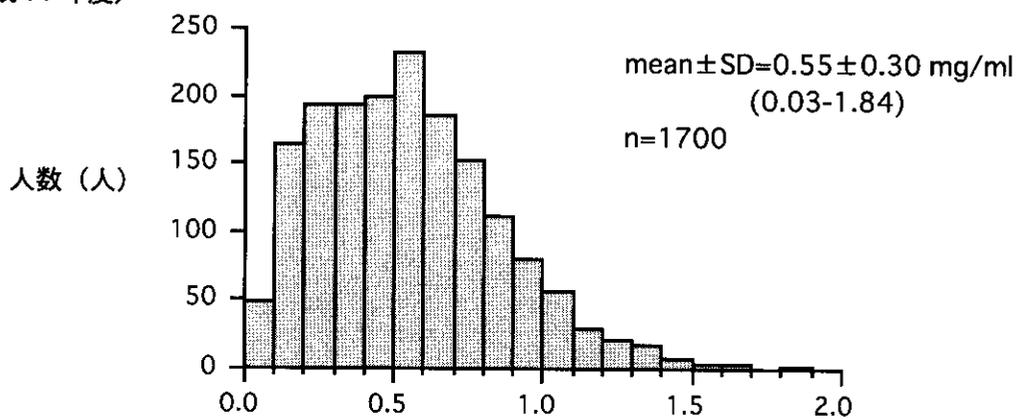


図1 尿セルロプラスミン値の分布

来院時尿
(平成11年度)



早朝尿
(平成12年度)

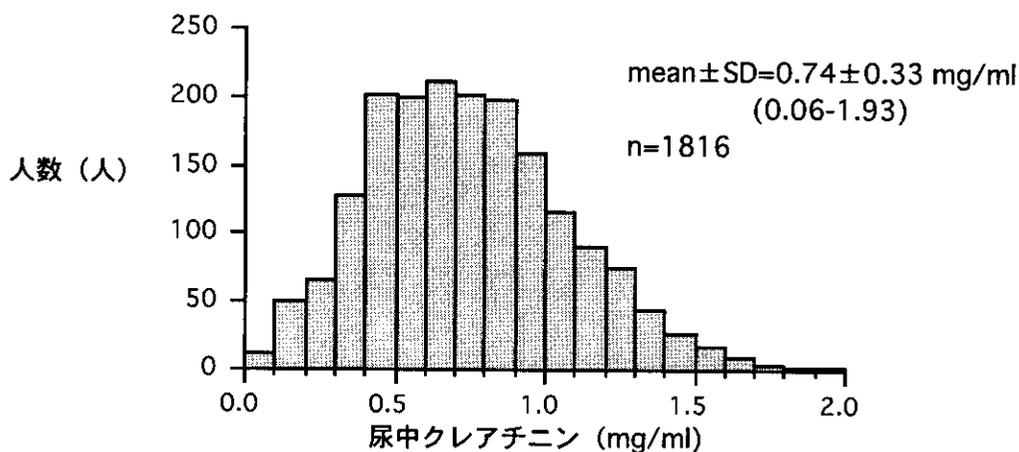


図2 尿クレアチニン値の分布

表1 検体の種類によるスクリーニング結果の比較

	受検者数 (受検率)	再検数 (再検率)	精検数	陽性者数
濾紙血	791 (75.1%)	2 (0.25%)	1	1 (保因者?)
来院時尿	1700 (86.0%)	55 (3.2%)	3	0
早朝尿	1816 (92.3%)	18 (1.0%)	0	0

表2 検体の種類による利点、欠点

	利 点	欠 点
血液	<ul style="list-style-type: none"> ・偽陽性，偽陰性が少ない ・検体の長期保存が可能 ・検体輸送が容易 	<ul style="list-style-type: none"> ・採血を要するため，受検率が下がる ・採血の人員，費用の確保
尿	<ul style="list-style-type: none"> ・受検率が高い ・受診者の負担が少ない ・健診との連携がスムーズ 	<ul style="list-style-type: none"> ・血液に比較すると，偽陽性が多い（偽陰性は？） ・検体の長期保存が不可能 ・検体輸送の問題

分担研究：効果的なマスキング事業の実施に関する研究

尿によるウィルソン病のスクリーニングの研究（第4報） －3歳児検尿を利用したスクリーニングのシステム化について－

研究要旨

ウィルソン病は薬物療法が有効な治療可能な先天代謝異常症であるが、診断が遅れて肝障害や神経障害を残す予後不良の例も少なくなく発症前に診断する必要がある、マスキングの対象に取り上げるべき疾患と考えられている¹⁾。ウィルソン病スクリーニングの開始時期は3歳から遅くとも6歳までの間であることが望ましいとされており²⁾、一部の地域では幼児期に血液ホロセルロプラスミン（HCP）測定による本症のスクリーニングが行われ、発症前のウィルソン病患者が発見されている^{3,4)}。しかし、幼児は一般的に採血を嫌うので、血液を用いた本症のスクリーニングの普及は困難と思われる。そこで、我々は協力の得られた地域（保谷市、三鷹市、立川市）の3歳時検尿を利用してCPを測定し、ウィルソン病のスクリーニングの検討を試みた。今回行った本症のスクリーニングは、行政担当者の協力の下に幼児の家族にリーフレットを配付して本症への理解を得るように努力した結果、円滑に行うことができた。また尿によるスクリーニングは、血液による場合と異なり苦痛を伴わず、検体を容易に採取できることから90%を越える高い受診率が得られたと考えている。なお、現在までに2,734例の検査を行ったが、本症は発見されていない。今後、地方行政機関の協力が得られれば、全国的に行われている3歳時検尿を利用して、本症のスクリーニングを広く普及できると考えている。

研究協力者

北川照男，鈴木健（東京都予防医学協会）
大和田操（日本大学医学部小児科）

研究目的

ウィルソン病は薬物療法が有効な治療可能な先天代謝異常症であるが、診断が遅れて肝障害や神経障害を残す予後不良の例も少なくなく発症前に診断する必要がある、マスキングの対象に取り上げるべき疾患と考えられている¹⁾。ウィルソン病スクリーニングの開始時期は3歳から遅くとも6歳までの間であることが望ましいとされており²⁾、一部の地域では幼児期に血液ホロセルロプラスミン（HCP）測定による本症のスクリーニングが行われ、発症前のウィルソン病患者が発見されている^{3,4)}。しかし、幼児は一般的に採血を嫌うので、血液を用いた本症のスクリーニングの普及は困難と思われる。そこで、我々は血液を用いずに尿HCPの測定による本症のスクリーニング法を開発した⁵⁾。次に東京都の地方自治体の協力を得て3歳児検尿の尿を用いて本症をスクリーニングすることを試み、その場合の問題点、即ち、早朝起床時の採尿、検体回収、受診者への結果の連絡および精密検査対象者への対応、特に陽性者に対する確定診断法等、スクリーニングの流れに

ついて検討するのを本研究の目的とした。

スクリーニングシステムおよび方法

スクリーニングシステムの概略は、図1に示した。3歳児検尿を目的として採尿された尿を用いてウィルソン病をスクリーニングすることを計画し、東京都の地方自治体に働きかけたところ、保谷市、三鷹市、立川市の3市の協力が得られた。

本会より保谷市、三鷹市、立川市の3市の3歳児健診担当係へ検診の対象となる2,877名分の採尿セット（CHG添加容器、同意書を兼ねた申込書、Wilson病解説リーフレットの3点）を予め届けておき、その担当係は受診予定者にこれを郵送により配布した。このように3歳児の父母にウィルソン病とその早期診断の重要性を記載した説明書を配布し、検査について同意を求めたところ2,734名の家族の同意が得られた。ウィルソン病スクリーニングを希望した家族は、健診前日に排尿させ、翌日の早朝尿を採り、腎臓検診のための容器に尿を採取すると共に、グルコン酸クロロヘキシジン（CHG）入りの容器にウィルソン病検診のための尿を採って、これを健診会場受付に同意書も兼ねた申込書と共に提出した（表1）。

この尿は直ちに4℃の保冷箱に入れて、健診終了

後に当協会に搬送してから冷蔵庫に保管し、原則として翌日に検査を行った。

尿HCPは、抗ヒトセルロプラスミンモノクローナル抗体を用いたELISA法（株ニッショー）により測定した。また、尿クレアチニンをJaffe法により測定し、尿CPのクレアチニン換算値を算出した。

健康正常児の尿HCP値の3パーセント以下を一応判定基準値とし、25ng/mlあるいは40ng/mg Cr.以下の値の場合は、再採尿を依頼した。再採尿された尿のHCPの測定結果も基準値以下の場合は、精密検査を受けるように父母に電話で連絡すると共に、結果を郵送することとした。また、市の3歳児健診担当係に精密検査依頼までの経過を電話で報告すると共に報告書を郵送し、精密検査対象者に対する専門治療機関への受診等の指導を依頼した。

スクリーニング成績

前に述べたように、現在までに3歳児健診を受診しWilson病のスクリーニングを受けたものは、表2に示すように2,734名で、これは3歳児健診受診者の95.0%に相当する。初回の尿HCP値は 138.1 ± 90.3 ng/ml、 135.7 ± 103.8 ng/mg Cr.であり、これまでに実施した小学生の尿HCPによるWilson病スクリーニングで得られた一次検査での平均値と有意差は認められなかった。2,734名中60例（2.2%）が基準値以下を示したので、再採尿するよう依頼したが、このうち56名が再採尿を行い、残りの4名は現在再採尿を行うように依頼中である。再採尿した検体について測定した結果、4名が再度基準値以下を示したので精密検査を依頼したところ、全例が正常と診断された。

考察

今回試みた3歳児健診におけるWilson病スクリーニングシステムは、幸い地方行政機関の協力が得られ、リーフレットによって健診受診者の家族にWilson病について十分な説明を行ったために、比較的円滑に検査を行うことができた。また、受診者からの電話での結果の問い合わせ、本症に対する質問などがかなり多くみられ、本症のスクリーニングに対する関心が高いことが窺われた。

尿のHCPの測定は、血液の場合と異なり検体採取に苦痛を伴わず、採取が容易なことから、90%を越える高い受診率が得られたと考える。従って、地方行政機関が主体となって全国的に実施されている3歳児健診の際に本症のマス・スクリーニングを行えば、広くこれを普及でき、広い範囲での早期発見・早期治療が可能になると考えている。

本スクリーニングで尿HCPが低値を示した場合には確定診断を行う必要があるが、その診断根拠には表3に示すように、臨床症状、眼科的所見、血清・尿HCP、血清銅、尿銅排泄、生検肝組織の銅量の測定値および遺伝子診断などが挙げられている⁶⁾。Martins da Costaら⁷⁾は表4に示すように、血清銅の診断における特異度は良好であるが、感度には問題があり、肝臓の銅量は感度、特異度ともに尿銅値以下であるのに対して、血清HCPおよび尿銅測定の感度・特異度は何れも良好であって、比較的信頼度が高いと述べている。

一方、Stremmelらによれば、KF輪の診断率は67%、血清HCPのそれは93%であるのに対して、肝組織の銅量の診断率はほぼ100%と報告している⁸⁾。このようにウィルソン病の診断根拠についての評価は、これまでいろいろに報告されており、診断基準について統一された見解が得られていない。従って、3歳児を対象としたスクリーニングで発見された患者の確定診断は、臨床症状、血清・尿HCPおよび血清・尿銅、それに遺伝子診断を併用して総合的に診断するのが良い。何れにしても我が国の本症の専門家の間で発症前ウィルソン病の診断基準について早期に合意が得られることが望ましい。

文献

- 1) WHO Scientific Group. Screening for Inborn Errors of Metabolism WHO Technical Report Series No.401, Geneva: WHO 1968.
- 2) 青木継稔, 原まどか, 鈴木真理子 他: Wilson病の全国追跡調査成績 小児内科 1991; 23: 1893-1898.
- 3) 山口之利, 清水教一, 藤井秀樹 他: 乳児期後半から幼児を中心としたWilson病スクリーニング成績 日本マス・スクリーニング学会誌 1998; 8: 3-6.
- 4) 大浦敏博, 虻川大樹, 白石広行 他: 1-6才児を対象としたウィルソン病マス・スクリーニングの検討 日本マス・スクリーニング学会誌 1998; 8: 7-12.
- 5) 鈴木 健, 笹島 薫, 穴澤 昭 他: 尿によるWilson病のスクリーニングの研究 日本マス・スクリーニング学会誌 1997; 7: 108.
- 6) 大和田操, 北川照男: Wilson病マス・スクリーニングに関する研究 山内邦昭編 東京都予防医学協会年報 1988年度 (昭和63年度) 通巻19号, 東京, (財)東京都予防医学協会, 1990,p145-147.
- 7) Martins da Costa C, Baldwin D, Portmann B

et al.: Value of urinary copper excretion after penicillamine challenge in the diagnosis of Wilson's disease. Hepatology 1992; 15: 609-615

Hefter H, Kreuzpaintner G, Strohmeyer G.: Wilson disease : Clinical presentation, treatment and survival. (Review) Ann. Internal Med 1991; 115: 720-726.

8) Stremmel W, Meyerrose KW, Niederau C,

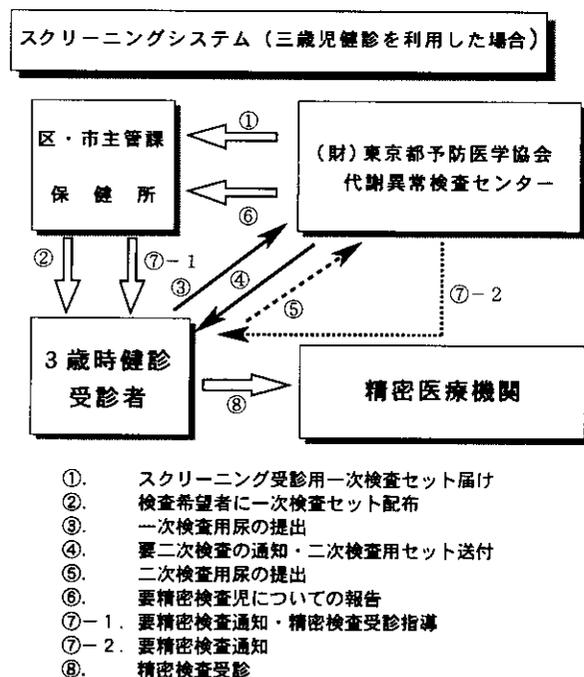


図1. スクリーニングシステム

表1. 採尿方法

①健診前日	就寝前の排尿
②検査当日	早朝尿の採取 (グルコン酸クロロヘキシジンを含む採尿容器)
③健診翌日 (少なくとも2日以内)	ELISA報により 尿CP測定

表3. ウィルソン病の診断根拠

1. 臨床症状	: 肝硬変, 眼症状
2. 尿銅排泄	: 著明な増加
3. 血清セルロプラスミン値	: 正常対照の25%
4. 尿セルロプラスミン値	: 正常対照の25%
5. 遺伝子診断	: 両アレルに変異を認める

表4. ウィルソン病診断における銅の感度・特異度について

Sensitivity and specificity of copper studies for the diagnosis of WD in the 75 patients studied

Criteria of positivity	Sensitivity (%)	Specificity (%)
Ceruloplasmin (<0.2 gm/L)	82.4	94.4
Serum copper		
Total (<12 μmol/L)	56.3	94.2
Free (>3 μmol/L)	50.0	88.4
24-hour urinary copper		
Baseline (>1.1 μmol/L)	100.0	82.8
After penicillamine challenge (>25 μmol/L)	88.2	98.2
Liver copper (>250 μg/gm dry wt.)	75.0	61.5

Claudia Martins Costa et al, 1992

表2. Wilson病スクリーニング受診率

	保谷市	三鷹市	立川市
Wilson病受診者数	882	890	967
3歳児健診受診数	904	949	1,024
受診率 %	97.6	93.8	94.4
総計	2,734/2,877 (95.0%)		

分担研究：効果的なマススクリーニング事業の実施に関する研究

ウィルソン病確定診断法としての 責任遺伝子ATP7Bの直接塩基配列解析法の検討

研究要旨

全国各地でウィルソン病のマススクリーニングがパイロットスタディとして実施されているが、発見例は臨床症状に乏しく病型診断が難しい。このことから、私たちは同病マススクリーニング発見例の確定診断法として、責任遺伝子ATP7Bを直接塩基配列解析する方法を検討してきた。これまで日本人ウィルソン病患者65家系を解析した結果、未報告の14の病因変異を含む35の病因変異が同定され、56家系において確定診断がなされた。本法は同病確定診断法として十分有用であると考えられる。

研究協力者

藤田晃三、野町祥介、田上泰子、
水嶋好清、佐藤勇次（札幌市衛生研究所）
福土勝（札幌市保健福祉局生活衛生部）
山口昭弘（札幌IDL）

研究目的

ウィルソン病は臨床的に多臓器障害が出現する前に診断することにより、効果的な治療が期待できる銅代謝障害による疾患であり^{1,2)}、その発症時期は小児期から思春期前期が多い。そこで新生児スクリーニングの対象疾患として検討が行われてきた³⁻⁵⁾。しかし、マススクリーニングで見出されるウィルソン病陽性例は特有の症状を持たないため、マススクリーニング開始と同時に有効な同病の確定診断法を確立する必要がある。

近年、その蛋白産物である銅輸送ATPase7Bが細胞膜上に存在する銅のイオンチャンネルと考えられる同病責任遺伝子ATP7Bがクローニングされた^{6,7)}。これにより私たちは、今回ATP7Bの全21エクソンを検索するサイクルシーケンス法を用い、責任遺伝子を直接塩基配列解析することで病因変異を確認（ホモ接合体変異なら1つ、ヘテロ接合体変異なら2つ）する方法に関して、ウィルソン病確定診断法としての有用性を検討することを研究目的とした。

研究方法

全国から収集された65ウィルソン病家系について解析を行った。以下に解析手順を示す。

(1) DNA抽出

全血からのDNA抽出は、赤血球を溶血除去した後、白血球成分をプロテイナーゼK消化の後、また、濾紙血の場合は1/8inchディスク1枚を有機溶媒に

よるHb固定の後、ともにボイル処理を行い、遠沈により得られた上清をエクソン増幅用のDNA試料とした。

(2) PCRによるエクソン増幅

得られたDNA試料からATP7Bをコードする21のエクソン部位とそのイントロン境界部位を含む26種のプライマーペアを使用し、TaqDNAポリメラーゼによるPCRを行った。増幅はアガロースミニゲル電気泳動により確認を行った。

(3) サイクルシーケンス反応

得られたPCR産物を精製したのち、蛍光標識（テキサスレッド）プライマーを用い、サイクルシーケンスを行った。

(4) SQ5500Eによる解析

サイクルシーケンス反応後、尿素変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動により蛍光標識されたDNA断片をレーザー光照射することで、塩基配列を解析した。本法では電気泳動開始後約6時間で、数百塩基対の解析が可能である。

研究結果および考察

2001年1月までに65ウィルソン病家系についてATP7Bの直接塩基配列解析を行った。その結果、56家系（86%）が前述の十分条件を満たし、確定診断に至った。このうち6家系にホモ接合体の変異があり、他の50家系は複合ヘテロ接合体であることが確認された。また、確定診断に至らなかった9家系においても少なくとも1つのヘテロ病因変異を確認した。これまで私たちは65家系の合計130アレルから35種類の病因変異を同定した。

ウィルソン病における病因変異は、現在報告のあるものだけで、200箇所を越え、その存在領域はATP7B全域に広がっている。また、それらの変異

の種類は、挿入(insertion)と欠損(deletion)のように、その変異以後のアミノ酸配列をまったく変えてしまうもの、あるいは点突然変異(point mutation)のように配列中のひとつのアミノ酸を変えてしまうもの、また更に、スプライシングサイトの変異によりスプライシング異常をきたすものなど様々である。今回は挿入2種、欠損8種、挿入欠損1種、スプライシング異常1種、点突然変異23種が同定された。

これらの事実は、ウィルソン病がきわめて多様な臨床像(肝型、神経型、劇症型)や広範な発症年齢域を持つ疾患であることと矛盾しない。特にウィルソン病の場合、多数の病因変異を様々な組み合わせで所有するために、遺伝子型(genotype)と病型(phenotype)を細かく関連付けて議論することは困難である。しかし、挿入や欠損のように、それ以後のアミノ酸配列をすべて変えてしまうものに比べて、一つのアミノ酸の変異のみに終わる点突然変異には比較的酵素活性低下の程度が小さい軽症例も含まれることは十分考えられる。

今回、同定された病因変異のなかで、比較的頻度の高かったものは、R778L: 17.4%, 2871delC: 10.7%, G1186S: 9.1%, A874V: 7.4%, N1270S: 6.6% などであった。また、14種の新たな病因変異と考えられる未報告変異が同定された。そのうちわけは、挿入1種1例、欠損2種3例、挿入欠損1種1例、点突然変異10種17例であった⁸⁾。

なお、確定診断ができた56例のうち6例(10.7%)に確認されたホモ接合体は、R778L, G1186Sがそれぞれ2例、2871delC, A874V, がそれぞれ1例であり、これらの変異の発生頻度が比較的高いことと矛盾しなかった。

今回、本法を用いて65ウィルソン病家系のうち56家系が確定診断された。また、確定診断に至らなかった9家系においても、少なくとも一つのヘテロ病因変異を同定することができた。これらのことから、ウィルソン病責任遺伝子ATP7Bの直接塩基配

列解析法は、労力、効率面も含め、ウィルソン病確定診断法として十分有用であると考えられた。未確定例の原因究明などにより、本法をウィルソン病マス・スクリーニング確定診断法として確立していきたい。

文献

- 1) 青木継稔: ウィルソン病治療と患者QOL, 日本医事新報 3939, 26-32, 1999
- 2) 青木継稔: 銅代謝および先天性銅代謝異常に関する最近の進歩-Wilson病とMenkes病を中心として-, 日本小児科学会雑誌, 100, 567-570, 1996
- 3) 水嶋好清, 山口昭弘, 福士勝, 他: ウィルソン病マス・スクリーニングの基礎的検討, 札幌市衛生研究所年報, 19, 79-85, 1992
- 4) 山口昭弘, 中澤恵実理, 石橋麻里子, 他: 札幌市におけるWilson病の新生児マス・スクリーニング, 札幌市衛生研究所年報, 22, 66-71, 1995
- 5) 野町祥介, 三浦友未佳, 田上泰子, 他: ネフェロメトリーによるウィルソン病マス・スクリーニング, 札幌市衛生研究所年報, 26, 43-46, 1999
- 6) Thomas GR, Forbes JR, Rpberts EA, et al: The Wilson disease gene; spectrum of mutations and their consequences, Nature Genetics, 9, 210-217, 1995
- 7) Petrukhin K, Lutsenko S, Chernov I, et al: Characterization of the Wilson disease gene encoding a P-type copper transportong ATPase; genomic organization, alternative splicing, and structure/function prediction, Human Molecular Genetics, 3(9), 1647-1656, 1994
- 8) 野町祥介, 田上泰子, 水嶋好清, 他: ウィルソン病患者における責任遺伝子ATP7Bの解析, 札幌市衛生研究所年報, 27, 46-51, 2000

分担研究：効果的なマススクリーニング事業の実施に関する研究

マススクリーニングにて発見されたWilson病症例の診断確定までの方略 — 一次スクリーニングから診断確定のプロセス —

研究要旨

Wilson病マススクリーニング・システムの確立を目的として、本症に対する一次スクリーニングから診断確定に至るまでの方略を検討した。一次スクリーニング法としては、その検体採取の容易さより尿中活性型セルロプラスミン値測定が良いと思われた。しかし採血の同意が得られれば血清セルロプラスミン値測定も優れた方法である。二次スクリーニングは尿中活性型セルロプラスミン値再検とし、三次スクリーニングにて血液を用いた肝機能検査および血清セルロプラスミン値測定を行う。本症の診断は、尿中銅排泄量の増加により確定して良いと考える。しかし若年例においては尿中銅排泄量が正常な例も存在する。その場合は、経時的な肝機能および尿中銅排泄量の測定、あるいはATP7B遺伝子解析など、可能な限り非侵襲的な方法により診断を確定することが重要であると考えられた。

研究協力者

清水教一，山口之利，青木継稔
(東邦大学医学部第2小児科)

研究目的

平成8年度から12年度にわたる小児科専門開業医を窓口としたWilson病スクリーニングの成績ならびに本システムの有効性や問題点を報告する。Wilson病は、肝臓、中枢神経、角膜および腎臓などの様々な臓器に銅が蓄積する、先天性銅代謝異常症の代表的疾患である。臨床的には、肝硬変、錐体外路症状およびKayser-Fleischer角膜輪を3主徴とする。本症は、治療可能な数少ない遺伝病の一つである。銅キレート薬による治療法が確立されており、早期に診断、治療を開始すれば発症の予防が可能である。また、本症は現在マス・スクリーニングの対象となっている疾患の一部よりも発生頻度が高く、小児期の慢性肝疾患としては最も頻度が高い¹⁾。これらのことより、本症のマススクリーニング・システムへの導入が検討されている。

マススクリーニング・システムを確立する上で、一次スクリーニングから診断の確定、さらに治療へと進む一連の流れがよどみなく進むことが必要不可欠である。そのために一次スクリーニングの方法のみならず、その後の二次・三次スクリーニング法、確定診断法、治療法と開始時期、さらにそこに至るまでのfollow upの方法を詳細に検討する必要がある。

本研究において筆者らは、より効率の良いWilson病マススクリーニング・システムの確立を目的とし

て、一次スクリーニングから診断確定までの方略について検討を行った。

研究方法・結果・考察

現在までの種々の研究の結果、以下に示す3種類の方法が、Wilson病一次スクリーニングの方法として検討されている²⁾。

1. 新生児血中活性型セルロプラスミン値測定
2. 乳幼児血清総あるいは活性型セルロプラスミン値測定
3. 尿中活性型セルロプラスミン値測定

いずれも肝臓における活性型セルロプラスミンの合成障害に注目し、その結果として現れる所見を検出しようとする方法である。しかし、この所見は本症に特異的とは言えないため、診断確定のためには他の検査が必要である。

[Wilson病確定診断の為の検査法]

Wilson病の確定診断法を表に示す。

1. 尿中銅排泄量測定
尿中銅排泄量の増加は本症に極めて特異的である。血中セルロプラスミン値の低下と合わせ、診断を確定することが可能と考える。
2. 肝銅含量測定
肝生検を施行し肝組織中の銅含量の増加を証明することは、現時点において最も信頼性の高いWilson病の診断法である。正常な肝組織の銅含量は15 µg/g wet tissue以下であるが、本症患者においては150-200µg/g wet tissue以上という値を示す³⁾。
3. ATP7B遺伝子解析
Wilson病原因遺伝子(ATP7B)の構造解析は、最

も新しい本症の確定診断法である⁴⁾。Wilson病の病態・病因はATP7Bより産生される銅輸送膜蛋白、P-typeATPaseの障害によると考えられる^{5),6),7)}。ATP7B遺伝子の変異の検索はいわば原因診断法であり、他の検査結果、臨床症状の程度、患児の年齢などの条件に関わらず診断を確定することが可能である。

[Wilson病確定診断法における問題点]

上記したWilson病の確定診断法は、実際にマススクリーニング・システムとして施行する上においてはいくつかの問題点を有している。

1. 血中セルロプラスミン値測定と尿中銅排泄量測定の併用

本法によりWilson病を確定診断することができれば、最も簡便かつ非侵襲的である。しかし尿中銅排泄量測定の施行時期が問題となる。3-5歳の症例にては、尿中銅排泄増加は必発ではなく、さらにそれよりも若年例における尿中銅排泄量は正常範囲内にあると考えられる。若年症例の診断においては信頼性が乏しい。これに対し、Wilson病の最重症型である劇症型症例の最年少例は5歳であり⁸⁾、また4歳頃に既に肝硬変が始まっている症例も多く存在する。本法により確実に診断可能な時期は理想的な治療開始時期よりも遅いと言わざるを得ない。

2. 肝銅含量の測定

本法の最大の問題点は肝生検の侵襲性である。また、新生児期、乳児期および幼児早期におけるWilson病症例の肝銅含量のデータはなく、この時期における確定診断法としての信頼性は確立されていない。

3. ATP7B遺伝子解析

日本人Wilson病患者において比較的頻度の高い遺伝子異常が認められているが、本症におけるATP7B遺伝子の異常にはいくつかのcommonな変異と多くのrareな変異が存在すると想像されている⁹⁾。そのためWilson病の遺伝子診断には、比較的多くの手間とコストがかかる。また、現在解析が可能な範囲に変異が存在しないWilson病症例も、頻度は少ないが存在する。遺伝子解析にて異常が認められない症例に対し、Wilson病を完全に否定することは困難である。

[Wilson病一次スクリーニングから確定診断までの方略] (図)

前記した種々の条件を考慮し、Wilson病一次スクリーニングから確定診断までのprotocolを作成した。一次スクリーニングの施行時期は3歳を想定した。一次スクリーニングは、検体採取の容易さ、非侵襲性より、尿中活性型セルロプラスミン値測定により

行うのが良いと考えられた。しかし、採血に対する同意が得られれば、血清セルロプラスミン値測定も優れた方法である。この検査の陽性例に対して、二次スクリーニングとして再採尿、再検査を行う。再検査陽性例には三次スクリーニングを施行する。この時点で採血を行い、血清セルロプラスミン値および肝酵素の測定を行う。

確定診断は可能な限り非侵襲的に行うことが重要である。まず尿中銅排泄量の測定を行う。上昇が認められれば、血中セルロプラスミン値低下と併せてWilson病と診断可能である。正常例に対しては、肝機能と尿中銅排泄量の経時的測定によるfollow upか、遺伝子解析を行う。特にこの時点において肝酵素の上昇が認められた場合は遺伝子診断を選択すべきである。遺伝子解析にて変異が同定されれば診断は確定する。変異が認められなければ、肝銅含量の測定を行いWilson病であるか否かを最終的に決定する。肝機能と尿中銅排泄量の経時的測定を行う場合は、尿中銅排泄量の上昇が認められた時点でWilson病と診断する。しかし、尿中銅排泄量正常例であっても、肝酵素の上昇がみられた場合は、遺伝子解析を行い、診断を急ぐ必要があると考えられる。

結論

1. Wilson病マス・スクリーニングシステム確立を目的として、本症に対する一次スクリーニングから診断確定に至るまでの方略を検討した。
2. 一次スクリーニング法としては尿中活性型セルロプラスミン値測定が良いと思われた。また、採血の同意が得られれば、血清セルロプラスミン値測定も優れた方法であると考えた。
3. 確定診断は、尿中銅排泄量測定あるいはATP7B遺伝子解析を中心に可能な限り非侵襲的に行うことが重要であると考えられた。

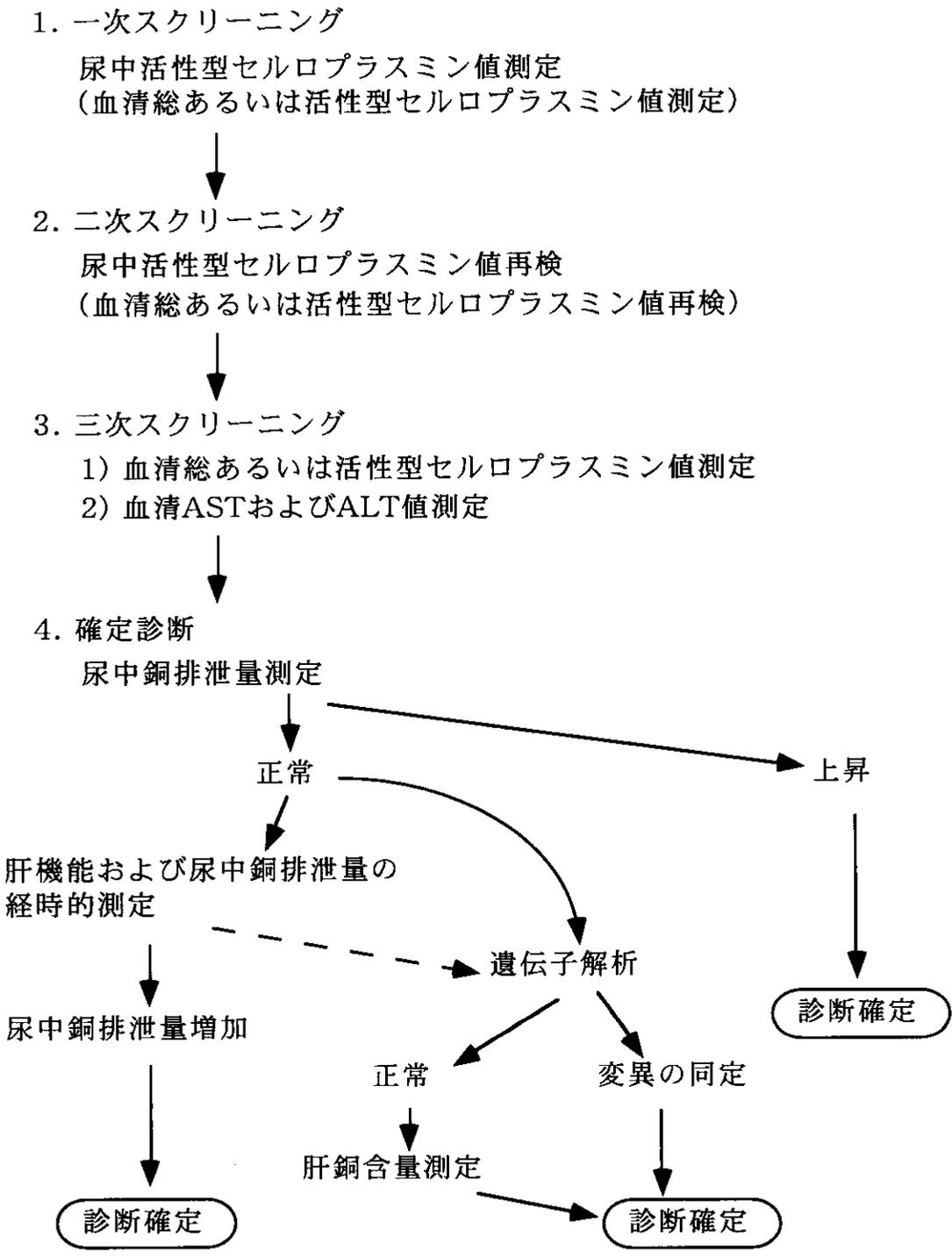
文献

- 1) Danks DM. In Metabolic Basis of inherited Disease. pp1411-1431, McGraw-Hill, 1989
- 2) Yamaguchi Y et al. Pediatr Intr. 1999; 41: 409-413
- 3) 青木継稔. Wilson病, 星和書店, 1984
- 4) Shimizu N et al. Lancet. 1997; 349: 1811-1812
- 5) Yamaguchi Y et al. Biochem Biophys Res Commun. 1993; 197: 271-277
- 6) Bull PC et al. Nature Genet. 1993; 5: 327-337
- 7) Tanzi RE et al. Nature Genet. 1993; 5: 344-350

表 Wilson病確定診断の方法

1. 血清セルロプラスミン値および尿中銅排泄量測定
2. 肝銅含量の測定
3. ATP7B遺伝子解析

図 Wilson病一次スクリーニングから診断確定までの方略



分担研究：効果的なマスキング事業の実施に関する研究

ウィルソン病患者の尿中ヘム代謝産物動態からみた銅代謝変化

研究要旨

ウィルソン病（WND）尿検体を用いたWNDにおけるヘム代謝異常の検索と、早期診断指標としての尿中ヘム代謝産物の有用性に関する検討を、昨年度に引き続き行った。治療前の新規WND患者及び治療中の安定期WND患者尿検体は、北海道内在住のWND患者より提供を受けた。今年度は、治療前の新規患者の尿分析により、総porphyrin濃度とCopro. I濃度の異常な増加を示すRotor's症候群様porphyrinパターンの存在が、複数の症例で確認された。尿中 δ -aminolevulinic acid（ALA）濃度は、治療中の安定期患者群と健常対照群とで有意差がないことが、昨年と同様に示された。一方、道内の安定期患者尿中の総porphyrin濃度は、昨年度のWND友の会検体とは異なり、対照群と比較して有意な変化が認められなかった。そこで、道内患者に関し詳細な検討を実施したところ、D-penicillamine（D-Pc）投与患者尿においては、trientine（Trn）投与患者尿と比較し、有意な尿中総porphyrin濃度の減少が認められた。更に、モデル動物を用いた治療薬の投与実験においても、D-Pcによる尿中総porphyrin濃度の減少が確認された。以上の結果から、D-Pc投与治療においては、D-Pcによる銅の過剰捕捉によりヘム代謝が変化し、その結果、尿中総porphyrin濃度の減少を起こすことが明らかとなった。

研究協力者

中山憲司，市原侃，寺井格，中島美知子，
浦口弘子，林三起子，山崎由香，田村正秀
（北海道立衛生研究所）
高澤啓，田村守（北海道大学電子科学研究所）
窪田満，小林邦彦（北海道大学医学部小児科）
長坂博範（埼玉医科大学小児科）
鈴木健（東京都予防医学協会）
青木継稔（東邦大学医学部第2小児科）

研究目的

近年，Nakayama et al.は，ウィルソン病（WND）モデル動物（LECラット）を用いた実験により，銅代謝異常とヘム代謝異常の密接な関連性を報告した^{1,2)}。これらの報告までは，ヒトWNDにおけるヘム代謝異常症の報告は，晩発性皮膚ポルフィリン症併発の症例報告があるのみであった³⁾。本研究においては，昨年度に引き続き，北海道内在住のWND患者尿検体を用いてWNDにおけるヘム代謝異常の検索と，尿中ヘム代謝産物の早期診断指標としての有用性に関する検討を行った。

研究方法

本研究においては，北海道内で実施された学校検尿で正常と診断された小学1・3・6年生の尿検体の中から男女それぞれ24検体を無作為に抽出し，健常

対照群とした。また，本年度に用いたWND患者尿検体は，北海道内に在住するWND患者からご提供いただき， -20°C のクール宅急便にて運搬し分析を行った。

新規WND患者尿検体のporphyrin分析では，Kennedy and Maslenの方法⁴⁾に従いporphyrin isomersについて解析を行った。治療中安定期の患者尿中ヘム代謝産物の測定は，porphyrin precursorである δ -aminolevulinic acid（ALA）⁵⁾と各porphyrin体濃度⁶⁾について行った。尿中クレアチニンは，セロテック社製CrE-L測定試薬キットを用い，日立7170型自動分析装置にて測定した。得られた健常対象群とWND患者群の分析結果については，one-way ANOVAで統計解析を行った。

研究結果および考察

北海道内で新規に発見されたWND患者に関する臨床情報を，表1に示した。本患者の治療開始以前の尿中ALA濃度は 0.38 mg/l で，重金属中毒特有の尿排泄増加は認められなかった。しかし，総porphyrin濃度は 994 pmol/ml に達し，健常対照群のおよそ8.3倍と顕著な排泄増加が認められた。Porphyrin体の中では，Copro. Iの顕著な上昇が認められた（図1）。Copro. Iは，健常者尿中においては総Copro. 体（Copro. IとCopro. IIIの濃度合計）の10～40%程度しか存在していないと報告されている⁷⁻¹⁰⁾。

しかし、本症例における存在比率は71.4%に、また昨年度の症例においても70.6%に達していた。この2例の患者において認められたCopro.Iの尿排泄異常は、総Copro.体の尿排泄増加も伴うことから、Rotor's症候群に類似していると考えられた^{7,8)}。しかしながら、本症例も昨年度と同じく既に急性肝機能障害を呈していたことから、WNDにおいて常にRotor's症候群様のporphyrinパターンを有するか否かの問題に関しては、肝機能障害を呈する以前の未治療WND患者の更なる尿検体分析が必要とされる。次に、道内在住の治療中安定期のWND患者尿中のヘム代謝産物の分析を行った。表2に示す通り、尿中平均ALA濃度は、健常者でおよそ0.93 mg/l、昨年度のWND友の会検体で0.87 mg/l、道内WND患者検体で1.05 mg/lとなり、WNDによる有意な変動は認められなかった。以上のことから、WND患者では、重金属中毒において特異的に認められる尿中ALA濃度の増加¹¹⁾が認められないことが明らかとなった。

表3に尿中porphyrin濃度の分析結果を示した。昨年度のWND友の会検体の総porphyrin濃度は49.7 pmol/mlで、健常者の120 pmol/mlの半分以下まで有意に減少した。しかし、本年度の道内在住の安定期WND患者尿検体では111 pmol/mlであり、顕著な減少は認められなかった。そこで、道内検体に関して、患者の治療法、検体の取り扱い、尿中銅との関連等に関して検討した。その結果、使用している治療薬の違いによって2群に分別されることが明らかとなった(表4)。

そこで、D-Pc投与による尿中総porphyrin濃度減少を確認するために、雄性WNDモデル動物(LECラット)にD-Pcを経口投与して検討した。LECラットを生後4週目で離乳させ、通常食(オリエンタル酵母社CMF)と治療薬を溶解させた超純水を自由摂取させた。治療薬のD-PcとTrnは、超純水に溶解して500 µg/mlと3000 µg/mlとし、各々2日おきに交換した。LECラットを6から8週間飼育した後(生後10から12週齢)、代謝ケージを用いて24時間尿を採取した。採取中の尿は常に4℃で冷却を保った。図2に、尿中総porphyrin濃度の分析結果を示した。D-Pcを投与したLECラットの尿中総porphyrin濃度は、超純水のみを給水させた対照群と比較し、投与濃度依存的に有意な減少が認められた。しかし、Trn投与においては、D-Pc投与で認められた尿中総porphyrin濃度の減少は認められなかった。このような尿中総porphyrin濃度の減少は、低銅食飼育による銅欠乏状態でも起こる¹²⁻¹⁴⁾ことから、D-Pc投与による尿中総porphyrin濃度の減少は、D-Pcによ

る銅の過剰捕捉により銅欠乏状態が投与ラットに生じたものと考えられた。ラットへのD-Pc投与によって、特に顕著な銅濃度減少を認める臓器が、ヘム代謝の主たる臓器である骨髄・腎臓である¹⁵⁾ことから、D-Pc投与とヘム代謝変化との関連性は十分に考えられるものである。

本研究の結果、複数の新規WND患者において尿中総porphyrin濃度とCopro. I濃度の異常な増加を示すRotor's症候群様のporphyrinパターンの存在が確認されたことにより、WNDにおけるヘム代謝異常の存在が再確認された。しかし、WND早期診断法としての尿中porphyrin動態の利用に関しては、異常が認められる時期等について更なる検討が必要であると思われる。また、治療中の安定期WND患者尿の解析により、D-Pc投与治療による銅の過剰捕捉がヘム代謝を変化させ、尿中総porphyrin濃度の減少を起こすことが明らかとなった。本知見は、今後、重篤な副作用を呈するD-Pc療法の、副作用予防の一つの指標となりうる。今後、より多くの治療中のWND患者の尿検体を用いて、治療経過を追いながら追跡調査を実施する予定である。

謝辞

WND患者の尿及び血清検体をご提供戴き、また、ご多忙の中、治療法等に関するアンケートにご協力戴いた道内各医療機関の諸先生方に深謝致します。

文献

- 1) Nakayama K. et al.: Biochem Biophys Res Commun, 1998; 242: 164.
- 2) Nakayama K. et al.: Arch Biochem Biophys, 2000; 375: 240.
- 3) Chesney TMC. et al.: J Am Acad Dermatol, 1981; 4: 64.
- 4) Kennedy SW. et al.: J Chromatogr, 1989; 493: 53.
- 5) Tomokuni K. et al.: Ind Health, 1992; 30: 119.
- 6) Ford RE. et al.: Clin Chem, 1981; 27: 397.
- 7) Wolkoff AW. et al.: Am J Med, 1976; 60: 173.
- 8) Shimizu Y. et al.: Hepatology, 1981; 1: 173.
- 9) Ben-Ezzer J. et al.: Clin Sci, 1971; 40: 17.
- 10) Kondo T. et al.: Gastroenterology, 1976; 70: 1117.
- 11) Oishi H. et al.: J Anal Toxicol, 1996; 20: 106.
- 12) 高澤啓他: 第9回LECラット研究会抄録集, p15, 2000.
- 13) 高澤啓他: 第73回日本生化学会大会発表抄録集(生化学 72:) 943, 2000.
- 14) Takasawa A. et al.: in submitting for publication, 2001.
- 15) Owen CA Jr. et al.: Am. J. Physiol, 1975; 228:88.

表1 道内で見つかった新規WND患児の臨床所見

Name:	I. K. (male)
Age:	12 years old
AST:	122 U/l
ALT:	37 U/l
Total bilirubin:	16.3 mg/dl
Direct bilirubin:	10.6 mg/dl
Serum ceruloplasmin:	<7 mg/dl
Serum copper:	108 μ g/dl
Urinary ALA:	0.38 mg/l
Urinary total porphyrins:	994 pmol/ml
Urinary coproporphyrins:	885 pmol/ml

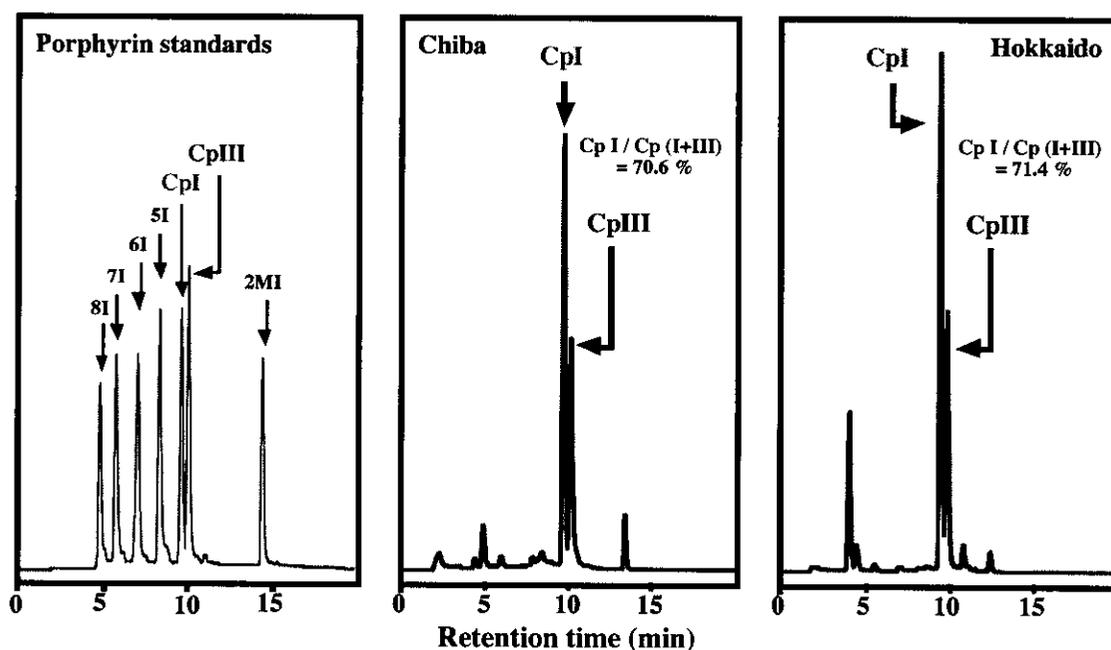


図1 尿中porphyrinのHPLC溶出パターン
 Chiba: 千葉県で発見された新規WND患児 (平成11年度報告)
 Hokkaido: 道内で発見された新規WND患児

表2 WND患者尿中の δ -aminolevulinic acid (ALA) 濃度

		ALA濃度 (mg/l)
健常者コントロール	(n=48)	0.93 ± 0.36
WND友の会	(n=31)	0.87 ± 0.54
道内WND患者	(n=33)	1.05 ± 0.64

(mean ± SD)

表3 WND患者尿中の総porphyrin濃度

		総porphyrin濃度 (pmol/ml)
健常者コントロール	(n=48)	120 ± 53.5
WND友の会	(n=31)	49.7 ± 46.6 ^{***}
道内WND患者	(n=33)	111 ± 65.2

(mean ± SD)

* 健常者コントロールと比較しての有意差： p < 0.001

** 道内WND患者と比較しての有意差： p < 0.01

表4 治療薬別WND患者尿中の総porphyrin濃度

		総porphyrin濃度 (pmol/mg Cr.)
健常者コントロール	(n=48)	103 ± 36.1
Trientine投与WND患者	(n=24)	115 ± 37.5
D-penicillamine投与WND患者	(n=9)	68.6 ± 21.3 ^{***}

(mean ± SD)

* 健常者コントロールと比較しての有意差： p < 0.01

** Trientine投与WND患者と比較しての有意差： p < 0.005

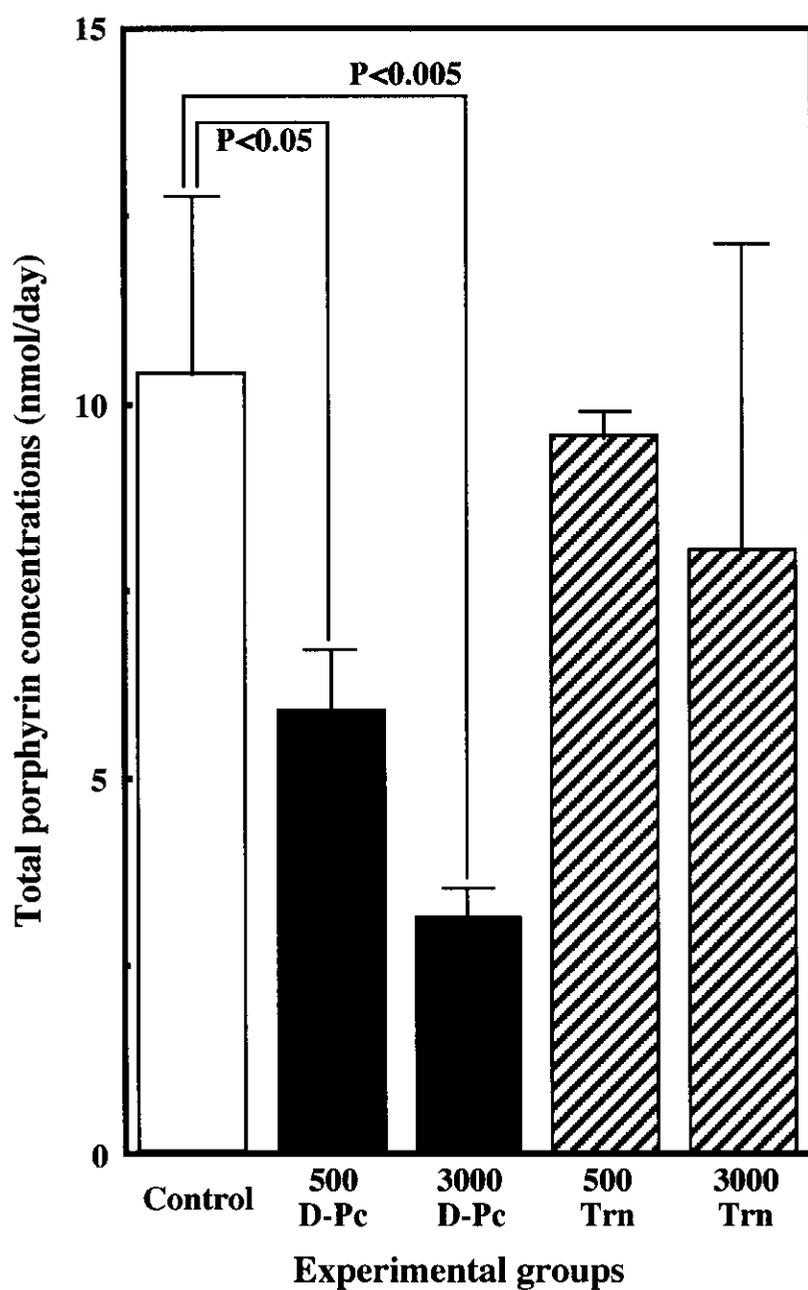


図2 銅キレート剤経口投与による雄性 LECラット尿中総 porphyrin濃度に与える影響に関して (n=4), 500: 500 $\mu\text{g/ml}$; 3000: 3000 $\mu\text{g/ml}$; D-Pc: D-penicillamine; Trn: trientine.

分担研究：効果的なマスキング事業の実施に関する研究

マスキングで発見されたウィルソン病患者（者）の治療指針（案）の策定に関する研究

研究要旨

ウィルソン病マスキングによって発見された患者（者）の治療指針（案）を策定し

た。対象は0～7歳にて発見された幼若児ウィルソン病患者23名であり、これらの症例の診断時（治療開始前）検査所見および確定診断所見を検討した。さらに、これらの症例の治療経過から、治療開始年齢、銅キレート薬投与量・投与経路・投与方法、併用薬などについて治療指針（案）を策定した。

研究協力者

青木継稔，清水教一，山口之利，
藤井秀樹，中園宏紀

（東邦大学医学部第二小児科）

研究目的

遺伝性銅代謝異常の代表的疾患であるウィルソン病は、肝硬変・錐体外路症状およびKayser-Fleischer角膜輪を三主徴とする進行性の重篤な疾患である。常染色体性劣性遺伝形式をとり男女両性に出現する。本症は、治療開始が遅れたり、診断が遅れた進行例の場合、社会復帰困難であったり、死亡する例が少なくない。また、本症の5～7%の症例は、小児期において劇症肝炎型にて発症し、不幸な転帰をとる例があり注目に値する。本症には有効な治療法があり、また発症予防することも可能である。本症の発症頻度は、出生約3.5～4.5万人に1人と推定され、現在マスキングが実施されているフェニルケトン尿症（PKU）の約2.5～3.0倍である。

本症患者がマスキングされたときの治療指針（案）を策定しておくべきであり今年度検討した。なお、本治療指針（案）は、わが国において現在承認されている薬価収載の医薬品を採用して策定した。

研究方法

対象：0～7歳のときにウィルソン病と診断された自験23例（男児15，女児8）を対象とした。0～2歳2例（8カ月，1歳6カ月），2～3歳3例，3～4歳2例，4～5歳2例，5～6歳3例，6～7歳7例，7～8歳4例である。

方法：対象とした0～7歳のウィルソン病患者23例の診断時の主な検査所見・確定診断所見として、

血清AST(GOT)値，血清ALT(GPT)値，血清尿酸値，血清セルロプラスミン(Cp)値，血清銅値，尿中銅排泄量，肝生検肝銅含量などを測定した。さらに、各症例の銅キレート薬を中心とした治療について調査し、治療計画を策定した。23例中、2例は、5歳10カ月と6歳であり劇症肝炎型を示し、1例は交換輸血、他の1例は肝移植にていずれも救命し得た。

治療計画：銅キレート薬開始年齢，投与量，投与経路，投与方法，併用薬，低銅食療法などについて定める。

研究結果

1. 検査成績について

1) 血清AST(GOT)・ALT(GPT)値

2歳以前の2例は、いずれも正常範囲内にあった。2歳代の3例中2例は軽度の上昇を認めた。3歳以降は全例に異常値を認めた。極めて興味ある事実は、5歳と6歳の劇症肝炎型を示した2例がAST>ALTであり、ASTの上昇は軽度であり、ALT値はほぼ正常域に近い値であったことである。いずれにしろ、3歳以降の症例はほとんど肝機能異常が観察された。

2) 血清銅と血清Cp値

各症例の血清銅値は低値を示した。劇症肝炎型の1例は210 μ g/dlと高値を示した。血清Cp値は、全例20mg/dl以下の低値であり、1例12.5mg/dlの中間値を示したがそのほかは10mg/dl以下であった。8月児男児例も1mg/dlという血清Cp低値を示しており、生後8カ月以降のウィルソン病症例の血中Cp値は十分に低値であることが判明した。血清銅値と血清Cp値は、相関していた。

3) 血清尿酸値

3.5mg/dl以下を低値とすると、測定した21例中15例が低値を示した。血清尿酸値は治療によりほと

んどが正常値に復した。

4) 尿中銅排泄状況

乳幼児の蓄尿が困難なこともあり、尿中銅(μg)/クレアチニン(mg)比を中心に比較検討した。0.20以上を尿中銅排泄増加とした場合、3歳未満5例中3例は排泄増加を認めなかった。3歳以上の症例ではすべての症例で0.20以上の排泄過多があった。ウィルソン病成人例の尿中銅排泄増加基準は、 $100\mu\text{g}/\text{日}$ 以上であり、蓄尿できた2例は小児例であっても増加を示した。

5) 肝銅含量

ウィルソン病症例の肝銅含量は、全例が $200\mu\text{g}/\text{g}$ 肝湿重量以上を示した。本症の診断基準が $200\mu\text{g}/\text{g}$ 肝湿重量以上ということであり、測定できた最年少1歳児例であっても $361.5\mu\text{g}/\text{g}$ 肝湿重量と著明な肝銅の蓄積を認めた。

2. 0~7歳の自験ウィルソン病患児の治療および治療成績について

1) 劇症肝炎型を示した2例について

5歳10カ月男児男児例は、昏睡・溶血性貧血を伴ったため、頻回の交換輸血を施行して救命し得た。D-ペニシラミン(D-Pc)は、初期 $25\text{mg}/\text{kg}/\text{日}$ 、維持量 $15\text{mg}/\text{kg}/\text{日}$ にて治療し20年以上が経過し通常の勤務をしている。思春期に胆石(ビリルビン結石:溶血発作が原因と推定される)にて手術を行った。6歳女児例は血漿交換療法を行ったが改善せず肝移植を実施し、現在は特別なウィルソン病に対する治療はせずに、肝移植に対する治療を実施している。

2) 銅キレート薬治療について

8カ月男児例および1歳6カ月男児例は、3歳過ぎから銅キレート内服療法を開始した。2歳児の3例は確定診断できたときから直ちに治療を開始した。3歳以降の症例についても確定診断したときに直ちに治療を開始した。治療開始後、3~18カ月の間に血清AST・ALT値は全例が正常化した。第一選択治療薬はD-Pcであり、2例に治療開始初期に発熱・発疹をみたがD-Pcを一旦中止後に、急速減感作療法にて使用再開可能となったが、1例はネフローゼ症候群を発症し、塩酸トリエンチンに変更した。

D-Pc初期投与量は、最大 $25\text{mg}/\text{kg}/\text{日}$ とし、最初 $5\text{mg}/\text{kg}/\text{日}$ から開始し、漸増して約10日~2週間で $25\text{mg}/\text{kg}/\text{日}$ まで増量した。肝機能検査(血清AST・ALT値)が正常化し、銅キレート薬3日間休薬後の尿中銅排泄量が正常範囲内(尿中銅 $\mu\text{g}/\text{クレアチニンmg}$ 比が0.10以下、蓄尿中銅 $1\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ 以下)であればD-Pcは $10\sim 15\text{mg}/\text{kg}/\text{日}$ に減量し維持する。1日3回、食間空腹時(食前1~2時間)経

口投与を原則とした。

塩酸トリエンチンを投与するときは、投与量はD-Pcの倍量が必要であり、投与経路・投与方法はD-Pcと同じである。

3) 低銅食療法について

全例において低銅食療法を行った。維持期は、銅含量の多い食品を避ける程度として、とくに問題はなかった。

4) 併用薬および対症療法

ビタミンB6欠乏、亜鉛欠乏、鉄欠乏性貧血などの合併症が報告されているが稀である。筆者は、併用薬を用いないことが多いが、ビタミンB6を $5\sim 10\text{mg}/\text{日}$ 、1日1~2回の経口投与を実施した例もある。劇症肝炎型2例の急性期は肝不全や意識障害等に対しての対症療法を積極的に実施した。

5) 治療成績について

劇症型を示した2例は上述のごとくであった。残り21例は、いずれも順調な経過を示している。ただし、約30%の症例にて、血清AST・ALT値が経過中に上昇したため、D-Pcの投量を $20\sim 25\text{mg}/\text{kg}/\text{日}$ に増量することにより数カ月~12カ月の間に正常値に復することが多かった。怠薬する例は、思春期から青春期になると認められた。いずれの症例も顕症例はないが、検査上、超音波所見にて肝硬変へ進展した例が存在したが、多くは軽度の肝障害パターンであった。したがって、長期に治療を行っている症例から判断して確実に発症が予防されていると判明した。

考察

今回、0~7歳に発見され、確定診断した23例のウィルソン病幼若児例について自験例を中心に検討を行い、今後マスキングの開始後の本症の治療指針(案)について策定した。

1. 治療開始年齢

1歳6カ月児症例であっても肝銅含量はウィルソン病の診断基準を満たすほど蓄積増加していること、2歳児症例でもすでに肝機能が障害されている例が存在すること、などから確定診断後直ちに治療を開始する方がよい。本症のマスキング実施年齢は、3~4歳が適切とされていることを考慮して、3歳以降、確定診断後直ちに治療を開始する。

2. 銅キレート薬治療

1) 銅キレート薬は、D-Pc(メタルカプターゼ)を第一選択薬とし、D-Pc不耐患児に対しては塩酸トリエンチンに変更する。

2) D-Pcは最初 $5\text{mg}/\text{kg}/\text{日}$ から投与を開始し、数日毎に10, 15, 20, $25\text{mg}/\text{kg}/\text{日}$ 量と漸増し、10

日～2週間で最大量（25mg/kg/日）に達するように計画する。

3) 経口投与，1日3回，食間空腹時（食前1～2時間）に服用する。

4) 血清AST・ALT値が正常化するまで25mg/kg/日を連日継続投与する。

5) 維持投与量は，15mg/kg/日量を目安とする。

6) D-Pc投与開始1～2週間に，発熱・発疹などを認めることがあるが，発熱・発疹軽快後に，短期少量漸増方法による減感作投与にて目的投与量（約2～3週間かけて）に達することが可能な例が多い。

7) D-Pc投与中に，副作用として自己免疫性疾患（ネフローゼ症候群，重症筋無力症，甲状腺症，関節リウマチなど），骨髓抑制などがあれば塩酸トリエンチンに変更する。

8) 塩酸トリエンチンの投与量は，D-Pcの倍量として，急性期最大量を50mg/kg/日，維持量を30～35mg/kg/日とする。

3. 低銅食療法

低銅食療法は必ず実施する。(a) 小児期は，0.5～1.0mg/日，(b) 成人期は1.0～1.5mg/日程度とする。維持期は，銅含量の比較的多い食品の摂取を避ける程度でよいとする。

4. ビタミンB6

大量投与の必要はなく，5～10mg/日，1日1～2回に分服するとよい。是非，必要な薬物ではない。

5. 亜鉛薬

わが国において薬価未収載であるため現状では推奨できない。亜鉛薬は維持期に有用であるとされる。銅キレート薬と併用する必要はないと考える。

6. 対症療法

肝障害や神経症状のとき，それぞれ有効な対症療法を行うことは当然のことである。

結論

ウィルソン病マススクリーニングが導入されることを前提として，幼児期を中心に発見され確定診断された本症患者に対する治療指針（案）について策定した。0～7歳の自験幼若本症症例23例の検査成績，治療法および治療後の経過等について検討した。その結果，3歳以下の症例であっても，すでに肝銅含量が著増し，2歳児例の血清AST・ALT値の上昇する例が認められたため，3歳児にて本症のマススクリーニングを実施するとなれば3歳以上であれば確定診断後直ちに治療を開始する必要があると結論した。0～7歳の自験幼若ウィルソン病症例において，5歳と6歳の2例に劇症肝炎型が存在したため，少なくとも5歳の治療開始では遅いと推定した。

分担研究：効果的なマスキング事業の実施に関する研究

ウイルソン病マスキングの検査有効性の検討

研究要旨

ウイルソン病のマスキングの検査（血中セルロプラスミンならびに尿中活性セルロプラスミン測定）有効性に関する検討を行った。黄金率である肝臓銅含量あるいは遺伝子検査を、検査陽性者に対してのみ行っており、また検査陰性者に関しては追跡を行っていないので、偽陰性者の見落としの可能性が指摘された。特異度は99%と推定されたが、偽陰性者数が把握されておらず、感度は不明であり、検査有効性は不明であった。今後、追跡研究による検査・効果の評価が必要であると考えられた。

研究協力者

三笠洋明（徳島大学医学部衛生学）
青木菊麿（母子愛育会総合母子保健センター）
清水教一、青木継稔（東邦大学医学部小児科）

研究目的

スクリーニングの導入にあたっては、検査有効性、臨床的効果、経済的効率が前提となる。しかしながら、我が国においては、こうした評価が系統的に行われないうまま全国的にスクリーニングが導入されてきた。現在においても実施されているスクリーニングの根拠は必ずしも確立していないのが現状である。しかも、スクリーニングの評価は全国的に普及した場合、その有効性の評価は極めて困難になる。そこで、今回ウイルソン病の検査有効性に関し評価を行った。

研究対象および方法

東邦大学医学部で行われたウイルソン病マスキングパイロットスタディにおける検査（血中セルロプラスミンならびに尿中活性セルロプラスミン測定）の感度・特異度に関する報告書¹⁾について批判的吟味^{2,3,4)}を行った。

研究結果

ウイルソン病マスキング検査の黄金律は肝臓銅含量測定あるいは遺伝子検査である。この確定診断法はスクリーニング検査が陽性者にものみ実施されていた。また、検査者に目隠しが行われたかは不明であった。またスクリーニングの対象者は、東邦大学医学部付属病院を受診した児であり、一般集団の代表と見なせるかは不明であった。検査有効性の指標である特異度は、血中セルロプラスミン法が、0.996、尿中活性セルロプラスミン法では0.994であった。ただ、スクリーニング陰性者に関して追跡

を行っていないために擬陰性者数の把握が出来ず感度は不明であった。以上の事から、本報告からウイルソン病のマスキング検査は血中セルロプラスミンならびに尿中活性セルロプラスミン測定はいずれも検査有効性は不明であった。

また、マスキングの効果に関しては治療効果を示唆するデータが示されているに止まっていた。

考察

ウイルソン病のマスキングも、テクノロジーアセスメントの枠組みにしたがって、検査の有効性に関する評価を行うことが必要である。検査の有効性を評価する際は、黄金律と独立した比較が必要とされるが、この報告では検査陰性者に対し精密検査/確定診断を行われておらず偽陰性者の見落としの可能性が考えられた。さらに、検査陰性者に対しては追跡を行っておらず偽陰性者数は不明であった。肝臓銅含量の測定は児への負担が大きく対象者全員への適応は困難であるが、検査有効性を評価するにあたっては遺伝子検査に関しては、今後の検討が必要と考えられた。対象者は大学病院を受診した児である事から、代表性に関しては明確な判断は不可能であった。検査有効性の指標である感度・特異度に関しては、特異度は血中セルロプラスミンならびに尿中活性セルロプラスミン測定のいずれの方法でも0.99以上の成績を得たが、偽陰性者数が不明であるので、感度の算出が不可能であり、検査の有効性は不明であった。

報告には、ウイルソン病の患者に対する治療効果を示唆するデータが示されているが、スクリーニングの効果に関しては、RCTあるいはコホート研究により評価する事が求められており、我が国でも神経芽細胞腫のマスキングについてコホート研

究が実施されている^{5,6)}。今後、多施設での臨床的なデータを蓄積のみならず、地域を基盤とした出生コホートについてウイルソン病マススクリーニング受診群と未受診群を追跡する事により、検査有効性の評価ならびに効果評価を実施する事を検討する必要があると考えられた。

結論

ウイルソン病のマススクリーニングにおける血中セルロプラスミンならびに尿中活性セルロプラスミン測定の検査有効性に関する検討を行った。特異度は99%であったが、検査陰性者が把握されていないので、感度は算出できず、検査の有効性は不明であった。今後、多施設での臨床情報の蓄積のみならず、追跡研究による検査・効果の評価が必要と考えられた。

文献

- 1) 清水教一, 青木継稔, 三笠洋明 Wilson病マススクリーニングの有効性に関する検討, 厚生省子ども家庭総合研究「効果的なマススクリーニングの実施に関する研究」平成11年度報告書 pp374-376
- 2) Roman Jaeschke, MD,MSc; Gordon Guyatt, MD,MSc et. al. User' Guides to the Medical Literature III. How to Use an Article About a Diagnostic Test A.Are the Results of the Study Valid? JAMA 271, 5, 389-391 (1994)
- 3) Roman Jaeschke, MD,MSc; Gordon Guyatt, MD,MSc et. al. User' Guides to the Medical Literature III. How to Use an Article About a Diagnostic Test B.What Are the Results and Will They Help Me in Caring for My Patients? JAMA 271, 9, 703-707 (1994)
- 4) Alexandre Barratt,MMBBS,MPH,PhD; Les Irwing, MBBCh; Paul Glasziou, MBBS,PhD; Robert G.Cumming, MBBS, MPH,PhD et. al. User' Guides to the Medical Literature XVII. How to Use Guidelines and Recommendations About Screening JAMA 281, 21, 2029-2034 (1999)
- 5) 久繁哲徳 他 神経芽細胞腫スクリーニングの評価—1.死亡率を指標とした検討, 厚生省子ども家庭総合研究 平成11年度報告書 pp197-204
- 6) 久繁哲徳 他 神経芽細胞腫スクリーニングの評価—2.発生率を指標とした検討, 厚生省子ども家庭総合研究 平成11年度報告書 pp205-211