

図3：実測Cp濃度（ng/ml）とCr.補正Cp濃度（ng/mg Cr.）との関係

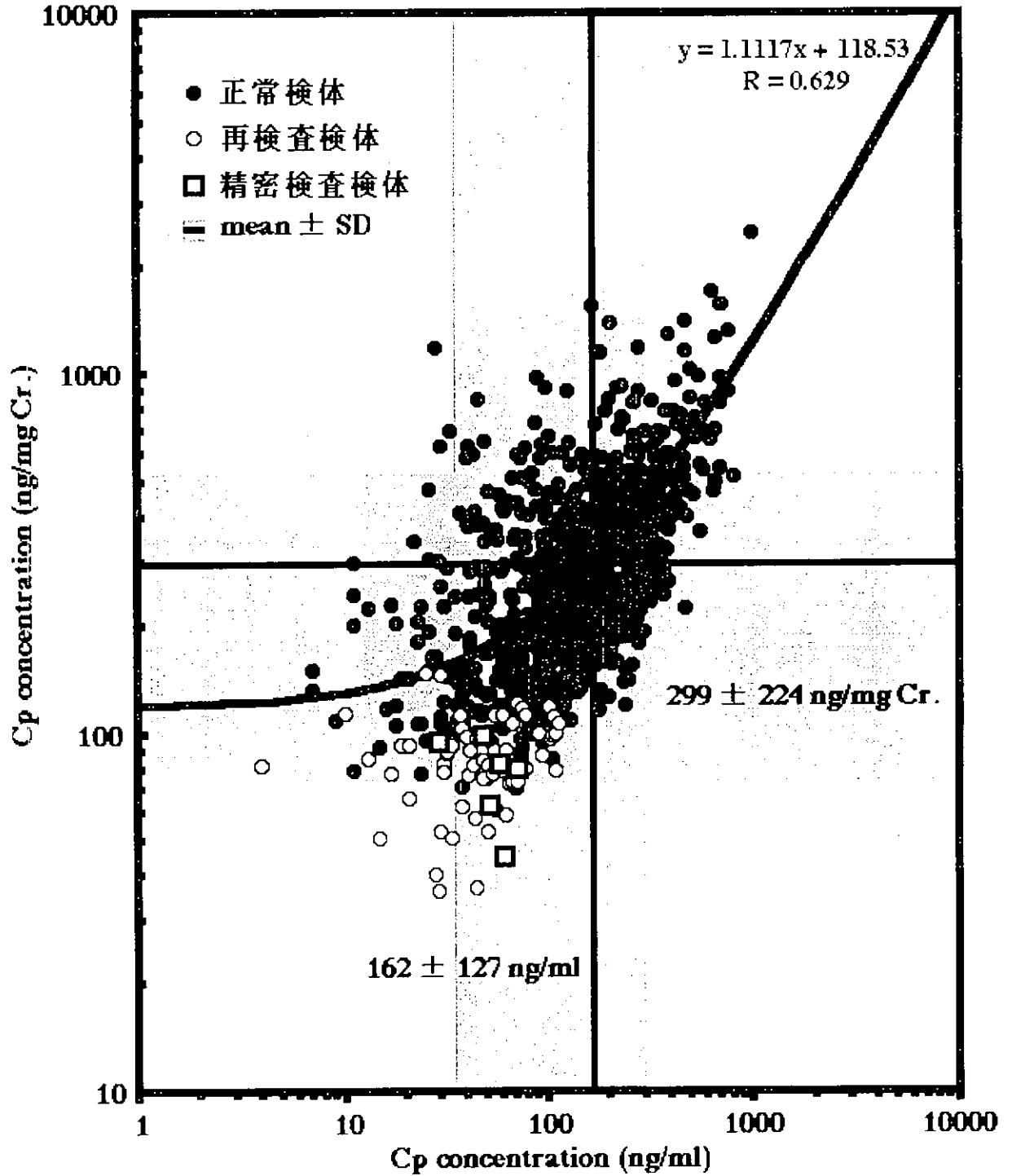


図4：初回検査でのCr.補正Cp濃度 (ng/mg Cr.) のヒストグラム

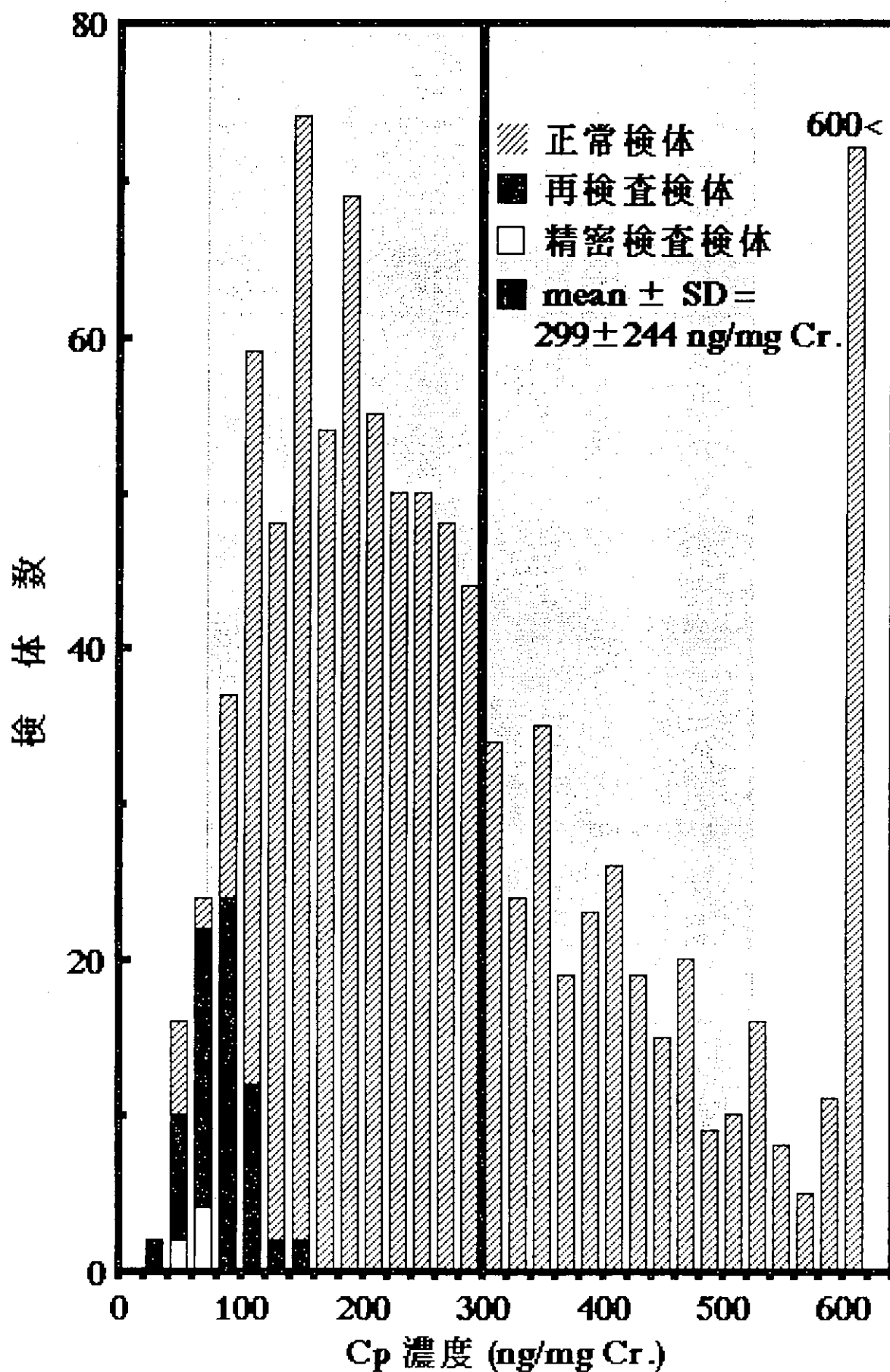


図5：北海道における平成13年度のウィルソン病スクリーニングの状況

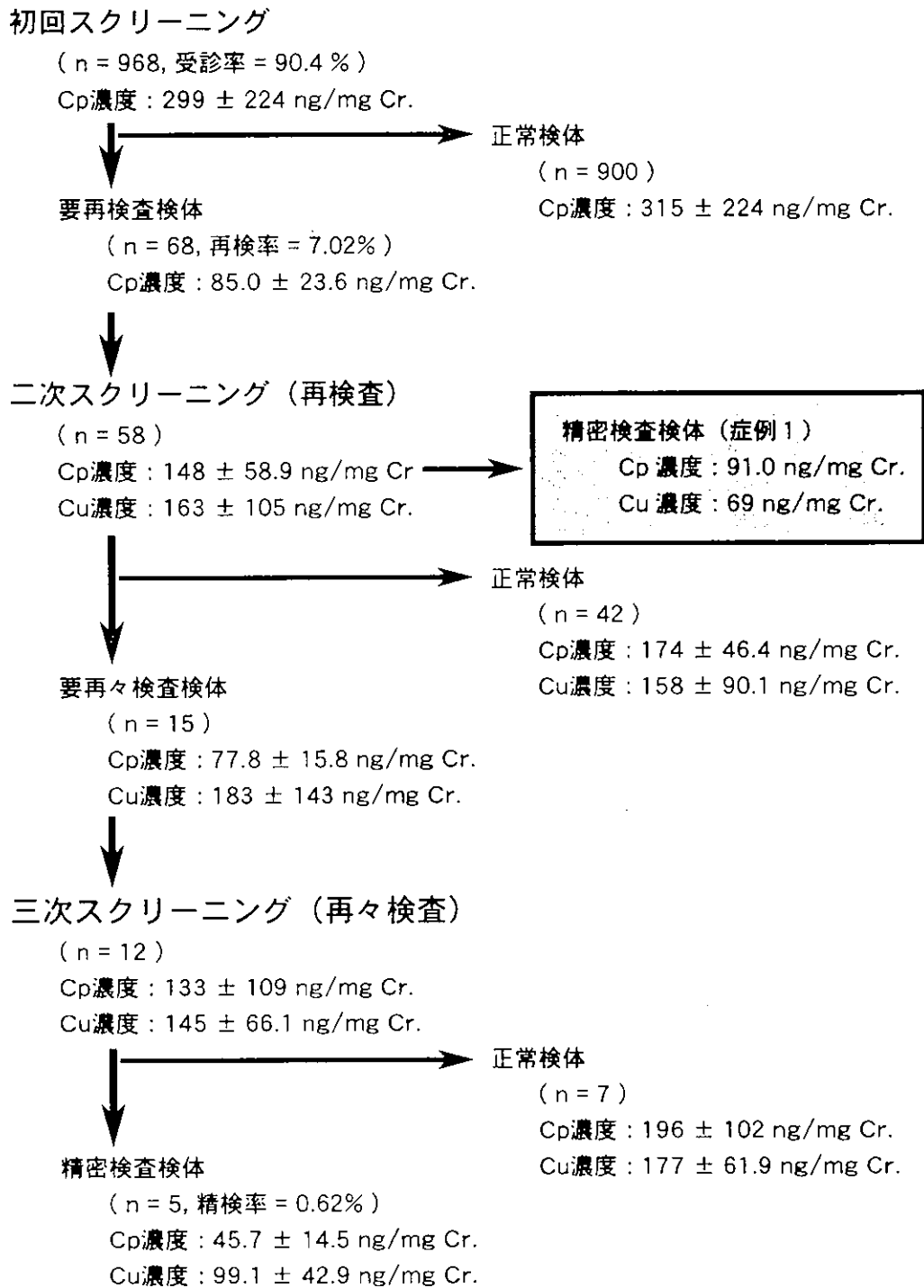


表1：精密検査児のデータ

症例1 (N.A.・女児)			
	Cp濃度 (ng/mg Cr.) (ng/ml)		Cu濃度 (ng.mg Cr.)
初 回 :	80	72	68
再 検 査 :	91	72	69
精密検査時 :	93	81	35
精密検査結果			
血 清 Cu :	122 µg/dl		
血 清 Cp :	24.0 mg/dl		
肝 機 能 :	正 常		
	GOT; 28, GPT; 12, LDH; 457, LAP; 47, Ch-E; 308, ALP; 685, ALD; 4.7 (IU/l)		
腎細尿管機能 :	正 常		
	尿NAG/Cr; 3.5, 尿2βMG/Cr; 0.059, 尿Ca/Cr; 0.075		
症例2 (O.M.・男児)			
	Cp濃度 (ng/mg Cr.) (ng/ml)		Cu濃度 (ng.mg Cr.)
初 回 :	63	52	53
再 検 査 :	92	69	37
再々検査 :	33	26	160
精密検査時 :	406	35	581
精密検査結果			
血 清 Cu :	109 µg/dl		
血 清 Cp :	23.3 mg/dl		
肝 機 能 :	正 常		
	GOT; 25, GPT; 12, LDH; 540, LAP; 57, Ch-E; 466, ALP; 1030, ALD; 5.3 (IU/l)		
腎細尿管機能 :	正 常		
	尿NAG/Cr; 0.0, 尿2βMG/Cr; 0.138, 尿Ca/Cr; 0.110		
遺伝子解析 :	Exon 2: A406S (G/T)CT < GCT, Cu-binding 4 Exon 3: L456V GTG < CTG, Cu-binding 5 Exon 12: K952R A(A/G)G < AAG, Tm 5 Exon 16: A1140V G(C/T)C < GCC, Tm 8		

分担研究：今後導入すべき新しいマススクリーニング方法および新しい対象疾患に関する研究

秋田市3才児健診におけるウイルソン病マススクリーニングの試み

研究要旨

ウイルソン病(WD)では尿中セルロプラスミン(Cp)が低値となることが知られている。3才児健診では尿検査が一般的に行われている。秋田市では3才児健診で用いた尿（当日朝の自宅採尿）のCpを測定してWDのスクリーニングを平成12年から試みている。今年度は平成13年1月から12月まで2,364名の受検者があった（3才児健診対象者の83.5%）。測定値は平均（標準偏差）102.3（±101.4）ng/mgCrであった。陽性者は4名で、精査の結果3名はWDは否定された（1名は未受診）。秋田県には10市50町10村の70自治体が存在する。秋田市以外でのWDマススクリーニング実施を各自治体へのアンケート調査で検討した。秋田市以外の全体で年間383回の健診が実施されていた。全体の55.3%（35自治体）では採尿を健診会場で行っていた。以上の点から秋田県全体での実施には検体輸送、検体の安定性、各自治体の協力など多くの考慮すべき点が明かとなった。

研究協力者

高田五郎

（秋田大学小児科）

研究目的

ウイルソン病(WD)では尿中セルロプラスミン(Cp)が低値となることが知られている。3才児健診では尿検査が一般的に行われており、この3才児健診の尿を用いたWDマススクリーニングが可能かどうか注目されている。秋田市では3才児健診で用いた尿（当日朝の自宅採尿）のCpを測定してWDのスクリーニングを平成12年から試みている。今年度も引き続き実施した。以上から本方法でマススクリーニングが可能かどうか検討し、その問題点を明らかにしようとした。また今年度は本スクリーニングを秋田県全体で実施する場合の問題点を各自治体へのアンケート調査から検討した。

研究方法

1999年4月から2001年12月まで、秋田市3才児健診の対象者全員に秋田市保健所の協力を得て健診に前もって郵送でウイルソン病マススクリーニングの説明書と同意書を郵送した。尿は一般検査用に当日朝にプラスチック容器に採取してもらった検体の残りを、同意の得られたものに関してのみ回収した。回収した検体は、測定まで4℃で保存して4日以内に尿クレアチニンとCp値を測定した。尚、2000年1月からは安定化剤としてグルコン酸クロルヘキシジン（ヒビテン）を加えた。クレアチニンは比色法による標準法にて、セルロプラスミンはニッショールにより提供された測定キットを用いて測定を行っ

た。初回測定で低値（ ≤ 15 ng/mgCr）示したものを陽性として再検依頼を秋田保健所および本人に連絡し尿検体採取、血セルロプラスミン測定、肝機能検査を実施した。今年度の結果と平成12年度からのデータを比較検討した。

秋田県内の秋田市以外の自治体に対して3才児健診のアンケート調査を行った。内容は健診の回数、1回の健診の受検者数、採尿方法、秋田市への輸送方法、WDマススクリーニングが実際可能か等である。

研究結果

平成13年1月から12月までは2,364名の受検者があった（3才児健診対象者の83.5%）（図1）。測定値は平均（標準偏差）102.3（±101.4）mg/mgCrであった。本結果は平成12年4月から平成13年3月までのデータと同様の分布を示していた（図2）。陽性者は4名で、精査の結果3名はWDは否定された（1名は未受診）。

秋田県には10市50町10村の70自治体が存在する。秋田市以外でのWDマススクリーニング実施を各自治体へのアンケート調査で検討した。対象は69自治体で回答が得られたのは65（94.2%）であった。秋田市以外の全体で年間383回の健診が実施されていた。全体の55.3%（35自治体）では採尿を健診会場で行っていた。以上の点から秋田県全体での実施には検体輸送、検体の安定性、各自治体の協力など多くの考慮すべき点が明かとなった。

考察

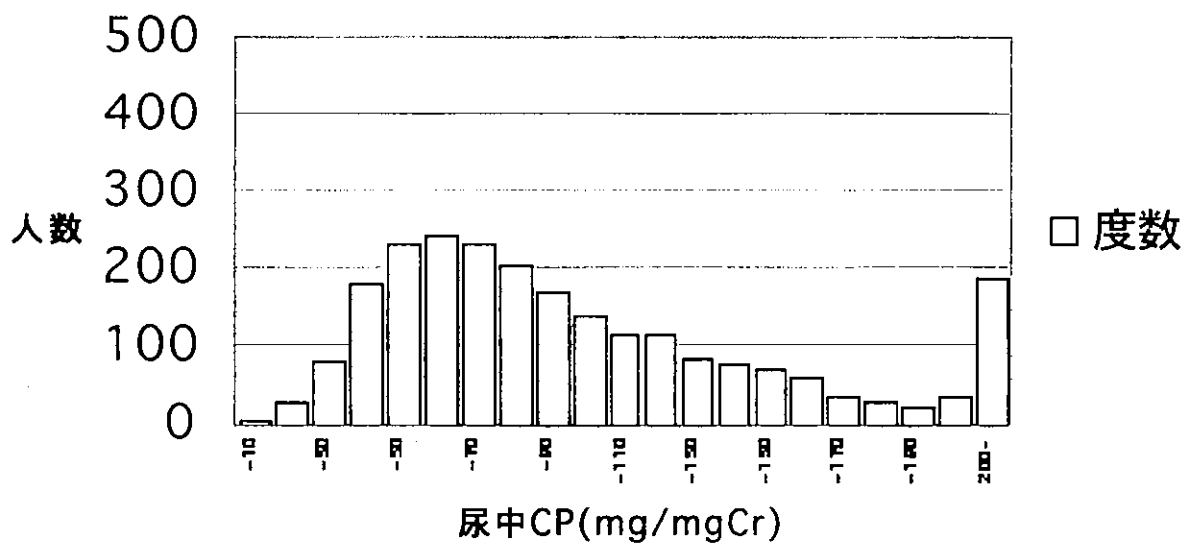
秋田市3才児健診において尿を用いたWDマスキューニングを実施した。平成12年から現在まで6,744名の受検者があったが、これは3才児健診の90%近い受検率であり、本方法のマスキューニングとしての有用性を示していた。現在まで患者の発見には至ってはいないが、発症頻度が約3万人に1名であり患者発見に本スクリーニング方法が有用かどうかにはさらなる検討が必要であると思われた。他施設での検討にも期待するところである。3才児健

診は各自治体で独自に実施されている。秋田県内には70自治体が存在しているので県単位で実施するためには種々の問題があると思われる。今回、我々の実施したアンケート調査では、各自治体では全体で少なくとも383回の健診がばらばらに実施されており、またその1回の健診受検者の人数は10~20人と少ない健診も多かった。問題として検査機関への輸送の方法や検査機関における1回の測定検体数を十分確保できるかなど考えられた。WDの知名度は低く保健婦への教育なども重要な点と考えられた。

図1：WDマスキューニング受検者数

月	対象者数	3才児健診受検者数	WD検査受験	WD検査受験率
1999.04 /	2,072	1,884	1,828	88.2% (97.0%)
1999.12 /	2,838	2,597	2,551	89.9% (98.2%)
2000.01 /	2,834	2,444	2,365	83.5% (96.8%)

図2：尿セルロプラスミン値



分担研究：今後導入すべき新しいマススクリーニング方法および新しい対象疾患に関する研究

東京小児科医会の協力による幼小児Wilson病スクリーニング

研究要旨

わが国では、昭和40年に母子保健法が制定され、その後今日に至るまで地方自治体で3歳児健診が実施されており、この健診が幼児の健康維持・増進に大きな役割を果たしていると考えられている。その受診率は昭和60年には90%に達していたが、平成4年の厚生省研究班によれば、3歳児検尿を受診している健診対象者は全体の約2/3に過ぎないと報告されている。従って、3歳児検尿によるWilson病のスクリーニングのみでは、約1/3がもれることになる。そこで、協力の得られた西東京市（保谷市、田無市）、三鷹市、立川市、国分寺市の4市の3歳児健診でのスクリーニングに加えて、東京小児科医会の協力を得て、会員の外来を受診した児のWilson病のスクリーニングを試みたので、3歳児検尿を利用したWilson病のスクリーニングシステムと対比して、報告する。

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

我々は、これまでに小学生の児童や3歳児健診におけるWilson病のスクリーニングについて報告してきたが、小学生学童期ではスクリーニング時期としてやや遅いとの指摘があり、3歳児健診を利用したシステムでは、受診率や地方自治体によっては検尿を行っていないなどの問題点が指摘されていた。そこで今回、我々は東京小児科医会の協力を得て、3歳から5歳の幼小児を対象としたWilson病スクリーニングシステムを構築したので、現在行っている3歳児健診と対比して報告する。

スクリーニングシステムおよび方法

1) 3歳児健診システム

3歳児検尿を利用した本システムに関しては平成12年度研究会議において既に報告しているが、そのシステムの概略を図1に示す。協力の得られた西東京市（保谷市、田無市）、三鷹市、立川市および国分寺市の母子保健課に予め病気の説明書、受診のための同意書、採尿セットを届け、市では3歳児健診の対象者に受診通知を郵送する際にWilson病関連のものも同封する。検査希望者は3歳児健診の際に、腎臓病検診のための検尿と共に、Wilson病の尿および同意書も提出する。検体は東京都予防医学協会の業務関係者が各健診会場に回収に行く。二次あるいは三次検査が陽性になった場合は、その保護者に連絡し、市が予め指定した専門医療機関で精密検査を受けるようにすすめて、そこに陽性者を紹介する。

2) 東京小児科医会のシステム

東京小児科医会の協力を得て試みた、会員の外来を受診した3歳から5歳児を対象としたWilson病スクリーニングの流れについては図2、3に示した。今回、予め東京小児科医会会員にWilson病スクリーニングに協力するか否かについて調査を行ったところ、約670名の会員のうち101名の会員の登録があった。

このシステムは、3歳児健診と同様に同意書などを含む検査セットを東京都予防医学協会から協力医療機関に郵送にて配布する。外来を受診した3歳から5歳の幼小児の保護者にWilson病の必要性を医会会員が説明し、インフォームドコンセントを確認して後に採尿セットを渡す。

検査結果が陽性を示したものは再度採尿して検査を行い、二次検査の結果も陽性を示した場合は、採尿と同時に医会会員が採血も行い、検査センターに三次精密検査を依頼する。三次精密検査が陽性となった場合は、医会会員が予め指定されている専門医療機関を紹介する。

インフォームドコンセントの確認のための同意書を表1に示す。同意書は、PKUなどの新生児スクリーニングに用いられている東京都で使用されている同意書を参考に作成した。受診者の氏名、住所、電話番号を記入するようになっており、2枚複写で医療機関保存用と検査機関保存用となっている。

研究結果

表2に示すように、3歳児健診を受診した6,426例の児に対して行ったWilson病のスクリーニングでは、6,426例のうち130例（2%）が陽性を示し二次

検査を受け、そのうち5例が引き続き陽性を示したので、駿河台日本大学病院小児科にて精密検査を受診したが、すべて正常と判定された。Wilson 病スクリーニングの目的物質であるセルロプラスミン測定値の平均は、 $100 \pm 89.2 \text{ ng/ml}$, $103.7 \pm 92.3 \text{ ng/mg creatinine}$ であった。

Wilson 病スクリーニングの受診率は、表3に示すように、西東京市では二度の採尿、同胞例などが含まれていることから3歳児健診受診数を上まわって100%を越えている。全体での受診率も95.4%と高く、本症スクリーニングに対する保護者の関心の高さが窺われた。

考察

平成12年から開始した3歳児健診でのWilson 病スクリーニングでは、その受診率が高率であり、また病気あるいは検査結果の問い合わせ等が対応に窮するほど多く、予想以上の保護者の本症に対する関心の高さに驚かされている。このような状況から、東京小児医会の協力の得られたスクリーニングと3歳児健診におけるスクリーニングとを並行して行えば、100%のスクリーニング実施が可能になると期待している。

Wilson 病のスクリーニング法の開発が始められて約14年が経過するが、その間に様々な研究が行われ、現在3歳児を中心とした非侵襲性である尿によるELISA法を用いたスクリーニングシステムが確立され、次第に普及しつつある。本法を用いた早期発見・早期治療のためのWilson 病スクリーニングが行政レベルで実施されることが望ましいと考えている。

図1：3歳児健診システム

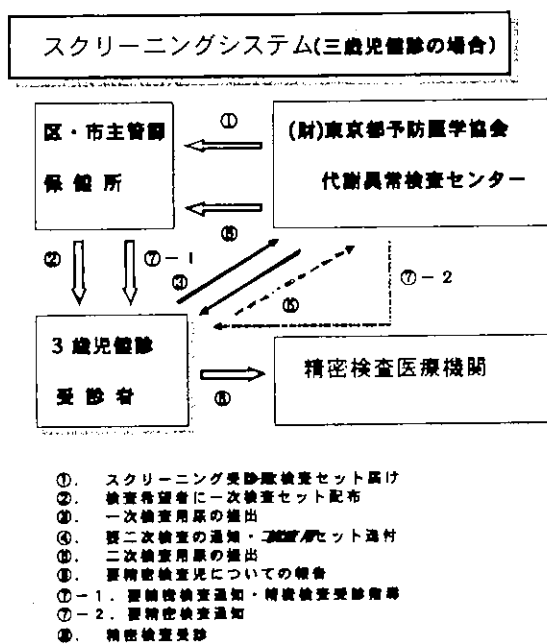


図2：東京小児科医会システム-1

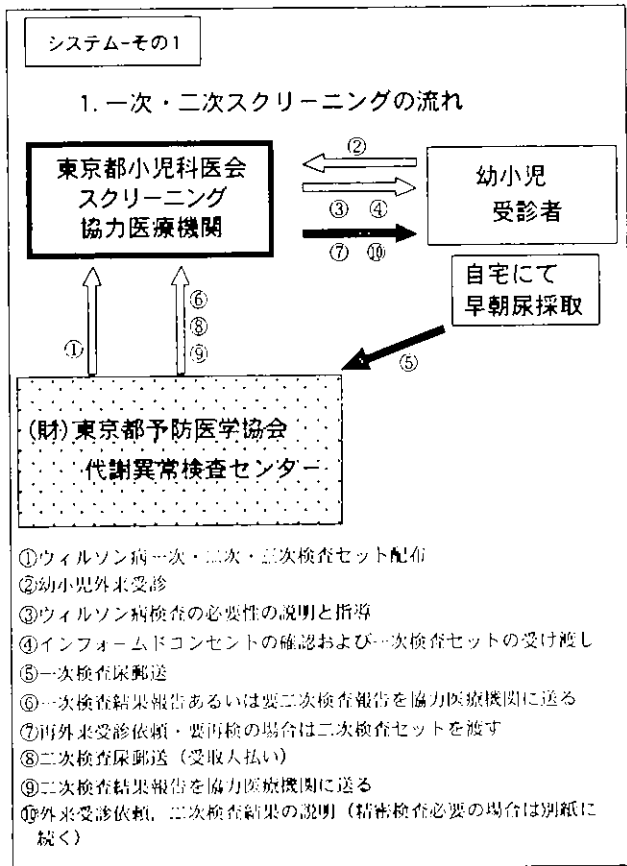


図3：東京小児科医会システム-2

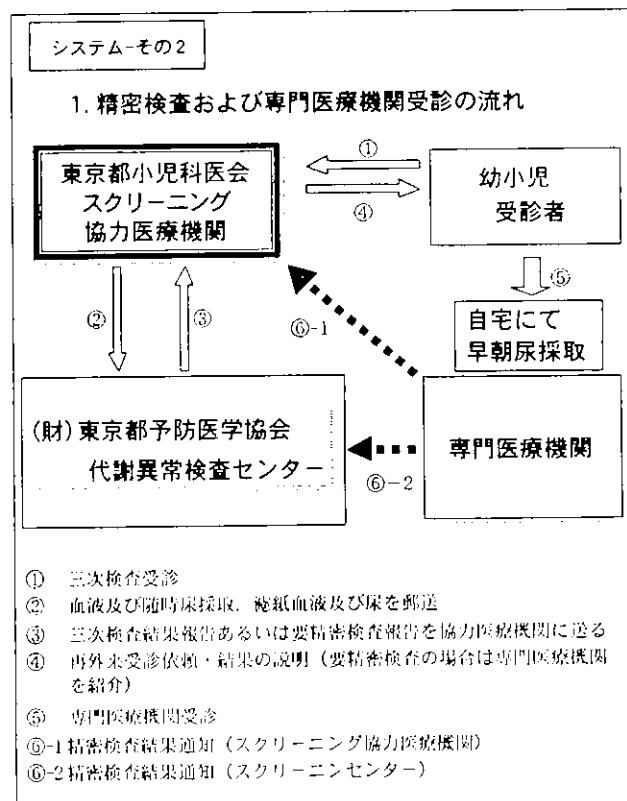


表1：Wilson病検査申込書（同意書）

ウィルソン病検査申込書（甲）
 （医療機関用）
 No. _____

「ウィルソン病検査のお知らせ」を読み、趣旨を了解しましたので検査を申し込みます。

医療機関 _____ 御中 （ 担当医師名： _____ ）

[申し込み： _____ 年 _____ 月 _____ 日]

フ リ ド ガ ナ 保 護 者 氏 名			
住 所	都道府県		区市町村
		電話番号	()
備 考			

- ・ 太枠内は、申し込み者ガボールペンで強く記入してください。
- ・ 検査を受ける場合は、この申込書（甲乙2枚複写）を医療機関に提出してください。
- ・ 担当医氏名は、医療機関が記入すること。

表2：Wilson病スクリーニング成績

三歳児尿セルロプラスミン測定		
一次検査	6,426例	100.9 ± 89.2 ng/ml 103.7 ± 92.3 ng/mg creatinine
二次検査依頼書	130例 (0.2%)	11.8 ± 6.8 ng/ml 18.5 ± 9.1 ng/mg creatinine
要精密依頼数	5例	正常4例 7.6, 9.3, 12.5, 16.3, 6.2 ng/mg creatinine

表3：wilson病スクリーニング受診率

平成13年1月～平成14年1月現在				
	西東京市（保谷市）	三鷹市*	立川市	国分寺市
Wilson病受診数	2,259	1,228	2,368	442
3歳児健診受診数	2,252	1,305	2,459	459
受診率%	100.3	94.1	96.3	96.3
総 計	6,283 / 6,475 (97.0%)			

*：三鷹市は平成13年3月に終了

分担研究：今後導入すべき新しいマススクリーニング方法および新しい対象疾患に関する研究

新生児ろ紙血液を用いたウィルソン病スクリーニングのまとめと、
総セルロプラスミン測定ELISAを用いた1才2か月尿スクリーニングの基礎的検討

研究要旨

札幌市では新生児乾燥濾紙血液を用いて血清中セルロプラスミン（以下CP）濃度を測定することにより1995年4月からウィルソン病の新生児マス・スクリーニングを行っている。これまでに10万人以上の新生児を検査したが、患者の発見にはならず、1名の見逃し例があった¹⁾。これをふまえ、別の時期での検査法を検討する必要がある。今回、私たちは札幌市で実施している1才2ヶ月（以下14か月）時の小児がんマス・スクリーニングの尿検体を用いることを前提に、私たちの開発した全CP量測定用高感度ELISA法^{2,3)}による基礎的検討を行った。

研究協力者

藤田晃三、野町祥介、中澤恵実理、田上泰子、
水嶋好清、尾崎恒一（札幌市衛生研究所）
福士勝（札幌市保健福祉局生活衛生部）
山口昭弘（札幌医科大学）

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、その発症時期は小児期から思春期前期が多い。そこで、以下の検体を用いたウィルソン病のマス・スクリーニングが可能か検討することを本研究の目的とした。

- ア) 新生児マス・スクリーニングろ紙血液
- イ) 小児がんマス・スクリーニング尿検体
（14か月時）

研究方法

ア) 札幌市内で、1995年4月から2001年3月までに出生した新生児104,117人を対象とし、酵素免疫法によるCP測定によりウィルソン病の新生児スクリーニングを実施した¹⁾。また、測定に用いた方法は以下の3つの時期において異なり、(1) 1995年4月～1995年7月（以下、初期）はELISA法（モノクローナル抗体）により活性型CP測定を、(2) 1995年8月～1998年8月（以下、前期）は競合法ELISA（ポリクローナル抗体）、(3) 1998年9月～2001年3月（以下、後期）はネフェロメトリーを原理とする全自動免疫化学分析装置⁵⁾により、全CP測定を行った。一次検査のカットオフ値は4mg/dlを用い、これを下回った検体について再検査を行い、再度カットオフ値を下回った検体について1ヶ月後の再採血を依頼した。

イ) 総セルロプラスミン測定サンドイッチ法ELISAキットを作成し、ろ紙尿からのCP回収率、生尿中CPの安定性の評価を行った。

また札幌市における6か月時と14か月時における小児がんマス・スクリーニングにおいて要再検査となった再採尿について、保護者のインフォームド・コンセントを得、生尿検体も合わせて確保し、全CP濃度を測定した。

研究結果と考察

ア) 2001年3月までに、104,117人の新生児について検査を行い、242名(0.23%)を再採血、96年に1名を精査としたが、患者の発見にはならず、1例の見逃し例があった（検査時CP濃度3.8～5.4mg/dl、発症時CP濃度1mg/dl以下）。

これらの測定による新生児血清中の全CP濃度分布をヒストグラムにより示したものが図1である。また、新生児血清中全CP濃度値の採血時体重依存性を図2に示す。

これらの結果、ろ紙血による新生児スクリーニングシステムで行ったウィルソン病のスクリーニングでは、高頻度に見逃し例が出てしまうことが考えられる。このため、乳幼児期の生尿検体によるスクリーニングについて検討することが必要と考えられた。

イ) 水嶋らによって開発された全CP測定用高感度ELISA法^{2,3)}によりいくつかの検討を行った。

(1) ろ紙尿からのCP抽出回収試験

いくつかの溶媒環境において、ろ紙尿からのCP回収試験を行ったが、回収率は20%以下で、ろ紙尿検体を用いたCP測定は困難であると考えられた。（図3）

(2) 標準蛋白溶液の尿への添加回収試験

N Protein Standard SL（DADE BEHRING）の

尿添加回収試験をネフェロメトリー法と本ELISA法の比較により行ったところ、きわめて良好な相関が得られた。

(3) 尿中CPの安定性及び測定系の評価

成人尿サンプル中の全CP量をELISA法により測定し4℃保存の状態で経日変化を検討したところ、採尿直後から翌日にかけてCP量は低下したが、2日目以降は安定した。また、凍結尿においては測定値の継続的な減少が認められた。(図4) これらの検討において、アッセイ間CVは2.3~9.2%、アッセイ内CV (N=8) は3.9~10.0%と良好だった。

(4) 乳幼児尿を用いた検討

札幌市の小児がんマス・スクリーニングは生後6か月と14か月の2度、ろ紙尿を用いて実施されている。今回、これらの検査で要再検査となった例において、保護者のインフォームド・コンセントを得た上で、生尿を確保し、これらの全CP量を本ELISA法により測定した。このさいN Protein Standard SL (DADE BEHRING) の希釈系列によって求められた検量線を図5に示す。これまでに、31例の6か月尿と47例の14か月尿について測定を行った結果、全CP濃度をクレアチニン濃度に対してプロットしたものを図6に、各全CP濃度、クレアチニン濃度、全CP/クレアチニンの補正值の平均値±標準偏差を表に示す。また、クレアチニン濃度換算値の対数分布を図7に示す。

これらの検討の結果、尿中CPは採尿直後に低下するが、その後安定であり、これらをふまえた測定は可能であると考えられた。しかし、凍結による劣化等の原因不明の事象も観測された。また、乳幼児尿中全CP濃度の分布幅は広範であり、クレアチニンとの相関も少ないため、補正值の応用も現段階では困難である。スクリーニングとしてのカットオフ値の導入にはさらなるデータの蓄積と検討が必要である。

結論

新生児期でのスクリーニングでは多くの例が見逃されると考えられた。

生後14か月時の採尿システムを応用し、ポリクローナル抗体による高感度ELISA法により全CP量の測定を行うことが可能である。しかしスクリーニングの実施のためには、測定法、カットオフ値の設定法などの更なる検討が必要である。

文献

- 1) 野町祥介, 中澤恵実理, 野呂奈津子, 他: 札幌市における新生児ウィルソン病マス・スクリーニングの実施成績と見逃し例について, 札幌市衛生研究所年報, 28: 40-44, 2001.
- 2) 水嶋好清, 山口昭弘, 福土勝, 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.
- 3) 水嶋好清, 福土勝, 菊地由生子, 高杉信男, 荒島真一郎: ウィルソン病の濾紙血液中のセルロプラスミン値測定によるマススクリーニング, 進行阻止及び長期管理に関する研究, 厚生省 心身障害研究, 代謝疾患・内分泌等のマス・スクリーニングに関する研究, 平成3年度報告書, 215-217, 1991.
- 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) Hiyamuta S, Shimizu K, Aoki T: Early diagnosis of Wilson's disease, Lancet, 1993 Jul 3; 342 (8862): 56-57.

図1

新生児濾紙血液による
血清中 CP 濃度の測定結
果を示したヒストグラム。

上：前期 ELISA 法による
測定結果

下：後期 ネフェロメトリー
法による測定結果

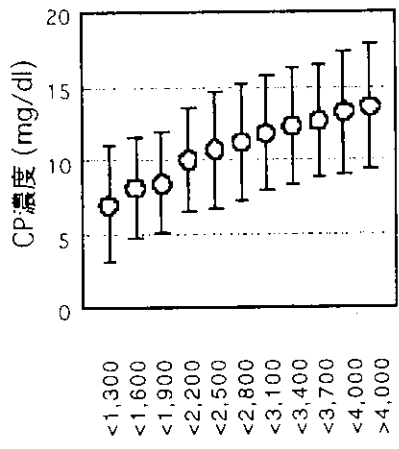
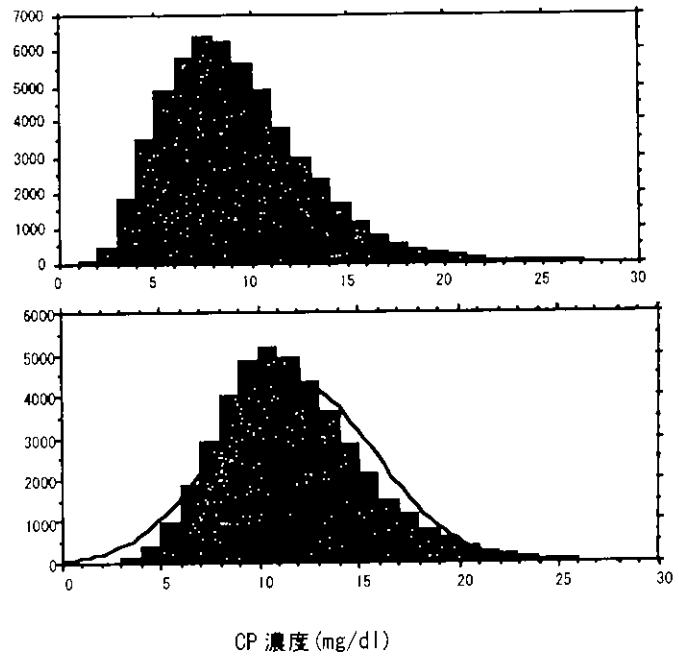


図2 CP濃度と採血時体重

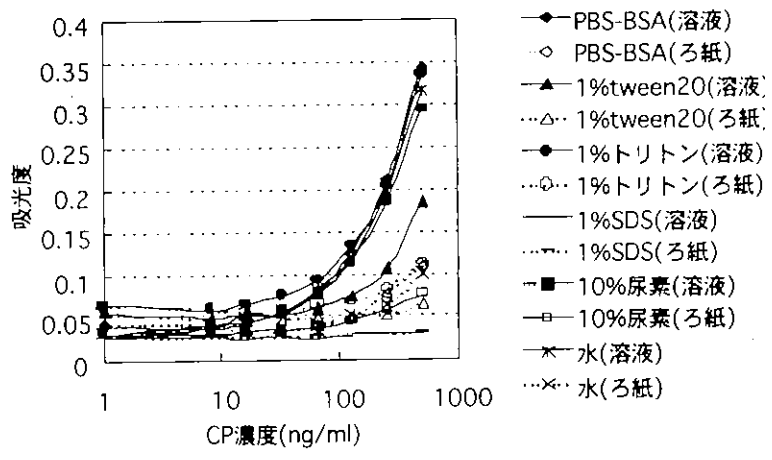


図3 各溶媒によるろ紙尿からのCP回収評価

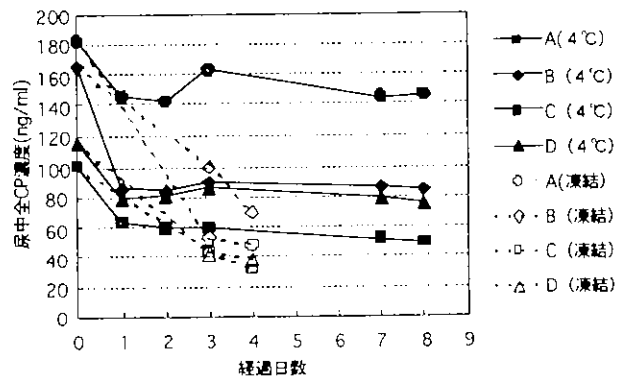


図4 尿中CPの経日変化

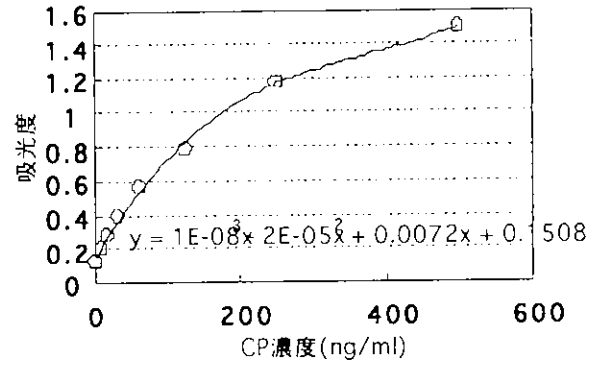


図5 全CP量ELISA法における検量線

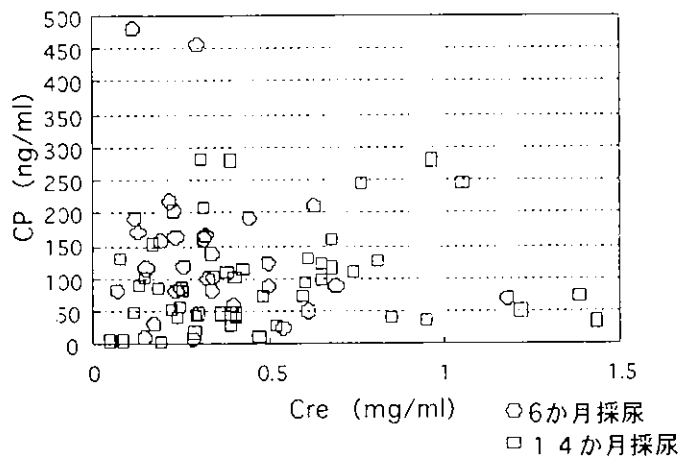


図6 尿中全Cp濃度の対クレアチニン濃度プロット

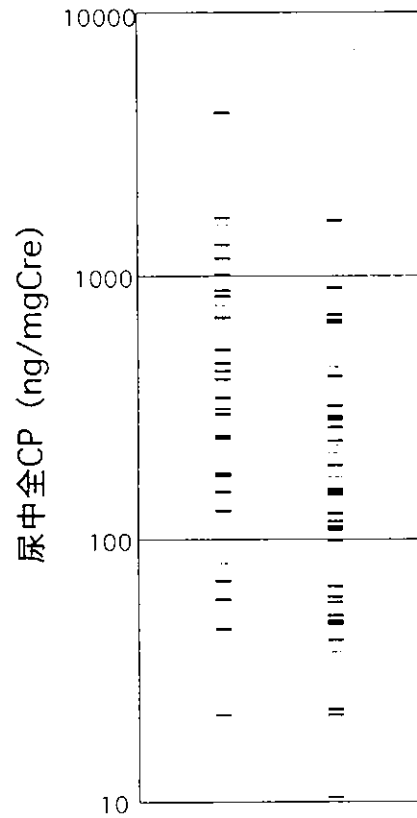


図7 尿中全CP(ng/mgCre)の分布(月齢;左6,右14)

表: 乳児尿中の前CP濃度・クレアチニン濃度測定結果

採尿時期	検体数	CP値 (ng/ml)	Cre値(mg/ml)	CP/Cre (ng/mg Cr)
6カ月	31	136±106	0.34±0.24	621±789
14カ月	47	92.4±74.7	0.50±0.35	266±311

分担研究：今後導入すべき新しいマススクリーニング方法および新しい対象疾患に関する研究

DHPLCを用いたWilson病の遺伝子変異スクリーニングに関する検討

研究要旨

Wilson病に対するATP7B遺伝子の変異スクリーニング法として、変性高速液体クロマトグラフィー(DHPLC)による解析について検討を行った。変異の同定されている日本人Wilson病症例8例 (compound heterozygote 7例, homozygote 1例)に対し、WAVE DHPLC (Transgenomic, U.S.A.)を用いて解析を行った。その結果、全例においてピークの差を認められた。DHPLCは、温度変性を利用してPCR産物中のheteroduplex (ミスマッチ塩基配列)を検出する方法である。本法を用いたATP7B遺伝子解析にて、compound heterozygoteのみならず、homozygoteの症例についても変異が検出可能であった。本法を用いて変異を認める頻度の高いエクソンをスクリーニングすることにより、効率の良い遺伝子解析が可能であると考えられた。

研究協力者

清水教一, 竹下由紀子, 山口之利, 青木継稔
(東邦大学医学部第2小児科)

研究目的

Wilson病は、常染色体劣性遺伝形式をとる遺伝性銅代謝異常症の代表的疾患である。肝細胞からの銅の排泄障害が病態の中心であり、肝臓をはじめ、中枢神経、角膜および腎臓などの種々の臓器に銅の過剰な蓄積を認める。原因遺伝子(ATP7B)に関しては、すでに200種類以上の変異が報告されており¹⁾、日本人と欧米人においては変異の型と頻度が明らかに異なっていることもわかってきた。そのため筆者らは、日本人Wilson病症例の遺伝子解析には独自の方略が必要であると考えている。本研究は、日本人症例に対するより効率の良いATP7B遺伝子解析法の確立を目的として、変性高速液体クロマトグラフィー(Denaturing High-Performance Liquid Chromatography, DHPLC)を用いた変異スクリーニングについて検討を行った。

研究方法

対象は、すでに変異の同定されている日本人Wilson病症例8例、およびwild typeとして健常コントロール1例であった。患者本人あるいは家族の同意を得た後に遺伝子解析を行った。症例はcompound heterozygote 7例, homozygote 1例を選択した。これらの症例において変異を有するエクソンをPCR法を用いて増幅した。PCR産物を熱処理した後、徐々に温度を下げアニーリングさせた。

これにより、変異を有するPCR産物(mutant)は、homoduplexとheteroduplexの2種類を形成する。これらをwild typeとともにWAVE DHPLC (Transgenomic, U.S.A.)にて解析し、wild typeとmutantの間にてピークに差が出るか否かを検討した。なお、カラムの分析温度は、まずWAVEMAKERTM Software Version 4.0の推奨温度にて行った。Homozygoteの症例に関しては、mutantのPCR産物とwild typeのPCR産物を1:1の割合で混ぜて解析を行った。

研究結果

全例においてピークの出現速度および位置にwild typeと差を認めた。検出可能であった変異は、2299insC変異, R778L変異 (ともにエクソン8), A874V変異, 2648del2, 2659delG (ともにエクソン11), 2871delC (エクソン13) および T1010I, G1035V変異 (ともにエクソン14) であった。これらのうち、homozygoteの症例は2874delC変異を有していたが、上記した方法にてheterozygoteの症例と同様にピークの出現速度・位置にwild type単独のものと差を認めた。

考察

DHPLCは、温度変性を利用してPCR産物中のheteroduplex (ミスマッチ塩基配列)を検出する方法である²⁾。Heteroduplexにおいては、変異の存在する部位はミスマッチが生じており、homoduplexに比べカラムへの保持力が弱くなる。そのためheteroduplexとhomoduplexではカラムが

らの溶出速度が異なり、それがピークの差として描出される。このような特性を有するDHPLCを用いたATP7B遺伝子解析の方略を検討するため、まず compound heterozygoteのWilson病症例について解析を行った。この解析にて7種類の変異が検出可能であることが判明した。また、homozygoteの症例においても、そのPCR産物をwilt typeと混ぜ、人工的にheterozygoteを作成することにより変異検出が可能であった。この結果より、未知の症例・検体に関しては、そのPCR産物単独とwilt typeと混ぜたものの2種類を、あるいは症例のPCR産物とwild typeを混ぜたもののみを解析することにより、容易に変異の有無を同定することが可能であると考えられた。

Wilson病症例における遺伝子変異は極めて多岐にわたるものの、日本人症例にてはエクソン8および13に変異が存在する頻度が高い。現在までの筆者らの解析結果と、他施設からの報告をあわせた検討より3)4)、この2つのエクソンをはじめ、エクソン5、10、11、12、14、16、18などを解析することにより、全アレルの60-70%以上において変異を同定することが可能であると考えている。DHPLCを用い

て変異の存在する頻度の高いエクソンをスクリーニングすることにより、効率の良い遺伝子解析が可能であると考えられた。

文献

- 1) Butler P, McIntyre N, Mistry PK: Molecular diagnosis of Wilson disease. *Molecular Genetics and Metabolism* 72: 223-230, 2001
- 2) Underhill PA, Jin L, Lin AA, et al: Detection of numerous Y chromosome biallelic polymorphisms by Denaturing High-Performance Liquid Chromatography. *Genome Res* 7: 996-1005, 1997
- 3) Shimizu N, Nakazono H, Takeshita Y, et al: Molecular analysis and diagnosis in Japanese patients with Wilson's disease. *Pediatr Int.* 41: 409-413, 1999
- 4) Okada T, Shiono Y, Hayashi H, et al: Mutation analysis of ATP7B and genotype-phenotype correlation in Japanese with Wilson's disease. *Hum Mutat* 15: 454-462, 2000

分担研究：今後導入すべき新しいマススクリーニング方法および新しい対象疾患に関する研究

Wilson病マススクリーニングシステム確立に向けての方略に関する研究

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、現在までのパイロットスタディの累計結果をもとに検討した。新生児ろ紙血の活性型セルロプラスミン測定では178,965人を検査して患者発見はできなかった。また今回、5年前のスクリーニング後の患者発見例1例が報告された。乳幼児の血中セルロプラスミン値の測定では39,907人中9名の患者発見に至った。乳幼児における尿中セルロプラスミン値測定では61,032人中3名が発見された。このうち現行の3歳児健診における検尿を利用した検討では現在までに9,759名が受診している。患者発見はまだであるがスクリーニング希望率は93～96%でありまれな疾患とされながらも保護者の関心は非常に高く、「Wilson病ではない」ことで安心することが非常に意義のあることと思われた。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も述べた。現状ではこの全国規模の3歳児健診における尿検査を利用してスクリーニングを進めていくことが最も効果的であり直ちに実行できると結論した。

研究協力者

山口之利，清水教一，青木継稔
（東邦大学医学部第2小児科）

研究目的

Wilson病は、先天性銅代謝異常症の代表的疾患である。臨床的には、諸臓器に蓄積する銅により肝硬変、錐体外路症状およびKayser-Fleischer角膜炎を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り銅キレート薬による治療法が確立されているが症状出現後の診断では患者のQOLが著しくそこなわれる。そこで、早期に診断、治療を開始することに意義がある¹⁾。本症の発症頻度はおよそ3万4千人にひとりとされ²⁾、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（フェニルケトン尿症など）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。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において、本研究班は現在までに様々なパイロットスタディを行ってきた。今後はその実現に向けて最も効率の良い方法、方略を決定すべきである。そこで今回までのパイロットスタディの結果をもとに現実的な方略を目的として検討した。

研究方法

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た³⁾。活性型セルロプラスミン測定は従

来のニッショーのキットを用いて行った。対象は、1) 新生児ろ紙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である。

尿中活性型セルロプラスミン値測定は乳幼児・学童を中心に行い、さらに3歳児健診における検尿を利用して進めている。

研究結果

表1に現在までのパイロットスタディの結果を示す。1) 新生児ろ紙血による検討では累計178,965人に行い、患者発見はなかった。また、今回の班会議にてそのグループからおよそ5年後に1例患者が発見され、見逃し例と報告された。2) 乳幼児血中セルロプラスミン測定では、協力施設および関連病院、実地医家により地道に検討され、累計39,907人のうち9名の患者発見となった。そのうち3名は家族内検索とパイロットスタディ実施施設に肝機能障害にて来院していた。また保因者（ヘテロ）も3名発見された。3) 尿を用いた検討においては2)と同様、乳幼児および学童累計61,032人より3名の患者発見に至っている。このうち9,759人は現行の3歳児健診の検尿システムを利用した検討であり、今だ患者発見には至っていない。しかし3歳児健診の検尿時におけるパイロットスタディ受診（希望）率は93～96%であり健診受診者家族の関心は非常に高かった。検尿によるセルロプラスミン測定は東京都の場合、

都予防医学協会が、他府県では主に衛生研究所および大学医学部にて協力して行っている。

考察

新生児ろ紙血の検討では患者発見に至らず5年後の見逃し例1例となった。現状では施行は困難と考える。乳幼児における血中セルロプラスミン測定は、患者も発見されており確実であるが健診の場では実施困難であり、患者の家族内検索や精査の場で積極的に行っていくのが現実的と考える。尿を用いた検討では6万人に3人の患者発見があり、有効と考える。現在までは患者はすべて学童であるが、学童検尿にしぼると幼児期発症の重症型を見逃す恐れがあるため3歳児検尿にて検討することが最も現実的である。1万人近く検討して患者発見はないが、Wilson病の発症頻度から考えれば今後の累積が待たれる。また3歳児検尿におけるWilson病スクリーニング受診希望率が93~96%であったことは、稀な代謝疾患でありながら受診者家族の関心が非常に高いことを示している。自分の子がまさかWilsonとは思わなくても、スクリーニングにより「Wilson病ではない」と知ることが非常に意義があると家族は考えており、患者発見率ばかりに注目されがちだがこの点をしっかり考えていくべきと思われる。情報が氾濫する中で安心して子育てをしていく手助けとして、スクリーニ

ングの効果は現行の「健やか親子21」の骨子にも十分相応している。このあと一次スクリーニングにて繰り返す尿中低セルロプラスミン値を認めた場合、関連専門施設での精密検査を行う。詳しい家族歴や血清セルロプラスミン値、血清銅値、尿中銅排泄量（ただし3歳児の場合は尿中銅含有量が増えていない場合もあり診断は慎重に行う）の測定を行う。血清セルロプラスミン低値を示す場合にはさらに肝臓、脳の画像診断や、ATP7B遺伝子解析、さらに診断に苦慮する場合は肝臓中銅含有量の測定（肝生検）へと進めていく。

結論

Wilson病マススクリーニングシステムの確立についてパイロットスタディの累積結果をもとに検討した。疾患の早期発見のためには現行の3歳児健診における検尿を利用してスクリーニングを行っていくのが現時点で最も効果的かつ直ちに実現可能であると考えられる。

文献

- 1) 青木継稔. Wilson病, 星和書店, 1984.
- 2) 青木継稔他. 小児内科. 1991; 23:1893-1898.
- 3) Yamaguchi Y et al. Pediatr Intr. 1999; 41: 409-413.

表1: Wilson病マス・スクリーニング パイロットスタディ

活性型セルロプラスミン測定試料	対象	施設	数累計人数	新たに発見されたWilson病患者	ヘテロ患者
血液ろ紙あるいは血清を使用	新生児	11	178,965	0	
	乳幼児・学童	8	39,907	9 (3)	3
尿を使用	乳幼児・学童	4	61,032	3	
合計			279,904 (うち乳幼児100,939)	12	3

() 家族内検索およびスクリーニング実施施設に肝機能障害にて来院、精査後診断

分担研究：今後導入すべき新しいマススクリーニング方法および新しい対象疾患に関する研究

ムコ多糖症のスクリーニングの実施に関する研究

研究要旨

当施設では、1993年より尿濾紙を検体としてジメチルメチレンブルー呈色反応による先天性ムコ多糖症のスクリーニング法を検討し、1995年よりは当院及び関連病院にて出生した乳児を対象にスクリーニング検査を行ってきた。1995年1月～2001年12月での検体数は9,254、1次スクリーニング陽性は3.0%、2次スクリーニング陽性は0.26%で、患者は見つからなかった。

他方、早期発見による早期治療が行われた時の効果判定の資料とするため、日本人に最も多いムコ多糖症Ⅱ型について自然歴を調べた。18例のうち、最重症型2例、重症型6例、中間型4例、軽症型4例、最軽症型2例と分類された。

研究協力者

田中あけみ、梶田知子

（大阪市立大学大学院医学研究科発達小児医学）

研究目的

1981年ころより、先天性ムコ多糖症の有効な治療法として骨髄移植が目ざされてきたが、近年急速に普及してきている。我々は、早期の骨髄移植がより大きな効果をもたらすことから、1991年より早期診断のためのスクリーニング法の検討を始めた。日本においては、全ムコ多糖症患者のうち、ムコ多糖症Ⅱ型がその半数を占めている。さらに、このⅡ型についての酵素補充療法の臨床治験がすでに米国で行われ、日本においても計画されていることから、当施設に通院しているあるいはしていたⅡ型患者18例について臨床記録を調べ、自然歴を検討した。

研究方法

I. ムコ多糖症スクリーニング

【検体】1か月児の濾紙尿を用い、ムコ多糖症のスクリーニングを検討した。

【方法】検体収集法：新生児病棟を退院時、スクリーニング検査のパフレットと検査用濾紙を配布し、検査希望者は1ヶ月検診時に尿を染み込ませた濾紙を持ってくるようにした。さらに、平成13年度は、スクリーニング参加施設の拡大を試み、一部の関連病院について、検査希望者自身に添付封筒に入れて当施設まで郵送する方法も試みた。

スクリーニング法：ジメチルメチレンブルー呈色反応にて+2SD以上のもの（1次スクリーニング陽性）については、さらに濾紙をコンドロイチナーゼA/Cで消化し、反応を行った（2次スクリーニング）。

消化後も正常値にならなかった乳児には、原尿を提出するよう指示し、ウロン酸測定と電気泳動を行った。

II. ムコ多糖症Ⅱ型の自然歴

当施設に通院しているあるいはしていたⅡ型患者18例について臨床記録を調べ、自然歴を検討した。

研究結果

I. ムコ多糖症スクリーニング

検体収集法については、1ヶ月検診時に尿濾紙を持ってきてもらう方法によると受検率はほぼ100%であったのに対して、郵送してもらう方法では約50%に低下した。

表1に、1995年1月から2001年12月までのスクリーニングの結果を示した。患者はまだ見つかっていない。コンドロイチナーゼA/C消化の2次スクリーニングにより、要精査検体を1/10に減らすことができた。

2001年の陽性検体について、男女比を見ると、男：女=1：2.6であった。

II. ムコ多糖症Ⅱ型の自然歴

18例のうち、複数の所見より、最重症型2例、重症型6例、中間型4例、軽症型4例、最軽症型2例と分類された。表2、3、4にまとめを示す。

考察

ジメチルメチレンブルー呈色反応によるムコ多糖症のスクリーニングは、ある程度の擬陽性、擬陰性の発生は免れない。より効果的な方法の開発が待たれる。検体収集法としては、1ヶ月検診時等の行事と関連づけて回収することが受検率を高める良い方

法であると結論された。

日本人においてムコ多糖症Ⅱ型患者が約半数を占め、またⅡ型のみがX連鎖性劣性遺伝形式をとることから、患者男女比は理論上3：1となる。女兒において擬陽性が多い理由は、外陰部の汚れが尿に混入するためと推測された。

知能障害が全く来ない最軽症型や軽症型、また、

来てもわずかである中間型については、酵素補充療法の効果が期待される。日本人のムコ多糖症Ⅱ型患者において、これらは全体の約半数以上を占めることが明らかにされ、スクリーニングによる早期発見と酵素補充による早期治療が期待される結果となった。

表1：ムコ多糖症スクリーニングの結果

年	検体数	1次スクリーニング陽性者数 (%)	2次スクリーニング陽性者数 (%)
1995	2,095	31 (1.5)	施行せず
1996	380	10 (2.6)	0 (0.00)
1997	950	29 (3.0)	0 (0.00)
1998	1,077	62 (5.6)	2 (0.19)
1999	1,523	59 (3.9)	7 (0.46)
2000	1,805	43 (2.3)	9 (0.50)
2001	1,425	40 (2.8)	6 (0.42)
総計	9,254	274 (3.0)	24 (0.26)

表2：全身所見

	発症年齢	初発症状	最終身長
重症型	<3歳	頭囲拡大 発達遅滞	5歳頃より成長が停止しはじめ、最終身長110~120cm
中間型	3歳~5歳	肝腫大 関節拘縮 その他	
軽症型	>5歳	関節拘縮	5歳頃より成長の減速が起こるが、その後も伸び、最終身長140~150cm

表3：精神神経障害

	発達の遅れに気付く	言語の喪失	周囲に無関心	痙攣	歩行不能
最重症型	3歳頃までに気付く	5歳までに言葉が減少	小学校低学年	小学校低学年	小学校低学年
重症型	4, 5歳頃までに気付く	5歳以降に言葉が減少	小学校高学年	小学校高学年	小学校高学年
中間型	小学校高学年で普通学級が無理になる				
軽症型	(-)				

表4：頭部MRI

	初期変化	中期~晩期変化
重症型 (知能障害あり)	脳室拡大	脳萎縮, 斑状変化, 小胞状変化
軽症型 (知能障害なし)	小胞状変化	斑状変化 → 脳室拡大

分担研究：今後導入すべき新しいマススクリーニング方法および新しい対象疾患に関する研究

遺伝性ムコ多糖症マススクリーニングの試験的研究と今後の方向性について

研究要旨

遺伝性ムコ多糖症の早期診断システムの確立を目的として、岐阜県の6ヶ月児尿を用いた試験的スクリーニングを継続して行った。本年度（2001.4-12）は12,320名をスクリーニングしたが、陽性例は見つかっていない。1993年10月から2001年12月までの結果は以下のとおりであった。1次スクリーニング数142,894検体、陽性は2,860検体（2.0%）、2次スクリーニングは2,178検体（再検率：76%）について行い、DMB法で再陽性となった219検体（0.2%）は、精査により1例（0.0007%）が陽性であった。陽性例として発見されたHunter病患者は骨髄移植治療を受けたが、骨髄の生着は見られなかった。早期診断システムの開発とともに多様な治療法開発が待たれる。

研究協力者

折居忠夫（中部学院大学人間福祉学部）
祐川和子、鈴木真弓、近藤直実
（岐阜大学医学部小児科）

研究目的

遺伝性ムコ多糖症の治療法は、骨髄移植が実施され、またいくつかの亜型については酵素補充療法の治療が進められており、効果が期待されている。発症前の早期治療がより効果的であることが示されているが、乳児期早期に診断されるムコ多糖症は極めて少なく、早期診断システムの開発が待たれている。1993年10月から岐阜県の6ヶ月乳幼児を対象としたスクリーニング法の試験的研究を行い、適性の検討を加えてきた。本年度までの結果と今後の方向性について考察した。

研究方法および対象

1. 岐阜県の神経芽細胞腫マススクリーニングシステムによって収集され、インフォームドコンセントが得られた6ヶ月乳幼児尿を、本年度は12320検体スクリーニングした。
2. 検査方法は、1次スクリーニングはDMB法にてGAGを測定し、クレアチニン比を算出した。GAGはマイクロプレート法にて測定した¹⁾。2次スクリーニングはDMB法とCPC沈殿/カルバゾール法を併用した。クレアチニンはJaffe法により測定した。

研究結果

1. 岐阜県の6ヶ月児尿によるスクリーニング
1993年10月から2001年12月までのスクリーニン

グ結果を表1に示す。検体数は年間約17,000あり、9年間で142,894名のGAGを測定した。1次スクリーニングでcut off値に設定した400 mg GAG/g クレアチニン以上を示した陽性数は2,860例（2.0%）であった。陽性者には採尿方法と容器を同封した尿再提出の依頼書を発送した。2,178例から再検尿が届き（再検率：77%）、1次スクリーニングと同じDMB法にてGAGを測定した。2次スクリーニングで再陽性を示した219例（0.2%）は、同一尿を用いてCPC沈殿/カルバゾール法にて精査を行い、最終的に1例の陽性例が認められた。

2. 陽性例の早期治療

2次スクリーニングで明らかに陽性であった症例は、生後8ヶ月時にMPS II型（Hunter病）と診断された。骨髄移植を希望されたが、家族にはドナー対象者はおらず、骨髄バンクへドナー検索を依頼した。2000年8月（生後9か月）時にバンクへドナー依頼書を提出し、最終的にドナーの同意が確認されたのが、2000年12月（1歳2か月）。翌年2月に移植の予定であったが、入院中に麻疹に罹患し、移植は3ヶ月延期された。5月（1歳7ヶ月）に漸く移植が実施されたが、残念な事に生着せず、拒絶されてしまった。

現在2歳4ヶ月になり、症状としては大きな頭、肝腫、特異顔貌が軽度に認められるが、明らかな知能障害は認められない。ただ浸出性中耳炎がでてきた。治療として再移植の道も考えられ、台湾の移植バンクに登録したところ、ドナーが見つかり、同意が得られている。Hunter病については酵素補充療法が開発され、現在アメリカでの認可待ちである。その結果により日本でも近く治療が実施される可能性もあり、現在治療法の選択を図っている。