

今後導入すべき新しいマススクリーニング方法として、現行新生児濾紙血によるマススクリーニングのうち、PKU、MSUD およびホモシスチン尿症の3種のアミノ酸代謝異常症、その他の有機酸代謝異常症などに TMS 法が有用かどうかを検討した。

また、今後導入すべき新しいマススクリーニング対象疾患について、(1) ムコ多糖症、(2) 有機酸代謝異常症・脂肪酸酸化異常症、(3) ウィルソン病、(4) 胆道閉鎖症を中心に、スクリーニング方法の基礎的検討、臨床的事項、パイロットスタディなどの研究を推進した。また、(5) その他のマススクリーニングの必要な疾患についても検討した。

2. 研究方法および研究結果

1) タンデム質量分析計 (TMS) による新生児濾紙血を用いたマススクリーニング法

現行新生児マススクリーニングで PKU、MSUD およびホモシスチン尿症の3種アミノ酸代謝異常症は、Guthrie 法を主体として実施され、一部の地域では高速液体クロマトグラフィ (HPLC) 法が導入されている。重松らは、有機酸代謝異常症・脂肪酸β-酸化異常症のマススクリーニングを新生児濾紙血に導入するためもあり、TMS 法にて、これら3種アミノ酸代謝異常を含めてマススクリーニングする方法を検討した。欧米をはじめ、近年、世界的に TMS 法が PKU などのアミノ酸代謝異常症、有機酸代謝異常症、尿素サイクル代謝異常症および脂肪酸酸化異常症マススクリーニングに普及してきている。TMS 自体の装置は比較的高価であるが、大量の検体を迅速かつ安価に処理することが可能であり、十分に応用可能であることを明らかにした。今後は、わが国において多くの施設が TMS を導入してスクリーニングへの応用を吟味し、世界に遅れないようにしなければならない。重松らは、162,800 名の新生児のパイロットスタディを実施し、アミノ酸代謝異常症7例 (シトルリン血症4例、PKU 2例)、有機酸代謝異常症10例 (プロピオン酸血症6例、メチルマロン酸血症2例、グルタル酸尿症 I 型2例)、尿素サイクル代謝異常症と脂肪酸β-酸化異常症数例ずつの発見をした。

2) 今後導入すべき新しいマススクリーニング対象疾患に関する研究

(1) ムコ多糖症

①スクリーニング適期とスクリーニング法について：岐阜県と大阪府で検討した。早期発見・早期

治療のために可能な限り新生児に近い時期がよい。新生児の血液と尿によるケタラン硫酸、ヘパラン硫酸、コンドロイチン硫酸およびデルマトン酸硫酸測定を ELISA 法によって実施する方法の検討を行った。マススクリーニングへ応用することが可能であることを示唆した。しかし、患者の発見に至っていない。大阪市大グループは、1ヶ月児尿濾紙によるジメチルメチレンブルー (DMB) 呈色反応を実施している。

②パイロットスタディ成績：1ヶ月児尿濾紙法により、約1万5千名のスクリーニングを行っているがまだ患児の発見に至っていない。岐阜県において、6ヶ月児尿を用いた成績では、1名の患者を発見している。

(2) 有機酸代謝異常症・脂肪酸β-酸化異常症
①スクリーニング法とスクリーニング適期について：新生児濾紙血を用いる TMS 法、4~6 生日の新生児尿を用いる GC/MS 法が実施された。

②パイロットスタディ成績：金沢、福井、島根および久留米の4施設において検討された。福井の重松らは、現在までに約162,800 例の新生児濾紙血を用いて TMS 法にて、6例のプロピオン酸血症、3例のメチルマロン酸血症、3例のⅡ型シトルリン血症、2例の中鎖アシル CoA 脱水素酵素欠損症 (MCAD)、2例の PKU が発見された。金沢の久原は、郵送された新生児濾紙尿を用いたパイロットスタディを実施している。ハイリスク児の検査であり、GC/MS 法では約1人/1,000 人の異常を検出している。久留米大の吉田らは、1996 年よりの7年間、39,172 名の新生児尿を用いて GC/MS 法にて、メチルマロン酸血症7例を含む29例の疾患児を発見している。島根医大の山口らは、有機酸代謝異常症のほかにも多くの脂肪酸β-酸化異常症を GC/MS 法にて発見した。

(3) ウィルソン病

①スクリーニング法とスクリーニング適期について：新生児濾紙血では累計178,965 名のパイロットスタディにて患児の発見に至らず、乳幼児血中 Cp 測定によるパイロットスタディは約6万検体のパイロットスタディにて9例の患児の発見があった。しかし、乳幼児の採血上の困難さがあり、乳幼児に採血してマススクリーニングすることの問題点もあり、3~5歳の幼児期の尿中 Cp 測定して、本症をスクリーニングする方法を採用してパイロットスタディを実施した。尿中 Cp 測定による本症のマススクリーニングのパイロットスタディにて、今年までに約8万検体を実施して、3名の患児発見の実績がある。

②Cp 測定法の抗体とキットについて：抗 Cp モノクローナル抗体による Cp 測定用キットを提供してきた会社（出光ーニッショー株式会社）が提供停止の方針を打出した。そのため、抗 Cp ポリクローナル抗体による免疫比濁法や ELISA 法によりパイロットスタディが実施された。抗体の安定性などの基礎的検討も実施され、有用性が確立された。

③幼児尿によるパイロットスタディ：北海道、札幌市、秋田市、東京都などで実施された。3年間約3万名のスクリーニングを実施し、1例の患者の発見があった。3歳児健診において希望者のみを対象としたが、いずれの地域においても約95%以上の受診率であった。

(4) 胆道閉鎖症

①スクリーニング法とスクリーニング適期について：松井らの開発した便色調カラーカード法を用いる。栃木県では母子健康手帳にカードを挟み込んで配布し、1か月健診時に担当医が回収する方法である。茨城県では母子健康手帳交付時あるいは出生届時に、カードを1か月用と2か月用の2枚を配布し、郵送法（費用自己負担）にて実施した。

②パイロットスタディ成績：栃木県では、86.9%が検査された。茨城県では、1か月児42.1%、2か月児32.5%であった。回収方法としては栃木方式が優れていた。しかし、生後1か月の時点ではn約15%の遅発型胆道閉鎖症の発見が困難であることも判明した。回収方法による受診率の向上を考慮すれば、栃木方式の方を採用する方法が良いと結論した。

(5) その他の疾患について

シリトン血症、ファブリー病、異染性ロイコジストロフィー症、Gaucher 病などがマススクリーニング対象疾患の候補に上がり、検討を開始したグループがあった。

3) 倫理面への配慮

本研究における採血、採尿等の実施に際しては、各施設において説明（説明書を渡し、口頭にて説明）を行い、同意を得た者に対して、スクリーニング検査を実施した。

3. 考察

1) TMS 法による新生児マススクリーニング法の導入について

TMS 法は、現在世界各国で導入されつつある。PKU、MSUD、ホモシスチン尿症のわが国現行アミノ酸代謝異常症を含めて、治療可能なプロピオ

ン酸血症やメチルマロン酸血症などの有機酸代謝異常症、脂肪酸酸化異常症、尿素サイクル代謝異常症およびその他のアミノ酸代謝異常症も発見が可能である。機器・装置が高価であるが、各スクリーニングセンターの導入により価格低下も予測されること、大量検体が自動的に迅速に処理されることによりスクリーニングが安価に行われることが可能となる。近い将来、世界に遅れないように Guthrie 法や HPLC 法に代わって導入すべきであると結論した。

2) 今後導入すべき新しいマススクリーニング対象疾患に関する研究

(1) ムコ多糖症

骨髄移植を可能な限り早期に実施し中枢神経障害発症予防が必要であり、さらに、欧米を中心に酵素補充療法が開発され治療の進展が期待される。DMB 法の新生児尿あるいは1か月児尿の検討、あるいは他の方法の開発の必要性など新たな展開となってきている。今後の研究の継続が必要であると結論する。

(2) 有機酸代謝異常症・脂肪酸酸化異常症

新生児尿を中心に GC/MS 法、新生児濾紙血による TMS 法が研究され、さらに、パイロットスタディが進められてプロピオン酸血症、メチルマロン酸血症などの治療可能な疾患が数多く発見されてきた。近年、世界的に PKU などのアミノ酸代謝異常症も新生児濾紙血を用いる TMS 法にてマススクリーニングすることが可能である。他のアミノ酸代謝異常症、尿素サイクル代謝異常症、有機酸代謝異常症、脂肪酸酸化異常症など幅広い先天代謝異常症のマススクリーニングにも TMS 法が普及しつつあり有用である。TMS 法により、発見されない疾患について、GC/MS 法を採用する方向がよいと結論した。

(3) ウィルソン病

3歳児を中心とする乳幼児尿を用いて、尿中 Cp 測定を指標として検討することとした。活性型 Cp 測定とポリクローナル抗体による Cp 測定が行われた。活性型 Cp 測定キット提供会社の経営上の理由による提供停止の通告があり、比濁法や ELISA 法測定用の Cp 抗体の作製に着手し使用可能となった。尿中 Cp 測定によるウィルソン病患儿の発見されたことにより、本法の有用性が確立された。早期に導入する必要があると結論した。さらに、今後のパイロットスタディ成績が期待される。遺伝子診断によるスクリーニング法の検討も重要である。本研究班において、スクリーニング陽性者の確定診断法と治療指針を策定した。

(4) 胆道閉鎖症

松井らにより開発された便色調カラーカード法は確実に広がっている。本症は、生後 60 日以内に手術することが大切であるとされる。したがって、母子健康手帳にカラーカードを差し込んで配布し、1 か月検診時に担当医に持参する方法が優れていると結論された。ただし、遅発例が約 15% 存在することがあり、1 か月児検診時における発見率は約 85% ということになる。本法は安価で簡便である。早急なる全国実施が望まれる。

このほかに、他のライソソーム病のスクリーニング法などについて検討した。今後は、さらに開発法の検討を進め、パイロットスタディを精力的に進める必要がある。

4. 結論

1) 新生児マススクリーニングへのダンデム質量分析法 (TMS) の導入について

世界各国において TMS が導入され広く普及しつつある。現行の新生児マススクリーニング法の対象疾患のほかに、多くのアミノ酸代謝異常症、尿素サイクル代謝異常症、有機酸代謝異常症およ

び脂肪酸 β -酸化異常症などの早期発見、早期治療が可能となる。わが国においても至急導入すべきであり、世界に遅れないようにすべきである。

2) 新しい対象疾患について

① 1 か月児及び 2 か月児を対象として便色調カラーカード法は、簡便であり行政的に至急導入する必要がある。② ウィルソン病は、3~5 歳児の尿を用いて尿中セルロプラスミン測定する方法を採用し、3 歳児健診を中心に早期導入すべきである。③ 有機酸代謝異常症や脂肪酸 β -酸化異常症は、TMS 法導入により主としてスクリーニングされ得る。ハイリスク児については、新生児期、1 か月児を中心に GC/MS 法にて尿を用いてスクリーニングする方法がよいと結論した。④ ムコ多糖症については、発症前の発見が重要であり、新生児~1 か月児を対象に血液あるいは尿を用いて MPS (ムコ多糖各種) を検出する方法を根本的にさらに検討の必要があると結論した。⑤ その他、シトリン血症、リビドーシス、ライソソーム病などのマススクリーニングの開発の必要性が議論され、今後の継続的な研究課題となった。

分担研究：マスキリーニングの効率的実施及び開発に関する研究

北海道における 3 歳児健診を利用したウィルソン病スクリーニング（第 3 報）
-ラテックス免疫凝集比濁法を用いた尿中セルロプラスミン濃度自動分析法のスクリーニング導入-

研究要旨

平成 14 年度に、我々が開発したラテックス免疫凝集比濁法に基づく尿中セルロプラスミン (Cp) 濃度自動分析法を用いて、3 歳児健診時の尿検査検体を用いたウィルソン病 (WND) スクリーニングを実施した。今年度のスクリーニングは、実施地域を昨年度までの道央圏 3 市に加え、新たに 5 市 4 町の協力のもと、全道の 3 歳児健診対象者総数の 4 分の 1 にあたる 7,000 名が居住する地域で実施した。昨年度の WND 患者と健常人の尿中 Cp 濃度分布の比較検討から cut-off 値を 45ng/mg Cr.と設定し、初回検査・再検査・再々検査を実施した。最終的に 3 回とも尿中 Cp 濃度に異常低値が認められた検体について、コンサルタント医師に相談の上、精密検査勧奨を実施した。平成 15 年 4 月から平成 15 年 12 月 26 日までの 3 歳児健診受診者総数は 3597 名であり、そのうち 3254 名が WND スクリーニング検査を受診し、受診率は 90.5%となり、道民の本検査に対する関心の高さが改めて明らかとなった。全受診者の平均 Cp 濃度は、 167 ± 136 ng/mg Cr.であった。再検査数は 162 名、再検査率は 4.98%であった。全再検査対象者の平均 Cp 濃度は 29.7 ± 60.3 ng/mg Cr.となり、正常と判定された群と比較し有意な ($p < 0.001$) 濃度低下が認められた。再検査の結果、127 再検査検体のうち 119 検体が正常と判定された。しかし、8 検体は平均 Cp 濃度が 56.0 ± 71.0 ng/mg Cr.と再度低値となり再々検査対象となった。再々検査対象者のうち、現在までに 7 名について再々検査を実施した。再々検査の結果、6 検体が正常と判定されたが、Cp 濃度が 12.9ng/mg Cr.となった 1 名について、コンサルタント医師に相談の上、精密検査受診勧奨を行った。

研究協力者

中山憲司、齋藤明子、西村一彦、桂英二、鈴木智宏、孝口裕一、加藤芳伸、澤田幸治、本間寛
(北海道立衛生研究所)
窪田満、小林邦彦 (北海道大学医学部小児科)
藤枝憲二 (旭川医科大学小児科)
遠藤満智子 (函館五稜郭病院)
神崎節夫、伊丹均、大竹明彦 (株式会社ナスカ)
池上潔、敦賀靖朗 (DADE Behring 社)
青木継稔 (東邦大学医学部第 2 小児科)

Behring 社と北海道立衛生研究所（道衛研）の産官 3 機関の共同研究で開発したラテックス免疫凝集比濁法に基づく尿中 Cp 濃度自動分析法³⁾を導入して、3 歳児健診時の尿検査検体を用いた WND スクリーニングを実施したので報告する。

研究方法

本研究は、「北海道立衛生研究所ヒトを対象とする医学研究に関する規程」に従った。

本 WND スクリーニングは、平成 15 年 4 月 1 日から平成 15 年 12 月 26 日まで、岩見沢・小樽・北広島・江別・恵庭・石狩・函館・帯広の 8 市と、愛別・当麻・東川・比布の 4 町で実施した。本スクリーニングのシステム概略を図 1 に示した。各市町から発送する 3 歳児健診受診案内書の中に、WND の解説書と検査申込用紙、そして採尿容器セットを同封し配布した。採尿容器には、鈴木らの方法⁴⁾に従いグルコン酸クロルヘキシジン（ヒピテン）を塗布した濾紙を入れた。3 歳児健診当日、自宅にて尿を採取して貰い、検査会場で WND 検査申込用紙と共に尿検体を回収した。回収後、所轄の保健センター等から尿検体を冷蔵宅配便で道衛研まで送付し、尿中 Cp 濃度を測定した。

尿中 Cp 濃度の分析は、(株)ナスカ社より既に販売を開始した、尿中 Cp 濃度自動分析用キット (Lot No. CP006 及び CP007) を購入し、使用した。尿

研究目的

ウィルソン病 (WND) は、およそ 3 万人に 1 人の割合で発症する先天性銅 (Cu) 代謝異常症である。本疾患は、日常生活において摂取される Cu が正常に排泄されず、肝臓・腎臓・脳に多量に蓄積し重い肝障害 (肝炎・肝硬変) や中枢神経障害を起こす病気である。しかし、Cu キレート剤を用いて Cu の排泄を促進することにより、重篤な症状を呈する前に治療が可能なることから、本疾患の早期診断法の開発・導入が強く望まれている。WND の早期診断法に関する現在までの研究から、幼児及び学童健診時の尿検体を用いた尿中セルロプラスミン (Cp) 濃度を指標とした方法が早期診断法として最も有望視されている^{1,2)}。

本年度は、昨年度に (株) ナスカ社及び DADE

中銅 (Cu) 濃度の測定には、シノテスト社クイックオート ネオ Cu 測定キットを用いた。正確性を上げるための尿中クレアチニン (Cr.) 濃度の測定は、和光純薬工業の L タイプワコー・クレアチニン F (F-DAOS 法) を用いて測定し、Cr.濃度補正を行った⁵⁾。自動分析装置は、DADE Behring 社の Dimension Xpand を用いて上記 3 項目を同時測定した。尿中 Cp 及び尿中 Cu 濃度の自動分析に関しては、DADE Behring 社のオープンチャンネルフレックスを用いて測定キットを充填した。

尿中 Cp 濃度の測定は、N-Protein Standard SL (DADE Behring 社) を標準溶液として、検量線を作成した。コントロール溶液は、N/T Protein Control SL/L (DADE Behring 社) を用いた。標準溶液及びコントロール溶液の希釈には、(株)ナスカ社の NS オート共通希釈液を用いた³⁾。

スクリーニングでの cut-off 値は、昨年度の検討³⁾から尿中 Cp 濃度については 45ng/mg Cr. に設定して、初回検査・再検査・再々検査を実施した。尿中 Cu 濃度の cut-off 値は 500ng/mg Cr. に設定し、極めて顕著な増加が認められる検体のみ抽出した。初回検査・再検査・再々検査の 3 回の検査共に異常が認められる検体について、それらのデータを基にコンサルタント医師に相談の上、精密検査勧奨を実施した。

精密検査の結果、WND が極めて疑わしい幼児に関しては、WND 病因遺伝子 ATP7B の遺伝子診断、或いは、肝生検による肝組織中 Cu 濃度測定による確定診断を実施した。WND 病因遺伝子 ATP7B の遺伝子診断に関しては、全血より DNA を抽出し、札幌市衛生研究所で開発された Direct sequence 法⁶⁾を改変し、ABI 社 Prism 377 DNA sequencer 及び 310 Genetic analyzer を用いて全 exon の遺伝子解析を行った。肝生検による肝組織中 Cu 濃度の測定は、肝組織を秤量し、硝酸・過塩素酸系による湿式灰化を行った後、0.1M 硝酸で定容し、Hewlett Packard 社 4500 ICP-MS を用いて分析を行った。

得られた結果の統計処理は、one-way ANOVA で解析した。

結果と考察

平成 14 年度に我々が開発した、ラテックス免疫凝集比濁法に基づく尿中 Cp 濃度自動分析法³⁾を用いて、3 歳児健診時の尿検査検体を用いた WND スクリーニングを実施した。今年度のスクリーニングは、実施地域を昨年度までの道央圏 3 市に加え、新たに 5 市 4 町の協力のもと、全道の 3 歳児健診対象者総数の 4 分の 1 にあたる 7,000 名が居住する地域で実施した。

平成 15 年 4 月から平成 15 年 12 月 26 日までの 3 歳児健診受診者総数は 3597 名であり、そのうち

3254 名が WND スクリーニング検査を受診した。受診率は 90.5% に達し、3 年続けて 90% 以上の高受診率が確認された。この受診率の高さは、北海道における本検査の強いニーズと関心の高さを示すものであると推測された。

図 2 に示した通り、全受診者の平均 Cp 及び Cu 濃度は、それぞれ 167 ± 136 ng/mg Cr. と 10.9 ± 161 ng/mg Cr. となった。初回検査で 3092 名が正常と判定されたが、162 名が要再検査対象となり、再検査率は 4.98% となった。尿中 Cp 濃度が cut-off 値を下回ったものが 151 名、その内、尿中 Cu 濃度も高値であったものが 3 名含まれていた。また、尿中 Cu 濃度のみが cut-off 値以上を示したのは 11 名で、最高尿中 Cu 濃度は、7392 ng/mg Cr. に達した。再検査対象数は 162 名、全再検査対象者の平均 Cp 濃度は 29.7 ± 60.3 ng/mg Cr.、平均 Cu 濃度は 120 ± 702 ng/mg Cr. となり、それぞれ正常と判定された群と比較し有意な ($p < 0.001$) 濃度低下と上昇が認められた。

昨年度の検討³⁾から、自動分析法の再検査率は 1% 台に収まるものと予想していたが、実際は従来法の ELISA 法と変わらない 4.98% となった^{5,7)}。そこで検査データを検討したところ、平成 14 年度に既に採尿容器を配布した道央圏 3 市に比べ、平成 15 年度に新たに発注した採尿容器を配布した地域で再検査率が高くなる傾向が認められた。更に、新規実施地域の保護者からヒビテンを散布してある濾紙に着色が認められるとの問い合わせ相次いだことから、実際に容器を回収したところ、ヒビテン濃度に極端なムラがあることが判明した。製造業社の調査の結果、平成 14 年の製造工程と平成 15 年の製造工程に違いがあることが判明し、製造工程違いによってヒビテン濃度の散布ムラが生じ、安定したヒビテンの効果が発揮されなかったために再検査率が高まったと推測された。自動分析法の真の再検査率の安定性についての検討は、次年度に持ち越しとなった。

再検査を実施した 127 名の内 119 名が、正常と判定された。しかし、8 名については要再々検査対象となった。尿中 Cp 濃度が cut-off 値を下回ったものが 6 名、その内 1 名に尿中 Cu 濃度高値が認められた。また、残りの 2 名については、尿中 Cu 濃度が 564 及び 2112 ng/mg Cr. になり、要再々検査対象となった。初回検査と同じく、再検査においても正常と判定された群と要再々検査群の間には、尿中 Cp 濃度においては有意な ($p < 0.001$) 低下が、尿中 Cu 濃度には有意な ($p < 0.001$) 上昇が認められた。

再検査対象者のうち、現在までに 7 名について再々検査を実施した。再々検査の結果、尿中 Cu 濃度の高値を示す検体は認められず、6 名が尿中 Cp 濃度が cut-off 値以上となり正常と判定された。しかし、1 名が尿中 Cp 濃度が 12.9 ng/mg Cr. となり、

顕著に尿中 Cp 濃度の cut-off 値を下回った。そこで、コンサルタント医師に相談の上、精密検査受診勧奨を行った。

精密検査勧奨を実施した男児の精密検査結果は、血清 Cp 濃度 27mg/dl、血清 Cu 濃度 116 μ g/dl、尿中 Cp 濃度 72ng/mg Cr.、尿中 Cu 濃度 0.0ng/mg Cr. となり、更に肝機能および腎機能も正常であった。精密検査実施病院小児科担当医師とコンサルタント医師との協議の結果、本精密検査対象児は正常と判定された。

本年度は、過去2年間の道央圏3市を対象とした WND パイロットスクリーニング^{5,7)}の経験を生かして、スクリーニング実施地域を拡大し、最終的に8市4町、年間3歳児健診対象者数およそ7000名が居住する地域で、WND スクリーニングを実施した。それぞれの市町の3歳児健診対象者数は年間およそ3000名からおよそ20名まで、また実施回数も毎週実施から年3回実施までと、対象者数も実施形態も異なる複数の地域での実施となった。しかし、全ての地域で円滑なスクリーニング運営を実践出来たことは、過去2年間に得た経験により構築された3歳児健診を利用した WND スクリーニング運営システム(図1)が、他の都府県でも十分に機能するシステムであると考えられた。また、産官共同研究で開発された(株)ナスカ社の尿中 Cp 濃度自動分析法キットの大量生産、大量販売の準備が整った現在、一日も早い本法の各自治体への導入と全国規模での実施を切に願うものである。

北海道における WND スクリーニングの強いニーズと関心の高さから、道衛研としても今後も道民の要望に応じていく必要性を痛感しており、検査体制の強化、更には道衛研のホームページ上(<http://www.iph.pref.hokkaido.jp>)や道内各保健所及び各市町村の保健センターなどで、WND スクリーニングに関する啓蒙活動を展開し、本検査の普及、更には恒常的な検査の実施に努めていきたいと考えている。

謝辞

今年度の WND スクリーニング研究事業にご協力を賜りました、北海道岩見沢保健所(柳瀬道子係長、木村浩男所長)、小樽市保健所(藤井千恵子課

長、斉藤勝衛課長)、北広島市役所保健福祉部(白坂亜紀保健婦、影久真美保健婦)、江別市保健センター(池田知子主査、小野景子保健婦、白石ゆかり保健婦)、石狩市総合保健福祉センターりんくる(廣瀬芳江主査、丹羽美穂保健師)、恵庭保健センター(阿部隆課長、高橋明子主査)、帯広市保健福祉部(下川原和子副主幹、堀田真樹子係長)、北海道帯広保健所(和田聖一課長)、市立函館保健所(沖本勉課長、藤山美津子係長)、北海道渡島保健所(多田文朗課長、木村千都子課長)、愛別町役場保健福祉課(三谷絵理保健婦)、当麻町健康課(国松淑子保健婦長)、東川町保健福祉課(坂井直志課長、片山孝司課長補佐、伊藤和代保健婦)、比布町保健センター(大谷浪子補佐、山本亜希子保健婦)、北海道上川保健所(中川忠則係長)に深謝申し上げます。

文献

- 1) 清水教一他：日本マス・スクリーニング学会誌、1997; 7, 107.
- 2) 山口之利他：日本マス・スクリーニング学会誌、1998; 8, 3.
- 3) 中山憲司他：平成 14 年度厚生科学研究費補助金(子ども家庭総合研究事業)「マススクリーニングの効率的実施及び開発に関する研究」報告書、2004; 106.
- 4) 鈴木健他：日本小児科学雑誌、2001; 105, 846.
- 5) 中山憲司他：平成 13 年度厚生科学研究費補助金(子ども家庭総合研究事業)「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」報告書、2002; 145.
- 6) 野町祥介他：日本マス・スクリーニング学会誌、2001; 11, 41.
- 7) 中山憲司他：平成 14 年度厚生科学研究費補助金(子ども家庭総合研究事業)「マススクリーニングの効率的実施及び開発に関する研究」報告書、2004; 90.

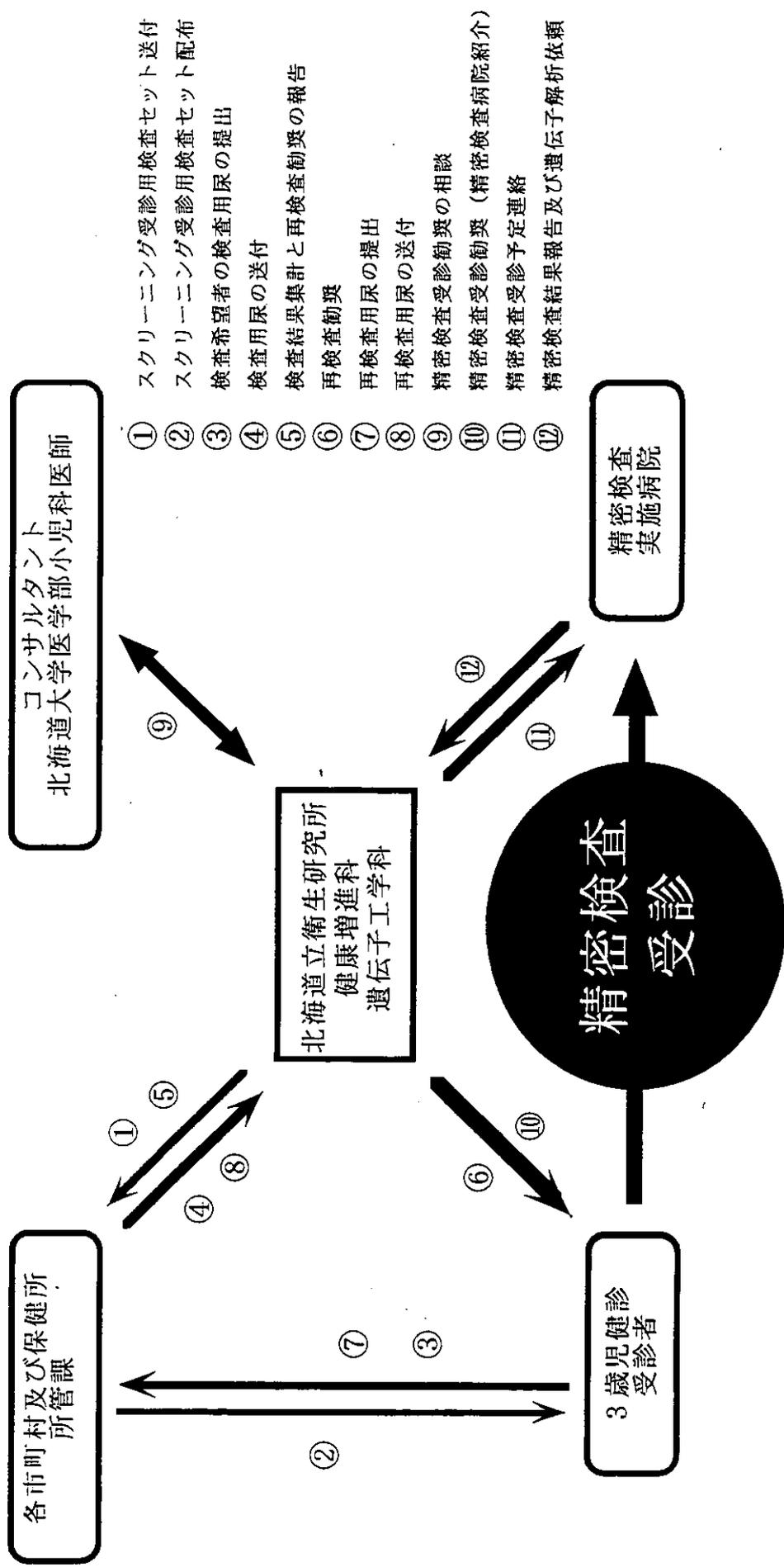


図 1 : 北海道における 3 歳児健診を利用したウイルソン病のスクリーニングシステム概略図

初回スクリーニング

(n = 3254, 受診率 = 90.5%)

Cp濃度 : 167 ± 136 ng/mg Cr.

Cu濃度 : 10.9 ± 161 ng/mg Cr.

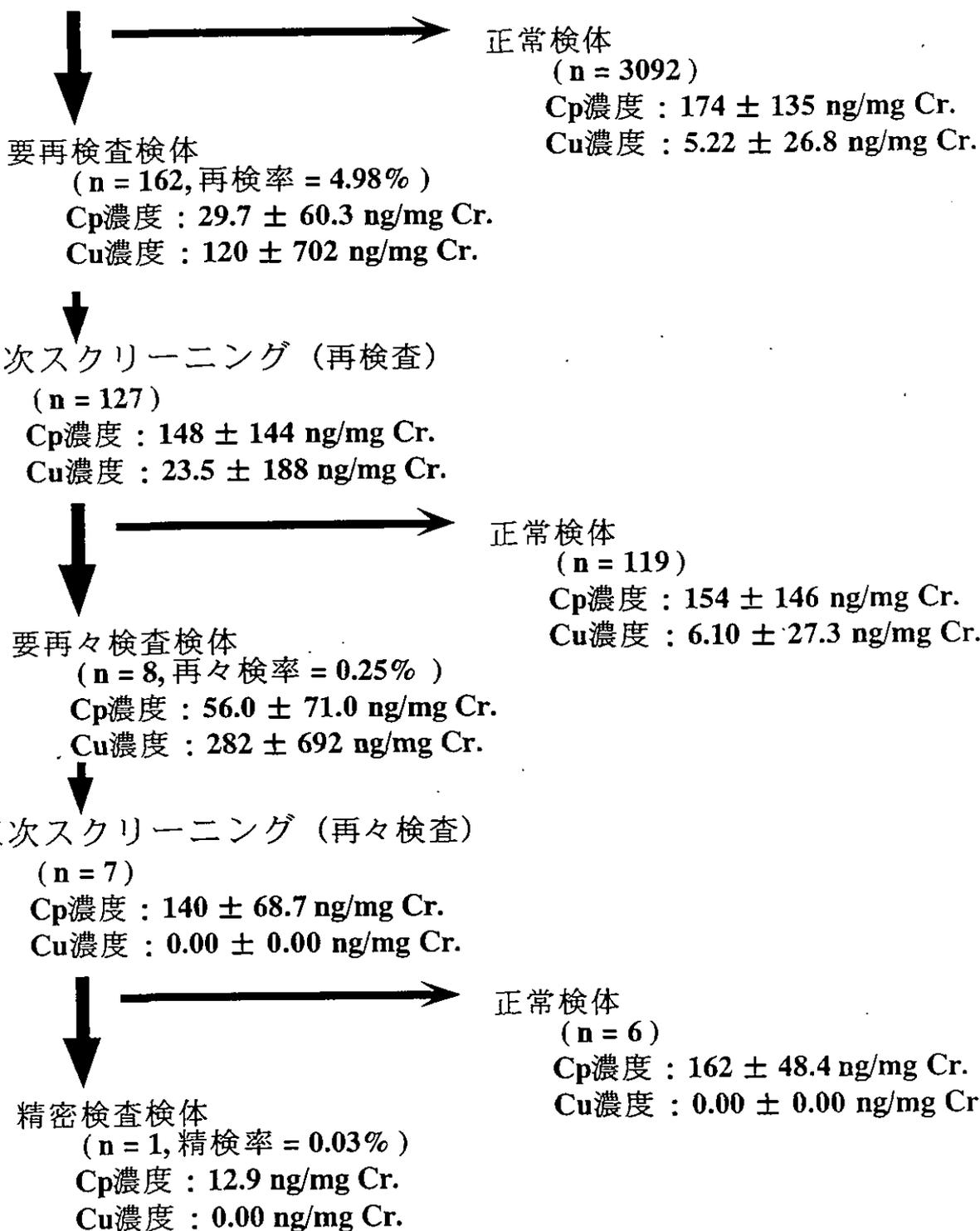


図 2 : 北海道における平成15年度の
ウィルソン病スクリーニングの流れ

研究要旨

秋田市3才児健診受検者を対象に、一般尿検査に使用した検体を用いて尿セルロプラスミン測定によるウイルソン病マスクリーニングを実施した。受検者は 1999 年4月から 2002 年 12 月まで、3才児健診受検者の 97.3%にあたる 9,313 名であった。陽性は 18 名あったが精査によりウイルソン病の発見には至らなかった。尿セルロプラスミンは不安定性が問題だが季節による測定値の有意な変動はなかった。高い受検率が得られ、また受検者の高い関心が得られた。本方法は、種々の問題を克服できれば自治体単位での実施が可能と思われた。

A. 研究目的

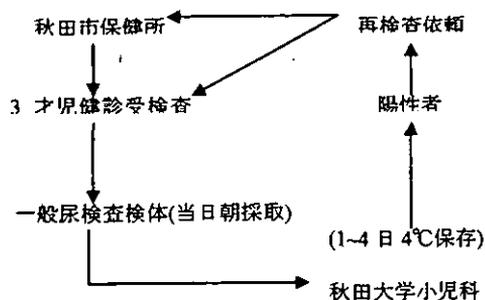
ウイルソン病は約 3 万 5 千人に 1 名の頻度で発症する遺伝性疾患である。すでにその治療法は確立しているため、発症前に治療を開始することができれば予後の著明な改善が可能となる。早期発見のために血中セルロプラスミン測定、尿中銅測定、遺伝子検査など種々のスクリーニング法が試みられたが、就学前の多くの小児を対象にスクリーニングすることが可能な検査法として尿中セルロプラスミン測定法が考案された。すなわちウイルソン病患者では血中と同様に尿中セルロプラスミンも低下していることが見出された。

現在、自治体単位で行われている 3 才児健診の受検率は全対象者の約 90%であり、その健診では尿検査が行われているのが通常である。この尿を用いてウイルソン病のマスクリーニングができれば多くの対象にウイルソン病のマスクリーニングが可能となる。今回、秋田市で行っている 3 才児健診の受検者を対象として尿を用いるウイルソン病マスクリーニングを実施してその有用性、実際上の問題点などを検討した。また秋田県全体で実施する場合の問題点を検討した。

B. 研究方法

1999 年4月から 2002 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先だつて郵送でウイルソン病マ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た検体の残りを、同意を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セルロプラスミン値を測定した。2000 年1月からは安定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、セルロプラスミン値はニッショーより提供された測定キットを用いて測定を行った。初回値が低値($\leq 15\text{ng/mgCr}$)を示したものを陽性として再検査を依頼した(図1)。

図1 秋田市3才児健診におけるマスクリーニング



C. 研究結果

1999年4月から2002年12月まで秋田市での3才児健診の対象者は10,627名あり、うち健診を実際に受検したものは9,575名であった。そのうち本検査を受けたものは9,313名(健診対象者の87.6%、全受検者の97.3%であった(表1))。

表1 ウイルソン病MS検査受検者数

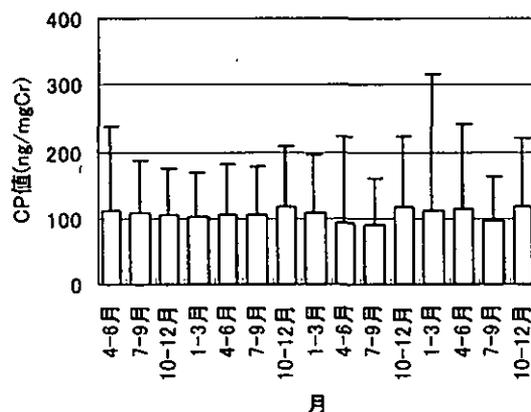
月	対象者	3才児健診	MS受検	%
1999.04				
/	2,072	1,884	1,828	88.2%
1999.12				(97.0%)
2000.01				
/	2,838	2,597	2,551	89.9%
2000.12				(98.2%)
2001.01				
/	2,834	2,444	2,365	83.5%
2001.12				(96.8%)
2002.01				
/	2,883	2,650	2,569	89.1%
2002.12				(96.9%)
計	10,627	9,575	9,313	87.6% (97.3%)

測定値は1999年4月から2000年12月まで対象者が4,379名あり平均107.7 ng/mgCr、標準偏差83.9 ng/mgCrであった。2001年1月から12月までは対象者2,364名で平均102.3 ng/mgCr、標準偏差101.4 ng/mgCr、2002年1月から12月まで対象者2,569名で平均109.3 ng/mgCr、標準偏差139.4 ng/mgCrであった。

尿中セルロプラスミン値は不安定であり、特に温度など保存状態の影響が大きいと予想される。健診尿は朝尿を採取し午後の健診に提出するのが一般的である。気温等の影響をみるため季節別の測定値を比較したが有意な変動は見られなかった(図2)。

1999年4月から2002年12月の間に18名の陽性者があり尿セルロプラスミン値の再検査と血中セルロプラスミン値と肝機能検査を行なった。そのうち2名は検査が未施行であるが、他の16名はすべての再検査セルロプラスミンが正常であり、他の検査も正常値でありウ

図2 尿CP値の季節変動



イルソン病は発見されなかった。

マススクリーニング実施中の健診を担当する保健士から以下の感想が得られた。1)本検査に対して高い関心が寄せられ他の自治体からの問い合わせもあった。2)高い同意取得率が得られ高い受検率が得られた。

秋田県全体での実施に関して各自治体にアンケート調査して問題点を検討した。秋田県は9市、50町、10村の自治体が存在し、年間計383回の3才児健診が実施されていた。人口の少ない自治体では1回の健診対象者が数名で行われているところもあった。このアンケート結果により以下の問題が考えられた。1)検体の安定性を確立すること。2)検査機関での精度管理のために1回の測定数をどうやって確保するのか。3)多くの保健士の教育をどうするのか。

D. 考察および結論

尿セルロプラスミン測定でのウイルスン病マススクリーニングを試みたが患者発見には至らず有用性は不明であった。しかし種々の問題を克服できれば全国レベルでの実施が可能と思われた。

E. 謝辞 本研究にご協力くださいました秋田市保健所保健予防課・保健士の方々に深謝いたします。

分担研究: マスクリーニング方法及び新しい対象疾患に関する研究

尿によるウィルソン病のスクリーニングに関する研究(第 6 報)

研究要旨

ウィルソン病（以下 WD と略す）は薬物療法が有効で治療可能な疾患であるが、診断が遅れて肝障害や神経症状などの後遺症を残す症例が現在も少なくなく発症前に診断する必要がある、マス・スクリーニングの対象として取り上げられるべき疾患と考えられている。これまで我々は、抗ヒトセルロプラスミン（以下 CP と略す）モノクローナル抗体を用いた ELISA 法による尿 CP を対象としたウィルソン病スクリーニングについて検討し、これまでの成績について報告してきた。

わが国では学校保健法や母子保健法により幼小児の検尿が義務付けられており、これらの何れかのシステムを利用すれば全国規模での WD のスクリーニングの普及が可能になると考え、我々は本法を用いた小学生低学年および 3-5 歳児約 6 万 5 千名を対象とした試験的スクリーニングを行い 2 名の患者を発見し、その有用性を証明した。今後、本法を用いて全国規模で WD スクリーニングが広く普及されれば、多くの患者発見につながると考えている。

研究協力者

北川照男 (東京都予防医学協会)
鈴木 健 (")
大和田操 (日本大学総合科学研究所)

研究目的

これまで、尿 CP を ELISA 法で測定する WD スクリーニングを研究してきた。そして、尿 CP の安定性、および健常人と WD 患者の尿 CP 値、血液 CP 値を測定して患者診断のためのカットオフ値を検討すると共に、尿と血液の CP 値の相関関係や尿銅値など様々な基礎的事項について検討してきた。

この結果、本法が WD スクリーニングに適していると結論されたので、小学生低学年の児童約 5 万名と 3~5 歳の幼児 1 万 5 千名の早朝尿を用いた試験的な WD スクリーニングを実施して 2 名の WD 患者を発見した。

また検体の大量処理を目的として、我々が開発した ELISA 法に代わり得る Latex 免疫比濁法について検討した。

研究方法および材料

1. 尿 CP の安定性

- 1) グルコン酸クロルヘキシジン（以下 CHG と略す）を添加した容器および無添加の容器にそれぞれ尿を入れて、室温並びに 4℃ で 2 週間保存して尿 CP の経時的変化を測定し、尿 CP の安定性を検討した。
- 2) 検査施設から離れた地域に住む子どもの尿を郵送で受けとり検査する場合を考慮して、77 例の健康対照者の尿を都内各地から協会に郵送し、その尿 CP を測定した。
2. WD 患者 41 例および対照者幼児 28 例(男児 12 例、女児 16 例)、小中学生 70 例(男児 21 例、女児 49 例)、成人 98 例(男性 76 例、女性 22 例)の尿 CP を測定し、それぞれの値について比較した
3. WD 患者 19 例について血清と尿を同時に採取して CP 値を測定し、両者の相関関係を求めた。
4. 各種腎疾患患者 10 例の尿 CP と血清 CP を測定して、尿 CP に及ぼす各種腎障害の影響を検討した。
5. 健康幼児 10 例、小中学生 51 例、15 歳以上の成人 66 例および WD 患者 44 例の尿銅を測定し、比較した。
- 6 健康診断のために採尿された小学生の早朝

尿を対象として、平成10年22,639名、平成11年度26,180名、合計48,819名の試験的スクリーニングを行なった。

- 東京都内の4市の自治体の3歳児健診で採尿された尿11,239検体、および平成12年から15年の間に小児科医会会員の診療施設を受診した3歳から5歳の尿3,350検体について尿CPを測定した。
- 抗ヒトポリクローナル抗体を使用したLatex免疫比濁法(Latex Turbidity Immunoassay)とELISA法で測定した尿CP値を比較検討した。

研究結果

1. 保存条件による尿の安定性

1) CHGを添加せずに尿を室温に放置した場合は3日目に平均72%、5日目には50%までに減少したが、CHGを添加した容器に入れて放置した場合は3日目で平均81%、5日目で72%と比較的安定性が保たれていた(表1)。

4℃に保存した場合は、CHGを添加した場合としない場合との間に尿CPの安定性には殆ど差が見られなかった(表2)。

2) 郵送による尿CPの変化

普通の容器に尿を入れて郵送し検査室に到着後4℃に保存した場合は、3日目で平均87%であったが一部22%まで低下したものがあり、5日目は平均80%であったが一部は16%に低下した。これに対して予めCHGを添加して郵送し、到着後4℃で保存した場合は、3日目は86-117(平均100%)、5日目になっても73-116%(平均95%)であり、CHG無添加よりは良好な結果であった(表3)。

2. WD患者および年齢グループ別健康対照者の尿CP値

健康対照者のうち、3歳以上6歳未満28例の尿CP平均値は 99.3 ± 77.7 ng/mg Cr、6歳以上15歳未満の小中学生70例の尿CP平均値は 112.3 ± 66.4 ng/mg Cr、15歳以上60歳未満の成人の尿CP平均値は 144.4 ± 77.0 ng/mg Crであり、加齢とともに尿CP値が上昇する傾向にあったが、男女間には余り差が認められなかった。これに対して、8歳以上51歳未満のWD患者41例の尿CP平均値は 8.2 ± 9.1 ng/mg Cr

と極めて低値であり、健康対照者と統計学的に明らかな有意差を認めた(表4)。

3. 血液と尿CPの相関関係

健康成人40例と尿蛋白や血尿を認めないWD患者19例の血液と尿CPの相関関係は、 $r=0.846$ と正の相関が認められた。また、WD患者の血液CP値は健康対照者よりも統計学的に有意の差を持って低値を示していた(図1)。

4. 各種腎障害における尿CP値

糸球体疾患5例では $817.8 \sim 1383.4$ ng/mg Crで明らかな高値を示し、これに対して糸球体疾患以外の各種腎疾患5例の尿CP値は $67.6 \sim 8103.6$ ng/mg Crで、低い値から高い値まで幅広く分布していた(表5)。

5. WDおよび健康対照者の尿銅値

健康幼児10例の尿銅値は 88.3 ± 34.4 ng/mg Cr ($44.3 \sim 156.7$ ng/mg Cr)、小中学生51例の尿銅値は 73.9 ± 39.4 ng/mg Cr ($24.1 \sim 211.0$ ng/mg Cr)、15歳以上の成人の尿銅値は 48.7 ± 28.6 ng/mg Cr ($17.9 \sim 161.0$ ng/mg Cr)と加齢とともに減少する傾向が見られたのに対して、WD患者では 1222.3 ± 1523.3 ng/mg Cr ($117.5 \sim 5726.0$ ng/mg Cr)の極めて高い値を示していた(表6)。

6. 小学生での試験的WDスクリーニング

平成10年および11年に行った児童のスクリーニングは、合計48,819名であり、一次スクリーニングで陽性を示し再採尿を依頼したのは423例(0.87%)であった。2次検査も陽性となり精密検査を依頼したものは41例で、そのうち精密検査を受診したものが36例(精検受診率88%)で、この中から2例の患者を発見した。この2例について札幌市衛生研究所に依頼して遺伝子診断を行なったところ、1例はExon8のR778LおよびExon9のA803Tの複合ヘテロ接合体であり、他の1例はExon18 D1267N, Exon18 D129N変異の複合ヘテロ接合体であった(表7)。

7. 3歳児健診受診者及び小児科医会会員の施設受診者の試験的WDスクリーニング成績

1) 3歳児健診受診者の尿でのWDスクリーニング結果は、平成16年1月20日現在11,239名の尿を検査し、その平均は 115.5 ± 78.4 ng/mg Crで、cut-off値以下を示し再採尿

を依頼したのは164例(1.46%)で、二次検査で陽性を示したので精密検査を依頼したのは6例であり、精密検査の結果すべて正常と診断された(表8)。

この試験的 WD スクリーニングの受診率を調べたところ、3歳児健診受診者6,475例のうちインフォームドコンセントが得られ本スクリーニングを受けたものは6,297例であり、その受診率は97.3%であった(表9)。

2) 小児科医会会員の施設受診者でWDの検査を希望したものは3,350名で、尿CPの平均値は $118.1 \pm 74.2 \text{ ng/mg Cr}$ であり、そのうち30例については再採尿を依頼し、二次検査の結果は東邦大学大橋病院小児科で精査中の1例を除き、他はすべて正常であった。

8. Latex免疫比濁法とELISA法による尿CP値の比較

3歳児早朝尿64例の尿CPを測定した結果は、ELISA法で平均 $142.9 \pm 70.2 \text{ ng/mg Cr}$ であるのに対して、Latex法では平均 $117.2 \pm 66.7 \text{ ng/mg Cr}$ とやや低値を示す傾向にあった。しかし、両者の相関は $r=0.952$ と良好な相関を示し、その分布においても大きな乖離は認められなかった(図2)。

考察

これまでの研究の結果、CHGを添加した容器に尿を採取し、直ちに4℃に保存すれば尿CPは比較的安定であるが、正しい測定結果を得るため採尿当日か少なくとも翌日には測定することが望ましい。また尿の凍結融解を行うと尿CPは著しく減少するので、凍結保存は避けなければならない。酵素蛋白を測定する場合は、いずれにしてもその安定性に留意して採尿後速やかに検査を行わなければならないが、本法によるWDのスクリーニングは問題がないと考える。

健常成人とWD患者の血液CPおよび尿CP値を測定したところ、それぞれの値には $r=0.846$ の正の相関が認められ、患者と対照者の間には何れも統計学的に有意差が認められたので、尿CPによるWDスクリーニングは血液CPによるスクリーニングと同様に、その早期発見に使用できると考えられた。他方、蛋白

尿が陽性の腎疾患々々者では、尿CPは明らかな高値を示すことが多いので、本症をスクリーニングする場合はこの点に注意する必要がある。

3歳児健診、小児科医会会員の診療施設を受診した3-5歳児約1万5千名のスクリーニングでは患者は発見されなかったが、小学生低学年約5万名を対象に2年間に行ったWDスクリーニングでは2名の患者を発見し、本法の有用性を証明した。我々が試験的に行った3歳児健診1年間の受診率は平均97%で良好であり、受診者の関心の高さが窺われた。

ELISA法は尿CPを測定する方法として費用便益性に優れているが、検体処理能にやや難点があるので、我々は短時間で大量の検体を処理することが可能なLatex法を開発した。この方法を用いて全国規模でのWDマス・スクリーニングを行えば多くのWD患者の発見につながるかと考える。

わが国のWD患者の発症頻度は2~4万人に一人の割合と推定されており、この頻度は現在公費で行われている新生児スクリーニングの対象疾患であるクレチン症の約5,000人に一人に比べて低く、9万人に一人の割合であるフェニルケトン尿症と比較すると明らかに高い。

厚生科学研究の報告によれば、この2疾患のスクリーニングの費用便益は極めて有効であり、その有用性が高く評価されている。

とすれば、わが国ではウィルソン病はその頻度から考えて毎年30から60人の患者が出生することになり、費用便益の面も含めて本症のマス・スクリーニングは必要と結論される。

表1. 室温保存における尿CP値経時的变化
 グルコン酸クロルヘキシジン(CHG)添加の影響

採尿後	(CHG無添加 n=10, CHG添加 n=8)			
	0日目	1日目	3日目	5日目
CHG無添加(%)	100	84	72	50
Range(%)		66-108	42-88	32-67
CHG添加(%)	100	100	81	72
Range(%)		97-112	72-88	62-86

表2. 4℃保存における尿CP値経時的变化
 グルコン酸クロルヘキシジン(CHG)添加の影響

採尿後	(CHG無添加 n=10, CHG添加 n=8)			
	0日目	1日目	3日目	5日目
CHG無添加(%)	100	100	100	95
Range(%)		98-110	80-110	71-104
CHG添加(%)	100	100	100	95
Range(%)		97-117	86-117	73-116

表3. 郵送された尿を4℃で保存した場合の
 尿CP値経時的变化

採尿後	(採尿当日)	(到着日からの日数)		
	0日目	1日目	3日目	5日目
CHG無添加(%)	100	100	87	80
Range(%)		61-116	22-109	16-117
CHG添加(%)	100	100	100	95
Range(%)		91-117	86-117	73-116

表4. Wilson病患者および年齢グループ別
 健康対照者の尿CP値

健康対照者	
幼児 (3歳以上6歳未満)	99.3±77.7ng/mg Cr.
男児 (n=12)	95.6±66.0ng/mg Cr.
女児 (n=16)	103.0±89.4ng/mg Cr.
小中学生(6歳以上15歳未満)	
男児 (n=21)	121.7±58.0ng/mg Cr.
女児 (n=49)	102.9±74.8ng/mg Cr.
成人 (15歳以上60歳未満)	
男性 (n=76)	144.4±77.0ng/mg Cr.
女性 (n=22)	142.8±82.2ng/mg Cr.
Wilson病患者 (8歳以上51歳未満)	8.2±9.1ng/mg Cr.
(n=41)	

5. 腎疾患患者尿および血清CP値

患者No.	疾患名	尿一般検査		尿CP	血清CP
		蛋白	潜血	ng/mg Cr.	mg/dl
糸球体疾患1	慢性増殖性糸球体腎炎(type1)	2+	3+	1091.6	14.6
2	慢性増殖性糸球体腎炎(type2)	±	3+	817.8	28.4
3	萎縮性腎炎	+	3+	892.0	31.4
4	硬化性糸球体腎炎	+	-	883.6	24.7
5	IgA腎症	2+	2+	1383.4	19.7
その他の疾患1	水腎症	±	-	320.8	44.7
2	微小血尿	±	+	204.2	24.6
3	尿毒性腎性腫血症	-	-	67.6	32.4
4	ファンコニー症候群	2+	-	649.4	26.7
5	腎形不全症	3+	+	8103.6	54.1

表6. 健康幼児、小中学生、健康成人
 およびWilson病患者の尿銅値

健康幼児 (n=10)	88.3±34.4ng/mg Cr. (44.3-156.7ng/mg Cr.)
小中学生 (n=51)	73.9±39.4ng/mg Cr. (24.1-211.0ng/mg Cr.)
15歳以上の健康成人 (n=66)	48.7±28.6ng/mg Cr. (17.9-161.0ng/mg Cr.)
WD患者 (n=44)	1222.3±1523.3ng/mg Cr. (117.5-5726.0ng/mg Cr.)

表7. 小学生の尿CP測定によるWDスクリーニング成績

年度	一次検査数	二次検査数 一次陽性数	精密検査数 二次陽性数	確定診断数
平成10年度	22,639	138/148	10/12	1例
平成11年度	26,180	261/275	26/29	1例
合計	48,819	399/423	36/41	2例

表8. 3歳児健診におけるWilson病スクリーニング成績

	検査数	測定値
一次検査	11,239	115.5±78.4ng/mg Cr.
再採尿検査 (1.46%)	164	9.0± 8.6ng/mg Cr.
精密検査依頼数 (0.06%)	6	7.9, 9.3, 12.5, 16.3, 6.2, 7.3 ng/mg Cr.

表9. 3歳児健診におけるWilson病スクリーニングの受診率

平成13年1月～平成14年1月

	西東京市	三鷹市	立川市	国分寺市
Wilson病受診数	2,259	1,228	2,368	442
健診受診数	72,252	11,305	72,459	1459
受診率(%)	100.3	94.1	96.3	96.3
総計(%)	6,297/6,475 (97.3)			

注:三鷹市は平成13年4月1日より実施せず

表10. 小児科医会会員の施設受診者のWilson病スクリーニング成績

	検査数	測定値
一次検査	3,350	118.1±74.2ng/mg Cr.
再採尿検査 (0.87%)	30*1	14.5± 8.4ng/mg Cr.
精密検査依頼数	1	なし

*1: 再採尿30例中1例は、初回検査1.4ng/mg Cr.で、即精密検査を東邦大学大橋病院小児科に依頼

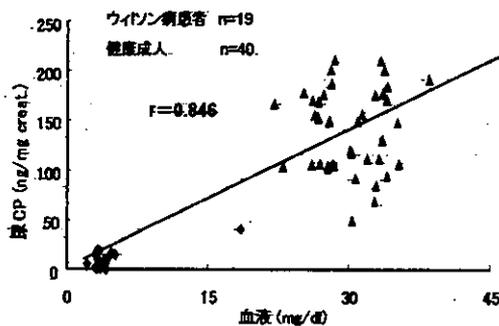


図1. 尿と血液CP値の相関関係

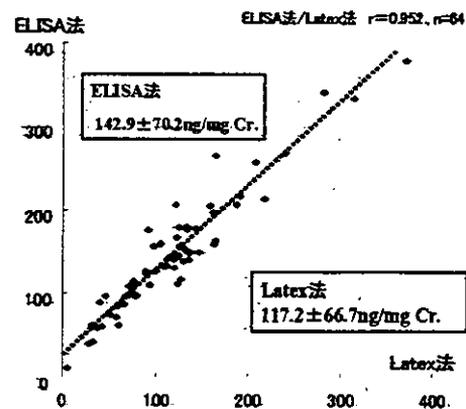


図2. Latex法およびELISA法による3歳児尿CP測定値の相関関係

ウィルソン病の病型解析

研究要旨

全国的にパイロットスタディが進められているウィルソン病マス・スクリーニングにおいて、臨床症状に乏しい本症の確定診断法として、私たちは責任遺伝子の病因変異を同定する方法を検討してきた。今回、加えて、より効率的なスクリーニングを実施するために、各症例の臨床像、病型、遺伝子型などの比較を試みた。その結果、発症年齢と発症時の血清銅濃度の間には相関を認め、また、10歳以前の早期発症例は、発症時に GOT 高値例が多く、逆に10歳以上で発症した例はすべて、発症時の GOT が 150IU/l 以下であった。しかし、遺伝子型と病像や病型との関連は、認められなかった。

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（札幌市保健福祉局健康衛生部）
山口昭弘（日本食品分析センター 千歳研究所）
窪田 満（北海道大学 医学研究科 小児科）

研究目的

ウィルソン病のマス・スクリーニングにおける確定診断法として検討している責任遺伝子変異同定と同時に、遺伝子型から同病の多様な病像や病型が類推可能か検討する。

研究方法

札幌市の調査研究の一環として行っている直接塩基配列解析法によるウィルソン病の確定診断^{1,2)}において、2000年度以降に全国の医療機関から遺伝子解析を依頼されたウィルソン病患者のうち、病型調査に関するインフォームド・コンセントが得られた例について、担当医に所定の様式のアンケート・フォーム(図1)に回答していただく形でデータを収集し、病像や病型、遺伝子型などの比較を行った。なお、セルロプラスミン濃度は、遺伝子解析を依頼されたろ紙血検体を用い、札幌市衛生研究所でネフェロメトリー法³⁾により測定した。

研究結果

これまで、日本人ウィルソン病患者について13の未報告変異を含む34種の変異が同定された。34種の変異のうち12種は塩基挿入(insertion)や塩基欠損(deletion)などにより不完全なタンパク(truncate protein)を生成するもので ATP7Base の酵素活性は、ほぼ完全に喪失していると考えられる。その他は残存酵素活性も考えられる点突然変異(point mutation)であった。

2001年度以降41件の病型調査アンケートの回答を得たが、このうち十分な記載内容のあった39件の結果を表1にまとめた。

酵素活性の完全喪失が予想される変異同士による遺伝子型を持つ患者は、私たちが病型調査の対象とした2000年度以降の遺伝子解析依頼検体中にはなかった。このため、そのような症例の病型解析の検討は、現在までできていない。

また、点突然変異と、挿入欠損などの重篤な変異の compound hetero の場合、酵素の残存活性が考えられる点突然変異(以下;主病因変異)が病型に影響を与えるとの仮定のもとに、R778Lなどの主病因変異について、比較、検討を行なった。

今回、検討対象とした主病因変異は R778L, A874V, G1186S, N1270S の4種である。

アンケートの結果、早期発症例ではより発症時血清銅濃度が低い例が多く、肝機能異常も顕著な例が多いなどの特徴的な傾向が認められた。しかし、現在までのところ主病因変異の違いによる病型の違いは認められず、例えば、発症年齢の分布も主病因変異間での差は認められなかった(図2)。

一方で、発症年齢と発症時の血清銅濃度の間には関連性が認められた(図3)。

また、10歳以前に発症する例は、発症時 GOT 高値例が多く、逆に10歳以上で発症した例はすべて発症時の GOT が 150IU/L 以下であった(図4)。

考察

R778L などの点突然変異の場合、その変異該当箇所のアミノ酸が、タンパク中でつかさどる機能により酵素活性の低下の程度が異なり、病型に影響を与えると推測される。

R778L は日本人ウィルソン病患者においてもっとも高頻度に同定される変異であり、778番アルギニンはタンパク質中では第4膜透過部位に存在する。親水性アミノ酸であるアルギニンに対し、グリシンは疎水性であるので、膜透過構造の安定性が低下すると予測される。A874V は同じ疎水残基をもつアミノ酸同士のアラニン・バリン変異であり、一般的にはマイルドと考えられる病因変異である。また、874番アラニンは第5膜透過部位に存在する。1186番グリシンは、ATP7Base中の ATP 結合地点のアミノ酸である 1153番トリプトファンの近傍に位置するため、G1186S によるタンパクの構造変化で、ATP 結合能が低下することが予測される。1270番アスパラギンは、transduction 部位のアミノ酸の一つであり、この領域は特に生化学的な機能を持たないと考えられるが、あらゆる ATPase において共通しているアミノ酸の一つであり、N1270S は電荷的、容積的に全体構造になんらかの影響を与えるかもしれない。このように各アミノ酸がタンパク質中でつかさどる機能が異なり、また、変異前後のアミノ酸の性質の違いも異なることから、各変異による酵素活性の低下の程度は異なり、ひいては病型に影響を与えることが想像できる⁴⁾。

しかし、今回の結果は、責任遺伝子の変異型と病像が、単純には結びつかないことを示した。

また、早期発症例において発症時 GOT 高値例が多いことは、これらの例に劇症例が多いことを示しており、ウィルソン病マス・スクリーニングを実施する時期として学童期前頃が適切と考えられた。

結論

今回の遺伝子型が確定した症例のアンケート調査で、遺伝子型と病像や病型に明確な関連は認められなかった。しかし、ウィルソン病には多様な遺伝子型が存在するので、今後もデータを収集し検討を継続する必要がある。

謝辞

本研究をすすめるにあたり、その主旨を理解いただき、アンケート調査にご協力いただいた諸先生に深謝いたします。

文献

- 1) 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, 札幌市衛研年報, 27,46-51,2000.
- 2) 野町祥介, 田上泰子, 水嶋好清, 他: 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, 日本マス・スクリーニング学会誌, 11,41-46,2001.
- 3) 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.
- 4) R. Tsivkovskii, B. C. MacArthur, S. Lutsenko: The Lys¹⁰¹⁰-Lys¹³²⁵ Fragment of the Wilson's Disease Protein Binds Nucleotides and Interacts with the N-terminal Domain of This Protein in a Copper-dependent Manner, J. Biol. Chem. 276(3),2234-2242, 2001.

ウィルソン病 病型調査書

札幌市衛生研究所 保健科学係 行き

病院名 : _____ 医師名 : _____

患者氏名 : _____ 性別 : M・F 生年月日 : _____

■ 発症形態

(肝型 ・ 神経型 ・ 肝神経併発型)
 (劇症型 ・ その他)
 (重症型 ・ 中間型 ・ 軽症型)
 発症年齢 (才) 発症前診断

■ 臨床経過

■ 臨床症状

	発症時	現在
肝機能異常	: + - 未検	+ - 未検
Kayser-Fleischer-ring	: + - 未検	+ - 未検
痙攣	: + - 未検	+ - 未検
意識障害	: + - 未検	+ - 未検
構音障害	: + - 未検	+ - 未検
硬直・麻痺	: + - 未検	+ - 未検
運動発達遅滞	: + - 未検	+ - 未検
精神発達遅滞	: + - 未検	+ - 未検
尿中銅上昇	: + - 未検	+ - 未検
腎臓障害	: + - 未検	+ - 未検
錐体外路症状	: + - 未検	+ - 未検
特有顔貌 (fixed - smiling)	: + - 未検	+ - 未検

■ 発症時脳MRI所見

レンズ核に軟化・嚢胞形成・グリオーシスなどが認められた。
 レンズ核への銅、鉄の沈着が認められた。
 その他特記事項:

■ 発症時肝エコー・肝CT所見

肝細胞の繊維化が認められた。
 その他特記事項:

■ 検査所見

	発症時	現在
血清中セルロプラスミン濃度 (mg/dl) (mg/dl)		
血清トランスアミナーゼ		
GOT (AST) (IU/l) (IU/l)		
GPT (ALT) (IU/l) (IU/l)		
血清銅濃度 (ug/dl) (ug/dl)		
尿中銅濃度 (ug/day) (ug/day)		

■ 治療

D-ペニシラミン投与
 塩酸トリエンチン投与
 硫酸亜鉛投与
 肝移植
 その他:

ご協力ありがとうございました。

図1 ウィルソン病病型調査のためのアンケート・フォーム(患者名は記載なしでも可)

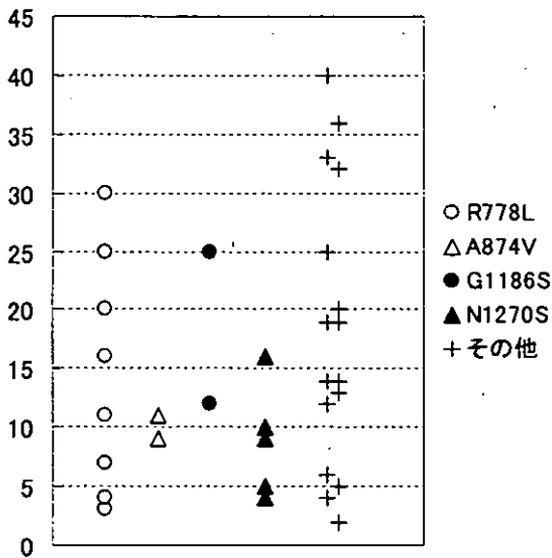


図2 主病因変異別のウィルソン病発症年齢の分布

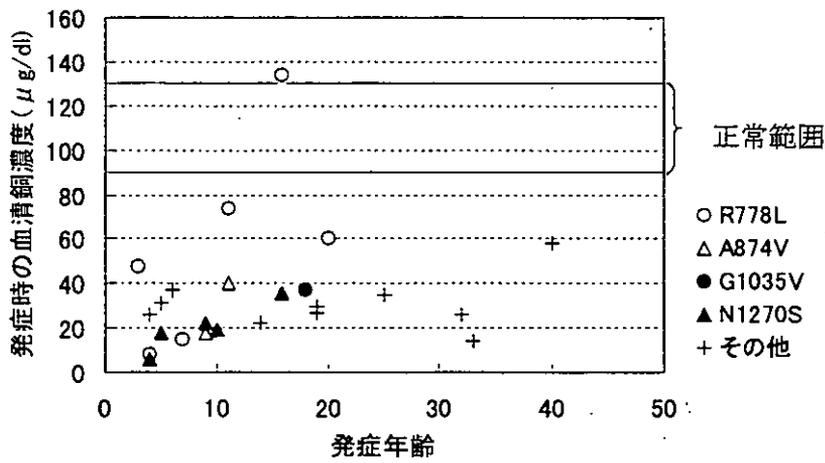


図3 発症年齢と発症時血清銅濃度の比較

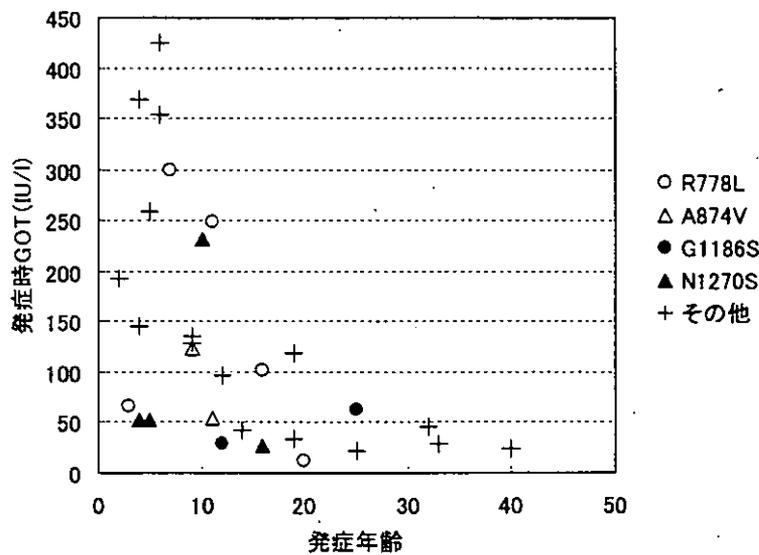


図4 発症年齢と発症時 GOT の比較