

Fig. 1. Heparan sulfate (HS) accumulation and effect of genistein in ML-II cells. (A) HS was accumulated in ML-II skin fibroblasts compared to normal cells on immunofluorescence. (B) HS amount was significantly higher in ML-II cells. Four independent samples were collected on different days after passage and HS was measured. Values are shown as means \pm SD. * $P < 0.05$. (C) Magnified immunofluorescence picture of HS accumulation. In ML-II, HS accumulation showed a vesicular and membranous pattern with clear localization along the plasma membrane as indicated by arrowheads. Scale bar 20 μ m. (D) Genistein dose dependently reduced the amount of cellular HS in ML-II cells. Relative HS amounts in genistein-treated cells are shown as compared to untreated cells. Values are shown as means \pm SD for the three cell lines. Significant differences from genistein-untreated cells are indicated as asterisks. * $P < 0.0001$. (E) Genistein dose dependently inhibited cell proliferation in ML-II cells. Double line indicates the average cell number of genistein-untreated ML-II cells (left vertical axis). Single lines indicate growth rates of genistein-treated cells as compared to untreated cells. Values are shown as means \pm SD for the three cell lines (right vertical percentage scale). Significant differences from genistein-untreated cells are indicated as asterisks. * $P < 0.0001$.

2.3. Heparan sulfate measurement

Collected skin fibroblasts were sonicated and subjected to HS measurement (HS-ELISA Kit; Seikagaku Biobusiness). HS amount was calculated as $\mu\text{g HS/mg protein}$.

2.4. Statistical analysis

We confirmed the normality of values by Shapiro–Wilk W-test for each assessment and the distribution of values by F-test. For testing significant differences between the samples, we applied two-tailed Student's *t*-test, or two-tailed Welch's *t*-test especially in samples that were not equally distributed. Significant differences are indicated in figures.

3. Results

3.1. Heparan sulfate was accumulated in both cytosol and cell surface of ML-II cells

Normal and ML-II skin fibroblasts were subjected to immunofluorescence staining using anti-HS antibody with DAPI. HS was significantly accumulated in ML-II cells as compared to normal cells (Figs. 1A,B). HS was detected in a vesicular pattern in cytosol, which partially co-localizes with lysosome (data not shown), and in the extracellular space along the plasma membrane of ML-II cells (Fig. 1C).

3.2. Genistein reduced the amount of heparan sulfate in ML-II cells

We used primary cultures of skin fibroblasts obtained from the ML-II patients and measured the amount of HS in cultured ML-II cells on day 5. The amount of HS differed between the three untreated cell lines: 116.2, 190.9, and 348.4 $\mu\text{g HS/mg protein}$. In order to evaluate the effect of genistein in these cells, we calculated the relative HS amount (%) in genistein-treated cells compared to untreated cells, and the averages of these values are shown graphically (Fig. 1D). Genistein significantly reduced the amount of HS in ML-II cells dose dependently.

3.3. Genistein inhibited ML-II cell growth

We seeded 2×10^4 cells into 60-mm dishes (day 0) and cultured with and without various genistein concentrations. Cells were harvested by trypsinization and counted on days 1, 3, 5, and 7. As previously mentioned, the primary cell cultures showed different growth rates. We calculated the relative cell number (%) in genistein-treated cells as compared to untreated cells, and the averages of these values are shown (Fig. 1E). Average cell numbers ($\times 10^4$ cells) are shown in the graph for genistein-untreated cells. Genistein dose dependently reduced cell growth rate. No floating cells, indicating cell death, were noted at any genistein concentration. This suggests that cell proliferation was inhibited by genistein.

4. Discussion

We report the effects of genistein in human ML-II skin fibroblasts. HS was accumulated both in cytosol and in the extracellular space along the plasma membrane of ML-II cells and this accumulation was reduced by genistein treatment. HS accumulation has been previously reported in plasma and urine samples of patients with MPS and ML-II using enzyme-linked immunosorbent assay [5]. This is presumed to result from the defective degradation of GAG in these diseases. Although HS accumulation was obvious in ML-II compared to normal cells, the specific amount of HS differed between each cell line. We suggest that the differences result from the cellular conditions of the primary skin fibroblast cultures such as passage times,

growth rate, and patient age at sample collection, which cannot be standardized.

Genistein also reduced ML-II cell proliferation in our experiments. In previous reports, genistein has been shown to directly suppress epidermal growth factor (EGF) signaling [6], which causes a reduction in GAG synthesis [7] and suppression of cellular proliferation. Extracellular HS is necessary for the dimerization of fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) and FGFR2 dimerization efficiently activates FGF signal transduction [8]. Both EGF and FGF are growth factors, whose signaling pathways are involved in cellular proliferation via the Ras/Raf/MAPK or PI3K/Akt signaling pathway [9]. Interestingly, treatment of normal cells with genistein 10 μM reduced cell growth to 72.8% of untreated cells on day 7 (data not shown), which means ML-II cells are more sensitive to genistein as compared to normal cells. It is suggested that ML-II cells bear more HS on the cell surface than normal and its reduction by genistein may affect cell growth more.

Recently, our group demonstrated the possibility of enzyme replacement therapy using multiple lysosomal enzymes in ML-II [10]. We reported that many kinds of substrate are accumulated within lysosomes and endosomes in ML-II, which causes various cellular dysfunctions including a blockade of endocytosis, delayed M6P receptor recycling, abnormal autophagy, and impaired mitochondria with the generation of inclusion bodies. Although we did not directly measure GAG accumulation in our previous study, GAG could be the major accumulation in ML-II as in MPS. In this respect, a reduction of HS accumulation with genistein treatment might possibly produce a beneficial cellular effect. Additionally, genistein has been shown to have an estrogen-like effect (phytoestrogen) and also have a beneficial effect on bone health [11,12]. In ML-II, bone impairment is one of the major involvements. Bone mineral density reduces from 1 year after birth, which is suggested to result from persistent osteoclastic function [13]. Additionally, cartilage homeostasis is also regulated by extracellular sulfates via bone morphogenetic protein and FGF [14]. Taken together, genistein might possibly improve bone status in ML-II.

In conclusion, it is suggested that genistein can be considered as a candidate for supportive drug therapy in patients with ML-II. However, the safety of genistein should be carefully observed when it is used at high doses for patients.

References

- [1] S. Kornfeld, W.S. Sly, I-cell disease and pseudo-hurler polydystrophy: disorders of lysosomal enzyme phosphorylation and localization, in: C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly, D. Valle (Eds.), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, McGraw-Hill, New York, 2001, pp. 3469–3482.
- [2] E. Piotrowska, J. Jakóbkiewicz-Banecka, S. Barańska, A. Tylki-Szymańska, B. Czartoryska, A. Wegrzyn, G. Wegrzyn, Genistein-mediated inhibition of glycosaminoglycan synthesis as a basis for gene expression-targeted isoflavone therapy for mucopolysaccharidoses, *Eur. J. Hum. Genet.* 14 (2006) 846–852.
- [3] M. Malinowska, F.L. Wilkinson, K.J. Langford-Smith, A. Langford-Smith, J.R. Brown, B. E. Crawford, M.T. Vanier, G. Gryniewicz, R.F. Wynn, J.E. Wraith, G. Wegrzyn, B.W. Bigger, Genistein improves neuropathology and corrects behaviour in a mouse model of neurodegenerative metabolic disease, *PLoS One* 5 (2011) e14192.
- [4] T. Otomo, T. Muramatsu, T. Yorifuji, T. Okuyama, H. Nakabayashi, T. Fukao, T. Ohura, M. Yoshino, A. Tanaka, N. Okamoto, K. Inui, K. Ozono, N. Sakai, Mucopolidiosis II and II alpha/beta: mutation analysis of 40 Japanese patients showed genotype–phenotype correlation, *J. Hum. Genet.* 54 (2009) 145–154.
- [5] S. Tomatsu, M.A. Gutierrez, T. Ishimaru, O.M. Peña, A.M. Montaño, H. Maeda, S. Velez-Castrillon, T. Nishioka, A.A. Fachel, A. Cooper, M. Thornley, E. Wraith, L.A. Barrera, L.S. Laybauer, R. Giugliani, I.V. Schwartz, G.S. Frenking, M. Beck, S.G. Kircher, E. Paschke, S. Yamaguchi, K. Ullrich, K. Isogai, Y. Suzuki, T. Orii, A. Noguchi, Heparan sulfate levels in mucopolysaccharidoses and mucopolidiosis, *J. Inher. Metab. Dis.* 28 (2005) 743–757.
- [6] T. Akiyama, J. Ishida, S. Nakagawa, H. Ogawara, S. Watanabe, N. Itoh, M. Shibuya, Y. Fukami, Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases, *J. Biol. Chem.* 262 (1987) 5592–5595.
- [7] J. Jakóbkiewicz-Banecka, E. Piotrowska, M. Narajczyk, S. Barańska, G. Wegrzyn, Genistein-mediated inhibition of glycosaminoglycan synthesis, which corrects storage in cells of patients suffering from mucopolysaccharidoses, acts by influencing an epidermal growth factor-dependent pathway, *J. Biomed. Sci.* 16 (2009) 26.

- [8] J. Turnbull, A. Powell, S. Guimond, Heparan sulfate: decoding a dynamic multi-functional cell regulator, *Trends Cell Biol.* 11 (2001) 75–82.
- [9] J. Schlessinger, Common and distinct elements in cellular signaling via EGF and FGF receptors, *Science* 306 (2004) 1506–1507.
- [10] T. Otomo, K. Higaki, E. Nanba, K. Ozono, N. Sakai, Lysosomal storage causes cellular dysfunction in mucopolipidosis II skin fibroblasts, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 35283–35290.
- [11] G. Williamson, C. Manach, Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies, *Am. J. Clin. Nutr.* 81 (2005) 243–255.
- [12] S. Sehmisch, J. Uffenorde, S. Maehlmeyer, M. Tezval, H. Jarry, K.M. Stuermer, E.K. Stuermer, Evaluation of bone quality and quantity in osteoporotic mice—the effects of genistein and equol, *Phytomedicine* 17 (2009) 424–430.
- [13] T. Otomo, T. Yamamoto, Y. Fujikawa, T. Shimotsuji, K. Ozono, Elevated bone turnover in an infantile patient with mucopolipidosis II; no association with hyperparathyroidism, *Clin. Pediatr. Endocrinol.* 20 (2011) 7–12.
- [14] S. Otsuki, S.R. Hanson, S. Miyaki, S.P. Grogan, M. Kinoshita, H. Asahara, C.H. Wong, M. K. Lotz, Extracellular sulfatases support cartilage homeostasis by regulating BMP and FGF signaling pathways, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107 (2010) 10202–10207.

Case report

Isolated pyramidal tract impairment in the central nervous system of adult-onset Krabbe disease with novel mutations in the *GALC* gene

Shin-ichi Tokushige^{a,*}, Tomohiro Sonoo^a, Risa Maekawa^a, Yuichiro Shirota^b,
Ritsuko Hanajima^b, Yasuo Terao^b, Hideyuki Matsumoto^b, Mohammad Arif Hossain^c,
Norio Sakai^c, Yasushi Shiio^a

^a Department of Neurology, Tokyo Teishin Hospital, 2-14-23 Fujimi, Chiyoda-ku, Tokyo 102-8798, Japan

^b Department of Neurology, Graduate School of Medicine, Faculty of Medicine, The University of Tokyo, Japan

^c Department of Pediatrics, Osaka University Graduate School of Medicine, Japan

Received 11 May 2012; received in revised form 8 August 2012; accepted 8 August 2012

Abstract

This report describes a 60-year-old female patient with Krabbe disease who presented with slowly progressive gait disturbance due to mild spastic paraplegia. Brain magnetic resonance imaging showed high-intensity lesions along the upper parts of the bilateral pyramidal tracts in fluid-attenuated inversion recovery images. Central motor conduction time was prolonged both in the upper and the lower extremities, while central sensory conduction time was normal. The reduced lymphocyte galactocerebrosidase (*GALC*) activity and two novel mutations in the *GALC* gene, p.G496S and p.G569S, proved the diagnosis of Krabbe disease. Our findings show that adult-onset Krabbe disease is characterized by isolated pyramidal tract impairment in the central nervous system, both neurophysiologically and radiologically.

© 2012 The Japanese Society of Child Neurology. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Krabbe disease; Magnetic resonance imaging (MRI); Motor evoked potential (MEP); Pyramidal tract; Galactocerebrosidase (*GALC*)

1. Introduction

Krabbe disease is an autosomal recessive lysosomal storage disease caused by loss of galactocerebrosidase (*GALC*) activity [1]. Patients with adult-onset Krabbe disease typically develop slowly progressive spastic paraplegia and sometimes sensorimotor neuropathy [1,2]. Although magnetic resonance imaging (MRI) revealed that the involvement of pyramidal tracts is characteristic of adult-onset Krabbe disease [3,4], there have been few reports on neurophysiology of the pyramidal tracts [5]. Here, we present a case of adult-onset Krabbe disease

with novel mutations of the *GALC* gene. Neurophysiological studies revealed delayed central motor conduction with normal central sensory conduction, in accordance with the MRI findings.

2. Case report

A 60-year-old Japanese woman who had experienced slowly progressive gait disturbance was referred to our hospital. Her past medical history and family history were unremarkable. She had no siblings and her parents were non-consanguineous. Neurological examination revealed mild spastic paraplegia, exaggerated patellar tendon reflexes, and positive Babinski and Chaddock reflexes. She exhibited no cognitive dysfunction, sensory loss, ataxia, or autonomic dysfunction.

* Corresponding author. Tel.: +81 3 5214 7111.

E-mail address: tokushige-tyk@umin.ac.jp (S. Tokushige).

Brain MRI revealed high-intensity lesions along the upper parts of the bilateral pyramidal tracts in fluid-attenuated inversion recovery (FLAIR) images (Fig. 1). Nerve conduction studies (NCS) showed decreased motor and sensory conduction velocities. A sensory evoked potential (SEP) study revealed normal central sensory conduction time (CSCT) and delayed peripheral latencies. Motor evoked potentials (MEPs) were recorded from the left first dorsal interosseous (FDI) and tibialis anterior (TA) muscles using the method reported by Matsumoto et al. [6,7] and Ugawa et al. [8]. As shown in Table 1, the central motor conduction time (CMCT) was prolonged, especially between the cortex and the brainstem. The cortico-conus motor conduction time (CCCT), which is the most direct indicator of pyramidal tract conduction [6], was also prolonged. Needle electromyography in the biceps brachii, flexor carpi ulnaris, rectus femoris, and tibialis anterior muscles showed reduced recruitment of motor unit potentials during voluntary contraction without any spontaneous activities during relaxation. Auditory brainstem responses, visual evoked potentials, and electroencephalography revealed no abnormalities.

Since the activity of lymphocyte GALC was reduced to 0.03 nmol/h/mg (normal range, 2.1 ± 0.29 nmol/h/mg [9]), the patient received a diagnosis of Krabbe disease. We investigated the DNA sequence for all 17 exons of the *GALC* gene, and found two novel heterozygous missense mutations, p.G496S and p.G569S (Fig. 2A and B), which were not found in 100 healthy controls.

3. Discussion

We described a case of adult-onset Krabbe disease with slowly progressive gait disturbance due to mild spastic paraplegia. Brain MRI showed bilateral lesions along the upper pyramidal tracts, and neurophysiological studies revealed delayed central motor conduction with normal central sensory conduction. The lymphocyte GALC activity was decreased and two heterozygous mutations were found in the *GALC* gene, which proved the diagnosis of Krabbe disease.

Matsumoto et al. [5] reported a 30-year-old female patient with Krabbe disease with severe spastic paraplegia, whose CMCT was prolonged and CSCT was normal, in a pattern identical to that seen in our patient. Therefore, isolated pyramidal tract impairment appears to be a common feature of adult-onset Krabbe disease in both neurophysiological and radiological examinations. In contrast, in regard to infantile-onset Krabbe disease, a 23-month-old female patient with delayed central sensory conduction has been reported [10]. A comparison of our case with this case suggests that isolated pyramidal tract impairment may be characteristic of the adult-onset subtype or mild form of Krabbe disease.

To date, genetic studies on patients with Krabbe disease have suggested some correlation between the genotype and the clinical severity [9]. Although further analysis is needed to verify the significance of the *GALC* mutations found in our patient, the mild neurological symptoms may be related to the genotype.



Fig. 1. FLAIR MR images of the brain showing high-intensity lesions along the upper part of the bilateral pyramidal tracts from just beneath the motor cortex to the cerebral peduncle.

Table 1
Motor evoked potentials.

	Latency (ms)			Conduction time (ms)		
	Cortical	Brainstem	Cervical	Cortical–brainstem	Brainstem–cervical	Cortical–cervical (CMCT)
Left FDI	31.3	23.6	19.3	7.7	4.3	12.0
Normal range (mean ± SD)	20.7 ± 1.0	17.3 ± 0.8	13.6 ± 0.8	3.3 ± 0.3	3.7 ± 0.5	7.0 ± 0.4
	Latency (ms)		Conduction time (ms)			
	Cortical	Conus	Cortico-conus (CCCT)			
Left TA	38.9	22.8	16.1			
Normal range (mean ± SD)	26.1 ± 1.6	14.0 ± 1.4	12.3 ± 1.2			

FDI, first dorsal interosseus; TA, tibialis anterior; CMCT, central motor conduction time; CCCT, cortico-conus motor conduction time. Abnormal values: bold italic.

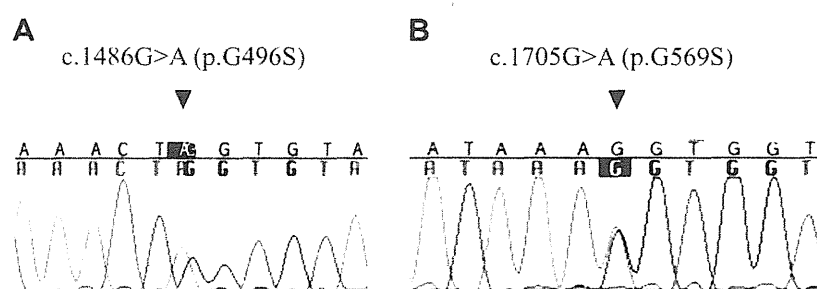


Fig. 2. Two novel missense mutations in the *GALC* gene of the patient. (A) c.1486G>A (p.G496S), (B) c.1705G>A (p.G569S).

The characteristic upper pyramidal tract lesions and decreased sensorimotor nerve conduction velocities strongly suggested the diagnosis of Krabbe disease, which was finally confirmed by the decreased *GALC* activity. Other leukodystrophies including adrenoleukodystrophy, metachromatic leukodystrophy, Pelizaeus–Merzbacher disease, Sjögren–Larsson syndrome and vanishing white matter disease were ruled out by the clinical and radiological findings.

In conclusion, the pyramidal tract is considered to be the only tract involved in the central nervous system of adult-onset Krabbe disease. Physiological and radiological studies provide consistent results on this issue.

References

- [1] Suzuki K. Globoid cell leukodystrophy (Krabbe's disease): update. *J Child Neurol* 2003;18:595–603.
- [2] Henderson RD, MacMillan JC, Bradfield JM. Adult onset Krabbe disease may mimic motor neurone disease. *J Clin Neurosci* 2003;10:638–9.
- [3] Wang C, Melberg A, Weis J, Månsson JE, Raininko R. The earliest MR imaging and proton MR spectroscopy abnormalities in adult-onset Krabbe disease. *Acta Neurol Scand* 2007;116: 268–72.
- [4] De Stefano N, Dotti MT, Mortilla M, Pappagallo E, Luzi P, Rafi MA, et al. Evidence of diffuse brain pathology and unspecific genetic characterization in a patient with an atypical form of adult-onset Krabbe disease. *J Neurol* 2000;247:226–8.
- [5] Matsumoto R, Kohara N, Kaji R, Fukuyama H, Shibasaki H, Kimura J. Electrophysiological studies of adult type Krabbe's disease. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1995;95:P91–2.
- [6] Matsumoto H, Hanajima R, Shirota Y, Hamada M, Terao Y, Ohminami S, et al. Cortico-conus motor conduction time (CCCT) for leg muscles. *Clin Neurophysiol* 2010;121:1930–3.
- [7] Matsumoto H, Hanajima R, Terao Y, Hamada M, Yugeta A, Shirota Y, et al. Efferent and afferent evoked potentials in patients with adrenomyeloneuropathy. *Clin Neurol Neurosurg* 2010;112: 131–6.
- [8] Ugawa Y, Uesaka Y, Terao Y, Hanajima R, Kanazawa I. Magnetic stimulation of corticospinal pathways at the foramen magnum level in humans. *Ann Neurol* 1994;36:618–24.
- [9] Xu C, Sakai N, Taniike M, Inui K, Ozono K. Six novel mutations detected in the *GALC* gene in 17 Japanese patients with Krabbe disease, and new genotype-phenotype correlation. *J Hum Genet* 2006;51:548–54.
- [10] Kurokawa T, Chen YJ, Nagata M, Hasuo K, Kobayashi T, Kitaguchi T. Late infantile Krabbe leukodystrophy: MRI and evoked potentials in a Japanese girl. *Neuropediatrics* 1987;18: 182–3.

特集 | 種々の代謝異常

銅代謝異常症—Wilson病*

清水教一**

Key Words: Wilson's disease, ATP7B, copper, ceruloplasmin

疾患概要

Wilson病は常染色体劣性遺伝形式をとる先天性銅代謝異常症である。肝臓における銅の排泄障害が病態の中心であり、その結果、肝臓、中枢神経、角膜など、種々の臓器に銅蓄積による障害が生じる。本邦での発症頻度は、出生35,000～45,000人に1人と推定されている¹⁾。小児期の慢性肝疾患としては最も頻度が高い²⁾。先天性疾患ではあるが、発症年齢は3～50歳代と幅広く分布している。発症のピークは10～11歳頃である¹⁾。男女比は男性：女性が55：45とやや男性に多いが、明らかな性差は認められない¹⁾。本症は進行性であり、無治療で放置されれば肝不全や神経障害により死の転帰をとる予後不良な疾患である。しかし、本症は治療可能な数少ない遺伝病の一つでもある。早期から適切な治療が行われれば、社会復帰が可能になるまでの回復や、発症の予防が可能である。

病因・病態

Wilson病の原因遺伝子は13番染色体長腕14.3に位置するATP7B遺伝子である。この遺伝子から産生される蛋白は6個の銅結合部位を持つ膜蛋白であり、P-type ATPaseの一種であると推定さ

れている。ATP7B遺伝子の発現は肝臓で最も強く、そのほかに脳、腎臓、心臓および筋肉などでもみられる。肝臓でのATP7B蛋白の役割は、肝細胞内から胆汁中への銅の排泄と、ホロ型(活性型)セルロプラスミン蛋白の合成過程におけるアポ型セルロプラスミンへの銅の供給と考えられている。これらATP7B遺伝子あるいはATP7B蛋白の異常により肝臓中から胆汁中への銅の排泄障害は生じ、Wilson病が発症する(図1)。

人間は必須微量元素である銅を食事から摂取している。1日約2 mgの銅が小腸や十二指腸から吸収され、そのほとんどが門脈から肝臓へ運ばれる³⁾。余剰な銅の主たる排泄経路は肝臓から胆汁中である。前述のとおりATP7B蛋白がそれを司っているため、Wilson病では銅の排泄障害が生じ肝細胞内に銅が蓄積していく。銅は初めメタロチオネインと結合し、無毒化され貯蔵される。しかし、その貯蔵閾値を超えたとき、銅イオンとヒドロキシラジカルなどのフリーラジカルが出現し、それらにより肝細胞障害が生じる。さらに、肝臓中より血中に放出された銅(非セルロプラスミン銅)は、種々の臓器、特に大脳基底部、角膜および腎臓などに蓄積し、それらを障害する(図1)。また、Wilson病では肝細胞内でのホロ型セルロプラスミン合成も障害されるため、アポ型セルロプラスミンが血液中に分泌される。アポ型セルロプラスミンは血液中ではきわめて不安定であり、血清セルロプラスミン値の低下が生じる(図1)。

* Inborn error of copper metabolism—Wilson's disease.

** Norikazu SHIMIZU, M.D.: 東邦大学医療センター大橋病院小児科(〒153-8515 東京都目黒区大橋2-17-6); Department of Pediatrics, Toho University School of Medicine, Ohashi Medical Center, Tokyo 153-8515, JAPAN

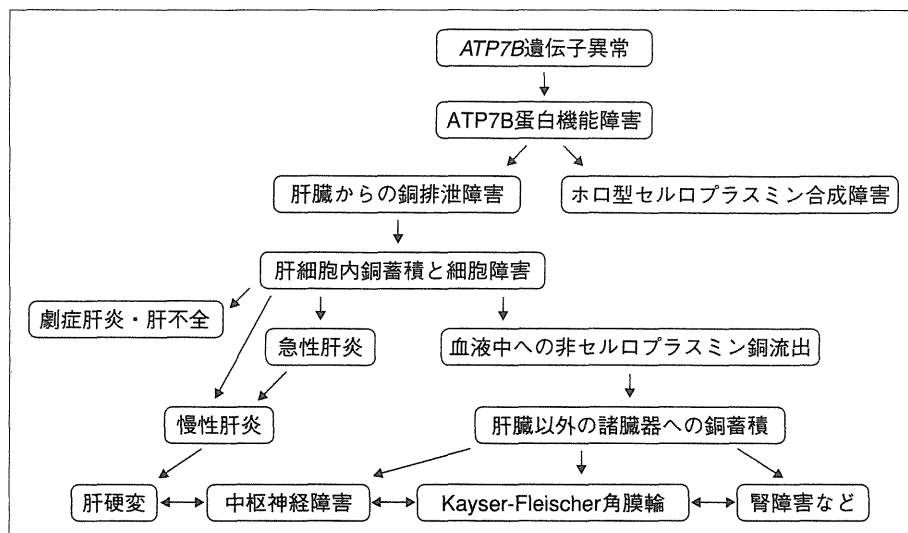


図1 Wilson病の基本病態

表1 病型分類

①肝型	肝機能障害に基づく症状で発症した症例 1)一過性肝障害型 急性あるいは亜急性肝炎様症状を一過性に呈する 2)慢性肝障害型 慢性肝炎様症状あるいは肝硬変の病像を呈する 3)劇症肝炎型 急性肝不全あるいは劇症肝炎の状態を呈するもの、溶血を伴う 4)溶血を伴う型 溶血をきたしながらも劇症型とならない症例
②神経型	既往および経過中にまったく肝症状や肝機能障害がなく、神経症状のみで発症・経過する症例
③肝神経型	神経症状および肝症状、肝機能障害がともに(同時にあるいは時間差をもって)認められる症例
④発症前型	家族内検索や本症のスクリーニングで症状の出現前に診断された例、ならびに他疾患の検索中に偶然発見・診断された例

症状・所見

Wilson病の3主徴は、①肝硬変、②錐体外路症状、ならびに③Kayser-Fleischer角膜輪である。これからもわかるように、本症における臨床症状の中心は肝障害と神経障害である。これらの症状の出方によって病型分類がなされている(表1)。また、Kayser-Fleischer角膜輪はきわめて特徴的所見であるが、年少例や軽症例においては認められず、必発ではない。そのほかに、

精神症状、腎障害、あるいは白内障などを呈する症例もみられる。肝障害は、急性あるいは慢性肝炎の症状を呈し、最終的には肝硬変へと進行していく。また、本症の最重症型である「劇症肝炎型」(意識障害と溶血を伴い急速に肝不全が進行する)は全体の4~7%程度に認められる。神経症状としては、構音障害、歩行障害、羽ばたき振戦などが高い頻度で認められる。ほかに知能障害、ジストニア、仮性硬化症なども呈する。

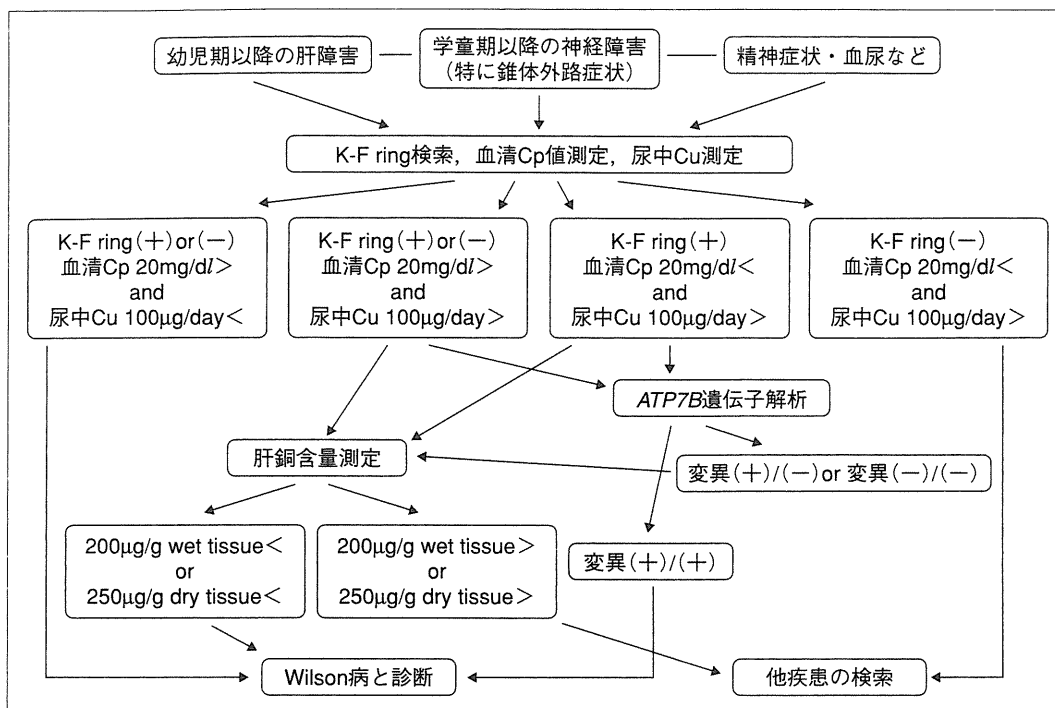


図2 Wilson病診断確定までの流れ
K-F ring : Kayser-Fleischer角膜炎, Cp : セルロプラスミン, Cu : 銅

臨床検査

Wilson病において最も特徴的な検査所見は、血清セルロプラスミン値低下と尿中銅排泄量増加である。多くの症例が、これら2つの検査結果から診断を行うことが可能である。しかし、本症患者の約5%に血清セルロプラスミン値正常例が存在すること、4~5歳以下の年少例における尿中銅排泄量はさほど増加していない(正常対照群と比べ有意差がない)症例が多い点は注意が必要である。また、血清セルロプラスミン値低下の程度は重症度とまったく関連しない。血清銅値は多くの場合低値であるが、溶血を伴う症例では高値となる。血清尿酸値は、発症後症例では一般的に低く、発症前症例は低くならないことが多い。

最も特異的な検査所見は肝銅含量の増加である。200µg/g wet tissueあるいは250µg/g dry tissue以上という著明な高値を示す。

診断

上記した臨床症状や肝機能障害などの一般的検査所見からWilson病を疑い、特殊検査を施行してそれらの所見から診断を行う(図2)。血清セルロプラスミン値、血清銅値および尿中銅排泄量の測定を行う。Kayser-Fleischer角膜炎検査のため、眼科的検査も必要である。しかし、本症はさまざまな臨床症状を呈し、発症年齢も幅広いため診断に苦慮する症例も多くみられる。幼児期以降の急性・慢性の肝障害、および学童期以降の神経あるいは精神症状をみたときは、本症の可能性を考えるべきである。

確定診断法として最も信頼性が高いのは肝細胞中の銅含量測定である。また、原因遺伝子であるATP7B遺伝子の変異が同定できれば、やはり確定診断となる⁴⁾⁵⁾。1997年に当教室の藤井が発症前型Wilson病の診断基準を報告した⁶⁾。この基準は、発症後症例の診断においても有用と思われる。この基準では、①血清セルロプラスミン値低下(20mg/dl以下)、②尿中銅排泄量増加

(100 μ g/日, 1.5 μ g/kg/日または0.2 μ g/mg creatinine以上), ならびに③肝銅含量の増加(200 μ g/g wet tissue以上)のうち2つ以上を認めれば本症と診断してよいというものである⁶⁾. ただし, 肝銅含量の増加を認めれば診断できる. 年少例や, ①と②の基準を満たさないもののWilson病が強く疑われる非定型例に関しては, 遺伝子解析や肝銅含量測定が必要となる⁶⁾.

治 療

Wilson病の治療は, 主に内服薬による除銅と食事療法による銅の摂取制限により行われる. また, 一部に肝移植が適応となる症例もみられる. 除銅のための内服薬は, 尿中への銅排泄を促進させる銅キレート薬(D-ペニシラミンあるいは塩酸トリエンチン)と腸管からの銅の吸収阻害を行う亜鉛薬(酢酸亜鉛)が用いられている.

1. 銅キレート薬

(1) D-ペニシラミン

Wilson病の治療薬として最も長い歴史を有する. 優れた除銅効果を有し, 本邦における第一次選択薬である. 初期治療においては, 15~25mg/kg/日(最大量1,400mg/day)を分2~3回で食間空腹時に内服する. 状態と検査結果が安定する「治療維持期」になれば, 10~15mg/kg/日に減量することが可能である. 優れた除銅効果を有する薬剤であるが, 副作用の出現頻度が20~25%と高いことが欠点である⁷⁾. 軽度の副作用の場合は服用が継続可能なことが多いが, 自己免疫疾患の出現や骨髄抑制などの重篤な副作用が出現した場合には中止せざるを得ない. また, 神経症状を有する症例に対しては, 一過性にその神経症状を増悪させる可能性がある.

(2) 塩酸トリエンチン

本邦における第二次選択薬である. D-ペニシラミンが副作用により使用できない症例や効果がない「D-ペニシラミン不耐症例」が適応となる. また, 神経症状に対する治療効果が高く, 神経症状を有する症例に対しては初めから使用することもある⁸⁾. 本薬剤の長所は副作用がきわめて少ないことである. 銅に対するキレート効果はD-ペニシラミンより劣るため, 投与量を増やすことで対応している. 40~50mg/kg/日(最大量

2,500mg/day)をD-ペニシラミンと同様, 食間空腹時に分2~3で内服する.

2. 酢酸亜鉛

亜鉛薬は, 腸管上皮粘膜細胞のメタロチオネインを誘導することにより腸管からの銅吸収を阻害する⁹⁾¹⁰⁾. その除銅効果はD-ペニシラミンと同等であると考えられている¹¹⁾. 投与量・方法は, 亜鉛として75~150mg/day(成人量)あるいは50~75mg/day(小児量)を分3(50mg/dayは分2)として食前1時間もしくは食後2時間に内服する.

3. 治療薬内服の注意点

銅キレート薬を内服するとき重要なことは, 必ず空腹時(食前1時間もしくは食後2時間以上)に内服することである. 消化管内において銅キレート薬と食物が一緒になると, 銅キレート薬は食物中の金属と結合し, 血液中に吸収されなくなる. また, 亜鉛薬は繊維質や乳製品などと結合する性質を持っており, それらを含む食事や飲み物と一緒に内服すると吸収が阻害される¹²⁾¹³⁾. そのため, この薬剤も食事から一定の時間を空けて服薬することが望ましい. ただし, その程度は銅キレート薬ほど厳密ではない.

4. 低銅食療法

銅キレート薬や亜鉛薬の内服治療とともに, 銅の摂取を制限する低銅食療法を併用する. 治療初期は銅の摂取量を1mg/day(乳幼児は0.5mg/day)以下に制限する⁷⁾. 治療維持期には1.5mg/dayまで摂取可能とする⁷⁾. なお, 酢酸亜鉛内服時は, 銅キレート薬のみで治療を行っているときほど厳密な制限は必要ないと考えられている.

5. 肝移植

本邦では生体肝移植が大多数を占める. 劇症肝炎型Wilson病, 進行性・持続性肝不全, 治療のコンプライアンスが悪く肝不全に陥った例, および門脈圧亢進による再発性の消化管出血を生じた症例が肝移植の適応となると考えられている¹⁴⁾¹⁵⁾. また, 難治性の神経症状を有する症例も肝移植の適応となるが, 本邦では神経症状の改善を目的とした肝移植はきわめて少ない¹⁴⁾¹⁵⁾.

6. 治療・管理の注意点

肝移植以外のWilson病に対する内科的治療は, あくまで薬により銅代謝の状態を良好に保つものであり, 決して治癒させるものではない. し

たがって、治療は生涯にわたって継続されなければならない。当然、治療・管理は長期間にわたる。生涯良好な服薬コンプライアンスを保つことは、良好な予後のためにきわめて重要である。

文 献

- 1) Aoki T, Suzuki M, Fujioka Y, et al. Nationwide survey of clinical feature of Wilson's disease in Japan. In : Lam STS, Pang CCP, editors. Neonatal and Perinatal Screening, the Asian Pacific Perspective. Hong Kong : The Chinese University Press ; 1996. p. 25.
- 2) Culotta VC, Gitlin JD. Disorder of copper transport. In : Scrover CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. The Metabolic Basis of Inherited Disease. Vol. 2. 8th ed. New York : McGraw-Hill ; 2001. p. 3105.
- 3) 青木継稔. 遺伝性銅代謝異常症の臨床とその分子病態. Biomed Res Trace Elements 2004 ; 15 : 307.
- 4) Shimizu N, Nakazono H, Watanabe A, et al. Molecular diagnosis of Wilson's disease. Lancet 1997 ; 349 : 1811.
- 5) Shimizu N, Nakazono H, Takeshita Y, et al. Molecular analysis and diagnosis in Japanese patients with Wilson's disease. Pediatr Int 1999 ; 41 : 409.
- 6) 藤井秀樹. 発症前型Wilson病のセルロプラスミン及び銅代謝に関する研究, 診断基準作成の試み. Biomed Res Trace Elements 1997 ; 8 : 75.
- 7) Shimizu N, Yamaguchi Y, Aoki T. Treatment and management of Wilson's disease. Pediatr Intr 1999 ; 41 : 419.
- 8) 清水教一, 青木継稔. 神経症状を呈したWilson病症例に対する銅キレート薬治療に関する検討. 日小児臨薬理会誌 2004 ; 17 : 95.
- 9) Lee D-Y, Brewer GJ, Wang Y. Treatment of Wilson's disease with zinc. VII. Protection of the liver from copper toxicity by zinc-induced metallothionein in a rat model. J Lab Clin Med 1989 ; 114 : 639.
- 10) Yuzbasiyan-Gurkan V, Grider A, Nostrant T, et al. Treatment of Wilson's disease with zinc : X. Intestinal metallothionein induction. J Lab Clin Med 1992 ; 120 : 380.
- 11) Brewer GJ. Wilson disease. In : Kasper DL, Braunwald E, Hauser S, et al, editors. Harrison's Principles of Internal Medicine. 16th ed. New York : McGraw-Hill ; 2005. p. 2313.
- 12) Oelshlegel Jr FJ, Brewer GJ. Absorption of pharmacologic dose of zinc. In : Brewer GJ, Prasad AS, editors. Zinc Metabolism : Current Aspects in Health and Disease. New York : Alan R Liss, Inc. ; 1997. p. 299.
- 13) Pecoud A, Donzel P, Schelling L. Effect of foodstuffs on the absorption of zinc sulfate. Clin Pharmacol Ther 1975 ; 17 : 469.
- 14) Schilsky ML, Scheinberg IH, Sternlieb I. Liver transplantation for Wilson disease : indication and outcome. Hepatology 1994 ; 19 : 583.
- 15) 藤澤知雄. わが国におけるWilson病の肝移植, 適応と移植成績. 医学のあゆみ 2006 ; 216 : 823.

* * *

8. 先天性代謝異常

5) 銅代謝異常

東邦大学医療センター大橋病院 小児科 しみずのりかず
清水教一

KEY WORDS

銅, Wilson 病, Menkes 病, セルロプラスミン

I. 銅代謝

銅は植物・動物いずれにおいても必要な物質であり、その過不足は健全な成長を妨げる。ヒトにおいても、銅は必須微量元素である。食事や飲み物の中の銅は、消化管から吸収される¹⁾。消化管での銅の吸収は、ATP 7 A 蛋白により行われる。吸収された銅は門脈から肝臓へ運ばれ、約 5% は全血中に流入し、約 10% はセルロプラスミン結合銅として血液中に再度出現する¹⁾。セルロプラスミン結合銅は血液中の銅の約 95% を占めている。銅の主な排泄経路は胆汁中である¹⁾。また、極微量であるが尿中あるいは汗からも排泄される。唾液や胃液などからも排泄され、一部は上部消化管から再吸収される。肝臓中から胆汁中への銅の排泄と肝細胞内での銅とセルロプラスミンとの結合は ATP 7 B 蛋白により行われている。

II. 先天性銅代謝異常症

先天性銅代謝異常症としては、銅蓄積性疾

患の Wilson 病と、銅欠乏性疾患である Menkes 病が挙げられる。原因遺伝子は、Wilson 病が ATP 7 B 遺伝子、Menkes 病が ATP 7 A 遺伝子である。ATP 7 A は肝臓を除くほとんどの臓器で発現している。ATP 7 B は肝臓を中心とし、その他に脳、腎臓、心臓、筋、胎盤などで発現している。これらの遺伝子から産生される蛋白はいずれも 6 個の銅結合部位を持つ膜蛋白であり、P-type ATPase の一種であると考えられている。これらの蛋白は、銅を細胞内から細胞外へ移動させる役割を担っている。ATP 7 A 蛋白は、腸管粘膜細胞から血液中へ、ATP 7 B 蛋白は肝細胞から胆汁中へ、それぞれ銅を輸送している。これらの遺伝子・蛋白が障害されることにより先天性銅代謝異常症が発症する。表 1 に 2 疾患のプロフィールを示す。

III. Wilson 病

1. 概念

常染色体劣性遺伝形式をとる先天性銅代謝異常症の代表的疾患である。肝臓をはじめ、

表1 先天性銅代謝異常症

	Wilson 病	Menkes 病
遺伝形式	常染色体劣性遺伝	X染色体劣性遺伝
遺伝子座	13q14.3	Xq13.3
遺伝子	<i>ATP7B</i>	<i>ATP7A</i>
発症頻度	1/35,000~45,000	1/140,000 (男児)
病因	肝臓からの銅の排泄障害	腸管からの銅の吸収障害
病態	肝臓, 脳, 角膜, 腎臓などへの銅の蓄積	生体内銅欠乏
発症年齢	3~50歳代	新生児期から青春期
臨床症状	肝硬変, 錐体外路症状, Kayser-Fleischer 角膜輪	精神運動発達遅滞, 毛髪異常, 結合織障害
検査所見	血清セルロプラスミン値低下, 尿中銅排泄量増加, 肝銅含量著増	血清セルロプラスミン値低下, 血清銅低下, 細胞内銅取り込み能亢進
治療	銅キレート薬, 亜鉛薬	銅の非経口投与

大脳基底部, 角膜および腎臓などに銅が過剰に蓄積し, 種々の臓器障害を呈する。本邦における発症頻度は出生35,000人から45,000人に1人と推定されている²⁾。また, 小児期の慢性肝疾患としては最も頻度が高い³⁾。発症年齢は3歳から50歳代と幅広く分布しているが, 本邦での発症のピークは10~11歳ごろである²⁾。

2. 病態

本症の病態の中心は肝臓から胆汁中への銅の排泄障害による銅蓄積である。また, ホロ型(活性型)セルロプラスミンの合成が障害される。蓄積した銅により肝細胞障害が生じる。さらに非セルロプラスミン銅として血中に放出され, 大脳基底部, 角膜および腎臓などの全身の諸臓器に蓄積し, それらの臓器障害を引き起こす。

3. 臨床症状

Wilson 病の3主徴は, 肝硬変, 錐体外路症状および Kayser-Fleischer 角膜輪である。そのほかに, 精神症状, 腎障害あるいは溶血などもみられる。表2に本症の病型分類を示す。

4. 臨床検査所見

特徴的生化学検査所見は, 血清セルロプラ

スミン値低下と尿中銅排泄量増加である。しかし, 本症患者の約5%に血清セルロプラスミン値正常例が存在する。また, 年少例(4~5歳以下)における尿中銅排泄量は正常対照群と比し有意に上昇していない。これらの点には注意が必要である。血清銅値は, 多くの場合血清セルロプラスミン値の低下に伴い低値を示すが, 溶血を伴う症例では高値となる。肝銅含量の増加は, Wilson 病における最も特異的な検査所見であり, 200 $\mu\text{g/g}$ wet tissue あるいは250 $\mu\text{g/g}$ dry tissue 以上という著明な高値を示す。

5. 診断

前述した臨床症状と一般検査所見より本症を疑う。特殊検査は, 血清セルロプラスミン値, 血清銅値および尿中銅排泄量の測定を行う。Kayser-Fleischer 角膜輪検索のため, 眼科的検索も必要である。

確定診断法としては, 肝細胞中の銅含量測定が最も信頼性が高い。表3に藤井が1997年に報告した発症前型 Wilson 病の診断基準を示す⁵⁾。この基準は発症後症例の診断にも有用である。

6. 治療

Wilson 病は薬物療法が可能な疾患である。

表2 Wilson 病の病型分類

1) 肝型	肝機能障害に基づく症状で発症した症例
①一過性肝障害型	急性あるいは亜急性肝炎様症状を一過性に呈する
②慢性肝障害型	慢性肝炎様症状あるいは肝硬変の病像を呈する
③劇症肝炎型	急性肝不全あるいは劇症肝炎の状態を呈するもの。溶血を伴う。
④溶血を伴う型	溶血で発症したり、溶血を来しながらも劇症型とならない症例。
2) 神経型	既往および経過中に全く肝症状の出現や肝機能障害がなく、神経症状のみで経過する症例
3) 肝神経型	神経症状および肝症状、肝機能障害がともに認められる症例
4) 発症前型	家族内検索や Wilson 病スクリーニングで症状の出現前に診断された例、ならびに他疾患の検索中に偶然発見・診断された例

表3 Wilson 病の診断基準 (文献5より引用, 改変)

検査所見	
1. 肝銅含量	$\geq 200 \mu\text{g/g wet tissue}$
2. 血清セロプラスミン値	$\leq 20\text{mg/dL}$
3. 尿中銅排泄量	(1) $\geq 100 \mu\text{g/day}$ (2) $\geq 1.5 \mu\text{g/kg/day}$ (3) $\geq 0.2 \mu\text{g/mg Creatinine}$
診断基準	
上記検査所見 1, 2, 3 のうち 2 つ以上を満たせば Wilson 病と診断してよいと考える。	
ただし、肝銅含量の増加が認められれば Wilson 病と診断できる。	
3 歳未満の症例の場合は、1 + 2 あるいは 2 + 遺伝子診断が必要となる。	

現在用いられている治療薬は、銅排泄を促進させる銅キレート薬と、銅吸収阻害を行う亜鉛薬である。これらを単独あるいは併用で用いる。また、銅の摂取を制限する低銅食療法も行う。銅キレート薬には、D-ペニシラミン (メタルカプターゼ®) と塩酸トリエンチン (メタライト250®) の2種類があり、亜鉛薬は酢酸亜鉛 (ノベルジン®) である。

1) D-ペニシラミン (メタルカプターゼ®)

本邦における Wilson 病治療の第一次選択薬である。優れた除銅効果を有しており、本症治療薬の中で最も長い歴史を持つ。投与方法は、15~25mg/kg/日を食間空腹時に2~3回に分けて内服する。服薬時のポイントは、必ず空腹時 (食前1時間もしくは食後2

時間以上あけて)に内服させることである。食事の直前や直後では、食事中の金属と結合してしまい、血液中に吸収されなくなってしまう。せっかく早期に診断され治療が開始されたにもかかわらず、銅キレート薬を食後に内服していたため、症状が悪化して不可逆的な障害を残してしまった症例が実際に存在する。

治療を開始する時は、維持量の1/2量から開始し、数週間で維持量まで増量する。本薬剤の最大の問題点は副作用の出現頻度が20~25%と高いことである⁶⁾。アレルギー反応など軽度の副作用であればD-ペニシラミン使用を継続することが可能な場合が多いが、自己免疫性疾患の出現や骨髄抑制などの重篤な副作用の時には、使用を断念せざるをえない。また、神経症状を有する症例に対しては、一過性にその神経症状を増悪させる可能性があるため、注意が必要である。

2) 塩酸トリエンチン (メタライト®250)

D-ペニシラミン不耐症例、副作用などにより使用できない、あるいは効果がない例、に用いられる。本症における第二次選択薬である。また、神経症状に対する治療効果が高いとの報告があるため、神経症状がみられる症例に対しては初めから使用することもある。40~50mg/kg/日をD-ペニシラミンと同様、食間空腹時に分2~3で内服する。本薬剤の最大の利点は、副作用がほとんどないことである。

3) 酢酸亜鉛 (ノベルジン®)

最も新しいWilson病治療薬である。単剤では、発症前型症例ならびに治療により症状や検査所見が安定している(治療維持期)症例に適応がある。亜鉛として75~150mg/日(成人)あるいは50~75mg/日(小児)を分3として食前1時間もしくは食後2時間に内服する。亜鉛薬は繊維質や乳製品などと結合する性質を持っており、それらを含む食事や

飲み物と一緒に内服すると吸収が阻害される⁷⁾⁸⁾。そのため、食事から一定の時間を空けて服薬することが望ましい。

本薬剤は、単剤での治療のみならず、銅キレート薬との併用も可能である。この場合は発症後症例の初期治療にも使用できる。なお、銅キレート薬と亜鉛薬を併用する場合は、銅キレート薬と亜鉛が消化管内にて結合してしまうのを防ぐため、服薬時間を最低でも1時間以上ずらす必要がある。

4) 低銅食療法

銅の摂取量は、治療開始時には1.0mg/日(乳幼児は0.5mg/日)以下に制限する。治療により症状や検査値が改善し安定すれば、1.5mg/日まで摂取可能とする。

実際に低銅食療法を行う時に必要なのが、料理あるいは素材に銅がどれ位含まれるか(銅含量)を知ることである。一般的には、文部科学省が公表している「日本食品標準成分表」からその情報を得ることができる。そして、銅の多く含まれる食材をさける、というのが基本的なやり方といえる。注意すべき点は、摂取する銅の量は、食材の単位重量中の銅含量と各々の食事を作る時に使われる食材の量により決定される、ということである。銅含量が比較的多い食材でも料理に使う量が少なければあまり影響しないし、逆に単位あたりの銅の量が少なくても、多量に摂取する食材では1日の銅摂取量に大きな影響を与える。食材、レシピを考える時は、この点を十分考慮する必要がある。

実際に低銅食レシピを作成する時は、Wilson病症例を治療・管理している病院の栄養部の協力を得て行うことが望ましい。西本らは、食品中の銅含量を把握しやすくすることを目的として、「銅制限のための食品交換表」を開発した⁹⁾。本表を用いることも有効な方法と考えられる。この「銅制限のための食品交換表」は、大阪府立母子保健総合医療セン

ターのホームページ (URL: <http://www.mch.pref.osaka.jp/>) に掲載されている⁹⁾。なお、亜鉛製剤を内服している時は、銅キレート薬のみで治療を行っている時ほど厳密な銅の摂取制限は必要ないと考えられている。

7. 治療・管理上の注意事項

Wilson 病の内科的治療は、あくまで薬により銅代謝の状態を良好に保持するものであり、決して治療させるものではない。治療は生涯に渡って継続されねばならない。当然、その治療期間は長期に渡る。本症の予後は、診断ならびに治療開始時期と、服薬コンプライアンスの良否によって左右される。本症患者の中には、早期に治療が開始され、全く普通の日常生活を送っていたにもかかわらず、怠業のため症状が再燃し、最悪の場合は死亡する例がみられる。良好な服薬コンプライアンスを保つことが本症の予後を良くするためには極めて重要である。

IV. Menkes 病

1. 概念

Menkes 病は、銅の吸収障害により種々の銅要求酵素に銅が供給されず発症する X 連鎖劣性遺伝性の銅欠乏性疾患である。中枢神経、結合織などの銅要求酵素に銅が供給されず、様々な障害・症状が生じる。臨床症状と経過の重症度により古典型 (重症型)、軽症型および Occipital horn 症候群 (極軽症型) に分類される¹⁰⁾。本邦における発症頻度は、男児の約 14 万人に 1 人である¹¹⁾。

2. 病態

Menkes 病の病因は、腸管からの銅吸収障害と細胞レベルでの銅輸送障害による生体内銅欠乏である。これにより各組織内の銅要求酵素に銅が供給されず、それらの活性低下により様々な症状を呈する。

本症の、古典型、軽症型および Occipital horn 症候群という表現形 (phenotype) は、

遺伝子型 (genotype) と ATP 7 A 蛋白の残存活性に相関しており、活性が少ないほど重症形となる¹⁾。

3. 臨床症状

古典型は、新生児期より低体温、哺乳力低下、嗜眠傾向などがみられる。精神発達遅滞、けいれんは必発である。筋緊張は早期には低下するが、やがて次第に痙性四肢麻痺、除脳硬直を呈する。顔貌は、青白い皮膚、水平の眉毛、小顎、弓のような上口唇などの特徴を呈する。毛髪は色が淡くねじれ、折れやすい (kinky hair)。易感染傾向も認める。膀胱憩室などの結合織異常による症状も呈する。生後 3～5 カ月ごろに発見される例が多い。軽症型は軽から中等度の精神発達遅滞、けいれん、あるいは小脳症状で 2～3 歳ごろに診断されることが多い。Occipital horn 症候群は頭部 X 線側面像における occipital exostosis (本疾患名の由来、後頭骨が下方に角状に突出する) が最大の特徴である。軽度の精神発達遅滞を伴うことが多い。学童期から青春期に発見される。

4. 臨床検査所見

血清セロプラスミン値低下、血清銅値の低下および尿中銅排泄量の若干の増加が特徴的である。肝銅含量は低下し、腎銅含量が増加する。動脈造影にて血管の蛇行、迂曲を認める。

5. 診断

上記した臨床症状と生化学的検査およびレントゲン学的検索などの結果から総合的に診断を行う。毛髪の顕微鏡的所見は特徴的であり、診断的価値が高い。補助診断法として、硫酸銅を経口摂取させ血清銅ならびに血清セロプラスミン値の変化をみる銅の経口負荷試験も有効である。確定診断には、皮膚繊維芽細胞や培養リンパ球における銅の取り込み能亢進の証明を行う。

6. 治療

可能な限り早期から硫酸銅、酢酸銅の経静脈的投与、あるいはヒスチジン銅の皮下投与などの非経口的銅投与を行う。生後1カ月以内に非経口的銅投与を開始すると、中枢神経障害を予防できたとする報告がある¹²⁾。たとえ、中枢神経症状には無効であっても、易感染傾向が改善され、生命予後が改善する。また、てんかんなどの合併症の治療や全身管理も重要である。

文 献

- 1) 青木継稔：遺伝性銅代謝異常症の臨床とその分子病態. *Biomed Res Trace Elements* 15 : 307~315, 2004
- 2) Aoki T, Suzuki M, Fujioka Y et al : Nationwide survey of clinical feature of Wilson's disease in Japan. In : *Neonatal and Perinatal Screening, the Asian pacific perspective* (ed by Lam STS, Pang CCP), p.25~28, The Chinese University Press, Hong Kong, 1996
- 3) Culotta VC, Gitlin JD : Disorder of copper transport. In : *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, vol. 2, 8th ed. (ed by Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D), McGraw-Hill, New York, p.3105~3126, 2001
- 4) 清水教一, 鈴木真理子, 山口之利他 : 全国調査からみた神経型・肝神経型 Wilson 病の臨床像および肝銅含量に関する検討. *脳と発達* 28 : 391~397, 1996
- 5) 藤井秀樹 : 発症前 Wilson 病のセルロプラスミン及び銅代謝に関する研究, 診断基準作成の試み. *Biomed Res Trace Elements* 8 : 75~83, 1997
- 6) Shimizu N, Yamaguchi Y, Aoki T : Treatment and management of Wilson's disease. *Pediatr Intr* 41 : 419~422, 1999
- 7) Oelshlegel Jr FJ, Brewer GJ : Absorption of pharmacologic dose of zinc. *Zinc Metabolism : Current Aspects in Health and Disease*, Alan R, New York, : Liss, Inc. p.299~316, 1997
- 8) Pecoud A, Donzel P, Schelling L : Effect of foodstuffs on the absorption of zinc sulfate. *Clin Pharmacol Ther* 17 : 469~474, 1975
- 9) 西本裕紀子, 佐久間幸子他 : 「銅制限のための食品交換表」を用いて在宅で銅制限を実践・継続できた Wilson 病児の2症例. *日本小児栄養消化器肝臓学会雑誌* 19 : 119~125, 2005
- 10) 青木継稔, 山口之利, 大村育子他 : Menkes 病と脳形成異常. *脳と神経* 53 : 427~435, 2001
- 11) Gu YH, Kodama H, Shiga K et al : A survey of Japanese patients with Menkes disease from 1990 to 2003 : incidence and early signs before typical symptomatic onset, pointing the way to early diagnosis. *J Inherit Metab Dis* 28 : 473~478, 2005
- 12) Kodama H, Murata Y, Kobayashi M : Clinical manifestations and treatment of Menkes disease and its variants. *Pediatr Int* 41 : 423~429, 1999

☆ ☆ ☆ ☆ ☆ ☆

特集

知っておきたい代謝異常症の知識 4

Key words

銅
ATP7B
セルロプラスミン
塩酸トリエンチン
亜鉛

Wilson 病

しみず のりかず
清水 教一*

要旨

Wilson 病は常染色体劣性遺伝形式を示す先天性銅代謝異常症である。原因遺伝子 ATP7B は、染色体 13 番長腕 13q14.3 に位置する。病態の中心は肝臓から胆汁中への銅の排泄障害であり、肝臓、中枢神経、角膜などに銅の過剰な蓄積を生じる。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。検査所見では血清セルロプラスミン値の低下、尿中銅排泄量の増加ならびに肝銅含量の増加が特徴的である。治療は、銅キレート薬 (D-ペニシラミン、塩酸トリエンチン) あるいは亜鉛薬 (酢酸亜鉛) の内服と低銅食療法にて行う。肝不全に陥った症例に対しては、肝移植が適応となる。

はじめに

Wilson 病は、常染色体劣性遺伝形式をとる先天性銅代謝異常症の代表的疾患である。その病態の中心は肝臓からの銅の排泄障害であり、肝臓をはじめとして中枢神経、角膜あるいは腎臓などの種々の臓器に銅が過剰に蓄積して障害を引き起こす。本症の臨床的 3 主徴は、①肝硬変、②錐体外路症状、③ Kayser-Fleischer 角膜輪である。特徴的検査所見は、血清セルロプラスミン値低下、尿中銅排泄量の増加、ならびに肝銅含量の増加である。Wilson 病は進行性の疾患であり、無治療では予後不良である。肝障害や神経障害、あるいはそれらの合併症によって死亡したり、寝たきりとなったりする。しかし、本症は治療可能である。銅キレート薬や亜鉛薬による薬物療法が確立されており、適切な時期から治療が行われれば、十分な社会復帰や発症の予防が可能である。

I 疫学

本邦における Wilson 病の発症頻度は出生 35,000~45,000 人に 1 人と考えられている¹⁾。先天性代謝異常症の中では比較的発症頻度が高い疾患である。加えて、小児期の慢性肝障害の原因としてはもっとも頻度が高いといわれている²⁾。発症年齢は 3~50 歳代と幅広く分布しており、本邦での発症のピークは 10~11 歳頃である¹⁾。男女比は、男性：女性が 55:45 であり、明らかな性差は認められない¹⁾。

II 病態 (図 1)

銅は必須微量元素であり、ヒトにおいても生体の保持に必要不可欠である。銅は食事や飲料から摂取され、通常 1 日約 2 mg が小腸や十二指腸から吸収される³⁾。吸収された銅は門脈から肝臓へ運ばれ、約 5% は全血中に流入し、約 10% はセルロプラスミン結合銅として血液中に

* 東邦大学医療センター大橋病院小児科
〒153-8515 東京都目黒区大橋 2-17-6

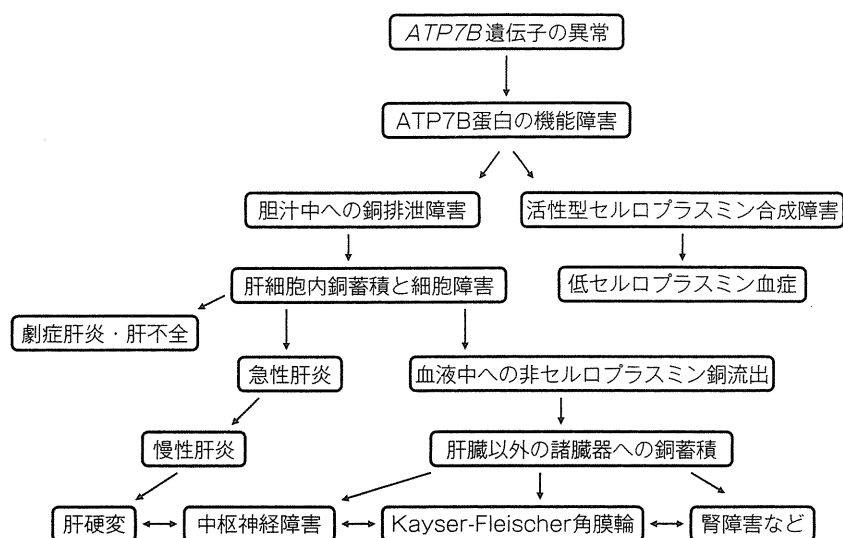


図1 Wilson 病の病態模式図

再分泌される³⁾。銅の排泄経路は主に胆汁中である。

Wilson 病の原因遺伝子は、染色体 13 番長腕 13q14.3 に位置する *ATP7B* 遺伝子である。この遺伝子は 21 個のエクソンを有し、約 7.5 kbp の大きさの mRNA を発現する。翻訳部位は約 4.5 kbp である。*ATP7B* 遺伝子は、肝臓にてもっとも強く発現しているが、脳、腎臓、心臓および筋肉などでも発現がみられる。この遺伝子から産生される蛋白は、6 個の銅結合部位をもつ膜蛋白であり、P-type ATPase の一種であると推察されている。肝臓における *ATP7B* 蛋白の役割は、肝細胞内から胆汁中への銅の排泄と、活性型セルロプラスミン蛋白の合成過程における銅の受け渡しと考えられている。

この *ATP7B* 遺伝子の異常により Wilson 病が発症するが、その病態の中心は *ATP7B* 蛋白の機能障害による肝臓中から胆汁中への銅の排泄障害である。Wilson 病患者では、肝細胞内に取り込まれた銅は、胆汁中に排泄されることなく、そのまま蓄積していく。銅ははじめメタロチオネインと結合 (MT-Cu) し、無毒化され貯蔵される。しかし、貯蔵閾値を超えたとき、

銅イオンとヒドロキシラジカルなどのフリーラジカルが出現する。それらが細胞内の活性酸素消去能を超えると、肝細胞障害が生じる。さらに肝臓中より血中に放出された非セルロプラスミン銅は、全身諸臓器、とくに大脳基底部、角膜および腎臓などに蓄積し、それらの臓器障害を引き起こす。また、*ATP7B* 蛋白のもう一つの役割は、セルロプラスミン合成過程における銅の供給である。そのため、Wilson 病ではアポ型セルロプラスミンに銅が供給されず、活性型 (ホロ型) セルロプラスミンの合成が障害される。そのためアポ型セルロプラスミンがそのまま血液中に分泌される。アポ型セルロプラスミンは血液中にはきわめて不安定であり、血清セルロプラスミン値が低下する。

III 臨床症状と臨床病型

Wilson 病の 3 主徴は、肝硬変、錐体外路症状および Kayser-Fleischer 角膜輪である。その他に、精神症状や腎障害などもみられることがある。Kayser-Fleischer 角膜輪は、角膜に沈着した銅による角膜周囲にみられる暗緑色～暗褐色

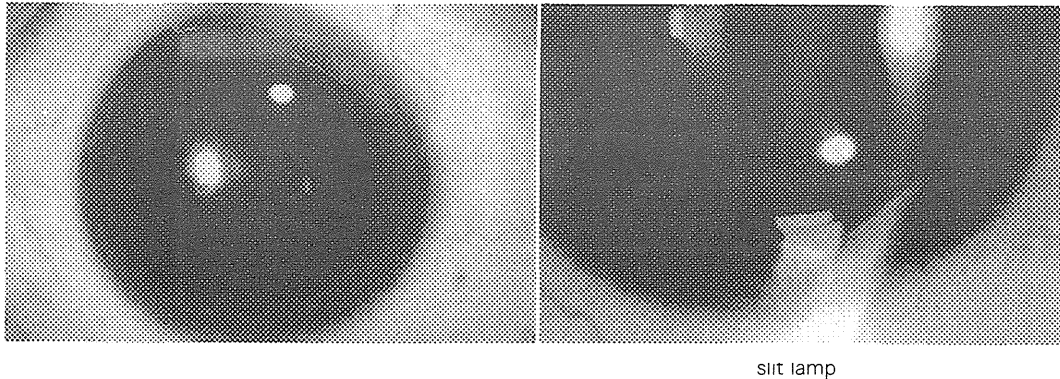


図2 Kayser-Fleischer 角膜輪 (中村浩章ほか, 2009⁴⁾)

表1 Wilson 病の病型分類

1. 肝型
肝機能障害に基づく症状にて発症した症例
1) 一過性肝障害型
2) 慢性肝障害型
3) 劇症肝炎型
4) 溶血を伴う型
2. 神経型
神経症状のみにて発症し経過する症例
3. 肝神経型
神経症状および肝症状, 肝機能障害がともに認められる症例
4. 発症前型
家族内検索にて症状の出現前に診断された例, ならびに他疾患の検索中に偶然発見・診断された例

色の輪である (図2⁴⁾). Kayser-Fleischer 角膜輪は本症に比較的特徴的な所見であるが, 年少例や軽症例においては認められない。また, 腎尿細管や間質に銅が沈着し血尿が出現したり, 二次性 Fanconi 症候群を呈する症例が存在する。

臨床症状は発症年齢によっても異なり一定しないが, 若年者ほど肝障害にて発病することが多い。本症の病型分類を表1に示す。その詳細は以下の通りである。

1. 肝型

易疲労性, 黄疸など肝機能障害に基づく症状にて発症した症例である。さらに細分類される。

a. 一過性肝障害型

急性あるいは亜急性肝炎様症状を呈するが, 一過性であり消失してしまう症例である。

b. 慢性肝障害型

慢性肝炎様症状あるいは肝硬変の病像を呈する症例である。

c. 肝不全あるいは劇症肝炎型

全症例の4~7%に存在する最重症型である。意識障害と溶血を伴い急速に進行する肝不全あるいは劇症肝炎の状態を呈する。早期に診断し治療を開始しないと死亡する危険が高い。

d. 溶血を伴う型

溶血をきたしながらも肝不全・劇症型とならない症例も存在する。溶血にて発症する Wilson 病もみられる。

2. 神経型

既往および経過中にまったく肝症状の出現や肝機能障害もなく, 神経症状のみにて発症し経過する症例である。発症年齢は全体的に肝型より遅く, 10歳以降に多くみられる¹⁾。初発症状としては, 構音障害がもっとも多く, 歩行障害, 羽ばたき振戦, 知能障害なども高い頻度にて認められる⁵⁾。他にジストニア, 仮性硬化症なども呈する。精神症状が出現することもある。

3. 肝神経型

神経症状および肝症状, 肝機能障害がともに認められる型である。肝症状あるいは肝機能障