

総セルロプラスミン測定 ELISA を用いた乳児期生尿による ウィルソン病マス・スクリーニングの基礎的検討

野町 祥介 中澤 恵実理 田上 泰子 水嶋 好清 尾崎 恒一 藤田 晃三

要 旨

札幌市では新生児乾燥ろ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きた。しかし、新生児期では、検査時期として尚早で、一部の患者において血清 CP 値の低下が顕著ではなく、疑陰性例が多いことが予測された。このため、新生児期以降での検査法の検討を開始した。今回、札幌市で実施している乳幼児の神経芽細胞腫マス・スクリーニングの尿検体を用いることを前提に、全 CP 量測定用高感度 ELISA 法による基礎的検討を行ったが、乳児期の尿中 CP 値は全般に低値であり、ウィルソン病のスクリーニングには不適と考えられた。

1. 緒 言

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が多い。ウィルソン病の患者の代表的な検査所見として血清中の銅結合性蛋白質セルロプラスミン(以下 CP)の濃度が著しく低下することから、札幌市では 1995 年 4 月から新生児乾燥ろ紙血液を用いて血清中 CP 濃度を測定することでウィルソン病の新生児マス・スクリーニングを行ってきた。しかし、12 万人以上の新生児を検査したが患者の発見には至らず、1 名の見逃し例があった。その原因として、新生児期では血清中の CP 濃度が不安定であることが予測されたため¹⁾、2002 年 3 月いっぱい新生児のろ紙血を用いたウィルソン病マス・スクリーニングを中止し、別の時期での検査法を検討することとした。

東京都の学童検尿において 4 万 9 千名を検査し 2 名の患児を見出していること^{2,3)}、乳児期以降の採

血による検査が困難であることから、今回、札幌市で実施している生後 6 か月時および 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たウィルソン病のマス・スクリーニングの可能性について、全 CP 量測定用高感度 ELISA 法を用いて検討を行った。

2. 対象と方法

2-1 対 象

札幌市の神経芽細胞腫マス・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、生尿を収集し、初期検討に用いた。

2-2 検討に用いた測定法

(1) 全 CP 測定用高感度 ELISA 法

水嶋らの開発したろ紙血中 CP 測定用の方法^{4,5)}により、10 倍希釈尿を用いて測定を行った。

(2) 活性型 CP 測定用 ELISA 法

活性型 CP モノクローナル抗体を用いた活性型 CP 測定用キット(ニッショー)⁶⁾により使用書に従って測定を行った。

(3) クレアチニンの測定

花井らの高速液体クロマトグラフィーによる測定⁷⁾により行った。

3. 結果

3-1 測定法の検討結果

(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、いずれも回収率は 20 数%以下(表 1)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。

表 1 各抽出溶媒によるろ紙尿からの CP 回収率

抽出溶媒	CP 回収率
PBS-BSA	22%
1% tween20	8%
1% トリトン X100	23%
1% SDS	0%
10% 尿素	10%
水	20%

(2) 尿中 CP の安定性及び測定系の評価

成人尿サンプルを用いて、4 保存の状態で全 CP 量の経日変化を本法により検討したところ、採尿直後から翌日にかけて CP 量は低下したが、2 日

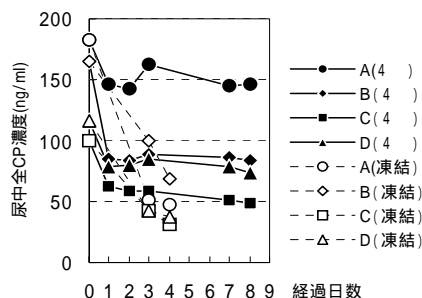


図 1 尿中 CP 測定値の経日変化

目以降は安定した。一方で、凍結尿においては 2 日目以降も測定値の減少が認められた(図 1)。これらの検討において、アッセイ間変動係数は 2.3-9.2%、アッセイ内変動係数(N=8)は 3.9-10.0%であった。

(3) 標準蛋白溶液の尿への添加回収試験

CP を含む標準蛋白溶液 N Protein Standard SL (DADE BEHRING) による尿添加回収試験によるネフェロメトリー法⁸⁾と本法の比較を行ったところ、きわめて良好な相関が得られた。

(4) 活性型 CP 測定キットとの比較

札幌を除く北海道などでウィルソン病マス・スクリーニングへの応用が検討されている活性型 CP 測定用キット⁶⁾と本法の比較を、乳児で行った結果、相関が認められた(図 2)。また、当検討において検量線は、非活性型 CP を含む標準蛋白溶液 N Protein Standard SL (DADE BEHRING) の希釈系列によって求めた。

また、市販のヒト活性型 CP (シグマ C-4770) の希釈系列がこれらの系で応用可能かこころみたところ、活性型 CP 測定用キットでは使用不能だった。

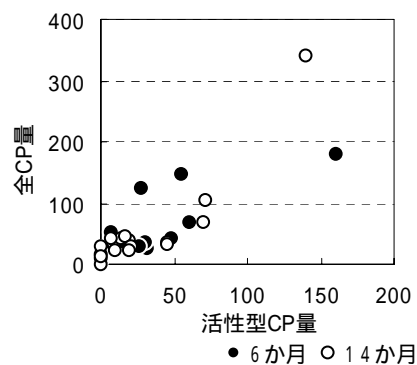


図 2 尿中 CP 濃度(ng/ml)測定値の比較

3-2 スクリーニングへの応用

(1) 見逃し例患児の生尿を用いた測定

新生児ウィルソン病マス・スクリーニングで正常判定された見逃し例患児¹⁾(現在 4 才、治療中)の 2002 年 9 月現在の生尿を用いて、本法による全 CP 量の測定を行った。

その結果、尿中全 CP 濃度は 35ng/ml、尿中クレ

アチニン (Cre) 濃度は 0.12mg/ml で, クレアチニン補正値は 292ng/mgCre であった。年齢の異なる治療中の患児ではあるが, 以下にまとめた乳児正常群との間に有意差は認められなかった。

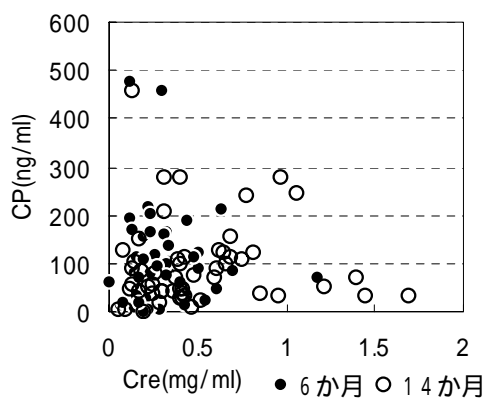


図3 尿中全 CP 値の分布 (対クレアチニン)

(2) 一般の乳幼児の生尿を用いた測定

これまでに, 37 例の 6 か月尿と 55 例の 14 か月尿について測定を行った。全 CP 濃度をクレアチニン濃度に対してプロットした結果を図 3 に, 各全 CP 濃度, クレアチニン濃度, および全 CP/クレアチニンの補正値の平均値 ± 標準偏差を表 2 に示す。また, 全 CP 濃度, 全 CP/クレアチニン補正値を採尿時日齢に対してプロットした結果を図 4,5 に示す。これらの結果, 全 CP 濃度, および全 CP/クレアチニン補正値のいずれも採尿時日齢依存性を示さなかった。

4. 考 察

尿中 CP は採尿直後に低下するが, その後安定であった。そのため, 劣化を伴う凍結状態での郵送を

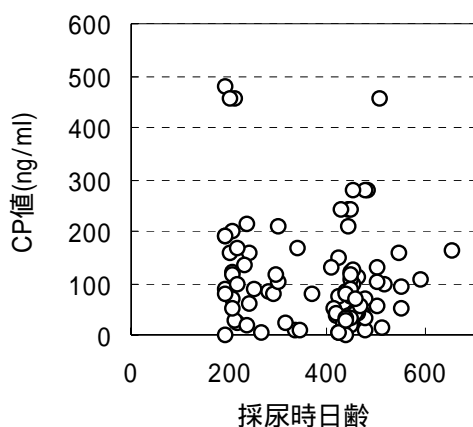


図4 尿中全 CP 値の採尿時日齢依存性

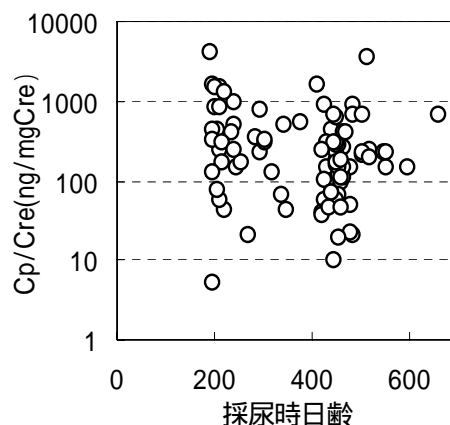


図5 尿中全 CP / クレアチニン値の採尿時日齢依存性 (対数プロット)

表2 6 か月, および 14 か月時の生尿を用いた全 CP, クレアチニン(Cre)の測定値

採尿時期	検査数	CP 値(ng/ml)	クレアチニン値(mg/ml)	CP/Cre 値(ng/mgCre)
		平均 ± 標準偏差	平均 ± 標準偏差	平均 ± 標準偏差
6 か月	37	128 ± 120	0.32 ± 0.21	563 ± 753
14 か月	55	96.4 ± 88.9	0.50 ± 0.36	316 ± 524
合計	92	109 ± 103	0.43 ± 0.32	415 ± 634

避けるなどの配慮を前提に、生尿検体を用いた高感度 ELISA 法による全 CP 量の測定そのものは可能であると考えられた。

一方で、実際の乳幼児尿中全 CP 濃度を測定した結果、尿中クレアチニン値との相関が認められず、クレアチニン補正值を用いたスクリーニングはふさわしくないと考えられた。さらに全体のおよそ 12% で、尿中全 CP 値は 20ng/ml 以下の低値を示した。これらの状況から、適切な再検査率に基づくスクリーニングの実施は、きわめて困難であると考えられた。

また、現在いくつかの地域で尿によるウィルソン病のマス・スクリーニングの検討に用いられている活性型 CP 測定用キットを用いた場合、シグマ社製ヒト活性型 CP は測定不能であり、加えて、その製法過程において、蛋白を安定化する目的でイヌリン処理されているため、CP のペルオキシターゼ活性は失われていると考えられる N Protein Standard SL (DADE BEHRING)^{9,10} 中の CP が測定可能であった。このことから、活性型 CP 測定用の ELISA キットには検討の余地があるものと思われた。

5. 結 語

ポリクローナル抗体を用いた高感度 ELISA 法により生後 6 か月時、あるいは 14 か月時の生尿中の全 CP を測定することでのウィルソン病のスクリーニングは困難であると考えられる。しかし、本法で生尿中の全 CP 量の測定を行うことは可能であると思われた。

今後は他地域のスクリーニング動向を見守りながら、学童期などさらに高年齢時の尿を用いて本法によるデータ収集を試み、ウィルソン病マス・スクリーニングの検査時期、カットオフ値の設定などに、検討を加えたい。

6. 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) 北川照男, 鈴木健, 大和田操: 効果的なマススクリーニング事業に関する研究, 尿によるウィルソン病のスクリーニングに関する研究, 平成 10 年度厚生科学研究報告書, 360-361, 1998
- 3) 鈴木健, 大和田操, 穴澤昭, 他: 尿セルロプラスミン測定による Wilson 病スクリーニング法の検討, 日本小児科学会雑誌 105(8), 846-852, 2001.
- 4) 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
- 5) 水嶋好清, 福士勝, 菊地由生子, 他: ウィルソン病のろ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
- 6) Hiyamuta S, Shimizu K, Aoki T: Early diagnosis of Wilson's disease, Lancet, 1993 Jul3; 342 (8862): 56-57.
- 7) 花井潤師, 竹下紀子, 桶川なをみ, 他: 札幌市における新しい神経芽細胞種スクリーニングデータ処理システムと 1999 年度スクリーニング結果, 札幌市衛生研究所年報, 27,27-31,2000.
- 8) 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.
- 9) Baudner S, Haupt H, Hubner R: 14 項目の血漿蛋白のために設定された新しい標準品 CRM470(RPPHS Lot5), 臨床検査機器・試薬, 17,465-483,1994.
- 10) 伊藤喜久, 河野均也, 岩田進, 他: IFCC 血漿蛋白国際標準品 CRM470 の性状, 安全性, 反応性の検討, 臨床検査機器・試薬, 18,1-12,1995.

Fundamental Investigation for Wilson Disease Screening using Infant Urine Samples by ELISA

Shosuke Nomachi , Emiri Nakazawa, Yasuko Tagami , Yoshikiyo Mizushima,
Tsuneichi Ozaki, Kozo Fujita,

In Sapporo, a newborn screening for Wilson disease has been carried out by measuring the concentrations of ceruloplasmin (CP) in dried blood sample on filter paper since April 1995. But serum CP concentrations of patients are considered not to be low enough to detect the patients. Therefore, we started the Investigation for screening in other ages.

Provided that the urine samples which were collected for Neuroblastoma screening, the fundamental investigation for Wilson disease screening has been done by measuring the total amount of CP in urine. But we conclude that this screening is difficult to be done since the urine CP levels are too low to screen in Infants of six and 14 month of age.