

学位論文題名

ウイルソン病における銅代謝に関する研究

- I. 診断および長期治療における銅代謝の指標
- II. 尿中測定法の検討とマス・スクリーニングの試み

学位論文内容の要旨

ウイルソン病は脳、肝、腎、角膜などに銅が蓄積してゆく常染色体劣性遺伝性疾患で、その典型例はセルロプラスミン(以下 Cp)低値、血清銅低値、尿中銅高値、Kayser-Fleischer ring 陽性を呈する。1993年には原因遺伝子である *ATP7B* がクローニングされた。この P-type ATPase 酵素蛋白の障害により、肝臓から胆汁への銅排泄障害や活性型 Cp の合成障害が起こるといわれ、その遺伝子変異と関連して多彩な臨床症状を呈すると考えられている。

ウイルソン病は典型的な銅代謝異常を呈しない場合があり、診断に苦慮する。また、Cp、血清銅の測定には複数の測定法が並立し変遷してきたため銅代謝の評価には注意を要する。治療は銅キレート剤、亜鉛製剤が有効である。治療は生涯にわたるため、体重に応じた投薬量や患者の怠薬にも、キレート剤の副作用にも注意が必要である。このように、ウイルソン病の診断と治療には様々な問題点があるため、論文 I では、肝臓銅含量測定、キレート剤負荷試験、バランス・スタディなど銅代謝の指標の有用性を検討した。

ウイルソン病は早期診断と治療により、発症や病期の進行を予防することが可能である。論文 II では、マス・スクリーニング法として、少量の尿による精度の高い尿中銅測定法を設定し、その測定法で小学生 223 人の学校検尿で正常値を調べて cut-off を設定した。次いで約 3 万人の小学生のマス・スクリーニングを行い、患者 1 人を発見した。今後のスクリーニング時期の参考とするため、乳幼児の尿中銅分布も調べた。

[論文 I の方法・結果] 対象は 9 歳から 20 歳のウイルソン病患者 10 例で、尿中銅、血清銅、非 Cp 銅など銅代謝の指標を、治療前と治療後、休薬時と投薬時で推移を調べた。さらに肝臓銅含量、キレート剤負荷試験、銅バランス・スタディを行った。銅は原子吸光法で、血清 Cp は SRID 法で、非 Cp 銅は Cp が 0.3% の銅を含むとして計算により求めた。

診断時の尿中銅排泄は $254 \pm 120 \mu\text{g/day}$ (mean \pm SD)、キレート剤が治療量になった時の尿中銅排泄は $2,249 \pm 887 \mu\text{g/day}$ となり、診断に有用であった。治療後の尿中銅排泄は、キレート剤負荷時で 4~8 年後は $9.6 \pm 6.1 \mu\text{g/kg/day}$ 、休薬時で 2~4 年後は $1.6 \sim 2.1 \mu\text{g/kg/day}$ (mean) になった。血清銅は治療前 $47.6 \pm 17.5 \mu\text{g/dl}$ (mean \pm SD)、治療後 2 年以降から $20 \mu\text{g/dl}$ 以下になり $10 \mu\text{g/dl}$ に近づいた。非 Cp 銅は治療前 $29.2 \pm 9.2 \mu\text{g/dl}$ 、治療後は $10 \mu\text{g/dl}$ 以下になり、さらに低下した。

非ウイルソン病の肝臓で、蛋白あたり銅含量は乾燥重量あたりの銅含量と相関が高かった。ウイルソン病の肝臓銅含量は、肝組織像別には一定の傾向はなかった。

キレート剤負荷試験、銅バランス・スタディでは、ペニシラミンは負荷後早期の尿中銅が高い特徴

があり、トリエンは一部で便中への排泄量が高かった。

[論文Ⅱの方法・結果]

1. フレーム式・Dz-MIBK 法とフレームレス式・DDTC-MIBK 法の比較

少量の尿による簡便で精度の高い測定法として、今回フレームレス式原子吸光光度計による DDTC-MIBK 法を 3 測定法 4 条件で設定し、従来のフレーム式 Dz-MIBK 法を golden standard として 11 検体を比較検討し、硝酸処理を加えたフレームレス式 DDTC-MIBK 法・検量線法を学校検尿および乳幼児の尿中銅測定法に採用した。

2. マス・スクリーニングのための、未処理尿によるフレームレス式・直接法での、標準添加法と検量線法との比較

オートサンプリング装置を併設した原子吸光光度計を用い、フレームレス式・直接法で標準添加法を基準として 2 測定法を 15 検体で比較検討し、プール尿に銅標準液を入れた検量線法をマス・スクリーニング法として採用した。

3. フレーム式・Dz-MIBK 法と、マス・スクリーニングのための、未処理尿によるフレーム式・直接法の比較

さらに大量の検体を処理する方法を探るため、従来の精度の高い Dz-MIBK 法と未処理尿によるフレーム式・直接法を 10 検体で比較し、有意な差を認めた。

4. 小学生 223 人の尿中銅測定と cut-off point の設定

対象は小学校 1 年 109 人、小学校 6 年 114 人の計 223 人で、銅、クレアチニンを測定し、cut-off point を $40 \mu\text{g/l}$ に設定した。

5. 新生児 15 人、乳幼児 37 人の尿中銅測定

新生児から生後 2 ヶ月まではバラツキが多かったが、生後 3 ヶ月以降 2 歳未満の 29 人では比較的バラツキが少なく、累積度数分布では $40 \mu\text{g/l}$ で 96.6%を示した。

6. 小学生の学校検尿によるウィルソン病マス・スクリーニングの試み

小学生の学校検尿 30,933 人の尿中銅を簡便な 2 法で測定し、患者 1 名を発見した。

[考察]

ウィルソン病では“free copper”すなわち非 Cp 銅が増加して各臓器に沈着するとされ、尿中銅は非 Cp 銅の一部を反映しているといわれる。尿中銅、血清銅、血清非 Cp 銅の指標は、総合的に検討すれば、診断や長期治療中の指標として怠薬を発見するなど有用であった。非 Cp 銅は、計算値であること、Cp を免疫学的方法で測定する場合はアポ体の量だけ少なく計算されること等に留意する必要があるが、実際の診療の場では有用であった。ウィルソン病の肝臓銅含量は、蛋白あたり銅含量の測定法の検討も含め、今後もデータの蓄積が必要である。キレート剤負荷試験および銅バランス・スタディでは、トリエンはキレート剤として有用と考えられた。

尿中銅によるマス・スクリーニングはフレームレス式直接法とフレーム式直接法の 2 種類で施行し、小学生 30,933 人からウィルソン病患者 1 例を発見した。一試料の測定時間は前者で 4 分、後者で 15~30 秒であり、費用と測定時間の著しい経済性から 85%は後者で測定した。今後、ウィルソン病乳幼児での銅代謝が解明されれば、スクリーニング時期の設定に重要な手がかりになると思われる。近年の測定機器の進展は顕著で、尿中銅によるマス・スクリーニングは、今後有望と考える。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 林 邦 彦

副 査 教 授 藤 堂 省

副 査 教 授 岸 玲 子

学位論文題名

ウィルソン病における銅代謝に関する研究

I. 診断および長期治療における銅代謝の指標

II. 尿中測定法の検討とマス・スクリーニングの試み

ウィルソン病は脳、肝、腎、角膜などに銅が蓄積してゆく常染色体劣性遺伝性疾患で、その典型例はセルロプラスミン (Cp) 低値、血清銅低値、尿中銅高値、Kayser-Fleischer ring 陽性を呈する。原因遺伝子は *ATP7B* である。この P-type ATPase 酵素蛋白の障害により、肝臓から胆汁への銅排泄障害や活性型 Cp の合成障害が起こるといわれ、その遺伝子変異と関連して多彩な臨床症状を呈すると考えられている。ウィルソン病は典型的な銅代謝異常を呈しない場合があり、診断に苦慮する。また、Cp、血清銅の測定には複数の測定法が並立し変遷してきたため銅代謝の評価には注意を要する。治療は銅キレート剤、亜鉛製剤が有効である。治療は生涯にわたるため、体重に応じた投薬量や患者の怠薬、キレート剤の副作用などの注意が必要である。このように、ウィルソン病の診断と治療には様々な問題点があるため、論文 I では、肝臓銅含量測定、キレート剤負荷試験、バランススタディなど銅代謝の指標の確立を検討した。一方、ウィルソン病は早期診断と治療により、発症や病期の進行を予防することが可能である。論文 II では、マス・スクリーニング法として、少量の尿による精度の高い尿中銅測定法を設定し、その測定法で小学生 223 人の学校検尿で正常値を調べて cut-off を設定し、約 3 万人の小学生のマス・スクリーニングを試みた。今後のスクリーニング時期の参考とするため、乳幼児の尿中銅分布も調べた。

[論文 I の方法・結果・考察] 対象は 9 歳から 20 歳のウィルソン病患者 10 例で、尿中銅、血清銅、非 Cp 銅など銅代謝の指標を、治療前と治療後、休薬時と投薬時で推移を調べた。さらに肝臓銅含量、キレート剤負荷試験、銅バランススタディを行った。銅は原子吸光法で、血清 Cp は SRID 法で、非 Cp 銅は Cp が 0.3% の銅を含むとして計算により求めた。

銅代謝異常の指標として、尿中銅、血清銅、Cp、非 Cp 結合銅測定は診断に有用であった。肝臓銅含量は治療にもかかわらず増加しているものもあり、評価には組織像との関連を考慮する必要があることが明らかとなった。負荷試験やバランススタデ

イからトリエンはペニシラミンと同様治療薬として有用であった。

【論文Ⅱの方法・結果・考察】 少量の尿による簡便で精度の高い測定法として、フレームレス式原子吸光光度計による DDTC-MIBK 法を 3 測定法 4 条件で設定し、従来のフレーム式 Dz-MIBK 法を golden standard として 11 検体を用いて比較検討した。試料に硝酸処理を加えたフレームレス式 DDTC-MIBK 法・検量線法の安定性を検討し、学校検尿および乳幼児の尿中銅測定法に採用した。対象は小学校 1 年 109 人、小学校 6 年 114 人の計 223 人で、銅、クレアチニンを測定し、ヒストグラムからマス・スクリーニングの cut-off point を $40 \mu\text{g}/\text{l}$ に設定した。新生児 15 人、乳幼児 37 人の尿中銅測定も行った。新生児から生後 2 ヶ月まではバラツキが多かったが、生後 3 ヶ月以降 2 歳未満の 29 人では比較的バラツキが少なく、累積度数分布では $40 \mu\text{g}/\text{l}$ で 96.6%を示した。小学生の学校検尿によるウィルソン病マス・スクリーニングを簡便な 2 法で試み、30,933 人中、患者 1 名を発見した。フレームレス式原子吸光光度計の精度の進展から、尿試料を輸送する媒体を選べば、今後尿中銅測定をマス・スクリーニングのシステムに載せる事が可能と考えた。

公開発表に際し、副査の藤堂教授よりウィルソン病のマス・スクリーニングの現況、偽陽性の扱いについて、キレート剤の効果と移植後の治療についてなど、副査の岸教授からデータと予後との関連、スクリーニング開始時期について、尿を試料とする場合の注意点や媒体についてなど、主査の小林教授から尿を用いる本スクリーニング法を一般化するための今後の問題点についての質問があったが、申請者は自らの知見と文献からほぼ妥当な回答をした。

本研究は、ウィルソン病の銅代謝把握法の確立ならびに新しいマス・スクリーニング法の開発を行った点が評価され、今後の同疾患の診断と治療に貢献することが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。