《原 著》

ウィルソン氏病における白血球チトクローム
オキシダーゼ測定の診断的意義

中野 博 中川 潤 伊藤 憲一*

I はじめに

ウィルソン氏病（ウ氏病）は先天的銅代謝の異常により、全身とくに肝・脳に大量の銅が沈着し、多彩な全身的症状を呈する疾患である。ウ氏病ではそのほとんどの症例で血清セルロプラスミンが欠除または低下し、肝でのセルロプラスミンの合成障害の存在することはほぼまちがいないが、本症の肝・脳などにみられる組織学的変化が、沈着した銅の直接的中毒作用によるものか、またはセルロプラスミンの減少など、なんらかの別の機序を介して惹起されてきたものであるのかは明らかでない。

最近 Shokeir ら¹⁾、ウ氏病患者の末梢白血球中のチトクロームオキシダーゼ活性が、著しく減少していることを明らかにし、銅代謝異常による組織でのチトクロームオキシダーゼの合成障害が、本症にみられる組織障害の本質であろうと述べている。

今回我々は、ウ氏病患者の2症例およびその血縁者の末梢白血球抽出液のチトクロームオキシダーゼ活性の測定を行い、種々検討を加えた結果、本法がウ氏病患者とくにその carrier の発見に有力なる診断法たりえとの知見を得たのでここに報告する。

II 検索症例

症例1 (A. W.) : 13才、女兒。11才ころより手指振顫、嚥下困難、流涎をきたし、次第に言語障害、さらには歩行障害を伴うようになった。肝機能検査ではアルカリフォスファターゼの上昇、血清銅の低下、尿中銅排泄量の増大、血清セルロプラスミンの著減を認め、肝生検にて肝硬変症および銅の組織沈着が証明された。

症例2 (F. W.) : 症例1の父親。セルロプラスミン値は中等度の減少を示している。しかし種々の肝機能検査および血清銅値は正常であった。

症例3 (H. W.) : 症例1の母親。セルロプラスミン値

は正常域にあった。

症例4 (K. M.) : 20才、男子。15才ころより性格の変化、歩行障害、手指の振顫を訴えて来院した。入院時の肝機能検査では BSP の排泄遅延、血清アルカリフォスファターゼの中等度上昇のほか、血清銅の低下、血清セルロプラスミンの欠如を認めた。なお、この患者の7人の同胞のうち、2人はウ氏病にて死亡している。

症例5 (K. T.) : 症例4の姉であり、血清セルロプラスミン値は中等度に減少している。

III 測定材料および測定方法

A) 白血球抽出液のチトクロームオキシダーゼの測定

i) 酵素液の作成 : ヘパリン処理を行った血液 10 ml に2倍量の3%高分子デキストラン生理的食塩水溶液を加えて90分間4°Cに放置後、上層をとり軽く遠心、その沈渣を2回生理的食塩水で洗う。その後2 ml の蒸留水を加えて正確に30秒間攪拌、溶血をおこさせたのち、直ちに1.8%の食塩水を2 ml 加えて遠心。上清を捨て2 ml の0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) を加えて、超音波処理を行ったものを酵素液として使用した。

ii) 基質の作成 : チトクローム C (シグマ製 III 型) 100 mg に上記リン酸緩衝液 10 ml を加えて、溶解後25 mg のアスコルビン酸ソーダを加え、再び攪拌溶解せしめる。この溶液をリン酸緩衝液に対して2日間十分に透析を行った。なお上記操作はすべて4°Cで行った。

iii) 測定方法 : 還元型チトクローム C は 550 mμ に特異吸収が存在することから、チトクロームオキシダーゼの活性は、還元型チトクロームの単位時間あたりの吸光度の減少をもって表わした。反応組成液は、0.15 ml の還元型チトクローム液に2.5 ml のリン酸緩衝液を加え、38°C に数分間放置。反応液が38°C に達したのち、直ちに0.35 ml の酵素液を加え、以後30秒ないし1分間ごとの吸光度の減少を求めた。測定に当たっては、反応組成液を38°C に保つようにした。ブランクとして0.2 N の Potassium Ferricyanide 0.4 ml を同量のリン

* H. Nakano, J. Nakagawa, K. Ito : 京都大学 第2内科

酸緩衝液の代わりに加え、還元型チトクロームを完全に酸化したものを吸光度零とし、0.4 ml の 0.1 N Sodium cyanide にてチトクローム C の酸化を防いだものを酸化前のブランクとした。

なお酵素液蛋白量は Lowry 法²⁾ に従い測定し、酵素活性値は単位蛋白量をもって表現した。

B) 血清セルロプラスミンの測定

Cox らの方法³⁾ に従い測定した。

IV 成 績

今回測定したウ氏病患者、本症の carrier さらに正常人の血清セルロプラスミン値および白血球抽出液のチトクロームオキシダーゼの活性値は表 1 に示した。本法による正常人の白血球チトクロームオキシダーゼ活性は 30.6 Δ OD/min/prot であった。症例 1 (A. W.) および症

表 1. Leucocyte cytochrome oxidase activity in Wilson's disease patients, carriers and normal controls

Case	Cytochrome oxidase (Δ OD/min/prot)	Serum ceruloplasmin mg/dl
A. W.	5.8	2.5
K. M.	4.1	0
F. W.	16.9	28.3
K. T.	17.3	13.7
H. W.	36.6	45.3
Normal controls	30.6	44.0

例 4 (K. M.) はウ氏病患者であると考えられるが、血清セルロプラスミン値はそれぞれ 2.5 mg/dl, 0 mg/dl と著減を示したのに平行して、白血球チトクロームオキシダーゼ値は 5.8, 4.1 Δ OD/min/prot と著しい低値を示した。

症例 2 (F. W.) および症例 5 (K. T.) はいずれもウ氏病の carrier と考えられるが、セルロプラスミン値はそれぞれ 28.3, 13.7 mg/dl であり、白血球チトクロームオキシダーゼ値はそれぞれ 16.9, 17.3 Δ OD/min/prot と正常人のそれに比し約 50% の低下を示した。症例 3 (H. W.) はウ氏病患者である症例 1 の母親であるが、セルロプラスミン、白血球チトクロームオキシダーゼ値ともに正常域にあった。

図 1 は白血球チトクロームオキシダーゼ活性測定に当たって、還元型チトクロームの特異吸収帯である 550 $m\mu$ の吸光度の減少を、経時的に図表に示したものである。正常人 3 例はすべて反応開始後吸光度はすみやかに

図 1. Optical density decrement in absorbancy at 550 $m\mu$ in Wilson's disease patients, carriers and normal controls.

減少し、その後はほぼ一定のレベルを保つようになる。これに反し、ウ氏病患者での吸光度の低下はきわめて緩慢であり、チトクロームオキシダーゼ活性の著しい低下が推測され、正常人のそれとは非常に異なったパターンである。本症の carrier と考えられる症例 2 および症例 5 では、正常人の場合とはもとより、ウ氏病患者のそれとも異なった態度を示している。すなわちチトクロームオキシダーゼ活性を表わすと考えられる初速度は、正常と患者の中間の値をとるが、550 $m\mu$ の吸光度を経時的に長時間測定し続けても、一定のレベルに達することなく漸次減少をつづけ、やがて正常人の減少曲線と交叉しさらに減少をつづける。

症例 3 はウ氏病患者の母親である。ウ氏病は、常染色体性劣性遺伝の形式をとると考えられているので、症例 3 では、血清セルロプラスミン値あるいは、白血球チトクロームオキシダーゼ値の少なくともいずれかに異常が推測されたが、結果はいずれの値も正常域にあった。しかしながら 550 $m\mu$ での吸光度の経時変化は、正常人のパターンと carrier のパターンの中間の態度を示した点は興味を引かれた。

V 考 案

近年ベニシラミンがウ氏病の治療に導入されて以来、

本症は必ずしも致命的な疾患ではなくなりつつある。しかしウ氏病患者で組織に大量の銅が沈着し、肝・脳などに不可逆的組織障害が惹起される以前に本症を診断し、ペニシラミンを早期に投与することは、本症の治療上重要なことと考えられる。ウ氏病は常染色体劣性の遺伝形式に従うものであるので、遺伝学的に本症が疑われる場合、それがまだ臨床症状を呈するに至っていない *homozygotes* であるのか、または将来もなんらの医学的加療を要しない単なる *carrier* すなわち *heterozygotes* なのかの鑑別に迫られることになる。

Levi, Sherlock ら⁴⁾はこの問題について臨床的・血液生化学的立場より、血清銅の低下、セルロプラスミンの欠陥または著減、さらに肝に大量の銅の沈着を認めることを *homozygotes* の診断根拠としてとり上げているが、これらも絶対的な診断基準ではないことは彼ら自身も認めているところである。最近 Shokeir¹⁾ はウ氏病患者およびその *carrier* の末梢白血球中のチトクロームオキシダーゼ活性を測定し、それが血清セルロプラスミンの態度とおおむね並行することを報告している。今回我々の行った実験でも、ウ氏病患者である症例1および症例4では、末梢白血球中のチトクロームオキシダーゼは正常人の約 20% にまで活性低下が認められ、*heterozygotes* と考えられる症例2および症例5では 50% の活性低下が存在する。症例3は症例1の母親である。ウ氏病は前述のごとく、常染色体劣性の遺伝形式に従うものであり、その子供に *homozygotes* の患者がある点より考え、遺伝形質上 *heterozygotes* であることが予想される。しかし症例3の臨床生化学的諸検査はもとより、血清セルロプラスミン、および白血球のチトクロームオキシダーゼ活性はすべて正常であった。しかし末梢白血球抽出液による、還元型チトクロームの酸化を経時的に測定した図1をみると、症例3は明らかに正常人の態度とは異なっている。すなわちチトクロームオキシダーゼの活性を示すと考えられる初速度の勾配は、正常人と同様急速な減少を示すが、正常人の場合とは異なり、還元型チトクロームの経時的減少はさらに漸次減少を続けていき、*heterozygotes* と正常人の曲線の中間のパターンをとった点は興味ある知見であった。

チトクロームオキシダーゼは衆知のごとく、細胞内の酸化還元にあずかる重要な位置を占めるものであり、本酵素の合成低下は組織になんらかの障害を惹起せしめることは当然予想されるところである。いわゆる one-gene one-enzyme 説に従えば、末梢白血球中のチトクロ

ームオキシダーゼの減少は、当然組織での本酵素の活性低下が存在するはずである。しかし今回我々および Shokeir らの成績によると、ウ氏病の *carrier* のチトクロームオキシダーゼ活性は、正常人の約 50% にまで減少をみているにもかかわらず、組織学的になんらの異常を認められぬことはどのように説明すべきであろうか。

還元型チトクロームの経時的酸化を検討した我々の成績によると (図1)、本症の *carrier* のチトクロームオキシダーゼ活性は低下しているが、ウ氏病患者とは異なり、酸化は中断されることなく次第に進行を続けていく。このことは、生体内におけるチトクロームの酸化にあずかる副次的経路が存在しているのかもしれないし、または他の酸化酵素が代償的に働いていることの可能性を推測しうるのかもしれない。この点に関しては、今後も検討をつづけていきたいと考えている。

ウ氏病の診断には現在血清セルロプラスミンの測定がもっとも一般的に行われている。しかし血清セルロプラスミンは、他の疾患で減少をみることもあり、反対にウ氏病患者で正常のことも時に存在し、確診しにくいことがある。今回ここに示した酵素学的診断法は、測定対象が末梢白血球のため入手がきわめて容易であり、また測定方法も簡易なことより、今後ウ氏病およびその *carrier* の診断への応用が期待される。

VI 結 論

ウィルソン氏病の2家系について、末梢白血球中のチトクロームオキシダーゼ活性を、還元型チトクロームを基質として使用し、その経時的減少をもって測定した。

ウィルソン氏病患者のチトクロームオキシダーゼ活性は正常人の 20% 以下に、*carrier* では 50% の減少をみた。還元型チトクロームの経時変化を検討した成績では、正常人、患者、およびその *carrier* ではそれぞれ独特の型の減少曲線を得た。

遺伝学的には *carrier* と考えられるが、セルロプラスミン値を含めた諸種臨床検査では異常を認めなかった症例で、この還元型チトクロームの経時変化を追求すると、*carrier* の曲線に近い型のものが得られた。

文 献 1) Shokeir, M. H. K. & Shreffler, D. C.: Cytochrome oxidase deficiency in Wilson's disease: a suggested ceruloplasmin function, Proc. Nat. Acad. Sci, U. S. A. 62: 867, 1969. 2) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J.: Protein

measurement with the folin phenol reagent., J. Biol. Chem. **193**: 265, 1951. 3) Cox, D. W.: Factors influencing serum ceruloplasmin levels in normal indi-

viduals, J. Lab. Clin. Med. **68**: 893, 1966. 4) Levi, A. J., Sherlock, S. et al.: Presymptomatic Wilson's disease, Lancet **II**: 575, 1967.

*

*

*

*

*

*