

し、本症をマス・スクリーニングする方法を開発したので報告する。

## B. 研究方法および対象

尿を採取して直ちに 4℃で保存して、当日、遅くとも翌日には $\alpha$ GalA およびクレアチニン (Cr) を測定した。

方法は、ヒト $\alpha$ GalA モノクローナル抗体を固相化したマイクロプレートに 25 $\mu$ l の尿をとり、これに 50mM のリン酸緩衝液 (pH 7.2) 75 $\mu$ l を加えて 4 倍に希釈し、90 分、25℃で反応させる。反応後、緩衝液で 3 回洗浄し、抗 $\alpha$ GalA ウサギ血清を 1500 倍に希釈したものを加え、90 分、25℃で反応させる。反応後、同様に緩衝液で 3 回洗浄し、ペルオキシダーゼ標識抗ラビット IgG を 1500 倍に希釈したものを加え、90 分、25℃で反応させる。更に反応後、*o*-phenylenediamine 0.2mg/lwell 濃度のものを加えて 30 分、25℃で反応させる。発色後、3N 硫酸で発色を停止して、分光光度計 (波長 420nm) にて測定する。血清の $\alpha$ GalA 測定は、サンプル量が 80 $\mu$ l である点が尿 $\alpha$ GalA 測定と異なるだけで、その他は尿 $\alpha$ GalA 測定と同様である。

尿 $\alpha$ GalA 活性の測定は、尿 75 $\mu$ l を試験管にとり、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ B ( $\alpha$ GalB) の活性を抑えるために N-アセチル- $\alpha$ -ガラクトサミンを加え、次いで基質 4-メチレンウンベリフェレル- $\alpha$ -ガラクトピラノサイド (4MU- $\alpha$ -Gal) 緩衝液に溶解したものを 100 $\mu$ l を加えて、37℃、60 分反応させる。反応後、グリシン緩衝液で反応を停止し、励起波長 360nm、蛍光波長 448nm、にて蛍光強度を測定する。検体の保存状況を確認するために、検体中の $\alpha$

-GalA とヘキソサミニデースの比率を算出する。

尿クレアチニン濃度の測定には、Jaffe 法を使用した。

## C. 研究成績

3 例の健康成人の尿をそれぞれ 3 本づつ別の試験管にとり、各例の 1 本を各々 4℃の冷蔵庫で、別の 1 本を 23-25℃の室温で 7 日間保存し、0、3、5、7 日目に $\alpha$ GalA 蛋白と酵素活性を測定した。そして、それぞれの 0 日目の測定値を 100 として、各測定値を%で表したところ、表 1 のように、尿を 4℃で冷蔵保存した場合は、活性値も蛋白値も採尿して 3 日目まではあまり低下しなかった。しかし、室温に放置した場合は、一部の例では採尿して 3 日目に蛋白値や活性値が低下するものが見られた。また、採尿して直ちに尿を凍結融解し、これを反復して 5 日目と 7 日目にそれぞれ 3 回目と 5 回目の凍結融解を行って $\alpha$ GalA を測定した。その結果、尿を凍結保存するよりも、4℃で冷蔵保存した方が、 $\alpha$ GalA の安定が保たれるように思われた。

以上の成績から、尿を採尿後直ちに 4℃で冷蔵保存し、その日のうちに $\alpha$ GalA を測定するか、それが不可能の時は少なくとも 2 日以内に測定すれば、蛋白値も活性値も正しい成績が得られると考えて、その後の測定はすべてこの方法を用いた。

次に、40 名の健康成人の尿について、 $\alpha$ GalA 蛋白と活性とを同時に測定したところ、図 1 のように両者は  $r=0.911$  の正の相関関係を示した。健康成人の尿 $\alpha$ GalA 蛋白値に性差が見られるか否かを検討するために、20-30 歳、および 31-40 歳の健康

成人それぞれ 267 名と 312 名(計 579 名)の尿  $\alpha$ GalA 値を測定し、その値の男女差を検討したところ、男女の間には有意差は認められなかった(表 2)。従って、その後の研究においては、健常者の測定値を男女で区別せずにすべてを対照として使用した。

また、健常成人 9 名、Fabry 病患者(男性)8 例、保因者 3 例の血清と尿の  $\alpha$ GalA 蛋白を同時に測定して検討したところ、両者の間には  $r = 0.758$  の正の相関関係を認めた(図 2)。そして、Fabry 病患者(男性)8 例と対照成人 9 例の血清 GalA 蛋白の平均値はそれぞれ  $0.3 \pm 0.2$ 、および  $2.6 \pm 1.1 \text{ ng/ml}$  であり、両者には  $P < 0.001$  の有意差が認められた。また、Fabry 病患者 9 例と対照成人 1,447 例の尿  $\alpha$ GalA 蛋白の平均値はそれぞれ  $1.3 \pm 2.6 \text{ ng/mg creat.}$  および  $18.5 \pm 14.6 \text{ ng/mg Cr.}$  であり、両者の間にも  $P < 0.001$  の有意差が認められた。Fabry 病保因者(女性)3 例のうち 1 例を除いて、 $\alpha$ GalA 蛋白は血清も尿も、男性患者と対照との中間の値を示す傾向が認められた。

成人対照 1,447 例の尿  $\alpha$ GalA 蛋白の測定値の濃度分布を検討したところ、頻度の最も多いのは  $10 \text{ ng/mg creat.}$  であり、低い方から見た 3 パーセンタイル値は  $3 \text{ ng/mg creat.}$  であった。従って、この方法で Fabry 病スクリーニングする場合は、 $3 \text{ ng/mg creat.}$  を cut-off 値とするのが良いと思われる。

8 例の Fabry 病患者と 1,447 例の成人対照とについて、 $3 \text{ ng/mg creat.}$  を cut-off として本法でスクリーニングをしたと仮定すると、その sensitivity は 100%、selectivity は 96.3% となる。従って、本法は Fabry 病のマス・スクリーニング法として有用な方

法と思われる。

#### D. 考察

わが国の Fabry 病の頻度は明らかでないが、これまでの疫学調査成績から、Gaucher 病やムコ多糖症 I 型および II 型よりも頻度が高いと考えられており、10 万~20 万人の出生に 1 例と推定されている。しかも、社会で最も大きく活躍する 30 歳代に腎不全となり、40 歳代で心不全となる不幸な疾患であるので、有効な治療法を開発することは、社会的にも大切なことと思われる。

幸い最近、本症に対する酵素療法薬が開発され、その治療によって予後が改善されることが期待されている。しかし、これまで本症は、しばしば不可逆性の腎障害や新機能障害を呈してから診断されており、本症の早期診断法を開発することも、予後を改善する上で大切である。

筆者らはたまたま正常対照者の尿にかなりの  $\alpha$ GalA が排泄されており、Fabry 病患者ではそれが著しく低下しているのを認めたので、モノクローナル抗体を用いた ELISA 法で尿の  $\alpha$ GalA を測定して、無侵襲のマス・スクリーニング法の開発が可能ではないかと考えた。そして研究を進めた結果、尿を  $4^\circ\text{C}$  で冷蔵保存すると  $\alpha$ GalA は比較的安定であり、2 日間位はその活性値も蛋白量も採尿時とほぼ同じであったので、採尿後直ちに尿を冷蔵保存し、少なくとも翌日中にこれを測定すれば本症のスクリーニングが可能と思われた。そして、 $\alpha$ GalA 活性値と蛋白量とは良く並行し、活性と蛋白量何れを測定しても本症の診断は可能と思われた。しかし大量の尿サンプルの  $\alpha$ GalA を測定する場合は、ELISA 法で酵素

測定時間が短く、簡単であり、有用と思われた。尿 $\alpha$ GalAは血清のその値を反映しており、また、正常対照者と患者の平均値の間には統計学的に有意差が認められたので、尿の $\alpha$ GalA蛋白を測定して本症を診断することが可能との結論を得た。

わが国では3歳児の健康診断の際に集団検尿が行われており、この尿を用いてFabry病をスクリーニングすれば、全国的にこれを普及することが可能である。

そこで、約1,500人の正常対照者の尿 $\alpha$ GalA蛋白を測定し、その値の濃度分布、並びに患者と保因者の測定値から、低い方から3パーセントイルに相当する3ng/mg creat.の値をcut-off値として本症をスクリーニングするのが良いと思われた。

この方法でスクリーニングすると、保因者は見逃されるが、敏感度100%、特異度96.3%で患者(男性)をスクリーニングすることが可能との成績を得た。従って、本法は極めて有用なFabry病のスクリーニング方法であると考えている。

## E. 結論

ヒト $\alpha$ GalAに対するモノクローナル抗体を使用したELISA法で、尿 $\alpha$ GalA蛋白を測定するFabry病のマス・スクリーニング法を開発し、スクリーニング法の実際について若干の考察を行った。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 北川照男 新生児時期から学童期までの検診の根拠 公衆衛生(2001)、65: 20-27.
- 2) 北川照男 先天代謝異常症治療の歴史

小児内科(2001)、33: 901-910.

- 3) 鈴木健、大和田操、穴澤昭、松本勝、北川照男. 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. 日児誌(2001)、105: 846-852.
- 4) 大和田操、北川照男 リソソーム蓄積症(リソソーム病) 日本臨床(2001)、59巻:増刊号8 本邦臨床統計集(2)、317-327
- 5) Owada M, Suzuki K, Fukushi M, Yamauchi K, Kitagawa T  
Mass screening for Wilson's disease by measuring urinary holoceruloplasmin  
J Pediatr(2002) 140: in press

表 1. 健常成人 3 例の尿を 4℃ と 25℃ 並びに凍結保存した場合の  $\alpha$ Gal a 蛋白と活性の経時的変化

$\alpha$ Gal A 蛋白値 (%)

保存条件	検体 No.	0 日目	3 日目	5 日目	7 日目
冷蔵保存 4℃	1	100	102	78	81
	2	100	95	71	77
	3	100	114	55	53
	平均	100	104	68	70
室温保存 23_25℃	1	100	87	70	68
	2	100	96	28	43
	3	100	88	65	70
	平均	100	90	54	60
凍結融解 -40℃	1	100	—	45	42
	2	100	—	69	98
	3	100	—	63	59
	平均	100	—	59	66

$\alpha$ Gal A 活性値 (%)

保存条件	検体 No.	0 日目	3 日目	5 日目	7 日目
冷蔵保存 4℃	1	100	106	101	96
	2	100	104	88	88
	3	100	115	91	101
	平均	100	108	93	95
室温保存 23_25℃	1	100	95	88	74
	2	100	88	85	78
	3	100	96	81	63
	平均	100	93	85	72
凍結融解 -40℃	1	100	—	—	84
	2	100	—	—	72
	3	100	—	—	68
	平均	100	—	—	75

表 2. 健常成人の尿  $\alpha$  Gal A 蛋白値の男女比較

年齢	平均値 M $\pm$ SD	(N)	男性 M $\pm$ SD	(N)	女性 M $\pm$ SD	(N)
20~30 歳	17.1 $\pm$ 14.6	267	16.1 $\pm$ 14.3	173	18.1 $\pm$ 14.9	96
31~40 歳	17.3 $\pm$ 11.8	312	17.3 $\pm$ 13.7	159	17.2 $\pm$ 9.8	153
総計	17.2 $\pm$ 13.2	579	16.7 $\pm$ 14.0	330	17.7 $\pm$ 12.4	249

図 1.  $\alpha$ -galactosidase A 蛋白測定値と活性値との相関関係

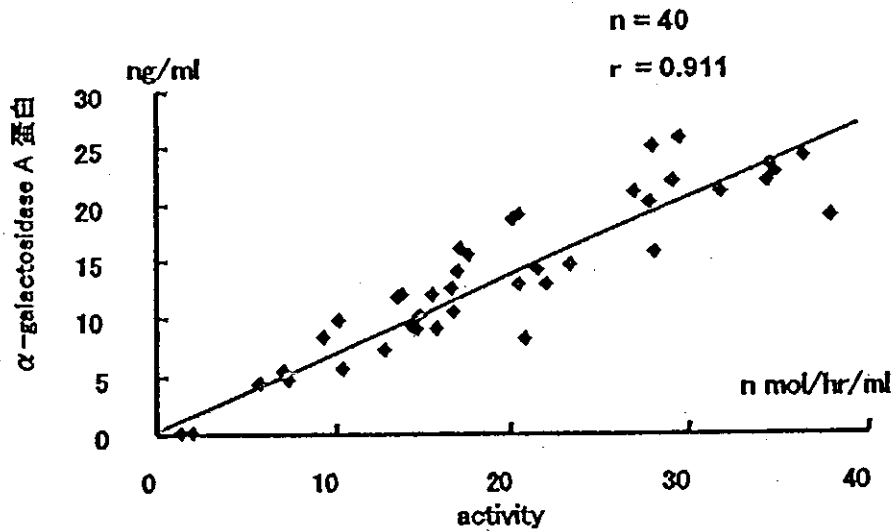
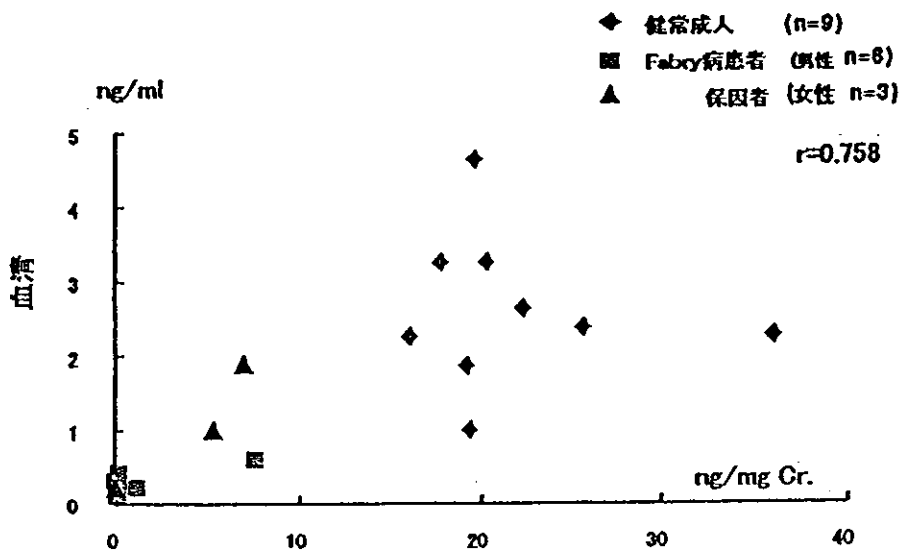


図 2. Fabry 病患者、保因者および健常成人  
血清と尿  $\alpha$  Gal A 蛋白の相関関係



ライソゾーム病の病態解明及び治療法の開発に関する研究

分担研究：ライソゾーム病の病因、病態の解析、治療

分担研究者：田中あけみ（大阪市立大学・大学院医学研究科・発達小児医学・助教授）

研究要旨

(1) ライソゾーム病患者のスクリーニング：ファブリ病リスク患者のスクリーニングとして肥大型心筋症患者 16 名について  $\alpha$ -ガラクトシダーゼ活性を測定し、1 名の患者を発見した。尿濾紙を検体として当院及び関連病院にて出生した乳児を対象に、ジメチルメチレンブルー呈色反応により先天性ムコ多糖症のスクリーニングを行った。1995 年 1 月～2001 年 12 月での検体数は 9,254、1 次スクリーニング陽性は 3.0%、2 次スクリーニング陽性は 0.26% で、患者は見つからなかった。

(2) 早期発見による早期治療が行われた時の効果判定の資料とするため、日本人に最も多いムコ多糖症 II 型について自然歴を調べた。18 例のうち、最重症型 2 例、重症型 6 例、中間型 4 例、軽症型 4 例、最軽症型 2 例と分類された。

(3) 脳に対する非侵襲的早期治療を目的として  $G_{M1}$  ガングリオシドーシスモデルマウス ( $\beta$ -galactosidase ノックアウトマウス) を用い、生後 1～2 日のマウスに、 $\beta$ -galactosidase 遺伝子を組み換えアデノウイルスベクターに組み込んだものを経静脈的に投与し、生化学的、組織学的にその効果を検討した。治療マウスにおいて  $\beta$ -galactosidase 活性は脳組織を含め各臓器で上昇し、組織におけるウイルスベクターの存在部位と一致して活性が上昇していた。脂質分析において、脳および肝臓での  $G_{M1}$  ガングリオシドの蓄積の抑止が見られ、治療効果が認められた。

研究目的

ムコ多糖症 II 型について自然歴を調査した。

I、臨床研究

近い将来に酵素補充療法実施の可能性のある疾患について以下の研究を行った。

(1) ファブリ病のリスク者スクリーニング

肥大型心筋症患者について、末梢リンパ球中の  $\alpha$ -ガラクトシダーゼ活性を測定した。また、人工透析患者について、血清中の  $\alpha$ -ガラクトシダーゼ活性を測定した。

(2) ムコ多糖症のマス・スクリーニング

1 か月児の濾紙尿を用い、ムコ多糖症のマス・スクリーニングを検討した。

(3) ムコ多糖症 II 型患者の自然歴調査

早期発見による早期治療が行われた時の効果判定の資料とするため、日本人に最も多い

II、実験研究

ライソゾーム病の中枢神経病変は、酵素補充療法や骨髄移植によっても満足な結果は得られていないことから、ライソゾーム病の中枢神経病変に対する遺伝子治療の実験的研究を行った。

研究方法および対象

I、臨床研究

(1) ファブリ病のリスク者スクリーニング

大阪市立大学医学部付属病院内科に通院治療中の肥大型心筋症患者 16 名について、ファブリ病のリスク患者スクリーニングの承諾

を得、末梢リンパ球中の $\alpha$ -ガラクトシダーゼ活性を測定した。さらに、発見された患者について家族検索と遺伝子解析を行った。

大阪市立大学医学部付属病院人工透析室および関連病院人工透析室通院治療中の男性患者について、ファブリ病のリスク患者スクリーニングの承諾を得、透析時に血清の採取と保存を行った。

$\alpha$ -ガラクトシダーゼ活性は、4-MU- $\alpha$ -galactoside を基質として測定した。

#### (2) ムコ多糖症のマス・スクリーニング

1か月児の濾紙尿を用い、ムコ多糖症のマス・スクリーニングを検討した。

新生児病棟を退院時、スクリーニング検査のパンフレットと検査用濾紙を配布し、検査希望者は、1ヶ月検診時に尿を付けた濾紙を持ってくるようにした。

96穴マイクロプレート上で、尿濾紙よりアルカリ緩衝液にて尿を抽出し、ジメチルメチレンブルー呈色反応にてムコ多糖量を測定した。呈色のOD 515nmの吸光度が+2SD以上のもの(1次スクリーニング陽性)については、さらに濾紙をコンドロイチナーゼA/Cで消化し、同様の呈色反応を行った(2次スクリーニング)。消化後も正常値にならなかった乳児には、原尿を提出するよう指示し、ウロン酸量測定と電気泳動とを行った。

#### (3) ムコ多糖症II型患者の自然歴調査

当施設に通院しているあるいはしていたムコ多糖症II型患者18例について臨床記録を調べ、自然歴を検討した。

## II、実験研究

脳に対する非侵襲的早期治療を目的としてG<sub>M1</sub>ガングリオシドーシスモデルマウス( $\beta$ -galactosidase ノックアウトマウス)を用い、血液脳関門が成熟する以前の生後1~2日に、マウス $\beta$ -galactosidase 遺伝子を組み換えアデノウイルスベクターに組み込んだものを経静脈的に投与し、生化学的、組織学的にその効果を検討した。

組み換えアデノウイルスベクターはAdEasy Systemにて作製し、 $3.93 \times 10^9$  pfu/ml

のウイルス液を得た。マウスは、生後0-1日に尾を材料として酵素活性を測定し、ホモ、ヘテロを判別した。生後1-2日のホモマウスに組換えアデノウイルス液( $4 \times 10^7$  pfu)を片側の浅側頭静脈から投与した。対照として、無治療ホモマウス、正常マウスを使用した。投与後30日、60日に屠殺し、分析を行った。各臓器のホモジネートについて酵素活性を測定し、薄層クロマトグラフィーにて脂質分析を行った。組織では、HE染色、抗GFP抗体による免疫染色、X-gal染色、PAS染色を行った。

## 研究結果と考察

### I、臨床研究

#### (1) ファブリ病のリスク者スクリーニング

肥大型心筋症患者16名をスクリーニングしたところ、1例の女性ファブリ病患者を発見した。家族検索により、兄、弟、息子がファブリ病患者であることが分かった。遺伝子検索を本人と息子、娘について行ったところ、19番目のアミノ酸ロイシンがプロリンに変異する一塩基置換が本人と息子に認められ、娘には無かった。この変異は、過去に報告のない新しい変異であった。

人工透析患者についての結果はまだ得られていない。

今後、ファブリ病の酵素補充療法について保険診療が可能となることから、患者の発見が重要となると考えられる。全体スクリーニングの前段階として、リスク者スクリーニングが必要であろうと考えられた。

#### (2) ムコ多糖症のマス・スクリーニング

1995年1月~2001年12月での検体数は9,254、1次スクリーニング陽性は3.0%、2次スクリーニング陽性は0.26%で、2001年については、検体数1,425、一次スクリーニング陽性検体は40(2.8%)、二次スクリーニング陽性検体は6(0.42%)で、患者は見つからない。2001年の陽性検体の男女比は、男:女=1:2.6であった。

ジメチルメチレンブルー呈色反応によるム

コ多糖症のスクリーニングは、ある程度の擬陽性、擬陰性の発生は免れない。より効果的な方法の開発が待たれる。日本人においては、全ムコ多糖症患者の内 II 型患者が約半数を占め、また、II 型のみが X 連鎖性劣性遺伝形式をとることから、ムコ多糖症患者の男女比は理論上 3:1 となる。女兒において擬陽性が多い理由は、外陰部の汚れが尿に混入するためと推測された。

### (3) ムコ多糖症 II 型患者の自然歴調査

18 例のうち、最重症型 2 例、重症型 6 例、中間型 4 例、軽症型 4 例、最軽症型 2 例と分類された。

知能障害が全く来ない最軽症型や軽症型、また、来てもわずかである中間型については、酵素補充療法の効果が期待される。日本人のムコ多糖症 II 型患者において、これらは II 型全体の約半数以上を占めることが明らかにされ、スクリーニングによる早期発見と酵素補充による早期治療が期待される結果となった。

## II. 実験研究

無治療群ホモマウスの  $\beta$ -galactosidase 活性は、各臓器で正常マウスの 10% 以下であった。治療群ホモマウスにおいては、30 日目で全ての臓器において活性が上昇し、特に肝臓、肺、心臓での上昇が著明であった。30

日の治療マウスにおいて大脳、小脳の一部に X-gal 染色で染まっている細胞を認めた。心臓、肺、肝臓に有意な GFP 抗体染色、X-gal 染色陽性細胞を認めた。脂質分析では、治療群 30 日の 3/8 匹のマウスで大脳の GM1 ガングリオシドの量はほぼ正常であった。肝臓では全例で  $G_{M1}$  ガングリオシド量の低下を認め、4/8 匹が正常域であった。

治療ホモマウスでの  $\beta$ -galactosidase 活性は脳組織を含め各臓器で上昇し、組織におけるウイルスベクターの存在部位と活性の上昇とは一致した。脂質分析において、脳および肝臓での GM1 ガングリオシドの蓄積の抑止が見られ、治療効果が認められた。

## 結論

1. ライソゾーム病に対する酵素補充療法の発展に伴い、患者の早期発見はさらに重要となる。確実に効率的なスクリーニング法の開発が重要である。
2. 酵素補充療法をはじめとする治療法の効果を正確に判定するためには、その疾患の自然歴を調査し、明らかにしていくことが必要である。
3. 酵素補充療法では効果が期待できない中枢神経病変に対しては、遺伝子治療等の新しい治療法の開発研究が重要である。



## 研究成果の刊行に関する一覧表

### 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
田中あけみ	Sanfilippo 症候群	衛藤義勝 松尾宣武 柳澤正義	小児の症候群	診断と治療社	東京	2001	279
田中あけみ	GM1 gangliosidosis GM2 gangliosidosis	諏訪康夫	先天異常症候 群辞典・上巻	日本臨床社	東京	2001	756-757 758-759
田中あけみ	Wolman disease	諏訪康夫	先天異常症候 群辞典・下巻	日本臨床社	東京	2001	819-821
田中あけみ	ムコ多糖体蓄積症	「小児内科」 「小児外科」 編集委員会	小児疾患の診 断治療基準	東京医学社	東京	2001	180-181

### 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Seto, T et al.	Brain magnetic resonance imaging in 23 patients with mucopolysaccharidoses and the effect of bone marrow transplantation.	Ann. Neurol.	50	79-92	2001
Yagi, T et al.	Detection of the exogenous hGDNF in gerbils under the treatment with AxCAhGDNF adenoviral vector.	Brain Res. Protocols.	8	88-98	2001
田中あけみ	遺伝性疾患の患者親の会と医師との係わりについて —「日本ムコ多糖症親の会」の発足と発展	Cytomolecular Genet.	6	16	2001
田中あけみ	Wolman 病および cholesteryl ester storage disease	日本臨床	59	337-340	2001
田中あけみ	先天性代謝異常症に対する骨髄移植の効果	小児科	43	199-204	2002

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

分担研究報告書

当科におけるゴーシェ病 4 例の酵素補充療法について

分担研究者 高柳 正樹 千葉県こども病院 代謝科医長

研究要旨

ゴーシェ病に対して酵素補充療法が行われるようになり 5 年近く経過した。この間我々は 4 例のゴーシェ病の患者に対して酵素補充療法を行ったのでその治療効果を検討した。

貧血の改善、血小板の増多、肝脾腫の軽減、血中酸性フォスファターゼ値、アンギオテンシン II 転換酵素活性値などの改善については従来の方法の酵素補充療法により、半年から一年の間に大きな効果が認められる事が観察された。

III 型(chronic neuronopathic type)の一例においては酵素補充療法中も神経症状の増悪が認められた。今後のこの病型に対する治療法の検討が必要と考えられた。

A. 研究目的

ゴーシェ病に対して酵素補充療法が行われるようになり 5 年近く経過した。この間我々は 4 例のゴーシェ病の患者に対して酵素補充療法を行ったのでその治療効果を中心に報告する。

週間に一回静脈注射を行い治療を行った。患者 2 に対しては最近 4 5 単位 / k g / 毎週にて治療している。

4 名の患者の病型、遺伝子変異、性別、初診時年齢、主訴、治療開始年齢、治療継続期間など表にして示す。

B. 研究方法

ゴーシェ病の患者 4 名に対してイミグルセラゼ（遺伝子組換え）60 単位 / k g を 2

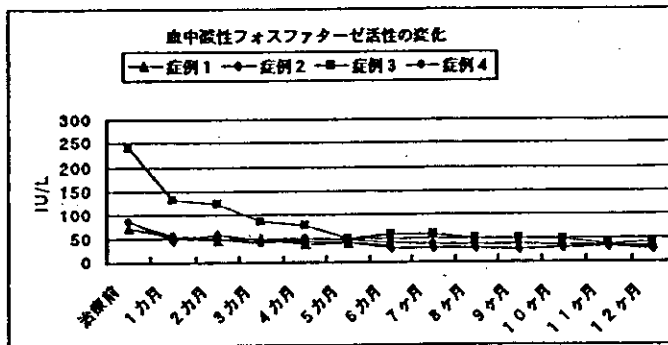
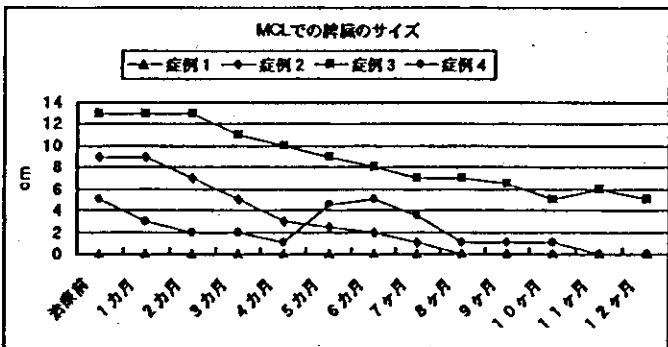
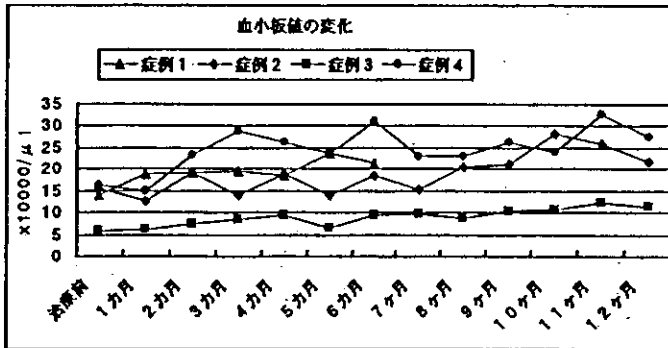
	病型	遺伝子変異	性別	診断時年齢	主訴	補充療法開始年齢	補充療法継続期間
患者 1	I 型	L444P / R496C	男子	10M	肝脾腫	16Y7M	4Y10M
患者 2	III 型	L444P / L444P	男子	2Y4M	骨クリーゼ	2Y5M	3Y8M
患者 3	III 型	?	男子	2Y5M	肝脾腫出血傾向	2Y6M	1Y10M
患者 4	III 型	?	女子	3M	患者 3 の妹	4M	1Y10M

研究結果

肝脾腫や貧血、血小板減少などの症状、さらには血中酸性フォスファターゼ値、アンギ

オテンシン変換酵素 I 活性などの異常検査値などは速やかに改善を示した。以下に治療後一年間の各症例の血小板の値、脾臓のサイズ、

酸性フォスファターゼ値の変化を図に示す。



症例2は4歳頃から歩行時の体幹のふらつき、しゃべり方が緩慢などの症状が目立つようになった。ABRは異常所見を示している。酵素補充療法を継続的に行ってきたが、6歳過ぎ頃からミオクローヌスと思われる動きが体幹、頭部を中心に出現しはじめている。突

然の転倒などをおこし危険であるので薬物療法にて管理をはじめたが、症状は増悪軽快を繰り返しおり治療困難である。

なお治療による副反応はほとんど認められず、治療を中断したりしたことはなかった。

#### 考察

私たちが酵素補充療法を行った4症例においても、これまでの報告のように肝臓、脾臓、骨髄におけるグルコセプロジッドの蓄積は速やかに減少し、臨床症状、検査成績もそれにつれて改善を示した。I型と思われる患者については酵素補充療法はきわめて良好な治療効果が認められるものと考えられる。しかしながら俗型が疑われる患者においてその中枢神経症状の改善は認められず徐々に進行してきている。

ヨーロッパではすでに神経型のゴーシェ病に対する酵素補充療法のコンセンサスも発表されている。(J.Inherit.Metab.Dis.24:319-327,2001) 我が国においても早急に検討をおこない、適切な神経型に対する治療法を確立する必要があると考えられた。

平成13年度厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）  
「ライソゾーム病の病態の解明及び治療法の開発に関する研究」

分担研究者報告

Gaucher 病患者に対する酵素補充療法の治療効果に関する臨床的研究

分担研究者 芳野 信（久留米大学小児科）

研究要旨

Gaucher 病 I 型の患者に対し、遺伝子組み替えヒト  $\beta$ -グルコセレブロシダーゼ (imiglucerase, BGC と略記) の補充を行い、その治療効果を検討し、以下の結果を得た。BGC による補充療法は、治療開始後 1 年以内は、血液像、肝脾腫とも速やかに改善するが、その後の改善は緩徐である。したがって、長期にわたる補充にあたっては、治療開始時と同様の投与方法、投与量でよいかどうかの検討が必要である。また、治療経過中、時期を問わず軽度ながら無視できない程度の腎不全を伴わない持続性高尿酸血症をみとめた。その原因として臓器の無症候性の微細梗塞なども考えられるが今後その機序の解明と対策が必要である。

A. 研究目的

Gaucher 病 I 型の患者に対する遺伝子組み替えヒト  $\beta$ -グルコセレブロシダーゼ (imiglucerase, BGC と略記) の治療効果を検討する。

B. 対象患者

対象は Gaucher 病 I 型患者 (1958 年 4 月 30 日生まれ、BGC 投与開始時 40 歳 2 か月、女性)。培養線維芽細胞で acid  $\beta$ -glucosidase 活性は対照の 7.7%、遺伝子変異は L444P と未同定の複合ヘテロ接合体である。【病歴】中学生の頃から、腹部が”硬い”と感じていたが、18

歳頃から、腹部がででいると自覚しはじめた。22~23 歳頃、腹満、左下腹部痛、鼻出血が続くため、近医 (外科) 受診、A 病院病院内科を紹介された。同内科で脾腫、貧血 (Hb 4g 台)、血小板減少 (正常の 1/10) を指摘され、1981 年 5 月、同病院で脾摘 (脾重量 3kg)、右卵巢摘出を受けた。この際、脾および骨髄に Gaucher 細胞を認め、本症と診断された。1981 年 9 月、急性肝炎と診断され 4 カ月入院、退院後は A 病院に通院していたところ、1984 年 9 月、腹部腫瘤を指摘されエコー検査で副脾の腫大と診断された。その後、1991 年 9 月頃から貧血が増

強、A 病院に再入院、検査を受け、増血剤、点滴を受けたが改善せず、検査目的で久留米大学第2内科に紹介され6カ月間入院、貧血などは改善はしなかったが、安定したため退院。1993年の暮れに左卵巣腫大を指摘され、1994年春、久留米大学産婦人科で部分切除を受け、現在に至っている。28歳のとき、正座から立ち上がろうとしたとき転倒、右足第5足指を骨折した。

#### C. 研究方法

BGC 投与開始前と開始後1年、3年時の臨床検査値、診察所見、画像の推移を検討した。BGCの投与量は60単位/kg/回とし、2～3時間かけて輸注を行った。

#### D. 結果と考察

BGC 投与開始前および開始後の臨床経過 1) 臨床検査値の推移 (括弧内は、BGC 投与による治療開始前→開始後1年→3年の値を示す) 赤血球数 ( $\times 10^4/\text{cmm}$ ) 243 → 358 → 315、血色素 (g/dl) 5.9 → 9.6 → 9.4、ヘマトクリット (%) 20.9 → 29.8 → 28.6、白血球 (/cmm) 2400 → 3700 → 3000、血小板 ( $\times 10^4/\text{cmm}$ ) 4.7 → 9.6 → 6.0、酸性フォスファターゼ (IU/l) 124 → 35.7 → 71.6、アンギオテンシン変換酵素 (U/l) 81.3 → 43.5 → 43.0、TTT (Kunkel Unit) 18.8 → 19.3、ZTT (Kunkel Unit) 41.0 → 36.9、尿酸

(mg/dl) 6.4 → 6.9 → 6.3、HPT (%) 56 → 78 → 69、PT (%) 51 → 62 → 61。2) 肝脾腫の推移 肝の大きさは乳線上、右肋骨弓下に触れる大きさ (cm)、脾の大きさは左乳線上で左肋骨弓下および左肋骨弓に直角方向の出最大長を、治療開始前、開始後1年、3年の順で示す。肝：6 → 4 → 3、脾：12 x 7 → 8 x 6 → 7 x 5 3) 骨変化 大腿骨の単純X線像は、治療開始前は、微細骨梁像の消失、横走する骨皮質の委縮像 (looser 像) を認めた。これらの所見は治療開始3年後に至っても極軽度の改善に留まっている。また、BGC 補充開始後2年の時点でBGCに対するIgG抗体が放射免疫沈降法で検出された。これらの結果から、以下のことが考えられる。

1) 病像のマーカーである酸性フォスファターゼ、アンギオテンシン変換酵素は治療開始後、速やかに低下したが正常範囲を越えた値に留まっている、2) 血液像、特に赤血球系は1年以内に改善しその後も緩解を持続するが、白血球、血小板数は改善の程度は相対的に軽度であった。

3) 肝、脾腫大はBGCによる治療開始後1年間は比較的速やかに縮小するがその後の縮小は極めて緩徐である。また骨病変も同様に治療に対する反応は極めて遅い。4) 尿酸は治療開始前、治療中を通じほとんど常時正常上限を上回る高値を示した。

経過中、脾などの梗塞を思わせる症状は認めなかった。

#### E. 結論

BGC による補充療法は、治療開始後 1 年以内は、血液像、肝脾腫とも速やかに改善するが、その後の改善は緩徐である。その理由は明らかでないが BGC に対する seroconversion の関与も推察される。したがって、長期にわたる補充にあたっては、治療開始時と同様の投与方法、投与量でよいかどうかの検討が必要である。また、治療経過中、

時期を問わず軽度ながら無視できない程度の腎不全を伴わない持続性高尿酸血症をみとめた。その原因として臓器の無症候性の微細梗塞なども考えられるが今後その機序の解明と対策が必要である。

#### F. 健康危機情報

投与開始 15 か月後頃から本剤輸注後にそう痒を伴う膨疹を生じることがあったが、輸注速度を緩徐（3 時間以上かける）にすることによって予防可能であった。

## ライソゾーム病の遺伝子治療に関する研究

分担研究者 島田 隆 (日本医科大学 生化学第二講座 教授)

### 研究要旨

Fabry 病のモデル動物としてノックアウトマウスの筋肉組織へヒト  $\alpha$ -Gal A cDNA を持つ AAV ベクターを導入した。筋肉内で発現させた  $\alpha$ -Gal A 蛋白質は治療後 32 週まで長期間持続的に血中に分泌し、正常マウスの約 26% の活性を維持した。生体内基質である Gb3 の組織濃度、免疫組織学的検討、電子顕微鏡像によりその蓄積の抑制を確認した。また 2D-Doppler 胸部心エコーにより形態機能学的に心肥大の抑制を認めた。本方法は十分に臨床応用が可能なものであることを、マウス動物実験にて確認した。

### A. 研究目的

Fabry 病は、リソゾーム酵素の一つである  $\alpha$ -ガラクトシダーゼ A ( $\alpha$ -GalA) 遺伝子の欠損による先天性代謝疾患である。この  $\alpha$ -Gal A が欠損すると、生体内基質である globotriaosyl-ceramide (以下 Gb3) などの糖脂質が分解されずに、全身の組織や臓器に蓄積される。現在のところ Fabry 病に対する有効な治療法は無く、米国、日本では酵素補充療法の治療が開始されている。又、レトロウイルスベクターや、アデノウイルスベクターによる遺伝子治療の基礎実験が行われているが、臨床応用には不十分で未だ多くの課題を残している。そこで安全性に優れ、神経系細胞や筋肉細胞などの非分裂細胞へも高率に遺伝子導入できる AAV ベクターを筋肉へ導入し、筋肉内で発現させた  $\alpha$ -Gal A 蛋白質を長期間持続的に血中に分泌させる新しい酵素補充療法を開発す

る。

### B. 研究方法

1. AAV ベクターの構築: ヒト  $\alpha$ -Gal A cDNA を CAG プロモーターによって発現させ、マーカー遺伝子として B19 ウイルスの初期プロモーターにドライブされた enhanced green fluorescence protein (EGFP) 遺伝子もしくは HSV-Tk プロモーターにドライブされたネオマイシン耐性遺伝子 (neoR) を持つ 2 種類の AAV ベクターを作成した。
2.  $\alpha$ -Gal A とその活性の測定:  $\alpha$ -Gal A 活性を Kusiak らの方法に従い 4-MU- $\alpha$ -Galactoside を基質する蛍光光度法にて測定した。
3. 発現した  $\alpha$ -Gal A の細胞への取込み: neoR を持つ AAV ベクターを用いて HeLa 細胞に遺伝子導入し、ネオマイシン耐性クローンを分離した。クローンの培養液内に分泌した  $\alpha$ -Gal A 活性を測定し、最も高濃度に  $\alpha$ -Gal A 分泌する細胞クローンを樹立した。このクローン培養液を Fabry 病患者由来の fibroblast へ浸し、24 時間培養後細胞内の  $\alpha$ -Gal A 濃度を 1mM mannose-6-phosphate (M6P) もしくは glucose-6-phosphate (G6P) 存在下で検討した。
4. In vivo 実験: 12 週令の  $\alpha$ -Gal A 遺伝子をノックアウトしたマウス (Fabry mouse) の右大腿四頭筋へ AAV ベクター ( $1.5 \times 10^{11}$  particles,  $0.5 \times 10^{11}$  particles) を注射し、経時的に血漿中の  $\alpha$ -Gal A 活性を測定した。また、投与 5, 15 及び 25 週経過後、肝臓、脾臓、心臓、肺、腎臓、脳、左右大腿四頭筋の組織内  $\alpha$ -Gal A および Gb3 濃度を測定した。同週齢の未治療ノ

ックアウトマウスおよびその野性型マウスも併せて測定した。

5. PCR法による  $\alpha$ -Gal A cDNA の細胞導入の確認: マウスより分離した肝臓、脾臓、心臓、肺臓、腎臓、脳、左右大腿四頭筋より DNA を抽出し、ヒト  $\alpha$ -Gal A cDNA に特異的なプライマーを用いた PCR を実施し、177 bp のバンドが増幅される事で確認した。同時にマウス  $\beta$ -アクチンを増幅する PCR プライマーを用いてマウスゲノム由来 604 bp のバンドが増幅されることより試料内の DNA の存在を確認した。

6. 組織 Gb3 量の定量; 組織ホモジネートより Folch 法 (J. Biol. Chem. 226, 497-509, 1975) の変法を用いて粗脂質分画を抽出した。precoated HPTLC-silica gel 60F<sub>154</sub> プレート (E. Merck) を用いた薄層クロマトグラフィーにて、Gb3 を分離し、オルシノール呈色後、発色した薄層を解析プログラムであるラインアナライザー (ATTO 社) で解析した。

7. 組織内 Gb3 の免疫組織学的検討: Itoh らの方法の変法を用いて、1次抗体として抗-Gb3 IgG マウスモノクローナル抗体を、2次抗体として fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated F(ab')<sub>2</sub> goat anti-mouse IgG を用いた。

8. 電子顕微鏡を用いて Gb3 の減少を組織学的に検討した

9. 治療効果の形態的、機能的効果の判定の為、2D, Doppler 胸部心エコーを施行した。ペントバルビタール麻酔下で心室中隔壁厚 IVST, 左室後壁厚 PWT を測定、同時に心重量 (Heart weight/body weight, mg/g) HW/BW を経時的に測定した。

### C. 研究結果

1. HeLa 細胞クローンから分泌された  $\alpha$ -Gal A 蛋白の Fabry fibroblast への取り込みは M6P 存在下では抑制されるのに対し、G6P 存在下では抑制されなかった。M6P レセプターを介した、

$\alpha$ -Gal A の internalization が示唆された。

2. AAV ベクター

( $1.5 \times 10^{11}$  particles) を筋肉に注射したノックアウトマウスでは、血清中の  $\alpha$ -Gal A 活性は上昇し、治療 10 週後には正常マウスの約 26% まで上昇し、最長治療 32 週後まで活性の上昇を維持した。5 週、15 週、25 週にて各臓器の  $\alpha$ -Gal A 活性を測定したところ、治療 5 週後には各臓器の  $\alpha$ -Gal A 活性の上昇 (正常マウスの 5-15%) を認め、その後も 25 週に渡って、活性の低下は認められず、同様の活性を維持した。Gb3 の蓄積は経時的に抑制され、治療群ではすべての臓器で、正常マウスとほぼ同等の Gb3 の低値を示した。

3. PCR 法により筋肉での  $\alpha$ -Gal A cDNA の遺伝子導入が確認され、その他の臓器での遺伝子導入がない事を確認した。

4. 抗 Gb3 モノクローナル抗体を用いた免疫組織学的検討では、非治療群では Gb3 の蓄積が認められるのに対し、治療群では Gb3 の蓄積がほとんど認められなかった。

5. 電子顕微鏡による腎臓実質の観察でも、非治療群では Gb3 の蓄積が認められるのに対し、治療群では Gb3 の蓄積がほとんど認められなかった。

6. 治療後 25 週における、HW/BW は非治療群で  $5.48 \pm 0.52$ , 治療群で  $4.76 \pm 0.31$  mm ( $p < 0.05$ ), IVST は非治療群で  $1.83 \pm 0.10$ , 治療群で  $1.65 \pm 0.10$  mm ( $p < 0.05$ ), PWT は非治療群で  $1.68 \pm 0.31$ , 治療群で  $1.58 \pm 0.10$  mm ( $p < 0.10$ ) と治療群では形態機能的に心肥大の抑制を認めた。

### D. 考察

Fabry 病は白人男性で 4000 人に一人の割合でみられる比較的頻度の高い先天性代謝疾患で、心不全、腎不全等を引き起こし、何も治療を施さない場合 40 代から 50 代で死亡するとされている。治療法としては対症療法しか無く、根本治療が期待されてい



る。米国において $\alpha$ -Gal Aを経静脈的に投与する酵素補充療法のトライアルが行われ、 $\alpha$ -Gal Aの発現とGb3の各臓器での蓄積の抑制が認められたが、長期に渡る $\alpha$ -Gal A投与が必要であるため患者に大きな金銭的負担が生じる。また治療の評価方法が、患者の痛みの軽減度合い、病理的な改善スコアでの判断など、やや客観性に欠けるものであった。我々のFabryマウスでの実験結果では、安全性に優れ、非分裂細胞にも導入できるAAVベクターを筋肉に一回導入することにより長期的な $\alpha$ -Gal Aの発現とGb3の各臓器での蓄積を確認できた。さらに心臓超音波検査を用いることにより、客観的データによる治療の効果判定ができた。今回の結果はヒトのFabry病の根本治療にも十分応用出来るものと確信した。今回の実験では治療による免疫反応等は調べて無いが、病理学的検査の結果や、 $\alpha$ -Gal Aの発現が抑制されなかったことから、免疫反応は起きていないと考えても差し支えないように思われる。今後は実際に抗体価を測定して、治療の安全性に関してさらなる配慮をする必要がある。

#### E. 結論

Fabry病の治療方法として、AAVベクターを筋肉組織へ導入する方法は十分に臨床応用が可能なものであることを、マウス動物実験にて確認した。今後治療の効果、安全性について、さらなる長期間にわたる観察をする必要があると思われる。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Miyake, K., Iijima, O., Suzuki, N., Matsukura, M., and Shimada, T. (2001) Selective killing of HIV infected cells by targeted gene

transfer and inducible gene expression using a recombinant HIV vector. *Hum. Gene Ther.* 12:227-233

- 2) Nakano, K., Migita, M., Mochizuki, H., and Shimada, T. (2001) Differentiation of transplanted bone marrow cells in the adult mouse brain. *Transplantation* 71:1735-1740
- 3) Sakai, N., Miyake, K., Suzuki, N., and Shimada, T. (2001) Selective transduction of HIV-1 infected cells by the combination of HIV and MLV vectors. *Inter. J. Hematol.* 73:476-482
- 4) Shimizu, H., Akasaka, S., Suzuki, S., Akimoto, M., and Shimada, T. (2001) Preferential gene transfer to BBN-induced rat bladder tumor by simple instillation of adenoviral vector. *Urology* 57:579-584
- 5) Akasaka, S., Suzuki, S., Shimizu, H., Igarashi, T., Akimoto, M., and Shimada, T. (2001) Suicide gene therapy for chemically induced rat bladder tumors entailing instillation of adenoviral vectors. *Jpn. J. Cancer Res.* 92:568-575
- 6) Goseki-Sone, M., Orimo, H., Watanabe, A., Hamatani, R., Yokozeki, M., Ohyama, K., Kuroda, T., Watanabe, H., Shimada, T., and Oida, S. (2001) Identification of a novel frameshift mutation (383insT) in the RUNX2 (PEBP2 alpha/CBFA1/AML3) gene in a Japanese patient with cleidocranial dysplasia. *J. Bone Miner. Metab. J. Bone Miner. Metab.*, 19: 263-266, 2001.
- 7) Nishiyama, Y., Nejima, L., Watanabe, A., Kotani, E., Sakai, N., Hatamachi, A., Shinkai, H., Kikuchi, K., Tamura, K., Shimada, T., Takano, T., and Katayama, Y. (2001) Ehlers-Danlos syndrome

- type IV with a unique point mutation in COL3A1 and familial phenotype of myocardial infarction without organic coronary stenosis. *J. Intern. Med.* 249:103-108
- 8) Okino, T., Onda, M., Matsukura, N., Inada, K., Tatematsu, M., Suzuki, S., Shimada, T. (2001) Sequential histopathological changes in vivo after suicide gene therapy of gastric cancer induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in rats. *Jpn. J. Cancer Res.* 92:673-679
  - 9) Orimo, H., Girschick, H. J., Goseki-Sone, M., Ito, M., Oda, K., and Shimada, T. (2001) Mutational analysis and functional correlation with phenotype in German patients with childhood-type hypophosphatasia. *J. Bone Miner. Res.* 16: 2313-2319
  - 10) Mochizuki, M., Hayakawa, H., Migita, M., Shibata, M., Tanaka, R., Suzuki, A., Shimo-Nakanishi, Y., Urabe, T., Yamada, M., Tamayose, K., Shimada, T., Miura, M. and Mizuno, Y. (2001) An AAV-derived Apaf-1 dominant negative inhibitor prevents MPTP toxicity as anti-apoptotic gene therapy for Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98:10918-10923
  - 11) 島田隆：カラー図説：遺伝子修復技術の進歩. *日本臨床* 59:2-5 (2001)
  - 12) 島田隆：レトロウイルスベクター. (第2部第1章第1節 遺伝子治療用医薬品の品質・安全性評価法)「バイオ医薬品の品質・安全性評価」早川、山崎、延原編集 p351-363 (2001) LIFE-SCIENCE INFORMATION CENTER
  - 13) 島田隆：癌遺伝子治療の現況. (特集：遺伝子医療-現況と将来) *臨床婦人科産科* 55:918-921 (2001)
  - 14) 島田隆：遺伝子治療に使われるベクター. (特集：遺伝子治療と Vector) *細胞* 33:208-212 (2001)
  - 15) 埴秀樹、島田隆：臨床で有望な新規ベクター開発研究の現状 (特集：遺伝子治療研究の新たな展開) *分子細胞治療* 2:223-229 (2001)
  - 16) 島田隆：遺伝子治療の現状と将来. *東日本整形災害外科学会雑誌* 13:127-130 (2001)
  - 17) 島田隆：遺伝子治療技術の新しい展開. *分子呼吸器病* 5:75-77 (2001)
  - 18) 島田隆：遺伝子治療の現状と将来. (卒後研修講座) *整形外科*
  - 19) 島田隆：遺伝子治療の現状と展望. *耳鼻咽喉科免疫アレルギー* 19:1-6 (2001)
  - 20) 島田隆：遺伝子を治療する遺伝子治療. 「先天性代謝異常症-最新の治療」*小児内科* 33:1021-1024 (2001)
  - 21) 島田隆、中島英逸：レトロウイルスベクターゲノムの安定性. 「遺伝子治療の最前線」*細胞工学* 20:1243-1249 (2001)
  - 22) 島田隆：遺伝子治療の現状と展望. *東京小児科医会報* 20:6-10 (2001)
  - 23) 島田隆：遺伝子医療の倫理的課題. *日本医大誌* 68:430-434 (2001)
  - 24) 池島三与子、島田隆：ミスマッチ修復の分子機構. *蛋白質・核酸・酵素* 46:1124-1129 (2001)
  - 25) 島田隆：遺伝子治療の将来. 「癌治療の先端にせまる」*実験医学* 19:255-2556 (2001)
- ## 2. 学会発表
- 1) 五十嵐 勉、三宅 弘一、鈴木 紀子、加藤 興、高橋 浩、大原 國俊、島田 隆：角膜上皮幹細胞、TA細胞への遺伝子導入. *角膜カンファレンス (大阪)* 2001.2.
  - 2) 島田 隆：遺伝子医学の現状と将来. 第53回東海地区歯科医学大会 (名古屋) 2001.2.
  - 3) 五十嵐 勉、三宅 弘一、鈴木 紀子、加藤 興、高橋 浩、大原 國俊、島田 隆：角膜上皮幹細胞およびTA細胞への遺伝子導入：第105回日本眼科学会総会 (横浜) 2002.4.

- 4) 早川 潤、右田 真、島田 隆、福永慶隆：GFP+骨髄幹細胞と間葉系幹細胞を持つ2種類のキメラマウスの作成-間葉幹細胞の多能性の解明に向けて-：第105回日本小児科学会総会（名古屋）2002.4.20
- 5) 早川 潤、右田 真、林田真理、倉持雪穂、島田 隆、福永慶隆：GFP陽性骨髄細胞のモデルマウスの作製～骨髄細胞の多能性の解明に向けて：第一回日本再生医学学会総会（京都）2002.4.19
- 6) 高橋 啓、平井幸彦、清野精彦、桜庭 均、橋本康弘、島田 隆：AAVベクターによる Fabry 病遺伝子治療の基礎的検討  
リビドーシス研究会（東京）2001,12
- 7) H.Takahashi, Y.Hirai, K.Takahashi, H. Sakuraba, R.Kase, T.Shimada: Development Of AAV Vector Mediated Enzyme Replacement Therapy For Fabry Disease. 4th annual meeting of the American Society of Gene Therapy (Sealte) 2001.05.
- 8) Hirai, Y., Takahashi, H, Takahashi, K, Shimada, T.: Production of recombinant adenovirus (rAd) carrying all genome of adeno-associated virus type 2 (AAV) in the 293 cell line which expressed antisense of AAV Repromoters. 4th annual meeting of the American Society of Gene Therapy (Sealte) 2001.05.
- 9) H.Takahashi, Y.Hirai, K.Takahashi, H. Sakuraba, R.Kase, T.Shimada: Development Of AAV Vector Mediated Enzyme Replacement Therapy For Fabry Disease. 第7回日本遺伝子治療学会（東京）2001.7
- 10) Hirai, Y., Takahashi, H, Takahashi, K, Shimada, T.: Production of recombinant adenovirus (rAd) carrying all genome of adeno-associated virus type 2 (AAV) in the antisense-rep expressed 293 cells.: 7th annual meeting of the Japan Society of Gene Therapy (Tokyo) 2001.07
- 11) H.Takahashi, Y.Hirai, K.Takahashi, H. Sakuraba, R.Kase, Y.Hashimoto, T.Shimada: Development of AAV Vector Mediated Enzyme Replacement Therapy For Fabry Disease. 日本先天代謝異常学会（久留米）2001.11

## 厚生科学研究費補助金(特定疾患対策研究事業)分担研究報告書

ライソゾーム病の病態の解明及び治療法の開発に関する研究:

5 型 AAV ベクターによる acid maltase ノックアウトマウスへの遺伝子導入の検討

分担研究者 辻野 精一

国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第5部室長

協力研究者 水上 浩明、小澤 敬也

自治医科大学遺伝子治療研究部

### 研究要旨

アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターは非分裂細胞への遺伝子導入効率に優れ、かつ免疫原性が低く野生型ウイルスでさえ病原性がないという点から遺伝子治療に用いるベクターとして期待されている。最近その血清型により生物種、組織の遺伝子導入効率が異なることが知られるようになってきた。一方、ライソゾーム病の一種である acid maltase(AM)欠損症には重篤な病型もあるがその治療法はいまだ確立されていない。従来広く用いられてきた血清型2型 AAV ベクターでは我々が用いている AM ノックアウトマウス(KOM)への遺伝子導入効率は低く実験系として成り立ち難かったが、今回 5 型 AAV ベクターの遺伝子導入効率が非常に高いことが判明し AM-KOM に対する長期的な効果を検討中である。

#### A. 研究目的

AM 欠損症には重篤な病型もあるがその治療法はいまだ確立されていない。将来的な遺伝子治療を目指して5型 AAV ベクターを用いて AM-KOM に対する遺伝子導入実験を行なった。

測定、組織の PAS 染色などの方法により解析した。AAV5-AM を筋注した個体では現在までには9週まで経過を追い、上記解析を施行した。モデル動物の取り扱いに関しては必要以上の苦痛を与えないよう十分配慮した。

#### B. 研究方法

AM-KOM の線維芽細胞(Fb)と個体筋組織に血清型2型、5型の AM 発現 AAV ベクター(AAV2-AM, AAV5-AM)で遺伝子導入した後、Fb では酵素活性を測定し、固体では酵素活性の測定の他、グリコーゲン含量の

#### C. 研究成果

AM-KOM の Fb と個体筋組織ではいずれも AAV2-AM 投与では酵素活性の上昇は少なかったが、AAV5-AM 投与では十分な酵素活性の上昇が観察され、グリコーゲン含量も低下し、PAS の染色性も低下した。この効果