

成人ハンター病患者の QOL に関する検討

分担研究者 鈴木康之（岐阜大学医学部医学教育開発研究センター）
研究協力者 加藤智美（岐阜大学医学部医学教育開発研究センター）
折居忠夫（中部学院大学）

研究要旨

成人ハンター病患者の QOL を評価する 1 つの方法として FIM を用いて検討を行った。FIM の質問項目は日常生活を良く反映しており、身体機能・QOL を評価するのに適した手段と考えられた。今回の調査結果から、成人の軽症型ハンター病患者は全般的には身体的制約があるものの QOL を保持しようと努力しており、治療により QOL の改善が望めると考えられた。

A. 研究目的

ムコ多糖症は関節拘縮、中枢神経障害、心臓障害、聴力障害、呼吸障害などをきたす遺伝病であるが、治療法は確立されておらず、患者 QOL についても詳細な検討は行われていない。我々は FIM 質問紙 (functional independence measure、慶応義塾大学月ヶ瀬リハビリテーションセンター太田哲生先生作成) を用い、ムコ多糖症で最も頻度の高いハンター病の QOL に関するパイロットスタディを行った。

B. 対象・研究方法

対象：8 例の年齢は 18～39 歳（平均 25.4 歳）で、VIQ=58～108（平均 78）、PIQ=65～103（平均 79）、全 IQ=55～106（平均 74）であった。学生 2 名、事務職 2 名、鍼灸師 1 名（盲）、文筆業 1 名、内職 1 名、無職 1 名（弱視）であった。

方法：検査入院した際に本人もしくは家族が質問紙に回答し、医師が評価を行った。質問は A 食事、B 整容、C 入浴、D 更衣上半身、E 更衣下半身、F トイレ動作、G 排尿コントロール、H 排便コントロール、I ベッド移乗、J トイレ移乗、K 浴槽移乗、L 歩行移動、M 階段移動、N 理解、O 表出、P 社会的交流、Q 問題解決、R 記憶にわかれ、完全自立 7 点～全介助 1 点で評価した（最高 126 点、最低 18 点）。

（倫理面への配慮）

本調査は岐阜大学医学研究倫理審査委員会の承認のもと、文書による同意を得て実施した。

C. 研究結果

各項目の平均得点は以下のとおりであった。A 食事 6.9、B 整容 5.9、C 入浴 5.8、D 更衣上半身 6.3、E 更衣下半身 6.6、F トイレ動作 6.4、G 排尿コントロール 7.0、H 排便コントロール 6.6、I ベッド移乗 7.0、J トイレ移乗 7.0、K 浴槽移乗 6.9、L 歩行移動 6.5、M 階段移動 6.1、N 理解 5.8、O

表出 6.8、P 社会的交流 6.8、Q 問題解決 6.5、R 記憶 7.0、合計 118。

目立った点は以下のとおり。整容・入浴（柄つきブラシなどの補助具）、更衣（マジックテープを使った改良服）、食事・更衣・歩行・社会的交流（時間がかかる）、階段（手すり）、理解（補聴器）など。

D. 考察

FIM の質問項目は日常生活を良く反映しており、身体機能・QOL を評価するのに適した手段と考えられた。今回、質問をより具体的にし、本人と家族の主観を極力排除することが可能であった。今回の調査結果から、成人の軽症型ハンター病患者は全般的には身体的制約があるものの QOL を保持しようと努力しており、治療により QOL の改善が望めると考えられた。

E. 結論

ムコ多糖症患者の QOL を評価する手段として FIM が有用と考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Tomatsu S, Orii KO, Islam MR, Shah GN, Grubb JH, Sukegawa K, Suzuki Y, Orii T, Kondo N, Sly WS. Methylation patterns of the human beta-glucuronidase gene locus: boundaries of methylation and general implications for frequent point mutations at CpG dinucleotides. *Genomics*. 2002;79:363-75.

2. 学会発表

祐川和子、笠 信博、戸松俊治、鈴木康之、折居忠夫、近藤直実：遺伝性ムコ多糖症 II 型（Hunter 病）患者の実態調査。第 105 回日本小児科学会学術集会、2002.4.19-21、名古屋

H. 知的所有権の取得状況

なし

Late-onset Krabbe 病の当科経験例 2 例の臨床的特徴と遺伝子変異

分担研究者：辻 省次 東京大学大学院医学系研究科神経内科学教授

研究要旨：Late-onset type Krabbe 病の 2 例を経験し、その臨床的特徴、galactocerebrosidase (GALC) 酵素活性、GALC 遺伝子変異について検討し、さらに既報例と合わせて、遺伝子変異と臨床型との対応について考察した。今回の 2 例はともに若年期から成人期に手の振戦、痙性歩行で発症し、緩徐に進行した。脳 MRI では 1 例は錐体路に局限した脱髄病変を認めたが、他の 1 例は大脳全体に広範な脱髄性病変を認めた。GALC 活性値 (0.053 および 0.328nmol/mg/hr) は infantile-onset type Krabbe 病に比較すると高値の傾向であった。遺伝子解析では、症例 1 は Ser7stop, Ile66Met 変異の複合ヘテロであり、症例 2 は exon 6 の欠失と Leu618Ser 変異の複合ヘテロであった。既報例と合わせて検討すると、Ile66Met、Leu618Ser の両変異は Late-onset type Krabbe 病の表現型に相関している可能性があり、また、Late-onset type Krabbe 病では、infantile-onset type Krabbe 病に比し、変異が GALC 遺伝子の N 末端、C 末端に存在するケースが多いことが示された。しかし、遺伝子変異と表現型との相関については更に症例を蓄

A. 研究目的

Krabbe 病 (globoid cell leukodystrophy) は galactocerebrosidase (GALC) 遺伝子の遺伝子変異によりライソゾーム中の GALC 活性が低下し、galactosylsphingosine (psychosine) が蓄積することにより中枢、末梢の脱髄をきたす常染色体劣性遺伝性疾患である。多くの症例は生後 6 ヶ月までに精神運動発達遅滞などで発症し、2 歳までに死亡する infantile-onset type (以下、IOT) であるが、若年期あるいは成人後に発症する稀な late-onset type (以下、LOT) の存在も知られている。LOT では筋力低下など錐体路症状を主症状とするが、知能障害、視力障害、感覚障害などは比較的軽度にとどまり、長期生存例も存在する。一般的に IOT の症例は LOT 例よりも GALC 活性がより低値である傾向はあるものの、活性値により両者を区別することはできないと言われている。しかし、酵素活性の測定条件が症例毎に異なるために酵素活性値と重症度との相関はなお検討の余地があると考えられる。

新潟大学脳研究所神経内科では過去に 2 例の LOT の Krabbe 病を経験し、GALC 遺伝子解析を行ったので、その遺伝子変異、GALC 活性、臨床症状について検討し、文献例と合わせて遺伝子型と表現型の相関について考察した。

B. 研究方法

新潟大学脳研究所神経内科にて LOT Krabbe 病と診断された 2 症例について、臨床症状、MRI 所見などを検討し、GALC 遺伝子解析を行った。本邦において報告されている LOT Krabbe 病症例と合わせて遺伝子型と表現型の相関について検討した。

GALC 遺伝子解析は、症例 2 については Furuya らにより cDNA 解析が行われ、変異が報告されている (Hum Genet 100:450-456, 1997)。今回、症例 2 は既報の変異部位をゲノム DNA 解析にて確認した。症例 1 については GALC 遺伝子の 17 個の全エクソン部分をゲノム DNA を用いて PCR で増幅し、直接シーケンス法にて塩基配列を決定した。

(倫理面への配慮) 2 症例とも GALC 遺伝子解析を行うことについて十分なインフォームドコンセントを行い、文書による同意を得て、解析を行った。

C. 結果

1) 症例の臨床像：

症例 1：39 才女性。家系内には血族婚なく、類症なし。未熟児で出生し、小学生の頃から歩き方に癖があると指摘され、動作時に右手に振戦を認めるようになった。16 歳頃より右

手の筋力低下が出現。32歳頃から右上肢の筋力低下、振戦が悪化し、36歳頃から痙性歩行が顕在化。その後も進行性経過のため39歳時に当科入院。神経所見では、右上肢、両下肢遠位部に筋萎縮があり、四肢遠位部優位の筋力低下を認めた。高度の両下肢痙性を認め、片足立ちは不可能。右上肢には姿勢時、動作時振戦を認めた。腱反射は左上肢、両下肢で亢進していたが右上肢ではむしろ低下。Babinski反射が両側陽性。感覚系では右上肢と両下肢の遠位部に触覚低下を認めた。検査所見では軽度の髄液中蛋白増加(57mg/dl)を認めた。末梢神経伝導速度検査では全被検神経に高度のMCV低下を認めたが、振幅は比較的保たれており、伝導ブロックやtemporal dispersionは認めなかった。脳MRIではT2強調画像にて皮質下から中脳にかけ、左右対称性に錐体路に沿って連続した高信号病変を認めた。皮質はきれいにspareされており脱髄性病変と考えられた。

症例2: 38才男性。家系内には血族婚なく、類症なし。17歳時に痙性歩行を指摘され、25歳時に手の姿勢時、動作時振戦出現。37歳時下肢筋力低下のため階段昇降不能となり、また、酩酊様の構語障害を指摘された。38歳時に当科入院。神経所見では脅迫笑、構語障害、左上肢遠位部と両下肢遠位の軽度筋萎縮、左手背側骨間筋に筋線維束攣縮を認めた。歩行は痙性対麻痺歩行で、四肢の腱反射は亢進し、Babinski反射は両側陽性。左上肢に姿勢時振戦を認め、四肢の失調を認めた。検査所見では髄液中蛋白の増加(80mg/dl)を認め、末梢神経伝導速度検査では症例1と同様に全被検神経に高度のMCV低下を認めたが、伝導ブロックやtemporal dispersionは認めなかった。脳MRIでは前頭葉、後頭葉、頭頂葉の白質に広範な高信号域と萎縮所見を認めた。

以上から症例1, 2とも中枢および末梢の進行性脱髄性疾患と考えられ、ライソゾーム酵素活性を測定した結果、GALC活性の低下(症例1: 0.053nmol/mg/hr、症例2: 0.328nmol/mg/hr)を認め、LOT Krabbe病と診断した。両症例ともIOT Krabbe病に比べて軽症で緩徐な経過を示し、GALC活性値も一般的なIOT Krabbe病に比較して高値であった。

遺伝子解析では、症例1はSer7stop, Ile66Met変異の複合ヘテロであり、症例2はexon 6の欠失とLeu618Ser変異の複合ヘテロであった。Exon 6の欠失は、発現実験での確認が必要で

あるが、intronのdonor領域の点変異(G→A)があることから、これによると思われた。また、それぞれのalleleにpolymorphismも認められており、症例1ではSer7stopと同一アリル上にGln312Gln, Ile66Metと同一アリル上にIle289Valのpolymorphismを、症例2ではExon 6の欠失と同一アリル上にGln312Gln, Ser434Ser, Ile546Thrを、Leu618Serと同一アリル上にIle289Valの各polymorphismを認めた。

D. 考察

Krabbe病の表現型とGALC酵素活性値やGALC遺伝子変異の種類がどのように対応するのか、あるいは対応がないのかはまだ不明である。

しかし本邦では症例1と同様にIle66Met変異を有するLOT Krabbe病の2例が報告されており、この変異はLOT Krabbe病の表現型と対応している可能性がある。既報の2例も症例1と同様にIle66Met変異の同一アリル上にIle289Valのpolymorphismが存在する。Cos1細胞を用いた変異蛋白の発現試験ではIle66Met変異は単独では軽度のGALC活性低下しか起こさず、また、polymorphismであるIle289Valも軽度ながらGALC活性を低下させるが、この2つアミノ酸置換を同時に発現させるとGALC活性が著明に低下する(Hum Genet 100:450-456, 1997)。このことは病因遺伝子変異であるIle289ValがpolymorphismであるIle289Valの存在下で初めてGALC活性の低下を引き起こし、病因となることを示唆している。

また症例2で認められたLeu618Ser変異と同一の変異を有するLOT Krabbe病が本邦で1例報告されているが、この変異はIOT Krabbe病では報告がなく、やはりLOT Krabbe病と対応する変異である可能性がある。

過去のLOT Krabbe病とIOT Krabbe病の報告例を対比検討すると、LOT Krabbe病ではLeu618Ser変異のように変異がGALC遺伝子のN末端あるいはC末端近くに偏在している傾向がある。このことはN末端あるいはC末端近くの変異はGALC酵素の構造変化に与える影響が比較的小さく、その結果、残存酵素活性も比較的大きくなり、結果として軽症の表現型をとるという可能性が考えられる。今後さらに症例を蓄積し、検討することが必要であるが、比較に耐えうるような酵素活性

の測定条件の統一などが望まれる。

E. 結 論

新潟大学脳研究所神経内科で経験された LOT Krabbe 病の 2 症例について、臨床的特徴と遺伝子変異について解析を行った。既報例と合わせて考察すると GALC 遺伝子の Ile66Met、Leu618Ser の両変異は LOT Krabbe 病の表現型に相関している可能性があり、また、LOT Krabbe 病では、IOT Krabbe 病に比し、変異が GALC 遺伝子の N 末端、C 末端に存在する場合が多いことが示された。しかし遺伝子変異と表現型との相関については更に症例を蓄積して検討する必要がある。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表 なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

ライソゾーム病の早期診断法の開発に関する研究

分担研究者	北川照男 (財)東京都予防医学協会	理事長
	鈴木健 (財)東京都予防医学協会	次長
	石毛信之 (財)東京都予防医学協会	主任
	大和田操 日本大学医学部小児科	助教授
	大橋十也 東京慈恵会医科大学小児科	助教授
	衛藤義勝 東京慈恵会医科大学小児科	教授

研究要旨

Fabry 病は Globotriaosylceramide (GL3) を分解する α -Galactosidase A 蛋白 (α -GalA) の欠損あるいは障害によって生ずる糖脂質蓄積症である。

最近、ヒト α ガラクトシダーゼ (α GalA) の生産が工業的に行われ、Fabry 病の酵素療法が可能となったので予後の改善が望めるようになり、ヨーロッパ諸国では既に Fabry 病の酵素補充療法が一般的な治療として広く使用され、良好な結果を得ていると報告されている。しかし、本症の多くは腎機能や心機能が低下し、重篤な症状を呈してから発見されており、酵素療法によって本症の予後を改善するには、早期診断、早期治療法の開発が望まれている。

そこで、我々は、ヒト α GalA モノクローナル抗体を用いた ELISA 法を開発し、尿 α GalA を測定することによる population をベースにした本症のマス・スクリーニング法について検討し、2,3 の知見を得たので報告する。

1. 研究目的

研究目的は、我々が開発した抗ヒト α -GalA モノクローナル抗体を使用した ELISA・Sandwich 法を用いて α -GalA を測定し、わが国における population を base にした Fabry 病のマススクリーニング法のシステムについて検討することである。

2. 研究対象および方法

対象は Fabry 病患者 10 名、保因者 3 名、健常成人 1,447 名、小学生 30 名、中学生 30 名の随時尿および血清を用いた。 α GalA 蛋白は、ヒト α GalA モノクローナル抗体を固相化したマイク

ロプレートを用いて測定した。尿 α GalA 活性は、血漿 α GalA 活性測定に広く用いられている方法を用いた。また、酵素障害による蓄積物である尿 GL3 の測定には Tandem-Mass 法 (LC-MS/MS 法) を用いて行い、尿クレアチニン濃度の測定には Jaffe 法を用いた。

3. 倫理面への配慮

今回の研究に際して使用した成人および 3 歳児の尿検体については、受診者本人または保護者から、文書あるいは口頭によって了解を得ている。

4. 研究成績

- 1) 尿を 4°C で冷蔵保存した場合は、 α GalA の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ので、尿を採取後直ちに 4°C で冷蔵保存し、その日のうちに α GalA を測定するか、それが不可能な時は少なくとも 2 日以内に測定した。
- 2) 40 名の健常成人の尿について、 α GalA 蛋白と活性とを同時に測定したところ、図 1 に示すように、両者は $r = 0.911$ の正の相関関係を示した。
- 3) 健常成人 9 名、Fabry 病患者（男性）10 例、保因者 3 例の血清と尿の α GalA 蛋白を同時に測定して検討したところ、図 2 に示すように、両者の間には $r = 0.758$ の正の相関関係を認めた。
- 4) Fabry 病患者（男性）8 例と対照成人 9 例の血清 α GalA 蛋白の平均値はそれぞれ 0.3 ± 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。
- 5) 成人対象 1,447 例の尿 α GalA 蛋白の測定値の濃度分布を検討したところ、図 3 に示すように、頻度の最も多いのは 10 ng/mg creat. であり、低い方から見た 3 パーセンタイル値は 3 ng/mg creat. であった。従って、この方法で Fabry 病をスクリーニングする場合は、 3 ng/mg creat. を cut-off 値とするのが良いと思われた。
- 6) 我々が検討したこれまでの成績を確認するために測定した尿 GL3 値は、表 1 に示すように、健常成人（2 例）では低値を示していたのに対して、患者（4 例）では極めて高値を示してお

り、イオン強度総量で 1 : 50-100 の割合であった。また、保因者（3 例）は、健常成人の 3-7 倍程度の濃度であり、患者の GL3 濃度のように増量していなかった。

5. 考察

以上の成績から、採尿後直ちに尿を冷蔵保存し、少なくとも翌日中に α GalA 蛋白を測定すれば本症のスクリーニングが可能であり、 α GalA 活性値と蛋白量は相関し、尿 α GalA は血清のその値を反映しており、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 α GalA 蛋白を測定して本症を診断することが可能である。

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 α GalA 蛋白を測定すれば、全国的に population base で Fabry 病をスクリーニングすることが可能と思われる。

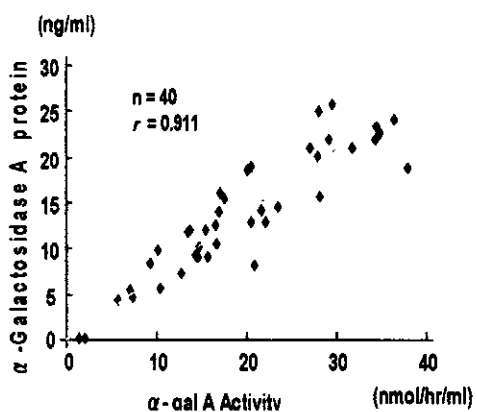


図 1. α -galactosidase A 蛋白測定値と活性値の相関関係

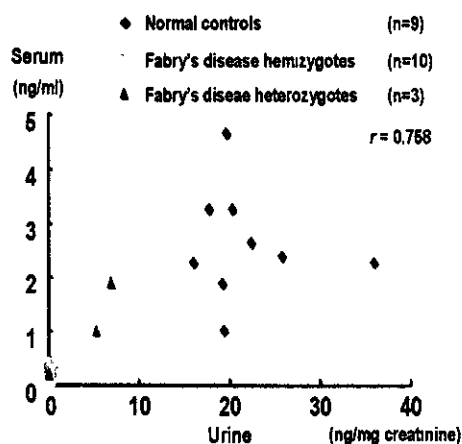


図 2. 尿と血液の α -galactosidase A 蛋白値の相関関係

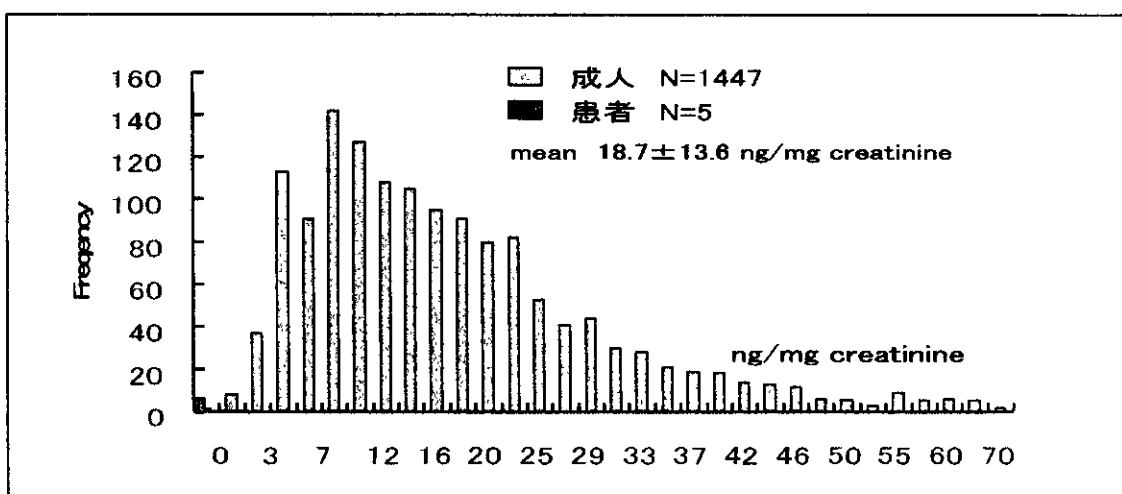


図 3. 成人尿における α -galactosidase A 蛋白濃度分布

表 1. 尿における GL3 および α -galactosidase A 蛋白濃度

Classification	Name	Male/female	urinaryGL3	α -Gal A protein
Hemi- zygotes	T.N	Male	23.5	0.2
	M.K	Male	15.6	0.2
	A.I	Male	7.2	0.1
	K.N	Male	1.4	0.6
Hetero- zygotes	S.I	Female	0.3	0.2
	T.N	Female	0.3	3.1
	Y.N	Female	-	3.4
Normal	N.I	Male	0.1	31.6
	K.S	Male	0.1	29.3

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

ライソゾーム病の脳病変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 (β -ガラクトシダーゼ・ノックアウトマウス) を用いて実験を行った。生後 1～2 日のマウスに、 β -ガラクトシダーゼ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 β -ガラクトシダーゼ活性は脳組織を含め各臓器で上昇し、組織の X-Gal 染色パターンと一致して活性が上昇していた。脳の組織染色においても β -ガラクトシダーゼ活性を持つ細胞が散見され、また、脂質分析でも G_{M1} ガングリオシドの蓄積抑止が認められた。生後間もないマウスにおいては、経静脈的に脳への遺伝子導入が可能であることが示され、さらに、治療効果も認められた。

研究協力者

高浦奈津子（大阪市立大学大学院医学研究科・発達小児医学）

研究目的

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。これは、血液脳関門の存在が大きな原因であると推測されることから、非侵襲的に脳内に物質を入れることは難しい。脳に対する非侵襲的早期治療を目的として、血液脳関門が成熟する以前の生後間もないマウスを用い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

G_{M1} ガングリオシドーシスモデルマウス (β -ガラクトシダーゼ・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 β -ガラクトシダーゼ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、 3.93×10^9 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 β -ガラクトシダーゼ酵素活性を測定し、ホモ、ヘテロを識別した。生後 1～2 日のホモマウスに組換えアデノウイルス液 (4×10^7 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、同系の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 G_{M1} ガングリオシド抗体による免疫染色、X-gal 染色を行った。
(倫理面への配慮)

実験動物の手術操作、処置、屠殺方法については、「大阪市立大学医学部実験動物取り扱い規定」に従った。

研究結果

無治療群ホモマウスの β -ガラクトシダーゼ活性は、各臓器で正常マウスの 10% 未満であった。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、60 日目ではこれよりやや低下していた。各マウ

スの各臓器における酵素活性の上昇度は、すべてのマウスで肝臓、肺、心臓で著しく高く、臓器間での一定の傾向は認められたが、マウス間では各臓器の比例的上昇はなかった(図1)。

脂質分析では、表1に示したように、酵素活性の有意な上昇を認めた個体(*で示したもの)において、G_{M1} ガングリオシド蓄積量も有意に少なく、遺伝子導入による治療効果が認められた。図2に、治療効果が認められたマウスの薄層クロマトグラフィーを示した。正常マウスとほぼ同様のパターンが見られた。

さらに、治療効果が認められたマウスの大脳組織において X-gal 染色で強染する細胞を認め(図3)、経静脈的に投与されたβ-ガラクトシダーゼ遺伝子が脳細胞に到達してβ-ガラクトシダーゼ酵素蛋白を発現したことが明らかにされた。また、抗G_{M1} ガングリオシド抗体を用いた免疫染色によっても、G_{M1} ガングリオシドの蓄積の減少を見ることができた。

考察

マウスにおいて、血液脳関門が成熟するのは生後10-14日であるといわれている。これ以前には、血管系より脳内へ物質を投与することが可能であると推測される。今回の実験では、アデノウイルスベクターに組み込まれた遺伝子を経静脈的に1回投与するだけで、少なくとも60日間、導入遺伝子の発現とその効果の持続を認めることができた。各臓器

での酵素活性の上昇度は各マウスにおいて異なり、肝臓等で高い酵素活性を示したマウスが脳においても高い活性をもつとは言えなかった。このことから、肝臓等で大量に発現された酵素蛋白が脳へ移行するのではなく、ウイルス粒子が直接脳細胞に到達して感染し遺伝子発現されることにより脳での活性が認められるものと考えられた。このことは、組織染色でも明らかにすることができた。

今回の実験結果から、より長期にあるいは恒久的に発現を持続することができる導入ベクターを用いれば、ライソゾーム病の脳障害を遺伝子導入により治療することが可能であると推測された。ヒトにおいては、生下時にすでに血液脳関門が成熟しているため、胎児期での投与、あるいは、人工的早産による治療が必要であろうと思われる。

結論

ライソゾーム病における脳障害は、骨髄移植や酵素補充療法の効果が期待できない。遺伝子治療、細胞治療の面からの研究が必要であると考えられる。

研究発表

Takaura, N., Yagi, T., Maeda, M., Nanba, E., Ohshima, A., Suzuki, Y., Yamano, T., Tanaka, A. Attenuation of ganglioside GM1 accumulation in the brain of GM1 gangliosidosis mice by neonatal gene transfer. *Gene Therapy* 10: 2003 (in press)

表 1、大脳組織中の β -ガラクトシダーゼ活性と GM1 ガングリオシド含量

マウス No.	β -ガラクトシダーゼ活性 (nmol/mg/h)	GM1 ガングリオシド含量 (μ mol/g wet weight)
(30 th day)		
Treated 1*	6.15*	1.03*
2	0.939	1.57
3	0.615	2.01
4	1.57	2.04
5*	11.6*	0.49*
6*	6.16*	0.48*
7*	8.46*	0.36*
Untreated	3.18 \pm 2.14 (n=8)	1.68 \pm 0.23 (n=8)
Normal	67.4 \pm 19.1 (n=7)	0.17 \pm 0.18 (n=7)
(60 th day)		
Treated 1	2.62	2.16
2	4.36	2.33
3*	16.1*	0.99*
4	2.47	1.79
5	2.71	4.01
6	1.83	4.56
7*	8.59*	2.06*
8*	4.63*	1.97*
9*	8.31*	1.46*
10*	6.22*	1.88*
Untreated	2.65 \pm 0.45 (n=12)	3.22 \pm 1.00 (n=12)
Normal	45.8 \pm 12.2 (n=6)	0.32 \pm 0.07 (n=6)

图 1

Percent of normal mean activity

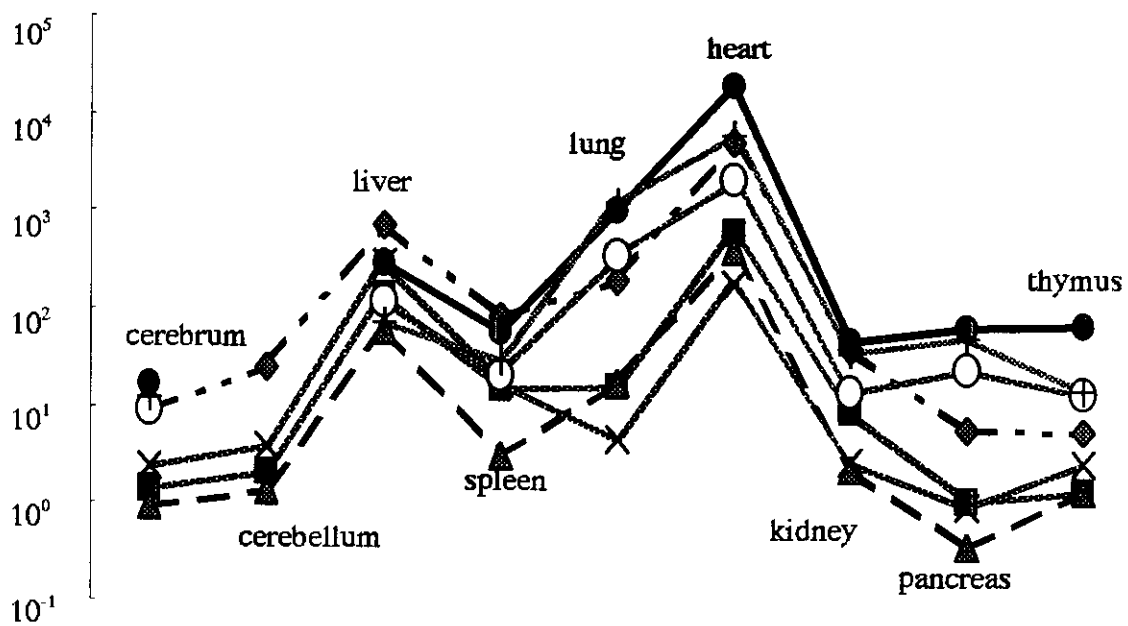


图 2

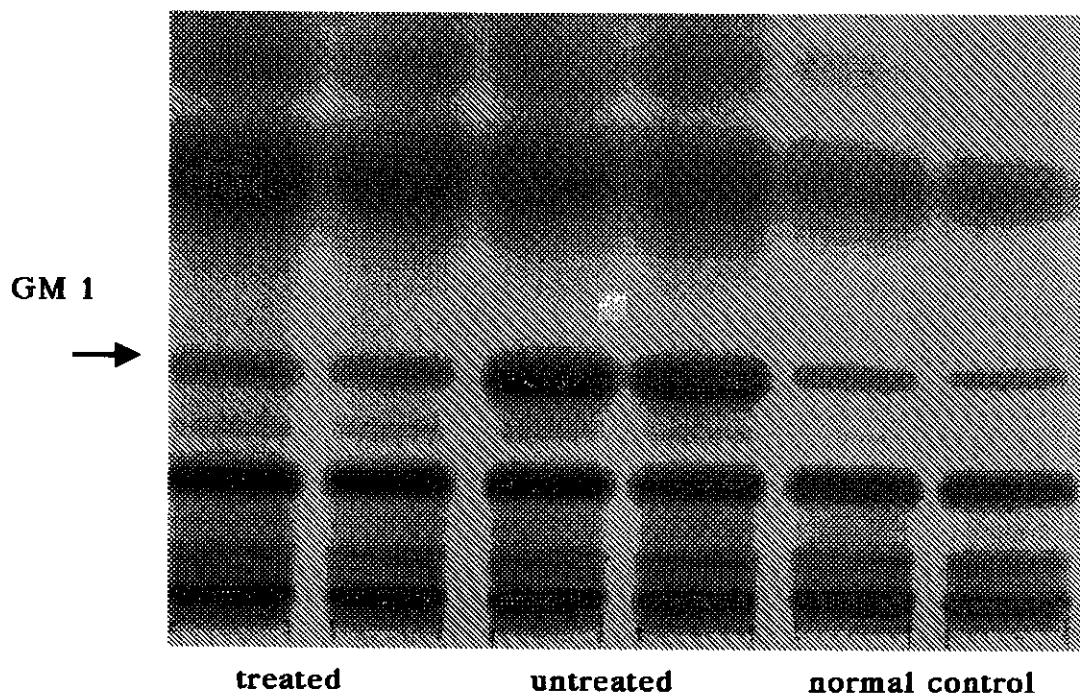
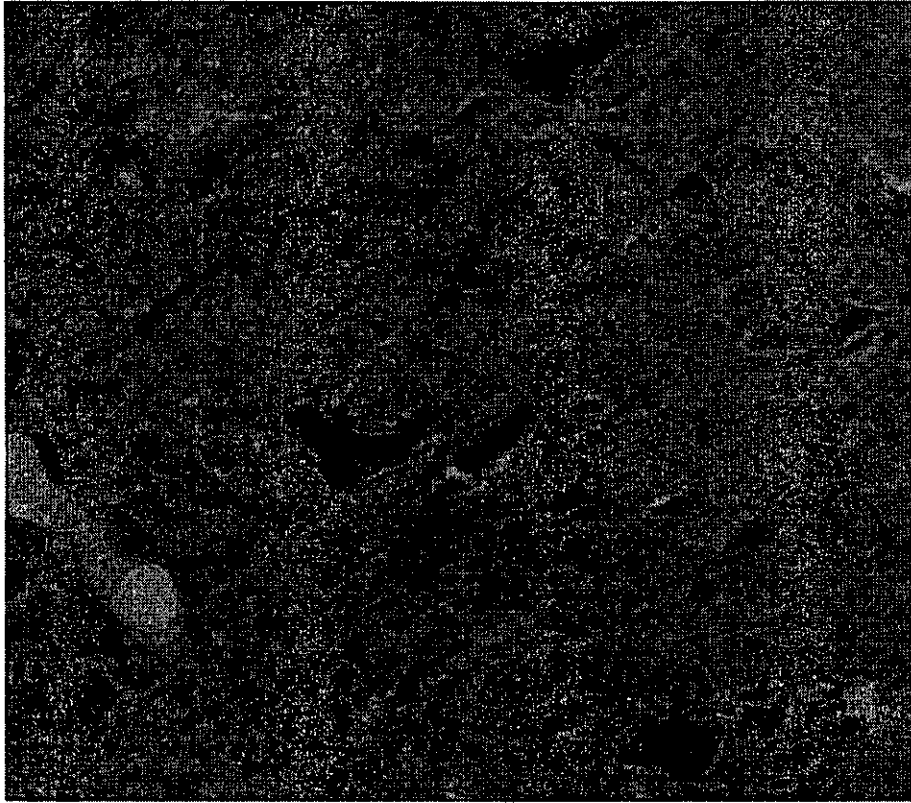


図 3、 大脳組織の X-Gal 染色（黒く見えるのが陽性細胞）



厚生労働科学研究費補助金（特定疾患研究事業）
分担研究報告書

ライソゾーム病における ADL (Activities of daily living) と QOL (Quality of life) の検討

分担研究者 高柳正樹 千葉県こども病院第二小児科部長

研究要旨：ライソゾーム病における各疾患の ADL と QOL を評価することにより、疾患が症例に与えている負担を正しく理解することができる。さらに今後開発されるであろう治療法の効果についての評価をおこなうためにも、現状での症例の ADL と QOL を検討しておくことは有意義と考えられる。アイセル病、重症型ハンター症候群、セロイドリポフスチノーシスにおいては ADL の評価はきわめて低値を示した。ゴーシェ病のⅢ型の症例ではその病期の進行につれその評価は低下し病状の把握に有用と思われた。QOL は重症型ハンター症候群では低く、ゴーシェ病のⅠ型の症例では高かった。

A. 研究目的

ライソゾーム病における各疾患群さらには各症例の ADL と QOL を評価することにより、疾患が症例に与えている負担を正しく理解する。さらに今後開発されるであろう治療法の効果についての評価をおこなうために、現状でのライソゾーム病症例の ADL と QOL を検討する。

B. 研究方法

対象はファブリー病 1 例、遊離シアル酸蓄積症 1 例、ハンター症候群重症型 5 例、軽症型 1 例、アイセル病 4 例、ゴーシェ病Ⅰ型 3 例、Ⅲ型 1 例、セロイドリポフスチノーシス 2 例である。

ADL の検討は WeeFIM（医学リハビリテーションのための統一データセット）を用いて行った。全例の検討はできていないので当研究班の二

次調査表の ADL の調査項目を利用して評価したものを加えた。すなわち精神発達、移動、トイレ、着替え、食事の 5 項目を問題がない 2 点、多少問題がある 1 点、大きな問題がある 0 点として合計し点数とした。QOL の検討は効用を評点尺度法と時間得失法を用いて母親より聴取して測定した。同時に主治医の評価も合わせ行った。

患者にはこれらの調査結果は個人が特定されない形で発表されることや、回答しなくてなんら医療面には影響がないことをよく説明した。

疾患名	WeeFIM	調査表を利用した ADL		
ファブリー病	140	10		
遊離シアル酸蓄積症	N.D.	9		
アイセル病	23	0		
	20	0		
	20	0		
	20	0		
ハンター病重症型	N.D.	0		
	N.D.	0		
	20	0		
	20	0		
	20	0		
ハンター病軽症型	N.D.	10		
ゴーシェ病 I 型	103	7		
	140	10		
	N.D.	10		
ゴーシェ病 III 型	59	5		
セロイドリポフスチノーシス	200			
	20	0		

QOL の検討の結果を効用値により表に示した。主治医の評価は省略したが一部の症例を除きほぼ母親の評価と同程度であった。

疾患名	評点尺度法	時間得失法
ファブリー病	N.D.	N.D.
遊離シアル酸蓄積症	0.6	1.0
アイセル病	N.D.	N.D.
	0.7	0.5
	N.D.	N.D.

	N.D	N.D
ハンター病重症型	N.D	N.D
	0.7	N.D
	0.2	0.3
	0.25	0.2
	0.3	1.0
ハンター病軽症型	0.7	0.5
ゴーシェ病 I 型	0.8	1.0
	0.9	1.0
	N.D	N.D
ゴーシェ病 III 型	0.4	1.0
セロイドリポフスチノーシス		
	N.D	N.D
	N.D	N.D

D. 考案

アイセル病、重症型ハンター症候群、セロイドリポフスチノーシスにおいては ADL の評価はきわめて低値を示した。ゴーシェ病の III 型の症例では一年前の WeeFIM の点数は 107 点であった。この間症例の神経症状は急速に進行しており WeeFIM の評価は各症例の病状の変動の把握にも有用と思われた。効用の測定を用いた QOL の評価では重症型ハンター症候群では軽症型に比して低値をしめした。ゴーシェ病の I 型の症例では高かったが III 型の症例では低値となった。ゴーシェ病の I 型は酵素補充療法が行われているために ADL, QOL とともに良好な成績となったものと思われる。今後各種の治療法が開発され、その治療効果を検討評価するのに ADL と QOL の評価が有効と思われる。正しい評価のためには治療法開発前のすな

わち現状のライソゾーム病症例の ADL と QOL をぜひとも検討しておく必要がある。

今回の QOL の評価法として評点尺度法と時間得失法を用いて母親より聴取する方法を使用した。時間得失法は母親に聴取する場合には願望などとの区別ができなため、今回の調査においては有益な情報とはならなかった。評点尺度法も小児症例においては母親のみならず、主治医、

担当看護師などの評価が必要と思われた。

E. 結論

ライソゾーム病は、ことに中枢神経合併症を有する疾患はきわめて多大な負担を患者さんたちに与えている。新しい治療法の評価には ADL と QOL の検討が欠かせない。今後も全国レベルで ADL と QOL の調査を行っていく必要があると思われた。

Gaucher 病 I 型患者における血中サイトカイン等の動態に関する研究

分担研究者 芳野 信 久留米大学医学部小児科学教室

研究要旨 Gaucher 病 I 型患者に対する酵素 (imiglucerase) 補充療法経過中の血中 M-CSF、TNF- α 、s-CD14 の推移を検討した。その結果、3 者とも対照値より高値を示し、前 2 者は治療経過とともに低下し、病勢の指標となること、またアンギオテンシン変換酵素、酸性フォスファターゼと強い正の相関を、血色素値と強い負の相関を示すことがわかった。

A. 研究目的

Gaucher 病では glucocerebrosidase の欠損の結果、マクロファージ/単球系細胞に glucocerebroside などが蓄積、過剰活性化を引き起こしサイトカイン等を放出する事が知られているが、その詳細は必ずしも明らかではない。その動態を明らかにすることにより症状の緩和、さらに患者の QOL の改善が期待される。そこで Gaucher 病 I 型で、どのようなサイトカイン等が増加するか、また、glucocerebroside (imiglucerase) による補充療法の経過中にそれらの値の推移、各種臨床検査値との相関につき検討した。

B. 研究方法

血清または血漿中のサイトカイン等は ELISA 方法で測定した。アンギオテンシン変換酵素、酸性フォスファターゼは既報の方法で測定した。採血の目的については事前に説明をして了解を得たうえで、治療効果の

評価のための一般採血と同時に行った。対象は imiglucerase 補充療法 (60 単位/kg/回、2 週に 1 回) を受けている女性 (補充療法開始時 40 歳) の Gaucher 病 I 型患者 1 名。

C. 研究結果

1. M-CSF

血清中 M-CSF (図 1) は治療開始 1 ヶ月時は 1130 pg/ml と高値を示した (対照値: 256 \pm 159 pg/ml) が、6 ヶ月時には 532 pg/ml と著明に低下した。24 カ月には 439 pg/ml と対照値上限をわずかに超える程度まで低下した。

2. TNF- α

TNF- α (図 2) は治療開始 1 ヶ月時は 48 pg/ml と対照値 (16 \pm 8 pg/ml) の上限をわずかに超える程度に上昇していた。その後低下傾向を示したが、6 ヶ月 24 ヶ月の観察期間中、37~36pg/ml と軽度高値のまま推移した。

3. s-CD14

s-CD14 (図 3) は、治療開始 1 ヶ

月の時点

で $5.6\mu\text{g/ml}$ と対照値 ($3.0 \pm 0.5 \mu\text{g/ml}$) をこえる値を示していたが、経過中、18ヶ月時に一過性に $8.65 \mu\text{g/ml}$ まで上昇した。その後、24ヶ月時には $5.3 \mu\text{g/ml}$ と再度下降したが依然として対照値上限をこえたままであった。

4. 各種臨床検査値との相関 (表1)

M-CSF、TNF- α は、アンギオテンシン転換酵素、酸性フォスファターゼの値と強い正の相関を、血色素の値と強い負の相関 ($r > 0.9$ 、 $p < 0.02$) を示したが、白血球数、血小板数とは有意の相関を示さなかった。いっぽう s-CD14 はアンギオテンシン転換酵素、酸性フォスファターゼ、血色素、白血球数、血小板数のいずれとも有意の相関は認めなかった。

D. 考察

治療開始直後に M-CSF、TNF- α が高値を示し、それらが治療経過とともに低下した事は、治療初期のマクロファージなどの過剰活性化が、治療経過とともに軽快することを示唆する所見と考えられる。これらのサイトカインの高値はマクロファージ活性化に伴う非特異的上昇と考えられるが、血液所見については、赤血球系にある程度特異的に影響を与えているかもしれない。いっぽう、s-CD14 は、治療経過中、常に対照より高値を示したことから、マクロファージなどの活性化の非特異的指

標としての意義にとどまる可能性が高い。

E. 結論

Gaucher 病 I 型患者で、血液中 M-CSF、TNF- α 、s-CD14 は高値を示した。なかでも前2者は病勢の推移の非特異的指標として意義がある。また、前2者はその過剰発現が赤血球造血に抑制的に作用している可能性がある。

F. 健康危険情報

該当せず

G. 研究発表

1. 論文発表

芳野 信：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. 平成13年度厚生科学研究報告書 p30-32, 2002

2. 学会発表

芳野 信、渡辺順子：Gaucher 病患者の血清サイトカインの動態. 平成14年度厚生科学研究特定疾患対策研究班会議.

2002年12月5日 (東京)

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

図 1

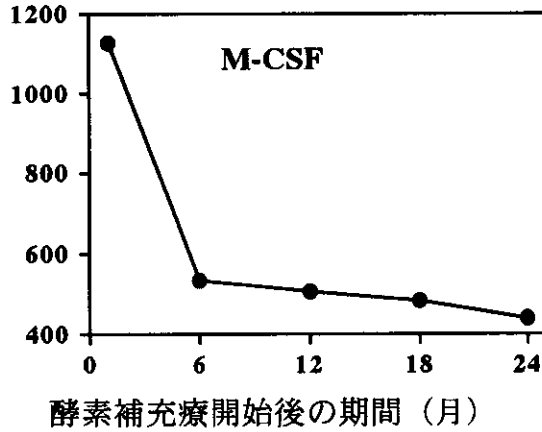


図 2

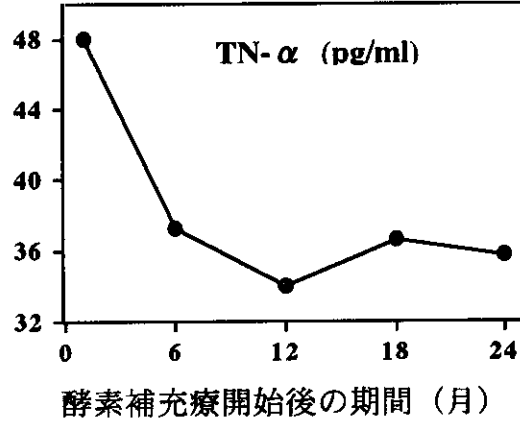


図 3

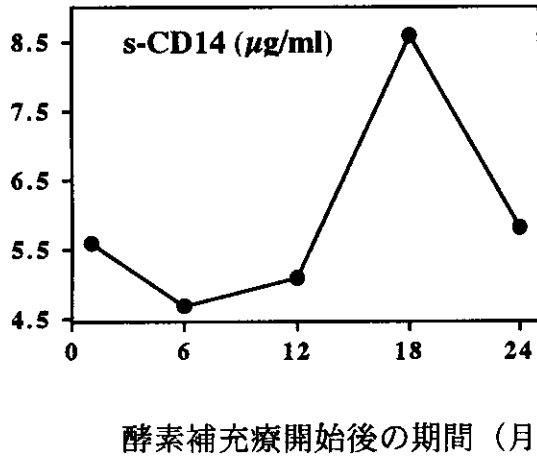


表 1 サイトカイン等の濃度と各種臨床検査値との相関

検査項目	M-CSF	TNF-α	s-CD14
ACE ¹⁾	r=0.948, p=0.0141	r=0.921, p=0.0265	r=0.142, p=0.8195
AcP ²⁾	r=0.934, p=0.0202	r=0.964, p=0.0081	r=0.062, p=0.9207
血色素	r=0.948, p=0.0140	r=0.924, p=0.0249	r=0.374, p=0.5357
白血球数	r=0.748, p=0.1469	r=0.714, p=0.1753	r=0.774, p=0.1246
血小板数	r=0.538, p=0.3501	r=0.571, p=0.3150	r=0.162, p=0.7950

¹⁾ アンギオテンシン変換酵素 ²⁾ 酸性フォスファターゼ

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 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 α -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 α -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 α -ガラクトシダーゼ A (α -GalA) 遺伝子の欠損による先天性代謝疾患である。この α -Gal A が欠損すると、生体内基質である globotriaosylceramide (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験が開始されている。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 α -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 α -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. α -Gal A とその活性の測定： α -Gal A 活性を Kusiak らの方法に従い 4-MU- α -Galactoside を基質する蛍光光度法にて測定した。

3. 発現した α -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 α -Gal A 活性を測定し、最も高濃度に α -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 α -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 α -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 (1.5×10^{11} particles, 0.5×10^{11} particles) を注射し、経時的に血漿中の α -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 α -Gal A および Gb3 濃度を測定した。同週令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 α -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 α -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 β -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 60F₂₅₄ プレート (E.Merk)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. HE 染色により腎臓心臓の治療効果を確認した。

8. 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')₂ goat anti-mouse IgG を用いて腎臓、心臓、肝臓、大動脈における Gb3 の減少を確認した。

9. 電子顕微鏡を用いて心臓、腎臓における Gb3 の減少を組織学的に検討した。

10. 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 α -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、 α -Gal A の internalization が示唆された。

2. AAV ベクター (1.5×10^{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 α -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 α -Gal A 活性を測定したところ、治療 5 週後には各臓器の α -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 α -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. He 染色において腎臓において非治療群では糸球体の有意な拡大、基底膜の肥厚が認められるのに対し治療群では改善を認めた。心臓においても筋繊維の肥厚が治療後に改善をみた。

5. 腎臓、心臓、肝臓、大動脈において抗 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。

6. 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。

7. 治療後 25 週における、HW/BW は非治療群で 5.48 ± 0.52 , 治療群で 4.76 ± 0.31 mm ($p < 0.05$), IVST は非治療群で 1.83 ± 0.10 , 治療群で 1.65 ± 0.10 mm ($p < 0.05$), PWT は非治療群で 1.68 ± 0.31 , 治療群で 1.58 ± 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。