

[10] ムコ多糖症の新生児マススクリーニングに関する研究

岐阜大学	磯貝光治、下沢伸行、折居忠夫
セントルイス大学	戸松俊治
生化学工業	加藤 俊、宮浦修一、岡村和夫
大阪市立大学	田中あけみ
国立成育医療センター	奥山虎之、松尾宣武（

【序文】 ムコ多糖症はリソソーム分解酵素の欠損もしくは活性低下により、ムコ多糖が体内に蓄積する疾患である。治療法として造血幹細胞移植の他、近い将来の酵素補充療法の開発といった治療法があるものの、いずれにせよ早期発見し、早期に治療を開始することが前提となる。乳幼児期の本疾患患者の発見は困難であるため、早期発見のためには新生児のろ紙血を用いたマススクリーニングを行う必要があると考え、各種のムコ多糖に対する特殊抗体とこれを応用した測定キットを開発し、そのデータを検討した。

【方法】 ケタラン硫酸、ヘパラン硫酸、コンドロイチン硫酸、デルマトン硫酸に対して特異的に反応する特殊抗体を作成した。この抗体を用いてサンドイッチ ELISA 法を応用して、グルコサミノグリカン(GAG)を測定するキットを作成した。その方法は、マイクロプレートにのせた、anti-GAG antibody にサンプルの GAG が付着する。その付着した GAG に対してビオチンラベルした特殊抗体を反応させた上でアビジンで発色させ吸光度測定する。これらの吸光度測定は検量線を作成しその有用性を確認した。次に、岐阜大学、大阪市立大学、国立成育医療センターで経過観察中のムコ多糖症患者および健常人（新生児を含む）の血漿、ろ紙血を材料として本キットを用いて検討した。

【結果】 患者と正常人の血漿を検体として、キットを用いてムコ多糖の測定を行った。ケタラン硫酸の測定では、ムコ多糖症患者は正常人に比べ、明らかな高値をとった。ヘパラン硫酸では、血漿でムコ多糖症患者が高値をとる傾向があった。デルマトン硫酸では、ムコ多糖症患者と正常人で差を認めなかった。とくにケタラン硫酸を測定するキットは、モルキオ病以外のムコ多糖症でも正常人に比べて高値を示し、そのみでモルキオ病のみでなく、他の型のムコ多糖症に対してのスクリーニングに有用であると示唆された。次に、血漿から直接測定した結果をろ紙血から抽出した血漿を用いての測定結果と比較した。これらは非常に強い相関を認め、ろ紙血での測定の有用性を確認した。しかし、今回我々が検討した血漿中 GAG は、年齢依存性があり、新生児期は低く、年齢を重ねると増加し、成人期以降は加齢と共に減少していく傾向を示した。そこで、ムコ多糖症患者と正常人で最も差が顕著であったろ紙血を用いたケタラン硫酸の測定を検体数を増やすと共に検体の年齢を考慮して行いました。ムコ多糖症患者はすべての年齢層で高値を示す傾向があったが、少数ながらケタラン硫酸の測定値が正常人と患者が交わる部分が存在した。これらの部分については、他の GAG を追加測定することで、スクリーニングの質の確保を検討している。

【考察】 本研究で使用した特殊抗体とそれを使用したムコ多糖測定キットは、従来の測定法に比べ簡便でその有用性は高いと考える。とくにケタラン硫酸を測定するキットは、そのみで新生児ムコ多糖症スクリーニングに有用であると示唆された。現在、正常新生児のろ紙血を用いて正常範囲やカットオフ値を設定する作業を行っており、より実用性の高いマススクリーニング法となるように詰めの作業を行っている。

[11] 重症心身障害児病棟・施設におけるライソゾーム病患者に関するアンケート調査

東邦大学医学部

清水教一、青木継稔

東京小児療育病院

松田光展、桜川宣男

東邦大学医学部 SRL 代謝病再生医学寄付講座 桜川宣男

【目的】ライソゾーム病が厚生労働省の特定疾患に認定され、昨年度より 20 歳以上の患者に対する個人調査の申請手続きが始まった。ファブリ病を含め、30 種類のライソゾーム病が対象である。ライソゾーム病は一般に予後不良であり、新しい治療法の開発と QOL の改善が望まれているが、一方最近では重度の障害児（者）に対する医療、療育の進歩により、重症心身障害児病棟、施設において、ターミナルステージの医療ケア、療育を受ける症例が増えている。全国の重症心身障害児病棟及び施設において経過観察されている症例につき、医療と療育に関するアンケート調査を行った。

【方法】全国の重症心身障害児病棟及び施設（計 180 施設）を対象に調査を行った。

「入所・入院か在宅か」、入所・入院期間、罹病期間、治療状況、種々の手帳の取得状況、在宅診療の状況等についてアンケートを作製し、患者への説明書、調査の同意書とともに全国の療養所、施設に郵送、各主治医によるインフォームドコンセントを経て、同意を得られた患者を対象とした。尚、アンケート調査に関しては東邦大学医学部の倫理委員会より承認を得た。

【結果】国立療養所重症心身障害児病棟 75 ヶ所の回答率は 48%、公法人立重症心身障害児施設 105 ヶ所の回答率は 53% で、全体として 51%、患者数は合計 47 例であった。サンフィリップ症候群（11 例）、セロイドリポフスチノーシス（11 例）、ハンター症候群（7 例）が多く、特定疾患対策事業の対象となる 20 歳以上の患者は 28 例（59.6%）であった。55.3% が入所または長期入院をしており、その期間は 5 年以下が過半数を占めていた。一方 21 年以上に渡り長期入所・入院している患者の存在も確認された。罹病期間をみると 11-20 年の症例が最も多く、21 年以上の症例も報告された。大島分類では 1 が 29 例（61.7%）、2 が 4 例（8.5%）を占めていた。現在の医療状況としては酸素療法、経管栄養を受けている症例がそれぞれ 29.8%、48.9% と多かった。これらはいずれも大島分類 1 の症例であり、さらに 23.4% の患者が気管切開を、10.6% の患者が喉頭気管分離を受けていた。療育状況に関しては、在宅で機能訓練を受けている症例も 57.1% と多いことが分かった。また訪問看護、在宅機能訓練等の在宅診療、通園事業、支援費制度を利用している患者の割合は低かった。手帳の取得状況をみると療育手帳、身体障害者手帳については大半の患者が取得している一方で、特定疾患の登録を済ませた症例は 3 例に過ぎず、年齢対象の 10.7% と極めて少なかった。

【考察】特定疾患に登録している症例はまだ少ないことが判明した。QOL の改善に当たっては、特定疾患対策事業の啓蒙や、在宅患者への社会資源に関する情報提供及び資源の活用が重要である。

[12] ライソゾーム病の「包括的遺伝診療サポートシステム」の構築

(株) エスアールエル
学術情報部、医科学分析センター
横山安伸 田部美穂

1. はじめに

遺伝性疾患を対象とした酵素診断を含む遺伝学的診断は、その結果が被検者のみならず血縁者の遺伝情報を内包することから、その検査実施と取り扱いには、その倫理的、社会的、法的問題への十分な配慮が求められる。したがって、このような遺伝学的診断は、「包括的遺伝診療体制」のもとで実施されるべきである。

そこで、我々は、「包括的遺伝診療サポートシステム」を考案した。「包括的遺伝診療サポートシステム」は、医療機関（病院）における「包括的遺伝診療体制」を積極的にサポートするものであり、本研究班の協力のもと、本システムの構築を進めたので報告する。

2. 研究目的

ライソゾーム病認定のため、その検査と診断が「包括的遺伝診療体制」のもとで適正に実施されることを目的とする。

3. 研究方法

医療情勢、社会情勢および個人情報保護を踏まえて、ライソゾーム病の適正な「遺伝学的診断実施体制」を構築する。

4. 研究結果

本研究班の協力のもと、「ライソゾーム病の包括的遺伝診療サポートシステム」の構築を進めた。

平成13年度 「包括的遺伝診療サポートシステム」を考案した。

平成14年度 ムコ多糖症-尿スクリーニングと酵素活性測定検査体制を構築した。

平成15年度 ガラクトセレブロシダーゼ (Krabbe病) とサンフィリッポD (MPS III型) の酵素活性測定検査体制を構築した。

5. まとめ

「包括的遺伝診療サポートシステム」は、医療機関（病院）における「包括的遺伝診療体制」を積極的にサポートするものであり、その実現には、臨床医、検査員そして疾患専門医あるいは基礎研究者との密接な連携が不可欠である。我々は、本研究班の協力を得て、「ライソゾーム病の包括的遺伝診療サポートシステム」を構築した。本システム下で、ムコ多糖症の尿スクリーニング検査と酵素測定システム、そして、ガラクトセレブロシダーゼ (Krabbe病) の酵素活性測定検査体制を構築した。さらに、現在、国立成育医療センターの協力を得て、ライソゾーム病の出生前診断システムを構築中にある。

今回、構築した「ライソゾーム病の包括的遺伝診療サポートシステム」は、ライソゾーム病患者と家族のQOL改善に貢献できるものと信ずる。

[13] 遺伝子導入ヒト羊膜細胞による Sandhoff 病モデルマウスの治療研究

北里大学医学部・微生物学 北里英郎

「目的」

リソゾーム病の欠損遺伝子である Hexamidase gene (Hex) A および Hex B をレトロウイルスベクターにより両遺伝子欠損ヒト羊膜細胞 (FSD-2) に導入し、実験動物モデルである Sandhoff knock out マウスを使用し cell therapy のモデルを構築する。

「方法及び結果」

(1) Hex A

徳島大学・伊藤孝司先生より供与された Hex A 遺伝子を sequence し、塩基配列を確認した後に、Not I site を Hpa I site に変換後、クローンテック社の pLXSN (Neo marker) の HpaI-XhoI site にクローニングした。パッケージング細胞である PT67 マウス繊維芽細胞にトランスフェクション後、G418 にて選択、細胞上清を NIH/3T3 細胞に感染させ、ウイルス力値を求めたところ 10^3 cfu/ml であった。ウイルス上清中の Hex A の遺伝子転写産物は QIAamp Viral RNA mini kit (キアゲン) を用いて RNA 抽出を行い RT-PCR 法にて確認した。このウイルスをさらにヒト羊膜細胞 FSD-2 に感染させ、同様に G418 にて選択したところ 330cfu/ml の頻度で耐性コロニーが観察された。これらの耐性コロニーを集め、Hex A 遺伝子の発現を RNeasy mini kit (キアゲン) を用いて RNA を抽出し RT-PCR 法にて確認した。

(2) Hex B

ヒト Brain cDNA library (Takara) より Hex B ATG を含む 5' 上流域約 400bp の cDNA を PCR 法にて pBluescript vector (Stratagene) の BamHI-EcoRV site にサブクローンした。この上流域 400bp をあらかじめ pBluescript vector の EcoRV site にクローンした Hex B 遺伝子の上流の Bam HI-EcoRV site にクローンし、完全長の Hex B cDNA とした。全塩基配列を sequence により確認した後に、この Hex B 全長 cDNA を Not I-ClaI で切り出し、ピューロマイシンを選択マーカーとして持つレトロウイルスベクター pLPCX の Not I-Cla I にクローンした。現在、前述の PT67 細胞にトランスフェクションし、ピューロマイシンにて選択中である。

「今後の課題」

耐性コロニーを選択後、ウイルス上清中の Hex B の遺伝子転写物を前述の方法にて確認する。さらに、すでに Hex A を導入したヒト羊膜細胞 FSD-2 に感染させ、ピューロマイシンで選択後、Hex B の遺伝子転写産物を RT-PCR 法にて確認し、Hex A, Hex B 双方が発現した FSD-2 細胞を構築し、酵素活性の確認後、Sandhoff 病モデルマウスに導入し、cell therapy を行う予定である。