

および本研究班で2001年に施行したライソゾーム病の全国疫学調査における成績から、各疾患の報告数に及ぼす出生前診断の影響を検討した。
 なお、我々の教室では、1971年からIEMの出生前

診断を表1に示す方法で行ってきたが、他施設においてもそのような方法が用いられており、1990年代に入るとこれに加えて遺伝子解析も行われるようになった。

表1. ライソゾーム病の出生前診断
 (駿河台日本大学病院小児科)

1. 施行期間：1971-2002年
2. 施行数：67件 (IEM全体では82件)
3. 検査材料
(1) 培養羊水細胞
(2) 羊水上清
(3) 絨毛細胞
4. 診断方法
(1) 培養細胞の酵素分析, 形態観察, 取り込み実験
(2) 羊水上清の酵素分析, 蓄積物質の分析
(3) 染色体分析
5. 診断の確認
(1) 正常と判定した例—出生後に行う
(2) 異常と判定し中絶した場合—胎児組織による確認

C. 研究結果

これまでに行われた2回のIEM出生前診断の調査において報告されたライソゾーム病の種類と報告数、我々の施設で行った診断結果、および2回行われたライソゾーム病患者の実態調査報告を表2に示す。

2回の調査で最も多く行われた出生前診断の対象疾患はGM₂-ガングリオシドーシスであり、全例がTay-Sachs病であった。次に多かった疾患はGaucher病であり、1987年の調査ではHunter病がこ

表2. 日本におけるライソゾーム病出生前診断成績および患者報告数

分類	疾患	出生前診断			患者の疫学調査	
		1981年の報告	1987年の報告	自験例 (1971~2002)	1981年全国調査 (%は分類別頻度)	2001年全国調査 (%は分類別頻度)
スフィンゴリピドーシス	GM ₂ -ガングリオシドーシス	36 (33.6)	57 (26.3)	12 (17.5)	38 (22.4%)	15 (6.3%)
	Gaucher 病	20 (18.7)	36 (17.6)	25 (37.3)	41 (24.1%)	52 (23.5%)
	GM ₁ -ガングリオシドーシス	12 (11.2)	22 (10.7)	3 (4.5)	17 (10.0%)	15 (6.8%)
	Krabbe 病	9 (8.4)	19 (9.3)	2 (3.0)	8 (4.7%)	15 (6.3%)
	異染性白質ジストロフィー	4 (3.7)	5 (2.4)	1 (1.5)	24 (14.1%)	16 (7.2%)
	Niemann-Pick 病	2 (1.9)	5 (2.4)	0	15 (8.8%)	14 (6.3%)
ムコ多糖症	Hurler 病	2 (1.9)	7 (3.4)	1 (1.5)	28 (20.6%)	33 (18.1%)
	Hunter 病	9 (8.4)	24 (11.7)	2 (3.0)	52 (38.2%)	100 (55.0%)
	Maroteaux-Lamy 症候群	1 (0.9)	3 (1.5)	0	5 (3.7%)	4 (2.2%)
その他	I-cell 病	10 (9.3)	16 (7.8)	17 (25.4)	27 (28.7%)	21 (19.6%)
	シアリドーシス	0	4 (1.9)	0	2 (2.1%)	10 (9.4%)
	糖原病 2型*	2 (1.9)	10 (4.9)	4 (5.9)	16 (17.0%)	29 (27.1%)
	計	107 (100%)	205 (100%)	67 (100%)		

* 出生前診断例は、乳児型(Pompe 病)、患者調査では遅発型が多い。

れに続いていた。また、我々の施設で1971～2002年の間に行った胎児診断ではGaucher病とI-cell病が多く、この2疾患で63%を占めていた。

一方、1981年に行ったライソゾーム病疫学調査では、Hunter病、Gaucher病、GM₂ガングリオシドーシス（大部分はTay-Sachs病）が多かったが、2001年の調査ではGM₂ガングリオシドーシスの比率が22.4%から6.3%と著しく低下していた。また、Hunter病は胎児診断数が増加しているにも拘わらず、患者報告数は2001年の調査で有意に増加していた。

D. 考察

出生前診断が多く行われたライソゾーム病は、疫学調査においても頻度が高かった疾患であった。そして、胎児診断が行われたために20年後の患者疫学調査で報告数が明らかに減少した疾患としてTay-Sachs病が挙げられる。また、酵素補充療法が実用化されたGaucher病については、1981年、1994～1996年に全国疫学調査が行われたが、両者で報告された病型は図のように差がみられ、日本人に多かった急性神経型（Ⅱ型）の報告が

1995年の調査で有意に減少していた。その理由の1つとして本症の出生前診断があるものと考えられる。即ち、我々の教室で1981～1996年の間に行ったGaucher病胎児診断25回の中の発端者24例がⅡ型であったことがそれを裏づけているものと推測される。

以上のようにいくつかの疾患では出生前診断が患者発生に予防的な効果を示したと考えられる。

E. 結論

出生前診断は従来、予後不良で治療法のないIEMの発生予防の手段として行われることが多かった。しかし、酵素補充療法など新しい治療法が開発された疾患に対しては、より早期に診断し治療を開始することで症状を予防することが可能になるので、そのためにも胎児診断を行う意義があるものと考えられる。

しかし、表2のように胎児診断の適応となるライソゾーム病は多岐に亘っており、一施設で全ての疾患に対応することは困難であるため、出生前診断が行える施設の選択、連携などが今後必要になるものとする。

病型	1981年の全国調査	1995年の全国調査	1972～1993年の出生前診断(自験例)
I	39.5%	75.9%	28.6%
Ⅱ	47.4%	3.7%	66.7%
Ⅲ	5.2%	18.5%	4.8%
不明	7.9%	1.9%	39.5%
計	38	54	21*

* 発端者数(分析数は計24例)

図. Gaucher病報告例の病型

F. 健康危険情報

本研究は担当医に対するアンケート調査および共同研究者の施設における化学診断によって行ったが、患児のプライバシーを侵すことは一切ないことを明記する。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 大和田 操ほか：わが国におけるGaucher病の実態。日児誌 104(7) : 717~722, 2000.
- 2) 大和田 操ほか：胎児の異常と奇形—先天性代謝異常症と胎児医療の関わり。産婦人科の世界 53(8) : 749~753, 2001.
- 3) 大和田操、北川照男：リソゾーム蓄積症（リソゾーム病）。日本臨牀 増刊、本邦臨牀統計集(2) : 317~327, 2001.
- 4) 大和田操：治療可能なライソゾーム病の疫学に関する研究—Gaucher病, Fabry病に関して—。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。研究報告書pp12~14, 2002.
- 5) Ken Suzuki et al : Study on new screening method for Fabry's disease,日本マス・スクリーニング学会誌 12(2), 25, 2002(Abstract).
- 6) 衛藤義勝ほか：ファブリー病患者に対する α -ガラクトシダーゼA補充療法の多施設臨床試験成績。小児科臨床 56 : 133~143, 2003.

- 7) 大和田操：Fabry病の自然経過に関する研究：平成14年度厚生労働科学研究費補助金（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。研究報告書pp15~18.

2. 学会発表

- (1) Ken Suzuki, Misao Owada, Teruo Kitagawa : Study on new screening method for Fabry's disease. 第30回日本マス・スクリーニング学会、シンポジウム I, ライソゾーム病マス・スクリーニングの現状と将来, 2002年9月, 東京
- (2) Kitagawa T, Owada M, Ishige N, Suzuki K, Ohashi T, Eto Y, Mills K, Winchester B : Pilot study of mass-screening for Fabry's disease(FD) by measuring globotriaosylceramide(GL3) in whole urine samples using Tandem Mass spectrometry. IX th International Congress on Inborn Errors of Metabolism. September, 2-6, 2003, Brisbane, Australia
- (3) 鈴木 健、石毛信之、大和田 操、大橋十也、後藤義勝、北川照男：LC-MS/MSを用いたFabry病スクリーニングの研究。第46回日本先天代謝異常学会、2003年11月、松江

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

厚生科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

ムコ多糖症の病態と治療法開発に関する研究

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）

研究要旨

（1）ムコ多糖症の病態・自然歴を明らかにするために患者データベースの構築を行い、データの集積を行った。（2）抗KS抗体を用いたムコ多糖症マス・スクリーニング法の基礎検討を行い、I型・II型はコントロールより有意に高値で、24例中22例がスクリーニング可能と考えられたが、2例はコントロールとオーバーラップし、更なる検討が必要と考えられた。（3）成人ハンター病患者のQOLを評価するためにFIMを用いて検討を行い、日常生活における具体的な問題点を明らかにした。

研究協力者

加藤智美（岐阜大学医学教育開発研究センター）
倉坪和泉（岐阜大学小児病態学）
折居忠夫（中部学院大学）

A. 研究目的

ムコ多糖症の詳細な自然歴や患者 QOL は明らかでなく、治療法も確立されていない。我々はこれらの問題を解決するために（1）ムコ多糖症患者のデータベース構築、（2）ムコ多糖症患者の ADL, QOL 実態調査、を行った。

B・C. 研究方法と結果

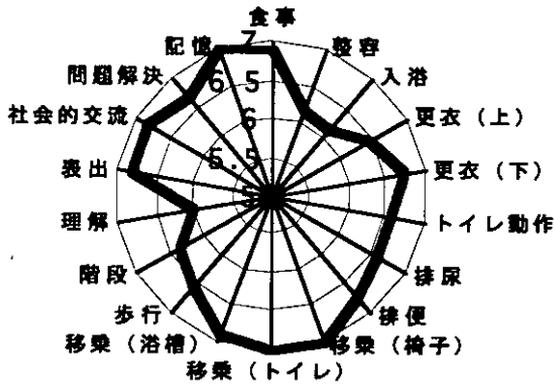
（1）データベースの構築

ムコ多糖症患者の臨床所見、検査所見、臨床経過、治療歴、QOL、ADLなどを経時的に入力し、種々の解析が可能なデータベースを開発した。これらは自然歴の解明のみならず、病態、早期診断、医療対策、福祉対策にも還元できると考えられる。（患者登録、身体所見、Review of Systems、治療歴、発達テスト、血液生化学検査、聴力検査、関節可動域、心電図・エコー、肺機能、レントゲン・MRI、歩行検査、指導事項・コメント、画像取り込み、印刷・ファイル出力）

（2）患者 ADL, QOL 調査

FIMによる患者ADL, QOLの調査を行い、日常生活における具体的な問題点を明らかにした。

- 食 事：時間がかかる
- 整 容：歯磨粉をつける、洗顔、髪をとかす
ひげ剃り
- 入 浴：体を洗う、タオルをしぼる
特別な器具
- 更 衣：下着、服の着脱、ジッパーの上げ下げ
マジックテープのついた改良服
- トイレ：お尻を拭く、ジッパーの上げ下げ
- 歩 行：時間がかかる、50m歩けない
- 階 段：1人で昇れない、手すりが必要
- 理 解：ゆっくり大声で話す必要
補聴器が必要
- 表 出：ゆっくり大声で話さないと理解してもらえない
- 社会性：新たな場面に慣れるのに時間がかかる
- 問題解決：料金を支払う、書類手続き
病院予約



(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。

D. 考察

ムコ多糖症の患者データベースの構築は、ムコ多糖症の自然歴と病態の解明に有用な情報を提供することが可能となるであろう。このデータベースは他疾患にも応用が可能である。FIMの質問項目は日常生活を良く反映しており、ADL、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。今回の結果から、成人の軽症型ハンター病患者の具体的制約が明らかにされた。ADL、QOLの改善にターゲットを絞った治療・福祉対策が重要と考えられた。

E. 結論

ムコ多糖症患者のデータベースを構築し、FIMによるADL、QOL評価を行った。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

S Tomatsu, K Okamura, T Taketani, K Orii, T Nishioka, M Gutierrez, S Velez-Castrillon, A Fachel, J Grubb, A Cooper, M Thornley, E Wraith, L Barrera, R Giugliani, I Schwartz, G Frenking, M Beck, S Kircher, E Paschke, S Yamaguchi, K Ullrich, K Isogai, Y Suzuki, T Orii, N Kondo, M Creer, A Noguchi: Development and Testing of New Screening Method for Keratan Sulfate in Mucopolysaccharidosis IVA. Pediatric

Research (in press)

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

鈴木康之、加藤智美、磯貝光治、近藤直実、折居忠夫：門脈圧亢進症を合併した Hunter 病の成人例。日本先天代謝異常学会、松江

鈴木康之、磯貝光治、下澤伸行、近藤直実、戸松俊治、田中あけみ、奥山虎之、松尾宣武、宮浦修一、岡村和夫、折居忠夫：抗 KS モノクローナル抗体を用いたムコ多糖症マス・スクリーニング法の検討。日本ライソソーム病研究会

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

磯貝光治、祐川和子、岩田晶子、鈴木康之、船戸道徳、近藤直実、折居忠夫：乳児期ムコ多糖症マススクリーニングの試験研究で発見されたムコ多糖症Ⅱ型の 1 例。第 104 回日本小児科学会学術集会 2001. 5. 18-20 仙台

鈴木康之：ハンター病ナチュラルヒストリー調査および下痢治療について。第 7 回日本ムコ多糖症研究会。2003. 8、大阪

H. 知的所有権の取得状況

なし

成人型の Fabry 病の酵素補充療法の臨床効果

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：成人発症の Fabry 病の一例を経験し、臨床的特徴、galactocerebrosidase (GALA) 酵素活性、GALA 遺伝子変異について検討後、酵素補充療法を導入し、臨床効果を検討した。46 歳にて無頓着、整理整頓不能、尿失禁で発症し、痙性歩行・前頭葉徴候・驚愕反応を認め、発作性心房細動、左心肥大、腎機能障害を呈していた。さらに皮膚 angiokeratoma と発汗障害を認めたが、疼痛発作や角膜混濁などはなかった。 α -galactosidase A 活性の著明な低下と GLA 遺伝子の開始コドンの点変異を認めた。2003 年 8 月より recombinant human α GAL 1mg/kg/2weeks の酵素補充療法を開始したが、6 ヶ月後の現在も神経所見および腎機能に大きな変化は認められていない。成人発症の Fabry 病の酵素補充療法の臨床効果は長期の観察が必要と考えられる。

A. 研究目的

Fabry 病はリソゾームの加水分解酵素である α -galactosidase A の欠乏に起因する X 染色体連鎖性の劣性遺伝性代謝異常疾患である。 α -galactosidase A の活性が低下あるいは欠損し、globotriaosylceramide (GL3) を主とする中性スフィンゴ糖脂質が細胞内リソゾームに異常蓄積する。特に血管内皮、周膜および平滑筋細胞、自律神経系の神経節、糸球体、心筋に顕著に蓄積する。このため進行すると脳血管・心および腎組織で微細血管障害を呈し、30 代～50 代に脳梗塞、心筋症および心筋梗塞、腎不全を来し、死亡するものも多い。

近年ヒト由来の α galactosidase A を使用した酵素補充療法は Fabry 病患者の GL3 の代謝異常を正常化する可能性があることが示された。さらに欧米で第 I/II 相臨床試験、第 III 相プラセボ対照二重盲試験、およびオープンラベル延長試験にて遺伝子組み換えヒト α galactosidase A の 1mg/kg/隔週投与は血漿・

腎・心・皮膚のいずれにおいても GL3 の除去に有効であることが明らかにされた。2003 年、本邦でも同様に第 II 相オープン試験にて有効性が示された。しかし、いずれも、脳血管病変における評価は行われていない。

40 歳代に痴呆で発症した成人型 Fabry 病を経験し、酵素補充療法の有効性を検討した。

B. 研究方法

成人型 Fabry 病と診断された 1 症例について、臨床症状・MRI など画像所見・電気生理学的所見を検討し、 α -galactosidase A 遺伝子解析を行った。その後 recombinant α -galactosidase A を 1.0mg/kg を 20 週間に渡り隔週投与を行い、その臨床効果を判定した。なお、投薬は適切な量を生理食塩水に加えて希釈し、投与にあたっては 0.25mg/分を越えない速度で静脈内投与した。投与関連反応を管理するため、3 回目以降、前治療として投与開始 1 時間前にアセトアミノフェン 300mg とヒドロキシジン 30mg を服用を行

った。ベースライン検査として、投与開始前 28 日以内に、問診、バイタルサイン、臨床検査、 α GAL 活性、理学的所見、心エコー、ECG、頭部 MRI、IMP-SPECT・FDG-PET など画像検査、脳波・交感神経皮膚反応 (SSR)・末梢神経伝導速度・体性誘発電位・視覚誘発電位・聴覚誘発電位など神経電気生理学的検査、眼科的検査、皮膚生検、血漿および尿中 GL3 測定、クレアチニンクリアランス検査、1 日尿蛋白量、抗 rhGAL 抗体を行った。抗 rhGAL 抗体、症状の評価およびバイタルサインの確認、血液学的検査および血液生化学的検査は毎回実施した。有害事象および併用薬投与に関しては投与期間中常に監視した。

(倫理面への配慮) 遺伝子解析を行うことについて十分な説明を行い、文書による同意を得て行った。酵素補充療法については、学内 IRB の承認を得て、十分な説明を行い、文章による同意を得て実施した。

C. 結果

1) 症例の臨床像：

脳梗塞・脳出血の既往はなく、高血圧・高脂血症もない 51 歳男性。母親が 67 歳時に腎不全・心不全で死亡している。43 歳頃より徐々に無頓着、整理整頓不能、尿失禁が出現し、経理の仕事に支障をきたすようになったため精査入院になった。

低身長で、特異な顔貌を呈し、膝・肘伸側部および臍周囲に angiokeratoma を認めた。また、明らかな発汗低下が確認されたが疼痛発作を起こしたことはなく、角膜混濁もない。神経学的所見としては、動作性 IQ の低下を主体とした痴呆に加えて、両側錐体路徴候、痙性歩行、前頭葉徴候、驚愕反応、尿便失禁を認めた。さらに、検査上、発作性心房細動、軽度左心肥大、軽度腎機能障害が明らかになった。また交感神経皮膚反応の潜時が有意に遅延していることが

確認された。なお末梢神経伝導速度・体性誘発電位・視覚誘発電位・聴覚誘発電位は、下肢にて驚愕反応のため体性誘発電位が導出されず、視覚誘発電位で軽度潜時の遅延を認めた以外はほぼ正常範囲内の所見であった。

臨床経過と顔貌、および神経学的所見より代謝性疾患を疑い、白血球中の α -galactosidase A 活性の著明な低下と GLA 遺伝子の開始コドンの点変異 (M1V) が判明し、Fabry 病と診断された。

痴呆の精査のため頭部画像の諸検査を行った。頭部 MRI にて、内部に空洞病変を伴う、びまん性脳白質病変を認め、これは Fabry 病で報告されたことのない所見であった。さらに、FDG-PET にて前頭部内側を中心に側頭部・頭頂部に、軽度から中等度の不均一な集積低下を認めた。IMP-SPECT でもほぼ同様の結果であった。

2) 酵素補充療法の経過と臨床効果の評価：

2 年の経過で Cre 1.2 が 1.63 になり腎機能障害の悪化を認め、WAIS-R は TIQ 75 (PIQ 54, VIQ 97) が 71 (PIQ 59, VIQ 85) へ徐々に低下を認めた。

これらの病変に対して、2003 年 8 月 21 日より、r-h α GAL 1mg/kg/2weeks の酵素補充療法を開始した。2004 年 3 月に至るまで計 10 回投与を行った。投与 2 回目に発熱・悪寒を認めたが、アセトアミノフェン 300mg とヒドロキシジン 30mg を前投与薬として開始後同様の症状なく経過した。その他、酵素補充療法には直接関連はないと考えられる尿路感染症を繰り返し、また胆石発作を認めたが、それ以外に大きな合併症なく経過している。評価項目としての歩行状態は自覚的にはやや改善しているが、記憶力・意欲に関する自覚症状は不変、WAIS-R などによる痴呆の評価、頭部画像所見、心臓・腎臓の機能評価、皮交感神経皮膚反応など他覚的所見はいずれもほぼ不変。血中および尿中 GL3、抗 rh α

GAL 抗体は測定中である。

D. 考 察

神経内科領域にて Fabry 病はしばしば若年発症の脳梗塞，あるいは発汗障害・疼痛発作を示すまれな原因疾患として注目される。成人発症例は，主に心臓のみが障害される心筋型と心臓以外に全身性に侵される古典型に分けられる。

これに対して，本例は 40 歳代で痴呆を機に診断に至った非典型的な成人型の Fabry 病である。また，心臓病変に加えて腎障害，angiokeratoma，発汗障害を呈し，古典型 Fabry 病の範疇にあるが，発症年齢が遅く，脳卒中の既往はなく，緩徐進行性の痴呆と痙性歩行を来している点，高率に認めるとされる疼痛発作や角膜混濁を認めない点が特徴的であった。

リソソーム病の酵素補充療法は Gaucher 病では顕著な臨床効果が確認され，Fabry 病における酵素補充療法の心・腎臓障害に対する有効性が確立されつつあるが，脳血管障害を始めた Fabry 病の神経障害に対する評価は十分になされていない。末梢神経以外は病理学的検討が困難な領域であり，また多様な神経症状・所見を呈し得るため，評価方法は個々に工夫を要する。

本症例において 20 週投与後の腎機能，痴呆に大きな変化は認められず，より長期の観察が必要であると考えられる。

E. 結 論

痴呆と痙性歩行など緩徐進行性の神経徴候を主訴とした成人 Fabry 病を経験した。酵素補充療法を導入したが，臨床効果の評価には長期観察が必要と考えられる。

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

平成 15 年度厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）分担研究報告書

分担研究：ライソゾーム病の早期診断法の開発に関する研究

－Tandem 質量分析計を用いた尿中 Globotriaosylceramide (GL3) 測定による Fabry 病スクリーニング法の研究－

分担研究者	北川照男	(財) 東京都予防医学協会	理事長
研究協力者	石毛信之	(財) 東京都予防医学協会	係長
	鈴木健	(財) 東京都予防医学協会	次長
	大和田操	日本大学総合科学研究所	教授
	田中あけみ	大阪市立大学大学院	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、ライソゾーム酵素の一つである α -galactosidase A タンパク (α -Gal A) の欠損または障害によって生ずる糖脂質蓄積症である。

最近、ヒト α -Gal A の生産が工業的行われ、Fabry 病の酵素補充療法 (ERT) が可能となったので予後の改善が望めるようになった。しかし本症の多くは腎機能や心機能が低下し、重症な症状を呈してから発見されることが多く、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 -Gal A モノクロナール抗体を用いた ELISA 法を開発し、尿 α -Gal A を測定する本症マス・スクリーニング法について検討した。しかし、尿 α -Gal A は採尿からなるべく速やかに測定する必要があったので、今年度は Tandem 質量分析計 (MS/MS) で尿 GL3 を測定する本症のマス・スクリーニング法を開発した。以下、その方法と成績について報告する。

A. 研究目的

Fabry 病は、lysosomal α -galactosidase A (α -Gal A) の欠損またはその活性低下によって、腎、心、脳に GL3 が蓄積し、予後不良の経過をとる疾患である。しかし、最近、遺伝子組み換えの方法により、ヒトの α -Gal A が工業的に生産されるようになり、本症の酵素療法が可能となり、

予後の向上が望めるようになった。

日本における Fabry 病の疫学調査成績によると、20 歳を過ぎると約 30% に蛋白尿を認め、30 歳を過ぎると約 40% が腎不全に陥り、40 歳を過ぎると約 75% が心不全をきたすと云われている。従って、本症の予後を向上するには、幼小児期に本症のスクリーニングを行って診断し、治

療を開始する必要がある。幼小児は一般に採血を嫌うので、無侵襲の検査法を開発する必要があり、われわれは、最初、尿中の α -Gal A を測定して本症を早期診断する方法を検討した。しかし、尿の α -Gal A タンパクは室温ではやや不安定なので、これよりも安定な尿中の GL3 を測定して本症を診断する方法を検討した。その結果、本法は本症の早期診断に用い得る方法と考えたので報告する。

B. 研究対象および方法

1) 研究対象

Fabry 病患者の hemizygote 男性 12 例および heterozygote 女性 9 例ならびに健康対照者 1,140 名の尿を研究対象とした。

2) MS/MS による尿中 GL3 の各 isoform の測定と総 GL3 の定量

定量は市販のヒト赤血球由来の GL3 標準物質を用いた外部標準法で行い、検体である尿には内部標準物質 (IS) として C17-GL3 を添加した。尿中 GL3 の各 isoform 並びにその総和としての総 GL3 は、尿 200 μ L に IS を 10 μ L (200ng) 添加したのち、その 20 μ L を直接 MS/MS へ注入して測定した (直接法)。測定値はクレアチニン (Cr) 比とし、Cr の測定は Jaffe 法でおこなった。

3) クロロホルム-メタノール抽出法による尿中総 GL3 定量法 (抽出法)

抽出法による GL3 定量法を図 1 に示した。IS を添加した患者検体 20 μ L に対してクロロホルム-メタノール溶液 350 μ L を加えて全尿中の GL3 を抽出し、抽出液を固相抽出用カラム (ポアサイズ 20 μ m PE 製フ

リット付) でろ過したのち総 GL3 を測定した。

4) 尿中総 GL3 測定の再現性、並びに直接法と抽出法による測定結果の比較

方法は図 1 の直接法および抽出法を用いた。表 1 に示すように直接法で試料 a を 10 回反復測定した結果は平均 2.30 μ g/mL \pm 0.16 μ g/mL (2.00 ~ 2.48 μ g/mL)、抽出法で試料 b を 5 回反復測定した結果は平均 11.08 μ g/mL \pm 0.62 μ g/mL (10.26 ~ 11.91 μ g/mL) であり、いずれの方法でも測定値の再現性は良好であった。

また、ERT 実施前の hemizygote 男性例 6 名の全尿中の総 GL3 値を直接法と抽出法の両法で測定した結果、その平均値はそれぞれ 13.12 μ g/mL と 13.90 μ g/mL で、症例によって多少の違いが見られるものの、2 つの方法の測定結果はよく一致していた (表 2)。

5) 尿沈渣と上清における GL3 の分布の検討

全尿を遠心して沈渣と上清に分離し、それぞれについて図 2 のように総 GL3 を定量した。IS を 100 μ L 添加した患者全尿 2,000 μ L を 12,000 rpm / 30 分間 (15,000g) と 30,000 rpm / 30 分間 (45,000g) の二つの条件で遠心分離したのち、上清は直接 MS/MS へ注入して総 GL3 を測定し、沈渣はクロロホルム-メタノール (2:1) 溶液によってその細胞成分から GL3 を抽出し、その抽出液中の総 GL3 を測定した。そしてそれぞれの分画の GL3 の isoform を比較検討した。

(倫理面への配慮)

今回の研究に際して使用した健常者ならびに患者の尿検体の GL3 の測定につい

ては、本人または保護者から文書あるいは口頭で了解を得た。

C. 研究結果

1) hemizygote 3 例（有症状、Ccr \geq 30mL/min）の尿を用い、図 2 に示した方法で尿沈渣と上清における総 GL3 の分布を求め、その結果を表 3 に示した。尿沈渣と上清中の GL3 値を合算した値の、直接法による全尿中総 GL3 値に対する回収率は、いずれの症例においても 90%前後であった。12,000 rpm / 30 分間では尿沈渣と上清の GL3 の分布はそれぞれ平均 81.1% (78.5~83.5%) と 18.9% (16.6~21.5%) であり、30,000 rpm / 30 分間ではそれぞれ平均 80.4% (78.2~82.0%) と 19.6% (18.0~21.8%) で、どちらの遠心条件においても、尿沈渣中に約 80%、上清中に約 20%となった。この分布は、採尿日が異なる同一患者で GL3 の含有量が異なってもほぼ同様であったが、患者によってはその分布に若干の差がみられた。

2) ERT 実施前の hemizygote 8 例（有症状）と健常成人 12 名の全尿を直接法で測定して GL3 の脂肪酸構成を比較したところ、患者では健常成人と比較して C24-GL3 が著明に増加していた（図 3）。

3) ERT 実施前の hemizygote 5 例の尿沈渣では C24-GL3 が、総 GL3 の 34.6%を占めていたが、上清では 28.0%と、上清よりも尿沈渣中にこれが多く含まれていた。これに対して C16-GL3 は尿沈渣と上清中でそれぞれ総 GL3 の約 8.9%、13.6%であり、尿沈渣中よりも上清中に多く分布していた（図 4）。

4) 健常者 1,140 名と Fabry 病 hemizygote 男性 12 例（その内訳は、無症状の 2 例、症状があつてクレアチニンクリアランス (Ccr) \geq 30mL/min の 7 例、Ccr < 30mL/min の 3 例)、および heterozygote 女性 9 例（その内訳は、無症状の 2 例、症状のある 7 例）の随時尿を用いて全尿中総 GL3 を直接法にて測定し、その分布を図 5 に示した。健常者 1,140 名では $0.17 \pm 0.13 \mu\text{g/mgCr}$ (0.08~0.42 $\mu\text{g/mgCr}$) であった。一方、有症状の hemizygote で腎障害が見られない 7 例では、 $15.76 \pm 10.18 \mu\text{g/mgCr}$ (7.71 ~ 37.27 $\mu\text{g/mgCr}$) と他群と比較して著しく高値を示したが、腎障害がある 3 例では、 $11.28 \pm 14.84 \mu\text{g/mgCr}$ (1.72~28.3 $\mu\text{g/mgCr}$) で前者と比較して低値傾向にあった。また、遺伝子解析または末梢白血球 α -Gal A 活性値によって hemizygote と確定診断されたにもかかわらず、無症状な症例 2 例（年齢 14 歳および 3 歳の若年例）においては、14 歳の症例は $0.07 \mu\text{g/mgCr}$ と総 GL3 値は低く、健常者群の測定値とほぼ同じ値であったが、他の 3 歳の症例は $4.35 \mu\text{g/mgCr}$ と有症状例と同様な測定値で、健常者と比較して著しく高値であった。これに対し、有症状の heterozygote 7 例は $0.91 \pm 0.55 \mu\text{g/mgCr}$ (0.27 ~ 1.71 $\mu\text{g/mgCr}$) で、有症状の hemizygote 例と比較して明らかに低値であるが、健常者よりも高値傾向を示し、無症状の heterozygote 2 例は $0.57 \pm 0.72 \mu\text{g/mgCr}$ (0.06 と 1.08 $\mu\text{g/mgCr}$) で有症状の heterozygote 群と健常者群の中間の値であった。

5) 図 5 の無症状な hemizygote 2 症例の家系 H と家系 W を表 4 に示した。家系 H の 14 歳の症例（尿中総 GL3 $0.07 \mu\text{g/mgCr}$ ）

は、9歳時に酵素診断によって Fabry 病と診断され、遺伝子解析によって M296I の hemizygotе で心型 Fabry 病であることが明らかにされている症例である。その家系の母方の曾祖父は既往歴で皮膚症状がみられ、70歳で腎不全で死亡したといわれている。母親は19歳でタンパク尿が認められ、37歳で酵素診断によって Fabry 病患者と診断され、遺伝子解析によって M296I の heterozygotе であることが明らかにされている。なお、母親の妹と患者本人の姉は非保因者と診断されている。

家系 W の3歳の症例（尿中総 GL3 4.35 μ g/mgCr）は末梢白血球 α -Gal A 活性が 3.08 nmoL/hr/mg prot. と著明に低く、hemizygotе と診断されており、その母親はタンパク尿があり、 α -Gal A 活性が 33.47 nmoL/hr/mg prot. と低値で Fabry 病 heterozygotе の患者である。この家系の5歳の姉は四肢の疼痛がみとめられ、尿中総 GL3 値は 0.65 μ g/mgCr で、健常者よりやや高値で heterozygotе の患者と診断された。

D. 考察

1970年、Desnick らによって尿沈渣中の中性糖脂質の定量法が報告されて以来、Fabry 病の診断や治療のモニタリングには尿沈渣中の GL3 が測定されてきた。しかし、2002年に Mills らによって、MS/MS による GL3 定量用の IS (C17-GL3) の合成法と GL3 の定量法が示された。我々は、Mills らの方法を用いて、MS/MS で Fabry 病患者と健常者の全尿中の総 GL3 値を定量した。

本症患者の腎には C24-GL3、血漿ならびに肝には C16-GL3 が多く含まれているとの報告があるが、図3に示したように本症の患者では、いずれの症例でも健常成人と比較して C24-GL3 が著明に増加していたことから、本症の患者の尿中の GL3 はおもに腎由来と考えられた。また、全尿を遠心分離した上清中の GL3 の占める割合は多くないが、C16-GL3 がやや多かったので血漿や肝などの腎以外の臓器由来 GL3 が含まれている可能性が示唆された。

尿 GL3 をクロロホルム-メタノール溶液で抽出せずに MS/MS で直接測定しても、抽出後に測定しても、その測定値には大きな差異がみられなかったので、スクリーニングには操作が簡便な直接法が適していると考えられた。

健常者と有症状の本症患者の尿中総 GL3 値は著明な差がみられ、MS/MS を用いた尿中総 GL3 測定による非侵襲的な本症のマス・スクリーニングが可能と考えられた。しかし、無症状群においては、遺伝子診断や酵素診断にて hemizygotе と確定されているにもかかわらず、尿中総 GL3 値が低い症例（例えば心型 Fabry 病）も経験しており、尿中総 GL3 定量によるスクリーニング検査では発見されない症例もあることが示唆された。このような症例においても、尿 α -Gal A タンパク値は健常者と比較して明らかな低値を示しており、尿中の総 GL3 定量と α -Gal A タンパク定量の両者を組み合わせることで、より精度が高いスクリーニングが実施可能と期待される。

現在までの検討では、Fabry 病の予後を

改善するためのマス・スクリーニングをいつ行うかについての結論はまだ得られていない。今後、試験的なスクリーニングが実施されて、スクリーニングの時期や陽性者の診断基準の設定が行われることが望まれる。

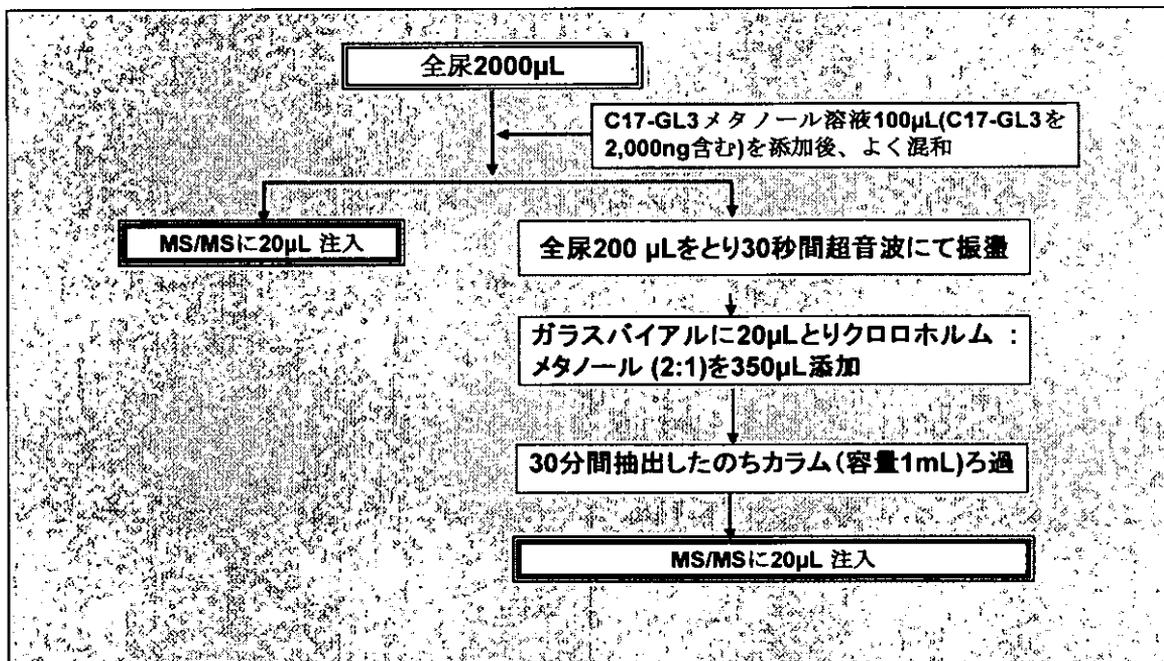


図 1. 尿中総 GL3 の測定：直接法とクロロホルム-メタノール抽出法

表 1. MS/MS を用いた尿中総 GL3 測定値の再現性

注入回数	総GL3 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	
	直接法 (試料a)	抽出法 (試料b)
1	2.20	10.26
2	2.08	10.83
3	2.42	11.91
4	2.26	11.41
5	2.30	10.98
6	2.42	
7	2.00	
8	2.38	
9	2.44	
10	2.48	
Mean:	2.30	11.08
SD:	0.16	0.62
Range:	0.48	1.65

表 2. 直接法とクロロホルム-メタノール抽出法で測定した尿中総 GL3 値の比較

症例No.	直接法 μg/mL	抽出法	
		μg/mL	(%)
1	14.42	13.78	(95.6)
2	18.20	19.53	(107.3)
3	9.82	9.56	(97.4)
4	12.98	17.20	(132.6)
5	9.23	9.00	(97.5)
6	14.08	14.30	(101.5)
Mean	13.12	13.90	(105.9)

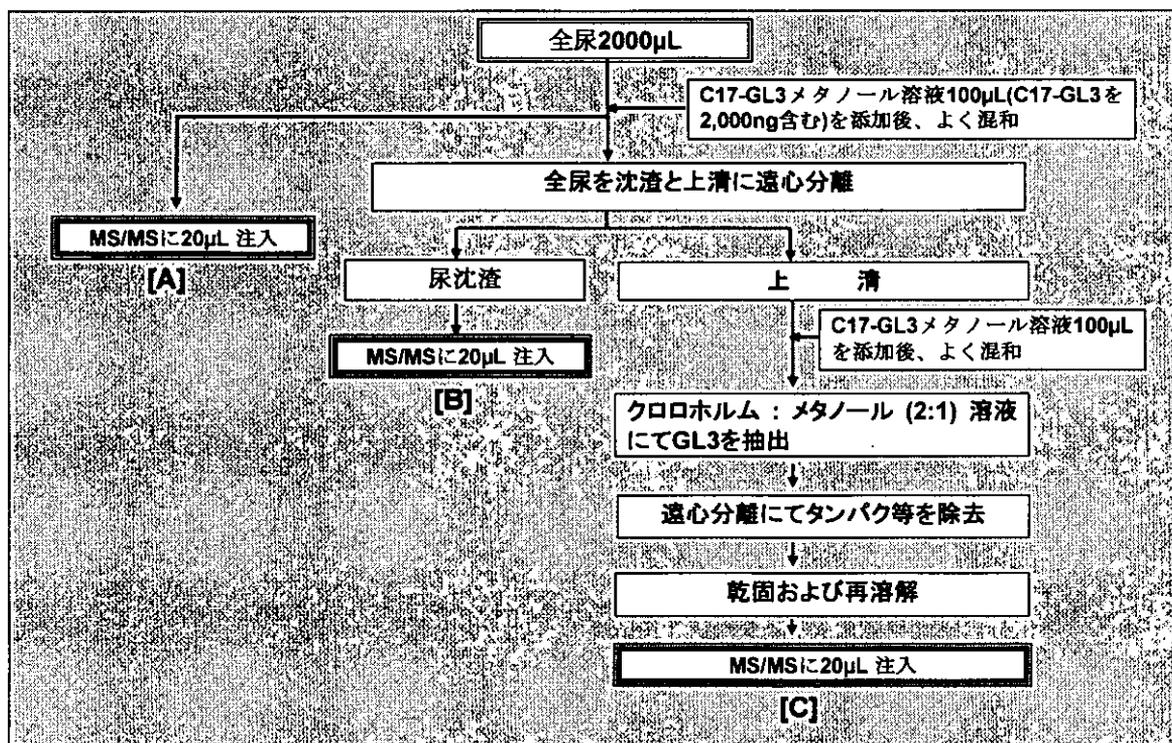


図 2. 全尿中総 GL3 および尿沈渣、上清中総 GL3 の測定法

表 3. 二通りの遠心条件による尿沈渣および上清中の総 GL3 の分布

遠心条件	症例 No.	年齢 / 性別	測定日	全尿中 総GL3値 μg/mL	尿沈渣および上清中総GL3分布	
					上清(%)	沈渣 (%)
12,000rpm for 30min (15,000g)	1	37/M	12/08/03	14.42	16.6	83.4
			19/07/03	8.65	19.4	80.6
	2	32/M	12/08/03	18.20	20.3	79.7
			19/07/03	30.20	21.5	78.5
	3	33/M	19/07/03	13.01	16.5	83.5
	Mean	—	—	—	18.9	81.1
30,000rpm for 30min (45,000g)	1	37/M	12/08/03	14.42	18.0	82.0
	2	32/M	12/08/03	18.20	21.8	78.2
	3	33/M	12/08/03	9.82	19.1	80.9
	Mean	—	—	—	19.6	80.4

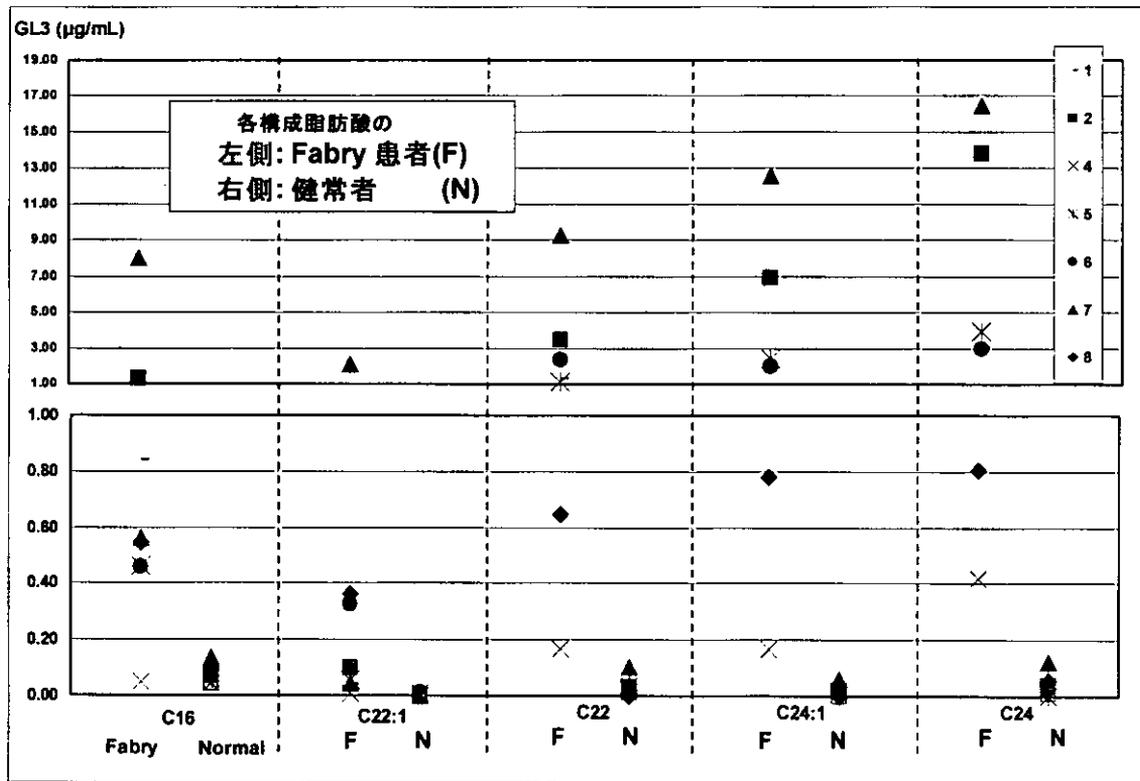
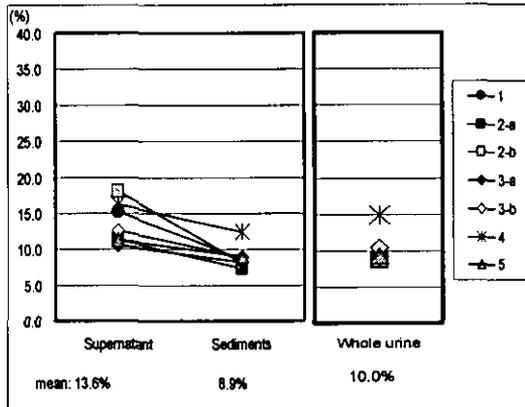


図 3. ERT 未実施の Fabry 病患者 8 例と健常人 12 例における全尿中 GL3 の脂肪酸構成の比較

A) C16-GL3



B) C24-GL3

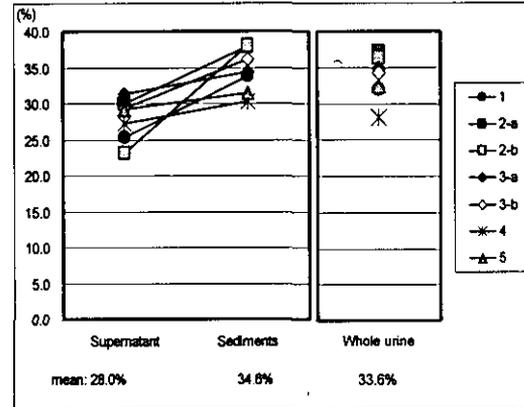


図 4. ERT 未実施 Fabry 病患者 5 例の尿沈渣、上清中ならびに全尿における総 GL3 値に対する C16-GL3 と C24-GL3 の比率の比較

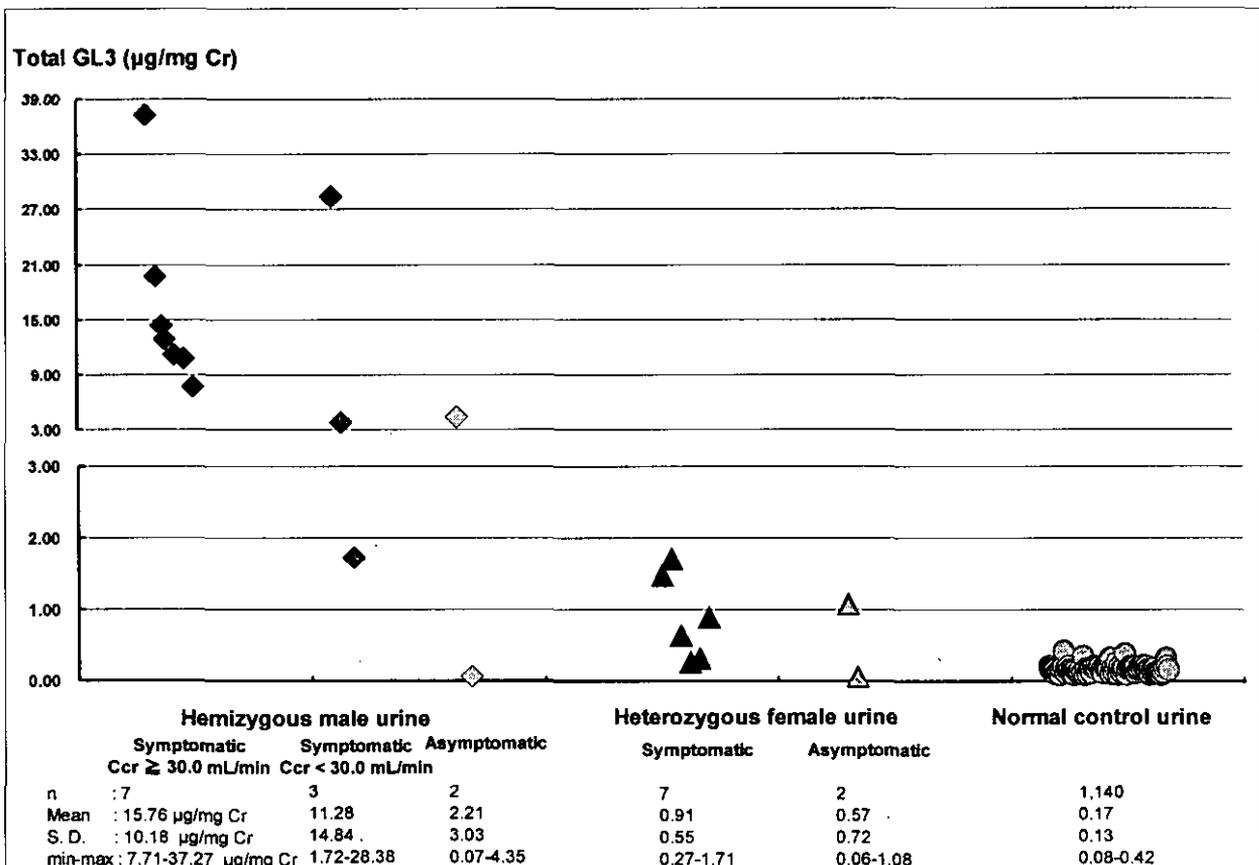


図 5. 健常者と Fabry 病患者の尿中総 GL3 値の分布

表 4. Fabry 病 hemizygote 未発症 2 例の家族歴

Family	Pedigree	Gene	Cutaneous symptoms	Kidney symptoms	Pain of the extremities	α -GalA activity	GL3 in the urine ($\mu\text{g}/\text{mgCr}$)	Comments
H		-	+	Renal failure	?	?	?	
		-	-	-	-	?	?	
		M296I hetero	-	Since 19 years of age proteinuria (+), Ccr normal	-	About 1/2 of the normal values	0.32	Electron microscope revealed lamellas inclusions in lysosomes in kidney
		M296I hemi	-	-	-	Very low	0.07	This case will be missed by the screening.
W		?	?	Proteinuria (+)	?	Activity in WBC: 33.47 nmol/hr/mgProt.	?	
		?	-	-	+	Urinary α -GalA protein: 7.8 ng/mgCr (1/2 of the control)	0.65	
		?	-	-	-	Urinary α -GalA protein: 1.5 ng/mgCr Activity in WBC: 3.08 nmol/hr/mgProt.	4.35	This case will be detected by the screening in the presymptomatic stage.

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

先天性ムコ多糖症 II 型患者の診断のプロセスと治療法の選択について、臨床経験に基づきまとめられた。

22名のうち15名（68%）が知能障害を伴い重症型と考えられ、7名（32%）は知能障害を伴わず軽症型と考えられた。身体所見については、ムコ多糖症一般に認められるガルゴイル顔貌、骨変形、関節拘縮、肝腫大、多毛のほか、鼠径ヘルニア、広範で長期に存在する蒙古斑は、II型重症型患者に高頻度で特徴的な所見であった。

尿中ムコ多糖分析において、異常ムコ多糖のうちのデルマトン硫酸が占める割合は、10歳をピークとした緩やかなカーブを示し、重症型、軽症型の差は認められなかった。また、骨髄移植を行った患者では、この割合は有意に低下したが、正常パターンにはならなかった。

欠損酵素 α -Iduronate-2-sulfate sulfatase 活性は、末梢リンパ球を材料とし、人工基質 4-methylumbelliferyl- α -iduronate-2-sulfate を用いて測定した。結果、患者および保因者の診断が可能であった。

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）

坂口知子（同上）

をなす。さらに、臨床型においても重症型から軽症型まで幅広いスペクトラムを示し、治療法の選択に苦慮することが多い。当科外来でフォローアップ中の II 型患者の現況を分析し、検討した。

研究目的

先天性ムコ多糖症の診断は、尿中のムコ多糖体の分析と、酵素活性の測定による。しかしながら、いわゆるガルゴイル様の顔貌や骨の変形に気付かれて始めて本疾患が疑われ、検査がされるのが現状である。かつては、原因療法としての治療法が無く、確定診断後に治療方針が変わるということではなかった。近年は、骨髄移植が普及し、また酵素補充療法が開発されてきたことから、早期の診断が求められるようになり、また、診断後の治療方針の選択という新たな課題が現れてきた。

特にムコ多糖症 II 型（Hunter 病）は、日本人においては全ムコ多糖症の 60%以上を占める上、X連鎖性劣性遺伝形式をとるため、患者診断のみならず保因者診断も重要な意味

研究方法および対象

当科外来でフォローアップをしている、あるいはしていた II 型患者 22 名について、検討した。うち、骨髄移植を行った患者は 4 名である。

α -Iduronate-2-sulfate sulfatase 活性は、末梢リンパ球を材料とし、人工基質 4-methylumbelliferyl- α -iduronate-2-sulfate を用いて測定した。

尿中ムコ多糖は、酢酸ナトリウム飽和エタノールで沈殿させた後精製し、カルバゾール硫酸法にてウロン酸量を測定、セルロースアセテート膜上で電気泳動を行いムコ多糖の種類を同定した。さらに、デンシトメトリーを用いて、電気泳動上に分離された各ムコ多糖

分面の量的割合を求めた。

研究結果

(1) 臨床診断

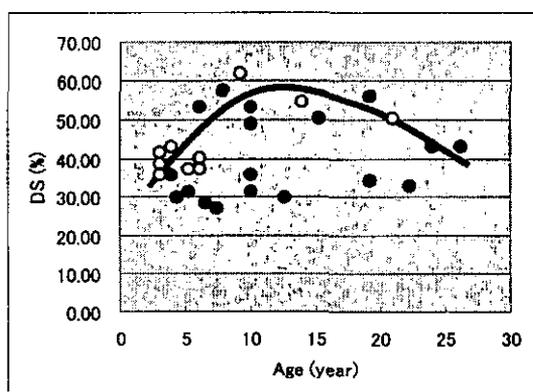
22名のうち15名(68%)が知能障害を伴い重症型と考えられ、7名(32%)は知能障害を伴わず軽症型と考えられた。全国的にもこの割合はほぼ変わらないものと推測される。

その他の身体所見については、ムコ多糖症一般に認められるガルゴイル顔貌、骨変形、関節拘縮、肝腫大、多毛のほか、鼠径ヘルニア、広範で長期に存在する蒙古斑は、II型重症型患者に高頻度で特徴的な所見であった。また、体格は、幼児期前半では、むしろ大きいことが多かった。

(2) 蓄積物質の同定

ムコ多糖症II型においては、電気泳動上、デルマタン硫酸、ヘパラン硫酸が多量に認められる。ヘパラン硫酸は、成人においては正常人でも認められるため、正常人には見られないデルマタン硫酸に着目して分析した。図1に示すように、デルマタン硫酸の割合は、10歳をピークとした緩やかなカーブを示し、重症型、軽症型の差は認められなかった。また、骨髄移植を行った患者では、この割合は有意に低下したが、正常パターンにはならなかった。

図1、ムコ多糖症II型患者における年齢とデルマタン硫酸含有率の変化。白丸：重症型、灰丸：軽症型、黒丸：骨髄移植施行後。



(3) 酵素診断

α -Iduronate-2-sulfate sulfatase 活性は、末梢血よりリンパ球を分離して超音波にて破碎し、これの蛋白量約 $15\mu\text{g}$ を 1.25 mM の人工基質 4-methylumbelliferyl- α -iduronate-2-sulfate とともに酢酸バッファー pH 5.0 中にて 4 時間反応させ、硫酸基を切断する。その後、備え付けの酵素液を加えて 24 時間反応させて基質糖鎖を分解し、遊離の 4-methylumbelliferone の蛍光を蛍光吸光度計にて測定して活性を求めた。

リンパ球中の活性は、正常者 $4.95 \pm 0.47\text{ nmol/mg/h}$ ($n=8$)、保因者 $2.72 \pm 0.57\text{ nmol/mg/h}$ ($n=6$)、患者 $0.135 \pm 0.067\text{ nmol/mg/h}$ ($n=7$) で、今回測定した保因者 6 検体においては、正常者活性とのオーバーラップはなく、保因者の判定が可能であった。

考察

ムコ多糖症II型患者に対する酵素補充療法の薬価収載がなされると、重症型、軽症型にかかわらず、適応となるであろう。しかしながら、2週間に1回の点滴治療を一生継続しなければいけないという手間と費用を考えると、骨髄移植という選択は残存すると思われる。

現在では、II型患者への骨髄移植治療は、軽症型で且つHLAタイプが一致の同胞がいる場合には比較的積極的になされているが、これ以外ではあまり行われていない。しかしながら、骨髄バンクからの移植もかなり行われている。さらに、重症型患者に対しても、家族の強い希望から骨髄移植が行われている例も少なくない。骨髄移植は、移植時のリスクはあるが、一度生着するとその後の手間や費用はかからず、この点において酵素補充に勝る。他方、酵素補充、骨髄移植共に、脳に対する効果はほとんどないが、骨髄移植のほうが脳に対しては酵素補充より期待が持てるのではないかと考えられている。

ムコ多糖症II型の確定診断は、酵素活性の測定によるが、臨床所見によりほぼ推定でき