

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

β -ガラクトシダーゼ欠損症に対する新しい分子治療の効果予測
分担研究者 鈴木義之 国際医療福祉大学教授

研究要旨

β -ガラクトシダーゼ欠損症(β -ガラクトシドーシス)患者由来の線維芽細胞に対して、培養液内に添加した新しいガラクトース類似誘導体NOEVの活性還元効果スクリーニングを行った。 β -ガラクトシドーシス患者由来線維芽細胞49種の細胞株の中で、17種に有意の活性上昇を認めた。R201C、R457Q変異にとくに著しい効果があった。

A. 研究目的

遺伝性ライソゾーム病に対する内服薬による新しい分子治療法を確立することを目的に、本研究では β -ガラクトシダーゼ欠損症(β -ガラクトシドーシス)患者由来の線維芽細胞に対して、培養液内に添加した新しいガラクトース類似誘導体の活性還元効果スクリーニングを行った。

B. 研究方法

まず正常細胞の酵素抽出液を用い、新しく有機合成により得られた化合物N-octyl-4-epi- β -valienamine(以下NOEV)の阻害活性を試験管内で測定した。つぎに正常および病的対照、 β -ガラクトシドーシスなどの国内外から提供いただいた患者由来の線維芽細胞の培養液にNOEVを添加し、活性還元最適濃度を確認した。 β -ガラクトシダーゼの活性測定には、蛍光人工基質4-methylumbelliferyl- β -D-galactosideを用いた。

C. 研究結果

試験管内実験ではNOEVのIC₅₀は0.125Mであった。次に β -ガラクトシドーシス患者由来線維芽細胞の実験を行った。培養液中に4日

間、0.2-2MのNOEVを添加することにより、G_{M1}-ガングリオシドーシス若年型細胞(変異R201C)で3-7倍の酵素活性を認めた。この現象には変異特異性があり、R201CのほかにR457Qの変異で活性上昇を認めた。これまで検討した49種の細胞株の中で、17種に有意の活性上昇を認めた。うちG_{M1}-ガングリオシドーシス若年型では87%の例が(7/8)、乳児型で約3割の例で(10/31)活性上昇を認めた。R201C、R457Q変異細胞に対する8週までの長期投与実験では、長期投与による活性還元への明らかな影響は認められなかった。

D. 考察

新しく合成した低分子化合物NOEVが、特定の変異遺伝子を持つ β -ガラクトシドーシス患者由来の線維芽細胞内で酵素活性を上昇させることを確認した。 β -ガラクトシダーゼ変異に有効な1-デオキシガラクトノジリマイシンの β -ガラクトシダーゼに対する活性還元効果はNOEVの1/100-200程度であり(IC₅₀:25M)、この新しい化合物が特定の変異細胞・個体に対して治療薬として使える可能性のあることがわかった。細胞実験に用いた細胞株は引き続い

て変異解析を行っており、今後この化合物の変異特異的活性を明らかにしていく。

E. 結論

NOEVは特定の変異遺伝子を持つβ-ガラクトシドーシス患者由来の線維芽細胞内で酵素活性の復元に有効であった。全体では約3割の患者由来の線維芽細胞で酵素活性復元が認められた。現在のところR201C、R457Qの変異で酵素活性の復元効果を認めている。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

学会発表

岩崎博之、一ノ宮悟史、難波栄二、松崎祐二、小川誠一郎、鈴木義之：β-ガラクトシドーシス患者由来線維芽細胞に対する新しい酵素阻害剤GalXによる細胞内活性復元効果のスクリーニング、第45回日本先天代謝異常学会 2002年11月8日、神戸

岩崎博之、一ノ宮悟史、難波栄二、富永里香、飯田真己、小川誠一郎、鈴木義之：β-ガラクトシドーシス患者由来線維芽細胞を用いたケミカルシャペロン療法の検討、第46回日本先天代謝異常学会 2003年11月21日、松江

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1) 構造特許：カルバ糖アミン誘導体

出願日：平成13年(2001)9月7日

発明者：小川 誠一郎、鈴木 義之

要約：β-ガラクトシダーゼ阻害活性を有する擬似糖

2) 用途特許：糖脂質代謝異常症治療剤

出願日：平成13年(2001)9月7日

発明者：鈴木 義之、難波 栄二

要約：糖脂質代謝異常症治療剤、特にβ-ガラクトシダーゼ遺伝子の変異に起因する糖脂質代謝異常症の治療剤

ライソゾーム病（ファブリー病含む）調査研究

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

ムコ多糖症 II 型は、日本人ムコ多糖症患者の約 6 割を占め、比較的多いライソゾーム病である。近年、骨髄移植、酵素補充などの治療法が開発され普及しつつあるが、臨床症状のバリエーションが大きいため、効果判定が困難である。この効果判定の指標のため、II 患者 22 家系 24 症例について、臨床分類を試みた。患者は、軽症型が 2 グループに、重症型は 3 グループに分けられた。このグループ分けに従って、骨髄移植をされた 7 症例（軽症型 3 症例、重症型 4 症例）について効果判定を試みた。全ての症例について身体所見の改善が認められただけでなく、軽症型、重症型とも脳 MRI 所見の改善ないしは進行停止が見られ、また、重症型患者では痙攣の発症阻止（あるいは発症の遅延）が見られた。この II 型患者の臨床分類は、過去に行われた骨髄移植の効果の評価に有用であるだけでなく、近々実施される酵素治療の評価にも有用であると考えられた。

A. 研究目的

ムコ多糖症 II 型は、日本人においては、症例数として多いだけでなく、臨床症状のバリエーションも大きく、兄弟間でも症状が異なることがある。従って、種々の治療効果を症例ごとに正確に判定することは困難である。正確な効果判定の指標とするため、近似する臨床症状の症例をグループ化することを行い、グループ内で臨床経過を比較することによる効果判定を試みた。

B. 研究方法および対象

当科でフォロー中の 22 家系 24 症例を対象とし、病歴と検査所見を比較検討し、グループ分けを行った。グループ分けにあたり、中枢神経症状を主とし、身体症状を従とした。なぜなら、身体症状は、感染、栄養などの付帯事象の影響を受けやすく、兄弟間の差も認められやすいためである。また、種々の治療が中枢神経に効くか否かは、身体症状よりも、患者の QOL への影響が大きいと推測されたためである。

さらに、骨髄移植を受けた症例について、同一グループ内での経過を比較することにより効果判定を試みた。

（倫理面への配慮）患者は番号化し、個人名が分からないように配慮した。患者各人および日本ムコ多糖症親の会に対し、口頭で説明を行い、承諾を得た。

C. 研究結果

22 家系のうち、知能障害が無く軽症型と判定された患者は 6 家系（27%）、知能障害を伴い重症型と判定された患者は 16 家系（73%）であった。軽症型は、より身体症状の軽いグループ A（1 家系、5%）とより重いグループ B（5 家系、23%）とに分けられた。重症型は、より軽いグループ C（5 家系、23%）、中間的なグループ D（8 家系、36%）、より重いグループ E（3 家系、14%）に分けられた。表 1 に各々のグループの臨床経過を、表 2 に MRI 所見を示した。

表 1. ムコ多糖症 II 型の臨床分類

グループ	初発年齢	初発症状	一語文	痙攣 言語喪失	歩行不能	生命予後
A	5 歳以降	関節拘縮	1 歳頃	無し		30 歳代後半
B	3~5 歳		1 歳頃			30 歳前後
C	2~3 歳	言語発達遅延 (大頭症、肝腫 大、ヘルニア)	1~1.5 歳	10 歳頃	10 歳前後	20 歳前後
D	1~2 歳		1~2 歳	10 歳頃	10 歳以降	10 歳代
E	1 歳以前		2 歳	不明	不明	10 歳未満

表 2. ムコ多糖症 II 型の MRI 所見

グループ	所見
A	20 歳以降もほぼ正常
B	篩状変化、10 歳以降に脳室の軽度拡大
C	5 歳：明らかな脳室拡大
D	5 歳：明らかな脳室拡大と白質の信号変化
E	3 歳：明らかな脳室拡大

骨髄移植を行った患者は、グループ B で 3 症例、グループ C で 2 症例、グループ D で 2 症例であり、グループ A と E にはいなかった。全ての移植症例で、肝脾腫、皮膚の肥厚、閉塞性呼吸障害、関節拘縮の改善が認められた。中枢神経所見においては、グループ B では MRI 所見上篩状変化の改善が認められた。グループ C では白質の異常信号の改善、脳室拡大所見の進行停止が認められた。臨床症状においても、グループ C、D の移植症例で痙攣の発症が認められていない。さらに、グループ C の 1 症例で、失われていた言葉が再び獲得されてきたことは特記すべきである。

D. 考察

ムコ多糖症 II 型は、日本人ムコ多糖症患者の約 6 割を占める。ムコ多糖症の治療法として、現在、骨髄移植と酵素補充とが行われている。欧米では、骨髄移植はムコ多糖症 I 型、VI 型では適応とされているが、II 型はされていない。これは、脳に対して有意な効果が認められないということが主な理由である。日本においては、II 型についても軽症型を中

心に骨髄移植が行われている。これは、日本人においては骨髄移植の副反応が比較的少ないという医学的理由と、家族の希望を最優先するという社会的理由とがある。酵素補充は、ムコ多糖症 I 型にはすでに商品化されている。II 型についても、現在、米国で治験が行われている。そして、酵素補充は、骨髄移植に比べ副反応が少なくドナーの必要も無いことから、軽症型、重症型を問わず適応とされている。しかし、脳に対する効果は期待されない。

II 型は、知能障害を伴わない軽症型と、伴う重症型とに大きく分けられているが、バリエーションが大きい。病歴、臨床所見を詳細に検討することにより、軽症型は 2 グループに、重症型は 3 グループに分類された。分類に当たっては、中枢神経所見を優先させた。身体所見としては、身長、関節可動域、呼吸機能、歩行能力、肝脾腫の程度などが挙げられる。身長は、遺伝的素質の影響と関節拘縮、関節変形の影響が大きい。関節可動域は、検者によって測定値が異なることが起こりやすい。呼吸機能検査は、重症型では検査不能な

患者がほとんどである。また、呼吸器感染や心機能低下、肥満などの影響を受ける。歩行能力もほぼ同様である。肝脾腫については、体格、胸郭の変形、年齢の影響があり、ムコ多糖症患者の正常値を求めることは難しい。さらに、心機能障害や呼吸器感染により大きさが変動する。中枢神経症状は、これらの付帯事象の影響が少ないものと推測される。従って、まず、中枢神経症状により分け、身体所見を参考にして最終的に分類した。

今回の研究分担者の行った II 型患者の臨床分類は、過去に行われた骨髄移植の効果の評価に有用であるだけでなく、近々実施される酵素治療の評価にも有用であると考えられた。

E. 研究発表

(学会発表)

- 1) 田中あけみ、高浦奈津子、新宅治夫、山野恒一 「ムコ多糖症 II 型患者の検査所見と生化学的所見」 第 46 回日本小児神経学会 (2004 年 7 月、東京)
- 2) 田中あけみ、高浦奈津子、新宅治夫、澤田 智、山野恒一 「当科外来におけるムコ多糖症 II 型患者の臨床像のまとめ」 第 49 回日本人類遺伝学会 (2004 年 10 月、東京)
- 3) 田中あけみ、高浦奈津子、新宅治夫、澤田 智、山野恒一 「ムコ多糖症 II 型の臨床分類と自然歴比較から見た骨髄移植の脳に対する効果」 第 47 回日本先天代謝異常学会 (2004 年 11 月、栃木)

厚生労働省科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

レクチンを利用したシアリドーシス/ガラクトシアリドーシスにおける蓄積物質の
検出とその治療法評価への応用

分担研究者 桜庭 均 東京都臨床医学総合研究所・臨床遺伝学研究部門部長

研究要旨

イヌエンジュ由来のレクチン *Maackia amurensis* (MAM)は、シアリドーシスおよびガラクトシアリドーシス患者由来の培養線維芽細胞中に蓄積するシアリル糖複合体を高感度で認識した。この検出法を利用して、ガラクトシアリドーシス細胞に対して、その責任蛋白質であるライソゾーム性保護蛋白質/カテプシン A (PPCA)の前駆体を投与した場合の効果を解析した。PPCA前駆体は、ヒト PPCA cDNA をチャイニーズハムスター卵巣細胞に導入して、PPCA を恒常的に発現する株を樹立した後に、その conditioned medium からカラムクロマトグラフィーで粗精製して得た。PPCA 前駆体の投与により、ガラクトシアリドーシス細胞内に蓄積していたシアリル糖複合体が分解されることが、MAM を用いた検出法で確認された。MAM を用いた分析法は、シアリドーシスやガラクトシアリドーシスの治療法の評価に有用と考えられる。

A. 研究目的

ライソゾーム病においては、酵素補充療法などの開発により、有効な治療が可能になったことから、近い将来、早期診断、早期治療のためのスクリーニングの導入が予想される。また、今後、現行の治療薬よりも強力で安全な治療薬開発が指向されると考えられる。これらの新規診断法や治療法の開発や評価においては、ライソゾーム病責任蛋白質や蓄積物質の特異的かつ鈍敏な検出法が必要となる。

我々は、これまでに本研究において、イヌエンジュ由来のレクチン *Maackia amurensis* (MAM)は、シアリドーシスおよびガラクトシアリドーシス患者由来の培養線維芽細胞中に蓄積するシアリル糖複合体を認識することを見い出

した。シアリドーシスでは、ライソゾーム性シアリダーゼの活性低下により、一方、ガラクトシアリドーシスでは、同酵素の活性化を担うライソゾーム性保護蛋白質/カテプシン A (PPCA)の異常により、シアリル糖複合体が分解されずに細胞内に蓄積すると考えられる。

今年度の研究においては、組み換え PPCA の投与により、ガラクトシアリドーシス細胞に蓄積したシアリル糖複合体が分解されるか否かを調べる目的で、MAM を用いた染色やウエスタンブロットリング解析を行い、この方法が治療法の評価に使用できるか検討した。

B. 研究方法

a) レクチンと抗体

biotin 結合 *Maackia amurensis* (MAM) は、生化学工業 (東京) から、ライソゾームのマーカーである lysosome-associated membrane protein-1 (LAMP-1) に対する抗体は、Southern Biotechnology (Birmingham, AL, 米国) から購入した。Cy3-conjugated goat anti-mouse IgG F(ab')₂ と streptavidin-fluorescein isothiocyanate (SAv-FITC) は、それぞれ Jackson Immuno Research (West Grove, PA, 米国) と BD Bioscience (San Jose, CA, 米国) から購入した。Peroxidase-conjugated mouse anti-biotin は Zymed (San Francisco, CA, 米国) から購入した。

b) 培養線維芽細胞

シアリドーシス 1 型と 2 型、ガラクトシアリドーシスの早期乳児型および若年/成人型の患者由来の培養線維芽細胞と正常対照由来の細胞は、10% ウシ胎児血清を加えた Ham の F-10 培地中で、37°C、5% 炭酸ガス濃度の条件下で培養した。

c) MAM と抗 LAMP-1 抗体による 2 重染色

患者および対照由来の培養線維芽細胞を Lab-Tek chamber slide (Nunk, Naperville, IL, 米国) で培養し、Kotani らの方法 (Clin Chim Acta, 344: 131-135, 2004) により、MAM と抗 LAMP-1 抗体とを用いて反応させ、Cy3-conjugated goat anti-mouse IgG F(ab')₂ と SAv-FITC で処理した後に、共焦点レーザー走査型イメージングシステム (LSM510, Carl Zeiss, Oberkochen, ドイツ) を装備した蛍光顕微鏡 (Axiovert 100M, Carl Zeiss) で鏡見した。

d) ウエスタンブロッティング

培養線維芽細胞の破碎液を試料として、Kotani らの方法 (Clin Chim Acta, 344: 131-135, 2004) により、ウエスタンブロッティングを行った。SDS-polyacrylamide ゲル電気泳動後に、蛋白質を

polyvinylidene difluoride 膜に転写し、biotin 結合 MAM と反応させて、peroxidase-conjugated mouse anti-biotin で処理を行った。

e) 酵素活性の測定

ライソゾーム性シアリダーゼ (NEU-1) 活性および対照酵素としての β -ヘキソサミニダーゼ (β -Hex) の活性は、4-methylumbelliferone 誘導体を基質とする蛍光法 (Clin Chim Acta, 125: 275-283, 1982) で測定した。カテプシン A (Cath A) の活性は、Z-Phe-Leu を基質とする方法 (Jpn J Hum Genet, 36: 169-175, 1991) で測定した。

f) ライソゾーム性保護蛋白質/カテプシン A の前駆体の発現

ライソゾーム性保護蛋白質/カテプシン A (PPCA) 前駆体は、ヒト PPCA cDNA をチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞に導入し、PPCA を安定に発現する株を樹立した (J Biol Chem, 268: 1180-1186, 1993)。この株を培養し、PPCA 前駆体を含む conditioned medium を調整した。この conditioned medium を concanavalin A カラムにかけて、PPCA 前駆体を含む画分を採取した (Neurochem Int, 44: 447-457, 2004)。

g) ガラクトシアリドーシス細胞に対するライソゾーム性保護蛋白質/カテプシン A 前駆体の投与効果の解析

ガラクトシアリドーシス患者由来の培養線維芽細胞の培養液中に、上記の PPCA 前駆体画分を加えて、細胞を 3 日間培養した。その後、細胞を採取して、Cath A、NEU-1 および β -Hex 活性を測定した。また、その細胞破碎液を試料として、MAM を用いたウエスタンブロッティングを行った。

(倫理面への配慮)

本研究の実施に関しては、当研究所の倫理委員会の承認を得て、その規約を遵守した。

C. 研究結果

a) MAMによる細胞のレクチン染色

MAM と抗 LAMP-1 抗体を用いて、細胞の 2 重染色を行った。シアリドーシスおよびガラクトシアリドーシス患者由来の細胞では、正常対照に比べて、顆粒状に MAM に対する強い染色性が認められた。その細胞内局在は、LAMP-1 のそれに一致した。

b) 細胞のウエスタンブロッティング

細胞破碎液を試料として、ウエスタンブロッティングを行い、蛋白質を転写した膜を MAM で染色した。シアリドーシスおよびガラクトシアリドーシス患者由来の細胞では、高分子領域に、MAM に反応する複数のバンドが検出されたが、正常対照では認められなかった。

c) ガラクトシアリドーシス細胞に対するライソゾーム性保護蛋白質/カテプシン A 前駆体の投与効果

PPCA cDNA を導入した CHO 細胞の conditioned medium から得た PPCA 前駆体画分を、ガラクトシアリドーシス患者由来の細胞の培養液に加えて、3 日間培養した。PPCA 前駆体画分の投与により、容量依存的に Cath A および NEU-1 活性の増加がみられた。β-Hex の活性値には有意な変化はみられず、対照に相当する値であった。また、PPCA 前駆体画分を加えない場合に比べて、ウエスタンブロッティングで、MAM 反応性のバンドの強度の減少が認められた。

D. 考察

シアリドーシスおよびガラクトシアリドーシスでは、それぞれ一次的および二次的なライソゾーム性シアリダーゼの活性低下が起こり、糖鎖の非還元末端にシアル酸が付いた糖蛋白質が蓄積すると考えられる。MAM は Siaα2-3Gal に反応することから、MAM を用いたレクチン染色およびウエスタンブロッティングは、シアリドーシスおよびガラクトシアリドーシスの細胞内に蓄積しているシアリル糖複合体を検出していると考えられる。この方法を利用して、ガラクトシアリドーシス患者由来の細胞に対して、PPCA 前駆体を投与した場合の効果进行分析した。その結果、ガラクトシアリドーシス患者由来の細胞に蓄積したシアリル糖複合体が分解されることを確認した。

E. 結論

MAM を用いた分析法は、簡便で、少数の細胞を試料として分析できることから、シアリドーシスやガラクトシアリドーシスの治療法評価に有用と考えられる。

F. 謝辞

本研究は、東京都臨床医学総合研究所臨床遺伝学研究部門の小谷政晴研究員および徳島大学大学院薬科学教育部附属医薬資源教育研究センターの伊藤孝司教授の協力によって行われた。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Itoh, K. , Satoh, Y. , Kadota, Y. , Oheda, Y. , Kuwahara, J. , Shimmoto, M. , Sakuraba, H. : Expression of lysosomal protective protein/cathepsin A in a stably transformed

human neuroblastoma cell during bi-directional differentiation into neuronal and Schwannian cells. *Neurochem. Int.*, 44, 447-457, 2004

- 2) Kotani, M., Yamada, H., Sakuraba, H.: Cytochemical and biochemical detection of intracellularly accumulated sialyl glycoconjugates in sialidosis and galactosialidosis fibroblasts with *Maackia amurensis*. *Clin. Chim. Acta*, 344, 131-135, 2004

- 3) 桜庭 均, 伊藤孝司: リソソーム性ノイラミニダーゼ (ノイラミニダーゼ-1). **日本臨床 増刊「広範囲 血液・尿化学検査, 免疫学的検査 (第6版) - その数値をどう読むか -」**, 62, 517-520, 2004

- 4) Ishiwari, K., Kotani, M., Suzuki, M., Pumbo, E., Suzuki, A., Kobayashi, T., Ueno, T., Fukushige, T., Kanzaki, T., Imada, M., Itoh, K., Akioka, S., Tajima, Y., Sakuraba, H.: Clinical and biochemical studies on a Japanese Salla disease case associated with a renal disorder. *J. Hum. Genet.*, 49, 656-663, 2004

2. 学会発表

- 1) 出石知子, 神崎 保, 桜庭 均, 田島素子, 永木 茂: 電顕的検索を行ったシアリドーシスの一例. 第31回日本電顕皮膚生物学会, 2004.10.8-9, 鹿児島
- 2) 大枝由加子, 小谷政晴, 桜庭 均, 内田佳人, 多田野 豊, 桑原 淳, 伊藤孝司: レクチン染色を用いたノイラミニダ

ーゼ-1 欠損細胞におけるシアル酸含有糖鎖蓄積の解析. 第77回日本生化学会大会, 2004.10.13-16, 横浜

- 3) 出石知子, 神崎 保, 桜庭 均, 田島素子, 永木 茂: 本邦16例目のシアリドーシスの臨床的・電顕的検索. 第45回日本組織細胞化学会, 2004.10.29-30, 鹿児島
- 4) 田島素子, 溝口枝里子, 立川恵美子, 永木 茂, 大澤真木子, 荒木博子, 山村英司, 桜庭 均, 伊東 康: ミオクロームスで発症したシアリドーシスの一例. 第47回日本先天代謝異常学会, 2004.11.11-13, 宇都宮

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

クラッペ病の病態解析と自然歴調査

（分担）研究者 酒井規夫

大阪大学大学院医学系研究科 小児発達医学講座

研究要旨

リソソーム病のうち遺伝性脱髄疾患の1つであるクラッペ病の病態解明をめざすために、遺伝子解析を行い、日本人の遺伝子変異の特徴を見だし、遺伝子型・表現型相関について明らかにした。若年型クラッペ病2症例に対し、造血幹細胞移植を行い、神経学的予後について観察した。乳児型クラッペ病を中心に、患者会を通じて自然歴調査の方法について検討した。

A. 研究目的

- 1) クラッペ病の病態解明；日本における遺伝子変異を解明し、表現型との関連を調べることを目的とした。
 - 2) 造血幹細胞移植の効果；若年型クラッペ病に対しては造血幹細胞移植の効果が海外症例で報告されているので、2症例に対してこれを施行し、神経学的効果について調べる。
 - 3) 自然歴調査；疾患の自然歴を把握することにより、進行に伴う合併症、死亡原因などを明らかにし、家族に満足の得られる治療方針を立てることを目的とする。
- 調べた。また過去の日本人変異報告と合わせて、日本人の変異分布とスクリーニング法について検討した。
- 2) 造血幹細胞移植の効果；若年型クラッペ病の兄弟2症例に対して、兄には臍帯血移植、弟には骨髄バンク移植を施行し、MRI、髄液所見、運動神経伝導速度、神経学的診察所見、IQ、視野検査などのフォローを行った。
 - 3) 自然歴調査；患者家族の医療に対する意識も含めて調査するために、家族会を通じて患者主体の調査を行うことを目指している。現在、調査項目の検討中である。

B. 研究方法

- 1) クラッペ病の病態解明；乳児型15例、若年型3例、成人型2例に関して、galactocerebrosidase 遺伝子の変異をDHPLC法で検索し、塩基配列決定法にて

C. 研究結果

- 1) 1クラッペ病の病態解明；20例の解析結果と過去の報告を合わせたものを下記に示す。変異の数はallele数で表現した。

Mutation	Allele	
12Del3Ins		11
I66M+I289M		9
R515H		3
G270D		2
L618S		2
S52F		1
W115X		1
a393Del		1
Ex6Del		1
R204X		1
T262I		1
P302A		1
Y354X		1
L364R		1
W410G		1
W647X		1
T652R		1
Total		39

また、これを病型との関係で表したものを下表に示す。

Correlation between Genotype-Phenotype

{Genotype}	{Phenotype}
12Del3ins/12Del3ins	Infantile (two)
12Del3ins/ R204X	Infantile
/W647X	Infantile
/T652P	Infantile
/T262I	Infantile
/?	Infantile
12Del3ins/I66M+I289V	Juvenile (two)
I66M+I289V/I66M+I289V	Adult (three)
L618S/?	Infantile
L618S/ Ex6Del	Adult
L618S / I66M+I289V	Adult
R515H/?	Infantile
R515H/R515H	Infantile

G270D /G270D Infantile

日本人 Krabbe 病患者における 12Del3ins と I66M+I289V は今までのデータで合わせて 50%allele を占めており、Hot spot と考えられる。これによる日本人 Krabbe 病の変異スクリーニング方法についても確立した。

2) 造血幹細胞移植の効果；症例は兄；9 歳 10 ヶ月、弟；6 歳 5 ヶ月であり、いずれも 5 歳頃から視力障害に気付かれていた。兄が 8 歳になり歩行障害から診断を受け、造血幹細胞移植を希望したため、complete match の臍帯血による移植を行った（9 歳 10 ヶ月）。弟は骨髄バンクからの移植を行った（6 歳 5 ヶ月）。その後、それぞれ 1 年、10 ヶ月経過フォロー中であるが、MRI 画像、MCV は変化ないが、髄液蛋白の減少、髄液 NSE の正常化を認めている。兄は 1 年後の検査において、移植前はほぼ歩行困難であったのが 6 分間歩行で 400m 可能になり、振戦の明らかな改善と、視力の軽度改善を認めている。弟においては視力障害は存在するが著変なく、運動機能の低下は認めていない。

3) 自然歴調査；疾患の自然歴調査に関してまず、親の会の同意を得ることができたので、アンケート形式案を作成した。主たる項目は下記の通りである。A) 診断に関するもの；診断方法、診断年齢、家族歴、B) 臨床経過に関するもの；出生時、乳児期の発育発達、初発症状、神経症状の経過 C) 合併症に関するもの；易感染性、胃食道逆流、誤嚥性肺炎、痙攣、無呼吸、嚥下困難、D) 現在の症状；視力、聴力、歩行状態、食事、学校、E) 現在の介助、治療；車椅子、栄養法（鼻注、胃ろう）、

酸素療法、気管切開、人工呼吸器、F)家族の満足度；疾患に対する理解、受け入れ、主治医との信頼関係、医療に対する要望

D. 考察

- 1) クラッペ病の病態解明；日本人 Krabbe 病患者における 12Del3ins と I66M+I289V は 50%allele を占めており、日本人における特徴と考えられる。また 12Del3ins は乳児型もしくは重症型に寄与していると考えられ、I66M+I289V は若年型もしくは軽症型に関与すると考えられ、各の検索方法が確立したことは、早期の診断、予後の推定に重要な知見と考えられる。
- 2) 造血幹細胞移植の効果；若年型クラッペ病に対する造血幹細胞移植の効果は国内ではまだ詳細な報告がなかったため、適応、効果などについての情報がなかったが、この症例の報告が今後の症例の適応に関して重要な情報となると考えられ、更に長期的なフォローをする予定である。
- 3) 自然歴調査；クラッペ病の大半を占める乳児型についてはまだ根本的な治療法がなく、対症療法が中心となるが、家族にとってどのような治療選択がベストなのかを考える上で、今までの症例における情報は不可欠なものとなると考えられ、今年度中に情報をまとめたい。

E. 結論

リソソーム病は全体としては5000人に1人に及ぶと言われており、いくつかの疾患に関しては治療法が開発されているが、多くの疾患に関してはその適応が内とされてい

る。クラッペ病は近年造血幹細胞移植が若年型に対しては効果が認められているが、発症後の乳児型は適応がないとされ、早期の正確な診断が重要であり、また適切な時期の医療介入が必須であると考えられるため、それに関する情報を本研究で集める予定である。

G. 研究発表

論文発表

- 1) Chikara Kokubu Ulrich Heinzmann², Tomoko Kokubu, Norio Sakai, Takuo Kubota, Masanobu Kawai, Matthias B. Wahl, Juan Galceran, Rudolf Grosschedl, Keiichi Ozono and Kenji Imai, Skeletal defects in *ringelschwanz* mutant mice reveal that Lrp6 is required for proper somitogenesis and osteogenesis, *Development* 131(21):5469-80 2004
- 2) Okano Y, Hase Y, Kawajiri M, Nishi Y, Inui K, Sakai N, Tanaka Y, Takatori K, Kajiwara M, Yamano T., In Vivo Studies of Phenylalanine Hydroxylase by Phenylalanine Breath Test: Diagnosis of Tetrahydrobiopterin-Responsive Phenylalanine Hydroxylase Deficiency., *Pediatr Res.* 56 (5):714-719 2004
- 3) Ihara-Watanabe M, Uchihashi T, Miyauchi Y, Sakai N, Yamagata M, Ozono K, Michigami T., Involvement of phosphoinositide 3-kinase signaling pathway in chondrocytic differentiation of ATDC5 cells: Application of a gene-trap mutagenesis. *J Cell Biochem.* 93(2):418-426, 2004
- 4) Tamamori A, Fujimoto A, Okano Y,

- Kobayashi K, Saheki T, Tagami Y, Takei H, Shigematsu Y, Hata I, Ozaki H, Tokuhara D, Nishimura Y, Yorifuji T, Igarashi N, Ohura T, Shimizu T, Inui K, Sakai N, Abukawa D, Miyakawa T, Matsumori M, Ban K, Kaneko H, Yamano T., Effects of citrin deficiency in the perinatal period: feasibility of newborn mass screening for citrin deficiency., *Pediatr Res.* 56(4):608-14, 2004
- 5) Yamada M, Inui K, Hamada D, Nakahira K, Yanagihara K, Sakai N, Nishigaki T, Ozono K, Yanagihara I. Analysis of recombinant human saposin A expressed by *Pichia pastoris*. *Biochem Biophys Res Commun*, 318(2), 588-593, 2004

学会発表

- 第47回日本先天代謝異常学会:04.11.11-11.13, 栃木
3-メチルグルタコン酸尿症の一症例
大友孝信、青天目 信、神尾範子、沖永剛志、今井克美、酒井規夫、谷池雅子、大藺恵一
- Krabbe 病患者における DHPLC 法を用いた遺伝子変異の検索 (第二報)
許 成哲、酒井 規夫、谷池 雅子、赤木 幹弘、乾 幸治、大藺 恵一
- 第31回日本小児栄養消化器肝臓学会:04.9.17-9.19、東京
Wilson 病の遺伝相談の経験
酒井規夫、谷口真理子、吉津紀久子、谷池雅子、大藺恵一
- 第46回日本小児神経学会:04.7.15-7.17、若年型糖原病 II 型 4 例における睡眠時無呼吸に関する検討
酒井規夫、青天目信、神尾範子、谷池雅子、立花直子、大藺恵一
- 視神経萎縮、尿細管性アシドーシス、難聴など多彩な合併症を伴った hereditary motor and sensory neuropathy の兄妹例
酒井規夫、下野九理子、沖永剛志、今井克美、谷池雅子、大藺恵一
- 第107回日本小児科学会学: 04.4.9-4.11、岡山
若年型糖原病 II 型 3 例における睡眠時無呼吸に関する検討
酒井規夫、青天目信、神尾範子、谷池雅子、立花直子、大藺恵一
- 第4回関西出生前診療研究会: 04.2.28, 大阪
出生前診断の適応について
酒井規夫、吉津紀久子*, 谷池雅子、大藺恵一
- 第22回臨床細胞分子遺伝研究会; 04.1.31
ライソソーム病の治療の進歩
酒井規夫
- 染色体異常と遺伝相談
酒井規夫、谷池雅子、和田和子、大藺恵一

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ADL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

ムコ多糖症II型患者のADL評価をFIM質問紙を用いて行った。重症型患者は加齢に伴いADLは低下しており、特に運動面に比べ認知面の低下が顕著であった。成人軽症患者では全項目が完全自立の症例はなく、学童期をピークにADLが低下しており、下位項目の検討から、運動面では関節の拘縮と呼吸障害に、認知面では難聴に起因した様々な生活場面における困難が明らかとなった。FIM質問紙はムコ多糖症における造血幹細胞移植、酵素補充療法の効果判定の1つとして有用と考えられた。年齢を問わず利用でき、臨床症状の経時的変化をADLの観点から定量化ができるFIM質問紙は、各種代謝性疾患においても利用可能であると思われる

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)

移乗(ベッド、椅子、車椅子)、移乗(トイレ)、移乗(浴槽)、移動(歩行、車椅子)、階段 <認知>理解、表出、社会的交流、問題解決、記憶<採点方法>各項目とも7段階評価で、全項目全介助の場合18点、完全自立の場合126点。

A. 研究目的

ムコ多糖症II型(Hunter病)には合併症として、骨変形、関節拘縮、肝脾腫、聴力障害、閉塞性呼吸障害、中枢神経障害などがあり、進行性の病像を示すが、患者が実際の日常生活の、どのような場面において困難を感じているのかは明らかにされていない。

今回、機能的自立度評価法(Functional Independence Measure, FIM)質問紙を用いてムコ多糖症II型患者の日常生活動作(activities of daily living, ADL)評価を行ったので報告する。

B. 研究方法

【対象】

日本人ムコ多糖症II型患者29名(3-39歳、重症型14名、軽症型15例名、ムコ多糖症親の会協力)

【方法】

FIM質問紙にWee FIMの内容を追加した質問紙を作成し、患者が自宅でどの程度日常生活動作を行っているかを、介助者(家族)が記入した。

【FIM質問紙評価項目】

<運動>食事、整容、清拭、更衣(上半身)、更衣(下半身)、トイレ動作、排尿、排便

【FIM質問紙】

臨床頻度が高い具体例を折り込みながら、介助者にも理解できるように作成されたアンケート方式の質問紙

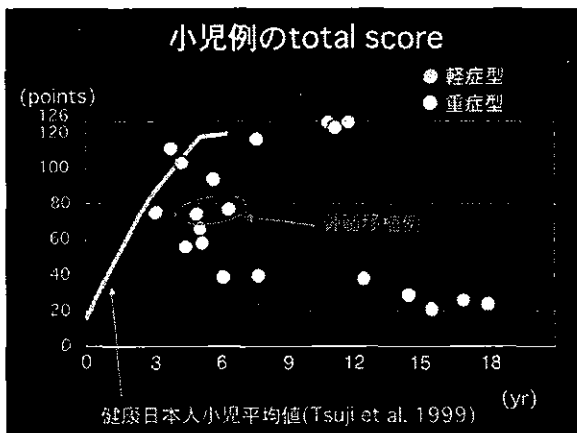
(例) トイレ動作 (採点質問紙)
トイレの表紙の上げ下げ、およの掃除をみる動作についてお答えします。
質問1) 一人でトイレに行くことが一人でできるますか?
スポンジ上げ下げ (はい) (いいえ)
お尻を拭く (はい) (いいえ)
【婦科の女性の着】 生活用品の交換を覚える (はい) (いいえ)
すべて (はい) (質問2)へ進む、一つでも (いいえ)がある (質問3)へ進む。
質問2) トイレの手すりや器具を使いますか? (はい) (いいえ)
通常のお風呂・お風呂かお風呂ですか? (はい) (いいえ)
すべて (はい) (いいえ) (質問3)へ進む、一つでも (いいえ)がある (質問4)へ進む
他、<質問3> <質問4> <質問5>、<質問6>
トイレットペーパー 1枚

C. 研究結果

(1)小児例

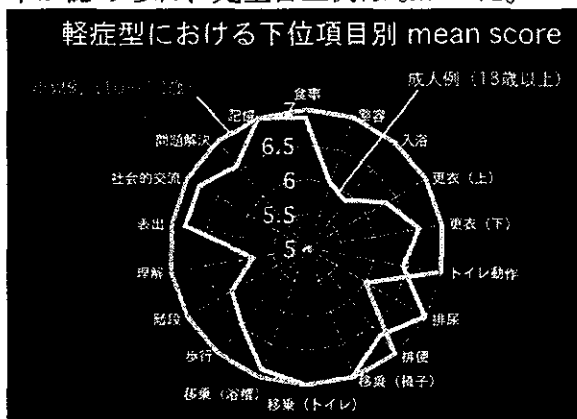
軽症例のFIMスコア(Total)は図に示すとおり、各年齢でほぼコントロールと同じ値をとり、10歳以降ではほぼ満点(完全自立)であった。

一方、重症小児例では5-6歳で既にコントロールより低値で、年齢が上昇するにつれてスコアが低下してゆくことが明らかになった。さらに重症例を運動面と認知面で比較すると、運動面では5-6歳の時点ではまだスコアが良く保持されているものの、認知面は5-6歳で既にかかなりの低下が見られ、8歳以降、認知の各項目のスコアはほぼ最低(1点)になることが明らかになった。



(2) 軽症成人例

小児の軽症例は10～12歳でほぼ満点のスコアとなるが、18歳以上の軽症成人例では関節拘縮、呼吸障害、聴力障害によるADLの低下が認められ、完全自立例はなかった。



各項目における具体的な問題点は以下のとおりであった。

食 事：時間がかかる
 整 容：歯磨粉をつける、洗顔、髪をとかす
 入 浴：体を洗う、タオルしぼり、柄つきブラシ
 更 衣：下着、服の着脱、ジッパーの上げ下げ
 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：補聴器、ゆっくり大声で話す必要
 表 出：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

(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

FIM 質問紙は年齢を問わず利用でき、臨床症状の経時的変化を ADL の観点から定量化ができ、ムコ多糖症におけるリハビリ、造血幹細胞移植、酵素補充療法の効果判定の1つとして有用と考えられた。また FIM 質問紙は他の先天代謝異常症においても利用可能であると思われた。

E. 結 論

ムコ多糖症の ADL 評価として FIM 質問紙が有用であることを明らかにした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Tomatsu S, Okamura K, Taketani T, Orii KO, Nishioka T, Gutierrez MA, Velez-Castrillon S, Fachel AA, Grubb JH, Cooper A, Thornley M, Wraith E, Barrera LA, Giugliani R, Schwartz IV, Frenking GS, Beck M, Kircher SG, Paschke E, Yamaguchi S, Ullrich K, Isogai K, Suzuki Y, Orii T, Kondo N, Creer M, Noguchi A. Development and testing of new screening method for keratan sulfate in mucopolysaccharidosis IVA. *Pediatr Res.* 2004;55(4):592-7.

田中あけみ、坂口知子、戸松俊治、鈴木康之：ムコ多糖症スクリーニング。小児科 45:2028-2033, 2004

2. 学会発表

加藤智美、鈴木康之、倉坪和泉、近藤直実、折居忠夫、太田哲生：ムコ多糖症 II 型における ADL 評価 -FIM 質問紙を用いて。第 47 回日本先天代謝異常学会、2004. 11. 11-13, 宇都宮

鈴木康之、加藤智美、倉坪和泉、田中 登、石神太人、梶原淳一、磯貝光治、下澤伸行、近藤直実、折居忠夫：日本人ムコ多糖症 II 型 (Hunter 病) の Genotype/phenotype relationship. 第 47 回日本先天代謝異常学会、2004. 11. 11-13, 宇都宮

H. 知的所有権の取得状況

なし

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

ゴーシェ病における聴力と ABR について

分担研究者 高柳正樹 千葉県こども病院小児救急総合診療科部長

研究要旨：ゴーシェ病において聴覚機能についての報告はすくない。我々が経験したゴーシェ病症例における聴力検査、ABRなどを検討した。対象はⅠ型3名、Ⅱ型1名、Ⅲ型1名である。中枢神経合併症の存在するゴーシェ病では ABR は異常所見を示す。ABR は他の中枢神経症状が乏しい頃より異常を示す。聴力と ABR とは単純な相関は示さない。ゴーシェ病患者に認められる聴覚障害の機序についてはいまだ不明であり、今後の研究が必要とされる。

A. 研究目的

ゴーシェ病において聴覚機能についての報告はすくない。これまで Kaga ら Barniou らの報告などで ABR をはじめとする聴覚検査がゴーシェ病の病型分類、神経学的な評価法やモニタリング法として有用であるとの報告がある。Uyama ら、Erduran らは聴力障害を伴った特異な病型の症例の報告をしている。

今回我々が経験したゴーシェ病症例5例において聴力検査、ABRなどを検討し、ゴーシェ病における聴力障害について検討を行った。

これらの検査実施に当たっては患者の保護者に十分な説明を行い了解を得て行った。

B. 研究方法

ゴーシェ病5例（Ⅰ型3名、Ⅱ型1名、Ⅲ型1名）に対して検討をおこなった。表に対象患者の詳細を表に示した。

C. 研究結果

Ⅱ型ゴーシェ病：

生後11ヶ月時の ABR はすでにⅡ波以降Ⅴ波まですべて消失していた。CORによる聴力検査は70-80Db

であり中程度の難聴があるものと思われた。酵素補充療法後の再検査にても同様な所見で改善は認められなかった。

Ⅲ型ゴーシェ病：

4歳3ヶ月時の ABR はⅠ波のみ認めⅡ波以降は消失していた。Ⅰ波の潜時は右 1.38ms, 左 1.40ms と延長は認められなかった。Play Audio では右 25dB, 左 21.3dB であった。このとき明確な神経症状の発現はなく、難聴も訴えていなかった。その後ミオクローヌスなどの神経症状が出現した後の ABR は初回のものと同様の所見であった。

Ⅰ型ゴーシェ病：

患者1はすでに25歳になるが聴力にはまったく異常がない。患者3は全く神経症状のない症例である。3歳11ヶ月時の ABR は90dB におけるⅠ波からⅤ波までの分離はきわめて良好であった。このときの COR は 25-30dB と正常であった。しかし一年後の ABR はⅠ波、Ⅴ波

は明瞭に分離されたがⅡ波からⅣ波は消失していた。聴力検査には変化がなかった。

症例4は3ヶ月時に診断されすぐに酵素補充療法をおこなっている症例である。

2歳9ヶ月時のABRはⅠ波からⅤ波の分離良好で潜時の延長はなかった。3歳9ヶ月のPlay Audioでは40-50dBであった。以後進行性に聴力障害が悪化し、4歳9ヶ月時聴力右75dB左105dBでABRはⅠ波、Ⅴ波のみ検出するのみであった。

5歳4ヶ月時聴力右123dB左125dBでABRは105dB両側無反応であり、ECOG(蝸電図検査 Echogram)も無反応、EABR(聴神経電気刺激検査 Electrically induced Promontory Test)も1、2、3mAにて両側とも無反応であった。

D. 考案

ゴーシェ病における神経症状としては眼球運動失行、核上性上方注視麻痺などの神経眼科的な所見について多くの報告が見られる。しかしゴーシェ病において聴覚機能についての報告はすくない。これまでKagaらBamiouらの報告などでABRをはじめとする聴覚検査がゴーシェ病の病型分類、神経学的な評価法やモニタリング法として有用であるとの報告がある。またUyamaら、Erduranらの聴力障害を伴った特異な病型の症例の報告がある。

今回の我々の検討より

1. 中枢神経合併症の存在するゴーシェ病ではABRは異常所見を示す。
2. ABRは他の中枢神経症状が乏しい頃より異常を示す。
3. 聴力とABRとは単純な相関は示さな

い。

4. ゴーシェ病患者に認められる聴覚障害の機序については不明であり、今後の研究が必要とされる。

などのことが判明した。

また急速に聴力障害を来した症例を検討した。各種検査結果から患者の聴力障害は、内耳、聴神経がともに関係していると思われる。しかしこの病態にゴーシェ病の中枢神経症状がどのように関与しているかは現在のところ不明である。今回検討した患者以外にも日本人のゴーシェ病には聴力障害をきたしている症例があり、これらの症例の検討がゴーシェ病における聴力障害の病態を解明する事になるものと思われる。

E. 結論

ゴーシェ病における聴力については不明なことが多い。ことにゴーシェ病で聴力障害を来している症例について十分な検討をおこない、ゴーシェ病における聴力障害の機序について検討することが必要と思われる。

F. 研究発表

学会発表:

急速に難聴の症状が進行したゴーシェ病5才女児症例

第10回日本ライソゾーム病研究会

DEC.10,2004 東京

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表

	病型	遺伝子変異	性別	診断時 年齢
患者1	I型	L444P/R496C	男子	10M
患者2	III型	L444P/L444P	男子	2Y4M
患者3	I型	?	男子	2Y5M
患者4	I型	?	女子	3M
患者5	II型	?	男子	7M

主訴	補充療法 開始年齢	補充療法 継続期間
肝脾腫	16Y7M	8Y10M
骨クリーゼ	2Y5M	5Y8M
肝脾腫出血傾向	2Y6M	3Y10M
患者3の妹	4M	3Y10M
眼球運動異常	7M	1Y4M

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	ページ	出版年
衛藤義勝、井田博幸	ファブリー病について	総監修 衛藤義勝	ファブリー病-基礎から臨床までの最近の知見-	ブレーン出版	東京	3-10	2004
大橋十也	ファブリー病の治療、酵素補充療法	総監修 衛藤義勝	ファブリー病-基礎から臨床までの最近の知見-	ブレーン出版	東京	144-55	2004
大橋十也	ファブリー病の治療、遺伝子治療	総監修 衛藤義勝	ファブリー病-基礎から臨床までの最近の知見-	ブレーン出版	東京	156-62	2004
大橋十也	ファブリー病の診断、リソソーム病の医療費等助成認定基準（ファブリー病を中心に）	総監修 衛藤義勝	ファブリー病-基礎から臨床までの最近の知見-	ブレーン出版	東京	98-107	2004
井田博幸	ファブリー病の臨床診断	総監修 衛藤義勝	ファブリー病-基礎から臨床までの最近の知見-	ブレーン出版	東京	75-6	2004
井田博幸	関連学会、患者団体の活動	総監修 衛藤義勝	ファブリー病-基礎から臨床までの最近の知見-	ブレーン出版	東京	165-72	2004
田中あけみ 山岡小百合	メチルマロン酸		血液・尿化学検査、免疫学的検査	日本臨床社	東京	696-9	2004

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	ページ	出版年
田中あけみ 富和清隆	GM1カンガリオトランス、各型	「小児内科」「小児外科」編集委員会	目でみる骨系統疾患	東京医学社	東京	319-23	2004
桜庭 均	ファブリー病の酵素補充療法	伊藤克己, 遠藤均, 御手洗哲也, 東原英二, 秋澤忠男/編	Annual Review 腎臓 2004	中外医学社	東京	231-6	2004
桜庭 均	ファブリー病における病態生理学、病理生化学	衛藤義勝/編	Fabry病：基礎から臨床までの最近の知見	ジャパンメデアートパブリッシング	東京	13-20	2004
桜庭 均, 奥宮敏可	ファブリー病における分子生物学的病態生理	衛藤義勝/編	Fabry病：基礎から臨床までの最近の知見	ジャパンメデアートパブリッシング	東京	21-35	2004
北川照男 特殊ミルク改良開発部会第一、第二部会	改訂にあたって	北川照男 特殊ミルク共同安全開発委員会	改訂食事療法ガイドブック アミノ酸代謝異常症のために	社会福祉法人恩賜財団母子愛育会	東京	III~IV	2004
北川照男 鈴木 健 石毛信之 大和田操	ファブリー病のスクリーニング	衛藤義勝	ファブリー病基礎から臨床までの最近の知見	ブレーン出版	東京	65-72	2004