

表

1	生年月	性別	体重	居住地	骨髄移植の有無	転帰	心合併症	呼吸状態	移動	その他
2	1988年10月	男	30 kg	福井県	済み	生存中	有り	呼吸管理なし	車椅子	
3	1990年11月	女	21 kg	愛知県	未	生存中	有り	BiPAP	車椅子	
4	2001年4月	男	16 kg	岡山県	未	生存中	有り	呼吸管理なし	独歩	酵素補充中
5	1974年9月	女	29 kg	大阪府	済み	生存中	有り	呼吸管理なし	車椅子	
6	1987年12月	女	24 kg	新潟県	済み	生存中	有り	不明	不明	

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)
ライソゾーム病(ファブリー病を含む)に関する調査研究

分担研究者 衛藤 義勝 東京慈恵会医科大学小児科
研究協力者 小林 正久 東京慈恵会医科大学小児科

Fabry 病女性ヘテロ症例の自然歴についての研究

要旨

背景: Fabry 病は X 連鎖遺伝形式の先天代謝異常症である。わが国でも Fabry 病の酵素補充療法が保険承認され、症候性ヘテロ症例は酵素補充療法の適応と考えられている。酵素補充療法の適応の判断, 治療効果の判定については, Fabry 病ヘテロ症例と照らし合わせて評価する必要がある。本研究の目的は日本人 Fabry 病ヘテロ症例の自然歴を明らかにすることである。

方法: 日本人 Fabry 病ヘテロ症例 36 例を対象として, 各医療施設にアンケート調査を行った。

結果: 初発症状として最も多かったのは四肢末端痛であり, 平均発症年齢は 23.5 才, 平均診断年齢は 35.0 才であった。各症状の発症率は, 四肢末端痛 50.0%, 発汗異常 16.7%, 角膜混濁 50.0%, 尿蛋白 38.9%, 透析を要する腎不全 5.6%, 左心肥大 38.9%, 脳梗塞 8.3% であり, これらのいずれかの症状を有する症候性ヘテロの割合は 86.1% であった。

考察: Fabry 病ヘテロ症例において, 四肢末端痛, 角膜混濁, 尿蛋白, 左心肥大は発症率が高く, 診断価値の高い症状と考えられた。左心肥大は, 発症率が高く, 日常診療において心不全の発症に注意を要すると考えられた。

結論: 女性ヘテロ症例においても, 左心肥大, 脳血管障害, 腎不全のような重篤な症状が認められることから, 酵素補充療法は積極的に施行するべきと考えられた。

A. 研究目的

Fabry 病は, X 連鎖遺伝形式の先天代謝異常症である。古典的男性患者では, 小児期より, 四肢末端痛, 発汗異常, 被角血管腫で発症し, 20 才代より角膜混濁, 尿蛋白を認め, 30 才以降より脳血管障害, 腎障害, 左心肥大を認める。四肢末端痛は中年期以降自然軽快傾向を呈するが, その他の症状は進行性であり, 脳血管障害, 腎障害, 心障害の重症度が予後を左右するとされている。Fabry 病は X 連鎖劣性遺伝形式と

考えられていたため, これまで Fabry 病の女性ヘテロ症例は, 無症状, あるいは症状があっても軽症と考えられてきた。しかし, 近年になり Fabry 病女性ヘテロ症例の中には無症状の軽症例から心不全に至る重症例まで, その症状は多彩であることが報告されている。わが国でも Fabry 病の酵素補充療法が承認され, 症候性ヘテロ症例は治療対象となっている。女性ヘテロ症例に対する酵素補充療法の適応, 効果を検討するためには, 女性ヘテロ症例の自然歴

を明らかにする必要があるが、女性ヘテロ症例の自然歴についての検討は世界的にも少なく、日本人症例での検討はなされていない。本研究の目的は、日本人 Fabry 病女性の自然歴を明らかにすることである。

B. 研究方法

対象は東京慈恵会医科大学小児科に遺伝子解析の依頼のあった酵素補充療法を受けていない Fabry 病女性ヘテロ症例 36 例 (28 家系, 4~68 才, 平均 40.1 才)。対象症例は、家族歴からヘテロであることが明らかであり、かつ遺伝子解析、病理所見 (心生検あるいは腎生検)、あるいは尿中 GL3 の異常高値からヘテロと診断された。遺伝子解析の依頼のあった施設に臨床病歴についてアンケート調査を行い、臨床症状 (四肢末端痛, 発汗異常, 被角血管腫, 尿蛋白, 腎不全, 左心肥大, 脳梗塞) の発症時期について検討した。重症度の比較のために、東京慈恵会医科大学に通院中の男性 Fabry 病症例 40 例 (4~60 才, 平均 33.3 才) の酵素補充療法施行前の症状と比較検討した。

本研究は、東京慈恵会医科大学倫理委員会の承認を受けた上で行われた。患者データは全て匿名化して扱われた。

C. 研究結果

発症年齢についての検討では、36 例中 28 例が診断前に Fabry 病に特有な自覚症状、あるいは検査値の異常を認めており、自覚症状として最も多かったのは四肢末端痛であった。平均発症年齢は 23.5 才であった。36 例中 25 例は家族歴から、11 例は自覚症状から Fabry 病を疑われ診断に至り、平均診断年齢は 35.0 才であった。

各症状の発症率は、四肢末端痛 50.0%、発汗異常 16.7%、角膜混濁 50.0%、尿

蛋白 38.9%、透析を要する腎不全 5.6%、左心肥大 38.9%、脳梗塞 8.3%であり、これらのいずれかの症状を有する症候性ヘテロの割合は 86.1%であった。四肢末端痛、角膜混濁、尿蛋白、左心肥大の順に発症率が高く、この傾向は過去の報告と同様の傾向であった。

次に各症状の発症年齢と症状の経過について、検討した。四肢末端痛、発汗異常については、男性患者、女性ヘテロ症例とも 20 才代をピークに発症率が高くなり、以後軽快傾向を示した。男性患者に比して、女性ヘテロでは四肢末端痛、発汗障害の発症率は低かった。

四肢末端痛、発汗障害以外の進行性の症状については、カプラン・マイヤー曲線により推定発症率を統計学的に検討した。被角血管腫は、男性患者に比べ有意差を持って発症率は低かった ($p=0.0003$)。男性患者では、加齢とともに発症率が高くなる傾向を示したが、女性ヘテロ症例では加齢とともに発症率が高くなる傾向は示さなかった。角膜混濁も、男性患者に比べ有意差を持って発症率は低かったが ($p=0.0099$)、男性患者と同様に 10 才代から認められるようになり、発症率は男性患者と同様に加齢とともに高くなる傾向を示した。尿蛋白、腎不全とも有意差を持って発症率は低かった (それぞれ $p=0.0007$, $p=0.0001$)。尿蛋白の発症時期は男性患者では 20 才代以降、女性ヘテロでは 30 才代以降と女性ヘテロにおいて遅れて発症がする傾向を示したが、女性ヘテロでも男性患者と同様に加齢とともに発症率が高くなる傾向を示した。左心肥大も有意差を持って発症率は低かった ($p=0.0007$)。左

心肥大の発症時期は, 男性患者で 30 才代以降, 女性患者は 40 才代以降と女性ヘテロにおいて遅れて発症する傾向を認めたが, 男性患者と同様に加齢とともに発症率は高くなり, 推定発症率は約 70 才で 100%となった. 脳梗塞のみ発症率に統計学有意差を認めなかったが ($p=0.0601$), 男性患者, 女性ヘテロ症例とも発症率はそれぞれ 10%, 8.3%と低かった.

D. 考察

女性ヘテロ症例の 86.1%が Fabry 病に特徴的な何らかの症状を有しており, 症候性ヘテロは稀ではないと考えられた. また, Fabry 病ヘテロ症例において, 四肢末端痛, 角膜混濁, 尿蛋白, 左心肥大は発症率が高く, 診断価値の高い症状と考えられた. 左心肥大については, 加齢とともに合併率が高く, 自覚症状に乏しいことから, 日常診療において, 中年期以降の女性ヘテロ症例については心不全の発症に注意を要すると考えられた.

E. 結論

女性ヘテロ症例においても, 左心肥大, 脳血管障害, 腎不全のような重篤な症状が認められることから, 酵素補充療法は積極的に施行するべきと考えられた.

F. 学会発表

M. Kobayashi, Toya Ohashi, Hiroyuki Ida, Yoshikatsu Eto: Clinical manifestations of Japanese heterozygotes with Fabry disease, 10th International Congress of Inborn Errors of Metabolism, September, 2006, Chiba, Japan

平成 18 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

ライソゾーム病(ファブリー病含む)に関する調査研究
分担研究者 北川照男 財団法人 東京都予防医学協会理事長

尿 α -galactosidase A 蛋白と globotriaosylceramide 測定による
Fabry 病ハイリスク・スクリーニングに関する研究

研究要旨

尿 α -galactosidase A 蛋白(α -gal AP)を抗ヒト α -gal AP に対するモノクローナル抗体を用いた ELISA 法で測定すると共に、尿 GL-3 をタンデム質量分析計で測定する方法を開発し、Fabry 病 (FD) が疑われる症状があったり、その家族歴がある FD ハイリスク症例 259 例の尿について α -gal AP と GL-3 を測定し、FD のハイリスク・スクリーニングを行った。

その結果、両者が異常値を示した男性はその全例が FD のヘミ接合体であった。しかし、その一方が異常値のものの中にも FD ヘミ接合体が若干含まれているので、その診断は慎重に行う必要があると思われた。また、この方法は女性のハイリスクの症例の中から FD のヘテロ接合体をスクリーニングするのにも有用な方法であったので、本症の早期診断に活用する予定である。

研究協力者

鈴木 健 (東京都予防医学協会参与)
石毛信之 (東京都予防医学協会主査)
大和田操 (女子栄養大学大学院教授)
小林正久 (東京慈恵会医科大学小児科)
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)

A. 研究目的

平成 17 年度に尿中 α -galactosidase A 蛋白(α -gal AP)と globotriaosylceramide (GL-3) をそれぞれ ELISA 法およびタンデム質量分析計(MS/MS)で測定する方法を開発し、これらの方法を用いて Fabry 病 (FD) が疑われる症状がみられたり、その家族歴のあるハイリスク症例 259 例について FD のスクリーニングを行い、検査を依頼した各医療

機関での最終診断結果とわれわれの検査結果を対比して、この検査法の有用性を評価するのが本研究の目的である。

B. 研究対象および方法

対象は (財) 東京都予防医学協会(以下協会と略す)を受診した 432 名の健常対照群(小学生 179 名、中学生 136 名、高校生 97 名、成人 20 名)の随時尿、および東京慈恵会医科大学で診断された古典型 FD ヘミ接合体 34 名、ヘテロ接合体 25 名の随時尿を酵素補充療法 (ERT)開始前に採取し、直ちに凍結してマイナス 40°C で保存した。尿 GL-3 と α -gal AP を測定する時は、その直前に室温で一度だけ融解し、これを夫々のマーカーの測定に使用した。その理由は、尿 α -gal AP および α -gal A 活性は尿を室温で長時間放置したり、尿の凍結融解を繰り返すと測定値が低下するためである。なお、尿 α -gal AP の測定は、

米国ジエンザイム社から分与された抗ヒトモノクローナル抗体および抗ヒトウサギポリクローナル抗体を組み合わせたサンドイッチ・ELISA法により行った。

尿 GL-3 の測定は、すでにわれわれが報告したタンデム質量分析計を用いた直接法によって測定した。即ち、尿 GL-3 の定量は市販のヒト赤血球由来の GL-3 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) として一定量の C17-GL3 を添加した。尿中総 GL-3 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 に注入して測定した。

尿 α -gal AP と GL-3 の測定値はクレアチニン (Cr) 比とし、Cr の測定は Jaffe 法で行った。Fabry 病ハイリスク・スクリーニングを行う時は、正常対照者 432 例の尿 α -gal AP の 5th%ile 値、および尿 GL-3 値の 95th%ile 値をもって GL-3、 α -gal AP 測定時の cut off 値とした。

FD のハイリスク症例としての A グループには、某県の学校検尿で蛋白尿または潜血反応が持続的に陽性を示した小中学生 149 例の随時尿を用いた。B グループには、全国の 70 診療施設から FD が疑われる症状がある、または家族歴があるために、尿 GL-3 と α -gal AP の測定を依頼された男性 55 例、女性 55 例の尿を用いた。各施設で採取した尿をスクリーニング施設から協会に送付する場合も、なるべく前に述べたように採尿後速やかに尿を凍結して保存したものを送付するように依頼した。協会で尿の α -gal AP と GL-3 を測定した成績を、検査を依頼した各施設に報告した。各施設では患者の診断を確認するために血漿または白血球の α -gal A 活性を測定し、必要に応じて変異遺伝子の解析を行い、男性 50 例 (家族歴あり 27 例、なし 23 例)、女性 49 例 (家族歴あり 34 例、なし 15 例) の診断結果についての報告を協会は受けた (回収率 90.0%)。われわれは、その診断結果と尿 α -gal AP および GL-3 の測定結果とを対比してこの方法の有用性を評価した。

(倫理面への配慮)

尿を採取する場合は、被検者に研究目的および用途について事前に文書によって説明し、被検者に承諾書(検査申込書)を提出してもらうように主治医に依頼した。そして被検者の了解のもとに協会に尿を送付し、その尿のバイオマーカーを協会が測定し、結果を主治医に書面で報告し、被検者への成績の説明は主治医が行うように依頼した。

C. 結果

図 1 に示したように、正常対照者 432 例の尿 α -gal AP の 5th%ile 値は 38.2ng/mg Cr., GL-3 の 95th%ile 値は 0.26 μ g/mg Cr. であった。

慈恵医大ですでに診断されていた 34 例の古典型 FD ヘミ接合体の尿の α -gal AP と GL-3 を測定し、前記の cut off 値を用いて、患者を診断した時の感度と特異度を計算したところ、 α -gal AP の測定では 100% と 92.8%、GL-3 の測定では 100% と 98.4% であった。また、既知のヘテロ接合体 25 例の尿の α -gal AP と GL-3 を同時に測定した場合の診断の感度と特異度は、96.0% と 91.2% であり、ヘテロ接合体の診断の場合は、2 つのバイオマーカーを同時に測定してスクリーニングの方が精度が高かった(表 1)。

次に、Fabry 病のハイリスクの A グループ 149 例と B グループ 99 例の尿 α -gal AP と GL-3 を測定し、その結果と、尿の検査を依頼した 71 診療施設での診断結果とを対比した成績は、以下のようである。

A グループの成績

早朝起床時に採尿した児童生徒の尿について試験紙法で蛋白尿と血尿の検査を行い、(+) 以上の結果を得たものに対して再度採尿を依頼し、2 回連続して陽性となったものについて再々採尿を行い、この尿の GL-3 と α -gal AP を測定した。

その結果、尿 GL-3 と α -gal AP の両者が

cut off を超えていたものではなく、GL-3 が異常値を示したものはなかった。α-gal AP のみが異常値を示したものが 8 例みられたが、その 1 例について α-gal AP を再検査したところ、結果は正常であった。他の 7 例は再々採尿の提出についての承諾が得られず、α-gal AP 値の異常を確認することはできなかった。しかし、尿 α-gal AP 値が異常を示した児童生徒 8 例においては、Fabry 病を疑わせる症状はなかったとの報告をうけているので、正常であったと思っている。

B グループの男性の成績 (表 2)

男性 50 例の尿 α-gal AP と GL-3 を測定し、α-gal AP 値が cut off 値以下であったものは 44 例で、その診断名は 35 例が古典型 FD、3 例が心型異型 FD で α-gal AP のみ測定した場合のヘミ接合体診断の感度は 86.4% であった。また、50 例中 GL-3 が cut off 値以上の値を示した 37 例では、32 例が古典型 FD、2 例が心型異型 FD で、GL-3 のみ測定した場合のヘミ接合体診断の感度は 91.9% であった。両者の測定値が何れも異常値であった 34 例では、2 例の心型異型 FD を含めて全例が FD ヘミ接合体であり、その診断の感度は 100% であった。

他方、男性 50 例中 α-gal AP が正常値であった 6 例の中には心型異型ヘミ接合体が 1 例含まれていたが、その他はすべて正常と診断されていた。また、GL-3 が正常範囲内であった 13 例の中には、心型異型 FD ヘミ接合体 2 例と古典型 FD ヘミ接合体と診断された 3 症例が含まれていた。心型異型 FD ヘミ接合体では尿 GL-3 が増加しないものもあるといわれているので、尿 GL-3 の測定によって FD をスクリーニングした場合は、心型異型 FD の一部は見逃される可能性がある。しかし、古典型 FD ヘミ接合体 3 例も見逃されていたので、FD のハイリスク・スクリーニングでは尿 α-gal AP と GL-3 の両者を測定するのが良いと思われる。もしも両者が異常値であれば FD ヘミ接合体の可能性が極めて高

いが、α-gal AP か GL-3 の何れかが異常を示した時は、尿を再度採取して 2 つのバイオマーカーを測定すると共に、血漿の α-gal AP と α-gal A 活性を測定するなどして、FD か否かについて慎重に診断を進める必要がある。

B グループの女性の成績 (表 3)

女性 49 例の尿 α-gal AP と GL-3 を測定し、α-gal AP 値が cut off 以下であったのは 32 例で、その診断名は 23 例が古典型 FD のヘテロ、3 例が心型異型 FD のヘテロ接合体であって、α-gal AP 測定によるヘテロ接合体の診断の感度は 81.3% であった。

他方、女性 49 例中尿 GL-3 が cut off を超えていたものは 36 例で、そのうち 32 例が古典型 FD のヘテロ、3 例が心型異型 FD のヘテロ接合体で、GL-3 測定による FD ヘテロ接合体の診断の感度は 97.2% であった。また、尿 α-gal AP と GL-3 が何れも異常値であった女性 26 例では、1 例を除いて 25 例が FD のヘテロ接合体 (23 例古典型、2 例心型異型 FD のヘテロ接合体) であり、その診断の感度は 96.2% であった。他方、女性 49 例中 α-gal AP が正常値であった 17 例の中には古典型 FD のヘテロ 10 例と、心型異型 FD のヘテロ 1 例が含まれていた。また、GL-3 値が cut off 値以下で正常と思われた 13 例の中には、心型異型 FD のヘテロが 1 例、古典型 FD のヘテロ接合体が 1 例含まれていた。このように女性の尿 α-gal AP と GL-3 を測定して、FD のヘテロ接合体をスクリーニングする場合、その両者が異常値であれば FD のヘテロ接合体の可能性が高いが、その何れかが正常値であっても FD のヘテロ接合体である可能性がある。したがって、女性のハイリスク症例で 2 つのバイオマーカーのうちの片方が異常値を示した場合も、尿を再度採取して 2 つのバイオマーカーを再検査し、血漿の α-gal AP と α-gal A 活性を測定して診断することが望ましい。また、両者の値が正常値であっても、遺伝子検索によってヘテロ接合

体であることが証明された症例もあるので、FD を疑わせる症状や家族歴がある女性の場合は、遺伝子検索を行うなどして慎重に診断を確かめる必要がある。

D. 考察

1973年にDesnick¹⁾らは、正常対照者、Fabry病のヘミ接合体とヘテロ接合体の血漿、血清、白血球および尿の α -gal Aを4-methyl-umbelliferyl- α -D-galactopyranoside(4-MU- α -D-gal)を基質としてその活性を測定した結果、Fabry病のヘミ接合体は容易に診断できると報告した。しかし、尿 α -gal A活性ではヘテロ接合体の診断は困難であったが、その他の試料ではヘテロ接合体の活性は、ヘミ接合体と正常対照者の中間の値を示したと報告している。また、筆者らのグループ²⁾は、Desnickらと同様に、正常対照の尿にはかなりの量の α -gal APが排泄されているのに対して、Fabry病のヘミ接合体患者では、それが著しく低下しているのを α -gal APに対するモノクローナル抗体を用いたELISA法で証明した。したがって、この方法で尿の α -gal APを測定すれば、無侵襲でFabry病をスクリーニングすることが可能と考えた。そして研究を進めた結果、尿を4°Cで冷蔵保存すると α -gal APは比較的安定であり、2日間程度はその活性値も蛋白量も採尿時とほぼ同じであるので、採尿後直ちに尿を冷蔵保存し、少なくとも翌日に測定すれば、本症のスクリーニングが可能と考えている³⁾。さらに、尿中の α -gal A活性と α -gal AP量とは良く並行することを証明し、活性と蛋白量のいずれを測定しても、本症の診断は可能と思われたが、大量の尿サンプルの α -gal APを測定する場合は、活性値を測るよりもELISA法で酵素蛋白を測定するほうが、測定時間は短くて簡単であり、スクリーニング法としてはELISA法が有用と思われた。しかし、尿 α -gal APは尿を室温に放置すると急速に、また4°Cでも長期に保存するとその値が低下する欠点があるので、尿中でも比較的安定なGL-3を測定

するスクリーニング法の開発も同時に試みた。

1969年にPhilippartら⁴⁾は、健康な人の尿沈渣には少量のGL-3とジヘキソシルセラミド(dihexosylceramide: CDH)が存在し、Fabry病患者の尿沈渣ではその量が著しく増加していると報告した。他方、尿沈渣には腎糸球体や尿細管から剥離した細胞成分が存在することが知られていた。そして、Fabry病患者の尿沈渣には、腎組織に見られると同様なスフィンゴ糖脂質の蓄積を思わせる層状構造を示す物質の沈着が形態学的にも見られると報告⁵⁾されていたので、尿沈渣のGL-3を測定することによって、腎組織へのGL-3の蓄積を間接的に知ることができるとして1970年のDesnickらの報告⁶⁾以来、今日まで本症の診断や、治療効果を評価する指標として、この方法による尿沈渣のGL-3測定が広く用いられてきた。

しかし、尿沈渣のGL-3測定は、まず尿から沈渣を集め、脂質を抽出し、糖脂質を分離し、ガスクロマトグラフ法(GLC)や、高速液体クロマトグラフ法(HPLC)によって定量しなければならず、慣れた技術者でも1週間に10~20検体以上の試料を分析するのは不可能とされていた。

他方、2002年にMillsら⁷⁾は、生体内に存在しないC-17のGL-3を合成し、これを内部標準物質として血漿中のGL-3をTandem質量分析計(MS/MS)で測定する方法を開発した。著者らは、英国ロンドン大学小児保健研究所のKevin Mills博士とBryan Winchester教授の指導と、ジエンザイム社(Genzyme, 米国)の援助を受けながらMills博士らの方法を改変して、GL-3の測定に必要な量のC17-GL-3標準物質を尿に加え、ソニケトしてから直接MS/MSに注入して尿GL-3を測定する方法を開発した⁸⁾。

この方法は、沈渣の分離収集、脂質の抽出、糖脂質の分離を行い、GLCやHPLCによって糖脂質を測定するこれまでの方法に比べて、MS/MSで簡単にGL-3の総量および各 isoform

の量を測定できるので、この方法で本症のスクリーニングすることが可能であり、極めて有用な方法である。しかし、尿蛋白が陽性の場合、尿中の脂質をクロロホルム-メタノール (2:1) でいったん抽出して、その抽出液をMS/MSに注入する必要がある。

また、異型FD^{9,10)}では、糖脂質が腎臓にあまり多く蓄積されず、尿中にGL-3が排泄されないため、尿中のGL-3を測定して本症をスクリーニングすると、心型FDは見逃される可能性がある。実際に今回の研究でも、尿 α -gal APが低値でFDが疑われたにも拘らず、GL-3が正常範囲にあった心型異型FDのヘミ接合体も経験している。また、尿 α -gal APと尿GL-3が何れも正常値であった症例の主治医が、心型異型FDと診断した例もあり、このような症例の診断は慎重に行うことが必要である。

また、われわれの経験でも、症状のあるFDのヘテロ接合体では、尿GL-3が高く、 α -gal APが低いものが多いが、無症状のヘテロ接合体は一般にGL-3が低く、 α -gal APがやや高いものも多く、見逃される可能性があると思われる。

したがって、慎重にヘテロ接合体を診断する必要があり、本研究のように尿中の総GL-3と α -gal APの両者を同時に測定すれば、より精度が高いスクリーニングを行うことが可能である。今後は、この方法を用いてFDのハイリスク・スクリーニングを広く行う予定である。

文献

- 1) Desnick RJ, Allen KY, Desnick SJ et al: Fabry's disease: enzymatic diagnosis of hemizygotes and heterozygotes. α -Galactosidase activities in plasma, serum, urine and leukocytes. *J Lab Clin Med* 81: 157-171, 1973
- 2) 鈴木 健、大和田操、大橋十也、他: 新しい Fabry 病のマス・スクリーニング法. *日本先天代謝異常学会雑誌* 18: 134, 2002
- 3) Suzuki K, Owada M, Kitagawa T: Study on new screening method for Fabry's disease. *J Jap Soc Mass-screening* 12(2):25, 2002
- 4) Philippart M, Surlieve L, Manacorda A: Urinary glycolipids in Fabry's disease. Their examination in the detection of atypical variants and the pre-symptomatic state. *Pediatrics* 43: 201-206, 1969
- 5) Desnick RJ, Ioannou YA, Eng CM: α -Galactosidase A deficiency: Fabry disease, in Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D(Eds): *The metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* 8th ed. McGraw-Hill, New York, pp3733-3774, 2001
- 6) Desnick RJ, Sweeley CC, Krivit W: A method for the quantitative determination of neutral glycosphingolipids in urine sediment. *J Lipid Res* 11: 31-37, 1970
- 7) Mills K, Johnson A, Winchester B: Synthesis of novel internal standards for the quantitative determination of plasma ceramide trihexoside in Fabry disease by tandem mass spectrometry. *FEBS Lett* 515:171-176, 2002
- 8) Kitagawa T, Ishige N, Suzuki K, et al: Non-invasive screening method for Fabry disease by measuring globotriaosylceramide in whole urine samples using tandem mass spectrometry. *Mol Genet Metab* 85: 196-202 2005
- 9) Ogawa K, Sugamata K, Funamoto N, et al: Restricted accumulation of globotriaosylceramide in the hearts of atypical cases of Fabry's disease. *Human Pathology* 21: 1067-1073, 1990
- 10) Desnick RJ, Wasserstein MP, Banikazemi M: Fabry disease (α -galactosidase A deficiency): renal involvement and enzyme replacement therapy. *Contrib Nephrol* 136: 174-192, 2001

図 1. 健康正常対照者 432 例の尿 α -gal A 蛋白値の 5th%ile 値、
および GL-3 値/ 95th%ile

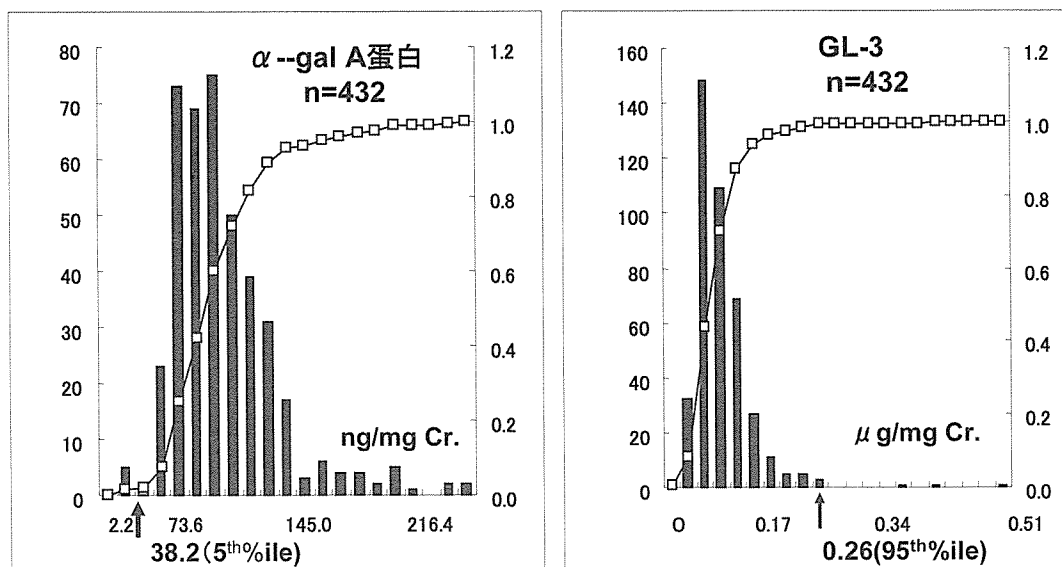


表 1. 尿 α -gal A 蛋白と GL-3 測定による Fabry 病の診断の感度と特異度
— 診断が確認されている古典型 Fabry 病患者の尿での成績 —

測定項目	診断の信頼性	hemizygotas	%	heterozygotas	%
α -gal A	感度	34/34	100	21/25	84.0
	特異度	401/432	92.8	401/432	92.8
GL-3	感度	34/34	100	22/25	88.0
	特異度	425/432	98.4	425/432	98.4
α -gal A & GL-3	感度	34/34	100	24/25	96.0
	特異度	394/432	91.2	394/432	91.2

表2. α -GalAP および GL-3 濃度による Fabry 病ハイリスク・スクリーニング成績
—男性—

Urinary α -gal A and GL-3 levels		α -gal \leq 38.2 ng/mg Cr GL-3 \geq 0.26 μ g/mg Cr	α -gal \leq 38.2 ng/mg Cr GL-3 < 0.26 μ g/mg Cr	α -gal > 38.2 ng/mg Cr GL-3 \geq 0.26 μ g/mg Cr	α -gal > 38.2 ng/mg Cr GL-3 < 0.26 μ g/mg Cr
家族歴の有無	症状の有無				
Fabry病の 家族歴あり	疑わしい症状あり	16*+1**	-	2	1**
	疑わしい症状なし	4*	1*+2	-	-
Fabry病の 家族歴なし	疑わしい症状あり	12*+1**	2*+1**+4	1	2
合 計		32*+2**/34 (100.0%)	3*+1**/10 (40.0%)	0*/3 (0.0%)	1**/3 (33.3%)

1) * : 古典型ヘミ 2) ** : Cardiacヘミ 3) 無印 : 正常

表3. α -GalAP および GL-3 濃度による Fabry 病ハイリスク・スクリーニング成績
—女性—

Urinary α -gal A and GL-3 levels		α -gal \leq 38.2 ng/mg Cr GL-3 \geq 0.26 μ g/mg Cr	α -gal \leq 38.2 ng/mg Cr GL-3 < 0.26 μ g/mg Cr	α -gal > 38.2 ng/mg Cr GL-3 \geq 0.26 μ g/mg Cr	α -gal > 38.2 ng/mg Cr GL-3 < 0.26 μ g/mg Cr
家族歴の有無	症状の有無				
Fabry病の 家族歴あり	疑わしい症状あり	11*+2**+1	-	3*+1**	-
	疑わしい症状なし	7*	1**+1	3*	1*+3
Fabry病の 家族歴なし	疑わしい症状あり	5*	4	3*	3
合 計		23*+2**/26 (96.2%)	1**/6 (16.7%)	9*+1**/10 (100%)	1*/7 (14.3%)

1) * : 古典型ヘテロ 2) ** : Cardiacヘテロ 3) 無印 : 正常

平成18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）
ライソゾーム病（ファブリー病含む）に関する調査研究班
分担研究報告書

Pompe病の全国調査

分担研究者 衛藤 義勝 東京慈恵会医科大学小児科教授

研究要旨： Pompe病は進行性筋力低下性疾患であり、原因となる欠損酵素alpha-glucosidase (GAA)をchinese hamster ovary cellを用いて大量精製する技術が開発され酵素補充療法が可能になってきている。本格的な臨床導入に際しわが国における臨床状況、QOLについて把握することを目的としてアンケート調査を行った結果、わが国のPompe病患者数は今回の結果では37名であり、男女ほぼ同数で遅発発症型が過半数を占める。Activity of Daily Life (ADL)は外来管理が主体で比較的自立度は高いといえるが、呼吸補助を必要としている割合も64.2%と高い。症候として知能低下はほぼなく、酵素補充の効果は早期であればきわめて高いとされ、治療による社会還元効果も大きいといえるため、酵素補充療法の早期導入が望まれる。

研究協力者

小林博司（東京慈恵会医科大学講師）

（倫理面への配慮）

(1) アンケートはすべて患者情報は無記名とし個人特定されないように配慮した。

A. 研究目的

Pompe病は進行性筋力低下性疾患であり、原因となる欠損酵素alpha-glucosidase (GAA)をchinese hamster ovary cellを用いて大量精製する技術が開発され酵素補充療法が可能になってきている。酵素補充により筋肉内のグリコーゲン蓄積ひいては呼吸筋を含む筋力低下の進行を抑制し症候を改善させることが期待され、本格的な臨床導入に際しわが国における臨床状況、QOLについて把握することを目的としてアンケート調査を行った。

B. 研究方法

- (1) まず一次調査として日本全国200床以上の病院を対象としてPompe病患者の有無、および臨床型を調査するため、小児科、神経内科、リハビリ科、循環器科、循環器内科にアンケートハガキを発送した。
- (2) 更に二次調査として患者ありと返信のあった施設へ、診断根拠（診断方法、特殊検査）および各患者のActivity of Daily Life (ADL)を調査した。

C. 研究結果

- (1) 一次調査では発送先施設の内訳は小児科1386、神経内科786、リハビリ科1421、循環器科1173、循環内科3であり発送計4769施設。うち返信数821でリターン率17.2%であった。患者ありと返答された施設は22施設であり、患者数は計37名、内訳としては乳児型4名、幼児型12名、成人型21名であった。
- (2) 二次調査結果は患者ありと返答のあった22施設へ依頼し、今回回答のあったのは17施設、リターン率77.3%であった。二次調査で回答のあった患者内訳は生存28名、死亡3名の計31名で、男15名、女13名。生存患者の年齢分布は10歳未満2名、10-19歳5名、20-29歳7名、30-39歳4名、40-49歳4名、50-59歳4名、60-69歳2名であった。
推定発症年齢は10歳未満13名、20歳未満5名と乳児・若年発症が大半を占めた。更に診断根拠としては筋、白血球を用いた酵素活性測定が主体で、発症から診断までは1年以内が8名（28.6%）5年以内が14名（50%）であった。症候は筋力低下、腱反射減弱が85%、嚥下困難が21.4%、呼吸困難が39.3%に見られた。

筋電図異常は35.7%、肺活量異常は67.8%であった。遺伝子解析は判明済み記載2名のみ(7.1%)であった。

ADLでは入院4名、外来23名、精神発達は異常なしが24名(85.7%)
排泄、着替え、食事の自立はそれぞれ46%、42.8%、75%であった。また呼吸補助なしは5名(17.8%)、非侵襲的補助は12名(42.8%)、侵襲的補助は6名(21.4%)であった。

勝 ; 第1回日本ポンペ病の会、日本ライソゾーム研究会 2006年11月、東京

E. 結論

わが国のPompe病患者数は今回の結果では37名であり、男女同数で遅発発症型が過半数を占める。ADLは外来管理が主体で比較的自立度は高いといえるが、呼吸補助を必要としている割合も64.2%と高い。Pompe病は進行性疾患であり知能低下はほぼなく、酵素補充の効果は早期であればきわめて高いとされるため、社会還元効果も大きいといえる。生命予後に直接関与するのは呼吸筋低下とされるため、酵素補充療法の早期導入が望まれる。

F. 研究発表

学会発表

【学会発表】

1. Enzyme Replacement Therapy for late onset Pompe disease. Kobayashi H., Ken Sakurai, Ohashi T., Ida H., Eto Y. ; Asian LSD meeting, The 10th International Congress of Inborn Errors of Metabolism (ICIEM) September, 2006., Chiba(Makuhari)
2. ムコ多糖 I 型日本人女性の継続的な酵素補充による治療経過について
小林博司、有賀賢典、井田博幸、大橋十也、衛藤義勝 ; 日本ライソゾーム研究会、2006年11月、東京
3. 遅発型 Pompe 病日本人男性に対する酵素補充療法
小林博司、井田博幸、大橋十也、船塚真、宍倉啓子、鈴木よう子、大澤真木子、衛藤義

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

ガルゴイリズム様顔貌、知能発達遅延、肝脾腫、尿中シアル酸排泄増多を示し、
Salla 病と考えられる一女兒例

分担研究者 高柳正樹 千葉県こども病院医療局長

研究要旨：Salla 病はライソゾームの膜における anion transport の障害によって引き起こされる。フィンランドに多く報告があるが、日本においてはこれまで一例のみが報告されているのみである。

今回ガルゴイリズム様顔貌、知能発達遅延、肝脾腫、尿中フリーシアル酸の排泄増多、線維芽細胞に多数の空砲と層状の蓄積物を認めた症例を経験し、Salla 病と考えられたので報告する。

患者は現在 15 歳となった。身長は $-2.8SD$ と低身長を示す。知能発達遅延は認められるが、全身の骨変化は少なく、心血管および腎臓にも異常は認められない。

Salla 病の成長に伴う natural history を報告する意味でも患者の現状を含めて報告する。

A. 研究目的

Salla 病はライソゾームの膜における anion transport の障害によって引き起こされる。

今回ガルゴイリズム様顔貌、知能発達遅延、肝脾腫、尿中フリーシアル酸の排泄増多、線維芽細胞に多数の空砲と層状の蓄積物を認めた症例を経験し、Salla 病と考えられたので報告する。

Salla 病の成長に伴う natural history を報告する意味でも患者の現状を含めて報告する。

B. 症例

家族歴：血族婚なし。家族に精神発達遅延の人はいない。

既往歴：在胎 41 週、2900gにて出生。仮死が認められた。生後直後より啼泣微弱、チアノーゼ、嘔吐を認めNICU

に入院加療を受けている。このときより顔貌の異常に気がつかれている。現病歴、現症：生後 5 ヶ月時に体重増多不良、顔貌の異常、肝脾腫を主訴に来院した。初診時の臨床所見としては発育発達遅延、発達遅延、ガルゴイリズム様顔貌、多毛、巨舌、臍ヘルニア、肝脾腫、視神経萎縮、虹彩萎縮、筋緊張低下が認められた。骨のレントゲン検索では明らかな変化を認めなかった。

C. 検査結果

末梢血一般、血液化学、検尿一般には異常を認めない。

代謝異常症に対するスクリーニング検査、血糖、血液ガス、ケトン体、乳酸、ピルビン酸、アンモニア、血中、尿中アミノ酸分析、尿中有機酸

分析、血中カルニチン分析などはすべて正常であった。

染色体分析は正常。

頭部 MRI 画像にて両側 PVH および myelination の遅れが認められた。

特殊な検査

1. 骨髄所見：ゴーシェ細胞、ニーマンピック細胞は認められない。

2. 尿中ムコ多糖排泄量：ウロン酸/クレアチニン比 21.4 mg/gcreatinine と正常

2. 血清中 β -Hexosaminidase, β -Galactosidase 活性正常

4. 白血球中各種ライソゾーム酵素活性
 α -Hexosaminidase, β -Galactosidase, Sialidase, α -Fucosidase, α -Mannosidase 活性は正常

5. 尿中アスパラチルグルコサミンの異常排泄は認められない。

6. 線維芽細胞の電子顕微鏡写真にて空胞化と層状の蓄積物を認めた。

7. 尿中シアル酸値 (nmol/mgcreat.)

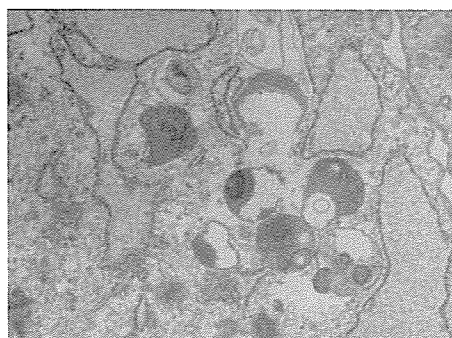
酵素法：症例 1876、I-cell 病症例 987、正常対照 298

Warren の thiobarbituric acid 法：

フリー；症例 433、I-cell 病症例 285、正常対照 116 ± 42

トータル；症例 1114、I-cell 病症例 2642、正常対照 356 ± 128 (n=5)

8. 線維芽細胞の電子顕微鏡写真



D. 考案

患者は現在 15 歳となった。身長は -2.8SD と低身長を示す。知能発達遅延は認められるが、全身の骨変化は少なく、心血管および腎臓にも異常は認められない。

Salla 病の成長に伴う natural history を報告する意味でも患者の現状を含めて報告することは重要であると考えられる。

今後染色体 6 番に位置している SLC17A5 遺伝子の解析が必要と考えている。

E. 結論

Salla 病は日本ではきわめて症例が少ない疾患と考えられている。おそらく診断がなされていない症例も多くいるものと思われる。今後尿中シアル酸の簡便で正確な測定法を、タンデムマスによる分析などを開発していくことが、重要なことと考えられる。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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

ライソゾーム病（ファブリー病含む）に関する調査研究

分担研究者 松田純子

東海大学・未来科学技術共同研究センター・糖鎖工学研究施設 助教授

研究要旨

ゴーシェ病は最も頻度の高いライソゾーム病で、近年、酵素補充療法が画期的な治療効果をあげているが、神経症状に対しては十分な治療効果が得られず、新たな治療戦略の開拓が望まれている。しかしながら有用な神経型ゴーシェ病のモデルマウスは未だ存在しない。本研究では、ゴーシェ病の欠損酵素（acid- β -glucosidase）の生体内での必須の活性化たんぱく質であるサポシンCをノックアウトすることにより、神経型ゴーシェ病の疾患モデルマウスの作成を試みた。マウスのスフィンゴ脂質活性化タンパク質（プロサポシン）遺伝子のサポシンC領域に、遺伝子変異（5番目のシステインをセリンに置換）を導入するターゲティングベクターを構築し、サポシンC変異ES細胞を経て、サポシンC変異ヘテロマウスを得た。今後のサポシンCノックアウトマウス脳神経系病変の解析により、ゴーシェ病の神経病変の病態が明らかになり、ゴーシェ病の神経病変に対する新たな治療の標的分子が見つかることが期待される。また、現在、有用な神経型のモデル動物が存在しないために、基礎的検討が行い得なかった既存の治療法（Substrate reduction therapy, 骨髄移植、遺伝子治療など）の神経系への治療効果の詳細な評価が可能となる。

A. 研究目的

ゴーシェ病は最も頻度の高いライソゾーム病で3つの臨床病型（Type 1（慢性非神経型）、Type 2（急性神経型）、Type 3（亜急性神経型））に分類される。Type 1に対しては、近年、酵素補充療法が画期的な治療効果をあげているが、神経症状を主要症状とするType 2、Type 3には酵素補充療法は十分な治療効果が得られず、新たな治療戦略の開拓が望まれている。ゴーシェ病の責任遺伝子はacid- β -glucosidase (GCCase)で、1992年頃より、GCCase遺伝子を改変することにより（Null変異、各種点変異導入等）、ゴーシェ病のモデルマウスを作成する試みが世界の複数の研究室で行われた。その結果、胎生致死のもの、無症状のもの、Type 1のモデルは作成されたが、いまだヒトの神経型ゴーシェ病のモデルマウスは存在しない（The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease. (2001), 3635-3668.）。稀な小児遺伝性神経変性疾患の治療戦略を立てる上で、マウスモデルは必須であり、神経型ゴーシェ病のマウスモデルは国内外の研究者が待ち望んでいる。

一方、ヒトのサポシンC欠損症は世界で2症例のみであるが、ともにType 3のゴーシ

ェ病類似の病型を呈することが知られており、*in vitro*でもサポシンCはacid- β -glucosidaseに必須の活性化たんぱく質であることが明らかになっている（The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease. (2001), 3371-3388.）。これらの事実から、サポシンCの特異的ノックアウトマウスは生化学的、病理学的に神経型ゴーシェ病のモデル動物となることが予想される。我々は同一遺伝子にコードされるサポシンAおよびDの特異的ノックアウトマウス作成の実績があり、サポシンCの特異的ノックアウトマウス作成にも成功する可能性が高い。サポシンCノックアウトマウスが作成できれば、Substrate reduction therapyなどの、脳・神経系をターゲットとした各種治療戦略をテストすることが可能となり、その有用性は基礎的研究のみならず、臨床医学的にも大きい。

B. 研究方法

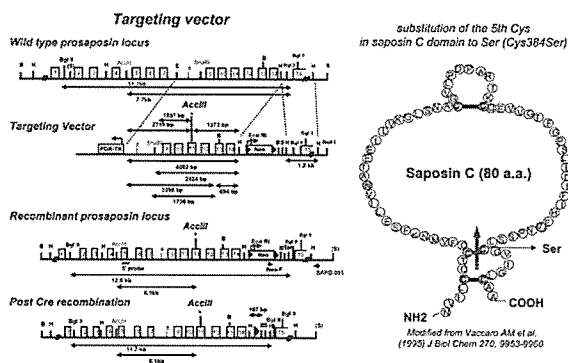
1) ターゲティングベクターの構築とジーンターゲットング

マウスプロサポシンのゲノムDNA（Exon 1-15、129Sv系統）をpBluescript SK (-) およびpGEM 3Zf (+)にサブクローニングし、サポシンCの3つのジスルフィド結合のうち

1つが破壊されるように、5番目のシステインをセリンに置換する遺伝子変異 (C384S, Exon 11) をマウスプロサポシン遺伝子のサポシンCドメインに導入する (図1)。この変異により、同時にAccIIIサイトが新しく導入されるようにデザインし、ターゲティング操作時、操作後の遺伝子型を容易に確認できるように工夫する。変異の導入には mismatchプライマーによるPCR法を用いる。loxPサイトに挟まれたネオマイシン耐性遺伝子を含むターゲティングベクター

(OSdupdel) を基本ベクターに用いることにより、正しく相同組み換えの起こったES細胞クローンに対して一過性にCreリコンビナーゼを発現させ、ネオマイシン耐性遺伝子を除去し、C384S変異のみを導入する。これにより、1つのloxPサイトがイントロン内に残ることになるが、遺伝子の翻訳には影響しないものと推定する。129Sv系統マウス由来のES細胞にジーンターゲティングを行い、正しく相同組み換えの起こったクローンを同定した後、変異ES細胞クローンをC57BL/6J系統マウス由来の胎盤胞に注入し、生まれた雄キメラマウスをC57BL/6J雌マウスと交配して、サポシンC変異ヘテロマウス(Sap-C+/-)を得る。

図 1



2) サポシンCノックアウトマウスの表現型の解析

サポシンC変異ヘテロマウス(Sap-C+/-)を交配し、サポシンCノックアウトマウスを得る。その表現型を下記の項目について解析する。

- 症状の観察
- 生化学的解析
- 神経病理学的解析
- 神経生理学的解析
- 各種治療戦略の検討：Substrate reduction therapy、骨髄移植、遺伝子治療など

C. 研究結果

平成18年度内にサポシンC変異ヘテロマウスの作成に成功した。F1ヘテロマウスは生後3ヶ月となるが、現時点で特に症状は認められていない。今後はF1ヘテロマウスの交配によりサポシンCノックアウトマウスを作成し、その症状(寿命、体重増加、各種症状、特に神経症状)を野生型の同胞マウスと比較検討する。さらに生化学的、神経病理学的、神経生理学的分析を行い、その神経病態を検討する。また、サポシンCノックアウトマウスを用いて神経病変に対する治療効果を検討する。具体的には Substrate reduction therapy の治療効果を検討する目的で、Glucocerebrosidase のインヒビターである1-phenyl-2-decamoyl amino-3-morpholino-1-propanol (PDMP) や N-butyldeoxynorjirimycin をサポシンCノックアウトマウスに投与し、glucosylceramideの合成を抑制による神経病変の変化を検討する予定である。

D. 考察

ライソゾーム病は、細胞内小器官であるライソゾームにおける、物質の遺伝的分解障害を病因とする疾患群である。その多くは、小児期に神経系に障害をきたす難治性疾患である。個々のライソゾーム病は比較的稀であるが、疾患群全体としての発生頻度は出生7700人に1人と、決して稀ではない。近年、ライソゾーム病に対する治療法の進歩は目覚ましく、酵素補充療法、骨髄移植、臍帯血移植などが一部のライソゾーム病患者に臨床の場で実施され、その治療効果が報告されはじめています。これら治療法の進歩をうけて、早期発見・早期治療により患者の正常な発育発達を目指す観点から、ライソゾーム病の新生児マススクリーニングの導入も世界的に現実味を帯びてきている。しかしながら、ライソゾーム病の神経病変の病態生理は未知な部分が多く、神経病変の治療はいまだ困難で、患児の生命予後、QOLの十分な改善が得られる治療法は限られているのが現状である。最も頻度の高いライソゾーム病であり、酵素補充療法が他のライソゾーム病に先行して行われているゴーシェ病においても、現在の治療法では神経病変に対する治療効果は乏しいことが明らかになってきている。したがって、ライソゾーム病の神経病変に対しては、新たな治療戦略の開拓が急務であるといえる。

一方、脳・神経系は他の組織に比べ、大量かつ多様な脂質を含んでいる。その大部分は複合脂質、特に糖脂質である。疎水基

としてセラミドを持つスフィンゴ糖脂質は、近年、細胞の増殖・再生・分化を含む様々な生物機能においてその役割が注目され、神経系においても、神経機能の発現におけるその重要性が明らかになってきた。これらのことから、スフィンゴ糖脂質の代謝障害であるスフィンゴリポドーシスモデルマウスは神経系におけるスフィンゴ糖脂質の機能解析にも有用なツールであるといえる。

我々のこれまでの各種ライソゾーム病モデルマウス作成・解析の経験と実績を生かし、最も頻度の高いライソゾーム病でありながら、いまだ有用な疾患モデルマウスが存在しない、神経型ゴーシェ病の疾患モデルマウスの作成に取り組んだ。これにより神経病変の病態が明らかになり、ゴーシェ病の神経病変に対する新たな治療の標的分子が見つかることを期待している。また、最近では、サポシンCの新たな生理機能が、免疫学の分野から報告された (Zhou D et al. *Science* 2004, Kang SJ et al. *Nature immunol* 2004)。神経系では、従来、プロサポシン、サポシンCには神経栄養因子としての生理機能が推定されており、サポシンCノックアウトマウスは、ライソゾーム病の研究領域のみならず、神経科学、免疫学をふくむ広い研究分野でも有用なモデルマウスとなることが期待される。

E. 健康危険情報
該当なし

F. 研究発表

1, 論文発表

1) Sun Y, Witte DP., Zamzow M, Ran H, Quinn B, **Matsuda J**, Grabowski GA. Combined saposin C and D deficiencies in mice lead to a neuronopathic phenotype, glucosylceramide and α -hydroxy ceramide accumulation, and altered prosaposin trafficking. *Hum. Mol. Genet.* 2007 (*in press*).

2) **Matsuda J**, Yoneshige A., Suzuki. K. The function of sphingolipids in the nervous system: Lessons learnt from mouse models of specific sphingolipid activator protein deficiencies. *J. Neurochem.* 2007 (*in press*).

3) 松田純子. スフィンゴリポドーシスの新たな疾患モデルマウスの作成; 神経系におけるスフィンゴ糖脂質の生理機能の理解と神経病変治療法の開発をめざして. 日本先天代謝異常学会雑誌 Vol.22, No.1, 35-41, 2006.

4) **Matsuda J**, Vanier MT, Popa I, Portoukalian J, Suzuki K. GD3-and O-acetylated GD3-gangliosides in the GM2 synthase-deficient mouse brain and their immunohistochemical localization. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B.* 82: 189-196, 2006.

5) **Matsuda J**, Suzuki K. Krabbe disease (Globoid cell leukodystrophy). In *Lysosomal Storage Disorders* edited by Barranger, J., Cabrera-Salazar, M.A., Springer, New York, 2006 (*in press*).

2, 学会発表

1) **Matsuda J**, Suzuki K. The function of sphingolipid in the nervous system: Lessons learnt from mouse models of specific sphingolipid activator protein deficiency. Second Special Meeting of the International Society of Neurochemistry, on Neural Glycoproteins and Glycoproteins. (招待講演) December 1-5, 2006, Antigua, West Indies.

2) **Matsuda J**, Yoneshige A, Kubo N, Suzuki K. Prosaposin is up-regulated in the brain and placenta of lysosomal storage disorders (LSDs) in the mouse: Possible markers for the neonatal screening for LSDs? The 6th meeting of the international society for neonatal screening. September 16-19, 2006, Awaji, Hyogo and Tokushima, Japan.

3) Yoneshige A, Kubo N, Suzuki K, **Matsuda J**. Generation of a specific anti-mouse prosaposin antibody: Specific up-regulation of prosaposin in the brain of saposin D knockout mouse. The 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress. June 18-23, 2006, Kyoto, Japan.

4) 松田純子. ライソゾーム病モデルマウスを用いた脳の発達、維持、病態におけるスフィンゴ糖脂質の機能解析. 東海大学糖鎖工学研究施設・Hi Tech Research Center 合同研究発表会. 2006年11月24日、東海大学校友会館、東京都霞ヶ関。

5) 松田純子. 脳の発生、発達、病態におけるスフィンゴ糖脂質の機能解析. 第12回日本ライソゾーム病研究会. 2006年11月25日、東京慈恵会医科大学。

G. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

日本人 I-cell 病の遺伝子解析

(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

リソソーム病の一つであり、著明な骨病変、心弁膜症、神経症状を来す I-cell 病は我が国に多い疾患とされるが、2005年になりその遺伝子 GNPTAB が解明されたため、日本人患者13人における遺伝子解析を行った。その結果、欠失や挿入 frame shift など蛋白が発現されないような変異が多いことが確認され、また日本人に特徴的で高頻度変異を見い出すことができた。

A. 研究目的

I-cell 病の遺伝子解析;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。検体は全国専門施設から協力を得て、入手可能なものを解析して日本人の変異の特徴を解明することを目標とした。

B. 研究方法

I-cell 病の患者13人について、同意の上皮膚生検を行い、その培養皮膚線維芽細胞から RNA を抽出し、RT-PCR 法により遺伝子の増幅を行い、GNPTAB 遺伝子の全翻訳領域を塩基配列決定を行った。一部は凍結細胞から直接 RNA を抽出して実験を行った。また各変異はゲノム DNA を用いて確認を行った。

C. 研究結果

I-cell 病患者11名とやや軽症で MLIII と考えられる患者2名に関して、GNPTAB 遺伝子の変異を解析し、下表のような結果を得た。

Pt.No	phenotype	cDNA	protein
1	MLIII	3565C>G	R1189X
		3565C>G	R1189X
2	MLIII	324delAG	fs
		933ins123b	fs
3	MLII	3565C>G	R1189X
		3565C>G	R1189X
4	MLII	dup(ex2)	fs
		c2089insC	fs
5	MLII	?	
6	MLII	dup(ex2)	fs
		2541delA	fs
7	MLII	?	
		?	
8	MLII	3565C>G	R1189X
		3565C>G	R1189X
9	MLII	3565C>G	R1189X
		3565C>G	R1189X
10	MLII	?	
		?	
11	MLII	3565C>G	R1189X
		3565C>G	R1189X
12	MLII	3458A>G	N1153S
		3565C>G	R1189X
13	MLII	324delAG	fs
		dup(ex2)	fs

表1

これにより、日本人における変異も停止コドン、frame shift が大半であり、なかでも R1189X 変異はアレル頻度で42%に及ぶと考えられ、日本人に最も多い変異と考えられる。

D. 考察

Mucopolipidosis は典型的なものが II 型(I-cell 病)、軽症のものが III 型と呼ばれるが、GPTAB 遺伝子の変異はその両者に見られ、日本人においても停止コドン、frame shift 変異が多いことが判明した。高頻度変異 R1189X については、これがホットスポットなのか創始者効果によるものかについては検討を要する。

E. 結論

I-cell 病は日本人に多い疾患であり、本研究において日本人における遺伝子異常の概略が初めて明らかにされたことになる。この結果は今後確定診断の確実で迅速な方法となりえると考えられ、またこの解析が今後の本疾患に対する治療法の開発の基本となると考えられる。

G. 研究発表

論文発表

- 1) Waguri S, Tomiyama Y, Sakai N, et al., The luminal domain participates in the endosomal trafficking of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor. *Exp Cell Res.* 312 (20): 4090-107, 2006
- 2) Xu C, Sakai N, Taniike M, et al., Six novel mutations detected in GALC gene in 17 Japanese patients with Krabbe disease and new genotype-phenotype correlation., *J Hum Genet* 51(6):548-554, 2006
- 3) Gordillo M, Vega H, Sakai N, et al., Characterization of the sensitivity of lymphoblastoid cell lines to various stress agents in Roberts syndrome., *Med J Osaka Univ* 49 (1-4): 29-41, 2006
- 4) Kawai M, Sakai N, Miyake S, Tsukamoto H, Akagi M, Inui K, Mushiake S, Taniike M,

Ozono K., Novel mutation of gene coding for glial fibrillary acidic protein in a Japanese patient with Alexander disease. *Brain Dev.* 28(1):60-2, 2006

- 5) 酒井規夫、神経症状でみつかるとする先天代謝異常症 小児科診療 69; 1579-84, 2006

- 6) 酒井規夫、ロイコジストロフィー、小児科診療増刊号、小児の治療指針 69,Suppl 553-555, 2006

酒井規夫、ムコ多糖症、小児内科、小児外科、小児疾患の診断治療基準、38 Suppl 71, 2006

学会発表

The 10th International Congress of Inborn Errors of Metabolism, Chiba, 06.09.12-16

Sakai N, Xu C, Taniike M, Inui K, Ozono K, Six novel mutations detected in the GALC gene in 17 Japanese patients with Krabbe disease and new genotype-phenotype correlation

Otomo T, Sakai N, Nabatame S, Okinaga T, Takizawa S, Kusuki S, Hashii Y, Ohta H, Taniike M, Ozono K, Neurological improvement of hematopoietic stem cell transplantation on late-onset Krabbe disease; two years' clinical course of siblings

Akagi M, Miyoshi Y, Sakai N, Taniike M, Ozono K, Novel mutations of ZMPSTE24 in a Japanese family with madibuloacral dysplasia.

第33回大阪大学阪神地区小児科勉強会;神戸 06.9.7

小児の白質変性症—その診断と治療—
酒井規夫