

1980年に世界保健機関(World Health Organization; WHO)が制定した国際障害分類(International Classification of Impairments, Disabilities and Handicaps; ICIDH)では、障害が機能・形態障害(impairment)、能力低下(disability)、社会的不利(handicap)の3つのレベルに分類され、ADL遂行能力の低下は能力低下レベルに相当していると考えられている。これらのQOLやADLに関する研究は、欧米で盛んに行われ、一般に「アウトカム研究(Outcome Research)」と呼ばれ、医療の質を評価する「医療アウトカム」の重要な指標として明確に位置付けされている。

近年のアウトカム研究では、患者自身の主観的な評価指標を重要視することが大きな特徴であり、患者立脚型アウトカム(Patient-based Outcomes)と呼ばれ、医療の評価においても医療の受け手である患者の視点に立ったアウトカムであるQOLや客観的な評価としてADLが重要であると考えられるようになり、患者自身が直接報告する患者の視点で捉えた主観的な健康度・機能状態を表す「健康関連QOL(health-related QOL)」という概念が注目を集め、指標としては、Sickness Impact Profile (SIP)、Nottingham Health Profile (NHP)、WHO/QOL-26、Short-Form 36-Item Health Survey (SF-36)などがある。また、ADLの代表的な評価尺度としては、Barthel Index、PULSES Profile、機能的自立度評価法(Functional Independence Measure; FIM)などがある。これらのADLとQOLは密接に関連しており、ADLを改善させることでQOLを向上させるのみではなく、高いQOLがADLをさらに改善させるという相互の関連が

指摘されている。ADLとQOLは相互に関連し、QOLの向上にとってADLが極めて大きな要因である可能性が考えられる。

今回、健康関連QOLを測定する包括的尺度としてSF-36ver2日本語版(以下、SF-36)を使用し、また、疾患特異的尺度として、ゴーシェ病に対してG-QOL調査票、ファブリー病に対してF-QOL調査票、ポンペ病に対してP-QOL調査票、ムコ多糖症に対してM-QOL調査票を新たに作成し、また、基本的ADLに関してはFIMを使用する。本研究の目的は、ライソゾーム病患者の健康関連QOLおよび基本的ADLの実態調査を行うものである。

B. 研究方法

1. 対象

名古屋セントラル病院(旧 JR 東海総合病院)を受診されたライソゾーム病患者24名(ゴーシェ病5名、ファブリー病17名、ポンペ病2名)、および各患者会(ゴーシェ病患者及び親の会、ファブリー病患者と家族の会、ポンペ病の会、日本ムコ多糖症親の会)に所属している方のうち、同意および疫学調査に回答の得られた症例を対象とした(Fig.1-4)。

2 健康関連QOLの評価

QOLを測定する尺度は、おもに包括的尺度と疾患特異的尺度に分類することが出来る。包括的尺度とは、疾患特異性のない包括的な尺度で患者の視点に立脚した健康度、およびこれに伴う日常・社会生活機能の変化を、計量心理学的な手法によって定量的に測定することを目的に作成された尺度である。健康人を含めた全ての人を対象にできるた

め、大規模調査をすることによってその標準値を設定することができる。

包括的尺度の指標としては、SIP、NHP、WHO/QOL-26、SF-36などがある。SF-36は、米国で作成され、概念構築の段階から心理計量学的な検定に至るまで十分な検討を経て、現在、50カ国語以上に翻訳されて国際的に広く使用されている。全体で36項目からなり、身体機能 (Physical functioning) PF、日常役割機能(身体) (Role physical) RP、身体の痛み (Bodily pain) BP、社会生活機能 (Social functioning) SF、全体的健康感 (General health perceptions) GH、活力 (Vitality) VT、日常役割機能(精神) (Role emotional) RE、心の健康 (Mental health) NHの8つの下位尺度から構成されている。本研究では、健康関連 QOL の包括的尺度を評価するための指標として、SF-36 を使用し、また、疾患特異的尺度として、ゴーシェ病に対しては G-QOL 調査票、ファブリー病に対しては F-QOL 調査票、ポンペ病に対しては P-QOL 調査票、ムコ多糖症に対しては M-QOL 調査票を新たに作成し、SF-36 と同様に対象者に行い総合的に QOL の評価を行っている。

3 基本的 ADL の評価

ADL は基本的 ADL(basic ADL)と手段的 ADL(instrumental ADL)に分類されている。基本的 ADL は、食事、入浴、更衣、整容、トイレの各動作に尿便禁制を加えた身のまわり動作項目と、起居、移乗、歩行などの移動動作項目から構成され、手段的 ADL は、地域社会生活の中で共通性の高い活動を総称している。基本的 ADL の代表的な評価尺度として Barthel Index、PULSES Profile、

FIM などがある。

FIMの項目は、①運動項目:セルフケア(6項目)、排泄コントロール(2項目)、移乗(3項目)、移動(2項目)の計13項目と、②認知項目:コミュニケーション(2項目)、社会的認知(3項目)の計5項目を加えた合計18項目から構成されている。評定尺度として、自立は「7.完全自立」と「6.修正自立」に分類され、介助は必要な介助の程度により「5.監視」、「4.最小介助」、「3.中等度介助」、「2.最大介助」、「1.全介助」に分類されている。FIMの合計点と介助時間との間には高い相関関係が認められており、また、ADL能力の細かな変化を把握しやすいという利点がある。本研究では、FIM 日本語版を使用し無記名アンケート調査形式によりADLの測定・評価を行っている。

(倫理面への配慮)

当研究は、「ヘルシンキ宣言」および厚生労働省の「臨床試験に関する倫理指針」に従い、また、「疫学倫理指針(平成16年12月28日改訂 文部科学省 厚生労働省)」に基づき、名古屋セントラル病院(旧 JR 東海総合病院)の倫理委員会の承認を得て行っている。

対象者に与える負担を最小限に抑えるように十分に配慮し、調査を行うにあたり十分な説明をしたのち、同意および疫学調査に回答の得られた症例に対し解析を行った。今回の調査は、対象患者の QOL を無記名アンケート調査形式で行うものであり、住所、氏名の記載欄は設けていない。匿名化により対象患者が特定できないようにすることに

より個人情報の保護対策を行い、アンケート結果を処理する際に他施設へ持ち出すことはない。また、患者検体を用いるものではない。

C. 研究結果

1. 対象者の基本的属性

a) ポンペ病

回収は、全ての会員の方から得られ、回収率は、100%(23名)であった。年齢階級別・性別では、0歳から30歳代に多く分布し、特に10歳代に7名(30%)見られた。性別は、男性4割、女性6割で女性が多く、発症時期は小児期に見られ、病型では乳児型が3名(13%)、小児型が12名(52%)、成人型が8名(35%)で、小児型が最も多く見られた(Fig.1)。

b) ゴーシェ病

回収は、57名の会員の方から得られ、回収率は、約8割であった。年齢階級別・性別では、0歳から30歳代に多く分布し、特に20歳以下に多く見られた。性別は、男性6割、女性4割で、男性が多く見られた。発症時期は小児期に見られ、病型では1型(成人型または、慢性非神経型)が30名(52%)、2型(乳児型または、急性神経型)が10名(17%)、3型(若年型または、亜急性神経型)が18名(31%)で、1型が最も多く見られた(Fig.2)。

c) ファブリー病

回収は、50名の会員の方から得られ、回収率は、約7割であった。年齢階級別・性別では、30歳から50歳代に多く分布し、20歳以上が45名(96%)で、20歳未満が2名(4%)であった。性別は、男性6割、女性4割で、男性

が多く見られた。特徴として、成人例が多く、病型では古典型が30名(60%)、ヘテロ型が15名(30%)、亜型(心臓型)が4名(8%)で、古典型が最も多く見られた(Fig.3)。

d) ムコ多糖症

回収は、78名の会員の方から得られた。年齢階級別・性別では、0歳から20歳代に多く分布し、特に20歳未満が53名(68%)であり、特に10歳未満が25名(32%)であった。性別は、男性8割、女性2割で、男性が多く見られた。病型ではI型が8名(10%) (Hurler 4名、Hurler-Scheie 1名、Scheie 1名)、II型(Hunter)は最も多く50名(64%)であった。III型(Sanfilippo)は、9名(12%)、IV型(Morquio)は、8名(10%)、VI型(Marteaux-Lamy)、VII型(Shy)は、それぞれ1名(1%)であった。病型は多岐にわたっているが、II型が最も多く見られた(Fig.4)。

2. 健康関連 QOL 得点と国民標準値との比較

各患者における下位尺度の得点は、SF-36のマニュアルをもとに計算し、国民標準値に基づいた各下位尺度得点を求めた。次に下位尺度の標準化を行い、日本全国調査に基づく因子係数を用いて身体的側面と精神的側面のサマリー・スコア(身体的健康度、精神的健康度)を算出した。各下位尺度の得点は0-100点に換算され、得点が高いほど主観的健康度・機能状態が優れていることを示している。この関数変換により、国民標準値は50、標準偏差は10になり、各下位尺度を含め標準得点との比較を行った。その結果、ポンペ病患者およびゴーシェ病患者において、全ての下位尺度得点は、国民

標準値よりも低値を示していた。サマリー・スコアとして、身体的健康度および精神的健康度も国民標準値を下回る傾向が認められ、特に、身体的健康度に関しては著明な低下が認められた。現在、ファブリー病患者、ムコ多糖症患者に関しては、解析中である。

3. 疾患特異的 QOL

ポンペ病では、筋力低下や呼吸不全などが日常生活の低下や制限をもたらす重大な要因であり、このことが疾患特異的に QOL の低下を招いていると考えられた。ゴーシェ病では、肝脾腫、骨病変、造血障害に加え、特に神経症状などが日常生活の低下や制限をもたらす重大な要因でと認められ、これらの各疾患における特異的な臓器障害が身体的健康度に様々な影響を及ぼしていると考えられた。また、ポンペ病およびファブリー病患者の多くの方が、病気や治療、結婚、遺伝などに関し様々な不安を抱えていることが今回の調査で明らかになり、これらのことが疾患特異性に精神的健康度の低下を引き起こす要因の一つであると考えられた。

D. 考察

平成 16 年度に、当院通院中のライソゾーム病患者を対象に基本的 ADL および健康関連 QOL の調査を行った。さらに、平成 17 年度には、ポンペ病患者における健康関連 QOL 調査を行い、また、平成 18 年度は、ゴーシェ病患者における健康関連 QOL 調査を行った。ポンペ病やゴーシェ病などライソゾーム病は、個々の臨床症状や臓器障害を評価するだけでは不十分であり、患者自身による主観的な指標である QOL の評価が必

要であると考えられた。

今後、さらにファブリー病やムコ多糖症など他のライソゾーム病を含めた臨床疫学調査も順次予定している。現在、ファブリー病患者やムコ多糖症患者に関しては、調査票の解析中であり、また、ポンペ病患者に関しては基本的 ADL 調査を開始し、集計を行っている。また、ポンペ病に関しては、今後、酵素補充療法の導入が検討されており、治療の有効性を判断する上で、経年的に QOL 調査および ADL 調査を開始し、現在、集計中である。

各疾患における解析の結果として、ポンペ病やゴーシェ病患者における健康関連 QOL の評価は、国民標準値に比べ全ての下位尺度得点において低値を示し、身体的健康度および精神的健康度は共に国民標準値を下回る傾向が認められた。特に、身体的健康度に関しては著明な低下が認められた。ライソゾーム病は、一般診療で診られる疾患とは多くの点で異なり、極めて稀な疾患であること、また、疾患ごとに見られる多臓器障害を伴った難病であることに加え、酵素補充療法の承認された疾患や、未承認の疾患、さらには治療法が確立されていない疾患など多岐にわたるため専門医の不足は深刻な問題であり、多くの方が不安を訴えられていた。さらに患者自身の症状の自覚、病名の告知、現在の病状や治療の説明、また、本疾患が遺伝性疾患であるための婚姻や家族(子供)に対する不安、情報の不足など様々な要因が相互に不安をもたらし、身体的健康度の低下に加え精神的健康度の低下を来していると考えられた。

従来 of 疫学研究では、罹患率、合併症発生率、死亡率などが、その普遍性、定義の明

確さ、個人・社会にとっての重要性などの理由から、広く一般に利用されてきた。しかし、近年では、患者自身の主観的な評価指標を重要視することが大きな特徴であり、患者立脚型アウトカム(patient-based outcomes)と呼ばれ、医療の評価においても医療の受け手である患者の視点に立った健康関連 QOL が重要であると考えられるようになり、健康関連 QOL は、「医療アウトカム」の重要な指標として明確に位置付けされてきている。EBM(Evidence-Based Medicine) の4段階といわれる実践のステップのうち、最終段階にあたる「EBM を実際の患者に適用する」という最も重要な場面で、QOL および ADL の評価は、医療アウトカムのエンドポイントとして今後ますます重要になると考えられる。

E. 結語

平成 16 年度は、当院通院中のライソゾーム病患者を対象に基本的 ADL および健康関連 QOL の調査を行った。平成 17 年度は、ポンペ病患者における健康関連 QOL 調査、また、平成 18 年度に、ゴーシェ病患者における健康関連 QOL 調査を行った。ポンペ病、ゴーシェ病などライソゾーム病は、個々の臨床症状や臓器障害を評価するだけでは不十分であり、患者自身による主観的な評価指標である QOL の評価や客観的な ADL の評価が必要であると考えられた。今後、さらにファブリー病やムコ多糖症など他のライソゾーム病を含めた臨床疫学調査も順次予定している。現在、ファブリー病患者やムコ多糖症患者に関しては、調査票の解析中であり、また、ポンペ病患者に関しては基本的 ADL 調査を開始し、集計中である。また、ポ

ンペ病患者に関しては、経年的に QOL 調査および ADL 調査を開始している。

謝辞

今回の調査に御協力頂いた、“ゴーシェ病患者及び親の会”、“ファブリー病患者と家族の会”、“ポンペ病の会”、“日本ムコ多糖症親の会”の会員の皆様に謝意を表します。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

- 1) 三谷 順子、坪井 一哉、高木 弘 他、
ゴーシェ病・ファブリー病の治療(酵素補充療法)におけるクリニカルパスの導入 第 59 回日本交通医学会総会 大阪 2005.6 (誌上発表)
- 2) 坪井 一哉、秋田 憲志、高木 弘
ライソゾーム病における ADL および QOL の評価 第 59 回日本交通医学会総会 大阪 2005.6 (誌上発表)
- 3) 坪井 一哉、秋田 憲志、高木 弘 他、
酵素補充療法を導入した Fabry 病 5 症例の検討 第 102 回日本内科学会講演会 大阪 2005.4
- 4) 坪井 一哉 酵素補充療法を開始した Fabry 病 8 例の検討 第 80 回東海臨床遺伝代謝懇話会 名古屋 2005.10
- 5) 坪井 一哉 当院における酵素補充療法を導入した Fabry 病 8 例の検討 第 48 回日本先天代謝異常学会 熊本 2005.11
- 6) 坪井 一哉、仁田 正和、高木 弘 他

Gaucher 病患者における健康関連 QOL の全国調査 第 11 回ライソゾーム病研究会 東京 2005.12

- 7) 坪井 一哉、仁田 正和、上田 龍三、高木 弘 Pompe 病患者における健康関連 QOL および基本的 ADL の全国調査 第 103 回日本内科学会講演会 横浜 2006. 4
- 8) 坪井 一哉、仁田 正和、上田 龍三 Gaucher 病患者における健康関連 QOL の全国調査 第 60 回日本交通医学会総会 東京 2006. 6
- 9) 坪井 一哉 酵素補充療法とチーム医療- ライソゾーム病外来の試み. 第 9 回ゴーシェ病セミナー. 千葉, 2006.8
- 10) Kazuya Tsuboi, Masakazu Nitta, Ryuzo Ueda, et al, Investigation on QOL of Patients with Pompe Disease in Japan. The 10th International Congress of Inborn Errors of Metabolism Chiba, Japan 2006. 9
- 11) 叶 春霖, 坪井 一哉, 溝口, 良順, 他 稀な成人女性 Fabry 病の一例剖検とその病態. 第 38 回藤田学園医学会. 愛知, 2006. 10
- 12) 坪井 一哉 酵素補充療法におけるチーム医療 第 83 回東海臨床遺伝代謝懇話会 名古屋 2006.10
- 13) 坪井 一哉 酵素補充療法におけるクリティカルパスの運用. 第 12 回ライソゾーム病研究会. 東京, 2006. 11

【参考文献】

1. 福原俊一、鈴嶋よしみ: 健康関連 QOL 尺度 SF-36v2 日本語版マニュアル. NPO 健康医療評価研究機構, 2004.
2. 福原俊一、鈴嶋よしみ: 健康プロファイル型尺度(SF-36 を中心に). 臨床のための QOL 評価ハンドブック, 医学書院, 2001

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

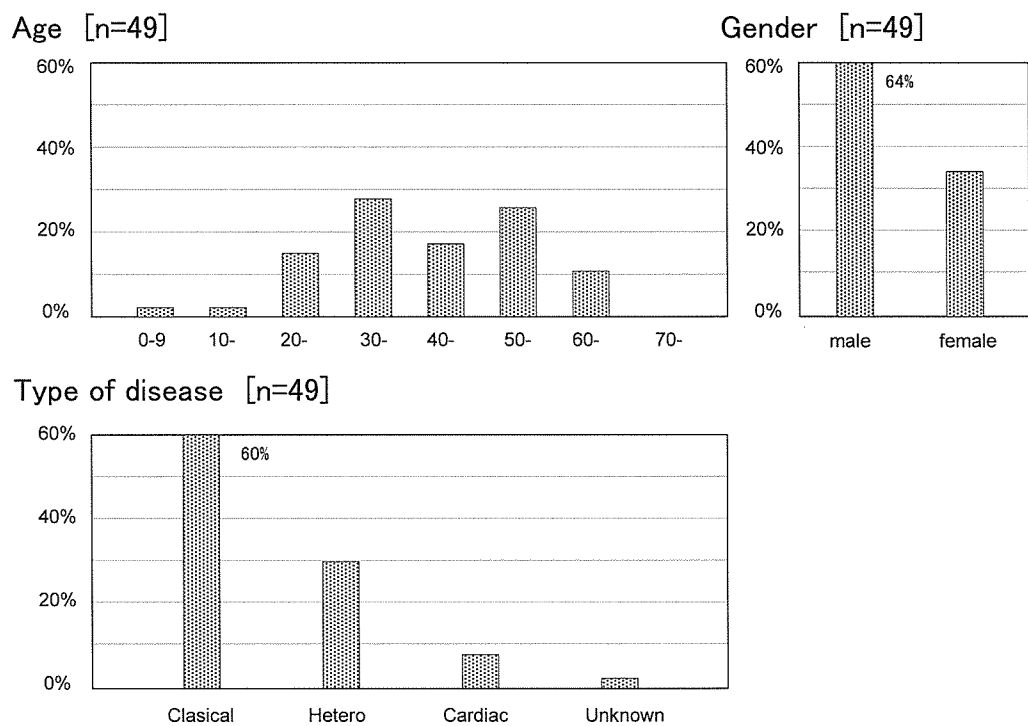


Fig 1 Fabry病患者の基本属性

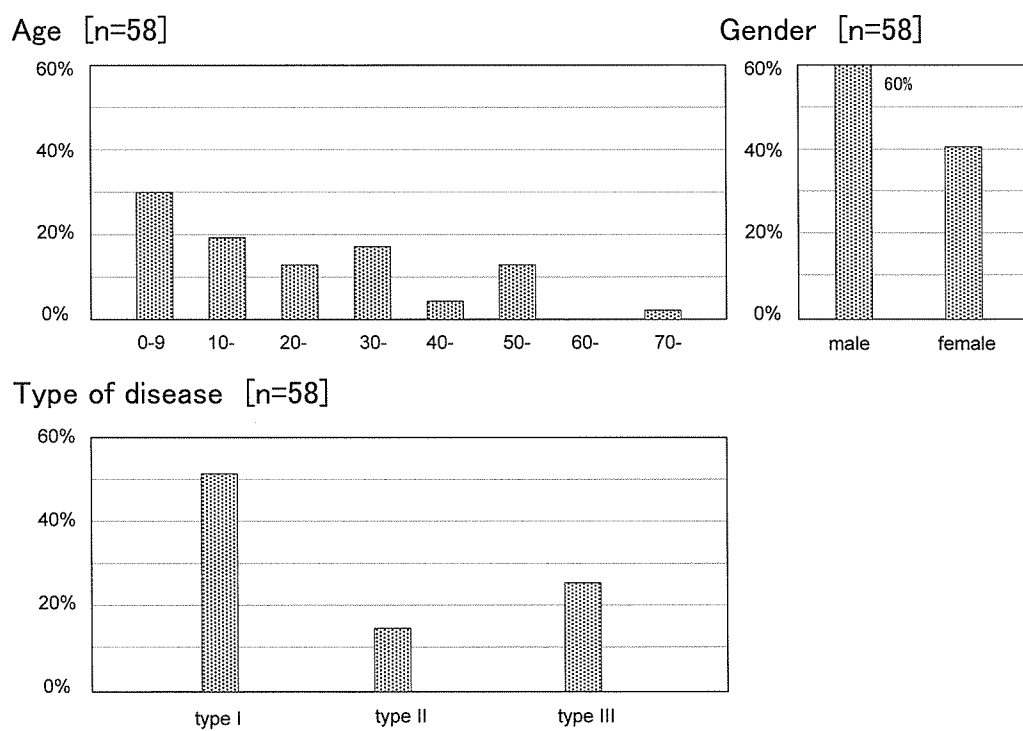


Fig 2 Gaucher病患者の基本属性

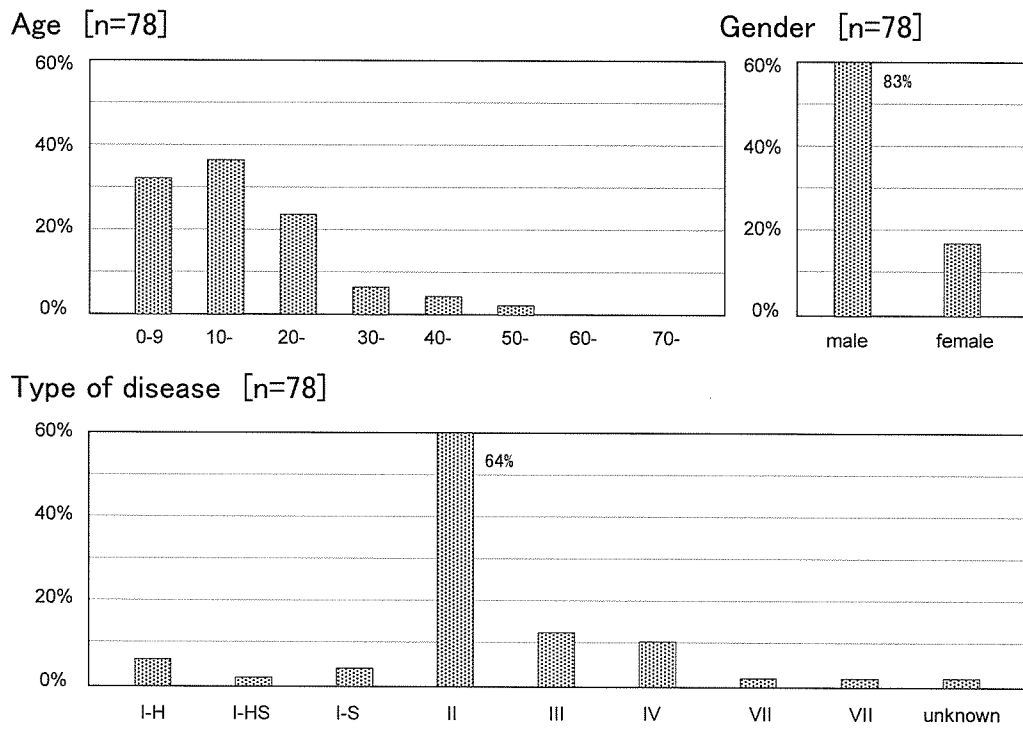


Fig 3 MPS患者の基本属性

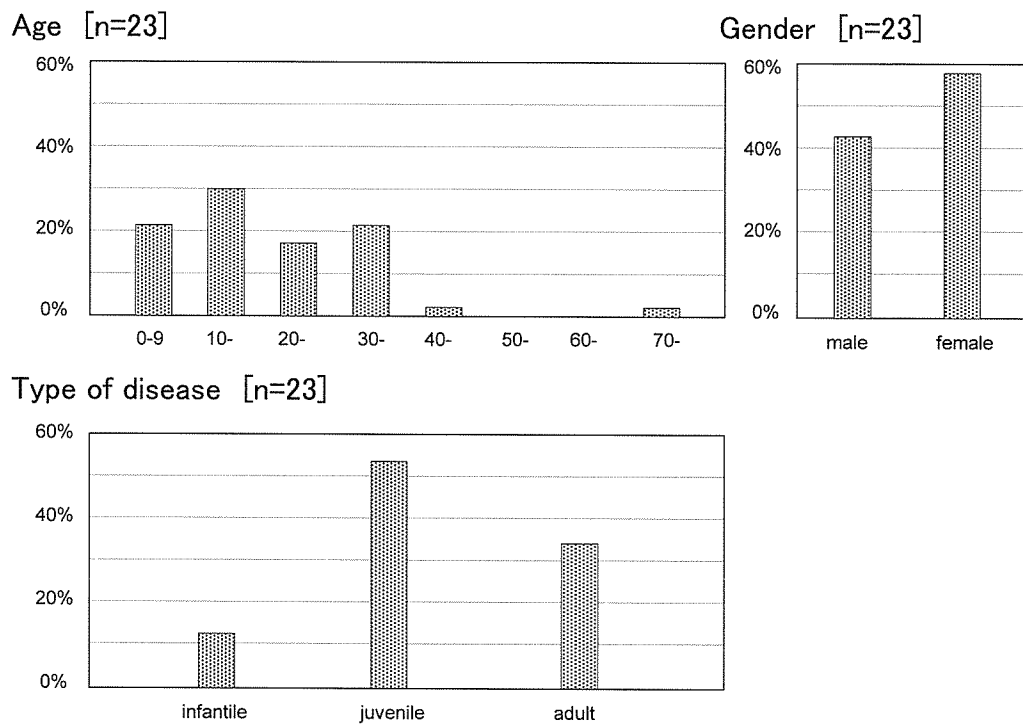


Fig 4 Pompe病患者の基本属性

Table 1 健康関連QOLおよび基本的ADLの調査研究

[1] ライソゾーム病患者における健康関連QOLに関する研究

ポンペ病	23症例（H17年度 報告）
ゴーシェ病	59症例（H18年度 報告）
ファブリー病	51症例（集計中）
ムコ多糖症	80症例（集計中）

計213症例

[2] ライソゾーム病患者における基本的ADLに関する研究

ポンペ病	23症例（解析中）
------	-----------

[3] 健康関連QOLおよび基本的ADLに関するフォローアップ調査研究

ポンペ病	22症例（H17-18年）（集計中）
------	--------------------

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

尿を用いた Fabry 病の無侵襲ハイリスク・スクリーニングの開発
—3年間のまとめ—

研究要旨

平成 16 年に、Mills らのタンデム質量分析計を用いた血漿 globotriaosylceramide (GL-3) の測定法を改変して尿 GL-3 の定量法を開発した。この方法で古典型および心型異型ファブリー病 (FD) ヘミ接合体とヘテロ接合体の尿 GL-3 を測定し、心型異型 FD のヘミの一部と、無症状の古典型および異型 FD のヘテロは GL-3 が低く、この方法で診断すると見逃される可能性があった。平成 17 年度は、血漿と尿の α -galactosidase A (α -gal A) の活性と ELISA 法で測定した酵素蛋白値との間には正の相関々係にあることを明らかにし、尿中 α -gal A の安定性を研究して酵素蛋白の測定法を確立した。平成 18 年度は、この開発した尿 α -gal AP と GL-3 の測定法を使用して FD を疑わせる症状や家族歴のあるハイリスク症例について FD のスクリーニングを行い、この方法が本症のスクリーニング法として極めて有用なことを明らかにした。

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)

幸な疾患であるため、有効な治療法を開発することは、社会的にも重要なことである。幸い最近、本症に対する酵素補充療法薬が開発がされ^{3~6)}、その治療によって予後が改善されることが期待されている。しかし、本症は頻度が稀であるとともに、特有の症状が乏しいために診断が遅れ、しばしば不可逆性の腎障害や心機能障害を呈してから診断されており²⁾、本症の早期診断法を開発することは、予後を改善する上で大切である。

A. 研究目的

わが国の FD の頻度は明らかでないが、これまでの疫学調査成績から、10~20 万人の出生に 1 例と推定されている^{1, 2)}。そして、社会で最も大きく活躍する 30 歳代に腎不全となり、40 歳代で心不全となることの多い不

ところで、早期発見・治療を目的とした疾患のスクリーニング検査には、一般の人口集団を対象とするマス・スクリーニング検査と、FD の可能性の高い集団を対象とするハイリスク・スクリーニング検査、例えばアンギオケラトーマが疑われる皮疹、四肢の疼痛、低

汗症、角膜混濁・白内障などの眼症状、蛋白尿や腎機能の低下、心臓病の症状のある患者やFDの家族歴のある集団などを対象としたスクリーニング検査がある。

本症の頻度が低いことと共に、伴性遺伝性疾患であることから、一般人口集団を対象にしたスクリーニングは適切な方法ではなく、本症が疑われる症例についてスクリーニングするのが良いと思われる。そのために、簡単に使用できる尿を用いたFDの無侵襲ハイリスク・スクリーニング法について開発研究したので報告する。

B. 研究対象および方法

1. 尿 α -galA 蛋白 (α -galAP) を ELISA 法で測定する方法の開発の研究

尿を採取して直ちに4°Cに保存し、できれば当日、遅くとも翌日には α -galAPおよびクレアチニン(creat.)を測定する。

方法は、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に25 μ Lの尿を採り、これに50mMのリン酸緩衝液(pH7.2)75 μ Lを加えて4倍に希釈し、90分間、25°Cで反応させる。反応後、緩衝液で3回洗浄し、抗 α -galAウサギ血清を1,500倍に希釈したものを加えて、90分間、25°Cで反応させる。反応後、同様に緩衝液で3回洗浄し、ペルオキシダーゼ標識抗ラビットIgGを1,500倍に希釈したものを加えて、90分間、25°Cで反応させる。さらに、反応後、*o*-フェニレンジアミン(*o*-phenyldiamine)0.2 μ g/1wel濃度のものを加えて30分間、25°Cで反応させる。発色後、3N硫酸で反応を停止させて、分光光度計(波長492nm)で測定する。

血漿の α -galAP測定は、測定するサンプルを50 μ Lにする点が尿 α -galAP測定と異なる。しかし、その他は尿 α -galAP測定と同様である。

尿 α -galA活性の測定は、2倍に希釈した尿75 μ Lを試験管にとり、基質緩衝液(5.0mMの濃度になるように4MU- α -D

-galを、また117mMの濃度になるようにN-アセチル-D-グルコサミンを、それぞれ0.1mol/Lのクエン酸ナトリウム溶液に溶解し、10NHClでpHを4.6に調整したものを75 μ L加えて、37°C、120分間反応させる。反応後、グリシン緩衝液3.0mL(0.17mol/Lの濃度になるようにグリシンと炭酸ナトリウムをそれぞれ溶解し、10NNaOHでpHを10.4に調整)で反応を停止し、励起波長365nm、蛍光波長450nmで蛍光強度を測定する。検体の保存状況に疑いがもたれた場合は、これを確認するために、検出中の α -galAと β -ヘキソサミニダーゼ活性の比率を算出する。

尿クレアチニン濃度の測定にはJaffe法を使用する。尿 α -galA活性は、クレアチニン1mg当たりの尿が1時間に加水分解する4MU- α -D-galの量(nmol)で表す。

本法において使用したヒト α -galAモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体は、いずれも米国ジエンザイム社から提供を受けたものである。

2. 尿の保存条件の測定値への影響

25°Cの恒温槽中に放置した場合は、1日目で平均84%(range71-91%)、3日目で平均73%(range58-84%)、5日目で平均34%(range21-59%)、7日経過すると平均24%(range3-63%)となり、著しい減少がみられた(表1)。

尿 α -galAPの安定性は、4°Cに保存した場合は、1日目で平均98%(range89-103%)、3日目で平均73%(range62-84%)、6日目で平均65%(range55-90%)にまで減少するのが認められた(表2)。しかし、尿の α -galAPの安定性には、かなりの個人差が認められた。

尿をあらかじめ凍結して、3日目に融解して α -galAPを測定し、再び凍結して5日目に2回目の測定を行い、同様の操作を繰り返して7日目に3回目の測定を行った場合は、1回目で平均97%(range84-102%)、2回

目では平均 73% (range 65-84%)、3 回目では平均 71% (range 55-84%) であり、 α -gal AP は凍結融解を反復すると低下するので、採尿後なるべく速やかに 4°C で保存し、できれば採尿した日に測定し、不可能な時は少なくとも翌日に尿 α -gal AP を測定する。尿を長期間保存する時は、採尿した日に凍結して -40°C 以下で保存し、初めて融解した尿を測定に使用し、凍結融解を反復した尿を測定に使用しない。(表 3)

40 名の正常対照者 (成人) の尿 α -gal AP 値と活性を同時に測定したところ、両者の間には正の相関 ($r=0.911$) が認められたので、 α -gal A 活性の測定と同様に、尿 α -gal AP 値も FD の診断に有用と考えられた。

3. Tandem 質量分析計 (MS/MS) による尿中 GL-3 の測定法の開発研究

(1) 尿蛋白陰性の場合

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う。尿中 GL-3 の各 isoform、ならびにその総和として総 GL-3 の測定は、尿 200 μ L に内部標準物質として C17-GL-3 を添加した後、十分にソニケートして、その 20 μ L を直接 MS/MS へ注入して測定する (直接法)。測定値はクレアチニン (creat.) 比とし、その測定は Jaffe 法で行う。

(2) 蛋白尿陽性の場合

患者検体 50 μ L に対して 50ng の C17-GL-3 を添加したクロロホルム-メタノール溶液 1.0mL を加えて、30 分間 GL-3 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) でろ過した後、その 20 μ L をとって MS/MS に注入し、総 GL-3 を測定する。

(3) 尿中総 GL-3 測定の再現性、ならびに全尿中 GL-3 の直接法と抽出法による測定結果および尿沈渣の GL-3 の測定結果との比較

古典型 FD 患者の尿を試料として直接法で 10 回反復測定した結果は、平均 $2.30 \pm 0.16 \mu$ g/mL (CV%6.96) であり、別の患者の尿を

試料として抽出法で 5 回反復測定した結果、平均 $26.40 \pm 2.02 \mu$ g/mL (CV%7.66) 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、酵素補充療法 (ERT) 実施前のヘミ接合体男性 6 例の全尿中の総 GL-3 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 13.12μ g/mL と 13.90μ g/mL で、直接法に対する抽出法の比率 (%) は平均 105.9% (95.6-132.6%) であって、症例によって多少の違いがみられるものの、2 つの方法測定結果は良く一致していた。(表 4)

以上の尿 GL-3 の測定結果から、尿を遠沈して沈渣を分離したり、沈渣中の GL-3 をクロロホルム-メタノール (2:1) で抽出しなくても、尿に内部標準物質の C17-GL-3 を適当に加えて十分にソニケートし、MS-MS に直接注入することにより、尿 GL-3 を正確に測定できることが明らかになった。

これまでの研究によると、FD の尿沈渣の GL-3 は主として腎臓に蓄積している GL-3 に、尿上清中の GL-3 は血漿中の GL-3 に、それぞれ由来すると云われている。しかし、尿沈渣と尿上清の GL-3 量はほぼ 8:2 の比率であり、いずれの分画の GL-3 も FD では著しく増加するので、尿沈渣の GL-3 を測定しても、沈渣を分離せずに全尿の GL-3 を測定しても、FD の診断における意義に大差はなく、本症をスクリーニングするには、操作が簡単な直接法が優れていると思われる (表 5)。

4. 尿 α -gal AP と GL-3 の測定による FD ハイリスク・スクリーニングの研究

(1) 尿 α -gal AP と GL-3 の測定して FD をスクリーニングする時の cut off 値

研究対象は (財) 東京都予防医学協会 (協会) 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した古典型 FD ヘミ接合体 34 名、ヘテロ接合体 25 名の酵素補充療法 (ERT) 開始前の随時尿を採取し、直ちに凍結して一

40℃で保存した。尿 GL-3 と α -gal AP を測定する時は、前にも述べた理由で、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。

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

この cut off 値を用いて既知の 34 例の古典型 FD へミ接合体を診断した時の感度と特異度は、 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 FD のヘテロ接合体 25 例を診断した時の感度と特異度は、 α -gal AP の測定では 84.0%と 92.8%、GL-3 の測定では 88.0%と 94.4%であったが、 α -gal AP と GL-3 を同時に測定して 25 例のヘテロ接合体を診断した場合の感度と特異度は 96.0%と 91.2%であり、ヘテロ接合体の診断には、2 つのバイオマーカーを同時に測定して行う方が精度が高かった(表 6)。したがって、FD のハイリスク・スクリーニングでは検査対象の尿 α -gal AP と GL-3 を同時に測定し、上記の cut off 値を使用して測定値を評価し、これを検査対照の尿を採取した施設の最終診断名と比較した。

(2) FD ハイリスク・スクリーニング成績

FD 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、以下のようなものである。

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 を超えていたものはなく、GL-3 が異常値を示したものもなかった。 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、FD 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 7)

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へ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へ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 へミ接合体であり、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へミ接合体が 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 へミ接合体 2 例と古典型 FD へ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 へミ接合体では尿 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 へミ接合体 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8)

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、FD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、FD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⁸⁾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、FD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FD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⁹⁾。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¹⁰⁾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、FD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、FD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²⁾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¹¹⁾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¹²⁾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、ジェンザイム社(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¹³⁾。

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、尿蛋白が陽性的場合は、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^{14,15)}では、糖脂質が腎臓にあまり多く蓄積されず、尿中にGL-3が排泄されないので、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 A P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 A P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、一般に尿GL-3が高く、 α -gal A Pが低いものが多いが、無症状のヘテロ接合体はGL-3が低く、 α -gal A P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るが、本研究のように尿中の総GL-3と α -gal A P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) 大和田操、北川照男：リソソーム蓄積症(リソソーム病)。日本臨牀増刊、本邦臨床統計集{2}：317-327, 2001

2) 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

- 3) Schiffmann R, Murray GJ, Treco D et al: Infusion of α -galactosidase A reduces tissue globotriaosylceramide storage in patients with Fabry disease. Proc Natl Acad Sci USA 97: 365-370, 2000
- 4) Schiffmann R, Kopp JB, Austin HA III, et al : Enzyme replacement therapy in Fabry disease: a randomized controlled trial. JAMA 285: 2743-2749, 2001
- 5) Eng CM, Guffon N, Wilcox WR, et al: Safety and efficacy of recombinant human α -galactosidase A replacement therapy in Fabry's disease. N Engl J Med 345: 9-16, 2001
- 6) Desnick RJ, Brady R, Barranger J, et al: Fabry diseases, an under-recognized multi-systemic disorder: expert recommendations for diagnosis. 2003 Graw-Hill, New York, pp3733-3774, 2001
- 7) 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
- 8) 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
- 9) Suzuki K, Owada M, Kitagawa T: Study on new screening method for Fabry's disease. J Jap Soc Mass-screening 12(2):25, 2002
- 10) 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
- 11) 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. Mac-Graw-Hill, New York, pp3733-3774, 2001
- 12) 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
- 13) 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
- 14) 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
- 15) Desnick RJ, Wasserstein MP, Banikazemi M : Fabry disease (α -galactosidase A deficiency): renal involvement and enzyme replacement therapy. Contrib Nephrol 136: 174-192,2001

表 1. 保存条件による α -gal AP の安定性の変化 —その 1—

1. 25°C保存(%)

症例No. 保存期間	No.1	No.2	No.3	平均(range)
1日目	91	89	71	84(71-91)
3日目	58	84	79	74(58-84)
5日目	21	59	23	34(21-59)
7日目	3	63	5	24(3-63)

表 2. 保存条件による α -gal AP の安定性の変化 —その 2—

2. 4°C保存(%)

症例No. 保存期間	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6	No.7	平均(range)
1日目	102	89	96	103	94	101	99	98(89-103)
3日目	77	68	62	84	70	81	72	73(62- 84)
6日目	67	61	59	90	55	66	58	65(55- 90)

表 3. 保存条件による α -gal AP の安定性 —その 3—

3. 凍結融解の繰り返しによる安定性の変化%

症例No. 凍結融解回数	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6	No.7	平均(range)
1回目	101	82	98	102	97	101	99	97(82-102)
2回目	79	68	66	84	63	82	70	73(63- 84)
3回目	80	64	67	84	53	82	68	71(53- 84)

表 4 ファブリー病患者の尿中 GL-3 の直接法および抽出法での測定値の比較

症例No.	直接法	GL-3抽出法	
	µg/mL	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)

表5 尿沈渣および上清中総GL-3の分布

遠心条件	症例No.	検体No.*	年齢/性別	全尿中総GL-3 (A) µg/mL	回収率 B/A x 100 (%)	沈渣中および上清中総GL-3		
						上清+沈渣 (B) µg/mL	上清 µg/mL (%)	沈渣 µg/mL (%)
15,000g for 30min	1	1-a	37/M	14.42	79.5	11.47	1.91 (16.6)	9.56 (83.4)
		1-b		8.65	89.6	7.75	1.50 (19.4)	6.25 (80.6)
	2	2-a	32/M	18.20	83.8	15.25	3.09 (20.3)	12.15 (79.7)
		2-b		30.20	92.6	27.97	6.00 (21.5)	21.97 (78.5)
	3	3-a	33/M	13.01	91.5	11.90	1.96 (16.5)	9.94 (83.5)
		Mean		16.90	88.0	14.87	2.80 (18.9)	12.07 (81.1)
45,000g for 30min	1	1-a	37/M	14.42	94.1	13.56	2.44 (18.0)	11.13 (82.0)
	2	2-a	32/M	18.20	91.2	16.59	3.62 (21.8)	12.97 (78.2)
	3	3-b	33/M	9.82	88.7	8.71	1.66 (19.1)	7.05 (80.9)
			Mean		14.15	91.6	12.96	2.57 (19.6)

*: 検体No.中の「a」、「b」は、同一症例であるが採尿日が異なる検体であることを示す。

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

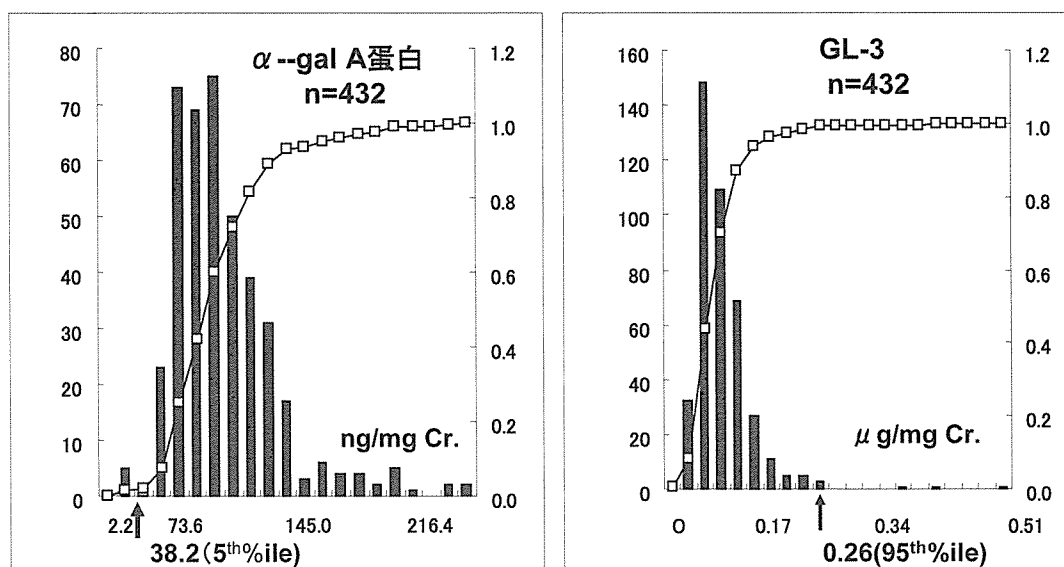


表 6. 尿 α -gal A 蛋白と GL-3 測定による Fabry 病の診断の感度と特異度
— 診断が確認されている古典型 Fabry 病患者の尿での成績 —

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 7. 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/mgCr	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 8. 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/mgCr	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