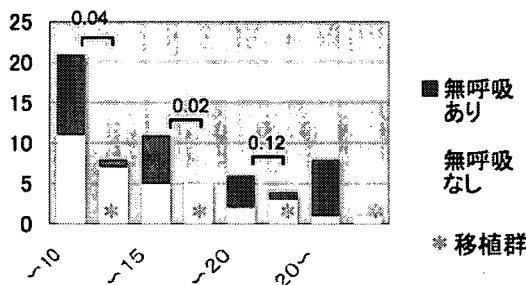


がなく、全介助となった。

- 3) 睡眠時無呼吸の比較：非移植群 46 例中 27 例が睡眠時無呼吸を認め、7 例が気管切開や呼吸管理を受けていたのに対し、移植群 18 例中、睡眠時無呼吸 2 例と有意に少なかった。



D. 考察

ムコ多糖症 II 型重症型では運動能力は 10 歳前後まで比較的高く維持されるものの、介護度は全年齢にわたって高いことが明らかとなった。また移植によって運動能力や言語能力がある程度維持されることが明らかとなったが、発達が改善するわけではなく、徐々に進行し、15 歳以上で全例全介助となることが判明した。今後、酵素補充療法も含め、早期診断・早期治療によるさらなる検討が必要と考えられた。

E. 結論

ムコ多糖症 II 型重症型における自然歴(運動、言語、介護)を明らかにし、造血幹細胞移植の効果と問題点を明らかにした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kato T, Kato Z, Suzuki Y et al : Evaluation of ADL in patients with Hunter disease using FIM score. Brain and Development 29 : 298-305, 2007
- 2) Ochiai T, Suzuki Y, Kato T, et al : Natural history of extensive Mongolian spots in mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome) : a survey among 52 Japanese patients. J Eur Acad Dermatol Venereol 2007 ; 21 : 1082-5
- 3) Kuratsubo I, Suzuki Y, Orii KO, et al : Psychological Status of Patients with Mucopolysaccharidosis Type II and their Parents. Pediatrics International (in press)
- 4) 鈴木康之 : ムコ多糖症 1 型. 骨系統疾患マニュアル改訂第 2 版, 南江堂 東京, p120-121, 2007
- 5) 鈴木康之 : ムコ多糖症 2 型. 骨系統疾患マニュアル改訂第 2 版, 南江堂 東京, p122-123, 2007

2. 学会発表

- 1) 鈴木康之, 倉坪和泉, 加藤智美, 他 : 網膜色素変性を主徴候とする Hunter 症候群成人例. 第 49 回日本先天代謝異常学会, 2007.11.15-17, 山形
- 2) 鈴木康之, 折居建治, 奥山虎之, 他 : ムコ多糖症 I 型・II 型の全国疫学調査. 第 49 回日本先天代謝異常学会, 2007.11.15-17, 山形
- 3) 鈴木康之, 奥山虎之, 田中あけみ, 他 : ムコ多糖症 II 型の酵素補充療法 : 日本人 14 例の解析. 第 49 回日本先天代謝異常学会, 2007.11.15-17, 山形
- 4) Syzuki Y, Kato T, Orii T : An extremely attenuated phenotype of Hunter disease with retinopathy. International Symposium of Lysosomal Storage Disease. Urayasu, Nov 29-Dec 1, 2007

H. 知的所有権の取得状況

なし

新生児聴覚異常スクリーニングを契機に発見された GM1 ガングリオシドーシスの一例

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

新生児聴覚異常スクリーニングで異常を指摘されたことがきっかけで、GM1 ガングリオシドーシスと診断された乳児例を経験した。新生児聴覚異常スクリーニングを利用してライソゾーム病の早期発見ができれば、患者の QOL の向上に大きく寄与するものと考えられる。

研究協力者

高柳正樹(千葉県こども病院医療局長)

A. 研究目的

近年新生児聴覚異常マススクリーニングが開始され、日本においてもすでに多くの産科施設でおこなわれるようになっていく。

今回新生児聴覚異常スクリーニングで異常を指摘されたことがきっかけで、GM1 ガングリオシドーシスと診断された、乳児例を経験したので報告する。

B. 研究方法、C. 研究結果

症例：平成 18 年 4 月 27 日生まれ

当院初診時生後 7 ヶ月

家族歴：血族婚なし。血族婚はない。

家系内に知的障害の方、乳幼児期死亡例はない。

既往歴：在胎 37 週、3734 g にて出生。

喘鳴(ゼロゼロ)が新生児のころからある。

発達歴は定額は 3.5 ヶ月、寝返りは 5 ヶ月にできた。8 ヶ月時お座り少しできる。

現病歴：新生児期の聴覚スクリーニングで両側とも要精査となった。

精査のため東京歯科大市川総合病院の耳鼻科へ紹介された。

当院耳鼻科へ 7 ヶ月時に紹介された。眼振ある

ため眼科に紹介となり、チェリーレッドスポットあるため当科に紹介になった。

現症：生後 8 ヶ月検査入院時

身長 72.2cm、体重 9.4kg、頭囲 46cm

全身状態良好、活発。

胸部：多呼吸はない。ゼロゼロしているが、呼吸困難症状なし。聴診上異常所見なし

腹部：軽度の膨満認められる。肝は右鎖骨中線にて 3 横指触れ、脾臓のエッジが触知された。

筋緊張の亢進、低下などは明らかではない。

小奇形などは認められない。

各種検査結果：

聴力検査：新生児スクリーニングでは両側異常を指摘されている。第一次精査での聴性脳幹反応は 40dB まで 5 波を認めた。当院での条件詮索反射(COR)聴力検査は 10 ヶ月時 40dB、13 ヶ月時 60dB であった。

骨レントゲン：肋骨のオール様変化、椎体骨の変形を認めた。

尿中ムコ多糖定量：正常。

末梢白血球ライソゾーム酵素活性：

β ガラクトシダーゼ 2.1nmol/mgprot./H

(成人対照：n=100, 37.6-230.1)

β ヘキソサミニダーゼ A 418.3nmol/mgprot/H

遺伝子検索：Exon4 p.L146del のみ確認されている。(鳥取大学生命機能研究支援センター遺伝子検

索分野 難波栄二教授に依頼)

D. 考案

新生児聴覚異常スクリーニングで異常を指摘されたことがきっかけで、GM1 ガングリオシドーシスと診断された乳児例を経験した。

新生児聴覚異常スクリーニング異常患者に小児科医が積極的に関与することで、GM1 ガングリオシドーシスをはじめとする、ライソゾーム病を早期発見できる可能性があると考えられた。

ライソゾーム病を早期発見できれば、患者のQOLの向上に寄与すると考えられる。

現在千葉県こども病院に紹介されてくる新生児聴覚異常スクリーニング異常症例について、耳鼻科医と協力してライソゾーム病合併の有無をチェックしている。

E. 結論

新生児聴覚異常スクリーニング異常症例の中には、新生児期に異常をきたす多様な疾患が混在しているものと思われる。これらの陽性症例のなかにライソゾーム病の患者が含まれていることが予想されるので、本スクリーニングの陽性症例の診断過程に小児科医の関与が必須であるものと考えられる。

新生児聴覚異常スクリーニングを利用してライ

ソゾーム病の早期発見ができれば、患者のQOLの向上に大きく寄与するものと考えられる。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 高柳正樹, 村山 圭, 水落弘美: 新生児聴覚異常スクリーニングを契機に発見された GM1 ガングリオシドーシスの一例. 第 49 回日本先天代謝異常学会, 山形, 2007.11

2) 村山 圭, 水落弘美, 高柳正樹: 新生児聴覚異常スクリーニングを契機に発見された GM1 ガングリオシドーシスの一例. 第 34 回日本マスキュレーション学会, 千葉, 2007.09

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

ろ紙血検体を用いたファブリー病診断の試み

分担研究者：遠藤文夫(熊本大学大学院 医学薬学研究部小児科学分野 教授)

研究要旨

ファブリー病は X 連鎖性遺伝形式の先天代謝異常症であり、 α グルコシダーゼの欠損によって発症する。われわれは、酵素活性のろ紙血測定法を用いて、説明と同意に基づいたファブリー病の新生児マススクリーニングのパイロットスタディを開始した。

A. 研究目的

ファブリー病は X 連鎖性遺伝形式の先天代謝異常症であり、リソゾーム酵素である α グルコシダーゼの欠損によって発症する。近年この疾患に対して酵素補充療法が導入され、患者の QOL の改善が可能になった。そのため、ファブリー病の早期発見と早期治療が重要となってきた。しかし、ファブリー病の症状は多様であるため、早期の診断は困難であることも少なくない。われわれは、新生児ろ紙血検体を用いたファブリー病のマススクリーニングを試みた。

B. 研究方法

われわれは、新生児ろ紙血検体を用いたファブリー病のマススクリーニングを試みた。Chamoles らの方法を改変し、ろ紙血検体の α ガラクトシダーゼ酵素活性を測定した。

(倫理面への配慮)

本研究は熊本大学倫理委員会の承認と保護者への説明と同意に基づいて行った。

C. 研究結果

この方法を用いると健常者とファブリー病患者とを明確に区別することができた。また 37 度までの保存条件では、ろ紙血検体の α ガラクトシダーゼ活性は 2 週間で約 20% 以内の活性低下であった。そのため、室温で送付されたろ紙血検体を測

定に用いてもスクリーニングにはほとんど影響ないことが分かった。

いっぽうで、熊本地区では現行の新生児マススクリーニングに加えてタンデムマススクリーニングを行っている。

さらに、このろ紙血測定法を用いて、説明と同意に基づいたファブリー病の新生児マススクリーニングを開始した。活性低値の新生児に対して、ファブリー病の説明と遺伝カウンセリングにもとづく遺伝子解析を含めた精密検査が可能となった。

D. 考 察

このスクリーニングによって発見された新生児の家系の解析を行うことで、家族に存在するファブリー病の発症前の診断も可能となった。同様の方法を用いることで、成人のファブリー病についても酵素活性の診断を簡便に安価に行うことが可能となった。

E. 結 論

ろ紙血を用いたファブリー病のスクリーニングは、本疾患を疑ったときに簡便に試みることができる検査法として有用であると考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Nakamura K, Mitsubuchi H Endo F et al :

- Animal model of tyrosinemia. *J. Nutrition* 137, 1573S-1575S (2007)
- 2) Matsumoto S, Nakamura K and Endo F et al : Isolation of Tissue Progenitor Cells from Duct-Ligated Salivary Glands of Swine. *Cloning and Stem Cells* 9, 176-190 (2007)
- 3) Hattori K, Nakamura K, Endo F et al : Arrhythmia Induced by Spatiotemporal Overexpression of Calreticulin in the Heart. *Mol. Genet. Metab.* 91, 285-293 (2007)

本邦におけるペルオキシソーム病診断例

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

岐阜大学で診断したペルオキシソーム病の特徴を明らかにした。Zellweger 症候群が最も多く、ついで β 酸化系酵素欠損症であった。頻度は 20-30 万人に 1 名と推定されたが、診断体制の確立により、増加すると考えられる。自然歴の調査と治療法開発が急務である。

研究協力者

下澤伸行(岐阜大学生命科学総合研究支援センター)

万人につき 1 名と推定された。診断体制の確立により、発症頻度はさらに高くなると推測される。

A. 研究目的

ペルオキシソーム病は重度の精神運動発達遅滞、筋緊張低下、けいれん、骨格四肢異常、肝障害、腎障害、心奇形などを特徴とする一群の予後不良の先天代謝異常症であるが、本邦では未だ十分認知されておらず、診断体制の確立と治療法開発が重要な課題となっている。今年度、研究者らはこれまでに診断したペルオキシソーム病の特徴を解析したので報告する。

2) 臨床所見(表)

Zellweger 症候群では筋緊張低下、けいれん、顔貌異常、大泉門開大、肝障害、心奇形などが高頻度に認められ、極長鎖脂肪酸、plasmalogen、フィタン酸など多彩な代謝異常が認められた。今後全国調査によって自然歴を把握する予定である。

B. 研究方法

1980 年以降に岐阜大学で診断したペルオキシソーム病患者について解析した。

病名	ZS	ZS	ZS	ZS	ZS	ZS	ZS	NALD	D-BP	D-BP	RCDP
筋緊張低下	あり	あり	あり	あり	あり	あり	あり	あり	あり		
けいれん	あり	あり	あり	あり	あり	あり	あり	あり	あり	あり	
顔貌異常	あり	あり	あり	あり	あり	あり	あり	あり	あり		あり
大泉門開大	あり		あり	あり	あり	あり		あり			
肝障害	あり	あり	あり	あり	あり	あり	あり	あり			あり
心奇形	あり		あり	あり		あり					
C24/C22	2.45	3.11	2.07	2.41	2.12	3.31	2.09			1.99	1.11
C25/C22	0.227	0.217	0.159	0.276	0.190	0.340	0.430			0.237	0.012
C26/C22	0.608	0.788	0.480	0.863	0.546	1.470	0.433			0.364	0.014
Plasmalogen フィタン酸	低下 増加	低下	低下 増加	低下	低下 増加	低下	増加			増加	低下 増加

C. 研究結果及び考察

1) 1980 年～2005 年の診断数：

X-linked ALD(101 例)を除くと、Zellweger 症候群が 33 例と最も多く、次いで β 酸化系酵素異常 10 例、新生児型 ALD 2 例、RCDP 2 例、Plasmalogen 代謝異常 2 例であった。Zellweger などのペルオキシソーム形成異常症は毎年 3～4 例診断され、その他を含めて考えると、ペルオキシソーム病(ALD を除く)の頻度は出生約 20-30

D. 考 察

ペルオキシソーム病の頻度は現状では少ないものの、重篤な代謝異常症であり、診断システムの開発により診断例が増加することが予想される。また治療法が無いため、その開発が重要な課題である。

E. 結 論

ペルオキシソーム病診断例の特徴を明らかにした。

F. 健康危険情報

なし

常症—Zellweger 症候群を中心に. 小児内科増

刊号 39 : 536-538, 2007

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 下澤伸行, 鈴木康之 : ペルオキシソーム形成異

H. 知的所有権の取得状況

なし

ペルオキシソーム病(ALDを除く)の全国調査(一次調査)

主任研究者：衛藤義勝(慈恵医大)

分担研究者：鈴木康之(岐阜大学)

研究協力者：下澤伸行(岐阜大学)

研究要旨

ペルオキシソーム病(ALDを除く)の全国疫学調査を行った。Zellweger 症候群、肢根型点状軟骨異形成症、D-二頭酵素欠損症、高シュウ酸尿症 I 型が比較的多く認められた。来年度は 2 次調査を行い詳細な診療情報の調査を行う。

A. 研究目的

本邦におけるペルオキシソーム病(ALDを除く)の実態を明らかにする。

I 型が比較的多く認められた。来年度は 2 次調査を行い詳細な診療情報の調査を行う。

B. 研究方法

まず本邦における患者数を明らかにするために往復はがきを用いて調査を行った。今回は過去 1 年ならびに 5 年の診療経験数のみを調査した。発送先は全国大学付属病院の小児科、小児病院の各科、250 床以上の病院の小児科である。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

なし

C. 研究結果

発送件数は 1305 であった。回答は 625 件で回収率は 47%であった。それぞれの疾患の症例数を表 1 に示す。ALD を除くと過去 5 年でもっとも多かったのは Zellweger 症候群の 12 例で、次に肢根型点状軟骨異形成症の 6 例であった。また D-二頭酵素欠損症、高シュウ酸尿症 I 型もそれぞれ 5 例、認められた。最近の 1 年でも過去 5 年と同じ傾向を示した。

H. 知的財産権の出願・登録

なし

表 1

	過去 1 年	過去 5 年
ペルオキシソーム形成異常症		
Zellweger 症候群	5 例	12 例
新生児型副腎白質ジストロフィー	1 例	1 例
乳児型 Refsum 病	0 例	0 例
肢根型点状軟骨異形成症	3 例	6 例
単独酵素欠損症		
副腎白質ジストロフィー	38 例	61 例
アシル-CoA オキシダーゼ欠損症	1 例	3 例
D-二頭酵素欠損症	2 例	3 例
高シュウ酸尿症 I 型	4 例	5 例
無カタラーゼ血症	0 例	0 例
DHAP-AT 欠損症	0 例	0 例
Refsum 病	0 例	0 例

DHAP-AT：ジヒドロキシアセトンリン酸アシルトランスフェラーゼ

D. 考察および結論

ペルオキシソーム病(ALDを除く)の全国疫学調査を行った。Zellweger 症候群、肢根型点状軟骨異形成症、D-二頭酵素欠損症、高シュウ酸尿症

分担研究報告書

Ⅱ. ライツゾーム病の病態：遺伝子解析、メカニズム

日本人 I-cell 病の遺伝子解析と自然歴調査

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、日本人患者 38 人に対して原因遺伝子 GNPTAB の解析を行った。また、患者の臨床症状について調査を行い、遺伝子変異と臨床病型の比較を行なった結果、いくつかの高頻度変異についてその臨床病型との関連が判明した。

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 38 人について、同意取得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

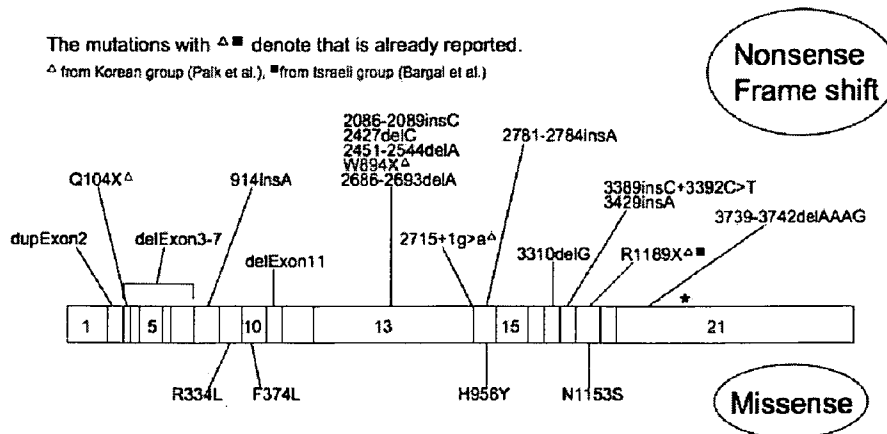
抽出して実験を行った。また各変異はゲノム DNA を用いて確認を行った。

C. 研究結果

I-cell 病患者 27 名とやや軽症で MLIII と考えられる患者 11 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。

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 変異はアリアル頻度で 48% に及ぶと考えられ、日本人に最も多い変異と考えられる。またいくつかのミスセンス変異は MLIII に見いだされ、片方でもこの変異の場合表現型が軽症となると考えられた。

The distribution of the mutations in the cDNA region detected this time.



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。

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大多数の患者の変異解析の情報が解明され、遺伝子型表現型の相関関係が明らかになった。これから今後生化学的診断に続いて遺伝子診断の結果が臨床病型の推定に役立つと考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Shimotori M, Maruyama H, Sakai N(9), et al. : Novel mutations of the GLA gene in Japanese patients with Fabry disease and their functional characterization by active site specific chaperone., *Hum Mutat.* 29(2) : 331. 2008

2) 酒井規夫 : 先天代謝異常、ムコ多糖症、小児内科、38 : 169-170, 2006

3) 酒井規夫 : 日常診療での先天代謝異常症、神経症状で見つかる先天代謝異常症、小児科診療、69(11) : 1579-1583, 2006

4) 酒井規夫 : ムコリポドーシス、小児内科、39 増刊号 : 505-507, 2007

2. 学会発表

1) 酒井規夫 : 招待講演 1) Methods for enzyme determination required for clinical diagnosis of lysosomal storage diseases and glycogen storage diseases, 2) Recent advance of diagnosis and treatment for lysosomal diseases. 日中先天性代謝異常症研究会 2007,

北京、2007.5.25-27.

2) 酒井規夫:教育講演 周産期医療における遺伝カウンセリング. 大阪新生児研究会, 2007.6.16.

3) 酒井規夫、大友孝信、富永康仁、北井征宏、沖永剛志、谷池雅子、大藪恵一 : Fabry 病に対する酵素補充療法の効果と合併症について. 第 49 回日本先天代謝異常学会, 山形, 2007.11.15-17

4) 赤木幹弘、毛利育子、谷池雅子、酒井規夫、大藪恵一 : giant axonal neuropathy 患者の遺伝子解析. 第 49 回日本先天代謝異常学会, 山形, 2007.11.15-17

5) Araya K, Shimono K, Okinaga T, Mohri I, Ohta H, Sakai N, Taniike M, Ozono K : Histological evaluation of mucopolysaccharidosis II patient brain treated with hematopoietic stem cell transplantation. International symposium of lysosomal storage disease, Urayasu, 11.29-12.1.2007

6) Otomo T, Muramatsu T, Inui K, Yorifuji T, Nakabayashi H, Ohura T, Yoshino M, Tanaka A, Okuyama T, Ozono K, Sakai N : Mutation analysis of GNPTAB gene in 36 Japanese mucopolipidosis II and III patients : genotype phenotype correlation. International symposium of lysosomal storage disease, Urayasu, 11.29-12.1.2007

7) Otomo T, Muramatsu T, Inui K, Yorifuji T, Nakabayashi H, Ohura T, Yoshino M, Tanaka A, Okuyama T, Ozono K, Sakai K : Mutation analysis of GNPTAB gene in 24 Japanese Mucopolipidosis II and III patients. SSIEM 2007 Annual symposium, Hamburg, 9.4-9.7. 2007

ライソゾーム病(ファブリー病含む)に関する研究

分担研究者：辻 省次(東京大学神経内科 教授)

研究要旨

Glucocerebrosidase (GBA) 遺伝子のヘテロ接合性病原性変異は孤発性パーキンソン病患者と有意に関連した。

研究協力者

三井 純(東京大学神経内科)
高橋祐二(東京大学神経内科 助教)
伊達英俊(東京大学神経内科)
岩田 淳(東京大学神経内科)
後藤 順(東京大学神経内科 講師)
辻 省次(東京大学神経内科 教授)

A. 研究目的

Gaucher 病の原因遺伝子である GBA 遺伝子のヘテロ接合性病原性変異が孤発性 PD の危険因子であることを検討する。

B. 研究方法

PD 患者 63 例、若年性 PD (JPD) 患者 11 例、進行性核上性麻痺 (PSP) 患者 16 例、多系統萎縮症 (MSA) 患者 30 例、大脳皮質基底核変性症 (CBD) 患者 6 例、正常対照 47 例を対象にして、GBA 遺伝子の全エクソン及びエクソン・イントロン境界域の resequencing を行った。

(倫理面への配慮)

検体は全て書面による同意を得ており、匿名化の上、解析された。

C. 研究結果

PD 患者 7 例 (RecNci 3 例、R120W 2 例、R329C 1 例、R496C 1 例)、PSP 患者 1 例 (N188S 1 例) に病原性変異をヘテロ接合性に認め、対照群およ

び他の疾患群には全く認めなかった。PD 群と対照群の間だけに統計学的有意差を認め、PD に特異的な関連を考えた。GBA 変異を有する PD 患者 7 例中、4 例で家族歴を認め、PD の家族集積性に関与する可能性を考えた。また、GBA 変異を有する PD 患者 7 例中、4 例で幻視、3 例で痴呆を認めており、GBA 変異が PD の臨床表現系に関与する可能性を考えた。

D. 考察

Gaucher 病の原因遺伝子である GBA 遺伝子がパーキンソン病という全く別の疾患と関連するとすれば、両者の病因を解明する上で重要な手がかりになると期待される。

E. 結論

小規模な解析ながら孤発性 PD 発症の遺伝的病因の一つが GBA 遺伝子のヘテロ接合性病原性変異であることが示唆された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし(投稿中)。

2. 学会発表

1) 三井 純, 高橋祐二, 伊達英俊, 岩田 淳, 後

藤 順, 辻 省次. パーキンソニズムを呈する疾患患者における Glucocerebrosidase 遺伝子の解析. 第 48 回日本神経学会総会. 名古屋, 2007.5.	2. 実用新案登録 なし。	3.その他 なし。
---	------------------	--------------

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得
なし。

ニーマンピック病に関する臨床的・分子遺伝学的解析

分担研究者：高橋 勉(秋田大学医学部小児科)

研究要旨

国内症例に関して培養皮膚線維芽細胞を用いたニーマンピック病の確定診断を行った。培養線維芽細胞の酸性スフィンゴミエリナーゼ活性低下を認めれば A/B 型、活性正常でフィリピン染色が陽性であれば C 型と診断した。A 型 1 例、B 型 1 例、C 型 3 例を診断した。それらの遺伝子解析の結果、A/B 型の ASM 遺伝子に関して遺伝子異常 c.567delT、c.575delC、c.1481-9T>G を同定した。C 型の NPC1 遺伝子に関しては遺伝子異常 c.2974G>T、c.2800C>T、c.3418G>A、c.1891A>G、c.581_592delinsG を同定した。ニーマンピック病 A/B 型および C 型では細胞内でのスフィンゴミエリン/コレステロール蓄積を特徴とするが、血清脂質異常(低 HDL 血症)も示すことが明らかになってきた。血清脂質形成に関与する脂質輸送に関する膜蛋白 ABC トランスポーターは、細胞内脂質濃度などにより発現調節を受けることが明らかになっている。NPC1 遺伝子異常を有す C 型細胞における ABC トランスポーター遺伝子の発現量を調べ、ABCA1 遺伝子、ABCG1 遺伝子の発現低下が示され、本疾患の病態に関する知見と思われた。

1. 研究目的

ニーマンピック病 A/B 型はライソゾーム酵素である酸性スフィンゴミエリナーゼの欠損が原因の疾患であり、C 型は主に NPC1 遺伝子異常により発症する肝脾腫や多彩な神経症状を特徴とする疾患である。B 型では近年登場した酵素補充療法の対象疾患として欧米では臨床試験が行われている。また C 型では Miglustat など新しい考え方の治療が奏功したとの報告も登場し、期待されている。国内のニーマンピック病症例に関して培養皮膚線維芽細胞を用いた確定診断を行い、遺伝子解析も行った。

次に本疾患の基本病態である細胞内スフィンゴミエリン/コレステロール蓄積と脂質輸送に関係する遺伝子として次々に研究されている ABC (ATP-binding cassette) 蛋白との関係を、2 例の C 型症例の培養皮膚線維芽細胞用いて発現レベル

での解析を行なった。昨年はニーマンピック病 A/B 型での同様の解析を行なったが、今回の結果と合わせ考察する。

2. 研究方法、結果、及び考察

- 1) 遺伝子解析: ①症例 5 ヶ月、女児。34 週、2920g で出生。著明な肝脾腫を認めた。生後 15 日の骨髓検査で泡沫細胞を認めたためニーマンピック病が疑われ培養皮膚線維芽細胞を用いた診断を行った。ASM 活性は正常であったが、フィリピン染色陽性のため C 型の診断となった。NPC1 遺伝子解析の結果、c.1891A>G (M631V) と c.581_592delinsG の遺伝子異常を認めた。
- ②症例 2 才、女児。36 週、1995g で出生。乳児期は異常を認めなかったが、1 歳半で失調歩行、2 才で上肢の振戦が出現した。骨髓検査で泡沫細胞を認めたためニーマンピック病が疑

われ培養皮膚線維芽細胞を用いた診断を行った。ASM 活性は正常であったが、フィリピン染色陽性のため C 型の診断となった。NPC1 遺伝子解析の結果、c.2800C>T(R934X)と c.3418G>A(G1140R)の遺伝子異常を認めた。

2) 培養皮膚線維芽細胞 3 種類(正常、ニーマンピック病 C 型 2 例)に関して、脂質輸送に関する 4 種類の ABC 蛋白(ABCA1、ABCA3、ABCA7、ABCG1)に関して遺伝子発現量(mRNA)を GAPDH mRNA を内部コントロールとして LightCycler を用いたハイブプロローブ法にて測定した。

ABCA1 は肝やマクロファージにおけるコレステロールの細胞外排出に関与する。その異常では低 HDL 血症や臓器コレステロール蓄積を特徴とする Tangier 病をきたす。ニーマンピック病 C 型でも低 HDL 血症は特徴的な検査所見である。測定結果では正常 1.77×10^{-2} (以下 GAPDH 補正值)に対して C 型(症例①) 1.41×10^{-3} (* $p < 0.0001$)、C 型(症例②) 5.21×10^{-3} (* $p < 0.0001$)と有意の低下を示していた。

ABCA3 は肺胞 II 型細胞のラメラ体限界膜に発現し脂質輸送を通じサーファクタント合成に関与する。その異常は先天性サーファクタント欠損症をきたす。測定結果は 3 つの細胞で差はなかった。

ABCA7 は ABCA1 蛋白と相同性が高く HDL 形成に関与することが分っている。測定の結果、正常 1.75×10^{-4} に対して C 型(症例①) 0.73×10^{-4} (* $p < 0.0001$)、C 型(症例

②) 1.18×10^{-4} (* $p = 0.0002$)と有意に低下が見られた。

ABCG1 はマクロファージや肺で発現がみられコレステロールやリン脂質の輸送に関与している。その欠損モデルでは肺で泡沫細胞の浸潤などニーマンピック病 A/B 型および C 型と似た病像を呈する。測定結果は正常 2.01×10^{-4} に対して C 型(症例①) 1.87×10^{-6} (* $p = 0.0002$)、C 型(症例②) 2.77×10^{-6} (* $p = 0.0002$)と著明な低下が観察された。ニーマンピック病 C 型が多彩な症状を来す病態はほとんど不明である。しかし細胞内主要脂質であるスフィンゴミエリンの蓄積が主病態である点を考えると細胞内脂質輸送に関係する ABC 蛋白の機能に二次的な影響が発現す可能性は高く、今回の解析結果はそれを支持する。本疾患の治療を考えた病態解明に重要な所見と思われる。昨年のニーマンピック病 A/B 型の細胞では、ABCA1 遺伝子および ABCG1 遺伝子の発現の低下が認められたが、今回の C 型でも同様に ABCA1 遺伝子、ABCA7 遺伝子、ABCG1 遺伝子の発現低下が認められたことは、両疾患の臨床像が類似していることと関与している可能性を示唆した。

4. 結 論

ニーマンピック病 C 型の病態を考える上で細胞内脂質輸送に関与する ABC 蛋白発現の二次的な変化に関して解析し ABCA1、ABCA7、ABCG1 の発現変化の可能性を示唆した。

ニーマン・ピック病 C 型の神経変性に関する研究

分担研究者：大野耕策(鳥取大学・医学部・脳幹性疾患研究施設・脳神経小児科部門・教授)

研究協力者：齋藤義朗、Luan Zhuo(鳥取大学・医学部・脳幹性疾患研究施設・脳神経小児科部門)

研究要旨

ニーマン・ピック病 C 型(NPC)では脳幹の機能障害によると考えられる症状が多く存在する。しかし脳幹部で障害される神経網は明らかではない。NPC のモデルマウスの脳幹部の病理学的変化について検討した。チロシン水酸化酵素(TH)で染色される神経細胞は黒質、青斑核で減少していたが、脚橋被蓋核や舌下神経核のコリンアセチルトランスフェラーゼ(ChAT)で染色される神経細胞の減少は見られなかった。Kluver-Barrera 染色で染色される神経は、孤束神経核、腹側蝸牛神経核で減少していたが、背側蝸牛神経核での減少はなかった。GFAP 染色によるグリオーシスは四丘体、内側縦束、動眼神経核、内側膝状体核、疑核、舌下神経核など広汎に分布していた。これらの病変は NPC の強剛、眼球運動障害、カタプレキシー、睡眠障害、嚥下障害、難聴などの症状と関係している可能性がある(Luan Z, et al. Brain Nueropathology in a mouse model of Niemann-Pick disease type C. J Neurol Sci 2008 Jan 9 [Epub ahead of print])。

A. 研究目的

ニーマン・ピック病 C 型は細胞内コレステロール輸送の欠陥による脂質蓄積症で、進行性の神経症状を特徴とする。神経症状は、知的退行、失調、痙性麻痺、てんかんであるが、経過中、脳幹部の機能障害によると考えられる極めて特異な症状を認めることがある。カタプレキシー、早期からの嚥下障害、垂直性眼球運動障害、聴覚障害、ジストニアなどである。

NPC モデルマウスでの脳幹部の病理所見を記載したものは少ないため、臨床症状との関係を明らかにする目的で、神経病理学的検討を行った。

B. 研究方法

1. マウス 8 週齢のホモ(NPC1^{-/-})のマウス(N=10)とその同腹のヘテロ(NPC1^{+/-})または正常マウス(NPC1^{+/+})(N=10)を対照とした。マ

ウスはペントバルビタールで麻酔後還流固定を行った。

2. 脳を摘出し重量と容積を計測後、冠状断で切断し、パラフィン包埋した。
3. 切片は、①黒質、上丘、動眼神経核、内側膝状核、内側縦束の吻側間質核が確認できる上中脳レベル、②下丘が確認できる下中脳レベル、③脚橋被蓋核を確認できる中脳・橋境界レベル、④青斑核を確認できる橋上部のレベル、⑤蝸牛神経核、舌下神経核、疑核、孤束核が確認できる延髄上部の異なった 4 つのレベルで作成した。それぞれ 30 μm 毎の切片を染色した。

中脳の諸領域は筋緊張のコントロールおよび眼球運動のコントロール領域として黒質、上丘、動眼神経核、内側縦束の吻側間質核に注目した。橋の領域は睡眠に関与する領域として脚橋被蓋核、青斑核を選択した。延髄は嚥下に関

係する領域として舌下神経核、疑核、孤束核に注目した。聴覚系として蝸牛神経核、下丘、内側膝状核を選択した。

4. 一次抗体は、ウサギ抗 GFAP 抗体 (DACO, 1 : 4000)、モノクローナル抗神経核抗体 (NeuN) (Chemicon, 1 : 500)、ウサギ抗コリンアセチルトランスフェラーゼ抗体 (ChAT) (GeneTex, 1 : 1600)、ウサギ抗チロシン水酸化酵素抗体 (TH) (1 : 1000) を用いた。二次抗体ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギ免疫グロブリン抗体またはヤギ抗マウス免疫グロブリン抗体を用い、ジアミノベンチジンで発色し、ヘマトキシリンでカウンター染色を行った。
5. 染色された標本は ImagePro-Plus5.0 (Media Cybernetics) で定量的に、免疫染色陽性細胞の数と免疫染色の強さ (IOD) を定量化した。SPSS13.0 を用いて、統計的に解析した。

C. 研究結果

1. NPC^{-/-}マウスの脳重量と容量

NPC^{-/-}マウスの脳重量は小さく、特に延髄は正常より短かった。

2. Kluber-Barrera 染色

NPC^{-/-}と対照の脳を比較した結果、脳幹の構造には明らかな異常は認めなかった。大脳では神経細胞の膨化を認めたが脳幹部では認めなかった。

3. 中脳の免疫染色

TH-陽性神経細胞は黒質緻密体に存在する。正常では TH に強く染色され、多棘性の形態を示すが、NPC^{-/-}マウスでは、TH 陽性神経細胞の神経突起の数は少なく、TH 染色性も弱かった。GFAP 染色で正常の黒質緻密体では GFAP で染色される細胞はまばらで血管周囲に存在していたが、NPC^{-/-}の脳では広く顕著に増加していた。上丘、動眼神経核、内側縦束の吻側間質核でも GFAP で染色される細胞の数も IOD も NPC^{-/-}で有意に増加していた。

4. 橋の免疫染色

青斑核の TH 陽性細胞の数も IOD も NPC^{-/-}で明らかに減少していたが、この領域では IOD の減少が細胞数の減少より顕著であった。GFAP 陽性細胞は対象と NPC^{-/-}で明らかな差はなかった。脚橋被蓋核では ChAT で染色される細胞には対照と NPC^{-/-}の間に明らかな差はなかったが、GFAP 陽性細胞の数も IOD も増加していた。

5. 延髄の免疫染色

5-1. 舌下神経核と疑核

舌下神経核には大型で ChAT に強く染色される細胞が存在するが、対照との間明らかな差はなかった。GFAP 陽性細胞は NPC^{-/-}で増加していた。

5-2. 孤束核

Kluber-Barrera 染色で核と核小体が明瞭な紫色に染色される孤束核神経細胞は NPC^{-/-}で減少していた。GFAP 陽性細胞には明らかな差はなかった。

5-3. 聴神経系

蝸牛神経核背側核は抗 NeuN 抗体陽性を指標に定量し、腹側核は Kluber-Barrera 染色で定量した。背側核では明らかな差はなかったが、腹側核の神経細胞は NPC^{-/-}で有意に減少していた。GFAP 陽性細胞の数には明らかな差はなかった。下丘、内側膝状核では GFAP 陽性細胞の数は NPC^{-/-}で増加していた。

D. 考 察

NPC^{-/-}マウスはおよそ 6 週齢から体重減少が始まり、8 週から 11 週で死亡するまで急激に体重減少が進行する。これはニーマン・ピック病 C 型患者の嚥下障害の進行とよく似ている。NPC1^{-/-}の体重減少が摂食障害の結果どうか明らかではないが、NPC1^{-/-}で認知運動障害が明らかになる 8 週齢で検討した。この結果、NPC1^{-/-}の脳幹では特異な領域の神経細胞密度の減少とグリオーシスがおこっていることが明らかになり、これらの特異な領域の変化が NPC の特有の症状と関係していると考えた。

黒質のドーパミンニューロンの減少とグリオシスは NPC 患者のジストニアやパーキンソン症状と関係している可能性がある。

核上性垂直眼球運動障害が垂直眼球運動の選択的麻痺で、NPC 患者に高頻度に認められる。内側縦束の吻側間質核の選択的障害が垂直眼球運動障害と関係している可能性がある。

青斑核の TH 陽性細胞の減少と ChAT で染色される脚橋被蓋核神経細胞が障害されていない所見は極めて興味を持たれる。NPC 患者ではカタプレキシシー・ナルコレプシーを認めることが多い。コリン作動性神経細胞の活性化とモノアミン神経細胞の活動の減少が non-REM から REM への移行に重要と考えられており、青斑核活動停止がカタプレキシシーで認められことから、この所見がカタプレキシシーの発生に関係している可能性が考えられる。

嚥下運動の関する中枢は延髄に分布している。NPC 患者で早期に認められる嚥下障害が、孤束核の神経細胞の減少、舌下神経核と疑核領域のグリオシスがこの嚥下障害やマウスの体重減少と関係している可能性がある。

難聴は NPC では多くは認められないが、聴覚神経レベルや上丘のレベルでの障害を示唆するレポートがある。今回の蝸牛神経核の神経細胞密度の減少と下丘のグリオシスはこれらのレポートと関係した所見である可能性が高い。

E. 結論

NPC1-/-マウスでは、脳幹の特異な神経核の神経細胞の脱落やグリオシスがあり、これらの特異領域の変性が、NPC 患者の特異な神経症状と関係している可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. Luan Z, Saito Y, Miyata H, Ohama E,

Ninomiya H, Ohno K. Brain Nueropathology in a mouse model of Niemann-Pick disease type C. *J Neurol Sci* 2008 Jan 9[Epub ahead of print]

2. Takamura A, Higaki K, Kajimaki K, Otsuka S, Ninomiya H, Matsuda J, Ohno K, Suzuki Y, Nanba E. Enhanced autophagy and mitochondrial aberrations in murine GM1-gangliosidosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008 (in press).

3. Lei K, Ninomiya H, Suzuki M, Inoue T, Sawa M, Iida M, Ida H, Eto Y, Ogawa S, Ohno K. and Suzuki Y. Enzyme enhancement activity of N-octyl-beta-valienamine on beta-glucosidase mutants associated with Gaucher disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1772(5) : 587-96, 2007.

4. Suzuki Y, Ichinomiya S, Kurosawa M, Ohkubo M, Watanabe H, Iwasaki H, Matsuda J, Noguchi Y, Takimoto K, Itoh M, Tabe M, Iida M, Kubo T, Ogawa S, Nanba E, Higaki K, Ohno K, Brady RO. Chemical chaperone therapy : clinical effect in murine GM1-gangliosidosis. *Ann Neurol*. 62(6) : 671-5, 2007

5. Suzuki M, Sugimoto Y, Ohsaki Y, Ueno M, Kato S, Kitamura Y, Hosokawa H, Davies JP, Ioannou YA, Vanier MT, Ohno K, Ninomiya H. Endosomal accumulation of Toll-like receptor 4 causes constitutive secretion of cytokines and activation of signal transducers and activators of transcription in Niemann-Pick disease type C (NPC) fibroblasts : a potential basis for glial cell activation in the NPC brain. *J Neurosci*. 27(8) : 1879-91, 2007

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

なし

ゴーシェ病における骨粗鬆症の病態に関する研究

分担研究者：芳野 信(久留米大学医学部小児科学講座・教授)

研究要旨

ゴーシェ病患者の骨粗鬆症の機序を検討する目的で8名のゴーシェ病患者(I型4名、IIIa型1名、IIIb型3名)につき、血中サイトカイン、血中・尿中の骨形成マーカー、骨吸収マーカーを測定した。その結果、ゴーシェ病では、macrophage-colony stimulating factorの過剰により骨吸収が亢進し、反面 transforming growth factor- β 1の過剰が骨吸収に対して抑制的に作用し、いっぽう interleukin-18の増加により骨形成が亢進した状態であることが分かった。

研究協力者：

渡辺順子(久留米大学医学部小児科学講座)

井田博幸(東京慈恵会医科大学医学部小児科学講座)

田嶋朝子(東京慈恵会医科大学医学部小児科学講座)

小林正久(東京慈恵会医科大学医学部小児科学講座)

大橋十也(東京慈恵会医科大学医学部小児科学講座)

衛藤義勝(東京慈恵会医科大学医学部小児科学講座)

A. 研究目的

ゴーシェ病では骨粗鬆症、骨壊死などの骨病変が見られるがその発生機転は明らかではない。また、ゴーシェ病では単球/マクロファージ系が活性化され、血中各種のサイトカインの増加が知られている。それらのサイトカインの一部は骨代謝の調節に関与する。本研究は、それらのサイトカインと骨代謝マーカーの相関を検討し、骨病変におけるサイトカインの役割を検討することを目的として本研究を行った。

B. 研究方法

対象は8名のゴーシェ病患者(I型4名、IIIa型1名、IIIb型3名)、性別は男子7名、閉経前女性1名(I型)。骨病変の程度は grade 0~5、酵素補充療法を1か月~141か月受けている。血清または血漿中のサイトカインは市販のキットを用い、

ELISA法で、骨形成マーカー(血清 bone-specific alkaline phosphatase ; B-ALP, 血清 osteocalcin ; OS)、骨吸収マーカー(血清 N-telopeptide to helix ; s-NTx, 尿 deoxypyridinoline ; u-DPD)はそれぞれの方法で測定し、測定値の評価(上昇または対照値内)は年齢、性別一致の対照群と比較した。2群の数値の相関は $r > 0.6$ かつ $P < 0.05$ の場合、有意とした。本研究は久留米大学医療倫理委員会の承認を得た研究計画に基づき、上個別の患者から同意を得た上で実施した。

C. 研究結果

測定した10種類のサイトカインのうち interleukin(IL)-18は8名中7名、transforming growth factor(TGF)- β 1は8名全員で上昇を認めた。macrophage-colony stimulating factor(M-CSF)は1例(酵素補充療法開始後1か月の症例)で高値を示した。

B-ALPはすべての小児患者と成人患者1名で軽度上昇、u-TNxは小児患者3名と成人患者2名で、またu-DPDは成人患者3名で上昇を認めた。

IL-18値とB-ALP($r=0.751$, $P=0.041$, $n=8$)、OC($r=0.8160$, $P=0.0136$, $n=8$)の各々の間に正の相関を認めた。いっぽう、M-CSF($r=0.819$, $P=0.0128$, $n=8$)とsCD14($r=0.720$, $P=0.044$,

n=8)の値は u-TN α のそれと正の相関を示した。

D. 考 察

骨組織は破骨細胞による吸収と造骨細胞による形成の両者のバランス remodeling によって維持されている。ゴーシェ病では、概ね骨吸収マーカー、骨形成マーカーとも増加傾向にあり、吸収と形成がいずれも亢進傾向にあることが伺われた。

M-CSF は c.f.u. granulocyte/monocyte の前破骨細胞への分化の初期の数段階を刺激する。また、未治療のゴーシェ病では血中の M-CSF が増加することも知られている。これらのことから、ゴーシェ病では前破骨細胞への分化が亢進していると考えられる。このことは M-CSF の値が骨吸収マーカーである u-TN α の値と正の相関を示したと矛盾しない。sCD14 は monocyte の可溶性リポポリサッカライド受容体であり、病態生理上の意義は M-CSF と同様と考えられる。

いっぽう IL-18 は前破骨細胞の癒合(多核前破骨細胞形成)を抑制し、他方では骨形成細胞の増殖を刺激する。すなわち IL-18 は全般的に見れば骨形成方向に作用する。TGF- β 1 は c.f.u. granulocyte/monocyte の分化・増殖を抑制し、また破骨細胞の apoptosis を誘導しその活性を抑制する。したがって TGF- β 1 の上昇は骨吸収に対して抑制的に作用する。以上から、ゴーシェ病では M-CSF の増加による骨吸収の亢進と TGF- β 1 の増加によるその抑制および IL-18 の増加による骨形成の亢進が共存した状態と考えられる。

今回の研究では患者がすべて一定の期間、酵素補充療法を受けた時点での採血、採尿であったにも関わらず、このような結果が得られた。すなわち本症の骨粗鬆症の治療には酵素補充療法に加え、骨粗鬆症の病態特異的な治療戦略の開発が必要と考えられる。

E. 結 論

ゴーシェ病気の骨病変のうち骨粗鬆症については M-CSF の増加による骨吸収の亢進と IL-18 お

よび TGF- β 1 の増加による骨形成の亢進の両者が関与していることが明らかになった。

F. 健康危険情報

該当せず

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Yoshino M, Watanabe Y, Tokunaga Y, Harada E, Fujii C, Numata S, Harada M, Tajima A, Ida H. Roles of specific cytokines in bone remodeling and hematopoiesis in Gaucher disease. *Pediatr Int.* 2007 49(6) : 959-65, doi : 10.1111/j. 1442-200X. 2007. 02502.x

2. 学会発表

- 1) Yoshino M, Watanabe Y, Tajima A, Ida H, Eto Y. Cytokines and bone remodeling in Gaucher disease. International Symposium of lysosomal storage diseases, Nov 29-Dec. 1, 2007 (Makuhari)
- 2) Otomo T, Muramatsu T, Inui K, Yorifuji T, Nalabayashi H, Ohura T, Yoshino M, Tanaka A, Okuyama T, Ozono K, Sakai N. Mutation analysis of GNPTAB gene in 36 Japanese mucopolidosis II and III patients : genotype phenotype correlation? International Symposium of lysosomal storage diseases, Nov 29-Dec. 1, 2007 (Makuhari)

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし