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

ムコ多糖症患者における健康関連 QOL の調査研究

研究分担者：坪井　一哉(名古屋セントラル病院 血液内科)

研究要旨

ムコ多糖症(mucopolysaccharidoses；MPS)はグリコサミノグリカン(酸性ムコ多糖、ムコ多糖ともいう)を分解するリソソーム酵素(5種類のグリコシダーゼ、5種類のスルファターゼ、1種類のトランスフェラーゼ)の欠損あるいは活性の低下症である。その結果、デルマタン硫酸、ヘパラン硫酸、ケラタン硫酸、コンドロイチン硫酸あるいはヒアルロナンの分解が単独または複数阻害され、臨床症状としては、特有な顔付き、ごつい体付き、多毛症、軟骨内骨化障害、関節の運動制限、肝脾腫、呼吸循環障害、角膜混濁、難聴などを生ずる。今回、"日本ムコ多糖症親の会"の協力のもと、無記名アンケート形式にて健康関連 QOL の調査を行った。健康関連 QOL を測定する疾患特異的尺度としては新たにムコ多糖症 QOL 調査票(Muco-QOL)を作成し使用した。また、16 歳以上の方に対しては包括的尺度として SF-36ver2(日本語版)を使用し、MPS 患者における健康関連 QOL の評価を行った。解析の結果、身体的健康度で著明な低下が認められ、重要な因子として原疾患による骨や関節の異常が考えられた。また、精神的健康度に関しては、16 歳以上の解析では、国民標準値と同等であったが、疾患特異的に調査した結果、病気や治療、結婚、遺伝など多くの不安を抱えていることが以前報告したポンペ病、ゴーシェ病、ファブリー病患者と同様に今回の調査でも明らかになった。

A. 研究目的

ムコ多糖症(mucopolysaccharidoses；MPS)はグリコサミノグリカン(酸性ムコ多糖、ムコ多糖ともいう)を分解するリソソーム酵素(5 種類のグリコシダーゼ、5 種類のスルファターゼ、1 種類のトランスフェラーゼ)の欠損あるいは活性の低下症である。その結果,デルマタン硫酸、ヘパラン硫酸、ケラタン硫酸、コンドロイチン硫酸あるいはヒアルロナンの分解が単独または複数阻害され、全身組織の細胞内リソソームに不完全に分解されたムコ多糖の断片が蓄積し、機能障害を引き起こす常染色体劣性遺伝(MPSⅡのみは X 染色体劣性遺伝)の先天性代謝異常である。臨床症状としては、蓄積するムコ多糖の種煩、程度、部位によってさまざまな徴候を呈する。主な徴候として、特有な顔付き、ごつい体付き、多毛症、軟骨内骨化障害、関節の運動制限、肝脾腫、呼吸循環障害、角膜混濁、難聴などを生ずる。知的障害は MPSⅠ型(Hurler 症候群)，MPSⅡ型(Hunter 症候群)の重症型、MPSⅢ型(Sanfilippo 症嫉群)の全亜型、MPSⅦ型の一部に特徴的で、それ以外の MPS の亜型では知能は正常に保たれている。また、MPS Ⅳ型を除きムコ多糖尿を伴うことが特徴である。

本研究の目的は、臨床疫学調査として、MPS 患者における健康関連 QOL の評価を行い、実態を把握することである。このことは、現在、認可されている MPSⅠ型、MPSⅡ型、MPSⅥ型に対する酵素補充療法の有効性、また、骨髄移植との

比較、治療の適応や開始時期を検討するための必要な基礎的データになると考えられる。

QOL(Quality of Life)とは「生命の質」「生活の質」などと訳され、生命に関与する疾病・症状の除去や生活を物質的な側面から量的にとらえるのではなく、精神的な側面を含めて質的にとらえる概念で、"人生や生活に対する個人的満足度"を意味する概念である。欧米では ADL(Activities of Daily Living:日常生活活動)や QOL に関する研究活動が盛んで、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、主観的な健康度・機能状態を表す「健康関連 QOL」という概念が注目を集めている。

今回、"日本ムコ多糖症親の会"の協力のもと、無記名アンケート形式にてQOLの調査を行った。QOL を測定する疾患特異的尺度としては新たにムコ多糖症 QOL 調査票(Muco-QOL)を作成し使用した。また、16歳以上の方に対しては包括的尺度として SF-36ver2 日本語版(SF-36)を使用し、MPS 患者における健康関連 QOL の評価を行った。

B. 研究方法

1. 対象者

平成17年1月より、平成18年3月の調査期間中に、"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78症例を対象に解析を行った。健康関連 QOL の疾患特異的尺度として新たに Muco-QOL を作成し無記名アンケート形式にて調査を行い、さらに16歳以上の方に対しては包括的尺度として SF-36 を使用し評価を行った。

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。指標としては、WHO/QOL-26、SF-36 などがある。

疾患特異的尺度とは、ある特定の疾患グループに対してその特有の症状やその影響をより詳細に測定することを目的とし、疾患特異的に評価をする尺度である。

3. 疾患特異的尺度:Muco-QOL

MPS に関する疾患特異的尺度としての評価法は、まだ開発されていないため、今回、新たに Muco-QOL を作成し無記名アンケート形式にて調査を行った。なお、本人が記入できない場合は、保護者の方に代行していただいた。

4. 包括的尺度:SF-36

本研究では包括的尺度として16歳以上の方に SF-36 を使用した。算出方法は、マニュアルに従って素点を計算し、国民標準値によって調整したのち各下位尺度の偏差得点を算出した。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、標準得点からの乖離を比較することが可能となった。また、各下位尺度の値より身体的健康度、精神的健康度を算出し、国民標準値との比較を行った。

SF-36 は、全体で36項目からなり、以下の8つの下位尺度から構成されている;
(a)身体機能(PF)、(b)日常役割機能(身体)(RP)、(c)身体の痛み(BP)、(d)全体的健康感(GH)、(e)活力(VT)、(f)社会生活機能(SF)、(g)日常生活役割機能(RE)、(h)心の健康(MH)

(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の倫理委員会の承認を得て行った。

対象者に与える負担を最小限に抑えるように充

分に配慮し、調査を行うにあたり充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。また、匿名化により対象患者が特定できないようにし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も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

回答は、78 名の会員の方から得られ、回収率は、約 8 割であった。年齢は、1 歳から 55 歳まで広く分布し、特に小児から 20 歳代に多く見られた。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、MPS I 型が 8 名(10%)、MPS II 型が 50 名(64%)、MPSIII型が 9 名(12%)で、MPSIV型が 8 名(10%)、MPSVI型が 1 名(1%)で、MPSVII型が 1 名(1%)で、不明が 1 名(1%)で、MPS II 型が最も多く見られた(Fig.1)。

2. 身体症状

低身長のため、約 4 割の対象者が、日常生活に制約を受けていた。また、同様に視力障害のため、約 3 割の対象者が日常生活に制約を受けていた。心疾患、肝脾腫の場合、約 4-5 割の方は、日常生活に何らかの制約を受けていた。特に、原疾患による骨や関節の異常のために普段の生活に制限を感じている対象者が最も多く、約 9 割の方が日常生活に制約を強いられ、約 3 割の対象者が非常に強く制約を受けていた(Fig.2)。

3. 精神的状態

多くの対象者が、様々な不安を抱えていた。個々の因子として、病気に対する不安が 93.5%、今後の治療法に対する不安が 96.1%(※)、結婚や遺伝に対する不安が、85.7%、将来に対しては、97.4%の者の対象者が不安を抱えていた(Fig.3)。

※ 今回のアンケート調査は、ムコ多糖症に対する酵素補充療法が認可される前に行いました。

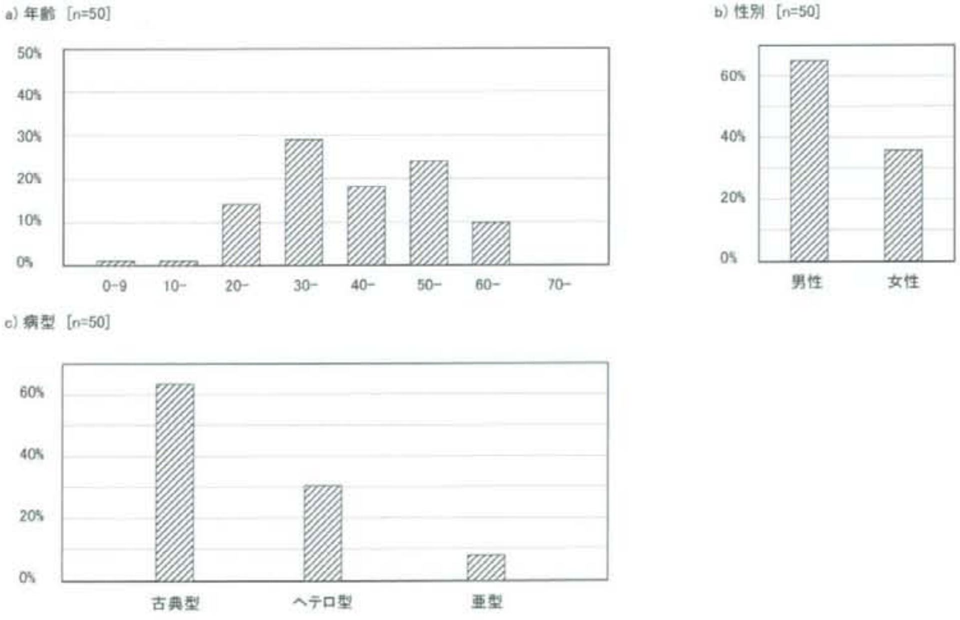

Fig.1 基本属性(患者背景)

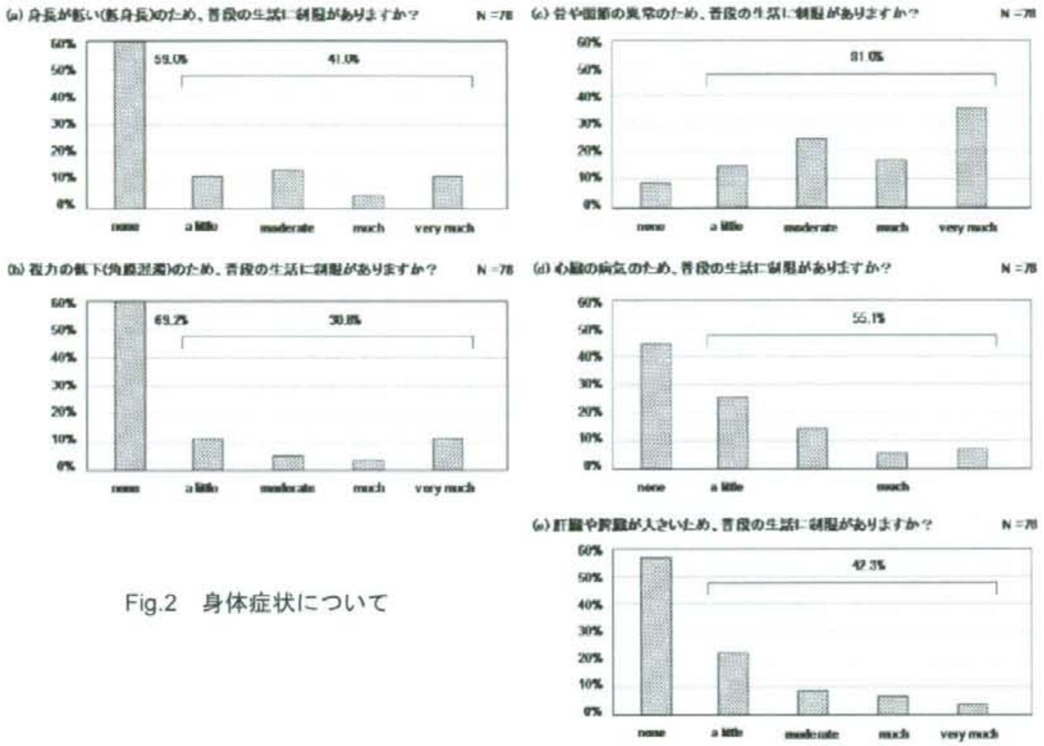

Fig.2　身体症状について

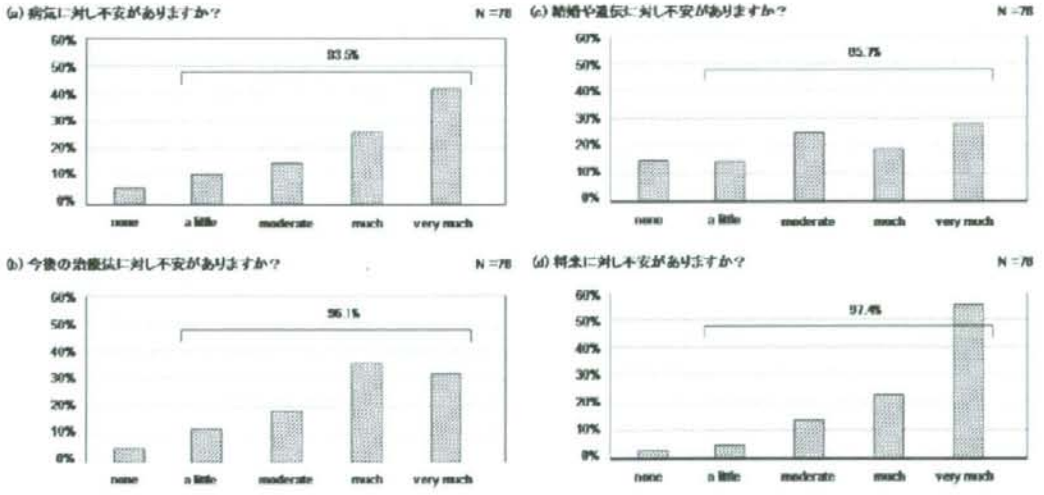

Fig.3　精神的状態について

4. 治　療

今回のアンケート調査は、ムコ多糖症に対する酵素補充療法が認可される前に行ったことにより、今後、酵素補充療法の効果を考える上で、基礎的データになると考えられる。すでに、酵素補充療法を知っている対象者が、大半(96.2%)であり、ほぼ全員(98.6%)が、治療効果に期待を持たれ、約5割の方が、かなりの期待をされていた。骨髄移植に関しては、全員の対象者が知っておられ、約9割の方が期待をされているものの、かなり期

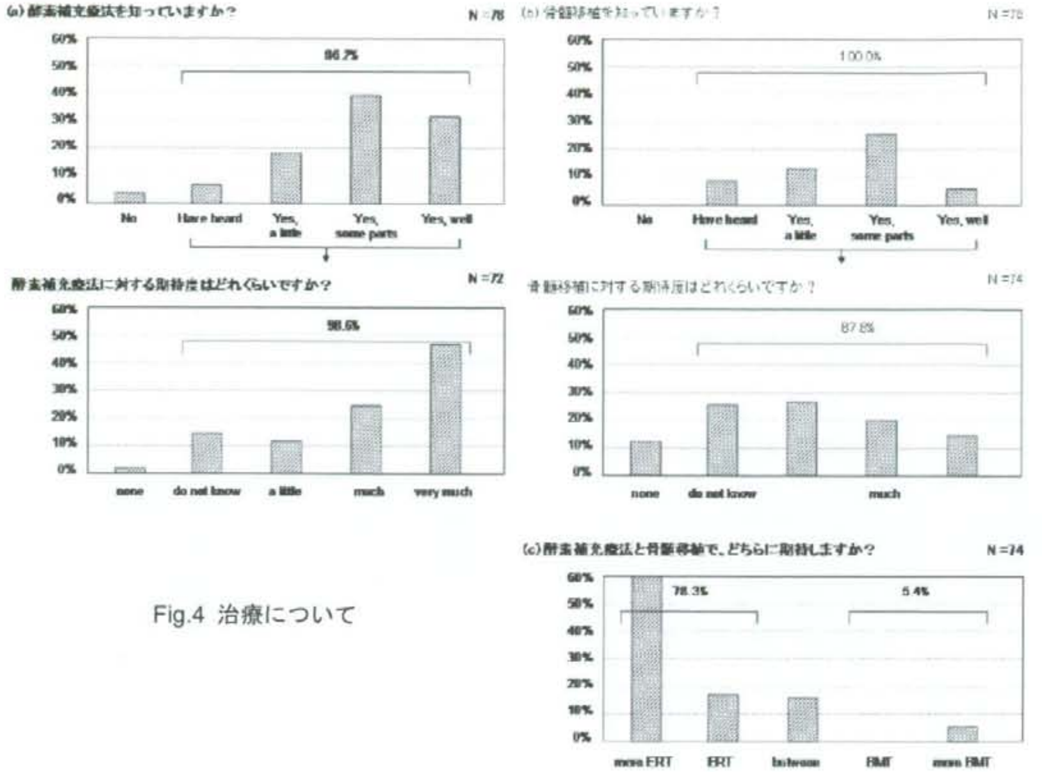

Fig.4 治療について

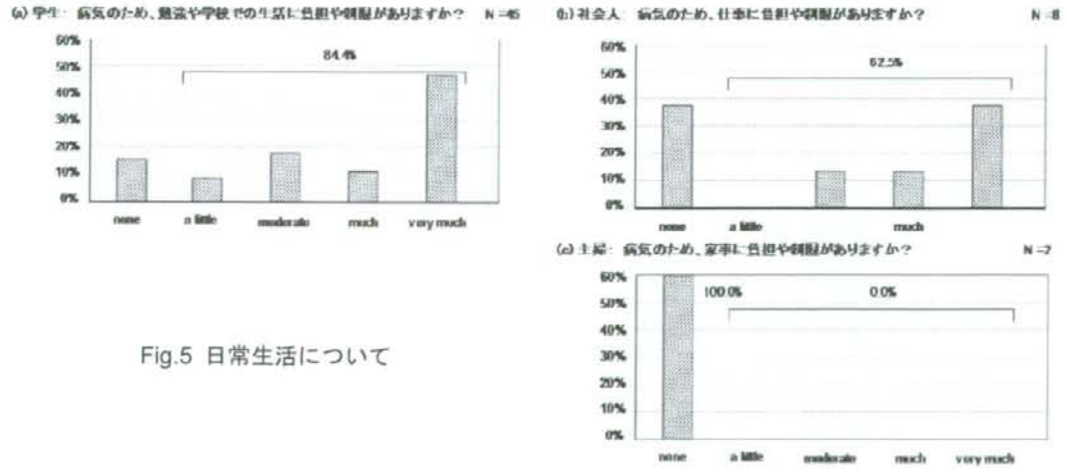

Fig.5 日常生活について

待されている方は、2 割にみたなかった。酵素補充療法に対する期待は強く、約 7 割の方が骨髄移植よりも酵素補充療法に期待されていた (Fig.4)。

5. 日常生活・社会活動 (Fig.5)

a) 学生;病気のために学校生活に何らかの制約を受けている対象者は、84.4%であった。特に約 5 割の方が、かなりの負担や制約を強いられていた。

b) 社会人 ; 62.5%の対象者が、社会生活に何らかの負担や制約を受け、約 4 割の方がかなりの負担や制約を強いられていた。

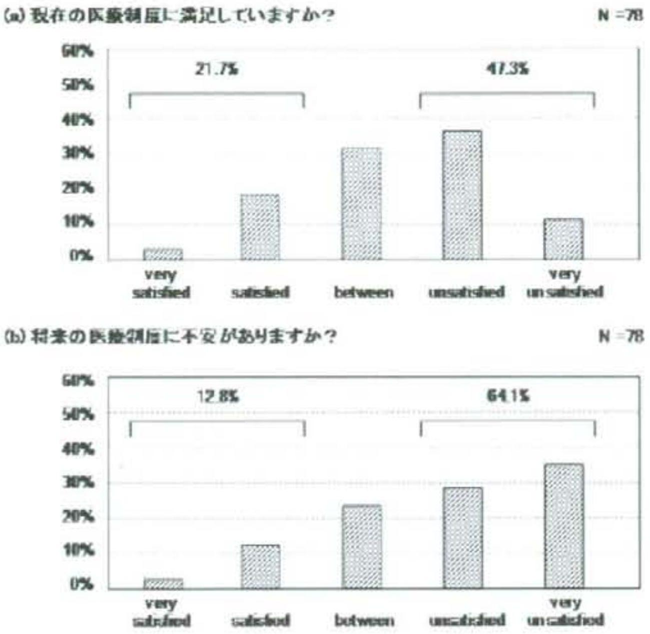

Fig.6　医療制度について

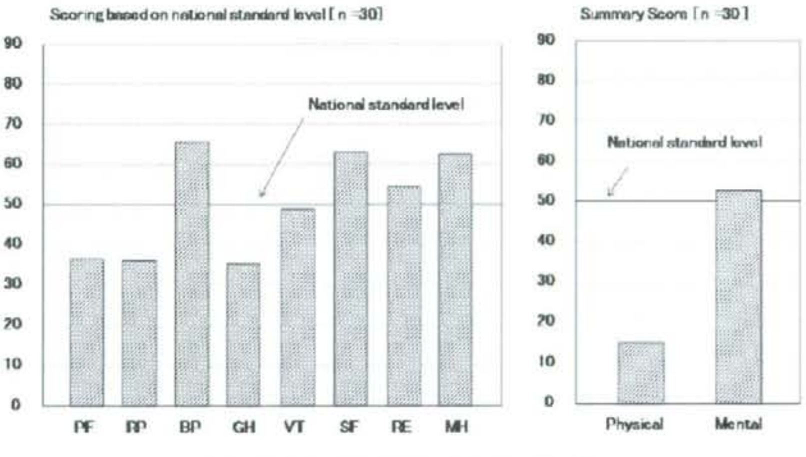

Fig.7　身体的健康度・精神的健康度

c) 主婦；今回の調査では該当者は 2 名であったため、詳細は解析できないが、家事に負担や制限は認められなかった。

6. 国民標準値との比較

本研究では、SF-36 の各下位尺度の得点について日本人の国民標準値をもとに、偏差得点およびサマリースコア(身体的健康度、精神的健康度)をマニュアルに従い算出した。その結果、各下位尺度は、身体機能(PF) 37.1 点、日常役割機能(身体)(RP) 37.1 点、身体の痛み(BP) 66.1 点、全体的健康感(GH) 36.4 点、活力(VT) 49.0 点、社会生活機能(SF) 64.6 点、日常生活役割機能(RE) 53.1 点、心の健康(MH) 62.2 点であった(Fig.7)。

身体機能(PF)、日常役割機能(身体(RP)、全体的健康感(GH)の得点は、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も、身体的健康度(PCS) 15.2 点、および 精神的健康度(MCS) 52.8 点であった。今回の調査では、精神的健康度は保たれていたが、身体的健康度は国民標準値を下回る傾向が認められた(Fig.7)。

D. 考 察

現在、MPS における酵素補充療法の有効性として、尿中 GAG(ヘパラン硫酸とデルマタン硫酸)の減少、肝脾腫の改善などが報告されている。しかし、検査結果や臨床所見に加え、近年の医療では、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、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患者立脚型アウトカム(patient-based outcomes)としての健康関連 QOL の重要性が考えられるようになってきている。また、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 の評価は、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ている。

今回、MPS における健康関連 QOL に関する臨床疫学的調査を開始した。解析の結果として、身体機能、日常役割機能(身体)、全体的健康感の得点は、国民標準値よりも低値を示していた。健康度のサマリースコアでは、精神的健康度は保たれていたが、身体的健康度は国民標準値を下回る傾向が認められた(Fig.7)。

身体的健康度の低下の要因としては、原疾患による骨や関節の異常が日常生活に制限をきたし、QOL の低下に影響を及ぼしていると考えられた。一方、他の臨床症状として低身長や視力の低下は、健康度にあまり影響を及ぼしていなかった(Fig.2)。

精神的健康度に関しては、国民標準値と同等であった。今回の調査では包括的尺度として SF-36 を使用したが、本疾患の基本属性でも明らかにしたように、20 歳未満に多くの対象者が分布していたため、16 歳以上の解析結果としては、国民標準値と同等になったと考えられた。しかし、Muco-QOL を用いた結果では、以前に報告したポンペ病患者、ゴーシェ病患者、ファブリー病患者と同様に、病気や治療、結婚、遺伝などに関し多くの不安を抱えていることが明らかになった(Fig.3)。MPS は、希少性疾患でもあるため、一般診療で診られる疾患とは多くの点で異なり、対応可能な医師や医療機関も少なく、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作用し、健康度の低下を来たしていると考えられた。

MPS I 型に対するラロニダーゼ(遺伝子組換え)は、2006 年に承認、販売された。MPS II 型に対するイデュルスルファーゼ(遺伝子組換え)は、2007 年に承認、販売され、MPSVI型に対するガルスルファーゼ(遺伝子組換え)は、2008 年に承認、販売され、各病型において酵素補充療法は徐々に開始されてきている。

今回の QOL 調査は、MPS に対する酵素補充療法が認可される前に調査を行った。今後、継続的に調査を行うことにより、現在行われている酵素補充療法の有効性、また、骨髄移植を含めた治療戦略を検討する上で、重要な基礎的データになると考えられる。

また、ライソゾーム病患者における健康関連 QOL 調査に加え、当院通院中で同意の得られた対象者に対し個別にインタビューを行い、ライソゾーム病患者の抱えている生理的変動要素、心理的変動要素、社会文化的変動要素などの様々なニーズを明らかにするための調査も開始した。インタビューは、主治医および"ライソゾーム病看護チーム"で、対象者の外来受診時に個室にて行い、調査は、対象者 1 名につき 3-4 回関わり、時間は 1 回につき 15 分-1 時間以内で行っている。これらの解析が終了次第、順次報告を行ってゆく予定である。

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の調査を行い、予備調査をもとに平成 17 年度より全国調査を開始した。平成 17 年度は、ポンペ病患者を対象に、平成 18 年度は、ゴーシェ病患者を対象に、19 年度は、ファブリー病患者を対象に、健康関連 QOL 調査を行った。また、本年度は、ムコ多糖症患者を対象に QOL 調査を行った。

現在、ポンペ病患者、ファブリー病患者に関しては基本的 ADL 調査を開始し、経年的に QOL 調査および ADL 調査を開始している。平成22年度、集計および解析予定である。

謝辞

今回の調査に御協力頂いた、"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. 小冊子

1) 監修 坪井一哉, 井田博幸：ゴーシェ病ハンドブック　genzyme japan, 東京, 2007
2) 監修 坪井一哉：ファブリー病と上手につきあう．ファブリー病ハンドブック．大日本住友製薬, 東京, 2007

2. 論　文

1) Tsuboi K. : Enzyme Replacement Therapy in Patients with Fabry's Disease. The Journal of INTERNATIONAL MEDICAL RESEARCH, 35(4) : 574-581, 2007
2) 坪井一哉：本邦における Gaucher 病の病態・診断・治療の現状.血液フロンティア, 17(5) : 78-87, 2007

3. 学会発表

1) Kazuya Tsuboi, Masakazu Nitta, Ryuzo Ueda : Investigation on QOL of Patients with Gaucher Disease in Japan. The XXXII nd World Congress of the International Society Of Hematology, Bangkok, Thailand, 2008.10.19-23
2) 坪井一哉、鈴木貞夫、柴崎智美、永井正規：臨床調査個人票を用いたゴーシェ病の疫学像の解析. 第 50 回日本先天代謝異常学会総会, 鳥取, 2008.11.6-8.
3) 坪井一哉：臨床調査個人票を使用したゴーシェ病受給者の解析. 第 62 回日本交通医学会総会, 仙台, 2008.6.7-8
4) 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 の臨床疫学調査. 第 105 回日本内科学会講演会, 東京, 2008.4.11-13
5) 片岡智史, 坪井一哉：遅発型 Pompe 病に対する酵素補充療法：症例報告. 第 76 回日本交通医学会東海北陸地方会, 名古屋, 2007
6) 坪井一哉：ゴーシェ病における NK 細胞活性および LAK 細胞活性の定量的検討. 第 49 回日本先天代謝異常学会, 山形, 2007
7) 片岡智史, 坪井一哉：糖原病Ⅱ型(Pompe 病)における酵素補充療法の導入. 第 86 回東海臨床遺伝代謝懇話会, 名古屋, 2007
8) 坪井一哉：ゴーシェ病における NK 細胞活性および LAK 細胞活性の検討. 第 69 回日本血液学会・第 49 回日本臨床血液学会　合同総会, 横浜, 2007
9) 坪井一哉：ファブリー病 11 症例に対する酵素補充療法の検討. 第 104 回日本内科学会講演会, 大阪, 2007
10) 坪井一哉, 鈴木貞夫：ライソゾーム病患者における公費負担医療に対する調査. 第 17 回日本疫学会学術総会, 広島, 2007

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし.

【参考文献】

1）福原俊一，鈴鴨よしみ：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，鈴鴨よしみ：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

厚生労働省科学研究費補助金(難治性疾患克服事業)
分担研究報告書

糖原病Ⅱ型(GSDⅡ、Pompe 病)およびムコ多糖症Ⅰ型(MPSⅠ、Hurler 病)、ムコ多糖症Ⅱ型(MPSⅡ、Hunter 病)の新生児スクリーニング方法に関する研究

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)

研究要旨

GSDⅡ、MPSⅠおよび MPSⅡに対する酵素補充療法(ERT)が確立されたので、何れの疾患も早期に発見し、治療することによって、予後の改善と QOL の向上が得られるようになった。特に GSDⅡの重症型は、早期に ERT を開始しないと、ほとんどの症例が 1 歳になる前に死亡することから、新生児期に治療を開始することが重要である。そのため、我々は、これら 3 疾患の早期発見法を確立する目的で、新生児あるいはハイリスク患者を対象として、平成 19 年度に引き続き濾紙血液を用いて診断する方法の研究を行った。

GSDⅡおよび MPSⅠについては欠損酵素を測定してスクリーニングする方法を、また MPSⅡのスクリーニング法については酵素活性、あるいは酵素蛋白を測定して診断する方法を研究したので、それらの成績について報告する。

研究者協力者：
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)
穴澤　　昭 (東京都予防医学協会科長)
大和田　操 (女子栄養大学大学院教授)
大橋　十也 (東京慈恵会医科大学教授)
衛藤　義勝 (東京慈恵会医科大学教授
田中あけみ (大阪市大小児科助教授)

A. 研究目的

2002 年および 2004 年に Chamoles らは、濾紙血液における白血球中の GSDⅡ、MPSⅠの酵素活性を蛍光基質を用いて測定し、診断する方法を報告した。また、2006 年に Dean らは MPSⅡの欠損酵素である iduronate-2-sulfatase(IDS)の山羊抗ポリクローナル抗体を固相化したマイクロプレートを用いて、IDS 活性およびその蛋白量を測定して診断する方法を報告した。

我々は、これらの方法を用いて GSDⅡ、MPSⅠおよび MPSⅡの新生児スクリーニング法を検討した。

B. 研究方法および対象

1. GSDⅡ型のスクリーニング法

1) 測定方法および原理

本法の原理を図 1 に示した。

測定方法は、新生児代謝異常等スクリーニングで使用されている血液濾紙ディスク 1 枚と α-glu に対する人工基質である 4-methylumbelliferyl-

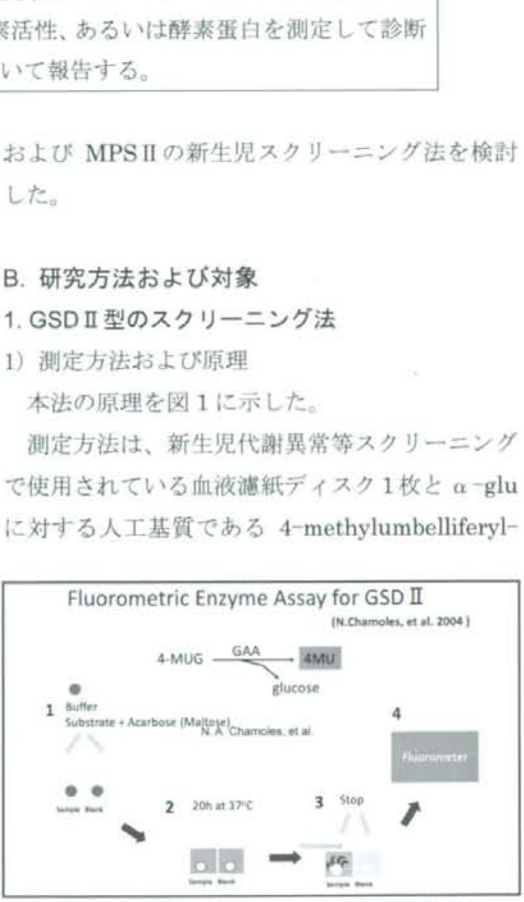

図 1　GSDⅡスクリーニング法の原理

α-D-glucopyrano-side 溶液、ならびに α-glu と類似の活性を示す maltose-glucoamylase を阻害する目的で acarbose(もしくは maltose)を添加し、ライソゾマル酸性 α-glu を測定することを試みた。すなわち 40mM リン酸緩衝液 pH 3.75 および 7.0 の 2 系列を準備した後、37℃で incubate し、20 時間反応させて、酸性および中性 α-glu 活性をコロナ MPT-600F 蛍光光度計で測定し、4MU 0～625 pmol/mL からなる検量線を用いて、反応時間当りの濾紙血液デイスク 1 枚の酸性 α-glu 活性量を算出した。

2) 測定値の評価

測定の評価は、(1)総酸性 α-glu 活性値から阻害剤を加えて測定した酸性 α-glu 活性値を引いた値を総酸性 α-glu 活性値で割ったもの、即ち阻害の度合い(%)、(2)中性 α-glu 活性値を、阻害剤を加えて測定した酸性 α-glu 活性値で割ったもの、および(3)阻害剤を加えて測定した酸性 α-glu 活性値を総酸性 α-glu 活性値で割ったもの、これらの 3 種の測定値を評価して、GSD II 型を診断した。

2. MPS I のスクリーニング法

本法の原理を図 2 に示した。

α-L-iduronidase(ID)活性の測定法は、基質に 4-Methylumbelliferyl-α-L-ido-pyranosiduronic acid(4MUI)を使用し、ID の類似酵素である β-glucuronidase 活性を阻害するために、3mM saccharolactone を添加して反応させた。試料は濾紙血液 3mm ディスク 2 枚を用い、これに 200mM ギ酸緩衝液を加え、37℃、20 時間 incubate し、反応後に 0.5M EDTA(pH11.5)停止液を加え、EX355 nm、EM460 nm で蛍光強度を測り、その活性を測定した。

3. MPS II のスクリーニング法

1) 酵素活性の測定

本法の原理を図 3 に示した。

(1) iduronate-2-sulfatase(IDS)に対するウサギ抗 IDS ポリクローナル抗体を作成し、これを 25mM carbonate buffer, pH 9.6 溶液に 20μg/mL 濃度に溶解したものを 100μL マイクロプレート各 well に固相化した。

(2) 濾紙血液 3mm ディスク 2 枚を各 well にいれ、それに 100μL の assay buffer : 25mM phosphate buffer saline (PBS), pH 7.2 を加え、1 時間室温でゆっくり震盪した後、4℃で 20 時間反応させ、試料中の IDS をマイクロプレート well に捕捉した。

(3) 血液ディスクを吸引して取り除き、洗浄 buffer : 20mM Tris HCl, 250mM NaCl : (pH7.0)で 5 回洗浄した後、5mM 4MU-sulfate : 0.1M acetic acid buffer(pH 5.6)を 75μL 各 well に加え、1 分間室温で震盪した後、37℃で 20 時間反応させた。

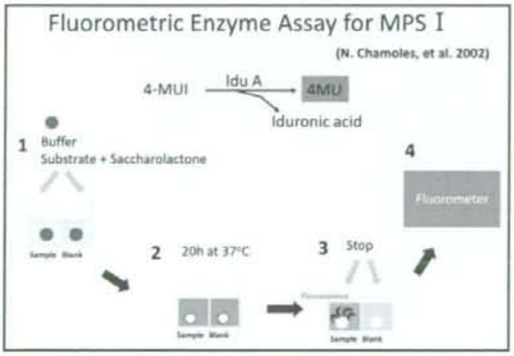

図 2 MPS I スクリーニング法の原理

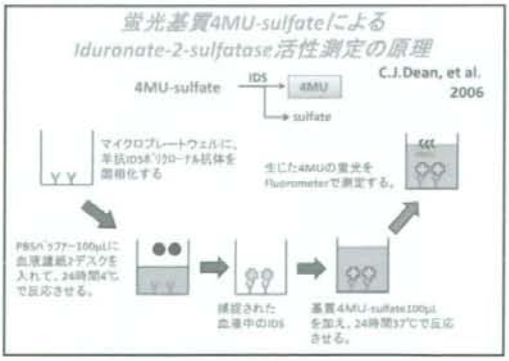

図 3 MPS II 酵素活性の測定(4MU)法

(4) 反応停止 buffer : 0.2M glycine, 0.125M Na2CO3, 0.16M NaOH(pH10.7)を 100 μL 各 well に加え、反応を停止させた後、蛍光光度計で IDS 活性を測定した。

2) 酵素蛋白の測定(DELFIA 法)

本法の原理を図 4 に示した。

(1) 前述したウサギ抗 IDS ポリクローナル抗体を固相化したマイクロプレートに、濾紙血液 3mm ディスク 2 枚を各 well にいれ、それに assay buffer 50mM Tris HCl、0.15M NaCl、20μM ジエチレントリアミン-5-酢酸、0.1M Tween 40、5g/L 牛アルブミン、および 0.5g/L チッ化ソーダ(pH 7.8)100μL を加え、1 時間室温でゆっくり震盪した後、4℃で 20 時間反応させた。

(2) 血液ディスクを吸引して取り除き、洗浄 buffer で 5 回洗浄した後、ビオチン標識 IDS ポリクローナル抗体を assay buffer で溶解(最終濃度 200μg/L)し、100μL を各 well に加え、4℃ 20 時間反応させた。

(3) buffer で 5 回洗浄した後、ユーロピウム標識 streptavidin(最終濃度 100ng/mL)を 100μL 加え、30 分間室温で、ゆっくり震盪しながら反応させた。

(4) buffer で 5 回洗浄した後、DELFIA 増幅 buffer(Perkinermer)200μL を加え、震盪しながら 10 分間室温で反応させ、蛍光光度プレートリーダーARVOTM X4 (Perkinermer) で測定し、IDS 濃度はスプライン曲線によるマルチデータ分析ソフトで計算した。

(5) 精製 IDS 標準溶液(calibrator : 0-2000 pg/mL)は、assay 毎にすべてのプレートに加え、2 重(duplicate)測定した。

4. 対　象

(1)GSDⅡ患者 6 名、GSDⅡハイリスク対象 4 名、(2)MPS I 患者 7 名、MPS I ハイリスク対象者 1 名、(3)MPSⅡ重症型 1 名、軽症型 1 名、および(4)新生児対照 268 名を対象とし、すべての検体を 2 重測定した。

(倫理面への配慮)

血液の採取には、その用途、研究目的を事前に文書にて十分に説明した後、承諾書(検査申込書)に署名を得て行った。

C. 研究結果

1. GSDⅡスクリーニング成績

GSDⅡスクリーニング成績は、正常対照群で異常値を示し、再採血検査の結果正常となったものが 1 例みられたが、その他はいずれの判定基準の場合でも、GSDⅡ患者 6 例と正常対照群との区別は明確で、患者を検出することは容易であった。また、GSDⅡが疑われる何らかの症状を有した 4 例のハイリスク対象者の測定結果は、いずれも正常範囲にあった(図 5)。

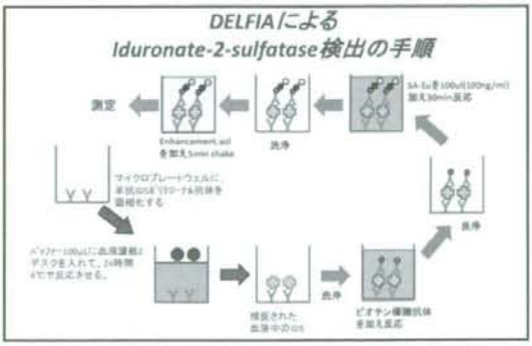

図 4　MPSⅡ酵素蛋白の測定(DELFIA)法

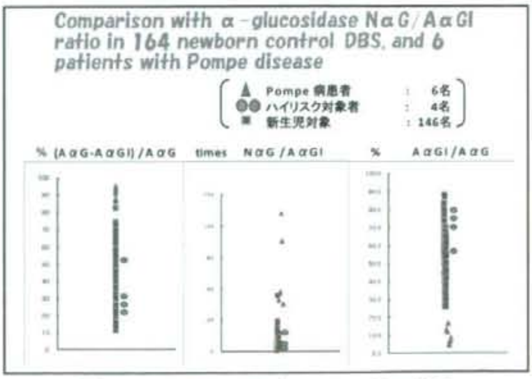

図 5　GSDⅡスクリーニングの成績

図 6　MPS Ⅰ スクリーニングの成績

図 7　IDS 標準溶液の測定結果

2. MPS Ⅰ スクリーニング成績

MPS Ⅰ スクリーニング成績は、正常対照群 42 例では mean ± SD 139.2 ± 34.1pmol/hr/disk (range72.4-233.5pmol/hr/disk) の範囲にあるのに対して、患者群 7 例では mean±SD 7.9±3.8 pmol/hr/disk (range 3.3-14.0pmol/hr/disk) と著しく低値を示しており患者の判定は容易であった。また、ERT を開始した患者では ERT 開始前と開始後の測定値はいずれも低値であり、両者の測定値に差はみられなかった。

丸形（紫色）で示した本症患者の出産歴を持つ母親の第二子（女子）の IDS 活性は正常であった。その母親は一度羊水診断の結果から人工中絶を行っており、今回の結果を喜んでいるとの報告を得た（図 6）。

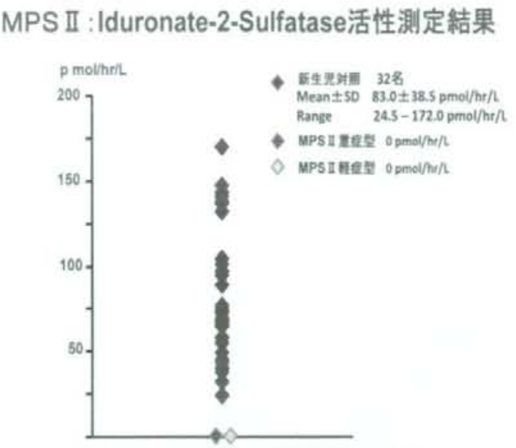

図 8　MPS Ⅱ 酵素活性測定による
スクリーニング成績

図 9　MPS Ⅱ 酵素蛋白測定による
スクリーニング成績

3. MPS Ⅱ スクリーニング成績

1) IDS 活性測定による成績

精製 IDS 標準溶液 (0-2000pg/mL) は、図 7 に示すよう直線性を示した。

IDS 活性測定値は、新生児対照群 32 例で mean ±SD 83.0±38.5pmol/hr/disk (range 24.5-172.0 pmol/hr/disk) であるのに対して、ERT 開始前の重症型 1 例、軽症型 1 例の測定値はいずれも 0 で、感度以下であった（図 8）。

2) 酵素蛋白測定による成績

図 9 に示すように、IDS 酵素蛋白測定値は正常新生児対照群で mean ± SD 120.5 ± 43.4pmol/hr/disk (range 37.0-237.5 pmol/hr/disk) であるのに対して、患者では IDS 活性値と同様に IDS 蛋

白量は重症型、軽症型共に0であり、感度以下であった。

D. 考　察

GSDⅡ、MPSⅠ、およびMPSⅡについて新生児濾紙血液を用いたスクリーニング法を検討し、いずれの疾患についても我々が検討した方法で患者群の活性値は正常対照群と比較して明らかな低値を示しており、患者の判定は容易であった。
また、MPSⅡのスクリーニング法についてはポリクローナル抗体を固相化したマイクロプレートを用いた蛍光基質4-MUによるIDS活性、DELFIA法によるIDS蛋白の測定法も新たに確立した。

E. 結　論

今後、MPSⅡのみならず、GSDⅡ、MPSⅠにも、それぞれの酵素の抗体を固相化し、病因酵素の活性を測定すると共に、DELFIA法により酵素蛋白量を測定する方法を確立して、2つの方法を併用する精度の高い診断法を開発する予定である。そして、これらの方法を用いたハイリスク患者を対象とした3疾患のマルチスクリーニングを行い、これらの疾患を早期診断して、患児の予後を向上する予定である。

F. 参考文献

1) N. A. Chamoles, et al : Hurler-like Phenotype : Enzymatic Diagnosis in Blood Spots on Filter Paper. Clinical Chemistry, 47(12) : 2098-2102, 2002
2) N. A. Chamoles, et al. Glycogen Storage Disease Type Ⅱ : Enzymatic Screening in Dried Blood Spots on Filter Paper. Clinica Chimica Acta, 347 : 97-102, 2004
3) C. J. Dean,et al. Detection of Mucopolysaccharidosis Type Ⅱ by Measurement of Iduronate-2-Sulfatase in Dried Blood Spots and Plasma Samples. Clinical Chemistry, 52(4) : 643-649, 2006

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Kitagawa T, et al : Non-invasive high-risk screening for Fabry disease hemizygotes and heterozygotes. Pediatr Nephrol, 23 : 1461-1471, 2008
2) 石毛信之, 他 : タンデム質量分析計を用いたファブリー病の尿中グロボトリアオシルセラミドの測定について. 日本マス・スクリーニング学会誌, 18(1) : 31-40, 2008
3) 青木菊麿, 他 : 新生児マス・スクリーニングで発見されたフェニルケトン尿症の長期追跡の意義. 日本マス・スクリーニング学会誌, 17(1) : 11-17, 2007
4) Ohashi T, et al : Influence of antibody formation on reduction of globtriaosyceramide(GL-3) in urine from Fabry patients during agalsidase beta therapy. Mol Genet Metab, 92 : 271-273, 2007

2. 学会発表

1) 鈴木　健, 他 : 新生児濾紙血液を用いたムコ多糖症Ⅰ型スクリーニング法の研究. 日本マス・スクリーニング学会誌, 18(2) : 87(183), 2008
2) 鈴木　健, 他 : 新生児濾紙血液を用いた4-metylumbelliferyl-α D-glucopyrano-side法によるグリコーゲン蓄積症Ⅱ型(ポンペ病)スクリーニング法の検討. 日本マス・スクリーニング学会誌, 17(2) : 61, 2008

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

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

ライソゾーム病（ファブリ病含む）に関する研究

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 ガラクト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 ガラクト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行った。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

熊本地区をはじめとする西日本において、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。ろ紙血を用いたα ガラクトシダーゼ活性測定法を用いて、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。

これまでに新生児において約 82,000 名中 16 名の酵素活性の異常低値者が明らかになった。活性低値の新生児と家族に対して、遺伝カウンセリングを行い、α ガラクトシダーゼ遺伝子解析を行っている。

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、簡便で安価なファブリー病の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) Kurome M, Endo F, Nagashima H et al : Production Efficiency and Telomere Length

of the Cloned Pigs Following Serial Somatic Cell Nuclear Transfer. J. Reproduction and Development, 54 : 254-258, 2008

2) Mitsubuchi H, Nakamura K, Endo F et al. Inborn errors of proline metabolism. J Nutr, 138(10) : 2016S-20S, 2008.10

3) Yanai M, Endo F, Yokouchi Y et al : FGF signaling segregates biliary cell- lineage from chick hepatoblasts cooperatively with BMP4 and ECM components in vitro. Dev Dyn, 237 : 1268-83, 2008

平成20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

ムコ多糖症における耳鼻科領域治療の検討

分担研究者：奥山　虎之(国立成育医療センター 臨床検査部)

研究要旨

2006年のムコ多糖症Ⅰ型酵素製剤ラロニダーゼ、2007年のムコ多糖症Ⅱ型酵素製剤イデュルスルファーゼに続き、2008年4月にムコ多糖症Ⅵ型酵素製剤ガルスルファーゼが承認・販売されたことにより、ライソゾーム病酵素製剤の承認状況は欧米と同じ6疾患7種類となった。われわれはムコ多糖症Ⅰ型の酵素補充療法を最長で約3年6ヶ月間行っており、長期効果の中でも特に聴力および閉塞性呼吸障害についての検討を行った。その結果、酵素補充慮法と平行して中耳炎治療や睡眠時無呼吸治療などを組み合わせることにより、症状およびQOLの改善が認められたので報告する。

研究協力者
田中　藤樹(国立成育医療センター・遺伝診療科)
小須賀基通(国立成育医療センター・臨床検査部)
小田　絵里(国立成育医療センター・遺伝診療科)

A. 研究目的

ムコ多糖症Ⅰ型酵素製剤ラロニダーゼは2006年に本邦で承認された。われわれはムコ多糖症Ⅰ型の酵素補充療法を最長で約3年6ヶ月間行っており、長期効果の中でも特に聴力および閉塞性呼吸障害についての検討を行った。

B. 研究方法

国立成育医療センターで治療、検査をしているムコ多糖症Ⅰ型の3症例(症例1:4歳11ヶ月ハーラー症候群男児、症例2:5歳4ヶ月ハーラー症候群女児、症例3:10歳8ヶ月ハーラー・シャイエ症候群女児)においてラロニダーゼ0.58mg/kg(100単位/kg)を毎週点滴投与した。ラロニダーゼ投与期間はそれぞれ症例1:3年4ヶ月、症例2:3年3ヶ月、症例3:2年6ヶ月である。

酵素補充療法の経過期間中に中耳炎治療、聴力検査、睡眠時呼吸モニタリングなどを行い、その経過を観察した。

C. 研究結果

症例1：1歳7ヶ月からラロニダーゼを開始している。聴力は投与前で裸耳 80dB、補聴器装用下65dB と高度難聴を呈し、慢性滲出性中耳炎が持続している状態である。酵素補充療法を継続しつつ、鼓膜チューブを留置した結果、中耳炎が軽快する時も認められるようになり現在裸耳 70dB、補聴器装用下 50dB と軽度の改善を認めている。睡眠時呼吸モニタリングでは投与前で、Desaturation Index(DI)値が5.0回/h、SaO_2 90%以下が0.1%と呼吸状態に問題はなかったが、現在DI値24.0回/h、SaO_2 90%以下15.6%と、重度の呼吸障害を呈している。この間にアデノイドと扁桃腺が肥大してきており、原因のひとつと考えられている。

症例2：2歳1ヶ月からラロニダーゼを開始している。慢性滲出性中耳炎が持続し、鼓膜チューブを留置しているが、聴力は投与前で裸耳 55dB と高度難聴を呈し、中耳炎悪化時には 75dB にまで低下していた。酵素補充療法を開始してから、中耳炎は改善傾向を認め、現在裸耳 45dB(R)/55dB(L)

を維持している。睡眠時呼吸モニタリングでは投与前で、DI 値 6.0 回/h、SaO_2 90%以下 0%と呼吸状態に問題はなかったが、投与開始 2 カ月目には DI 値 24.0 回/h、SaO_2 90%以下 11.2%と増悪しており、アデノイド・扁桃腺摘出術を行った。術後は DI 値 1.8 回/h、SaO_2 90%以下 0%と改善し、その後も良好な状態を維持している。

症例 3：8 歳 2 ヵ月からラロニダーゼを開始している。鼓膜チューブを留置しており、中耳炎はコントロールされていた。聴力は投与前で裸耳 55dB(R)/45dB(L) であったが、現在裸耳 30dB(R)/30dB(L) と良好な状態を維持している。睡眠時呼吸モニタリングでは投与前にすでに DI 値 29.1 回/h、SaO_2 90%以下 35.9%とかなり強い無呼吸を認めており、酵素補充療法を開始するとともに持続的陽圧換気：CPAP の装着とした。CPAP 装着下では DI 値 5.1 回/h、SaO_2 90%以下 0.7%と有意な無呼吸は消失した。その後、酵素補充療法 2 年経過した時点で CPAP 非装着での DI 値 9.5 回/h、SaO_2 90%以下 1.0%となり、CPAP 療法を中止し現在も良好な呼吸状態を維持している。

D. 考　察

酵素補充療法を行うことにより尿中ウロン酸排泄の減少、肝脾腫の縮小、関節可動域の増大が認められるが、中枢神経系、角膜混濁、骨変化、弁膜症には効果が少ないとされている。耳鼻科領域に関しての評価は不明な点が多い。高率に合併する難聴の原因として慢性滲出性中耳炎があり、以前から鼓膜チューブ留置で対処されていたが、その効果は限定的であった。酵素補充療法では中耳炎、鼻炎、上気道炎症状の発症を減少させ得るため、酵素補充療法と鼓膜チューブ留置を組み合わせることにより、反復性の滲出性中耳炎を抑えることができ、結果として難聴の改善に役立つと考えられる。酵素補充療法を早期より開始することにより難聴を防ぐことができれば、言語を中心とした発達遅滞の進行を抑えることが可能であると考える。

また、睡眠時無呼吸に関しても酵素補充療法での有効性がはっきりしていない。症例 2 では酵素補充療法早期でもあり、呼吸障害について早急に改善の必要があったためアデノイド・扁桃腺摘出術を選択した。その後、酵素補充療法により呼吸状態は維持されており、二次治療としての酵素補充療法の有効性が示唆される。症例 3 では CPAP が装着可能な年齢であったことも加味し、保存的に治療を開始した。その結果、酵素補充療法を継続することにより、手術せずに睡眠時無呼吸が改善することができた。年齢的に生理的アデノイド肥大が縮小してくることもあり、自然経過なのか酵素補充療法の効果なのかははっきりしないが、一次治療としての酵素補充療法の有効性の可能性が示唆される一例である。症例 1 は酵素補充療法を 3 年 4 ヵ月間継続した経過中での呼吸増悪であり、乳児期早期から酵素補充療法を開始してもアデノイド、扁桃腺腫大や睡眠時無呼吸については慎重に経過を見ていかねばならない結果となっている。アデノイド、扁桃腺腫大の治療としては、手術療法、CPAP や酸素などの内科的保存療法、酵素補充療法などがあるが、症例に合わせて治療適応を選択しなければならない。また、手術に関しては心臓合併症や麻酔合併症などにも留意しなければならず、その適応は慎重になされなければならない。

酵素補充療法における耳鼻科領域の合併症への有効性に関して、難聴、難治性中耳炎については早期からの複合的な治療介入により発達遅滞の進行を防ぐことが可能であり、睡眠時無呼吸に関しては症例ごとに治療の選択、組み合わせを考慮する必要があるが、局所治療を考慮する前に全身状態の安定を図る上で酵素補充療法を早期から行っていくことは重要と考えられる。

E. 結　論

酵素補充療法における耳鼻科領域の合併症への有効性に関して、難聴、難治性中耳炎については早期からの複合的な治療介入により発達遅滞の進

行を防ぐことが可能であり、睡眠時無呼吸に関しては症例ごとに治療の選択、組み合わせを考慮する必要があるが、局所治療を考慮する前に全身状態の安定を図る上で酵素補充療法を早期から行っていくことは重要と考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 奥山虎之, 田中藤樹, 小須賀基通, 三原喜美恵, 四元淳子:ムコ多糖症に対する酵素補充療法の導入と新生児マス・スクリーニングの可能性. 日本マス・スクリーニング学会誌, 18(1) : 23-28, 2008
2) 田中藤樹 : 先天性糖代謝異常. 肝胆膵 56(1) : 27-34, 2008
3) 田中藤樹, 奥山虎之:ムコ多糖症II型の酵素製剤の承認と治療の実際. 在宅と難病, 14(3) : 49-52, 2008
4) 田中藤樹, 奥山虎之:ムコ多糖症I型の最新治療薬と臨床具体的事例. 在宅と難病, 14(5) : 40-42, 2008

2. 学会発表

学会発表

1) 奥山虎之:酵素補充療法, イソフラボン療法の現状-MPS I・VI. 第12回日本ムコ多糖症研究会, 東京, 2008
2) 小田絵里, 田中藤樹, 右田王介, 岡田美智代, 小須賀基通, 小崎里華, 大澤真木子, 奥山虎之:ろ紙を用いたポンペ病スクリーニング法の検討. 第35回日本マス・スクリーニング学会, 松江, 2008
3) Torayuki Okuyama, Toju Tanaka : ENZYME REPLACEMENT THERAPY FOR MUCOPOLYSACCHARIDOSIS TYPE I IN JAPAN. SOCIETY FOR THE STUDY OF INBORN ERRORS OF METABOLISM ANNUAL SYMPOSIUM, LISBOA, 2008.9.2-5
4) Toju Tanaka, Mahoko Furujo, Tetsuo Kubota, Tohya Ohashi, Akemi Tanaka, Yasuyuki Suzuki, Yoshikatsu Eto, Tadao Orii, Torayuki Okuyama : ERT USING GALSULFASE FOR MAROTEAUX-LAMY SYNDROM IN JAPAN. SOCIETY FOR THE STUDY OF INBORN ERRORS OF METABOLISM ANNUAL SYMPOSIUM, LISBOA, 2008
5) 奥山虎之:保険収載された遺伝病学的検査と遺伝カウンセリング加算. 日本人類遺伝学会第53回大会, 横浜, 2008
6) 田中藤樹, 右田王介, 小田絵里, 岡田美智代, 三原喜美恵, 李 紅蓮, 小須賀基通, 小崎里華, 林 聡, 左合治彦, 奥山虎之 : 先天代謝異常症に対する出生前遺伝カウンセリング. 日本人類遺伝学会 第53回大会, 横浜, 2008
7) Torayuki Okuyama : RECENT CLINICAL PROGRESS IN LSDS : NEW DATA FROM LSD CLINICAL TRIALS AND REGISTRIES, MPS I DISEASE, Japanese case. 11th Annual Asia LSD Symposium. Beijing, 2008
8) 田中藤樹, 田中あけみ, 鈴木康之, 井田博幸, 奥山虎之, 衛藤義勝, 折居忠夫 : Hunter 症候群成人 10 例における酵素補充療法 JET Study の治療成績. 第50回日本先天代謝異常学会総会, 米子, 2008
9) 田中藤樹, 古城真秀子, 小倉和郎, 久保田哲夫, 大橋十也, 田中あけみ, 鈴木康之, 奥山虎之, 衛藤義勝, 折居忠夫 : Maroteaux-Lamy 症候群に対する酵素補充療法〜国内 3 症例の治療例. 第50回日本先天代謝異常学会総会, 米子, 2008
10) 小田絵里, 田中藤樹, 右田王介, 岡田美智代, 小須賀基通, 小崎里華, 大澤真木子, 奥山虎之 : ポンペ病スクリーニング ; 日本人特有の遺伝子多型の影響. 第50回日本先天代謝異常学会総会, 米子, 2008
11) 三原喜美恵, 李 紅蓮, 四元淳子, 右田王介,

小須賀基道, 田中藤樹, 小崎里華, 奥山虎之：オルニチントランスカルバミラーゼ(OTC)欠損症の遺伝カウンセリング. 第50回日本先天代謝異常学会総会, 米子, 2008

12) 小須賀基通, 田中藤樹, 小田絵里, 岡田美智代, 右田王介, 小崎里華, 奥山虎之：ムコ多糖症I型に対する酵素補充療法－長期投与における有効性・安全性の評価－. 第13回日本ライソゾーム病研究会, 東京, 2008

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし