

20093600-2A

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

平成21年度 総括・分担研究年度終了報告書

平成22(2010)年3月

研究代表者

衛 藤 義 勝

(東京慈恵会医科大学遺伝病(ライソゾーム病)研究講座)

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(ファブリ病含む)に関する調査研究班
平成 21 年度総括・分担研究年度終了報告書

平成 22(2010)年 3 月

研究代表者

衛 藤 義 勝

目 次

はしがき	1
研究組織	2
総括研究報告書	5
ライソゾーム病(ファブリー病を含む)に関する調査研究 主任研究者 衛藤 義勝	
付 1 平成 21 年度班会議プログラム	16
分担研究報告書	
I. 病臨床像の把握	
1) ライソゾーム病患者における健康関連 QOL の調査研究	21
坪井 一哉(名古屋セントラル病院血液内科)	
2) ムコ多糖症の患者家族における酵素補充療法に関する意識調査	29
奥山 虎之(国立成育医療センター臨床検査部)	
3) 新生児ファブリー病スクリーニングに関する研究	32
遠藤 文夫(熊本大学大学院生命科学研究部小児科学分野)	
4) 濾紙血液を用いた蛍光的免疫補足酵素活性測定法による GSD II 型(Pompe 病) スクリーニング法の研究	34
北川 照男((財)東京都予防医学協会)	
5) 酵素補充療法中に死亡した 3 例のライソゾーム病患者の検討	38
高柳 正樹(千葉こども病院代謝内分泌科)	
II. 病態の解析	
1) β -ガラクトシダーゼ遺伝子変異解析とケミカルシャペロン療法に関する研究	43
難波 栄二(鳥取大学生命機能研究支援センター)	
2) ハンター症候群患者における酵素補充療法の効果に関する研究	45
芳野 信(久留米大学医学部小児科学教室)	

3) 日本人ムコリピドーシス II/III の遺伝子解析	47
酒井 規夫(大阪大学大学院系医学研究科 小児発達研究講座)	
4) ニーマンピック病 A/B 病の臨床および病態に関する研究	50
高橋 勉(秋田大学大学院医学系研究科医学専攻機能展開医学系小児科学講座)	
5) ファブリー病のバイオマーカーの探索	52
櫻庭 均(明治薬科大学 分析化学教室)	
6) 孤発性パーキンソン病における GBA (Glucocerebrosidase) 遺伝子変異に関する研究	56
辻 省次(東京大学大学院脳神経医学専攻神経内科学)	
7) ペルオキシソーム病に関する診断・病態解明に関する研究	58
下澤 伸行(岐阜大学生命科学総合研究支援センターゲノム研究分野)	
8) ペルオキシソーム膜形成障害の分子機構	61
今中 常雄(富山大学大学院医学薬学研究部分子細胞機能学講座)	
9) サポシン C ノックアウトマウスの作成と表現型解析	65
松田 純子(東海大学・糖鎖科学研究所)	

Ⅲ. 治療法の開発

1) ライソゾーム病に対するシャペロン療法の基礎研究	75
鈴木 義之(国際医療福祉大学)	
2) ニーマン・ピック病 C 型患者の調査研究	78
大野 耕策(鳥取大学医学部 脳神経小児科学)	
3) アガルシダーゼ・アルファとベータの血漿中および末梢リンパ球中の動態 についての研究	81
田中あけみ(大阪市立大学大学院医学研究科 発達小児医学)	
4) ライソゾーム病の遺伝子治療に関する研究	83
島田 隆(日本医科大学生化学・分子生物学)	
5) Sly 病(ムコ多糖症 VII 型)、Krabbe 病を中心としたライソゾーム病の 遺伝子・細胞治療に関する基礎的研究	86
小林 博司(東京慈恵会医科大学 DNA 医学研究所遺伝子治療研究部)	
6) イソフラボンによるムコ多糖症の試験的治療	88
鈴木 康之(岐阜大学医学部 医学教育開発研究センター)	

7) 先天代謝異常症における造血幹細胞移植の後方視的研究と標準的移植法確立

に関する研究 90

加藤 俊一(東海大学医学部 基盤診療学系再生医療科学)

研究成果一覧 95

は し が き

平成 21 年度は本研究班の 3 年目の年となります。ライソゾーム疾患並びにペルオキシゾーム病の病態解明並びにシャペロン治療、細胞治療・遺伝子治療等新しい治療の開発、酵素補充療法の効果並びに問題点に関して研究成果を挙げることが出来ました。又ライソゾーム病モデルマウス、ファブリ病、Sly 病、クラベ病マウスでの iPS 細胞樹立に成功できたことは今後ライソゾーム病の病態解析、並びに治療法の開発に大きく貢献するものと考えられます。本研究班はライソゾーム病の病像調査研究、病態・メカニズムの解析、新規治療法開発、の 3 つの研究の柱で成り立ち、ライソゾーム病全体で多くの成果を挙げることが出来ました。

これも班員ならびに研究協力者の皆様、更にご協力いただきました患者様、ご家族、関係者の方々のお力によるものと深く感謝いたします。本研究がライソゾーム病関連疾患で苦しむ方々やご家族のために少しでもお役に立てることを心から祈念しております。

平成 22 年 3 月吉日

東京慈恵会医科大学遺伝病研究講座
研究代表者 衛藤 義勝

平成 21 年度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)に関する調査研究組織

氏名	所属	職名	分担研究課題
研究代表者 衛藤 義勝	東京慈恵会医科大学 遺伝病(ライソゾーム病)研究講座	教授	総括・新しい治療法の開発
分担研究者 鈴木 義之	国際医療福祉大学	教授	新しい治療法の開発(ケミカルシャペロン法)
芳野 信	久留米大学 医学部 小児科学	教授	バイオマーカーの開発
田中あけみ	大阪市立大学大学院医学研究科 医学部 発達小児医学	准教授	先天代謝異常症における造血幹細胞移植の後方視的調査 研究と標準的移植法確立に関する研究
島田 隆	日本医科大学 生化学・分子生物学講座	教授	新しい治療法の開発(遺伝子治療)
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	講師	病態に関する研究
高橋 勉	秋田大学大学院医学系研究科医学 専攻機能展開医学系小児科学	教授	臨床学的研究
高柳 正樹	千葉県こども病院 代謝科	医療局長	臨床学的研究
大野 耕策	鳥取大学医学部 脳神経小児科学	教授	新しい治療法の開発(ケミカルシャペロン法)
辻 省次	東京大学大学院脳神経医学専攻 神経内科学	教授	病態に関する研究
難波 栄二	鳥取大学 生命機能研究支援センター	教授	新しい治療法の開発(ケミカルシャペロン法)
鈴木 康之	岐阜大学医学部 医学教育開発研究センター	教授	ADL, QOL に関する研究
櫻庭 均	明治薬科大学 分析化学・臨床遺伝学	教授	新しい治療法の開発(酵素補充療法)
北川 照男	(財)東京都予防医学協会	理事長	新しい診断法の開発(マススクリーニング法)
奥山 虎之	国立成育医療センター 臨床検査部	部長	新しい治療法の開発(酵素補充療法)
坪井 一哉	名古屋セントラル病院 血液内科	医長	ADL, QOL に関する研究
松田 純子	東海大学 糖鎖科学研究所	准教授	新しい治療法の開発(骨髄移植)
加藤 俊一	東海大学 基盤診療学系再生医療科学	教授	先天代謝異常症における造血幹細胞移植の後方視的調査 研究と標準的移植法確立に関する研究
遠藤 文夫	熊本大学大学院生命科学研究所 小児科学	教授	新しい診断法の開発(マススクリーニング法)
下澤 伸行	岐阜大学医学部生命科学総合研究 支援センターゲノム研究分野	教授	ライソゾーム病、ペルオキシゾーム病の ADL, QOL に関 する研究
今中 常雄	富山大学大学院医学薬学研究部 分子細胞生物学	教授	病態に関する研究(ペルオキシゾーム病に関する)
小林 博司	東京慈恵会医科大学 DNA 医学研究所	講師	新しい治療法の開発(遺伝子治療)

総括研究報告書

ライソゾーム病(ファブリー病含む)に関する調査研究

研究代表者

衛藤 義勝(東京慈恵会医科大学遺伝病 [ライソゾーム病] 研究講座)

研究要旨

本年度はライソゾーム病(Lysosomal storage Disease, LSD) 調査研究の第三年目(最終年度)の報告として、従来掲げてきた三つの柱、Ⅰ. 臨床像の把握、Ⅱ. 病態の解析、Ⅲ. 治療法の開発、に沿って三年目の総仕上げと更なる研究推進に向けた報告が多数為された。

Ⅰ. LSD 全国症例数、QOL 評価、酵素補充など現行治療の評価、スクリーニング開発(ファブリー病、ポンペ病)、自然歴調査(GM1 ガングリオシドーシス、ムコリピドーシスⅡ/Ⅲ型)

Ⅱ. ケミカルシャペロン効果検討、ゴーシェ病骨病変の検討、ムコリピドーシスの遺伝子解析、ニーマンピック A/B 病態、ファブリー病の早期診断治療開発、パーキンソン病における GBA(ゴーシェ病) 遺伝子変異、ペルオキシゾーム病病態、サポシン C 欠損症モデルマウス作製

Ⅲ. 経口シャペロン治療薬開発、ニーマンピック C に対する脳内グリオシス抑制治療、ファブリー病酵素補充における血中酵素動態解析、MLD、MPS VII、クラッペ病に対する遺伝子治療、イソフラボンの臨床効果、造血幹細胞移植研究

以上のようなタイトルで三つの柱に沿って総合的な研究報告が為され、それぞれ以下本文の示す成果を上げて居り、LSD の予後改善に向け今後も大いなる期待が持てる状況であり、研究の更なる発展、継続が重要と思われる。

A. 研究目的

本研究の目的はライソゾーム病(LSD)患者の生命予後、activity of daily life(ADL)、quality of life(QOL)を改善させることである。そのために本研究では3本の柱として(Ⅰ)現在のLSD患者の現状および実態(ADL、QOLおよび現行の治療効果を含めたもの)を調査、把握し、更に(Ⅱ)LSDの病態を解析しその理解を深め、(Ⅲ)これらを基に早期診断法、新規治療法を開発していくことに重点を置いて研究を推進していく。

B. 研究方法

Ⅰ. 臨床像の把握

1. 症例数、ADL、QOLに関する調査：ゴーシェ

病、ファブリー病、ポンペ病、ムコ多糖症の患者会に所属されている患者または家族の方で同意の得られた症例を対象に健康関連QOLを測定する包括的尺度、疾患特異的尺度を用いて総合的にQOL評価を行なった。

2. 現行の治療法の評価：ムコ多糖症の患者家族における酵素補充療法に関する意識調査を行なった。国立成育医療センターで酵素補充療法を継続的に実施している患者家族にインタビューを行い、またムコ多糖症親の会に所属する患者家族に対して、アンケート調査を行い、酵素補充療法についてのどのようにとらえているかを調査した。・ファブリー病に対する酵素補充療法で用いるアガルシダーゼアルファ

とベータに関する薬物動態について解析調査を行なった。・酵素治療中に死亡した3例のライゾゾーム病患者(ゴーシェ病1例、ハンター症候群2例)の検討を詳細に検討した。・Pompe病の酵素補充療法中のアレルギー反応対策の研究として12週令マウスに抗CD3抗体を投与し、経時的に抗体価を測定し効果を調査した。更に酵素療法補充中のファブリー病患者血清で抗体陽性・陰性のものを其々加えてファブリー病由来の線維芽細胞を培養、また同じ血清をファブリー病モデルマウス(8週令)に尾静脈注射し、酵素補充における抗体産生の影響を調査した。

3. 診断法(スクリーニング)の開発: ファブリー病、ポンペ病の濾紙血液を用いたスクリーニング方法を検討し実態を調査した。ファブリー病では 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、西日本において新生児におけるスクリーニングのパイロットスタディを行った。ポンペ病では蛍光抗体法に加え、抗 A α G 抗体をマイクロプレートウェルに固相化し、これにサンプル中の酵素を捕捉させた後に A α G 活性を測定する方法を開発した。
4. 自然歴: 新生児聴覚異常スクリーニングで発見された GM1 ガングリオシドーシス症例の臨床経過を調査、さらに5年前の当研究班の全国調査により把握されたアイセル病、ムコリピドーシスIII型症例についてその生死、ADL、気管切開・人工呼吸器管理の有無などをアンケートにて再調査した。

II. 病態解析

1. ベータガラクトシダーゼ酵素に対するケミカルシャペロン(NOEV; N-octyl-4-epi-beta-valienamine)の開発: ベータガラクトシダーゼ欠損症患者末梢血または皮膚線維芽細胞からゲノムDNAを抽出し、シークエンス解析を行った。ケミカルシャペロン効果の検討は、ヒ

ト患者由来培養皮膚線維芽細胞または変異ヒトベータガラクトシダーゼ cDNA 発現マウス皮膚線維芽細胞の培養液に NOEV を添加後、細胞抽出液を調整し、酵素活性測定により行った。酵素活性測定は4-MU人工基質を用いた。

2. 1) ゴーシェ病の骨病変の病態解明: 血中サイトカインなどおよび血液、尿中の骨代謝マーカーなどの値をそれぞれの方法で測定し、単変量解析を行った。2) ムコリピドーシスIII型患者の不随意運動の病態解明: 神経学的診察、表面筋電図、脳および脊髄画像を解析した。
3. ムコリピドーシス(ML)の病態解析: (I)日本人 ML-II型およびIII型患者から採取したリンパ球および皮膚線維芽細胞を用い、責任遺伝子である *GNPTAB* 遺伝子変異を解析した。同時に多型(SNPs)の解析を行い、これらの変異が日本人に特異的な創始者効果(Founder Effect)があるかどうかの検討を行った。次に臨床型と遺伝子変異の型を比較する事によって genotype phenotype correlation について検討した。(II)次に ML-II、ML-IIIにおけるオートファジーの機能を解析するために、培養皮膚線維芽細胞を用いて、Cathepsin B/D の活性、ユビキチン化タンパク、オートファジーのマーカーをウェスタンブロットおよび免疫蛍光染色において評価した。ミトコンドリア機能を形態および活性染色で評価した。オートファジーの阻害剤である 3-methyladenine (3-MA)を投与してミトコンドリア機能の変化を観察した。
4. ニーマンピック病 A/B 型の病態に関する研究: NP-A/B の基本病態であるスフィンゴミエリン(SM)代謝異常は、SM および SM と親和性の強いコレステロール(Ch)の細胞内輸送障害を引起す。疾患細胞を用いて SM および Ch の細胞内輸送に関わる新規蛋白との関係を調べた。1) NP-A/B 培養皮膚線維芽細胞を用いて Ch 輸送に関与する ABC 蛋白(ABCA1、ABCA3、ABCA7、ABCG1)の mRNA および

- 蛋白発現レベルを調べた。2) ABCA1 および ABCG1 の細胞内発現レベルを調節する LXR アゴニスト T0901317 の NP-A/B 細胞蓄積 SM および Ch への影響を調べた。3) NP-A/B 細胞において SM 合成系酵素インヒビターの蓄積 SM、Ch への影響を調べた。4) NP-A/B 細胞においてエンドゾーム内 Ch 排泄に関与する NPC1 に関与する薬剤の影響を調べた。細胞内 SM は SM 結合蛋白ライセニンを使用した免疫染色、Ch はフィリピン染色を用いた免疫染色を用いて解析した。
5. ファブリー病(α -ガラクトシダーゼ欠損症)の早期診断および治療法の策定に役立つ方法の開発: 1) タイタープレートを用いた血清中の α -ガラクトシダーゼ (GLA) 活性測定: 10 名のファブリー病ヘミ接合体男性、27 名のファブリー病ヘテロ接合体女性および 10 名の対照者由来の血清 10 μ l を試料として、それと人工蛍光基質との酵素反応を 96 穴のタイタープレートで 1 時間行わせ、酵素反応によって生じた蛍光を検出することにより、各試料中の GLA 活性を測定した。2) MUSTag 法による乾燥濾紙血中の GLA 蛋白質量の測定: 2 種類の抗 GLA 抗体(そのうちの 1 種類の抗体にはオリゴ DNA を付着させた)を用いた免疫固相法と抗 GLA 抗体に付けたオリゴ DNA を Real-Time PCR で増幅定量する方法とを組み合わせ、MUSTag 法を利用した GLA 蛋白質の測定法を開発した。4 名のファブリー病ヘミ接合体男性と 10 名の対照者由来の乾燥濾紙血を試料とし、MUSTag 法で血中 GLA 蛋白質を定量した。3) 血漿中のリゾグロボトリアオシルセラミド (Lyso-Gb3) の測定。8 名のファブリー病ヘミ接合体男性、8 名のヘテロ接合体女性(臨床症状を伴うもの 5 例と無症状のもの 3 例を含む)および 6 名の対照者由来の血漿 100 μ l を試料として、脂質画分を抽出した後、高速液体クロマトグラフィー法で血漿中の Lyso-Gb3 を定量した。
 6. パーキンソン病の発症リスクとしてのゴーシエ病の変異解析研究: 日本人パーキンソン病患者群と対照群に対して GBA 遺伝子の塩基配列決定を行い、全ての変異を網羅的に同定して、関連を検証した。国際多施設共同研究を行い各施設のデータをメタ解析した。なお、研究対象者に対する書面によるインフォームドコンセントのうえ、検体は匿名化して解析した。
 7. ペルオキシソーム病に関する診断・病態解明に関する研究: ペルオキシソーム病の診断システムは臨床症状よりペルオキシソーム病が疑われた患者血清を用いて、ガスクロマトグラフィー質量分析装置 (GC-MS) により極長鎖脂肪酸、フィタン酸、プラスマローゲンなどペルオキシソーム代謝産物を測定し、異常を認められた患者については皮膚生検による培養線維芽細胞の樹立から細胞、タンパク、遺伝子レベルの解析を経て、確定診断を行う。その際に同意を得られた患者試料については本症の病態解明から治療法の開発研究を進めて行く。その 1 つとしてペルオキシソーム形成異常症と対照細胞から全転写産物と代謝産物をマイクロアレイおよび GC-MS+LC-タンデムマスにて網羅的に解析することにより、ペルオキシソームの新たな機能や生活習慣病に関連する脂質代謝異常症や神経変性疾患における疾患感受性遺伝子としての可能性を検討する。一方で、発展途上にある本疾患群の国内医療機関への更なる周知を目的に、ペルオキシソーム病に属する各疾患概要から診断フローチャート等の医療情報を掲載した「ペルオキシソーム病診断パンフレット」を作成して全国に配布している。
 8. ペルオキシソーム病におけるペルキシソーム膜形成障害の分子機構: His-tag 等を導入したヒト Pex3p の細胞質ドメインならびに Pex19p の野生型、部位特異的変異型を大腸菌に発現させ、精製した。Pex3p と Pex19p との相互作用は、ゲル濾過、トリプトファンの蛍光スペクトル、表面プラズモン共鳴、pull down assay 等

により解析した。Pex3p ならびに Pex19p によるペルオキシソーム形成能は、それぞれの変異をもつ CHO 細胞や Zellweger syndrome 患者線維芽細胞に、野性型もしくは変異型 PEX3、PEX19 遺伝子を導入し、ペルオキシソームの形成をペルオキシソーム膜タンパク質 PMP70 に対する抗体を用いた蛍光抗体法で解析した。

9. サポシン C 欠損症モデルマウスの作製と解析：サポシン C は主として glucosylceramide (GlcCer) を分解する GCCase を活性化し、ヒトのサポシン C 欠損症は GCCase 欠損症であるゴーシェ病様の病像を呈する。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、ヒトのサポシン C 欠損症で報告されている遺伝子変異(サポシン C 領域の 5 番目のシステインのアミノ酸置換)を mimic したアミノ酸置換(5 番目のシステインをセリンに置換する遺伝子変異(C384S))を導入し、サポシン C 特異的欠損マウス(Sap-C^{-/-})を作成した。さらに、Sap-C^{-/-}をプロサポシンノックアウトヘテロマウス(Psap^{+/-})と交配し、Psap の一方の allele が null で他方がサポシン C 領域の missense mutation(C384S)を持つ Psap^{+/-}C384S マウスを作成した。

Ⅲ. 治療法の開発

1. ライソゾーム病の新しい経口薬(シャペロン)治療の開発：新規に開発した β -ガラクトシダーゼシャペロン NOEV(N-アセチル-4-エピ- β -バリエナミン)の GM1-ガングリオシドーシスモデル動物へのシャペロン効果を調べ、その分子機構を解析した。同時に β -グルコシダーゼシャペロン NOV(N-アセチル- β -バリエナミン)についても検討した。化合物の構造解析、酵素と阻害剤のドッキング・複合体生成、pH 条件における結合自由エネルギー計算はそれぞれ専用のソフトウェアを用いた。
2. ニーマン・ピック病 C 型に対する IL-6 の制御

による脳内グリオシスの抑制による実験的治療、ゴーシェ病に対する薬理的シャペロン療法の開発：ニーマン・ピック病 C 型線維芽細胞は大量の IL-6、IL-8、INF- β を産生しており、症状の重症な患者でその産生量が多いことを明らかにしていた。このシグナルの異常が脳内のプルキンエ細胞などに STAT 系シグナルの恒常的活性化をおこしていることを明らかにし、その背景に Toll-like 受容体 4 のリゾーム内への蓄積とそのシグナルの恒常的活性化がおこっていることを明らかにした。Toll-like 受容体 4 と IL-6 ノックアウトをニーマン・ピック病 C 型モデルマウスに導入し、その効果を検討した。またゴーシェ病の変異酵素の中で F213I、N188S、G202R、N370S の酵素活性を増強させる N-octyl- β -valienamine (NOV)を見出していた。NOV で活性化される変異をさらにスクリーニングするとともに新しい薬理的シャペロンのスクリーニングを行った。

3. ファブリー病酵素補充における酵素の血中動態：アガルシダーゼ・アルファとベータ製剤をそれぞれ同一蛋白量(0.2mg/kg)にして IgG 抗体陰性のファブリー病男性患者に投与し、血漿中および末梢リンパ球中の α -ガラクトシダーゼ活性を経時的に測定した。
4. MLD の遺伝子治療：AAV1-GFP、AAV1-ASA ベクターを、C57BL6 或いは ASA ノックアウトマウスの後頭蓋窩からの髄腔内投与を行ない 8 週後に解析した。ASA 活性は ELISA 法で、スルファチドの定量は TLC 法で行った。
5. MPS、Krabbe 病の遺伝子治療：Lentivirus ベクターを各モデルマウスの新生児期に静脈注射を行い、臨床効果、酵素活性(蛍光基質法)、遺伝子発現(real time PCR)を確認した。
6. イソフラボンの臨床効果：主治医に同意を得た MPS 患者にイソフラボンを無償供与しアンケート調査でその効果を確認した。
7. 先天代謝異常症における造血幹細胞移植の後

方視的研究と標準的移植法確立:東海大学において1986年~2008年に造血幹細胞移植が施行された先天性代謝異常疾患の患者53例について、その臨床的特徴、移植方法、移植結果、治療効果を検討した。

C. 研究結果および考察

I. 臨床像の把握

1. 症例数、ADL, QOLに関する調査:ライソゾーム病患者(平成17年度はポンペ病患者、平成18年度はゴーシェ病患者、19年度はファブリー病患者、平成20度はムコ多糖症患者)を対象にした健康関連QOLの臨床疫学的調査を行った。解析の結果として、各疾患における身体的健康度、精神的健康度は、国民標準値に比べ、同等もしくは低値を示していた。比較的、精神的健康度は保たれていたものの、各疾患すべてにおいて身体的健康度は国民標準値を下回る傾向が認められた。身体的健康度の低下の要因としては、原疾患による臓器の障害が健康度の低下・QOLの低下に影響を及ぼしていると考えられた。また、精神的健康度に関しては国民標準値と同等であったものの、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。ライソゾーム病は、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、健康度の低下を来していると考えられた。
2. 現行の治療法の評価:・ムコ多糖症の患者家族における酵素補充療法に関する意識調査ではムコ多糖症の主要症状には、骨の形成不全、知的障害、退行などの中枢神経障害があるが、酵素補充療法はこれらの症状に対しては、あまり効果が期待できない。これに加えて、他のライ

ゾーム病とは異なり毎週の投与が必要である。それにもかかわらず、ほとんどの患者家族が酵素補充療法を積極的にとらえていた。しかし、毎週の投与における家族機能の消耗も無視できない問題であり、さらに中枢神経系に有効な治療法の開発を希望する意見が多かった。・またファブリー病に対する酵素補充療法で用いるアガルシダーゼアルファとベータに関する薬物動態についてはアガルシダーゼ・アルファ、ベータともに、血漿中の酵素活性のピーク値は、投与速度に比例し、総投与量には関係なかった。これに対し、リンパ球中の酵素活性のピーク値は、総投与量に比例し、投与速度とは関係がなかった。・酵素補充療法中に死亡した例の検討では、1例のファブリー病患者は現疾患の呼吸障害の増悪にて死亡した。もう一例は多臓器不全での死亡であった。肝のネクロプシーでは病因は明確にはならなかった。ライソゾーム病患者におけるサイトカインなどの動態の検討が必要であると考えられた。1例のゴーシェ病患者は突然死であった。いくつかの臓器のネクロプシーでは異常所見を得られなかった。・またPompe病における酵素補充療法での抗体産生(アレルギー反応)は抗CD3抗体を投与することで免疫寛容に誘導できることがモデルマウス実験で確認された。更に酵素療法補充中のファブリー病患者血清を加えてファブリー病由来の線維芽細胞を培養した場合、抗体陽性の血清で培養した群は抗体陰性の血清で培養した群に比べて優位に酵素活性の発現が低かった。更に同じ血清をファブリー病モデルマウス(8週令)に尾静脈注射したところ、各臓器での酵素活性の発現が抗体陰性の血清を注射した群で有意に低かった。以上より酵素補充療法での抗体価は臨床効果に影響すると考えられた。

3. 診断法(スクリーニング)の開発:

- 1) ファブリー病(FD)スクリーニング
グループ A(α ガラクトシダーゼ(GLA)値とGL-3値が何れもcut-off値超え)の女性27例

のうち 26 例は FD ヘテロ接合体(古典型 23 例、心型異型症 2 例、腎型異型症 1 例)で、1 例は正常であった。グループ B (GLA 値と GL-3 値がどちらかが cut-off 値超え)の女性 15 例のうち 10 例は FD ヘテロ接合体(古典型 6 例、心型異型症 4 例)で、5 例は正常であった。グループ C (GLA 値と GL-3 値が何れも cut-off 値を超えていない)の女性 7 例のうち 6 例は正常で、1 例が古典型ヘテロ接合体であった。また熊本地区をはじめとする西日本において、ファブリー病の新生児におけるスクリーニングのパイロットスタディを行い、これまでに新生児において約 182,000 名中 33 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た。その中で遺伝子異常を認めたものが 26 名であった。特に古典型ファブリー病に認められる変異は 4 名の男児に認められた。そのことから、ファブリー病のわが国における頻度は、男性の約 5,700 名に 1 名、古典型ファブリー病の頻度は、男性の約 23,000 名に 1 名であると推定された。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。

2) Pompe 病スクリーニング

従来の方法(Chamolés ら)と蛍光的免疫捕捉測定法を用いた同一検体の測定成績は、いずれの方法でも Pompe 病患者 5 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。

3) MPS I 型スクリーニング

MPS I スクリーニング成績は、正常対照群 42 例では mean \pm SD 139.2 \pm 34.1pmol/hr/mL (range 172.4-233.5pmol/hr/mL) の範囲にあるのに対して、患者群 7 例では mean \pm SD

7.8 \pm 3.8pmol/hr/mL(range 3.3-14.0pmol/hr/mL)と著しく低値を示し、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ったが、両者の測定値に差はみられなかった。

4) MPS II 型スクリーニング

以下の両者はいずれも有効と考えられた：(1) 蛍光的免疫捕捉法による iduronate-2-sulfatase (IDS) 活性の測定成績 IDS 活性測定値は、新生児対照群 90 例で mean \pm SD 158.2 \pm 54.1pmol/hr/L(range 98.6-301.0 μ mol/hr/L)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。(2) 酵素蛋白測定による成績 DELFIA®を用いた酵素蛋白測定値は新生児対照群で mean \pm SD 125.2 \pm 43.4 μ mol/hr/L (range 37.0-237.5 pmol/hr/disk)であるのに対して、患者では活性と同様に重症型、軽症型共に 0 であり、感度以下であった。

4. 自然歴：新生児聴覚異常スクリーニングで発見された GM1 ガングリオシドーシス症例の臨床経過を調査では、現在の新生児聴覚異常スクリーニングでは小児科医は全く関与していない。今後このスクリーニングに小児科医を積極的に関与させることで、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。さらに 5 年前の当研究班の全国調査により把握されたアイセル病、ムコリピドーシス III 型症例についてその生死、ADL、気管切開・人工呼吸器管理の有無などをアンケートにて再調査した。新規の症例を加えて作成したアイセル病の生存曲線では、10 年生存率は約 55%であった。ムコリピドーシス III 型には死亡症例はなかった。多くのアイセル病症例では 5 年間で ADL は悪化している。ADL は早期から非常に悪い群と、年齢依存性に悪化していく群とに分けられた。QOL を保って長期生存する

ためには気管切開、在宅人工呼吸器療法が必須であると考えられた。

II. 病態解析

1. ベータガラクトシダーゼ酵素に対するケミカルシャペロン (NOEV ; N-octyl-4-epi-beta-valienamine) の開発 : 11 人のベータガラクトシダーゼ欠損症患者について遺伝子変異解析を行い、新規変異型 (L146del, G190D, W92ter) を含む変異型を同定した。また、患者皮膚線維芽細胞を用いた解析により、新規変異 G190D について NOEV による有意なケミカルシャペロン効果を認めた。マウス細胞発現実験系を用いた解析の結果、48 種類の変異ベータガラクトシダーゼのうち 14 種類の変異型で NOEV の効果を認めた。以前に行った 40 種類の変異型についての結果とあわせ、88 種類中 22 種類 (25%) の変異型で NOEV が有効であることが分かった。また、患者変異型リストを検索した結果、NOEV はベータガラクトシダーゼ欠損症患者の 30~40% に適応できる可能性があることが分かった。
2. 1) ゴーシェ病の骨病変の病態説明 : 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。2) ムコリピドーシス III 型患者の不随意運動の病態説明 : ムコリピドーシス III 型成人患者で不随意運動を認めた。筋電図所見上、振戦が主体と考えられた。頭頸部画像上ではこの不随意運動の責任病巣と思われる特定部分の異常所見を認めなかったが、頸髄の圧迫所見と脊髄後角の高信号域を認めた。本症は不随意運動の原因疾患に追加すべきと考えられる。
3. ムコリピドーシス (ML) の病態解析 : (I) 日本人 ML-II 型および III 型患者における遺伝子変

異解析日本人 ML-II 型患者 25 名および III 型患者 15 名の *GNPTAB* 遺伝子変異解析を行った。40 名 80 アリルにおいて、のべ 73 個の変異が同定された。うち新規の変異が 14 種類であった。(欠失 5 種類、挿入 3 種類、塩基置換 4 種類、挿入+塩基置換 1 種類、エクソン重複 1 種類) 日本人における変異は停止コドン、frame shift が大半である事が分かった。なかでも p.R1189X 変異はアリル頻度で 41% に及ぶと考えられ、日本人に最も多い変異と考えられた。p.F374L はアリル頻度が 10% で、軽症型の ML-III に見いだされたため、片方でもこの変異をもつ場合に表現型が軽症となると考えられた。exon2 の duplication 変異は 2 つのアリル間におけるゲノムレベルでの組み替えによって起こったと考えられる特殊な変異であり、アリル頻度も 7.5% と日本人に比較的多く見つかる新規変異であった。これら 3 種類の変異については簡便なスクリーニング方法を確立した。ML-II、ML-III の分類と症状の関係では、立位、独歩、会話は ML-II で著しく障害されていた。一方、心雑音、鼠径ヘルニア、肝脾腫は ML-II と ML-III で差がなかった。ある種の変異には genotype phenotype correlation が認められ、SNPs の解析では 2 つの変異において Founder Effect が示唆された。(II) ML-II、ML-III 皮膚線維芽細胞におけるオートファジーの解析 ML 細胞においては CathepsinB/D の低下が確認され、また、ユビキチン化された基質が蓄積していた。オートファゴソームの膜に局在する LC3-II 蛋白は著明に増加しており(ウェスタンブロット)、MDC 染色陽性で、Lamp-2 と共局在する LC3 陽性の小胞(オートライゾーム)が多数細胞質内に蓄積していた(免疫蛍光染色)。ミトコンドリアは細く断片化しており、JC-1 染色では膜電位が低下していたが、3-MA の 16 時間の投与によりオートファジーの誘導を阻害する事でミトコンドリアの形態は著明に改善を認

め、膜電位も回復を認めた。ライソゾーム病ではオートファゴソームとライソゾームの融合が障害されていると言われているが、MLにおいては融合後の分解が障害されているためにオートライソゾームのクリアランスが低下していると考えられた。また、オートファジー分解経路の障害による異常ミトコンドリアの二次的な蓄積のみならず、正常ミトコンドリアもオートライソゾームにより直接障害されている可能性が示された。オートファジーを薬剤で調整する事でミトコンドリアの一時的な回復を確認した事は、今後治療法の開発においても興味深い知見である。

4. ニーマンピック病 A/B 型の病態に関する研究：1) NP-A/B 細胞において ABCA1 および ABCG1 の発現低下が確認された。特に ABCG1 に関し蛋白レベルでの低下が確認された。ABCG1 は細胞から SM や Ch の細胞外排出に関与する。したがって疾患特徴的な泡沫細胞形成を説明する病態かも知れない。2) NP-A/B 細胞に対して LXR アゴニスト T0901317 を用いると ABCG1 の蛋白発現量の上昇が観察された。蓄積 SM および Ch の減少も観察された。3) SM 細胞内合成系に関与する酵素 SPT 抑制薬 myriocin、SMS 抑制剤 D609 のエンドゾーム蓄積 SM、Ch への影響を調べたが明らかでなかった。また、エンドゾームから Ch の細胞内輸送を調節する NPC1 を調節する薬剤 forskolin、thapsigargin も同様に明らかな影響を示さなかった。SM に関しては形質膜からエンドゾームへの経路に関与する薬剤の影響を調べるのが今後の課題である。
5. ファブリー病 (α -ガラクトシダーゼ欠損症) の早期診断および治療法の策定に役立つ方法の開発：1) タイタープレート法による血中 α ガラクトシダーゼ (GLA) 活性測定本法による血清中 GLA 活性の測定値は、ファブリー病ヘミ接合体男性における値と対照者の値との間には明らかな差が認められた。一部タイタープ

レート法での測定値は、従来法での測定値に比べてやや低かった(約 50%) が、よく相関しており、ファブリー病の診断法として十分に使用可能と考えられた。本法は、その簡便性から、腎や心疾患を伴う患者群からファブリー病男性患者を見つけるためのハイリスク・スクリーニングに利用出来ると考えられた。

2) MUSTag 法による血中 GLA 蛋白質の定量 今回測定したファブリー病患者群と対照とを比較すると、前者で明らかな血中 GLA の減量が認められた。一般に、当該酵素蛋白質が欠損した患者に対して酵素補充療法を行うと、酵素に対する抗体が出来、アレルギー反応などの有害副反応を生じ易いことが知られている。

MUSTag 法により、微量の血液試料で GLA の量が測定出来れば、その結果により、酵素補充療法を行う際にアレルギー反応の発生を予測して予防処置をとるなど適切な治療法の策定にも利用出来ると期待される。3) 血中 Lyso-Gb3 の測定 対照者では、全例、血中 Lyso-Gb3 の値が 2nmol/l 以下であったのに対して、ファブリー病ヘミ接合体男性およびファブリー病ヘテロ接合体女性では、それぞれ、平均 160nmol/l (範囲 58~403) および平均 18nmol/l (範囲 9~35) であった。ファブリー病男性患者においては、血中 Lyso-Gb3 の著明な増加が認められた。また、ファブリー病ヘテロ接合体女性においては、臨床症状の有無を問わず全例で血中 Lyso-Gb3 の増加がみられた。これらの結果から、本法がファブリー病の診断補助に役立つ可能性があると考えられた。また、Lyso-Gb3 は血管増殖作用を持ち、ファブリー病と密接に関係することがすでに明らかにされており、本症による血中 Lyso-Gb3 測定は、ファブリー病の病態把握にも有用と思われる。

6. パーキンソン病の発症リスクとしてのゴーシェ病の変異解析研究：日本人サンプルでは GBA 遺伝子変異のキャリアはパーキンソン病の 10%弱に認められ、オッズ比 28 倍の強い危

陰因子であった。キャリアでは発症年齢が若年化し、認知症の頻度が多かった。また家族性パーキンソン病の一部にも関与していた。メタ解析による検証でも、GBA 遺伝子変異はパーキンソン病と有意に関連した。

7. ペルオキシソーム病に関する診断・病態解明に関する研究：平成 19-21 年の 3 年間に全国の医療機関より依頼された約 240 例に及ぶ血清の脂肪酸分析を行い、80 例のペルオキシソーム病患者または保因者を診断している。さらに診断した患者の主治医に対してパンフレット、ホームページも含めて疾患の治療情報や予後、国内患者の状況を個人情報に留意して情報提供を行っている。また国際貢献としてサウジアラビア国立病院とペルオキシソーム病患者の診断協力に関する協定を締結し、20-21 年度にアラブ地域において副腎白質ジストロフィーを除いた 11 例のペルオキシソーム病患者の確定診断を行っている。患者細胞を用いたペルオキシソーム代謝機能の解明では温度感受性を有する遺伝子型の異なる 6 種類のペルオキシソーム形成異常症患者細胞に 2 種類の対照細胞において培養温度を変えて得られた RNA を用いて Gene chip 解析を行い、8 ペア 16 検体からなる転写産物の網羅的データを作成した。今後、このデータをもとに広く代謝病の病態に関わる遺伝子群におけるペルオキシソームの関与を検討していく。
8. ペルオキシソーム病におけるペルキシソーム膜形成障害の分子機構：リコンビナント Pex3p と Pex19p は単量体として存在し、両者は 1 : 1 の複合体を形成した。Pex19p 存在下での Pex3p のトリプトファン蛍光(340nm)の blue shift、GSP-Pex19p との pull down assay 等より、Pex3p 中の Trp-104 が Pex19p との結合に重要であることが示唆された。一方、Pex19p の Pex3p との相互作用には、pull down assay 等により Pex19p の N 末端から 44 アミノ酸残基が関与することが示唆された。

この配列中の特徴あるドメイン構造より各種の変異型 Pex19p を作製し pull down assay を行った結果、Leu-21、Leu-22、Phe-29 が Pex3p との結合に重要であることが示唆された。さらに Pex19p を欠損した Zellweger syndrome 患者線維芽細胞に野生型もしくは変異型 pex19p(L21A)、Pex19p(L22A)、Pex19p(W29A)を発現させると、野生型ではペルオキシソームが形成されたが、変異型では形成されなかった。よって、Pex19p N 末端の疎水性アミノ酸の重要性が示唆された。なお患者線維芽細胞では Pex19p の N 末端から 255 番目の Met が Asn に変異し、続いて 24 アミノ酸が変異し終止コドンとなっている。大腸菌で発現した本変異体は Pex3p との結合能を有するので、患者線維芽細胞内での変異型 Pex19p の分解がペルオキシソーム形成異常の原因であると推定された。

9. サポシン C 欠損症モデルマウスの作製と解析：本研究で、新たにサポシン C ノックアウトマウス(Sap-C^{-/-}および Psap^{-7C384S})の作成に成功し、Sap-C^{-/-}および Psap^{-7C384S}マウスの中樞神経系では特定の神経細胞が選択的に細胞死に至り、遅発性の神経変性疾患を発症することを明らかにした。ヒトのサポシン C 欠損症は亜急性神経型のゴーシェ病類似の病型を呈することから、当初、サポシン C ノックアウトマウスは、神経型ゴーシェ病の疾患モデルマウスとなることを予想したが、サポシン C ノックアウトマウスでは、GCCase の基質である GlcCer や GlcSph の蓄積を認めず、ヒトとは異なる表現型し、神経型ゴーシェ病の典型的な疾患モデルマウスにはならなかった。しかしながらサポシン C ノックアウトマウスでは特定の神経細胞が選択的に細胞死に至ったことから、その神経細胞死の原因は GlcCer、GlcSph の蓄積とは別の原因、たとえば、サポシン C 自体の機能の欠損による可能性が示唆された。今後はその脳病態の分子メカニズムの

解明が必要である。

III. 治療開発

1. ライソゾーム病の新しい経口薬(シャペロン)治療の開発:シミュレーションによる結合自由エネルギーを計算しNOEV、NOVともにpH5の条件でpH7より結合強度が低下する(自由エネルギーが上昇する)ことが確認された。またpHによるNOVについて、配座の変化と酵素との水素結合の変化が観察された。配座は、pH7においてNOVが活性ポケットにより深く入るように変化していた。
2. ニーマン・ピック病C型に対するIL-6の制御による脳内グリオシスの抑制による実験的治療、ゴーシェ病に対する薬理的シャペロン療法の開発:ニーマン・ピック病C型:モデルマウスへToll-like受容体4のノックアウトを導入したがマウスの寿命は変化なかった。一方、IL-6ノックアウトを導入したマウスでは、寿命が2週間延長し、脳の反応性グリオシスが抑制された。このことはニーマン・ピック病C型では細菌内毒素によるシグナルが活性化し、IL-6、IL-8、INF- β 、MAPKの恒常的活性化を引き起こし、これらが脳内の炎症やtauの過剰リン酸化を引き起こしている可能性が示唆され、このシグナルの抑制が延命効果と脳内グリオシスの抑制につながることを明らかにした。ゴーシェ病:NOVで活性化される新しい変異としてT369M、R120Wを見出した。また新たな薬理的シャペロンとして二環系ノジリマイシンを見出した。
3. ファブリー病酵素補充における酵素の血中動態:ベータ製剤はアルファ製剤よりもリンパ球への取り込みが多かった。これは、ベータ製剤のほうがマンノース6リン酸の付加量が多いためであろうと考えられる。しかし、細胞表面のマンノース6リン酸受容体の分布には臓器差があり、リンパ球への取り込みは、主な罹患臓器である心臓や腎臓への取り込みに一致するものではない。他方、腎臓のタコ足細胞など血流の届きにくい細胞への移行は、酵素の投与量だけでなく、血漿中での半減期にも影響されることが推測されている。投与速度を変えることによって、罹患臓器への移行効率を良くすることができる可能性がある。
4. MLDの遺伝子治療:GFPの発現は脳室上衣細胞、脈絡叢、嗅球、視床下部、脳幹部、小脳プルキンエ細胞、脊髄実質、脊髄神経節など脳全域で認められた。脳組織を13領域に分割しELISA法にてASA活性を、TLC法にてスルファチドの測定したところいずれの領域でも酵素活性の上昇とスルファチドの減少を認めた。脳脊髄液中への薬剤の投与は臨床で一般に行われている手技であり、侵襲性も低い。又、大量持続投与も可能であり、脳組織全体への遺伝子導入法としては優れている。今後、サルを含む大型動物での前臨床試験も行い髄注による神経変性疾患治療の可能性を検討していきたい。今回、新たにAAV1ベクターの髄注投与により脊髄後根神経節及び脊髄後索に極めて高率に遺伝子が導入されることが明らかになった。これは脊髄後根神経節の解剖学的位置とベクターの親和性が影響していると考えられる。脊髄後根神経節に存在する感覚ニューロンは痛みの重要な経路であり、AAVベクターの髄注による痛みの遺伝子治療という新しい分野に発展する可能性がある。
5. MPS、Krabbe病の遺伝子治療:Lentivirusベクターの新生児遺伝子治療ではMPSI、VII型に対しては欠損酵素の長期発現、病理の改善、寿命の延長と非常に効果的であったが、Krabbe病に関しては十分な効果がみられていない。これはおそらくサイトカインなどの欠損酵素以外の病態に関する影響が大きいためと思われる。
6. イソフラボン効果:治療効果に関しアンケート調査の結果、肝脾腫大や髪の毛の硬さ、表情の変化などには効果が見られたが、悪影響を示唆

する報告も見られ今後の更なる調査が必要と考えられた。

7. 先天代謝異常症における造血幹細胞移植の後方視的研究と標準的移植法確立:移植の対象となった疾患としては副腎白質ジストロフィー(ALD)が最も多く(21例)、全体の約半数を占めていた。次いでムコ多糖症が19例であった。移植時年齢は8ヵ月から15歳までに分布し、中央値5歳であった。男女比では男性が41例、女性が12例で圧倒的に男性が多かった。初回移植のドナーは31例が血縁者(同胞24例、父親4例、母親3例)、22例で非血縁者であり、29例でHLAが一致していた。移植細胞源は44例で骨髄、9例で臍帯血であった。44例(83.0%)では初回移植でドナー由来の生着が得られ、9例(17.0%)では拒絶されていたが、5例で再移植、1例では再々移植が行われ、最終的には41例(77.4%)が生存中で、12例(22.6%)が死亡していた。ドナー細胞の生着が得られた上での生存(無イベント生存)に有意に有利に相関していた因子としては移植細胞源としての骨髄、同胞ドナー、HLA適合、非照射前処置(ブスルファン主体の前処置)などであった。以上より、従来为全国集計と同様に、HLA適合の同胞または非血縁者からの骨髄移植が最も安定した成績が期待されるという結論が得られた。移植が適応となる症例においては、診断確定後速やかに造血幹細胞移植を考慮した治療計画が立案されることが必要である。

D. 総合的考察

今回も病像(臨床像)把握、病態解析、治療法開発の三本柱に沿って昨年より更に進んだ報告が為された。保険適応で酵素補充療法が出来る疾患が増え、予後改善もいよいよ実際の臨床の場で実現されつつあるが、これに伴い副反応や実際の治療中のQOL評価など新たな課題が出現し更なる研究が必要とされる。また、その他の疾患も基礎的研究の進歩は早く、病態解析、シャペロン療法や遺伝子治療など酵素補充に変わる根本的治療法の開発など課題は山積しており、今後も継続的な研究努力が非常に重要と思われる。

E. 結論

今回も引き続きライソゾーム疾患の臨床予後、QOL改善を目指して様々な研究が行なわれ、酵素補充が保険適応となり予後改善が現実化していく中、更によりよい根本治療や他の疾患に対する対策などますますより精力的な調査研究を推進する必要があると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

各分担研究者の報告書欄参照

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働省 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会議

日 時：平成 21 年 12 月 11 日(金)12 時～
場 所：東京慈恵会医科大学 GH 会議室

総合司会：小林 博司

12 : 20

班長挨拶 衛藤 義勝(東京慈恵会医科大学遺伝病研究講座)

ご挨拶 大竹 輝臣(厚生労働省健康局疾病対策課 課長補佐)

12 : 30

I. 実態調査

座長：奥山 虎之

- 1) ムコ多糖症の患者家族における酵素補充療法に関する意識調査
：田尾絵里子、奥山虎之(国立成育医療センター 臨床検査部)
- 2) ライソゾーム病患者における健康関連 QOL の調査研究
：坪井一哉(名古屋セントラル病院 血液内科)
- 3) ろ紙を用いたファブリー病のスクリーニング
：中村公俊、遠藤文夫(熊本大学大学院医学薬学研究部)
- 4) 濾紙血液を用いた GSD II 型(Pompe 病)スクリーニング法の研究
一酸性 α -glucosidase に対するポリクローナル抗体を固相化法の確立一
：鈴木 健、石毛信之、藤川研人、穴沢 昭((財)東京都予防医学協会)
大和田 操(女子栄養大学大学院 小児栄養学)
田中あけみ(大阪市立大学大学院医学研究科発達小児医学)
小林博司、大橋十也、井田博幸、衛藤義勝、北川照男(東京慈恵会医科大学)
- 5) ニーマン・ピック病 C 型患者の調査研究
：戸川雅美、大野耕策(鳥取大学医学部脳神経小児科学)

★ ☆ 休 憩 ☆ ★