

ファブリー病の頻度を推定することができた。また、簡便で安価な酵素測定法を用いることで、ファブリー病の発症前の診断も容易となった。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。

ファブリー病の新生児におけるスクリーニングは臨床的にも研究対象として有用であるため、今後パイロットスタディを継続する予定である。さらに、成人のファブリー病のハイリスク者とされる心疾患・腎疾患・脳血管障害患者における本法を用いたファブリー病のスクリーニングは、早期発見と治療に有用と考えられる。本研究では先天代謝異常症の専門家のネットワークを用いることで対象地域を限った効率的な研究を行うことができた。

## E. 結論

本研究の目的であるファブリー病の安価で簡便な診断法の開発とわが国におけるファブリー病の頻度の推定を行った。説明と同意を得たうえでスクリーニングを行うことができた対象者は18万人余りであり、ファブリー病の頻度の推定に必要な対象者数を達成することができた。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。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 中村公俊, 遠藤文夫: 遺伝性高チロシン血症 小児疾患診療のための病態生理 2. 小児内科, 41(増), 2009
- 2) 大浦敏博, 新宅治夫, 高柳正樹, 呉 繁夫, 大和田 操, 松原洋一, 芳野 信, 岡野善行, 伊藤哲也, 奥山虎之, 中村公俊, 松尾雅文, 遠藤文夫: テトラヒドロビオプテリン(BH4)反応性高フェニルアラニン血症に対する天然型BH4 製剤塩酸サプロプテリンの適正使用に関する暫定指針. 日本先天代謝異常学会: BH4

反応性高フェニルアラニン血症の診断と治療に関する専門委員会, 日本小児科学会雑誌, 133: 649-653, 2009

- 3) 中村公俊, 遠藤文夫: 血中アミノ酸分析によって診断できる先天性アミノ酸代謝異常症 「広範囲 血液・尿化学検査 免疫学的検査」 III 生化学的検査. 日本臨床, 67: 625-629
- 4) 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
- 5) Mitsubuchi H, Nakamura K, Endo F et al.: Inborn errors of proline metabolism. J Nutr, 138 (10): 2016S-20S, 2008.10
- 6) 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
- 7) Kumamoto S, Katafuchi T, Nakamura K, Endo F, Oda E, Okuyama T, Kroos MA, Reuser AJ, Okumiya T: High frequency of acid alpha-glucosidase pseudodeficiency complicates newborn screening for glycogen storage disease type II in the Japanese Population. Mol. Genet. Metab, 97: 190-5, 2009
- 8) Nakamura Y, Matsumoto S, Mochida T, Nakamura K, Takehana K, Endo F: Glycine regulates proliferation and differentiation of salivary-gland-derived progenitor cells. Cell Tissue Res, 336: 203-12, 2009
- 9) Fujii H, Kono K, Goto S, Onishi T, Kawai H, Hirata KI, Hattori K, Nakamura K, Endo F, Fukagawa M: Prevalence and Cardiovascular Features of Japanese Hemodialysis Patients with Fabry Disease. Am J Nephrol, 16: 527-535, 2009

治療可能なライソゾーム病スクリーニング法の研究  
「ファブリー病ハイリスク・スクリーニングの研究」および  
「濾紙血液を用いた GSD II 型、MPS I 型、および MPS II 型スクリーニング法の研究」

分担研究者：北川 照男((財)東京都予防医学協会 理事長)

研究要旨

Fabry 病(FD)が疑われる症状を有するか、あるいは家族歴がある FD ハイリスク症例 112 名を対象に、尿  $\alpha$ -galactosidase A 蛋白( $\alpha$ -gal AP)を ELISA 法で測定すると共に、尿 GL-3 をタンデム質量分析計で測定するスクリーニング方法を開発し、この 2 つのマーカーを同時に測定し、FD のハイリスクスクリーニングを行った。その結果、両者が異常値を示した男性はその全例が FD のヘミ接合体であった。他方、この方法は女性のハイリスクの症例の中から FD のヘテロ接合体をスクリーニングするのにも有用な方法であり、本症の早期診断に活用が可能なことを確認した。

また、わが国でも酵素補充療法によって治療が開始されている GSD II 型、MPS I 型、MPS II 型の 3 疾患のスクリーニング方法についても研究し、GSD II 型については合成基質 4-Metylumbelliferyl 誘導体を用いた Chamoles らの従来法および蛍光的免疫捕捉酵素活性測定法で酵素活性を測定し両者を比較した。また、MPS I 型と MPS II 型のハイリスクスクリーニング法についても検討し、前者の方法としては Chamoles が、後者の方法としては Dean らの方法がそれぞれよいと思われ、これらの方法を用いて試験的ライソゾーム病のスクリーニングを試みたので報告する。

研究協力者

鈴木 健((財)東京都予防医学協会)  
石毛 信之((財)東京都予防医学協会)  
藤川 研人((財)東京都予防医学協会)  
穴澤 昭((財)東京都予防医学協会)  
田中あけみ(大阪市立大医学部小児科)  
大橋 十也(東京慈恵医科大学小児科)  
井田 博幸(東京慈恵医科大学小児科)  
小林 博司(東京慈恵医科大学小児科)  
衛藤 義勝(東京慈恵医科大学小児科)  
大和田 操(女子栄養大学小児栄養学)

酵素補充療法を行うことによって、治療効果が向上するファブリー病、ムコ多糖症 I 型(MPS I 型・ハーラー症候群)、ムコ多糖 II 型(MPS II 型・ハンター病)、および糖尿病 II 型(GSD II 型・ポンペ病)の 4 疾患について研究協力の同意が得られた各疾患患者、ハイリスク対象者、および正常対照者の検査を試み、これらの疾患のスクリーニング方法を検討した。

A. 研究目的

ライソゾーム病のうちで、早期診断して早期に

B. 研究方法及び対象

1) ファブリー病(FD)のスクリーニング

尿  $\alpha$ -galactosidase A 蛋白( $\alpha$ -gal AP)を抗ヒト  $\alpha$ -gal AP に対するモノクローナル抗体を用いた ELISA 法で測定し、同時に尿 GL-3 をタンデ

質量分析計で測定した。尿  $\alpha$ -gal AP と GL-3 の測定値は Creatinine (Cr.) 比とし、Cr. の測定は Jaffe 法で行った。症状や家族歴があつて Fabry 病が疑われるハイリスク症例 112 名(男性 57 名、女性 55 名)の尿について  $\alpha$ -gal AP と GL-3 を同時に測定し、FD ハイリスク症例を対象としたスクリーニングを行った。

## 2) GSD II 型のスクリーニング

Chamoles らの蛍光基質の 4-methylumbelliferylglucopyranoside を用い、阻害剤の存在下で酸性および中性  $\alpha$ -glucosidase 活性を測定し、それぞれの酵素活性の比率を彼らの基準に従つて判定し、GSD の診断を行った。また、我々は酸性  $\alpha$ -glucosidase 蛋白に対する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酸性  $\alpha$ -glucosidase 活性を測定する方法(図 1)を開発して、正常対照

者 12 名および GSD II 型患者 4 名および酸性  $\alpha$ -glucosidase pseudo deficiency 1 名を検査し、それら両法の測定感度を比較した。

## 3) MPS I 型のスクリーニング

Chamoles らの  $\alpha$ -L-iduronidase 活性を測定する方法(図 2)を用いて、正常対照者 42 名、MPS I 型患者 7 名およびハイリスク対照者 2 名の  $\alpha$ -L-iduronidase を測定し、MPS I 型のスクリーニングを試みた。

## 4) MPS II 型のスクリーニング

Dean らの方法(図 3)により iduronate-2-sulfatase 活性を測定する方法と、この方法を応用した DELFIA®による iduronate-2-sulfatase 蛋白を測定する方法(図 4)の両者を用いて、正常対照者 154 名、および MPS II 型患者 4 名の診断方法を検討した。

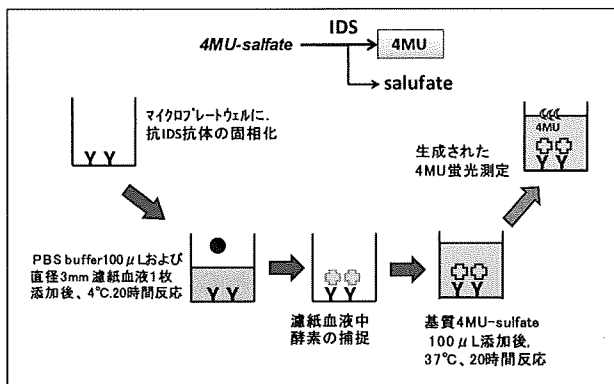


図 1 蛍光的免疫捕捉法による GSD II 型酸性  $\alpha$ -glucosidase 酵素活性測定法の概略

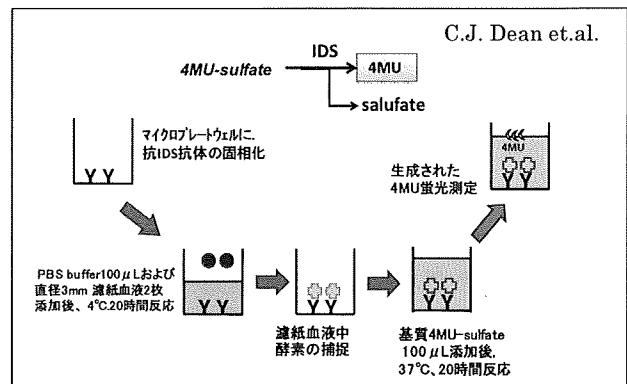


図 3 蛍光的免疫捕捉法による MPS I 型 Iduronidase-2-sulfatase 活性測定法の概略

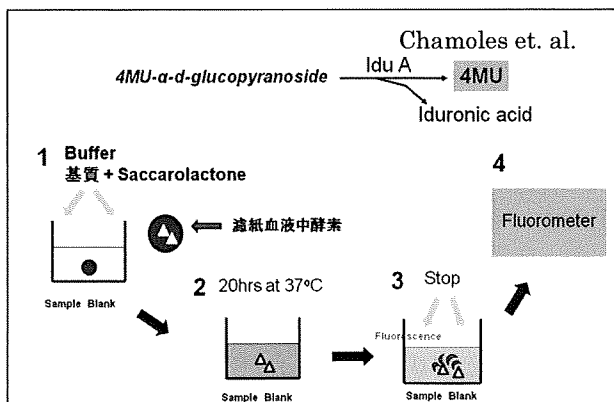


図 2 MPS I 型酵素活性測定法の概略

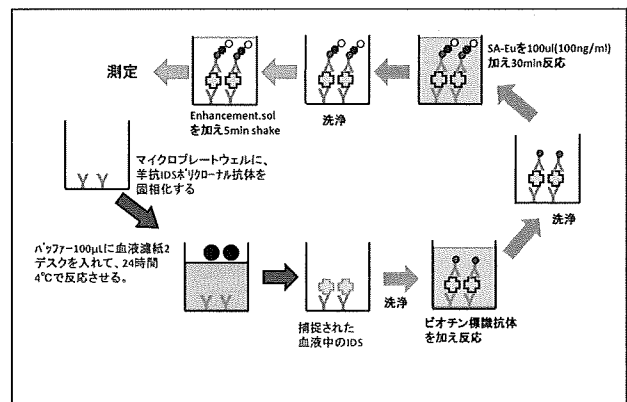


図 4 DELFIA®を用いた MPS II 型 Iduronate-2-sulfatase 蛋白測定法の概略

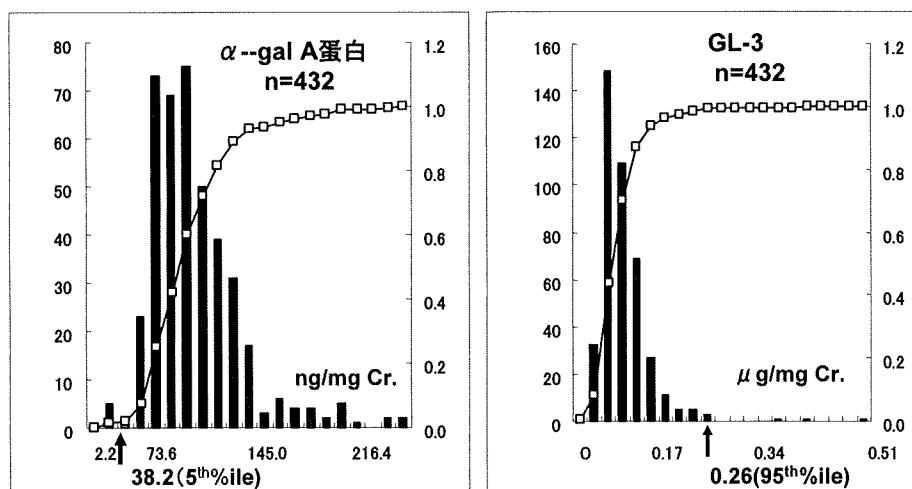


図5 健康正常対照者432例の尿 $\alpha$ -gal A 蛋白値の5th%ile値、およびGL-3値95th%ile

表1 尿 $\alpha$ -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 | hemizygotes | %    | heterozygotes | %    |
|-------------------------|--------|-------------|------|---------------|------|
| $\alpha$ -Gal A         | 感度     | 39/40       | 97.5 | 27/37         | 73.0 |
|                         | 特異度    | 418/444     | 94.1 | 418/444       | 94.1 |
| GL-3                    | 感度     | 35/40       | 87.5 | 35/37         | 96.7 |
|                         | 特異度    | 428/444     | 96.4 | 428/444       | 96.4 |
| $\alpha$ -Gal A<br>GL-3 | 感度     | 39/40       | 97.5 | 36/37         | 97.3 |
|                         | 特異度    | 402/444     | 90.5 | 402/444       | 90.5 |

(倫理面への配慮)

研究に用いた患者、および正常対照者の血液および尿は、その用途、研究目的を事前に文章にて説明した後、承諾書に署名を得てから採取し、研究に用いた。

### C. 研究結果及び考察

#### 1. FDスクリーニング

正常対照者432例の尿 $\alpha$ -gal APの5th%ile値は38.2ng/mg Cr.、GL-3の95th%ile値は0.26 $\mu$ g/mg Cr.であった(図5)。

慈恵医大ですでに診断されていた40例の古典型FDヘミ接合体の尿の $\alpha$ -gal APとGL-3を測定し、前記のcut off値を用いて、患者を診断した時の感度と特異度を計算したところ、 $\alpha$ -gal APの測定では97.5%と94.1%、GL-3の測定では

87.5%と96.4%であった。また、既知のヘテロ接合体37例の尿の $\alpha$ -gal APとGL-3を同時に測定した場合の診断の感度と特異度は、97.3%と90.5%であり、ヘテロ接合体の診断の場合は、2つのバイオマーカーを同時に測定してスクリーニングの方がその精度は高かった(表1)。

表2にFabry病のハイリスクの男性52例の診断内訳を示した。 $\alpha$ -gal APとGL-3何れも陽性を示したAグループ35例では31例が古典型FDヘミ接合体、他は心型異型2例、腎型異型2例で、正常者は含まれていなかった。このグループで家族歴のあるものは23例(66%)、家族歴のないものは12例(34%)がFD患者であった。 $\alpha$ -gal APとGL-3何れかが陽性を示したBグループ12例のうち2例が古典型ヘミ接合体であり、心型異型1例、腎型異型1例で、その他の8例は正常であっ

表2  $\alpha$ -Gal AP 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 $\alpha$ gal A and GL-3 levels |                  | Group A  | Group B   | Group C   |
|--|------------------|--|---|---|
|  |                  | Exceeded cut-off values for both $\alpha$ gal A and GL-3 | Exceeded cut-off values for either $\alpha$ gal A or GL-3 | Both $\alpha$ gal A and GL-3 levels were within normal ranges |
| Family history                         | Symptoms         |  |   |   |
| With family history                    | With symptoms    | 18*+1**  | 2****   | 1**   |
|  | Without symptoms | 4*   | 1*+1****  | 2****   |
| Without family history                 | With symptoms    | 9*+1**+2***  | 1*+ 1**+ 1***<br>+ 5****                                  | 2****   |
| Hemizygotes / Total cases              |                  | 31*+2**+2***<br>/ 35 (100.0%)                            | 2*+1**+1***<br>/ 12 (33.3%)                               | 1** / 5<br>(20.0%)  |

Final diagnosis and classification of phenotypes

- \* Number of classic type hemizygotes
- \*\* Number of cardiac variant hemizygotes
- \*\*\* Number of renal variant hemizygotes
- \*\*\*\* Number of normals

—女性—

| Urinary $\alpha$ gal A and GL-3 levels |                  | Group A  | Group B   | Group C   |
|--|------------------|--|---|---|
|  |                  | Exceeded cut-off values for both $\alpha$ gal A and GL-3 | Exceeded cut-off values for either $\alpha$ gal A or GL-3 | Both $\alpha$ gal A and GL-3 levels were within normal ranges |
| Family history                         | Symptoms         |  |   |   |
| With family history                    | With symptoms    | 12*+2**+1****  | 2*+1**  | -   |
|  | Without symptoms | 7*   | 3*+1**+1****  | 1*+3****  |
| Without family history                 | With symptoms    | 4*+1***  | 1*+2**+4****  | 3****   |
| Hemizygotes / Total cases              |                  | 23*+2**+1*** /<br>27 (96.3%)                             | 6*+4** / 15<br>(66.7%)                                    | 1* / 7<br>(14.3%)   |

Final diagnosis and Classification of heterozygotes

- \* Number of heterozygotes suggestive of classic type group
- \*\* Number of heterozygotes suggestive of cardiac variant group
- \*\*\* Number of heterozygotes suggestive of renal variant group
- \*\*\*\* Number of normals

た。 $\alpha$ -gal AP と GL-3 何れも正常であった C グループでは、5 例中 1 例が心型異型 FD ヘミ接合体であり、他の 4 例はすべて正常であった。表 3 に示した女性 49 例の診断内訳は、 $\alpha$ -gal AP と GL-3 何れも陽性を示した A グループ 27 例では 23 例が古典型 FD ヘテロ接合体であり、他は心型異型 2 例、腎型異型 1 例で、1 例が正常であった。このグループでは、家族歴のあるものの 5 例

(19%) が FD ヘテロ接合体であった。 $\alpha$ -gal AP と GL-3 何れかが陽性を示した B グループ 15 例のうち 6 例が古典型ヘテロ接合体であり、4 例が心型異型、その他 5 例は正常であった。 $\alpha$ -gal AP と GL-3 何れも正常であった C グループでは、7 例中 1 例が古典型 FD ヘテロ接合体であり、他の 6 例は正常であった。

## 2) GSD II型スクリーニング

同一検体を従来の方法(Chamolés ら)と蛍光的免疫捕捉酵素活性測定法で測定した成績は、図 6 に示すように、いずれの方法でも GSD II患者 4 例および酸性  $\alpha$ -glucosidase pseudo deficiency 1 名は、正常対照群との区別は明確で、容易に患者を診断することが可能であった。

## 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/disk (range 72.4-233.5 pmol/hr/disk)の範囲にあるのに対して、患者群 7 例では mean $\pm$ SD 7.9 $\pm$ 3.8 pmol/hr/disk (range 3.3-14.0pmol/hr/disk)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

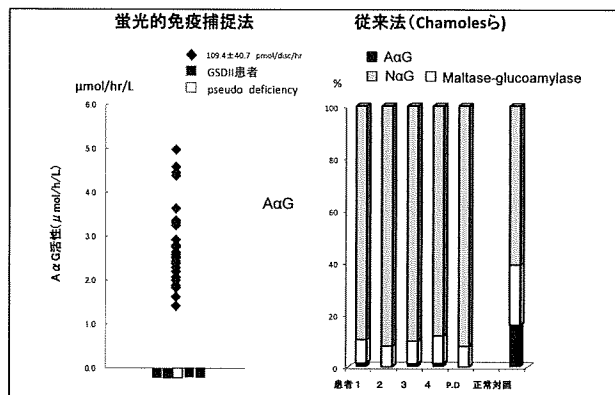


図 6 GSD II型患者および正常対照者の同一濾紙を用いた従来法と蛍光的免疫捕捉法の AaG 活性値

定値に差はみられなかった(図 7)。

## 4) MPS II型スクリーニング

### (1) iduronate-2-sulfatase (IDS) 活性測定によるスクリーニング成績

IDS 活性測定値は、新生児対照群 90 例で mean $\pm$ SD 165.9 $\pm$ 71.5pmol/hr/disk (range 47.0-339.5pmol/hr/disk)であるのに対して、ERT 開始前の重症型 1 例、軽症型 1 例の測定値はそれぞれ 19.1、23.1pmol/hr/disk で、正常対照群より明らかな低値を示した(図 8)。

### (2) 酵素蛋白測定による成績

図 9 に示すように、DELFLIA®を用いた IDS 酵素蛋白測定値は新生児対照群で mean $\pm$ SD 120.5 $\pm$ 43.4pmol/hr/disk (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

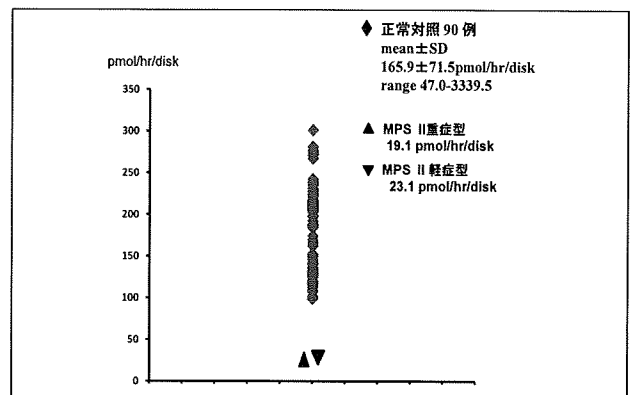


図 8 MPS II型患者 2 例および正常対照 90 例の  $\alpha$ -iduronate-2-sulfatase 活性測定値

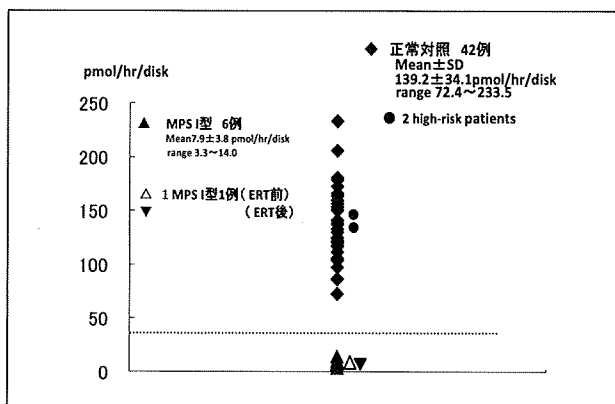


図 7 MPS I 型患者 8 例および正常対照者 42 例の  $\alpha$ -iduronidase 活性値

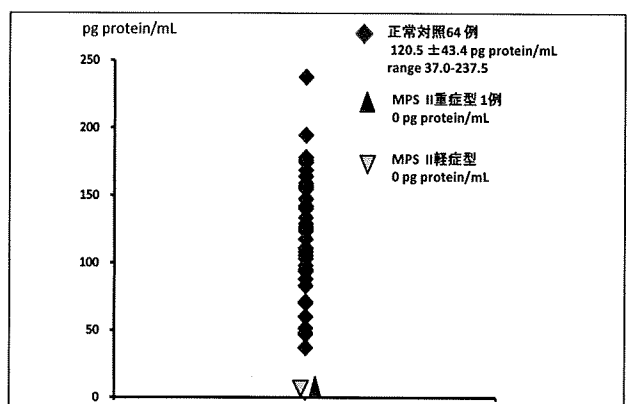


図 9 DELFLIA®を用いた MPS II 型 iduronate-2-sulfatase 蛋白値

下であった。

#### D. 考 察

FD、GSD II、MPS I および MPS II 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、いずれの方法でも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り、DELFLIA®による酵素蛋白測定法も同様に有用な方法であった。

また、GSD II型、MPS II型のスクリーニング法についてポリクローナル抗体を用いた蛍光的免疫捕捉酵素活性測定法による酸性  $\alpha$ -glucosidase 活性測定法を開発すると共に、IDS 活性の測定を検討したが、これらは何れも優れた方法であり、患者群と正常対照の判定は容易であった。

#### E. 評 価

##### 1) 達成度について

FD、GSD II、および MPS I の 3 疾患について、ハイリスクを対象とした蛍光基質 4MU を用いた酵素活性測定法を用いてハイリスクスクリーニングを行った。また、GSD II型および MPS II型の蛍光的免疫捕捉法による酵素活性測定法を検討し、GSD IIについては新生児スクリーニングを、MPS IIについては、ハイリスクスクリーニングを行い、これらの疾患の早期診断、治療による予後の向上を達成した。

##### 2) 研究成果の学術的、国際的、社会的意義について

本研究によりこれらの疾患の早期診断が可能となり、早期治療によって予後が向上したことは社会的に意義深いことである。特に早期診断が困難であった GSD II型を容易に診断できる蛍光的免疫捕捉酵素活性測定法を開発できたので、国際的、社会的意義も大きいと考える。

##### 3) 今後の展望について

GSD II型は、特に重症型は新生児期に重篤な症

状を呈することから、新生児を対象に本症のスクリーニングを行う必要があり、現在行われている新生児スクリーニングシステムを利用することを今後の課題としたい。また MPS I 型、MPS II型は類似の症状を呈することから、ハイリスク者を対象にスクリーニングを行って早期診断し、その有用性を研究し、日本におけるこれらの疾患の疫学を明らかにし、早期発見された症例の予後向上のための研究を行う。また、今回 FD ハイリスクスクリーニング成績から早期診断・治療を行って予後を向上することは可能と考えている。

#### 4) 研究内容の効率性

本研究班の 3 年間で、FD、GSD II、MPS I および MPS II の 4 疾患について、酵素活性測定法、MPS II型について DELFLIA®による酵素蛋白法を確立し、GSD II型および MPS II型の蛍光的免疫捕捉法による酵素活性測定法を検討した。また、ハイリスク患者を対象にこれらの方法を用いてスクリーニングを行い、その成績から効率的なスクリーニング方法であると考えられる。

#### F. 結 論

ERT が有効とされている FD、GSD II、MPS I および MPS II の 4 疾患について、ハイリスク症例を対象として蛍光基質を用いた酵素活性測定法、あるいは蛍光的免疫捕捉法を用いた酵素活性測定によるスクリーニングを行い、各症例の早期発見に成功した。また DELFLIA®による酵素蛋白測定を同時に行えば、より精度の高いスクリーニングが可能であると考え、この方法も今後発展させる予定である。

#### G. 研究発表

##### 1. 国内

口頭発表 12 件

原著論文による発表 7 件

##### ① 論文発表

1) 北川照男：PKU の予後を向上させた人々と患

- 者たち. 日本マススクリーニング学会雑誌, 18(3) : 109-115, 2009
- 2) 北川照男 : 第 50 回日本先天代謝異常学会開催を記念して一本学会から世界に発信した日本の業績に触れながら. 日本先天代謝異常学会雑誌, 25(1) : 3-25, 2009
  - 3) 石毛信之, 北川照男, 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 : 31-40, 2008
  - 4) 2. 青木菊麿, 北川照男, 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
  - 5) 鈴木 健, 北川照男, 他 : 尿によるウイルソン病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, 17(1) : 21-26, 2007
  - 6) 北川照男 : Fanconi 型腎性くる病を伴う肝腎型高チロジン血症をめぐって. 小児内科, 39 : 1421-29, 2007
  - 7) 北川照男 : 糖尿病と私一学童糖尿病検診の経験から. 「肥満と糖尿病」, 6 : 533-536, 2007
- ② 学会発表
- 1) 石毛信之, 北川照男, 他 : 東京都でのタンデム質量分析計による新生児 マススクリーニングのパイロット研究 第 2 報. 日本先天代謝異常学会雑誌, 25 : 113, 2009
  - 2) 鈴木 健, 北川照男, 他 : 濾紙血液を用いたライゾーム病ハイリスクスクリーニング法の研究. 日本先天代謝異常学会雑誌, 25 : 118, 2009
  - 3) 鈴木 健, 北川照男, 他 : 東京都における MS/MS による新生児マススクリーニング成績 -第二報-. 日本マス・スクリーニング学会誌, 19 : 71(162), 2009
  - 4) 穴澤 昭, 北川照男, 他 : タンデム質量分析計による新生児マス・スクリーニングの課題について. 日本マス・スクリーニング学会誌, 18 : 169, 2008
  - 5) 石毛信之, 北川照男, 他 : 先天性代謝異常症の新生児マス・スクリーニングの課題について. 日本マス・スクリーニング学会誌, 18 : 179, 2008
  - 6) 鈴木 健, 北川照男, 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 : 183, 2008
  - 7) 石毛信之, 北川照男, 他 : 東京都でのタンデム質量分析計による新生児マススクリーニングのパイロット研究-3年間の経験について. 日本先天代謝異常学会, 24(2) : 79, 2008
  - 8) 鈴木 健, 北川照男, 他 : ファブリー病ハイリスク・スクリーニングの研究. 日本先天代謝異常学会雑誌, 24(2) : 102, 2008
  - 9) 石毛信之, 北川照男, 他 : 尿  $\alpha$  ガラクトシダーゼ A 蛋白とグロボトリアオシルセラミド測定に関する研究. 日本マス・スクリーニング学会誌, 17(2) : 60, 2007
  - 10) 鈴木 健, 北川照男, 他 : 新生児濾紙血液を用いた 4-methylumbelliferyl- $\alpha$  D-glucopyranoside 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, 2007
  - 11) 新宅治夫, 北川照男, 他 : BH4 反応性軽症 PKU の診断と日本における頻度. 日本先天代謝異常学会雑誌, 23(2) : 59, 2007
  - 12) 大橋十也, 北川照男, 他 : ファブリー病酵素補充療法の効果に対する抗体の影響. 日本先天代謝異常学会雑誌, 23(2) : 151, 2007
2. 海外  
原著論文による発表 2 件
- ① 論文発表
- 1) Kitagawa T, et al. : Non-invasive high-risk screening for Fabry disease hemizygoties and heterozygoties. Clin Chem 23, 1461-1471, 2008



2) Ohashi T, Eto Y, Kitagawa T, et al. : Influence of antibody formation on reduction of globotriaosylceramide (GL-3) in urine from Fabry patients during agalsidase beta

therapy. Mol Genet Metab, 92 : 271-273, 2007

H 知的所有権の出願・取得状況  
特になし

## ライソゾーム病患者の Quality of life (QOL) をあげるには、いかなる方策が必要か

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

ライソゾーム病患者の Quality of life (QOL) をあげるには、いかなる方策が必要かを評価するため以下の3点についての検討を行った。

ライソゾーム病の早期診断ができれば、患者の QOL が向上する可能性がある。新生児聴覚異常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。

アイセル病、ムコリピドーシスⅢ型症例の自然暦を検討した。アイセル病の10年生存率は約55%であった。多くのアイセル病症例では5年間でADLは悪化している。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。

酵素補充療法中に死亡した3例のライソゾーム病患者(ゴーシェ病1例、ハンター症候群2例)を経験した。今後同様な症例があれば、全国的に情報を蓄積して検討していく必要があると考えられた。

### A. 研究目的

ライソゾーム病患者の Quality of life (QOL) をあげるには、いかなる方策が必要かを評価するため以下の3点についての検討を行った。

- ① 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るか検討した。
- ② アイセル病、ムコリピドーシスⅢ型症例の自然暦を検討した。
- ③ 酵素補充療法を安全有効に行うために、治療中に死亡した3例のライソゾーム病患者(ゴーシェ病1例、ハンター症候群2例)の検討を行った。

### B. 研究方法

- ① 発見された GM1 ガングリオシドーシス症例

の臨床経過を詳細に検討した。

- ② 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。
- ③ 酵素補充療法中に死亡した3例のライソゾーム病患者(ゴーシェ病1例、ハンター症候群2例)の臨床経過を詳細に検討した。

(倫理面への配慮)

各種検査は患者様家族のご了解をいただき行った。

### C. 研究結果

- ① 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考えられた。

- ② 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。
- ③ 死亡した症例は、1.ハンター症候群。5歳時診断を受ける。重症型であり気管切開を受け、重症心身障害児施設に入所していた。22歳0ヶ月時より idusulfatase による酵素補充療法開始。idusulfatase による治療開始後2ヵ月後に、突然死亡した。死因は不明であった。2.ハンター症候群。3歳児に診断を受ける。軽症型であり、社会人として勤務していた。22歳6ヶ月より idusulfatase による酵素補充療法開始。治療開始後13ヵ月後に、原因不明の多臓器不全で死亡した。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。3.ゴーシェ病。家族内検索で3ヶ月時に診断。生後4ヶ月より imiglucerase による酵素補充療法を開始。難聴、てんかん、パーキンソン病を思わせるトレモールが認められていた。酵素補充療法開始後9年11ヵ月後に、自宅にて突然に死亡しているところを発見された。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。

#### D. 考 察

ライソゾーム病患者のQOLを向上する方法についての研究は、端緒についたところである。ライソゾーム病は多くの疾患があり、疾患毎にQOLの評価方法を検討する必要があると思われる。

今回の研究でアイセル病についてのQOL調査

の基礎的検討ができたものと思われる。ライソゾーム病患者をQOLの観点からサポートする体制の一部を構築できたものと思われる。

酵素補充療法の患者QOLへの影響については、安全性を含めて今後の全国的に組織された調査が必要である。特に基礎となる各疾患の自然暦の検討がもっとも重要である。

この研究を進めることにより、患者のQOLの向上に必要なことがらを直接的に検討することができるであろう。

#### E. 結 論

酵素補充療法をはじめとする各種の治療法を、QOLの向上という観点から評価する必要があると考えられた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 水落弘美, 村山圭, 高柳正樹, 長坂博範: 新生児聴覚スクリーニングの異常を契機に発見されたGM1ガングリオシドーシスの一例. 日本マス・スクリーニング学会誌, 19: 59-62, 2009

##### 2. 学会発表

- 1) 国内
- ① 口頭発表 2件
- ② 学会発表
- a. Murayama K, Takayanagi M, Sanayama Y, Nagasaka H: Four cases with lysosomal storage diseases treated by home mechanical ventilation therapy. The 3<sup>rd</sup> International Symposium of Lysosomal Storage Diseases, Nagoya, 2009
- b. Takayanagi M, Murayama K, Sanayama Y, Nagasaka N: Natural history of I-cell disease in Japan. The 3<sup>rd</sup> International Symposium of Lysosomal Storage Diseases, Nagoya, 2009

2) 海外

① 学会発表

- a. Ohtake A, Akatsuka J, Hoshino M, Katoh T, Amemiya S, Ohasi T, Takayanagi M : 9<sup>th</sup> International Symposium on Lysosomal Storage Disease, Frankufurt, Germany, , 2009

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

# 分担研究報告書

## Ⅱ. 病態の解析

## $\beta$ -ガラクトシダーゼ欠損症の病因、病態、治療法に関する研究

分担研究者：難波 栄二(鳥取大学生命機能研究支援センター教授)

### 研究要旨

11人の $\beta$ -ガラクトシダーゼ欠損症患者の遺伝子変異解析を行い、変異を同定した。患者由来線維芽細胞、またはマウス細胞発現系を用い NOEV (N-octyl-4-epi- $\beta$ -valienamine)のシャペロン効果の判定を行い、NOEV効果と遺伝子変異型の相関について検討した。新規ケミカルシャペロン候補化合物探索のためのルシフェラーゼを用いた酵素蛋白質検出系を構築した。また、神経変成に至る分子病態に関し、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ欠損マウス脳においてオートファジー分解系の異常とミトコンドリア活性低下が関連することを見いだした

### A. 研究目的

$\beta$ -ガラクトシダーゼ欠損症の遺伝子変異型を同定し、ケミカルシャペロン効果との相関を明らかにする。モデルマウスを用い、神経変成に関連する分子機構を明らかにする。

### B. 研究方法

#### 1. $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子変異解析と NOEV 効果の検討

$\beta$ -ガラクトシダーゼ欠損症患者由来培養皮膚線維芽細胞からゲノム DNA を抽出し、全エクソンについてシーケンス解析を行った。NOEV の酵素活性還元効果の検討は、培養皮膚線維芽細胞を 0.2、2  $\mu$ M の NOEV を含む培地で 4 日間培養後、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ酵素活性を測定した。変異型と NOEV 効果についてのスクリーニングはヒト変異  $\beta$ -ガラクトシダーゼ cDNA 発現ベクターを  $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子欠損ノックアウトマウス由来線維芽細胞株に一過性に発現後、0.2 または 2  $\mu$ M の NOEV を含む培地で 2 日間培養した後、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ酵素活性を測定した。酵素活性測定は 4-MU 人工基質を用い測定した。

#### 2. ケミカルシャペロン候補化合物探索のための新規細胞系の構築

ヒト正常および変異  $\beta$ -ガラクトシダーゼ cDNA の C 末端に発光性鞭毛藻類由来の新規ルシフェラーゼ Dinofla 遺伝子を融合させた発現ベクターを構築した。培養 COS7 細胞にそれぞれ一過性に発現させ、NOEV 投与後、細胞抽出液と培養上清の  $\beta$ -ガラクトシダーゼ酵素活性とルシフェラーゼ活性を測定した。

#### 3. $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子欠損マウスにおける神経変成とオートファジー異常についての検討

10ヶ月齢の正常および  $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子欠損マウス大脳皮質から Triton X-100 難溶性画分を抽出し、オートファジー形成に関して抗 LC3、抗 Beclin-1 抗体を、Akt-mTOR シグナルは抗 Akt、Erk、mTOR、S6 抗体およびリン酸化抗体を用い、ウェスタンブロット法により発現定量解析を行った。組織学的解析はマウス脳凍結切片を用い免疫蛍光抗体法により行った。マウス大脳由来アストロサイト初代培養は生後 4 日齢のマウス大脳組織より採取し行った。ミトコンドリア

機能解析は Cytochrome C oxidase 活性測定および、MitoTracker-JC-1 を用いた。

### C. 研究結果

11 人の  $\beta$ -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 E143fsX186, L147del, G190D, L608P を含む 11 の変異型を同定した。また、培養線維芽細胞を用いた NOEV 効果の検討では、9 検体のうち 4 検体で有為な残存酵素活性上昇効果を認めた。また、マウス発現系を用い、48 種類の遺伝子変異型に対する NOEV の酵素活性還元効果を調べた結果、15 種類の変異において 0.2 または 2  $\mu$ M の NOEV による有意な酵素活性還元効果を認めた。また、0.2、2  $\mu$ M 共に効果を認めたのは 3 種類 (L173P、G190D、R590C) であった。

新規ルシフェラーゼ Dinofla を融合したヒト  $\beta$ -ガラクトシダーゼ cDNA 発現ベクターを COS7 細胞に一過性に導入後、細胞抽出液と培養上清におけるルシフェラーゼ活性を測定した結果、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ酵素活性と同等の活性を検出した。また、R201C 変異融合蛋白質を発現させた COS7 細胞において、0.2、2  $\mu$ M の NOEV によるルシフェラーゼ活性上昇効果を認めた。さらに、Dinofla 融合正常および変異  $\beta$ -ガラクトシダーゼ蛋白質の安定発現株を樹立した。

生後 10 ヶ月齢  $\beta$ -ガラクトシダーゼ欠損マウス 大脳では正常マウスに比べオートファゴソーム形成に関わる LC3-II と Beclin-1 蛋白質の発現が有為に上昇していた。また、オートファジー経路に関連するリン酸化 Akt、Erk、mTOR の発現上昇も欠損マウスで見られた。一方、欠損マウス脳由来初代培養アストロサイトでは Cytochrome C oxidase 活性が有為に低下し、ミトコンドリアの形態異常と膜電位の低下が見られた。さらに、欠損マウス由来アストロサイトはミトコンドリア酸化ストレスに対し高感受性を示し、ATP、オートファジー抑制剤 3-methyladenine、カスパーゼ阻害剤 z-VAD-fmk により抑制された。

### D. 考 察

$\beta$ -ガラクトシダーゼ欠損症の遺伝子変異と NOEV 効果について、これまでの 40 の変異型についての検討結果と今回の結果をあわせると、88 のミスセンス変異のうち 23 の変異型 (26%) で NOEV のシャペロン効果を認めた。また、遺伝子型では 30~40% の  $\beta$ -ガラクトシダーゼ欠損症に NOEV の効果が期待できる。一方、効果を認めなかった変異酵素に対しては新たな化合物の探索が必要であるが、今回樹立したルシフェラーゼ細胞系は生細胞で酵素蛋白質を検出可能であり、今後化合物ライブラリーの検索などに大規模なスクリーニングな有な細胞になると考える。

$\beta$ -ガラクトシダーゼ欠損マウス脳におけるオートファジー関連蛋白質の発現上昇はライソゾーム内  $G_{M1}$  蓄積がオートファゴソームとライソゾームの融合不全を引き起こされる。培養  $\beta$ -ガラクトシダーゼ欠損アストロサイトのミトコンドリア機能異常は、ATP 添加またはオートファジー阻害剤により抑制されることから、オートファジー異常と細胞死の関連性を示唆する。最近、他のライソゾーム病でも同様の所見が得られており、オートファジー機能不全はライソゾーム病一般に共通する病態の可能性が示唆されている。今後さらに詳細な分子機能の解明を進めることで、オートファジー分解系がライソゾーム病の分子標的療法の標的となり得ると考える。

### E. 結 論

NOEV のケミカルシャペロン効果と遺伝子変異型の相関を明らかにした。ライソゾーム病に神経変成にオートファジー異常が関連することを示した。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Suzuki Y, Ichinomiya S, Kurosawa M, et al. : Chemical chaperone therapy : clinical effect in murine  $G_{M1}$ -gangliosidosis. Ann

- Neurol, 62 : 671-675, 2007
- 2) Takamura A, Higaki K, Kajimaki K, et al. : Enhanced autophagy and mitochondrial aberrations in murine GM1-gangliosidosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 28 : 482-486, 2008
  - 3) Matsumoto N, Gondo K, Kukita J, et al. : A case of galactosialidosis with a homozygous Q49R point mutation. *Brain Dev*, 30 : 595-598, 2008
  - 4) Gucev ZS, Tasic V, Jancevska A, et al. : Novel beta-galactosidase gene mutation p.W273R in a woman with mucopolysaccharidosis type IVB (Morquio B) and lack of response to in vitro chaperone treatment of her skin fibroblasts. *Am J Med Genet A* 146A : 1736-1740, 2008
  - 5) Sawada T, Tanaka A, Higaki K, et al. : Intracerebral cell transplantation therapy for murine GM1 gangliosidosis. *Brain Dev*, 31 : 717-724, 2009
  - 6) Otomo T, Higaki K, Nanba E, et al. : Inhibition of autophagosome formation restores mitochondrial function in mucopolysaccharidosis II and III skin fibroblasts. *Mol Genet Metab*, 98 : 393-399, 2009
- ## 2. 学会発表
- 1) 難波栄二, 檜垣克美 : DNA マイクロアレイを用いた GM1-ガングリオシドーシス神経変性機構の解明. 第 49 回日本小児神経学総会, 大阪, 2007.7
  - 2) 澤田 智, 田中あけみ, 瀬戸俊之, 松田潤一郎, 難波栄二, 山野恒一 : ライソゾーム病の脳内病変に対する細胞治療. 第 49 回日本小児神経学総会, 大阪, 2007.7
  - 3) 高村歩美, 檜垣克美, 松田潤一郎, 飯田真巳, 鈴木義之, 難波栄二 :  $\beta$ -ガラクトシダーゼ欠損症の神経変性における Trk 受容体の機能異常. 第 30 回神経科学大会, 横浜, 2007.9
  - 4) 檜垣克美, 高村歩美, 梶巻賢哉, 飯田真巳, 鈴木義之, 難波栄二 : GM1-ガングリオシドーシスに対するケミカルシャペロン療法のマウスモデル細胞を用いた解析. 第 49 回日本先天代謝異常学会総会, 山形, 2007.11
  - 5) 澤田 智, 田中あけみ, 瀬戸俊之, 前田光代, 高村歩美, 檜垣克美, 難波栄二, 松田潤一郎, 山口悦子, 山野恒一 : 細胞移植によるライソゾーム病脳病変の長期治療の可能性についての検討. 第 49 回日本先天代謝異常学会総会, 山形, 2007.11
  - 6) 一ノ宮悟史, 黒澤美枝子, 飯田真巳, 檜垣克美, 鈴木義之 : GM1-ガングリオシドーシスモデルマウスに対するケミカルシャペロン療法の臨床効果. 第 49 回日本先天代謝異常学会総会, 山形, 2007.11
  - 7) Higaki K, Takamura A, Suzuki Y, Nanba E : Lysosomal storage and enhanced signaling of Trk receptors in the neurons of GM1-gangliosidosis mouse brain. *International Symposium of Lysosomal Storage Diseases*, Tokyo, 2007.12
  - 8) 難波栄二, 檜垣克美 : GM1-ガングリオシドーシスとオートファジー機能異常. 第 50 回日本小児神経学総会, 東京, 2008.5
  - 9) 難波栄二, 檜垣克美, 足立香織, 李 林静, 飯田真巳, 松田潤一郎, 鈴木義之 : ヒト  $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子変異とケミカルシャペロン療法. 第 53 回日本人類遺伝学会, 横浜, 2008.9
  - 10) 難波栄二 : ライソゾーム病の中枢神経症状の治療. 第 50 回日本先天代謝異常学会総会, 米子, 2008.11
  - 11) 李 林静, 檜垣克美, 高村歩美, 飯田真巳, 松田潤一郎, 鈴木義之, 難波栄二 : GM1-ガングリオシドーシスにおける神経細胞膜機能異常と Trk シグナルの亢進. 第 50 回日本先天代謝異常学会総会, 米子, 2008.11



- 12) 檜垣克美, 高村歩美, 松田潤一郎, 鈴木義之, 難波栄二: GM1-ガングリオシドーシスモデルマウスにおけるオートファジーの異常. 第 50 回日本先天代謝異常学会総会, 米子, 2008.11
- 13) 池端宏記, 檜垣克美, 李 林静, 飯田真巳, 松田潤一郎, 鈴木義之, 難波栄二: b-ガラクトシダーゼ遺伝子変異とケミカルシャペロン療法. 第 50 回日本先天代謝異常学会総会, 米子, 2008.11
- 14) 檜垣克美, 李 林静, 高村歩美, 鈴木義之, 難波栄二: ライソゾーム病神経変性とオートファジーの異常. 第 13 回日本ライソゾーム病研究会, 東京, 2008.11
- 15) Higaki K, Nanba E, Suzuki Y: Screening of chemical chaperone effect for GM1-gangliosidosis. 11<sup>th</sup> ICIEM, San Diego, CA, 2009.8.29-9.2
- 16) 難波栄二, 檜垣克美, 鈴木義之: GM1-ガングリオシドーシスに対するケミカルシャペロン療法: 88 種類のミスセンス変異に対する NOEV の効果. 第 51 回 日本小児神経学会総会, 米子, 2009.5
- 17) Li L, Higaki K, Adachi K, Matsuda J, Ogawa S, Iida M, Iwasaki H, Suzuki Y, Nanba E: Screening of chemical chaperone effect for human mutant beta-galactosidase. 第 9 回アジア・オセアニア小児神経学会, 2009.6
- 18) Higaki K, Takamura A, Li L, Matsuda J, Suzuki Y, Nanba E: Cellular dysfunction in murine GM1-gangliosidosis. 第 3 回国際ライソゾーム病シンポジウム, 第 14 回日本ライソゾーム病シンポジウム, 名古屋, 2009.9
- 19) Li L, Higaki K, Matsuda J, Iida M, Suzuki Y, Nanba E: Screening for chemical chaperone therapy in beta-galactosidosis. 第 3 回国際ライソゾーム病シンポジウム, 第 14 回日本ライソゾーム病シンポジウム, 名古屋, 2009.9

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

## ライゾーム病の病態と治療に関する臨床的研究

分担研究者：芳野 信(久留米大学・小児科教授)

### 研究要旨

以下の 3 点につき検討した。1. ゴーシェ病の骨病変につき分析し、macrophage-colony stimulating factor の過剰により骨吸収が亢進し、反面 transforming growth factor- $\beta$  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を明らかにした。2. ムコリピドーシスⅢ型成人患者で不随意運動を認め、電気生理学的に振戦であることを明らかにした。本症も不随意運動の原因疾患に追加すべきである。3. Hunter 症候群患者の酵素補充療法に対する効果を分析し、ウロン排泄の正常化、身長伸び率の改善、肝脾腫の縮小、心筋肥厚の軽減の効果はあるが関節拘縮や脳室拡大の進行は阻止できず、臓器毎に差異があることが明らかになった。

研究協力者：

大平 智子(久留米大学小児科)

原 宗嗣(久留米大学小児科)

西村 美穂(久留米大学小児科)

渡邊 順子(久留米大学小児科)

井田 博幸(慈恵会医科大学小児科)

小林 博司(慈恵会医科大学小児科)

運動については神経学的診察、表面筋電図、脳および脊髄画像を解析した。ハンター症候群患児の治療効果の評価は市販後調査の規約に沿った項目を評価した。これらは何れも本学倫理委員会の規定に沿ったものである。

### A. 研究目的

本研究期間中(平成 19 年度～21 年度)に行った研究とその目的は以下の通りである。1) ゴーシェ病の骨病変の病態解明、2) ムコリピドーシスⅢ型患者の不随意運動の病態解明、3) ハンター症候群患者における酵素補充療法の評価に関する臨床研究。

### B. 研究方法

ゴーシェ病の骨病変については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。ムコリピドーシスⅢ型(MLⅢ)患者の不随意

### C. 研究結果

- 1) 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- $\beta$  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) ハンター症候群患児 2 名に対してイデュルス

ルファターゼの補充療法を行った。その18か月時点では、尿中ウロン酸排泄の正常化、身長伸びの改善、肝脾臓の縮小、左心室後壁・心室中隔の肥厚の軽減を認めた。いっぽう関節拘縮は不変または軽度進行、1例で脳室拡大の進行を認め、治療効果が見られる臓器とそうでない臓器との差が認められた。

## D. 考察

ゴーシェ病の骨病変については、今回の研究で明らかになったサイトカインの動態の修飾に基づく治療の開発が期待される。MLIII患者での振戦の責任病巣は明らかではないが、本症の中枢神経病変異は報告が稀でありその解明に示唆を与えると考えられる。ハンター症候群患児への酵素補充療法の効果については本症例を含むより多数例で長期間の経験の蓄積と分析が必要である。

## E. 結論

- 1) ゴーシェ病の骨病変にはサイトカインの動態が関係していることを明らかにした。
- 2) MLIIIは振戦を呈する疾患の鑑別疾患に加えるべきである。
- 3) ハンター症候群に対する酵素補充療法の効果は臓器毎に差がある。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 神戸太郎：成長発達遅滞，退行，眼振，肝脾腫を認めた1歳0ヶ月女児。症例から学ぶ先天代謝異常症。日本先天代謝異常学会編集，診断と治療社(東京)，157-160，2009。総頁数237。
- 2) Otomo T, Muramatsu T, Yorifuji T, et al. : Mucopolysaccharidosis II and III alpha/beta: mutation analysis of 40 Japanese patients showed genotype-phenotype correlation. *J Hum Genet*, 54 : 145-151, 2009 (doi:10.1038/jhg.2009.3)
- 3) Yoshino M, Watanabe Y, Tokunaga Y, et al. :

Roles of specific cytokines in bone remodeling and hematopoiesis in Gaucher disease. *Pediatr Int*, 49 : 959-965, 2007 (doi:10.1111/j.1442-200X.2007.02502.x)

### 2. 学会発表

- 1) 原 宗嗣, 大矢崇志, 渡辺順子, 山下裕史朗, 松石豊次郎, 芳野 信: 不随意運動を呈したムコリピドーシス3型の1例. 第51回日本小児神経学会総会, 米子, 2009.5.28-30
- 2) Kanbe T, Iizuka C, Watanabe Y, Yoshino M : Effects of a high-dose course with Imiglucerase in an infant with type 2 Gaucher disease. The 3<sup>rd</sup> International Symposium of Lysosomal Storage Diseases, Nagoya, 2009.9.26-27
- 3) Oohira T, Okada J, Imamura K, Watanabe Y, Hashimoto T, Yoshino M : Ulceration of legs in a 15 year-old boy: an unusual symptom of Fabry disease. The 3<sup>rd</sup> International Symposium of Lysosomal Storage Diseases, Nagoya, 2009.9.26-27
- 4) 芳野 信, 岡松由紀, 高瀬隆太, 中西未来, 木村光一: ムコ多糖症における睡眠時無呼吸の評価の意義. 第71回久留米大学睡眠障害研究会, 久留米, 2009.1.8
- 5) 芳野 信, 岡田純一郎, 渡辺順子, 松石豊次郎, 谷脇考恭, 酒井規夫: 著明な不随意運動を呈するムコリピドーシス3型の成人例. 第50回日本先天代謝異常学会, 米子, 2008.11.6-11.8
- 6) 原 宗嗣, 日高正人, 廣瀧慎太郎, 飯塚千穂, 大矢崇志, 渡辺順子, 松石豊次郎, 芳野 信: 著明な不随意運動を呈したムコリピドーシスIII型の成人例. 第452回日本小児科学会福岡地方会例会, 福岡, 2008.12.13
- 7) Yoshino M, Watanabe Y, Tajima A, Ida H, Eto Y : Cytokines and Bone remodeling in Gaucher disease. International Symposium of Lysosomal Storage Diseases, Urayasu,

2007.11.29-11.30

- 8) Otomo T, Muramatsu T, Inui K, Yorifuji T, Nakabayashi H, Ohura T, Yoshino M, Tanaka A, Okuyama T, Ozono K : Mutation analysis of GNPTAB gene in 36 Japanese mucopolipidosis II and III patients: genotype phenotype correlation? International Symposium of Lysosomal Storage Diseases, Urayasu, 2007.11.29-11.30
- 9) 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 24

Japanese mucopolipidosis II and III patients. Annual symposium of the Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism, Hamburg, 2007. 9. 4-7

G. 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