

201015021A・B

厚生労働科学研究費補助金

医療技術実用化総合研究事業

(臨床研究推進研究事業)

新規治療法が開発された小児希少難病の疫学調査と  
長期フォローアップ体制の確立に関する研究

平成22年度 総括・分担研究報告書  
平成20年度～22年度 総合研究報告書

研究代表者 奥山 虎之

平成23 (2011) 年 3月

厚生労働科学研究費補助金  
医療技術実用化総合研究事業  
(臨床研究・予防・治療技術開発研究事業)

新規治療法が開発された小児希少難病の疫学調査と  
長期フォローアップ体制の確立に関する研究

平成22年度 総括・分担研究報告書  
平成20年度～22年度 総合研究報告書

研究代表者 奥山 虎之

平成23(2011)年 3月

## 目 次

### I 総括研究報告

- 新規治療法が開発された小児希少難病の疫学調査と長期フォローアップ体制の確立に関する研究 . . . . . 1  
研究代表者 (独)国立成育医療研究センター 奥山虎之

### II 分担研究報告

- 1 ポンペ病の迅速診断法の確立とその実施 . . . . . 5  
(独)国立成育医療研究センター 奥山虎之
- 2 リソゾーム病長期フォローアップシステムの構築 . . . . . 8  
熊本大学 遠藤文夫
- 3 リソゾーム病の疫学調査のための技術開発 . . . . . 9  
熊本大学 中村公俊
- 4 ムコ多糖症Ⅱ型に対する造血幹細胞移植の効果に関する研究 . . . . . 10  
大阪市立大学 田中あけみ
- 5 ムコ多糖症Ⅳ型に対する疫学調査 . . . . . 12  
岐阜大学 鈴木康之
- 6 造血幹細胞移植を受けたムコ多糖症患者の長期予後調査 . . . . . 15  
東海大学 加藤俊一
- 7 ムコ多糖症に対する同種造血細胞移植治療の標準化と長期フォローアップ体制の確立 . . . . . 19  
東海大学 矢部普正
- 8 濾紙血を用いてのライソゾーム病のスクリーニング法の開発 . . . . . 22  
東京慈恵会医科大学 衛藤義勝
- 9 ライソゾーム病の新生児スクリーニング導入の妥当性について . . . . . 26  
(独)国立成育医療研究センター研究所 掛江直子

**III 総合研究報告**

新規治療法が開発された小児希少難病の疫学調査と長期フォローアップ体制の確立に関する研究 . . . . . 29

研究代表者 (独)国立成育医療研究センター 奥山虎之

**IV 研究成果の刊行一覧表**

. . . . . 33

**V 研究成果の刊行物・別刷り**

. . . . . 39

總 括 研 究 報 告

## 新規治療法が開発された小児希少難病の疫学調査と 長期フォローアップ体制の確立に関する研究

研究代表者 奥山 虎之 (独)国立成育医療研究センター 臨床検査部 部長

### 研究要旨

早期発見のための新生児マススクリーニング法の開発をファブリ病およびポンペ病で検討した。技術的な問題は解消し、パイロット研究の段階に至ることができた。しかし、どちらの疾患でも、酵素活性の測定値が正常下限であるが疾患を発症しない Pseudodeficiency の存在も明らかとなった。今後、これらの症例の取扱い是全国レベルでの本格的なスタートにむけて克服すべき重要課題となる。また、欧米ではあまり行われないムコ多糖症 II 型の造血幹細胞移植の効果について、後方視的な検討を加えた結果、酵素補充療法とほぼ同様な効果があることが示された。酵素補充療法には、高額な治療や週 1 回の通院の必要性などの問題もあり、造血幹細胞移植も選択肢に加えた形での治療選択に関するガイドラインの必要性が示唆された。さらに、ムコ多糖症 IV 型の自然歴調査により酵素補充療法の臨床試験の必要性が認識されるに至り、次年度中に予定されている国際共同治験に日本が参加できることが確定した。

### 研究分担者

遠藤文夫	熊本大学大学院医学薬学研究部
中村公俊	熊本大学大学院医学薬学研究部
田中あけみ	大阪市立大学大学院医学研究科
鈴木康之	岐阜大学医学部医学教育開発研究センター
加藤俊一	東海大学医学部基盤診療学系
矢部普正	東海大学医学部基盤診療学系
掛江直子	(独)国立成育医療研究センター研究所
衛藤義勝	東京慈恵会医が大学遺伝病研究講座

### A. 研究目的

これまで有効な治療手段がなかったライソゾーム病の一部の疾患で、酵素補充療法が開発された。種々の臨床症状の改善が得られるが、中枢神経症状に対して効果が期待できない、病態の進行した症例での治療効果が乏しい、莫大な費用がかかる、などの問題があり、酵素補充療法開発以前の唯一の治療法であった造血幹細胞移植を再評価する動きもある。このような背景を考慮して、本研究では、以下の目的で研究を進めた。

- 1) 血液ろ紙検体を使用したファブリ病およびポンペ病の迅速診断法を開発し、新生児マススクリーニングのパイロット研究とハイリスク群のスクリーニング検査を実施し、診断率の向上をはかる。
- 2) ムコ多糖症 II 型の骨髄移植の長期的な効果を明らかにする。
- 3) ムコ多糖症 IV 型のわが国における実態を調査し、開発途上にあるムコ多糖症 IV 型酵素製剤の臨床試験の基礎資料とする。

## B. 研究方法

### 1) ファブリー病のスクリーニング法の開発とパイロット研究の実施

Chamoles らの方法を改変し、蛍光基質を用いた酵素反応測定系の原理を利用したろ紙血検体における $\alpha$ ガラクトシダーゼ酵素活性を測定した。この方法を用いて、新生児ろ紙血検体を用いたファブリー病の新生児マススクリーニングパイロット研究と、ファブリー病症状を有する患者のハイリスクスクリーニングを行った。

### 2) ポンペ病のスクリーニング法の開発とパイロット研究の実施

ろ紙血検体中の GAA 酵素活性値を人工蛍光基質である 4-methyl-umbelliferyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside を用いて、以下の条件で測定を行った。1) GAA 活性：酸性条件下で、アカルボースによって GAA 異性体であるマルターゼグルコアミラーゼ (MGA) を阻害した活性。2) t-GAA 活性：酸性条件下で、アカルボース阻害なしによる GAA と MGA 活性の総和。3) NAG (中性 $\alpha$ グルコシダーゼ) 活性：中性条件下でのグルコシダーゼ活性。これらの活性値を用いて、%阻害率 = (t-GAA 活性 - GAA 活性) / t-GAA 活性  $\times$  100、NAG/GAA 比 = NAG 活性 / GAA 活性を算出する。またすべてのろ紙血検体に対して、PCR ダイレクトシーケンス法による p. G576S 多型解析を行い、“Pseudodeficiency”の頻度を調べた。

### 3) ムコ多糖症 II 型に対する造血幹細胞移植の後方視的検討

全国の移植施設にアンケート用紙を送りムコ多糖症 II 型の移植症例を調査した。フォローアップ施設の主治医および患者家族にもアンケート用紙を送り調査した。主な調査項目は、移植時年齢、IQ/DQ、身長、肝脾腫、心機能 (弁逆流)、呼吸機能、関節可動域、頭部 MRI、生活機能 (ADL)、FIM、尿中ウロン酸値である。

他方、ムコ多糖症親の会に所属する II 型患者家族のすべてにアンケートを送付し、骨髄移植の有無をはじめ、発病から病状の進行速度について調査した。

### 4) ムコ多糖症 IV 型のわが国における実態

全国の 200 床以上の病院小児科と整形外科 3132 施設を対象としてムコ多糖症 IV 型患者の実態把握をアンケート調査した。二次調査で報告された 16 例中、データの充分ある 14 例について身体発育を中心に解析した。

## C. 結果

### 1) ファブリー病のスクリーニング法の開発とパイロット研究の実施

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。このろ紙血を用いて、 $\alpha$ ガラクトシダーゼの酵素活性を測定し、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継続した。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。遺伝子解析では 4 名の男児と 1 名の女児にこれまで古典型のファブリー病に認められた遺伝子変異が見られた。また、遺伝子解析の結果、44 名の新生児に遺伝子変異を認めた。その中で 21 名は E66Q 変異であった。E66Q 以外の遺伝子変異を持った新生児は 23 名、男児 16 名、女児 7 名であった。このことから、男児におけるファブリー病の頻度は約 8,000 名の男児に 1 名と考えられた。活性低値の新生児とその家族に対して、遺伝カウンセリングを行い、 $\alpha$ ガラクトシダーゼ遺伝子解析を行い、フォローアップを行っている。さらに通常ファブリー病を発生することは少ないと考えられる E66Q 変異が検出された新生児と家族に対してもフォローアップを行っている。

### 2) ポンペ病のスクリーニング法の開発とパイロット研究の実施

健康対照者者 469 例のうち、G576S 多型を AA 型のホモ接合体でもつ Pseudodeficiency は 15 例であり、全体の約 3 パーセントであった。この結果は、日

本における Pseudodeficiency の割合は約 4%であるとする既報告とほぼ一致した結果だった。

Pseudodeficiency、健康対照者、ポンペ病保因者およびポンペ病患者の活性結果を、欧米のスクリーニング陽性基準 (NAG/GAA 比のカットオフラインを 30 倍以上、阻害率のカットオフラインを 60%以上に設定し、両方の条件を満たす場合をスクリーニング陽性とする) を、我々の研究対象の測定結果に当てはめると、ポンペ病患者 29 症例中 29 症例、Pseudodeficiency 15 症例中 4 症例と保因者 5 症例中 1 症例がスクリーニング陽性となった。一方、上記の条件値に加えて、さらに GAA 活性のカットオフラインを正常コントロールに対して 8%とし、すべてを満たす場合にスクリーニング陽性とする我々の基準を用いると、ポンペ病患者 29 名中 29 名と Pseudodeficiency 15 症例中 1 症例と保因者 5 症例中 1 症例が陽性と判定され、より正確に患者群と Pseudodeficiency および健康対照者を分けることが可能であった。

国立成育医療研究センターでのポンペ病新生児マス・スクリーニングを 2011 年 1 月よりパイロットスタディとして開始した。これまでに 117 名の新生児が対象となり、4 名が Pseudodeficiency と診断され、その他はすべて正常と診断された。

### 3) ムコ多糖症 II 型に対する造血幹細胞移植の後方視的検討

移植施設から回答のあった II 型の移植症例数は 26 であり、このうち患者自身より承諾とアンケートの回答が得られたのは 16 症例であった。移植後の観察期間は 5 年 5 か月から 17 年 7 が月であった。データの収集と評価が可能であった項目は、身長、IQ/DQ、頭部 MRI フィルム、エコー所見による心機能、関節可動域であった。ムコ多糖症親の会患者家族からは、55 家族 60 名の回答が得られた。うち 13 名が移植を受けていた。

患者は、発達歴より分担研究者による重症度分類 (タイプ A~D) により分け、各々のタイプ別に効果を検討した。

身長は、重症型 (タイプ C、D) の非移植

患者では 5、6 歳以降に伸びが止まり横ばいとなるのに対し、重症型移植患者ではなだらかな発育が続いた。軽症型でも身長の伸びは良くなっていた。身長の伸びは、姿勢の改善の影響も大きいと推測された。

IQ/DQ および ADL に関しては、移植時年齢が 6 歳未満の場合、良好な状態が保たれる傾向であり、3 歳未満でより明らかであった。

その他、自由記述から読み取れたものは、肝脾腫の改善といびきの消失、活動性の増加であった。

4) ムコ多糖症 IV 型のわが国における実態  
モルキオ病に特有の各種身体所見をスコア化した。重症 3 点、中等症 2 点、軽症 1 点、異常なし 0 点とし、全 13 項目、最重症 39 点、健康者 0 点とした。

モルキオ病患者では、漏斗胸、低身長スコアが最も高く、次いで X 脚、関節弛緩、頸椎亜脱臼となった。

次に個々のモルキオ病患者の身体スコアと日常生活動作 ADL との相関を検討した。

その結果、身長 110 cm 未満の患者においては、ADL と年齢は強い負の相関を示した ( $p = -0.71$ )。また関節弛緩とは中等度の負の相関、身体所見スコア総計、年齢、X 脚とは弱い負の相関を示した。身長 110 cm 以上の患者は年齢が高くても ADL が良好であることが示された。また身体所見の総スコアは X 脚および頸椎亜脱臼の重症度と中等度の正の相関を示した。年齢と身長は正の相関を示した

### D. 考察

酵素補充療法は、発症早期あるいは発症前から治療を開始することにより、その効果を最大限に引き出すことができる。その意味で、新生児マススクリーニング (NBS) の開発は重要である。本研究により、ファブリー病およびポンペ病の NBS の技術的問題は解消し、パイロット研究の段階に入った。

酵素補充療法の開発前から導入されている治療法として造血幹細胞移植がある。欧米を中心に、適応が認められていなかったムコ多糖症 II 型に対して、わが国では、相当



数のムコ多糖症患者に造血幹細胞移植が行われ、一定の効果があるとされていたが、実態は不明であった。本研究で行った調査により、造血幹細胞移植には限界はあるものの明らかな効果が認められた。酵素補充療法はまだ始まって日が浅いため、これと比較することは難しいが、少なくとも同等の効果があると思われた。今後、造血幹細胞移植の前向き臨床研究で同治療法の効果や酵素補充療法との比較研究を実施する必要がある。

本邦におけるムコ多糖症 IV 型患者の身体所見の重症度と ADL の関係は今まで明らかでなかったが、今回、14 例（男性 9 例、女性 5 例）について解析し、ADL と年齢に強い負の相関があり、年齢とともに、ADL が低下することが明らかとなった。また関節弛緩、X 脚などの身体所見も ADL に影響することを明らかにした。日本でのムコ多糖症 IV 型の実態が明らかになったことから、酵素補充療法の臨床試験の必要性が認識されるに至り、次年度中に予定されている国際共同治験に日本が参加できることが確定した。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

別紙のとおり

##### 2. 学会発表

別紙のとおり

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし。

分 担 研 究 報 告

## ポンペ病の迅速診断法の確立とその実施

研究分担者 奥山虎之（独）国立成育医療研究センター臨床検査部部長

### 研究要旨

乳児型ポンペ病に対する酵素補充療法の有効性を受けて、ポンペ病の早期発見・早期治療の重要性が認識されている。一部の国ではポンペ病の新生児マス・スクリーニングがすでに開始されている。しかし、我が国でポンペ病新生児マス・スクリーニングを行うにあたってには、“Pseudodeficiency”の存在を考慮する必要がある。本研究では、正常対照群、ポンペ病保因者、ポンペ病患者およびPseudodeficiencyのろ紙血検体を用いて、我が国でのポンペ病スクリーニングにおける適切なスクリーニング判定基準の検討を行った。Pseudodeficiencyの存在を考慮した我々のスクリーニング判定基準を用いると、ポンペ病患者 29 症例中 29 症例、Pseudodeficiency 15 症例中 1 症例、保因者 5 症例中 1 症例が陽性と判定され、欧米の判定基準よりも正確に患者群とPseudodeficiency および健康対照者を分けることが可能であった。この判定基準によるポンペ病スクリーニングの偽陽性率は 0.2%であった。また 2011 年 1 月より国立成育医療研究センターで本スクリーニング法を用いて、ポンペ病新生児マス・スクリーニングのパイロットスタディを開始した。

### 共同研究者

小須賀基通、木田和宏、藤直子（国立成育医療研究センター）：乾燥ろ紙血検体による人工蛍光基質を用いたポンペ病の迅速診断法の開発

### A. 研究目的

ポンペ病は、ライソゾーム内のグリコーゲン分解酵素である酸性 $\alpha$ グルコシダーゼ（GAA）の欠損により、主として骨格筋にグリコーゲンが蓄積し、著明な筋力低下、呼吸筋障害、心肥大を来す先天代謝異常症である。発症時期と臨床経過によりポンペ病は 3 つの型に分類できるが、最重症型である乳児型ポンペ病は、生後数か月以内に心不全、呼吸不全を呈し、1 才前後に死に至る。

2007 年 4 月に本疾患に対する酵素製剤アルグルコシダーゼアルファが我が国でも承認された。乳児型ポンペ病に対しては早期に酵素補充療法を開始することにより、ほとんどの患者の救命が可能となり、ポンペ病の早期発見・早期治療の重要性が認識されている。そのため、すでに台湾や米国の一部の州では、ポンペ病の新生児マス・スクリーニングが導入されている。我が国の人口の約 4%に“Pseudodeficiency”と呼ば

れる集団が存在する。“Pseudodeficiency”は GAA 遺伝子に p. G576S 多型を有し、GAA 活性が正常対照群の酵素活性値の 10 - 15%程度であるが、臨床症状を呈しないと考えられている。したがってスクリーニングにおいては、“Pseudodeficiency”とポンペ病の判別が必要であり、そのために我が国におけるポンペ病マス・スクリーニングの実施が困難となっていた。今回、我々は、我が国でポンペ病新生児マス・スクリーニング法を実施するにあたり、適切なスクリーニング判定基準を検討した。また本法におけるマス・スクリーニングに対する“Pseudodeficiency”の影響についても併せて検討した。

### B. 研究方法

健康対照者として 496 名（乳児 400 名、成人 96 名）とポンペ病保因者 5 名およびポンペ病患者 29 名（成人型 13 名、小児型 14 名、乳児型 2 名）を対象に、ろ紙血検体中の GAA 酵素活性値を人工蛍光基質である 4-methyl-umbelliferyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside を用いて、以下の条件で測定を行った。1) GAA 活性：酸性条件下で、アカルボースによって GAA 異性体であるマ

ルターゼグルコアミラーゼ（MGA）を阻害した活性。  
2)t-GAA 活性：酸性条件下で、アカルボース阻害なしによる GAA と MGA 活性の総和。3)NAG（中性αグルコシダーゼ）活性：中性条件下でのグルコシダーゼ活性。これらの活性値を用いて、%阻害率=(t-GAA 活性-GAA 活性) / t-GAA 活性×100、NAG/GAA 比=NAG 活性/GAA 活性を算出する。またすべてのろ紙血検体に対して、PCR ダイレクトシーケンス法による p. G576S 多型解析を行い、“Pseudodeficiency”の頻度を調べた。

さらに本検査法によるポンペ病新生児マス・スクリーニングを 2011 年 1 月よりパイロットスタディとして開始した。対象は、国立成育医療研究センターで出生した在胎週数 35 週以上かつ出生体重 2000 g 以上の新生児の中で親権者が本検査実施に同意した新生児である。現行の先天性代謝異常症マス・スクリーニングのために新生児からろ紙採血をする際、本検査用のろ紙にも血液を採取し、GAA 酵素活性測定を行った。

### C. 研究結果

健康対照者 469 例のうち、G576S 多型を AA 型のホモ接合体でもつ Pseudodeficiency は 15 例であり、全体の約 3 パーセントであった。この結果は、日本における Pseudodeficiency の割合は約 4%であるとする既報告とほぼ一致した結果だった。

Pseudodeficiency、健康対照者、ポンペ病保因者およびポンペ病患者の活性結果を、欧米のスクリーニング陽性基準（NAG/GAA 比のカットオフラインを 30 倍以上、阻害率のカットオフラインを 60%以上に設定し、両方の条件を満たす場合をスクリーニング陽性とする）を、我々の研究対象の測定結果に当てはめると、ポンペ病患者 29 症例中 29 症例、Pseudodeficiency15 症例中 4 症例と保因者 5 症例中 1 症例がスクリーニング陽性となった。一方、上記の条件値に加えて、さらに GAA 活性のカットオフラインを正常コントロールに対して 8%とし、すべてを満たす場合にスクリーニング陽性とする我々の基準を用いると、ポンペ病患者 29 名中 29 名と Pseudodeficiency15 症例中 1 症例と保因者 5 症例中 1 症例が陽性と判定され、より正確に患者群と Pseudodeficiency および健康対照者を分けることが可能であった。

国立成育医療研究センターでのポンペ病新生児マス・スクリーニングを 2011 年 1 月よりパイロットスタディとして開始した。これまでに 117 名の新生児が対象となり、4 名が Pseudodeficiency と診断され、その他はすべて正常と診断された。

### D. 考察

我々のスクリーニング判定基準を用いると、ポンペ病患者は見逃すことなく、すべて陽性と判定可能であった。さらに Pseudodeficiency15 症例中 14 例と保因者 5 症例中 4 例は正常範囲内と判定可能であり、偽陽性例を減らすことが可能であった。この判定基準によるポンペ病新生児マス・スクリーニングの偽陽性率は 0.2%であった。最終的にスクリーニング陽性と判定された Pseudodeficiency をポンペ病患者から除外するためには、p. G576S 多型解析を行うことが必要である。

実際に運用開始されたポンペ病新生児マス・スクリーニングでは、スクリーニング判定基準を満たすポンペ病患者例はなく、4 名の Pseudodeficiency を判定した。今後、検査対象例の結果を蓄積し、症例数が増えたところで本検査のカットオフ基準値が適正であるかどうかについて、レトロスペクティブに検討していく必要があると考える。

### E. 結論

我々のスクリーニング判定基準を用いることでポンペ病患者はすべて検出することが可能であったが Pseudodeficiency を含めた偽陽性も 2 症例認めた。またスクリーニング陽性例については、G576S 多型解析を行うことにより Pseudodeficiency を除外することが必要であると考えられた。

### F. 健康危険情報

なし。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1)Hayashi S, Okuyama T, Ohki H, et al. Clinical application of array-based comparative genomic hybridization by two-stage screening for 536

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）  
分担研究報告書

patients with mental retardation and multiple congenital anomalies. J Hum Genet. 2010 Oct 28.

2) Okuyama T, Tanaka A, Suzuki Y, et al. Japan Elaprase((R)) Treatment (JET) study: Idursulfase enzyme replacement therapy in adult patients with attenuated Hunter syndrome (Mucopolysaccharidosis II, MPS II). Mol Genet Metab. 2010;99:18-25.

3) Furukawa Y, Okuyama T, Iwasa K, et al. Cervical pachymeningeal hypertrophy as the initial and cardinal manifestation of mucopolysaccharidosis type I in monozygotic twins with a novel mutation in the alpha-l-iduronidase gene. J Neurol Sci. 2010 Dec 20.

4) 奥山虎之：「ライソゾーム病の診断」特集「わが国のライソゾーム病の病因、病態、診断、治療」：血液フロンティア Vol. 20, No. 4, 47-50, 2010.

5) 小須賀基通、奥山虎之：「先天代謝異常症の遺伝学・遺伝相談」見逃せない先天代謝異常、小児科臨床ピクシス 23, 197-201, 2010.

## 2. 学会発表

1) 田尾絵里子、徐朱玆、四元淳子、小須賀基通、田中藤樹、大森美香、川目裕、Dong-kyu Jin、奥山虎之。日韓のムコ多糖症における新生児マス・スクリーニングに関する意識調査。第37回日本マス・スクリーニング学会。横浜、2010. 8. 29

2) 中島英規、小須賀基通、巽国子、藤直子、藤本純一郎、奥山虎之、濾紙血検体を用いたライソゾーム酵素活性測定法の開発。第37回日本マス・スクリーニング学会。横浜、2010. 8. 28.

3) 中島英規、小須賀基通、藤直子、巽国子、藤本純一郎、奥山虎之、タンデムマス質量分析器を用いたポンペ病の診断法の開発。第52回日本先天代謝異常学会総会・第9回アジア先天代謝異常症シンポジウム、大阪、2010. 10. 22.  
症シンポジウム、大阪、2010. 10. 22.

4) Tao-Nishida Eriko, See Joo-Hyun, Sohn Young-Bae, Yotsumoto Junko, Kosuga Motomichi, Tanaka Toju, Omori Mika, Kawame Hiroshi, Jin Dong-Kyu, Okuyama

Torayuki. WHAT DO YOU THINK OF ENZYME REPLACEMENT THERAPY AND NEWBORN SCREENING FOR MUCOPOLYSACCHARIDOSIS? OPINIONS FROM PATIENTS AND FAMILIES OF PATIENTS IN JAPAN AND KOREA. Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism (SSIEM) ANNUAL SYMPOSIUM 2010、イスタンブール、2010, 8.

5) ライソゾーム病マス・スクリーニングの試みと遺伝カウンセリング。田中 あけみ、鈴木 健、奥山 虎之、藤川 研人、坂口 知子、小田 絵里、藤 直子、斎藤 三佳、澤田 智、北川 照男。第55回人類遺伝学会、大宮、2010. 10. 28.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
該当なし。

## リソゾーム病長期フォローアップシステムの構築

研究分担者 遠藤文夫 熊本大学医学薬学研究部小児科学分野 教授

### 研究要旨

リソゾーム病のひとつであるファブリー病は 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、説明と同意にもとづくファブリー病のスクリーニング検査を継続し、フォローアップ体制の構築を試みている。

#### A. 研究目的

リソゾーム病のひとつであるファブリー病は X 連鎖性遺伝形式の先天代謝異常症である。リソゾーム酵素である  $\alpha$  ガラクトシダーゼの欠損によって、細胞内に糖脂質が蓄積し、さまざまな臓器障害を引き起こす。この疾患に対して酵素補充療法が行われるようになり、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いる。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、ファブリー病のスクリーニング検査に基づいた長期フォローアップ体制の構築を試みた。

#### 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スクリーニング検査を試みた。蛍光基質を用いた酵素反応測定系を用いて、ろ紙血検体の  $\alpha$  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

ろ紙血を用いた  $\alpha$  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。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ろ紙血を用いて  $\alpha$  ガラクトシダーゼ活性を測定し、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を行った。これまでに新生児において約 256,000 名中 65 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、 $\alpha$  ガラクトシダーゼ遺伝子解析を行い、フォローアップを行っている。さらに通常ファブリー病を発生することは少ないと考えられる E66Q 変異が検出された新生児と家族に対してもフォローアップを行っている。

#### 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により、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。この方法を用いることで、酵素活性による検査を行うことができる。さらに臨床遺伝専門医による遺伝カウンセリングを行い、ファブリー病の長期フォローアップ体制の構築を試みている。

#### E. 結論

ろ紙血を用いた酵素活性測定法によって、ファブリー病の簡便な検査を行い、ファブリー病の長期フォローアップ体制の構築を試みている。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Nakamura K, Sekijima Y, Nakamura K, Hattori K, Nagamatsu K, Shimizu Y, Yasude T, Ushiyama M, Endo F, Fukushima Y, Ikeda S. Cerebral hemorrhage in Fabry's disease. *J Hum Genet.* 55, 259-61. (2010)

Nakamura K, Hattori K, Endo F. Newborn Screening for lysosomal disorders. *Am J Med Genet.* (2011 in press)

Shigeto S, Katafuchi T, Okada Y, Nakamura K, Endo F, Okuyama T, Takeuchi H, Kroos MA, Verheijen FW, Reuser AJJ, Okumiya T. Improved assay for differential diagnosis between Pompe disease and acid alpha-glucosidase pseudodeficiency on dried blood spots. *Mol. Genet. Metab.* (2011 in press)

## リゾーム病の疫学調査のための技術開発

研究分担者 中村公俊 熊本大学医学部附属病院小児科 講師

### 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、 $\alpha$  ガラクトシダーゼの欠損によって発症する。われわれは、ろ紙血測定法を開発し、ファブリー病の新生児マスキングのパイロットスタディを継続した。

#### 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る。責任遺伝子である  $\alpha$  ガラクトシダーゼの欠損によって心不全、腎不全、脳血管障害などを引き起こす。近年この疾患に対して酵素補充療法が行われるようになり、ファブリー病の早期診断が重要となっている。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キングを試みた。

#### B. 研究方法

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

#### （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

熊本地区では現行の新生児マスキングに加えてタンデムマスキングを行っている。このろ紙血を用いて、 $\alpha$  ガラクトシダーゼの酵素活性を測定し、説明と同意に基づいたファブリー病の新生児マスキングを継続した。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。遺伝子解析では 4 名の男児と 1 名の女児にこれまで古典型のファブリー病に認められた遺伝子変異が見られた。また、遺伝子解析の結果、44 名の新生児に遺伝子変異を認めた。その中で 21 名は E66Q 変異であった。E66Q 以外の遺伝子変異を持った新生児は 23 名、男児 16 名、女児 7 名であった。このことから、

男児におけるファブリー病の頻度は約 8,000 名の男児に 1 名と考えられた。

#### D. 考察

このろ紙血測定法を用いることで、酵素活性による診断を簡便に安価に行うことができる。このマスキ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。さらに、一般集団を対象としたファブリー病の疫学調査を行うことが可能となり、ファブリー病の長期フォローアップ体制の確立に有用である。

#### E. 結論

一般集団を対象としたファブリー病の疫学調査を、ろ紙血を用いた酵素活性測定法と遺伝カウンセリング、遺伝子解析などを組み合わせることによって行うことが可能であると考えられた。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Nakamura K, Sekijima Y, Nakamura K, Hattori K, Nagamatsu K, Shimizu Y, Yasude T, Ushiyama M, Endo F, Fukushima Y, Ikeda S. Cerebral hemorrhage in Fabry's disease. *J Hum Genet.* 55, 259-61. (2010)

Nakamura K, Hattori K, Endo F. Newborn Screening for lysosomal disorders. *Am J Med Genet.* (2011 in press)

Shigeto S, Katafuchi T, Okada Y, Nakamura K, Endo F, Okuyama T, Takeuchi H, Kroos MA, Verheijen FW, Reuser AJJ, Okumiya T. Improved assay for differential diagnosis between Pompe disease and acid alpha-glucosidase pseudodeficiency on dried blood spots. *Mol. Genet. Metab.* (2011 in press)

## ムコ多糖症 II 型に対する造血幹細胞移植の効果に関する研究

研究分担者 田中あけみ 大阪市立大学大学院医学研究科 准教授

### 研究要旨

ムコ多糖症 II 型に対する造血幹細胞移植の効果を検証するため、全国のムコ多糖症 II 型造血幹細胞移植症例の臨床データを集積し解析する多施設共同調査研究を行った。主な調査項目は、IQ/DQ、日常生活動作（ADL）、身長、肝脾腫、心機能、呼吸機能、関節可動域、頭部 MRI である。すべての項目についてある程度の効果が認められ、日常生活動作（ADL）、心機能、頭部 MRI では症状が明らかに発現する以前に移植することで効果が認められた。酵素補充療法と並べ評価し、適応のガイドラインを作成することが必要である。

### 研究協力者

ムコ多糖症 II 型骨髄移植研究グループ

患者はすべて番号化し、個人を特定できないようにした。

### A. 研究目的

ムコ多糖症 II 型は、日本において最も多い先天性代謝異常症の一つである。1980 年代より、日本では造血幹細胞移植による治療が行われて来ているが、欧米では否定的な見解である。近年、酵素補充療法が広く行われるようになってきているものの、高額な医療費を必要とし、毎週の点滴治療が必要である。今までに造血幹細胞移植が行われた症例について効果を再評価し、ムコ多糖症 II 型の造血幹細胞移植の適応について検討する。

### B. 研究方法

全国の移植施設にアンケート用紙を送りムコ多糖症 II 型の移植症例を調査した。フォローアップ施設の主治医および患者家族にもアンケート用紙を送り調査した。主な調査項目は、移植時年齢、IQ/DQ、身長、肝脾腫、心機能（弁逆流）、呼吸機能、関節可動域、頭部 MRI、生活機能（ADL）、FIM、尿中ウロン酸値である。

他方、ムコ多糖症親の会に所属する II 型患者家族のすべてにアンケートを送付し、骨髄移植の有無をはじめ、発病から病状の進行速度について調査した。  
(倫理面への配慮)

### C. 研究結果

移植施設から回答のあった II 型の移植症例数は 26 であり、このうち患者自身より承諾とアンケートの回答が得られたのは 16 症例であった。移植後の観察期間は 5 年 5 か月から 17 年 7 が月であった。データの収集と評価が可能であった項目は、身長、IQ/DQ、頭部 MRI フィルム、エコー所見による心機能、関節可動域であった。ムコ多糖症親の会患者家族からは、55 家族 60 名の回答が得られた。うち 13 名が移植を受けていた。

患者は、発達歴より分担研究者による重症度分類（タイプ A～D）により分け、各々のタイプ別に効果を検討した。

身長は、重症型（タイプ C、D）の非移植患者では 5、6 歳以降に伸びが止まり横ばいとなるのに対し、重症型移植患者ではなだらかな発育が続いた。軽症型でも身長の伸びは良くなっていた。身長の伸びは、姿勢の改善の影響も大きいと推測された。

IQ/DQ および ADL に関しては、移植時年齢が 6 歳未満の場合、良好な状態が保たれる傾向であり、3 歳未満でより明らかであった。

頭部 MRI 所見では、重症型（タイプ C、D）、軽症型（タイプ A、B）また年齢を問わず、脳萎縮所見が認



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

められる以前に移植を行った症例では、脳室拡大の進行はなく、小胞状の病変も減少傾向が認められた（Table 1）。

心臓弁の逆流については、86%の症例で改善あるいは病状の固定が認められた。しかし、6歳以降の移植症例で悪化するものが多かった（6/9）。重症型、軽症型また移植時年齢を問わず、弁の逆流が明らかになる以前での移植で予後がよい傾向であった。

尿中ムコ多糖（ウロン酸）量は、データが得られたすべての症例（7例）において正常域を示していた。

関節可動域もデータが得られたすべての症例（3例）ではおおむね改善していた。

その他、自由記述から読み取れたものは、肝脾腫の改善といびきの消失、活動性の増加であった。

#### D. 考察

ムコ多糖症 II 型に対する造血幹細胞移植は効果が認められた。酵素補充療法はまだ始まって日が浅いため、これと比較することは難しいが、少なくとも同等の効果があると思われた。

#### E. 結論

造血幹細胞移植は、脳萎縮が現れる以前、心臓弁逆

流が発生する以前に行うことにより、良好な効果と予後が得られることが明らかにされた。酵素補充療法と並べ、治療法選択のガイドラインを作成する予定である。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 学会発表

- 1) 田中あけみ、澤田智、奥山虎之 他 ムコ多糖症 II 型に対する造血幹細胞移植の効果に関する多施設共同調査研究（中間報告）第 113 回日本小児科学会 平成 22 年 4 月 23-25 日（岩手）
- 2) 田中あけみ、酒井規夫、奥山虎之 他 ムコ多糖症 II 型における造血幹細胞移植の中樞神経系への効果について（多施設共同研究）第 52 回日本小児神経学会 平成 22 年 5 月 20-22 日（福岡）

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

Table 1. Number of patients and change of MRI findings in each category

	Category I Cribriform change	Category II White matter signal change	Category III Ventricular enlarge-ment	Category IV Brain atrophy	Total number
Improve	9	1	4	0	14
Stable	7 (0)	15 (13)	10 (4)	11 (9)	43 (26)
Deteriorate	1	1	3	6	11

(n), Absent of lesion at baseline examination

## ムコ多糖症Ⅳ型に対する疫学調査

研究分担者 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）

研究協力者 奥山 虎之（国立成育医療センター臨床検査部・部長）

田中あけみ（大阪市立大学医学部小児科・准教授）

折居 忠夫（折居クリニック）

戸松 俊治（セントルイス大学）

### 研究要旨

ムコ多糖症ⅣA型（モルキオ病）の酵素補充療法の国際治験が進んでおり、わが国への早期導入を視野に入れた調査研究を行った。今年度は、モルキオ病患者の重症度判定のために、各種身体所見をスコア化し、ADLとの相関を評価した。その結果、身長110 cm未満の患者においては、ADLと年齢は強い負の相関を示した（ $p = -0.71$ ）。また関節弛緩とは中等度の負の相関、身体スコア総計、年齢、X脚とは弱い負の相関を示した。身長110cm以上の患者は年齢が高くてもADLが良好であることが示された。これらのデータはモルキオ病の自然歴と、酵素補充療法の効果判定に有用と考えられた。

### A. 研究目的

ムコ多糖症Ⅳ型（モルキオ病）は全身の骨病変をきたす常染色体劣性遺伝病で、従来は頸椎手術などの対症療法が行われてきたが、近年、酵素補充療法の研究が海外で進んでおり、患者の期待は大きい。一昨年から、研究者らは我が国モルキオ病患者の実態概要、身体発育を検討し、報告してきたが、今年は各種身体所見とADLの相関を比較検討した。

### B. 研究方法

#### 1. アンケート調査

一昨年度の二次調査で報告された16例中、データの充分ある14例について解析した。

#### 2. 倫理面への配慮

本研究では個人情報すべてを除外し、連結不可能匿名化してデータ処理を行った。

### C. 研究結果

#### 1. モルキオ病患者の身体所見のスコア化

モルキオ病に特有の各種身体所見をスコア化した。重症3点、中等症2点、軽症1点、異常なし0点とし、全13項目、最重症39点、健康者0点とした。

モルキオ病患者では、漏斗胸、低身長のスコアが最も高く、次いでX脚、関節弛緩、頸椎亜脱臼となった。

## モルキオ病 身体所見スコア

n=14、平均年齢 35.6歳、男9名、女5名

	3	2	1	0	平均
1. 低身長	6	6	1	1	2.21
2. 漏斗胸	8	4	2		2.43
3. 関節弛緩	4	3	4	2	1.69
4. 頸椎	1	3	5	5	1.00
5. 角膜炎		2	6	5	0.77
6. 中耳感染			2	12	0.15
7. 発声障害	1		3	10	0.50
8. 睡眠時無呼吸	1		2	9	0.42
9. 頸椎亜脱臼	5	1	4	3	1.62
10. 背柱側弯・後弯	5	2	3	4	1.57
11. 心臓弁膜症	1	2	8	3	1.07
12. 外反脚	4	2	2	6	1.28
13. X脚	5	4	1	3	1.85

## モルキオ病 ADLスコア表

スコア	4	3	2	1	0
移動	歩行 100m以上	歩行 5-100m	歩行 5m未満	車椅子	寝たきり
トイレ	自立		半介助		全介助 オムツ
食事	自立		半介助		全介助
着替え	自立		半介助		全介助
合計	16		8		0

## 2. 身体所見スコアとADLの相関

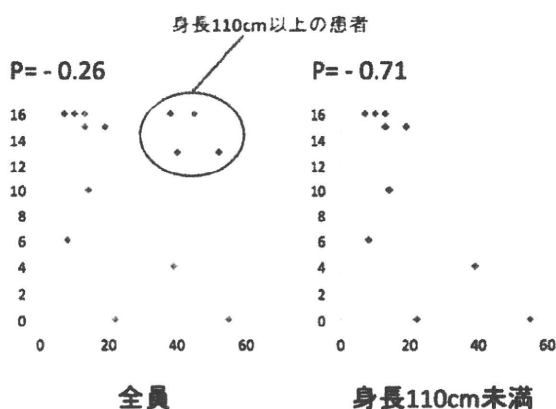
次に個々のモルキオ病患者の身体スコアと日常生活動作ADLとの相関を検討した。

その結果、身長 110 cm 未満の患者においては、ADL と年齢は強い負の相関を示した( $p = -0.71$ )。また関節弛緩とは中等度の負の相関、身体所見スコア総計、年齢、X脚とは弱い負の相関を示した。身長 110cm 以上の患者は年齢が高くても ADL が良好であることが示された。また身体所見の総スコアはX脚および頸椎亜脱臼の重症度と中等度の正の相関を示した。年齢と身長は正の相関を示した。

### 相関係数

	年齢 (身長 110未満)	ADL	身体 所見 スコア	X脚	頸椎 亜脱臼	関節 弛緩	身長	年齢
年齢	/	-0.26	-0.15	-0.08	+0.37	-0.04		
身長	+0.27	-0.19	-0.06	+0.19	+0.08	-0.16		
関節弛緩			+0.18	0.00	-0.23			
頸椎亜脱臼	+0.32	+0.16		-0.05				
X脚	-0.03	-0.26						
身体所見スコア	+0.27	-0.38						
ADL								
年齢(身長110未満)								

### 年齢とADLの相関



## D. 考察

本邦におけるムコ多糖症 IV 型患者の身体所見の重症度と ADL の関係は今まで明らかでなかったが、今回、14 例(男性 9 例、女性 5 例)について解析し、ADL と年齢に強い負の相関があり、年齢とともに、ADL が低下することが明らかとなった。また関節弛緩、X脚などの身体所見も ADL に影響することを明らかにした。これらの成果はモ

ルキオ病の自然歴の理解と、治療効果判定に有用であると考えられた。

## E. 結論

本邦におけるムコ多糖症 IVA 型患者の ADL と身体所見の関係を明らかにした。

## F. 健康危険情報

後ろ向きの調査であるため、健康被害はなかった。

## G. 研究発表

1. 著書 なし
2. 論文発表

Tomatsu S, Montaño AM, Oguma T, Dung VC, Oikawa H, Gutiérrez ML, Yamaguchi S, Suzuki Y, Fukushi M, Barrera L, Orii T. Validation of disaccharide composition derived from dermatan sulfate and heparan sulfate in mucopolysaccharidoses and mucopolipidoses II and III by tandem mass spectrometry. *Molecular Genetics and Metabolism* 2010;99:124-131

Okuyama T, Tanaka A, Suzuki Y, Ida H, Tanaka T, Cox GF, Eto Y, Orii T. Japan Elaprase Treatment (JET) study: idursulfase enzyme replacement therapy in adult patients with attenuated Hunter syndrome (Mucopolysaccharidosis II, MPS II). *Mol Genet metab* 2010;99:18-25

Tomatsu S, Montaño AM, Oguma T, Dung VC, Oikawa H, de Carvalho TG, Gutiérrez ML, Yamaguchi S, Suzuki Y, Fukushi M, Sakura N, Barrera L, Kida K, Kubota M, Orii T. Dermatan sulfate and heparan sulfate as a biomarker for mucopolysaccharidosis I. *J Inherit Metab Dis.* 2010; 33:141-150

Tomatsu S, Montaño AM, Oguma T, DunG VC, Oikawa H, Carvalho TG, Gutiérrez MG, Yamaguchi S, Suzuki Y, Fukushi M, Kida K, Kubota M, Kida K, Kubota M, Orii T. Validation of keratan sulfate level in Mucopolysaccharidosis IVA by liquid tandem mass spectrometry method. *J Inherit Metab Dis* (Epub 2010).

## 3. 学会発表

Suzuki Y, Chinen Y, Tomatsu S, Tanaka A, Okuyama T, Orii T. Efficacy of Genistein on Mucopolysaccharidosis Type III and Mucopolipidosis : A Preliminary Report. 1<sup>st</sup> Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases. 2010.3.7-10, Fukuoka

Tanaka T, Okuyama T, Suzuki Y, Sawada T, Tanaka T, Takakura H, Yabe K, Ohashi T, Ohura T, Suzuki N, Kato G, Adachi S, Wada M, Mugishima H, Kato S.

Efficacy of hematopoietic stem cell transplantation on the patients with mucopolysaccharidosis type II. 1<sup>st</sup> Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases. 2010.3.7-10, Fukuoka

田中あけみ、澤田 智、奥山虎之、田中藤樹、鈴木康之、酒井規夫、大橋十也、高倉広充、大浦敏博、加藤俊一：ムコ多糖症 II 型に対する造血幹細胞移植の効果に関する多施設共同調査研究. 第 113 回日本小児科学会学術集会. 2010.4.23-25、盛岡

Muenzer J, Beck M, Giugliani R, Suzuki Y, Tytki-Szymanska. Safety of idulsulfase in patients aged under 6 years in the Hunter Outcome Survey. ACMG Annual Clinical Genetics Meeting, Albuquerque, March 2010.

鈴木康之、知念安紹、戸松俊治. ムコ多糖症 III 型に対する Genistein の効果. 第 18 回統合医療機能性食品国際会議. 2010.7.24-25、札幌

鈴木康之、知念安紹、田中あけみ、澤田 智、奥山虎之、田中藤樹、折居忠夫、折居恒治、戸松俊治. ムコ多糖症 III 型に対する Genistein 補充の効果. 第 52 回日本先天代謝異常学会、2010.10.21-23、大阪

Tomatsu S, Montano A, Yamaguchi S, Suzuki Y, Orii T, Fujii T, Fukushi M. Newborn screening for MPS by using Liquid tandem mass spectrometry method. 第 52 回日本先天代謝異常学会、2010.10.21-23、大阪

#### 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
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし