

(Accepted on April 9, 2010)

Key words : family function, child care, premature baby, gender, lifework balance

はじめに

近年、少子化が加速している中、早産・低出生体重児の出生割合が増加している¹⁾。低出生体重児はその「育てにくさ」や出生時からの親子分離による愛着障害、虐待など、育児に困難をきたすケースが多い²⁾と言われる。

低出生体重児の保護者たちが抱える問題は、一般的な育児上の問題³⁾と、低出生体重による成長・発達への影響からくる問題⁴⁾などであり、特殊であることが多い。また、低出生体重児における標準的な成長発達の基準が存在しないため、乳幼児健診の場で、他児と比較されることによる母親の心理的な負担が大きいと推察される。

育児に関する多くの調査では、子どもの出生時体重が母親の生活に及ぼす影響についての報告は少ない。そこで、本研究では、出生時体重が母親の育児および日常生活にどのような影響を及ぼしているのかについて乳幼児および学童について調査し、育児支援の在り方について検討したので報告する。

対象および方法

研究対象は、Y市に在住する0～12歳までの子供の保護者であり、人口構成比から6,000件を無作為抽出し調査を行った。

調査期間は2009年2月12日～2009年2月26日であり、無記名の自記式質問調査票とプライバシー保護などの倫理的配慮を記した文書を郵送で配布、および回収した。

回収は2,638 (回収率44.0%)であった。今回は母親の生活への影響調査であるため、母親以外によるアンケートの回答は除外し、有効回答は2,532 (有効回答率96.0%)であった。

調査内容は、出生時体重、家族構成、家族機能(家族APGAR⁷⁾)、就労状況、育児に関する受け止め方などである。

出生時体重が2,500g未満の低出生体重児について、本調査では更に極低出生体重児(出生時体重が1,500g未満)と超低出生体重児(出生時体重が

1,000g未満)に分類して検討した。家族機能の測定にはGabriel Smilksteinが開発した家族APGAR (Adaptability Partnership Growth Resolve)⁷⁾の日本語版を用いた。日本語版は和田⁸⁾が翻訳し、5項目からなる自記式質問用紙で、各項目3段階での自己評価で得た回答により得点化される。各々に0～2点が与えられ10点満点で採点する。0～6点を家族機能障害あり、7～10点を家族機能障害無しと判断する評価法である。育児に関する受け止め方については、「不安—安心」「苦しみ—楽しみ」「不満足—満足」「空虚感—充実感」の各項目について、スケールを示し、主観的育児観について7段階で回答を求めた。

分析方法としては出生体重と家族構成との関係についてオッズ比および95%信頼区間、そのほか χ^2 検定、t検定、一元配置分析(その後の検定Tukey (T))を行い、5%以下をもって有意差ありとした。統計解析ソフトは、SPSS Ver. 18.0 J for Windows (SPSS社)を使用した。

倫理的配慮として、対象者へは文書で説明、無記名の調査とし、返信をもって同意とした。なお、本研究計画に関しては鳥取大学医学部倫理審査委員会の承認を得た(承認番号1160)。

結 果

対象の子どもの各年齢と出生体重を表1に示す。生時体重が2,500g未満の児は306名(12.4%)であった。

家族構成について、両親揃った拡大家族と核家族、一人親の拡大家族と核家族に分類し、その割合を出生時体重別に比較した。核家族がどの出生体重でも多く占めた。また、出生体重が少なくなるに従い、一人親家族の割合が多かった(図1)。出生時体重別に一人親の相対危険度をみると、1,500g未満は適正体重児に比べ3.75 (95%CI: 1.05 - 13.46)、1,000g未満は適正体重児に比べ5.63 (95%CI: 1.45 - 21.46)で有意な結果であった(表2)。

出生時体重別に家族機能(家族APGAR)の平均点を比較すると、何れも7～10点の正常な

表1 子どもの年齢出生時体重別人数

出生体重 年齢					(%)
	1,000g未満	1,500g未満	2,500g未満	2,500g以上	計
0	1 (1.2)	2 (2.4)	9 (10.8)	71 (85.5)	83 (100.0)
1	1 (0.8)	0 (0.0)	15 (11.8)	111 (87.4)	127 (100.0)
2	2 (1.0)	4 (2.0)	23 (11.2)	176 (85.9)	205 (100.0)
3	0 (0.0)	1 (0.5)	12 (5.5)	204 (94.0)	217 (100.0)
4	0 (0.0)	0 (0.0)	24 (11.1)	192 (88.9)	216 (100.0)
5	2 (0.9)	1 (0.4)	12 (5.3)	210 (93.3)	225 (100.0)
6	1 (0.4)	1 (0.4)	31 (11.8)	230 (87.5)	263 (100.0)
7	1 (0.5)	2 (1.0)	32 (15.5)	171 (83.0)	206 (100.0)
8	3 (1.3)	2 (0.9)	21 (9.3)	199 (88.4)	225 (100.0)
9	2 (1.1)	0 (0.0)	27 (14.4)	158 (84.5)	187 (100.0)
10	3 (1.3)	0 (0.0)	21 (9.3)	201 (89.3)	225 (100.0)
11	5 (2.5)	1 (0.5)	27 (13.3)	170 (83.7)	203 (100.0)
12	1 (0.7)	1 (0.7)	15 (10.0)	133 (88.7)	150 (100.0)
計	22 (0.9)	15 (0.6)	269 (10.6)	2226 (87.9)	2532 (100.0)
2,500g未満/以上		306	(12.1)	2226 (87.9)	2532 (100.0)

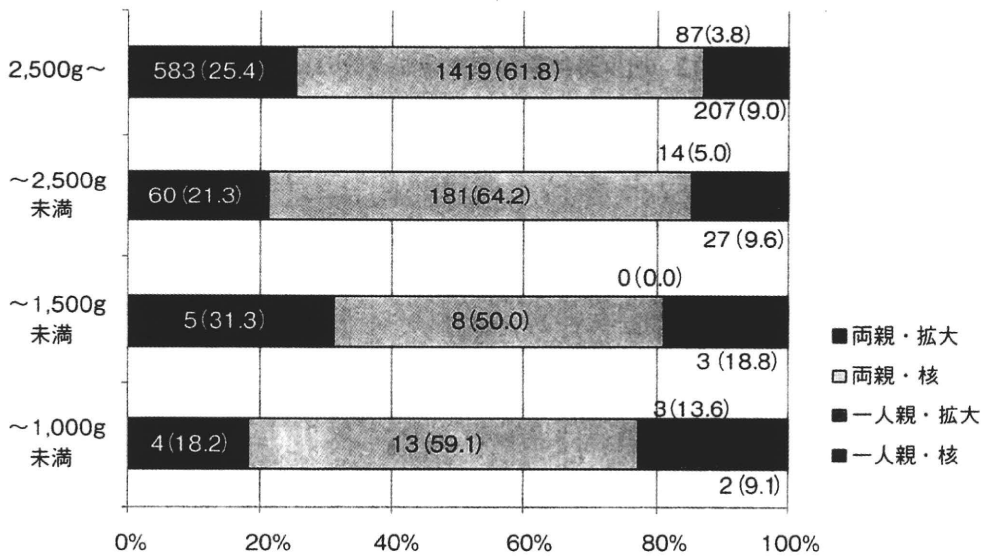


図1 出生時体重別でみた家族形態の割合

n (%)

家族機能の範囲内にあり、有意な差は認められなかった(図2)。家族形態別に家族機能(家族APGAR)の平均点を比較すると、両親揃った家族では機能障害を認めなかったが、一人親家族では家族機能障害が認められた。また、両親揃った拡大家族と一人親の拡大・核家族、両親揃った核

家族と一人親の核家族との間で有意な差を認めた(図3)。

次に、母親が出産を機に就労状態を変化させた割合について、出生時体重の、適正体重(出生時体重2,500g以上)と低出生体重(出生時体重2,500g未満)で比較したところ低出生体重群では

表2 出生時体重別にみた一人親の相対危険度

出生時体重	OR	(95%信頼区間)
1,000g未満	5.63	(1.48 - 21.46)
1,500g未満	3.75	(1.05 - 13.46)
2,500g未満	1.01	(0.60 - 1.70)

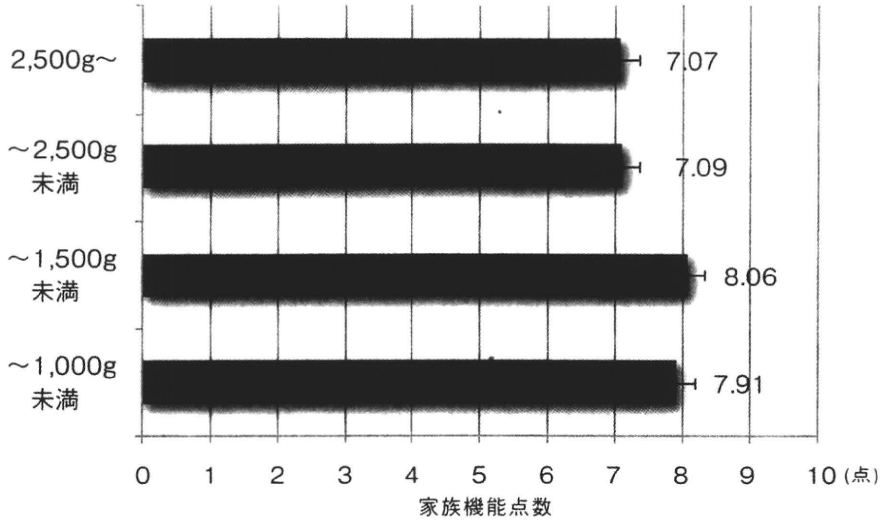


図2 出生時体重別家族機能点数の比較

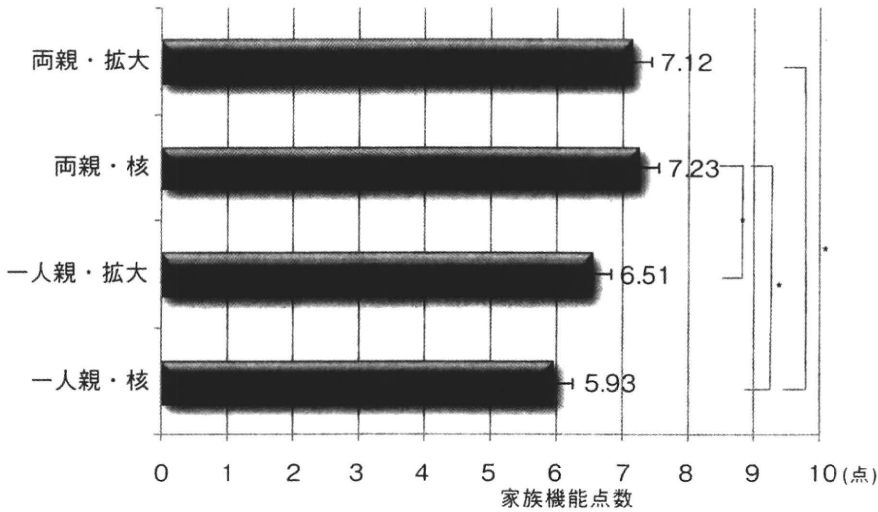


図3 家族形態別家族機能点数の比較

*P<0.05

出産後の母親の離職が有意に多くみられた (p < 0.01)。出生時体重別離職について相対危険度をみると、低出生体重群は適正体重群に比べ、1.34

(95%CI: 1.01 - 1.78) と有意に離職が高かった。離職したものの中で、予定退職以外の離職理由を出生時体重別にみたところ「保育サービスが受けら

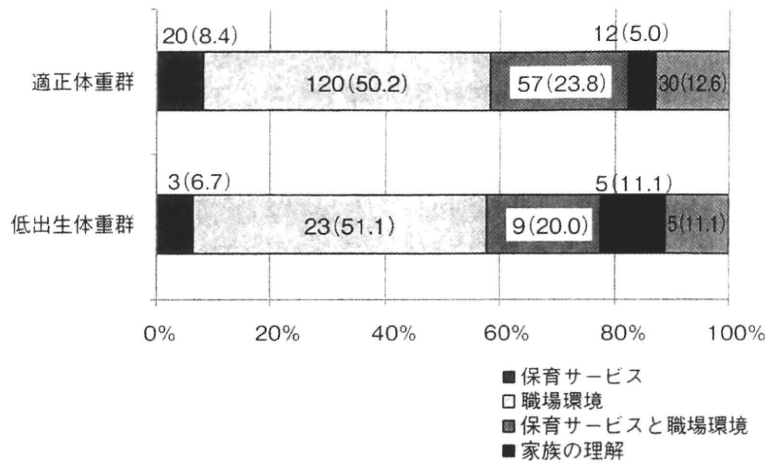


図4 出生時体重別の離職理由（予定退職を除く）

n (%)

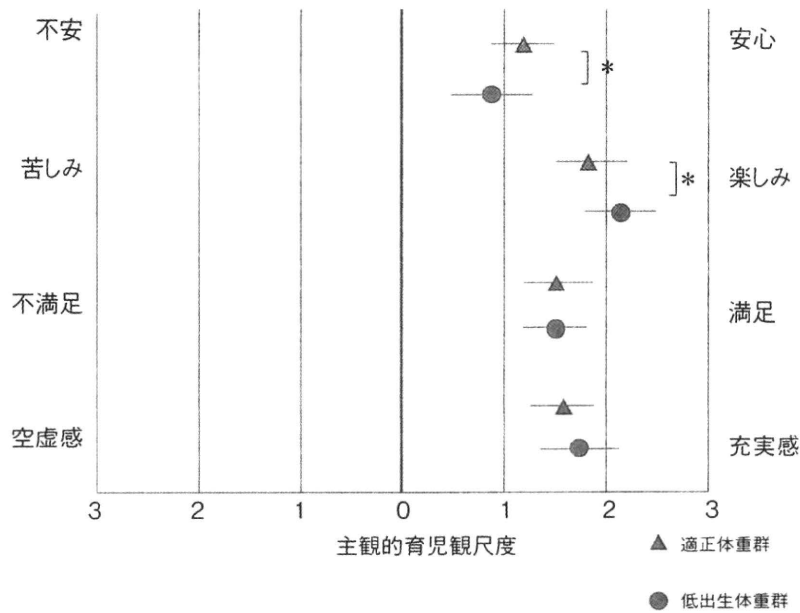


図5 育児に関する気持ち

*P<0.05

れなかった」「職場環境が育児に適さなかった」「保育サービス、職場環境ともに育児に適さなかった」「家族の理解が得られなかった」などの理由が挙げられた。体重群別で比較したところ、有意差は認めなかったが、適正体重群に比べ低出生体重群に「家族の理解が得られなかった」が多かった(図4)。

育児に関する性役割認識について体重群別に比較したが各群ともに「男女が同じように育児を担

うべき」と考える者が最も多く、次いで「女性が主になって育児を担うべき」という考え方が多かったが、体重による有意差は認められなかった。

育児に対してどのような気持ちを持っているかについての比較をした。ここでは、育児に対する満足感・充実感などの子どもへの愛着は関連が認められなかったが、「不安—安心」「苦しみ—楽しみ」については適正体重群と低出生体重群で有意差が認められた ($p < 0.05$) (図5)。

考 察

今回の調査では2,500未満の低出生体重児が全体の12.4%を占めていた。低出生体重児は平成18年の厚生労働省の人口動態統計による全国平均で9.6%であり、今回調査した自治体での平成20年度の低出生体重児出生率は9.1%であった。これらを比較すると、今回の調査対象者で低出生体重児の割合が多かった。

低出生体重児の保育においては、成長、発達の問題や「育てにくさ」などの報告があることから、出生体重が母親の生活にどのような影響を及ぼしているのかについて、0～12歳児をもつ保護者を対象に調査を実施した。

家族の理解、協力が重要と考え、出生時体重別に家族構成をみたところ、出生時体重の少ない群で、一人親家族が有意に多くみられた。今回の調査では一人親になった時期を明らかにしていないため、低出生体重児の出生が要因で一人親になったのか、あるいは元来、不安定な家族関係であった母親が低出生体重児を出産したのかについては不明である。しかし、低出生体重児を抱える家族では、明らかに一人親が多い現状を踏まえ、周産期看護では家族関係の調整や家族の分離が起きないような配慮をすることも重要である。

従来、結婚や妊娠というイベントを機会に離職する女性は多かった。しかし、現在、保育環境や母親の就労支援政策などにより、就労を継続する女性が増加してきている。今回の調査では、適正出生体重児の母親に比べ、低出生体重児の母親では出産後の離職が有意に多いことが判明した。通常、出産後に就労を継続していくためには家族の理解、職場の環境とともに、母親に代わる保育者が必要になってくる。離職理由に有意差は認められなかったものの、低体重児を抱える母親の離職理由に「家族の理解が得られない」というものが多かった。低体重児を抱えての就労は職場環境や保育施設の充実も重要であるが、家族内でのコンセンサスが得られないことによる、母親の不本意な離職があることに注目しなくてはならない。

家族は多面的な機能を担い、生殖、経済、保護、教育、保健、愛情などがあげられる。家族形態では出生時体重による差が大きく認められたものの、家族機能では出生時体重による有意な差は認められず、一人親家族では母親への負担が大き

く、家族機能が低下しているのではないかと推察した。しかし、家族機能点数では出生体重による有意な差は認められなかった。出生時体重別で家族機能スコアに差異がなく、機能不全が認められなかったのは、重度の家族機能障害を生じると家族破綻を起こしてしまうために家族構成が変化したためではないかと推察する。ある程度家族機能が悪化してしまうと、家族は安定化をするため家族崩壊してしまい、そのため出生体重別でみたところ、家族機能に差異を示さなかったと考えられる。この家族構成の変化は家族の安定化によるものであり、森山らが家族システム看護による家族の捉え方¹⁰⁾で、Wright & Leaheyがサイバネティクス理論から導き出した家族における重要概念¹⁰⁾として述べているものと一致している。一方、一人親では有意に家族機能が低く、安定化へ形態変化ができない家族が機能を悪化させている。一人親世帯では母親の負担が大きく、子どもへの影響が少なからずあるものと推察され支援が必要である。

育児に対する感情として、今回は「安心—不安」「楽しみ—苦しみ」「満足感—不満足感」「充実感—空虚感」という指標でみた。「安心—不安」の質問の中で、「安心」点が低体重児群で有意に低得点であり、「楽しみ—苦しみ」の質問では「楽しみ」点が低体重群で有意に高得点を示した。低出生体重児の育児をしていく上で、母親は育児に対して、不安を感じつつも、成長に楽しみを感じることができていると推察した。

低出生体重児の出生は母子の生活に長期にわたって影響を及ぼすことが明らかになったが、その出生割合は年々増加し、周産期医療の分野では深刻な問題になってきている。低出生体重児出生の原因は早期産によるもののほか、子宮内での発育障害などがある¹¹⁾。その要因には身体的要因と、社会的な要因が考えられ、不安定な家族関係、特にパートナーとの関係についてもその要因のひとつ¹²⁾といわれる。身体的要因では母親の非妊娠時体重が50kg以下の痩せや喫煙など¹³⁾があげられる。また性行為感染症 (Sexually Transmitted Disease) による膣感染症もその要因¹⁴⁾とされている。低出生体重児の出生につながる早産予防、子宮内発育不全の予防には、思春期からの生活指導、禁煙指導などきめ細やかな保健指導が必要である。今回明らかになった家族形態の問題では母

親のみでなく、家族にも着目し、妊娠中から家族の理解と協力を得られるような支援が重要であると考える。

本研究の限界については、家族構成の変化時期およびその原因について詳細な理由、離職した職場の就労環境などの情報が欠如していたことである。今回の調査は、対象を年齢構成比で抽出し、回答が2,000を越す大規模で母集団をより反映しやすい調査方法で実施できた点などが優れた点と思われる。今後は、具体的介入について検討を加え解析していく必要がある。

結 語

出生時体重が母親の育児・日常生活にどのような影響を及ぼしているのか、明らかにし、育児支援の在り方について検討することを目的に0歳から12歳の児をもつ保護者へ調査研究を実施した。低出生体重では家族構成が一人親の家族、出産を機に離職するものが有意に高く、相対危険度も高かった。家族機能は出生時体重による差が認められなかったが、家族形態で一人親世帯で有意に家族機能低下を認めた。育児に対する感情として、適正出生体重児の母親に比べ低出生体重児の母親では育児の「不安」が有意に高い一方で「楽しみ」が大きいという結果が得られた。

本稿を終えるにあたり、調査にご協力いただいた、市役所児童家庭課の皆様および、回答していただいた保護者の皆様に感謝申し上げます。

なお、本研究は平成20年度鳥取大学医学研究助成により実施した。

文 献

- 厚生労働省. 人口動態統計. 2009.
- 小泉武宣. NICUと虐待予防 不適切な育児を避けるには. 小児科臨床 2005; 58: 1649-1658.
- 安藤朗子, 高野陽, 小山修, 井川尚, 庄司順一, 佐藤紀子, 山口規容子. 極低出生体重児の保育所生活に関する調査研究 (2) 入所児の発育・発達状況について. 日本子ども家庭総合研究所紀要 2004; 40: 189-200.
- 安藤朗子, 高野陽, 井川尚, 佐藤紀子, 石井のぞみ, 山口規容子. 極低出生体重児の発達研究 (1) 修正1才6ヶ月の発達状況について. 日本子ども家庭総合研究所紀要 2005; 41: 225-233.
- 安藤朗子, 高野陽, 井川尚, 栗原佳代子, 佐藤紀子, 石井のぞみ. 極低出生体重児の発達研究 (3) 3歳児の発達状況について. 日本子ども家庭総合研究所紀要 2007; 43: 281-288.
- 安藤朗子, 高野陽, 井川尚, 栗原佳代子, 佐藤紀子, 石井のぞみ, 山口規容子. 極低出生体重児の発達研究 (4) 6歳時(就学前)の発達状況について. 日本子ども家庭総合研究所紀要 2008; 44: 317-323.
- Gabriel S. A personal for a family function test and its use by physicians. J Fam Prac 1978; 6: 1231-1239.
- 和田紀子. 3歳児健診を利用した児にみられる問題と家族機能の評価. 小児保健研究 2000; 59: 25-34.
- Mark M. The use of the family APGAR in screening for family dysfunction in a family practice center. J Fam Prac 1987; 24: 394-398.
- 森山美知子. 家族システム看護の概要. 森山美智子編, ファミリーナーシングプラクティス 家族看護の理論と実践. 東京, 医学書院. 2001. p. 30-41.
- 濱中拓郎, 鎌田久美子, 石橋さやか, 瀬戸佐和子, 木下聡子, 福井温, 門脇浩三, 末原則幸他. 超低出生体重児Light for date infants (LFD) におけるその母体臨床背景について 胎児の発育像と分娩の決定方法 IUGRの原因や病像の変遷. 近畿新生児研究会会誌 2006; 15: 1-8.
- 藤田景子, 高田昌代. 低出生体重児を出産した母親とドメスティック・バイオレンス (DV) との関係. 日本新生児看護学会誌 2008; 14: 6-14.
- 斎藤茂. 早産の原因と病態. 日本産科婦人科学会雑誌 2005; 57: 1555-1559.
- 天満久美子, 下屋浩一郎, 村田雄二. 早産の原因. 産婦人科治療 2005; 91: 1-6.

低身長児の心理的側面

新しい対面式身長イメージ評価尺度の開発

研究代表者 花木啓一（鳥取大学医学部保健学科 母性・小児家族看護学講座）
共同研究者 西村直子、遠藤有里、南前恵子
（鳥取大学医学部保健学科 母性・小児家族看護学講座）
田中敏章（たなか成長クリニック）
堀川玲子（国立成育医療研究センター内分泌代謝科）
有阪 治（獨協医科大学小児科）
神崎 晋（鳥取大学医学部周産期・小児医学分野）

はじめに

低身長であることは、小児にとって心理社会的ストレスの要因となりうるとされている¹⁾。しかしながら、小児が感じているストレスが低身長自体に由来していて、低身長であることで心理社会的適応に困難を生じていることを証明できた研究は希少である²⁾。

小児の心理社会的適応状態は、実測の身長より小児自身の持つ身長のイメージとより関連しているとされている^{3) 4)}。たとえば、実際に身長が低くても「自分は身長が低い」という認識がないと、心理社会的適応が肯定的な場合がある。逆に、平均的な身長でも「自分は背が低い」と感じていると心理社会的な不適応が起りやすい^{5) 6)}。このように、小児のもつ身長のイメージと実測の身長とは必ずしも一致しないとされているので、小児の健全な心理社会的適応を支援していくためには、小児自身のもつ身長イメージを正確に評価することが重要であるといえる。

自身の身長イメージを評価する方法として、従来はシルエット式が用いられていたが、この方法は人間の模式図を平面に並べたもので、日常的に身長を意識する場面とは異なる。そこで私たちは、児が相手と対面している模式図を作成し、日常的に感じる身長差を意識しながら図を選択する評価方法（以下、対面式）を開発した。

低身長小児の心理社会的適応の指標としては、親の立場からみた児童の問題行動についての調査研究が主に報告されている^{7) 8)}。これに対して本研究では、Self-Perception Profile法によって子ども自身の自己概念を評価し、心理社会的適応の指標とした。

本研究では、身長イメージの評価方法として、対面式とシルエット式を実測身長と比較することにより、イメージ身長の適切な評価方法を確立すること（研究1）と、イメージ身長と小児の自己概念の関連を明らかにすることにより、イメージ身長法の臨床の場での応用の可能性を検討すること（研究2）を目的とした。

方法

1) 対象

正常身長群と低身長群を対象とした。正常身長群は、A市の小学校・中学校・高校に通学している6～18歳の身長が $-2.0 \sim +2.0$ SDの小児916名を対象とした。低身長群は、低身長を主訴に2009年3月～8月に3施設の外来を受診した6～18歳の81名を対象とした。

正常身長群では、小学校・中学校の児童生徒へ質問紙を担任より配布し、郵送もしくは学校への持参により回収した。高校生徒へは、担任が質問紙を配布しその場で回収した。低身長群では、外来受診時に質問紙を小児へ配布し記入を求めた。

2) 調査項目

実測身長・イメージ身長・心理社会指標を含む自記式の質問紙を用いて調査を実施した。

a) イメージ身長

従来から使用されているシルエット式と今回新たに開発した対面式の2つの方法を用いて評価した(図1、図2)。

従来用いられているシルエット式は、3、25、50、75、97パーセンタイルに相当する身長の人型を平面的に並べたものから、自分の身長がどれにあてはまるかを選択させるものである(図1)。

本研究で開発した対面式は、こちらを向いている50パーセンタイルの平均的な身長の小児と、それぞれ3、25、50、75、97パーセンタイルの自分が向かい合っている図を用い、平均的な身長の小児と向かい合った場合に、自分がどの図に相当するかを選択させるものである(図2)。

図1. シルエット式

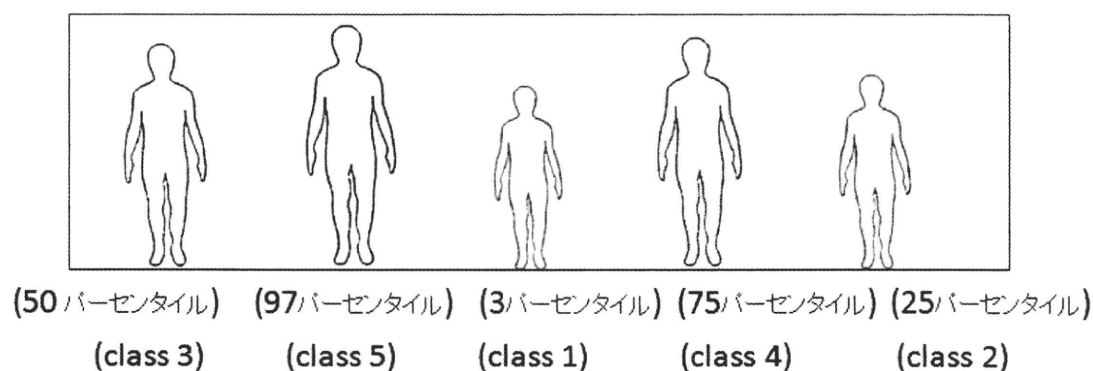
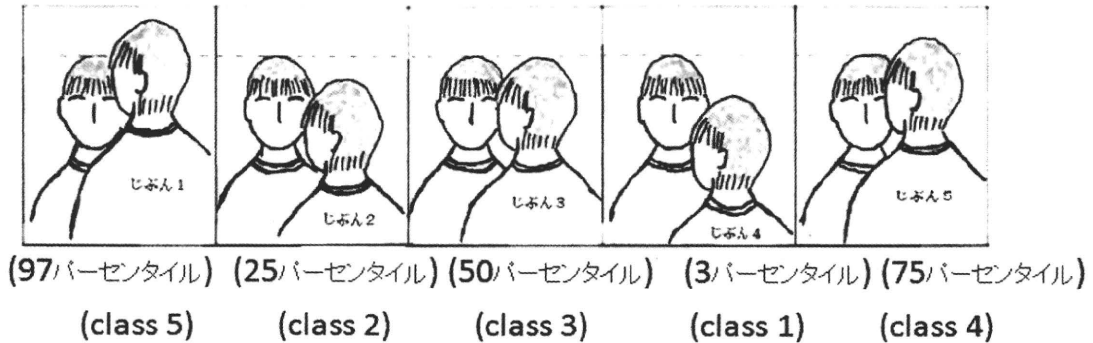


図2. 対面式



従来のシルエット式では人間の模式図を一行に並べているが、自分の身長をこのような平面図で意識することは日常的ではなく、必ずしも実際に児童が認識している自己の身長イメージと一致しているのかは議論的であった。Hallは約2メートルの距離で相手を見下ろすと威圧感があると述べており¹⁰⁾、自分の身長をより意識するのはエレベーターや満員電車など誰かと相対している時ではないかと推察された。これらのことから、対面式は、従来法に比べて自分と他人の身長差をより正確に認識させることを目的として作成した。

実測身長とシルエット式・対面式イメージ身長はそれぞれ、低身長から高身長の順に5つに区分し、それぞれclass 1～5と表記し、その数値をノンパラメトリック分析に用いた。なお、順番によるバイアスを避けるために、半数の小児にシルエット式、対面式の順番に答える質問紙を配布し、あとの半数の小児には対面式、シルエット式の順番に答える質問紙を配布した。

b) 心理社会的指標

Harterによって開発されたSelf-Perception Profileの日本語版を用いた（以下、SPP）⁹⁾。SPPは学業能力・運動能力・容姿・友人関係・道徳性・全体的自己価値の6つと、高校生については親友関係・異性関係・職業の3つの側面を加えた指標で構成されている。各側面の粗点のSDスコアを評価に用いた。4件法にて各項目で評価の高い方から4、3、2、1と得点化しており、得点が高い方が自尊感情が高いことを示す。

3) 分析方法

統計用パッケージ SPSS ver 13.0を用いた。単純集計、Man-Whitney検定、Kruskal wallis検定、一元配置分散分析を用いて検討した。そして有意差があった場合にはBonferroni法による多重比較を行った。関連要因の分析ではSpearmanの相関係数 (ρ)、重回帰分析を用いた。なお、許容度、VIF値より多重共線性の問題はないと判断した。有意水準は $p < 0.05$ もしくは $p < 0.01$ とした。

4) 倫理的配慮

鳥取大学倫理審査委員会の承認を得て実施した（承認番号1163、1273）。対象者とその保護者に

は文書にて研究の目的・意義などを説明した。調査は匿名で行い、回答は任意とした。質問紙の提出をもって同意とした。

研究 I

結果

表 1 は正常身長群の属性である。質問紙を提出した455名中、有効な回答は398名であった。小・中・高生いずれも身長SDスコアの平均はほぼ0であり標準的な身長の分布を示す集団であった。

表 1 正常身長群の属性

	n	身長cm	身長SDスコア	range	体重Kg
小学生 2年 男	7	124.1±5.3	+0.1±1.0	-1.7~+1.1	25.7±6.5
女	14	122.8±3.9	+0.2±0.9	-1.5~+1.6	22.3±1.8
4年 男	10	132.9±6.4	-0.2±1.1	-1.7~+1.7	29.9±5.1
女	12	135.3±5.6	+0.2±0.8	-1.2~+1.4	31.7±4.7
6年 男	13	144.6±6.4	-0.2±0.8	-1.9~+0.9	35.5±4.9
女	9	146.0±4.9	-0.2±0.7	-1.3~+1.1	36.3±5.4
中学生 1年 男	15	153.3±9.3	0±0.9	-1.4~+1.7	43.5±8.6
女	18	152.2±5.4	-0.1±0.9	-1.7~+1.0	43.7±6.0
2年 男	11	162.3±4.4	+0.3±0.5	-0.6~+1.0	50.5±6.5
女	13	155.2±3.6	0±0.6	-0.9~+1.0	46.6±6.0
3年 男	9	167.6±6.9	+0.3±1.0	-1.7~+1.4	52.7±5.4
女	11	157.1±5.3	+0.1±1.0	-1.8~+1.4	47.3±4.4
高校生 1年 男	53	168.4±4.8	0±0.8	-1.7~+1.7	57.7±6.9
女	50	158.4±4.3	+0.2±0.8	-1.4~+1.7	47.8±5.7
2年 男	43	170.9±4.4	+0.1±0.8	-1.9~+1.8	59.5±7.5
女	43	157.1±4.1	-0.1±0.8	-1.8~+1.9	47.8±5.3
3年 男	30	171.6±4.6	+0.1±0.8	-1.4~+1.6	62.5±10.1
女	37	159.0±4.4	+0.2±0.8	-1.1~+1.9	52.7±14.0

(m±SD)

図 3 に実測身長とイメージ身長の相関を示す。小・中・高生いずれの年齢でも、対面式イメージ身長のほうがシルエット式イメージ身長より、実測身長との相関は良好であった (表 2)。

図 3 実測身長とイメージ身長の相関：正常身長群

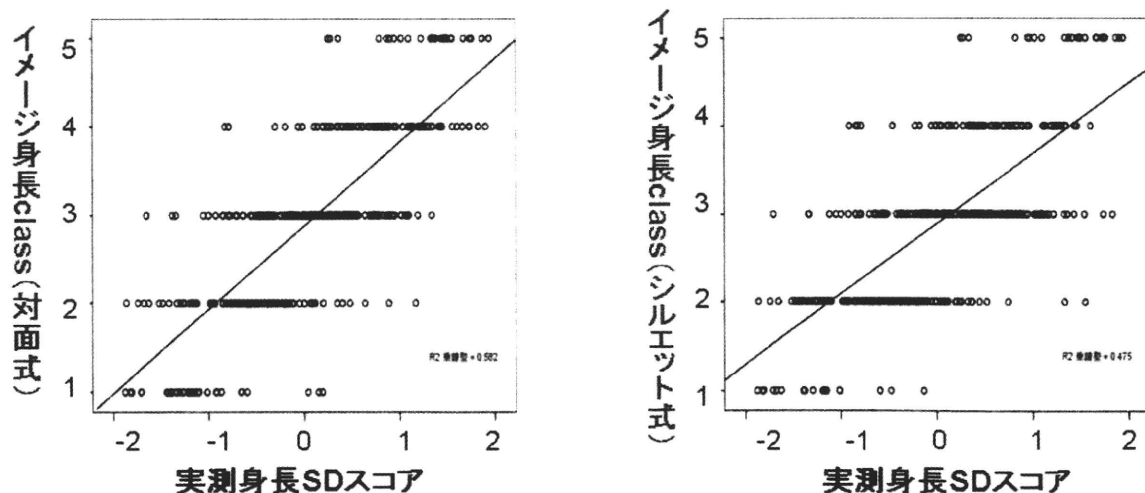


表2 実測身長とイメージ身長の相関係数 (ρ) : 正常身長群

	相関係数(ρ) (Spearmanの相関)			
	小学生	中学生	高校生	小中高
実測身長 vs イメージ身長(対面式)	0.599	0.823	0.786	0.765
実測身長 vs イメージ身長(シルエット式)	0.549	0.731	0.703	0.682

考察

実測身長とイメージ身長との相関が、いずれの年齢でもシルエット式より対面式のほうが高値であったことより、対面式イメージ身長法の方が小児が日常生活で認識している身長差を反映している可能性が示唆された。以下では対面式イメージ身長法を用いて小児の自己概念との関連の検討を行う。

研究II

結果

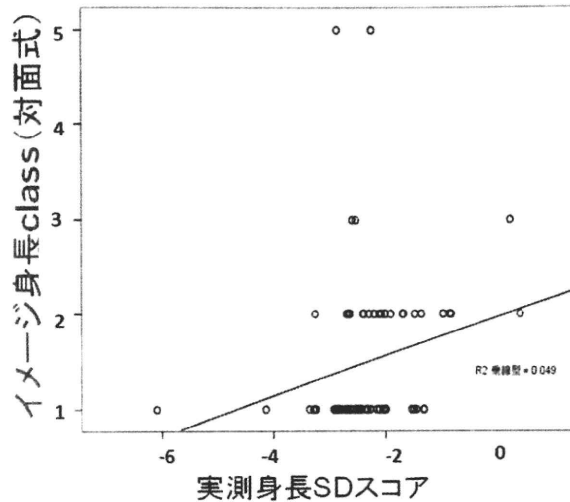
表3は低身長群の属性である。平均年齢は11.6歳、身長SDスコアの平均は-2.3、SDの範囲は-6.1~-0.4であった。

表3 低身長群の属性

					n	身長cm	身長SDスコア	range	体重Kg	
男子(n=48) 女子(n=26) Total(n=74)										
年齢	平均	11.2歳	12.4歳	11.6歳	小学生 男	25	120.1±8.7	-2.3±0.8	-4.1~+0.2	23.5±5.4
	SD	2.5	2.9	2.7	女	12	123.6±11.4	-2.5±0.7	-3.4~-0.8	24.8±7.8
	Range	7~17	7~17	7~17	total	37	121.7±9.6	-2.3±0.8	-4.1~+0.2	23.9±6.2
身長SDスコア	平均	-2.3	-2.3	-2.3	中学生 男	20	139.7±7.6	-2.4±1.2	-6.1~+0.4	35.7±9.3
	SD	1	0.5	0.9	女	8	141.4±3.5	-2.6±0.4	-2.6~-1.5	34.9±6.5
	Range	-6.1~-0.4	-3.3~-0.8	-6.1~-0.4	total	28	140.1±6.6	-2.3±1.0	-6.1~-2.3	35.4±8.5
					高校生 男	3	159.2±4.1	-1.9±0.9	-2.7~-0.9	43.0±7.6
					女	6	145.7±2.8	-2.3±0.5	-2.9~-1.7	42.5±3.9
					total	9	150.1±7.4	-2.1±0.6	-2.9~-0.9	42.1±0.6

低身長群の実測身長とイメージ身長の相関を図4に示す。低身長群のイメージ身長と実測身長の相関は正常身長群に比べ低値 ($r=0.22$) で、中には大きく乖離している例がみられた。

図4 実測身長とイメージ身長の相関：低身長群



次に低身長群についてイメージ身長と実測身長の乖離の度合いを記述統計により分析した（表4）。

表4 イメージ身長と実測身長の差異：低身長群

属性		イメージ身長class-実測身長class						
		-2	-1	0	1	2	3	4
治療の有無	あり(n=27)		3.7	66.7	25.9	3.7	0	0
	なし(n=45)		2.2	66.7	24.4	2.2	0	4.4
性別	男子(n=48)	2.1	4.2	64.6	25.0	2.1	0	2.1
	女子(n=26)	0	0	69.2	23.1	3.8	0	3.8
年齢	小学生(n=37)	0	2.7	73.0	18.9	2.7	0	2.7
	中学生(n=28)	3.6	3.6	60.7	28.6	0	0	3.6
	高校生(n=9)	0	0	55.6	33.3	11.1	0	0
全体	n=74	1.4	2.7	66.2	24.3	2.7	0	2.7

(%)

イメージ身長classから実測身長classを引いた値の数字で乖離の度合いを表している。0はイメージ身長と実測身長が同じであったことを示し、マイナスになるにつれ自分の身長を過小評価していることを示し、逆にプラスになるにつれ過大評価していることを示す。乖離の度合いは治療の有無や性別によって差異は認めなかったが、年齢が高くなるにつれ自分の身長を正確に把握する割合は減少し、過大評価する割合が増加した。正常身長群にはこのような傾向はなかった。

低身長群で、正確に身長を評価した群（正確評価群）と過大に身長を評価した群（過大評価群）の年齢別のSPPのSDスコアを比較したところ、過大評価群では容姿評価SDスコアで有意差を認め（F値=4.72、p=0.02）、Bonferroni法により多重比較を行った結果、高校生のSDスコアが小学生より有意に高かった（表5）。

表5 年齢別の身長認識の違いによるSPPのSDスコア：低身長群

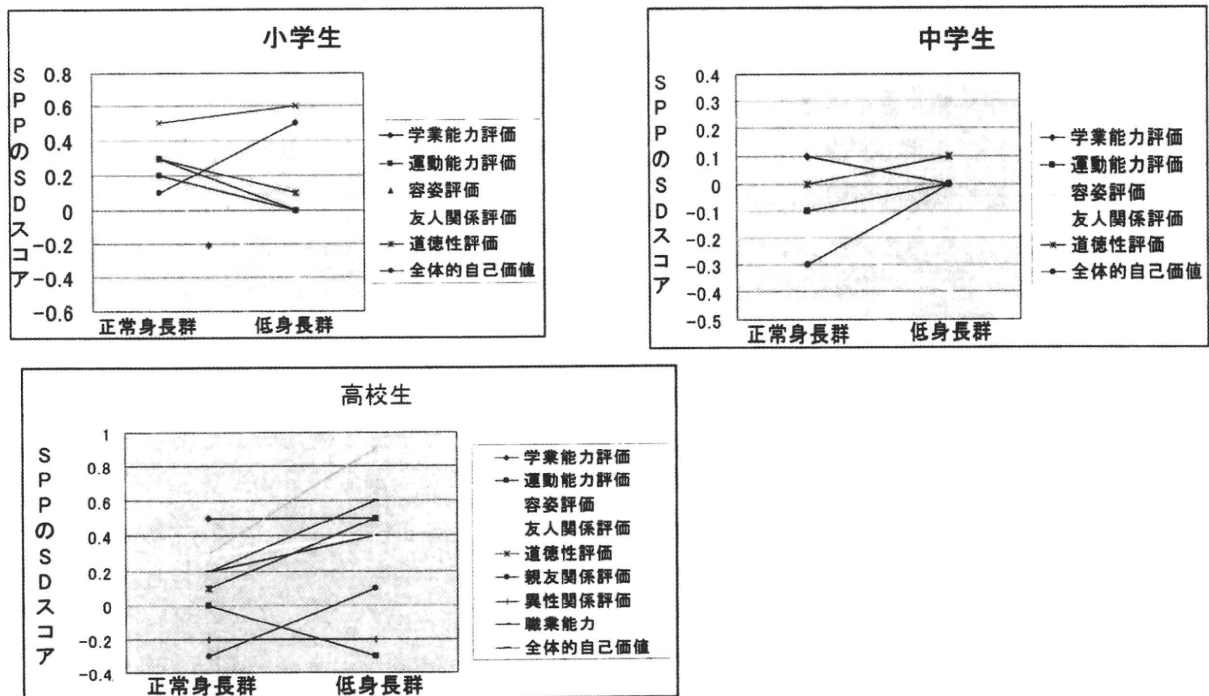
各側面	小学生		中学生		高校生	
	正確(n=26)	過大(n=9)	正確(n=17)	過大(n=9)	正確(n=5)	過大(n=4)
全体的自己価値	0.5±0.8	0.4±0.8	0.1±1.1	-0.2±1.2	0.6±0.9	0.5±1.8
学業能力評価	0.2±1.1	0.1±1.2	0.1±0.9	-0.0±1.1	0.6±1.0	0.3±1.9
運動能力評価	-0.1±0.6	0.6±0.9	0.0±1.1	-0.0±0.7	-0.4±0.5	-0.2±1.7
容姿評価	-0.2±1.0	-0.9±0.5	-0.4±0.9	-0.5±1.3	-0.1±0.8	1.1±1.5
友人関係評価	0.7±0.9	0.5±0.9	0.5±0.8	-0.1±1.4	0.9±1.3	0.9±0.9
道徳性評価	-0.1±0.9	0.8±0.9	0.1±1.0	0.1±0.7	-0.5±0.7	1.18±0.7

*

(m±SD)

図5に正常身長群と低身長群についてのSPPスコアの比較を示す。小学生の低身長群では、容姿評価スコアが有意に低く、全体的自己価値は高い傾向を示した。中学生でも小学生と同様に低身長群では容姿評価スコアが低く、全体的自己価値は高い傾向を示したが、統計的な有意差はなかった。高校生の低身長群では運動能力評価のみが低い傾向であった。

図5 正常身長群と低身長群のSPPスコアの比較



また、正常身長群と低身長群の身長のとらえ方によるSPPの比較を行った（表6）。小学生では、自身の身長を過大評価している低身長群の容姿評価のSDスコアが健常群に比べ有意に低かった。中学生では、低身長群と正常身長群で身長のとらえかたによるSPPのSDスコアの差異は認めなかった。高校生では自身の身長を過大評価している正常身長群の道徳評価が有意に低かった。

表6 正常身長群と低身長群の身長のとらえ方によるSPPの比較

各側面	小学生				中学生				高校生			
	正確		過大		正確		過大		正確		過大	
	低(n=26)	正(n=18)	低(n=9)	正(n=12)	低(n=17)	正(n=45)	低(n=9)	正(n=12)	低(n=5)	正(n=38)	低(n=4)	正(n=35)
全体的自己価値	0.5±0.8	-0.2±1.1	0.4±0.8	0.3±0.5	0.1±1.1	-0.1±0.9	-0.2±1.2	-0.5±0.9	0.6±0.9	0.3±1.2	0.5±1.8	0.2±1.3
学業能力評価	0.2±1.1	0.3±1.0	0.1±1.2	0.5±0.6	0.1±0.9	0.1±1.1	0.0±1.1	0.3±1.1	0.6±1.0	0.6±1.1	0.3±1.9	0.5±1.0
運動能力評価	-0.1±0.6	0.3±1.1	0.6±0.9	0.0±1.0	0.0±1.1	-0.1±0.9	0.0±0.7	0.2±1.2	-0.4±0.5	-0.1±1.1	-0.2±1.7	-0.1±1.4
容姿評価	-0.2±1.0	0.1±0.8	-0.9±0.5	0.0±0.9	-0.4±0.9	0.1±0.9	-0.5±1.3	0.1±1.3	-0.1±0.8	0.4±1.0	1.1±1.5	0.4±1.1
友人関係評価	0.7±0.9	0.6±1.0	0.5±0.9	0.8±0.9	0.5±0.8	0.3±1.1	-0.1±1.4	0.3±1.0	0.9±1.3	0.4±1.0	0.9±0.9	0.2±1.3
道徳性評価	-0.1±0.9	0.1±1.4	0.8±0.9	0.8±0.6	0.1±1.0	0.0±0.8	0.1±0.7	0.1±1.1	-0.5±0.7	0.2±1.1	1.2±0.7	-0.1±1.1
親友関係									0.3±0.4	-0.2±0.8	-0.1±1.3	-0.3±0.8
異性関係									-0.3±0.9	-0.2±1.1	0.0±0.6	-0.1±1.2
職業									0.4±0.6	0.2±0.9	0.3±0.7	0.3±0.9

低:低身長群 正:正常身長群 (m±SD)

次に、イメージ身長および実測身長とSPPのSDスコアの関連を階層的重回帰を用いて分析した。実測身長はSPPスコアとは相関を示さなかったが、イメージ身長との差は、容姿評価と全体的自己価値の2つの側面と有意な相関を示した（表9）。また、正常身長群では小・中・高生全ての年齢でイメージ身長が学業能力評価と有意な相関を示した（小・中学生： $\beta=0.20$ 、 $p=0.045$ 、 $\Delta R^2=0.038$ 、高校生： $\beta=0.18$ 、 $p=0.01$ 、 $\Delta R^2=0.03$ ）。

表9 イメージ身長と実測身長との差とSPPの関連：低身長群の小・中学生

	実測身長		イメージ身長-実測身長	
	β	ΔR^2	β	ΔR^2
学業能力評価	-0.08	0.006	-0.083	0.07
運動能力評価	0.27	0.072	0.087	0.007
容姿評価	0.163	0.026	-0.329*	0.103
友人関係評価	-0.1	0.009	-0.173	0.029
道徳評価	-0.04	0.001	0.108	0.011
全体的自己価値	0.112	0.012	-0.333**	0.106

* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$

考察

1) 正常身長群と比較した低身長群の身長認識と心理社会的適応

低身長群でイメージ身長と実測身長の相関が低かったこと、年齢が高くなるにつれて自身の身長を過大評価する割合が増加するという、正常身長群にはない傾向を示したことから、低身長群は正常身長群とは異なったイメージ身長を持っていることが示唆された。これらのことから、低身長児(者)の診療・治療に際してはイメージ身長を把握しながらの関わりが必要であると考えられる。

また、小・中学生の低身長群では、正常身長群より容姿評価が低く、全体的自己価値が高い傾向であった。一方、高校生の低身長群では運動能力評価が低い傾向であった。このように正常身長群と低身長群の心理社会的適応が年齢によって異なった様相を示したことから、特に低身長を主訴に医療機関を受診した小児への精神的サポートには注意が必要であることが示唆された。また、医療機関を受診している低身長児(者)としていない児童(者)では心理社会的適応に相違を認めるとの報告があり¹¹⁾、この点については十分に留意する必要があると考える。

2) 低身長群におけるイメージ身長と心理社会的適応の関連

低身長群の小学生で、過大評価群が、正確評価群よりも容姿評価スコアが有意に低かったこと、イメージ身長と実測身長の乖離の度合いがSPPスコアの容姿評価・全体的自己価値と関連を示したことより、身長に何らかの現実的でないイメージを持っていることが、心理社会的適応に影響することが示唆された。これは、外来の受診時に対面式を小児に実施してもらうことで、実測身長との乖離が大きければ、何らかの心理社会的な不適応がある可能性を予測することが出来ることを示している。SPPなどの質問紙は回答するのに時間がかかり、小児が心理社会的なストレスを感じていても原因を特定するのは困難である。対面式は簡易であり、小児への負担は少ない。毎回の外来受

診時に、対面式への回答を踏まえて小児と会話を持つことが、精神的サポートの有用な手段になると考えられる。

3) 低身長群の年齢と心理社会的適応の関連

年齢が低いほうが自身の身長を正確に把握し、年齢が上がるにつれ身長を過大評価する傾向は先行研究と一致していた³⁾。低身長児は特に思春期にかかるころにジストレスを経験するとの報告があるが⁵⁾、本研究の結果で過大評価している高校生の容姿評価SDスコアが小学生に比べ高値であったことと、高校生の低身長群と正常身長群のSPPのSDスコアは特に差異を認めなかったことより、高校生になると身長を肯定的にとらえると推測することができる。また、中学生では低身長群と正常身長群でSPPのSDスコアの差異を認めなかったものの、低身長群で小学生の容姿評価のSDスコアが高校生より有意に低かったため、本邦の小児には小学生の時期、つまり思春期になる前の関わりが特に重要であると考えられる。さらに低身長であることのストレスや不便さを経験しながらも、高校生が高い自尊感情をもっているのは、コーピングが上手く機能してきたからと考えられ、社会資源、環境、家族のサポートなど、どの要因が寄与しているのかを検討することで小中学生への支援の示唆を得られると考える。

今後の課題として、本研究の結果から対面式の有効性が示唆されたので、イメージ身長評価法を診療の際に、どのように用いて児童の心理社会的適応のサポートをしていくかを検討していくことがあげられる。また、本研究では小児が自己の身長をどのように認識しているかということに焦点をおいたが、低身長の児童を持つ両親が質問紙の自由記載欄に記入した様々な悩みを知ることができた。家族への精神的なサポートも念頭にいった関わりが重要である。

研究の限界としては社会的背景を聴取していないことがあげられる。先行研究で人格形成には身長よりも社会的な背景が影響している可能性が高いとの報告もあり^{12) 13)}、今後小児に介入していく上で留意すべき点であろう。また、正常身長群の小・中学生は郵送で返送という形式とっており、もともと身長に興味のある対象に偏った可能性もある。高校生で実施したように、その場で回収する形式をとり妥当性を向上させる必要がある。

文献

- 1) Sandberg, D.E., Michael, P. (1998) The psychosocial stress related to short stature :does their presence imply psychological dysfunction? In: Drotar D., editor Measuring health-related quality of life in children and adolescents; implications for research and practice. Mahwah, New Jersey, Lawrence Erlbaum Associates., pp. 287-312
- 2) Noeker, M., Haverkamp, F. (2000) Adjustment in Conditions with Short Stature: A Conceptual Framework. Journal of Endocrinology and Metabolism 13, 1585-1594.
- 3) Hunt, L. et al (1999) Perceived versus Measures Height. Hormone Research 53, 129-138.
- 4) Grew, R. S. et al. (1983) Fcilitating Patient Understanding in the Treatment of Growth Delay.

CLINICAL PEDIATRICS 22, 685-690.

- 5) Erling, A. (2004) Why do some children of short stature develop psychologically well while other have problems? *European Journal of Endocrinology* 151, 35-39.
- 6) Visser, H. et al (2005) Motives for choosing growth-enhancing hormone treatment in adolescents with idiopathic short stature: a questionnaire and structured interview study. *BioMed Central Pediatric*, 5-15 .
- 7) 長田久雄, 高橋亮, 田中敏章. (2009) SGA性低身長児における心理社会的特徴に着目した成長ホルモン治療効果の検討 小児保健研究. 68 (2) , 240-247
- 8) 長田久雄, 田中敏章ら (2009) SGA性低身長児と健常児のQOL比較およびSGA性低身長児の成長ホルモン治療によるQOLの変化. 小児保健研究, 68 (3) , 350 -358
- 9) 眞榮城和美. (2007) 改訂・自己知覚尺度日本語版の作成－児童版・青年版・大学生版を対象として－心理学研究, 78 (2) , 182-188,
- 10) Hall, E. T. (1996) *The hidden dimension*, pp.107-122, Doubleday company
- 11) Stabler, B. et al (1998) Behavior change after growth hormone treatment of children with short stature. *The journal of pediatrics* 133 (3), 366-373
- 12) Voss, L., Bailey, B., Mulligan, J., Wilkin, T. and Betts, P. (1991) Short stature and school performance - the Wessex Growth Study. *Acta Paediatrica Scandinavica Supplement* 377, 29-31.
- 13) Downie, A., Mulligan, J., Stratford, R., Betts, P. and Voss, L. (1997) Are short children at a disadvantage? *British Medical Journal* 314, 97-100.

DOI: 10.1002/cbic.201000323

A Fluorescent sp²-Iminosugar With Pharmacological Chaperone Activity for Gaucher Disease: Synthesis and Intracellular Distribution Studies

Zhuo Luan,^[a, f] Katsumi Higaki,^{*,[b]} Matilde Aguilar-Moncayo,^[c] Linjing Li,^[a, b] Haruaki Ninomiya,^[a] Eiji Nanba,^[b] Kousaku Ohno,^[a] M. Isabel García-Moreno,^[c] Carmen Ortiz Mellet,^{*,[c]} José M. García Fernández,^{*,[d]} and Yoshiyuki Suzuki^{*,[e]}

Gaucher disease (GD) is the most prevalent lysosomal-storage disorder, it is caused by mutations of acid β -glucosidase (β -glucocerebrosidase; β -Glu). Recently, we found that bicyclic nojirimycin (NJ) derivatives of the sp²-iminosugar type, including the 6-thio-*N*-octyl-(5*N*,6*S*)-octyliminomethylidene derivative (6*S*-NOI-NJ), behaved as very selective competitive inhibitors of the lysosomal β -Glu and exhibited remarkable chaperone activities for several GD mutations. To obtain information about the cellular uptake pathway and intracellular distribution of this family of chaperones, we have synthesized a fluorescent analogue that maintains the fused piperidine-thiazolidine bicyclic skeleton and incorporates a dansyl group in the *N*'-substituent, namely 6-thio-(5*N*,6*S*)-[4-(*N*'-dansylamino)butyliminomethyl-

idene]nojirimycin (6*S*-NDI-NJ). This structural modification does not significantly modify the biological activity of the glycomimetic as a chemical chaperone. Our study showed that 6*S*-NDI-NJ is mainly located in lysosome-related organelles in both normal and GD fibroblasts, and the fluorescent intensity of 6*S*-NDI-NJ in the lysosome is related to the β -Glu concentration level. 6*S*-NDI-NJ also can enter cultured neuronal cells and act as a chaperone. Competitive inhibition studies of 6*S*-NDI-NJ uptake in fibroblasts showed that high concentrations of D-glucose have no effect on chaperone internalization, suggesting that it enters the cells through glucose-transporter-independent mechanisms.

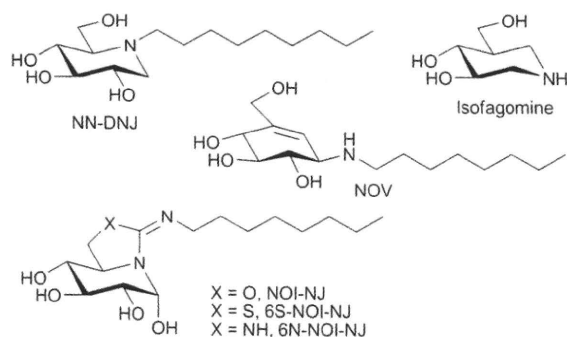
Introduction

Gaucher disease (GD), the most prevalent lysosomal storage disorder, is caused by mutations in the gene encoding for acid β -glucosidase (β -Glu; glucocerebrosidase, EC 3.2.1.45).^[1] These mutations lead to significant protein misfolding during translation in the endoplasmic reticulum and then to a reduction in enzyme trafficking to the lysosome.^[2] The deficiency of lysosomal β -Glu results in progressive accumulation of glucosylceramide in macrophages, which often leads to hepatosplenomegaly, anemia, bone lesions, respiratory failure, and, in the most severe manifestations of the disease, central nervous system (CNS) involvement.

At present there are two therapeutic strategies for GD namely, enzyme replacement therapy (ERT) and substrate reduction therapy (SRT). ERT has been achieved by intravenous administration of macrophage-targeted recombinant β -Glu.^[3] SRT however, can be realized by oral administration of *N*-(*n*-butyl)-1-deoxynojirimycin (NB-DNJ, miglustat, Zavesca®), which inhibits glucosylceramide synthase and thereby decreases the biosynthesis of glucosylceramide, the natural substrate of β -Glu.^[4] Both therapies have been proven to be effective for visceral, hematologic, and skeletal abnormalities.^[5–7] However, the efficacy of these therapies for neurological manifestations is limited.^[8–11] Bone marrow transplantation can also reverse the disease, but thus far gene therapy strategies have been unsuccessful.

-
- [a] Dr. Z. Luan, L. Li, Prof. H. Ninomiya, Prof. K. Ohno
Division of Child Neurology, Institute of Neurological Sciences
Faculty of Medicine, Tottori University
Nishi-cho, Yonago, 683-8504 (Japan)
Fax: (+ 81)859-38-6779
- [b] Dr. K. Higaki, L. Li, Prof. E. Nanba
Division of Functional Genomics
Research Center for Bioscience and Technology
Faculty of Medicine, Tottori University
86 Nishi-cho, Yonago, 683-8503 (Japan)
Fax: (+ 81)859-38-6470
- [c] Dr. M. Aguilar-Moncayo, Dr. M. I. García-Moreno, Prof. C. Ortiz Mellet
Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química
Universidad de Sevilla
Profesor García González 1, 41012 Sevilla (Spain)
Fax: (+ 34)954-624960
- [d] Prof. J. M. García Fernández
Instituto de Investigaciones Químicas, CSIC-Universidad de Sevilla
Américo Vespucio 49, Isla de la Cartuja, 41092 Sevilla (Spain)
Fax: (+ 34)954-460565
- [e] Prof. Y. Suzuki
International University of Health and Welfare Graduate School
2600-1 Kita Kanemaru, Otawara 324-8501 (Japan)
Fax: (+ 81)287-24-3229
- [f] Dr. Z. Luan
Present address: Department of Neurobiology
University of Massachusetts Medical School
Worcester, MA 01605 (USA)

It has been recently found that compounds that act as inhibitors of a lysosomal glycosidase can also stabilize the properly folded structure of the enzyme, thus rendering them suitable for an alternative therapeutic concept, namely *chemical chaperone therapy*. Active-site-directed chemical chaperones stabilize mutant forms of lysosomal enzymes, such as β -Glu, as they pass through the secretory pathway, evading endoplasmic-reticulum-associated degradation (ERAD). Once at the lysosome, the excess of substrate displaces the chaperone from the active site and the enzyme recovers its hydrolytic activity.^[12] Several years ago we proposed the carbasugar-type glucomimetic *N*-octyl- β -valienamine (NOV), a potent inhibitor of β -Glu, as a potential chemical chaperone for the treatment of neuronopathic GD.^[13–17] NOV could increase the protein level and enzyme activity of mutant β -Glu in cultured cells with several mutation profiles, including homozygotic F231I, N188S, N370S, and G202R mutants. Nitrogen-in-the-ring glucomimetics of the iminosugar or 1-azasugar families, such as *N*-(*n*-nonyl)nojirimycin (NN-DNJ) or isofagomine, respectively (Scheme 1), have also shown great promise as chemical chaperones although they have been proposed in general for non-neuronopathic forms of GD (type 1 GD).^[18–24] Compounds having chemical structures that are unrelated to carbohydrates have been additionally added to the list of potential chemical chaperones.^[25, 26]



Scheme 1. Chemical structures of chaperones for β -Glu.

Recently, we found that bicyclic sugar-shaped compounds that incorporate a pseudoamide-type (isourea, isothiurea, or guanidine) endocyclic nitrogen atom with substantial sp^2 character (sp^2 -iminosugars), such as 5*N*,6*O*-[*N'*-(*n*-octyl)iminomethylidene]nojirimycin (NOI-NJ) or its 6-thio or 6-amino-6-deoxy analogues (6*S*-NOI-NJ and 6*N*-NOI-NJ),^[27–29] behaved as very selective competitive inhibitors of human lysosomal β -Glu and exhibited remarkable chaperone activities for several Gaucher mutations.^[30] Interestingly, a comparative study with the classical iminosugar NN-DNJ indicated that sp^2 -iminosugars are significantly more efficient for mutations associated with neuronopathic forms of GD (types 2 and 3 GD), which was ascribed to their ability to bind to the mutant β -Glu with a considerably higher affinity at neutral rather than at acidic pH.^[30] It was assumed that these compounds would act by rescuing the mutant enzyme at the endoplasmic reticulum thus facilitating

trafficking and finally dissociating at the lysosome. To substantiate this hypothesis we have now synthesized a fluorescent sp^2 -iminosugar analogue bearing a dansyl group namely, 6-thio-(5*N*,6*S*)-[4-(*N'*-dansylamino)butyliminomethylidene]nojirimycin (6*S*-NDI-NJ; see Scheme 2), as a probe to unravel the cellular uptake mechanisms and intracellular distribution of this type of glycomimetic. It has been previously shown that the introduction of fluorescent probes such as dansyl residues onto lateral chains in classical iminosugars results in compounds that might exhibit similar or even enhanced glycosidase-inhibitory activity.^[31–33] The utility of the fluorescently labeled iminosugar inhibitors for the construction of sensors to detect glycosidase binding^[34] and as chemical chaperones^[35] has been demonstrated, illustrating the potential of the approach in glycobiology.

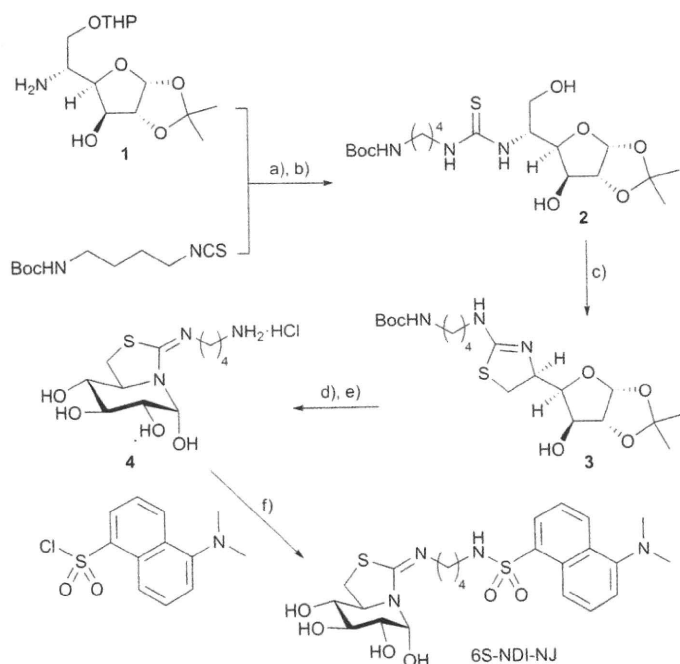
Results

6*S*-NDI-NJ can be synthesized from a D -glucofuranose precursor following the general method disclosed for bicyclic sp^2 -iminosugars

The coupling reaction of 5-amino-5-deoxy- α -*D*-glucofuranose derivative **1**^[28] with 4-(*tert*-butyloxycarbonylamino)butyl isothiocyanate afforded the corresponding thiourea adduct, which was transformed into the desired *vic*-thioureidoalcohol **2** by removing the tetrahydropyranyl protecting group at O-6. Activation of the primary hydroxyl in **2** by formation of the corresponding methanesulfonate ester resulted in spontaneous cyclization to the key aminothiazoline pseudo-C-nucleoside precursor **3**. Simultaneous acid-catalyzed removal of the *tert*-butoxycarbonyl and isopropylidene groups and final neutralization afforded the bicyclic NJ derivative **4**, which bears a terminal free amino group at the exocyclic substituent and was characterized as the corresponding hydrochloride salt. Finally a sulfonamide-forming reaction with dansyl chloride afforded the target compound 6*S*-NDI-NJ in 98% yield (Scheme 2).

6*S*-NDI-NJ shows a lysosomal glycosidase inhibition profile similar to that of 6*S*-NOI-NJ

The inhibitory activity of 6*S*-NDI-NJ was first checked on lysosomal glycosidases by using lysates from normal human fibroblasts. Strong inhibition of β -Glu and no or weak inhibition of other lysosomal enzymes, such as α -glucosidase, α -galactosidase, β -galactosidase, and β -hexosaminidase, was observed (Figure 1). We next analyzed the inhibitory potencies on F213I/F213I, N370S/N370S, and L444P/L444P mutant β -Glu. The IC_{50} values of 6*S*-NDI-NJ on F213I/F213I, L444P/L444P and normal β -Glu were very similar, whereas the corresponding IC_{50} value on N370S/N370S mutant β -Glu turned out to be significantly higher. A comparison of β -Glu inhibition at pH 7.0 and 5.2 indicated that, although 6*S*-NDI-NJ strongly inhibits F213I, N370S, L444P, and normal acid β -Glu at both neutral and acidic pH, all of the β -Glu were more sensitive to inhibition at pH 7.0 than at pH 5.2 (Table 1). Overall, these results indicate that the behav-



Scheme 2. Synthesis of 6-thio-(5*N*,6*S*)-[4-(*N*'-dansylamino)butyl]iminonojirimycin (6*S*-NDI-NJ). a) Et₃N, py; b) TsOH, 70%; c) MsCl, py, 78%; d) TFA/H₂O (9:1); e) OH⁻ resin, 82%; f) DMF, Et₃N, 98%.

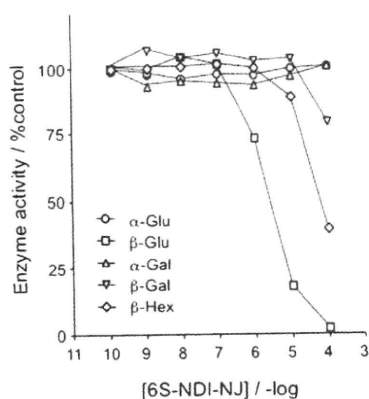


Figure 1. Effects of 6*S*-NDI-NJ on lysosomal enzyme activities in lysate from human normal fibroblasts. Enzyme activity in normal cell lysates was determined in the absence or presence of increasing concentrations of chaperones. Each point represents means of triplicate determinations obtained in a single experiment. Values were expressed relative to the activity in the absence of compounds (100%).

Table 1. Inhibition of normal and mutant β -Glu by 6*S*-NDI-NJ at neutral and acidic pH.

Cell lysates	IC ₅₀ (pH 5.2) [μ M]	IC ₅₀ (pH 7) [μ M]
H37	1.287	0.37
F2131/F2131	2.221	0.93
N3705/N3705	29.38	1.15
L444P/L444P	2.318	2.1

ior of 6*S*-NDI-NJ towards lysosomal glycosidases and mutant β -Glu is very similar to that previously observed for 6*S*-NOI-NJ.

6*S*-NDI-NJ showed no cytotoxicity on GD cells

To evaluate the cytotoxicity of 6*S*-NDI-NJ, we cultured normal and GD human fibroblasts and neuronal cells in the absence and presence of 6*S*-NDI-NJ at 0.3, 1.0, 3.0, 10, and 30 μ M concentrations for four days, and then the cell viabilities were assayed. The results indicated the absence of cytotoxicity in all cases, even at the maximum concentration of 30 μ M.

6*S*-NDI-NJ enhances β -Glu activity in human GD fibroblasts

To evaluate the enzyme activity enhancement of 6*S*-NDI-NJ, normal as well as F2131/F2131, N3705/N3705, and L444P/L444P mutant human fibroblasts were cultured in the absence and presence of 6*S*-NDI-NJ at 0.3, 1.0, 3.0, 10, and 30 μ M for four days before performing the intact cell lysosomal β -Glu assay (Figure 2a). Contrary to the β -Glu inhibition assay, which is carried out in cell lysates, in intact cells, the chemical-chaperone-promoted ERAD-evading mechanism might operate. The measured enzyme activities then represent the balance between the chemical chaperone and the enzyme inhibition activities of 6*S*-NDI-NJ at each concentration. In F2131/F2131 mutant cells, treatment with 10 and 30 μ M MTD111 resulted in 100–200% increase of β -Glu activity. In N3705/N3705 mutant fibroblasts, treatment with 30 μ M 6*S*-NDI-NJ resulted in about 70% increase of β -Glu activity. Lower concentrations of the fluorescent sp²-iminosugar failed to improve enzyme activity in both mutant cells. No effect was observed either in the L444P/L444P mutant or the normal cell line H37.

The optimal concentration of 6*S*-NDI-NJ from the above results (30 μ M) was selected to carry out a ten-day time-course analysis of chaperone activities by using H37 (normal) and F2131/F2131, N3705/N3705 and L444P/L444P (mutant GD) human fibroblasts. For F2131/F2131 and N3705/N3705 cells, β -Glu activity increased in a time-dependent manner in the presence of the fluorescent chaperone; it reached a peak on days 3–5, then decreased slightly and came to a plateau at about 50–100% increase in the last few days. When cells were deprived of 6*S*-NDI-NJ on day 4, the activity gradually decreased to the basal level within 1–4 days. No effects were observed in the L444P/L444P cell line. In normal H37 cells, the β -Glu activity slightly increased in the first few days in the presence of 30 μ M 6*S*-NDI-NJ, then dropped back to the basal level (Figure 2B).

To investigate the specificity of the chaperone activity of 6*S*-NDI-NJ among lysosomal glycosidases, mutant Gaucher and normal fibroblasts were treated with 30 μ M 6*S*-NDI-NJ for four days, and then the cell lysates were screened for α -glucosidase, β -glucosidase, α -galactosidase, β -galactosidase, and β -