

れている。古典型と比べて酵素活性が比較的残存しているが、心不全、腎不全単独でも予後は悪く、注意が必要である。心型Fabry病では、原因不明の左室肥大型心筋症があり、X連鎖性遺伝形式に一致するFabry病の家族歴を有することが診断の手がかりとなることがある¹⁷⁾¹⁸⁾。左室拡張能の障害を認めるが左室収縮能は比較的保たれている。末期には拡張相肥大型心筋症の病像へと移行し、左室収縮能が低下し心不全が著明になる。心筋組織の線維化が明らかとなり、治療への反応が低下することが知られている。腎型Fabry病は古典型Fabry病の症状をほとんど示さず、成人期以降に蛋白尿が出現し、進行性の腎不全に至る⁷⁾。血中クレアチニン値の上昇やeGFR値の低下がある閾値を超えると腎障害が不可逆的に進行すると考えられている。一例としてクレアチニン値 $>1.5\text{mg/dl}$ 、eGFR $<55\text{ml/min/1.73m}^2$ を目安としている報告がある¹⁹⁾。典型的な例では40～50歳頃に透析導入となる。

3. ヘテロ接合体の女性

ヘテロ接合体の女性ではX染色体不活化の程度の違いによって、無症状から心臓、腎臓などの単一臓器の障害、古典型と同様の複数の臓器にわたる障害までさまざまな病型を示す⁵⁾²⁰⁾。女性の体細胞では性染色体XXの片方がランダムに不活化される。ヘテロ接合体女性の体細胞において正常 α -ガラクトシダーゼ遺伝子をもつX染色体が不活化されると病的遺伝子のみが発現する。その細胞ではFabry病男性患者と同様の糖脂質の蓄積が生じる。X染色体不活化の偏りは個人、組織によって違うことが知られている。それぞれのX染色体が半分ずつ不活化しているのではなく、組織によっては正常遺伝子をもつX染色体が多く不活化される。すると、正常遺伝子が発現している細胞がほとんどない臓器も生じる。正常細胞と糖脂質が蓄積し障害された細胞とがモザイク状に存在する。そのため臓器ごとに障害の程度が異なる。ヘテロ女性では血液中の酵素活性と臓器の障害の程度とが一致しない。酵素活性が低下していれば他の臓器でも同様の障害が起きている可能性が推測できるが、酵素活性が正常であっても臓器障害の可能性を否定できない。ヘテロ女性では男性患者に比べ

て発症が遅い傾向にあるが、臓器障害は重篤となる。男性患者と同様に四肢末端痛、発汗低下、被角血管腫などを認めることがある。原因不明の左室肥大型心筋症、蛋白尿、腎不全、脳血管障害などのFabry病の症状と、X連鎖性遺伝形式に一致するFabry病の家族歴を有することが診断の手がかりとなる。

Fabry病の診断

Fabry病の古典型では初発症状は小児期に認められる。被角血管腫、四肢末端痛、発汗低下、角膜混濁などが症状である。Fabry病における痛みは特徴的である。Burning painと呼ばれる焼けつくような強い痛みを訴えることがある。痛みは数分から数日持続する。運動や発熱によって増強する。また、発汗が低下または消失していることも特徴である。

Fabry病の心病変は左室肥大や不整脈をきっかけとして診断される。心電図や心エコーによる評価が必要となる。蛋白尿は非特異的な所見であるためFabry病における診断的な価値はあまり高くない。Fabry病の腎症状が存在していても必ずしも蛋白尿が出現するとは限らない。原因不明の蛋白尿を認めたときにFabry病に特徴的な他の臨床症状を伴っていないか着目することは重要である。また、脳血管障害は突然発症し、脳出血よりも脳梗塞が起こりやすい。Fabry病であることがわかったら頭部MRI検査を行い、微小脳梗塞の存在など脳血管障害についての評価を行うことが望ましい。

1. Fabry病診断のための検査

Fabry病を疑った場合は白血球の α -ガラクトシダーゼA酵素活性を測定する。保険適用の外注委託検査が可能であり、EDTA-2Na加採血の検体が用いられる。また、ろ紙血を用いた酵素活性の測定は比較的簡便にできる検査として有用である。新生児マススクリーニング用のガスリール紙を用いて1スポット以上採血し、十分に乾燥させたうえ常温で検体を輸送する。検体の取り扱いが容易であるため、Fabry病であるかどうか判断が困難な症例やスクリーニング的に検査を行う場合に適している。日本先天代謝異常学会のホームページに専門施設が紹介されている

(<http://square.umin.ac.jp/JSIMD/>). 尿中のGL3測定や尿沈渣脂質解析も非侵襲的検査として有用である。また、心筋、腎臓、直腸粘膜などの組織生検において、電子顕微鏡下に封入体やzebra bodyなどの層状蓄積物を検出することも診断に役立つ。説明と同意に基づいた遺伝子解析は確定診断として価値が高い。既知の遺伝子変異が検出された場合には、古典型または亜型の推定が可能である。新規の遺伝子変異であるときは病的意義について酵素活性や他の検査結果を参考に慎重に判断する必要がある。また、Fabry病ヘテロ女性の診断は酵素活性のみからは困難であり、遺伝子解析が必要となることが多い。そのほかの一般的な検査として心電図、胸部単純X線撮影、心エコー、検尿、腎機能検査、頭部MRIなどがある。

2. Fabry病のスクリーニング検査

Fabry病は心肥大や不整脈、腎不全、脳血管障害といった多彩な症状が時間的、空間的に異なって発症する。そのためにFabry病に特徴的な症状が同時期に出現することは稀であり診断が困難なことが少なくない。Fabry registryの報告によると、主に古典型の症状を呈するFabry病の男性では初発症状が出現した平均年齢は9歳であり、診断が確定した平均年齢は23歳であった²¹⁾。比較的特徴的な症状が出現する古典型であっても、初発症状の出現から診断まで平均14年ほどかかっている。また、Fabry病の家族歴がある男性、女性では小児期に初発症状が出現後、2年以内に診断されている症例が多いとの報告がある²²⁾。このことはFabry病の可能性を念頭におけばFabry病の診断に至ることは決して困難ではないことを示している。

Fabry病の早期診断のために新生児を対象としたスクリーニングが各国で試みられている¹²⁾⁻¹⁴⁾。Fabry病の男性では α -ガラクトシダーゼ活性が低下しており、血清中またはろ紙血中の α -ガラクトシダーゼ活性を測定することによりFabry病の診断が可能である。Fabry病女性ではX染色体不活化の程度によって臨床症状は無症状から古典型男性と同様の症状まで多彩である。血液中の酵素活性は低下している例も正常である例もみられる。酵素活性の低下を指標として血液検

体を用いたFabry病の診断が行われている。一般には、人工基質である4MU(methylumbelliferyl)-galactopyranosideと酵素が反応して得られた蛍光を測定することで α -ガラクトシダーゼ活性を定量している。

新生児におけるFabry病のスクリーニングはろ紙血を検体として、イタリア、台湾など各地で行われている。そして、Fabry病の頻度はこれまで知られていたより高いことが明らかになってきた。イタリアでは男児3,000名に1人、台湾では男児1,100~1,600名に1人という比較的高い頻度が報告されている。Fabry病は決して稀な疾患ではなく、これまで考えられていたより頻度が高い疾患であると考えられる。また、心肥大、腎不全、脳血管障害などを有する成人におけるFabry病のスクリーニングも試みられている。報告によって違いはあるが、成人発症の特発性肥大型心筋症の約3~6%、腎不全の透析患者の約0.2~1.2%、潜在性脳卒中患者の約1.2%がFabry病であるとされる。

Fabry病のスクリーニングにおいては、検査前の説明と同意、精密検査や遺伝子解析における遺伝カウンセリングや地域における専門医との連携が重要である。遺伝子解析では、これらの翻訳領域、エクソンイントロン境界部、5'上流の非翻訳領域、台湾で多いことが報告されたIVS4+919領域などの解析が行われる。これまでにFabry病の遺伝子変異は400種類以上が報告されているが、変異部位はすべてのエクソンにわたっており、ホットスポットは知られていない。Fabry病のスクリーニング検査においてはいくつかの倫理的な問題点が提起されている。Positive predict valueが低いこと、発症時期より診断時期のほうが早い症例が想定されること、スクリーニング前の説明を十分行う必要があることなどである。これらの問題点に関しては、検査時の説明や遺伝カウンセリングを十分に行い、発症のリスクがある人にFabry病の情報を伝えることが重要とされる。スクリーニング対象の性別や年齢、治療を開始する時期、遺伝カウンセリングの重要性など臨床的な課題は多い。

おわりに

Fabry病の酵素補充治療が可能になり早期診断の重要性が高まった。酵素補充治療の有効性は発症早期の症例では高く末期では低い。脳血管障害以外の症状では有効性が確立されてきた。一方、早期の治療にはコンプライアンスが重要である。Fabry病の酵素補充治療は2週間ごとの点滴治療を必要とするため患者の負担が大きい。重篤な障害が出現する前に治療を開始する必要があるが、無症状であれば2週間ごとの治療が負担となり脱落してしまう可能性も考えられる。Fabry病では家族にも患者が存在することがあるため、診断や治療における課題は多い。Fabry病の検査や治療に関する情報を理解していただくため、遺伝カウンセリングを十分に行うことが重要である。

文 献

- 1) Desnick RJ, Ioannou YA, Eng CM. α -galactosidase A deficiency : Fabry disease. In : Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, et al, editors. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 8th ed. New York : McGraw-Hill ; 2001. p. 3733-74.
- 2) 衛藤義勝(総監修). ファブリー病「基礎から臨床までの最近の知見」. 東京 : プレーン出版 ; 2004.
- 3) Anderson W. A case of angio-keratoma. *Br J Derm* 1898 ; 10 : 113-7.
- 4) Fabry J. Beitrag zur Kenntniss der Purpura heamorrhagica nodularis. *Arch Dermatol Syph* 1898 ; 43 : 187-200.
- 5) Wang RY, Lelis A, Mirocha J, et al. Heterozygous Fabry women are not just carriers, but have a significant burden of disease and impaired quality of life. *Genet Med* 2007 ; 9 : 34-45.
- 6) Nakao S, Takenaka T, Maeda M, et al. An atypical variant of Fabry's disease in men with left ventricular hypertrophy. *N Engl J Med* 1995 ; 333 : 288-93.
- 7) Nakao S, Kodama C, Takenaka T, et al. Fabry disease : detection of undiagnosed hemodialysis patients and identification of a "renal variant" phenotype. *Kidney Int* 2003 ; 64 : 801-7.
- 8) Schiffmann R, Murray GJ, Treco D, et al. Infusion of α -galactosidase A reduces tissue globotriaosylceramide storage in patients with Fabry disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000 ; 97 : 365-70.
- 9) Eng CM, Banikazemi M, Gordon RE, et al. A phase 1/2 clinical trial of enzyme replacement in Fabry disease : pharmacokinetic, substrate clearance, and safety studies. *Am J Hum Genet* 2001 ; 68 : 711-22.
- 10) Chamoles NA, Blanco M, Gaggioli D. Fabry disease : enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper. *Clin Chim Acta* 2001 ; 308 : 195-6.
- 11) Shiffmann R, Ries M. Fabry's disease-an important risk factor for stroke. *Lancet* 2005 ; 366 : 1754-6.
- 12) Spada M, Pagliardini S, Yasuda M, et al. High incidence of later-onset fabry disease revealed by newborn screening. *Am J Hum Genet* 2006 ; 79 : 31-40.
- 13) Hwu WL, Chien YH, Lee NC, et al. Newborn screening for Fabry disease in Taiwan reveals a high incidence of the later-onset GLA mutation c.936+919G >A (IVS4+919G >A). *Hum Mutat* 2009 ; 30 : 1397-405.
- 14) Lin HY, Chong KW, Hsu JH, et al. High incidence of the cardiac variant of Fabry disease revealed by newborn screening in the Taiwan Chinese population. *Circ Cardiovasc Genet* 2009 ; 2 : 450-6.
- 15) Sheth KJ, Werlin SL, Freeman ME, et al. Gastrointestinal structure and function in Fabry's disease. *Am J Gastroenterol* 1981 ; 76 : 246-51.
- 16) Mitsias P, Levine SR. Cerebrovascular complications of Fabry's disease. *Ann Neurol* 1996 ; 40 : 8-17.
- 17) Ogawa K, Sugamata K, Funamoto N, et al. Restricted accumulation of globotriaosylceramide in the hearts of atypical cases of Fabry's disease. *Hum Pathol* 1990 ; 21 : 1067-73.
- 18) Sakuraba H, Oshima A, Fukuhara Y, et al. Identification of point mutations in the alpha-galactosidase A gene in classical and atypical hemizygotes with Fabry disease. *Am J Hum Genet* 1990 ; 47 : 784-9.
- 19) Banikazemi M, Bultas J, Waldek S, et al. Agalsidase-beta therapy for advanced Fabry disease : a randomized trial. *Ann Intern Med* 2007 ; 146 : 77-86.
- 20) Deegan PB, Baehner AF, Barba Romero MA, et al. Natural history of Fabry disease in females in the Fabry outcome survey. *J Med Genet* 2006 ; 43 : 347-52.
- 21) Eng CM, Fletcher J, Wilcox WR, et al. Fabry disease : baseline medical characteristics of a cohort of 1765 males and females in the Fabry registry. *J Inher Metab Dis* 2007 ; 30 : 184-92.
- 22) Hopkin RJ, Bissler J, Banikazemi M, et al. Characterization of Fabry disease in 352 pediatric patients in the Fabry Registry. *Pediatr Res* 2008 ; 64 : 550-5.
- 23) 宇山英一郎. Fabry病. *Brain and Nerve* 2008 ; 60 : 1235-44.
- 24) 大橋十也. Fabry病. 小児疾患診療のための病態生理 2. *小児内科* 2009 ; 41(増刊号) : 449-53.

アミノ酸代謝異常症, 尿素サイクル異常症, 糖原病の新しい治療法

中村公俊*

はじめに

アミノ酸代謝異常症, 尿素サイクル異常症, 糖原病はそれぞれ多くの先天代謝異常症を含んだ疾患群である。そのなかには治療法の進歩によって予後が改善した疾患も少なくない。たとえば, フェニルケトン尿症におけるテトラヒドロbiopterin (BH₄), 遺伝性高チロシン血症 I 型におけるニチシノン, リジン尿性蛋白不耐症や尿素サイクル異常症におけるシトルリン, 尿素サイクル異常症におけるアルギニン, 安息香酸ナトリウム, フェニル酢酸ナトリウムなどによる治療法があげられる。また, 肝不全をきたすアミノ酸代謝異常症, 尿素サイクル異常症, 糖原病の一部は, 肝臓移植の適応となる。わが国では, 高チロシン血症 I 型, オルニチントランスカルバミラーゼ (OTC) 欠損症, カルバモイルリン酸合成酵素 I (CPS I) 欠損症, 古典型高シトルリン血症やシトルリン異常症, アルギニノコハク酸尿症, アルギニン血症, 糖原病 I 型, IV 型などで生体肝移植が行われている。

I 高フェニルアラニン血症の BH₄による治療

BH₄は生体内で補酵素として働いている。高フェニルアラニン血症を示す症例のなかに, BH₄

投与の効果がみられる 2 つの病態がある。ひとつはこの補酵素の欠損である BH₄欠損症であり, もうひとつは BH₄反応性高フェニルアラニン血症である。BH₄はフェニルアラニン水酸化酵素, チロシン水酸化酵素, トリプトファン水酸化酵素の補酵素であり, BH₄欠損症では上記の 3 つの酵素の障害が同時に起こるため, 神経活性アミンの欠乏も同時に起こる。そのため BH₄欠損症の治療には, BH₄の補充による血中フェニルアラニン濃度のコントロールと, 神経伝達物質の補充とが必要である。わが国では, BH₄製剤としてビオプテン顆粒 (第一三共アスピオファーマ) が使用できる。BH₄欠損症では, 1 日あたり 2~5 mg/kg, 3 分割経口投与を行い, 血中フェニルアラニンが正常となる量まで BH₄を増量する。また, BH₄反応性高フェニルアラニン血症では, 1 日あたり 10 mg/kg を 3 分割経口投与する。4 歳未満の小児では BH₄投与の安全性が確立されていないため, まずフェニルアラニン制限食を行うことが重要である。

II 高チロシン血症 I 型のニチシノンによる治療

遺伝性高チロシン血症には遺伝的に異なった 3 つの病型がある。I 型はフマリルアセト酢酸分解酵素, II 型はチロシンアミノ基転移酵素, III 型は 4-ヒドロキシフェニルピルビン酸酸化酵素の欠損によって発症する。I 型では肝障害と腎尿細管障害を認め, 重症例では乳児期早期から肝障害が進行する。軽症例でも 1~3 歳で肝移植が必要

Nakamura Kimitoshi

* 熊本大学医学部附属病院小児科

(〒860-8556 熊本市本荘 1-1-1)

E-mail: nakamura@kumamoto-u.ac.jp

表 尿素サイクル異常症の薬物治療

疾患名	フェニル酢酸 Na (g/kg/日)	安息香酸 Na (g/kg/日)	アルギニン (g/kg/日)	シトルリン (g/kg/日)	カルニチン (g/kg/日)
NAGS 欠損症 CPS I 欠損症 OTC 欠損症	<20 kg } >20 kg }	0.45~0.6 (9.9~13.0)	0.1~0.25 (2.2~5.5)	0.1~0.2 (2.2~4.4)	20~30
シトルリン血症	<20 kg >20 kg	0.45~0.6 (9.9~13.0)	0.1~0.25 (2.2~5.5)	0.4~0.7 (8.8~15.4)	— (—)
アルギニノ コハク酸尿症	<20 kg >20 kg	— —	— —	0.4~0.7 (8.8~15.4)	— (—)
アルギニン血症	<20 kg >20 kg	0.3~0.6 (6.6~13.0)	0.1~0.25 (2.2~5.5)	— (—)	20~30

※ >20 kg における投与量 g/m²/日

※ 1日あたりの維持量。初期投与の場合は上記を1~2時間で投与する。

になる。I型の治療では肝障害の進行を早期に防止することが重要であり、国内未承認薬である4-ヒドロキシフェニルピルビン酸酸化酵素の阻害薬ニチシノン (Orfadin) を使用し、食事療法 (低フェニルアラニン・低チロシン食) を併用する。早期に治療を開始した例では、肝臓移植を回避できる可能性がある。ニチシノンを使用しない例では肝不全に至ることが多く、肝移植が行われる。またニチシノンを使用した例でも、肝臓がんの発症例では肝移植が行われる。

III 尿素サイクル異常症におけるアルギニンまたはシトルリン治療

高アンモニア血症に対する治療にL-アルギニン、L-シトルリンが用いられる。尿素サイクル異常症として、カルバモイルリン酸合成酵素I (CPS I)、オルニチントランスカルバミラーゼ (OTC)、アルギニノコハク酸合成酵素 (ASS)、アルギニノコハク酸分解酵素 (ASL)、アルギナーゼ (ARG) のそれぞれの欠損症が知られている。CPS I、OTC、ASS、ASLの欠損症ではアルギニンを補充することで尿素サイクルの代謝が活性化し、尿素、シトルリン、アルギニノコハク酸が尿中に排泄されるため血中アンモニアを低下させることができる。アルギU顆粒、アルギU注 (味の素) が高アンモニア血症の治療適応がある。成長ホルモン分泌刺激試験に用いられるアルギニン注も同様の

効果が期待できるため、緊急時には使用されることがある。アルギU注は塩酸L-アルギニンとして0.2 g/kgを1時間程度かけて点滴静注する。その後、0.2~0.6 g/kg/日を24時間かけて点滴静注する。アルギU顆粒は0.1~0.2 gを3分割経口投与する。また、シトルリンはCPS I欠損症、OTC欠損症においてアルギニンより効率的に血中アンモニアを低下させると考えられている。通常は試薬のシトルリンを倫理委員会などの承認を経て用いる。シトルリンは1日あたり0.1~0.2 g/kgを3分割経口投与する。

なお、小腸、腎臓などにおける二塩基アミノ酸転送蛋白y+LAT-1異常であるリジン尿性蛋白不耐症に対しても、シトルリン0.1~0.2 g/kg/日の内服治療が有効である。

IV 高アンモニア血症における安息香酸ナトリウム、フェニル酢酸ナトリウムによる治療

安息香酸ナトリウム、フェニル酢酸ナトリウムは尿素サイクル以外の窒素排泄系を利用することで、高アンモニア血症の治療に有効である。

安息香酸は肝臓でグリシン抱合されて尿中へ排泄される。そのため尿素サイクルを介さずに窒素を体外へ排泄できる。過剰投与により肝障害をきたすことがあるので、使用量の設定には注意が必要である。フェニル酢酸ナトリウムは覚醒剤の原料となりうるため手続きや管理が煩雑である。欧

米ではプロドラッグであるフェニル酪酸ナトリウム（ブフェニル）として販売されている。フェニル酪酸ナトリウムは β 酸化によりフェニル酢酸ナトリウムとなり、グルタミンと結合して尿中に排泄される。フェニル酪酸ナトリウムは1モルあたり2モルの窒素を排泄することができる。国内未承認薬であるため、使用の際は個人輸入が必要である。

安息香酸ナトリウムとフェニル酢酸ナトリウムの利用によって、欧米の報告ではアンモニアを効率的に低下させて、高アンモニア血症の生存率を改善することが知られている。CPS I 欠損症、OTC 欠損症、ASS 欠損症では、安息香酸ナトリウムまたはフェニル酢酸ナトリウム (0.25 g/kg) を10%グルコースに溶解し、24時間かけて静脈内投与を行う。試薬を用いた院内製剤として倫理委員会の承認を経て使用することが必要である。同量の試薬を経口投与することも可能である。

V 糖原病

糖原病はグリコーゲンの代謝に関係する酵素の異常によって、肝臓や心筋、骨格筋などにグリコーゲンが蓄積する。主に肝臓の異常が起こる肝型糖原病と、心筋、骨格筋の異常が主にみられる筋型糖原病とに分けられる。肝型糖原病としては、I型、III型、IV型、VI型、IX型がある。以前VIII型とよばれていた肝臓、筋、脳の phosphorylase kinase (α , β , γ サブユニット) 異常症は、現在ではこのIX型に分類されている。肝型糖原病の主な症状は、空腹時の低血糖と肝腫大である。糖原病I型では glucose-6-phosphatase が欠損している Ia型と glucose-6-phosphatase transporter が欠損している Ib型とが存在する。Ia型では低血糖と高乳酸血症の予防が重要である。診断はグルコース負荷によって血糖値が上昇し乳酸値が低下すること、遺伝子診断などによって行われる。早期に診断される症例が増えたことで、長期の予後も改善してきた。とくに幼児期は糖質を頻回に摂取し、夜間に未調理のコーンスターチ投与や糖液の持続胃内栄養を行うことなどが有効である。Ib型はIa型の症状に加えて好中球の減少と機能障

害が特徴である。糖原病III型では debranching enzyme が欠損しており、I型と同様の低血糖に対する治療を行う。予後は良好なことが多い。糖原病IV型は branching enzyme が欠損しており、進行性の肝障害によって幼児期に肝不全にいたる。予後が不良であるため肝臓移植の適応となる。糖原病VI型は肝型 phosphorylase が欠損している。低血糖は比較的軽度であり、予後は良好である。筋型糖原病であるII型、V型、VII型では、筋力低下や易疲労性、筋肉痛などが主な症状である。糖原病II型 (Pompe病) はリソゾームの異常により全身の細胞にグリコーゲンが蓄積する。酵素補充療法が可能となり、良好な予後がみられる症例もある。糖原病V型は筋 phosphorylase が欠損している。激しい運動を避けることが有効である。糖原病VII型は筋 phosphofructokinase が欠損している。V型と同様に激しい運動を避けることが有効である。

VI 肝移植

肝不全をきたすアミノ酸代謝異常症、尿素サイクル異常症や糖原病は肝臓移植の適応となる。上記の疾患群においてわが国では、高チロシン血症I型、OTC 欠損症、CPS I 欠損症、古典型高シトルリン血症やシトルリン異常症、アルギニノコハク酸尿症、アルギニン血症、糖原病I型、IV型などで生体肝移植が行われている。尿素サイクル異常症では、新生児期早期に発症しアンモニア値が高い症例は早期に肝臓移植が必要であるが、移植前に意識障害が進行し死亡する例も少なくない。乳幼児期に発症する症例や、学童期以降に発症し、高アンモニア血症をくり返しながら悪化していく症例は肝移植治療の適応と考えられる。遺伝性高チロシン血症I型は特殊ミルクと、国内未承認薬であるニチシノン (Orfadin) による治療が行われるが、肝細胞がんの発症が知られており、肝移植の適応が考慮される。

これらの疾患以外にも、先天性代謝異常症では、 α_1 アンチトリプシン欠損症、Wilson病、Crigler-Najjar症候群、原発性高シュウ酸血症I型、メチルマロン酸血症、プロピオン酸血症などが肝移植

の適応となる。移植の適応とドナー選定の基準に絶対的なものはなく、移植可能な施設において症例ごとに十分な検討を行うことが必要である。

Ⅵ 肝細胞移植

ドナーの肝臓から肝細胞を採取・分離し、レシピエントの門脈からカテーテルを用いて注入する移植法である。採取、分離されたドナー肝細胞は凍結保存できるため、くり返し移植を行うことが可能である。肝臓移植が可能となるまでの「つなぎ治療」として、肝不全状態を改善することができる。欧米では肝細胞移植の治験が行われており、わが国でも臨床応用されることが期待されている。

Ⅶ 救急室での対応

本稿で取り扱っている疾患群のなかで緊急の対応が必要と考えられる疾患は、アシドーシス、高アンモニア血症、低血糖、高乳酸血症などを呈するものがあげられる。診断と並行して治療を行うことが重要であり、異化を防ぐために十分なグルコースを補給すること、高アンモニア血症が高度である場合には、血液浄化治療が可能な高度医療施設との連携を行うことが必要である。

おわりに

先天代謝異常症の多くは希少疾患であり、これらの治療に用いられる薬剤にはオーファンドラッグとして治療薬の承認や適応拡大が求められているものが少なくない。治療にあたっては先天代謝異常症を専門としている施設に遠慮なく尋ねていただきたい。日本先天代謝異常学会のホームページ (<http://square.umin.ac.jp/JSIMD/>)、日本先天代謝異常学会セミナーなどが、それぞれの施設の専門分野を知るのに有用と思われる。

Key Points

- ① 高フェニルアラニン血症では BH_4 治療によって血中フェニルアラニン値が低下する症例がみられる。
- ② 尿素サイクル異常症などの高アンモニア血症の治療における L-アルギニン、L-シトルリン、安息香酸ナトリウム、フェニル酢酸ナトリウムの効果が明らかになってきた。
- ③ 糖原病Ⅰ型では早期診断と早期治療によって、予後が改善してきている。
- ④ 肝臓移植の適応とドナー選定の基準に絶対的なものはなく、移植可能な施設において症例ごとに十分な検討を行うことが必要である。

文 献

- 1) 中村公俊, 遠藤文夫: 遺伝性高チロシン血症. 小児内科 41 (増刊): 341-344, 2009
- 2) 大浦敏博, 新宅治夫, 中村公俊, 他: テトラヒドロピオプテリン (BH_4) 反応性高フェニルアラニン血症に対する天然型 BH_4 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: BH_4 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, 日小児会誌 133: 649-653, 2009
- 3) Kure S, Hou DC, Ohura T, et al: Tetrahydrobiopterin responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. J Pediatr 135: 375-378, 1999
- 4) 遠藤文夫: 先天性高アンモニア血症. 小児臨 59: 653-658, 2006
- 5) Endo F, Matsuura T, Yanagida K, et al: Clinical manifestation of inborn errors of urea cycle and related metabolic disorders during childhood. J Nutr 134: 1605S-1609S, 2004
- 6) 大竹 明: 尿素サイクル代謝異常. 小児診療 69: 1678-1683, 2006
- 7) Enns GM, Berry SA, Berry GT, et al: Survival after treatment with phenylacetate and benzoate for urea-cycle disorders. N Engl J Med 356: 2282-2292, 2007
- 8) Chen YT: Glycogen storage disease. In Scriver CR, et al (eds): The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease, 8th ed, McGraw-Hill, New York, pp1521-1531, 2001

* * *

先天性アミノ酸代謝異常症

—高チロシン血症I型—

Inborn errors of amino acid metabolism

—Hereditary hypertyrosinemia type I—

Key words : チロシン, 肝移植, アミノ酸, ニチシノン, 肝臓癌

中村公俊
遠藤文夫

1. 概念・定義

チロシンは食事に含まれるアミノ酸の一つとして、またフェニルアラニンの代謝産物として得られる。生体内でフェニルアラニンはフェニルアラニン水酸化酵素によってチロシンへと変換される。チロシンは、チロシナーミノ基転移酵素によって4-ヒドロキシフェニルピルビン酸、続いて4-ヒドロキシフェニルピルビン酸酸化酵素によってホモゲンチジン酸、ホモゲンチジン酸酸化酵素によってマレイルアセト酢酸、マレイルアセト酢酸イソメラーゼによってフマリルアセト酢酸へと代謝され、フマリルアセト酢酸ヒドラーゼによってフマル酸とアセト酢酸に分解される(図1)。このチロシン代謝系の異常である遺伝性高チロシン血症は、遺伝的・酵素学的に3つの病型に分類されている(表1)。これらは、臨床症状出現の機序も異なる。遺伝形式はいずれも常染色体劣性である。遺伝性高チロシン血症I型[MIM276700 HEREDITARY TYROSINEMIA TYPE I]はフマリルアセト酢酸ヒドラーゼ(FAH: EC 3.7.1.2)が欠損することで発症する。同じチロシン代謝系の異常である遺伝性高チロシン血症II型[MIM276600 HEREDITARY TYROSINEMIA TYPE II]は細胞質チロシナーミノ基転移酵素(TAT: EC2.6.1.5)の欠損症で、眼皮膚型高チロシン血症、Richner-Hanhart 症候群とも呼ばれる。また、遺伝性高チロシン血症III型[MIM276710 HEREDITARY TYROSINEMIA TYPE III]は4-ヒドロキシフェ

ニルピルビン酸酸化酵素(HPD: EC1.13.11.27)が欠損している。また、ホーキンシン尿症もHPDのヘテロの異常により発症する常染色体優性遺伝性疾患である。

2. 疫学

高チロシン血症は Medes によって1932年に初めて報告されている。この報告では重症筋無力症患者の尿中にチロシン代謝産物の著明な排泄増加を認めている。この患者の病型は明らかにされていない。遺伝性高チロシン血症I型の原因がフマリルアセト酢酸ヒドラーゼの異常であることが判明したのは1980年代の初めのことである。遺伝性高チロシン血症II型は1960年代末にチロシナーミノ基転移酵素の欠損が原因であることが明らかにされた。1980年代の初めには、これらの酵素欠損とは異なる高チロシン血症を示す症例が遠藤らによって報告され、この欠損酵素は4-ヒドロキシフェニルピルビン酸であることが判明した。この酵素異常は高チロシン血症III型と分類された。それぞれまれな疾患であり、頻度は明らかにされていない。カナダ、ケベック州のSaguenay-Lac St. Jean 地区には遺伝性高チロシン血症I型の集積を認める。この地域の患者頻度は約1,800人に1人と大変高いことが報告されている。

3. 病因

(1) I型ではフマリルアセト酢酸ヒドラーゼ酵素欠損によって細胞内に蓄積するフマリルア

Kimitoshi Nakamura, Fumio Endo: Department of Pediatrics, Kumamoto University Hospital 熊本大学医学部附属病院 小児科

0047-1852/10/¥40/頁/JCOPY

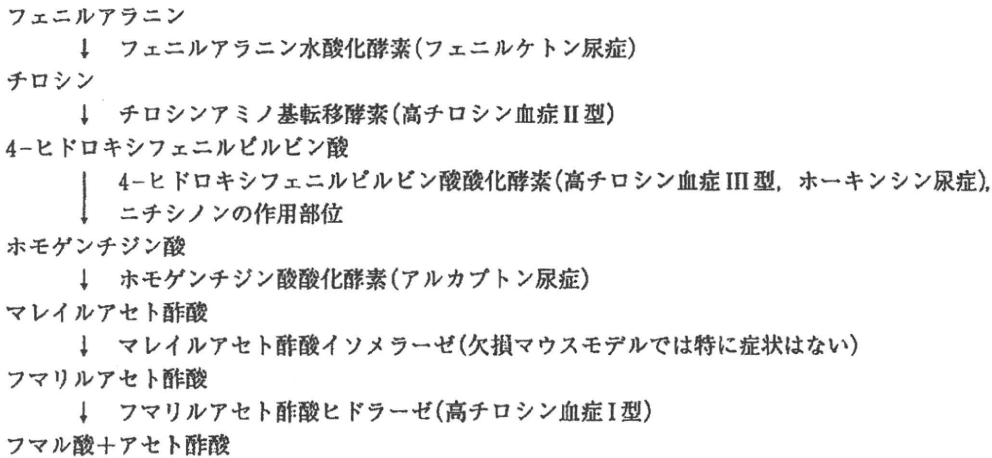


図1 チロシンの合成と分解系

表1 高チロシン血症の分類

病型	遺伝型	血中のチロシン上昇	酵素欠損	主な症状
遺伝性高チロシン血症I型	常劣	軽度	フマリルアセト酢酸ヒドラーゼ	肝障害 尿細管障害 低血糖 ガラクトース代謝異常 神経症状 肝臓癌
遺伝性高チロシン血症II型	常劣	高度	チロシニアミノ基転移酵素	精神発達遅延 皮膚の異常角化 角膜びらん・潰瘍
遺伝性高チロシン血症III型	常劣	中等度	4-ヒドロキシフェニルピルビン酸酸化酵素	失調 痙攣 軽度の精神発達遅延
ホーキンシン尿症	常優	一過性	4-ヒドロキシフェニルピルビン酸酸化酵素	一過性発育遅延 食欲不振
肝障害に伴う高チロシン血症	原疾患による	様々		原疾患による
新生児一過性高チロシン血症	なし	様々		無症状または不活発

セト酢酸の毒性のために種々の病態が生じる。肝細胞では遺伝子発現の異常、酵素活性の阻害、アポトーシス、染色体の不安定および癌化が生じている。患者における低血糖、アミノ酸やその他の代謝障害、凝固因子の低下などは、遺伝子発現の低下が原因であると考えられる。また、染色体の不安定性によって高い頻度で若年性肝臓癌が出現する。更にアポトーシスによる肝細胞死によって肝不全が進行する。近位尿細管においても細胞障害が出現し、アミノ酸尿、糖尿、代謝性アシドーシスなどのFanconi症候群が発症する。その結果、低リン血症性くる病となる。

(2) II型では細胞質チロシニアミノ基転移酵素の欠損により体液中のチロシン濃度が高くなることによって臨床症状を呈する。この症状の一部はチロシンの溶解度が低いことと関連している。皮膚や角膜では他の部位よりも温度が低下しやすく、チロシン結晶が析出しやすいため細胞障害を生じると考えられる。一方、精神発達の遅延も多くの患者で観察されている。これは血中チロシン値の上昇と関連して出現している。

(3) III型では4-ヒドロキシフェニルピルビン酸酸化酵素の欠損によって、チロシンの α ケ



ト酸である4-ヒドロキシフェニルピルビン酸とチロシンが増加する。尿中への4-ヒドロキシフェニルピルビン酸とその酸化物の排泄も著明に増加している。

4. 病 態

(1) I型では、肝実質細胞と近位尿管細胞の障害を認める。臨床的には、進行する肝障害と尿管細管障害が特徴である。急性型、亜急性型、慢性型の3つの病型があり、急性型では生後数週から始まる肝腫大、発育不良、下痢、嘔吐、黄疸などがみられる。重症例では肝不全へ進行し、無治療であれば生後2-3カ月に死亡する。亜急性型では、生後数カ月から1年程度で肝障害を発症する。慢性型では肝障害の進行は緩やかであるが、最終的には肝硬変、肝不全に至る。肝臓癌を発症する症例も多く、多発性腫瘍も報告されている。一方、腎臓では尿管細管機能障害が出現し、低リン血症性くる病、ビタミンD抵抗性くる病などが認められる。また、サクシニルアセトンがアミノレブリン酸デヒドラターゼを阻害する結果、腹痛発作、ポリニューロパチーなどの急性間欠性ポルフィリン症に類似した症状が出現する。臨床症状の重症度と遺伝子型には関連を認める。

(2) II型では、I型やIII型より血中チロシン値が高く、I型のような肝・腎障害を認めない。II型の皮膚病変はチロシンの針状結晶が析出することによって出現し、手掌・足底に局限した過剰角化、びらんを生じる。また角膜においてもチロシンの結晶が析出し、角膜のびらん・潰瘍が生じる。角膜の変化は皮膚症状より早く出現し、生後数カ月からみられるが、思春期以降に明らかになる症例もある。血中チロシン濃度が特に高い一部の症例では精神発達の遅れを認めることがある。

(3) III型の症状はI型、II型よりも軽度であり、無症状の症例も存在する。これまでに失調、痙攣、軽度の精神発達遅延などが報告されている。これらはI型、II型にはみられない症状であり、体液中における4-ヒドロキシフェニルピルビン酸の増加が関連している可能性がある。

このような症状をきっかけに診断される症例が少なくないことから、実際は無症状の例が多く存在することが考えられる。

5. 診断と鑑別診断

血中チロシンが高値である患者では高チロシン血症I型、II型、III型以外に、他の原因による血中チロシン値の高値を鑑別する必要がある。I型の鑑別診断では肝障害の原因となる疾患が重要である。また、II型、III型の鑑別では、新生児一過性高チロシン血症が問題となる。血中チロシン値の経過観察には血中アミノ酸分析やタンデム質量分析が有用である。

(1) 遺伝性高チロシン血症I型の診断では肝障害の有無が重要である。肝機能障害の結果、血清トランスアミナーゼの上昇、凝固因子の合成低下、アルブミン、コリンエステラーゼの低値などを認める。尿管細管機能障害による低リン血症、糖尿、タンパク尿などが認められる。また、血清中 α フェータンパクの増加が特徴的である。血中アミノ酸分析ではチロシンのほかメチオニン、セリン、スレオニンなどの多くのアミノ酸が上昇する。尿中アミノ酸分析ではチロシンをはじめとする多くのアミノ酸の排泄が増加している。ポルフィリン代謝障害の結果、尿中 δ アミノレブリン酸が増加する。画像診断では肝腫大、肝硬変や脂肪肝の所見がみられる。肝生検では肝構築の乱れや肝細胞の形態の異常、脂肪肝などを認める。しかしこれらの所見は非特異的であり、確定診断には至らない。

確定診断としては、尿中有機酸分析を行い、チロシン代謝産物である4-ヒドロキシフェニルピルビン酸、4-ヒドロキシフェニル乳酸、4-ヒドロキシフェニルピルビン酢酸などの増加と、サクシニルアセトンの増加を明らかにする。血中または尿中サクシニルアセトンの増加は診断的な価値が高い。また、酵素診断は肝細胞、培養皮膚線維芽細胞を検体として、フマリルアセト酢酸ヒドラーゼ活性を測定する。これらの尿中有機酸分析や酵素診断を行うことで診断を確定することができる。

(2) 遺伝性高チロシン血症II型では皮膚や眼

の所見から本症を疑われる。眼の症状は herpes simplex keratitis との鑑別が問題となることがある。血中アミノ酸分析では血中チロシンは 20mg/dL 以上と極めて高値である。また、尿有機酸分析では 4-ヒドロキシフェニルピルビン酸、4-ヒドロキシフェニル乳酸、4-ヒドロキシフェニルピルビン酢酸が大量に見いだされる。酵素活性の測定には肝生検が必要である。チロシンアミノ基転移酵素には可溶画分に存在する sTAT とミトコンドリアに局在する mTAT がある。この疾患では sTAT だけが欠損しているため、酵素診断においてはこの両者を区別して測定する。

(3) 遺伝性高チロシン血症 III 型では臨床症状は特徴的ではない。血中アミノ酸ではチロシンが約 10-20mg/dL 程度まで増加し、尿中には 4-ヒドロキシフェニルピルビン酸およびその酸化物が大量に検出される。確定診断では肝酵素を測定する。III 型の軽症型であるホーキンシン尿症は尿中ホーキンシンを検出することで診断される。

6. 治療と予後

チロシン高値の患者では I 型、II 型、III 型とその他の原因による高チロシン血症の鑑別を対症療法と同時に行う。新生児期には臓器障害が

なければ基本的には経過観察する。

(1) I 型では肝障害の進行を早期に防止することが重要であり、4-ヒドロキシフェニルピルビン酸酸化酵素の阻害剤であるニチシノン(Orfadin)を使用し、食事療法(低フェニルアラニン・低チロシン食)を併用する。早期に治療を開始すると約 90% がニチシノンに反応する。治療の効果判定には肝機能検査と血清 α フェトタンパク値の測定が有用である。血清 α フェトタンパクを正常範囲に保つことができれば予後が期待できる。ニチシノンを使用しない例では肝不全に至ることが多く、肝移植が行われる。また、ニチシノンで早期治療を行った症例でも肝臓癌が発症することがある。そのため治療中は肝臓癌の早期発見に努める。ニチシノンを使用した例でも肝臓癌の発症例では肝移植が行われる。

(2) II 型では血液中のチロシン値を低下させることを治療の目標とする。チロシン値の低下に伴って皮膚および眼の症状は改善する。そのため、低フェニルアラニン・低チロシン食による食事療法を行い、血中チロシン値を 10mg/dL 以下に保つ。

(3) III 型では II 型と同様に、低フェニルアラニン・低チロシン食による食事療法を行う。

■ 文 献

- 1) Mitchell GA, et al: Hypertyrosinemia. In: The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Metabolic Disease, 8th ed(ed by Scriver CR, et al), p1777-1805, McGraw Hill, New York, 2001.
- 2) Kelsey G, et al: Rescue of mice homozygous for lethal albino deletions: implications for an animal model for the human liver disease tyrosinemia type I. *Genes Dev* 7: 2285-2297, 1993.
- 3) Grompe M, et al: Loss of fumarylacetoacetate hydrolase is responsible for the neonatal hepatic dysfunction phenotype of lethal albino mice. *Genes Dev* 7: 2298-2307, 1993.
- 4) Endo F, et al: Complete rescue of lethal albino c14CoS mice by null mutation of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase and induction of apoptosis of hepatocytes in these mice by in vivo retrieval of the tyrosine catabolic pathway. *J Biol Chem* 272: 24426-24432, 1997.
- 5) Medes G: A new error of tyrosine metabolism: tyrosinosis. The intermediary metabolism of tyrosine and phenylalanine. *Biochem J* 26(4): 917-940, 1932.
- 6) Kubo S, et al: Hepatocyte injury in tyrosinemia type I is induced by fumarylacetoacetate and is inhibited by caspase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 9552-9557, 1998.
- 7) Nakamura K, et al: Animal model of tyrosinemia. *J Nutr* 137: 1573S-1575S, 2007.
- 8) Lindstedt S, et al: Treatment of hereditary tyrosinemia type I by inhibition of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *Lancet* 340: 813-817, 1992.

Newborn Screening for Lysosomal Storage Disorders

KIMITOSHI NAKAMURA,* KIYOKO HATTORI, AND FUMIO ENDO

Lysosomes are intracellular organelles containing acid hydrolases that degrade biological macromolecules. Lysosomal storage disorders (LSDs) are caused by absent activity of one or more of these enzymes due to mutations of genes encoding lysosomal hydrolases or enzymes that process, target, and transport these enzymes. The specific signs and symptoms of each LSD derive from the type of material accumulated within the lysosome, the site (organ) of accumulation and the response of the body (sometimes in the form of an inflammatory or immune response) to the accumulated material. Interest for inclusion of these disorders in newborn screening programs derives from the availability of effective therapy in the form of enzyme replacement or substrate reduction therapy and bone marrow transplant that may improve long-term outcome especially if started prior to irreversible organ damage. Based on the availability of therapy and suitable screening methods, Gaucher disease, Fabry disease, Pompe disease, mucopolysaccharidosis I and II, Niemann–Pick disease, and Krabbe disease are candidates for newborn screening. Pilot newborn screening projects have been performed for some of these conditions that indicate the feasibility of this approach. This review will provide insight into these screening strategies and discuss their advantages and limitations. © 2011 Wiley-Liss, Inc.

KEY WORDS: tandem mass spectrometry; multiplex assays; mucopolysaccharidosis; Fabry disease; Pompe disease,

How to cite this article: Nakamura K, Hattori K, Endo F. 2011. Newborn screening for lysosomal storage disorders. *Am J Med Genet Part C Semin Med Genet* 157:63–71.

INTRODUCTION

A lysosome is an intracellular organelle containing acid hydrolases that degrade proteins, glycoproteins, proteoglycans, lipids, and other complex macromole-

cules from phagocytosis, endocytosis, and autophagy [Futerman and van Meer, 2004; Fletcher, 2006; Eckhardt, 2010]. These macromolecules are degraded to smaller molecules through the action of various acid hydrolases. The resulting small molecules are then catabolized or recycled by the cell after export to the cytoplasm by passive diffusion or through the use of transporters. For some pathways, these recycled metabolites play a major role in the synthesis pathway. For example, almost 90% of sphingolipids are synthesized in this recycled pathway in many cells [Fredman, 1998; Gillard et al., 1998]. Lysosomal hydrolases are transported from the endoplasmic reticulum to the lysosome by a vesicular transporter. This vectorial transport is dependent on the presence of mannose 6-phosphate residues on their oligosaccharide chains attached to the lysosomal enzyme by a Golgi-localized phosphotransferase complex [Kollmann et al., 2010]. Mannose-6-phosphate receptors capture these processed enzymes into transport vesicles of the *trans*-Golgi network

and deliver them to the lysosome. These enzymes can be endocytosed again by neighboring cells and delivered to the lysosome. This latter pathway plays a key role in allowing enzyme replacement therapy (ERT) to reach the lysosome of target cells.

More than 40 LSD are known and have a total estimated incidence of 1:7,000–1:9,000 [Meikle et al., 1999; Fletcher, 2006]. Symptom severity and disease onset of most LSD vary. This heterogeneity can be explained to some extent by the difference in organs affected and, in part, by the type of mutation. In general, mutations leaving very low residual enzyme activity cause the most severe early onset forms of the diseases. In contrast, higher residual enzyme activity delays disease onset [Kolter and Sandhoff, 1999]. Disease severity and onset are remarkably different in the late-onset forms of LSD and can vary even between siblings with identical mutations [Clarke et al., 1989; Wenger et al., 2000; Zhao and Grabowski, 2002]. The major lysosomal storage disorders (LSDs) for which a therapy is

Kimitoshi Nakamura is currently Assistant Professor, Department of Pediatrics at the Kumamoto University. Dr Nakamura has had an interest in Pediatrics, Genetics and Inherited Metabolic Diseases.

Kiyoko Hattori is currently Research Associate, Department of Pediatrics at the Kumamoto University. Dr Hattori has had an interest in Pediatrics Kidney Diseases.

Fumio Endo is currently Professor and Chair, Department of Pediatrics at the Kumamoto University. Dr Endo has had an interest in Pediatrics and Inherited Metabolic Diseases.

Grant sponsor: Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology, Japan; Grant sponsor: Scientific Research from the Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan.

*Correspondence to: Kimitoshi Nakamura, M.D., Ph.D., Department of Pediatrics, Kumamoto University Graduate School of Medical Science, Honjo1-1-1, Kumamoto 860-8556, Japan.

E-mail: nakamura@kumamoto-u.ac.jp

DOI 10.1002/ajmg.c.30291

Published online 10 February 2011 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

More than 40 LSD are known and have a total estimated incidence of 1:7,000–1:9,000. Symptom severity and disease onset of most LSD vary. This heterogeneity can be explained to some extent by the difference in organs affected and, in part, by the type of mutation. In general, mutations leaving very low residual enzyme activity cause the most severe early onset forms of the diseases.

available and newborn screening is at different stages of development will be briefly described.

SELECTED LYSOSOMAL STORAGE DISORDERS

Fabry Disease

Fabry disease is an X-linked LSD that was initially described in 1898 [Anderson, 1898; Fabry, 1898]. Women can also have symptoms, but onset is generally later than for men and life expectancy is reported better. Fabry disease is caused by α -galactosidase A (Gal A) deficiency [Desnick et al., 2001]. The enzymatic defect leads to progressive accumulation of glycosphingolipids such as globotriaosylceramide (GL-3), especially in the brain, heart, kidney, eye, and skin. The classic disease phenotype consists of angiokeratomas, acroparesthesias, hypohidrosis, and corneal opacities during childhood. Accumulation of GL-3 in the vascular endothelium leads to renal and cardiac failure and cerebrovascular disease. Late-onset cardiac and renal variants with residual Gal A activity have been identified in individuals lacking some or all of the early classic manifestations mentioned above.

Patients with the cardiac variant present with left ventricular hypertrophy (LVH), arrhythmia, and/or cardiomyopathy [Nakao et al., 1995], whereas patients with the renal variant develop proteinuria and end-stage renal disease (ESRD) [Kotanko et al., 2004] after 50 years of age. In addition, some patients with acute strokes after adolescence were found to have previously undiagnosed Fabry disease, 30% of whom had, retrospectively, classic manifestations. Fabry disease is diagnosed by measuring enzyme activity in white cells or plasma in males. Females can have normal enzyme activity and DNA testing is necessary to confirm or exclude the diagnosis in them.

ERT for Fabry disease was approved in Eng et al. [2001] and clinical trials are ongoing for pharmacologic enzyme enhancement therapy [Desnick and Schuchman, 2002]. The estimated incidence of classic Fabry disease is 1 in 50,000 males. Screening of males in hemodialysis, cardiac, and stroke clinics by determination of plasma Gal A activities detected previously undiagnosed Fabry disease in 0.25–1% of males undergoing hemodialysis, in 3–4% of males with LVH or hypertrophic cardiomyopathy, and in 5% of males with acute cryptogenic strokes [Brouns et al., 2010].

Newborn screening using a fluorometric enzyme assay in 37,104 males in Italy with follow-up mutation analysis identified 1 in 3,100 patients with Fabry disease. The mutations identified in this cohort predicted later-onset rather than classic Fabry disease with an 11:1 ratio [Spada et al., 2006]. In Japan, a newborn screening pilot program for Fabry disease has been carried out by Nakamura et al. (submitted for publication) using the fluorometric enzyme assay and subsequent mutation analysis. The incidence of the disease was approximately 1 in 4,700 males, with 88% of mutations being associated with a later-onset phenotype. In Taiwan [Sands and Davidson, 2006], a newborn screening pilot program for Fabry disease using the fluorometric enzyme assay found an incidence of approximately 1 in 1,250 males [Hwu et al., 2009; Lin et al., 2009].

All these studies suggest that Fabry disease may be underdiagnosed, especially the late-onset variants.

Mucopolysaccharidoses

Mucopolysaccharidoses (MPS) are LSDs that are characterized by the accumulation of glycosaminoglycans (GAGs) in urine, plasma, and various tissues. Primary treatment options for MPS include hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) and ERT. ERT is now available for MPS I, MPS II, and MPS VI [Kollmann et al., 2010]. ERT reduces GAG accumulation, improves the clinical status and quality of life. Clinical trials of ERT for other types of MPS are underway.

Newborn screening for these conditions can be accomplished by measuring urinary GAG or directly by measuring enzyme activity in blood spots. Methods have been proposed for the quantification and qualitative evaluation of GAGs in urine by LC-MS/MS. This method can screen for MPS I, II, and VI by quantifying dermatan sulfate (DS) and heparan sulfate (HS) in urine.

In blood spots, eight lysosomal enzymes (α -L-iduronidase, iduronate sulfatase, arylsulfatase B, β -D-glucuronidase, β -D-galactosidase, α -D-mannosidase, α -L-fucosidase, and β -hexosaminidase), including those involved in selected MPSs, can be assayed. This can screen for MPS I, MPS II, MPS VI, MPS VII, GM1 gangliosidosis, galactosialidosis, MPS IV B, α -mannosidosis, fucosidosis, Sandhoff disease, and mucopolipidosis II and III [Chamoles et al., 2001a,b, 2004]. Unfortunately, there are still no methods described for multiplexing these assays.

More recently, specific substrates have been developed to allow the use of MS/MS [Duffey et al., 2010a,b]. The advantage of this approach is that it allows multiplexing with simultaneous assays for MPS I, MPS II, MPS IIIA, and MPS VI.

Pompe Disease

Pompe disease, also known as glycogen storage disease type II, is an autosomal recessive disorder caused by deficiency

of the enzyme α -glucosidase (GAA), resulting in the accumulation of lysosomal glycogen in the skeletal muscles and heart [Kishnani et al., 2006]. This disorder causes a steady accumulation of glycogen substrate that leads to progressive muscle damage and organ failure. The rates of substrate accumulation and tissue damage are variable and reflect the residual enzyme activity and immune response to the accumulated material. In 2006, α -glucosidase alfa was approved as the ERT for Pompe disease. A pilot program for Pompe disease newborn screening was started in Taiwan in 2005 that measures GAA activity using a fluorometric assay [Chien et al., 2009]. A thorough examination was performed to screen positive newborns. A diagnosis of Pompe disease was made clinically after the onset of symptoms. Screening revealed five severely affected infants with an incidence of approximately 1 in 41,000 screened newborns. ERT for Pompe disease was started in the five severely affected infants. In unscreened infants, the clinical diagnosis of Pompe disease was made later, at an average of 4 months of age. Initiation of earlier treatment of infants after newborn screening resulted in normal cardiac function and growth and acquisition of age appropriate milestones.

Krabbe Disease

Krabbe disease (globoid cell leukodystrophy) is an autosomal recessive disorder caused by deficiency of the lysosomal enzyme galactosylceramide β -galactosidase (GALC). This results in the accumulation of galactosylceramide and psychosine that in most cases cause abnormalities of the brain white matter. Most patients present early in life with an early infantile or "classic" phenotype. Symptoms usually appear before 6 months of age and death occurs before 2 years of age. Other patients can present later in life with an attenuated phenotype. HSCT is the only available treatment for infants with early infantile Krabbe disease and must be performed prior to neurodegeneration. Newborn screening has been performed for

Krabbe disease [Duffner et al., 2009]. Newborns treated with HSCT can have progressive central myelination and continued gains in developmental skills and cognitive function, whereas children who undergo transplantation after symptom onset experience minimal neurologic improvement. Transplantation is not effective in all cases of Krabbe disease and some transplanted patients have experienced developmental delays. Screening involves GALC activity detection by a fluorescent assay and subsequent DNA mutation analysis. Molecular analysis of the GALC gene is used for diagnostic confirmation.

THERAPEUTIC ADVANCES FOR LYSSOMAL STORAGE DISORDERS

Hematopoietic Stem Cell Transplantation

Allogenic HSCT was one of the first therapies attempted in LSDs to introduce metabolic cross-correction. Therapy may also be useful for neurodegenerative LSDs because microglia cells are derived from hematopoietic stem cells [Asheuer et al., 2004; Boelens, 2006]. Clinical trials of HSCT have suggested that cells migrate across the blood-brain barrier. In animal models, it has been shown that donor cells produce the defective enzyme and that donor macrophages replace microglial cells in the brain [Kennedy and Abkowitz, 1997; Malatack et al., 2003]. Repopulation of transplanted cells in the brain is relatively slow because of the long lifespan of microglia [Kennedy and Abkowitz, 1997].

HSCT has shown efficacy in pre-symptomatic or mildly affected patients with some LSDs. It has been used in patients with MPS I, II, and VI; Gaucher disease; Wolman disease; metachromatic leukodystrophy; and Krabbe disease. Each LSD responds differently to HSCT, and transplantation timing relative to symptom onset seems critical for some disorders. HSCT is not effective for the patients with Fabry disease because secreted α -galactosidase lacks mannose-6-phosphate residues and the

enzyme is seldom taken up by cells with the enzyme defect. Complications after HSCT are common and limit the usefulness of this treatment. These include graft versus host disease, toxicity of the conditioning regimen, and graft failure.

In addition to HSCT, transplantation of neural stem cells to the brain has been performed in an animal model for LSDs. This was first demonstrated in an MPS VII mouse model by injection of neural stem cells overexpressing β -glucuronidase into the ventricles of newborn mice [Snyder et al., 1995]. Clinical improvement has been observed after neural stem cell transplantation in animal models [Lee et al., 2007; Strazza et al., 2009]. There are no human data for this type of therapy.

Enzyme Replacement Therapy

Marked progress has been made in the treatment of LSDs over the past few decades [Brady et al., 1974; Achord et al., 1978; Brady, 2006]. Recombinant DNA techniques have allowed production of lysosomal enzymes in vitro. The recombinant enzymes are transported via the mannose-6 receptor pathway in Fabry disease, MPS I, II, and VI; and Pompe disease. In contrast,

Marked progress has been made in the treatment of LSDs over the past few decades. Recombinant DNA techniques have allowed production of lysosomal enzymes in vitro. The recombinant enzymes are transported via the mannose-6 receptor pathway in Fabry disease, MPS I, II, and VI; and Pompe disease. In contrast, they are transported by macrophage mannose receptors in Gaucher disease.

they are transported by macrophage mannose receptors in Gaucher disease. The exogenous enzymes are internalized by somatic cells and transferred to the lysosome where they degrade accumulated substrate and diminish the burden of the disease. ERT has been approved by regulatory agencies for Gaucher, Fabry, and Pompe disease in addition to MPS I, II, and VI. Before the introduction of ERT, no specific therapy was available for LSD patients, and supportive care and treatment were used only to manage complications. ERT consists in the regular administration of recombinant enzyme intravenously and since its success in patients with Gaucher disease, was extended to other LSDs. Clinical trials have demonstrated the clinical benefit of ERT in Fabry disease [Eng et al., 2001]; MPS I [Kakkis et al., 2001], II [Muenzer et al., 2006], and VI [Harmatz et al., 2005]; and in Pompe disease [Amalfitano et al., 2001].

The usefulness of ERT is limited because the enzyme is not always effective for all clinical symptoms. Clinical studies have shown that many symptoms of LSDs are irreversible in advanced cases despite the use of long-term ERT. Therefore, early diagnosis and treatment is important. In addition, recombinant proteins cannot cross the blood–brain barrier, and ERT has little or no effect on central nervous system (CNS) manifestations. Current clinical trials are assessing the effect of intrathecal enzyme replacement in MPS I and II.

Substrate Reduction Therapy

Substrate reduction therapy partially inhibits the biosynthesis of the accumulated product to reduce substrate influx into the catabolically compromised lysosome. A small-molecule oral substrate reduction therapy, miglustat, is available for Gaucher disease. The efficacy of substrate reduction therapy was evaluated in patients with Gaucher disease [Cox et al., 2000]. Adult Gaucher patients not treated with ERT were treated with *N*-butyldeoxynojirimycin for 12 months. Mean liver and spleen volumes were significantly decreased, and hematological parameters showed

slight improvement. The most frequent adverse effect was diarrhea. In the extension study, statistically significant improvement was achieved in all major efficacy end points, indicating that treatment with *N*-butyldeoxynojirimycin was increasingly effective with time [Elstein et al., 2004]. The use of *N*-butyldeoxynojirimycin, known as miglustat (Zavesca), has been approved for Gaucher disease and is considered safe for adult patients, with mild or moderate symptoms, who are unwilling or unable to receive or to continue ERT or for patients with persistent signs of disabling disease activity despite maximal enzyme dosing. The drug may be applied in combination with ERT in these patients.

N-Butyldeoxynojirimycin is also considered an option for patients with Sandhoff disease, Tay–Sachs disease, or Niemann–Pick disease type C (NPC) because the drug is a small enough to cross the blood–brain barrier [Lachmann et al., 2004]. The drug is usually given at higher doses than in Gaucher disease to allow increased entry into the brain. A randomized clinical trial in patients with NPC demonstrated that miglustat improves or stabilizes horizontal saccadic eye movement velocity, a clinically relevant markers of NPC, with improvement in swallowing capacity, stable auditory acuity, and a slower deterioration in ambulatory index [Patterson et al., 2007; Wraith et al., 2010]. An open-label extension confirmed the persistence of clinical benefit that is more marked in patients with milder forms of the disease. A lower dose of this drug was not effective in late-onset Tay Sachs [Shapiro et al., 2009]. Nevertheless, further developments in this area have the potential of developing effective an treatment for this condition.

Chemical Chaperons

Chemical chaperones can enhance the residual activity of the defective lysosomal enzyme. Imino sugars, such as deoxynojirimycin can act as both enzyme inhibitors and chaperones, which control the quality of newly

synthesized proteins [Sawkar et al., 2002; Fan, 2008]. Under physiological conditions, chaperones help restore the native conformation of misfolded proteins. Chaperone therapy by using small molecules to stabilize and target a misfolded enzyme to the lysosome is in clinical trial for Gaucher, Fabry, and Pompe diseases caused by mutated but catalytically active enzymes. In animal models, these small molecules cross the blood–brain barrier and may be effective for CNS manifestations of LSDs. *N*-(*n*-nonyl)deoxynojirimycin for Gaucher disease and 1-deoxygalactonojirimycin for Fabry disease are good examples of chemical chaperones that show satisfactory response in vitro [Sawkar et al., 2002; Yam et al., 2005]. A similar effect was observed in fibroblasts from adult patients with Tay–Sachs disease and Sandhoff disease [Tropak et al., 2004]. Chemical chaperones may be therapeutically useful for treatment of various LSDs, although they are currently experimental and none is approved for the treatment of any LSD.

Gene Therapy

Many LSDs respond to HSCT and are excellent candidates for gene transfer therapy [Sands and Davidson, 2006], since they are generally well-characterized single gene disorders, the enzymes defective are usually not subject to complex regulation mechanisms, and enzyme activity even only a little higher than normal should be clinically sufficient. In vivo and ex vivo gene therapy techniques have been developed to administer the gene to defective organs in LSD animal models via the bloodstream or directly to the brain. Gene therapy using adenoassociated viral (AAV) or lentiviral vectors has been tested in small animal models of LSDs and resulted in normalized enzyme activity [Cachon-Gonzalez et al., 2006; Broekman et al., 2007]. However, gene therapy was initiated before the appearance of clinical symptoms in these studies. Testing in large animal models of LSDs is under current study [Haskins, 2009]. After intracerebral injection of

AAV-encoding human arylsulfatase A (ASA) into nonhuman primates, ASA expression could be detected [Colle et al., 2010]. The wide distribution of enzyme expression appears to be mediated by axonal transport and secretion by transduced neurons. At present, gene therapy in humans with their much larger brains has yet to be initiated.

SCREENING FOR DISEASES

Newborn Screening

Newborn screening for metabolic disorders started with Robert Guthrie's study of phenylketonuria (PKU) in the early 1960s. After demonstration that early diagnosis and therapy could prevent mental retardation in PKU, neonatal screening has become routine practice in developed countries as part of a public health program [Guthrie and Susi, 1963; Scriver and Kaufman, 2001]. Newborn screening identifies a high-risk group of patients from normal infants and then thoroughly investigate this group. Initial tests screened for one disorder at a time. The introduction of screening by tandem mass spectrometry permits the measurement of multiple analytes at the same time, allowing the detection of multiple classes of metabolic disorders.

The potential use of MS/MS for newborn screening was first suggested in 1990 [Millington et al., 1990], and early studies soon demonstrated its practicality [Chace et al., 1993; Rashed et al., 1995; Ziadeh et al., 1995]. MS/MS could simultaneously detect a number of disorders, making it possible to screen for some disorders that might otherwise have seemed too rare. Many compounds are initially separated by mass to charge ratio in MS/MS. Each compound is then fragmented for identification. The process requires roughly 2 min per sample and can detect 30 or more inborn errors of metabolism just screening for amino acids and acylcarnitines. At the present time, expanded screening is used to detect disorders of amino acid, organic acid, and fatty acid metabolism.

However, the technology can be applied to a much wider range of compounds, and the field appears ready to expand. Table I summarizes the enzymes defective in several LSDs and those for which newborn screening assays have been developed.

Advances in Newborn Screening Technologies for LSD

Enzymatic assays. The initial system to diagnose LSD was the measurement of enzyme activity using a fluorescent artificial substrate [Meikle et al., 2006]. Diagnosis of MPS I is performed on leukocyte or cultured fibroblast homogenates to assay α -L-iduronidase activity by using 4-methylumbelliferyl-L-iduronide. For newborn screening, the standard method was adapted to measure α -L-iduronidase activity in dried blood spotted on filter paper [Chamoles et al., 2001a]. A 3-mm-diameter punchout of a blood spot on filter paper is added to elution buffer containing 4-methylumbelliferyl- α -L-iduronide as the substrate. Fluorescence of the enzyme product 4-methylumbelliferone is then measured. Methods for detection of other LSD, including MPS II, Pompe, Fabry, Sandhoff, Gaucher, Niemann-Pick (type A/B, not C), and Tay-Sachs diseases have been reported using the revised enzymatic assay of dried blood spot samples [Chamoles et al., 2001b, 2004]. The limitation of these approaches is that each assay uses 4-methylumbelliferone as an indicator of enzyme activity. In these assays, multiplexing is not possible because all assays (for MPS I, MPS II, Pompe, Fabry, Sandhoff, Gaucher, Niemann-Pick, and Tay-Sachs diseases) yield the same product (4-methylumbelliferone) as the fluorescent product of the enzyme reaction.

A variation of this approach includes the use of antibodies to enrich for the enzyme to be tested. In the case of Pompe disease, antibodies against GAA are used to coat microtiter plates. The endogenous GAA from the dried blood spots is eluted, attaches to the antibodies and is assayed for enzyme activity using fluorescent substrate

[Umaphysivam et al., 2000]. Hypothetically, microtiter plates could be coated with several different primary antibodies to capture different endogenous enzymes. However, if all of the substrates produce the same fluorescent enzyme product (4-methylumbelliferone), then multiplexing is not possible. These limitations would work against practical newborn screening using this method.

Functional Detection of Enzymatic Products by Using MS/MS

The second advancement in LSD screening technology involves analyzing the activity of endogenous lysosomal enzymes with electrospray ionization-MS/MS [Gerber et al., 2001; Li et al., 2004]. This method, modified from the one for cell lysates for use with dried blood spots, was used in Krabbe disease to detect galactocerebroside β -galactosidase (GALC) activity. The substrate β -Gal-C8-Cer is broken down by GALC to C8-Cer by the enzyme eluted from the dried blood spots. Both C8-Cer and C10-Cer, which is used as an internal standard, are quantified using MS/MS to detect GALC activity. The GALC enzyme on the dried blood spots is stable, allowing for sample transportation. A pilot program for Krabbe disease screening using MS/MS was started in 2006 [Orsini et al., 2009]. Out of 555,000 newborns, 10 were identified at risk for Krabbe disease. MS/MS has the advantage of being able to detect products of different mass to change ratio enabling the analysis of the results of different enzyme reactions. In theory, multiplexed assays can be developed for multiple diseases, including Pompe, Fabry, Gaucher, Niemann-Pick types A/B (NP A/B), Krabbe disease, and MPS-I [Zhang et al., 2008] and for five of them a multiplex assay has been proposed [Gelb et al., 2006]. In reality, the amount of activity measurable in a single blood spot is still limited. The assay for Pompe, Fabry and MPS-I can already be performed on the same blood spot [Duffey et al., 2010a]. MS/MS assays for blood spots have also been reported for MPS-VI [Duffey et al.,

TABLE I. Lysosomal Storage Disorders Amenable to Newborn Screening

Disease	Protein defect	Availability of screening strategies	Chromosomal localization	OMIM
Defects in glycosaminoglycan degradation (mucopolysaccharidoses)				
MPS I (Hurler, Scheie)	α -Iduronidase	Fluorometric, immune-quantification, multiplex	4p16.3	607015
MPS II (Hunter)	Iduronate sulfatase	Fluorometric, immune-quantification, multiplex	Xq28	309900
MPS IIIA (Sanfilippo A)	Heparan <i>N</i> -sulfatase	Immune-quantification, multiplex	17q25.3	252900
MPS IIIB (Sanfilippo B)	<i>N</i> -Acetylglucosaminidase	None	17q21	252910
MPS IIIC (Sanfilippo C)	Acetyl-CoA transferase	None	8p11.1	252930
MPS IIID (Sanfilippo D)	<i>N</i> -Acetylglucosamine-6-sulfatase	None	12q14	252940
MPS IVA (Morquio A)	<i>N</i> -Acetylgalactosamine-6-sulfatase	None	16q24.3	253000
MPS IVB (Morquio B)	β -Galactosidase	None	3p21.33	230500
MPS VI (Maroteaux-Lamy)	<i>N</i> -Acetylgalactosamine-4-sulfatase	Fluorometric, MS/MS, immune-quantification, multiplex	5q11-13	253200
MPS IX	Hyaluronidase	None	3p21.3	601492
Defects in glycoprotein degradation (oligosaccharidoses)				
α -Mannosidosis	α -Mannosidase	None	19q12	248500
β -Mannosidosis	β -Mannosidase	None	4q22	248510
α -Fucosidosis	α -Fucosidase	None	1q34	230000
Sialidosis	α -Sialidase	None	6p21.3	608272
Galactosialidosis	Cathepsin A	None	20q13.1	256540
Aspartylglucosaminuria	Aspartylglucosaminidase	None	4q32	208400
Schindler disease, Kanzaki disease	α -Acetylglucosaminidase	None	22q13.1	104170
Others				
GM1-gangliosidosis	β -Galactosidase	None	3p21.33	230500
GM2-gangliosidosis (Tay-Sachs)	α -Subunit of β -hexosaminidase	Fluorometric	15q23	606869
GM2-gangliosidosis (Sandhoff)	β -Subunit of β -hexosaminidase	Fluorometric	5q13	606873
GM2-gangliosidosis (variant AB)	GM2 activator protein	None	5q31	272750
Gaucher disease	β -Glucocerebrosidase	Fluorometric, MS/MS, immune-quantification, multiplex	1q21	606463
Fabry disease	α -Galactosidase	Fluorometric, MS/MS, immune-quantification, multiplex	Xq22.1	301500
Pompe disease	Acid α -glucosidase	Fluorometric, MS/MS, immune-quantification, multiplex	17q25.2-q25.3	232300
Niemann-Pick type A and B	Sphingomyelinase	Fluorometric, MS/MS, immune-quantification, multiplex	11p15.2	607808
Krabbe disease	Galactosylceramidase	Fluorometric, MS/MS, immune-quantification, multiplex	14q31	245200

2010b] and Gaucher disease [Legini et al., 2011]. One issue with newborn screening is the identification of patients whose phenotype is not clear. For example, most patients identified by

screening for Fabry disease have late-onset variants [Spada et al., 2006] and it is unclear whether they would have had clinical symptoms without treatment.

SUMMARY

Newborn screening is a major public health achievement that has improved the morbidity and mortality of inborn

errors of metabolism. The introduction of newborn screening for LSDs presents new challenges. The first is to be able to design a multiplex assay for multiple enzymes applicable to the limited amount of enzyme present in blood spots. These new assays must be validated in large numbers of newborns to confirm sensitivity and specificity. The second challenge is to have a better understanding of which forms of these diseases need treatment. This will allow us to determine if and when to start therapeutic interventions. In the absence of a family history, presymptomatic detection of an LSD can be achieved only through a newborn screening program. The efficacy and cost of the currently available therapies and the detection in newborns of diseases with later onset, often in adulthood, may raise ethical issues. The advancement of therapeutic options for treatment of LSD, especially in the field of small molecules, capable of entering the brain offers new hopes to affected patients in whom a timely diagnosis will become even more essential.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was partly supported by a grant-in-aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology, Japan and by a grant-in-aid for Scientific Research from the Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan. We acknowledge Dr. Nicola Longo (University of Utah) for critical comments with manuscript writing.

REFERENCES

- Achord DT, Brot FE, Bell CE, Sly WS. 1978. Human beta-glucuronidase: In vivo clearance and in vitro uptake by a glycoprotein recognition system on reticuloendothelial cells. *Cell* 15:269–278.
- Amalfitano A, Bengur AR, Morse RP, Majure JM, Case LE, Veerling DL, Mackey J, Kishnani P, Smith W, McVie-Wylie A, Sullivan JA, Hoganson GE, Phillips JA III, Schaefer GB, Charrow J, Ware RE, Bossen EH, Chen YT. 2001. Recombinant human acid alpha-glucosidase enzyme therapy for infantile glycogen storage disease type II: Results of a phase I/II clinical trial. *Genet Med* 3:132–138.
- Anderson W. 1898. A case of angio-keratoma. *Br J Dermatol* 10:113–117.
- Asheuer M, Pflumio F, Benhamida S, Dubart-Kupperschmitt A, Fouquet F, Inai Y, Aubourg P, Cartier N. 2004. Human CD34+ cells differentiate into microglia and express recombinant therapeutic protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:3557–3562.
- Boelens JJ. 2006. Trends in haematopoietic cell transplantation for inborn errors of metabolism. *J Inher Metab Dis* 29:413–420.
- Brady RO. 2006. Enzyme replacement for lysosomal diseases. *Ann Rev Med* 57:283–296.
- Brady RO, Pentchev PG, Gal AE, Hibbert SR, Dekaban AS. 1974. Replacement therapy for inherited enzyme deficiency. Use of purified glucocerebrosidase in Gaucher's disease. *N Engl J Med* 291:989–993.
- Broekman ML, Baek RC, Comer LA, Fernandez JL, Seyfried TN, Sena-Esteves M. 2007. Complete correction of enzymatic deficiency and neurochemistry in the GM1-gangliosidosis mouse brain by neonatal adeno-associated virus mediated gene delivery. *Mol Ther* 15:30–37.
- Brouns R, Thijs V, Eyskens F, Van den Broeck M, Belachew S, Van Broeckhoven C, Redondo P, Hemelsoet D, Fumal A, Jeanette S, Verslegers W, Baker R, Hughes D, De Deyn PP, BeFaS Investigators. 2010. Belgian Fabry study: Prevalence of Fabry disease in a cohort of 1000 young patients with cerebrovascular disease. *Stroke* 41:863–868.
- Cachon-Gonzalez MB, Wang SZ, Lynch A, Ziegler R, Cheng SH, Cox TM. 2006. Effective gene therapy in an authentic model of Tay-Sachs-related diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:10373–10378.
- Chace DH, Millington DS, Terada N, Kahler SG, Roe CR, Hofman LE. 1993. Rapid diagnosis of phenylketonuria by quantitative analysis for phenylalanine and tyrosine in neonatal blood spots by tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 39:66–71.
- Chamoles NA, Blanco M, Gaggioli D. 2001a. Diagnosis of alpha-L-iduronidase deficiency in dried blood spots on filter paper; the possibility of newborn diagnosis. *Clin Chem* 47:780–781.
- Chamoles NA, Blanco M, Gaggioli D. 2001b. Fabry disease: Enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper. *Clin Chim Acta* 308:195–196.
- Chamoles NA, Niizawa G, Blanco M, Gaggioli D, Casentini C. 2004. Glycogen storage disease type II: Enzymatic screening in dried blood spots on filter paper. *Clin Chim Acta* 347:97–102.
- Chien YH, Lee NC, Thurberg BL, Chiang SC, Zhang XK, Keutzer J, Huang AC, Wu MH, Huang PH, Tsai FJ, Chen YT, Hwu WL. 2009. Pompe disease in infants: Improving the prognosis by newborn screening and early treatment. *Pediatrics* 124:e1116–e1125.
- Clarke JT, Skomorowski MA, Chang PL. 1989. Marked clinical difference between two sibs affected with juvenile metachromatic leukodystrophy. *Am J Med Genet* 33:10–13.
- Colle MA, Piguet F, Bertrand L, Raoul S, Bieche I, Dubreil L, Sloothak D, Bouquet C, Moulrier P, Aubourg P, Cherel Y, Cartier N, Sevin C. 2010. Efficient intracerebral delivery of AAV5 vector encoding human ARSA in non-human primate. *Hum Mol Genet* 19:147–158.
- Cox T, Lachmann R, Hollak C, Aerts J, van Weely S, Hrebicek M, Platt F, Butters T, Dwek R, Moyses C, Gow I, Elstein D, Zimran A. 2000. Novel oral treatment of Gaucher's disease with N-butyldeoxynojirymycin (OGT 918) to decrease substrate biosynthesis. *Lancet* 355:1481–1485.
- Desnick RJ, Schuchman EH. 2002. Enzyme replacement and enhancement therapies: Lessons from lysosomal disorders. *Nat Rev Genet* 3:954–966.
- Desnick RJ, Ioannou YA, Eng CM. 2001. Alpha-galactosidase A deficiency: Fabry disease. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The metabolic and molecular bases of inherited diseases* 8th edition. New York: McGraw-Hill. p 3733–3774.
- Duffey TA, Bellamy G, Elliott S, Fox AC, Glass M, Turecek F, Gelb MH, Scott CR. 2010a. A tandem mass spectrometry triplex assay for the detection of Fabry, Pompe, and mucopolysaccharidosis-I (Hurler). *Clin Chem* 56:1854–1861.
- Duffey TA, Sadilek M, Scott CR, Turecek F, Gelb MH. 2010b. Tandem mass spectrometry for the direct assay of lysosomal enzymes in dried blood spots: Application to screening newborns for mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux-Lamy syndrome). *Anal Chem* 82:9587–9591.
- Duffner PK, Caggana M, Orsini JJ, Wenger DA, Patterson MC, et al. 2009. Newborn screening for Krabbe disease: The New York State model. *Pediatr Neurol* 40:245–252.
- Eckhardt M. 2010. Pathology and current treatment of neurodegenerative sphingolipidoses. *Neuromol Med* 12:362–382.
- Elstein D, Hollak C, Aerts JM, van Weely S, Maas M, Cox TM, Lachmann RH, Hrebicek M, Platt FM, Butters TD, Dwek RA, Zimran A. 2004. Sustained therapeutic effects of oral miglustat (Zavesca, N-butyldeoxynojirymycin, OGT 918) in type I Gaucher disease. *J Inher Metab Dis* 27:757–766.
- Eng CM, GuVon N, Wilcox WR, Germain DP, Lee P, Waldek S, Caplan L, Linthorst GE, Desnick RJ. 2001. Safety and efficacy of recombinant human alpha-galactosidase A replacement therapy in Fabry's disease. *N Engl J Med* 345:9–16.
- Fabry J. 1898. Beitrag zur Kenntnis der Purpura heamorrhagica nodularis. *Arch Dermatol Syph* 43:187–200.
- Fan JQ. 2008. A counterintuitive approach to treat enzyme deficiencies: Use of enzyme inhibitors for restoring mutant enzyme activity. *Biol Chem* 389:1–11.
- Fletcher JM. 2006. Screening for lysosomal storage disorders—A clinical perspective. *J Inher Metab Dis* 29:405–408.
- Fredman P. 1998. Sphingolipids and cell signaling. *J Inher Metab Dis* 21:472–480.
- Futerman AH, van Meer G. 2004. The cell biology of lysosomal storage disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:554–565.
- Gelb MH, Turecek F, Scott CR, Chamoles NA. 2006. Direct multiplex assay of enzymes in dried blood spots by tandem mass

- spectrometry for the newborn screening of lysosomal storage disorders. *J Inher Metab Dis* 29:397–404.
- Gerber SA, Scott CR, Turecek F, Gelb MH. 2001. Direct profiling of multiple enzyme activities in human cell lysates by affinity chromatography/electrospray ionization mass spectrometry: Application to clinical enzymology. *Anal Chem* 73:1651–1657.
- Gillard BK, Clement RG, Marcus DM. 1998. Variations among cell lines in the synthesis of sphingolipids in de novo and recycling pathways. *Glycobiology* 8:885–890.
- Guthrie R, Susi A. 1963. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics* 32:338–343.
- Harmatz P, Ketteridge D, Giugliani R, Guffon N, Teles EL, Miranda MC, Yu ZF, Swiedler SJ, Hopwood JJ, MPS VI Study Group. 2005. Direct comparison of measures of endurance, mobility, and joint function during enzyme-replacement therapy of mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux–Lamy syndrome): Results after 48 weeks in a phase 2 open-label clinical study of recombinant human *N*-acetylgalactosamine 4-sulfatase. *Pediatrics* 115:e681–e689.
- Haskins M. 2009. Gene therapy for lysosomal storage diseases (LSDs) in large animal models. *ILAR J* 50:112–121.
- Hwu WL, Chien YH, Lee NC, Chiang SC, Dobrovolsky R, Huang AC, Yeh HY, Chao MC, Lin SJ, Kitagawa T, Desnick RJ, Hsu LW. 2009. Newborn screening for Fabry disease in Taiwan reveals a high incidence of the later-onset GLA mutation c.936+919G>A (IVS4+919G>A). *Hum Mutat* 30:1397–1405.
- Kakkis ED, Muenzer J, Tiller GE, Waber L, Belmont J, Passage M, Izykowski B, Phillips J, Doroshov R, Walot I, Hoft R, Neufeld EF. 2001. Enzyme-replacement therapy in mucopolysaccharidosis I. *N Engl J Med* 344:182–188.
- Kennedy DW, Abkowitz JL. 1997. Kinetics of central nervous system microglial and macrophage engraftment: Analysis using a transgenic bone marrow transplantation model. *Blood* 90:986–993.
- Kishnani PS, Steiner RD, Bali D, Berger K, Byrne BJ, Case LE, Crowley JF, Downs S, Howell RR, Kravitz RM, Mackey J, Marsden D, Martins AM, Millington DS, Nicolino M, O'Grady G, Patterson MC, Rapoport DM, Slonim A, Spencer CT, Tiff CJ, Watson MS. 2006. Pompe disease diagnosis and management guideline. *Genet Med* 8:267–288.
- Kollmann K, Pohl S, Marschner K, Encarnação M, Sakwa I, Tiede S, Poorthuis BJ, Lübke T, Müller-Loennies S, Storch S, Braulke T. 2010. Mannose phosphorylation in health and disease. *Eur J Cell Biol* 89:117–123.
- Kolter T, Sandhoff K. 1999. Sphingolipids: Their metabolic pathways and the pathobiochemistry of neurodegenerative diseases. *Angew Chem Int Ed* 38:1532–1568.
- Kotanko P, Kramar R, Devrnja D, Paschke E, Voigtländer T, Aunger M, Pagliardini S, Spada M, Demmelbauer K, Lorenz M, Hauser AC, Kofler HJ, Lhotka K, Neyer U, Pronai W, Wallner M, Wieser C, Wiesholzer M, Zödl H, Födinger M, Sunder-Plassmann G. 2004. Results of a nationwide screening for Anderson–Fabry disease among dialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 15:1323–1329.
- Lachmann RH, te Vrugte D, Lloyd-Evans E, Reinkensmeier G, Sillence DJ, Fernandez-Guillen L, Dwek RA, Butters TD, Cox TM, Platt FM. 2004. Treatment with miglustat reverses the lipid-trafficking defect in Niemann–Pick disease type C. *Neurobiol Dis* 16:654–658.
- Lee JP, Jayakumar M, Gonzalez R, Takahashi H, Lee PJ, Baek RC, Clark D, Rose H, Fu G, Clarke J, McKercher S, Meerloo J, Muller FJ, Park KI, Butters TD, Dwek RA, Schwartz P, Tong G, Wenger D, Lipton SA, Seyfried TN, Platt FM, Snyder EY. 2007. Stem cells act through multiple mechanisms to benefit mice with neurodegenerative metabolic disease. *Nat Med* 13:439–447.
- Legini E, Orsini JJ, Hung C, Martin M, Showers A, Scarpa M, Zhang XK, Keutzer J, Mühl A, Bodamer OA. 2011. Analysis of glucocerebrosidase activity in dry blood spots using tandem mass spectrometry. *Clin Chim Acta* 412:343–346.
- Li Y, Scott CR, Chamois NA, Ghavami A, Pinto BM, Turecek F, Gelb MH. 2004. Direct multiplex assay of lysosomal enzymes in dried blood spots for newborn screening. *Clin Chem* 50:1785–1796.
- Lin HY, Chong KW, Hsu JH, Yu HC, Shih CC, Huang CH, Lin SJ, Chen CH, Chiang CC, Ho HJ, Lee PC, Kao CH, Cheng KH, Hsueh C, Niu DM. 2009. High incidence of the cardiac variant of Fabry disease revealed by newborn screening in the Taiwan Chinese population. *Circ Cardiovasc Genet* 2:450–456.
- Malatack JJ, Consolini OM, Bayever E. 2003. The status of hematopoietic stem cell transplantation in lysosomal storage disease. *Pediatr Neurol* 29:391–403.
- Meikle PJ, Hopwood JJ, Clague AE, Carey WF. 1999. Prevalence of lysosomal storage disorders. *JAMA* 281:249–254.
- Meikle PJ, Grasby DJ, Dean CJ, Lang DL, Bockmann M, Whittle AM, Fietz MJ, Simonsen H, Fuller M, Brooks DA, Hopwood JJ. 2006. Newborn screening for lysosomal storage disorders. *Mol Genet Metab* 88:307–314.
- Millington DS, Kodo N, Norwood DL, Roe CR. 1990. Tandem mass spectrometry: A new method for acylcarnitine profiling with potential for neonatal screening for inborn errors of metabolism. *J Inher Metab Dis* 13:321–324.
- Muenzer J, Wraith JE, Beck M, Giugliani R, Harmatz P, Eng CM, Vellodi A, Martin R, Ramaswami U, Gucavas-Calikoglu M, Vijayaraghavan S, Wendt S, Puga AC, Ulbrich B, Shinawi M, Cleary M, Piper D, Conway AM, Kimura A. 2006. A phase II/III clinical study of enzyme replacement therapy with idursulfase in mucopolysaccharidosis II (Hunter syndrome). *Genet Med* 8:465–473.
- Nakao S, Takenaka T, Maeda M, Kodama C, Tanaka A, Tahara M, Yoshida A, Kuriyama M, Hayashibe H, Sakuraba H, Tanaka H. 1995. An atypical variant of Fabry's disease in men with left ventricular hypertrophy. *N Engl J Med* 333:288–293.
- Orsini JJ, Morrissey MA, Slavin LN, Wojcik M, Biski C, Martin M, Keutzer J, Zhang XK, Chuang WL, Elbin C, Caggana M. 2009. Implementation of newborn screening for Krabbe disease: Population study and cutoff determination. *Clin Biochem* 42:877–884.
- Patterson MC, Vecchio D, Prady H, Abel L, Wraith JE. 2007. Miglustat for treatment of Niemann–Pick C disease: A randomised controlled study. *Lancet Neurol* 6:765–772.
- Rashed MS, Ozand PT, Bucknall MP, Little D. 1995. Diagnosis of inborn errors of metabolism from blood spots by acylcarnitines and amino acids profiling using automated electrospray tandem mass spectrometry. *Pediatr Res* 38:324–331.
- Sands MS, Davidson BL. 2006. Gene therapy for lysosomal storage diseases. *Mol Ther* 13:839–849.
- Sawkar AR, Cheng WC, Beutler E, Wong CH, Balch WE, Kelly JW. 2002. Chemical chaperones increase the cellular activity of N370S beta-glucosidase: A therapeutic strategy for Gaucher disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:15428–15433.
- Scriver CR, Kaufman S. 2001. Hyperphenylalaninemia: Phenylalanine hydroxylase deficiency. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The metabolic and molecular bases of inherited diseases* 8th edition. New York: McGraw-Hill. p 1667–1724.
- Shapiro BE, Pastores GM, Gianutsos J, Luzy C, Kolodny EH. 2009. Miglustat in late-onset Tay–Sachs disease: A 12-month, randomized, controlled clinical study with 24 months of extended treatment. *Genet Med* 11:425–433.
- Snyder EY, Taylor RM, Wolfe JH. 1995. Neural progenitor cell engraftment corrects lysosomal storage throughout the MPS VII mouse brain. *Nature* 374:367–370.
- Spada M, Pagliardini S, Yasuda M, Tükel T, Thiagarajan G, Sakuraba H, Ponzzone A, Desnick RJ. 2006. High incidence of later-onset fabry disease revealed by newborn screening. *Am J Hum Genet* 79:31–40.
- Strazza M, Luddi A, Carbone M, Rafi MA, Costantino-Ceccarini E, Wenger DA. 2009. Significant correction of pathology in brains of twitcher mice following injection of genetically modified mouse neural progenitor cells. *Mol Genet Metab* 97:27–34.
- Tropak MB, Reid SP, Guiral M, Withers SG, Mahuran D. 2004. Pharmacological enhancement of beta-hexosaminidase activity in fibroblasts from adult Tay–Sachs and Sandhoff patients. *J Biol Chem* 279:13478–13487.
- Umapathysivam K, Hopwood JJ, Meikle PJ. 2000. Determination of acid alpha-glucosidase activity in blood spots as a diagnostic test for Pompe disease. *Clin Chem* 47:1378–1383.
- Wenger DA, Rafi MA, Luzi P, Datto J, Costantino-Ceccarini E. 2000. Krabbe disease: Genetic aspects and progress toward therapy. *Mol Genet Metab* 70:1–9.
- Wraith JE, Vecchio D, Jacklin E, Abel L, Chadha-Boreham H, Luzy C, Giorgino R, Patterson MC. 2010. Miglustat in adult and juvenile patients with Niemann–Pick disease type C: Long-term data from a clinical trial. *Mol Genet Metab* 99:351–357.

- Yam GH, Zuber C, Roth J. 2005. A synthetic chaperone corrects the trafficking defect and disease phenotype in a protein misfolding disorder. *FASEB J* 19:12–18.
- Zhang XK, Elbin CS, Chuang WL, Cooper SK, Marashio CA, Beauregard C, Keutzer JM. 2008. Multiplex enzyme assay screening of dried blood spots for lysosomal storage disorders by using tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 54:1725–1728.
- Zhao H, Grabowski GA. 2002. Gaucher disease: Perspectives on a prototype lysosomal disease. *Cell Mol Life Sci* 59:694–707.
- Ziadeh R, Hoffman EP, Finegold DN, Hoop RC, Brackett JC, Strauss AW, Naylor EW. 1995. Medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in Pennsylvania: Neonatal screening shows high incidence and unexpected mutation frequencies. *Pediatr Res* 37:675–678.