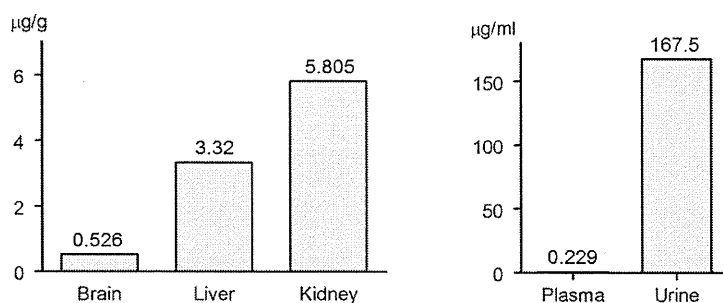


図 1 1mM NOEV 経口負荷後の代謝動態



1 mM NOEV 経口アドリブ6か月
(R201マウス、N=2)

図 2 NOEV 投与後の組織・体液濃度

中濃度は60分で最高値に達した。半減期は3mg/kg 塩酸塩投与群で2時間ほどであった。そこで以後の実験にはすべてNOEV塩酸塩を用いた。

次に短期間投与後の組織・体液内へのNOEV移行と排泄動態を調べた(図1)。1mM水溶液投与3-7日後、水投与に変えて7日間まで経過観察した。投与開始3日以内に組織で飽和し、4-7日以内に検査対象組織(脳、肝、腎)から消失することが分かった。血中濃度は非常に低かったが、同じ傾向を示した。尿中には大量に排泄されたが、

NOEV投与7日後4-7日で排泄がほとんど消失した。

長期NOEV投与はモデルマウス(R201Cマウス)について行った(図2)。検査したいずれの組織でも6か月間で大きな蓄積効果は見られなかった。脳組織中では肝、腎の10%程度のNOEV濃度を維持していた。これら少数例での組織や血液、尿では短期投与で得られたデータと本質的に大きな違いはなかった。

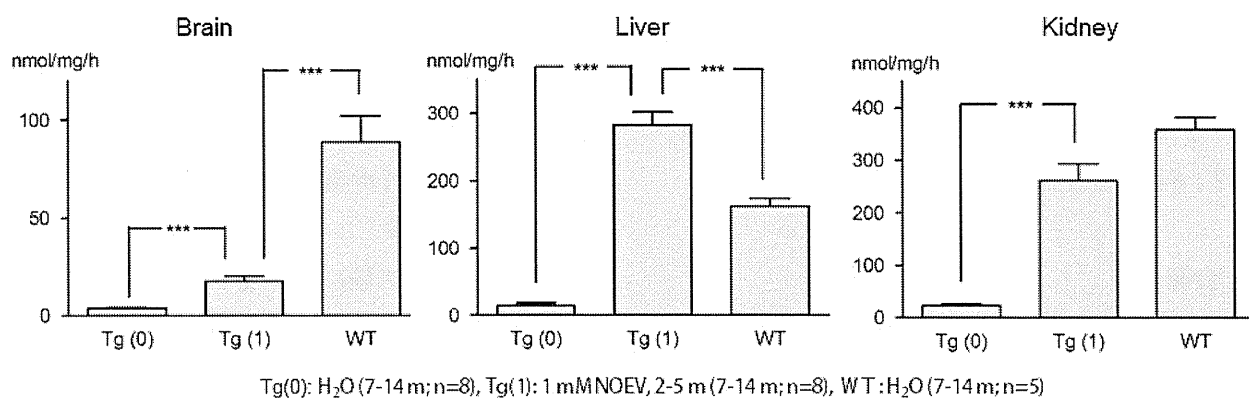


図3 NOEV投与後の組織内β-ガラクトシダーゼ活性

R201C マウスに対する NOEV 長期投与の酵素活性に対する効果を図3にまとめた。モデルマウスに NOEV を投与すると、すべての組織・体液で NOEV 上昇にともなった β-ガラクトシダーゼ活性上昇を認めた。脳では野生型マウスの 20-25%まで上昇した。肝、腎では野生型マウスの活性とほぼ同等かそれ以上になった。

D. 考察

今年度は GM1-ガングリオシドーシスのモデルマウスについて、NOEV の経口薬としての体内動態の確認のための分析を行った。NOEV 経口投与後の代謝反応の有無については検査を行っていないが、少数例の尿中排泄量から判断すると、体内で NOEV が代謝される可能性は少ないと予想される。そして、少なくとも脳、肝、腎においては長期投与後も蓄積効果はなく、投与中止後は速やかに排泄され細胞に残ることはないという結論が得られた。

現在ライソゾーム病に対しては広く酵素補充療法がおこなわれているが、中枢神経病変に対する効果が確認されていないし、蛋白質という巨大分子を中枢神経系に非侵襲的に到達させることは今後も技術的に容易でないであろう。また基質削減の試みも行われているが、その原理からも、薬剤としての細胞毒性は決して無視できないであろう。これに対して我々が開発中のシャペロン薬は経口投与という新しいアプローチ法であるということのほかに、少ない投与量で細胞病態を修正するこ

とができるという利点がある。しかも今回の実験でも明らかになったように脳組織に容易に到達することは、これまでの神経遺伝病治療の概念を大きく変えるはずである。今後はさらに厳密な毒性試験とともにヒト患者に対する有効性を確認して、薬剤開発に向かいたい。

E. 結論

今年度の研究により、薬剤候補としてのシャペロン化合物 NOEV の投与後の動態が明らかになった。さらに詳細に物性、有効性、毒性についての検討を進め、ヒト患者への投与に進む予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Suzuki Y : Molecular basis of neurogenetic diseases. *Brain Dev*, 33 : 719-725, 2011
- 2) Takamura A, Higaki K, Ninomiya H, Takai T, Matsuda J, Iida M, Ohno K, Suzuki Y, Nanba E : Lysosomal accumulation of Trk protein in brain of GM1-gangliosidosis mouse and its restoration by chemical chaperone. *J Neurochem*, 118 : 399-406, 2011
- 3) Higaki K, Li L, Bahrudin U, Okuzawa S, Takamura A, Yamamoto K, Adachi K, Paraguison RC, Takai T, Ikehata H, Tominaga L, Hisatome I, Iida M, Ogawa S, Matsuda J, Ninomiya H, Sakakibara Y, Ohno K, Suzuki Y, Nanba E : Chemical

chaperone therapy : chaperone effect on mutant enzyme and cellular pathophysiology in β -galactosidase deficiency. Hum Mutat, 32 : 843-852, 2011

2. 学会発表

- 1) 難波栄二, 檜垣克美, 大野耕策 鈴木義之 : ヒトベータガラクトシダーゼ欠損症に対するケミカルシャペロン療法 : 88 のミスセンス変異に対する NOEV の有効性. 第53回日本小児神経学会総会, 横浜, 2011.5.26-28
- 2) Mena-Barragán T, Li L, Aguilar-Moncayo M, García-Moreno MI, Luan Z, Nanba E, Ohno K, Ortiz Mellet C, Higaki K, Suzuki Y, García Fernández JM: sp2-Iminosugar-type (galacto) nojirimycin analogues with pharmacological chaperone activity for GM1-gangliosidosis and Fabry disease. 16th European Carbohydrate Symposium, Sorrento, Italy, 2011.7.3-7
- 3) Takai T, Higaki K, Ohno K, Suzuki Y, Nanba E : Chemical chaperone therapy : chaperone effect on mutant enzyme and cellular pathophysiology in β -galactosidase deficiency. 2011 Tokyo Meeting on Lysosomal Storage Disease Screening, Tokyo, 2011.8.4-6
- 4) Suzuki Y : Chemical chaperone therapy for

neuronopathic lysosomal diseases. International Conference of Medicchem 2011, Beijing, 2011.8.9-11

- 5) 檜垣克美, 高村歩美, 高井知子, 大野耕策, 鈴木義之, 難波栄二 : GM1 ガングリオシドーシスモデルマウス脳におけるシグナル伝達異常. 日本ライソゾーム病研究会, 東京, 2011.9.29-30
- 6) 高井知子, 檜垣克美, Ortiz Mellet C, García Fernández JM, 大野耕策, 鈴木義之, 難波栄二: ベータガラクトシダーゼに対する新規シャペロン候補化合物の解析. 第53回日本先天代謝異常学会, 幕張, 2011.10.24-26
- 7) Suzuki Y : Chemical chaperone therapy for neuronopathic lysosomal diseases. 4th International Conference on Drug Discovery & Therapy, Dubai, 2012.2.12-15

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 新規出願
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

β -ガラクトシダーゼ遺伝子変異解析とケミカルシャペロン療法に関する研究

分担研究者：難波 栄二(鳥取大学生命機能研究支援センター教授)

研究要旨

β -ガラクトシダーゼ欠損症患者 1 検体について遺伝子変異解析を行い、Y333C/Y333C 変異を同定した。またこの患者由来の皮膚線維芽細胞に対するケミカルシャペロン化合物 NOEV(N-octyl-4-epi- β -valienamine)の検討を行い、有意なシャペロン効果を認めた。

A. 研究目的

β -ガラクトシダーゼ欠損症の遺伝子変異解析を行い、培養細胞に対するケミカルシャペロンの効果の有無を判定し、変異型との相関を明らかにすることで、シャペロン療法の臨床応用のための基礎的な解析を目的とした。また、新規シャペロン化合物の開発も試みた。

B. 研究方法

1. β -ガラクトシダーゼ遺伝子変異解析

β -ガラクトシダーゼ欠損症患者由来培養皮膚線維芽細胞および血液検体からゲノム DNA を抽出し、全エクソンについてシークエンス解析を行った。

2. GM1-ガングリオシドーシス患者皮膚繊維芽細胞に対するシャペロン効果の検討

培養皮膚線維芽細胞に対するシャペロン効果の検討は 0.2、2 μ M の NOEV(N-octyl-4-epi- β -valienamine)を含む培地で 4 日間培養後、細胞抽出液の β -ガラクトシダーゼ酵素活性を 4-MU 人工基質を用い測定し行った。

C. 研究結果

GM1-ガングリオシドーシス 1 検体について、遺伝子変異解析を行い、Y333C/Y333C(Morquio

B 病の変異として報告 ; Mayer et al, Mol Genet Meta, 2009) を同定した。また、皮膚線維芽細胞について NOEV のシャペロン効果を検討した結果、2 μ M の NOEV による有意なシャペロン効果(4.1 倍の残存酵素活性の上昇)を認めた。また、我々が同定し解析を行っている β -ガラクトシダーゼに対する新規シャペロン化合物も、NOEV 同様有意なシャペロン活性を認めた。

D. 考 察

今回新たに 1 人の GM1-ガングリオシドーシスについて遺伝子変異を行い、Y333C ホモ変異を同定した。この変異は NOEV によるシャペロン効果を認めた。NOEV は約 25% のミスセンス変異に対しシャペロン効果を示し、報告している(Higaki et al, 2011)。また、我々は β -ガラクトシダーゼに対する新規シャペロン化合物を同定し、解析を行っている(投稿中)。Y333C 変異はこの化合物によるシャペロン効果も認めた。これまでの解析から、この新規化合物は NOEV の効かない I51T 変異などにもシャペロン効果を示すことが分かっている。今後、シャペロン化合物と酵素蛋白質との構造機能解析を行うことで、シャペロン効果についての詳細な分子機構が明らかになるものと考えられる。

E. 結 論

β -ガラクトシダーゼ欠損症の遺伝子変異解析を行い、Y333C ホモ変異を同定した。この変異は NOEV によるシャペロン効果を認めた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Higaki K, Li L, Bahrudin U, Okuzawa S, Takamura A, Yamamoto K, Adachi K, Paraguison RC, Takai T, Ikehata H, Tominaga L, Hisatome I, Iida M, Ogawa S, Matsuda J, Ninomiya H, Sakakibara Y, Ohno K, Suzuki Y, Nanba E : Chemical chaperone therapy : chaperone effect on mutant enzyme and cellular pathophysiology in β -galactosidase deficiency. Hum Mutat, 32 : 843-852, 2011
 - 2) Takamura A, Higaki K, Ninomiya H, Takai T, Matsuda J, Iida M, Ohno K, Suzuki Y, Nanba E : Lysosomal accumulation of Trk protein in brain of GM1-gangliosidosis mouse and its restoration by chemical chaperone. J Neurochem, 118 : 399-406, 2011
 - 3) Otomo T, Higaki K, Nanba E, Ozono K, Sakai N : Lysosomal storage causes cellular dysfunction in mucopolipidosis II skin fibroblasts. J Biol Chem, 286 : 35283-35290, 2011
- ### 2. 学会発表
- 1) Nanba E : Chemical chaperone therapy for lysosomal storage diseases. Satellite Symposium of Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases 2011 Tokyo Meeting on Lysosomal Storage Disease Screening, Tokyo, 2011.8
 - 2) Takai T, Higaki K, Ohno K, Suzuki Y, Nanba

E : Chemical chaperone therapy : chaperone effect on mutant enzyme and cellular pathophysiology in β -galactosidase deficiency. Satellite Symposium of Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases 2011 Tokyo Meeting on Lysosomal Storage Disease Screening, Tokyo, 2011.8

- 3) 高井知子, 檜垣克美, 鈴木義之, 難波栄二 : ヒト変異 β -ガラクトシダーゼに対する新規シャペロン化合物. 第 84 回日本生化学会大会, 京都, 2011.9
- 4) 三浦弘子, 檜垣克美, 山内裕子, 高井知子, 難波栄二 : ライソゾーム病神経変性とミトコンドリア異常. 第 84 回日本生化学会大会, 京都, 2011.9
- 5) 檜垣克美, 高村歩美, 大野耕策, 鈴木義之, 難波栄二 : GM1 ガングリオシドーシスモデルマウス脳におけるシグナル伝達異常. 第 16 回日本ライソゾーム病シンポジウム, 東京, 2010.9
- 6) Higaki K, Ohno K, Suzuki Y, Nanba E : Chemical chaperone therapy for β -galactosidase deficiency. 12th International Congress of Human Genetics, Montreal, Canada, 2011.10
- 6) 高井知子, 檜垣克美, Ortiz Mellet C, Garcia Fernandez J, 大野耕策, 鈴木義之, 難波栄二 : ベータガラクトシダーゼに対する新規シャペロン候補化合物の解析. 第 53 回 日本先天代謝異常学会総会, 千葉, 2011.11
- 7) Yi Y, 檜垣克美, Ortiz Mellet C, Garcia Fernandez J, 大野耕策, 鈴木義之, 難波栄二 : ファブリー病に対する新規シャペロン候補化合物の解析. 第 53 回 日本先天代謝異常学会総会, 千葉, 2011.11

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

ゴーシェ病 3 型患者に対するケミカルシャペロン療法

分担研究者：大野 耕策(鳥取大学・医学部・教授)

研究要旨

ゴーシェ病に対する酵素補充療法は臓器腫大や血液学的所見を改善させる。しかし、酵素製剤は脳血液関門を通過出来ない為、本邦のゴーシェ病患者の過半数を占める神経型の中枢神経症状に、酵素補充療法の効果は乏しく、酵素補充療法に併用する新規治療法の開発が望まれている。今回、我々はカナダのグループがゴーシェ病患者由来皮膚線維芽細胞においてアンブロキシソールのシャペロン効果を報告した事を受け、ゴーシェ病患者線維芽細胞と正常マウスで、アンブロキシソール投与の有効性と安全性を確認した後、鳥取大学倫理委員会の承認を受け、ゴーシェ病 3 型患者 1 名に対し、アンブロキシソールによるケミカルシャペロン療法を行った。

投与を 22 カ月間継続し、長期大量投与に伴う有害事象を認めず、リンパ球酵素活性は正常範囲となり、ABX の髄液移行も確認した。治療後の聴性脳幹反応で中枢伝導速度と閾値の改善が見られ、中枢神経系への効果が示唆された。

研究協力者

成田 綾(鳥取大学医学部附属病院・助教)

白井謙太郎(同上)

A. 研究目的

ゴーシェ病はライソゾーム酵素の一つであるグルコセレブロシダーゼの欠損により、その基質であるグルコセレブロシドが肝、脾、骨髄、神経系等に蓄積することで発症する遺伝性疾患で、神経症状の有無、重症度により 3 型に分類される。ゴーシェ病 3 型はその一つの病型で、小児期に発症し肝脾腫、核上性眼球運動障害、運動失調、不随意運動、発達の退行を認め、寝たきりとなる予後不良の疾患である。現在、酵素補充療法が開発され、治療により肝脾腫、貧血などの身体症状は改善するが、神経症状に対する効果は認められていない。

我々はゴーシェ病の中枢神経系の治療法の開発をめざし、変異酵素を活性化する薬理的シャペロンの開発を行い、N-オクチルバリエナミン

(NOV) が 3 型の原因変異である F213I、N188S、G202R の残存酵素活性を上昇させることを見いだした。またスペインとの共同研究で SP2 アザ糖が新しいシャペロンとして働くことを見いだした。一方カナダのグループは、FDA 承認薬をスクリーニングし、2009 年 7 月にアンブロキシソール(ムコサル、ムコソルバン)が、F213I や 1 型の原因変異である N370S 変異の酵素活性をあげることを見いだした。アンブロキシソールは酵素製剤とは異なり、低分子化合物である為、血液脳関門を通過し、神経症状への効果が期待できる。また、去痰剤として汎用されている薬剤であり、安全性や薬物動態が比較的明らかにされており、より早期の臨床応用が期待できる。

よって、本研究では鳥取大学医学部倫理審査委員会の承認を得た後、患者家族の同意を得てゴーシェ病 3 型患者 1 名に対して、アンブロキシソール投与を行い、シャペロン療法の有効性と安全性を評価した。

B. 研究方法

【患者】

患者は 30 歳の女性。12 歳より進行性ミオクロニーてんかん、小脳失調にて発症し、その後退行、運動障害が進行。20 歳時、ゴーシェ病 3 型の診断を受けた。現在、表情の変化はあるが意思疎通困難、寝たきり、完全経管栄養、喉頭気管分離術後。

【治療薬の調整】

アンブロキシソール塩酸塩製剤(以下、アンブロキシソール、商品名ムコソルバン)は帝人ファーマ株式会社から購入した。

【治療薬の投与方法】

簡易懸濁法にて溶解したアンブロキシソールを分 3 投与した。アンブロキシソールは 3mg/kg/日から開始し、2 ヶ月毎に 3mg/kg/日ずつ増量し、開始 6 ヶ月目から 12 ヶ月目まで 12mg/kg/日、13 ヶ月目から現在(22 ヶ月)まで 15mg/kg/日の投与を行った。

【治療効果の判定】

血液(血算、一般生化学検査、酵素活性、アンブロキシソール血中/髄液中濃度)、尿検査、腹部エコー、腹部 CT、脳 MRI、MRS、脳波、電気生理検査(聴性脳幹反応、短潜時 SEP、視覚誘発電位、Blink reflex)を治療開始前後に行った。

C. 結果

【1 年間の治療経過による有害事象】

アンブロキシソール大量投与の副作用として低尿酸血症や消化器症状が挙げられるが、いずれも認めず、安全に長期大量投与が可能であった。

【残存酵素活性の推移】

アンブロキシソール投与量増量に伴い、酵素補充療法前の残存酵素活性はコントロールの 60-70% に上昇した。また、アンブロキシソール 12mg/kg/日の時点で髄液移行が 13%であった。

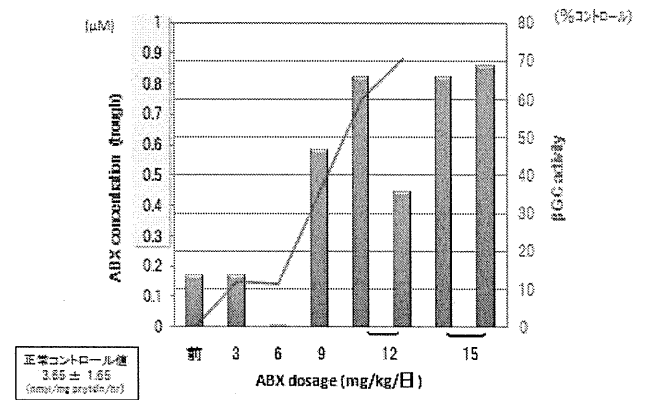


図 1 白血球 β -glucocerebrosidase 活性とアンブロキシソール血中濃度

【脳 MRI、MRS の推移】

開始前、6 ヶ月、12 ヶ月、18 ヶ月の MRI では、ごく軽度の萎縮の進行を認めた。

MRS を前頭葉、後頭葉、小脳歯状核、脳幹(橋)にて施行し、Chol/Cr が全領域で低下を示した。NAA/Cr は不変であった。

【電気生理検査の推移】

聴性脳幹反応では、治療 12 ヶ月目に中枢伝導速度と閾値の改善を認めた。

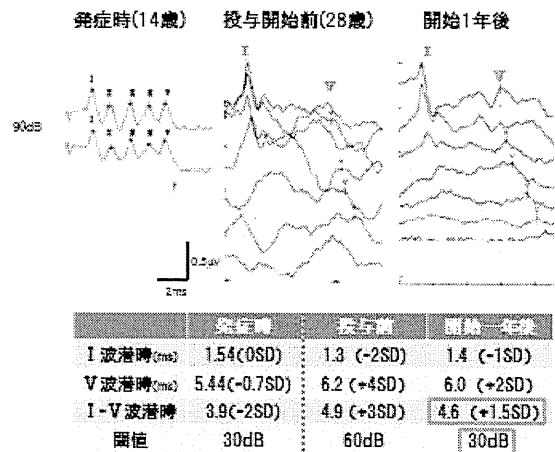


図 2 聴性脳幹反応の変化

体性感覚誘発電位では、治療 6 ヶ月目、18 ヶ月目に皮質波 (N37) の出現を認めた。

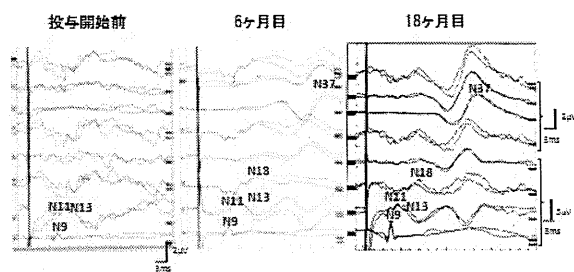


図 3 体性感覚誘発電位の変化

その他、末梢神経伝導速度や脳波、聴性脳幹反応には明らかな変化を認めなかった。

D. 考 察

今回の症例は、神経症状が進行しており重度である為、臨床症状の顕著な改善を指摘する事は難しかった。しかしながら、大量長期投与による有害事象を認めず、髄液移行も確認された事から、安全性の点からアンブロキシソールはゴーシェ病の中枢神経治療薬として早期臨床応用が期待出来る。

また、アンブロキシソールの増量に伴い残存酵素活性は正常コントロールの 60-70%まで上昇し、聴性脳幹反応で中枢伝導速度の改善が見られた事から、進行例であっても残存する神経機能の改善に寄与する可能性が示唆された。また、治療経過中に MRI にて軽度萎縮の進行を認めたが、神経細胞のマーカーである NAA/Cr は低下を認めず、更なる神経脱落の進行を抑制している事が推測された。加えて治療に伴い MRS にて Chol/Cr が低下しており、病態との関連について、定量 MRS や代謝物の測定にて更なる検討を行う予定である。

E. 結 論

ゴーシェ病 3 型患者へのアンブロキシソールの大量長期経口投与は、有害事象を伴わず、患者の残存酵素活性を上昇させた。また、進行例であって

も神経症状に対して改善効果を有する可能性が示唆された。

今後は症例数を増やし、ゴーシェ病 3 型の中枢神経治療薬としての有効性を検討していく。

更には、シャペロン単独では無効な変異型に対しても、外因性補充酵素の取り込みや安定化に対するアンブロキシソールの併用効果について検討を行う。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Higaki K, Li L, Ohno K, et al. : Chemical Chaperone Therapy : Chaperone Effect on Mutant Enzyme and Pathophysiology in β -Galactosidase Deficiency. Hum Mutat, 32 : 843-852, 2011
- 2) Takamura A, Higaki K, Ohno K, et al. : Lysosomal accumulation of Trk protein in brain of GM1-gangliosidosis mouse and its restoration by chemical chaperone. J. Neurochem, 118 : 399-406, 2011

2. 学会発表

- 1) 成田 綾, 前垣義弘, 大野耕策 : Gaucher 病 3 型患者に対するケミカルシャペロン療法の効果. 第 53 回日本小児神経学会総会, 横浜, 2011.5

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

メタボローム解析による ALD 等ペルオキシソーム病の発症前診断マーカーの探索

分担研究者：横山 和明(帝京大学薬学部教授)

研究要旨

Zellweger 症候群患者由来繊維芽細胞に含まれる極長鎖脂肪酸含有脂質の構造を解析したところ、従来の指標である C26 ; 0 以外の多数の極長鎖脂肪酸の存在が確認された。さらなる解析が必要である。

研究協力者

下澤伸行(岐阜大学生命科学総合研究支援センター
ゲノム分野 教授)

今中常雄(富山大学大学院医学薬学研究部 教授)

A. 研究目的

Zellweger 症候群(ZS)や副腎白質ジストロフィー(ALD)などのペルオキシソーム病において、蓄積する極長鎖脂肪酸を含有している脂質の構造について、メタボローム解析の手法によって解析することにより、ALD 発症診断マーカーを明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

ペルオキシソーム病患者の皮膚政権により得られた繊維芽細胞を、大量に培養し、回収して Bligh & Dyer 法により全脂質を抽出した。これを ESI-LC-MS/MS 法によるメタボローム解析に供し、極長鎖脂肪酸を含む分子種の構造を明らかにした。

(倫理面への配慮)

各所属機関における倫理委員会の審査を受け、承認を受けたうえで実施した。

C. 研究結果

ZS と ALD の検体を ESI-LC-MS 法で解析したところ、両者ともリン脂質画分で通常では検出さ

れない大きな分子量で疎水性の高いスポットが多数検出された。特に ZS で著しく、今年度の解析では ZS を優先して行うこととした。

次に、各スポットの MS/MS 解析を行うことにより、リン脂質の極性部と脂肪酸の構成を調べたところ、ホスファチジルコリン(PC)には、臨床指標として通常用いられている C26 : 0 以外の、多様な極長鎖脂肪酸が含まれていることが明らかとなった。炭素数としては 32 個までのものがあり、加えて二重結合 6 個までの高度不飽和のものも検出された。

D. 考 察

多様な極長鎖脂肪酸が存在することから、臨床指標について再検討の余地があるものと考えられた。

E. 結 論

ペルオキシソーム病のうち少なくとも ZS では、これまでに臨床指標に用いられている C26 ; 0 以外の極長鎖脂肪酸が多数存在し、PC に含まれていることが明らかとなった。今後、他のクラスの脂質や ALD に関して解析していく必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

- 1) 西澤千穂、永井 徹、池田和貴、守田雅志、唐澤健、原田史子、谷川和也、佐藤典子、田口 良、下澤伸行、今中常雄、井上圭三、横山和明：ペルオキシソーム病の繊維芽細胞にみられる極長鎖脂肪酸含有脂質定量の試み．生化学，83(8)：158 項及び CD, 2011

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

小児副腎白質ジストロフィーの超早期診断法開発に関する研究

分担研究者：加我 牧子(国立精神・神経医療研究センター精神保健研究所)

研究要旨

家系内の小児副腎白質ジストロフィー症(Adrenoleukodystrophy, ALD)発症者の存在などから極長鎖脂肪酸高値、遺伝子変異が確定された ALD 児における発症を早期に診断し早期治療につなげるため、未発症の状態での評価のため紹介来院した初診時 3 歳から 14 歳の男児 8 例について神経心理学的検査、神経生理学的検査を実施した。Wechsler 系知能検査で言語性 IQ が正常範囲でありながら動作性 IQ 低値であった 2 例は、他の視覚性認知機能検査の異常を示す者が多く、視覚誘発電位振幅が高値であった者に多かった。年少時からの長期観察症例の神経生理学的検査の結果からは SSEP の N20 延長にも注目する必要性が示唆された。

研究協力者

稲垣真澄¹⁾、軍司敦子¹⁾、崎原ことえ¹⁾、
中村雅子¹⁾²⁾、小久保奈緒美¹⁾、安村明¹⁾、
佐久間隆介¹⁾

1) 国立精神・神経医療研究センター精神保健研
究所知的障害研究部

2) 国際医療福祉大学三田病院耳鼻咽喉科

A. 研究目的

小児副腎白質ジストロフィー症(Adrenoleukodystrophy, ALD)は伴性劣性遺伝によるきわめて予後不良な代謝性変性疾患であり、現在のところ、発症早期の幹細胞移植(stem cell transplantation)が現実的にはほとんど唯一の治療法となっている。最近では家系内発症をきっかけとした受診例がふえてきており、未発症男児の発症の有無に関する診断の重要性は極めて大きいものがある。しかし、同一家系内でも発症時期や臨床症状の違いが指摘されており、複雑な病像を呈する点も特徴である。従来は臨床症状発現以前の診断は、MRI 病変の出現の有無でのみ判断されていたが、神経心理学的検査所見の重要性が認識されて来たことに加えて、

これまでの私たちの報告により神経生理学的検査所見の重要性も指摘できるようになった。このため、私たちは ALD 診断における超早期診断のための臨牀マーカーをめざすことを目的として研究を行った。

B. 研究方法

本プロジェクトにより来院評価を希望された 20 歳以下の症例 42 名のうち、当院初診時に神経学的異常が指摘されていなかった 11 名を無発症型とした。このうち、3 名は来院時すでに幹細胞移植を受けて安定した状態で受診されたが対象から除外した。2 例は副腎皮質不全の状態をきっかけに診断された兄弟例であるが神経症状が認められなかったため、今回の解析に含めた。この結果 8 例の評価を実施した。

対象児に対して神経心理学的検査と神経生理学的検査を実施した。神経心理学的検査としては年齢発達に応じて WISC-III など Wechsler 系の知能検査、K-ABC、イリノイ言語発達検査、標準失語症検査、レイの複雑図形、レイの auditory verbal learning test、Dichotic listening test、音像定位

検査、環境音認知検査、人物描画知能テスト、立方体透視図等を実施して、言語能力、視覚認知・視空間認知・視覚的推理、視覚性記憶・言語性記憶、注意機能、聴覚認知機能等を評価した。また神経生理学的検査では聴性脳幹反応 ABR、視覚誘発電位 VEP、mismatch negativity、P300 等の評価を行った。これらは既報告のテストバッテリーを本人の状態に合わせて組み合わせて実施した。

特に症例 1 については 3 年 4 か月にわたって経過を観察中であり、この間の神経生理学的検査について詳しく検討した。なお本症例は経過中に Charcot Marie Tooth 病を合併していることが経過中に判明した。

(倫理面への配慮)

紹介もと病院での主治医の説明に加えて、当院来院時に患児および保護者に、上記検査について説明し、同意を得たうえで検査を実施した。

C. 研究結果

対象例は初回検査時 3 歳 11 か月から 14 歳 7 か月であり、すべて男児であった。検査結果のまとめを表に示した。また症例 1 の神経生理学的検査の推移について図に示した。

心理検査については Wechsler 系知能検査で言語性 IQ は 8 例全例で正常域であったが、動作性 IQ に異常を示す者があり、値の低い者が 2 例あった。また言語性 IQ との差が 10 以上ある者が 3 例あった。低年齢群では検査可能な項目が少なかったが、言語性 IQ と動作性 IQ の乖離のある者は各種心理検査に異常を示す者が多く見られた。

また神経生理学的検査では閃光刺激視覚誘発電位ならびに P300 課題における P1 成分が異常を示す者が VEP では 5 例、事象関連電位では 4 例あり、定型発達児平均と比べるとすべて異常高値であった。言語性 IQ と動作性 IQ の乖離を示した者はすべて視覚誘発電位の振幅巧遅をまた年少児では潜時の異常を示す者がありすべて潜時の延長であった。

なお症例 1 の継時的変化(図)によれば上段の視覚誘発電位 VEP は潜時は急速に正常化するものの、振幅は 4 年後も一貫して高いままであった。また中段の聴性脳幹反応 ABR は、時間の経過とともに潜時が延長する傾向は見いだされなかった。これに反して下段の体性感覚誘発電位 SSEP の N20 は対照定型発達児に比較して一貫して潜時が遅延しており、年齢とともに下位成分も延長の傾向を示していた。

D. 考察

発症前 ALD 児における発症の指標として神経心理学的には Wechsler 知能検査における言語性 IQ と動作性 IQ の乖離(動作性 IQ 低値)及びこれに関連した視覚認知機能障害を示唆する所見が、後頭型の発症を示唆する所見と考えられた。視覚誘発電位ならびに事象関連電位 P300 の P1 振幅高値の所見は発症前男児に特徴的な所見であると考えられ、神経心理学的検査の異常所見と併せてきわめて重要な早期サインと考えられた。なお症例 1 にみられた高振幅の所見も発症のハイリスクを示唆していると考えられた。なお ABR は発達的に V 波が急速に低下する時期は過ぎていることもあって、潜時の延長はみられておらず、未発症の状態で推移している現状を表しているものと考えられ、発症早期の指標としてはとらえられていない。また SSEP については、早期から N20 の延長がみられており、末梢成分の延長は 6 歳以降に見られていることを考慮すると、末梢性ニューロパチーの合併によるものではなく、皮質性、中枢性の異常を示唆する所見であって、VEP 同様、早期発症のサインとなり得る可能性がある。ただしこれまでの検討では SSEP の異常は明らかではなかったので本症例に特有の可能性もあり今後の検討課題としたい。

E. 結論

神経心理学的検査における言語性 IQ と動作性 IQ の乖離と、神経生理学的検査における VEP な

らびに P300 における P1 振幅高値は未発症 ALD の早期診断に有用であると思われる。超早期診断に必要なマーカーの検索をさらにすすめる必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 加我牧子：副腎白質ジストロフィー症の話題. 東京小児科医会報 100：47-53, 2011.
- 2) 加我牧子：小児の誘発電位 基礎. 臨床神経生理学 39：227-231, 2011
- 3) 加我牧子：小児聴覚失認の診療. 音声言語医学 52：316-321, 2011

3. 学会発表

- 1) 宮内彰彦, 長嶋雅子, 森本哲, 稲垣真澄, 加我牧子, 下澤伸行, 山形崇倫, 桃井真理子：内包から延髄の錐体路病変で発症した副腎白質ジ

ストロフィーの 1 例. 第 53 回日本小児神経学会総会, 神奈川, 2011.5.26-28.

- 2) 小関道夫, 下澤伸行, 矢部普正, 加藤俊一, 加藤剛二, 加我牧子, 辻省次, 鈴木康之：副腎白質ジストロフィーに対する造血幹細胞移植効果：国内症例の包括的検討, HSCT for ALD in Japan. 第 53 回日本先天代謝異常学会, 千葉, 2011.11.25.

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

副腎白質ジストロフィー症に対する造血細胞移植

分担研究者：加藤 剛二(名古屋第一赤十字病院 小児医療センター血液腫瘍科)

研究要旨

進行性でかつ難治性の副腎白質ジストロフィー(以下 ALD)3 例に対して骨髄非破壊的前処置にて造血細胞移植を施行した。その結果、さい帯血移植でも骨髄移植と同様に生着生存が得られ、緊急的移植が必要な本疾患に対して有望と考えられた。

研究協力者

下澤伸行(岐阜大学生命科学総合研究支援センター
ゲノム研究分野教授)

は認められるもののリハビリにて改善が得られている。また頭部 MRI にても T2 で白質の異常領域の縮小および造影効果の低下が認められた。(表 4, 5, 6)

A. 研究目的

ALD は薬物療法が無効であり、症状の進行を停止もしくは緩徐にできる唯一の方法が造血細胞移植である。これまで本症例に対しては主として骨髄破壊的前処置を用いた骨髄移植が施行されていたが今回、骨髄非破壊的前処置による造血細胞移植を施行し臨床経過を検討した。

D. 考察

過去の報告によれば ALD 症例に対する造血細胞移植の適応は IQ80 以上、もしくは MRI の Loes score が 9 点以下とされている。しかしながら家族歴がない場合は発症から診断まで数か月から 1 年を要し、さらに HLA 一致同胞が得られない場合は骨髄バンクからの移植施行時にはさらに数か月を要し、この間に神経症状が進行することも稀ではなかった。また移植までの時間短縮を目的として臍帯血移植も試みられていたものの生着不全の頻度が高いという問題が指摘されていた。今回、フルダラビン、メルファラン、低線量全身放射線照射を用いて移植を実施した結果、移植細胞源に拘らずドナー完全キメラが移植後 4 週までに得られ、さらに造血細胞移植特有の合併症は認められなかった。また従来移植前処置にブスルファンを用いると進行期症例においては移植直後に急速な神経症状の進行が認められたが本症例においては緩徐な進行であった。移植後の神経症状は 1 年から 1 年半後までは進行するとされているので今後も注意深いフォローが必要である。

B. 研究方法

家族歴のない、もしくは不明な進行期 ALD3 症例に対してフルダラビン、メルファラン、低線量全身放射線照射を前処置として臍帯血移植 2 例、HLA 一致同胞からの骨髄移植を 1 例施行した。(表 1, 2, 3)

(倫理面への配慮)

患児の保護者に対して本症例に対する意義と合併症に関する説明を行い了承を得た。

C. 研究結果

造血細胞移植施行後 3 例とも生着が得られ、移植関連合併症も軽度で血液学的には安定している。また神経学的には視力低下および運動機能の低下

E. 結論

今回施行したフルダラビン、メルファラン、低線量全身放射線照射を用いた移植前処置は進行期 ALD 症例に対して安全に施行することが可能であり、神経症状の安定に寄与することが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kato K, Yoshimi A, Ito E, et al : Cord blood transplantation from unrelated donors for children with acute lymphoblastic leukemia in Japan : the impact of methotrexate on clinical outcomes. Biol Blood Marrow Transplant, 17 : 1814-1821, 2011

2. 学会発表

- 1) 加藤剛二, 坂口大俊, 吉田奈央, 松本公一 : 先天性代謝異常症に対する RIST による同種造血細胞移植. 第 33 回日本造血細胞移植学会総会, 松山, 2011.3.9

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表 1

症例	移植時年齢	家族歴	発症から移植(月)	Loes score	病変部位	遺伝子異常	VLCFA
							(C26 : 0/C22 : 0)
1	11	なし	4	9	後頭葉(内包非進展)	あり	0.062
2	9	なし	6	11.5	後頭葉(内包非進展)	あり	0.018
3	7	叔父(?)	2	9	後頭葉(内包非進展)	あり	0.048
症例	全 IQ	VIQ	PIQ	神経症状			
1		82		視力低下、視野狭窄、歩行困難			
2	70	104	<40	視力低下、視野狭窄、同名半盲、斜視			
3	59	52	75	斜視、記憶力低下			

表 2

症例	ドナー	HLA (Ag/Allele)	HLA (Ag/Allele)	細胞数	CD34	GVHD 予防	G-CSF
		GVHD direction	HVG D direction	CB : x10e7/kg	x10e5/kg		
				BM : x10e8/kg			
1	CB	8/8, 8/8	8/8, 8/8	2.8	2.7	MTX+TAC	+
2	CB	6/8, 6/8	8/8, 8/8	4.33	1.13	MTX+TAC	+
3	ID-SIB	6/6, 6/6	6/6, 6/6	4.05	8.59	MTX+CsA	+

表 3

day	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	0
Fludarabine (mg/m ² /d)	25	25	25	25	25			
Melphalan (mg/m ² /d)				70	70			
TBI (Gy)							4	
SCT								SCT

表 4

症例	生着	好中球	血小板	complete	A/C	感染症以外の 合併症	F/U
		>500 (d)	>50K (d)	chimera (d)	GVHD		
1	あり	19	40	14	0/none	-	10mo+
2	あり	24	40	28	0/none	diarrhea	7mo+
3	あり	15	25	15	0/none	-	4mo+

表 5

症例	歩行		視力		発語	
	前	後	前	後	前	後
1	自立歩行	介助歩行	0.04/0.01	明暗	有意語あり	有意語あり
2	自立歩行	介助歩行	1.2/0.4	明暗	有意語あり	有意語あり
3	自立歩行	介助歩行	1.5/1.2	0.01/0.01	有意語あり	有意語あり

表 6

症例	ALD-DRS		言語性 I Q		頭部 MRI	
	前	後	前	後	前	後
1	2	3	82	70	9	不変
2	2	3	104	71	11.5	高信号域縮小、 造影効果消失
3	2	3	52	検査できず	9	不変(単純、造影共)

静注用ブスルファンを用いたライソゾーム病の移植前処置の検討

分担研究者：矢部 普正(東海大学医学部再生医療科学准教授)

研究要旨

4例のライソゾーム病の小児に対して、静注用ブスルファンとシクロフォスファミドを用いた移植前処置で同種骨髄移植を施行した。静注用ブスルファンは肝中心静脈閉塞症などの合併症の増加が懸念されており、最初の2例は従来の投与方法で移植骨髄の生着を確認、後半の2例は両薬剤の投与順序を逆転させ合併症の頻度低下を目指した。ムコ多糖症Ⅱ型が3例、異染性白質ジストロフィーが1例、ドナーは同胞3例、非血縁骨髄1例であった。全例で生着が確認され、9～59ヶ月を経て生存中である。

共同研究者

高倉 広充 (東海大学医学部専門診療学系 助教)

矢部みはる (東海大学医学部基盤診療学系准教授)

加藤 俊一 (東海大学医学部基盤診療学系 教授)

A. 研究目的

先天性代謝異常に対する造血細胞移植(SCT)においては、生着不全あるいは拒絶の頻度が高く、ブスルファンを用いた強力な移植前処置が用いられる。近年開発された静注用ブスルファン(ivBu)は安定した血中濃度が得られやすいが、反面有効血中濃度が高く維持されることで副作用が増強する可能性もある。ivBuを用いた代謝異常の前処置の確立は急務であり、われわれは4例のライソゾーム病患者にivBuを用いた前処置でSCTを施行したので報告する。

B. 研究方法&結果

ムコ多糖症Ⅱ型(Hunter 症候群)が3例、異染性白質ジストロフィー(MLD)が1例であった。前処置はシクロフォスファミド(CY)50mg/kg×4日間、抗胸腺細胞グロブリン(ATG)1.25mg/kg×4日間と能書通りの体重別投与量によるiv Bu 0.95

～1.2mg/kg×4回/日×4日間で行い、最初の2例は従来の経口投与 Bu の場合と同じivBu/CYの順で投与したが、後の2例は成人白血病の移植で副作用の頻度が減少すると報告されているCY/ivBuの順で投与した。GVHD 予防はHLA一致同胞間移植ではシクロスポリン単独、非血縁者間移植では短期メソトレキセートとタクロリムスの併用とした。移植細胞の種類は4例とも骨髄であった。

(倫理面への配慮)

移植についてのインフォームドコンセントはヘルシンキ宣言に基づいて行い、文書での同意を得た。

C. 研究結果

前処置の副作用としてはMLDの1例がATGによる発熱で痙攣が誘発され、Hunter 症候群の2例で100日以内の軽度呼吸障害を認めたがいずれも治療により軽快した。肝中心静脈閉塞症(肝VOD)は認めなかった。年少同胞ドナーから移植した2例では、ドナー/患者体重比がそれぞれ39%、57%であったが、生着は全例で得られ、好中球が500/ μ Lを超えたのは中央値13日(11～16日)で

あった。急性 GVHD は 4 例とも認めず、慢性 GVHD は皮膚の限局型を 1 例に認めたものの、治療で軽快した。移植後 9～59 ヶ月を経て全例が生存中であり、MLD の 1 例は移植後 1 年以上にわたって神経症状が進行したが、その後安定し、Hunter 症候群の 3 例は臨床的改善を得ている。CY/ivBu 前処置例におけるキメラ解析では、1 例目が移植後 6 ヶ月まで T 細胞分画に 5%前後の本人由来の混合キメラを認め、その後は 100% ドナー由来に転換し、2 例目も移植後 7 ヶ月の検査で同様の経過であった。

D. 考 察

従来より先天性代謝異常の前処置として経口 Bu 150～160mg/m²/日×4 日間とそれに続いて CY 50mg/kg×4 日間の併用が行われ、さらに拒絶予防と GVHD 予防の両方の効果を期待して抗胸腺細胞グロブリン(ATG)が投与されてきた。2006 年に ivBu が承認されたため、静注製剤に置き換えた前処置の安全性と有効性を確認する必要が生じたが、先行して臨床応用が始まったヨーロッパでの臨床研究では、経口剤よりも肝 VOD の合併が多いと指摘された。ヨーロッパでは肝 VOD に対して有効とされる defibrotide が入手できるが、わが国では未承認であり、肝 VOD の発症頻度を低下させる工夫が必要になった。そこで後半の 2 例においては、成人白血病を中心に肝 VOD の頻度を減少させ、安定した生着を得ることができると報告された reversed CY-Bu regimen の有用性を検討することとした。生着の判定はモノクローナル抗体でサブセット別の STR 法を検討し、細胞分画別に生着動態を観察した。末梢血 T 細胞分画では移植後早期に混合キメラを認めたものの、その後完全キメラとなり、GVHD のリスクが少ない生着パターンが得られた。一方、酵素補充の主役である顆粒球系は移植後早期より 100%ドナータイプであり、移植の効果には影響しないものと考えられた。

E. 結 論

静注用 Bu 製剤を用いたムコ多糖症に対する移植前処置として、reversed CY-Bu regimen は安全かつ有効に行える可能性が示された。今後は症例の蓄積により科学的に証明していく必要がある。

F. 健康危険情報

特記事項無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

原著論文

- 1) Hyodo H, Ishiguro H, Yabe H, et al. : Decreased serum testosterone levels in long-term adult survivors with fatty liver after childhood stem cell transplant. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2012.1.13, [Epub ahead of print]
- 2) Koike T, Yanagimachi N, Yabe H, et al. : High Incidence of Radiation-Induced Cavernous Hemangioma in Long-Term Survivors Who Underwent Hematopoietic Stem Cell Transplantation with Radiation Therapy during Childhood or Adolescence. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2011.12.23, [Epub ahead of print]
- 3) Mynarek M, Tolar J, Yabe H, et al. : Allogeneic hematopoietic SCT for alpha-mannosidosis : an analysis of 17 patients. *Bone Marrow Transplant*, 2011.5.9, [Epub ahead of print]
- 4) Maekawa K, Yoshimitsu M, Yabe H et al. : Successful allo-HSCT with a minimal myeloablative conditioning regimen in an adult patient with Fanconi's anemia. *Bone Marrow Transplantation*, 2011, doi : 10.1038/bmt.201
- 5) Yagasaki H, Kojima S, Yabe H, et al. : Acceptable HLA-mismatching in unrelated

- donor bone marrow transplantation for patients with acquired severe aplastic anemia. *Blood*, 118(11) : 3186-3190, 2011
- 6) Yabe M, Shimizu T, Yabe H, et al. : Alternative donor marrow transplantation in children with aplastic anemia using low-dose irradiation and fludarabine-based conditioning. *Bone Marrow Transplant*, 46(8) : 1148-1150, 2011
- 7) Kamio T, Ito E, Yabe H, et al. : Relapse of aplastic anemia in children after immunosuppressive therapy : a report from the Japan Childhood Aplastic Anemia Study Group. *Haematologica*, 96(6) : 814-819, 2011 ;
- 8) Yoshida N, Yagasaki H, Yabe H, et al. : Predicting response to immunosuppressive therapy in childhood aplastic anemia. *Haematologica*, 96(5) : 771-774, 2011
- 9) Suzuki D, Yabe M, Yabe H, et al. : Precursor-T lymphoblastic lymphoma after unrelated bone marrow transplantation in a patient with Fanconi anemia. *J Pediatr Hematol Oncol*, 33(1) : 22-24, 2011
- 10) Yabe M, Morimoto T, Yabe H, et al. : Therapy-related myelodysplastic syndrome of recipient origin in a juvenile myelomonocytic leukemia patient 17 years after allogeneic BMT. *Bone Marrow Transplant*, 46(7) : 1023-1025, 2011
- 11) Tomita Y, Yabe H, Yabe M, et al. : High incidence of fatty liver and insulin resistance in long-term adult survivors of childhood SCT. *Bone Marrow Transplant*, 46(3) : 416-425, 2011
- 12) Imaizumi M, Yabe H, Horibe K, et al. : Prospective study of a therapeutic regimen with all-trans retinoic acid and anthracyclines in combination of cytarabine in children with acute promyelocytic leukaemia : the Japanese childhood acute myeloid leukaemia cooperative study. *Br J Haematol*, 152(1) : 89-98, 2011
2. 学会発表
- 1) Yabe H, Koike T, Ootsubo K, Morimoto T, Shimizu T, Takakura H, Kato S, Yabe M : Endocrine function in Japanese Fanconi anemia patients. 23rd Annual Fanconi Anemia Research Fund Scientific Symposium, Barcelona, Spain, 2011.10
- 2) Yabe M, Yabe H, Shimizu T, Morimoto T, Koike T, Takakura H, Ootsubo K, Kato S : Clonal chromosomal aberration in Fanconi anemia patients with myelodysplasia. 23rd Annual Fanconi Anemia Research Fund Scientific Symposium, Barcelona, Spain, 2011.10
- 3) Yabe H : on behalf of the Stem Cell Transplantation Committee of Tokyo Children's Cancer Study Group (TCCSG), Tokyo, Japan. Intensified conditioning with total-body irradiation, etoposide, and cyclophosphamide for children with acute lymphoblastic leukemia in first and second complete remission. 37th Annual Meeting of the European Group for Blood and Marrow Transplantation, Paris, France, 2011.4
- 4) Yabe M, Yabe H, Morimoto T, Shimizu T, Koike T, Takakura H, Kato S : Experience with marrow harvesting from paediatric donors at a single center : safety and efficacy. 37th Annual Meeting of the European Group for Blood and Marrow Transplantation, Paris, France, 2011.4
- 5) 矢部普正, 笹原洋二, 佐藤 貴, 今井千速, 石田宏之, 大杉夕子, 小池和俊, 井上彰子, 今井正, 石井栄三郎, 小島勢二 : 小児再生不良性貧

- 血治療研究会 再生不良性貧血に対する骨髄移植後にドナータイプの造血不全を呈した 18 例. 第 33 回日本造血細胞移植学会総会, 松山, 2011.3
- 6) Yabe H, Adachi S, Oota H, Honda Y, Shiomi M, Fujita N, Niizuma H, Kato K : Engraftment depends on the schedule of fludarabine and melphalan in reduced-intensity CBT. 第 73 回日本血液学会総会, 名古屋, 2011.10
- 7) Yabe M, Yabe H, Shimizu T, Morimoto T, Koike T, Takakura H, Mori T, Yoshida H, Ohtsuka Y, Shiomi M, Kato S : Alternative donor hematopoietic stem cell transplantation in inherited bone marrow failure syndrome. 第 73 回日本血液学会学術集会, 名古屋, 2011.10
- 8) Koike T, Yanagimachi N, Yabe H, Yabe M, Morimoto T, Shimizu T, Ishiguro H, Takakura H, Kato S : Radiation induced cavernous hemangioma (RICH) in long term survivors who underwent BMT. 第 73 回日本血液学会学術集会, 名古屋, 2011.10
- 9) Ishiguro H, Hyodo H, Tomita Y, Takakura H, Koike T, Shimizu T, Morimoto T, Yabe H, Yabe M, Kato S : Decreased testosterone levels in long-term adult survivors with fatty liver after childhood SCT. 第 73 回日本血液学会学術集会, 名古屋, 2011.10
- 10) 矢部みはる, 矢部普正 : リバージョン・モザイク型 Fanconi 貧血の診断と臨床. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会シンポジウム, 前橋, 2011.11
- 11) 大坪慶輔, 清水崇史, 小林真弓, 高倉広充, 森本克, 松田晋一, 神園淳司, 矢部みはる, 矢部普正, 加藤俊一 : 著明な心機能低下を認めた再発 AML に対して 2 度の臍帯血移植を施行した一男児例. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会, 前橋, 2011.11
- 12) 小林真弓, 高倉広充, 大坪慶輔, 小池隆志, 清水崇史, 森本克, 矢部みはる, 矢部普正, 加藤俊一 : Minor bcr-abl が検出された急性巨核球形白血病の一例. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会シンポジウム, 前橋, 2011.11
- H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)
1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし