

The Japanese Society for Inherited Metabolic Disease; 2013 Nov 27-29; Chiba, Japan

- 5) Yamamoto H, Goto H, Tsuboi K. Histopathological findings of the nasal mucosa in 2 cosanguineous patients with Fabry disease. 12th International Congress of Inborn Errors of Metabolism; 2013 September 3rd - 6th Barcelona, Spain.
- 6) Tsuboi K, Yamamoto H, Goto H. Clinical course and safety in 13 Fabry Disease patients who switched from agalsidase-beta to agalsidase-aifa. 12th International Congress of Inborn Errors of Metabolism; 2013 September 3rd - 6th Barcelona, Spain
- 7) Tsuboi K, Yamamoto H, Goto H. Switch from agalsidase beta to agalsidase alfa in 13 Fabry disease (FD) patients: Clinical course and safety. The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Disease and The 55th Annual Meeting of The Japanese Society for Inherited Metabolic Disease; 2013 Nov 27-29; Chiba, Japan
- 8) Tsuboi K. Wish with a silver wing. 15th Asia LSD Symposium; 2013 November 26th Chiba, Japan
- 9) Goto H, Tsuboi K, Yamamoto H. Abnormal heart rate variability and left ventricular hypertrophy in patients with Fabry disease. 12th International Congress of Inborn Errors of Metabolism; 2013 September 3rd - 6th Barcelona, Spain
- 10) Goto H, Tsuboi K, Yamamoto H. Cardiac manifestations and enzyme replacement therapy of Fabry disease. 12th International Congress of Inborn Errors of Metabolism; 2013 September 3rd - 6th Barcelona, Spain

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

ライソゾーム病におけるミトコンドリア障害

分担研究者：高柳 正樹（千葉県こども病院副病院長）

研究要旨

ライソゾーム病における、ミトコンドリア機能の研究も進み、呼吸鎖活性の異常も報告され始めている。当院で治療管理しているライソゾーム病症例におけるミトコンドリア呼吸鎖活性の検討をおこない、ライソゾーム病の病態解明を行う。

当院でライソゾーム病としてフォローしている症例、ゴーシェ病 3 例、テイザックス病 2 例、ハンター病 2 例、サンフィリップウ病 1 例を対象に、臓器、培養細胞において、ミトコンドリア呼吸鎖酵素解析等を行い、ミトコンドリア呼吸能を評価した。

突然死した Gaucher disease III 型の 1 例は、心筋、肝臓、腎臓において有意な酵素活性の低下、蛋白量の低下を認めた。突然死症例の肝臓、心筋を用いて Autophagy marker の検出を行ったところ、ATG5 及び LC3-I, II のシグナルが低下しており、Autophagy 障害の可能性が示唆された。

今後ゴーシェ病はもとより、ライソゾーム病全般においてミトコンドリア機能の検討を行っていくことは、ライソゾーム病の病態の解明に大きな寄与をすることと考えられる。

研究協力者氏名

村山 圭（千葉県こども病院 代謝科医長）

こない、ライソゾーム病の病態解明を行う。

A. 研究目的

最近、ミトコンドリア呼吸鎖異常症の分子病理の解明が進んできており、従来から知られている MELAS や Leigh 脳症のみならず、多彩な病態・病型がある事が分かってきた。

他の先天代謝異常症（Wilson 病、メチルマロン酸血症、PDHC 欠損症など）やパーキンソン病などでも呼吸鎖の低下が起こることが分かっている。

ライソゾーム病における、ミトコンドリア機能の研究も進み、呼吸鎖活性の異常も報告され始めている。

当院で治療管理しているライソゾーム病症例におけるミトコンドリア呼吸鎖活性の検討をお

B. 研究方法

当院受診したファブリー病患者のうち当院でライソゾーム病としてフォローしている症例、ゴーシェ病 3 例、テイザックス病 2 例、ハンター病 2 例、サンフィリップウ病 1 例を対象に、臓器、培養細胞において、ミトコンドリア呼吸鎖酵素解析等を行い、ミトコンドリア呼吸能を評価した。

さらに死亡したゴーシェ病の心筋において Autopagic marker の検索をおこない、ミトコンドリア機能障害の成因の検討を行った。

（倫理面への配慮）

患者さま個人が特定されない方法で、研究報告など行う。

C. 研究結果

突然死した Gaucher disease III 型の 1 例は、心筋、肝臓、腎臓において有意な酵素活性の低下、蛋白量の低下を認めた。

肝臓・腎臓は Complex I 欠損が認められ、心筋は Complex I+IV の欠損が認められた。

残りの 7 症例のうち 6 例は線維芽細胞、1 例は肝臓の呼吸鎖活性を測定したが、活性は正常であった

突然死症例の肝臓、心筋を用いて Autophagy marker の検出を行ったところ、ATG5 及び LC3-I, II のシグナルが低下しており、Autophagy 障害の可能性が示唆された。

D. 考察

ゴーシェ病のモデルマウスにおいて、ミトコンドリアとその品質管理がパーキンソン病との関連において検討されている。

突然死した Gaucher disease III 型の 1 例における検討では、臓器においてミトコンドリア呼吸鎖活性の低下を示したのみならず、オートファジーの障害を示す証拠が認められた。このことから本症例においては、ミトコンドリアの品質管理に異常が生じ、その結果ミトコンドリア呼吸鎖活性の低下をもたらした可能性が高いのではと考えられる。

ゴーシェ病に限らず、ライソゾーム病においては機能障害を呈するライソゾームが、同じ細胞内小器官であるミトコンドリアに大きな影響を与えている可能性が考えられる。

今回線維芽細胞においてはミトコンドリア呼吸鎖活性の低下を見た症例はなかったが、障害臓器の直接的な呼吸鎖活性の測定がさらに必要であろうと考えられる。

E. 結論

8 例のライソゾーム病症例においてミトコンドリア呼吸能を評価した。

突然死した Gaucher disease III 型の 1 例は、心筋、肝臓、腎臓において有意な酵素活性の低下、蛋白量の低下を認めた。さらに心筋で Autophagy marker の検出を行ったところ、ATG5 及び LC3-I, II のシグナルが低下していた。

今後ゴーシェ病はもとより、ライソゾーム病全般においてミトコンドリア機能の検討を行っていくことは、ライソゾーム病の病態の解明に大きな寄与をすることと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 井田 博幸, 衛藤 義勝, 田中 あけみ, 高柳 正樹, 酒井 規夫, 川合 基司, 田畑 恭裕. 薬剤の臨床 日本人 Gaucher 病(I 型、II 型および III 型)患者に対するセラザイムの 8 年間の製造販売後調査結果による有効性と安全性の検討. 小児科診療 76 : 1325-1334, 2013

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

小児型 Pompe 病患者 3 名における酵素補充療法の長期経過

分担研究者：石垣 景子（東京女子医科大学医学部小児科講師）

研究協力者氏名

大澤真木子（東京女子医科大学小児科名誉教授）

A. 研究目的

異なる治療反応性を示す小児型Pompe病患者 3名における酵素補充療法（Enzyme Replacement Therapy:ERT）の長期経過の比較を行い、治療反応性への予測因子を検討する。

B. 研究方法

酵素補充療法に対し、異なる反応性を示す 3 例の小児型 Pompe 病患者の発症時身体所見、骨格筋画像、発症から治療開始までの期間、経過中の抗体価、合併症等の比較検討を行った。（倫理面への配慮）個人が特定される情報は厳密に管理し、患者両親よりインフォームドコンセントを得た。

C. 研究結果

患者 1 は 18 歳男性。12 歳時に側弯が急激に進行し、13 歳時に感染に伴い、慢性呼吸不全が急性増悪した。確定診断と同時に ERT を開始し、18 歳現在は進行が停止した状態で安定している。患者 2 は 16 歳男子。幼児期より高 CK 血症、易転倒性、鼻咽頭閉鎖不全があった。5 歳時に確定診断されたが、ERT を開始したのは 10 歳時であった。一旦著明改善したが、1 年後に退行が始まり、現在呼吸機能障害、筋力低下共に進行している。患者 3 は 7 歳女兒。1 歳時に偶然高 CK 血症に気づかれ、2 歳 6 か月時に確定診断と同時に ERT 開始した。骨格筋症状はなく、肝脾腫が認められたが、治療開始 1 か月で改善した。7 歳現在、筋力低下はない。3 例の治療反応性は患者 1

が良好、2 が不良、3 が非常に良好と分類できる。患者 3 では抗体価産生を認めなかったが、患者 1、2 では同程度に認めず、抗体価だけでは治療決定因子とならなかった。

治療開始時の骨格筋画像では、患者 2 では不可逆的な局所的高吸収を認めたが、患者 1、2 とも全体的な高吸収値のみだった。患者 1、3 は骨格筋症状発現も遅く、治療開始は診断直後であったのに対し、患者 2 は幼児期発症と早期であり、治療開始までも時間を要した。

D. 考察

無症候期の治療開始、または、発症から治療開始までの期間が短いほど、ERT 効果は高い。経過良好な早期治療開始例は、開始時に骨格筋全体の軽度 CT 値上昇を認めるのみで、局所的吸収異常を認めなかった。抗体非産生例は ERT 効果が維持された。経過中、抗体産生時期と一致して、ERT 効果を失った例もあったが、影響を受けない例もあり、絶対的な効果決定因子ではない。遺伝子型の関与は今回の検討では十分できなかった。長期経過に伴う合併症に注意が必要。

E. 結論

治療開始まで短期間、骨格筋画像で局所的高吸収域なし、抗体産生なしが治療反応性良好の予測因子にはなりうる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 石垣景子ら。小児の呼吸管理 9 「神経・筋疾患」。小児科。2013;54(2):213-221

2. 学会発表

- 1) 石垣 景子：小児型 Pompe 病の診断と治療」
第 30 回小児神経筋疾患懇話会 於東京国際
フォーラム，東京 2013 年 8 月 24 日

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

ライソゾーム病の新生児スクリーニングの研究

分担研究者 奥山 虎之（国立成育医療研究センター臨床検査部）

研究要旨

ライソゾーム病の早期発見・早期治療の重要性が認識され、新生児マススクリーニングが注目されている。我々は、治療可能なライソゾーム病 5 疾患を対象にした血液ろ紙検体による簡便かつ迅速なスクリーニング法の開発を目標とした。健康対照者 284 検体およびハーラー症候群、ハンター症候群、ゴーシェ病、ポンペ病、ファブリー病患者 70 検体を対象として、Liquid Logic™ Newborn Screening Analyzer によるライソゾーム病 5 疾患の酵素活性値の同時測定を行った。その結果、すべてのライソゾーム酵素活性測定において健康対照者と患者を鑑別することが可能であった。またファブリー病の女性保因者では、活性値が正常コントロールの活性値内に留まる症例が見られ、本法のみではスクリーニングが困難であることが示唆された。

A. 研究目的

ライソゾーム病に対する酵素補充療法は、症状が進行する以前に開始することにより最大の治療効果が得られるため、ライソゾーム病の早期発見・早期治療の重要性が認識され、新生児マススクリーニングの開発が注目されている

我々は、すでにライソゾーム病のひとつであるポンペ病の酵素活性測定をろ紙微量血液検体を用いて可能とし、新生児マススクリーニングを開始した。本研究では、現在、我が国で酵素補充療法による治療が可能であるライソゾーム病 5 疾患のライソゾーム酵素をろ紙微量血液検体を用いて同時測定することにより新生児マススクリーニングを可能とする系の確立を目標とした。

B. 研究方法

ろ紙微量血液検体を用いて、 α -L-イブロンダーゼ（ハーラー症候群）、イブロン酸-2-スルファターゼ（ハンター症候群）、 β -グルコセレブロシダーゼ（ゴーシェ病）、酸性 α -グルコシダーゼ（ポンペ病）、 α -ガラクトシダーゼ（ファブリー病）の各ライソゾーム酵素を Liquid Logic™ Newborn Screening Analyzer（Advanced Liquid Logic 社、米国）による 4 MU 法により同時測定を行った。検体は本研究に同意が得られた 284 名の健康新生児からなる正常対照群と 70 名の患者群（ハーラー症候群 4 名、ハンター症候群 15 名、ゴーシェ病 2 名、ポンペ病 31 名、男性ファブリー病 18 名）と女性ファブリー病 17 名から得られたろ紙検体を対象とした。

（「ライソゾーム病の新生児スクリーニング検

査」、独立行政法人国立成育医療研究センター倫理委員会承認、平成 22 年 11 月 30 日、受付番号 443）。

C. 研究結果

対照群と患者群のそれぞれのライソゾーム酵素活性平均値は、 α -L-イブロンダーゼ（ハーラー症候群） 23.6 (9.3-41.9) および 2.1 (1.4-2.6) $\mu\text{mol/L/h}$ 、イブロン酸-2-スルファターゼ（ハンター症候群） 27.7 (15.2-51.3) および 8.3 (3.9-12.1) $\mu\text{mol/L/h}$ 、酸性 α -グルコシダーゼ 22.3 (ポンペ病) (9.4-46.6) と 4.9 (2.3-8.3) および 5.7 (2.6-15.5, pseudodeficiency 群) $\mu\text{mol/L/h}$ 、 β -グルコセレブロシダーゼ（ゴーシェ病） 10 (4.7-22.1) と 1.93 (1.6-2.2) $\mu\text{mol/L/h}$ 、ファブリー病) α -ガラクトシダーゼ 値は、正常群では平均 32.5 (最小値 11.3-最大値 90.5)、男性患者平均値 4.6 (最小値 1.9-最大値 8.9)であった。さらに女性ファブリー病患者の α -ガラクトシダーゼは平均 7.4、(最小値 2.7、最大値 19.2) $\mu\text{mol/L/h}$ であった。

D. 考察

本研究では、ライソゾーム病 5 疾患の対照群と患者群のライソゾーム酵素活性平均値は明らかに違いがみられ、Liquid Logic™ Newborn Screening Analyzer によるライソゾーム病スクリーニングが可能であることが示唆された。しかしポンペ病の pseudodeficiency (偽陰性) とファブリー病の女性保因者の酵素活性値は一部が患者群あるいは対照群の結果とオーバーラップする結果もみられた。ポンペ病の pseudodeficiency

は多型解析による判別が可能であるが、ファブリー病の女性保因者については GLA 遺伝子解析や血漿中の蓄積物質の解析が必要であり、スクリーニングを実施するにあたり、これらの問題点を克服する必要がある。

E. 結論

284 名の正常対照群と 70 名のライソゾーム患者群のろ紙微量血液検体を用いたライソゾーム病 5 疾患のライソゾーム酵素活性同時測定により正常対照群とライソゾーム患者群の鑑別が可能であった。ポンペ病の pseudodeficiency (偽陰性) とファブリー病の女性保因者の酵素活性値は一部が患者群あるいは対照群の結果とオーバーラップする結果もみられた。

F. 発表業績 :

1. 論文発表

- 1) Tajima G, Sakura N, Kosuga M et al. Effects of idursulfase enzyme replacement therapy for Mucopolysaccharidosis type II when started in early infancy: comparison in two siblings. Mol Genet Metab. 2013;108:172-7.

2. 学会発表

- 1) Tanaka A, Okuyama T, Suzuki Y, Sakai N, Hamazaki T, Kosuga M, Sawada T, Yabe H, Ishige M, Mugishima H, Kato S : EFFICACY OF ENZYME REPLACEMENT THERAPY VERSUS HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION ON BRAIN INVOLVEMENT IN MPS II, 12th International Congress of Inborn Errors of Metabolism, Barcelona, Spain, September.4.2013.
- 2) 小須賀基通、木田和宏、藤直子、奥山虎之:5 つのライソゾーム酵素同時測定によるライソゾーム病の新たなスクリーニング法. 第 116 回 日本小児科学会学術集会学会、広島、2013.4.19.
- 3) 奥山虎之:ライソゾーム病に対する新生児マス・スクリーニングの現状と今後の課題 (シンポジウム) 第 40 回日本マス・スクリーニング学会学術集会、大阪、2013.8.24.

ライソゾーム病（ファブリー病、糖原病 II 型、ムコ多糖 I 型・II 型）スクリーニング法の基礎的検討
—特に酵素活性測定の実験時間について—

分担研究者：北川照男（公益財団法人 東京都予防医学協会理事長）

研究要旨

ファブリー病（FD）、糖原病 II 型（GSD II）、ムコ多糖 I・II 型（MPS I・MPS II）などのライソゾーム病の一部の酵素補充療法が開発され、治療によって各疾患の予後の改善が得られるようになって、早期診断法が開発が進められるようになった。その一つとして蛍光基質を用いた酵素活性測定が N.Chamoles ら¹⁾、C. J. Deanra ら²⁾、K. Umaphathysivam ら³⁾ によって報告されているが、その酵素活性測定の実験時間はいずれも 37℃、20 時間以上であり、incubation 中に酵素の劣化や菌の繁殖などによる測定系への影響が考えられた。今回、我々は、それぞれの方法について time course による酵素活性測定の実験時間および防腐剤の影響などを検討したので報告する。

研究協力者：

鈴木 健（財）東京都予防医学協会
藤川研人（財）東京都予防医学協会
石毛信之（財）東京都予防医学協会
穴澤 昭（財）東京都予防医学協会
大和田操（財）東京都予防医学協会
大橋十也 東京慈恵会医科大学小児科
井田博幸 東京慈恵会医科大学小児科
衛藤義勝 東京慈恵会医科大学小児科
田中あけみ 大阪市立大医学部小児科

A. 研究目的

高感度の人工基質である 4-MU 誘導体を用い、濾紙血液のライソゾーム酵素活性を測定して種々の疾患を発見する方法が報告され、スクリーニングに使用されている。しかし、これらの方法はどれも反応時間が 37℃、20 時間またはそれ以上と反応時間が長いために酵素の劣化や細菌の増殖が危惧される。そこで、濾紙血液を用いたライソゾーム病の酵素診断の至適条件の検討を目的として、類似酵素阻害法、および酵素免疫捕捉

法における、1. 至適基質濃度、2. 酵素免疫捕捉法の測定効率、3. 至適反応時間、4. 防腐剤の影響等について検討した。

B. 研究対象

大阪市大小児科を受診した新生児 36 名の濾紙血液、健常成人 12 名の血漿、白血球を対象に本研究を行った。

C. 研究方法

ファブリー病、MPS I は類似酵素を競合不活化し、目的酵素に 4-MU 蛍光基質を作用させて、活性を測定する類似酵素阻害法、N. Chamoles らの方法¹⁾ を用いて検討した。GSD II(ポンペ病)、MPS II はマイクロプレートに各疾患酵素に対するポリクローナル抗体を固相化して目的酵素を捕捉した後、4-MU 蛍光基質を作用させ活性を測定する酵素免疫捕捉法、MPS II は C.J. Dean らの方法²⁾、GSD II は K. Umaphathysivam の方法³⁾ を用いた。

表 1 に類似酵素阻害法の類似酵素、その酵素活

性を阻害するための阻害剤を示し、表 2 に酵素免疫捕捉法における酵素を捕捉するために固相化した抗体を示した。

検討方法は、各々の方法における酵素活性測定時間の time course (0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 20 時間) を作製し、時間毎の活性値、およびこれに酵素補充療法剤を添加した回収値について検討した。また、防腐剤として 0.02% チメロサルを添加して、防腐剤の効果・影響を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は、大阪市立大学医学部倫理委員会、(財) 東京都予防医学協会倫理委員会の承認を得て、本研究のライゾーム病患者と新生児正常対照者、および大阪市大で出生した新生児対象者の濾紙血液は、その用途、研究目的を事前に文章にて説明した後、承諾書に署名を得てから採取し、これらの検体を使用して本研究を行った。

D. 研究結果

1. 至適基質濃度

図 1 に、基質濃度による α -galactosidase 活性の変化をミカエリス定数 K_m 値によって示した。正常対照および一定濃度の酵素補充療法剤ファブラザイムの K_m 値は 1.18 から 1.60 の範囲にあった。

2. 酵素免疫捕捉法の測定効率

図 2 に反応液の残液から算出した固相化抗体の酵素捕捉率、および捕捉された酵素の 4-MU に対する作用率を示した。本法の抗体捕捉率は平均 74.5% であったが、Umapathysivam らの方法では平均約 95% であり、我々の方法よりも高い捕捉率であった。一方、固相化抗体に捕捉された酵素の 4-MU に対する作用効率は、競合阻害法を 100% として比較すると、Umapathysivam らの方法は平均 29% であるのに対して、本法では約 63% であり、Umapathysivam らの方法よりも 4-MU に対する作用効率は良好であった。

3. 至適反応時間

図 3 に競合阻害法におけるファブリー病 α

-galactosidase 比活性値の推移を示した。図左側は血漿、図右側は濾紙血液の α -galactosidase 活性を示し、それぞれに酵素補充療法剤ファブラザイムを一定量加えた場合の比活性値をも示し、その添加回収率は 72%~96% の範囲にあった。血漿の場合は、ファブラザイムを加えた場合と加えない場合でほぼ同じパターンで、反応後 1 時間で最大値を示し、時間の経過と共に減少し、20 時間を経過すると 1 時間値の約 1/3~1/4 まで減少した。この傾向は白血球の場合でもほぼ同様な結果であった。一方、濾紙血液の場合はファブラザイムを加えた場合と加えない場合では若干パターンが異なり、加えた場合では 1~4 時間値で最大ピークを示し、20 時間を超えると約 1/5 まで減少した。他方、加えない場合では 2 時間で最大値を示し、20 時間以上の場合には約 1/4 まで減少した。

図 4 に、免疫捕捉法におけるムコ多糖症 II 型 iduronate-2-sulfatase の比活性値の推移について示した。図左側に酵素補充療法剤エラプレース、図右側に濾紙血液 iduronate-2-sulfatase の比活性値の推移を示したが、何れも 2 時間で最大値となり、20 時間では 2 時間値の 1/3~1/4 まで減少した。

4. 防腐剤の影響

菌の増殖が測定系へ与える影響について、防腐剤を加えた場合と加えない場合とで比較検討した結果、防腐剤としてチメロサルを添加した場合としない場合とで血漿、濾紙血液、何れの場合もほとんど差がなく、また 37°C で 20 時間 incubation し、添加した場合としない場合の反応液を血液寒天培地・普通寒天培地で培養しても菌の増殖はみられなかった(図 5)。

E. 考察

1. 基質濃度による α -galactosidase 活性の変化を示すミカエリス定数 K_m 値は、正常対照の濾紙血液および酵素補充療法剤ファブラザイム、何れの場合も 1.18 から 1.60 の範囲にあり、本法で

使用している基質濃度は適切であることが証明された。

2. 酵素活性反応時間での蛍光度は、いずれの方法においても2~3時間で最大のピークを示し、その後は平衡を示すか、減少した。従って、時間当たりで算出される測定値は2~3時間を最大として、時間が経過すればするほど減少し、20時間を経過した場合は2時間値の約1/2~1/5に減少した。

F. 結論

今回の結果から、各々のライソゾーム病の酵素活性を測定する場合、活性測定反応時間は37°C、2時間~4時間が最も良く、従来から行われている37°C、20時間の反応時間では正しい測定値が得られない結果であり、反応時間は2~4時間の反応が良いと考えられた。

G. 研究発表

- 1) 北川照男、大和田操、他. 新生児マス・スクリーニングの今後の飛躍を期待して. 日本マス・スクリーニング学会誌 第23巻, 2号, P175, 2013.
- 2) 鈴木 健、北川照男、他. ライソゾーム病(ファブリー病、糖原病II型、ムコ多糖症I型・II型)スクリーニング法の基礎的検討—酵素活性測定の反応時間について. 日本マス・スクリーニング学会誌 第23巻, 2号, P213, 2013.

【参考文献】

- 1) Chamoles NA, Niizawa G, Blanco M, Gaggioli D, Casentini C: Glycogen storage disease type II: enzymatic screening in dried blood spots on filter paper. Clin Chim Acta. 347: 97-102, 2004.
- 2) Dean CJ, Bockmann MR, Hopwood JJ, Brooks DA, Meikle PJ: Detection of Mucopolysaccharidosis type II by measurement

of iduronate-2-sulfatase in dried blood spots and plasma samples. Clin Chem. 52: 643-649, 2006.

- 3) Umaphysivam K, Hopwood JJ, Meikle PJ: Determination of acid α -glucosidase activity in blood spots as a diagnostic test for Pompe disease. Clin Chem. 47: 1378-1383, 2001.

H. 知的財産の出願・登録状況

特になし

表 1. 類似酵素の活性を阻害するための阻害剤

疾患名	類似酵素	阻害剤
ファブリー病 (α -galactosidase 欠損症)	N-acetylgalactosaminidase	N-acetylgalactosamine
糖原病 II 型 (α -glucosidase 欠損症)	Maltose-glucoamylase	acarbose
ムコ多糖症 I 型 (Iduronidase 欠損症)	β -glucuronidase	saccharolactone

表 2. 免疫酵素捕捉法における酵素を捕捉するために固相化する抗体

疾患名	固相化抗体
糖原病 II 型 (α -glucosidase 欠損症)	抗ヒト α -glucosidase ポリクローナル抗体
ムコ多糖症 II 型 (Iduronate-2-sulfatase 欠損症)	抗ヒト Iduronate-2-sulfatase ポリクローナル抗体

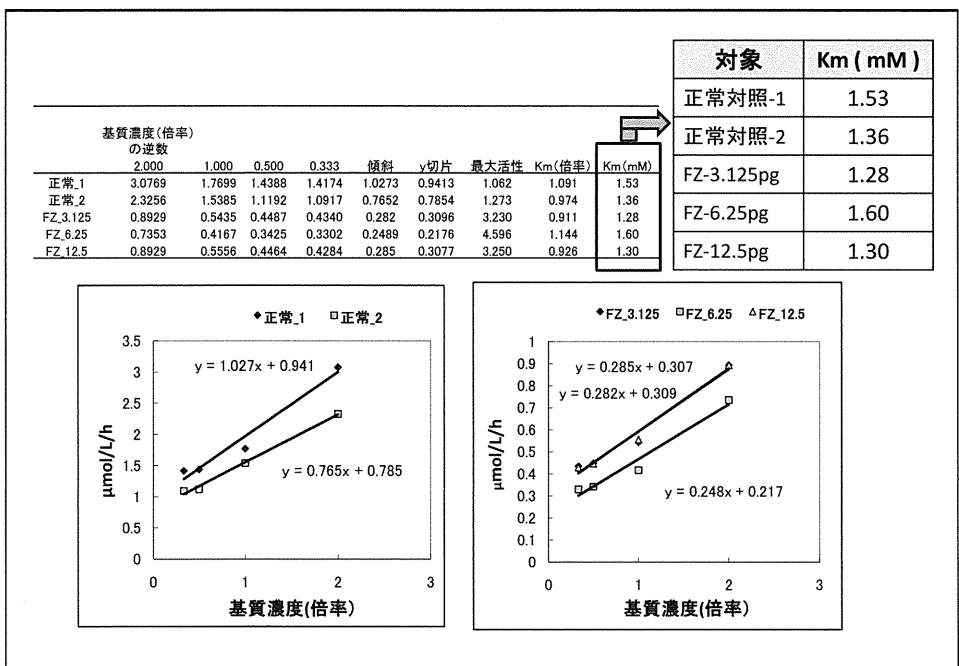


図 1. 基質濃度による α -galactosidase 活性の変化 (ミカエリス定数 Km)

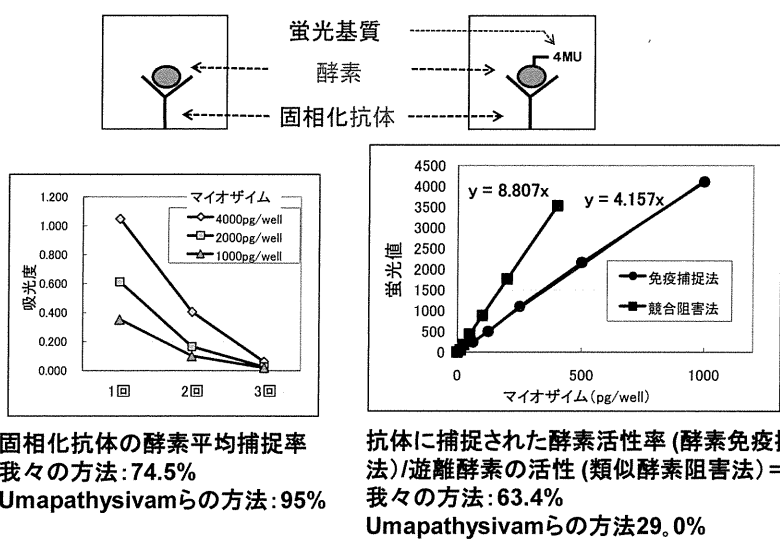


図2. 酵素免疫捕捉法の測定効率

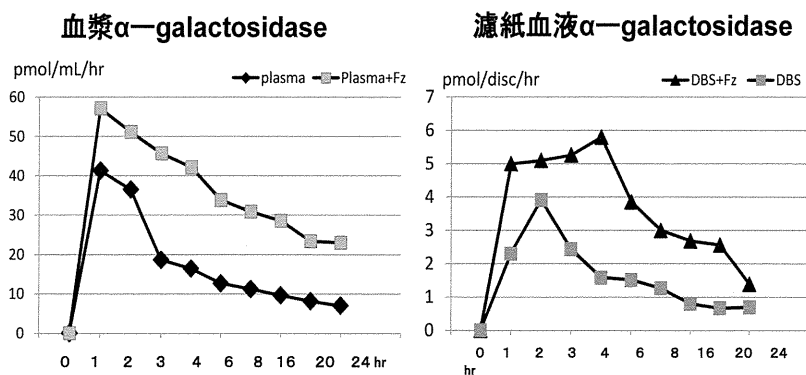


図3. 反応時間による α -galactosidase比活性の推移
—Chamolesらの方法(類似酵素阻害法)—

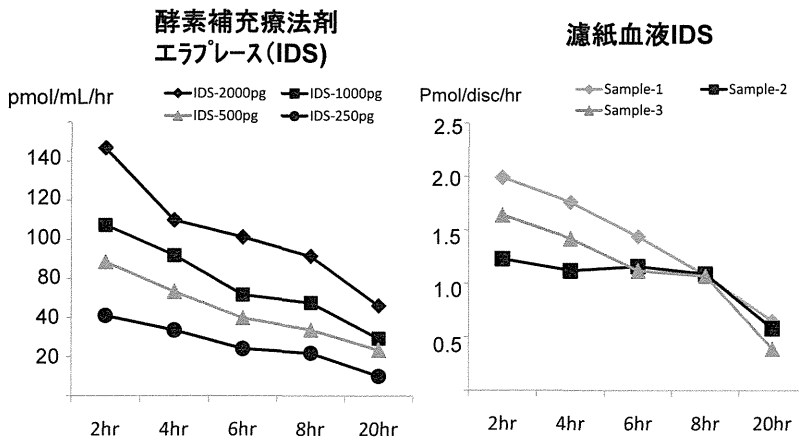


図4. 反応時間によるIduronate-2-sulfatase比活性の推移
 -Deanらの方法(酵素免疫捕捉法) -

20時間反応させた測定反応液を一昼夜培養した血液寒天培地と普通寒天培地

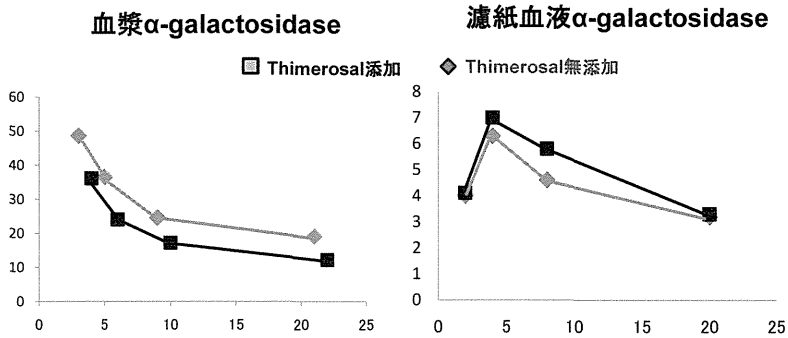
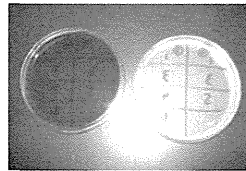


図5. α -galactosidase活性に対する防腐剤の影響
 -thimerosal-

ファブリー病・ポンペ病のスクリーニング研究

分担研究者：遠藤 文夫（熊本大学大学院 医学薬学研究部小児科学分野 教授）

研究要旨

ファブリー病とポンペ病はそれぞれ(ガラクトシダーゼと酸性(グルコシダーゼの欠損によって発症する先天代謝異常症である。われわれは、酵素活性のろ紙血測定法を用いて、説明と同意に基づいたスクリーニングのパイロットスタディを行った。

A. 研究目的

ファブリー病はライソゾーム酵素である(ガラクトシダーゼの欠損によって発症する。また、ポンペ病は酸性(グルコシダーゼの欠損によって発症する。近年これらの疾患に対して酵素補充療法が導入され、患者の治療が可能になった。そのため、ファブリー病とポンペ病の早期発見と早期治療が重要となってきた。しかし、ファブリー病の症状は多様であるため、早期の診断は困難であることも少なくない。また、乳児型ポンペ病は乳児期早期に治療を開始しなければ予後が不良であると考えられている。我々は、新生児におけるろ紙血検体を用いたファブリー病とポンペ病のスクリーニングを行った。

B. 研究方法

ファブリー病とポンペ病のスクリーニングにおいて、Χηαμολεσらの方法を改変し、ろ紙血検体の(ガラクトシダーゼ酵素活性と酸性(グルコシダーゼ酵素活性とを測定した。平成18年8月から現行の新生児マススクリーニングに加えて、説明と同意に基づいたファブリー病のマススクリーニングを開始した。また、平成25年4月からはポン

ペ病のマススクリーニングも追加した。ファブリー病では、スクリーニング陽性者とその家族に遺伝カウンセリングをおこなったうえで、ダイレクトシーケンス法を用いた(ガラクトシダーゼ遺伝子解析を行った。また、ポンペ病においてはBα/Zv法を用いた酵素活性の測定と、皮膚線維芽細胞を用いた酵素活性の測定によって解析を行った。

本研究は熊本大学倫理委員会の承認と、保護者への説明と同意に基づいて行った。活性低値の新生児に対して、説明と遺伝カウンセリングを行った。

C. 研究結果

熊本県ならびに協力自治体において、現行の新生児マススクリーニングに加えて、ファブリー病とポンペ病の新生児におけるスクリーニングのパイロットスタディを行った。ろ紙血を用いたαガラクトシダーゼ活性と酸性αグルコシダーゼ活性の測定法を用いて、説明と同意に基づいた新生児スクリーニングを行った。

ファブリー病のスクリーニングでは、遺伝子解析を含めた精密検査を行った。本研究では約

387,000名中82名の酵素活性の異常低値者が明らかになった。活性低値の新生児と家族に対して、遺伝カウンセリングを行い、 α ガラクトシダーゼ遺伝子解析を行った。その中で古典型ファブリー病に認められる変異は、5名の男児に認められた。また、ファブリー病を発症しうると考えられる変異は23名の男児に認められた。これらのことから、ファブリー病のわが国における頻度は、男性の約8,400名に1名、古典型ファブリー病の頻度は、男性の約39,000名に1名であると推定された。

また、平成24-25年度において、ポンペ病のスクリーニングでは、約7,500検体中に1名の遅発型のポンペ病患者を認めた。ポンペ病の pseudo deficiency と考えられるスクリーニング陽性者は11名であった。Ba/Zn法を用いることにより、pseudo deficiency による偽陽性者を著しく減らすことができた。

さらに、平成24-25年度において、成人のファブリー病患者においてDS3スコアリングを用いたファブリー病スクリーニングによって発見された患者の予後の検討をおこなった。すると、酵素補充治療前にスコア15点以上の患者では、治療開始後もスコアの平均点は約5点悪化していた。一方、酵素補充治療前のスコア15点未満の患者では、スコアの平均点が約1点改善しており、少なくとも臨床症状の悪化を防ぐことができていることがわかった。すなわち、スクリーニングによる早期発見は、臨床症状が軽度なうちに行う必要があることが明らかになった。

D. 考察

このスクリーニングによってわが国におけるファブリー病の頻度を推定することができた。また、簡便で安価な酵素測定法を用いることで、ファブ

リー病の発症前の診断も容易となった。また、ポンペ病においてもBa/Zn法を用いることにより新生児スクリーニングを効率的に行うことが可能になった。

ファブリー病とポンペ病の新生児におけるスクリーニングは臨床的にも研究対象として有用であるため、今後もパイロットスタディを継続する予定である。さらに、成人のファブリー病のハイリスク者とされる心疾患・腎疾患・脳血管障害患者における本法を用いたファブリー病のスクリーニングは、早期発見と治療に有用と考えられる。ポンペ病の遅発型の成人期におけるスクリーニングも同様に可能であり、ポンペ病のスクリーニングを行うことにより、発症早期に酵素補充などの治療が可能になると考えられた。

E. 結論

ろ紙血を用いたファブリー病とポンペ病のスクリーニングは、簡便で安価な検査法として有用であると考えられた。さらにファブリー病とポンペ病の安価で簡便な診断法の開発とわが国における疾患頻度の推定を行った。また、本疾患を疑ったときに簡便に試みることができる検査法としても利用されている。このスクリーニング検査は、ファブリー病とポンペ病の症状が軽度なうちにおこない、早期発見されると、酵素補充治療の効果も期待できた。一方、ファブリー病とポンペ病のスクリーニングや遺伝カウンセリングにおいて配慮すべき点も少なくない。スクリーニング検査を慎重に行うことによってファブリー病とポンペ病患者の予後を改善できると考えている。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Kido J, Nakamura K, Matsumoto S,

- Mitsubuchi H, Ohura T, Shigematsu Y, Yorifuji T, Kasahara M, Horikawa R and Endo F Current status of hepatic glycogen storage disease in Japan: clinical manifestations, treatments and long-term outcomes. *J. Hum. Genet.* 58, 285-292 (2013)
- Lee D, Oka T, Hunter B, Robinson A, Papp S, Nakamura K, Srisakuldee W, Nickel BE, Light PE, Dyck JRB, Lopaschuk GD, Kardami E, Opas M, and Michalak M Calreticulin induces dilated cardiomyopathy. *Plos One* 8, e56387 (2013)
- Yamamoto A, Nakamura K, Matsumoto S, Iwai M, Shigematsu Y, Tajima G, Tsumura M, Okada S, Mitsubuchi H, Endo F. VLCAD deficiency in a patient who recovered from VF, but died suddenly of an RSV infection. *Pediatr Int.* 55, 775-778 (2013)
- Nakamura K, Sekijima Y, Nakamura K, Hattori K, Nagamatsu K, Shimizu Y, Yazaki M, Sakurai A, Endo F, Fukushima Y, Ikeda S p.E66Q Mutation in the GLA Gene is Associated with a High Risk of Cerebral Small-Vessel Occlusion in Elderly Japanese Males. *Eur J Neurol* (2013 in press)
- Inoue T, Hattori K, Ihara K, Ishii A, Nakamura K, Hirose S Newborn screening for Fabry disease in Japan: Prevalence and genotypes of Fabry disease in a pilot study. *J. Hum. Genet.* (2013 in press)
- Tanaka T, Mochida T, Maki Y, Shiraki Y, Mori H, Matsumoto S, Shimbo K, Ando T, Nakamura K, Endo F, Okamoto M. Interactive network analysis of the plasma amino acids profile in a mouse model of hyperglycemia. *Springerplus.* (2013 in press)
- Fujisawa D, Nakamura K, Mitsubuchi H, Ohura T, Shigematsu Y, Yorifuji T, Kasahara M, Horikawa R and Endo F Clinical features and management of organic acidemias in Japan. *J. Hum. Genet.* (2013 in press)
- Kido J, Nakamura K, Mitsubuchi H, Ohura T, Takayanagi M, Matsuo M, Yoshino M, Shigematsu Y, Yorifuji T, Kasahara M, Horikawa R, Endo F. Long-term outcome and intervention of urea cycle disorders in Japan. *J Inherit Metab Dis.* 35, 777-785 (2012).
- Nishino T, Obata Y, Furusu A, Hirose M, Shinzato K, Hattori K, Nakamura K, Matsumoto T, Endo F, Kohno S Identification of a novel mutation and prevalence study for fabry disease in Japanese dialysis patients. *Ren Fail.* 34, 566-570 (2012)
- Katsuren K, Nakamura K, Ohta T Effect of body mass index-z score on adverse levels of cardiovascular disease risk factors. *Pediatr Int.* 54, 200-204 (2012)

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

分担研究報告書

Ⅱ. 病態解析

GBA 遺伝子とパーキンソン病との関連

分担研究者：辻 省次（東京大学神経内科 教授）

研究要旨

Glucocerebrosidase (GBA) 遺伝子のヘテロ接合性病原性変異は多系統萎縮症患者と関連するかどうか検討した。

分担研究者：

松川 敬志 東京大学神経内科 大学院生

三井 純 東京大学神経内科 特任助教

後藤 順 東京大学神経内科 准教授

辻 省次 東京大学神経内科 教授

Exome解析の方法：SureSelect v4+UTR (Agilent) を用いてゲノムDNAを濃縮した。Hiseq2000にて100塩基ペア・エンドで配列解析し、bwaにて参照配列 (hg19) へのアライメントを行い、samtoolsにて変異の検出を行った。

A. 研究目的

1. ゴーシェ病の原因遺伝子である GBA 遺伝子変異のキャリアーがパーキンソン病の危険因子になるという関連解析が、日本人を含め様々な人種で報告されている。パーキンソン病と共通する病理学的特徴 (α -synuclein の蓄積・封入体) をもつ神経変性疾患である多系統萎縮症 (MSA) について、GBA 遺伝子変異との関連を検討する。

2. GBA 遺伝子は相同性が極めて高い偽遺伝子が存在し、変異の多くは偽遺伝子の配列由来である。特異的 PCR とサンガー法による GBA 遺伝子全エクソン配列解析と並行して、exome 解析 (SureSelect/Hiseq) を行い、ショートリードシーケンサーによる GBA 遺伝子変異の検出程度について検証する。

B. 研究方法

MSA患者346例、健常者618例を対象にした。特異的PCRとサンガー法によるGBA遺伝子全エクソン配列解析とexome解析 (SureSelect/Hiseq) を同時に行った。

(倫理面への配慮)

検体は全て書面による同意を得ており、匿名化の上、解析された。

C. 研究結果

1. MSA患者346例中4例 (1.6%)、健常者618例中3例 (0.49%) に病原性変異をヘテロ接合性に認めた。MSA患者群に多い傾向はあったが、P値は0.26と有意差は得られなかった。

2. サンガー法による解析で同定された R120W, F213I, D409H, L444P 変異のうち、当該領域に濃縮プローブがデザインされていた F213I, D409H は exome 解析においても検出できた。一方、エクソン5の R120W, エクソン10の L444P は偽遺伝子との相同性が高く、濃縮プローブがデザインされていなかったことから、exome 解析では検出できなかった。

D. 考察

1. 今回の検討規模では、MSAとGBA遺伝子

変異の関連について結論は得られなかったが、MSAに頻度が高い傾向がみられた。

2. 現在のショートリードを用いた解析では、GBA遺伝子のように相同性の高い配列がゲノム上にある遺伝子の場合、変異の検出が難しい領域がある。

E. 結論

MSA と GBA 遺伝子変異の関連を検証するにはさらに大規模な解析が必要である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

なし。

H. 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。

ALD の遺伝子表現型連関

分担研究者：辻 省次（東京大学神経内科 教授）

研究要旨

副腎白質ジストロフィー(ALD)は, *ABCD1* を原因遺伝子とし, 多彩な表現型を認めるが, 遺伝子表現型連関は明らかではない. 表現型修飾因子同定のため, ペルオキシソームで機能する遺伝子群を表現型修飾因子の候補遺伝子と考え, Exome 解析を行った. コントロール 369 例での解析が終了し, 今後 ALD 症例の解析も行う予定.

分担研究者：

- ・松川 敬志 東京大学神経内科 大学院生
- ・三井 純 東京大学神経内科 特任助教
- ・石浦 浩之 東京大学神経内科 助教
- ・Budrul Ahsan 東京大学神経内科
特任研究員
- ・吉村 淳 東京大学大学院新領域創成科学
研究科 特任助教
- ・土井 晃一郎 東京大学大学院新領域創
成科学研究科・特任講師
- ・後藤 順 東京大学神経内科 准教授
- ・鈴木 康之 岐阜大学医学教育開発センター
教授
- ・下澤 伸行 岐阜大学生命科学総合研究支援
センター 教授
- ・小野寺 理 新潟大学脳研究所生命科学
リソース研究センター 教授
- ・西澤 正豊新潟大学脳研究所神経内科 教授
- ・森下 真一 東京大学大学院新領域創成科学
研究科・教授

A. 研究目的

ALD は多彩な臨床病型を呈するが, 遺伝子表現型連関は明らかではない. 予後不良な大脳型 ALD

に対しては, 早期の造血幹細胞移植が有効である可能性があり, 大脳型を発症しやすい背景因子を同定すれば, 臨床上有用である. 多彩な臨床病型を規定する遺伝的修飾因子の探索を行うことが目的である.

B. 研究方法

ABCD1 の発現産物である

adrenoleukodystrophy protein (ALDP) は, ペルオキシソームで機能することから, 他のペルオキシソームで機能する遺伝子群を, 臨床病型を規定する修飾因子の候補遺伝子と考え, これらの候補遺伝子内の variants について, 表現型毎の出現頻度に有意な差のある場合, 修飾因子としての可能性が指示されると考え, 表現型との関連を検討した.

対象者のエキソーム解析を行い, 候補遺伝子内の variants を選択. 新規 variants については直接塩基配列法で確認を行った.

対象者は, ALD 患者 67 例 (小児大脳型 13 例, 思春期大脳型 6 例, 成人大脳型 10 例, 大脳型への移行例 12 例, 小脳脳幹型 3 例, AMN19 例, Addison 病 1 例, 未発症 2 例), 日本人コントロール 369 例とした.