

厚生労働省科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究年度終了報告書

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（GSDⅡ）、ムコ多糖Ⅰ・Ⅱ型（MPSⅠ・MPSⅡ）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、早期診断法の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<sup>1)</sup>、C. J. Deanra ら<sup>2)</sup>、K. Umaphysivam ら<sup>3)</sup>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実験時間が 37、20 時間またはそれ以上と実験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．至適実験時間、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、MPSⅠ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<sup>1)</sup>を用いて検討した。GSDⅡ(ポンペ病)、MPSⅡ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、MPSⅡは C.J. Dean らの方法<sup>2)</sup>、GSDⅡは K. Umaphysivam の方法<sup>3)</sup>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  $\beta$ -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

$\beta$ -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  $\beta$ -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ブレース、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  $\beta$ -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、2時間~4時間が最も良く、従来から行われている37、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(フアブリー病、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 : 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 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  $\alpha$ -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 ( $\beta$ -galactosidase 欠損症)	N-acetylgalactosaminidase	N-acetylgalactosamine
糖原病 II 型 ( $\beta$ -glucosidase 欠損症)	Maltose-glucoamylase	acarbose
ムコ多糖症 I 型 (Iduronidase 欠損症)	$\beta$ -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 ( $\beta$ -glucosidase 欠損症)	抗ヒト $\beta$ -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

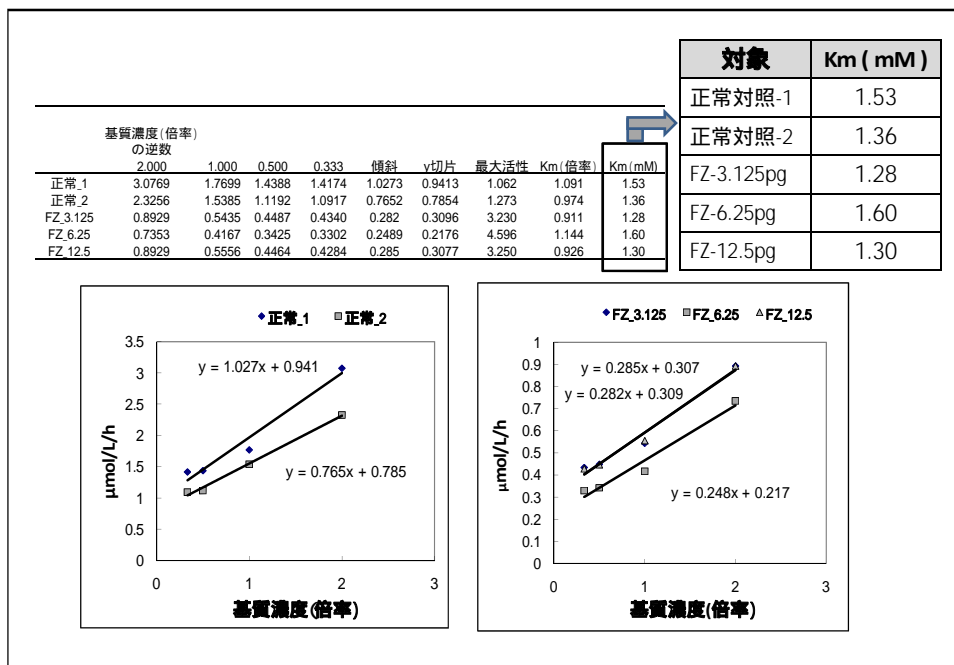


図 1. 基質濃度による  $\beta$ -galactosidase 活性の変化 (ミカエリス定数 Km)

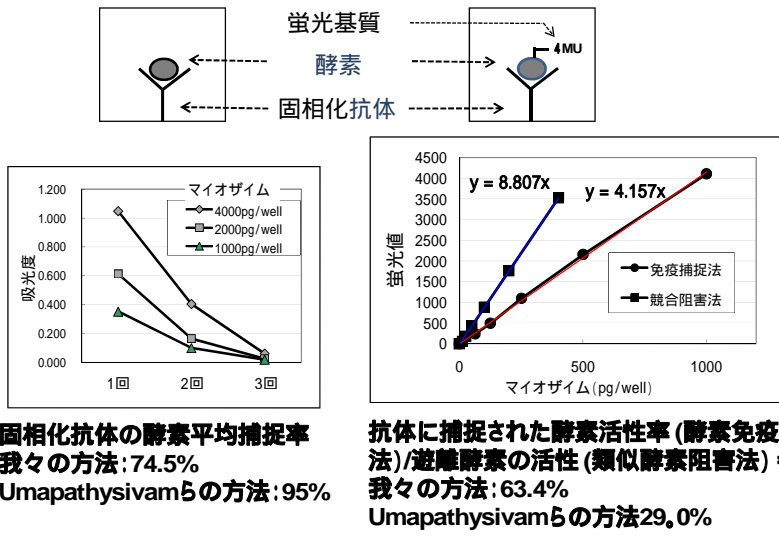


図2. 酵素免疫捕捉法の測定効率

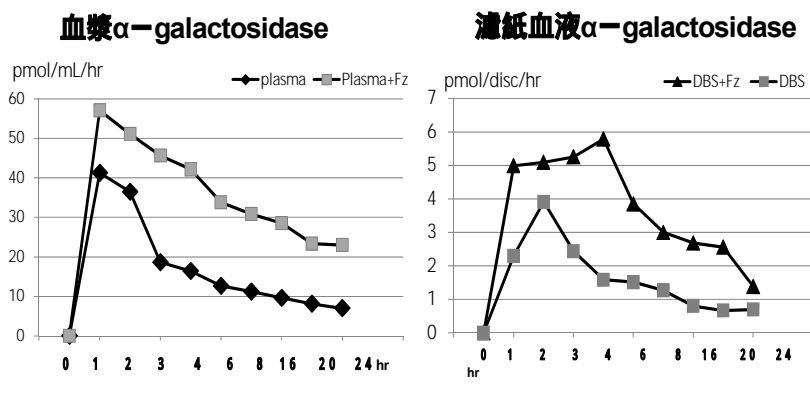


図3. 反応時間による α-galactosidase比活性の推移  
 - Chamolesらの方法 (類似酵素阻害法) -

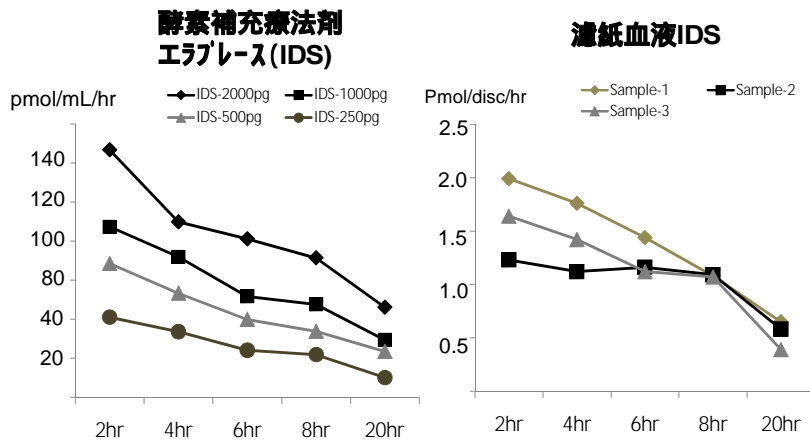


図4. 反応時間によるIduronate-2-sulfatase比活性の推移  
-Deanらの方法(酵素免疫捕捉法) -

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

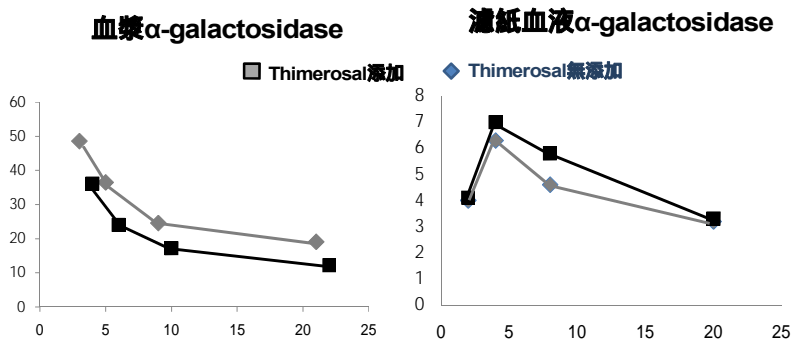
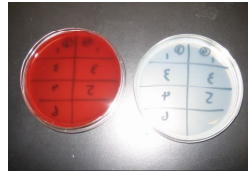


図5. -galactosidase活性に対する防腐剤の影響  
-thimerosal -