

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
総合分担研究報告書

新しい診断法の開発（酵素補充療法）

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。平成 22-23 年度はポンペ病のスクリーニング検査を開発・実用化し、国立成育医療研究センターにおけるパイロットスタディの結果の検討後、ポンペ病有料マス・スクリーニングを開始した。平成 24 年度以降は、ハーラー症候群、ハンター症候群、ゴーシェ病、ポンペ病、ファブリー病のライソゾーム病 5 疾患を対象として、Liquid Logic™ Newborn Screening Analyzer による酵素活性値の同時測定の開発を行った。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となった。

A．研究目的

ライソゾーム病に対する根治的治療法に酵素補充療法と造血幹細胞移植がある。どちらの治療法も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、特に新生児マス・スクリーニングの開発が注目されている。我々は、まずライソゾーム病のひとつであるポンペ病を対象とし、ろ紙微量血液検体を用いた酵素活性測定を可能とし、新生児マス・スクリーニングへの応用を目的とした。さらに、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測定系の確立を目標とした。

B．研究方法

ポンペ病スクリーニング法の開発では、健康対照者 496 名、ポンペ病保因者 5 名およびポンペ病患者 29 名の血液ろ紙中の酸性 グルコシダーゼ（GAA）酵素活性値を人工蛍光基質を用いて測定した。また GAA 酵素活性の低値を示すが、治療の必要のない集団である、pseudodeficiency（偽欠損）の頻度を p.G576S 多型解析により調べた。さらに、本検査法によるポンペ病新生児マス・スクリーニングを国立成育医療研究センターで出生した新生児を対象に 2011 年 1 月よりパイロットスタディとして開始した。

ライソゾーム病 5 疾患の酵素活性値の同時測定の開発は、ろ紙微量血液検体を用いて、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。本研究は、平成 22 年 11 月 30 日に「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に承認されている。

C．研究結果

GAA 活性のカットオフラインを正常コントロールに対して 8%、NAG/GAA 比のカットオフラインを 30 倍以上、阻害率のカットオフラインを 60%以上として、すべてを満たす場合にスクリーニング陽性とする、ポンペ病患者 29 名中 29 名と Pseudodeficiency 15 症例中 1 症例と 保因者 5 症例中 1 症例が陽性と判定され、患者群と Pseudodeficiency（偽欠損）および健康対照者を分けることが可能であった。正常対照者 469 例のうち、Pseudodeficiency（偽欠損）は 15 例であり、全体の約 3 パーセントであった。

国立成育医療研究センターでのパイロットスタディ対象者となったのは 361 名であり、そのうち 15 名が一次スクリーニング陽性と診断された。これらの陽性例の 1726G > A (G576S) の GAA 遺伝子多型解析を行った結果、14 例は pseudodeficiency（偽欠損）に矛盾しないホモ接合体であった（対象者の 3.9%）。1 例はヘテロ接合体であったため、リンパ球での GAA 活性測定、GAA 遺伝子検査を行ったところ、GAA 活性値は 15%で、GAA 遺伝子変異は認められなかった。

ライソゾーム病 5 疾患の酵素活性値の同時測定の開発では、284 名の正常対照群と 70 名のライ

ソゾーム病患者群(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、ファブリー病 18 名)から得られたろ紙検体を対象とした。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-イズロニダーゼ 23.6 (9.3-41.9) および 2.1 (1.4-2.6) $\mu\text{mol/L/h}$ 、イズロネート酸-2-スルファターゼ 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 (9.4-46.6)、4.9 (2.3-8.3) および 5.7 (2.6-15.5、pseudodeficiency 群) $\mu\text{mol/L/h}$ 、 α -ガラクトシダーゼ 32.5 (1.3-90.5)、4.6 (1.9-8.9)、および 7.4 (2.7-19.2、女性保因者) $\mu\text{mol/L/h}$ 、 α -グルコセレブロシダーゼ 10 (4.7-22.1) および 1.93 (1.6-2.2) $\mu\text{mol/L/h}$ であった。

D. 考察

ろ紙微量血液検体を用いたポンペ病スクリーニング法により、患者群と正常群は明確に鑑別可能であった。Pseudodeficiency (偽欠損) の鑑別には、G576S の多型解析を併用することで可能であり、これら方法を用いてポンペ病新生児マス・スクリーニングを開始した。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、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鑑別には他法の併用が必要と考えられた。

E. 結論

ろ紙微量血液検体を用いたポンペ病スクリーニング法が可能となった。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が、ポンペ病の pseudodeficiency (偽陰性) とファブリー病の女性保因者の診断には検討が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hayashi S, Okuyama T, Ohki H, et al. Clinical application of array-based comparative genomic hybridization by two-stage screening for 536 patients with mental retardation and multiple congenital anomalies. *J Hum Genet.* 2010 Oct 28.
- 2) Okuyama T, Tanaka A, Suzuki Y, et al. Japan Elaprase((R)) Treatment (JET) study: Idursulfase enzyme replacement therapy in adult patients with attenuated

- Hunter syndrome (Mucopolysaccharidosis II, MPS II). *Mol Genet Metab.* 2010;99:18-25.
- 3) Furukawa Y, Okuyama T, Iwasa K, et al. Cervical pachymeningeal hypertrophy as the initial and cardinal manifestation of mucopolysaccharidosis type I in monozygotic twins with a novel mutation in the alpha-l-iduronidase gene. *J Neurol Sci.* 2010 Dec 20.
- 4) 奥山虎之: 「ライソゾーム病の診断」特集「わが国のライソゾーム病の病因、病態、診断治療」: 血液フロンティア Vol.20, No.4,47-50,2010.
- 5) 小須賀基通、奥山虎之: 「先天代謝異常症の遺伝学・遺伝相談」見逃せない先天代謝異常、小児科臨床ピクシス 23,197-201,2010.
- 6) Oda E, Tanaka T, Migita O, et al. Newborn screening for Pompe disease in Japan. *Mol Genet Metab.*104:560-565,2011.
- 7) Furujo M, Kubo T, Kosuga M, et al. Enzyme replacement therapy attenuates disease progression in two Japanese siblings with mucopolysaccharidosis type VI. *Mol Genet Metab.* 104:597-602,2011
- 8) Shigeto S, Katafuchi T, Okada Y, et al.: Improved assay for differential diagnosis between Pompe disease and acid α -glucosidase pseudodeficiency on dried blood spots. *Mol Genet Metab.* 103:12-17,2011.
- 9) Tanaka A, Okuyama T, Suzuki Y, et al. Long-term efficacy of hematopoietic stem cell transplantation on brain involvement in patients with mucopolysaccharidosis type II: A nationwide survey in Japan. *Mol Genet Metab.* 2012;107:513-520.
- 10) Sasaki T, Niizeki H, Shimizu A, et al. Identification of mutations in the prostaglandin transporter gene SLCO2A1 and its phenotype-genotype correlation in Japanese patients with pachydermoperiostosis. *J Dermatol Sci.* 2012;68:36-44.
- 11) Hwu WL, Okuyama T, But WM, et al. Current diagnosis and management of mucopolysaccharidosis VI in the Asia-Pacific region. *Mol Genet Metab.*2012;107:136-144.
- 12) D'Aco K, Underhill L, Rangachari L, et al. Diagnosis and treatment trends in mucopolysaccharidosis I: findings from the MPS I Registry. *Eur J Pediatr.*2012; 171:911-919.
- 13) 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) 田尾絵里子、徐朱玟、四元淳子、小須賀基通、田中藤樹、大森美香、川目裕、Dong-kyu Jin、奥山虎之. 日韓のムコ多糖症における新生児マス・スクリーニングに関する意識調査. 第 37 回 日本マス・スクリーニング学会. 横浜、2010.8.29
- 2) 中島英規、小須賀基通、巽国子、藤直子、藤本純一郎、奥山虎之、瀧紙血検体を用いたライソゾーム酵素活性測定法の開発. 第 37 回 日本マス・スクリーニング学会. 横浜、2010.8.28.
- 3) 中島英規、小須賀基通、藤直子、巽国子、藤本純一郎、奥山虎之、タンデムマス質量分析器を用いたポンペ病の診断法の開発. 第 52 回 日本先天代謝異常学会総会・第 9 回アジア先天代謝異常症シンポジウム、大阪、2010.10.22.
- 4) Tao-Nishida Eriko, See Joo-Hyun, Sohn Young-Bae, Yotsumoto Junko, Kosuga Motomichi, Tanaka Toju, Omori Mika, Kawame Hiroshi, Jin Dong-Kyu, Okuyama Torayuki WHAT DO YOU THINK OF ENZYME REPLACEMENT THERAPY AND NEWBORN SCREENING FOR MUCOPOLYSACCHARIDOSIS? OPINIONS FROM PATIENTS AND FAMILIES OF PATIENTS IN JAPAN AND KOREA Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism (SSIEM) ANNUAL SYMPOSIUM 2010、イスタンブール、2010,8.
- 5) ライソゾーム病マス・スクリーニングの試みと遺伝カウンセリング. 田中 あけみ、鈴木 健、奥山 虎之、藤川 研人、坂口 知子、小田 絵里、藤 直子、斎藤 三佳、澤田 智、北川 照男. 第 55 回 人類遺伝学会、大宮、2010.10.28.
- 6) Motomichi Kosuga, Eri Oda, Toju Tanaka, Kazuhiro Kida, Torayuki Okuyama. The Feasibility of Newborn Screening for Pompe Disease in Japanese Population. The 7th Congress of Asian Society for Pediatric Research Hosted with the pediatric Academic Societies' Annual meeting. Denver, USA. April 30, 2011.
- 7) 小須賀基通、木田和宏、藤直子、小田絵里、奥山虎之. 国立成育医療研究センターにおける新生児型ポンペ病マススクリーニングパイロットスタディの結果報告. 第 38 回 日本マス・スクリーニング学会、福井、2011.10.29.
- 8) 小須賀基通、木田和宏、藤 直子、小田絵里、奥山虎之. 乳児型ポンペ病新生児スクリーニングのパイロットスタディ. 第 53 回 日本先天代謝異常学会・第 10 回アジア先天代謝異常症シンポジウム、千葉、2011.11.26.
- 9) Kosuga M, Kakee N, Hirakiyama A, Fuji N, Kida K, Okuyama T. The Feasibility of Newborn Screening for Pompe Disease in Japanese Population. The 7th Congress of Asian Society for Pediatric Research Hosted with the pediatric Academic Societies' Annual meeting. Denver, USA. April 30, 2011.
- 10) 藤直子、小須賀基通、開山麻美、荒木尚美、五十嵐仁美、木田和宏、奥山虎之. Liquid Logic Newborn Screening Analyzer を用いた新生児スクリーニング. 第 54 回 日本先天代謝異常学会、岐阜、2012.11.16.
- 11) M. Kosuga, Fuji N, Kida K, Okuyama T. Newborn screening for infantile Pompe disease: Report of a pilot study in National Center for Child Health and Development, The American Society Of Human Genetics 62nd Annual Meeting, Nov. 8 2012, San Francisco, USA.
- 12) Kosuga M, Fuji N, Kida K, Okuyama T. Newborn Screening for infantile-onset Pompe disease in National Center for Child Health and Development. 4th International Forum for Lysosomal Storage Disorders, 17th Japanese Society of Lysosomal Storage Disorders Joint Meeting, October. 4-6, 2012. Tokyo, Japan.
- 13) 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.
- 14) 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.
- 15) 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.

G . 知的財産権の出願・登録状況
特になし