

厚生労働省科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
総合分担研究報告書

ライソゾーム病の新生児スクリーニングに関する研究
並びに Fabry 病のハイリスクスクリーニングの研究

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）

研究協力者

鈴木 健（公財）東京都予防医学協会
藤川研人（公財）東京都予防医学協会
石毛信之（公財）東京都予防医学協会
穴澤 昭（公財）東京都予防医学協会
大和田操（公財）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

【はじめに】

ライソゾーム病は細胞内の小器官ライソゾームの中に分布する酵素の先天的な異常に基づく疾患であり、他の遺伝性代謝病と同様に出生後酵素の基質が徐々に蓄積していろいろな症状を呈するのが特徴である。従って、先天代謝異常症と同様に蓄積された基質を同定するか、酵素活性の異常を証明して診断される。しかし、ライソゾーム病での酵素基質の蓄積は、主に細胞内で起こるので血漿を検体として用いても良い診断結果が得られないことが多く、むしろ尿を検体として用いたほうが良い結果を得られることが少ない（例：Fabry 病 (FD)における尿 GL3 やムコ多糖症における尿 GAG の測定など）。また、酵素活性の測定も患者において欠損している酵素の活性を天然基質で測定できることは稀であって、蛍光基質等を使用して類似酵素と共に目的とする酵素の活性を測定して診断を試みる事が多く、そのために類似酵素を阻害薬で inhibition したり、目的とする酵素を抗体で捕捉して活性を測定してスクリーニングする。それでも pseudo enzyme

deficiency の問題もあるので、診断には注意が必要である。

従って、上記の点について検討しながら平成 22 年には Pompe 病、Hurler-Scheie 病および Hunter 病の新生児スクリーニングについての研究を行い、平成 23 年度には Pompe 病について酸性 α -グルコシダーゼを抗体で捕捉して活性を測る方法と混在する類似酵素の活性を阻害薬で抑えて目的とする酵素を測定する方法とを比較する研究を行った。平成 24 年度はハイリスクスクリーニングで発見した FD の重症度を検討し、平成 25 年度は、これまで濾紙血液の酵素を用いてライソゾーム病をスクリーニングする場合、検体の試料が少ないために試料の incubation time を 20 時間としているものが多いので、スクリーニングのための至適条件について研究した。従って、本稿では各年度別の研究の概要と考察を記載し、最後に総括をまとめて記述した。

Ⅰ 平成 22 年度：Pompe 病、Hurler-Scheie 病および Hunter 病の新生児スクリーニング法の研究

【研究の概要】

1 . Pompe 病のスクリーニング法

Pompe 病はライソゾーム酸性 α -glucosidase (LGAA) の異常症であるので血中に存在する酸性 maltase-gluco-
amylase (MG) や中性 α -glucosidase C をアルカボースを加えて阻害し、LGAA の活性を測定した。Chamoles らの競合酵素阻害法で検査すると共に、抗 LGAA 抗体を用いて LGAA のみを捕捉し、そ

の酵素活性を測定する immuno-capture enzyme assay 法 (Umapathysivam 法) で測定して、何れの方法が Pompe 病を新生児期にスクリーニングするのに優れているかを比較検討した。

2 . Hurler-Scheie 病 (MPS I 型) のスクリーニング法

本症はライソゾーマル α -iduronidase (ID) の異常症であり、類似酵素を saccharic acid-1-4-lactone を加えて阻害し、4MU-iduronide を基質として血漿と共に incubate し、ID を測定した。

3 . Hunter 病 (MPS II 型) のスクリーニング法

α -Iduronide-2-sulfatase (IDS) の先天異常症である Hunter 病のスクリーニングは、この酵素 (IDS) のポリクローナル抗体を使用して、マイクロプレートウェルに固相化して捕捉し、蛍光基質 4MU-sulfate を加えて IDS を測定した。

【研究成績と考察】

新生児を対象とした Pompe 病の試験的二次スクリーニングに使用した免疫捕捉法による濾紙血液 GAA 活性の測定法は、Chamoles らの方法よりもより簡便で容易に測定できる上に、患者の GAA 活性値は正常対象と比較して明らかに低値を示しており、患者の診断を速やかに行うことができた。従って、この免疫捕捉法で一次スクリーニングを行い、陽性を示した例について本法と Chamoles らの方法を併用して二次スクリーニングを行えば、より精度の高いスクリーニングが可能となると思われる。しかし、pseudodeficiency と Pompe 病との鑑別は遺伝子検査以外の方法では不可能であった。

MPS I 型、MPS II 型の新生児スクリーニングは、それぞれの疾患で活性が低下する方法で酵素を測定すれば早期発見が可能である。しかし、MPS I 型も II 型も神経症状を伴う症例があり、これに対して酵素補充療法は効果が乏しく、スクリーニングの有用性は少ない。従って、一般の新生児集団に新生児スクリーニングを行う場合はこの点

について予め行政や新生児の家族の理解を得ておくことが必要であろう。

II 平成 23 年度：乾燥濾紙血液を用いた糖原病 II 型の酵素学的スクリーニング法の研究：免疫捕捉酵素活性測定法と競合酵素阻害法の比較研究

【研究の概要】

本研究は大阪市立大学小児科グループとの共同研究の形式で実施した。すなわち、予めインフォームドコンセントが得られた、2009 年 11 月から 2010 年 10 月の間に同大学病院で出生した 485 例の新生児について、GSD II のスクリーニング検査を行った。また、某病院でフォローアップされていた、既知の GSD II 患者 4 例の乾燥濾紙血液 (以下 DBS) を、正常新生児の LGAA 活性測定値と対比する目的で本研究に使用した。患者 4 例の病型は、乳児型 2 例、成人型 1 例、病型不明 1 例であった。

【考察】

今回の研究結果から、我々が試みた免疫捕捉法と、従来から用いられている競合阻害法の両者を比較した結果、感度は両法とも 100% であり、特異度は、免疫捕捉法では 97.3%、競合阻害法では 96.7% と高い数値であったので、いずれの方法とも GSD II の新生児スクリーニングに使用可能と思われる。また、これまでに報告されている、免疫捕捉法における捕捉時の酵素活性の低下は、患者の発見には影響しないと考えられた。免疫捕捉法は競合阻害法と比較して、捕捉した LGAA の活性を直接測定しており、また、類似酵素を阻害する手順が不要で、手技が簡便である点が優れていると考えている。

しかし、我々が経験している患者は 4 例に過ぎず、遅発型の患者の経験も少なく、今後さらに多くの患者や新生児の検査を行って結論を得たいと考えている。また、ELISA 法による LGAA 蛋白を濾紙血液で測定する方法を確立して、免疫捕

捉法および競合阻害法と合わせてより精度の高いスクリーニング法に発展させたいと考えている。

III 平成 24 年度：ハイリスクスクリーニングで発見された FD 患者の CKD 重症度に関する研究

【研究の概要】

FD は慢性腎臓病 Chronic Kidney Disease (CKD) の一疾患であり、腎不全を予防するには、本症に似た症状を呈する症例について早い時期にスクリーニングして、早期に治療を開始する必要がある。

CKD の重症度分類は、2012 年に日本腎臓学会が改訂し、より使用し易いものになった。本症が疑われる症状や家族歴が認められるために、FD が否かの検査を依頼されて、本症と診断した患者の CKD staging を新しい分類に従って検討し、若干の成果を得たので報告する。

【対象と研究方法】

全国の病院・クリニックから依頼された FD が疑われる症状や家族歴のある症例 202 名の酵素補充療法開始前の随時尿と血漿を研究対象とすると共に、健常成人 432 名の随時尿および 211 名の血漿を研究対象とした。

【方法】一次スクリーニングは、尿 α -gal A 蛋白を ELISA 法で測定し、尿 globotriaosylceramide (GL-3) をタンデム質量分析計 (MS/MS) で測定した。

この検査で陽性のは血漿 α -gal A 蛋白測定に加えて α -gal A 活性を Chamoles 変法で測定した。最終的に FD 患者と診断された症例については、主治医から臨床診断名、治療状況等の報告を受け、これをもとにこれらの症例の CKD の stage 分類を行い検討した。

【研究結果と結語】

ハイリスク症例のスクリーニング成績は、男性

105 名のうち最終結果を得たのは 88 名で、古典型 49 例、心型亜型 7 例、腎型亜型 5 例、正常 27 名であり、女性 97 名のうち最終結果を得たのは 76 名で、古典型 40 例、心型亜型 9 例、腎型亜型 5 例、正常 22 名であった。

男性の FD と診断された 58 症例の 46.6% の症例は、予後が最も良好なグループで、17.2% は最もリスクの高いグループであった。また、予後良好なグループの症例の 63.2% は 29 歳未満であり、若い年齢の者が多く、最もリスクの高い予後不良群ではその 60% が 50 歳以上であった。また、54 例の女性の 68.1% が予後良好なグループであり、11.8% が予後不良のグループであった。従って、FD が疑われる症例はなるべく早くにスクリーニングして遅くとも 30 歳までに検査をして診断するのが良いと思われた。

平成 25 年度：濾紙血液を用いたライソゾーム病 (Fabry 病、糖原病 II 型、ムコ多糖 I 型・II 型) の酵素活性測定によるスクリーニング法の検討 特に反応時間について

【研究の概要】

濾紙血液を用いたライソゾーム病の酵素診断における至適条件の設定を目的として大阪市大 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、白血球を対象に類似酵素阻害法、および酵素免疫捕捉法を用いて、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：2~20 時間、4. 防腐剤添加の影響等について検討した

【結論】

その結果、各々のライソゾーム病の酵素活性測定する場合、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。

【平成 22～25 年度の総括】

これまでの研究では、幾つかのライソゾーム病のスクリーニングにおいて、類似酵素を inhibition して目的とするライソゾーム酵素活性を測定する方法と、ライソゾーム酵素の抗体で目的とする酵素を capture し、混在する類似酵素の影響を除外する方法を、同時に検討した報告は少ない。

本研究の結果によると、inhibition assay 法と immuno-capture enzyme assay 法との精度には大きな差はなく、何れの方法を用いても良いように思われた。しかし、ライソゾーム病はライソゾーム酵素の異常に基づく疾患なのでその診断結果を確認する時は、白血球などの細胞を用いて行う方が良いと思われる。