

氏名・(本籍)	加藤 明英 (秋田県)
専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	医博甲第 1083 号
学位授与の日付	令和 5 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	医学系研究科医学専攻
学位論文題名	A study of mass screening for acid sphingomyelinase deficiency; the relationship between enzyme activity and blood cell counts (酸性スフィンゴミエリナーゼ欠損症におけるマススクリーニングの研究; 酵素活性と血球数の関係について)
論文審査委員	(主査) 寺田 幸弘 教授 (副査) 長谷川 仁志 教授 水野 大 准教授

学位論文内容要旨

A study of mass screening for acid sphingomyelinase deficiency;
the relationship between enzyme activity and blood cell counts
(酸性スフィンゴミエリナーゼ欠損症におけるマススクリーニングの研究;
酵素活性と血球数の関係について)

申請者氏名 加藤 明英

研究目的

ライソゾーム病は、50種類以上の酸性加水分解酵素を含むライソゾーム蛋白の機能不全によって起こる、稀な遺伝性疾患である。ライソゾーム病の分子化学的解明が進み、新たな治療法が開発され、早期治療のため各疾患に対するマススクリーニングが重要となっている。酸性スフィンゴミエリナーゼ欠損症 (ASMD) もそのひとつであり、酸性スフィンゴミエリナーゼ (ASM) が先天的に欠損や低下している疾患で、2022年に酵素補充療法が承認された。従来、ASMDはリンパ球や線維芽細胞を用いたASM活性測定により診断される。乾燥濾紙血(DBS)は移送利便性に優れ、酵素活性やDNA増幅などの分析ができるため、マススクリーニングに適している。また、ASMは細胞内に存在するライソゾーム型ASM (L-ASM) と、細胞外に存在する分泌型ASM (S-ASM) がある。我々は、ライソゾームを含む血球成分により、DBS中ASM活性が影響を受ける可能性があると考えた。

本研究では、DBSを用いてASMDのマススクリーニングを実施し、ASM活性に影響を与え得る血液データを評価して臨床的意義を検討することを目的とした。

研究方法

本研究はヘルシンキ宣言に基づき実施され、秋田大学倫理委員会 (No. 2091) の承認を受けた。2019年2月から2020年6月までに秋田大学医学部附属病院に入院した、非ASMDの62名の小児が本研究に登録された。対象は在胎28週から15歳までの、男児29名・女児33名であった。年齢によるASM活性の違いを検討するため、(1)早産児(28名)、(2)正期産児(24名)、(3)その他(10名)の3群に分けた。DBSと血液検査が同日に採血された37検体を用いて、ASM活性と血液データを統計学的に解析した。また、既に診断が確定しているASMD患者1名からもDBSを得た。

研究成績

ASM活性は、Neo LSDキット(パーキンエルマー社)を使用してタンデム質量分析法で解析した。本研究では検体数が限られているため、既報の $1.5 \mu\text{mol/h/L}$ を参考カットオフ値とした。これは米国44,432人の新生児におけるASM活性平均 $6.0 \mu\text{mol/h/L}$ の25%である。

62名のDBS中ASM活性の平均は $5.7 \pm 2.4 \mu\text{mol/h/L}$ (最小2.3、最大16.4、中央値5.1)であった。参考カットオフ値 $1.5 \mu\text{mol/h/L}$ を下回る検体は無かった。ASMD患者のASM活性は $1.0 \mu\text{mol/h/L}$ であった。本研究により、非ASMDの日本人小児のDBS中ASM活性の分布が明らかとなった。ASMD患者は明確に陽性と判定された。従って、本法はASMDの簡便で信頼性の高いマススクリーニングを提供するものである。本研究結果は、日本におけるASMDのマススクリーニングを促進する可能性がある。

DBS採取と血液検査が同日であった37検体において、ASM活性と血液検査データの相関関係を検討した。ASM活性とWBC数はPearsonの相関係数 $r=0.44$ で有意な正の相関を認めた($p=0.006$)。ASM活性とリンパ球数は $r=0.51$ で有意な正の相関を認めた($p=0.001$)。好中球数・好塩基球数・好酸球数・単球数・ヘマトクリット値・網状赤血球数・血小板数・血清CRP値・血清フェリチン値は有意な相関を示さなかった。この相関関係は、白血球数とリンパ球数が軽症ASMD患者の偽陰性と、保因者の偽陽性に関与しうることを示唆するものである。

早産児群と正期産児群のASM活性・白血球数・リンパ球数を比較検討した。ASM活性は(早産児群 $6.1 \pm 2.3 \mu\text{mol/h/L}$ vs. 正期産児群 $5.4 \pm 1.2 \mu\text{mol/h/L}$ [$p = 0.30$])、白血球数は($10,606 \pm 552$ vs. $10,975 \pm 826$ [$p = 0.70$])、リンパ球数は($5,626 \pm 514$ vs. $5,151 \pm 510$ [$p=0.53$])で、有意差は認められなかった。このことから、早産児は成長してから再検査を受ける必要がない可能性が示唆されたが、本研究は同一症例での比較を行っていないため、追加の検証が必要である。

結論

当院に入院した小児を対象に、DBSを用いたASMDのマススクリーニングを施行した。本研究は、DBS中のASM活性が白血球数とリンパ球数と正の相関関係にあることを示した、初めての報告である。白血球数とリンパ球数は、偽陰性と偽陽性に関与する可能性が示唆された。

学位（博士一甲）論文審査結果の要旨

主 査： _____ 寺田 幸弘 _____

申請者： _____ 加藤 明英 _____

論文題名：A study of mass screening for acid sphingomyelinase deficiency;
the relationship between enzyme activity and blood cell counts
(酸性スフィンゴミエリナーゼ欠損症におけるマススクリーニングの研究；
酵素活性と血球数の関係について)

要旨

著者の研究は、論文内容要旨に示すように、乾燥濾紙血（DBS）を用いて酸性スフィンゴミエリナーゼ欠損症（ASMD）のマススクリーニングを実施し、酸性スフィンゴミエリナーゼ（ASM）活性に影響を与える血液データを評価して、臨床的意義を検討したものである。希少疾患 ASMD 患者 1 名と、秋田大学小児科で入院加療を行なった非 ASMD 小児 62 名の DBS から酵素活性を測定し、日本人 DBS 中 ASM 活性の分布と、早産児における ASM 活性を明らかにした。また、白血球数とリンパ球数が ASM 活性と正の相関を示すことから、これらが軽症 ASMD 患者の偽陰性、保因者の偽陽性の要因となりうることを見出した。

本論文の斬新さ、重要性、実験方法の正確性、表現の明確さは以下の通りである。

1) 斬新さ

これまでに、DBS を用いたタンデム質量分析法による ASM 活性の測定方法が開発され、いくつかの国からマススクリーニングのパイロット研究の報告がなされていたが、日本人の酵素活性分布は明らかではなく、世界的にも早産児の報告はなかった。また、本研究は分泌型 ASM とライソゾーム型 ASM に着目し、白血球数とリンパ球数が ASM 活性と正の相関関係にあることを初めて明らかにした点に斬新性がある。このことは DBS 中 ASM 活性測定において、白血球数とリンパ球数が診断結果に影響を与えることを見出した初の報告である。

2) 重要性

本研究の酵素活性測定方法は、ASMD の簡便で信頼性の高いマススクリーニングを提供するものである。本研究により ASMD マスクリーニングが促進される可能性がある。ASMD は早期発見と早期治療が重要な疾患であるが、日本の生存患者は僅か数名であり、地域差・人種差を考慮したとしても未診断例が多く存在することが懸念される。本研究を基盤としてマススクリーニングを展開することにより、未診断患者へ適切な医療を提供することが可能となる。また、診断において偽陰性と偽陽性の要因検討は必須であり、本研究の臨床上の重要性を示すものと考えられる。

3) 実験方法の正確性

DBS を用いたタンデム質量分析法による ASM 活性測定は確立された手法である。キットに付随するコントロール DBS を用いたバリデーションが行われ、日間 CV は 3.9 ~ 9.7 % であり、質量分析器による解析として非常に良好な結果を示した。本研究における解析は定量的に行われ、さらに統計学的検討も加えられており、客観的な評価法で正確性が高いと考えられる。

4) 表現の明瞭さ

既報や臨床上の事実から仮説を設定し、その立証のために妥当と考えられる検討を行い、DBS 中 ASM 活性に影響を与える血液データを明らかにするための研究の目的、方法、実験結果、考察を簡潔、明瞭に記載していると考えられる。

以上述べたように、本論文は学位を授与するに十分値する研究と判定された。