

6615

論文題目

Adrenoleukodystrophy の生化学並びに

臨床医学的研究

東京大学医学部第二生化学教室

紹介教官

永井克孝 教授

氏 名

辻 省 次

目 次

1. 緒 言	1
2. 第一章	2
赤血球膜及び血漿スフィンゴリピドの脂肪酸分析による Adrenoleukodystrophy (ALD)	
の生化学的診断法	
3. 第二章	14
Adrenoleukodystrophy 皮膚繊維芽細胞における脂肪酸代謝の検討	
4. 第三章	21
Adrenoleukodystrophy 及びその亜型についての臨床医学的検討	
5. 結 語	38

緒 言

Adrenoleukodystrophy (以下 ALDと省略) は、主に5-15才の男児に好発する伴性劣性遺伝性の脱髄性神経疾患である。従来、副腎萎縮を伴う汎発性硬化症として報告されていた疾患(1)の中に、副腎皮質の束状帯と網状帯に腫大した細胞が見られ、この細胞及び脳白質の脱髄巣のマクロファージに、電顕上 ALD以外で観察された事のない特異的な trilamellar の膜様構造物が細胞内に認められ、何らかの脂質代謝異常による疾患と考えられることが、Schaumburg らにより報告された(2, 3)。1976年に Igarashi らは、本疾患の脳及び副腎の脂質分析の結果、炭素数22以上の極長鎖脂肪酸を有する異常なコレステロールエステルの蓄積と、セレブロシド、ガングリオシドにおいても、炭素数25, 26等の極長鎖脂肪酸の増加を証明し、本疾患の生化学的異常が確立された(4, 5)。その後、Kawamura らにより培養皮膚繊維芽細胞においても、総脂質あるいはスフィンゴミエリン中の hexacosanoic acid (C26:0) の増加が報告され、本疾患の診断法として用いられるようになった(6, 7)。

ALD に関する重要な問題点としては、1) 血液等容易に採取できる検体を用いて本疾患の生化学的診断が行えないか、2) 遺伝的には伴性劣性遺伝性であり、脂肪酸代謝に関する何らかの酵素欠損症であると考えられるが、どのような酵素欠損症であるのか、3) 臨床的な観点からみると、成人発症例は、小児期発症例と比較して臨床像が非常に異っており、臨床型の分類を再検討する必要がある、等を挙げることができる。

本研究は、1) 脳生検(8)、副腎生検(9)、結膜及び皮膚生検(10, 11)、あるいは培養皮膚繊維芽細胞の脂質分析(6, 7)等の侵襲の大きい方法でなく、血液等、臨床上容易に侵襲の少ない方法で採取できる検体を用いて、本疾患の生化学的診断法を確立すること、2) 本疾患の極長鎖脂肪酸の代謝異常の本態を明らかにすること、3) 1)により診断の確定した ALDあるいはその亜型、特に成人例についてその臨床像を明らかにすると共に、臨床型の分類についても検討を加えることを目的として行われた。

第一章 赤血球膜及び血漿スフィンゴリピドの

脂肪酸分析による Adrenoleukodystrophy (ALD)

の生化学的診断法

Schaumburg らにより ALD の病理形態学的異常が確立され (2, 3), Igarashi ら (4, 5) により生化学的異常が確立されて以後, ALD の確定診断を行う為に, 脳や副腎の生検 (8, 9), 結膜や皮膚生検 (10, 11) あるいは培養皮膚繊維芽細胞の脂質分析 (6, 7) 等の方法がとられてきたが, これらはいずれも侵襲の大きな方法であり実用的であるとは言い難い。

ALD における極長鎖飽和脂肪酸の増加は, コレステロールエステル (4) を除けば, セレブロシド (4, 12), スルファチド (12), スフィンゴミエリン (13), ガングリオシド (4, 5) 等のスフィンゴリピドに限られている。そこで, 容易に採取できる検体として, 赤血球膜スフィンゴミエリン及びグロボシド, 血漿スフィンゴミエリンの各スフィンゴリピドの脂肪酸組成を調べ, 本疾患の生化学的診断の可能性について検討した。

材料及び方法

材料：Adrenoleukodysrtophy にはその臨床像においていくつかの亜型の存在することが知られており、その詳細については第三章で述べるが、Schaumburg ら(3)、Griffin ら(14)の報告に基づいて、Adrenoleukodystrophy (ALD) と臨床診断された症例13例、Adrenomyeloneuropathy (AMN) と臨床診断された症例5例、及びALD患者の母親9例、父親3例より10mlの血液を採取し、赤血球、血漿を得た。

赤血球膜スフィンゴミエリンとグロボシドの調製及びその脂肪酸メチルエステルの調製 (15)
：Dodge らの方法(16)に従い赤血球膜を調製し、凍結乾燥後、クロロホルム-メタノール(2:1, 容比) 50ml及びクロロホルム-メタノール(1:2, 容比) 30mlにて全脂質を抽出した。得られた総脂質から、シリカゲル薄層クロマトグラフィー(展開系 クロロホルム-メタノール-水, 65:25:4, 容比)によりスフィンゴミエリン及びグロボシドを分取し、さらにイアトロビーズカラムクロマトグラフィー(溶出溶媒, クロロホルム-メタノール 6:4, 4:6及び2:8, 容比)により精製グロボシド及びスフィンゴミエリンを得、2.5%塩酸メタノール1mlを加え、80℃10時間の反応でメタノリシスを行ない、生成した脂肪酸メチルエステルを、シリカゲル薄層クロマトグラフィー(展開系 n-ヘキサン-エチルエーテル-酢酸, 90:10:1, 容比)により分取した。

血漿スフィンゴミエリンの精製及びその脂肪酸メチルエステルの調製 (17)：Bligh らの方法(18)で、血漿総脂質を抽出し、シリカゲル薄層クロマトグラフィー(展開系 クロロホルム-メタノール-酢酸-水 25:15:4:2, 容比)によりスフィンゴミエリンを分取し、赤血球膜スフィンゴミエリンの場合と同様にイアトロビーズカラムクロマトグラフィーでスフィンゴミエリンを精製し、その脂肪酸メチルエステルを得た。

重水素置換脂肪酸メチルエステルの調製：マスフラグメントグラフィーによる分析の際に、内部標準物質として用いる為、hexacosanoic acid (C₂₆:0) 及び docosanoic acid (C₂₂:0) に重水素置換した2.5%の塩酸メタノール(DCL及びCD₃OD)を加え、80℃10時間の反応でメタノリシスを行ない、生成した脂肪酸メチルエステルを、シリカゲル薄層クロマトグラフィー(展開系 n-ヘキサン-エチルエーテル-酢酸, 90:10:1, 容比)にて分取した。

キャピラリーカラムガスクロマトグラフィー-化学イオン化マスフラグメントグラフィー (15) :

島津- LKB9000A を用い、カラムは30m (内径 0.25 mm) の中空キャピラリーを SE-30でコーティングしたものに、Van den Berg 型アダプター (19) をつけて用いた。カラム温度は、C 22 : 0 の測定には 250℃、C 26 : 0 の測定には 270℃とした。注入部の温度は、C 22 : 0 の測定には 270℃、C 26 : 0 の測定には 300℃とした。イオン化電圧 500eV、イオン化電流 400 μ A、加速電圧 3.5KVとし、反応ガスとしてアンモニア (1.0 Torr) を用いた。

マスフラグメントグラフィーは、スフィンゴミエリンあるいはグロボシドから調製した脂肪酸メチルエステルに、一定量の重水素置換した脂肪酸メチルエステル (C 22 : 0- d_3 、C 26 : 0- d_3) を内部標準物質として加え、それぞれの $(M+18)^+$ をモニターして行い、試料のピーク波高と内部標準物質のピーク波高の比を計算して、別に描いた検量線から C 26 : 0、C 22 : 0 の定量を行ない、その比 C 26 : 0 / C 22 : 0 を求めた。

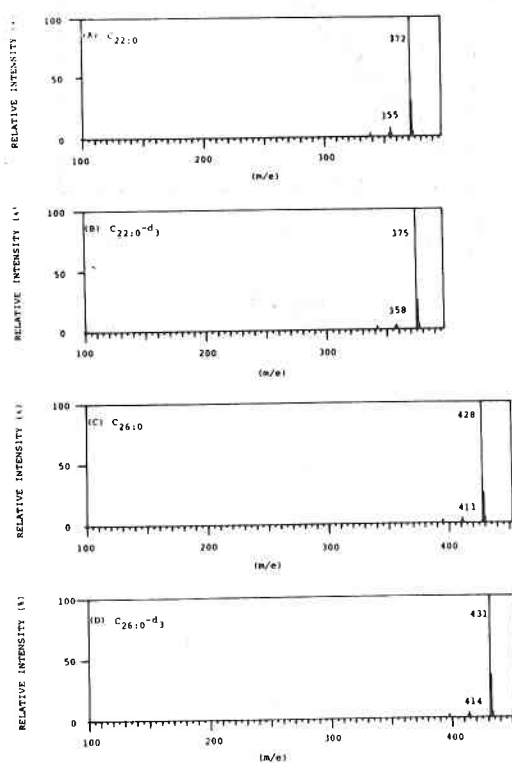
赤血球膜スフィンゴミエリンのスフィンゴシン塩基組成の分析 (17) : Carter らの方法 (20) に従い、ガスクロマトグラフィーによりスフィンゴシン塩基組成を調べた。

赤血球膜グリセロリン脂質の脂肪酸分析 (17) : 赤血球膜総脂質より、シリカゲル薄層クロマトグラフィー (展開系 クロロホルム-メタノール-酢酸-水、25 : 15 : 4 : 2、容比) により、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルコリンを分取し、スフィンゴミエリンの場合と同様にその脂肪酸メチルエステルを調製した。脂肪酸組成は、島津 GC 5 A を用いて分析した。カラムは、80-100メッシュのガスクローム Q に、液相として 10% DEGS をコーティングしたものを用了。

結 果

Fig1にC22:0 (A), C22:0-d₃ (B), C26:0 (C), C26:0-d₃ (D) のアンモニアを反応ガスとして用いた化学イオン化マスペクトルを示す。アンモニアとの ion molecule reactionによる $(M + NH_3 : M + 18)^+$ が強いベースピークとして出現し, protonated molecular ion $(M + H : M + 1)^+$ は非常に弱く, 従ってC22:0の定量は, ベースピークの m/z 372及び内部標準物質として加えたC22:0-d₃のベースピークである m/z 375をモニターして行い, C26:0の定量は同様に m/z 428, 431 をモニターして, それぞれのピーク波高の比を測定した。

Fig. 1. Ammonia CI mass spectra of fatty acid methyl esters.
A: Methyl docosanoate; B: Trideuteriomethyl docosanoate; C: Methyl hexacosanoate; D: Trideuteriomethyl hexacosanoate.



C 22 : 0 及び C 26 : 0 の検量線は Fig.2 に示す如く、それぞれ 1 ng から 10 ng の範囲において、ほぼ原点を通る直線として得られた。Fig.3 に赤血球膜スフィンゴリエリンから調製した脂肪酸メチルエステルのマスフラグメントグラムを示す。ALD では明らかに C 26 : 0 の増加が認められ、また生体試料由来の background による影響は全くなかった。

Fig. 2. Calibration curves for the determination of methyl docosanoate and methyl hexacosanoate.

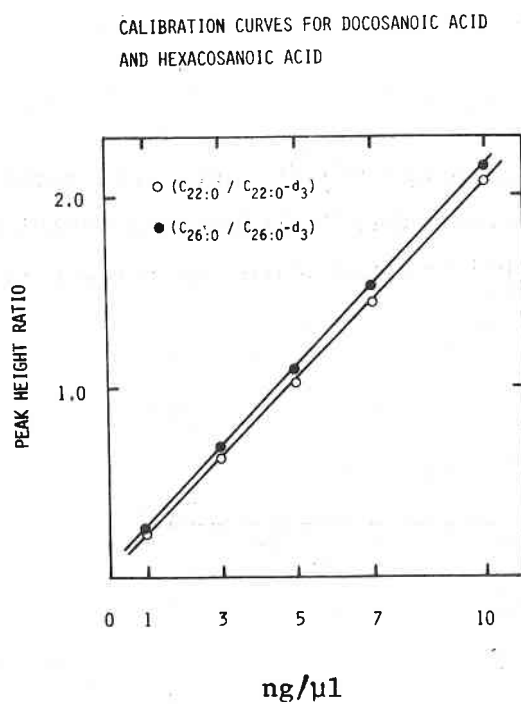
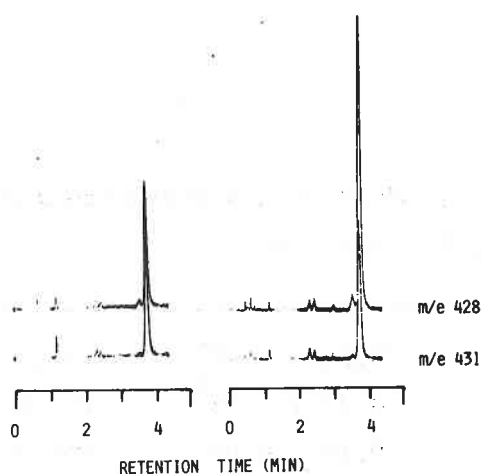


Fig. 3. Mass fragmentograms of methyl hexacosanoate (m/z 428) and trideuteriomethyl hexacosanoate (m/z 431) in erythrocyte membrane sphingomyelin from a normal control and a patient with ALD.

MASS FRAGMENTOGRAMS OF HEXACOSANOIC ACID IN RBC

(NORMAL)

(ALD)



この方法を用いて赤血球膜スフィンゴミエリン、グロボシドのC26:0, C22:0を測定し、C26:0/C22:0を求めた結果を Table 1, 2 に示す。C26:0/C22:0の値は、赤血球膜スフィンゴミエリンでは ALDにおいて対照の 2.5倍 ($p < 0.001$) と有意の上昇を示し、AMNにおいても同様に対照の 2.1倍 ($p < 0.001$) と有意の上昇を示した。AMNでは、ALDと比較してC26:0/C22:0の値の上昇がやや軽度である傾向を示したが、両者の間に統計的な有意差は認められなかった。赤血球膜グロボシドにおいても、C26:0/C22:0の値はALDで 2.4倍 ($p < 0.001$)、AMNで 1.4倍 ($p < 0.01$) と有意の上昇を認めた。AMNはALDと比較して低値を示した ($p < 0.05$)。また、heterozygoteである母親では、スフィンゴミエリン、グロボシド共にC26:0/C22:0の値が対照とALDの中間の値を示した。

Table 1. C26:0/C22:0 in erythrocyte membrane sphingomyelin

ALD	$0.25 \pm 0.06^*$	(N=13)
AMN	$0.21 \pm 0.04^*$	(N= 5)
Mother	0.18 ± 0.05	(N= 9)
Control	0.10 ± 0.02	(N=16)

values are mean \pm SEM

* different from control by $p < 0.001$

Table 2. C26:0/C22:0 in erythrocyte membrane
globoside

ALD	0.33 ± 0.07 [*]	(N=6)
AMN	0.20 ± 0.04 ^{**}	(N=3)
Mother	0.20 ± 0.04	(N=4)
Control	0.14 ± 0.02	(N=8)

values are mean ± SEM

* different from control by p<0.001

** different from control by p<0.01

赤血球膜のグリセロリン脂質の脂肪酸組成を Table 3 に示す。ホスファチジルエタノールアミン, ホスファチジルセリン, ホスファチジルコリンにおいては, いずれも脂肪酸組成に変化に認めなかった。

Table 3. Fatty acid composition (%) in phospholipids of erythrocyte membrane.

	P.E.		P.S.		P.C.	
	Control	ALD	Control	ALD	Control	ALD
C14:0	0.5±0.2	0.9±0.6	0.4±0.4	0.6±0.4	0.4±0.1	0.4±0.1
C15:1	1.3±0.3	1.2±0.4	0	0.1±0.1	0.1±0.1	0.1±0.1
C16:0	20.4±2.6	21.4±3.3	4.0±1.4	4.1±2.2	40.2±1.9	41.6±2.0
C16:1	0.2±0.3	0.1±0.1	0.3±0.2	0.2±0.2	0.3±0.2	0.4±0.2
C16:2	0.4±0.6	0	0	0	0	0
C17:0	1.8±1.4	0.5±0.6	0.1±0.1	0.2±0.3	0.2±0.2	0.2±0.1
C18:0	8.3±1.1	8.9±1.9	51.5±5.3	46.5±8.6	12.6±1.7	12.6±2.6
C18:1	22.1±2.7	21.0±2.0	7.2±2.1	7.3±3.0	19.8±1.2	20.4±2.7
C18:2	6.0±0.8	6.3±1.4	2.6±1.3	2.9±1.5	17.0±1.7	15.5±2.5
C20:0	0	0	0.2±0.1	0.1±0.1	0.3±0.3	0.4±0.2
C20:1	0.5±0.1	1.0±1.4	0.7±0.2	0.6±0.1	0.2±0.2	0.1±0.2
C20:3	1.5±0.5	2.9±0.9	1.6±0.3	2.2±0.5	1.3±0.4	1.4±0.4
C20:4	17.0±3.3	16.1±3.6	13.5±1.6	14.4±2.6	3.8±0.3	3.0±1.3
C20:5	2.6±1.6	1.2±0.9	0.9±0.5	0.6±0.4	0.8±0.5	1.0±1.1
C21:1	0.5±0.2	1.0±0.9	0.2±0.0	0.3±0.2	0.2±0.0	0.2±0.1
C22:3	0.1±0.1	0	2.3±1.3	1.3±1.3	0.3±0.3	0.3±0.4
C22:4	3.7±1.1	3.6±1.3	2.8±1.3	2.2±0.9	0.2±0.1	0.2±0.0
C22:5	3.6±0.9	3.2±1.0	2.1±0.9	2.0±0.6	0.5±0.1	0.4±0.1
C22:6	9.5±3.1	11.0±2.1	8.6±4.0	13.6±5.0	1.9±0.9	1.3±1.0

P.E.; Phosphatidylethanolamine, P.S.; Phosphatidylserine
P.C.; Phosphatidylcholine

mean±SEM (N=4)

ALD, AMN における脂肪酸組成の異常が, スフィンゴミエリン, グロボシドといういずれもスフィンゴシンを含むスフィンゴリピドにおいてのみ見出された為に, 次にスフィンゴシン塩基の分析を行った。結果は Table 4 に示す如く ALD, 対照ともに C 18-スフィンゲニンが主成分で, その組成には差がなかった。

Table 4. Sphingosine base composition in erythrocyte membrane sphingomyelin

	ALD (N=4)	Control (N=4)
16:1	2.0 \pm 1.3 %	1.6 \pm 1.0 %
18:1	96.9 \pm 1.2	97.5 \pm 0.6
18:0	1.1 \pm 0.3	0.9 \pm 0.3

values are mean \pm SEM

血漿スフィンゴミエリンにおける脂肪酸組成の分析結果を Table 5 に示す。赤血球膜におけると同様に, ALDで C 26:0 / C 22:0 の値が対照の 6.1倍と高値を示し ($p < 0.001$), AMN においても ALDと同様に高値を示した ($p < 0.001$)。ALDと AMNの間には有意な差は認められなかった。母親においては, 対照の 3.1倍と対照と ALDの値の中間値を示したが, 父親では対照と同様の値であった。

Table 5. C26:0/C22:0 in plasma sphingomyelin

ALD	0.0263 \pm 0.0037*	(N= 8)
AMN	0.0232 \pm 0.0018*	(N= 4)
Mother	0.0132 \pm 0.0013	(N= 4)
Father	0.0051 \pm 0.0018	(N= 3)
Control	0.0043 \pm 0.0022	(N=16)

values are mean \pm SEM

* different from control by $p < 0.001$

考 察

Igarashi らが初めて ALD患者脳および副腎において、C 22 : 0 以上の極長鎖脂肪酸を有するコレステロールエステルの蓄積を証明して以来(4), セレブロシド (4, 12), スルファチド (12), ガングリオシド (4, 5) 等のスフィンゴ糖脂質, あるいはスフィンゴリン脂質であるスフィンゴミエリン (13) において、C 25 : 0, C 26 : 0 等の極長鎖脂肪酸の増加が証明されている。しかしながら、ALDの確定診断を行おうとすると、これまでのところ、副腎、睪丸、末梢神経あるいは脳等の臓器の生検を行ない、病理形態学的に特異的な膜様構造物を証明するか、脂肪酸分析を行い上記の変化を証明するしかなかった (8, 9, 10, 11)。

最近になり、培養皮膚繊維芽細胞あるいは培養筋細胞の脂肪酸分析を行い、C 26 : 0 の増加を証明し、ALDの生化学的診断が可能であるという報告があるが (6, 7, 21), これらの方法は皮膚あるいは筋を切除するという侵襲を患者に与えること、脂質分析を行うに十分な量の細胞を得るには長期間を必要とする等の点で実用的とはいえない。

このような点から、容易に採取できる検体でしかも極長鎖脂肪酸を含むものとして、赤血球膜スフィンゴミエリン、グロボシド、血漿スフィンゴミエリンに着目した。このような脂質に含まれるC 26 : 0 は1%以下と少く、ガスクロマトグラフィーによる定量では感度、特異性の点で難点がある為に、キャピラリーカラムガスクロマトグラフィー化学イオン化マスフラグメントグラフィーという感度、特異性の優れた方法を採用した。Fig 2 に示した如く、本法を用いることにより1 ng-10 ngという微量の脂肪酸の定量が可能となった。

ALD, AMN においては、赤血球膜スフィンゴミエリン、グロボシド、及び血漿スフィンゴミエリンのいずれにおいても、C 26 : 0 / C 22 : 0 の有意な上昇を認め、グリセロリン脂質の脂肪酸組成には異常のないことが明らかとなった。スフィンゴシン塩基組成は、ALD, 対照いずれもC 18スフィンゲニンが主成分で、両者の間に差は認められなかった。以上の事実は、本疾患の生化学的異常は、スフィンゴリピドにおいて存在し、スフィンゴシン塩基部分には異常がなく、極長鎖脂肪酸の増加がその本質であると言える。この事実は、従来、脳白質 (4, 5, 12, 13), 副腎(4), 皮膚繊維芽細胞 (6, 7) で認められてきたものであるが、赤血球膜、血漿においても同様の変化があることが確認された。

以上の結果から、赤血球膜あるいは血漿中のスフィンゴリピドの脂肪酸分析による本疾患の生

化学的診断法が可能であることが明らかとなった。赤血球膜スフィンゴミエリンの脂肪酸分析によるALDの生化学的診断法を報告した後(15)、血漿の脂肪酸分析による生化学的診断法がMoserら(22)により報告されたが、今回の結果からMoserらの報告を確認することができた。その後、白血球においても極長鎖脂肪酸の増加を認めることがMolzerらにより報告された(23)。

また両親の分析結果から、母親のC26:0/C22:0の値が、ALDとコントロールの中間値を示し、父親のそれは異常のない事が明らかとなった。この事実は、Moserら(7)により報告されているが、本疾患が伴性遺伝性の疾患であることを裏付ける結果と考えられる。母親でC26:0/C22:0の値が、コントロールとALDの中間値を示すメカニズムは、次のように考えることができる。即ち、Lyonの仮説(24)によると、女性の体細胞は、XX染色体の片方が胎生早期にat randomに不活化される結果、母親由来のXを表現型に持つ細胞と、父親由来のXを表現型に持つ細胞のモザイクを形成している為と考えられる。事実、Migeonら(25)により、ALDのheterozygoteの培養皮膚繊維芽細胞では、極長鎖飽和脂肪酸の増加を認める細胞と、正常の細胞のモザイクであることが示されている。

一方、本疾患において、病変の存在する脳白質、副腎のみならず、赤血球膜、血漿、皮膚繊維芽細胞、培養筋細胞、白血球においても極長鎖脂肪酸の増加が認められ、しかもheterozygoteにおいても極長鎖脂肪酸の増加の認められることから、本疾患が、全身性の極長鎖脂肪酸の代謝異常症であり、極長鎖脂肪酸の代謝に関する何らかの酵素異常に基づく疾患であると考えられる。

この極長鎖脂肪酸の増加がどのようなメカニズムにより、脱髄や副腎不全をきたすかについては全く不明である。しかしながら、C25:0、C26:0といった極長鎖脂肪酸は全てスフィンゴリピドに含まれており、極長鎖脂肪酸の増加がミエリン等の膜構造を保つ上で何らかの障害を生じる可能性があるのではないかと考えられる。

第二章 Adrenoleukodystrophy 皮膚繊維芽細胞における

脂肪酸代謝の検討

第一章において、本疾患では赤血球膜スフィンゴミエリン、グロボシド、血漿スフィンゴミエリンの極長鎖飽和脂肪酸の有意の増加が認められ、本疾患の生化学的診断の可能なことを証明した。しかしながら、これらのスフィンゴリピドの脂肪酸組成の異常がどのようなメカニズムにより、あるいはどのような酵素の異常により生じるのかについては、十分な解明がなされていない。

一方、Kishimotoらは(26)、ALD末期患者に重水素でラベルしたC26:0-d₄を食事に加えて投与したところ、脳白質コレステロールエステルに取り込まれることを報告し、本疾患で増加する極長鎖脂肪酸の由来が、食事に含まれる外来性のものである可能性を指摘し、Brownらは(27)、食事のC26:0の含量を約1/10に減少させ、本疾患の食事療法を試みたが、臨床的にも改善は認められず、血漿中のC26:0の含量も減少しなかった。

従って、内在性のC26:0の合成系に関する研究は、本疾患における極長鎖脂肪酸の代謝を検討する上で重要であると考え、ALD皮膚繊維芽細胞におけるステアリン酸(C18:0)からの極長鎖脂肪酸の合成について検討した。

材料及び方法

^{14}C - ステアリン酸 - アルブミン溶液の調製 : Oginoらの方法 (28) に従い調製した [$^{18}\text{-}^{14}\text{C}$] - ステアリン酸アルブミン - PBS溶液1.5ml に, 10%牛胎児血清を含むEagle のMEM 溶液 13.5mlを加え培養液を調製した。ステアリン酸の最終濃度は61.3 μM (18.3mCi /mmole) で, ステアリン酸のradiochemical purityは以下に述べるラジオガスクロマトグラフィーでチェックした結果C18:0が97.1%, C17:0が2.9%であった。

^{14}C - ステアリン酸存在下での培養 : ALD 1例, AMN 1例及び対照 2例の皮膚繊維芽細胞 5×10^5 個を75cm²のフラスコに培養し, 上記 ^{14}C - ステアリン酸を含む培養液15mlを加え, 5% CO_2 存在下で37℃で7日間培養した後harvest し, Ogino らの方法 (28) に従い総脂質を抽出した。

分析 : 細胞内に取り込まれた放射活性は, 液体シンチレーションカウンターにより測定した。各脂質分画への取り込みは, 総脂質の一部を, 20×20cmのシリカゲルプレートにて, 第一の展開系として, クロロホルム-メタノール-酢酸-水 (25:15:4:2, 容比) を用いて, 10cm程展開し, 乾燥後, 第二の展開系としてn-ヘキサン-エチルエーテル-酢酸 (90:10:1, 容比) を用いて, 同じ方向に20cmまで展開した後, フルオログラフィー (29) により調べた。各脂質分画の放射活性を持つ脂肪酸の組成を調べる為に, シリカゲル薄層クロマトグラフィー (展開系 クロロホルム-メタノール-酢酸-水, 25:15:4:2, 容比) によりホスファチジルエタノールアミン, ホスファチジルセリン, ホスファチジルコリン, スフィンゴミエリンを分取し, さらにイアトロビーズカラムクロマトグラフィーにより精製単離した。得られた各脂質分画に, 2.5%塩酸メタノールを加え, 80℃10時間の反応でメタノリシスを行ない, n-ヘキサンで脂肪酸メチルエステルを抽出した。 ^{14}C でラベルされた脂肪酸メチルエステルの分析は, 島津GC5Aガスクロマトグラフ及びPackard Model 894 Proportional Counterを組み合わせたラジオガスクロマトグラフィーにより求めた。カラムは, 80-100メッシュのガスクロームQに, 液相として3%OV-1をコーティングしたものを用いた (30)。カラム温度は試料注入後3分間 190℃, 次いで 270℃まで毎分3℃の昇温を行った。

結 果

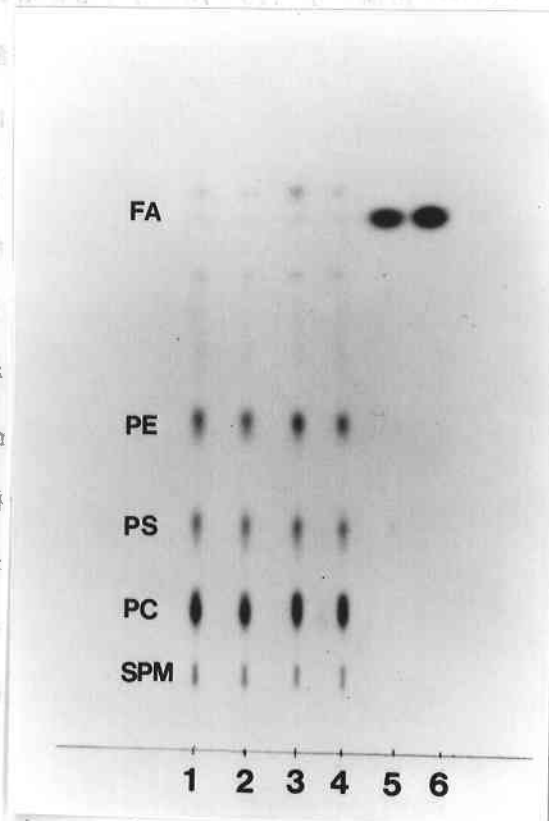
7日間培養後、コントロールの細胞では、当初加えた放射活性の18.9%、19.4%が、ALD、AMNの細胞ではそれぞれ9.4%、10.7%が、細胞内に認められた。

各脂質分画への取り込みは、Fig. 4に示す如く、殆どの放射活性が、ホスファチジルエタノールアミン (PE)、ホスファチジルセリン (PS)、ホスファチジルコリン (PC)、スフィンゴミエリン (SPM) のリン脂質に認められ、ALD、AMNの細胞とコントロールの細胞で、パターンに差は認められなかった。

Fig. 4. Fluorography of total lipids extracted from (1) control 1, (2) control 2, (3) ALD, and (4) AMN fibroblasts, and (5) culture medium.

Lane 6; authentic $[18-^{14}\text{C}]$ -stearic acid.

PE; phosphatidylethanolamine, PS; phosphatidylserine, PC; phosphatidylcholine, SPM; sphingomyelin



次に各リン脂質の ^{14}C でラベルされた脂肪酸の組成を、ラジオガスクロマトグラフィーで調べたところ、Table 6-9 に示すように、炭素数20よりも長い脂肪酸への鎖長延長は、コントロール、ALD、AMN の細胞とも、スフィンゴミエリンにおいてのみ認められ、グリセロリン脂質では炭素数16~18の脂肪酸のみが認められた。

グリセロリン脂質については、ALD、AMNにおいて、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルコリンに共通して、 $^{14}\text{C}-\text{C}18:0$ が多く、 $^{14}\text{C}-\text{C}18:1$ 、 $^{14}\text{C}-\text{C}16:0$ がやや少ない傾向を示した。

スフィンゴミエリンにおいては、対照、ALD、AMNともに炭素数16から24の ^{14}C でラベルされた脂肪酸が認められ、ALDにおいては $^{14}\text{C}-\text{C}26:0$ の合成も認められた。炭素数18より長鎖の ^{14}C でラベルされた脂肪酸は、炭素数20, 22, 24と偶数鎖の脂肪酸に多く認められること、及び不飽和脂肪酸の生成はわずかであることが示された。コントロールと比較して ALDでは $^{14}\text{C}-\text{C}24:0$ の含量が上昇していること、及び $^{14}\text{C}-\text{C}16:0$ の含量が少ないことが示された。

Table 6. Composition (%) of ^{14}C -labelled fatty acid of phosphatidylethanolamine 7 days after the culture in the medium containing ^{14}C -stearic acid.

	Control 1	Control 2	ALD	AMN
C16:0	4.3	7.0	3.6	3.7
C17:0	3.7	2.8	5.4	3.5
C18:0	60.4	57.9	63.3	78.7
C18:1	17.0	13.0	9.6	5.0
X1	14.6	19.3	18.0	9.1

Table 7. Composition (%) of ^{14}C -labelled fatty acid of phosphatidylserine after 7 days culture in the medium containing ^{14}C -stearic acid.

	Control 1	Control 2	ALD	AMN
16:0	4.0	3.5	2.2	3.1
17:0	2.5	2.2	2.3	2.8
18:0	87.4	89.2	93.9	91.3
18:1	6.1	5.1	1.6	2.8

Table 8. Composition (%) of ^{14}C -labelled fatty acid of phosphatidylcholine after 7 days culture in the medium containing ^{14}C -stearic acid.

	Control 1	Control 2	ALD	AMN
16:0	21.9	25.5	13.6	17.8
17:0	2.7	3.2	4.3	3.6
18:0	54.3	47.4	70.1	65.1
18:1	19.7	21.4	9.8	13.5
X1	1.4	0.0	2.3	0.0

Table 9. Composition (%) of ^{14}C -labelled fatty acid of sphingomyelin after 7 days culture in the medium containing ^{14}C -stearic acid.

	Control 1	Control 2	ALD	AMN
16:0	16.6	14.5	6.1	7.7
17:0	9.2	9.0	10.8	10.6
18:0	30.7	29.3	28.1	28.1
18:1	0.0	0.0	0.5	0.0
X1	0.0	0.0	1.7	0.0
19:0	0.0	0.0	1.9	0.0
20:0	4.3	6.1	2.4	3.0
22:0	22.0	21.5	18.3	20.2
23:0	0.4	0.0	1.0	0.0
24:0	15.1	17.4	27.4	28.7
24:1	1.8	2.1	1.1	1.8
26:0	0.0	0.0	0.9	0.0

考 察

第一章で明らかにした極長鎖脂肪酸の増加が、どのような脂肪酸代謝の異常による結果であるのか、特に極長鎖脂肪酸の合成系に関して、皮膚繊維芽細胞における ^{14}C -ステアリン酸 ($\text{C}18:0$) の代謝を検討した。この実験条件において、炭素数20よりも長鎖の脂肪酸への鎖長延長はスフィンゴミエリンにおいて認められ、偶数鎖の脂肪酸合成が主に認められ、奇数鎖の脂肪酸の合成は極くわずかであることから鎖長延長は、Murad ら (31) が報告している 2-carbon elongationによるものと考えられる。また、 $\text{C}24:0$ 、 $\text{C}26:0$ の生体内での合成については、ウサギ坐骨神経についての報告がある (32)。

ALD、AMNと対照を比較すると、スフィンゴミエリン中の ^{14}C - $\text{C}24:0$ の含量は対照の約 1.7 倍と高値を示し、さらに ALDでは $\text{C}26:0$ の合成も認められ、ALD、AMN において $\text{C}24:0$ 、 $\text{C}26:0$ の合成が上昇していることが示された。この事実が、 $\text{C}24:0$ 、 $\text{C}26:0$ の分解の障害によるのか、合成そのものが亢進している事によるのか、あるいはスフィンゴミエリンの脂肪酸組成を決めるメカニズムの異常によるのかについて、今回の実験結果から結論することはできないが、最近 Singhらにより、ALD皮膚繊維芽細胞で $[1-^{14}\text{C}]$ - $\text{C}24:0$ 、 $[1-^{14}\text{C}]$ - $\text{C}26:0$ からの $^{14}\text{CO}_2$ の生成が低下しているとの報告があり (33)、分解系の障害が存在する可能性が示唆されている。本実験系で、さらに研究を進めるには、pulse-chaseにより、それぞれの鎖長の脂肪酸のturn over を検討する必要があると考えられる。

一方、Kishimotoらは (26)、ALD末期患者に重水素でラベルした $\text{C}26:0\text{-d}_4$ を投与し、死亡後脳白質コレステロールエステルを分析した結果、 $\text{C}26:0\text{-d}_4$ がコレステロールエステルにとり込まれており、本疾患における極長鎖脂肪酸の増加が、食事由来の極長鎖脂肪酸の蓄積によるのではないかと仮説を示した。この結果から Brownらは (27)、食事メニューを工夫し、 $\text{C}26:0$ の含量を約 1/10に減少させ、本疾患の食事療法を試みたが、臨床的にも、血漿中の $\text{C}26:0$ の含量にも全く改善は認められなかったと報告している。また今回の実験結果から、対照ALD、AMNの細胞とともに、生体内に豊富に存在するステアリン酸から極長鎖脂肪酸の合成が行われ、ALD において、 $\text{C}24:0$ 、 $\text{C}26:0$ が対照よりも多量に合成されることが示された。以上の事実から、ALDにおける極長鎖脂肪酸の増加は、内在性の極長鎖脂肪酸合成が重要な部分を占めていると考えられる。

第三章 Adrenoleukodystrophy 及びその亜型 についての臨床医学的検討

従来 ALDの確定診断は剖検や生検によってのみ可能だったため、ALDの診断が困難で、ALDの詳細な臨床症状の調査は少なかった。そこで、第一章で確立した生化学的診断法により赤血球膜あるいは血漿スフィンゴリピドの極長鎖飽和脂肪酸の上昇を認めた20家系24例のALD及びその臨床亜型について、主として、遺伝性の面、臨床像につき、統計調査を行ない、合わせて検討するに足る臨床像の記載されている文献報告例についても検討を加えた。

方 法

統計調査：ALDあるいはその臨床亜型の生化学的診断は、第一章で述べた方法により、赤血球または血漿のスフィンゴリピド（グロボシド，スフィンゴミエリン）のC26：0 / C22：0を求め、有意の増加の認められるものとした。

24例中症例1，2が自験例，症例3－24は他施設の症例で，調査は，各施設に調査票を送り，各施設の主治医に記入していただき，回収後集計し検討を行った。

なお症例7（34），12（35），13（36），14（37），15（37），17（38），19（39），22（40），23（41），24（37）はそれぞれ詳細な症例報告がなされている。

病型の分類：Schaumburg ら(3)が報告した，小児期に発症し，数年以内に四肢麻痺，除皮質硬直状態に陥る典型的な1)小児型 (childhood) ALD の他に，主に成人例で多彩な神経症状を呈する亜型の存在が知られている。これらの中では，Griffin ら (14) によって報告された，家族性痙性対麻痺 (42) に類似の脊髄症状を呈する2) adrenomyeloneuropathy (AMN) がよく知られているが，それ以外に，多彩な脳白質の症状を呈する成人例が少数ながら知られている (8, 9, 14, 43, 44)。従って，本論文では，成人例をさらに2つの亜型に分け，2) myelopathy type (AMN)，3) leukodystrophy type として分類した。さらに，heterozygote と考えられる女性で軽度の痙性対麻痺等の神経症状を呈する例が知られており，これを Moser らの分類 (45) に従い，4) symptomatic heterozygote として，以上の4型について統計調査を行った。

結 果

1. 小児型 (Childhood) ALD : Table 10に11家系13例のまとめを示す。家系内発症の見られたのは3家系で、うち2家系は同胞発症があり、2家系は母方のイトコ同志の発症が見られた。患者は全て男児で家系内に女性の発症者は認められなかった。13例の調査時点での平均年齢は13.3才(7-24才)、発症年齢は平均9.1才(5-15才)で、調査時点で全員生存中で、平均罹病期間は4.2年であった。

神経症状の初発症状は視力低下が5例(38%)、歩行障害あるいは動作緩慢が4例(31%)、性格変化あるいは知能低下が4例(31%)と高頻度に認められた。その他の初発症状として、2例(15%)に聴力低下、1例(8%)に構音障害、1例(8%)にけいれん発作が見られた。末梢神経障害については、神経伝導速度測定あるいは神経生検により異常を認めた例は2例(15%)であった。臨床経過は、比較的進行の早い例が多く1-3年で四肢麻痺、除皮質状態、全く意思疎通のできない状態に陥っている。

副腎皮質機能に関しては、i)、血中コルチゾールが低値を示し、ステロイドの補充療法を必要とした症例は3例(23%)で、うち2例は神経症状の発現より3年前にAddison病の発症が認められている。ii)血中コルチゾールは正常でACTH刺激試験で副腎皮質機能低下が見出された症例が3例認められた。i)、ii)以外で皮膚色素沈着のみ指摘された症例が3例(23%)認められた。

文献的には、Schaumburgらの統計(3)では、発症年齢が平均7.8才(3-12才)で、報告例17例中死亡例16例の平均罹病期間は3.0年(11ヶ月-9年)であった。初発症状としては、知能低下、性格変化、行動異常を示す例が多く10例(59%)に認められた。視力低下を示した例は5例(29%)、歩行障害を示した例は4例(24%)と今回の調査結果よりもやや少ない傾向を示した。副腎機能については、6例35%が副腎不全症状を呈し、このうち2例が神経症状の出現に3-4年先立ってステロイドの補充療法を受けている。その他に4例が経過中に副腎皮質機能低下が見出されており、何らかの副腎皮質機能低下を認めた症例は合計10例(59%)であった。

Table 10. Clinical manifestations of childhood adrenoleukodystrophy

Case	Family history	Age	Sex	Age of onset	Duration	Pigmentation	Adrenal insufficiency	Initial symptoms
1	+, *	13	M	5	8	+	-	dysarthria
2	+, *	16	M	8	8	+	-	visual impairment
3	-	14	M	11	3	-	-	visual impairment
4	-	8	M	7	1	-	++	hearing impairment
5	+	12	M	11	1	+	-	character change
6	-	8	M	7	1	-	-	visual impairment, gait disturbance
7	-	15	M	8	7	+	++	character change
8	-	7	M	6	1	+	++	hearing impairment
9	+, *	16	M	10	6	-	-	gait disturbance, mental deterioration
10	+, *	10	M	7	3	-	+	visual impairment
11	+, *	10	M	9	1	-	-	seizure
12	-	20	M	14	6	+	+	mental deterioration, clumsiness, visual impairment
13	-	24	M	15	9	+	+	gait disturbance

* childhood ALD in pedigree

** + : subclinical adrenal insufficiency

++: clinically overt adrenal insufficiency

2. 成人例 myelopathy type (AMN) : Table 11 に示す如く、5家系6例が見出され、2家系では、同胞に myelopathy type (AMN) の症例が認められた。(症例14, 15及び17)。また症例16では、母方従弟に小児型 (childhood) ALD の症例が見られた。症例14-19は全て男子であるが、症例14, 15の母親は、軽度の錐体路徴候を示し、symptomatic heterozygoteと考えられ、症例24として Table 13 に示した。

6例の平均年齢は29.8才(19-40才)、発症年齢は平均23.3才(17-39才)、全員調査時点で生存例で、罹病期間は平均6.5年(1-18年)で、症例15のように18年と長期にわたる例も見出された。

神経症状の初発症状は全例痙性対麻痺による歩行障害であった。他の神経症状としては、何らかの知覚障害を伴う例が5例(83%)、このうち3例(50%)は、脊髄性の知覚レベルを認める知覚障害を呈した。臨床的に明らかな末梢神経症状を呈した例はなく、針筋電図、神経伝導速度の測定で軽度の異常を認めたものが2例(33%)、膀胱障害を伴うものが4例(67%)であった。

副腎皮質機能低下については、血中コルチゾールが低値を示し、ステロイドの補充療法を受けた症例が2例(33%)、血中コルチゾールは正常で ACTH 刺激試験で反応の低下を認めた例が2例(33%)であるが、逆に副腎機能に異常を認めない例も2例(33%)認められた。

文献的には、最初 Budka らより(46)、脳白質の症状を呈さず、Addison 症状を伴う痙性対麻痺を呈する ALD の成人亜型が存在することが報告され、次いで Griffin, Schaumburg らにより(14, 47) Adrenomyeloneuropathy (AMN) と命名され、ALD の亜型としての疾患概念が確立された。Griffin らの報告(14)を含め、確実に myelopathy type (AMN) と考えられ、検討に足る臨床像の記載されている14例(4, 48-55)について調べてみると、Table 11 に示すが如く、発症年齢は平均23.5才(17-33才)で、死亡例は2例で、12例の生存例の罹病期間は平均5.6年(2-21年)であった。また、死亡例の罹病期間はそれぞれ2年、11年であった。家系内発症の見られたものは14例中10例で、この内2家系内に小児型 (childhood) ALD の発症が認められた。神経症状の初発症状は全例歩行障害であり、全例に錐体路徴候が認められ、何らかの知覚障害が11例(79%)に認められ、このうち7例(50%)に脊髄性の知覚レベルを伴う知覚障害が認められた。臨床的に明らかな末梢神経症状が認められたものは3例(21%)に過ぎないが、針筋電図、神経伝導速度あるいは神経生検で異常を認めたものは11例(79%)

(79%) で あった。

副腎皮質機能低下については、血中コルチゾールが低値を示し、臨床的に明らかな副腎不全症状を呈した例が5例(36%)、ACTH の高値あるいは ACTH 刺激試験で機能低下を認めた例が5例(36%)で、合わせて72%の例に何らかの副腎機能低下が認められた。

Table 11. Clinical manifestations of myeloneuropathy type (AMN)

	Case 14	Case 15	Case 16	Case 17	Case 18	Case 19	in literature
Age, Sex	40, M	36, M	23, M	29, M	32, M	19, M	29.1 (19-41), M
Age of onset	39	18	21	22	23	17	23.5 (17-33)
Duration	1	18	2	7	9	2	5.6
Family history	+,*	+,*	+,**	+,*	-	-	10/14
Initial symptoms	gait disturbance	gait disturbance	gait disturbance	gait disturbance	gait disturbance	gait disturbance	gait disturbance
Pyramidal sign	+	+	+	+	+	+	14/14
Spinal sensory level	-	+	+	-	+	-	7/14
Sensory disturbance	+	+	+	-	+	+	11/14
Peripheral neuropathy							
clinically overt	-	-	-	-	-	-	3/14
subclinical	-	+	-	+	-	-	11/14
Disturbance of urination	-	+	-	-	+	+	10/14
Skin pigmentation	+	+	-	+	-	+	9/14
Adrenal insufficiency [#]	+	++	-	+	-	++	10/14

* myelopathy type (AMN) in siblings

** child hood ALD in pedigree

+ subclinical adrenal insufficiency

++ clinically overt adrenal insufficiency

3. 成人例 leukodystrophy type: Table 12 に示す如く、4家系4例が見出された。家系内発症例はなく、全例孤発例であった。患者は全て男子で年齢は平均41.0才(28-54才)、発症年齢は平均37.3才(22-52才)、全例生存例で罹病期間は平均3.8年(2-6年)であった。神経症状の初発症状は多彩で、歩行障害、痴呆、運動失調、聴力障害がそれぞれ1例ずつに見られた。他の神経症状として、症例20では、錐体路徴候、小脳失調、膀胱障害を伴っており、症例22では、錐体路徴候、アテトーゼ、四肢の dysesthesia、無抑制型神経因性膀胱を伴っていて、いずれの例でも CT スキャンで、橋、小脳半球の萎縮を認め、オリブ・橋・小脳萎縮症等の脊髓小脳変性症に類似した臨床像を呈した。症例21では4-5年痴呆等の精神症状で終始し、症例23は聴力低下で発症し、その他に右下1/4盲、錐体路徴候、両膝以下の表在知覚の低下を呈した。臨床的に明らかな末梢神経症状を呈した例はなく、神経伝導速度は3例で測定されており、1例のみ軽度の低下を認めた。

副腎皮質機能低下については、血中コルチゾールが低値を示し、Addison 症状を伴ない、ステロイドの補充療法を受けた例が1例(症例22)認められたが、この例では Addison 症状の出現は神経症状の出現より約20年先行していた。この症例以外の3例は、血中コルチゾールレベルは正常であるが全例 ACTH 刺激試験に対する反応性が低下していた。

文献的には、成人例で leukodystrophy type と分類でき、ある程度臨床像の記載されている例として8例見出すことができる(8, 9, 14, 43, 44)。発症年齢は平均27.1才(12-42才)、死亡例6例の平均罹病期間は7.7年(2-16年)。神経症状の初発症状は、筋力低下又は痙性麻痺が4例(50%)、視力低下が3例(38%)、性格変化、知能低下が2例(25%)、けいれん発作が2例(25%)、幻覚が1例(13%)に見られた。経過中に見られた症状あるいは所見は、痴呆が6例(75%)、けいれん発作が5例(63%)、視力障害が5例(63%)、運動失調は3例(38%)で指摘されているが、小脳性失調か後索性失調か必ずしも明確でない。錐体外路徴候を認めた例は1例もなく、錐体路徴候は6例(75%)で認められている。末梢神経障害については3例(25%)で認められており、1例で神経伝導速度の低下、1例で針筋電図で神経原性の異常を指摘されている。副腎皮質機能については、ステロイドの補充療法を必要とした例が6例(75%)、このうち2例は副腎不全の出現が、神経症状の発現より先行している。この他に、ACTH 刺激試験で反応性の低下を認めたものが1例認められ、合わせて7例(88%)に何らかの副腎皮質機能低下が認められた。

Table 12. Clinical manifestations of adult onset leukodystrophy type

	Case 20	Case 21	Case 22	Case 23	in literature
Age, Sex	28, M	37, M	54, M	45, M	35.8 (22-46)
Age of onset	22	32	52	43	27.1 (12-42)
Duration	6	5	2	2	7.7 (2-16)
Family history					1/8
Initial symptoms	gait disturbance	dementia	ataxia	Hearing impairment	motor weakness 4/8 visual disturbances 3/8 Character change 2/8 seizure 2/8 hallucination 1/8
Dementia	-	+	-	-	6/8
Seizure	-	-	-	-	5/8
Visual impairment	-	-	-	+	5/8
Hearing impairment	-	-	-	+	1/8
Cerebellar sign	+	-	+	-	3/8
Extrapyramidal sign	-	-	+	-	0/8
Pyramidal sign	+	+	+	+	6/8
Sensory disturbance	-	-	+	+	3/8
Peripheral neuropathy	-	?	-	-	3/8
clinically overt	-	-	-	-	?1/8
subclinical	-	?	+	-	3/8
Disturbance of urination	-	+	+	-	1/8
Skin pigmentation [#]	-	+	+	+	5/8
Adrenal insufficiency [*]	+	+	++	+	7/8

onset of skin pigmentation is represented in parentheses

* + : subclinical adrenal insufficiency

++: clinically overt adrenal insufficiency

4. symptomatic heterozygote: Table 13 に symptomatic heterozygote と考えられる症例24の概要を示す。この症例は、myelopathy type (AMN) と分類した症例14, 15の母親である。72才の女性で36才の頃より難聴があり、60才より徐々に歩行障害が出現した。神経学的には錐体路徴候と、混合性難聴を示した。副腎機能には異常を認めなかった。

文献的には、ALD の家系内に女性で軽度の痙性対麻痺等の神経症状を示す例が記載されているものが散見されるが (53, 54-56), 十分な記載のあるものは少ない。O'Neill らの報告 (53) の中で紹介されている7例では発症年齢は4-41才とばらつきが大きく、痙性対麻痺による歩行障害が主症状で、1例では脊髄性の知覚レベルを持つ知覚障害を示している。末梢神経伝導速度の低下が1例で記載されており、副腎機能は全て正常であった。

Table 13. Clinical manifestations of symptomatic heterozygotes (53)

	Case 24	In literature
Age, Sex	72, F	4-59, F
Age of onset	60	variable,*
Duration	12	variable,*
Family history	Mother of case 14,15	+
Initial symptoms	gait disturbance	gait disturbance disturbance of urination
Pyramidal sign	+	7/7
Sensory disturbance	-	3/7
Spinal sensory level	-	1/7
Peripheral neuropathy	-	1/7
Disturbance of urination	-	4/7
Skin pigmentation	+	0/7
Adrenal insufficiency	-	0/7

* details not described

考 察

今回統計調査を行った本邦における小児型 (childhood) ALDの臨床像を要約すると次のようになる。 5 - 15才の男児に発症し、視力低下、性格変化あるいは知能低下、歩行障害等で発症し、数年の経過で四肢麻痺、除皮質状態で全く意思の疎通のできない状態に陥る。末梢神経障害を伴う例は殆どなく、46%に副腎皮質機能低下を認めるが、ステロイドの補充療法を必要とする場合は少ないが (23%) その際には、副腎不全症状が神経症状の出現より先立つ事が多い。

以上の臨床像を Schaumburg ら (3) の統計と比較検討すると、本邦例では、1) 軽度のもも含めて副腎皮質機能低下を示す例が46%とやや少ない。2) 罹病期間が平均 4.2年で、しかもこれらは全て生存例であり、中に8年以上経過している例が3例認められ、従来言われているより生存期間が長い例が多い 等の点が明らかになった。これらの点を除けば、発症年齢、神経症状、臨床経過等、ほぼ従来からの報告と一致するものであった。

myelopathy type (AMN) と分類した本邦の6例の臨床像を要約すると以下のようになる。

主として20代で発症し初発症状は全て痙性対麻痺による歩行障害である。さらに約80%の症例に何らかの下肢の知覚障害を認め、約50%の症例にはっきりした脊髄性の知覚レベルを伴う知覚障害が出現する。約30%の症例で、針筋電図、神経伝導速度の異常が認められ、約70%の症例に膀胱障害を認める。副腎皮質機能低下は、小児型 (childhood) ALD と対照的に約70%と高率に認められるが、血中コルチゾールが低値を示しステロイドの補充療法を必要とするのは約30%に過ぎない。

文献例と比較してみても、subclinical なものを含めて末梢神経障害の合併率がやや低い点を除けば、発症年齢、罹病期間、神経症状、臨床経過、副腎不全の合併率等ほぼ同様である。

この myelopathy type (AMN) は、臨床症状が家族性痙性対麻痺 (42) のそれに似ている為に、臨床的には両者の鑑別が重要になってくる。Griffin らによっても指摘されているが (14) 、1) AMN では20代で比較的急性に症状が出現し、2) 知覚障害を伴う例が多く (80%) 、約半数に脊髄性の知覚レベルを認める。3) 臨床的に明らかな末梢神経障害を呈するものは少ないが、針筋電図、神経伝導速度の軽度の異常を認める例が多い 等の点が鑑別上重要である。また、逆に、副腎不全を全く認めない例や、錐体路徴候のみで他の神経症状を伴わない例も少数

ながら存在し注意を要する。

成人例 leukodystrophy type と診断した4例の要約は次のとおりである。

myelopathy type (AMN) と比較して、発症がやや遅く20~50代であり、神経症状の初発症状は多彩で、痴呆、聴力障害、運動失調等の脳白質の障害によると考えられる症状を呈する例が見出された。他の神経症状としては、錐体路徴候は全例に認められるが、小脳失調を呈し脊髄小脳変性症と類似の症例も認められる。末梢神経伝導速度の低下が一例に認められ、何らかの副腎皮質機能低下は全例に認められる。

文献報告例(8, 9, 14, 43, 44)と比較してみると、発症年齢はほぼ同様であるが、神経症状の初発症状は多彩をきわめ、視力低下、けいれん発作、性格変化、知能低下、痙性麻痺、幻覚等が見出される。末梢神経障害の合併率は文献例でも多くなく25%であった。副腎不全の合併率も88%とほぼ同様に高率に認められている。

symptomatic heterozygote は今回の調査では1例のみ認められたが、文献上でも発症者の報告は極めて少く、heterozygote の中での発症率は非常に低いと考えられる。その臨床像は主として中年以後に軽度の痙性対麻痺で発症し、他の神経症状はあまり合併せず、進行は緩徐で、成人男子にみられる myelopathy type (AMN) と比較しても軽症例が多く、副腎機能にも異常を認めない。

以上の4つの臨床型のまとめをTable 14に示す。

Table 14. Clinical manifestations of adrenoleukodystrophy and its clinical variants in Japan

Childhood ALD			Adult onset		symptomatic heterozygote
myelopathy type		leukodystrophy type			
Sex	male	male	male	female	
Age of onset	5-15	3rd decade	3rd-6th decade	60.	
Severity, course	severe, subacute	moderate, chronic	moderate to severe, chronic	mild, chronic	
Neurological symptoms	visual impairment,	spastic paraparesis,	variable;	spastic paraparesis	
	character change,	sensory loss,	dementia		
	mental deterioration,	disturbance of	hearing impairment		
	gait disturbance	urination	visual impairment		
Adrenal insufficiency			ataxia		
			pyramidal sign		
	40 % (mild-severe)	70 % (mild-severe)	100 % (mild-severe)	normal function	

ALD の臨床型の分類については、最近の Moser らの報告 (45) によると、彼らは、4つの亜型に分け 1) neonatal ALD, 2) childhood ALD 3) AMN 4) symptomatic heterozygote という分類をしている。

neonatal ALDは、Ulrich (57) は、Manz (58), Benke (59), Jaffe (60) らの報告があるが、今回の調査では、neonatal ALD は本邦では見出されず、今回の検討からはずした。

今回の調査で明らかとなった点は、小児型 (childhood) ALD, symptomatic heterozygote については、従来の文献例と比較して、ほぼ同様と考えてよいが、成人例については、主に脊髄症状を呈する myelopathy type (AMN) と、脳白質の症状を主症状とする leukodystrophy type が存在し、成人例の ALDを、この2つの亜型に分類することが、臨床上重要であるという点である。

すなわち、leukodystrophy type の特徴として、1) 神経症状の発症は平均37.3才と myelopathy type (AMN) よりも、さらに高齢の発症者が多いこと 2) 神経症状の初発症状が多様な脳白質の症状を呈し、myelopathy type (AMN) のように痙性対麻痺で発症することは少く、症例20, 22のように、オリブ・橋・小脳萎縮症に類似する症例も存在する 3) 副腎不全の合併率は myelopathy type (AMN) と同様かそれ以上に高率である 4) 小児型 (childhood) ALDと比較して慢性の経過をとる例が多い等の点を挙げることができる。

臨床経過から見ても、myelopathy type (AMN) は、脊髄症状、末梢神経症状で終始することが多く、leukodystrophy type とのoverlap も少ないと考えられ、成人例を従来から言われている AMN (myelopathy type) ともう一つの亜型として leukodystrophy type とに分類することが臨床的に見て有用であると考えられる。

もちろん、症例15, 19や Marsden らの報告例 (44) のように発症年齢が10代で、小児型 (childhood) ALD と overlapする症例も認められ、GriffinらのAMN としての報告例の中に、痙性対麻痺で発症し、後に小脳失調や痴呆の出現を見た症例もあり分類の困難な症例も存在する。また、同一家系内に小児型 (childhood) ALD, adult leukodystrophy type, myelopathy typeの発症が認められることから、遺伝的な面から見て、これらは同一の遺伝的な異常に基づいていると考えられ、ここで議論している臨床型の分類が、遺伝的に規定されるものではないらしい等の理由により、あまりに厳密な分類や議論を行うことは意味がないと思われるが、従来強調されることの少なかった、成人例で myelopathy type (AMN) でなく、脳白質の症状

を主症状とする亜型を leukodystrophy type という概念で分離することは重要であると考えた。

ALD の亜型に関する言葉としては、O'Neillらにより、adrenoleukomyeloneuropathy (ALMN) という概念が提唱されたが (53), O'Neillらの原著によると、ALD と AMN の疾患の総称名として ALMN という表現を提唱したのであって、彼らは ALMN という言葉を、ここで著者が主張するところの leukodystrophy type に相当する臨床型として用いたのではない。ただ、その後この ALMN という言葉を、脳白質、脊髄、末梢神経障害の病変を合わせ持つ臨床型として Marsden らが用いており、ことばの用法に混乱が見られる。このような点から、ALMN という定義のあいまいな表現は避けるべきと思われる。成人で発症する代謝性神経疾患が小児期発症のものに比較して、全く異なる症状を呈し、しかも従来変性性神経疾患とされてきた疾患と同様の臨床像を呈する事が最近見出されつつある。ジストニア、パーキンソンニズムを呈する GM1 ガングリオシドーシス (61, 62), Friedreich病に類似する GM2 ガングリオシドーシス (63), Ramsey Hunt 症候群を呈するシアリドーシス (64) 等がそうであり、ALDにおいても、家族性痙性対麻痺に類似する myelopathy type (AMN) の存在が見出され、Probstらは、脱髄性疾患であるにもかかわらず、系統的なニューロンの変性と似た病変分布を示すことに対し、pseudosystematic involvement という表現を用いている (50)。

次に遺伝的な面からは、ALD のそれぞれの臨床亜型が遺伝的に見て同一の疾患かどうかという点が問題となる。家系調査からは、myelopathy type (AMN) の症例16の家系内に小児型 (childhood) ALD の発症が見られ、文献的に見ても、myelopathy type (AMN) の家系内に小児型 (childhood) ALD の発症が見られたものが2家系 (49, 50) 成人の leukodystrophy type の一家系にも小児型 (childhood) ALD の発症が見られ、遺伝的な面からはこの三者はおそらくは、同一の遺伝的な異常に基づく疾患と考えてよいように思われる。赤血球膜、血漿スフィンゴリピドの分析結果においても、三者同様の結果が得られている。

heterozygote と考えられる女性で、軽度の痙性対麻痺の認められる例が存在し、このような例を Moserらは symptomatic heterozygote と呼んでいる (45)。これは第一章でも議論したとおり、女性におけるX染色体は、片方が胎性早期に at random に不活性化された (24) 結果、父親由来のXを表現型に持つ細胞と、母親由来のXを表現型に持つ細胞のモザイクになっていると考えられ、この為に、軽症ながら発症者が出現するものと思われる。

副腎皮質機能低下については、本邦例の統計では小児型 (childhood) ALD 46%, 成人例

myelopathy type (AMN) 70%, 成人例 leukodystrophy type 100 % と成人例で高率に認められるが、いずれの場合も、血中コルチゾールが低値を示し、ステロイドの補充療法を要する例はむしろ少なく、ACTH 刺激試験で初めて機能低下が証明される例が多いことに注目すべきである。また、成人例で副腎不全の合併率が多いことは、文献的にも同様であるが、これは成人例の多くが副腎不全を手がかりに見出されていることが多く、実際には、副腎不全の合併しない例が、さらに多く見出される可能性も考えられ、生化学診断の容易になった現在、副腎不全の有無にとらわれることなく、本疾患の可能性を考えることが必要であると考えられる。

その他の内分泌異常として、特に AMN で、testosterone の低値、LH の高値等、hypogonadism に相当する所見が指摘されているが、今回の調査で十分なデータが得られなかった為に割愛した。

結 語

赤血球膜スフィンゴミエリン、グロボシド、血漿スフィンゴミエリンの各スフィンゴリピドの脂肪酸組成をキャピラリーカラムガスクロマトグラフィー化学イオン化マスフラグメントグラフィーにより測定し、ALD、AMN患者で、C26:0/C22:0の有意な上昇を認め、生化学的診断の可能な事を証明した。またスフィンゴミエリンのスフィンゴシン塩基組成及びグリセロリン脂質の脂肪酸組成には異常は認められなかった。heterozygoteと考えられる母親において、C26:0/C22:0の値がALDとコントロールの中間の値を示し、これは、Lyonの仮説に従い母親由来のX染色体と父親由来のX染色体がat randomに不活化された結果であると考えられた。

培養皮膚繊維芽細胞における、 ^{14}C -ステアリン酸からの極長鎖脂肪酸への合成を調べ、脂肪酸の鎖長延長は主に2-carbon elongationで行われ、炭素数20以上の脂肪酸はスフィンゴミエリンに認められること、及びALDにおいて ^{14}C -C24:0、 ^{14}C -C26:0が高値であることを明らかにしたが、この結果が分解系の障害によるのか、鎖長延長そのものが亢進しているのかについては結論できなかった。しかしながら、この実験結果と、食事中的C26:0を制限しても、血漿中のC26:0の減少が見られなかったという報告を合わせて考えてみると、ALDにおける極長鎖脂肪酸の増加には、内在性のC26:0の合成が重要な部分を占めていると考えられた。

上記の生化学的診断法により、本邦のALDあるいはその臨床亜型24例の診断を行ない、これらの症例の臨床医学的検討を行った。その結果、成人発症例の中に、臨床像を異にする2つの亜型が存在し、1つは従来より知られているmyelopathy type (AMN)であるが、この他に、20-50代の男子に発症し、多彩な脳白質の症状を呈するものをleukodystrophy typeとして新たな分類を行うことが重要であると考えられた。

謝 辞

本研究を遂行し本論文をまとめるにあたり、御指導御鞭撻をいただきました東京大学医学部教授永井克孝先生、新潟大学脳研教授宮武正先生、東京都臨床医学総合研究所有賀敏夫博士、鈴木寛先生、の諸先生方に心から感謝の意を表します。

また本研究に終始協力していただきました東京都臨床医学総合研究所河村（旧姓佐野）友乃氏、関根美知子氏に厚く感謝申し上げます。

更に、統計調査に御協力いただきました、国立小児病院二瓶健治先生、内藤春子先生、国立栃木病院田中久夫先生、阿部 隆先生、北海道大学脳神経外科緒方昭彦先生、九州大学神経内科田平 武先生、鈴木 聡先生、国立療養所沖縄病院川平 稔先生、仲本聰子先生、大阪小児市立保健センター近藤琢磨先生、鹿児島大学第三内科栗山 勝先生、群山達男先生、井手正美先生、住友病院神経内科宮崎元滋先生、名古屋大学第一内科錫村明生先生、衣斐 達先生、東北大学脳神経内科高瀬貞夫先生、円谷健治先生、川島孝一郎先生、弘前大学第三内科松永宗雄先生、成田祥耕先生、東京大学第四内科山本通子先生、新潟大学脳研神経内科土田英夫先生、大野 司先生、群馬大学第二内科吉田忠義先生の諸先生方に感謝申し上げます。

REFERENCES

1. Siemerling, E., und Creutzfeldt, H.G. : Bronzenkrankheit und sklerosierende Encephalomyelitis. Arch. Psychiatr. Nervenkr. 68 : 217-244, 1923
2. Schaumburg, H.H., Richardson, E.P., Johnson, P.C., Cohen, R.B., Powers, J.M. and Raine, C.S. : Schilder's disease. Sex-linked recessive transmission with specific adrenal changes. Arch. Neurol. 27 : 458-460, 1972
3. Schaumburg, H.H., Powers, J.M., Raine, C.S., Suzuki, K., and Richardson, E.P. : Adrenoleukodystrophy. A clinical and pathological study of 17 cases. Arch. Neurol. 32 : 577-591, 1975
4. Igarashi, M., Schaumburg, H.H., Powers, J., Kishimoto, Y., Kolodny, E. and Suzuki, K. : Fatty acid abnormality in adrenoleukodystrophy. J. Neurochem. 26 : 851-860, 1976
5. Igarashi, M., Belchis, D. and Suzuki, K. : Brain gangliosides in adrenoleukodystrophy. J. Neurochem. 27, 327-328, 1976
6. Kawamura, N., Moser, A.B., Moser, H.W., Ogino, T., Suzuki, K., Schaumburg, H., Milunsky, A., Murphy, J. and Kishimoto, Y. : High concentration of hexacosanoate in cultured skin fibroblast lipids from adrenoleukodystrophy patients. Biochem. Biophys. Res. Commun. 82 : 114-120, 1978
7. Moser, H.W., Moser, A.B., Kawamura, N., Murphy, J., Suzuki, K., Schaumburg, H. and Kishimoto, Y. : Adrenoleukodystrophy : Elevated C26 fatty acid in cultured skin fibroblasts. Ann. Neurol. 7 : 542-549, 1980
8. Case records of the Massachusetts General Hospital : Case 18-1979. New Engl. J. Med. 300 : 1037-1045, 1979
9. Weiss, G.M., Nelson, R.L., O'Neill, B.P., Carney, J.A. and Edis, A.J. : Use of adrenal biopsy diagnosing adrenoleukomyeloneuropathy. Arch. Neurol. 37 : 634-636, 1980
10. Martin, J.J., Ceuterick, C., Martin, L. and Libert, J. : Skin and conjunctival biopsies in adrenoleukodystrophy. Acta Neuropathol. 38 : 247-250, 1977

11. Martin, J.J., Ceuterick, C. and Libert, J. : Skin and conjunctival nerve biopsies in adrenoleukodystrophy and its variants. *Ann. Neurol.* 8 : 291-295, 1980
12. Miyatake, T., Ariga, T., Atsumi, T. and Komiya, Y. : Biochemical study on myelin in adrenoleukodystrophy. *Adv. Exptl. Med. Biol.* 100 : 585-599, 1978
13. Ramesey, R.B., Banik, N.L., Scott, T. and Davison, A.N. : Neurochemical findings in adrenoleukodystrophy. *J. Neurol. Sci.* 29 : 277-294, 1976
14. Griffin, J.W., Goren, E., Schaumburg, H., Engel, W.K. and Loriaux, L. :
Adrenomyeloneuropathy : A probable variant of adrenoleukodystrophy. 1. Clinical and endocrinologic aspects. *Neurol.* 27 : 1107-1113, 1977
15. Tsuji, S., Suzuki, M., Ariga, T., Sekine, M., Kuriyama, M. and Miyatake, T. :
Abnormality of long-chain fatty acids in erythrocyte membrane sphingomyelin from patients with adrenoleukodystrophy. *J. Neurochem.* 36 : 1046-1049 , 1981
16. Dodge, J.T., Mitchell, C. and Hanahan, D.J. : The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 100 : 119-130, 1963
17. Tsuji, S., Suzuki, M., Sano, T., Ariga, T. and Miyatake, T. : Abnormality of very long-chain fatty acids in erythrocyte membrane and plasma, and increased synthesis of these fatty acids by cultured skin fibroblasts in adrenoleukodystrophy and adrenomyeloneuropathy. *International symposium on leucodystrophy and allied diseases.* pp 247-253, 1981
18. Bligh, E.G. and Dyer, W.J. : A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37 : 911-917, 1959
19. Van den Berg, P.M.J. and Cox, T.P.H. : An all-glass solid sampling device for open tubular columns in gas chromatography. *Chromatographia* 5 : 301-305, 1972
20. Carter, H.E. and Gaver, R.C. : Improved reagent for trimethylsilylation of sphingolipid bases. *J. Lipid Res.* 8 : 391-395, 1967
21. Askanas, V., McLaughlin, J., Engel, W.K. and Adornato, B.T. : Abnormality in cultured muscle and peripheral nerve of a patient with adrenomyeloneuropathy. *New Engl. J. Med.*

301 : 588-590, 1979

22. Moser, H.W., Moser, A.B., Frayer, K.K., Chen, W., Schulman, J.D., O'Neill, B.P. and Kishimoto, Y. : Adrenoleukodystrophy : Increased plasma content of saturated very long chain fatty acids. *Neurology* 31 : 1241-1249, 1981
23. Molzer, B., Bernheimer, H., Heller, R., Toifl, K. and Vetterlein, M. : Detection of adrenoleukodystrophy by increased C26 : 0 fatty acid levels in leukocytes. *Clin. Chim. Acta.* 125 : 299-305, 1982
24. Lyon, M.F., Sex chromatin and gene action in the mammalian X chromosome. *Am. J. Hum. Genet.* 14 : 135-148, 1962
25. Migeon, B. R., Moser, H.W., Moser, A.B., Axelman, J., Sillence, D. and Norum, R.A. : Adrenoleukodystrophy : Evidence for X linkage, inactivation, and selection favoring the mutant allele in heterozygous cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78 : 5066-5070, 1981
26. Kishimoto, Y., Moser, H.W., Kawamura, N., Platt, M., Pallante, S.L. and Fenselau, C. : Adrenoleukodystrophy : Evidence that abnormal very long chain fatty acids of brain cholesterol esters are of exogenous origin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 96 : 69-76, 1980
27. Brown III, F.R., Van Duyn, M.A.S., Moser, A.B., Schulman, J.D., Rizzo, W.B., Snyder, R.D., Murphy, J.V., Kamoshita, S., Migeon, C.J. and Moser, H.W. : Adrenoleukodystrophy : Effects of dietary restriction of very long chain fatty acids and of administration of carnitine and clofibrate on clinical status and plasma fatty acids. *Johns Hopkins Med. J.* 151 : 164-172, 1982
28. Ogino, T., Schaumburg, H.H., Suzuki, K., Kishimoto, Y. and Moser, A.B. : Metabolic studies of adrenoleukodystrophy. *Adv. Exp. Med. Biol.* 100 : 601-619, 1978
29. Randerath, K. : An evaluation of film detection methods for weak β -emitters, particularly tritium. *Anal. Biochem.* 34 : 188-205, 1970
30. Tsuji, S., Sano, T., Ariga, T. and Miyatake, T. : Increased synthesis of hexacosanoic acid (C26 : 0) by cultured skin fibroblasts from patients with adrenoleukodystrophy (ALD) and adrenomyeloneuropathy (AMN) . *J. Biochem.* 90 : 1233-1236, 1981

31. Murad, S. and Kishimoto, Y. : Chain elongation of fatty acid in brain: A comparison of mitochondrial and microsomal enzyme activities. Arch. Biochem. Biophys. 185: 300-306, 1978
32. Cassagne, C., Darriet, D. and Bourre, J. M. : Biosynthesis of very long chain fatty acids by the sciatic nerve of the rabbit. FEBS Lett. 90: 336-340, 1978
33. Singh, I., Moser, H. W., Moser, A. B. and kishimoto, Y. : Adrenoleukodystrophy: Impaired oxidation of long chain fatty acids in cultured skin fibroblasts and adrenal cortex. Biochem. Biophys. Res. Commun. 102: 1223-1229, 1981
34. 仲本聰子, 仲村佳久, 川平稔, 馬場泰光: Adrenoleukodystrophyと思われる一例について. 国療沖縄病院医学雑誌 2: 47-51, 1981
35. 上田高司, 中村重信, 宮崎元滋: Adrenoleukodystrophyにおける血中遊離脂肪酸分析. 神経内科 9: 492-494, 1978
36. 井出正美, 片岡明美, 群山達男, 納光弘, 井形昭弘: Adrenoleukodystrophyの臨床的, 内分泌学的新知見 —— 頻回の欠伸(あくび)と血中ACTH高値, 脳内石灰沈着と副甲状腺機能低下を伴ったAdrenoleukodystrophyの一例 —— . 臨床神経 22: 112-119, 1982
37. 衣斐達, 松岡幸彦, 祖父江逸郎, 松井務, 辻省次: Adrenoleukodystrophy —— 同胞2症例と産性対麻痺を呈した母親についての検討 —— 臨床神経 22: 980-985, 1982
38. 成田祥耕, 松永宗雄, 武部和夫, 田村豊一, 吉村教皐: Adrenomyeloneuropathy (Adrenoleukodystrophy variant) の兄弟例. 臨床神経 21: 872-878, 1981
39. 錫村明生, 祖父江元, 高柳哲也, 祖父江逸郎: 若年型 Adrenoleukodystrophy の1例. 臨床神経 22: 24-29, 1982
40. 土田秀夫, 大野司, 福原信義, 湯浅龍彦, 宮武正: オリーブ橋小脳萎縮症の臨床経過をとった adrenoleukodystrophy (ALD) の一例. 臨床神経 (印刷中)
41. 吉田忠義, 小野善平, 高山嘉郎, 鈴木忠, 柳沢英雄: 色素沈着, 末梢性ニューロパチー, 視力障害及び聴力障害を主徴とした adrenoleukomyeloneuropathy (ALMN) の一症例. 臨床神経 22: 343-350, 1982
42. Behan W.M.H. and Maia, M. : Strümpell's familial spastic paraplegia : genetics and

- neuropathology. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr. 37 : 8-20, 1974
43. Powers, J.M. and Schaumburg, H.H. : A fatal cause of sexual inadequacy in men : Adrenoleukodystrophy. J. Urol. 124 : 583-585, 1980
 44. Marsden, C.D., Obeso, J.A. and Lang, A.E. : Adrenoleukodystrophy presenting as spinocerebellar degeneration. Neurol. 32 : 1031-1032, 1982
 45. Moser, H.W., Moser, A.B., Kawamura, N., Migeon, B., O'Neill, B.P., Fenselau, C. and Kishimoto, Y. : Adrenoleukodystrophy : Studies of the phenotype, genetics and biochemistry. Johns Hopkins Med. J. 147 : 217-224, 1980
 46. Budka, H., Sluga, E. Heiss, W.D. : Spastic paraplegia associated with Addison's disease : Adult variant of adreno-leukodystrophy. J. Neurol. 213 : 237-250, 1976
 47. Schaumburg, H.H., Powers, J.M., Raine, C.S., Spencer, P.S., Griffin, J.W., Prineas, J.W. and Boehme, D.M. : Adrenomyeloneuropathy : A probable variant of adrenoleukodystrophy. II. General pathologic, neuropathologic, and biochemical aspects. Neurol. 27 : 1114-1119, 1977
 48. Davis, L.E., Snyder, R.D., Orth, D.N., Nicholson, W.E., Kornfeld, M. and Seelinger, D.F. : Adrenoleukodystrophy and adrenomyeloneuropathy associated with partial adrenal insufficiency in three generations of a kindred. Am. J. Med. 66 : 342-347, 1979
 49. Martin, J.J., Dompas, B., Ceuterick, C. and Jacobs, K. : Adrenomyeloneuropathy and adrenoleukodystrophy in two brothers. Eur. Neurol. 19 : 281-287, 1980
 50. Probst, A., Ulrich, J., Heitz, Ph., U. and Herschkowitz, N. : Adrenomyeloneuropathy. A protracted, pseudosystematic variant of adrenoleukodystrophy. Acta Neuropathol. 49 : 105-115, 1980
 51. Molzer, B., Bernheimer, H., Budka, H., Pilz, P. and Toifl, K. : Accumulation of very long chain fatty acids is common to 3 variants of adrenoleukodystrophy (ALD). "Classical" ALD, atypical ALD (female patient) and adrenomyeloneuropathy. J. Neurol. Sci. 51 : 301-310, 1981
 52. Julien, J., Vallat, J.M., Vital, C., Lagueny, A., Ferrer, X. and Darriet, D. : Adrenomyeloneuropathy : Demonstration of inclusions at the level of the peripheral

- nerve. Eur. Neurol. 20 : 367-373, 1981
53. O'Neill, B.P., Marmion, L.C. and Feringa, E.R. : The adrenoleukomyeloneuropathy complex : Expression in four generations. Neurology 31 : 151-156, 1981
 54. O'Neill, B.P., Moser, H.W. and Marmion, L.C. : Adrenoleukodystrophy : Elevated C26 fatty acid in cultured skin fibroblasts and correlation with disease expression in three generations of a kindred. Neurol. 32 : 540-542, 1982
 55. Martin, J.J., Lowenthal, A., Ceuterick, C. and Gacoms, H. : Adrenomyeloneuropathy. A report of two families. J. Neurol. 226 : 221-232, 1982
 56. O'Neill, B.P., Moser, H.W. and Saxena, K.M. : Familial X-linked Addison disease as an expression of adrenoleukodystrophy (ALD) : Elevated C26 Fatty acid in cultured skin fibroblasts. Neurol. 32 : 543-547, 1982
 57. Ulrich, J., Herschkowitz, N., Heitz, Ph., Sigrist, Th. and Baerlocher, P. : Adrenoleukodystrophy. Preliminary report of a congenital case. Light- and electron microscopical, immunohistochemical and biochemical findings. Acta Neuropathol. 43 : 77-83, 1978
 58. Manz, H. J., Schuelein, M., McCullough, D.C., Kishimoto, Y. and Eiben, R.M. : New phenotypic variant of adrenoleukodystrophy. Pathologic, ultrastructural, and biochemical study in two brothers. J. Neurol. Sci. 45 : 245-260, 1980
 59. Benke, P. J., Reyes, P.F. and Parker, Jr, J.C. : New form of adrenoleukodystrophy. Hum. Genet. 58 : 204-208, 1981
 60. Jaffe, R., Crumrine, P., Hashida, Y. and Moser, H.W. : Neonatal adrenoleukodystrophy. Clinical, pathologic, and biochemical delineation of a syndrome affecting both males and females. Am. J. Pathol. 108 : 100-111, 1982
 61. Goldman, J.E., Katz, D., Rapin, I., Purpura, D.P. and Suzuki, K. : Chronic G_{M1} gangliosidosis presenting as dystonia : I. Clinical and pathological features. Ann. Neurol. 9 : 465-475, 1981
 62. 大田恵子, 辻省次, 渥美哲至, 水野美邦, 宮武正 : type III (成人型) G_{M1} ガングリオシドーシスに関する臨床ならびに生化学的研究. 臨床神経23 : 191-198, 1983

63. Rapin, I., Suzuki, K., Suzuki, K. and Valsamis, M.P. : Adult (chronic) G_{M2} gangliosidosis. Atypical spinocerebellar degeneration in a Jewish sibship. Arch. Neurol. 33 : 120-130, 1976
64. Miyatake, T., Atsumi, T., Obayashi, T., Mizuno, Y., Ando, S., Ariga, T., Matsui-Nakamura, K. and Yamada, T. : Adult type neuronal storage disease with neuraminidase deficiency. Ann. Neurol. 6 : 232-244, 1979