

탠덤매스에 의한 체액 중 Globotriaacylceramide(Gb-3)의 측정을 이용한 한국인 고 위험도군에서의 파브리병 스크리닝

윤 혜 란[#]

덕성여자대학교 약학대학 생의약 분석실

(Received December 17, 2010; Revised February 3, 2011; Accepted February 9, 2011)

Status of High Risk Group Fabry Disease Screening in Korea by Measuring Globotriaacylceramide in Body Fluid using Electrospray-MS/MS

Hye-Ran Yoon[#]

Dept. of Biomedical & Analytical Chemistry, College of Pharmacy, Duksung Women's University, Seoul 132-714, Korea

Abstract — Fabry disease (FD) is an X-linked inborn error of glycosphingolipid metabolism resulting from mutation in the enzyme α -galactosidase A gene. The disease is an X-linked lipid storage disorder and the lack of α -Gal A causes an intracellular accumulation of glycosphingolipids, mainly globotriaosylceramide (Gb-3). Measurement of Gb-3 in plasma has clinical importance for monitoring after enzyme replacement therapy for confirmed FD patients. Using electrospray ionization MS/MS we had developed, a simple, rapid, and highly sensitive analytical method for Gb-3 in plasma was used for the purpose of screening FD among high risk groups in Korean population. To date, no comprehensive results for FD screening have been performed and reported in Korea. We screened 1,100 outpatients from 13 hospitals (including clinics) to assess the incidence of FD among patients in high risk groups. For patients with borderline level amount of Gb-3, we repeated Gb-3 or performing complementary or confirmative assay with α -Gal A activity and DNA mutation analysis for confirmation diagnosis. Of 1,100 we diagnosed 3 FD with 2 classical type and 1 carrier (0.27%).

Keywords □ fabry disease screening, globotriaosylceramide, electrospray-MS/MS, inherited metabolic disorder, incidence

Fabry Disease(이하 파브리병, OMIM 301500)은 α -galactosidase A(α -gal A)의 결핍으로 세포내 리소솜에 globotriaosylceramide(이하 Gb-3)가 축적되는 질병이다.^{1,2)} 이 질환은 반성 열성으로 유전되는 특징을 가지며 임상적으로는 피부의 혈관각화증, 점진적 신부전, 허혈성 심질환, 사지의 동통, 자율신경계의 장애, 뇌졸중 등 다양한 임상경과를 취한다. 이 병은 희귀하여 대부분의 환자가 성인이 되어 생체기관의 조직이 비가역적으로 손상된 상태가 되어야 진단을 받게 되거나 진단이 되지 못한 채로 치료를 위해 여러 병원을 전전하는 경우가 많다. 환자가 영구적인 조직 손상을 입기 전에 재조합 human α -gal A를 정맥내로 반복적으로 주사하면 기관에 축적된 Gb-3의 양이 감소하고 임상증상도 상당히 호전된다는 증거가 있다.²⁻⁴⁾

효소 대체치료법이나 주사요법 등의 치료방법이 있으므로 이 희귀질환 환자를 조기에 발견하려는 많은 노력이 세계 각국에서 이루어지고 있다.²⁻⁴⁾ 스크리닝을 위한 다양한 방법이 연구되고 있으며 탠덤매스를 이용한 Gb-3 측정방법에⁵⁻¹¹⁾ 대한 지속적인 분석법 개발이 계속하여 진행되면서 기존에 사용하던 검사법인 효소검사를¹²⁻¹⁸⁾ 이용한 스크리닝 혹은 DNA 분석법¹⁹⁾도 병행하여 사용되기도 한다.

파브리병이 X-염색체 연관 희귀 유전질환의 일종이지만 2005년까지 한국에서는 10 가족에서 21명의 환자만이 파브리병으로 진단되어 효소치료를 받고 있는 실정이었다. 네덜란드와 일본의 보고에 의하면 고 위험도군을 효소검사법으로 스크리닝하였을 때 0.2%의 발생 빈도를 보였다.^{20,21)} 지정학적으로 일본과 매우 가까운 한국인에 대한 유병을 보고는 현재 없는 상태이고, 개별적인 증례는 국내 학술발표에서 보고된 예가 있다. 미국의 경우 파브리병의 발생빈도는 1:40,000명으로 여러 다른 희귀유전질환의 발생빈도인 1:200,000 혹은 1:300,000 명보다 발생빈도가 높

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-901-8387 (팩스) 02-901-8386
(E-mail) hyeran11@duksung.ac.kr

은 편에 속한다. 국내 발생 빈도에 대한 정확한 보고가 없지만 파브리병 역시 청소년기나 40 대 초기에 발병하는 만큼 증상이 나타나면 빨리 진단하여 효소치료를 하는 것이 바람직하며 이를 위해 정확한 진단을 하기 위한 protocol이 필요하다고 본다. 이 질환은 임상적 증상만으로는 진단하기 어려운 희귀질환이므로 오랜 경험을 가진 유전질환전문가인 임상 의사가 아니고는 일반 임상 의사가 임상 증상만으로 진단할 수 없다는 특수한 상황에 있는 질환이다. 외국에서는 신생아 스크리닝이나²⁰⁻²²⁾ 대규모 스크리닝 연구²³⁻²⁵⁾를 수행한 보고가 있으나 국내에서는 이런 연구 보고가 전혀 없는 실정이다.

본 연구에서는 파브리병을 발견할 가능성이 높은 고 위험도군(심장비대,²⁶⁻²⁹⁾ 신질환,²⁰⁻²²⁾ 신기능이상,^{20-25,30)} 또는 hemodialysis 환자에 대해서 외래 내원환자나 입원환자를 대상으로 스크리닝 하였다. 그 외에도 신장내과, 심장내과 외래환자 중 고 위험도군에 대해 스크리닝하여 파브리병 환자를 스크리닝하고 유병율을 조사하였다.

실험방법

시약 및 기기

Ceramide trihexosides(globotriaosylceramide, Gb-3)는 Matreya사(PA, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 내부표준액인 C17:0-Gb-3은 Genzyme사(MA, USA)에서 제공한 것을 사용하였다. HPLC급 시약인 용매 및 이동상인 메탄올, 클로로포름, 아세톤, 암모니움아세테이트는 Sigma사(MO, USA) 및 Tedia사(OH, USA)에서 구입하여 사용하였다. 초순수 증류수는 Millipore MilliQTM system의 표준 정제수 정제 시스템(MA, USA)을 이용하여 정제된 18 MΩ-cm의 증류수를 사용하였다. 이동상의 용매와 초순수 증류수는 Millipore membrane filter 시스템 통해 Whatman사(Maidstone, U.K.)의 nylon membrane filter(0.2 μm)로 여과한 후 10분간 탈기하여 사용하였다. C8 guard cartridge 칼럼은 Phenomenex사(CA, USA)로부터 구입하였다.

혈장 시료 분석에 사용한 ESI-MS/MS로는 Applied Biosystems 사(MA, USA)의 API 4000 triple quadrupole 모델을 사용하였으며, HPLC 및 펌프는 Agilent 1100 시리즈 이중 마이크로 펌프 (CA, USA) 모델과 함께 CTC Analytics AG사(Zwingen, Switzerland)의 HTS PAL autosampler를 사용하였다. 데이터는 Analyst(version 1.4.2)를 이용하여 처리하였다.

임상검체 대상 - 2005년 1월 1일에서 2009년 11월 30일까지 채취 가능한 전국의 혈액투석환자 혹은 좌심실비대 환자 검체를 대상으로 하였다. 검체의 개수는 7 곳의 종합병원과 8 곳의 개업병원에서 채취한 1,100명의 혈장 또는 소변이었다. 임상검체의 구성은 서울 순천향 병원 혈액투석환자 검체 157명, 부천 순천향 병원 혈액투석환자 검체 86명, 천안 순천향 병원 혈액투석환

자 검체 77명, 구미 순천향 병원 혈액투석환자 검체 61명, 고대구로병원 투석환자 검체 117명, 서울 구로지역의 개업병원에서의 투석환자 검체 422명으로 총 1,100명이었다.

스크리닝 방법 - 고 위험도군의 스크리닝 방법 및 치료와 국가 기관에 등록되는 과정은 아래와 같았다. 1) 좌심실비대(left ventricular hypertrophy), 신부전(kidney dysfunction), 혈액투석환자(hemodialysis), 단백뇨(proteinuria)를 보이는 그룹의 환자를 수집한다(n=1,100). 2) 혈액과 소변(가능하다면 두 검체 모두 채취) 검체를 채취한 후 MS/MS를 이용하여 total Gb-3를 분석하여 정량수치를 얻는다. 3) 미리 설정한 정상인과 환자군의 reference range를 비교함으로써 high risk 그룹으로 판정하거나 total Gb-3 수치에 따라 파브리병으로 확진한다. 4) 효소검사 및 DNA 분석으로 재차 확진한다. 5) 확진된 환자는 효소 대체요법제(enzyme replacement therapy)로 치료한다. 6) 치료 중 total Gb-3의 혈장 중 농도를 일정기간 간격으로 검사 한다 7) 확진된 환자는 파브리병 환자로 국가기관에 등록하여 보건복지부로부터 치료비를 보조받도록 유관기관과 협력하여 조처한다.

혈장 검체의 채취와 시료전처리 - 효소 검사와 DNA 유전자 분석을 통하여 파브리병 환자로 확진되어 효소치료를 시작하는 환자를 대상으로하여 효소투여 전과 후의 임상 추적관찰을 위해 병원에 내원할 때마다 무작위 혈장을 2 ml씩 채취한 후 분석 전까지 -70°C에서 냉동 보관하였다.

시료 전처리를 위해서 1.5 ml micro tube에 혈장 20 μl와 증류수 80 μl, 내부표준액 5 μl를 가한 후 80% dioxane 895 μl를 넣고 30초간 vortex mix를 한다. 이 액을 5분간 원심분리(12,000 rpm)하여 Gb-3를 추출한다. 상층인 유기층액 800 μl를 autosampler 용 유리 바이알에 옮겨 담는다. 이 중 20 μl를 취하여 LC/MS/MS system에 주입한다.

확진검사를 위한 임상검체 채취 - Enzyme assay에 필요한 전혈(EDTA tube 사용)을 5 ml 채취한 후 1일 이내에 아래와 같이 백혈구를 분리하여 냉동 보관한다. 1차 파브리병 스크리닝에서 양성(혹은 borderline)으로 검사결과가 나온 경우 효소검사를 통하여 확진검사를 한다.

효소검사를 위한 백혈구의 분리 - EDTA 튜브에 있는 혈액 약 5 ml를 cornical tube(15 ml 부피)에 넣은 후 0.83% NH₄Cl을 약 10 ml 넣어 가득 채우고 잘 혼합하여 실온에서 15분 간 방치한다. 3500 rpm에서 3분 동안(혹은 3000 rpm, 5분) 원심분리를 하면 하층에 백색의 백혈구가 가라앉는다. 상층액은 버리고 다시 0.83% NH₄Cl 3 ml를 넣은 후 바닥의 백혈구를 완전히 풀어주고 10분간 실온에서 방치한다. 10분간 방치한 후에 0.9% NaCl 10 ml를 가한다. 3000 rpm에서 5분 동안(1500 rpm, 10분) 원심분리를 한다. 백혈구 이외의 것이 있으면 상층액 분리과정부터 다시 반복하여 백혈구만을 분리한다. 상층액을 버리고 0.9% NaCl 1 ml에 풀어 1.5 ml microtube에 옮겨 -80°C에서 보관한다.

혈장 중 Gb-3 정량

표준용액 조제 - -70°C 에서 냉동 보관된 Gb-3 표준품을 메탄올/클로로포름(2:1, v/v)에 녹여 농도를 Gb-3로 1 mg/ml로 조제하여 stock 표준용액을 냉장 보관하였다. Stock 표준용액을 메탄올로 희석하여 농도를 Gb-3로서 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 조제하여 working 표준용액을 냉장 보관하였다. -70°C 에서 냉동 보관된 C17:0-Gb-3 내부표준품을 메탄올/클로로포름(2:1, v/v)에 녹여 농도를 C17:0-Gb-3로서 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 조제하여 stock 내부표준용액으로 하여 냉장 보관하였다. 표준용액과 내부표준용액은 분석 전까지 -20°C 이하로 냉동 보관하였다.

검량선 작성 - 표준액(20 $\mu\text{g}/\text{ml}$)은 공혈장 및 디옥산으로 희석하여 최종용액 1 ml 중 Gb-3의 농도가 각각 0, 1, 2, 10, 20, 및 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되도록 조제하였고 내부표준액(5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 첨가하여 검량선의 용액을 조제하였다. 서로 다른 6개의 Gb-3 농도가 되도록 공혈장 20 μl 를 각각의 유리튜브에 넣고 여기에 내부표준물질인 C17:0-Gb-3(5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 5 μl 를 가하고 희석 용매인 디옥산을 가하여 최종부피를 1 ml로 하였다. 이 액을 vortex mix로 30초간 잘 섞은 후 30초간 초음파로 다시 잘 섞고 5분간 원심분리(10,000 rpm)하여 autosampler 용 유리 튜브로 옮겼다. 이 중 5 μl 를 탠덤매스로 주입하였고 C_8 guard cartridge 칼럼을 통하여 ESI-MS/MS로 분석하였다. 여기서 얻은 내부표준물질의 피크면적에 대한 Gb-3의 피크 면적비를 가지고 검량선을 작성하였다.

ESI-MS/MS 분석조건 - 위와 같이 전 처리된 혈장 시료 중 Gb-3 분석은 다음 조건에서 분석되었다. 이동상 A는 2 mM ammonium acetate와 0.1% formic acid를 포함하는 탈이온 증류수를 사용했고, 이동상 B는 2 mM ammonium acetate와 0.1% formic acid를 포함하는 메탄올을 사용했으며, 이동상 B는 20% 메탄올 농도로부터 80% 메탄올 농도까지의 농도 구배조건(10%씩 증가/min)을 사용하였다. 칼럼은 C_8 guard cartridge 칼럼(4.0 mm \times 3.0 mm, 5 μm , Phenomenex사(CA, USA))을 사용하였으며, 유속은 500 $\mu\text{l}/\text{min}$ 이었고, 10 μl 크기의 시료 루프를 사용하였고, 충돌 가스로는 초고순도 질소를 사용하였다. 칼럼 온도는 40°C 였고 Gb-3 isoform의 프로파일을 얻고 정량을 위해 MRM scan mode로 분석을 하였다. 이를 위한 모이온과 딸이온 두 이온을 정량이온으로 선택하여 정량하였다. Gb-3 isoform 분석을 위한 최적의 MS/MS조건은 declustering potential(DP)이 80 V, entrance potential(EP)이 10 V, collision energy(CE)가 22 V, collision cell exit potential(CXP)이 12 V, deflector(DF)가 -200 V, channel electron multiplier(CEM)가 2100 V, collision activated dissociation gas(CAD)가 6 psi, curtain gas(CUR)가 12 psi, nebulizer gas(NG)가 50 psi, auxiliary gas(AG)가 40 psi, ionspray voltage(ISV)가 5500 V 그리고 이온원 온도는 400°C 였다. 데이터 처리장치로는 Analyst(version 1.4.2)을 사용하였다.

Table I - Plasma Gb-3 concentration measured in normal controls, carrier females, fabry disease males (Seoul, Korea)

Classification	Plasma ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
Normal controls (n=57)	0.01~0.90 (0.17 \pm 0.20)
Carrier females (n=3)	0.01~0.70 (0.38 \pm 0.27)
Fabry disease males (n=8)	2.90~15.10 (7.38 \pm 4.15)

*Cconcentration presented as mean \pm SD.

연구결과 및 고찰

MRM 모드를 위한 이온선택과 분석법 검증³⁰⁾

소변과 혈장에 의한 ESI-MS/MS로 분석법은 본 연구실에서 이미 보고한 것과 같이 MRM scan 모드를 사용하였고,³⁰⁾ Table I과 같이 특징적인 모이온과 딸이온으로 구분할 수 있었으며, 두 이온을 정량이온으로 선택하여 분석을 하였다. Gb-3은 8종의 Gb-3 isoform(C16:0 Gb-3, C18:0 Gb-3, C20:0 Gb-3, C22:0 Gb-3, C24:1 Gb-3, C24:0 Gb-3, C24:0 OH Gb-3) 들로 이루어지며 혈장 중에는 C16:0 Gb-3이 소변 중에는 C24:0 Gb-3이 주종을 이루고 있다.³⁰⁾ Gb-3 isoform과 내부표준물질로 사용한 C17:0 Gb-3(1060.64/898.64)의 precursor ion/product ion 쌍은 각각 m/z 1046.64/884.64, 1074.65/912.65, 1102.68/940.68, 1128.68/966.68, 1130.68/968.68, 1156.71/996.71, 1174.95/1012.95의 수소화된 분자이온([M+H]⁺)과 생성된 product ion으로 m/z를 각각 모니터링 하였다.³⁰⁾ 혈장의 바탕성분 하에서 8종의 Gb-3 isoform들이 완전히 분리됨을 확인하였다.

검량선용 표준 혈장시료의 농도를 희석하여 직선성을 나타내는 범위를 구해 본 결과 0.001~1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 범위 내에 있었으며, 혈장의 주 종인 C16:0 Gb-3의 검량선은 $y=0.556x+0.1921$ ($R^2=0.9989$)이었고, 소변의 주 종인 C24:0 Gb-3 검량선은 $y=0.5038x+0.3758$ ($R^2=0.9976$)이었으며, 모든 Gb-3 isoform들의 검량선의 R^2 은 0.9678~0.9982 범위에 속하였다.³⁰⁾

정상인의 혈장 중 참고 범위 설정 - 고 위험도 그룹에 대하여 실제 혈 중 Gb-3를 스크리닝하기 위해서 한국인 정상인에 대한 혈장 중 참고 범위를 설정하였다. 한국인 혈장에서 구한 Gb-3의 참고 범위는 정상인(n=57)의 경우 0.01~0.90 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 보인자(heterozygote)인 여성(n=3)의 경우 0.01~0.70 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 파브리병 환자인 남성(n=8)의 경우는 2.90~15.10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 범위에 각각 속하는 것으로 나타났다(Table I).

파브리병인 남성 환자의 Gb-3 농도는(Fig. 1B) 정상인의 혈장 중 Gb-3 농도(Fig. 1C)보다 월등히 높은 농도범위에 있었고 이러한 사실은 도탈 스펙트럼 상에서도 여러 isoform 중 C16:0 Gb-3에서 정상인과 확연하게 구분이 가능하였다. 특히 파브리병 환자의 혈장에서는 다양한 Gb-3 isoform 중에서 C16:0 Gb-3이 현저하게 정상 혈장보다 증가되어 있음을 알 수 있었다(Fig. 1B).

확진된 파브리병 남성 환자 및 보인자와 정상인의 혈장 중 Gb-

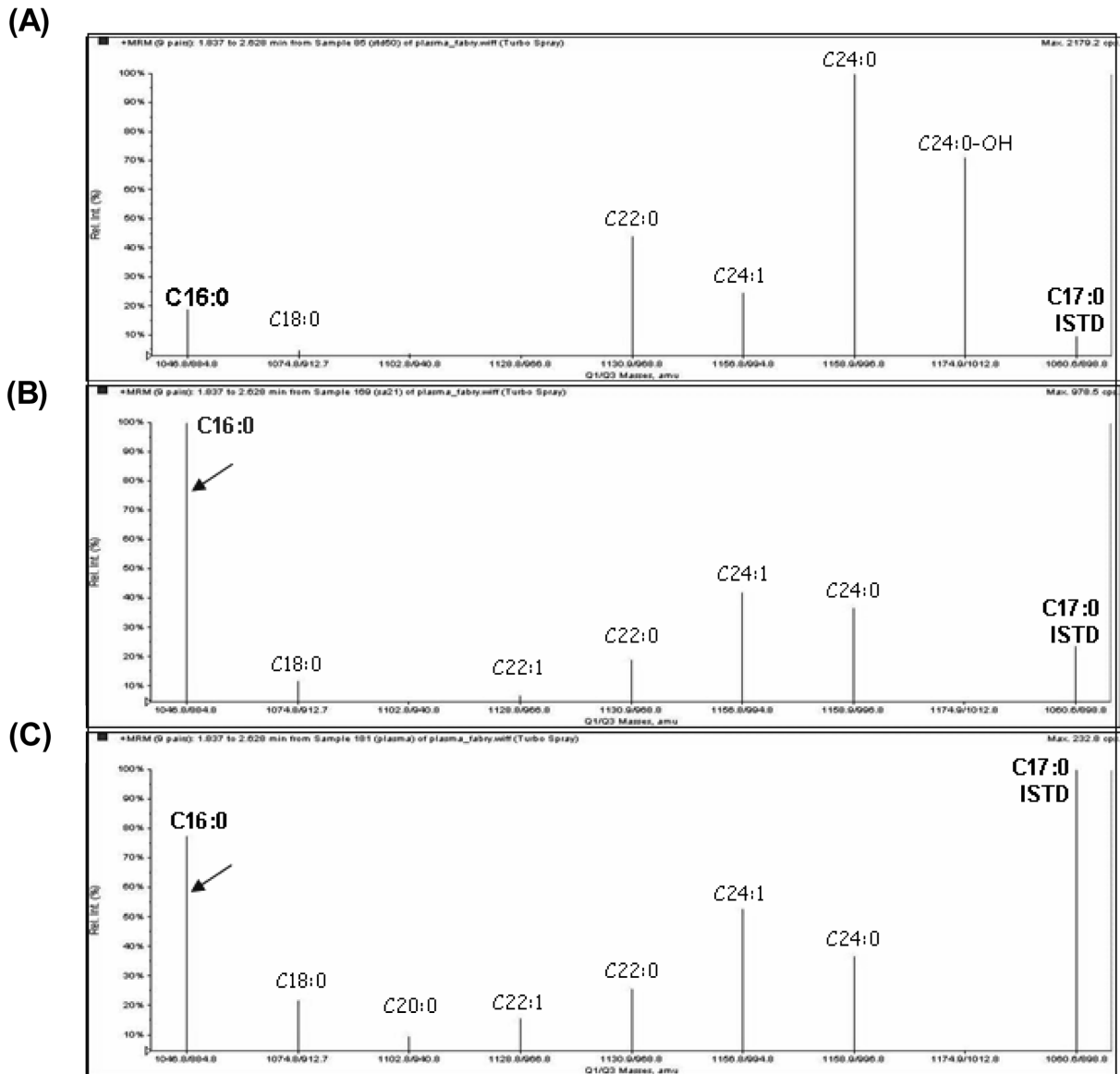


Fig. 1 – ESI-MS/MS multiple reaction monitoring spectrum for (A) Standard Gb-3, (B) Fabry disease affected male plasma, and (C) healthy plasma.

3의 농도를 모니터링하였을 때, 파브리병 남성 환자는(Fig. 2, ○ 표시) 정상인과 확연히 구분 가능하였으나 보인자인 경우는(Fig. 2, △ 표시) 정상인(Fig. 2, ◇ 표시)과 overlap되는 경우가 많았으므로 구분이 명확하지는 않았다(Fig. 2).

고 위험도군 스크리닝 결과 - 네덜란드의 Linthorst 등은 파브리병은 희귀질환이나 임상양상이 다양하여 발병빈도가 과소평가 되는 실정이라고 보고하였다.²⁰⁾ 국내에서도 과거에는 임상 증상만으로는 진단이 어려웠으므로 신장질환이 있는 환자에 대해서 신생검을 하였을 때 Zebra body가 나타나는 것을 진단의 첫 번째 주요 단서로 여기고 파브리병을 의심하여 효소검사로 확진하였다. Linthorst 등²⁰⁾의 그룹은 고위험도 그룹에서 α-Galactosidase

A 효소의 활동도 측정방법으로 스크리닝 하였을 때, 508명의 투석 환자 중 발병빈도가 0.22%라고 보고하였다. 또한 장기간의 치료효과에 따른 효소활동도의 변화와 관련하여 최종 진단 시 매우 주의가 필요하다고 보고하였다. 2005년 Bekri 등의 그룹은 end stage renal failure 그룹 중 α-Galactosidase A 효소 활동도를 측정하여 스크리닝 검사를 시행하여 파브리병으로 진단될 경우 효소 대체 요법으로 치료를 할 수 있으므로 이에 대한 혜택을 볼 수 있다며 스크리닝 검사의 긍정적인 면을 시사하였다.²¹⁾ 2005년 Eto 그룹 등도 450명의 남자 투석환자 중 0.22%의 비정형적인 파브리병의 variant를 발견하였다. 이 보고는 진단되지 않은 파브리병 환자를 투석환자 중에서 진단 할 수 있는 가능성

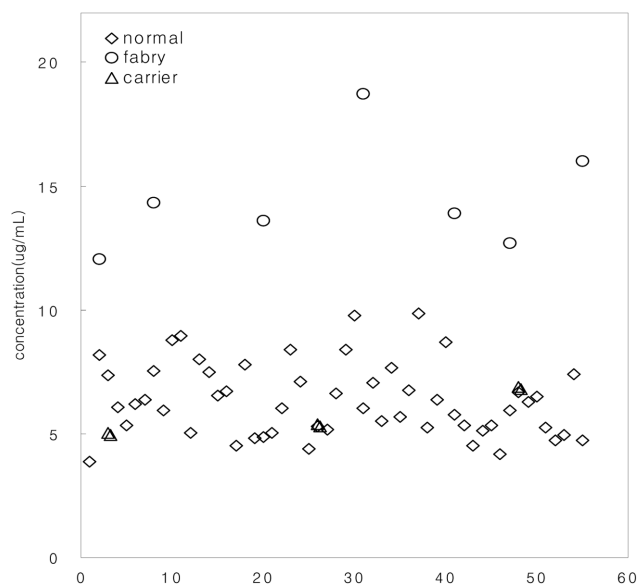


Fig. 2 – Distributaion of Gb-3 concentration in plasma with fabry disease-affected males.

을 열어 놓고 있다.²²⁾

본 연구에서도 이에 근거하여 주요 고 위험도 그룹을 신장질환이 있는 투석환자에 대하여 스크리닝을 착수하였다.

임상실험 대상 1,100명의 구성과 파브리병으로 진단된 확진

환자 수는 Table II에서 보여주고 있다.

Table III에서 보는바와 같이 팔호안의 단백뇨를 보이는 환자를 포함하여 2005년 1월 1일부터 2009년 11월 30일까지 채취 가능한 전국의 혈액투석환자 검체나 좌심실비대 환자 검체로 5 곳의 종합병원과 8 곳의 개업병원의 신장내과에서 채취한 1,100명 이었다. 이들 중 파브리병 환자로 확진된 경우는 서울 순천향 병원으로부터의 혈액투석환자 검체 157명 중 양성 환자 0명, 부천 순천향 병원 혈액투석환자 검체 86명 중 양성 환자 2명, 천안 순천향 병원 혈액투석환자 검체 77명 중 양성 환자 0명, 구미 순천향 병원 혈액투석환자 검체 61명 중 양성 환자 1명, 고대 구로병원 투석환자 검체 117명 중 양성 환자 0명, 서울 구로 지역의 개업병원에서의 투석환자 검체 422명 중 위양성 환자 추정(border line 환자) 10명 이었으며 양성환자 0명 이었다.

Table IV는 국내외에서 보고된 국내 한국인 파브리병 환자의 숫자를 정리한 것이다. 1984년에서 2009년까지 보고된 파브리병 환자의 수는 21명이었고 스크리닝하여 확진된 파브리병 환자는 3명으로 스크리닝 하였을 경우 정확한 진단과정을 거쳐 환자를 발견하여 치료에 도움을 주었으므로 다른 외국의 경우와 같이 고 위험도군 스크리닝의 유효성이 검증되었다.

2000년도 이전까지는 확진 검사가 주로 효소검사에 의해 수행 되었지만 2000년도 이후 부터는 확진검사도 Yoo 등의 연구실에서 DNA 분석에 의해 수행되었다.²³⁾ Table IV에서 2000년도까

Table II – Clinical manifestations of fabry disease reported in Korea (1984~2009)

Patients.	Age	Age diagnosed	Sex	Skin	Fever	Heart	Kidney	Biopsy	α -Gal	Confirmation dx
1	18	11 y	M	+	?	?	+ ptn ur	Renal	ND	Conf; renal bx
2	28 ¹⁾	18 y	M	+	+	-	-	Skin	0.36 ²⁾	Conf; enz
3	21 ³⁾	13 y	M	+	+	-	+ ?	Skin	0%	Conf; enz, FH ¹⁰⁾
4	29 ⁴⁾	12 y	M	+	+	-	+ ?	Skin	0%	Conf; enz, FH ¹⁰⁾
5	16		M	-	+	-	-	Nerve, Muscle	0%	Conf; enz, FH ¹⁰⁾
6	15 ⁵⁾		M	+	+	-	-	Skin Renal	0.3 ⁸⁾	Conf; enz, renal bx, FH ¹⁰⁾
7	27 ⁶⁾		M	+	+	+ ⁷⁾ LVH	+ CRF	Renal	0.3 ⁸⁾	Conf; enz, renal bx
8	34		M	+	-	-	+ ptn ur	Skin Renal	0%	Conf; enz, renal bx
9	29 ⁹⁾	8 y	M	+	+	-	+ ptn ur	Skin Kidney	0%	Conf; enz, renal bx,
10	29		M	-	-	-	+ ptn ur	Renal	0.71 ²⁾	Conf; enz, renal bx
11	45(38)		M	-	-	-	+ ptn ur	Renal	ND	Conf, renal bx
12	30(15) ¹⁰⁾		M	+	+	-	+ CRF		0%	Y86X, R342X
13	30(16) ¹⁰⁾		M	-	+	-	+		0%	D226N
14	30(13) ¹⁰⁾		M	+	+	-	+ ptn ur		0%	296del
15	30(19) ¹⁰⁾		M	-	+	+ ¹¹⁾	-		0%	802del4
16	30(8) ¹⁰⁾		M	+	+	-	-		0%	R342X
17	45(35)		M	-	-	-	+ ptn ur	Renal	ND ¹²⁾	Conf; renal bx, FH ¹⁰⁾
18	35(25)		M	+	+	- LVH	+ ptn ur	Renal	ND ¹²⁾	Conf; renal bx, p.D231G
19	37 ¹⁵⁾		M	-	-	-	+ ptn ur	S7.56, U0.89	0%	Conf; renal bx, p.F113L ¹²⁾
20	60 ¹⁵⁾		F	-	-	-	+ CRF ¹⁶⁾ hd ¹⁷⁾	11.19	1.50%	I91T
21	31 ¹⁵⁾		M	-	-	-	+ ptn ur	?	0%	R227X

+; present, -; absent, ?; not described, 1) J. Am. Acad Dermatol 1987;17(5);883-7, 2) ng/hr/ng protein, 3), 4); nephew 5), 6); brothers, 7) Left ventricular hypertrophy, 8) nmol/hr/ μ L, 9) Yonsei Medical J 1998;39(1); 67-72, 10) FH: family history, 11) Clin Genet 2000;58;228, 12) ND; not determined, 13) normal range Fabry disease range, 14) Mild cardiac variant, Eng Mol Med 1997;3;174, 15) Pt. 19, 20, 21 ; not published, 16) chronic renal failure, 17) hd: hemodialysis.

Table III – Total number of clinical specimen and patients showing borderline concentration of Gb-3 with confirmed cases

Hospital	No. of dialysis patients (proteinuria)	No. of patients showed borderline concentration of Gb-3 ¹⁾	Confirmation diagnosis	Confirmed cases among borderline concentration of Gb-3
Seoul SCH ²⁾	157	11 (10.09-12.74)	proteinuria	2
Buchon SCH ²⁾	86 (2)	2 (10.09-10.39)		
Chonan SCH ²⁾	77 (2)	1 (10.57)	hemodialysis ³⁾ (proteinuria)*	1
Kumi SCH ²⁾	61 (1)	5 (10.88-12.84)		
Korea Univ.	117 (2)	1 (10.18)		
Guro local clinic	422 (7)	10 (11.27-13.08)		
Total	1100 (14)	30	3	3

- 1) 10.09~13.08 µg/ml (borderline concentration of Gb-3).
- 2) SCH: Sooncheonhyang University Hospital.
- 3) Gb-3; µg/ml *diagnosed by renal biopsy but denied treatment.

Table IV – Fabry disease diagnosis in reported and screened cases in Korea

Diagnostic assay	Reported cases (1984~2009)	Screened cases (2005~2009)
Renal tissue biopsy (Zebra body)	3	-
Zero enzyme assay (or low activity)	9	-
Both enzyme assay and DNA analysis (with other assay)	6 (3)	3
Total	21	3

지 보고된 환자들의 진단과정을 살펴보면 이 경우 3명은 Zebra body를 보이는 신장 조직 생검에 의해 진단되었고 9명은 효소 활성도검사에 의해, 9명은 효소 활성도검사와 DNA검사 두 가지를 모두 확인함으로써 확진되었다. 본 연구에서 발견된 3명의 환자는 효소검사 및 DNA 분석으로 진단 확진되었다.

이 질환은 진단만 되면 치료방법이 있는 질환이므로 스크리닝을 하는 의의가 있는 질환이다.²²⁾ 그러므로 임상시료 검체를 수집하는 것이 매우 어려움에도 불구하고 투석환자나 신장질환이 있는 환자에 대하여 스크리닝을 시작하게 되었다. 혈장 수집이 가능한 경우 우선적으로 혈장 중 Gb-3 농도를 측정하였고 소변을 받을 수 있는 경우 소변 시료를 추가 하였다.

2005년 이전에 보고된 한국인 파브리병 환자들의 연령범위는 15~45세로 다양하였고 실제 임상증상이 나타난 것은 진단되기 훨씬 이전인 것으로 보고되었다. 대개 파브리병 환자들이 첫 임상증상을 나타낸 것은 10 대나 20 대였다. 1997년 이전에는 주로 효소검사로 확진되고 DNA 분석 없이 안과적 이상, 피부의 이상한 병변, 내과적 이상이 심각한 환자들이었다(Table II). 1998~2002 년 사이는 DNA mutation 분석에 의해 최종 진단되었다.²³⁾ 18명의 보고된 파브리병 환자 중 3 명은 좌심실비대(left ventricular hypertrophy)와 같은 파브리병의 심장에서 전형적으로 나타나는 증후의 소견을 보였다(Table II).

본 스크리닝 연구에서의 확진은 2명의 경우 효소검사와 DNA

분석으로 확정 진단되었고 1명의 경우는 신장조직 생검에서의 Zebra body의 존재에 의해 확정 진단되었으나 본인이 그동안 계속하여 환자가 아님을 주장한 경우였다. 이 모든 경우에서 스크리닝 검사인 Gb-3 측정 외에 효소검사, DNA 분석을 함으로서 확진되었고 현재 보건복지부의 희귀 난치질환자 registry에 등록되어 의료비 지원을 받으며 효소대체요법으로 치료받고 예후가 좋아지고 있다. 최종적으로 2명은 파브리병으로 확진되었고 1명은 classical type이고 1명은 보인자인 것으로 진단되었다. 그러므로 고 위험도군의 스크리닝으로 얻은 국내 파브리병의 발병빈도는 0.27%로 나타났다. 이 경우 역시 보고된 다른 나라보다는 낮은 발병빈도로 앞으로 좀 더 나은 protocol을 작성하여 2,000명 이상에 대한 장기간 스크리닝 연구가 필요하다고 본다.

본 스크리닝으로 발견된 효소 치환요법(enzyme replacement therapy) 전 후의 Gb-3 농도의 감소 효과를 확인하였다. 효소치료 전과 비교하였을 때, 효소치료 후 3, 6, 9, 12개월 후에 치료 효과가 나타나면서 소변 중 Gb-3의 농도가 현저히 감소되어 6개월 이후부터는 정상범위에 속하거나 거의 정상범위의 수준에 있게 됨을 확인할 수 있었다.³¹⁾

따라서, 본 연구에서의 분석방법이 파브리병 환자의 확진검사와 환자의 치료 전 후의 임상 추적 모니터링에 유용하게 응용할 수 있음을 보여주었다.

결 론

저자 등의 연구실에서 이미 개발한³⁰⁾ 간단하면서도 비교적 비침습적인(non-invasive) 방법인 MS/MS를 이용한 혈장 중 Gb-3 측정법을 통하여 고 위험도군인 1100명에 대하여 스크리닝을 수행하였다. 이 결과를 통하여 전형적인 파브리병 환자 2명과 보인자 1명을 확진하였으며, 이들을 국가기관의 환자리스트에 등록하여 의료비를 지원받고 치료할수 있도록 진단 후 조치를 하였다. 고 위험도군 중 파브리병 스크리닝 결과 유병율은 0.27%로 비교적 발생빈도가 높은 희귀질환임을 확인하였다.

본 연구를 통하여 진단 체계 및 치료체계가 확립되고 통계적

으로 유의한 데이터와 유병율의 근간을 알 수 있게 되면 국가에서 지속적으로 희귀 유전성 대사질환을 예방, 치료, 관리를 체계적으로 확립할 수 있을 것으로 사료된다. 본 연구에서 실제 임상에 적용한 분석법이 간편, 신속, 정밀한 진단법으로 스크리닝 및 환자의 치료와 follow-up 모니터링이 가능한 분석방법이므로 환자가 가능한 빨리 치료받을 수 있도록 함으로써 환자의 삶의 질을 높이는 데 기여할 것이다.

감사의 말씀

본 연구는 덕성여자대학교 2009년도 교내 연구비 지원을 받아 수행되었음. 본 연구를 위해 환자 시료 채취와 제공, 임상 증상에 관한 정보에 도움을 주신 순천향대학병원 이동환 교수, 황승덕 교수, 고대구로병원 권영주 교수, 서울의과학연구소의 이경률 이사장, 조경희연구원, 서울아산병원의 유한옥 교수, 김구환 박사, Genzyme Korea와 Genzyme USA에 깊이 감사드립니다.

참고문헌

- Desnick, R. J., Ioannou, Y. A., Ioannon, C. M., Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S., Valle, D., Kinzler, K. E. and Vogelstein, B. : The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. *McGraw-Hill, New York* 3733-3774 (2001).
- Desnick, R. J. and Brady, R. O. : Fabry disease in childhood. *J. Pediatr.* **144**, S20 (2004).
- Whitfield, P. D., Calvin, J., Hogg, S., O'Driscoll, E., Halsall, D., Burling, K., Maguire, G., Wright, N., Cox, T. M., Meikle, P. J. and Deegan, P. B. : Monitoring enzyme replacement therapy in Fabry disease-role of urine globotriaosylceramide. *J. Inherit. Metab. Dis.* **28**, 21 (2005).
- Boscaro, F., Pieraccini, G., la, Marca, G., Bartolucci, G., Luceri, C., Luceri, F. and Oneti, G. : Rapid quantitation of globotriaosylceramide in human plasma and urine a potential application for monitoring enzyme replacement therapy in Anderson-Fabry disease. *Rapid Commun Mass Spectrom.* **16**, 1507 (2002).
- Chien, Y. H., Olivova, P., Zhang, X. K., Chiang, S. C., Lee, N. C., Keutzer, J. and Hwu, W. L. : Elevation of urinary globotriaosylceramide (GL3) in infants with Fabry disease. *Mol. Genet. Metab.* **102**, 57 (2011).
- Nelson, B. C., Roddy, T., Araghi, S., Wilkens, D., Thomas, J. J., Zhang, K., Sung, C. C. and Richards, S. M. : Globotriaosylceramide isoform profiles in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* **5**, 805, 127 (2004).
- Mills, K., Morris, P., Lee, P., Vellodi, A., Waldek, S., Young, E. and Winchester, B. : Measurement of urinary CDH and CTH by tandem mass spectrometry in patients hemizygous and heterozygous for Fabry disease. *J. Inherit. Metab. Dis.* **28**, 35 (2005).
- Boscaro, F., Pieraccini, G., la, Marca, G., Bartolucci, G., Luceri, C., Luceri, F. and Oneti, G. : Rapid quantitation of globotriaosylceramide in human plasma and urine: a potential application for monitoring enzyme replacement therapy in Anderson-Fabry disease. *Rapid Commun Mass Spectrom.* **16**, 1507 (2002).
- Mills, K. and Johnson, A. : Winchester Synthesis of novel internal standards for the quantitative determination of plasma ceramide trihexoside in Fabry disease by tandem mass spectrometry. *B. FEBS Lett.* **515**, 171 (2002).
- Eng, C. M., Guffon, N., Wilcox, W. R., Germain, D. P., Lee, P., Waldek, S., Caplan, L., Linthorst, G. E. and Desnick, R. J. : International collaborative fabry disease study group. *N. Engl. J. Med.* **45**, 9 (2001).
- Nakanishi, T., Funahashi, S., Funai, T., Hashimoto, T. and Shimizu, A. : Chemical diagnosis of Fabry's disease by fluorometric assay and fast atom bombardment/mass spectrometry. *Ann. Clin. Biochem.* **28**, 368 (1991).
- Caudron, E., Moliere, D., Zhou, J. Y., Prognon, P. and Germain, D. P. : Recent advances of Fabry disease screening for at risk population. *Med. Sci. (Paris)* **21**, 480 (2005).
- Tanaka, M., Ohashi, T., Kobayashi, M., Eto, Y., Miyamura, N., Nishida, K., Araki, E., Itoh, K., Matsushita, K., Hara, M., Kuwahara, K., Nakano, T. and Yasumoto, N. : Nonoguchi H, Tomita K. Identification of Fabry's disease by the screening of alpha-galactosidase A activity in male and female hemodialysis patients. *Clin. Nephrol.* **64**, 281 (2005).
- Hoffmann, B., Georg, Koch, H., Schweitzer-Krantz, S., Wendel, U. and Mayatepek, E. : Deficient alpha-galactosidase A activity in plasma but no Fabry disease-a pitfall in diagnosis. *Clin. Chem. Lab. Med.* **43**, 1276 (2005).
- Zeidner, K. M., Desnick, R. J. and Ioannou, Y. A. : Quantitative determination of globotriaosylceramide by immunodetection of glycolipid-bound recombinant verotoxin B subunit. *Anal. Biochem.* **267**, 104 (1999).
- Ohshima, T., Murray, G. J., Swaim, W. D., Longenecker, G., Quirk, J. M., Cardarelli, C. O., Sugimoto, Y., Pastan, I., Gottesman, M. M., Brady, R. O. and Kulkarni, A. B. : alpha-Galactosidase A deficient mice: a model of Fabry disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 2540 (1997).
- Hoffmann, B. and Mayatepek, E. : Neurological manifestations in lysosomal storage disorders - from pathology to first therapeutic possibilities. *Neuropediatrics* **36**, 285 (2005).
- Ichinose, M., Nakayama, M., Ohashi, T., Utsunomiya, Y., Kobayashi, M. and Eto, Y. : Significance of screening for Fabry disease among male dialysis patients. *Clin. Exp. Nephrol.* **9**,

- 228 (2005).
- 19) Bierer, G., Kamangar, N., Balfe, D., Wilcox, W. R. and Mosenifar, Z. : Cardiopulmonary exercise testing in fabry disease. *Respiration* **72**, 504 (2005).
 - 20) Linthorst, G. E., Hollak, C. E., Korevaar, J. C., Van Manen, J. G., Aerts, J. M. and Boeschoten, E. W. : Alpha-Galactosidase A deficiency in Dutch patients on dialysis: a critical appraisal of screening for Fabry disease. *Nephrol. Dial. Transplant.* **18**, 1581 (2003).
 - 21) Bekri, S., Enica, A., Ghafari, T., Plaza, G., Champenois, I., Choukroun, G., Unwin, R. and Jaeger, P. : Fabry disease in patients with end-stage renal failure: the potential benefits of screening. *Nephron. Clin. Pract.* **101**, c33 (2005).
 - 22) Ichinose, M., Nakayama, M., Ohashi, T., Utsunomiya, Y., Kobayashi, M. and Eto, Y. : Significance of screening for Fabry disease among male dialysis patients. *Clin. Exp. Nephrol.* **9**, 228 (2005).
 - 23) Lee, J. K., Kim, G. H., Kim, J. S., Kim, K. K., Lee, M. C. and Yoo, H. W. : Identification of four novel mutations in five unrelated Korean families with Fabry disease. *Clin. Genet.* **58**, 228 (2000).
 - 24) Kitagawa, T., Ishige, N., Suzuki, K., Owada, M., Ohashi, T., Kobayashi, M., Eto, Y., Tanaka, A., Mills, K., Winchester, B. and Keutzer, J. : Non-invasive screening method for Fabry disease by measuring globotriaosylceramide in whole urine samples using tandem mass spectrometry. *Mol. Genet. Metab.* **85**, 196 (2005).
 - 25) Rozenfeld, P. A., Tarabuso, A., Ebner, R., Ramallo, G. and Fossati, C. A. : A successful approach for the detection of Fabry patients in Argentina. *Clin. Genet.* **69**, 344 (2006).
 - 26) Hasegawa, H., Takano, H., Shindo, S., Takeda, S., Funabashi, N., Nakagawa, K., Toyozaki, T., Kuwabara, Y. and Komuro, I. : Images in cardiovascular medicine. Transition from left ventricular hypertrophy to massive fibrosis in the cardiac variant of Fabry disease. *Circulation.* **113**, e720 (2006).
 - 27) Liu, H. J., Cao, K. J., Li, C. R., Dai, J., Ma, J. Z., Yong, Y. H. and Sun, W. : Alpha-galactosidase A gene mutation in a Chinese family with Fabry disease mimicking clinical features of hypertrophic cardiomyopathy. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi.* **34**, 143 (2006).
 - 28) Lindsay, A. C., Behar, J. M. and McEwan, J. : Images in cardiology. Fabry's disease, an X-linked recessive condition, can have isolated cardiac manifestations in heterozygote females. *Heart.* **92**, 685 (2006).
 - 29) Hagège, A. A., Caudron, E., Damy, T., Roudaut, R., Millaire, A., Etchecopar-Chevreuil, C., Tran, T. C., Jabbour, F., Boucly, C., Prognon, P., Charron, P. and Germain, D. P. : Screening patients with hypertrophic cardiomyopathy for Fabry disease using a filter-paper test : the FOCUS study. *Heart.* **97**, 131 (2011).
 - 30) Yoon, H.-R., Cho, K., Kang, S., Kwon, Y. J., Jeong, C. S. and Lee, Y. S. : Method development for the profiling analysis of urine globotriaosylceramide (Gb-3) for the screening of Fabry disease by tandem mass spectrometry. *Yakhak Hoej* **51**, 96 (2007).
 - 31) Choi, J. H., Cho, Y. M., Suh, K. S., Yoon, H. R., Kim, G. H., Kim, S. S., Ko, J. M., Lee, J. H., Park, Y. S. and Yoo, H. W. : Short-term efficacy of enzyme replacement therapy in Korean patients with Fabry disease. *J. Korean Med. Sci.* **23**, 243 (2008).