

13・2 Gaucher 病の診断を目的とした

³H標識 glucosyl ceramide の合成

日本大学医学部

北川 照 男

大和田 操

目 的

Gaucher 病の酵素学的診断に必要な天然基質 glucosyl ceramide (glc-cer) を ³H で標識し、測定感度を上昇させて診断を容易にすることを目的とした。

材 料

Gaucher 病患者の脾

方 法

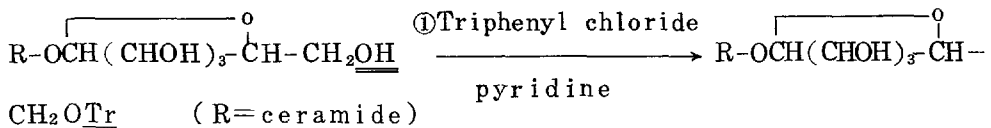
(1) Glc-Cer の抽出および精製

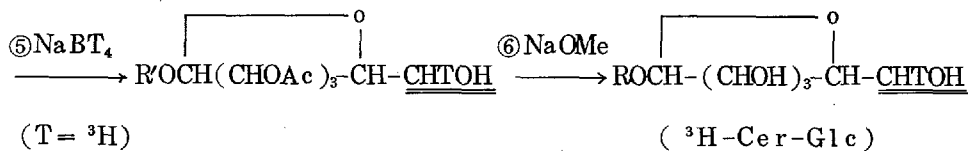
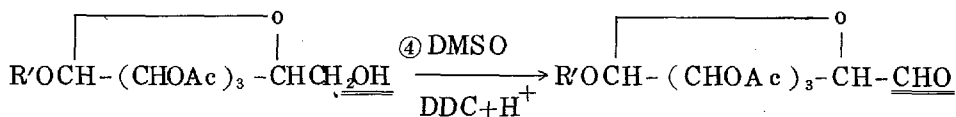
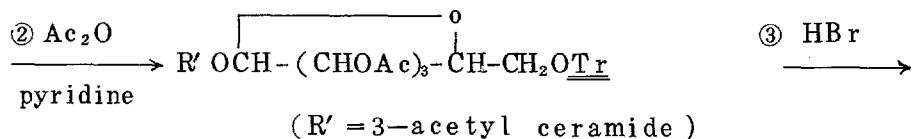
Radin らにより報告された方法に従い、Gaucher 病患者の脾から glc-cer を抽出し、silicic acid column chromatography を行って精製した。

(2) Glc-Cer の ³H による標識

Radin らにより 1976 年に報告された方法で、Glc-Cer の glucose の 6 位の水素を ³H に置換するもので、反応の原理は下図に示すようである。即ち、① Glucose の 6 位の水酸基を Triphenyl 化し、② 残りの水酸基を全て acetyl 化し、③ 6 位の triphenyl 基を HBr にて外し、④ 6 位の水酸基を酸化して aldehyde とし、⑤ NaBT₄ により再び還元すると同時に ³H を 6 位に入れ、⑥ 脱 acetyl を行って ³H-Glc-Cer とする。

実施は Glc-Cer 100mg より出発した。





(3) ${}^3\text{H}$ -Glc-Cer を用いた glucocerebrosidase の assay system の検討

${}^3\text{H}$ -Glc-Cer を cold Glc-Cer にて稀釈し, detergent として Na-Cholate を用いて酵素液とともに incubate し, CHCl_3 -MeOH を加えて反応を停止させ, 遠沈して upper phase を採り, 更に CHCl_3 -MeOH (85:15 $\frac{\text{v}}{\text{v}}$) にて一回洗滌し, upper phase の放射能を測定した。

結 果

(1) 100 mg の Glc-Cer から, total count 1.2×10^9 c. p. m を有する ${}^3\text{H}$ -Glc-Cer を得た。この ${}^3\text{H}$ -Glc-Cer は, 異った2種類の溶媒系による TLC を行って, 単一の spot を示し, しかも radioactivity を radioautography にて測定すると, 放射能の100%が spot の部位に一致して認められた。(下図参照)

更に, ${}^3\text{H}$ -Glc-Cer の Methanolysis の結果, この count の80%が glucose の部位に認められた。

(2) 各 assay tube に 5×10^4 c. p. m の glc-cer を使用し, 肝, 脾の homogenate における glucocerebrosidase を測定した結果は下記のとおりである。

glucocerebrosidase 活性

(c. p. m. /mg protein /hr)

Control spleen	4 6 5
Gaucher's spleen	2 6
Control liver	3 5 1
Gaucher's liver	4 7

考 察

Gaucher 病において障害されている β -glucosidase は、合成基質を用いて証明することが可能とされている。しかし、すでに我々が報告したように、肝において合成基質水解能が正常な Gaucher 病が存在することは明らかであり、fibroblasts を除く material によって Gaucher 病の酵素診断を行う場合には、天然基質を用いる必要があると思われる。

我々は、これまで、非標識の Glc-Cer を基質として、遊離してくる glucose を測定する方法によって glucocerebrosidase 活性を測定してきたが、この方法では crude な肝、脾を用いた場合に測定困難な場合をしばしば経験したので、より感度が良い方法を開発するために、 ^3H による Glc-Cer の標識を試みた。

今回用いた方法によると、Glc-Cer の glucose の位置に ^3H がラベルされるために、反応系・測定系を比較的簡略化し得た点に、大きな利点があると思われる。

要 約

(1) Gaucher 病の中には、肝における合成基質水解能が正常な症例があり、そのような場合には、天然基質を用いて酵素学的診断を行う必要がある。

(2) そのためには、酵素活性測定之感度をあげる必要がある、その目的で、Glc-Cer の ^3H による標識を試みた。

(3) ^3H 標識 Glc-Cer を基質として glucocerebrosidase 活性を測定したところ、従来の方法に比べて、感度が良好で、しかも手技の点でも簡略化され、有用と思われた。

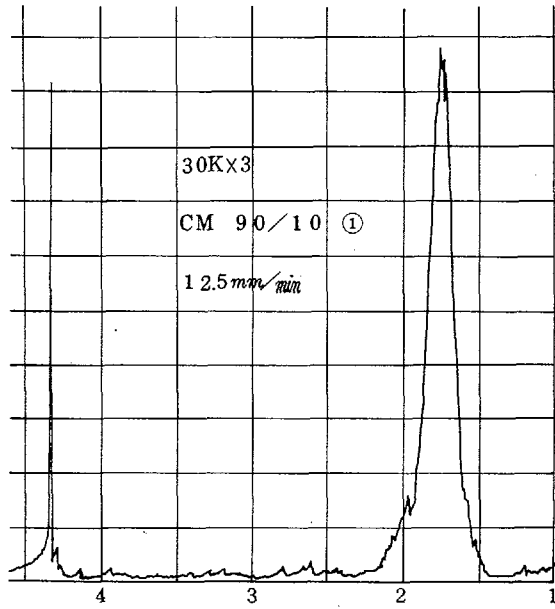


図 精製した³HCer-Glc の radioautogram

↓ 検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用 ↓
論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります

目的

Gaucher 病の酵素学的診断に必要な天然基質 glucosyl ceramide(glc-cer)を
3H で標識し,測定感度を上昇させて診断を容易にすることを目的とした。