

## Microlymphocyte Cytotoxicity Test

1. ヘパリン採血 (5 ml)
2. 比重法によりリンパ球分離
3. 分離したリンパ球を McCoy's medium に浮遊させ、  
2,500/mm<sup>2</sup> に数を調整する。
4. microtest plate にあらかじめ 1 ml ずつの抗血清  
を分注、パラフィンにて乾燥を防ぐ。
5. plate にリンパ球 1 ml 添加。
6. 22°C, 45 分 incubation。
7. ウサギ補体 5 ml 添加。
8. 22°C, 90 分 incubation。
9. ネオジジン染色, 5 分間放置。
10. ホルマリン添加。
11. カバーガラスをかける。
12. 位相差顕微鏡にて判定。
  - 0~ 30% 1
  - 30~ 50% 2
  - 50~ 75% 3
  - 75~ 100% 4 (反応して死んだリンパ球率)
 3, 4 を陽性とする。

## III. 結 果

先天性四肢障害, 染色体異常例を正常対照群と比較して一覧表に示した。しかし, 本対象例はそれぞれ例数が少ないため推計学的処理は行わなかった (別表)。

## IV. 考 案

臨床免疫学の面で, HLA の研究には目ざましいものがあり, ある種の疾患の遺伝学的背景を探る上で, HLA は非常に有用な手段となるものと考えられている。先天性疾患との関係については, Terasaki らは先天異常児を出産した母親の血清中には正常者と比べ有意な HLA 抗体出現率を報告して, 母児間の HLA 不適合が先天

別表 HLA 抗原の phenotype frequency

	Control	先天性四肢障害	染色体異常
Locus A			
A 2	38.7%	1 (10%)	5 (45.5%)
A 9	58.1	6 (60 )	5 (45.5 )
A10	27.4	4 (40 )	4 (36.4 )
A11	21.0	3 (30 )	2 (18.2 )
Locus B			
B 7	14.5%	1 (10%)	2 (18.2%)
B12	11.3	0	2 (18.2 )
B13	1.6	0	1 ( 9.1 )
B15	16.1	4 (40 )	1 ( 9.1 )
BW16	14.5	2 (20 )	1 ( 9.1 )
BW35	11.7	2 (20 )	1 ( 9.1 )
B40	38.7	1 (10 )	5 (45.5 )
BW46	3.2	1 (10 )	0
BW51	21.0	2 (20 )	1 ( 9.1 )
BW52	22.6	1 (10 )	2 (18.2 )
BW54	8.1	4 (40 )	2 (18.2 )

異常形成に何らかの影響を及ぼす可能性を示唆している。また, Buc らは先天性心疾患の患者に HLA-A2 の有意の上昇を見たことを報告している。その他, Down's syndrome, Brachymetacarpus, pyloric stenosis などの検討もされており, 先天性四肢障害症と HLA との相関も期待されるところであるが, 今回の我々の preliminary な data からは明らかな結論を得ることが出来なかった。これには, 各疾患群の対象例が少ないこと, 単一疾患群でないため再現性に欠けることなどがあげられる。その他, これらの疾患では C 6 への影響が少ないためなのかも考慮する必要がある。しかし, 今後, 症例を重ねると共に詳細な family study を行い, 家系内での遺伝子の動向を追究することで, C 6 染色体のこれら患児に及ぼす影響, さらには他の染色体の marker としての C 6 染色体の有意性の有無を見極める必要があろう。

## 角膜の混濁のある L-iduronosulfate sulfatase 欠損症の 2 家系 2 症例

岐阜大小児科 折 居 忠 夫

遺伝性ムコ多糖代謝異常症である Hurler 症候群 (狭義の意味に使用), Scheie 症候群について 1972 年 Bach らおよび Matalon と Dorfman は  $\alpha$ -L-iduronidase 活

性を測定し, その欠損をそれぞれ独立に発見した。さらに臨床的に両者の中間型である Hurler-Scheie compound についても同酵素活性の欠損が Neufeld によって

見出されたと McKusick は記載している。

著者らは  $\alpha$ -L-iduronide を用いて本酵素活性の欠損が考えられる以前から角膜の混濁の存在することなどから Hurler 症候群と診断していた3例, Hurler-Scheie compound の3例および Scheie 症候群の1例, 計7例の白血球について検索したところ, 意外にも Hurler 症候群と診断していた2家系3例に酵素活性の欠損を見出し得なかったことはすでに医学のあゆみ, 98:610, 1976; Tohoku J. exp. Med., 122:393, 1977; Pediatrics, 60:764, 1977 に発表した。それで今回その病因を検索するために Hunter 症候群に欠損している L-iduronosulfate sulfatase の基質を調製し, 本酵素活性の有無を検討した。

### I. 実験材料および方法

#### 1) 症例

症例1と2<sup>1-3)</sup>(図1)は兄弟で兄は9才, 弟は4才の時精査を行っている。症例3<sup>1-3)</sup>(図1)は両親がまたいとこ結婚で4才の時精査を受けている。症例1, 2, 3ともに特有の顔貌, 角膜の混濁, 高度の精神運動発達遅延, 関節の運動制限, 特有の軟骨内化骨障害, 肝脾腫(症例1, 肝7cm, 脾3.5cm; 症例2, 肝5cm, 脾1.5cm;

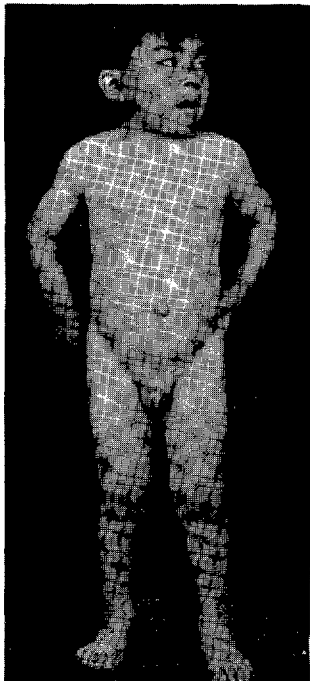


図1 症例2(4才)と症例3(4才)

表1 L-Iduronosulfate Sulfatase Activities

Patient	Sex and Age	n mole/mg protein/hr.
Case 2	M, 13	0
Case 3	M, 12	0
Hurler	M, 1	1.97
Control (n=3)	—	1.16 (0.87 1.54)

症例3, 肝3.5cm), 臍ヘルニアなどの特徴的症候と組織学的所見を備え, 尿中ムコ多糖の増量とから Hurler 症候群と診断していた。症例1は12才時重心施設へ収容され, 除脳強直の状態, 次第に嚥下困難のため経管栄養が行われ, 流涎の嚥下も不能となり, 頻回の吸引も効なく15才で死亡した。症例2は現在13才であるが, 症例1よりやや症状が軽く, 症例3は現在12才で排便排尿は教えないが長時間椅子に坐っていることができる。

#### 2) 基質の調製

Lim ら<sup>4)</sup>の方法により 0-( $\alpha$ -L-idopyranosyluronic acid 2-sulfate)—(1 $\rightarrow$ 4)—2,5 anhydro-D-mannose 6-sulfate の分離・精製と [<sup>3</sup>H] 標識を行った。①ヘパリン (Sigma 社) を塩化セチルピリジニウム (CPC) 法にて精製し, 1.4 M と 1.2 M NaCl 沈澱画分を集める。②精製ヘパリンを butyl nitrite にて脱アミノ化分解し,

2糖体を Sephadex G-25 カラムで分離する。③ECTEOALLA セルローズ カラムにて2糖体から disulfated uronosylanhidromannose を分離する。④ [<sup>3</sup>H] NaBH<sub>4</sub> を用いて disulfated uronosylanhidromannose を還元標識しこれを基質とする。

#### 3) 酵素試料

E Bウイルス感染株細胞約 10<sup>7</sup> 個を 0.9% NaCl 0.5 ml でホモジナイズした後凍結融解し 0.9% NaCl 溶液中で18時間透析を行い酵素試料とした。

#### 4) 酵素活性測定法

Liebaers ら<sup>5)</sup>の方法に準拠して測定した。0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 4.0) 10  $\mu$ l, 5 mM アジ化ナトリウム 10  $\mu$ l, 1 mg/ml のウシ血清アルブミン 10  $\mu$ l, 3 mM [<sup>3</sup>H]標識硫酸化2糖類 (0.2  $\mu$ Ci) 10  $\mu$ l, 50~200  $\mu$ l の蛋白量の酵素試料を加えて全量を 90  $\mu$ l とし 37°C で2時間インキュベイトし, 蒸溜水 1.5 ml の添加にて反応を停止させ, ECT

表 2 Leucocyte acidy-drolase activities

Patient	Sex and Age (yrs)	Enzyme activity per mg protein				
		$\alpha$ -L-iduronidase (nmole/18 h)	$\beta$ -D-galactosidase (nmole/h)	$\beta$ -D-glucuronidase (nmole/h)	N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase (nmole/h)	Arylsulfatase B (nmole/h)
<b>Hurler</b>						
Case 1	M, 15	166	208	147	485	109
2	M, 11	244	105	—	806	—
3	M, 10	286	217	99	1,639	159
<b>Hurler-Scheie compound</b>						
Case 4	M, 28	0	186	99	790	68
5	M, 25	0	155	110	891	101
6	F, 13	0	349	200	759	137
<b>Scheie</b>						
Case 7	M, 16	12	136	76	1,288	81
Control (mean)		185	284	178	1,265	108
Control (range)		105~371 (n=10)	167~417 (n=10)	84~337 (n=10)	460~2,829 (n=10)	32~231 (n=6)

EOLLA セルローズカラム (bed volume 0.6 ml, formate form) にアプライし, 0.07 M 蟻酸ナトリウム溶液 10 ml で反応生成物を溶出させ, 溶出液 1 ml にトルエンシンチレーター 9 ml (トルエン 11, Triton X-100 500 ml, ppo 4 g, popop 0.1 g) を加えて液体シンチレーションカウンターにて測定した。なお蛋白量はLowry法にて測定した。

## II. 実験成績

表 1 に示す如く対照 3 例の L-iduronosulfate sulfatase 活性は平均 1.16 n mole/mg/hr. であった。しかし症例 2 と 3 は本酵素活性を見出し得なかった。なお  $\alpha$ -L-iduronidase 欠損症 (Hurler 症候群の 1 例の L-iduronosulfate sulfatase 活性は 1.97 n mole/mg/hr. であった。

## III. 考 案

従来 Hunter 症候群の分類また診断に角膜の混濁のないことが必須の条件であった。著者らも症例 2 と 3 は 4 才の初診時すでに著明な角膜の混濁を見出し, その他の所見もあわせて Hurler 症候群と診断していた。最近

の文献に Hunter 症候群の成人例に例外的に角膜の混濁を記載した報告はあるが, 幼児期にすでに角膜の混濁があって L-iduronosulfate sulfatase の欠損せる症例の報告はない。またごく最近女性の L-iduronosulfate sulfatase 欠損症の報告もあり, さらに同胞間で臨床症状のことなる重症型と軽症型の存在が報告されている。

Genetic heterogeneity の問題は常に古くて新しい問題点ではある。今後これらの問題点を追求してゆきたいと考える。

## IV. 結 論

幼児期から角膜の混濁のある L-iduronosulfate sulfatase 欠損症の 2 家系 2 症例をみいだした。

## 文 献

- 1) 折居忠夫・他: 医学のあゆみ, 98: 610, 1976.
- 2) Orii, T. et al.: Tohoku J. exp. Med. 120: 113, 1976.
- 3) Orii, T. et al.: Pediatrics, 60: 764, 1977.
- 4) Lim, T.W. et al.: Carbohydr. Res. 57: 103, 1974.
- 5) Liebaers, I. et al.: J. Pediatr. 90: 423, 1977.

↓  
**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  
↓

遺伝性ムコ多糖代謝異常症である Hurler 症候群(狭義の意味に使用), Scheie 症候群について 1972 年 Bach らおよび Matalon と Dorfman は  $\alpha$ -L-iduronidase 活性を測定し, その欠損をそれぞれ独立に発見した。さらに臨床的に両者の中間型である Hurler-Scheie compound についても同酵素活性の欠損が Neufeld によって見出されたと McKusick は記載している。

著者らは  $\alpha$ -L-iduronide を用いて本酵素活性の欠損が考えられる以前から角膜の混濁の存在することなどから Hurler 症候群と診断していた 3 例, Hurler-Scheie compound の 3 例および Scheie 症候群の 1 例, 計 7 例の白血球について検索したところ, 意外にも Hurler 症候群と診断していた 2 家系 3 例に酵素活性の欠損を見出し得なかったことはすでに医学のあゆみ, 98:610, 1976; Tohoku J. exp. Med., 122:393, 1977; Pediatrics, 60:764, 1977 に発表した。それで今回その病因を検索するために Hunter 症候群に欠損している L-iduronosulfate sulfatase の基質を調製し, 本酵素活性の有無を検討した。