

ゴーシェ病の病型に関する研究

北川 照 男
大和田 操
(日本大学医学部小児科教室)

I. はじめに

Gaucher 病は複合糖脂質 glucosyl ceramide (GlcCer) の代謝の遺伝的な障害症で^{1)~5)}, β -glucosidase の欠損のために網内系に多量の GlcCer が蓄積する lysosomal storage disease である。

Gaucher 病は臨床的に肝脾腫, hypersplenism を主徴とし, 慢性の経過をたどる Type I (chronic nonneuronopathic form, adult form), 肝脾腫, 貧血の他に斜視, 筋緊張亢進, 頭部後屈などの神経症状が乳児期に出現し, 急性の経過をたどって生後2年以内に死亡する Type II (acute neuronopathic form, infantile form) および神経症状の発現が緩徐な Type III (subacute neuronopathic form, juvenile form) の3型に分類されている。しかし, この各病型における臨床的な差異が如何なる生化学的異常の差異に基づくものかは明らかでない。そこでわが国の Gaucher 病の臨床的, 生化学的特徴を明らかにするために, 18例の Gaucher 病について研究を行い, その蓄積脂質と β -glucosidase に検討を加えたので報告する。

II. 研究対象

Type I 7例, Type II 10例, Type III 1例の Gaucher 病患者について生化学的な分析を行った。その内訳は, 蓄積脂質の分析を行ったもの9例, および培養皮膚 fibroblast における酵素分析を行ったものが12例である。

Type I は全例生存しており, Type II の9例および Type III の1例がそれぞれ死亡している。

本報告では, 臓器における酵素分析と脂質分析を行った7例を中心に述べる。なお, その症例の臨床経過は表1に示すようである。

III. 研究方法

1. 脂質分析

1) 脂質の抽出

臓器の脂質は, Folch の方法⁶⁾に従い, 19倍容のクロロホルム, メタノール(2:1 V/V)にて抽出し, これを総脂質として秤量したのちに溶媒分別を行った。

表1 7例の Gaucher 病の臨床経過

	Age at onset	Age at death	Neurological symptoms
Infantile type (II)			
Case 1	6 M	1 Y 3 M	(++)
2	6 M	1 Y 1 M	(++)
3	5 M	8 M	(++)
4	4 M	1 Y 1 M	(++)
Juvenile type (III)			
Case 5	1 Y	5 Y	(+)
Adult type (I)			
Case 6	2 Y	8 Y*	(-)
7	2 Y	6 Y*	(-)

* Age splenectomy

2) ケイ酸カラムクロマトグラフィーによる Glc-Cer の⁷⁾分離

Folch の下層を乾固して少量のクロロホルムに溶解して、ケイ酸カラムにて CHCl_3 -MeOH 95:5 分画を除き、90:10の分画を採取して乾固、秤量して Glc-Cer 含量とした。

3) 薄層クロマトグラフィー (T.L.C.)

総脂質、およびケイ酸カラムクロマトグラフの90:10分画の少量を採り、T.L.C. を行った。展開は CHCl_3 :MeOH:H₂O (65/25/4) にて行い、アンスロン硫酸にて発色した⁸⁾。

2. 酵素分析

1) 皮膚 fibroblast の培養

皮膚生検により得た皮膚 fibroblast は、15%の割合に fetal calf serum を含む F-10 培地で培養した。培地は週に2~3回交換し、4~6週で細胞を機械的に剥離し、生食水にて洗滌したのち、水を加えて超音波処理を行った。 β -glucosidase 活性は、whole homogenate にて測定した。

2) 酵素液の調整

Gaucher 病および control の脾と肝は、9倍容の水を加え、glass homogenizer にて homogenize し、8,000×g 20分間遠沈して上清を分離して、soluble fraction とした。沈澱は、水で1回洗滌後8,000×g 20分間遠沈し、上清を捨て、10% homogenate となるように水を加えて再び homogenize し、particulate fraction として酵素分析を行った。

3) 酵素活性測定法

基質としては、Gaucher 病患者の脾から抽出精製した Glc-Cer (天然基質) と、4-methylumbelliferyl- β -glucoside (4 MU- β -glucoside, 合成基質, 半井化学) とを用いて測定した。

i) Glc-Cer- β -glucosidase 活性測定⁹⁾法

Glc-Cer 250 μ moles, コール酸ナトリウム 250 μ g に0.1 M citrate phosphate buffer (pH 3.0~8.0) 0.2 ml を加えて37°C で6~8時間 incubate したのち、沸騰水溶液中で3分間加熱して反応を停止し、冷却後、hexokinase, G-6-P dehydrogenase による Lowry¹⁰⁾の方法にて、

遊離した glucose を NADPH の生成量から換算した。

ii) 4 MU- β -glucosidase 活性

4 MU- β -glucosidase を最終濃度で 0.5 mM となるように、0.1 M citrate phosphate buffer と酵素液を加えて調整し、37 °C にて1~2時間 (fibroblast では6時間) incubate したのち、0.2 M glycine buffer pH 10.8を加えて反応を停止させ、遊離した 4-methylumbelliferone の蛍光を Turner の Fluorometer Model 10を用いて、excitation 365 m μ , emission 450 m μ にて測定した。

iii) 4 MU- β -galactosidase 活性

lysosomal enzyme の marker として、同時に 4 MU- β -galactosidase を測定し、pH 4.5 における β -glucosidase と β -galactosidase の活性比を計算した。

4) 蛋白の定量は、Lowry 法の変法¹¹⁾により行った。

3. 肝 β -glucosidase の部分精製

1) DEAE cellulose column による部分精製

肝を5倍容の10 mM phosphate buffer pH 6.0にて homogenize し、8,000 \times g 20分間遠沈してその上清を粗抽出液とした。

粗抽出液を硫酸アンモニウムにより塩析し、その70%飽和分画を phosphate buffer にて透析して、DEAE cellulose (Brown), カラム (11mm \times 170 mm) に吸着させ、NaCl 溶液による gradient elution を行った。溶出液は3.5mlずつ採取し、各 tube の蛋白量は280 m μ の吸収で測定し、 β -glucosidase 活性は4 MU- β -glucoside を用いて pH 5.0 で測定した。NaCl 濃度は、200 ml 溶出時 (tube No.55附近) が0.1 M となるように調整した。以上の操作は全て4 °C にて行った。

2) 部分精製した β -glucosidase の酵素学的性質の検討

DEAE cellulose column chromatography による β -glucosidase の活性の peak の部分を集めて、citrate phosphate buffer pH 3.0~8.0における pH dependence の測定、Michaelis Constant (Km) の測定、heat stability の検討 (50 °C 加熱) を行った。

4. 肝 β -glucosidase の等電点分画

Triton X 100 0.5%を含む0.1 M citrate phosphate buffer pH 6.0にて肝の10% homogenate を作製し、凍結融解、超音波処理を行ったのち、100,000 \times g 60分間遠心し、上清を0.5% glycine にて一夜透析後、再び100,000 \times g 60分間遠沈して得た上清を酵素液とした。酵素液 1 ml を用いて Vesterberg and Svensson の¹²⁾方法で110 ml の2%アンホライン(pH 3~10) 蔗糖溶液カラムを用いて等電点分画を行った。溶出液は 1 ml ずつ採取し、それぞれの pH を測定し、4 MU- β -glucosidase 活性を pH 5.0にて測定した。

IV. 研究結果

1. 脂質分析

1) Glc-Cer 含量 (表2)

表2 Gaucher 病の脾および肝における
Glucosyl ceramide 含量

		Spleen	Liver
Type II			
Case	1	33.8	17.3
	2	30.4	13.5
	3	21.0	10.3
	4	23.2	16.2
Type III			
Case	5	25.6	18.5
Type I			
Case	6	24.4	—
	7	26.1	—
Controls		0.10~0.28 ²³⁾	0.20 ²⁵⁾

(mg/g wet tissue)

7例の Gaucher 病脾における Glc-Cer 含量は21~33.8 mg/g wet spleen で, Suomi ら¹³⁾の報告による正常対照の脾の Glc-Cer 0.10~0.28 mg/g wet tissue に比べて著明な増加を示していた。また, Type II および Type III の肝における Glc-Cer も10.3~18.5 mg/g wet liver で, 脾の場合と同様に著しい増加が認められた。これらの Glc-Cer は全て TLC により単一の等しい Rf を有する spot として確認され, ホウ酸を含む plate を用いた TLC では, galactosyl ceramide と異なった Rf を示し, Glc-Cer の Rf 値と一致した。

2. 酵素分析

1) 培養皮膚 fibroblast における β -glucosidase 活性

12例の Gaucher 病の培養皮膚 fibroblast における4 MU- β -glucosidase 活性は図1のようであり, pH 4.5における活性は各病型でほとんど差をみとめず, 対照に比べると著明な活性低下を示していた。しかし, 保因者と正常との間には有意の差はみられなかった。また, pH 4.5における β -glucosidase / β -galactosidase 比も対照と Gaucher 病では著明な差を認めたが, 一部の保因者と正常との間には明らかな差異がみられなかった。Glc-Cer- β -glucosidase 活性を一部の線維芽細胞について測定したが, Gaucher 病では著明な活性低下が認められた。

12例中6例について, 4 MU- β -glucosidase の pH dependence を測定したが, 図1のように, 対照に比べていずれの pH においてもその活性が低下しているのが認められた。

2) 肝および脾における β -glucosidase 活性

pH 4.5 および 6.0 において測定した Glc-Cer- β -glucosidase, 4 MU- β -glucosidase 活性は, 次のようである。天然基質水解能は Gaucher 病の脾では著明に低下しており, 肝においては Type III の1例を除いて活性低下が認められた。Type II および Type III の Gaucher 病の脾の可溶性分画における合成基質水解能は明らかに低下していたが, Type I では中等度の低下を示していた。また, particulate 分画でも II 型, III 型において正常の30%以下の活性を

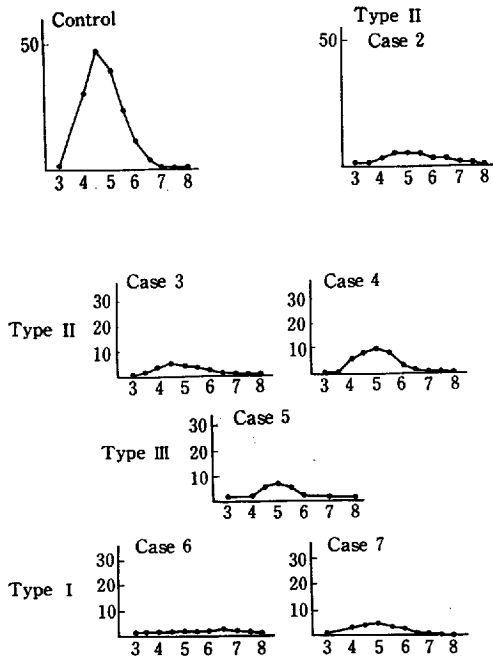


図1 培養皮膚 fibroblast の 4 MU- β -glucosidase 活性

示していたが、I型では中等度の活性低下を認めたと過ぎなかった。これに対して肝の 4 MU- β -glucosidase は、2例の Type II および Type III の1例において正常に近い活性を示していたが、2例の Type II ではその活性が著明に低下していた。肝の 4 MU- β -glucosidase 活性の低下している症例においては、肝に正常の活性を有する症例に比較して、脾における活性

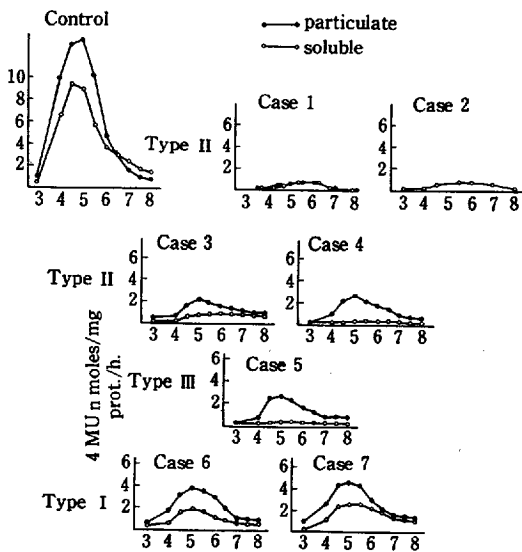


図2 脾8000 \times g particle, 及び8000 \times g soluble fraction における 4 MU- β -glucosidase 活性

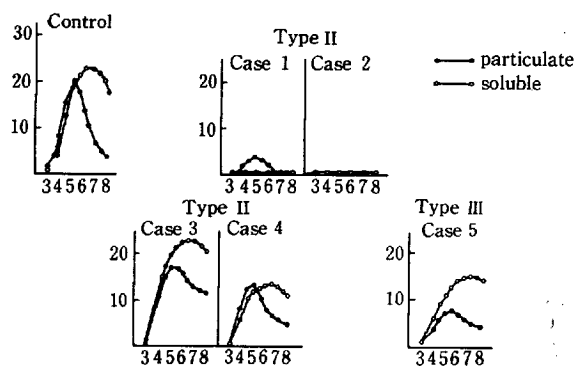


図3 肝8000×g particle および soluble fraction における 4 MU- β -glucosidase 活性

も著しく低下している傾向が認められた。

前述の7例の Gaucher 病の脾と5例の肝における 4 MU- β -glucosidase の pH dependence は図2, 3のようであり, 肝の β -glucosidase 活性の低い2例においては, 脾の 4 MU- β -glucosidase 活性も低下していた。control 肝の pH profile をみると, particle 分画は酸性側に至適 pH を有する急峻な曲線を示しており, soluble fraction ではアルカリ側でも活性が高く, broad な曲線を示していた。肝における 4 MU- β -glucosidase 活性の正常なものの pH profile も正常対照の肝と同様な曲線を示しており, 両者に大きな差はみられなかった。正常の脾の 4 MU- β -glucosidase は particle 分画の方に活性がよく, pH activity curve は soluble 分画と particle 分画で差がみられなかった。Type II の2例, Type III の1例および Type I の1例の脾においては, particle 分画にある程度の活性が認められ, その至適 pH は control と同様であった。

V. 考 按

1. 蓄積物質について

Gaucher 病患者の肝, 脾における Glc-Cer の蓄積量についての集計に¹⁴⁾よると, その蓄積の度合は, 正常対照の数十倍から数百倍に達しているが, 病型との関連はみられていない。本研究の分析結果においても, その量は病型に関係なく, 肝脾に Glc-Cer の蓄積を認めた。

2. 組織の β -glucosidase 活性について

1) 培養皮膚 fibroblast

Gaucher 病の臨床診断を確定するには, 培養皮膚 fibroblast の 4 MU- β -glucosidase を測定することが最も容易で, しかも, 確実な方法と思われる。これまでの報告と同様に, 4 MU- β -glucosidase も, Glc-Cer- β -glucosidase も, 患者において著明に活性が低下し, 正常対照と明らかな差異を示していた。

2) 脾および肝の β -glucosidase

われわれは、Gaucher 病の各臨床型について、皮膚線維芽細胞、肝、脾の β -glucosidase の天然基質の水解能と合成基質の水解能を比較検討した結果、Type I と III においては、脾の 4 MU- β -glucosidase が Type II よりも高い傾向を、Type I と III および Type II の一部においては、肝の 4 MU- β -glucosidase がほとんど正常に近い活性を示すのを認めた。そして、Type II の一部は皮膚線維芽細胞、脾および肝の何れも 4 MU- β -glucosidase が低いが、一部は線維芽細胞と脾にのみその活性低下を認め、生化学的に 2 群に分けることができるということを見出した。

1965年、Brady¹⁾ らは、Gaucher 病脾における Glc-Cer- β -glucosidase の活性低下を報告し、Patrick²⁾ および Öckerman ら⁵⁾ は基質として PNP- β -glucoside および 4 MU- β -glucoside を用いても、 β -glucosidase 活性の低下を証明することが可能であると報告した。そして、脾のみではなく、肝、白血球、および fibroblast における活性も脾と同様に低下しているとの報告もある¹⁵⁾¹⁶⁾。しかし、すでに、1965年に Patrick²⁾ は、1例の Gaucher 病の肝においては Glc-Cer- β -glucosidase は対照の30%以下の値を示していたが、PNP- β -glucosidase は対照の2倍の活性を示したと報告し、われわれも肝における 4 MU- β -glucosidase 活性が正常な Gaucher 病を3例経験し、報告している。¹⁷⁾

以上の結果から、4 MU- β -glucosidase と Glc-Cer- β -glucosidase は、同一の酵素ではなく、また、4 MU- β -glucosidase も単一の酵素ではなく、ヒトの臓器の β -glucosidase には、いくつかの isozyme があることが示唆された。

また、数年前から、 β -glucosidase の性質に関する研究が盛んになり、ゲル濾過を用いた β -glucosidase の分画に¹⁸⁾ 関する報告、Gaucher 病脾には熱に安定な β -glucosidase 活性化因子が存在するという報告^{19)~23)}、胆汁酸塩やある種の酸性リン脂質によって、 β -glucosidase が活性化されるという報告などがあり、Gaucher 病における β -glucosidase の活性低下にもいろいろな因子が関与している可能性がある。そして、臨床的な病型の差異には、 β -glucosidase の遺伝的変異の差異ばかりでなく、活性化因子なども関与している可能性があり、これらについて詳細な研究が必要と思われる。

VI. む す び

Type I 7例、Type II 10例、Type III 1例の Gaucher 病について、生化学的な分析を行って次のような成績を得た。

1) 肝脾における Cer-Glc の蓄積量と、Cer-Glc の脂酸構成には、病型による差異を認めなかった。

2) 培養皮膚線維芽細胞の β -glucosidase 活性は、4 MU- β -glucoside を基質として測定しても著明に低下していた。そして、その活性低下の程度には病型による差異はみられなかった。

3) 脾の Cer-Glc- β -glucosidase 活性は何れの病型も著しく低下し、肝の Cer-Glc- β -gluc-

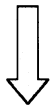
osidase 活性も, Type III の 1 例が中等度の低下を示した以外は, 著明な低下を認めた。

4) 脾の 4 MU- β -glucosidase 活性は, 可溶性分画, 顆粒分画の何れにおいても, II 型, III 型において著明な低下を認め, I 型では軽度ないし中等度の低下を認めた。

5) 肝の 4 MU- β -glucosidase 活性は, 可溶性分画, 顆粒分画の何れにおいても, 2 例の II 型で著しい低下を示していたが, II 型 2 例, III 型 1 例では中等度以上の活性を示した。

文 献

- 1) Brady, R.O. et al. : Biochem. Biophys. Res. Commun., **18** : 221, 1965.
- 2) Patrick, A.D. : Biochem. J., **97** : 17C, 1965.
- 3) Brady, R.O. et al. : J. Clin. Invest., **45** : 1112, 1966.
- 4) Hultberg, B. and Öckermam, P. A. : Clin. Chim. Acta, **28** : 169, 1970.
- 5) Öckerman, P.A. and Köhlin, P. : Scand. J. Lab. Invest., **22** : 62, 1968.
- 6) Folch, J. et al. : J. Biol. Chem., **226** : 497, 1957.
- 7) Makita, A. et al. : Tohoku J. Exp. Med., **88** : 277, 1966.
- 8) Morrison, W.R. et al. : J. Lipid Res., **5** : 600, 1964.
- 9) Handa, S. and Yamakawa, T. : J. Neurochem., **18** : 1275, 1971.
- 10) Lowry, O.H. et al. : J. Biol. Chem., **239** : 18, 1964.
- 11) Lowry, O.H. et al. : J. Biol. Chem., **193** : 265, 1951.
- 12) Vesterberg, O. and Svensson, H. : Acta Chem. Scand., **20** : 820, 1966.
- 13) Suomi, M.D. and Argranoff, B. W. : J. Lipid Res., **6** : 211, 1965.
- 14) Stanbury, J. B. et al. : The Metabolic Basis of Inherited Disease, McGraw-Hill, 744, 1972.
- 15) Kampine, J. P. et al. : Science, **155** : 86, 1967.
- 16) Beutler, E. et al. : J. Lab. Clin. Med., **76** : 747, 1970.
- 17) Owada, M. et al. : Pediat. Res., **11** : 641, 1977.
- 18) Ho, M. W. : Biochem. J., **136** : 721, 1973.
- 19) Ho, M. W. and O'Brain, J. S. : Proc. Nat. Acad. Sci., **68** : 2810, 1971.
- 20) Ho, M. W. et al. : Biochem J., **131** : 173, 1973.
- 21) Ho, M. W. et al. : Biochem. J., **136** : 821, 1973.
- 22) Pentchev, P.G. et al. : Biochem. Biophys. Acta, **297** : 491, 1973.
- 23) Peters, S.P. et al. : J. Biol. Chem., **252** : 563, 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



1.はじめに

Gaucher 病は複合糖脂質 glucosyl ceramide(GlcCer)の代謝の遺伝的な障害症で 1)-5),
— glucosidase の欠損のために網内系に多量の GlcCer が蓄積する lysosomal storage
disease である。

Gaucher 病は臨床的に肝脾腫 ,hypersplenism を主徴とし ,慢性の経過をたどる
Type1 (chronic nonneuronopathic form, adult form) ,肝脾腫 ,貧血の他に斜視筋緊張元通頭
部後屈などの神経症状が乳児期に出現し ,急性の経過をたどって生後 2 年以内に死亡する
Type (acute neuronopathic form, infantile form)および神経症状の発現が緩徐な Type
(subacute neuronopathic form, juvenile form)の 3 型に分類されている。しかし ,この
各病型における臨床的な差異が如何なる生化学的異常の差異に基づくものかは明らかでな
い。そこでわが国の Gaucher 病の臨床的 ,生化学的特徴を明らかにするために ,18 例の
Gaucher 病について研究を行い ,その蓄積脂質と — glucosidase に検討を加えたので報告
する。