

遺伝性リソゾーム病診断のための新しい酵素 測定法の開発ならびに患者由来細胞の無限増 殖株の樹立

研究協力者 鈴木 義之
(東京大学医学部小児科)

共同研究者 加藤 尚彦
(東京大学医学部脳研究施設・
生化学部門)

桃井 隆

溝部 達子

粕谷 淳子

(国立武蔵療養所神経センター・
疾病研究第五部)

われわれは1972年以来、遺伝性リソゾーム病二次スクリーニングの目的に、患者試料を用いた多項目酵素測定をおこない、多くの患者を発見した¹⁾。測定には血液細胞や皮膚由来線維芽細胞を用いることが多いが、多くの患者検体を扱うようになると、できるだけ省力化し、且つ再現性のよい装置、手技が要求されるようになる。しかも対象患者が乳幼児の場合、必ずしも十分な検体量が得られるとは限らない。そのため、微量の検体を用いた高感度測定法の開発がのぞまれてきた。

多くの症例は、比較的典型的臨床経過、臨床像を示し、特定の酵素活性の測定により、明確な診断がつけられた。しかしながら、中には臨床的にも生化学的にも診断未確定のままで終る症例もあった。ところが診断法の進歩により、後者の中には後年になって別の測定項目の実施により診断された場合があり、患者試料の保存という問題がでてきた。

これらの問題への対応として、本研究班では、微量試料を用いた高感度自動測定法の開発のために2つの異ったアプローチをおこなうとともに、患者試料の中で、これまで永久保存は不可能であった線維芽細胞にSV40のDNAを導入することにより、無限増殖株の作成をおこなった。この方法による試料加工により、患者の生きた細胞が、常に供給可能となり、診断のみならず、その病態解析にも極めて有用な材料を提供することができるようになった。

A. 高感度微量測定法の開発

1) 従来の試験管内酵素測定法の微量化

これまでリソゾーム病診断のための酵素測定には、人工的蛍光基質である4-メチルウンベリ

フェロン誘導体を用い、通常のスケールで蛍光比色をおこなってきた。それぞれの操作自体、特殊な技術を必要とするものではないが、多数検体の処理にはかなりの手間を要し、試験管のとりちがえという事故も皆無ではなかった。そこでわれわれは、この操作を簡便化するために、免疫学的操作に用いられる96穴マイクロプレートを使用し、同時に検体の微量化をこころみた。

その1例として、 β -ガラクトシダーゼ測定例についてのべる²⁾。各ウェルには、20 μ l の基質液 (2 mM 4-メチルウンベリフェリル β -D-ガラクトピラノシド; 半井化学), 40 μ l のクエン酸緩衝液 (0.2 M, pH 4.5; 0.2 M 塩化ナトリウムを含む) と20 μ l の酵素液を混和し、37 $^{\circ}$ C で10~60分インキュベートした。酵素反応は200 μ l のグリシン緩衝液 (0.2 M, pH10.7) を加えて停止させ、発生した蛍光はマイクロプレート蛍光比色計 (コロナ MTP-12) で測定し、データは NEC9801型パーソナルコンピュータで直接処理をおこなった。

この工夫により、個々の試験管の扱いが全く省略され、とりちがえの心配もなくなり、蛍光セルへの試料の移しかえも不要となった。この測定システムを用いた結果、図1に示したように、普通の蛍光比色計を使用した場合に比べ、絶対的な感度が100倍に上昇した。従って、

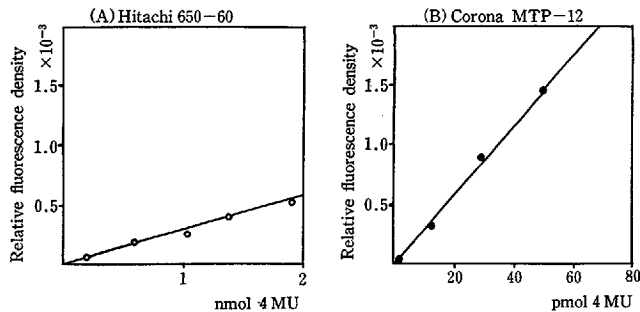


図1 蛍光比色法の比較²⁾

(A) 通常の方法 (B) コロナ MTP-12 を用いたプレート比色法

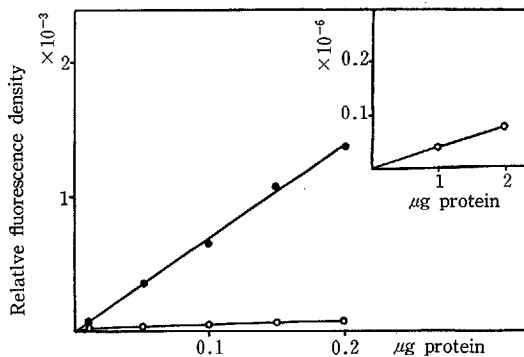


図2 線維芽細胞中 β -ガラクトシダーゼ活性測定²⁾

●—● 正常細胞, ○—○ GM₁-ガングリオシドーシス細胞

マイクロプレート上での反応液の量はさらに減少させることが可能であった。反応液量を減らすことにより、インキュベーション中の蒸発による量の変化が無視し得なくなる。この点は、無蛍光流動パラフィンで水滴の表面を被う（オイルウェルとする）ことにより、蒸発を防ぐことができた。

線維芽細胞を用いた場合、正常細胞であれば、 $0.1 \mu\text{g}$ 以下の蛋白量の酵素活性を検出することが可能であった（図2）。

従ってこのシステムは、微量検体を用いる多項目スクリーニングに通しており、汎用するべきものと考えられた。

2) 酵素的サイクリング法による自動分析

酵素的サイクリング法とは、2つの酵素によるサイクル反応を用い、微量の補酵素を増幅定量する方法である³⁾。現在、 $\text{NAD}^+ - \text{NADH}$, $\text{NADP}^+ - \text{NADPH}$, $\text{CoASH} - \text{アセチル CoA}$ の3つの系を用いた反応による定量法が開発されている。われわれはまず NAD サイクリング法によるガラクトースの微量定量法を開発し、ガラクトセレブロシダーゼ活性測定に応用した⁴⁾。

この方法においては、酵素により遊離されたガラクトースをガラクトノラクトンに酸化する際に生成される等モルの NADH を、酵素的サイクリングにより増幅し、定量した。これを白血球、線維芽細胞中の活性測定に利用した結果をまとめたのが図3である。このデータは、ラジオアイソトープを用いた従来の測定法と本質的に同じ結果であるばかりでなく、それよりも100~500倍の高感度であり、微量定量法として臨床応用の可能であることが示された⁴⁾⁵⁾。白

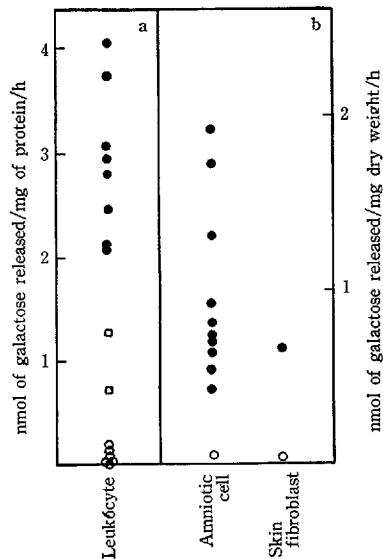


図3 酵素的サイクリング法によるガラクトセレブロシダーゼ活性⁵⁾

●対照, □Krabbe 病患者両親,
○Krabbe 病患者

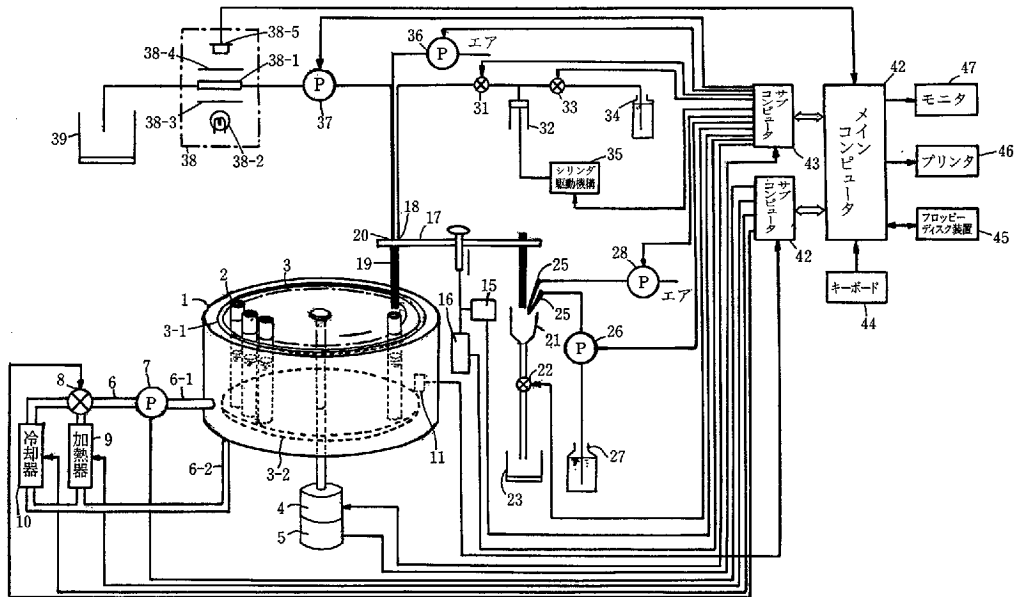


図4 酵素的サイクリング反応装置の構造設計見取図

血球を用いた測定で、患者の両親は低い酵素活性を示し、保因者診断も可能であろうと予想された。

これまででは、この測定をすべて人手により操作してきたが、微量試料を用いる特殊操作を必要とするところから、われわれはこの反応の中で中核をなすサイクリング反応部分を自動化する試みをおこない、原理的には一応成功した。

その原理は図4のようである。反応槽（数字1）にターンテーブル（数字3）を入れ、ロータリーエンコーダ（数字5）で回転角を調節する。不凍液を入れた反応槽は、循環ポンプ（数字7）を介して加熱器（数字9）、冷却器（数字10）と接続する。温度は温度センサ（数字11）で検出され、制御される。反応槽の上に昇降可能なアーム（数字17）を設定し、3本のノズルを固定する。これらは分注（数字34、35）、チューブ内攪拌（数字36）、反応液吸引（数字38）などの目的に用いる。これら相互の働きを制御する目的で2つのサブコンピュータ及びそれらを統括するメインコンピュータを使用することにした。

この試作装置は完成し、試験的運転をおこなっているが、用手法と同じ結果が得られており、今後は機械としての完成度の高い装置の工夫と、特定の物質測定のためのアッセイキットの作成により、汎用化をはかるべく、現在研究を続行中である。

B. 患者由来細胞の無限増殖株の樹立

遺伝性リソゾーム病をはじめ、先天性代謝異常の診断には、患者皮膚由来の線維芽細胞を用

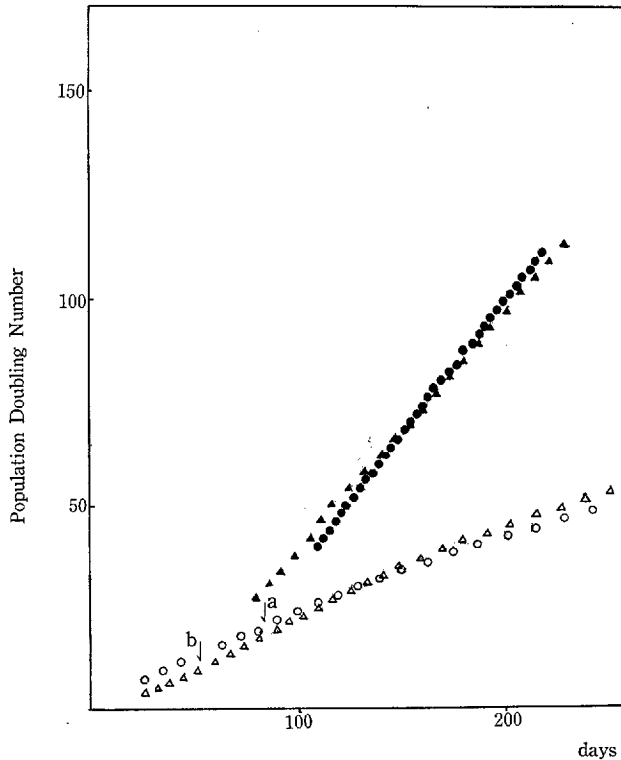


図5 SV40 DNA 導入前後のヒト線維芽細胞増殖曲線
 ○GM₁-ガングリオシドーシス, ●同形質転換株
 △Sandhoff 病, ▲同形質転換株

いることが多い。ところがこの細胞には寿命があり、一般に50回程度の分裂とともに老化し、増殖しなくなる。従って診断、病態解析のために、長期間くり返して使うことには限度があった。われわれはこの難点を克服するために、Simian virus40 (SV40)を用い、細胞の株化を試みた。リンパ球はEB ウイルスを用いて株化することができるが、線維芽細胞については成功していない。

SV40 は種々のヒト細胞の形質転換をおこすことが知られているが、大部分の場合、感染細胞内で DNA (ウイルスの) 複製がおこってしまい、細胞は死にいたる。ところが Gluzman らは最近、細胞の形質転換には、このウイルス DNA の複製開始部位は必要でないことを示した⁶⁾。われわれはこの複製開始部位欠損 SV40 DNA (SV40 ori(-)) を Gluzman より供給され、酵素欠損の確認された線維芽細胞に導入した。

DNA のトランスフェクションはリン酸カルシウム法によりおこない、3週間後に形成されたコロニー(クローン)をとり、それぞれの細胞株について形質転換クローンを確立した⁷⁾。これらのクローンはすべて腫瘍抗原(T 抗原)陽性であった。増殖速度はもとの細胞の3倍で、20時間で細胞数が2倍となった。分裂能は120回の分裂をくり返した後もおとろえず、老化を示す徴候は全く認められなかった(図5)。

表1 SV40 DNA 導入前後の細胞のリゾゾーム酵素活性

Cell line	α -Glucosidase	α -Galactosidase	β -Glucosidase	β -Galactosidase	α -Mannosidase	β -N-Acetyl-hexosaminidase
Normal						
IMR-90	37.5 ± 1.58	57.2 ± 0.72	111.2 ± 5.00	660.9 ± 22.39	71.3 ± 1.62	9021 ± 542.7
IMR-90-SV	35.9 ± 1.87	65.9 ± 3.26	103.0 ± 8.82	675.6 ± 4.84	46.3 ± 3.74	11802 ± 948.3
Gaucher's disease						
GA-15	77.0 ± 2.81		22.7 ± 0.41	797.6 ± 23.78		7696 ± 836.7
GA-15-SV	49.5 ± 3.40		17.7 ± 0.68	748.5 ± 81.89		4226 ± 224.8
Fabry's disease						
FA-1073		2.3 ± 0.13		1396 ± 44.1		9180 ± 304.3
FA-1073-SV		4.1 ± 0.07		537.3 ± 53.53		4762 ± 761.1
Sandhoff disease						
SA-1077	115.7 ± 4.32	33.8 ± 1.98	612.5 ± 30.79	612.5 ± 30.79		51 ± 2.4
SA-1077-SV	68.9 ± 2.12	43.5 ± 0.24	582.6 ± 4.35	582.6 ± 4.35		44 ± 2.4
GM ₁ -gangliosidosis						
GM ₁ -1019				14.2 ± 0.83	46.9 ± 2.81	8954 ± 192.4
GM ₁ -1019-SV				6.3 ± 0.31	39.2 ± 2.49	9832 ± 192.4
GM ₁ -22				32.3 ± 1.04	60.0 ± 3.08	12490 ± 937.0
GM ₁ -22-SV				7.8 ± 0.34	28.6 ± 1.43	7750 ± 201.8
GM ₁ -1026				18.6 ± 0.96	172.5 ± 16.34	17402 ± 525.8
GM ₁ -1026-SV				4.6 ± 0.27	82.0 ± 1.32	6348 ± 228.8

各細胞株下段は SV40 による変異株を示す (-SV と表記)

酵素活性: nmol/mg protein/h.

これまでに Gaucher 病, Fabry 病, Sandhoff 病, G_{M1}-ガングリオシドーシスの線維芽細胞を形質転換クローン化することができた。これらはすべて, 少なくとも数種のリンゾーム酵素については, もとの細胞株の特性, すなわち特異的な酵素欠損を示していた⁸⁾。従ってこれらの細胞は遺伝性リンゾーム病の診断, 病態解析, あるいは治療実験に用い得ることが分った。

考 察

本研究班においてわれわれが目ざしたのは, 患者診断その他の診療上必要な生化学的細胞学的方法の改善と, 新しい材料の提供のための研究であった。第1の点については, これまで広くおこなわれてきた方法を, より簡便に, より高感度に方法を改善することにより, また全く新しい原理による微量自動化定量装置を開発することにより達成された。これらは装置として, 機械的にはさらに工夫して使いやすい製品とする余地は残されているものの, 原理的には十分な検討がすでにおこなわれてきており, 今後広く臨床検査室, 研究室で採用されることを期待したい。尚サイクリング装置は現在, 国内, 国外の特許を申請中であり, より簡便な装置として完成させるべく, 研究中である。

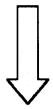
SV40 ori (-) による形質転換は種々の細胞について報告されており, ヒトの遺伝性疾患でも色素性乾皮症⁹⁾, 小脳失調—毛細血管拡張症 (Louis-Bar 症候群)¹⁰⁾などでの成功例がある。しかし酵素欠損を容易に検出できる代謝異常細胞株については今回のわれわれの報告が最初の成功例であり, これも今後種々の研究, 診療の目的に極めて有用な材料となることが予想される。

次年度以降はこれらの成果をもとに, 多くの疾患, 多くの症例の発見につとめるとともに, 現在は治療, 予防が不可能であるこれらの疾患をもった患児に, 何らかの医学的アプローチを可能とすべく, さらに研究をすすめたい。

文 献

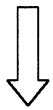
- 1) Suzuki, Y.: Enzymatic diagnosis of lysosomal diseases. An experience in a clinical laboratory during the period 1972~1980. *Acta Paediat Jpn* **24**: 25, 1982.
- 2) Furuya, T., Suzuki, Y., Momoi, T.: Acid β -galactosidase from human fibroblasts. A microscale purification method monitored by a highly sensitive enzyme assay. *J. Biochem* **99**: 437, 1986.
- 3) 加藤尚彦: 酵素的サイクリング—酵素増幅反応による微量定量法—医用電子と生体工学 **22**: 260, 1984.
- 4) Kato, T., Suzuki, Y.: Enzymatic microdetermination method for galactocerebrosidase (EC 3. 2. 1. 46) in tissue samples. *Proc Japan Acad.* **55B**: 69, 1979.
- 5) Tsutsumi, O., Sato, K., Sakamoto, S., Suzuki, Y., Kato, T.: Application of a galactosylceramidase microassay method to early prenatal diagnosis of Krabbe's disease. *Clin. Chim. Acta.* **125**: 265, 1983.
- 6) Gluzman, Y., Sambrook, J.F., Frisque, R.J.: Expression of early genes of origin-defective mutants of simian virus 40. *Proc Natl Acad Sci. U.S.A.* **77**: 3898, 1980.

- 7) Momoi, T., Furuya, T., Suzuki, Y., Sato, H., Yamaguchi, N. : *In vitro* establishment of human fibroblasts of lysosomal diseases, GM₁-gangliosidosis and Sandhoff disease, by transformation with origin-minus SV40 DNA. *Biosci Rep.* **5** : 267, 1985.
- 8) Furuya, T., Momoi, T., Suzuki, Y., Sato, H., Yamaguchi, N. : Establishment of human fibroblast cell lines with lysosomal enzyme deficiency by transformation with origin-minus SV40 DNA. *J. Inher. Metab. Dis.* **8** : 143, 1985.
- 9) Protić-Sabljić, M., Whyte, D., Fagan, J., Howard, B.H., Gorman, C.M., Padmanabhan, R., Kraemer, K.H. : Quantification of expression of linked cloned genes in a simian virus 40-transformed xeroderma pigmentosum cell line. *Molec. Cell. Biol.* **5** : 1685, 1985.
- 10) Murnane, J.P., Fuller, L.F., Painter, R.B. : Establishment and characterization of a permanent PSV ori⁻-transformed ataxia-telangiectasia cell line. *Exp. Cell. Res.* **158** : 119, 1985.



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



われわれは 1972 年以来、遺伝性リソゾーム病二次スクリーニングの目的に、患者試料を用いた多項目酵素測定をおこない、多くの患者を発見した。測定には血液細胞や皮膚由来線維芽細胞を用いることが多いが、多くの患者検体を扱うようになると、できるだけ省力化し、且つ再現性のよい装置、手技が要求されるようになる。しかも対象患者が乳幼児の場合、必ずしも十分な検体量が得られるとは限らない。そのため、微量の検体を用いた高感度測定法の開発がのぞまれてきた。

多くの症例は、比較的典型的臨床経過、臨床像を示し、特定の酵素活性の測定により、明確な診断がつけられた。しかしながら、中には臨床的にも生化学的にも診断未確定のままで終る症例もあった。ところが診断法の進歩により、後者の中には後年になって別の測定項目の実施により診断された場合があり、患者試料の保存という問題がでてきた。

これらの問題への対応として、本研究班では、微量試料を用いた高感度自動測定法の開発のために 2 つの異ったアプローチをおこなうとともに、患者試料の中で、これまで永久保存は不可能であった線維芽細胞に SV40 の DNA を導入することにより、無限増殖株の作成をおこなった。この方法による試料加工により、患者の生きた細胞が、常に供給可能となり、診断のみならず、その病態解析にも極めて有用な材料を提供することができるようになった。