

先天性代謝異常症とその保因者診断法に関する研究

富山大学和漢薬研究所

荻田 善一

研 究 目 的

A. 微量電気泳動法の保因者診断への適用

従来、種々の疾患の保因者診断および病態解析あるいは遺伝性代謝異常症の保因者診断には、主として血液・尿が用いられてきた。最近になって遺伝性代謝異常症の保因者より得られた組織片の培養によって診断する方法が開発されている。しかし遺伝性代謝疾患について考えても、血液や尿を試料とする解析では、保因者診断ならびに正確な動的病態に関する情報を得ることは必ずしも容易ではない。また、線維芽細胞を試料とする場合には、培養に時間がかかり、かつ複雑な操作が必要である。我々は、これらの欠点を補うため、試料採取の容易な、そして培養操作なしに利用できる毛根を試料とし、遺伝性代謝異常症の保因者診断に関する電気泳動的解析法について検討した。このため微量電気泳動法(第26回電気泳動学会で報告)において2つの緩衝液系を適用した。その第1はSDS系であり、試料をSDSで処理することにより得られるペプチドを解析する。第2は非SDS系であり、未変性蛋白ならびに酵素を解析する。

B. 微量電気泳動法による出生前診断の検討

出生前診断法は羊水あるいは羊水細胞を試料として胎児の先天異常を知る方法であるが、採取できる試料が微量であるため必ずしも容易でない。一般に採取された羊水細胞は1度培養、増殖させてから細胞学的あるいは臨床化学的検査によって診断される。このため羊水細胞培養に日数を要し、時にはその診断に3週間から2ヶ月もかかることがある。また、羊水細胞が培養液成分によって影響を受け診断を誤らせる可能性がある。したがって、穿刺直後の羊水細胞を培養することなしに試料として解析することのできる微量解析法があれば、これら出生前診断法における難点を克服できるであろう。このためこの目的に

応ずることのできる微量電気泳動法について検討した。

## 研 究 方 法

### A. 保因者診断における研究方法

毛根は、採取直後直ちにハサミで毛球と毛根鞘にわけ、それぞれを10 $\mu$ lの試料液を含むサンプルチューブに入れる。SDS系の場合は、SDS用試料液を用い、95 $^{\circ}$ C 10分処理する。これに0.005% BPB溶液2.6 $\mu$ lを加え、これを試料液として用いる。非SDS系の場合は、Triton用試料液を用い、凍結融解を5回くり返したものを試料液として用いる。

電気泳動用本体は図1の如くであり、アクリル樹脂及びガラス板で作製した。

ゲル緩衝液は、SDS系では0.1% SDSを含む0.375 M トリス・塩酸緩衝液(pH 8.8)を、非SDS系では、G6PD検出の際には、1% Triton X-100を含む0.75 M トリス・塩酸緩衝液(pH 8.8)を、LDH検出の際には、1% Triton X-100を含む6.3 mM グリシン・水酸化ナトリウム・塩化ナトリウム(pH 10.0)緩衝液を用いた。

電極用緩衝液には、SDS系では0.1% SDSを含む2.5 mM トリス・グリシン緩衝液(pH 8.3)を、非SDS系では、G6PD検出の際には、1% Triton X-100を含む、5.0 mM トリス・グリシン緩衝液(pH 8.3)を、LDH検出の際には、3.0 mM グリシン・水酸化ナトリウム緩衝液を用いた。

蛋白染色：泳動後、50%トリクロル酢酸に30分浸漬し固定し、50%トリクロル酢酸中に0.1%になる様に溶かしたCoomassie Brilliant Blue 溶液中で30分染色する。脱色は、10%酢酸を使用する。

酵素活性の検出法

① LDH染色には下記溶液中で行なう。

NAD	3.0 mg
Nitro Blue Tetrazolium (NBT)	1.8 mg
Phenazin Methosulfate (PMS)	2 mg
4.0% Na-DL-Lactate	5 ml
0.5 M トリス・塩酸緩衝液 (pH 8.8)	5 ml
蒸留水	4.0 ml

37°C 30分～60分保温する。

② G6PD染色には下記溶液を用いる。

NADP	10 mg
NBT	10 mg
PMS	2 mg
Glucose-6-phosphate	40 mg
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	100 mg
0.5 M トリス・塩酸緩衝液 (pH 8.8)	5 ml
蒸留水	45 ml

37°C 30分～60分保温する。

#### B. 出生前診断における研究方法

羊水および羊水細胞は、穿刺直後3000回転15分遠心分離する。羊水には、同量のSDS用試料液を加え、前述の如く処理し、SDS系で解析するか、あるいはTriton用試料処理液を加え、非SDS系で解析する。羊水細胞には、試料処理液を $10^5$  cell/10  $\mu$ lとなる様に加え、同様に処理する。

電気泳動条件は、毛根の解析の際と同様であるが、アミラーゼ活性検出の時は、Triton X-100を使用してはならない。

#### アミラーゼ活性検出法

- ① 0.2% NaClを含む1%可溶性澱粉溶液に30分浸漬
- ② 澱粉溶液をすて37°C 30分～3時間インキュベート
- ③ 5%酢酸中に5分間浸漬
- ④ I<sub>2</sub>-KI溶液(KI 13 g, I<sub>2</sub> 7 g, 蒸留水1 l)を5倍に希釈し、ゲル上に注ぐ。
- ⑤ 青色の背景中に白くぬけた部分が活性のある所である。

### 研 究 成 果

#### A. 保因者診断に関する研究結果

##### (1) SDS系における解析

検出に用いた試料は5  $\mu$ lであり、1コの毛球あるいは毛根鞘の約 $\frac{1}{2}$ 量で分析可能であった。それぞれのペプチドの分離像は図2の如くであり、毛球と

毛根鞘の間に大きな差異の存在することが判明した。

## (2)非SDS系における解析

LDH活性検出には4 $\mu$ lを要した。そのアイソザイムパターンは、毛球では  $A_2 B_2 > A_1 B_3 > A_3 B_1 > B_4 > A_4$  であり、毛根鞘においては

$$A_2 B_2 > A_3 B_1 > A_1 B_3 > A_4 > B_4$$

であった。この様にSDS系における解析と同様に、LDHアイソザイムパターンからも毛球と毛根鞘の間に差異が存在する事が判明した。

G6PD活性検出にも4 $\mu$ lの試料を要した。正常人では個々の毛球の活性値の変動は比較的少いが、毛根鞘における活性の変動はかなり見られた。一方、G6PD活性低下の男児をもち、その保因者と推定される母親の毛球における活性値の変動は、同一試料におけるLDH活性の変動に比し大であった。

## B. 出生前診断法に関する研究結果

### (1)SDS系における解析結果

検出しうる最少の細胞数に関する検討の結果、 $10^4$ コ/5 $\mu$ lあれば十分可能であることが判明した。

### (2)非SDS系における解析結果

羊水細胞のLDH活性検出を妊娠第37週の試料で試みたところ、十分検出することができ、そのアイソザイムパターンは

$$A_2 B_2 > A_1 B_3 > A_3 B_1 > B_4 > A_4$$

であることが判明した。

羊水におけるアミラーゼアイソザイムの検出にも成功し、全て唾液型であることが判明した。

## 考 察

### A. 保因者診断法に関する考察

SDS系における分析及びLDHアイソザイムパターンの分析より、毛球を構成する細胞群と上皮組織の続きである毛根鞘を構成する細胞群との間には大きな差異の存在する事が確認でき、今後、種々の分析の際には、両者を分けねばならない事が判明した。

先天性代謝異常症とくに伴性遺伝を示すものの保因者診断の際の試料として

毛根を用いる際にまず検討しなければならないのは、これら2つの細胞群、即ち毛球と毛根鞘がいったいいくつの細胞にその起源があるかという事である。X染色体上の遺伝子について考えてみると、女性ではいずれか一方が不活化される(Lyonの仮説)。今、この女性がG6PD欠損症の保因者であるとし、毛球が1つの細胞より由来していると仮定すると、この女性は2種類の毛球、即ち正常なG6PD活性(100とする)を示すものと、異常なG6PD活性(0とする)を示すものとの2種類をもつ。そしてこの両者の比は1:1となる。もし、毛球が2つの細胞に由来すると仮定すると、3つの種類、即ち活性100のもの、50のもの、および0のものが存在する事になり、その比は1:2:1となる。そして、この場合は、理論的には4本に1本の割合で活性0の毛球が存在することになる。この様にして由来する細胞数が増加するに従がい、活性0を示す毛球の率は少なくなる。逆に、実験により何本に1本の割合で活性0の毛球が存在するかを知る事により、その由来する細胞数を推定する事ができる。毛根鞘についても全く同じ事が言えるが、我々の実験結果からは、毛根鞘においては、もともと付着する細胞数の変動が大きく、組織学的に上皮と同一と考えられるから、その由来細胞は多いと推定され、保因者診断の試料としては適さないと思われる。一方毛球は、付着する細胞数もかなり一定しており、G6PD活性低下症の保因者において、その活性の変動が大きかったので、試料として適している可能性が強い。

SDS系の解析においても上記と同じ理由により、ペプチドレベルで保因者診断しうる可能性がある。

#### B. 出生前診断に関する考察

一般に羊水中の細胞数は $3 \sim 5 \times 10^4 / ml$ といわれており、一回の穿刺にて5~20ml採取するのであるから、理論的には、この微量電気泳動法にて、培養操作なく直接診断する事が可能である。実際にSDS系におけるペプチドレベルでの解析及び非SDS系におけるアミラーゼやLDHの検出は可能であった。今後、先天代謝異常症の諸酵素について実際に検討するつもりである。

### 要 約

(1)毛根のうち毛球を試料とし、我々の開発した微量電気泳動法を用いる事に

より伴性遺伝様式を示す先天性代謝病の保因者の診断が可能である。

(2)穿刺直後の羊水ないしは羊水細胞を培養することなく直接の試料として、微量電気泳動法に適用することにより、出生前診断しうる可能性が示唆された。

### 発 表

荻田善一，山村研一。第26回電気泳動学会にて報告。

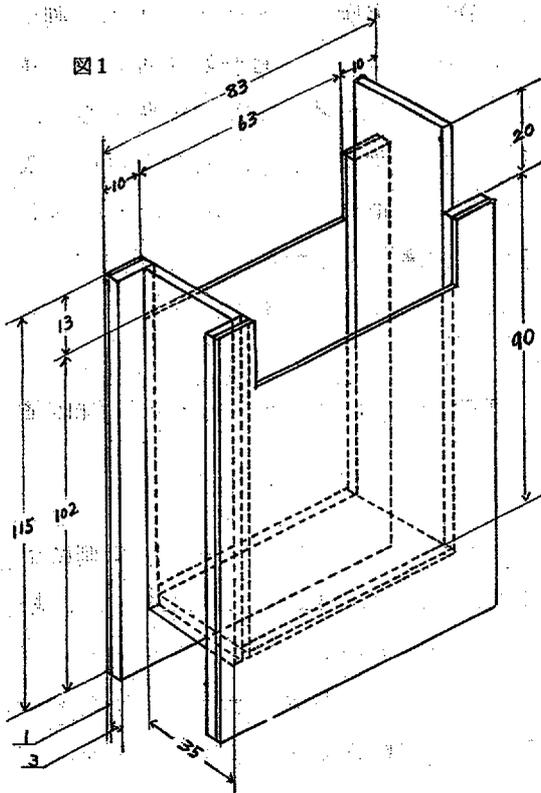
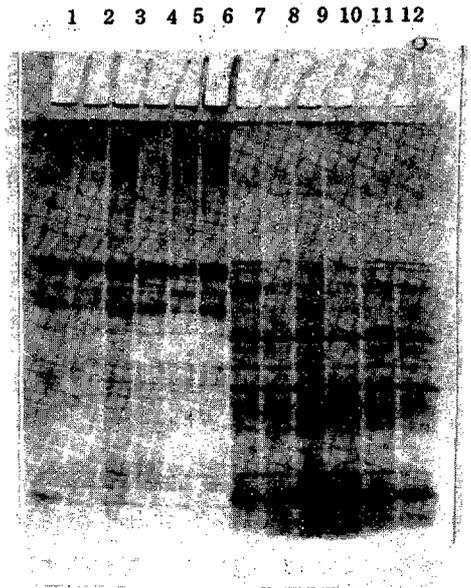


図2 SDS-peptide の分離像



1~6: Hair bulb

7~12: Hair sheath



研究・目的

A. 微量電気泳動法の保因者診断への適用

従来, 種々の疾患の保因者診断および病態解析あるいは遺伝性代謝異常症の保因者診断には, 主として血液・尿が用いられてきた。最近になって遺伝性代謝異常症の保因者より得られた組織片の培養によって診断する方法が開発されている。しかし遺伝性代謝疾患について考えても, 血液や尿を試料とする解析では, 保因者診断ならびに正確な動的病態に関する情報を得ることは必ずしも容易ではない。また, 線維芽細胞を試料とする場合には, 培養に時間がかかり, かつ複雑な操作が必要である。我々は, これらの欠点を補うため, 試料採取の容易な, そして培養操作なしに利用できる毛根を試料とし, 遺伝性代謝異常症の保因者診断に関する電気泳動的解析法について検討した。このため微量電気泳動法(第26回電気泳動学会で報告)において2つの緩衝液系を適用した。