

東京大学医学部

鈴木 義之

ま え が き

過去1年間に、我々は3例の Tay-Sachs 病の出生前診断の依頼をうけ、培養羊水細胞の酵素測定法について検討した。その結果、N-acetyl- β -hexosaminidase 活性の A, B 分画法には、方法によりかなりの測定値の差があることが分った。又、その中の1例は、Tay-Sachs 病患児と診断し、治療的流産後、脂質分析及び酵素測定により確認し得たので報告する。

研 究 方 法

すべて Tay-Sachs 病患児をもった母の次回妊娠例であり、妊娠 16-19 週に羊水を採取した。症例 1 は東京女子医大小児科、症例 2 は新潟大小児科、症例 3 は広島大第三内科の症例であり、培養は夫々別の研究室で行なわれた。羊水自体の検索は行なわず、培養した羊水細胞のみについて、酵素測定を試みた。4-8 週間培養後、細胞を物理的に剥離させ、生理的食塩水で 2 回洗滌した。蒸留水に浮遊させ、超音波で細胞を破壊したものを、そのまま酵素源として用いた。

N-acetyl- β -hexosaminidase 活性は、4-methyl-umbelliferyl-N-acetyl- β -glucosaminide を基質として、pH 4.5 で測定した。酵素液と、基質溶液 (1 mM, 0.1 M クエン酸緩衝液中) とを 1:2 に混合し、37°C, 1 時間の反応後、0.2 M グリシン緩衝液、pH 10.7 を加えてアルカリ性としたあと、蛍光比色 (excitation 365 m μ , emission 448 m μ) を行った。

N-acetyl- β -hexosaminidase A, B の分画には、以下の 3 つの方法を試みた。

(1) 熱処理法¹⁾

適当量の酵素液に 0.1% アルブミンを加え、50°C, 3 時間加熱。加熱後の

酵素活性を B 分画とし、加熱前の総活性から B 活性を引いたものを A 分画とした。

(2) DEAEセルロースバッチ法²⁾

0.1g DEAEセルロースに、酵素液(0.1%アルブミン加)を加え、15分間、時々攪拌しながら放置後、遠心し、上清を B 分画とした。10mMリン酸緩衝液(pH 6.0)で沈渣を洗滌後、0.2M食塩水を加え、15分間同様に放置し、遠心後の上清を A 分画とした。これにより、A B 活性比を求めた。回収率は、血清を用いた場合より低く、70-80%であった。

(3) 電気泳動法³⁾

セルロースアセテート膜上で分離した。20mMクエン酸及びリン酸を pH 6.0 とした緩衝液を泳動槽に入れ、同じ緩衝液にセルロースアセテートを浸して泳動を行った。定電位 200v で 40-60 分間分離後、あらかじめ酵素液を浸した別のセルロースアセテート膜に重ね、37°C、30 分間インキュベートした。これをアンモニア蒸気中でアルカリ性とし、蛍光ランプでスポットを確認した。定量の目的には、この部分を切りとり、0.2Mグリシン緩衝液で抽出、蛍光比色を行った。

研 究 成 果

培養羊水細胞中の酵素測定結果を表 1 にまとめた。症例数、対照例数が少ないが、総活性にかなりの変動がみられた。恐らく培養条件の違いによるものと考えられる。

A B 分画の活性については、3つの方法により大きな差がみられた。これらは少なくとも 2 回は反復し、確認した結果であり、同じ方法の、同一条件での再現性はあるものと考えられる。どの検体も、電気泳動法による A 分画の活性が、最も低いという結果となった。特に第 3 例の結果は、方法により大きな違いを示し、その判定が困難であった。すなわち、この数字からは、正常、保因者、Tay-Sachs 病患者のどの結論も出し得るようにはみえた。結局再度行った電気泳動のパターンが、患児(胎児)と他の対照例とに大きな差がある(つまり A 分画のスポットが検出できない)という事実より、Tay-Sachs 病患児と診断し、治療的人工流産を行った。

その胎児組織については、未だ十分な検査は行っていないが、脳のガングリオシドは明らかに異常パターンを示していた。すなわち正常胎児ではほとんど検出されないGM₂のスポットが明瞭に認められ、総ガングリオシドの20~30%を占めていた。出生後、臨床症状の発現により診断されたTay-Sachs病では、脳の総ガングリオシドの80~90%がGM₂であるのに対し、その割合は低い、すでに胎児期に脂質蓄積がはじまっていることが確認されたわけであり、もし病的ホモ接合体の発症予防が試みられる場合には、胎児早期になされねばならないことになる。

又本症例肝のライソゾーム酵素活性測定により、特異的なN-acetyl- β -glucosaminidase Aの欠損があることが確認された。N-acetyl- β -glucosaminidase B, β -galactosylase, β -glucosidaseその他はすべて、対照胎児とくらべ、差がみられなかった。従って、脂質分析、酵素活性両方の検討から、この胎児がTay-Sachs病患儿であったことは確実である。

第1例は電気泳動の結果より、ヘテロ保因者と診断し、妊娠を継続し、昭和50年10月無事出生した。生後2カ月の酵素活性値は、やはり保因者のパターンとなっていた。

第2例は、最終診断は困難であったが、少なくともTay-Sachs病患儿ではないとの診断のもとに、妊娠を継続した。51年1月出生後、順調な発育とのことであるが、生後1カ月での血清酵素活性からは、遺伝子型までは判定できず、経過を観察中である。これは新潟大小児科で測定されたものであり、我々の正常人対照との直接の比較はできないが、恐らく正常と考えられる。

この結果からみる限り、今回の研究に用いた3つの方法を比較すると、電気泳動法が最も信頼性が高いという結論が得られた。

考察および結論

Tay-Sachs病の診断は、O'Brien et al.⁴⁾の報告以来、世界中で広く行なわれ、Tay-Sachs病患儿の診断例も年々増加しつつある。出生前診断が正しく行なわれるためには、その方法論が確立されていなければならない。我々のこれまでの経験では、N-acetyl- β -hexosaminidaseのAB画面比は、方法により大きな差が生じ得るという印象があった。現在行なわれて

いる方法は大部分、血清を用いた分画法であり、細胞内、特にその量の少い白血球や培養細胞では、問題が多いことが知られていた。最も大きな違いは、検体中の蛋白量の差であり、そのために O'Brien からもアルブミンを加え、酵素の安定性を保たせ、加熱により B 分画が失活するのを防ぐ工夫をしている。我々のイオン交換パッチ法でも、やはり同じ点に問題があり、血清を用いるかぎり、再現性、回収率は良好であったが、白血球で試みると必ずしも信頼し得るデータが得られなかった。しかしそれも、アルブミンを加えることにより、一応確実が得られるようになったと思われた。

元来、この酵素の A B 分画は、電気泳動法による 2 つのスポットとして定義されたものであり、電気泳動法が、本来の意味では最も確実な Tay-Sachs 病診断法であることは明らかである。しかしそれが、多数検体の処理能力において劣るため、いくつかの別の方法が試みられたわけである。

臨床例の場合、何度か条件、検体を変えて検査をくり返すことができ、又、血清で十分に信頼し得る結果が得られることが、多くの研究者により確認されている。これに反し、胎児診断という、極めて重大且つ時間的制約のある診断過程においては、最も確実な方法で診断することが要求される。従って今回の研究で明らかな如く、少なくとも胎児の Tay-Sachs 病の診断は、必ず電気泳動法により行うべきものとする。

胎児診断の場合、多数検体を処理する必要はなく、対照を含む数検体の測定で十分である。装置も決して特殊なものではなく、手技も容易に修得可能である。さらにこの電気泳動法（特にセルロースアセテート法）は微量の検体でよく、この点も少量の培養細胞を扱う上に有利である。

同じ GM₂-gangliosidosis ではあるが、Sandhoff 病の出生前診断には全く問題がない。N-acetyl- β -glucosaminidase 総活性を測定することにより、容易に診断し得ることは、昨年度に報告した通りである。しかし疾患の頻度は、Tay-Sachs 病が Sandhoff の 3-4 倍と予想されるため、今後、Tay-Sachs 病胎児が確実に診断されることがのぞまれる。

文献および発表論文

- 1) O'Brien, J. S. et al. (1970). New Eng. J. Med.

283, 15.

- 2) Suzuki, Y. et al. (1973). Clin. Chim. Acta, 48, 153.
- 3) Suzuki, Y. et al. (1971). J. Pediat. 78, 643.
- 4) O'Brien, J.S. et al. (1971). Science, 172, 61.

表 1

Tay-Sachs 病出生前診断例
(N-acetyl- β -glucosaminidase活性)

	総活性 (n mol/mg protein/hr)	A (%)		出生後血清酵素	
		DEAE セルロース法	加熱法	電気泳動	総活性 A (%)
症例 1 横○	7133	50.7	64.5	26.5	1540 35% (2カ月)
2 藤○	1210	82.5	62.0	43.5	2280 44% (1カ月)
3 新○	1300	34.4	76.5	0.02	(人工流産)
対照 1	2440	58.7	79.0		
2	9500	64.3	72.0		
3	1870	67.0	89.0	60.0	

↓ **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

まえがき

過去1年間に、我々は3例の Tay-Sachs 病の出生前診断の依頼を受け、培養羊水細胞の酵素測定法について検討した。その結果、N-acetyl- β -hexosaminidase 活性の A, B 分画法には、方法によりかなりの測定値の差があることが分った。又、その中の1例は、Tay-Sachs 病患児と診断し、治療的流産後、脂質分析及び酵素測定により確認し得たので報告する。