

## 13・2 Gaucher 病の診断を目的とした

### $^3\text{H}$ 標識 glucosyl ceramide の合成

日本大学医学部

北川 照 男

大和田 操

#### 目 的

Gaucher 病の酵素学的診断に必要な天然基質 glucosyl ceramide (glc-cer) を  $^3\text{H}$  で標識し、測定感度を上昇させて診断を容易にすることを目的とした。

#### 材 料

Gaucher 病患者の脾

#### 方 法

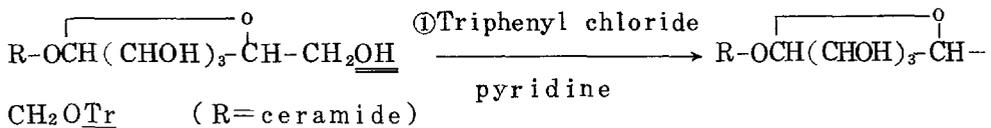
##### (1) Glc-Cer の抽出および精製

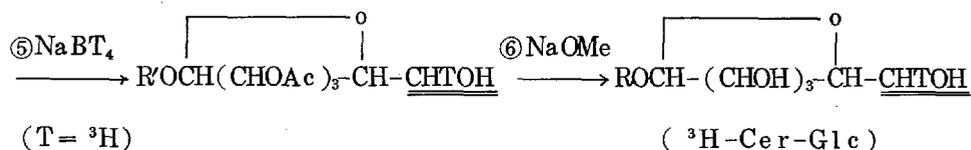
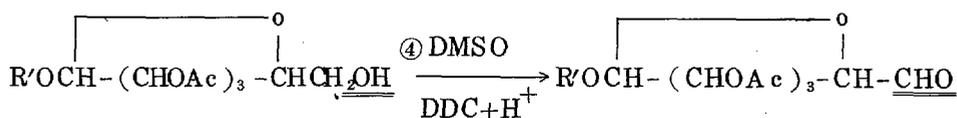
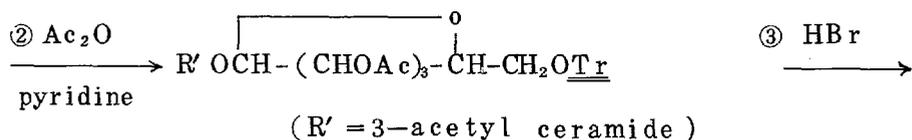
Radin らにより報告された方法に従い、Gaucher 病患者の脾から glc-cer を抽出し、silicic acid column chromatography を行って精製した。

##### (2) Glc-Cer の $^3\text{H}$ による標識

Radin らにより 1976 年に報告された方法で、Glc-Cer の glucose の 6 位の水素を  $^3\text{H}$  に置換するもので、反応の原理は下図に示すようである。即ち、① Glucose の 6 位の水酸基を Triphenyl 化し、② 残りの水酸基を全て acetyl 化し、③ 6 位の triphenyl 基を HBr にて外し、④ 6 位の水酸基を酸化して aldehyde とし、⑤  $\text{NaBT}_4$  により再び還元すると同時に  $^3\text{H}$  を 6 位に入れ、⑥ 脱 acetyl を行って  $^3\text{H}$ -Glc-Cer とする。

実施は Glc-Cer 100mg より出発した。





(3)  ${}^3\text{H}$ -Glc-Cer を用いた glucocerebrosidase の assay system の検討

${}^3\text{H}$ -Glc-Cer を cold Glc-Cer にて稀釈し, detergent として Na-Cholate を用いて酵素液とともに incubate し,  $\text{CHCl}_3$ -MeOH を加えて反応を停止させ, 遠沈して upper phase を採り, 更に  $\text{CHCl}_3$ -MeOH (85:15  $\frac{\text{v}}{\text{v}}$ ) にて一回洗滌し, upper phase の放射能を測定した。

## 結 果

(1) 100 mg の Glc-Cer から, total count  $1.2 \times 10^9$  c. p. m を有する  ${}^3\text{H}$ -Glc-Cer を得た。この  ${}^3\text{H}$ -Glc-Cer は, 異った2種類の溶媒系による TLC を行って, 単一の spot を示し, しかも radioactivity を radioautography にて測定すると, 放射能の100%が spot の部位に一致して認められた。(下図参照)

更に,  ${}^3\text{H}$ -Glc-Cer の Methanolysis の結果, この count の80%が glucose の部位に認められた。

(2) 各 assay tube に  $5 \times 10^4$  c. p. m の glc-cer を使用し, 肝, 脾の homogenate における glucocerebrosidase を測定した結果は下記のとおりである。

## glucocerebrosidase 活性

( c. p. m. /mg protein /hr )

Control spleen	4 6 5
Gaucher's spleen	2 6
Control liver	3 5 1
Gaucher's liver	4 7

## 考 察

Gaucher 病において障害されている  $\beta$ -glucosidase は、合成基質を用いて証明することが可能とされている。しかし、すでに我々が報告したように、肝において合成基質水解能が正常な Gaucher 病が存在することは明らかであり、fibroblasts を除く material によって Gaucher 病の酵素診断を行う場合には、天然基質を用いる必要があると思われる。

我々は、これまで、非標識の Glc-Cer を基質として、遊離してくる glucose を測定する方法によって glucocerebrosidase 活性を測定してきたが、この方法では crude な肝、脾を用いた場合に測定困難な場合をしばしば経験したので、より感度が良い方法を開発するために、 $^3\text{H}$ による Glc-Cer の標識を試みた。

今回用いた方法によると、Glc-Cer の glucose の位置に  $^3\text{H}$  がラベルされるために、反応系・測定系を比較的簡略化し得た点に、大きな利点があると思われる。

## 要 約

(1) Gaucher 病の中には、肝における合成基質水解能が正常な症例があり、そのような場合には、天然基質を用いて酵素学的診断を行う必要がある。

(2) そのためには、酵素活性測定之感度をあげる必要がある、その目的で、Glc-Cer の  $^3\text{H}$  による標識を試みた。

(3)  $^3\text{H}$  標識 Glc-Cer を基質として glucocerebrosidase 活性を測定したところ、従来の方法に比べて、感度が良好で、しかも手技の点でも簡略化され、有用と思われた。

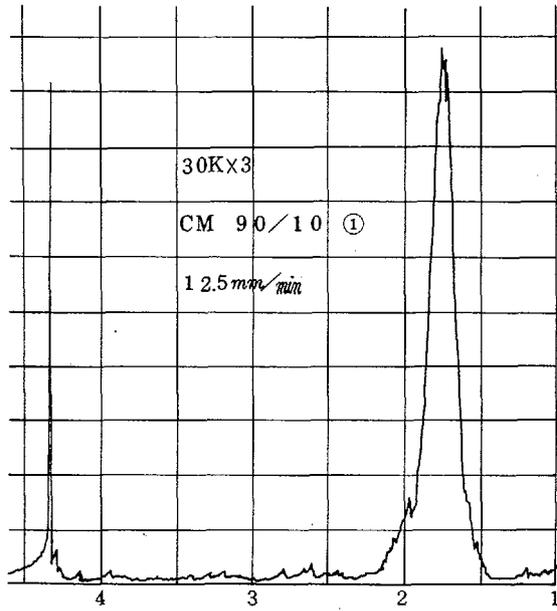


図 精製した<sup>3</sup>HCer-Glc の radioautogram

↓  
**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  
↓

目的

Gaucher 病の酵素学的診断に必要な天然基質 glucosyl ceramide(glc-cer)を  
3H で標識し、測定感度を上昇させて診断を容易にすることを目的とした。