

## 10・2 Sphingomyelinase 測定法の検討

東京慈恵会医科大学

青 木 菊 磨  
山 口 修 一  
衛 藤 義 勝

Niemann Pick 病は、諸臓器に sphingomyelin および cholesterol の蓄積がみられ、組織における sphingomyelinase の欠損を伴う、先天性脂質代謝異常症である。その病型は多彩で、現在までに5つの型に分類されている。診断は欠損酵素である sphingomyelinase の活性を測定することにより可能であるが、放射性同位元素で標識した sphingomyelin を使用する以外には、人工基質として Gal らが1975年に発表した Hexadecanoyl-amino-4-nitrophenyl-phosphoryl-choline (HNP) が製品化されており、また最近では Gatt らが合成した N- $\omega$ -trinitrophenyl amino-lauric acid sphingomyelin (TNPAL-SM) が製品化されている。今回これら3種類の基質を用いて、白血球、培養皮膚線維芽細胞の sphingomyelinase を測定し、Niemann Pick 病の出生前診断の精度向上に関して検討した。

### 測 定 方 法

放射性同位元素標識の基質としては  $^{14}\text{C}$ -sphingomyelin を用い、表1に示す方法で測定した。HNP および TNPAL-SM を基質とした場合の測定法は、それぞれ表2および表3に示した。

### 研究成果並びに考察

HNP を基質とした場合の Niemann Pick 病での sphingomyelinase 活性は、白血球では正常の43%、皮膚線維芽細胞では34%であり、これは TNPAL-SM を用いた場合のそれぞれ0%、0%、 $^{14}\text{C}$ -sphingomyelin での0.3%、0.005%と比較して高値であり、このような測定法に用いるには問題があると思われる。白血球を用いた場合の正常の酵素活性値は2.5~3.2

nmol/mg prot./hr. と比較的低い値を示したが、皮膚線維芽細胞では 55~63 nmol/mg prot./hr. と高値であった。

Niemann Pick 病の診断には  $^{14}\text{C}$ -sphingomyelin が基質として用いられていたが、測定法が繁雑であり、時間を要し、さらに汚染などの問題がある。しかし TNPAL-SM を基質とした場合の酵素活性の測定は、白血球あるいは皮膚線維芽細胞を用いて可能であり、精度も十分であり、感度の点でも優れており、出生前診断に応用することは可能である。

### 要 約

Niemann Pick 病の酵素学的診断は、 $^{14}\text{C}$ -sphingomyelin あるいは人工基質としての 2-Hexadecanoylamino-4-nitro phenyl phosphoryl choline, N- $\omega$ -trinitro phenylamino lauric acid sphingomyelin を用いることにより可能であるが、白血球、皮膚線維芽細胞を用いての診断には  $^{14}\text{C}$ -sphingomyelin あるいは N- $\omega$ -trinitro phenylamino lauric acid sphingomyelin を用いての酵素活性測定が好ましいと考えられ、出生前診断にも用いられ、かつ精度向上の点でも非常に優れていると思われる。

### 文 献

- 1) S. Yamaguchi & K. Suzuki : Purification and characterization of Sphingomyelinase from human brain. *J. Biol. Chem.* 252 : 3805, 1977.
- 2) S. Yamaguchi & K. Suzuki : Sphingomyelinase isozymes of human tissues : A hypothesis on enzymatic differentiation of the neuropathic & non-neuropathic forms of Niemann Pick disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 77 : 999, 1977.

表 1

SPHINGOMYELINASE ASSAY SYSTEM

Enzyme assay mixture           total 0.2 ml  
<sup>14</sup>C-sphingomyelin           60 nmol  
 Triton X-100                   0.1 mg  
 Acetate buffer, 0.1M, pH 5.0  
 Enzyme source

Incubate 1 hr at 37°C  
 Terminate by the addition of choroform-methanol (2/1)  
 Take upper phase  
 Lower phase was washed twice with pure upper phase solvent  
 Pooled upper phase were then washed with pure lower phase solvent  
 Final upper phase was dried in the scintillation vial  
 Count with scintillator ( BioSolv, PPO, POPOP, in toluene )

表 2 — 2-Hexadecanoylamino-4-nitrophenylphosphrylcholine ( HNP ) —

Incubation mixture    0.105 ml  
 Sodium Acetate Buffer 25 μmoles, pH 5.6  
 HNP                   1.5 μmoles  
 Enzyme source

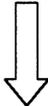
Incubate at 37 C for 1 hr  
 Terminate the reaction with addition of 0.4 ml of glycine buffer (0.1 M, pH 10.5)  
 Add ethanol 0.7 ml  
 Centrifuge , 2,000 g, 10 min.  
 Take supernatant  
 Absorbance at 410 nm  
 ( 1 nmole; O.D. 0.0124 )

表 3 — N-ω-trinitrophenylamino lauric acid sphingomyelin —  
( TNPAL sphingomyelin )

Incubation mixture    0.2 ml  
 TNPAL-sphingomyelin 60nmoles  
 Triton X-100           100 μg  
 Sodium acetate buffer( pH 5.0, 0.1 M)  
 Enzyme source

Incubate at 37 C for 1 hr  
 Terminate the reaction with addition of Dole's reagent\* 0.75 ml  
   Heptane                   0.45 ml  
   H<sub>2</sub>O                        0.40 ml

Centrifuge at 2,000g for 10 min.  
 Take upper phase  
 Read at 330 nm       ( 1 nmole ; 0.0115 O.D.)

 **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**

Niemann Pick 病は, 諸臓器に sphingomyelin および cholesterol の蓄積がみられ, 組織における sphingomyelinase の欠損を伴う, 先天性脂質代謝異常症である。その病型は多彩で, 現在までに 5 つの型に分類されている。診断は欠損酵素である sphingomyelinase の活性を測定することにより可能であるが, 放射性同位元素で標識した sphingomyelin を使用する以外には, 人工基質として Gal らが 1975 年に発表した Hexadecanoyl-amino-4-nitrophenyl-phosphorylcholine (HNP) が製品化されており, また最近では Gatt らが合成した N- $\omega$ -trinitrophenylamino-lauric acid sphingomyelin (TNPAL-SM) が製品化されている。今回これら 3 種類の基質を用いて, 白血球, 培養皮膚線維芽細胞の sphingomyelinase を測定し, Niemann Pick 病の出生前診断の精度向上に関して検討した。