

10・6 酵素的サイクリング法によるガラクトセレブロンダーゼ 超微量定量法

東京大学医学部

鈴木 義之

まえがき

現在、出生前診断の実施されている病気のかなりの部分はリソゾーム病であり、我々はリソゾーム病の実態分析とともに、診断法についての検討をすすめている。その中でスフィンゴリピドーシスは比較的発生頻度も高く、多くは乳幼児期に重症の脳障害をおこすので、その予防、治療法の開発は重要な課題である。本研究ではKrabbe病をとりあげ、その新しい診断法の開発を試み、出生前診断への応用の可能性について検討した。

研究目的

Krabbe病の患児及び出生前診断はこれまで、生体内基質であるガラクトセレブロンドに³Hをラベルして、その分解能をみることによりなされたが、¹⁾⁴⁾放射能汚染、廃棄物処理の問題が大きく、できれば他の方法を用いるべきであると考へ、酵素反応により遊離したガラクトースの超微量定量法を使用した。

研究方法

ガラクトセレブロンダーゼ測定は、アイソトープ法の際に用いた条件²⁾に準じて行った。遊離したガラクトースは以下の3つの反応の結果生じたNADHとして測定した。³⁾

- (1) ガラクトース脱水素酵素によるNADH生成
- (2) NADHの酵素的サイクリングによる増巾(6,000~10,000倍)
- (3) 反応2の産物であるリンゴ酸を脱水素酵素によりオキザロ酢酸とし、その際生成されるNADHの蛍光測定を行う。

材料は新鮮なラット脳、肝、腎の他、種々の期間-20℃に冷凍保存したヒト及びその胎児脳、肝、腎である。20 mM Tris-HCl, pH 8.0 中で、20

%ホモジェネートを作り，根本的には以前の報告²⁾と同じ条件であるが，基質として，兆放射能性ガラクトセレブロシドを用いた点が異なる。

結 果

本法で測定したガラクトセレブロシダーゼ活性は，図1にまとめた。Krabbe病患儿及び胎児から得られたすべての組織の酵素活性は低く，アイソトープ法により得られた結果と一致した。但しこの方法では，組織によっては残余活性がやや高いように見える点，一層の検討が必要である。又，測定法の微量化を試み，数 μ l でも充分に測定が可能であることが分った。

考 察 並 び に 結 論

酵素的サイクリング法は，ラジオアイソトープ法の処理，環境汚染問題を考える時，それに代る（あるいはそれ以上に感度のよい）測定法の1つとして，今後広く，特に臨床医学において用いられることが期待される。測定操作は現在では，アイソトープよりもやや繁雑ではあるが，理論的には自動化が可能であり，この方向への研究がのぞまれる。それにより，液体シンチレーションカウンターと全て同じように使用できるようになるのではないと思われる。

本研究により，ガラクトセレブロシダーゼ測定が微量化され，Krabbe病胎児組織でも酵素欠損がみられることから，本法による出生前診断は可能と考えてよい。従って，従来よりも少数の羊水細胞で出生前診断ができるようになり，その臨床的意義も大きい。今後，培養細胞，血液細胞についても測定を試みる予定である。

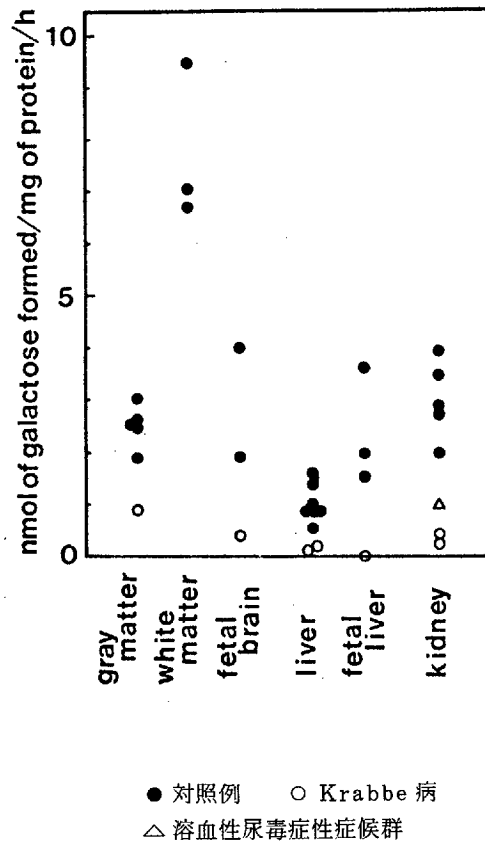
要 約

ガラクトセレブロシダーゼは Krabbe 病の欠損酵素であるが，これまでアイソトープ標識化合物が基質として用いられた。我々は酵素的サイクリング法を応用した新しいガラクトセレブロシダーゼ測定法を開発し，人体組織について検討した。Krabbe 病患儿及び胎児の脳，肝，腎では本酵素の欠損が確認された。その測定感度は，アイソトープ法の数百倍であり，Krabbe 病の出生前診断はより容易になるものと期待される。

文 献

- 1) Suzuki, Y. & Suzuki, K.: Krabbe's globoid cell leukodystrophy ; Deficiency of galactocerebrosidase in serum, leukocytes, and fibroblasts. *Science*, 171;73-75, 1971.
- 2) Suzuki, K., Suzuki, Y. & Eto, Y. : Deficiency of galactocerebroside β -galactosidase in Krabbe's globoid cell leukodystrophy. *Lipid Storage Diseases* (ed. Bernsohn, J. & Grossmann, H.J.), Academic Press, New York, 1971, pp111-136.
- 3) Kato, T. & Suzuki, Y.: Enzymatic microdetermination method for galactocerebrosidase (EC 3,2,1,46) in tissue samples. *Proc. Japan Acad.*, in press, 1979.
- 4) Suzuki, Y., Nakamura, N., Jimbo, T., Horiguchi, S. & Fujii, T.: Prenatal diagnosis in twin pregnancy. *J. Pediat.*, 93;293-294, 1978.

図1 組織内ガラクトセレブロンダーゼ活性



↓ **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

現在, 出生前診断の実施されている病気のかなりの部分はリソゾーム病であり, 我々はリソゾーム病の実態分析とともに, 診断法についての検討をすすめている。その中でスフィンゴリピドーシスは比較的発生頻度も高く, 多くは乳幼児期に重症の脳障害をおこすので, その予防, 治療法の開発は重要な課題である。本研究では Krabbe 病をとりあげ, その新しい診断法の開発を試み, 出生前診断への応用の可能性について検討した。