

12・7 ヘパラン硫酸サルファターゼ測定法の検討,
および保因者診断の問題点

東京慈恵会医科大学

衛 藤 義 勝
青 木 菊 麿

ヘパラン硫酸サルファターゼ活性の欠損症として、Sanfilippo A 症候群と Multiple Sulfatase 欠損症 (MSD と略す) の 2 つの疾患が知られている。しかし Sanfilippo 症候群の場合は A および B の 2 つの type が知られており、臨床症状のみでは鑑別不能である。酵素学的には A は Heparan N-sulfatase, B は N-acetyl- α -glucosaminidase の欠損が証明されている。MSD の患者では Heparan 硫酸の過剰蓄積並びに尿中への排泄が認められており、更に培養皮膚線維芽細胞を用いて $^{35}\text{S}\text{O}_4$ の細胞内蓄積を検討してみると、Sanfilippo 症候群と同様に細胞内にムコ多糖の蓄積があり、ムコ多糖代謝の障害が見出されている。

本研究では、これまで本邦では測定されていない Heparan N-sulfatase 活性を、 ^{35}S -heparin を基質として測定し、その測定方法並びに測定上の問題点に関して MSD 培養皮膚線維芽細胞を用いて検討したので報告する。

測 定 方 法

培養皮膚線維芽細胞は、F-10 Medium に Fetal Calf Serum を 10% 加え、5% CO_2 条件下で継代培養した。MSD 患者の臨床症状、生化学的所見に関しては、沼口らにより報告されている。Subculture 后 7~10 日前後の細胞を生理的食塩水で洗浄し、細胞をかきとり、遠沈して細胞を集めて蒸溜水に浮遊させた後、freeze and thawing を 5 回くり返す。次いで 50 K cycle 1 分間超音波処理を加え、図 1 に示すような方法で Heparan N-sulfatase を測定した。基本的には Schmidt らの方法に準じ、50~100 μg の蛋白を含む酵素液 50 μl に 100 μl の Sodium acetate buffer pH 4.5 (0.15 M NaCl, 0.2 g/l NaN, 0.1 g/l albumin を

含む)を加え、およそ 2×10^5 cpm を含む (N- 35 Sulfonate)-heparin $30 \mu\text{g}$ を加え、 37°C で $20 \sim 24$ 時間 incubation を行い、これに $500 \mu\text{g}$ blue dextran, $100 \mu\text{g}$ Na_2SO_4 および heparin を加え、 $0.7 \text{ cm} \times 30 \text{ cm}$ の Sephadex G-25 カラムを用いて溶出した。フラクションコレクターを用いて 0.15 M NaCl により漸次溶出し、 ^{35}S -heparin および遊離した $^{35}\text{SO}_4$ を分離し、free の $^{35}\text{SO}_4$ 分画を総計した後、Heparan N-sulfatase 活性を mg 蛋白/時間で示した。

結果並びに考察

MSD 患者では表 1 に示す如く、ブランクと比較して活性値が殆んど認められなかった。Arylsulfatase A, B, C 活性も極めて低値を示しており、対照の $10 \sim 20\%$ 以下に低下していた。測定上の問題点として、分画した各フラクションについて radioactivity を測定するために時間を要すること、また検体数が多くなること、などのことが気付かれたが、カラムによるヘパリンと遊離の SO_4 との分離は良好である。Schmidt らの方法は、アセテート膜を用いて電気泳動で多数の検体を同時に分離するものであるが、この方法は我々の経験では両者の分離が良好ではない。測定法の正確さに関しては、カラムを用いた方法が優れていると考えられる。今後は、保因者の検索への応用、Heparan N-sulfatase の酵素学的性状の検討を行うとともに、イオン交換樹脂を用いて測定法の簡便化およびマイクロ化を検討中である。

文 献

- 1) 衛藤義勝：脳白質ジストロフィー，
代謝 15：53，1978
- 2) 沼口俊介他：Multiple Sulfatase Deficiency，
小児科診療 42：21，1979

図1 DETERMINATION OF HEPARIN N-SULFATASE ACTIVITY

modified by the method of Schmidt (1977)

50 μ l leukocytes or skin fibroblasts homogenates
 (protein: 100 μ g; skin fibroblasts, 300-400 μ g, leukocytes)
 100 μ l buffer (0.15M sodium acetate, pH 4.5 containing 0.15M NaCl, 0.2gr/l NaN₃, 0.1gr/l bovine albumine)
 50 μ l 30 μ g of heparin Na₂³⁵SO₄ (2 x 10⁵ cpm)

incubation for 24 hours

↓
 add blue dextran (500 μ g)
 add 100 μ g cold Na₂SO₄ and heparin

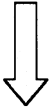
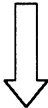
↓
 Sephadex G-25 gel filtration

↓
 Count radioactivity

表1 MSD患者培養皮膚線維芽細胞の酵素活性値

Cells	Arylsulfatase			heparin	Cholesterol	β -galacto-	N-acetyl- β -
	A	B	C	N-sulfatase	sulfatase	sidase	glucosaminidase
Control 1	259	293	19.6	0.37	8.3	174	1103
11	230	219	7.9	0.43	6.3	178	794
Hunter	316	504	28.4	0.17	3.9	149	1054
MLD	18	318	9.1	0.28	5.9	165	940
MSD	21	93	2.2	0.01	1.3	142	783

Activities were expressed as n moles per mg protein per hour.

 **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

ヘパラン硫酸サルファターゼ活性の欠損症として, Sanfilippo A 症候群と Multiple Sulfatase 欠損症 (MSD と略す) の 2 つの疾患が知られている。しかし Sanfilippo 症候群の場合は A および B の 2 つの type が知られており, 臨床症状のみでは鑑別不能である。酵素学的には A は Heparan N-sulfatase, B は N-acetyl- α -glucosaminidase の欠損が証明されている。MSD の患者では Heparan 硫酸の過剰蓄積並びに尿中への排泄が認められており, 更に培養皮膚線維芽細胞を用いて ^{35}S の細胞内蓄積を検討してみると, Sanfilippo 症候群と同様に細胞内にムコ多糖の蓄積があり, ムコ多糖代謝の障害が見出されている。