

### 13・5 組織細胞を用いた遺伝性疾患の系統的診断法の開発的研究

富山医科薬科大学和漢薬研究所

萩 田 善 一

我々はすでに電気泳動法による酵素蛋白質の微量化学分析技術を確立し、すでに報告してきた。これら微量化学分析技術を用いて、組織化学的解析、染色体分析を加え成人病を含めた遺伝性疾患の系統的診断法を開発し、発症予防に応用したいと考えている。

#### 研 究 目 的

本研究の目的は、試料採取が容易で、培養操作することなしに利用できる毛根あるいは白血球・赤血球などを試料として用い、X染色体性あるいは常染色体性の代謝異常症とその保因者ならびに染色体異常症を検査することのできる新しい遺伝性疾患の系統的診断法の確立にある。

#### 研 究 方 法

図1に示したように、毛根を用いた遺伝性疾患の系統的診断法を確立するために必要な問題について検討した。毛根を病態検査試料として用いる場合、最も重要な問題は、1本の毛根より得た①微量抽出液を得る方法②微量抽出液を解析できる分析技術の開発である。すでに我々は、次のような微量分析法を開発した。水平式、垂直式微量電気泳動法の考案および泳動条件の決定、微量二次元電気泳動法の確立、蛍光分光光度計によるレサズリンを用いた微量酵素活性ならびに蛋白定量法の確立、ならびに毛根の抽出液調製法について検討し、種々の型の試料処理溶液を作成した。毛根は、毛球と毛根鞘を構成する2つの細胞群からなり、これらの細胞群の間には、分化に基づく酵素蛋白質の量的質的差異が認められる。したがって、1本の毛根より得られた毛球ならびに毛根鞘をそれぞれ試料処理液に浸し、凍結融解と超音波処理を組み合わせ得た抽出液を試料とし、蛍光法による酵素量、蛋白量の測定および電気泳動法、薄層クロマトグラフ法や免疫化学的解析法によって解析する。

## 研 究 成 果

毛根は毛根の上皮細胞の増殖により発育し、その細胞分裂速度は速い。したがって、採取した毛根を培養することなしに直接染色体分析を行なうことができる。さらに毛髪は、ほとんど全身を被っており、染色体異常のモザイク的分布あるいはX染色体性遺伝子の Lyonization に基づく酵素蛋白のモザイク的発現分布を知ることができる可能性がある。毛細胞のモザイク的分布を明らかにするために種々の面から検討し、次のような成果を得ることができた。

### (1) 毛根を用いた組織化学ならびに細胞遺伝学的診断法の確立

滅菌用ヘアローションで処理することによって毛根に付着するかびや細菌類を除去し、直接あるいは培養後染色体解析あるいは組織化学的解析をおこなった。図2に示した組成のヘアローション塗布後、1分以上経過すればほとんど完全に滅菌されるので、毛根の滅菌的採取前に適用した。毛根の直接染色体分析に関する方法についてはさらに検討しつつある。

### (2) 毛球を用いたX染色体性酵素異常診断技術の開発

毛根がX染色体性酵素異常診断に適した試料であるかどうかをG6PD変異型ヘテロ接合体の女性から得られた毛髪を例として、垂直式微量電気泳動法によるザイモグラムを解析した。その結果、G6PD変異型のモザイク的分布は、毛根鞘よりもむしろ毛球を用いる方がより有利に正確に診断できることを明らかにした。糖脂質代謝異常症の毛根による鑑別診断法を確立する目的で、ヘキサミニデースの良好な泳動分離条件ならびに蛋白成分の鋭敏度の高い蛍光染色法を確立できた。また、蛍光光度計による酵素性ならびに蛋白質の微量測定法について検討した。NAD依存性酵素の一つであるLDH活性は、従来の測定方法よりも約100倍感度の高い測定が可能になった。

### (3) 痛風体質の遺伝的異質性に基づく生化学的異質性を解明する方法の確立

毛根および赤血球・白血球を試料として、 $[^{14}\text{C}]$ -ヒポキサンチンを含む試料処理溶液に入れ、保温(37°C)し、その一部を経時的にサンプリングし、TLCを用いてラジオクロマトスキャナーで反応生成物を同定し、生成量は、液体シンチレーションカウンターで測定を行ない、HGPRT酵素活性を測定する検査法を確立した。そして伴性劣性型痛風がHGPRT酵素の質的変異によってもたらされる可能性について検討しつつある。

## 考 察

毛髪は、成人の頭と顔に40～50万本、他の体毛を合わせると140万本あるといわれ、ほとんど全身をくまなく被っているのでX染色体性酵素異常あるいは染色体異常のモザイク的発現分布を知るのに適した試料であることを確認できた。また頭髪の平均数8万本で、その寿命は2～4年、他の部位でも6ヶ月と長いので、病態変化にともなって変動する血清酵素蛋白の量的質的变化と比較することによって遺伝性以外の疾患にも適用することによって病態の動的变化を適確に認識できるであろう。

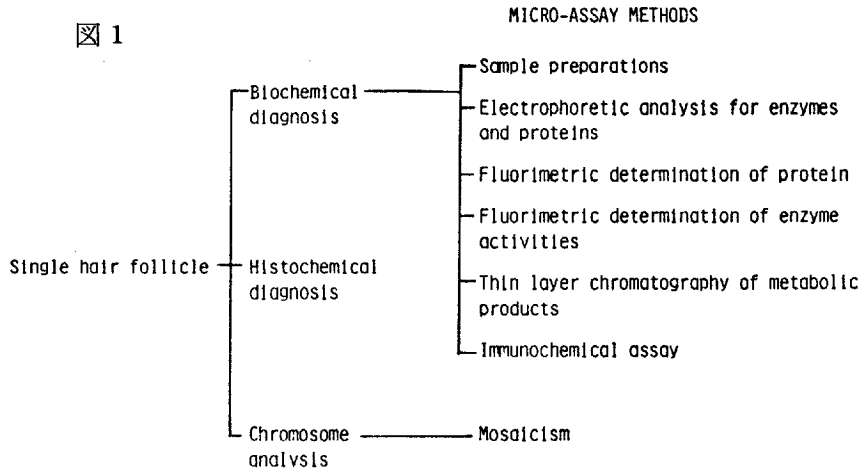
## 要 約

毛根を病態検査試料として用いる微量分析法を開発した。(A)水平式、垂直式微量電気泳動法の考案および泳動条件の決定。(B)微量二次元電気泳動法の確立。(C)蛍光分光光度計によるレサズリンを用いた微量酵素活性ならびにオルソフタルアルデヒドを用いた蛋白定量法を検討した。その結果、X染色体性酵素異常の保因者診断に毛根試料として用いた場合、毛球と毛根鞘に細胞分化が存在するので両者を分離して用いる必要があることを明かにした。

## 文 献

K.Yamamura, Z.Ogita, and S.Miwa : Utilization of hairbulbs for detection of heterozygotes of the electrophoretic G6PD Variant., Jap.J.Human Genet.23;371-375,1978.

☒ 1



☒ 2

### Hair Lotion for Sterilization

	final concentration
Benzethonium Chloride	0.5 %
Penicillin G Potassium	10 unit/ml
Streptomycin Sultate	10 µg/ml

in 70% Ethyl alcohol

↓ **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

我々はすでに電気泳動法による酵素蛋白質の微量化学分析技術を確立し、すでに報告してきた。これら微量化学分析技術を用いて、組織化学的解析, 染色体分析を加え成人病を含めた遺伝性疾患の系統的診断法を開発し、発症予防に応用したいと考えている。