

先天性代謝異常症の出生前診断の  
精度向上に関する研究

5・1 Gaucher 病の出生前診断の問題点

日本大学医学部小児科

北川 昭 男  
大和田 操  
西谷 修

研 究 目 的

Gaucher 病の出生前診断は、培養羊水細胞中の  $\beta$ -glucosidase 活性を測定することによって行われており、その際、合成基質を使用して診断が可能であるとされている。我々は、これまでに8例の Gaucher 病の high risk 妊娠に対して出生前診断を行い、全例でその診断が正しいことを確認した<sup>1)</sup>が、その後、細胞培養条件により異った  $\beta$ -glucosidase 活性を示し、診断に困難を感じた症例や、培養皮膚 fibroblast において有意の合成基質水解活性を有する成人型 Gaucher 病を経験し、本症の酵素診断に未解決の問題点があることが明らかとなった。そこで、信頼度の高い出生前診断を行う目的のために、細胞培養条件による  $\beta$ -glucosidase 活性の変化について検討した。

研 究 材 料

1)  $\beta$ -glucosidase 活性測定の前質：著者らが作製した  $^3\text{H}$ -glucosyl ceramide<sup>2)</sup> (以下  $^3\text{H}$ -Glc-Cer と略す) および 4-methylumbelliferyl- $\beta$ -glucoside (半井化学製、以下 4 MU- $\beta$ -glucoside と略す) を基質として使用した。

2) 緩衝液は 0.1 M, citrate-phosphate buffer ph 3.0~7.0 を、detergent としてコール酸ナトリウムを使用した。

3) 酵素源：Gaucher 病の high risk 妊娠の培養羊水細胞および Gaucher

病患者の培養皮膚 fibroblast を材料とした。

## 研 究 方 法

1)組織培養：羊水および皮膚 fibroblast は 15% に仔牛胎児血清を含む MEM 培地で培養し、4～5 週後に細胞を採取した。また、一部は培養を継続し、8 週、16 週、20 週に細胞を採取して酵素分析を行った。

2)酵素液の調製：羊水又は皮膚 fibroblast を採取後、水を加えて蛋白量を 200～500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  となるように調製して超音波処理を行った。

### 3)酵素活性測定法

①Glc-Cer- $\beta$ -glucosidase 活性： $^3\text{H}$ -Glc-Cer および、非標識 Glc-Cer 200  $\mu\text{g}$  に Na-Cholate 200  $\mu\text{g}$  と緩衝液 200  $\mu\text{l}$  を加えて超音波処理を行い、酵素液を加えて 37°C で 3～6 時間 incubate し、 $\text{CHCl}_3$ -MeOH (2:1 V/V) を加えて反応を停止させ、glucose 溶液 (1  $\text{mg}/\text{ml}$ ) を加えて溶媒分別を行い、上層の  $^3\text{H}$ -glucose の放射能を測定した。②4MU- $\beta$ -glucosidase 活性：最終濃度 1mM の 4MU- $\beta$ -glucoside を使用し、37°C で 2～6 時間反応させ、0.25 M glycine buffer pH10.8 を加えて反応を停止させ、生じた 4-methylumbelliferone の蛍光を 365/450  $\text{m}\mu$  で測定した。

4)蛋白量は Lowry 法により測定した。

## 研 究 結 果

1)他施設で培養した若年型 Gaucher 病の high risk 妊娠の羊水細胞における  $\beta$ -glucosidase 活性の測定結果は表 1 のようである。第 1 回目の測定結果から胎児を保因者と診断したが、同施設で更に 4 週間培養を継続した細胞の 4 MU- $\beta$ -glucosidase 活性は Gaucher 病患者と同様に低く、しかも glucosidase/galactosidase 比も著しく低下していた (表 1, 第 2, 第 3 回)。しかし、天然基質水解活性はある程度認められたので、胎児を保因者又は患者と判定した。両親の希望で人工中絶を行い、同施設で培養した胎児皮膚 fibroblast の  $\beta$ -glucosidase は有意の活性を示しており、正常又は保因者と考えられたが、その細胞を、我々の施設で更に 4 週間培養し、 $\beta$ -glucosidase 活性を測定したところ、全く正常の活性を示した。

2)我々の行っている培養条件で、8、16、20週と種々の細胞を継代培養し、その $\beta$ -glucosidase活性を測定した結果は図1のようである。即ち、同一条件で培養した場合には、20週まで培養を継続しても、 $\beta$ -glucosidase活性に有意の変化は認められなかった。図中星印の細胞は表1の胎児皮膚の結果を示したものである。

3)臨床的に成人 Gaucher 病を疑われた1例の培養皮膚 fibroblastにおける測定結果を表2に示すが、この症例では、天然基質水解活性は著しく低下しているにも拘らず、合成基質水解能は正常に近い値を示していた。

## 考 察

以上の結果から、次のような結論が得られた。即ち、

1)培養 fibroblastにおける $\beta$ -glucosidase 活性は培養条件によって変化する。この変化は、合成基質のみでなく、天然基質を使用した場合にも認められる。

2)同一施設で、同一条件で培養すれば、少くとも8~16週の培養では、 $\beta$ -glucosidase 活性に有意の変化は認められない。

3)培養 fibroblastにおいて、有意の4MU- $\beta$ -glucosidase 活性を示す Gaucher 病も存在する。

従って、培養細胞を用いて Gaucher 病の患者の診断や出生前診断を行う場合には、同一条件で培養した対照の細胞における $\beta$ -glucosidase活性を同時に測定し比較するとともに、合成基質のみでなく、天然基質水解活性を同時に測定することが必要と思われた。

## 文 献

1) Kitagawa, T. et al : In Utero Diagnosis of Gaucher's Disease. Am. J. Hum. Genet. 30, 322, 1978

2) 大和田 操他 : Gaucher 病の診断を目的とした $^3\text{H}$ -Glucosyl-ceramide の作製 : 日本臨床代謝学会記録 XV, P26, 1978

図1 培養期間による $\beta$ -Glucosidase 活性の変化

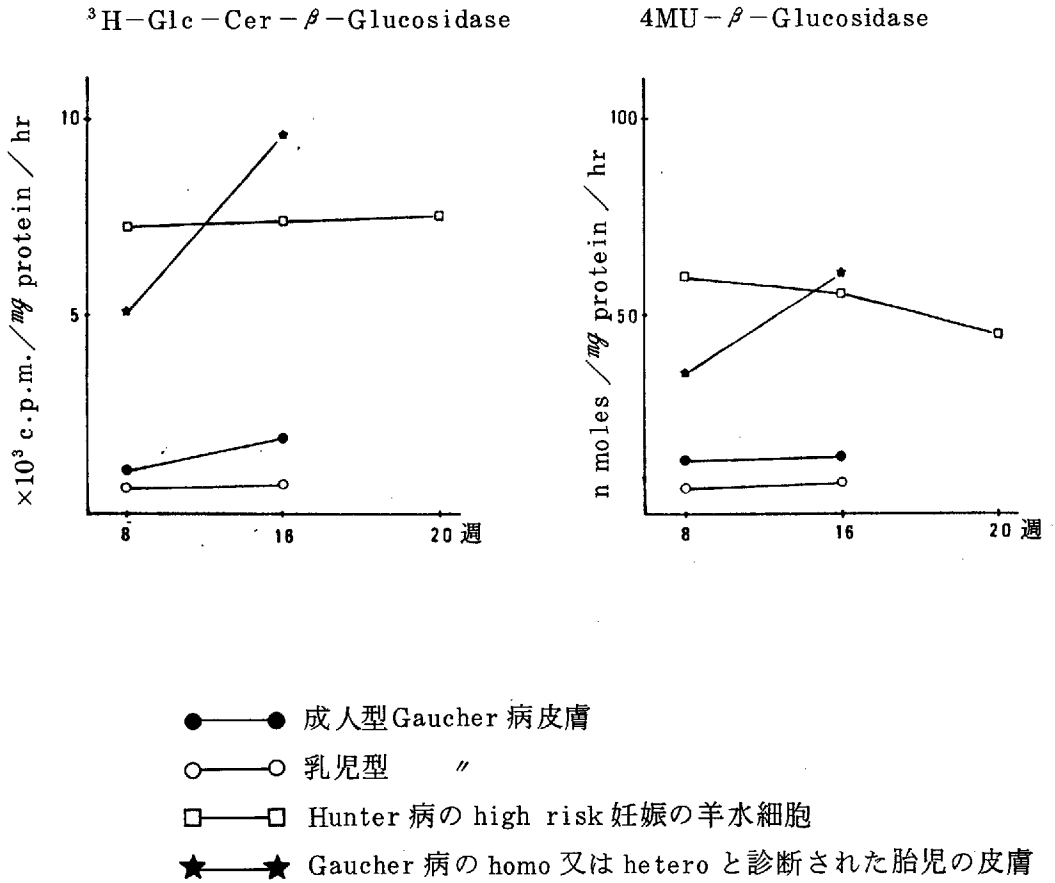


表1 他施設で培養した羊水細胞におけるβ-glucosidase活性

培養期間	4MU-β-glucosidase PH45 (n-moles/mg protein/hr)	$\frac{\beta\text{-glucosidase}}{\beta\text{-galactosidase}}$ 比 pH45	Glc-Cer-β- glucosidase, PH5.5 c.p.m./mg protein/hr	判定
羊水細胞				
第1回 4週	2.00	0.19	—	保因者
第2回 8週	6.9	0.05	2000	保因者又は患者
第3回 8週	1.05	0.05	2000	同上
胎児皮膚fibroblast				
第1回 6週	3.00	0.20	6000	正常又は保因者
第2回* 6週+4週	6.00	0.20	10000	同上

\*我々の施設において培養を続行

表2 培養皮膚fibroblastのβ-glucosidase活性

	4MU-β-glucosidase PH4.5 n moles/mg protein/hr	$\frac{\beta\text{-glucosidase}}{\beta\text{-galactosidase}}$ 比 PH4.5	<sup>3</sup> H-Glc-Cer-β- glucosidase, PH5.5 c.p.m./mg protein/hr
成人型Gaucher病 を疑われた1例	25.6	0.10	690
対照 (n=13)	61.5±5.6	0.34±0.04	6,000-10,000 (n=5)
Gaucher病*			
乳児型 (N=6)	4.1±1.0	0.02±0.007	600, 590 (n=2)
若年型 (N=1)	1.3, 6.3	0.01, 0.04	
成人型 (N=5)	5.7±0.8	0.03±0.006	890, 1000 (n=2)

\* 4MU-β-glucosidase活性が12.0をこえる例は、これまでの測定では1例もみられない。



## 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



### 研究目的

Gaucher 病の出生前診断は、培養羊水細胞中の  $\alpha$ -glucosidase 活性を測定することによって行われており、その際、合成基質を使用して診断が可能であるとされている。我々は、これまでに 8 例の Gaucher 病の high risk 妊娠に対して出生前診断を行い、全例でその診断が正しいことを確認したが、その後、細胞培養条件により異った  $\alpha$ -glucosidase 活性を示し、診断に困難を感じた症例や、培養皮膚 fibroblast において有意の合成基質水解活性を有する成人型 Gaucher 病を経験し、本症の酵素診断に未解決の問題点があることが明らかとなった。そこで、信頼度の高い出生前診断を行う目的のために、細胞培養条件による  $\alpha$ -glucosidase 活性の変化について検討した。