

5・5 単一細胞内酵素測定による出生前診断の試み

東京大学医学部小児科

鈴木 義之

研究 目 的

現在、出生前診断の大部分は、培養羊水細胞を用いておこなわれる。化学分析のためにはかなりの数の細胞が必要であり、通常、羊水穿刺後4～6週間の培養により得られた試料が用いられる。本研究では測定感度を飛躍的に向上させることにより、上記の培養期間を著しく短縮させ、羊水穿刺後、化学分析までの待ち時間を少なくすることを目的とした。

研究 対 象 ， 方 法

羊水細胞はそのまま20%胎児仔牛血清加F-10培養液中で数日間培養し、得られた少数の細胞を以下の方法によって単離し、リソゾーム酵素の活性測定に用いた。

細胞培養は底のうすい特別の培養ディッシュでおこない、細胞を0.9%食塩水、0.09%食塩水で順に洗ったあと、凍結乾燥した。単一の細胞は顕微鏡下で切りとり、無蛍光スライドグラス上に移し、約0.3 μ lの基質液を加え、パラフィン液で覆い、37°Cでインキュベートした。基質(4メチルウンベリフェロン誘導体)はあらかじめ、クエン酸緩衝液(PH4.0～5.0)に溶解しておいた。酵素の種類により1～5時間インキュベート後、1 μ lの0.2Mグリシン緩衝液(PH10.7)を加え、顕微鏡蛍光光度法により遊離4-メチルウンベリフェロン量を測定した。

蛍光測定はカール・ツァイス社製Spectro-microscopic photometerを用いた。正確な励起光波長、蛍光波長を得るため、種々のカットフィルター、干渉フィルターを組合わせた。すなわち励起部にはUVH365, BG38(2枚)蛍光部にはLP420, LP450(以上カール・ツァイス)、干渉フィルター(448 \pm 5 nm, 日本真空光学)を用いることにより満足すべき結果が得られた。

研 究 成 績

以上の方法により、4-メチルウンベリフェロン標準物質の測定には再現線のある結果が得られた。 10^{12} モルの量は十分に測定が可能であった。N-アセチル- β -グルコサミニダーゼは 10^{12} モル/時間/細胞、 β -ガラクトシダーゼは 10^{13} モル/時間/細胞程度の活性であった。

GM₁-ガングリオシドーシス患児をもつ母親の次回妊娠時、羊水穿刺をおこない、上記の方法により出生前診断を試みた。患児の β -ガラクトシダーゼ活性は白血球、血漿において欠損し、両親では正常時よりも低い値を示した。この胎児由来の羊水細胞について β -ガラクトシダーゼ活性を測定し、図1に示した。対照側においては羊水細胞の方がやや高い活性値を示した。これらの細胞に対し、本胎児ではどの細胞も全く β -ガラクトシダーゼ活性を示さなかった。念のためN-アセチル- β -グルコサミニダーゼ活性を検討したが正常であった。結局Gm₁-ガングリオシドーシスと診断し、両親の希望により治療的流産を行った。胎児組織の脳及び肝の β -ガラクトシダーゼ欠損がたしかめられ、出生前診断の正しかったことが確認された。

考 按

本法により少くともリソゾーム病の一部については、出生前診断に要する時間が大幅に短縮されることが確かめられた。今回は4-メチルウンベリフェロン誘導体を基質とした酵素活性測定を行ったが、理論的にはこの方法によりあらゆる種類の蛍光物質の測定が可能である。従って手技の工夫により、他の種類の酵素、物質の測定にも応用できるのではないかと思われる。出生前診断にあたっては、羊水穿刺以後の待ち時間が決定的な因子となることが少なくないので、単一細胞内酵素測定法が今後広く用いられるようになることを期待したい。

要 約

顕微鏡蛍光分光光度法による単一細胞内酵素測定を行った。皮膚線維芽細胞ばかりでなく、羊水細胞についても検討した。

1例胎児について β -ガラクトシダーゼ活性測定によるGM₁-ガングリオシ

ドーシスの診断をおこない、脳及び肝の酵素測定によって診断を確認した。

本法の実施にあたっては、短期培養による生存細胞の確認のみで十分であり、今後広く実際に応用されることを期待したい。

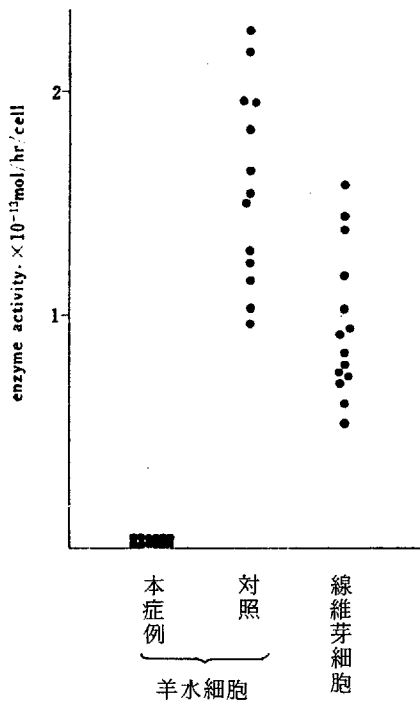
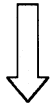
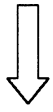


図1 単一細胞中β-ガラクトシダーゼ活性



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



要約

顕微鏡蛍光分光光度法による単一細胞内酵素測定を行った。皮膚線維芽細胞ばかりでなく、羊水細胞についても検討した。

1 例胎児について αガラクトシダーゼ活性測定による GM1-β ガングリオシドーシスの診断をおこない、脳及び肝の酵素測定によって診断を確認した。本法の実施にあたっては、短期培養による生存細胞の確認のみで十分であり、今後広く実際に応用されることを期待したい。