

7・5 Multiple sulfatase 欠損症の保因者診断法に関する研究

東京慈恵会医科大学小児科

青 木 菊 麿

衛 藤 義 勝

研 究 目 的

Multiple Sulphatase Deficiency (MSD) はヒト先天性代謝異常症では、唯一の多酵素欠損症である。このような疾患でのヘテロ保因者の酵素活性を検索することは、MSD の保因者診断を可能にすることばかりではなく、本症の如き多酵素欠損の本態を解明する上でも極めて有用であり、従来報告がない。本研究では、MSD 患者並びにヘテロ保因者（母親）の白血球、培養皮膚線維芽細胞に於ける種々のサルファターゼ活性を測定すると同時に患者並びにヘテロ保因者の酵素学的性質に関しても検討したので報告する。

研究対象および方法

MSD 患者は臨床的、病理学的、生化学的に診断した患者、母親、対照患者 10 名より、ヘパリン全血 10 ml から Snyder らの方法に従って採取した。又培養皮膚線維芽細胞は皮膚生検により、12% 子牛血清を含む F-10 培養液により 5% 炭酸ガス下で培養した。

ホモジェネートの調製並びに酵素測定条件

白血球又は培養皮膚線維芽細胞に distilled water 1ml を加え、超音波 40 kcycle 1 分間処理後、freeze and thawing を数回くり返し、10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) で透析した後、100,000 \times 30 分間超遠心し、上清を DEAE-Sephrose Column による酵素分画の為の酵素液とした。本法によるアリルサルファターゼ A, B の可溶化は A が 90% 以上 B は 80-90% であった。アリルサルファターゼ A, B は Baum らの方法に従い、P-nitrocatechol sulfate を用いて測定し、又 4-methyl-umbeliferyl (4-MU) sulfatase 活性は 100 μ l ホモジェネートに 100

μl 10mM 4MU-sulfate (Koch-Light 社) を含む 0.2M acetate buffer に溶解した基質液を加えて、1時間インキュベーション後、1 ml 0.2M glycine-carbonate buffer (pH 10.8) を加えて反応を停止し、遊離の 4 MU を蛍光光度計で測定した。Arylsulfatase C, cholesterol sulfatase は、各々 4 MU-sulfate, ($4-^{14}\text{C}$) cholesterol sulfate (東大医科研岩森博士の御好意による) を Eto らの方法に従って測定した。

研 究 成 績

(1) 白血球酵素活性：白血球アрилサルファターゼ A・B・C 活性は、ヘテロ保因者では正常下限界を示し、対照白血球の 70~80% を示し、対照値とオーバーラップした。一方 MSD 患者白血球ではアрилサルファターゼ A・B・C 活性の残存酵素活性はほとんど認められず、対照の 5% 以下であった。

(2) ヘテロ保因者白血球残存酵素活性の分画並びに酵素学的検討、透析白血球ホモジュネート上清を DEAE-Sepharose カラムにかけ、0.5 M NaCl の Continuous gradient によりアрилサルファターゼを分画すると、図 1 に示す如く、対照白血球では、4 MU-アрилサルファターゼ、P-NCS アрилサルファターゼ共に B_1 , B_2 , A 画分に分画される。MSD 患者ではアрилサルファターゼ A, B 共に欠損し、その残存酵素活性はみられない。一方ヘテロ保因者では、DEAE-Sepharose カラム上では異常なピークは認められず、A, B_1 , B_2 共に活性の低下が認められほぼ対照の 50~60% であった。これら A, B_1 , B_2 画分を 10 mM Acetate buffer (pH 6.0) で透析後 K_m , 至適 pH, 種々のイオンの影響, thermostability を検討すると、 K_m 値, 至適 pH 共にヘテロ保因者の残存酵素活性は、対照酵素と比較してその差異を認めず、又 Cu^{++} , Ca^{++} , Mg^{++} , Hg^{++} イオン等の添加によっても、ヘテロ保因者の酵素と比較して差異を見出すことは出来なかった。

(3) 培養皮膚線維芽細胞に於けるアрилサルファターゼ活性並びに Cholesterol sulfatase 活性。

培養皮膚線維芽細胞に於けるアрилサルファターゼ A, B_1 , B_2 , C, Cholesterol sulfatase 活性は共に対照の 25~30% 以下であり、又ヘテロ保因者では酵素活性は 40~60% とほぼ中間値を示した。又患者の残存

酵素活性は白血球が患者では5%以下に対して培養皮膚線維芽細胞では高値を示したことは培養条件に左右されるものと考えられる。DEAE-セファロースカラムクロマトでは、白血球と同様に異常なピークは見られず、ヘテロ保因者では白血球と同様にアрилサルファターゼA, B₁, B₂ 共に対照と比較して低下を認めた。Km, 至適pH等も白血球で得られた結果と同様であり、ヘテロ保因者, 患者共に対照酵素との酵素学的差異は認められなかった。

考 按

MSD患者ヘテロ保因者の診断は、白血球では対照と比較して70~80%と低値を示すものの、正常対照とオーバーラップすることより、実際のヘテロ保因者の診断には不確実であると考えられる。これは白血球のheterogeneous populationによるものと推測される。しかしながらDEAE-セファロースカラムにより酵素分画することにより、ヘテロ保因者の診断は或る程度可能であると考えられる。一方培養皮膚線維芽細胞では明らかに通常の培養条件では、種々のサルファターゼ活性はヘテロ保因者は、ほぼ中間値を示すが、Fluhartyらが報告した様に、アрилサルファターゼ活性は培養液のpHにより左右され、アルカリ側でアрилサルファターゼAはInductionされることから、MSD患者、保因者診断には十分培養条件に注意して診断する必要がある。今後更にヘテロ保因者の診断法に関して症例を増して検討したい。

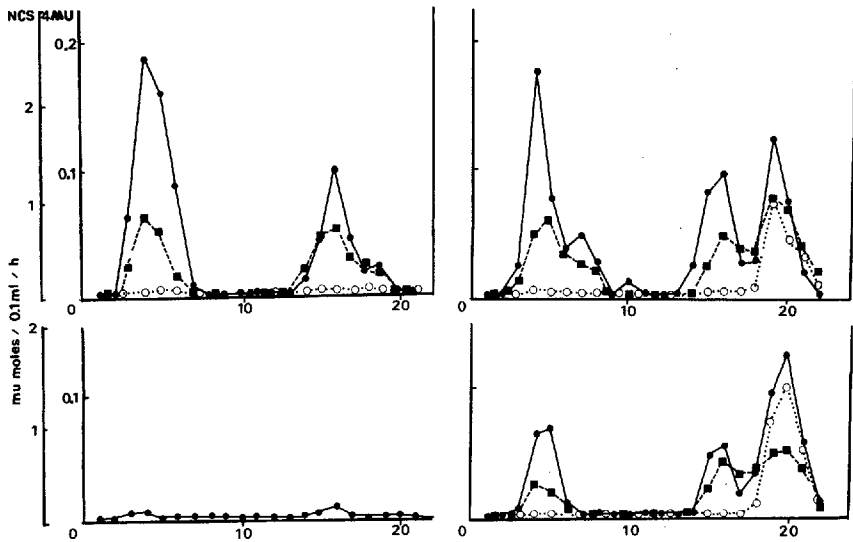
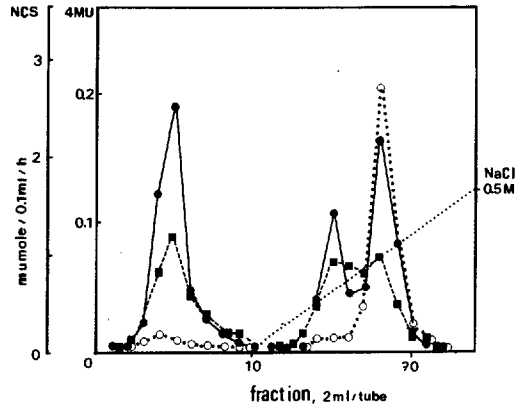
要 約

Multiple Sulphatase Deficiency (MSD)のヘテロ保因者の診断法に関して、白血球並びに培養皮膚線維芽細胞を用いて検討した。白血球のヘテロ保因者のアрилサルファターゼA, B, C活性は対照の約70~80%と低下を示し、対照とオーバーラップしたが培養皮膚線維芽細胞での酵素活性の測定では、アシルファターゼA, B₁, B₂, C, Cholesterol sulphatase活性は対照の40~60%を示し、MSDヘテロ保因者の診断には有用である。又ヘテロ保因者の残存酵素活性は、酵素学的に対照と比較して差異を認めなかった。

文 献

1. Eto Y. et al. : Arch. Neurol. 30: 153-156 (1974) .
2. Eto Y. et al. : Europ. J. Pediat.132: 207-211 (1979) .
3. 沼口俊介他：小児科診療42 (2), 21-26, 1979 .

図1. DEAE-セファロースカラムによる白血球アリルサルファターゼの分画



上段：对照白血球

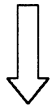
中段左：MLD患者，中段右：MLD保因者

下段左：MSD患者，下段右：MSD保因者

●—●：10mM 4MU-Sulfate ○…○：Baumらの測定法による reagent A による ■…■：Baumらの測定法による reagent B による。



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

Multiple Sulphatase Deficiency(MSD)のヘテロ保因者の診断法に関して、白血球並びに培養皮膚線維芽細胞を用いて検討した。白血球のヘテロ保因者のアрилサルファターゼA,B,C活性は対照の約70~80%と低下を示し、対照とオーバーラップしたが培養皮膚線維芽細胞での酵素活性の測定では、アシルファターゼA,B1,B2,C,Cholesterol sulphatase活性は対照の40~60%を示し、MSDヘテロ保因者の診断には有用である。又ヘテロ保因者の残存酵素活性は、酵素学的に対照と比較して差異を認めなかった。