

8・4 毛根による先天性代謝異常症とその
保因者診断法に関する研究

富山医科薬科大学
和漢薬研究所

萩田善一
林和子
磯部正治
林真一
金溶奎

日本大学小児科

赤塚章

岐阜大学小児科

祐川和子

研 究 目 的

本研究の目的は、採取が容易で培養操作することなしに利用できる毛根を試料とする遺伝性酵素異常症その保因者ならびに染色体異常症の系統的診断法の確立にある。

研 究 対 象

毛根を試料とする遺伝性疾患の新しい系統的診断法を確立するため、(1)生化学的診断法 (2)組織化学的診断法ならびに (3)染色体分析法に分類し、それぞれについて検討しつつある。

1) 毛根による生化学的診断法を確立するため、常染色体性酵素異常症の例としてGM₂ ガングリオシドーシス診断のための蛍光基質を用いるヘキソサミニダーゼ、および特殊型異染性脳白質ジストロフィー症診断のための天然基質を用いるスルファターゼ活性、ホスファターゼならびにATPase 活性の電気泳動法による微量解析法を検討した。

2) X染色体性酵素異常症の例としてプリン代謝系のHGPRT (Hypoxan-

thine-guanine Posphoribosyltransferase)酵素異常によってもたらされる痛風を例として放射性基質を用いた後オートラジオグラフィ法を併用することによる微量電気泳動法について検討した。

研 究 結 果

a. 毛根による Tay-Sachs 病とその保因者診断法

① 毛根からの抽出液調整法：採取した毛根 10 本を 0.25 M Tris-HCl buffer (pH 6.8) 20 μ l に浸し、液体窒素を用いて凍結融解を 5 回くり返す。この抽出液を diluting solution で 1 : 1 に希釈し、混合後、12000 rpm 5 分間遠心分離して上清を試料とする。

② 泳動条件：電気泳動は、荻田らによって考察された垂直式微量電気泳動装置 (Z. Ogita, C. L. Markert 1979) を用い、ゲル濃度 10 % (表 1) とし、1 mA/cm で 3 時間泳動を行なう。

③ Hexosaminidase 活性の検出法：泳動後、0.05 M Citrate-phosphate buffer (PH 4.5) にゲル薄層を 15 分間浸し、酸性条件に調整する。次いで 2 % 寒天溶液 2.5 ml (0.05 M Citrate-Phosphate buffer) と基質 4-methylumbelliferyl-N-acetyl- β -glucosaminide 10 mg / 2.5 ml 0.05 M Citrate-Phosphate buffer を混合し、ゲル薄層表面に静かにのせ、37 $^{\circ}$ C で 30 分間反応させる。その後、アンモニアガスに暴露することによってアルカリ性条件に調製した後、ブラックライト (波長 366 nm) をあてて観察するとともに写真撮影を行ない記録する。毛根における Hexosaminidase 活性は Hex A, B とさらにも 1 つの合計 3 つの主成分として検出される。Tay-sachs 病では Hex A の完全欠損と Hex C の活性低下がみられることは興味のある点である。(荻田善一, 林和子, 林真一)。

b. 天然基質を用いるライソゾーム酵素異常症の電気泳動法的診断法

一般にホスファターゼ, ATPase, エステラーゼやスルファターゼなどの水解酵素は、しばしばライソゾームと呼ばれる細胞内小粒子群に局在する。

天然基質を用いるホスファターゼ, あるいは ATPase を電気泳動法で分離検出するため、リン酸イオンあるいはスルファターゼ活性による遊離硫酸イオンを金属塩として沈降させる同時捕捉反応型検出方法を検討した。

電気泳動分離に用いる緩衝液系は、捕捉金属 Pb^{2+} や Ba^{2+} イオンと反応しない成分から構成された Tris-Maleate-NaOH 緩衝液を用いた。リン酸イオンの検出法はまず泳動後の支持体を水洗し、PH 7.4 の 0.2M Tris-Maleate-NaOH 緩衝液で十分洗浄した後、硫化アンモニウム溶液を固定検出として Pb^{2+} イオン黒色沈澱として捕捉した。(荻田善一, 金溶奎, 赤塚章)。

生体内における硫酸エステルの種類は多いが、先天性代謝異常症としていくつかのスルファターゼ欠損症が知られている。特殊型異染性脳白質ジストロフィーとこれらの類似疾患ならびに保因者診断法を検討するため天然基質を用いて遊離した硫酸イオンを塩化バリウムで捕捉し、よく洗浄した後生成した硫酸バリウム沈澱物に微量吸着されて残った Ba^{2+} イオンを、ロジゾン酸 (Rhodizonate) で発色させることによって生体内の硫酸エステルを天然基質として用いることのできるスルファターゼ活性検出法を完成した。(荻田善一, 祐川和子)

表 2 に示した方法によって、天然基質を用いてホスファターゼ, ATPase やスルファターゼを分離検出することが出来る。またオートラジオグラフィ法を併用することによってその感度を上げることが可能であろう。

2) プリン代謝系酵素異常の電気泳動法的解析

痛風患者を X 染色体性劣性遺伝子型と常染色体性優性型に分類し、それぞれの型に属する患者の血清・尿などの体液ならびに血球や毛根などの細胞組織試料を用い電気泳動法的に解析した。

考 察

毛根による遺伝性疾患の診断法は結局毛根に付着した微量細胞を用いる診断法とすることができる。したがって、毛根細胞に含まれる微量酵素活性の検出に、蛍光基質を用いるか、放射性基質とオートラジオクロマトグラフィ法との併用あるいは免疫化学的手段を組み合わせることによって生化学的、組織化学的診断法を展開させ得る可能性がある。

要 約

毛根を試料とする遺伝性疾患ならびにその保因者の新しい系統的診断法を確

立するため、(1)生化学的診断法、(2)組織化学的診断法ならびに(3)染色体分析法に分類し、それぞれについて検討した。血液成分や尿などに比較して寿命の長い毛髪は成人の頭と顔に40～50万本、他の体毛とを合わせると140万本あることから、X染色体性異常酵素に基づくモザイク的発現の検出による保因者診断ならびにモザイク型染色体異常症の診断に適している。

文 献

- 1) 血清コリンエステラーゼアイソザイムと罹病性 荻田善一, 岩橋寛治, 林和子 生物物理化学: 22 (3) 252 1979.
- 2) Testosterone 効果の微量電気泳動法による解析 荻田善一, 北原浪子 生物物理化学: 22 (3) 235 1979.
- 3) 後成的修飾機構によるマウスLDHアイソザイムバンド形成 山村研一, 荻田善一, Markert C.L. 生物物理化学: 22 (3) 248 1979.
- 4) 和漢薬効果の電気泳動法的解析 荻田善一, 岩橋寛治, 磯部正治, 宇田川千恵子 生物物理化学: 23 (1) 69 1979.
- 5) SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法による尿蛋白分析—その臨床応用について— 小西徹, 岡田敏夫, 鈴木好文, 荻田善一 生物物理化学: 23 (1) 70 1979.
- 6) 薄層電気泳動法によるガガンボの esterase isozyme の遺伝生化学的研究 荻田善一, 金浴奎, 林和子, 松崎沙和子 生物物理化学: 23 (1) 84 1979.
- 7) 電気泳動法による腎機能検査法の開発 荻田善一, 丸山由紀子, 岡田敏夫, 鈴木好文, 小林収 生物物理化学: 22 (3) 203 1979.
- 8) Epigenetic Formation of Lactate Dehydrogenase Isozymes in the House Mouse, *Mus musculus* Ken-ichi Yamamura, Zen-ichi Ogita, Markert C.L. *The Journal of Experimental Zoology*: 208 (3) June 1979.
- 9) A Miniaturized System for Electrophoresis on Polyacrylamide Gels Zen-ichi Ogita, Market C.L. *Analytical Biochemistry* 99, 233, 1979.

10) X染色体の不活性化 — 遺伝子量補償機構 — 萩田善一, 窪田裕子
 代謝16 1979.

表1. Stock solutions for running gel

IA: acrylamide-bis solution		
acrylamide	39.0	g
BIS	1.0	g
glycerol	20.0	ml
H ₂ O to make	100.0	ml
IB: buffer solution (adjust pH to 8.8)		
Tris	9.15	g
HCl (conc.) about	3.0	ml
H ₂ O to make	100.0	ml
IC: 0.2% APS solution (W/V)		
ammonium persulphate	0.2	g
H ₂ O to make	100.0	ml
ID: 0.4% TEMED solution (V/V)		
TEMED	0.4	ml
H ₂ O to make	100.0	ml

表2. Thin Layer Agarose Gel Electrophoretic Conditions
for the Detection of PO_4^{3-} and SO_4^{2-} ion

I. Buffer system

	electrode buffer	gel buffer
pH 4.5	0.1 M Tris-Maleate-NaOH	0.02 M Tris-Maleate-NaOH
	Tris 24.23 g	buffer 20 ml
	Maleic acid 23.20 g	H ₂ O 80 ml
	NaOH 0.73 g	
	H ₂ O make to 2.000 ml	
	(2.2×10^3 mho)	(0.42×10^3 mho)
pH 7.4	0.04 M Tris-Maleate-NaOH	0.008 M Tris-Maleate-NaOH
	Tris 9.69 g	buffer 20 ml
	Maleic acid 9.28 g	H ₂ O 80 ml
	NaOH 3.64 g	
	H ₂ O make to 2.000 ml	
	(2.2×10^3 mho)	(0.48×10^3 mho)

II. Supporting media

PVP	0.7 g
Agarose I	1.0 g
Gel buffers	100.0 ml

III. Electrophoresis

1 mA/cm constant current, 30 min

IV. Reaction Mixtures for PO_4^{3-} ion 15 min

pH 4.5	0.4 M Tris-Maleate-NaOH buffer, pH 4.5	25.0 ml
	2% Lead Nitrate	1.5 ml
	H ₂ O make to	50.0 ml
pH 7.4	0.4 M Tris-Maleate-NaOH buffer, pH 7.4	25.0 ml
	2% Lead Nitrate	2.0 ml
	H ₂ O make to	50.0 ml

V. Reaction Mixture for SO_4^{2-} ion

VI. Washing (pH 4.5, pH 7.4)

deionized water, a few times

0.2 M Tris-Maleate-NaOH buffer, pH 7.4 5 min 5 times

VII. Fixation and Staining for PO_4^{3-} ion 5 min

Aqueous yellow ammonium sulphate	1.0 ml
25% Ammonium	10.0 ml
H ₂ O make to	100.0 ml

VIII. Fixation and Staining for SO_4^{2-} ion

BaCl ₂	500 mg
20 mM Acetic acid	100 ml

表3. Micro-vertical Acrylamide gel Electrophoresis
(Z. Ogita and Markert)

Buffer system

I	Running Gel	pH 8.8	0.1875 M Tris-HCl
II	Running Gel	pH 8.3	0.1875 M Tris-HCl
III	Spacer Gel	pH 6.8	0.125 M Tris-HCl
IV	Electrode Buffer	pH 8.3	0.0125 M Tris-Glycine

Concentration of Running Gel (T=40, c=2.5)

7%

Electrophoresis

1 mA/cm, (constant current), 2.0 - 2.5 hours

Sample diluting Solution

0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)	25.0 ml
Glycerine	40.0 ml
0.01% BPB	20.0 ml
H ₂ O	15.0 ml

Substrate solution

HPRT (hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase)

0.01 M Tris-HCl (pH 7.4)

0.01 M MgCl₂

0.2 mM PRPP-Mg salt

0.5 μ Ci/ml ¹⁴C-hypoxanthine (sp. act. 42.5 mCi/m mole)

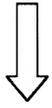
APRT (adenine phosphoribosyltransferase)

0.01 M Tris-HCl (pH 7.4)

0.01 M MgCl₂

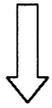
0.2 mM PRPP-Mg salt

0.5 μ Ci/ml ¹⁴C-adenine (sp. act. 7.9 mCi/m mole)



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

毛根を試料とする遺伝性疾患ならびにその保因者の新しい系統的診断法を確立するため、(1)生化学的診断法、(2)組織化学的診断法ならびに(3)染色体分析法に分類し、それぞれについて検討した。血液成分や尿などに比較して寿命の長い毛髪は成人の頭と顔に40~50万本、他の体毛とを合わせると140万本あることから、X染色体性異常酵素に基づくモザイク的発現の検出による保因者診断ならびにモザイク型染色体異常症の診断に適している。