

8. Hunter 症候群の患者および保因者検索とその意義

研究協力者 藪 内 百 治
(大阪大学医学部小児科)

共同研究者 豊 徹
岡 田 伸 太 郎
(大阪大学医学部小児科)

緒 言

致死的な伴性劣性遺伝疾患，すなわち患者が子孫をつくる年齢まで生存し得ない疾患では，患者の死亡によって起こる変異遺伝子の減少は，新しく突然変異がおこることによって補われるために，患者数の減少がみられず，遺伝的な平衡がたもたれると考えられている。Haldane¹⁾の式によれば，新しい突然変異率は $\frac{1}{2}$ となるが，Francke ら²⁾は Lesch-Nyhan 症候群の家系検索を行ない，突然変異による男子患者の発生は，それほど大きくないことを示している。しかし何れにしても突然変異による変異遺伝子の生成が，致死的な伴性劣性遺伝疾患の頻度に重要な役割を果たすことは確かである。

Hunter 症候群は，デルマタン硫酸やヘパラン硫酸の分解を行なう Iduronate sulfatase の遺伝的な欠損により，諸組織にムコ多糖の蓄積をきたす先天性ムコ多糖代謝異常症である。本症の患者はすべて男性で，伴性劣性に遺伝することが知られており，通常15～16歳で死亡する。本症患者は，リンパ球，血漿，培養皮膚線維芽細胞などを用いて Iduronate sulfatase 活性を測定することにより，診断が可能であるが，保因者の診断は血漿やその他の細胞の酵素活性測定では不確実なことがある。したがって，毛根を酵素源として利用することにより，保因者および患者の診断，Hunter 症候群における突然変異の実態の追求への応用の可能性を検討した。

材料および方法

酵素原としては毛根，リンパ球，血漿を用いた。正常人，Hunter 症候群患者，およびその母親から，毛根と毛鞘の完全に付着した毛髪20～50本を頭部の異なった部位から抜きとり，pH 7.5，25 mM，Tris-HCl 緩衝液0.1ml中で凍結，融解を5回くり返し，酵素液とした。リンパ球は，リンパ球分離用の Ficoll-paque 法を用いて血液から分離し，上記 Tris-HCl 緩衝液中でホモジナイズした後凍結，融解をくり返し，同じ緩衝液を用いて20時間，4℃で透析したあと酵素液とした。血漿は Tris-HCl 緩衝液を用いて透析した後に使用した。

基質は Lim ら³⁾の方法にしたがってヘパリンを亜硝酸で分解し，^[8H] Borohydride で還元して末端を ^[3H] で標識した Idopyranosyluronic acid 2-sulfate-anhydromannitol 6-sulfate を得，基質として用いた。

酵素活性の測定⁴⁾：白血球は反応液 50 μ l中に pH 3.7，0.1M 酢酸-酢酸ソーダ緩衝液，

5mM NaN₃, 12 μ M の基質 (1,500 cpm), ウシ血清アルブミン (0.5mg/ml), 酵素液 (10~20 μ g 蛋白量) を含ませ, 37°C, 2時間インキュベートした。

毛根を酵素源とした場合は, 反応液 100 μ l 中に毛鞘部も含めた毛根酵素液 70 μ l, 0.5 mM NaN₃, pH 3.7, 0.1M 酢酸-酢酸ソーダ緩衝液, 6 μ M の基質およびウシ血清アルブミン (0.5mg/ml) を加え, 37°C, 17時間インキュベートした。

反応終了後, 反応液を蟻酸型陰イオン交換樹脂カラム (Cellex E, Bio-Rad Laboratories) により反応生成物と未反応基質を分け, 放射能を測定することにより酵素活性を測定した。

結 果

臨床的に Hunter 症候群と診断された患者 9 名の血漿およびリンパ球の Iduronate sulfatase 活性は著しい低下を示し, とくにリンパ球では正常対照の 1/100 以下の活性であった (表 1)。患者の母親, すなわち保因者の血漿 Iduronate sulfatase 活性は, 正常対照と同じ活性を示し, 保因者と正常者を区別することはできなかった。リンパ球では症例 7 の母親を除いて, 全例正常人と患者の中間値を示した。症例 7 の母親の活性は正常下限の値を示した (表 1)。

毛根の Iduronate sulfatase 活性を患者と正常対照で測定した結果は, 患者では活性を認めないか, 著しい活性低下がみられた。対照では活性値は広範囲の分布がみられるが, 0.1 nmole/17 hour/hair root 以下に低下するものはなく, 患者と正常対照の間に明確な差異が認

表 1 Plasma and Leukocyte Enzyme Activity

Subject	Iduronosulfate Sulfatase	
	Plasma	Leukocytes
Hunter hemizygotes Activity nmoles/mg/hr		
1	0	0
2	0.0312	0.089
3	0.037	0.025
4	0	0
5	0	0
6	0.01	0.08
7	0	0.08
8	0	0
9	0.0295	0
Mother of Hunter hemizygotes		
1	0.158	1.44
2	0.274	n.d.
4	0.123	2.97
6	0.12	4.1
7	0.26	6.4
8	0.18	2.7
9	0.361	0.437
Control	0.19 \pm 0.03 (N=12)	9.1 \pm 3.3 (N=14)

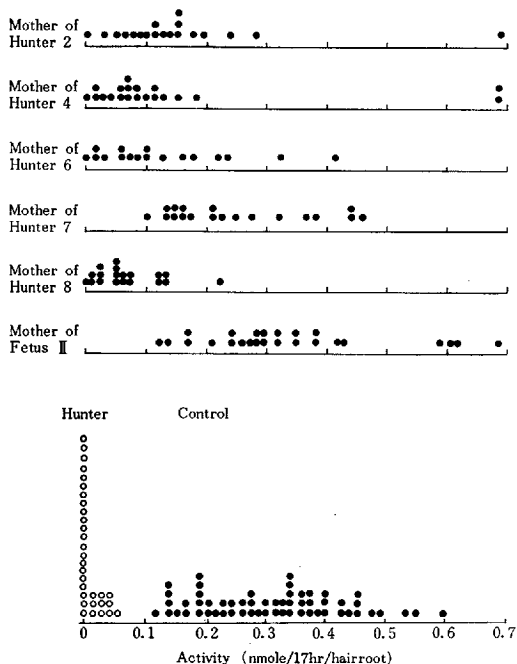


図1 Iduronate Sulfatase Activity of Individual Hair Root

められた (図1)。次に母親の毛根の酵素活性は症例7を除いて、著しい活性低下を示すもの、中等度の活性低下を示すもの、および正常人と同じ活性を示すものが、連続的に分布するのが認められ、明らかに正常人と区別することが可能であった。しかし症例7の母親では毛根の活性は 0.1nmole 以上を示し、正常対照と全く同じ活性分布を示し、正常人と考えられた。

考 案

Hunter 症候群は遺伝性ムコ多糖代謝異常症の中でもっとも頻度の多いもので、本邦では少なくとも80名以上の患者が現在治療を受けていると思われる。本症は伴性劣性に遺伝する疾患で、患者および保因者の診断は遺伝相談上でも重要である。また伴性劣性遺伝疾患は突然変異によって、変異遺伝子の数が保たれていると考えられているので、保因者を確実に診断できれば、患者が遺伝によるものか、突然変異による発生かの判定が容易となる。

われわれは今回、血漿、リンパ球、毛根の三つを酵素源として Iduronate sulfatase 活性を、患者およびその母親について測定した。患者の血漿の酵素活性は対照に比して著しい低値を示し、診断に用い得ることが示されたが、母親はすべて正常範囲内の活性を示し、保因者の診断には役立たないことが明らかとなった。リンパ球の酵素活性は患者で著しい低値を示し、母親では1例を除いて正常人と患者の中間値を示し、患者、保因者の診断に役立つと考えられた。1例の母親は正常の下限の活性を示したため正常と考えられた。しかし、伴性劣性遺伝疾患の保因者では、しばしば Lyonization のために正常活性を示す可能性もあり、正確に保因

者診断を行なうためには細胞のクローニングが必要となる。一方毛根の Iduronate sulfatase 活性は正常対照で広範囲の活性分布を示したが、患者では著しい活性低下があり、両者を明らかに鑑別することができた。また保因者では患者と同じ活性のもの、それよりやや高いが正常より低い活性のもの、正常範囲内に分布するものなど、活性の無いものから正常までの連続的な活性分布が得られ、正常人とは明らかに違った分布を示し保因者の診断に役立つことが示された。症例7の母親のリンパ球の酵素活性は正常の下限であったが、毛根の酵素活性は正常人の活性分布と全く同じで、保因者でみられる低活性の毛根はみられず、正常と判定された。これらの結果は G-6-PDH 欠乏症⁹⁾ や Lesch-Nyhan 症候群⁶⁾ におけるのと同じように、毛根を用いた Iduronate sulfatase 活性の測定が患者および保因者の診断に極めて有用であることを示しており、とくに伴性劣性遺伝疾患における保因者の検索には細胞のクローニングなど複雑な方法を用いなくとも、比較的簡単にかつ確実に診断できることを示している。

今回われわれは9例の Hunter 症候群の患者と、その母親7例について酵素活性を測定した。その結果、1例の母親の毛根およびリンパ球の Iduronate sulfatase 活性は正常で、保因者でないことが示された。したがって症例7は突然変異によって発症した患者であると推測される。Haldane の式によれば、X染色体の劣性遺伝子の突然変異率 μ は

$$\mu = \{x(1-f)\}/3$$

と計算され、 f は患者である男性が子供をもつ数、すなわち相対増殖率を示し、 x は男子の中の患者の頻度を示す。患者が成年に達するまでに死亡する疾患では $f = 0$ となり、突然変異は $1/3$ にみられることになる。Francke らは Lesch-Nyhan 症候群47家系、うち20家系は1人の患者、27家系では複数の患者をもつ家族および患者について、毛根を用いて hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT) の活性を検し、Lesch-Nyhan 症候群における変異の発生について研究を行なった。その結果、保因者の毛根の HGPRT 活性は、正常と異常のモザイクがみられることから診断が可能であり、4人の母親が保因者でないことが示された。この結果からも突然変異による男子患者の発症は極めて少ないと思われる。Francke らはさらに、保因者である母親の母、すなわち患者の母方祖母について毛根の HGPRT を検し、保因者女性が新しい突然変異によってできる率は高く、 $1/2$ にみられることを報告している。我々の今回の Hunter 症候群での検索は、患者および保因者診断に対する毛根の有用性を検討したもので、例数が少なくかつ母方祖母についての検索は行わなかったが、Lesch-Nyhan 症候群と同じく新しい突然変異による男子患者の発生は、従来考えられていたより極めて少ないことが明らかである。また Francke らの成績から考えると Hunter 症候群においても突然変異による女性の heterozygote の発生は比較的高いと考えられ、患者数もこのような女性の new mutation によって保持されていると推測される。したがって伴性劣性遺伝疾患をコントロールしていくためには保因者の検索が重要であり、有効な保因者検索が行なわれれば遺伝相談や出生前診断によって患者を減少させることも考えられる。

結 論

伴性劣性遺伝疾患である Hunter 症候群の患者および保因者を診断するために、血漿、リンパ球、毛根の Iduronate sulfatase 活性を測定し、比較検討した。その結果、毛根は患者のみならず保因者の診断に極めて有用であることが示された。さらにこの方法を用いることにより、男子患者および女子 heterozygote の突然変異率算出の可能性を示した。

文 献

- 1) Haldane, J.B.S. : The rate of spontaneous mutation of a human gene. *J. Genet.*, **31** : 317, 1935.
- 2) Francke, U., Felsenstein, J., Gartler, S.M., Migeon, B.R., Dancis, J., Seegmiller, J.E., Bakay, F. and Nyhan, W.L. : The occurrence of new mutants in the X-linked recessive Lesch-Nyhan disease. *Am. J. Hum. Genet.*, **28** : 123, 1976.
- 3) Lim, T.W., Leder, I.G., Bach, G. and Neufeld, E.F. : An assay for iduronate sulfatase (Hunter corrective factor), *Carbohydr. Res.*, **37** : 103, 1974.
- 4) Yutaka, T., Fluharty, A.L., Stevens, R.L. and Kihara, H. : Iduronate sulfatase analysis of hair root for identification of Hunter syndrome heterozygote. *Am. J. Hum. Genet.*, **30** : 575, 1978.
- 5) Gartler, S.M., Candini, E., Angioni, G. and Argiloas, N. : Glucose-6-phosphate dehydrogenase mosaicism : utilization as a tracer in the study of the development of hair root cells. *Am. J. Hum. Genet.*, **33** : 171, 1969.
- 6) Gartler, S.M., Scott, R.C., Goldstein, J.L., Campbell, B. and Sparkes, R. : Lesch-Nyhan Syndrome : rapid selection of heterozygotes by use of hair follicles. *Science*, **17** : 572, 1971.



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



緒言

致死的な伴性劣性遺伝疾患,すなわち患者が子孫をつくる年令まで生存し得ない疾患では,患者の死亡によって起こる変異遺伝子の減少は,新しく突然変異がおこることによって補われるために,患者数の減少がみられず,遺伝的な平衡がたもたれると考えられている。Haldane,の式によれば,新しい突然変異率は%となるが,Franckeら²⁾はLesch-Nyhan症候群の家系検索を行ない,突然変異による男子患者の発生は,それほど大きくないことを示している。しかし何れにしても突然変異による変異遺伝子の生成が,致死的な伴性劣性遺伝疾患の頻度に重要な役割を果たすことは確かである。

Hunter 症候群は,デルマタン硫酸やヘパラン硫酸の分解を行なう Iduronate sulfatase の遺伝的な欠損により,諸組織にムコ多糖の蓄積をきたす先天性ムコ多糖代謝異常症である。本症の患者はすべて男性で,伴性劣性に遺伝することが知られており,通常 15~16 歳で死亡する。本症患者は,リンパ球,血漿,培養皮膚線維芽細胞などを用いて Iduronate sulfatase 活性を測定することにより,診断が可能であるが,保因者の診断は血漿やその他の細胞の酵素活性測定では不確実なことがある。したがって,毛根を酵素源として利用することにより,保因者および患者の診断,Hunter 症候群における突然変異の実態の追求への応用の可能性を検討した。