Lowe症候におけるヘパラン硫酸代謝の異常

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8957

金沢大学十全医学会雑誌　第91巻　第1号　32－41　(1982)

Lowe 症候におけるヘパラン硫酸代謝の異常

金沢大学医学部小児科学教室（主任：谷口　昂教授）

横　井　　透

(昭和56年12月25日受付)

Lowe 症候は原因不明の伴性劣性遺伝性疾患であるが，その症状より，結合織のグリコスアミノグリカン(GAG)ないしは糖蛋白の異常が想定されている．本研究では3人の Lowe 症候患児の，尿中 GAG と皮膚線維芽細胞による GAG 生合成について検討した．尿中 GAG は塩化セチルピリジニウム法で分離し，同年令の小児を対照として，セルロースアセテート膜電気泳動，ヘキソサミン分析，酵素2糖マッピング法で検討した．尿中総 GAG 量は正常であったが，ヘパラン硫酸(HS)が対照の 26～46 %に減少していた．また電気泳動上デルマタン硫酸部に低硫酸化コンドロイチン硫酸がみられたが，マッピングでは硫酸化に差をみなかった．線維芽細胞内 GAG への^{35}S-硫酸，^{14}C-グルコサミンの取り込みは，共にコンドロイチン硫酸，デルマタン硫酸は差がないが，HS で低下しており，線維芽細胞内の GAG の電気泳動像でも HS の割合は対照の約 1/2 に低下していた．

Key words Lowe's syndrome, Glycosaminoglycans, Heparan sulfate, Chondroitin sulfate isomers, Fibroblast

Lowe 症候は 1952 年 Lowe ら[1]により記載された伴性劣性（一部優性）遺伝性疾患で，臨床的に眼症状として白内障及び緑内障，中枢神経系障害として知能障害，筋の低緊張を伴ない，腎障害として初期には腎尿細管障害，後年になって糸球体不全を伴なうところから，眼・脳・腎症候ともいわれている．女性保因者は軽度の白内障を持つこともある．その病因は不明であるが，独特の眼病変，筋の低緊張，及び骨成熟の遅延は，グリコスアミノグリカン (Glycosaminoglycan, 以下 GAG と略)や糖蛋白などの結合織物質の代謝異常を考えさせる．Lowe 症候に関する尿中 GAG 分析の報告[2)~5)]は数編あるが種々の矛盾した結果が出ており，線維芽細胞の GAG についての報告[6)]はわずかに1編あるのみである．

今回3人の Lowe 症候患児と年令の一致した正常対照児の尿中 GAG を塩化セチルピリジニウム (Cetylpyridinium chloride, 以下 CPC と略)沈殿法で分離し，比較検討した結果，Lowe 症候の尿中ヘパラン硫酸 (Heparan sulfate, 以下 HS と略)排泄が，正常対照の 26～24 %と低下しており，また Lowe 症候2例の皮膚由来線維芽細胞について，GAG 合成能を検討した結果，正常細胞に比べ HS 合成能が約 1/2 に低下していることを見出した．

対象および方法

Lowe 症候患児：症例1；3歳男児．症例2；症例1の従兄で 14 歳男児．症例3；症例1，2とは血縁関係のない 14 歳男児．3名共典型的な Lowe 症候で，先天性白内障及び緑内障，知能発達遅延，筋の低緊張があり，幼少時に腎尿細管性アシドシースもみられていたが，症例2，3では現在代謝性アシドシースもなく，血中クレアチニンや BUN の上昇も認めていない．この3名の Lowe 症候患児より採尿した．また症例2と症例3は皮膚生検を行ない，線維芽細胞培養を行なった．

正常対照：対照尿は，3歳及び8歳から 16 歳の健康小児と，溶連菌感染後糸球体腎炎患児，アナフィラクトイド紫斑病性腎炎患児，両側の水腎症により尿毒症となり血液透析を受けている9歳の患児より採尿した．

Aberrations in the Metabolism of Heparan Sulfate in Lowe's Syndrome. **Tohru Yokoi,** Department of Pediatrics, (Director: Prof. N. Taniguchi), School of Medicine, Kanazawa University,

対照皮膚由来線維芽細胞は，代謝性疾患，染色体異常等がないと考えられる1歳男児，3歳女児，8歳男児，成人男性の4例から得た．

尿中GAGの分離

蒸留水で2倍希釈した尿に0.1％にCPCを加え，4°C1夜静置してGAG-CPC複合体として遠心沈殿させた[7]．これを0.1％CPCで2回洗滌後37°Cで，10％エタノールを含む2.0 M NaClに溶解し遠心後その上清に4倍量のエタノールを加え混和した．−20°Cに数時間静置後遠心し，沈殿を水に溶解し，最終濃度10％となるようにトリクロル酢酸を加え4°C3時間静置して除蛋白後，その遠心上清を水に対して24時間透析し，同量の0.5 M NaClを加えて0.25 Mとした．ここへ1％CPCを含む0.25 M NaClを白濁が生じなくなるまで加え，37°Cに数時間静置し，再びGAG-CPC複合体を形成させた．その沈殿を0.1％CPCで洗滌後，1.5 M NaClに溶解し，2.5倍量のエタノールを加え，0°C数時間静置後遠心し，沈殿を水に溶解した．酢酸ナトリウムで飽和したエタノールを2.5倍量加えることにより，GAGをNa塩として回収した．これをエタノール，次いでエチルエーテルにて洗滌し，空気中で乾燥させた．再び0.25 M NaCl中でのCPCによるGAG沈殿以下の操作をくりかえし，最終的に尿中GAGをNa塩として回収し，吸引デシケーター中で5酸化リン存在下で乾燥させ秤量した．

セルロースアセテート膜電気泳動

GAGの電気泳動はWessler[8]の方法で行なった．セパラックス膜（常光産業）を使用し，0.05 Mの酢酸バリウム中で，20 V/cmの定電圧下で，3時間泳動した．これを2％酢酸を含む0.1％アルーシャンブルーで10分間染色し，流水で洗滌した．GAGの硫酸化度は0.1 N塩酸中での移動度を指標とするWessler[9]の方法で判定した．

ヘキソサミンの定量

尿中GAGを4.0 N塩酸中で100°C8時間加水分解し，Taniguchi[10]の方法でアミノ酸自動分析装置（日立KLA-3B）を使用し，グルコサミンとガラクトサミンを分離定量した．

睾丸ヒアルロニダーゼによる分解

GAG 1 mgにつき1000 IUの牛睾丸ヒアルロニダーゼ（Miles-Seravac Ltd., Maidenhead, England）を使用し，0.2 M酢酸-0.15 M NaCl緩衝液pH 5.0中で37°C48時間インキュベートを行なった．インキュベート終了後，最終濃度が10％となるようにトリクロル酢酸を混和し4°C3時間静置した．遠心後，上清を4°Cで蒸留水に対して透析を行なった．分解されなかったGAGは，0.25 M NaCl中でGAG-CPC複合体として回収し，上述の方法でNa塩とした．

コンドロイチナーゼによる消化と不飽和2糖のマッピング

コンドロイチナーゼによる消化はSaito[12]らの方法を用いて37°C2時間インキュベートした．コンドロイチナーゼAC-II（生化学工業）は，Anthrobactor aurescenceから抽出したコンドロイチナーゼAC型の酵素で，コンドロイチナーゼABC（生化学工業）はProteus vulgarisの培養上清より単離精製されたものである．消化生成物は60 cm長の東洋濾紙No.51にスポットし，下降クロマトグラフィーを行なった．まず1-ブタノール，エタノール，水（52：32：16，V/V）にて24時間脱塩を行なった後，1-ブタノール，酢酸，1 Mアンモニア水（2：3：1，V/V）を溶媒として室温18時間で，コンドロイチン硫酸（Chondroitin sulfate，以下ChSと略）構成単位の不飽和2糖の分離を行なった．Δ^4-グルクロン酸を含むスポットは短波長紫外線（230〜260 mμ）照射下で見ることにより，その位置を決定した．紫外線吸収スポットを切り出し，細切して0.01 N塩酸中50°C10分で溶出した．Δ^4-グルクロン酸残基は232 mμで特有の分子吸光を持ち，ΔDi-6S（Δ^4-グルクロニド-アセチルガラクトサミン-6硫酸）は5,500，ΔDi-4S（Δ^4-グルクロニド-アセチルガラクトサミン-4硫酸）は5,100，ΔDi-0S（Δ^4-グルクロニド-アセチルガラクトサミン）は5,700の分子吸光係数によって計算した[13][14]．

皮膚由来線維芽細胞

皮膚は主に前腕屈側より採取した．採取部位を3％ヘキサクロロフェン（ファイゾヘックス®三共）にてよくこすり，0.5％キシロカインにて皮内麻酔をした後，メスにて表皮を5×5 mm採取した．採取した皮膚片は直ちにイーグルMEM培養液（カナマイシン60 mg/Lを含む，イーグルMEM培地「ニッスイ」①，日水製薬）に浮遊させ，2時間以内に植え込みを行なった．

初代培養は皮膚片を培養液に入れた無菌シャーレ中で，0.5〜1 mm角に細切し，25 cm²のフラスコ（Nunc 163371）に1〜2片入れ，10％牛胎児血清を加えたイーグルMEM培養液を少量加え，37°C5％ CO_2インキュベーター内にて静置培養を行なった．培養液交換（Medium change，以下MCと略）は，皮膚片のまわりに上皮細胞が出始めてから，週2回行ない，約1カ月後にはサブカルチャー（Subculture，以下SCと略）を行なえるようになった．

SCは以下の手順にて行なった．まず培養液を除去し，細胞表面をリン酸緩衝液（Phosphate-buffered saline，pH 7.4，以下PBSと略）にて1回洗滌後，0.02％EDTA，0.02％トリプシンを含むPBSを37°C20分

間作用させた後，培養液を加えてピペッティングし，2～4倍の面積になるようにSCした．週に2回MCを行ない，Confluenceになって2～3週の間にSCを行なった．最終的に75 cm²のフラスコ（Corning 25110）にて継代培養を行なった．以下，線維芽細胞を使用しての実験はすべて継代10代目前後の細胞を使用した．

線維芽細胞内GAGの検討

Confluenceに達した細胞を使用した．培養液を除去し，細胞表面をPBSで1回洗滌後，0.02％EDTA 0.02％トリプシンを含むPBSを37°C20分間作用させた後，ピペッティングして遠心管に移した．PBSにて細胞を2回洗滌後，蒸留水を加えて1 mlとし，超音波ホモジェナイザーで150 mA，90秒にて細胞試料液とし，Lowry法[15]で蛋白定量した．残りの試料液には，プロナーゼ1 mg/mlを含むプロナーゼ緩衝液（0.1 Mトリス，0.01 M塩化カルシウム，0.02％窒化ソーダ，pH 8.0）を1 ml加え，37°C24時間インキュベート後，プロナーゼ液を1 ml追加し，さらに24時間インキュベートした．そこへ最終濃度10％となるようにトリクロル酢酸を加え，4°C3時間静置後遠心し上清を水に対して24時間透析を行なった．酢酸ナトリウム飽和エタノールを2.5倍量加え，0°C数時間静置後遠心し，沈殿をエタノール，エチルエーテルと洗滌し乾燥させた．そこへ0.25 M NaClを0.5 ml加えて溶解し，等量の1％CPCを含む0.25 M NaCl溶液を加えた後，37°Cに数時間静置した．遠心後，その沈殿を2.0 M NaClに溶解し，3倍量のエタノールを加えて0°C数時間静置した．得らえた沈殿を再び蒸留水に溶解し，酢酸ナトリウム飽和エタノールで沈殿させ，細胞内GAG試料を得た．この試料について酢酸バリウムにてセルロースアセテート膜電気泳動を行なった．

線維芽細胞への^{35}S-硫酸の取り込み

Confluenceに達した線維芽細胞を，硫酸塩を含まないJoklik-Modified MEM（GIBCO 410-1300）に0.13 mg/mlの塩化カルシウムを加えた培養液でMCを行ない24時間インキュベート後，同様の培養液に，10％の1夜PBSに対して透析した牛胎児血清と2 μCi/mlの^{35}S-硫酸（Amersham；59 mCi/mmol）を加えた培養液でMCを行なった．37°C72時間5％CO_2下でインキュベート後，上述の方法で細胞を集め，ホモジェナイズ，プロナーゼ処理，トリクロル酢酸沈殿，透析後の水溶液にcarrierとしてChS，デルマタン硫酸（Dermatan sulfate，以下DSと略），HSをそれぞれ0.1 mgづつ加えて，上述の方法でGAG試料を得た．これを0.05 M酢酸バリウムにてセルロースアセテート膜電気泳動を行ない，染色後，ChS，DS，HSの各分画を切り出してミニバイアルに入れ，6 mlのシンチレーター（トルエン1 Lに4.0 gの2,5-Diphenyloxazoleと0.05 gの1,4-Bis［2-(5-phenyloxazolyl)］-Benzeneを溶解した液）を加えAlokaシンチレーションカウンターで測定した．

線維芽細胞への^{14}C-グルコサミンの取り込み

Confluenceに達した線維芽細胞を，0.3 μCi/mlの［1-^{14}C］Glucosamine hydrochloride（Amersham；55.5 mCi/mmol）を加えたイーグルMEM培養液でMCを行ない，37°C72時間5％CO_2下でインキュベート後，^{35}S-硫酸の時と同様にして，各分画をカウントした．

成　　績

1．Lowe症候の尿中GAG排泄量

症例2の尿中GAGの1日排泄量はNa塩として約9 mg，症例3では約7 mgであった．上述の方法で得られた正常値は5.4～9.3 mgであるので尿中総GAG量は正常であると考えられる．

2．尿中GAGの電気泳動パターン

酢酸バリウム緩衝液によるセルロースアセテート膜電気泳動で図1に示す如く尿中GAGは大きく3つに分

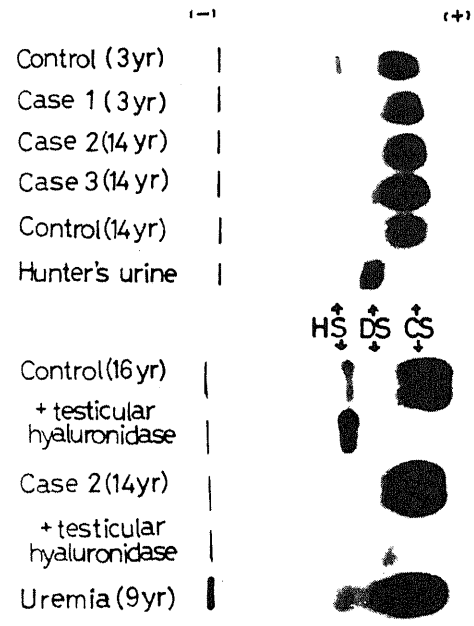

Fig. 1. Electrophoretic pattern of urinary glycosaminoglycans. Electrophoresis was carried out on cellulose acetate membrane in 0.05M barium acetate for 3h with a potential gradient of 20 V/cm. The strip was stained with 0.1 % alcian blue in 2% acetic acid. HS, heparan sulfate; DS, dermatan sulfate; CS, chondroitin sulfate A/C.

けられた．睾丸ヒアルロニターゼ消化後の電気泳動より，Lowe 症候患児でも正常児でも，尿中 GAG の主な分画は ChS A/C で，少量の DS と HS が含まれていることが示された．同年齢の正常児と比較すると 3 例の Lowe 症候の尿中 GAG の HS 分画の割合が明らかに低く，図には示さないが，粗 GAG を透析後エタノール沈殿にて集めた試料でも明らかに低かった．

Lowe 症候患児及び透析中の尿毒症患児の尿中 GAG の電気泳動像では DS に相当する分画がやや増加しているかにみえるが，睾丸ヒアルロニターゼ消化の結果からは少量のみが睾丸ヒアルロニターゼ耐性であることが示された．

3．尿中 GAG のヘキソサミン組成

表 1 の如く，総量では正常と差はなかったが，グルコサミンの総ヘキソサミンに対する比では Lowe 症候の方が小さい値だった．この結果は Lowe 症候の尿中 HS 排泄が正常に比べて低いことを考えさせる．溶連菌感染後糸球体腎炎で蛋白尿を認める患児及びアナフィラクトイド紫斑病性腎炎の 2 人の患者も 8 歳から 16 歳の対照群に含まれているが，彼等の 1 日尿中総 GAG 量は正常であり，その電気泳動による分画も他の正常児と変わりなかった．しかし，血液透析をうけている尿毒症患児の 1 日尿中総 GAG 量は減少しているようであったが，電気泳動像では他の正常児と比べて HS が特に少ないということはなかった．グルコサミンの総ヘキソサミンに対する割合は，症例 1 は同年齢対照の 46 %，症例 2 は 28～30 %，症例 3 は 26～31 % とそれぞれ減少していた．

4．コンドロイチナーゼ消化による 2 糖マッピング

図 2 及び表 2 に示す如く，患児でも不飽和 2 糖の排泄が特に減少しているということはなく，ΔDi-0S の量にも Lowe 症候と対照間で差がなかった．また粗 GAG を透析後エタノール沈殿で集めた試料でも，ΔDi-0S の増加はなかった．酢酸バリウムによるセルロースアセテート膜電気泳動では，Lowe 症候患児の DS の比率が高いようであったが，睾丸ヒアルロニターゼやコンドロイチナーゼ消化の結果から，後述のようにこの分画は主に低硫酸化 ChS A を示すと考えられた．

5．尿中 GAG の硫酸化の程度

尿中 GAG の 0.1 N 塩酸による電気泳動では，主な分

Table 1. Hexosamine contents of urinary glycosaminoglycans

	Case 1 (3 yr)	Control-I (3 yr, n=4)	Case 2 (14 yr)	Case 3 (14 yr)	Control-II (11－16 yr, n=7)
		(μmoles per mg of urinary GAG-Na salts)			
Total hexosamines	1.162	1.178±0.108	1.316	1.178	1.122±0.110
Ranges		(1.054－1.320)			(1.000－1.332)
		(% of total hexosamines)			
Glucosamine	4.0	8.55±1.22	3.9, 4.1	4.3, 3.5	13.51±1.62
Ranges		(7.4－9.5)			(10.4－15.4)

Table 2. Disaccharide subunits of urinary chondroitin sulfate isomers

	*CHase AC-digests**			*CHase ABC-digests*		
	ΔDi-6S	ΔDi-4S	ΔDi-0S	ΔDi-6S	ΔDi-4S	ΔDi-0S
Case 2 (14 yr) [CPC]†	0.512**	0.698	0.105	0.519	0.827	0.107
Case 2 [Ethanol]††	0.371	0.409	0.028	0.353	0.484	0.054
Control (14 yr)	0.411	0.679	0.058	0.439	0.780	0.070
Control (3 yr, pooled urine)	0.512	0.966	0.084	0.521	1.018	0.081
Control (8－14 yr, pooled urine)***	0.490	0.708	0.096	0.496	0.816	0.090

* CHase indicates chondroitinase. For further details, see the text.
** Results are expressed as μmoles per mg of urinary glycosaminoglycans (Na salts).
*** Cited from Ref. 14.
† Urinary GAG were precipitated with CPC in the presence of 0.25 M NaCl.
†† Urinary GAG were precipitated with ethanol.

画であるChS A/Cの移動度は患児と対照間で差がなく，ChS A/Cの硫酸化の程度はほぼ一致していると考えられた（図3）．また尿中GAGをコンドロイチナーゼABCで消化後，エタノールで未消化のGAGを集め，0.05M酢酸バリウムによる電気泳動を行なうと，未消化GAGの殆んどがHSであることがわかった（図4）．これを0.1N塩酸によるセルロースアセテート膜電気泳動を行なって硫酸化の程度をみると，図5の如く患児のHSも対照も，生化学工業製の牛腎のHSと差がなかった．ただこれらのHSは，NHI標準HSである牛肺のHSより少々硫酸化が少なかった．

6. 皮膚由来線維芽細胞内GAGの電気泳動パターン

皮膚由来線維芽細胞内GAGの0.05M酢酸バリウムによるセルロースアセテート膜電気泳動は，図6の如くであった．デンシトメーターにてその分画をみると，正常細胞では，ChS 9.8%，DS 57.5%，HS 32.7%に対して，Lowe症候では，ChS 13.9%，DS 66.4%，HS 19.7%と明らかなHSの低下をみたが，ChSとDSのバンドは特に差をみなかった．

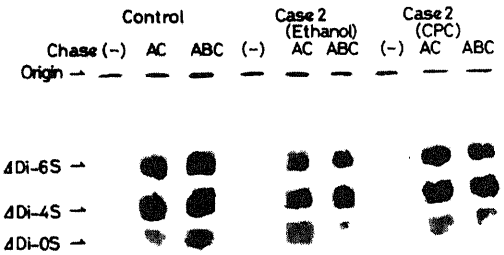

Fig. 2. Descending chromatographic pattern of chodroitinase - digestion products. Chase, chondroitinase; AC, chondroitinase AC-II-digests; ABC, chondroitinase ABC - digests; ΔDi - 6S, Δ^4 - glucuronide - acetylgalactosamine - 6 - sulfate; ΔDi - 4S, Δ^4- glucuronide - acetylgalactosamine - 4 - sulfate; ΔDi - OS, Δ^4- glucuronide acetylgalactosamine; (CPC), urinary glycosaminoglycan was prepared by the CPC method described in the method; (Ethanol), urinary glycosaminoglycan was purified by ethanol precipitation instead of CPC precipitation in 0.25M NaCl.

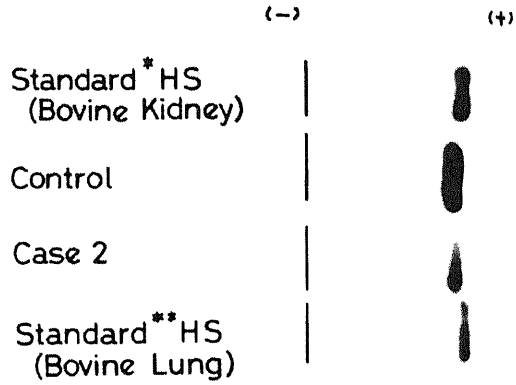

Fig. 4. Electrophoretic pattern of the remaining GAG in enzymatic digestion with chondroitinase ABC. Electrophoresis was carried out on cellulose acetate membrane in 0.05M barium acetate for 3h with a potential gradient of 20 V/cm.
* Standard heparan sulfate was prepared from bovine kidney by Seikagaku Kogyo Ltd.
** Standard heparan sulfate was prepared from bovine lung by National Heart Institute.

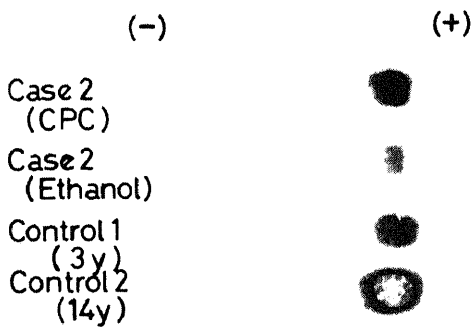

Fig. 3. The degree of sulfation of glycosaminoglycan estimated by electrophoresis carried out on cellulose acetate membrane in 0.1N HCl. (CPC) and (Ethanol) are same to Fig. 2.

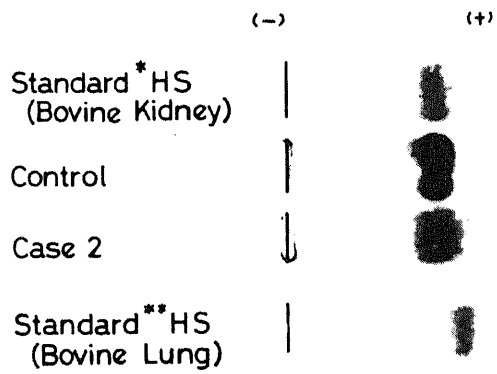

Fig. 5. The degree of sulfation of the remaining GAG in enzymatic digestion with chondroitinase ABC. *, ** Standard heparan sulfates are same to Fig. 4.

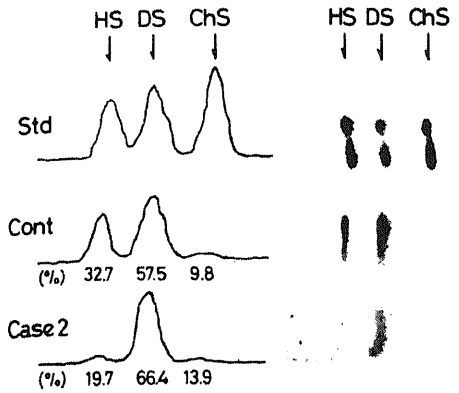

Fig. 6. Electrophoretogram and its densitometric pattern of intracellular glycosaminoglycans. HS, heparan sulfate; DS, dermatan sulfate; ChS, chondroitin sulfate; Std, standard; Cont, control of 14yr.

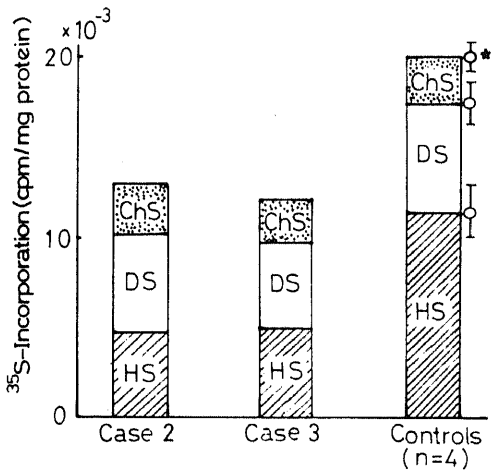

Fig. 7. Distribution of ^{35}S - label glycosaminoglycans after 72h of incorporation of ^{35}S - sulfate. ChS, chondroition sulfate; DS, dermatan sulfate; HS, heparan sulfate. * Mean±S. D.

7. ^{35}S -硫酸の細胞内 GAG への取り込み

図7の如く，ChS 及び DS に関しては Lowe 症候と対照の間に取り込み量の差をみないが，HS への取り込みは症例2及び3で，対照の 53％及び 58％と低下していた．

8. ^{14}C -グルコサミンの細胞内 GAG への取り込み

図8の如く ^{14}C -グルコサミンの取り込みも ChS 及び DS では Lowe 症候と対照の間に差をみないが，HS への取り込みは症例2及び3で，対照の 26％及び 58％と低下していた．

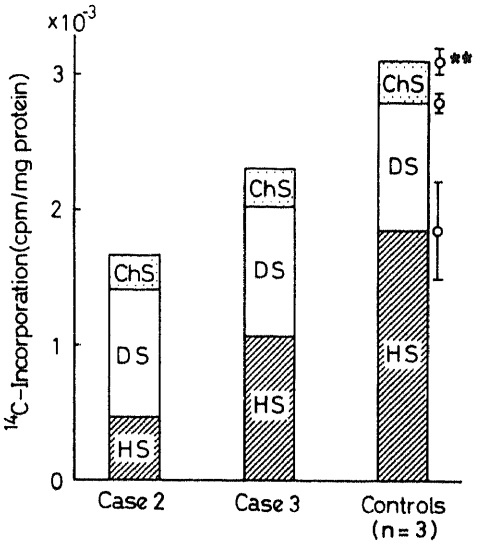

Fig. 8. Distribution of ^{14}C - label glycosaminoglycans after 72h of incorporation of ^{14}C - glucosamine. ChS, chondroitin sulfate; DS, dermatan sulfate; HS, heparan sulfate. ** Mean±S. D.

考　　察

Lowe 症候の原因は現在なお明らかにされておらず，その診断は特有の眼症状，中枢神経症状，腎障害の合併にもとづいて臨床的に下される．Lowe 症候にみられる眼，腎，骨などの異常は，結合織成分，ことにマトリックス成分として重要な GAG などの異常を推定させる．Suschke ら[2]は Lowe 症候患者の尿中 GAG の増量を報告しているが，その定量方法は間接的なものであり，GAG に特異的なものではない．Hayashi ら[3][4]は，成人の Lowe 症候患者で尿中総 GAG 量が正常の 4～5 倍になるとしており，その報告では分子量の大きな低硫酸化 ChS A と HS が，6：4 の比で排泄され，ビタミン D_2 とアルカリ療法により，尿中 HS 量及び低硫酸化 ChS A 量が著明に減少するという．しかしアルカリ療法下における HS の実質的な減少が，グルクロン酸として定量される尿中総 GAG 量の減少をおこさないという事実に対する考察はなされていない．一方，Akasaki ら[5]は Lowe 症候では尿中総 GAG 量は正常範囲内にあるが，本症の尿中 GAG はもっぱら低硫酸化 ChS A からなり，通常の尿中に見出される ChS C，HS などを認めないと報告している．著者の尿中 GAG 異性体の分析では電気泳動法，コンドロイチナーゼ分解後の2糖マッピングでも Lowe 症候と正常児の間に特に差はみられず，ただ電気泳動法で低硫酸化 ChS がやや多いこ

とが示唆された．腎機能障害に際しては低硫酸化ChSの尿中排泄が増加することが知られており，これは血漿中の主なGAGである低硫酸化 ChS Aが漏出するためではないかと考えられている[16]．本研究では糖蛋白，ヒアルロン酸などの夾雑を避けるため0.25 M NaCl中におけるGAG沈殿法を行なっており，低硫酸化ChSが上清中に残るおそれがあるが，エタノール沈澱法により集めた粗GAGの2糖マッピングで特にΔDi-OSの増量を認め得なかったことから，本症のChSの硫酸化の程度は，対照に比し有意に低いものとは考え難かった．

一方，尿中HSについてはLowe症候と対照の間に著しい差を認めた．尿中HSは，通常年齢の進むにつれ相対的排泄量が増加することが知られており[17]，尿中HSの定量については，同年齢の対照をおく必要がある．図1のセルロースアセテート膜電気泳動では，3人のLowe症候患児で同年齢の対照に比して，HSの割合が少ないことがわかる．患者尿中のHS排泄が少ないためデンシトメーターによる正確なHSの分画測定がむずかしく，HSの相対的排泄は尿中GAGのヘキソサミン分析の結果から計算した．尿中GAGの単位重量当たりのヘキソサミン総量は，Lowe症候患児も対照と差がなかったが，グルコサミン量から計算したHSの相対量は，同年齢の対照の26～46％であった．腎機能障害時には低硫酸化ChSの尿中排泄が増加することはよく知られているが，尿中HS排泄がどのように影響をうけるかは充分には知られていない．1例の血液透析患者について行った分析では尿中HS排泄は特に異常はなかったが，血液透析患者での尿中HS排泄の低下が報告されている[18]．対象としたLowe症候患児は軽度の蛋白尿は認めるが，血中尿素，クレアチニン等は正常域にあり，それほど著明な腎機能障害があるとは考えられないが，腎機能障害，ことに尿細管機能障害によるHS排泄の低下の可能性は否定し得ない．尿中HSの排泄の低下が腎機能障害によるものか，あるいはHSの生合成自体の低下を反映するものかを確かめるために，培養皮膚線維芽細胞について一連の検索を行なった．

線維芽細胞内のGAGは，対照でDSが57.5％，ChS A/Cが9.8％，HSが32.7％と殆んどをDSとHSが占めていたが，Lowe症候ではDSが66.4％と殆んどをDSが占め，HSとChS A/Cでそれぞれ19.7％と13.9％とHS割合の低下をみた．Lowe症候及び対照のHSをDSに対する比でみると，Lowe症候0.30に対して対照0.57であり，Lowe症候線維芽細胞内のHSは対照の約1/2であった．

^{35}S-硫酸及び^{14}C-グルコサミンの線維芽細胞内GAGへの取り込みに関しては，実験方法の違いで種々の値が報告されているが，今回の値はSlukeら[19]のWI-38株（胎児由来線維芽細胞）を使用した結果とほぼ一致していた．今回の実験では，細胞自体のAgingの影響を除き状態を一定にするため継代10代前後のConfluentの細胞を使用し，^{35}S-硫酸取り込みの際には，SO_4^{--}を含まない培養液で前培養を行ない，取り込み中も同様の培養液に，PBSに対して透析しSO_4^{--}をきわめて低濃度にしたと考えられる牛胎児血清を加えたものを使用し，培地内硫酸濃度約0.03 mMの条件で行なった．^{35}S-硫酸の線維芽細胞内GAGへの取り込みは，ChS A/CとDSについては，Lowe症候も対照と差がなかったが，HSの取り込みはLowe症候では対照の53％と57％と明らかな減少を認め，^{14}C-グルコサミンでも同様の結果を得た．この値は線維芽細胞内GAGのデンシトメーターによる分画ともよく一致していた．各分画へ取り込まれた^{35}S/^{14}C比もChS A/CでLowe症候8.3～10.4に対して対照8.4，同様にDSで5.1～5.8に対して6.2，HSで4.5～5.9に対して5.9とほぼ同様の値を示し，Lowe症候で特に硫酸化障害があるとは考えられなかった．

Fukuiら[6]は，前述のAkasakiらのLowe症候患児の尿中には，低硫酸化ChS Aのみが排泄されているとみる成績を確かめるべく，Lowe症候の皮膚線維芽細胞についてGAGの硫酸化を検討し，ChSとDSの硫酸化に著しい障害があることを報告しており，この原因は活性硫酸（3′-phosphoadenosine 5′-phosphosulfate，以下PAPSと略）の低下にあり，PAPSの低下はNucleotide pyrophosphataseの活性亢進によるものではないかとしている．また，細胞内HSの割合は極めて低く，かつ対照よりむしろ生合成に亢進のみられる成績を報告している．しかし，患児，対照とも1例についての成績であること，さらにGAGの分析法が本研究とは著しく異なっており，直接の比較は困難である．

ヒトにおいて，尿中総GAGが正常域にあり低硫酸化ChS Cのみが尿中に排泄される疾患として，全身のplatyspondylyをきたすSpondyloepiphyseal dysplasiaが知られており，Mourãoら[20]はPAPS-chondroitin sulfate sulfotransferaseの欠陥を推定しているが，皮膚線維芽細胞のGAGには異常はみられない．この疾患に近い動物モデルとして遺伝性短肢マウスが知られている．短肢マウスでは，骨変化とChSの硫酸化障害が明らかにされ[21]，PAPSの低下はAdenosine phosphosulfate kinase活性の低下によるものとする報告がある[22]．しかし，このような異常は軟骨細胞にのみみられ，皮膚線維芽細胞，脳については正常であるとされ，異常は軟骨組織にのみ限られるようである．Lowe症候のPAPSの低下による低硫酸化は皮膚線維芽細胞

にのみ限局し，軟骨細胞他にはみられないか否かは，今後明らかにされるものと思われる．しかし Lowe 症候に特徴的と報告された低硫酸化 ChS A のみの尿中排泄は，著者の成績からはむしろ否定的であり，再検討が必要と考えられるし，皮膚線維芽細胞における ChS, DS の低硫酸化についても方法論的な疑問も多く，成績の解釈には慎重を要すると思われる．

上述の如く，本研究から Lowe 症候患児の皮膚由来線維芽細胞では，HS の生合成の低下が明らかにされた．HS は細胞の表面（Cell Coat）に多く見出され，細胞機能に重要な働きをもつことが推定されている[23]が，充分には明らかにされていない．Brown[24]らは腎糸球体基底膜では，HS が GAG の 65％を占め，その機能と密接に関係することを想定している．一方，骨には殆んど HS は見出されず，HS の生合成に異常があっても骨変化の起り難いことは，Sanfilippo 症候の例をみても明らかであり，Lowe 症候の骨変化が，腎尿細管機能障害にもとずく 2 次的なクル病性変化であることとも矛盾しない．

このような Lowe 症候の培養皮膚線維芽細胞にみられる HS の生合成の低下は，本症の病態と深く関わる所見と考えられ，尿中 HS の排泄低下はこれを反映するものであろう．

結　　論

結合組織の異常を想定されている Lowe 症候患児より得た尿及び皮膚由来線維芽細胞を材料として，GAG について検索し以下の結果を得た．

1．Lowe 症候の尿中 GAG 排泄量は正常であったが，酢酸バリウムによるセルロースアセテート膜電気泳動上，HS 分画は著明に減少しており，グルコサミン-ヘキソサミン比でみると，正常の 26～46％であった．また DS に相当する分画がやや増加しているようにみえたが，腎障害による低硫酸化 ChS と考えられた．しかし尿中 GAG の硫酸化の程度は対照と差がなかった．

2．線維芽細胞内 GAG の電気泳動では，Lowe 症候の ChS と DS は正常対照と差がなかったが，HS は著明に減少しており，DS に対する HS の割合は対照の約 1/2 に低下していた．

3．線維芽細胞内 GAG への ^{35}S-硫酸及び ^{14}C-グルコサミン取り込みは，ChS, DS では差がないが HS の取り込みは Lowe 症候で ^{35}S-硫酸は対照の 53～58％，^{14}C-グルコサミンは 26～58％と減少していた．また，これらの $^{35}S/^{14}C$ カウント比は，ChS, DS, HS で，Lowe 症候と対照間で差がなかった．

以上より Lowe 症候では HS 生合成の低下が考えられるが，GAG の硫酸化には特に障害はないと考えられた．

謝　　辞

稿を終えるにあたり御指導と御校閲を賜わりました恩師谷口昂教授に心からの謝意を表します．

文　　献

1) **Lowe, C. U., Terry, M. & MacLachlan, E. A.**: Organic-aciduria decreased renal ammonia production, hydroophthalmos, and mental retardation. A clinical study. Am. J. Dis. Child.,**83**, 164-184 (1952).

2) **Suschke, J. & Murken. J. D.**: Uber die Ausscheidung saurer Mucopolysaccharide bei einem Kind mit Lowe-Syndrom. Mschr. Kinderheilk.,**117**, 412-414 (1969).

3) **Hayashi, S., Nagata, T., Kimura, A. & Tsurumi, K.**: Urinary excretion of acid glycosaminoglycans and hydroxyproline in a patient with oculo-cerebro-renal syndrome. Tohoku J. Exp. Med.,**126**, 215-223 (1978).

4) **Hayashi, S., Nagata, T., Kimura, A. & Tsurumi, K.**: Urinary acid glycosaminoglycans in a patient with oculo-cerebro-renal syndrome. Tohoku J. Exp. Med., **126**, 225-234 (1978).

5) **Akasaki, M., Fukui, S., Sakano, T., Tanaka, T., Usui, T. & Yamashina, I.**: Urinary excretion of a large amount of bound sialic acid and of undersulfated chondroitin sulfate A by patients with the Lowe syndrome. Clin. Chim. Acta. **89**, 119-125 (1978).

6) **Fukui, S., Yoshida, H., Tanaka, T., Sakano, T., Usui, T. & Yamashina, I.**: Glycosaminoglycan synthesis by cultured skin fibroblasts from a patient with Lowe's syndrome. J. Biol. Chem., **256**, 10313-10318 (1981).

7) **Di Ferrante, N. M.**: The measurement of urinary mucopolysaccharides. Anal. Biochem., **21**, 98-106 (1967).

8) **Wessler, E.**: Analytical and preparative separation of acidic glycosaminoglycans by electrophoresis in barium acetate. Anal. Biochem., **26**, 439-444 (1968).

9) **Wessler, E.**: Electrophoresis of acidic glycosaminoglycans in hydrochloric acid: A micro method for sulfate determination. Anal. Biochem., **41**, 67-69 (1971).

10) **Taniguchi, N.**: Separation and identification of glycosaminoglycans. Separation and Purification Methods, **5**, 247 - 299 (1976).

11) **Di Ferrante, N.**: Turbidimetric measurement of acidic mucopolysaccharides and hyaluronidase activity. J. Biol. Chem., **220**, 303 - 306 (1956).

12) **Saito, H., Yamagata, T. & Suzuki, S.**: Enzymatic methods for the determination of small quantities of isomeric chondroitin sulfates. J. Biol. Chem., **243**, 1536 - 1542 (1968).

13) **Yamagata, T., Saito, H., Habuchi, O. & Suzuki, S.**: Purification and properties of bacterial chondroitinases and chondrosulfatases. J. Biol. Chem., **243**, 1523 - 1535 (1968).

14) **Taniguchi, N., Okamoto, T. & Okuda, N.**: Subunit structure of isomeric chondroitin sulfates from normal human urine. Biochem. Med., **15**, 169 - 177 (1976).

15) **Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J.**: Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., **193**, 265 - 275 (1951).

16) **Ohkawa, S., Hata, R., Nagai, Y. & Sugiura, M.**: Urinary excretion of acidic glycosaminoglycans in the aged. J. Biochem., **72**, 1495 - 1501 (1972).

17) **Taniguchi, N.**: Age differences in the pattern of urinary glycosaminoglycan excretion in normal individuals. Clin. Chim. Acta, **37**, 225 - 233 (1972).

18) 田中あけみ，山岡小百合，一色玄，揖場和子：腎障害における尿中ムコ多糖の変化．結合組織，**13 (suppl.)**, 58 (1981).

19) **Sluke, G., Schachtschabel, D. O. & Wever, J.**: Age - related changes in the distribution pattern of glycosaminoglycans synthesized by cultured human diploid fibroblasts (WI - 38). Mech. Ageing Dev., **16**, 19 - 27 (1981).

20) **Mourão, P. A. S., Kato, S. & Donnelly, P. V.**: Spondyloepiphyseal dysplasia, chondroitin sulfate type: A possible defect of PAPS - chondroitin sulfate sulfotransferase in humans. Biochem. Biophys. Res. Commun., **98**, 388 - 396 (1981).

21) **Orkin, R. W., Pratt, R. M. & Martin G. R.**: Undersulfated chondroitin sulfate in the cartilage matrix of brachymorphic mice. Dev. Biol., **50**, 82 - 94 (1976).

22) **Sugahara, K. & Schwartz N. B.**: Defect in 3′ - phosphoadenosine 5′- phosphosulfate formation in brachymorphic mice. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), **76**, 6615 - 6618 (1979).

23) **Chiarugi, V. P. & Vannucchi S.**: Surface heparan sulphate as a control element in eukariotic cells: A working model. J. theor. Biol., **61**, 459 - 475 (1976).

24) **Brown, D. M., Michael, A. F. & Oegema T. R.**: Glycosaminoglycan synthesis by glomeruli in vivo and in vitro. Biochim. Biophy. Acta, **674**, 96 - 104 (1981).

Aberrations in the Metabolism of Heparan Sulfate in Lowe's Syndrome Tohru Yokoi, Department of Pediatrics, (Director: Prof. N. Taniguchi), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920 – J. Juzen Med. Soc., **91**, 32–41 (1982)

Key words: Lowe's syndrome, Glycosaminoglycans, Heparan Sulfate, Chondroitin sulfate isomers, Fibroblast.

Abstract

This study was undertaken to examine urinary excretion of glycosaminoglycans (GAG) and biosynthesis of intracellular GAG in three patients with Lowe's syndrome. Urinary GAG were isolated by the cetylpyridinium chloride precipitation method. The excretion patterns of individual species of urinary GAG in three patients with Lowe's syndrome were compared with those of the age-matched control children by means of the electrophoretic method on cellulose acetate membrane, quantitation of hexosamine contents, and of enzymatic subunit assay with chondroitinases. Total daily amounts of urinary GAG in these patients remained within normal ranges, but the urinary excretion ratios of heparan sulfate were significantly reduced and amount to 26-46% of the age-matched control means, as calculated on the basis of relative contents of glucosamine in urinary GAG. Although electrophoretogram suggested some excess of low sulfated chondroitin sulfate corresponding in mobility with dermatan sulfate in urine from Lowe's patient, the enzymatic subunit assay with chondroitinases could not disclose any significant differences in the excretion pattern and in the degree of sulfation of chondroitin sulfate isomers between Lowe's syndrome and the control children.

Biosynthesis of intracellular GAG was evaluated by means of the incorporation of isotopic labeled compounds; ^{35}S-sulfate and ^{14}C-glucosamine, into the confluent skin fibroblasts around the 10th generation of culture. The incorporation of ^{35}S-sulfate as well as ^{14}C-glucosamine into intracellular heparan sulfate fraction in Lowe's fibroblasts was about half that of control fibroblasts, while the incorporation of these labeled materials into intracellular dermatan sulfate and chondroitin sulfate isomers showed no significant differences between Lowe's and control fibroblasts. In addition, a direct analysis of intracellular GAG on cellulose acetate electrophoretogram disclosed that the relative amounts of heparan sulfate among intracellular sulfated GAG in Lowe's fibroblasts were markedly low as compared with these in control fibroblasts.