# 末梢血リンパ球による遺伝性リソゾーム蓄積症の診断-1-正常人のリンパ球,顆粒球のリソゾーム水解酵素活性


| メタデータ | 言語: jpn<br>出版者:<br>公開日: 2017-10-04<br>キーワード (Ja):<br>キーワード (En):<br>作成者:<br>メールアドレス:<br>所属: |
| --- | --- |
| URL | http://hdl.handle.net/2297/8759 |

金沢大学十全医学会雑誌　第88巻　第1号　68－75　(1979)

# 末梢血リンパ球による遺伝性リソゾーム蓄積症の診断

## 〔I〕正常人のリンパ球，顆粒球のリソゾーム水解酵素活性

金沢大学医学部小児科学教室（主任：谷口　昂教授）
加　藤　英　治

(昭和54年1月10日受付)

遺伝性リソゾーム蓄積症[1]（Inherited lysosomal storage disease）はリソゾーム酵素の欠損のために，種々の組織に中間代謝産物の蓄積を来たす先天性代謝異常症であり，現在迄にリソゾーム酸性水解酵素の特異的な欠損は20以上の疾患で証明されている[2]．リソゾーム酵素は赤血球のようにリソゾームを含有しない細胞を除いて，全ての細胞に見い出されるので，遺伝性リソゾーム蓄積症の酵素学的診断の材料として，脳，肝，筋肉，白血球，培養皮膚線維芽細胞等が用いられ，更に疾患によっては血清や尿も使われている．特に培養線維芽細胞での酵素欠損の証明が最も信頼性のある診断方法とされているが，線維芽細胞の培養は限られた施設でしか行えず，しかも検体の採取，継代培養等手技上煩雑であるので，一般的な検査方法とは言い難い．

末梢血白血球（以下白血球と略す）はリソゾームに富み，又容易に採取できるので，Tay-Sachs病[3][4]，異染性白質ジストロフィー[5][6]，Gaucher病[7]~[9]，Niemann-Pick病[9]，Krabbe病[10]，$GM_1$-gangliosidosis[11]，Fabry病[12]，Pompe病[13]では患者の診断やヘテロ保因者の検出に使用されている．

しかし，白血球自体は，形態，寿命，及び機能の点で異なるheterogeneousな細胞の集団であるので，ほぼ同一な細胞から成ると考えられる培養線維芽細胞と同等に見做すことはできない．又リンパ球や顆粒球，単球等の細胞群によって，リソゾーム酵素活性に差があることが予想される．白血球の酵素活性はこれらの細胞群の活性の総和として表現されるので，白血球分離法により回収される細胞群の構成比率が異なれば，測定される酵素活性にも変動が生じると考えられる．

末梢血白血球を顆粒球やリンパ球等に分離し，各細胞群のリソゾーム酵素の活性を測定している文献[7][8][11]は2，3散見されるだけで，殆んどの文献は白血球全体の酵素活性を測定している．報告されている測定結果の齟齬はこの事柄に起因するのかも知れない．

この論文で，著者は，より均一な細胞群と考えられるリンパ球と顆粒球に白血球を分離し，各細胞群に於けるリソゾーム酸性酵素の活性を健康な成人で検討した．

### 研究対象及び方法

1．対象

20歳台の健康な男女で，各リソゾーム酵素活性は6名づつ測定した．

2．細胞の分離

Snyderら[14]の方法により，ヘパリン加静脈血5容に，5％のデキストランを含む生食水1容を混和し，室温で30分間静置後，白血球に富む上清を得た．この上清を，Böyum[15]の方法に従って，Ficoll-Isopaque上に重層し，400×g，4℃で，30分間遠心し，interfaceに単核細胞層を，pelletに赤血球の混入のある顆粒球層を分離した．単核細胞層は主にリンパ球であるが，10～20％単球を含み，顆粒球の混入率は2.5％以下であった．この単核細胞層を今後リンパ球分画と呼ぶ．pelletに混入した赤血球を溶血させるために，2 mlの蒸留水で再浮遊し，20秒後1.8％

---

The use of peripheral blood lymphocytes as an aid in the diagnosis of several inherited lysosomal storage diseases. 〔I〕The activity of lysosomal hydrolases in lymphocytes and granulocytes from healthy individuals. **Eiji Kato**, Department of Pediatrics (Director : Prof. N. Taniguchi), School of Medicine, Kanazawa University.

の塩化ナトリウム液を2 ml加えて，等張に戻した．pelletから回収された細胞は顆粒球だけで，単核細胞の混入はなかった．この細胞層を，以下顆粒球分画と称する．

リンパ球分画と顆粒球分画の細胞は3回生食水で洗浄し，生食水で再浮遊後，各酵素活性の測定に適当な細胞数に調整した．

3．リソゾーム水解酵素活性の測定法

酵素活性の測定には，fluorigenic 基質である4-methylumbelliferyl (4-MU と略す)化合物を用いた．各酵素に対する基質は以下の通りである．

1）α-glucosidase---4-MU-α-D-glucopyranoside (Koch-Light Lab.)
2）α-galactosidase---4-MU-α-D-galactopyranoside (Koch-Light Lab.)
3）β-galactosidase---4-MU-β-D-galactoside (Nakarai Chemicals).
4）β-glucuronidase---4-MU-β-D-glucuronide (Koch-Light Lab.)
5）α-mannosidase---4-MU-α-D-mannopyranoside (Koch-Light Lab.)
6）N-acetyl-β-glucosaminidase---4-MU-N-acetyl-β-D-glucosaminide (Nakarai Chemicals)

各酵素活性の測定はHindmanら[16]の方法を少し修正して実施した．最終濃度が1.0g/Lになるように，Triton X-100を加えた細胞浮遊液50μlに，Vortex mixerで強く振盪後，1.0mmol/1の4-MU基質を含むMcIlvaine緩衝液100μlを加え，37℃で，1時間，Shaking water bathの中で反応させた．Blankとして，細胞浮遊液と4-MU基質を含むMcIlvaine緩衝液を混合後，即座にpH10.4の0.25M glycine-NaOH緩衝液を3.0 ml加えて，37℃のshaking water bath内に1時間置いた．

1時間incubate後に，pH10.4の0.25M glycine-NaOH緩衝液を加えて，反応を停止させた．

遊離した4-methylumbelliferoneを，日立分光蛍光光度計を用い，励起波長360nm，蛍光波長450nmで測定した．

各酵素のpH activity curueを調べるために，pH3.0，3.5，4.0，4.3，4.5，5.0，5.5，6.0，6.5，7.0，及び8.0のMcIlvaine緩衝液を用いた．

酵素活性はnmoles 4-MU cleaved/$10^7$cells/hと表現した．

## 結　　果

1．α-glucosidase（図1）

リンパ球分画の活性のpH activity curveはpH4.5と6.5にpeakをもつ2峰性であり，それぞれacidとneutral α-glucosidaseの活性を示すと考えられる．一方，顆粒球分画の酵素活性はpH6.5にpeakの1峰性の曲線で，acidとneutralの活性を分けれなかった．pH4.5及び6.5での活性は有意に顆粒球分画が高かった（$p < 0.01$）．

2．α-galactosidase（図2）

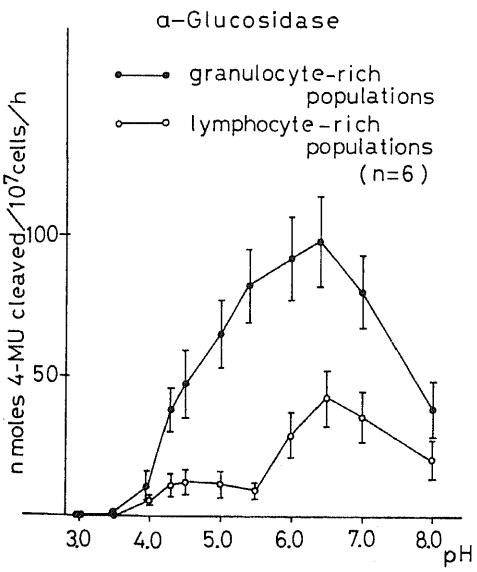


図　1

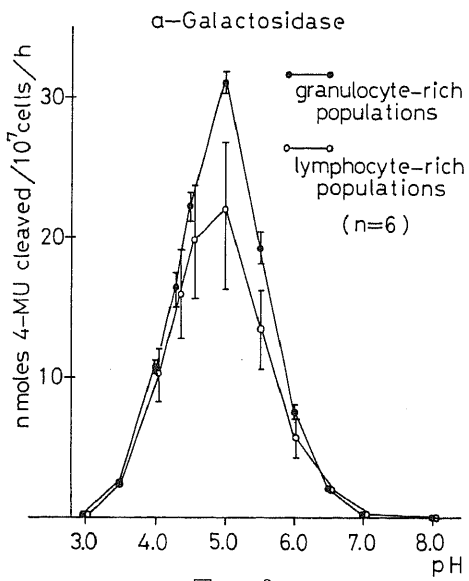


図　2

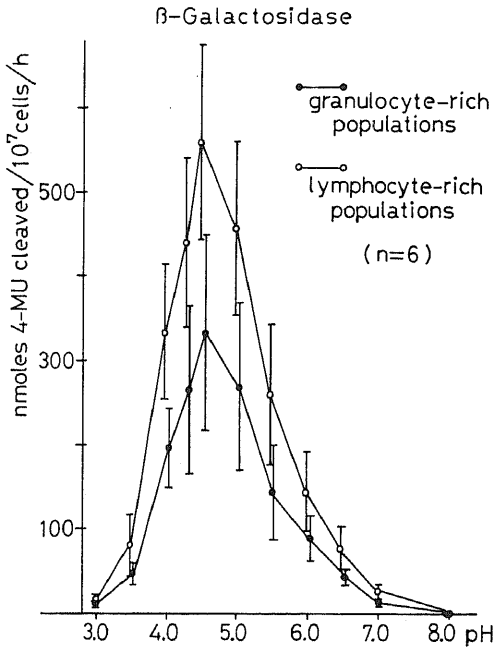


図 3

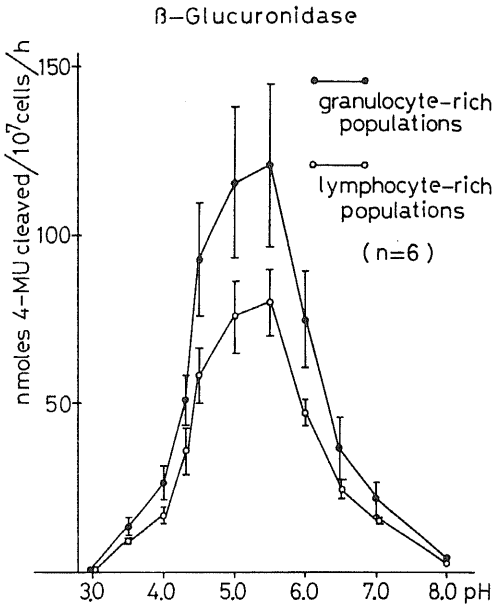


図 4

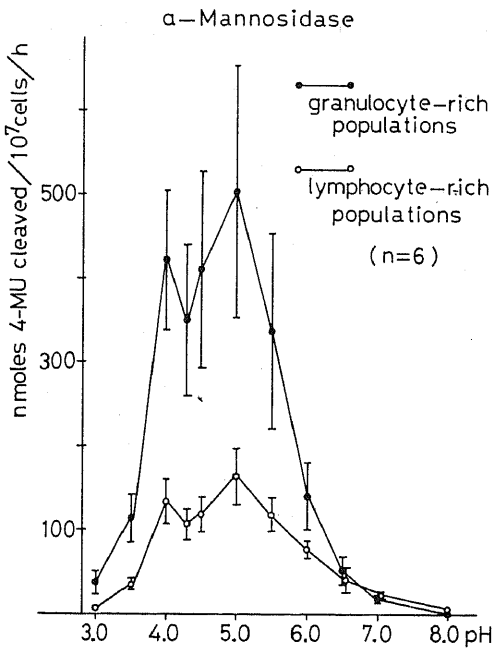


図 5

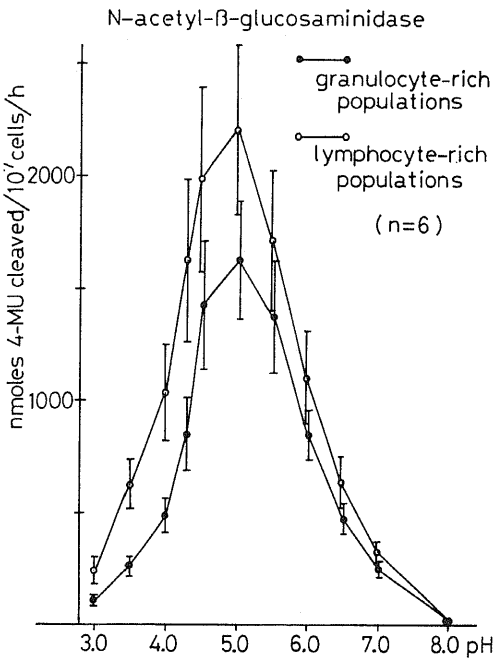


図 6

両細胞分画の活性とも，至適 pH は 5.0 であった．至適 pH での活性は顆粒球分画が 30.9 ± 0.5，リンパ球分画が 22.1 ± 4.8 で，有意差を認めた．

3．$\beta$-galactosidase ）図 3 ）

リンパ球分画及び顆粒球分画の pH profile は類似しており，至適 pH は 4.5 で，活性値はリンパ球分画が

560.3 ± 120.2 で，顆粒球分画の 351.5 ± 100.1 より有意に高かった（$p < 0.01$）.

4．β-glucuronidase（図 4）

至適 pH は 5.5 で，両細胞分画とも同じであった．活性は，顆粒球分画 120.9 ± 24.3，リンパ球分画 79.7 ± 10.0 で，有意差（$p < 0.01$）を認めた．

5．α-mannosidase（図 5）

両細胞分画の pH activity curve は pH4.0 と pH5.0 に 2 つの peak をもった．顆粒球分画とリンパ球分画の酵素活性は，pH4.0 で，421.8 ± 86.0 と 133.0 ± 27.1，pH5.0 で 501.8 ± 149.7 と 163.1 ± 34.2 であり，両方の pH で，有意に顆粒球分画の活性が高かった（$p < 0.01$）．2 つの peak は acid と neutral α-mannosidase の活性を表わすものと考えられる．

6．N-acetyl-β-glucosaminidase（図 6）

至適 pH は 5.0 で，顆粒球分画の活性値は 1625 ± 257，リンパ球分画の活性は 2209 ± 384 で，有意差（$p < 0.01$）を認めた．

## 考　　察

遺伝性リソゾーム蓄積症は比較的稀な疾患であるが，ヘテロ保因者の検出や出生前診断が可能であり，将来治療法の開発が予期されているので，先天性代謝異常症の中でも，近年注目を溶びており，これらの疾患のより簡便な診断法や信頼性の高いヘテロ保因者のスクリーニング法の確立は重要である．

chromogenic 或いは fluorigenic な合成基質によるリソゾーム酵素活性の測定は天然基質を用いる方法より，比較的簡便であり，しかも少ない検体量で実施できるので，現在広く診断に利用されている．

培養皮膚線維芽細胞は，現在最も信頼性のある酵素学的診断材料として用いられているが，ヘテロ保因者の診断の場合には，検体の採取の点で被検者に負担を課けるので問題がある．又培養条件によってリソゾーム酵素活性が変化すると報告されており[17]，false positive 或いは false negative の原因となることも考えられる．

最も容易に採取できる酵素源は末梢白血球であり，幾つかのリソゾーム蓄積症の診断やヘテロ保因者の検出に用いられている．しかし，白血球のリソゾーム酵素活性の測定結果の分析において，白血球の heterogeneity に起因すると考えられる解釈上の困難がみられることもある．著者は白血球をより均一な細胞群と考えられるリンパ球分画と顆粒球分画に分離し，6 種のリソゾーム酵素活性を調べた．

α-glucosidase は，至適 pH が 4.0 付近の acid α-glucosidase と，至適 pH が 6.0 付近の neutral α-glucosidase が存在し，Pompe 病（糖原病 II 型）では acid α-glucosidase が欠損し，neutral α-glucosidase の活性は冒されない[18]．著者の結果では，リンパ球分画の活性は acid と neutral に分離しえたが，顆粒球分画では酸性域でも neutral の活性の overlap のために acid と neutral の活性を分離して評価することはできなかった．Huijing ら[19]の報告以来，白血球の α-glucosidase の活性は Pompe 病の患者やヘテロ保因者の診断に使用されているが，本症の患者の白血球の酵素活性が欠損せず，むしろ殆んど正常であったという報告もみられる[20]．著者の結果が示すように，顆粒球が多く回収される白血球分離法の場合，たとえ pH5.0 以下の酸性域で酵素活性の測定が行われても，顆粒球の neutral α-glucosidase の残存活性のために，見かけ上酵素活性の欠損を認めない結果を招くことが予想される．従って，Pompe 病の患者，ヘテロ保因者の診断には，acid と neutral の活性を分離して評価できるリンパ球分画の使用が妥当と考えられる．

α-galactosidase の pH profile は顆粒球分画，リンパ球分画で相似した曲線であり，同様な酵素活性を示すものと考えられる．Fabry 病は α-galactosidase A の欠損症であり，Kint[12] の報告以来，白血球の酵素活性が診断，保因者の検出に利用されている．Beutler ら[8]はリンパ球，顆粒球，単球及び血小板の α-galactosidase の活性を調べ，Fabry 病の患者では全部の細胞で欠損していたと報告しており，リンパ球分画及び顆粒球分画の酵素活性の測定は，Fabry 病の患者及びヘテロ保因者の診断に役立つものと考えられる．

β-galactosidase の欠損症には，galactocerebroside β-galactosidase 欠損の Krabbe 病と，$GM_1$-ganglioside β-galactosidase 欠損の $GM_1$-gangliosidosis type 1 がある．Krabbe 病の酵素欠損は 4-MU 合成基質を用いて証明できない[10]が，一方 $GM_1$-gangliosidosis type 1 の患者及びヘテロ保因者の診断には，4-MU 合成基質による白血球酵素活性の測定は有効である[11]．著者の成績では，リンパ球分画と顆粒球分画の活性の至適 pH は同じであったが，活性値に有意差がみられた．しかし，両細胞分画とも，$GM_1$-gangliosidosis type 1 の診断に応用できると思われる．

β-glucuronidase のリンパ球分画及び顆粒球分画の pH activity curve は pH5.5 を peak とする 1 峰性の曲線であった．β-glucuronidase 欠損症は

Mucopolysaccharidosis type Ⅶと呼ばれ，皮膚線維芽細胞，白血球の酵素欠損を示す[21]ので，本症の診断に，リンパ球分画及び顆粒球分画での酵素活性の測定が役立つかも知れない．

α-mannosidase 活性には，α-glucosidase と同様に，acidic form と neutral form があり，Mannosidosis は acid α-mannosidase の欠損を呈する[22]．Masson ら[23]はヘテロ保因者の診断に，血清の acid α-mannosidase の活性は neutral の影響を受けるので有効でなく，一方白血球の α-mannosidase は殆んど至適 pH4.2 ～ 4.6 の acidic form で，neutral の活性は trace であるので，白血球の acid α-mannosidase の活性測定の方が信頼できると報告した．著者の結果では，リンパ球分画，顆粒球分画ともに，pH4.0 と 5.0 の 2 つの peak に活性が分離された．それぞれの peak での活性は，acid と neutral α-mannosidase の活性を表現すると考えられ，Masson ら[23]の白血球の活性の pH profile と異なる．しかし pH4.5 以下の酸性域の酵素活性の測定は mannosidosis の診断に役立つものと考えられる．

Hexosaminidase にはリソゾーム酵素として，熱に不安定な hexosaminidase A（hex A と略す）と，そうでない hexosaminidase B(hex B)の 2 種の isoenzyme が存在し，Tay-Sachs 病では hex A の欠損があり，Sandhoff 病では hex A と B の欠損を示し，両疾患の患者の白血球もそれぞれの酵素欠損を伴なう．Suzuki ら[3]は，hexosaminidase の活性を 4-MU 合成基質を用いて検討し，血清や白血球等では，N-acetyl-β-glucosaminidase が N-acetyl-β-galactosaminidase よりはるかに高い活性を示すので，hexosaminidase の活性は N-acetyl-β-glucosaminidase の活性を用いて表現する方が適切であると報告しているので，著者も N-acetyl-β-glucosaminidase の活性をリンパ球分画及び顆粒球分画で調べた．Tay-Sachs 病は $GM_2$-gangliosidosis の中で最も頻度が高く，ヘテロ保因者の診断に血清の hex A のレベルが使用されている[3]．しかし，糖尿病の患者や経口避妊薬服用中の婦人で，false-positive がみられる[24]．一方，白血球の酵素活性はこれらの影響を受けないので，ヘテロ保因者のスクリーニング法として，より信頼性があると考えられている．

α-glucosidase の活性の測定はリンパ球分画の使用が，neutral の活性を除いて acid α-glucosidase の活性を評価できるので，Pompe 病の診断に有用であろう．

その他の測定した 5 種のリソゾーム水解酵素活性の pH profile はリンパ球分画と顆粒球分画で類似した曲線であったので，同一の性質をもつ活性であることが示唆された．しかし，至適 pH での酵素活性値は，測定した全部の酵素で，リンパ球分画と顆粒球分画で有意差を示した．このことから，末梢血白血球のリソゾーム酵素活性は，測定される白血球の細胞の構成比の変化により，測定値が異なり，分散の大きな分布を示すことが予想される．分散の大きな正常値であれば，false-positive 或いは false-negative を伴うことが考えられ，ヘテロ保因者のスクリーニングに支障を来たすかも知れない．

白血球をより均一な細胞群と考えられるリンパ球と顆粒球に分離し，各細胞分画のリソゾーム酵素活性を測定すれば，以上のような困難さが解決されるかも知れない．今後，リンパ球及び顆粒球分画の活性が遺伝性リソゾーム蓄積症の患者及びヘテロ保因者の診断に応用され，有効性について検討されることが望まれる．

## 結 論

健康成人の末梢血白血球をリンパ球分画と顆粒球分画に分離し，各細胞分画に於けるリソゾーム水解酵素活性の pH activity を検討し，以下のような成績を得た．

1．α-glucosidase の活性は，リンパ球分画に於いて至適 pH が 4.5 付近と 6.5 の acid と neutral に分離されたが，顆粒球分画では neutral の活性が高く，pH4.5 付近でも neutral の活性の overlap のために，acid α-glucosidase の活性を評価することはできなかった．

2．α-galactosidse, β-galactosidase, β-glucuronidase, 及び N-acetyl-β-glucosaminidase の活性は，リンパ球分画，顆粒球分画ともに類似した曲線を示し，各酵素の至適 pH はそれぞれ，5.0, 4.5, 5.5, 5.0 であった．至適 pH での活性値は，α-galactosidase と β-glucuronidase では顆粒球分画の方が，一方 β-galactosidase と N-acetyl-β-glucosaminidase では，リンパ球分画の方が有意に高かった．

3．α-mannosidase では，両細胞分画で，pH4.0 及び pH5.0 に peak をもつ 2 峰性の活性曲線で，それぞれ acid と neutral の活性を示すと考えられた．活性値は pH4.0 及び 5.0 で，顆粒球分画の方が有意に高かった．

4．末梢血白血球を，より均一な細胞群であるリンパ球分画及び顆粒球分画に分離し，それぞれの細胞分画のリソゾーム水解酵素活性の測定が，未分画白血球の使用よりも，遺伝性リソゾーム蓄積症の患者及びヘ

テロ保因者の診断に有用であることが示唆された．

## 文　　献


1) **Hers, H. G.** : The concept of inborn lysosomal disease, p147－171. *In* H. Hers & F. Van Hoof (ed.), Lysosomes and Storage Disease, Academic Press, New York, 1973.

2) **Kolodny, E. H.** : Current concepts in genetics. Lysosomal storage diseases. New Engl. J. Med., **294**, 1217－1220 (1976).

3) **Suzuki, Y., Berman, P. H., & Suzuki, K.** : Detection of Tay-Sachs disease heterozygotes by assay of hexosaminidase A in serum and leukocytes. J. Pediat., **78**, 643－647 (1971).

4) **Padeh, B., & Navon, R.** : Diagnosis of Tay-Sachs disease by hexosaminidase activity in leukocytes and amniotic fluid cells. Israel J. Med. Sci., **7**, 259－263 (1971).

5) **Percy, A. K., & Brady, R. O.** : Metachromatic leukodystrophy : Diagnosis with sample of venous blood. Science, **161**, 594 (1968).

6) **Taniguchi, N., & Nanba, I.** : Enzymatic abnormality of the carrier state in metachromatic leukodystrophy. Clin. Chim. Acta, **29**, 375－379 (1970).

7) **Beutler, E., & Kuhl, W.** : The diagnosis of the adult type of Gaucher's disease and its carrier state by demonstration of deficiency of $\beta$-glucosidase activity in peripheral blood leukocytes. J. Lab. Clin. Med., **76**, 747－755 (1970).

8) **Beutler, E., Kuhl, W., Matsumoto, F., & Pangalis, G.** : Acid hydrolases in leukocytes and plaselets of normal subjects and in patients with Gaucher's and Fabry's disease. J. Exp. Med., **143**, 975－980 (1976).

9) **Kampine, J. P., Brady, R. O., & Kanfer, J. N.** : Diagnosis of Gaucher's disease and Niemann-Pick disease with small sample of venous blood. Science, **155**, 86－88 (1966).

10) **Sutuki, Y, & Suzuki, K.** : Krabbe's globoid cell leukodystrophy : Deficiency of galactocerebrosidase in serum, leukocytes and fibroblasts. Science, **171**, 73－75 (1971).

11) **Singer, H. S., Nankervis, G. A., & Schafer, I. A.** : Leukocyte beta-galactosidase activity in the diagnosis of generalized $GM_1$ gangliosidosis. Pediatrics, **49**, 352－361 (1972).

12) **Kint, J. A.** : Fabry's disease : Alpha-galactosidase deficiency. Science, **167**, 1268－1269 (1970).

13) **Williams, H. E.** : $\alpha$-glucosidase activity in human leukocytes. Biochem. Biophys. Acta, **124**, 34－38 (1966).

14) **Snyder, R. A., & Braby, R. O.** : The use of white cells as a source of diagnostic material for lipid storage diseases. Clin. Chim. Acta, **25**, 331－338 (1969).

15) **Böyum, A.** : Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Scand. J. Lab. Invest., **21**(suppl. 97), 77－89 (1968).

16) **Hindman, J., & Cotlier, E.** : Glycosidase in normal human leukocytes and abnormalities in $GM_1$-gangliosidosis. Clin. Chem., **18**, 971－975 (1972).

17) **Milunsky, A., Spielvogel, C., & Kanfer, J. N.** : Lysosomal enzyme variations in cultured normal skin fibroblasts. Life Sci., **11**, 1101－1107 (1972).

18) **Salafsky, I. S., & Nadler, H. L.** : Alpha-1, 4 glucosidase activity in Pompe's disease J. Pediat., **79**, 794－798 (1971).

19) **Huijing, F., van Creveld, S., & Losekoot, G.** : Diagnosis of generalized glycogen storage disease (Pompe's disease) J. Pediat., **63**, 984－987 (1963).

20) **Steinitz, K., & Rutenberg, A.** : Tissue $\alpha$-glucosidase activity and glycogen content in patients with generalized glycogenosis. Israel J. Med. Sci., **3**, 411－421 (1967).

21) **Glaser, J. H., & Sly, W. S.** : $\beta$-glucuronidase deficiency mucopolysaccharidosis ; method for enzymatic diagnosis. J. Lab. Clin. Med., **82**, 969－977 (1973).

22) **Carroll, M., Dance, N., Masson, P. K., Robinson, D., & Winchester, B. G.** : Human mannosidosis－The enzyme defect. Biochem. Biophys. Res. Commun., **49**, 579－583 (1972).

23) **Masson, P. K., & Lundblad, A.** : Mannosidosis : Detection of the disease and heterozygotes using serum and leukocytes. Biochem. Biophys. Res. Commun., **56**, 296－303 (1974).

24) **O'Brien, J. S.** : The gangliosidoses, p839 – 865. *In* J. B. Stanbury, J. B. Wyngaarden, & D. S. Fredrickson (ed.), The metabolic basis of inherited disease, 4th ed. McGraw-Hill Book Co., New York, 1978.

**The use of peripheral blood lymphocytes as an aid in the diagnosis of several inherited lysosomal storage diseases. [I] The activity of lysosomal hydrolases in lymphocytes and granulocytes from healthy individuals.** Eiji Kato, Department of Pediatrics, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920, Japan. J. Juzen Igk. Z., 88, 68–75 (1979).

Abstract

In this study, a measurement of the activity of lysosomal hydrolases in peripheral lymphocytes was applied to the diagnosis of Pompe's disease and I-cell disease.

1. The pH activity curve of the α-glucosidase indicated that differential estimation between acid and neutral α-glucosidase was difficult to perform with granulocyte-rich populations, but easily accessible with lymphocyte-rich populations. The use of lymphocyte-rich populations for the enzymatic diagnosis of Pompe's disease seemed to be more reliable than the use of the whole leukocytes; this was also the case with a Pompe's patient. The lymphocyte-rich populations from the parents had normal or low normal activity of acid α-glucosidase in the freshly isolated state, but when cultured with PHA for 72 h, the stimulated lymphocytes of both parents showed about 30% of the enzyme activity of the cultured controls. It was deemed possible in all probability to identify the carrier state by an assay of the enzyme activity in PHA-stimulated lymphocytes.

2. Several lysosomal acid hydrolases were investigated in peripheral blood leukocytes from a patient with I-cell disease and his parents. The activities of lysosomal hydrolases in granulocyte-rich populations showed no significant differences among the patient, the parents, and the normal controls, while lymphocyte-rich populations from the patient with I-cell disease exhibited the reduced activities of α- and β-galactosidases, β-glucuronidase, and N-acetyl-β-glucosaminidase. After PHA-stimulated culture, lymphocytes from the patient showed a more difinite reduction in the activities of these enzymes; the activities of β-glucuronidase, α-mannosidase, and N-acetyl-β-glucosaminidase were reduced to about 20–30% of the activity in the PHA-stimulated controls, and the activities of α- and β-galactosidases to 10% or less. Lymphocytes from the parents showed no significant difference in the activities of these enzymes from the controls, whether stimulated or not.

These results indicate that the assay of the lysosomal acid hydrolases in lymphocytes, especially in PHA-stimulated lymphocytes, provides a useful aid in the enzymatic confirmation of I-cell disease.