

末梢血リンパ球による遺伝性リソゾーム蓄積症の診断-2-末梢血リンパ球によるPompe病及びI-cell病の酵素診断

| | |
|-------|---|
| 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/2297/8760 |

末梢血リンパ球による遺伝性リソゾーム蓄積症の診断

〔Ⅱ〕末梢血リンパ球による Pompe 病及び I-cell 病の酵素診断

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)

著者は〔Ⅰ〕編に於いて、末梢血白血球をより均一な細胞群であるリンパ球分画と顆粒球分画に分離し、リソゾーム水解酵素の活性を検討し、両細胞分画での酵素活性に量的な差や質的な差が認められることを明らかにした。遺伝性リソゾーム蓄積症の欠損酵素は酸性域に主な活性を示す酸性水解酵素であり、又 α -glucosidase の活性のように、顆粒球分画では acid α -glucosidase の活性を評価することが困難である場合もあり、末梢血リンパ球の使用がリソゾーム蓄積症の酵素学的診断により有用な場合も多いと考えられた。

従来、末梢血白血球を用いては正確な診断が困難と考えられてきた典型的なリソゾーム蓄積症である Pompe 病 (糖原病Ⅱ型) と、培養線維芽細胞で多くのリソゾーム酵素の活性の低下を示す奇妙な疾患である I-cell 病 (Mucopolipidosis Ⅱ型) の末梢血リンパ球についてリソゾーム酵素を検討する機会を得たので、それらの結果について報告する。

Ⅰ. Pompe 病 (糖原病Ⅱ型) の診断及び保因者検出への応用

研究対象及び方法

1. 対象

血族関係のない両親より出生した生後 3 ヶ月の第 2 子の女兒で、筋肉生検標本にて α -glucosidase の活性の欠損及びグリコーゲン含有量の増加を認め、本症と診断された。猶お第 1 子 (男児) は生後 10 ヶ月の時、心不全で死亡し、剖検にて本症と確認されている。及び、obligate heterozygote と考えられる患児の両親。

2. 細胞の分離

既に〔Ⅰ〕編において記載した方法に従った。

3. リンパ球の培養

glutamine (0.3mg/ml), 10% 胎児牛血清, streptomycin (100 μ g/ml), 及び Penicillin (100 単位/ml) を含む RPMI 1640 培地 1.0 ml 中に、2 の細胞分離より得られたリンパ球分画の細胞を 1×10^6 個入れ、PHA-P15 μ g/ml を添加、或いは添加せずに、37°C, 5% CO₂ in Air の条件下に、72 時間培養した。

培養後、リンパ球を 3 回生食水で洗浄し、生食水で再浮遊後、細胞数を調整し、酵素活性測定に使用した。

4. α -glucosidase 活性の測定

〔Ⅰ〕編と同様な方法で実施した。但し、acid α -glucosidase の活性の測定は pH4.25 で行った。

結 果

図 1 に示したように、患児の顆粒球分画の活性は、酸性域でも中性域でも正常対照の活性と同等以上であり、対照と同様に、acid と neutral の酵素活性を分離評価することはできなかった。一方、リンパ球分画では、患児の酵素活性は、pH4.0 ~ 5.5 で欠損しており、pH6.0 ~ 7.5 では対照より低下しているが、測定可能な活性を示した。即ち、リンパ球分画では、neutral α -glucosidase の残存活性の影響なしに acid α -glucosidase の活性の測定が可能であった。

正常対照の PHA 刺激培養後のリンパ球の α -glucosidase の活性は、培養前の活性よりやや減少したが、殆んど同様な pH activity profile を示した (図 2)。

The use of peripheral blood lymphocytes as an aid in the diagnosis of several inherited lysosomal storage diseases. [II] The enzymatic diagnosis of Pompe's disease and I-cell disease with the use of peripheral blood lymphocytes. Eiji Kato, Department of Pediatrics (Director : Prof. N. Taniguchi), School of Medicine, Kanazawa University.

α -Glucosidase pH Activity

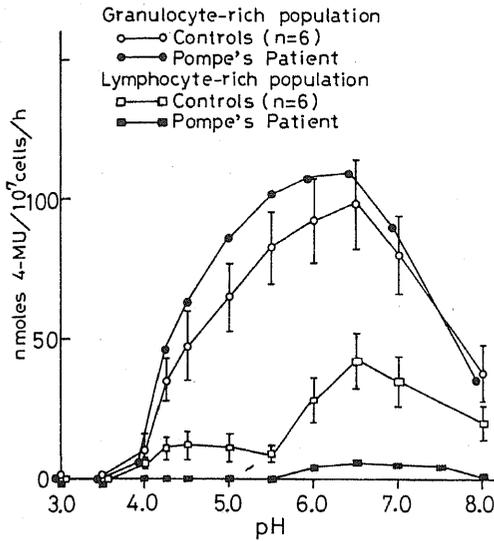


図 1

α -Glucosidase Activity in Lymphocytes

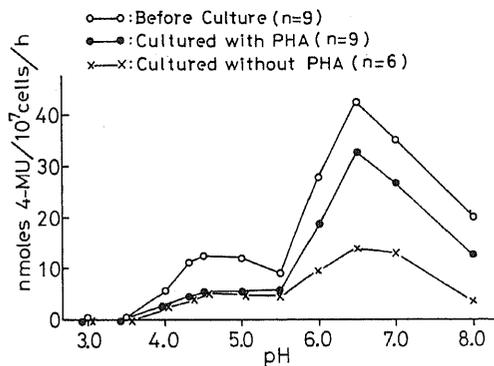


図 2

しかし、PHA 非添加培養のリンパ球の活性は低下した。

pH4.25 での acid α -glucosidase の活性を培養前と PHA 刺激培養後のリンパ球分画と比較した(図 3)。正常対照の活性の平均値は、培養後やや低下したが、分散は小さくなった。患児の活性は、培養前及び培養後も欠損していた。両親の活性は、培養前父親は正常下限、母親は正常域であったが、培養後の両親の活性は正常対照の約 30% に低下した。

考 察

Pompe 病(糖原病 II 型)は心拡大及び筋緊張低下を

Acid α -Glucosidase(pH4.25) in Lymphocytes Before and After PHA-Stimulated Culture

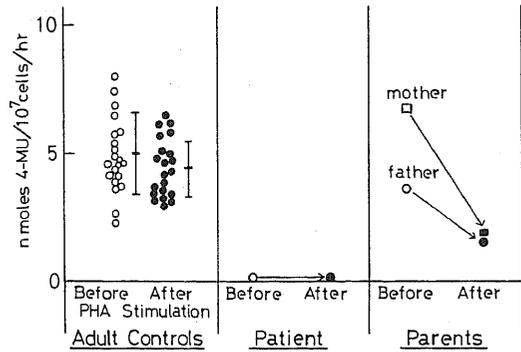


図 3

主徴とする全身性のグリコーゲン蓄積症で、心不全のために 1 歳前後で死亡する常染色体劣性遺伝性の疾患である¹⁾。本症の酵素学的診断に、Huijing ら²⁾の報告以来、末梢血白血球が用いられている。報告されている末梢血白血球の酵素活性は、多くの症例で欠損しているが、しかし、臨床経過並びに筋肉や肝の α -glucosidase の活性の欠損により確認された本症の患者であるのにも拘らず、白血球の酵素活性が僅かに低下、或いは殆んど正常であったという報告も散見される³⁾⁻⁶⁾。

著者の検討では、Pompe 病の患者のリンパ球分画の α -glucosidase の活性は pH5.5 以下の酸性域で欠損したが、一方顆粒球分画では、正常対照と変らぬ活性を示した(図 1)。末梢血白血球の酵素活性はリンパ球や顆粒球などの細胞の活性の総和として表現されるので、著者の結果から、顆粒球を多く含む白血球試料を用いた場合には、たとえ酸性域で酵素活性が測定されても、顆粒球の活性のために、患者の白血球は酵素活性の欠損を示さないことが予想される。実際に使用される白血球分離法には、主として単核細胞が回収される“Film technique”と、リンパ球、顆粒球を末梢血に近い割合で得られるデキストラン沈降法、フィブリノーゲン法がある⁷⁾。本症の患者の白血球の酵素活性が著しく低値とする報告の多くは、白血球分離に前者の方法を用いており、酵素活性が正常ないし低下とする報告の多くは、後者の方法を用いている。この事度は、著者の結果からの推定と一致するものと考えられる。

α -glucosidase の活性の pH profile は組織の種類や、同じ組織であっても用いられる基質によってかなり相違のあることが知られている⁸⁾⁹⁾。Koster ら⁵⁾の

maltose を基質に用いた研究によると、Pompe 病の患者の多核球の活性は pH4.0 で中等度低下、pH6.5 で正常であり、一方リンパ球の活性は pH4.0 で殆んど認められなく、pH6.5 でも低下していた。4-MU 基質を用いた著者の結果と、顆粒球分画の pH4.0 の活性に相違はみられるけれど、一致した成績と思われる。

本症の患者の顆粒球分画の酸性域で測定される活性は neutral α -glucosidase の残存活性とも考えられるが、十分な説明ではないだろう。Pompe 病の患者の腎には、 α -glucosidase の活性が正常近く見られ³⁰⁾、この活性を示す component は、肝などにみられる α -glucosidase の component と、その Kinetics 及び免疫学的性質を異にするとされる³¹⁾³²⁾。Broadhead ら¹⁰⁾は顆粒球にみられる α -glucosidase の活性が腎に存在する component に近い性状をもつと報告しており、一方、リンパ球の acid α -glucosidase は、顆粒球のそれと異なり、肝にみられるのと同一の酵素であると考えられている。従って、Pompe 病の診断には、末梢血リンパ球を用いて、acid α -glucosidase の活性を測定する方法が最も信頼性が高いと考えられる。

末梢血リンパ球の acid α -glucosidase 活性によるヘテロ保因者の診断については、患者の両親の酵素活性が正常域であったので、有用であるという結果は得られなかった。しかし PHA 刺激培養後のリンパ球の acid α -glucosidase の活性の測定では、患者の両親の活性が、正常対照の活性より有意に低下し、ヘテロ保因者の検出に役立つと考えられた。リンパ球に、PHA などのレクチンを添加培養すると、blast 化、蛋白合成の亢進とともに、種々のリソゾーム酵素の産生も触発されることが知られている¹¹⁾。更に、blast 化により細胞としての均一性もより高くな

ることも考えられる。Hirschhorn ら¹²⁾は PHA 刺激培養したリンパ球の acid α -glucosidase の活性の測定がヘテロ保因者の検出に有用であったと報告しており、著者の成績も彼らの結果を支持するものであった。PHA 刺激培養リンパ球の acid α -glucosidase の活性の測定がヘテロ保因者の診断にどれだけ信頼性があるかについては、今後多数の症例で検討されることが望まれる。

結 論

Pompe 病の診断に、4-MU 合成基質を用いるリンパ球の acid α -glucosidase の活性の測定が有用であったが、顆粒球の酵素活性の測定は役立つなかった。

本症のヘテロ保因者の検出に、PHA 刺激培養後のリンパ球の acid α -glucosidase 活性値が有用である可能性が示唆された。

II. I-cell 病 (Mucopolipidosis II 型) の診断への応用

研究対象及び方法

1. 対象

2 歳の I-cell 病の男児で、患児の血漿中の α -glucosidase, β -galactosidase, β -glucuronidase, α -mannosidase, N-acetyl- β -glucosaminidase の高値がみられた(表 1)。及び、血縁関係のない患児の両親。対照として、生後 1 ヶ月から 48 歳までの健康な 30 名の白血球を用いた。猶お、培養リンパ球の酵素活性の正常対照には、健康な成人 7 名を用いた。

2. 細胞の分離

(1) 編に記載した方法を用いた。但し、デキストラン沈降後の上清の一部を取り、3 回生食水で洗浄後、全

Table 1. Activity of Plasma Acid Hydrolases in the Patient with I-cell Disease, and the Parents.

| | α -glucosidase | α -galactosidase | β -galactosidase | β -glucuronidase | α -mannosidase | N-acetyl- β -glucosaminidase |
|-----------------|-----------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------------------|
| Patient | 44.7 | 3.3 | 358 | 700 | 6197 | 21475 |
| Father | 2.4 | 1.0 | 10.8 | 19.3 | 78.7 | 1450 |
| Mother | 1.7 | 0.8 | 4.5 | 8.2 | 57.2 | 1024 |
| Controls (n=13) | | | | | | |
| mean \pm S.D. | 2.3 \pm 0.8 | 1.2 \pm 0.7 | 5.6 \pm 2.2 | 8.7 \pm 3.0 | 40.7 \pm 14.6 | 971 \pm 326 |
| range | 1.3-3.8 | 0.5-2.9 | 3.2-8.8 | 3.9-14.5 | 17.9-69.9 | 600-1717 |

The enzyme assay was performed at pH 4.3 and activities were expressed as nanomoles of substrate hydrolyzed per hour per milliliter of plasma.

白血球として、測定に使用した。

3. リンパ球の培養

〔II〕編のI.に既に記載した方法に従った。

4. リソゾーム酸性水解酵素活性の測定

α -glucosidase, α -galactosidase, β -galactosidase, β -glucuronidase, α -mannosidase, 及び N-acetyl- β -glucosaminidase の活性を、全白血球、リンパ球分画、及び顆粒球分画を用いて、pH4.3で測定した。測定法は、〔I〕編の方法と同様である。

結 果

各細胞群でのリソゾーム酸性水解酵素活性値は、正常対照で、年齢間の差がみられなかったので、対照全部の活性値を纏めて正常値とした。

表2に示したように、I-cell病の患児のリンパ球分画では、 α -galactosidase, β -galactosidase, β -glucuronidase, 及び N-acetyl- β -glucosaminidase の活性が正常対照より低下していた。顆粒球分画のこれらの酵素活性は正常であった。患児の全白血球の活

性は、 α -と β -galactosidaseで低下していたが、その他の酵素では正常であった。一方、両親の酵素活性は、3つの細胞群ともに、正常域であった。

PHA刺激培養後のリンパ球のリソゾーム酸性水解酵素の活性は表3に示した。正常対照では、培養前に比し、PHA刺激培養後のリンパ球の酵素活性は、幾分減少した。

患児のリンパ球の活性は、 α -glucosidaseを除いて、PHA刺激培養後に、顕著な低下を示した。 β -glucuronidase, α -mannosidase, 及び N-acetyl- β -glucosaminidase の活性はそれぞれ、正常対照の29.8%, 21.1%, 30.6%であった。 α -と β -galactosidaseの活性は、更に低値で、正常対照の10.8%と6.9%であった。

両親のリンパ球の酵素活性は、PHA刺激培養後も、正常対照と有意な差を示さなかった。

考 察

I-cell病は臨床的にHurler病に類似した常染色体

Table 2. Lysosomal Enzyme Activities in Different Cell Populations From Peripheral Blood.

| | Patient | Father | Mother | Controls (n=30) | |
|------------------------------------|---------|---------------|--------|-----------------|---------------------------------|
| | | | | mean \pm S.D. | range |
| α -glucosidase | WBC* | 29.7 | 53.7 | 24.7 | 29.4 \pm 8.5 (15.2-47.2) |
| | Gra* | 37.1 | 62.5 | 28.1 | 37.8 \pm 9.4 (22.8-61.4) |
| | Ly* | 13.9 | 20.5 | 20.3 | 12.8 \pm 4.1 (6.0-23.6) |
| α -galactosidase | WBC | 10.2 | 22.8 | 14.3 | 18.3 \pm 5.3 (11.5-34.5) |
| | Gra | 18.3 | 25.8 | 12.8 | 16.3 \pm 4.4 (8.4-27.7) |
| | Ly | 4.2(20.8%)** | 14.8 | 15.3 | 20.1 \pm 7.9 (10.8-42.2) |
| β -galactosidase | WBC | 90.7 | 280.7 | 340.3 | 296.5 \pm 98.3 (151.5-490.4) |
| | Gra | 126.4 | 257.5 | 253.2 | 209.5 \pm 56.8 (113.8-337.8) |
| | Ly | 56.0(14.7%)** | 295.8 | 471.0 | 380.2 \pm 124.4 (157.0-683.0) |
| β -glucuronidase | WBC | 32.1 | 52.9 | 49.7 | 45.9 \pm 9.6 (25.8-64.7) |
| | Gra | 50.4 | 64.0 | 48.0 | 51.0 \pm 8.8 (37.5-72.3) |
| | Ly | 13.5(37.8%)** | 36.4 | 52.2 | 35.7 \pm 8.2 (26.1-57.4) |
| α -mannosidase | WBC | 175.3 | 418.0 | 208.6 | 263.3 \pm 71.7 (130.2-396.4) |
| | Gra | 394.8 | 581.3 | 278.3 | 360.6 \pm 117.6 (182.5-609.5) |
| | Ly | 80.0(76.2%)** | 144.8 | 107.0 | 105.0 \pm 33.9 (64.0-179.3) |
| N-acetyl- β -glucosaminidase | WBC | 912 | 1317 | 1109 | 1118 \pm 264 (801-1813) |
| | Gra | 1117 | 1112 | 935 | 845 \pm 164 (560-1201) |
| | Ly | 607(37.3%)** | 1400 | 1370 | 1627 \pm 369 (1147-2427) |

* WBC, total leukocytes; Gra, granulocyte-rich populations; Ly, lymphocyte-rich populations.

** Percentage of the enzyme activity to the arithmetic mean of 30 normal control values.

The enzyme activity was assayed at pH 4.3 and expressed as nanomoles of substrate cleaved by 10^7 cells per hour.

Table 3. Activity of Lysosomal Acid Hydrolases in PHA-Stimulated Lymphocytes*

| | α -gluco- sidase | α -galacto- sidase | β -galacto- sidase | β -glucuro- nidase | α -manno- sidase | N-acetyl- β - glucosaminidase |
|-----------------------------------|----------------------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------|--|
| Controls (n=7) mean \pm S.D. | 6.8 \pm 2.6 | 19.4 \pm 5.2 | 200.6 \pm 79.9 | 35.0 \pm 8.2 | 131.0 \pm 45.3 | 954.4 \pm 223.3 |
| range | 4.6-11.9 | 13.8-27.1 | 146.5-353.4 | 25.6-49.6 | 89.2-202.5 | 540-1189 |
| Patient | 6.9 (101%)** | 2.1 (10.8%)** | 13.9 (6.9%)** | 10.4 (29.8%)** | 27.6 (21.1%)** | 292 (30.6%)** |
| Father | 10.8 | 17.9 | 191.5 | 35.0 | 131.4 | 1038 |
| Mother | 7.8 | 11.7 | 131.1 | 25.5 | 106.4 | 838 |

* Lymphocytes were cultured for 72 h in the presence of 15 μ g/ml PHA-P. The enzyme assay was performed at pH 4.3 and activities were expressed as nanomoles of substrate hydrolyzed per 10^7 cells per hour.

** Percentage of normal mean.

性劣性遺伝性の疾患であるが、尿中のムコ多糖体の排泄は正常である¹³⁾。患者の培養皮膚線維芽細胞に多数の封入体 (inclusion body) を認めることから、I-cell 病と呼ばれる。培養線維芽細胞では、acid phosphatase や β -glucosidase を除いて、多数のリソゾーム酸性水解酵素が低下している。一方、これらの低下した活性を示す酵素が、培養線維芽細胞の培地中や、患者の血清、髄液や尿中に異常に増加している。

しかし、今日までの報告では、本症の患者の末梢白血球のリソゾーム酵素活性は正常域である¹⁴⁾とされ、僅かに Walbaum ら¹⁵⁾と Strecker ら¹⁶⁾が、患者の白血球で α -galactosidase と β -galactosidase の活性の低下を報告しているだけであり、このような成績から、従来、末梢白血球の酵素測定は本症の診断には意味をもたないと言われてきた。

一方、本症の患者の末梢血リンパ球の 20% 前後に空胞形成がみられ、培養線維芽細胞と同様な蓄積現象によるものと考えられている¹³⁾¹⁴⁾。このことは、末梢血リンパ球におけるリソゾーム水解酵素の活性の低下を暗示するものように思われ、事実本患児のリンパ球分画の α -galactosidase、 β -galactosidase、 β -glucuronidase、N-acetyl- β -glucosaminidase の活性は低下していた。このように、患児の顆粒球分画では酵素活性の低下はないが、リンパ球分画には明らかな活性の低下がみられており、従って顆粒球とリンパ球の活性の総和として表現される全白血球の酵素活性は、リンパ球の活性の低下が著しい酵素の場合に、正常以下の活性値を示すと考えられる。

PHA 刺激培養後のリソゾーム酵素活性は患児で、培養前より、更に明確な低下を示した。本症例で活性の低下が明らかであったリソゾーム酵素は、I-cell 病の

患者の培養線維芽細胞でみられる結果と極めて良好な一致を示した。この成績から、本症の酵素学的診断には、培養皮膚線維芽細胞のみならず、末梢血リンパ球、特に PHA 刺激培養後のリンパ球が有用であることが明らかにされた。

患児の両親では、リンパ球分画、顆粒球分画、及び PHA 刺激培養リンパ球のリソゾーム酵素活性は全て正常であり、本症のヘテロ保因者の検出に利用できないと思われた。

I-cell 病の培養線維芽細胞にみられる多数のリソゾーム酵素活性の低下の病因について、Wiesmann ら¹⁷⁾はリソゾーム酵素の細胞外への漏出を考えているが、現在では否定的であり、Hickman ら¹⁸⁾はリソゾーム酵素の細胞内への取り込みの研究から、本症のリソゾーム酵素は正常の酵素と何らかの形で異なるために細胞内へ取り込まれないことが本態であると考えている。

最近、Neufeld 一派はリソゾームの構成に、“The Secretion-Recapture Hypothesis”を提唱し、分泌された酵素蛋白における認識部分 - phosphomannose (?) - の存在が、細胞内への取り込みに関係深いとし、この点から I-cell 病におけるリソゾーム酵素の活性低下を説明しようと試みている¹⁹⁾。

一方、strecker ら¹⁶⁾は、本症での neuraminidase の活性の低下を報告しており、Vladutiu²⁰⁾は、primary lysosome における特定の neuraminidase の欠損が、酵素蛋白の構造異常を来とし、ひいては異常な exocytosis の原因になるのではないかと考えているが、I-cell 病の本態の解明は今後に残された問題である。

結 論

I-cell 病の患児のリンパ球で、 α -galactosidase, β -galactosidase, β -glucuronidase, α -mannosidase, N-acetyl- β -glucosaminidase の活性の低下がみられた。PHA 刺激培養後のリンパ球では、これらの酵素活性は更に顕著に低下した。一方、顆粒の酵素活性は正常であった。

患児の両親の酵素活性は、リンパ球、顆粒球、及び PHA 刺激培養リンパ球で、正常であった。

以上の結果より、末梢血リンパ球、特に PHA 刺激培養リンパ球のリソゾーム酸性水解酵素活性の測定は、I-cell 病の患者の診断に有用であるが、ヘテロ保因者の検出には役立つことが示唆された。

稿を終えるに臨み、御指導、御校閲を賜った恩師谷口昂教授に衷心より謝意を表します。また多大な御協力をいただきました奥田則彦講師、森谷直樹、宮脇利男、長沖 武、関 秀俊各医員はじめ第2研究室の諸兄、並びに教室員の皆様に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Hers, H. G., & de Barsy, T. : Type II glyco-genosis (Acid maltase deficiency), p197-216. In H. G. Hers & F. Van Hoof (ed.), Lysosomes and storage diseases, Academic Press, New York, 1973.
- 2) Huijing, F., van Creveld, S., & Losekoot, G. : Diagnosis of generalized glycogen storage disease (Pompe's disease). J. Pediat., 63, 984-987 (1963).
- 3) Steinitz, K., & Rutenberg, A. : Tissue α -glucosidase activity and glycogen content in patients with generalized glycogenosis. Israel J. Med. Sci., 3, 411-421 (1967).
- 4) Leathwood, P. D., & Ryman, B. : Enzymes of glycogen metabolism in human skin with particular reference to differential diagnosis of the glycogen storage diseases. Clin. Sci., 40, 261-269 (1971).
- 5) Koster, J. F., Slee, R. G., & Hulsmann, W. C. : The use of leukocytes as an aid in the diagnosis of glycogen storage disease type II (Pompe's disease). Clin. Chim. Acta, 51, 319-325 (1974).
- 6) Niermeijer, M. F., Koster, J. F., Jahodova, M., Fernandes, J., Heukels-Dully, J., & Galjaard, H. : Prenatal diagnosis of type II glycogenosis (Pompe's disease) using microchemical analyses. Pediat. Res., 9, 483-503 (1975).
- 7) Wyss, S. R., Koster, J. F., & Hulsmann, W. C. : Choise of leucocyte preparation in the diagnosis of glycogen storage disease type II (Pompe's disease). Clin. Chim. Acta, 35, 277-280 (1971).
- 8) Salafsky, I. S., & Nadler, H. L. : Alpha-1, 4 glucosidase activity in Pompe's disease. J. Pediat., 79, 794-798 (1971).
- 9) Salafsky, I. S., & Nadler, H. L. : A fluorometric assay of alpha-glucosidase and its application in the study of Pompe's disease. J. Lab. Clin. Med., 81, 450-454 (1973).
- 10) Broadhead, D. M., & Butterworth, J. : Pompe's disease : Diagnosis in kidney and leukocytes using 4-methylumbelliferyl- α -D-glucopyranoside. Clin. Genet., 13, 504-510 (1978).
- 11) Hirschhorn, R., Hirschhorn, K., & weissmann, G. : Appearance of hydrolase rich granules in human lymphocytes induced by phytohemagglutinin and antigens. Blood, 30, 84-102 (1967).
- 12) Hirschhorn, K., Nadler, H. L., Waithe, W. I., Brown, B. I., & Hirschhorn, R. : Pompe's disease : Detection of heterozygotes by lymphocytes stimulation. Science, 166, 1632-1633 (1969).
- 13) Leroy, J. G., Spranger, J. W., Feigold, M., Opitz, J. M., & Crocker, A. C. : I-cell disease : A clinical picture. J. Pediat., 79, 360-365 (1971).
- 14) Wiesmann, U. N., Vassella, F., & Herschkowitz, N. N. : Mucopolidosis II (I-cell disease), A clinical and biochemical study. Acta Paediat. Scand., 63, 9-16 (1974).
- 15) Walbaum, R., Dehaene, P., Scharfman, W., Farriaux, J. P., Tondeur, M., Vamos-Hurwitz, E., Kint, J. A., & Van Hoof, F. : La mucopolidose de type II (I-cell disease). Arch. Franc. Ped., 30, 572-592 (1973).
- 16) Strecker, G., Michalski, J. C., Montreuil, J., & Farriaux, J. P. : Deficit in neuraminidase associated with mucopolidosis II (I-cell disease). Biomedicine, 25, 238-240 (1976).
- 17) Wiesmann, U. N., Lightbody, J., Vassella, F., & Herschkowitz, N. N. : Multiple lysosomal enzyme deficiency due to enzyme leakage? New

Engl. J. Med., 284, 109-110 (1971).

18) **Hickman, S., & Neufeld, E. F.** : A hypothesis for I-cell disease : Defective hydrolases that do not enter lysosomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **49**, 992-999 (1972).

19) **Neufeld, E. F., Sando, G. N., Garvin, A. J., & Rome, L. H.** : The transport of lysosomal

enzymes. *J. Supramol. Structure*, **6**, 95-101 (1977).

20) **Vladutiu, G. D.** : I-cell disease : A hypothesis for the structure of the carbohydrate recognition site on β -D-N-Acetylhexosaminidase. *Biochem. J.*, **171**, 509-512 (1978).

The use of peripheral blood lymphocytes as an aid in the diagnosis of several inherited lysosomal storage diseases. [II] The enzymatic diagnosis of Pompe's disease and I-cell disease with the use of peripheral blood lymphocytes. Eiji Kato, Department of Pediatrics, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920, Japan. J. Juzen Igk. Z., 88, 76-83 (1979).

Abstract

In several inherited lysosomal storage diseases, the determination of lysosomal acid hydrolase activity in peripheral blood leukocytes has been used in the identification of both homozygotes and heterozygous carriers. Peripheral blood leukocytes, however, represent a heterogeneous mixture of various cell species which differ from each other in morphology, life span, and function. And leukocyte preparations contain two main cell populations, granulocytes and lymphocytes, which may have different enzymatic activities.

Therefore, leukocyte preparations from healthy individuals were separated into lymphocyte-rich populations and granulocyte-rich populations, and six lysosomal hydrolases were assayed in lymphocyte-rich populations and granulocyte-rich populations in this study.

1. The pH activity profile of α -glucosidase in lymphocyte-rich populations showed two pH optima; pH 4.5 and pH 6.5. So the assay of acid α -glucosidase activity could be easily performed around pH 4.5 without interference from the activity of neutral α -glucosidase, while in granulocyte-rich populations differential estimation between acid and neutral α -glucosidase activities was impossible.

2. In α -galactosidase, β -galactosidase, β -glucuronidase, and N-acetyl- β -glucosaminidase, the pH activity profile of lymphocyte-rich populations showed a pattern similar to that of granulocyte-rich populations. The maximal activity was observed at pH 5.0 in α -galactosidase, at pH 4.5 in β -galactosidase, at pH 5.5 in β -glucuronidase, and at pH 5.0 in N-acetyl- β -glucosaminidase. Granulocyte-rich populations exhibited a higher activity level of α -galactosidase and β -glucuronidase than did lymphocyte-rich populations. The activity of β -galactosidase and N-acetyl- β -glucosaminidase in lymphocyte-rich populations was significantly higher than that in granulocyte-rich populations.

3. Two pH optima of α -mannosidase activity, one pH 4.0 and the other pH 5.0, were observed both in lymphocyte-rich and granulocyte-rich populations. The activity in granulocyte-rich populations was much higher at two pH optima than that in lymphocyte-rich populations.

4. These results indicated that lymphocyte-rich populations and granulocyte-rich populations might be more useful as a source of enzyme both in establishing the diagnosis of several inherited lysosomal storage diseases and in identifying heterozygous carriers than peripheral blood leukocyte preparations.