

末梢白血球(顆粒球,単球,リンパ球)と培養皮膚線維芽細胞におけるリソゾーム酵素の活性分布と臨床的応用に関する研究

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/2297/8892

末梢白血球（顆粒球，単球，リンパ球）と培養皮膚 線維芽細胞におけるリソゾーム酵素の 活性分布と臨床的応用に関する研究

金沢大学医学部小児科学教室（主任：谷口 昂教授）

川 島 ひろ子

（昭和56年1月21日受付）

Key words 遺伝性リソゾーム蓄積症，リソゾーム酸性水解酵素，pH activity profile, Pompe 病, I-cell 病

遺伝性リソゾーム蓄積症 (inherited lysosomal storage disease)¹⁾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す比較的稀な疾患で、現在までに20以上知られている²⁾。これまでこのようなリソゾーム蓄積症の診断には、培養線維芽細胞で該当する酵素の欠損、又は低下を証明するのが最も信頼できる方法といわれて来た。しかし、培養線維芽細胞を準備するに際しては、患者への侵襲、培養技術及び設備、培養に要する時間等のいくつかの問題があり、日常用いる臨床検査と言うには、あまりにも特殊すぎる感がある。そのため培養線維芽細胞にかわり、取り扱いが簡単でかつ同様もしくはそれ以上の信頼性のあるものを用いることができれば、日常臨床において非常なメリットが得られる。

リソゾームに含まれる種々の水解酵素は細胞の種類により活性は異なるが、赤血球を除くほとんどすべての細胞に含まれており、採取及びその取り扱いが簡単なところから、末梢白血球を用いることが行なわれてきた。けれども今までの報告では、Tay-Sachs病³⁾⁴⁾、異染性白質ジストロフィー⁵⁾⁶⁾、Gaucher病⁷⁾⁸⁾、Niemann-Pick病⁹⁾、Krabbe病¹⁰⁾、GM₁-gangliosidosis¹¹⁾、Fabry病¹²⁾では信頼できる方法とされているが、Pompe病やI-cell病では酵素活性が正常又はわずかに低下していたにすぎないという報

告が多かった¹³⁾¹⁷⁾。しかし、Katoらの報告¹⁶⁾では末梢白血球から顆粒球を除いたリンパ球分画では、I-cell病においても該当酵素の低下がはつきりしており、診断に有用であるとされている。そこで著者は末梢白血球をさらに、顆粒球、単球、リンパ球の3分画に分離し、培養線維芽細胞と共に6種類のリソゾーム酵素のpH activity profileを求め、末梢白血球各分画と培養線維芽細胞のリソゾーム酵素の活性分布を比較検討してみた。

対象および方法

1. 対象

末梢白血球は正常対象として、2才から35才までの健康人10名から、更に筋肉生検標本で α -glucosidase活性欠損が証明されたPompe病の1才女児と、培養線維芽細胞でinclusion bodyと、多くのリソゾーム酵素活性の低下が見られたI-cell病の3才男児から得た。培養線維芽細胞は、20才から60才までの少なくとも代謝性疾患を有しない患者5名から、Pompe病、I-cell病に関しては前述の患者達から皮膚生検によつて得た。

2. 細胞分画の分離及び培養線維芽細胞の採取

末梢白血球の分離は、Snyderらの方法¹⁹⁾によりヘパリン加静脈血5容に、5%デキストランPBS溶液1

A Comparative Study of Lysosomal Enzyme Activity in Peripheral Blood Leukocyte Populations (Granulocytes, Monocytes, and Lymphocytes) and Cultured Skin Fibroblasts: Clinical Utility of Lymphocyte Populations for the Enzymatic Diagnosis of Some Lysosomal Diseases. **Hiroko Kawashima**, Department of Pediatrics, (Director: Prof. N. Taniguchi), School of Medicine, Kanazawa University.

容を混和し、室温で30分間静置し白血球に富む上清を得た。この上清をBöyumの方法²⁰⁾に従って、Ficoll-Isopaque上に重層し、400×g、4℃、30分間遠心して、中間層に単核細胞層を、pelletに赤血球の混入のある顆粒球層を分離した。更にこの単核細胞層を直径6cmのFalconシャーレ中に10%FCS入りRPMIメディウムで1×10⁷個の割合で浮遊させ、37℃、5%CO₂下で1時間静置し、単球をシャーレの底に吸着させた。この上清を集めてリンパ球分画とし、吸着した単球はポリスマンではがし単球分画としたが、80%~87%のα-naphtyl-esterase-positive cellが認められた。²¹⁾一方、pelletは赤血球が混入しているため蒸留水で再浮遊し、20秒後に同量の1.8%塩化ナトリウム液を加えて等張にもどした。赤血球の多い場合は、更に同様の低張処理をくり返した。これを顆粒球分画としたが、単核細胞の混入はなかった。このようにして得られたそれぞれの分画を生食水で3回洗浄し、各酵素活性の測定に適当な細胞数に生食水で再浮遊した。培養線維芽細胞は、前腕屈側部を1%キシロカインで麻酔後、無菌的に皮膚小片を採取し、抗生物質入りメディウムで洗った後、メスで細片にした。これらの細片をFalconの25cm²カルチャーボトルにうえこみ、10%FCS入りMEMメディウム中で、37℃、5%CO₂の条件下で培養し、メディウム交換は週2回行なった。Primary culture後、少なくとも1回以上subcultureを行なった後、1日目から10日目までの細胞について酵素活性の測定を行ない、細胞がconfluencyに達した後に、ほぼ一定した活性が得られたので、以後の実験ではすべてconfluencyに達した後の細胞を用いた。カルチャーボトル内の細胞がconfluencyに達した後、ポリスマンではく離し、これらの細胞を生食で3回洗浄した後、適当な数に再浮遊して酵素活性に用いた。

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-methyl-umbelliferyl (以下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...4MU-α-D-glucopyranoside
(Koch - Light Lab)
- 2) α-galactosidase...4MU-α-D-galactopyranoside
(Koch - Light Lab)
- 3) β-galactosidase...4MU-β-D-galactoside
(Nakarai chemicals)
- 4) β-glucuronidase...4MU-β-D-glucuronide

(Koch - Light Lab)

- 5) α-mannosidase...4MU-α-D-mannopyranoside
(Koch - Light Lab)

- 6) N-acetyl-β-glucosaminidase...4MU-N-acetyl-β-D-glucosaminide
(Nakarai chemicals)

各酵素活性の測定は、Hindmanらの方法²²⁾を少し修正して実施した。Triton X-100を細胞浮遊液に加え(最終濃度1.0g/l)、Vortex mixerで強く振盪後、freeze and thawを3回行ない、3000g、4℃、10分間遠心し、上清を測定に用いた。この上清50μlに4-MU基質を含むMcIlvaine緩衝液(1m mole/L)100μlを加え、37℃で1時間shaking water bathの中で反応させた。Blankとして細胞浮遊液に4-MU基質を含むMcIlvaine緩衝液を混合後、即座にpH10.4のglycine-NaOH緩衝液を3.0ml加えて、同様に37℃のshaking water bath内に1時間おいた。1時間のincubationの後にpH10.4の0.25M glycine

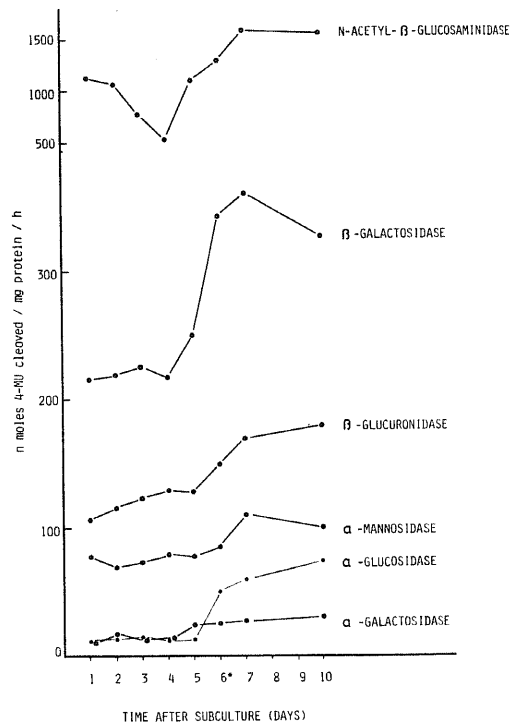


Fig. 1. The lysosomal acid hydrolase activities of fibroblasts in relation to time (days) since subculture.

*Confluency was reached on 6th day since subculture.

- NaOH 緩衝液を 3.0 ml 加えて反応を停止させた。遊離した 4-MU 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 profile を調べるために, pH 3.0, 3.5, 4.0, 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。又, 酵素活性測定に用いた上清液の残りをを用いて Lowry 法²³⁾によりタンパクの定量を行ない, 酵素活性を n moles 4-MU cleaved / mg protein / h で表現した。

成 績

1). サブカルチャー後の培養線維芽細胞におけるリソゾーム酵素活性の時間的变化 (図 1)

α -glucosidase, α -galactosidase, β -galactosidase, β -glucuronidase, α -mannosidase, N-acetyl- β -glucosaminidase のすべての酵素で, 細胞が confluency に達した後, ほぼ一定した活性値を示した。

2). 正常対照

① α -glucosidase (図 2)

顆粒球分画は pH 6.5 にピークをもつ一峰性であったが, 残りの 2 分画と培養線維芽細胞ではいずれも pH 4.5 と pH 6.5 にピークをもつ二峰性の pH activity profile を

示した。pH 4.5 及び pH 6.5 での活性値は, リンパ球分画が一番低く, 顆粒球分画, 単球分画, 培養線維芽細胞の順に高くなっていた。

② α -galactosidase (図 3)

3 分画及び培養線維芽細胞のすべてが pH 5.0 にピークをもつ 1 峰性で, ピークにおける活性値は, α -glucosidase と同様にリンパ球分画が一番低く, 顆粒球分画, 単球分画, 培養線維芽細胞の順に高くなっていた。

③ β -galactosidase (図 4)

3 分画及び培養線維芽細胞とも pH 5.0 にピークをもつ 1 峰性で, pH 5.0 での活性値は前述の 2 酵素とは異なり, 顆粒球分画が一番低く, リンパ球分画, 単球分画, 培養線維芽細胞の順に高かった。

④ β -glucuronidase (図 5)

3 分画及び培養線維芽細胞とも pH 5.0 にピークを示し, ピークでの活性値はリンパ球分画が最も低く, 顆粒球分画が次に高く, 単球分画と培養線維芽細胞はほぼ同じような活性値を示した。

⑤ α -mannosidase (図 6)

3 分画及び培養線維芽細胞で pH 4.5 にピークが見られ, pH 4.5 での活性値はリンパ球分画が最も低く, 顆粒球分画, 培養線維芽細胞, 単球分画の順に高くなつ

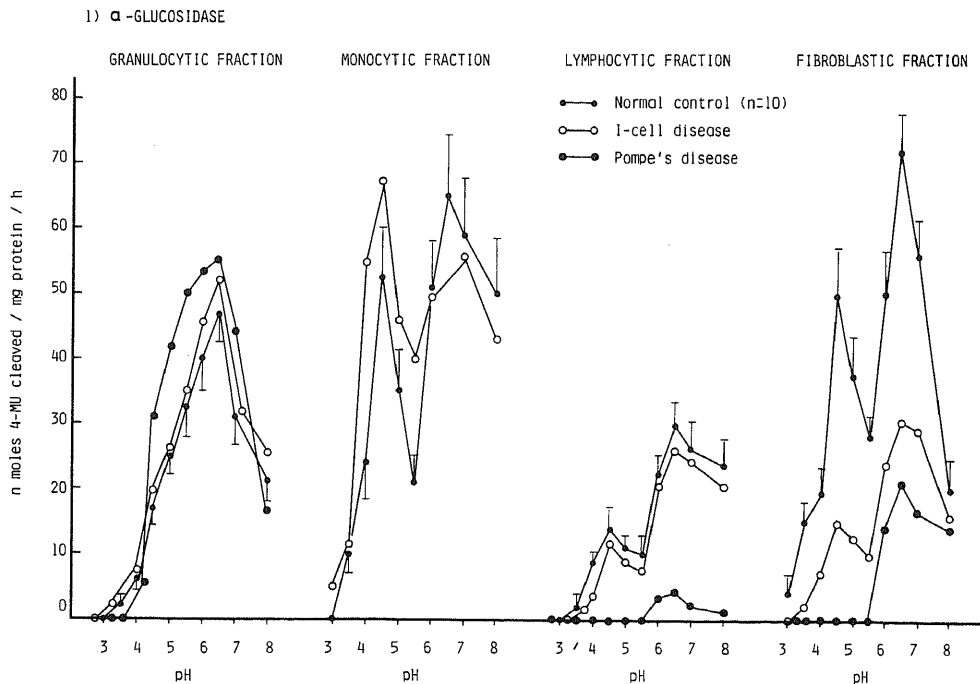
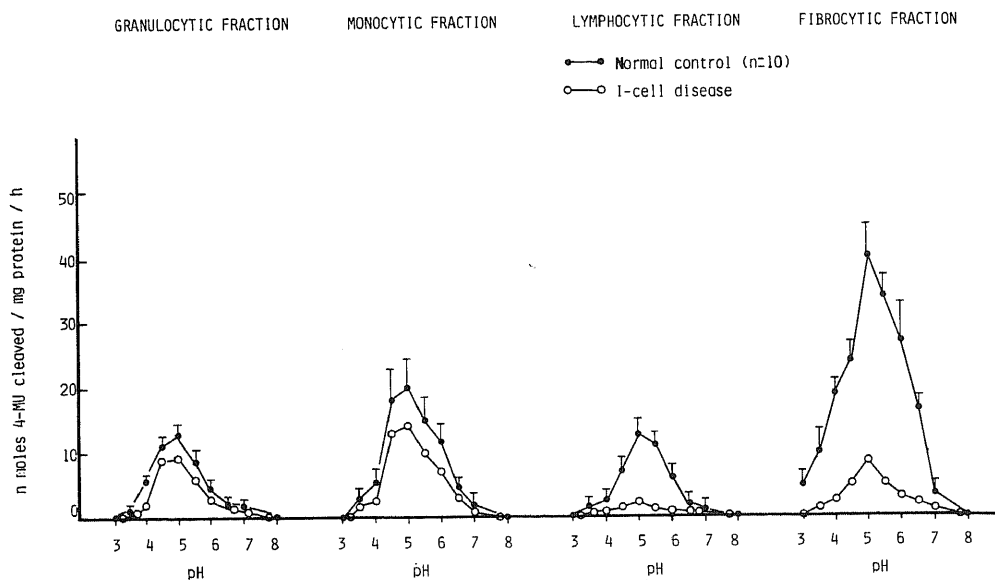
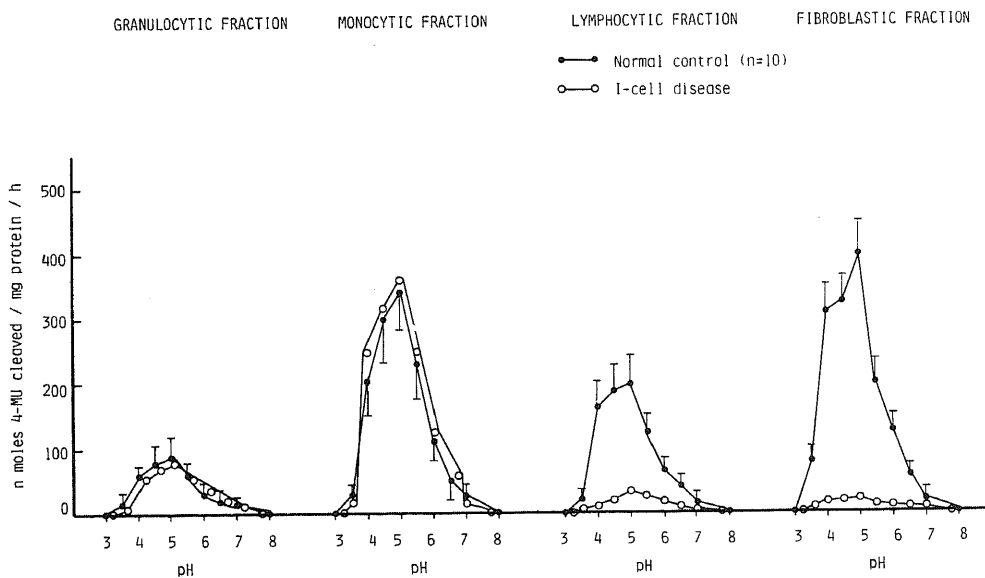


Fig. 2. PH activity profiles of α -glucosidase in each leukocyte fraction (granulocytes, monocytes, and lymphocytes) and fibroblasts.

2) α -GALACTOSIDASEFig. 3. PH activity profiles of α -galactosidase.3) β -GALACTOSIDASEFig. 4. PH activity profiles of β -galactosidase.

4) β - GLUCURONIDASE

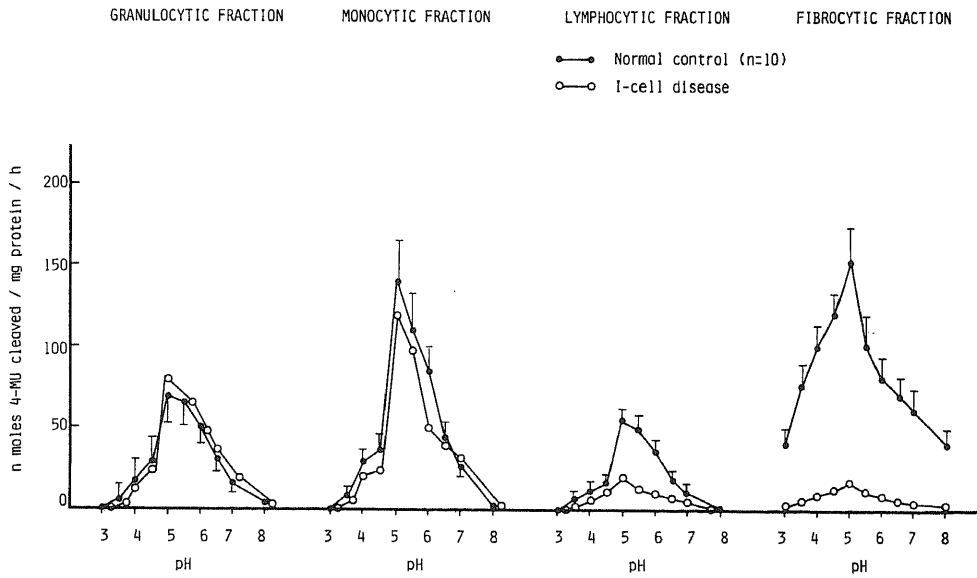


Fig. 5. PH activity profiles of β -glucuronidase.

5) α -MANNOSIDASE

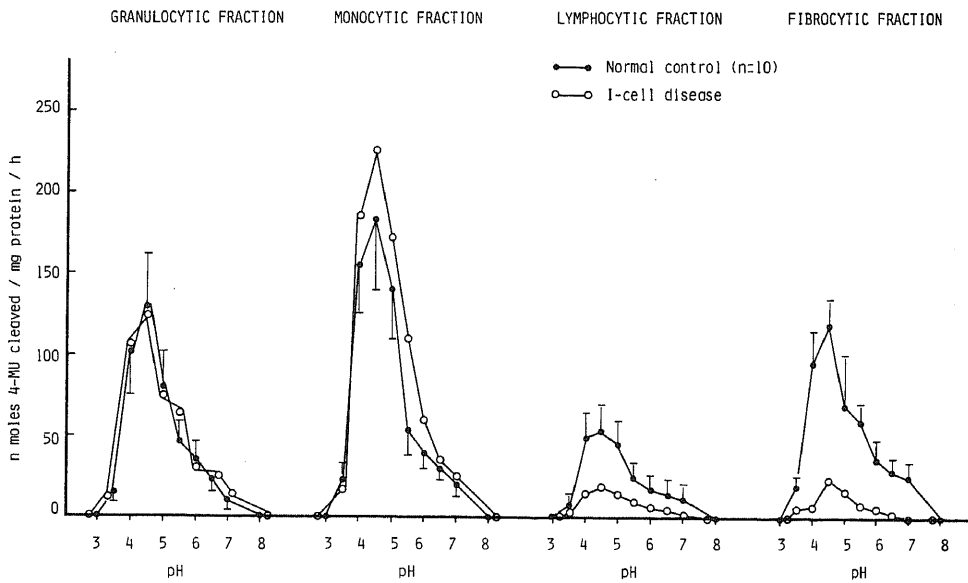
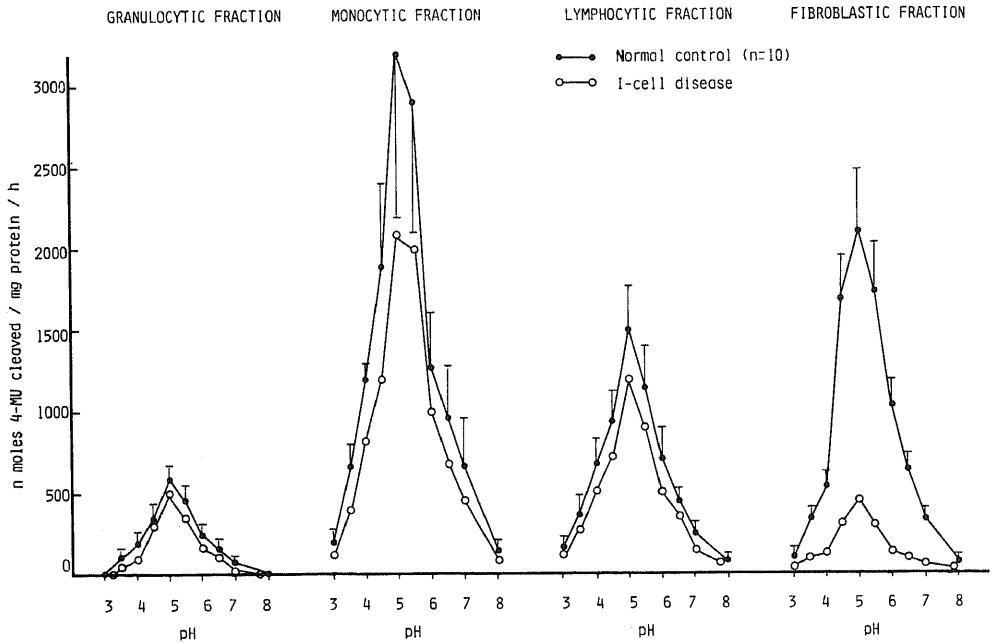


Fig. 6. PH activity profiles of α -mannosidase.

6) N-ACETYL- β -GLUCOSAMINIDASEFig. 7. pH activity profiles of N-acetyl- β -glucosaminidase.

ていた。

⑥ N-acetyl- β -glucosaminidase (図7)

pH 5.0 に3分画及び培養線維芽細胞でピークをもち、pH 5.0での活性値は顆粒球分画が最も低く、リンパ球分画、培養線維芽細胞、単球分画の順に高くなっていた。

3). Pompe 病

末梢白血球の3分画のうち、単球分画は回収率が悪く酵素活性の測定はできず、残りの顆粒球分画、リンパ球分画と、培養線維芽細胞について行なった。 α -glucosidase以外の他の5酵素では、顆粒球分画、リンパ球分画及び培養線維芽細胞において、正常対照とほぼ同様のpH activity profileを示したので、結果の図示は省略した。 α -glucosidaseのpH activity profileは顆粒球分画ではpH 6.5にピークをもつ1峰性で、活性値の低下は全く見られず、むしろ正常対照よりも少し高めであった。一方リンパ球分画及び培養線維芽細胞では共に酸性域(pH 3.0~pH 5.0)で活性が欠損しており、中性域(pH 5.5~pH 8.0)にのみ活性を認めたと、正常対照と比較し、著しい低下を示した。

4) I-cell 病

α -glucosidase, α -galactosidase, β -galactosidase, β -glucuronidase, α -mannosidase, N-acetyl- β -glucosaminidaseのすべての酵素で、培養線維芽細胞において、正常対照に較べ著しい酵素活性の低下を示した。顆粒球分画と単球分画では正常対照と比較して、ほぼ同じかやや低めの活性を示したが、リンパ球分画では低い活性を示し、特に α -galactosidase, β -galactosidase, β -glucuronidase, α -mannosidaseの4酵素では低下が著しく、それぞれ正常対照の22%, 16%, 40%, 35%であった。

考 察

遺伝性リソゾーム蓄積症は現在のところまだ治療法もなく、余後も悪い病気であるが、保因者の検出や羊水診断により出生予防が可能であり、その為これら疾患や保因者のスクリーニングの為により簡単でかつ信頼性の高い診断法の確立は非常に重要である。リソゾーム水解酵素の測定法は、以前は天然基質も用いられたが、fluorogenicな合成基質を用いた測定は天然基質を用いる方法に較べ、比較的簡単でありかつ少量の検体量で実施できるので、現在では天然基質にとってか

わり広く診断に用いられている。一方、診断材料としては培養線維芽細胞が最も信頼性があるとされているが、種々の点で日常臨床検査として用いるには困難であり、又、培養条件によってリソゾーム酵素活性が非常に変化するという報告²⁴⁾もあり、必ずしも理想的な診断材料とはいえない。その点、末梢白血球は採取が非常に簡単で、培養線維芽細胞のかわりに診断に用いる試みが、遺伝性リソゾーム蓄積症においてこれまでに多くなされ、その結果いくつかの疾患では非常に有効な診断法として、病気の診断のみではなく保因者診断にも用いられている。²⁵⁾しかし、Pompe病とI-cell病では患者の末梢白血球の酵素活性は、ほとんど正常かごく軽度の低下しか示さず、末梢白血球はこれらの疾患の診断には全く役に立たないと言われてきた。ところが、今までにこの様に報告されている例は、すべて顆粒球、単球、リンパ球が種々の割合で混ざつたものをそのまま測定材料として用いており、リソゾーム酵素活性は細胞の種類によって異なり、その結果それらの混合比の違いによつて当然活性値が大きく変わることが考えられる。そこで著者は白血球をより均一な細胞群である顆粒球、リンパ球、単球の3分画に分離し、培養線維芽細胞と共に6種類のリソゾーム酵素、 α -glucosidase, α -galactosidase, β -galactosidase, β -glucuronidase, α -mannosidase, N-acetyl- β -glucosaminidaseのpH activity profileを調べ、末梢白血球のいずれかの分画が培養線維芽細胞にとってかわり、Pompe病やI-cell病の診断に用いることができないか調べてみた。

1), 正常対照

正常対照の培養線維芽細胞と末梢白血球の3分画の各々のpH activity profileを比較してみると、酵素によって培養線維芽細胞に一番近いpH activity profileを示す分画は異なっていた。たとえば、 α -glucosidase, α -galactosidase, β -galactosidase, β -glucuronidaseでは単球分画が、 α -mannosidaseでは顆粒球分画、N-acetyl- β -glucosaminidaseではリンパ球分画が、それぞれ培養線維芽細胞に最も近いpH activity profileを示しており、これらの結果から、特定の分画と培養線維芽細胞との対応は証明できなかった。又、著者の実験で得られた酵素のpH activity profileのうち、 α -glucosidase, α -mannosidaseについてNakagawaらの結果²⁵⁾と比較してみた。 α -glucosidaseではNakagawaらに見られる顆粒球分画の2峰性のピークは著者では見られず、Nakagawaらで酸性域に見られた単球分画の活性値のピークは、著者では中性

域にあった。又、 α -mannosidaseは著者の結果では全分画で1峰性であったが、NakagawaらはCarrollら²⁶⁾やKatoら¹⁹⁾と同様、酸性、中性両域に2峰性のピークを示した。しかし、これら以外はほぼ同じようなpH activity profileを示した。又、正常対照の顆粒球分画、単球分画、リンパ球分画相互間の活性値の関係をBeutlerら⁷⁾の報告と比較して見ると、著者の結果では α -mannosidaseの単球分画は顆粒球分画より高い活性を示し、Beutlerらの結果ではこれが逆になっていたが、その他の酵素はすべて同じ傾向を示した。

2), Pompe病

Pompe病(糖原病II型)は心拡大及び筋緊張低下を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才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らの報告以来、末梢白血球が用いられ、多くは酵素活性が欠損していたと報告されているが、なかには明らかに患者でありながら、わずかに低下或いはほとんど正常であったという報告も散見される。¹³⁾⁻¹⁶⁾著者の結果ではリンパ球分画と培養線維芽細胞において、これまでの多くの報告と同様に酸性域で α -glucosidaseの活性の欠損が認められ、中性域では低下はしているが酵素活性を残存していた。しかし、顆粒球分画では中性域にピークをもつ1峰性を示し、活性の低下は全く見られず、逆に正常よりやや高めの活性を示した。これらの結果は、リソゾーム酵素活性が、細胞の種類によって異なることをはっきりと表わしており、末梢白血球全体を酵素活性測定に用いた場合には、活性値はこれらの異なった活性をもつ細胞の総和として表わされるので、酸性域で酵素活性を測定しても、リンパ球以外の細胞成分が多いとそれらの活性の為、酵素欠損を示さないか、又はわずかに低下という結果になることが当然考えられる。これまでの報告で、末梢白血球において α -glucosidase活性が正常ないし、わずかに低下と報告された例は、末梢白血球分離の時に、顆粒球や単球が多く得られるデキストラン沈降法やフィブリノーゲン法を用い、逆に低下とされたものはリンパ球分画が多く得られるFilm technique²⁸⁾を用いておりこのことは著者の結果からの推定と一致すると考えられる。著者の結果ではPompe病に見られる培養線維芽細胞での α -glucosidase活性の欠損が、末梢白血球のリンパ球分画にはっきりと表われており、これより、Pompe病の診断には、末梢白血球のリンパ球分画を酸性域で測定するのが、最も確かな方法であることが証明された。

3), I-cell病

I-cell 病は臨牀的に Hurler 病に類似した常染色体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。²⁹⁾ 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 病と呼ばれている。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。²⁹⁾ 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、今日までのほとんどの報告では、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とされ、わずかに Walbaum ら³⁰⁾、Strecker ら³¹⁾、Tanaka³²⁾ が患者の白血球で α -galactosidase, β -galactosidase, β -glucuronidase, α -Neuramidase, N-acetyl- β -galactosaminidase の低下を報告しているにすぎない。又、彼等は α -mannosidase, N-acetyl- β -glucosaminidase, Arylsulfatase-A, acid phosphatase が正常であったと報告しているが、これらの結果と著者の結果を比較検討してみた。彼等の報告で低活性を示した α -galactosidase, β -galactosidase, β -glucuronidase は著者の結果でも、いずれもリンパ球分画で酵素活性がそれぞれ正常対照の 22%, 16%, 40% と著明に低下しており、顆粒球分画、単球分画は正常対照とほぼ同じか軽度低下を示し、当然これら活性の総和は、正常対照に較べ低活性を示すものと思われる。一方正常活性と報告された α -mannosidase は、リンパ球分画では正常対照の 35% と低活性であるが、顆粒球分画と単球分画において、正常対照とほぼ同じか軽度上昇を示し、かつその活性値がリンパ球分画の 7~11 倍と高い為、全体としてリンパ球分画での活性低下が隠されてしまい、正常と報告されたものと思われる。N-acetyl- β -glucosaminidase は著者の結果でも、単球分画の pH 4.5~pH 5.5 でやや活性が低下していた以外は、3 分画共正常対照とほぼ同じような活性を示しており、これらの総和は当然正常活性を示すと考えられる。 α -Neuramidase, N-acetyl- β -galactosaminidase の測定を著者は行っていないが、acid phosphatase, β -glucosidase は Leroy らの報告²⁹⁾ が示すように、I-cell 病ではおかされておらず、彼等の報告でも当然正常となっている。このように著者の結果は彼等の報告と一致するものと思われる。又、本症の末梢リンパ球の 20% 前後に見られる空胞形成は、培養線維芽細胞と同様の蓄積現象によるものと考えられている。¹⁷³⁾ この事は、末梢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、本児のリンパ球分画の α -galactosidase, β -galactosidase, β -glucuronidase, α -mannosidase の活性は、培養線維芽細胞に見られると同様著明に低下しており、Kato ら¹⁸⁾ の報告とほぼ同じような結果を示した。このように著者の結果では、患児の顆粒球分画と単球分画では酵素活性の低下はほとんどなく、リンパ球分画にのみ著明な活性の低下が見られ、Pompe 病と同様に、リンパ球分画でリソゾーム酵素の活性を測定することによって、I-cell 病の診断が可能であることが証明された。

結 論

健康人、Pompe 病及び I-cell 病患者において、末梢白血球を、顆粒球、単球、リンパ球の 3 分画に分離し、各細胞分画と各人由来の培養線維芽細胞のリソゾーム水解酵素の pH activity profile を検討し、以下のような成績を得た。

1), 正常対照の α -glucosidase の酵素活性は、単球分画、リンパ球分画、培養線維芽細胞において、至適 pH が 4.5 の acid form と、6.5 の neutral form に分離されたが、顆粒球分画では至適 pH が 6.5 の 1 峰性であった。正常対照及び Pompe 病の α -galactosidase, β -galactosidase, β -glucuronidase, α -mannosidase, N-acetyl- β -glucosaminidase の pH activity profile は、各酵素で全分画及び培養線維芽細胞でほぼ類似した 1 峰性の曲線を示し、至適 pH はそれぞれ 5.0, 5.0, 5.0, 4.5, 5.0 であった。

2), 各至適 pH での活性値は、 α -glucosidase, α -galactosidase, β -galactosidase では培養線維芽細胞が、 β -glucuronidase, α -mannosidase, N-acetyl- β -glucosaminidase では単球分画が最も高い活性を示した。

3), Pompe 病における α -glucosidase は、リンパ球分画と培養線維芽細胞でのみ、酸性域において酵素活性の欠損を示したが、顆粒球分画では正常対照とほぼ等しい pH activity profile を示し、活性低下は全く認められなかった。

4), I-cell 病は、これまでの報告と同様、培養線維芽細胞では全酵素で著明な活性低下を示した。又、末梢白血球 3 分画では、リンパ球分画でのみ、 α -galactosidase, β -galactosidase, β -glucuronidase, α -mannosidase の著明な活性低下を認め、それぞれ正常対照の 22%, 16%, 40%, 35% であった。しかし、顆粒球分画、単球分画では正常対照とほぼ同じ活性を示した。

5), 末梢白血球をより均一な細胞群である顆粒球分画, 単球分画, リンパ球分画に分離し, そのリンパ球分画のリゾーム水解酵素を測定することによって, 培養線維芽細胞を用いなくとも, Pompe 病及び I-cell 病の診断が可能と考えられる。

稿を終えるに臨み, 御指導と御校閲を賜りました谷口昇教授に深謝いたします。また多大な御協力をいただきました第6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.** : The concept of inborn lysosomal disease, p 147-171. 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 disease*. *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) **Pery, 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 β -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 platelets 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 with small sample of venous blood. *Science*, **155**, 86-88 (1966)
- 10) **Suzuki, Y., & Suzuki, K.** : Krabbe's globoid cell leukodystrophy : Deficiency of galacto-cerebrosidase in serum, leukocytes and fibroblasts. *Science*, **171**, 73-75 (1971)
- 11) **Singer, H. S., Nankervis, G. A., & Schafer, I. A.** : Leukocyte betagalactosidase activity in the diagnosis of generalized GM₁ gangliosidosis. *Pediatrics*, **49**, 352-361 (1972)
- 12) **Kint, J. A.** : Fabry's disease : Alpha-galactosidase deficiency. *Science*, **167**, 1268-1269 (1970)
- 13) **Steinitz, k., & Rutenberg, A.** : Tissue α -glucosidase activity and glycogen content in patients with generalized glycogenosis. *Israel J. Med. Sci.*, **3**, 411-421 (1967)
- 14) **Leathwood, P. D., & Ryman, B.** : Enzymes of glycogen metabolism in human skin with particular reference to differentiated diagnosis of the glycogen storage diseases. *Clin. Sci.*, **40**, 261-269 (1971)
- 15) **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)
- 16) **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 analysis. *Peiat. Res.*, **9**, 483-503 (1975)
- 17) **Wiesmann, U. N., Vassella, F., & Hersch-Kowitz, N. N.** : Mucopolipidosis II (I-cell disease), A clinical and biochemical study. *Acta Paediat. Scand.*, **63**, 9-16 (1974)
- 18) **Kato, E., Yokoi, T., and Taniguchi N.** : Lysosomal acid hydrolases in lymphocytes of I-cell disease. *Clin. Chim. Acta*, **95**, 285-290 (1979)
- 19) **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)
- 20) **Bøyum, A.** : Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand. J. Lab. Invest.*, **21**, (suppl. 97), 77-89 (1968).

- 21) **Li, C. Y., Lam, K. M., & Yam, L. T.** : Esterases in human leukocytes. *J. Histochem. Cytochem.* **21**, 1 (1973)
- 22) **Hindman, J., & Cotlier, E.** : Glycosidase in normal human leukocytes and abnormalities in GM₁-gangliosidosis. *Clin. Chem.* **18**, 971 - 975 (1972)
- 23) **Lowry, H. O., Rosenbough, J. N., Farr L. A., & Randall, J. R.** *J. Biol. Chem.* **193**, 265 - 275 (1951)
- 24) **Milunsky, A., Spelvogel, C., & Kamfer, J. N.** : Lysosomal enzyme variations in cultured normal skin fibroblasts. *Life Sci.*, **11**, 1101 - 1107 (1972)
- 25) **Nakagawa, S., Kumin, S., & Nitowsky M. H.** : Studies on the activities and properties of lysosomal hydrolases in fractionated populations of human peripheral blood cells. *Clin. Chim. Acta*, **101**, 33-44 (1980).
- 26) **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)
- 27) **Huijing, F., van Creveld, S., & Losekoot, G.** : Diagnosis of generalized glycogen storage disease (Pompe's disease). *J. Pediat.*, **63**, 984 - 987 (1963)
- 28) **Wyss, S. R., Koster, J. F., & Halsmann, W. C.** : Choice of leukocyte preparation in the diagnosis of glycogen storage disease type II (Pompe's disease). *Clin. Chim. Acta*, **35**, 277 - 280 (1971)
- 29) **Leroy, J. G., & Crocker, A. C.** : I-cell disease : A clinical picture. *J. Pediat.*, **79**, 360 - 365 (1971)
- 30) **Walbaum, R., Dehaene, P., Scharfman, W., Farriaux, J. P., Tendeur, M., Vamos-Hurwits, E., Kint, J. A., & Van Hoof, F.** : La mucopolidose de type II (I-cell disease). *Arch. Franc. Ped.*, **30**, 572-592 (1973)
- 31) **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)
- 32) **Tanaka, T.** : The different composition of eight lysosomal enzyme in human peripheral lymphocytes and granulocytes. *Hiroshima J. of Med. Sci.* **27**, 4, 253-259 (1978)

A Comparative Study of Lysosomal Enzyme Activity in Peripheral Blood Leukocytes Populations (Granulocytes, Monocytes, and Lymphocytes) and Cultured Skin Fibroblasts: Clinical Utility of Lymphocytes populations for the Enzymatic Diagnosis of some Lysosomal Diseases. Hiroko Kawashima, Department of Pediatrics, (Director: Prof. N. Taniguchi), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920. — J. Juzen Med. Soc., **90**, 171–181 (1981).

Key words: inherited lysosomal storage diseases, lysosomal acid hydrolase, pH activity profile, Pompe's disease, I-cell disease

Abstract

Peripheral blood leukocytes have been separated into three fractions (granulocytes, monocytes, and lymphocytes). The mononuclear cell populations were isolated from heparinized whole blood on a Ficoll-Hypaque gradient after dextran sedimentation according to the methods of Snyder and Böyum. Adherent monocytes were obtained by incubating 1×10^7 unfractionated mononuclear cell populations suspended in RPMI 1640 containing 10% fetal bovine serum on 60×15 mm tissue culture dishes at 37°C for 1.5 hr. in the presence of 5% CO_2 . The dishes were vigorously washed with RPMI 1640, and nonadherent cells (lymphocytes) were collected. Monocytes were recovered from the surface of the tissue dishes with a rubber policeman. The granulocytes were obtained from the pellet of Ficoll-Hypaque gradient.

The six lysosomal acid hydrolase (α -glucosidase, α -galactosidase, β -galactosidase, β -glucuronidase, α -mannosidase, N-acetyl- β -glucosaminidase) were assayed in three leukocyte fractions and fibroblasts from normal individuals, Pompe's disease, and I-cell disease by the method of Hindman.

1) The pH activity profiles of α -glucosidase in monocytes, lymphocytes, and fibroblasts from normal control showed two pH optima, pH 4.5 and pH 6.5, but granulocytes one optimum, pH 6.5. The pH activity profiles of 4 enzymes (α -galactosidase, β -galactosidase, β -glucuronidase, N-acetyl- β -glucosaminidase) had one pH optimum, pH 5.0 and α -mannosidase, pH 4.5 in three leukocyte fractions and fibroblasts.

2) The activity of α -glucosidase in pH 3.0–pH 5.5 was deficient and decreased in pH 6.0–pH 8.0 in lymphocytes and fibroblasts, but normal in granulocytes from Pompe's diseases. But most reports so far showed normal or slightly decreased α -glucosidase activities in whole peripheral leukocytes from Pompe's disease. Our findings revealed the differences in activities in cell types, therefore, the results obtained with unfractionated total leukocyte samples from Pompe's diseases might vary according to the distribution of cell types, the methods used for separation of leukocytes from whole blood.

3) I-cell disease showed decreased activities of α -galactosidase, β -galactosidase, β -glucuronidase, and α -mannosidase in lymphocytes and fibroblasts but not in granulocytes and monocytes. Their activities in lymphocytes were 22%, 16%, 40%, 35% of the values in normal individuals respectively. The activities of α -glucosidase and N-acetyl- β -glucosaminidase were decreased in fibroblasts, but not in lymphocytes.

4) These results indicated that lymphocytes among leukocyte species might be most useful as a source of enzyme in diagnosis of several inherited lysosomal storage diseases, especially Pompe's disease and I-cell disease.