

ファブリー病を疑われる一症例の生化学的 的同定について

岡山大学医学部細菌学教室

藤井 順子・木口 健一郎・永田 哲英
狩山 玲子・平井 義一・金政 泰弘

岡山協立病院

小林 純

(昭和57年8月27日受稿)

Key words: Fabry's disease, Lipidosis
Hexosyl ceramide, Hereditary disease

結 言

ファブリー病は、1898年 Anderson¹⁾と Fabry²⁾によって、それぞれ独立に発表された疾患で、初めは皮膚の変化に注目され被角血管腫 (angiokeratoma) の一種と考えられた。しかし、その後の研究で遺伝性の全身病で、 α -galactosyl hydrolase の先天的欠損によりスフィンゴ糖脂質代謝に異常をきたす疾患で、諸臓器に tri-and dihexosyl ceramide が蓄積する病気であることが明らかにされた³⁻⁸⁾。従ってその確定診断には、 α -galactosyl hydrolase の酵素活性測定、あるいは蓄積脂質分析が必須であるとされている。我々は、今回主訴・臨床症状などからファブリー病を疑わせる患者に遭遇し、尿沈渣の脂質分析の結果からファブリー病と診断し得た症例について報告し考察を加えた。

症 例 概 略 ⁹⁾⁻¹¹⁾

症例は54才の女性で、下肢痛と眼瞼浮腫を主訴として入院した。既往歴と家族歴には特記すべきものはなかった。40才過ぎより四肢に針で刺すような疼痛と微熱が持続し、その頃から次第に陰毛や腋毛が減少してきた。また50才頃から乾性の咳も持続するようになった。入院時に

は体幹と四肢に表在性の telangiectasis (静脈拡張とその間にくもの巣様の毛細血管の拡張) の存在を認めた。入院時検査成績は表1に示すごとくであるが、腎機能不全 (特に汙過および濃縮不全)、代謝性アシドーシス、血清中の尿素窒素の上昇および甲状腺機能低下を示した。また静脈性腎盂造影により右腎萎縮が指摘され、骨X線検査では高度の全身性骨吸収像が認められた。さらに病理学的検査では、腎・腸骨骨髓および皮膚の生検を行ったが、図1 (腎生検) および図2 (骨髓生検) に示すごとくある種の蓄積病が示唆された。

尿 中 脂 質 分 析

尿よりの total lipid の分離

細菌の汚染を防ぐために100万unit/1日尿程度の Penicillin G を加え、嚴重に氷冷保存しつつ24時間尿を集めた。集めた尿は極力その日のうちに処理するべく pH 6.5~7.0 に調節して4℃で30分間15,000×g で遠心分離して沈渣を得た。この沈渣を更に生理的食塩水にて懸濁洗浄し、再度遠心分離した。沈渣は総量100 ml の methanol に懸濁し、抽出するまで-20℃に保存した。10日分の尿からの沈渣試料を用いて、以下 Desnick et al¹²⁾ の方法に従って CHCl₃-

Table 1 Summary of laboratory examinations of the patient.

I Urine	protein:(+) <1g/day, sediments:normal, Bence Jones:(-)
II Renal function test	GFR:37, RPF:207, RBF:273, FF:0.197, TRR:93 Tm_G :121, Ccr:37, C_K :10.7, TRP:43.8 PSP:15min 10%, 30min 16%, 60min 37%, 120min 39% Fishberg's concentration test:I SG 1.018, 316mOs II SG 1.018, 316mOs III SG 1.018, 359mOs
III Blood and serum	Blood:RBS 294×10^4 , Hb 9.7, Ht 29, WBC 4900 Chemistry:BUN 32.9, K 6.0, Ca 6.0, Cl 118, Fe 56 Gas:pH 7.30, pCO_2 18.3, pO_2 115.1, HCO_3^- 8.5, SaO_2 97.5, BE -16 GTT (50g) : before 90, 60min 202, 120min 123
IV Thyroid	T_3 : 0.4, T_4 : 4.0
V Immunochemistry	within normal limit

Abbreviations and units of the examinations are referred from "RINSHOKENSAHO TEIYO."¹¹⁾

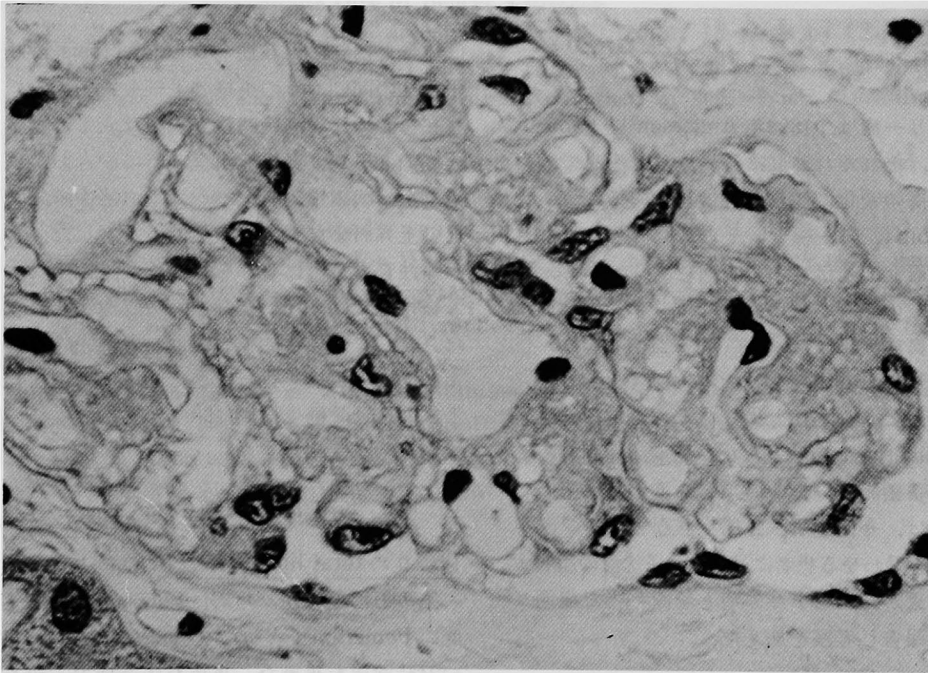


Fig. 1 Photomicrograph of a glomerulus by biopsy
(paraffin embedding, hematoxylin and eosin staining)

MeOHによるtotal lipid抽出を行った。なお対照として、正常健康男性四名の収集尿1.5ℓからも同様の方法でtotal lipid抽出を行った。赤血球からのtotal lipidの分離

尿中 glycolipid 同定のための標準比較物には、

Vance et al¹³⁾の方法に従い、赤血球の glycolipid を用いることとした。新鮮血 200 ml を 5000 rpm, 5分遠心し、更に同量の生理的食塩水を用いて同じ遠心により2回洗浄した。50ml のバックされた赤血球を用いて Vance et al¹³⁾

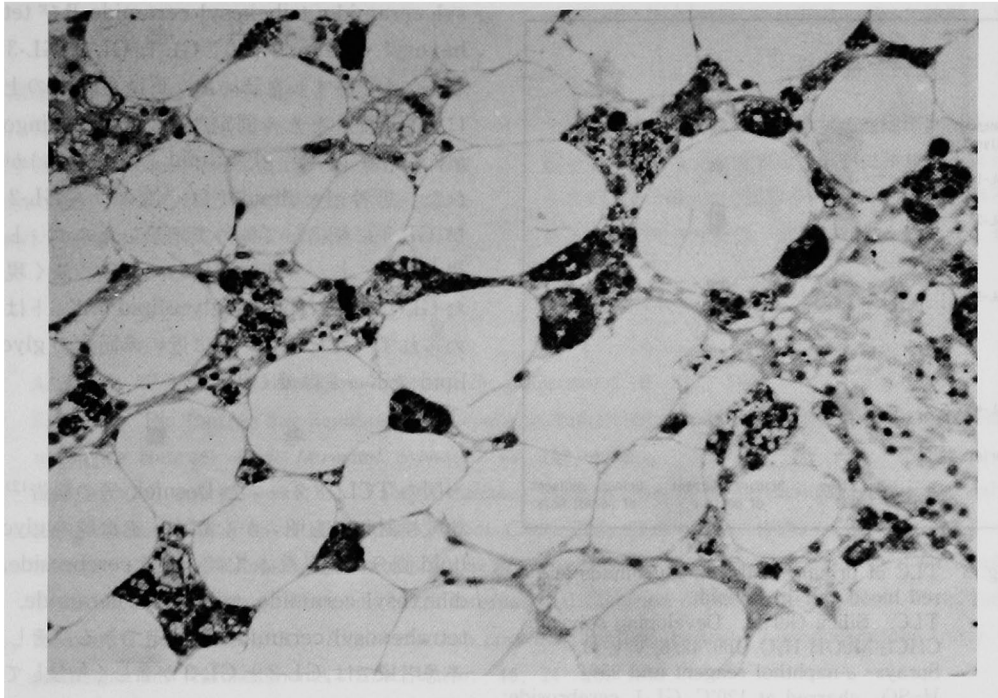


Fig. 2 Photomicrograph of a bone marrow of flank bone by biopsy (paraffin embedding, PAS staining)

Table 2 Analysis of urinary sediment lipids from patient with Fabry's disease and normal male

Urinary sediment	Volume of urine (l)	Total lipid		Glycolipid		
		Total mg	mg /l of urine	Total mg	mg/l of urine	% in total lipid
Patient	14.7	59.2	4.03	18.2	1.24	30.7
Normal male	1.50	3.50	2.33	1.15	0.77	31.4

の方法で $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$ による抽出で total lipid を得た。

Glycolipid の精製

患者の尿 (10日分, 14.7 l) から得られた total lipid は, Unisil カラムクロマトグラフィーで分画し, glycolipid 画分を精製した。すなわち 4 g の Unisil を $1 \times 10\text{cm}$ のカラムにパックし, chloroform で充分洗浄後, 1 ml の chloroform に溶かした total lipid 50mg をロードする。まず chloroform 50ml により neutral li-

pid を, 次に acetone 100ml で glycolipid を, 更に methanol 100ml で phospholipid の溶出分画を行った。正常人及び赤血球の total lipid からは, Vance et al¹³⁾ の方法に従って, ケイ酸カラムを用いて acetone-methanol (9 : 1) 溶出によって glycolipid 画分を得た。

Glycolipid の分画

Silica Gel H (Merk 社, Darmstadt) の薄層クロマトプレート (0.25mm, $20 \times 20\text{cm}$) に各々の glycolipid 画分をスポットし, chloro-

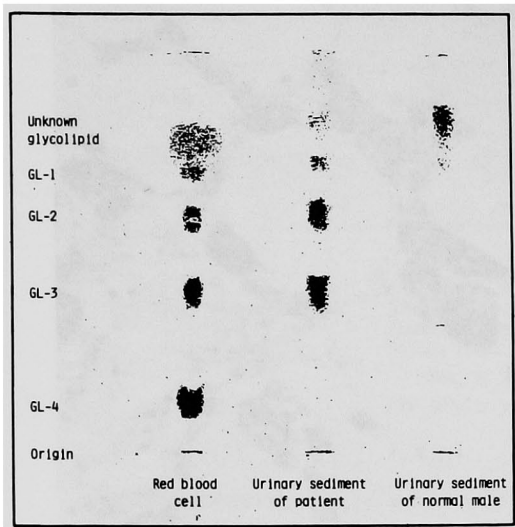


Fig. 3 TLC of urinary sediment glycolipids and red blood cell glycolipid. TLC: Silica Gel H, Developing solvent: CHCl_3 -MeOH- H_2O (100/42/6, v/v/v), Spray: α -naphthol reagent and 95% H_2SO_4 , charred at 120°C . GL-1, cerebroside; GL-2, dihexosyl ceramide; GL-3, trihexosyl ceramide; GL-4, tetrahexosyl ceramide.

form/methanol/water (100/42/6, v/v/v) による一次元展開で分画を行った¹³⁾. 各々の glycolipid スポットの検出は α -ナフトール法により行った¹⁴⁾.

結果

患者尿及び正常尿から分画した total lipid 量及び glycolipid 画分は表2に示す如くであった。患者尿は14.7 l を供試し、正常尿は1.5 l のみであったので、収量比較はやや誤差を含む可能性はあるが、患者尿において脂質量は著明に多い結果を得た。しかしこのうちの glycolipid の含有量は患者尿・正常尿共に約30%であって有意差は認められなかった。

Glycolipid 画分の分析は、シリカゲルプレート上で患者尿、正常尿及び赤血球の glycolipid を展開し比較した。スポットした量は尿からのものはそれぞれ1日尿由来相当の glycolipid であり、赤血球のものは約3 mg をスポットした(図3)。標準比較物としての赤血球 glycolipid には、典型的な赤紫色を呈した sphingoglycolipid の4スポット、即ち cerebroside, dihexo-

syl ceramide, trihexosyl ceramide 及び tetrahexosyl ceramide (以下 GL-1, GL-2, GL-3 及び GL-4 と略す) を認めた。更に GL-1 の上部に青色調を示した未同定のスポット (sphingoglycolipid 以外の glycolipid と考えられる) が現れた。患者 glycolipid には、このうち GL-2 及び GL-3 に相当して極めて増量したスポットが得られた。しかし正常尿においては、淡く現れた GL-1 以外の sphingoglycolipid スポットは認められず、ただフロントに近い未同定の glycolipid スポットは濃く現れた。

考 察

図の TLC パターンと Desnick 等の報告¹²⁾と比較検討しても明らかな如く、赤血球の glycolipid 画分に現れた4スポットは cerebroside, dihexosyl ceramide, trihexosyl ceramide, tetrahexosyl ceramide と同定できる。そして本患者尿では、GL-2 と GL-3 が著しく増量しており、正常人尿のそれと比較して明らかにファブリー病と同定してよいと思われる。

ちなみにファブリー病は X染色体(性染色体)上に位置する α -galactosyl hydrolase の欠損による劣性遺伝の形式をとる全身病である⁷⁾。従って半接合体(男性)の場合は症状は著明であるが、ヘテロ接合体(女性)の場合はこれらの症状は軽く、しかも生涯のうち一定年齢経過後におこると考えてよく、本患者の症状が中年以後に発症し軽度であったのは充分妥当と思われる。なお本患者は検査の中途(1980年、11月)に尿毒症症状が急速に悪化して他界したため、 α -galactosyl hydrolase 活性の測定ができなかったし、病理解剖の承諾も得られなかった。なお家族歴では、親・同胞には見るべきものがない。すなわち子供の四子(三男一女)のうち、女子一人に軽度の蛋白尿が認められたが、ファブリー様症状は現在のところ認められていない。また発症の可能性大と考えられる男子にも、十分な診察、検査の機会が得られないので正確なことは言えないが、幸いなことにファブリー様の症状も徴候も現れていない。

結 論

眼瞼浮腫・蛋白尿・下肢痛のような症状を呈し、腎生検で泡沫細胞を認めた患者において、尿中脂質中に dihexosyl ceramide, trihexosyl ceramide の著明な増加を認めたので、 α -galactosyl hydrolase 欠損による tri- and dihexosyl

ceramide lipidosis (ファブリー病) と診断した。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本患者の病理標本所見にご教示を頂いた協立病院豊田博士に深甚の謝辞を表します。また種々のご援助をいただいた教室の諸兄弟および香川医大林教授、岡部助教授に感謝致します。

文 献

1. Anderson, W.: A case of angiokeratoma. *Br. J. Dermatol.* **10**, 113, 1898.
2. Fabry, J.: Ein Beitrag zur kenntnis der Purpura haemorrhagica nodularis (Purpura papulosa haemorrhagica Hebrae). *Arch. Dermatol. Syphilol.* **43**, 187, 1898.
3. Sweeley, C.C. and Klionsky, B.: Fabry's disease: classification as a sphingolipidosis and partial characterization of a novel glycolipid. *J. Biol. Chem.* **238**, 3148—3150, 1963.
4. Sweeley, C.C. and Klionsky, B.: *Fabry's Disease: the Isolation and Characterization of a Ceramide-Trihexoside from Kidney*. Abstracts, Sixth International Congress of Biochemistry, New York, 1964.
5. Kremer, G.J. and Denk, R.: Angiokeratoma corporis diffusum (Fabry). Lipoidchemische Untersuchungen des Harnsediments. *Klin. Wschr.* **46**, 24—26, 1968.
6. Philippart, M., Sarlieve, L. and Manacorda, A.: Urinary glycolipids in Fabry's disease: their examination in the detection of atypical variants and the presymptomatic state. *Pediatrics* **43**, 201—206, 1969.
7. Brady, R.O., Gal, A.E., Bradley, R.M., Martensson, E., Warshaw, A.L. and Laster, L.: Enzymatic defect in Fabry's disease: ceramide trihexosidase deficiency. *N. Engl. J. Med.* **276**, 1163—1167, 1967.
8. Desnick, R.J., Klionsky, B. and Sweeley, C.C.: Fabry's disease (α -Galactosidase A Deficiency). In *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, 4th Ed. ed. Stanbury, J.B., Wyngaarden, J.B. and Fredrickson, D.S., McGraw-Hill Book Company, New York, pp. 810—840, 1978.
9. 藪内百治: 先天性脂質代謝異常. 内分泌・代謝 **3**, 鎮目和夫・井村裕夫編, メジカルビュー社, 東京, p. 86, 1979.
10. 鈴木義之: 先天性脂質蓄積症. 脂質代謝異常のすべて (内科シリーズ No.34), 高橋善彌太編, 南江堂, 東京, p. 187, 1979.
11. 金井 泉, 金井正光編: 臨床検査法提要, 第27版, 金原出版, 東京, 1975.
12. Desnick, R.J., Sweeley, C.C. and Krivit, W.: A method for the quantitative determination of neutral glycosphingolipids in urine sediment. *J. Lipid Res.* **11**, 31—36, 1970.
13. Vance, D.E. and Sweeley, C.C.: Quantitative determination of the neutral glycosyl ceramides in human blood. *J. Lipid Res.* **8**, 621—630, 1967.
14. Siakotos, A.N. and Rouser, G.: Analytical separation of nonlipid water soluble substances and gangliosides from other lipids by dextran gel column chromatography. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **42**, 913—919, 1965.

**Identification of sphingoglycolipids in a patient
regarded as having Fabry's disease.**

**Junko FUJII, Kenichiro KIGUCHI, Akihide NAGATA, Reiko KARIYAMA,
Yoshikazu HIRAI, Yasuhiro KANEMASA and Jun KOBAYASHI ***

**Department of Microbiology, Okayama University Medical School
and *Okayama Kyoritsu Hospital**

Fabry's disease is one of the inherited diseases, in which sphingoglycolipids accumulate systemically in tissue as the result of defective α -galactosyl hydrolase. In this paper, we studied a 54 year-old female who had complaints of leg pain, palpebral edema and telangiectasis and in whom foam cells in renal biopsy as well as proteinuria in urinalysis were revealed. As an increase of sphingoglycolipids was discovered in her urinary sediment by biochemical analysis, this patient was shown to be suffering from Fabry's disease.