

G<sub>M1</sub>-Gangliosidosis の Heterogeneity に関する研究

菊地 浩一

札幌医科大学小児科学講座 (主任 中尾 亨教授)

Studies on Heterogeneity in G<sub>M1</sub>-Gangliosidosis

Koichi KIKUCHI

Department of Pediatrics, Sapporo Medical Collage  
(Chief: Prof. T. Nakao)

The activity of G<sub>M1</sub>-β-galactosidase in leukocytes and in lymphoblastoid cell lines transformed by Epstein-Barr virus, from five patients with reduced β-galactosidase activity and their parents, was assayed with G<sub>M1</sub>-ganglioside tritiated in the terminal galactose. Moreover, an analysis of brain ganglioside was performed in two autopsy cases and an affected fetus.

The activity of G<sub>M1</sub>-β-galactosidase in leukocytes and lymphoblastoid cells from four cases was profoundly deficient, and their parents were found to be carriers of obligate heterozygotes. Accordingly, these patients were diagnosed as G<sub>M1</sub>-gangliosidosis.

The activity in leukocytes from a case showed about 6% of the control level and the activity in lymphoblastoid cells was enhanced to a level of about 70% of the control.

Although his mother showed the levels of carriers in both samples, the levels of his father were normal. This patient was similar to sialidosis type II with a secondary β-galactosidase defect on the clinical and biochemical findings. However, there are several questionable points at present with regard to the procedures of sialidase assay and further studies into these problems are necessary.

On the analysis of the two cases of gangliosides in the brain affected by G<sub>M1</sub>-gangliosidosis and the brain of the affected fetus, it was suggested that the degree of G<sub>M1</sub>-ganglioside accumulated was not proportionally related to the level of G<sub>M1</sub>-β-galactosidase activity and the content of G<sub>M1</sub>-ganglioside in the affected fetal brain was similar to the control level.

(Received May 16, 1980 and accepted August 25, 1980)

## 1 緒 言

Mucopolipidosis の代表的な疾患である G<sub>M1</sub>-gangliosidosis は、常染色体劣性の遺伝形式をとる致死的な疾患で、本症の診断は諸臓器で G<sub>M1</sub>-ganglioside の蓄積、G<sub>M1</sub>-β-galactosidase 活性の欠損を証明することによってなされる。

現在 G<sub>M1</sub>-gangliosidosis は臨床症状より2つの型に分類されている。つまり新生児期に発症して2歳前後に死亡する infantile type (type I) と、乳児期後半に発症して3~10歳前後に死亡する juvenile type (type II) である<sup>1)</sup> (Table 1)。

しかしながら、両者の臨床症状はかなり overlap しており、両者の中間型や、これらの表現型に合致せず G<sub>M1</sub>-β-galactosidase 欠損の程度が異なる症例も報告され、G<sub>M1</sub>-gangliosidosis との異同が問題となっている<sup>1)</sup>。

著者は、5家系の β-galactosidase および G<sub>M1</sub>-β-galac-

Table 1 Major clinical features of G<sub>M1</sub>-gangliosidosis

	Type I (infantile)	Type II (juvenile)
Age at onset of symptoms	Birth	6-20 mo
Age at death,	½-2 yr	3-10 yr
Mental/motor retardation	+	+
Facial appearance	Coarse	Normal
X-ray change, long bone	+	-
X-ray change, vertebrae	+	Mild
Vacuolated lymphocytes	+	+
Foam cells in bone marrow	+	+
Hepatosplenomegaly	+	-
Cherry-red spots	50%	-
Seizure	+	+
Macrocephaly	Rarely	-
Neuronal lipidosis	+	+
Glomerular epithelial ballooning	+	+
Mucopolysacchariduria	+	+

O'Brien によるのを一部改変<sup>1)</sup>

tosidase 活性の低下を伴う患者およびそれらの両親由来の末梢白血球と、末梢リンパ球に Epstein-Barr virus (EBV) を感染させて得られたリンパ芽球様細胞を酵素源とし、本症患者剖検脳より精製した GM<sub>1</sub>-ganglioside を基質として、GM<sub>1</sub>-β-galactosidase 活性を、および 4-methylumbelliferyl (4 MU)-β-D-galactopyranoside を基質として、4 MU-β-galactosidase 活性を測定した。

また GM<sub>1</sub>-gangliosidosis の 2 症例および 1 胎児例の剖検材料を用いて生化学的検索を行う機会を得たので、肝の酵素活性、脳の GM<sub>1</sub>-ganglioside 蓄積の程度、表現型の関係について考察を加え合わせて報告する。

## 2 研究対象および方法

### 2.1 研究対象

5 家系の β-galactosidase および GM<sub>1</sub>-β-galactosidase 活性低下を伴う 5 症例と 1 胎児例、およびそれらの両親である。患児 5 例の臨床症状は Table 2 に示すごとくである。症例 V はかつて Orii *et al.*<sup>2)</sup> により a new type of mucopolipidosis として報告された症例である。

### 2.2 研究材料

末梢白血球は、ディスポ注射器を用いてヘパリン加静脈血を 10 ml 採血し、針先を上にして室温で約 1 時間放置後、分離した上層を遠心管に移し 700×g で 10 分間遠心した。上澄みは捨て、沈渣 (白血球) に混入している赤血球を除くため、蒸留水 3.0 ml 加えて 40 秒間よく攪拌してから 3.6% 塩化ナトリウム液を 1.0 ml 加えて 700×g にて遠心し、沈渣を生理的食塩水で 2 回洗浄して得られた白血球を分析まで -70°C にて保存した。

リンパ芽球様細胞は Minami *et al.* の方法<sup>3)</sup> に従って採取した。すなわち、末梢ヘパリン加静脈血を 2~3 ml 採

血し、Ficoll-Conray にてリンパ球を分離する。

このリンパ球を培養液 (streptomycin 100 μg/ml と penicillin 100 単位/ml および 20% 胎児ウシ血清を含んだ RPMI 1640) で 2 回洗浄し、この培養液に細胞数 1.2×10<sup>6</sup>/ml となるように浮遊させる。培養液 0.8 ml に B95-8 株の EBV の培養液 0.2 ml を加えて培養すると、数週以内にリンパ球はトランスホームし、リンパ芽球様細胞が樹立される。このリンパ芽球様細胞を 4~5 日毎に subculture してゆけば、無制限の増殖が生じる。

このようにして得られたリンパ芽球様細胞を遠沈し、沈渣を生理的食塩水で 2 回洗浄し、測定まで -70°C で保存した。

脳および肝は死後 4 時間以内に採取し、分析まで -70°C で保存した。対照脳および肝は、神経疾患を有していない剖検材料より、また対照胎児の脳および肝は、社会経済的理由により人工中絶した胎児より得た。

### 2.3 研究方法

#### 2.3.1 脳 ganglioside の抽出

脳は剖検後すみやかに -70°C にて凍結保存されたもので使用直前に融解させ、血管・結合などを注意深く取り除いたものを用いた。

脂質の抽出の大意は Folch 法<sup>4)</sup> に従った。

すなわち、脳をホモジナイズし、19 倍容量のクロロホルム:メタノール (2:1, v/v) を加えて一晚室温に放置後濾過した。Suzuki の方法<sup>5)</sup> にて残渣に 5% の水を加え、さらに 10 倍容量のクロロホルム:メタノール (1:2, v/v) で 2 回目の抽出を行った。それぞれの濾液を合わせ、クロロホルム:メタノール (2:1, v/v) となるようにクロロホルムを適量量加えた。

これに 0.1 M KCl 溶液を 0.2 倍容量加え振盪後 2 相に

Table 2 Clinical manifestations of five cases with the reduced β- and GM<sub>1</sub>-β-galactosidases

Case	I	II	III	IV	V
Onset (yr)/Sex	6 mo/M	1 yr 4 mo/M	1 yr 6 mo/M	7 mo/M	3 yr/M
Age at death	2 yr 9 mo	11 yr 2 mo	alive (5 yr)	alive (2 yr)	alive (24 yr)
Mental retardation	severe	severe	severe	severe	slight
Abnormal face	+	-	-	+	+
Bone change	severe	slight	severe	severe	mild
Vacuolated lymphocytes	+	+	+	+	+
Hepatosplenomegaly	+	-	-	+	-
Cherry-red spot	-	-	-	+	+
Seizure	tonic-clonic	tonic-clonic	tonic-clonic	tonic-clonic	myoclonus
Consanguinity	-	+	-	-	+

分配した。分配後、上層を除いてから下層を 0.05 M KCl を含む pure solvent upper phase, KCl 塩を含まない pure solvent upper phase で 2 回洗い、先の上層と合わせてクロロホルムを除き、4°C で充分透析し凍結乾燥して、粗 ganglioside 画分とした。

### 2.3.2 ganglioside 分画の定量

得られた ganglioside 画分は、一定量のクロロホルム：メタノール (2:1, v/v) に溶解し、Suzuki のレゾルシノール法変法<sup>6)</sup>で総 N-acetylneuraminic acid (以下 NANA と略) を定量した。

NANA 量で 20  $\mu$ g の ganglioside 画分を、厚さ 0.25 mm の silica gel G (Merk 社) プレートにスポットし、クロロホルム：メタノール：2.5 N アンモニア (60:40:9, v/v) で 2 回クロマトグラフィーを行った後、短時間ヨード蒸気に曝して各分画を識別した。各分画の識別後ヨード蒸気を完全に除き、それぞれの分画をプレートよりかき出し、小遠心管に取り、silica gel を含んだまま NANA を定量した。

### 2.3.3 G<sub>M1</sub>-ganglioside 分画の抽出

上記方法にて ganglioside 分画を識別したのち、ヨードを完全に除き、G<sub>M1</sub>-ganglioside 分画をプレートよりかき出し、珪酸カラムクロマトグラフィーで、クロロホルム：メタノール：蒸留水：ピリジン (40:56:12:2, v/v) にて溶出した。得られた濃液よりクロロホルムを除き、4°C 下で充分透析し凍結乾燥して、G<sub>M1</sub>-ganglioside 分画とした。

### 2.3.4 <sup>3</sup>H-G<sub>M1</sub>-ganglioside の合成

大要は Radin *et al* の方法<sup>7)</sup>に従った。

得られた G<sub>M1</sub>-ganglioside 50 mg に、再蒸留したテトラヒドロフラン 4.0 ml, 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.0) 4.0 ml を加えて充分混和後、galactose oxidase (Sigma 社) 450 単位を加えて室温で 3 時間放置、再び同酵素を同量加えて一晩攪拌した。

さらに 5 倍容量のクロロホルム：メタノール (2:1, v/v) を加えて振盪し、2 相に分配した。分配後上清を除き、下層を塩を含むおよび塩を含まない pure solvent upper phase で洗い、先の上層と合わせて濃縮し、クロロホルムを除いて 4°C 下で充分透析し凍結乾燥した。

得られた G<sub>M1</sub>-ganglioside は、テトラヒドロフラン 4.0 ml に溶解し、蒸留水 1.0 ml を加えた後 <sup>3</sup>H-sodium borohydride (New England Nuclear Corp. Boston, Mass.) 50 mCi を含む 0.1 N 苛性ソーダ 0.33 ml を加えて室温にて一晩攪拌した。さらに 10 mg の sodium borohydride を加えて 2 時間攪拌後、10 N 酢酸にて余分な sodium borohydride を除去した。

テトラヒドロフランを除いた後、5 倍容量のクロロ

ホルム：メタノール (2:1, v/v) を加え、先の pure solvent upper phase を用いた操作で上層を採取し、濃縮して透析・凍結乾燥を行った。

得られた <sup>3</sup>H-G<sub>M1</sub>-ganglioside は、再び silica gel G プレートによる薄層クロマトグラフィーにて分画され、溶出後透析・凍結乾燥された。

最終的には、<sup>3</sup>H-G<sub>M1</sub>-ganglioside の比活性は 4500 cpm/nmole であった。

### 2.3.5 <sup>3</sup>H のガラクトースへの取り込み

<sup>3</sup>H のガラクトースへの取り込みを調べるために以下の操作を行った<sup>8)</sup>。

<sup>3</sup>H-G<sub>M1</sub>-ganglioside の一定量を 1 N 塩酸とともに密封試験管で 100°C 16 時間加熱した。蒸発乾固後、クロロホルム：メタノール：蒸留水 (10:10:3, v/v) に溶解し、Whatman 3 MM を用いペーパークロマトグラフィー [エチルアセテート：ピリジン：酢酸：蒸留水 (5:5:1:3, v/v)] を行った。

対照として、グルコース、ガラクトース、グルコサミン、ガラクトサミンを用い silver nitrate-NaOH 法にて発色後、1 cm 幅に細断して液体シンチレーションカウンター (LK-250, USA) にて測定した。その結果、全カウントの 85% がガラクトースへ、5% がグルコースへ取り込まれていた。

### 2.3.6 酵素試料の作製

末梢白血球およびリンパ芽球様細胞を 4°C の蒸留水に浮遊させ、30 秒間超音波処理 (cell disrupter 200, Branson 社) し酵素源とした。

肝は 16 倍容量の 4°C 蒸留水を加えてホモジナイズし、1 分間超音波処理したあと、100,000×g 1 時間超遠心 (日立分離用超遠心機 65 P, 日立工機社) 後の上清を使用した。

### 2.3.7 G<sub>M1</sub>- $\beta$ -galactosidase 活性の測定

肝の G<sub>M1</sub>- $\beta$ -galactosidase 活性は Kudoh の方法<sup>9)</sup>に従った。

すなわち、酵素液 0.05 ml (蛋白質 25~30  $\mu$ g) と <sup>3</sup>H-G<sub>M1</sub>-ganglioside 9 nmole, sodium taurocholate (和光純薬) 0.5 nmole, 0.1 M NaCl を含む 0.1 M citrate phosphate buffer (pH 4.5) 10 nmole を混合し、最終容量を 0.15 ml として 37°C 30 分インキュベート後、100°C 2 分間放置し、10 mM ガラクトース 1.0 ml を加えて反応を止めた。

<sup>3</sup>H-G<sub>M1</sub>-ganglioside より遊離した <sup>3</sup>H-ガラクトースは Dowex 50 W × 8 (H<sup>+</sup> form) 100 mg, Amberlite CG-4 B (OH<sup>-</sup> form) 100 mg を加えて 1500×g 20 分間遠心して他の反応生成物より分離した。そして遠心上清 0.5 ml に scintillation count solution (トルエン 1,000 ml,

PPO 4.0 g, POPOP 0.1 g, Triton X-100 500 ml) 5.0 ml 加え, Beckman LS-250 液体シンチレーションカウンタにてカウントした. なお quenting の補正は, automatic external standard technique によった.

白血球, リンパ芽球様細胞の G<sub>M1</sub>-β-galactosidase 活性の測定は, 少しかえて行った. すなわち, <sup>3</sup>H-G<sub>M1</sub>-ganglioside, sodium taurocholate を各々 3 倍量用い, また酵素液は蛋白量として 100 μg を用いた. 他の操作は肝の場合と同様である.

### 2.3.8 β-galactosidase 活性の測定

β-galactosidase は, 4-methylumbelliferyl (4 MU) substrate (Koch-Light 社) を使用して測定した.

すなわち, 0.1 ml の酵素液に 0.1 M citrate phosphate buffer (pH 4.0) に溶かした 0.5 ml の 0.8 mM 4 MU-β-D-galactopyranoside を加え 37°C 60 分インキュベートし, 3.0 ml の 0.25 M glycine buffer を加えて反応を止め, 遊離した 4-methylumbelliferone を日立蛍光分光光度計 (model MPE-4) で, 励起波長 365 mμ, 蛍光波長 450 mμ で測定した.

### 2.3.9 Sephadex G-150 による肝酵素液のゲル濾過

肝酵素液を Sephadex G-150, カラム (1.8×93 cm) に添加し, 0.05 M sodium phosphate buffer (pH 7.0) で溶出した. 4°C 下で流速 15 ml/h, 2.0 ml 毎に分取し, おおのこのフラクションについて, 上記方法で β-galactosidase 活性を測定した.

なお蛋白量の測定は Lowry 法<sup>10)</sup> に従った.

## 3 結 果

### 3.1 脳 ganglioside 分析

Table 3 は, 症例 I, II および家系 III の胎児の脳 ganglioside 分析を, 正常小児脳との比較で示したものである.

症例 I は, シアル酸含量として 1.62%/dry weight で正常小児脳の約 4 倍の蓄積を認めるが, 症例 II は 0.65%/dry weight で約 1.5 倍程度であった.

しかし症例 I, II とも ganglioside 分画パターンは類似

しており, G<sub>M1</sub>-ganglioside 分画が正常小児脳に比して約 3 倍以上の割合を占めていた. 胎児脳では, G<sub>M1</sub>-gangliosidosis 胎児脳, 対照脳とも総 ganglioside 量に大きな差はなく, また分画にも違いは認められなかった. 正常小児脳と対照胎児脳では, 後者で総 ganglioside 量が約 30% 少く, また G<sub>M1</sub>-ganglioside 分画の割合は, 正常小児脳が 20.9% と対照胎児脳の 12.7% より多く, 逆に G<sub>M2</sub>-ganglioside 分画の割合が 3.6% と対照胎児脳の 6.5% に比して少かった.

### 3.2 β-galactosidase および G<sub>M1</sub>-β-galactosidase 活性について

酵素源として白血球を用いると, 蛋白量 150 μg まで G<sub>M1</sub>-β-galactosidase 活性は直線的であった. (Fig. 1)

正常者の白血球・リンパ芽球様細胞を用いて G<sub>M1</sub>-β-galactosidase の K<sub>m</sub> を測定したところ, それぞれ 1.0×10<sup>-4</sup>, 1.1×10<sup>-4</sup> M ではほぼ一致していた. なお症例 V のリンパ芽球様細胞の K<sub>m</sub> は, 2.0×10<sup>-4</sup> M で, 正常者のそれと大きな違いはなかった. (Fig. 2 a-c)

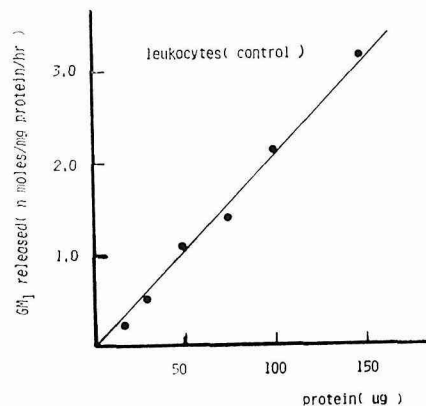
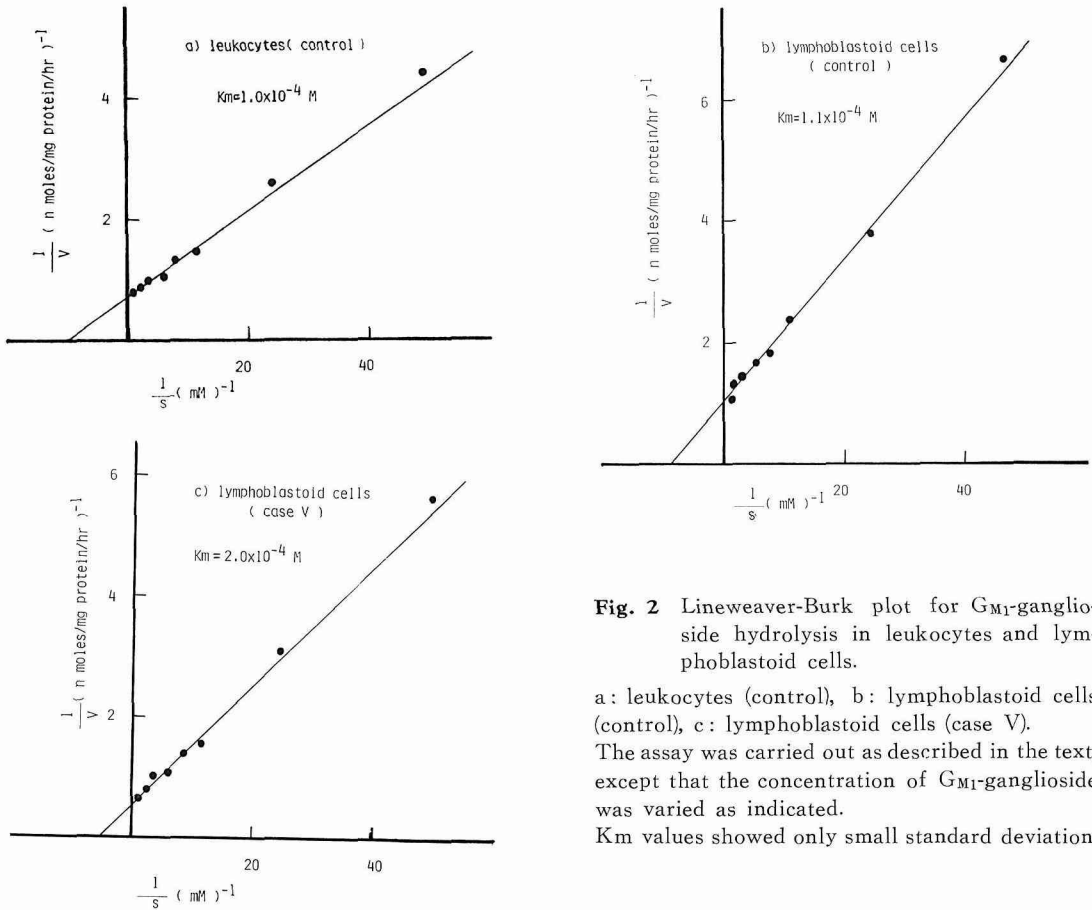


Fig. 1 Effect of amount of protein as enzyme source.

Activity was linear with increasing enzyme concentration from 25 to 150 μg of leukocyte protein.

Table 3 Composition of gangliosides in brain

Brain	Total NANA (%/dry wet.)	Distribution of NANA (%)					
		G <sub>T</sub>	G <sub>D1b</sub>	G <sub>D1a</sub>	G <sub>M1</sub>	G <sub>M2</sub>	G <sub>M3</sub>
Case I	1.62	6.3	5.3	9.8	73.2	1.7	3.7
Case II	0.65	4.9	6.1	15.6	65.2	4.7	3.5
Control (n=2)	0.41	18.1	11.9	42.6	20.9	3.6	2.9
Fetus (Family III)	0.37	29.5	14.5	35.0	12.5	6.5	2.0
Fetal control (n=5)	0.28	20.3	11.9	42.3	12.7	6.5	6.3



**Fig. 2** Lineweaver-Burk plot for G<sub>M1</sub>-ganglioside hydrolysis in leukocytes and lymphoblastoid cells.

a: leukocytes (control), b: lymphoblastoid cells (control), c: lymphoblastoid cells (case V). The assay was carried out as described in the text, except that the concentration of G<sub>M1</sub>-ganglioside was varied as indicated. Km values showed only small standard deviation.

**Table 4** G<sub>M1</sub>-β-galactosidase activity and 4 MU-β-galactosidase activity in leukocytes

a) G <sub>M1</sub> -β-galactosidase activity					
Family	I	II	III	IV	V
Patient	N. S.	N. S.	0.5 (1.5)	0 (0)	2.0 (6.0)
Father	17.0 (50.7)	26.0 (77.6)	16.4 (50.0)	26.4 (78.8)	35.1 (104.8)
Mother	16.7 (49.9)	20.9 (62.4)	17.9 (53.4)	14.8 (49.2)	23.3 (69.6)
	control (n=10)		mean 33.5	range 24.6-53.9	
b) 4 MU-β-galactosidase activity					
Family	I	II	III	IV	V
Patient	N. S.	7.7 (4.9)	6.3 (4.0)	3.3 (2.1)	9.3 (6.0)
Father	64.6 (41.4)	94.6 (60.6)	73.4 (47.0)	83.0 (53.1)	105.2 (67.3)
Mother	79.4 (50.8)	87.5 (56.0)	70.9 (45.4)	46.7 (29.9)	82.8 (53.0)
	control (n=10)		mean 156.2	range 120-265	

Activities are expressed as nanomoles per mg protein per hour. The figures in parenthesis indicate percent of the mean activity in the control. N. S., not studied.

**Table 5** GM<sub>1</sub>-β-galactosidase activity and 4 MU-β-galactosidase activity in lymphoblastoid cells

a) GM <sub>1</sub> -β-galactosidase activity					
Family	I	II	III	IV	V
Patient	N. S.	0.48 (3.0)	0.74 (4.6)	0 (0)	11.2 (68.3)
Father	N. S.	5.0 (30.5)	7.7 (47.0)	5.8 (35.4)	10.9 (66.5)
Mother	N. S.	6.4 (39.0)	8.2 (50.0)	10.9 (66.5)	12.9 (77.4)
	control (n=7)		mean 16.1	range 12.9-19.4	
b) 4 MU-β-galactosidase activity					
Family	I	II	III	IV	V
Patient	N. S.	1.1 (1.4)	1.0 (1.3)	N. S.	30 (38.0)
Father	N. S.	43 (54.4)	32 (40.1)	N. S.	93 (117.6)
Mother	N. S.	29 (36.7)	47 (59.7)	N. S.	68 (86.1)
	control (n=20)		mean 79	range 46-109	

Activities are expressed as nanomoles per mg protein per hour.

The figures in parenthesis indicate percent of the mean activity in the control.

N. S., not studied.

**Table 6** GM<sub>1</sub>-β-galactosidase activity in liver

Case I	0.2 (0.1)		
Case II	0.48 (0.2)	Control (n=5)	220
		range	150-310
Fetus (Family III)	1.37 (1.1)		
		Control (n=5)	126
		range	60-176

Activities are expressed as nanomoles per mg protein per hour.

The figures in parenthesis indicate percent of the mean activity in the control.

末梢白血球の, β-galactosidase および GM<sub>1</sub>-β-galactosidase 活性は (Table 4 a, b), 家系 I~IV で患児は正常者平均値の5%以下であり, 両親は, 患児と正常者平均値の中間の値を示し保因者と考えられた. 症例 V は, それぞれの値は正常者平均値の6%であり, また母親は保因者の値を示した. しかしながら父親は β-galactosidase は保因者の値を示したが, GM<sub>1</sub>-β-galactosidase は正常の値を示した.

リンパ芽球様細胞の GM<sub>1</sub>-β-galactosidase は (Table 5 a), 家系 II, III, IV で, 患児は5%以下, 両親は保因者値を示している.

症例 V は, 68%と上昇しているが, 両親は保因者値を示していた.

β-galactosidase は (Table 5 b), 家系 II, III で, 患児は2%以下, 両親は保因者値を示しているが, 家系 V では患児は38%と上昇し, 両親は正常値を示していた.

肝の GM<sub>1</sub>-β-galactosidase 活性は (Table 6), 患児と GM<sub>1</sub>-gangliosidosis 胎児例とも正常平均値の約1%以下であった.

### 3.3 肝の β-galactosidase のゲル濾過

パターンについて (Fig. 3 a-c)

正常例では β-galactosidase は3つの Peak (I, II, III) に分かれ, Peak I, II に比して III は約1/2の高さであった.

症例 I では, 正常パターンに比して小さな Peak I および III が認められるが, 症例 II では Peak III のみで Peak I, II は認められなかった.

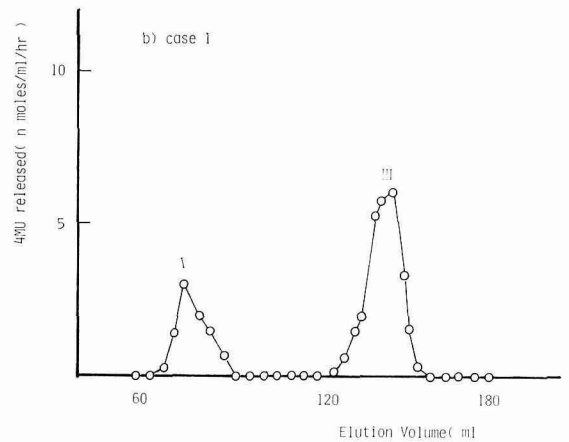
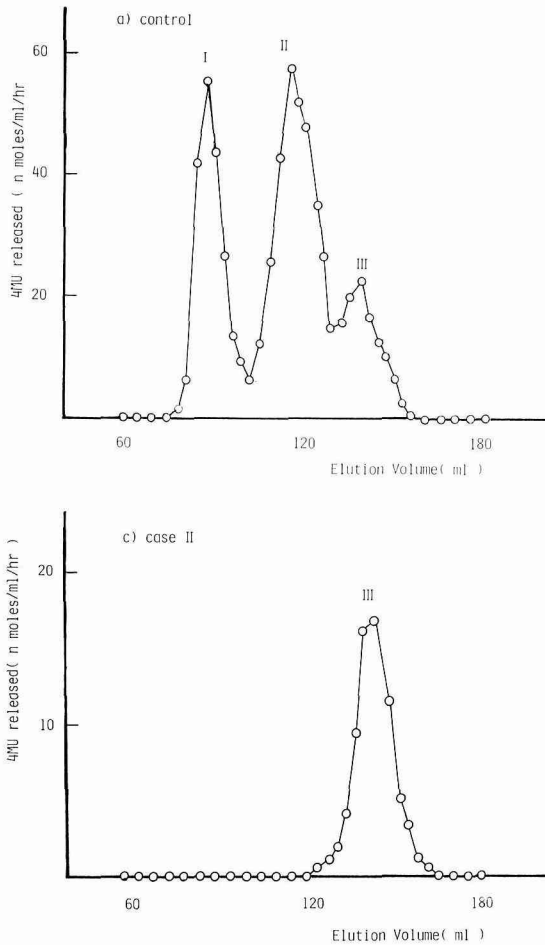


Fig. 3 Gel filtration patterns of liver 4 MU- $\beta$ -galactosidase.

a: control, b: case I, c: case II.

The enzyme source was applied to a Sephadex G-150 column (1.8 $\times$ 93 cm) and eluted with 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0).

Fractions of 2.0 ml were collected at a flow rate of 15 ml/hr. Activity was assayed according to the method described in the text.

一方, type I と II の酵素学的な差を見いだそうとして,  $\beta$ -galactosidase の等電点分画, ゲル電気泳動および Sephadex のゲル濾過による isoenzyme 分析<sup>15)</sup> が試みられているが, 現在のところ両 type 間の酵素学的相違について, 一致した見解は得られていない。

また, 脳における ganglioside の蓄積については, 両 type とも脳灰白質中の ganglioside の 70% 以上が  $G_{M1}$  である<sup>16)</sup> ことがわかったが, 両 type 間の蓄積の程度については今ははっきりしていない。

さらに  $\beta$ -galactosidase 欠損のため, 脳や肝に keratan like substance に類似したガラクトースを含む糖蛋白や, ガラクトースを含むオリゴ糖の蓄積が報告されているが, その量は症例により異なるようである<sup>17)</sup>。

著者の症例において, 症例 I と IV は臨床的に, cherry-red spots を除けば type I と II の中間型に属すると思われる, また症例 II と III は骨変化に違いはあるが類似しており, 臨床的には type II に属すると思われる。

酵素学的に症例 I~IV は, 末梢白血球・リンパ芽球様細胞とも  $G_{M1}$ - $\beta$ -galactosidase および 4 MU- $\beta$ -galactosidase は正常者平均値の 5% 以下であり, また両親の総活性はいずれも保因者の値を示し, 家系間では全く区別しえなかった。

Sephadex G-150 ゲル濾過による肝の  $\beta$ -galactosidase 活性パターンは, 正常では Peak (I, II, III) に分かれ, Peak

## 4 考 按

### 4.1 $G_{M1}$ -ganglioside の蓄積と $G_{M1}$ - $\beta$ -galactosidase 活性の関係

Ganglioside の代謝異常症である  $G_{M1}$ -gangliosidosis が始めて報告されたのは, 1959 年であり<sup>11)</sup>,  $G_{M2}$ -gangliosidosis (Tay-Sachs 病) が 1881 年に最初に報告された<sup>1)</sup> のに比して, つい最近のことである。

その後の研究により, 蓄積している  $G_{M1}$ -ganglioside の同定<sup>12)</sup>,  $G_{M1}$ - $\beta$ -galactosidase と  $\beta$ -galactosidase の欠損が発見され<sup>13)</sup>, 現在は羊水穿刺による出生前診断<sup>14)</sup> も行なわれている。

現在  $G_{M1}$ -gangliosidosis は臨床的に 2 つの型に分類されており, この両者は, 発症年齢・cherry-red spots の有無・Hurler 症候群を思わせる顔貌の有無・肝脾腫の有無および骨変化の程度により区別されているが, しばしば両 type の特徴を有し分類困難で, 両者の中間型とされている症例もある。

I, II は至適 pH を酸性側に持ち, G<sub>M1</sub>-ganglioside を分解する. 一方 Peak III は中性側に至適 pH を持ち, ガラクトースを含んだ糖蛋白を分解するが, G<sub>M1</sub>-ganglioside は分解しない<sup>9)</sup>.

症例 II では, 症例 I に存在する小さな Peak I が認められなかった.

かつて教室の Orii *et al.*<sup>18)</sup> は, 臨床経過および  $\beta$ -galactosidase の Sephadex G-150 のゲル濾過パターンより, 従来の type II を 2A と 2B に分けて報告した. それにしたがうと, 症例 I は type 2A, 症例 II はゲル濾過パターンより type 2B に属する. ただし症例 II は 11 歳まで生存し, 偶然的な異物誤飲がなければまだまだ生存可能な症例であった.

またこの症例の脳 ganglioside 含量は, Orii *et al.* が type 2B として報告した例<sup>18)</sup> の 45% とかなり軽度であり, 蓄積の進行はかなり緩慢であったと推定される.

しかしながら, G<sub>M1</sub>- $\beta$ -galactosidase および  $\beta$ -galactosidase 活性は, 他の症例同様欠損しており, 酵素欠損の程度と G<sub>M1</sub>-ganglioside 蓄積の程度には, 相関関係がない症例のあることが示唆された.

胎児脳の検索では, 対照脳では正常小児に比して総 ganglioside 量が少く, また G<sub>M1</sub> と G<sub>M2</sub> の占める割合が逆転しており興味深い.

G<sub>M1</sub>-gangliosidosis 胎児脳では, 総 ganglioside 量, G<sub>M1</sub> 分画が対照脳とかわりないことより, Tay-Sachs 病とは異なり<sup>19)</sup> 胎児期は殆んど蓄積せず, 生後徐々に蓄積することが推定された.

#### 4.2 G<sub>M1</sub>-gangliosidosis の variants について

G<sub>M1</sub>-gangliosidosis と診断されたなかには, type I および type II の表現型に合致せず, かつ  $\beta$ -galactosidase 欠損の程度が異なるいくつかの症例が報告されている.

さらにまた,  $\beta$ -galactosidase 欠損を伴うが, 経過の緩やかな成人例も報告され, type III<sup>20)</sup>, type IV<sup>21)</sup>, adult  $\beta$ -galactosidase deficiency<sup>22)</sup> などと分類されている.

これらの例は主に,  $\beta$ -galactosidase 活性の測定により診断されているが, 遺伝性蓄積疾患においては, 蓄積物質の証明が最終的に必要である. しかしほとんどの例が生存しており, Suzuki *et al.*<sup>23)</sup> の例のみ剖検されているが, 脳における G<sub>M1</sub>-ganglioside の特異的な蓄積は認められず, 肝で amylopectin like polysacchride の存在が認められた. だがこれらの症例の中に, G<sub>M1</sub>-ganglioside が蓄積している症例もある可能性を否定できない.

一方著者の症例 V は, 発症時期が遅いこと, 知能障害が比較的軽度なこと, および現在すでに成人に達していることなどより, 症例 I~IV とは明らかに臨床所見が異なる.

本例の末梢白血球の, G<sub>M1</sub>- $\beta$ -galactosidase と  $\beta$ -galactosidase 活性は低下しているが他の症例より高く, また両親では父親の G<sub>M1</sub>- $\beta$ -galactosidase 活性以外は, 保因者値を示していた.

Watanabe and Minami<sup>24)</sup> は, リンバ芽球様細胞で Sephadex G-150 のゲル濾過を試みたが, 正常では Peak I と II に分け, G<sub>M1</sub>-gangliosidosis では Peak I が欠落していた. この症例では Peak I を認めかつ G<sub>M1</sub>-gangliosidosis と同様に, 小さな Peak II が存在していた. 一方母親のパターンは, 他の保因者同様に Peak II が低下していたが, 父親は正常に類似したパターンを示した結果を得ている. また Orii *et al.*<sup>18)</sup> は, この症例の生検肝の  $\beta$ -galactosidase 活性が正常の 21.8~29.6% と低下し, さらに Sephadex G-150 のゲル濾過で, Peak II に小さな, Peak III に大きな  $\beta$ -galactosidase 活性を認め, 従来の type I, II とは違うパターンより adult variants of G<sub>M1</sub>-gangliosidosis として報告している.

一方本例は, galactose containing glycopeptide に比して G<sub>M1</sub>-ganglioside に強い残余活性を示し, 活性値が 6% もあるために脳神経系に比較的軽度の病変を示しているとも考えられ, O'Brien<sup>1)</sup> により unusual  $\beta$ -galactosidase variants と分類された.

Suzuki *et al.*<sup>22)</sup> は, 従来の type に分類し難い 6 例の自検例を 3 つに分類し, 同様に症例 V も含めて今まで報告された非定型例を彼らの分類にあてはめる試みを報告している.

それによると group I は adult  $\beta$ -galactosidase deficiency と称し,  $\beta$ -galactosidase 欠損は二次的な変化であり, 両親では同酵素の異常は認められず, 彼らが経験した剖検例の脳では, G<sub>M1</sub>-ganglioside の蓄積は認められなかった. 著者の症例 V は, この group I に分類されている.

group II は, 酵素的には group I と同様であるが, group I に認められるガーゴイル様顔貌および cherry-red spots のないものとし, group III を G<sub>M1</sub>-gangliosidosis の adult type とした. その後, group III の自検例の線維芽細胞を用いた <sup>14</sup>C-ガラクトースの ganglioside 分画への取り込み実験で, G<sub>M1</sub> 分画への増加を認めている<sup>25)</sup>.

最近, 染色体地図の研究より,  $\beta$ -galactosidase の遺伝子座が, 染色体 3 と 22 番にある<sup>26)</sup> ことが明らかになった.

一方 G<sub>M1</sub>-gangliosidosis type I, II および他の  $\beta$ -galactosidase 低下症の線維芽細胞を利用した complementation study より, 2 つの遺伝子座はおのおの  $\beta$ -galactosidase の構造遺伝子と, modification factor であることを示唆する報告がなされている. そして, 構造遺伝子に異



常がある場合—group A (type I, II および一部の variants), modification factor に異常がある場合—group B (type III, IV および一部の variants) と分類する試みも報告されている<sup>27)</sup>.

#### 4.3 Sialidosis と症例 V の関係

1976年, Thomas *et al.*<sup>28)</sup> は, mucopolipidosis II (I-cell 病) 患者の線維芽細胞中にシアル酸の増量を認め, 基質として fetuin を用いると, sialidase 活性が著しく低いことを報告した.

その後, mucopolipidosis I<sup>29)</sup>, III<sup>30)</sup>, IV<sup>31)</sup> について, sialidase 欠損に基づくシアル酸代謝異常を示唆する報告がなされ, さらに症例 V と臨床的に類似している, cherry-red spots と myoclonus を伴い  $\beta$ -galactosidase 低下を示す疾患でも sialidase 欠損を認めることが報告されている<sup>32)</sup>.

1978年, Strecker and Michalski<sup>30)</sup> はこれらをまとめて sialidosis として整理した.

しかし I-cell 病に関しては報告者によって違いがあり, 当教室の東海林<sup>33)</sup> によると, I-cell 病の肝ではシアル酸量は正常者に比してたかだか 2 倍程度であり, また当教室の Minami *et al.*<sup>34)</sup> および Suzuki *et al.*<sup>35)</sup> の報告によると, I-cell 病の脳と肝では, sialidase は軽度の低下しか認められず, さらに I-cell 病線維芽細胞に influenza virus を感染させた実験でも<sup>36)</sup>, 一次的な sialidase 欠損は否定的である.

1979年, Lowden and O'Brien<sup>37)</sup> は, mucopolipidosis II (I-cell 病), III 以外の sialidase 欠損を証明された例と, かつて O'Brien<sup>1)</sup> により unusual  $\beta$ -galactosidase variants として分類された疾患を sialidosis として整理し, 骨変化の有無で type I と II に分け, さらに骨変化を認める type II を infantile type と juvenile type に分類した.

症例 V を含め, わが国で多く報告された cherry-red spots と myoclonus を伴い  $\beta$ -galactosidase 低下を示す疾患は, type II の juvenile type に分類されている. しかし症例 V と臨床所見および  $\beta$ -galactosidase 活性が非常に類似している Yamamoto *et al.* の症例<sup>38)</sup> は, 両親の白血球  $\beta$ -galactosidase が保因者値を示していることより, variant  $\beta$ -galactosidase deficiency として除外されている. 著者は, 症例 V のリンパ芽球様細胞および白血球を用いて,  $\alpha$ -D-N-Acetylneuraminosyl (2 $\rightarrow$ 3) lactose,  $\alpha$ -L-N-Acetylneuraminosyl (2 $\rightarrow$ 6) lactose を基質として, sialidase を測定したところ, 20~50% 程低下していた (未発表データ). また同症例の培養線維芽細胞の検索を Colorado 大学に依頼した結果, シアル酸含量は正常であり, 5 種類の基質を用いて sialidase 活性を測定したところ,

継代培養するにつれて活性が低下するデータが得られた. (Dr. Wenger, personal communication).

また, sialidase 欠損症として報告された Miyake *et al.* の例<sup>39)</sup> では, 生検神経組織において, nonlipid 分画のシアル酸量は正常者と違いがないと報告されている.

一方, Suzuki and Fukuoka<sup>35)</sup> は, Lowden and O'Brien により sialidosis type II に分類された症例の脳と肝では, sialidase は正常であったと報告し sialidosis のあるものは一次的な sialidase 欠損ではないと報告している.

このような報告者による違いの原因として, sialidase 測定法および分析材料の違いが考えられる.

sialidase は, 一般に酵素活性自体が低く, ライソゾーム性 sialidase は非常に不安定であること, 膜結合型シアリダーゼは内因性膜酵素であり可溶化操作が困難であることなど, 現在にいたるもその性質が充分に明らかにされていない<sup>40)</sup>.

さらに今までの報告では, ほとんどが培養線維芽細胞を酵素源として用いており, 線維芽細胞の継代培養, トリプシン処理, 凍結融解および超音波処理などの操作が, sialidase 活性になら影響をあたえないという保証はないと思われる.

著者のデータにおいて, 症例 V の  $G_{M1}$ - $\beta$ -galactosidase 活性が末梢白血球に比して, リンパ芽球様細胞では非常に上昇しており, 他の症例には認められない現象であった. 原因ははっきりしないが, Hurler-Hunter 症候群で, 蓄積するデルマタン硫酸やヘパリン硫酸が,  $\beta$ -galactosidase 活性を抑制するごとく<sup>41)</sup>, 何かの蓄積物質が  $\beta$ -galactosidase と  $G_{M1}$ - $\beta$ -galactosidase 活性を抑制し, 培養することによって抑制がとれて活性が上昇したと推定される.

その点からも, 症例 V は一次的な  $\beta$ -galactosidase 欠損ではないかもしれない.

しかしながら, sialidosis の概念には前述したごとく, 知能障害の有無および骨変化などの臨床症状の差異,  $\beta$ -galactosidase 低下の有無, 欠損している sialidase の測定条件および分析材料の問題もふくめて, まだまだ大きな課題が残っている.

$\beta$ -galactosidase 欠損症には, 完全欠損である  $G_{M1}$ -gangliosidosis と, 部分欠損である Krabbe 病<sup>42)</sup> および lactosylceramidosis<sup>43)</sup> があるように, ganglioside のシアル酸を遊離する sialidase と, オリゴ糖および糖蛋白のシアル酸を遊離する sialidase が存在するわけであり, sialidase の完全欠損と部分欠損も sialidosis にはあると推定され, この点からも将来検索する必要があると思われる.

## 5 結 語

5家系の  $\beta$ -galactosidase 活性低下を伴う患者およびそれらの両親の末梢白血球と、Epstein-Barr virus によりトランスフォームされたリンパ芽球様細胞について、G<sub>M1</sub>-ganglioside を基質として G<sub>M1</sub>- $\beta$ -galactosidase を測定した。

さらに剖検した G<sub>M1</sub>-gangliosidosis の2症例と1胎児例の脳 ganglioside を分析し、以下の結果を得た。

5・1 4症例では、末梢白血球およびリンパ芽球様細胞の G<sub>M1</sub>- $\beta$ -galactosidase は欠損し、それらの両親は保因者値を示したことにより、G<sub>M1</sub>-gangliosidosis と診断された。

5・2 1症例は、末梢白血球の G<sub>M1</sub>- $\beta$ -galactosidase 値は正常値の6%であったが、リンパ芽球様細胞は約70%と上昇していた。母親は末梢白血球およびリンパ芽球様細胞の G<sub>M1</sub>- $\beta$ -galactosidase 活性は保因者値を示したが、父親は末梢白血球で正常値を示した。

本症例は二次的に  $\beta$ -galactosidase が低下する sialidosis type II に類似しているが、現在 sialidosis の診断の根拠となる sialidase の測定法には種々の問題点があり、今後の研究が期待される。

5・3 剖検した G<sub>M1</sub>-gangliosidosis の2症例および1胎児例の生化学的検索より、G<sub>M1</sub>- $\beta$ -galactosidase 活性と脳の G<sub>M1</sub>-ganglioside の蓄積には相関関係のない症例があること、また G<sub>M1</sub>-gangliosidosis の胎児例の脳 ganglioside 蓄積は、正常とほとんど変わりなく、生後蓄積することが示唆された。

本論文の要旨は、1978年11月、第21回小児代謝研究会(於京都)において発表した。

稿を終えるにあたり、リンパ芽球様細胞の樹立に御協力いただいた渡辺葉子医学士、実験および論文作成に際し、御指導いただきました、工藤亨博士、南良二講師に深謝いたします。

## 文 献

- O'Brien, J. S.: The gangliosidoses. In: Stanbury, J. B., Wyngaarden, J. B. and Fredrickson, D. S.: The metabolic basis of inherited disease. 841-865, McGraw-Hill Book Co., New York (1978).
- Orii, T., Minami, R., Sukegawa, K., Sato, S., Tsugawa, S., Horino, K., Miura, R. and Nakao, T.: A new type of mucopolipidosis with  $\beta$ -galactosidase deficiency and glycopeptiduria. *Tohoku J. Exp. Med.* **107**, 303-315 (1972).
- Minami, R., Suzuki, M., Kudoh, T., Sato, S., Oyanagi, K., Nakao, T. and Orii, T.:  $\alpha$ -L-iduronidase activity in established lymphoblastoid cells from patients with Hurler and Scheie syndromes transformed by Epstein-Barr virus. *Tohoku J. Exp. Med.* **122**, 393-396 (1977).
- Folch, J., Lees, M. and Sloane-Stanley, G. H.: A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **226**, 497-509 (1957).
- Suzuki, K.: The pattern of mammalian brain gangliosides-II. *J. Neurochem.* **12**, 629-638 (1965).
- Suzuki, K.: A simple and accurate micromethod for quantitative determination of ganglioside pattern. *Life Sci.* **3**, 1227-1233 (1964).
- Radin, N. S., Hof, L., Bradley, R. M. and Brady, R. O.: Lactosylceramide galactosidase: Comparison with other sphingolipid hydrolases in developing rat brain. *Brain Res.* **14**, 497-505 (1969).
- Suzuki, Y. and Suzuki, K.: Specific radioactive labeling of terminal N-acetylgalactosamine of glycosphingolipids by the galactose oxidase-sodium borohydride method. *J. Lipid Res.* **13**, 687-690 (1972).
- Kudoh, T.: The abnormalities of  $\beta$ -galactosidase in G<sub>M1</sub>-gangliosidoses. *Tohoku J. Exp. Med.* **125**, 93-101 (1978).
- Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275 (1956).
- Norman, R. M., Urich, H., Tingey, A. H. and Goodbay, R. A.: Tay-Sachs disease with visceral involvement and its relationship to Niemann-Pick's disease. *J. Path. Bact.* **78**, 409-421 (1959).
- O'Brien, J. S., Stern, M. B. and Landing, B. H.: Generalized gangliosidosis. *Amer. J. Dis. Child.* **109**, 338-346 (1965).
- Okada, S. and O'Brien, J. S.: Generalized gangliosidosis: Beta galactosidase deficiency. *Science* **160**, 1002-1004 (1968).
- Kudoh, T., Kikuchi, K., Nakamura, F., Yokoyama, S., Karube, K., Tsugawa, S., Minami, R. and Nakao, T.: Prenatal diagnosis of G<sub>M1</sub>-gangliosidosis: Biochemical manifestation in fetal tissues. *Hum. Genet.* **44**, 287-293 (1978).
- Ho, M. W. and O'Brien, J. S.: Differential effect of chloride ion on  $\beta$ -galactosidase isoenzyme: A method for separate assay. *Clin. Chim. Acta* **32**, 443-450 (1971).
- Suzuki, K., Suzuki, K. and Chen, G. C.: Mor-

- phological, histochemical and biochemical studies on a case of systemic late infantile lipidosis (generalized gangliosidosis) *J. Neuropath. Exp. Neurol.* **27**, 15-38 (1965).
17. Suzuki, Y., Crocker, A. C. and Suzuki, K.:  $G_{M1}$ -gangliosidosis. *Arch. Neurol.* **24**, 58-64 (1971).
  18. Orii, T., Sukegawa, K., Kudoh, T., Horino, K. and Nakao, T.: Three  $G_{M1}$ -gangliosidoses and a variant of  $\beta$ -galactosidase deficiency. *Tohoku J. Exp. Med.* **117**, 197-198 (1975).
  19. Higami, S., Nishizawa, K., Omura, K., Sugimoto, K., Isshiki, G., Tada, K. and Kamoshita, S.: Prenatal diagnosis and fetal pathology of Tay-Sachs disease. *Tohoku J. Exp. Med.* **118**, 323-330 (1976).
  20. Pinsky, L., Miller, J., Shanfield, B., Watters, G. and Wolfe, L. S.:  $G_{M1}$ -gangliosidosis in skin fibroblast culture: enzymatic differences between type I and II and observation on a third variant. *Am. J. Hum. Genet.* **26**, 563-577 (1974).
  21. Sandhoff, K. and Christomanou, H.: Biochemistry and genetics of gangliosidoses. *Hum. Genet.* **50**, 107-143 (1979).
  22. Suzuki, Y., Nakamura, F., Shimada, Y. and Uono, M.:  $\beta$ -Galactosidase deficiency in juvenile and adult patients: report of six Japanese cases and review of literature. *Hum. Genet.* **36**, 219-229 (1977).
  23. Suzuki, Y., Nakamura, N., Shimada, Y., Yotsu-moto, H., Endo, H. and Nagashima, K.: Macular cherry red spots and  $\beta$ -galactosidase deficiency in an adult. *Arch. Neurol.* **34**, 157-161 (1977).
  24. Watanabe, Y. and Minami, R.: Lymphoblastoid cell line, transformed by Epstein-Barr virus, in the enzymatic study of hereditary lysosomal storage disease. *Tohoku J. Exp. Med.* (in preparation).
  25. Suzuki, Y., Nakamura, N. and Fukuoka, F.:  $G_{M1}$ -gangliosidosis: Accumulation of ganglioside  $G_{M1}$  in cultured skin fibroblasts and correlation with clinical types. *Hum. Genet.* **43**, 127-131 (1978).
  26. de Wit, J., Hoeksema, H. L., Bootsma, D. and Westerveld, A.: Assignment of structural  $\beta$ -galactosidase loci to human chromosomes 3 and 22. *Hum. Genet.* **51**, 259-267 (1979).
  27. Bootsma, D. and Galjaard, H.: Heterogeneity in genetic diseases studied in cultured cells. In: Hommes, F. A. ed.: *Models for the study of inborn errors of metabolism: proceedings of an international symposium on models for the study of inborn errors of metabolism*, 1978. 241-258, Elsevier/North Holland Biomedical Press, 1979. (cited from 21.)
  28. Thomas, G. H., Tiller, G. E. Jr., Reynolds, L. W., Miller, C. S. and Brace, J. W.: Increased levels of sialic acid associated with sialidase deficiency in I-cell (mucopolipidosis II) fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **71**, 188-195 (1976).
  29. Catz, M., Gehler, J. and Spranger, J.: Mucopolipidosis I: Increased sialic acid content and deficiency of an  $\alpha$ -N-acetylneuraminidase in cultured fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **74**, 732-738 (1977).
  30. Strecker, G. and Michalski, J. C.: Biochemical basis of six different type of sialidosis. *FEBS Lett.* **85**, 20-24 (1978).
  31. Bach, G., Zeigler, M., Schapp, J. and Kohn, G.: Mucopolipidosis type: Ganglioside sialidase deficiency. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **90**, 1341-1347 (1979).
  32. O'Brien, J. S.: Neuraminidase deficiency in the cherry-red spot and myoclonus syndrome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **79**, 1136-1141 (1977).
  33. 東海林黎吉: 遺伝性蓄積性疾患の肝組織における糖蛋白に関する研究. *札幌医誌* **48**, 52-67 (1979).
  34. Minami, R., Kudoh, T., Oyanagi, K. and Nakao, T.: Neuraminidase activity in liver and brain from patients with I-cell disease. *Clin. Chim. Acta* **96**, 107-111 (1979).
  35. Suzuki, Y. and Fukuoka, K.: Neuraminidase in mucopolipidoses: Normal activity in frozen autopsy tissues from three patients with I-cell disease and adult  $\beta$ -galactosidase deficiency. *Clin. Chim. Acta* **99**, 107-112 (1979).
  36. Richard, A. S., Paul, M. C. and Florence, S. L.: I-cell disease: Intracellular desialylation of lysosomal enzymes using an influenza vector. *Biochim. Biophys. Acta* **523**, 435-442 (1978).
  37. Lowden, J. A. and O'Brien, J. S.: Sialidosis: A review of human neuraminidase deficiency. *Am. J. Hum. Genet.* **31**, 1-18 (1979).
  38. Yamamoto, A., Adachi, S., Kawamura, S., Takahashi, M., Kitani, T., Ohlari, T., Shinji, Y. and Nishikawa, M.: Localized  $\beta$ -galactosidase deficiency occurrence in cerebellar ataxia with myoclonus epilepsy and macular cherry-red spot: A new variant of  $G_{M1}$ -gangliosidosis. *Arch. Intern. Med.* **134**, 627-634 (1974).
  39. Miyake, T., Atsumi, T., Obayashi, T., Mizuno,

- Y., Ando, S., Ariga, T., Matsui-Nakamura, K. and Yamada, T.: Adult type neuronal storage disease with neuraminidase deficiency. *Ann. Neurol.* **6**, 232-244 (1979).
40. 齋藤政樹: シアリダーゼ. *代謝* **16**, 37-56 (1979).
41. Rushton, A. R. and Dawson, G.: The effect of glycosaminoglycan on the *in vitro* activity of human skin fibroblast glycosphingolipid  $\beta$ -galactosidase and neuraminidase. *Clin. Chim. Acta* **80**, 133-139 (1977).
42. Suzuki, K. and Suzuki, Y.: Galactosylceramide lipidosis: Globoid cell leukodystrophy (Krabbe disease). In: Stanbury, J. B., Wyngaarden, J. B. and Fredrickson, D. S.: *The metabolic basis of inherited disease*. 747-769, McGraw-Hill Book Co., New York (1978).
43. Dawson, G. and Stein, A. O.: Lactosyl ceramidosis: Catabolic enzyme defect of glycosphingolipid metabolism. *Science* **170**, 556-558 (1970).