——〔シンポジウム〕人類遺伝学に果たした電気泳動法の役割——

6. アミラーゼアイソザイムの遺伝学的 検討と疾患における変動**

大 槻 真**

は じ め に

血清に含まれている酵素活性は、種々の疾患に伴って著しく上昇したり、あるいは低下することが知られている。しかしながら、このような病態に伴う種々の原因によってのみならず、遺伝的にも酵素活性の変動がもたらされることが知られている。したがって、血清酵素活性の変動を臨床診断に用いようとする場合、それが突然変異による遺伝的なものなのか、あるいは疾患に伴う組織変化によってひきおこされたものなのかを考える必要がある。そこで、酵素診断法の始まりをなしたアミラーゼのポリアクリルアミドゲル薄層電気泳動法によって得た結果について、臨床診断への応用とその問題点について述べてみたい。

研究材料ならびに研究方法

1. 試 料

試料としては唾液、脾液、血清、尿および脾臓と耳下腺ホモジェネートを用いた。尿は、20～25歳の健康は医学部学生2,296名より採取した。血清は同様22～25歳の学生560名より採取した。さらに、0～13歳の正常人150名の血清も検討した。以上の様な正常人に対して、急性脾炎、流行性耳下腺炎、慢性再発性脾炎患者と、脾全摘を受けて6年を経た患者、さらに、上顎洞癌のため手術を受け、広範囲のコバルト照射により、唾液腺機能が著名に低下している患者の血清と尿も検討した。組織ホモジェネートとしては、剖検時に採取した耳下腺と脾を用いた。即ち、各組織を3倍量の0.25 M sucrose 溶液 (20 mm CaCl_2 を含む) で、Potter-Elvehjem homogenizer を用いてホモジェネートし、27,000×G, 30分, 4℃ で遠沈後、その上清を電気泳動に供した。

一部の症例では、約2年間にわたり経過を観察し、さ

らには家系調査も行なった。

2. 電気泳動

ゲル用緩衝液としては 0.19 M Tris [tris (hydroxymethyl) aminomethane]-HCl (pH 8.8) buffer を用いた。この buffer 溶液に acrylamide と Bis (N,N'-methylenebisacrylamide) を 95 対 5 の割合に溶解した単体溶液と過硫酸アンモニウム (120 mg/100 ml), TEMED (N,N'-tetramethylene diamine) (1 ml/100 ml) の触媒溶液を 2 : 1 : 1 の割合に混合して、厚さ 1 mm のゲル薄層板をつくった。電極槽用緩衝液としては 0.3 M boric acid-NaOH (pH 8.2) を用いた。

ゲル薄層板の試料溝にマイクロピペットで 7 μl の試料を入れ、試料溝側を陰極として、Tris-HCl/boric acid-NaOH の不連続緩衝液系で、ゲル薄層板幅 1 cm 当り 0.8 mA の定電流で 4℃ のもとに 2 時間 30 分水平電気泳動した。

電気泳動終了後、0.2 % NaCl を含む 1 % 可溶性澱粉溶液 20 ml をゲル薄層板上に載せ、基質を十分ゲル内へ浸透させてから、ゲル薄層板のみを 37℃ 恒温器内で 15～120 分間アミラーゼ活性に応じて反応させた。次いで、 I_2 -KI 溶液 (KI 30 g, I_2 13 g/liter) で染色した。この方法ではアミラーゼ活性の存在する部分は、濃紺の背景中に淡黄色ないしは透明の band として認められた。これを直ちに陰画紙に焼付けるとともに densitometry にかけて、アミラーゼアイソザイムの解析に供した。

アミラーゼアイソザイムの命名については、現在、種々な方法が行なわれているが、アミラーゼアイソザイムの特徴を考えて、ここでは陽極側への易動度の最も遅いアイソザイムで、ほとんどすべての正常人に認められるアイソザイムより、陽極側のものへと順次番号をつけることにした (Amy-1, 2.... etc.)。

3. Amylase 活性測定

* Genetical investigation and clinical evaluation of amylase isoenzymes.

** Makoto Otsuki, 神戸大学医学部第2内科学教室。

アミラーゼ活性は blue-starch polymer (Pharmacia-塩野義) を用いた色素澱粉法で測定し、単位は血清の場合には Somogyi U/100 ml, 尿中の場合には Somogyi U/h とした。

結果ならびに考察

耳下腺, 膵アミラーゼは, ポリアクリルアミドゲルを支持体とした電気泳動により, 4~5本のアイソザイムに分離できたが, 両臓器におけるアイソザイムの易動度は全く異なっていた。しかし, 膵アミラーゼのアイソザイムは, 急性膵炎患者 および 唾液腺機能低下 患者の血清, 尿中アミラーゼアイソザイムと易動度が一致していた (Fig. 1)。従って, これらのアイソザイム Amy-1, 2, 4, 6 を膵型アミラーゼアイソザイムとした。一方, 耳下腺および唾液中のアミラーゼのアイソザイムと流行性耳下腺炎患者および膵臓を全摘された患者の血清, 尿中アミラーゼアイソザイムは易動度が一致していた。従ってこれらのアイソザイム Amy-3, 5, 7 を唾液腺型のアミラーゼアイソザイムと考えた。このような, 唾液腺と膵のアミラーゼ分泌亢進と低下状態におけるアイソザイムの変化と正常人におけるアミラーゼアイソザイムの比較か

Fig. 1. Amylase isoenzymes in pancreatic (A-1) and parotid gland (A-4) extracts, in saliva (B-4), in serum of patients with acute pancreatitis (A-2, B-1), pancreatotomy (A-3, B-2), mumps (A-5, B-5) and decreased amylase activity of saliva (A-3, B-2) and in serum of a normal adult person (B-3).

Amylase isoenzymes in pancreatic extracts and in serum from patients with acute pancreatitis are the same in mobility and those in parotid gland extracts and in saliva and in serum from a patient with pancreatotomy are the same.

Amylase-1,2 in normal person have mobilities indistinguishable from those of pancreatic isoamylases, while amylase-3, 5 have mobilities similar to salivary isoamylases.

ら, 人間の血清, 尿中アミラーゼは唾液腺と膵に由来すると考えられる。即ち, 正常人血清, 尿中アミラーゼは 4~5本のアイソザイムに分離されるが, Amy-1, 2は膵, Amy-3, 5, 7は唾液腺型である。

健康な乳幼児から成人までの血清, 尿中アミラーゼをみると, アミラーゼ活性は生後4~8か月まではいわゆる正常値よりも低値を示した。これを densitometry で解析すると, Fig. 2-A のごとく膵型アミラーゼの活性が異常に低いことが分った。このことは, 乳児では膵外分泌機能が十分には発達しておらず, 加齢と共に完成していくことを示していると思われる。即ち, Amy-1 の活性が, 生後次第に増大していくことより明らかである。

正常成人では, 膵型 (Amy-1) と唾液腺型 (Amy-3) アイソザイム夫々1本に強いアミラーゼ活性を認めた。血清アミラーゼアイソザイムは, さらに densitometry による解析から3つの型に分類できた。即ち, 膵型アミラーゼ活性が唾液型よりも高い例 (52.9%), 両型のアミラーゼ活性がほぼ等しい例 (14.8%), それに膵型アミラーゼ活性が唾液腺型よりも低い例 (32.3%) である。しかし, 全体を平均すると膵型アミラーゼ活性が全

Fig. 2. Densitometric analysis of serum and urinary amylase isoenzymes of normal infants (A) and normal adult persons (B). Origin at the left.

アミラーゼ活性の52.3%を占めた。一方、尿中アミラーゼアイソザイムをみると、そのパターンは血清のそれと一致していたが、densitometryによる解析では、全例で、膵アミラーゼ活性が唾液腺型よりも高値を示した。これは腎における唾液腺アミラーゼと膵アミラーゼのクリアランスの差によると思われる。

正常人2,296例中には種々のアミラーゼアイソザイムパターンが発見された。98%以上の例で、血清、尿中アミラーゼアイソザイムはアミラーゼ活性の高い2本のmajor isozyme (Amy-1, 3)とアミラーゼ活性の低い2～3本のminor isozymeより成っているが、他にアイソザイムパターン、あるいは各アイソザイムのアミラーゼ活性比の非常に異なった4種類の型があった (Fig. 3), 0.13%で Amy-1よりも陽極側への易動度の遅いアイソザイムが認められた。ここでは仮りに、このアイソザイムを Amy-1s (slow) と命名した。Amy-1sはmajorと同程度のアミラーゼ活性を示していた。他の3型では、minor isozymeであるAmy-2のアミラーゼ活性がmajor isozymeと同程度にまで増大していた。1.002%で Amy-3の活性が低下し、Amy-1, 2の活性が高かった。0.004%では Amy-2のみの活性が高く、Amy-1, 3の活性は低下していた。一方、0.523%で Amy-1, 2, 3すべてのアミラーゼ活性が増大していた。このようなアイソザイムパターンの変化は、アミラーゼ合成過程における遺伝子による質的変異によるのか、あるいはある種の疾患に伴う変化によるのかが問題となる。Fig. 3に示したすべてのパターンが、血清、尿中両試料で観察され、さらには約2年間にわたる検索において、常に同じパターンがみとめられた。また、現在までの検査では、全く

Fig. 3. Various pattern of amylase isoenzymes found in 2,296 normal adult persons. There was no difference between the isoenzyme patterns in urine and serum of normal adult persons in whom both were examined. The incidence of each pattern of amylase isoenzymes is shown at the bottom.

疾患との関連性を見いだすことが出来なかった。そこで遺伝的变化を検討すべく家系調査を行なった所、すべてのパターンに遺伝的背景の存在を確認した。特に Amy-1s についてみると Fig. 4 のごとく常染色体優性遺伝形式をとることが明らかとなった。また、Fig. 3-(2)

Fig. 4. Sheet polyacrylamide zymograms of amylase-1s and pedigree of the family with amylase-1s.

Fig. 5. Sheet polyacrylamide amylase zymograms of urine from persons with high amylase activity of amylase-2 and the pedigree study of the family.

Table 1. Comparison of amylase-1s with other reports.

Name	Incidence	Authors	Supporting media	Nationality	Total number of tested
SPp sSPp (duplicated P)	15.2% 0.9% } 16.1%	Kamaryt and Laxóva	Agar gel	C.S.S.R.	111 families with twin
SPp sSPp (duplicated P)	5.1% 0.2% } 5.3%	Vacikóva and Blochóva	Agar gel	C.S.S.R.	1,000
Amy SE-1	10%	Boettcher and De La Lande	Polyacrylamide gel slab	Australian	?
Amy ₂ B C	10.5% 0 %	Merritt et al.	Polyacrylamide gel slab	Caucasian —American	673
Amy ₂ B C	2.87% 4.70% } 7.57%	Merritt et al.	Polyacrylamide gel slab	Afro —American	383
Amy ₂ -1s	0.13%	Otsuki et al.	Thin layer polyacrylamide gel	Japanese	2,296

の型においても同様の遺伝形式の存在がうかがわれた (Fig. 5).

Amy-1s と同じアイソザイムであるか否かは明らかではないが、陽極側への易動度の遅いアイソザイムが外国ではいくつか報告されている (Table 1). 即ち、重複した腓アミラーゼ (duplicated P) として,^{3,4)} Amy SE-1 として⁵⁾あるいは Amy₂ B, C⁶⁾として報告されているが、その出現率を見ると、Kamaryt and Lax va³⁾および Vacikóva and Blochóva⁴⁾は、夫々 16.1%, 5.3%, Merritt ら⁶⁾は 7.57~10.5%, さらに、Boettcher and De La Lande⁵⁾は 10% としている。これに反し日本では、Amy-1s に相当するアイソザイムの報告は、私達の教室からのもののみで 0.13% と非常に低い出現率である。このような出現率の違いが、電気泳動法の差によるのか人種差によるのか興味ある所である。しかし、支持体としては agar^{3,4)} polyacrylamide^{5,6)} が用いられており、これらの差によるものではないと思われる。Amy-1s はポリアクリルアミドゲルを支持体とした時だけではなく、セロゲル膜を用いても分離検出された。⁷⁾ 従って、このアイソザイム (Amy-1s) の出現率の差は人種差によるものと思われ、人類遺伝学上非常に興味ある所となるであろう。

以上のように、正常人においても種々のアイソザイムパターンが認められることから、アイソザイムの解析と臨床診断に用いるにあたっては十分慎重でなければならない。

血清アミラーゼ活性測定は酵素診断法の始まりをなし、⁸⁾ 現在も広く臨床検査に用いられている。特に腓炎診断には最もよく利用されている。しかしながら、アミ

Fig. 6. Changes of amylase isoenzymes and amylase activities in serum of a patient with acute pancreatitis.

ラーゼは組織特異的なものではなく、単に活性の変化を知ることは機能障害をおこした臓器、あるいは組織を指摘することは不可能である。このような考えのもとで、アイソザイムの分離、ならびに測定が臨床検査としてつかわれるようになった。⁹⁻¹¹⁾ 急性腓炎における血清アミラーゼアイソザイムの変化をみると (Fig. 6), 腓炎発作前で、血清アミラーゼ活性が 181.0 Somogyi U/100 ml の時にはアイソザイムは、Amy-1, 2, 3, 5 と正常であったが、アミラーゼ活性上昇に伴って、Amy-1, 2 の活性は上昇し、さらに Amy-4, 6 の出現をみた。その後アミラーゼ活性が正常に復しても Amy-1, 2, 4 のパターンが持続した。Amy-4, 6 は正常人血清、尿中では試料を濃縮、あるいは反応時間を長くしても認められず、単にアミラーゼ活性上昇によってのみ出現したものではない。このようなことより Amy-4, 6 の出現は腓の炎症性変化を反映しているとも考えられる。しかしながら、試料の状態によっては Amy-4, 6, 8 の出現も認められることもあり (Fig. 7), 注意しなければならない。このような試料の保存による変化や^{12,13)} 先に示した遺伝的

Fig. 7. Effect of storage on amylase isoenzymes. The increment of numbers of amylase isoenzymes toward the anode side and the changes of proportion of amylase activity are observed.

背景を有するアイソザイムを除けば Amy-2, 4, 5, 6 等の minor isozyme の活性上昇は major isozyme よりも アミラーゼ活性の変動をよく反映するものである。

腹部単純レントゲンで明らかな膵石が認められ、P-S test で膵外分泌機能低下が示された慢性膵炎患者では、血清アミラーゼ活性は60~70 Somogyi U/100 ml と低値を示した (Fig. 8)。アイソザイム上も Amy-1 (膵型) の比活性が17.6%と正常人に比し著明に低下しており、膵外分泌能障害が示された。経過観察中腹痛発作を来したが、血清アミラーゼ活性は低値のまま変化しなかった。しかし、アイソザイム上では Amy-1 の比活性が49%にまで上昇しており、膵炎の再燃と考えられた。その後、自覚症状の改善とともにアイソザイムパターンも変化し、Amy-1 の活性が発作前のレベルにまで低下していった。この症例において、仮りに発作時のみのアイソザイムを見ると、全く正常のパターンを示しており、膵炎再燃の診断は、連続的にアミラーゼアイソザイムの分離測定が行なわれてはじめてなされたものである。

ま と め

1. 正常人血清、尿中アミラーゼは4~5本のアイソザイムに分離できる。
2. 正常人アミラーゼアイソザイムには5種類のパターンがあり、すべてのパターンに遺伝的背景が存在した。従って、常にこのことを考慮しておく必要がある。
3. アミラーゼアイソザイムは試料の状態により変化することがある。
4. アミラーゼアイソザイムは経目的に変化するものであるから経過を追う必要がある。

Fig. 8. Serum amylase activity (A) and amylase isoenzymes (B) in serum of a patient with chronic relapsing pancreatitis. Origin at the left.

B-1 : Amylase isoenzymes in serum before the attack of abdominal pain.

The proportion of amylase activity of pancreatic type isoenzyme is 17.6%.

B-2 : Amylase isoenzymes in serum during the attack. The proportion of pancreatic type isoamylase increased up to 50%.

B-3,4 : Amylase isoenzymes in serum sampled 4 and 9 days after the attack, respectively. The proportion of pancreatic type isoamylase gradually decreased to the levels of before the attack.

この研究は神戸大学第2内科、佐伯 進、尤 芳才、前田光雄、神田 勤、岡野邦泰、山崎富夫先生の御協力を得てなされたことを附記させていただきます。

終りにのぞみ御指導と御校閲を賜った馬場茂明教授に深謝します。

文 献

- 1) Kamaryt, J. : Z. Klin. Cem Klin. Biochem., **7** : 51, 1969.
- 2) Duane, W.C. et al. : J. Clin. Invest., **50** : 156, 1971.
- 3) Kamaryt, J. and Laxóva, R. : Humangenetik, **3** : 41, 1966.
- 4) Vacikóva, A. and Blochóva, L. : Humangenetik, **8** : 162, 1969.
- 5) Boettcher, B. and De La Lande, F.A. : Enzymol., **40** : 234, 1970.
- 6) Merritt, A.D. et al. : Amer. J. Hum. Genet., **25** : 510, 1973.
- 7) 大槻 真他 : 臨床化学シンポジウム, **14** : 9, 1974.

(118) 生物物理化学

- 8) Wohlgemuth, J. : Biochem. Ztschr., **9** : 1, 1908.
- 9) 大槻 真他 : 日本消化器病学会雑誌, **71** : 1241, 1974.
- 10) 大槻 真他 : 日本消化器病学会雑誌, **72** : 1282, 1975.
- 11) Otsuki, M. et al. : Clin. Chem., **21** : 948, 1975.
- 12) Kauffman, D. L. et al. : Arch. Biochem. & Biophys., **137** : 325, 1970.
- 13) 大槻 真他 : 生物物理化学, **19** : 27, 1974.