——〔シンポジウム〕 癌研究における電気泳動法の応用——

5. アルカリフォスファターゼアイソザイム*

鈴木 宏**・飯野四郎**

緒 言

血清アルカリフォスファターゼ (ALP) の測定は、肝・胆道疾患および骨疾患の診断に欠くことのできない検査法であり、日常臨床上広く行なわれている。さらに、そのアイソザイムの分析により、血清 ALP には臓器由来を異にする ALP のあることが明らかにされ、ALP アイソザイム検査により、更に臨床的意義は拡大されている。癌の診断については、転移性肝癌あるいは骨腫瘍において血清 ALP が著明に上昇することが古くから知られていたが、1968年、Fishman ら¹⁾ が癌細胞に由来し、胎盤 ALP と同じ性質を有する Regan isoenzyme を報告して以来、改めて注目されるようになった。その後、中山²⁾ が Nagao isoenzyme、また Warnock ら³⁾ がヘパトームに特異的に出現する variant ALP などを報告している。

ここではわれわれの成績を中心として、血清 ALP アイソザイムおよびその癌診断における意義について報告する。

I. 血清アルカリフォスファターゼアイソザイムについて

血清 ALP のザイモグラムは寒天ゲル、セルロゲルを支持体とした場合と澱粉ゲルを支持体とした場合で異なっている。また、ポリアクリルアミドディスク電気泳動法は澱粉ゲルと同じザイモグラムを示す。

寒天ゲルとポリアクリルアミドディスク電気泳動法の血清 ALP ザイモグラムを Fig. 1 に示した。寒天ゲルでは ALP₁ から ALP₆ までの6つに分離され、ディスク電気泳動法では ALP I から ALP VII までの7つに分離された。

ALP₂₋₆ は ALP II~VI にそれぞれ一致している。また、ALP₁ は ALP VII に一致している。ALP VII は原点に留まる ALP であり、この ALP は後述の如く、高分子 ALP であるのでディスク電気泳動法では分子篩効果が大いいため原点に留まると考えられる。ALP I は寒天ゲル法では検出されない。これは ALP₁ と電気的易動度がほぼ等しいため分別できないためと考えてい

Fig. 1. Serum ALP zymogram, left side : agar gel electrophoresis, right side : polyacrylamide gel disc electrophoresis.

* Alkaline phosphatase isoenzymes.

** Hiroshi Suzuki, Shiro Iino, 東京大学医学部第1内科学教室.

Table 1. The tissue origins and clinical significances of serum ALP isoenzymes.

Agar gel	PAGD	Origin	Clinical significance
1	VII	Liver (high molecular)	Obstructive jaundice Space-occupying lesion
	I	Hepatoma	Hepatoma (30%)
2	II	Liver	Hepato-biliary diseases
3	III	Bone	Osteoplastic diseases
4	IV	Placenta Cancer	Pregnancy cancer (<1%)
5	V	Intestine	B and O blood group (secretor status), Liver cirrhosis (40%)
6	VI	Liver	Ulcerative colitis (20%)

PAGD: polyacrylamide gel disc.

Table 2. Enzymological and immunological properties of tissue alkaline phosphatases.

	Liver	Bone	Placenta	Intestine
Inhibitors				
L-phenylalanine	—	—	+	+
L-homoarginine	+	+	—	—
Urea	+	++	+	+
Heat-stability				
56°C, 15 min.	+	++	—	+
65°C, 10 min.	++	++	—	++
Neuraminidase*	++	++	+	—
Immunological reaction				
Anti liver ALP	++	+	—	—
Anti placental ALP	—	—	++	+
Anti intestinal ALP	—	—	+	++

* Changes of electrophoretic mobility.

る。従って、高分子 ALP (ALP₁) の検出には寒天ゲル法が、ALP I の検出にはディスク電気泳動法が適しており、両法を併用する必要がある。

血清 ALP アイソザイムの臨床的意義および臓器由来のまとめを Table 1 に示した。^{4,5)}

ALP₂ (ALP II) は肝 ALP, ALP₃ (ALP III) は骨 ALP, ALP₄ (ALP IV) は胎盤 ALP, ALP₅ (ALP V) は、小腸 ALP と電気的易動度および酵素学的性質が一致している。ALP₆ (ALP VI) は、潰瘍性大腸炎の活動期に出現するが、正常に存在する ALP₂ が何等かの修飾を受けてその電気的易動度を変えたものである。⁶⁾

Fig. 2. High molecular biliary tract enzymes.

これら ALP アイソザイムの血中の上昇機序は、その臓器における ALP の生成亢進を反映している点が、いわゆる血清遊出酵素とは異なる点である。

われわれは現在までに、肝、胎盤および小腸 ALP の精製に成功しているが、骨 ALP を加えたこれら臓器 ALP の酵素学的性質のまとめを Table 2 に示した。この成績からみると肝と骨、胎盤と小腸 ALP は、それぞれ近い関係にあることが認められる。

癌の診断と関係があるのは ALP₁, ALP₃ (ALP III), ALP₄ (ALP IV) および ALP I である。

II. ALP₁ (高分子 ALP) について

ALP₁ は肝癌、とくに転移性肝癌に高率に出現が認められる。明渡らは ALP₁ は肝癌細胞に由来する可能性を考えている。しかし、われわれは ALP₁ が肝癌だけでなく、肝膿瘍などの肝癌以外の限局性肝障害および閉塞性黄疸でも高率に出現を認めている。⁴⁾ また、Sephadex G-200 によるゲル濾過により ALP₁ は 19S 分画に認められ、同時にこの分画に 5'-スクレオチダーゼ (5'-N), ロイシンアミノペプチダーゼ (LAP), γ -グルタミルトランスペプチダーゼ (γ -GTP) などのいわゆる胆道系酵素も認められる (Fig. 2).⁷⁾ 従って、ALP₁ は高分子 ALP であると同時に、胆道系酵素と同一の機序によって血中に上昇すると思われる。また、ALP₁ は n-ブタノール処理により低分子化し、ALP₂ と同じ電気的易動度を示す。また、肝癌組織の ALP を組織化学的に検索すると、ALP 活性は、肝癌細胞よりも周囲の肝組織中に著明な活性が認められる。これは肝癌により周囲の肝組織が圧迫され、部分的な胆管閉塞が起り、それより末梢の肝細胞において ALP の生成亢進が起るとともに、胆管から腸管への排泄障害により、ALP 活性が増加すると考えている。これらの成績を総合すると ALP₁ は肝癌細胞に由

来するのではなく、閉塞性黄疸と同様の機序で肝細胞の毛細胆管側絨毛に局在する ALP_2 が膜破片の形で血中に出現するため、高分子 ALP として検出されると考えられる。

III. ALP_3 (骨性 ALP) について

癌の骨生成性骨転移では、血清 ALP が著明に上昇するが、これは ALP_3 の増加によるものである。しかし、 ALP_3 の増加は癌だけでなく、乳・幼児、骨生成の亢進のみられる骨疾患でも同様に ALP_3 の増加がみられる。従って ALP_3 の増加は癌細胞由来の ALP によるものではなく、骨生成の亢進を反映したのものであると考えられる。なお、北村らは、乳・幼児期にみられる血清 ALP_3 と癌の骨転移にみられる血清 ALP_3 とは、電気的易動度に多少の差がみられるとしているが、われわれはまだその様な例を経験していない。癌の骨転移にみられる ALP_3 が骨 ALP と異なるかどうかは更に検討する必要があると考えられる。

IV. ALP_4 (胎盤 ALP) について

妊娠末期に血清中に出現する ALP_4 は胎盤 ALP と電気的易動度および酵素学的性質が一致しており、胎盤での ALP 生成亢進を反映して、血中に増加したと考えられる。

Fishman らは Regan という肺癌患者の血清および癌組織中に胎盤 ALP と同じ酵素学的性質を有する ALP を認め、Regan isoenzyme として報告した。¹⁾ われわれもほぼ同時期に一部の癌患者血清中に ALP_4 の出現を認めたが、同時に重症非癌疾患にも ALP_4 の出現を認め、重症疾患にみられる ALP_4 として報告した。⁴⁾ ALP_4 は $65^\circ C$ でも失活しないという耐熱性を有しているので、耐熱性 ALP として測定すると、悪性腫瘍患者の約20%に出現が認められた。しかし、われわれは、当時、わが国で使用されているアルブミン製剤の使用例に ALP_4 が血清中に出現することを認めた。⁸⁾ これはアルブミンを一部胎盤血から精製しているため、胎盤 ALP がアルブミン製剤中に入るためである。従ってアルブミン製剤使用例では、そのために ALP_4 が血中に出現する可能性がある。癌患者の多くはアルブミン製剤の投与を受けているため、正確な癌由来の ALP_4 の出現頻度を算出することはできなかった。一方、中山ら²⁾は Regan isoenzyme と α -ロイシンに対する感受性の異なる癌由来の ALP の出現を認め、Nagao isoenzyme として報告している。われわれは癌患者血清中からは Nagao isoenzyme を証明することはできなかったが、妊婦200例の血清中1例に

Nagao isoenzyme と同じ性質を有する ALP を認めた。この ALP の電気的易動度は、通常の胎盤 ALP に比べて寒天ゲル法では、やや陽極寄りに泳動された。⁹⁾ 中山らの好意により分与を受けた Nagao isoenzyme および Regan isoenzyme は胎盤 ALP の radioimmunoassay により胎盤 ALP と同一の dose response curve を示し、免疫学的には同一であることを認めた。なお Inglis ら⁹⁾ は Nagao isoenzyme は胎盤 ALP の d-variant であるとしている。

癌患者に癌由来の ALP が血中に出現する頻度は極めて低く、1%以下であると考えられる。したがって、臨床的意義は大きいとはいえない。しかし、癌由来の ALP が胎盤 ALP と酵素学的にも免疫学的にも同一であることは、癌化と ALP の関係を研究する上には重要な所見であり、carcinoplacental enzyme の1つであるといえる。

V. ALP I (Hepatoma ALP) について

Warnock ら³⁾は、ヘパトーム患者の癌組織および血清中に特異な ALP の出現を認め、肝 ALP の variant であると考え、variant ALP として報告した。われわれはヘパトームに特異的に出現するので hepatoma ALP と呼んでいる。われわれの hepatoma ALP の成績は、Table 3 に示すとおりである。¹⁰⁾ ヘパトームの約30%に出現が認められ、その他の疾患では、尿毒症に一過性の出現をみたほかは現在まで1例も認めていない。 α -フェトプロテイン (AFP) との関係を見たのが Table 4 である。AFP の出現していないヘパトーム4例中2例に出現を認めている。また、AFP の出現を認めたヘパトーマおよび胎児性腫瘍では hepatoma ALP は1例も出現を認めていない。これらの成績は AFP と hepatoma ALP は生成機序が異なることを示すとともに、AFP に

Table 3. Prevalence of hepatoma ALP .

Diseases	Number of cases	Hepatoma ALP
Hepatoma	51	16 (31%)
Hepatoblastoma	3	0
Embryonal cancer	2	0
Congenital bile duct atresia	5	0
Other cancers	76	0
Liver cirrhosis	90	0
Other diseases	220	1 (Uremia)
Healthy adults	235	0

Table 4. α -fetoprotein, hepatitis B antigen and hepatoma ALP.

		Number of cases	Hepatoma ALP	
			+	-
AFP (ng/ml)	0~10	4	2	2
	11~400	7	2	5
	401~10,000	3	1	2
	≥10,000	35	11	24
Total		49	16	38
HBs Ag	+	17	8	9
	-	32	8	24
Total		49	16	33

比べると、ヘパトームにおける出現頻度は低い、ヘパトームの診断にある程度役立つことを示すものである。

Hepatoma ALP は、組織化学的検索では、ヘパトーム細胞の細胞質内に認められた。また、hepatoma ALP は電気的易動度および耐熱性以外は Nagao isoenzyme に類似しており、免疫学的には胎盤性 ALP と同一であった。東野ら¹¹⁾ は羊膜の株化細胞の 1 つである FL 細胞の ALP のうち、fast moving band の ALP (FL-ALP_F) が酵素学的にも免疫学的にも hepatoma ALP と同一であることを認めている。したがって、hepatoma ALP も広い意味では carcinoembryonic enzyme の 1 つであるといえる。

結 論

1. 肝癌では高分子 ALP、骨生成性骨転移では骨

ALP、一部の癌患者では胎盤 ALP およびヘパトームで hepatoma ALP が血中に増加する。このうち、癌細胞に由来するものは後二者のみである。

2. 癌患者の 1% 以下に癌組織由来の胎盤型 ALP である Regan isoenzyme および Nagao isoenzyme が血中に出現する。しかし、その出現頻度は低く臨床的意義は少ない。

3. ヘパトーム患者の約 30% にヘパトーム組織由来の ALP の出現が認められ、ヘパトームに比較的特異的に出現する。この ALP も広義の carcino-placental ALP の 1 つである。

引 用 文 献

- 1) Fishman, W.H. et al. : Cancer Res., **28** : 150, 1968.
- 2) Nakayama, T. et al. : Clin. Chim. Acta, **30** : 546, 1970.
- 3) Warnock, M.L. and Reisman, R. : Clin. Chim. Acta, **24** : 5, 1969.
- 4) Suzuki, H. et al. : Ann. N.Y. Acad. Sci., **166** : 811, 1969.
- 5) 飯野四郎他 : 生物物理化学, **19** : 35, 1974.
- 6) 三木一正他 : 日消誌, **73** : 162, 1976.
- 7) 鈴木 宏, 堺 隆弘 : 日消誌, **69** : 865, 1972.
- 8) Iino, S. et al. : Tumor Res., **8** : 146, 1973.
- 9) Inglis, N.R. et al. : Cancer Res., **33** : 1657, 1973.
- 10) Suzuki, H. et al. : Ann. N.Y. Acad. Sci., **295** : 307, 1975.
- 11) Higashino, K. et al. : Ann. N.Y. Acad. Sci., **295** : 337, 1975.