〔原 著〕

小児に一過性に見られた易動度の速い ALP アイソザイムの4例*

塚田敦子**・塚田敏彦**・中山年正**・北村元仕**

Summary

An abnormal isozyme of alkaline phosphatase (ALP: orthophosphoric monoester phosphohydro-lase, EC 3.1.3.1) detected in the serum of four children with no malignancy is described.

The molecular weights of the abnormal enzyme in all four patients were about 1.7×10^5 daltons, and the enzyme migrated to the front position of the liver ALP ($\alpha_1 \sim \alpha_2$ globulin region) irrespective of electrophoretic medium. Other features of the enzyme, i.e., Michaelis constants, molecular sizes, susceptibilities to amino acids and to the action of neuraminidase, and heat stability suggest that this enzyme is an anomalous bone ALP with respect to sugar chains.

はじめに

血液中に見い出される異常な alkaline phosphatase (ALP: orthophosphoric monoester phosphohydro-lase, EC 3.1.3.1.) アイソザイムと悪性腫瘍との関連を取り扱った報告¹⁻¹⁰⁾は多い。

特に、PVP 添加寒天やポリアクリルアミドゲルのような分子篩効果を持つ支持体を用いても、肝性 ALP より易動度が速く $\alpha_1 \sim \alpha_2$ glob 位を示す ALP として、Kasahara isozyme⁵⁾ と悪性腫瘍産生性の骨性 ALP¹⁰⁾ が注目されている。

悪性腫瘍以外でこのような易動度を示す ALP は非常に稀であり、わずかに Rosalki ら¹¹⁾ が軽度胃腸障害を伴う1男性にこの種の ALP を一過性に見い出しているにすぎず、その ALP は生化学的特徴において骨性 ALP であると報告している。

本報告は、当病院の過去15年間の ALP isozyme 分析の途上に見い出された、この Rosalki タイプと特徴が類似する異常 ALP について述べる。この異常 ALP は非悪性腫瘍の小児4例が一過性に高 ALP 血症を示した時に見い出され、性質においては骨性であった。

症 例

4例はいずれも (1)5歳以下の小児である、(2)ALP 活性値が 45~125 K-A 単位で子供としても異常高値である、(3)非悪性腫瘍の疾患である、などの共通な特徴が認められた。4例の略病歴は下に記載した。

Case 1: 2歳女児、生後6か月頃からの左強直母指で腱鞘切開手術のため入院。術前 ALP 活性 125 K-A 単位。臨床診断名: 左強直母指。

Case 2: 5歳女児、1歳頃から左滲出性中耳炎と慢性扁桃炎を繰り返し、扁桃炎手術のため入院。術前 ALP 100 K-A 単位。臨床診断名: 左滲出性中耳炎・アデノイド増殖症・慢性扁桃炎。

Case 3: 5歳男児、3歳頃からの反復性耳下腺炎のため精査入院。耳下腺腫張時の ALP 活性 45 K-A 単位。臨床診断名: 反復性耳下腺炎。

Case 4: 2歳女児、1歳頃から頭頂部に母指頭大の良性腫瘍発生。手術により頭蓋骨腫瘍を摘除した。術前 ALP 68 K-A 単位。臨床診断名: 良性頭蓋骨腫瘍、病理診断名: 硬線維性線維腫 (Desmoplastic fibroma)。

* Atypical fast-moving isozyme of alkaline phosphatase transiently found in sera of four children.

** Atsuko Tsukada, Toshihiko Tsukada, Toshimasa Nakayama, Motoshi Kitamura, 虎の門病院臨床化学検査部, 沖中記念成人病研究所
(受付 1983年10月26日, 受理 1984年2月27日)

材料および方法

1. 材料

患者血清を用い、全ての材料は使用時まで -20°C 以下に保存した。コントロールは日常検査で判定済みの肝性および骨性 ALP を多量に含有するヒト血清を用いた。

2. 方法

1) ALP 活性測定

ALP の総活性およびアミノ酸阻害は MgCl_2 添加 Kind-King 変法¹²⁾にて測定した。ALP の *p*-nitrophenylphosphate に対する K_m 値は LKB Ultrolab system 8600 reaction rate analyzer を用い、基質濃度以外の条件をドイツ臨床化学会標準法¹³⁾に準じて測定した。

2) ALP アイソザイムの分析

ポリビニールピロリドン (PVP-K 90, 東京化成) を 0.8% 含む 1% 寒天 (半井化学, Extra pure grade) ゲル電気泳動による ALP アイソザイム分析は、すでに報告した方法¹⁴⁾を用いた。ALP 活性染色は *p*-toluidinium, 5-bromo-4-chloro-3-indoxyl-phosphate (和光純薬) を基質とする indigo 発色¹⁴⁾を用いた。

また、5% PAGE は不連続系スラブ泳動により、陰極側には 22.3 mmol/l TES-19.8 mmol/l Bis・Tris buffer, 陽極側には 50 mmol/l HCl-62.5 mmol/l Bis・Tris buffer を用い、250V 定電圧、 4°C 、約 3 時間泳動し、染色は上記に準じた。

3) Neuraminidase 処理

血清に *Arthrobacter Ureafaciens* の neuraminidase (丸金醬油製, 半井化学販売) を 0.2 IU/ml となるよう添加し、酢酸緩衝液で pH 6.0 とし、この混合液を 37°C 、3 時間反応させた。反応後は 1 mmol/l MgCl_2 を含む 20 mmol/l Tris-HCl 緩衝液 pH 8.6 に対し 4°C 、2 時間透析し試料とした。

4) 熱安定性試験・アミノ酸阻害試験

両試験はすでに報告した方法¹⁴⁾を用い、その ALP 活性の測定は 5 mmol/l MgCl_2 を含む Kind-King 変法¹²⁾によった。

5) 薄層ゲルクロマトグラフィー (TLG)

Sephadex G-200 Superfine (Pharmacia) による TLG は常法¹⁵⁾によった。

結 果

1. 血清 ALP ザイモグラムとその経過

Fig. 1 に患者 4 例の PVP 添加寒天ゲル電気泳動法による血清 ALP ザイモグラムを示した。正常骨性 ALP

Fig. 1. PVP-agar gel electrophoretograms of serum ALP isozymes.

Fig. 2-1. Levels of ALP and other enzyme activities in the serum of Case 2.

Fig. 2-2. Disappearance of the abnormal ALP isozyme in the serum of Case 2 after operation.

は α_2 - β -glob 位に broad な band として、また、正常肝性 ALP は α_2 -glob 位に電気泳動された。一方、

Table 1. Properties of ALP isozymes in the serum of four children.

Source	Case 1	Case 2	Case 3	Case 4	Control			
	(Y.S.)	(M.H.)	(S.K.)	(Y.Y.)	Liver	Bone	Placenta	Intestine
Mobility on PVP-agar	$\alpha_1\text{-}\beta$	$\alpha_1\text{-}\beta$	$\alpha_1\text{-}\beta$	$\alpha_1\text{-}\beta$	α_2	$\alpha_2\text{-}\beta$	$\alpha_2\text{-}\beta$	β
5% PAGE	$\alpha_1\text{-}\beta$	$\alpha_1\text{-}\beta$	$\alpha_1\text{-}\beta$	$\alpha_1\text{-}\beta$	α_2	$\alpha_2\text{-}\beta$	$\alpha_2\text{-}\beta$	β
K_m (mmol/l) for <i>p</i> -nitrophenylphosphate	0.57	0.56	0.54	0.58	0.56	0.58	0.63	0.55
Heat stability (% Remaining activity)								
54°C 7.5 min	23	27	24	32	56	21	100	25
56°C 10 min	5	5	4	9	19	2	100	5
Inhibition (% Inhibition)								
5 mM Phenylalanine	15	16	17	18	18	14	74	82
5 mM Leucine	33	30	30	30	32	32	44	60
5 mM Homoarginine	81	78	82	76	78	80	20	15
Neuraminidase sensitivity	+	+	+	+	+	+	±	—
Molecular size on TLG ($\times 10^5$ d)	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.2	1.5

4例の泳動像はいずれも $\alpha_2\text{-}\beta\text{-glob}$ 位に正常と思われる骨性 ALP が見られる他に、肝性 ALP より陽極側 ($\alpha_1\text{-}\alpha_2\text{-glob}$ 位) に泳動する異常 ALP が認められた。この易動度の大きな異常 ALP 分画の各症例の易動度は、症例による差がほとんど認められなかった。

これら4例の経過において、特に ALP 活性値の変動が顕著であった Case 2 について、日常分析される各種の血清酵素の経過を Fig. 2-1 に示した。扁桃炎の術前 100 K-A 単位であった ALP 活性は術後急速に低下し、6週目には 14 K-A 単位に下がった。一方、LDH・GOT・GPT・ γ -GTP などの肝マーカー酵素の値はほとんど変化が見られず、正常値を維持していた。

Fig. 2-2 には、この Case 2 の ALP ザイモグラムの経過を示した。術前 100 L-A 単位の高 ALP 血症時に見られた異常な ALP 分画は、術後も 30 K-A 単位に下がったときまで認められるが、6週目に総活性が 14 K-A 単位と正常化した時点では検出できなかった。

他の3例に関しても、ALP を除く他の肝機能データは全て正常であり、異常高値を示した ALP 活性は術後あるいは消炎時に次第に正常化した。

2. 血清 ALP の性質

異常 ALP を含む ALP mixture としての血清 ALP の性状は Table 1 にまとめた。

表の電気易動度は、異常 ALP と正常骨性 ALP が混在するため、全体として $\alpha_1\text{-}\beta\text{-glob}$ 位の易動度と表現した。熱安定性は肝性 ALP と異なり骨性 ALP に類似した。 K_m 値やアミノ酸阻害などの酵素学的性状は、肝性や骨性 ALP と区別できなかった。TLG で求めた分子量は肝性・骨性 ALP のそれと等しく、高分子成分は

Fig. 3. ALP zymograms of neuraminidase untreated (N-) and treated (N+) sera electrophoresed on PVP-agar gel.

存在せず、免疫 glob との結合や膜結合 ALP の存在の可能性が否定された。

Neuraminidase 処理のこの酵素に対する感受性を電気泳動の易動度の変化で調べた結果を Fig. 3 に示す。4例とも neuraminidase 処理により2本の band は消失し、 $\gamma\text{-glob}$ 位に1本の band となった。この位置は肝性・骨性 ALP とほぼ同一で、区別はできなかった。

3. 部分精製 ALP の性質

比較的試料が多く入手できた Case 2 では、DEAE-Sephacryl S-300 により酵素を部分精製して性状を調べた。PVP 添加寒天・ポリアクリルアミドゲル電気泳動の易動度・耐熱性。アミノ酸阻害・neuraminidase 感受性などの諸性質は、血清のそれと類似した。

考 察

肝性 ALP より易動の早い ALP が悪性腫瘍においてしばしば見い出されている。それらには Wornock ら²⁾ が最初に肝癌で見い出し、その後、東野ら^{5,9,16,17)} が Kasahara isozyme と命名した胎児の小腸性 ALP に類似したアイソザイムと、Fishman ら¹⁸⁾ が早期胎盤型 ALP としている骨性 ALP に類似したアイソザイムがある。前者は主に原発性肝癌で、後者は稀に胃癌などの悪性腫瘍で見い出され、癌による酵素の ectopic な産生と考えられている。

ここに報告した異常に易動度の速い ALP が見い出された4例は、いずれも5歳以下の小児で、特定の疾患と関連付けられない良性の疾患であり、少なくとも悪性腫瘍とは関係がなかった。

この異常な ALP は病状悪化時に一過性に出現して、高 ALP 血症を来していた。ALP 活性値は 45~125 K-A 単位に及び、これは小児の ALP 値としても異常高値である¹⁹⁾。肝機能検査の正常なことは、この ALP が肝由来でないことを示唆しており、また、アミノ酸阻害の成績はこの ALP が Kasahara isozyme でないことを支持する。この酵素の生化学的特徴、すなわち、 K_m 値、アミノ酸阻害、分子量、neuraminidase 処理後の電気泳動の易動度、他、特に耐熱性の結果は、明瞭な電気泳動の易移動性の差を除いて、この酵素が骨由来の ALP とよく似ており、それと区別できない ALP であることを示している。熱試験は蛋白濃度²⁰⁾、pH²⁰⁾、Mg 濃度^{21,22)}などの影響を受け、結果は±5%程度のバラツキがあり、大凡の型判定しかできない^{14,23)}。また、neuraminidase 処理後の電気泳動の易動度が肝性・骨性 ALP のそれに似ていることは、これらの異常 ALP が三木や飯野ら²⁴⁾の言う universal type の ALP で、糖鎖の異なる ALP であり、小児期のある種の疾患で出現し、それは耐熱性の点で骨性に近い ALP であることを示している。

これら酵素の上記特徴は、Rosalki ら¹¹⁾の報告した軽度胃腸障害のある21歳男性に一過性に出現した異常な易動性の ALP と類似している。

我々は、ここに報告した4例がすべて悪性腫瘍と関係しない小児であり、また、Rosalki らの1例も非悪性腫瘍患者であったことから、肝性 ALP より易動度の速い ALP が必ずしも腫瘍産生ではなく、特に、小児に稀れではあるが見い出されることを強調したい。我々の経験

した4例は、Case 1 が1981年、Case 2 は1982年、Case 3 は1976年、Case 4 は1973年にそれぞれ見い出されたものである。病的状態にある1部の小児で、このような易動度の速い異常な ALP、多分、骨性 ALP の糖鎖の一修飾型が何故出現するかについては、今後の研究が必要である。

文 献

- 1) Fishman, W.H. et al.: *Cancer Res.*, **28**: 150, 1968.
- 2) Warnock, M.L. et al.: *Clin. Chim. Acta*, **24**: 5, 1969.
- 3) Nakayama, T. et al.: *Clin. Chim. Acta*, **30**: 546, 1970.
- 4) Portugal, M.L. et al.: *Int. J. Cancer*, **6**: 383, 1970.
- 5) Higashino, K. et al.: *Clin. Chim. Acta*, **40**: 67, 1972.
- 6) Kang, K.Y. et al.: *Gann*, **63**: 217, 1972.
- 7) McKenzie, D. et al.: *Clin. Chim. Acta*, **62**: 447, 1975.
- 8) Miki, K. et al.: *Cancer Res.*, **36**: 4266, 1976.
- 9) Higashino, K. et al.: *Gann*, **67**: 909, 1976.
- 10) 塚田敏彦他: *生物物理化学*, **25**: 234, 1981.
- 11) Rosalki, S.B. and Hurst, N.P.: *Clin. Chim. Acta*, **73**: 149, 1976.
- 12) 渡辺賢誠他: *臨床病理*, **15**: 708, 1967.
- 13) G.S.C.C.: *Klin. Chem. Klin. Biochem.*, **10**: 290, 1972.
- 14) 北村元仕, 仁科甫啓編: *実践臨床化学(増補版)*, 第2版, 医歯薬出版, 東京, 1982, p.352~368.
- 15) Morris, C.J.O.R.: *J. Chromatogr.*, **16**: 167, 1964.
- 16) 東野一弥, 岩田寿一: *代謝*, **16**: 215, 1979.
- 17) 東野一弥, 谷野智子: *日本臨床*, **38**: 4588, 1980.
- 18) Fishman, L. et al.: *Cancer Res.*, **36**: 2268, 1976.
- 19) 北村元仕: *検査と技術*, **8**: 17, 1980.
- 20) Moss, D.W. et al.: *Clin. Chim. Acta*, **40**: 35, 1972.
- 21) 飯野四郎他: *医学のあゆみ*, **85**: 593, 1974.
- 22) Brunel, C. and Cathala, G.: *Biochim. Biophys. Acta*, **309**: 104, 1973.
- 23) Cadeau, B.L. and Melkin, A.: *Clin. Chim. Acta*, **45**: 235, 1973.
- 24) Mili, K. et al.: *Carcino-embryonic Protein*, Vol. 1, ed. by Lehman, F.G., p. 403, Elsevier Amsterdam, 1979.