〔原 著〕

前処理にアフィニティークロマトグラフィーを用いた 血清 γ -glutamyltransferase アイソザイムの 電気泳動法による分画

三宅洋左*・宮本 京**・渡辺 均***・大森智弘*・鳴海正毅*

SUMMARY

We separated serum γ -glutamyltransferase isozymes by electrophoresis after elimination of cell membrane/lipoprotein fractions (LP) from human serum by Affi-Gel Blue (AGB) affinity chromatography. Electrophoresis of original serum and the AGB-nonbound fraction (membrane-nonbound GGT) was performed in parallel on cellulose acetate membrane (TAITAN III LIPO). Electrophoretograms stained for GGT showed membrane-bound and -nonbound isozymes of GGT. The membrane-bound GGT isozymes were GGT 1, 2, 2+2' and 4, corresponding to albumin, α_1 , α_1 + post α_1 and β in protein fraction, respectively, and the membrane-nonbound GGT isozymes were GGT 1, 2, 2' and 3 (pre α_2). GGT 2 and GGT 2+2' in chronic hepatitis (2/10, 20%) and liver cirrhosis (8/11, 73%) were in the membrane-bound fraction, while those in alcoholic liver disease (10/10, 100%) and metastatic liver cancer (8/8, 100%) were in the membrane-nonbound fraction.

Key words: serum γ -glutamyltransferase isozyme, affinity chromatography, membrane-bound and -nonbound γ -glutamyltransferase, liver diseases.

はじめに

近年, γ -glutamyltransferase (GGT) アイソザイムは, 細胞膜ないしリポ蛋白結合性 (以下この両者を総称して膜結合性とする) と非膜結合性にわけて考えられるようになった¹⁾. すなわち, 膜結合性 GGT アイソザイムは閉塞性黄疸の場合に lipoprotein X 上にあり^{2,3)}, 肝臓に特異的に出現する GGT アイソザイム^{1,4-7,10)}は膜に非結合性であることが示唆されている. われわれは電気泳動によって膜結合性の有無を簡便に判別するため

に, アフィニティークロマトグラフィーによって血清を前処理し, リポ蛋白と共に吸着される GGT を膜結合性, また, 吸着されなかったものを膜非結合性と表現した. 本法を用いて肝臓と閉塞性黄疸およびそれ以外の肝疾患について, 出現する GGT アイソザイムの膜非結合性を中心に検討を試みた. 当方法により GGT アイソザイムの膜結合性および非結合性のものを容易に分別することが可能となり, 肝, 胆道疾患における膜結合性および膜非結合性 GGT アイソザイムの出現頻度に関して, 臨床的に有用と思われる結果を得たので報告する.

Electrophoretic separation of serum γ -glutamyltransferase isozyme after fractionation of serum by affinity chromatography.

* Yohsuke Miyake, Tomohiro Ohmori, Masatake Narumi; 国立東京第二病院

** Kei Miyamoto; 日本鋼管病院

*** Hitoshi Watanabe; ヘレナ研究所

Correspondence address: Yohsuke Miyake, The 2nd Tokyo National Hospital, 5-1 Higashigaoka 2-chome, Meguro-ku, Tokyo 152, Japan.

(受付 1989年7月14日, 受理 1990年8月6日)

対象と方法

1. 対象

国立東京第二病院に通院、あるいは入院中の肝、胆道疾患患者 46 名 (男子 27 名, 年齢 18~76 歳, 女子 19 名, 年齢 31~82 歳). また, 健常者として肝機能に異常の認められなかった本院職員の血清を用いた.

2. 実験方法

1) GGT 活性測定

測定試薬としてメルクオート γ -GT (関東化学) を用い, 日立 736-50 にて測定した.

2) リポ蛋白除去処理

アフィニティークロマトグラフィーの担体として用いたアフィゲルブルー (バイオラッド社) は 100~200 mesh のものを, 開始バッファーとしては 0.02 M リン酸バッファー pH 7.1 を用いた. 開始バッファーで平衡化したアフィゲルブルーをエコカラム (バイオラッド社) に 2.5 ml 均等に充填した. このカラムに血清 100 μ l をのせ, 約 2.5 ベッド容量まで開始バッファーで溶出した. 溶出される蛋白を波長 280 nm の紫外吸光で測定し, 検出されなくなった点を終点とした. この操作をアフィゲルブルーの各カラムごとに実施した. 溶出液をアミコン CS 15 (アミコン社) にて約 10 μ l に濃縮し, 膜非結合性分画の泳動用試料とした. また, このカラムから 40% イソプロピルアルコールを約 2.5 ベッド容量用いて得られた溶出液を, アミコン CS 15 にて約 10 μ l に濃縮し, 膜結合性 GGT 分画とした.

3) GGT および脂質の電気泳動

支持体はタイタン III LIPO (セルロースアセテート膜, ヘレナ社) を, 電気泳動用バッファーはエレクトラ HR バッファー (トリス・ペロナルバッファー, pH 8.8, イオン強度: 0.067, ヘレナ社) を用いた. GGT 染色試薬はタイタン γ -GT (ヘレナ社) を, コレステロール染色試薬はタイタンコレステロールサプライキット (ヘレナ社) を用いた.

GGT 染色用とコレステロール染色用の 2 枚の支持体を使用する 20 分前に電気泳動用バッファーにて平衡化し, それぞれの支持体に同一検体のリポ蛋白除去処理をした試料と, 原血清を隣接して塗布した. 塗布した検体量は GGT 活性にしたがって 0.3~1.2 μ l とした. 電気泳動は氷冷下で 180 V 定電圧にて 30 分間行った. GGT 染色用の支持体は電気泳動の終了 3 分前に, 電気泳動用バッファーで平衡化した他の 1 枚の支持体に GGT 染色試薬液を均一に含ませ, 電気泳動の終了後の

支持体と貼り合わせ, ビニール袋内にて, 37°C, 30 分間反応させた. 反応後 7.5% TCA 溶液中で 5 分間処理し, 5 分間水洗後乾燥させた. 一方, コレステロール染色用の支持体はコレステロール染色試薬液を均一に含ませ, 37°C で 20 分間発色させ, ドライヤーで乾燥固定した. また, 上記と同一の条件で電気泳動した支持体をボンソー S で蛋白分画染色した.

4) 超遠心法によるリポ蛋白の分画

血清 1 ml に臭化カリウムを加えて比重を 1.06 に調整し, ベックマン社の L 8-55 M 型超遠心機を用いて, 223,000 G (42,000 回転), 10°C で 4 時間遠心後, 上層 (カイロミクロン, LDL, VLDL) と下層 (HDL) に分画採取した⁸⁾.

結 果

GGT アイソザイムは, Fig. 1 (GGT 1 は Fig. 2) のごとく泳動された位置によって, 陽極より GGT 1, 2, 2', 3, 4 の五つのバンドに分画でき, 蛋白分画ではそれぞれ, アルブミン, α_1 , post α_1 , pre α_2 , β の分画に対応した. また, リポ蛋白とは GGT 2+2' が HDL 分画とその陽極に幅広いバンドとなっており, GGT 4 は LDL 分画の一部に存在した (Fig. 2). アフィニティークロマトグラフィーによるリポ蛋白除去処理を行い, 原血清との泳動像を比較することによって膜結合性の有無を判定し, バンド別にまとめて示した (Table 1). なお, GGT バンドが GGT 1 から 4 までテーリングしている場合

Fig. 1. Electrophoretograms of GGT in sera from patients with hepatobiliary diseases.

Case 1, common bile duct stone (GGT 369 IU/l); Case 2, fulminant hepatic failure (GGT 453 IU/l); Case 3, alcoholic liver injury (GGT 172 IU/l); and Case 4, chronic hepatitis (GGT 326 IU/l), 0: original serum, -: Affi-Gel-nonbound fraction.

は、強く染色されているバンドのみ取り上げた。Fig. 2 の健常者例では GGT 2 がリポ蛋白のバンドの位置にあるいは、その一部に染色され、アフィゲルブルー分画後のアイソザイムを比較すると、処理前は GGT 2 は 3 より強く染色されているが、処理後は 2 と 3 は同等に染色されたことから健常人の GGT 2 は膜結合性、膜非結合性共に存在したことが推測された。また、慢性肝炎例では原血清と膜非結合性分画中の GGT 2, 4 がリポ蛋白のバンドの位置に泳動されている。40% イソプロピルアルコールによる溶出液から得られた試料のリポ蛋白分画では、慢性肝炎例、健常者ともに、未処理のものと比較してバンドの移動度が陽極側にずれたが、とくに慢性肝炎の例では、GGT 4 も同様に (リポ蛋白の β 分画の

位置でバンドの幅がやや狭い) 陽極へ移動し、さらに新たなバンドとして GGT 1 が出現した。Fig. 1 に、肝、胆疾患の GGT アイソザイムを示した。Case 2 の劇症肝炎例では、膜非結合性の GGT 2', 3 が増加している。通常、急性肝炎では GGT の顕著な上昇はないが、この例は胆管閉塞のため上昇があったのでとくに取り上げた。Case 3 のアルコール性肝障害例では、膜非結合性 GGT 2 が認められた。Case 4 の慢性肝炎例の GGT 2, 4 はすべて膜結合性で、開始バッファーによる溶出液に GGT 活性は認められなかった。

血清を超遠心処理後、上層と下層から採取された試料の泳動像と、さらに、それぞれをリポ蛋白除去処理したものの泳動像とを、原血清と比較した (Fig. 3)。原血清 (GGT isozyme 0) は GGT 4 が存在したが、超遠心上

Fig. 2. Relationship among proteins, lipoproteins and GGT isozymes.

0: Original sera, —: Affi-Gel-nonbound fraction, +: -bound fraction. a: chronic hepatitis (GGT, 326 IU/l) and b: healthy subject (GGT, 31 IU/l).

Fig. 3. Electrophoretograms of GGT in serum from a patient with chronic hepatitis.

0: Original serum, U: upper fraction in ultracentrifugation of serum, L: lower fraction in ultracentrifugation of serum, and —: Affi-Gel-nonbound fraction.

Table 1. Serum GGT isozymes after affinity chromatography with affi-gel blue.

GGT isozymes	Before treatment	Affi-gel-bound	Affi-gel-nonbound	Correspondence to serum proteins
GGT ₁	+	+	+	Albumin
GGT ₂	+	+	+	α_1
GGT _{2'}	—	—	+	post α_1
GGT _{2+2'}	+	+	—	α_1 + post α_1
GGT ₃	+	—	+	pre α_2
GGT ₄	+	+	—	β

+ : present, — : absent

(30) 生物物理化学

Table 2. Serum GGT isozymes in hepatobiliary diseases before affinity chromatography with affi-gel blue.

	No. of cases studied	GGT ₁	GGT ₂	GGT _{2'}	GGT _{2+2'}	GGT ₃	GGT ₄
Chronic hepatitis	10		3		7	10	2
Liver cirrhosis	11	1	3		8	11	3
Hepatocellular carcinoma	2	1	1			2	1
Alcoholic liver injury	10				10	10	3
Common bile duct stone	3				3	3	2
Metastatic liver cancer	8	2			8	8	5
Total	44	4	7		36	44	16
Healthy subjects	16		16			16	

Table 3. Affi-gel-nonbound GGT isozymes in hepatobiliary diseases.

	No. of cases studied	GGT ₁	GGT ₂	GGT _{2'}	GGT _{2+2'}	GGT ₃	GGT ₄
Chronic hepatitis	10		8			10	1
Liver cirrhosis	11		3			11	
Hepatocellular carcinoma	2					2	
Alcoholic liver injury	10		10			10	
Common bile duct stone	3		2	1		3	
Metastatic liver cancer	8	1	3	6		8	
Total	44	1	26	7		44	1
Healthy subjects	16		16			16	

層試料 (Fig. 3 GGT isozyme U) のリボ蛋白除去処理したものでは消失していた。また、下層の試料 (GGT isozyme L) では、さらにリボ蛋白除去処理したもの (GGT isozyme L-) にも同様に GGT 2, 3 が存在した。

Table 2 は肝、胆道疾患患者の血清をそのまま電気泳動したときの GGT バンド陽性者数を示したもので、Table 3 はリボ蛋白除去処理後の膜非結合性 GGT のバンドの陽性者数を示したものである。GGT 1 は処理前で 4 例 (10%) 存在したが、処理後は転移性肝癌で 1 例 (2%) のみ陽性であった。GGT 2 のみと GGT 2+2' の連続したものとどちらか一方が存在したものは、処理前で 44 例中 43 例 (98%)、処理後は GGT 2 は 26 例 (59%)、GGT 2' は 7 例 (16%) で、処理後 GGT 2 が見いだせなかった例は、慢性肝炎例の 2 例 (この 2 例は膜結合性 GGT)、肝硬変症例の 8 例であった。処理前の肝硬変症例での GGT 2+2' の陽性は 11 例中 8 例 (73%) で、この 8 例の GGT も膜結合性であった。GGT 3 は処理前、処理後ともに全例陽性、GGT 4 の処理後の出現は 1 例 (2%) のみであった。

考 察

1976 年、Will⁹⁾ はアフィゲルブルーがアルブミンのみならず、リボ蛋白も吸着することを見いだした。

GGT は膜に存在する酵素¹⁾で、血清中にもリボ蛋白 (膜) 結合性 GGT として存在し、そのリボ蛋白結合性 GGT を分離するためにリボ蛋白がアフィゲルブルーに吸着する性質を利用したものである。その後、1981 年に Izumi¹⁰⁾ らは、アフィゲルブルークロマトグラフィーで処理した血清をポリアクリルアミドグラジエントゲルで電気泳動することによって、原発性肝癌に特異的な GGT アイソザイムが効率よく検出されることを報告した。一方、Huseby³⁾ はゲルろ過とアガロースを支持体とした電気泳動によって、血清中 GGT の 50~80% は、リボ蛋白複合体 (本稿の膜結合性 GGT) であるとした。さらに、超遠心と抗血清を用いた検討では、胆道閉塞症例における β 位に出現する GGT アイソザイムの大部分は分子量 600,000 以上の lipoprotein X 複合体になっており、 α_1 , α_2 に位置するアイソザイム (本稿の GGT 2, 3 に相当する) は分子量 250,000~450,000 の HLD とのその他リボ蛋白複合体であるとした。しかし、この方法は多数検体を処理するには操作がやや煩雑であると思われたため、われわれはアフィニティークロマトグラフィーで前処理する方法を用いた。本稿における膜結合性 GGT アイソザイムとは、アフィゲルブルークロマトグラフィーによってリボ蛋白除去処理した試料と原血清を電気泳動によって比較し、その処理によって消失

したものとした。本来なら、直接アフィゲルブルー吸着性 GGT アイソザイムを溶出して電気泳動の試料とすべきであったが、この方法は以下の理由により、採用できなかった。すなわち、アフィゲルブルーに吸着した膜結合性 GGT アイソザイムの溶出には 6N 尿素あるいは、40% イソプロピルアルコールが一般に用いられるが、6N 尿素は色素と結合した膜結合性 GGT アイソザイムを溶出させ GGT アイソザイムの発色が不明瞭になるため、また、40% イソプロピルアルコールは Fig. 2 の GGT isozyme a+ が示すように処理前にはない GGT 1 が出現しており、蛋白に対する影響が考えられたからである。しかし、これらのアイソザイムの正確な泳動位置については、アフィゲルブルーに吸着した膜結合性 GGT アイソザイムを泳動像に問題のない方法で溶出させて検討することが必要であろう。

Fig. 3 に示したように、超遠心で処理した試料の GGT 分画は上層も下層も、原血清に存在しているバンドと位置的には一致しており、超遠心処理においても下層部に膜非結合性 GGT 2 は存在していることが推測される。しかし、超遠心処理は上層の試料に見られる GGT 4 はリポ蛋白除去処理で消失する膜結合性のアイソザイムであるが、下層の GGT は膜結合性の 2 と膜非結合性の GGT 2, 3 が混在していることから、膜結合性の有無を調べるのには適していない。

Table 2 のように、健常人の GGT 2 は 16 例中全例に膜結合性、および膜非結合性の両方の性質のアイソザイムが混在しており、また、GGT 3 は全例膜非結合性であった。GGT アイソザイムと疾患との関係で注目されることは、Table 2, 3 のごとく膜結合性アイソザイム GGT 2 は、慢性肝炎例に 10 例中 8 例 (80%)、肝硬変症例では 11 例中 3 例 (27%) に出現、膜非結合性アイソザイムはアルコール性肝障害例で 10 例中全例、転移性肝癌例で 8 例中 3 例 (38%)、GGT 2' 6 例も加えれば全例 (1 例は GGT 2, 2' 両バンド共出現した例) に出現したことである。

ま と め

われわれは、リポ蛋白除去処理としてアフィゲルブルーを用いたアフィニティークロマトグラフィーにより、膜非結合性 GGT 分画試料とした後、原血清と同時にセルロースアセテート膜 (タイタン III LIPO) を支持体として電気泳動を行い、GGT アイソザイムの膜結合性の有無を調べた。この方法により、肝疾患における膜結合性および膜非結合性 GGT アイソザイムの出現頻

度を検討し、以下の結果を得た。膜結合性 GGT アイソザイムは GGT 1, 2+2', 4 であり、膜非結合性 GGT アイソザイムは、GGT 1, 2, 2', 3 であった。慢性肝炎 (10 例中 2 例, 20%)、肝硬変症 (11 例中 8 例, 73%) では、GGT 2+2' が、膜結合性を示した。一方、アルコール性肝障害 (10 例中 10 例, 100%)、転移性肝癌 (8 例中 8 例, 100%) では、膜非結合性の GGT 2 が存在し、病態の鑑別に応用可能と考えられた。

文 献

- 1) Goldbery, D. M.: CRC Critical Review in Clin. Lab. Sci. Chemical Rubber Company, Cleveland, 1980, pp. 1-58.
- 2) Kreiswijk, T. et al.: Clin. Chim. Acta, 112: 3, 1981.
- 3) Huseby, N. E.: Clin. Chim. Acta, 124: 1, 1982.
- 4) Kojima, J. et al.: Clin. Chim. Acta, 106: 2, 1980.
- 5) Sawabu, N. et al.: Cancer, 51: 2, 1983.
- 6) Fujisawa, K. et al.: Carcino-embryonic Proteins, Chemistry, Biology, Clinical Applications, Vol. 1, F. G. Lehman (ed.), Biochemical Press, Elsevier, North-Holland, 1979, pp. 421-428.
- 7) 吉川智加男, 他: 臨床検査, 32: 11, 1988.
- 8) 山川民夫編: 医化学実験法講座, 1B, 初版, 中山書店, 東京, 1972, pp. 260-263.
- 9) Will, L. E.: Clin. Chim. Acta, 71: 2, 1976.
- 10) Izumi, M. and Taketa, K.: Electrophoresis '81, Walter de Gruyter & Co., Berlin, New York, 1981, pp. 709-713.

要 旨

われわれは、前処理としてアフィゲルブルーによるアフィニティークロマトグラフィーで血清 γ -glutamyl-transferase (GGT) を膜結合性、非結合性の分画に濃縮後、処理前血清と同時にセルロースアセテート膜 (タイタン III LIPO) を支持体として電気泳動し GGT アイソザイムを分離した。この方法により、肝疾患における膜結合性および膜非結合性 GGT の出現を検討し、以下の結果を得た。膜結合性 GGT アイソザイムは、GGT 1, 2, 2+2', 4 に存在し、それぞれ albumin, α_1 , α_1 +post α_1 , β 位、の蛋白分画にあたり、膜非結合性のそれは、GGT 1, 2, 2', 3 (pre- α_2) に存在した。GGT 2 および 2+2' の膜結合性を示すものが、慢性肝炎および肝硬変症では、10 例中 2 例 (20%)、11 例中 8 例 (73%) それぞれ存在し、GGT 2 および 2+2' の膜非結合性を示すものでは、アルコール性肝障害 10 例中 10 例 (100%) 転移性肝癌 8 例中 8 例 (100%) に認められた。