〔シンポジウム：レクチンの臨床応用〕

慢性肝疾患患者血清コリンエステラーゼアイソザイムの レクチン電気泳動による解析

波田 寿一・東野 一彌

SUMMARY

We investigated whether or not liver cirrhosis (LC) can be discriminated from chronic hepatitis (CH) by analysis of serum cholinesterase (ChE) isozymes using affinity electrophoresis with concanavalin A (Con A), wheat germ agglutinin (WGA),[†] lens culinaris agglutinin (LCA) or ricinus communis agglutinin I (RCA I). On Con A-containing agarose gel electrophoresis, one of three ChE isozymes disappeared in 50% (15/30) of cirrhotic patients. But only one of 20 patients with CH had the same abnormality. WGA-containing agarose gel electrophoresis revealed that normal controls and patients with CH had four ChE isozymes. However, approximately 63% (20/32) of cirrhotic patients lacked one of the four ChE isozymes. When these two affinity electrophoresis were used in combination, 73% (22/30) of cirrhotic patients had isozymic alteration of their serum ChE on either Con A- or WGA-containing agarose gel electrophoresis or both. The data obtained by use of LCA or RCA I was less contributable.

Key words: cholinesterase, liver cirrhosis, affinity electrophoresis, concanavalin A, wheat germ agglutinin.

目 的

血清コリンエステラーゼ (ChE) は血清糖蛋白の一つで肝臓で合成され血中に放出されるので、血清 ChE 活性の測定は日常臨床で肝機能検査の一つとして、とくに肝予備能を示す指標として用いられている。一般に慢性肝機能障害〔慢性肝炎 (CH)、肝硬変 (LC)〕では ChE 活性は低下するが、その値のみで CH と LC を鑑別することは困難である。われわれ¹⁾ はこれまでにポリアクリルアミドグラディエントゲル電気泳動を用いて、肝硬変患者では血清 ChE アイソザイムの異常が約 55% にみられることを報告してきた。今回われわれは各種レクチン [Concanavalin A (Con A), Wheat germ agglutinin (WGA), Lens culinaris agglutinin (LCA), Rici-

nus communis agglutinin I (RCA I)] を用いたアガロースゲル電気泳動により血清 ChE アイソザイムの変化を検討し、慢性肝炎と肝硬変の鑑別が可能かどうかを検討した。

対象と方法

対象は健常人 (HC) 20 例、慢性肝炎 (CH) 20 例 (慢性活動性肝炎 10 例、慢性非活動性肝炎 10 例)、肝硬変 (LC) 32 例、肝疾患以外の患者 20 例である。ChE 活性はコリンエステラーゼ B-test Wako を用いて行った。レクチンアガロースゲル電気泳動は Con A (0.5 mg/ml), WGA (0.25 mg/ml), LCA (0.25 mg/ml), RCA I (0.25 mg/ml) をそれぞれ含む 1.2% アガロースゲルを用いて、また槽バッファーとして 60 mmol/l Tris-

Analysis of serum cholinesterase isozymes in patients with chronic liver diseases by use of lectin-containing agarose gel electrophoresis.

Toshikazu Hada and Kazuya Higashino; 兵庫医科大学第三内科

Correspondence address: Toshikazu Hada, 3rd Department of Internal Medicine, Hyogo College of Medicine, 1-1, Mukogawa-cho, Nishinomiya 663, Japan.

Veronal buffer (pH 8.6) を用いて, Con A では定電圧 165 V で約 3.5 時間, WGA, LCA, RCA I では 100 V 約 4 時間泳動後, α -naphthyl acetate と Fast violet B salt を用いて活性染色を行い, ゲルを乾燥後デンストメーター (495 nm) にてアイソザイムの検討を合わせて行った.

結 果

血清 ChE 活性 (mean $\pm$ SD) は HC で 1879.8 ± 691.4 IU/l, CH で 1248.8 ± 466.5 , LC で 778.0 ± 472.4 で CH, LC となるに従って ChE 活性は低下したが, 各群間にはかなりの重複がみられ, ChE 活性のみから CH と LC の鑑別は困難と思われた (Fig. 1). Con A 含有アガロースゲル電気泳動では, HC の血清 ChE は主として 3 本の活性帯にわかれ (陽極側からアイソザイム I, II, III と命名) たが, LC ではアイソザイム II の消失または活性帯の著明な減少を 30 例中 15 例 (50%) に認めた (Fig. 1, 2). CH では 20 例中 1 例で同様の変化を認めたが, HC 群や肝疾患以外の群ではこの変化を

Fig. 1. ChE levels in sera of HC, patients with CH and LC.

(○) shows the patients with normal isozymic pattern of serum ChE. (Δ) and (●) indicate the patients positive for isozymic alteration (disappearance of band II) detected by Con A- and WGA-containing agarose gel electrophoresis, respectively. (◐) indicates patients positive for isozymic alteration of serum ChE on both affinity electrophoresis. HC, healthy controls; CH, chronic hepatitis; LC, liver cirrhosis.

Fig. 2. Electrophoretogram of serum ChE isozymes on Con A-containing agarose gel (upper) and the corresponding isozymic pattern obtained by densitometry at 495 nm (lower).

CH and LC, the same as in Fig. 1.

Fig. 3. Electrophoretogram of serum ChE isozymes on WGA-containing agarose gel (upper) and the corresponding isozymic pattern obtained by densitometry at 495 nm (lower).

CH and LC, the same as in Fig. 1.

Table 1. Frequency of isozymic alteration of serum cholinesterase by affinity electrophoresis with Con A compared with that by WGA-containing agarose gel electrophoresis.

		WGA-containing agarose gel	
		Disappearance of band II	Normal isozymic pattern
Con A-containing agarose gel	Disappearance of band II	13	2
	Normal isozymic pattern	7	8

認めなかった。WGA 含有アガロースゲル電気泳動では、HC の血清 ChE は主として4本の活性帯（陽極側からアイソザイム I, II, III, IVと命名）に分かれた。LC ではアイソザイム II が消失している例は 32 例中 20 例 (62.5%) に認めたが、CH では HC と同様の成績を示した (Fig. 1, 3)。しかし肝疾患以外で肺癌 2 例、肺結核 1 例でアイソザイム II の欠損を認めた。

LCA 含有アガロースゲル電気泳動では、HC の血清 ChE は主として3本の活性帯（陽極側からアイソザイム I, II, IIIと命名）を認めたが、LC ではアイソザイム III の欠損を 30 例中 6 例 (20%) に認めた。CH ではこのような変化を認めなかった。RCA I 含有アガロースゲル電気泳動では血清 ChE アイソザイムには著明な変化を CH, LC で認めなかった。以上4種類のレクチン含有電気泳動のうちで、LC で血清 ChE アイソザイム異常の出現率が高かった Con A と WGA 含有アガロースゲル電気泳動の成績を、両方の電気泳動を行った 30 例について組み合わせで検討した。両方の電気泳動で ChE アイソザイム異常を認めたのは、LC 30 例中 13 例 (43.3%)、どちらか一方の電気泳動でのアイソザイム異常は 30 例中 9 例 (30%) であり、両方を合わせてどちらか一方または両方でアイソザイム異常を認めたのは 30 例中 22 例 (73.3%) であった。また両方法での成績の一致率は 30 例中 21 例 (70%) であった (Table 1)。

次にアイソザイム異常の出現と臨床病期について検討した。今回検討した LC 症例は、Child 分類²⁾で分類す

Table 2. Relationship between isozymic alteration of serum cholinesterase and clinical stages of liver cirrhosis.

Clinical stage	Isozymic alteration
Child's A	16/23 (69.6%)
Child's B	5/6 (83.3%)
Child's C	1/1 (100%)

ると、30 例中 23 例 (76.7%) が Child A, 30 例中 6 例 (20%) が Child B, 残り 1 例が Child C であった。群では 6 例中 5 例 (83.3%) に、Child C 群では 1 例に Child A 群では 23 例中 16 例 (69.6%) に、Child B アイソザイム異常を認め、LC の病状が進行している群ほど本酵素のアイソザイム異常の出現率が高くなることが明らかになった (Table 2)。

考 察

血清 ChE はその分子量の約 23.9% に糖を含んでおり、糖の組成としては galactose, mannose, acetylhexosamine, acetyl-neuraminic acid, fucose を含むと報告³⁾されているが、詳細な糖鎖構造は不明である。われわれはこれまでに肝癌由来樹立培養細胞株 HuH-7⁴⁾ の培養上清中 ChE のレクチンへの反応性を検討し、Con A, WGA, RCA I に対する反応性が血清 ChE と異なることから、HuH-7 の ChE は D-mannose, N-acetylglucosamine, D-galactose に発現異常があることを示唆する結果を報告⁵⁾してきた。この成績から、肝癌やその前癌病変であると考えられる肝硬変でも血清 ChE に糖鎖発現異常が生じているのではないかと考え、まず Con A, WGA, LCA, RCA I のおのおののレクチンと血清 ChE を混合し、その遠沈上清の活性を測定して HC, CH, LC で差があるかどうかを検討したが、いずれのレクチンでも有意な差を認めなかった。次にこれらのレクチンを用いたレクチン電気泳動を行ったところ、前三者で ChE アイソザイムの変化を認めたので、肝硬変では D-mannose, N-acetylglucosamine, fucose に変化がおこっている可能性を示唆した。また Con A, WGA を用いたレクチン電気泳動は CH と LC の鑑別に有用な方法であると思われた。今回得た成績は、ChE アイソザイムの minor component の変化 (消失または減少) を主としてとらえたものであるが、今後は major component の糖鎖異常の有無を検討していく予定である。

文 献

- 1) Hada, T. et al.: Clin. Chim. Acta, 178: 111, 1988.
- 2) Barbare, J. C. et al.: J. Hepatol., 1: 253, 1985.
- 3) Haupt, H. et al.: Blut, 14: 65, 1966.
- 4) Nakabayashi, H. et al.: Cancer Res., 44: 3749, 1984.
- 5) Hada, T. et al.: Tumor Biol., 8: 3, 1987.

要 旨

各種レクチン[concanavalin A (Con A), wheat germ agglutinin (WGA), lens culinaris agglutinin (LCA), ricinus communis agglutinin I (RCA I)]を用いたアガロースゲル電気泳動により, 血清コリンエステラーゼ

(ChE) アイソザイムの変化を検討し慢性肝炎 (CH) と肝硬変 (LC) の鑑別が可能かどうかを検討した. Con A 含有アガロースゲル電気泳動では LC では約 50% に ChE アイソザイム異常を認めたが, CH では 5% にしか ChE アイソザイム異常を認めなかった. WGA 含有ゲルでは LC で 62.5% に ChE アイソザイム異常を認めたが CH では異常を認めなかった. LCA 含有ゲル電気泳動では LC で 20% に異常を認めたが CH では異常はなく, また RCA I では LC, CH とも ChE アイソザイム異常はみられなかった. 異常出現頻度の高い Con A と WGA 含有ゲルでの成績を合わせると LC では 73.3% に ChE 異常をいずれかの方法で認め, その出現は LC の病期が進行するほど高率であった.