〔原 著〕

血清 ALP アイソザイムのセ・ア膜と PAG ディスク

電気泳動法による成績の比較検討

— 消化器系疾患を中心に —

菊野 晃*・北田増和*・渡辺伸一郎**・竹内 正**

菰田二一***・坂岸良克***

SUMMARY

Differences between alkaline phosphatase (ALP) isozyme patterns obtained by cellulose acetate membrane (CA) and polyacrylamide disc gel (PAG) electrophoreses were compared. With the PAG, high-molecular mass ALPs can be detected more frequently than those with the conventional CA. The high-molecular mass ALP migrated to the pre-liver ALP position on the CA, but was separated into the two retained ALP fractions on the PAG: one is that detected at the top position of the stacking gel (retained 2, R 2); the other is that detected at a position between the stacking and the loading gels (retained 1, R 1). After treatment of serum with 2% Triton X-100, the two retained ALPs could homogeneously migrate to the position of biliary ALP. The contents of the R 1 and R 2 ALPs in serum were related to pathological conditions of gastrointestinal disorders. Although the R 2 ALP was frequently observed in benign hepatobiliary disorders, the R 1 ALP detected more in the gallbladder and pancreas carcinomas. The retained ALPs were extracted from the PAG with 2% Triton X-100 and treated with phosphatidylinositol specific phospholipase C. The resulting aliquots were further subjected to the PAG electrophoresis for analyzing the organic origin of ALP isozymes. The results showed that the R 2 ALP contained the liver, bone, and intestinal ALP(s), whereas the R 1 ALP had mainly liver ALP. These findings suggest that the retained ALPs serve a useful information for the diagnosis of damaged organs in clinical practice because of the organ specificity of R 1 and R 2 ALPs.

Key words: PAG, high-molecular-size ALPs, retained ALPs, PIPLC, organic origin.

Comparative studies on serum ALP isozyme fractions isolated by conventional cellulose acetate membrane and polyacrylamide disc gel electrophoreses: Focusing on gastrointestinal diseases.

* Akira Kikuno, Masukazu Kitada; 東京女子医科大学臨床中央検査部

** Shin-ichiro Watanabe, Tadashi Takeuchi; 同, 消化器内科

*** Tsugikazu Komoda, Yoshikatsu Sakagishi; 埼玉医科大学第一生化学教室

Correspondence address: Akira Kikuno, Central Clinical Laboratories, Tokyo Women's Medical College, 8-1 Kawada-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 162, Japan.

略号: ALP, alkaline phosphatase; CA, cellulose acetate membrane; PAG, polyacrylamide disc gel;

R1, retained 1; R2, retained 2; PIPLC, phosphatidylinositol-specific phospholipase C

(受付 1993年6月18日, 受理 1993年10月7日)

はじめに

ポリアクリルアミドゲル (PAG) ディスク電気泳動法によるアルカリ性ホスファターゼ (ALP) アイソザイムの鑑別は, Epstein らによって開始され¹⁾, アイソザイムの荷電と分子篩効果により精密に ALP アイソザイムを特定でき, retained 型・肝型・骨型・小腸型および免疫グロブリン結合型 ALP などの判別が従来法より簡単で, かつ病態特異的な ALP も容易に鑑別できることが報告されている^{2,3)}.

ALP は本来生体膜に結合している酵素であり, 健常時には可溶性の ALP として血流中に検出されるが, 特定の病態時血流中へ出現する際は, 酵素分子の C 末端アミノ酸配列側にある糖脂質様膜結合アンカー (GPI アンカー) をもつ ALP として検出される⁴⁾. このため, ALP 分子は病態により種々の形態をとり⁵⁾, また分子量も異なるといわれる⁶⁾.

一般に GPI アンカーをもつ ALP は PAG ディスク電気泳動法で通常濃縮ゲルに留まり, 原点位 ALP (retained ALP) として泳動されないが, 胆汁うっ滞を伴う患者の血清試料やこの血清に界面活性剤 (Triton X-100 等) を添加した試料では, ALP は分離用ゲル内に移行し, いわゆる biliary 型 ALP として検出されるようになる⁷⁾. また検体に Triton X-100 存在下で GPI アンカーのジアシルグリセロール部分を切断する PIPLC (phosphatidylinositol-specific phospholipase C) を作用させると健常時血清に認められる可溶性 ALP に変換されるといわれる⁸⁾.

今回, われわれは種々の形態をとる原点位 ALP を PAG ディスク電気泳動としてアルフォーキット ((株) 常光) を用いて, 原点位に留まる retained 1 と retained 2 の異なる高分子型 ALP に分類し, 各種消化器系疾患に伴う出現頻度と両者に含まれる ALP の主たる由来臓器を検討した. また, 本研究ではさらに通常繁用されているセルロース・アセテート膜 (セ・ア膜) Titan III 法との ALP アイソザイムパターンを比較検討した.

材料および方法

先の報告^{2,7,9)}またはアルフォーキット ((株) 常光) の使用書に従って, 25 μ l の血清サンプル調製, 電気泳動, ゲルの ALP 染色を 2 時間行い, 発色の停止は 7% 酢酸溶液を使用した.

Fig. 1. A recovery method of biliary-type ALP.

1. Biliary 型 ALP の回収法 と可溶性 ALP への変換

まず, 血清サンプルに Triton X-100 (Kodak) を最終濃度 2% となるように添加し, 室温で 1 時間放置した.

次にこの処理サンプル 50 μ l ずつを各ディスクゲル管に入れ, ゲル管 1 本当り 3 mA, 定電流で 80 分間, 4°C で泳動した. その後のゲルの ALP 染色法は上記と同様に行い, 37°C で約 10 分間, biliary 型 ALP のバンドが淡く染色されるまで発色させた.

そこで Fig. 1 のごとく, biliary 型 ALP バンドの部分をカミソリで薄くスライスして, 小型の乳棒ですり潰した. 一方, タンパク回収器である Phoretodyield (常光) の目皿の上に濾紙を敷き, この上に先のすり潰したゲルをのせ, キットと同じ緩衝液中でゲル管 1 本当り 3 mA, 定電流で 3.5 時間, 4°C で通電した.

さらに限外濾過用 tube (ミリポア-UFC 3 分子量 30,000 用) 中に, 前記の泳動によって Phoretodyield の下部の回収槽に回収された酵素サンプルを注入し, 1 mmol/l $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 10 μ mol/l $Zn(CH_3COO)_2$, 10 μ mol/l $CaCl_2$, 2% Triton X-100 を含む 10 mmol/l トリス・ホウ酸緩衝液 (pH 7.0) を加え, 6,400 rpm で約 30 秒間遠心した.

この操作を 3~4 回繰り返すことによりサンプル中の塩や界面活性剤を除き, 最終的に試料を約 100 μ l に濃縮した後, 濃縮回収した試料に最終濃度 0.5% の Tri-

ton X-100 を加え、これに PIPLC ((株)フナコシ) を 0.3 U/ml 添加し、室温で over night 放置した。この PIPLC 処理した試料をアルフォークキットと同様の方法で再泳動した。

2. セ・ア膜電気泳動法

これは測定値の互換性評価のための参照法として使用した。泳動用膜には Titan III Lipo (Helena 社)、基質は 5-プロモ-3-インドリルリン酸 *p*-ナットリジン塩 (Helena 社)、緩衝液はトリス・バルビタール緩衝液 (pH 8.6, $i=0.06$, Helena 社) を使用した。

3. 各 ALP 型の検出

検体は東京女子医大病院の入院および外来患者より得た、消化器系疾患 187 例 (肝疾患 89 例、脾疾患 15 例、胆道系疾患 33 例、食道癌 12 例、胃癌 22 例、腸疾患 16 例) の血清について、高分子型・肝型・骨型・小腸型 ALP を、PAG ディスク法とセ・ア膜法で比較した。

4. retained 1 と retained 2 の含量の違いと各疾患の相関性

本実験で使用した検体は上記の“3. 各 ALP 型の検出”で使用した症例のうち、消化器系疾患 137 例 (肝疾患 89 例中、悪性腫瘍 47 例、良性疾病 42 例; 胆道系疾患 33 例中、悪性腫瘍 7 例、良性疾病 26 例; 脾疾患 15 例中、悪性腫瘍 9 例、良性疾病 6 例) に絞ったものを対象とし、PAG 法で濃縮ゲル上部の ALP 成分 (retained 2—R2) が下部の ALP 成分 (retained 1—R1) に比較して高い例 ($R2 > R1$), R1 が R2 より高い例 ($R1 > R2$) を選出し、疾患別、良性と悪性別の差異を比較した。

結 果

1. PAG ディスク法とセ・ア膜法の ALP パターンの比較

同一検体を用いて比較した結果は Fig. 2 に示すように、高分子型 ALP は、セ・ア膜法では移動度が早いいわゆる I 型または pre-liver 型 ALP として検出されたのに対し、PAG ディスク法では retained 1 (R1) と retained 2 (R2) の異なる移動度を示す二つのバンドとして検出され、移動位置としては原点位に留まった。

また、セ・ア膜法で肝型 ALP が主成分であり、この他 I 型 ALP、小腸型 ALP、肝型と分離が悪い骨型が検出された症例では、PAG ディスク法で再検討すると、それぞれの ALP アイソザイム、たとえば biliary 型、小腸バリエーション型が比較的鮮明でシャープなバンドとして検出された。

Fig. 2. Differences between the ALP isozyme pattern for matched serum samples on cellulose acetate membrane and polyacrylamide disc gel electrophoreses.

R2: retained ALP₂, R1: retained ALP₁, Bi: biliary-type ALP, Iv: intestinal variant, I: intestinal type, B: bone type, L: liver type, P-I: pre-liver type or type I, CA: cellulose acetate membrane, PAG: polyacrylamide disc gel, upper panel: The ALP isozyme patterns with two electrophoretic methods, bottom panel: The densitometric patterns of the upper panels.

セ・ア膜法と PAG ディスク法の相関性は、高分子型、肝型、骨型、小腸型の間で、回帰式および相関係数はそれぞれ $y=0.55x+14.0$, $r=0.43$; $y=0.64x+6.6$, $r=0.77$; $y=0.57x+10.0$, $r=0.65$ および $y=0.93x+5.2$, $r=0.80$ となった。本式の y は PAG ディスク法, x はセ・ア膜法を示す。この結果は両アイソザイム測定法により得られる値の相関性が高分子型 ALP で最も低く、小腸型 ALP で最も相関性が高いことを示唆する。

一方、56°C、10 分間の熱処理法は、とくに骨型 ALP の著しい上昇で肝型と小腸型 ALP のバンドが重なって一塊となる症例や逆に骨型 ALP バンドが少なく肝型と小腸型 ALP の陰に隠れて骨型 ALP が見えにくい症例に有効であった。また、PAG ディスク法による分析は、熱処理により骨型 ALP がほぼ完全に失活するため、アイソザイムの同定をさらに容易にした。

2. 泳動法による ALP 型検出の差異

肝型・骨型・小腸型 ALP については両方法ではほぼ同程度検出された。しかし高分子型 ALP の検出は、セ・ア膜法では 62 例の検出に留まったが、PAG ディスク法ではセ・ア膜法での 62 例全例を含む 94 例が検出された。すなわち、PAG ディスク法はセ・ア膜法に比

Fig. 3. Percentages of the isozymes having $R1 > R2$ and $R2 > R1$ found in three groups of gastrointestinal diseases with or without malignant tumors. The percentages of the isozymes with CA electrophoresis were also compared with PAG electrophoresis.

(a) patient with the isozymes having $R2 > R1$.
 (b) patient with the isozymes having $R1 > R2$.
 HCC: hepatocellular carcinoma, CCC: cholangiocellular carcinoma, LC: liver cirrhosis, CH: chronic hepatitis, AH: acute hepatitis, Cb-Ca: carcinoma of the gall bladder, Gb-stone: gall stone, Pa-Ca: pancreatic carcinoma, P-stone: pancreatic stone.

較して、高分子型 ALP が 1.5 倍高く検出された (表省略)。

3. R1 と R2 の含量の差違と疾患の相関性

Fig. 3 に示すように、肝疾患全体では、良性疾患、悪性腫瘍ともに retained ALP が $R2 > R1$ となる例が多かった。また、症例別では良性の肝硬変に比較して急性肝炎で retained ALP の上昇が顕著で、細胞破壊の著しい良性疾患でも増加することが示された。

胆道胆管系疾患では、悪性腫瘍は retained ALP が $R1 > R2$ となる傾向があった。他方、良性疾患では retained ALP が $R2 > R1$ となる例がより多かった。さらに胆嚢疾患では他の胆道胆管系疾患に比較して、著しく高頻度に retained ALP が検出され特徴的であった。

脾疾患では、良性、悪性疾患ともに ALP が $R1, R2$ に留まるものはほぼ同程度検出された。これに対し悪性腫瘍においては $R2 > R1$ の場合、両方法でほぼ同程度検出されたが、 $R1 > R2$ の場合、PAG ディスク法のほうがセ・ア膜法のそれより高く検出される傾向にあった。また良性疾患では $R1 > R2, R2 > R1$ ともに PAG ディスク法でより多く高分子型 ALP が検出されたが、セ・ア膜法では高分子型 ALP がほとんど検出されなかった。

Fig. 4. The effect of various concentrations of Triton X-100 on the ALP isozyme patterns in a patient's serum containing the two retained ALPs.

4. Triton X-100 添加濃度の変化による高分子型 ALP アイソザイムの変化

胆汁うっ滞患者の血清中には、しばしば数本の biliary 型 ALP が検出される。この由来について、Sykes ら⁷⁾は retained ALP と考えている。そこで retained ALP の界面活性剤添加による変化を検討したところ、Triton X-100 濃度が 1.0% 以下では、数本の ALP バンドとして認められたが、Triton X-100 2.0% 添加により retained ALP は、biliary 型 ALP 領域に収束した 1 本のバンドとして検出されるようになった (Fig. 4)。

5. PIPLC 処理後の ALP アイソザイムパターンの変化

あらかじめ retained ALP を抽出し、PIPLC 処理を行うことにより retained ALP がどの臓器由来であるかを検討したところ、 $R2 > R1$ の症例では小腸型・骨型および肝型 ALP などが検出され、本 ALP が複数の ALP アイソザイムより構成されていることがわかった。

一方、retained ALP が $R1 > R2$ の症例について上記と同じ実験を行うと、肝型 ALP が主として検出された (Fig. 5)。

考 察

PAG ディスク法はセ・ア膜法、アガロースゲル法と異なり、WGA レクチンやノイラミニダーゼを使用しなくとも骨型と肝型 ALP が鮮明に分離されること^{2,7,11)}、小腸型と小腸型バリエーションが移動度の違いにより明瞭に分離されること、高分子型または biliary 型 ALP が濃縮ゲルに留まる^{2,7,9)}ことなどの特徴が知られている。

今回の成績より高分子型 ALP は、セ・ア膜法に比較

Fig. 5. Conversion of the retained ALP to biliary-type ALP, and difference between possible organic origins of the ALP isozymes from the retained ALP₁, and retained ALP₂.

(1) non-treated (2) Triton X-100 treated (3) PIPLC-treated. (a) patient with the isozymes having R2>R1. (b) patient with the isozymes having R1>R2.

して PAG ディスク法は高い検出率を有し、高分子型 ALP の検出には有用と考えられた。この原因としては両方法のサンプル量の違いに基づく点もあるが、PAG ディスク法は荷電だけでなく、さらに分子篩効果が加味された点が大きく関与しており、多型性で分子サイズが大きな細胞膜断片を含む ALP が濃縮ゲルに留まる結果と推定される。つまり高分子型 ALP はその分子サイズの差によって濃縮ゲル内でさらに R1 ALP と R2 ALP に分画されるものと考えられる。注目すべき点は、これらの R1 と R2 の ALP を分取後、PIPLC を作用させてから再泳動した ALP アイソザイムの結果が、R2 ALP は R1 に比し、より高分子で広い分子量範囲にわたる複数の成分から成り立ち、また R1 ALP は R2 ALP より分子量が小さく、R2 ALP より比較的分子量が均一な点であった。

また、R1 および R2 ALP は、GPI アンカーをもち、通常の肝・骨・腎型 ALP より分子量がより大きい高分子型 ALP で、組織破壊の著しい疾患で比較的检测されやすいことが示された。疾患別において、良性肝疾患および良性胆道胆管疾患患者の高分子型 ALP は良性脾疾患患者と比較して、R2 がより検出されやすい傾向にあった。これに対し、脾疾患では R1 と R2 がほぼ同程度検出され、これらの疾患において出現する高分子 ALP の特徴かもしれない。一方、悪性腫瘍においては、肝癌や脾癌での R2 ALP の検出度は、良性疾患に比較して増加する傾向にあったが、胆道胆管癌では R2 ALP が

減少して、R1 ALP が著しく増加していた。したがって R2 の減少と R1 の増加は胆道胆管癌の診断の新しいマーカーとして有用であるかもしれない。

さて、疾患に特徴ある高分子型 ALP は、従来種々の界面活性剤添加により低分子化されることが知られている^{7,12)}。一般に、胆道胆管および脾疾患患者では血清中の胆汁酸濃度が上昇しており、結果として高分子型 ALP は胆汁酸濃度に依存して可溶化状態が異なるため、R2 ALP 領域から biliary 型 ALP 領域にかけて ALP が多型性に検出されるものと思われた。

従来、高分子型 ALP は 0.5% Triton X-100 などの界面活性剤存在下では biliary 型 ALP に変換されるとの報告がある^{8,13,14)}。しかしわれわれの成績では、膜断片を含む高分子型 ALP は 0.5% Triton X-100 存在下で、R2 ALP 領域から biliary 型 ALP 領域にかけて数本の ALP バンドが検出されることが多かった。そこで、われわれは Triton X-100 濃度を検討し、2%に上昇させたところ、この高分子 ALP は biliary 型 ALP 領域に収束した 1 本のバンドとして検出されるようになった。この結果は、他の研究者の使用した Triton X-100 処理条件下では R1 や R2 の ALP がまだ十分に可溶化されておらず、多型性を示す状態にあるのではないかと推測された。

最後に急性肝炎患者で、肝型 ALP と R1 ALP が著しく増加している症例があったが、この R1 ALP は 0.5% Triton X-100 と 0.1 U/ml PIPLC の処理で、血

清中に通常認められる肝型 ALP に変換された。このことは本処理を施すことで疾患により多様な形で血中に出現してくる高分子型または retained ALP が本来どの臓器由来か、また疾患臓器がどこにあるのかが予測でき、臨床診断に今後有用と思われた。

文 献

- 1) Epstein E, Wolf PL, Horwitz JP, Zack B. An indigogenic reaction for alkaline phosphatase in disc electrophoresis. *Am J Clin Pathol* 1967; 48: 530-4.
- 2) Dingjan PG, Postma T, Stroes JAP. The diagnostic value of certain alkaline phosphatase isoenzyme patterns in human serum, fractions obtained by polyacrylamide disc electrophoresis. *Clin Chim Acta* 1975; 60: 169-83.
- 3) Epstein E, Kiechle FL, Artiss JD, Zak B. The clinical use of alkaline phosphatase enzymes. *Clin Lab Med* 1986; 6: 491-505.
- 4) 菰田二一, 坂岸良克. アルカリ性ホスファターゼ研究の進歩. *生物物理化学* 1989; 33: 9-15.
- 5) 菰田二一, 三浦雅一, 小山岩雄. アルカリ性ホスファターゼアイソザイム. *Medical Technology 別冊電気泳動法のすべて* 1991: 101-9.
- 6) De Broe ME, Roels F, Nouwen EJ, Cleays L, Wieme RJ. Liver plasma membrane, the source of high molecular weight alkaline phosphatase in human serum. *Hepatology* 1985; 5: 118-28.
- 7) Sykes E, Kiechle FL, Epstein E. Association of high-molecular-mass and electrophoretically atypical alkaline phosphatases. *Clin Biochem* 1987; 20: 259-63.
- 8) Kihn L, Dinwoodie A, Stinson RA. High-molecular-weight alkaline phosphatase in serum has properties similar to the enzyme in plasma membranes of the liver. *Am J Clin Pathol* 1991; 96: 470-8.
- 9) 坂井隆夫, 牧田 明, 近藤朝明, 滝川 一, 三宅和彦, 山中正己, 菰田二一, 坂岸良克. Phosphatidylinositol-specific phospholipase C 処理した血清アルカリ性ホスファターゼアイソザイムの polyacrylamide-gel disc 電気泳動法による検討. *医学のあゆみ* 1990; 155: 741-2.
- 10) Viot M, Thyss A, Schneider M, Viot G, Ramaioli A, Cambon P, Lalanne CM. α_1 isoenzyme of alkaline phosphatases. *Cancer* 1983; 52: 140-5.
- 11) Morero J, Vera MC, Yorio MA. Method for determining high- M_r (biliary) alkaline phos-

phatase in plasma. *Clin Chem* 1992; 38: 319-20.

- 12) Crofton PM, Smith AF. High-molecular-mass alkaline phosphatase in serum and bile, physical properties and relationship with other high-molecular-mass enzymes. *Clin Chem* 1981; 27: 860-6.
- 13) Leen HW, Diaz D, Szakaly M. A study of alkaline phosphatase isoenzyme electrophoresis on cellulose acetate compared with agar, agarose and acrylamide in the presence or absence of Triton X-100. *Clin Chim Acta* 1979; 91: 147-52.
- 14) Fishman L. Acrylamide disc gel electrophoresis of alkaline phosphatase of human tissues, serum and ascites fluid using Triton X-100 in the sample and the gel matrix. *Biochem Med* 1974; 9: 309.

要 旨

ポリアクリルアミドディスクゲル (PAG ディスク法) とセルロース・アセテート膜 (セ・ア膜法) によるアルカリ性ホスファターゼアイソザイムの差異を比較した。PAG ディスク法ではセ・ア膜法に比し、高分子型 ALP を高頻度に検出できた。セ・ア膜法では高分子型 ALP が pre-liver 型 ALP 領域に泳動されたが、PAG 法では 2 種類の retained ALP に分別された。すなわち、一方は、濃縮ゲルの上部 (retained 2 R2) に、他方は、濃縮ゲルと分離用ゲルの間 (retained 1 R1) に検出された。血清を 2.0% Triton X-100 で処理すると、2 種類の retained ALP は biliary 型 ALP 領域に収束した 1 本のバンドとして検出されるようになった。また血流中の R1 と R2 ALP の含量は各消化器系疾患の病態と相関していた。つまり、良性の肝・胆道胆管系疾患では、R2 に ALP がより多く検出されるのに対し、R1 ALP は、胆嚢癌や膵臓癌でより多く検出された。retained ALP を 2% Triton X-100 存在下で抽出・PIPLC 処理し、この retained ALP を再度 PAG 法で ALP アイソザイムの臓器由来を判定したところ、R2 では小腸型・骨型および肝型 ALP が含まれていたが、R1 では肝型 ALP が主成分であった。

これらの知見から、retained ALP は、臨床上 R1 と R2 ALP の臓器特異性から障害臓器を特定する有効な情報として利用可能と考えられた。