

3. 血漿酵素の電気泳動による分析*

菅野 剛 史**

はじめに

血清を中心とした体液成分の酵素活性の測定は、臨床生化学の領域においては肝疾患等を始めとして損傷を受けた臓器の診断、疾病の予後の判定に大きな比重を占めている。この酵素活性の測定は、1) 損傷臓器より遊出した酵素の血清への反映、臓器での酵素の産生レベルの変化とその血清レベルへの反映、傷害臓器からの逆流などのいろいろな機序で血清レベルが変動し、その値が疾患との相関性が高いことから診断を目的として測定されている以外にも、2) 遺伝的な酵素変異の解析、3) 腫瘍によって産生された異常酵素の解析、検出を目的として血清レベルで測定されている。一方、電気泳動分析を中心とした酵素の多様性の解析は、Table 1 に示すように血清酵素を対象とした場合には、isoenzyme による多様性を始めとして、血清中での酵素の修飾に基づく多様性、遺伝的変異、腫瘍産生酵素による多様性など、前述した目的とは別の次元で電気泳動分析による多様性が示されてくる。

Table 1. Electrophoretic heterogeneities of plasma enzymes.

1) Isoenzymes
2) Modification of Plasma enzymes
Membrane-bound
Immunoglobulin-linked
3) Genetical abnormalities
4) Tumor-producing enzymes

Table 2. Combination of electrophoretic analysis.

Cellogel electrophoresis	Enzymo-immunoelectrophoresis
Cellogel electrophoresis	Immunofixation electrophoresis and enzyme staining
Cellogel electrophoresis	Thin-layer gel filtration
Cellogel electrophoresis	PAG electrophoresis

* Electrophoretic analysis of plasma enzymes.

** Takashi Kanno, 浜松医科大学附属病院検査部。

得られて来た酵素の多様性が、何に起因し、如何なる病態との関連によってその多様性が解析されるかについては、異なった泳動分析の手技を組合せることによっていくつかの解析が行われて来た。ここではその具体的な例を検査室における試料の解析を中心に述べることにする。

方法および試料

1. 試料

1959年1月までに慶応義塾大学中央臨床検査部に検査を依頼された血清、および1953年2月以降は浜松医科大学検査部に依頼された血清を試料とした。

2. Cellogel 電気泳動と酵素の zymogram

1) LDH; 塩谷ら¹⁾の方法により LDH zymogram を得た。Densitometry は透明化を行わずに実施した。

2) ALP; 泳動終了後 naphthol-ASM phosphate を基質として、反応生成物にデアゾ染色にて活性帯を染色した。

3) Amylase; 須藤ら²⁾の方法を用いて zymogram を作成した。

3. 酵素免疫電気泳動

Table 2 に示したように Cellogel 電気泳動とそれに引続いていくつかの分析法の組合せにより、血清中での酵素の存在様式を確認する。酵素免疫電気泳動は LDH の場合にのみ agarose-agar。他の酵素では Cellogel を支持体として免疫沈降線の作成後にそれぞれの酵素活性染色を行った。抗血清は、ヘキスト社およびダコパツ社

のものを用いている。

4. Immunofixation electrophoresis と酵素活性染色

Immunofixation (IF) を行う場合に抗血清の力価が問題となり、なるべく高力価のものを用いる。堀井ら³⁾の方法に従って Cellogel 膜を支持体として行うが、抗原(血清)の希釈を行うことにより酵素活性が希釈されるので、力価の高い抗血清を用いるか、必要に応じて抗体の濃縮を行うことが要求される。

5. Thin layer gel-filtration

通常の Pharmacia 製の薄層ゲル透過装置を用いている。展開後 Separax 膜に蛋白質を吸着し、これに蛋白染色、または蛋白活性染色を実施する。酵素活性染色は Cellogel 膜電気泳動の場合と同一である。また必要があればこの膜を用いて immunofixation を行い、固定された酵素に対して酵素活性染色を行った。

6. Affinity disc electrophoresis

Amylase の基質に対する解離定数を求めるために竹尾ら⁴⁾の方法に準じ、10%のPAGにて9.0cmの高さのゲルを用意した。和光の可溶性デンプンでは終濃度0.125~2.0g/lまで、maltotriose, amylase EX-Iにおいてはそれぞれ5.0~100g/l, 0.5~5.0g/lの濃度のゲルを用意し、易動度の遅れを相対易動度の逆数と基質濃度の関係にて作図し、みかけのKdを求めた。

結 果

1. 酵素 zymogram の病態解析への応用

1) LDH isoenzyme

血清のLDHが、いくつかの分画に分離出来ると同時に、特定の疾患にて特定の分画が上昇することは1957年に Vesell および Bearn⁵⁾によって報告されている。その後多くの研究者達によって損傷臓器の推定という観点より、ほぼ Table 3 にまとめられるような結果が得られている。この場合と同じ I, II 型の上昇であっても LDH/GOT の比を併せて観察することによって赤血球に由来するか、心筋に由来するかについては判別が可能である。また、この他に seminoma 等で、I, II 型の上昇が認められその LDH/GOT 比は一般には非常に高く観察されている。

2) ALP isoenzymes

成人血清中のALPの由来が、大部分は肝由来であるということでは意見の一致を認めるにしても、その血清中での存在様式が単に isoenzyme という範疇に入るかどうかについては、膜結合と考えられる高分子ALP I, 更には免疫 glob 結合と考えられるALP VI を考えると問題が残されている。

Table 4 に電気泳動的に分離されるALPの多様性とその診断的な応用をまとめた。骨由来の α_2 - β 位のALP

Table 3. Diagnostic uses of LDH isoenzymes.

LDH isoenzymes	LDH/GOT > 20	LDH/GOT < 20
I and II dominant pattern	red cell origin hemolytic anemia	heart muscle origin myocardial infarktion
II, II and III dominant pattern	blast cell origin leukemia	lymphoma cell malig. lymphoma
III to V dominant pattern		Sk muscle origin anoxic stage
V dominant pattern		liver cell origin hepatitis

Table 4. Diagnostic uses of ALP isoenzymes.

Electrophoretic mobility		Origin	Diseases
Cellogel	Starch gel		
Alpha-1 (I)	origin	macro, hepatic	hepatobiliary diseases
Alpha-1	alpha-1	hepatoma	hepatoma
Alpha-2 (II)	alpha-2 (II)	hepatic	drug induced hepatitis
Alpha-2 to beta (III)	alpha-2 to beta (III)	bone	metastasis of cancer
Alpha-2 to beta (IV)	alpha-2 to beta (IV)	placenta	pregnancy or tumor producing
Beta to gamma (V)	beta to gamma (V)	intestine	liver cirrhosis
Beta to gamma (VI)	beta to gamma (VI)	Ig-linked	ulcerative colitis.

については同様な易動度を持つ原因不明の分画が存在するにしても、LDH の isoenzyme に比して診断的有用性はより大きい酵素の中に入るものと考えられる。

3) Amylase isoenzyme

Amylase の分画が不連続緩衝系を用いることにより容易となつてから、膵由来、唾液腺由来の分離と、amylase の臨床的評価が新たに再検討された。その中で特記すべきは、術後高アミラーゼ血症の評価についてであろう。この現象は、原因は必ずしも明確にされ、意見の一致をみていないにせよ、膵由来アミラーゼの上昇は術後高アミラーゼ血症の約10%に認めるに過ぎず、他は全て唾液腺由来のアミラーゼの上昇として観察されるものである。

2. 血清酵素の修飾

血清中の酵素の泳動分析の多様性は、単に isoenzyme という範疇のみでなく、血清中の酵素が何等かの修飾を受けている場合がかなり証明されている。これらは、修飾そのものが病態と直結するものもあれば、必ずしも直結しないものも存在する。しかし、その存在様式が明確にされることは、病態との関連性が明らかにされる過程と考えられるので、ここではその例を示すこととする。

1) 免疫 glob との結合による酵素の修飾

Ganrot⁵⁾ により LDH と結合した IgA が見出されて以来、amylase においては Levitt ら⁶⁾ の IgA 結合例、Nagamine ら⁷⁾ による ALP と IgG の結合例と多くの免疫 glob と酵素との結合例⁸⁾ が示され、高 LDH、高 amylase 血症の一因としてこのような免疫 glob による修飾が考えられ、かつ、病態との関連性が検索されている。

Fig. 1 に LDH 結合性の免疫 glob の検索の例をまとめた。中段の zymogram にて示すように、この例は LDH II 型の減少と III 型が異常に増加すると同時に幅広い分画パターンを示している。下段に示すように、薄層

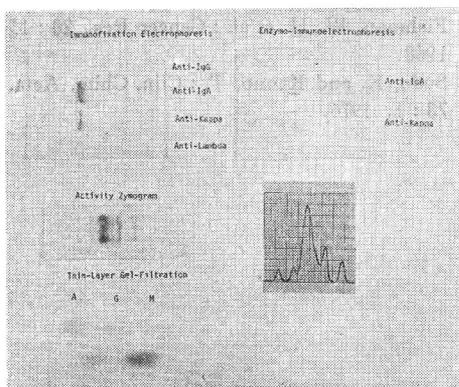


Fig. 1.

ゲル透過では大きな分子サイズ (G~M) 間に LDH 活性が証明され、上段右の免疫電気泳動の抗 IgA 抗 L 鎖 κ に LDH 活性が染色されている。より判然と観察されるのは immunofixation による酵素染色を示した上段左図であり、抗 IgA、抗 L 鎖 κ で固定された沈降物に対して LDH 活性が染色されている。

同様な方法は ALP, amylase に対して非常に有効である。特に immunofixation の技術は酵素結合性免疫 glob の検索には非常に優れた有用な方法であると考えられる。この方法により、Cellogel 免疫電気泳動によってのみわずかに検出されていた ALP, amylase 等が容易に検出可能となり、かつ、amylase において 2 ME 処理後に始めて L 鎖のみ検出された例においても、容易に H 鎖 IgG, L 鎖 λ と決定することが可能であった。amylase について macroamylase の生因が、技術的な免疫 glob との結合を証明する困難さから、いろいろな生因が考えられているが、この方法による解析が新しい血清酵素の存在様式の解明に役に立てばと考えられる。

2) 膜結合高分子酵素

所謂閉塞性黄疸、部分閉塞等の場合に、出現する高分子 ALP, LAP, γ -GTP は、膜成分と結合したままで血中に出現した酵素と考えられている。これらが、電気泳動分析により多様性を呈するところから、その出現位置と病態との関連で検索が進められ、現象的観察から病態を推定していた。このような高分子膜結合酵素について α_1 位に移動されるものの中に IgA(λ) を含むものが多数見出され、⁹⁾ 今後その出現機序等についての詳細な検索が必要とされる。

3) 血中での酵素作用による修飾

血清 amylase が保存によって泳動帯の数が増加すると同時に易動度が速くなる現象が観察されている。Peptide deaminase 等いろいろな原因が考えられているが、このような修飾による電気易動度の多様性については、今後充分にそれを解析する必要があると考えられる。

3. 遺伝的変異と血清酵素の異常

血清酵素の評価に酵素の遺伝的変異、その他、遺伝的な背景を理解している必要がある。臨床的に評価するのは、先ずその酵素の酵素活性値であるが、cholinesterase の C₃ band 保持者などでは、低下すべき酵素活性が、肝硬変症などで低下せずに臨床医を混乱させることもあり、また、LDH, H subunit 欠損症での hetero 体などでは、上昇すべき LDH 活性が上昇せずにまた臨床医をまどわすことになる。このような場合に、泳動分析において、その変異、遺伝的背景を明確にしていくことは日常の臨床評価上必要なことと考えられる。

Table 5. Apparent Kd values of tumor-producing and normal human amylases.

Amylases	Kd for substrates			
	maltotriose	Wako soluble starch	glycogen	EX-1 (Amylase)
Purified pancreatic	43.0	1.6	0.8	30.8
Purified salivary	55.0	1.0	0.8	28.2
Lung cancer KI	—	0.4	0.2	16.0
Lung cancer Suy	60.5	1.2	0.8	28.2
Lung cancer Sug	—	0.4	0.2	12.0

4. 腫瘍産生の酵素の泳動分析による解析

Regan ALP¹¹⁾ を始めとして多くの腫瘍産生の酵素が泳動分析にて見出され、その性質が明らかにされている。ここでは腫瘍産生の amylase の例を挙げる。いわゆる腫瘍産生の amylase は、電気易動度としては salivary 由来と同一であるとされている。我々が経験した3例の(肺癌2例, 卵巣癌1例)腫瘍産生の amylase において、主要な band は salivary 由来のものに一致していた。しかし、2例において neuraminidase sensitive な subbands を認め、基質に対する kinetic な態度は異なることが見出された。Amylase の基質に対する解離の定数の差は、竹尾らの方法に基いたものであり、泳動分析の方法を利用した kinetic な解析を容易にした点が、このような腫瘍産生の酵素の泳動的な易動度では見出せなかった差異を明らかに出来た例として考えた¹²⁾

Table 5 に種々の基質に対しての Kd の差をまとめた。腫瘍産生の2例が maltotriose に対して親和性を持たず、この事実は、可溶性デンプンを基質とした終末産物の oligo 糖の解析でも明確にされた。また逆にこの2例は、他の基質に対してはより強い親和性を示す点でも異なっている。そして他の肺癌の1例で示されるように、易動度および kinetic な態度で salivary amylase とまったく区別出来ない例も存在し、今後の腫瘍産生 amylase の解析に1つの問題点をなげかけている。

ま と め

血清を中心とした酵素の泳動分析による多様性の解析を述べた。単なる isoenzyme という範疇では考えられない modification などに基づく多様性を含めると、1つの支持体、または1つの条件で、これら全ての多様性を同時に解析することは困難かも知れない。このような多様性を示す要因の解析が必要であったと同時に、血中の酵素の存在様式を明確にすることが、今後の病態解析に寄与することは大きいと考えられる。

文 献

- 1) 塩谷実枝子他：臨床病理，**19**：469，1971.
- 2) 須藤加代子他：臨床化学，**3**：209，1974.
- 3) 堀井康司，菅野剛史：臨床検査，**22**：1201，1978.
- 4) Takeo, Y. and Nakamura, S.: Arch. Biochem. Biophys., **153**：1，1972.
- 5) Ganrot, P. O.: Experientia, **23**：593，1967.
- 6) Levitt, M. D. and Cooperband, S. R.: New Eng. J. Med., **278**：474，1968.
- 7) Nagamine, M. and Ohkuma, S.: Clin. Chim. Acta, **65**：39，1975.
- 8) 菅野剛史：臨床検査，**21**：381，1977.
- 9) 須藤加代子，菅野剛史：生物物理化学，**23**：145，1979.
- 10) Kitamura, M. et al.: Clin. Chim. Acta, 1971.
- 11) Fishman, W. H. et al.: Cancer Res., **28**：150，1968.
- 12) Sudo, K. and Kanno, T.: Clin. Chim. Acta, **73**：1，1976.