

犬 ALP アイソザイム分析の応用性について

鳥取大学農学部獣医学科 獣医臨床検査学教室

教授 竹内 崇

【はじめに】

アルカリフォスファターゼ (ALP) はアルカリ側に活性のある加水分解酵素であり、全身のさまざまな組織の細胞膜に局在します。翻訳後修飾が異なるアイソフォームは臨床的に“ALP アイソザイム”と呼ばれています。犬の血中に出現するのは主に3種類で、肝臓型 ALP (LALP)、骨型 ALP (BALP)、およびコルチコステロイド誘導性 ALP (CALP) が知られていますが、犬の ALP アイソザイムはヒトに比べてバンドの分画が不明瞭であることから、臨床にはあまり利用されてきませんでした。当教室では、分析方法を改良することで、肝疾患、胆道系疾患、副腎皮質機能亢進症などの鑑別に有用な情報が得られるようになりましたので、概要をご紹介します。

【ALP アイソザイム分析の基礎】

血漿中には数百種類を超えるタンパク質が存在していますが、電気泳動した後、発色基質を反応させてバンドが検出されれば、そのバンドに含まれるタンパク質には ALP 活性があることが確認できます。当教室では、アガロースゲルによる等電点電気泳動の後、発色基質と ALP が反応して生成されるホルマザンの色をデンストメーターで読み取ることによって ALP 活性の程度とその特徴を解析しています。健康な犬の血漿から検出される ALP は LALP のみですが、胆道系疾患や副腎皮質機能亢進症の例では、LALP が陽極側へ幅広いバンドとなって検出されることがあります (図1)。しかし、この LALP と CALP のバンドは近接することから、これまでは両者を区別することに苦労していました。

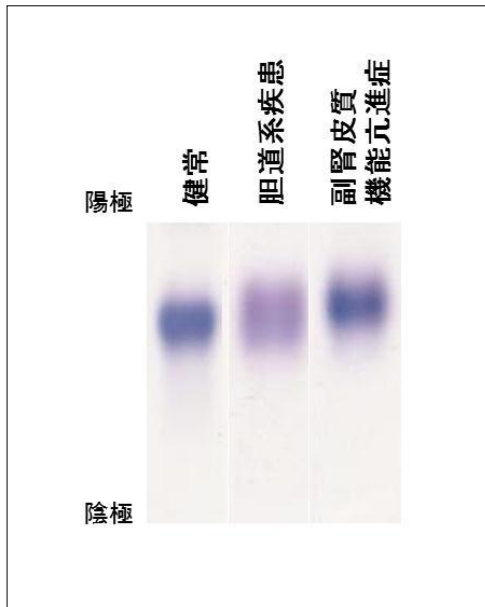


図1 健常犬、胆道系疾患犬、副腎皮質機能亢進症犬に認められるALPのバンド

【サンプルのノイラミニダーゼ処理と電気泳動】

ALPにはシアル酸を含む糖鎖が結合しており、これが電気泳動における易動度に影響を及ぼします。そこで、シアル酸を切断する酵素（ノイラミニダーゼ）で処理し、ほぼ完全に糖鎖を除去することで、バンドの位置は変化します。これがALPのタンパク構造の特徴を表すことになり、同時に、糖鎖が多く結合しているALPほど、糖鎖がはずれると陰極側へ大きく変位することになります（図2）。

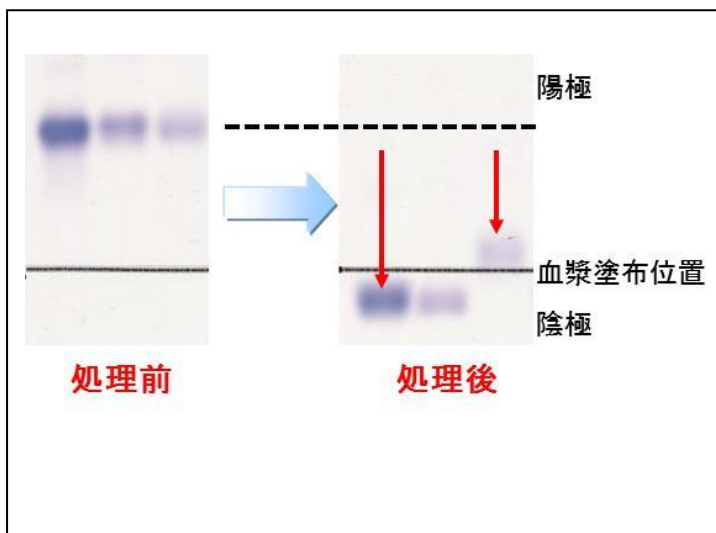


図2 ノイラミニダーゼ処理によって、バンドの位置は陰極側へ変化する。

【電気泳動とレバミゾール処理】

犬の血中に出現する3種類のALPアイソザイムのうちLALPおよびBALPの活性は4.2 mM レバミゾールによって98%阻害されますが、CALPは42%の阻害にとどまります。電気泳動後のゲルにレバミゾールを作用させると、LALPまたはBALPのバンドはほぼ完全に消失しますが、CALPのバンドは発色が確認されます(図3)。

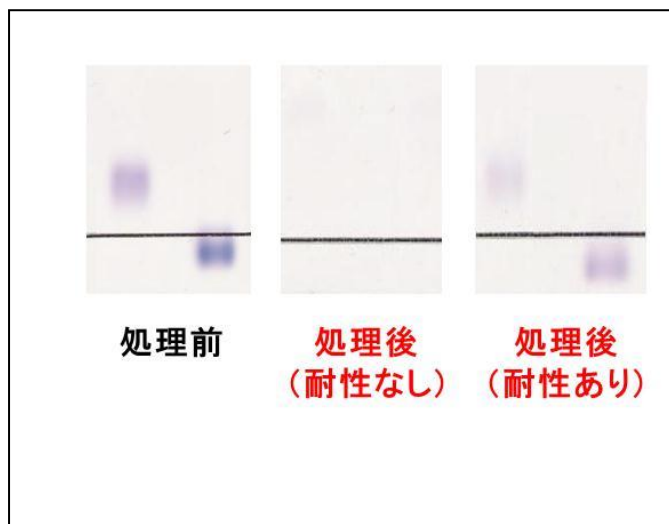


図3 レバミゾール処理により、LALPは消失するが、CALPは耐性を示す。

【疾患ごとのALPアイソザイムパターンの特徴】

サンプルのノイラミニダーゼ処理と電気泳動パターン、さらには電気泳動後のレバミゾール処理の結果を組み合わせることで、健常、肝疾患、胆道系疾患、副腎皮質機能亢進症に特徴的なALPを鑑別することが可能となりました(図4)。重度肝疾患では肝細胞の傷害が大きいため、肝細胞から放出されたALPはシャープなバンドを形成し、さらにレバミゾール処理でバンドが消失します。肝障害が顕著でない胆泥症や胆汁うっ滞の症例では、胆管上皮や毛細胆管の上皮で誘導されるALPが幅の広いバンドを形成し、レバミゾール処理にやや耐性を示します。副腎皮質機能亢進症では、コルチゾールによって誘導されるALPがシャープなバンドを形成し、バンドは最も陽極側に移動します。さらに、ノイラミニダーゼ処理では最も陰極側へ変位し、レバミゾール処理に最も耐性を示します。

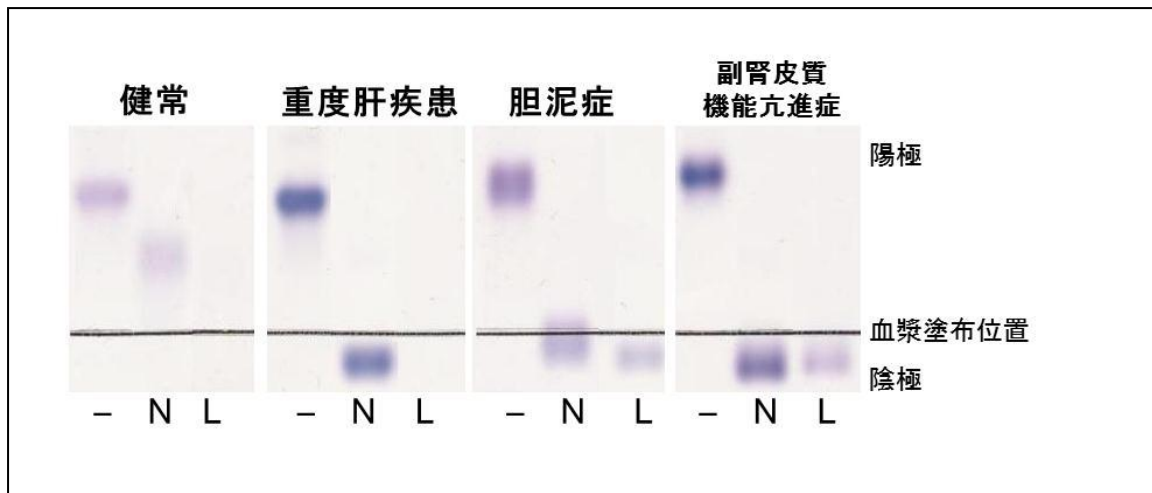


図4 疾患動物のALPアイソザイムパターンの例

(-) : 無処理、N : ノイラミニダーゼ処理、L : N+レバミゾール処理

【考察】

今回ご紹介した方法では、ノイラミニダーゼ処理によってほぼ完全に糖鎖を除去することでALPアイソザイムの各バンドが明瞭となり、さらにレバミゾール処理に耐性を示すか否かという酵素活性の特徴を組み合わせることで、臨床例に応用可能な結果が得られています。副腎皮質機能亢進症についてみると、ACTH刺激試験あるいは低用量デキサメサゾン抑制試験でも明確な診断が得られないケースでは、ALPアイソザイム分析によって、どこから誘導されたALPであるかを明らかにすることで、診断に有用な情報が得られると思われれます。また、副腎皮質機能亢進症と胆泥症（あるいは胆嚢粘液嚢腫）を併発している症例では、典型的な副腎皮質機能亢進症パターンと胆泥症パターンの両者を併せ持つケースも認められます。このような症例では、治療前後において経日的にアイソザイムパターンを比較することで、治療効果の判定としても応用が期待されます。