

〈原著〉

パピー期初期血清中に出現するイヌアルカリ性 ホスファターゼアイソザイム

岡崎 登志夫¹⁾、高橋 優¹⁾、宮井 紗弥香¹⁾、花田 道子¹⁾、内田 明彦¹⁾、武信 宏実²⁾

Canine alkaline phosphatase isozymes appeared in serum during early puppy period

Toshio Okazaki¹⁾, Yu Takahashi¹⁾, Sayaka Miyai¹⁾, Michiko Hanada¹⁾,
Akihiko Uchida¹⁾ and Hiromi Takenobu²⁾

Summary We analyzed the alkaline phosphatase (ALP:E.C.3.1.3.1.) activity in the serum from 50 dogs. Canine serum ALP activity in the early puppy period was high, and clearly decreased during the 4th to the 7th month. After one year old, ALP activity was kept stable in healthy dogs, and sometimes elevated in association with various diseases especially in elderly dogs. Next, we performed agarose gel electrophoresis of ALP isozymes in the canine serum, and identified two ALP bands only in the serum obtained during the early puppy period. They disappeared along with growth, and only one band was identified by the age of one. Two puppy ALP bands had high affinity with WGA lectin. It was thought that the band slower than liver type was bone type, and the fast band, which was found for the first time in this study, was about 14 kDa smaller than bone-type ALP isozyme.

Key words: Puppy, Alkaline phosphatase isozyme, Electrophoresis

I. 緒言

アルカリ性ホスファターゼ (EC:3.1.3.1. ALP) は、アルカリ側で活性を示すリン酸モノエステルの加水分解酵素で、構造的にはGPIアンカーを有し、二量体で細胞膜に結合し、生体に広く分布している^{1,2)}。ヒトでは、この酵素は、臓器

特異的な小腸型、胎盤型アイソザイムと、臓器非特異的な骨型、肝臓型、腎臓型アイソザイムなどに分類される^{3,5)}。イヌ血清でも、ヒトと同様のアイソザイムのほか、アトピー性皮膚炎治療等でコルチコステロイドを使用したときにコルチゾール誘導型ALPアイソザイムが出現することが報告されている^{6,7)}。血清骨型ALP活性値

¹⁾ヤマザキ学園大学動物看護学部動物看護学科
〒192-0364 東京都八王子市南大沢4-7-2

²⁾浜松家畜病院

〒430-0924 静岡県浜松市中区龍禅寺町810-1

受領日 平成27年3月28日

受理日 平成27年6月9日

¹⁾Yamazaki Gakuen University

4-7-2 Minami-osawa, Hachioji, Tokyo 192-0364, Japan

²⁾Hamamatsu Domestic Animal Hospital

810-1 Naka-ku Ryuzenji-cho, Hamamatsu, Shizuoka

430-0924, Japan

は骨髓腫や若齢犬の骨成長時に上昇し、肝臓型ALP活性値は肝胆道系障害等で上昇することが知られており^{8,9)}、診断に用いられる。一般に、ヒトALPアイソザイムの分画には、セルロースアセテート膜やアガロース膜を支持体とする電気泳動法が用いられる。アガロース膜電気泳動によれば、これらALPアイソザイムは、陽極側から $\alpha 2$ 位に肝臓型、 $\alpha 2\beta$ 位に骨型、胎盤型、 β 位に小腸型が分画されることが知られているが、判別は難しい。そこで、さらにアミノ酸阻害試験、レクチン親和性試験、アンカーの有無、耐熱性などさまざまな物理化学的特徴に基づいて鑑別される。例えば、胎盤型や骨型ALPアイソザイムは、その他のALPアイソザイムと比べて加熱処理で失活しやすく、骨型やコレチゾール誘導型ALPアイソザイムは、肝臓型ALPアイソザイムと比較して高いWGA親和性を有する¹⁰⁻¹³⁾。また、骨型や腎臓型ALPアイソザイム活性はレバミゾール処理で失活しやすい¹⁴⁾。今回我々は、イヌ血清を材料として、ALP活性測定とそのアガロース膜電気泳動を行い、ALP活性の高い若齢期に由来知られている骨型ALPアイソザイムバンドのほかに、もう一本バンドが出現することを発見したので、その分画の物理化学的特徴についていくつかの検討を行い、報告する。

II. 材料と方法

1. イヌ血清試料の採取

当該研究は、健康診断や去勢手術等の目的で

動物病院を訪れた2ヶ月から2歳のイヌ（ゴールデンレトリバー、キャバリア、シーザー、プードル）血清を用いて実施された。動物実験に際しては、動物の適正な使用及び取り扱いを謳った「ヤマザキ学園大学研究倫理指針」（平成24年制定）に基づいた。

2. ALP活性測定

イヌ血清中ALP活性は、装置として富士フィルムメディカル株式会社の富士ドライケム3000を用い、試薬として体外診断用医薬品・富士ドライケムスライドALP-PⅢ（JSCC標準化対応法との相関： $y=0.994x+5.8$ ）を用いて測定した。当該スライドの基質は、p-ニトロフェニルリン酸である。

3. ALPアイソザイム分画及びレクチン処理

ALPアイソザイムは、ヘレナ研究所のアガロース膜電気泳動キットを用いて分画した。各ALPアイソザイム分画は3-インドキシルリン酸p-トルイジン塩を基質として3-ヒドロキシインドールとニトロテトラゾリウムブルー（NTB）で染色した。また、各分画の糖鎖構造の特徴を解析するために、イヌ血清試料にWGAとConAの2種類のレクチン（フナコシ、東京）を終濃度が10%になるように添加し、10分間静置後、3000 rpmで5分間遠心した。その上清を採取し、上述したと同様に電気泳動を行い、レクチン処理後と未処理のALPアイソザイムの電気泳動パターンを比較した。

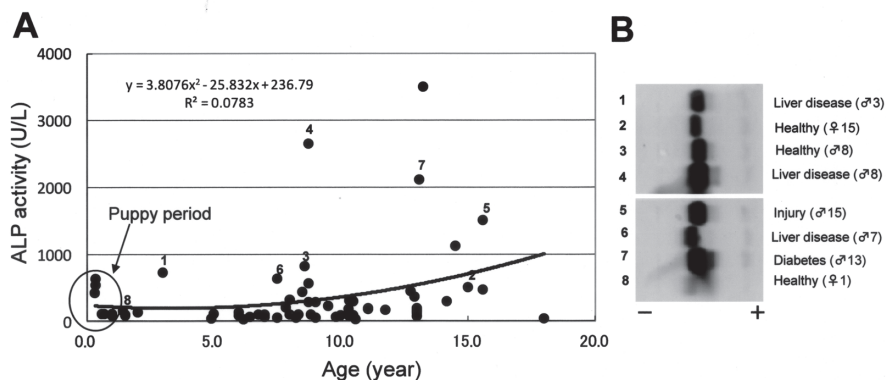


Fig. 1 Relationship between age and ALP.

A. Age distribution of ALP activity in canine serum. B. ALP isozyme pattern of the canine serum with a high ALP level.

4. ALPアイソザイム分画の分子量の推定

ALPアイソザイム分画の分子量の推定を行うために、支持体として7%ポリアクリルアミドゲル（積水メディカル、東京）を用い、テフコ社の分子量マーカーとともにトリス-グリシンバッファーで泳動した。ALP分画の染色はヘレナ社のALP検出用試薬を、分子量マーカーの染色は同社のCBB染色液を用いた。これらの結果に基づいて、分子量マーカーの近似曲線式からそれぞれの分子量を推定した。

Ⅲ. 結果

1. イヌ血清の年齢別ALP活性変化とアイソザイムパターン

富士フィルム株式会社の富士ドライケムキットを用いて、動物病院を受診したさまざまな年齢のイヌ血清についてALP活性を測定した（Fig. 1）。ALP活性は、老化に伴って緩やかな増加傾向を示した。特に高い活性を示した症例について、ヘレナ社のALPアイソザイム分画用アガロース膜電気泳動キットを用いて分析したところ、肝硬変例でメインバンドが陰極側にずれるなどさまざまな変化を示した。

2. パピー期ALP活性変化とアイソザイムパターン

1と同様、富士ドライケムキットを用いて、犬種はまちまちであるが、1歳～2歳の若齢期のALP活性を測定した。我が国の動物臨床検査においては、統一されたイヌALP活性の基準値は設定されていないが、例えば、LSIメディエンスのJSCC標準化対応法で、健常犬のALP活性参考値は47-237 U/Lと設定されている。それと比較すると4ヶ月齢未満では5倍以上高い活性であったが、成長に伴って速やかに低下し、1歳頃には参考値と同レベルになった（Fig. 2）。そのアイソザイムパターンをみると、7ヶ月ごろまでは2本のバンドが認められ、1歳齢に近づくにつれて1本のバンドになり、それ以降は1本のままであった。1歳齢ごろのバンドの位置に比べて、パピー期の2本のバンドの1本はやや陽極側に（fast $\alpha 2$ 位）、もう1本のバンドはやや陰極側（ $\alpha 2\beta$ 位）にずれていた。

3. パピー期ALPアイソザイムのレクチン親和性

レクチン処理前後のALPアイソザイムの電気泳動パターンを比較した結果、ConA処理前後ではほとんど変化が認められなかったが、WGA処理では、パピー期の2本のALPアイソザイムバンドは、陰極側の極わずかな残留染色を除いて

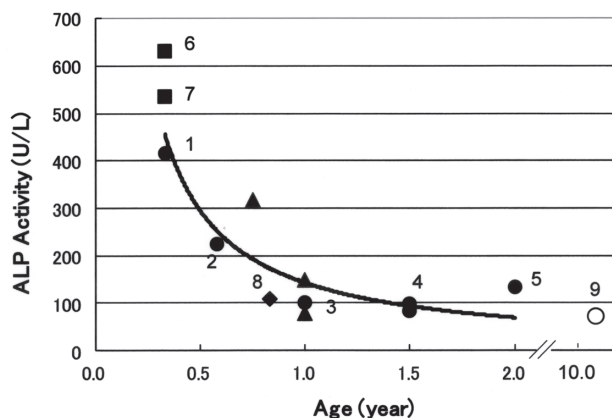


Fig. 2 Relationship between the age and ALP activity during the puppy period.

●: Golden retriever; ■: Cavalier; ▲: Poodle; ◆: Shih-tzu; ○: Pomeranian

The number 1-9 assigned to symbol in this figure is matched with the lane number of ALP isozyme electrophorogram in Figure 3.

ほとんど消失した (Fig. 3)。

4. パピー期ALPアイソザイムの分子量の推定

ALPアイソザイムの分子量の推定のために、
SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を実施し

た (Fig. 4A)。その結果、fast α 2位のバンドの
分子量は、約114 kDa、 α 2位のバンドは約121
kDa、 α 2 β 位のバンドは約128 kDaと推定され
た (Fig. 4B)。

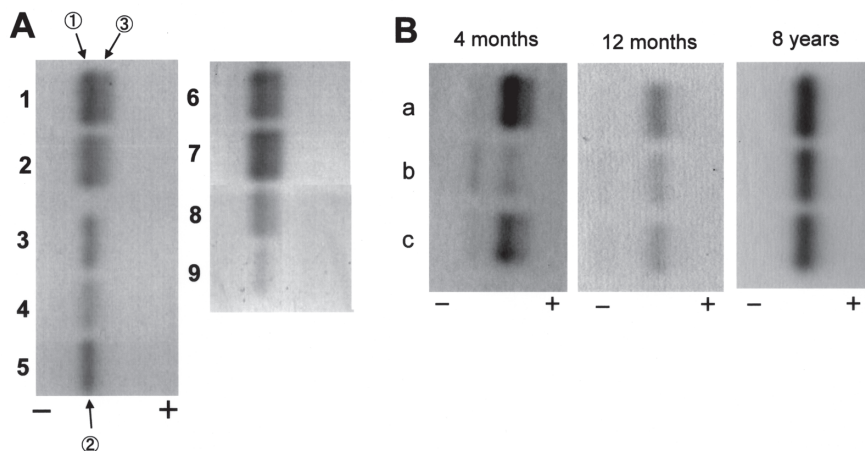


Fig. 3 Agarose gel electrophoretogram of ALP isozyme.
A. Change of ALP isoenzyme electrophoretogram during the puppy period.
1: 4 month old; 2: 7 month old; 3: 12 month old; 4: 18 month old; 5: 24 month old; 6: 4 month old; 7: 4 month old;
8: 8 month old; 9: 11 year old.
B. Change of ALP isozyme electrophoretogram after the lectin treatment.
a: non-treatment; b: WGA-treatment; c: ConA-treatment.

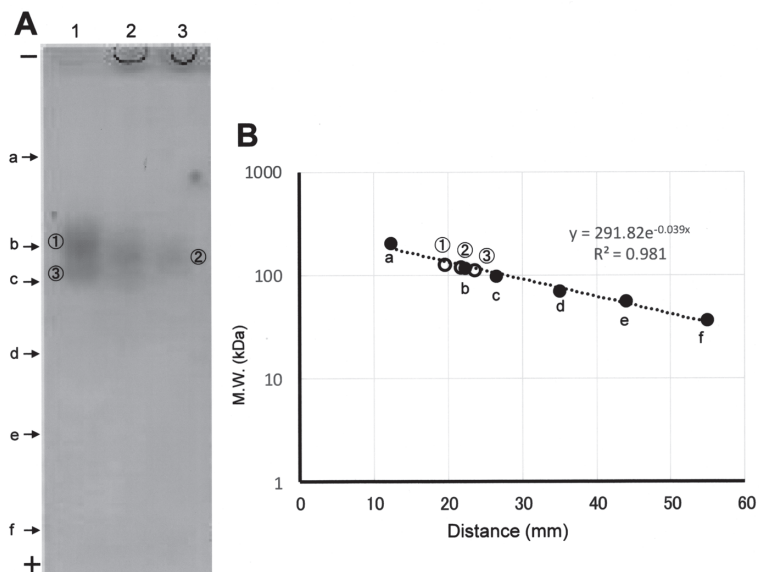


Fig. 4 Calculation of ALP isozyme molecular weight using the SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.
A. Electrophoretogram of ALP isozyme. Lane 1: 4 month old; 2: 9 month old; 3: 10 month old. Arrows indicate the
molecular weight markers.
B. Calculation of ALP isozyme molecular weight comparing the mobility of molecular markers.

IV. 考察

ALPアイソザイムは、特定の臓器に多く分布する臓器特異型と、さまざまな臓器に広く分布する臓器非特異型（あるいは普遍型）に分類され、臓器特異型には小腸型と胎盤型が、非特異型には骨型、肝臓型、腎臓型がある。そのほかイヌでは、コルチコステロイドに刺激されて肝臓から分泌されるステロイド誘導型が知られている⁶⁻⁹⁾。しかし、これらイヌのALPアイソザイム分画について、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いた報告が僅かにあるものの^{15,16)}、アガロース膜電気泳動を用いた報告は極めて少なく、ましてや年齢ごとにALPアイソザイム分画を比較した報告例はほとんど認められない。これまでのALPアイソザイムのアガロース膜電気泳動に関する報告によれば、健常成犬で最も一般的に検出されるのが肝臓型で、 $\alpha 2$ 位に分画されるが、そのほか小腸型、胎盤型、腎臓型、骨型などは、いずれも肝臓型よりも陰極側に泳動される。これに対してステロイド誘導型は、肝臓型よりも陽極側のfast $\alpha 2$ 位に分画されることが知られている¹⁰⁾。

パピーの成長過程におけるアガロース膜電気泳動像の変化をみると、初期の4ヶ月齢、7ヶ月齢には2本のALPバンドが確認され、そのうちの、1本は成犬時の $\alpha 2$ 位の肝臓型に対して、わずかに陽極側（fast $\alpha 2$ 位）で、もう1本はわずかに陰極側（ $\alpha 2\beta$ 位）であった。この2本のバンドは齢を重ねるごとにうすくなり、1歳ごろには成犬と同じ $\alpha 2$ 位の1本のバンドになった。ヒトと同様、イヌの成長期には骨型ALPアイソザイムが出現することが知られており、パピー期の2本のバンドのうち、陰極側の $\alpha 2\beta$ 位のバンドは成長期に出現する骨型と考えられた。肝臓型の陽極側のfast $\alpha 2$ 位のバンドは不明であるが、ステロイドホルモンによる誘導型ALPアイソザイムが、肝臓型より陽極側に泳動されることが知られていることから、パピー期の血清中ステロイドホルモン濃度をELISA法で測定したが、成犬に比べて特に高い値は示さなかったことから（データ省略）、ステロイド誘導型ではないと考えられた。WGAレクチンは、糖鎖のシアル酸に対する親和性が高いことが知られており、パピー期の2本のバンドはシアル酸リッ

チと考えられた。このようにパピー期の2本のバンドは、消長も、レクチン反応性もお互い類似していたが、分子量は、肝臓型の陽極側（fast $\alpha 2$ 位）のバンドのほうが、陰極側（ $\alpha 2\beta$ 位）の骨型ALPアイソザイムより約14 kDa小さかった。ALPは膜結合のGPIアンカータンパク質で、遊離する際にはこのアンカーが切断されることが知られている²⁾。骨成長期、何らかの原因で一部のALP分子のGPIアンカーが切断され、可溶性ALPとして血清中に出現しているのかもしれない。

幼少期に出現するALPの亜バンドとして、ヒトの小児一過性高ALP血症（THA）が知られている⁴⁾。このALPアイソザイムの出現原因は現在のところ不明であるが、今回見出されたイヌパピー期のALP同様、血清中で高活性を示し、数ヶ月で健常者の基準値レベルまで低下し、アガロース膜電気泳動ではfast $\alpha 2$ 位に出現する^{17,18)}。イヌとヒトではALP分子量が異なっていたり、THAでは分子量の低下は認められていなかったりするが^{18,19)}、いくつかの特徴が一致しており、イヌパピー期ALPアイソザイムの起源解明が、THAの原因解明にも役立つかもしれない。

V. 結語

パピー期初期のALP活性は高く、健常犬の参考値レベルの5倍以上であったが、成長に伴って速やかに低下し、1歳頃には基準範囲レベルになった。アガロース膜電気泳動でALPアイソザイムを分画したところ、パピー期初期には2本のバンドが認められ、両者ともWGAと親和性が高く、成犬でみられる肝臓型とは異なっていた。肝臓型の陰極側のバンドは骨型と考えられたが、陽極側のバンドは分子量が骨型より14 kDa小さいパピー期に特異的なバンドであった。

謝辞

幼犬試料を提供して下さった、たまプラーザどうぶつ診療室・井上 英樹 先生に深謝いたします。

文献

- 1) Wong YW and Low MG: Phospholipase resistance of the glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchor on

- human alkaline phosphatase. *Clin Chem*, 38(12): 2517-2525, 1992.
- 2) Murakami Y, Kanzawa N, Saito K, Krawitz PM, Mundlos S, Robinson PN, Karadimitris A, Maeda Y and Kinoshita T: Mechanism for release of alkaline phosphatase caused by glycosylphosphatidylinositol deficiency in patients with hyperphosphatasia-mental retardation syndrome. *J Biol Chem*, 287: 6318-6325, 2012.
 - 3) Kuwana T and Rosalki SB: Intestinal variant alkaline phosphatase in plasma in disease. *Clin Chem*, 36: 1918-1921, 1990.
 - 4) Suzuki M, Okazaki T, Nagai T, Törö K and Sétonyi P: Viral infection of infants and children with benign transient hyperphosphatasemia. *FEMS Immunol Med Mic*, 33: 215-218, 2002.
 - 5) Okazaki T, Suzuki M, Nagai T and Nagai T: Abnormal alkaline phosphatase isoenzymes detected in the serum of elderly patients. *Scand J Clin Lab Invest*, 64: 611-618, 2004.
 - 6) Hadley SP, Hoffmann WE, Kuhlenschmidt MS, Sanecki RK and Dorner JL: Effect of glucocorticoids on alkaline phosphatase, alanine aminotransferase, and gamma-glutamyltransferase in cultured dog hepatocytes. *Enzyme*, 43: 89-98, 1990.
 - 7) Sanecki RK, Hoffmann WE and Gelberg HB: Subcellular location of corticosteroid-induced alkaline phosphatase in canine hepatocytes. *Vet Pathol*, 24: 296-301, 1987.
 - 8) Barger A, Graca R, Bailey K, Messick L DE, Lorimier L-P, Fan T and Hoffmann W: Use of alkaline phosphatase staining to differentiate canine osteosarcoma from other vimentin-positive tumors. *Vet Pathol*, 42: 161-165, 2005.
 - 9) Gaskill CL, Miller LM, Mattoon JS, Hoffmann WE, Burton SA, Gelens HC, Ihle SL, Miller JB, Shaw DH and Cribb AE: Liver histopathology and liver and serum alanine aminotransferase and alkaline phosphatase activities in epileptic dog receiving phenobarbital. *Vet Pathol*, 42: 147-160, 2005.
 - 10) Kidney BA and Jackson ML: Diagnostic value of alkaline phosphatase isoenzyme separation by affinity electrophoresis in the dog. *Can J Vet Res*, 52: 106-110, 1988.
 - 11) Gaskill CL, Hoffmann WE, Cribb AE: Serum alkaline phosphatase isoenzyme profiles in Phenobarbital-treated epileptic dogs. *Vet Clin Pathol*, 33: 215-222, 2004.
 - 12) Farley JR, Chesnut CH, III, Baylink DJ: Improved method for quantitative determination in serum of alkaline phosphatase of skeletal origin. *Clin Chem*, 27(12): 2002-2007, 1981.
 - 13) Moak G and Harris H: Lack of homology between dog and human placental alkaline phosphatases. *Proc Natl Acad Sci*, 76: 1948-1951, 1979.
 - 14) 小玉智美, 森 優子, 田辺梨恵, 鈴木友子, 山田隆紹: アガロースゲル電気泳動による犬の組織ALPアイソザイムの検討. *ヤマザキ学園大学雑誌*, 3: 29-35, 2013.
 - 15) Hatayama K, Nishihara Y, Kimura S, Goto K, Nakamura D, Wakita A, Urasoko Y: Serum alkaline phosphatase isoenzymes in laboratory beagle dogs detected by polyacrylamide-gel disk electrophoresis. *J Toxicol Sci*, 36: 653-660, 2011.
 - 16) Ito H, Kakuta T, Genda G, Sakonju I, Takase K: Canine serum alkaline phosphatase isoenzymes detected by polyacrylamide gel disk electrophoresis. *J Vet Med Sci*, 64: 35-39, 2001.
 - 17) 遠藤八千代, 清宮正徳, 浅野はるな, 齋藤啓子, 吉田俊彦, 澤部祐司, 松下一之, 野村文夫: 小児の一過性高アルカリ性ホスファターゼ血症の解析. *生物試料分析*, 38(1): 78, 2015.
 - 18) 岡崎登志夫, 鈴木光行, 長井辰男: 血中異常ALPアイソエンザイムの特徴. *生物試料分析*, 27(3): 215-220, 2004.
 - 19) Eckersall PD, Thomas A, Marshall GM and Douglas TA: The effect of neuraminidase on the molecular weight and the isoelectric point of the steroid induced alkaline phosphatase of dogs. *J Comp Pathol*, 96(5): 587-591, 1986.