

ALT異常低値の意義と解析方法について

Clinical significance and Analysis of abnormally low alanine aminotransferase activity

酒本 美由紀 Miyuki Sakemoto

九州大学病院 検査部 主任臨床検査技師
Department of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Kyushu University Hospital (Chief Medical Technologist)

キーワード ... ALT、PALP、遺伝子解析

01 はじめに

アラニンアミノトランスフェラーゼ (L-alanine: 2-oxoglutarate aminotransferase: ALT, EC 2.6.1.2) は生体内でアラニン・ α -ケトグルタル酸とグルタミン酸・ピルビン酸との相互のアミノ基転位を触媒する酵素である。補酵素として、ビタミンB6誘導体であるピリドキサルリン酸 (PALP) を必要とするため、PALPと結合し酵素活性をもつホロ酵素と、PALPを結合せず活性をもたないアポ酵素が存在する。PALPとの結合は強く、一度ホロ型となった酵素はアポ型になりにくい。アポ酵素は細胞内でPALPと結合する前に逸脱したものと考えられている¹⁾。

アラニンは血漿中でもっとも濃度が高いアミノ酸であり、肝臓ではピルビン酸の供給源となり、糖新生などに利用される。

ALTはミトコンドリアにも存在するが、大部分は細胞質に局在する。生体内のほとんどすべての臓器細胞に存在しており、肝、腎、心筋、骨格筋、脾、肺、赤血球の順に多く含まれる。特に肝臓に多く含まれ肝臓が障害されると血中へ逸脱するため、肝障害の指標として用いられており、肝炎や胆汁うっ滞症などあらゆる肝細胞障害をきたす疾患で上昇する。同じく肝障害で上昇するアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) より肝細胞の局在割合が高いため、AST・ALTを同時に測定し、AST/ALT比を算出して疾患の鑑別に用いる。また、ALTの半減期は約41時間であり、ASTの半減期 (s-AST: 14~20時間、m-AST: 約10時間) よりも長い。AST/ALT比は病態の推移の予測にも用いられる。

臨床検査では日本国内においてJSCC (Japan Society of Clinical Chemistry) 法が広く普及している。JSCC法は国際標準法であるIFCC (International Federation of Clinical Chemistry) 法と測定原理は同じであるが、補酵素であるPALPを添加していない点が異なり、PALPと結合しているホロ酵素のみを測定し、PALPと結合していないアポ酵素は測定できないと

いう特徴がある²⁾。

ALTはJCCS共用基準範囲において男性10~42 U/L、女性7~23 U/Lと設定されている³⁾。また、出生直後は成人より低値であるが、その後増加して生後数か月ごろに最高値となり、その後漸減し、17~18歳ごろまでは成人より低値となる⁴⁾。臨床においてALTは高値を示したときに問題となるが、定量限界未満である検体や、基準範囲以内であっても臨床像と一致せず低値を示す検体と遭遇することがある。

本稿ではALT異常低値となる原因とその解析方法について、過去に検討した事例を含め紹介する。

02 ALT異常低値の概要

ALT異常低値となる原因としてPALP不足・欠乏によるアポ酵素の増加が挙げられる。PALPはビタミンB6の活性型であり、ピリドキシン、ピリドキサル、ピリドキサミン、ピリドキシンリン酸、ピリドキサミンリン酸とともにビタミンB6群に含まれる。ピリドキシン、ピリドキサル、ピリドキサミンが腸管から吸収され、細胞で活性化されると活性型であるリン酸エステル型となる。ALTはアミノ基転位を触媒する酵素であり、PALPはアミノ基を運ぶ補酵素として働いている (図1)。ALTの測定法については前述のとおりJSCC法が用いられている。JSCC法の測定原理は基質としてL-アラニン・ α -ケトグルタル酸を用い、血清中のALTによりピルビン酸を生成させる。生成したピルビン酸を β -ニコチン酸アミドアデニンジヌクレオチド還元型 (NADH) の存在下、乳酸脱水素酵素 (LD) を作用させると、 β -ニコチン酸アミドアデニンジヌクレオチド酸化型 (NAD) に変化する。このNADHの減少速度を340nmで測定しALT活性を求める。JSCC法は測定試薬にPALPが添加されていないため、アポ型が増加すると見かけ上測定値が低値となる。また、尿毒症物質 (uremic toxin) の存在やALT

結合性免疫グロブリンの存在など様々な因子が酵素活性の失活因子となり、ALT活性測定において影響を及ぼすことがある。さらに、遺伝子変異によりALT活性発現異常の原因となる場合がある。

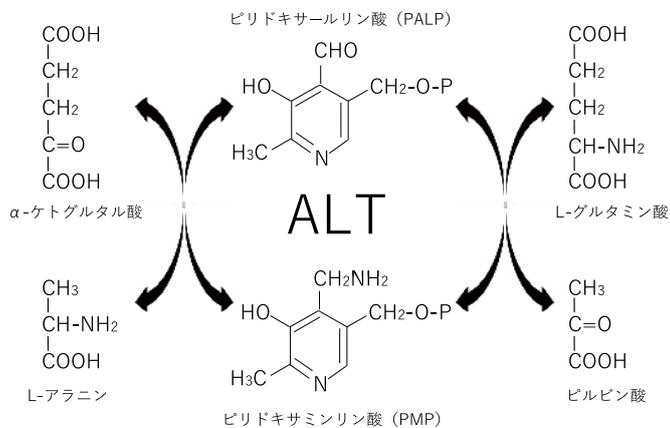


図1 ALTの酵素反応

1) ビタミンB6不足・欠乏

末期腎不全患者や血液透析患者で水溶性ビタミンは低下を示すことが多く、食事療法からの摂取不足、吸収不良、透析での除去など、複数の原因が関係する。特に補充療法を受けない血液透析患者でビタミンB6は低下することが多く、血液透析により血中濃度が約30%低下する⁵⁾。また、妊娠も蛋白質代謝亢進や低栄養などによりビタミンB6は欠乏しやすい。妊娠後期でエストロゲンが増加するとトリプトファンの代謝が亢進しビタミンB6代謝に影響する⁶⁾。ビタミンB6欠乏によって細胞内PALP濃度が低下すると、血中のホロ酵素が減少しアポ酵素が相対的に増加するため測定値が低値となる。小野らはビタミンB6非補充透析患者では血漿PALP濃度とALTに正の相関があり、ビタミンB6 30mgの経口摂取により全症例でALTが上昇したことを報告している⁷⁾。ビタミンB6不足・欠乏によるALT低活性症例においては試薬にPALPを添加して測定することでALT活性は上昇する。

2) ビタミンB6不足・欠乏以外のアポ酵素の増加

ビタミンB6欠乏以外にアポ酵素が増加する疾患として、肝疾患、心筋梗塞、アルコール性肝障害などが知られている。奥本らにより、アポ型ALTによりALT異常低値を示したC型慢性肝炎の症例が報告されており、血漿PALP濃度の低下は認められなかったが、試薬にPALPを添加して測定すること、すなわちアポ酵素をホロ化する事でALTが上昇している⁸⁾。疾患によるアポ型増加の機序は明らかにされていないが、アポ型とホロ型の逸脱の時期が異なることやPALPの産生低下によるものが考えられている⁹⁾。また、ビタミンB6に拮抗作用のある抗リウマチ薬のペニシラミンや抗結核薬のイソニアジド(INH)などの薬剤はPALPを不活化するためアポ酵素が増加する⁹⁾。ビタミンB6不足・欠乏以外のアポ酵素増加によるALT低活症例においても試薬にPALPを添加して測定することでALT活性は上昇する。

3) 尿毒症物質

腎機能が低下すると尿中への代謝産物の排泄障害により、尿毒症物質が体内に蓄積するようになる。尿毒症物質は酵素やホルモン活性を低下させ、細胞・組織や体液の恒常性に異常を与えることが知られている¹⁰⁾。ビタミンB6の欠乏を認めない透析患者でもALT低値を呈する例が認められる症例がある¹¹⁾。このことから、何らかの尿毒症物質の存在によって、酵素あるいはPALP代謝が低下し、ALT活性が阻害される機序が推定される。

4) ALT結合性免疫グロブリン

酵素結合性免疫グロブリンはアミラーゼ(AMY)、クレアチンキナーゼ(CK)、アルカリホスファターゼ(ALP)、乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)、AST(アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ)など様々な酵素で報告されており、免疫グロブリンと結合することによって耐熱性や保存安定性が増加することや、逆に酵素活性を阻害することが知られている¹²⁾。他の酵素と比較しALT結合性免疫グロブリンの報告は稀であり、疾患との関連は明らかにされていない。ALT結合性免疫グロブリンは1978年に日本でKajitaraらによって発見されておりALTに対するIgG抗体が慢性肝疾患患者血清に存在することを報告した¹³⁾。その後、安藤らがIgG-κ型免疫グロブリンによるALT活性阻害について報告している。この報告症例では分子異常はなく、PALP添加試験でALT活性に変化は認めていない¹⁴⁾。

5) ALT遺伝子変異

ALTは2つのアイソフォームが同定されており、ALT1は細胞質画分に、ALT2はミトコンドリアに局在する。ラットやマウスなど一部の種ではALT1、ALT2の両方が発現しているが、ヒトではALT2はほとんどなく、ALT1優位である。

ALT1遺伝子は第8番染色体長腕に位置し、全長約2.7Kb、11個のエクソン、495個アミノ酸からなる¹⁵⁾。遺伝子変異は303番目のアミノ酸がグルタミンから終止コドン(Gln303Ter)へ置き換えられるナンセンス変異が報告されている。

日本では、C型肝炎の患者においてASTは上昇したがALTは変化がなかったことで見いだされた遺伝子変異が強く疑われる症例が報告されているが、アミノ酸変異については解析されていない¹⁶⁾。

我々がALT 3 U/L以下の低活性症例において遺伝子解析を行った結果、11症例(A-K)の全てに変異が認められた(表1)。いずれも塩基置換によるアミノ酸変異をともなうミスセンス変異であった。Pro59Leu、Arg133Trp、Arg143Cys、Pro187Phe、Val274Met、Glu328Gln、Pro351Thrの7種類であったが、その中でArg133Trpを6例に、Arg143Cysを2例に、Pro187Pheを2例に認めた。特に、Arg133Trpの1008C>T塩基置換は6例中2例がホモ接合体、4例がヘテロ接合体であり高頻度の変異であった(アレル頻度36%)。1008C>T塩基置換が遺伝子多型でないことを確認するために、PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism)による健常人70名の解析では同変異は認めなかった。よってこの塩基置換は遺伝子多型でないことが

表1 遺伝子解析結果

塩基置換	575C>T	1008C>T	1038C>T	1285C>T	1286C>T	1967G>A	2228G>C	2297C>A
アミノ酸置換	Pro59Leu	Arg133Trp	Arg143Cys	Pro187Phe	Val274Met	Glu328Gln	Pro351Thr	
症例A								◎
症例B				◎				
症例C		○			○			
症例D		○					○	
症例E		○	○					
症例F			○					
症例G		◎						
症例H	○							
症例I						○		
症例J		◎						
症例K		○						

○：ヘテロ接合体、◎：ホモ接合体

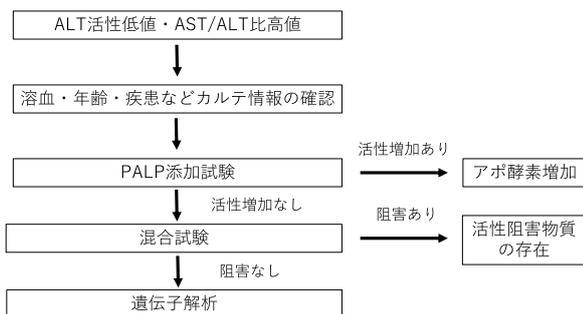


図2 ALT異常低値症例解析フローチャート

表2 ALT測定条件・試薬組成

	IFCC	JSCC
測定温度 (°C)	37.0	30
検体量 (mL)	0.2	0.3
総反応液量 (mL)	2.4	3.0
緩衝液	Tris	Tris
試薬終濃度		
緩衝液濃度 (mmol/L)	100	100
pH	7.15	7.5
L-アラニン (mmol/L)	500	500
α-オキソグルタル酸 (mmol/L)	15	15
NADH (mmol/L)	0.18	0.16
LD (U/L)	1700	2000
PALP (mmol/L)	0.1	

推測され、アミノ酸変異による構造上の変化がALT低活性に関連していることが示唆された。

また、藤井らがALT低活性症例において行った遺伝子解析では、塩基置換部位として(Pro351Thr)が報告されており¹⁷⁾、筆者らの遺伝子解析で1症例に認められた部位と同じ部位であった。この遺伝子変異ではWestern Blot法によりALT蛋白質の発現が確認できたことから、活性のみが失われた機能分子異常であることが示唆された。

これらの塩基置換部位はPALP結合部位として明らかとなっている313番目のリシン残基¹⁸⁾ではなく、ALT低活性を引き起こした機序は解明できていない。

03 ALT異常低値検体に遭遇した場合の対応

1) 異常検体を発見する方法

異常検体を発見するためには検査システムが有用である。ALTが基準範囲下限よりも低い検体やAST/ALT比が高い検体をピックアップすることが必要である。

2) 解析方法

筆者らがALT低活性症例解析を行ったフローチャートを図2に示す。

① 異常値が疑われる検体を発見したら、血清が溶血していないかの確認を行う。ASTは赤血球中に血漿中の約40倍多く含まれるため、溶血するとAST/ALT比が高くなる。またカルテより年齢や疾患、治療、投薬内容を確認し、ALTが異常値となる原因がないか確認する。

② PALP添加試験

日常検査で使用している試薬がJSCC法試薬であれば、試薬にPALPを添加してALT活性を測定する。表2にJSCC勧告法とIFCC法の試薬組成および測定条件の比較を示す¹⁹⁾。IFCC法ではPALPが0.1 mmol/L添加されている。測定には比較対象として透析患者で低活性が疑われる患者検体を用いる。PALP添加後ALT活性が上昇すれば、アポ酵素が増加していたことが原因と考えられる。

③ 混合試験

免疫グロブリン等の活性阻害物質の有無を確認するには血清混合試験が有用である。患者血清とALT高値血清を等量混合し、37°C10分加温後、日常法でALT活性を測定する。患者血清中に阻害物質が存在しなければ、理論上、[混合血清ALT値×2]の値は、[患者ALT値+ALT高値血清]の値に近似する。一方、[混合血清ALT値×2]の値が[患者ALT値+ALT高値血清]の値より明らかに低値であれば患者血清中に阻害物質の存在を疑うこととなる。

④ 遺伝子解析

遺伝子解析はEDTA採血の末梢血よりQIAamp DNA

Blood Minikit(QIAGEN)を用いて抽出したゲノムDNAを使用した。PCRはエクソン1-4、エクソン5-6、エクソン7-11を3組のプライマーを用いて増幅した(表3)。我々の検討で高頻度に認められたArg133Trpや過去に報告されたGln303Terが確認できれば、この塩基置換がALT低活性に関連していることが疑われる。

表3 プライマー配列

	プライマー名称	プライマー配列
Exon1-4	AF	5' -TAAGCCAGACCCACTGTGCG-3
	AR	5' -AGCAGCTTCAGCACCGTCTG-3
Exon5-6	BF	5' -GCGGACCCCAACAACGTCTTCTCTGT-3
	BR	5' -CTCGCCCATGTAGCCCTGGAGGT-3
Exon7-11	CF	5' -AGTGCATCGAGGCGGTGATC-3
	CR	5' -AAGAGCAAGTACAGTGGGCTCCAGA-3

3) 臨床への報告

ALT結合性免疫グロブリンや遺伝子変異などを有する患者において肝障害が発症した場合、ALT活性にどのような影響を与えるか明らかとなっていないため、臨床医へ異常低値の原因とその変動に注意することを報告することが重要であると考えられる。

04 最後に

ALTは肝障害マーカーとして広く測定されている項目であり、肝炎治療ガイドラインに指標としてカットオフ値が記載されている。またNASH・NAFLD患者の肝繊維化の指標として用いられているFIB4-indexでは計算式の項目になっている²⁰⁾。高値を示した場合は臨床で注意されるが、低値であった場合は見逃されてしまう可能性がある。しかし、様々な因子で偽低値を示すことが多く、臨床症状と合致しない場合は精査をする必要がある。

現在、臨床検査の現場ではJSCC法が広く普及しているが、国際的な標準化とハーモナイゼーションの取り組みとして、LD・ALPIに続きAST・ALTも国際標準法であるIFCC法へ移行するプロジェクトが計画されている。IFCC法へ移行するとアポ酵素増加によるALT活性の偽低値の問題は解決するが、IFCC法では健康人においてもJSCC法と比較し高値を示すため、各種ガイドラインの見直しも必要となる。

参考文献

- 1) 米田孝司, 最新 酵素・アミノザイム検査 測定法とその臨床的意義 AST (GOT), ALT (GPT), 臨床病理レビュー, **116**, 72-80 (2001).
- 2) 河野正臣, 石橋みどり, 臨床化学検査の焦点 追加発言 AST/ALT ホロ酵素測定 IFCC 法と JSCC 法の比較, 臨床病理, **68**(4), 318-324 (2020).
- 3) 日本臨床検査標準協議会基準範囲共用化委員会(編): 日本における主要な臨床検査項目の共用基準範案, <https://www.jccls.org/wp-content/uploads/2020/02/2020013103.pdf> (参照 2021-03-17).
- 4) 秦堅佐工, これって肝臓病? 小児におけるトランスアミナーゼ、ALP、GGT の正常値と生体内での役割, 小児内科, **48**(6), 804-808 (2016).
- 5) 本田浩一, 【透析療法の課題と展望 2020】水溶性ビタミンの補充, 腎と透析, **88**(5), 683-687 (2020).
- 6) 里和スミエ, 三澤美紀, 神山一郎, 藤野容子, 妊婦血清中のビタミン B6 (3型) と Pyridoxal 5'-phosphate (PLP) 値, ビタミン, **63**(8), 361-368 (1989).
- 7) 小野慶治, 小野高志, 久末洋子, 松股 考, 透析患者における低 aspartate transaminase(GOT)・低 alanine transferase(GPT) の病因 ビタミン B6 欠乏との関連性について, 日本透析医学会雑誌, **27**(10), 1319-1323 (1994).
- 8) 奥本和夫, 斎藤貴史, 勝見智大, 富田恭子, 佐藤佳子, 阿藤里佳, 西瀬雄子, 渡辺久剛, 上野義之, アポ型 ALT により ALT が異常低値を示した C 型慢性肝炎に対して抗ウイルス療法を行った 1 例, 肝臓, **54**(8), 543-547 (2013).
- 9) 大久保昭行, 血清 GOT の活性測定とピリドキサルリン酸の効果, ビタミン, **54**(11), 511-520 (1980).
- 10) 斎藤 明, Uremic Toxins と透析療法, 透析会誌, **42**(2), 127-135 (2009).
- 11) K. Yasuda, K. Okuda, N. Endo, Y. Ishiwatari, R. Ikeda, H. Hayashi, K. Yokozeki, S. Kobayashi, Y. Irie, Hypoaminotransferasemia in patients undergoing long-term hemodialysis: clinical and biochemical appraisal. *Gastroenterology*, **109**(4), 1295-1300 (1995).
- 12) 藤田清貴, 最新 酵素・アミノザイム検査 測定法とその臨床的意義 異型酵素, 臨床病理レビュー, **116**, 7-15 (2001).
- 13) Y. Kajita, T. Majima, M. Yoshimura, T. Hachiya, T. Miyazaki, H. Ijichi, Y. Ochi, Demonstration of antibody for glutamic pyruvic transaminase (GPT) in chronic hepatic disorders, *Clin. Chem. Acta*, **89**(3), 485-492, (1978).
- 14) 安藤敏子, 渡邊眞一郎, 大川記代, 小川 登, 荏原 茂, 長澤佳美, 石原 潤, 亀子文子, 藤田清貴, ALT 活性阻害を示す IgG の免疫化学的特性, 生物物理化学, **50**(4), 225-229 (2006).
- 15) M. M. Sohocki, L. S. Sullivan, W. R. Harrison, E. J. Sodergren, F. F. B. Elder, G. Weinstock, S. Tanase, S. P. Daiger, Human glutamate pyruvate transaminase (GPT) ; Localization to 8q24.3, c DNA and polymorphic sites, *Genomics*, **40**(2), 247-252 (1997).
- 16) S. Uno, M. Kaito, Y. Kobayashi, S. Ishida, H. Kato, E. Gabazza, S. Tamaki, J. Ikoma, I. Imoto, S. Watanabe, Y. Adachi, Case report: alanine aminotransferase deficiency detected in a patient with chronic hepatitis C, *J. Gastroenterol. Hepatol.* **13**(5), 480-482 (1998).
- 17) 藤井智美, 増本道子, 井上須美子, 浦田美秩代, 栗原正子, 飯田廣子, 木下幸子, 濱崎直孝, 血清 ALT 低活性症例における遺伝子解析, 臨床化学, **32**(3), 255-259 (2003).
- 18) M. Ishiguro, K. Takio, M. Suzuki, R. Oyama, T. Matsuzawa, K. Titani, Complete amino acid sequence of human liver cytosolic alanine aminotransferase (GPT) determined by combination of conventional and mass spectral methods, *Biochemistry* **30**(43), 10451-10457 (1991).
- 19) 日本臨床化学会, ヒト血清中酵素活性測定の方法, 報告法総編集編 2012 年版, 臨床化学, **18**(4), 211-261 (1989).
- 20) 日本消化器病学会編, NAFLD/NASH 診療ガイドライン, (南江堂, 東京, 2014).