

THE CHEMICAL TIMES

2021 No.3 (通巻261号)
ISSN 0285-2446

特 集

日常臨床検査で測定する
血清酵素の欠損症

02 特集「日常臨床検査で測定する血清酵素の欠損症」を
刊行するにあたって

浜松医科大学医学部 臨床検査医学 教授 前川 真人

03 LD(乳酸デヒドロゲナーゼ)欠損症

浜松医科大学医学部 臨床検査医学 教授 前川 真人

09 ALT異常低値の意義と解析方法について

九州大学病院 検査部 主任臨床検査技師 酒本 美由紀

13 クレアチンキナーゼ欠損症

兵庫医科大学 臨床検査医学講座 主任教授 小柴 賢洋, レジデント 中野 正祥

16 低ALP血症 vs 低ホスファターゼ症

金沢大学附属病院 遺伝診療部/遺伝医療支援センター 特任教授 渡邊 淳

22 血清コリンエステラーゼ欠損症

浜松医科大学医学部附属病院 検査部 主任臨床検査技師 石川 仁子
浜松医科大学医学部 臨床検査医学 教授 前川 真人



KANTO CHEMICAL CO., INC.

特集

「日常臨床検査で測定する血清酵素の欠損症」を
刊行するにあたって

血清酵素の測定は早いものでは20世紀初頭から始まっているが、今でもスクリーニングをはじめ、細胞傷害のマーカー、機能障害のマーカー、産生誘導のマーカーなど、特定の目的でも使用されている。また、アイソザイムの概念が生まれたのは、1950年代のことなので、こちらも還暦を迎えている。これまでに、ほとんど全ての血清酵素の欠損症が発見されてきた。臨床症状と深く関係するもの、(奇異な)検査データから気がついたものなど、発端は種々ある。

血清酵素の主な働き場所は細胞内のものが多いが、細胞外のものもある。今一度、原点に立ち戻り、その血清酵素の生理的な役割、臨床検査としての意義を見つめ直してみよう。本来の機能は欠損症を見つけることから始まるという言葉もある。欠損して起きたこととの関係を改めて見てみよう。そして、今なお現役で、日常検査の現場で日々活躍している彼らを改めて注目してみよう。これまで知らなかったこと、気づかなかったことに巡り会える機会となると信じて。

前川 真人

浜松医科大学医学部 臨床検査医学 教授

LD(乳酸デヒドロゲナーゼ)欠損症

Lactate dehydrogenase deficiency

前川 真人 Masato Maekawa

浜松医科大学医学部 臨床検査医学 教授
Department of Laboratory Medicine, Hamamatsu University School of Medicine (Professor)

キーワード ... 乳酸デヒドロゲナーゼ、アイソザイム、遺伝性変異、先天代謝異常症、運動後ミオグロビン尿症

01

乳酸デヒドロゲナーゼ(LD)の概要

乳酸デヒドロゲナーゼ(LD; L-Lactate:NAD⁺ oxidoreductase; EC 1.1.1.27)は解糖系最終段階であるピルビン酸と乳酸の変換に際し、NAD(H)を補酵素とした酸化還元反応を触媒する酵素である。原核生物から真核生物に幅広く存在し、ヒトでは全ての細胞に存在して嫌氣的解糖などで重要な役割を有している。

LDはH(B)とM(A)の2種のサブユニット蛋白からなる4量体で、5種のアイソザイムを形成する(図1)。分子量はおよそ134000である。LDのサブユニットは他にX(C)があり、精子でのみ発現している。H型は心臓(Heart)に多く、酸素供給が十分な状態で働きやすく、乳酸からピルビン酸(NADからNADH)に変換するのに向いている。一方、M型は骨格筋(Muscle)に多く、ピルビン酸から乳酸(NADHからNAD)への変換が得意で、無酸素運動時にも働きやすいタイプである。遺伝子の進化論に従って、遺伝子名はLDHA、LDHB、そして精子で発現するLDHCと名付けられている。LDHA、LDHB、は単一のLDHA-like LDH遺伝子の重複によってでき、LDHCはLDHAの重複によってできたと考えられて

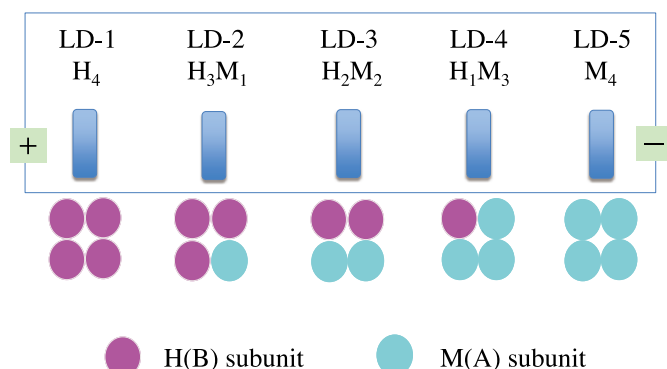


図1 LDアイソザイムの構成

いる。LDHAとLDHCは染色体11番短腕、LDHBは12番短腕に座位している。これらのサブユニットはDNA配列で84~89%、アミノ酸レベルで69~75%の相同性がある¹⁾。

02

生理的意義

先述したように、LDは酸化還元反応によってピルビン酸と乳酸の変換を行う酵素であり、体内全ての細胞の細胞質に存在している。酸素の供給が十分であれば、乳酸からピルビン酸に変換し、ミトコンドリアで酸化的リン酸化によって大量のATP(36分子)を獲得することができる。一方、酸素の供給が乏しい条件であっても、解糖系を回すことによってNADとATP(2分子)を得ることができる。これは非常に損な反応に見えるが、嫌氣的解糖は酸化的リン酸化の100倍は速い反応であるため、短期的な息こらえ状態では、たくさんのグルコースを使ってでも有効にエネルギーを獲得することができる目的に合致した反応と考えられる。LDには複数のサブユニットが存在し、組織・細胞によってHとMサブユニットの発現量が異なり、その細胞環境に応じたアイソザイムが形成されるように調節されている。例えば中枢神経系では、星状細胞からニューロンに転送された乳酸は、脳に多く発現しているLD-1型の作用でピルビン酸に変換される。

がん細胞では一般的にLD活性は上昇しており、嫌氣的解糖の方向に、つまりピルビン酸から乳酸の方向にシフトしNADが増加傾向に傾く。これはワールブルグ効果(好氣的解糖)と言われ、酸素供給される環境下でも解糖系によってATPと乳酸を増やす方向に働く。また、クエン酸回路のアミノ酸などを活用して、細胞分裂に必要な脂質・脂肪酸・ヌクレオチドなどを合成することができる。特にがん細胞との関連でLDHAの発現制御に関して多くの研究が進められてきた。HIF1、c-Myc、FOXO1、KLF4、cAMP、エストロゲンなどがLDHAの転写制御因子として知られている。

また、LDHA自身が転写因子として機能したり、細胞周期、分子シャペロン、胸腺細胞の分化、細胞死(アポトーシス、オートファジー)などにも関与する。このがん細胞におけるLDの代謝過程や役割はがん特異的な治療法への応用も期待されている²⁾。

03 臨床検査診断での意義

LDは全ての細胞に存在する。細胞の可溶性分画に存在するため、細胞の傷害時に直接もしくはリンパを通して間接的に血管内に流入する逸脱酵素である。従って、大多数の細胞傷害で血清LD活性が上昇するため、非常に感度の良い体内での異常の発信シグナルであり、初診時のスクリーニング検査として重要な役割を示す。

次に、AST、ALT、CKなど他の逸脱酵素との組み合わせで、損傷臓器(細胞)を推定するのに使用できる。これは、LDアイソザイム分画を調べることでさらに鑑別が容易になる。すなわち、細胞・組織における2種のサブユニット遺伝子の発現量が異なることで特徴的なパターンを示すため、それが血中LDにも反映されるからである。

さらに、血中レベルの上昇の程度は損傷を受けた細胞数を反映するため、重症度の推定が可能であり、疾患の予後予測にも頻用されている。悪性リンパ腫などの血液悪性腫瘍だけでなく、固形腫瘍でも、また間質性肺炎など多くの疾患で血清LD活性は予後と関連するという報告が多数ある。最近では、COVID-19の重症度判定マーカーの一つとされている³⁾。

血中LDはアイソザイムごとに生体内半減期が異なる(1型から5型の順にそれぞれおよそ79時間、75時間、31時間、15時間、9時間)。肝細胞傷害では肝細胞に多く含まれるLD-5が血中に増加するが、5型は半減期が短いため上昇の期間は相対的に短い。逆に半減期の長い1型が増加する心筋梗塞などではLD上昇が長続きする。このように半減期の違いにより、LD総活性もアイソザイムパターンも病期によって変化する。

LD活性は、2020年3月まで、日本臨床化学会(JSCC) 勧告法に準拠したJSCC標準化対応法によって測定されてきたが、2020年4月から2021年3月までの移行期間を経て、2021年4月から全国的に国際臨床化学連合(IFCC) 常用基準法で測定されるようになった⁴⁾。共に乳酸を基質として、NADが還元され生成するNADHを340 nmの増加で連続的に捉える方法である。相違点は、JSCC法がpH 8.80のジエタノールアミン緩衝液であるのに対し、IFCC法はpH 9.40のN-メチル-D-グルカミン緩衝液を使用しており、測定時のpHが異なることが大きい。

LD活性が異常値を示す疾患・病態を表1に示す。また、アイソザイムパターンとLD/AST比による鑑別診断を表2と以下に示す。

表1 血清LD活性値を変動させる病態・疾患

LD活性	病態・疾患
上昇	溶血性貧血、悪性貧血
	心筋梗塞、横紋筋融解症
	筋ジストロフィ、多発性筋炎、ミオパチー
	自己免疫性疾患、ウイルス感染症
	急性肝炎、劇症肝炎、肝硬変
	白血病、悪性リンパ腫、固形癌
	(ビットフォール) 溶血検体、酵素結合性免疫グロブリン
低下	失活因子
	薬剤による干渉
	遺伝性LD-Hサブユニット欠損症(ホモ接合体、ヘテロ接合体)
	遺伝性LD-Mサブユニット欠損症(ヘテロ接合体のみ)
	(ビットフォール) 保存による失活

表2 LDアイソザイムパターンとLD/AST比からみた由来組織・病態の推定

パターン名称	アイソザイムパターン	LD/AST比	原因となる疾患	推定される由来細胞
1,2型優位	1>2	3~10	心筋梗塞など	心筋
	1≥2	20~40	溶血性貧血など	赤血球
	1>2	30~80	巨赤芽球性貧血など	巨赤芽球
	1≥2	15~∞	腫瘍(セミノーマ等)	腫瘍細胞
	1<2	10~20	2,3型優位からの移行(慢性非活動期)	骨格筋リンパ球腫瘍など
2,3型優位 2,3,4,5型上昇と類縁パターン	2>3	5~15	筋ジストロフィ、多発性筋炎など、慢性的持続的な酵素遊出	骨格筋
		10~20	膠原病、ウイルス感染症、皮膚炎、間質性肺炎など	リンパ球
		15~∞	白血病、リンパ腫など、肺癌、胃癌などの固形癌	腫瘍細胞
5型優位	4<5	5~10	急性の筋崩壊	骨格筋
		~3	急性肝炎	肝細胞
		~5	肝細胞癌	腫瘍細胞
		10~20	前立腺癌	腫瘍細胞

1) 1,2型優位

臨床的に重要なのは赤血球と心筋である。赤血球由来の溶血性貧血ではLD/AST比は20~40くらいを示すが、悪性貧血ではもっと高く50を越える例もある。肝硬変では、肝細胞由来の5型と赤血球由来の1,2型が上昇したパターンを示す。心筋梗塞では、LD活性の上昇および1,2型優位(1>2のflip pattern)となる。他に、腎梗塞も腎臓由来のLD上昇がみられる。また、極端にLD-1が高い場合、LD/AST比が高値の場合は、セミノーマなど腫瘍由来を疑う。

2) 5型の上昇

肝細胞、骨格筋、皮膚、腫瘍などに由来すると考えられる。病態として急性肝炎が最も考えやすい。急性横紋筋壊死で5型が非常に高くなる場合がある。腫瘍由来としては、肝細胞癌と前立腺癌の他、大腸癌、子宮体癌、リンパ腫、肺癌なども考えられ、予後

因子としても重要である。

3) 2,3型優位

白血病、リンパ腫、筋ジストロフィ、多発性筋炎、膠原病、ウィルス感染症、皮膚の発疹(皮膚炎、紅皮症、薬疹など)、間質性肺炎、種々の腫瘍などが考えられる。

04

ピットフォール

- ① 安定性：室温・冷蔵ともに短時間なら問題ないが、不安定な4,5型が多い場合は失活による低下が大きいので、速やかに分析する。特にLD-4型の安定性が悪い。
検体の状況：溶血検体では赤血球由来のアイソザイム1,2型が血清中に出てくるため、血清LD活性が上昇するので注意する。本態性血小板血症などで血小板数が著増している時には、血小板由来のLDが血液凝固時に出てくるので、血漿に比べて血清ではLDが高くなる。
- ② 生理的変動：生理的変動はLD総活性で約20～30単位である。性差はないが年齢差があり、出生直後は最も高く成人の約2倍であるが、その後漸減して14歳前後でほぼ成人の値となる。
- ③ アノマリー像：アノマリーは原因不明の高LD血症の最たる原因である(一般患者の頻度は約0.2～0.3%)。LDアイソザイム分析を行い、異常な分画パターンならば免疫グロブリン結合を疑い同定する。酵素結合性免疫グロブリンでは、活性を阻害し低LD血症を示す場合もある。
- ④ 遺伝性変異：後述

05

LDの遺伝性変異

H(B)とM(A)の2種のサブユニットは、先述したようにそれぞれ染色体12番と11番に座位するLDHB、LDHA遺伝子によって支配されている。遺伝子変異は、酵素活性に影響を与えずアイソザイム分析で幅の広い活性帯が出現するサブユニットバリエーションと、酵素活性に影響を及ぼし、通常は活性低下をひきおこすサブユニット欠損に分けられる。前者で荷電が変わるようにアミノ酸が置換した変異では、野生型と変異型のハイブリッドが形成されるため、電気泳動で幅の広い活性帯を示すことで気づくことがある。

以降は後者の欠損症を中心に記載する。まず強調すべきは、Hサブユニット欠損症⁵⁾もMサブユニット欠損症⁶⁾も世界に先駆けて本邦で発見されていることである。その後も本邦からの報告が圧倒的に多い。双方ともに、本邦でのヘテロ接合体の頻度は、およそ600-700人に一人、ホモ接合体は近親婚の存在も考慮すると30万から50万人に一人と推測される⁷⁾。

1) 乳酸デヒドロゲナーゼHサブユニット欠損症

Lactate dehydrogenase H subunit deficiency

LD-H欠損症は、血清LD活性が低値を示すことが発見の発端となった⁵⁾。Hサブユニットは心筋や赤血球、脳などに多く発現しており、血中半減期が長いという特徴を有し、血清LD活性の多くはHサブユニットの多いアイソザイムの1型や2型である。LD-H欠損ホモ接合体ではLD-5型(Mサブユニットの4量体)しか存在せず、5型は半減期が最も短いため、血清LD活性が極端に低値になる。ヘテロ接合体においても相対的に半減期の短いアイソザイムに偏位するため、血清LD活性が基準範囲下限を下回ることが多い。

他の血清LD活性低値の原因として最も高頻度に認められるのが酵素結合性免疫グロブリンの存在で、電気泳動によるアイソザイム分析でアノマリー像を認めることもある。LDは、幸い赤血球に多く含まれているため、赤血球のアイソザイム検査をすることで獲得性(血清中の因子)と先天性の鑑別が可能であり、先天性LD-H欠損症では赤血球でも5型のみとなるため、その診断は可能である。これに加えて、家族(両親、子供など)検索で同様のパターン、もしくはヘテロ接合体が疑われる赤血球のLDアイソザイムパターンが確認できれば、遺伝的な欠損症と判定できる。この状況で、遺伝子解析を行い、欠損の原因と考えられる変異が見出されれば、もちろん確定診断となるが、検査診断、臨床診断には特に必須ではない。しかしながら、例数も少ないため、臨床検査医学的、人類遺伝学的な意義は十分ある。

症状との関連性であるが、赤血球に多いHサブユニットが欠損しているため、溶血性貧血が生じないかどうかを検討されたが、因果関係は証明されなかった⁸⁾。従って、LD-H欠損症による臨床症状は明らかではない。

2) 乳酸デヒドロゲナーゼMサブユニット欠損症(糖原病XI型)

Lactate dehydrogenase M subunit deficiency (Glycogen storage disease XI)

① 臨床症状と検査所見、診断と治療

LD-M欠損症は糖原病の一つの型とされているが、実質的には組織に糖が蓄積するわけではない。他の多くの解糖系酵素の欠損症では糖の蓄積があるため、便宜上XI型とされている。激しい運動後、特に短距離走・格闘技など息をつめて嫌気的な状況での運動が必要な場合に、骨格筋の硬直・壊死、褐色尿(ミオグロビン尿)などを起こす運動後ミオグロビン尿症(exertional myoglobinuria)の原因の一つである⁹⁾(表3、4)。

LD-M欠損症の発端は臨床症状であった^{6,9)}。表3の症例1に示したように、激しい運動後の褐色尿(横紋筋壊死によるミオグロビン尿症)が発端となり血液検査を行ったところ、血清CKやASTが顕著に上昇しているにもかかわらず血清LD活性の上昇が乏しいという検査データであった。それらの検査データの乖離からアイソザイム分析が施行され、1型しかないことで判明した⁶⁾。

LD-M、LD-H欠損症の臨床症状、検査所見を表4にまとめた。LD-M欠損症の特徴的な皮膚所見の報告¹⁰⁾を見て、皮膚症状からLD-M欠損症の発見に繋がった症例もある¹¹⁾。発見の発端は、基本的には臨床症状や検査所見から血清と赤血球のアイソザイ

表3 LD-Mサブユニット欠損症症例の特徴

症例	年齢	性別	主訴、疾患	遺伝子解析結果	筋症状	皮膚症状	検査データ (U/L)*				地域	報告
							LD	AST	ALT	CK		
1	18	男	運動後の筋崩壊	エクソン620塩基の欠失	+++	+	233	364	76	26290	浜松	1980
2	26	女	マススクリーニング	エクソン620塩基の欠失	+	+	140	23	28	48	浜松	1984
3	23	男	運動後の筋崩壊、腎障害	エクソン620塩基の欠失	+++	+	238	44	29	3796	東京	1985
4	61	男	易疲労感	エクソン620塩基の欠失	++	?	150	26	20	491	東京	1989
5	16	女	皮疹	エクソン33塩基の欠失	+	+	163	16	7	94	大分	1991
6	58	男	ホジキン病	未解析	-	-	107	49	38		東京	1991
7	54	女	パーキンソン病	R171X	+	+	WNL	WNL	WNL	WNL	福岡	1994
8	51	女	子宮内膜症	エクソン620塩基の欠失	?	?	167	WNL	WNL	1926	東京	1998
9	64	男	膿疱性乾癬	エクソン620塩基の欠失	++	++	222	33	30	383	浜松	2006
外1	30	男	運動後の筋崩壊	エクソン52塩基の欠失	+++	?					アメリカ	1990
外2	51	女	皮疹	未解析	?	+					イタリア	1992
外3	38	男	運動後の筋崩壊	エクソン2のスキップ	+++	?					アメリカ	1994
外4**	70	女	強度の筋痛と乳酸アシドーシス	未解析	+++	?	?	2720	1679	33700	アメリカ	2011

* 検査データは単位をJSCC標準化測定法に概数として換算したが、他施設のものもあるので、参考データとして見られたい。

WNL: within normal limit

** 骨格筋の生検材料のLD-Mサブユニット活性は基準範囲下限の1/3に低下していたと記載されており、完全欠損ではない。

表4 LDサブユニット欠損症の臨床症状、検査所見のまとめ

	H(B)サブユニット欠損症	M(A)サブユニット欠損症
臨床症状	特になし	運動後の筋硬直、筋融解、ミオグロビン尿 分娩時に子宮硬直、胎児仮死などの危険性 紅斑鱗屑性皮膚病変、膿疱性乾癬(汎発型)様の皮膚病変
日常検査所見	血清LD活性は顕著に低下 LDアイソザイム: LD-5 (M4) のみ	血清LD活性は基準範囲内高め LDアイソザイム: LD-1 (H4) のみ
運動後の検査所見	特記すべきことなし	血清LD上昇せず(軽微)、CK・ASTの上昇 尿中ミオグロビン増加、尿潜血反応陽性
糖代謝産物の変化	赤血球 FBP: 著増、DHAP: 著増、GA3P: 増加	運動後の筋肉 FBP: 増加、DHAP: 著増、GA3P: 著増、Glycerol: 増加、G3P: 増加
虚血下運動負荷試験	特記すべきことなし	ビルビン酸: 著増、乳酸: ほとんど変化なし

FBP: fructose-1,6-bisphosphate, DHAP: dihydroxyacetone phosphate, GA3P: glyceraldehyde-3-phosphate, G3P: glycerol-3-phosphate

ム分析が行われることである。日常の血清LD活性は低値を示さず、多くは基準範囲上限を示す(表3、4)。なぜならば、Mサブユニットがないことによって、血中半減期が長い1型のみを形成するからである。

臨床症状の強さと遺伝子変異の種類、すなわち遺伝型と表現型との関係は特に明らかではなく、むしろ臨床症状の代表である筋症状の発現には、痛みをこらえて激しい運動を行えるかどうかにかかっていると考えられる。無理をすればするほど筋の崩壊が強く、症状がきつくなる。

発症したときの治療は対症療法であり、個々に対応する。特に、横紋筋融解、ミオグロビン尿症による腎障害が発症した場合は、予後に影響する。

② 症状の発現機序

LDは解糖系でピルビン酸を還元して乳酸を生成する過程で、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GA3PD) のステップと共役して還元型のNADHを再酸化する。しかし、LD活性が極端に減ることによってGA3PDによって生じたNADHの再酸化をglycerol phosphate dehydrogenase (GPD)が担うことによってグリセロールに流れる系が働く。この系ではATP

が産生されないため、横紋筋壊死に至ったと考えられている⁹⁾(図2)。同様の理由で、女性では分娩時に働く筋にもLD-Mは多いため、分娩の遷延などのリスクが考えられる。また、男女に共通する症状として、夏期に増悪する四肢伸側などにできる紅斑鱗屑性皮膚病変がある^{10,11)}。他に膿疱性乾癬(汎発型)様の皮膚病変も認められる。表皮は、真皮毛細血管から供給されるグルコースを栄

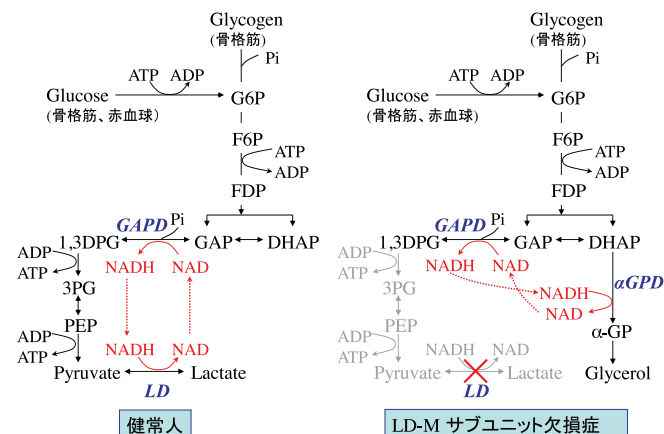


図2 骨格筋における解糖系の代謝

養源として解糖系でATPを得ているため、その経路に問題が生じるためと考えられる。また、それにより表皮角化細胞がIL-8、生体防御ペプチドLL-37、VEGFなどの乾癬惹起因子を放出するなど免疫反応が生じることに因るとも考えられる¹²⁾。

3) 遺伝子解析

原因遺伝子であるLDHA、LDHBに大きな欠失、挿入、逆位がある可能性もあるが、基本的には点変異や小さな欠失・挿入がほとんどなので、PCRによる解析が便利である。LD-M欠損ではホットスポットであるエクソン6内の20塩基の欠落から調べる。LD-H欠損にはホットスポットがないため、全てのエクソンをダイレクトシーケンスする。エクソンは7個でPCR解析には手頃な大きさなので、それほど困難ではない。表5、6にLDHA、LDHBの遺伝子変異についてまとめた。HGMD 78 (81) Mutations (2020.4) で参照したcDNA sequence は、LDHAに関しては

NM_005566.4、LDHBに関してはNM_002300.8を用いた。アミノ酸の番号が既報とは異なるものもあることにご留意願いたい。

06

おまけ — LDHD

臨床検査で測定されているLDはL-乳酸のデヒドロゲナーゼ (EC 1.1.1.27) であり、本稿ではこの酵素について記載してきた。しかし、LDの基質となる乳酸はヒト体内で2種類の光学的異性体として存在する。L-乳酸はD-乳酸よりも血中に100倍多く存在し、嫌氣的解糖でピルビン酸から生成される。

一方、D-乳酸デヒドロゲナーゼ (EC 1.1.1.28) は全く別の酵素で、遺伝子はLDHDで染色体16番長腕に座位している。そし

表5 LD-M欠損症などを引き起こすLDHAの遺伝子変異

表現型	エクソン	塩基置換	アミノ酸の置換	文献
LD-M欠損	1	C6 > C7	p.Q20fs	Maekawa (1994) Eur J Lab Med 2, 161; Kanno (1995) Muscle Nerve 3, S54
	2	IVS2 ds -I G > A	exon 2 skip	Tsujino (1994) Ann Neurol 36, 661
	3	TGTTGT > TGT	p.V124del	Maekawa (1994) Hum Mol Genet 3, 825
	4	CGA-TGA	p.R169X	Maekawa (1994) Eur J Lab Med 2, 161; Kanno (1995) Muscle Nerve 3, S54
	5	CTCT > CT	p.L214fs	Tsujino (1994) Ann Neurol 36, 661
	6	TTGG---TTGG > TTGG	p.G253fs	Maekawa (1990) Biochem Biophys Res Commun 168, 677
	7	GAG > TAG	p.E329X	Maekawa (1991) Biochem Biophys Res Commun 180, 1083
電気易動度が変わるバリエーション	5	AAA > GAA	p.K222E	Maekawa (1994) Clin Chem 40, 665
	7	CG > TGT	p.R315C	Sudo (1992) Biochem Intl 27, 1051

HGMD 78 (81) Mutations (2020.4) cDNA sequence : NM_005566.4 に記載の活性喪失型などの変異

表6 LD-H欠損症などを引き起こすLDHBの遺伝子変異

表現型	エクソン	塩基置換	アミノ酸の置換	文献
LD-H欠損	1	GCG > GAG	A35E	Maekawa (1993) Hum Genet 91, 163
	2	GGG > GAG	G69E	Takatani (2001) Mol Genet Metab 73, 344
	3	CGTCAGCAの重複	Q102fs	Maekawa (1994) Hum Genet 93, 74
	3	AGT > CGT	S129R	Sudo (1992) Hum Genet 89, 158
	3	TCC > C	S138fs	Sudo (1994) Clin Chem 40, 1567
	4	CATT の重複	L144fs	Maekawa (1994) Hum Genet 93, 74
	4	TAT > TAG	Y146X	Sudo (1994) Clin Chem 40, 1567
	4	CGC > TGC	R158C	Wang (2015) Sci Rep 5, 18209
	4	TTT > GTT	F171V	Maekawa (1993) Hum Genet 91, 163
	4	CGC > CAC	R172H	Sudo (1990) Biochem Biophys Res Commun 168, 672
	4	CGC > CCC	R172P	Hidaka (1999) J Hum Genet 44, 69
	4	TAC > TAA	Y173X	Maekawa (1994) Eur J Lab Med 2, 161
	4	ATG > TTG	M175L	Maekawa (1993) Hum Genet 91, 163
	5	AAT 欠失	N223del	Sudo (1999) Clin Biochem 32, 137
	7	CC > C	L290fs	Maekawa (1994) Hum Genet 93, 74
電気易動度が変わるバリエーション	1	AAA > GAA	K7E	Maekawa (1993) Hum Genet 91, 423
	3	CGG > TGG	R107W	Shonnard (1996) Biochim Biophys Acta 1315, 9
	7	GAT > GTT	D322V	前川 (1994) 生物物理化学 38, 25
	7	TGG > CGG	W325R	Okumura (1999) Clin Chim Acta 287, 163

HGMD 78 (81) Mutations (2020.4) cDNA sequence : NM_002300.8 に記載の活性喪失型などの変異

て、欠損症が見つかり、D-乳酸尿症 (MIM 245450) をきたす。最初の症例は、幼少期に精神運動発達遅滞が尿中乳酸高値を示し、それがL-乳酸ではなくD-乳酸であったこと、大人になつての再検査で尿中D-乳酸排泄亢進と血中D-乳酸濃度の上昇という表現型から、D-LD欠損症と診断され、染色体16q23に座位するLDHDの遺伝子解析により病的な遺伝子変異が同定された¹³⁾。

D-乳酸は食物由来か、腸内細菌による産生で外因性に、またはメチルグリオキサル代謝によって内因性に産生される。このため、種々のがんでメチルグリオキサル代謝が亢進、もしくは短腸症候群で腸内細菌叢の変化によってD-乳酸が増加する。従つて、D-乳酸アシドーシスの鑑別診断ではLDHD欠損症ともども注意する必要がある。

07 おわりに

血清LD測定は、今でもスクリーニング検査として、予後マーカー、治療のモニタリングマーカーとして、広く活用されている。本稿にも紹介したように、がんにおけるLD-Mは代謝、免疫、血管新生など多くの機序で関与しており、がん治療の標的としても研究は進められていて、まだまだ研究対象としてホットである。LDサブユニット欠損症は本邦でいずれも世界第一例が発見されていることは特筆に価する。

参考文献

- 1) S. S. Li, *Prog. Clin. Biol. Res.* **344**, 75-99 (1990).
- 2) J. R. Doherty, J. L. Cleveland, *J. Clin. Invest.* **123**(9), 3685-3692 (2013).
- 3) B. M. Henry, G. Aggarwal, J. Wong, S. Benoit, J. Vikse, M. Plebani, G. Lippi, *Am. J. Emerg. Med.* **38**(9), 1722-1726 (2020).
- 4) 日本臨床化学会、酵素・試薬専門委員会、ALPプロジェクト・LDプロジェクト、ALP・LD測定法変更についてー医療従事者向けー、<http://jscc-jp.gr.jp/file/2019/alpld2.pdf>, (accessed 2021-4-8).
- 5) M. Kitamura, N. Iijima, F. Hashimoto, A. Hiratsuka, *Clin. Chim. Acta* **34**(3), 419-423 (1971).
- 6) T. Kanno, K. Sudo, I. Takeuchi, S. Kanda, N. Honda, Y. Nishimura, K. Oyama, *Clin. Chim. Acta* **108**(2), 267-276 (1980).
- 7) M. Maekawa, S. Kanda, K. Sudo, T. Kanno, *Am. J. Hum. Genet.* **36**(6), 1204-1214 (1984).
- 8) S. Miwa, T. Nishina, Y. Kakehashi, M. Kitamura, A. Hiratsuka, K. Shizume, *Acta Haematol Jpn.* **34**: 228-232 (1971).
- 9) T. Kanno, K. Sudo, M. Maekawa, Y. Nishimura, M. Ukita, K. Fukutake, *Clin. Chim. Acta* **173**(1), 89-98 (1988).
- 10) T. Yoshikuni, H. Tagami, M. Yamada, K. Sudo, T. Kanno, *Arch. Dermatol.* **122**(12), 1420-1425 (1986).
- 11) S. Takayasu, S. Fujiwara, T. Waki, *J. Am. Acad. Dermatol.* **24**(2), 339-342 (1991).
- 12) T. Ito, M. Aoshima, K. Sugiura, T. Fujiyama, N. Ito, J. I. Sakabe, M. Akiyama, M. Maekawa, Y. Tokura, *Br. J. Dermatol.* **172**(6), 1674-1676 (2015).
- 13) G. R. Monroe, A. M. van Eerde, F. Tessadori, K. J. Duran, S. M. C. Savelberg, J. C. van Alfen, P. A. Terhal, S. N. van der Crabben, K. D. Lichtenbelt, S. A. Fuchs, J. Gerrits, M. J. van Roosmalen, K. L. van Gassen, M. van Aalderen, B. G. Koot, M. Oostendorp, M. Duran, G. Visser, T. J. de Koning, F. Cali, P. Bosco, K. Geleijns, M. G. M. de Sain-van der Velden, N. V. Knoers, J. Bakkers, N. M. Verhoeven-Duif, G. van Haften, J. J. Jans, *Nat. Commun.* **10**(1), 1477 (2019).

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いため、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、膵、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) よりも長いいため、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JCCLS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。

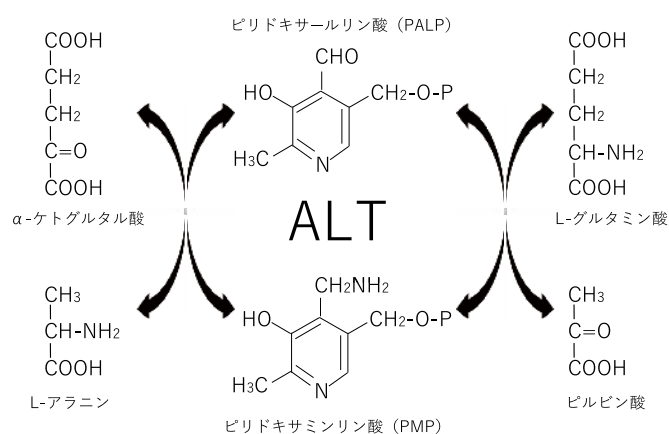


図1 ALTの酵素反応

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ことで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ま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

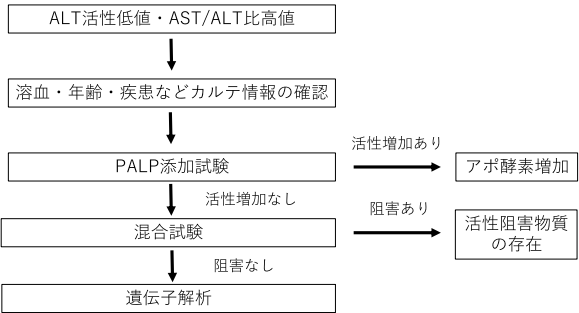


図2 ALT異常低値症例解析フローチャート

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-オキシグルタル酸 (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、アスパラギン酸が増加している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℃10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'-TAAGCCAGACCCACTGTCTGC-3'
	AR	5'-AGCAGCTTCAGCACCGTCTG-3'
Exon5-6	BF	5'-GCGGACCCCAACAACGTCTTCTCTGT-3'
	BR	5'-CTCGCCCATGTAGCCCTTGGAGGT-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法では健常人群においても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・アイソザイム検査 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, 佐藤智佳子, 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・アイソザイム検査 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勧告法, 勧告法総編集編 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).

クレアチンキナーゼ欠損症

Creatine kinase deficiency

小柴 賢洋 Masahiro Koshiba, MD, PhD

兵庫医科大学 臨床検査医学講座 主任教授
Department of Clinical Laboratory Medicine, Hyogo College of Medicine (Chief Professor)

中野 正祥 Masayoshi Nakano, MD

兵庫医科大学 臨床検査医学講座 レジデント
Department of Clinical Laboratory Medicine, Hyogo College of Medicine (Resident Doctor)

キーワード ■ クレアチンキナーゼ (CK)、遺伝子変異、急性心筋梗塞

01

はじめに

クレアチンキナーゼ(creatine kinase: CK)は、筋肉や心臓、脳などの組織に含まれ、クレアチンおよびクレアチンリン酸間におけるリン酸基転移反応を触媒する酵素である。クレアチンリン酸はATPの供給源となるため、筋肉などのエネルギー消費の大きい組織においてCKは化学エネルギーの貯蔵と供給の両面で重要な役割を有していると考えられている。

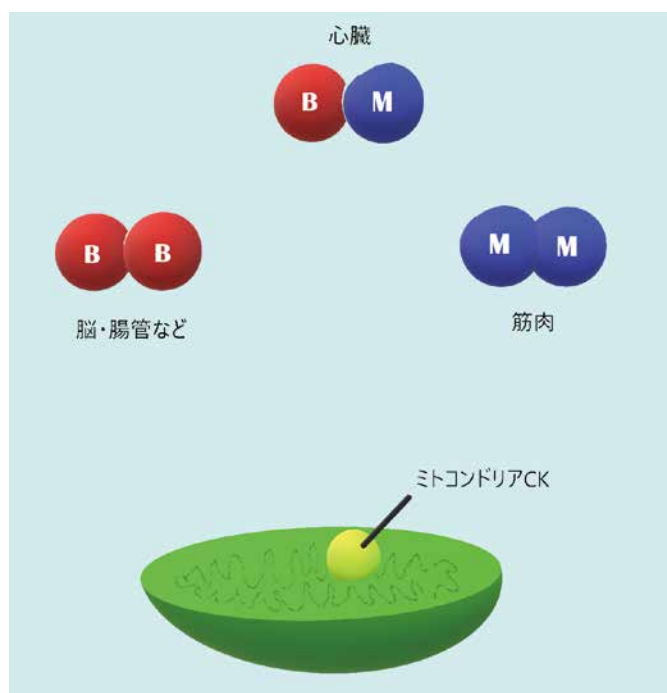


図1 CKアイソザイムと臓器局在性

医療における臨床検査分野においては、上記の組織中の細胞が破壊された場合に血液中に漏れ出す酵素、すなわち逸脱酵素として測定されており、心筋梗塞や骨格筋疾患などで血中濃度が増加する。CKは同じ反応を触媒するが構造が異なる酵素、すなわちアイソザイムを有している。CKはCK-muscle (CK-M)とCK-brain (CK-B)の2種類のサブユニットが2量体を形成しており、サブユニットの組み合わせによってCK-MM、CK-MB、CK-BBの3種類のアイソザイムが存在する。これらは等電点の違いから電気泳動によって陽極側からCK-BB、CK-MB、CK-MMと分離できる。CK-MMは骨格筋、CK-MBは骨格筋と心筋に多く含まれているため、血液中における比率を測定することによって疾患の存在部位を推定することが可能となる。CK-BBは脳や平滑筋(腸管や子宮)に含まれている(図1)。通常は脳-血液関門(Blood-Brain Barrier; BBB)が機能していることもありCK-BBの血液中への逸脱は少なく無視しうる程度であるが、脳損傷や悪性腫瘍などで増加することがある(表1)。

表1 CKアイソザイムの臨床的意義

MB増加	心筋梗塞 心筋炎 開心手術後 筋ジストロフィー など
BB増加	脳損傷 中枢神経手術後 悪性腫瘍 絞扼性腸閉塞 など
MM増加	横紋筋融解症 多発性筋炎・皮膚筋炎 挫滅症候群 など

CK-Mサブユニットは血液中でカルボキシペプチダーゼによってC末端のLys残基が切断される。これによってMMアイソザイムは3種類(MM_{1~3})、MBアイソザイムは2種類(MB_{1,2})のアイソフォームを生じることが報告されている。心筋梗塞の発症直後は組織型のCK-MM₃の比率が上昇するため、CK-MM₃と終末産物であるCK-MM₁の比を計測することによって心筋梗塞の早期診断に貢献することが可能となる¹⁾。また、CK-MBの組織型アイソフォームであるCK-MB₂も心筋梗塞の超急性期より末梢血に認められ、診断への応用が期待されていた²⁾。しかしCKアイソフォームは測定が比較的煩雑で測定キットもすでに販売中止となり、心筋梗塞でより早期に上昇する心筋トロポニン(トロポニンT、トロポニンI)が迅速測定も可能なことから、現在は日常臨床では測定されず保険適用からも外れている。

02 CK欠損症について

CK欠損症は日本国内では我々の報告³⁾がある。我々の症例は急性心筋梗塞症例において血中CK活性値が増加しなかったことを契機にCK欠損症と診断された。この症例の血液中ではCK-MB活性は検出されず、骨格筋や心筋組織におけるCK活性値もコントロール群と比べて10%未満の低値となっていた。さらに詳しく調べた結果、CK-M遺伝子のエクソン2のアデニンがグアニンに変化していることが確認され、これによって翻訳されるアミノ酸がアスパラギン酸からグリシンに変化し、このミスセンス変異がCK活性の欠損につながったと考えられる。

家族性発症の可能性も報告されているが⁴⁾、CK欠損症は非常に稀な疾患であり、その有病率は明らかではない。我々は108名の健常人でCK-Mエクソン2のミスセンス変異の有無を検討したが、同変異は検出されなかった³⁾。すなわちその頻度は相当低いものであることが示唆される。CK欠損症患者は日常生活において明らかな症状を呈さず、また特定健康診査や会社などの定期健康診査ではCKは測定項目に含まれないため、急性心筋梗塞や皮膚筋炎/多発筋炎などの炎症性筋炎、あるいは挫滅症候群など本来CKをはじめとする筋原性酵素が血中で増加する筋疾患を発症しない限りその発見は困難であると考えられる。我々の症例でも急性心筋梗塞発症以前に脱力などの筋疾患を疑わせる症状は存在していなかった。動物モデルとしてはCK-M欠損マウスが作製されているが、ヒトCK欠損症と同様に外見上であきらかな症状は認められていない。筋活動後のクレアチンリン酸の回復も保たれており、ミトコンドリアCKによる補完の可能性が示唆されている⁵⁾。ミトコンドリアCKは細胞小器官であるミトコンドリアの内膜に存在するCKであり、CK-Mと同様にクレアチンリン酸を基質としたリン酸基転移反応を触媒する。CK-MノックアウトマウスおよびCK-M / ミトコンドリアCKダブルノックアウトマウス、野生型マウスを比較したMomkenらによる報告によると、ダブルノックアウトマウスは野生型マウスに比べて総走行距離が10分の1程度と短く、CK-M単独ノックアウトマウスはその中間程度で

あった。一方、走行時の最大速度に関しては、ダブルノックアウトマウスでは低下していたが、CK-M単独ノックアウトは野生型マウスと差が無かった⁶⁾。このノックアウトマウスを用いた報告からも、筋組織におけるCKによるエネルギー供給システムはCK-MとミトコンドリアCKの総和として実現されている可能性が示唆され、CK-M単独欠損の場合は最大運動強度にあきらかな低下を認めず、自覚症状が出ないことが推測される。

03 遭遇した時の対応

過去のCK欠損症の症例報告においては、急性心筋梗塞を疑う状況下でCK活性値が増加しなかったことを端緒として発見されている。胸痛に加えて心電図上でのST上昇や血中白血球数、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)、乳酸脱水素酵素(LD)値の増加などの所見を認めて急性心筋梗塞を強く疑う状況下でCK高値を伴わなかった場合にCK欠損症を疑うことになるが、こういった特殊な状況下以外で本疾患を発見することは難しいと考えられる。Shibuyaらの症例報告では血中CK値が基準範囲下限値以下であった⁴⁾が、日常臨床においては甲状腺機能亢進症の他、高齢や長期臥床による筋力低下・筋萎縮でもCK低値となる患者が散見されるため、単純に血中CK値のみでの発見も困難である。

検査室スタッフから各診療科へのアナウンスメントとしては、CK欠損症の存在は臨床医の間でも認知度が低いためこの疾患の存在を周知すると共に、CK低値が必ずしも急性心筋梗塞の否定の根拠にはならないことを再確認いただくよう提言していく必要がある。日本循環器学会発行の急性冠症候群ガイドライン(2018年改訂版)に記載されているように、臨床的に急性心筋梗塞が疑われる場合には心筋トロポニンの測定を優先させるべきである。

CK欠損症に関しては未だ不明な点が多く残っているが、病態や体格と一致しない血中CK低値を認めた際には、CK欠損症の可能性を考慮してアイソザイム分画の実施を検討してもよいのかもしれない。

04 関連事項およびトピックス

CKの基質であるクレアチンに関する欠損症の報告は国内外で数多く報告されている⁷⁾。脳クレアチン欠乏症候群(cerebral creatine deficiency syndromes: CCDS)は、日本国内の小児慢性特定疾病に指定されている疾患であり、脳組織内のクレアチンが欠乏することによって、知的障害や言語発達遅滞、てんかんなどの症状が認められる。発症の原因としては、クレアチンの生合成に必要な酵素の欠損もしくはクレアチン輸送タンパクの欠損が報告されている。

一方、脳血管疾患患者の梗塞部位においては、クレアチンおよびクレアチンリン酸の枯渇が報告されている。ラットを用いた実験では、あらかじめ組織にクレアチンを補充しておくことによって酸素欠乏による神経細胞死を遅らせることが可能であったと報告されている⁸⁾。ヒトにおいても、低酸素によって誘発される注意力の低下をクレアチンのサプリメント摂取によって軽減できたとの報告もある⁹⁾。

さらに、虚血性の組織障害が原因となる疾患に関しては、経静脈的にクレアチンリン酸を心筋梗塞後の患者に投与することによって不整脈の合併を減少させた報告がある¹⁰⁾。

以上のように、CK-クレアチン系は全身の細胞においてエネルギー源として重要なATPの高エネルギーリン酸結合の保存と供給を担う極めて重要なシステムであり、その欠乏や欠損は様々な疾患の原因となり得ると考えられる。脳血管障害や心筋梗塞などの日本国内での死亡率の多数を占める疾患において治療開発の糸口となる可能性を秘める一方で、一般にスポーツ選手向けなどにサプリメントとして市販されるなど、社会における位置付けも幅広い大変興味深い生体システムであるといえる。当研究室は臨床検査を専門とする立場から、CKを中心としたエネルギー供給系の病態への関与や臨床検査としての有用性に関して研究を行っていきたい。

参考文献

- 1) T. Suzuki, K. Tomita, H. Tsubota, Y. Uji, H. Sugiuchi, H. Okabe, Y. Takagi, K. Gomi, K. Yoneda, Y. Katayama, *Rinsho Byori* **39**(4), 383-388 (1991).
- 2) J. Zimmerman, R. Fromm, D. Meyer, A. Boudreaux, C. C. Wun, R. Smalling, B. Davis, G. Habib, R. Roberts, *Circulation* **99**(13), 1671-1677 (1999).
- 3) H. Yamamichi, S. Kasakura, S. Yamamori, R. Iwasaki, T. Jikimoto, S. Kanagawa, J. Ohkawa, S. Kumagai, M. Koshiha, *Clin. Chem.* **47**(11), 1967-1973 (2001).
- 4) J. Shibuya, T. Matsumoto, K. Takahashi, K. Sugisawa, N. Yasutomi, S. Kawashima, H. Naruse, J. Tateishi, T. Iwasaki, T. Tozawa, *Intern. Med.* **31**(5), 611-616 (1992).
- 5) J. van Deursen, A. Heerschap, F. Oerlemans, W. Ruitenbeek, P. Jap, H. ter Laak, B. Wieringa, *Cell* **74**(4), 621-631 (1993).
- 6) I. Momken, P. Lechêne, N. Koulmann, D. Fortin, P. Mateo, B. T. Doan, J. Hoerter, X. Bigard, V. Veksler, R. Ventura-Clapier, *J. Physiol.* **565**(3), 951-964 (2005).
- 7) S. Mercimek-Andrews, G. S. Salomons, in *GeneReviews*, M. P. Adam, H. H. Ardinger, R. A. Pagon, S. E. Wallace, L. J. H. Bean, K. Stephens, A. Amemiya, Ed. (University of Washington, Seattle, 2009), pp. 1-29.
- 8) D. Kitzenberg, S. P. Colgan, L. E. Glover, Creatine kinase in ischemic and inflammatory disorders. *Clin. Transl. Med.* **5**(1), e31 (2016).
- 9) C. E. Turner, W. D. Byblow, N. Gant, *J. Neurosci.* **35**(4), 1773-1780 (2015).
- 10) M. Y. Rud, M. B. Samarenko, N. I. Afonskaya, V. A. Saks. *Am. Heart. J.* **116**(2), 393-397 (1988).

低ALP血症 vs 低ホスファターゼ症

Hypophosphatasemia・Hypophosphatasia

渡 邊 淳 Atsushi WATANABE

金沢大学附属病院 遺伝診療部/遺伝医療支援センター 特任教授
Division of Clinical Genetics, Support Center for Genetic Medicine, Kanazawa University Hospital (Professor)

キーワード … 血清ALP、アイソザイム、JSCC法、IFCC法、低ALP血症、低ホスファターゼ症

01 はじめに

臨床検査項目の1つである血清ALP(アルカリホスファターゼ)は、AST、ALT、LD、CKとともに逸脱酵素の一つである。日本において血清ALPは、2020年にALP測定試薬が JSCC(日本臨床化学会)法からIFCC(国際臨床化学連合)標準測定法に準拠した測定法への変更が進められ、基準範囲が変更された¹⁾。これまで、血清ALPは高値(高ALP血症)に注目されることが多かった。本稿では、血清ALPとともに、血清ALP低値(低ALP血症)の臨床的意義と低ホスファターゼ症について紹介する。

02 様々な側面を持つ血清ALP

ALPに関連する検査法として、血清ALP検査の他にALPアイソザイム、骨型ALP等が知られている。また、血清ALP検査値は、病的だけでなく生理的にも変動する。血清ALP検査値を評価・解釈する際には、これら様々な側面を有するALPの特性についても理解しておく必要がある。

血清ALPは、タンパク質の由来となる遺伝子が1つではない。血清ALPは複数の遺伝子産物(タンパク質)の集合体である(表1)。ヒトのALPをコードする遺伝子には、1)組織非特異型

表1 血清ALPタンパク質を構成する遺伝子群

遺伝子	アイソザイム		血清ALP高値	
	名称	由来	生理	病態
ALPL	ALP1	高分子ALP (肝胆管細胞膜と結合)		閉塞性黄疸(胆汁うっ滞) 転移性肝癌
	ALP2	肝型 (成人の主体)		細胆管炎 薬剤性肝障害
	ALP3	骨型 骨芽細胞 (小児の主体)	小児期	悪性腫瘍の骨転移 骨肉腫 骨折回復期 甲状腺機能亢進症 副甲状腺機能亢進症 整形外科手術
ALPP	ALP4	胎盤型	妊婦	肺癌・卵巣癌など
ALPI	ALP5	小腸型	食事:血液型B、Oの Lewis分泌型の食後	肝硬変
ALPG				

(遺伝子名:ALPL)、2)小腸型(遺伝子名:ALPI)、3)胎盤型(遺伝子名:ALPP)、4)生殖細胞型(類胎盤型、遺伝子名:ALPG)の4種が知られている。ALPL遺伝子(組織非特異型)は常染色体1番染色体の短腕(1p36.12)に位置するのにに対し、他の3種の組織特異型酵素遺伝子はいずれも2番染色体の長腕(2q37.1)に近接して存在する。ALPL遺伝子産物である組織非特異型ALP(タンパク名:TNSALP)は別名、肝臓／骨／腎臓型とも呼ばれ、これらの臓器に強く発現し、体内にも広く発現しているが、他の3種の遺伝子は組織特異的に発現する。いずれのALPも約500残基のアミノ酸からなる糖タンパク質である。それぞれの遺伝子におけるアミノ酸レベルでのホモロジーは、組織特異型ALP間では87～97%であり、組織非特異型ALPと胎盤型ALPでは74%となる。

糖蛋白であるALP分子は、異なる遺伝子由来の蛋白構造や翻訳後の糖鎖修飾の違いから、異なる臓器に由来するALPアイソザイムが存在する。アイソザイム間には電気泳動易動度、耐熱性、各種アミノ酸による阻害度、免疫交差反応などにかなりの相違がみられ、相互の分別に利用されている。血清ALPを電気泳動すると、6種の分画に分離できる。正常血清では、ALPL由来のALP2型とALP3型の2種類のみ存在する。ALPアイソザイムのパターンの変化から障害臓器の推定、病態解析が可能となる。ALP3型に該当する骨型ALP(BAP)は、ALPアイソザイムとは別の手法である特異的なモノクローナル抗体による免疫学的方法(CLEIA(化学発光酵素免疫測定法))で測定される骨形成マーカーでもあり、骨粗鬆症の病態の把握に有用である骨代謝マーカーの1つである。

血清ALP値は個人の年齢や性、ライフステージにより生理的

変動をきたす検査項目として知られている。それぞれの状況により、該当する遺伝子の発現量が増え、血清ALP値が変動する。成長期には骨のALPL遺伝子発現量、すなわちアイソザイムALP3型が増加し、血清ALPの下限値は成人の3～5倍の値を示す。小児期において、血清ALPが異常値かどうかの判定は、成人基準値では対応できず、性別、年齢別の基準範囲の提案もある(図1)。また、血液型がB型やO型の人は食後に小腸でALPI遺伝子が発現し、食後血清でALPアイソザイムを分析するとALP5型を認め、血清ALP値が上昇する。妊娠中には胎盤がつくるALPP遺伝子発現量、すなわちアイソザイムALP4型が増え、時期によっては成人基準値の2～3倍になる。

03

日本における血清ALP測定方法
—JSCC法からIFCC法へ

血清ALPは、2019年までは日本固有の方法(JSCC法)で測定されていた。JSCC法とIFCC法の違いは、各測定法で使用する緩衝液(アミノアルコール)が異なることによる。血清ALPを構成するタンパクのうち小腸型ALPはJSCC法では検出されやすい性状を有する。また前述のとおり、生理的変動の影響をうけることで血清ALP値は病態に関係なく高値(偽陽性)となり、基準範囲を上回る異常値を示す場合がある。この状況は臨床医にとっても、患者や健診受診者にとっても好ましくない。これらの問題を解決するため、2020年4月国際標準法である国際臨床化学連合(IFCC)法への切り替えが実施された^{1,2)}。今回の変更は、国際標

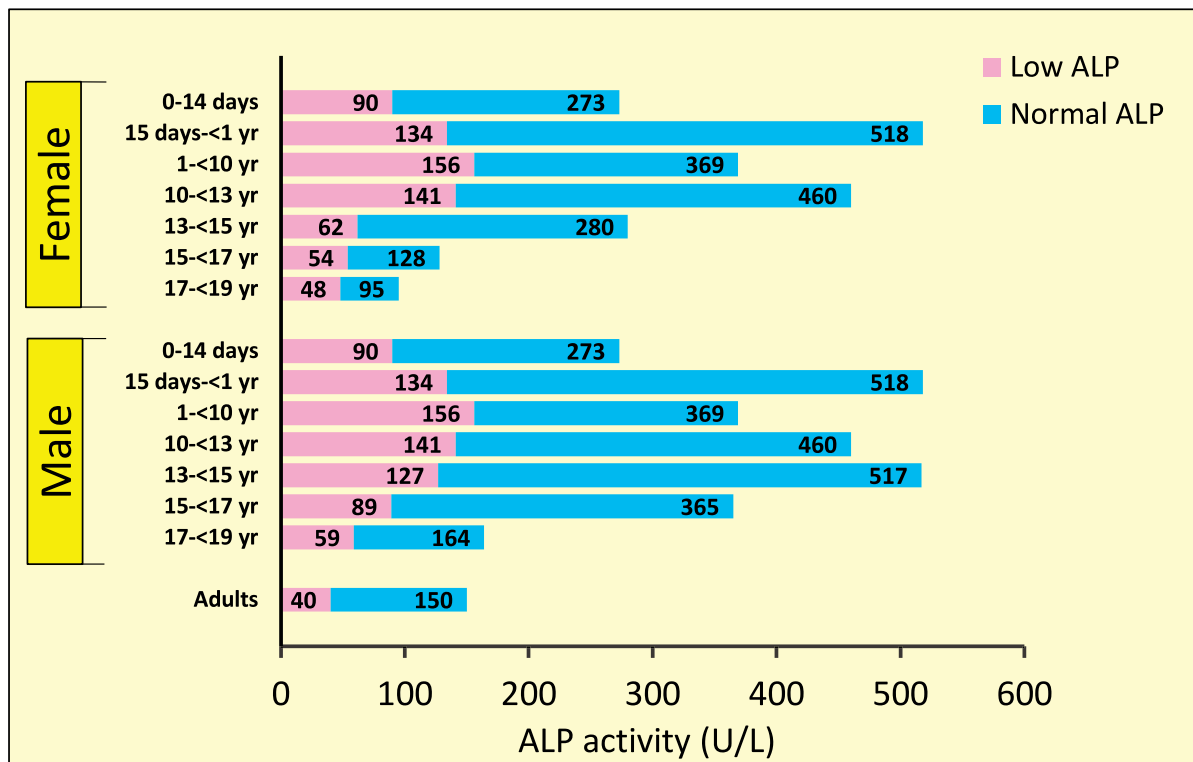


図1 年齢別血清ALP基準範囲 例 (IFCC法)

準法に準拠する形式となり、国際治験や論文発表において日常検査結果をそのまま使用でき、研究成果の国際的発表の後押しにつながる事が期待される。

IFCC法による血清ALPの基準範囲(38~113 U/L)は、JSCC法による基準範囲(106~322 U/L)の約3分の1(換算:0.35 倍)となり、経時的に測定し評価する場合にはどちらの方法で測定しているかの確認が必要となる。血清ALPの構成がほぼ肝型と骨型と仮定した検体でのIFCC法・JSCC法間の換算係数、換算式が示されている。小腸型ALP、胎盤型ALPについては、IFCC法とJSCC法の反応性が異なる。小腸型ALPの感度は、IFCC法ではJSCC法に比べて低いため、食事による偽陽性率が低くなり、肝型・骨型ALPの判別には有利になる。一方、胎盤型ALPは小腸型とは逆にIFCC法はJSCC法に比べて感度が高いという特徴がある。妊婦では胎盤型ALPが増加することにより、IFCC法で測定するとJSCC法による値の換算値よりも高めに測定される。小腸型ALPや胎盤型ALPの増加が想定される検体では、それぞれの測定法による実測値は換算値から乖離する傾向がある。

04 低ALP血症・低ホスファターゼ血症

血清ALP値は、高値についての病態が示されることが多い。血清ALPの基準範囲下限より低値を示す低ALP血症・低ホスファターゼ血症(hypophosphatasemia)はこれまであまり注目されていなかった。低ALP血症は、後述する血清ALPを構成する遺伝子の1つであるALPL遺伝子に病的変異を有する低ホスファターゼ症以外の疾患においても、様々な病態を反映している³⁾(表2)。ALPは亜鉛酵素であり、血清ALPは亜鉛欠乏の指標として有用である。血清ALPは、亜鉛欠乏症により生じる症状の1つである皮疹の出現に先立ち早期から低下する。血清ALPの測定は、亜鉛欠乏症の診断および治療効果判定に有効であると報告されている⁴⁾。低ALP血症は、疾患以外にも副腎皮質ステロイドや化学療法といった薬剤の影響を受け、重度の栄養不良などでも続発

表2 低ALP血症(低ホスファターゼ血症)を示す病態

疾患	薬剤	その他
低ホスファターゼ症	副腎皮質ステロイド	ビタミンD中毒
壊血病	化学療法	不適切な採血法(EDTA, シュウ酸塩)
マグネシウム欠乏症	クロフィブラート	大量輸血
亜鉛欠乏症		
多発性骨髄腫		
セリアック病		
悪性貧血または 重度貧血		
ウィルソン病		
甲状腺機能低下症		
重度の栄養不良		

性に低下する。

低ALP血症を呈した際には、臨床症状等ほかの所見を踏まえて、血清ALPを経時的に複数回測定し低値が一過性でないことを確認し、原因を検索、鑑別することが必要である。ALP活性の測定には、不可欠金属としてZnが必要であるため、検体として通常血清で測定する。抗凝固剤としてEDTAが入った採血管を用いた血漿でALPを測定すると、見かけ上異常低値となる。症状がなくALPが低値であった場合には、採血管の種別を確認し、再採血も考慮する。小児期、妊娠中や骨折、肝疾患、整形外科手術では一過性にALP活性が上昇するため、本来の病態でALP活性が低下していてもマスクされる可能性がある。

05 低ホスファターゼ症(HPP)ー日本に多い遺伝性疾患ー血清ALP値低下に気づく第一歩

低ホスファターゼ症(hypophosphatasia:HPP)は、血清ALPを構成する遺伝子の1つであるALPL遺伝子に病的変異を来し、血清ALP活性が低下することにより発症する先天性代謝異常疾患、骨系統疾患に属する単一遺伝子病である。HPPは、無機ピロリン酸(Inorganic pyrophosphate, PPi)及びピリドキサル-5'-リン酸(Pyridoxal phosphate, PLP)等の生体内基質が蓄積し、全身の骨や歯の形成不全(骨の低石灰化、くる病様変化や歯の早期脱落など)、呼吸不全及び痙攣発作等の症状を呈する(図2)⁵⁻⁷⁾。HPPは、1948年にカナダ人医師のJ.C. Rathbunによって初めて報告された。

組織非特異的アルカリホスファターゼ(TNSALP)をコードする遺伝子(ALPL)の病的変異

血清ALP活性の低下

ALPの基質の蓄積

PPi: 無機ピロリン酸
PLP: ピリドキサル-5'-リン酸
PEA: ホスホエタノールアミン

低ホスファターゼ症

骨低石灰化
乳歯早期脱落
ビタミンB6依存性けいれん

→ 骨系統疾患
先天代謝異常症

図2 低ホスファターゼ症

表3 低ホスファターゼ症の病型

病型		発症時期	遺伝形式
周産期 (Perinatal)	重症型	子宮内および出生時	AR
	良性型		AR or AD
乳児型 (Infantile)		生後6か月未満	AR
小児型 (Childhood/Juvenile)		生後6か月以上18歳未満	AR or AD
成人型 (Adulthood)		18歳以上	AR or AD?
歯限局型 (Odontohypophosphatasia)		あらゆる年齢	AR or AD
		臨床的異常は歯牙のみ	

AR 常染色体劣性遺伝 (ホモ接合体、コンパウンドヘテロ接合体)
AD 常染色体優性遺伝 (ヘテロ接合体)

HPPIは、原因遺伝子は1つの遺伝子 (ALPL) だが、重症度や発症年齢に個人差があり、発症時期による病型が提唱されている。発症時期により、周産期重症型(perinatal severe form またはperinatal lethal form)、周産期良性型 (prenatal benign form、またはperinatal benign formと呼ばれる)、乳児型 (infantile form)、小児型 (childhood form)、成人型 (adulthood form)、歯限局型 (odontohypophosphatasia) の6病型に分類される (表3)。国により病型の患者頻度が異なり、日本では周産期重症型が多く、HPPIは胎児期に発見される骨系統疾患の鑑別疾患の1つに挙げられている。以前は周産期型を二分しない5病型分類が用いられていた。無治療であれば、周産期重症型はほぼ全例が、乳児型は約半数が死亡するとされていた。近年、周産期 (胎児期) 発症であっても出生後生命予後良好な周産期良性型の存在が明確になり、周産期型を周産期重症型と周産期良性型に区別した6病型分類が用いられるようになって

きた。骨形成はライフステージで成長に関連することから、HPPにおける骨形成不全の症状は病型 (年齢) により特徴的かつ多彩である (表4)。乳歯の脱落は早期 (4歳未満) に生じるだけでなく、本症に特徴的な形態 (脱落した乳歯の歯根が残っている) を呈する。

低ALP血症は、HPPが疑われ診断する第一歩である。骨系統に症状を呈し基準範囲下限以下の血清ALP値が続く場合には、HPPを鑑別疾患に加えることが重要である。臨床的に低ホスファターゼ症が疑われた際には、まず低ALP血症があるかを確認するために、血清ALPの測定を行う。HPPの症状は血清ALP値が低いほど重く、また早期に発症する。HPPの中で最も重症な病型である周産期重症型HPPでは、血清ALP値はほとんどが10 U/L未満 (JSCC法、IFCC法) と非常に低くなるため、臨床症状を有していれば診断が可能である。HPP患者の血清ALP値は通常、基準範囲下限を下回るが、年齢・性別ごとに基準範囲は異なる (図1)。HPPの臨床症状は、より一般的な他の骨系統疾患 (例えば骨形成不全症) と類似しているため、血清ALP値から疑われないと見過ごされ、診断が遅れるケースがある。すなわち、小児期発症する小児型、歯限局型では、血清ALP値は100 U/L (JSCC法) 以上とある程度の値を有し、小児基準範囲下限より低い成人基準範囲内 (106~322 U/L) であることが多い。血清ALP値のアラート値の基準を成人基準範囲で設定すると、小児基準範囲下限より低くてもアラートが出ず診断の遅れにつながりうるため、注意が必要である。小児期においては血清ALPの年齢別基準範囲 (図1) の設定もあるが、年齢幅等の枠組みは様々である。血清ALPの基準範囲の設定は年齢別で難しくとも、指定難病におけるHPPの診断基準にある「成長期の小児の血清ALP値が300 U/L未満 (JSCC法) である場合は、本症を疑う必要がある」ようにカットオフ値を設けることも有用である⁸⁾。同様に米国では血清ALP値100 U/L未満 (IFCC法) をカットオフ値として提示している⁹⁾。

表4 HPP病型により異なる臨床像

病型	臨床像	歯病変	予後
周産期重症型	重度の骨石灰化障害、膜様頭蓋、呼吸障害、ビタミンB6依存性けいれん	N/A	治療が行われなければ、早期に死亡
周産期良性型	長管骨彎曲	+/-	良好
乳児型	くる病様骨変化、頭蓋骨縫合早期癒合症、発育障害、高カルシウム尿症・血症	乳歯の早期脱落	治療が行われなければ、約50%は早期に死亡
小児型	低身長、くる病様骨変化、歩容異常、骨痛、骨折	乳歯の早期脱落	良好
成人型	骨折、偽骨折、骨軟化症、骨密度低下、筋力低下、筋肉痛、関節痛、頭痛、偽痛風	+ ?	良好
歯限局型	症状は歯のみにとどまる	乳歯の早期脱落	良好

HPPでは、血清ALP低値以外に、尿中ホスホエタノールアミン (PEA) (尿中アミノ酸分析の項目にあり)、血中PPi、血中PLPが増加することが知られている。

胎児期に骨系統疾患が疑われHPPを鑑別する際、胎児のALP活性測定は難しいことから、保因者と推定される両親の血清ALP値の測定を行うことがある。HPP保因者(c.1559delTヘテロ変異)の中には、血清ALP値、ALPの基質である尿中PEAが成人基準範囲内を満たしている人もいる¹⁰⁾。両親の血清ALP値が基準範囲内であっても患児がHPPでないと断定することはできない。また、妊娠中は妊婦の血清ALPは生理的に上昇を来すため、妊婦がHPP保因者かどうかのスクリーニング法も検討されている¹¹⁾。

HPPの病型でみられる表現型(phenotype)の個人差は、患者で同定された*ALPL*遺伝子の病的変異の位置や組み合わせ(genotype)による酵素残存活性に関連すると考えられている。HPPの遺伝形式は、重症型では両アレル(ホモ接合体あるいはコンパウンドヘテロ接合体)に病的変異を有する常染色体劣性遺伝形式をとり、軽症型は劣性または優性の傾向がある。*ALPL*遺伝子の病的変異のうち日本人特有であるc.1559delTは酵素残存活性がほとんどなく、c.1559delTホモ接合体は周産期重症型と関連が強い。c.1559delT変異は他国での報告はなく、日本人の創始者効果であると考えられる。c.1559delT変異のヘテロ接合体(保因者)は日本人一般集団の480分の1の頻度でみられ、ホモ接合体となって周産期型HPPとして発症する割合は約100万分の1と推算される¹⁰⁾。これはc.1559delT変異ホモを有する周産期重症型HPPの患児が近親婚でない両親からも毎年生まれる根拠であり、日本人で胎児期にHPPが多い原因でもある。HPPの確定診断としては、病的変異の検出のため原因遺伝子である*ALPL*遺伝子の遺伝学的検査がある。HPPは、2015年1月から「小児慢性特定疾病」、さらに7月から難病法の対象となる「指定難病」の対象となり、医療費助成が受けられることになった。指定難病の申請には遺伝学的検査による確定診断が求められている。

HPPの根本的な原因であるALPの欠損を補い、骨を標的として欠乏したALPを補充する酵素補充療法として、アスホターゼ アルファが開発された。2015年7月、アスホターゼ アルファは日本において、「低ホスファターゼ症」を適応症として、世界に先駆けて認可、保険収載された^{12,13)}。アスホターゼ アルファは、TNSALPタンパクC末に、ヒト免疫グロブリンFcドメインと骨を標的にしたデカ(10個の)アスパラギン酸ペプチドを融合した、遺伝子組換えタンパク質製剤である。周産期重症型HPPにおいては、出生当日(day 0)からアスホターゼ アルファを週3回皮下注射することにより、骨症状の著明な改善がみられている¹⁴⁾。

HPPの酵素補充療法実施にあたっては、他の臨床検査値への影響が知られている。ALPiは、臨床検査の酵素免疫測定法の二次抗体に標識する代表的な酵素として使用されている。HPP患者において酵素補充療法の治療中に採取した検体を用いて、ALPで標識した抗体が含まれる酵素免疫測定法を基盤とした臨床検査を実施すると、測定値に影響を与えることがある^{15,16)}。酵素補充療法を実施しているHPP患者において、臨床症状と乖離

する検査結果を認めた場合には、ALPを使用しない原理による測定法で再検査を行い、真の異常値か確認が必要となる。

06

おわりに

血清ALPの測定法がIFCC法に変更された機会を通して、低ALP血症ならびに低ホスファターゼ症について概説した。今回変更されたIFCC法により、血清ALP値は海外と同一の測定法となることから世界的に情報共有が可能となる。一方、継続して測定しているケースでは、これまでのJSCC法による検査値よりも約1/3となる等の特徴も反映した評価が必要である。本稿を通して、低ALP血症ならびに低ホスファターゼ症を知っていただくことで、診断の向上に繋がると幸いである。

参考文献

- 1) 日本臨床化学会 酵素・試薬専門委員会 ALP プロジェクト・LD プロジェクト・ALP・LD 測定法変更について ― 医療従事者向け ―, <http://jscc-jp.gr.jp/file/2019/alpld2.pdf> (参照 2021- 4-10).
- 2) 宮本 博康, ALP 測定試薬の JSCC 法から IFCC 法への切り替え―理解しておきたい特徴と変更に伴う注意点, 検査と技術 **48**(7), 674-678 (2020).
- 3) F. E. McKiernan, L. K. Shrestha, R. L. Berg, J. Fuehrer, Acute hypophosphatasemia, *Osteoporos. Int.* **25**(2), 519-523 (2014).
- 4) 児玉浩子, 板倉弘重, 大森啓充, 佐々木雅也, 山東勤弥, 篁 俊成, 布施養善, 細井孝之, 吉田 博, 亜鉛欠乏症の診療指針 2018, 日本臨床栄養学会雑誌 **40**(2), 120 – 167, (2018). <http://jscn.gr.jp/pdf/aen2018.pdf> (参照 2021- 4-10).
- 5) 渡邊 淳, 低ホスファターゼ症, 遺伝カウンセリングマニュアル改訂第3版, 福嶋義光監修 (南江堂, 東京, 2016) pp. 212-216.
- 6) E. Mornet, M. E. Nunes (渡邊 淳 訳) 低ホスファターゼ症, GENEReviews 日本語版, <http://grj.umin.jp/grj/hops.htm> (参照 2021- 4-10).
- 7) 日本小児内分泌学会, 低ホスファターゼ症診療ガイドライン (最終版の公開日: 2019 年 1 月 11 日) https://minds.jcqh.or.jp/docs/gl_pdf/G0001124/4/Hypophosphatasia_Clinical_practice_guidelines.pdf (参照 2021- 4-10).
- 8) 難病情報センター診断・治療指針 (医療従事者向け), 低ホスファターゼ症 (指定難病 172) <https://www.nanbyou.or.jp/entry/4565> (参照 2021- 4-10).
- 9) V. Saraff, V. K. Narayanan, A. J. Lawson, N. J. Shaw, M. A. Preece, W. Högl, A Diagnostic Algorithm for Children with Low Alkaline Phosphatase Activities: Lessons Learned from Laboratory Screening for Hypophosphatasia, *Pediatrics*, **172**, 181-186. e1, (2016).
- 10) A. Watanabe, T. Karasugi, H. Sawai, B. T. Naing, S. Ikegawa, H. Orimo, T. Shimada, Prevalence of c.1559delT in ALPL, a common mutation resulting in the perinatal (lethal) form of hypophosphatasia in Japanese and effects of the mutation on heterozygous carriers, *J. Hum. Genet.* **56**, 166-168, (2011).
- 11) Y. Takahashi, H. Sawai, J. Murotsuki, S. Satoh, T. Yamada, H. Hayakawa, Y. Kouduma, M. Sase, A. Watanabe, O. Miyazaki, G. Nihimura, Parental serum alkaline phosphatase activity as an auxiliary tool for prenatal diagnosis of hypophosphatasia, *Prenat. Diagn.* **37**(5), 491-496, (2017).
- 12) T. Kitaoka, T. Tajima, K. Nagasaki, T. Kikuchi, K. Yamamoto, T. Michigami, S. Okada, I. Fujiwara, M. Kokaji, H. Mochizuki, T. Ogata, K. Takebayashi, A. Watanabe, S. Yatsuga, T. Kubota, K. Ozono, Safety and efficacy of treatment with asfotase alfa in patients with hypophosphatasia: Results from a Japanese clinical trial, *Clin. Endocrinol.* **87**(1), 10-19 (2017).
- 13) P. S. Kishnani, E. T. Rush, P. Arundel, N. Bishop, K. Dahir, W. Fraser, P. Harmatz, A. Linglart, C. F. Munns, M. E. Nunes, H. M. Saal, L. Seefried, K. Ozono, Monitoring guidance for patients with hypophosphatasia treated with asfotase alfa, *Mol. Genet. Metab.* **122**(1-2), 4-17 (2017).
- 14) Y. Okazaki, H. Kitajima, N. Mochizuki, T. Kitaoka, T. Michigami, K. Ozono, Lethal hypophosphatasia successfully treated with enzyme replacement from day 1 after birth, *Eur. J. Pediatr.* **175**(3), 433-437, (2016).
- 15) A. G. Sofronescu, M. Ross, E. Rush, W. Goldner, Spurious testosterone laboratory results in a patient taking synthetic alkaline phosphatase (asfotase alfa), *Clin. Biochem.* **58**, 118-121 (2018).
- 16) I. D. Picc, B. Tompkins, W. D. Fraser, Interference of Asfotase Alfa in Immunoassays Employing Alkaline Phosphatase Technology, *J. Appl. Lab. Med.* **5**(2), 290-299 (2020).

血清コリンエステラーゼ欠損症

Serum Cholinesterase deficiency

石川 仁子 Jinko Ishikawa

浜松医科大学医学部附属病院 検査部 主任臨床検査技師
Clinical Laboratory, University Hospital, Hamamatsu University School of Medicine (Chief Medical Technologist)

前川 真人 Masato Maekawa

浜松医科大学医学部 臨床検査医学 教授
Department of Laboratory Medicine, Hamamatsu University School of Medicine (Professor)

キーワード ... コリンエステラーゼ、遺伝性変異、薬理遺伝病、肝機能検査

01 コリンエステラーゼとは

コリンエステラーゼは、コリンエステルをコリンと有機酸に加水分解する酵素の総称であり、大別すると2種類が存在する(表1)。一つは、神経・筋刺激伝達に関与するアセチルコリンエステラーゼ(AChE)であり、神経組織のアセチルコリン受容体、赤血球膜などに局在し、アセチルコリンを特異的に分解する。もう一つは、種々のアシルコリンに作用するアシルコリンエステラーゼ(BChE;ブチリルコリンエステラーゼ、血清コリンエステラーゼ)である。日常臨床検査で測定されているのは後者であり、通常ChEと略しているが、本稿ではAChEと明確に鑑別するために、BChEと記載する。BChEは肝細胞で合成されるため、肝臓での

蛋白質の合成能をみる肝機能検査として用いられている。

これら2つのコリンエステラーゼは、別々の遺伝子から産生される。AChEについてはACHE遺伝子が7.4 kbの大きさに染色体7q22.1に座位し、BChEは、BCHE遺伝子が65 kbの大きさに染色体3q26.1に座位している。

02 BChEの生理的意義

AChEが基質や役割が明確であるのに対し、BChEの基質特異性はブロードで、神経伝達物質であるアセチルコリンだけでなく、その類似物質や種々のアシルコリン(脂肪酸コリンエステル、

表1 2種のコリンエステラーゼの特徴・性状の対比

	ブチリルコリンエステラーゼ Butyrylcholinesterase (BChE)	アセチルコリンエステラーゼ Acetylcholinesterase (AChE)
別名	偽性コリンエステラーゼ 血清コリンエステラーゼ	真性コリンエステラーゼ
EC番号	3.1.1.8	3.1.1.7
系統名	acylcholine acyl-hydrolase	acetylcholine hydrazase
臓器分布	肝、血清	神経組織、筋、赤血球
機能	解毒機能(サクシニルコリン、ミバクリウムなど薬剤の分解)AChEの保護、ほか	神経・筋刺激伝達 (コリン作動性神経の神経伝達物質アセチルコリンを分解)
分子量	モノマーは約85000。血清中は95%が水溶性4量体で約34万	モノマーは約7万。血清中は50%が4量体で残りが2量体かモノマー。
至適pH	8.0 ~ 8.5	7.5 ~ 8.0
基質特異性		
アセチルコリン	++	+++
ベンゾイルコリン	+++	±
ブチリルコリン	+++	±
有機リン剤による阻害	+	+
遺伝子座位	BCHE 染色体3番長腕	ACHE 染色体7番長腕

芳香族コリンエステル、麻酔剤のプロカインアミドなど)の代謝にも関わっている。すなわち本命の基質ははっきりしておらず、その存在意義についてもはっきりわかっていない。想定されている機能としては、多くの生体内のアシルコリンを分解する役割、薬物・毒物の代謝、AChEを神経シナプスで過剰な有機リン系の神経作動物質から守るなどの役割が考えられている¹⁾。

1) 麻酔薬の分解・代謝

麻酔導入時に使用する筋弛緩剤、脱分極性の神経筋ブロックであるサクシニルコリンや、速効性の非脱分極性神経筋ブロックであるミバクリウムを迅速に代謝する。従って、BChEがなければ、それらのコリンエステル薬剤を効率よく代謝できないため、無呼吸状態が遷延することになる。これは、筋弛緩剤を使用し始めた時から知られている*BCHE*の遺伝性変異によって発生したため、手術前には必ずBChE活性を測定し、その活性に応じた薬剤量を投与することが重要とされてきた²⁾。サクシニルコリンが血中に注入されると、正常ではその90%は1分以内にBChEによって代謝され、残りの10%が神経筋接合部内で作用する。BChE活性が低ければ代謝されずに残存するサクシニルコリンが長時間働くわけである。これは、肝疾患など二次性の原因でBChE活性が低下している場合でも、神経筋のブロックは1時間足らず続くと言われる。そして、遺伝的な欠損、特に*atypical gene* (非定型遺伝子)を有する場合はブロックが長時間継続し、無呼吸状態が8時間にも達すると言われる。一方、BChE活性が高ければ分解速度が速くなるため、薬剤量を増やさないと期待した作用が得られないことになる。

2) アルツハイマー病(AD)治療との関係

ADの治療薬として、コリンエステラーゼ阻害剤が使用されるが、これはADの主な原因として神経組織におけるアセチルコリンの合成低下が考えられているため、従ってAChEを阻害することでアセチルコリンの濃度を高め、神経細胞の機能を高めるものである³⁾。ガラントミン(レミニール[®])やドネペジル(アリセプト[®])はAChEの阻害剤であるが、リバスチグミン(イクセロン[®]、リバスタッチ[®])はAChEとBChEの両方に作用する阻害剤である。選択的なBChE阻害薬はアセチルコリンを増加させ、βアミロイドの産生を抑制する作用が報告されたため、BChE阻害薬の有効性も期待され、次世代の薬剤の開発、試験が進行中である。

3) 肥満・インスリン耐性・ダイエットとの関係

グレリンは食欲を刺激し、肥満とインスリン耐性を促進するホルモンであるが、血漿中のグレリンがBChEによって制御され、摂食と体重増加に強い作用を有することがわかってきた。たとえば、ダイエット後の過食はリバウンド現象として望ましくない転帰を引き起こす。これはカロリー不足に反応してアシルグレリンが血中に増加することで生じているものと考えられている。そこで、アシルグレリンを加水分解する酵素である*BCHE*遺伝子をダイエット誘導性肥満マウスに導入したところ、*BCHE*の発現亢進に伴い、血中のアシルグレリン濃度は低下し、カロリー制限によ

るグレリンの作用を抑制し、食物摂取と体重、グルコース代謝の恒常性を正常化することがわかった。以上から、ヒトの肥満でも、カロリー制限とBChEの調整によって体重と生体内代謝の正常化が期待される⁴⁾。

03 BChEの臨床検査としての測定意義、臨床的意義(表2)

表2 血清BChE活性の上昇・低下の原因

機序	活性低下	活性上昇
遺伝性	遺伝子変異・多型(産生低下、活性性状の変化)	遺伝子変異・多型(産生亢進、活性性状の変化)
二次性	肝疾患(特に肝硬変)、心筋梗塞、感染症、悪性腫瘍、尿毒症、低栄養、ほか	ネフローゼ症候群、過栄養性脂肪肝、ほか
医原性外来性	有機リン剤(農薬、殺虫剤など)の中毒(自殺、事故、冷凍餃子)サリン中毒(テロ;1995年の地下鉄サリン事件)コリン作動薬(ネオスチグミン、ジスチグミンなど;重症筋無力症や排尿障害の治療薬として処方される;特にコリン作動性クリーゼ時にChE低下)抗がん剤、放射線治療	ハプトグロビン製剤

1) 低下の原因

① 肝臓での合成能低下

BChEは肝臓で作られその血中半減期がアルブミンより短く(BChEは10日、アルブミンは20日)、また活性で測定できるため、蛋白合成能の鋭敏な指標として肝機能検査に応用されている。肝硬変など合成能が低下する慢性肝疾患で進行度とともに低下する。すなわち、重篤であるほどBChE低下が強い。

他に、栄養不良によるアミノ酸などの材料不足、代謝亢進などによると考えられる慢性感染症、心筋梗塞、腎不全、がんなどの各種疾患でも活性が低下する。がんにおいては、進行がんでは低下の程度は強く、胃・腎・上部尿路・前立腺・膀胱・子宮頸部・頭頸部などのがんでは予後不良や治療に対する反応性とも関連しており、予後予測マーカーとしての意義も報告されている⁵⁾。

② 有機リン中毒(農薬中毒)、抗コリンエステラーゼ阻害薬

有機リン中毒は命に関わる症例であり、低BChE血症を呈する極めて重要な要因である。自殺を目的とした農薬の服用、農薬散布中の事故などがある。サリンやVXは農薬を化学兵器に改変した有機リン剤で、地下鉄サリン事件の被害者は激的な有機リン中毒に陥った。

神経接合部で放出されたアセチルコリンは、AChEの作用でコリンと酢酸に速やかに分解・代謝される。有機リン剤はAChEを阻害することでアセチルコリンが分解されなくなり、痙攣、唾液過多、瞳孔の収縮などの症状が出現し、重篤な場合は死に至る。有機リン剤はBChE活性も阻害するため、血清ChE活性を指標とすることで薬物中毒の重篤度を間接的にみることができわけである。

コリンエステラーゼ阻害剤が治療薬として適用となるのは、重

症筋無力症、排尿障害である。また、アルツハイマー病などの認知症でも使用されるため、軽度のBChE活性低下の原因となることがある。

③ 遺伝的な欠損症

BChEの遺伝性変異による低値、遺伝性低BChE血症は、日常生活で問題はないと言われているが、薬理遺伝病であるため、薬物代謝などで不都合な状況を招く可能性はある。臨床検査データでは、他の検査項目に異常はなくBChE活性のみ低値を示すことが少なくない。詳細は後述する。

2) 上昇の原因

BChE活性は低下した場合の臨床的意義が重視され上昇時はほとんど着目されないが、上昇する原因には以下のものがあげられる。なお、BChE活性の個体間変動は大きく基準範囲は広いものの、個体内変動は小さいため、個人の健常値を基準にデータを見ていれば、病態による上昇や先天性高ChE血症がわかる。

- ・ネフローゼ症候群: 蛋白の体外喪失に伴い(BChEは分子量約34万と大きいため容易に喪失しない)、肝臓での蛋白合成亢進などによりBChE高値を示す。
- ・過栄養性脂肪肝: 基準範囲上限を若干上回る程度のものが多い。

表3 活性低下を引き起こす原因と考えられるBChE遺伝子変異

エクソン	コドン*	名称**	塩基置換	アミノ酸置換	エクソン	コドン*	名称**	塩基置換	アミノ酸置換
2	32	4delCAT	CATCAT- CAT	del (Ile)	2	299	E271X	GAA-TAA	Glu-Stop
	34	6delT	ATT-TT	frameshift		322	V294M	GTG-ATG	Val-Met
	40	K12R	AAA-AGA	Lys-Arg		335	L307P	CTT-CCT	Leu-Pro
	43	G15G	GGG-GGC	Gly-Gly		339	Q311X	CAA-TAA	Gln-Stop
	48	20delVFGGTVT				343	315insA	ACC-AACC	frameshift
	52	T24M	ACG-ATG	Thr-Met		343	T315S	ACC-TCC	Thr-Ser
	56	F28I	TTT-ATT	Phe-Ile		356	A328D	GCT-GAT	Ala-Asp
	61	Y33C	TAT-TGT	Tyr-Cys		358	L330I	TTA-ATA	Leu-Ile
	62	A34V	GCA-GTA	Ala-Val		361	G333C	GGT-TGT	Gly-Cys
	65	P37S	CCT-TCT	Pro-Ser		373	I345T	ATA-ACA	Ile-Thr
	98	D70H	GAT-CAT	Asp-His		378	E350X	GAA-TAA	Glu-Stop
	98	D70G (atypical)	GAT-GGT	Asp-Gly		383	355ins4LU	Alu insertion	frameshift
	103	G75R	GGC-CGC	Gly-Arg		387	Pro359fs	CCA-TCCA	frameshift
	116	L88H				393	G365R	GGA-AGA	Gly-Arg
	118	E90D	GAA-GAC	Glu-Asp		393	G365R	GGA-CGA	Gly-Arg
	124	N96Y	AAT-TAT	Asn-Tyr		414	R386C	CGT-TGT	Arg-Cys
	127	I99M	ATT-ATG	Ile-Met		418	G390V (F-2)	GGT-GTT	Gly-Val
	128	P100S	CCA-TCA	Pro-Ser		421	V393A	GTT-GCT	Val-Ala
	134	I06insA	AAT-AAAT	frameshift		428	C400X	TGC-TGA	Cys-Stop
	143	G115D	GGT-GAT	Gly-Asp		446	F418S	TTC-TCC	Phe-Ser
	145	I17del7insAG	GGT-GGAG	frameshift		452	R424X	CGA-TGA	Arg-Stop
	147	Q119X	CAA-TAA	Gln-Stop		453	S425P	TCC-CCC	Ser-Pro
	153	L125F	TTA-TTT	Leu-Phe		460	E432X	GAA-TAA	Glu-Stop
	154	His126fs	CAT-T	frameshift		462	M434I	ATG-ATT	Met-Ile
	156	Y128C	TAT-TGT	Tyr-Cys		462	431ins7	ATG-ATTG	frameshift
	168	I140del				463	G435R	GGA-AGA	Gly-Arg
	170	V142M(H variant)	GTG-ATG	Val-Met		467	G439S	GGC-AGC	Gly-Ser
	184	L156S	TTG-TCG	Leu-Ser		469	E441Q		
	198	D170E	GAT-GAG	Asp-Glu		474	F446V	TTT-GTT	Phe-Val
	200	Q172X	CAG-TAG	Gln-Stop		476	Leu448fs	TTA-TTTA	frameshift
	205	W177C				479	E451X	GAA-TAA	Glu-Stop
	209	N181T	AAT-ACT	Asn-Thr		488	E460K	GAG-AAG	Glu-Lys
	212	A184V (SC)	GCC-GTC	Ala-Val		493	R465X	AGA-TGA	Arg-Stop
	222	L194H				498	R470W	CGG-TGG	Arg-Trp
	226	S198G	AGT-GGT	Ser-Gly		499	W471R	TGG-CGG	Trp-Arg
	227	A199V	GCA-GTA	Ala-Val		502	F474L	TTT-CTT	Trp-Arg
	229	A201T	GCA-ACA	Ala-Thr	3	518	W490R	TGG-CGG	Trp-Arg
	231	S203P	TCA-CCA	Ser-Pro		525	E497V (J variant)	GAA-GTA	Glu-Val
	232	V204D	GTT-GAT	Val-Asp		528	Y500X	TAT-TAA	Tyr-Stop
	271	T243M (F-I)	ACG-ATG	Thr-Met		543	R515C	CGT-TGT	Arg-Cys
4	276	K248X				546	Q518L	CAA-CTA	Gln-Leu
	278	T250P	ACT-CCT	Thr-Pro	4	567	A539T (K variant)	GCA-ACA	Ala-Thr
	283	E255D	GAG-GAC	Glu-Asp		intron 2	IVS2-8G	T-G	Altered splicing
	295	K267R	AAA-AGA	Lys-Arg					

HGMD 78 (81) Mutations (2020.4) cDNA sequence : NM_000055.4 に記載の活性喪失型と考えられる変異

* HGMD のコドン番号

** 成熟蛋白質のN末アミノ酸から数えた番号

背景が水色のものは、日本で検出・報告された変異、それ以外は海外での報告。

背景が黄色のものは、K/リナントと呼ばれる日本にも海外にも10%以上の頻度で存在する多型

赤字は、別名のついている変異

・遺伝的には、C5変異という電気泳動で過剰バンドC5が出現する個体があり、BChE活性が高値を示す傾向がある。他に、地名のついた名称を持つ高活性の遺伝子変異が海外には存在する。

3) ピットフォール

他の検査データ、臨床所見との間に乖離が認められる場合は、遺伝性変異の可能性が高いため、状況に応じて家系検索、遺伝子解析なども考慮する。特に、軽度の低値は欠損症のヘテロ接合体である可能性を忘れず、個人の基準範囲(健常値)を考慮することが大切である。

異常低値の検体が集中した原因が、病院でゴキブリ退治のために散布した駆虫薬が血清へ混入したためであったことが、以前は起こっていたという。

強度の溶血性疾患や異型輸血などではヘモグロビン血症、ヘモグロビン尿症の病態が発生する。過量の遊離ヘモグロビンは腎毒性が強いため、ハプトグロビン製剤を使用することがある。このハプトグロビン製剤には一定量のBChEが混在しているため、ハプトグロビン製剤の使用中は血中BChEが高値となる。

04

遺伝性BChE欠損症

1) 概要

麻酔の導入に筋弛緩剤のスキサメトニウム(サクシニルコリン)などを投与した後、無呼吸状態が長時間続く個体がいることから、生まれつきBChEの活性や性状が通常と異なる個体がいることに気がつき、薬理遺伝病として位置づけられてきた。特に、ディブカイン耐性型(Atypical type, A型)やフルオライド耐性型(Fluoride resistance gene, F型)を有する場合、筋弛緩剤の分解が著しく遅れ、遷延性無呼吸の原因として麻酔科領域で非常に重要とされた²⁾。従って欧米ではBChE活性測定は重要な術前検査として位置づけられており、活性の低下だけでなく阻害剤であるフッ化ナトリウムあるいはディブカイン耐性が調べられてきた。一方、日本人にはA型はなく、性状の変化のない産生低下や活性低下によるサイレント型(Silent gene, S型)が大部分をしめる⁶⁾。

2) 病因と疫学

BChEは574個(他にシグナルペプチドとして28個)のアミノ酸からなり、染色体3番に座位する*BCHE*遺伝子によって支配されている。*BCHE*遺伝子は、4つのエクソンからなり、エクソン2が約80%を占める⁷⁾。ChE遺伝性変異のうち、活性低下(欠損)や基質との親和性の変化をひきおこすものが薬理遺伝病として位置づけられ、半世紀前から欧米では術前検査として、BChE活性測定、およびディブカイン、NaFによって活性が何%阻害されるかをDibucaine Number (DN)、Fluoride Number (FN)として計算し、阻害率によって遺伝性変異の種類を大別してきた⁸⁾。これらの阻害剤に対して耐性を示すものが先述した異型遺伝子(A

型)、フルオライド耐性遺伝子(F型)である。しかし現在、日本ではA型やF型は少ないため、DN、FNの測定はほとんど行われていない。

1990年頃からBChEの遺伝子構造が明らかになり⁹⁾、PCR技術の発展に伴って、それぞれに相当する遺伝子変異がDNAレベルで明らかになってきた^{6,8)}。A型は点変異により70番目のアミノ酸がアスパラギン酸からグリシンに置換、F型は243番目および390番目のアミノ酸置換であることが判明した。本邦でも、遺伝性BChE変異の遺伝子解析がなされたが、日本ではA型は発見されておらず、S型が大部分をしめ、欧米とは異なる日本人型のF型が1種類存在する(L330I)^{9,10)}。表3には、HGMD 78 (81) Mutations (2020.4) cDNA sequence : NM_000055.4に記載の活性喪失型と考えられる変異を記載した。ClinVarには記載されているがHGMDにないものは文献を追えなかったため記載していない。コドン番号はHGMD命名のものと、遺伝子解析が施行された時から慣用的に成熟蛋白質のN末アミノ酸から数えた番号の2種類で記した。また、報告(発端者)が日本人かそれ以外かで分別して記載した。

Kバリエント(K多型:A539T)を除いて、日本人で検出・報告された変異と海外で検出・報告された変異は大きく異なっており、ほぼ完全に異なっていることに気づく。新しく低BChE血症例の遺伝子解析をしても欧米人に見出された変異は見つかっていないことから、遺伝子変異は人種差が大きいと言える。

本邦における遺伝性BChE変異(欠損症)の頻度は、低BChE血症例のスクリーニングなどから、ヘテロ接合体として150人から200人に1人、ホモ接合体としておよそ10万から15万人に1人と推測された⁶⁾。

Kバリエントは血清 BChE活性値が20%ほど低下するタイプの変異で、日本人でも17.5%の頻度で見出された¹¹⁾。A型はKバリエントとリンクしていると言われるが、本邦ではG365R(コドン365のアミノ酸がグリシンからアルギニンに置換)の変異がKバリエントとリンクしていることを我々は見つけている。このことから、Kバリエントが世界に広がった後に、欧米ではそのアレルにA型変異が発生し、日本ではG365R変異が生まれたものと考えている。

3) 病態

BChE活性が低値というだけで日常生活には影響はないが、麻酔時のスキサメトニウムなどの筋弛緩剤投与により遷延性無呼吸になるため注意が必要である。すなわち、該当する薬剤を使用する手術前には血清BChE活性測定を行い、活性値に応じた薬剤の投与量の調整が必要と考えられる。

BChE欠損者が医療従事者として有機リン中毒患者の処置に関与したために、患者自身や衣類などに由来する有機リン剤に曝露したことによって強い症状が現れたとの報告がある。BChEの生理的意義として薬剤などの分解・代謝があるが、薬剤と結合して神経細胞のAChEを守るという機能も有しているとの報告がある¹⁾。

Kバリエントは近年、ADとの関連性について研究されている。

認知機能の低下したADの脳ではAChEが低下し、BChEが増加し、プラークに蓄積しているという。アポリポ蛋白Eの遺伝子の1つであるAPOE-ε4はADの最も重要な遺伝的危険因子とされているが、*BCHE*-KバリエントはAPOE-ε4と相乗効果でADの危険性を高めており¹²⁾、*BCHE*のN末領域の変化が関係しているとの報告がある¹³⁾。

4) 遺伝子検査の意義と検査法

活性低下の原因となる*BCHE*遺伝子変異のホモ接合体は、BChE活性がほぼゼロに近いものの、臨床症状はなく日常生活にも支障がないという所見と合わせて、容易に推定可能である。従って、遺伝子検査によって低値の原因を明らかにすることは可能であるが、臨床的には必須でない。遺伝性変異があるものとして個人の基準範囲として理解すれば問題は生じない。

一方、ヘテロ接合体の血清BChE活性は、概ね一般集団の基準範囲の下限を平均値として分布するため、BChE低値として肝機能障害を疑われて精査されることがあるため、むしろ要注意である。できれば、BChE活性がほとんどゼロの欠損ホモ接合体が見出されたときに、その家系であることを認識するか、遺伝子検査で原因遺伝子を明らかにした上で家系検索を行ない、各人および主治医用の結果説明文書を準備するのがよいと考える。ヨーロッパでは、麻酔時の遷延性無呼吸のハイリスク者として、判明した時点で警告カードが配布されるシステムになっている¹⁴⁾。

遺伝子解析では、多くは点変異か小さな欠失・挿入が原因なので、PCRによる解析で十分であるが、大きな欠失・挿入・逆位が疑われた場合には、ロングPCRなどが必要となる。Alu配列の挿入のあった症例の解析では、PCR産物が予想よりも長く、増幅効率が悪く検出しづらくなるという、あわや見逃しによる偽陰性となりがねないことがあったので、注意すべき点であろう¹⁵⁾。

特に日本人に多い変異は、G365R(サイレント型)とL330I(日本人のF型)である。それらをピンポイントで調べるか、もしくは全てのエクソンをシーケンスする。3分の1くらいの頻度を有す

るG365変異は、制限酵素のTaqIの切断部位が生じることから、PCR-RFLP(restriction fragment length polymorphism:制限酵素断片長多型)によって容易に判定が可能である。臨床的に必須ではなく、*BCHE*は検査センターで解析されていないため、自前で準備するか、経験施設に依頼することになる。

5) 実際の解析例

血清BChE活性が極めて低く、遺伝性変異のホモ接合体が疑われる症例が紹介された場合、まずは他の低BChE血症の原因を除外する。すなわち、日常生活に支障なく、肝障害などの原因がないことを確認する。この際、血清アルブミンやコレステロールなどの検査結果も参考になる。コリンエステラーゼ阻害剤の使用などにも注意する。可能であれば家系図も書いてみる(図1)。常染色体劣性(活性値からは共優性)の遺伝形式をとるため、多くは家系にヘテロ接合体(血清BChE活性が基準範囲下限値付近)が見つかる。いとこ結婚などの近親婚があると兄弟にもホモ接合体(活性ほぼゼロ)がいることがある。ホモ接合体は麻酔時、ヘテロ接合体は健診などでの低値指摘に注意することは先述したとおりである。遺伝子解析の結果(図2、3)、G365RとKバリエントが検出された場合、以下の内容で依頼元に報告する。

エクソン2、コドン365にGGA(グリシン)からCGA(アルギニン)へのミスセンス変異が検出されました。この変異は、日本人のサイレント型変異として最も多いものです(遺伝子頻度として約0.2%)。

また、エクソン4、コドン539にGCA(アラニン)からACA(スレオニン)へのミスセンス変異(K多型)が検出されました。この遺伝子多型により、コリンエステラーゼの活性が約30%低下します。日本人における遺伝子頻度は約18%です。

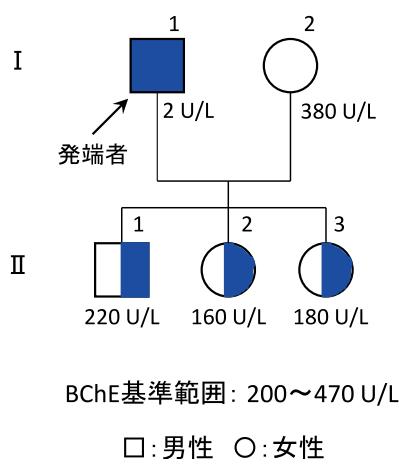


図1 家系図とBChE活性

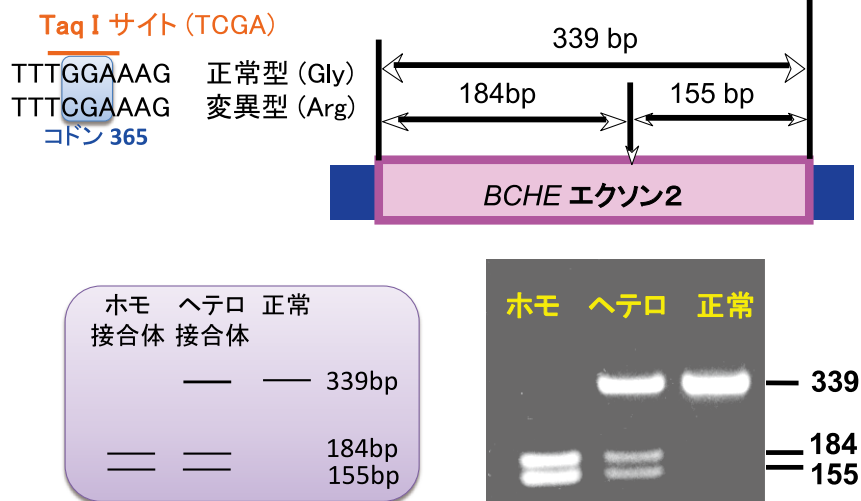


図2 PCR-RFLPによる*BCHE**G365R 検出

05

おわりに

コリンエステラーゼについて包括的に記載した。生体中での役割が明確でなく、なくてもよい酵素と思われてきたBChEだが、臨床検査としては肝機能検査や麻酔前のスクリーニング、有機リン中毒の診断などで十分意義を有しており、さらに最近ではアルツハイマー病やダイエットなどとの関係についての報告が熱いように思われる。BChEの活性測定法ができ、KalowがA型変異を発見して60年を超えたが、なお研究テーマとして現役である。

参考文献

- 1) O. Lockridge, R. B. Norgren Jr., R. C. Johnson, T. A. Blake, *Chem. Res. Toxicol.* **29**(9), 1381-1392 (2016).
- 2) M. L. Andersson, A. M. Møller, K. Wildgaard, *Anaesthesia* **74**(4), 518-528. (2019).
- 3) K. Sharma, *Mol. Med. Rep.* **20**(2), 1479-1487 (2019).
- 4) V. P. Chen, Y. Gao, L. Geng, S. Brimijoin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **114**(41), 10960-10965 (2017).
- 5) D. Noro, T. Koie, Y. Hashimoto, T. Tanaka, C. Ohyama, Y. Tobisawa, T. Yoneyama, A. Imai, S. Hatakeyama, H. Yamamoto, M. Kitayama, K. Hirota, *Jpn. J. Clin. Oncol.* **48**(2), 184-189 (2018).
- 6) M. Maekawa, K. Sudo, D. C. Dey, J. Ishikawa, M. Izumi, K. Kotani, T. Kanno, *Clin. Chem.* **43**(6), 924-929 (1997).
- 7) M. Arpagaus, M. Kott, K. P. Vatsis, C. F. Bartels, B. N. La Du, O. Lockridge, *Biochemistry* **29**(1), 124-31 (1990).
- 8) B. N. La Du, C. F. Bartels, C. P. Nogueira, M. Arpagaus, O. Lockridge, *Cell. Mol. Neurobiol.* **11**(1), 79-89 (1991).
- 9) K. Sudo, M. Maekawa, S. Akizuki, T. Magara, H. Ogasawara, T. Tanaka, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **240**(2), 372-375 (1997).
- 10) D. C. Dey, M. Maekawa, K. Sudo, T. Kanno, *Ann. Clin. Biochem.* **35**(2), 302-310 (1998).
- 11) M. Izumi, M. Maekawa, T. Kanno, *Clin. Chem.* **40**(8), 1606-1607 (1994).
- 12) A. J. Gabriel, M. R. Almeida, M. H. Ribeiro, D. Carneiro, D. Valério, A. C. Pinheiro, R. Pascoal, I. Santana, I. Baldeiras, *J. Alzheimers. Dis.* **61**(3), 1097-1105 (2018).
- 13) J. Jasiecki, A. Limon-Sztencel, M. Żuk, M. Chmara, D. Cysewski, J. Limon, B. Wasag, *Sci. Rep.* **9**(1), 5223 (2019).
- 14) M. Whittaker, *Anaesthesia* **35**(2), 174-197 (1980).
- 15) M. Maekawa, T. Taniguchi, J. Ishikawa, S. Toyoda, N. Takahata, *Clin. Chem.* **50**(12), 2410-2411 (2004).

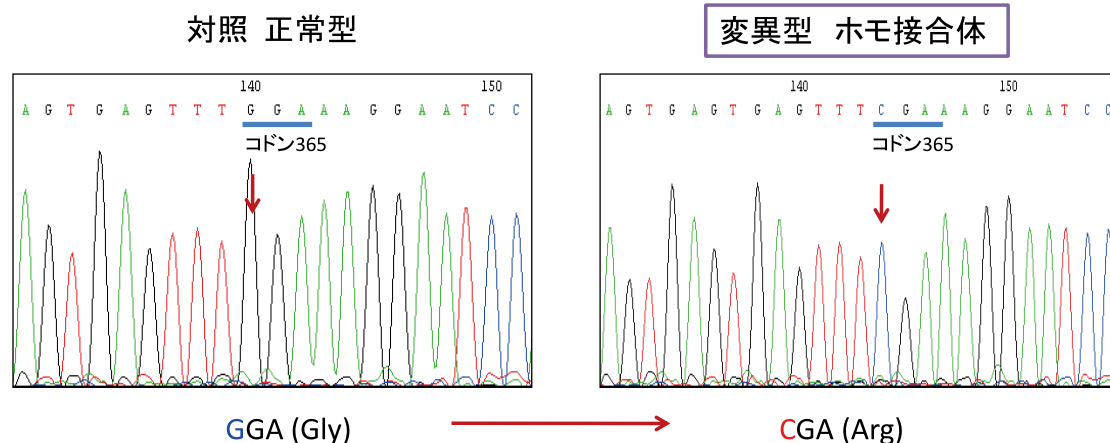


図3 DNA 塩基配列解析結果(エクソン 2)

キーワード解説

臨床検査における酵素活性測定の意味

酵素とは生体内の反応を触媒する蛋白である。臓器細胞に存在する酵素は、生命維持に必要な物質やエネルギーの生成反応等に関与している。蛋白の分子構造は異なるが、同じ反応を触媒する酵素をアイソザイムという。臓器細胞により特定の酵素やアイソザイムが存在するため(酵素の臓器特異性)、血中の各種酵素活性の増減を調べることで、どの臓器に障害があるか推定することができる。血中の酵素活性が増減するメカニズムには、臓器細胞の破壊による血中への流出(逸脱酵素)、病態や薬物代謝による酵素合成の亢進や低下が反映された場合などがある。

遺伝子変異(最近ではバリエーションという用語に置き換わりつつある)

遺伝子をコードするDNA複製のミスや放射線照射によるDNAの損傷など、何らかの原因で体細胞の塩基配列の部分的な置換や挿入、欠失が起こることを体細胞遺伝子変異と言う。これにより、作られる蛋白の機能の低下や欠損、あるいは機能の変化が引き起こされ、がんなどの疾患につながる場合がある。一方、両親から受け継ぐ遺伝子変異は、生殖細胞系列の遺伝子変異であり、一生変化せず、家族で共有し、子孫に遺伝するものである。

ヘテロ接合体とホモ接合体

両親から受け継いだ対立遺伝子の組み合わせで、同じ組み合わせの個体をホモ接合体、一方に変異があるなど、異なる組み合わせの個体をヘテロ接合体という。すなわち、野生型(正常型)のホモ、野生型と変異型のヘテロ、変異型のホモと、大きく3つに分類できる。該当する遺伝子変異がその遺伝子産物をうまく産生できないタイプであるならば、その対立遺伝子を有する個体では産生量が減り、ヘテロよりもホモで減少の度合は強くなる。そして、症状発現の閾値を超えて減少すれば発症する。すなわち、〇〇欠損症となる。

体外診断用医薬品

IFCC標準化対応試薬

シカリキッド ALP-IFCC / シカフィット LD-IFCC

血液検査用アルカリ性フォスファターゼキット

共存物質の影響を回避しています

体外診断用医薬品

IFCC標準化対応試薬

シカフィット LD-IFCC

乳酸脱水素酵素キット

開栓後の安定性は良好です



各種自動分析装置に搭載可能な包装タイプをご用意しています

当社HPでは、ケミカルタイムス最新号、バックナンバーを公開しております。

ケミカルタイムス URL

<https://www.kanto.co.jp/times.html>

関東化学 URL

<https://www.kanto.co.jp/>

QRコードはこちらです▶▶▶



※無断転載および複製を禁じます。



関東化学株式会社

〒103-0022 東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号
室町東三井ビルディング

電話(03)6214-1090 FAX(03)3241-1047

E-mail: chemiti-info@kanto.co.jp 編集責任者: 湯浅 隆秀

2021年7月発行