# 白血球アルカリ性ホスファターゼアイソザイムに関する研究


| メタデータ | 言語: jpn<br>出版者:<br>公開日: 2017-10-04<br>キーワード (Ja):<br>キーワード (En):<br>作成者: 伊藤, 恵子<br>メールアドレス:<br>所属: |
| --- | --- |
| URL | http://hdl.handle.net/2297/9105 |

金沢大学十全医学会雑誌　第92巻　第6号　942－952　(1983)

# 白血球アルカリ性ホスファターゼアイソザイムに関する研究

金沢大学医学部内科学第三講座（主任：服部絢一教授）
伊　藤　恵　子

(昭和58年12月27日受付)

本研究では，正常人および各種疾患（白血病，真性多血症，血小板血症，類白血病反応）における白血球アルカリ性ホスファターゼの酵素学的特徴を明らかにするために，種々のアミノ酸による阻害，熱安定性，およびミカエリス定数を検討した．その結果，正常人白血球アルカリ性ホスファターゼは，L-フェニールアラニン，L-ロイシン，L-ホモアルギニン，グリシンに阻害されない耐熱性アルカリ性ホスファターゼが大部分を占めた．この耐熱性アルカリ性ホスファターゼは，現在までに種々の細胞で確定されている4つの耐熱性アルカリ性ホスファターゼが，L-フェニールアラニンに阻害されることから，新しいアイソザイムと考えられた．また，正常人白血球には，L-ホモアルギニンに阻害される易熱性アルカリ性ホスファターゼもわずかに認められた．慢性骨髄性白血病，急性骨髄性白血病，血小板血症では，比較的熱に不安定で，L-ホモアルギニンに阻害されるアルカリ性ホスファターゼが認められ，これはユニバーサル型アイソザイムに類似していた．真性多血症の白血球アルカリ性ホスファターゼは，きわめて熱に不安定で，L-ホモアルギニンに強く阻害された．p-ニトロフェニールリン酸に対するミカエリス定数は，正常人白血球アルカリ性ホスファターゼでは1.1 mM，慢性骨髄性白血病では1.3～3.6 mMで，病態によるアイソザイム分布の違いが示唆された．

**Key words** Leukocyte alkaline phosphatase, Heat-stable, Heat-labile, New variant isoenzyme

血清，組織におけるアルカリ性ホスファターゼ（alkaline phosphatase以下ALPと略）の研究は，Bodansky(1937年)に始まる．Fishmanら[1](1962年)はアミノ酸の本酵素に対する特異的活性阻害作用を発見して，アイソザイムの研究を急速に発展させた．現在行われているALPアイソザイムの分析方法としては，電気泳動法，阻害剤（各種アミノ酸，尿素，レバミゾール）による方法，熱処理による方法，基質親和性，ミカエリス定数，至適pHなどの酵素学的検査がある．また，免疫学的方法も用いられる．また本酵素の分子量，アミノ酸配列なども次第に明らかにされつつあり，これらの方法により，現在までに10種以上のALPアイソザイムが同定されている．

一方，好中球アルカリ性ホスファターゼ(neutrophil alkaline phosphatase，以下NAPと略）の研究も古くから行われ[2]，慢性骨髄性白血病（chronic myelocytic leukemia以下CMLと略)において，NAP活性がきわめて低値を示すことは周知の事実であり[3)~6)]，診断上重要な検査となっている．しかし，NAPアイソザイムに関する研究[7)~11)]は，未だ少なく，一定の見解は得られていないばかりか，NAPの機能，各種疾患におけるNAP活性変動の意義など，まだ不明の点が多い．またFishmanら[12]が，癌化に伴うALPアイソザイムの変化を報告しているように，造血器疾患においてもNAPアイソザイムの研究は，癌化の機序解明に重要と思われる．そこで，正常人および各種疾患におけるNAPアイソザイムについて，比較的容易に行い得る阻害剤による方法，熱処理による方法，ミカエリス定数から分析し検討を行った．これらの実験から若干の知見を得たので報告する．

Studies on Isoenzymes of Leukocyte Alkaline Phosphatase. **Keiko Itoh,** Department of Internal Medicine (III), (Director: K. Hattori), School of Medicine, Kanazawa University.

## 材料および方法

### Ⅰ．組織化学的方法

1．対象および採取方法

正常人としては，健康診断のために金沢大学第3内科を受診した成人男女から貧血のみられない人を選び用いた．NAP活性低値例としてはCMLを，NAP活性高値例としては，真性多血症，妊婦，感染症，悪性腫瘍骨髄転移患者を選んだ．

外来受診時，あるいは，早朝空腹時に，末梢静脈から，EDTA-3K添加で採血を行った．

2．染色方法

採血後30分以内に，型の如く塗抹標本を作製し，十分に乾燥した後，朝長法[13]に従って−4°C5秒間の固定を行い，水洗後さらに，ナフトールAS-MXリン酸（naphthol AS-MX phosphate, Sigma）を基質として37°C2時間の染色を施した．後染色は，サフラニン0（Schmid gmbh & Co.）を使用した．

アミノ酸による阻害は，これまでの報告[14)~16)]に基づいて行った．アミノ酸としては，L-フェニールアラニン（L-phenylalanine，和光）50 mM，L-ロイシン（L-leucine，和光）4 mM，L-ホモアルギニン（L-(+)-homoarginine，和光）50 mM，グリシン（glycine，和光）50 mMを用い，それぞれ，プロパンジオール（2-amino-2-metyl-1，3 propanediol，和光）緩衝液（0.05 M，pH 8.6）に溶解した．固定した塗抹標本を，十分に水洗した後，アミノ酸溶液あるいはプロパンジオール緩衝液に37°Cで反応させ，水洗後，染色，後染色を行った．

アミノ酸による阻害試験の前実験として，プロパンジオール緩衝液のNAPスコアへの影響を検討した．15分ではNAPスコア95%，30分96%，60分91%，90分85%および120分85%と，時間とともに低下の傾向が認められた（図1）．また，時間の経過とともに細胞の膨化，崩壊が生じ，サフラニン0による後染色では，核構造や特殊顆粒は不明瞭となり，NAP陰性の成熟好中球と，単球あるいは核変形の著しいリンパ球との区別が困難となった．従って，長時間のプロパンジオール緩衝液浸漬は不適当で，1時間が限度と考えられ，以下の実験は1時間で行った．

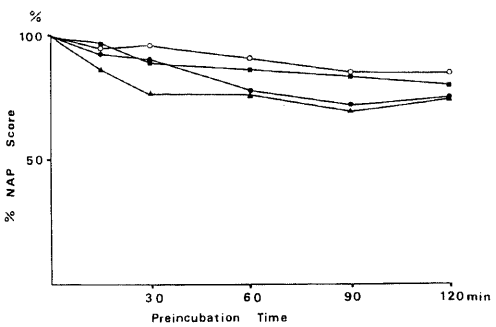


Fig. 1　Effects of buffer and amino-acids on neutrophil alkaline phosphatase (NAP) activity. ○——○, Buffer (n=4); ■——■, Phenylalainine (n=2); ●——●, Homoarginine (n=12); ▲——▲, Glycine (n=12).

NAP染色は，固定時間，固定温度，染色を施すまでの時間に強く影響されるため．これらの条件を厳守するとともに，必ず同時に対照をおいて行った．

3．判定方法

NAPスコアは，従来の方法[13),17)]に従い，成熟好中球を100～200個順次鏡検し，染色色素の数により0～VIの7つのクラスに分類して算出した．従ってNAPスコアは最低0，最高600と表わされた．

アミノ酸による阻害は，

$$\text{残存活性率}(\%) = \frac{\text{アミノ酸で1時間反応させた標本のNAPスコア}}{\text{プロパンジオール緩衝液に1時間静置した標本のNAPスコア}} \times 100$$

で表わした．

### Ⅱ．生化学的方法

1．対象および採取方法

組織化学的方法と同様に，正常人，CML，真性多血症，血小板血症，急性骨髄性白血病，妊婦を対象とし，末梢静脈から，ヘパリン添加またはEDTA-3K添加で採血を行った．一つの実験系を実施するために，各患者から10～20 mlの採血を必要としたが，正常人および妊婦では，それぞれ3 mlずつ採血し，白血球を分離し，10～40人分をまとめて測定に供した．

2．白血球分離方法

谷島ら[18]の方法に従った．静脈血を直ちに生理食塩水で1.2倍に希釈し，メトリゾ酸ナトリウム(Sodium metrizoate solution, 32.8% W/V, Nyegaard & Co. A/S, Oslo, Norway)2 mlと6% W/Vのデキストラン（dextran M. W. 10万～20万，和光）5 mlの混合液の上に静かに重層し，室温で30分～1時間静置した．上清を分離し，これを1,000 rpm 15分間遠心沈殿し，血小板を取り除いた．さらに混在している赤血球は，低張食塩水（0.28%）で溶血させ，生理食塩水で洗い出した．白血球の中で，好中球はきわめてALP活性が高く，リンパ球，単球にはほとんど活性が認められない[19]ので，好中球の分離は行わなかった．従って，生化学的方法においては白血球ALPと表現し，組織化学的NAPと区別して用いる．白血球沈澱物は，測定時まで−80°Cにて凍結保存した．

3．白血球ALP抽出方法

試料解凍後は，0～4°C下で取り扱い，3日以内に測定を終了した．白血球沈澱物に，0.01%トリトンX-100（triton X-100，和光）を加えたトリス塩酸緩衝液（pH 8.0，0.04 M）を，採血量10 mlで得られた白血球沈殿物に対して0.5～1.0 ml加え，10分間ホモジネート（ポッター型テフロンガラスホモジナイザー使用）した．この試料について30,000 rpm 30分間の遠心を行い，上清を白血球ALP抽出液とした．

4．白血球ALP酵素活性測定法

酵素活性測定には，基質として，p-ニトロフェニールリン酸ニナトリウム（p-nitrophenylphosphate disodium salt和光，以下pNPPと略）を用い，これを硫酸マグネシウム1 mMを加えたジエタノールアミン（diethanolamine，和光）緩衝液（pH 10.0，1.01 M）に測定時毎に溶解して，167 mMの基質液を作成した．酵素反応は，2 mlの基質液に白血球ALP抽出液10～30 μlを加えて25°Cで行い，初速度（反応開始後5分間）を200-20形日立ダブルビーム分光光度計を使用して，405 nmの吸光度で記録した．

5．白血球ALPアイソザイムの検討

1）アミノ酸による阻害試験

ALPの各種アミノ酸による阻害試験を行う時の至適アミノ酸濃度は，報告者により多少異なる[20)～23)]．従って，本実験では，これまでよく用いられ，また，感受性の有無による差が最も大きく現われるアミノ酸濃度を選んだ．すなわち，L-フェニールアラニンは最終濃度5 mM，L-ロイシン，L-ホモアルギニン，グリシンは最終濃度10 mMとした．アミノ酸による阻害は

$$\text{残存活性率}(\%)=\frac{\text{アミノ酸添加の系におけるALP活性}}{\text{アミノ酸未添加の系におけるALP活性}}$$

で表わした．

2）熱安定性試験

あらかじめ，試験管を56±1°Cおよび65±1°Cに加温しておき，これに白血球ALP抽出液を0.05～0.1 ml入れ，10分間加温した後，直ちに氷水で冷却し，酵素活性を測定した．これと，熱処理を行っていない系に対する残存活性値比（%）を，熱安定ALPとした．

3）ミカエリス定数（km）の測定

前記のジエタノールアミン緩衝液（pH 10.0）で，pNPPを基質として行った．

4）耐熱性白血球ALPのアミノ酸による阻害

正常人および真性多血症の白血球ALP抽出液を65°C20分間熱処理し，その後，前記方法に従ってアミノ酸阻害試験を行った．

なお，生化学的に白血球ALP活性を検討するさいに，対照として，胎盤性ALP（和光）と，正常人血清（ユニバーサル型ALP）を用いた．

## 成　　績

### Ⅰ．組織化学的方法による正常及び患者白血球のアルカリ性ホスファターゼ活性の検討

正常成人におけるNAPスコアは，240±45.1（S.D.）で，NAP陽性率は，87.3±9.3%となった．

正常人12例（NAPスコア200～300）におけるアミノ酸阻害試験では，L-フェニールアラニン119±20(S.D.)%，L-ロイシン102±37%，L-ホモアルギニン84±21%，グリシン89±25%で，いずれのアミノ酸にも阻害は認められなかった（図2）．L-フェニールアラニン，L-ホモアルギニン，グリシンを用いて経時的な阻害率の検討を行ったところ，緩衝液と同様にNAPスコアは時間とともに低下したが，緩衝液との間に有意な差異は認められなかった（図1）．

CML 14例におけるNAP残存活性率（図2）は，L-フェニールアラニン81±24%，L-ロイシン91±28%，L-ホモアルギニン72±25%，グリシン77±22%で，L-ホモアルギニンにより軽度に阻害される傾向がみられた．しかし，CMLでは，NAP陽性率が著明に低下しているため，標準偏差値が大きくなり，L-ホモアルギニンにおいても，正常人との間に有意な差（T検定）は認められなかった．

NAPスコア300以上を示す妊婦6例，悪性腫瘍骨髄転移3例の類白血病反応におけるNAP残存活性率（図2）は，L-フェニールアラニン96±5%，L-ロイシン96±7%，L-ホモアルギニン100±6%，グリシン100±1%であり，いずれのアミノ酸にも阻害されず，標準偏差値は正常人より低値であった．

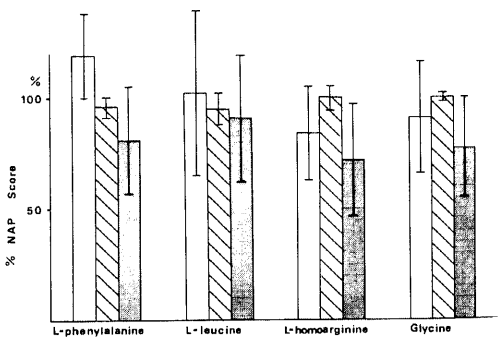


Fig. 2 Effects of amino-acids on NAP activity under normal and pathological conditions (histochemical method). □, Normal (n=12); ▨, Leukemoid reaction (n=9); ▩, Chronic myelocytic leukemia (CML n=9).

なお，塗抹標本により，熱安定性試験を試みたが，56°Cおよび65°Cの処理により，細胞の崩壊が著しく，NAPの活性値を求めるのは不可能であった．

### II．生化学的方法による正常及び患者白血球のアルカリ性ホスファターゼ活性の検討

正常人白血球プール12検体における，白血球ALPアミノ酸阻害率（図3A）は，L-フェニールアラニン82.5±13.4%，L-ロイシン79.1±8.2%，L-ホモアルギニン84.2±8.0%，グリシン93.9±5.8%で，組織化学的方法と同様に，いずれのアミノ酸にも阻害されず，標準偏差値は，組織化学的方法に比較して小さかった．一方，CML 14人における白血球ALPのアミノ酸阻害試験では，L-フェニールアラニン86.4±5.9%，L-ロイシン80.6±10.8%，L-ホモアルギニン62.3±14.7%，グリシン88.8±8.4%であり，L-ホモアルギニンで軽度阻害された．また，白血球数が増加し，NAPスコアが軽度低値を示す血小板血症2例，急性骨髄性白血病2例，悪性リンパ腫1例，および白血球が増加し，NAPスコアも高値を示す妊婦プール白血球と真性多血症2例における白血球ALPのアミノ酸阻害試験では，L-フェニールアラニン，L-ロイシン，グリシンには阻害されず，L-ホモアルギニンに軽度ないし中等度阻害された．真性多血症2例では，L-ホモアルギニンにより，白血球ALP活性はそれぞれ26%，34%に低下し，著明な阻害が認められた．

次に，アミノ酸の濃度を変えて阻害試験を行った（図3B）．正常人白血球ALP活性は，L-フェニールアラニンの$10^{-1}$Mで98.5%，$10^{-2}$Mで87.5%，$10^{-3}$Mで77.0%，$10^{-4}$Mで69.7%と，いずれの濃度でも阻害は軽度であった．対照の胎盤性ALPでは，このアミノ酸の高濃度で強く阻害された．またL-ロイシン，L-ホモアルギニンおよびグリシンによる阻害は軽度であり，胎盤性ALPと類似していた．CML 2例において行ったアミノ酸濃度勾配における阻害試験では，L-フェニールアラニン，L-ロイシン，グリシンは，正常人白血球ALPの成績と差はなかったが，L-ホモアルギニンは，各濃度において正常人より軽度阻害された．

疾患別白血球ALPの熱安定性試験を図4に示した．正常人白血球ALP活性は，56°C処理で84.8±9.5%，65°C処理で74.0±7.8%となり，比較的熱に安定していた．一方，CML 14例では，56°C 63.3±13.9%，65°C 46.5±20.0%で，56°Cでは軽度，65°Cでは中等度に活性低下がみられ，正常人との間にはいずれも有意（T検定，$p<0.05$）であった．CMLの症例により耐熱性ALP活性が異なり，標準偏差値は大きくなったが，耐熱性ALPと白血球数およびNAPス

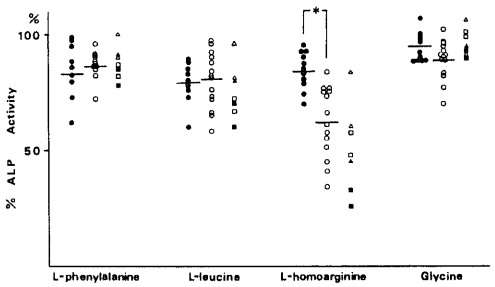


Fig. 3A　Effects of amino-acids on leukocyte alkaline phosphatase (ALP) activity as measured biochemically. ●, Normal; ○, CML; ■, Polycythemia vera; □, Thrombocythemia; △, Acute mylelocytic leukemia; ▲, Pregnant; *, $P<0.05$.

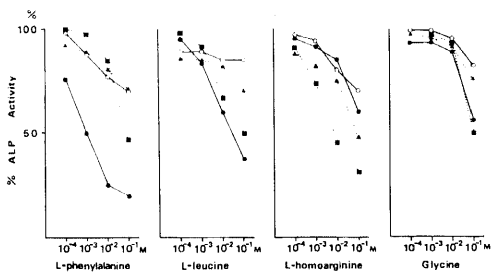


Fig. 3B　Effects of concentrations of various amino-acids on ALP activity as measured biochemically. ○——○, Normal; ●——●, Placenta; ▲——▲, CML (C. K.); ■——■, CML (K. N.).

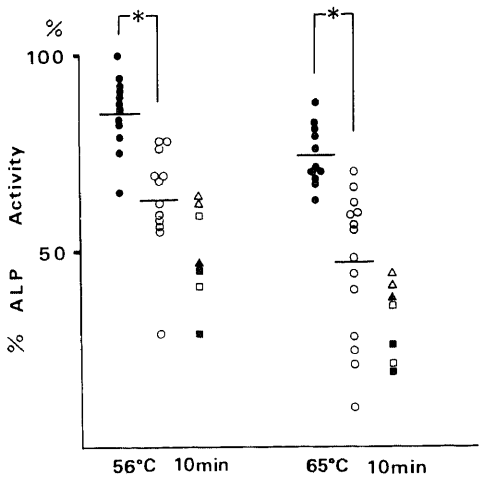


Fig. 4　Heat-stability of leukocyte ALP. ●, Normal; ○, CML; ■, Polycythemin vera; □, Thrombocythemia; △, Acute myrlocytic leukemia; ▲, Pregnant; *, <0.05.

コアとの間には関連が認められた．つまり，白血球数が増加するほど熱に不安定で，NAP スコアは低下し，耐熱性 ALP と白血球数の相関係数は－0.69 となった（図 5）．血小板血症，急性骨髄性白血病，妊婦の白血球 ALP による熱安定性試験（図 4）では，CML と同様で，56°C処理，65°C処理のいずれも軽度ないし中等度の活性低下が認められた．真性多血症 2 例では，65°C10 分で 19%および 26%と低下し，きわめて熱に不安定であった．

さらに，加熱処理時間を変えて，白血球 ALP 活性を測定した（図 6 A）．正常人白血球 ALP 活性は，56°C5 分 87%，10 分 85%，15 分 78%，20 分 76%となり，65°C5 分 91%，10 分 74%，15 分 80%，20 分 73%で，65°Cにおいては 10 分以後，活性値はプラトーとなった．対照に行った胎盤性 ALP も 65°C10 分で 72%となり，以後プラトーであった．CML 2 例および真性多血症では，5 分あるいは 10 分で著明に活性低下が認められるも，それ以後は活性値の変動は少なく，20 分で 0 になることはなかった（図 6 B）．

正常人，CML，各種疾患すべてについて，耐熱性 ALP とアミノ酸阻害率の相関関係を検討した．L-フェニールアラニン，L-ロイシン，グリシンと耐熱性 ALP の間には相関は認められなかったが（図省略），L-ホモアルギニンと 56°C10 分処理群（n＝33）との相関係数は，図 7 A に示すように 0.79 で，65°C10 分処理群（n＝32）とのそれは，図 7 B に示すように 0.79 で，高い正の相関を示した．

次に，正常人および真性多血症の白血球から抽出した ALP の試料を，65°C20 分間加熱処理を行い，その後アミノ酸阻害試験を行った（図 8）．正常人は，L-フェニールアラニン 99.7%，L-ロイシン 94.9%，L-ホモアルギニン 98.6%，グリシン 97.1%であり，真性多血症は，L-フェニールアラニン 99.8%，L-ロイシン 92.3%，L-ホモアルギニン 95.2%，グリシン 95.4%であった．両者とも，いずれのアミノ酸にも阻害されなかった．

正常人白血球 ALP の pNPP に対する Km は，1.1 mM および 1.2 mM であった（図 9）．同様に，CML 3 例について Km を測定した（表 1）．症例 I. S.（白血球数 $7.34\times10^4/mm^3$，NAP スコア 17）では，3.6 mM，症例 K. N.（白血球数 $9.00\times10^4/mm^3$，NAP スコア 21）では，2.5 mM と，正常人に比較して高値であったが，白血球数 $2.26\times10^4/mm^3$ で NAP スコア 67 と正

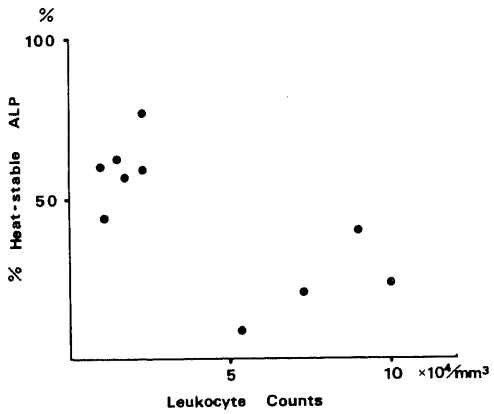


Fig. 5 Relationship between heat-stable (65°C, 10 min) leukcoyte ALP and leukocyte counts of CML. n＝10, r＝－0.69.

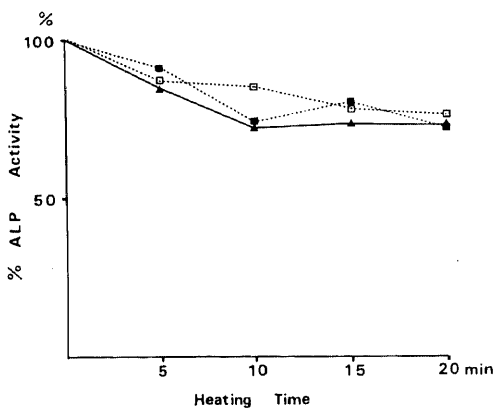


Fig. 6A Heat-stability of leukocyte ALP obtained from normal subject and placenta ALP. □——□, Normal (56°C); ■——■, Normal (65°C); ▲——▲, Placenta (65°C).

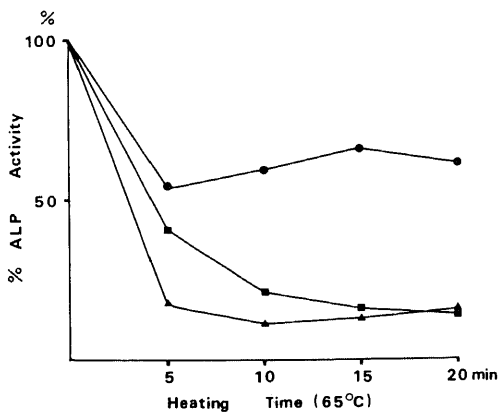


Fig. 6B Heat-stability of leukocyte ALP obtained from patient with CML and polycythemia vera. —●—, CML (K. A.); —■—, CML (I. S.); —▲—, Polycythemia vera (M. N.).

常に近い状態でコントロールされている症例 K. T. では，Km も 1.3 mM と，正常人に近い値を示した．ちなみに後者では，熱安定性，アミノ酸阻害試験でも正常人と差はみられなかった．

## 考　　察

白血球 ALP アイソザイムに関する報告はきわめて少なく，Robinson[7]や岡田ら[8]の電気泳動法による検討，Rosenblum[10]の免疫学的検討などがみられるのみで，いまだに，一定の結論は得られていない．本研究では，正常人と各種疾患における白血球 ALP の酵素学的特徴を，組織化学的方法及び生化学的方法で検討し，各種疾患における白血球 ALP 活性の変動と，ALP アイソザイムの変異について考察を行った．

組織化学的方法，特に光顕的方法は，手技が簡単で，同時に ALP の局在をある程度推定できるという利点がある．近年，組織化学的に Regan アイソザイムが同定できるようになり[16]，癌の組織診断に利用されつつある．本実験では，この組織化学的方法を血液塗抹標本で試み，各種アミノ酸の NAP に対する阻害効果を，正常人，CML，類白血病反応について検討した．図 2 に示すように，いずれの NAP も，各種アミノ酸による阻害は軽度であった．CML において，L-ホモアルギニンで比較的に阻害されていたが，バラツキ（S. D.）が大きく，正常人との間に有意差は認められなかった．NAP スコアのバラツキは，NAP スコアの高い類白血病反応では小さく，NAP スコアの低い CML では大き

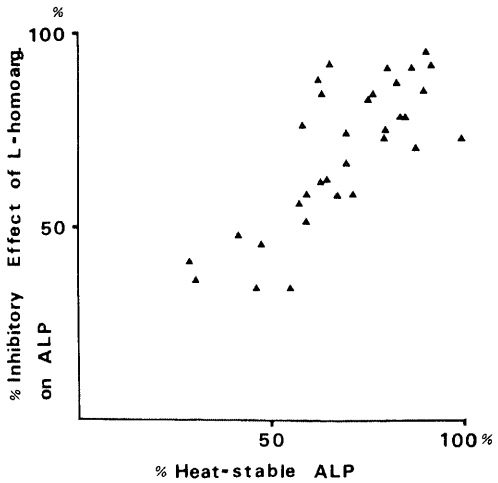


Fig. 7A　Relationship between the heat-stable (56°C, 10 min) leukocyte ALP and inhibitory effect of L-homoarginine on leukocyte ALP. n=33, r=0.79.

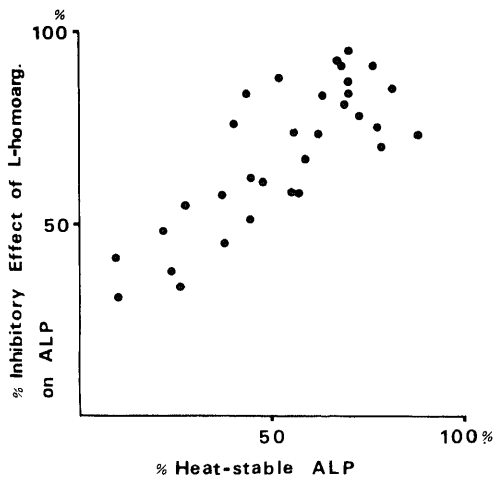


Fig. 7B　Relationship between the heat-stable (65°C, 10 min) leukocyte ALP and inhibitory effect of L-homoarginine on leukocyte ALP. n=32, r=0.79.

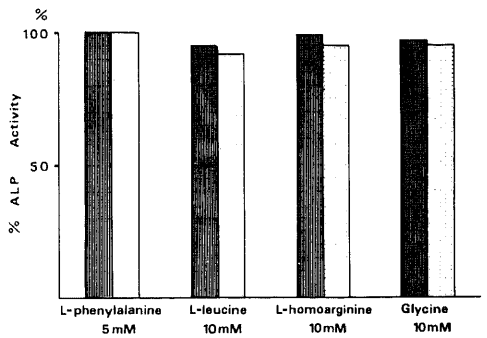


Fig. 8　Effects of amino-acids on leukocyte ALP obtained from normal subject and patient with polycythemia vera heated at 65°C for 20 minutes. ▥, Normal ; □, Polycythemia vera.

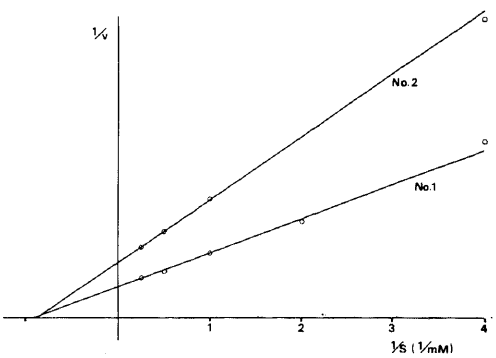


Fig. 9　Lineweaver-Burk plots of normal leukocyte ALP. Substrate, p-nitrophenylphosphate disodium salt (pNPP), pH 10.0. No. 1, Km=1.1 mM ; No. 2, Km=1.2 mM.

い傾向がみられた．これは，NAPスコアを算出する際に，染色された色素の数により，好中球を7つのクラスに分類しているが，このクラス分類が必ずしも生化学的活性に均等分されていないためと考えられる．

また，NAPスコアのバラツキの原因として，種々の処理による血球の変形，ならびに観察者の主観もあげられる．血液塗抹標本には数種の細胞が種々の割合で混在している．この中で成熟好中球が最も強いALP活性を示し，他の血球にはほとんど活性が認められない[19)24)]．従って，血液塗抹標本では，細胞を正確に分類し，成熟好中球のALP活性のみを算定する必要がある．しかし，図1で示すように，いずれのアミノ酸でも，アミノ酸の反応時間を長くすると，阻害率は多少大きくなるものの，血球の変形が生じ，細胞同定が困難となり，NAPスコアのバラツキが大きくなった．また，熱安定性試験時の加熱処理でも，熱のため血球の変形が著しく，細胞の同定が不可能であった．

このように，組織化学的方法をそのままNAPアイソザイムの鑑別に用いるには，問題が多い．しかし，塗抹標本による白血球ALP分析は，簡単でしかもALP活性をNAPスコアとして半定量化できる利点があり，今後，組織化学的方法の改良が必要と考えられる．

組織化学的方法では，好中球ALPのアミノ酸による阻害は軽度であることが示唆されたが，組織化学的方法のみでALPアイソザイムを分析するのは，きわめて困難で精度を欠く恐れがある．このため，生化学的方法で，正常人及び各種疾患の白血球ALPの酵素学的特徴を検討した．

図3A・3Bで示すように，正常人白血球ALPの各種アミノ酸による阻害は軽度であり，組織化学的方法と一致していた．また，図4で示すように，56°Cおよび65°C10分の加熱においても，酵素活性の低下は軽度であった．正常人白血球ALPを65°Cで加熱すると，10分で74%に活性が低下したが，以後はプラトーとなり，活性の消失はみられなかった（図6A）．

一般に，65°Cの熱処理で活性が消失しないALPを耐熱性ALP，活性が消失するものを易熱性ALPとよび，胎盤性ALPは，耐熱性ALPの代表的なものである．実験方法を検討するために，すでに精製市販されている胎盤性ALPで熱安定性試験を行ったところ，白血球ALPの成績と類似していた（図6A）．また，易熱性ALPであるユニバーサル型ALP（血清）では，65°C10分の熱処理で，残存活性は8%となり，正常人白血球ALPや胎盤性ALPとは対照的であった．これらの実験より，正常人白血球には，主として耐熱性ALPが含まれていると考えられた．

耐熱性ALPとされているアイソザイムも，65°Cの加熱により若干は活性が低下する[22)]．正常人白血球ALPを65°Cで加熱すると，74%までに活性が低下したが，この活性低下が何によるのかを検討した．

測定した全ての症例について，56°Cおよび65°Cの加熱処理後の白血球ALP残存活性と，各種アミノ酸阻害後の残存活性を検討すると，L-ホモアルギニンで，両者の間に強い相関がみられた（図7A・7B）．つまり，熱について安定した白血球ALPを持つ症例では，L-ホモアルギニンにはほとんど阻害されず，熱に不安定な白血球ALPを持つ症例では，L-ホモアルギニンに阻害される傾向がみられた．さらに，正常人白血球ALPを，あらかじめ65°C20分間の加熱処理を施してアミノ酸阻害試験を行うと，L-ホモアルギニン，およびその他のアミノ酸にもほとんど阻害されなくなった．これらの成績は，正常人白血球ALPの中に，L-ホモアルギニンに阻害される易熱性ALPが存在することを推定させる．従って，正常人白血球には，いずれのアミノ酸にも阻害されない耐熱性ALPと，L-ホモアルギニンに阻害される易熱性ALPの少なくとも2種類のアイソザイムが存在し，かつ耐熱性ALPが大

Table 1. Km of Leukocyte ALP for pNPP, white blood cell counts (WBC) and NAP score

| Sourse of Leukocyte ALP | Km (mM) | WBC ($\times 10^3/mm^3$) | NAP | |
|---|---|---|---|---|
| | | | rate (%) | score |
| I. S. (CML) | 3.6 | 73.4 | 8 | 17 |
| K. N. (CML) | 2.5 | 90.0 | 11 | 21 |
| K. T. (CML) | 1.3 | 22.6 | 35 | 67 |
| Normal pool No. 1 | 1.1 | | | |
| Normal pool No. 2 | 1.2 | | | |

部分を占めていると考えられる．

一般には，一つの組織あるいは細胞中には，一種類のALPアイソザイムが存在するといわれ[25]，白血球ALPは，ユニバーサル型アイソザイムであるとの報告がある[19]．しかし，白血球ALPが単一なアイソザイムより成るのではなく，複数のアイソザイムより成っているとの報告もある．Wilsonら[11]は，電顕的手段を用いて，妊婦の白血球に，耐熱性ALPと易熱性ALPが存在していることを観察し，また，大久保[26]は，正常人白血球に，$Mg^{++}$と$Zn^{++}$によって活性化される2種類のALPアイソザイムのあることを報告している．さらに，白血球ALPの電気泳動では，2～4本の活性帯が認められており[7][8]，白血球ALPの多様性を示唆している．

一方，アミノ酸に関する実験では，Wilsonら[11]は，電顕的方法で検討し，正常人白血球ALPは，L-フェニールアラニンで阻害されず，グリシンで阻害されたとしており，菰田ら[19]は，生化学的方法で，L-フェニールアラニンで阻害されず，L-ホモアルギニンで阻害されたと述べている．これらの報告は，本実験で得られた成績と異なっているが，これは，次のような理由によると考えられる．

ALPは，分子量8～16万の2量体蛋白で，細胞内では，膜成分と結合した複合物として存在すると考えられている[25]．電顕的組織化学的方法を用いた好中球ALPの局在の検討では，ホスファゾームと呼ばれる顆粒に強い活性がみられるほかは，アズール顆粒の膜，特殊顆粒の膜，細胞膜，核膜に弱い活性があり，ミトコンドリアには活性が認められていない[11]．組織からALPを抽出する方法として，ホモジネート，遠心沈殿，ブタノール処理，トリトンX-100処理などが行われている[27]が，いずれの方法を用いても，膜成分の完全な分離は不可能で，膜成分と結合した巨大分子ALPが混在することになり，これがALPアイソザイム分析を困難にしている．

さらに，ある種のALPアイソザイムにおいては，$Zn^{++}$あるいは$Mg^{++}$が微量含まれていることが知られている．これらの金属は，酵素活性発現に伴う構造変化，酵素活性の安定化に関与していると考えられている[19]．前述のように，ALPは種々の方法で組織から抽出精製されているが，抽出方法によっては，これらの金属が取り除かれている可能性が考えられる．白血球ALPもまた，$Zn^{++}$および$Mg^{++}$の存在が推定されており，白血球ALP精製方法が，ALPアイソザイム分析に大きく影響するものと思われる．

表2に，正常人白血球ALPの酵素学的特徴をまとめ，現在明らかにされている胎盤性ALP，ユニバーサル型ALPも併記した．

耐熱性ALPとしては，後期胎盤性ALP，Reganアイソザイム，Nagaoアイソザイム，Kasaharaアイソザイムの4種が知られているが，これらは全て，癌に伴って出現し，L-フェニールアラニンに阻害されるという特徴を持っている．しかし，本実験では，正常人白血球の耐熱性ALPは，L-フェニールアラニン，L-ロイシン，L-ホモアルギニン，グリシンのいずれにも阻害されなかった．この成績は，これまでに知られていない新しいアイソザイムの存在を強く示唆し，極めて注目すべきことと考えられる．さらに，pNPPに対するミカエリス定数でも，胎盤性ALPが0.6 mMであるのに対して，正常人白血球ALPでは1.1 mMであり，胎盤性ALPと異なるアイソザイムであることが確かめられた．

易熱性ALPとしては，正常人血清中に認められている肝性ALP，骨性ALP，小腸性ALPなどがある．

Table 2. Comparison of ALP isoenzyme

| Analyzed Methods | Normal Leukocyte | Normal Leukocyte Heated* | CML Leukocyte | Placenta | Serum |
|---|---|---|---|---|---|
| Inhibition by : ** | | | | | |
| L-phenylalanine | 82.5±13.4 | 99.7 | 86.4±5.9 | 39.2 | 82.7 |
| L-leucine | 79.1±8.2 | 94.9 | 80.6±10.8 | 59.9 | 77.8 |
| L-homoarginine | 84.2±8.0 | 98.6 | 62.3±14.7 | 85.4 | 30.3 |
| Glycine | 93.9±5.8 | 97.1 | 88.8±8.4 | 88.1 | 88.8 |
| Heat stability** | | | | | |
| 56°C 10 min | 84.8±9.5 | | 63.3±13.9 | 75.3 | 28.5 |
| 65°C 10 min | 74.0±7.8 | | 46.5±20.0 | 72.1 | 8.0 |
| Km for pNPP (mM) | 1.1−1.2 | | 1.3−3.6 | 0.6 | |

*, 65°C, 20 min ; **, % of remaining ALP activity

小腸性 ALP は，L-ロイシンに阻害される．肝性 ALP と骨性 ALP は，いずれも L-ホモアルギニンに阻害されるが，肝性 ALP は，56°Cの加熱に比較的安定しており，骨性 ALP と区別されている．正常人白血球の易熱性 ALP は L-ホモアルギニンに阻害され，56°Cと 65°C の加熱処理による残存活性に差が少ないことより，骨性 ALP に類似したものと推定された．

各種疾患における白血球 ALP の分析結果を図 3 A～6 に示した．これらの疾患においても，正常人と同様に，アミノ酸に阻害されない耐熱性 ALP と L-ホモアルギニンに阻害される易熱性 ALP の 2 種類のアイソザイムの存在が示唆されたが，正常人白血球に存在しないアイソザイムの出現を推定させる成績は得られなかった．しかし，図 10 に示すように，耐熱性 ALP と易熱性 ALP の比活性は，正常人白血球 ALP と異なっていた．

CML では，NAP スコアと白血球数との間に，逆の相関が認められている[3)28)]が，本実験では，白血球数と耐熱性 ALP の間にも逆の相関がみられた（図 5・表 1）．つまり，治療によく反応して寛解状態にある CML では，白血球数が減少するとともに，NAP スコアが上昇し，特に耐熱性 ALP が増加して正常人に近い値となるが，一方，白血球数が増加している症例では，NAP スコアが低下し，その低下は主として耐熱性 ALP の低下によるものと推定された．

また，NAP スコアの高い妊婦や真性多血症においては，正常人に比較して，耐熱性 ALP よりも易熱性 ALP 活性の増加が顕著であった．実験的には，Hela・S 3 細胞にプレドニソロンを加えて培養すると，類似した変化がみられる[29)]．この時，可溶性分画中に存在する耐熱性 ALP にはまったく変化がなく，細胞膜分画に存在する易熱性 ALP のみが上昇するため，耐熱性 ALP と易熱性 ALP では，活性化を調節する機序が異なると推定されている．白血球 ALP 活性は，21 番目あるいは 22 番目の染色体，Fc-IgG レセプター，ホルモンなどによって調節されていることが知られてきている[30)～33)]．本実験においても，CML と類白血病反応では，活性化される白血球 ALP アイソザイムが異なり，調節機序の差異が推測された．

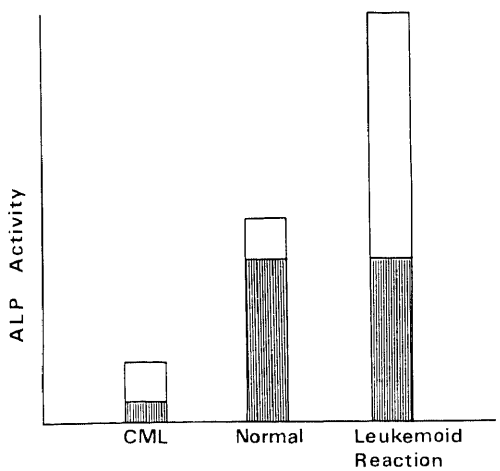


Fig. 10 Schematic distribution of heat-stable and heat-labile ALP under various conditions. □, Heat-labile ALP ; ▤, Heat-stable ALP.

本研究では，白血球 ALP の中に異なった性質を持つ 2 種類のアイソザイムの存在が見い出された．今後，分析方法が発達するにつれて，さらに新しいアイソザイムが発見される可能性があり，病態を検討するうえで，きわめて重要であると考える．

## 結　　論

正常人，類白血病反応，骨髄増殖性疾患における白血球 ALP を，組織化学的アミノ酸阻害方法，生化学的アミノ酸阻害方法，熱安定性，pNPP に対する Km から検討を行い，以下の結果を得た．

1．正常人白血球 ALP には，L-フェニールアラニン，L-ロイシン，L-ホモアルギニン，グリシンのいずれにも阻害されない耐熱性 ALP と，L-ホモアルギニンに阻害される易熱性 ALP の少なくとも 2 種類あることが，生化学的方法および組織化学的方法で証明された．量的には正常人白血球においては，耐熱性 ALP 活性が大部分を占め，易熱性 ALP 活性は量的に少なかった．

2．白血球耐熱性 ALP は，いずれのアミノ酸にも阻害されないことより，これまでに知られている耐熱性アイソザイムに該当するものがなく，新しいアイソザイムと考えられた．他方，白血球易熱性 ALP は，L-ホモアルギニンに阻害されるので，肝あるいは骨性アイソザイムつまりユニバーサル型アイソザイムに類似するものと考えられた．

3．類白血病反応，骨髄増殖性疾患でも，正常人に認められた耐熱性 ALP および易熱性 ALP が存在し，その比率は，疾患によって異なっていたが，耐熱性 ALP 活性に比較して，易熱性 ALP 活性の高い症例が多く，とくに，真性多血症では，易熱性 ALP が著しく多かった．

4．pNPP に対する Km は，正常人白血球 ALP が 1.1 mM であるのに対し，CML では 1.3～3.6 mM であり，病態により，アイソザイム分布の違いが存在することを示唆した．

## 謝　　辞

稿を終えるにあたり，御指導ならびに御校閲を賜わりました恩師服部絢一教授に深謝いたします．また本研究の遂行にあたり終始御教示，御支援いただいた中村忍助教授，医療技術短期大学部谷島清郎教授に感謝いたします．

なお，本論文の一部は，第45回日本血液学会総会，第25回日本臨床細胞学会総会にて発表した．

## 文　　献

1) **Fishman, W. H., Green, S. & Inglis, N. I.**: L-phenylalanine: an organ specifi, stereospecific inhibition of human interstinal alkaline phosphatase. Nature, **198**, 685-686 (1963).

2) **Kaplow, L. S.**: A histochemical procedure for localizing and evaluating leukocyte alkaline phosphatase activity in smears of blood and marrow. Blood, **10**, 1023-1029 (1955).

3) **Spiers, A. S. D., Liem, A. & Baikie, A. G.**: Neutrophil alkaline phosphatase score in chronic granulocytic leukemia: effects of splenectomy and antileukemic drugs. J. Clin. Path., **28**, 517-523 (1975).

4) **Kamada, N., Okada, K., Oguma, N., Tanaka, R., Mikami, M. & Uchino, H.**: C-G translocation in acute myelocytic leukemia with low neutrophil alkaline phosphatase activity. Cancer, **37**, 2380-2387 (1976).

5) **Zeya, H. I., Keku, P. E., Richarda II, F. & Spurr, C. L.**: Absence of neutral protease and alkaline phosphatase in neutrophils of case of hairy cell leukemia. Am. J. Pathol., **95**, 55-66 (1979).

6) **Kamada, N., Dohy, H., Okada, K., Oguma, N., Kuramoto, A., Tanaka, K. & Uchino, H.**: In vivo and in vitro activity of neutrophil alkaline phosphatase in acute myelocytic leukemia with 8; 21 translocation. Blood, **58**, 1213-1217 (1981).

7) **Robinson, J. C., Dierce, J. E., Goldstein, D. P. & Rosse, W. R.**: Leucocyte-alkaline-phosphatase isoenzymes. Lancet, **8**, 805 (1966).

8) **岡田浩佑・中津井俊之・伊藤隆明**：アルカリホスファターゼ，臨床血液，**9**, 256-265 (1968).

9) **Bottomley, R. H., Lovig, C. A., Holt, R. & Griffin, M. J.**: Comparison of alkaline phosphatase from human normal and leukemic leucocytes. Can. Res., **29**, 1866-1874 (1969).

10) **Rosenblum D. & Petzold, S. J.**: Granulocyte alkaline phosphatase. J. Clin. Invest., **52**, 1665-1672 (1973).

11) **Wilson, P. D., Rustin, G. J. S. & Peters, T. J.**: The ultrastructural localization of human neutrophil alkaline phosphatase in normal individuals during pregnancy and patients with chronic granulocytic leukemia. Histochem. J., **13**, 31-43 (1981).

12) **Fishman, W. H., Inglis, N. I., Stolbach, L. L. & Krant, M. J.**: A serum alkaline phosphatase isoenzyme of human neoplastic cell origine. Can. Res., **28**, 150-154 (1968).

13) **朝長正允・佐々木隆子・奥崎美江子**：白血球alkaline phosphataseの研究．白血会誌，**26**, 179-192 (1963).

14) **Rufo, M. B. & Fishman, W. H.**: L-homoarginine, a specific inhibitor of liver-type alkaline phosphatase, applied to the recognition of liver-type enzyme activity in rat intestine. J. Histochem. Cytochem., **20**, 336-343 (1972).

15) **Sasaki, M. & Fishman, W. H.**: Ultrastructural studies on Regan and non-Regan isoenzymes of alkaline phosphatase in human ovarian cancer cells. Can. Res., **33**, 3008-3018 (1973).

16) **Miyayama, H., Doellgast, G. J., Memoli, V., Gandbhir, L. & Fishman, W. H.**: Direct immunoperoxidase staining for Regan isoenzyme of alkaline phosphatase in human tumor tissues. Cancer, **38**, 1237-1246 (1976).

17) **Merker, V. H. & Heilmeyer, L.**: Die alkalische phosphatase neutrophiler leukozyten, Deutsche medizinische wochenschrift, **12**, 253-258 (1960).

18) **Tanishima, K., Matsuki, T., Fukuda, N., Takeshita, M. & Yoneyama, Y.**: NADH-cytochrome $b_5$ reductase in platelets and leukocytes with special reference to normal levels and to levels in carriers of hereditary methemoglobinemia with or without neurological symptoms. Acta Haematol., **63**, 7-12 (1980).

19) **菰田二一・小山岩雄・長谷川正博・坂岸良克**：アルカリ性ホスファターゼ．臨床病理，**31**, 682-691 (1983).

20) **東野一彌・波田寿一**：癌とアルカリホスファターゼ．代謝，**16**, 215-223 (1979).

21) **Komada, T., Hokari, S., Sakagishi, Y. & Tamura, T.**: L-phenylalanine inhibition of human alkaline phosphatases with p-nitrophenyl phosphate as substrate. Clin. Chem., **24**, 2426-2428 (1982).

22) 飯野四郎・鈴木宏・織田敏次：血性アルカリホスファターゼ（ALP）とそのアイソエンザイム．日本臨床，38, 1350-1358 (1980).

23) **Mulivor, R. A., Plotkin, L. I. & Harris, H.**: Differential inhibition of the products of the human alkaline phosphatase loci. Ann. Hum. Genet., **42**, 1-13 (1978).

24) 菰田二一・坂岸良克：アルカリ性ホスファターゼ．蛋白質・核酸・酵素，**24**, 131-144 (1979).

25) 中山年正：アルカリホスファターゼのアイソザイム．検査と技術，**4**, 845-852 (1976).

26) 大久保昭行：アイソザイムの分類と臨床的意義．代謝，**13**, 285-292 (1976).

27) **Morton, R. K.**: The purification of alkaline phosphatases of animal tissues. Biochem. J., **57**, 595-603 (1954).

28) 中津井俊之：慢性骨髄性白血病における好中球 Alkaine phosphatase の研究．九血会誌，**16**, 133-168 (1966).

29) **Nose, K. & Katsuta, H.**: Induction of alkaline phosphatase activity by dibutyl 3' : 5'-cyclic monophosphate in aneuploid rat liver cells. Exp. Cell Res., **87**, 8-14 (1974).

30) **Scott, C. S., Cordingley, R. J., Roberts, B. E., Bynoe, A. G. & Hough, D.**: Relation of neutrophil alkaline phosphatase activity to Fc-IgG receptor development in human blood and bone marrow. J. Clin. Pathol., **35**, 967-971 (1982).

31) **Garcia-rozas, C., Plaza, A., Diaz-espada, F., Kreisler, M. & Martinez-alonso, C.**: Alakline phosphatase activity as a membrane marker for activated B cell. J. Immunol., **129**, 52-55 (1982).

32) **Sato, N., Mori, M., Oshimura, M., Ueyama, Y., Miwa, T., Ohsawa, N., Kosaka, K. & Asano, S.**: Factor (s) responsible for the increase in alkaline phosphatase activity of postmitotic granulocytes from normal individuals and patients with chronic myeloid leukemia. Blood, **59**, 141-147 (1982).

33) **Rustine, G. S., Goldman, J. M., McCarthy, D., Mees, S. & Peters, T.**: An extrinsic factor controls neutrophil alkaline phosphatase synthesis in chronic granulocytic leukemia. Brit. J. Haematol., **45**, 381-387 (1980).

**Studies on Isoenzymes of Leukocyte Alkaline Phosphatase**

Keiko Itoh, Department of Internal Medicine (III) (Director: K. Hattori), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920 – J. Juzen Med. Soc., **92**, 942–952 (1983)

**Key words:** Leukocyte alkaline phosphatase, Heat-stable, Heat-labile, New variant isoenzyme

## Abstract

The present study was performed to clarify the characteristic property of leukocyte alkaline phosphatase in normal subjects, patients with chronic and acute myelocytic leukemia, polycythemia vera, thrombocythemia and leukemoid reactions, inhibitory effect of several amino-acids, heatstability and Michaelis constant for p-nitrophenl phosphate.

Leucocyte alkaline phosphatase of normal subjects was found to consist of a large portion of heat-stable enzyme, which was not inhibited by L-phenylalanine, L-leucine, L-homoarginine and glycine, and a small portion of heat-labile one, which was inhibited by L-homoarginine. These findings suggest that the heat-stable enzyme is a new variant isoenzyme, since 4 hitherto-established isoenzymes were inhibited by L-phenylalanine. The leukocyte alkaline phosphatase in chronic and acte myelocytic leukemia and thrombocythemia was moderately heat-labile, and inhibited by L-homoarginine, showing that the enzyme is similar to the universal alkaline phosphatase. The leukocyte alkaline phosphatase in polycythemia vera was markedly heat-labile, and strongly inhibited by L-homoarginine. Michelis constant for p-nitrophenyl phosphate showed 1.1 mM for normal leukocyte alkaline phosphatse, and 1.3-3.6 mM for leukocyte alkaline phosphatase from chronic myelocytic leukemia, suggesting the different distribution of these isoenzymes under pathological conditions.