

酵素とアイソザイム

昭和大学
高木 康

酵素とは

- 酵素は生体内で合成される触媒作用をもった蛋白質である
- 生体内でのさまざまな化学反応を引き起こすために触媒として働いている
- ヒトを含む生物が、摂取した食べ物を消化・吸収・代謝したり、体の中で起こるほとんどの化学反応に関与している

**アイソザイム(アイソエンザイム)と
何ですか。どうして存在・必要ですか。**

アイソザイムとは

- ほぼ同じ酵素活性をもちながら、蛋白質分子として異なるアミノ酸配列をもつ酵素
- 産生・存在する臓器ごとに環境が異なるので、それに適応できるように、異なる構造となっている
- アイソザイム分析により血中・尿中の異常高値となる酵素がどの臓器に由来するかを推測できるため、臨床的意義が向上する

血清酵素にはどんなものがありますか

血清酵素

➤ 逸脱酵素

AST (GOT)、ALT (GPT)、LD、CK
アミラーゼ、リパーゼ、酸性ホスファターゼ

➤ 胆管酵素

アルカリホスファターゼ、 γ -GT

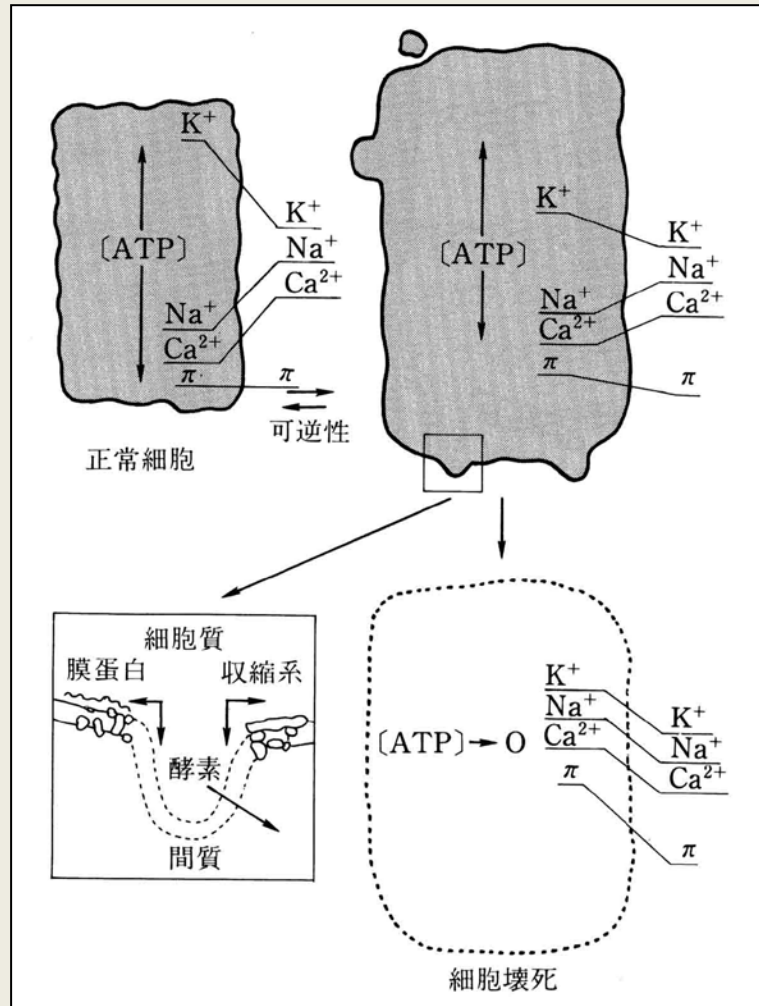
➤ 合成酵素

コリンエステラーゼ、LCAT

血清酵素活性の変動に影響を与える因子

1. 組織・臓器における酵素の分布、含有量
2. 酵素の組織内、細胞内局在
3. 傷害組織からの酵素の逸脱
4. 細胞膜透過性の亢進
5. 酵素生合成の亢進
6. 組織から血中への酵素の移行
7. 循環系（血清）からの酵素の消失

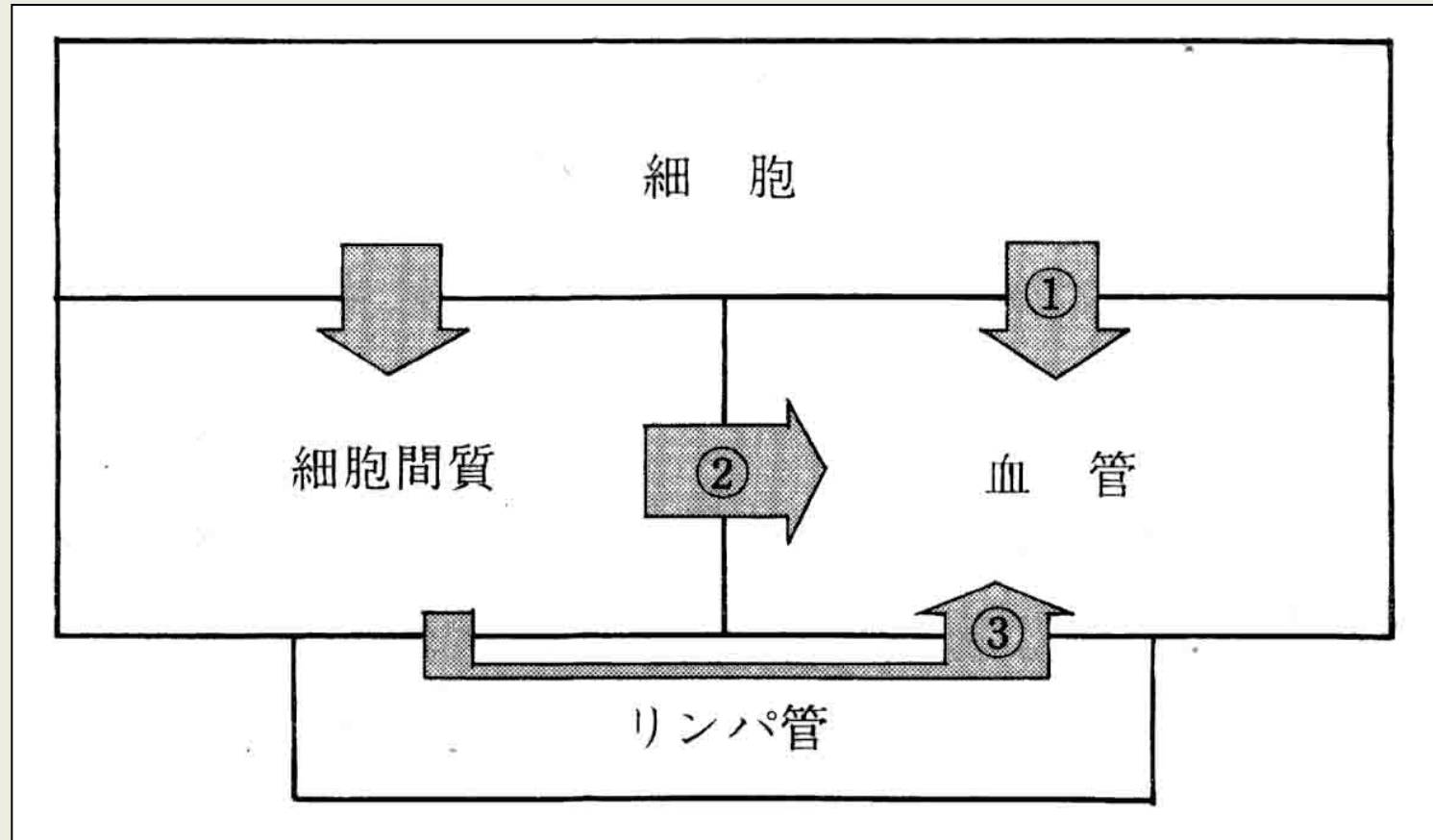
酵素の逸脱機序



1. エネルギー代謝障害
2. 細胞内エネルギーレベル (ATP量) の減少
3. ATP-イオンポンプの機能低下
4. 細胞内外イオン差の低下
5. 細胞の膨化
6. 細胞の一部が囊状に突出
7. フィラメントが伸長し小孔があく
8. 分子量の小さいものの逸脱
9. 膜の透過性の亢進

• 必ずしも細胞膜が損傷される必要はない

酵素の臓器から血中への移行形式



主要な酵素のヒト臓器内分布

	AST (GOT)	ALT (GPT)	LD	CK
肝 臓	142,000	44,000	7,300	94
腎 臓	91,000	1,900	9,900	480
心 臓	156,000	7,000	21,400	6,200
脳	33,000	2,800	8,900	2,100
骨格筋	99,000	4,800	9,900	27,000
脾 臓	14,000	1,200	4,700	30
血 清	20	16	290	70

血清酵素活性測定のご案内

-日本臨床化学会-

- 酵素活性は測定条件（温度、pH、緩衝液、基質など）により著しく異なる
- 施設間のデータの互換性が乏しい検査項目の代表であった
- 測定条件を一定（最適）にした条件の提示
 - 1989：AST(GOT)、ALT(GPT)、クレアチンキナーゼ、アルカリホスファターゼ、乳酸デヒドロゲナーゼ
 - 1994： γ -GT
 - 2003：コリンエステラーゼ

酵素活性による損傷臓器の推測

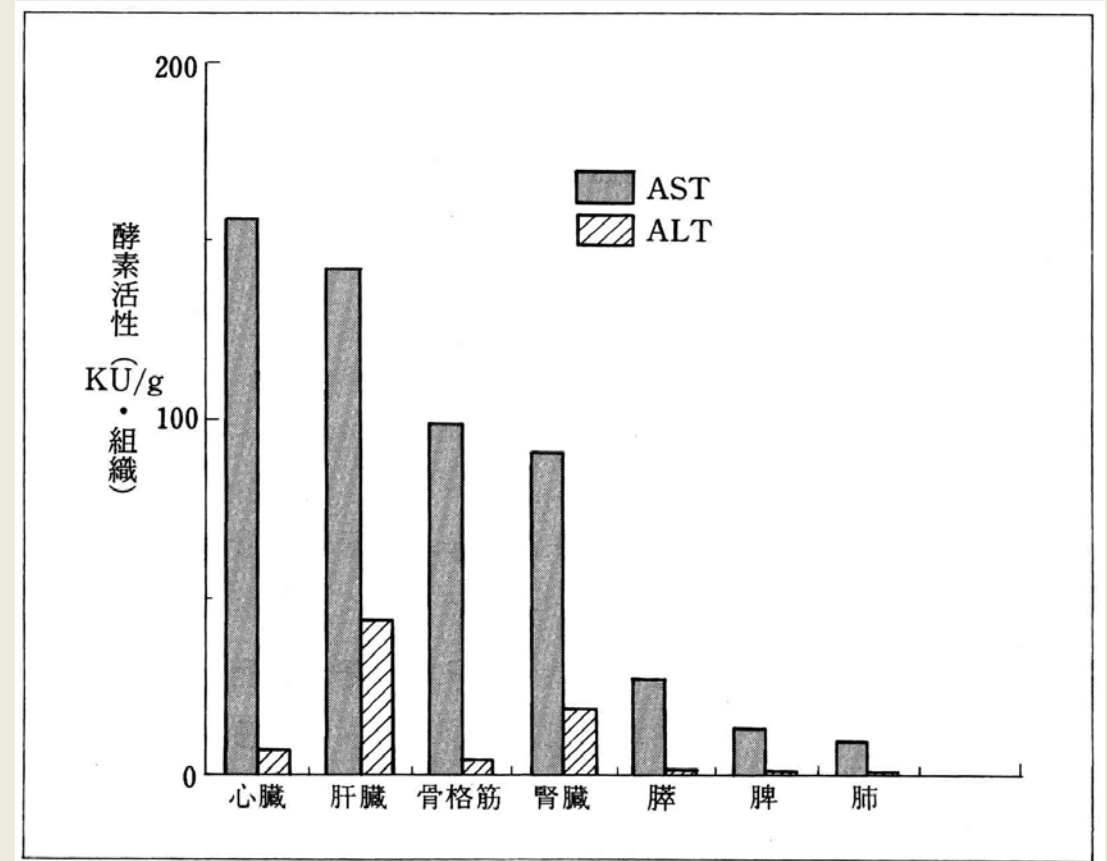
- 肝臓： AST、ALT、LD、ALP、 γ -GT、ChE、LCAT、LAP
- 心臓： AST、LDH、CK
- 膵臓： アミラーゼ、リパーゼ、エラスターゼ
- 前立腺： 酸性ホスファターゼ

主な肝酵素の細胞内分布

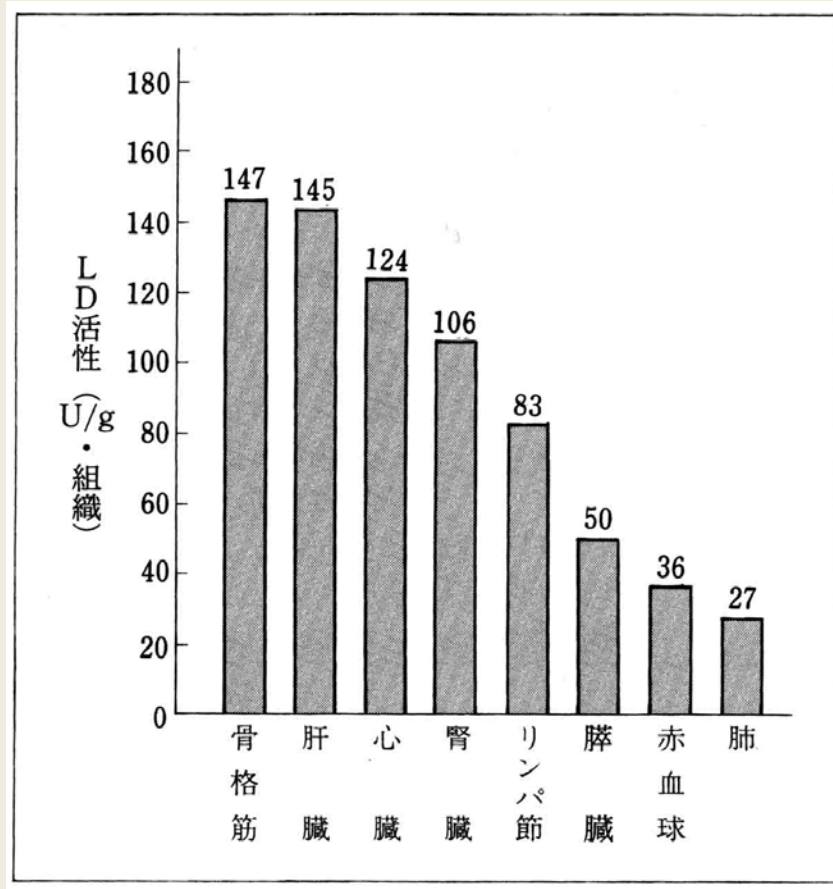
細胞質上清分画	細胞内小器官	細胞膜（結合）
AST (GOT) ALT (GPT) LD LAP (γ -GT)	mAST GLDH OCT	ALP γ -GT アリルアミダーゼ

ASTとALTの臓器別分布

- AST
 - ほとんどの臓器に存在
 - 心、肝、骨格筋疾患の診断に有効
 - mASTは重症の指標
- ALT
 - 肝臓に特異的に存在
 - 肝障害の診断指標
- AST/ALT
 - 傷害臓器の推定に有効
 - 肝疾患の病態解析に有用



LDの臓器別分布とアイソザイム



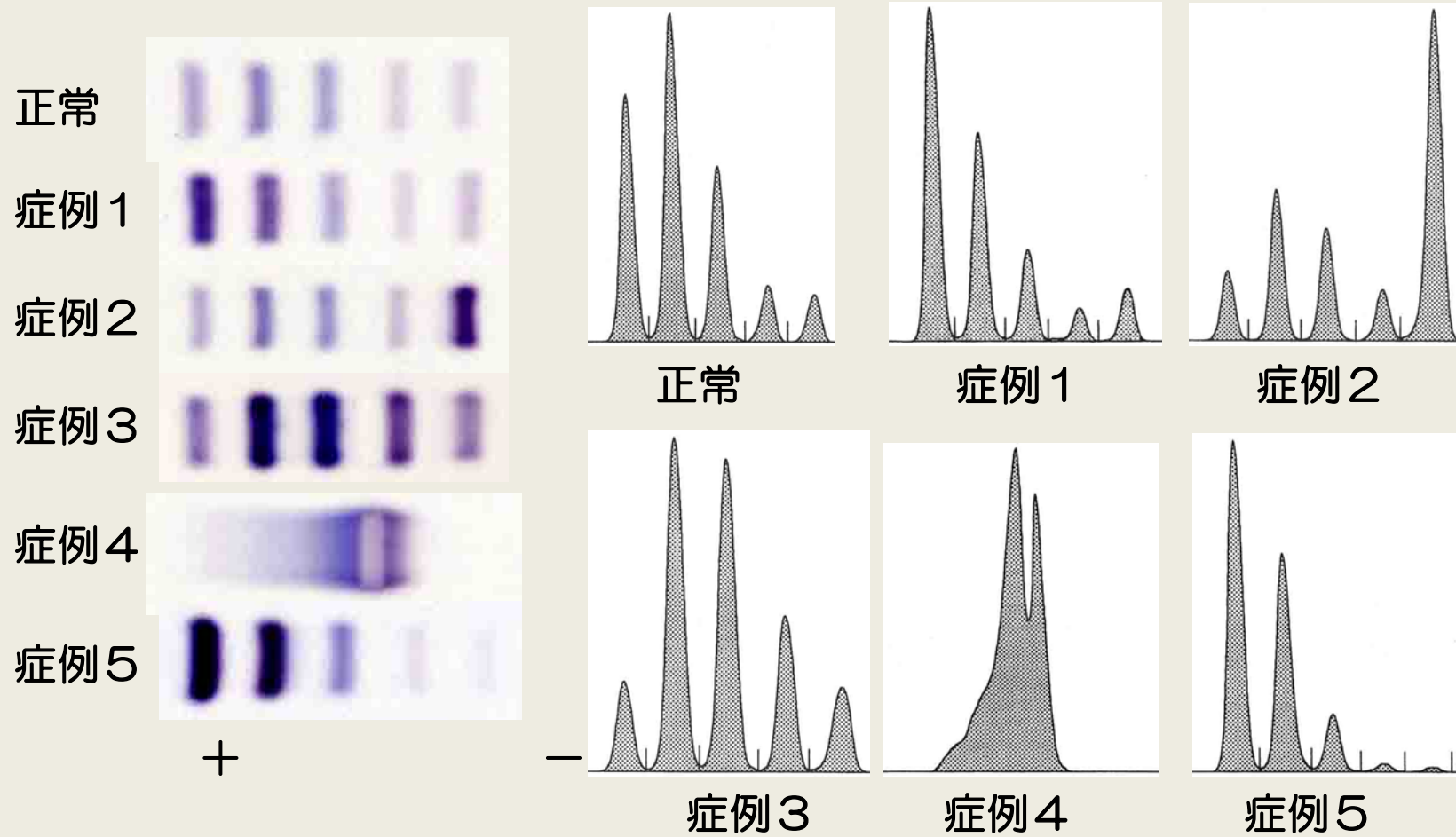
	LD ₁ (H ₄)	LD ₂ (H ₃ M ₁)	LD ₃ (H ₂ M ₂)	LD ₄ (H ₁ M ₃)	LD ₅ (M ₄)
	%	%	%	%	%
血清	19.5~28.5	27.5~34.5	20.0~26.0	9.0~14.5	5.5~14.0
赤血球	39~46	36~56	11~15	4~5	2
心筋	35~70	28~45	2~16	0~6	0~5
肝臓	0~8	2~10	3~33	6~27	30~85
骨格筋	1~10	4~18	8~38	9~36	40~97

- ほとんど全ての細胞・臓器に存在
- アイソザイム分析が病態解析に有用
 - 心筋梗塞：LD1>2
 - 肝疾患：LDH5の増加
 - LDH3を中心に増加：悪性パターン

LDHアイソザイムとLDH/ASTによる病態解析

LDHアイソパターン	上昇アイソ	LD/AST	代表的疾患
○1,2型優位	$1 \geq 2$	5前後 20~40 15~∞	心筋梗塞 溶血性貧血 腫瘍（セミノーマなど）
	$1 < 2$	5~20	2,3型からの移行 （慢性非活動期）
○2,3,4型優位	$2 > 3$	5~15 10~20	筋ジス、多発性筋炎 膠原病、ウィルス感染症
	$2 < 3 > 4$	15~∞	白血病、リンパ腫 肺癌、胃癌
○5型優位	$4 < 5$	~5	急性肝炎、肝癌
		5~10	急性筋崩壊
		10~20	腫瘍（前立腺癌など）

LDダイモグラム



LD異常パターンの検索

○血液学的検査

- RBC : $374 \times 10^4 / \mu\text{L}$
- Hb : 11.2g/dL
- Ht : 33.7%
- WBC : 5,100 / μL
- Plt : $18.4 \times 10^4 / \mu\text{L}$

○生化学的検査

- 総蛋白 : 7.5g/dL
- 総ビリルビン : 0.5mg/dL
- BUN : 13.5mg/dL
- クレアチニン : 0.7mg/dL
- AST : 18U/L
- ALT : 10U/L
- LDH : 512U/L (105~220)
- ALP : 267U/L (100~350)
- 総コレステロール : 180mg/dL

免疫向流法による検索

対象

患者

抗ヒト全血清

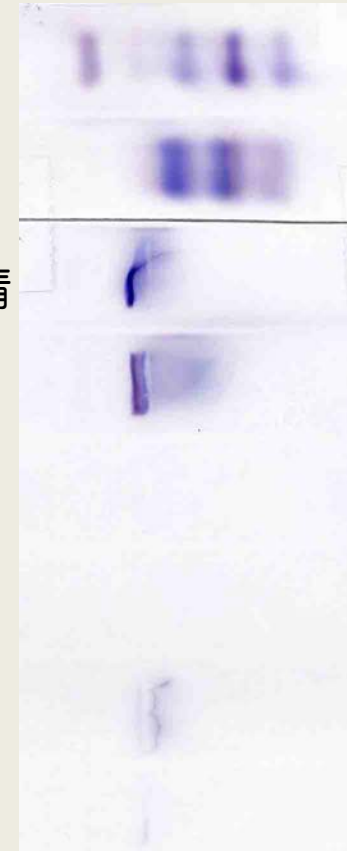
抗IgG

抗IgA

抗IgM

抗 κ

抗 λ



(-)

(+)

アルカリホスファターゼ(ALP)

- リン酸モノエステルを加水分解する酵素のうち、アルカリ側（pH9.8付近）に活性を示すもの
- 年齢による変動が最も激しい酵素であり、骨の成長する小児期には成人の2.5～4倍の高値で20歳前後で成人値となる
- 妊娠では胎盤由来のALPが上昇する。このALPは耐熱性であり、分娩時には成人の2～3倍となり、分娩後数週間で妊娠前値に復する。
- ABO式血液型と関連しており、OおよびB型の分泌型ではAおよびAB型と比較して約10%高値である。これは小腸由来のALPが血中増加するためである。
- ALPは活性中心に Zn^{2+} をもつ金属酵素で、 Mg^{2+} を賦活剤とするため、脱 Ca^{2+} 作用による抗凝固剤での血漿を試料とすると活性は著しく低下し、OU/l近くなる。

ALPアイソザイム

性状\アイソザイム	ALP1	ALP2	ALP3	ALP4	ALP5	ALP6
分子量 (kDa)	>5000	160	160	120~ 140	140	>320
neuraminidase感受性	+	+	+	+	-	+
免疫性	肝性	肝性	肝性(骨 性)	胎盤性	小腸性	?
耐熱性 (56°C5分、残存)	70	40	20	100	30	?
阻害剤 (Phe)	10	10	10	70	80	?
阻害剤 (Leu)	0	0	0	5	10	?
阻害剤 (Homoarg)	60	60	60	15	20	?

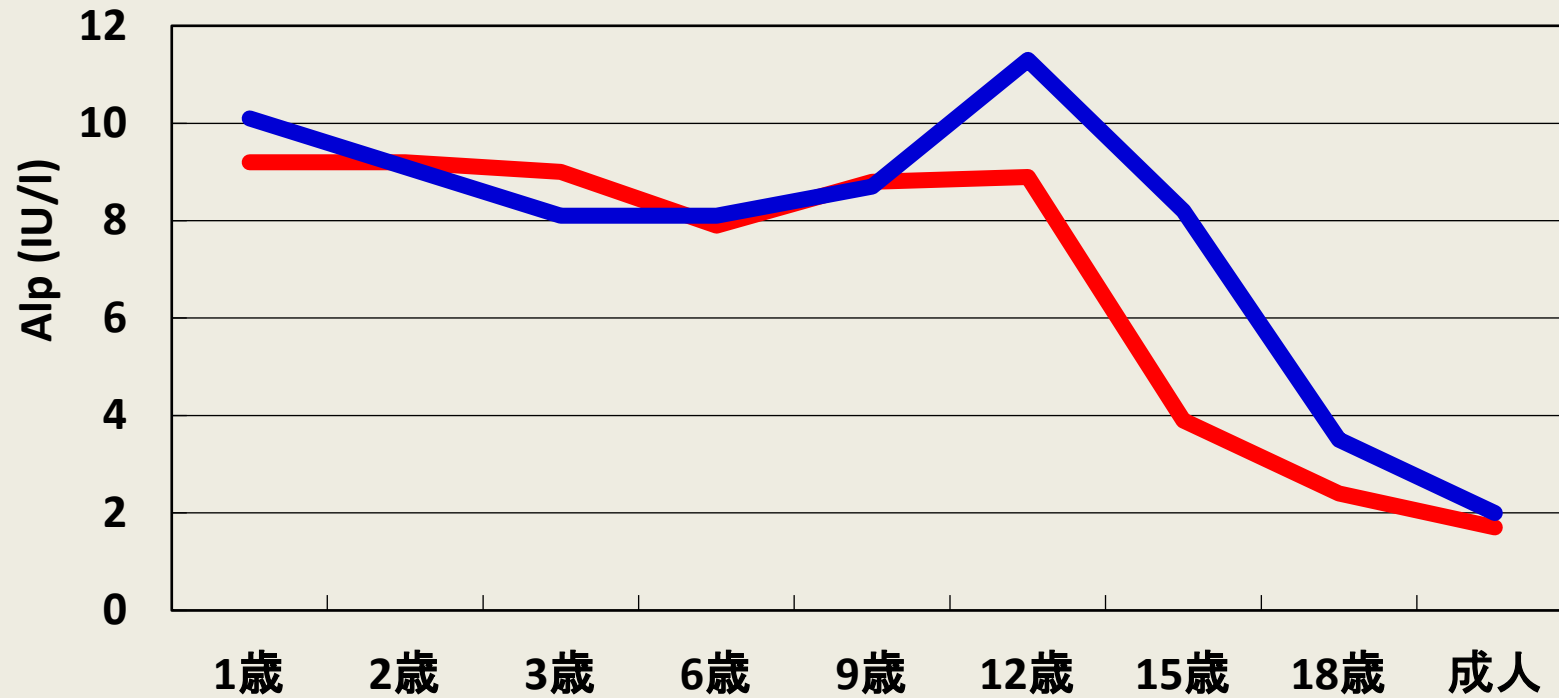
ALPアイソザイムの臨床的意義

アイソザイム	上昇する病態・疾患
ALP1	肝癌型（肝癌、肝硬変） 膜結合型（閉塞性黄疸、肝炎など）
ALP2	肝胆道疾患（肝炎、肝硬変、胆管癌、肝癌など）
ALP3	骨疾患（副甲状腺機能亢進症、くる病、骨肉腫など）
ALP4	妊娠後期、癌（肺癌、膵癌など）
ALP5	血液型O型またはB型の分泌型、肝硬変
ALP6	潰瘍性大腸炎、肝硬変、自己免疫疾患

ALPの年齢による推移

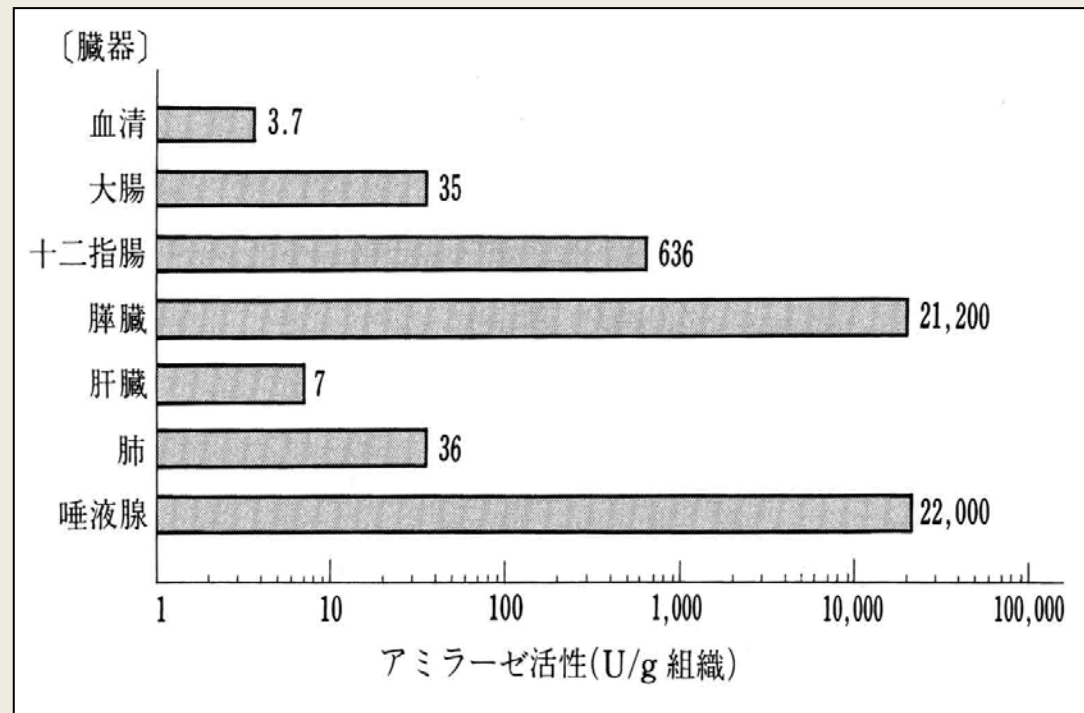
Alpの推移

—女子 —男子



アミラーゼの臓器別分布

- 膵疾患の診断に有用
- 尿中へ排泄される
- マクロアミラーゼでは尿中/
血中活性乖離
- 唾液型は卵巣、消化管、肺
疾患で上昇することもある



クレアチンキナーゼ(CK)

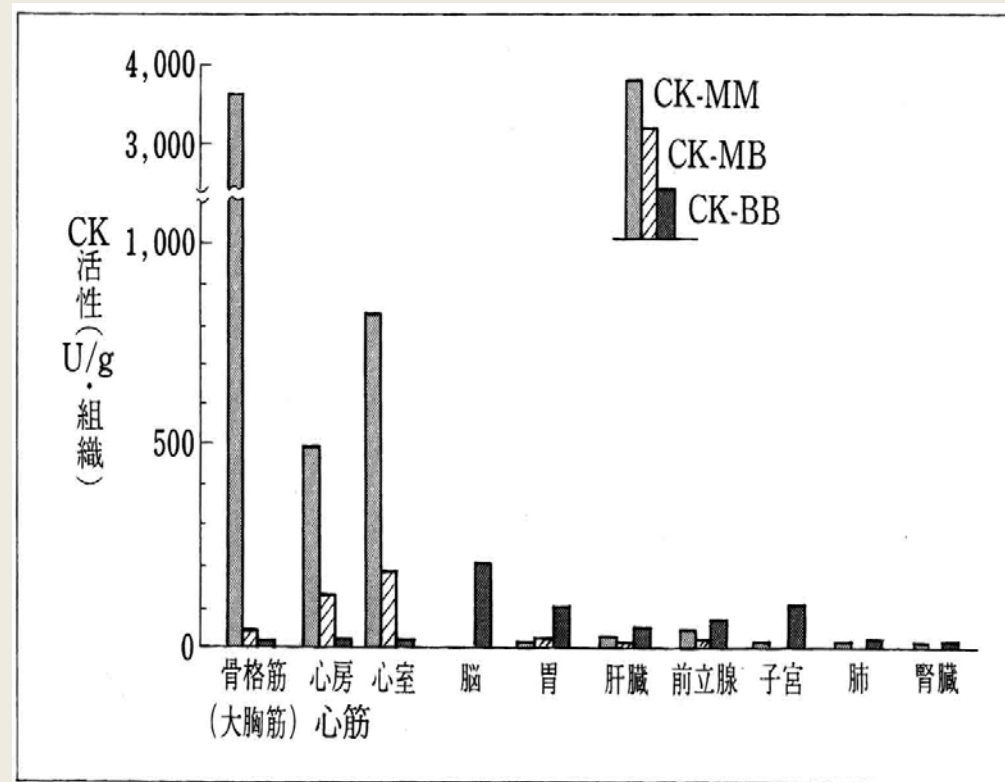
- クレアチンとクレアチンリン酸との間のリン酸の転移に関与する転移酵素で、高エネルギーリン酸であるATPを介して、筋肉の収縮時のエネルギー代謝上重要な役割を果たしている。
- CKはM (muscle) とB (brain) の2つのサブユニットからなる2量体であり、分子量は約82kDaである。
- サブユニットのランダムハイブリッドよりCK-MM、-MBおよびCK-BBの3つのアイソザイムが存在し、CK-MMは骨格筋に、CK-BBは脳に多量に存在し、CK-MBは心筋に高濃度存在する。
- 細胞質内にCK-BB、-MB、およびCK-MMが存在し、ミトコンドリアに存在するミトコンドリアCKは重症例で出現する

クレアチンキナーゼ(CK)

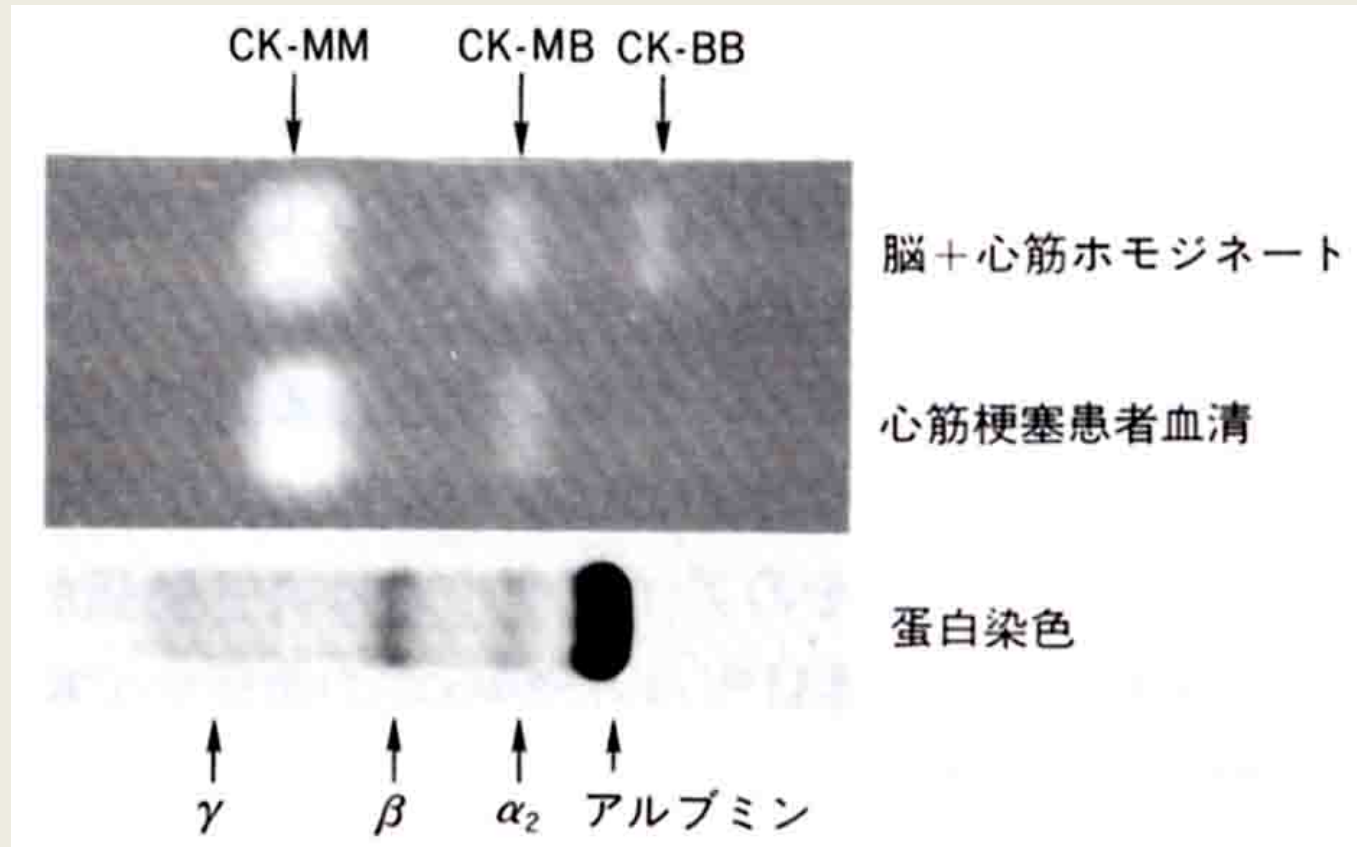
- クレアチンリン酸とADPからクレアチンとATPを生成する酵素で、ATPによるエネルギー供給に関与し、骨格筋、心筋、平滑筋、脳に分布している
- 3つのアイソザイムが存在
 - CK-MM：骨格筋に多量に存在
 - CK-MB：心筋に多量に存在⇒**心筋梗塞のマーカー**
 - CK-BB：脳、平滑筋に存在
- 臨床的有用性
 - 骨格筋疾患：筋ジストロフィ症、多発性筋炎、横紋筋融解症、甲状腺機能低下症
 - 心疾患：急性冠症候群、急性心筋炎
- ピットフォール
 - 筋肉内注射や筋肉運動で上昇する

CKアイソザイムの臓器別分布

- 心疾患、骨格筋疾患の診断に有用
- アイソザイム分析
 - ✓ CK-MB：心筋梗塞
 - ✓ CK-BB：腺癌
 - ✓ CK-MM：骨格筋疾患
 - ✓ マクロアミラーゼ
 - ✓ mCK：重症度判定

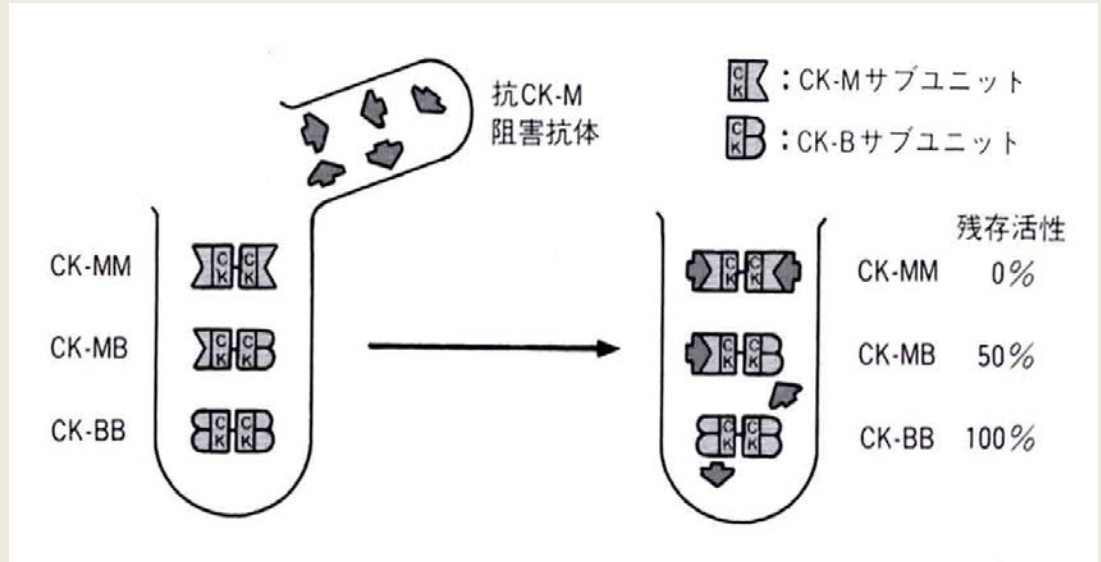


CKザイモグラム



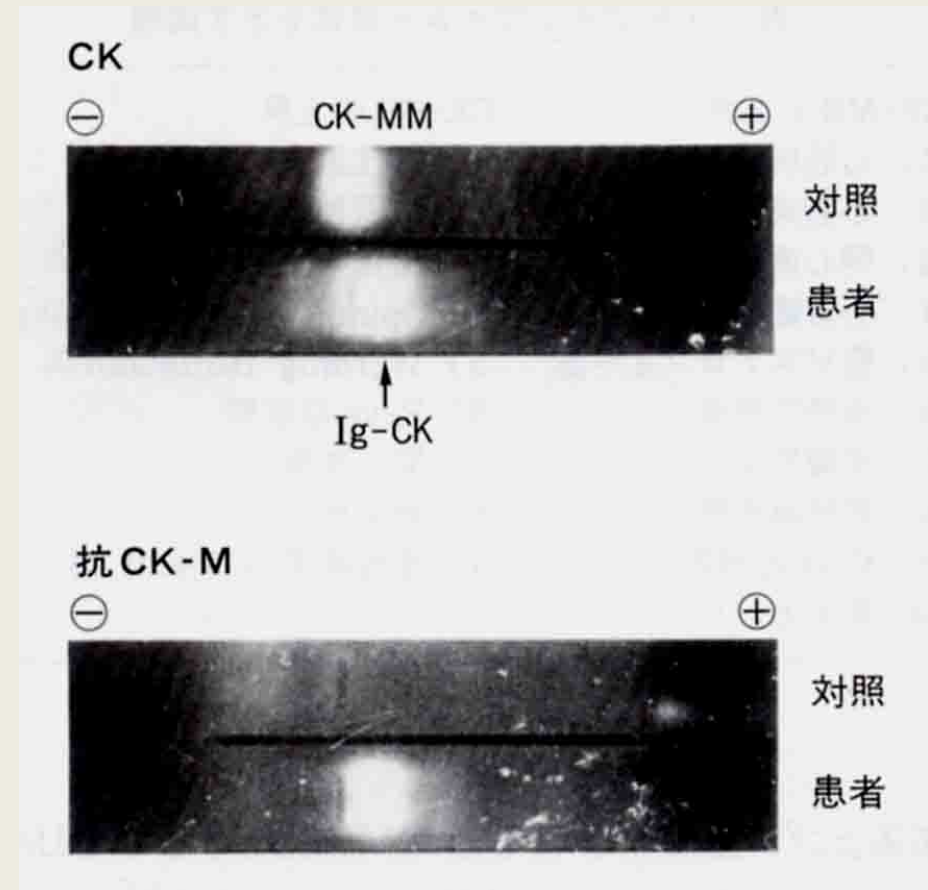
CKアイソザイムの免疫阻害法

- 抗CK-Mサブユニット抗体によりCK-M活性を阻害して、CK-B活性を測定する
- CK-BBは稀にしか存在しないため、残存活性を2倍してCK-MB活性とする



異常CKザイモグラム

- CK-MMの陽極側にCK活性が認められる
- このバンドは抗CK-M抗体で活性が阻害されない→CK-MM、-MBではない

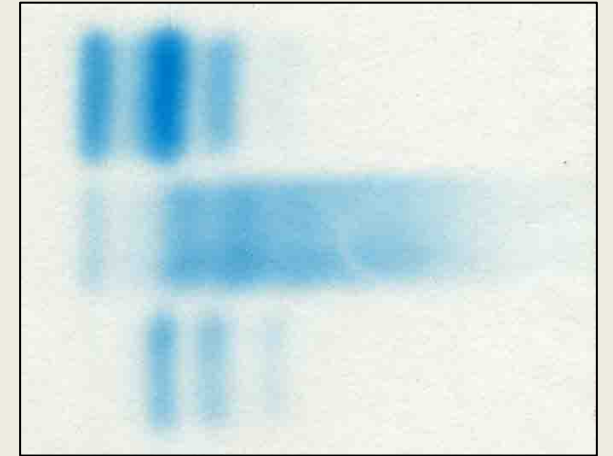
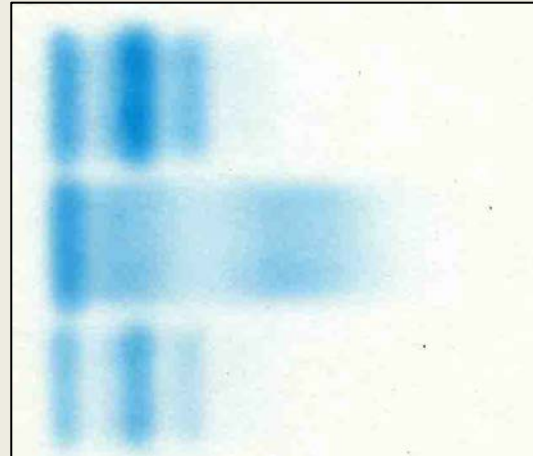
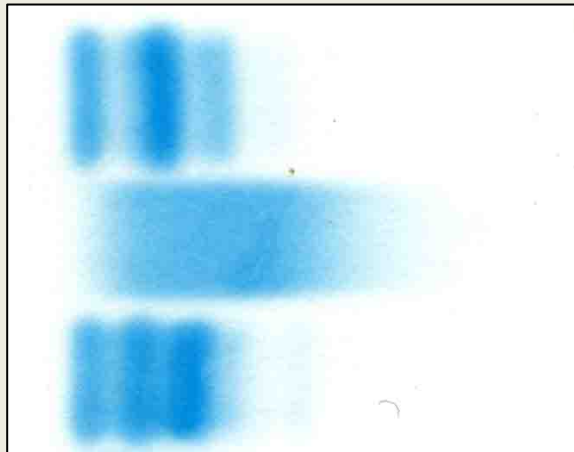


アミラーゼ

- 消化酵素（ジアスターゼの別称）で、澱粉、多糖類の α 1,4結合を加水分解し、ヒトでは α アミラーゼである
- 2つのアイソザイムが存在
 - S型アミラーゼ：唾液腺、小腸・消化管に存在する
 - P型アミラーゼ：膵臓に存在する
- 臨床的有用性
 - 膵疾患：急性膵炎、慢性膵炎、その他の膵疾患
 - 唾液腺/腹部腸管疾患：急性耳下腺炎、卵巣疾患、腹部手術
- ピットフォール
 - 小児では膵臓が未成熟で、低値であり、5～10歳で成人値
 - 尿中に存在排泄されるが、P型の方が低分子であるので、尿中ではP型優位
 - 免疫グロブリンが結合したマクロアミラーゼでは尿中に排泄されないため、血中活性が高値になる

異常アミラーゼアイソザイム

膵液
患者血清
唾液

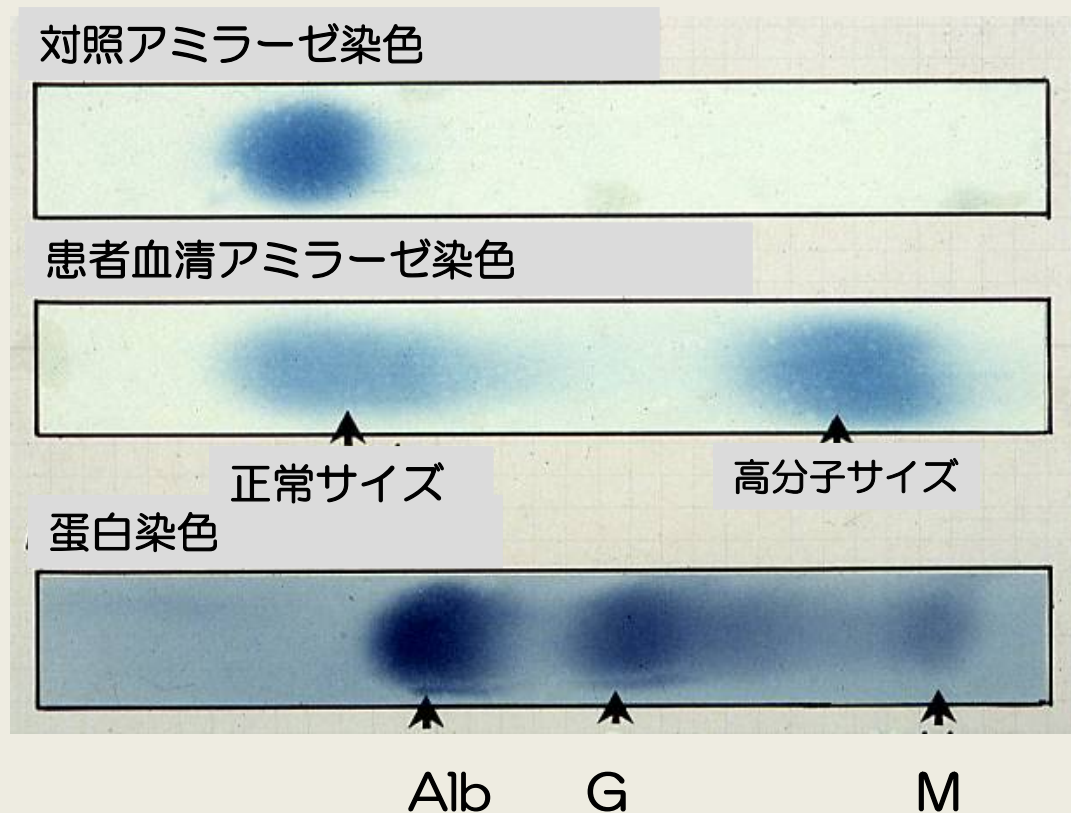
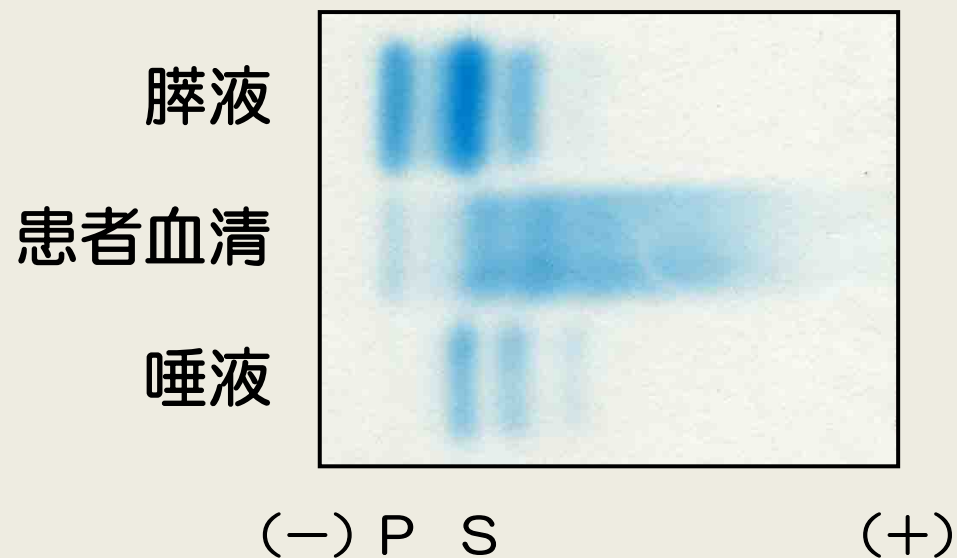


56歳の男性:

血清アミラーゼ: 536U/L、尿中アミラーゼ: 68U/L

アミラーゼアイソザイム

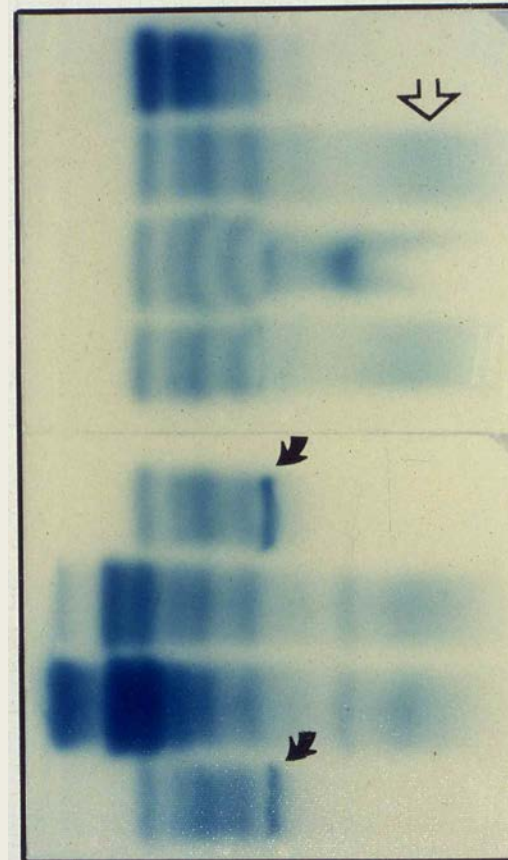
薄層ゲル濾過像



高分子アミラーゼの本態の検索

結合免疫グロブリンの検索: 向流免疫電気泳動法

対照血清
患者血清
抗ヒト全血清
抗IgG
抗IgA
抗IgM
抗L鎖κ
抗L鎖λ

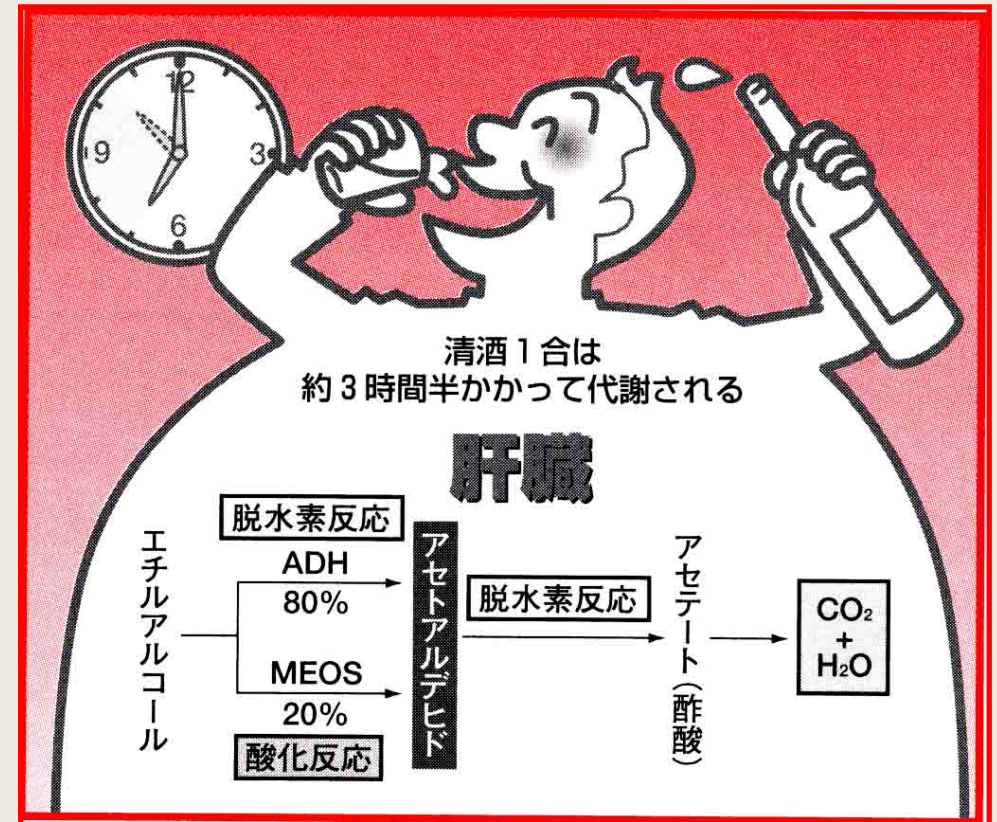


γ -GT (γ -glutamyl transferase)

- 従来は γ -glutamyl transpeptidase (γ -GTP) と呼ばれた
- γ -glutamyl基を他のペプチドやアミノ酸に転移する
- 腎、膵、肝、脾、小腸、脳、心筋に存在する
- 肝では膜結合型としてマイクロソーム分画に局在する
- 閉塞性肝障害では逆流性と酵素誘導により上昇する
- アルコール性肝障害では著明に上昇し、一度上昇した γ -GTは10~20日の禁酒で活性値は約1/2になる

肝臓のアルコール代謝のメカニズム

- アセトアルデヒドが蓄積すると顔面紅潮や悪心・嘔吐、動悸などが出現
- 日本人はアルデヒド脱水素酵素が欠損するのでアルコールに弱い



コリンエステラーゼ

- コリンエステルをコリンと有機酸とに分解する加水分解酵素
- 生理的機能、体内分布、酵素学的性状より2種類が存在
 - アセチルコリンエステラーゼ（系統名；acetylcholine hydrolase、別名真性コリンエステラーゼ）：アセチルコリンに作用して酢酸とコリンとに分解する。神経組織、赤血球に存在して中枢神経系、神経・筋刺激伝達系に関与している
 - コリンエステラーゼ（系統名；acylcholine acylhydrolase、別名偽性コリンエステラーゼ）：ベンゾイルコリン、ブチリルコリンなどのアシルコリン類に作用し、有機酸とコリンとに分解する。肝臓で合成され、血中に遊離されている。生理作用は明らかでないが、神経、筋肉系および脂質代謝に関与していると考えられている。臨床検査で測定されている

コリンエステラーゼ

- 偽性コリンエステラーゼは電気泳動で4つに分かれるが、これは分子量の多寡によるもので、一番小さいC₁は85KDaで、最も大きいC₄は345KDaである。
- ピットフォール
 - 有機リン剤で阻害されるため、検査室内で有機リン系の殺虫剤を撒布する場合には著明に低値となる。
 - フッ素や塩素などのハロゲン属金属により阻害されるため、これらの入った試験管（NaF）やNaClでの希釈では低値となる。
- 臨床的意義
 - 上昇：脂肪肝、ネフローゼ症候群、家族性異常症（C5）
 - 低下：肝硬変、肝癌、有機リン剤中毒、遺伝性異常症

酸性ホスファターゼ(ACP)

- 酸性条件下でリン酸モノエステルを加水分解する酵素
- 前立腺に極めて多量に存在する他、赤血球、骨、血小板、白血球、腎臓、肝臓など多くの臓器に広く存在
- 酵素として多様性を示し、電気泳動法では通常5分画に分離され、臨床上重要なのは前立腺由来と血小板由来のACPである
- ピットフォール
 - 血液凝固の際に血小板からACPが遊出するために、血清の方が血漿より高値
 - 赤血球中には血清に比較して約100倍も高濃度のACP活性があるため、溶血検体では高値
 - 前立腺ACPは酒石酸で阻害され、加熱に弱い

マクロアミラーゼ血症のアミラーゼについて正しいのはどれか。

1. S型が重合したもの
2. P型が重合したもの
3. アルブミンが結合したもの
4. S型とP型が結合したもの
5. 免疫グロブリンが結合したもの

LDアイソザイムのうち急性心筋梗塞で最も上昇するアイソザイムについて正しいのはどれか。

1. 血中半減期が最も長い。
2. 急性肝炎でも最も上昇する。
3. 4℃保存で最も不安定である。
4. Mサブユニットの4量体である。
5. 電気泳動で最も陰極側に泳動される。

上昇するアイソザイムと疾患の組合せ
で正しいのはどれか。

1. ALP1 ----- 閉塞性黄疸
2. ALP2 ----- 悪性腫瘍の骨転移
3. ALP3 ----- 肝硬変
4. ALP4 ----- 腎不全
5. ALP5 ----- 潰瘍性大腸炎

ASTのホロ化に必要なのはどれか。

1. NADH
2. マグネシウム
3. L-アスパラギン酸
4. 2-オキシグルタル酸
5. ピリドキサルリン酸

CK-MBが著しく上昇するのはどれか。

1. 心筋炎
2. 皮膚筋炎
3. 重症筋無力症
4. 筋萎縮性側索硬化症
5. Duchenne型筋ジストロフィ症

血清コリンエステラーゼのフルオライド
阻害率測定に用いられるのはどれか。

1. NaF
2. エゼリン
3. ジブカイン
4. パラチオン
5. サクシニルコリン

血清コリンエステラーゼ活性が異常に低値の場合には、異型コリンエステラーゼを疑って検索する。
1.NaFを用いるフルオライド阻害率と3.ジブカインを用いるジブカイン阻害率を測定する
2.エゼリンと4.パラチオンは阻害剤であり、5.サクシニルコリンは筋弛緩薬で、コリンエステラーゼにより分解される。異型コリンエステラーゼではこれが分解されないために、筋弛緩が長時間持続して、危機的状況になる