

先天性代謝異常症の発症予防に関する開発的研究

8・1 Hypophosphatasia の Alkaline phosphatase  
の生化学的，免疫学的検討

日本大学医学部小児科

北川 照 男

崎 山 武 志

研 究 目 的

Hypophosphatasia は血清と組織のアルカリフォスファターゼ (Al-p) の活性低下を伴い，発病が早い程臨床症状も重篤で，胎内で発症した場合は死産が多く，骨形成不全も著しい。現在まで，本症の病因は不明であり，本症の病態と Al-p とに関する研究も多くはない。また本症で致死的経過をとる型は，出生前診断の適応と云われる。しかし，本症での羊水及び培養線維芽細胞の Al-p 活性が必ずしも病型と平行しないと云われ，出生前診断の確定した基準はない。この為，羊水および組織の Al-p を詳細に比較検討する必要がある。われわれは，正常の満期胎盤および肝から Al-p を精製し，各々に対する抗体を作成したので，妊娠38週で死産した胎児例の肝と，出生前に得られた羊水の Al-p を免疫化学的に研究した。

研 究 方 法

Hypophosphatasia の Al-p を詳細に検討する為，ヒト胎盤10コより胎盤性 Al-p を，ブタノール処理，アセトン沈澱法，DEAE cellulose, Con A Sepharase, Bio-Gel, Sephadex NG 200 等の手技を用いて精製した。同時にヒト肝 Al-p についても同様の方法で精製を行った。この精製 Al-p を家兎に注射し，胎盤型ならびに肝型 Al-p の抗体を作成した。なお，胎盤および肝から精製した Al-p はポリアクリルアミドゲルでの電気泳

動法で、単一の band を示し、胎盤  $A\ell-p$  は肝  $A\ell-p$  より比活性は高いが、両者共約 4000 倍に精製されており、その抗血清の抗体価も高く、 $0.1 \sim 0.2 \mu\ell$  を添加することにより、酵素と抗体の複合物の沈澱を生じた。

研究対象は、38 週で死産した hypophosphatasia の胎児の肝と患児の妊娠中に摂取した羊水ならびに正常対照の肝および羊水である。 $A\ell-p$  活性は、 $p$ -nitrophenyl phosphate を基質とし、2 amino 2 methyl-1-propanol pH 10.5. 0.3 M を緩衝液として使用し、酵素液と  $37^\circ\text{C}$  10 分で反応させ、生成された  $P$ -nitrophenol を比色して測定した。また 4MU-phosphate や G6P も基質として用いた。酵素の物理化学的性状については、 $\ell$ -phenylalanine (10mM) と  $\ell$ -homoarginine (20mM) の阻害作用を検討すると共に、0.1 M Tris-HCl buffer pH 7.4 で  $56^\circ\text{C}$  の熱処理を行い、経時的な  $A\ell-p$  活性の変化を検討した。また、患児と対照の羊水及び肝  $A\ell-p$  を 0.1 M Tris HCl (pH 7.4)  $1 \text{ mg}/\text{ml}$  牛血清アルブミン添加のもとで抗ヒト  $A\ell-p$ 、家兎血清と共に、 $37^\circ\text{C}$  2 時間 incubate し、 $4^\circ\text{C}$  で冷却後、この酵素抗体反応物を抗家兎羊  $\gamma$ -グロブリン血清と反応させ、遠沈後に上清の  $A\ell-p$  活性を前記の PNP を基質として測定した<sup>2)</sup>。

### 研 究 成 績

胎児が hypophosphatasia の羊水の  $A\ell-p$  活性は対照の羊水のそれに比べて低く、特に acid phosphatase との比をとると、その値は著しく低かった。hypophosphatasia の胎児の肝  $A\ell-p$  も正常対照の約  $1/20$  と低かったが、同時に測定した胎盤  $A\ell-p$  活性は、患児のものと対照との間で差を認めなかった。4MU phosphate, G6P を基質とした場合も、PNP を基質とした時と同様に、患児の肝の  $A\ell-p$  活性は対照の  $1/10$  以下であった。アミノ酸による阻害実験では、羊水の  $A\ell-p$  は対照に比べて  $\ell$ -phenylalanine による阻害が弱く、肝の  $A\ell-p$  は  $\ell$ -homoarginine による阻害が対照に比べて弱い傾向が認められた。また熱安定性については、患児の羊水及び肝  $A\ell-p$  は何れも対照に比べて耐熱性であった。

胎児が hypophosphatasia の羊水の  $A\ell-p$  とヒト  $A\ell-p$  家兎血清との反応は、正常対照のそれとの反応に差はなく、胎盤  $A\ell-p$  抗体で殆んど完全

に沈澱反応を起した。一方、対照と同様に hypophosphatasia の肝 A $\ell$ -p と胎盤 A $\ell$ -p 抗体とは殆んど反応しなかったが、肝 A $\ell$ -p 抗体とは 75% まで反応し、対照のように 100% 反応する成績は得られなかった。

### 考 按

Hypophosphatasia は、A $\ell$ -p 活性の著しい低下を認める疾患であるが、その本態は不明である。胎児期に診断した致死例を経験し、羊水及び胎児の肝 A $\ell$ -p について検討した結果、対照と比べて熱に比較的安定で、アミノ酸の阻害度も対照とやゝ異なる知見を得た。胎児が hypophosphatasia の場合、羊水の A $\ell$ -p にこのような酵素学的な異常があるならば、これを利用して本症の出生前診断を行なうことができると考える。また精製した胎盤及び肝 A $\ell$ -p の抗体を使用した研究によれば、胎児が hypophosphatasia でもその羊水の A $\ell$ -p は同様に胎盤性であったが、患児の肝 A $\ell$ -p は肝 A $\ell$ -p 抗体との間に 75% 程度の沈澱を示し、対照のように 100% の沈澱は示さなかった。しかし、胎盤 A $\ell$ -p 抗体とは反応しなかった。このように、本症の肝 A $\ell$ -p は抗血清に対して正常肝の A $\ell$ -p とはやゝ異なる態度を示し、また酵素学的な性質も異なる可能性があり、今後はより詳細にその性状を検討する予定である。

### ま と め

致死的な Hypophosphatasia の胎児の羊水、肝 A $\ell$ -p を精製肝および胎盤 A $\ell$ -p 抗体を使用して研究した結果、本症の肝 A $\ell$ -p がヒト肝 A $\ell$ -p 抗体と完全に酵素抗体反応を起こさないのを認めた。また、対照の肝 A $\ell$ -p と比較すると患児の肝 A $\ell$ -p は耐熱性やアミノ酸阻害についての性質において差異のあるのを認めた。この点を利用すれば、本症を出生前診断することが出来ると考えられる。

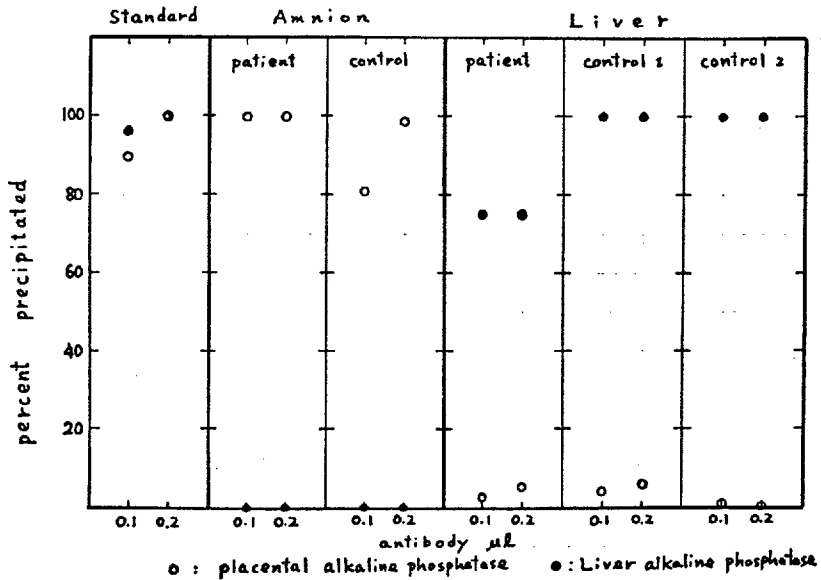
### 文 献

1. Mulivor, R.A. et al. : Am. J. Hum. Genet. 30; 271, 1978.
2. Sakiyama, T. et al. : J. Biol. Chem. 254; 935, 1979.

表 1. Term Placental Alkaline Phosphatase Purification

step	volume ml	activity PNP mmol/min	protein mg	specific act. PNP $\mu$ mol/min/mg prot	yield %
whole homogenate	8000	103.1	720,000	0.14	100
butanol extracts	3850	82.7	25,064	3.3	80
acetone precipit.	282	72.7	8,920	8.14	71
1st DEAE	385	38.3	323	118.4	37
con A sepharo.	370	25.3	115	220.5	25
2nd DEAE	60	22.6	72	312.0	22
Bio Gel A-05m	3.6	15.2	28	537.2	15
sephadex N6200	2.2	12.7	21	587.6	12

図 1. Hypophosphatasia 胎児の肝および羊水 Alkaline phosphatase の抗血清に対する反応性

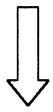


205



## 検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



### 研究目的

Hypophosphatasia は血清と組織のアルカリフォスファターゼ(Al-p)の活性低下を伴い、発病が早い程臨床症状も重篤で、胎内で発症した場合は死産が多く、骨形成不全も著しい。現在まで、本症の病因は不明であり、本症の病態とAl-p に関する研究も多くはない。また本症で致死経過をとる型は、出生前診断の適応と云われる。しかし、本症での羊水及び培養線維芽細胞のAl-p 活性が必ずしも病型と平行しないと云われ、出生前診断の確定した基準はない<sup>1)</sup>。この為、羊水および組織のAl-p を詳細に比較検討する必要がある。われわれは、正常の満期胎盤および肝からAl-p を精製し、各々に対する抗体を作成したので、妊娠38週で死産した胎児例の肝と、出生前に得られた羊水のAl-p を免疫化学的に研究した。