

医療機関から依頼された マクロエンザイム検出結果の集計 ーマクロアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼを中心にー

Total results of macro enzymes requested by medical institutes
ーFocusing on macro aspartate aminotransferaseー

安彦 裕実^{*1}、村尾 咲音^{*1}、松川 典子^{*1}、中野 恵一^{*2}、森山 隆則^{*1}

Hiroimi Abiko, Sato Murao, Noriko Matsukawa, Keiichi Nakano,
Takanori Moriyama

キーワード：マクロエンザイム、マクロアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（マクロAST）、マクロクレアチンキナーゼ（マクロCK）、マクロアミラーゼ

Key words : Macro enzymes, macro aspartate aminotransferase, macro creatine kinase, macro amylase

要旨

我々は、全国からよせられたマクロエンザイム、とりわけマクロアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（マクロAST）の依頼検体28検体を対象に、アイソザイム電気泳動を実施し結合免疫グロブリンの解析を実施した。内、マクロAST解析依頼は24件であった。その結果、IgG型マクロASTが12例（内母子例2例を含む）およびIgA型マクロASTが1例同定された。残りのマクロASTの依頼のあった11例については陰性であった。矛盾する高AST血症の中に依然としてマクロASTの存在があるものの、他の要因によるASTのみ高値例の存在についても示唆された。

*1 札幌保健医療大学保健医療学部栄養学科 Department of Nutrition, School of Health Sciences, Sapporo University of Health Sciences

*2 北海道大学病院検査・輸血部 Division of Laboratory and Transfusion Medicine, Hokkaido University Hospital

I. はじめに

我々は、これまで臨床検査の生化学部門においてピットホールとなっているマクロエンザイム（酵素・免疫グロブリン複合体）¹⁻³⁾の解析検討依頼を全国の医療機関から受けてきた。そこで今回、期間を区切ってその依頼検体を対象にした検出結果を集計したので報告する。

マクロエンザイムとは、血液中に存在する酵素と自己の免疫グロブリンが結合した高分子複合体である。血中酵素は、複合体を形成することで半減期が延長し、持続性の高活性を呈する¹⁻⁴⁾。そのため、臨床側は診断に苦慮し検査を繰り返し実施することになりかねない。本来であれば各病院の臨床検査室が対応すべきところではあるが、アイソザイム電気泳動自体が実施されなくなった現状から我々のような研究室に依頼されて来るものと理解される。ここでは、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）を中心として、アミラーゼおよびクレアチンキナーゼ（CK）なども含め、マクロエンザイムの検出結果について報告する。

II. 対象と方法

1. 対象

2015年12月～2020年3月までに依頼を受けた患者血清を対象とした。但し、血清検体は各医療施設の倫理規定に基づき、病態解析のため患者本人および未成年の場合は親の承諾が得られたものであり個人情報伏せた形で入手された。全ての患者検体は凍結状態で送られ解析まで同様に凍結保存された。

2. 方法

各種の酵素活性の検査値は、依頼元の施設のデータを利用した。マクロエンザイムの同定については、以下に示す各酵素のアイソザイム電気泳動において異常バンドを確認する

ことおよび免疫混合にて結合免疫グロブリンの同定を実施した。さらに一部の症例には、ゲル濾過法（Superose 12もしくはSuperose 6カラムクロマトグラフィー）により当該酵素の分子量を検討した³⁾。

1) アイソザイム電気泳動

ASTアイソザイム、アミラーゼアイソザイムおよびCKアイソザイム電気泳動については、いずれもセルロースアセテート膜（Titan III Lipo膜、ヘレナ研究所）を支持体として常法より実施された⁵⁾。各酵素のアイソザイムバンドの染色についてはASTについては自家調製試薬³⁾を用いその他はヘレナ社の製品を用いた。

2) 免疫混合法

結合免疫グロブリンの同定に際しては、最も高感度で検出可能な免疫混合法を採用した³⁾。抗ヒトIgG, IgA, IgM, L鎖κおよびλの各種抗血清は、医学生物学研究所の製品を使用した。免疫沈降物中の各酵素活性はアイソザイム電気泳動試薬で使用した製品を使用した。但し、マクロASTの同定に際しては、セロテック社の可溶性色素を用いた活性測定用キット（製造中止）に準じ作成した自家調製試薬を用いた。本試薬は、共役酵素としてオキサロ酢酸脱水素酵素、アラニンアミノトランスフェラーゼ、ピルビン酸オキシダーゼおよびペルオキシダーゼを用いたキノン色素発色系（555nm）である⁶⁾。

3) 解析依頼

解析の依頼は、電話もしくはメールにて問題の症例について伺い検討することを決定した。臨床側の解析依頼の端緒は、日常診療において矛盾する酵素活性の異常高値を認識し最近の我々の総説^{3,4)}をチェックされたことによるものが大部分であった。症例によっては過去に遡った保存検体の問題解決のための解析依頼もみられた。

4) 統計処理

統計処理についてはカイ二乗検定を実施した。

Ⅲ．結果

1) 依頼検体の集計

2015年12月～2020年3月までに依頼を受けた検体数は28検体であった。その内訳は、北海道内からの依頼が6検体（内1例は患児の母親）、北海道外からの依頼が22検体であった。北海道外の内訳として、広島県1例、大阪府1例、愛知県3例（内1例患児の母親）、石川県2例（内1例患児の母親）、滋賀県1例、静岡県1例、神奈川県5例（内1例患児の父親）、山梨県1例、群馬県1例、茨城県1例、千葉県4例および山形県が1例

であった。診療科では、小児科が82%と圧倒的に多く23検体（内患児の親3例）であり、内科・その他が5検体であった。

2) マクロエンザイムの同定結果

依頼された28検体の解析結果について表1に総括した。この結果、マクロASTが疑われた件数は合計24検体であり、同定された症例は、IgG型が12例（内、母親にも確認された母子例2例を含む）およびIgA型が1例であった。IgA型の1例は、表中27番の父親であり、以前よりASTの矛盾する高値が指摘されていた症例であった。しかしながら同患児の母親からの検体は得られなかったこ

表1 マクロエンザイムの依頼酵素と同定結果

番号	依頼年月日	年齢 (M/F)	依頼酵素	酵素活性 (U/L)	AST/ALT	アノマリーバンド	免疫グロブリン
1	2015,12,01	3(M)	AST	AST/ALT: 788/28	28.1	有	IgG- κ , λ
2	2016,11,07	3(F)	AST	AST/ALT: 834/11	75.8	有	IgG- κ , λ
3	2016,10,17	6ヶ月 (M)	AST	AST/ALT: 220/15	14.7	有	IgG- λ
4	2016,10,17	患児3の母親	AST	不明	—	有	IgG- λ
5	2017,09,15	1(M)	AST	AST/ALT: 182/16	11.4	有	IgG- κ λ
6	2017,09,15	患児5の母親	AST	不明	—	有	IgG- κ λ
7	2017,04,12	66(M)	AST	AST/ALT: 123/12	10.3	有	IgG- κ λ
8	2018,03,02	4(M)	AST	AST/ALT: 69/17	4.1	無	ND
9	2018,03,22	10 (F)	AMY	AMY: 3776	—	有	IgG- λ *
10	2018,03,22	不明	AMY	AMY: 873	—	有	IgG, A- κ
11	2018,05,21	79(M)	CK	CK: 6159	—	有	IgG, A- λ
12	2018,05,21	72(M)	AST	AST/ALT: 1462/105	13.9	有	IgG, A- κ , λ
13	2018,05,24	3(M)	AST	AST/ALT: 78/15	5.2	無	ND
14	2018,05,25	5(M)	AST	AST: 77	—	無	ND
15	2018,07,20	8(F)	AST	AST/ALT: 161/21	7.7	有	IgG- λ
16	2018,07,20	8(F)	AST	AST/ALT: 61/21	2.9	無	ND
17	2019,01,07	23(F)	AST	AST/ALT: 129/9	14.3	有	IgG- κ
18	2019,01,10	5(F)	AST	AST/ALT: 120/19	6.3	有	IgG- κ , λ
19	2019,01,28	2ヶ月	AST	AST/ALT: 193/48	4.0	無	ND
20	2019,01,28	患児19の母親	AST	不明 (基準範囲)	—	無	ND
21	2019,01,28	1(F)	AST	AST/ALT: 81/20	3.9	無	ND
22	2019,01,28	6(M)	AST	AST/ALT: 58 /13	4.5	無	ND
23	2019,01,31	3(F)	AST	AST/ALT: 72/15	4.8	無	ND
24	2018,12,05	7(M)	AST	AST/ALT: 73/14	5.2	無	ND
25	2019,03,06	3(M)	AST	AST/ALT: 48/41	1.2	無	ND
26	2019,03,06	2(M)	ALP	ALP: 2421	—	無	ND
27	2020,02,28	1歳4ヶ月	AST	AST/ALT: 87/23	3.8	無	IgG- κ , λ
28	2020,03,02	患児27の父親	AST	AST/ALT: 200/80	2.5	有	IgA- λ

M, male; F, female; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanin aminotransferase; AMY, amylase; ALP, alkaline phosphatase; CK, creatine kinase.

ND, not determined (免疫グロブリン検出せず)。

*マクロアミラーゼと同時にマクロリパーゼが検出された可能性があり現在さらに解析中。

とから、母子例としての解析はできなかった。残りの12例は、マクロASTが疑われたもののASTアイソザイムパターンにおいて異常所見（アノマリーバンド）は認められず、免疫混合法において結合免疫グロブリンは同定されなかった。AST/ALT比で同定例と非同定例を比較すると、前者の比は2.5～75.8（平均15.7）に分布し、後者は1.2～5.2（平均4.5）に分布した。そこで、AST/ALT比4.5でマクロASTの有無を検定したが有意差は見られなかった。

また、IgG型マクロアミラーゼが2例（表1の9, 10番）みられ、そのうち、1例はマクロリパーゼ併存が示唆された。この症

例についてはさらに検討を加え別途報告したい。さらに、IgG-IgA混合型のマクロクレアチンキナーゼ（CK）が1例（表1の11番）確認された。これらの事例ではいずれも、アイソザイム電気泳動において特徴的なアノマリー所見を示した。表－1中26番の依頼酵素アルカリフォスファターゼでは、検索した限りマクロエンザイムは陰性であった（表1の26番）。

マクロエンザイムの同定結果については、未だ報告例の少ないマクロAST母子例についての解析結果を図1（ASTアイソザイム電気泳動パターン）および図－2（免疫混合法による同定結果）に示す。図1において、患児

図1 母児血清のAST アイソザイム電気泳動パターン

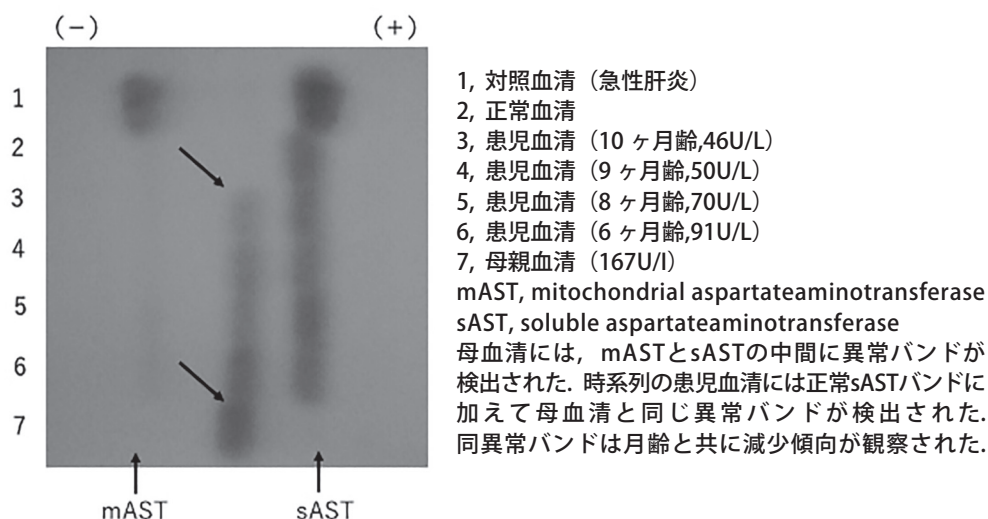
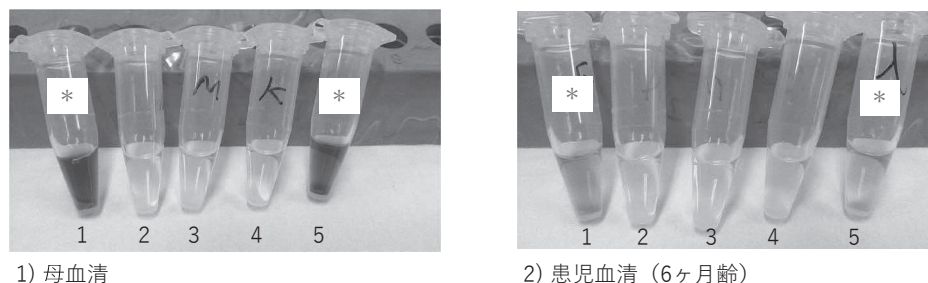


図2 母子血清の免疫混合法による結合免疫グロブリン同定結果



1, 抗ヒトIgG血清 2, 抗ヒトIgA血清 3, 抗ヒトIgM血清 4, 抗ヒトL鎖κ型血清 5, 抗ヒトL鎖λ型血清。患者血清5～10μLに対し各種抗血清を0.1 mLを混合し一昼夜4℃で放置後、免疫沈降物を十分洗浄し、AST活性検出試薬 (OD 550 nm) を加え37℃で2時間放置後の所見を示す。母血清と患児血清はいずれも抗ヒトIgG血清及び抗ヒトL鎖λ型血清の免疫沈降物にAST活性が検出された。尚、他の採取日の患児血清も同様な結果を示した。この結果より、母血清中にはIgG-λ type Macro ASTが検出され、患児血清中にも同様のMacro ASTが確認された。

血清では、対照血清の2つのアイソザイムバンドsoluble AST (sAST) とmitochondrial AST (mAST) の中間にみられるアノマリーバンド (IgG型の典型例³⁾) を示した。一方、母親のアイソザイムパターンにおいても同様な位置にアノマリーバンドが確認された。また、患児血清中の同バンドは、発見時の6ヶ月齢から10ヶ月齢まで確認されたものの、月齢により減少傾向がみられた。そこで、図2に示す免疫混合法を実施したところ、抗ヒトIgGおよび抗ヒトL鎖 λ 型血清との免疫沈降物にのみAST活性が明瞭に確認された。この結果は、既報の結果より⁷⁾、患児の血清中に確認されたマクロASTは、母親のAST結合性IgGの経胎盤移行によって生じたものと理解された。

IV. 考察

1) 依頼検体について

マクロエンザイムについては、我が国では、1980～1990年代^{1,2)}において盛んに検討されていた。しかし近年、臨床検査の新規項目の増加およびコストパフォーマンスが悪いなどの理由から、アイソザイム電気泳動自体が臨床検査室より姿が消えつつあり同定はもちろんコンサルテーションもできない状況にある。さらに大手の臨床検査センターにおいてもマクロエンザイムの同定は、煩雑なためかすでに依頼を受け付けていない現状となっている。しかしながら、臨床科からの問題解決のために需要は絶えないことから、我々のようなボランティア研究室に依頼されるものと理解される。特に近年、我々に多く依頼される理由として、我々の総説³⁾やコラム⁴⁾に関心を示して頂いていることが大きく感じられる。特に、マクロASTの解析においては、不溶性色素による電気泳動用試薬および可溶性色素による活性測定試薬 (免疫混合法・ゲル濾過用) が市販されておらず、自家調製に頼らざるを得ないことから、従来から我々の

研究室への依頼が絶えないところである。特に今回の集計で、小児科が多くみられたのは、我々の最初の母子例の報告⁷⁾とコラムの報告⁴⁾が大きいものと考えられる。したがってマクロエンザイムの解析は古くて新しいテーマと考えられた。

2) マクロASTの同定結果について

疾患関連性がないのにも拘らずALTに対して異常高値を示す一群に、マクロASTの存在があることがこれまで報告されている³⁾。実際に、我々の最初の1例も、矛盾する高AST血症が長期間指摘され肝庇護剤の投与を受けていた症例であった⁸⁾。今回の集計結果においても、全く同様であったものの、マクロAST非同定例の中にもAST/ALT比が高値例であったことから、今後、逸脱酵素であるASTに対する臨床的意義の理解により深い評価が必要であると考えられた。一般には、AST/ALT比が2.0以上には肝悪性疾患が多いとされており、我々は、臨床検体において同比が2.0以上を示す症例の中に一定の頻度にマクロASTの存在を明らかにしている⁹⁾。したがって、疾患関連性の有無にかかわらず矛盾するAST異常高値例に際しては、マクロASTの存在を検討すべきであると考えられる。

マクロASTの母子例を疑った事例が3件寄せられたが、確認できた事例は2件であった。通常は、6ヶ月齢未満の児に血液検査を実施することは限られているが、理由があって生化学検査を実施してたまたま発見されたことになる。経胎盤由来の母親のIgGは、約3週間で半減期を迎えることから、通常は患児のマクロASTについては図1に示したように暫時減少傾向になる。この部分については、さらに検討を加えたい。

V. 結論

我々は、全国からよせられたマクロエンザイム、とりわけマクロASTを主とした依頼検体28検体を対象に解析を実施した。その結

果、IgG型マクロASTが12例（内母子例2例を含む）およびIgA型マクロASTが1例同定された。残りのマクロASTの解析依頼のあった12例については陰性であった。

aminotransferase-immunoglobulin complexes in patients with a high serum aspartate to alanine aminotransferase ratio. Clin Chim Acta 190 : 47-56, 1990.

文献

- 1) 前川真人. 臨床検査から病因病態の解析へ 酵素結合性免疫グロブリン. 臨床病理. 1987, 53(1), 53-63.
- 2) 戸沢辰夫. 酵素免疫グロブリンによる分子修飾. 日本臨床 1995, 53(5), 1106-1111.
- 3) Moriyama T, Tamura S, Nakano K, et al. Laboratory and clinical features of abnormal macroenzymes found in human sera. Biochim Biophys Acta 1854 : 658-667, 2015.
- 4) 森山隆則, 中野恵一, 新関紀康, 他. ASTアイソザイム—見逃していませんか? マクロAST血症例. 小児内科. 2016, 48(6), 914-916.
- 5) 森山隆則, 中野恵一, 畑瀬正尚, 他. アイソザイム染色. 最新染色法の全て, 第7版, 水口國雄, 医歯薬出版, 2011, pp 396-403.
- 6) (株) セロテック. トランスアミナーゼ測定用「セロテック」TA-N使用書（製造中止）, 1995年5月改訂.
- 7) Yasuhara H, Moriyama T, Higuchi B, et al. Transient immunoglobulin-complexed aspartate aminotransferase in infancy caused by maternal immunoglobulin G. Pediatr Int 52 : 827-831, 2010.
- 8) Moriyama T, Ashie T, Kikuri K, et al. Mitochondrial aspartate aminotransferase linked to immunoglobulin G of the κ - λ type : report of a case. Clin Chim Acta 160 : 297-305, 1986.
- 9) Moriyama T, Nobuoka M, Makino M. Incidence and properties of aspartate

謝辞

本研究は、2018年度～2019年度の札幌保健医療大学研究奨励金の助成により実施されました。ここに心より深謝いたします。また、一部の症例において分子量の解析が必要となり北海道大学大学院保健科学研究院病態解析学分野の櫻井俊宏講師と恵淑萍教授にお世話になりました。ここに共に御礼申し上げます。