

# 家畜の血清 Alkaline Phosphatase に関する臨床学的研究

## II. 家畜の血清 alkaline phosphatase isoenzyme の検出

森 園 充・北 敏 郎・西 山 実 光

(昭和 50 年 8 月 28 日 受理)

### Clinical Studies on Serum Alkaline Phosphatase in Domestic Animals

#### II. Detection of Isoenzymes of Serum Alkaline Phosphatase in Domestic Animals

Mituru MORIZONO, Toshiro KITA and Sanemitsu NISHIYAMA

(Laboratory of Veterinary Medicine)

## 緒 言

血清 *AL-P* isoenzyme の染色法の確立と電気泳動法の進展により、臓器由来性<sup>1~9)</sup> が明らかにされ、isoenzyme 活性を測定することにより、由来する病態臓器と病態の程度を卒直に反映することが知られるに及び、従来の血清 *AL-P* 総活性値の測定と併行して、血清 *AL-P* の isoenzyme レベルにおける臨床的診断法の価値が急激に昂って来た。

現在わが国の人医領域では寒天<sup>10~15)</sup>、セルロゲル<sup>16)</sup>、および薄層ポリアクリルアミド<sup>17)</sup>を支持体とする電気泳動法を中心として実用化され骨疾患、肝疾患、癌などの診断法を進展させている。

しかしながら獣医領域においては、Sebesta ら<sup>18)</sup>、Ruegnitz ら<sup>19)</sup>、浜名ら<sup>20)</sup>の臓器由来性について検討した報告がわずかに見られる程度で、本診断法は漸くその緒についたというのが現状で、診断の基準となる各家畜の血清 *AL-P* の zymogram の正常像については、一部の育種学的なもの<sup>6~9, 21~26)</sup>を参考にする以外は、臨床的に定量化されたものは見当らない。そこで著者らは、前報の家畜の血清 *AL-P* 総活性値の正常値測定について、今回は disc 電気泳動法により、家畜の血清 *AL-P* isoenzyme の定量的検出を行ない、その zymogram の正常像を得たので、その成績を報告する。

## 材料および方法

### 1. 実験動物

実験に使用した動物は、ウマ、ウシ、ブタ、イヌ、ネコの 5 種である。ウマは中央競馬会小倉競馬場の競走馬および本学馬術部使用馬の計 64 頭で年令範囲は、

3~19 才、種別、性別はサラブレッド 59 頭 (♂ 34, ♀ 3, ♀ 22), アラブ 1 頭 (♀), その他 4 頭 (♀ 2, ♂ 2) である。ウシは鹿児島市食肉センターにおける屠殺前のウシが主体で一部に本学の飼育牛を含む計 74 頭、年令範囲は、1~8 才、種別、性別は黒毛和種 63 頭 (♀ 9, ♂ 54), 褐毛和種 1 頭 (♀), ホルスタイン 10 頭 (♀ 8, ♂ 2) である。ブタは県下の末吉屠場における 50 頭 (♀ 24, ♂ 26) で、種別ははっきりしないが、ランドレース系雑種が主体を占めると考えられる。イヌは県下指宿市地区の飼イヌ 12 頭および鹿児島市の野犬 113 頭計 125 頭を使用した。年令範囲は 1 才未満 40 頭 (♀ 20, ♂ 20), 1 才以上 64 頭 (♀ 27, ♂ 37), 不明 21 頭 (♀ 13, ♂ 8) で、種別は一定しない。ネコは鹿児島市内の飼ネコ 29 頭、いずれも在来種で年令および性別は 1 才未満 16 頭 (♀ 7, ♂ 9), 1 才以上 13 頭 (♀ 7, ♂ 6) であった。実験動物はいずれも視診により健康と思われるもので、罹病したものは除外した。

### 2. 採血、血清分離および血清の保存

前報<sup>27)</sup>に準じて行なった。

### 3. isoenzyme 検出法

#### a) Disc 電気泳動法

定電圧定電流装置は、エムエス機器 KK と東洋製作所のものを使用、電気泳動槽は、エムエス機器 KK のものを使用、デンシトメーターは明日香工業 KK の OZUMOR-82 型を使用した。ゲルの組成および作製法は、Davis の原法<sup>36)</sup>に準拠した。供試血清量はウマ、ウシ、ブタ、イヌ 20  $\lambda$ , ネコ 25  $\lambda$  をそれぞれ使用、通電条件は Per Juul<sup>28)</sup>の方法に従った (カラム 1 本当たり 3 mA, 90~120 分)。但し泳動用の緩衝液は、原法のグリシンに代えて Tris-borate buffer<sup>29)</sup>

(pH 9.5) を用いた。またゲルのカラムからの取出しは、Davis<sup>36)</sup>の方法により、またゲルの縦割2分は著者ら<sup>30)</sup>の方法により行なった。

#### b) ゲルの蛋白染色とデンストメトリー

蛋白染色は、aniline blue 0.5 g/dl 溶液を用い、染色法と脱染色法は Davis の方法によった。デンストメトリーは、フィルターの波長 610 nm, スリット幅 0.2 mm, スリット長 2.0~2.5 mm, 試料送り速度 40 mm/min の条件で血清蛋白のない透明なゲル部分を吸光度零の位置に合わせて行なった。

#### c) AL-P isoenzyme 検出法とデンストメトリー

AL-P isoenzyme 検出には、Kaplou<sup>31)</sup>の白血球 AL-P 染色法を応用した水島ら<sup>11)</sup>の方法に準拠しホリアクリルアミドゲルの染色を行なった。但し基質として  $\alpha$ -Naphthyl acid phosphate Na 塩を、染色剤として Fast Blue B salt を用いた。またゲル染色のための incubation は、37°C の孵卵器内で1時間行なった。デンストメトリーは、フィルターの波長 500 nm, スリット幅 0.2 mm, スリット長 2.0~2.5 mm, 試料送り速度 40 mm/min とし、透明なゲル部分を吸光度零の位置に合わせて行なった。デンストメトリー後各分画の濃度とパターンが記録されている記録紙により各 isoenzyme 分画の活性比と易動度を計算した。活性比は総濃度に対する百分率で求め、易動度は albumin の易動度を 100 とした時の各 isoenzyme 分画の相対易動度で、易動度の速い方から順次 A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub> と仮称し、さらに畜種別を標示するためにウマで H, ウシでは C, ブタでは P, イヌでは D, ネコでは Ca をそれぞれ A の前に附記した。

### 実験成績

#### 1. ウマ

使用したウマは、血清 AL-P 総活性  $17.4 \pm 0.78$  (SE)

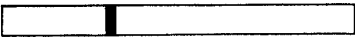
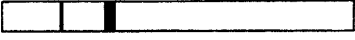
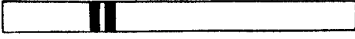
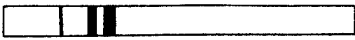
Type	Origin	Albumin	No of animals	incidence (%)
Type I	↓	↓		
HA <sub>1</sub>			20	31.3
Type II			38	59.4
HA <sub>1</sub> -HA <sub>3</sub>			27	42.2
HA <sub>1</sub> -HA <sub>2</sub>			11	17.2
Type III			6	9.4

Fig. 1 Diagrammatic representation of serum alkaline phosphatase isoenzymes in horses and incidence (%) of individual type.

KAU を示す 64 検体で、Table 1 に示すように 3 種の易動度の異なる isoenzyme の分画が得られ易動度の速い順に HA<sub>1</sub>, HA<sub>2</sub>, HA<sub>3</sub> と呼んだ。その分画の発現パターンは、Fig. 1 に示すように 1 本の分画からなる Type I, 2 本の分画からなる Type II (これはさらに HA<sub>1</sub>-HA<sub>3</sub> 型と HA<sub>1</sub>-HA<sub>2</sub> 型に分ける) および 3 本の分画を有する Type III の 3 つに分類された。出現頻度は Type II が 59.4 % で 3 つの Type 中もっとも多く、中でも HA<sub>1</sub>-HA<sub>3</sub> 型が 42.2 % でその大多数を占めている (Fig. 2 参照)。

Type II, Type III の活性化を検討したものは Table 2 に示す通りである。Type II の HA<sub>1</sub>-HA<sub>3</sub> 型では、HA<sub>1</sub> の方が活性が高く、HA<sub>1</sub>-HA<sub>2</sub> 型では両者の活性に差は見られない。Type III においては HA<sub>1</sub> と HA<sub>2</sub> が活性の大部分を占め、HA<sub>3</sub> の活性は

Table 1. Mobilities of serum alkaline phosphatase isoenzymes in horses.

Isoenzyme	Number of isoenzymes	$\bar{X}$	SE
HA <sub>1</sub>	64	50.8	0.2
HA <sub>2</sub>	21	43.2	0.2
HA <sub>3</sub>	32	28.2	0.2

$\bar{X}$ : mean value SE: standard error

Table 2. Percentage activities in the various types of serum alkaline phosphatase isoenzymes in horses.

Type	No. of animals	Isoenzyme		
		HA <sub>1</sub>	HA <sub>2</sub>	HA <sub>3</sub>
Type II				
HA <sub>1</sub> -HA <sub>3</sub>	27	*93.6 $\pm$ 0.8		6.4 $\pm$ 0.8
HA <sub>1</sub> -HA <sub>2</sub>	11	54.5 $\pm$ 3.0	45.5 $\pm$ 3.0	
Type III	6	50.4 $\pm$ 1.8	41.4 $\pm$ 2.1	8.2 $\pm$ 1.5

\* Mean  $\pm$  standard error

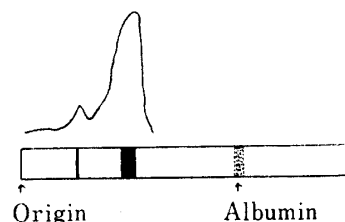


Fig. 2 Diagrammatic representation of the electrophoretic pattern of serum alkaline phosphatase in horse Type II (HA<sub>1</sub>-HA<sub>3</sub>).

明らかに低い。

## 2. ウシ

ウシにおいては、 $9.2 \pm 0.63$  (SE) KAU 血清 *AL-P* 総活性を示す 74 検体について検討を行なった。

ウマと同様に血清 *AL-P* isoenzyme の分画は、Table 3 に示すごとく 3 種の易動度の異なる分画が検出され、その易動度の順に  $CA_1$ ,  $CA_2$ ,  $CA_3$  と呼んだ。その分画の発現パターンは Fig. 3 に示すように 3 つの type に大別され、Type II においては馬と同様にさらに  $CA_1-CA_3$  型と  $CA_1-CA_2$  型の 2 つに細分される。この中で  $CA_1$  分画のみからなる Type I がウシの主要な型であり、出現頻度は 87.7% の高率を占めている (Fig. 4 参照)。Type II, Type III の活性化を検討したものは Table 4 に示すように  $CA_1-CA_3$  型では、 $CA_1$  が活性が高く  $CA_3$  が低いと

Table 3. Mobilities of serum alkaline phosphatase isoenzymes in cattle.

Isoenzyme	Number of isoenzymes	$\bar{X}$	SE
$CA_1$	73	43.3	0.18
$CA_2$	4	35.5	1.1
$CA_3$	9	24.4	0.67

$\bar{X}$ : mean value SE: standard error

Table 4. Percentage activities in the various types of serum alkaline phosphatase isoenzymes in cattle.

Type	No. of animals	Isoenzyme		
		$CA_1$	$CA_2$	$CA_3$
Type II				
$CA_1-CA_3$	6	$76.4 \pm 6.8$		$23.6 \pm 6.8$
$CA_1-CA_2$	1	53.3	46.7	
Type III	3	$43.6 \pm 5.9$	$43.6 \pm 8.2$	$12.8 \pm 1.4$

\* Mean  $\pm$  standard error

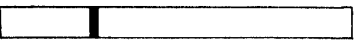
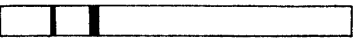
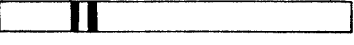
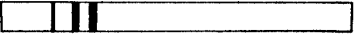
Type	Origin	Albumin	No of animals	incidence (%)
Type I	↓	↓		
$CA_1$			64	86.5
Type II			7	9.5
$CA_1-CA_3$			6	8.1
$CA_1-CA_2$			1	1.4
Type III			3	4.1

Fig. 3 Diagrammatic representation of serum alkaline phosphatase isoenzymes in cattle and incidence (%) of individual type.

いう明らかな差が見られるのに対し、 $CA_1-CA_2$  型は、ほぼ同等の活性が示された。Type III は  $CA_1$ ,  $CA_2$  がともに同程度の活性を示し、 $CA_3$  は活性が前者に比べて低い。

## 3. ブタ

ブタの供試血清は *AL-P* 活性値が  $6.6 \pm 0.33$  (SE) KAU を示す 50 検体を使用した。その酵素分画は、Table 5 に示すごとく 1 種で、その zymogram は Fig. 5 に示す。ブタにおいては他の家畜の  $A_3$  に相当する部分に痕跡程度の不明瞭な分画の出現するものが 3 検体に認められたが、再現性が悪いいため、その分画は除外した。

Table 5. Mobilities of serum alkaline phosphatase in pig.

Isoenzyme	Number of enzymes	$\bar{X}$	SE
$PA_1$	50	50.0	0.2

$\bar{X}$ : mean value SE: standard error

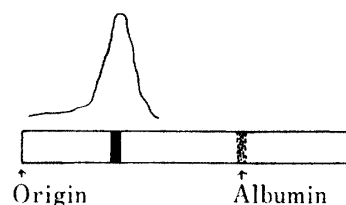


Fig. 5 Diagrammatic representation of the electrophoretic pattern of serum alkaline phosphatase in pig.

## 4. イヌ

イヌは Table 6 に示すような 1 才未満のものを infant, 1 才以上のものを adult とした。血清 *AL-P* isoenzyme の分画は、Table 7 に示すように 3 種の異なる易動度を示すものが得られた。イヌの *AL-P*

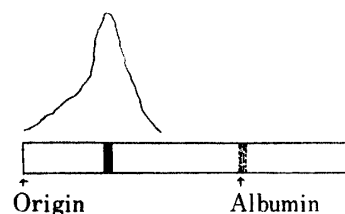


Fig. 4 Diagrammatic representation of the electrophoretic pattern of serum alkaline phosphatase in cattle Type I.

zymogram は、その分画の組合せによって3つの型に分けられた。その Type は Fig. 6 に示す通りに Type I の  $DA_1$  と Type II の  $DA_1-DA_3$  が出現頻度が高く、イヌにおける主なる型と言えよう。その

Table 6. Serum alkaline phosphatase activities classified by age in dogs. (KAU)

Age	No. of animals	$\bar{X}$	SE
Infant	40	9.0	1.3
Adult	64	6.4	0.5
Unkown	21	5.1	0.8

Table 7. Mobilities of serum alkaline phosphatase isoenzymes in dog.

Isoenzyme	Number of isoenzymes	$\bar{X}$	SE
$DA_1$	100	42.0	0.2
$DA_2$	34	37.0	0.2
$DA_3$	63	23.2	0.3

$\bar{X}$ : mean value SE: standard error



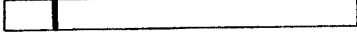


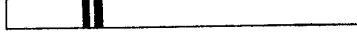
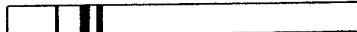
Type	Origin	Albumin	No of animals	incidence (%)
Type I	↓	↓	59	47.2
$DA_1$			48	38.4
$DA_2$			9	7.2
$DA_3$			2	1.6
Type II			60	48.0
$DA_1-DA_3$			41	32.8
$DA_2-DA_3$			14	11.2
$DA_1-DA_2$			5	4.0
Type III			6	4.8

Fig. 6 Diagrammatic representation of serum alkaline phosphatase isoenzymes in dogs and incidence (%) of individual type.

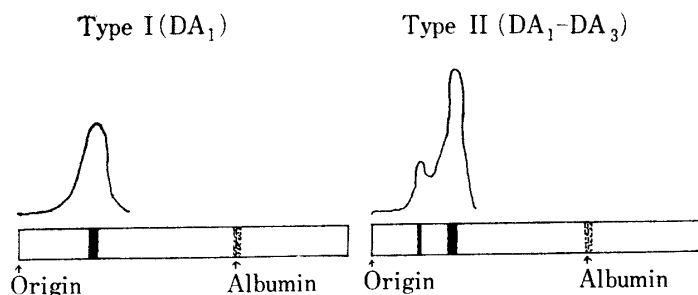


Fig. 7 Diagrammatic representation of the electrophoretic pattern of serum alkaline phosphatase in dog Type I ( $DA_1$ ), Type II ( $DA_1-DA_3$ ).

Table 8. Pattern of zymogram classified by age in dogs.

Type	No. of animals		incidence (%)	
Type I	*17	**36	*42.5	**56.3
$DA_1$	14	29	35.0	45.3
$DA_2$	3	5	7.5	7.8
$DA_3$	0	2	0	3.2
Type II	21	24	52.5	37.5
$DA_1-DA_3$	13	15	32.5	23.4
$DA_2-DA_3$	6	6	15.0	9.4
$DA_1-DA_2$	2	3	5.0	4.7
Type III	2	4	5	6.2

\* infant \*\* adult

zymogram は、Fig. 7 に示されている通りである。

各 isoenzyme の出現頻度を年齢別に示したものが Table 8 で、infant に Type II が多く adult に Type I の型が多い。Type I は、adult にのみ  $DA_3$

分画が認められた。Type II, Type III における活性比を検討したものを Table 9 に示す。Type II の  $DA_1-DA_3$  型では  $DA_1$  の活性が高く  $DA_2-DA_3$  においては  $DA_2$  の活性が高い。

Type III では、 $DA_2$  の活性が高い活性を示し、 $DA_3$  は  $DA_1$ ,  $DA_2$  に比べると活性が低い。年齢別活性比の検討については Table 10 に示す通りであるが、Type II の  $DA_1-DA_3$  型で adult と infant を比較すると  $DA_1$  においては、infant が高く、 $DA_3$  では infant が低い所見が得られた。Type III の adult と infant を比較すると  $DA_1$ ,  $DA_3$  において adult が高く、 $DA_2$  では infant が高かった。

## 5. ネコ

使用したネコは、Table 11 に示すような1才未満のものを infant, 1才以上のものを adult とした。血清  $AI-P$  isoenzyme の分画については、3種の異なる易動度を示すものが得られた (Table 12 参照)。ネコの  $AI-P$  Zymogram は、その分画の組合せによって3つの Type に分けられた。その Type は、Fig. 8 に示したように Type II の出現頻度が高く、とりわけ  $CaA_2-$

CaA<sub>3</sub> 型と CaA<sub>1</sub>—CaA<sub>2</sub> 型が多い (Fig. 9 参照). Table 13 は, これら各分画の出現頻度を年令別に検討したものであるが, Type I の出現頻度は, adult が infant よりも高く, Type II はほぼ同程度で, Type III は逆に adult が infant より低い所見が得られた. さらに Type II の infant では, CaA<sub>2</sub>—CaA<sub>3</sub> 型が多く, adult では CaA<sub>1</sub>—CaA<sub>2</sub> 型が多

Table 9. Percentage activities in the various types of serum alkaline phosphatase isoenzymes in dogs.

Type	No. of animals	Isoenzyme		
		DA <sub>1</sub>	DA <sub>2</sub>	DA <sub>3</sub>
Type II				
DA <sub>1</sub> —DA <sub>3</sub>	41	*82.1±1.7		
DA <sub>2</sub> —DA <sub>3</sub>	14		83.0±1.9	17.9±1.7
DA <sub>1</sub> —DA <sub>2</sub>	5	55.5±6.0	44.5±6.0	17.0±1.9
Type III	6	31.9±1.9	51.4±4.7	16.7±3.7

\* Mean±standard error

Type	Origin	Albumin	No of animals	incidence(%)
Type I	↓	↓	6	20.7
CaA <sub>1</sub>			3	10.3
CaA <sub>2</sub>			3	10.3
Type II			17	58.6
CaA <sub>1</sub> —CaA <sub>3</sub>			2	6.9
CaA <sub>2</sub> —CaA <sub>3</sub>			9	31.0
CaA <sub>1</sub> —CaA <sub>2</sub>			6	20.7
Type III			6	20.7

Fig. 8 Diagrammatic representation of serum alkaline phosphatase isoenzymes in cats and incidence (%) of individual type.

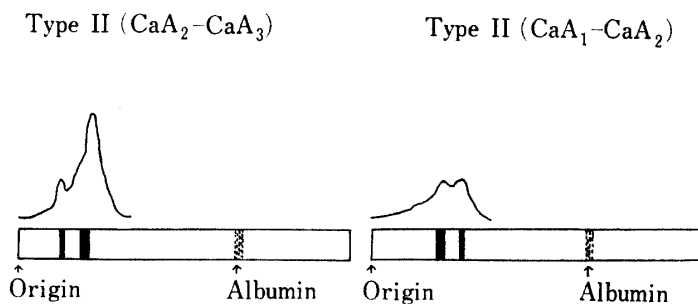


Fig. 9 Diagrammatic representation of the electrophoretic pattern of serum alkaline phosphatase in cat Type II (CaA<sub>2</sub>—CaA<sub>3</sub>, CaA<sub>1</sub>—CaA<sub>2</sub>).

Table 10. Percentage activities in the various types of serum alkaline phosphatase isoenzymes in dogs classified by age.

Type	Isoenzyme					
	DA <sub>1</sub>		DA <sub>2</sub>		DA <sub>3</sub>	
Type II						
DA <sub>1</sub> -DA <sub>3</sub>	*89.2	**76.2			*10.8	**23.8
DA <sub>2</sub> -DA <sub>3</sub>			*86.6	**79.1	13.4	21.0
DA <sub>1</sub> -DA <sub>2</sub>	55.5	55.5	44.5	44.5		
Type III	28.2	43.3	59.6	39.5	12.2	17.3

\* infant \*\* adult

Table 11. Serum alkaline phosphatase activities classified by age in cats. (KAU)

Age	No. of animals	$\bar{X}$	SE
Infant	16	7.9	0.8
Adult	13	4.0	0.7

い. Type II と Type III における活性比を検討したものでは (Table 14 参照), CaA<sub>1</sub>—CaA<sub>3</sub> 型の CaA<sub>1</sub>, CaA<sub>2</sub>—CaA<sub>3</sub> 型の CaA<sub>2</sub> および CaA<sub>1</sub>—CaA<sub>2</sub> 型の CaA<sub>2</sub> がいずれも高いことが認められる. Type III においては, CaA<sub>2</sub> が高い活性を示している.

年令別の活性比については Table 15 にその成績を示しているが, Type II の CaA<sub>2</sub>—CaA<sub>3</sub> 型では CaA<sub>3</sub> が infant で高く, CaA<sub>1</sub>—CaA<sub>2</sub> 型では CaA<sub>2</sub> が infant で高い傾向を示した. Type III では CaA<sub>2</sub> が infant において高く, 逆に CaA<sub>3</sub> は adult が高い傾向を示した.

## 考 察

血清蛋白の disc 電気泳動には, トリス・グリシン緩衝液が常用されているが, 本緩衝液中のグリシンは AL-P の活性に対して阻害的に働く<sup>32)</sup>ので AL-P isoenzyme 検出目的には適当ではなく<sup>27)</sup>, 現在 AL-P に関しては Hodson<sup>33)</sup>のトリス塩酸緩衝液や Smith<sup>29)</sup>のトリス・ホウ酸緩衝液が使用されている. 本実験においては後者のトリス・ホウ酸緩衝液を使用した. 本緩衝液は著

Table 12. Mobilities of serum alkaline phosphatase isoenzymes in cats.

Isoenzyme	Number of isoenzymes	$\bar{X}$	SE
CaA <sub>1</sub>	17	40.9	0.2
CaA <sub>2</sub>	24	33.1	0.3
CaA <sub>3</sub>	17	21.3	0.3

 $\bar{X}$ : mean value SE: standard error

Table 13. Pattern of zymogram classified by age in cats.

Type	No. of animals	Incidence (%)
Type I	*2    **4	*12.5    **30.8
CaA <sub>1</sub>	1	6.2
CaA <sub>2</sub>	1	6.2
Type II	10	62.5
CaA <sub>1</sub> -CaA <sub>3</sub>	1	6.3
CaA <sub>2</sub> -CaA <sub>3</sub>	8	50.0
CaA <sub>1</sub> -CaA <sub>2</sub>	1	6.3
Type III	4	25.0

\* infant \*\* adult

Table 14. Percentage activities in the various types of serum alkaline phosphatase isoenzymes in cats.

Type	No. of animals	Isoenzyme		
		CaA <sub>1</sub>	CaA <sub>2</sub>	CaA <sub>3</sub>
Type II				
CaA <sub>1</sub> -CaA <sub>3</sub>	2	79.2±2.9		20.9±2.9
CaA <sub>2</sub> -CaA <sub>3</sub>	9		79.3±3.0	20.8±3.4
CaA <sub>1</sub> -CaA <sub>2</sub>	6	34.4±4.2	65.7±4.3	
Type III	6	33.2±5.0	44.8±7.1	21.9±4.5

\* Mean±standard error

Table 15. Percentage activities in the various types of serum alkaline phosphatase isoenzymes in cats classified by age.

Type	Isoenzyme					
	CaA <sub>1</sub>	CaA <sub>2</sub>	CaA <sub>3</sub>	CaA <sub>1</sub>	CaA <sub>2</sub>	CaA <sub>3</sub>
Type II						
CaA <sub>1</sub> -CaA <sub>3</sub>	*83.3	**75.0		*16.7	**25.0	
CaA <sub>2</sub> -CaA <sub>3</sub>		*78.8	**83.3	32.3	16.7	
CaA <sub>1</sub> -CaA <sub>2</sub>	21.1	37.0	78.9	63.1		
Type III	33.2	33.3	50.6	33.3	16.3	33.3

\* infant \*\* adult

者らが行なったトリス・グリシン緩衝液との比較実験において、より鮮明な分画が得られることを実際に確認した。

以下畜種別に zymogram の正常像について検討を加える。

まずウマについては、比較すべき適当な文献を見出せず、対照はできないが、主軸となるものは Type II の HA<sub>1</sub>-HA<sub>3</sub> 型であり、活性においては HA<sub>1</sub> 分画が最も高くかつ3つのどの type にも共通して認められることから、ウマの血清 AL-P 総活性に反映する変動の要因には HA<sub>1</sub> 分画が大きく関与しているものと考えられる。

ウシについては Gahne<sup>23)</sup> が澱粉ゲルで血清 AL-P isoenzyme の易動度の異なる4種の分画を報告しているのに対し、本実験では3種の分画しか得られていない。これは Cunningham<sup>27)</sup> がモルモットの血清 AL-P isoenzyme を澱粉ゲルとポリアクリルアミドゲルの両支持体による比較検討において、前者に分画が多く出現するとの報告もあり、支持体による差も考えられる。

ウシの血清 AL-P isoenzyme の中で、もっとも速い易動度で、 $\alpha$ -グロブリン域に検出される分画をAバンド<sup>23)</sup>と称し、ウシの血液型の遺伝<sup>37)</sup>、その他<sup>34), 35)</sup> 育種学的には重要視されている。このAバンドは易動度の速さから推定して、著者らの CA<sub>1</sub> 分画に相当するものと思われるが、出現頻度を比べた場合、著者らの CA<sub>1</sub> 分画がどの type においても常時見出せるのに対し、Aバンドはその出現頻度が著しく低いことから CA<sub>1</sub> 分画とAバンドは同一物ではない。ただ本実験での disc 電気泳動における血清の泳動時間と展開距離が彼らのそれに比べて約1/2の規模であることを考えれば、出現頻度の低いAバンドは CA<sub>1</sub> 分画内に包含されている可能性が強い。

isoenzyme レベルにおける臨床的応用において、遺伝的要素は無視できないが、ウシの AL-P isoenzyme のAバンドについては、その出現頻度の低いこととその活性にもかなりの個体差があることから、著者らの CA<sub>1</sub> 分画に包含された状態でも臨床的にはAバンドを確認しなくても許容されるものと考ええる。

ブタについては、遺伝学的に主として AL-P isoenzyme の出現と日令との関係について研究されているが<sup>24~26)</sup>、いずれにしても同一個体が1~2本の分画を持っているのに対し、本実験では1~2才の adult のみを使用し、isoenzyme 分画は1種しか得られなかった。しかし数例ではあるが、痕跡程度の再現性の

悪い分画らしいものが見られたことから、例数を増すことにより、2本の分画を持つ個体の存在も考慮された。

イヌについては、体型的に大型、中型、小型が混合し、品種的にも不統一であった関係からバラツキが多く、*Al-P isoenzyme* の多岐性を思わしめたが、異なる易動度を示す検体の血清を混ぜて泳動する方法を講じた結果、3種類の *isoenzyme* が得られ、その *zymogram* は、3つの *type* に分類された。この中で *adult*, *infant* を通じて *Type I* の  $DA_1$  型と *Type II* の  $DA_1-DA_3$  型がイヌの血清 *Al-p zymogram* の主体を占め、 $DA_1$  分画の出現頻度が最も高い所見が得られた。本実験成績中、*Type I* において他の家畜とは異なり、 $DA_3$  という分画が *adult* のみに存在したことは、少なくとも  $DA_3$  が骨由来性ではないことを示し、*Type III* の年令による活性比の変化において、*infant* の方が  $DA_2$  分画の活性に高い傾向が認められたことは、 $DA_2$  分画が骨由来性を示唆しているものとする。また *Type II* および *Type III* における各分画の活性比は他の家畜に比べ大差は見られなかったが、*Type III* の1例に、血清総活性値および一般所見は正常であるにもかかわらず、 $DA_3$  の活性が  $DA_1$  に比べて、著しく高い個体が見られたことは、本個体が潜在的疾患を秘めている可能性が考慮され、臨床的に興味ある所見といえよう。

ネコにおいては他の家畜と比較して  $CaA_2$  分画の発現頻度が高く、 $CaA_1-CaA_3$  型の発現頻度が少ないのが特徴的である。年令的には *infant* で  $CaA_2-CaA_3$  型が多く、*adult* では  $CaA_1-CaA_2$  型が多く、活性的には *Type III* の  $CaA_2$  が *infant* において高いことから  $CaA_2$  が骨由来性を思わしめる。

本実験で得られた家畜の *Al-p zymogram* の正常像から、ブタを除くウマ、ウシ、イヌ、ネコでいずれも *Type I*, *Type II*, *Type III* の3つに分類され、2つの *isoenzyme* からなる *Type II* においては、さらにウシ、ウマで2つに、イヌ、ネコで3つに細分類され、*type* においては非常によく似たパターンを示し、易動度の面においても  $HA_1$  と  $PA_1$  が同程度で最も速い易動度を示す例外を除けば、ウシ、イヌ、ネコの各分画の易動度はいずれも近似していることから、disc 電気泳動法による家畜の *Al-p zymogram* の正常像には一定の傾向が得られたものとする。

disc 電気泳動法による Smith ら<sup>29)</sup> のヒトの成績では3種の分画が得られ、これらは易動度の速いものから肝臓由来、骨由来、そしてわずかに出現する小腸

由来の *isoenzyme* のあることが報告され、益沢ら<sup>17)</sup> の簡易薄層ポリアクリルアミドゲル電気泳動法によってもこの事が裏づけられている。

著者らは臓器由来性については、年令的關係から間接的に骨由来性 *isoenzyme* の推定を試みているが、直接的な検討は行なっていない。血清 *Al-p isoenzyme* レベルにおける臨床的応用は、*Al-p zymogram* の正常像と共に各分画の臓器由来性が明らかにされることにより、真の意義が生じてくる。ヒトに比べて家畜の場合、ウマ、ウシ、イヌ、ネコは *isoenzyme* 数の上では3種類で同数となっているが、*zymogram* の正常像は遺伝的要素も絡み、やや複雑化しており、易動度の速さから臓器由来性を人に準じて同定することについては今後なお検討の必要があるものとする。

## 要 約

disc 電気泳動法により、家畜の血清 *Al-P isoenzyme* の定量的検出を行なった結果、次の知見が得られた。

1. 家畜の血清 *Al-P isoenzyme* はウマ、ウシ、イヌ、ネコで3種検出され、その *zymogram* は *Type I*, *Type II* および *Type III* に分類され、さらに組合せにより *Type II* はウマ、ウシで2つ、イヌ、ネコで3つに細分された。

ブタにおいては単一の酵素分画のみを認めた。

2. 各 *isoenzyme* の *albumin* との相対易動度はウシ、イヌ、ネコでいずれも近似していることが判った。

3. 各動物を通じて易動度の速い  $A_1$  ないし  $A_2$  に最も高い活性が見られた。

4. イヌ、ネコの  $A_2$  分画は骨由来性と推定された。

以上の所見からウマ、ウシ、イヌ、ネコにおいてもヒトと同様に *isoenzyme* レベルにおける臨床診断への応用が可能であるものとする。

## 文 献

- 1) Rosenberg, I. N.: *J. Clin. Invest.*, **38**, 630 (1959)
- 2) Keiding, N. R.: *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **11**, 106 (1959)
- 3) Davis, B. J.: *Ann. New York Acad. Sci.*, **121**, 404 (1964)
- 4) 齊藤正行: 臨床化学分析 IV 酵素, 88 (1970).
- 5) 織田敏次・鈴木宏: 日本臨床, **31**(5), 614-622 (1973)
- 6) Taleisnik, A. et al.: *Compt. Rend. Soc.*

- Biol. Paris*, **149**, 1790 (1955)
- 7) Cunningham, V. R. and Field, E. J.: *J. Neurochem.*, **11**, 281-285 (1964)
  - 8) Law, G. R. and Munro, S. S.: *Science*, **149**, 1518 (1965)
  - 9) Maeda, Y. Hashiguchi, T. and Taketomi, M.: *Japan. J. Genetics*, **47**(3), 165-170 (1972)
  - 10) 高橋 浩・和嶋 毅・水島 淳: 医学と生物学, **66**(5), 224-229 (1963)
  - 11) 水島 淳: 同上, **67**(6), 302-305 (1963)
  - 12) 鈴木 宏: 第17回日本医学会総会講演集, **1**, 454 (1967)
  - 13) 織田敏次・鈴木 宏・山中正己: 代謝, **5**(2), 33-40 (1968)
  - 14) 小野 猛・他: 医学と生物学, **77**(2), 37-41 (1968)
  - 15) 芝 燁彦・坂岸良克: 生物物理化学, **16**(3), 27-31 (1972)
  - 16) 青木紀生・他: 同上, **18**(1), 59 (1973)
  - 17) 益沢 学・他: 同上, **17**(2), 23-28 (1973)
  - 18) Sebesta, D. G., Bradshaw, F. J. & Prockop, D. J.: *Clin. Res.*, **11**, 188 (1963)
  - 19) Ruegnitz, P. C. and Schwartz, E.: *Am. J. Vet. Res.*, **32**(10), 1525-1531 (1971)
  - 20) 浜名克己・他: 日本獣医学雑誌, **33**, 270-271 (1971)
  - 21) Rendel, J. et al.: *Genetics*, **50**, 973-986 (1963)
  - 22) 渡辺誠喜・鈴木正三: 日本畜産学会報, **37**, 3 (1966)
  - 23) Gahne, B.: *Nature*, **199**, 305-306 (1963)
  - 24) Saison, R.: *11th Europ. Conf. Anim. Blood Groups & Bioch. Polymorph.*, 321 (1968)
  - 25) Dinklage, H.: *ibid.*, 329 (1968)
  - 26) Imlah, P.: *ibid.*, 331 (1968)
  - 27) 森園 充・北 敏郎・西山実光: 鹿大農学術報告, **26**, (1976)
  - 28) Juul, P.: *Clin. Chim. Acta.*, **19**, 205 (1968)
  - 29) Smith, I. et al.: *ibid.*, **19**, 499-505 (1968)
  - 30) 森園 充・飯屋喜弘・西山実光: 鹿大農学術報告, **23**, 257-266 (1973).
  - 31) Kaplow, L. S.: *Blood.*, **10**, 1023-1029 (1955)
  - 32) Luke, D. and Worf, P. L.: *Enzymologia.*, **39**(2), 129-133 (1970)
  - 33) Hodson, A. W. et al.: *Clin. Chim. Acta.*, **7**, 255-261 (1962)
  - 34) 天野 卓・鈴木正三・阿部恒夫: 日本畜産学会報, **40** (臨時増刊号), 32 (1969)
  - 35) ———: 同上, **41** (臨時増刊号), 10 (1970)
  - 36) Davis, B. J.: *Ann. New York Acad. Sci.*, **121**, 404-427 (1964)
  - 37) 佐々木清綱: 家畜の血液型とその応用 134~136, 養賢堂 (1971)

### Summary

Sera of domestic animals were examined by disc electrophoresis on polyacrylamide gels for the detection of their alkaline phosphatase-isoenzymes. The results obtained are summarized as follows.

1) Three kinds of alkaline phosphatase-isoenzyme were detected in the sera of horses, cattle, dogs and cats, respectively. The zymogram of each animal was classified into three types, namely Type I, Type II and Type III. Furthermore, according to the combination of the isoenzymes detected, Type II was divided into two and three subtypes in horses or cattle and dogs or cats, respectively. In pigs only one enzyme fraction was detected.

2) The relative electrophoretic mobilities of each isoenzyme to albumin fraction were noted to be practically the same in cattle, dogs and cats.

3) The highest enzyme activity was observed in the fraction showing the first or the second mobility.

4) It was conjectured that the isoenzyme-fraction ( $DA_2$  or  $CaA_2$ ) showing the second mobility in dogs and cats might be originated in bone-tissues.

The above-mentioned findings suggested to the authors the possibility of applying these isoenzymes to the clinical diagnoses in horses, cattle, dogs and cats as in man.