

〔 研 究 〕

ヒト腩液により発現する二峰性アルブミン

長岡赤十字病院 検査

小林 幸子

島宗 良子

山田 弘美

高野 淳子

小片早千子

山崎 明

丸山 直子

同 外科

岡村 直孝

〈 緒 言 〉

血清異常アルブミンを電気泳動上、形状的に分類すると二峰性アルブミンとカギ型アルブミン⁽¹⁾とにわけられる。

この二峰性アルブミンの発現は先天的遺伝に基づく場合⁽¹⁾と、後天的で一過性である場合⁽²⁾とがあり、腩性腹水症で認められるものは後者である。我々は1991年から93年の3年間に、3例の腩性腹水症の患者に一過性の二峰性アルブミンを見いだした。その二峰性の形成には腩液中の蛋白分解酵素の関与が示唆されている⁽³⁾が、腩液そのものが異常アルブミンを形成させるのかどうかは示されていない。

一方、これまでに後天的な一過性の二峰性アルブミンは薬剤^(3, 4)やビリルビン⁽⁵⁾の関与により、あるいは高尿素血症⁽⁶⁾や高アマラーゼ血症患者^(7, 8)の血清中に認められたとの報告があり、また発現するアルブミンは電気泳動上fast typeとslow typeの異なった型が確認されている⁽⁷⁾が、腩性腹水症ではfast typeのものが出現する^(9, 10)とされている。

我々は、術後患者より得た純粋なヒト腩液を用いて二峰性アルブミンの形成実験を行うとともに、腩性腹水症の患者血清と腹水とを分析し、その臨床的意義を検討した。またヒト血清アルブミンを用いて、蛋白分解酵素が

どのように関与しているかについても検討したので報告する。

〈 材 料 と 方 法 〉

1 腩液添加実験

正常ヒト血清は健常成人（当院検査科職員）より採取した。ヒト腩液は腩頭十二指腸切除後の患者に留置した腩外瘻チューブより採取した。採取時期は全身状態が落ちつき、腩液分泌量がほぼ一定となった術後7日目とした。この腩液200 μ lと正常ヒト血清200 μ lを混合した後37 $^{\circ}$ Cでインキュベートし、経時的に（直後、24、48、72、96時間後）電気泳動を行った。更に腩液を生理食塩水で5、10、20、50、100倍に希釈し同様の実験を行った。

アルブミンの確認には免疫固定法を実施した。

2 蛋白分解酵素添加実験

1) トリプシン単独の添加

トリプシン（bovine pancreas type XI DPCC Sigma, USA）は20mgを2mlの1/16N塩酸で処理し、水酸化ナトリウムでPH8に調整した^(12, 13)。このトリプシン液200 μ lを正常ヒト血清200 μ lに加え37 $^{\circ}$ Cで24時間インキュベートした後電気泳動を行った。

2) キモトリプシン、カルボキシペプチダーゼA、及びBの添加

α キモトリプシン（bovine pancreas

type VII TLCK Sigma, USA) は1 mgを0.1 molの炭酸アンモニウム500 μ lで溶解し用いた。カルボキシペプチダーゼA (bovine pancreas type I DFP Sigma, USA) 100 μ lを0.1 mol炭酸アンモニウム500 μ lで溶解した。カルボキシペプチダーゼB (porcine pancreas Boehringer Mannheim, Germany) 200 μ lを0.1 mol炭酸アンモニウム300 μ lにて溶解した。これら各々200 μ lを同時に正常ヒト血清200 μ lに混合し、37°Cで24時間インキュベートした後電気泳動を行った。

3) キモトリプシン、カルボキシペプチダーゼA、B及びトリプシン添加

各種酵素を前述と同様に調整し、キモトリプシン200 μ l、カルボキシペプチターゼA 200 μ l、カルボキシペプチターゼB 200 μ l、トリプシン200 μ lを正常ヒト血清200 μ lに加え混合後インキュベートし、24時間後に電気泳動を行った。

3 脾性腹水症患者の電気泳動

過去3年間の脾性腹水症患者血清と腹水の電気泳動を行い、アルブミン及び α 1グロブリン分画を測定した。

アルブミンの確認には免疫電気泳動法を実施した。

なお、本実験の電気泳動にはオリンパスAES600を用い、指持体はセパラックスSP膜を用いた。免疫電気泳動にはコーニング電気泳動装置を用い、支持体にはアガロースゲルフィルム(チバ・コーニング)を用い、アルブミンの確認には抗アルブミン血清(DAKO, Denmark)を用いた。免疫固定法はAES600の泳動槽のなかでDAKO抗血清を用いて行った。

〈結 果〉

1 脾液添加実験

ヒト脾液とヒトアルブミンのインキュベーションにより、24時間後にはfastおよびslow typeアルブミンが形成され、このfastアルブミンは免疫固定法(図1)により、slow typeアルブミンは免疫電気泳動法によりアルブミンであることが確認された。生成されたfastアルブミン量は72時間後ほぼプラトーに達し、 α 1グロブリンは24時間でほぼプラトーに達した。生成量には個人差があり、電気泳動法ではfastアルブミンが11.3%から

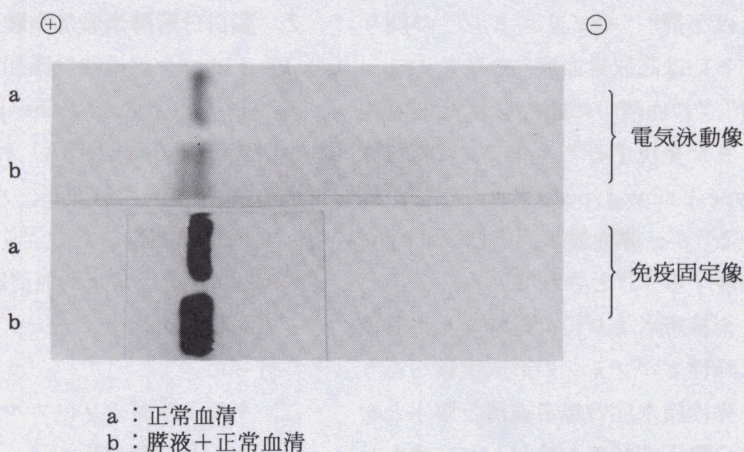


図1

36.7%までの範囲で見られ、 $\alpha 1$ グロブリンも1~2%の増加が見られた(表1)。

なお二峰性アルブミンの生成は膵液の濃度に依存しており、本実験の膵液の場合、20倍希釈まで僅かに認められた(図2)。

2 蛋白分解酵素の添加実験

1) 正常ヒト血清にトリプシンを添加しインキュベーションすると24時間後 $\alpha 1$ グロブリン分画の増加が認められた(図3)。これは免疫泳動法でslow typeアルブミンであることが確認された(図4)。

2) 正常ヒト血清にキモトリプシン、カルボキシペプチダーゼA、カルボキシペプチダーゼBを混合しインキュベーションすると、24時間後にはfast typeのアルブミンが認められた(図3)。

3) 正常ヒト血清にキモトリプシン、カルボキシペプチダーゼA、カルボキシペプチダーゼBに更にトリプシンを添加しインキュベーションすると、24時間後にはfast及びslow typeのアルブミンが認められた(図3)。

TABLE1. Effects of human pancreatic juice on the electrophoretic mobility of human serum albumin

	Fast-albumin		$\alpha 1$ -globulin	
	Before incubation (%)	After incubation (%)	Before incubation (%)	After incubation (%)
Mean \pm SD	0	19.0 \pm 1.9*	2.5 \pm 0.3	3.5 \pm 0.5*
Range(Maximum-Minimum)		(11.3-36.7)	(2.2-3.2)	(2.8-4.9)

* P < 0.01 vs before incubation with human pancreatic juice (n = 30)

正常血清
 正常血清 + 膵液
 " + " 5×
 " + " 10×
 " + " 20×
 " + " 50×
 " + " 100×

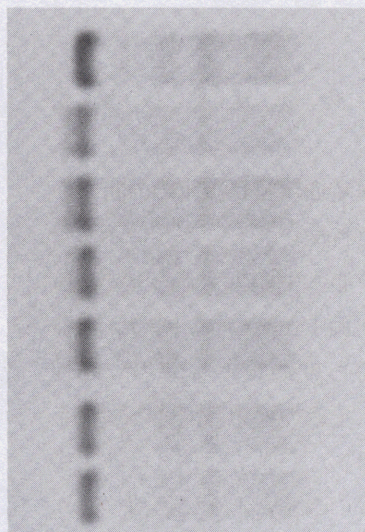


図2 膵液希釈実験

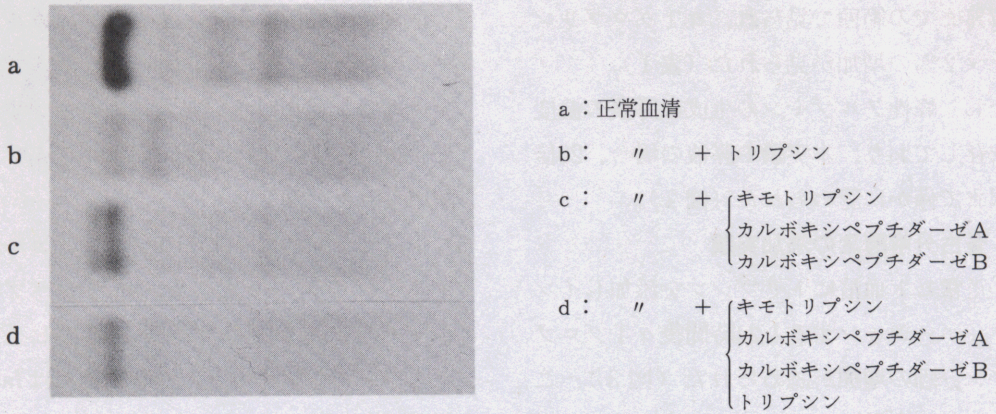
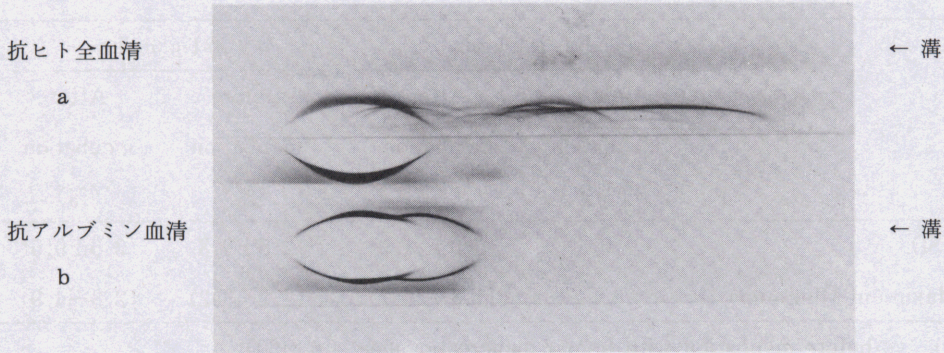


図3 蛋白分解酵素添加実験



a : 正常血清
b : 正常血清 + トリプシン

図4 免疫電気泳動像

3 慢性腹水症患者血清及び腹水の分析

3 症例の概要と特徴を表2、表3に示した。いずれも血清及び腹水中のアミラーゼの高値が認められた。症例1と2については、血清及び腹水中に認められた fast type の二峰性アルブミンはそれぞれの疾患に対する根治手術後消失した(図5)。一方、症例3は非手術例であるが、腹水の改善とともに血清の fast

typeアルブミンは消失した。なお症例1と3では僅かながら slow type のアルブミンも認められたが症状の改善とともに、同様に消失している。

TABLE2. Clinical characteristics of patients with pancreatic ascites

Case No.	1	2	3
Age	46	2	61
Sex	Male	Female	Male
Pancreatic ascites	Present	Present	Present
Amylase (IU/L)			
Serum	2,111	600	7,568
Ascites	35,419	4,381	92,895
Others	Chronic Pancreatitis	Congenital choledochal cyst	Pancreatitis after gastroectomy

Reference values of serum amylase ; 70-250 IU/L

TABLE3. Characteristics of bisalbuminemia in serum and ascites of the patients

Case No.	1		2		3	
	Serum	Ascites	Serum	Ascites	Serum	Ascites
Total protein (g/L)	50	39	58	33	53	38
Albumin (%)	45.8	29.2	64.1	68.3	47.9	38.2
Fast albumin (%)	8.5	34.7	trace	trace	4.1	20.1
α 1-globulin (%)	7.0	5.8	4.4	5.0	6.6	6.9

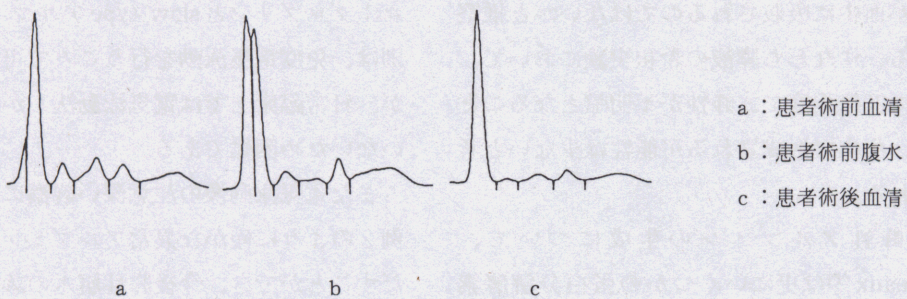


図5 デンシトメトリー像

〈考 察〉

我々は腓液のみを用いて fast type アルブミンが形成されることを初めて示した。また僅かではあるが slow type のアルブミンも認められたが通常の電気泳動像で示すことができない量であった。同様の実験を行った Rouseaux 等の報告では腓液にトリプシンを添加することにより fast type アルブミンが形成されたとするものであったが、我々の実験では純粋な腓液のみであり、腓性腹水症のように腓液が腹腔内に直接漏れるような病態下においては、そのみで二峰性アルブミンが形成されることを直接証明できたと考える。腓液を希釈し反応をみると、明らかに濃度依存性であることから、この変化は腓液に特有の反応であり、二峰性アルブミンは腓液のみより形成されることが明らかになった。一方血清中より腹腔内の異常アルブミン濃度の方が高いという結果は Rouseaux 等も同様であった。このことは本疾患における血清中の異常アルブミンの出現する機序を考える上で重要である。すなわち本症は腓液が腹腔内に漏れることにより発症するとされているが、このような病態下においては腹水中の蛋白分解酵素によりまず異常アルブミンが形成されそれが血中に吸収されるのではないかと推察できる。すなわち腓液の希釈実験において、僅かに20倍程度で二峰性が不明瞭となることより、血中で形成される可能性は少ないと考えられる。

二峰性アルブミンの生成について、Rouseaux 等は更にいくつかの蛋白分解酵素を用いて検討している。彼らはカルボキシペプチターゼA及びBの存在下にキモトリプシンまたはエラスターゼが作用すると fast

type の二峰性アルブミンとなると報告している。我々の実験では、正常ヒトアルブミンにトリプシンを添加するのみで、異常アルブミンの発現をみた。しかもこれは slow type のアルブミンであり、免疫電気泳動では一部抗原性の違うアルブミンが確認された。一方キモトリプシン、カルボキシペプチターゼA及びBの混合では fast type が形成され、更にトリプシンも同時混合した場合は fast と slow の両 type のアルブミンが生成された。高アミラーゼ血症に伴う一過性の二峰性アルブミンのこれまでの報告はすべて fast type のものであった。しかし我々の実験結果からはいずれの type のアルブミンも生成されることが明らかになった。このことは症例1と3において fast type と、僅かながら slow type のアルブミンを認める所見があることを考えると示唆に富む。すなわち腓性腹水においてすべて fast type が現れるのではなく、膵酵素の関与のしかたによっては、いずれの type のアルブミンも出現することを示すものである。また、我々の3例の血液検査では、いずれも $\alpha 1$ グロブリン分画が高値を示していたが、これは $\alpha 1$ グロブリンの上昇によるものではなく、slow type アルブミンの上昇によるものであることが、強く示唆される。 $\alpha 1$ グロブリンと slow type アルブミンの鑑別は、免疫電気泳動を行うことで可能であるが、日常臨床上では電気泳動法しか行われていないため困難である。

また電気泳動像の注意深い観察により、症例2のように僅かな異常アルブミンをも見いだすことができ、今後腓性腹水の診断に役立つものと思われる。

実験を進めるに当たり現上越看護大学教授 杉田収先生に、ご指導いただきましたことを

深謝致します。

〈文 献〉

- 1) Sugita O, Endo N, Yamada M, Odani S. The molecular abnormality of albumin Niigata : 269 Asp → Gly. Clin Chim Acta 1987 ; 164 : 251-9
- 2) Shashaty GG, Atamer MA. Acquired bisalbuminemia with hyperamylasemia. Am J Dig Dis 1972 ; 17 : 59-67
- 3) Arvan DA, Blumberg BS, Melartin L. Transient " bisalbuminemia " induced by drugs. Clin Chim Acta 1968 ; 22 : 211-8
- 4) Lapresle C, Wal JM. The binding of penicillin to albumin molecules in bisalbuminemia induced by penicillin therapy. Biochim Biophys Acta 1979 ; 586 : 106-11
- 5) Yukihiro Adachi et al : Clinical Application of Serum Bilirubin Fractionation by Simplified Liquid Chromatography. Clin. Chem. 34, 2 : 385~388, 1988
- 6) 上原みどり、他 : 高尿素血症患者に見られた一過性 Bisalbuminemia. 臨床病理 31 : 1330~1334, 1983
- 7) Stoodley BJ, Rowe DJ. Pancreatitis with hyperamylasaemia and bisalbuminaemia. Br Med J 1970 ; 2 : 30-1
- 8) Rousseaux J, Debeaumont D, Scharfman A, Pommelet P, Dautrevaux M, Biserte G. Bisalbuminemia in pancreatitis ; structural modification of human serum albumin by proteolytic enzymes of the pancreas. Clin Chim Acta 1976 ; 71 : 35-46
- 9) Geukens R, De Baere H, Beys J, Fevery J. Pancreatic ascites. Acta Clin Belgica 1984 ; 39 : 275-84
- 10) Keidar S, Hornstein L, Brook JG. Bisalbuminaemia in pancreatic ascites. Postgraduate Med J 1986 ; 62 : 43-4
- 11) 藤田清貴 : 悪性腫瘍における血中ヒアルロン酸の増量に関する研究。衛生検査 31 : 999~1003, 1982
- 12) 高橋健治 : 実験講座 1 蛋白質の構造決定法21. 蛋白質およびポリペプチドの酵素分解、共立出版、763~769
- 13) 高橋健治 : 実験講座 2 蛋白質の構造決定法22. 蛋白質およびポリペプチドの酵素分解、共立出版、26~31