

体外診断用医薬品

アルカリ性フォスファターゼアイソザイムキット

＊平成 22 年 2 月改訂(第 2 版)
平成 18 年 4 月作成(新様式第 1 版)

製造販売承認番号
20400AMY00352000

アルフォー

〔全般的な注意〕

- ア. 本製品は、体外診断用でありそれ以外の目的に使用しないで下さい。
イ. 診断は他の関連する検査結果や臨床症状等に基づいて総合的に判断してください。
ウ. 添付文書以外での使用方法については保証を致しません。

〔形状・構造等（キットの構成）〕

- ①ゲル管 4 個
N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン 1.34 μL/本
アクリルアミド 88.3mg/本
N,N'-メチレンビスアクリルアミド 3.7mg/本
②基質液 200mL 1 本
5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルリン酸 p-トルイジン塩 0.021g/dL
③バッファー 6 本
トリスヒドロキシメチルアミノメタン 10.9g/本
ホウ酸 5.6g/本

〔使用目的〕

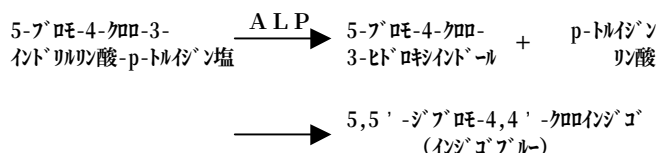
人の血清中のアルカリ性フォスファターゼアイソザイムの分画による検出

〔測定原理〕

アルカリ性フォスファターゼ(ALP)アイソザイムはアルフォーのゲル管内の 2 層のゲルシステム（濃縮ゲル、分離ゲル）により濃縮され、ゲル内の分子ふるい効果と、ALP 自体の荷電により分離されます。

この泳動後のゲルを、基質 5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルリン酸-p-トルイジン塩と共にインキュベーションすると、透明なゲル中に、分離されたアイソザイムバンドに従って青色のインジゴブルーが発色します。

(Epstein らの染色法¹⁾の変法)



本測定法では、結果の判定をより確実にするため、未処理の検体の泳動の他に 56℃・10 分間の加熱処理後の検体を同時に泳動して、易熱性である骨型 ALP を選択的に失活させることにより、その存在を確認することが測定条件となっています。この加熱処理により胎盤型 ALP の存在が疑われる場合は、さらに 65℃・30 分間の加熱処理検体の泳動で、その存在をほぼ決定することができます。従って、通常の分画%の報告の他に、加熱後の泳動像を模式図などで図示し、相互比較することでアイソザイムの同定を行う必要があります。

〔操作上の注意〕

- (1) 検体は、2～8℃で保存し、採血後はできるだけ早く使用してください。2～8℃で保存しても、3 日間以上経った検体は使用できません。長期に検体を保存したい場合には、-20℃以下に保存してください。
- (2) 高 ALP 活性を示す検体では、精製水で希釈を行い、1000IU/L を超えないようにしてください。
- (3) 加熱処理の際、小試験管にはキャップやパラフィルムをしないでください。
- (4) 全ての試薬は、使用前に室温に戻してください。
- (5) ゲルとバッファーの間に空気が残らないようにしてください。空気があると電気が流れません。気泡を作らないため、バッファーを入れる前に、ゲル管とゴムリングの間に予めバッファーをスポイト等で分注しておくことをお勧めします。
- (6) 濃縮ゲルは柔らかく切れる恐れがありますので慎重に操作してください。

2. アルカリ性フォスファターゼ活性に及ぼす諸因子²⁾

活性を上昇させるもの	活性を低下させるもの
妊娠、血液型（O 型または B 型）、コカイン、カナマイシン、テトラサイクリン、胆汁、ペニシリン、プロマジン、アスピリン、炭酸リチウム、メチルドパ、アドレナリン、ビタミン A、ビリルビン、Mg、Mn 等	クロロプロマジン、スルホンアミド、カフェイン、パパイン、エストロゲン、ポリアミン、コルチコステロイド、リン脂質、グルコース、ビタミン C、Fe、Cu、Hg、尿素 等

〔用法・用量（操作方法）〕

- (1) 検体の採取
防腐剤を入れない血清を使用します。
- (2) 検体の調製方法
未処理検体と加熱処理した同検体を同時に泳動します。加熱処理の方法は下記のとおりです。
 - ① 予め小試験管を 56℃に加熱しておきます。
 - ② ①の小試験管に検体を 100 μL 採り、正確に 56℃で 10 分間、インキュベートします。
 - ③ 直ちに氷水で冷却します。
- (3) 試薬・試液の調製方法
バッファー1 本を 1000mL の精製水で溶解します。バッファーを除く試薬類は、全て調製済ですので、そのまま使用します。
- (4) ゲルのセッティング
 - ① ゲル管を取り出し、軽く振って余分な保存液を取り除きます。
 - ② ゲルの詰まっていない端を上にして、泳動槽の上槽に差し込みます。
 - ③ ゲル管の上下が充分浸るように、(3)で用意したバッファーを上槽に約 200mL、下槽に約 300mL 注ぎ入れます。

- (5) 検体の分注
- ① 未処理検体と 56℃、10 分間加熱処理した検体をそれぞれ 25 μL ずつサンプリングします。
 - ② マイクロピペットの先端が濃縮ゲルに触れない程度に近づけ、注意深く検体を注入します。検体と上槽のバッファーとの混合はできるだけ避けてください。
- (6) 電気泳動
- 泳動槽と電源をつなぎ、すぐ通電を開始します。ゲル管 1 本当たり 3mA に設定し、定電流で泳動します。定電圧を使用する場合は 140V に設定して下さい。泳動は約 90 分または、アルブミンバンドがゲルの下端に達するまで行います。
- (7) 基質液の準備
- 泳動が終わる前に、基質液を用意します。基質液をよく振り、10×75mm の試験管に 2mL ずつ分注します。これを恒温槽で 37℃ にしておきます。
- (8) 染色
- ① 電気泳動が終わったら、電源を切り、上槽のバッファーを捨てます。下槽のバッファーは 2～8℃ で保存すれば 4 回使用できます。
 - ② ゲルをゲル管から取り出します。
- (取り出し方法)
- 10mL 注射針付きの注射器に精製水を満たし、濃縮ゲル側のゲルとガラス管の間に針を突き刺し水を出しながらゆっくり 1 回転させます。次にゲルのもう一方の側から針を突き刺し、同様に水を出しながら 1 回転させてください。これでゲルが取り出せない場合は、濃縮ゲル側のガラス管の端にゴム帽を取り付け、ゲルをゆっくり押し出してください。ゲルが滑り出てきたら、温めていた基質液に濃縮ゲルを上にして入れます。
- ③ 37℃ で 2 時間染色して下さい。染色開始後 30 分頃より青いバンドが現れます。高 ALP 活性の検体では染色時間を短縮することもできます。
 - ④ 染色後基質液を捨て、7%酢酸を満し、反応を停止させます。
- (9) デンシトメトリー
- 熱処理しなかった検体のゲルは、小試験管に入れたまま、波長 620nm でデンシトメトリーを行います。

〔測定結果の判定法〕

アルカリ性フォスファターゼ(ALP)のアイソザイムには、臓器特異性があります。本測定法は他の支持体より分離能が優れているといっても、すべての病態に対処することはできません。特に肝臓型や骨型、小腸型 ALP のいずれかが著しく高濃度の場合、互いに重なり合って見えることがあります。この場合、骨型のアイソザイムが他のアイソザイムより易熱性であることを利用して、56℃・10 分間の加熱処理を併用します。それにより加熱処理後の泳動像では、骨型 ALP がほぼ消失するため（骨型が非常に多い患者ではわずかに残る場合があります。）、識別が容易になります。骨型 ALP の移動度は、小児と成人ではやや異なり、健常小児の骨型 ALP は成人の骨型 ALP よりやや早い移動度を示します。

また胎盤型 ALP は、骨型 ALP に近い移動度をもつため、56℃・10 分の加熱処理後、この付近のバンドが濃い場合は胎盤型 ALP の存在が考えられます。この場合は、さらに 65℃・30 分間の加熱処理をしてから泳動を行い、肝臓型及び小腸型 ALP をほぼ消失させ、胎盤型 ALP の

確認を行います。検体によっては 65℃ に加熱すると凝固することがありますが、この場合は胎盤型 ALP 抗体を利用するか、検体と同量の 10mM 塩化マグネシウム溶液を加え、よく攪拌してから加熱処理をしてください。

その他、臓器の細胞破壊が激しい患者の血清には、濃縮ゲルの前（陰極側、原点位 ALP2）または分離ゲルの前に留まって動かないバンド（原点位 ALP1）がよく出現します³⁾。これは細胞膜をもつ分子量の大きい ALP であり、ほとんどが肝臓由来といわれています³⁾。しかしこのバンドの出現機序はまだよく分かっておらず、このバンドの出現から癌と断定することはできません。このバンドについては菊野ら⁴⁾の報告があります。

また胆管閉塞時によく出現する biliary 型 ALP は、小腸型 ALP より少し遅れて出現します。このバンドよりさらに遅れて免疫結合性 ALP および血液型由来高分子 ALP が確認できます。

本測定法を用いた ALP アイソザイムの判定方法については菰田の技術資料⁵⁾が参考になります。

本測定法では、セルロース・アセテート膜やアガロースゲルに出現する I 型 ALP は出現しません。これは前述のようにそれぞれ特定の位置に泳動されます。

健常正常値		
	A	B
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$
小腸型分画%		13±6.2
骨型分画%	50±8.3	42±9.6
肝型分画%	50±8.3	45±9.3

A:小腸型のない検体 N=50

B:小腸型のある検体 N=33

これはアルフォーキットでの参考値であり使用する濃度計や患者年齢、性別等も合わせて考慮する必要があります。

〔性能〕

1. 同時再現性

	平均値	CV%
肝臓型	47.1%	2.34%
骨型	52.9%	2.25%

N=10

サンプル：コントロール血清

試験方法：当社試験方法による

2. 測定範囲

ALP 活性値が 20IU/L 以上あるヒトの血清 (1000IU/L 以上の検体は希釈や検体量調節が必要になります)

3. 相関性

ここでは臨床上診断が確定した患者サンプル 15 例についてのデータを示します⁶⁾。

		アルカリ性 フォスファターゼ [*] 総活性 IU/L	ALP アイソザイム分画百分率 (%)			
			胆汁型	小腸	骨	肝
肝胆管疾患						
1	転移性肝癌	427	+	—	34	66
2	胆管閉塞	305	16	—	—	84
3	肝硬変	180	—	—	28	62
4	肝癌	740	24	—	5	71
5	胆石症	92	4	—	36	60
骨疾患						
6	転移性骨癌	317	—	—	73	27
7	転移性骨癌	217	—	—	66	34
8	多発性骨髄腫	73	—	—	100	—
9	ペーজেット病	85	—	—	64	36
10	骨折	250	—	—	76	24
骨と肝疾患						
11	肝骨転移癌	706	—	—	75	25
その他の疾患						
12	気管支癌	103	18	—	8	74
13	転移性肺癌	72	+	—	—	100
14	おびこ氏病(Ⅱ)	87	—	—	15	85
15	大動脈弁狭窄	132	+	15	12	73

〔使用上又は取扱い上の注意〕

- (1) 未泳動ゲル、ゲル管保存容器の残液及び泳動後の下層バッファーには防腐剤としてチメロサル（水銀化合物）が含まれています。
直接、皮膚や粘膜に触れないようにしてください。
- (2) 本キットは2～8℃で保存してください。凍結防止のため2℃以下にはしないでください。
一度凍結させたゲルは、品質が変化して正しい結果が得られないことがありますので使用しないでください。
- (3) 本キットの有効期間は1年です。使用期限後の製品は、品質が変化して正しい結果が得られないことがありますので使用しないでください。
- (4) 本製品を使用済み後、廃棄する場合は廃棄物の処理及び清掃に関する法律等の規定に従って処理してください。

〔貯蔵方法・有効期間〕

1. 貯蔵方法
2～8℃保存（凍結厳禁）
2. 有効期間
製造後1年（使用期限は外箱に記載）

〔包装単位〕

100 回用 （コード番号：12350）

〔必要な器具〕

丸型ディスク電気泳動槽 （コード番号：05700）
 スペーサー （コード番号：05711）
 PAV1200S （コード番号：03112）

〔主要文献〕

- 1) Epstein E, Wolf PL, Horwitz JP, and Zak B: An indigogenic reaction for alkaline phosphatase in disc electrophoresis. Am J Clin Pathol. vol. 48, 530-534, 1967
- 2) 菰田二一他：アルカリ性フォスファターゼ(AP)・AP アイソザイム, medicina, vol.26, No.10, 1946-1949, 1989
- 3) Sykes E, Kiechle FL, and Epstein E: Association of high-molecular-mass and electrophoretically atypical alkaline phosphatases, Clin Biochem. vol.20, 259-263, 1987
- 4) 菊野晃他：消化器系疾患における血清 ALP アイソザイムのセ・ア膜と PAG ディスク電気泳動との比較検討, 臨床病理, vol.40, pp, 72, 1992
- 5) 大久保昭行, 菰田二一：アルカリ性フォスファターゼ・アイソザイム分析と臨床上への新しい展開—PAG ディスク電気泳動法の評価—, (株) 常光 試薬機器事業部 発行, 1993
- 6) Dingjan PG, Postma T, and Strokes JA: Quantitative differentiation of human serum alkaline phosphatase isoenzymes with polyacrylamide disc gel electrophoresis. Z Klin Chem Klin Biochem. vol.11, 167-171, 1973

* 〔問い合わせ先〕

株式会社 常光 菊川工場 医薬品薬事品質保証部
 静岡県菊川市西方154
 電話 0537-36-1644
 FAX 0537-36-2185

* 〔製造販売元〕

 株式会社 **常光**
 静岡県菊川市西方154
 電話 0537-36-1644