

骨形成マーカー「骨型アルカリフォスファターゼ」 測定の意味と測定法に関する新たな進展

**Bone type alkaline phosphatase as a bone formation marker :
Its role and advance in its measurement technologies**

おお た ひろ あき
太 田 博 明
Hiroaki OHTA

I. はじめに

近年、加齢に基づく酸化ストレスの増大が骨芽細胞機能を低下させるとともに、骨質の劣化を生じさせ、骨強度の低下を来すことが明らかになった。骨粗鬆症の発症メカニズムとして、従来いわれてきたエストロゲン欠乏に加えて、酸化ストレスの関与が指摘されている¹⁾。エストロゲンが欠乏するとRANKLとスクレロステインが増加し、骨吸収を亢進させ、相対的な骨形成の低下が生じる²⁾。従来の骨代謝の評価は、骨吸収活性を反映する骨吸収マーカーが頻用されてきたが、骨形成活性を反映する骨形成マーカーの有用性が最近、強調されるようになった。

そのような背景から、骨型アルカリフォスファターゼ (Bone Specific Alkaline Phosphatase ; BAP) 測定意義が見直されるとともに、測定法も従来頻用されていたEIA (enzyme immunoassay : 酵素免疫測定法) 法から、CLEIA (chemiluminescent enzyme immunoassay : 化学発光酵素免疫測定法) 法に変わりつつある。そこでBAPの測定意義と測定法の変遷について、骨粗鬆症診療とのかかわりを中心に概説する。

II. BAPの生理的意義

アルカリフォスファターゼ (Alkaline Phosphatase : ALP) は細胞膜に存在する糖蛋白質であり、アルカリ性の条件下 (pH9~11) でリン酸エステルを無機リンとアルコールに分解する酵素である。この酵素であるALPは形成する遺伝子によって、4つの型

(小腸型、胎盤型、胎盤様型、臓器非特異型) に分類することができる。このうちの臓器非特異型は肝臓、腎臓、骨組織で多く産生され、各々臓器特異的に糖鎖付加の修飾を受けることから、アインザイムとして電気泳動などにより分離することが可能である。

骨組織に特異的に存在するALPはBAPと呼ばれ、細胞膜に存在し、ホスファチジルイノシトール (Phosphatidylinositol : PI) を介して膜に結合している。BAPは骨新生に伴って骨芽細胞により4量体として算出されたのち、ホスホリパーゼによって分解され、2量体として血中に放出される。

血中BAP濃度は骨芽細胞からの放出速度と肝臓でのクリアランス率の両者に依存する。その結果、骨芽細胞機能が亢進し、骨形成活性が亢進している時期には、血中BAPは上昇する。したがって、ヒトのライフサイクルにおいては血中BAPは生理的に骨形成活性の盛んな幼児期と思春期前半に2つのピークを形成する³⁾ (図1)。このことは骨発育スパートのピークが1~4歳の幼児期と10~14歳の前半に急激な骨発育がなされることとも一致している (図2)。

一方、病的な骨代謝の亢進している骨粗鬆症においても、血中BAPは異常高値を示す時があることも判明している。この時、産生されたBAPは有機リン酸エステルを分解して無機リン酸塩濃度を高めると同時に、ハイドロキシアパタイトの結晶形成を限定するピロリン酸を加水分解して、骨芽細胞周辺部のリン酸濃度を上昇させることによって石灰化を促進すると考えられている。

なお、骨粗鬆症の保険適用はないが、代表的な血中骨形成マーカーであるオステオカルシン (Osteocalcin : OC) とBAPとの違いは、血中BAPが未分化

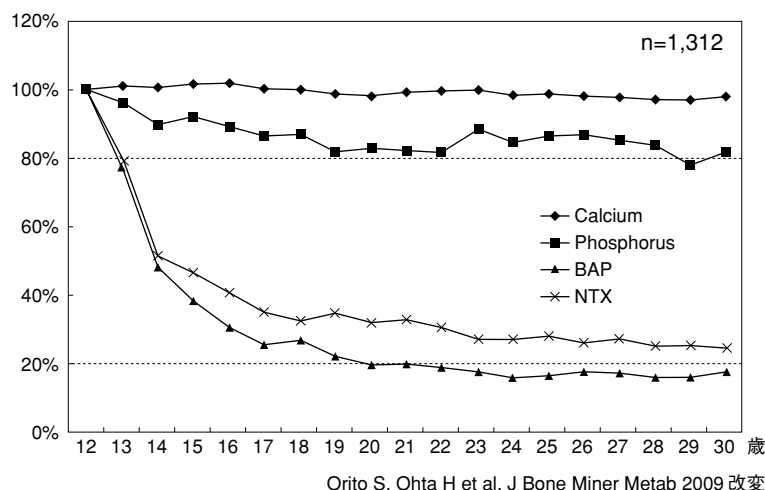


図1 若年女性における血清 Ca, P, BAP, NTX の年齢分布

Caは一定であったが、Pは緩やかに約20%の低下を示した。またBAPとNTXの低下は18歳までに約70%低下した。最大骨量値の獲得には18歳までに介入する必要がある。

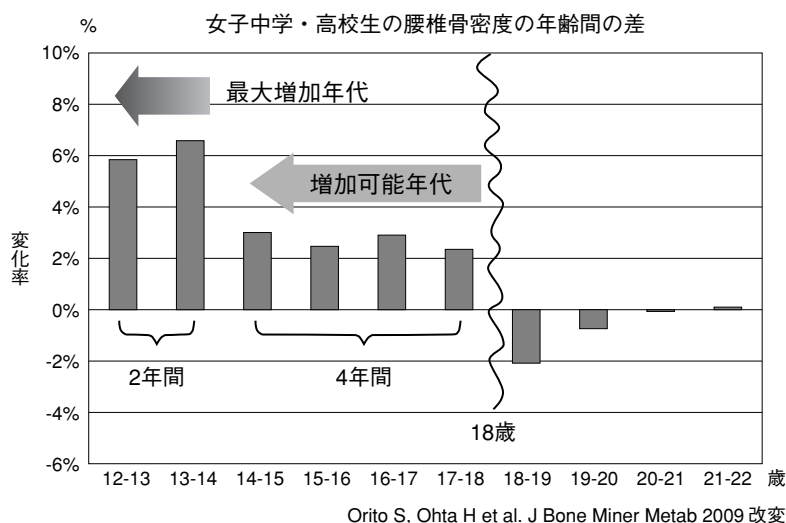


図2 骨増加率からみた骨密度獲得の時期

骨発育から骨密度獲得の最も効果のある時期は12～14歳であり、18歳までが効果があると推測される。

な骨芽細胞活性を反映するのに対して、OCは分化した骨芽細胞によって合成され、BAPよりもより分化した骨芽細胞機能を反映するとされている。さらにOCの生合成は血中ビタミンDの直接的な影響を受けるので、血中BAPとは異なる。そのため、活性型ビタミンD3投与時には、血中OCが上昇するので、その値の解釈には注意すべきである。

血中BAPはその95%が骨および肝臓由来であり、健常者においてその比率は1:1で存在する⁴⁾。特にBAPは骨代謝回転の亢進した海綿骨の骨量とよく相関することから、骨形成マーカーとして有用とさ

れている。

BAPは骨形成に関与する骨芽細胞において合成・分泌される酵素であるが、骨組織表面に存在し、骨を形成している骨芽細胞のみならず、骨芽細胞の前駆細胞にも存在する。したがって、血中BAP値は未分化な骨芽細胞の前駆細胞が新たに骨組織を形成していく細胞数をも反映しており、骨芽細胞系の全細胞数を推測するものであると考えられている。

一方、同じ骨形成マーカーであるOCは成熟骨芽細胞のマーカーとして知られている。そのため、両者を比較することによって、生体内における骨芽細

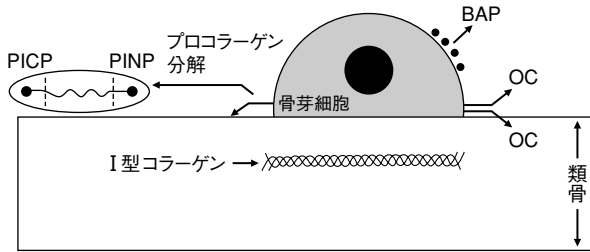


図3 各骨形成マーカーと骨芽細胞

BAP：骨芽細胞の機能を評価
 OC：成熟骨芽細胞の機能を評価
 PICP, PINP：BAPやオステオカルシンより早い段階の
 プロコラーゲン分解を、それぞれ反映する

(日本骨粗鬆症学会, 2004¹⁾より引用)

胞の分化がどの程度進んでいるかを推測可能とされている。またBAPはOCとは異なり、腎機能の影響を受けないことも特徴の一つである。

なお、骨形成マーカーとして保険収載されているものとして、I型プロコラーゲンC末端プロペプチド (Procollagen type I carboxy-terminal propeptide : PICP) やI型プロコラーゲンN末端プロペプチド (Procollagen type I amino-terminal propeptide : PINP) もあるが、BAPやOCよりもさらに早い段階でのプロコラーゲン分解を各々反映する⁵⁾(図3)。

Ⅲ. BAPの各種測定法と基準値

BAPの測定は、初期には電気泳動法や熱処理により不活性させる方法、レクチンによる吸着法などが用いられていたが、いずれも肝型ALPの影響を受け、感度・特異度に問題があり、実用的ではなかった。その後、各臓器で付加される糖鎖などに対する特異的免疫反応を用いた測定法が開発され、肝型ALPの影響が少なくなってきた。

BAPに対する特異性の高いモノクローナル抗体が作製されたことにより、これを用いた免疫アッセイによって、血中BAP値の測定が可能となった。当初は免疫放射定量測定 (immunoradiometric assay : IRMA) 法による血中BAPの測定が開発された。本法はRIA (Radioimmunoassay) 法の一つで、測定を目的とする抗原に標識抗体を加えると、抗原と標識抗体が結合した抗原-抗体複合物ができ、その放射性活性により検量線から濃度を読み取る方法である。肝型ALPと14~16%の交差性が認められるため、BAPに対する特異性と測定感度が改善された酵素免疫測定 (enzymic immunosorbent assay : EIA) 法がその後開発され、従来血中BAP測定はこのEIA法によって、専らなされていた。本法は抗原または抗体に酵素 (西洋ワサビペルオキシダーゼなど) を結合させ、その酵素活性をマーカーとして抗原抗体反応の程度を知り、これによって目的物質の抗原あるいは抗体量を求める方法である。本法の肝型ALPとの交差性は8~15%に低下し、検査も簡便になったことから、BAPの骨形成マーカーとしての評価が高まった。

一般的に骨代謝マーカーにおける基準値は、健常閉経前女性で確立された平均±1.96標準偏差 (SD) とされている。すなわち、平均-1.96SDが正常下限、平均+1.96SDが正常上限に設定されている。ガイドライン⁵⁾では閉経前女性 (30~44歳) の測定値をもとに、上記のごとく平均±1.96SDを各々下限と上限とし、基準値を設定している (表1)。したがって、健常者の骨代謝であるとされるBAPの上限値は、閉経前女性 (30~44歳) では29.0U/l、閉経後女性 (45~79歳) では75.7U/l、男性 (40~59歳) では44.0U/lとなっている。各対象者がこれ

表1 各骨代謝マーカーの基準値

骨吸収マーカー	DPD ¹⁸⁾	2.8 ~ 7.6 nmol/mmol · Cr	(30 ~ 44歳、女性)
	NTX (尿) ¹⁸⁾	9.3 ~ 54.3 nmolBCE/mmol · Cr	(30 ~ 44歳、女性)
	NTX (血清) ²³⁾	7.5 ~ 16.5 nmolBCE/l	(40 ~ 44歳、女性)
	CTX (尿)*	40.3 ~ 301.4 μg/mmol · Cr	(30 ~ 44歳、女性)
骨形成マーカー	BAP ^{**18)}	7.9 ~ 20.9 U/l	(30 ~ 44歳、女性)
	PINP ²³⁾	15.4 ~ 59.9 ng/ml	(40 ~ 44歳、女性)

骨代謝マーカーの基準値は、健常閉経前女性で確立された平均±1.96標準偏差の範囲とする。

() 内は、データ収集された年齢の範囲を示す。

基準値には施設間差があることに注意する。

BCE : bone collagen equivalent (骨コラーゲン相当量)

DPD : デオキシピリジノン

NTX : I型コラーゲン架橋N末端テロペプチド

CTX : I型コラーゲン架橋C末端テロペプチド

(日本骨粗鬆症学会, 2004¹⁾より引用)

以上の値であれば、転移性骨腫瘍などの骨疾患や副甲状腺・甲状腺機能亢進症などの骨・カルシウム代謝異常の存在、すなわち原発性骨粗鬆症以外の代謝性骨疾患である可能性もあることから、鑑別診断が必要となる。

さらにEIA法の場合にも肝型ALPとの交差性は依然として払拭できないため、肝臓疾患を有する患者においては、検査値の解釈には十分な注意が必要である。

骨代謝マーカーに関する現時点での最新のガイドライン⁵⁾は「骨粗鬆症における骨代謝マーカーの適正ガイドライン(2004年版)」であるが、当時はIRMA法によるタンデム-Rオスターゼ[®]とEIA法によるオステオリックス[®]「BAP」が保険適用となり、使用されていた。両者のうちEIA法が多くの臨床検査センターで採用されており、ガイドラインのBAPの基準値はEIA法を基に作成された。

ところが、その後2006年頃より大手臨床検査センターを中心に測定法がEIA法から、化学発光酵素免疫測定(chemiluminescent enzyme immunoassay: CLEIA)法に変更となったことを契機に、多くの検査センターがCLEIA法による測定を行うようになり、現在の国内使用状況はEIA法からCLEIA法に90%以上、置き換わっているとされ、使用頻度は顕著に増加している。

このCLEIA法とは、酵素を標識し、基質もしくは酵素反応によって生じた生成物の化学発光を検出する、または生成物を化学発光反応に導いて発光検出する測定法である。主な標識酵素にはペルオキシダーゼ、ALPなどがあり、発光検出系としてはルミノール/過酸化水素系、ジオキセタン誘導体系などがある。

「アクセス オスターゼ[®]」の場合には、磁性粒子に抗体を固相し、標識物としてALPを用い、発光基質には安定した物質で、発光効率にすぐれたジオキセタン誘導体であるルミジエンPPDを使用して

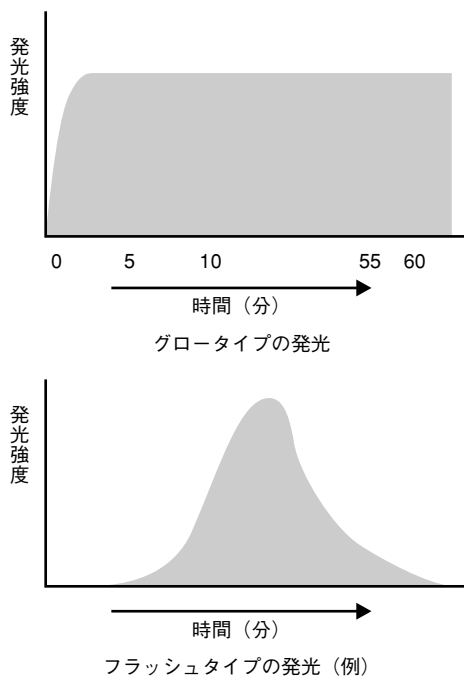


図4

いる。発光時間が安定して長続きするグロータイプの発光法(図4)により、安定した高感度な測定が可能であるという。また、このBAP試薬の場合、BAPがALPであるため、磁性粒子に固相された抗体でBAPを補足し、その酵素活性を用いて発光させている。このように抗体を1種類しか使用していないため、測定目的とする抗原が過剰にあると測定系に影響し、見かけ上、測定値が低くなるというフック現象が起きないとされている。EIA法は抗体をマイクログレートウェルのウェルに固相化しているため、自由度が低く、限定された抗原抗体反応しか行うことができない。一方、CLEIA法の主なメリットは、抗体を非常に細かい粒径である磁性粒子に感作しているため、自由度が高く、生体内に近い抗原抗体反応を行うことができるという。加えて、CLEIA法では酵素を用いた化学発光により、高感度かつ再現性がよりよい測定といえる。また測定時間も短いため、迅速な報告が可能となっている(表2)。

表2 EIA法とCLEIA法の比較

	アクセス オスターゼ (CLEIA法)	オステオリックス「BAP」 (EIA法)
MSC(最少有意変化)	9.0% ¹⁾	23.1% ²⁾
測定時間	30分	240分以上

1) 第13回日本骨粗鬆症学会 シンポジウム8 骨代謝マーカー：ガイドライン改定に向けて
2) 骨粗鬆症診療における骨代謝マーカーの適正使用ガイドライン(2004年度版)

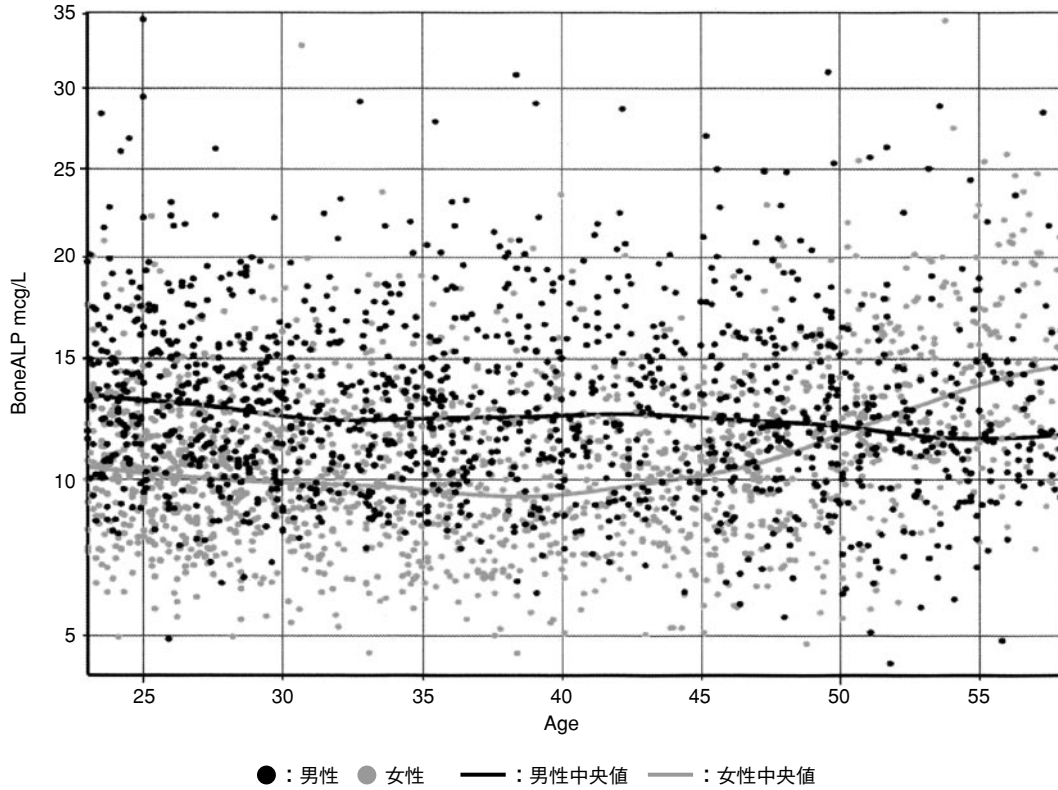


図5 健常者の年齢別 BAP 濃度変化

(出典；共有基準範囲設定国際プロジェクト)

表3 基準範囲

性別	基準範囲 (アクセスオスターゼ添付文書より； ベックマン・コールター社)
男性	3.7～20.9 (μg/L)
閉経前女子	2.9～14.5 (μg/L)
閉経後女子	3.8～22.6 (μg/L)

なお、CLEIA法で測定した健常者における年齢別基準値範囲はIFCC（世界生化学連合）共有基準範囲設定国際プロジェクトの主導にて2009～2010年に実施され、世界各国で共有化されている（図5、表3）。

おわりに

骨脆弱化を高めるものとして、骨密度が1SDずつ低下すると男女ともに骨折リスクは1.5～2.0倍、高値⁶⁾という。一方で、骨強度には骨質の関与も多大にあり、骨芽細胞系の機能低下を把握する骨形成マーカーであるBAPの存在は今後、ますます重要となる可能性がある。FITのサブ解析^{7,8)}からも示

されているように、骨折リスクをより反映するマーカーは骨吸収マーカーよりも骨形成マーカーであることが判明している。特に酸化ストレスの増大によって、骨基質におけるコラーゲンの状況を反映する骨形成マーカーであるP1NPとともに、骨形成の低下そのものを反映すると思われるBAPの臨床応用はその重要性とともにCLEIA法の普及により、測定が迅速かつ高感度となったことから、今後の活用が期待される。

文 献

- 1) 骨粗鬆症の予防と治療ガイドライン 2011年版 ライフサイエンス出版
- 2) Manolagas SC. From estrogen-centric to aging and oxidative stress : a revised perspective of the pathogenesis of osteoporosis. *Endocr Rev.* Jun ; **31** (3) : 266-300, 2010.
- 3) Orito S, Kuroda T, Onoe Y, Sato Y, Ohta H. Age-related distribution of bone and skeletal parameters in 1,322 Japanese young women. *J Bone Miner Metab.* **27** (6) : 698-704, 2009.
- 4) 実践骨代謝マーカー—骨疾患の治療に役立つ骨代謝マーカーの使用法—、福永仁夫編、メディカルレビュー社、2003.

- 5) 骨粗鬆症診療における骨代謝マーカーの適正使用ガイドライン (2004 年度版). *OsteoporosJpn* **12** : 191-207, 2004.
- 6) 骨粗鬆症の予防と治療ガイドライン 2006 年版 ライフサイエンス出版
- 7) Bauer DC, Black DM, Garnero P, Hochberg M, Ott S, Orloff J, Thompson DE, Ewing SK, Delmas PD ; Fracture Intervention Trial Study Group. Change in bone turnover and hip, non-spine, and vertebral fracture in alendronate-treated women : the fracture intervention trial. *J Bone Miner Res.* **19** (8) : 1250-1258, 2004.
- 8) Bauer DC, Santora A, Hochberg M et al. Alendronate reduces fracture risk in lowest bone turnover group. *Bone* **34** (suppl 1) : S92, 2004.