正常犬の creatine kinase 活性値とその isoenzyme

きくた やすし おおにしにかふみ
菊田安至*1) 大西堂文*2)

(昭和 61 年 10 月 17 日受理)

Creatine Kinase and Its Isoenzymes in Dogs
YASUSHI KIKUTA (Toneyama Institute for Tuberculosis, Osaka City University
Medical School, Toyonaka, Osaka 560), TAKAFUMI ONISHI.

SUMMARY

The mean value and normal range of serum creatine kinase (S-CK) activity were 27.3 IU/L and 8-72 IU/L, respectively, in 81 house dogs of various breeds, 26.1 IU/L and 13.0-41.0 IU/L in 62 beagles. The S-CK activity of the puppy showed a tendency to be higher than that of the adult. Three isoenzymes (CK-MM, CK-MB, and CK-BB) were recognized in serum. Their mean percentages and normal ranges were as follows: 46.3% and 9.6-83.0% for CK-MM, 8.2% and 3.5-16.7% for CK-MB, and 38.5% and 3.8-73.3% for CK-BB in the house dogs and 45.3% and 20.0-70.3% for CK-MM, 10.1% and 4.6-14.7% for CK-MB and 30.5% and 14.7-46.4% for CK-BB in the beagles. One or two sub-bands that differed from the three isoenzymes in electrophoretic mobility were found near CK-MM in 61 of 143 dogs.

All the tissues had CK activity. Skeletal muscle abounded with CK-MM. Cardiac muscle had CK-MM and always had few CK-MB. Smooth muscle had all of the three isoenzymes. Brain abounded with CK-BB. Other tissues had low activity, and specific isoenzyme pattern.

The half life period was 122.0 minutes (SD=23.9) for CK-MM, 125.7 minutes (SD=22.7) for CK-MB, and 49.7 minutes (SD=11.0) for CK-BB in circulating blood.

要 約

正常な一般家庭犬 81 頭の血清中の creatine kinase (以下 S-CK) 活性値を測定したところ、その平均値は 27.3 IU/L, 正常範囲は 8.0~72.0 で、正常ビーグル犬 62 頭では、平均 26.1 IU/L, 正常範囲は 13.0~41.0 であり、一般に幼若犬で高い傾向が認められた。S-CK には 3 つの isoenzyme (以下 IE) が認められ、各 IE の百分率の平均および正常範囲は、一般家庭犬では CK-MM が 46.3% (9.6~83.0%), CK-MB が 8.2% (3.5~16.7%), CK-BB が 38.5% (3.8~73.3%) であった。ビーグル犬では CK-MM が 45.3% (20.0~70.3%), CK-MB が 10.1% (4.6~14.7%), CK-BB が 30.5% (14.7~46.4%) であった。なお、これら 143 頭中 61 頭で CK-MM の陰極または陽極側にサブバンドが認められた。

また、creatine kinase (以下 CK) 活性は、調べたすべての臓器中に存在し、CK-MM は骨格筋や心筋に、CK-MB は平滑筋組織や心筋に、CK-BB は脳や平滑筋組織に多い傾向が認められた。

循環血液からの CK の各 IE の半減期は、CK-MM が 122.0 分 (SD=23.9), CK-MB が 125.7 分 (SD=22.7), CK-BB が 49.7 分 (SD=11.0) であった。

これらのことより、S-CK の測定は骨格筋や心筋、平滑筋などの疾患の診断に有用であろうと考えられた。

近年、臨床検査所の発達により多くの血液中の酵素が簡単に測定できるようになり、獣医学領域においても一般開業医に広く用いられるようになった。しかし、その

多くはヒトを対象としたものであり、動物にそのまま応用できるとは限らず、その臨床的意義がよくわかっていないものも少なくない。犬の血清 creatine kinase (S-CK) もその 1 つといえよう。

CK は ATP 代謝に関連した細胞質に存在する転移酵素で、すでに犬の筋疾患の診断に有用であることが報告されている²⁾。しかし、CK は骨格筋以外の臓器にも含

*1) 大阪市立大学医学部附属刀根山結核研究所 (大阪府豊中市刀根山 5-1-1)

*2) 大阪府立大学農学部 (大阪府堺市百舌鳥 梅町 4-804)

まれており、また、isoenzyme (IE) の分析技術の向上により、他の疾患においてもその応用が示唆されている^{4, 6, 9, 10}。ところが、犬の S-CK 中の IE については検査法の違いにより、その結果は必ずしも一致していない^{1, 5, 6}。そこで、現在臨床検査所において広く用いられている、オートアナライザーによる S-CK 活性値の測定法、およびセルロースアセテート膜電気泳動法による IE の分析法を用いて、① 正常犬の S-CK 活性値およびその IE、② 各臓器中の CK (以下 T-CK) 活性値およびその IE、③ CK の各 IE の循環血液からの半減期を測定した。

1. 材 料 と 方 法

1) 正常犬の S-CK 活性値およびその IE

(1) 対象犬：本学附属家畜病院にワクチン接種または健康診断のために来院した犬から、身体一般検査、血液および血清化学的検査 (S-GOT, S-GPT, Al-p, コレステロール, ビリルビン, クレアチニン, BUN, アミラーゼ, リパーゼ, 蛋白分画) によって正常と認めた一般家庭犬 81 頭 (雄: 42 頭, 雌: 39 頭, 年齢: 6 カ月~10 年), および同様の検査で正常であった経歴が明らかな実験用ビーグル犬 62 頭 (雄: 31 頭, 雌: 31 頭, 年齢: 10 カ月~6 年) を用いた。

(2) 被検血清：頸静脈または桡側皮静脈より 5~10 ml ずつ採血し、室温にて直ちに血清を分離した後 4℃ で保存し、24 時間以内に測定した。

(3) S-CK 活性値およびその IE の測定：S-CK は和光 CPK UVAR (和光純薬工業), 日立 712 Autoanalyzer (日立製作所) を用いて、Oliver-Rosalki 変法によって測定した¹¹。測定可能な活性値の範囲は 400 IU/l 以下で、これ以上のものは生理食塩液で希釈して測定した。IE の分析はヘレナ研究所のセルロースアセテート膜 (Titan III-IsoFlur) による電気泳動法を用いて行い (ベロナル緩衝液, pH=8.6, μ =0.03, 300 V, 15分), デンシトメーター (Densitron Model Pan-FV: Jookoo Co., LTD) により百分率を測定した。

2) T-CK 活性値およびその IE

(1) 諸臓器の採取：上記諸検査により正常と認めた雑種成犬 12 頭 (雄 6 頭, 雌 6 頭) を 5% pentobarbital sodium で麻酔後、放血致死させ、直ちに大脳、骨格筋 (大腿膜様筋), 肺, 心臓 (左心室壁), 大動脈弓, 後大静脈, 胃, 空腸, 大腸, 肝臓, 腎臓, 脾臓, 膀胱, 子宮および前立腺を摘出した。各臓器はそれぞれ 7 例としたが、肝臓は 9 例, 骨格筋と子宮は 6 例, 前立腺は 4 例であった。

(2) 被検材料の調製と測定：各臓器から湿重量で 1g を計り、10 倍量の Tris-HCl 緩衝液 (pH=8.6, 5 mM MgCl) 中でミキサー (日本精機 Bio-mixer) を用い 1~2 分間十分に粉碎し、遠心分離 (11,000×G 10 分間) 後、その上清を得た。この上清中の CK および IE を血

清の場合と同様の方法で測定した。

3) CK の各 IE の循環血液からの半減期

(1) 各 IE の精製：半減期を調べるために犬に投与した CK の各 IE は、以下のようにして精製した。CK-MM は犬の骨格筋を材料として、Kuby らの B 法⁷を Fraction 4 まで行い、その溶液をグリシン緩衝液 (1.0 M, pH=9.0) で 12 時間透析して精製した。この溶液の CK 活性値は 150~200 IU/ml で、IE は CK-MM が 100% であった。また、蛋白質濃度は 1.5~2.3 mg/ml (フェノール法) であった。CK-MB と CK-BB はそれぞれ胃と大脳をミンチ化し、1 kg あたり 2 l の KCl (0.01 M) 中で十分に粉碎し、MgSO₄ を 0.03 M になるまで加えてから、エタノール (95%) を体積の 1.5 倍量加え沈殿を取り除き、さらにエタノールを 60% になるまで加え、沈殿を Tris-HCl 緩衝液に十分に溶解した。さらに、硫酸アンモニウムを飽和度が 50% になるまで加え、その沈殿をグリシン緩衝液 (1.0 M, pH=9.0) 中で 12 時間透析した。抽出液の CK 活性値は両方とも 5~10 IU/ml で、蛋白質濃度もそれぞれ 0.5~1.0 mg/ml (フェノール法) であった。大脳の抽出液は CK-BB が 100% であったが、胃の抽出液は CK-MB の割合が 30~35% であった。

(2) 半減期の測定：上記のように抽出および部分的精製を行った各 IE を、実験犬の桡側皮静脈に投与した。投与直前および投与後 15, 60, 120, 180, 240, 300, 360 分に各実験犬の桡側皮静脈より 2~3 ml ずつ採血し、S-CK 活性値および IE を測定した。

(3) 半減期の算出：各 IE の百分率と総 CK 活性値とをかけあわせ各 IE の活性値とした。投与後の各活性値から投与直前の活性値を引いた差から、横軸に時間を、縦軸に活性値の対数をとったグラフ上で最小二乗法により直線を得、その勾配より半減期を算出した。

2. 成 績

1) 正常犬の S-CK 活性値およびその IE

一般家庭犬およびビーグル犬の両群の S-CK 活性値およびその IE の百分率のうち、S-CK 活性値および CK-MB の百分率は対数正規分布を示し、他は正規分布を示した。それぞれの平均値と正常範囲 (平均値±2SD)

表 1 正常犬の血清中 CK 活性値およびそのアイソザイム

	一般家庭犬 (81頭)		ビーグル犬 (62頭)	
	平均値	正常範囲	平均値	正常範囲
活性値 (IU/l)	27.3	8.0~72.0	26.1	13.0~41.0
CK-MM (%)	46.3	9.6~83.0	45.3	20.0~70.3
CK-MB (%)	8.2	3.5~16.7	10.1	4.6~14.7
CK-BB (%)	38.5	3.8~73.3	30.5	14.7~46.4

注) 正常範囲: 平均値±標準偏差×2

表2 正常犬の年齢別・性別による血清中 CK 活性値 (IU/l)

検 査 群	年 齢 別		性 別	
	1才以下	1才以上	雄	雌
一 般 家 庭 犬	36.5 (13~84) N=12	25.8 (7~67)* N=69	26.7 (8~69) N=42	28.1 (7~75) N=39
ビ ー グ ル 犬	26.2 (12~32) N=24	26.1 (13~42) N=38	27.4 (13~38) N=31	24.8 (15~33) N=31

注) 数値は平均値。() 内は正常範囲 (平均値±標準偏差×2)

N: 検体数 * : 一般家庭犬の1才以下と比べて有意差あり (P<0.05)

を表1に示した。両群のS-CK活性値の平均値はそれぞれ27.3 IU/l (SD=16.3) および26.1 IU/l (SD=15.7) で、正常範囲はそれぞれ8.0~72.0 IU/l および13.0~41.0 IU/l であった。一般家庭犬を6ヵ月~1年および1年~10年の2群にわけると、前者の群のS-CK活性値は後者の群のそれよりも有意に高かった (P<0.05)。

なお、ビーグル犬ではこのような差は認められなかった。性別によるS-CK活性値の差は、一般家

庭犬およびビーグル犬ともに認められなかった。性別については一般家庭犬では雌が、ビーグル犬では雄が少し高い活性を示したが、それらは有意な差ではなかった。いっぽう、ビーグル犬の各正常範囲はすべて一般家庭犬よりも狭かった(表2)。

S-CK は表1および図1 (A, B) のとおり基本的には3つのIEが認められ、易動度によりそれぞれを陰極側

図1 血清中CKのセルロースアセテート膜による電気泳動図

よりCK-MM, CK-MB, CK-BBとした。しかし、CK-MMは分離が悪く、143頭中61頭でCK-MMの陰極または陽極側にサブバンド (SB) が認められ、それぞれをSB-1, SB-2とした。

2) T-CK 活性値およびその IE

各臓器1g中のCK活性値およびそのIEの百分率を表3に示した。T-CKは骨格筋で最も高く、ついで心

表3 正常犬の諸臓器中のCK活性値およびそのアイソザイム

組 織	検体数	活性値 (IU/g)	SB-1 (%)	CK-MM (%)	SB-2 (%)	CK-MB (%)	CK-BB (%)
骨 格 筋	6	900.0±383.5	0.0	99.3±1.8	0.0	0.0	0.7±1.8
心 臓	7	539.1±203.9	0.0	89.4±9.7	0.0	6.9±2.5	0.0
膀 胱	7	215.1±55.9	0.0	14.9±4.6	4.2±4.2	40.4±5.9	42.0±6.7
胃	7	154.8±45.3	0.0	7.5±2.1	0.0	29.1±6.4	66.8±9.3
大 脳	7	140.6±59.0	1.1±1.8	5.6±5.0	0.0	0.0	93.4±5.4
大 腸	7	122.9±47.1	0.0	12.1±4.2	0.0	36.5±4.5	51.3±6.9
小 腸	7	97.3±49.6	0.0	12.2±4.3	0.0	34.7±5.0	53.1±5.8
子 宮	6	39.1±16.4	0.0	9.0±8.4	1.1±1.7	13.7±6.7	78.5±4.5
前 立 腺	4	39.1±14.5	0.0	13.5±12.3	1.0±2.1	21.8±7.7	63.8±12.8
脾 臓	7	37.6±19.6	0.0	6.9±2.7	4.2±4.2	15.5±5.2	73.4±7.5
犬 動 脈	7	14.4±6.8	0.0	16.0±13.7	0.4±1.2	31.0±12.2	56.8±23.7
肺	7	10.8±1.8	1.1±1.8	8.5±4.9	10.2±8.0	13.1±3.3	66.5±8.5
肝 臓	9	8.5±2.7	7.6±4.0	0.0	28.4±4.6	0.0	64.0±8.0
腎 臓	7	5.4±2.8	14.6±3.7	0.0	22.8±5.3	2.3±2.3	46.6±11.3
静 脈	7	3.6±2.7	0.0	20.3±15.3	4.0±7.3	25.6±14.9	42.6±23.7

注) 数値は平均値±標準偏差。

SB-1: CK-MMの陰極側に現われるサブバンド, SB-2: CK-MMの陽極側に現われるサブバンド

表4 各 CK アイソザイムの循環血液からの半減期

アイソザイム	検体数	半減期 (分)
CK-MM	7	122.0 $\pm$ 23.9*
CK-MB	5	125.7 $\pm$ 22.7*
CK-BB	6	49.7 $\pm$ 11.0

注) 数値は平均値 $\pm$ 標準偏差。*: CK-BB の半減期と比べて有意差あり ($P < 0.05$)

図2 各 CK アイソザイムの循環血液からの消失曲線

筋、膀胱などの平滑筋組織および大脳で高活性値を示した。骨格筋は CK-MM がほぼ 100%，また大脳は CK-BB がほぼ 100% であった。心筋では CK-MM の割合が約 90% であったが、CK-MB も必ず認められた。平滑筋組織では常に 3 つの IE が認められ、CK-BB, CK-MB, CK-MM の順に高い傾向にあった。その他の臓器では CK の活性値は低かったが、肝臓や腎臓では SB が認められた。

3) CK の各 IE の循環血液からの半減期

CK の各 IE を犬に投与した後の活性値の変化は図 2 のとおりであり、それぞれの活性値と投与後の時間との相関係数は 0.97 以上であった。これらの直線の傾きより算出した CK の循環血液からの半減期は表 4 のとおり、CK-MM が 122.0 分 (SD=23.9)，CK-MB が 125.7 分 (SD=22.7)，CK-BB が 49.7 分 (SD=11.0) であり、CK-BB の半減期は他に比べて有意 ($P < 0.05$) に短かった。

3. 考 察

本実験で得られた成犬の S-CK 活性値は、過去の報告と比較的よく一致していた²⁻⁶⁾。また、一般家庭犬では幼若犬の方が有意に高値を示したが、これは S-CK 活性値は若い犬のほうが高いとする報告⁴⁾を支持するものであった。IE については、CK-MB や CK-BB が犬の正常血清中にはみられないという報告^{1,5,6)}もあるが、コントロール発色剤で発色しなかったことから、これらの CK

バンドは犬の血清中に存在するものと考えられた。このように 3 つのバンドすべてが認められることから、電気泳動法による検査は有用であると考えられた。本成績では CK-MM の分離が明瞭でなく、さらに総検体数の約 43% に SB が認められた。これは、Adenylatekinase またはその他による非特異的反応とも考えられが、コントロール発色剤では発色しないなど、CK であることには間違いないが、その詳細については不明である。以上のことより、今回用いた CK の分析法は SB の解釈に問題は残るが、犬の S-CK の IE 分析には有効であると結論できよう。

一般家庭犬とビーグル犬を比較すると、平均値には大きな差はみられなかったが、正常範囲はすべてのビーグル犬のほうが狭かった。これは遺伝的背景および飼育環境の均一性に起因しているものと考えられる。

今回得られた T-CK 活性値およびその IE は、犬および人に関する報告^{4,10)}におおむね一致する結果であった。CK-MM は骨格筋や心筋にきわめて多く存在するが、CK-MB や CK-BB は心筋や大脳に必ずしも特異的ではなく、平滑筋組織にも多く存在することが明らかとなった。いっぽう、低活性を示した臓器においても T-CK 活性値は S-CK に比べ十分に高い値を示した。しかし、肝臓や腎臓などで SB がみられた原因については、S-CK の場合と同様に不明であり、またこれらの臓器中の SB が S-CK の SB の由来であるとするには活性値が低すぎると考えられた。以上のことから、血清中の CK-MM は骨格筋や心筋の疾患、CK-MB は心筋や消化管や子宮といった平滑筋組織、CK-BB は大脳や平滑筋組織の疾患の指標となり得ることが示唆された。ただし、大脳中の CK は脳血液関門の存在から循環血液中に容易に出現するとは考えにくい。

犬の循環血液からの CK の半減期に関する報告はこれまでいくつかある^{9,10)}が、今回の成績と比較すると CK-MM や CK-BB の半減期についてはおおむね一致した結果であり、CK-MB についてはやや長い傾向がみられた。この差異の原因については、投与した CK の量や純化の程度または分析法などの相違が考えられる。CK-BB の半減期が他の 2 つに比べて有意に短いことは、血清中の CK-BB の変化を起こすにはそれだけ多くの CK-BB が細胞から遊出する必要があることを示している。また、すべての IE の半減期が非常に短いことから、たとえ CK の異常高値が存在したとしても、その原因が一過性であれば 24 時間以内に十分に低い値になることが予測された。

稿を終るにあたり、CK および IE の分析は(株)日研生物医学研究所の協力によることを付記する。なお、本研究の要旨は第 98 回日本獣医学会 (鹿児島: 1984) において発表した。

引用文献

- 1) AHMED, S. A., WILLIAMSON, J. R., ROBERTS, R., et al.: *Circulation*, 54, 187~193 (1976).
- 2) DIBARTOLA, S. P. and TASKER, J. B.: *J. A. A. H. A.*, 13, 744~753 (1977).
- 3) HEFFRON, J. J. A., BOMZON, L. and PATTINSON, R. A.: *Vet. Rec.*, 98, 338~340 (1976).
- 4) KELLER, P.: *Am. J. Vet. Res.*, 42, 575~582 (1981).
- 5) KLEIN, M. S., SHELL, W. E. and SOBEL, B. E.: *Cardiovasc. Res.*, 7, 412~418 (1973).
- 6) KNOB, M. and SEIDL, I.: *Clin. Chim. Acta.*, 106, 287~293 (1980).
- 7) KUBY, S. A., NODA, L. and LARDY, H. A.: *J. Biochem.*, 191~201 (1953).
- 8) MORIN, L. G.: *Clin. Chem.*, 23, 205~210 (1977).
- 9) RAPAPORT, E.: *Cardiovasc. Res.*, 9, 473~477 (1975).
- 10) ROBERTS, R., HENRY, P. D. and SOBEL, B. E.: *Circulation*, 52, 743~754 (1975).
- 11) ROSALKI, S. B.: *J. Lab. Clin. Med.*, 69, 696~705 (1967).

新発売

豚・馬・牛・犬の消化管内線虫
肺虫駆除に!!

広範囲駆虫剤〈フルベンダゾール製剤〉

フルエキサル® 散 5%

フルエキサル® 散 50%

フルエキサル® 錠

特長

- 広範囲で優れた駆虫効果。● 作用は殺虫的。
- 安全性が高く、嗜好性が良い。

フジサワ 藤沢薬品工業株式会社
大阪市東区道修町4丁目3 丁541
電話 (06) 202-1141 (大代表)