内科学の展望 (第4回)

筋疾患を中心として

座長 徳島大学医学部第一内科 三好 和夫

(4) 筋ジストロフィー症と血清 creatine phosphokinase (CPK)

東京大学医学部薬理学教室

江橋 節郎

REVIEW ON INTERNAL MEDICINE, 1976—MUSCULAR DISEASES

Chairman: Kazuo MIYOSHI, MD

The First Department of Internal Medicine, School of Medicine, Tokushima University

(4) PROGRESSIVE MUSCULAR DYSTROPHY AND CREATINE PHOSPHOKINASE

Setsuro EBASHI, MD

Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, University of Tokyo, Tokyo

はじめに

本日は沖中先生の代役として出席したが、わたくし自身血清CPKの研究を行なつたのは今から10数年前であり、その後CPKの研究、また血清酵素の研究を行なっていないので、本日は血清CPKの発見当時の事情について回顧録的な意味でお話したいと思う。

I. Creatine phosphateとCreatine phosphokinase

Creatine phosphokinase(CPK)は最近ではcreatine kinaseと言う名称が一般に用いられているが、図1に示すようにATP, ADPとcreatine(Cr), creatine phosphate (Cr-P)をcoupleする酵素である。

図1

骨格筋とくにfast muscleではATPとそれに数倍するCr-Pが含まれている。骨格筋において何故にCr-Pという形で蓄えられなければならないか明らかではないが、その理由の一つとして次のようなことが考えられる。

ATPと収縮との関係をみるとATP濃度が低いと収縮し、一方ATP濃度が高くなると収縮が抑制され弛緩してしまう。従つてATP濃度にはあるoptimumの濃度が必要である。そこで収縮系に直接関係のないCr-Pという形で蓄えられCPKを回してATPを一定に保つ様に調節されているということになる。

Cr-Pは筋研究の発展の途上で極めて重要な役割をはたしたが、研究の流れを変える主役ではなく、常に脇役であつた。

1930年Lundsgaardは乳酸の発生を伴わない筋収縮の存在を発見した。この事は当時Meyerhofらにより乳酸が丁度今日のATPと同じ様に収縮に重要であるという考えを根底からくつがえしたといえる。そして乳酸に代つてCr-Pが脚光を浴びてき

た。Cr-Pはそれ以前にEggletn夫妻およびFiskeにより発見されたものである。

1934年LohmannはいわゆるLohmann反応を発見し、このことによりCr-Pは直接収縮に関係せず、Cr-P以前に発見されたATPが主役ではないかという考えに変つて行なつた。

当時Lohmann反応はATPよりADPが出来る反応ではなく、AMPが出来る反応として記載されたが、この理由は反応系に $2\text{ADP} \rightleftharpoons \text{AMP} + \text{ATP}$ を促進するadenylate kinase(myokinase)が混在していたためである。従つて厳密に言えばLohmann反応はCPK, adenylylate kinaseの二つの酵素の混合物の反応系を指すべきものであろうが、この発見はCPKの存在を示したものとして意義深い。

CPKは1954年Kuby, Noda, Lardyにより結晶化され、細かいkineticsの研究が行なわれた。そして、

の反応系が確認され、且つ酵素の性質が明らかになつた。

II. 筋ジストロフィー症(DMP)における血清酵素

DMP患者の血清酵素を測定する研究は1949年Sibley, Lechningerにより指摘された⁸⁾。すなわちJournal of National Cancer Instituteに発表されたわずかに二行の記載であるが、2例のDMP患者の血清aldolaseの増加が報告されている。わが国では杉田らにより1958年“血清aldolaseの測定”⁴⁾とその論文の中で、DMPにおいて高値を示す事が記載されている。しかしaldolaseは肝臓にも大量に含まれており、筋肉に特異的とはいえない。ことに血球に存在することは血液採取を非常にやりにくくさせる。わたくしはその意味でaldolaseよりもはるかに骨格筋に特異的であるので、CPKの測定を行なつた方が良いのではないかと提言した。

その結果、桃井、豊倉、杉田らと共同の非常に短い血清CPKにかんする最初の論文が生れることとなつた⁵⁾(図2)。これは、別に深く考えたわ

けでもなく、全く侥幸だつたというべきである。

このようにして臨床診断の補助としての血清CPKの意義が明らかになつて来たが、この事実を冲中先生が逸早く臨床に取入れられたことは、その後の血清CPKの研究の進歩にとつて極めて有意義であつた。また各種の疾患について測定を行ない、CPKはaldolaseよりDMPにより特異的であり、血清aldolaseの増加する肝疾患、悪性腫瘍において増加しないことも明らかとなつた⁶⁾。この時点で血清CPKのDMPにおける診断的価値についてはほぼ確立されたと考えてよいように思われる。

III. Cysteine添加の問題⁷⁾

CPKはSH酵素であるが、筋肉から取り出した酵素の測定にはSH基保護剤を必要としない。ところが血清CPKは採取後時間がたつとともに低下して来る。そこでその保護剤としてcysteineを添加すると活性は上昇し、かつ安定することがわかつた(図3)。このことは予想外であつて患者の血清中に何かあるかも知れないという期待をいだかせたが、兎骨格筋から抽出したCPKを健康者血清中に入れておくとやはり活性が低下し、かつcysteineで活性が上昇することがわかつた(図4)。つまりDMP血清CPKがcysteineで活性化される現象はDMPに特異的ではなく、一般的なCPKに結合する蛋白により不活性化されたためであろうと想像出来る。ただcysteineによる活性の回復は多少問題を残している。それはβ-mercaptoethanol, dithiothreitolでは-S-S-が完全にもどるがcysteineの場合にはそう簡単にもどらないのでこの点は今後も追求する必要がある。

いずれにせよcysteine添加は活性を上昇させ、かつ安定化させるので、今日各種の測定法に用いられている。その後小沢ら⁸⁾により、われわれが日本で広く行なつているNodaらの方法の変法である無機磷酸法とNAD, NADPH法との比較が報告されている。

IV. CPKの臓器分布⁹⁾

CPKは骨格筋に多量に含まれてはいるが圧倒

HIGH CREATINE PHOSPHOKINASE ACTIVITY OF SERA OF PROGRESSIVE MUSCULAR DYSTROPHY

Creatine phosphokinase is one of the most abundant soluble enzymes in skeletal muscle (1). Considering the fact that the aldolase activity in serum increases remarkably in patients with progressive muscular dystrophy (2, 3), it might be reasonable to examine the creatine phosphokinase activity in sera of this disease.

As shown in Table I, about seventy per cent of patients with progressive muscular dystrophy showed a remarkable increase in creatine phosphokinase activity. This is in sharp contrast with other subjects, in which a marked activity of the enzyme was not observed except for two cases with spinal progressive muscular atrophy of rather atypical type.

The formation of creatine phosphate by serum of progressive muscular dystrophy from creatine and ATP was also examined by other methods (4,

TABLE I
Creatine Phosphokinase Activity of Sera

	Number of cases	Enzymatic activities					
		Less than 0.3	Between 0.3 and 0.6	Between 0.6 and 1.0	Between 1.0 and 2.0	Between 2.0 and 5.0	More than 5.0 and 10.0
Progressive muscular dystrophy	19	3	1	1	5	4	4
Spinal progressive muscular atrophy	10	7	1	0	1	0	1
Amyotrophic lateral sclerosis	5	5	0	0	0	0	0
Other neuromuscular diseases	24	22	2	0	0	0	0
Liver diseases	9	6	2	1	0	0	0
Other diseases	10	10	0	0	0	0	0
Normal	5	5	0	0	0	0	0

Figures in columns show the number of cases of respective activities. Activities are expressed as the number of μ moles of phosphocreatine formed per ml. of serum per hour at 38° and pH 8.8. Each ml. of reaction mixture A contained, 6 μ moles MgCl_2 , 2 μ moles adenosine triphosphate, 30 μ moles tris-(hydroxymethyl)-amino-methane buffer (pH 8.8) and 0.2 ml. of serum; mixture B contained 24 μ moles creatine in addition to mixture A. Reactions were conducted at 38° for 30 minutes. Difference of so-called inorganic phosphate between mixture A and B was determined to measure the phosphocreatine produced (1).

5) than described in the legend of Table I; these gave almost the same values. The stability of the enzymic activity of the serum to ethanol treatment coincides with that of the creatine phosphokinase in skeletal muscle (1). Red blood corpuscles contained practically none of this enzyme. Therefore hemolysis does not significantly interfere with the measurement of this enzyme activity.

The above results suggest that creatine phosphokinase activity in serum is a valuable tool in studies on myopathies.

We wish to express our thanks to Prof. S. Okinaka and Prof. H. Kumagai for their encouragement and also to Dr. F. Ebashi and Dr. I. Ishiyama for their assistance.

REFERENCES

- (1) Noda, L., Kuby, S. A., and Lardy, H. A., *J. Biol. Chem.*, **209**, 191 (1954)
- (2) Sibley, J. A., and Lehninger, A. L., *J. Nat. Canc. Inst.*, **9**, 203 (1949)
- (3) Schapira, G., Dreyfus, J. C., and Schapira, F., *Semaine des Hopitaux de Paris*, **29**, 1917 (1953)
- (4) Fiske, C. H., and Subbarw, Y., *J. Biol. Chem.*, **81**, 629 (1929); Umbreit, W. W., Burris, R. H., and Stauffer, J. F., *Manometric Techniques and Tissue Metabolism*, Burgess Publishing Co., Minneapolis, 2nd ed., p. 190 (1949)
- (5) Weil-Malherbe, H., and Green, R. H., *Biochem. J.*, **49**, 289 (1951)

Department of Pharmacology
Faculty of Medicine

University of Tokyo, Tokyo

Okinaka's Clinic, Faculty of Medicine

University of Tokyo, Tokyo

SETSURO EBASHI

YASUO TOYOKURA

HIRONAO MOMOI

HIDEO SUGITA

(Received for publication, December 1, 1958)

図3. 血清CPKの時間経過(白丸)とcystineによる活性化(黒丸)を示す。文献7)より引用

図4. 健康人血清に加えられた家兎, CPKの時間経過とcystineによる活性化(黒丸)を示す。文献7)より引用

的と言える程でなく、心筋にも相当含まれており、このことは心筋梗塞の診断でこの酵素が役立つことを示している。また、脳にも相当含まれているが、そのアイソザイムパターンは骨格筋と全く異なっている。

V. 血清CPKによる保因者の発見

すでに1959年われわれはDuchenne患者のみでなくその兄弟姉妹の中に血清CPKが高値を示すことを発表し(図5)、また未発表ではあつたが患者の母親の中に血清CPKの高値を示す例のある

ことを観察していた。

そして1962年頃よりDuchenne型患者両親とくに母親において高値を示すことが次々に報告され、また母親の中に軽度の臨床症状のあることが注目され始めた。

この事実は1963年に至つてSugita, Tyler¹⁰⁾を含めほぼ同時の4つの論文に、Lyon仮説で説明出来る事が発表された(図6)。血清CPKはDuchenne型DMPの保因者発見の手段という意味で遺伝学的にも応用されるようになったのである。

図5. *は臨床的には正中であるが血清酵素の上昇している症例を指す。文献6)より引用

図6. Duchenne型DMP患者両親の血清CPK活性. 文献10)より引用

VI. DMPで血清CPK活性が上昇する理由

DMPにおける血清CPKを含めて酵素の増加する理由としては、筋細胞の破壊、膜の透過法の亢進等と一応説明はされているものの、もう少しつつ込んだ研究が必要であろう。

Duchenne型DMPで増加しない酵素として、adenylate deaminaseがある。この酵素はCPKよりはるかに骨格筋に特異的であるが、血中には増加しない¹¹⁾。このメカニズムは何であろうか。単なる分子の大きさのみでは説明出来ない。酵素遊出の機構はDMPの病因の解明のためにも、基礎の立場からもつと追求されるべき問題であると考えらる。

文 献

- 1) Lohmann, K: Über die enzymatische Aufspaltung der Kreatinphosphorsäure; zugleich ein Beitrag zum Chemismus der Muskelkentraktion. Biochemische Zeitschrift. 271: 17, 1934. —
- 2) Kuby, SA, et al: Adenosinetriphosphate-Crea-

tine Transphosphorylase 209: 191, 1954. —3) Sibley, JA and Lihninger, AL: Aldolase in the serum and tissues of tumor bearing animals. J Nat Cancer Inst 9: 303, 1949. —4) 杉田秀夫, 他: 血清Aldolaseの測定, 最近医学, 13: 213, 1958. —5) Ebashi, S, et al: High creatine phosphokinase activity of sera of progressive muscular dystrophy. J Biochem 46: 103, 1959. —6) Okinaka, S, et al: Serum creatine phosphokinase activity in progressive muscular dystrophy and neuromuscular diseases. Arch Neurol 4: 520, 1961. —7) Okinaka, S, et al: Ceptine-stimulated serum creatine kinase in health and disease. J Lab Clin Med 64: 299, 1963. —8) Ozawa, E, et al: Comparison of various methods for determination of serum creatine phosphokinase. Jap J Exp Med 37: 265, 1967. —9) Fujic, Y: Distribution of creatine phosphokinase among mammalian tissues. Seitainokagaku 11: 207, 1960. —10) Sugita, H and Tyler, FH: Pathogenesis of muscular dystrophy 76: 231, 1963. —11) 杉田秀夫: シンポジウム 内科診療における酵素の意義, 7) 進行性筋ジストロフィー症の酵素的な研究. 日内会誌 54: 40, 1965.

(4) 筋ジストロフィー症と血清creatine phosphokinase(CPK) 討論要旨

質問 東大脳研神経内科 周 弼明
素晴らしい御仕事をかくも淡々と話されてこの

上ない感銘を受けました。CKは筋線維の微細構造中何処に局在しているのでしょうか。

答

東大薬理 江橋節郎

CKは原則的には筋漿中に存在すると思われます。生化学的な検索では、ミオフィラメントおよび筋小胞体にも見出されるが、その結合はあまり強いものとは思われません。余談ですが、adenylate deaminaseはその大部分がmyosinに強く結合しているといわれています。

質問

徳大医酵素研 勝沼信彦

1) GOT, GPTは心筋障害の場合、血清での上昇と逆相関的に障害筋中では低下していますが、筋ジストロフィー症での血清CPKが非常に高くても筋中のCPKは必ずしも減少しないのは筋ジ

ストロフィー症の本態と何か大切な関連のある異常が筋中CPKの動態につき起こっているのでしょうか。お考えをお聞かせ下さい。

2) キャリヤーで高い例についての研究を上記でおやりになつたものはありませんでしょうか。

答

東大薬理 江橋節郎

CPKについては、そういう風にいわれていますが、ただ測定の方法などに問題があるので、確立した事実だとはいいいかねると思います。最近、わが国でも、ジストロフィー鶏が使える様になつたので、御検討頂ければ有難いと思います。