〔原 著〕

Macro creatine kinase type 1 および type 2 の 生化学的性状

森山隆則*・信岡 学*・高杉佑一**・牧野幹男**

SUMMARY

The biochemical properties of macro creatine kinase type 1 found in seven patients and type 2 found in one case were examined. In the cases of macro creatine kinase type 1, three patients with creatine kinase BB linked immunoglobulin G and three patients with creatine kinase MM linked immunoglobulin A were determined. Two forms of macro creatine kinase were easily differentiated by the determination of their distinct activation energies. Molecular masses of macro creatine kinase type 1 were approximately estimated to be from 230,000 to 330,000, and multi-molecular forms of macro creatine kinase type 2 were observed by the method of gel permeation high performance liquid chromatography. Two forms of macro creatine kinase were mainly detected in patients with malignancies.

Key words: CK-linked immunoglobulin, CK isoenzyme, immunoglobulin, mitochondrial CK, activation energy.

はじめに

Creatine kinase (CK, ATP: creatine N-phosphotransferase, EC 2.7.3.2) のアイソエンザイム電気泳動において、しばしば異常バンドがみられることがある。

そのおもな成因として、①CK アイソエンザイムの sub-band^{1,2)}, ②免疫グロブリン結合 CK の macro CK type 1^{3,4)}, および③高分子ミトコンドリア由来 CK (mCK) の macro CK type 2^{5,6)} の存在が知られている。

今回、われわれは、CK アイソエンザイム電気泳動および免疫阻害法による CK-MB 活性測定において、異常バンドあるいは測定値の解離のみられた 8 症例を経験した。そこで、Stein⁷⁾ らの方法に準じて、これらの患者血清の活性化エネルギーを測定し、さらに、その他の生化的性状を検討した結果、7 症例の macro CK type 1

と 1 症例の macro CK type 2 を同定したので、その検討結果を報告する。

症例と方法

1. 症 例

当検査部の CK アイソエンザイム測定において、1) 電気泳動法で異常バンドが認められた例、および、2) 免疫阻害法で測定値の解離を示した例の合計 8 症例の血清を検討試料とした。これら 8 症例の年齢、性別および基礎疾患を Table 1 に示した。

2. 総 CK 活性の測定

総 CK 活性は、GSCC 法⁸⁾ に準じた測定キット (monotest CK NAC, Boehringer) を使用し、Eppendorf ACP 5040 型自動分析機 (37°C) にて測定した (正常値, 男 24~195 IU/l, 女 24~170 IU/l)。

Biochemical properties of macro creatine kinase type 1 and type 2.

* Takanori Moriyama, Manabu Nobuoka, Mikio Makino; 旭川医科大学附属病院検査部

** Yuichi Takasugi; 旭川医科大学第 3 内科

Correspondence address: Takanori Moriyama, Clinical Laboratory, Asahikawa Medical College, 4-5, Nishikagura, Asahikawa 078, Japan.

(受付 1989 年 7 月 10 日, 受理 1989 年 8 月 18 日)

Table 1. Age, sex and clinical diagnoses of eight patients with serum macro CK.

Case	Age ^a	Sex ^b	Death ^c	Clinical diagnoses
1	69	F	No	Myocardial infarction
2	83	F	No	Depression
3	34	F	No	non A-non B acute hepatitis
4	80	M	2 days	Liver cancer (lung metastasis)
5	49	F	No	Cardiomyopathy, hypertension, polymyositis
6	67	M	No	Gastric cancer, intestinal obstruction
7	65	M	71 days	Liver cirrhosis, liver cancer
8	55	M	2 days	Lung cancer (brain metastasis)

^a Age in years. ^b F=female, M=male. ^c Days of death after admission. Serum macro CK type 1 was detected in the serum of case 1, 2, 3, 4, 5, 7 and 8. Serum macro CK type 2 was detected in the serum of case 6.

3. CK アイソエンザイムの電気泳動

1.0% アガロースゲルフィルム (Paragon CK, Beckmann) を支持体とし, 50 mM 3-(N-morpholine)-2-hydroxypropane sulfonic 緩衝液 (pH 7.0) で, Beckmann 社の電気泳動槽にて実施した (100 V, 20 分).

4. CK-MB 活性の測定, 加熱試験 および 活性化エネルギーの測定

CK-MB 活性は, 抗 CK-M 抗体を用いた免疫阻害法キット (monotest CK-MB, Boehringer) を使用した. 加熱試験は⁷⁾, 被検血清を 45°C 20 分の加熱処理後, 上記免疫阻害法で CK 活性を測定し, 残余活性 (%) で示した. 活性化エネルギー⁷⁾は, 被検血清の総 CK 活性を 25, 30 および 37°C の各条件で測定し, Arrhenius プロットから算出した.

5. 分子量の測定

分子量は, Superose 12 HPLC⁹⁾ (Pharmacia, 150 mm NaCl, 50 mM リン酸緩衝液, pH 7.2) によって検討した. Superose 12 カラムの検量は, 分子量マーカーキット (LMW, HMW, Pharmacia) を用い実施した. 被検血清は, 0.2 ml を挿入し, CK 活性はテトラゾリウム塩法キット (シノテスト) を用いてモニターした.

6. CK 結合免疫グロブリンの同定

CK 結合免疫グロブリンの同定は, Titan-III lipo 膜を支持体とした免疫向流直接法¹⁰⁾および免疫混合法¹¹⁾によって実施した. 前者の CK 活性染色には, CK 分画試薬 (日本商事) を用い, 後者の CK 活性測定には, 上述のシノテスト社のキットを用いた. 各種抗血清は Dako 社の製品を使用した.

7. 再結合試験

CK 結合免疫グロブリンの CK アイソエンザイム特性は, Kanemitsu¹²⁾ によって報告された sandwich electroimmunofixation (SEIF) によって検討した. 抗

原として用いる CK アイソエンザイムは高 CK 活性のプール患者血清 (総活性: 1200 IU/l, BB: 18%, MB: 18%, MM: 64%) を使用した. 各症例の免疫グロブリン分画は, Sephadex G-200 カラムクロマトグラフィー (1.0×95 cm, 150 mM NaCl, 50 mM グリシン・塩酸緩衝液, pH 3.0) により分取されたものを使用した. SEIF は, 上述の CK アイソエンザイム電気泳動法に準じ実施した. 各種抗血清は, Dako 社の製品を使用し, CK 活性の染色は CK 分画試薬 (日本商事) を用いて実施した.

結 果

1. 被検血清の総 CK 活性, CK ザイモグラム, および CK-MB 活性 (Table 2)

8 症例の総 CK 活性は, 正常値内のものから正常上限値の 32.4 倍のものまで多様であった. CK ザイモグラムでは, CK-MB と CK-MM の中間に異常バンドがみられた症例 (case 1, 2, 3, 7), MM バンドに異常のみられた症例 (case 4, 5) および MM バンドより陰極側に異常バンドがみられた症例 (case 6, 8) の 3 種類に分類された. 免疫阻害法による CK-MB 活性値では, 5 症例 (case 1, 2, 4, 7, 8) において 100% 以上を示す解離データが得られた.

2. 加熱試験および 活性化エネルギー の測定 (Table 2)

加熱試験では, 5 症例 (case 1, 2, 6, 7, 8) に 50% 以上の残余活性がみられた. 活性化エネルギーの測定値 (kJ/mol) では, case 6 の 100.0 を除く全症例が 27.0~63.9 の範囲で 75 以下であった.

3. macro CK の分子量, 結合免疫グロブリンの同定 および再結合試験 (Table 2)

case 6 を除く全症例の分子量は, Superose 12 HPLC

Table 2. Biochemical properties of serum macro CK found in eight patients.

Case	Total CK activity (IU/l)	CK-MB (%)	Heat inactivation (%)	Activation energy (kJ/mol)	CK zymogram			Molecular mass	CK-linked Immunoglobulin	CK isoenzyme specificity
					B	B	MM			
1	151	125.8	54.9	45.2	⋮	⋮	■	310,000	IgG-κ, λ	B B
2	159	157.2	95.8	27.0	⋮	⋮	■	330,000	IgG-κ	B B
3	2,505	2.0	37.0	51.4	⋮	⋮	■	230,000	IgA-κ, λ	MM
4	138	104.3	48.7	63.4	⋮	⋮	■	230,000	IgA-λ	MM
5	5,505	2.1	13.0	44.7	⋮	⋮	■	330,000	IgA-κ, λ	MM
6	76	86.8	80.3	100.0	⋮	⋮	■	1: 160,000 2: 1,000,000	(Macro CK type 2)	
7	111	148.6	67.0	51.9	⋮	⋮	■	310,000	IgG-λ	B B
8	122	192.0	94.9	63.9	⋮	⋮	■	310,000	IgA-λ	Not determined

Fig. 1. Fractionation of patient's serum (case 6) by gel permeation high performance liquid chromatography on a Superose 12 column (1.0×30 cm).

0.2 ml of patient's serum was injected and eluted at flow rate of 0.4 ml/min with 150 mm NaCl, 50 mm phosphate buffer (pH 7.2). Protein (—) was monitored by absorbance at 280 nm. CK activity (---) was monitored by absorbance at 570 nm. Multi molecular forms of CK were observed.

の検討から約 230,000~330,000 の範囲であった。case 6 は、約 160,000 と 1,000,000 にそれぞれ二つの高分子 CK のピークがみられた (Fig. 1)。免疫向流直接法および免疫混合法による検討から、結合免疫グロブリンとして IgG 型の 3 例 (case 1, 2, 7) および IgA 型の 4 例 (case 3, 4, 5, 8) が同定された。一方、case 6 は、いずれの方法においても結合免疫グロブリンは検出されなかった。再結合試験では、SEIF の検討から IgG 型の 3 例は CK-BB、IgA 型の 3 例は CK-MM との再結合が確認さ

れた。

以上の結果から、case 1, 2, 3, 4, 5, 7 および 8 は免疫グロブリンと結合した macro CK type 1 であり、一方、case 6 は、これらの症例の活性化エネルギーに対し高値 (100.0 kJ/mol) であることおよび分子量の多様性から、高分子化した mCK (macro CK type 2) と考えられた。

考 察

CK ザイモグラムにおいて, IgG 結合型の 3 例は, いずれも CK-MB と CK-MM バンドの間に異常バンドがみられた. 一方, IgA 結合型の 4 例は pre MM, MM および post MM バンドにそれぞれ異常バンドが観察され多様性を示した. これら CK ザイモグラム上の結合免疫グロブリンによる特性については, Urdal ら⁴⁾, Bohner ら¹³⁾ および Kanemitsu ら¹⁴⁾ の報告と一致した. 一方, mCK と考えられた case 6 も MM バンドより陰極側に異常バンドがみられ, 既報^{5,15,16)} の mCK と同様であった.

抗 CK-M 抗体を用いた CK-MB 活性測定法において, macro CK type 1 や type 2 が同抗体によって活性阻害を受けないことが報告^{4,15)} されている. 今回のわれわれの検討においても, case 3, 5 を除いて活性阻害はみられなかった. また, macro CK type 1 および type 2 が熱安定性であるという性質が報告^{7,17)} されているが, 同じ case 3, 5 を除き約 50% 以上の残余活性がみられた. したがって case 3, 5 は, これらの点において, Bohner ら¹⁷⁾, Stein ら⁷⁾ の報告と分離する症例であり, 免疫グロブリンの結合様式と熱安定性の関連性が示唆され興味深い.

活性化エネルギーの測定値では, Stein ら⁷⁾ の報告と一致して, 結合免疫グロブリンが証明された全症例では 75 kJ/mol 以下であった. 一方, case 6 は, 明らかに高値であったことから macro CK type 2 (mCK) と考えられた. CK ザイモグラムにおいて, mCK は MM バンドより陰極側に泳動^{5,16)} されることから, 同位置に泳動される免疫グロブリン結合 CK との鑑別のため, 活性化エネルギーの測定はとくに重要と考えられた.

分子量の検討では, ここに報告した免疫グロブリン結合 CK は, 230,000~330,000 であった. したがって, 分子量 230,000 の IgA 結合型では, IgA 1 分子に CK 1 分子, 310,000~330,000 の IgA 結合型では, IgA 1 分子に CK 2 分子, および 310,000~330,000 の IgG 結合型では, IgG 1 分子に CK 2 分子の結合比が推定される. これらの結果は, Kanemitsu ら¹⁴⁾, Yuu ら¹⁸⁾, Pudek ら¹⁹⁾ によって報告された数値とほぼ一致するものである. しかし, Bohner ら¹³⁾ は, さらに高分子 (650,000) な免疫グロブリン結合 CK の症例を報告していることから結合比の多様性が示唆される. 一方, mCK の分子量に関して, Kanemitsu ら²⁰⁾ は, ヒト心筋および肝から精製された mCK は分子量 350,000 と

80,000 の 2 種類みられたことを報告している. また, 近年, Schlegel ら²¹⁾ は, ニワトリの心筋から精製された mCK の Superose 12 HPLC による検討から, 2 量体 (86,000) と 8 量体 (364,000) が存在することを報告している. 今回, われわれが経験した症例は, Superose 12 HPLC による検討から, 160,000 と 1,000,000 のピークが検出された. これに対し, 分子量 240,000⁶⁾, 350,000²²⁾ および 700,000 以上⁷⁾ の各 mCK の症例が報告されていることから, mCK の高分子化の多様性が示唆された.

結合免疫グロブリンの CK アイソエンザイム特異性については, IgG 結合型は BB に対して, IgA 結合型は MM に対してそれぞれ親和性がみられた. この点に関しては, Urdal ら⁴⁾, Kanemitsu ら¹⁴⁾ の報告と一致するものであり, 免疫グロブリンのクラスによってアイソエンザイム特異性が異なることは, 大変に興味深い. Urdal ら²³⁾ は, 患者血清の CK-BB-IgG 複合体から IgG を精製し, CK-BB の免疫学的測定法を確立している.

最後に, macro CK と疾患との関連性であるが, type 1 の症例では 7 例中 3 例が悪性腫瘍の患者であり, しかもいずれの症例も, macro CK が検出されてまもなく死亡した症例であった. これに対して, Kanemitsu ら²⁴⁾ は, 悪性腫瘍患者の 11.5% に免疫グロブリンと CK の複合体が検出され, しかも進行期の患者が多かったことを報告している. わが国における酵素結合性免疫グロブリンの全国調査²⁵⁾ においても, 悪性腫瘍および筋ジストロフィーにおいて高率にみられたことが報告されており注目される. 一方, ここに報告した mCK の一症例は, 胃癌患者である. これは Kanemitsu ら⁶⁾ の mCK は, とくに胃癌患者に多くみられ, 総 CK 活性値は, 正常域であったという報告と一致するものである.

CK 結合免疫グロブリンが報告^{3,4,13)} されてからすでに 10 年が経過して, 検出感度の優れた同定方法^{10,11)} や解析方法^{7,12)} などが確立されている. 日常の臨床検査で見いだされる一つ一つの症例に検討を加え, 臨床的意義を探究することが今後のとくに重要な課題と考えられた.

結 論

1) 7 症例の macro CK type 1 (IgG 結合型 3 例 IgA 結合型 4 例) と 1 症例の macro CK type 2 が経験された. 再結合試験において IgG は CK-BB に対して, IgA は CK-MM に対してそれぞれ結合特異性がみられた.

2) 活性化エネルギーの測定によって, macro CK type 1 と type 2 が容易に区別された.

3) 分子量の検討では, macro CK type 1 の症例では, 免疫グロブリン 1 分子に対し, CK 1~2 分子の結合比が推定された. 1 症例にみられた mCK には分子量の多様性がみられた.

4) macro CK type 1 および type 2 は, それぞれ悪性腫瘍患者に多くみられ, 疾患関連性で注目された.

謝 辞

Case 1, 2 および 6 の患者血清をそれぞれ提供くださった市立旭川病院検査科の阿部茂美氏, 室蘭医師会検査センターの本田豊秋氏および新日鉄室蘭病院検査科の西山恭弘氏に深謝いたします.

文 献

- 1) Chapelle, J. P. and Heusghem, C.: Clin. Chem., 26: 457, 1980.
- 2) Panteghini, M. et al.: Clin. Chim. Acta, 155: 1, 1986.
- 3) 金光房江, 他: 臨床病理, 26 (補): 78, 1978.
- 4) Urdal, P. and Landaas, S.: Clin. Chem., 25: 461, 1979.
- 5) Yuu, H. et al.: Clin. Chem., 24: 2054, 1978.
- 6) Kanemitsu, F. et al.: Clin. Chim. Acta, 138: 175, 1984.
- 7) Stein, W. et al.: Clin. Chem., 28: 19, 1982.
- 8) Bergmeyer, H. U.: Z. Klin. Chem. Biochem., 8: 659, 1970.
- 9) Karande, A. A. et al.: J. Immunol. Methods, 99: 173, 1987.
- 10) 堀井康司, 加野象次郎: 生物物理化学, 27: 315, 1983.
- 11) 戸沢辰雄, 森田祐代: 臨床病理, 31: 732, 1983.
- 12) Kanemitsu, F. et al.: Clin. Chim. Acta, 160: 27, 1986.
- 13) Bohner, J. et al.: Clin. Chim. Acta, 97: 83, 1979.
- 14) Kanemitsu, F. et al.: Physico-Chem. Biol., 24: 301, 1981.
- 15) Wevers, R. A. et al.: Clin. Chim. Acta, 101: 103, 1980.
- 16) Rogalsky, V. Y. et al.: Clin. Chem., 32: 13, 1986.
- 17) Bohner, J. et al.: J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 19: 1021, 1981.
- 18) Yuu, H. et al.: Clin. Chem., 26: 1816, 1980.
- 19) Pudek, M. and Jacobson, B. E.: Clin. Chem., 28: 2434, 1982.
- 20) Kanemitsu, F. et al.: Clin. Chim. Acta, 119: 307, 1982.
- 21) Schlegel, J. et al.: J. Biol. Chem., 263: 16942, 1988.
- 22) Kanemitsu, F. et al.: Clin. Chim. Acta, 122: 377, 1982.
- 23) Urdal, P. and Kierulf, P.: Clin. Chem., 27: 83, 1981.
- 24) Kanemitsu, F.: Clin. Chim. Acta, 160: 19, 1986.
- 25) 五味邦英: 酵素結合性免疫グロブリンの我が国での発症頻度ならびに分布に関する研究報告書 (文部省総合研究. 班長: 菅野剛史), 1982, p. 46.