〔症例報告〕

クレアチンキナーゼアイソザイム電気泳動分析により
検出されたアルコール脱水素酵素

赤野 香子*・戸沢 辰雄**

SUMMARY

We found the fluorescent band revealed to cathodal position than mitochondria creatine kinase (CK) using the method of fluorescent staining (TAITAN N-CK, Helena) on CK electrophoresis, when we examined the serum of a patient with aplastic anemia who have been in serious liver damage (because of appearing graft versus host disease after bone marrow transplantation). However, it is widely noted that the alcohol dehydrogenase (ADH) band is believed to more cathodal position than lactate dehydrogenase (LDH) 5 on LDH electrophoresis. In this study, the fluorescent band revealed to cathodal position than mitochondria CK was also shown without substrate and addition of ethanol enhanced fluorescent strength. From these observations, these results suggest that this abnormal CK band will be ADH.

Key words: creatine kinase electrophoresis, mitochondria creatine kinase, graft versus host disease, alcohol dehydrogenase.

はじめに

クレアチンキナーゼ (CK) (EC 2.7.3.2) のアイソザイムには、細胞質上清分画に存在する CK 1 (BB), CK 2 (MB), CK 3 (MM), そしてミトコンドリア分画に存在するミトコンドリア CK (CK-mit) があり、日常検査の CK アイソザイム分析には電気泳動法が汎用されている。電気泳動法により CK 1 はプレアルブミン位に、CK 2 は α_2 -グロブリン (glob) 位に、CK 3 は β - γ -glob 位に、そして、CK-mit は CK 3 よりも陰極側の γ -glob 位に CK 活性を呈する¹⁾が、CK-免疫グロブリン複合体が、 α_2 -glob 位から γ -glob 位の範囲に結合するアイソザイムと、免疫グロブリンのク

ラスに依存する多彩な易動度をもつ異常 CK 活性を呈する²⁾。また、非特異活性を呈するものにアデニールキナーゼ (AK) がある³⁾が、この酵素はセルロースアセテート膜上では CK 3 の陰極側に、寒天ゲル上では CK 3 の陽極側に出現する⁴⁾ことが知られている。今回、これまでに報告のない CK-mit よりもさらに陰極側に異常活性を示した例を経験し、この異常活性をアルコール脱水素酵素 (ADH) (EC 1.1.1.1) による非特異活性であると同定した。

症 例

再生不良性貧血の 30 歳、男性。再生不良性貧血は 1 年 2 カ月前に感冒症状で発症し、10 カ月前に診断さ

Alcohol dehydrogenase observed in separation of creatine kinase isoenzymes by electrophoresis.

* Kyoko Akano; 兵庫医科大学病院中央臨床検査部

** Tatsuo Tozawa; 兵庫医科大学中央臨床検査部

Correspondence address: Kyoko Akano, Clinical Laboratories, Hyogo College of Medicine, 1-1, Mukogawa-cho, Nishinomiya 663, Japan.

略号: CK, クレアチンキナーゼ; ADH, アルコール脱水素酵素; Glob, グロブリン; mit, ミトコンドリア; LDH, 乳酸脱水素酵素

(受付 1997 年 4 月 30 日, 受理 1997 年 7 月 29 日, 刊行 1998 年 2 月 15 日)

れた。その際の血液学的検査の成績は、WBC 2900 (N 35%) / μ l, RBC 260×10^4 / μ l, Hb 8.6 g/dl, Plt 2.0×10^4 / μ l であった。骨髓移植のため当院を受診、6カ月前に施行。約4カ月前に移植片宿主症 (GVH) が出現し、2カ月前に肺炎が発症し、2日前から急速に腎機能、肝機能がともに低下し、多臓器不全のため死亡した。この異常活性は、死亡1日前と2日前に検出された。

材料と方法

1) 一連の患者血清と対照に CK-mit をもつ患者血清と正常人血清を用いた。

2) CK アイソザイム分析は、TAITAN III ISO-FLOR (ヘレナ) を支持体に 300 V, 10 分間の泳動をした。活性染色には、クレアチンリン酸を基質とし、生成した NADH を蛍光測定する試薬 (タイタン N-CK, ヘレナ) を用いた。

3) 異常活性の性状分析は、次のごとく処理を加えた血清、ないしは試薬を用いてタイタン膜電気泳動法によるアイソザイム分析を行った。

① 65°C, 1 分間加熱血清。② 4 M 尿素を等量混合した血清。③ 抗 CK-M 抗体 (25 倍濃度に調整した CK-MB 活性測定用抗体液, ベーリンガー) を等量混和した血清。④ 基質ブランク試薬。⑤ 1/200 容量のエタノールを混和した染色試薬。

4) 原血清とおのおのの処理血清については、アガロース膜 (カイロン) を支持体に、100 V 50 分間泳動し、同基質であるが、生成した NADPH からホル

マザンを生成させる試薬 (イアトロセット CK-S, ヤトロン) も用いてアイソザイム分析した。さらに、原血清については、生成した NADPH を蛍光測定する試薬 (タイタン CK-US, ヘレナ) を用いてもアイソザイム分析を行った。

成 績

1) 死亡1日前と2日, 3日前, 4カ月前 (GVH 併発ごろ), 骨髓移植前それぞれの生化学的検査と血液学的検査の成績を Table 1 に示した。

2) 血清 CK アイソザイムパターン

死亡前日の血清では、CK1 (BB) が 6%, CK2 (MB) が 18%, CK3 (MM) が 65%, さらにその陰極側に 11% の異常活性を認めた。異常活性は対照血清の CK-mit よりさらに陰極に認められた (Fig. 1)。死亡当日の血清でもこの異常活性が 8% 認められたが、死亡3日前の血清では認められなかった。

3) 異常活性の性状分析

この異常活性は 65°C 1 分間の加熱で失活し、4 M 尿素で阻害された。基質ブランク試薬では CK3 位に AK と推定される活性帯とこの異常活性だけが認められた。

そして同じ染色試薬にエタノールを添加した試薬を用いた (Fig. 2) 際には、B-2 に示した患者血清では、異常活性帯だけが 45% と明白に増強した。

また、NADP を用いた蛍光測定用試薬では、この異常活性帯を観察できず、さらにエタノールを添加しても、変化がみられなかった。

Table 1. Laboratory data on the patient (the days before death and before BMT).

the day before death	1st day	2nd day	3rd day	4th month	before BMT
AST (U/l) (10-35)	2360	2506	376	27	16
ALT (U/l) (5-35)	707	765	186	34	11
LDH (U/l) (120-230)	7517	7073	1930	639	173
ALP (U/l) (100-340)	3720	3390	2620	640	350
G-GTP (U/l) (8-90)	852	850	581	71	24
CK (U/l) (30-200)	134	115	—	15	—
CK-MB (U/l) (<15)	91	115	—	—	—
BUN (mg/dl) (8-18)	53.2	40.3	—	21.4	15.1
UA (mg/dl) (2-6)	11.5	9.1	—	6.7	5.2
CRN (mg/dl) (0.70-1.50)	3.38	2.53	—	1.19	0.98
WBC ($\times 10^3$ / μ l) (50-80)	290	112	90	21	22
RBC ($\times 10^4$ / μ l) (380-530)	268	171	222	258	185
Hb (g/dl) (12-17.5)	8.3	5.4	6.4	8.6	5.3
Ht (%) (35-51)	27.2	17.2	22.1	27.3	16.1
Plt ($\times 10^4$ / μ l) (12-28)	2.3	2.1	4.5	7.3	1.3

(): Reference intervals, —: no test.

Fig. 1. CK isoenzyme densitogram patterns of patients' sera by cellulose acetate electrophoresis.

1) control marker (BB, MB, MM), 2) mitochondria CK, 3) the patient's serum. (↑) extra activity band.

一方、これとは別の NADP よりホルマザンを生成し測定する試薬を用い、アガロース膜電気泳動法にて分析した。CK 1, CK 2, CK 3 と AK によると推定できる活性帯のみが原血清中に認められた。

考 察

今回報告した異常活性は加熱ないしは尿素により阻害されたことから、易動度は似ているが、まずは CK-mit でないと推定されたが、基質プランク試薬によりこの異常活性が認められたことから、非特異活性であると推定された。翌日に実施した別の NADP を含む活性染色試薬を用いた CK アイソザイム分析では、この異常活性を示さなかったことと、ほかの情報を得るために実施した、この異常活性を呈する患者血清のタイタン膜電気泳動による乳酸脱水素酵素 (LDH) アイソザイム分析により検出された ADH の易動度が、この異常活性の易動度と同一であることに着目し、この異常活性が ADH である可能性が推定された。そして CK アイソザイム分析用試薬 (NAD を含む) へのエタノール添加^{5,6)}がこの異常活性を増強させたことから、この異常活性が ADH と判定された。

Fig. 2. CK isoenzyme patterns of patients' sera were incubated reagent added ethanol by cellulose acetate electrophoresis.

1) control marker (BB, MB, MM), 2, 3) the patient's sera, 4) normal serum. A) ethanol (-), B) ethanol (+). (↑) origin.

ADH はその 95 % が肝臓に存在し、基質特異性に乏しく、補酵素に NAD を必要とする。この患者血清中で測定された逸脱酵素は著しく高値を示し、かつ LDH アイソザイム分析から大量の ADH の逸脱も示された。これらの成績はこの判定を支持している。約 2 週間の冷蔵保存によりこの異常活性は失活し、そのために分子サイズの測定および、ピラゾールによる阻害試験⁷⁾などはできなかった。この ADH の血清中での不安定性は知られている⁵⁾。

LDH アイソザイム分析で ADH がショックや高度な循環不全のような重篤な状態の患者で検出されることはよく知られている。本症例は、骨髄移植により移植片宿主症となり、極度に肝機能、腎機能が低下し、

多臓器不全となり、その結果 ADH だけでなく多くの酵素およびアイソザイムが血中に逸脱する可能性が高い。また、CK-MB 活性測定においても総 CK 活性と同等程度まで上昇し、CK-mit の出現が CK-BB の出現とともに推測され、誤認の要因の一つとなった。

CK 染色試薬に依存するが、ADH が CK アイソザイム分析でも検出されることはこれまでに報告されておらず、ADH を、易動度がお互いに近い CK-mit と誤認する可能性が大きいので注意深い観察が必要である。

文 献

- 1) Kanemitsu F. Creatine kinase isoenzymes. *J Chromatogr* 1988; 429: 399-417.
- 2) Tozawa T. Electrophoretic analysis of enzyme-linked immunoglobulins and their clinical significance. *J Chromatogr* 1991; 569: 347-65.
- 3) Massey TH, Barta JS. Creatine kinase isoenzymes in neonate plasma by cellulose acetate electrophoresis: Albumin and adenyl kinase artifacts. *Clin Chem* 1982; 28: 1174-6.
- 4) McCoy MT, Aguanno JJ, Ritzmann SE. Salicylate mimicking an abnormal CK-isoenzyme. *Clin Chem* 1981; 27: 1662-3.
- 5) Podlasek SJ, McPherson RA, Threatte GA. Characterization of apparent lactate dehydrogenase isoenzyme 6: A lactate-independent dehydrogenase. *Clin Chem* 1984; 30: 266-70.
- 6) Cabello BC, Lubin J, Rywin AM, Frenkel R. Significance of a six lactate dehydrogenase isoenzyme (LDH₆). *Am J Clin Pathol* 1980; 93: 253-8.
- 7) Kato S, Ishii H, Kano S, Horii K, Tsuchiya M. Evidence that "lactate dehydrogenase isoenzyme 6" is in fact alcohol dehydrogenase. *Clin Chem* 1984; 30: 1585-6.