[シンポジウム：古くて新しい Zymography—その基礎と臨床]

脳卒中とホスホグリセリン酸ムターゼ (PGAM)

林 泰 三

SUMMARY

Serum PGAM activities and the percentage of brain-subunit activity against total activity (B/T) were determined in the cases of apoplexy and traumatic injury on head. PGAM activities already increased and peaked within 2h after the stroke. This findings were also recognized in the cases with head-trauma. They gradually decreased in 12 h, 24 h and 3 day after the attack. The grade and duration on the elevation of PGAM activities were more dominant in the serious cases than in the slight cases. In these cases with apoplexy and head-trauma, B/T ratio almost remained in the normal range, namely about 90%. In the CSF, PGAM activities were consist of B-subunit, and significantly correlated with LD-activities and the protein content. In the experiment on SHRSP, serum PGAM activities were markedly increased during the stroke, compared with that of control rat. We suggest that serum PGAM activities would be an useful marker of apoplexy and the other brain damage.

Key words: phosphoglycerate mutase (PGAM), apoplexy, head-trauma, marker of brain damage.

はじめに

種々の酵素, その Zymogram が各種疾患の診断, 病態分析に用いられて, 久しいものがある。われわれはこのたび, まだ臨床的に確定された marker のない脳卒中について, 解糖系の酵素の一つである phosphoglycerate mutase (PGAM) の診断的有用性ならびに脳障害との関連について, 検討を行った。本酵素は CK と同様 MM, MB, BB のアイソザイムをもつ^{1,2)}が, 血中 Zymogram は, CK に反し B-subunit 優位である^{3,4)}。われわれは特に脳卒中の急性期の変化, すなわち stroke 後, 2 時間以内から 1~3 日の経過を重点的に検索した。また脳障害という観点から, 頭部外傷例の経過, および脳脊髄液中の本酵素の動態についても検索し, 一方共同研究により, 脳卒中易発症高血圧ラット (SHRSP)⁵⁾を用い, stroke 発

生後の PGAM の変化を正常血圧の control ラットと比較した。

また近年問題となっている老人性痴呆についても, 若干の検索を試みた。

試料ならびに方法

大阪医大附属病院中央検査部に提出された患者血清, 脳脊髄液 (CSF), ならびに健常者血清につき, PGAM 活性, B-subunit 活性, B/T を測定した。また大阪府三島救命救急センターに緊急搬送された, 脳卒中 65 例 (クモ膜下出血を含む脳出血 55 例, 脳梗塞 8 例, 脳腫瘍 2 例), 心筋梗塞 33 例, 頭部外傷 12 例の各症例について, 発症後 2 時間以内, 6~12 時間後, 1~3 日後の 3 時期について, PGAM の経時的変化を追究した。

大阪老人性痴呆医学研究会の協力により, 85 歳以

Phosphoglycerate mutase (PGAM) in apoplexy.

Taizo Hayashi; 大阪医科大学

Correspondence address: Taizo Hayashi, Osaka Medical College, 3-4-5, Aoyamadai, Suita 565-0875, Japan.

第 48 回日本電気泳動学会総会・シンポジウム

下のアルツハイマー型痴呆 (DAT) 65 例, 脳血管性痴呆 (VD) 52 例につき, PGAM を検索した。

家森, 池田らとの共同研究にて, SHRSP⁹⁾を用い, 脳血管障害発症後に, 同週齢の正常血圧の WKY (Wistar Kyoto) ラットを control とし, ペントバルビタール麻酔により, 下大静脈より採血し測定に供した。サンプルとした SHRSP の大脳は, 外観および組織学的にも, 腫大, 軟化巣, 出血巣, また梗塞巣が確認された。

PGAM の活性は Bergmyer の方法⁹⁾を日立 7150 自動分析装置に応用し実施^{7,8)}した。B-subunit 活性の測定は, PGAM-MM が SH 酸化剤の 4-チオン酸カリウムで失活する^{7,9)}ことを利用し測定し, B-subunit 活性と総活性の比, B/T を計算した。本測定による正常範囲に関しては, 健常者 50 例 (20~55 歳) につき検索し, 41 ± 16 U/l (mean $\pm$ 2 SD) を得た⁹⁾。また外来通院患者血清で, routine の検査項目が正常範囲にある 227 例 (3~89 歳) につき測定し, 42 ± 22 U/l (mean $\pm$ 2 SD) の値を得た。これらの所見から, 正常範囲を総活性 22 U/l から 60 U/l と設定した。同様に B-subunit 活性は 20 U/l から 56 U/l, B/T は 81% から 100% と設定した。

成 績

1. 各種疾患における PGAM の AST, ALT, LD, CK との相関関係

Table 1 に示すごとく, PGAM はランダムに採取した各種疾患 210 例において, AST, LD と最も著明な相関関係がみられた。肝疾患においては AST と, 悪性腫瘍においては LD と, 心疾患においては AST, LD, CK と, 中枢神経系疾患においては, CK

と有意の相関関係を認めた。

2. PGAM の脳卒中, 頭部外傷, 心筋梗塞の急性期における変動

Table 2 に脳卒中 (65 例), 頭部外傷 (12 例), 心筋梗塞 (33 例) の発症後, 2 時間以内, 6~12 時間後, 1~3 日後の PGAM の経過を示した。

1) 脳卒中: 発症後 2 時間以内に, 総活性, B 型活性ともに有意の上昇を示した。B/T は正常範囲にあった。以後漸減しながら, 1~3 日後も高値を持続した。B/T は正常範囲で経過した。

2) 頭部外傷: 発生後 2 時間以内に, 総活性, B 型活性ともに著明な上昇を認めた。B/T は正常範囲にあった。6~12 時間後には, 活性はいずれも急速に低下し, 1~3 日後には, ほぼ正常範囲となった。B/T は軽度低下した。

3) 心筋梗塞: 発症後 2 時間以内では, 総活性, B 型活性, B/T のいずれも正常範囲にあった。しかし 6~12 時間後には, 一転して両活性ともに, 急激に上

Table 1. Correlation between total PGAM and the other enzyme activities in the various diseases.

Disease	n	AST	ALT	LD	CK
all cases	210	0.809	0.450	0.851	0.559
liver d.	18	0.962	0.852	0.237	0.139
malig. tumor	32	0.758	0.476	0.872	0.185
leukemia	18	0.368	0.301	0.761	0.178
heart d.	41	0.928	0.367	0.928	0.971
CNS d.	54	0.538	0.098	0.503	0.689
respiratory d.	15	0.310	0.203	0.556	0.239
diabetes mellitus	13	0.805	0.501	0.241	0.137
autoimmune. d.	19	0.951	0.931	0.986	-0.032

d: disease, CNS: Central Nervous System

Table 2. Changes on total PGAM, B-PGAM activities and B/T ratios in the acute stage of the cases with apoplexy, head-trauma and acute myocardial infarction.

Diseases	PGAM		after occurring		
			within 2 h	6-12 h	1-3 day
Apoplexy (65 cases)	T-PGAM	U/l	77± 44	71± 37	71± 33
	B-PGAM	U/l	68± 36	56± 25	58± 26
	B/T	%	91± 5	87± 10	87± 12
Head-trauma (12 cases)	T-PGAM	U/l	198±115	105± 64	63± 36
	B-PGAM	U/l	180±106	85± 47	49± 21
	B/T	%	90± 6	83± 7	85± 13
Myocardial infarction (33 cases)	T-PGAM	U/l	44± 19	314±186	163±135
	B-PGAM	U/l	38± 17	149± 69	100± 58
	B/T	%	87± 7	55± 15	74± 14

昇し peak に達し、一方 B/T は著明に低下した。1〜3 日後は、活性はいずれも低下し、B/T は上昇し、正常化の傾向をとったが、なお異常値を示した。

3. PGAM の脳卒中、頭部外傷における重症度との関係

脳卒中、頭部外傷を発生後 1〜2 カ月の判定にて、生存例と死亡例に分け、各発生後 24 時間以内の PGAM の値を比較した。脳卒中においては、生存例 (52 例) は、T-PGAM: 68 ± 34 U/l, B-PGAM: 57 ± 27 U/l。死亡例 (13 例) はそれぞれ、 99 ± 53 U/l, 81 ± 42 U/l で、いずれも生存例に比し、有意の ($p < 0.05$) 高値を示した。

頭部外傷においても、生存例 (6 例) の T-PGAM: 124 ± 70 U/l, B-PGAM: 107 ± 58 U/l に対し、死亡例 (6 例) はそれぞれ、 182 ± 110 , 159 ± 95 U/l と、高値をとったが、SD の関係から有意差としては明らかではなかった。

4. PGAM と CK-BB の比較

脳卒中と頭部外傷の急性期において、CK-BB を合わせて検索した。T-PGAM 65 U/l 以上、CK-BB 4% 以上の高値を示した症例は、脳卒中の場合、PGAM は 65 例中 44 例 (68%)、CK-BB は 59 例中 9 例 (15%) であった。頭部外傷の場合、PGAM は 12 例中 11 例 (92%)、CK-BB は 12 例中 6 例 (50%) であった。

5. PGAM の CSF 中の動態

CSF 検体 52 例について測定、Table 3 に示した。SD は大きい、総蛋白量 (TP) は増加、グルコースは正常であった。酵素活性は、mean で LD が最も

高く、次いで PGAM であり、そのほとんどは B 型であった。その他 AST, ALT, CK は低値であった。

Fig. 1 に示すごとく、TP は PGAM, LD とそれぞれ $r=0.575$, $r=0.615$ と有意の相関関係を示した。また Fig. 2 に示すごとく、PGAM と LD の間には、 $r=0.914$ の高度の相関がみられた。

6. SHRSP の脳卒中発症例の PGAM

SHRSP の stroke 発症例を、同週齢の control の WKY ラットと比較した。T-PGAM は SHRSP においては 410 ± 36 U/l ($n=18$) で、WKY は 220 ± 18 U/l ($n=5$) であった。B-PGAM は SHRSP で 220 ± 18 U/l ($n=18$)、WKY で 125 ± 12 U/l ($n=5$) と、いずれも stroke を発生した SHRSP において、control に比し著明な高値を認めた。B/T は SHRSP, control それぞれ 53.7%, 56.8% と差異はみられなかった。

7. 老人性痴呆症における PGAM の検索

85 歳以下の老人性痴呆の症例を、DAT (65 例) と VD (52 例) に分け、PGAM を検索した。DAT は平

Table 3. Levels of protein, glucose and enzyme activities in cerebrospinal fluid (CSF) of 52 cases.

Total protein	85.1 ± 132.3	mg/dl
Glucose	56.2 ± 15.0	mg/dl
T-PGAM	57.4 ± 180.6	U/l
B-PGAM	55.4 ± 176.2	U/l
LD	138.0 ± 400.3	U/l
AST	16.2 ± 12.0	U/l
ALT	1.0 ± 0.8	U/l
CK	2.7 ± 4.8	U/l

Fig. 1. Correlation between total protein (TP) and activities of PGAM and LD in CSF ($n=52$).

Fig. 2. Correlation between total PGAM and LD activities in CSF ($n=50$).

均年齢 69.9 歳, PGAM は 36.1 ± 16.1 U/l. VD は平均年齢 73.8 歳, PGAM は 53.9 ± 39.1 U/l で, 両者の間には有意差 ($p < 0.005$) がみられ, DAT は VD に比し低値をとった。

考 察

PGAM は分子量約 60,000^{1,2)} で, その isozyme は筋肉特異的な M-subunit と非筋肉特異的な B-subunit からなる dimer^{1,2)} で, 両者の amino acid sequence には, 80% の homology がみられている¹⁰⁾. PGAM は骨格筋において, 最も高い活性をもち, その isozyme はほとんど MM であり, 一方心筋は MM, MB, BB をともにもつ唯一の臓器である¹¹⁾. 脳を始め肝, 肺, 小腸, 大腸, 赤血球の isozyme は, もっぱら BB で占められている¹¹⁾. このように isozyme は CK と似た型をもつが^{3,2)}, 血清中の main band は BB であり, MM は低値で^{3,4,8)}, CK とは反対の態度をとっている。

PGAM は Table 1 に示すごとく, 種々の疾患の marker enzyme とも相関関係はみられるが, 血清中の本酵素の zymogram が, BB 優位である^{3,4,8)} という特徴から, 脳卒中について検索した. 現在脳障害に関する適当な marker はなく, CK-BB は多量に脳に含まれているが, 脳疾患で血中 CK 活性の上昇することは少ない. 脳卒中急性期のわれわれの検索によれば, PGAM では 68% に異常高値がみられたのに対し, CK-BB では 15% にしかみられなかった. 急性期脳卒中 439 例の検索において, 57 例 (13%) にしか

CK-BB の出現をみなかったという報告¹²⁾ があるが, 相似た所見と思われる. 近年脳梗塞, 特に無症候性脳梗塞の増加が報告されているが, われわれの脳卒中例は, 65 例中 55 例がクモ膜下出血を含む脳出血の症例であった. これは急性期の経過を追う目的で, 救急センターへ緊急搬送された症例のみについて検索したため, stroke 症状の高度の患者が多かったことによると考察される。

PGAM はわれわれの場合, stroke 後 2 時間以内に, すでに有意の上昇を認め, peak に達し, その上昇は B-subunit によるもので, B/T は約 90% の正常範囲にあった. 頭部外傷例においても, 同様の傾向がみられた. 一方心筋梗塞では, 発生 2 時間以内においては, PGAM, B/T はいずれも正常範囲にあった. 通常の marker の AST, CK, CK-MB, LD も正常範囲であった⁹⁾. しかし 6~12 時間後には, PGAM は一転して上昇し, peak に達し, B/T は低下し, M-subunit の上昇を示した. この時期, 脳卒中, 頭部外傷では低下傾向をとると, 著明な差異がみられた. このように脳卒中と心筋梗塞にみられた逸脱 pattern の差には, blood-brain, blood-CSF barrier により, 血液と separate されている脳と, 血流の変動のままに transport する心筋との差異が考察される. blood-brain barrier の通過性は, それぞれの物質により差があるが, osmotic stress や ischemia による脳腫脹などが, 影響をもつことも報告されている¹³⁾. また stroke 後, 2 時間から 24 時間の T-PGAM, B-PGAM の値が, 死亡例で生存例より有意の高値をとり, 早期の測定値が脳卒中の重症度, 予後と関連するごとく観察された。

PGAM と脳障害の関連を検索するため, CSF 中の PGAM と諸酵素を検索した. 検体とした CSF は, 髄膜炎症例が多く, その他中枢神経症状をきたした症例が含まれていた. CSF の蛋白量についての臨床的重要性は, 確立されているが, それに対し LD, PGAM がともに同程度の有意の相関関係をとった. 近年 CSF の多くの酵素活性が測定^{14,15)} されており, 結果には議論の余地はあるが, 細菌性髄膜炎で LD の上昇が報告され, 脳障害の急性期での LD の著明な上昇は, 脳障害の広がりやを反映するとされている¹⁵⁾. PGAM が同じ解糖系の LD と, CSF 中で高度の相関を示したことは, 興味ある所見と思われる。

SHRSP⁵⁾ は岡本らにより開発された高血圧自然発症ラット (SHR)¹⁶⁾ から, 新たに岡本, 家森らにより分離された系で, 特別な処置を必要とせず, 通常の飼

育により、加齢とともに重症高血圧を来し、脳出血、脳梗塞を発症するモデル動物である⁵⁾。血圧は SHR¹⁶⁾ より速やかに上昇し、20 週齢で 240 mmHg に達し、6 カ月以降は例外なく脳血管障害を起こして倒れる⁵⁾。SHRSP の脳卒中発症の有無は、運動量の低下、刺激に対する反応性の低下、また四肢の痙攣、運動麻痺等の行動観察から判定できる⁵⁾。われわれはさらに発症後の剖検、組織学的検索により、これらのラットの脳の腫大、軟化、出血、梗塞巣を確認している。この場合 PGAM は Total, B 型ともに、control ラットの約 2 倍の上昇を認め、脳卒中との関連が証明された。PGAM は現在適切な項目のない、脳障害の臨床的 marker として、検討すべき問題と思われる。

また老人性痴呆について PGAM の検索を行ったが、脳卒中後遺症などとの関連が考慮される VD で、DAT より有意の高値がみられ、DAT は低値で、両痴呆症の間に差がみられたことは、両痴呆症の鑑別上、興味ある点であった。

まとめ

Isozyme として BB, MB, MM をもつ PGAM の血清中の総活性、B-subunit 活性、B/T を測定した。ルーチンの検索において、PGAM は各種疾患 210 例で、AST, LD と著明な相関関係をとった。脳卒中においては、発症後 2 時間以内にすでに上昇の peak をとり、6~12 時間後、1~3 日後と低下した。頭部外傷例も同様の傾向をとった。心筋梗塞は発症後 2 時間以内は変化なく、6~12 時間後に急激に上昇し、peak をとった。この PGAM の逸脱の違いには、barrier をもつ脳と、心筋との差が考察される。脳卒中の上昇は B-subunit によるものであり、心筋梗塞の上昇は M-subunit によるものであった。脳卒中の死亡例の PGAM の上昇は、生存例に比し有意の高値をとり、重症度との関連が考察された。PGAM は CSF 中にも出現し、TP, LD と有意の相関をとった。SHRSP の stroke 発症例の PGAM は、control に比し著明な上昇を認めた。老人性痴呆症において、VD は DAT に比し、PGAM の有意の高値がみられた。PGAM は脳障害の臨床的な marker として、今後検討すべき問題と思われる。

本研究は大阪医科大学中央検査部、渡部透、金田恵孝、清水章、大阪府三島救命救急センター、竹下仁、森田大、富士原彰、京都大学人間・環境学研究所、池田克巳、家森幸男。(財)大阪老人性痴呆医学研究会、

藤田素樹、三杉義潔、オリエンタル酵母工業長浜研究所、森京子、内田浩二、松尾雄志、大阪大学、堀尾武一の諸先生方との共同研究によった。

文 献

- 1) Omenn GS, Hermondtson MA. Human phosphoglycerate mutase: Isozyme marker for muscle differentiation and for neoplasia. In: Markert CL, editor. Isozymes III. Developmental Biology. New York: Academic Press, 1975: 1005-1018.
- 2) Uchida K, Kondoh K, Matsuo Y. Recombinant M-, B- and MB-type isozymes of human phosphoglyceric acid mutase: Their large-scale production and preparation of polyclonal antibodies specific to M- and B-type isozymes. Clin Chim Acta 1995; 237: 43-58.
- 3) Yates S, Jeffery S, Barnard P, Barnard E, Carter N. Plasma phosphoglycerate mutase muscle isoenzyme is strikingly raised Duchenne muscular dystrophy. Biochem Soc Trans 1986; 14: 1165-6.
- 4) 林 泰三. ホスホグリセリン酸ムターゼ (PGAM). 臨床検査 1996; 40: 545-9.
- 5) Okamoto K, Yamori Y, Nagaoka A. Establishment of the stroke-prone spontaneously hypertensive rat (SHR). Circ Res 1974; 34/35 (Suppl. 1): 143-53.
- 6) Bergmeyer HU, Grass IM, Walter HE. Phosphoglycerate mutase. In: Bergmeyer HU, editor. Methods of enzymatic analysis, (3rd ed) Vol. 2. Weinheim: Verlag Chemie, 1983: 282-283.
- 7) 金田恵孝, 林 泰三. ホスホグリセリン酸ムターゼ (PGAM) アイソザイム測定法. 検査と技術 1996; 24: 699-705.
- 8) 渡部 透, 金田恵孝, 林 泰三, 竹下 仁, 森田大, 富士原彰, 森 京子, 内田浩二, 松尾雄志, 堀尾武一. ホスホグリセリン酸ムターゼ (PGAM) とそのアイソザイム; 脳卒中と心筋梗塞の急性期における変化. 生物試料分析 1996; 19: 227-36.
- 9) Mezquita J, Bartrons R, Pons G, Carreras J. Phylogeny and ontogeny of phosphoglycerate mutases. II Characterization of phosphoglycerate mutase isozymes from vertebrates by their thermal lability and sensitivity to the sulfhydryl group reagents. Comp Biochem Physiol 1981; 70: 247-55.
- 10) Castella-Escola J, Ojcius DM, LeBoulch P, Joulin V, Blouquit Y, Garel M-C, Valentin C, Rosa R, Climent-Romeo F, Cohen-Solal M. Isolation and characterization of the gene encoding the muscle-specific isozyme of human

- phosphoglycerate mutase. *Gene* 1990 ; 91 : 225-32.
- 11) Durany N, Carreras J. Distribution of phosphoglycerate mutase isoenzymes in rat, rabbit and human tissue. *Comp Biochem Physiol* 1996 ; 114B : 217-23.
 - 12) 椎名巖造, 須貝和幸, 小沼武英. 急性期脳卒中症例の血清 CPK-BB 値の臨床的意義. *脳卒中* 1994 ; 16 : 596.
 - 13) Stummer W, Betz AL, Keep RF. Blood-brain barrier taurine transport during osmotic stress and in focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1995 ; 15 : 852-9.
 - 14) Nelson PV, Pollard AC. Diagnostic significance and sources of lactate dehydrogenase and its isoenzymes in cerebrospinal fluid of children with variety of neurological disorders. *J Clin Pathol* 1975 ; 28 : 828-33.
 - 15) Lutsar I, Haldre S, Topman M, Talvik T. Enzymatic changes in the cerebrospinal fluid in patients with infections of the central nervous system. *Acta Paediatr* 1994 ; 83 : 1146-50.
 - 16) Okamoto K, Aoki K. Development of a strain spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J* 1963 ; 27 : 289-93.