

11) 抗人筋型クレアチンキナーゼ家兎血清による人、動物、各種臓器、および Duchenne 型筋型クレアチンキナーゼの抗原性

三 好 和 夫 *

研究協力者 伊勢 浩* 平良 章* 八木田正聖*
林 郁郎 栗永 篤信* 小松 光一*
佐々木尚子* 多田 嘉明*

はじめに

筋ジストロフィー症の血中にみられるクレアチンキナーゼ (CK) 活性値の著しい上昇は、一般に筋細胞の崩壊ないし膜透過性の亢進に基づく、細胞外への漏出の結果とされている。果たしてそうであろうか。この場合に CK そのものが正常のものとは異なった CK であって、その異常が筋細胞内の代謝異常ひいては筋細胞の崩壊をもたらすのではなかろうか、との観点に立って私達は研究を進めている。従来私達の実験成績やそして文献成績からみても、CK の異常は、電気泳動易動度や抗血清による単なる沈降線の有無では、それをとらえることが困難であるので、本研究では、まず、常識的に異なっていると考えられる各種動物の筋型 CK の易動度や抗原性を系統的にしらべ、その結果を抗血清による阻害実験の成績と比較検討した。後者によって、前者ではとらええない差を明らかにしようと企てたものである。

研究対象と資料

研究対象と資料には各種の動物、すなわち魚、鶏、ラット、家兎、牛、日本ザルの骨格筋を用い、人の場合には剖検、または生検でえた健常成人の骨格筋、心筋 (左室心筋)、および病的骨格筋として、Duchenne 型筋ジストロフィー症と多発性筋炎の骨格筋を用い

た。

資料としては、骨格筋を 0.01MKCl を加えてホモジネートし、その遠沈上清をそのままのもの、および、澱粉粒電気泳動により分離抽出してえた陰極側主成分 CK を筋型 CK として用いた。

易動度の検索は、アガールゲルまたはポリアクリルアミドゲルを支持体として電気泳動を行ない、この際 CK 活性を tetrazorium 塩の還元発色により band として染色する zymogram 法を行なった。

資料の CK 活性測定は別に江橋、杉田らのシステイン添加無機リン酸法によって行った。

筋型 CK の抗原性の検定：抗原性の検定には著者らが作製した抗人筋型 CK 家兎血清を用いた。抗血清の作製は、成人健常骨格筋より Keutel, Kuby (1972) らの方法により筋型 CK を精製、分離し、これに Freund の完全アジュバントを加えて家兎を感作して作製した。この抗血清を用いて Ouchterlony 法および CK 活性阻害実験によって上記各試料の筋型 CK の抗原性の差異をしらべた。

CK 活性阻害実験：各種骨格筋抽出液および易動度により分離した CK 成分を倍数希釈し、各希釈液の 1 ml に非動化した抗血清 0.05 ml ずつを加えて incubate (4℃, 3 時間) した後遠沈し (1500g, 20 分) その上清の CK 活性値を測定した。同時に同じ各希釈液 1 ml に正常家兎血清 0.05 ml ずつを加えて CK 活性値を測定し、後者の値より前者のそれを差引いた数

* 徳島大学医学部第一内科

値を抗血清による阻害率として示し、曲線を作製(縦軸阻害率、横軸活性値)して比較した。

成績

〔1〕各種動物骨格筋の筋型CKの差異

1) 易動度における差異、各種動物筋抽出液中のCK易動度を同一zymogram上で比較すると陽極側への易動度は、検索した動物では、chickenが最も早く、ついでfish、これにつづく易動度の近似した、rat, rabbit, oxの1群、最も遅いmonkey, humanの順であった。また、人とmonkeyの筋型CKの易動度には差異を認めなかった。

2) Ouchterlony法による成績、抗人筋型CK家兎血清に対し、精製正常筋型CK、人正常骨格筋抽出液、monkey骨格筋抽出液はそれぞれ互いに融合する単一の沈降線をつくった。ox骨格筋抽出液でもごく弱い沈降線が認められ、この沈降線はmonkey骨格筋抽出液の沈降線とスパーをつくって一部融合した。ratとchickenの骨格筋抽出液は沈降線を

つくらなかった。

3) 抗血清によるCK活性阻害実験図1は各種動物骨格筋の抽出液をそれぞれ倍数希釈し、各希釈液のCK活性値を横軸にとり、各段階のCK活性値における阻害率を線で結んで曲線として示したものである。

人正常骨格筋、サル骨格筋の抽出液では、希釈倍数が大きくてCK活性値が低く抗血清が充分量と思われるところでは、ともにほぼ100%の活性阻害がみられた。これに対して、ox骨格筋抽出液では同量の抗血清により約50%の活性阻害がみられたにとどまった。Ratでは約10%の活性阻害がみられ、chickenでは本抗血清による活性阻害はみられなかった。また、人とサルの阻害率でCK活性値の各段階において人で高くサルで低い結果をえた。

〔2〕人の各種臓器におけるCKの抗原性の差異

1) Ouchterlony法による成績、本抗血清に対し、精製正常筋型CK、人正常骨格筋抽出液、心筋抽出液はそれぞれ単一の沈降線をつくり、これらの沈降線は互いに融合した。人

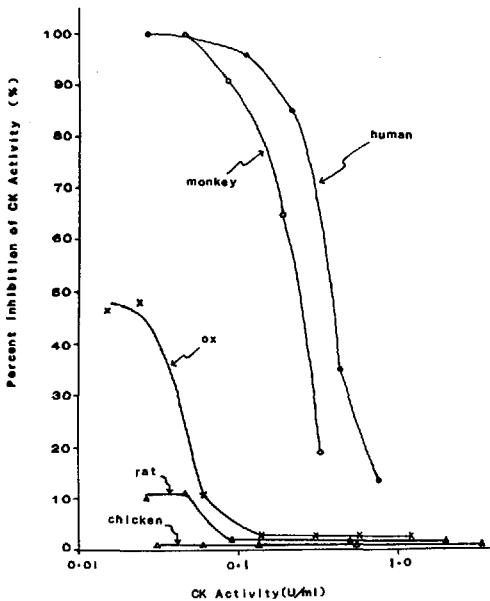


図1 抗人CK (MM) 家兎血清の人および各種動物骨格筋CKに対する活性阻害

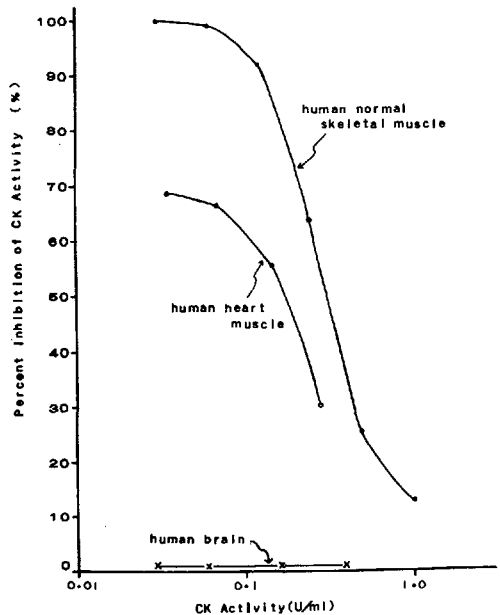


図2 抗人CK (MM) 家兎血清の人正常骨格筋および心筋の筋型CKに対する活性阻害

大脳、平滑筋抽出液、および正常人血清は本抗血清に対し沈降線をつくらなかった。

2) 抗血清によるCK活性阻害実験(図2) 人の正常な骨格筋、および心筋の抽出液を澱粉粒電気泳動により陰極側へ移動する主成分CKを分離採取し、そのCK活性が本抗血清によってうける阻害率を前述した同じ方法によりしらべた。

結果は、図2のごとく正常骨格筋では希釈倍数が大きくCK活性の低いところでは100%の活性阻害がみられた。これに対し、心筋では骨格筋で100%の活性阻害がみられたと同じCK活性を示す試料において、同一同量の抗血清により、約70%の活性が阻害されたにとどまり、約30%が阻害をうけずに残った。脳型CKは本抗血清により全く阻害をうけなかった。

〔3〕 Duchenne 型筋ジストロフィー症骨格筋の筋型CKの抗原性

1) Ouchterlony 法における成績

Duchenne 型の骨格筋抽出液は本抗血清に対して、明らかな単一の沈降線をつくり、この沈降線は人正常および多発性筋炎の骨格筋抽出液の沈降線と互いに融合して認められた。また別に本症患者の血清中CKについても同様の成績がえられた。

2) CK活性の阻害実験の成績

Duchenne 型の骨格筋抽出液より電気泳動により分離抽出した筋型CKの活性阻害実験では十分な阻害効果がみられ、とくに正常筋の筋型CKの活性阻害率よりも逆に高い阻害率を思わせる成績がえられた。

考 察

はじめに述べた主旨に従って、人、各種動物の骨格筋中筋型CK、人の各種臓器、および Duchenne 型筋ジストロフィー症骨格筋の筋型CKについて、電気泳動易動度および自製の抗人筋型CK家兎血清に対する抗原性の差異をしらべ、それぞれの差異や異常の有無を抗原性の面から検討した成績について述べた。

1. 各種動物種族間の骨格筋中筋型CKは電気泳動易動度では、鶏>魚>ラット、家兎、牛>サル、人の順に陽極への易動度が大きい。これに対応して、易動度の異なる種族間の筋型CKは抗原性においても異なり、易動度が近似した種族間、たとえば、サルと人の筋型CKは抗原性の上でも近似しており、抗人正常筋型CK家兎血清を用いた Ouchterlony 法では両者の抗原性の差は識別不能であった。しかし、サルと人の筋型CKは本抗血清による活性阻害率においては明らかに異なる結果がえられた。本阻害実験法は、抗血清の識別能や、この方法自体の限界はあるが、Ouchterlony ではとらええない筋型CKの抗原性のわずかな差異を識別しえたものとして価値がある。なお、これらの動物種族についての成績は、動物の系統発生や進化の過程を生化学レベルで考える上で、興味深い問題をふくんでいると思う。

2. 人、各種臓器におけるCKの抗原性についての成績では、大脳の脳型CKは抗人筋型CK家兎血清と全く反応しないことは当然ながら、心筋の陰極側主成分CKが、本抗血清により約70%の活性阻害をうけるに止まり、約30%は阻害をうけない事実は新しい知見で興味深い。すなわち、人心筋中には、易動度の上で骨格筋筋型CKと一見差がないが、抗原性の上で明らかに異なるCK(CK活性をもつもの)が存在することを意味するもので重要である。とくに、このCKは心筋の可溶性分画に存在するもので、いわゆる mitochondrial CKとは異なるものと考えられる。このものは心筋に特異な cardiac CK というべきものであろう。

3. Duchenne 型筋ジストロフィー症骨格筋の筋型CKは、正常骨格筋中筋型CKと電気泳動易動度や抗人筋型CK家兎血清に対する沈降反応では差異は認めがたいが、本抗血清による活性阻害率では、正常筋型CKにくらべ、より阻害をうけやすいがごとき結果をえた。今後さらに詳細な研究結果をえて結論づけたい。

筋ジストロフィー症のCK異常に関する文献成績としては、筋ジストロフィー症マウスで、筋型CKのspecific activityが正常マウスのその半であるというHootonら(1966)の報告がある。しかしその後の発表はみられない。また人の筋ジストロフィー症における筋型CK蛋白の性状について、Bulckeら(1969) Kubyら(1969, 1971)の報告があるが、いずれも正常筋型CKと差異を認めていない。しかし、これらの文献成績は、精製純化したCK蛋白(この点にむしろ問題があると思われる)によるものや、抗血清の違い(抗動物CK抗血清が多い)、さらに、判断はOuchterlony法によっていることなどの点が考慮されなければならない。

結 論

人、各種動物およびDuchenne型骨格筋のクレアチンキナーゼを電気泳動易動度と抗人CK(MM)抗血清を用いるOuchterlony法と活性阻害法で研究して次の結果をえた。

1. 人と各種動物の筋型CKはそれぞれ異なる電気泳動易動度を示し、隔った種族間では差が大きく、近い種族間では小さい。人とサルでは差異が明らかでない。類似のことが抗人筋型CK家兎血清に対する抗原性においてもうかがえる。人とサルでは、抗原性の差異はOuchterlony法では明らかにしえない。しかし、抗血清による阻害実験では、両者に明らかな差がみとめられた。

2. 人各種臓器におけるCKのうち、心筋には易動度の上では骨格筋中の筋型CKと近似しているが、抗原性において明らかに異なるものcardiac CKとういべきものがあることを見出した。

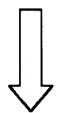
3. Duchenne型筋ジストロフィー症骨格筋の筋型CKでは、抗正常筋型CK血清に対して十分な阻害がみられ、阻害率では、健常人筋型CKよりも高いがごとき結果がえられ、検討中である。

(本文の内容は、1975年12月厚生省「進行性筋ジストロフィー症の病因の究明に関する

研究」(沖中班)班会議で発表した。)

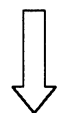
文 献

- 1) 三好和夫, 伊勢浩, 大音康郎, 八木田正聖, 林郁郎, 平良章: 抗人筋型クレアチンキナーゼ家兎血清による人, 各種動物の筋型クレアチンキナーゼの抗原性の差異, 第16回日本神経学会総会, 1975年5月, 於大阪.
- 2) 三好和夫, 平良章, 伊勢浩, 八木田正聖, 林郁郎, 栗永篤信: 人クレアチンキナーゼの研究, とくに心筋に確かめた特異なクレアチンキナーゼの存在とその特徴, 第17回日本神経学会総会, 1976年6月, 於東京, 発表予定.
- 3) H.J. Keutel, K. Okabe, H.K. Jacobs, F. Ziter, L. Maland and S.A. Kuby: Studies on Adenosine Triphosphate Transphosphorylases. XI. Isolation of the Crystalline Adenosine Triphosphate Creatine Transphosphorylases from the Muscle and Brain of Man, Calf and Rabbit, and a Preparation of their Enzymatically Active Hybrids, Arch. Biochem. Biophys. 150: 648-678, 1972.
- 4) R. Palmieri, H. Keutel, H. Jacob, K. Okabe, R. Yue, F. Ziter, F. Tyler and S.A. Kuby: A further Chemical Comparison of normal Human ATP-Creatine Transphosphorylases with those from Progressive Muscular Dystrophic Tissues, Fed. Proc. 30: 1255-1255, 1971.
- 5) B.T. Hooton and D.C. Watts: Adenosine 5'-Triphosphate-Creatine Phosphotransferase from Dystrophic Mouse Skeletal Muscle, Biochem. J. 100: 637-646, 1966.
- 6) J.A. Bulcke and A.L. Scherwin: Organ Specificity of Creatine Phosphokinase Muscle Isozyme: Immunochemistry. 6: 681-687, 1969.
- 7) H. Jacobs, K. Okabe, R.H. Yue, H. Keutel, F. Ziter, R. Palmieri, R. Tyler and S.A. Kuby: A Comparison of normal Human ATP-Creatine Transphosphorylases with those from Progressive Muscular Dystrophic Tissues, Fed. Proc. 28: 346, 1969.



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



はじめに

筋ジストロフィー症の血中にみられるクレアチンキナーゼ(CK)活性値の著しい上昇は、一般に筋細胞の崩壊ないし膜透過性の亢進に基づく、細胞外への漏出の結果とされている。果たしてそうであろうか。この場合に CK そのものが正常のものとは異なった CK であって、その異常が筋細胞内の代謝異常ひいては筋細胞の崩壊をもたらすのではなかろうか、との観点に立って私達は研究を進めている。従来の私達の実験成績やそして文献成績からみても、CK の異常は、電気泳動易動度や抗血清による単なる沈降線の有無では、それをとらえることが困難であるので、本研究では、まず、常識的に異なっていると考えられる各種動物の筋型 CK の易動度や抗原性を系統的にしらべ、その結果を抗血清による阻害実験の成績と比較検討した。後者によって、前者ではとらええない差を明らかにしようと企てたものである。