

免疫阻害法を用いた犬血清クレアチンキナーゼBBアイソザイム
(CK-BB) 測定法の検討

矢島愛子 小向奈津美 小林沙織 神志那弘明 大石明広 佐藤れえ子 安田 準☆

岩手大学農学部獣医学課程小動物内科学研究室 (岩手県盛岡市上田3-18-8 〒020-8550)

☆連絡責任者：安田 準 (岩手大学農学部獣医学課程小動物内科学研究室)

〒020-8550 岩手県盛岡市上田3-18-8 TEL

Evaluation of Measuring Canine Serum Creatine Kinase Isoenzyme BB
by an Immuno-inhibition Method

Aiko YAJIMA, Natsumi KOMUKAI, Saori KOBAYASHI, Hiroaki KAMISHINA,
Akihiro OISHI, Reeko SATO, Jun YASUDA

Department of Veterinary Medicine, Faculty of Agriculture Iwate University, 3-18-8 Ueda, Morioka-shi, Iwate 020-8550, Japan

(Received 17 February 2010 / Accepted 26 August 2010)

SUMMARY : We investigated whether canine serum creatine kinase isoenzyme BB (CK-BB) could be measured by the reagents prepared for human creatine kinase isoenzyme MB (CK-MB), according to an immuno-inhibition method. First, canine serum from a healthy dog and a dog with cerebro-neural-disease was treated respectively with mouse anti-human creatine kinase isoenzyme MM (CK-MM) monoclonal antibody (M antibody) preparation, or with normal mouse immunoglobulin G (IgG) antibody preparation as a negative control. These treated canine serums and an untreated canine serum were analyzed by agarose electrophoresis/CK enzyme staining. In both dogs, CK-BB and CK-MM bands were detected in the negative controls and in the untreated serum; only the CK-BB band was seen in the M antibody-treated serums. Further, step-wise diluted samples from serum of a healthy dog and a CK-MB control solution were measured by the immuno-inhibition method, which resulted in good linearity of calibration curves. In addition, using the serums of 28 tested dogs including dogs with cerebro-neural disease, the results obtained by the immuno-inhibition method and electrophoresis were compared. There was a statistically significant correlation between the residual CK (which was left uninhibited by M antibodies) determined by the immuno-inhibition method and CK-BB activity determined by electrophoresis. There was also a significant correlation between the values of CK-MM activity determined by both methods. We concluded that measurement of canine serum CK-BB by the immuno-inhibition method developed for human clinics is useful in diagnostic screening for canine cerebro-neural diseases.

KEY WORDS : BB isoenzyme, canine serum, cerebro-neural diseases, creatine kinase, immuno-inhibition method

要約: ヒト用免疫阻害法CK-MB測定用試薬を用いて、犬血清CK-BBを測定できるかを検討した。犬血清をマウス抗ヒトCK-MMモノクローナル抗体 (M抗体) と正常マウスIgG抗体 (陰性コントロール) にそれぞれ感作させた後、無処理犬血清と共にアガロース電気泳動・CK酵素染色した。無処理血清および陰性コントロール血清では、CK-BBとCK-MMが認められた。M抗体処理血清ではCK-BBは出現したがCK-MMは消失して阻害効果を認めた。次に、犬血清とCK-MB活性値が既知のコントロール液の段階希釈検体を免疫阻害法で測定したところ、双方の検量線は良好な直線性が認められた。さらに28頭の犬を用いて、免疫阻害法と電気泳動法において、M抗体で阻害されない残存CKとCK-BBの間および両方の測定方法で得たCK-MMの間で良好な相関関係を認めた。犬でも免疫阻害法にてCK-BBを評価できることから、犬の神経疾患のスクリーニング検査に用いることができると考えられた。

キーワード: BBアイソザイム, 犬血清, 脳神経疾患, クレアチンキナーゼ, 免疫阻害法

(動物臨床医学 19 (3) 79-86, 2010)

はじめに

獣医臨床では骨格筋、心筋、平滑筋および脳神経系に含まれる酵素であるクレアチンキナーゼ (CK) の血清総活性値を通常診断に用いており、CKアイソザイム分析まで行う機会は少ない。血清CK総活性は骨格筋由来のアイソザイムであるCK-MM活性の変動が主に反映されるため、骨格筋肉損傷の指標としては有用である。しかしながら脳神経系由来のアイソザイムであるCK-BB活性の変動は微量であるため、CK-BB活性の変動を評価するには電気泳動法によるアイソザイム分析が必要になる。CK-BB活性は人および各種動物において脳神経系に特に多く分布することが知られ[1, 2]、犬では実験的脳損傷時に脳脊髄液中でCK-BB活性が増加することや[3]、活動性の脳実質障害があると思われる症例、例えば高振幅徐派がみられる水頭症の症例において、血中CK-BB活性が上昇するという報告がある[4]。このように犬においても血清CK-BB活性の上昇が脳神経系組織の器質的障害を推定するうえで有用な手段となり得ると考えられているが、獣医臨床では一般的には測定されていない。一方人の臨床検査では、血清CK測定は骨格筋損傷に加えて心筋梗塞の指標として広く利用されている[5]。その中でも、抗ヒトCK-M抗体を利用した免疫阻害法による心筋由来のアイソザイムであるCK-MB活性の測定は、急性心筋梗塞の診断や病態把握のため日常的に利用されている[6]。

本研究は人用に開発された免疫阻害法によるCKアイソザイム分析を、犬においても自動分析装置を用いてルーチン検査化できるかを、電気泳動法によるアイソザイム分析法と比較検討した。

材料と方法

1. マウス抗ヒトCK-MMモノクローナル抗体による犬CK-Mサブユニット活性の阻害効果

供試動物は健康犬1 (ビーグル犬, 雄, 7歳齢) と神経疾患犬1 (ヨークシャーテリア, 未去勢雄, 2歳齢) を用いた。神経疾患犬1は右後肢跛行, 斜頸, 右旋回運動等を主訴に来院し, CT検査にて両側側脳室の中等度拡大

が認められた。血清CK総活性は、自動分析装置 (Accute TBA-40FR: 東芝メディカルシステムズ, 栃木) と、リキテックCK-NACプラス (ロシュ・ダイアグノスティックス, 東京) を用いた初速度測定法によって測定した。

次いで、犬血清を限外濾過ユニット (Ultrafree-0.5, Millipore, Bedford, MA, USA) を用いて2倍に濃縮した。CK-MB測定用試薬 (リキテックCK-MBプラス: ロシュ・ダイアグノスティックス, 東京) のキットに含まれるM抗体液40 μ lを犬濃縮血清20 μ lに加え, 4°C 20分間放置し, これを抗ヒトCK-MM抗体処理血清とした。M抗体液に対するコントロールとして, 正常マウスIgG抗体 (MsIgG: ベックマン・コールター社, 東京) を用いた。試薬キットに含まれる基質液を用いてM抗体液と同濃度に調製し, これをマウスIgG抗体液とした。このマウスIgG抗体液40 μ lを犬濃縮血清20 μ lに加え, 4°C 20分間放置したものを陰性コントロール血清とした。また無処理犬血清を用意し, 以上の3種類の血清を電気泳動用試料とした。

電気泳動法によるアイソザイム分析は、アガロースゲル電気泳動法 (クイックジェルCK: ヘレナ研究所, 埼玉) を用い, ホルマザン染色 (タイタンジェルCK: ヘレナ研究所, 埼玉) を行った。犬血清CKアイソザイムバンドの特定は、ヒト血清CKアイソザイムの電気泳動の移動度に準じて陰極側からCK-BB, CK-MB, CK-MM, ミトコンドリアCK (mCK) の順とした[7, 8]。デンストメーター (CS-9300PC: 島津, 京都) を用いて570 nmの波長で各アイソザイムバンドの分画比率を求め, CK総活性からCK-MM, CK-MB, CK-BB, mCKの各活性値を算出した。無処理犬血清, 陰性コントロール血清および抗ヒトCK-MM抗体処理血清の電気泳動像を比較し, ヒトCK-MM抗体が犬血清CK-MM活性を阻害するかを検討した。

2. 免疫阻害法CK測定用試薬を用いた犬血清とCK-MBコントロール液の定量性の比較

健康なビーグル犬の雄, 7歳, 1頭の血清を用いた。供試血清を生理食塩水を用いて16倍までの希釈列を作製し測定検体とした。CK-MB活性値が既知であるコントロール検体としてC.f.a.s.CK-MB原液 (ロシュ・ダイアグノス

ティックス, 東京) を使用し, 生理食塩水を用いて同様に16倍まで希釈列を作製した。CK-MM以外の残存CK活性値はAccute TBA-40FRとCK-MB測定用試薬を用いて2回連続で測定した。

3. 免疫阻害法CK測定用試薬を用いた犬血清CK-MM活性阻害後の残存CK活性の測定

临床上健康で, 血液化学検査でも特に異常が認められなかった1歳から9歳の健康犬11頭(雄7頭, 雌4頭)を用いた。また椎間板ヘルニアと診断された神経疾患犬17頭(3歳から12歳, 雄11頭, 雌6頭)を用いた。Accute TBA-40FRを用いて血清CK総活性値を測定した。犬血清CK-MM阻害後の残存CK活性は, Accute TBA-40FRを用いてCK-MB測定用試薬で免疫阻害法により測定した。また電気泳動法によるCKアイソザイム活性値は, 総CK活性値と分画百分率から算出した。

健康犬と神経疾患犬を併せた28例について, 免疫阻害法による残存CK活性値と電気泳動法によるCK-BB活性値の相関を, ピアソンの相関係数検定(Pearson's correlation coefficient test)によって調べた。また免疫阻害法により算出したCK-MM活性値と電気泳動法によるCK-MM活性値の相関についても, 同様の検定を行った。

結 果

1. マウス抗ヒトCK-MMモノクローナル抗体による犬CK-Mサブユニット活性の阻害効果

健康犬1の無処理血清および陰性コントロール血清の電気泳動法では, CK-BB, CK-MMおよびmCKのバンドが出現した。一方, 抗ヒトCK-MM抗体処理血清では, CK-BB位とmCKバンドは出現したが, CK-MM位のバンドは消失した(Fig.1)。健康犬1の血清CK総活性値は161.5 IU/ℓであり, 各アイソザイム活性値はそれぞれCK-MMは84.8 IU/ℓ (52.5%), CK-MBは4.0 IU/ℓ (2.5%), CK-BBは40.0 IU/ℓ (24.8%), mCKは29.3 IU/ℓ (18.1%)であった。

神経疾患犬1では, 無処理血清および陰性コントロール血清ではCK-BBとCK-MMの各バンドが出現した。抗ヒトCK-MM抗体処理を行った血清は, CK-BB位のバンドは出現したが, CK-MM位のバンドは認められなかった(Fig.2)。神経疾患犬1の血清CK総活性は472 IU/ℓであり, 各アイソザイム活性値はそれぞれCK-MMは418.5 IU/ℓ (88.6%), CK-BBは54.6 IU/ℓ (11.3%)であった。

2. 免疫阻害法CK測定用試薬を用いた犬血清とCK-MBコントロール液の定量性の比較

犬血清の段階希釈検体の残存CK活性測定値をTable 1に, コントロール検体の段階希釈検体のCK活性測定値をTable 2に示す。それぞれ平均値を求め, 残存CK活性値の希釈列(IU/ℓ)をy軸に, 測定用試料の希釈列を

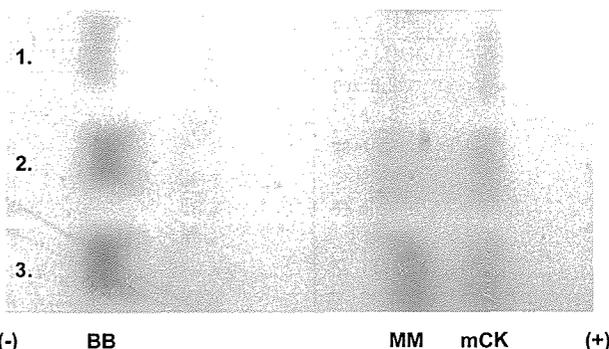


Fig.1 健康犬1血清の電気泳動像
Lane 1: 抗ヒトCK-MM抗体処理血清
Lane 2: 陰性コントロール血清
Lane 3: 無処理血清
mCK: ミトコンドリアCK

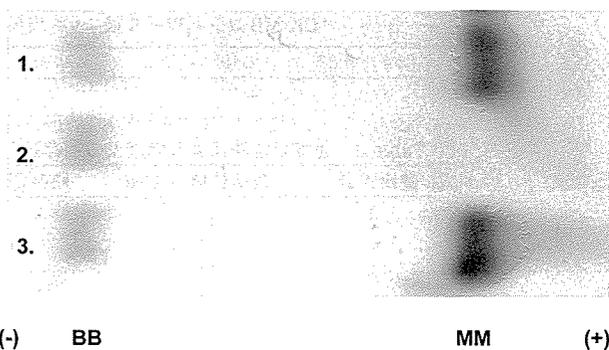


Fig.2 神経疾患犬1血清の電気泳動像
Lane 1: 無処理血清
Lane 2: 抗ヒトCK-MM抗体処理血清
Lane 3: 陰性コントロール血清

Table 1 犬血清のCK-M阻害後残存CK活性値

希釈列	1回目 (IU/ℓ)	2回目 (IU/ℓ)	平均値 (IU/ℓ)
1/16	24.7	17.1	20.9
1/12	23.5	22.4	22.95
1/8	27.8	31.1	29.45
1/6	34.9	43.7	39.3
1/4	55.3	54.4	54.85
1/3	66.9	71.2	69.05
1/2	100.5	102.4	101.45
2/3	127.5	129.1	128.3
1	192.2	197.7	194.95

Table 2 コントロール検体のCK-M阻害後残存CK活性値

希釈列	1回目 (IU/ℓ)	2回目 (IU/ℓ)	平均値 (IU/ℓ)
1/16	11.5	7.8	9.65
1/12	11.8	12.2	12
1/8	13.2	16.4	14.8
1/6	21.9	24.4	23.15
1/4	32.3	31.7	32
1/3	42.6	40.2	41.4
1/2	58.9	57.8	58.35
2/3	85.1	80.1	82.6
1	112.9	119.2	116.05

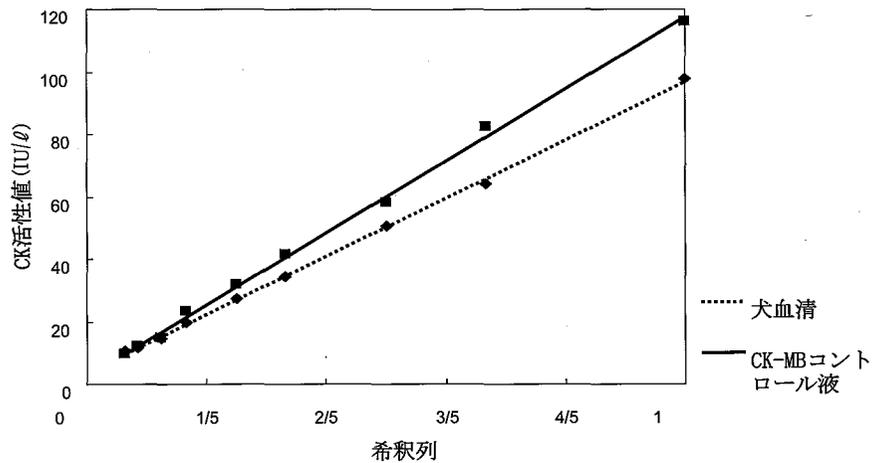


Fig.3 犬血清とCK-MBコントロール試薬の検量線
 健康犬血清： $y=92.773x+3.8763$, $R^2=0.9993$
 CK-MBコントロール液： $y=115.05x+2.5877$, $R^2=0.9977$

Table 3 免疫阻害法による健康犬の残存CK活性値と総活性の比率およびCK-MM活性値

健康犬群	総活性値 (IU/l)	残存CK活性値 (IU/l)	比率 (%)	CK-MM (IU/l)
1	135.7	62.2	45.8	73.6
2	115.3	57.4	49.7	58.0
3	111.3	46.5	41.8	64.8
4	139.3	70.7	50.8	68.6
5	93.5	52.8	56.4	40.8
6	52.7	42.7	81.0	10.0
7	41.4	27.4	66.2	14.0
8	108.0	55.1	51.0	53.0
9	148.7	120.3	80.9	16.3
10	97.9	76.6	78.2	15.8
11	101.0	83.2	82.4	13.0
平均値	104.1 ± 33.4	63.3 ± 26.0	52.6 ± 15.8	38.9 ± 25.5

平均値 = 平均値 ± 標準偏差 (IU/l)

CK-MM (IU/l) : 総活性値から免疫阻害法により測定した残存CK活性値を引いた値。

x軸としてグラフを作成した (Fig.3)。犬血清では、 $y=92.773x+3.8763$, $R^2=0.9993$, またCK-MBコントロール液では、 $y=115.05x+2.5877$, $R^2=0.9977$ と双方とも良好な直線性が認められた。

3. 免疫阻害法CK測定用試薬を用いた犬血清CK-MM活性阻害後の残存CK活性の測定

免疫阻害法による残存CK活性の平均値 ± 標準偏差は、健康犬では 63.3 ± 26.0 IU/l (Table 3), 神経疾患犬では 77.8 ± 30.8 IU/lであった (Table 4)。また、残存CK活性値 (IU/l) の総活性値に対する百分率 (%) は、健康犬では最小値は 41.8%, 最大値は 82.4% (Table 5), 神経疾患犬では最小値は 11.9%, 最大値は 83.0% (Table 6)であった。

電気泳動法による血清CK-BB活性の平均値 ± 標準偏差は、健康犬11頭では 32.5 ± 10.0 IU/l (Table 5), 神経疾患犬17頭では 63.7 ± 29.8 IU/l (Table 6)であった。

健康犬と神経疾患犬を併せた28例の免疫阻害法による残存CK活性値と電気泳動法によるCK-BB活性値の間には、統計的に有意な ($P < 0.001$) 強い相関 ($r=0.797$) が認められた。単回帰分析では、回帰式 $y=0.776x-4.4349$ [y: 電気泳動法によるCK-BB活性値 (IU/l), x: 免疫阻害法による残存CK活性値 (IU/l)]であった (Fig.4)。

また、免疫阻害法から算出したCK-MM活性値と電気泳動法とによるCK-MM活性値の間でも、統計的に有意な ($P < 0.001$) 非常に強い相関関係 ($r=0.995$) が認められた。単回帰分析では、 $y=1.064x+4.308$ [y: 電気泳

Table 4 免疫阻害法による神経疾患犬の残存CK活性値と総活性の比率およびCK-MM活性値

神経疾患犬群	総活性値 (IU/ℓ)	残存CK活性値 (IU/ℓ)	比率 (%)	CK-MM (IU/ℓ)
1	122.0	48.3	39.5	73.8
2	112.0	69.7	62.2	42.4
3	149.3	104.6	70.1	44.7
4	91.0	45.9	50.4	45.1
5	130.8	87.0	66.5	43.8
6	234.1	86.3	36.9	147.8
7	78.8	64.1	81.3	14.7
8	76.4	55.8	73.0	20.6
9	136.7	112.2	82.1	24.5
10	83.7	42.3	50.5	41.4
11	121.2	100.6	83.0	20.6
12	90.1	49.5	54.9	40.6
13	166.3	110.0	66.1	56.4
14	707.4	84.0	11.9	623.4
15	156.7	50.5	32.2	106.2
16	185.2	153.5	82.9	31.7
17	135.7	58.7	43.3	77.0
平均値	163.4 ± 146.2	77.8 ± 30.8	56.0 ± 20.6	85.6 ± 142.7

平均値 = 平均値 ± 標準偏差 (IU/ℓ)

CK-MM (IU/ℓ) : 総活性値から免疫阻害法により測定した残存CK活性値を引いた値。

Table 5 電気泳動法による健康犬の血清CKアイソザイム活性値

症例番号	分画 (%)				活性値 (IU/ℓ)				
	BB	MB	MM	mCK	総活性	BB	MB	MM	mCK
1	25.6	0.0	67.0	7.4	135.7	34.7	0.0	90.9	10.0
2	33.2	0.0	63.8	3.6	115.3	38.3	0.0	73.6	4.2
3	25.1	0.0	74.9	0.0	111.3	27.9	0.0	83.4	0.0
4	20.3	4.9	70.0	4.9	139.3	28.2	6.8	97.5	6.8
5	48.7	5.7	44.1	1.5	93.5	45.6	5.3	41.2	1.4
6	41.7	0.0	52.3	6.0	52.7	22.0	0.0	27.6	3.2
7	44.3	0.0	49.0	5.8	41.4	18.3	0.0	20.3	2.4
8	30.8	8.6	59.7	0.9	108.0	33.3	9.3	64.5	1.0
9	33.9	4.3	30.4	31.4	148.7	50.5	6.4	45.1	42.9
10	32.6	11.3	31.0	25.1	97.9	32.0	11.0	30.3	23.2
11	28.2	10.5	36.3	25.0	101.0	28.5	10.6	36.7	24.1
平均値					104.1 ± 33.4	32.5 ± 10.0	4.5 ± 4.6	55.6 ± 27.4	10.8 ± 13.6

mCK : ミトコンドリアCK

平均値 = 平均値 ± 標準偏差

動法によるCK-MM活性値 (IU/ℓ), x: 免疫阻害法による残存CK活性値を利用して算出したCK-MM活性値 (IU/ℓ)] であった (Fig.5)。

電気泳動法による健康犬のmCK活性値の最小値は0 (0%), 最大値は42.9 IU/ℓ (31.4%) (Table 5), 出現頻度は11例中10例 (90.9%) (Table 7) で, 一方神経疾患犬のmCK活性値の最小値は0 (0%), 最大値は40.4 IU/ℓ (21.8%) (Table 6), 出現頻度は17例中13例 (76.4%) であった (Table 7)。mCKは健康犬と神経疾患犬, 併せて28例中23例で出現が認められた。

考 察

健康犬1および神経疾患犬1の抗ヒトCK-MM抗体処理血清ではCK-MM位のバンドは検出されず, 人と犬のCK-Mアミノ酸配列の相同性が91.7%でもあり, マウス抗ヒトCK-MMモノクローナル抗体により犬CK-MM活性は阻害されたと考えられた。メーカー資料によると, M抗体液は75 μℓの容量でヒト血清CK-M活性を2,000 ~ 10,000 IU/ℓ相当を阻害するように調整された製品である。犬の筋ジストロフィーなどの骨格筋疾患の場合には,

Table 6 電気泳動法による神経疾患犬の血清CKアイソザイム活性値

症例番号	分画比 (%)				総活性	活性値 (IU/l)			
	BB	MB	MM	mCK		BB	MB	MM	mCK
1	35.8	0.0	58.9	5.4	122.0	43.6	0.0	71.8	6.6
2	45.3	0.0	51.6	3.2	112.0	50.7	0.0	57.7	3.5
3	60.9	6.0	29.1	4.1	149.3	90.9	8.9	43.4	6.1
4	49.9	1.3	48.7	0.0	91.0	45.4	1.2	44.4	0.0
5	64.6	7.7	24.5	3.2	130.8	84.5	10.1	32.0	4.2
6	20.4	1.6	70.1	8.0	234.1	47.7	3.7	164.1	18.6
7	75.0	0.0	24.9	0.0	78.8	59.1	0.0	19.6	0.0
8	63.6	0.0	32.6	3.6	76.4	48.6	0.0	24.9	2.7
9	83.2	0.0	5.9	10.9	136.7	113.7	0.0	8.1	14.9
10	39.1	0.0	54.3	6.2	83.7	32.7	0.0	45.5	5.2
11	54.0	0.0	20.3	25.1	121.2	65.5	0.0	24.6	30.4
12	38.1	0.0	55.1	6.9	90.1	34.3	0.0	49.6	6.2
13	65.0	3.8	27.5	3.7	166.3	108.1	6.3	45.7	6.2
14	5.3	0.0	94.7	0.0	707.4	37.7	0.0	669.7	0.0
15	28.0	0.0	68.8	3.3	156.7	43.9	0.0	107.7	5.1
16	68.7	0.0	12.3	21.8	185.2	127.2	0.0	22.9	40.4
17	35.87	4.8	59.35	0.0	135.7	48.7	6.5	80.5	0.0
平均値					163.4 ± 146.2	63.7 ± 29.8	2.2 ± 3.5	88.9 ± 154.4	8.8 ± 11.3

平均値 = 平均値 ± 標準偏差

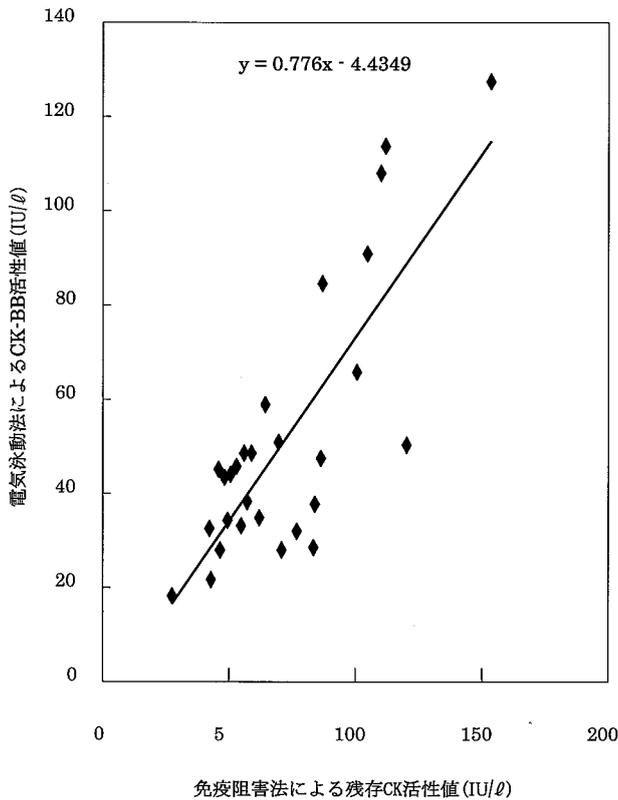


Fig.4 免疫阻害法による残存CK活性値と電気泳動法によるCK-BB活性値の関係
 回帰式 $y = 0.776x - 4.4349$
 y: 電気泳動法によるCK-BB活性値 (IU/l)
 x: 免疫阻害法による残存CK活性値 (IU/l)

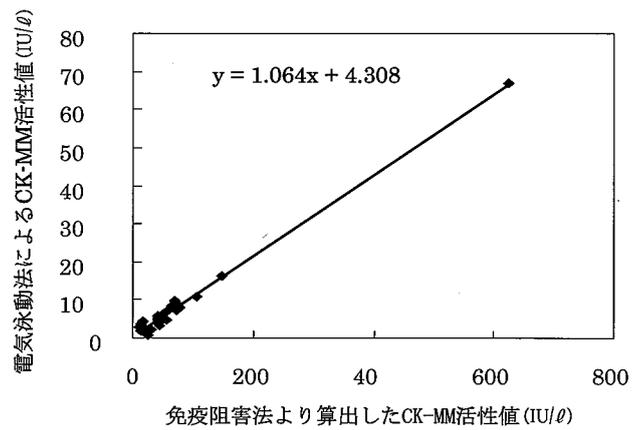


Fig.5 電気泳動法によるCK-MM活性値と免疫阻害法を利用して算出したCK-MM活性値の関係
 回帰式 $y = 1.064x + 4.308$
 y: 電気泳動法によるCK-MM活性値 (IU/l)
 x: 免疫阻害法により算出したCK-MM活性値 (IU/l)

Table 7 健康犬と神経疾患犬の血清mCKの出現率

	例数	出現数	出現率 (%)
健康犬	11	10	90.9
神経疾患犬	17	13	76.4

mCK: ミトコンドリアCK

血中CK-MM活性の上昇が報告されている[9, 10]が、臨床では犬血清中CK-MM活性を十分に阻害できるものと考えられた。本実験ではマウス抗ヒトCK-MMモノクローナル抗体により犬CK-MM活性が阻害されることを電気泳動像で示すために、検体血清がM抗体液で希釈されるのを回避するのに供試血清を2倍に濃縮した。自動分析装置のプロトコール設定のM抗体液量である75 μl より少ない45 μl を用いたが、犬血清中CK-MM活性は阻害された。

健康犬1の無処理血清で出現したCK-MM位より陽極側のバンドは、抗ヒトCK-MM抗体処理血清においても出現したことから、CK-MMとは異なるCKアイソザイムであり、本実験ではKanemitsuら[11]の4M尿素等量混合処理後の消失または移動度の変化により、このバンドがmCKであることを確認した。ヒト血清CKアイソザイム分析においてもmCKは電気泳動を行うとCK-MM位の陽極側にバンドが出現する[12, 13]。

CK-MB測定用試薬を用いて段階希釈した健康犬血清とCK-MBコントロール液のCK活性値を測定し、検量線の直線性を調べたところ、良好な直線性が認められた。コントロール液中のCK活性とは、CK-MBのCK-Mサブユニット活性阻害後に残存するCK-Bサブユニット活性のことであり、犬血清でも同様に検量線は良好な直線が得られたので、CK-MM以外の残存CK活性を正確に測定していることが示唆された。

正常犬の諸臓器中のCK活性値およびアイソザイム分析に関する報告によると、CK-BBは必ずしも脳神経系に特異的ではなく、平滑筋にはCK-MBとともにCK-BBが多く含まれることが指摘されている[1]。犬では腸管の過蠕動や消化管疾患においてもCK-BB分画比が上昇するという報告がある[14]。しかし、これらの平滑筋の障害で犬血清CK-BB活性が上昇する場合は血清CK-MB活性の上昇を伴う[1]。本実験では健康犬と神経疾患犬併せて28例の血清電気泳動の結果において、CK-MB活性が優勢パターンを示す例は認められなかったことから、平滑筋由来のCK活性はなかったと考えた。またCK-BB活性は年齢の影響を受けることが知られている[15]。健康犬であっても、1歳齢未満の若齢犬ではCK-BB活性値および分画比が高値を示す傾向があるという報告がある[15]。この原因は、幼若動物では血液脳関門の機能が未熟であること[16]に起因すると考えられている。本実験では1歳齢未満の症例を除外した。

免疫阻害法により測定した残存CK活性値と電気泳動法によるCK-BB活性値との間には、強い正の相関関係が認められたので(相関係数 $r=0.797$)、免疫阻害法により測定した残存CK活性値は、CK-BB活性の変動を反映していると考えられ、電気泳動法を行わずに血清CK-BB活性の上昇を知ることができると考えられた。一方電気泳動法ではmCKが28例中23例で認められた。免疫阻害法

による残存CK活性値と電気泳動法によるCK-BB活性値との間の相関関係(係数 $r=0.797$)が、CK-MM活性値間で見られた非常に強い正の相関関係(係数 $r=0.995$)より劣っていることから、免疫阻害法による残存CK活性値はmCKが含まれる場合は高値となり、CK-BBの活性値の推定に影響することが考えられた。ヒトの臨床検査でもmCKは、健常者の血清中でもCK-MBと同程度の活性量含まれているという報告がある[8, 17]。一方で、肝疾患などの細胞壊死、悪性腫瘍などでmCKの逸脱が起こるという報告もある[7]。獣医療分野ではmCKと病態に関する報告はない。免疫阻害法による残存CK活性値はmCKの影響が大きくなる場合もあるが、犬血清中のCKアイソザイムパターンの変化、特にCK-BB活性を主体とするCK-MM以外のCKアイソザイム分画の上昇を、電気泳動法を行わずに総活性値と同時に測定できるので、犬の神経疾患のスクリーニング検査として用いることができると考えられた。

引用文献

- 1) 菊田安至, 大西堂文: 正常犬の creatine kinase 活性値とその isoenzyme. 日獣会誌, 40, 26-30 (1987)
- 2) Lang H: Creatine kinase isoenzymes; pathophysiology and clinical applications. *Clin Chem*, 28, 403 (1982)
- 3) Vaagenes P, Safar P, Diven W: Brain enzyme levels in CSF after cardiac arrest and resuscitation in dog; markers of damage and predictors of outcome. *J Cereb Blood Flow Metab*, 8, 262-275 (1988)
- 4) 澤嶋裕子, 澤嶋効, 高木 泰, 安田 準, 梅村孝司: 脳疾患犬における血清クレアチンキナーゼBB活性値の上昇. 日獣会誌, 48, 491-494 (1995)
- 5) 高木 康, 五味邦英: 血中CKおよびCKアイソザイム分析による新しい病態解析. 臨床病理, 55, 80-100 (1983)
- 6) Kaste M, Hernensniemi J, Somer H: Creatine kinase isoenzymes in acute brain injury. *J Neurosurg*, 55, 511-515 (1981)
- 7) Heinz JW, O'Donnell NJ, Lott JA: Apparent mitochondrial creatine kinase in the serum of a patient with metastatic cancer to the liver. *Clin Chem*, 13, 1908-1911 (1980)
- 8) 豊田陽子, 上野芳人, 高階成美, 津村真由美, 桑田昇治, 木野内窩, ほか: 健常人新鮮血清中から見だされたミトコンドリアCKの検索. *Jpn J Electroph*, 42, 175-179 (1998)
- 9) Aktas M, Auguste D, Lefebvre HP, Toutain PL, Braun JP: Creatine kinase in the dog; a review. *Vet Res Commun*, 17, 353-369 (1993)
- 10) Jones BR, Brennan S, Mooney CT, Callanan JJ,

- McAllister H, Guo LT, et al.: Muscular dystrophy with truncated dystrophin in a family of Japanese Spitz dogs. *J Neurol Sci*, 217, 143-149 (2004).
- 11) Kanemitsu F, Kawanishi I, Mizushima J: Characteristics of mitochondrial creatine kinases from normal human heart and liver tissues. *Clin Chim Acta*, 119, 307-317 (1982)
- 12) 高木 康: クレアチンキナーゼ. 臨床病理特集号 (116), 52-61 (2001)
- 13) Yuu H, Takagi Y, Senju O, Hosoya J, Gomi K, Ishii T: Creatine kinase isoenzyme of high relative molecular mass in serum of a cancer patient. *Clin Chem*, 24, 2054-2057 (1987)
- 14) Kikuta Y, Onishi T: The contribution of intestinal creatine kinase to serum creatine kinase activity and its isoenzymes in dogs. *Jpn J Vet Sci*, 48, 547-551 (1986)
- 15) 澤嶋裕子, 澤嶋効, 高木 泰, 安田 準, 梅村孝司: 若齢犬の血清脳型クレアチンキナーゼ活性. 日獣会誌, 49, 180-182 (1996)
- 16) 相沢豊三, 後藤文男, 富田 稔: 薬物の生体内移行. (中垣正幸 編,) 183-226, 南江堂, 東京 (1969)
- 17) 豊田陽子, 高階成実, 上野芳人, 桑田昇治, 木野内喬蚕, 津村真由美, ほか: 健常人血清に見いだされる特異バンドとミトコンドリアCKに関する検討. 生物物理化学, 41, 244 (1997)