

# 抗ミトコンドリア CK 活性阻害抗体を用いた 新規 CK-MB 活性測定試薬の基本性能と臨床的有用性

星野 忠

日本大学医学部病態病理学系臨床検査医学分野：東京都板橋区大谷口上町 30-1 (〒173-8610)

## キーワード

CK-MB, ミトコンドリア CK, 免疫阻害法, 急性心筋梗塞, ROC 解析, カットオフ値, CK-MB/CK 活性値比

## はじめに

クレアチンキナーゼ (creatin kinase: CK, EC 2.7.3.2) は, クレアチンとクレアチンリン酸のリン酸転移に関与する酵素で, エネルギー代謝の面で重要な役割を担っている. CK アイソザイムは, B (brain) サブユニットと M (muscle) サブユニットの 2 量体で構成され, CK-BB (CK 1), CK-MB (CK 2), CK-MM (CK 3) の 3 種類が細胞質に存在する. その他に, ミトコンドリアには mitochondrial CK (MtCK) が存在し, sarcomeric MtCK (sMtCK) と ubiquitous MtCK (uMtCK) の 2 つのアイソフォームがある<sup>1)</sup>. MtCK はミトコンドリア内膜の外側に 8 量体として存在しているが, 血中では一部が 2 量体として共存している<sup>2,3)</sup>.

CK アイソザイムの中で CK-MB は, 他の臓器に比べて心筋に高比率に存在することから, 従来から急性心筋梗塞 (acute myocardial infarction: AMI) の診断指標として用いられている. CK-MB 測定には, 電気泳動法<sup>4)</sup>, 免疫阻害法<sup>5)</sup>, 蛋白定量法<sup>6)</sup> などがある. 汎用の自動分析装置が普及しているわが国においては, 迅速性, 簡便性および検査コストが安価な面から免疫阻害法が多く検査室で用いられている. しかし, 免疫阻害法は血中に CK-BB, 免疫グロブリン結合 CK (Macro CK type 1) や重合 MtCK (Macro CK type 2) が出現した場合, CK-MB 活性が偽高値となることが報告されている<sup>7-9)</sup>. Macro CK type 1 は悪性腫瘍, 潰瘍性大腸炎などで出現する傾向が高いが,

疾患特異性については明らかではない<sup>10)</sup>. 一方, Macro CK type 2 は悪性腫瘍<sup>11,12)</sup>, 肝硬変, ロタウイルス胃腸炎<sup>13)</sup> 等でみられる. なお, Lee ら<sup>9)</sup> は Macro CK の出現頻度について, Macro CK type 1 よりも Macro CK type 2 の方が多いと報告している. また, MtCK は健常成人および健常小児の血中にも常時存在するとの報告がある<sup>14,15)</sup>.

このような背景の中でわれわれは, 従来法の CK-MB 活性測定試薬の感度, 特異度の向上を図るには MtCK 活性の影響を排除する必要があると判断し, ヒト sMtCK およびヒト uMtCK 活性を阻害する抗体の開発に取り組んだ. その結果, 2 種類の抗ヒト MtCK 活性阻害モノクローナル抗体 (抗 MtCK 活性阻害抗体) の作製に成功した. この抗 MtCK 阻害抗体を組み込んだ新規の CK-MB 活性測定試薬は, 2008 年 8 月にシスメックス (株) から「エルシステム・CK-MB MtO」として上市され, 現在は「エルシステム・CKMB」として発売されている. また, 同年の 12 月には (株) シノテストから「アキュラスオート CK-MB MtO」が上市され, 現在はより試薬の安定性が向上した「シグナスオート CK-MB MtO」と並行発売されている.

本稿では, 新規 CK-MB 活性測定試薬の基本性能<sup>16,17)</sup> と臨床的有用性<sup>17,18)</sup> について, 今日まで多くの施設で検討, 評価された報告内容も含めて総括し解説する.

## 新規 CK-MB 活性測定試薬の基本性能

### 1. 抗 MtCK 活性阻害抗体の CK アイソザイムに対する反応性<sup>16)</sup>

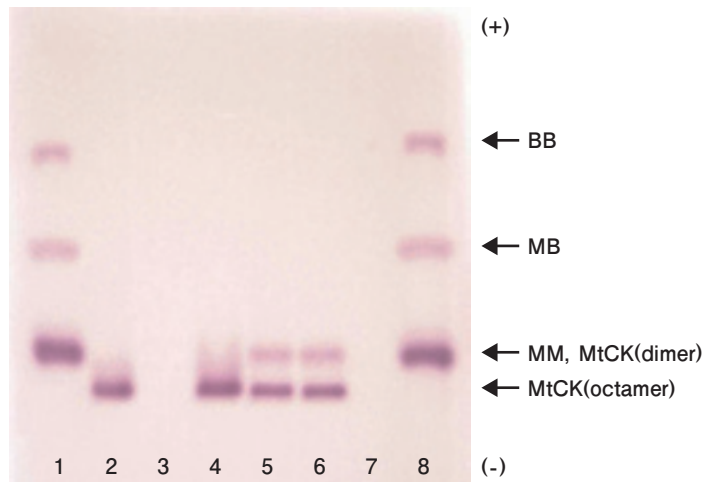
CK-BB, CK-MB, CK-MM は Scripps 社 (米国) の酵素標品を用いた。ヒトリコンビナント sMtCK および uMtCK は, Wallimann (Institute of Cell Biology, ETH, Zurich) から提供を受けた<sup>19)</sup>。抗ヒト sMtCK 活性阻害モノクローナル抗体 (抗 sMtCK 活性阻害抗体) と抗ヒト uMtCK 活性阻害モノクローナル抗体 (抗 uMtCK 活性阻害抗体) をそれぞれ 20 μg/mL 添加した CK 活性測定試薬を用いて, 抗 MtCK 活性阻害抗体の各 CK アイソザイムに対する阻害率を求めた。表 1 に示すように, 抗 sMtCK 活性阻害抗体は sMtCK に対して 98.1 % 阻害したが, uMtCK は 2.1 %,

他の CK アイソザイムについては 3.2 % 以下であった。一方, 抗 uMtCK 活性阻害抗体は uMtCK に対して 98.2 % 阻害したが, sMtCK は 1.9 %, 他の CK アイソザイムについては 3.4 % 以下であった。また, 増渕ら<sup>20)</sup> は「エルシステム・CKMB」試薬と「アキュラスオート CK-MB MtO」試薬, 戸松ら<sup>21)</sup>, 岩井ら<sup>22)</sup> は「アキュラスオート CK-MB MtO」試薬を用いて, われわれと同様の検討を行っており, 抗 sMtCK 活性阻害抗体の sMtCK に対する阻害率と抗 uMtCK 活性阻害抗体の uMtCK に対する阻害率はいずれも 98 % 以上あったと報告している。

次に, 抗 MtCK 活性阻害抗体のヒトリコンビナント MtCK に対する阻害について CK アイソザイム電気泳動を用いて確認した。図 1 に示すように, sMtCK は抗 sMtCK 活性阻害抗体で活性が阻害され

表 1. 抗 MtCK 活性阻害抗体の sMtCK, uMtCK, CK-BB, CK-MB, CK-MM に対する反応性

CK アイソザイム	CK 活性値 (U/L)	抗 sMtCK 抗体の活性阻害率 (%)	抗 uMtCK 抗体の活性阻害率 (%)
sMtCK	490	98.1	1.9
uMtCK	396	2.1	98.2
CK-BB	135	3.2	3.4
CK-MB	114	1.3	1.4
CK-MM	3356	0.4	0.5



1: CK アイソザイムコントロール試料, 2: sMtCK 試料, 3: 抗 sMtCK 活性阻害抗体を添加した sMtCK 試料, 4: 抗 uMtCK 阻害抗体を添加した sMtCK 試料, 5: uMtCK 試料, 6: 抗 sMtCK 活性阻害抗体を添加した uMtCK 試料, 7: 抗 uMtCK 活性阻害抗体を添加した uMtCK 試料, 8: CK アイソザイムコントロール試料

図 1. 抗 MtCK 活性阻害抗体のヒトリコンビナント MtCK 酵素標品に対する反応性

てバンドが消失した（レーン 3）が，抗 uMtCK 活性阻害抗体では活性は阻害されなかった（レーン 4）．一方，uMtCK は抗 sMtCK 活性阻害抗体では活性が阻害されなかった（レーン 6）が，抗 uMtCK 活性阻害抗体では活性が阻害されてバンドが消失した（レーン 7）．また，2 種類の抗 MtCK 活性阻害抗体は CK-MM バンドとほぼ同位置に泳動される 2 量体の MtCK と CK-MM バンドの陰極側に泳動される 8 量体の MtCK を共に阻害できることを確認した．

## 2. CK-MB 蛋白定量法および CK アイソザイム電気泳動法との相関

患者検体 85 例を用いて，従来 CK-MB 活性測定法（従来法）および新規 CK-MB 活性測定法（新規法）

と対照法としての CK-MB 蛋白定量法（蛋白定量法），CK アイソザイム電気泳動法（電気泳動法）との相関試験を行った．**図 2**に示すように，従来法と蛋白定量法（A）および電気泳動法（B）との相関係数は  $r=0.834$ ， $r=0.852$  であった．一方，新規法と蛋白定量法（C）および電気泳動法（D）とは  $r=0.974$ ， $r=0.971$  と従来法に比べて相関性は向上していた．

**図 2**の（A），（B）に示した赤で囲んだ乖離検体について，その原因を追究するために抗 CK-M 活性阻害抗体と 2 種類の抗 MtCK 活性阻害抗体を用いて CK アイソザイム電気泳動を行った．**図 3**に CK-MB 値が乖離した検体の 1 例として，ロタウイルス胃腸炎患者の CK アイソザイムパターンを示した．レーン 2 は未処理患者試料で CK-BB バンドと CK-MM バン

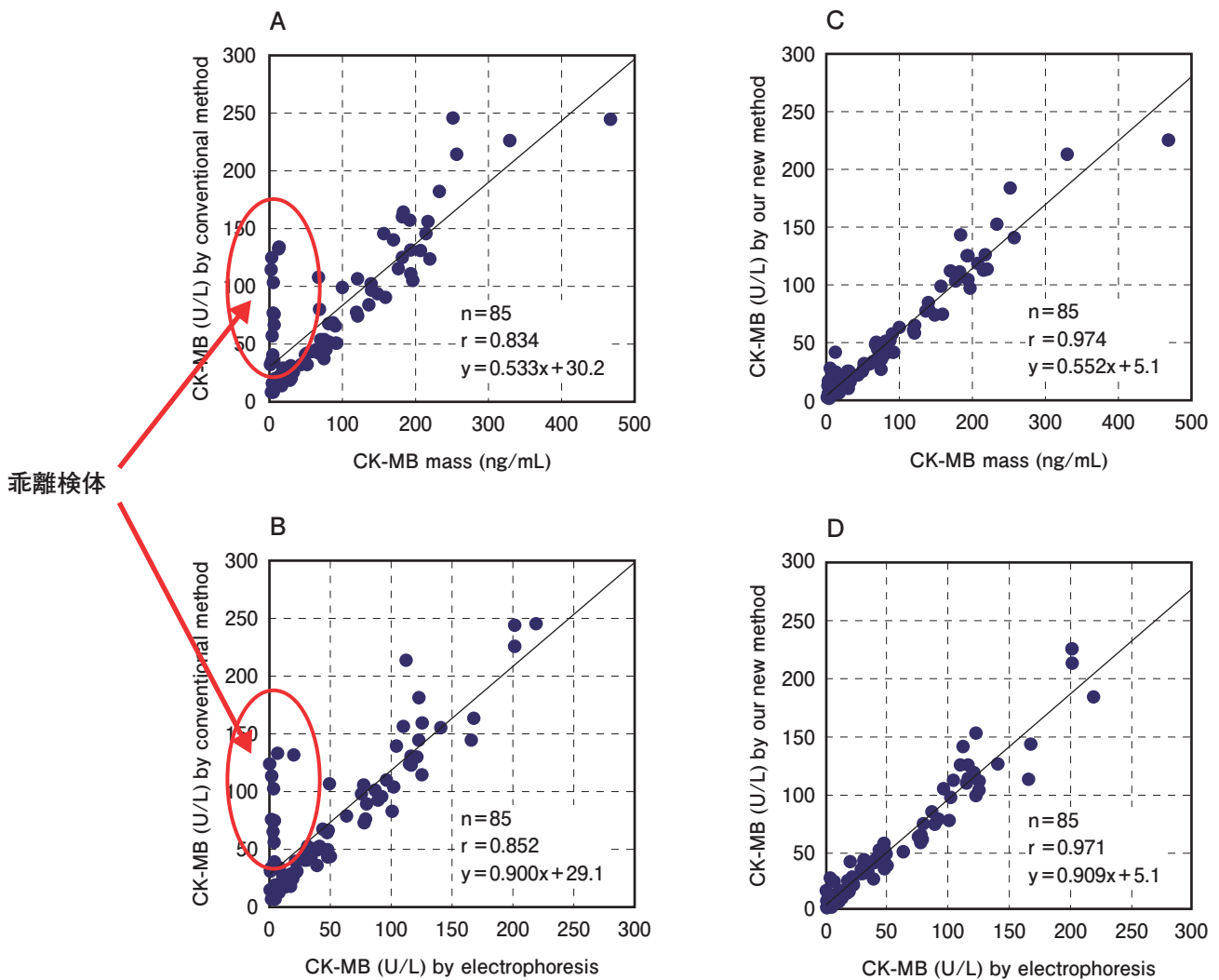
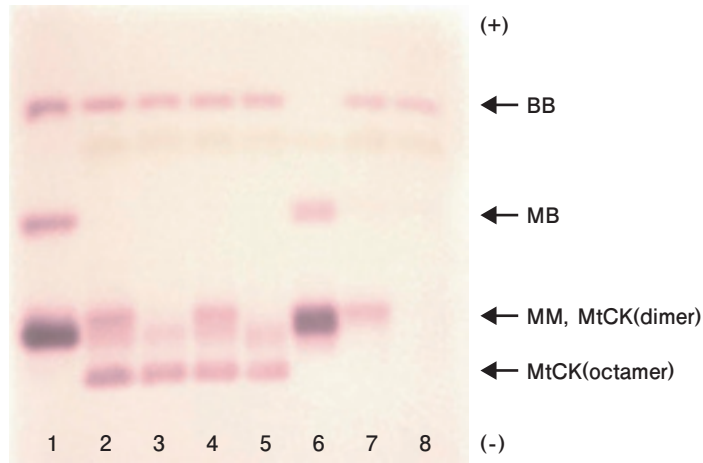


図 2. 従来法および新規法と CK-MB 蛋白定量法，CK アイソザイム電気泳動法との相関



1: CKアイソザイムコントロール(CK-BB・MB・MM)試料, 2: 患者試料, 3: 抗CK-M活性阻害抗体を添加した患者試料, 4: 抗sMtCK活性阻害抗体を添加した患者試料, 5: 抗CK-M活性阻害抗体と抗sMtCK活性阻害抗体を添加した患者試料, 6: CKアイソザイムコントロール(CK-MB・MM)試料, 7: 抗uMtCK活性阻害抗体を添加した患者試料, 8: 抗CK-M活性阻害抗体と抗uMtCK活性阻害抗体を添加した患者試料

図3. CK-MB活性偽高値を示した患者のCKアイソザイムパターン

ド、そしてCK-MMバンドの陰極側に8量体MtCK(Macro CK type 2)と推定されるバンドを認めた。レーン3は抗CK-M活性阻害抗体処理した患者試料で、2量体と8量体のMtCKと推定されるバンドを認めた。レーン4は抗sMtCK活性阻害抗体処理した患者試料であるが、各CKバンドに変化はなく、レーン2の未処理患者試料と同様のパターンであった。レーン5は抗CK-M活性阻害抗体と抗sMtCK活性阻害抗体処理した患者試料であるが、レーン3の抗CK-M活性阻害抗体処理した患者試料と同様のパターンであった。レーン7は抗uMtCK活性阻害抗体処理した患者試料でMtCKバンドは消失し、CK-MMに相当するバンドを認めた。レーン8は抗CK-M活性阻害抗体と抗uMtCK活性阻害抗体処理した患者試料であるが、CK-BBバンド以外のCK-MM付近のバンドは全て消失した。以上の結果から、この患者検体のCK-MB値が乖離した原因は、CK-BBと大量に存在するuMtCK(2量体と8量体)であったことが判明した。菅野ら<sup>23)</sup>もCK-MB活性値が従来法と新規法とで乖離した癌患者の検体について電気泳動法で解析したところ、患者検体中にCK-BBとuMtCK(Macro CK type 2)を認めたことを報告している。なお、われわれが今までに検索した約80例のMacro CK type 2は全てuMtCKが増加したものであつ

たことは大変興味深い。また、sMtCK増加例については今後検索していく中で見つければ、疾患との関連性について検討していく予定である。

## 新規CK-MB活性測定試薬の臨床的有用性

### 1. 健常成人のCK-MB活性値とMtCK活性値の基準範囲<sup>18)</sup>

健常成人440名、男性197名(平均年齢 $\pm$ 1標準偏差:39.2 $\pm$ 10.6歳, 20~63歳)と女性243名(33.2 $\pm$ 11.3歳, 21~64歳)の血清検体を用いた。CK, CK-MBおよびMtCK活性値の基準範囲は、ノンパラメトリック法を用いて統計処理した2.5~97.5パーセンタイル値を表2に示した。また、図4にCK-MB活性値、図5にMtCK活性値のヒストグラムを示した。CK-MB活性値の基準範囲は、従来法(図4-A)では6.4~18.5 U/L(平均値:12.0 U/L)、新規法(図4-B)では0.4~5.9 U/L(平均値:2.5 U/L)であった。なお、新規法において男性は0.2~6.0 U/L(平均値:2.8 U/L)、女性は0.8~5.4 U/L(平均値:2.2 U/L)と男性が女性よりも高値(p<0.05)であった。MtCK活性値の基準範囲(図5-A)は、1.0~6.4 U/L(平均値:3.6 U/L)であった。また、MtCKに

表2. 健常成人を対象としたCKアイソザイム活性の基準範囲

CK アイソザイム	健常者(n=440)		男性(n=197)		女性(n=243)	
	Mean (U/L)	Range (U/L)	Mean (U/L)	Range (U/L)	Mean (U/L)	Range (U/L)
CK	106	51-204	126	66-252	89	49-165
CK-MB(従来法)	12.0	6.4-18.5	11.4	5.3-18.3	12.6	8.0-18.5
CK-MB(新規法)	2.5	0.4-5.9	2.8	0.2-6.0	2.2	0.8-5.4
MtCK	3.6	1.0-6.4	3.2	0.6-6.3	3.9	2.5-6.5
sMtCK	0.4	0.0-1.2	0.4	0.0-1.2	0.4	0.0-1.1
uMtCK	3.4	0.9-6.3	3.0	0.6-5.8	3.7	1.8-6.3

Stat Flex ver. 5.0(Windows)を用いてノンパラメトリック法から2.5~97.5パーセンタイル値を算出した。

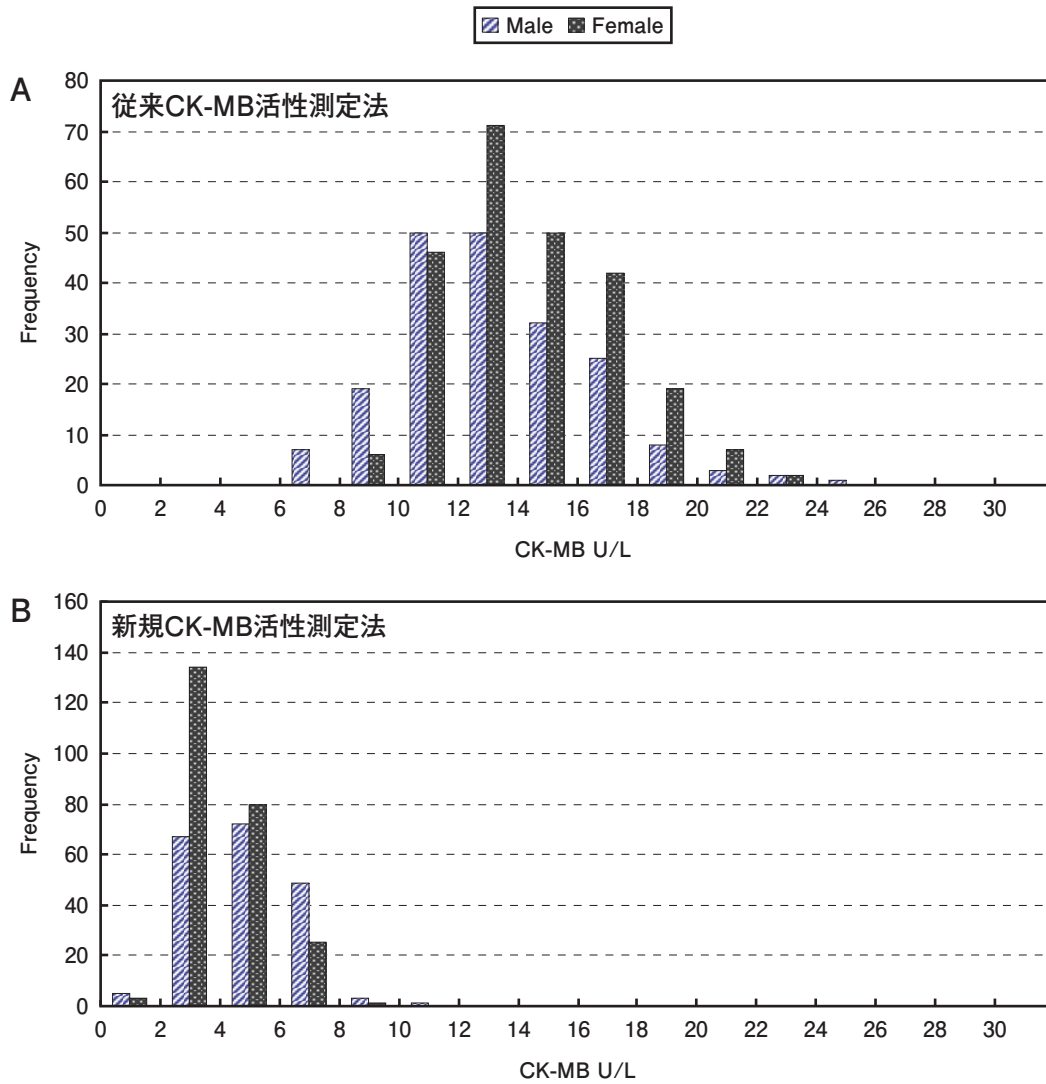


図4. 従来法試薬および新規法試薬を用いて測定した健常成人のCK-MB活性値のヒストグラム

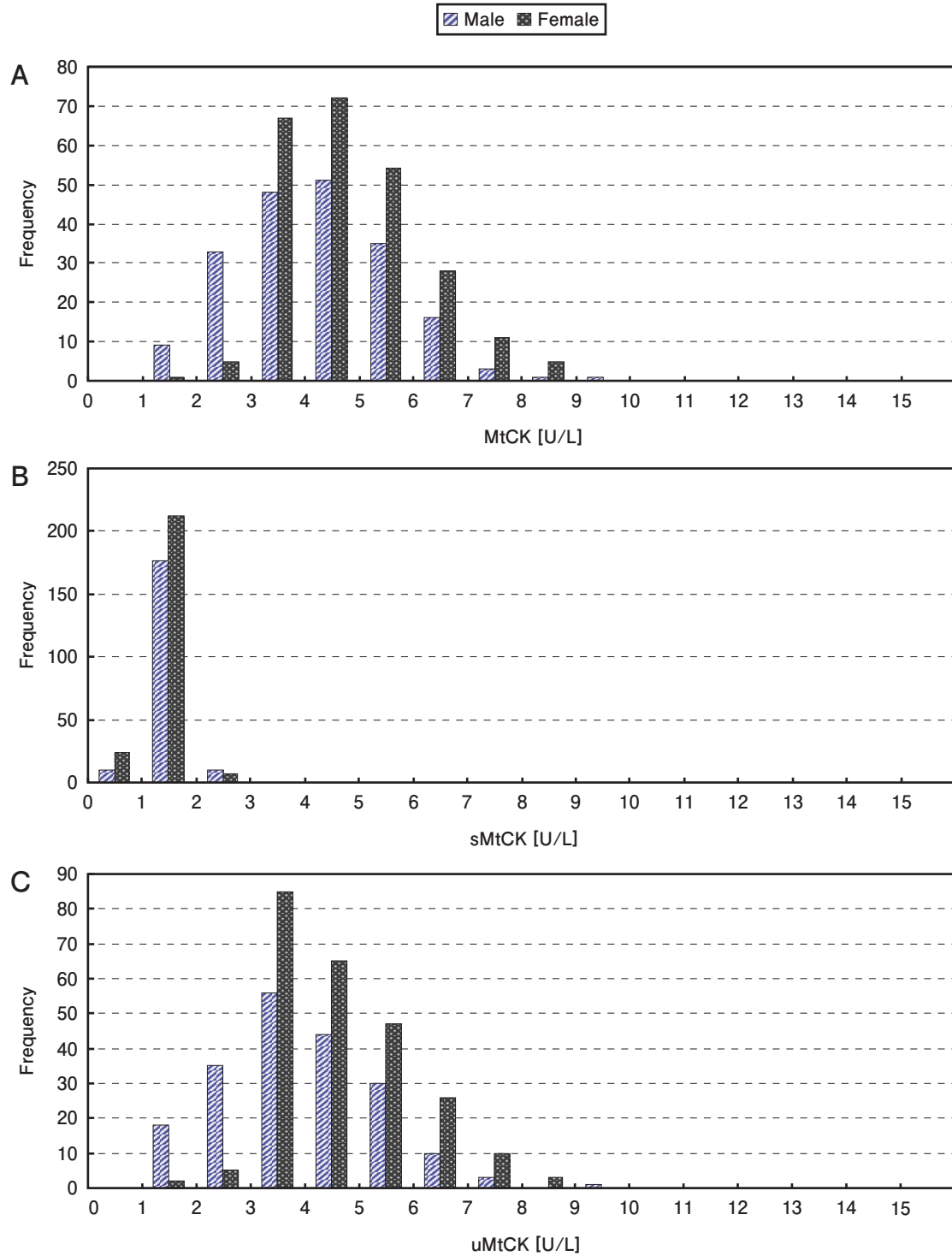


図5. 健常成人から算出した MtCK 活性値, sMtCK 活性値および uMtCK 活性値のヒストグラム

については2種類のアイソフォーム別に見ると、sMtCK 活性値の基準範囲 (図5-B) は0.0 ~ 1.2 U/L (平均値: 0.4 U/L), uMtCK 活性値の基準範囲 (図5-C) は0.9 ~ 6.3 U/L (平均値: 3.4 U/L)であった。なお、sMtCK は男女間で有意差を認めなかった

( $p=0.15$ ) が、uMtCK は男性よりも女性の方が高値 ( $p < 0.05$ ) であった。この成績は、以前われわれが健常成人114名から求めたCK, CK-MB および MtCK 活性値の基準範囲<sup>16)</sup> や齊藤ら<sup>24)</sup> が健診検体100名から求めた基準範囲とも近似していた。また、

町田ら<sup>25)</sup>も健常成人321名(男性113名, 女性208名)から求めたCK-MB活性値の基準範囲は0~6 U/Lと報告している。

新規法から求めた健常成人のCK-MB活性値の基準範囲は, 従来法よりも低値に算出されたが, 表2に示した従来法の基準範囲の平均値(12.0 U/L)と新規法の平均値(2.5 U/L)の差はMtCK活性値に相当することから, 従来法を用いて測定したCK-MB活性値の約80%はMtCK活性に由来していたと考えられた。また, 健常成人のMtCKアイソフォームにおける基準範囲の平均値は, sMtCKが0.4 U/L, uMtCKが

3.4 U/Lであったことから, 健常成人のMtCK活性の約90%はuMtCK由来であることが新たに判明した。

## 2. 急性心筋梗塞患者を対象としたROC解析とCK-MBのカットオフ値<sup>18)</sup>

胸痛を自覚して24時間以内に日本大学医学部附属板橋病院の救命救急センターに搬送された276例の中で, AMIと診断された116例と非AMIと診断された160例を対象としてROC(receiver-operating characteristic)解析を行った。なお, 統計ソフトはStat Flex ver. 5.0(Windows)を用いた。その結果を図6に

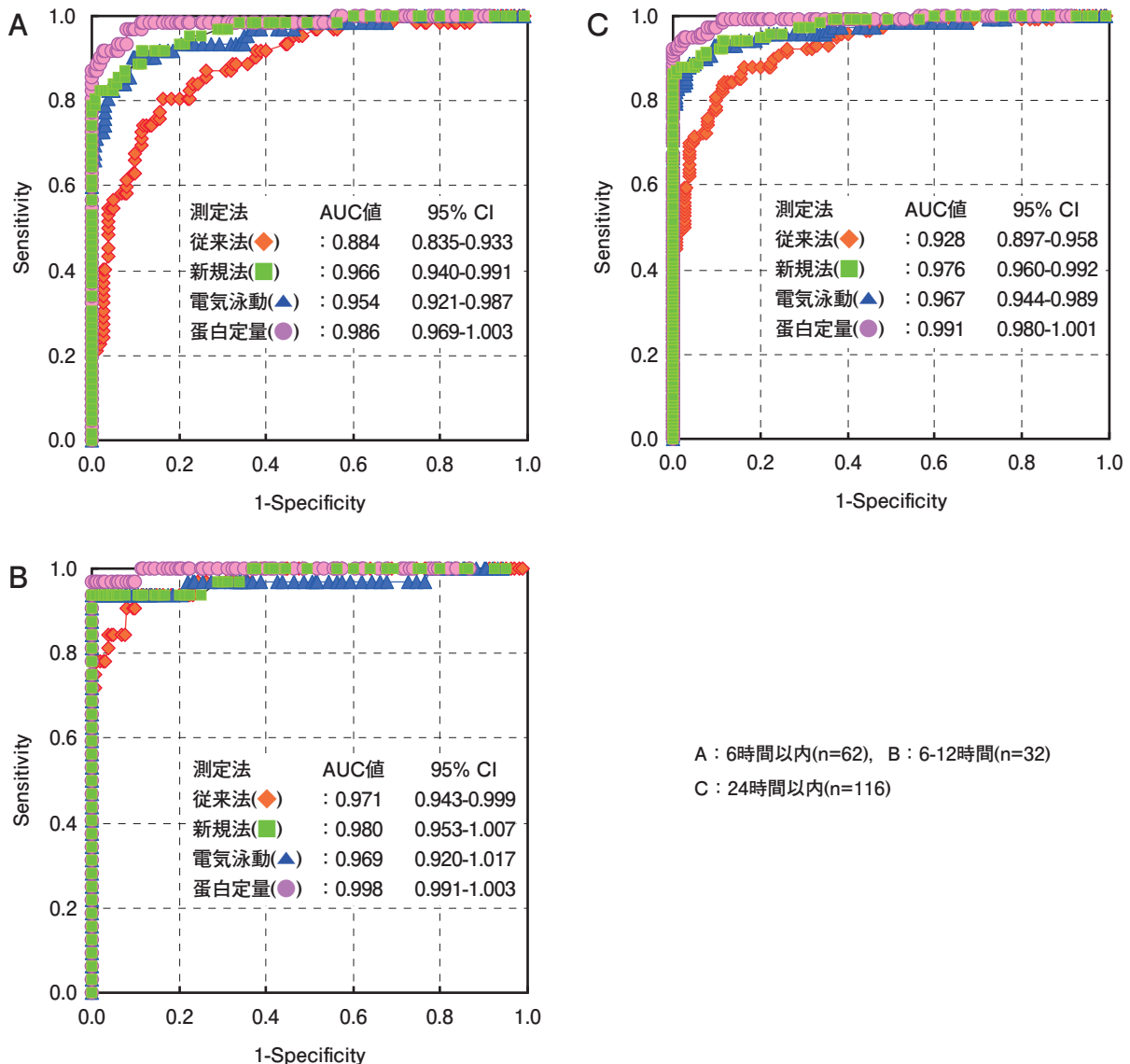


図6. AMI患者を対象としたROC解析

示したが、**図6-A**は胸痛を自覚してから6時間以内の62例、**図6-B**は6～12時間の32例、**図6-C**は24時間以内の116例のROC曲線である。ROC曲線から算出した曲線下面積（area under the curve：AUC）値は、6時間以内において従来法は0.884（95% confidence interval [CI]：0.835～0.933）、新規法は0.966（95% CI：0.940～0.991）、電気泳動法は0.954（95% CI：0.921～0.987）、蛋白定量法は0.986（95% CI：0.969～1.003）であった。6～12時間のAUC値は従来法で0.971（95% CI：0.943～0.999）、新規法は0.980（95% CI：0.953～1.007）、電気泳動法は0.969（95% CI：0.920～1.017）、蛋白定量法は0.998（95% CI：0.991～1.003）であった。24時間以内のAUC値は従来法で0.928（95% CI：0.897～0.958）、新規法は0.976（95% CI：0.960～0.992）、電気泳動法は0.967（95% CI：0.944～0.989）、蛋白定量法は0.991（95% CI：0.980～1.001）であった。AUC値の比較において、新規法は従来法との間で6時間以内と24時間以内で有意差を認めたと、蛋白定量法とは有意差を認めなかった。従って、新規法は蛋白定量法とほぼ同等であり、従来法よりも臨床的有用性が高いことが確認できた。また、村上ら<sup>26)</sup>は、胸痛発作から24時間以内のAMI患者79検体と陰性対象にAMI以外の心疾患、糖尿病、高血圧症を含む230検体を用いてROC解析を行って

いる。その結果、ROC曲線から求めたAUC値は従来法で0.861、新規法で0.912、蛋白定量法で0.912、高感度トロポニンTで0.944であったと報告している。

われわれがYoudenインデックス<sup>27)</sup>を用いて求めた各CK-MB測定の感度、特異度、カットオフ値を**表3**に示した。従来法のカットオフ値は22 U/L（感度84.5%、特異度88.1%）、新規法は12 U/L（感度87.1%、特異度99.4%）、電気泳動法は10 U/L（感度88.8%、特異度96.3%）、蛋白定量法は9 ng/mL（感度94.8%、特異度97.5%）であった。一方、村上らはわれわれとは異なる統計処理を用い、左上隅に最も接近するポイントをカットオフ値として求めている<sup>28)</sup>。なお、新規法で用いるCK-MB活性のカットオフ値は、臨床医とのコンセンサスを得た結果として、従来法のCK-MB活性のカットオフ値（25 U/L）と同等の特異度となるように再設定を行なった結果、12 U/Lが適当であると報告している<sup>26)</sup>。また、柳川ら<sup>29)</sup>は心疾患患者44例と非心疾患患者131例を用いてROC解析を行ったところ、新規法のCK-MB活性のカットオフ値は13 U/Lと報告している。これらの結果から、新規法を用いる際に使用するCK-MB活性のカットオフ値は、ROC解析に用いた対象が異なり、統計処理法に違いがあるにもかかわらず、3施設のカットオフ値は近似していた。従って、新規法のCK-MB活性のカットオフ値は12 U/Lを推奨する。

表3. AMI患者を対象としたROC解析から求めたCK-MBのカットオフ値

CK-MB測定	感度(%)	特異度(%)	カットオフ値
従来法	84.5	88.1	22 U/L
新規法	87.1	99.4	12 U/L
電気泳動法	88.8	96.3	10 U/L
蛋白定量法	94.8	97.5	9 ng/mL

AMI(n=116)、非AMI(n=160)を対象にしたカットオフ値は、Youden Indexを用いて算出した。



### 3. CK-MB/CK 活性値比<sup>18)</sup>

AMI 患者 116 例から求めた CK-MB/CK 活性値比の 2.5 ~ 97.5 パーセンタイル値を表 4 に示した。従来法は 0.05 ~ 0.23 (平均値 0.13), 新規法は 0.03 ~ 0.20 (平均値 0.10) であった。Stein ら<sup>30)</sup> は, 従来法を用いて AMI を診断する際に CK-MB 活性がカットオフ値の 25 U/L を超えた場合, CK-MB/CK 活性値比 (0.06 ~ 0.25) を用いることを提唱した。つまり, 0.06 未満であれば骨格筋由来の CK-MB の増加を考え, 0.25 以上の場合は抗 CK-M 活性阻害抗体で阻害できない CK-BB や Macro CK が血中に存在している可能性を示唆していることになる。従って, MtCK 活性を阻害する新規法は, 従来法の CK-MB/CK 活性値比をそのまま用いることはできないと考えられる

ため, 新たに CK-MB/CK 活性値比を設定する必要があった。この点について村上ら<sup>26)</sup> は, AMI 患者 79 検体から求めた CK-MB/CK 活性値比について, われわれと同じ 0.03 ~ 0.20 の範囲に分布していたと報告している。

次に, われわれが設定した CK-MB/CK 活性値比 (0.03 ~ 0.20) の妥当性について, 異常 CK アイソザイムとして CK-BB 高値検体 24 例, Macro CK type 1 検体 4 例, CK-MM 高値検体 8 例および Macro CK type 2 を含む MtCK 高値検体 34 例を用いて検証を行った。その結果を図 7 に示したが, 従来法の CK-MB/CK 活性値比はわれわれが求めた 0.05 ~ 0.23 を使用した。従来法 (図 7-A) では, CK-BB 高値検体, Macro CK type 1 検体がいずれもカットオフ値

表 4. AMI 患者から求めた CK-MB/CK 活性値比

CK-MB活性測定	Mean	Range
従来法	0.13	0.05-0.23
新規法	0.10	0.03-0.20

Stat Flex ver. 5.0(Windows)を用いてノンパラメトリック法から 2.5~97.5パーセンタイル値を算出した。

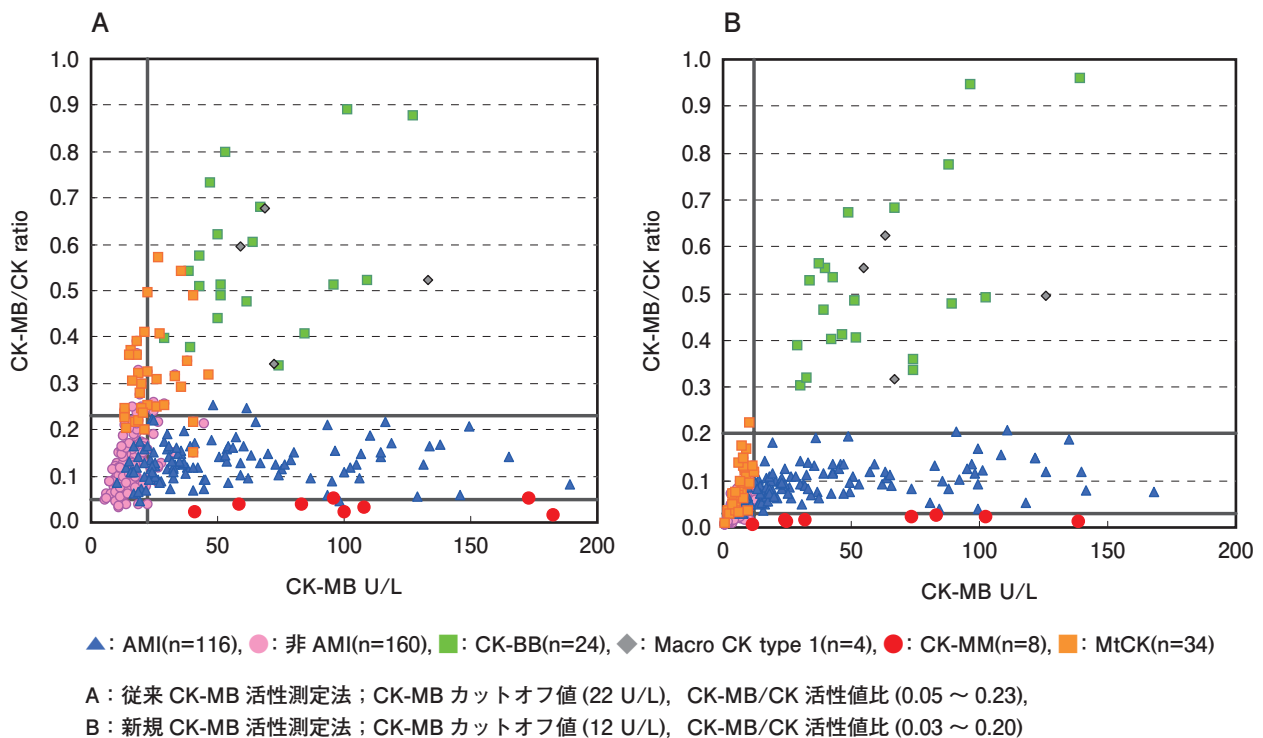


図 7. AMI 患者検体, 非 AMI 患者検体および CK アイソザイム異常検体の CK-MB 活性値と CK-MB/CK 活性値比

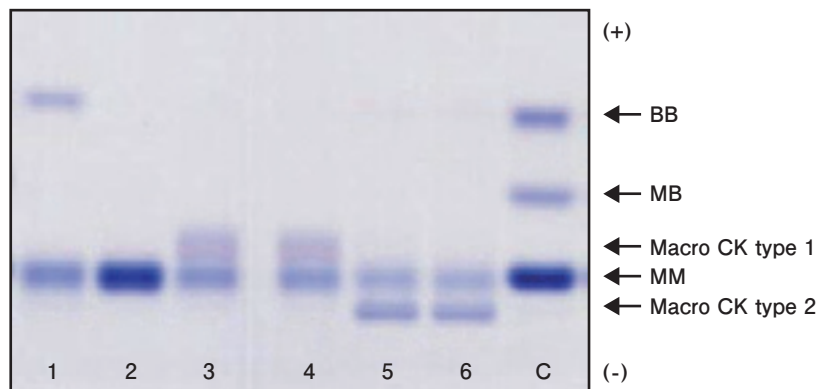
(22 U/L) を超え、かつ CK-MB/CK 活性値比の上限 (0.23) を超えていた。MtCK 高値検体は、CK-MB/CK 活性値比の上限を超える検体の中に CK-MB 活性がカットオフ値以下やカットオフ値以上を示す検体を認め、幅広く分布していた。また、CK-MB/CK 活性値比が 0.05 ~ 0.23 の範囲内で CK-MB 活性がカットオフ値を超えた検体も認められ、AMI と診断される可能性がある点で問題があった。一方、新規法 (図 7-B) では、CK-BB 高値検体、Macro CK type 1 検体は従来法と同じ挙動を示したが、MtCK 高値検体については抗 MtCK 活性阻害抗体が機能しているために CK-MB 活性はカットオフ値 (12 U/L) 以下であった。また、CK-MM 高値検体は従来法、新規法ともに CK-MB/CK 活性値比の下限以下に収まっていた。これらの結果から、新規法の CK-MB/CK 活性値比は 0.03 ~ 0.20 を推奨する。

## 新規 CK-MB 活性測定試薬の有効的な活用

### 1. 24 時間以内に複数回検査依頼があった際の CK-MB/CK 活性値比の活用

初回採血から 24 時間以内に次回採血が行われた症例について、従来法試薬で CK-MB 活性が 25 U/L 以上、CK-MB/CK 活性値比が 0.25 以上を示した検体を用いて電気泳動法による CK アイソザイム分析を

行った。CK-BB 高値検体 31 例、Macro CK type 1 検体 11 例、Macro CK type 2 検体 15 例について、CK-MB/CK 活性値比に注目したところ、CK-BB 高値検体は初回測定と次回測定との CK-MB/CK 活性値比の平均値が 0.53、次回測定との平均値は 0.05 と有意に低下していた。一方、Macro CK type 1 検体は平均値が 0.69 から 0.70、Macro CK type 2 検体は平均値が 0.81 から 0.82 と CK-MB/CK 活性値比の平均値に有意差を認めなかった。図 8 に代表的な CK アイソザイムパターンの経時変化例を示した。レーン 1, 2 は CK-BB 高値検体で、レーン 1 の初回採血検体で認められた CK-BB バンドがレーン 2 の次回採血検体では明らかに減少していた。レーン 3, 4 は Macro CK type 1 検体、レーン 5, 6 は Macro CK type 2 検体であるが、いずれもアノマリーバンドに変化を認めなかった。次に、従来法試薬で初回測定と次回測定との CK-MB/CK 活性値比の変化率を求めた。その結果を図 9 に示したが、CK-BB 高値検体は -70.2 % ~ -99.9 % (平均値 -90.5 %)、Macro CK type 1 検体は -13.8 % ~ 42.2 % (平均値 0.6 %)、Macro CK type 2 検体は -34.3 % ~ 45.0 % (平均値 7.0 %) であった。これらの結果をまとめると、初回採血から 24 時間以内に次回採血が行われて、CK および CK-MB 活性測定の検査依頼があった症例では、CK-MB/CK 活性値比の変化率をみることで、CK-MB 活性偽高値の原因として考えられる CK-BB と Macro CK を判別することが可能と考えられた。



1 : CK-BB 検体 (初回採血), 2 : CK-BB 検体 (次回採血), 3 : Macro CK type 1 検体 (初回採血), 4 : Macro CK type 1 検体 (次回採血), 5 : Macro CK type 2 検体 (初回採血), 6 : Macro CK type 2 検体 (次回採血), C : CK アイソザイムコントロール試料

図 8. 初回採血検体と次回採血検体の CK アイソザイムパターン

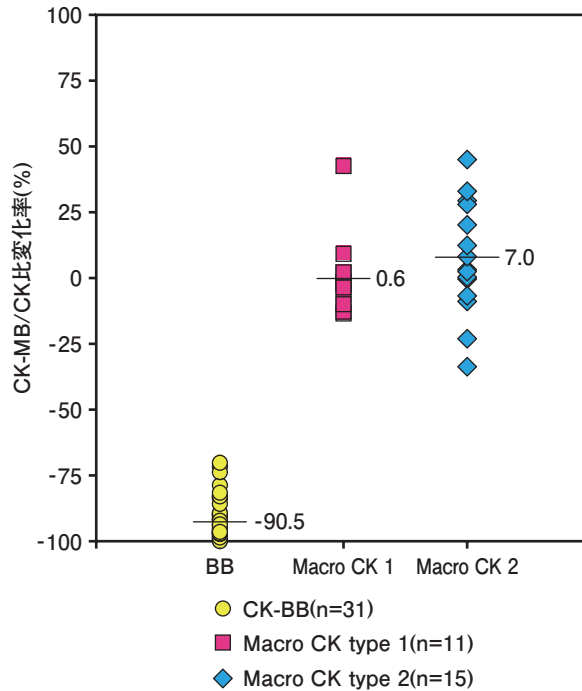


図9. 従来法試薬を用いた初回測定と次回測定でのCK-MB/CK活性値比の変化率(%)

しかし、従来法試薬ではMacro CKのタイプを区別することは困難であった。一方、新規法試薬を用いれば、MtCK活性を阻害できることからMacro CK type 2については排除できるので、CK-BBとMacro CK type 1の判別は容易であった<sup>31)</sup>。従って、臨床医に対してCK-MB活性偽高値を知らせるとともに血中に出現している異常CKアイソザイムについても報告することが可能となった。ただし、24時間以内に複数回の採血が行われた場合でのみ可能という点では、適応範囲が限られるという課題が残されている。

## 2. 熱処理試薬を用いたCK-MB活性値の活用法

新規法を用いても、CK-BB、Macro CK type 1が血中に存在すればCK-MB活性は偽高値を示す。そこで、より迅速、簡便な方法でCK-BBとMacro CK type 1を判別する方法を考案した。Bohnerら<sup>32)</sup>の報告を基に、CKアイソザイムの耐熱性の違いを利用してCK-BBとMacro CK type 1を判別できる熱処理条件の検討を行った。検討に用いた検体はあらかじめ電気泳動法によるCKアイソザイム分析を行い、CK-MB高値検体(CK-MB、CK-MMのみ)、Macro CK type 1検体(Macro CK type 1、CK-MMのみ)をそれぞれ5検体用いた。45℃の水浴中で熱処理時間を5分、10分、15

分の条件で得た試料を用いたところ、CK-MB活性の残存比の平均値は表5に示すように、5分でCK-MBは0.50、CK-BBは0.12、Macro CK type 1は0.95、10分でCK-MBは0.26、CK-BBは0.03、Macro CK type 1は0.91、15分でCK-MBは0.15、CK-BBは0.02、Macro CK type 1は0.86であった。また、CK-MBを対照としてWelchの検定を行ったところ、5分、10分、15分のいずれにおいてもCK-BBとMacro CK type 1との間に有意差を認めた。図10は45℃熱処理時間別のCK-MB活性残存比の分布を示したが、CK-BBとMacro CK type 1を判別するための熱処理時間は5分が最適であると判断した。図11は45℃熱処理試薬を用いたCKアイソザイムパターンの経時変化を示した。レーン1は未処理試料、レーン2は5分熱処理試料、レーン3は10分熱処理試料、レーン4は15分熱処理試料である。CK-BB検体は5分後でCK-BBバンドがわずかに見える程度まで活性が低下したが、Macro CK type 1検体は15分後でもアノマリーバンドにほとんど変化を認めなかった。これらの結果から、45℃水浴中での熱処理時間は5分とし、CK-MBに対してCK-BBとMacro CK type 1を判別できることが明らかとなった。なお、従来法を用いた場合は、CK-BBとMacro CKは判別できるが、MtCKも耐熱性を示す

表5. 45°C熱処理試料を用いた CK-MB 活性の残存比

5分熱処理	Mean	SD	P値
CK-MB	0.50	0.058	
CK-BB	0.12	0.030	<0.001*
Macro CK type 1	0.95	0.030	<0.001*
10分熱処理	Mean	SD	P値
CK-MB	0.26	0.056	
CK-BB	0.03	0.017	<0.001*
Macro CK type 1	0.91	0.045	<0.001*
15分熱処理	Mean	SD	P値
CK-MB	0.15	0.042	
CK-BB	0.02	0.017	<0.001*
Macro CK type 1	0.86	0.075	<0.001*

\* : 統計処理はCK-MBを対照として, Welchの検定を行った。

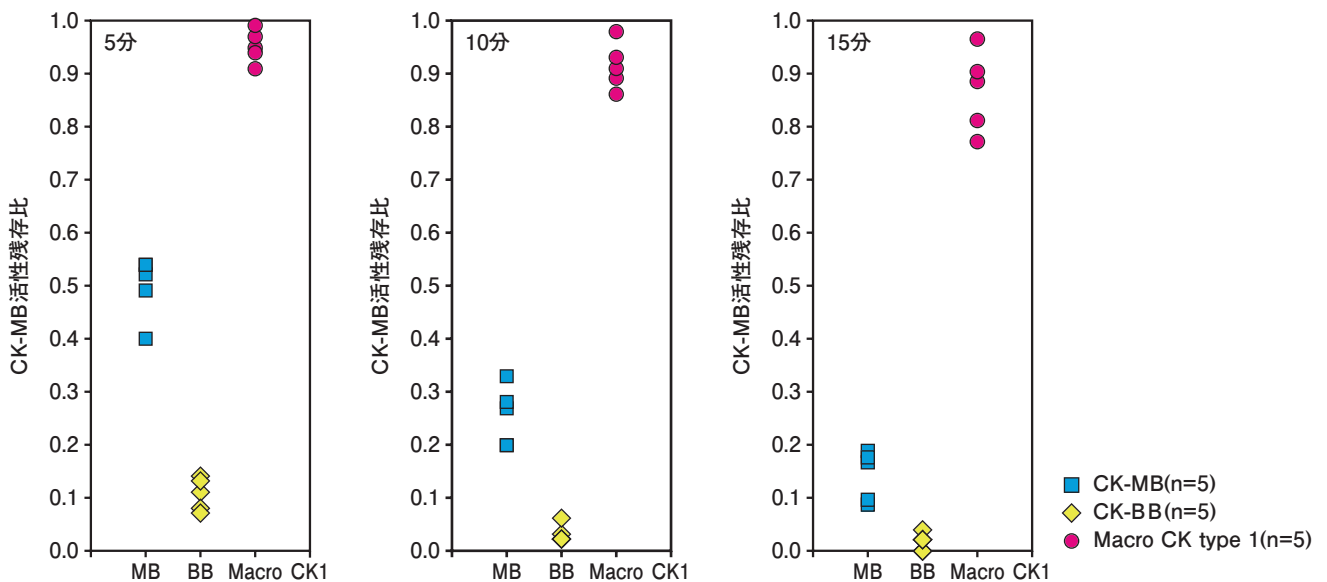
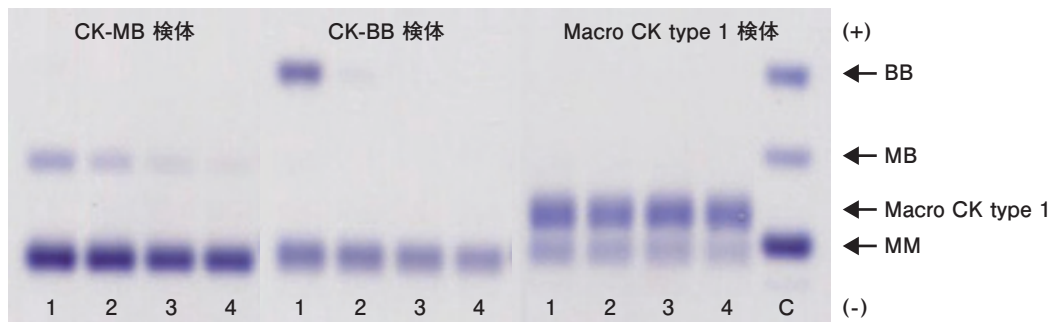


図 10. 45°C熱処理時間別の CK-MB 活性残存比の分布



1 : 未処理試料, 2 : 5分熱処理試料, 3 : 10分熱処理試料, 4 : 15分熱処理試料,  
C : CK アイソザイムコントロール試料

図 11. 45°C熱処理試料の CK アイソザイムパターン

ことから Macro CK type 1 と Macro CK type 2 を区別することはできない<sup>32)</sup>。この点からも、新規法を用いることの有用性が実証された。

## まとめ

抗 MtCK 活性阻害抗体の開発に着手して約 10 年が経過して、2 種類の抗 MtCK 活性阻害抗体を従来 CK-MB 活性測定試薬に添加した新規 CK-MB 活性測定試薬が 2008 年 8 月にシスメックス (株) から「エルシステム・CK-MB MtO」として上市された。また、同年 12 月には (株) シノテストから「アキュラスオート CK-MB MtO」が発売された。上市からまもなく 5 年を迎えようとしているが、この間に多くの施設で本試薬の基礎的検討、臨床評価の検討が行われてきた。そして、その検討成績は臨床検査関連学会で発表され、われわれが把握している限りでは 65 演題を超えている。また、論文としてまとめられたものは、国内誌で 17 編と MtCK 活性値を利用した論文 1 編<sup>33)</sup> の計 18 編と欧文誌は 3 編<sup>16, 18, 34)</sup> と MtCK 活性値を利用した論文 2 編<sup>35, 36)</sup> の計 5 編が報告されている。

ここで、新規法試薬と従来法試薬の相違点と新規法試薬の特色をまとめてみた。

- 1) 健常成人を対象とした CK-MB 活性の基準範囲は 0 ~ 6 U/L であった<sup>16~18, 25)</sup>。従って、従来法試薬を用いて測定した CK-MB 活性の約 80 % は偽 CK-MB 活性であり、その実体は MtCK (約 90 % は uMtCK) であることが明らかとなった<sup>17, 18)</sup>。
- 2) AMI 患者を対象とした CK-MB 活性のカットオフ値は、3 施設からの報告<sup>18, 26, 29)</sup> を統合した結果として 12 U/L、CK-MB/CK 活性値比は 0.03 ~ 0.20<sup>18, 26)</sup> を推奨する。
- 3) AMI 発症から 24 時間以内の患者を対象とした ROC 解析から求めた新規法の AUC 値は従来法よりも大きく、95 % CI 値に有意差を認めしたが、蛋白定量法とは 95 % CI 値に有意差を認めなかった。従って、新規法の臨床的有用性は従来法よりも高く、蛋白定量法とほぼ同等であることが確認された。
- 4) CK-MB/CK 活性値比の活用法については、初回採血から 24 時間以内に次回採血が行われた症

例において、CK-MB/CK 活性値比の変化率をみることで CK-BB と Macro CK type 1 の判定が可能であった。しかし、24 時間以内に複数回採血した症例という条件を満たす必要があることから、適応範囲が狭いという課題が残された。

- 5) CK-BB は易熱性、Macro CK type 1 は耐熱性を示す性質を利用して両者を判別する熱処理条件について検討を行い、45 °C、5 分が最適との結論を得た。また、CK-MB/CK 活性値比が 0.20 を超えた CK-MB 活性偽高値検体を用いて 45 °C、5 分の熱処理を行ない、CK-MB 活性の残存比を求めたところ、CK-BB と Macro CK type 1 を判別できることが実証された。従って、CK-MB 活性偽高値の原因を短時間で臨床医に報告できることから、検査部からの診療支援として貢献できると考えられた。

## おわりに

従来の免疫阻害法による CK-MB 活性測定は、抗 CK-M 活性阻害抗体を用いて残存する CK-B 活性を 2 倍した値を CK-MB 活性値としていた。しかし、健常者の血中に MtCK が CK-MB と同等以上に存在することが判明した今日では、MtCK 活性を阻害できる新規 CK-MB 活性測定が免疫阻害法のゴールドスタンダードとして認知されつつある。本稿では新規 CK-MB 活性測定試薬の基本性能と臨床評価に加え、有効的な活用法について紹介した。

最後に本試薬を現在使用している施設、今後採用される施設の検査担当者の方をお願いしたい。CK-MB 活性がカットオフ値の 12 U/L を超え、かつ CK-MB/CK 活性値比が 0.20 を超えた検体については、45 °C、5 分の熱処理試料を用いて CK-MB 活性の再測定を行い、CK-MB 活性の残存比を求めることを推奨したい。そして、この結果を基に CK-MB 活性偽高値の原因が CK-BB か Macro CK type 1 であるかを判別し、臨床医に迅速かつ正確な情報を提供していただきたい。

## 参考文献

- 1) Hass RC, Strauss AW. Separate nuclear genes encode sarcomere-specific and ubiquitous human mitochondrial creatine kinase isoenzyme. *J Biol Chem.* 1990 ; 265 : 6921-6927
- 2) Schlegel J et al. Native mitochondrial creatine kinase forms octameric structures. I . Isolation of two interconvertible mitochondrial creatine kinase forms, dimeric and octameric mitochondrial creatine kinase : characterization, localization, and structure-function relationships. *J Biol Chem.* 1988 ; 263 : 16942-16953
- 3) Schnyder T et al. Native mitochondrial creatine kinase forms cotameric structures. II . Characterization of dimers and octamers by ultracentrifugation, direct mass measurements by scanning transmission electron microscopy, and image analysis of signal mitochondrial creatine kinase octamers. *J Biol Chem.* 1988 ; 263 : 16954-16962
- 4) Yasmin WG, Hanson NQ. Electrophoresis on cellulose acetate and chromatography on DEAE-Sepadex A-50 compared in the estimation of creatine kinase isoenzymes. *Clin Chem.* 1975 ; 21 : 381-386
- 5) Neumeier D et al. Determination of creatine kinase isoenzyme MB activity in serum using immunological inhibition of creatine kinase M subunit activity. *Clin Chem.* 1976 ; 73 : 445-451
- 6) Piran U et al. Immunochemiluminometric assay of creatine kinase MB with a monoclonal antibody to the MB isoenzyme. *Clin Chem.* 1987 ; 33 : 1517-1520
- 7) Lederer WH, Gerstbrein HL. Creatine kinase isoenzyme BB activity in serum of a patient with gastric cancer. *Clin Chem.* 1976 ; 22 : 1748-1749
- 8) Pudek MR, Jacobson BE. Falsely negative laboratory diagnosis for myocardial infarction owing to the concurrent presence of macro creatine kinase and macro lactate dehydrogenase. *Clin Chem.* 1982 ; 28 : 2434-2437
- 9) Lee KN et al. Relevance of macro creatine kinase type 1 and type 2 isoenzymes to laboratory and clinical data. *Clin Chem.* 1994 ; 40 : 1278-1283
- 10) 五味邦英, 高木康, 澤龍一. クレアチンキナーゼ (CK). *臨床検査.* 1988 ; 31 : 69-78
- 11) Kanemitsu F et al. Mitochondrial creatine kinase as a tumor-associated marker. *Clin Chim Acta.* 1984 ; 138 : 175-183
- 12) 鈴木利之 他. 悪性腫瘍に関連した creatine kinase の臨床病理学的検索 - 特に消化器癌について -. *日消誌.* 1986 ; 83 : 829-837
- 13) 星野忠 他. 乳幼児口タウウイルス下痢症と血中ミトコンドリア CK に関する検討. *臨床病理.* 2001 ; 49 : 597-602
- 14) 豊田陽子 他. 健康成人新鮮血清中に見いだされたミトコンドリア CK の検索. *生物物理化学.* 1998 ; 42 : 175-179
- 15) 星野忠 他. 外来患児を対象とした CK アイソザイム分画値の年齢に依存した変動について. *生物物理化学.* 1999 ; 43 : 39-42
- 16) Hoshino T et al. Development and performance of an enzyme immunoassay to detect creatine kinase isoenzyme MB activity using anti-mitochondrial creatine kinase monoclonal antibodies. *Scand J Clin Lab Invest.* 2009 ; 69 : 687-695
- 17) 星野忠 他. 抗ミトコンドリア CK 活性阻害抗体を用いた新規 CK-MB 活性測定法の臨床評価. *臨床化学.* 2009 ; 38 : 299-307
- 18) Hoshino T et al. Clinical evaluation of a new creatine kinase MB activity reagent abrogating the effect of mitochondrial creatine kinase. *Clin Lab.* 2013 ; 59 : 307-316
- 19) Schlattner U et al. Divergent enzyme kinetics and structure properties of two human mitochondrial creatine kinase isoenzymes. *J Biol Chem.* 2000 ; 381 : 1063-1070
- 20) 増淵純一 他. ミトコンドリア由来 CK を阻害する CK-MB 測定 2 試薬の評価. *日本臨床検査自動化学会誌.* 2011 ; 36 : 348-355
- 21) 戸松宏明 他. ミトコンドリアクレアチンキナーゼ活性の影響を排除した新規試薬「アキュラスオート CK-MB MtO」の検討. *日本臨床検査自動化学会誌.* 2011 ; 36 : 356-361
- 22) 岩井理恵 他. 免疫阻害法によるミトコンドリア CK の影響を回避した新規 CK-MB 活性測定試薬「アキュラスオート CK-MB MtO」の基礎的検討. *医学検査.* 2011 ; 60 : 1050-1054
- 23) 菅野和久 他. 抗ミトコンドリア CK 活性阻害抗体を用いた CK-MB 活性測定法の検討. *機器・試薬.* 2010 ; 33 : 775-779
- 24) 齊藤知央 他. 新規 CK-MB 活性測定試薬「エルシステム・CK-MB MtO」の臨床検体を用いた基礎的検討.

- 臨床病理 . 2011 ; 59 : 236-242
- 25) 町田哲男 他 . 「アキュラスオート CK-MB MtO」の性能評価および参考基準範囲の検討 . 機器・試薬 . 2009 ; 32 : 253-256
- 26) 村上麻里子 他 . 抗ヒト MtCK 活性阻害抗体を添加した新規 CK-MB 活性測定試薬における急性心筋梗塞のカットオフ値の設定 . 臨床病理 . 2011 ; 59 : 649-655
- 27) Youden WJ. Index for rating diagnostic testes. *Cancer*. 1950 ; 3 : 32-35
- 28) 眞重文子 . ROC 曲線の作成と最適なカットオフ値の求め方 . 生物試料分析 . 2005 ; 28 : 133-139
- 29) 柳川香 , 竹浦久司 . クレアチンキナーゼアイソザイム測定試薬「エルシステム・CK-MB」の基礎的検討と心疾患を対象とした CK-MB 活性のカットオフ値 . 医学と薬学 . 2011 ; 65 : 417-424
- 30) Stein W. マクロクレアチンキナーゼを含んだサンプル中クレアチンキナーゼの測定 , CK-MB method and Clinical significance, proceedings of the CK-MB symposium. 東京 : 関東化学 ; 1982. 64-71
- 31) 武居宣尚 他 . シグナスオート CK-MB MtO 試薬における CK-MB/CK 活性値比と CK アイソザイム分析 . 日本臨床検査自動化学会誌 . 2012 ; 37 : 535
- 32) Bohner J et al. Stability of macro creatine kinases and creatine kinase isoenzymes compared : Heat inactivation test for determination of thermostable creatine kinase. *J Clin Chem Clin Biochem*. 1981 ; 19 : 1021-1026
- 33) 藤田京志 他 . 新規 CK-MB 活性測定試薬と従来試薬からみたミトコンドリア CK 活性値に関する検討 - 悪性腫瘍患者における含有率と心筋梗塞および胸部外科手術時の変動 -. 医学検査 . 2011 ; 60 : 875-880
- 34) Maekawa M et al. Effect of the inhibition of mitochondrial creatine kinase activity on the clinical diagnosis of suspected acute myocardial infection. *The Open Clin Chem*. 2012 ; 5 : 1-6
- 35) Watanabe D et al. Increase in serum mitochondrial creatine kinase levels induced by tenfovir administration. *J Infect Chemother*. 2012 ; 18 : 675-682
- 36) Soroida Y et al. Increased activity of serum mitochondrial isoenzyme of creatine kinase in hepatocellular carcinoma patients predominantly with recurrence. *J Hepatol*. 2012 ; 57 : 330-336

## Basic Performance and Clinical Utility of a New Creatine Kinase MB Activity Measurement Reagent Using Anti-Mitochondrial Creatine Kinase Inhibiting Antibodies

Tadashi HOSHINO

Division of Laboratory Medicine, Department of Pathology and Microbiology,  
Nihon University School of Medicine, 30-1 Oyaguchi-Kamimachi, Itabashi-ku, Tokyo 173-8610

### Key Words

Creatine Kinase MB, Mitochondrial Creatine Kinase, Immunoinhibition Method, Acute Myocardial Infection, Receiver-operating Characteristic Analysis, Cut-off Value, CK-MB Activity/CK Activity Ratio