

クレアチンキナーゼ測定試薬「エルシステム・CK」 および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」の基本性能

宮本 郁弓, 角田 浩一, 萩野 浩史, 新井 信夫, 船越 國宏

シスメックス株式会社 学術本部：神戸市西区室谷 1-3-2 (〒 651-2241)

SUMMARY

クレアチンキナーゼ (CK) は、心疾患や筋疾患の診断指標として広く臨床の場で利用され、特に、CK アイソザイムの一つである CK-MB は、心筋マーカーとして急性心筋梗塞などの心疾患の診断に用いられている。今回、溶血の影響を低減させたエルシステム・CK とミトコンドリア CK (MtCK) の干渉を排除したエルシステム・CK-MB を開発したのでこれらの試薬の基本性能について報告する。

エルシステム・CK については、同時再現性、直線性および当社従来品 (CPK 試薬・LB「コクサイ」) との相関は良好であった。また、干渉物質の影響については、干渉チェック・A プラスを用いて確認したところ、溶血ヘモグロビン濃度 500mg/dL まで影響を受けなかった。

エルシステム・CK-MB は、エルシステム・CK と同様に同時再現性、直線性は良好であり、干渉物質の影響についても溶血ヘモグロビン濃度 500mg/dL まで影響を受けなかった。また、本試薬には新規に自社開発した抗ヒト MtCK 抗体が添加されており、その阻害率はサルコメリック MtCK に対して 98.3%、ユビキタス MtCK に対して 96.3% であった。患者検体を用いた当社従来品 (CK-MB 試薬・L「コクサイ」) との相関は、 $r = 0.900$, $y = 0.799x - 8.1$ と乖離する検体が散見された。しかし、電気泳動法との相関では、 $r = 0.971$, $y = 0.909x + 5.1$ と乖離する検体が減少したことから、当社従来品との乖離は、本試薬に添加された抗ヒト MtCK 抗体が検体中の MtCK 活性を阻害した結果と考えられた。さらに、心疾患症例を対象とした ROC 解析を実施し、当社従来品およびエルシステム・CK-MB の曲線下面積 (AUC) を算出したところ、当社従来品では 0.802 であったが、エルシステム・CK-MB では 0.906 と、AUC の増加を認めた。また、本試薬を用いた CK-MB 活性の参考基準範囲は、0.6 ~ 5.7U/L と当社従来品よりも低値であった。

以上の結果から、エルシステム・CK は、検体ブランクを差し引いたレート法を採用することで溶血ヘモグロビン濃度 500mg/dL まで影響が見られず、その他は当社従来品と同様の基本性能を有することが示された。一方、エルシステム・CK-MB は、抗ヒト MtCK 抗体を添加することで従来の免疫阻害法に比べ、より特異的に CK-MB 活性を測定することが可能となり、ROC 解析結果から心疾患の診断に対する有用性が高いことが示された。

Key Words

CK, CK-MB, ミトコンドリア CK (MtCK), 抗ヒトミトコンドリア CK 抗体 (抗ヒト MtCK 抗体), 免疫阻害法

はじめに

クレアチンキナーゼ (CK) は、生体内においてクレアチンのリン酸化を触媒しており、この反応で得られたクレアチンリン酸は筋収縮のエネルギー源である。CK は、M と B の二種類のサブユニットから構成され、2 量体を形成し、CK-BB、CK-MB、CK-MM の 3 種類のアイソザイムが存在する。CK-BB は脳、CK-MB は心筋、CK-MM は骨格筋に主に含まれていることが知られている。総 CK 活性は心疾患や筋疾患の診断指標として、さらに CK-MB 活性は急性心筋梗塞をはじめとする心疾患の診断指標、いわゆる心筋マーカーの一つとして用いられている。

この他に、ミトコンドリア由来のミトコンドリア CK (MtCK) がもう一つのアイソザイムとして存在することが知られている¹⁾。MtCK は、ミトコンドリア内膜の外側に存在し、サルコメリック MtCK (sMtCK) とユビキタス MtCK (uMtCK) の二つのタイプがあり^{2,3)}、sMtCK は心筋や骨格筋、uMtCK は平滑筋に存在すると報告されている^{4,5)}。

CK-MB 活性測定については、抗ヒト CK-M 抗体を用いて CK-M 活性を阻害し、残存する CK-B 活性を 2 倍にすることで CK-MB 活性とする免疫阻害法が広く用いられている。しかし、この方法では、測定結果が臨床症状と乖離する検体がしばしばみられた^{6,7)}。その原因の一つとして、上述の MtCK の存在が挙げられている。MtCK 活性は抗ヒト CK-M 抗体では阻害できないため、CK-MB 活性値として上乗せされるためである^{6,8)}。

今回、JSCC 勧告法⁹⁾ に用いられている賦活化剤である NAC (N-アセチルシステイン) を用いた CK および CK-MB の酵素活性測定用試薬を開発し、測定系に検体ブランクを差し引いたレート法を採用した。

また、エルシステム・CK-MB は、従来から用いられてきた抗 CK-M 抗体に加え、自社開発した MtCK 活性を阻害する抗ヒト MtCK 抗体を添加しており、MtCK 活性を測り込むことのない CK-MB 測定試薬である。

本稿では、エルシステム・CK およびエルシステム・CK-MB の基本性能を報告する。さらに、エルシステ

ム・CK-MB については、心疾患に対する ROC 解析と参考基準範囲の算出をしたので合わせて報告する。

測定原理

1. エルシステム・CK

CK はクレアチンリン酸のリン酸基がアデノシン-5'-二リン酸 (ADP) へ転移し、アデノシン-5'-三リン酸 (ATP) とクレアチンを形成する反応を触媒する。この反応にグルコースおよび β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリリン酸酸化型 (NADP⁺) 存在下で、ヘキソキナーゼ (HK) およびグルコース-6-リン酸脱水素酵素 (G-6-PDH) を共役させ、生じた β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリリン酸還元型 (NADPH) の増加速度を波長 330 ~ 350nm で測定することにより、CK 活性値を求める (図 1)。

2. エルシステム・CK-MB

抗ヒト CK-M 抗体を用いて、CK-MM、CK-MB の CK-M サブユニット活性を阻害すると共に、抗ヒト MtCK 抗体により MtCK 活性を阻害する (図 2)。残存する CK-B サブユニット活性は CK 活性と同様の原理で測定される (図 1)。この時、CK-BB は通常血清中にはほとんど存在しないと仮定し、残存している CK-B サブユニット活性は CK-MB 由来のものと考え、CK-B サブユニット活性を 2 倍にすることで CK-MB 活性値を算出する。

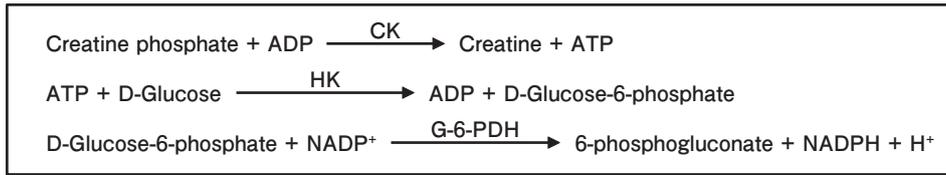


図 1. エルシステム・CK 測定原理

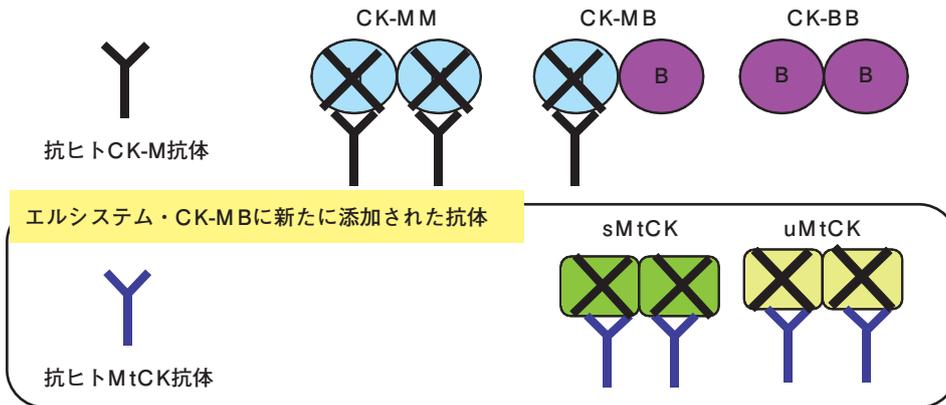


図 2. CK-MB 測定原理 (抗ヒト CK-M 抗体および抗ヒト MtCK 抗体による阻害イメージ図)

材料および方法

1. 試薬および標準液

- 1) エルシステム・CK
- 2) エルシステム・CK-MB
- 3) CPK 試薬・LB「コクサイ」
- 4) CK-MB 試薬・L「コクサイ」
- 5) 酵素キャリブレータープラス
- 6) キャリブザイム・CK (MB)

2. 抗ヒト MtCK 抗体の作製

エルシステム・CK-MB に用いた抗ヒト MtCK 抗体は、リコンビナント MtCK を免疫原としてマウスハイブリドーマ法により作製した。本抗体は、sMtCK および uMtCK 活性を特異的に阻害することを確認した。

3. 使用機器

日立 7170S 型自動分析装置

4. 測定条件

評価に用いた測定条件を表 1 に記した。

また、検体ブランクを差し引いたレート法を用いて活性値を算出した(図 3)。

結果

1. 同時再現性

- 1) エルシステム・CK

活性値の異なる 4 種のコントロール血清 (酵素コントロールプラス 1・2, QAP トロール 1X・2X) を用いて 20 回連続測定を行い、同時再現性を確認した。変動係数 (CV%) はいずれのコントロール血清においても 0.6% 以下であった (表 2)。

- 2) エルシステム・CK-MB

ヒト由来の CK-MB を含む、CK アイソザイム・コントロール, Qualitrol CK-MB (関東化学株式会社) を用いて 20 回連続測定を行い、同時再現性を確認した。CV% は、CK アイソザイム・コントロールで 1.1%, Qualitrol CK-MB で 0.3% であった (表 3)。

表 1. 測定条件

	エルシステム・CK	エルシステム・CK-MB
分析方法	レート法	レート法
主波長/副波長 (nm)	340/700	340/700
検体 (μL)	5	12
第1試薬 (μL)	180	168
第2試薬 (μL)	45	42

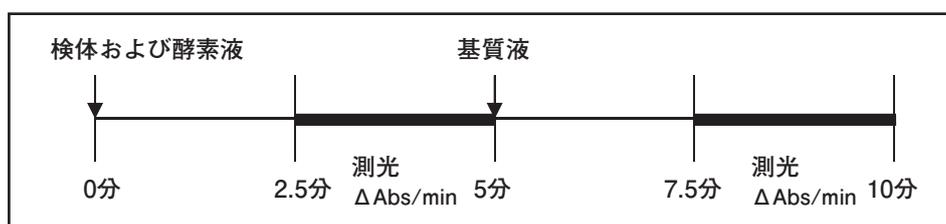


図 3. 検体ブランクを差し引いたレート法による活性値の算出

表 2. エルシステム・CK 同時再現性

	酵素コントロール プラス1	酵素コントロール プラス2	QAPトロール・1X	QAPトロール・2X
Average	179	601	150	367
SD	0.79	1.83	0.84	1.39
CV%	0.4	0.3	0.6	0.4

表 3. エルシステム・CK-MB 同時再現性

	CKアイソザイム・ コントロール	Qualitrol CK-MB
Average	50.8	282.7
SD	0.57	0.92
CV%	1.1	0.3

2. 高値直線性

1) エルシステム・CK

ハイレベルチェック・Eを段階希釈したものを試料として、高値直線性を確認した。その結果、原点から2800U/Lまでの直線性が得られた(図4)。

2) エルシステム・CK-MB

ヒトCK-MB高値試料を段階希釈したものを試料として、高値直線性を確認した。その結果、原点から2900U/Lまでの直線性が得られた(図5)。

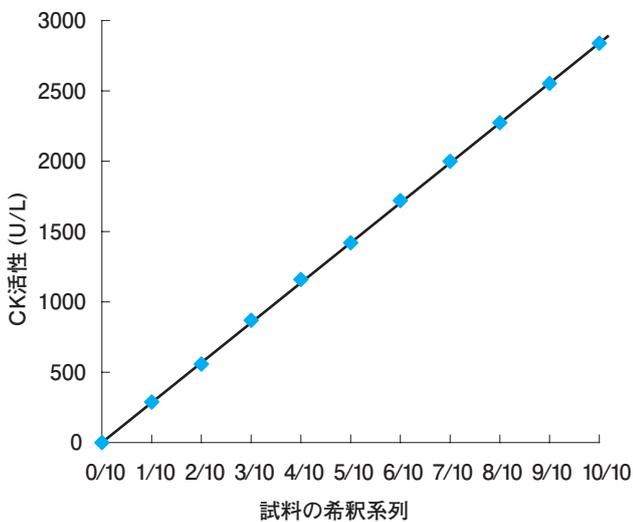


図4. エルシステム・CK 高値直線性

3. 低値直線性

1) エルシステム・CK

QAP トロール 1X を段階希釈したものを試料として、低値直線性を確認した。その結果、149U/L以下でも原点を通る直線性が得られた(図6)。

2) エルシステム・CK-MB

CKアイソザイムコントロールを段階希釈したものを試料として、低値直線性を確認した。その結果、52U/Lまでの原点を通る直線性が得られた(図7)。

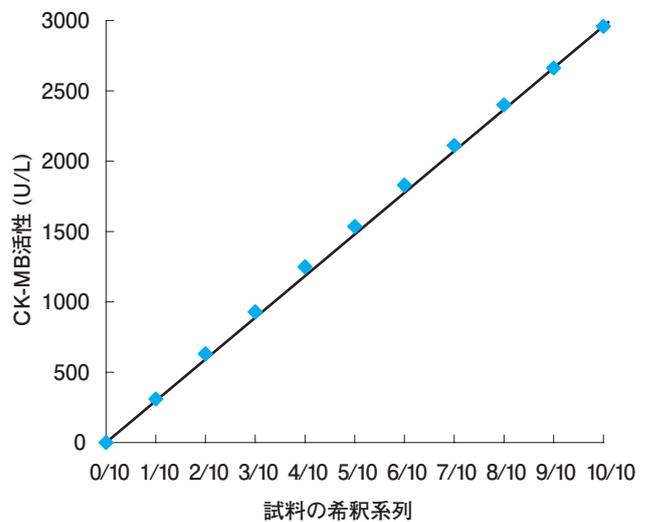


図5. エルシステム・CK-MB 高値直線性

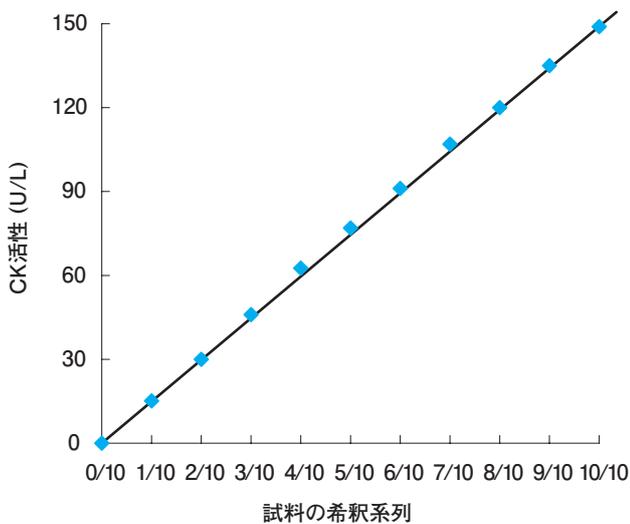


図6. エルシステム・CK 低値直線性

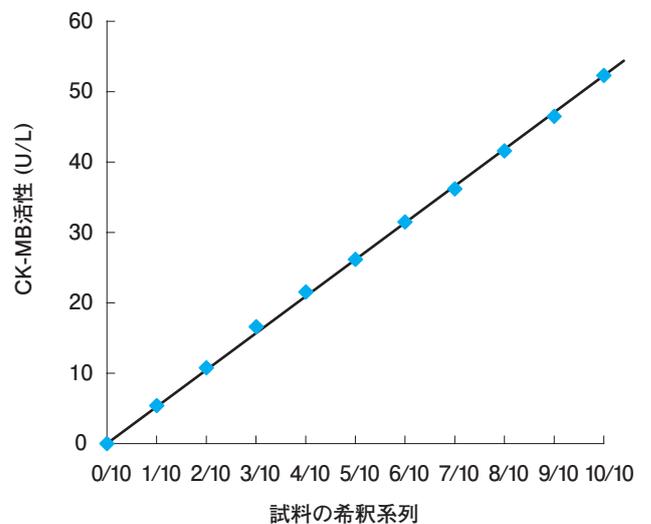


図7. エルシステム・CK-MB 低値直線性

4. 干渉物質の影響

ヒトプール血清に干渉チェック・Aプラス（遊離型ビリルビン，抱合型ビリルビン，溶血ヘモグロビン，乳び）およびアスコルビン酸を添加し，各種濃度試料を調製して干渉物質の影響を確認した。

1) エルシステム・CK

遊離型ビリルビン，抱合型ビリルビンは30mg/dLまで，乳びは2000ホルマジン濁度まで，アスコルビン酸は100mg/dLまで活性値に影響を認めなかった。溶血ヘモグロビンについては，当社従来品（CPK 試薬・LB「コクサイ」）では影響が見られていたが，本試薬では，500mg/dLまで影響が認められなかった（**図8**）。

2) エルシステム・CK-MB

遊離型ビリルビン，抱合型ビリルビンは30mg/dLまで，乳びは2000ホルマジン濁度まで，アスコルビン酸は100mg/dLまで活性値に影響を認めなかった。溶血ヘモグロビンについては，当社従来品（CK-MB 試薬・L「コクサイ」）では影響が見られていたが，本試薬では，500mg/dLまで影響が認められなかった（**図9**）。

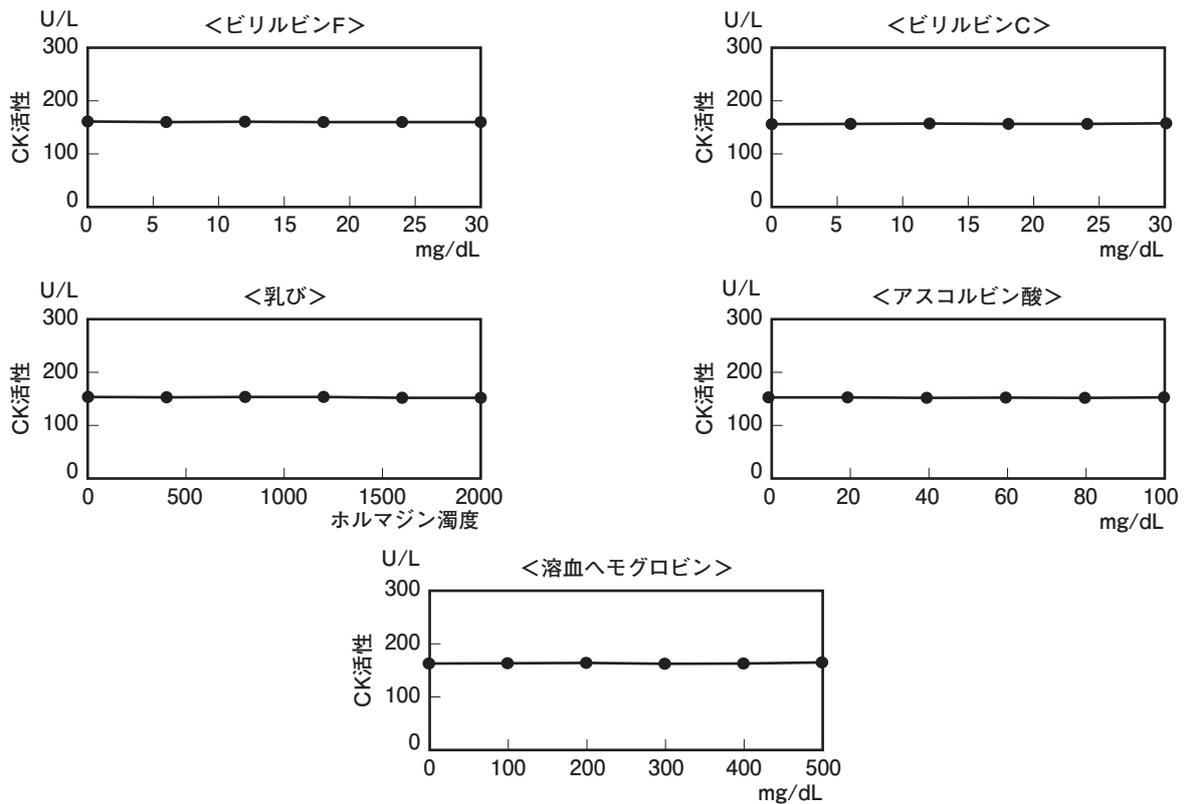


図8. エルシステム・CK 干渉物質の影響

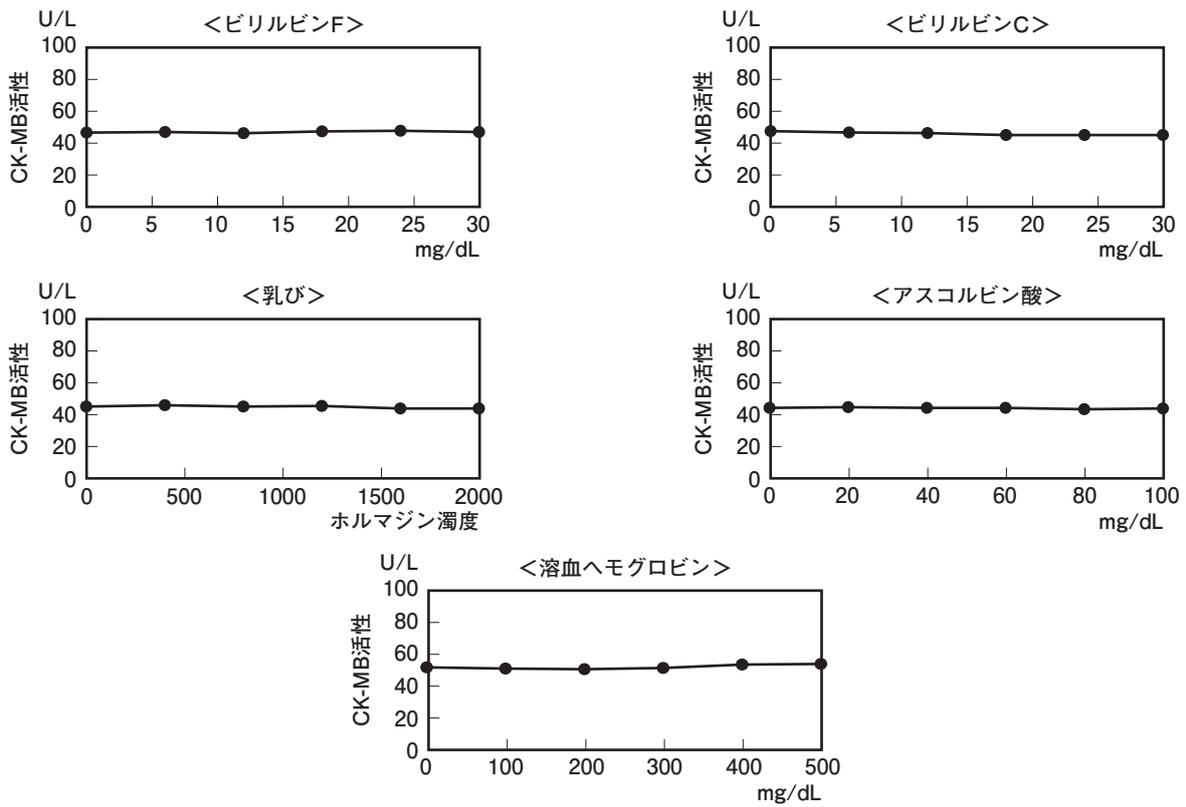


図9. エルシステム・CK-MB 干渉物質の影響

5. CK-MM および MtCK 阻害試験

活性値が既知のヒト由来またはリコンビナント試料を用い、CK-MM と MtCK の阻害率を確認した。

また、各阻害試験は、以下の通りに実施した。

1) CK-MM 阻害試験

ヒト CK-MM 高値試料をエルシステム・CK-MB およびエルシステム・CK にて測定し、(1)式により阻害率を求めた。

エルシステム・CK-MB における CK-MM の阻害率は、99.9%を示した(表4)。

2) MtCK 阻害試験

リコンビナント sMtCK および uMtCK 試料を希釈液にて 500U/L 以上に調整し、エルシステム・CK-MB およびエルシステム・CK にて測定し、(1)式により阻害率を求めた。

エルシステム・CK-MB における sMtCK の阻害率は 98.3%、uMtCK の阻害率は 96.3%であった(表4)。

表4. CK-MM および MtCK 阻害率

	エルシステム・CK測定値 (U/L)	エルシステム・CK-MB測定値 (U/L)	阻害率 (%)
CK-MM	3338	8.9	99.9
sMtCK	599	20.9	98.3
uMtCK	522	38.6	96.3

$$\text{阻害率} \% = 100 - \frac{\text{エルシステム・CK-MB 測定値 (U/L)}}{\text{エルシステム・CK 測定値 (U/L)} \times 2} \times 100 \dots (1)$$

6. 相関性

1) エルシステム・CK

患者検体 56 検体を用いて、当社従来品（CPK 試薬・LB「コクサイ」）との相関性を検討した。当社従来品との相関は、 $r = 0.999$, $y = 1.017x - 2.9$ と良好な相関が得られた（**図 10**）。

2) エルシステム・CK-MB

患者 85 名の検体を用いて、当社従来品（CK-MB 試薬・L「コクサイ」）との相関性を検討した¹⁰⁾。

当社従来品との相関は、 $r = 0.900$, $y = 0.799x - 8.1$ となり、一部の検体で乖離が見られた（**図 11**）。この乖離はいずれも当社従来品が高値であった。

一方、セルロースアセテート膜を用いた電気泳動法で得られた CK-MB 分画%に総 CK 活性値を乗じて CK-MB 活性値を求めた結果との相関性を検討したところ、 $r = 0.971$, $y = 0.909x + 5.1$ となり大きな乖離は認められなかった（**図 12**）。また、**表 5** に一部の乖離検体の測定結果をまとめた。

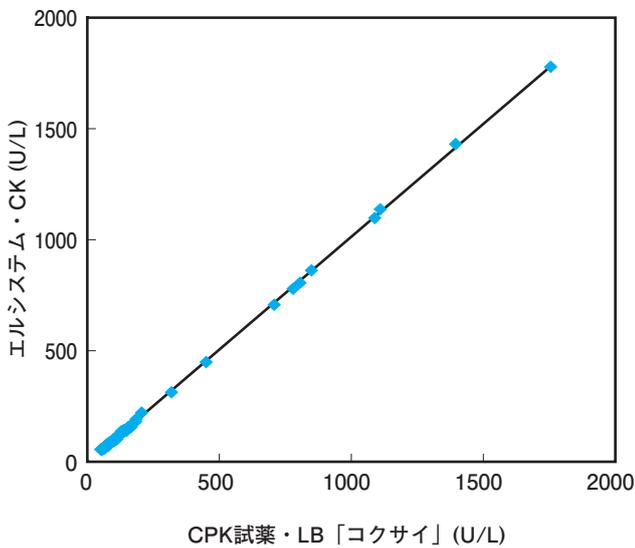


図 10. 当社従来品とエルシステム・CK との相関

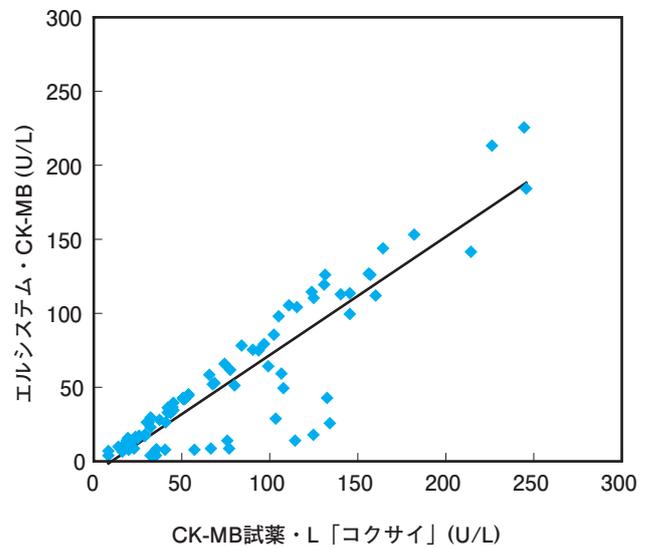


図 11. 当社従来品とエルシステム・CK-MB との相関

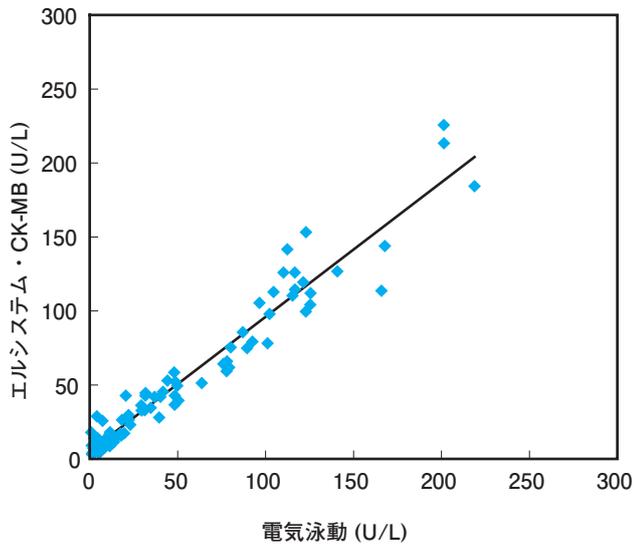


図 12. 電気泳動法とエルシステム・CK-MB との相関

表 5. 乖離検体の測定結果

単位：U/L

CK-MB試薬・L「コクサイ」	エルシステム・CK-MB	電気泳動
40.5	7.8	4.6
57.2	7.8	4.4
66.5	8.6	3.6
76.9	8.6	2.3
107.7	49.4	49.8
114.4	14.0	2.4

7. 心疾患におけるエルシステム・CK-MB の診断精度の評価

健常者 62 名と心疾患患者 51 名の検体を用いて、当社従来品 (CK-MB 試薬・L「コクサイ」) およびエルシステム・CK-MB で求めた活性値から ROC 曲線を作成し、エルシステム・CK-MB の心疾患に対する診断精度の評価を行った¹⁰⁾ (図 13)。ROC 曲線から曲線下面積 (Area Under the Curve : AUC) を算出したところ、当社従来品では 0.802, エルシステム・CK-MB では 0.906 となった。

8. エルシステム・CK-MB における CK-MB 活性値の参考基準範囲

健診者 248 名の検体を当社従来品 (CK-MB 試薬・L「コクサイ」) およびエルシステム・CK-MB で測定し、MCP-STAT (シスメックス社) のパラメトリック法 (最小歪度法) にて参考基準範囲を算出した¹⁰⁾。その結果、当社従来品の参考基準範囲は 8.0 ~ 19.7 U/L となったが、エルシステム・CK-MB では 0.6 ~ 5.7 U/L (図 14) であった。

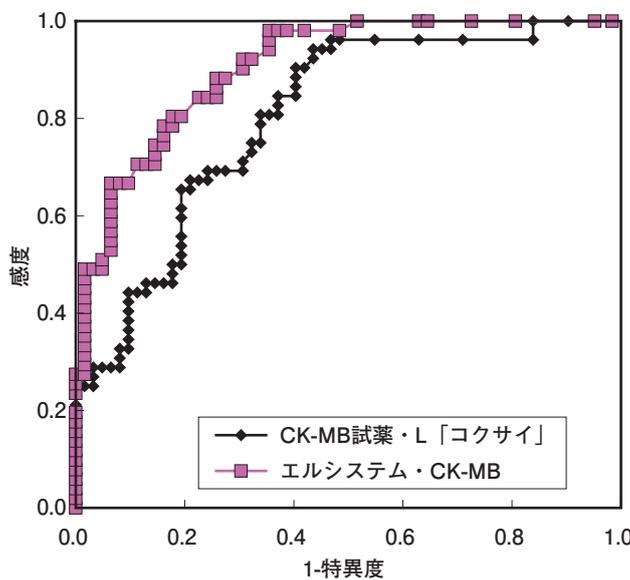


図 13. 当社従来品とエルシステム・CK-MB における ROC 曲線

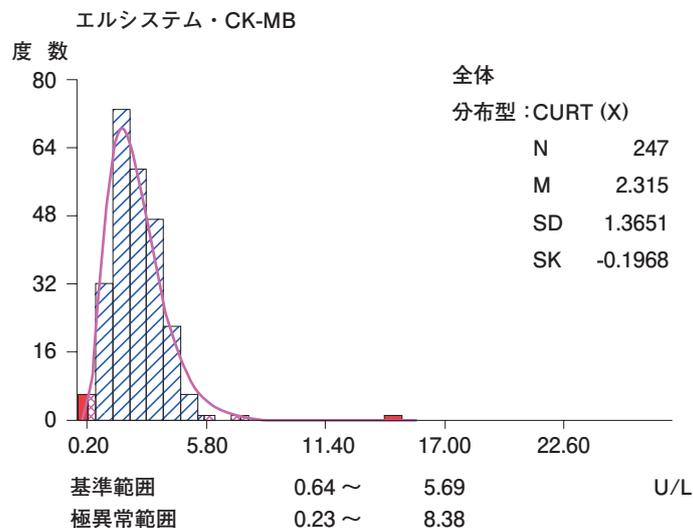


図 14. 参考基準範囲算出結果 (MCP-STAT 使用。)

考 察

エルシステム・CKおよびエルシステム・CK-MBは、同時再現性、直線性、干渉物質の影響ともに良好な結果を示した。特に溶血ヘモグロビンの影響については、検体ブランクを差し引いたレート法を採用することで、当社従来品（CPK 試薬・LB「コクサイ」およびCK-MB 試薬・L「コクサイ」）よりもその影響を低減することができた。

エルシステム・CK-MBは、抗ヒトCK-M抗体に加え、新規に開発したミトコンドリア由来のCKを阻害する抗ヒトMtCK抗体を添加しているため、検体中のsMtCKおよびuMtCKの活性も抑えている。阻害試験の結果を見ると、試薬中に添加されている抗ヒトCK-M抗体および抗ヒトMtCK抗体のCK-MM、sMtCKおよびuMtCKに対する阻害率は、それぞれ99.9%、98.3%、96.3%といずれも良好な結果が得られた。

当社従来品（CK-MB 試薬・L「コクサイ」）とエルシステム・CK-MBの相関を見ると、エルシステム・CK-MBは当社従来品と比較すると軒並み低値を示し、一部の検体においては大きな乖離が見られた。しかし、エルシステム・CK-MBは電気泳動法から算出されたCK-MB活性値と良好な相関が見られ、乖離は認められなかった。

また、参考基準範囲を確認すると、エルシステム・CK-MBにおいて0.6～5.7U/Lとなり、当社従来品（CK-MB 試薬・L「コクサイ」）よりも低値であった。健常人では、MtCKが1～7U/L（免疫阻害法では係数2を乗じるため、CK-MB活性値に換算すると2～14U/L）程度含まれている⁷⁾と推測されており、従来の免疫阻害法では本来のCK-MB活性値にMtCK活性値が上乘せされている。エルシステム・CK-MBは、MtCKを特異的に阻害した結果、従来法よりも低値となったものと考えられた。

以上のことから、エルシステム・CK-MBを用いるにあたっては、参考基準範囲の見直しが必要となる。

また、心疾患に対するROC曲線を作成したところ、当社従来品（CK-MB 試薬・L「コクサイ」）のAUCが0.802であったのに対し、エルシステム・CK-MBでは0.906であった。抗ヒトMtCK抗体を添

加することで、特異的にCK-MB活性値を求めることができるようになり、心疾患の診断特異性が向上したと考えられた。

CK-Mに反応する抗体のみを用いる免疫阻害法では、MtCKを阻害できないため、CK-MB活性値が臨床像と一致しないことがあった。しかし、ミトコンドリア由来のCKを阻害する抗ヒトMtCK抗体を添加したエルシステム・CK-MBではこのような現象は大幅に改善され、急性心筋梗塞などの心疾患の診断により有用な検査結果を報告することが可能になると考えられた。

謝 辞

本稿を作成するに当たり、共同研究者としてご協力いただいた星野忠先生（日本大学医学部病態病理学系臨床検査医学分野）をはじめ、シスメックス株式会社診断薬開発本部の方々に深謝いたします。

参考文献

- 1) James GP, Harrison R. Creatine kinase isozyme of mitochondrial origin in human serum. *Clin Chem.* 1979; 25(6):943-947.
- 2) Payne RM, Strauss AW. Expression of the mitochondrial creatine kinase genes. *Mol Cell Biochem.* 1994; 133-134: 235-243.
- 3) Payne RM, Strauss AW. Developmental expression of sarcomeric and ubiquitous. *Mol Cell Biochem.* 1994; 1219(1):33-38.
- 4) Anfous K, et al. Mitochondrial creatine kinase isoform expression does not correlate with its mode of action. *Biochem J.* 1997; 322:73-78.
- 5) Haas RC, Strauss AW. Separate Nuclear Genes Encode Sarcomere-specific and Ubiquitous Human Mitochondrial Creatine Kinase Isoenzymes. *J Biol Chem.* 1990; 265: 6921-6927.
- 6) 星野 忠. ミトコンドリアCKの測定法. *検査と技術.* 2000; 28(13):1499-1504.
- 7) Kanemitsu F, et al. Characterization of two types of mitochondrial creatine kinase isolated from normal human

-
- cardiac muscle and brain tissue. Electrophoresisvol. 2000 ; 21 (2). 266-270.
- 8) 五味邦英, 高木 康. CK 結合性免疫グロブリン. 臨床病理臨時特別号. 1984 ; 60 : 105-118.
- 9) 日本臨床化学会 : ヒト血清中酵素活性測定の勧告法-クレアチンキナーゼ-. 臨床化学. 1990 ; 19 (2) : 184-208.
- 10) 星野 忠, 矢内 充, 熊坂一成. ミトコンドリアCK 活性を阻害した時の健常成人のCK-MB 活性値に関する検討. 臨床病理. 2003 ; 51 (補) : 270.
- 11) 星野 忠. ミトコンドリアCK 活性を阻害したCK-MB 活性測定法の臨床的有用性に関する検討. 臨床病理. 2004 ; 52 (補) : 81.

Basic Performance of "L-System CK", Reagents for Creatine Kinase Measurement and "L-System CK-MB", Reagents for Creatine Kinase Isozyme Measurement

Ikumi Miyamoto, Hirokazu Kakuda, Nobuo Arai, Hirofumi Hagino and Kunihiro Funakoshi

Scientific Affairs, Sysmex Corporation, 1-3-2, Murotani, Nishi-ku, Kobe 651-2241

SUMMARY

Creatine kinase (CK) activity is widely used as a diagnostic parameter of muscle disorder and cardiac disease. CK has two major subunits of M and B, and there are three major isoenzymes: CK-BB (as found in the brain), CK-MM (as found in the skeletal muscle), and CK-MB (in the cardiac muscle). CK-MB is found mainly in myocardial tissue, so this isoenzyme is useful in a diagnosis of myocardial infarction. Recently, we developed new reagents for CK and CK-MB activity measurement avoiding the interference of hemoglobin and mitochondrial CK; L-System CK and L-System CK-MB.

In this paper, we report the basic performance of both new reagents.

L-System CK and L-System CK-MB showed the excellent results in within-run reproducibility and linearity. Moreover, there is no influence of hemoglobin up to 500mg/dL on the measurement results of both reagents. Anti-mitochondria CK antibody which was contained in L-System CK-MB was able to inhibit 98.3% of sarcomeric mitochondrial CK and 96.3% of ubiquitous mitochondrial CK. As for method comparison, the correlation coefficient and regression equation between L-System CK-MB and the conventional reagent, CK-MB reagent · L "kokusai" were 0.900 and $y = 0.799x - 8.08$ respectively and the discrepancy between measurement result of the two reagents was found in some samples. However, on the correlation between L-System CK-MB and electrophoresis assay, a good result was shown ($r = 0.971$, $y = 0.909x + 5.1$). ROC analysis in cardiac disease showed a larger AUC (Area Under the Curve) of L-System CK-MB (0.906) than the conventional reagent (0.802).

From these observations, it was shown that L-System CK and L-System CK-MB have better performance, and L-System CK-MB is able to measure CK-MB activity more specifically than the conventional reagent.

Key Words CK, CK-MB, Mitochondrial CK (MtCK), Anti-human MtCK antibody, Immunological inhibition method
