原 著 急性心筋梗塞におけるラテックス凝集反応による 血清ミオグロビン測定 of 臨床的意義

香川県立中央病院循環器科 安部行弘◇ 武田 光 藤井章伸

香川県立中央病院臨床検査部 桑島 実

岡山大学医学部第一内科 斎藤大治

岡山大学医学部臨床検査医学教室 原岡昭一

概要 急性心筋梗塞におけるラテックス凝集反応を用いた血清ミオグロビン測定の有用性を検討した。発症から12時間以内の急性心筋梗塞21例では、発症1, 2, 3時間の時点でミオグロビン凝集陽性を示したのは、それぞれ40, 70, 100%に対して、病的CK値の出現率は0, 11, 69%だった。またミオグロビン凝集は平均8時間で最大となり、2日で正常に復した。発症から24時間以内に入院した胸痛患者52例において、急性心筋梗塞に対する本法の感度は0.97、特異性は0.91と良好だった。ミオグロビンの凝集時間はRIA法の値と指数関数的に有意な逆相関がみられ、本法は半定量的にも使用しうると考えられた。以上より、本法は急性心筋梗塞早期の診断に極めて有用であった。
〔日内会誌 77: 15~21, 1988〕

緒 言

近年CCUの普及などに伴い急性心筋梗塞の死亡率は減少の傾向にあるが、本症の早期診断は、CCUへの搬送などの判断を含めて一般臨床医にとって極めて重要な問題である。心筋梗塞の早期の診断は主として臨床経過、心電図、心筋逸脱酵素によってなされているが、クレアチンキナーゼ(CK)、GOTなどの心筋逸脱酵素は発症ごく早期には、正常範囲内にとどまることも多く、時に診断の容易でない例も存在する。一方急性心筋梗塞では、血清ミオグロビン(Mb)がCK、GOTに先んじて上昇することが知られているが¹⁾²⁾。従来のラジオイムノアッセイ法(RIA法)などによる測定は機器、反応時間の問題から、緊急を要する診断の補助には不適當であった。近年Mbの新しい測定法として、より迅速かつ簡便なラテックス凝集反応(LA法)が開発され、その臨床応用が検討されている³⁾。今回著者らは本法を用い、急性心筋梗

塞早期の診断における有用性を検討したので報告する。

対象および方法

血清Mb(LA法、RIA法)、CK、CK-MB、GOTの測定は以下の方法にて行なった。

Mb(LA法): Rapitex・Myoglobin試薬(ベーリング研究所製)を用いたが、本キットは抗ミオグロビン抗体を吸着させたポリスチレン粒子と、偽陽性反応を起こしやすいリウマチ因子を除くための吸収液、および陽性、陰性対照として、Mb濃度がそれぞれ140ng/ml、50ng/mlの血清から構成されている。採血後3000rpm、5分間遠心血清分離後、以下の手順でMbの測定を行なった。テストプレートに陽性対照、陰性対照および被検血清をそれぞれ50μl置き、被検血清にはさらに吸収液を10μl滴下した。次にミオグロビン・ラテックス試薬をそれぞれ25μl加え、テストプレートを回転させながら5分間観察し、30秒ごとに凝集の有無をみ

〔昭和62年8月19日受稿〕

Clinical significance of serum myoglobin by a latex agglutination method for acute myocardial infarction.

Yukihiro ABE, Kou TAKEDA, Akinobu FUJII and Minoru KUWASHIMA* The Department of Cardiology and Clinical Laboratory*, Kagawa Central Hospital, Kagawa

Daiji SAITO and Shoichi HARAOKA* The First Department of Internal Medicine and *Laboratory Medicine, Okayama University Medical School, Okayama

た。判定は2分未満で凝集したもの4(+), 2分以上3分未満のもの3(+), 3分以上4分未満のもの2(+), 4分以上のものを(+)とし, 5分で凝集のみられなかったものを(-)とした。

Mb (RIA法): Mbキット(第一ラジオアイソトープ社製)を用い, 以下の手順で行なった。リン酸緩衝液0.2mlに希釈した被検血清0.1mlまたは標準溶液0.1mlを加えて混和した後, ^{125}I 標識ミオグロビン溶液, ミオグロビン抗血清各0.1mlを加えて混和し, 37°Cで2時間放置後, 牛ガンマグロブリン・ポリエチレングリコール混液1.0mlを加えて遠心し, B-F分離を行なった。次に上澄液を除去した後, 放射能計数を行ない, 各試料について総放射能との比を求め, 同時に行なった既知濃度ミオグロビンによって作成された標準曲線からその濃度を読みとった。

CK, CK-MB, GOT: CKはデュボンACAIIIを用い, NADPH-UV改良法にて測定した。CK-MBはコバスファラー自動分析機(ロッシュ社製)を用い, 免疫阻害法で測定した。GOTは日立自動分析機736-60にて国際標準法に基づいて行なった。

1) 急性心筋梗塞例における血清Mb (LA法) の検討

対象は発症12時間以内に当院へ入院した急性心筋梗塞患者連続21例(男17例, 女4例)で, 平均年齢は63才(47~88才)であった。19例は貫壁性(前壁11例, 下壁7例, 側壁1例)で, 2例は非貫壁性であった。入院直後より3時間目までは1時間ごと, それ以後は3時間ごとに採血し, 血清Mb (LA法), CK, CK-MB, GOTを測定した。さらにCKがピーク値を過ぎた後は, 12ないし24時間ごとに採血し, 同様の測定を行なった。またそのうち11例連続133検体についてはRIA法による血清Mb値の測定も同時に行なった。なお急性心筋梗塞の発症時間は自覚症状の出現時刻から推定した。患者はいずれも腎機能障害はなく, 血清クレアチニンは正常範囲内であった。また治療についてはCCUにおける通常の方法に従って行ない, 5例に経皮的冠動脈血栓溶解術を施行した。

2) 胸痛患者における血清Mb (LA法) 陽性率の検討

胸痛を主訴とし, 胸痛発症24時間以内に当院CCUに入院した患者連続52例(男39例, 女13例), 平均年齢63才(43~88才)を対象とし, 血清Mb (LA法) 陽性率を各疾患で比較検討した。心筋梗塞の診断はWHOの診断基準に基づいて行なった。なおショック状態で来院し, その後確定診断の得られなかった例については, 今回の対象から除外した。

3) 心臓カテーテル検査および筋肉注射後の血清Mb (LA法) の検討

心臓カテーテル検査(冠状動脈および左室造影を含む)による血清Mbの変化を検討するため, 5例(男2例, 女3例)平均年齢53才(44~58才)を対象として, 検査前, 検査後1時間, 2時間, 4時間, 6時間目の血清Mb (LA法), CK, CK-MB, GOTを測定した。また同様に筋肉注射の影響をみるため, 健康成人5例(男2例, 女3例), 平均年齢64才(43~73才)に鎮痛剤塩酸トラマドール100mgを筋肉注射し, 注射前および注射後1, 2, 4, 6時間目に同様の測定を行なった。

4) 希釈試験

Mb標準液(ベーリング社製, 20.7mg/ml)を用い, 正常プール血清ネスコールX(化血研製)で希釈してMb濃度5000ng/mlのものを作製した。この試料を生食, PBS, 0.2%アルブミン添加生食によりそれぞれ2倍から256倍まで希釈し, LA法による凝集時間を測定した。

統計処理はStudent's t-testによって分析し, $p < 0.05$ を有意とした。結果はmean $\pm$ SEMで示した。

結 果

1) 急性心筋梗塞例における血清Mb (LA法) の検討

① 急性心筋梗塞早期のMb (LA法), CKの異常出現率

発症から1, 2, 3, 4, 6時間目のMb凝集の陽性率は, それぞれ40, 78, 100, 100, 100%に対して, 病的CK値($>132\text{IU/l}$)の出現率はそれぞれ0, 11, 69, 100, 100%であった(図1)。すなわち発症1, 2, 3時間目ではMb凝集の陽性率は病

図1. 急性心筋梗塞早期のミオグロビン凝集および病的CK値の異常患者出現率。斜線棒はミオグロビン、白棒はCKを示す。

図2. ラテックス凝集法による凝集時間とRIA法によるミオグロビン値の比較。凝集時間はRIA法での値と指数関数的に有意な逆相関を示した。図中×で示したものはミオグロビンが13000ng/mlと著しく高値だったもので、ラテックス凝集法では3分30秒で凝集を示した。

的CK値のそれに比し大であった。

② LA法およびRIA法による血清Mb値の比較

RIA法により求めた値の自然対数とLA法での凝集時間との相関をみると、相関係数 $r = -0.76$ ($p < 0.001$)で有意な逆相関を認めた(図2)。また図2中×印で示したものはMbが13000ng/mlと著しく高値だったもので、LA法では3分30秒で凝集を示した。一方LA法で陰性を示したものはMb値が20ng/mlから86ng/mlのもので、平均 38 ± 2 ng/mlであった。(+)の凝集を示したMb値は平均 105 ± 5 ng/mlで、63から190ng/mlに分布してい

図3. RIA法による血清ミオグロビン値とラテックス凝集反応の比較。

た(図3)。

③ 急性心筋梗塞における血清Mbの経時的推移

Mb凝集とCKが発症から最大となるまでの時間、およびそれぞれが正常に復するまでの期間を表1に示した。Mb, CKのピーク時間の平均はそれぞれ 8.1 ± 0.7 時間, 21.1 ± 2.0 時間で、Mb凝集はCKに比し平均 12.9 ± 1.9 時間早くピーク値に達した($p < 0.001$)。またMb, CKが正常に復するのはそれぞれ平均 2.0 ± 0.3 日, 5.7 ± 0.4 日で、Mb凝集はCKに比し平均 3.7 ± 0.3 日早く陰性化した($p < 0.001$)。

次に症例を呈示する。

症例1(図4): 56才, 女性。急性下壁梗塞のため、胸痛発症から2時間て来院した。発症から2, 3時間目の血清CK値は正常範囲内で、4時間目によりやく異常値を示したのに対して、Mb(LA法)は2時間目, 3時間目ともに既にそれぞれ2(+), 3(+)と陽性を示した。来院時の心電図ではII, III, aVFのT波の増高がみられるのみだったが、発症3時間目の心電図では同部位でSTの上昇を認めた。その後MbはCKに比し、早期にピーク値に達し、33時間後には陰性化した。

表1. 急性心筋梗塞におけるミオグロビン凝集, CKのピーク時間および上昇持続時間

	ピーク時間(時)			上昇持続期間(日)		
	Mb	CK	CKとMbの差	Mb	CK	CKとMbの差
症例 1	6	15	9	1.4	6	4.6
2	9	30	21	1.2	8	6.8
3	9	17	8			
4	11	23	12	3	8	5
5	9	15	6	3.5	7.5	4
6	12	27	15	2	5	3
7	4	13	9	1.5	4	2.5
8	8.5	12	3.5	1	6	5
9	7.5	18	10.5	2	4	2
10	6	32	26			
11	4	11	7			
12	7	20	13	1.5	4.5	3
13	6	37	31	5	8	3
14	8	35	27			
15	8.5	8	-0.5			
16	9	19	10	2.5	5.5	3
17	16	29	13	1.5	6	4.5
18	6.5	18	11.5	0.8	4	3.2
19				1	3.5	2.5
平均	8.2±0.7	21.1±2.0	12.9±1.9	2.0±0.3	5.7±0.4	3.7±0.3

21例中18例でピーク時間を確認し得た。ミオグロビン凝集が数検体にわたって最大値を示したものは、その平均時間をピーク値とした。上昇持続期間は発症からミオグロビン, CKがそれぞれ正常化するまでの期間を示す。空欄は死亡、合併症などのために測定出来なかったものを示す。

図4. 急性心筋梗塞における血清ミオグロビンの経時的推移(症例1).

症例2(図5): 53才, 男性。急性前壁中隔梗塞のため, 胸痛発症から2時間で来院した。MbはCKより早期に上昇し, 発症から9時間でピーク値となり, 28時間目には正常化した。この際LA法による凝集の程度はRIA法によるMb値と一致した推移を示した。

2) 胸痛患者における血清Mb (LA法) 陽性率の検討

52症例のうち急性心筋梗塞29例, 狭心症18例, その他5例(うち3例は肺梗塞, 他の2例は心臓神経症)であった。急性心筋梗塞例のうちLA法で陽性を示したのは28例に対し, 狭心症, その他の群ではそれぞれ1例を認めるのみであった(図6)。したがってLA法の急性心筋梗塞例に対する感度は0.97, 特異性0.91, 陽性結果予測値0.93, 陰性結果予測値0.95であった。心筋梗塞でLA法陰性を示した1例は発症から21時間目に入院し, 入院時すでにCK 2524IU/l, GOT 286IU/lと上昇

し、いずれの酵素も既にピーク値を過ぎていた。狭心症で凝集陽性となった 1 例は、胸痛発症から 2 時間で来院した例で、腎機能障害、心不全はみられなかったが、胸痛持続時間は 30 分と比較的長く、心電図でも aVL に陰性 T 波を認めた。本例では CK の上昇はみられなかった。その他の群では陽性を示した 1 例は、肺梗塞でショック状態を呈していた。

3) 心臓カテーテル検査および筋肉注射後の血清 Mb (LA 法) の検討

心臓カテーテル検査後、4 時間目に 1 例、6 時

図 5. 急性心筋梗塞における血清ミオグロビンの経時的推移 (症例 2)。

図 6. 胸痛患者における血清ミオグロビン。急性心筋梗塞例は経過中最大のものを示す。

問目に別の 2 例において (+) の凝集がみられた。他の 2 例では凝集反応は陰性だった。筋肉注射後では、いずれの例でも凝集は認めなかった。CK, CK-MB, GOT は心臓カテーテル検査、筋肉注射のいずれにおいても変化はみられなかった。

4) 希釈試験

希釈倍数の対数値と凝集時間の関係をみると、生食、PBS、0.2% アルブミン加生食のいずれの希釈においても、1/4 希釈 (Mb 値 1250 ng/ml) までは凝集時間はほぼ一定で、それ以上の希釈では、希釈倍数と凝集時間は良好な直線性を示した。

考 案

Mb は主として心筋や骨格筋の筋細胞の細胞質に含まれ、分子量 17800 のヘム蛋白で、細胞膜透過性亢進などにより比較的容易に細胞外に逸脱して血中に流出し、尿中にはそのままの形で排泄される。従来から急性心筋梗塞の際、Mb は CK などの心筋逸脱酵素に先んじて上昇することが知られている¹⁾²⁾。しかし補体結合反応、対向流免疫電気泳動法などの Mb 検出法は感度が低く、RIA 法は高感度ではあるが、機器、反応時間⁴⁾などの問題から急性心筋梗塞のような緊急を要する診断の補助には不適當であった。今回著者らの用いた LA 法は、検査の実施に要する時間は 6 ~ 7 分と短く、その操作も簡便で、特殊な機器、技術は必要としない。Bachem³⁾、Mainard⁵⁾ はそれぞれ本法を用い、急性心筋梗塞早期の診断に有用だったとしているが、本法の定量的有用性や多数の心筋梗塞例での経時的推移を詳細に検討したものはみられない。

図 7. 希釈試験。生食、PBS、0.2% アルブミン加生食のいずれの希釈においても、1/4 希釈 (白丸) までは凝集時間はほぼ一定だったのに対して、それ以上の希釈 (黒丸) では、希釈倍数と凝集時間は良好な直線性を示した。

LA法は抗原抗体反応に基づき、本来定性反応であるが、凝集に要する時間とRIA法で得られたMb値には、指数関数的に有意な逆相関を認めた、このことから本法はある程度の定量的評価も可能と考えられた。一方血清Mb値が13000ng/mlと極めて高値を示した例では凝集2(+)を示したが、これは抗原過剰による地帯現象と考えられた。さらに希釈試験においても、高濃度のMb領域では凝集時間はほぼ一定であり、著しい高値例では本法の定量性に一定の限界が存在するものと思われた。また本法の感度については、今回の検討では凝集陰性を示した血清Mbの最高値は86ng/mlに対し、凝集陽性の最低値は63ng/mlだった。今回用いたRIA法の正常値上限が50ng/mlであることからほぼ満足できる感度と考えられた。Hansenら⁶⁾も本法は140ng/ml以上のものはすべて陽性、80ng/ml以下のものはすべて陰性だったと報告している。

今回の検討では、急性心筋梗塞発症1, 2, 3時間目のMb凝集の陽性率はそれぞれ40, 78, 100%に対して、病的CK値の出現率はそれぞれ0, 11, 69%で、いずれの時間においても前者の検出率が大きかった。McCombら⁷⁾もRIA法により血清Mbを測定し、急性心筋梗塞で発症から1, 2, 4時間目に85ng/ml以上を示したのはそれぞれ25, 50, 89%であったとし、同時に測定した病的CK値の出現率よりも高率に異常を認めたとしている。すなわち急性心筋梗塞早期の診断に際して、血清Mb測定はCKに比してより有用性が高く、迅速かつ簡便に行なえるLA法の臨床的意義は高いと考えられた。

急性心筋梗塞における経時的推移をみるとMb凝集、CK値の最大となるのは、それぞれ発症から平均8時間、21時間で、Mbはより早期にピーク値となった。またMb、CKが正常に復するのは、それぞれ平均2.0日、5.7日で、Mbは早期に陰性化した。Chapelleら⁸⁾もRIA法による検討で、血清Mbは8~12時間で最大となり、平均34時間で正常化したとしている。このように血清Mbが早期に陰性化することは急性心筋梗塞早期の診断のみならず、比較的早期の再梗塞や梗塞の進展の診断に際

しても本法は有用と考えられた。

次に胸痛を訴えて来院した患者の検討ではLA法による血清Mb測定の急性心筋梗塞に対する感度、特異性はそれぞれ0.97, 0.91, 陽性結果予測値、陰性結果予測値はそれぞれ0.93, 0.95と、いずれも良好な結果であった。このうち急性心筋梗塞で凝集陰性を示した1例は、発症から21時間目に入院しており、血清Mbはすでに正常化していた可能性がある。本田ら⁹⁾はRIA法において、発症12時間以内では98%にMbの上昇が見られたのに対して、発症から12時間と24時間の間のそれは80%だったとしている。従って適切な採血時期が得られれば感度はさらに向上するものと考えられた。一方狭心症でMb凝集を示した1例は、他に血清Mb上昇をきたす原因はみられず、CKは正常範囲内だったが、心電図変化が持続し、胸痛時間も比較的長かった。この点について林¹⁰⁾はRIA法による検討で、狭心症のうち胸痛時間の長い例では軽度の血清Mb上昇を認めたとしている。またMcMurtryら¹¹⁾は、イソプロテレノール投与による実験的な心筋障害において明らかな壊死所見がなく白血球浸潤のみの場合でも血清Mbの上昇を認めており、Mbは心筋障害に対してCKより感受性が高いとしている。このことから今回の検討で認めた狭心症の偽陽性例において、血清Mbの異常は心筋障害に基づくものと考えられた。しかしながらHansenら⁶⁾はLA法の急性心筋梗塞に対する陽性結果予測値は0.64、Mainardら⁵⁾も狭心症の例で25人中8人に凝集陽性を認めたとし、いずれも本法では偽陽性が比較的多く見られたと報告している。MbはCKと同様に心筋のみならず骨格筋にも存在しており、そのほとんどが速やかに腎臓から排出されることから、ショック、骨格筋障害、腎障害でも血清Mbが上昇することが知られている¹¹⁾。McCombら⁷⁾はRIA法によるMbの検討で、発症から6時間目での特異性は0.89としており、特に心不全例で偽陽性が多かったとしている。この点について三好ら²⁾もCKに比してMbはより循環不全の影響を受けやすいとしており、心不全を合併した例における心筋梗塞の診断には特に注意が必要と思われる。

急性心筋梗塞急性期においては、CCU搬送前に疼痛緩和などの目的のために、しばしば筋肉注射がなされる。このような筋肉注射の影響を検討するために、健常者に筋肉注射をおこないMb凝集の有無を観察した。その結果5例いずれにも凝集はみられず、筋肉注射はLA法による血清Mb測定に影響を及ぼさないものと考えられた。また心臓カテーテル検査後の検討では、5例中3例に凝集を認めたが、いずれも(+)の軽度の凝集であり、通常的心臓カテーテル検査では血清Mbの上昇は軽度にとどまるものと考えられた。Reeseら¹³⁾もRIA法による検討で、筋肉注射および心臓カテーテル検査後いずれも血清Mbの上昇はみられなかったとしている。

結 論

急性心筋梗塞におけるLA法による血清Mb測定の有用性を検討した。

1) 急性心筋梗塞発症から1, 2, 3時間目のMb凝集の陽性率はそれぞれ40, 78, 100%に対して、病的CK値の出現率はそれぞれ0, 11, 69%と前者で大きであった。

2) 急性心筋梗塞においてMb凝集、CK値が最大となったのはそれぞれ発症から8.1±0.7時間、21.1±2.0時間で、Mb、CKはそれぞれ発症から2.0±0.3日、5.7±0.4日で正常に復した。すなわちMbはCKに比し、早期にピーク値に達しかつ陰性化した。

3) RIA法による血清MbとMb凝集時間は指数関数的に有意な逆相関を認め、LA法は半定量的にも十分使用しうると考えられた。

4) 胸痛患者におけるLA法の急性心筋梗塞に対する感度は0.97, 特異性0.91, 陽性結果予測値0.93, 陰性結果予測値0.95と良好だった。

5) 筋肉注射後Mb凝集はみられず、心臓カテーテル検査後も著明な変化はみられなかった。

以上よりLA法による血清Mb測定は急性心筋梗塞早期の診断に極めて有用であった。

謝辞 本研究に多大なご協力を頂いた香川県立中央病院臨床検査部山階裕子氏、石川貴子氏に深謝いたします。

文 献

- 1) Stone MJ, et al: Radioimmunoassay of myoglobin in human serum. *J Clin Invest* 56: 1334, 1975.
- 2) 三好和夫, 他: 心筋梗塞における血中ミオグロビンの基本的変動パターン, ラジオイムノアッセイによる成績, *日本臨床* 35: 2506, 1977.
- 3) Bachem MG, et al: Myoglobin-Latextest. *Dtsch Med Wschr* 108: 1190, 1983.
- 4) Grachev MA: A rapid method for myoglobin radioimmunoanalysis as a diagnostic tool in myocardial infarction. *Clin Chim Acta* 124: 235, 1982.
- 5) Mainard F, et al: Study of a myoglobin test in patients hospitalized for suspected myocardial infarction. *Clinica Chimica Acta* 153: 1, 1985.
- 6) Norregaard-Hansen K, et al: A rapid latex agglutination test for detection of elevated level of myoglobin in serum and its value in the early diagnosis of acute myocardial infarction. *Scand J Clin Lab Invest* 44: 99, 1984.
- 7) McComb JM, et al: Myoglobin and creatine kinase in acute myocardial infarction. *Br Heart J* 51: 189, 1984.
- 8) Chapelle JP, et al: Serum myoglobin determinations in the assessment of acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 3: 122, 1982.
- 9) Honda Y, Katayama T: Detection of myocardial infarction extension or reattack by serum myoglobin radioimmunoassay. *Intern J Cardiol* 6: 325, 1984.
- 10) 林 正: 急性心筋梗塞における血清ミオグロビンの経時的変動パターン, *四国医誌* 37: 240, 1981.
- 11) McMurtry JP, Wexler BC: Detection of early myocardial infarction by radioimmunoassay of myoglobin. *Angiology* 30: 806, 1979.
- 12) Stone MJ, Willerson JT: Myoglobinemia in myocardial infarction. *Intern J Cardiol* 4: 49, 1983.
- 13) Reese L, Ukisik P: Radioimmunoassay of serum myoglobin in screening for acute myocardial infarction. *CMA J* 15: 1585, 1981.