〔報 告〕

クレアチンキナーゼ (CK) アイソザイム分画測定法における 市販検出用試薬の差異

—基質濃度と緩衝液の pH の影響について—

星野 忠*・橋本寿美子**・村上和美***・菰田二一†

熊坂一成*・河野均也*

はじめに

クレアチンキナーゼ (CK, EC 2.7.3.2.) 活性測定についてはドイツ臨床化学会 (GSCC)¹⁾, スカンジナビア臨床化学会 (SSCC)²⁾ および国際臨床化学連合 (IFCC) (1985-02, Stage 1 Draft 7) などから勧告法の提案がなされ, わが国においても日本臨床化学会 (JSCC)³⁾ が勧告法を提示している。しかしながら, CK アイソザイムの標準となるべき検出法の提案はまだなされていない。

われわれは,すでにアルカリホスファターゼ (ALP) および乳酸脱水素酵素 (LD) のアイソザイム検出法と活性測定法の違いによる検査成績の互換性に関する問題点を指摘し, その是正法について提言してきた^{4,5)}。今回も同様な主旨で市販の CK アイソザイム検出用試薬キットについてアイソザイム分画成績の差異を評価する目的でヒト由来の CK-BB (CK₁), CK-MB (CK₂), CK-MM (CK₃) を電気泳動的に分離し, 各分画値を求め比較した。また, CK アイソザイム分画成績を活性値に換算して定量的に評価する場合, 各種勧告法に準拠した活性測定試薬から得た活性値との関係についても調査した。さらに今回は, アイソザイム分画値に変動を与える主因とも考えられる基質濃

度と pH について, 液層系で測定条件を変化させてアイソザイム活性値および分画値におよぼす影響について検討を加えた。

試料および方法

1. 試 料

ヒト由来の CK-BB, CK-MB, CK-MM は, いずれも Aalto 社 (U.S.A.) の酵素標品を用いた。また, 酵素標品の希釈にはウシアルブミン, ヒトグロブリンを含む 50 mmol/l のリン酸緩衝液 (pH 7.4)⁶⁾ を用いた。

2. CK アイソザイム分画の検出法

検出法は蛍光法の試薬である CK アイソエンザイムシステム (チバ・コーニング), パラゴン CK 試薬キット (ベックマン), タイタン REP CK (ヘレナ) の 3 社の市販 CK アイソザイム検出試薬キットを用いた。なお, Table 1 に各検出試薬の主成分を示した。また, 電気泳動装置および泳動条件は各メーカー指定の装置を用い, キット説明書の指示に従って操作した。

3. CK 活性測定法

CK 活性測定法は終濃度が各種勧告法に準拠した試薬として CPK E-HA テストワコー (和光純薬, JSCC 常用基準法), CK NAC BMY (ペーリンガー・マンハイム, GSCC 常用基準法), ネスコート CK-V2 (日本商事,

Differences of creatine kinase (CK) fractions detected by commercially available reagents: effects of substrate concentrations and pH of buffers.

* Tadashi Hoshino, Kazunari Kumasaka, Kinya Kawano; 日本大学医学部臨床病理

** Sumiko Hashimoto; 日本大学板橋病院臨床検査部

*** Kazumi Murakami; (株)大塚東京アッセイ研究所

† Tsugikazu Komoda; 埼玉医科大学第 1 生化学

Correspondence address: Tadashi Hoshino, Department of Clinical Pathology, Nihon University School of Medicine, 30-1, Ohayaguchikami-machi, Itabashi-ku, Tokyo 173, Japan.

(受付 1995 年 3 月 23 日, 受理 1995 年 4 月 19 日, 刊行 1995 年 8 月 15 日)

Table 1. Reagent compositions of commercially available CK isozyme detection kits.

	CK isoenzyme System	Paragon CK	Titan REP CK
Buffer	MES	MOPSO	MES
(mM)	70	50	66
(pH)	6.2	7.0	6.2
Creatine phosphate (mM)	90	120	90
ADP (mM)	12	9	12
Mg (mM)	60	50	60
NAC (mM)	60	120	60
HK (U/l)	9,000	18,000	9,000
G 6 PD (U/l)	7,500	6,000	7,500
D-glucose (mM)	60	70	60
NADP (mM)	—	9	—
NAD (mM)	6	—	6
AMP (mM)	15	15	15
AP ₅ A (μ M)	10	30	—

ADP: adenosine 5'-diphosphate, AMP: adenosine 5'-monophosphate, AP₅ A: diadenosine pentaphosphate, G 6 PD: glucose-6-phosphate dehydrogenase, HK: hexokinase, MES: 2-(N-morpholine) ethanesulfonic acid, MOPSO: 3-(N-morpholino)-2-hydroxypropanesulfonic acid, NAC: N-acetyl-L-cysteine, NAD: β -nicotinamide-adenine dinucleotide, oxidized form, NADP: β -nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate, oxidized form.

SSCC 常用基準法) を用い日立 7070 型自動分析装置で測定温度 37°C の条件下で各メーカー指定のプロトコールに従って分析した。

4. CK アイソザイムの混合試験

ヒト CK-BB, CK-MB, CK-MM の活性を CPK E-HA テストワコーで測定し、活性値として等量となるように希釈液⁵⁾ で調整した。次に調整した各 CK アイソザイムをそれぞれ 1:1:1 の割合で混合したものを泳動用試料として電気泳動し、各種 CK アイソザイム検出用試薬を用いて分画値 (%) を求めた。

5. CK 活性測定試薬中の基質濃度, pH が各 CK アイソザイム活性および分画値に及ぼす影響

CPK E-HA テストワコーを用い、基質濃度については第 2 試薬の基質溶解液の量を調整して終濃度として 10~60 mmol/l までの 6 濃度を作製した。pH については第 1 試薬の溶解液を酢酸またはイミダゾールを加えることにより pH を 6.14~7.23 までの 6 段階に調整した。それぞれ試薬を組み合わせ、各アイソザイムの活性値を測定し、現行キット (基質濃度; 30 mmol/l, pH 6.68) から得られた値を基準として比較した。

Table 2. Percentages of CK isozyme fractions determined by different CK isozyme detection kits and several authorized assay methods.

Reagent Kit	CK-BBCK-MBCKMM		
CK isoenzyme system	30.6	35.5	33.9
Paragon CK	31.0	33.1	35.9
Titan REP CK	35.6	36.4	28.0
CPK E-HA Wako (JSCC Method)	33.3	33.3	33.4
CK-NAC-BMY (GSCC Method)	32.0	32.7	35.3
Nescoat CK-V2 (SSCC Method)	32.8	33.4	33.8

成 績

1. 各種 CK アイソザイム検出試薬別の CK アイソザイム分画 (%) と各 CK 活性測定法から計算した CK アイソザイム分画 (%) との比較

JSCC 準拠試薬で CK-BB, CK-MB, CK-MM の活性が等量になるように調整した試料を用いて電気泳動的に CK アイソザイムを分画し、3 社の CK アイソザイム検出試薬で求めた分画 (%) と各活性測定法で得られた各アイソザイムの活性値を分画 (%) に換算した値を Table 2 に示した。3 社の CK アイソザイム検出試薬で測定した分画 (%) は CK-BB で 5% 程度, CK-MB で 3% 程度, CK-MM で 8% 程度の分画値の開きが認められた。一方、活性測定法間では分画値とし

Fig. 1. Relationship between substrate concentrations of CK assay reagent kits and changes in relative activities or percentages of the fraction of respective CK isozymes.

●: CK-BB, ▲: CK-MB, ■: CK-MM. CK activities were determined with 30 mmol/l creatine phosphate at pH 6.68. The value is expressed as relative activities for (A) and percentages of the fraction for (B), respectively.

Fig. 2. Relationship between pH of buffers used for the CK assay reagent kits and changes in relative activities or percentages of the fraction of respective CK isozymes.

●: CK-BB, ▲: CK-MB, ■: CK-MM. CK assays are the same as described in the legend of Fig. 1. (A), relative activities: (B), percentages of the fraction of respective CK isozymes.

ていずれも1~2%程度の開きで、各アイソザイムの反応性に差はほとんど見られなかった。

2. CK 活性測定試薬中の基質濃度と各 CK アイソザイム活性および分画値の変動

pH 6.68 の条件下で基質濃度を10~60 mmol/l の範囲で変化させたところ、CK-BB は30 mmol/l, CK-MB は40 mmol/l, CK-MM は50 mmol/l 付近に活性のピークを認めた (Fig. 1 A)。一方、分画値は基質濃度30 mmol/l を基準として比較すると低濃度ではCK-BB>CK-MM, 高濃度ではCK-BB<CK-MM の傾向を示した。また、CK-MB はどの濃度でもほぼ一定の値であった (Fig. 1B)。

3. CK 活性測定試薬中の pH と各 CK アイソザイム活性および分画値の変動

基質濃度30 mmの条件下で、CK-BB, CK-MB はpH 6.68 付近に、CK-MM はpH 6.45 付近に活性のピークを認めた (Fig. 2 A)。一方、分画値はpH 6.68 を基準として比較すると、pH が低いほうではCK-BB<CK-MM であったが、高いほうでは各分画値にほとんど変動は認められなかった。また、CK-MB はほぼ一定の値であった (Fig. 2B)。

考 察

今日、CK アイソザイム検査は心筋梗塞の診断に有用であることが臨床的に確かめられているが、緊急性を要することから、抗体を用いたCK-MB 値の迅速測定法が普及している。しかし、一方で免疫グロブリンと結合したマクロCK や一部の免疫阻害法キットではCK-BB 高値例において誤ったCK-MB 値として評価される例⁶⁾もあることなどから問題がないわけではない。この点、電気泳動法では検査者がパターンを確認できることから、マクロCK や一部の悪性腫瘍で血中に増加するミトコンドリアCK⁷⁾の存在を認識することが可能であり、この情報を臨床に届けることができる。さらに、3分画の情報を一度に入手できる点も利点の一つといえる。また最近、CK アイソフォーム分画比がより早期の心筋梗塞の診断に有用であるとの報告^{8,9)}があり、CK アイソザイムの分析法として、電気泳動法は今後とも衰退するものではないと考えられる。

1990年、JSCC からCK 活性測定法の勧告が出された³⁾が、CK に関してはALP, LD とは異なり、すでに報告されている他の勧告法、とくにIFCC 法と結果的には内容に変わりがなく、国際的にもハーモナイズされている。

一方、電気泳動法を用いたCK アイソザイム分画は、

すでにわれわれが報告したALP, LD と同様に支持体上での酵素反応条件の把握が困難なためかいまだ標準化の動きはみられない。そこで今回は、液層条件ではあるが、アイソザイム分画値の成績に影響をおよぼす主因と考えられる基質濃度と緩衝液のpH に関して検討を加え、検出試薬の組成 (Table 1) とを比較した。その結果、基質濃度が影響している例として、タイタンREP CK とパラゴンCK 試薬キットを比較すると、Fig. 1B に示すようにタイタンREP CK (90 mmol/l) に対してパラゴンCK 試薬キット (120 mmol/l) のほうが基質濃度が高いことより、Table 2 に示すようにタイタンREP CK はパラゴンCK 試薬キットよりもCK-BB がCK-MM よりも優位に測定されたと考えられた。なお、基質溶解緩衝液のpH がタイタンREP CK (6.2), パラゴンCK 試薬キット (7.0) と異なるが、基質溶解後の発色液の実測pH はいずれもpH 6.8 であった。一方、pH が影響している例としては、タイタンREP CK とCK アイソエンザイムシステムが考えられる。タイタンREP CK とCK アイソエンザイムシステムとでは、基質濃度はいずれも90 mmol/l と差はなく、基質溶解緩衝液のpH も6.2 と試薬組成上はほぼ同一であったが、基質溶解後の発色液の実測pH はタイタンREP CK (6.8), CK アイソエンザイムシステム (6.4) とCK アイソエンザイムシステムのほうが若干酸性であった。このpH の差をFig. 2B に示した成績と比較すると、タイタンREP CK はCK アイソエンザイムシステムよりもCK-BB がCK-MM よりも優位に測定されたと考えられ、Table 2 に示す成績ともほぼ一致した。以上より、支持体上での反応が必ずしも再現できているという保証はないものの、液層での実験成績と電気泳動法でのアイソザイム分画測定値の対比で大きな乖離がないことは、支持体上の反応において基質濃度とpH の条件が各アイソザイムの反応性を左右する因子として重要であることがわかった。

各種勧告法に準拠した活性測定試薬から得られたアイソザイム活性比とCK アイソザイム検出試薬から得られた分画成績は、Table 2 に示すように、タイタンREP CK では、JSCC 処方試薬から求めたCK アイソザイム活性化よりもCK-BB とCK-MB はやや高く、CK-MM はやや低く測定される傾向がみられた。これに対し、CK アイソエンザイムシステムとパラゴンCK 試薬キットでは、CK-BB はいずれも低く、前者はCK-MB が高く、後者はCK-MM が高い傾向であった。このうち、パラゴンCK 試薬キットは、GSCC 処方試

薬から求めた CK アイソザイム活性比により近似していた。この原因は基質濃度、緩衝液の pH 以外に、補酵素や diadenosine pentaphosphate (AP_5A) など結果に影響しているように思えた。ただし、これらの成績は、各 CK アイソザイム分画を CK 活性として臨床上定量的に評価する際に大きな問題にならないかも知れない。

結 語

市販の CK アイソザイム検出試薬キットの分画測定値の違いは、基質濃度と pH の差異が主因であることが液層系での検討成績とキット試薬の成分組成との比較から推定された。

なお、本論文の要旨は第 45 回日本電気泳動学会総会 (1994 年 10 月, 札幌) で発表した。

文 献

- 1) Recommendations of the German Society for Clinical Chemistry. Standard method for the determination of creatine kinase activity. Revised draft of 1967. J Clin Chem Clin Biochem 1977; 15: 255-60.
- 2) The Committee on Enzymes of the Scandinavian Society for Clinical Chemistry and Clinical Physiology. Recommended method of the determination creatine kinase in blood

- modified by the inclusion of EDTA. Scand J Clin Lab Invest 1979; 39: 1-5.
- 3) 日本臨床化学会. ヒト血清中酵素活性測定法—クレアチンキナーゼ. 臨床化学 1990; 19: 184-208.
- 4) 星野 忠, 菰田二一, 熊坂一成, 河野均也. 3 種の ALP アイソザイム検出法に基づく ALP アイソザイム分画比の変動について—ALP 活性測定法との誤った組み合わせはないか. 臨床検査 1993; 37: 1041-4.
- 5) 星野 忠, 橋本寿美子, 村上和美, 吉富要子, 菰田二一, 熊坂一成, 河野均也. 乳酸脱水素酵素 (LD) アイソザイム分画測定における市販検出用試薬の感度の差異—どの LD 活性測定法との組み合わせが適切か. 臨床検査 1994; 38: 607-10.
- 6) 石沢修二, 陳 紹芬, 平沢政人, 鶴飼龍一, 五味邦英. 免疫阻害法を用いた CK アイソエンザイム測定に関する検討. 衛生検査 1983; 34: 1415-9.
- 7) 鈴木利之, 鶴飼龍一, 高木 康, 五味邦英, 石井 暢, 石井淳一. 悪性腫瘍に関連した creatine kinase の臨床病理学的検討—特に消化器癌について. 日消誌 1986; 83: 829-37.
- 8) Wu AB, Gornet TG, Wu VH, Brockie RE, Nishikawa A. Early diagnosis of acute myocardial infarction by rapid analysis of creatine kinase isoenzyme-3 (CK-MM) subtypes. Clin Chem 1987; 33: 358-62.
- 9) Kanemitsu F, Okigaki T. A combination assay of MB and MM isoforms of serum creatine kinase in acute myocardial infarction. Clin Chim Acta 1994; 229: 161-9.