

心筋梗塞診断用“富士ドライケムCKMB-Pスライド”の開発

田中 秀明*, 阿部 義彦*

Development of FUJI DRI-CHEM CKMB-P Slide for the Diagnosis of Acute Myocardial Infarction

Hideaki TANAKA* and Yoshihiko ABE*

Abstract

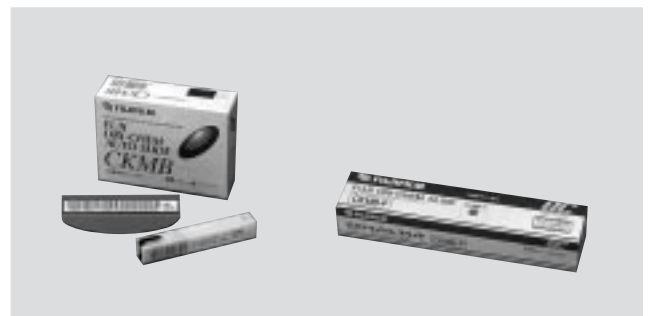
A dry chemistry slide was developed to determine CKMB activity (B-subunit activity of creatine phosphokinase) within serum or plasma. (CKMB exists in large quantities in cardiac muscle.) The key points of this development were a technology to incorporate within a dry chemistry slide an immunoinhibition reaction—in other words, a technology for inhibiting CK-M activity within serum through the use of anti-human CK-M antibody—and an improvement in storage stability. When a drop of serum or plasma is applied to a slide, CK-M is selectively inhibited by its specific antibody, and residual CK-B activity is determined via a dye formation reaction measured at 540 nm using reflective photometry. Satisfactory results were obtained for within-run precision evaluations. A comparison study of acute myocardial infarction (AMI) patients gave a good regression between the FUJI DRI-CHEM CKMB slide and a convention liquid immunoinhibition method measured using a Hitachi 7150. The newly developed present method is quite effective for the diagnosis of AMI, because reliable results can be quickly obtained through the use of this dry film assay technology.

1. はじめに

医療の現場において、疾患の診断および病態を把握するために、血液中の化学成分や酵素を定量的に測定することが広く行われている。富士ドライケム（以下、FDCと略す）は、乾燥状態で一体化した試薬スライドに血液などの検体を1滴点着するだけで、血液中の目的の物質濃度または酵素活性値が測定できるシステムであり、臨床検査分野での代表的なドライケムスライドである¹⁾。その主な特長は、試薬調製の手間がいない、

迅速簡便に測定ができ、緊急検査に対応できる、メンテナンスフリーである、水を使用しないため、災害時に強く、また、廃液が出ない、などである。FDCはこれまでも、各種病院の中央検査室、緊急検査室、ICU（集中治療室）、手術室などの多くの医療の現場で、これらの特長を活かしながらか、使用されている。FDCは、これまでに免疫項目1項目を含む比色22項目、電解質3項目を開発してきた。

本報告では、FDCのこれまでの酵素発色法に加え、新たに免疫阻害法の技術を応用して開発した、心筋梗塞の診断に有用なCKMB^{**}スライドについて紹介する。



CKMB slide

^{**} CKMBはエネルギー代謝に関わるCPK（クレアチンホスフォキナーゼ）という酵素のアイソザイムであり、その存在量、存在比率が心筋に著しく高いことが知られている²⁾。そのため、CKMBの測定は心筋梗塞に特異性の高い検出法として重要視されている³⁾⁴⁾。

本誌投稿論文（受理1997年9月10日）

* 富士写真フイルム（株）朝霞研究所
〒351-8585 埼玉県朝霞市泉水3-11-46

* Research Laboratories, Asaka
Fuji Photo Film Co., Ltd.
Asaka-shi, Saitama 351-8585, Japan

2. スライド開発

2.1 開発の背景

急性心筋梗塞は、発作後から治療開始までの時間が短いほど治療効果が高いとされている⁵⁾。そのため、その診断には迅速性、緊急性が要求される⁶⁾。我々は、緊

急検査に対応できるというFDC最大のメリットを活かし、年々増え続ける心筋梗塞の診断ニーズに応えるため、CKMBスライドの開発に着手した。CKMBの測定法には、電気泳動法、イオン交換法、カラム抗体法、免疫阻害法、イムノアッセイ法がある⁷⁾。現在では、⁸⁾が主流となっている。スライド開発にはこれらの中で最も迅速に測定が可能である免疫阻害法を用いることにした。

2.2 測定原理およびスライドの層構成

2.2.1 免疫阻害法^{9) 10)}の原理

Fig. 1に免疫阻害法の原理を示す。CPKは2つのサブユニットからなる2量体酵素である。サブユニットにはM型とB型の2種類が存在し、それぞれが活性部位を持つ。M、Bの組み合わせでCK-MM、CK-MB、CK-BBの3種類のアイソザイムが存在する。Mサブユニット活性のみを特異的に阻害する抗体を用いると、Bサブユニット活性のみが残存する。CK-BBの血中への出現はきわめて稀であるため、ここで得られた残存B活性はCKMB活性を反映していると考え、2倍することによりCKMB活性とすることができる。

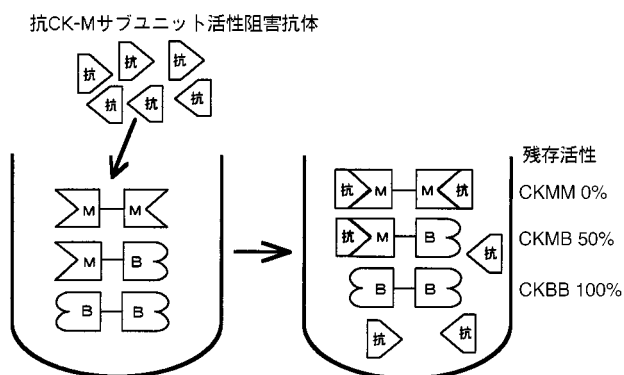


Fig. 1 Principle of the immunoinhibition method

2.2.2 層構成と反応タイムコース

CKMBスライドの層構成をFig. 2に示す。ポリエチレンテレフタレート（PET）の光透過性支持体上に、指示薬層、展開・反応層の2層から構成されている。測定には卓上型アナライザーFDC-5500、FDC-3000、または高速処理が可能な全自動アナライザーAUTO5を用いる。展開・反応層に検体を点着すると、検体は布の繊維に沿って均一に自由展開し、まず抗体によりCK-M活性が阻害される。そして、Fig. 3に従い反応が開始される。CPとADPは、CK-B活性に応じた量のATPおよびCreatineを生成する。生成したATPは酵素HKの作用でG6Pに変化し、G6Pは酵素G6PDHの作用で酸化され、同時にNADHが生成する。最終的に、NADHは酵素DIの作用でNTBと反応し、ジホルマザン色素（ $\lambda_{max} = 540\text{nm}$ ）を形成する。この色素を540nmにて支持体側から反射測光し、2.5分と5.0分間の反射光学濃度の増加量を求め、あらかじめ

めアナライザーに内蔵された検量線に従ってCKMB活性に換算する。

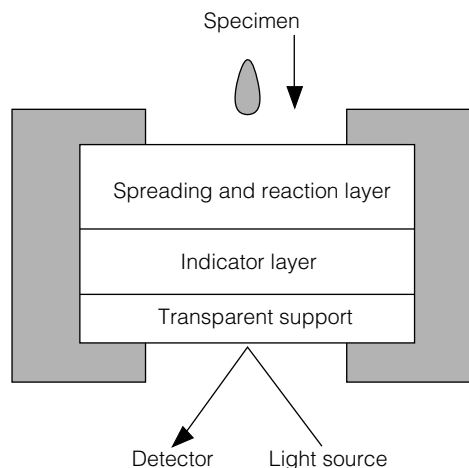


Fig. 2 Structure of the FUJI DRI-CHEM CKMB slide

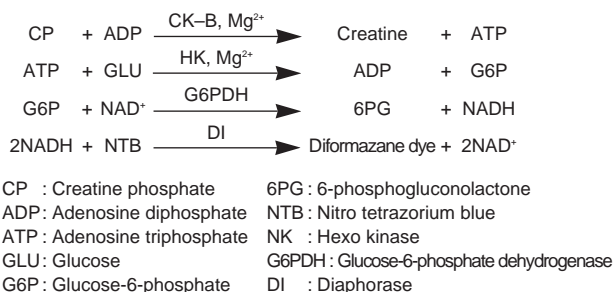


Fig. 3 Reaction sequence of the FUJI DRI-CHEM CKMB slide

2.3 スライド特異性

2.3.1 CKMMの影響

CKMB活性の測定において、一番重要なポイントは、CK-M活性をいかに阻害するかである。抗CK-M抗体を展開層に添加することにより、検体中のCK-Mサブユニット活性を効率よく阻害することができた。Fig. 4はCKMB正常域付近の検体にCKMMを添加し、CKMMの影響を調べたグラフである。CKMM 2000U/まで、CKMB活性値は影響を受けないことを確認した。

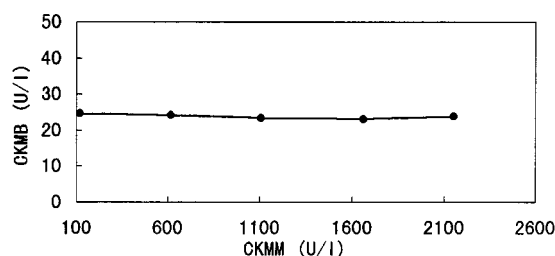


Fig. 4 Interference of CKMM

2.3.2 AKの影響

生体細胞中には、アデニル酸キナーゼ (以下, AKと略す) が広く存在する (骨格筋, 脳, 肝臓, 心臓, など)¹¹⁾。AKは次式で示されるように, ATP再生反応を触媒する酵素として働く。



AKは血液の赤血球中および肝臓に多く存在している。そのため, 溶血検体もしくは肝臓に疾病を持つ患者検体ではAKが高活性に出現する^{12) 13)}。AKが共存する検体を測定すると, CKMBの基質であるADPを消費しATPが生成するため, CKMB活性測定において正誤差の要因となる¹⁴⁾ (Fig. 3 反応経路参照)。そこで, スライド展開層にAKの阻害剤としてAP5A (1, 5 - ジアデノシン - ペンタリン酸) とAMPを添加することにより, AK活性の影響を抑制した。Fig. 5にCKMB約160U/ の検体に溶血検体を添加し, AKの影響を調べたグラフを示す。AK約450U/ (溶血Hbからの換算値) までCKMB活性値に影響を与えないことを確認した。

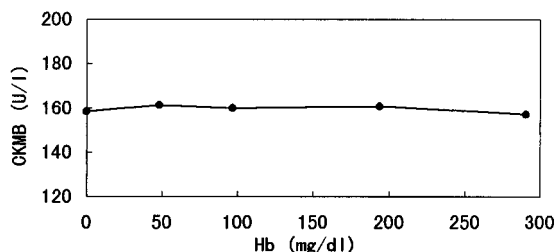


Fig. 5 Interference of Hb

2.3.3 LDHの影響

ヒトの血液中には, 乳酸および乳酸デヒドロゲナーゼ (以下, LDHと略す) が存在する。LDHは通常, 次の反応を触媒する酵素である。



CKMBスライドには試薬としてNAD⁺を添加しているため, 検体が点着されると上記右方向の反応が起こり, NADHが生成する。こうしてできたNADHは, CKMB活性測定において正誤差の要因となる (Fig. 3 反応経路参照)。そこで, スライド展開層にLDH阻害剤を添加することにより, LDHの影響を抑制した。Fig. 6にCKMB 150U/ の検体を用い, LDHの影響を調べたグラフを示す。LDH2000U/ までCKMB活性値に影響を

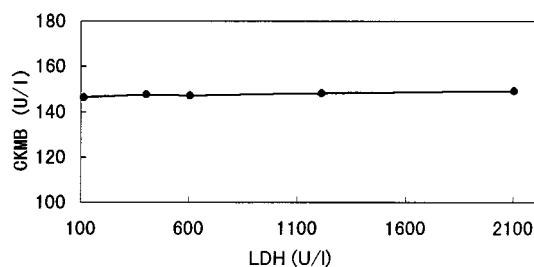


Fig. 6 Interference of LDH

与えないことを確認した。

2.4 保存安定性

CKMBスライドには熱力学的に不安定なCPを試薬として使用する。そのため, 反応に関与する試薬を一体化すると, ドライ状態であっても冷蔵保存中に発色の原因となる反応中間体ATPとG6Pが生成し, 測定時に正誤差を与えることが問題となった。冷凍保存とすれば問題は解決したが, 室温戻しに時間がかかるため, 緊急時に満足に対応できるよう冷蔵保存を目標とした。

(1) ATP生成の抑制

従来は, JSCC勧告法で使用されているイミダゾールバッファーを用いていた。ところが, イミダゾールを用いると, 保存中に下記ATP生成反応が進行することが判明した。



各種バッファーを検討した結果 (Fig. 7), ATP生成を抑制するにはスルホン酸基を持つ有機バッファー (MES, MOPSO, TES, TAPSO) が有効であることを見出し, TESを採用した。

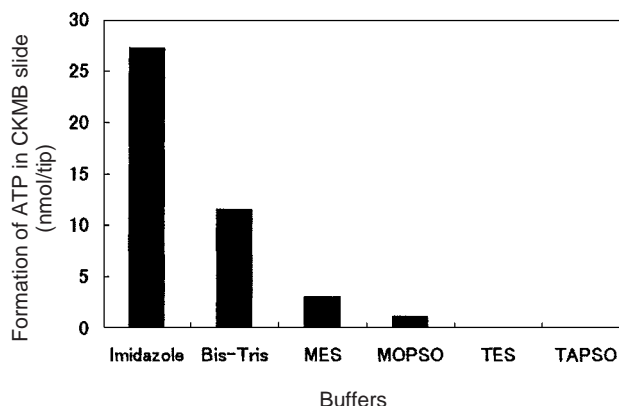


Fig. 7 Formation of ATP in CKMB slide after 24 hour incubation at 45 °C under the difference buffer condition

(2) G6P生成の抑制

G6Pの生成には, クレアチンリン酸とGLUの反応が関与していることが判明した。



GLUはHKの基質であるため, 本来, スライド中に添加すべき試薬である。しかし, CKMBは血液中の活性が比較的小さいことと, HKのGLUに対するミカエリス定数 (Km) が小さいことから, 血清または血漿中のGLU量が十分であることがわかった。そこで, スライドにはGLUを添加せず, 検体中のGLUを反応に利用する方式とし, G6P生成の問題を解決した。

以上, 2つの問題を解決することで冷蔵保存を可能と

した。Fig. 8は冷蔵12ヶ月保存時のCKMB正常域の測定値変動である。

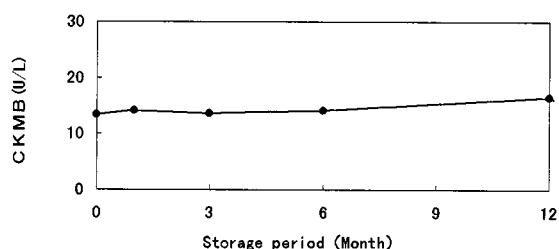


Fig. 8 Storage stability at 4

3. 実技テスト

病院にて実際に健常者および心筋梗塞患者への適用を試み、本スライドの有用性を確認した。

3.1 同時再現性

杏林大学付属病院の患者の血漿3検体を用いて、N = 15で測定した時の同時再現性の結果をTable 1に示した。正常域レベルでSD ; 0.63 U/ 高濃度域でCV ; 1.6 ~ 1.8%と良好な結果であった。

Table 1 Precision (within-run) Data for Human Plasma

N	Sample1	Sample2	Sample3
1	11	51	187
2	11	52	184
3	11	52	189
4	9	51	184
5	10	51	191
6	10	51	187
7	11	50	189
8	11	50	184
9	10	50	186
10	11	50	191
11	11	52	188
12	10	53	194
13	10	50	191
14	11	50	186
15	11	51	186
\bar{X} (U/l)	11	51	186.5
SD (U/l)	0.63	0.93	2.92
CV (%)	5.7	1.8	1.6

3.2 相関

杏林大学付属病院の患者の血漿検体39検体を用いて、自動分析装置HITACHI 7150との相関を調べた (Fig. 9)。回帰式 ; $y = 0.9847x - 0.9198$, 相関係数 ; $R = 0.9888$, $S_{yx} = 9.37$ と良好な関係を示した。

3.3 FDC CKMBスライドによる参考正常値の設定

健常者N = 178を用いて参考正常値をパラメトリック法で求めたところ、ドライケムシステムの正常域は2 ~ 17U/であった。

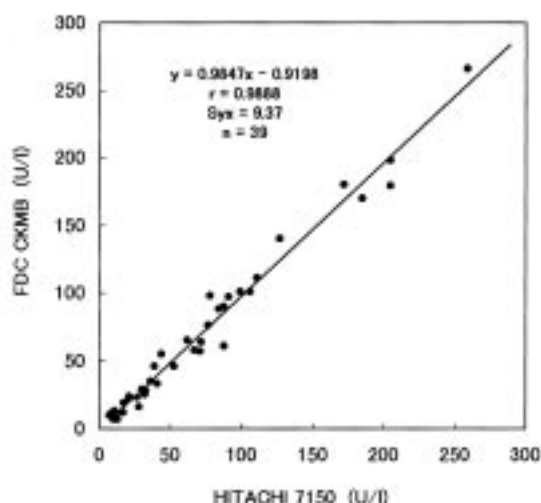


Fig. 9 Correlation between FDC CKMB slide and HITACHI 7150

4. おわりに

CKMBスライドは、ドライケムスリーの特徴である測定の簡便性・即時性を活かし、心筋梗塞などの緊急性の高いニーズに対応した製品である。また、免疫阻害法をドライスライドに取り入れた新規技術は、今後のFDCスライド開発に大きく貢献すると考える。

最後に、今回の開発にあたってご協力を頂いた、国立循環器病センター臨床検査部、杏林大学医学部付属病院中央臨床検査部、自治医科大学付属大宮医療センター検査部、ならびに当社の関係者各位に謝意を表します。

参考文献

- 1) 北島昌夫, 医療電子と生体工学, 22, 274 (1984)
- 2) Tsung, S. W, Clin. Chem., 22, 173 (1976)
- 3) Lott, J. A. et al., Clin. Chem., 26, 1241 (1980)
- 4) 高木康, 他, 臨床検査, 25 (3), 317 (1981)
- 5) Chesebro, J. H. et al., Circulation, 76, 142 (1987)
- 6) 米田孝司, 他, 臨床病理, 39, 389 (1991)
- 7) 片山善章, 他, 臨床検査, 34 (10), 1163 (1990)
- 8) 五味邦英, 他, Medical Technology, 10, 581 (1982)
- 9) Neumeier, D. et al., Clin. Chem. Acta., 73, 445 (1976)
- 10) Wuerzburg, U. et al., J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 15, 131 (1977)
- 11) Lehmann, F. G. et al., Enzymol. Bio. Clin., 6, 36 (1966)
- 12) Szasz, G. et al., Clin. Chem., 22, 1806 (1976)
- 13) Hamada, M. et al., Biochim. Biophys. Acta., 660, 227 (1981)
- 14) 片山善章, 他, 第46回日本臨床衛生検査学会 ランチョンセミナー資料

(本報告中にある“富士”, “FUJI”, “ドライケム”, “DRI-CHEM”は富士写真フイルム(株)の商標です。)