

《ノート》

IRMA法による血中ミオシン軽鎖I測定に 関する基礎的ならびに臨床的検討

Fundamental and Clinical Evaluation of IRMA for Serum Cardiac Myosin Light Chain I

末廣美津子* 成瀬 均** 福田 容子* 森田 雅人**
福地 稔* 岩崎 忠昭**

Mitsuko SUEHIRO*, Hitoshi NARUSE**, Yoko FUKUDA*,
Masato MORITA**, Minoru FUKUCHI* and Tadaaki IWASAKI**

*Department of Nuclear Medicine, **First Department of Internal Medicine,
Hyogo College of Medicine, Nishinomiya

I. はじめに

心筋ミオシンは、筋原線維のフラグメントを構成する構造蛋白で、重鎖と軽鎖から成り、軽鎖はさらに、分子量の差異により軽鎖Iと軽鎖IIの2種類に区別される¹⁾。心筋ミオシン軽鎖は、比較的安定な蛋白で、心筋障害時に心筋細胞内から早期に血中に漏出する。心筋ミオシン軽鎖の測定は、心筋細胞崩壊や構築過程に関する病態情報を反映していると期待され、心筋梗塞等におけるその臨床的意義が注目されている^{2~4)}。

今回、われわれは、Immunoradiometric assay (IRMA)法による血中ミオシン軽鎖I測定キットに関する基礎的検討を行うとともに、急性心筋梗塞における血中CPK値との比較等臨床的検討を行ったのでその成績を報告する。

II. 方法および材料

検討には日本メジフィジックス株式会社から提供を受けたミオシンLIキット「ヤマサ」を用い、実際の測定はFig. 1の手順で行なった。

1. 基礎的検討

1) 標準曲線および最小検出感度

本検討を行った46日間で12回標準曲線を作製したが、その平均±標準偏差 (Mean±S.D.) を求め、安定性と再現性を評価した。なお、標準曲線の作製は、各ミオシン標準液添加の際のカウント数 (B) からミオシン標準0濃度液添加の際のカウント数 (Bo) をnon-specific bindingとして減算した B-Bo (cpm) から求めた。最小検出感度は、ミオシン標準液の最低濃度 (2.5 ng/ml) を、キット添付のミオシン標準0濃度液で0.25 ng/mlまで段階的に希釈して各々5重測定を行ないカウント数の Mean±S.D. を求めミオシン標準0濃度液との間で各々有意差検定を行い求めた。また、ミオシン標準0濃度液の Mean±2 S.D. との重複の有無を指標とする評価も行った。

Key words: Cardiac myosin light chain I, IRMA, CPK, Acute myocardial infarction.

* 兵庫医科大学核医学科

** 同 第一内科

受付: 2年4月25日

最終稿受付: 2年7月4日

別刷請求先: 西宮市武庫川町1-1 (番663)

兵庫医科大学核医学科

末廣 美津子

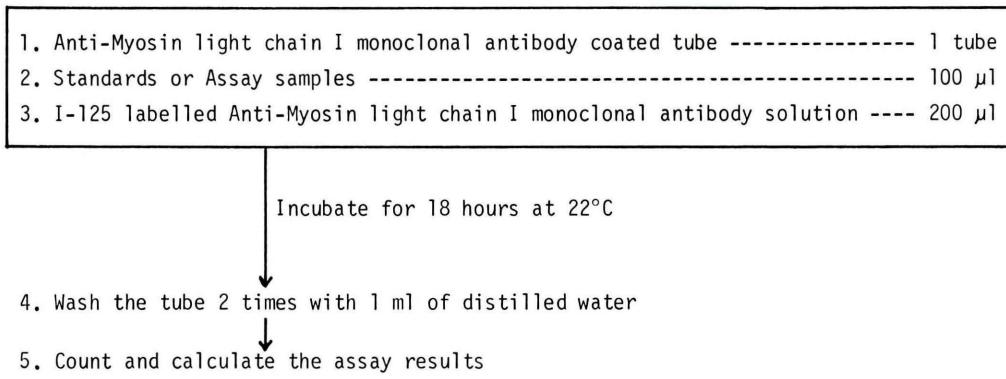


Fig. 1 Assay procedure of IRMA for serum myosin light chain I.

2) インキュベーション条件

インキュベーション時間と温度が本測定法の標準曲線におよぼす影響につき、以下の方法で検討した。インキュベーション温度を22°Cと一定にして、インキュベーション時間を1, 2, 3, 6, 10, 18時間とかえた際の標準曲線と、インキュベーション時間を18時間と一定にして、インキュベーション温度を4°C, 10°C, 22°C, 37°Cとかえた際の標準曲線につき各々検討した。また、インキュベーション温度を22°Cと一定にして、インキュベーション時間を3, 6, 10, 18時間とかえ、静置(Stationary)して反応させた場合と、ローターにより200 rpm振盪(Rotation)して反応させた場合の標準曲線についても比較検討した。

3) 精度再現性

血中ミオシン軽鎖I値の異なる3種類の血清試料を用い、同一測定内($n=5$)、および異なる5回の測定間の再現性をC.V.で評価した。

4) 希釈試験

血中ミオシン軽鎖I値の異なる3種類の血清試料を用い、ミオシン標準0濃度液で1:1から1:32まで倍々希釈を行い測定評価した。

5) 回収試験

血中ミオシン軽鎖I値の異なる3種類の血清試料に、各々濃度の異なる4種類のミオシン標準液を添加して回収率を求めた。

2. 臨床的検討

1) 健常人の血中ミオシン軽鎖I値

健常人50名を対象に血中ミオシン軽鎖I値を本測定法で測定した。その内訳は、男性25名、女性25名で、年齢分布は21歳～57歳(平均36.5歳)である。

2) 心疾患の血中ミオシン軽鎖I値

心疾患38例を対象に血中ミオシン軽鎖I値を本測定法で測定した。その内訳は、急性心筋梗塞15例、陳旧性心筋梗塞5例、狭心症10例、心筋症5例、その他3例である。なお、急性心筋梗塞15例では、連日血中ミオシン軽鎖I値を測定し、その最高値(maximum value)を、また、その他の疾患では、来院時の血中ミオシン軽鎖I値を評価の対象とした。

3) 急性心筋梗塞の血中CPK値と血中ミオシン軽鎖I値

急性心筋梗塞で発作後24時間以内に当院第一内科に入院した9例を対象に1日1回連日10日間、以後隔日1回20日目まで採血を行い血中ミオシン軽鎖I値を本測定法で測定した。さらにこれら9例中例8を対象に、発作後6時間($n=7$)、24時間($n=8$)、30時間($n=6$)、48時間($n=8$)、54時間($n=5$)、および以後1日1回10日まで連日採血を行い、クレアチニン磷酸UV法で血中CPK値を測定した。

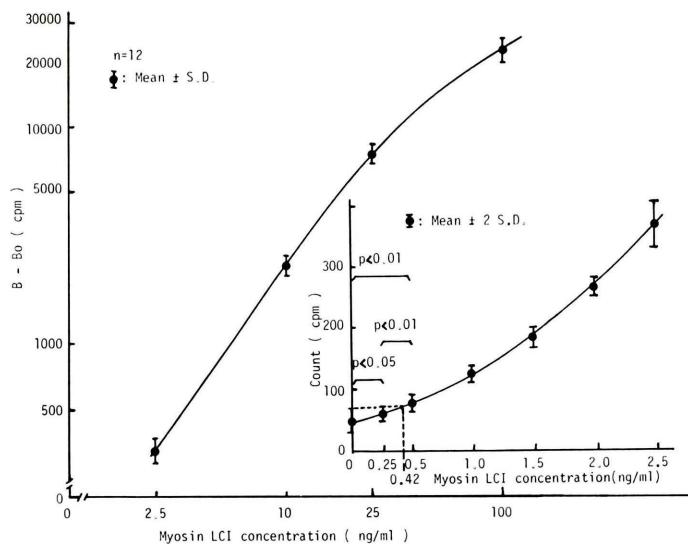


Fig. 2 Standard curve of IRMA for serum myosin light chain I.

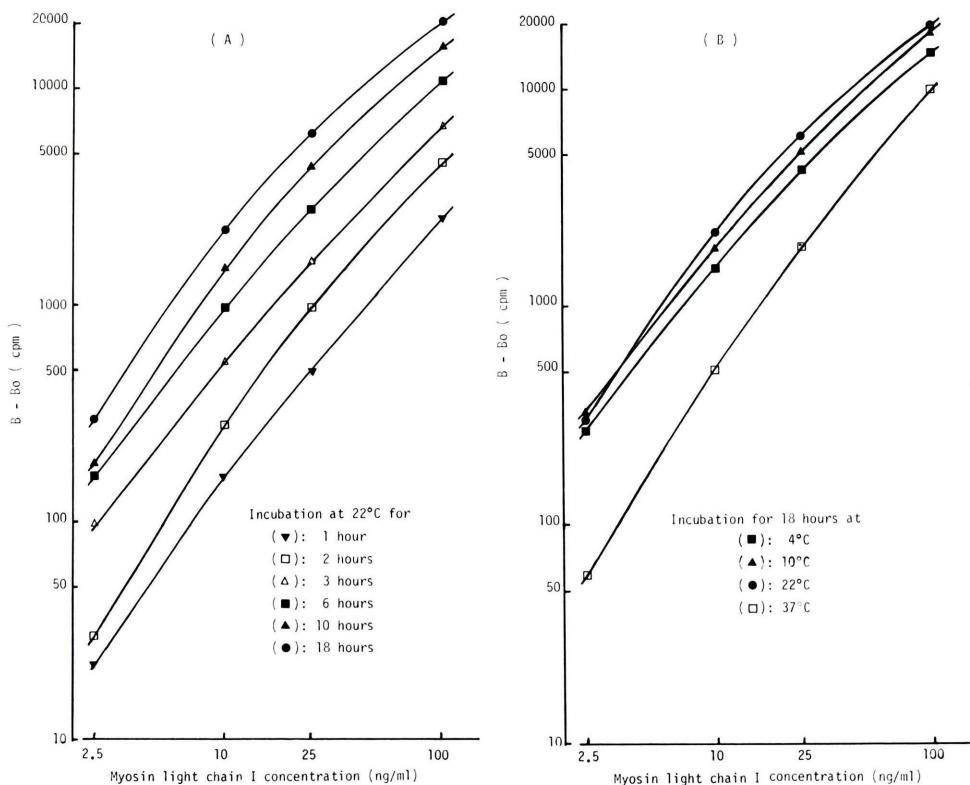


Fig. 3 Effect of incubation time and temperature on standard curve of IRMA for serum myosin light chain I.

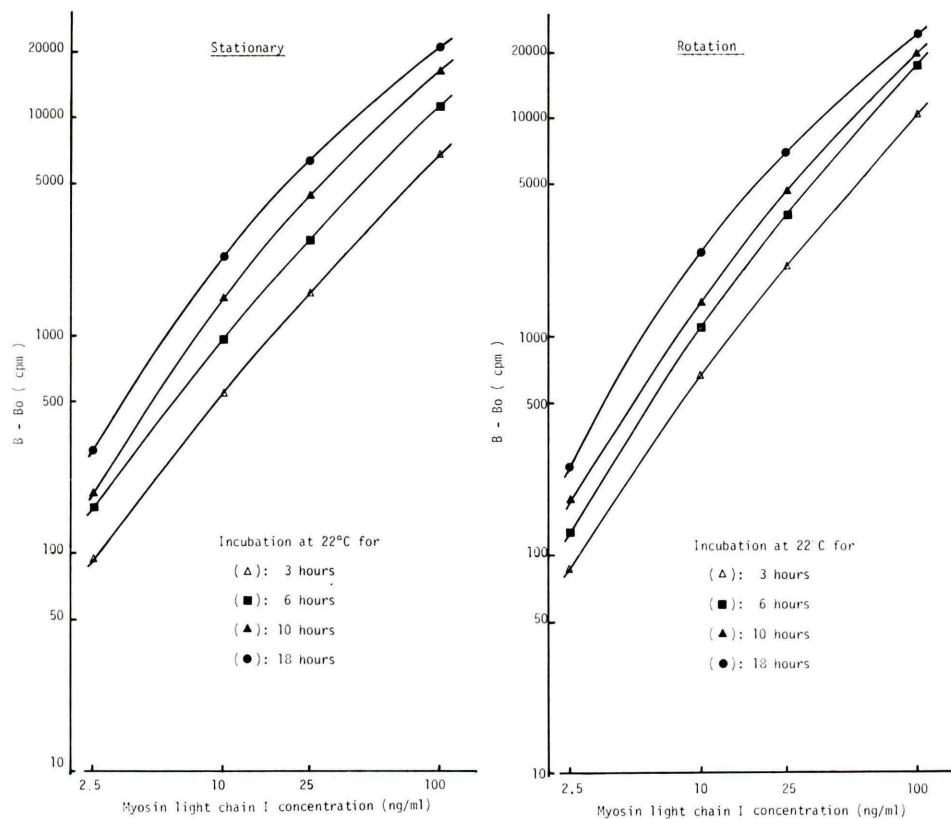


Fig. 4 Effect of incubation condition on standard curve of IRMA for serum myosin light chain I.

III. 結 果

1. 基礎的検討

1) 標準曲線および最小検出感度

異なる12回の測定で得られた標準曲線を Mean \pm S.D. で求め Fig. 2 に示す。ミオシン標準液 2.5 ng/ml から 100 ng/ml までの範囲で再現性のよい安定した標準曲線が得られた。最小検出感度は、有意差検定法で、ミオシン標準 0 濃度液と 0.25 ng/ml の間で結合カウントに有意差 ($p < 0.05$) を認めた。また、Mean \pm 2 S.D. との重複で見たところミオシン標準 0 濃度と、0.42 ng/ml との間で重複が見られなかった。

2) インキュベーション条件

インキュベーション温度を 22°C と一定にして、

インキュベーション時間をかえて反応させたところ、Fig. 3(A) の如く、インキュベーション時間 18 時間で最も高い B-Bo (cpm) が得られ、平行性を保ちながらインキュベーション時間を短くするほど B-Bo (cpm) も低くなる成績を得た。また、インキュベーション時間を 18 時間と一定にしてインキュベーション温度をかえて反応させたところ Fig. 3(B) の如く 22°C で最も高い B-Bo (cpm) が得られ、次いで 10°C, 4°C の順となり 37°C では最も低い B-Bo (cpm) であった。静置 (Stationary) して反応させた場合と、振盪 (Rotation) して反応させた場合につき標準曲線を比較したが Fig. 4 の如く、振盪反応で標準曲線 B-Bo (cpm) 低下するため、実際の測定では総て静置して反応させた。

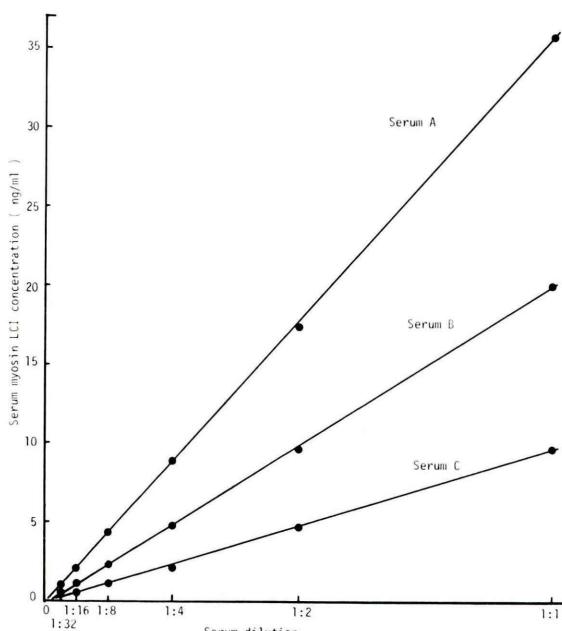
Table 1 Intraassay and interassay reproducibility of IRMA for serum myosin light chain I

(1) Intraassay reproducibility

Samples	n	Mean(ng/ml)	S.D.(ng/ml)	C.V.(%)
Serum A	5	5.1	0.13	2.6
Serum B	5	9.7	0.22	2.3
Serum C	5	20.4	0.32	1.6

(2) Interassay reproducibility

Samples	n	Mean(ng/ml)	S.D.(ng/ml)	C.V.(%)
Serum A	5	4.9	0.13	2.7
Serum B	5	10.8	0.67	6.2
Serum C	5	21.3	1.29	6.1

**Fig. 5** Dilution test of serum myosin light chain I measured by IRMA.

3) 精度両現性

Table 1 の如く、再現性の C.V. は同一測定内 ($n=5$) が血清 A で 2.6%, 血清 B で 2.3%, 血清 C で 1.6%, また、異なる 5 回の測定間が血清 A で 2.7%, 血清 B で 6.2%, 血清 C で 6.1% であった。

4) 希釈試験

希釈試験の結果を Fig. 5 に示す。いずれも 0

点に集束する直線が得られた。

5) 回収試験

回収試験の結果を Table 2 に示す。平均回収率は各々血清 A で 105.7%, 血清 B で 116.2%, 血清 C で 112.7% であった。

2. 臨床的検討

1) 健常人の血中ミオシン軽鎖 I 値

健常人 50 名の血中ミオシン軽鎖 I 値を Fig. 6 に示す。測定値は 0.42 ng/ml 以下から 2.2 ng/ml の範囲に分布し、50 名中 42 名 (84%) が 0.42 ng/ml 以下に分布した。

2) 心疾患における血中ミオシン軽鎖 I 値

心疾患 38 例における血中ミオシン軽鎖 I 値を Fig. 6 に示す。急性心筋梗塞 15 例での最高値 (maximum value) は 6.6 ng/ml から 88.3 ng/ml の範囲に分布し、平均 29.7 ng/ml であった。これに対し、陳旧性心筋梗塞 5 例では 0.42 ng/ml 以下から 3.5 ng/ml の範囲に分布し、5 例中 3 例で測定値が得られ、うち 1 例は 3.5 ng/ml であった。狭心症 10 例では 0.42 ng/ml 以下から 1.4 ng/ml の範囲を示し、10 例中 7 例 (70%) で 0.42 ng/ml 以下である。たゞ、心筋症 5 例では、0.42 ng/ml 以下から 1.1 ng/ml の範囲を示し、5 例中 4 例 (80%) が 0.42 ng/ml 以下であった。心臓弁膜症などその他の心疾患 3 例では全例が 0.42 ng/ml 以下であった。したがって、健常人および対照疾患群における成績を基にキット添付のミオシン標準液の最低

Table 2 Recovery test of myosin light chain I added to serum samples measured by IRMA

		Added myosin LCI (ng/ml)					Mean recovery (%)
		0	1.25	5.0	12.5	50.0	
Serum A	Measured(ng/ml)	5.8	6.9	10.9	19.5	67.4	
	Recovered(ng/ml)		1.1	5.1	13.7	61.6	
	Recovery(%)		88.0	102.0	109.6	123.2	105.7
Serum B	Measured(ng/ml)	10.7	12.0	16.8	24.9	73.2	
	Recovered(ng/ml)		1.3	6.1	14.2	62.5	
	Recovery(%)		104.0	122.0	113.6	125.0	116.2
Serum C	Measured(ng/ml)	18.8	19.9	24.8	33.7	80.6	
	Recovered(ng/ml)		1.1	6.0	14.9	61.8	
		88.0	120.0	119.2	123.6		112.7

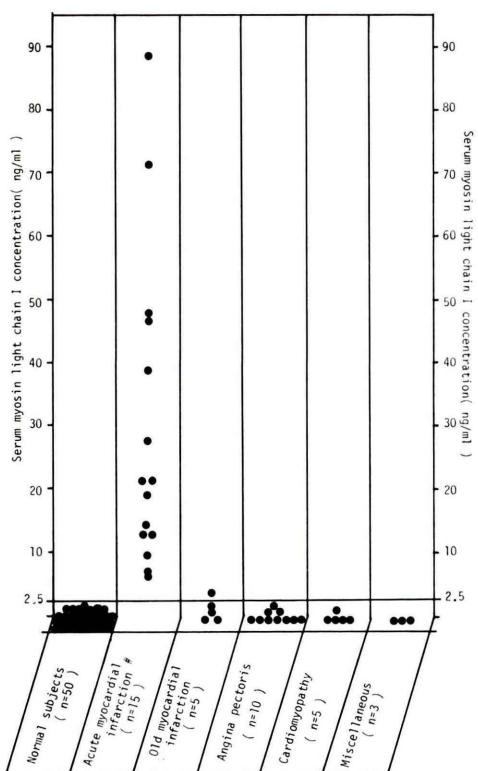


Fig. 6 Assay results of serum myosin light chain I in normal subjects and patients with myocardial diseases. (\$): maximum values.

濃度 2.5 ng/ml をカットオフ値とした。

3) 急性心筋梗塞の血中 CPK 値と血中ミオシン軽鎖 I 値

Figure 7 に示す如く、急性心筋梗塞での血中 CPK 値は、発作後 24 時間目を平均最高値として以後漸減し、1 週間でほぼ正常値 (30-120 IU/l) に復した。これに対し血中ミオシン軽鎖 I 値は、発作後 4 日目を平均最高値とし、2 週間目までカットオフ値以上を示し、以後漸減して正常値に復した。

IV. 考 察

心筋ミオシンは心筋細胞中に存在する構造蛋白で、分子量 (MW) 約 20 万の重鎖と、MW 約 2 万 8 千の軽鎖 I と MW 約 2 万の軽鎖 II から構成される¹⁾。心筋ミオシン軽鎖はミオシン分子からの解離が容易なため虚血等による細胞膜の障害で血中に放出されるが、血中でも比較的安定である¹⁾。従来、虚血による心筋障害の臨床検査的評価には、心筋細胞から血中へ漏出する GOT や CPK などの酵素を測定する方法が利用されてきた^{5,6)}。これら酵素は虚血により心筋細胞膜の透過性が亢進した場合でも血中に逸脱するため、必ずしも心筋細胞の崩壊過程を総て反映するものではないと指摘されてきた。1978 年 Trahern ら⁵⁾は急性心筋梗

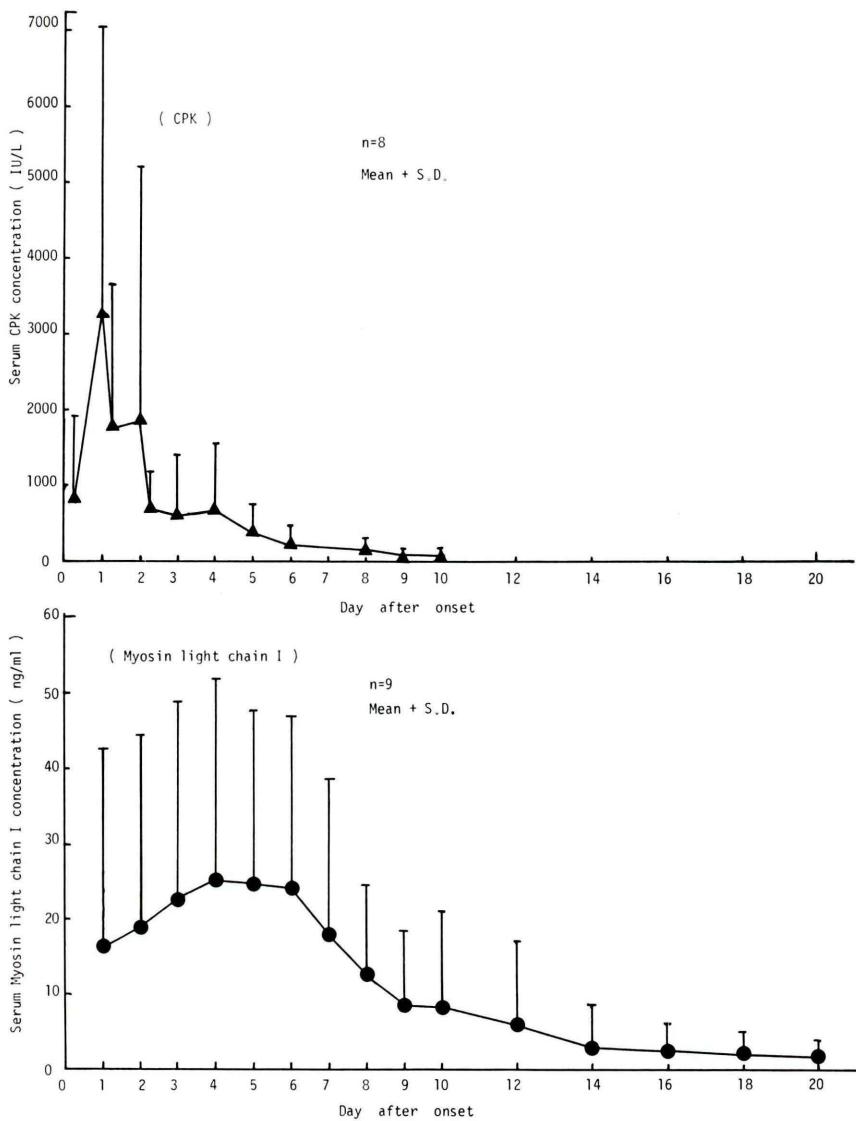


Fig. 7 Serial change of serum CPK and serum myosin light chain I in patients with acute myocardial infarction.

塞における血中ミオシン軽鎖測定の臨床的有用性を報告し、わが国でも Nagai ら^{3,4)}によりラジオイムノアッセイによる血中ミオシン軽鎖測定の臨床的意義が報告され注目された。今回、われわれが検討した測定法は、ヤマサ醤油株式会社が製造した two-site immunoradiometric assay (IRMA) 法である。試験管に抗ヒト心筋ミオシン軽鎖 I モノクローナル抗体を固相化し、被検血清と ¹²⁵I 標

識抗ヒト心筋ミオシン軽鎖 I モノクローナル抗体を加え、 $20 \pm 2^\circ\text{C}$ 、18 時間反応させ測定結果を得る手順となっている。インキュベーション温度については、今回の検討では 37°C では標準曲線の B-Bo (cpm) の低下が著しく、 4°C 、 10°C 、 22°C では、ほぼ同様の標準曲線が得られたが、B-Bo (cpm) でみると、僅かながら 22°C が最も高く、次いで 10°C 、 4°C の順であった。一方、インキュ

ベーション時間は、18時間で最も高い B-Bo (cpm) が得られ、標準曲線の平行性はほぼ保ちつつ、インキュベーション時間を短くする程 B-Bo (cpm) も低値となった。これらの成績は、本測定法における固相化抗体と標識抗体と抗原との間には抗原抗体反応を必要以上に促進させる条件下では逆に測定試験管壁から標識抗体が遊離することを意味し、本測定系では 22°C、18時間と言う比較的ゆるやかな反応条件下で最も良い B-Bo (cpm) が得られることが示唆された。ただ、どの条件下でも標準曲線の平行性は保たれていることから、測定時間はある程度短縮することは可能であると推測された。最小検出感度は、有意差検定法では 0.25 ng/ml であったが、ミオシン標準 0 濃度における Mean \pm 2 S.D. との重複で見ると 0.42 ng/ml が妥当だと考えられた。実際の臨床応用でのカットオフ値は、健常人 50 名における最高値が 2.2 ng/ml、また急性心筋梗塞や陳旧性心筋梗塞を除く対照疾患での最高値が 1.4 ng/ml であったことから、キット添付のミオシン標準液の最低濃度である 2.5 ng/ml が妥当だと考えられた。カットオフ値を 2.5 ng/ml として評価したところ、健常人 50 名、狭心症 10 例、心筋症 5 例、その他の心疾患 3 例で全例カットオフ値以下に分布し、陳旧性心筋梗塞 5 例中 1 例がカットオフ値以上であった。この 1 例は、時々胸痛発作が持続しており心電図所見と合わせ考察すると小規模で部分的な心筋壊死が断続的に続いているものと推測された。これに対し、急性心筋梗塞 15 例の最高値は全例で著しく高く(平均 29.7 ng/ml)、他の病態との区別が容易であった。特に血中 CPK 値が発作後 24 時間目を平均最高値とし、以後漸減するのに対し、血中ミオシン軽鎖 I 値は、発作後 4 日目を平均最高値とし、2 週間目まで平均値はカットオフ値以上を示した。この事から血中 CPK 値を急性心筋梗塞の評価に用いるためには、特異性の問題以外に発作後の採血時期が重要となるのに対し、血中ミオシン軽鎖 I 値は発作後の採血時期に時間的余裕が十分あり、心筋梗塞の臨床的評価法としてその活用は容易であると考えられた。本法は精度再現性、希釈試験、

回収試験など測定法に要求される諸条件をほぼ満足していることから測定法としてもすぐれたものであり、今後臨床検査法として活用されるものと期待される。

V. 結 語

1. 本法の最小検出感度は、有意差検定法で 0.25 ng/ml, Mean \pm 2 S.D. との重複で見ると 0.42 ng/ml とであった。
2. 本法のインキュベーション条件は、22°C、18時間で最も高い B-Bo (cpm) が得られた。
3. 本法におけるカットオフ値は、2.5 ng/ml が妥当と考えられた。
4. 本法による急性心筋梗塞での血中ミオシン軽鎖 I 値の最高値は 6.6~88.3 ng/ml(平均 29.7 ng/ml) であった。
5. 本法による急性心筋梗塞での平均血中ミオシン軽鎖 I 値は、発作後 4 日目で最大となり、発作後 2 週間目までカットオフ値以上を示した。

稿を終るにあたりミオシン LI キット「ヤマサ」の提供を受けた日本メジフィジックス株式会社に謝意を表する。

文 献

- 1) 矢崎義雄、永井良三：虚血による心筋障害——心筋細胞構築崩壊過程からの検討——. 医学のあゆみ, 122: 716-724, 1982
- 2) Trahern CA, Gere JB, Krauth GH, et al: Clinical assessment of serum myosin light chains in the diagnosis of acute myocardial infarction. Amer J Cardiol 41: 641-643, 1978
- 3) Nagai R, Ueda S, Yazaki Y: Radioimmunoassay of Cardiac myosin light chain II in the serum following experimental myocardial infarction. Bioch Biophys Res Comm 86: 683-688, 1979
- 4) 永井良三、矢崎義雄、小坂樹徳：ラジオイムノアッセイによる血中ヒト心筋ミオシン軽鎖 I の測定および急性心筋梗塞症における臨床的意義. 日本内科学会誌. 70: 16-22, 1981
- 5) LaDue JS, Wroblewski F, Karmen A: Serum glutamic-oxaloacetic transaminase activity in human acute transmural myocardial infarction. Science 120: 497-499, 1954
- 6) Serensen NS: Creatine phosphokinase in the diagnosis of myocardial infarction. Acta Med Scand 174: 725-734, 1963