

《ノート》

Immunoradiometric assay (IRMA) 法による ミオシン軽鎖 I 測定の臨床的意義と問題点

Clinical Evaluation of Immunoradiometric Assay for Serum Cardiac Myosin Light Chain I

中居 賢司* 中居 恵子* 伊藤 忠一* 菊池 正幸**
 中村 悟** 高橋 恒男*** 柳沢 融*** 鎌田 潤也****
 柴田 雅士**** 青木 英彦**** 平盛 勝彦****

Kenji NAKAI*, Keiko NAKAI*, Chuichi ITOH*, Masayuki KIKUCHI**,
 Satoru NAKAMURA**, Tsuneo TAKAHASHI***, Toru YANAGISAWA***,
 Junya KAMATA****, Masashi SHIBATA****, Hidehiko AOKI****
 and Katsuhiko HIRAMORI****

*Department of Clinical Pathology, **Central Laboratories, ***Radiology and
 ****The Second Department of Internal Medicine,
 Iwate Medical University, Morioka

I. はじめに

心筋ミオシンは重鎖(分子量 200 kDa)と 2 種類の軽鎖(軽鎖 I: 分子量 27 kDa, 軽鎖 II: 20 kDa)のサブユニット構造からなっている¹⁾。重鎖の尾部は α ヘリックス構造をとり, 2 本がコイル状に互いに絡み合っている。収縮に重要な ATPase 活性を有する頭部には, それぞれ一対の軽鎖 I と軽鎖 II が付着している。これらの軽鎖は構造タンパクとしては分子量が比較的小さく,

急性心筋梗塞症のような心筋壊死時に細胞内より容易に血中に流出すると考えられている^{2~4)}。

今回, 基礎的検討および健常者, 急性心筋梗塞症, 腎疾患例, 心筋症例の血清心筋ミオシン軽鎖 I を測定し, その臨床的意義および問題点を検討した。

II. 方法および材料

1. 方法および基礎的検討

1) 標準曲線

標準曲線は測定ごとに作成(10回)し, その平均土標準偏差を求め, 安定性と再現性を評価した。

2) 測定方法・条件

採血した検体は遠心分離したのち, 血清は一時 -20°C に凍結保存した。ミオシン軽鎖 I の測定

* 岩手医科大学臨床検査医学科

** 同 中央臨床検査部

*** 同 放射線科

**** 同 第二内科

受付: 2年12月26日

最終稿受付: 3年3月1日

別刷請求先: 盛岡市内丸19-1 (〒020)

岩手医科大学臨床検査医学科

中居 賢司

Key words: Cardiac myosin light chain I, IRMA, Acute myocardial infarction, Chronic renal failure.

にはミオシン LI キット(メジフィジックス社製)を用いた。測定原理は two-site immunoradiometric assay (IRMA) 法に基づく試験管固相法である。抗ヒト心筋ミオシン軽鎖 I モノクローナル抗体を内壁に被覆したチュウブに標準液又は血清サンプル 100 μ l を分注し、つづいて 200 μ l の 125 I で標識した別の抗ヒト心筋ミオシン軽鎖 I モノクローナル抗体を加えて混和後、20°C の恒温槽で 18 時間インキュベーションした。反応液を吸引除去後、蒸留水で 2 回洗浄しチュウブに含まれている 125 I をガンマカウンタで測定した。

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。

II. 臨床的検討

1) 健常人の血中ミオシン軽鎖 I 値

健常人 49 名を対象に血中ミオシン軽鎖 I 値を測

定した。年齢分布は 22 歳-50 歳(平均 33.5 歳)である。

2) 心疾患の血中ミオシン軽鎖 I 値

心疾患 47 例を対象に血中ミオシン軽鎖 I 値を測定した。その内訳は、急性心筋梗塞症 (AMI) 21 例、心筋梗塞症慢性期 (OMI) 10 例、弁膜症 (VALVE) 6 例、肥大型心筋症 (HCM) 5 例、拡張型心筋症 (DCM) 5 例である。なお、AMI では、血中ミオシン軽鎖 I 値の全測定値を、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) AMI の血中ミオシン軽鎖 I 値と血中 CK 値・臨床経過との比較

AMI で当院第 2 内科 CCU に入院した 21 例を対象に、9 日間可能な限り採血を行い、血中ミオシン軽鎖 I 値を測定した。同じ検体で血清 CK, CK-MB, GOT, LDH を同時に測定し、ミオシン軽鎖 I 値と比較した。AMI の臨床成績は Table 1 に示す。

Table 1 Summary clinical data in patients with AMI

No	Name	Age	DIAG	LOC	ICT	TIMI	MLCI	CK	GOT	LDH	BUN	CRNN	DVR	PROG	COM
1	GH	74	AMI	I	—	—	9.9	436	72	763	26	1.1	—	Alive	
2	YS	68	AMI	A	+	2	29.4	2,871	398	2,662	13	1.2	48.3	Alive	
3	KN	69	AMI	A	—	—	39.2	4,048	737	4,147	48	4	—	Alive	
4	TM	54	AMI	I	+	3	66.9	12,621	1,083	5,984	26	1.2	—	Alive	
5	TA	54	AMI	I	—	—	12.5	3,459	465	3,795	14	1	41.1	Alive	
6	FI	51	AMI	I	—	—	8.4	2,414	265	1,980	25	1.5	—	Alive	
7	NY	51	AMI	L	—	—	4.89	1,479	154	1,052	20	0.9	18.1	Alive	
8	TM	67	AMI	I	—	—	11.4	2,495	329	2,662	15	1	4.76	Alive	
9	IY	78	AMI	L	—	—	97.1	4,158	25	3,520	49	3.6	—	Alive	
10	KM	66	AMI	A	+	0	8.62	3,718	363	3,612	25	1.1	20.6	Alive	
11	SS	78	AMI	I	—	—	22.2	2,364	258	1,508	21	0.9	—	Alive	
12	CJ	74	AMI	I	—	—	17.1	625	78	800	35	1.9	18.9	Alive	
13	HT	79	AMI	I	—	—	10.3	179	95	762	27	1.6	—	Alive	
14	TY	79	AMI	I	+	3	12.4	2,388	250	1,319	33	1	—	Alive	
15	HR	63	AMI	L	—	—	4.17	743	98	659	24	0.9	1.37	Alive	
16	SK	67	AMI	non Q	—	—	13.9	335	49	857	17	1.2	—	Alive	
17	NY	62	AMI	L	—	—	14.9	305	38	531	28	1.6	41.9	Alive	
18	MW	75	AMI	I	+	0	48.6	735	114	832	78	7.8	—	Died	
19	TY	63	AMI	I	—	—	121	16,023	427	2,631	62	6.5	—	Died Rupture	
20	HM	72	AMI	A	+	1	42.3	846	432	2,592	38	2.6	—	Died Rupture	
21	FK	63	AMI	I	—	—	37	4,147	304	2,156	24	3	—	Died Shock	

LOC: location of MI, ICT: intra-coronary thrombolysis, TIMI: grade for thrombolysis in acute MI, MLC: myosin light chain I, DVR: defect volume ratio, PROG: prognosis, COM: etiology of death, I: inferior, A: anterior, L: lateral.

4) AMI の血中ミオシン軽鎖 I 最高値と慢性期梗塞サイズ

ミオシン軽鎖 I を経時的に測定し最高値を確認でき、慢性期に Thallium-201 心筋 SPECT を施行した 8 症例では、ミオシン軽鎖 I 最高値と梗塞サイズを比較した。Thallium-201 心筋 SPECT による心筋梗塞サイズは全心筋量に対する欠損部心筋量の比 (defect volume ratio, DVR)⁴⁾ として求めた。なお、梗塞領域の判定は正常者 10 例より作成した 960 領域の Thallium-201 RI プロファイルカーブの平均値-2 標準偏差以下とした。

5) 慢性腎不全症の血中ミオシン軽鎖 I 値

慢性腎不全症 (CRF) で血液透析中の 42 例を対象に血中ミオシン軽鎖 I 値を測定した。なお、CRF の血液透析前の BUN は $87.6 \pm 13.3 \text{ mg/dl}$ 、CRNN は $14.7 \pm 2.2 \text{ mg/dl}$ であった。

III. 結 果

1. 基礎的検討

1) 標準曲線、最小検出感度について

1. ミオシン標準液 2.5 ng/ml から 100 ng/ml までの範囲で、再現性の良い安定した標準曲線が得られた。最小検出感度は、ミオシン標準 0 濃度液と 0.35 ng/ml 液の間で、結合カウントに有意差 ($p < 0.05$) を認めた。

2. 3 濃度の患者血清を、5 回連続で測定した再現性の C. V. は血清 A で 4.9%，血清 B で 6%，血清 C で 3.7% であった。また異なる 3 濃度の血清を用いた 5 回の測定間の C. V. は血清 A で 7.4%，血清 B で 8.4%，血清 C で 9.5% であった。

2. 臨床的検討

1. 各疾患の血清ミオシン軽鎖 I 値を Fig. 1 に示す。NOR, CRF, AMI, OMI, VALVE, HCM, DCM の血清中ミオシン軽鎖 I 値はそれぞれ $0.16 \pm 0.31 \text{ ng/ml}$, $18.5 \pm 20.1 \text{ ng/ml}$, $25.5 \pm 21.9 \text{ ng/ml}$, $0.61 \pm 0.72 \text{ ng/ml}$, $0.18 \pm 0.45 \text{ ng/ml}$, $0.07 \pm 0.10 \text{ ng/ml}$, $1.81 \pm 2.88 \text{ ng/ml}$ であった。健常者の血清ミオシン軽鎖 I 値はいずれも 2.5 ng/ml 以下であった。AMI, 血液透析中の CRF の血清ミオシン軽鎖 I 値はいずれも 2.5 ng/ml 以上で、最高値は

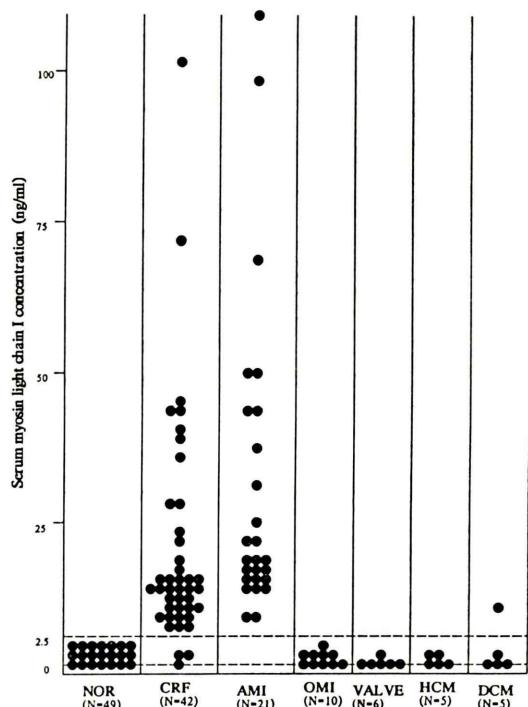


Fig. 1 Results of serum MLCI in normal subjects and patients with myocardial diseases. NOR: normal subjects, CRF: chronic renal failure, AMI: acute myocardial infarction, OMI: old myocardial infarction, VALVE: valve disease, HCM: hypertrophic cardiomyopathy, DCM: cardiomyopathy.

それぞれ 121 ng/ml , 104.9 ng/ml であった。また、NYHA IV 度の重症心不全で死亡した DCM の血清中ミオシン軽鎖 I 値は 6.7 ng/ml であった。

2. AMI の血清ミオシン軽鎖 I 値の経時的な変動を Fig. 2 に示す。AMI の血清ミオシン軽鎖 I 値は発作後 10~12 時間で 2.5 ng/ml 以上に上昇、2~4 日に最高値となり 6 日まで有意に高値を示した。AMI 生存群 (Fig. 2-A) 血清ミオシン軽鎖 I 値は 1 例を除き第 3 病日で 35 ng/ml 以下で、3 日以降次第に減少した。血清ミオシン軽鎖 I 値が継続して以後も上昇を示した 1 例は腎不全を合併した心不全例であった。AMI 死亡群 (死因は心不全 1 例、心破裂 2 例) (Fig. 2-B) の血清中ミオシン軽鎖 I 値は第 2~3 病日に 35 ng/ml 以上で、かつ上昇傾向にあった。死亡群 (症例 19, 20, 21)

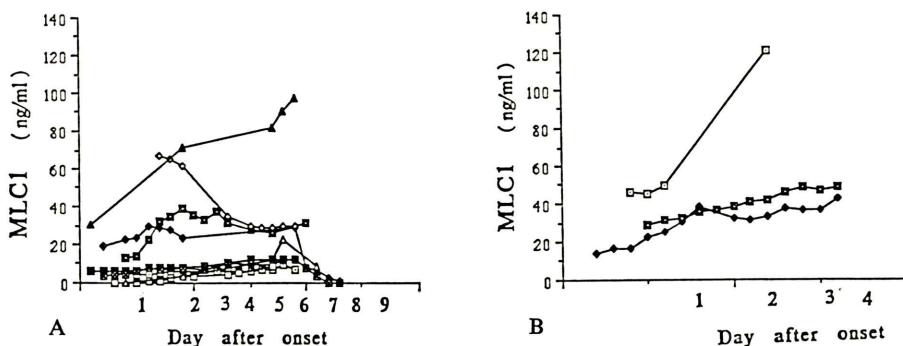


Fig. 2 Serial changes of serum MLCI in patients with acute myocardial infarction.
A: survival group, B: death group.

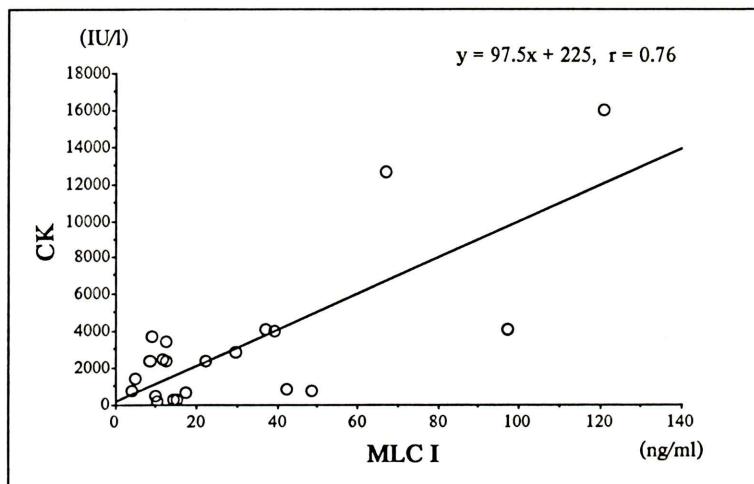


Fig. 3 Correlation between serum MLCI and CK in patients with acute myocardial infarction.

ではいずれも血清クレアチニン値は上昇しており、特に血清ミオシン軽鎖Iが121 mg/mlと高値を示した症例のクレアチニン値は6.5 mg/dlと高値を示した。

3. AMIにおいて血清ミオシン軽鎖I最高値とCK最高値との相関は $y=97.5x+225$ ($r=0.76$)であった(Fig. 3)。CK値がかけ離れて高値を示したのは2例(症例4, 20)あり、症例4は冠動脈内血栓溶解療法で再灌流(TIMI分類3)が得られた例、症例20は心不全を合併し第2病日に心破裂で死亡した例である。

4. AMIの血清ミオシン軽鎖I最高値とThallium-201心筋SPECTより求めた心筋梗塞量(DVR)との相関は $y=1.5x+4.7$ ($r=0.7$)であった(Fig. 4)。これらの症例の血清クレアチニン値は1例を除き1.6 mg/dl以下であった。

IV. 考 察

心筋梗塞症の生化学的診断や重症度の判定には血清CK-MB, CK, GOT等が広く用いられている。しかしAMI時の血中CK値の変動は速やかであり、最高値を捕えるためには数時間ごとの採

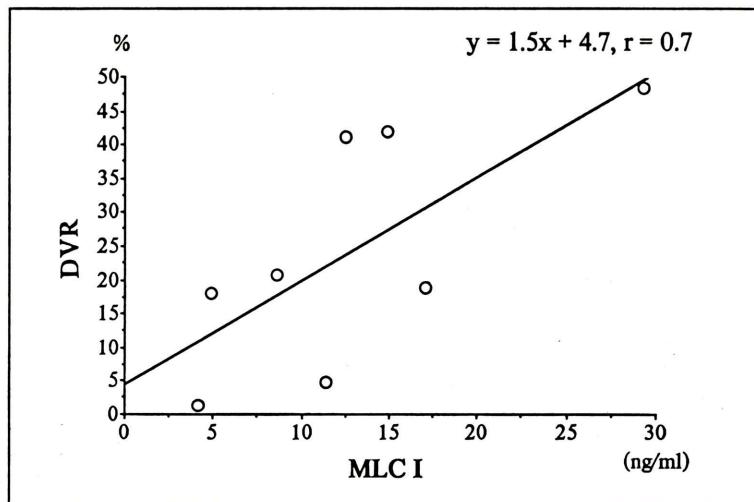


Fig. 4 Correlation between serum MLC I and the size of myocardial infarction estimated by Thallium-201 myocardial SPECT. DVR: defect volume ratio.

血が必要となり、患者の負担も少なくない。またAMIの治療法として冠動脈内血栓溶解療法が導入されるに伴い、再灌流によるCKが洗いだし効果をうけ梗塞量とは相関しなくなることが指摘されている。

一方、ミオシン軽鎖は心筋に特異的な構造蛋白であることから、骨格筋にも多量に含まれるCKやミオグロビンと異なり、その流出量は心筋細胞の崩壊の経過を直接反映するものと見られている。永井ら^{4,6,7)}は心筋ミオシン軽鎖をポリクローナル抗体を用いたラジオイムノアッセイで測定し、AMIでの意義と有用性について、(1)ミオシン軽鎖の血中からの消失は半減期が約4.5時間と速やかであることから、梗塞後血清中ミオシン軽鎖が長時間高値を続ける理由は、ミオシン軽鎖が梗塞部心筋の筋原纖維より持続的に流出を続けるためである、(2)血清ミオシン軽鎖の最高値は実験的な心筋梗塞の大きさと相関する、(3)冠動脈再灌流の影響を受けないと報告している。

近年、抗ヒト心筋ミオシン軽鎖Iに対するモノクローナル抗体と、ブタ心筋より抽出したミオシン軽鎖Iを用いる簡便な測定キットが開発された^{8,9)}。今回用いた測定法は、このモノクローナ

ル抗体と、ブタ心筋より抽出したミオシン軽鎖Iを用いるtwo-site immunoradiometric assay (IRMA)である。末広ら¹⁰⁾はIRMAによる血清ミオシン軽鎖I測定に関する基礎的検討を行い、本測定系では22°C、18時間という比較的緩やかな反応条件下で最も良い標準曲線が得られたと報告している。著者らは20°C、18時間の反応条件下で測定を行い、ミオシン軽鎖I測定値の直線性、再現性、検体保存による安定性などの基礎的な検討では良好な結果が得られた。NOR、OMI、VALVE、HCMの血清ミオシン軽鎖I値はいずれも2.5 ng/mlであり、本測定法で報告⁷⁾されているカットオフ値2.5 mg/mlは妥当と考えられた。AMI生存群の血清ミオシン軽鎖I値は1例を除き梗塞後6~12時間以降に上昇、2~4日目にピーク(1例を除き35 ng/ml以下)を有した後、次第に減少し7~14日で正常化した。一方、AMI死亡例の血清ミオシン軽鎖I値は第2病日で35 ng/ml以上の高値を示し、かつAMI発症2~3日目以降も上昇傾向を示した。以上のことから血清ミオシン軽鎖I値が35 ng/ml以上で、かつ第2~4病日で上昇傾向にある症例の予後には注意を要すると考えられた。また、冠動脈内血栓溶解療法

で再灌流が得られた例(症例4)では、CK値がかけ離れて上昇しており、CK値は梗塞量と相関しなくなると考えられた。

血清MLCI値は慢性期にThallium-201心筋SPECTで算出した梗塞量とおおよそ相関していた。明らかな腎不全のない症例において、血清ミオシン軽鎖I値35ng/mlは40%前後の梗塞量を反映していると考えられた。また、重症心不全を呈し死亡したDCM例の血清中のミオシン軽鎖I値が有意に上昇を示したことは、DCMの病態の進行および予後を考えるうえでも興味深い。一部の不安定狭心症や心筋炎でも血清ミオシン軽鎖I値は軽度上昇するとの報告もあり、その意義については今後さらに検討を要しよう。

以上のような有用性がある一方で、血清ミオシン軽鎖I測定にはいくつかの注意すべき点もある。血液透析中の慢性腎不全患者の血清中ミオシン軽鎖I値は高値(18.5 ± 20.1 ng/ml)を示した。AMI生存群で血清ミオシン軽鎖Iが上昇傾向であった1例は経過中、腎機能障害を伴っていた。AMI死亡例でも血清中ミオシン軽鎖I値が著明に上昇した症例では腎不全を合併していた。腎不全が存在すると、血清中ミオシン軽鎖I値は心筋細胞崩壊を正確に反映しないと考えられる。ミオシン軽鎖Iの血中からの消失には腎からの排泄あるいは腎における分解が関与していると考えられているが、腎不全時の血清中ミオシン軽鎖I高値の機序は不明であり、現在検討中である¹¹⁾。また、本assayは骨格筋由来のミオシン軽鎖と10~16%の交叉反応が見られ、多発性筋炎、筋ジストロフィー症などの高度の骨格筋障害時に有意の高値⁷⁾を示す可能性もあり注意を要する。

V. 結語

IRMA法によるミオシン軽鎖I測定の臨床的意義と問題点について報告した。

1. AMI死亡群の血清ミオシン軽鎖I値は1例を除き第2~3病日で35ng/ml以上で、かつ上昇傾向にあった。

2. AMIの血清ミオシン軽鎖I最高値とThal-

lium-201心筋SPECTより求めた心梗塞量との相関は $y = 1.5x + 4.7$ ($r = 0.7$) であった。

- 重症心不全を呈し死亡したDCM例の血清ミオシン軽鎖Iは6.7ng/mlであった。
- 血液透析中のCRF例の血清ミオシン軽鎖Iは 18.5 ± 20.1 ng/mlと高値であり、腎不全が存在する例ではその解釈に注意を要する。

文献

- Weed AG, Pope B: Chemical studies on light chains from cardiac and skeletal muscle myosin. *Nature* **234**: 85-88, 1971
- 矢崎義雄、永井良三:虚血による心筋傷害——心筋細胞構築崩壊課程からの検討——. *医学のあゆみ* **122**: 716-724, 1982
- Trahern CA, Gere JB, Krath GH, et al: Clinical assessment of serum myosin light chain in the diagnosis of acute myocardial infarction. *Amer J Cardiol* **41**: 641-643, 1978
- 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
- 中居賢司、伊藤忠一、盛合直樹、他:Thallium-201心筋SPECTによる梗塞サイズ—心室遅延電位発生と空間分布との関連—. *核医学* **27**: 593-598, 1990
- Nagai R, Ueda S, Yazaki Y, et al: Assessment of myocardial infarct size by serial changes in serum cardiac myosin light chain II in dogs. *Jpn Circ J* **45**: 661-666, 1981
- Isobe M, Nagai R, Yazaki Y, et al: Quantitative relationship between serum cardiac myosin light chain I levels and left ventricular function after acute myocardial infarction treated with coronary reperfusion. *Circulation* **70** supple: II- 153, 1984.
- 高久史磨、矢崎義雄、永井良三、他:モノクローナル抗体を用いた心筋ミオシン軽鎖Iの測定キットの開発と急性心筋梗塞症におけるその臨床的意義. *最新医学* **44**: 1708-1718, 1989
- 磯部光章、永井良三、矢崎義雄、他:心筋梗塞の診断—ミオシン軽鎖測定の意義. *診断と治療* **74**: 1716-1720, 1986
- 末広美津子、成瀬均、福田容子、他:IRMA法による血中ミオシン軽鎖Iの測定に関する基礎的ならびに臨床的検討. *核医学* **27**: 1183-1190, 1990
- 中居恵子、中居賢司、伊藤忠一、他:EIAによる心筋ミオシン軽鎖Iの測定と臨床的意義—特に腎不全における変動について—. *臨床病理* **38**: 191, 1990