

# 化学発光免疫測定法による乾燥濾紙血液クレアチンキナーゼMBの測定とDuchenne型筋ジストロフィ症のスクリーニングへの応用

福士 勝 菊地由生子 高杉 信男 藤枝 憲二\*

## 要 旨

乾燥濾紙血液クレアチンキナーゼMBの化学発光免疫測定法による基礎的検討を行い、測定感度、測定範囲、再現性、血清との相関等いずれもで良好な成績が得られた。乾燥濾紙血液CKMBは室温で4週間の保存で90%以上が残存しており安定であった。本法による健常新生児、乳児、幼児、学童、成人のCKMB値は、新生児期の20ng/mlから成人での1ng/mlまで漸減したが、Duchenne型筋ジストロフィ症患者9例では新生児から成人のいずれも異常高値を示した。乾燥濾紙血液CKMBの測定によりDuchenne型筋ジストロフィ症のスクリーニングが可能である。

## 1. 緒 言

Duchenne型筋ジストロフィ症(DMD)はX染色体に連鎖した伴性劣性遺伝疾患であり、骨格筋繊維破壊を主病変とする進行性筋ジストロフィ症の中でも特に進行が早く極めて重症であるが、有効な治療法は確立されていない。本症は筋ジストロフィ症の中では最も多く約70%を占め、わが国の発生頻度は出生男児10万人当たり約20人と高頻度であり<sup>1)</sup>欧米の報告とほぼ同じである。DMDの診断は発症時期、筋の脱力、血清クレアチンキナーゼ(CK, EC 2. 7. 3. 2)活性の上昇、筋電図、筋生検による典型的な組織像などの臨床所見によって比較的容易であるが、その発症年齢と診断年齢の平均はそれぞれ3.7歳と6.4歳と遅く<sup>2)</sup>、早期遺伝相談による二次患者の発生子防は難しい。しかし、DMDでは無症状の新生児期に既にCK活性が正常新生児の50-200倍に増加することから、新生児の乾燥濾紙血液を用いる生物発光法によるCK活性の測定法が開発されドイツ、フランス、カナダ、イギリスにおいて地域的及びハイリスクを対象としたスクリーニングに応用され、早期遺伝相談による2

次患者の発生子防対策がとられている<sup>3,4,5,6,7)</sup>。一方、CKのアイソエンザイムはCKMM, CKMB, CKBBの3種類に分類されるが、急性心筋梗塞の診断に有用であるCKMBはDMD等の骨格筋疾患でも増加することが知られている<sup>8,9,10)</sup>。そこでモノクローナル抗CKMB抗体を用いる高感度化学発光免疫測定法<sup>11)</sup>による乾燥濾紙血液CKMBの測定法を検討するとともに、DMDのスクリーニングへの応用の可能性についても検討したので報告する。

## 2. 方 法

### 2-1 対 象

血清と乾燥濾紙血液でのCKMB相関を求めるため正常成人8名と正常新生児12名から採血し、一部を50 $\mu$ lずつスクリーニング用濾紙(東洋濾紙株式会社製)にスポットし、残りを血清として分離し測定時まで-20°Cで保存した。さらに、正常値を求めるため生後5-7日と生後1カ月の男児と女児それぞれ30名、6カ月児7名、1歳児4名、3歳児4名、6歳児4名、成人男性と女性それぞれ15名の乾燥濾紙血液のサンプリングも行った。患者の乾

\*北海道大学医学部小児科

乾燥濾紙血液は新生児2名、4カ月児1名、6カ月児1名、2歳児1名、4歳児2名、10歳児1名、成人女性1名の合計9名を対象とした。

### 2-2 試薬

血清及び乾燥濾紙血液CKMBの測定はアクリジニウムエステル標識抗CKMBモノクローナル抗体、抗CKBBモノクローナル抗体結合鉄微粒子からなる化学発光免疫測定法試薬であるマジックライトCKMBキット(チバコーニング社製)を用いた。

### 2-3 標準CKMB

血清CKMB測定時の標準CKMBはキット添付の2ポイント標準溶液と10ポイント標準溶液の両者を用いたが同じ結果が得られたので2ポイント標準溶液とした。乾燥濾紙血液CKMB測定では10ポイントの血清標準CKMBに等量の洗浄赤血球を加えて、スクリーニング用濾紙に50 $\mu$ lずつスポットし乾燥後使用時まで-20 $^{\circ}$ Cで保存した。

### 2-4 測定装置

化学発光の測定にはマジックライトアナライザーII(チバコーニング社製)を用いた。

### 2-5 測定方法

血清CKMBの測定はキットの指示書に従って行った。乾燥濾紙血液CKMBの測定は血清測定法を改良して行った。すなわち、マイクロプレートのウェルに直径4.5mmディスク1枚を抜き取り、0.01M 磷酸緩衝液(pH7.2, PBS)を100 $\mu$ l加えて振とうしながら室温で2時間溶出する。溶出液75 $\mu$ lをポリスチレン試験管に取り、標識抗CKMB抗体20 $\mu$ lと抗CKBB抗体結合鉄微粒子100 $\mu$ lを加えて室温で3時間抗原抗体反応を行う。洗浄操作として1mlの精製水を各試験管に分注し磁気分離板(チバコーニング社製)にセットして3分間放置後上清を捨てる。この操作を再度繰り返して、最後に100 $\mu$ lの精製水を分注し、発光測定装置にて発光強度を測定した。

## 3. 結果

### 3-1 乾燥濾紙血液からのCKMBの溶出時間の検討

CKMBが0ng/mlと90ng/mlの乾燥濾紙血液にPBSを加えて、30分、1、2、3時間の振とう溶出を行ったところ、いずれの濃度でも30分では発光強度が他の90%であったが、1、2、3時間ではほぼ一定の発光強度が得られたことから以降の溶出時間は2時間とした(図1)。

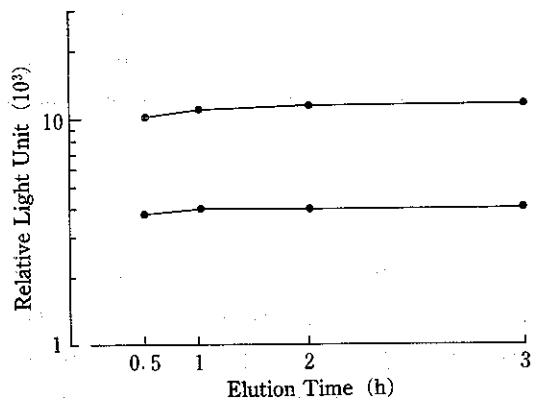


図1 乾燥濾紙血液からの溶出時間による発光強度の変化

### 3-2 試薬量と抗原抗体反応時間の検討

標識抗CKMB抗体と鉄微粒子結合抗CKBB抗体量をそれぞれ20 $\mu$ l-100 $\mu$ l, 50 $\mu$ l-250 $\mu$ l, 100 $\mu$ l-500 $\mu$ lの組み合わせで3時間インキュベートすると、試薬量の増加とともに発光強度は増加したが、測定感度には変化を認めなかった。しかし、抗原抗体反応時間を30分、1、2、3時間と変えると、時間とともに発光強度は増加し測定感度も上昇したことから(図2a, b)、試薬量は標識抗CKMB抗体と鉄微粒子結合抗CKBB抗体量をそれぞれ20 $\mu$ l-100 $\mu$ lとし、抗原抗体反応時間3時間とした。

### 3-3 再現性

2濃度のCKMB乾燥濾紙血液から求めた本法の測定内変動係数と測定間変動係数は、それぞれ8.6%-12%、12.1%-19.2%であった(表1)。

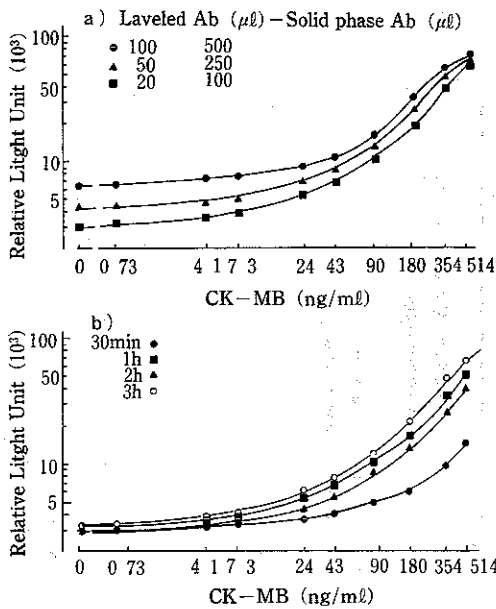


図2 反応溶液量 (a)および反応時間の変化 (b) による測定感度の変化

表1 化学発光免疫測定法による乾燥濾紙血液 CKMB測定の再現性

	平均値±標準偏差	変動係数(%)
測定内変動		
検体-1	8.4 ± 1.0	12.0
検体-2	53.8 ± 4.6	8.6
測定間変動		
検体-3	7.1 ± 1.4	19.2
検体-4	47.9 ± 5.8	12.1

### 3-4 希釈試験

CKMBが140ng/mlと330ng/mlの乾燥濾紙血液での希釈試験では8倍希釈まで直線性を示した(図3)。

### 3-5 血清測定値と乾燥濾紙血液測定値との相関

成人及び新生児検体20例での血清CKMBと乾燥濾紙血液CKMBの相関係数は $r = 0.9498$ と有意な相関関係が得られ ( $p < 0.001$ ), 回帰式も $Y$  (乾燥

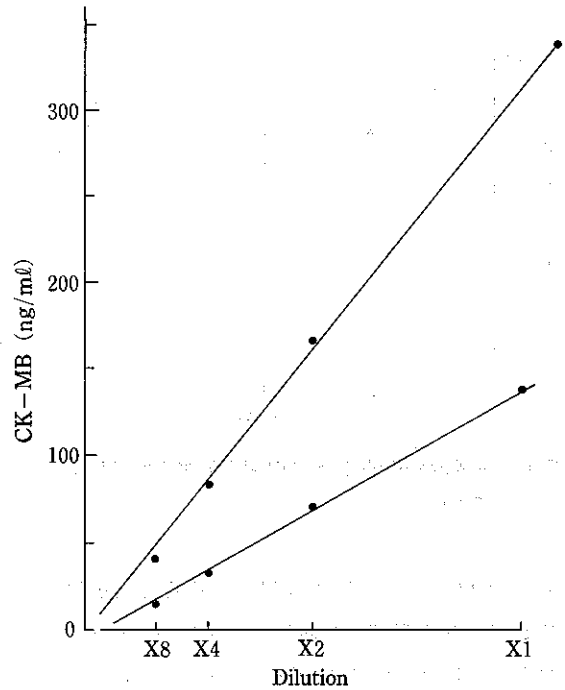


図3 希釈試験

濾紙血液) =  $0.8996 + 1.0465X$  (血清) と1:1の関係が得られた(図4)。

### 3-6 乾燥濾紙血液CKMBの保存安定性

CKMBが8.3ng/mlと47.1ng/mlの乾燥濾紙血液を $-20^{\circ}\text{C}$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ ,  $25^{\circ}\text{C}$ ,  $37^{\circ}\text{C}$ で4週間保存する

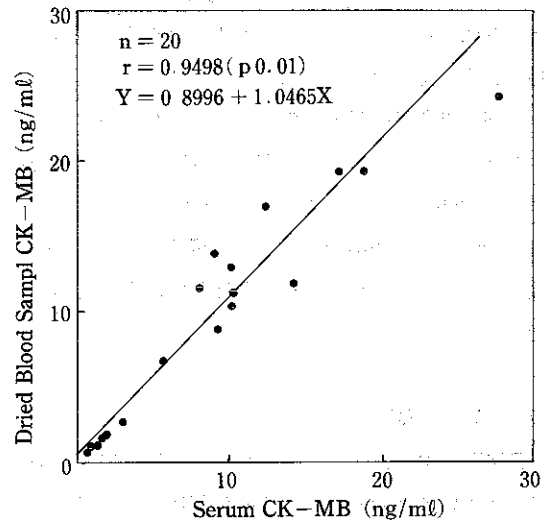


図4 血清CKMBと乾燥濾紙血液CKMBの相関

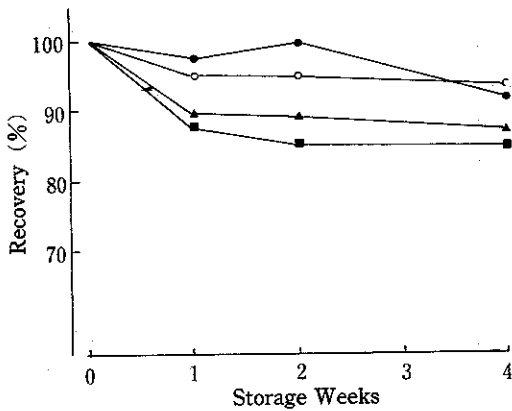


図5 乾燥濾紙血液CKMBの保存温度と時間による安定性

と、 $-20^{\circ}\text{C}$ と $4^{\circ}\text{C}$ では95%以上、 $25^{\circ}\text{C}$ では90%、 $37^{\circ}\text{C}$ で85%が残存しており、いずれの温度でも1週間目と4週間目ではほぼ一定であった(図5)。

### 3-7 CKMBの正常値とDMD患者のCKMB値

日齢5日から7日の正常新生児では男児が $20.5 \pm 11.4 \text{ ng/ml}$ 、女児が $20.2 \pm 10.4 \text{ ng/ml}$ と性差は認められなかった。しかし生後1カ月では $7.0 \pm 4.2 \text{ ng/ml}$ と有意に低下しており( $p < 0.001$ )、6カ月、1歳、3歳、6歳、と年齢とともにさらに低下し、成人では男性で $1.4 \pm 0.9 \text{ ng/ml}$ 、女性で $1.0 \pm 0.8 \text{ ng/ml}$ となった。また新生児と成人いずれも性差による違いは認められなかった。

DMD患者では新生児期ですでに $106, 130 \text{ ng/ml}$ と高値を示しており、4カ月児で $139 \text{ ng/ml}$ 、6カ月児で $300 \text{ ng/ml}$ 、2歳児で $53.1 \text{ ng/ml}$ 、4歳児で $16.1 \text{ ng/ml}$ と $500 \text{ ng/ml}$ 以上、10歳児で $98 \text{ ng/ml}$ 、成人女性で $50.8 \text{ ng/ml}$ といずれも異常高値を示した(図6)。

## 4. 考 察

DMDのマススクリーニングとしては乾燥濾紙血液の総CK活性の測定が、その簡便性と高感度のことから広く用いられている。その測定原理はクレア

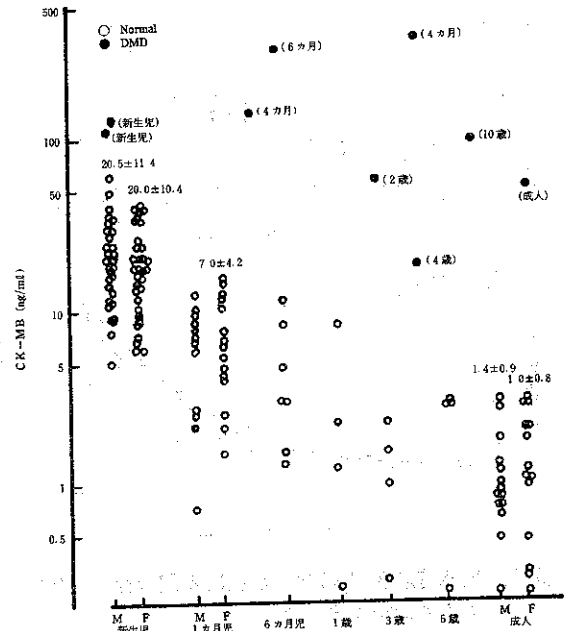


図6 正常新生児、乳児、幼児、成人のCKMB値と患者のCKMB値

チンリン酸とADP(アデノシン三リン酸)からCKによって生成されるATP(アデノシン三リン酸)をルシフェリン-ルシフェラーゼ系からの発光強度をKinetic testにより定量するものである<sup>2,3,4</sup>)。DMDでは出生直後に既にCK活性が高値を示し、保因者でも生後数週間でCK活性が高値となるが、CKは非常に不安定な酵素であり、その活性は保存温度、湿度、光の影響により時間とともに急速に減少する<sup>12</sup>)。さらに、総CK活性は分娩直後に一過性の上昇があり新生児期のマススクリーニングの偽陽性が多くなることが指摘されている。一方、正常人血清中に存在するCKのアイソエンザイムは大部分がCKMMであり、CKMBとCKBBは微量であることから、血中でのCKMBとCKBBの増加は直ちにある種の病態を意味する。特にCKMB活性は総CK活性よりもさらにDMDの鑑別診断上特異性の上から優れているとされている。CKMBの定量は従来電気泳動法や免疫阻害法<sup>13</sup>)によりその活性

の測定が行われていたが、最近酵素免疫測定法<sup>14,15)</sup>や化学発光免疫測定法<sup>11)</sup>が開発され、CKMBが酵素活性ではなく免疫学的な方法により蛋白量として直接測定可能となった。しかも酵素活性を測定するよりも免疫学的な方法で蛋白質量として測定する方が、妨害物質の影響を受けず、保存安定性が良いことも明らかとなりその有用性が認められている<sup>16,17)</sup>。

そこで今回、乾燥濾紙血液CKMBの化学発光免疫測定法による基礎的検討を行ったところ、直径4.5mmの乾燥濾紙血液1枚で検出感度は1ng/ml、測定範囲も500ng/mlと血清による測定法とほぼ同等であり、再現性にも優れ、同一例における血清と乾燥濾紙血液のCKMB値は一致し相関係数0.9498と良好な相関関係が得られたことから、マススクリーニングの検査法として十分満足できるものであった。さらに、CKMBの安定性は室温で4週間の保存では総CK活性の25%の減少<sup>18)</sup>に対して10%以下の減少であり、スクリーニングの指標としてCKMBの方が優れていた。本法により得られた新生児及び成人のCKMBはそれぞれ20ng/mlと1ng/mlで従来の報告<sup>15)</sup>と一致しており、DMD患者の検体においても新生児から成人の9例で全例正常群と比較して異常高値となったことからDMDのスクリーニングの指標として感度と特異度に優れていることが確認された。

以上のことから新生児乾燥濾紙血液を用いるDMDの早期発見を目的としたマススクリーニングは技術的には可能である。スクリーニングの実施により早期遺伝相談による第2子以下での本症の発生子防と、患者と家族に対する医師、パラメディカルスタッフによる早期の支援が可能となる。さらにDMD患者の両親の80-90%が早期診断を望んでいる<sup>19)</sup>ことから本疾患の新生児スクリーニングは重要である。ただし、現状ではDMDの有効な治療法も発症予防法もなく、発症前の早期診断と告知は家族に強い不安を与え、偽陽性者の精査診断にかか

わる本人と家族の負担も大きいことから本疾患のスクリーニングに反対する意見もあることは事実である。しかし、最近遺伝子工学的手法によりDMD遺伝子の完全クローニングとその遺伝子産物蛋白質であるジストロフィンも同定され<sup>20,21,22)</sup>、DNAレベルでの診断と蛋白質レベルでの診断が可能となり、類似疾患との鑑別診断法や治療法が検討されていることから、スクリーニング実施のための環境が整いつつある。

DMDのマススクリーニングとしては現行のフェニルケトン尿症やクレチン症の新生児マススクリーニングに組み込むのが最も効率的であるが、当面は保健所における1歳6カ月健診において歩行が遅れている児を対象としたり、ハイリスク児を対象として行い、スクリーニング機関、精査診療機関、リハビリテーション施設、遺伝相談施設等の連携体制を構築し、社会的なコンセンサスを得て新生児マススクリーニングのシステムを作って行かなければならないと考える。

## 5. 結 語

化学発光免疫測定法による乾燥濾紙血液CKMBの高感度測定が可能であり、さらにCKMBはDMDのマススクリーニングの指標として感度と特異度に優れていることから、これまでの総CK活性測定に変えて新生児マススクリーニングに応用可能である。

## 6. 文 献

- 1) 近藤喜代太郎：神経進歩，24，693-701，1980.
- 2) 椿 忠雄，他：筋ジストロフィ症の疫学，臨床および治療に関する研究，昭和57年報告書，4-15，1983.
- 3) Zellweger, H., et al : Pediatrics, 55, 30-34, 1975.
- 4) Lundin, A., et al : Clin. Chem., 28, 609-614, 1982

- 5) Dellamonica, C., et al : Clin. Chem., **29**, 161—163, 1983.
- 6) Scheuerbrandt, G., et al : Muscle & Nerve, **9**, 11—23, 1986.
- 7) Jacobs, K. H. & Cameron, I. A. : In Terrell, B. L. Jr. (Eds), Advances in Neonatal Screening, 367—372, Elsevier Science Publisher B. V. (Amsterdam), 1986
- 8) Lemieux, B., et al : In Terrell, B. L. Jr. (Eds), Advances in Neonatal Screening, 355—360, Elsevier Science Publisher B. V. (Amsterdam), 1986.
- 9) Goto, I. : Arch. Neurol., **31**, 116—119, 1974.
- 10) Somer, H., et al : J. Neurol. Sci., **29**, 129—136, 1976.
- 11) Takahashi, K., et al : Clin. Chim. Acta, **75**, 435—443, 1977.
- 12) Piran, U., et al : Clin. Chem., **33**, 1517—1520, 1987.
- 13) Dunphy, G. & Ely, D. : Clin. Chem., **36**, 778—780, 1990.
- 14) Neumeier, C., et al : Clin. Chim. Acta, **73**, 445—451, 1976.
- 15) Koch, T. R., et al : Clin. Chem., **32**, 186—191, 1986.
- 16) Kato, K. & Shimizu, A. : Clin. Chim. Acta, **158**, 99—108, 1986.
- 17) 杉山 弘, 他 : 臨床検査機器試薬, **12**, 411—418, 1989.
- 18) 森脇貴美, 他 : 臨床検査機器試薬, **12**, 598—604, 1989.
- 19) Firth, M. & Wilkinson, E. J. : Br. Med. J., **286**, 1933—1934, 1983.
- 20) Koenig, M., et al : Cell, **50**, 509—517, 1987
- 21) Hoffman, E. P., et al : Cell, **51**, 919—928, 1987.
- 22) Koenig, M., et al : Cell, **53**, 219—228, 1988.

# Immunochemiluminometric Assay of Creatine Kinase MB in Dried Blood Samples on Filter Paper and Its Application to Neonatal Duchenne Muscular Dystrophy

Masaru Fukushi, Yuko Kikuchi, Nobuo Takasugi and Kenji Fujieda\*

## ABSTRACT

A immunochemiluminometric assay for creatine kinase MB(CKMB) in dried blood samples spotted on filter paper was developed.

This assay was rapid and highly sensitive and also results obtained from dried blood samples correlated well with those obtained from serum. The reference interval for healthy newborn babies and adults were 5.9–61.8ng/ml and 0.2–2.9g/ml, respectively. The values for CKMB from patients with Duchenne muscular dystorophy(DMD) always exceeded the reference interval. These results demonstrate that this method will be able to adopt to screening for DMD.

\* Department of Pediatrics, Hokkaido University School of Medicine