

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4455767号
(P4455767)

(45) 発行日 平成22年4月21日 (2010. 4. 21)

(24) 登録日 平成22年2月12日 (2010. 2. 12)

(51) Int. Cl.

F 1

GO 1 N 33/573 (2006. 01)

GO 1 N 33/573

B

請求項の数 8 (全 16 頁)

(21) 出願番号	特願2000-595158 (P2000-595158)	(73) 特許権者	390014960
(86) (22) 出願日	平成12年1月18日 (2000. 1. 18)		シスメックス株式会社
(86) 国際出願番号	PCT/JP2000/000195		兵庫県神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番
(87) 国際公開番号	W02000/043788		1号
(87) 国際公開日	平成12年7月27日 (2000. 7. 27)	(74) 代理人	100088904
審査請求日	平成19年1月9日 (2007. 1. 9)		弁理士 庄司 隆
(31) 優先権主張番号	特願平11-10624	(72) 発明者	白波瀬 泰史
(32) 優先日	平成11年1月19日 (1999. 1. 19)		兵庫県神戸市西区室谷1丁目1-2
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		国際試薬株式会社 研究開
			発センター内
		(72) 発明者	梶田 忠宏
			兵庫県神戸市西区室谷1丁目1-2
			国際試薬株式会社 研究開
			発センター内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 クレアチンキナーゼアイソザイム活性測定法および測定試薬

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

免疫阻害法によりクレアチンキナーゼ (CK) アイソザイムの酵素活性を測定する方法であって、クレアチンキナーゼ M (CK-M) サブユニットに対する阻害抗体およびミトコンドリア局在クレアチンキナーゼアイソザイム (mCK) に対する阻害抗体を用いて検体を処理し、処理された検体中の残存する CK 活性を測定し、測定された CK 活性に基づいてクレアチンキナーゼ MB アイソザイム (CK-MB) の活性を求めることを特徴とするクレアチンキナーゼ MB アイソザイム (CK-MB) 活性測定法。

【請求項 2】

CK-M サブユニットに対する阻害抗体および mCK に対する阻害抗体を含む CK 活性測定用試薬を検体に添加することによって、検体を処理する請求項 1 の CK-MB 活性測定法。

10

【請求項 3】

CK-M サブユニットに対する阻害抗体および mCK に対する阻害抗体を一つの工程で同時に作用させる請求項 1 の CK-MB 活性測定法。

【請求項 4】

mCK に対する阻害抗体と CK-M サブユニットに対する阻害抗体とを、別々の工程において作用させる請求項 1 の CK-MB 活性測定法。

【請求項 5】

CK-M サブユニットに対する阻害抗体を用いて検体に第一の処理を施し、mCK に対す

20

る阻害抗体を用いて第一処理された検体に第二の処理を施し、第二処理された検体中の残存するＣＫ活性を測定する請求項４のＣＫ－ＭＢ活性測定法。

【請求項６】

免疫阻害法によりクレアチンキナーゼＭＢアイソザイム（ＣＫ－ＭＢ）の酵素活性を測定するための試薬であって、クレアチンキナーゼＭ（ＣＫ－Ｍ）サブユニットに対する阻害抗体およびミトコンドリア局在クレアチンキナーゼアイソザイム（ｍＣＫ）に対する阻害抗体を含むことを特徴とするＣＫ－ＭＢ活性測定試薬。

【請求項７】

前記ｍＣＫに対する阻害抗体が、サルコメリックｍＣＫ（ｓｍＣＫ）およびユビキタスｍＣＫ（ｕｍＣＫ）から選択される少なくとも１つである請求項６のＣＫ－ＭＢ活性測定試薬。

10

【請求項８】

前記ＣＫ－Ｍサブユニットに対する阻害抗体を含有する第一の試薬と、ミトコンドリア局在クレアチンキナーゼアイソザイム（ｍＣＫ）に対する阻害抗体を含有する第二の試薬とを含む請求項６または７のＣＫ－ＭＢ活性測定試薬。

【発明の詳細な説明】

【０００１】

技術分野

本発明はクレアチンキナーゼ（ＣＫ）アイソザイムの活性測定方法および測定試薬に関する。さらに詳しくは、本発明はクレアチンキナーゼＭＢアイソザイム（ＣＫ－ＭＢ）および／またはミトコンドリア局在クレアチンキナーゼアイソザイム（ｍＣＫ）の活性測定方法および測定試薬に関する。

20

【０００２】

背景技術

ヒトのＣＫは遺伝子を異にする４つの蛋白質が存在する。それらは、細胞質に由来する２種類の蛋白質〔局在により筋肉型（Ｍ型）と脳型（Ｂ型）〕と、ミトコンドリアに由来する２つの蛋白質Ｓａｒｃｏｍｅｒｉｃ ＣＫ（ｓｍＣＫ）とｕｂｉｑｕｉｔｏｕｓ ＣＫ（ｕｍＣＫ）である。ｓｍＣＫは心筋および骨格筋に、ｕｍＣＫは小腸、脳および胃に存在する。細胞質由来のＣＫアイソザイムはＭ型とＢ型の２量体から構成され、ＣＫ－ＭＭ、ＣＫ－ＭＢ、ＣＫ－ＢＢの３種類に分類される〔高木康、鵜澤龍一、五味邦英：臨床検査、３２巻、１３０９－１３１５（１９８８）〕。またｍＣＫは組織中では８量体で存在するが、血液中では経時的に２量体になる。以下、ｍＣＫとは、ｓｍＣＫおよび／またはｕｍＣＫを含む。

30

【０００３】

これらアイソザイムの電気泳動の移動度は陰極側からｍＣＫ（８量体）、ｍＣＫ（２量体）＝ＣＫ－ＭＭ、ＣＫ－ＭＢ、ＣＫ－ＢＢの順になる。ｓｍＣＫとｕｍＣＫの移動度は同じである。ｍＣＫ（２量体）はＣＫ－ＭＭと同じ移動度を示すため保存血液では電気泳動的にＣＫ－ＭＭとして測定されてしまう。その他にアイソザイムではないが、免疫グロブリンが結合したマクロＣＫも存在する。これらは移動度、免疫対向流法などによりザイモグラムから確認することができる。これらＣＫのアイソザイムの諸性質を表１にまとめた。

40

【０００４】

【表１】

	CK-1	CK-2	CK-3	mCK	
				2 量体	8 量体
サブユニット	BB	MB	MM		
分子量	82,000	82,000	82,000	84,000	320,000
分布組織	脳	心筋	骨格筋		
抗 CK-M 抗体による阻害率	—	50~60%	+	—	—

【 0 0 0 5 】

臨床検査において総 C K、C K - M B の定量が広く行われている。なかでも C K - M B は心筋梗塞のマーカーとして重要である。C K - M B の定量は E I A 法、免疫阻害法、電気泳動法等がある。

10

【 0 0 0 6 】

E I A 法は C K - M B だけを特異性高く測定できる反面、専用の機器が必要で迅速性に欠ける。電気泳動法は操作が煩雑で熟練を要する。また、結果を出すまでにデンストメーターで C K - M B の存在比率を出す必要があり迅速性に欠ける。免疫阻害法は自動分析装置により迅速簡便に測定ができる利点があるが、特異性に欠ける欠点を有していた。

【 0 0 0 7 】

しかし現状では、急性心筋梗塞（以下、A M I と略称することがある）の早期診断が求められるため、免疫阻害法が広く使用されている。この方法は、ヒト C K - M サブユニットに対する阻害抗体を用いて、M サブユニットを失活させ、残存する B サブユニット活性を測定するものである。この方法を用いると、C K - M B の他に C K - B B、m C K（2 量体 + 8 量体）を測定してしまう。この内 C K - B B は、血中にほとんど存在しないため無視できるし、またこれが逸脱する（組織破壊等により、組織から血中に放出される）疾患が少ない。しかし、m C K は健常者の血清中でも C K - M B とほぼ同じ活性量含まれており〔豊田陽子他、生物物理化学、42、175 - 179（1998）〕〔（星野忠他：生物物理化学、42 補冊 2、21（1998））、さらに肝疾患などの細胞壊死、悪性腫瘍などで m C K の逸脱が起こり、結果の判定を混乱させる。最近では、ロタウイルスによる腸炎、新生児仮死などでも m C K の逸脱が起こることが報告されている〔（星野忠他：臨床病理、46、総会号、57（1998））〕〔（金光房江他：臨床病理、46、総会号、56（1998））〕。しかも、この測定方法では C K - M B 活性も約半分阻害されるため、その活性は測定値に 2 を乗じて算出される。このため、m C K 活性の影響は 2 倍になってしまう。すなわち、従前の免疫阻害法により C K アイソザイムの酵素活性を選択的に測定する方法は、抗ヒト C K - M 阻害抗体を用いて C K - M B 活性を測定するものであり、簡便で迅速に測定できるが、この方法では m C K 活性も同時に測定してしまい、正確な C K - M B 活性の測定は期待できない。

20

30

【 0 0 0 8 】

発明の開示

本発明の目的は、m C K の酵素反応作用を選択的に免疫的に排除することにより、m C K の影響を回避して正確で特異性の高い簡便な、所望により自動化も可能な C K - M B 活性測定方法を提供することにある。また、本発明の別の目的は、該測定方法に用いる測定試薬を提供することにある。

40

【 0 0 0 9 】

C K - M B 活性を感度よく、簡便に、迅速に、自動化により検出するための測定系を提供することを目的として鋭意研究を重ねた結果、C K - M サブユニットおよび m C K の酵素作用を選択的、免疫的に排除する処理をした後に、C K 活性を測定することにより前記の目的を達成できることを見だし、本発明を完成した。

【 0 0 1 0 】

すなわち本発明は、以下よりなる。

1. 免疫阻害法によりクレアチンキナーゼ（C K）アイソザイムの酵素活性を測定する方

50

法であって、クレアチンキナーゼM (CK-M) サブユニットに対する阻害抗体およびミトコンドリア局在クレアチンキナーゼアイソザイム (mCK) に対する阻害抗体を用いて検体を処理し、処理された検体中の残存するCK活性を測定し、測定されたCK活性に基づいてクレアチンキナーゼMBアイソザイム (CK-MB) の活性を求めることを特徴とするクレアチンキナーゼMBアイソザイム (CK-MB) 活性測定法。

2. CK-Mサブユニットに対する阻害抗体およびmCKに対する阻害抗体を含むCK活性測定用試薬を検体に添加することによって、検体を処理する前項1のCK-MB活性測定法。

3. CK-Mサブユニットに対する阻害抗体およびmCKに対する阻害抗体を一つの工程中で同時に作用させる前項1のCK-MB活性測定法。

4. mCKに対する阻害抗体とCK-Mサブユニットに対する阻害抗体とを、別々の工程において作用させる前項1のCK-MB活性測定法。

5. CK-Mサブユニットに対する阻害抗体を用いて検体に第一の処理を施し、mCKに対する阻害抗体を用いて第一処理された検体に第二の処理を施し、第二処理された検体中の残存するCK活性を測定する前項4のCK-MB活性測定法。

6. 免疫阻害法によりクレアチンキナーゼMBアイソザイム (CK-MB) の酵素活性を測定するための試薬であって、クレアチンキナーゼM (CK-M) サブユニットに対する阻害抗体およびミトコンドリア局在クレアチンキナーゼアイソザイム (mCK) に対する阻害抗体を含むことを特徴とするCK-MB活性測定試薬。

7. 前記mCKに対する阻害抗体が、サルコメリックmCK (smCK) およびユビキタスmCK (umCK) から選択される少なくとも1つである前項6のCK-MB活性測定試薬。

8. 前記CK-Mサブユニットに対する阻害抗体を含有する第一の試薬と、ミトコンドリア局在クレアチンキナーゼアイソザイム (mCK) に対する阻害抗体を含有する第二の試薬とを含む前項6または7のCK-MB活性測定試薬。

【0011】

発明を実施するための最良の形態

本発明は、CKアイソザイム活性の測定法において、阻害抗体を組み合わせることで、目的とするCKアイソザイム活性を選択的に測定することが可能になることを見出し、この発見に基づいて完成された。

【0012】

すなわち、第一の実施の形態に従えば、本発明のCKアイソザイム活性測定法は、免疫阻害法によりCKアイソザイムの酵素活性を選択的に測定する方法であって、ヒトCK-Mサブユニットに対する阻害抗体 (抗ヒトCK-M阻害抗体) およびヒトmCKに対する阻害抗体 (抗ヒトmCK阻害抗体) で検体を処理し、CK-MサブユニットおよびmCKの酵素作用を選択的、免疫的に排除する処理をほどこした後、残存するCK活性を測定することを特徴とする。

【0013】

第二の実施の形態に従えば、本発明のCKアイソザイム活性測定法は、免疫阻害法によりCKアイソザイムの酵素活性を選択的に測定する方法であって、別々にCK-MサブユニットおよびmCKの酵素作用を選択的、免疫的に排除し、CK-MB活性およびmCK活性をも測定することを特徴とする。すなわち、抗ヒトCK-M阻害抗体を用いてCK-Mの全ての活性およびCK-MBの約半分の活性をそれぞれ阻害して測定を行い、その後抗ヒトmCK阻害抗体を加えてさらに測定を行うことを特徴とする。

【0014】

第三の実施の形態に従えば、本発明のCKアイソザイム活性測定法は、免疫阻害法によりCKアイソザイムの酵素活性を選択的に測定する方法であって、mCKの酵素作用を選択的、免疫的に排除し、mCK活性を測定することを特徴とする。すなわち、CK活性を測定し、その後抗ヒトmCK阻害抗体を加えてさらに測定を行うことを特徴とする。

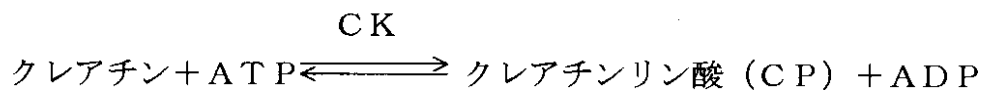
【0015】

本発明の基本原理は、免疫阻害法によるＣＫアイソザイムの酵素活性を選択的に測定する方法を利用する。一般に、この方法によるＣＫ－ＭＢの活性測定は次のようにして行われる。すなわち、ヒトＣＫ－Ｍサブユニットに特異的な活性阻害抗体を使用し、血清ＣＫのＭＭおよびＭＢ中のＭサブユニット活性（ＭＢは約半分の活性が阻害される）を阻害したのち、残存するＢサブユニット活性を２倍することによりＣＫ－ＭＢ活性を測定する。ＣＫ－ＭＢ活性の測定は、例えば、ヘキソキナーゼ（ＨＫ）、グルコース６リン酸脱水素酵素（Ｇ－６－ＰＤＨ）を用いる酵素反応系を利用した紫外測定法により行われる。この測定法は、下述の反応式（化１）の左行反応によって生成するＡＴＰをヘキソキナーゼ（ＨＫ）とＧ－６－ＰＤＨからなる共役反応によってＮＡＤＰＨの３４０ｎｍにおける吸光度増加として測定する初速度測定法である（化２）。

10

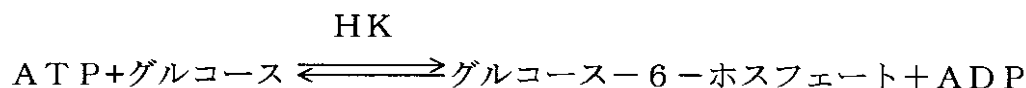
【００１６】

【化１】



【００１７】

【化２】



20



【００１８】

抗ヒトＣＫ－Ｍ阻害抗体を用いるＣＫ－ＭＢ活性の測定は、従来法ではｍＣＫ活性も同時に測定してしまうため、正確なＣＫ－ＭＢ活性の測定が期待できなかったが、本発明では、抗ヒトｍＣＫ阻害抗体を用いてｍＣＫの活性をも阻害することにより、実用上十分に正確なＣＫ－ＭＢ活性の測定を簡便迅速にできる。

30

【００１９】

また、本発明は、抗ヒトＣＫ－Ｍ阻害抗体を用いてＣＫ－ＭＭの全ての活性およびＣＫ－ＭＢの約半分の活性をそれぞれ阻害して、まず残存するＣＫアイソザイムの酵素活性を測定し、ついで抗ヒトｍＣＫ阻害抗体を添加し、なおも残存するＣＫアイソザイム活性を測定することにより、ＣＫ－ＭＢ活性を簡便迅速に測定することができる。また、最初に測定したＣＫアイソザイムの酵素活性からＣＫ－ＭＢ活性の値を差し引くことによりｍＣＫの活性を得ることができる。

40

【００２０】

具体的には、活性測定を目的とするアイソザイムがＣＫ－ＭＢの場合は、抗ヒトＣＫ－Ｍ阻害抗体および抗ヒトｍＣＫ阻害抗体で検体を処理し、血清ＣＫのＭＭ、ＭＢ中のＭサブユニット活性（ＭＢは約半分の活性が阻害される）およびｍＣＫ活性を阻害し、残存するＢサブユニット活性を測定して、測定値を２倍することによりＣＫ－ＭＢ活性とする。なお、ＣＫ－ＢＢは血中にほとんど存在しないため無視できる。

【００２１】

一方、活性測定を目的とするＣＫアイソザイムがＣＫ－ＭＢとｍＣＫである場合は、まず抗ヒトＣＫ－Ｍ阻害抗体で検体を処理してＣＫ活性を測定する。ついで抗ヒトｍＣＫ阻害抗体で処理して、なお残存するＣＫ活性を再度測定し、測定値を２倍することによりＣＫ

50

- M B 活性とする。また、最初の測定で得られた C K 活性から、二回目の測定で得られた C K 活性を差し引くことにより、m C K 活性の値が得られる。このように本発明の測定方法により、同一検体中の m C K 活性と C K - M B 活性の両方を同時に求めることができる。

【 0 0 2 2 】

m C K の活性のみが測定目的である場合は、C K 活性を測定し、ついで抗ヒト m C K 阻害抗体で処理して、なお残存する C K 活性を再度測定し、最初の測定で得られた C K 活性から、二回目の測定で得られた C K 活性を差し引くことにより、m C K 活性の値が得られる

【 0 0 2 3 】

不要な C K アイソザイムまたは C K - M サブユニットの活性を取り除くため活性阻害処理する際に用いる上述の阻害抗体は、それぞれ別々に用いて検体を処理してもよいが、同時に用いて検体を処理してもよい。抗ヒト C K - M 阻害抗体と抗ヒト m C K 阻害抗体が異種動物で作製された抗体である場合は混合すると沈殿などを生成する場合がある。このようなときは一方の動物の免疫グロブリンを固定化したアフィニティーカラムで処理して使用する。より好ましくは、異好性抗体の存在のリスクを避けるためには、別々に検体に作用させることが推奨される。

【 0 0 2 4 】

また、これらの阻害抗体は、C K 活性を測定するための酵素反応系に使用する酵素試薬および / または基質液とは別々に調製した試薬として検体の処理に用いてもよいし、あるいは酵素試薬および / または基質液に添加して調製した試薬として用いてもよい。

【 0 0 2 5 】

C K 活性の測定は、通常の C K 活性測定法により、試薬として例えば国際試薬社製 C P K 試薬 L 「コクサイ」を用いて行うことができる。

【 0 0 2 6 】

本発明の測定法に使用する抗ヒト C K - M 阻害抗体および抗ヒト m C K 阻害抗体は、例えばヤギをヒト C K - M サブユニットまたはヒト m C K 画分で常法 [J . S c h l e g e l e t a l . , J . B . C . , V o l . 2 6 3 , N o . 3 2 , p p . 1 6 9 4 2 - 1 6 9 5 3 (1 9 8 8)] に従って免疫・採取・精製することにより得ることができる。

【 0 0 2 7 】

抗ヒト m C K 阻害抗体は具体的には、例えば以下のようにして作製することができる。すなわち、抗原としては、目的とする特異性によっても異なるが、ヒトまたは哺乳類の m C K が用いられる。特異性を高めるためには種特異的な抗原を用いることが好ましい。

【 0 0 2 8 】

ヒト m C K に対して特異的に親和性を有し、且つヒト m C K の酵素活性を特異的に阻害する抗体を得る場合には、該抗原は遺伝子工学的手法によっても調製できる。

感作抗原としては、精製 m C K 蛋白質分子あるいは遺伝子工学的に調製した部分的なアミノ酸配列に基づいた発現蛋白質をリン酸緩衝液 (P B S) 等の適当な緩衝液中に溶解、あるいは懸濁したものが用いられる。抗原液は通常抗原物質として 5 0 ~ 5 0 0 μ g / m l 程度の濃度に調製すればよい。また、ペプチド抗原等、それだけでは抗原性が低い場合は、アルブミンやキーホールリンペットヘモシアニン等の適当なキャリアタンパク質に架橋して用いることが好ましい。

【 0 0 2 9 】

この抗原を免疫感作させる動物としては、マウス、ラット、ウマ、ヤギ、ウサギなどが例示される。好ましくはマウス、より好ましくは B A L B / c マウスである。このとき、被免疫動物の抗原への応答性を高めるため、上述の溶液をアジュバントと混合して投与することができる。アジュバントとしては、フロイント完全アジュバント (F C A) 、フロイント不完全アジュバント (F I A) 、 R i b i (M P L) 、 R i b i (T D M) 、 R i b i (M P L + T D M) 、百日咳ワクチン (B o r d e t e l l a P e r t u s s i s v a c c i n e) 、ムラミルジペプチド (M D P) 、アルミニウムアジュバント (A L U M) 、およびこれらの組合わせが例示されるが、初回免疫時に F C A 、追加免疫時に F I

10

20

30

40

50

AやR i b i アジュバントを使用する組合せが特に好ましい。

【0030】

免疫方法は、使用する抗原の種類やアジュバント混合の有無等により、注射部位、スケジュールなどを適宜変化させることができる。例えば、被免疫動物としてマウスを用いる場合は、アジュバント混合抗原液0.05～1ml（抗原物質10～200μg）を腹腔内、皮下、筋肉内または（尾）静脈内に注射し、初回免疫から約4～21日毎に1～4回追加免疫を行い、さらに約1～4週間後に最終免疫を行う。上述の抗原溶液をアジュバントを使用せずに投与する場合には、抗原量を多くして、腹腔内注射してもよい。抗体価は追加免疫の約5～6日後に採血して調べる。抗体価の測定は、後述の抗体価アッセイに準じ、通常行われる方法で行うことができる。最終免疫より約3～5日後、該免疫動物から脾細胞を分離して抗体産生細胞を得る。ポリクローナル抗体を利用する場合は、この採血した血液より血漿を得、自体公知の抗体の精製法を用いて、所望により純度を調整して、製造できる

10

。

【0031】

抗体は単独または組み合わせることにより、試料中のmC K酵素活性を特異的に阻害し、C K - M B 活性を特異的に測定することができる。また、本発明において抗体として、抗血清そのもの、または精製したI g G 抗体、さらに抗体をパパイン消化して得られるF a b フラグメントを使用することができる。

20

【0032】

本発明の方法により測定される検体は特に制限はないが、通常当分野で行われているC K - M B を測定されている方法に適用し得る。

【0033】

また、本発明においては、本発明の測定法に必要な試薬をキット化または単品で構成してなるC K アイソザイム活性測定用試薬を提供する。ここでいう試薬には、急性心筋梗塞マーカーに用いられているC K - M B 測定用試薬を、その一部として利用できるが、これに限定されるものではない。

【0034】

実施例

以下の実施例は本発明を具体的に説明するものであるが、これによって本発明の範囲を制限するものではない。

30

【0035】

実施例1

ポリクローナル抗体の作製方法

（1）ウサギN Z W / クリーン（ケアリー）ウサギ、雄、入荷時体重1.25～1.35kg / 匹を入手し、動物飼育チェンバーで標準ペレットを使用して飼育し、任意に給水して飼育した。

【0036】

（2）免疫原の調製

ヒトmC K はヒト心筋組織およびヒト胃組織を用い、R . R o b e r t s e t a l . 、 J . B . C . 、 V o l . 2 5 5 、 p p . 2 8 7 0 ~ 2 8 7 7 (1 9 8 0) 、 およびA . M . G r a c e e t a l . 、 J . B . C . 、 V o l . 2 5 8 、 p p . 1 5 3 4 6 ~ 1 5 3 5 4 (1 9 8 3) に記載されている方法により精製した。約300gのヒト心筋より精製s m C K が得られた。同様に約150gのヒト胃より精製u m C K が得られた。これらを使用するまで凍結保存した。

40

【0037】

（3）免疫方法

上記（2）で調製した抗原s m C K とu m C K 各々をR i B i アジュバント（M P L + T D M ）で100μg / ml に調製し、激しく混和して均一な懸濁液とした後、3羽ウサギの両鼠径部にそれぞれ200μl ずつ、また背中2箇所50μl ずつ投与した。さらに

50

4週間毎に、同様に調製した上記抗原を4回同様の方法により繰り返し投与した。

【0038】

(4) 抗体価測定

抗体価の測定に当たっては、定期的に兎耳静脈より少量の全血を採取し、血清を分離した後、55℃で60分間処理することによりウサギ血清中のCK活性を失活させ、使用直前まで凍結保存した。免疫開始よりsmCKとumCKに対する抗体価をmCK酵素活性阻害抗体法により調べた。

【0039】

すなわち、各兎の血清をPBSで100倍希釈して調製した抗体溶液50μlを96穴マイクロタイタープレートに採取し、50μlのmCK酵素液(PBS緩衝液に0.2U/ml smCKまたはumCKを含む)を加え室温で10分間放置後、100μlのCK発色試薬(100mMイミダゾール、2mM EDTA、10mM酢酸マグネシウム、2mMアデノシン-5'-ニリン酸(ADP)、5mMアデノシン-5'-一リン酸(AMP)、40μM P1, P5-ジ(アデノシン-5'-五リン酸(AP5A))、30mM 1-チオグリセロール、20mM D-グルコース、2mM NADP、3U/mlヘキソキナーゼ、2U/mlグルコース-6-リン酸脱水素酵素、30mMクレアチンリン酸、1mg/mlのニトロブルーテトラゾリウム、3U/mlのダイアフォラーゼ、pH 6.6)を加え、37℃で10分間反応させた。

ついで、上記の各穴に50μlの0.2N塩酸を加えて反応を停止させ、波長570nmにおける吸光度を精製水を対照に測定した。さらに、得られた吸光度から、mCKの酵素活性の阻害が認められた場合、基質反応が抑制されるため吸光度の変化量は低く、酵素活性阻害特異抗体の存在を特定することができた。なお、抗体陰性コントロールとしてPBSのみを添加したものを使用し、検体盲検としてmCK酵素液の代りにPBSを使用した。

【0040】

(5) 反応特異性の検討

得られた抗ヒトsmCK阻害抗体およびumCK阻害抗体はさらに、ヒトmCKの代りにヒトCK-MBまたはヒトCK-MMを至適濃度に加えた酵素液をそれぞれ調製し、上記と同様の方法によりそれぞれの酵素に対する酵素活性阻害を確認した。

【0041】

実施例2

CK活性測定用試薬として以下の試薬を調製した。

酵素試薬：140mMイミダゾール、2.8mM EDTA、14mM酢酸マグネシウム、2.8mMアデノシン-5'-ニリン酸(ADP)、7mMアデノシン-5'-一リン酸(AMP)、14μM P1, P5-ジ(アデノシン-5')五リン酸(AP5A)、42mM 1-チオグリセロール、28mM D-グルコース、2mM NADP、4.2U/mlヘキソキナーゼ、2.1U/mlグルコース6リン酸脱水素酵素、pH 6.6

基質液：150mMクレアチンリン酸二ナトリウム

分画試薬：酵素試薬に1U/mlの抗ヒトsmCK阻害抗体(ウサギ)またはumCK阻害抗体(ウサギ)を添加して分画液とした。

【0042】

精製ヒトCK(0.1%BSAを含む生理食塩水)5段階希釈液の20μlに酵素試薬250μlを加え、37℃で恒温とした後、波長340nmにおける吸光度変化量を測定する(A)。さらに基質液100μlを添加2~3分後より吸光度変化量を測定する(B)。CK活性は以下の計算式(数1)で算出する。

【0043】

【数1】

10

20

30

40

$$\text{CK活性 (U/L)} = \frac{(370 \times B - 270 \times A) \times 1000}{6.3 \times 20}$$

【 0 0 4 4 】

次に酵素試薬に代えて分画試薬を用いて同様に操作し、吸光度変化量を測定してC K 活性を測定した。C K 活性は前述の計算式(数1)で算出する。結果を表2～表4に示した。この抗体はヒトmC Kを阻害し、C K - Mサブユニット、C K - Bサブユニットは阻害しない。

【 0 0 4 5 】

【表2】

C K - M M 活性 (U / L) に与える阻害抗体の影響

希釈率	0	1/5	2/5	3/5	4/5	5/5
抗 mCK 抗体なし	0	752	1496	2262	3010	3748
抗 smCK 抗体あり	0	747	1496	2250	2998	3740
抗 umCK 抗体あり	0	750	1490	2258	3002	3745

【 0 0 4 6 】

【表3】

C K - B B 活性 (U / L) に与える阻害抗体の影響

希釈率	0	1/5	2/5	3/5	4/5	5/5
抗 mCK 抗体なし	1	28	57	85	115	143
抗 smCK 抗体あり	0	30	58	87	114	140
抗 umCK 抗体あり	0	30	61	87	116	143

【 0 0 4 7 】

【表4】

s m C K 活性 (U / L) および u m C K 活性 (U / L) に与える阻害抗体の影響

	希釈率	0	1/5	2/5	3/5	4/5	5/5
s m C K 活性	抗 mCK 抗体なし	1	31	64	95	124	157
	抗 smCK 抗体あり	0	1	0	1	1	1
	抗 umCK 抗体あり	0	2	3	3	4	4
u m C K 活性	抗 mCK 抗体なし	0	25	51	75	101	128
	抗 smCK 抗体あり	0	1	1	2	4	3
	抗 umCK 抗体あり	1	0	1	2	1	2

【 0 0 4 8 】

s m C K、u m C Kのどちらで抗体を作製しても阻害交差性が確認された。従って、以下の実施例は、抗ヒトs m C K阻害抗体を使用して行った。以下の実施例で抗ヒトm C K阻害抗体と表示している抗体は、この阻害交差性を有する抗ヒトs m C K阻害抗体である。

【 0 0 4 9 】

実施例3

ヒト健常検体およびヒトm C K陽性検体100μlに生理食塩水、抗ヒトC K - M阻害抗体(ヤギ)、抗ヒトm C K阻害抗体(ウサギ)および2つの阻害抗体を混合したものを各

10

20

30

40

50

々 10 μ l 加えて電気泳動を行った。電気泳動はボル E フィルムシステム（アガロース電気泳動）を使用し、40 分間泳動した。泳動後、実施例 1 で調製した CK 発色試薬を泳動したゲルに染み込ませて 37 で 30 分間インキュベートした。5 % 酢酸水溶液で反応を停止し、精製水で洗浄後、ゲルを乾燥させてコピーした結果を図 1 に示す。抗ヒト CK - M 阻害抗体だけでは mCK を阻害できないため CK - MB として測定されてしまう。また抗ヒト CK - M 阻害抗体と抗ヒト mCK 阻害抗体を併用して使用することにより CK - MB が初めて特異的に測定されることが示唆された。

【0050】

実施例 4

実施例 2 の酵素試薬に抗ヒト CK - M 阻害抗体（ヤギ）1.0 U/ml 添加したもの（対照法）とさらに 1 U/ml の抗ヒト mCK 阻害抗体（ウサギ）を添加したもの（本発明）を調製した。CK 活性が 300 U/L 以下の検体 19 例、GPT 活性が 80 U/L 以上の肝疾患検体 26 例について CK - MB 活性を実施例 2 の操作方法に従って測定して比較検討を行った。CK - MB 活性は以下の計算式（数 2）により算出する。

【0051】

【数 2】

$$\text{CK-MB 活性 (U/L)} = \frac{(370 \times B - 270 \times A) \times 1000 \times 2^{**}}{6.3 \times 20}$$

2^{**}: CK-B 活性を CK-MB 活性に変換するファクター

【0052】

結果を表 5 および 6 に示す。表 5 の結果より CK - MB 活性の平均値は対照法が 13 U/L に対して本発明は 7 U/L と約半分になることが分かった。従来、CK - MB 活性のカットオフ値は約 25 U/L といわれているが、本発明では非特異的反応をする mCK 活性を阻害できるため、約 10 U/L に設定できる。

表 6 に示すように、肝疾患患者検体は対照法では急性心筋梗塞患者検体でないにもかかわらず 7 検体が 25 U/L 以上の活性を示した。しかしながら、本発明においてはすべての検体が 10 U/L 以下となった。

以上の結果より、本発明は CK - MB 活性のカットオフ値が下がることにより急性心筋梗塞に対する早期マーカーとして従来よりも感度および特異性が高くなることが期待される。

【0053】

実施例 5

抗ヒト mCK 阻害抗体の添加は酵素試薬または、基質液に添加することもできる。さらに基質液および酵素試薬とは別の試薬として抗ヒト mCK 阻害抗体液を調製し、抗 CK - M 阻害抗体を含む酵素試薬と基質液で従来の CK - MB 活性測定を行った後、抗ヒト mCK 阻害抗体液を添加して mCK 活性を差し引いて測定することもできる。この場合の利点として、CK - MB 活性以外に mCK 活性を求めることができる。以下にその実施例を示した。

【0054】

急性心筋梗塞発症後、予後がよかった患者と予後が悪く死亡に至った患者から経時的に採血した検体を用いて CK - MB 活性と mCK 活性の同時定量を行った。

検体 20 μ l に、実施例 2 の酵素試薬に抗ヒト CK - M 阻害抗体を添加した試薬 250 μ l を加え、37 で恒温とした後、波長 340 nm における吸光度変化量を測定する（A）。次に基質液 100 μ l を添加し、2 ~ 3 分後より吸光度変化量を測定する（B）。次に抗ヒト mCK 阻害抗体（5.7 U/ml を含む 100 mM イミダゾール緩衝液 pH 6.6）50 μ l を加え、2 ~ 3 分後より吸光度変化量を測定する（C）。CK - MB 活性と mCK 活性は以下の計算式（数 3）より算出する。また、対照法を用いて求めた CK - MB 活性と比較し、結果を表 7、8、図 2、3 に示した。

【 0 0 5 5 】

この結果より予後がよいケースでは急性心筋梗塞発作後ピークに達するまでは対照法と本発明の測定方法に差がみられないが、CK-MB活性値が低下する回復期においては本発明の測定方法の方がより低値になり、正常に復帰するのが早いことが分かる。

この原因は、早期においては細胞質由来のCK-MBが逸脱し、その後細胞壊死を伴ってミトコンドリア由来のmCKが逸脱してくるためであると考えられ、予後の経過観察にも有用性が高まることが分かった。また、予後がよい場合はmCK活性値は低く推移するが、予後の悪い場合はmCK活性値が高く推移した。

ミトコンドリア酵素は細胞壊死が起こってから血中に逸脱するため、現在はmGOT（ミトコンドリア・グルタミン酸 - オキサロ酢酸トランスアミナーゼ）活性が測定されている。しかし、本発明を用いるとCK-MB活性の精密測定を行うと同時に細胞壊死程度を類推して急性心筋梗塞の重篤度および予後の情報を得ることもできる。

10

【 0 0 5 6 】

【 数 3 】

$$\text{CK-MB活性 (U/L)} = \frac{(420 \times C - 270 \times A) \times 1000 \times 2^{\ast}}{6.3 \times 20}$$

2[※]: CK-B活性をCK-MB活性に変換するファクター

20

$$\text{mCK活性 (U/L)} = \frac{(370 \times B - 420 \times C) \times 1000}{6.3 \times 20}$$

【 0 0 5 7 】

【 表 5 】

CK活性300U/L以下の検体のCK-MB活性測定結果(U/L)

検体No.	対照法	本発明
1	8.9	3.7
2	10.9	5.1
3	10.0	5.0
4	16.9	8.7
5	8.4	2.9
6	22.5	10.0
7	13.8	7.3
8	17.0	8.5
9	10.8	5.8
10	18.3	9.0
11	9.9	5.4
12	6.7	3.2
13	19.1	9.9
14	9.6	4.8
15	19.4	8.9
16	15.2	9.0
17	8.6	3.4
18	9.0	6.0
19	17.2	9.1
平均	13.3	6.7
SD	4.7	2.4
平均+2SD	22.7	11.5
平均-2SD	3.9	1.9

10

20

30

【 0 0 5 8 】

【表 6】

G P T 活性 8 0 U / L 以上の検体の C K - M B 活性測定結果 (U / L)

検体No.	対照法	本発明
1	11.4	6.9
2	5.1	2.0
3	8.0	4.8
4	5.8	2.6
5	6.8	3.2
6	18.2	7.7
7	11.4	5.3
8	35.7	9.0
9	4.4	2.0
10	19.7	8.8
11	10.4	4.9
12	13.3	5.2
13	27.9	9.3
14	11.5	6.7
15	8.5	4.0
16	25.1	8.8
17	10.2	4.9
18	6.9	3.0
19	10.5	4.5
20	42.8	7.5
21	8.7	4.5
22	30.6	5.7
23	34.6	8.9
24	6.7	2.6
25	22.8	8.2
26	47.9	9.4
平均	17.1	5.8
SD	12.5	2.5
平均+2SD	42.1	10.8
平均-2SD	-7.9	0.8

10

20

30

40

【 0 0 5 9 】

【表 7】

予後良好例

発作後 経過時間	対照法	本発明	
	(CK-MB)+2×mCK	CK-MB	mCK
4	42	31	4
6	90	80	4
8	190	175	6
10	325	310	5
12	486	475	6
14	480	460	8
18	380	338	18
21	313	276	20
24	235	191	22
33	165	105	28
45	62	12	25
63	40	11	14
75	23	10	7
99	15	5	5

【 0 0 6 0 】

【表 8】

予後不良例

発作後 経過時間	対照法	本発明	
	(CK-MB)+2×mCK	CK-MB	mCK
2	32	22	4
4	64	51	4
7	201	191	4
9	385	371	6
13	532	515	10
16	610	570	18
20	630	536	45
24	598	385	104
28	578	266	154
34	460	145	155
42	390	70	158

【 0 0 6 1 】

産業上の利用の可能性

現在、CK-MB活性の測定はCK-MM活性を特異的に阻害する抗体を試薬系に、添加することによりその特異性が改良されているが、mCK活性も測定してしまい、必ずしも心筋由来の特異的なCK-MB活性を測定しているわけではない。本発明では抗ヒトmCK阻害抗体を用い、従来識別することのできなかつたmCK活性を特異的に抑制することにより、正確なCK-MB活性の測定が可能となる。本発明の測定法は、抗ヒトmCK阻害抗体を使用し、急性心筋梗塞患者血清中のmCK活性を特異的に阻害することにより真のCK-MB活性値が測定され、より確度の高い急性心筋梗塞の重篤度、病態の把握が可能となり、急性心筋梗塞における早期診断のみならずその治療のモニターが可能となり臨床検査上大きな意義を持つ。

【図面の簡単な説明】

10

20

30

40

50

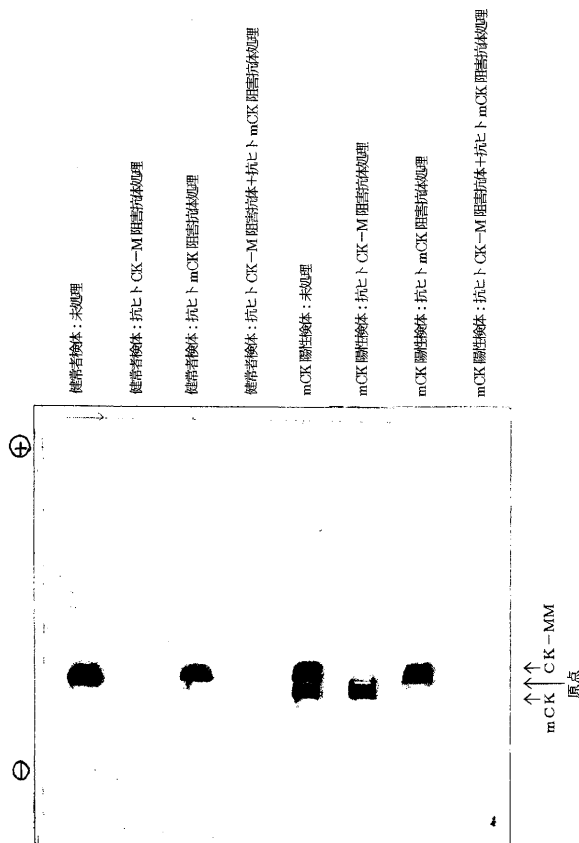
【図 1】 抗ヒトCK-MおよびmCK阻害抗体処理したときの健常人検体およびmCK陽性検体の電気泳動図である。

【図 2】 急性心筋梗塞（AMI）の予後良好な症例について、対照法（-●-；CK-MB活性+2×mCK活性）で測定したCK活性と、本発明の測定法で測定したCK活性（-○-；CK-MB活性、-△-；mCK活性）とを、AMI発作後の経時的な測定において比較した結果を示す図である。

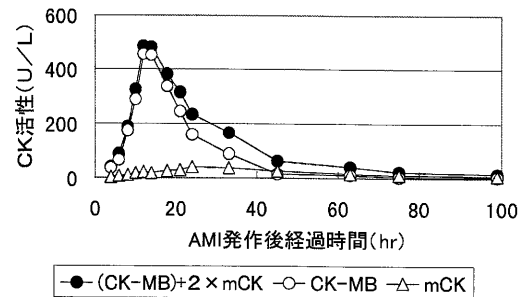
【図 3】 急性心筋梗塞（AMI）の予後不良な症例について、対照法（-●-；CK-MB活性+2×mCK活性）で測定したCK活性と、本発明の測定法で測定したCK活性（-○-；CK-MB活性、-△-；mCK活性）とを、AMI発作後の経時的な測定において比較した結果を示す図である。

10

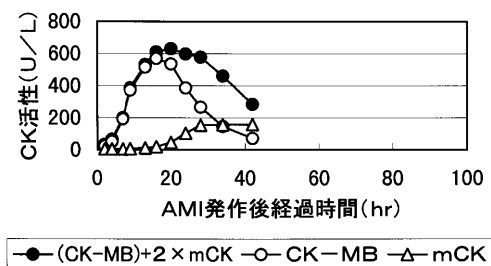
【図 1】
図 1



【図 2】
図 2



【図 3】



フロントページの続き

(72)発明者 星野 忠

東京都板橋区蓮根二丁目29番

新蓮根団地9号棟502号室

審査官 白形 由美子

(56)参考文献 特開昭52-57887(JP,A)

KANG X et al., 第44回日本臨床病理学会総会(V) 臨床酵素蛋白の免疫測定法と酵素活性測定法
および臨床応用, 臨床病理, 1998年, Vol.46 No.7, p.713-717

星野忠 他, 抗ミトコンドリアCK活性阻害抗体を用いた新規CK-MB活性測定法の臨床評価, 臨床
化学, 2009年, Vol.38 No.3, p.299-307

星野忠, CK-MB測定における課題解決への第一歩-抗ミトコンドリアCK活性阻害抗体を組み込んだ
, 新規CK-MB活性測定試薬の開発経緯と試薬性能について-, 臨床化学, 2008年, Vol.37 補
冊1, p.171-172

星野忠 他, 抗ミトコンドリアCK活性阻害抗体を組み込んだCK-MB活性測定法の検討, 生物試料
分析, 2004年, Vol.27 No.1, p.79

星野忠, 健常人のミトコンドリアCK, 検査と技術, 1999年11月, Vol.27 No.12, p.14
44-1446

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/573

PubMed

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)