

演題名 新規 CK-MB 活性測定試薬に添加されたミトコンドリア CK 活性阻害抗体の反応性評価

氏名 ○青木 義政 山中 基子 栢森 裕三 康 東天

所属 九州大学病院検査部

### 【目的】

従来の CK-M サブユニット抗体のみを用いた免疫阻害法による CK-MB 活性測定では血中に CK-BB やミトコンドリア CK (MtCK) が存在することで偽高値を示す問題を抱えていた。近年、特に MtCK による影響を解消するため、抗 MtCK 抗体を添加した新規試薬が開発、上市されたことにより、今後本試薬が徐々に検査室の現場に浸透していくものと思われる。

MtCK は ubiquitous MtCK (uMtCK) と sarcomeric MtCK (sMtCK) の2つのアイソフォームが存在し、新規試薬には両者に対する抗体がそれぞれ添加されている。今回、本試薬に添加されている MtCK 阻害抗体の反応性評価を患者実試料を用いた。

【方法】1) 対象：当院検査部に検査依頼を目的として提出された患者血清を用いた。このとき、従来のCK-MB活性測定により、CK-MB/総CK比が 25%以上となる患者血清を主に用いた。2) 免疫沈降法 (IP)：uMtCK、sMtCKそれぞれについて、新規試薬に添加されている抗体を結合させたセファロースと患者血清とを一晩反応させ、PBSで洗浄後、還元剤なしの SDS-PAGE サンプルバッファーで溶出した。

3) ウェスタンブロット (WB)：IPで得られた試料を還元条件下 10% SDS-PAGE で分離、ニトロセルロース膜に転写後、一次抗体に抗ヒト uMtCK または sMtCK マウスモノクローナル抗体、二次抗体に HRP 標識抗マウス IgG 抗体を用い、化学発光法により検出した。4) LC/MS：IP後の試料を SDS-PAGE で分離後、ゲルから目的バンドを回収し、インゲルでのトリプシン消化後のペプチド試料を LC/MS 分析した。結果の解析は Mascot サーチにて行った。5) 活性阻害試験：患者血清に抗 MtCK 抗体を種々の濃度で添加し、残存する CK 活性を測定した。

【結果】1) IP 後試料の WB：新規試薬に添加

されている MtCK 阻害抗体により uMtCK、sMtCK それぞれが IP されることを確認した。なお、両抗体共に CK-M サブユニットとの交差反応性は認められなかった。2) LC/MS：uMtCK については coverage が 25% となる結果が得られた。sMtCK については IP された蛋白量が極めて微量であったため解析ができなかった。3) 活性阻害試験：両抗体共に、対する MtCK 以外の活性を阻害していないこと、uMtCK 抗体は uMtCK 活性のみを阻害することを確認した。sMtCK 抗体による sMtCK 活性の阻害態度は、現在適当な患者血清が得られず未確認である。

【考察】新規試薬に添加されている2種類の MtCK 阻害抗体の反応性を評価したところ、sMtCK については適当な患者実試料が得られず一部の解析ができていないものの、これまでの成績から特に問題は認められず、両抗体共に概ね良好な特異性を有していると考えられる。今後検討症例数を増やし、特に高 sMtCK 活性の患者血清を対象とした解析により反応性評価を結論づけたい。

今回の反応性評価は従来の CK-MB 活性測定法で CK-MB 活性の測定値が偽高値を示したと考えられる患者血清を主に用いて行ったが、ほぼ全例で病歴の背景に何らかの悪性腫瘍を有していた。さらに sMtCK が検出された1例を除く全例で uMtCK が検出され、悪性腫瘍における uMtCK の関連性が興味深い。我々はさらに、健常人や MtCK が検出されない悪性腫瘍患者を対象とした解析も行い、悪性腫瘍における MtCK 出現の意義などを明確にしたいと考えている。

なお、新規試薬は MtCK の影響は回避できるものの、依然 CK-BB や免疫グロブリン結合 CK については影響を回避できないため注意が必要である。