

9) CPK の超微量測定

成瀬 浩*

研究協力者 小松 せつ*

目 的

CPKの微量測定法としては、いくつかの方法が考案されている。しかし現在もっとも敏感な方法は、Zellweger & Antonik¹⁾により考案されたものであり、彼等は、この方法を用い、アメリカアイオワあるいはイリノイ州において、先天代謝異常のマススクリーニングの為に、0.4 mm厚の濾紙上に採取された血液を用いて、CPK活性の測定を行っている。

彼等は0.4 mmの厚さの濾紙上の血液小紙片直径3～6mmのものをパンチアウトして、その小紙片中の血液を用いて、CPKを測定した。その場合の血液量は、1.8 μ l～5 μ lである。しかも彼等は、このような超微量サンプルを用いての定量法で、多数検体を処理することに成功した。

このような経験にもとづき、彼等は、代謝異常マススクリーニングのために、各地の検査センターに集る、新生児の血液を材料として、CPKのマススクリーニングを行い、Duchenne型筋ジストロフィーの早期発見を行うべきだと述べている。

現在、残念ながらDuchenne型筋ジストロフィーの完全な治療法のない段階で、マススクリーニングとして採り上げることについては、単に家族の苦しみを早めるのみであるという反論もつよく、われわれもマススクリーニングとして現実に広く実施することに対し

ては、疑義をもつものであるが、この方法の優秀さは高く評価しており、わが国においても、この方法によるCPKの超微量定量の確立をはかることは有意義であると考えている。

殊に近い将来、フェニールケトン尿症その他の代謝異常症スクリーニングのために、全国的に、新生児より微量の血液をとり検査をする制度が発足することになったので、²⁾もし、Duchenne型筋ジストロフィーの治療が見出された暁には、直ちにこれらの血液を用いて、CPKのマススクリーニングを、全国的に実施する必要があるものと考えている。そのために、現在から、CPKのマススクリーニングの方法を確立することは必要なことと判断した。

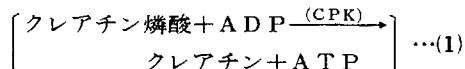
またこの特定の濾紙に血液をとり、これから検査する方法は、いかなる地域からでも、郵送で、必要な所に検体を送れるのであり、特定地域での集団検診・遠隔地の患者の診断等に便利であることも付け加える必要があろう。

これらの理由から、われわれも採血濾紙上の血液からCPK活性を測定することを目標とした。わが国では、現在0.39mmの濾紙上に、生後5～7日目の新生児から、ごく微量の血液を採取し、これらフェニールケトン尿症、ガラクトース血症その他の治療可能な代謝異常性精神薄弱のマススクリーニングを行いつつあり、近くこの検査は、全国で全ての産婦人科医により実施されようとしている。この濾紙上の血液から、通常3mm直径の小片をパ

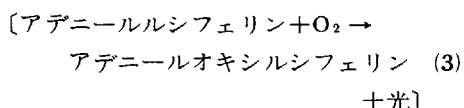
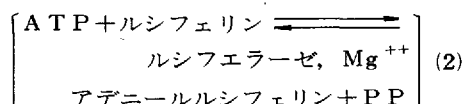
* 国立精神衛生研究所

ンチアウトして、1ヶから1種類の代謝異常の検査を行っているので、CPKの場合も3mm径小片の血液で測定することが便利であると考えた。この3mm小紙片中の血液量は、1.8 μ l程度である。

さてZellweger & Antonikの測定原理は、



の反応を行わせ、生成したATPを、



の反応をおこさしめ、この光を正確に測定することにより、ATPを測定するというものである。

現在ルシフェリン・ルシフェラーゼを用い、ATPを測定する方法は、広く実際に使用されており、文献によるとATPの 10^{-14} M迄測定しうるとのことである。こうして、CPK活性を、形成されたATP測定により、計算するというアイデアはすぐれたものである。

Zellwegerらの方法にもとづき、Antonikは、CPK微量定量用のキットをアメリカで市販した。それによると、まず血中あるいは試薬中に、内在性ATPが存在するので、それを取りのぞくために、血液検体を、ルシフェリン・ルシフェラーゼ、ADP、 Mg^{++} 及びチチオスライトールと共に一昼夜反応させ、内在性ATPを完全に分解させ、その後、クレアチン磷酸を加え、1)の反応をおこさしめ、ついで2)及び3)の反応により光を発生しめ、その光を測定する。試薬中のルシフェリン・ルシフェラーゼ、ADPおよびクレアチン磷酸の量を適当にすることにより、クレアチン磷酸を加えたのち、一定時間たつとCPKにより、ATPが生成される速度と、ATPを分解し、光を生ずる速度とが平衡状態に達し、光の量がそれ程急速に減衰することはなくなる筈である。それ故、クレアチン磷酸を加え、

一定時間で、光を測定すればよいというのがAntonikの試薬の使用法である。

このAntonikの試薬キットは、すぐれたものであるが、その内容は企業の秘密として、正確には公表されていないために、彼の市販したものを購入せざるを得ない。しかしこれでは、将来方法の改良を行うことが不可能に近い。また日本でもし、ルーチンのスクリーニングの中に、CPK測定を取り入れるとすると、試薬が国内でいつでも作れるようにすることは極めて大切である。

そこでわれわれは、Zellwegerらの方法によるCPKの測定法の確立の第一歩として、Antonikにより市販された、CPK定量キットを入手し、それを実際使用した場合の測定の問題点を充分把握することを目的に実験を行い、次いでこの方法に習熟した後に、研究室内でも簡単に試薬をつくりうるようにして、わが国でのCPK微量測定を容易ならしめようとした。以下今年度われわれが実行したことを列挙し、今年度の報告とする。

方 法

I) まずルシフェリン、ルシフェラーゼによるATPを測定する時の器具の検討を行った。ATP分解と共に生ずる光の測定のためには、現在もっとも鋭敏なのは、フォトンカウンターであり、これを用いれば、ATP 10^{-14} Mの測定も可能といわれている。しかしフォトンカウンターは、現在はどこでも簡単には利用出来ないで、蛍光分光計あるいは簡単な分光光度計を用うことを目的として、蛍光分光計として、日立203型蛍光分光計を選び、非常に簡単な分光光度計として、日立PERKIN-ELMER 139型UV-VIS分光光度計を選んで、ATP分解による光の測定を試みた。

1. 日立203型蛍光分光計による測定

1 \times 1 \times 4 cmのキューベット用セルホルダーにAntonik Lab発売のチューブ(0.5 \times 5 cm)が適用しうるかどうかを検討した。この点については、セルホルダー内のチューブの位置、チューブ内の液量等を適当な条件にすること

によって専用のキュベットと同等な測定値が得られることが分かったので次に測定を行った。測定はウサギ筋肉からの粉末CPK（ペーリンガー）を溶かして、Duchenne型筋ジストロフィー患者の最高値と思われる値の約500倍に相当する高濃度の溶液を作り、キットを用いて操作にしたがい測定した。予想に反して、光度計の高圧電源部のホトマル付加電圧及び、検知部の光電子倍增管への調整電圧を最高にしても感応せず測定不可能であった。

2. 日立PERKIN-ELMER 139型UV-VIS 分光光度計による測定

1. 同濃度の溶液について測定したところ最高感度でメーターの針がふり切れ感応が非常に良いことが分かった。そこで実際の正常人血液及びDuchenne型筋ジストロフィー患者のとりうると思われる最高濃度（正常～正常の150倍）が、高圧電源部の電圧を最大に固定し、検知部の感度調節つまみ（ $\times 1$, $\times \sqrt{10}$, $\times 10$ ）を切り換えることによって1%～1000%の範囲で測定出来ることが分かった。更に感度をあげるために次の工夫をした。測定室内のセルホルダーの使用に代り、受光部の窓にアルミ箔をはり、この箔と受光部の窓の間にチューブを挿入して光を測定することにより、感度を約3倍にすることが出来た。これは光源と受光部との距離を最短にすることで光の距離による減衰を少なくすることが出来、またアルミ箔からの反射による集光率の増加などによる効果のためと思われる。

II) CPK活性既知の血液を用いた本測定法の検討

予め無機磷酸法 (Okinaka, S., Sugita, H., et al, J. Lab. & Clin. Med., 64, 299, 1964) によって血清中のCPK活性の分ったDuchenne型筋ジストロフィー患者2名の血液から血液濾液を作り、3mmのディスクをパンチアウトして測定を行った。無機磷酸法では正常値は0～20uであるが、この2名の患者は各々、401u, 361uである。401uのものについては、ディスクの2枚、3枚を用いて2倍量、3倍量の802u, 1203uとして、これら

の値がAntonikのキットでどのような値をうるかを知るために操作にしたがい測定した。又対照として、正常人の血液濾液ディスク及び、臍帯血2例のディスクについて同時に測定した。操作はAntonikのキット使用の際の指示にしたがったが、今後の実験に於ける比較を正確なものとするために、温度条件などについて原法ではあまり明確でないが、われわれは、すべて反応中の温度を一定に保つなど、条件をより厳密に設定した。

測定操作

1. 3mm血液濾紙ディスクをチューブに入れる。
2. キットA液を3mlの水に溶かし、この0.2mlを加える。
3. 混和。30分、60分に10分間ずつ振盪する。
4. 15°Cに20時間放置。
5. 25°Cの水溶中で10分間予備的加温。
この時B液も同様に加温する。(B液はキットBを2mlの水に溶かす。)
6. B液を0.05ml加える。
7. 混和。25°Cの水溶中に放置し、混和しつつ各時間に測定する。

結 果

測定結果をまとめたものが表Iである。表Iを図示したものが図Iであるが、図でみるように、361u, 401u, 802u, 1203uは正常値、臍帯血に比して明らかに光度の差があり、少くとも30分及び45分の測定値は正常値とはっきり区別出来る。しかしここで問題なのは、1203u（正常値の約60倍）の場合、45分以後、光は急速に減衰し初めることで、75分過ぎると低濃度のものとの逆転が起ることである。図でみると、45分が最適の測定時間と思われるが、操作に熟練していても100検体を30分間で測定するのが最大限界と思われるので、測定時間のLagを見込むと30分で測定を開始して100検体が測定限界数である。しかしマスキングで同時に多数の検体を測定する場合には測定時間のLagを考えて、一定時間

中上昇曲線を示すか、或はプラトーとなるような曲線がえられることが望ましい。実際には3000u という高値を与える患者検体の場合、更に早くから減衰が初ることが予想され、逆転のためかえって、正常値に近づくという危険性が考えられる。これらのことから、この方法は実験室でのCPK測定には充分有効であるが、マススクリーニングに関しては尚改良の余地がある。更に高値のものについて検討を行い、濃度の逆転が起らないようなより

よい反応条件を見出すことが必要と思われる。

この点、今後試薬の改良、方法の改良を行うことが必要であり、引続き検討を行う予定である。

文 献

- 1) Zellweger, H. & Antonik : Pediatrics, 55, 30, 1975
- 2) 成瀬 浩 : 東京医学, 83, 300, 1975

表1 日立、PERKIN-ELMER 139型UV-VIS分光光度計
Coarse 8, Fine 11

	CK 活性	20hrs後 B液添加前	15 (分)	30 (分)	45 (分)	60 (分)	75 (分)	90 (分)	120 (分)	180 (分)
Patient 1	401(u)	3 (%)	11.8(%)	20.5(%)	36(%)	57(%)	80(%)	100(%)	115(%)	128(%)
"	401	3.2	11.8	21	36	57	80	98	110	120
"	802	4	35	83	130	150	160	160	150	110
"	1203	5	79	150	190	188	160	140	100	75
Patient 2	361	3	11	19.2	33	52	70	88	108	115
"	361	3	11.8	19.8	32.8	50	68	82	108	115
Patient 3		3	11	19	32	49	65	80	102	110
"		3	11.5	19.8	33.5	52	70	85	108	115
正常血液		3	6	5	5	5	5	5	5	5.2
臍帯血 1		3.5	5.5	6	6.5	7	7.5	7.8	9	10
" 2		3	5.2	5.2	5.5	5.8	6	6	6.2	6.5
Reagent		1	2	2	2	2	2	2	2	2

Unit(Pi Method)=the number of $\mu\ell$ of Phosphates transferred from ATP to Creatine / hour / ml. Serum at 38°C

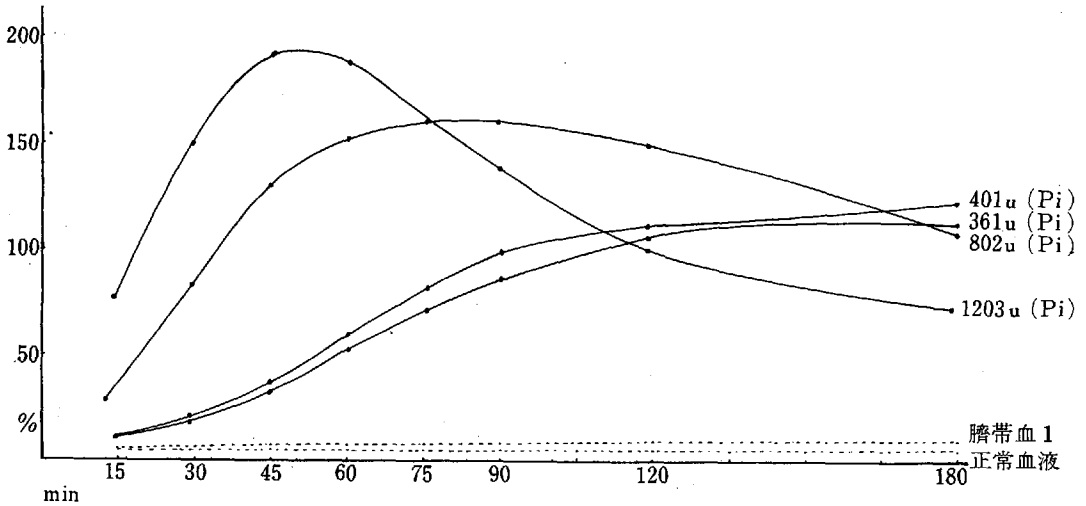
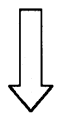
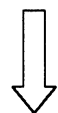


図1 各濃度のCPKによる反応光量の時間変化

(各濃度は無機磷酸法によって求めた血清中のCPK値である。)



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用
論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



目的

CPK の微量測定法としては、いくつかの方法が考案されている。しかし現在もっとも敏感な方法は、Zellweger & Antonik 1)により考案されたものであり、彼等は、この方法を用い、アメリカアイオワあるいはイリノイ州において、先天代謝異常のマススクリーニングの為に、0.4mm 厚の濾紙上に採取された血液を用いて、CPK 活性の測定を行っている。