

〈特集：検査技術の新たな展望（1）〉

## シグナスオートCKの安定化技術

加藤 大介、中尾 友作、飯塚 直美、芳村 一

### **New creatine kinase assay kit for clinical analyzers – Know-How and techniques for reagent stabilization –**

Daisuke Kato, Yusaku Nakao, Naomi Iizuka and Hajime Yoshimura

**Summary** Creatine kinase (CK) is an essential enzyme that is present in various tissues like skeletal muscle, myocardium or brain, and it plays a crucial role in energy metabolism. During muscle or myocardial injury, CK is released from damaged cells, resulting in elevation of CK in the blood. Serum CK can be determined by the coupled enzyme reactions (HK-G-6-PDH assay), which finally detects the increase in the absorbance of NADPH. Based on HK-G-6-PDH assay, the Japan Society of Clinical Chemistry (JSCC) published a reference method of CK measurement for assay standardization across laboratories. In this method, experimental conditions and reagent prescription were optimized for routine analysis, but the preservation stability of the reagents was not well established. To provide commercial CK assay kits that can withstand long-term storage, it is desirable that JSCC prescription be modified in terms of stability. In this study, we focused on N-acetylcysteine (NAC) oxidation and G-6-PDH glycation as key elements that accelerate reagent deterioration. By applying reducing agents and minimized glucose concentration to the reagent, we developed a stable CK assay kit, CYGNUS AUTO CK.

**Key words:** Creatine kinase (CK), N-acetylcysteine (NAC), Oxidation, Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PDH), Glycation

#### I. 緒言

クレアチンキナーゼ（CK）は骨格筋、心筋、脳、その他の平滑筋に分布し、エネルギー代謝上重要な役割を果たしている酵素である。生体内においてCKは（クレアチン+ATP $\rightleftharpoons$ クレアチ

ンリン酸+ADP）の可逆反応を触媒し、高エネルギーリン酸結合（クレアチンリン酸）を貯蔵するプロセスまたはATPの再生産に関与する。急性心筋梗塞などの虚血性心疾患・多発性筋炎・進行性筋ジストロフィー症などの原発性筋疾患で血清CK活性が上昇することから、CKは

株式会社シノテスト 研究開発部  
〒252-0344 神奈川県相模原市南区大野台2-29-14

Shino-test Corporation  
Research & Development Department  
2-29-14 Oonodai Minami-ku, Sagami-hara-shi, Kanagawa  
252-0331, Japan

これらの疾病を反映するマーカーとなることが知られている。

血清CKの測定法として、①上記反応の順反応により生成するクレアチンリン酸またはADPを検出する方法<sup>1,2)</sup>、②逆反応により生成するクレアチンまたはATPを定量する方法<sup>3,4)</sup>がこれまでに報告されてきた。この中でも特にOliverによって開発されたHK-G6PDH法<sup>4)</sup> (図1) はドイツ臨床化学会 (GSCC)、スカンジナビア臨床化学会 (SSCC)、フランス臨床生物学会 (FCBC) そして国際臨床化学連合 (IFCC) 等で勧告法に採用されており、一般的な測定法として広く定着している。国内では日本臨床化学会 (JSCC) がGSCC、SSCC、FCBCなどの検討結果を参考に至適条件の設定を行ってきた。これらのデータを基に1989年、ヒト血清中CK活性の測定法について勧告法が公表され、検査値の統一化が進められた<sup>5)</sup>。

各メーカーより発売されている「JSCC標準化対応」のCK活性測定キットは、勧告法に記載されている試薬組成を参考にして処方が決められている。しかしながら、勧告法試薬の安定性は4℃保存下で5日間 (第一試薬) ・3ヶ月間 (第二試薬) と十分とは言えず<sup>5,6)</sup>、製品としてキット化するためには長期間の保存に耐えうるよう、処方上の工夫を加える必要があった。

そこで弊社ではCKの活性化剤であるN-アセチルシステイン (NAC) および反応系に関与する共役酵素 (G-6-PDH) に着目して改良を重ね、長期間安定なCK活性測定キット「シグナスオー

トCK」を開発した。本稿では特許技術を含め、試薬の安定化方法とその効果について紹介する。

## II. NAC酸化

血清中においてCKは活性中心のSH基がブロックされることにより、不活性な状態で存在している<sup>7)</sup>。CK活性を共役酵素系にて測定するためには、ブロックされたSH基を還元剤により開裂させる必要がある。この為、CK活性測定試薬にはNACなどのチオール基を有する還元剤が処方されており、試薬と検体が混和されると同時にCKを活性化できるようになっている。しかしながら、試薬中に混在する鉄・銅などの微量金属イオンと空気中の酸素の作用によってNACは容易に酸化され、酸化型NACを生成することが知られている。酸化反応を触媒する微量金属イオンによる影響を除くため、EDTAを試薬に添加することが推奨されているが、安定化効果は限定的であり長期保存に適していない<sup>8,9)</sup>。さらに、酸化型NACはCKを活性化できないばかりか、CKに対して阻害活性を有するという報告もある<sup>10)</sup>。このような背景から我々は、NACの酸化が試薬の安定性を損ねる原因の1つであると考え、「NACの酸化防止」に焦点を絞って試薬の改良検討を実施した。

## III. G-6-PDHの劣化

試薬の長期保存に伴い、活性が著しく低下す

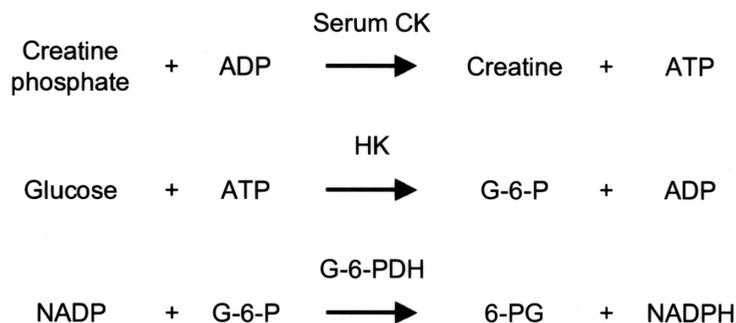


図1 共役酵素反応を用いた血清クレアチンキナーゼ (CK) 活性測定  
 HK: ヘキソキナーゼ、G-6-P: グルコース6リン酸、G-6-PDH: グルコース6リン酸脱水素酵素、  
 6-PG: 6-ホスホグルコノラクトン

る共役酵素としてG-6-PDHを見出した。試薬中のG-6-PDH活性は保存期間と共に直線的に低下し、CK試薬を10℃で12ヶ月間保存した結果、G-6-PDHの残存活性が10%程度まで落ちることがわかっている(図2-A)。また、この時点における高値直線性(CK活性として約5000 U/Lを上限值)を評価すると、1000 U/Lを越える領域で測定値が低下する現象が確認されている(図2-B)。この結果から、酸化型NACの生成とは別に、G-6-PDHの活性低下が試薬の保存安定性に直接的な影響を与えている可能性が示唆された。G-6-PDH活性を低下させる原因物質の同定を行い、G-6-PDHの失活を防ぐ方法について検討を行った。

#### IV. 方法と材料

##### 1. 試薬の安定性評価

試薬を10℃のインキュベーターで12ヶ月間保存し、管理血清の測定を行った。管理血清として同一ロットのAalto Controlを使用し、測定は日立7180形自動分析装置で実施した。得られた吸光度から理論Kファクターを用いてCK活性を算出した。12ヶ月間保存後、0ヶ月目に対する相対感度が90%を下回らないことを安定化の目標とした。

##### 2. NACの含量測定

5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB、同仁

化学)を用いてNACの含量を評価した。DTNBを0.1 Mリン酸バッファー(pH8.0)で溶解し、10 mMとしたものを指示薬とし、この指示薬3 mLに対し0.05 mLのサンプルを添加した際に生じる5-Mercapto-2-nitrobenzoic acid(モル吸光係数 =  $1.55 \times 10^4$ )の吸光度を412 nmにて検出し、NAC濃度を算出した。

##### 3. G-6-PDHの活性測定

G-6-PDH活性測定: 0.1 MグリシルグリシンバッファーpH8.5、2.1 mL、0.1 M塩化マグネシウム0.6 mL、10 mM グルコース-6-リン酸0.15 mL、10 mM NADP 0.15 mLを混和した溶液を調製した。ここへサンプルを0.02 mL添加後、生成するNADPH(モル吸光係数 =  $6.2 \times 10^3$ )の単位時間当たりの吸光度上昇率を340 nmで検出し、活性値を算出した。

##### 4. シグナスオートCKの反応性評価

CK標準操作法(SOP)試薬<sup>1)</sup>を調製し、健常人血清150検体を測定して相関性を検討した。

#### V. 結果

##### 1. NACの酸化防止

###### 1) 酸素の遮断

ボトルに充填した試薬が酸素と接触し、経時的にNACが酸化するのを抑制する目的で次に示す3つの対策を行った。①ボトル素材の検討:

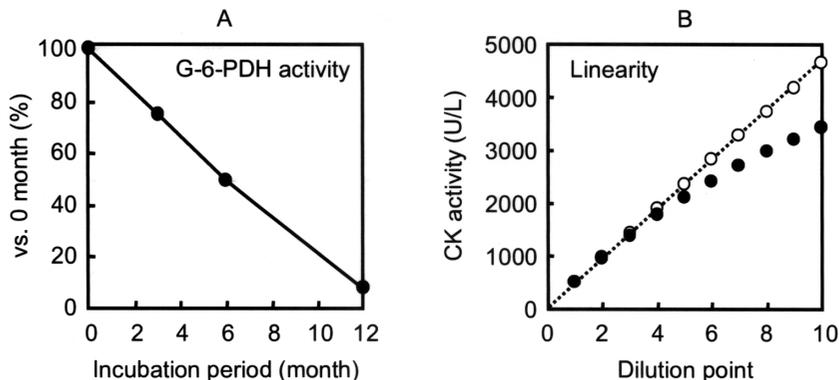


図2 CK活性測定試薬を10℃で12ヶ月間保存した。A: 0、3、6、12ヶ月のポイントにおけるG-6-PDH活性測定。B: 高値直線性(～5000 U/L)の評価。○: 新品の試薬 ●: 10℃・12ヶ月保存試薬

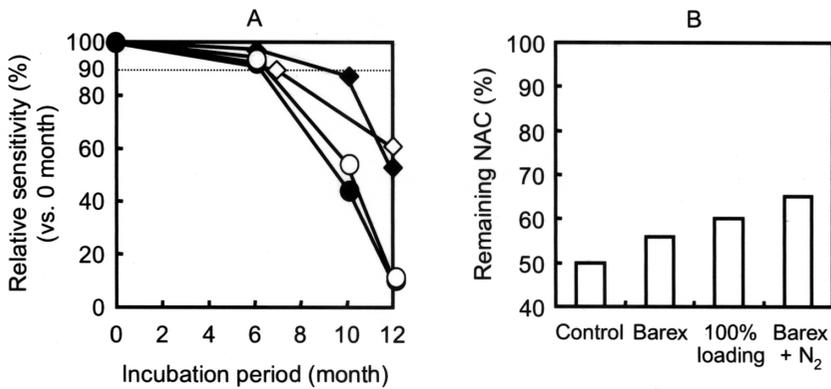


図3 NAC酸化防止の対策を施した試薬を10℃で12ヶ月間保存した。A：0ヶ月目に対する感度変化率のプロット。◇：100%充填 ◆：ガス不透過性ボトル（Barex）+窒素充填 ○：Barexのみ ●：NAC酸化防止対策をしていない試薬（Control）。B：12ヶ月目におけるNAC残存量の比較。ControlにはNAC酸化防止対策をしていない試薬を用いた。

ガス不透過性のボトル（PAN（Barex®）、ニッコー・ハンセン株式会社）に試薬を充填し、酸素の透過を遮断した。②試薬充填量の検討：従来、弊社のCK試薬はボトルの容積に対して約40%の割合で充填されている。この条件下ではボトルと試薬溶液との空隙に存在する空気層（酸素）によってNACの酸化が促進される可能性が考えられた。この空隙を埋めるために試薬の充填量をこれまでの40%から100%へ増量し、試薬が酸素と接触する機会を減らした。③：①と②の両方の効果を期待し、ガス不透過性のボトルへ試薬を40%充填した後に窒素ガスを封入し、ボトルと試薬溶液の空隙を窒素置換した。これらの試薬を10℃で12ヶ月間保存し、感度変化率を経時的に追跡した。コントロールとして、NAC酸化の対策を施していない試薬を用意した。

ガス不透過性のボトルを用いて検討を行った結果、10℃・12ヶ月保存試薬の0ヶ月目に対する相対感度は20%を割り込んだ。これはNAC酸化の対策を施していないコントロール試薬と同等の結果であった。一方、ボトルと試薬溶液との空隙を100%充填により埋めた試薬では大幅な安定化効果が認められた。また、ガス不透過性ボトルに試薬を分注後、窒素ガスを封入した場合も同等の成績が得られた。しかしながら、相対感度はいずれの系列も60%前後であり、弊社が目標とする「10℃・12ヶ月保存で90%」のラインをクリアすることは出来なかった（図3-A）。

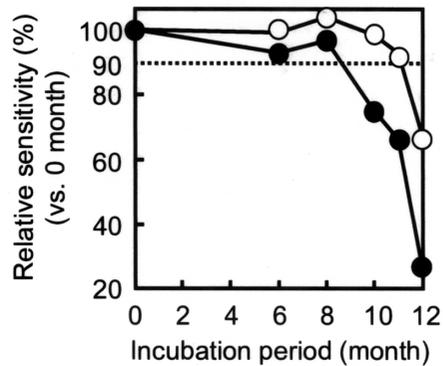


図4 ピロ亜硫酸カリウム（K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>）の効果を確認するため、試薬を10℃で12ヶ月間保存し、0ヶ月目に対する感度変化率をプロットした。○：K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>（+）●：K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>（-）

さらに、12ヶ月間保存した試薬についてNACの含量を測定したところ、残存率は相対感度の序列に対応しており、試薬の劣化具合を反映していた（図3-B）。

## 2) NACの安定化

NACを安定化する目的で、試薬中のNACに還元剤を共存させた処方を選製した。今回、還元剤としてピロ亜硫酸カリウムを選択し、これを処方した試薬を10℃で12ヶ月間保存することで感度変化率を経時的に追跡した。コントロール

として、NAC酸化の対策を施していない試薬を用意した。

ピロ亜硫酸カリウムをNACと共存させた結果、12ヶ月目の相対感度は70%前後であった。酸素の遮断やガス不透過性ボトルを上回る安定化効果が得られたものの、依然として「10℃・12ヶ月保存で90%」の目標を達成できないことが示された(図4)。

## 2. G-6-PDH劣化の原因究明と安定化

### 1) G-6-PDH活性を低下させる原因物質の同定

G-6-PDHが試薬中のどの物質によって劣化するのかを明らかにする目的で、G-6-PDHと共存している原料成分(グルコース、ヘキソキナーゼ(HK)、NAC、ADP、EDTA、 $Mg^{2+}$ 、 $NaN_3$ )を一つずつ抜いた試薬を調製した。コントロールとして全ての成分を処方した試薬を用意した。これらの試薬を37℃で7日間保存(過酷試験)した後、G-6-PDHの活性測定を行った。

過酷試験の結果、処方からグルコースを抜いた試薬についてのみ、G-6-PDH活性が殆ど低下しないことが明らかになった。一方、コントロー

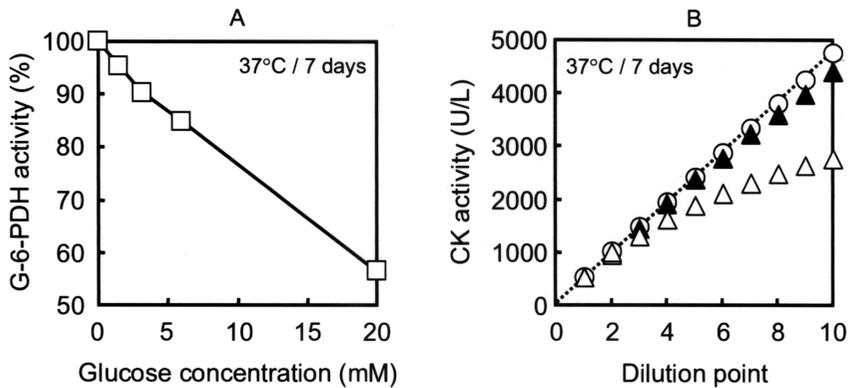


図5 グルコース処方量の異なる試薬(0-20 mM)を37℃で7日間保存した。A: G-6-PDH活性測定。処方量(2400 U/L)に対する残存活性をプロットした。B: 高値直線性(～5000 U/L)の評価。△: 20 mMグルコース処方試薬 ▲: 5 mMグルコース処方試薬 ○: 20 mMグルコース処方試薬(5℃・7日間保存、コントロール)

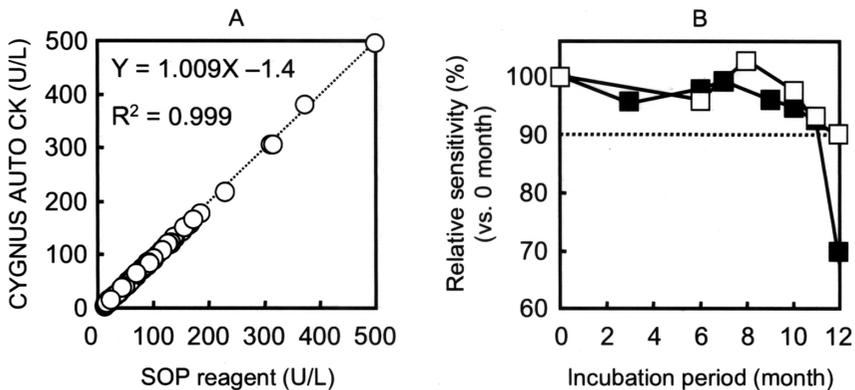


図6 A: シグナスオートCKとSOP試薬との血清相関(150検体)。B: 保存安定性試験(10℃・12ヶ月保存)。0ヶ月目に対する感度変化率をプロットした。□: シグナスオートCK(K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>添加+グルコース減量処方) ■: K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>添加処方(グルコースは減量していない)

ル及びその他の成分を抜いた系列では、G-6-PDH活性が60%程度まで低下していた(表1)。

2) G-6-PDHの安定化

グルコースを減量した試薬を調製し、G-6-PDHの安定化効果について評価を行った。グルコースの最終濃度を勧告法で設定された20 mMから段階的に減量した試薬を調製後、過酷試験を実施してG-6-PDHの残存活性を求めた。また、これらの試薬を用いてCKの高値直線性も評価した。

過酷試験の結果、グルコースを減量した試薬では、G-6-PDHの残存活性が高くなる傾向が認められた。この現象はグルコース濃度依存的であった。さらに、グルコース減量によって高値直線性が大幅に改善した(図5-A, B)。

3. シグナスオートCKの構築と性能評価

NAC酸化防止(ピロ亜硫酸カリウム添加)に加えてG-6-PDH安定化(グルコース減量)の対策を施した試薬「シグナスオートCK」を組み上げた。SOP試薬との反応性評価を血清相関によって確認した後、シグナスオートCKを10℃で12ヶ月間保存し、安定性の評価を行った。

検討の結果、シグナスオートCKはSOP試薬と良好な相関性を示した。また、10℃・12ヶ月保存後の相対感度は目標値の90%を越えており、長期間の保存安定性を確認することができた(図6-A, B)。

VI. 考 察

本検討ではCK活性測定試薬の安定化を目的に実験を行ってきた。試薬の安定性を損なう主要素として①NACの酸化、②G-6-PDHの活性低下を見出し、これらの問題点を克服した「シグナスオートCK」を構築した。シグナスオートCKは勧告法試薬と良好な反応性を担保しつつ、10℃・12ヶ月保存に十分耐えうる安定性を有していることが示された。

①NAC酸化の対策では、試薬と酸素が接触する機会を極力小さくする目的で、試薬の充填量やボトル素材の検討を行った。また、酸化型NACの生成を抑制するために還元剤であるピロ亜硫酸カリウムをNACと共存させた処方を用意した。安定性評価の結果、100%充填やガス不

表1 処方成分(グルコース、NAC、ADP、EDTA、HK、Mg<sup>2+</sup> or NaN<sub>3</sub>)のうち、いずれか1つを含まないCK活性測定試薬を調製した。これらの試薬を37℃で7日間保存後、試薬中のG-6-PDH活性の測定を行った。5℃保存試薬中のG-6-PDH活性を100%として比活性を算出した。尚、コントロールには全ての成分を含む処方を用いた。

Removed Ingredient	G-6-PDH activity (vs. 5℃ storage)
None (Control)	59 %
Glucose	98 %
NAC	57 %
ADP	57 %
EDTA	58 %
HK	60 %
Mg <sup>2+</sup>	61 %
NaN <sub>3</sub>	63 %

透過性ボトルではNAC酸化を完全に防ぐことができず、NAC含量の低下に伴い試薬が劣化することが示された。一方、NACにピロ亜硫酸カリウムを共存させた処方では試薬の安定性が大幅に向上していた。なお、この処方は弊社の特許技術である(特開平9-70298)。ピロ亜硫酸カリウムの還元作用により、経時的なNAC含量の低下が抑制され、酸化型NACによるCK活性阻害が回避された可能性が予測される。しかしながら、ピロ亜硫酸カリウムの効果は十分でなく、「10℃・12ヶ月保存で相対感度90%」のラインをクリアできなかった。これらの検討より、NACの酸化防止だけでは納得のいく保存安定性を獲得することが困難であることが明らかになった。

②について、これまでにG-6-PDHはグルコース、ガラクトース、フルクトースなどの単糖存在下で糖化修飾され、不可逆的に活性阻害を受けることが報告されている<sup>12)</sup>。G-6-PDHの活性中心に存在するアスパラギン酸・ヒスチジン・リシンは基質であるグルコース-6-リン酸の結合および触媒作用において重要な役割を担っている<sup>13)</sup>。この中でも特にリシン残基には糖化修飾のターゲットとなるεアミノ酸が存在すること

から、この部分がグルコースによって非酵素的に修飾され、活性阻害を受けているものと推察できる。したがって、グルコースの減量によってG-6-PDHが安定化された背景には、糖化反応を受けるG-6-PDHの割合が減少したことが直接的に関与していると考えられた。

以上の検討から、CK活性測定試薬の劣化にはNAC酸化とG-6-PDHの糖化修飾の両方が寄与していることが示された。試薬にこの2つの対策を施すことで、従来の試薬と比較して優れた保存安定性を獲得でき、1年間を通して良好な特異性・高値直線性を確保することが可能になった。

臨床検査薬によって得られる生体内の情報は、疾病の診断や治療方針を決める上で重要な判断材料となる。このため臨床検査薬には、常に安定したデータを臨床の現場にフィードバックできるだけの性能が求められる。万が一、長期保存などにより試薬が劣化した場合、正確なデータが得られないばかりか、誤った診断結果を提供してしまうことが懸念される。特に、CK活性測定試薬における感度の低下は偽低値の原因となり、病態の解釈に混乱を来す可能性も危惧される。したがって、試薬の保存安定性を向上させることは「信頼性のあるデータを安定的に提供する」という目標に貢献できるものと考えられる。今回開発したシグナスオートCKは弊社従来品よりも保存安定性に優れ、かつ勧告法試薬と良好な相関性を示すことから、臨床検査の現場で検査の質を高める一助となることが期待される。

#### 文献

- 1) Nuttall FQ and Wedin DS: A simple rapid colorimetric method for determination of creatine kinase activity. *J Lab Clin Med*, 68(2): 324-332, 1966.
- 2) Tanzer ML and Gilvarg C: Creatine and creatine kinase measurement. *J Biol Chem*, 234: 3201-3204, 1959.
- 3) Conn RB Jr, Anido V: Creatine phosphokinase determination by the fluorescent ninhydrin reaction. *Am J Clin Pathol*, 46(2): 177-184, 1966.
- 4) Oliver IT: A spectrophotometric method for the determination of creatine phosphokinase and myokinase. *Biochem J*, 61(1): 116-122, 1955.
- 5) 日本臨床化学会: ヒト血清中酵素活性測定の勧告法, 臨床化学, 第33巻補冊 1号: p.53a-77a, 2004.
- 6) Hørder M, Elser RC, Gerhardt W, Mathieu M, Sampson EJ: International Federation of Clinical Chemistry (IFCC): Scientific Division, Committee on Enzymes. IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 7. IFCC method for creatine kinase (ATP: creatine (N-phosphotransferase, EC 2.7.3.2). IFCC Recommendation. *J Automat Chem*, 12(1): 22-40, 1990.
- 7) Reddy S, Jones AD, Cross CE, Wong PS, Van Der Vliet A: Inactivation of creatine kinase by S-glutathionylation of the active-site cysteine residue. *Biochem J*, 347 Pt 3: 821-827, 2000.
- 8) Gerhardt W, Waldenström J, Gruber W: EDTA effect on creatine kinase (CK) and on the SCE reagent. *Scand J Clin Lab Invest*, 39(8): 737-742, 1979.
- 9) Sandifort CR: Effects of ethylenediaminetetraacetate on "CK-NAC" reagent stability and measured creatine kinase activities. *Clin Chem*, 23(11): 2169-2170, 1977.
- 10) Zhao TJ, Yan YB, Liu Y, Zhou HM: The generation of the oxidized form of creatine kinase is a negative regulation on muscle creatine kinase. *J Biol Chem*, 282(16): 12022-12029, 2007.
- 11) 日本臨床検査標準協議会: JCCLSによる酵素活性測定の標準操作法 (SOP) クレアチンキナーゼ (CK), 日本臨床検査標準協議会会誌, 17(2): 68-71, 2002.
- 12) Ganea E, Harding JJ: Inactivation of glucose-6-phosphate dehydrogenase by glycation. *Biochem Soc Trans*, 22(4): 445S, 1994.
- 13) Ganea E, Harding JJ: Molecular chaperones protect against glycation-induced inactivation of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Eur J Biochem*, 231(1): 181-185, 1995.