

《使用経験》

Radioimmunoassay (Phadebas β_2 -micro Test) による血清
 β_2 -microglobulin 濃度測定の基礎的ならびに臨床的検討

池 窪 勝 治*	遠 藤 啓 吾*	福 永 仁 夫*	吉 井 正 雄*
石 川 演 美*	千 種 貞 子*	小 西 淳 二*	森 田 陸 司*
鳥 塚 莞 爾*	浜 田 哲**	森 徹***	

1. 結 言

Berggård¹⁾ によって精製されたヒト β_2 -microglobulin (以下 β_2 -micro) は分子量 11,800 の低分子量の蛋白質で、ヒトの血液、尿、髄液、唾液および乳液等に存在する^{1), 2)}。 β_2 -micro は正常腎の糸球体を容易に通過し、大部分は尿細管で再吸収され異化される^{3), 4)}。この蛋白は組成上、血清 IgG の H 鎖及び L 鎖の不変部と極めて類似し^{5), 6)}、又 HL-A 抗原の不変部と同一であると報告されている^{7), 8)}。その機能は不明であるが、リンパ球で産生され⁹⁾しかもその表面に存在する¹⁰⁾事実から β_2 -micro の免疫との関連性が注目されている。

近年、臨床的応用として腎疾患における糸球体濾過値の測定や糸球体性と尿細管性の蛋白尿の鑑別に有用¹¹⁾とされている。

著者らは塩野義製薬(株)の好意により phadebas β_2 -micro Test の提供を受け、本キットの基礎的検討を行なうとともに臨床的検討として、腎疾患、甲状腺疾患を含む各種自己免疫疾患、悪性腫瘍患者の血清 β_2 -micro 濃度を測定したので、これら

の成績を報告する。

2. Phadebas β -micro Test の原理

本法では抗 β_2 -micro 抗体をセファデックスに結合させて固相としている。従って標準 β_2 -micro 又は未知検体中の β_2 -micro と ^{125}I 標識 β_2 -micro の競合作用により抗体と結合した結合型 β_2 -micro と遊離型 β_2 -micro の分離は、遠沈操作により簡単に行なうことが出来る固相法 radioimmunoassay (RIA) である。

3. キットの構成及び試薬の調製

1 キットは duplicate で 18 検体測定用である。

(1) 緩衝剤 6.3g (粉末) 1 びん

300ml の再蒸留水で溶解し、これにツィーン溶液 5ml を加え緩衝液とする。

(2) 標準 β_2 -micro 溶液 1 びん (凍結乾燥品)

2.0ml の再蒸留水を加えて溶解する。本溶液は 96 $\mu\text{g/l}$ 濃度の β_2 -micro を含んでいる。標準曲線の作成のため、緩衝液で倍々希釈して 0~96 $\mu\text{g/l}$ 濃度の標準溶液を調整する。

(3) Sephadex-anti- β_2 -micro complex 1 びん (凍結乾燥品)

5.0ml の再蒸留水を加えて溶解し、1.0ml のツィーン溶液を加えて調整する。

(4) ^{125}I - β_2 -micro 1 びん (凍結乾燥品)

5.5ml の再蒸留水を加えて溶解する。その比放射能は 94 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ である。

* 京大放射線部及び放射線科

** 京大放射性同位元素総合センター

*** 神戸中央市民病院 内科

受付: 51 年 1 月 16 日

採用: 51 年 3 月 11 日

別刷請求先: 京都市左京区聖護院川原町 (〒606)

京大医学部放射線科

池 窪 勝 治

4. 測定操作法

被検血清は緩衝液 10 ml に血清 50 μ l を加えて 201 倍に希釈する。高値が予想されるものは 2 段階で 1,000~2,000 倍に希釈する。

(1) 標準 β_2 -micro 及び希釈被検血清の各 0.1 ml を試験管にとる。試験管はプラスチック製シオノギチューブを使用した。

(2) ^{125}I - β_2 -micro 溶液 0.1 ml を各試験管に加える。

(3) Sephadex-anti- β_2 -micro complex 懸濁液をスターでかくはんしながらその 0.1 ml を各試験管に加える。

(4) 試験管を Vortex-mixer で混合し、密栓後室温にて 3 時間、rotator を用いてインキュベートする。

(5) 2,000 xg で 5 分間遠沈する。

(6) 栓をはずし、生理食塩水 2.0 ml を加え、2,000 xg で 2 分間遠沈分離する。

(7) ストッパー付サクシヨノズルを使用して上清を管底から 5 mm のところまで吸引除去する。

(8) この洗浄操作を更に 2 回くり返す。

(9) 自動ウエル型シンチレーションカウンタで各チューブの放射能を各 2 分間測定する。

(10) 零サンプルのカウント数の平均値 (B_0) と標準 β_2 -micro 及び被検血清のカウント数の平均値 (B) の比 B/B_0 (%) を計算する。

(11) 片対数グラフの横軸に β_2 -micro 濃度を取り、縦軸に B/B_0 (%) をプロットして標準曲線を作成する。

(12) 標準曲線より各被検血清の β_2 -micro 濃度を読みとる。

5. 実験方法及び実験対象

基礎的検討として、(1) インキュベーション温度、(2) インキュベーション時間、(3) 希釈試験、(4) 回収試験、(5) 交叉試験、(6) 再現性について検討した。

臨床的検討として、京大病院入院及び外来通院中の腎疾患 52 例、甲状腺疾患 99 例、甲状腺以外

の自己免疫疾患 8 例、痛風 9 例、白血病 5 例、肺癌 11 例、胃癌 23 例、大腸癌 11 例の合計 218 例を対象とし、正常者は京大病院勤務者で臨床的に健康と認められる 25 例を対象とした。慢性腎炎 21 例については血清クレアチニン濃度との関係、胃及び大腸癌 30 例については血清 carcinoembryonic antigen (CEA) 値との関係について検討した。

6. 実験成績

1) 基礎的検討

(1) インキュベーション温度の影響

25°C と 4°C における零サンプルの結合型 β_2 -micro のカウント数 (B_0) と全カウント数 (T) の比 B_0/T (%) を比較すると、25°C では 11.3%, 4°C で 10.2% であり、前者で若干結合 % が高い。25°C と 4°C における標準曲線は Fig. 1 に示す如く両者はよく平行し、温度による影響は少なかった。

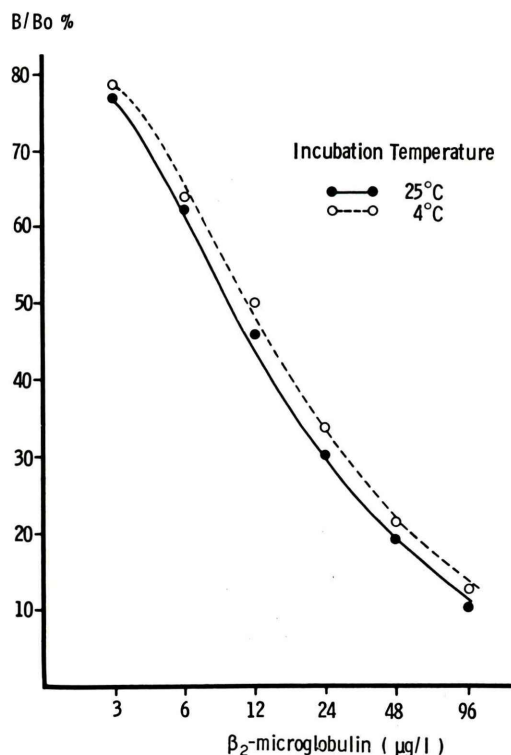


Fig. 1 Effect of incubation temperature on standard curve

(2) インキュベーション時間の影響

1.5時間、3時間及び6時間の B_0/T (%) はそれぞれ 8%, 10%, 11.1% であり、時間と共に結合%は増加するが、3時間以後では僅かである。又各時間の標準曲線は Fig. 2 の如くであり、1.5時間では高濃度でやや不安定である。3時間と6時間ではよく平行している。

(3) 標準曲線

Fig. 3 に室温、3時間のインキュベーションで得られた標準曲線を示す。10回測定した平均値は低濃度ではややバラツキが大きい、概ね良好な再現性を示した。

(4) 希釈試験

正常血清をキットの緩衝液で希釈した場合の希釈曲線を Fig. 4 に示すが、50~400倍希釈で、標準曲線とよく平行した。

(5) 回収試験

正常血清に各種濃度の標準 β_2 -micro を添加し、

それをキットを用いて測定した回収成績を Fig. 5 に示す。平均回収率は 101.3% であった。

(6) 交叉試験

アッセイ系に人血清アルブミン、 γ -グロブリン及び IgG を加えて、 ^{125}I - β_2 -micro と抗体の結合に及ぼす影響を検討した。Fig. 6 に示すように、アルブミン及び γ -グロブリンでは影響は認められず、IgG では正常血清の約 20 倍量で若干の結合%の減少がみられた。

(7) 再現性

Table 1(a) は同一キットを用いて、3種類の濃度の血清を各6回測定した成績を示す。変動範囲は 4.4~8.2% であった。又(6)には異なった10キットを用いて、3種類の濃度の血清を測定した成績を示すが、変動範囲は 7.1~15% であった。

2) 臨床成績

(1) 正常者ならびに各種疾患患者の血清 β_2 -micro 測定値

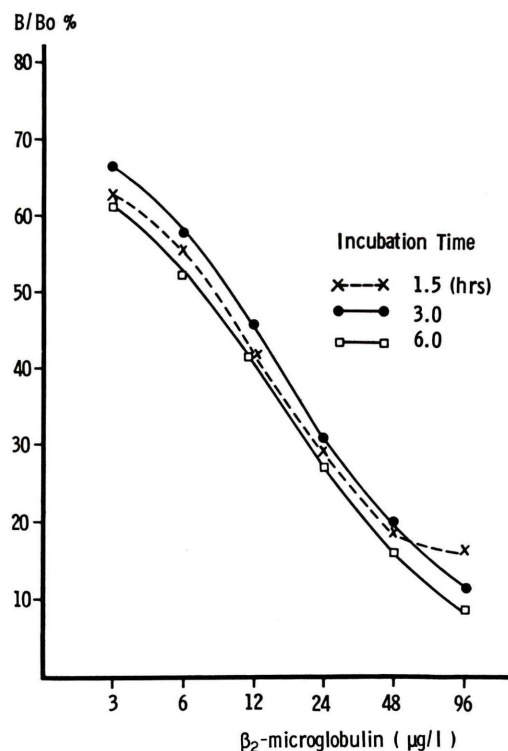


Fig. 2 Effect of incubation time on standard curve

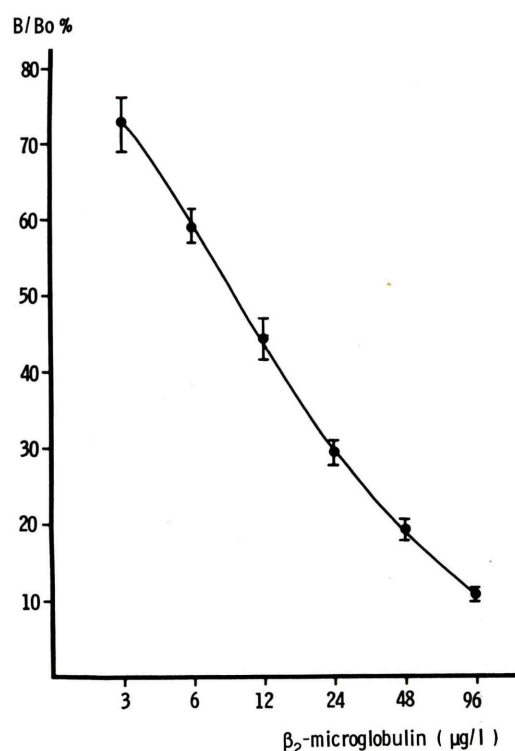


Fig. 3 Standard curve

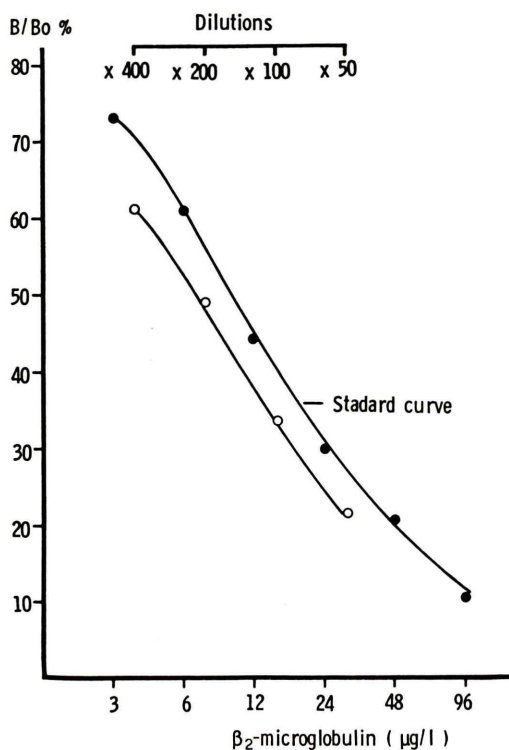
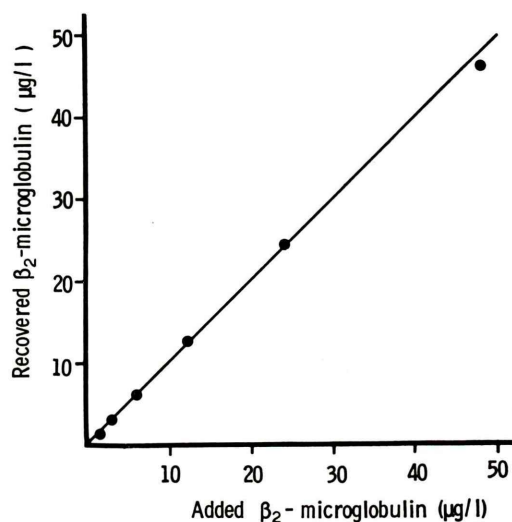


Fig. 4 Dilution curve (O) of serum with buffer

Fig. 5 Recovery of β_2 -microglobulin added to normal serum and then measured by radioimmunoassay.**Table 1** Reproducibility of β_2 -microglobulin values.(a) Reproducibility of β_2 -microglobulin concentrations using the same kit

Sample No.	β_2 -microglobulin conc. $\mu\text{g/l}$						Mean \pm S.D.
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	
1	12.7	13.7	13.7	12.5	12.5	12.7	12.97 \pm 0.57
2	20.1	24.1	23.5	24.7	21.1	24.1	22.93 \pm 1.87
3	84.4	96.5	86.4	94.5	84.4	94.5	90.11 \pm 5.63

(b) Reproducibility of β_2 microglobulin concentrations using the different kit

Sample No.	β_2 -microglobulin conc. $\mu\text{g/l}$										Mean \pm S.D.
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	
1	7.0	6.4	7.7	5.4	5.5	5.3	5.8	5.8	4.6	6.0	5.95 \pm 0.89
2	7.9	11.4	11.3	9.6	9.8	9.0	10.0	8.4	10.5	10.5	9.84 \pm 1.16
3	44.0	44.8	44.0	44.0	44.0	52.0	44.0	43.0	39.0	45.0	44.4 \pm 3.17

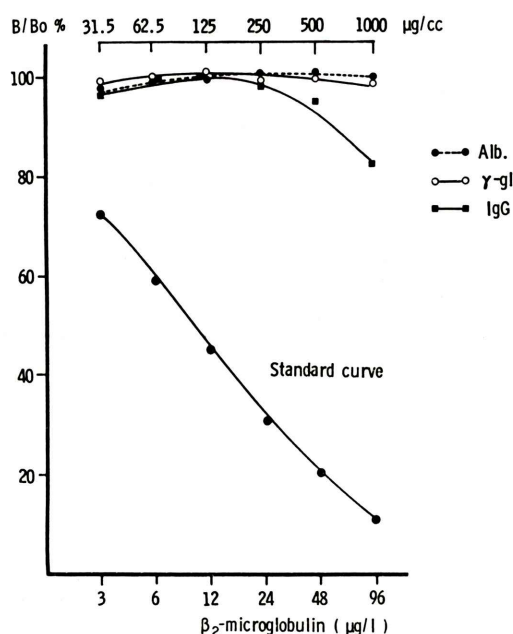


Fig. 6 Influence of albumin, γ -globulin and IgG on β_2 -microglobulin assay system.

Fig. 7 に正常者 25 例, 各種疾患 218 例における血清 β_2 -micro の測定成績を示す。正常者は $0.7 \sim 2.1 \mu\text{g/ml}$ に分布し, 平均値 1.3 ± 0.3 (標準偏差) $\mu\text{g/ml}$ であった。慢性腎炎では正常値から高値まで広く分布し, 半数例が $2 \sim 10 \mu\text{g/ml}$ の高値を示し, 平均値 3.3 ± 2.8 (標準偏差) $\mu\text{g/ml}$ であった。腎不全患者は全例が透析治療中のものであり, その値は $10 \sim 112 \mu\text{g/ml}$ の異常高値を示し, 平均値 $49.2 \pm 23.0 \mu\text{g/ml}$ であった。甲状腺疾患患者では大部分が正常範囲であったが, 橋本病, バセドウ病, 腺腫及び癌の少数例に高値を示す症例がみられた。自己免疫疾患及び痛風では高値の傾向が見られた。しかしながら痛風は全例が血清クレアチニンが $0.9 \mu\text{g/ml}$ 以上であった。癌では約 40% が高値を示した。

(2) 慢性腎炎における血清 β_2 -micro 濃度と血清クレアチニン濃度の関係

Fig. 8 に慢性腎炎 21 例における血清 β_2 -micro

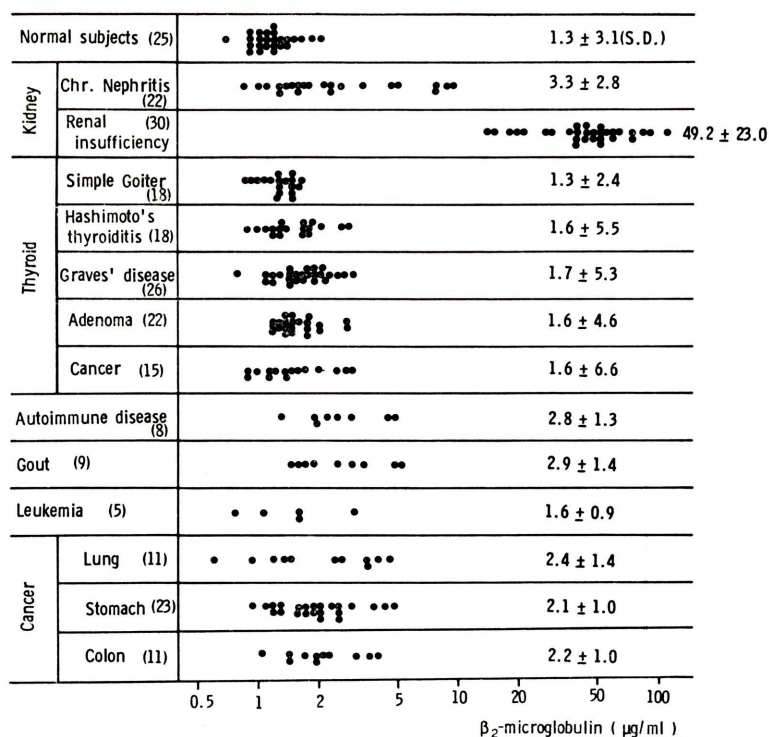


Fig. 7 Serum β_2 -microglobulin concentration in various disorders.

濃度と血清クレアチニン濃度の関係を示すが、両者の間には $r=0.96$ の相関関係が認められた。

(3) 胃及び大腸癌における血清 β_2 -micro 濃度と血清 CEA 濃度の関係

Fig. 9 に胃癌 21 例と大腸癌 9 例、合計 30 例における血清 β_2 -micro 濃度と血清 CEA 濃度の関係を示すが、 $r=0.37$ の相関が認められた。又胃癌および大腸癌のそれぞれの相関係数は 0.51 及び 0.74 であった。

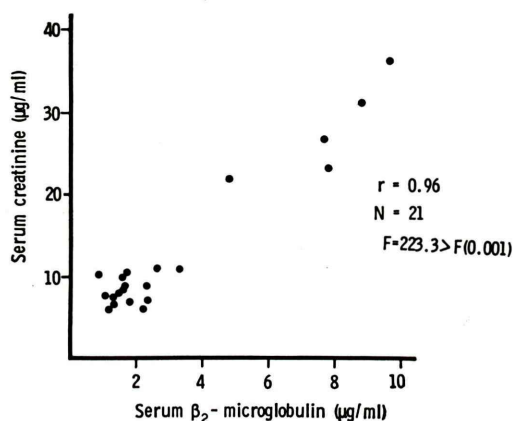


Fig. 8 Relationship between serum concentrations of β_2 -microglobulin and creatinine in 21 patients with renal disease.

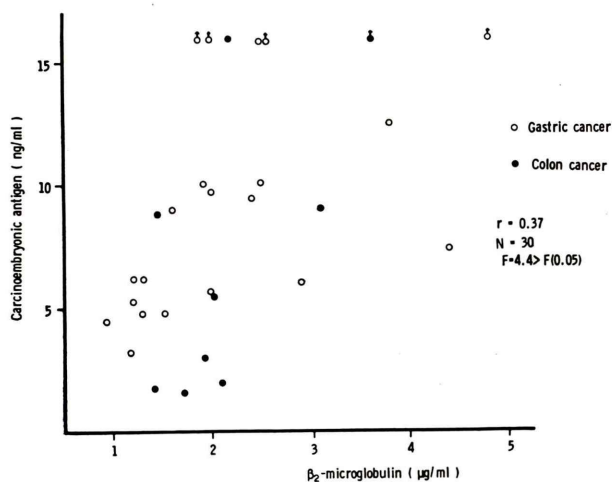


Fig. 9 Relationship between serum concentrations of β_2 -microglobulin and carcinoembryonic antigen in 9 patients with colon cancer (•) and 21 patients with gastric cancer (○)

7. 考 按

Phadebas β_2 -micro Test の基礎的検討を行なうとともに臨床的な有用性について検討した。

基礎的検討の結果、本アッセイ系ではインキュベーション温度の影響は少なく、 $B_0/T(\%)$ は3時間のインキュベーションで6時間のインキュベーションに匹敵する結合%が得られ、また良好な標準曲線の得られることから、室温、3時間のインキュベーションが適当と考えられた。

希釈試験では50~400倍希釈で標準曲線とよく平行し、本キットの緩衝液が被検血清の希釈溶液として不都合はないものと考えられた。又回収率も良好であり、血清アルブミン、 γ -グロブリン及びIgG等とも交叉反応を示さないことから、 β_2 -micro に特異なアッセイ系と考えられた。再現性に関しては同一キット内での変動は4.4~8.2%、異なったキット間では7.1~15%であり、ほぼ良好と考えられた。被検血清を201倍に希釈して測定するため、若干手数がかかる難点はあるが、この点を除けば操作は簡便であり、十分臨床的应用に適すると考えられる。

臨床的検討において、慢性腎炎では血清クレア

チニンと極めて良好な相関が認められた。これは従来の報告¹¹⁾と一致し、腎機能検査として有用であると考えられる。甲状腺疾患では若干例に高値のものがみられたが、これらの症例で腎機能検査は行なっておらず、 β_2 -micro 濃度高値が腎障害に基づくものかどうか不明である。しかしながら一般に甲状腺疾患において腎障害を伴うことは多くないことから、その意義については今後の検討が必要である。この点、他の自己免疫疾患においてクレアチニンは $0.8 \mu\text{g/ml}$ 以下にもかかわらず β_2 -micro 高値のものが認められており、免疫異常に基づく可能性も考えられ、その臨床経過での検討が興味深いと考えられる。癌患者では約 40% に β_2 -micro の高値が認められしかも CEA 値と有意の正相関が認められた。このことは癌の進展につれて β_2 -micro 高値を示す傾向を示唆する興味ある所見と考えられるが、腎機能との対比を十分行なっておらず、今後癌の進展度、腎機能との関係において、更に検討する必要がある。

8. 総括ならびに結論

Phadebas β_2 -micro Test の基礎的および臨床的検討を行ない、以下の成績を得た。

- (1) 本法の手技は簡便であり、被検血清は 0.05 ml と微量ですむ。室温で 3 時間のインキュベーションが至適であり、再現性も良好であった。
- (2) 本法の測定成績は慢性腎疾患において、血清クレアチニン値と良好な相関を示し、腎不全患者では全て異常高値を示した。

- (3) 甲状腺疾患をはじめ各種自己免疫疾患の若干例に β_2 -micro 濃度高値を示すものがある。又癌疾患では 40% に β_2 -micro 高値のものを認め、大腸癌の CEA 値との間に正相関が認められた。

本キットを提供して頂いた塩野義製薬㈱に深謝いたします。

本論文の要旨は昭和 50 年 10 月第 15 回日本核医学会総会において発表した。

文 献

- 1) I. Berggård, A. G. Bearn.: J. Biol. Chem. **243**: 4095, 1968.
- 2) P-E. Evrin, P. A. Peterson, L. Wide, I. Berggård.: Scand. J. Clin. Lab. Invest. **28**: 439, 1971.
- 3) P.A. Peterson, P-E. Evrin, I. Berggård.: J. Clin. Invest. **48**: 1189, 1969.
- 4) G. M. Bernier, M.E. Conrad.: Amer. J. Physiol. **217**: 1359, 1969.
- 5) P. A. Peterson, B. A. Cunningham, I. Berggård, G. M. Edelman.: Proc. Nat. Acad. Sci. USA. **69**: 1697, 1972.
- 6) O. Smithies, M. D. Poulik.: Science. **175**: 187, 1972.
- 7) K. Nakamuro, N. Tanigaki, D. Pressman.: Proc. Nat. Acad. Sci. USA. **70**: 2863, 1973.
- 8) H. M. Grey, R. T. Kubo, S. M. Colon, M. D. Poulik, P. Cresswell, T. Spriger, M. Turner, J. L. Strominger.: J. Exp. Med., **182**: 1608, 1973.
- 9) G. M. Bernier, M. W. Fanger.: J. Immunol, **109**: 407, 1972.
- 10) J. H. Hütteroth, H. Cleve, S. D. Litwin, M. D. Poulik.: J. Exp. Med. **137**: 838, 1973.
- 11) P. A. Peterson, P-E. Evrin, I. Berggård.: J. Clin Invest, **48**: 1189, 1969.