

《原 著》

Radioimmunoassay による血中 β_2 -microglobulin の基礎的検討と臨床応用

畔 立子* 網野 信行* 川島 実** 宮井 潔*
能原 雄一*

β_2 -microglobulin は 1968 年 Berggård らにより分離された 100 個のアミノ酸からなる分子量 11800 の低分子蛋白であり¹⁾、1971 年 Evrin らにより Radioimmunoassay (以下 RIA と略) による測定法が開発され、その測定が可能となった²⁾。

現在までの報告によると、血中 β_2 -microglobulin はイヌリン負荷による GFR と負の相関をするといわれ、又尿中 β_2 -microglobulin の測定は糸球体性腎疾患と尿細管性腎疾患との鑑別に有用であるとされている^{3),4)}。一方、この蛋白はリンパ球表面にある組織適合抗原 (HL-A 抗原) の subunit や IgG globulin 分子のうち特に CH_3 に分子構造上類似しているため、免疫疾患との関連性が問題にされている^{5),6),7)}。例えば骨髄腫などの悪性疾患や自己免疫疾患の一部の例で高値であるとの報告⁸⁾がみられる。しかしその臨床的意義についてはなお不明の点が多い。

著者らは、まず β_2 -microglobulin RIA の基礎的検討をおこなった。次いで臨床応用として従来報告のない自己免疫疾患である慢性甲状腺炎とバ

Table 1 Procedure of radioimmunoassay for β_2 -microglobulin

| | |
|---|-------------------|
| Serum or plasma sample ($\times 200$) or standard solution | 100 μl |
| β_2 -microglobulin- ^{125}I | 100 μl |
| Sephadex-Anti- β_2 -microglobulin | 100 μl |
| ↓ | |
| Incubation on a shaker for 3h. at room temperature | |
| ↓ | |
| Add 2 ml 0.9% Saline | |
| ↓ | |
| Centrifuge the tubes at 2000 g for 2 min. | 3 time (wash) |
| ↓ | |
| Withdraw the supernatant to approximately 7 mm from the bottom | |
| ↓ | |
| Count the radioactivity in each of the tubes | |

セドウ病及び悪性疾患である甲状腺癌について検討し考察を加えた。

I. 材料、対象および方法

1. 材 料:

β_2 -microglobulin RIA キット (Pharmacia 社製) は標識抗原として比放射能 100 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ の ^{125}I - β_2 -microglobulin を、B·F 分離には固相法を用いている。ヒト γ -globulin はミドリ十字社製、IgG はバセドウ病患者の血清より著者らが精製分離した

* 大阪大学医学部附属病院中央臨床検査部

** 大阪血清微生物研究所

受付: 51 年 4 月 9 日

最終稿受付: 51 年 9 月 16 日

別刷請求先: 大阪市福島区福島 1-1-50

大阪大学医学部附属病院

中央臨床検査部

畔 立子

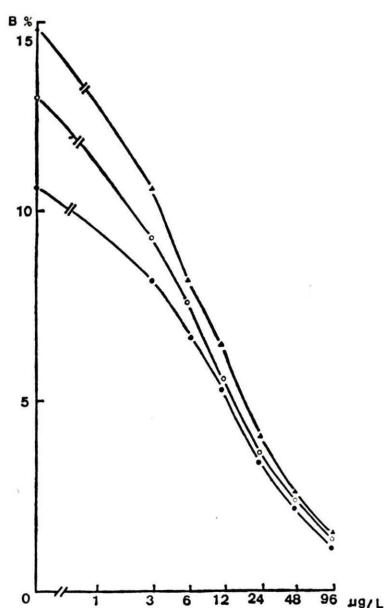


Fig. 1 Standard curves after incubation for three hours (●-●), six hours (○-○) and twelve hours (▲-▲).

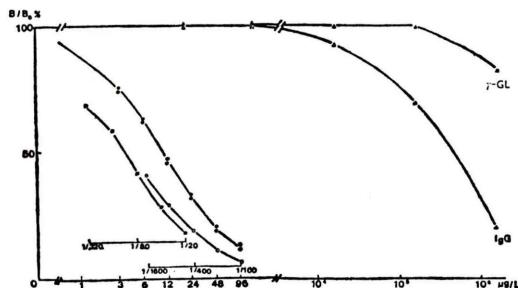


Fig. 2 Standard curve (●-●). Dilution curves; normal serum (■-■) and uremic serum (○-○). Effect of human IgG (Δ - Δ) and γ -globulin (\blacktriangle - \blacktriangle) on radioimmunoassay system

Table 2 Serum β_2 -microglobulin value in normal subject at different ages.

| age | n | mean \pm S.D. (mg/l) |
|-------|----|------------------------|
| 20-29 | 26 | 1.18 \pm 0.27 |
| 30-39 | 13 | 1.41 \pm 0.28 |
| 40-49 | 14 | 1.58 \pm 0.34 |
| 50-60 | 20 | 1.79 \pm 0.33 |
| Total | 73 | 1.46 \pm 0.38 |

ものをもちいた。

2. 測定法:

測定には Table 1 の如く原法通り施行した。クレアチニンの測定には Folin Wu 法を用いた。測定に用いた血清は採血後血清分離し -18°C に凍結したもの 1 年以内に測定した。

3. 対象:

健常人は 20~60 歳の成人男子 36 名、女子 37 名計 73 名で病院職員及び会社健康診断で異常のない者を選んだ。クレアチニン高値血清は各種疾患患者を対象とし、又甲状腺疾患患者は我々の内分泌外来を受診し検尿で異常のない者を選び諸種検査にて確定診断のついた患者を対象とした。

II. 結果

1. 基礎的検討:

Incubation 時間による影響をみると、室温で 1~48 時間にわたり incubation すると $B_0\%$ は漸増し 24 時間でほぼ plateau に達した。Incubation を 3, 6, 24 時間とした時の標準曲線を比較すると Fig. 1 の如く $B_0\%$ は時間と共に上昇したが、 B/B_0 でみると大差はなかった。Incubation 終了後、沈澱の放射活性は洗浄により減少するが、その減少は洗浄 2 回以後では極めて緩かで洗浄回数は 3 回で充分と考えられた。標準曲線は 1~96 $\mu\text{g}/\text{L}$ の間で測定可能で 50% intercept はほぼ 10 $\mu\text{g}/\text{L}$ であり B_0/T は 10~15% であった。他の血清蛋白に対する交叉率をみると Fig. 2 の如くミドリ十字社製ヒト γ -globulin で $1.33 \times 10^{-4}\%$ 、バセドウ病患者血清の IgG では $3.57 \times 10^{-3}\%$ 以下であった。血清希釈による影響の検討のため、 β_2 -microglobulin 高値の患者血清を緩衝液で連続倍数希釈して測定したところ、その曲線は標準曲線とよく平行した。標準 β_2 -microglobulin を 0.15~4.5 ng/ml の濃度で健常人血清に添加した際の回収率は $103 \pm 3.7\%$ であった。同一検体での測定再現性を C.V. であらわすと intraassay variation 8.6%，interassay variation は同一 lot 内で 8.9% であった。被検血清につき凍結融解を 6 回反覆おこなっても測定値に有意差はなかった。

Table 3 Serum β_2 -microglobulin levels in Graves' disease, chronic thyroiditis and thyroid carcinoma

| Graves' disease | | | | | |
|-----------------|-----|---------------------------------------|------------------|-----------------|-------------------------|
| Case | Age | serum β_2 -microglobulin (mg/l) | before treatment | after treatment | serum creatinine (mg/l) |
| 1 | 54 | 1.59 | 1.91 | | 1.0 |
| 2 | 43 | 2.80* | 1.58** | | 1.1 |
| 3 | 47 | 2.15 | 1.76 | | 1.0 |
| 4 | 28 | 1.56 | 1.74 | | 1.0 |
| 5 | 54 | 2.85* | 1.91** | | 0.6 |
| 6 | 33 | 2.35* | 2.02** | | 0.8 |
| 7 | 47 | 2.80* | 2.43 | | 0.6 |
| 8 | 35 | 0.98 | 1.25 | | 0.8 |

| Chronic thyroiditis | | | |
|---------------------|-----|--------------------------------|------------------|
| Case | Age | serum β_2 -microglobulin | Serum creatinine |
| 1 | 32 | 1.92 | 0.7 |
| 2 | 55 | 3.2 * | — |
| 3 | 24 | 2.7* | — |
| 4 | 60 | 4.1 * | — |
| 5 | 26 | 1.74* | — |
| 6 | 27 | 1.90* | — |
| 7 | 24 | 1.54 | — |
| 8 | 20 | 1.60 | 0.8 |
| 9 | 66 | 2.60* | 1.1 |
| 10 | 56 | 1.79 | — |

| Thyroid carcinoma | | | | |
|-------------------|-----|--------------------------------|------------------|---------------------------|
| Case | Age | Serum β_2 -microglobulin | serum creatinine | histology |
| 1 | 54 | 1.70 | 0.9 | papillary adenocarcinoma |
| 2 | 48 | 1.82 | 0.9 | follicular adenocarcinoma |
| 3 | 58 | 2.69* | 0.9 | follicular adenocarcinoma |
| 4 | 41 | 1.59 | 0.9 | medullary carcinoma |
| 5 | 14 | 1.96 | 0.8 | follicular adenocarcinoma |
| 6 | 65 | 2.62* | 1.0 | squamous cell carcinoma |
| 7 | 62 | 2.74* | 1.1 | reticulum cell sarcoma |
| 8 | 41 | 2.27* | 0.9 | anaplastic cell carcinoma |
| 9 | 65 | 2.29 | 1.2 | papillary adenocarcinoma |
| 10 | 24 | 0.94 | — | papillary adenocarcinoma |

* high value ** normal value after treatment

2. 臨床成績:

健常人3名において、6, 12, 18時に採血をおこない日内リズムを検討したところ有意の変動はなかった。健常人73名の β_2 -microglobulin値は平均値 \pm S.D. であらわすと、 $1.46 \pm 0.38 \text{mg/l}$ で平均値 \pm 2S.D. より求めた範囲は $0.70 \sim 2.22 \text{mg/l}$ であった。男女差は認められず、各年代別の男女間にも差はなかった。一方、各年代における平均値は加齢と共に増加し、分散分析による検定をおこなうと $F_{69}^3 (0.1\%) = 16.6$ で有意差が認められた(Table 2)。

血中クレアチニン値異常者の血中 β_2 -microglobulinを測定すると各種疾患における血中クレアチニンと血中 β_2 -microglobulinは $y = 0.41x - 0.12$ (y: 血中クレアチニン, x: β_2 -microglobulin), 相関係数0.86, $F_{36}^1 (0.1\%) = 12.61$ で正の相関がみられた。

甲状腺疾患患者での成績はTable 3に示す如くである。同一年代の正常範囲に比べ上昇している例は、未治療バセドウ病8例中4例慢性甲状腺炎10例中6例、甲状腺癌10例中4例であった。未治療バセドウ病患者では治療後低下傾向がみられた。

III. 考 察

今回我々が用いたRIAの基礎検討は、血清に関する限り十分満足する結果を得ることができた。すなわち、測定感度、回収率、再現性は良好で、 β_2 -microglobulin高値血清の希釈曲線と標準曲線はよく平行性を示した。今回の検討範囲ではヒト γ -globulin, IgG globulin濃度の影響はまず考慮しなくともよいと思われた。又、Incubation時間では $Bo/T\%$ は24時間でほぼplateauに達し24時間が最適であるが、3, 6, 24時間の各群の感度に有意差がみられないで、小規模なassayでは簡便な3時間を用いることが可能である。

成人健常人の血中 β_2 -microglobulin濃度は $0.70 \sim 2.22 \text{mg/l}$ であり既に報告されているEvrinら⁹の成績と一致した。さらに血中 β_2 -microglobulinは加齢とともに増加することも既にEvrinらによ

り指摘され回帰直線 $y = 1.058 + 0.0115x$ (x:年齢)を導びいているが、著者らは分散分析による検定をおこない、各年齢群間に有意差があることをみとめ、正常値は年齢により設定する必要性があることを確認した。

次に β_2 -microglobulinの血中濃度は血中クレアチニン濃度と正の相関をし、イヌリン負荷によるGFRと負の相関を示し、クレアチニンよりもGFRのよい指標として優れていると報告されている⁴。我々も血中 β_2 -microglobulinは血中クレアチニンと正の相関を示している結果を得た。

一方では、一部の悪性疾患や自己免疫疾患で高値を示すとの報告がある。我々も従来報告のない甲状腺癌、慢性甲状腺炎、バセドウ病の患者血清を測定し、それぞれ一部の患者で年齢による正常値より若干の高値を示す結果を得た。甲状腺機能正常な甲状腺癌では、4/10例に高値を示したが、病理組織学的な一定の特色を認めなかった。慢性甲状腺炎では、6/10例に高値を示し、うち甲状腺機能低下例は2/6例であった。未治療バセドウ病では4/8例が高値を示し、3/4例が甲状腺機能正常化後正常値を示している。しかしこれらの症例での β_2 -microglobulin高値と罹病期間、甲状腺機能亢進程度との間には一定の傾向を認めなかった。血中甲状腺ホルモンの変動による β_2 -microglobulin値におよぼす影響では、5例の甲状腺機能正常人と8例の甲状腺機能低下症患者に、3, 5, 3-triiodothyronine(T₃)を投与しても、投与前後で有意の変動を認めなかった。従って、甲状腺疾患における β_2 -microglobulin値の変動は甲状腺ホルモンの直接作用であるという可能性は否定的と思われる。慢性甲状腺炎、バセドウ病はともに自己免疫疾患であり、 β_2 -microglobulinと自己免疫現象との関連が興味深いところであるが、個々の症例での免疫グロブリン値、血中抗甲状腺抗体値との間には特に一定の傾向はみられなかった。別な指標を用いた免疫現象との関連や潜在性腎機能低下症の可能性も含め更に詳細な検索が必要とされる。

IV. 結 論

検討を加えた β_2 -microglobulin RIA キットは測定法としての条件を十分満足するものであった。臨床成績では血中 β_2 -microglobulin は年齢、腎機能により変動するので、測定の際にはこれらを十分考慮する必要性がある。又、一部の甲状腺疾患でもやや高値を呈することが認められた。

β_2 -microglobulin RIA キットの提供をいただいたシオノギ製薬に謝意を表します。

なお、本論文の一部は第 22 回日本臨床病理学会総会(1975 年 11 月、長崎)において報告いたしました。

文 献

- 1) Berggård I and A G Bearn: Isolation and properties of a low molecular weight β_2 -globulin occurring in human biological fluids, *J Biol Chem* **243**: 4095-4103, 1968
- 2) Evrin P E, Peterson P A, Wide Land I Berggård: Radioimmunoassay of β_2 -microglobulin in human biological fluid, *J Clin Lab Invest* **28**: 439-443, 1971
- 3) Peterson P A, Evrin P-E and I Berggård: Differentiation of glomerular, tubular, and normal proteinuria: determinations of urinary excretion of β_2 -microglobulin, albumin and total protein. *J Clin Invest* **48**: 1189-1198, 1969
- 4) Wibell L, Evrin P-E and I Berggård: Serum β_2 -microglobulin in renal disease. *Nephron* **10**: 320-331, 1973
- 5) Peterson P A et al: β_2 -microglobulin-A free immunoglobulin domain. *Proc Nat Acad Sci USA* **69**: 1697-1701, 1973
- 6) Nakamuro K et al: Multiple common properties of human β_2 -microglobulin and the common portion fragment derived from HL-A antigen molecules. *Proc Nat Sci USA* **70**: 2863-2865, 1973
- 7) Peterson P A et al: Highly purified papain-solubilized HL-A antigen contain β_2 -microglobulin. *Proc Nat Acad Sci USA* **71**: 35-39, 1974
- 8) Evrin P-E and L Wibell: Serum β_2 -microglobulin in various disorders. *Clin Chim Acta* **43**: 183-186, 1973
- 9) Evrin P-E and L Wibell: The serum levels and urinary excretion of β_2 -microglobulin in apparently healthy subjects. *Scand J Clin Lab Invest* **27**: 69-74, 1972

Summary

Radioimmunoassay of Serum β_2 -microglobulin and its Clinical Significance

Ritsuko KURO, Nobuyuki AMINO, Minoru KAWASHIMA*, Kiyoshi MIYAI, and Yuichi KUMAHARA

*The Central Laboratory for Clinical Investigation, Osaka University Hospital and
Osaka Kessei Research Laboratory

Serum β_2 -microglobulin was measured by radioimmunoassay in healthy adults and patients with thyroid diseases. The level of serum β_2 -microglobulin in 36 healthy males was not significantly different from that of 37 healthy females. Mean values of serum β_2 -microglobulin increased significantly ($P < 0.001$) according to aging in healthy subjects. The values in each decade were 1.18 ± 0.25 mg/dl (mean \pm S.D.) (20–29 years old), 1.41 ± 0.28 mg/dl (30–39), 1.54 ± 0.34 mg/dl (40–49) and 1.79 ± 0.33 (50–59) mg/dl. Significant correlation was obtained between

value of serum β_2 -microglobulin and serum creatinine in the patients with various kinds of diseases.

Slightly elevated values were observed in 4 out of 8 patients with Graves' disease, 6 out of 10 chronic thyroiditis and 4 out of 10 thyroid carcinoma. However, elevated levels of serum β_2 -microglobulin decreased to normal range after treatment in 3 patients with Graves' disease.

It is suggested that the factors affecting serum β_2 -microglobulin, such as age and renal function, should be considered for the diagnostic evaluation of serum β_2 -microglobulin.