

《ノート》

ミオグロビンラジオイムノアッセイの基礎的検討と心疾患 および下肢閉塞性動脈疾患における 血中ミオグロビン値について

Evaluation of Myoglobin Radioimmunoassay and Myoglobin Values in Various
Heart diseases and Ischemic Diseases of Lower Extremities

分校 久志* 一柳 健次* 久田 欣一*

Hisashi BUNKO, Kenji ICHIYANAGI and Kinichi HISADA

*Department of Nuclear medicine, School of Medicine, Kanazawa University,
13-1 Takaramachi, Kanazawa, 920, Japan*

1. はじめに

急性心筋梗塞の診断, 広がりの判定は従来 GOT, LDH, CPK などの血中逸脱酵素の測定によって行なわれていた. また, これらの血中逸脱酵素と同様に血中ミオグロビン値も急性心筋梗塞の早期に増加することが報告されており^{1),2)}, 近年ラジオイムノアッセイ (RIA) による高感度の血中ミオグロビン測定法もいくつか報告されるに至っている³⁾⁻⁵⁾. 血中ミオグロビンはまた, 急性循環不全や手術後などで骨格筋からも放出され, その測定に影響すると考えられる^{5),6)}. 今回著者らはミオグロビン RIA キット (第一ラジオアイソトープ研究所製) を入手し試用する機会を得たので, その基礎的検討と各種心疾患および骨格筋疾患としての下肢閉塞性動脈疾患例における血中ミオグロビン値の検討について報告する.

2. 方法と対象

2.1 ミオグロビン RIA キットと測定操作

今回使用したミオグロビン RIA キットは第一ラジオアイソトープ研究所製 lot No. 770916~80120829 の 8 キットであり, その構成は 100 検体用で以下の通りである. (1) ミオグロビン-¹²⁵I (約 2 μ Ci) 1 バイアル, (2) 標準ミオグロビン (ミオグロビン 1 μ g を含む) 1 バイアル, (3) 抗ミオグロビン家兔血清 1 ノバイアル, (4) リン酸緩衝液 1 バイアル, (5) 牛ガンマグロブリン 1 バイアル, (6) ポリエチレングリコール (PEG) 溶液 2 バイアルである. (1)~(5) は凍結乾燥品であり使用時 (1) および (3) はリン酸緩衝液 (4) 10 ml を, (2), (4), (5) はそれぞれ蒸留水 2.0 ml, 100 ml, 40 ml を加えて溶解する. 標準ミオグロビンは 500 ng/ml より 1.95 ng/ml までの倍数希釈を行ない標準曲線用とする. 測定操作の詳細は Fig. 1 に示す. 図中の新法と旧法の相違は, 旧法では血清 0.1 ml をそのまま用い, インキュベーションが 4°C 20 時

* 金沢大学医学部核医学教室

受付: 53 年 4 月 14 日

最終稿受付: 53 年 7 月 25 日

別刷請求先: 金沢市宝町 13 番 1 号

金沢大学医学部核医学教室 (〒920)

分校 久志

Key words: Myoglobin, Radioimmunoassay, Heart disease, Intermittent claudication

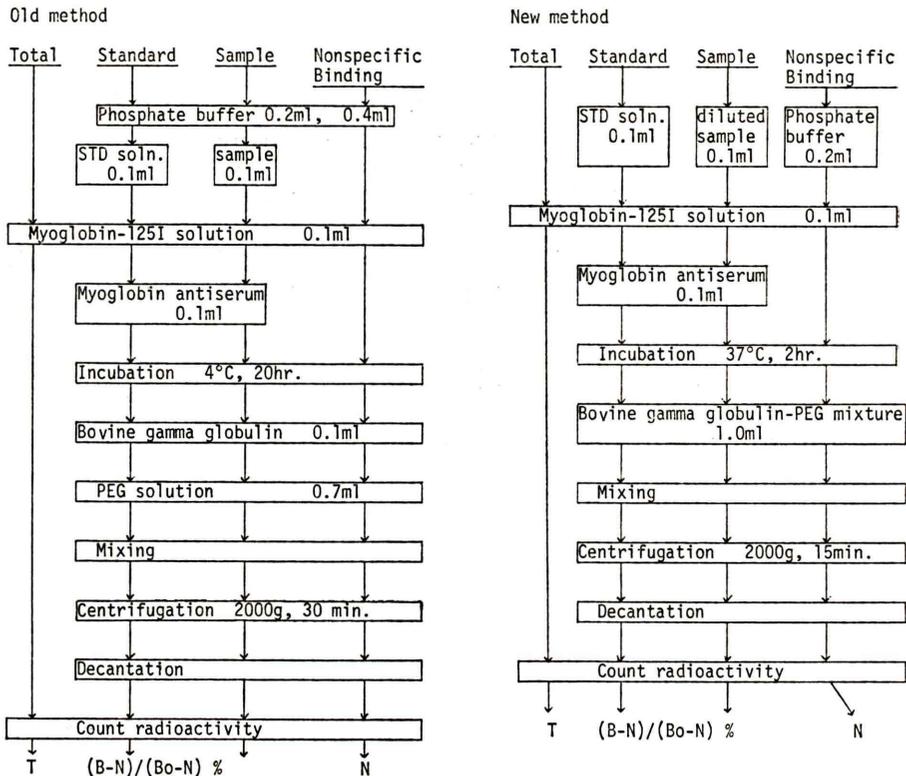


Fig. 1 Procedure of myoglobin radioimmunoassay

間であり、PEG と牛ガンマグロブリンを別々に添加するのに対し、新法では血中ガンマグロブリン濃度の影響をより少なくするため検体を緩衝液で2~10倍に希釈して用いる点、およびインキュベーションを37°C 2時間と短縮し、PEG 95 ml と牛ガンマグロブリン溶液 40 ml の混合物を添加する点であり、測定操作の簡略化、迅速化をはかっている。今回は Ex-1, 2 の2アッセイを旧法で、Ex-3 以後新法で行なった。

2.2 検討項目と対象

今回の検討では、基礎的検討として、牛ガンマグロブリン濃度、PEG量の変化、希釈、インキュベーション条件の変化、再現性、回収率、新法と旧法での測定値の相関について検討した。臨床的検討としては、正常者40例、狭心症5例、陳旧性心筋梗塞8例、その他の心疾患11例、下肢閉塞性

動脈疾患15例（うち4例は腰部交感神経節切除術などの術前、術後測定、1例は術後のみ測定）の計79例での血中ミオグロビン値の分布、正常値の決定等を主に検討した。

3. 結果

3.1 インキュベーション条件

インキュベーション条件の変化によるゼロサンプルの結合率はインキュベーション温度と共に増加したが、インキュベーション時間は2時間と3時間ではほとんど変化を認めなかった (Fig. 2)。これを標準曲線で見ると温度の低下と共に低濃度部での結合率 (B/Bo) が高値を示し、低濃度部での反応が不十分であることが考えられ、50% intercept もそれぞれ 34 (37°C), 53 (25°C), 63 (4°C) ng/ml と測定感度の低下がみられた (Fig. 3)。

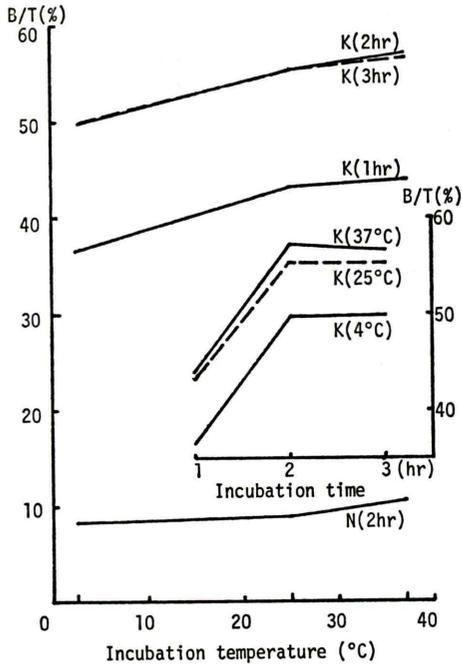


Fig. 2 Effects of incubation temperature and time on bound percent of zero sample (K) and nonspecific binding sample (N).

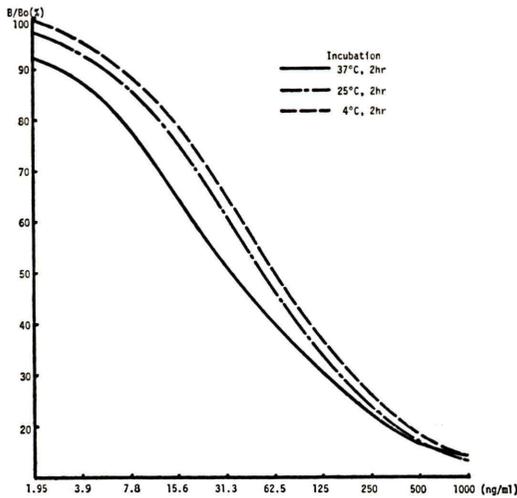


Fig. 3 Effect of incubation temperature on standard curve.

3.2 PEG および牛ガンマグロブリン量の変化 および希釈測定時のミオグロビン値

PEG の添加量のみを変化した時、PEG の増加

に伴い B/Bo の増加と測定値の低下を認めましたが、その変化は比較的小さかった。ガンマグロブリン量のみを変化させた場合はガンマグロブリン量の減少に伴い B/Bo の増加と測定値の低下を認めましたが、その変化は PEG 量の変化に比して小さい (Table 1).

血清の希釈測定では旧法で 8 倍まで、新法で 2 倍から 10 倍までの希釈にて測定値の変化は約 10% と少なく、とくに希釈血清の使用を標準とする新

Table 1 Myoglobin values according to volume of polyethylene glycol (PEG) and γ -globulin (γ -G1) solution.

PEG (ml)	B/Bo (%)	Myoglobin (ng/ml)	relative value
0.2	53.7	72	2.32
0.5	67.5	34	1.10
0.7	69.5	31	1.00*
1.0	71.6	28	0.90
2.0	74.8	24	0.77

γ -G1 (ml)	B/Bo (%)	Myoglobin (ng/ml)	relative value
0.00	78.8	20	0.69
0.01	77.0	22	0.76
0.02	73.9	25	0.86
0.05	73.1	26	0.90
0.10	70.8	29	1.00*

* Standard method of Ex-1 (old method)

Table 2 Effect of sample dilution on measured myoglobin values.

Ex-1			
Dilution	measured (ng/ml)	corrected (ng/ml)	relative value
1x	79	79	1.00*
2x	44	88	1.11
8x	9.4	75	0.95
32x	<3.9	—	—

Ex-5			
Dilution	measured (ng/ml)	corrected (ng/ml)	relative value
1x	97	97	0.70
2x	62	124	0.90
5x	26.7	134	0.97
10x	13.8	138	1.00*

* Standard method of each measurement (Ex)

法では5倍~10倍でほとんど測定値の差はないと考えられる (Table 2).

3.3 旧法と新法における測定値の相関

血清希釈を行なわない旧法と2倍および10倍の希釈を行なった新法との同一血清での測定値の相関を Fig. 4 に示す。旧法と新法はよく相関したが、2倍および10倍希釈の新法の間での相関は $r=0.98$ ときわめて良好であった。

3.4 再現性および回収率

同一アッセイ内での5種類の濃度の異なる検体の測定の再現性は $C.V.=11.0\sim 2.0\%$ 、平均 $C.V.=5.8\%$ と良好であった。異なる3回のアッセイ間での4種類の濃度の異なる検体の測定の再現性は $C.V.=32.1\sim 3.4\%$ 、平均 $C.V.=12.4\%$ とやや不良であったが、これは低濃度部での再現性が標準曲線の形から推定されるごとく不良であったため、中~高濃度部では平均 $C.V.=5.8\%$ と良好であった (Table 3)。39.5 ng/ml の検体に 250 ng/ml の標準ミオグロビンを等量混合した場合の回収率

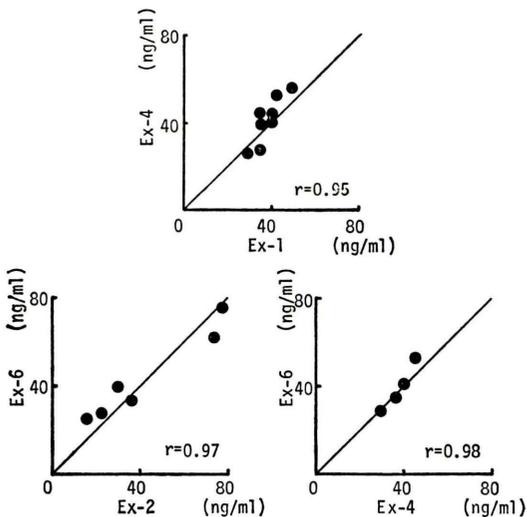


Fig. 4 Comparison of sample values measured with three different methods. Ex-1 and Ex-2: old method without sample dilution, Ex-4: new method with 2X sample dilution, and Ex-6: new method with 10x sample dilution. (Ex-1 and Ex-2 were carried out with same old method.)

Table 3 Reproducibility of myoglobin radioimmunoassay. Intraassay reproducibility

n	A (ng/ml)	B (ng/ml)	C (ng/ml)	D (ng/ml)	E (ng/ml)
1	27	43	53	120	288
2	33	41	55	133	278
3	28	37	51	124	288
4	—	37	53	133	—
5	—	—	—	120	—
mean	29.3	39.5	53.0	126.0	284.7
S.D.	3.2	3.0	1.6	6.6	5.8
C.V. (%)	11.0	7.6	3.1	5.2	2.0
mean C. V. = 5.8%					

Interassay reproducibility

n	A (ng/ml)	B (ng/ml)	C (ng/ml)	D (ng/ml)
1	31	106	304	425
2	29	114	293	490
3	16	103	284	500
mean	25.3	107.7	293.7	471.7
S.D.	8.1	5.7	10.0	40.7
C.V. (%)	32.1	5.3	3.4	8.6
mean C.V. = 12.4%				

Table 4 Recovery in myoglobin radioimmunoassay.

n	measured (ng/ml)	calculated (ng/ml)	recovery (%)
1	120	144.8*	82.9
2	133	144.8	91.9
3	124	144.8	85.6
4	133	144.8	91.9
5	120	144.8	82.9
mean recovery = 87.0%			

* $(39.5 + 250)/2 = 144.8$ ng/ml

は 82.9~91.9%、平均 87.0% とほぼ満足し得る結果であった (Table 4).

3.5 正常値および各疾患におけるミオグロビン値の分布 (Fig. 5)

旧法および新法における正常者の測定値の分布を Table 5 に示す。旧法および新法の Ex-4 については有意の差を認めいなが、Ex-5 では明らかに高値を示す傾向がみられた。この群は全例医療技術短大学生有志であり、他の群は中高年者が多い点、年齢の相違もこの差異の要因と考えられる。新法全体での正常値は 31.5 ± 9.4 ng/ml ($n=26$) で

Table 5 Distribution of myoglobin values in normal cases.

Ex-2	Ex-4	Ex-5*	Ex-6	(ng/ml)
21	30	39	41	
37	24	32	25	
29	22	47	31	
24	44	30	20	
21	24	32	—	
7	29	33	—	
27	37	33	—	
24	24	42	—	
39	12	50	—	
34	19	35	—	
15	23	42	—	
17	—	—	—	
30	—	—	—	
36	—	—	—	
n 14	11	11	4	
mean 25.8	26.2	37.7	29.4	(ng/ml)
S.D. 9.2	8.6	6.7	9.0	(%)

Myoglobin value measured by new method (Ex-4, Ex-5 and Rx-6) was 31.5 ± 9.4 ng/ml ($n=26$), and normal range was decided to be less than 51 ng/ml (mean+2 S.D.).

* All of these results were derived from young normal volunteer in school of medical technology.

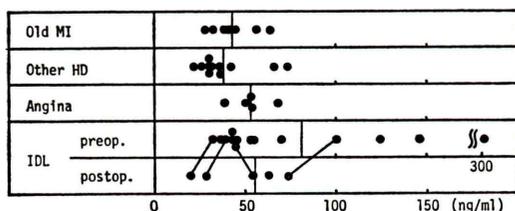


Fig. 5 Distribution of myoglobin values in various diseases. Vertical line in each column shows mean myoglobin value in each disease. MI= myocardial infarction, HD=heart diseases, IDL=ischemic diseases of lower extremities.

あり、平均 +2S.D. を正常範囲とし、51 ng/ml 以下を正常値とした。また、以下の各疾患例の測定は全て新法で 5~10 倍希釈にて行なった。

陳旧性心筋梗塞例では 2 例で軽度ミオグロビン高値 (それぞれ 56 および 63 ng/ml) を認めたのみで他は全て正常範囲内であった。分布は 28~63 ng/ml, 平均 43.0 ± 12.4 (S.D.) ng/ml であった。弁

膜疾患等で臨床上心電図、心筋スキャンなどで心筋虚血の存在しないと考えられる例では、2 例で軽度高値を認め、このうち 1 例は肺塞栓合併の高血圧症例 (73 ng/ml), 1 例は僧帽弁閉鎖不全症例 (66 ng/ml) であった。分布は 22~73 ng/ml, 平均 38.4 ± 17.1 (S.D.) ng/ml であった。狭心症では発作時に採血できた例はなく、また全例安静時であったが、1 例を除き正常上限から軽度高値を示し、その分布は 39~68 ng/ml, 平均 52.8 ± 11.6 (S.D.) ng/ml であった。

血栓性閉塞性動脈炎、動脈硬化性閉塞症などの下肢閉塞性動脈疾患で間けつ性跛行、下肢痛、冷感等を有する例では 4 例で 100 ng/ml 以上の高値を示し、とくに両側下肢の高度の血流障害の 1 例では 310 ng/ml と今回の検出中最高値を示した。3 例では軽度高値を示し、7 例は正常範囲内であった。分布は 32~310 ng/ml, 平均 81.4 ± 77.3 (S.D.) ng/ml であった。下肢閉塞性動脈疾患例で術前、術後の測定を行なった 4 例中 3 例は術後ミオグロビン値の低下を認め、臨床上的改善とよく一致したが、1 例では逆に術後増加を認めた。この例は術後 1 ヶ月以上経過し、臨床上的改善が一時的であり、採血時点では手術の効果がはっきりしなかった例であった。

4. 考 案

従来、血中ミオグロビンの定量には Spectroscopy, electrophoresis, immunodiffusion, hemagglutination, complement fixation (CF), counter immunoelectrophoresis (CIE) などの種々の方法が行なわれていたが、その測定感度は低く、Kagen ら⁷⁾は CF で 200 ng/ml, 平盛ら⁸⁾は 3% デキストランを用いる CIE 増感法で 200 ng/ml の値を報告している。これに対し RIA では 10~0.5 ng/ml と極めて高い感度の測定が可能である³⁾⁻⁵⁾。今回の検討では検出限界は 1.95 ng/ml であったが、測定に際して血清希釈を行なうため、実際の検出限界は 10 (5 倍希釈)~20 (10 倍希釈) ng/ml であった。急性心筋梗塞では発症後 8~12 時間で血中ミオグロビン値はピークに達するとされており^{3), 5)},

Volk ら²⁾は胸痛発作後30分以内に血中へのミオグロビン流出が起ると報告している。ミオグロビンはまた急性心筋梗塞発症後早期より尿中にも出現し長時間持続するとされ^{9),10)}、血中、尿中ミオグロビンとも CPK, LDH, GOT など従来測定されていた血中逸脱酵素よりも早期に異常高値を示す。また RIA によるミオグロビン測定は溶血の影響を受けず特異性も高い^{3),4)}。以上のごとく、今回の検討では遭遇しなかったが、血中ミオグロビンの測定は急性心筋梗塞の迅速で特異的な診断が可能と考えられる。Saranchaks ら⁹⁾は最初の尿中ミオグロビン値が 30~50 mg/dl の例では梗塞の広がりや予後の間に明らかな相関が考えられると報告しており、CPK と同様、ミオグロビン測定は梗塞の広がりや予後を早期に推定することが可能と考えられ⁵⁾、治療の面でもその有用性は高いと思われる。この様な早期の変化を検出し得る利点は、今回の検討における新法の迅速測定法によってより高められるものと思われる。

急性心筋梗塞と異なり、狭心症では著明高値は認められず、胸痛発作の鑑別診断にも有用と考えられるが、採血が24時間以上遅れた場合、軽度高値を示す例での判定は困難と考えられ、この場合尿中ミオグロビン測定は有用であると考えられる。

今回の検討では例数が比較的少ないため、正常値は年齢分布を特に考慮せず26例の新法での測定より、平均 31.5 ± 9.6 (S.D.) ng/ml, 2 S.D. をその範囲として 51 ng/ml 以下を正常値とした。このうち11例の短大学生有志では中高年者の群に比して一般に高値を示す傾向がみられた。この差異は年齢の相異のみならず、日常の運動状態の相異もその要因と考えられる。Eliot ら¹¹⁾はフットボール選手でのミオグロビン血症の検出を報告しており、この点からも正常例でのミオグロビン値の分布の差異が年齢またはそれによる運動状態の差異に起因すると考えてよいように思われる。

血中ミオグロビン値は急性心筋梗塞の他、急性循環不全⁵⁾、外科手術例^{5),6)}、血管内凝固症候群⁵⁾、腎不全⁵⁾、筋炎¹²⁾、虚血性筋壊死¹³⁾などで増加するとされている。今回の結果では血栓性閉塞性動

脈炎、動脈硬化性閉塞症などの閉塞性動脈疾患で間歇性跛行、下肢痛、冷感、チアノーゼ、下腿潰瘍等を有する7例で術前に軽度~高度血中ミオグロビン値増加を認めた。最高値は両側下肢の高度血流障害例の 310 ng/ml であった。両側皮膚温低下を主訴とした1例では血中ミオグロビン値は 20 ng/ml (10倍希釈時の測定限界)以下であり、RI アンギオ、下肢血流スキャン、血管撮影等で最終的に閉塞性動脈疾患を否定された。閉塞性動脈疾患では平均 81.4 ± 77.3 (S.D.) ng/ml と明らかに正常より高値を示す傾向を認めこの様な例の検出に有用と考えられたが、他検査、臨床所見による疾患の程度と血中ミオグロビン値の間には必ずしもはっきりした相関はみられず、また半数例で術前でも正常値であった点、必ずしも検出感度、特異性は高いとは言いがたい。しかしながら、術前、術後の血中ミオグロビン値の変動をみると、腰部交感神経節切除、血行再建術で臨床症状を改善した3例では術前に正常範囲内の2例と高値を示した1例とも術後血中ミオグロビン値の低下を認めた。これに対し、術後一時的な軽快の後症状の改善が不良であった1例では、術後1ヵ月以上経過した時点での血中ミオグロビン値は術前に比し軽度増加を認めた。以上の術前、術後の比較結果は、まだ少数例であるが、この様な例での治療効果の判定に血中ミオグロビン値が用い得ることを示唆するものである。この点については今後さらに多数例での評価が必要であろう。いずれにしても閉塞性動脈疾患例では比較的low値であることが多く、従来の感度の低い測定法では評価が困難であったが、新しい RIA による血中ミオグロビン測定法によってはじめて可能であり、今後さらに診断、治療効果判定、経過観察などに有用な情報を与えるものと期待される。

5. 結 論

RIAによる血中ミオグロビンの測定は手技が容易であり、迅速に高感度の測定が可能である。検出限界は検体の希釈倍率によっても異なるが、10~20 ng/ml であり、必要な場合は2倍希釈検体

による測定で検出限界 3.9 ng/ml まで測定可能であり、測定値の誤差も少ない。アッセイ内、アッセイ間の再現性も良好であり(それぞれ平均5.8%, 12.4% C.V.), 回収率も平均 87.0% と満足できる結果であった。ガンマグロブリン, PEG の量の変動による測定値の変動は少なく, 実際の測定では希釈検体を使用するため検体中のガンマグロブリン濃度の測定値に及ぼす影響は少ないと考えられた。正常値は全体で 31.5 ± 9.4 (S.D.) ng/ml であり, 正常範囲を 51 ng/ml (平均+2 S.D.) 以下としたが, 正常例中でも若年者は中高年者に比し高値を示す傾向がみられた。陳旧性心筋梗塞および虚血性心疾患以外の心疾患では大部分正常範囲内であり, 狭心症ではこれらよりわずかに高値を示す傾向がみられた。閉塞性動脈疾患による下肢虚血病変を有する例では平均 81.4 ± 77.3 (S.D.) ng/ml と高値を示す傾向を認め, また治療経過とよく一致する結果がみられ, これらの例での診断, 治療効果判定, 経過観察に有用であると考えられた。

謝辞: 今回の検討に際しミオグロビンラジオイムノアッセイキットを提供いただいた第一ラジオアイソトープ研究所に感謝の意を表します。

本論文の内容の一部は日本核医学会 第23回 東海地方会, 第32回 北陸地方会合同地方会(昭和53年3月, 豊明市)において報告した。

文 献

- 1) Kiss A, und Reinhart W: Über den Nachweis des Myoglobins im Serum und im Harn nach Herzinfarkt. *Wien Klin Wschr* **68**: 154, 1956
- 2) Volk P, Fittschen U, und Begemann M: Myoglobin im Serum nach Herzinfarkt. *Münch Med Wschr* **115**: 2122-2128, 1973
- 3) Stone MJ, Willerson JT, Comez-Sanchez, CE, and Waterman MR: Radioimmunoassay of myoglobin in human serum. *J Clin Invest* **56**: 1334-1339, 1975
- 4) Rosano TG, and Kenny MA: A radioimmunoassay for human serum myoglobin: Method development and normal values. *Clin Chem* **23**: 69-75, 1977
- 5) 三好和夫, 川井尚臣, 八木田正聖, 他: 心筋梗塞における血中ミオグロビンの基本的変動パターン, ラジオイムノアッセイによる成績. *日臨*, **35**: 2506-2512, 1977
- 6) Kagen LJ: Immunologic detection of myoglobinuria after cardiac surgery. *Ann Intern Med* **67**: 1183-1188, 1967
- 7) Kagen L, Scheidt S, and Butt A: Serum myoglobin in myocardial infarction: The "Staccato Phenomenon". *Am J Med* **62**: 86-91, 1977
- 8) 平盛勝彦, 住吉徹哉, 茂木佐恵子, 他: Counter immunoelectrophoresis 増感法による心筋梗塞症例の血中ミオグロビン検出とその臨床的意義. *医学のあゆみ* **100**: 751-753, 1977
- 9) Saranchak HJ, and Bernstein SH: A new diagnostic test for acute myocardial infarction. *JAMA* **228**: 1251-1255, 1974
- 10) 高橋良一, 荒井澄夫, 滝島 任: 心筋梗塞症における血清および尿中のミオグロビン測定. *医学のあゆみ* **99**: 557-559, 1976
- 11) Eliot RS, Shafer RB, and Gibas MA: Demonstration of myoglobinemia in football players. *Arch Phys Med Rehabil* **48**: 229-232, 1967
- 12) Kagen LJ: Myoglobinemia and myoglobinuria in patient with myositis. *Arthritis Rheum* **14**: 457-461, 1971
- 13) Bywaters EGL: Ischemic muscle necrosis. *JAMA* **124**: 1103-1109, 1944
- 1) Kiss A, und Reinhart W: Über den Nachweis des Myoglobins im Serum und im Harn nach Herzinfarkt.