

《ノート》

ミオグロビンのラジオイムノアッセイ

——ミオグロビンキット“第一”の基礎的検討ならびに臨床的評価——

Radioimmunoassay of Serum Myoglobin, Fundamental and Clinical Assessment of Myoglobin RIA Kit “Daiichi”

高坂 唯子* 米倉 義晴** 福永 仁夫** 吉岡三恵子***
 川下 憲二**** 神原 啓文*** 石井 靖** 小西 淳二**
 鳥塚 莞爾**

Tadako KOSAKA*, Yoshiharu YONEKURA**, Masao FUKUNAGA**,
 Mieko YOSHIOKA***, Kenji KAWASHITA****, Hirofumi KANBARA****,
 Yasushi ISHII**, Junji KONISHI** and Kanji TORIZUKA**

*The Central Clinical Radioisotope Division, **Department of Radiology and Nuclear Medicine,
 Department of Pediatrics and *The 3rd Division of Internal Medicine,
 Kyoto University School of Medicine, Kyoto 606, Japan

緒 言

骨格筋や心筋に存在するミオグロビンは、通常、血中にはほとんど認められないが、心筋梗塞の発作時、強度の腎障害や筋肉疾患のある場合には血中に遊出してくれることが報告されている¹⁻⁶⁾。しかし、従来より用いられてきた種々のミオグロビン測定法は、いずれも手技的に煩雑であり、多数検体の測定には不適であった。最近、Stone⁷⁾、三好⁸⁾らにより、radioimmunoassay による測定法が開発されて以来、ミオグロビンの測定が容易に行われるようになり、臨床診断にも用いられるよう

になってきた。著者らはすでに Nuclear Medical System 社 (以下 NMS 社と略す) のミオグロビン測定 RIA キットを用いて種々の検討を行い、その結果を報告⁹⁾したが、今回、第一ラジオアイソトープ研究所製のミオグロビンキット“第一”を使用する機会を得、若干の検討を行ったので、その結果について報告する。

測定方法

1. キットの内容

本測定に用いるキットの内容は下記のとおりである。

- (1) リン酸緩衝液 (凍結乾燥品) 1 バイアル (用時、100 ml の脱イオン水で溶解)。
- (2) ミオグロビン ¹²⁵I (凍結乾燥品) 1 バイアル (用時、10 ml の緩衝液で溶解)。
- (3) ミオグロビン抗血清 (凍結乾燥品) 1 バイアル

Key words: Myoglobin, Myocardial infarction, Muscular dystrophy, Radioimmunoassay

* 京都大学医学部付属病院放射線部

** 京都大学医学部付属病院放射線核医学科

*** 京都大学医学部付属病院小児科

**** 京都大学医学部付属病院第3内科

受付: 53年10月3日

最終稿受付: 54年1月12日

別刷請求先: 京都市左京区聖護院川原町54 (606)

京都大学医学部付属病院放射線部

高坂 唯子

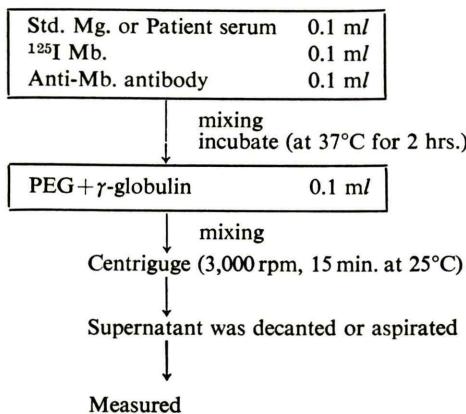


Fig. 1 Assay procedure of myoglobin radioimmunoassay "Daiichi" (Mb=myoglobin)

ル(用時, 10 ml の緩衝液で溶解)。

(4) 標準ミオグロビン(凍結乾燥品)1バイアル(用時2 ml の脱イオン水で溶解, 500 ng/ml になる)。

(5) 牛ガンマグロブリン(凍結乾燥品)1バイアル(用時, 40 ml の緩衝液で溶解)。

(6) ポリエチレン glycole, 50 ml 2バイアル。

2. 測定操作

本キットの測定手技は Fig. 1 に示し, その概略¹⁰⁾は下記のとおりである。

(1) 各試験管に標準ミオグロビンまたは被検血清 100 μl を加える。NSB (non specific bound-非特異的結合) 測定用の試験管には緩衝液を 200 μl 入れる。

(2) 各試験管に¹²⁵I 標識ミオグロビンおよびミオグロビン抗血清各 100 μl を加える。NSB 測定用試験管には¹²⁵I 標識ミオグロビン 100 μl のみ加える。

(3) 搾拌して, 37°C で 2 時間インキュベイトする。

(4) インキュベーション後, ガンマグロブリン, ポリエチレン glycole 混液を各試験管に 1 ml ずつ加える。

(5) 搾拌して, 3,000 回転, 15 分間遠沈する。

(6) 遠沈後, 上清を吸引またはデカントにより除去する。

(7) 各試験管の放射能を測定し, 下記の式より B/Bo (%) を計算して, 標準曲線を作成し, 未知検体のミオグロビン濃度を読み取る。

$$B/Bo (\%) = \frac{B - NSB}{Bo - NSB} \times 100$$

NSB; 非特異的結合

実験方法および対象

本キットの基礎的検討として, インキュベーション温度および時間, 稀釀曲線, 回収率, 精度および再現性について検討した。

また, 臨床的検討として, 健常人 29 例, 心筋梗塞症 10 例, 筋ジストロフィー症 31 例, 脊髄性筋萎縮症 6 例, 透析中の腎不全症 15 例, 高 Ca 血症 10 例および甲状腺疾患 27 例の血中ミオグロビン値の測定を行い, 心筋梗塞の 3 例では, 経時的変動を心電図所見と対比させ, また健常人, 透析中の腎不全症, 高 Ca 血症, 心筋梗塞および筋ジストロフィー症では, UV 法により血中 CPK (creatinine phosphokinase) を測定して, ミオグロビン値との関係を検討した。

結 果

1. 基礎的検討成績

(1) インキュベーション温度に関する検討

Fig. 2 にインキュベーション温度を 25, 37 および 47°C と変化させた時の標準曲線と 3 種類の異なる濃度の自家製プール血清(以下プール血清と略す)の値を示す。25°C では標準曲線の勾配は若干緩やかであるが, 37°C の場合に比較してプール血清の値には大きな変化はなかった。47°C では標準曲線は高濃度域で充分低下せず, プール血清の値は 3 濃度とも高値を示し, 蛋白の変性などによる影響が考えられ, インキュベーション温度は 37°C が適当と考えられた。

(2) インキュベーション時間に関する検討

Fig. 3 にインキュベーション時間を 1, 2 および 4 時間と変化させた時の標準曲線とプール血清の値を示す。2 時間および 4 時間での標準曲線はよく平行しており, プール血清の値にもほとんど変

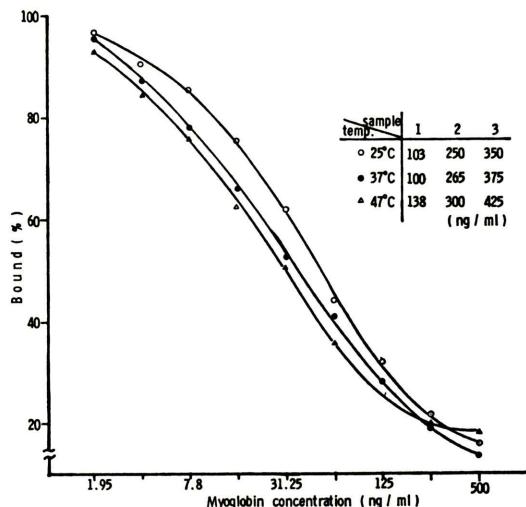


Fig. 2 Effect of incubation temperature on standard curves and assay values.

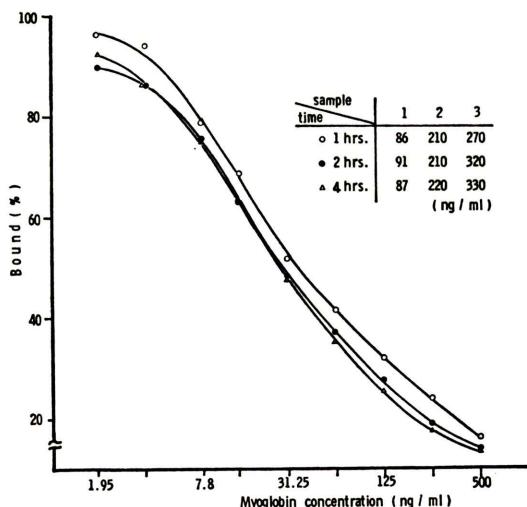


Fig. 3 Effect of incubation time on standard curves and assay values.

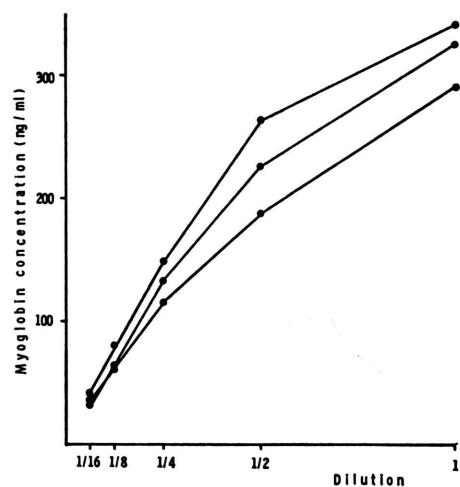


Fig. 4 Dilution test of 3 sera with high myoglobin concentration.

化はなかった。1時間の場合には結合%は全般に高く、高値域で若干値が低く出る傾向が認められ、インキュベーション時間は2時間が適当と考えられた。

(3) 稀釀曲線に関する検討

Fig. 4にミオグロビン濃度高値の患者血清3例の稀釀試験の結果を示す。稀釀にはキット付属のリン酸緩衝液を用いたが、原血清および2倍稀釀では、測定値は若干低く出る傾向が認められ、本キットによる測定にはあらかじめ4倍以上に稀釀した血清を用いる方がよいと考えられ、われわれも実際の測定には4~10倍の血清稀釀を行った。

(4) 回収試験に関する検討

Table 1に正常人血清に31.25, 62.5, 125および250 ng/mlの標準ミオグロビンを添加して測定した結果を示す。それぞれの回収率は124.8, 108.8, 100.0および94.0%で平均回収率は106.9%と良

Table 1 Recovery test of myoglobin radioimmunoassay "Daiichi"

Endogenous Mb.	(ng/ml)	10	10	10	10
Added Mb.	(ng/ml)	250	125	62.5	31.25
Observed value	(ng/ml)	245	135	78	49
Mb. recoverd	(ng/ml)	235	125	68	39
Recovery	(%)	94.0	100.0	108.8	124.8
Mean recovery 106.9%					

Table 2 Intra-assay variability of the assay

No.	Sample		
	1	2	3
1	33	113	204
2	35	117	204
3	38	116	209
4	35	122	186
5	34	109	189
6	38	124	208
7	34	113	191
Mean	35.3	116.3	198.7
S.D.	2.0	5.3	9.7
C.V. (%)	5.7	4.6	4.9

Table 3 Inter-assay variability of the assay

No.	Sample		
	1	2	3
1	32	112	200
2	29	104	204
3	33	113	216
4	34	124	230
5	36	129	240
6	37	124	206
Mean	33.5	117.7	216.0
S.D.	2.9	9.5	16.0
C.V. (%)	8.7	8.1	7.4

好であった。

(5) intra-assay に関する検討

Table 2 に 3 種類のプール血清を用いて、同一アッセイ内でくり返し 7 回測定を行った場合の結果を示す。それぞれの測定値の平均値と標準偏差は 35.3 ± 2.0 , 116.3 ± 5.3 および $198.7 \pm 9.7 \text{ ng/ml}$ であり、変動係数 (CV) はそれぞれ 5.7, 4.6 および 4.9% と良好な再現性が得られた。

(6) inter-assay に関する検討

Table 3 は異なった 6 回のアッセイにおけるプール血清の測定結果を示す。それぞれの測定値の平均値と標準偏差は 33.5 ± 2.9 , 117.7 ± 9.5 および $216.0 \pm 16.0 \text{ ng/ml}$ であり、変異係数はそれぞれ 8.7, 8.1 および 7.4% と良好であった。

2. 臨床的検討成績

(1) 健常人および各種疾患におけるミオグロビン値

Fig. 5 は健常人および各種疾患におけるミオグロビン値を示す。それぞれの平均値および標準偏差は健常人 (29 例) $31.0 \pm 10.4 \text{ ng/ml}$, 心筋梗塞症 (10 例) $385.6 \pm 43.0 \text{ ng/ml}$, 筋ジストロフィー症 (31 例) $234.9 \pm 176.0 \text{ ng/ml}$, 脊髄性筋萎縮症 (6 例)

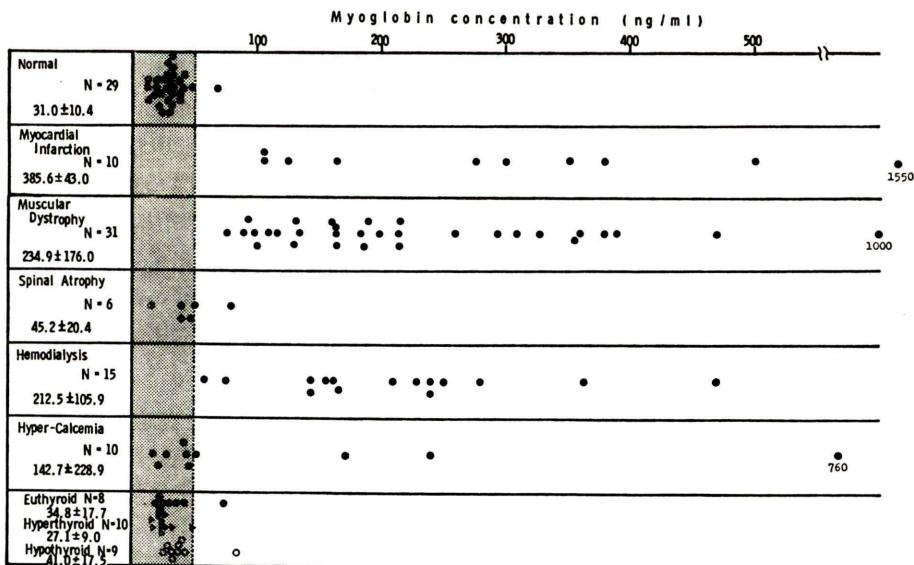


Fig. 5 Serum myoglobin concentration in various conditions.

45.2±20.4 ng/ml, 透析中の腎不全症(15例) 212.5±105.9 ng/ml, 高Ca血症(10例) 142.7±228.9 ng/ml, 正常機能甲状腺腫(8例) 34.8±17.7 ng/ml, 甲状腺機能亢進症(10例) 27.1±9.0 ng/ml および甲状腺機能低下症(9例) 41.0±17.5 ng/ml であった。なお、心筋梗塞症の症例は発症後3~24時間以内のものである。正常域は健常人の平均値±2SDの幅に取ると、10.2~51.8 ng/mlとなり、心筋梗塞症、筋ジストロフィー症腎不全症では全例が高値を示した。脊髄性筋萎縮症の症例は1例が若干の高値を示した以外は正常域に分布した。また、高Ca血症の症例では10例中3例が高値域に分布した。甲状腺疾患では正常機能甲状腺腫、甲状腺機能低下症に軽度上昇を示すものがそれぞれ1

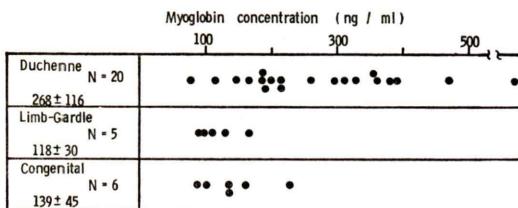


Fig. 6 Serum myoglobin concentration in muscular dystrophy.

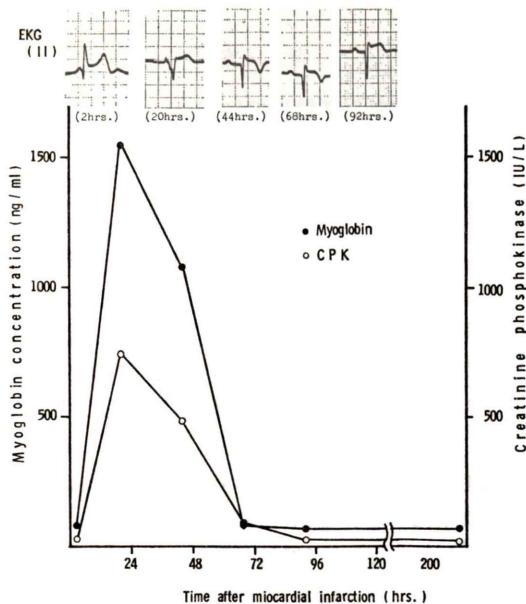


Fig. 7a

例認められた。Fig. 6 は筋ジストロフィー症31例の Duchenne 型、Limb-Girdle 型および Congenital 型の病型別のミオグロビン値の分布を示す。Duchenne 型で高値域に分布する割合が最も多く、Limb-Girdle 型、Congenital 型の間には著差は認められなかった。

(2) 心筋梗塞症の経時的変動成績および心電図所見

Fig. 7 は経時的に観察し得た心筋梗塞3例のミ

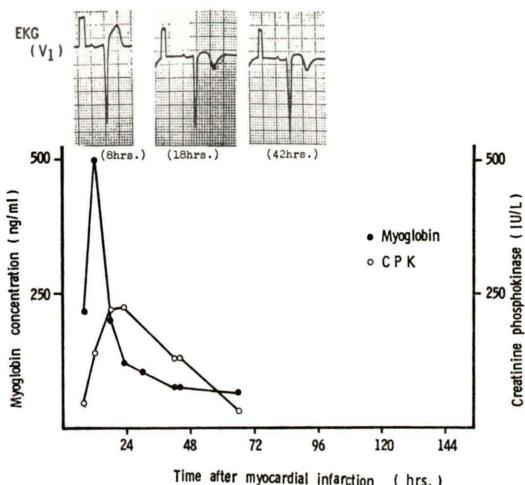


Fig. 7b

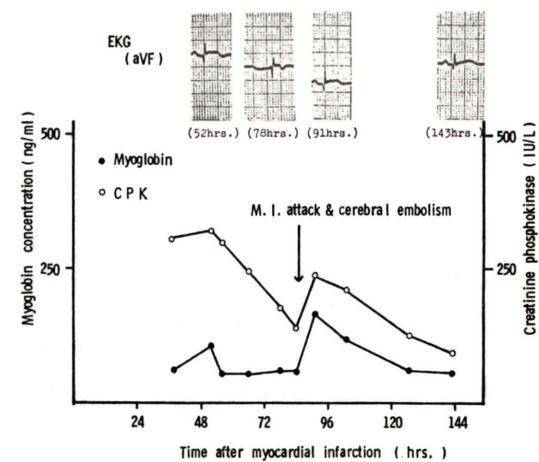


Fig. 7c

Fig. 7 Alteration of serum myoglobin, CPK and EKG in 3 cases with acute myocardial infarction.

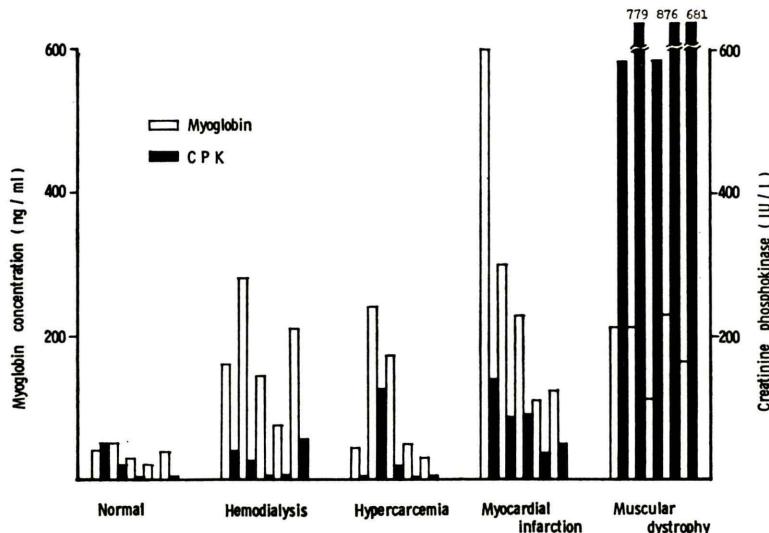


Fig. 8 Correlation between serum myoglobin and CPK.

オグロビン値、CPK 値および心電図の一部を示す。Fig. 7-a の症例は下壁梗塞の 1 例で、発症後 2.5 時間でミオグロビン値は 78 ng/ml, CPK 31 IV/L であり、ミオグロビン値に若干の上昇が認められ、心電図ではすでに ST 上昇が明らかである。20 時間後にはミオグロビン値は 1,550 ng/ml, CPK は 743 IV/L といずれもきわめて高値を示し、心電図上はこの時点で異常 Q 波の出現を認める。Fig. 7-b は前壁中隔梗塞で発症 8 時間後のミオグロビン値は 217 ng/ml, CPK は 46 IV/L で、12 時間後にはミオグロビン値 499ng/ml, CPK 141 IV/L で、ミオグロビン値がきわめて速やかに上昇することが認められ、心電図所見では 8 時間後に ST 上昇、18 時間後には冠性 T 波の出現が見られる。Fig. 7-c は発症後すぐに 52 時間を経て入院した症例で、CPK はまだ高値を示しているが、ミオグロビン値はほぼ正常に復している。しかし、90 時間目あたりで軽度の再発作があり、心電図で ST 上昇が見られ、ミオグロビン、CPK ともに上昇が認められた。

(3) ミオグロビン値と CPK 値との関係

Fig. 8 に健常人、透析中の腎不全症、高 Ca 血症、心筋梗塞症および筋ジストロフィー症各 5 例

のミオグロビンおよび CPK の測定値を示す。腎不全、高 Ca 血症および心筋梗塞症の症例では、ミオグロビン値の上昇の割合は CPK のそれをうわまわる傾向が認められ、筋ジストロフィー症では逆に CPK の上昇の度合いが、ミオグロビン値のそれをうわまわる結果が認められた。

考 案

1. 基礎的検討成績について

第一ラジオアイソトープ研究所製のミオグロビンキット“第一”について基礎的検討ならびに臨床的評価を行った。

インキュベーション温度については、47°C で標準曲線の高値域で勾配が鈍化する傾向が認められ、また、温度上昇とともにプール血清の値も高くなる傾向が認められたので、測定にあたっては規定の 37°C を厳守する必要があると考えられた。一方、インキュベーション時間は 2 時間、4 時間の間では著差はなく、規定の 2 時間以上であれば特に厳密にする必要はないと考えられた。

本法においては、被検血清を 2~10 倍に稀釀して測定するように規定されているが、著者らの行った稀釀試験の結果では 4~16 倍の稀釀で直線的

な関係が認められたが、原血清および2倍稀釀では測定値は低値を示した。本キットの標準ミオグロビンには free serum が含まれていないために、蛋白濃度の影響があると考えられ、従って、このような血清蛋白による影響を除外するため、リン酸緩衝液であらかじめ血清試料を4倍以上に稀釀する必要があると考えられた。血清10倍稀釀で測定する場合、5,000 ng/ml までの測定が可能である。

正常人血清に標準ミオグロビンを添加した際の平均回収率は106.9%と良好であった。

また、アッセイの精度、再現性も満足すべきものであり、本法は臨床的に充分使用し得ると考えられた。

2. 臨床的検討成績について

臨床例における測定成績では、健常人29例の測定値の平均値と標準偏差は 31.0 ± 10.4 ng/ml であり、正常域を2SDの幅に取ると、10.2~51.8 ng/ml となり、先にわれわれの報告⁹⁾したNMS (RIA) キットの10.8~46.8 ng/ml および諸家^{5,7,11)}の報告とよく一致した。

急性心筋梗塞例におけるミオグロビン値の上昇は、CPKの上昇と同じか、もしくはやや早期に認められた。この時点で心電図上ST上昇を認め、異常Q波、冠性T波の出現する時期にはミオグロビン値はすでに減少する傾向が見られた。第2例(Fig. 7-b)に示すように、ミオグロビン値はCPKに比して早期に上昇し、早く正常化する傾向が認められたが、これは血中からのクリアランスに差があると考えられる。ミオグロビン、CPK共に梗塞壊死細胞より血中へ流出し高値を示すと考えられるが、その生体での動態は若干異なるのではないかと思われる。最近、血中のCPK濃度変化より梗塞壊死部の大きさを推定する試み^{12~15)}がなされているが、ミオグロビンを用いても同様の試みが可能であり、ミオグロビン、CPKの体内での動的変化と共に今後の課題である。

筋ジストロフィー症では、Duchenne型にきわめて高値を示すものが多かったが、CPKとの関係をみると、三好¹⁶⁾らも指摘しているように他の

疾患に比してミオグロビンの上昇率よりCPKのそれの方が高いといえる。この理由については、まだ明らかでなく、今後さらに検討する必要がある。

脊髄性筋萎縮症の症例では、1例を除いて正常域に分布していた。透析中の腎不全の症例では全例が高値を示し、腎障害による排泄遅延、ミオパチーの存在などが示唆された。高Ca血症の症例では、10例中3例に高値を認めるものがあった。甲状腺機能低下症では、しばしばミオパチーが認められ、三好¹⁷⁾らは甲状腺機能低下症でミオグロビン値が高値を示し、逆に甲状腺機能亢進症では有意に低くなると報告しているが、今回の検討では1例に若干の高値を認めたのみであり、機能亢進症においても正常範囲内にあり、ミオパチーの程度との関係など、さらに今後症例を重ねて検討する必要がある。

結論

ミオグロビンキット“第一”について、若干の基礎的検討を行うとともに、臨床的評価を行った。

本法は精度、再現性にすぐれ、他社キット(NMS RIA キット)との間にも良好な相関($r=0.988$, $y=1.15x+5.5$)が認められた⁹⁾。また、測定領域も広く、臨床的にも興味ある結果が得られた。心筋梗塞においては、速やかに変動を示す点、CPKなどとともにその診断上に有用な情報を提供する。また、筋ジストロフィー症および腎不全症で著しい高Ca値がみられたほか、高血症でも高値を呈するものがみられた。

稿を終えるにあたり、キットを御提供頂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。

文献

- 1) 三好和夫、西条一夫、栗生陽次郎他：進行性筋ジストロフィー症骨格筋における myoglobin の異常。神經進歩 9: 105-115 (1965)
- 2) Rowland LP, Dunne PB, Pen As et al: Myoglobin and Muscular Dystrophy. Arch Neurol 18: 141-150, 1968
- 3) Rowland LP, Layzer RB and Kagen LJ: Lack of

- Some Muscle Proteins in Serum of Patients with Duchenne Dystrophy. *Arch Neurol* **18**: 272-276, 1968
- 4) Kagen L, Sheidt S, Roberts L et al: Myoglobinemia Following Acute Myocardial Infarction. *The Amer J Med* **58**: 177-182, 1975
- 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. *日本臨床* **35**: 2,506-2,512 (1977)
- 6) Adams EC, Rozman MJ: Differentiation of Hemoglobinuria and Myoglobinuria in Renal Diseases. in *Laboratory diagnosis of Kidney disease*. Sanderman FW, Sanderman FW, Jr. eds. 194-209
- 7) Stone MJ, Willerson JT, Gomez-Sanches GE et al: Radioimmunoassay of Myoglobin in Human Serum—Results in Patients with Acute Myocardial Infarction—. *The Clin Invest* **56**: 1,334-1,339, 1975
- 8) 三好和夫, 川井尚臣, 近藤彰他ラジオイムノアッセイ法による各種ミオパチーの血中ミオグロビン量. 厚生省進行性筋ジストロフィー症研究業績集(1976)
- 9) 高坂唯子, 米倉義晴, 福永仁夫他: ミオグロビン(RIA)キットの基礎的ならびに臨床的評価, ホルモンと臨床: **27**: 203-207 (1979)
- 10) ミオグロビンキット“第一”使用説明書
- 11) Rosano TG, Kenny MA: A Radioimmunoassay for Human Serum Myoglobin Method Development and Normal Values. *Clin Chem* **23**: 70-75, 1977
- 12) Burton ES, Gerald FB, William ES et al: Estimation of Infarcted Size in Man and its Relation to Prognosis. *Circulation* **46**: 640-648, 1972
- 13) Gail A, Robert R, and Burton ES: Evaluation of Myocardial Infarction with Enzymatic Indices. *Progress in Cardiovascular Disease* **18**: 405-420, 1976
- 14) Smith AF, Radford D, Wong CP et al: Creatine Kinase MB Isoenzyme Studies in Diagnosis of Myocardial Infarction. *British Heart Journal* **38**: 225-232, 1976
- 15) William JR, Huey GM, Lloyd RS: Correlation of Angiographic Estimates of Myocardial Infarct Size and Accumulated Release of Creatine Kinase MB Isoenzyme in Man. *Circulation* **56**: 199-205, 1977
- 16) 三好和夫, 川井尚臣, 日浅天春他: 筋の構造と機能 (酒井敏夫, 遠藤 実, 杉田秀夫編) 東京医学書院 1977, p581-594
- 17) 三好和夫, 川井尚臣, 中野益弘他: ヒト甲状腺に確めたミオグロビンの存在とその生理学的ならびに臨床的意義. *日内分泌誌* **63**: 940-942 (1974)