

《ノート》

Radioimmunoassay (Phadebas β_2 -micro Test 100 SD-8565) による血清,
尿中 β_2 -micro globulin 濃度測定の基礎的ならびに臨床的検討Basic and Clinical Study on the Measurement of Serum and Urine
 β_2 -Microglobulin Concentrations Using Phadebas β_2 -Microglobulin
Test 100 SD-8565 Kits太田 仁八* 中島 言子* 阪原 晴海* 中島 鉄夫*
遠藤 啓吾* 森田 陸司* 鳥塚 莞爾* 田村 忠雄**Hitoya OTA*, Kotoko NAKAJIMA*, Harumi SAKAHARA*, Tetsuo NAKASHIMA*,
Keigo ENDO*, Rikushi MORITA*, Kanji TORIZUKA* and Tadao TAMURA**

*Department of Radiology and Nuclear Medicine

**The 3rd Division of Internal Medicine, Kyoto University School of Medicine

I. 緒 言

β_2 -microglobulin (以下 BMG) は1968年 Berggardらによって尿細管性蛋白尿の患者から分離精製された分子量 11,800 の低分子性血漿蛋白である¹⁾。BMG はヒトの血液、髄液、唾液、羊水、腹水、乳汁などに存在し、腎糸球体から濾過されほとんどは近位尿細管腔から再吸収され細胞内で異化される²⁾。血中 BMG は糸球体濾過値 (GFR) ときわめて高い相関が認められるため³⁾血中 BMG 濃度の上昇は GFR 低下の指標となり、また尿中 BMG は腎尿管再吸収障害によって著明に増加することが知られている。BMG はリンパ球により産生され⁴⁾組織適合性抗原の構成に関与することが明らかになった⁵⁾ことからその免疫学的な役割も注目されてきている。さらに血中 BMG はリ

ンパ増殖性疾患、悪性腫瘍、自己免疫疾患で上昇することがあり⁶⁾、tumor marker としての有用性も報告されている。著者らは塩野義製薬株式会社のご好意により Phadebas β_2 -micro Test 100 SD-8565 の提供をうけ、本キットの基礎的検討および腎疾患、悪性腫瘍患者その他での臨床的検討を行ったので報告する。

II. 対象および方法

1. 本キットの原理、特徴

現在市販されている β_2 -マイクロテストシオノギと同様本キットはセファデックス固相法によるラジオイムノアッセイ (RIA) である。しかし抗体を新しく変更したため検体の希釈が従来の β_2 -マイクロテストシオノギでは血清200倍、尿10倍で測定していたのに対し、本キットでは血清20倍、尿5倍と検体の希釈が少なくてすみ、測定が著しく簡便化された利点がある。

そこで従来のキットと比較、検討し若干の考案を加えた。

Key words: β_2 -microglobulin, Radioimmunoassay.

* 京都大学医学部放射線核医学科

** 同 第三内科

受付: 58年2月1日

最終稿受付: 58年4月3日

別刷請求先: 京都市左京区聖護院川原町 54 (☎ 606)

京都大学医学部放射線核医学科

太 田 仁 八

2. 測定方法

本キット添付の説明書に従ったが、その概略は以下の通りである。

a) 検体の調製

血清は緩衝剤溶液をもちいて20倍に、尿は同じく緩衝剤溶液をもちいて5倍に希釈して測定に供した。

b) 測定操作法

1) 緩衝剤溶液 50 μ l をはかり 0 濃度標準とする。
2) 各濃度標準 BMG 溶液 50 μ l を試験管にとる。
また調製済検体 50 μ l を試験管にとる。

3) ヨウ化 BMG (125 I) 溶液を加える。

4) BMG 抗体結合セファデックス懸濁液 50 μ l を加える。

5) 室温で 1.5 時間インキュベーションする。

6) デカント法または洗浄法にて B・F 分離をする。

c) 結果の計算

1) 0 濃度標準試験管のカウント数 (B_0) を測定する。

2) 各濃度標準 BMG 溶液、調製済検体のカウント数 (B) を測定する。

3) 片対数方眼紙に $B/B_0\%$ をプロットし標準曲線を作成する。

4) 未知検体のカウント数の B_0 に対する % を求め標準曲線から BMG 値を読みとり希釈倍数を乗じる。

3. 基礎的および臨床的検討の方法

a) 基礎的検討

1) 標準曲線性, 2) インキュベーション時間の影響, 3) 測定感度, 4) 希釈試験, 5) 回収率試験, 6) 再現性(同時および日差), 7) 従来の β_2 -マイクロテストシオノギとの相関を検討した。

b) 臨床的検討

34例の健常人, 118例の各種疾患患者を対象とし,

1) 血中および尿中 BMG の測定を行うことともに
2) 血中 BMG と血中クレアチニン濃度との関係を検討した。

III. 結 果

1. 基礎的検討

a) 標準曲線および感度

BMG 濃度 2.5, 5, 10, 25, 75, 200, 500 μ g/l を 10 回測定し $B/B_0\%$ の平均値, 標準偏差をもとめ作成した標準曲線は Fig. 1 に示すとおりである。

各濃度の変動係数 (C.V.) はいずれもほぼ 10% 以内で標準曲線の再現性も良好であった。室温が 15~25°C 内にあることを確認し, インキュベーション時間 30, 45, 60, 90, 120 および 180 分における標準曲線の変化を観察した (Fig. 2)。低濃度 (2.5 μ g/l) ではインキュベーション時間の延長に伴い結合率 $B/B_0\%$ の上昇がみられたが中~高濃度 (75 μ g/l 以上) ではインキュベーション時間は結合率にほとんど影響しなかった。またインキュベーション時間はコントロール血清の測定値に影響を認めずほぼ一定であった。

キットには 10 μ g/l 濃度の標準品が添付されているが, 10 μ g/l 存在下では 0 濃度に比べ明らかに 125 I-BMG の抗体への結合に差異を認めた。したがって Fig. 1 および Table 1 に示したごとく 10 μ g/l をさらに希釈し 5 μ g/l, 2.5 μ g/l を追加して使用した。20 回の測定にて BMG 2.5 μ g/l でもなお

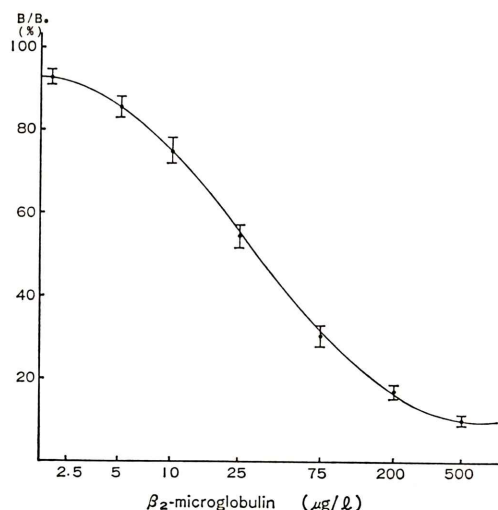


Fig. 1 Standard curve of Phadebas β_2 -micro Test 100 SD-8565 Radioimmunoassay.

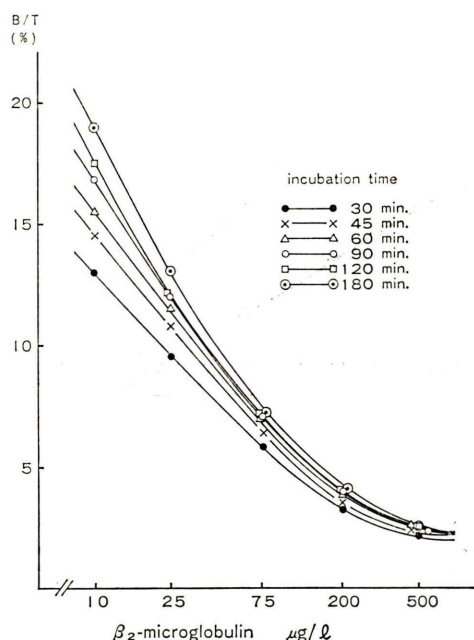


Fig. 2 Effect of the incubation time on the standard curve of Phadebas β_2 -micro Test 100 SD-8565 Radioimmunoassay.

Table 1 Sensitivity of BMG Measurement

| | conc. of BMG ($\mu\text{g/l}$) | | | |
|------------|----------------------------------|------|------|------|
| | 0 | 2.5 | 5 | 10 |
| Mean (cpm) | 10599 | 9766 | 9130 | 7838 |
| S.D. (cpm) | 231 | 334 | 331 | 318 |
| C.V. (%) | 2.2 | 3.4 | 3.6 | 4.1 |

(N=20)

0 濃度と有意差を認めるため最小検出感度は 2.5 $\mu\text{g/l}$ と良好であった。

b) アッセイの清度および再現性

血清約 13 mg/l, 尿約 2,100 $\mu\text{g/l}$ の検体を緩衝剤溶液を用いて 2, 4, 8, 16 倍と倍々希釈し 2 重測定を行ったところいずれも原点をとる直線となった (Fig. 3)。また血清, 尿に標準溶液を添付して添加回収試験を検討したところほぼ 100% と回収率も良好であった (Table 2)。

血清, 尿それぞれ高値, 中間値, 低値 3 種類の

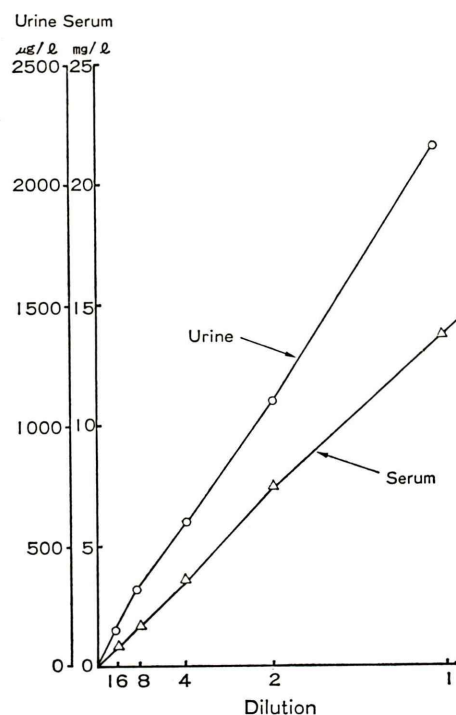


Fig. 3 Dilution curve of serum and urine by the addition of the buffer.

Table 2 Recovery test

| added BMG ($\mu\text{g/l}$) | Sample | | | | |
|-------------------------------|--------|-------|-------|-------|-------|
| | Serum | | Urine | | |
| | A | B | C | D | E |
| 0 | 26 | 40 | 60 | 8 | 336 |
| 5 | 32 | 46 | 65 | 12 | 42 |
| | (103) | (102) | (100) | (29) | (102) |
| 12.5 | 38 | 54 | 77 | 19 | 52 |
| | (99) | (103) | (99) | (93) | (107) |
| 37.5 | 64 | 80 | 100 | 46 | 73 |
| | (100) | (103) | (103) | (101) | (99) |
| 100 | 125 | 140 | 150 | 110 | 140 |
| | (99.6) | (100) | (94) | (101) | (103) |
| 250 | 270 | 260 | 320 | 260 | 240 |
| | (98) | (90) | (103) | (101) | (84) |

Recovery (%) 100 \pm 2 99.6 \pm 5 100 \pm 3 97.6 \pm 4 99 \pm 8
Mean \pm S.D.

(□): Recovery %

検体を用いて同時再現性 (intraassay), 日差再現性 (interassay) を duplicate でおのおの 10 回の測定を

Table 3 Result of intra-assay reproducibility

| | Serum (mg/l) | | | Urine ($\mu\text{g/l}$) | | |
|--------|--------------|--------|------|---------------------------|--------|------|
| | high | medium | low | high | medium | low |
| 1 | 9.2 | 4.5 | 1.5 | 1624 | 884 | 304 |
| 2 | 8.6 | 4.4 | 1.5 | 1760 | 880 | 280 |
| 3 | 9.4 | 4.3 | 1.3 | 1670 | 788 | 284 |
| 4 | 9.0 | 4.5 | 1.4 | 1750 | 782 | 300 |
| 5 | 9.8 | 4.3 | 1.5 | 1648 | 790 | 304 |
| 6 | 9.4 | 4.5 | 1.5 | 1800 | 840 | 298 |
| 7 | 9.8 | 4.5 | 1.3 | 1796 | 825 | 272 |
| 8 | 9.8 | 4.8 | 1.4 | 1704 | 824 | 280 |
| 9 | 9.8 | 4.9 | 1.4 | 1868 | 876 | 260 |
| 10 | 9.0 | 4.9 | 1.4 | 1764 | 880 | 296 |
| N | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Mean | 9.3 | 4.6 | 1.4 | 1738 | 837 | 288 |
| SD | 0.4 | 0.22 | 0.07 | 71.9 | 39.2 | 14.2 |
| CV (%) | 4.6 | 5.0 | 5.6 | 4.4 | 4.9 | 5.2 |

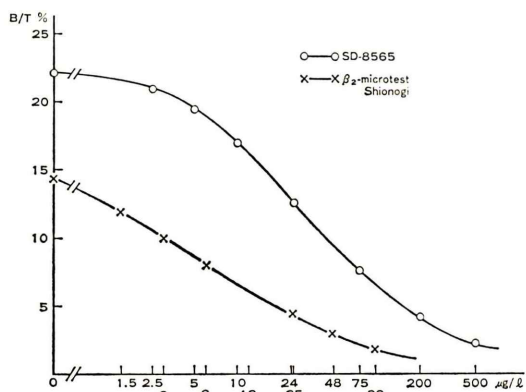
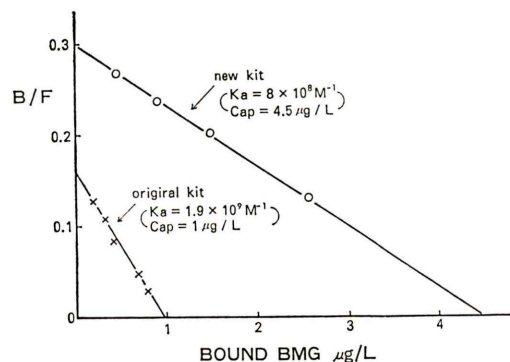
Table 4 Result of inter-assay reproducibility

| Sample | Serum (mg/l) | | | Urine ($\mu\text{g/l}$) | | |
|--------|--------------|--------|------|---------------------------|--------|------|
| | high | medium | low | high | medium | low |
| 1 | 8.0 | 4.4 | 1.5 | 1000 | 475 | 225 |
| 2 | 8.4 | 4.6 | 1.4 | 1000 | 470 | 200 |
| 3 | 8.4 | 4.0 | 1.6 | 1100 | 475 | 275 |
| 4 | 8.0 | 4.4 | 1.4 | 975 | 500 | 290 |
| 5 | 8.0 | 4.0 | 1.5 | 1100 | 425 | 265 |
| 6 | 8.4 | 4.0 | 1.4 | 1000 | 400 | 250 |
| 7 | 8.0 | 4.0 | 1.6 | 1000 | 450 | 240 |
| 8 | 8.2 | 4.4 | 1.5 | 1050 | 390 | 260 |
| 9 | 8.4 | 4.4 | 1.4 | 1050 | 390 | 260 |
| 10 | 8.0 | 4.6 | 1.5 | 1000 | 455 | 240 |
| N | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Mean | 8.28 | 4.26 | 1.40 | 1028 | 443 | 250 |
| SD | 0.3 | 0.22 | 0.07 | 42.5 | 37.4 | 24.4 |
| CV (%) | 3.8 | 5.4 | 5.6 | 4.4 | 8.9 | 10.3 |

行いC.V.より検討した。結果をTable 3, 4に示したが、同時再現性、日差再現性はいずれもC.V.がほぼ10%以内である満足すべきものであった。

c) 従来のキットとの関係

Figure 4には従来の β_2 -マイクロテストシオノギと本キットとの標準曲線を示すが、従来のキットに比し抗体への結合率が14%から22%と増加しており、また測定濃度の範囲を比べてみると従来の β_2 -マイクロテストシオノギが1.5~96 $\mu\text{g/l}$ であるのに対し、本法では2.5~500 $\mu\text{g/l}$ とその範囲

**Fig. 4** Relationship between the original kit (β_2 -microtest Shionogi) and the new kit (SD-8565).**Fig. 5** Scatchard plot of the original kit and the new kit. Data were obtained from Fig. 4.

が著しく拡大した。アッセイに用いられている抗BMG抗体の親和定数、結合能をFig. 5に示すScatchard plotを用いて解析した。従来の β_2 -マイクロテストシオノギの親和定数(K_a) $1.9 \times 10^9 \text{M}^{-1}$ 結合能(Cap)1 $\mu\text{g/l}$ に比べ、本キットの抗体の親和定数は $8 \times 10^8 \text{M}^{-1}$ と低下し、結合能が4.5 $\mu\text{g/l}$ と大きくなっている。つまりより結合能が大きく、親和定数が低い抗体を使用しているため、その測定濃度、範囲、結合率が変化したものと考えられる。しかし血清119例および尿99例について本キットと従来の β_2 -マイクロテストシオノギとの相関をもとめたところFig. 6 A, Bに示すごとく血清、尿中BMG濃度はいずれも従来のキットとの間にきわめて良好な相関を認めた。

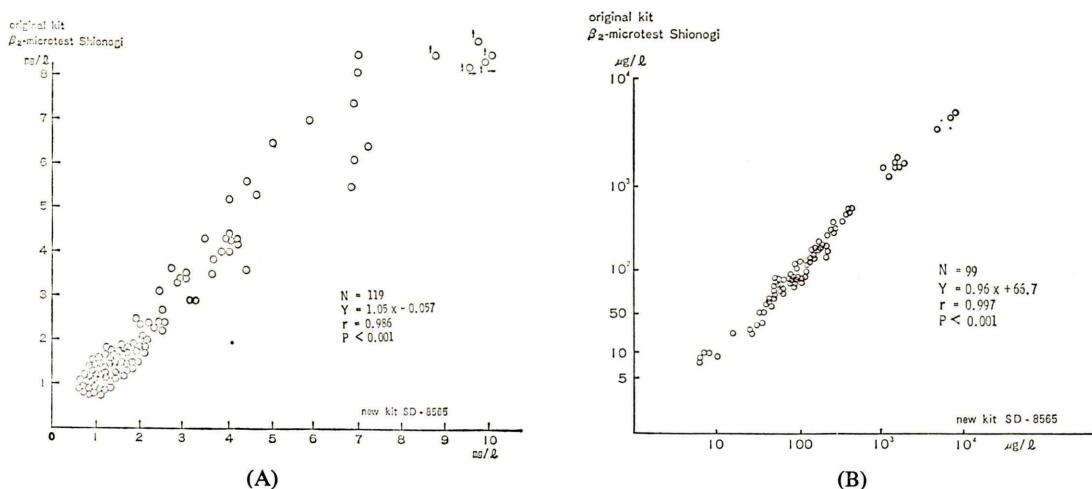


Fig. 6 Relationship between the original kit and the new kit of serum (A) and urine (B) β_2 -microglobulin.

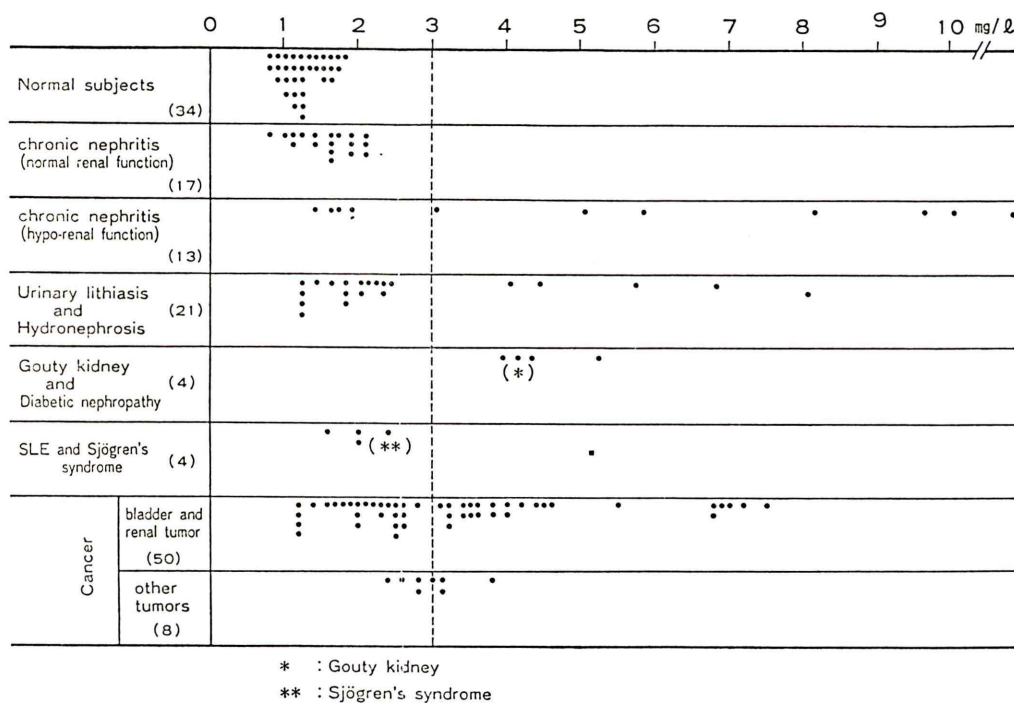


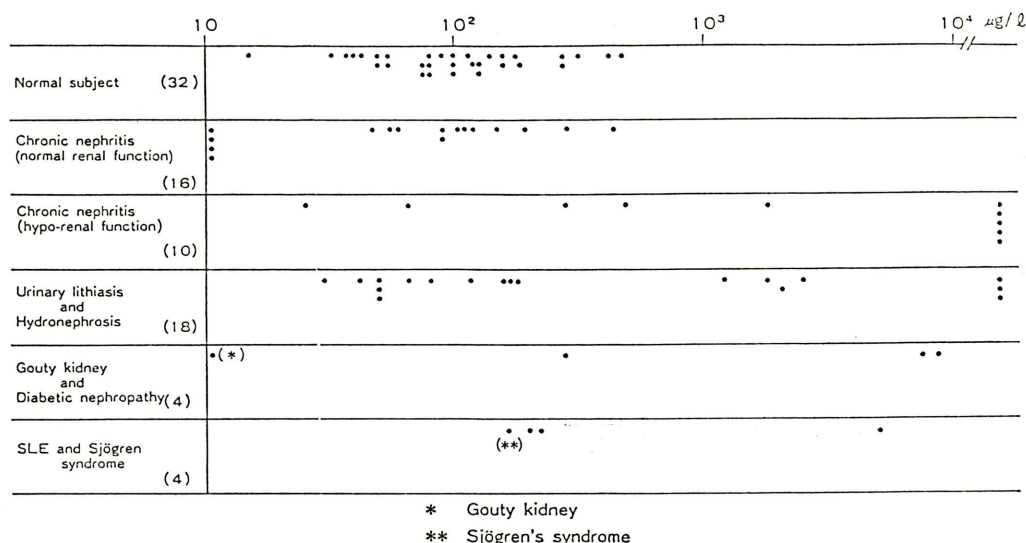
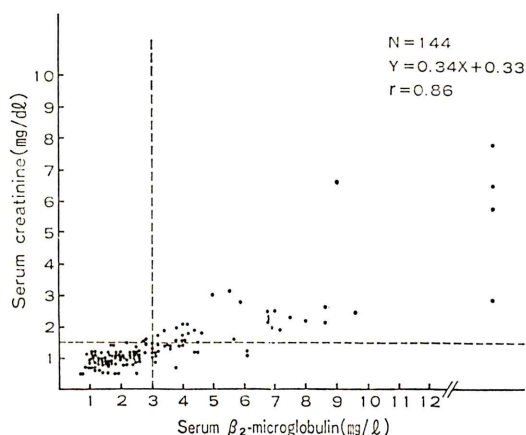
Fig. 7 Serum β_2 -microglobulin concentrations in various diseases.

2. 臨床的検討

a) 正常ならびに各種疾患患者の血清および尿中 BMG の測定

正常人 (34例) ならびに各種疾患 (血清 118例, 尿 52例) の血中 (Fig. 7) および尿中 (Fig. 8) BMG

の測定成績を示す。正常者の血清 BMG 濃度は $0.8 \sim 1.3 \text{ mg/l}$ に分布しその平均 \pm 標準偏差は $1.3 \pm 0.3 \text{ mg/l}$ であった。慢性腎炎では正常値から高値まで広く分布し腎機能低下に従って血中, 尿中 BMG とも高値となる傾向がみられた。腎尿路結

Fig. 8 Urine β_2 -microglobulin concentrations in various diseases.Fig. 9 Relationship between serum β_2 -microglobulin and creatinine concentrations.

石、水腎症についても同様の傾向がみられた。悪性腫瘍では腎尿路系およびその他の癌のいずれにおいても約半数の症例で BMG が高値を示した。これは BMG の高値が悪性腫瘍による腎機能低下のために 2 次的にひきおこされたものでなく、tumor marker としての BMG 測定の臨床的有用性を示唆するものと考えられる。

b) 血中 BMG と血中クレアチニン濃度の関係
144 例について血中クレアチニンと血中 BMG

の相関関係を調べた (Fig. 9) ところ、クレアチニン値が正常であるにもかかわらず BMG 高値を示すものがあり、血中クレアチニン = $0.34 \times$ 血中 BMG + 0.33 ($r = 0.86$) の関係が得られた。これは血中クレアチニンは GFR が $50 \text{ ml/min/1.73 m}^2$ 位まで低下しないと上昇してこないが、血中 BMG は GFR が $80 \text{ ml/min/1.73 m}^2$ 位まで低下すると上昇することを反映しているものと思われる。

IV. 考 察

Phadebas β_2 -micro Test 100 SD-8565 の基礎的、臨床的検討を行った。本アッセイはインキュベーション時間の影響は少なく、測定感度は $2.5 \mu\text{g/l}$ と良好で、希釈試験、回収率試験、日差同時再現性試験とも十分満足すべきものであった。従来の β_2 -マイクロテストシオノギがインキュベーション時間が 3 時間、標準曲線の範囲が $3 \sim 96 \mu\text{g/l}$ 、検体の希釈が血清 200 倍、尿 10 倍を要する⁷⁾のに対し、本アッセイはインキュベーション時間 1.5 時間、標準曲線の範囲が $10 \sim 500 \mu\text{g/l}$ 、検体の希釈が血清 20 倍、尿 5 倍である。したがって従来のものより手数がかからず抗体との結合率が高いため測定精度もすぐれている。これは従来のキットの抗体に比べその結合親和定数を低下させる一方、

結合能を高めたため, 臨床的に使いやすくなったためと思われる。しかし ^{125}I -BMG, 標準 BMG は同一であるため従来のキットとの間には血清, 尿 BMG ともきわめて良好な相関性がみとめられた。抗体をチューブに結合させる固相法による RIA はその操作, 特に B/F 分離が容易なため近年多用されている。しかし抗体のチューブへの結合は単に物理的に結合させているものであり, まだ解決すべき問題が残されている。抗体を大量に必要とすること, またチューブ間, ロット間で抗体のチューブへの結合に差異が生じやすいことなどである。本キットの場合にはその測定値の再現性は良好であり, Duplicate で測定してもチューブ間のばらつきはほとんど認められなかった。しかし固相法を用いる RIA では特に assay のバラツキに注意することが必要であると思われる。

BMG の測定は臨床的に腎機能を反映するものとしてすでに確立しており今回の臨床的検討でも血中 BMG は慢性腎炎, 水腎症, 結石の患者で腎機能低下に従って, BMG の上昇が認められた。また血清クレアチニンと良好な相関があるが, 腎機能低下症の指標としては BMG はクレアチニンよりもより鋭敏であると考えられる^{8,9)}。

また尿中 BMG について成人で Evrin³⁾は $60 \pm 40 \mu\text{g/l}$, 原田¹⁰⁾は $113 \pm 82 \mu\text{g/l}$ であるとのべているがわれわれの成績では $129 \pm 106 \mu\text{g/l}$ でありほぼ同様の結果がえられた。尿中 BMG は尿細管機能障害 (Fanconi 症候群, シスチン症, Lowe 症候群, 痛風腎, Cd, Hg などの重金属中毒など) において高値となり, 血中 BMG が尿細管再吸収能以上に上昇している場合は尿細管機能に関係なく高値となるが, また癌患者では約 50% に血中 BMG 高値が認められ, tumor marker としての有用性が示唆された。しかし BMG は腫瘍に特異的な抗原でなく, 癌胎児性抗原や α -フェトプロテイン, Ferritin などのいわゆる他の Tumor marker との比較検討がさらに必要であると思われる。

V. 結 語

Phadebas β_2 -micro Test 100 SD-8565 の基礎的

および臨床的検討を行い以下の成績をえた。

1) 本法の手技は従来の β_2 -マイクロテストと比較して希釈倍数が少なくインキュベーション時間が 1.5 時間と短く標準曲線の範囲もすぐれていた。回収率, 再現性も良好でその感度精度とも満足すべきものであった。これは従来のキットに比べ抗体の親和定数を下げ, 結合能を大きくしたことを反映したものと考えられる。

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と良好な相関を示し, 腎機能検査として有用であると考えられた。また癌患者の 50% に BMG 高値のものを認めた。

本キットを提供していただいた塩野義製薬㈱に深謝いたします。

文 献

- 1) Berggard I, Bearn AG: Isolation and properties of a low molecular weight β_2 -globulin occurring in human biological fluids. *J Biol Chem* **243**: 4095-4103, 1968
- 2) Peterson PA, Evrin PE, Berggard I, et al: Differentiation of glomerular, tubular, and normal proteinuria: Determination of urinary excretion of β_2 -microglobulin, albumin, and total protein. *J Clin Invest* **48**: 1198-1198, 1968
- 3) Wibell L: Studies on β_2 -microglobulin in patients and normal subjects. *Acta Clinica Belgica* **31**: 14-26, 1976
- 4) Bernier GM, Fanger MW: Synthesis of beta-2-microglobulin by stimulated lymphocytes. *J Immunol* **109**: 407-409, 1972
- 5) Nakamuro K, Tanizaki N, Pressman D: Multiple common properties of human beta-2-microglobulin and the common portion fragment derived from HLA antigen molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* **70**: 2863-2865, 1973
- 6) Kithier K, Cejka J, Belamaric J, et al.: β_2 -microglobulin: occurrence in fetal life and malignancy. *Clinica Chimica Acta* **52**: 293-299, 1974
- 7) 池窪勝治, 遠藤啓吾, 福永仁夫, 他: 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. *核医学* **13**: 513-519, 1976
- 8) 辰巳 学, 鈴木隆夫, 新垣光弥, 他: 血清 β_2 -Microglobulin 濃度と各種腎機能検査値との関連. *最新医学* **33**: 553-559, 1978
- 9) 河合 忠, 金衡 仁: β_2 -microglobulin 定量の臨床

的应用に関する研究. 最新医学 **31**: 354-363, 1976
10) 緒方正名, 柚木英二, 森田啓次郎, 他: 日本人尿中

β_2 -マイクログロブリン値の解析. 総合臨床 **29**:
2085-2094, 1980