

《ノート》

血中ミオグロビンの RIA に関する基礎的ならびに臨床的研究 (その 1)

Basic and Clinical Studies of Myoglobin Radioimmunoassay (Part I)

石井 周一* 有田 要一* 坂下 守* 宮崎 啓一*
鬼原 彰**

Shuuichi ISHII*, Youichi ARITA*, Mamoru SAKASHITA*,
Keiichi MIYAZAKI* and Akira KIHARA**

*RI Center, Sapporo Medical College,

**Internal Medicine, School of Allied Health Professions, Sapporo Medical College

I. はじめに

ミオグロビン (Mb) は分子量約 18,000 の複合蛋白質で骨格筋や心筋組織に含まれている。筋組織が障害されると血中あるいは尿中にあらわれるため、CPK, GOT などの逸脱酵素とともに心筋硬塞を中心とする心疾患、各種の筋疾患あるいは腎不全などで血中に上昇することが報告されている。とくにラジオイムノアッセイ (RIA) 法が導入されて以来、すでにその基礎的ならびに臨床応用に関する研究報告が多数認められている。

著者らも栄研イムノケミカル研究所より二抗体法による Mb 測定用 RIA キットの提供をうけ、その基礎的検討を行うとともにカラムクマロトグラフィおよび濾紙電気泳動法により、¹²⁵I-標識 Mb の純度検定を行った。

また、アルコールと有機溶媒の摂取が筋組織に変化をもたらすものかどうかを検討するため、慢性アルコール症およびシンナー常用者の血中 Mb

の測定を行ったのでその成績を報告する。

II. 対象および方法

使用した Mb 測定用キットは二抗体法によるもので、指定の操作手順は Table 1 に示す通りである。なお γ -カウンターは、LKB-WALLAC 80000 オートウエルカウンターを用い、標準曲線からの Mb 濃度算出は、LOG-3 次回帰曲線を用いてデスクトップコンピューター (Canon SX-350) で行った。

臨床研究としては健康対照群 21 名 (全例男性、22~56 歳、平均年齢 35.9 歳) 慢性アルコール症 20 名 (男 19, 女 1, 年齢 23~73 歳、平均 46.2 歳) およびシンナー常用者 10 名 (男 6, 女 4, 年齢 14~18 歳、平均 15.2 歳) の計 51 名について血中 Mb 値を測定した。

III. 研究成績

1. 基礎的検討

1) 第 1 反応時間

プレインキュベーション時間を 15 分、第 2 反応時間を 30 分とし、第 1 反応時間を室温 (25°C) で

* 札幌医科大学 RI センター

** 同 衛生短期部内科

受付: 58 年 10 月 3 日

最終稿受付: 58 年 11 月 28 日

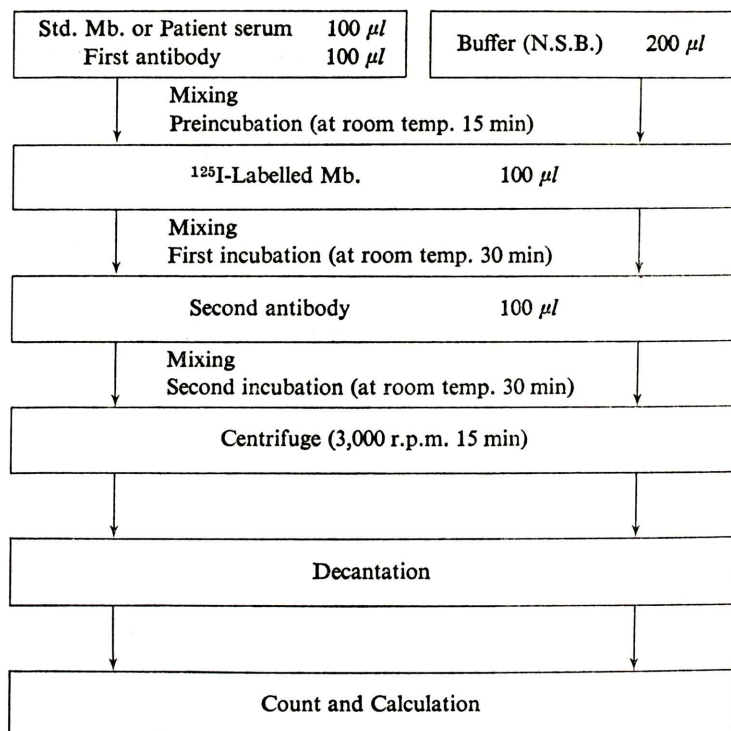
別刷請求先: 札幌市中央区南 1 条西 17 丁目 (☎ 060)

札幌医科大学 RI センター

石井 周一

Key words: Myoglobin, RIA, Myopathy, Alcohol, Organic solvent.

Table 1 Assay procedure of myoglobin RIA



30分～72時間まで変化させたさいの各濃度における B/T (%) を Fig. 1 に示したが、反応は 24 時間でほぼ平衡に達した。

2) 第 2 反応時間

プレインキュベーション時間を 15 分、第 1 反応時間を 24 時間とし、第 2 反応時間を室温 (25°C) で 30 分～24 時間まで変化させたときの各濃度における B/T (%) を Fig. 2 に示したが、反応時間は 30 分で十分と考えられた。

3) 標準曲線

前述の結果から第 1 反応 24 時間、第 2 反応 30 分での代表的な標準曲線を Fig. 3 に示す。標準濃度 31.2～250 ng/ml の範囲において良好な曲線が得られた。

4) 再現性

測定系内において 3 種類、測定系間においては 2 種類の血清試料を用いて再現性の検討を行った。Table 2 に示すように、測定系内では 4.3～9.6%

(C.V.), 測定系間では 10.8 および 12.9% (C.V.) の再現性を示した。

5) 回収率

3 種類の血清試料について回収率を求めた。Table 3 に示すようにそれぞれの血清において、98.7～118.6% の平均回収率が得られた。

6) 希釈試験

3 種類の血清試料を生理食塩水で 2～8 倍まで希釈して測定を行った。Fig. 4 に示すように、高濃度領域において直線性に欠けたが、低および中濃度域では良好な直線性が得られた。

7) ¹²⁵I-標識 Mb の検定

(a) ゲル濾過法

¹²⁵I-標識 Mb の純度を検定するために、セファデックス G-100 カラム (1×50 cm) に 1% ヒトアルブミン 2 ml をあらかじめ通導し、¹²⁵I-標識 Mb 1 ml を吸着させたのち、0.01 M リン酸緩衝液 (pH=7.4) を溶出液として 1 ml ずつ分画した。そ

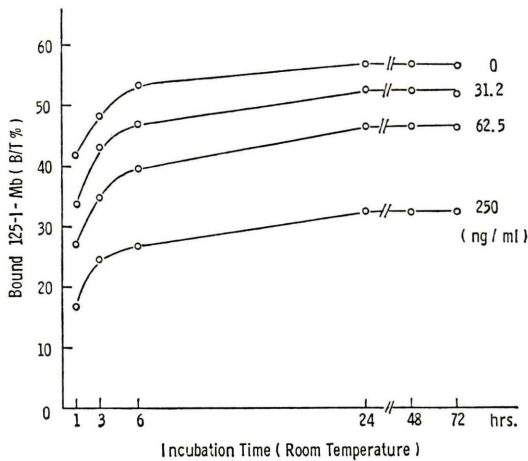


Fig. 1 Influence of first incubation time.

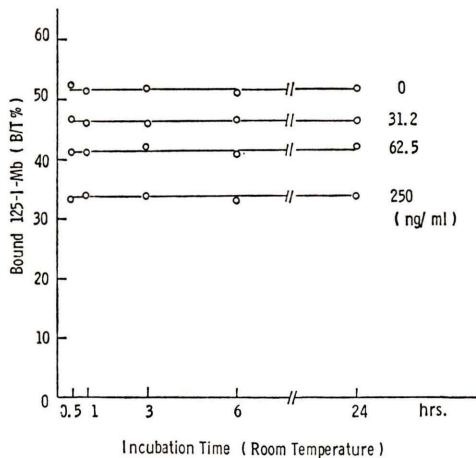


Fig. 2 Influence of second incubation time.

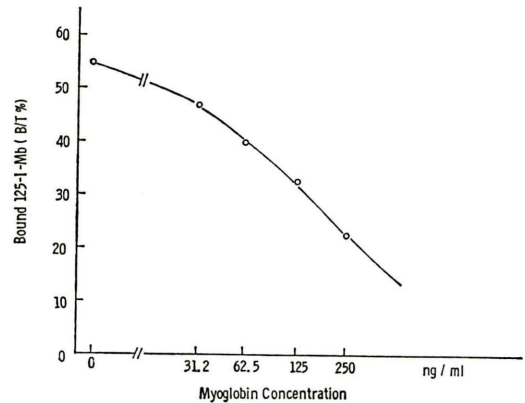


Fig. 3 Standard curve for myoglobin RIA.

Table 2 Reproducibility in myoglobin RIA

A) Intraassay

Sample	No.	Myoglobin ng/ml (M±SD)	CV (%)
Serum A	5	281.6±12.1	4.3
Serum B	5	107.6± 6.0	5.6
Serum C	5	163.3±16.1	9.6

B) Interassay

Sample	No.	Myoglobin ng/ml (M±SD)	CV (%)
Serum D	5	38.0± 4.9	12.9
Serum E	5	180.0±19.5	10.8

の結果は Fig. 5 に示すように 3 つの放射能のピークがみられ、その割合はおおの 5.4%, 67.2%, 27.4% であった。さらに第 2 および第 3 のピークについて抗体との結合率を調べるため、おおののピーク 1 ml に 1% ヒトアルブミン 0.1 ml を

Table 3 Recovery test

Added Myoglobin (ng/ml)	Serum F			Serum G			Serum H		
	Expected (ng/ml)	Measured (ng/ml)	%	Expected (ng/ml)	Measured (ng/ml)	%	Expected (ng/ml)	Measured (ng/ml)	%
0	—	6.6	—	—	9.1	—	—	12.4	—
31.2	37.8	45.0	119.1	40.3	41.1	102.0	43.6	40.7	93.3
62.5	69.1	100.4	145.3	71.6	83.7	116.9	74.9	90.4	120.7
125	131.6	154.5	117.4	134.1	121.5	90.6	137.4	161.2	117.3
250	256.6	237.6	92.6	259.1	220.7	85.2	262.4	251.4	95.8
Mean			118.6			98.7			106.8

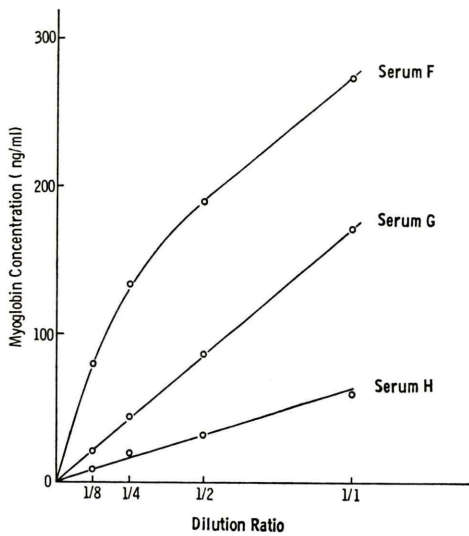
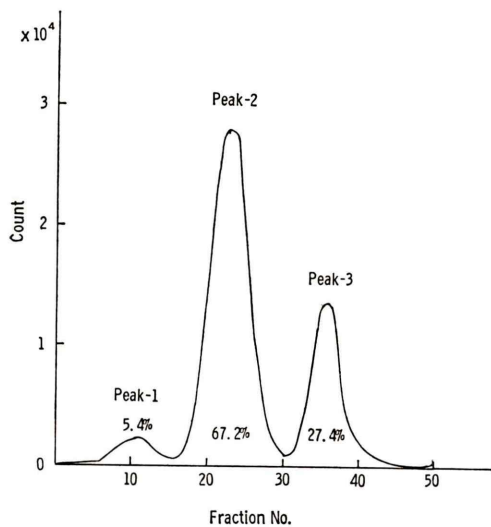


Fig. 4 Dilution test.

Fig. 5 Column chromatography of ^{125}I -Mb with sephadex G-100.

加え、これより 0.4 ml を試験管に分注し第 1 抗体 0.2 ml を加えて 24 時間インキュベートし、ついで第 2 抗体 0.4 ml を加え 30 分間インキュベート後、B/T (%) を求めた。

その結果、第 2 ピークにおいて結合率は 90.3%、第 3 ピークでは 3.9% となった。

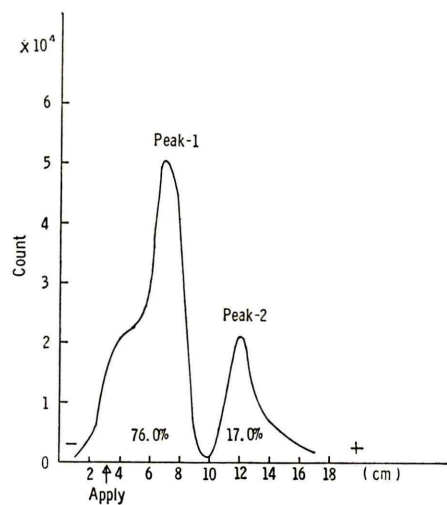
Fig. 6 Paperelectrophoresis of ^{125}I -Mb with Whatman 3MM paper.

Table 4 Serum myoglobin levels in patients with chronic alcohol intake and organic solvent abuse and in normal controls

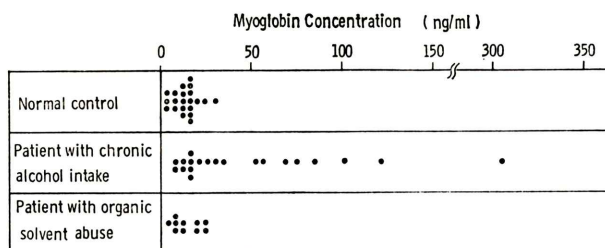
Subjects	No.	Myoglobin ng/ml ($\bar{M} \pm \text{SD}$)
Normal control	21	15.2 ± 5.8
Patients with chronic alcohol intake	20	$55.0 \pm 71.0^*$
Patients with organic solvent abuse	10	13.9 ± 7.2

VS normal control, * $p < 0.025$

(b) 電気泳動法

Whatman 3 MM 濾紙 (3 × 30 cm) をあらかじめバルビタール緩衝液 (pH=8.6, $\mu=0.075$) に浸した後、泳動槽に水平にはりつけ、 ^{125}I -標識 Mb 0.1 ml とヒト血清 0.1 ml にブロムフェノールブルー (BPB) を指標として加えた試料を濾紙面の原点にのせ、定電圧 500 V、定電流 10 mA で 4°C にて約 1 時間泳動した。終了後濾紙を乾燥し 1 cm 幅に切りおのおのを試験管に入れ、放射能を測定した。

その結果は Fig. 6 に示すように 2 つのピークがみられ、原点附近には 76% がとどまり、17% がヒト血清とともに移動した。



一方濾紙電気泳動においては、 $^{125}\text{I-Mb}$ の放射活性は原点附近に76%がとどまり17%がヒト血清とともに移動した。これもdamaged fractionの存在を示すものと考えられる。

このように ^{125}I -標識Mbの純度の検定では、かなりの不均一性が認められ、この点の改良は今後に残された問題の一つと考えられる。またRIAにおいては抗体の純度もきわめて重要な問題と考えられるが、今回はこの面の検討は行い得なかった。

さて、血中Mbの測定意義に関しては心筋硬塞をはじめとする循環器疾患¹⁻⁸⁾、筋ジストロフィーを中心とする筋疾患^{9,3)}、腎不全^{3,4,9)}、高Ca血症³⁾、火傷²⁾、および運動時¹⁰⁾に血中上昇がみられるとの報告がある。とくに心筋硬塞では早期に著明な上昇がおこりその診断にきわめて有用とされている。一方アルコールの長期摂取は各種の臓器障害を引きおこし、アルコール性心筋症やミオパチーの存在も知られている。そこで今回の研究では、慢性アルコール症患者およびシンナー常用者を対象に血中の変化を追究した。

著者らのアッセイ系においては、健康対照群21名の血中Mb値は 15.2 ± 5.8 ($M \pm SD$) ng/mlと同じ栄研キットを用いたこれまでの報告³⁻⁶⁾と比べて低値を示した。一方慢性アルコール症の血中Mbは約半数に異常高値がみられ、全体としても対照群と比べて有意の上昇を示した。この結果は慢性かつ多量のアルコール摂取が心筋あるいは骨格筋に障害を与えていることを強く示唆すると考えられ、アルコール性心筋症やミオパチーの発症とも密接に関連することが推測される。しかし、シンナー常用者の血中Mbは上昇せず、少数例の検討ではあるが、シンナーには血中Mbの上昇作用はないものと判断される。

V. 結 論

1. 基礎検討

- 1) 第1反応時間は24時間が適当と考えられた。
- 2) 再現性、回収率および希釈試験においては、RIA法としてほぼ満足し得る結果が得られた。
- 3) カラムクロマトグラフィーおよび濾紙電気

泳動を用いた ^{125}I -標識Mbの検定においてはいずれもかなりの不均一性が認められ、今後の残された問題と考えられた。

2. 臨床検討

1) 慢性アルコール症の血中Mbは有意に上昇し、アルコール性心筋症やミオパチーとの関連性が推測された。

2) シンナー常用者の血中Mb値は上昇を示さなかった。

本論文の要旨は第23回日本核医学会総会(昭和58年9月高槻市)で発表した。

なお本測定キットの提供をいただいた栄研イムノケミカル研究所ならびに症例の提供をいただいた札幌太田病院院長太田耕平博士に謝意を表します。

文 献

- 1) 片桐 敬, 鳥羽憲二, 佐藤龍次, 他: 急性心筋梗塞における血清ミオグロビンの変動. 臨床検査 25: 199-203, 1981
- 2) 安藤恒三郎, 加藤友義, 来住倫子, 他: ミオグロビンRIAキット(PEG法)の基礎的臨床的検討 (2) —臨床的検討—. ホルモンと臨床 28: 1501-1505, 1980
- 3) 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
- 4) 鈴木 伸, 村山雅恵, 橋場邦武, 他: 血清ミオグロビンのRadioimmunoassay法とその臨床応用. ホルモンと臨床 28: 1411-1414, 1980
- 5) 黒田 彰, 矢田部タミ, 稲葉妙子, 他: ラジオイムノアッセイによる血中ミオグロビンの測定. ホルモンと臨床 28: 85-90, 1980
- 6) 中島公雄, 藍田仁史, 木村孝司, 他: ミオグロビン栄研の基礎的検討と心筋硬塞時の血清ミオグロビン値. ホルモンと臨床 29: 377-380, 1981
- 7) 三好和夫, 川井尚臣, 八木田正聖, 他: 心筋硬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: 2506-2512, 1977
- 8) Stone MJ, Willerson JT, Gomez-Sanchez CE, et al: Radioimmunoassay of myoglobin in human serum, Results in patients with acute myocardial infarction. J Clin Invest 56: 1334-1339, 1975
- 9) 阿部 實, 岩倉治男, 八木 繁: 血中ミオグロビンの測定経験. 臨床と研究 57: 3962-3966, 1980
- 10) 三好和夫, 川井尚臣, 岩朝 勝, 他: 血液・尿化学検査—ミオグロビン—. 日本臨床 38(春季増刊号): 524-534, 1980