

《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中に含まれている。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ロマ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

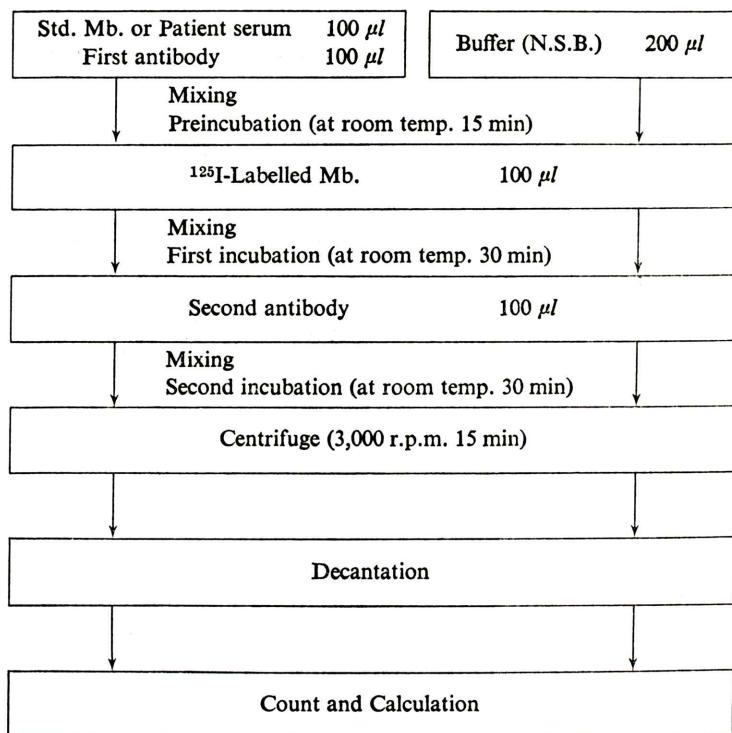
別刷請求先: 札幌市中央区南 1 条西 17 丁目 (番 060)

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

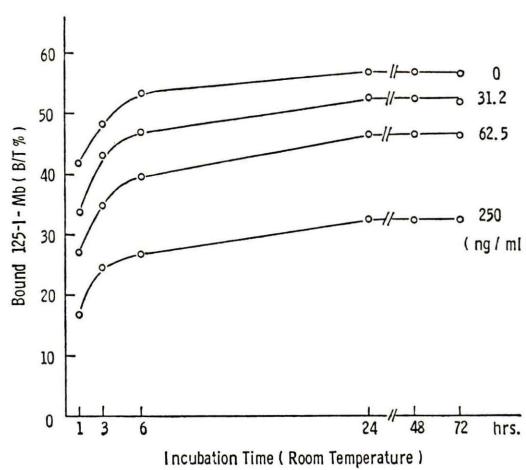


Fig. 1 Influence of first incubation time.

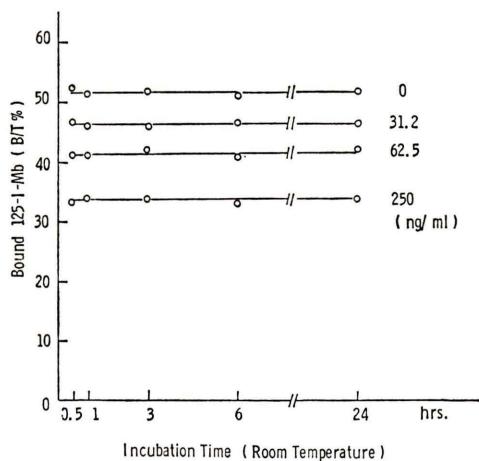


Fig. 2 Influence of second incubation time.

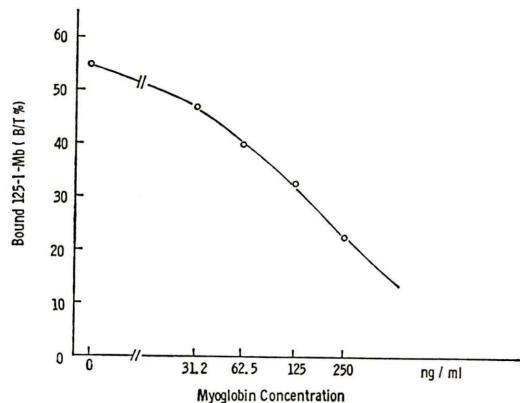


Fig. 3 Standard curve for myoglobin RIA.

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、その割合はおのおの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に、おおののピーク1mlに1%ヒトアルブミン0.1ml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	

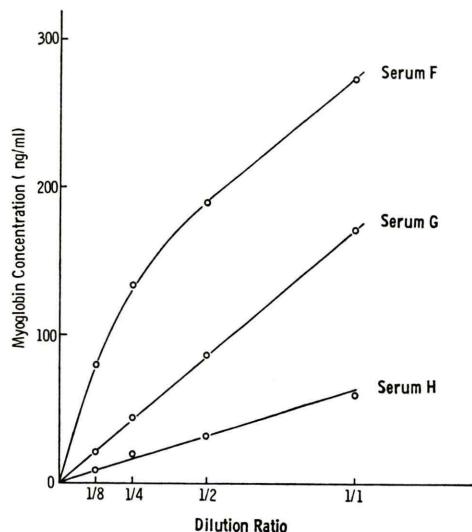
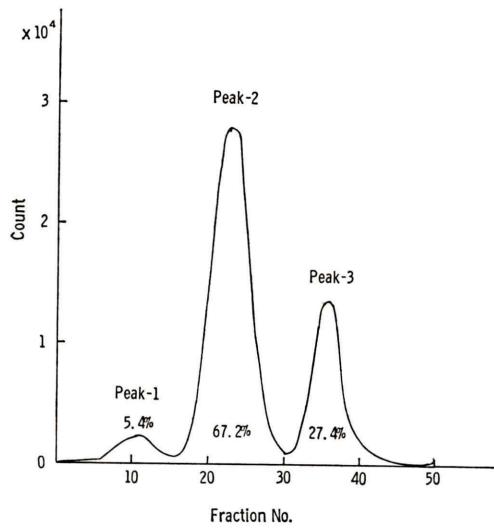


Fig. 4 Dilution test.

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、 $\text{B}/\text{T}(\%)$ 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。

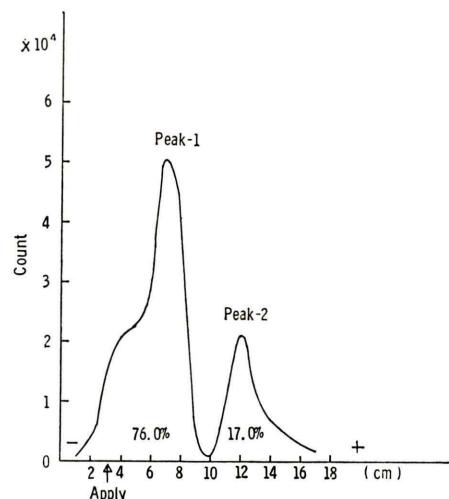
Fig. 6 Paperelectrophoresis of ^{125}I -Mb with Whatman 3MM paper.

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

Subjects	No.	Myoglobin ng/ml (M \pm 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 ($3 \times 30\text{ cm}$) をあらかじめバルビタール緩衝液 ($\text{pH}=8.6, \mu=0.075$) 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 にプロムフェノルブルー (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。

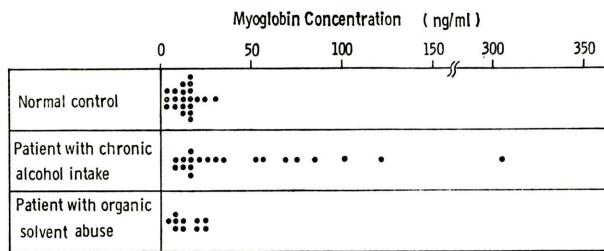


Fig. 7 Distribution of serum myoglobin in patients with chronic alcohol intake and with organic solvent abuse and in normal controls.

2. 臨床的検討

健常人、慢性アルコール症およびシンナー常用者の本キットによる血清 Mb 値をみると、Table 4 に示すように対照群 21 名の血中 Mb は 15.2 ± 5.8 ($M \pm SD$) ng/ml となり、正常域を $\pm 2 SD$ とすると 3.6~26.8 ng/ml の範囲であった。

一方慢性アルコール症 20 名については 55.0 ± 71.0 ng/ml を示し、対照群と比べて有意の上昇を示した。

またシンナー常用者 10 名では 13.9 ± 7.2 ng/ml を示し、対照群との間に有意の差を認めなかった。

なお各症例の実測値は Fig. 7 に示すごとくである。慢性アルコール症では 20 名中 10 名 (50%) が異常高値を示した。

IV. 考 察

現在、血中 Mb 測定用キットとしては第 1 ラジオアイソトープ¹⁾、ミドリ十字(CIS)²⁾ および栄研イムノケミカル研究所(NMS) 製^{3~6)}の 3 種類が用いられ、それぞれにつきその基礎ならびに臨床検討の成績が発表されている。

著者らも、血中 Mb の RIA キットを検討するために最も多用されている栄研 RIA キットについて基礎的検討を行うとともに、カラムクロマトグラフィおよび電気泳動法を用いて ^{125}I -標識 Mb の純度検定を行った。

まず反応時間の検討においては、キット指定では第 1、第 2 反応時間ともに 30 分となっているが、第 1 反応については反応系が完全に平衡に達するまでには 24 時間を要すると考えられた。したがつ

て以下の実験はすべて 24 時間で行った。しかし、30 分~1 時間の反応時間でもほぼ同程度の傾きの標準曲線が得られることから、心筋梗塞の診断時など迅速な測定を要する場合には 30 分でも可能と考えられる。

また第 2 反応時間は 30 分で、反応系は平衡に達した。

このようにして作製した標準曲線は標準 Mb 濃度 31.2~250 ng/ml において良好な曲線が得られた。

次に本キットの再現性に関しては、測定系内で 4.3~9.6% (C.V.)、測定系間では 10.8 および 12.9% であり、RIA 法としてほぼ満足できる結果を示した。

回収率については 85.2~145.3% とかなりの変動が認められたが、平均回収率では 98.7~118.6% と RIA 上とくに問題となるほどではないと考えられた。

希釈試験の結果は、低および中濃度領域では直線性を示したが、高濃度領域では希釈倍数に対して高濃度側に Mb 値が算出された。

今回の研究ではとくに ^{125}I -標識 Mb の純度検定を試みた。まずセファデックス G-100 を用いたゲルfiltration では、3 つのピーク部分が認められた。第 1 のピークは重合分子と考えられ、その割合は 5.4% であった。第 2 のピークは 67.2% を占め抗体ともよく結合した。一方第 3 のピークは Mb 分子のフラグメントと考えられるが、その比率は 27.4% とかなりの部分を占めていた。またこの分画と抗体の結合性はほとんど認められなかった。

一方濾紙電気泳動においては、 ^{125}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梗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^{2,3)}、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。とくに心筋梗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、少數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、稻葉妙子、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梗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**: 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