

《ノート》

Phadebas β_2 -micro Test 改良キットの基礎的
ならびに臨床的検討Fundamental and Clinical Evaluations of Phadebas
 β_2 -micro Test Improved Kit

矢野 正幸* 鈴木 崇代** 殿内 力*** 瀬戸 嗣郎****
平尾 敬男**** 高橋 昌里***** 三間屋純一*** 中村 孝*****

Masayuki YANO*, Takayo SUZUKI**, Tsutomu TONOUCHI***, Shirou SETO****,
Takao HIRAO****, Shouri TAKAHASHI*****, Junichi MIMAYA***
and Takashi NAKAMURA*****

*Division of Nuclear Medicine, **Department of Pharmacy, ***Division of Haematology and Oncology,
****Division of Allergy, Immunology and Infectious Disease, *****Division of Nephrology,
*****Division of Internal Medicine, Shizuoka Children's Hospital, Shizuoka

I. はじめに

β_2 -microglobulin (以下 β_2 -MG と略す) は, 1968 年 Berggård ら¹⁾ によって尿細管性蛋白尿の患者尿から分離・精製された分子量 11,800 の低分子性の蛋白質であり, ヒトのリンパ球をはじめとする有核細胞^{2,3)}で産生され, 血液・尿・髄液・唾液・乳汁・羊水・腹水・関節液・精液などに広く存在している^{1,4)}. 体液中の β_2 -MG は大部分が遊離の形で存在し, その異化には他の低分子血漿蛋白と同様に腎が主要な役割りを果たしている. 血液中の β_2 -MG は容易に腎糸球体から濾過され, 近位尿細管で再吸収され異化されるため^{5,6)}, 正常尿中

にはきわめて微量にしか排泄されない. したがって, 尿中 β_2 -MG は腎尿細管再吸収障害によって増加することとなり, 血液中および尿中 β_2 -MG を測定することは腎障害の早期診断として有用である. また, β_2 -MG はリンパ球のみならず悪性腫瘍細胞でも産生され^{3,7)}, 自己免疫疾患などにおいても増加する場合のあることが報告されている⁸⁾.

著者らは従来の Phadebas β_2 -micro Test にかえて, Phadebas β_2 -micro Test 改良キットを使用する機会が得られたので, 本キットの基礎的検討を行うとともに, 臨床的検討として健康小児ならびに腎疾患・悪性腫瘍患児の血清 β_2 -MG 濃度を測定したので, これらの成績を報告する.

II. 方法ならびに対象

1. Phadebas β_2 -micro Test 100 の原理

本法の原理は Fig. 1 に示すごとく, 抗 β_2 -MG 抗体をセファデックスに結合させた固相に対しての標準 β_2 -MG および未知検体中の β_2 -MG と

* 静岡県立こども病院核医学

** 同 薬剤部

*** 同 血液・腫瘍科

**** 同 感染・免疫・アレルギー科

***** 同 腎臓内科

***** 同 内科

受付: 58年6月17日

最終稿受付: 59年3月13日

別刷請求先: 中央区日本橋 3-10-5 徳力ビル (☎100)

(株)第一ラジオアイソトープ研究所製品企画

武田 慶三

Key words: Radioimmunoassay, β_2 -microglobulin.

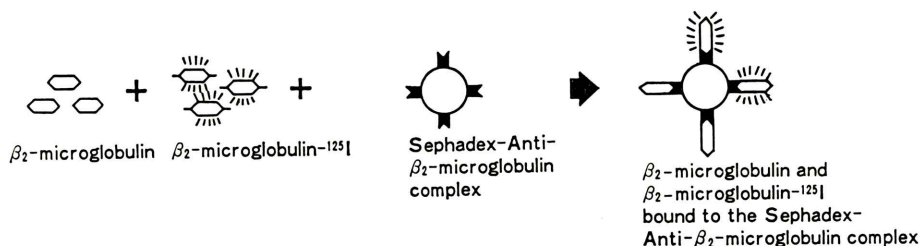


Fig. 1 Principle of the procedure.

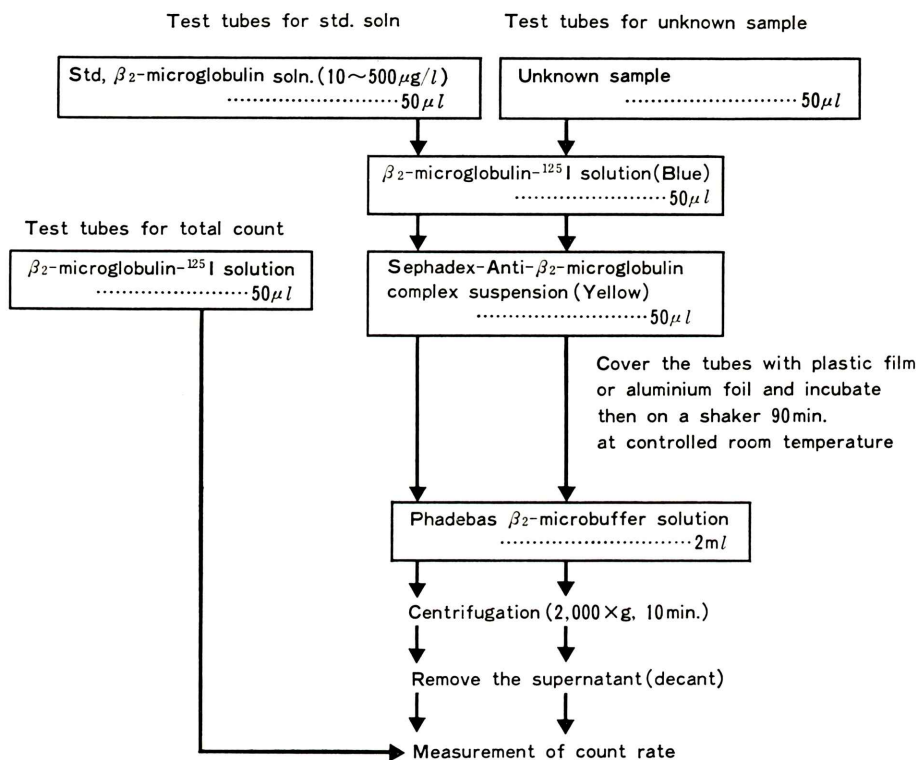


Fig. 2 Assay procedure.

^{125}I -標識 β_2 -MG の競合作用の結果、抗体と結合した結合型 β_2 -MG と遊離型 β_2 -MG を、遠心操作により分離し測定する固相法 Radioimmunoassay である。

2. キットの構成および操作手順

i) キットの構成

- (1) ^{125}I - β_2 -MG (青色に着色) 10.7 μCi $\times 1$
- (2) 標準 β_2 -MG 10, 25, 75, 200, 500 $\mu\text{g/l}$ $\times 1$
- (3) 抗 β_2 -MG (黄色に着色) $\times 1$

(4) 緩衝液 $\times 2$

ii) 操作手順

測定は Fig.2 に示した操作手順に従って行った。

iii) 検体の調整

検体の調整はキットに添付されている緩衝液を用い、血清で21倍(従来法は201倍)、尿で5倍(従来法は11倍)の希釈を行った。

iv) 検討事項

基礎的検討事項として、1) 標準曲線、2) イン

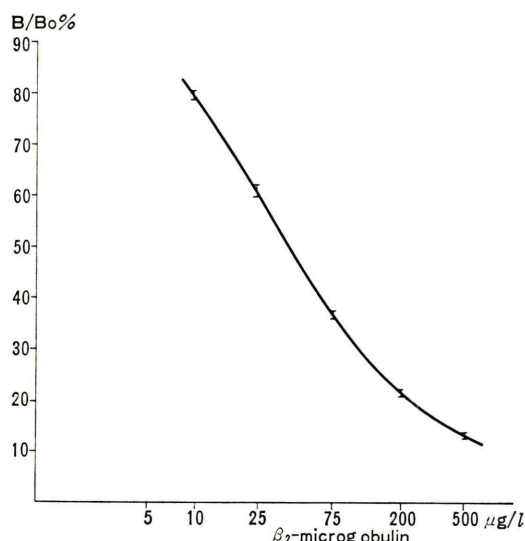


Fig. 3 Standard curve.

キュベーション温度および時間の影響, 3) 添加回収試験, 4) 希釈試験, 5) 再現性試験, 6) 従来法との相関を検討した. 臨床サンプルの検討としては, 月齢4か月から年齢15歳までの腎疾患患児39例(内訳: 男児22例, 女児17例), 悪性腫瘍患児28例(内訳: 男児20例, 女児8例)の計67例を対象とした.

なお, 今回扱った悪性腫瘍例においては, 特に腎機能の異常を認めていない.

III. 結 果

1. 基礎的検討

i) 標準曲線

原法(室温, 90分のインキュベーション)により得られた典型的な標準曲線を Fig. 3 に示す. 6重測定による変動係数は全域においてバラツキは非常に少なく, 良好な再現性を示した.

ii) インキュベーション温度および時間の影響

まず, 反応温度を4°C, 25°Cでそれぞれ行ない, 反応温度の影響を検討した. Fig. 4 に示すように, 25°Cと4°Cにおける零サンプルの結合型 β_2 -MGのカウント数(Bo)と全カウント数(T)の比Bo/T(%)を比較すると, 25°Cのほうが4°Cの場合よ

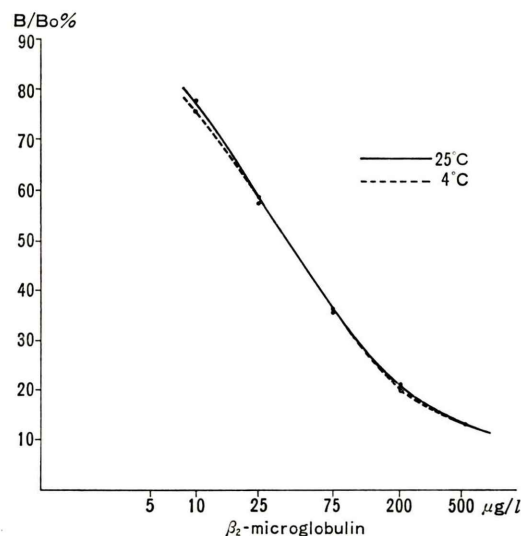


Fig. 4 Effect of incubation temperature on the standard curve.

り若干結合%が高かったが, 標準曲線はほぼ類似しており, 温度による影響はほとんど認められなかった. 次に反応時間を, 30, 60, 90, 120, 180分と変化させた時のBo/T(%)および標準曲線を Fig. 5 に示した. Bo/T(%)は, 反応時間が長くなるほど高くなるが, 90分以上ではその上昇度合は僅かであり, 90, 120, 180分でのB/Bo(%)に換算された標準曲線は, よく平行していることから, 反応時間は90分が適当であると考えた.

iii) 添加回収試験

4種の血清および尿にそれぞれ4種の標準 β_2 -MGを添加したときの成績を, Table 1 および Table 2 に示す. 血清の平均回収率は94.8~105.5%, 尿の平均回収率は98.8~100.4%とほぼ100%に近い値が得られた.

iv) 希釈試験

異なる β_2 -MG濃度をもつ3種の血清について, 緩衝液で21倍希釈した検体を, 順次倍々希釈した成績を Fig. 6 に示す. 3検体とも概ね原点に収束する希釈直線が得られた.

v) 再現性

異なる β_2 -MG濃度の3種の血清について, 2重測定で同時にそれぞれ6回測定を行った成績を

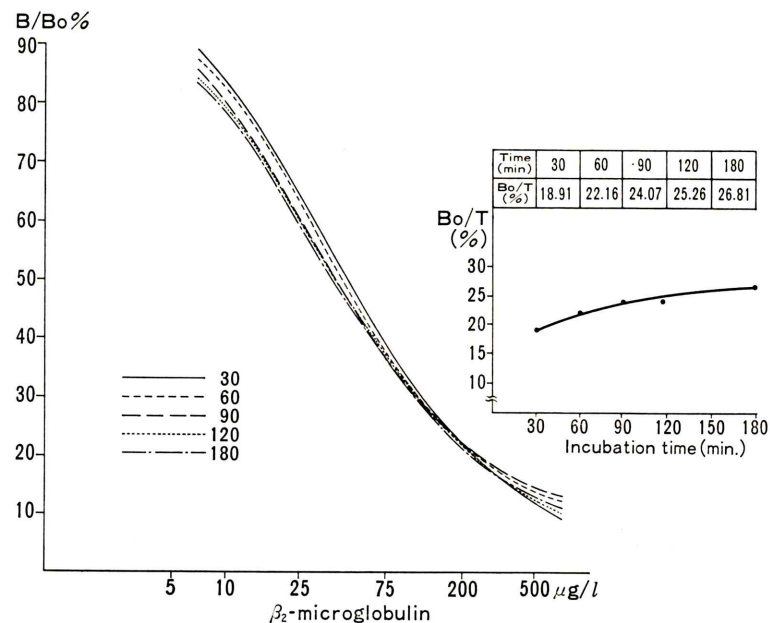


Fig. 5 Effect of incubation time on the standard curve.

Table 1 Recovery of β_2 -microglobulin added to normal serum at different concentrations

Pt. Serum volume μl	Added Standard β_2 -mic. $\mu g/l$	Total volume μl	β_2 -microglobulin concentration		Recovery (%)
			predicted $\mu g/l$	determined $\mu g/l$	
50	—	50	177	177	—
25	10	50	93.5	98.5	105
25	25	50	101.0	106	105
25	75	50	126.0	132	104
25	200	50	188.5	196	104
Mean					104.5
50	—	50	139	139	—
25	10	50	74.5	69	92.6
25	25	50	82	75	91.5
25	75	50	107	99.5	93
25	200	50	169.5	173	102
Mean					94.8
50	—	50	187	187	—
25	10	50	98.5	102	104
25	25	50	106	105	99.1
25	75	50	131	122	93.1
25	200	50	193.5	174	89.9
Mean					96.5
50	—	50	252	252	—
25	10	50	131	136	104
25	25	50	138.5	145	105
25	75	50	163.5	166	102
25	200	50	226	250	111
Mean					105.5

Table 2 Recovery of β_2 -microglobulin added to normal urine at different concentrations

Pt. urine volume μl	Added Standard β_2 -mic. $\mu g/l$	Total volume μl	β_2 -microglobulin concentration		Recovery (%)
			predicted $\mu g/l$	determined $\mu g/l$	
50	—	50	87	87	—
25	10	50	48.5	44.2	91.1
25	25	50	56	61.5	109
25	75	50	81	75	92.6
25	200	50	143.5	157	109
Mean					100.4
50	—	50	70.5	70.5	—
25	10	50	40.3	37.5	93.1
25	25	50	47.8	47.3	99.0
25	75	50	72.8	72.5	99.6
25	200	50	135.3	138.0	102.0
Mean					98.8
50	—	50	51.5	51.5	—
25	10	50	30.8	27.2	88.3
25	25	50	38.3	37.5	97.9
25	75	50	63.3	62.0	97.9
25	200	50	125.8	140.0	111.0
Mean					98.8
50	—	50	84	84	—
25	10	50	47	42	89.4
25	25	50	54.5	51.5	94.5
25	75	50	79.5	81.5	103.0
25	200	50	142.0	156.0	110.0
Mean					99.2

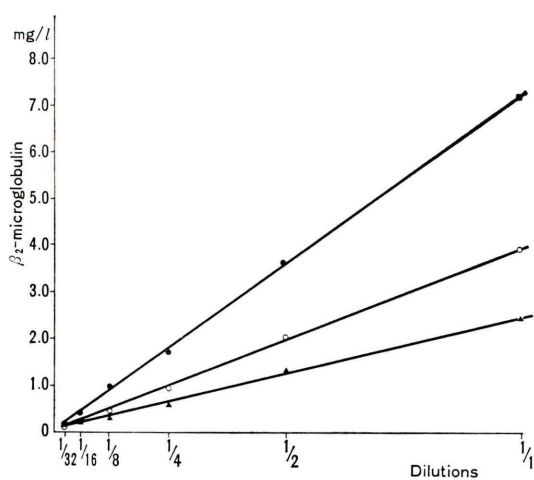


Fig. 6 Dilution test.

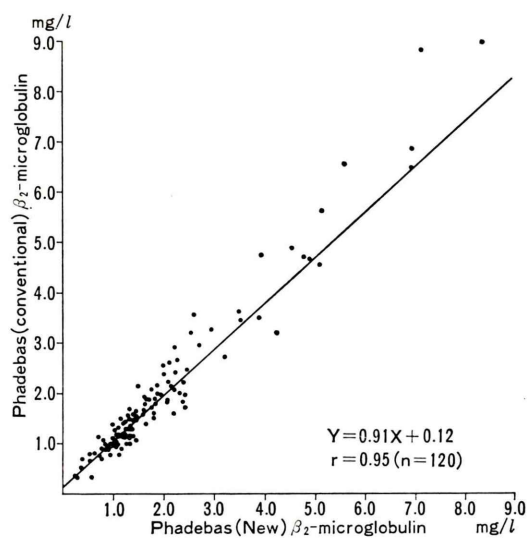
Fig. 7 Correlation between phadebas (new) β_2 -micro test and phadebas (conventional) β_2 -micro test.

Table 3 Reproducibility of β_2 -microglobulin concentrations using the same kit

Sample No.	β_2 -microglobulin conc. ($\mu\text{g/l}$)						Mean($\mu\text{g/l}$) \pm 1 S.D.	C.V.(%)
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)		
1	625.8	627.9	628.0	632.1	621.6	632.2	627.9 \pm 4.0	0.64
2	6,615.0	7,035.0	6,762.0	7,056.0	6,342.0	6,531.0	6,723.5 \pm 284.1	4.22
3	1,348.2	1,433.3	1,361.9	1,376.6	1,308.3	1,373.4	1,366.9 \pm 40.9	2.99

Table 4 Reproducibility of β_2 -microglobulin concentrations using the different sample

Sample No.	β_2 -microglobulin conc. ($\mu\text{g/l}$)				Mean($\mu\text{g/l}$) \pm 1 S.D.	C.V.(%)
	(1)	(2)	(3)	(4)		
Serum 1	1,512.0	1,628.1	1,670.1	1,638.2	1,612.1 \pm 69.1	4.29
" 2	6,825.1	7,141.1	7,350.4	7,081.2	7,099.5 \pm 216.3	3.05
" 3	1,333.1	1,315.2	1,365.2	1,354.3	1,342.0 \pm 22.3	1.66
Urine 1	2,395.3	2,325.5	2,490.3	2,475.3	2,421.6 \pm 76.4	3.15
" 2	54.2	52.5	53.1	57.1	54.2 \pm 2.0	3.69
" 3	432.5	465.5	437.3	425.1	440.1 \pm 17.7	4.02

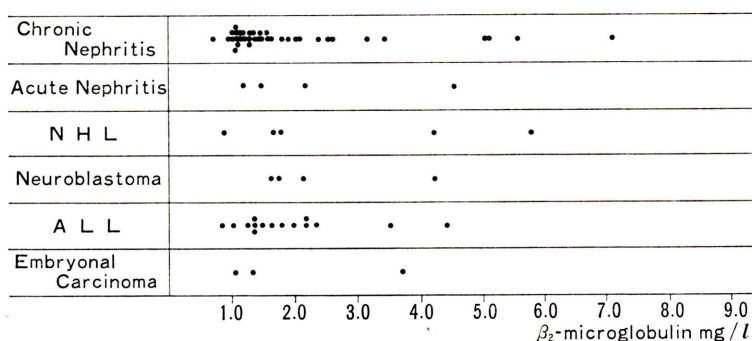
Fig. 8 Serum β_2 -microglobulin concentration in various disorders.

Table 3 に示す. 変動係数 CV% は 0.64~4.22% であり, 非常に良好な結果であった.

次に日をかえて 4 回のアッセイを行い, 同一検体による再現性をみたところ Table 4 に示すように変動係数 CV% はそれぞれ, 1.66~4.29%, 3.15~4.02% であり, 本測定系の再現性が優れていることが示された.

vi) 新旧 Phadebas β_2 -micro Test の相関関係
Phadebas β_2 -micro Test 従来法と改良法による

同一症例 120 例における測定値の相関関係を求めた成績を Fig. 7 に示す. 回帰直線式は, $Y=0.91X+0.12$, 相関係数 $r=0.95$ で示され, 高濃度域では従来法の方が高値をとる傾向が見られた.

2. 臨床的検討

悪性腫瘍を含む各種疾患患児 67 例における血清 β_2 -MG 濃度を Fig. 8 に示す.

1) 腎疾患患児の血清 β_2 -MG 濃度

慢性腎炎例による血清 β_2 -MG 濃度の平均値

± 1 S.D. は $2105.3 \pm 1489.9 \mu\text{g/l}$, 範囲は $732.9 \sim 3140.0 \mu\text{g/l}$ で, 急性腎炎 4 例による血清 β_2 -MG 濃度の平均値 ± 1 S.D. は $2375.6 \pm 1527.3 \mu\text{g/l}$, 範囲は $1217.9 \sim 4580.0 \mu\text{g/l}$ であり, いずれも正常値から高値まで広く分布した。

2) 悪性腫瘍患児の血清 β_2 -MG 濃度

急性リンパ性白血病 16 例, non-Hodgkin's lymphoma 5 例, 胎児性癌 3 例, 神経芽細胞腫 4 例の計 28 例による血清 β_2 -MG 濃度の平均値 ± 1 S.D. は, $2186.2 \pm 1253.7 \mu\text{g/l}$ であり, 正常値から高値まで広く分布した。

IV. 考 察

Phadebas β_2 -micro Test 改良法の基礎的検討を行うとともに臨床的有用性について検討を行った。まず標準曲線について 6 重測定による平均結合率に対する変動係数 CV% を求めると 0.66~2.62% であり, 全標準濃度域において良好な再現性が得られた。ただし, 原法通りにアッセイを行った場合, 変動係数 CV% は 6% 前後となるため改善策として, アッセイの最終段階である上清除去に際してデカントの状態で管壁の残液をアスピレートした。その結果, 変動係数 CV% に 3% 以上の改善が得られた。インキュベーション温度については, 25°C と 4°C において Bo/T に若干の差を認めるものの, 標準曲線としては類似しており, ほとんど温度による影響を受けないものと思われた。インキュベーション時間については, 90 分以上における Bo/T の差は僅かで標準曲線は良く平行していた。したがって原法通り, 室温・90 分のインキュベーション条件で実用上よいものと考えられ, 以下この条件で検討を進めた。添加回収試験の成績は, 尿平均回収率 99.3%, 血清平均回収率 100.3% と良好な結果が得られた。希釈試験では原点に収束する希釈直線を示し, 本キットの緩衝液が被検検体の希釈溶液として不都合ないものと考えられた。intra-assay での変動係数 CV% は 0.63~4.22%, inter-assay での変動係数 CV% は 1.66~4.28% と優れた再現性を示した。

次に, 臨床的検討として, β_2 -MG は低分子蛋白

であるため血液中の β_2 -MG は糸球体で容易に濾過されるが, 糸球体機能障害が生ずると濾過能が妨げられ血中 β_2 -MG 濃度が著明に高くなる⁹⁾。また, 糸球体で濾過された β_2 -MG はそのほとんどが近位尿細管で再吸収され異化されるが^{5,6)}, 異化能に障害が生ずると, 尿中 β_2 -MG 濃度が増加する^{5,10,11)}。以上の観点から血清 β_2 -MG 濃度の測定は糸球体機能の評価に, 尿中 β_2 -MG 濃度の測定は尿細管機能の評価にと広く臨床に応用されている。

今回, 著者らが検討した慢性腎炎および急性腎炎の血清 β_2 -MG 濃度は, 正常値から異常高値まで広く分布し, 高値を示した患児の血清クレアチニン値は諸家の報告^{9,12)}にあるように上昇傾向を示した。一方, 血中 β_2 -MG 濃度の上昇は腎疾患に特異的でなく, リンパ増殖性疾患・悪性腫瘍・自己免疫疾患においても増加することが知られ注目されている^{3,6,7)}。著者らの成績でも悪性腫瘍群における初診時採取血清の約 30% に高値を認めた。

V. 総括ならびに結論

Phadebas β_2 -micro Test 改良キットの基礎的並びに臨床的検討を行い, 以下の結論を得た。

1. 本法の検体希釈比が従来法に比較して血清で 10 分の 1, 尿で 2 分の 1 に改善されるとともに, 標準試薬の最小濃度に対する最大濃度比が 32 倍 (従来法) から 50 倍に拡張されたことにより, 測定感度, 安定性に満足すべき結果を得た。

2. 本法の手法は簡単であり, 被検血清は $50 \mu\text{l}$ と微量である。しかも, 室温・90 分のインキュベーションで再現性の高い優れた結果を得た。

3. 腎疾患患児における血清 β_2 -MG 濃度は患児の病態をよく反映していた。

4. 悪性腫瘍患児の初診採取血清 β_2 -MG 濃度は, 正常児に比較してやや高値を示した。

文 献

- 1) Berggård I, Bear AG: Isolation and properties of a low molecular weight β_2 -globulin occurring in human biological fluids. J Biol Chem 243: 4095, 1968

- 2) Bernier GM, Franges MW: Synthesis of β_2 -microglobulin by stimulated lymphocytes. *J Immunol* **109**: 407, 1972
- 3) Evrin PE, Nilsson K: β_2 -microglobulin production in vitro by human hematopoietic, mesenchymal and epithelial cells. *J Immunol* **112**: 137, 1974
- 4) Evrin PE, Peterson PA, Widel L, et al: Radioimmunoassay of beta-2-microglobulin human biological fluid. *Scand. J Clin Lab Invest* **28**: 439, 1971
- 5) Peterson PA, Evrin PE, Berggård I: Differentiation of Glomerular, Tubular, and renal Proteinuria: Determinations of Urinary Excretion of β_2 -microglobulin, Albumin, and Total Protein. *J Clin Invest* **48**: 1189, 1969
- 6) Bernier GM, Conrad ME: Catabolism of human β_2 -microglobulin by the rat kidney. *Am J Physiol* **217**: 1359, 1969
- 7) 片桐 一, 板倉克明, 丸山直記, 他: 悪性腫瘍患者血清中の β_2 -microglobulin. *医学のあゆみ* **95**: 650, 1975
- 8) Evrin PE, Wibell L: Serum β_2 -microglobulin in various disorders. *Clin Chim Acta* **43**: 183, 1973
- 9) Wibell L, Evrin PE, Berggård I: Serum β_2 -microglobulin in renal disease. *Nephron* **10**: 320, 1973
- 10) 金井正光, 百瀬 正, 相沢孝夫, 他: 低分子血漿蛋白 (β_2 -microglobulin と retinol-binding protein) の尿細管再吸収閾値について. *医学のあゆみ* **104**: 372, 1978
- 11) 金衡 仁, 伊藤喜久, 河合 忠: β_2 -マイクログロブリンと α_1 -マイクログロブリン. *総合臨床* **31**: 2007, 1982
- 12) 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, 1978