

《ノート》

ベータ2マイクログロブリン測定に関する 基礎的・臨床的検討

Fundamental and Clinical Studies on the Measurement of β_2 -microglobulin
Using Pharmacia β_2 -micro RIA

杉村 英一* 藤井美也子* 坂田 裕行* 木原 数弘*
佐藤 邦夫* 角田 新一* 出村 博* 川口 洋**
小田桐怜子***

Hidekazu SUGIMURA*, Miyako FUJII*, Hiroyuki SAKATA*, Kazuhiro KIHARA*,
Kunio SATOH*, Shinichi TSUNODA*, Hiroshi DEMURA*,
Hiroshi KAWAGUCHI** and Reiko ODAGIRI***

*The Radioassay Center, **Kidney Center, ***Diabetes Center,
Tokyo Women's Medical College

I. はじめに

β_2 -microglobulin (以下 β_2 -MG と略す) は、尿細管性蛋白尿を伴う慢性カドミウム中毒患者尿から分離精製された分子量 11,800 の低分子蛋白¹⁾で、免疫グロブリン IgG の各 domain と類似性^{2,3)}をもち、主要組織適合性抗原 (HL-A) の L 鎮を担っている^{4,5)}。 β_2 -MG はリンパ系および種々の細胞で産生され^{6~9)}、血液をはじめ種々の体液中に遊離形で微量存在する。血中および尿中 β_2 -MG の濃度に最も影響する因子は腎機能であり、現在臨床的にも糸球体および尿細管機能検査に用いられている。すなわち血中 β_2 -MG 値はクレアチニンクリアランスに代表される糸球体濾過値 (GFR)、ならびに腎血流量を反映する PSP テスト 15 分値

との間に負の相関を認め、血清クレアチニンとは正の相関関係^{10,11)}があるので腎機能の良い指標と考えられている。

これまで Phadebas β_2 -micro test¹²⁾ (塩野義) を用い測定を行ってきたが、このたび Pharmacia β_2 -micro RIA (塩野義) を試用する機会を得たので基礎的ならびに臨床的検討の成績を報告する。

II. 方 法

1. キットの構成および測定方法

i) キットの構成

- | | |
|---|--------|
| (1) 標準 β_2 -MG (0.4, 0.8, 1.6, 4, 8, 16 mg/l) | 6 バイアル |
| (2) 125 I-標識 β_2 -MG, 1.7 μ Ci | 1 // |
| (3) 第一抗体 (抗ヒト β_2 -MG 羊血清) | 1 // |
| (4) 第二抗体 (抗羊 IgG 馬血清) | 1 // |

ii) 操作方法と検体の調整

操作方法および抗原抗体反応の結合様式を

Key words: β_2 -microglobulin, Radioimmunoassay, Renal function test, Renal transplantation, Immunity.

* 東京女子医大ラジオアッセイ検査科

** 同 腎臓病センター

*** 同 糖尿病センター

受付：59年11月20日

最終稿受付：60年2月1日

別刷請求先：東京都新宿区市ヶ谷河田町10番 (番号 162)

東京女子医大病院ラジオアッセイ検査科

杉 村 英 一

Fig. 1 に示した。本法はマイクロセファロースに固相化した第二抗体で、 β_2 -MG と第一抗体との結合物を沈降せしめる二抗体法である。通常第二抗体は一定の第一反応時間後に添加するのである。

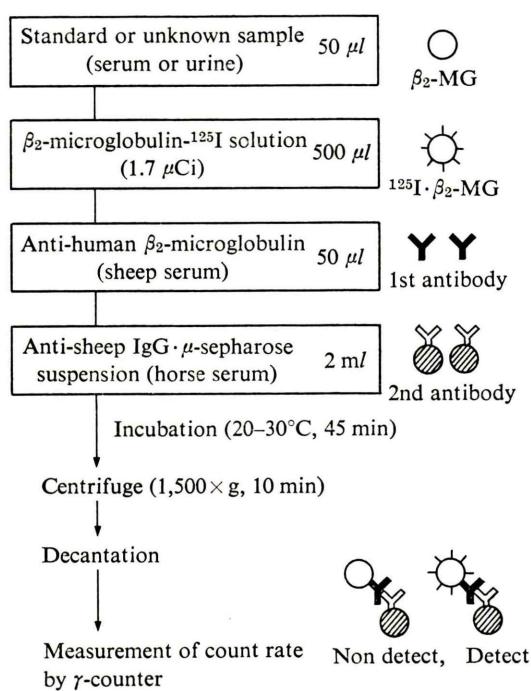


Fig. 1 Assay procedure and principle of Pharmacia β_2 -microglobulin radioimmunoassay.

が、本法ではこれらを同時に混合しインキュベイトする特徴がある。また尿検体は酸性尿による β_2 -MG の変性を考慮し、PH を中性に調整して測定を行った。

III. 結 果

1. 基礎的檢討

i) 非特異的沈降率

健常者の血清50検体、尿50検体における非特異的沈降率(%)の平均値±標準偏差は、血清で $2.01 \pm 0.61\%$ 、尿では $2.40 \pm 0.61\%$ と低値であることから、 β_2 -MG の測定値には大きな影響を与えないと思われた。

ii) 標準曲線

従来法および本法の標準曲線の濃度範囲と、添加標識抗原に対する結合率(Bound/Total %)の違いをFig. 2に示した。両者の標準品の最低濃度の結合率は、従来法が $1.5 \mu\text{g/l}$ -8.2%と低いのに対して本法では $0.4 \times 10^3 \mu\text{g/l}$ -61.6%と十分高い結合率が得られている。なお本法において第一反応の後に第二反応を行っても(2 step method)本法の標準曲線との間に大きな差は認められなかつた。

また本法の操作書に従った代表的標準曲線(Bound/B₀ %)と変動係数(CV %)をFig. 3に示し

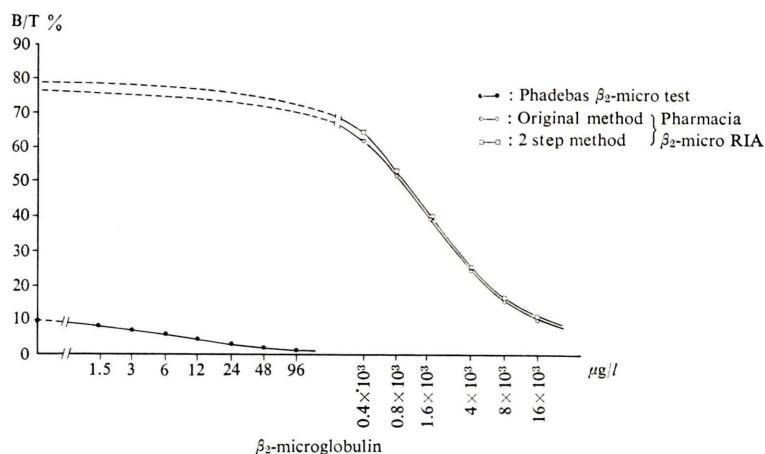


Fig. 2 Relationship between standard section of Phadebas β_2 -micro test and Pharmacia β_2 -micro RIA.

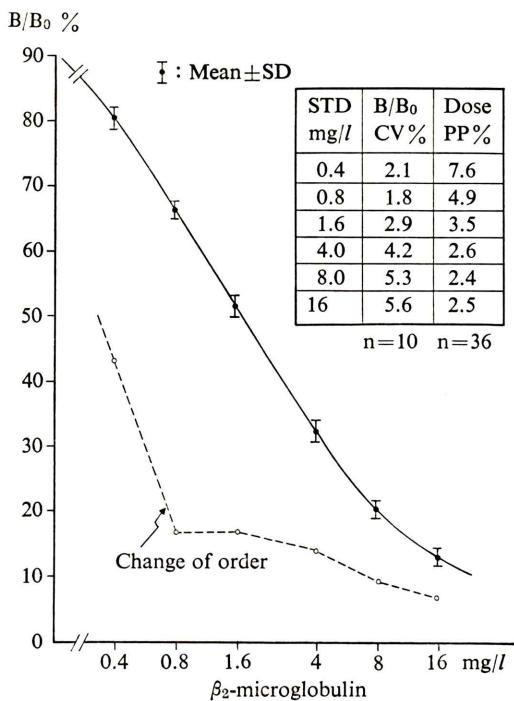


Fig. 3 Standard curve (B/B_0) and interassay coefficient of variation (CV%) of Pharmacia β_2 -micro RIA.

た。本法は結合率が高いため標準曲線は大きな変動がなく、36回の測定による response error relationship (R. E. R.) の平均値土標準偏差は slope 0.015 ± 0.004 であり、precision profile (P. P. %) も標準品 0.4 mg/l の $7.6 \pm 2.3\%$ ～ 16 mg/l の $2.5 \pm 0.8\%$ と良好な精度であった。

なお操作手順は①標準品または検体、② $^{125}\text{I}-\beta_2\text{-MG}$ 、③第一抗体の順番に行うが、手順を誤って①～③～②で行った場合 (change of order) 時間的に数分の違いであるが結合率が著明に低下し標準曲線は二相性を示した。

iii) 反応時間および温度の影響

反応温度を 25°C と定め反応時間を 10, 25, 45, 90 および 240 分としてアッセイを行った (Fig. 4-a)。おののの標準品における結合率の上昇は、45 分ではほぼプラトーであり、反応時間は 45 分で十分であった。次に反応時間を 45 分と定め反応温度を

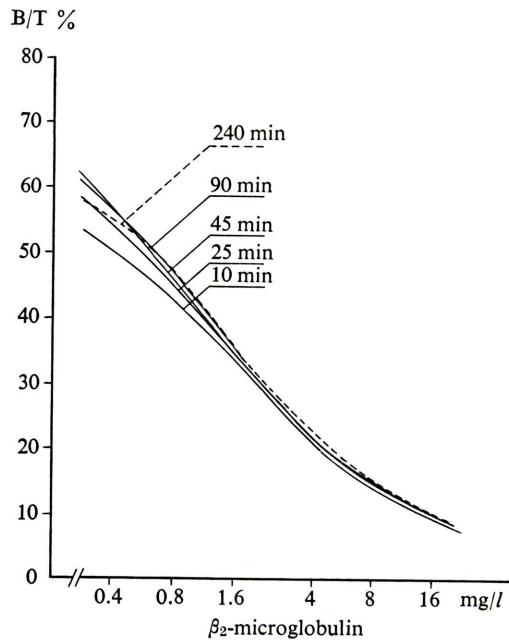


Fig. 4-a Effect of incubation time on the standard curves.

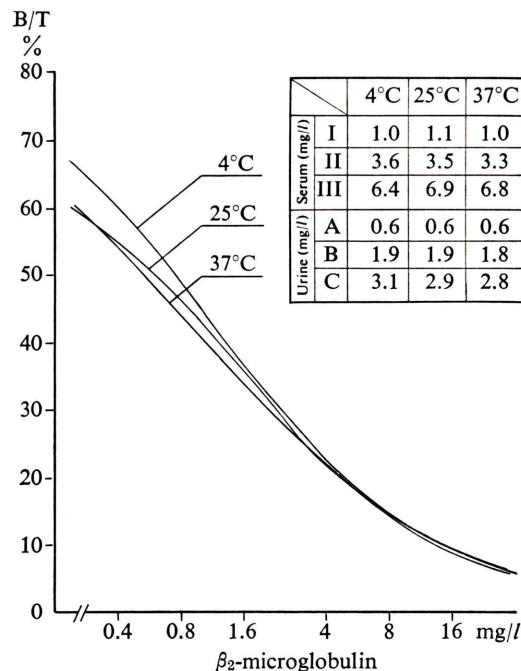


Fig. 4-b Effect of incubation temperature on the standard curves and serum or urine levels.

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

Serum I				Urine A			
Added (mg/l)	Measured (mg/l)	Calculated (mg/l)	Recovery (%)	Added (mg/l)	Measured (mg/l)	Calculated (mg/l)	Recovery (%)
0.4	—	—	—	0.4	0.62	0.60	103
0.8	0.90	0.84	107	0.8	0.76	0.79	96
1.6	1.33	1.24	107	1.6	1.09	1.19	91
4.0	2.51	2.44	102	4.0	2.21	2.39	92
8.0	4.22	4.44	95	8.0	4.14	4.39	94
16	8.44	8.44	100	16	8.16	8.39	97
Mean 102%				Mean 96%			
Serum II				Urine B			
0.4	1.40	1.29	108	0.4	0.71	0.79	90
0.8	1.49	1.49	100	0.8	0.83	0.99	84
1.6	1.93	1.89	102	1.6	1.32	1.39	95
4.0	3.02	3.08	98	4.0	2.25	2.59	87
8.0	5.32	5.09	104	8.0	4.40	4.59	96
16	9.29	9.09	102	16	7.90	8.59	92
Mean 102%				Mean 91%			
Serum III				Urine C			
0.4	3.52	3.43	102	0.4	5.31	5.60	95
0.8	3.84	3.63	105	0.8	5.44	5.80	94
1.6	4.25	4.03	105	1.6	5.93	6.20	96
4.0	5.53	5.23	105	4.0	6.53	7.40	88
8.0	7.13	7.23	98	8.0	9.14	9.40	97
16	11.8	11.2	105	16	12.4	13.4	93
Mean 103%				Mean 94%			
Mean 103%				Mean 94%			

4°C, 25°C, 37°C の 3通りでそれぞれアッセイを行った(Fig. 4-b). 標準品低濃度の結合率は 37°C より 25°C, 25°C より 4°C と低温になるほど高くなる傾向にあったが、検体の β_2 -MG 値は一定であることから操作が容易である室温で行うこととした。

iv) 添加回収率

濃度の異なる 3種類の血清および尿検体 25 μl に、おのおの 6濃度の標準品を 25 μl 添加してアッセイを行いその実測値と予測値を比較して回収率を求めた(Table 1). 血清の平均回収率は 102~103%と良好であったが、尿の平均回収率は 91~96%と若干低値であった。

v) 希釈試験

異なる β_2 -MG 濃度をもつ血清および尿のおのおの 3種について、リン酸緩衝液で倍数希釈した

成績を Fig. 5 に示した。血清および尿のいずれも良好な希釈直線が得られた。

vi) 再現性

濃度の異なる 3種類の血清および尿検体における、アッセイ内およびアッセイ間の再現性($n=10$)を Table 2 に示した。アッセイ内における変動係数は血清の 8.0%以下、尿検体では 7.0%以下であった。またアッセイ間における変動係数は血清の 6.0%以下、尿検体は 8.0%以下となり良好な再現性であった。

vii) 他キットとの相関性

従来法と本法における相関性を Fig. 6 に示した。血清および尿の回帰直線式と相関係数は良好であった。また本法と β_2 -microglobulin RIA キット(栄研)との相関性は、本法を X、栄研法を Y とすると血清は $Y=0.781X+0.031 \text{ mg/l}$,

Table 2 Result of intraassay and interassay reproducibility

Intraassay variance						
N=10	Serum I (mg/l)	Serum II (mg/l)	Serum III (mg/l)	Urine A (mg/l)	Urine B (mg/l)	Urine C (mg/l)
Mean	1.61	4.91	7.18	0.90	1.49	5.39
SD	0.099	0.302	0.575	0.055	0.096	0.304
CV%	6.1	6.1	8.0	6.1	6.4	5.6
Interassay variance						
Assay (N)	Serum I (mg/l)	Serum II (mg/l)	Serum III (mg/l)	Urine A (mg/l)	Urine B (mg/l)	Urine C (mg/l)
1	1.60	5.09	7.29	0.86	1.48	5.74
2	1.69	5.12	7.27	0.91	1.67	5.88
3	1.70	5.08	7.08	0.97	1.60	5.71
4	1.64	5.57	7.42	0.90	1.65	5.96
5	1.51	5.04	7.19	0.90	1.57	6.24
6	1.61	5.30	7.15	0.84	1.44	5.45
7	1.74	5.58	7.46	0.89	1.50	5.85
8	1.67	5.70	7.07	0.84	1.47	6.33
9	1.69	5.39	6.95	0.96	1.73	5.63
10	1.45	5.21	7.14	0.73	1.33	5.23
Mean	1.63	5.31	7.20	0.88	1.54	5.80
SD	0.091	0.240	0.160	0.070	0.122	0.333
CV%	5.6	4.5	2.2	7.9	7.9	5.7

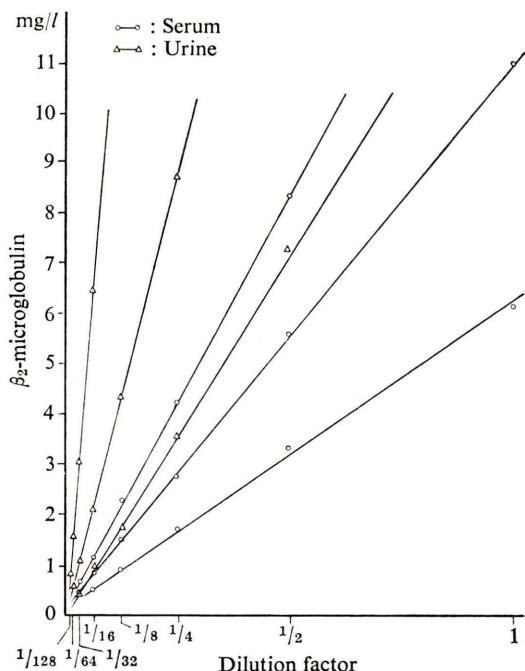


Fig. 5 Effect of dilution of the serum and urine with phosphate buffer on β_2 -microglobulin estimates.

$r=0.986$ ($n=82$) であり、尿では $Y=0.903X - 491.5 \mu\text{g}/\text{l}$, $r=0.991$ ($n=108$) であった。

2. 臨床的検討

健常者112例、腎疾患66例(慢性糸球体腎炎10例、ネフローゼ症候群18例、IgA腎症6例、急性腎不全7例、慢性腎不全25例)、糖尿病52例、腎障害を伴わない肝疾患81例(急性肝炎25例、慢性肝炎25例、肝硬変14例、肝細胞癌17例)および膠原病の14例(全身性エリテマトーデス11例、慢性関節リウマチ3例、シェグレン症候群5例)を対象とし、血中および一部の疾患については尿中、唾液中の β_2 -MG を測定した(Fig. 7)。

1) 健常者の β_2 -MG 濃度

健常者112例における血清 β_2 -MG の平均値士標準偏差は $1.12 \pm 0.27 \text{ mg}/\text{l}$ であり、尿では77例にて $116 \pm 83.9 \mu\text{g}/\text{l}$ であった。また健常者47例の唾液中 β_2 -MG は $0.83 \pm 0.44 \text{ mg}/\text{l}$ であった。

2) 糖尿病性腎症における血中 β_2 -MG 値

尿蛋白、2時間クレアチニクリアランスおよび血清クレアチニンなどから、腎障害を合併しな

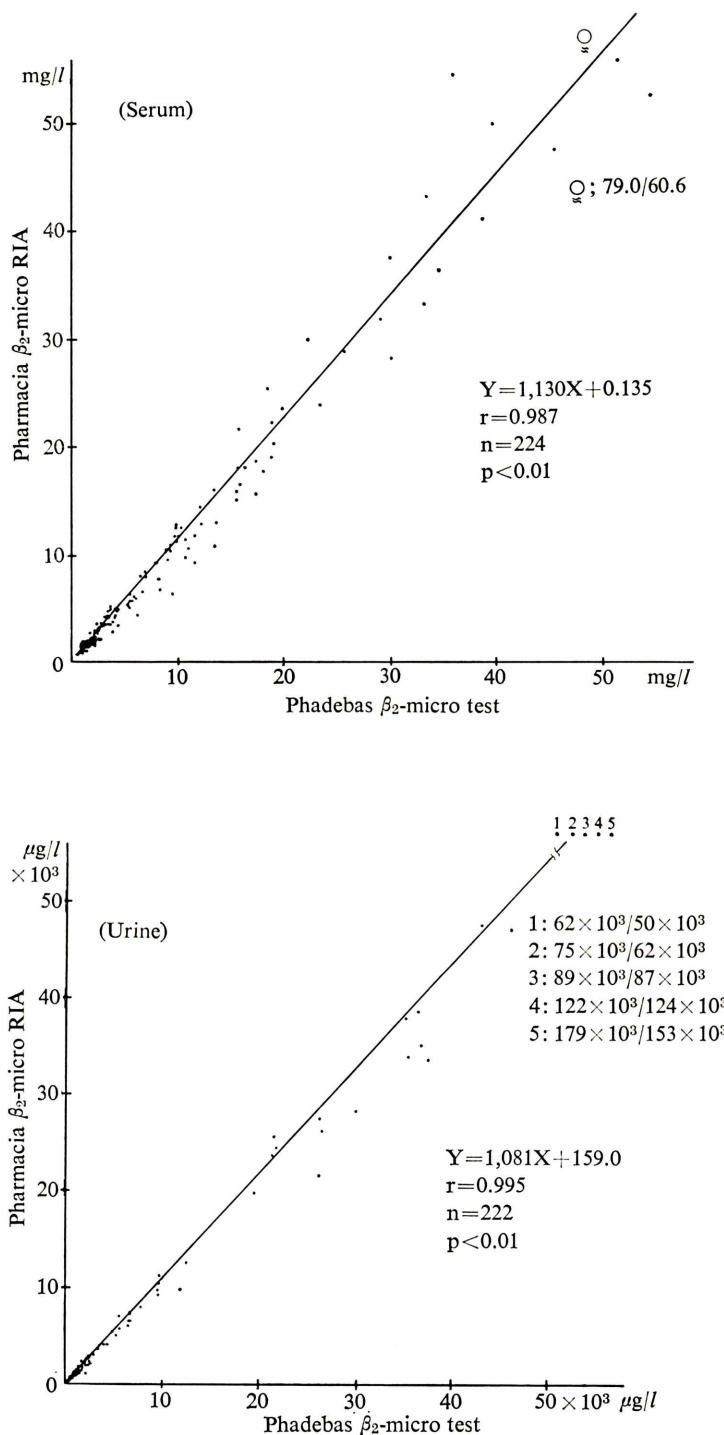
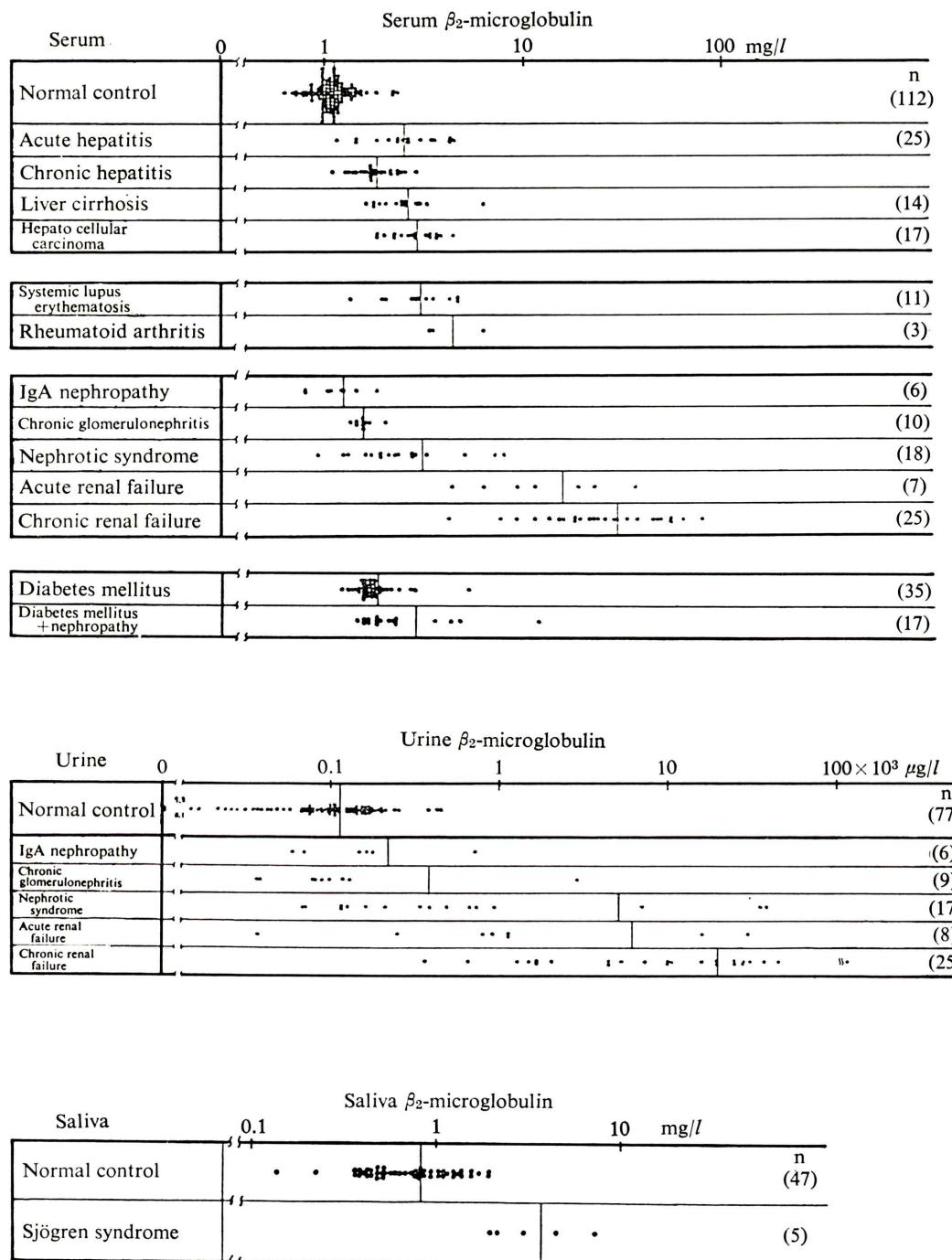


Fig. 6 Correlation between Phadebas β_2 -micro test and pharmaca β_2 -micro RIA on serum and urine.

Fig. 7 Serum, urine and saliva β_2 -microglobulin concentrations in various diseases.

い糖尿病35例(平均年齢 52.9 ± 11.4)と糖尿病性腎症17例(平均年齢 56.0 ± 11.4)の2群に分け両者を比較した。腎障害を合併しない群での平均値±標準偏差は、血清クレアチニン $1.1\pm0.17\text{ mg/l}$ 、2時間クレアチニクリアランス $71.3\pm19.7\text{ ml/min}$ で、血清 β_2 -MG値は $1.82\pm0.67\text{ mg/l}$ と正常範囲であったが、糖尿病性腎症では血清クレアチニン $1.3\pm0.27\text{ mg/l}$ 、2時間クレアチニクリアランス $51.0\pm14.3\text{ ml/min}$ また血清 β_2 -MG値は $2.83\pm2.48\text{ mg/l}$ となり、健常者や腎障害を合併しない糖尿病に比較して糖尿病性腎症の血清 β_2 -MGは上昇した。

3) 腎疾患の血中および尿中 β_2 -MG値

腎疾患における血清 β_2 -MGの平均値±標準偏差は、IgA腎症の $1.24\pm0.36\text{ mg/l}$ 、および慢性糸球体腎炎の $1.58\pm0.17\text{ mg/l}$ は正常範囲内であるが、ネフローゼ症候群は $3.01\pm2.01\text{ mg/l}$ と軽度の上昇を認めた。また急性腎不全の $15.5\pm11.2\text{ mg/l}$ および慢性腎不全の $29.7\pm19.5\text{ mg/l}$ は著明な上昇であった。なお尿中 β_2 -MGの平均値±標準偏差も血清と同様に、IgA腎症 $224\pm248\text{ }\mu\text{g/l}$ 、慢性糸球体腎炎 $390\pm920\text{ }\mu\text{g/l}$ 、ネフローゼ症候群 $5,050\pm12,210\text{ }\mu\text{g/l}$ 、急性腎不全 $6,160\pm10,710\text{ }\mu\text{g/l}$ および慢性腎不全 $19,700\pm31,740\text{ }\mu\text{g/l}$ と明らかな上昇を認めた。

4) 肝疾患における血中 β_2 -MG値

腎障害の合併を認めない各種肝疾患81例における血清 β_2 -MGの平均値±標準偏差は、急性肝炎 $2.53\pm0.94\text{ mg/l}$ 、慢性肝炎 $1.86\pm0.44\text{ mg/l}$ 、肝硬変 $2.66\pm1.20\text{ mg/l}$ および肝細胞癌 $2.93\pm0.78\text{ mg/l}$ となり、健常者に比較して軽度の上昇を認めた。

5) 膜原病における血中・唾液中 β_2 -MG値

全身性エリテマトーデスおよび慢性関節リウマチにおける血清 β_2 -MGの平均値±標準偏差は、前者 $3.04\pm1.98\text{ mg/l}$ 、後者 $4.42\pm1.66\text{ mg/l}$ であり健常者に比較して軽度の上昇を認めた。またシェグレン症候群5例における唾液中 β_2 -MGの平均値±標準偏差は $3.73\pm2.18\text{ mg/l}$ であり、健常者47例の唾液中 β_2 -MG $0.83\pm0.44\text{ mg/l}$ に比較して明らかな上昇を認めた。

IV. 考 察

β_2 -MGの血中濃度は mg/l のオーダーであるが従来法では測定に用いる標準品の範囲が $1.5\sim96\text{ }\mu\text{g/l}$ のため、血清は200倍希釈、尿では10倍希釈して測定する必要性があった。そのため mg/l 台の濃度を希釈なしで直接測定できるキットの実用化が待たれていた。

本キットの基礎的検討の結果、健常者における血清および尿検体の非特異的沈降は平均 2.2% で 5% を超える検体がないことから、検体のカウントより非特異的沈降を減ずる必要性はなくその影響は少ないと推測された。従来の一抗体固相法で結合率が 10% 程度と低いのは、一般的に固相化抗体を用いる場合に抗体の立体性が崩れ抗原との結合性が悪くなるためと考えられている。本法は二抗体法を用いるので 60% 以上の高い結合率が得られ、標準曲線は安定しておりその変動係数も良好である。また本法において第一・第二反応を同時に進行する理由は、本法と2 step法において結合率および標準曲線の形状が大きく変化していないことから、反応時間の短縮化を目的として行われている。なお第二抗体は第一抗体(IgG)のFc部位を抗原として認識し、第一抗体は目的とする β_2 -MG(抗原)を認識するため、先に第一・第二抗体の結合物が形成してもその第一抗体の抗原認識性は低濃度域において若干結合率の低下傾向を示すのみであると思われた。

なお本法の操作手順において標識抗原より先に第一抗体を加えてしまうと結合率が著明に低下したが、一般的のRIA法では目的抗原が ng, pg/ml の濃度であり、抗体は高い希釈が施されていることから手順を違えても上記現象は見られず標準曲線の形状は変化しない。本法では高濃度の抗原を直接測定するため、通常のRIA法と比較し抗体の絶対量が非常に多く非標識抗原と第一抗体の結合が先に進行し、標識抗原の結合する部位が少なくなったためと考えられ、本法は操作書の手順で行う注意が必要であった。

また反応時間は45分が適当であり、反応温度は

室温で十分行えるので便利である。添加回収率は血清で平均103%，尿検体においてはやや低値を示すものがあったが平均値で94%回収されるためほぼ満足できた。また希釈試験においても血清および尿のいずれも良好な希釈直線が得られた。なお再現性においてもアッセイ内およびアッセイ間ともにCV 8%以内で満足できる成績であった。

本法と従来法の相関関係も血清 $r=0.987$, 尿 $r=0.995$ と良好であり、栄研二抗体法とも良い相関性を示した。また健常者の血清および尿 β_2 -MG の平均値±標準偏差は、それぞれ $1.12 \pm 0.27 \text{ mg/l}$, $116 \pm 83.9 \text{ } \mu\text{g/l}$ であったが測定上の問題点のないこと、血清クレアチニン、糸球体濾過値との関係および従来法と良い相関性を示すことから、カットオフ値は血清で 2.0 mg/l 、尿は随時尿で $500 \text{ } \mu\text{g/l}$ の従来設定値が適当と考えられた。

臨床検体の測定において糖尿病性腎症は、クレアチニクリアランスの低下に伴い血清 β_2 -MG 平均値は 2.83 mg/l と上昇を示すため糸球体濾過率を反映していると考えられ、各種腎疾患においてもネフローゼ症候群の軽度上昇から慢性腎不全の平均 $29.7 \pm 19.5 \text{ mg/l}$ まで著明な上昇を示し、糸球体機能の障害度合を表わしていると思われる。また尿中 β_2 -MG 値は糸球体機能に高い障害があつても尿細管機能は保たれている症例も観察されたが、全体的には血中に比例し慢性腎不全の $19 \times 10^3 \pm 31.7 \times 10^3 \text{ } \mu\text{g/l}$ まで高度の上昇を示している。これは糸球体を通過する β_2 -MG 量が尿細管の再吸収の閾値を超えたために尿中への排泄増加をきたしたものと考えられる。

腎障害の認められない各種肝疾患における血清 β_2 -MG のほとんどは、健常者に比較して軽度の上昇を認めた。これは急性・慢性肝炎、肝硬変での肝における β_2 -MG の異化の低下が推測され、肝細胞癌でも癌細胞の活動性が高い状態での產生亢進⁹⁾が示唆されている。また全身性エリテマトーデスや慢性関節リウマチで健常者に比較して血清 β_2 -MG が軽度の上昇を認めるが、全身性エリテマトーデスや進行性全身性硬化症における抗 β_2 -MG 抗体の存在も確認されており^{13,14)}、抗 β_2 -

MG 抗体が測定系に影響している可能性もあるためこれらの特殊な自己免疫疾患の症例では、非特異的沈降率などの観察から抗 β_2 -MG 抗体の検索も今後の検討すべき課題と考えられた。

またシェグレン症候群における唾液中 β_2 -MG 値も諸家の報告と一致し¹⁵⁾、健常者の唾液中 β_2 -MG 値に比較して明らかな上昇を認める。これは唾液腺に浸潤した単核細胞の浸潤の程度を反映すると考えられており、本疾患の検索に役立つものと思われる。

V. まとめ

Pharmacia β_2 -micro RIA キットの基礎的ならびに臨床的検討の結果、本法では血清および尿検体のほとんどが希釈なしで測定できる簡便性と、第一・第二反応を同時に進行反応時間を45分と短縮しても安定したデータが得られるため、外来診療に即した Quick RIA 法であり臨床的に腎機能障害を検索する上で有用と思われる。

キットを提供いただいた塩野義製薬株式会社に感謝いたします。

文 献

- Berggård 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
- Peterson PA, Cunningham BA, Berggård I, et al: β_2 -microglobulin—a free immunoglobulin domain. *Proc Nat Acad Sci USA* **69**: 1697-1701, 1972
- Karlsson FA: Physical—chemical properties of β_2 -microglobulin. *Immunochemistry* **11**: 111-114, 1974
- Cresswell P, Turner MJ, Strominger JL, et al: Papain-solubilized HL-A antigens from cultured human lymphocytes contain two peptide fragments. *Proc Nat Acad Sci USA* **70**: 1603-1607, 1973
- Grey HM, Kubo RT, Colon SM, et al: The small subunit of HL-A antigens is β_2 -microglobulin. *J Exp Med* **138**: 1608-1612, 1973
- Nilsson K, Evrin PE, Berggård I, et al: Involvement of lymphoid and non-lymphoid cells in the production of β_2 -microglobulin—a homologue of

- the constant domains of IgG. *Nature New Biol* **244**: 44-45, 1973
- 7) Evrin PE, Nilsson K: β_2 -microglobulin production in vitro by human hematopoietic, mesenchymal, and epithelial cells. *J Immunol* **112**: 137-144, 1974
- 8) Poulik MD, Bloom AD: β_2 -microglobulin production and secretion by lymphocytes in culture. *J Immunol* **110**: 1430-1433, 1973
- 9) Kin K, Kasahara T, Itoh Y, et al: β_2 -microglobulin production by highly purified human T and B lymphocytes in cell culture stimulated with various mitogens. *Immunology* **36**: 47-54, 1979
- 10) Wibell L, Evrin PE, Berggård I: Serum β_2 -microglobulin in renal disease. *Nephron* **10**: 320-331, 1973
- 11) 河合 忠, 金 衡行: β_2 -microglobulin 測定の臨床的応用に関する研究1. 腎疾患における血清・尿 β_2 -microglobulin の変動. *最新医学* **31**: 354-363, 1976
- 12) Evrin PE, Peterson PA, Wide L, et al: Radioimmunoassay of β_2 -microglobulin in human biological fluids. *Scan J Clin Lab Invest* **28**: 439-443, 1971
- 13) Revillard JP, Vincent C, Rivera S, et al: Anti- β_2 -microglobulin lymphocytotoxic autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *J Immunol* **122**: 614-618, 1979
- 14) 梶田芳弘, 川村恒博, 加藤周司, 他: PSS患者血清中の抗 β_2 -microglobulin 抗体の性状について. *医学のあゆみ* **107**: 515-517, 1978
- 15) 本橋安美, 森田 守, 金 衡行: シエグレン病における血清および唾液中の β_2 -microglobulin の定量. *日本耳鼻咽喉科学会会報* **81**: 1322-1324, 1978