

《ノート》

ダイナボット β_2 -micro RIA キットによる β_2 -microglobulin 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 Dainabot β_2 -micro RIA Kit

杉村 英一* 飯野 優子* 坂田 裕行* 木原 数弘*
佐藤 邦夫* 出村 博* 川口 洋** 小田桐玲子***

Hidekazu SUGIMURA*, Yuko IINO*, Hiroyuki SAKATA*, Kazuhiro KIHARA*,
Kunio SATOH*, 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, Berggård らにより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 の低分子量蛋白で¹⁾, 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 鎖を担っており⁴⁻⁶⁾, 種々の体液中に微量存在する。 β_2 -MG は糸球体濾過機能の低下に応じて血中 (mg/l) に漸増し, 尿細管の再吸収能に応じ尿中 (μ g/l) に排泄されるので^{7,8)}, 腎機能検査として広く応用されている。

われわれは Pharmacia β_2 -micro RIA キット (二抗体法)^{9,10)} を用い測定を行ってきたが, このたびモノクローナル抗体を用いたダイナボット β_2 -micro RIA キットを試用する機会を得たので, 基礎的・臨床的検討を行い報告する。

II. 方 法

キットの構成および測定法

本キットは, 標準濃度 (0, 50, 150, 400, 1,000, 4,000 μ g/l), 125 I- β_2 -MG (2.2 μ Ci 以下), モノクローナル抗体固相化ポリスチレンビーズ, および緩衝液で構成されている。操作方法は Fig. 1 に示すように, ビーズ固相化モノクローナル抗体に標識 β_2 -MG と試料中の β_2 -MG を競合反応させ, ビーズを洗浄することで B/F 分離が完了するワンステップの一抗体固相法である。

III. 検討事項ならびに対象

本キットの基礎的検討として, 反応時間, 添加回収試験, 希釈試験, 精度・再現性, 他キットとの相関性について行った。臨床的に腎機能検査として最も広く行われている 2 時間クレアチンクリアランス値と, 生化学データ (血清クレアチニン値, 血中尿素素値), および血清 β_2 -MG 値の関係, またフェノールスルホンフタレイン試験値と尿中 β_2 -MG 値の関係についても検討した。

対象は, 健常者 (22~55 歳) の血清 120 例, 尿 72 例であり, 腎疾患群は慢性腎不全 23 例, 急性腎

* 東京女子医科大学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: 61 年 11 月 4 日

最終稿受付: 62 年 2 月 17 日

別刷請求先: 東京都新宿区河田町 8-1 (☎ 162)

東京女子医科大学ラジオアッセイ検査科

杉 村 英 一

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

不全13例, 慢性糸球体腎炎22例, IgA 腎症11例, 尿細管アシドーシス 2 例, ファンコニー症候群, ウイルソン病, 水腎症, 腎盂腎炎の各 1 例である。

IV. 結 果

1. 基礎的検討

1) 反応時間

反応時間を 0.5, 1, 3, 6, 8 時間と変化した時

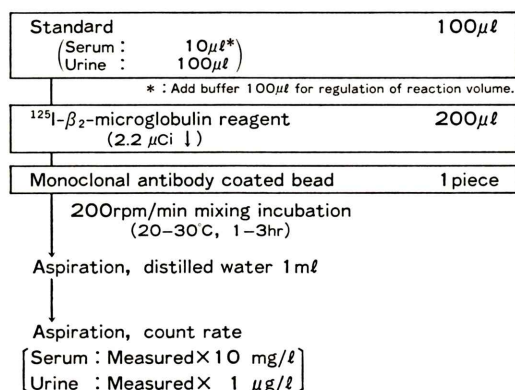


Fig. 1 Assay procedure of Dainabot β_2 -microglobulin radioimmunoassay kit.

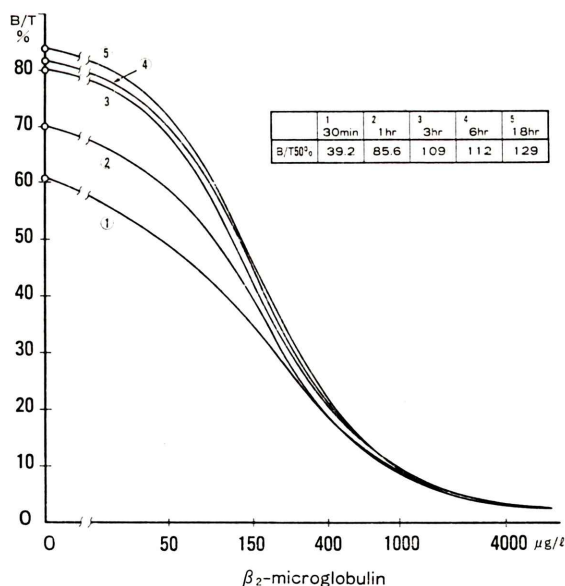


Fig. 2 Effect of incubation time on the standard curves, relationship of 1 hr and 3 hr incubation on the serum and urine β_2 -microglobulin levels.

の標準曲線の動きと, 血清および尿試料の値を比較した. Fig. 2 に示すよう反応時間の延長とともに低濃度域の Bound/Total % (B/T %) は上昇するが, 3 時間以降は B/T % に大きな変化が認められず, B/T 50% における濃度の読み値も 30 分~3 時間まで急上昇し, 以降はほぼ安定した. また 1 時間と 3 時間反応における血清および尿試料 4 検体の 10 重測定値は, 血清-I, 尿-A (低濃度検体) を除けば 1 時間法での平均値は, 3 時間法の平均値 $\pm 5\%$ 以内であった.

2) 添加回収試験

血清および尿試料 4 容に, 標準液を 1 容添加調整し, 血清は調整試料を $10 \mu\text{l}$, 尿は $100 \mu\text{l}$ それぞれの試料測定方法に従って測定した. Table 1 に示すように平均回収率は血清で 97, 99%, 尿では 102, 98% であった.

3) 希釈試験

血清および尿試料をキット添付の緩衝液にて倍倍希釈し, 希釈倍率と測定値を観察した. Fig. 3 に示すように血清 (I~III) および尿試料 (A~C) とも良好な直線性が得られた. $4.000 \mu\text{g/l}$ 以上の

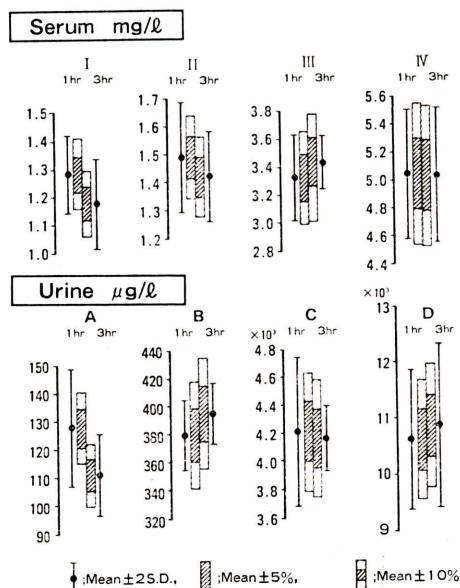


Table 1 Recovery of β_2 -microglobulin added to serum and urine at different concentrations

Base serum	Added STD (mg/L)	Measured (mg/L)	Calculated (mg/L)	Recovery (%)
I	0	1.20	1.27	—
1.59	0.4	1.28	1.35	95
mg/L	1.0	1.40	1.47	95
	4.0	2.12	2.07	102
Mean				97%
II	0	2.65	2.86	—
3.58	0.4	2.80	2.94	95
mg/L	1.0	2.94	3.06	96
	4.0	3.87	3.66	106
Mean				99%
Base Urine	Added STD (μ g/L)	Measured (μ g/L)	Calculated (μ g/L)	Recovery (%)
A	0	157	148	—
185	400	236	228	104
μ g/L	1000	339	348	97
	4000	991	948	105
Mean				102%
B	0	1698	1730	—
2162	400	1765	1810	98
μ g/L	1000	1824	1930	95
	4000	2582	2530	102
Mean				98%

Table 2 Result of precision and reproducibility**Intraassay Variance**

N=10	Serum (mg/L)			Urine (μ g/L)		
	I	II	III	A	B	C
Mean	0.85	2.89	3.60	102	348	3620
S.D.	0.024	0.081	0.124	4.1	11.2	125
C.V.%	2.8	2.8	3.4	4.0	3.2	3.5

Interassay Variance

Assay (N)	Serum (mg/L)			Urine (μ g/L)		
	I	II	III	A	B	C
1	0.83	2.90	3.54	107	361	3470
2	0.82	2.72	3.39	105	348	3750
3	0.79	2.67	3.64	100	318	3260
4	0.82	2.81	3.60	97.5	344	3500
5	0.85	2.84	3.58	91.7	344	3410
6	0.80	2.65	3.35	92.6	338	3580
7	0.82	2.74	3.49	99.6	342	3490
8	0.81	2.63	3.24	94.5	337	3600
9	0.95	3.00	3.72	103	340	3300
10	0.83	2.73	3.43	95.6	345	3650
Mean	0.83	2.77	3.50	98.7	342	3500
S.D.	0.045	0.118	0.146	5.21	10.7	152
C.V.%	5.4	4.3	4.2	5.3	3.1	4.3

高濃度尿試料 (D~G) では、血清の測定方法と同様に尿 10 μ l (基準量の 1/10) で直接アッセイする簡便法と、10倍希釈して測定する方法の測定値を比較した。両者の平均値は、相互に平均値 $\pm 5\%$ 以内と良好であった。

4) 精度・再現性

血清および尿試料を同時ないし繰り返し10回測定 (6 lot) し、それぞれの結果から変動係数を求めた。Table 2 に示すようにアッセイ内の変動係数は血清で4%以内、尿試料でも5%以内であった。またアッセイ間においても、血清および尿試料とも6%以内であった。

5) 他キットとの相関性

Pharmacia β_2 -micro RIA キット (X) と本法 (Y) の測定値の相関性について比較した。Fig. 4 に示すよう血清で $Y=0.995X+0.072$, 相関係数 0.989, 尿では $Y=1.005X-62.5$, 相関係数 0.998 と両測定法の測定値はよく相関した。

2. 臨床的検討**1) 健常者の β_2 -MG 濃度**

健常者における血清 β_2 -MG 濃度の平均値 (m) \pm 標準偏差 (S.D.) は 1.24 ± 0.339 mg/l であり, 2 S.D. 上限値の 1.92 mg/l を cut off 値とした。また随時尿における尿中 β_2 -MG 排泄量の平均値 (m) \pm 標準偏差 (S.D.) は 136 ± 71.3 μ g/l で, 2 S.D. 上限値は 279 μ g/l であった。しかし試験紙法 (ウリエス・M, テルモ社) の結果, 蛋白, 糖, 潜血反応が陰性であるが, 2 S.D. を超える例 (max 416 μ g/l) が3例認められるため, 随時尿での採尿時間や採尿状態, 尿 pH および水の飲み量などによるバラツキを考慮し, 健常者 max の 10% 上限値である 460 μ g/l を cut off 値とした。なお平均血中濃度 (1.24 mg/l) と, 平均尿中排泄量 (136 μ g/l) の比は, 1.24 mg/l: 136 μ g/l = 1: 0.1 であった。

2) 腎機能検査法の比較

2時間クレアチニンクリアランス (以下 Ccr と

略す)と血清クレアチニン(以下 S-Cr と略す), 血中尿素窒素(以下 BUN と略す)および血清 β_2 -MG(以下 S- β_2 -MG)の関係, ならびにフェノールスルホンフタレイン試験15分値(以下 PSP-15'

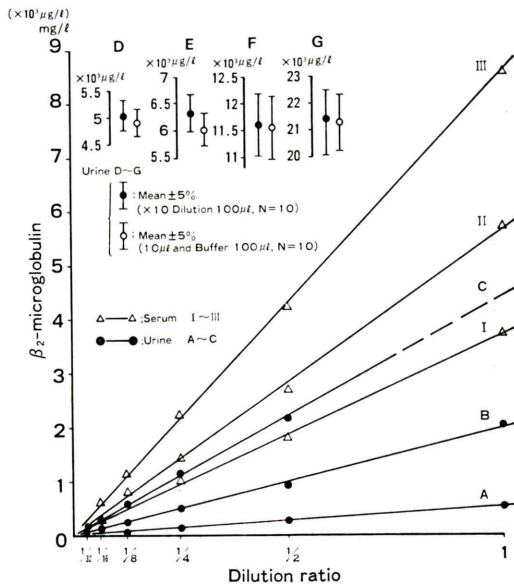
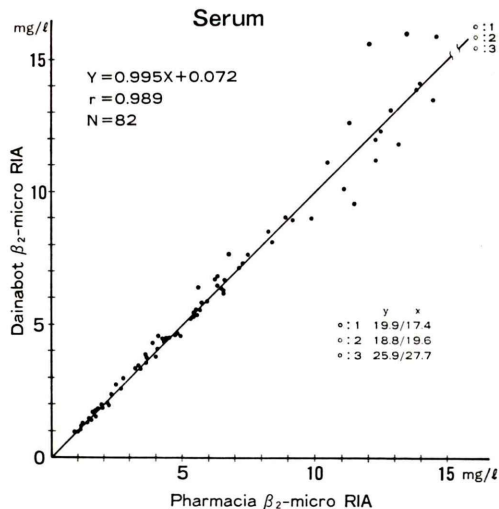


Fig. 3 Effect of dilution of the serum and urine with buffer on β_2 -microglobulin estimates.



と略す)と尿中 β_2 -MG(以下 U- β_2 -MG と略す)の関係を Fig. 5 に示した。

Ccr 値と S-Cr, BUN, S- β_2 -MG 濃度の関係は, Ccr 値が低下すると S-Cr, BUN, S- β_2 -MG の濃度は上昇する逆相関性が認められた。しかし Ccr の下限値 (70 ml/min) より低下した例における, S-Cr, BUN, S- β_2 -MG 濃度の上昇率は, S-Cr 値 (正常範囲 0.7~1.3 mg/dl) で 33.8% (22例), BUN 値 (正常範囲 8~20 mg/dl) で 46.0% (29例) と約半数以下であるが, S- β_2 -MG 値 (cut off 値 1.92 mg/l) では上昇率 73.3% (55例) と高率であった。

また PSP-15' 値と U- β_2 -MG 値の関係は, PSP-15' 値 (正常排泄量 25% 以上) が低下すると U- β_2 -MG (cut off 値 460 μ g/l) の排泄量は増加傾向にあるが, 一致しない例も認められバラツキが大であった。

3) 腎疾患について

各疾患の β_2 -MG 値を Fig. 6 に示した。 β_2 -MG 濃度の異常値出現率は, IgA 腎症 (血清で 18%, 尿中で 14%) から慢性腎不全 (血清で 100%, 尿中で 89%) まで上昇した。また平均血中濃度と平均尿中排泄量の比は, IgA 腎症 1:0.14, 慢性糸球体腎炎 1:0.14, ネフローゼ症候群 1:0.28, 急性腎不

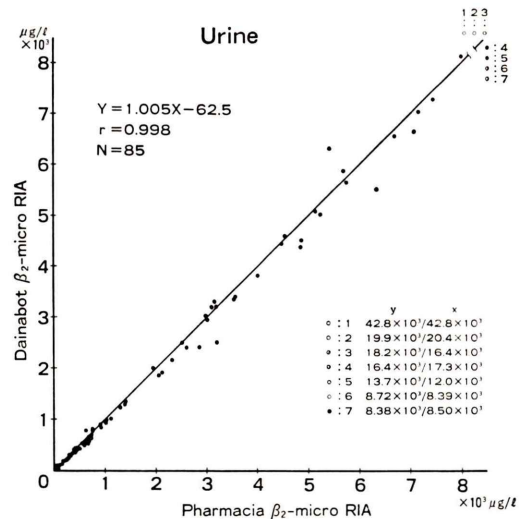


Fig. 4 Correlation between Pharmacia β_2 -micro RIA and Dainabot β_2 -micro RIA on serum and urine.

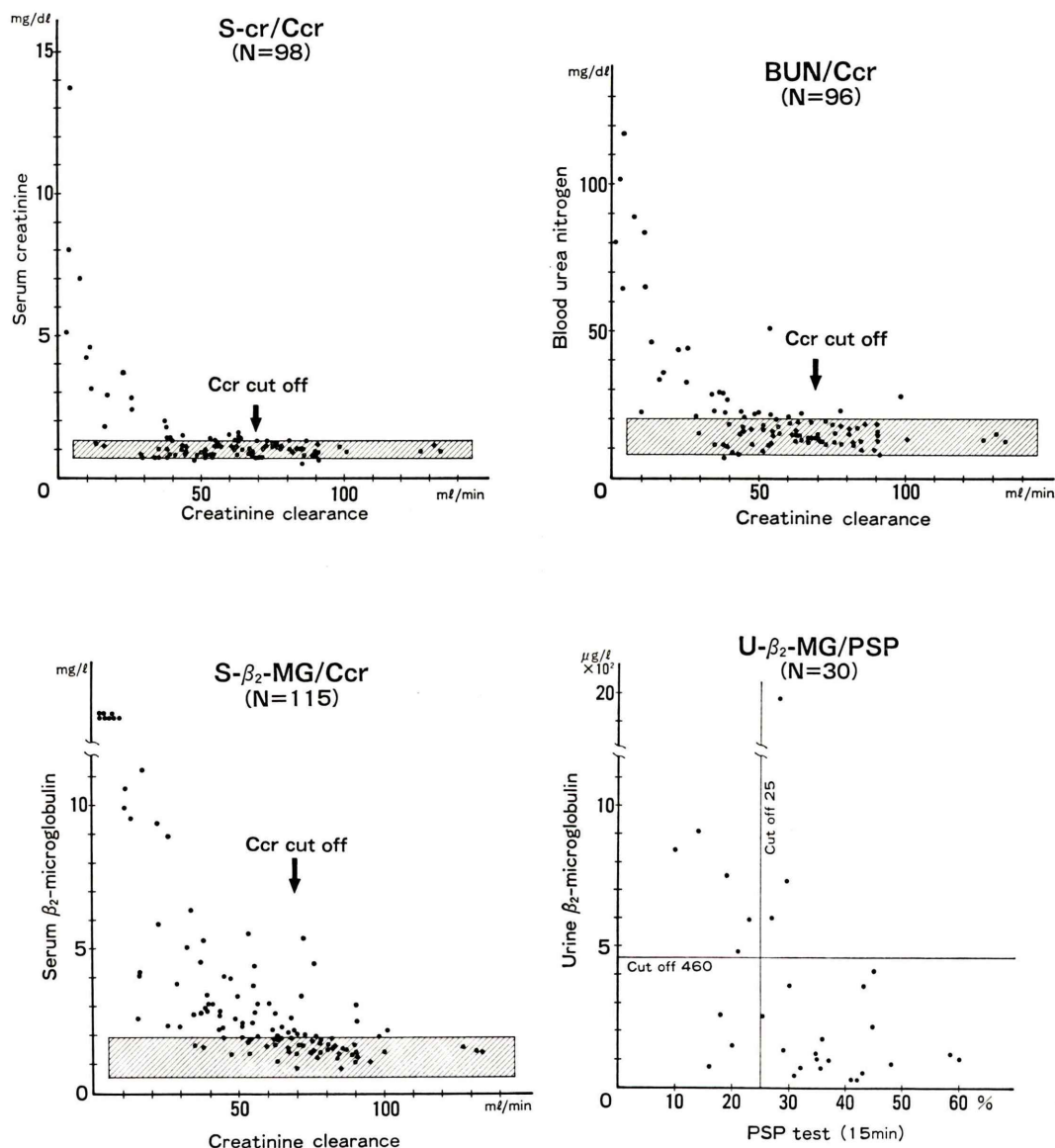


Fig. 5 Relationship of serum creatinine, blood urea nitrogen, serum β_2 -microglobulin and creatinine clearance, comparison urine β_2 -microglobulin and phenolsulfonphthalein test.

全 1:0.51, 慢性腎不全 1:0.72 となり, 血中濃度の上昇に比例して尿中排泄量の増加が認められた。

一方 S- β_2 -MG 値が正常範囲で, U- β_2 -MG 値が異常値を示した症例について検討した。Fig. 7A は尿管アスドーシス 2 例 (serum 1.21 mg/l-urine

4,870 $\mu\text{g/l}$, serum 1.68 mg/l-urine 10,720 $\mu\text{g/l}$), ファンコニー症候群 (serum 1.49 mg/l-urine 8,670 $\mu\text{g/l}$), ウイルソン病 (serum 1.30 mg/l-urine 1,420 $\mu\text{g/l}$), 水腎症 (serum 1.62 mg/l-urine 11,300 $\mu\text{g/l}$), 腎盂腎炎 (serum 1.27 mg/l-urine 1,050 $\mu\text{g/l}$) の各

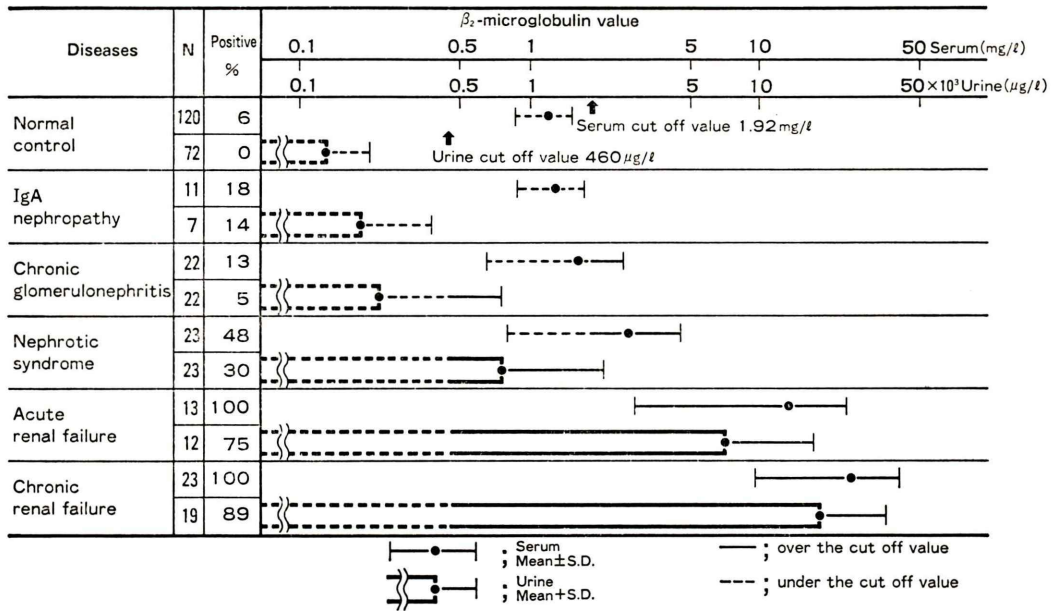


Fig. 6 Serum and urine β_2 -microglobulin concentrations in renal diseases.

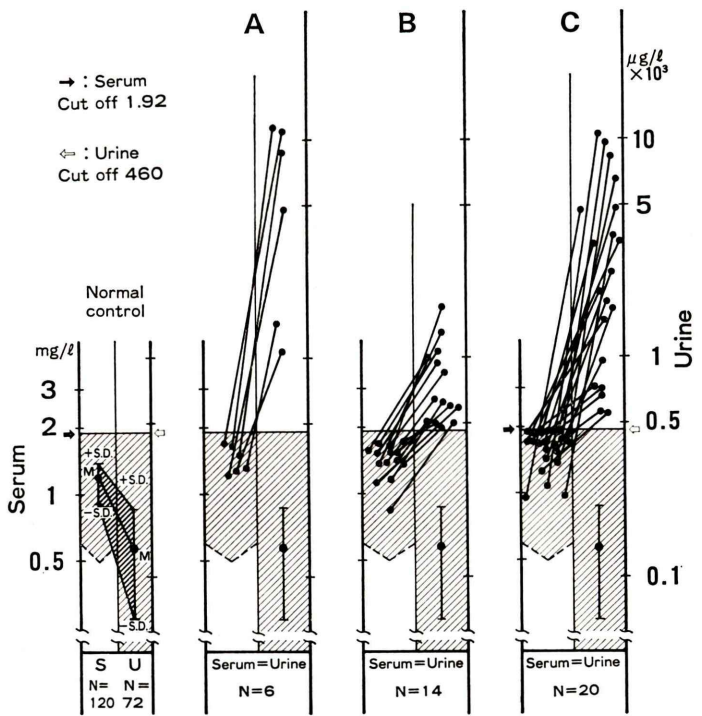


Fig. 7 β_2 -microglobulin levels of serum and urine pair samples on the urinary tubular dysfunction (A), investigation of urine β_2 -microglobulin abnormal levels (B), another information (C).

1例で血中：尿中の比は1:0.8~1:7.0まで著明に増加し、Ccr値の平均値±標準偏差は58.9±15.9 ml/minであった。

またFig. 7Bの14例は、腎症の診断はついていないがU- β_2 -MG値の軽度排泄増加を認める糖尿病7例、本態性高血圧2例、アジソン病、アルコール性肝炎、甲状腺機能亢進症、胃潰瘍、思春期遅発症の各1例である。全例外来患者(15~69歳)で腎毒性薬剤の使用はなく、S- β_2 -MGの平均値±標準偏差は1.42±0.24 mg/lと正常範囲であるが、U- β_2 -MGは795±338 μ g/lと増加し、血中：尿中の比は1:0.3~1:1.0まで軽度増加した。なお尿蛋白陽性率は71.4%、浮腫を認める率は42.9%、高血圧を伴う率は42.9%、尿中潜血反応陽性率は14.3%であり、同時に施行されたCcrの平均値±標準偏差は65.4±9.7 ml/min(n=5)であった。

Figure 7Cについての内容は、各種癌患者15例、心筋梗塞3例、パーキンソン病、ヘルペス症の各1例で、血中：尿中の比は1:0.3~1:9.6まで広く分布した。これらは各種の抗癌剤、抗生剤や鎮痛剤を多様に使用されていたが、U- β_2 -MGの排泄増加の原因について解明することは不可能であった。

V. 考 察

β_2 -MGのRIAは現在二抗体法が主に行われており、反応がツーステップであることや、遠心分離操作が必要であった。本キットは遠心分離操作のない、ワンステップの一抗体固相法のため簡便である。

本キットの基礎的検討の結果、反応時間は1時間でもB/T 70%と高い結合率が得られ、3時間ではB/T 80%以上を示した。一般的に固相化抗体を用いる場合、抗体の立体性が崩れ抗原との結合率が低下すると考えられるが、本キットは直径6 mmのポリスチレンビーズを用い、多量の抗体を固相化したため結合率が高く維持されていると考えられた。

血清および尿の添加回収率は、血清で97, 98%、

尿試料においては102, 98%の平均回収率が得られた。希釈試験においては、血清および尿のいずれも良好な希釈直線が得られ、高濃度が予測される尿試料の場合、簡便法と希釈法値は相互に平均値±5%以内を示したことから、sampling量を10 μ l (1/10)に減じ、ビーズが反応液で満たされるように緩衝液を100 μ l添加する簡便法でも測定可能であった。アッセイ内およびアッセイ間における変動係数は、6%以内と良好な精度・再現性であった。

なお本法とPharmaciaキットの相関性において、血清および尿ともに相関係数0.99と高い相関性を示した。Pharmacia法はポリクローナル抗体で本法はモノクローナル抗体を用いているが、相関係数が示すように抗原の認識性に関しては差がないと考えられた。しかしハイブリドーマ法により単一のモノクローナル抗体が長期間大量に作製できることが第1の利点で、第2にロット間の変動が少なくなるため、長期にわたって安定したデータが得られるので測定値の管理がしやすいことである。

臨床的検討において健常者のS- β_2 -MG・cut off値を1.92 mg/lとしたが、加齢(特に高齢者)によるS- β_2 -MG値の上昇¹¹⁾も考慮する必要があると考えられる。U- β_2 -MGのcut off値¹²⁾について、われわれは随時尿(一回尿)で行ったため、460 μ g/lが適当と考えられた。

腎機能検査法の比較において、Ccr値が70 ml/min以下に低下した例におけるS-Cr, BUN, S- β_2 -MG濃度の上昇率は、S- β_2 -MG値が73.3%、BUN値は46.0%、S-Cr値では33.8%であり、S- β_2 -MG値が最も高い逆相関性¹³⁾を示したことから、糸球体機能をよく反映すると考えられる。またPSP-15'値とU- β_2 -MG値の間には、PSP排泄量が低下するとU- β_2 -MG排泄量は増加傾向にあるので、尿細管機能を反映すると考えられた。

腎糸球体の働きは分子量による分子サイズ篩い分け¹⁴⁾や、分子の荷電によって透過性が調節されると考えられており^{15~17)}、急性・慢性腎不全におけるS- β_2 -MG濃度の上昇率は100%陽性であ

り、ネフローゼ症候群、慢性糸球体腎炎、IgA腎症例においても糸球体の障害度合に応じて血中に漸増したものと考えられた^{7,8,13)}。なおU- β_2 -MGの異常値出現率がS- β_2 -MGの場合に比較して低いのは、尿細管での β_2 -MG再吸収能に左右されるため、血中：尿中の比がIgA腎症の1:0.14から慢性腎不全の1:0.72まで増加するように、血中濃度の上昇が尿細管での β_2 -MG再吸収の閾値を超えたために、尿中排泄増加をきたしたものと考えられた^{18,19)}。

S- β_2 -MG値が正常範囲で、U- β_2 -MGが異常値を示した腎症は、尿細管アシドーシス、ファンコニー症候群、ウイルソン病(尿細管転送系障害)、水腎症(尿路通過障害)および腎盂腎炎(尿路感染症)であり、血中：尿中の比は1:0.8~1:7.0まで著明な増加を示す尿細管障害例であった^{20,21)}。また腎症の診断はついていないが、U- β_2 -MGの軽度上昇や尿蛋白の陽性、浮腫や高血圧の存在、Ccrの低下傾向が認められる例は、腎症へ伸展する可能性に注意と興味をもたれ追跡すべき検討課題と考えられた。

VI. まとめ

ダイナボット β_2 -micro RIAキットの基礎的・臨床的検討の結果、測定操作がワンステップときわめて簡略化され、良好な精度・再現性が得られるので、日常の検査法として満足する結果であった。

臨床的にS- β_2 -MGとU- β_2 -MGの同時測定により、S- β_2 -MG値は糸球体機能障害、およびU- β_2 -MG値は尿細管機能障害の検索に有用であった。

キットをご提供くださったダイナボット医学調査部・横溝勉氏に感謝致します。

文 献

- 1) 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
- 2) Peterson PA, Cunningham BA, Berggård I, et al: β_2 -microglobulin—a free immunoglobulin domain. *Proc Natl Acad Sci USA* **69**: 1967-1701, 1972
- 3) Karlsson FA: Physical-chemical properties of β_2 -microglobulin. *Immunochemistry* **11**: 111-114, 1974
- 4) Cresswell P, Turner MJ, Strominger JL, et al: Papain-solubilized HL-A antigens from cultured human lymphocytes contain two peptide fragments. *Proc Natl Acad Sci USA* **70**: 1603-1607, 1973
- 5) Gray 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
- 6) 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
- 7) Wibell L, Evrin PE, Berggård I: Serum β_2 -microglobulin in renal disease. *Nephron* **10**: 320-331, 1973
- 8) 河合 忠, 金 衡行: β_2 -microglobulin 定量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
- 9) 真坂美智子, 吉見輝也, 竹田弘美: β_2 -microglobulin 測定に関する基礎的・臨床的検討。核医学 **22**: 91-99, 1984
- 10) 平田文雄, 甲賀エリ子: セファロース固相第2抗体を用いた β_2 -マイクロキット“第一”Sの検討。医学と薬学 **12**: 83-88, 1984
- 11) 稲松孝思, 島田 馨, 浦山京子, 他: 高齢者における血中、尿中 β_2 -microglobulinの研究——特に腎機能の指標としての β_2 -microglobulinについて——。最新医学 **36**: 1407-1413, 1981
- 12) 緒方正名, 柚木英二, 森田啓次郎, 他: 日本人の尿中 β_2 -マイクログロブリン値の解析。総合臨床 **29**: 2085-2094, 1980
- 13) 辰巳 学, 鈴木隆夫, 新井光弥, 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
- 14) Igarashi S, Nagase M, Oda T, et al: Molecular sieving by glomerular basement membrane isolated from normal and nephrotic rabbits. *Clin Chim Acta* **68**: 255-258, 1976
- 15) Michael AF, Blau E, Vernier RL: Glomerular polyanion: Alteration in aminonucleoside nephrosis. *Lab Invest* **23**: 649-657, 1970
- 16) Robson AM, Glangiacomo J, Kienstra RA, et al: Normal glomerular permeability and its modification by minimal change nephrotic syndrome. *J Clin Invest* **54**: 1190-1199, 1974
- 17) Chang RLS, Deen WM, Robertson CR, et al: Permeability of the glomerular capillary wall:

III. Restricted transport of polyanions. *Kidney Int* **8**: 212-218, 1975

- 18) 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**: 372-376, 1978
- 19) 富田一穂, 武曾真理, 田中忠雄, 他: 腎疾患における血清および尿中 β_2 -microglobulin 測定の意義.

日腎誌 **24**: 599-607, 1982

- 20) Hall PW, Vasiljevic M: Beta 2-microglobulin excretion as an index of renal tubular disorders with special reference to endemic balkan nephropathy. *J Lab Clin Med* **81**: 897-904, 1973
- 21) 原 楨, 吉田和弘, 富田 勝, 他: 泌尿器領域における β_2 -microglobulin の測定の意義. *臨泌* **35**: 243-247, 1981