

## 《原 著》

二抗体法によるヒト  $\beta_2$ -Microglobulin Radioimmunoassay  
に関する研究

水野 信彦\* 岡田 究\* 高瀬 重暉\* 馬場 茂明\*

## I. 結 言

$\beta_2$ -microglobulin (以下  $\beta_2$ M) は, 1968 年に Berggård<sup>1)</sup> らによって尿細管性蛋白尿を伴う患者尿から分離精製された分子量 11,800 の低分子蛋白質で, 正常ヒト血清, 尿, 髄液, 唾液, 初乳および羊水等に微量存在<sup>2,3)</sup>する。 $\beta_2$ M は 100 個のアミノ酸残基<sup>4)</sup>を持つポリペプチド鎖からなり, 構造上特に Immunoglobulin (IgG<sub>1</sub>) の C<sub>H3</sub> domain のアミノ酸配列と類似<sup>5)</sup>し, さらに HL-A 抗原の subunit である分子量 11,000 のポリペプチド鎖のアミノ酸組成と酷似<sup>6)</sup>し, その抗  $\beta_2$ M 血清との反応性は  $\beta_2$ M と同一で, HL-A 抗原の構成成分としてリンパ球表面に存在<sup>7)</sup>する。また  $\beta_2$ M は主にリンパ球で産生<sup>8)</sup>され体液中に広く分布し, 腎糸球体で容易に濾過され, 正常では尿細管でほとんど 100% 再吸収され異化<sup>9)</sup>されるが, 腎疾患で特に尿細管障害時, 血中  $\beta_2$ M 濃度が上昇し, 尿中に多量の  $\beta_2$ M が認められることから糸球体性蛋白尿と尿細管性蛋白尿の鑑別<sup>9)</sup>に有用であるとの報告がみられ, さらに腎疾患以外の各種悪性疾患, 自己免疫疾患および感染症で血中  $\beta_2$ M 濃度の上

昇することが知られている。しかし現在のところ, 各種疾患における高  $\beta_2$ M 血症の病態生理学的意義については不明な点が多いが, 今後臨床検査の一手段として  $\beta_2$ M の測定が頻繁に行なわれるものと考えられる。

従来の  $\beta_2$ M の測定には単純放射免疫拡散法<sup>10)</sup> (SRID) 法, LAURELL のロケット免疫電気泳動法<sup>10)</sup>, 二抗体放射状免疫拡散法<sup>11)</sup> および固相法<sup>2,12,3)</sup>による radioimmunoassay (以下 RIA) など多数みられるが,  $\beta_2$ M は微量成分であるため, 一般には最も感度の高い RIA が用いられている。著者らは尿細管性蛋白尿患者尿から  $\beta_2$ M を分離, 精製し, 精製  $\beta_2$ M, 抗  $\beta_2$ M 抗体, 標識  $\beta_2$ M を作製し, 高感度で, 精度, 特異性に優れた二抗体法による  $\beta_2$ M の RIA を確立したので報告する。

## II. 研究材料

1. 精製  $\beta_2$ M: Berggård<sup>1)</sup> らの方法に準じ腎尿細管障害患者尿より精製を行なった。その概略は下記のとおりである。

腎尿細管障害患者の 24 時間プール尿 (0.1% Na N<sub>3</sub>, 4°C 保存) に 60% (W/V) 固形硫酸を加え塩析し, 沈澱物を少量の pH8.6  $\mu=0.05$  veronal buffer に溶解し, 透析膜 (Visking tube, 3787-F45) に移し同一 buffer で透析した後, 遠心して不溶物を除き, 次に Pevikon-C 870 (1.7×7.2×40 cm) を支持体として zone electrophoresis (pH 8.6,  $\mu=0.05$ ,

\* 神戸大学医学部内科学第 2 講座

受付: 52 年 2 月 23 日

最終稿受付: 52 年 5 月 9 日

別刷請求先: 神戸市生田区楠町 7 丁目 12-1 (〒650)

神戸大学医学部内科学第 2 講座

水野 信彦

veronal buffer, 2 mA/cm<sup>2</sup>, 200V, 24 hrs. 4°C) を行ない、電気泳動終了後、Pevikon block を 1 cm ずつ切り取り  $\beta$  領域の蛋白成分を 1/15 M, pH 7.5, phosphate buffered saline で抽出し、濃縮した。次に Sephadex G-100 column chromatography (2.6  $\times$  70 cm, 1.0 M NaCl 含有, 1/15 M pH 7.5 phosphate buffer) を行ない、 $\beta_2$ M が単一の peak になるまで同 column で rechromatography し、得られた粗  $\beta_2$ M を 0.01 M pH 7.5 Tris-phosphate buffer, で透析後、DEAE cellulose column chromatography (2.6  $\times$  25 cm, 0.01 M pH 7.5 Tris-phosphate buffer, linear gradient: 0~0.3 M NaCl) を行ない精製  $\beta_2$ M を得た。得られた精製  $\beta_2$ M は Fig. 1 に示すごとく、7.5% polyacrylamide disc 電気泳動 (Davis の変法) 後、蛋白染色で単一帯を示し、また免疫電気泳動では Fig. 2 に示すごとく、抗ヒト血清、抗ヒト尿蛋白とは反応せず抗  $\beta_2$ M 血清とのみ 1 本の沈降線を形成した。また、3~5% 濃度の抗 lysozyme, 抗 retinol binding protein, 抗 Kappa, 抗 Lambda 血清を含むアガロースゲル平板を個々に作製し、精製  $\beta_2$ M 溶液 (5 mg/ml) を検体として、single radial immuno diffusion 法により lysozyme, retinol binding protein および light chain を測定したが、これら夾雑蛋白はいずれも検出されず、きわめて高純度の  $\beta_2$ M であった。

精製  $\beta_2$ M の蛋白定量は、ウシ血清アルブミン (ARMOUR 社製, Lot No. P53502) を標準にした Folin-Lowry の比色法<sup>14)</sup>によって測定した。

なお、精製過程で  $\beta_2$ M の確認は Dakopatts 社製の抗  $\beta_2$ M 血清 (Lot No. 055) を使用し、micro-Ouchterlony 法によって行なった。

2. 抗  $\beta_2$ M 血清 (第一抗体): 精製  $\beta_2$ M を感作抗原とし、 $\beta_2$ M 400  $\mu$ g/ml を含む生食液 0.5 ml と等量のフロインド完全アジュバンド (Difco 社製) を混和したエマルジョンを家兎の足趾、大腿、および腹部皮下に分割注射した。その後 10 日間に 1 回、同量の抗原で追加免疫し、採取した家兎血清を 56°C 30 分間非動化した。得られた抗血清 Fig. 2 に示すごとく、 $\beta_2$ M 陽性血清、尿および精製  $\beta_2$ M を用いた免疫電気泳動法でいずれも  $\beta$  領

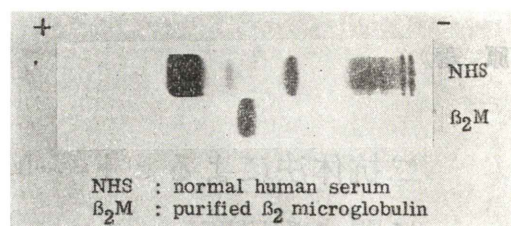


Fig. 1 Polyacrylamide disc electrophoretic pattern of  $\beta_2$  microglobulin.

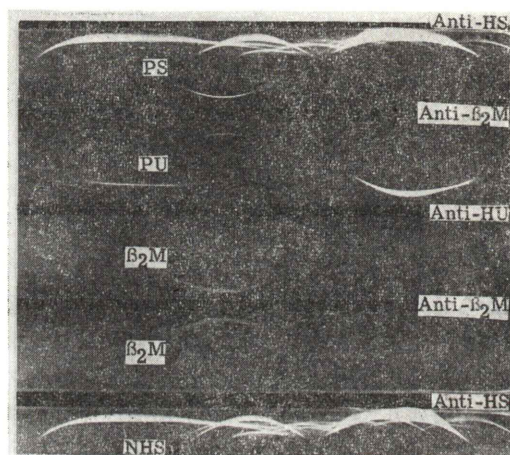


Fig. 2 Immunoelectrophoretic pattern of  $\beta_2$  microglobulin.

NHS : normal human serum  
PS : patient serum  
PU : patient urine  
 $\beta_2$ M : purified  $\beta_2$  microglobulin  
Anti-HS : anti-human serum  
Anti-HU : anti-human urine  
Anti- $\beta_2$ M : anti- $\beta_2$  microglobulin (KOBE)

域に単一の沈降線を示す mono-specific な特異抗  $\beta_2$ M 血清であった。

3. 抗家兎  $\gamma$ -グロブリンヤギ血清 (第 2 抗体): ダイナボット研究所製を使用した。

4. 標識基: New England Nuclear 社製 (Lot No. 8764) の Na<sup>125</sup>I を使用した。

5. 緩衝液: 1% ウシ血清アルブミンおよび 0.05% NaN<sub>3</sub> を含む 0.05 M pH 7.5 phosphate buffered saline (以下 BSA-PBS) を用いた。

6. 測定用試験管: プラスチック製 シオノギチ



ューブを使用した。

7.  $\beta_2$ M 測定用 RIA kit: Phadebas  $\beta_2$ -micro Test を用い、測定<sup>15)</sup>は Pharmacia 社記載の操作法に従った。本法はわれわれの方法と対比するために行なった。

8. 放射能計測器: ALOKA 社製自動ウエル型シンチレーションガンマカウンターを使用した。

### III. 対 象

血沈、一般検血、尿検査、肝機能検査および 50g ブドウ糖負荷試験でいずれも正常値を示した、20~70 歳代の正常ヒト 37 名の空腹時血清および 10 名の 24 時間プール尿。

正常分娩婦人 11 名より得られた臍帯血および初乳。

腎疾患および各種悪性疾患患者 28 名の空腹時血清および 24 時間プール尿。

以上の検体にすべて、0.05%  $\text{NaN}_3$  を混じ、測定時まで  $-20^\circ\text{C}$  に凍結保存した。

### IV. 方 法

#### 1. 標識法および標識 $\beta_2$ M の精製法

Hunter, Greenwood<sup>16)</sup>らの方法に準じて標識した。すなわち、Table 1 に示すごとく、精製  $\beta_2$ M 5  $\mu\text{g}$  を 0.2M, pH 7.5 phosphate buffer 0.2 ml で溶解し、1 mCi の  $\text{Na}^{125}\text{I}$  およびクロラミン T 40  $\mu\text{g}$  (0.1 ml の phosphate buffer で溶解) を注入し 60 秒間混和後メタ重亜硫酸ソーダー 200  $\mu\text{g}$  (0.1 ml) を加え反応を停止させた。2 分後ヨードカリ 1 mg (0.1 ml) を添加した。この溶液を Sephadex G-50 (0.9 $\times$ 25 cm) により column chromatography を行ない 1 ml ずつ分画採取し標識  $\beta_2$ M 分画を分離精製した。精製した標識  $\beta_2$ M は使用時まで  $-20^\circ\text{C}$  にて凍結保存した。

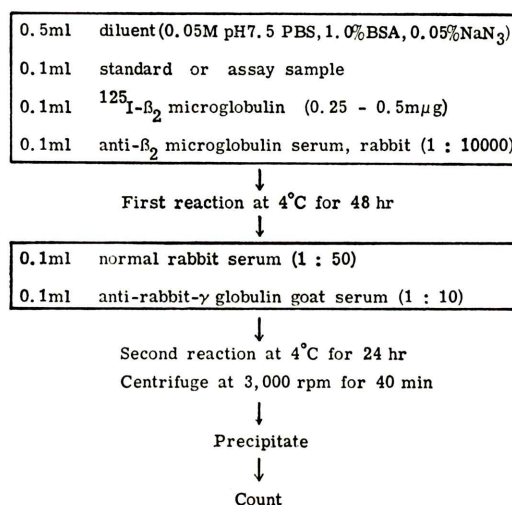
#### 2. 測定方法

結合  $^{125}\text{I}$ - $\beta_2$ M (B と略す) と遊離  $^{125}\text{I}$ - $\beta_2$ M (F と略す) の分離は、Morgan, Lazarow<sup>17)</sup>らの二抗体法にて行なった。測定系は Table 2 に示すごとくである。まず、試験管に稀釈被検検体、あるいは標準  $\beta_2$ M 液 0.1 ml に標識  $\beta_2$ M 稀釈液 0.1 ml、つ

Table 1 Preparation of  $^{125}\text{I}$ -labelled  $\beta_2$  microglobulin.

- 1 Mixture of  $\beta_2$  microglobulin 5  $\mu\text{g}$ ,  $^{125}\text{I}$  1 mCi and Chloramin T 40  $\mu\text{g}$  in 0.2 M phosphate buffer (pH 7.5) for 60 sec. at room temperature
- 2 Addition of Sodium metabisulfate 200  $\mu\text{g}$
- 3 After 2 min, Potassiumiodide 1.0 mg was added
- 4 Separation of  $^{125}\text{I}$ - $\beta_2$ microglobulin by Sephadex G-50 column in 0.2 M phosphate buffer
- 5  $^{125}\text{I}$ - $\beta_2$ microglobulin; 100-130  $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$

Table 2 Procedure of  $\beta_2$  microglobulin measurement by double-antibody radioimmunoassay.



いで第 1 抗体稀釈液 0.1 ml を添加し、0.5 ml の BAS-PBS 液で全量 0.8 ml にしたのち  $4^\circ\text{C}$  で第 1 反応を行なう。第 1 反応終了後 carrier protein として正常家兎血清 50 倍稀釈液 0.1 ml、第 2 抗体稀釈液 0.1 ml を順次加え、 $4^\circ\text{C}$  で第 2 反応を行なった。第 2 反応終了後全放射能 T (cpm) を測定し 3,000 回転、40 分間遠心後上澄を捨て、試験管壁に残存する上澄を濾紙で吸い取り、その後沈澱物の放射能 B (cpm) を測定した。なお測定検体はすべて重複測定で行ない、測定値は 2 検体の平均値にて表示した。標準曲線は、縦軸に結合放射能百分率  $B\% = B/T \times 100$  を、横軸に標準  $\beta_2$ M 濃度  $\mu\text{g}/1$  の対数値を用い作製した。以上の測定系のうち主に感度、精度の面から至適測定条件をみつけるために、標識  $\beta_2$ M 量、第 1 抗体濃度、第 1

反応時間, 第2抗体濃度および第2反応時間の検討を行ない, さらに本測定系の特異性, 精度, 再現性の検討, ならびに他のRIA法<sup>15)</sup> (Phadebas  $\beta_2$ -micro Test) との比較検討を行なった。

## V. 成績

### 1. 測定法に関する基礎的検討

#### (1) 標識および精製標識

$^{125}\text{I}$  標識  $\beta_2\text{M}$  と遊離  $^{125}\text{I}$  は Fig. 3 に示すごとく明瞭な2峰に分離され, 標識  $\beta_2\text{M}$  は第1峰に溶出された. この標識  $\beta_2\text{M}$  は radio-immunoelectrophoresis で抗  $\beta_2\text{M}$  血清とのみ単一の沈降線を描き, また抗  $\beta_2\text{M}$  血清 ( $\times 500$ ) 0.1 ml との結合率は97%を示し, 標識による抗原性の変化は認められなかった. このようにして得られた標識  $\beta_2\text{M}$  の比放射能は  $100\sim 130 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$  であった.

#### (2) 測定条件

(i) 標識  $\beta_2\text{M}$  量: 標識  $\beta_2\text{M}$  量の標準曲線に及ぼす影響を検討した. すなわち一定濃度の第1抗体 (抗  $\beta_2\text{M}$  血清 10,000 倍稀釈) 0.1 ml を用い, 標識  $\beta_2\text{M}$  量 0.25 m $\mu\text{g}$  (約 10,000 cpm), 0.5 m $\mu\text{g}$  (約 20,000 cpm), 1.0 m $\mu\text{g}$  (約 40,000 cpm) について各標準曲線を作製すると, Fig. 4 に示すごとく,  $\beta_2\text{M}$  検出感度は, いずれの標識  $\beta_2\text{M}$  量においても  $\beta_2\text{M}$  濃度は  $0.49 \mu\text{g/l}$  以上で測定可能であり,

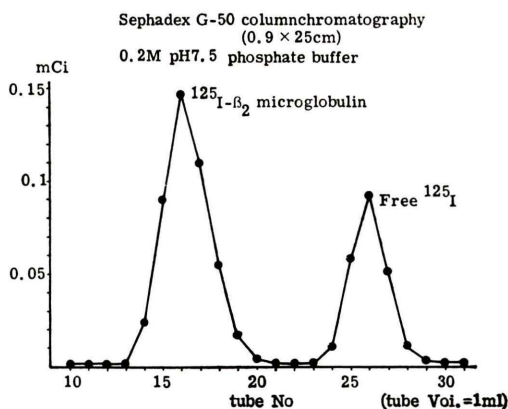


Fig. 3 Separation of free  $^{125}\text{I}$ - and  $^{125}\text{I}$ - $\beta_2$  microglobulin by chromatography on Sephadex G-50.

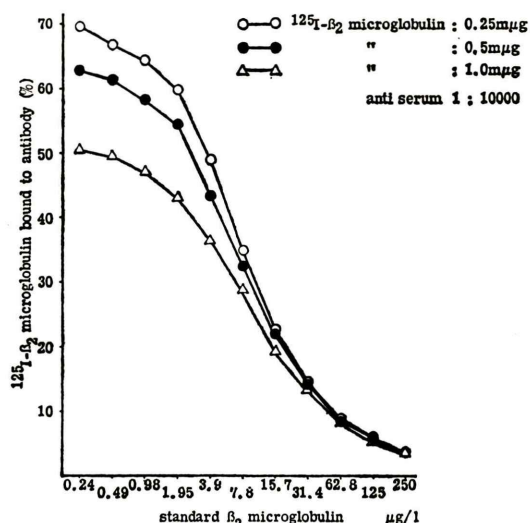


Fig. 4 Influence of various concentrations of  $^{125}\text{I}$ - $\beta_2$  microglobulin on standard curve for  $\beta_2$  microglobulin.

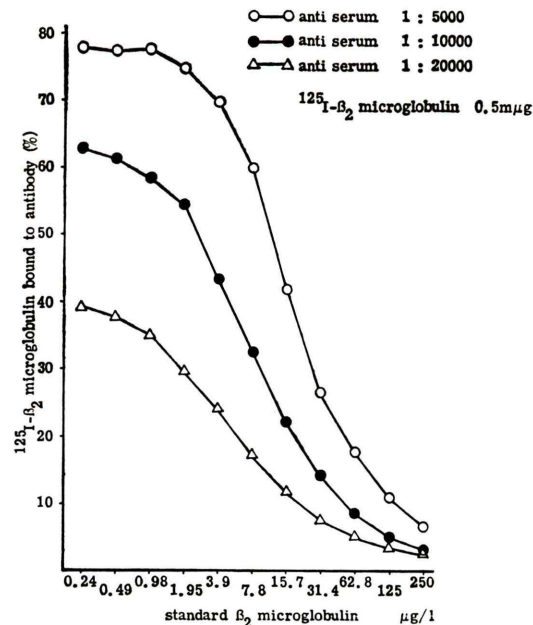


Fig. 5 Influence of various concentration of anti- $\beta_2$  microglobulin on standard curve for  $\beta_2$  microglobulin.

感度に関しては特に差異を認めなかったが、精度では、標識  $\beta_2$ M 量 0.25  $\mu\text{g}$  および 0.5  $\mu\text{g}$  の方が 1.0  $\mu\text{g}$  に比べて標準  $\beta_2$ M 濃度の増加に伴う B% の減少率が大きく、優れていた。また、標識  $\beta_2$ M 量 0.25  $\mu\text{g}$  の場合、0.5  $\mu\text{g}$  および 1.0  $\mu\text{g}$  に比べて実測カウント数が少なく測定誤差を生じやすいことより標識  $\beta_2$ M 量 0.5  $\mu\text{g}$  が最適と考えられた。

(ii) 第 1 抗体濃度: 第 1 抗体の濃度変化 (5,000, 10,000, 20,000 倍希釈) による標準曲線の相違を一定の標識  $\beta_2$ M 量 (0.5  $\mu\text{g}$ ) を使用して検討すると、Fig. 5 に示すごとく、標準  $\beta_2$ M 濃度増加に伴う B% の減少率が大きく、しかも  $\beta_2$ M 検出感度の優れた標準曲線を描く 10,000 倍希釈が最適と考えられた。

(iii) 第 1 反応時間: 第 1 反応時間の B% に及ぼす影響を検討するために、標準  $\beta_2$ M の代わりに BSA-PBS 液 0.1 ml を、標識  $\beta_2$ M 0.5  $\mu\text{g}$ , 第 1 抗体 10,000 倍希釈液 0.1 ml を使用し、反応時間 1.5, 3, 6, 12, 24, 48, 72 および 92 時間の各 B% を求め推移曲線を作製すると、Fig. 6 に示すごとく、時間の経過とともに漸次 B% の増加が認められたが、24 時間以後ではほぼ peak に達することにより 48 時間を第 1 反応時間とした。なお、反応温度は 4°C で行なった。

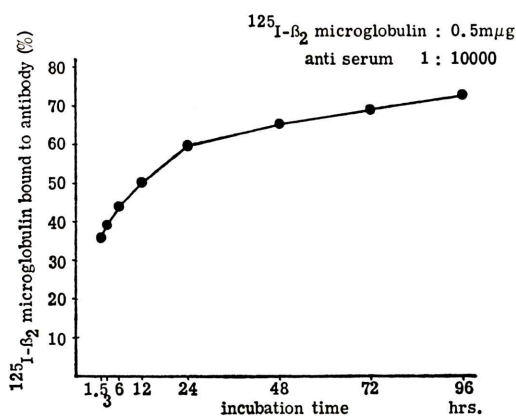


Fig. 6 Influence of first reaction time on  $^{125}\text{I}-\beta_2$  microglobulin bound rate.

(iv) 第 2 抗体濃度: 第 2 抗体濃度の B% に及ぼす影響を検討すると、第 2 抗体 (抗家兔  $\gamma$ -グロブリンヤギ血清) 5, 10, 20 倍希釈の範囲内では 10 倍希釈血清使用時に最高の B% が得られた。

(v) 第 2 反応時間: 第 2 反応時間の B% に及ぼす影響について、3, 6, 12, 24, 36, 48 時間の各 B% を求め推移曲線を作製すると、12 時間以後で B% は最高となり以後はほぼ同一の B% を示すことより 24 時間を第 2 反応時間とした。

### (3) 標準曲線ならびに希釈曲線

前項で検討した成績から、至適測定条件を選び Table 2 に示す測定系で標準曲線を作製すると Fig. 7 に示すごとく良好な用量反応曲線を描いた。この標準曲線の最少測定感度は 0.49  $\mu\text{g/l}$  であったが、本測定系の精度を高める目的から、測定可能範囲は B% の減少率の最も大きな 1.95~62.8  $\mu\text{g/l}$  とした。また、micro-Ouchterlony 法で  $\beta_2$ M の存在を確認し得た腎疾患患者血清および尿の希釈曲線は Fig. 7 のごとく標準曲線と平行した用量反応曲線を示した。

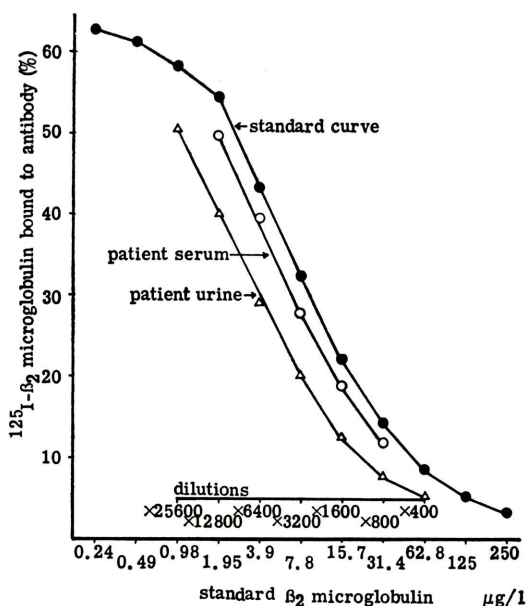


Fig. 7 Standard curve of  $\beta_2$  microglobulin radioimmunoassay and dilution curve of patient's serum and urine.



## (4) 特異性の検討

測定系に 7.8~1,000 mg/l 濃度の自家精製ヒト IgG, 精製 Bence Jones 蛋白の Kappa 鎖および Lambda 鎖を 0.1 ml ずつ加えて  $^{125}\text{I}$ - $\beta_2\text{M}$  と抗  $\beta_2\text{M}$  血清の結合に及ぼす影響を検討すると, Fig. 8

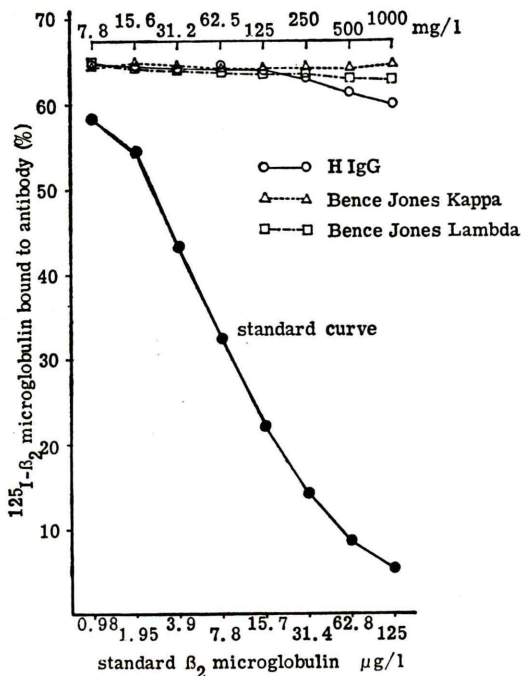


Fig. 8 Influence of human IgG, Bence Jones Kappa and Lambda on  $\beta_2$  microglobulin assay system.

に示すごとく Bence Jones 蛋白では影響を認めなかったが, IgG では 500 mg/l 濃度以上で若干の B% の減少がみられた. さらにヒト IgG 以外のヒト血清蛋白成分の測定系に及ぼす影響を検討する目的で, 正常ヒト血清 1 ml を Sephadex G-100 column chromatography (2.5×70 cm, 1.0 M NaCl 含, 1/15 M pH 7.5 phosphate buffer) を行ない, 3.8 ml ずつ分割採取し各分画の 0.1 ml を検体として  $\beta_2\text{M}$  量を測定すると, Fig. 9 のごとく, 血清蛋白を含む 35~55 分画では  $\beta_2\text{M}$  は認められず低分子蛋白の溶出部位である 66~80 分画に  $\beta_2\text{M}$  が検出された. 以上の検討から, 本測定系は  $\beta_2\text{M}$  にきわめて特異性の高い測定系と考えられた.

## (5) 回収試験

正常ヒト血清に各種濃度の精製  $\beta_2\text{M}$  を添加し, それを本測定系を用いて測定した回収率は Table 3 に示すごとく 92~118% であった.

## (6) 再現性

同一測定系内で  $\beta_2\text{M}$  濃度の異なる 3 種類の血清および 1 種類の尿を 5 本重複測定すると, Table 4 のごとく, intraassay C. V. (変動係数) は 0.99~5.25% であった. また, 4 回それぞれ異なる時期に標識した  $^{125}\text{I}$ - $\beta_2\text{M}$  を用いて測定すると, Table 4 のごとく interassay C. V. (変動係数) は 1.42~8.6% であった. いずれも尿を検体とした場合の方が血清に比べて変動係数は小であった.

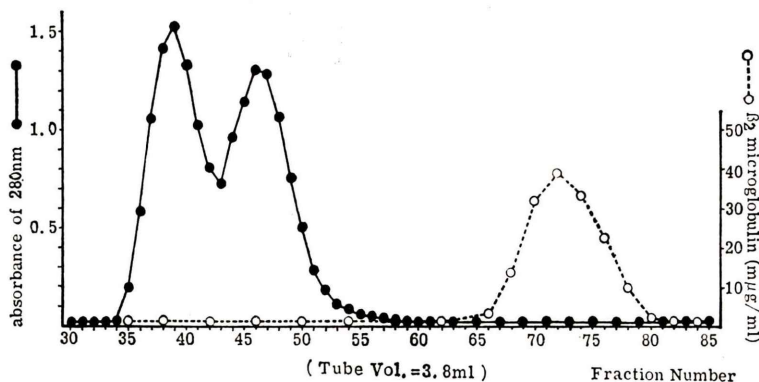


Fig. 9 Influence of normal human serum after Sephadex G-100 gel filtration on  $\beta_2$  microglobulin assay system.

**Table 3** Recovery of  $\beta_2$  microglobulin from normal human serum.

$\beta_2$ microglobulin added	$\beta_2$ microglobulin recovered from serum	
mg/l	mg/l	%
0	1.20	—
0.2	1.42	110
0.4	1.60	100
0.8	2.15	118
1.6	2.82	101
3.2	4.50	103
6.4	7.10	92
12.8	13.40	95

**Table 4** Reproducibility of  $\beta_2$  microglobulin values. intraassay

sample No.	$\beta_2$ microglobulin mg/l			
	serum A	serum B	serum C	urine D
1	1.43	7.40	24.64	71.04
2	1.46	7.60	22.84	70.40
3	1.44	8.40	24.90	72.00
4	1.54	7.84	23.04	70.40
5	1.46	7.68	22.08	70.40
mean	1.47	7.78	23.51	70.85
SD	0.04	0.38	1.23	0.70
SE	0.02	0.17	0.55	0.31
CV %	2.96	4.87	5.25	0.99

## interassay

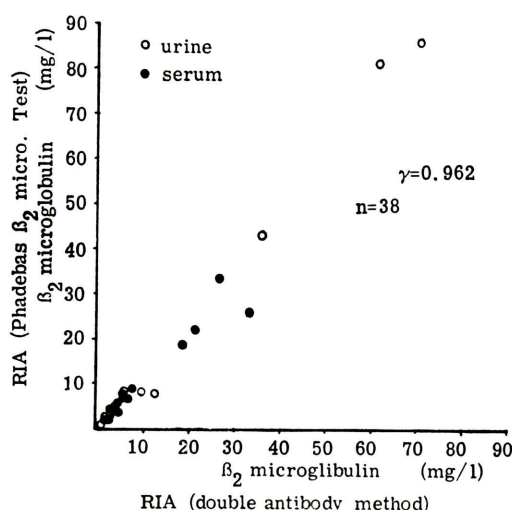
assay No.	$\beta_2$ microglobulin mg/l			
	serum A	serum B	serum C	urine D
1	1.20	7.60	22.08	42.56
2	1.23	8.48	24.32	43.52
3	1.45	7.92	22.88	42.24
4	1.30	8.16	22.40	42.24
mean	1.30	8.04	22.93	42.64
SD	0.11	0.37	0.98	0.60
SE	0.26	0.19	0.49	0.30
CV %	8.61	4.63	4.29	1.42

**2. 本法 (二抗体法) と Phadebas  $\beta_2$ -micro Test (固相法) の比較**

本法と Phadebas  $\beta_2$ -micro Test による測定値の比較は, Fig. 10 に示すごとく相関係数 0.962,  $p < 0.001$  と良好な相関を示した。

**3. 正常ヒト体液中の  $\beta_2$ M 濃度**

Table 5 に示すように, 正常ヒト 37 名の血清  $\beta_2$ M 値は 0.98~2.35 mg/l に分布し, 平均値 1.71

**Fig. 10** Correlation between the double-antibody method and the solidphase method in serum and urine.**Table 5**  $\beta_2$  microglobulin determined by the double antibody method in normal human body fluids.

Fluid	No. of subjects	Range	Mean	S.D.
Serum mg/l	37	0.98~2.35	1.71	0.29
Urine mg/24 hr.	10	0.036~0.160	0.075	0.036
Colostrum mg/l	11	8.4~58.4	37.3	14.8
Cord blood sera mg/l	11	2.24~3.12	2.58	0.28

$\pm 0.29$  (SD) で性差は認められなかった。正常ヒト 10 名の 24 時間尿  $\beta_2$ M 値は 0.036~0.160 mg/24 時間で, 平均値  $0.075 \pm 0.036$  で性差は認められなかった。臍帯血, 11 例の  $\beta_2$ M 値は 2.24~3.12 mg/l で平均値  $2.58 \pm 0.28$  であった。初乳 11 例の  $\beta_2$ M 値は 8.4~58.4 mg/l で平均値  $37.3 \pm 14.8$  と著明な個人差を認めた。

なお, 測定に際し, 血清, 尿, 臍帯血および初乳をそれぞれ BSA-PBS で 100 倍, 10 倍, 200 倍および 8,000 倍希釈しその 0.1 ml を検体とした。

**VI. 考 案**

従来,  $\beta_2$ M 測定法には単純放射免疫拡散法

(SRID 法) Laurell rocket 免疫電気泳動法<sup>10)</sup>, 二抗体放射状免疫拡散法<sup>11)</sup>, および RIA 法<sup>2, 12, 13, 18)</sup>がみられる. 通常, 体液中に認められる  $\beta_2$ M は微量であるため SRID 法 (検出感度 5 mg/l 以上) では検出されず, また rocket 電気泳動法 (1 mg/l 以上), 二抗体放射状免疫拡散法 (0.3 mg/l 以上) でも尿のごとき低濃度試料では検出困難であることから, 現在では高感度な RIA 法 (1  $\mu$ g/l 以上) が一般に用いられている.  $\beta_2$ M の RIA 法は, 初め Evrin<sup>2)</sup>らにより抗体 (抗  $\beta_2$ M) 結合 Sephadex を用いた Solid-phase RIA 法が報告されて以来, Plesner<sup>8)</sup>らの polyethylene glycol (MW, 6,000) を用いた一抗体法による RIA 法, Sevier<sup>12)</sup>らの第 2 抗体結合 Sepharase を用いた Solid-phase double-antibody RIA 法, さらに谷口<sup>13)</sup>らの標識抗  $\beta_2$ M と抗  $\beta_2$ M 結合濾紙を用いた Sandwich Solid-phase RIA 法など多数の報告がなされているが, 二抗体法による  $\beta_2$ M 測定法に関する詳細な報告はみられない. そこで著者らは, 高純度の精製  $\beta_2$ M および特異抗  $\beta_2$ M 血清を作製し, 二抗体法による  $\beta_2$ M 測定法の基礎的検討を行なった.

まず, RIA の実施に際し主要なことは, 高い比放射能を持ち, しかも抗原性の変化の少ない標識抗原を得ることである. 著者らは, 精製  $\beta_2$ M に  $\text{Na}^{125}\text{I}$  を Hunter Greenwood の方法に準じて標識した. 標識に際し, クロラミン T 量は 40  $\mu$ g とし, 半応時間を 30, 60, 90 秒について検討すると時間とともに高い比放射能の標識  $\beta_2$ M が得られたが, 90 秒では一部抗原性の壊出がみられた. 一方, 60 秒では抗原性にほとんど変化がみられず, しかも高い比放射能 (100–130  $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ ) を示す標識  $\beta_2$ M が得られた. 次に, 二抗体法の測定条件についての基礎的検討の結果, 標識  $\beta_2$ M 量 0.5 m $\mu$ g 第 1 抗体 10,000 倍稀釈, 第 1 反応時間 48 時間, 第 2 抗体 10 倍稀釈, 第 2 反応時間 24 時間が, 本法の精度, 感度の面から最適測定条件と考えられた. これら最適条件を採用した測定系による標準曲線は, 基準  $\beta_2$ M 1.95–62.8  $\mu$ g/l 濃度で直線性を示し, また, 患者血清, 尿による希釈曲線も標準曲線と一致するきわめて良好な曲線を描いた.

本法による最少検出感度は 0.49  $\mu$ g/l 以上と高感度であった. 特異性については, 精製ヒト IgG, Bence Jones protein およびその他の正常ヒト血清成分 ( $\beta_2$ M を除く) との交叉試験でいずれも反応を示さないことから本法は  $\beta_2$ M に特異性の高い測定法であると判断された. 本法による intrassay C.V. は 0.99–5.25 %, interassay C.V. は 1.42–8.61% を示しきわめて高い精度と再現性を有していた. 本法と Evrin らの固相法に準じた Phadebas  $\beta_2$ M Test キットとの比較では相関係数 0.962 と良好な相関が得られた. また, 本法による正常ヒト体液中の  $\beta_2$ M 濃度は, 血清 1.71  $\pm$  0.29 mg/l, 尿 0.075  $\pm$  0.036 mg/24 hrs, 初乳 37.3  $\pm$  14.8 mg/l, 臍帯血 2.58  $\pm$  0.2 mg/l で Evrin らの固相法 RIA 法<sup>2)</sup>や, Cejka らの SRID 法<sup>3)</sup>による成績とほぼ一致していた. しかし初乳に関して著者らの成績では症例により著明な個人差が認められ従来の報告と異なっていた. 著者らの入手した初乳は正常分娩後 24 時間以内に初回採取したもので, 分泌量が症例により数 ml ~ 十数 ml と著明な差がみられ, 分泌量の少ない初乳ほど高  $\beta_2$ M 値を示す傾向がみられた. また 1 症例において経日的に乳汁中の  $\beta_2$ M 濃度を測定すると, 初乳を peak としてしだいに  $\beta_2$ M 濃度の低下が認められたことから, 授乳時期および分泌量によって  $\beta_2$ M 濃度に差異が生じるものと考察される.

以上の結果より, 本法は感度, 精度, 再現性, 特異性に優れた測定法であると考察される. 一方, 固相法<sup>15)</sup>に比べると操作が比較的繁雑で, 第 2 抗体を必要とするなどの欠点がみられるが, 本法は精度, 再現性がきわめて高く, 一時に多数の検体処理が可能であり, また, いかなる研究室においても精製  $\beta_2$ M および特異抗血清の入手にて, 容易に再現性のある測定系が確立できるなどの利点がある.

## VII. 結 語

尿細管性蛋白尿患者尿より  $\beta_2$ M の分離, 精製を行ない, この精製  $\beta_2$ M および特異抗  $\beta_2$ M 血清を用いて二抗体法による  $\beta_2$ M の RIA を確立し,



以下の結論を得た。

① 本法による最少測定感度は  $0.49 \mu\text{g/l}$  と高感度で, intraassay C.V.  $0.99\sim 5.25\%$ , interassay C.V.  $1.42\sim 8.6\%$  を示しきわめて精度, 再現性に優れており,  $\beta_2\text{M}$  以外の正常ヒト血清成分および Bence Jones protein との交叉反応を認めない特異性の高い測定系であった。

② 本法と固相法 (Phadebas  $\beta_2$ -micro Test キット) との比較では, 相関係数  $0.962$  と良好な相関が得られた。

③ 本法による正常ヒト体液中の  $\beta_2\text{M}$  濃度は, 血清  $1.71\pm 0.29 \text{ mg/l}$ , 尿  $0.075\pm 0.036 \text{ mg/24 hr}$ , 初乳  $37.3\pm 14.8 \text{ mg/l}$ , 臍帯血  $2.58\pm 1.28 \text{ mg/l}$  を示し従来の報告とほぼ一致していた。

#### 文 献

- 1) Berggård I, Bearn AG: Isolation and Properties of a Low Molecular Weight  $\beta_2$ -Globulin Occurring in Human Biological Fluids. *J Biol Chem* **243**: 4095-4103, 1968
- 2) Evrin P-E, Peterson PA, Wide L: Radioimmunoassay of  $\beta_2$ -Microglobulin in Human Biological Fluids. *Scand J Clin Lab Invest* **28**: 439-443, 1971
- 3) Cejka J, Cohen F, Kithire K: Serum  $\beta_2$ -Microglobulin Levels in Normal Children and Sex-Linked Agammaglobulinemia Patients. *Clin Chim Acta* **47**: 59-61, 1973
- 4) Peterson PA, Cunningham BA, Berggård I:  $\beta_2$ -Microglobulin—A Free Immunoglobulin Domain. *Proc Nat Acad Sci USA* **69**: 697-1701, 1972
- 5) Smithies O, Poulik MD: Initiation of Protein Synthesis at an Unusual Position in an Immunoglobulin Gene? *Science* **175**: 187-189, 1972
- 6) Nakamuro K, Tanigaki N, Pressman D: Multiple Common Portion Fragment Derived from HL-A Antigen Molecules. *Proc Nat Acad Sci USA* **70**: 2863-2865, 1973
- 7) Solheim BG, Rankin B, Holmboe B: Association of  $\beta_2$ -Microglobulin and HL-A in the Cell Membrane. *Transplantation* **19**: 281-285, 1975
- 8) Nilsson K, Evrin P-E, Berggård I: Involvement of Lymphoid and Non-lymphoid cells in the Production of  $\beta_2$ -Microglobulin—a Homologue of the Constant Domains of IgG. *Nature New Biol* **244**: 44-45, 1973
- 9) Peterson PA, Evrin P-E, Berggård I: Differentiation of Glomerular, Tubular, and Normal Proteinuria: Determinations of Urinary Excretion of  $\beta_2$ -Microglobulin, Albumin, and Total Protein. *J Clin Invest* **48**: 1189-1198, 1969
- 10) 金衡仁, 河合忠:  $\beta_2$ -microglobulin の測定法 臨床病理 臨時増刊 **25**: 85-102, 1976
- 11) 西岡文彦, 谷内昭, 和田武雄: 血清  $\beta_2$ -microglobulin の二抗体放射状免疫拡散法による測定と腎疾患における知見 医学のあゆみ **96**: 116-117, 1976
- 12) Sevier ED, Reisfeld A: Semi-Automatic Solid-Phase Double-Antibody Radioimmunoassay for  $\beta_2$ -Microglobulin. *Immunochemistry* **13**: 35-37, 1976
- 13) 谷口直之, 大野秀樹, 高桑栄松: ヒト  $\beta_2$ -Microglobulin の固相法によるラジオイムノアッセイ 医学のあゆみ **98**: 15-17, 1976
- 14) Lowry OH, Rosebrough MJ: Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J Biol Chem* **193**: 265, 1951
- 15) 池窪勝治, 遠藤啓吾, 福永仁夫, 他: Radioimmunoassay (Phadebas  $\beta_2$ -Micro Test) による血清  $\beta_2$ -microglobulin 濃度測定の基礎的ならびに臨床的検討 核医学 **13**: 513-519, 1976
- 16) Hunter WN, Greenwood FC: Preparation of Iodine-131 Labelled Human Growth Hormon of High Specific Activity. *Nature* **194**: 495-496, 1962
- 17) Morgan CR, Lazarow A: Immunoassay of Insulin Two Antibody System. *Diabetes* **12**: 115-126, 1963
- 18) Plesner T, Nørsgaard-Pedersen B, Boenisch T: Radioimmunoassay of  $\beta_2$ -Microglobulin. *Scand J Clin Invest* **35**: 729-735, 1975

## Summary

### Studies on the Double-Antibody Radioimmunoassay of Human $\beta_2$ Microglobulin

Nobuhiko MIZUNO, Kiwamu OKADA, Shigeki TAKASE and Shigeaki BABA

*The Second Department of Internal Medicine, Kobe University School of Medicine Kobe Japan  
(Director: Shigeaki, Baba, M. D.)*

A double-antibody radioimmunoassay for  $\beta_2$  microglobulin in human body fluids was established and following results were obtained.

(1) The standard curve showed linear over the range 1.95–62.8  $\mu\text{g/l}$  and the detection limit was 0.49  $\mu\text{g/l}$ . The coefficients of variation for intraassay and interassay were 0.99–5.25% and 1.42–8.6%, respectively. The crossreactivities to Bence Jones protein (Kappa, Lambda) and human serum components except  $\beta_2$  microglobulin were not observed.

(2) Correlation between the double-antibody

method and the solid-phase method (Phadebas  $\beta_2$  Micro. Test.) in serum and urine showed good correlation,  $r=0.962$  ( $n=38$ ).

(3) The mean concentration of  $\beta_2$  microglobulin in normal human serum, colostrum after normal delivery and cord blood serum at normal delivery were  $1.71 \pm 0.29$   $\text{mg/l}$  ( $m \pm \text{SD}$ ,  $n=37$ ),  $37.3 \pm 14.8$   $\text{mg/l}$  ( $m \pm \text{SD}$ ,  $n=11$ ) and  $2.58 \pm 0.28$   $\text{mg/l}$  ( $m \pm \text{SD}$ ,  $n=11$ ), respectively. The mean 24 hr urinary excretion of  $\beta_2$  microglobulin in normal human was  $0.075 \pm 0.036$   $\text{mg/24 hr}$  ( $m \pm \text{SD}$ ,  $n=10$ ).