

《ノート》

二抗体法による β_2 -マイクログロブリン測定の 基礎的ならびに臨床的検討

Fundamental and Clinical Studies of Measurement for
 β_2 -microglobulin by Double Antibody Method

阿多まり子* 飯尾 篤* 萬家 千春* 和田 真理*

永井 郁子* 浜本 研**

Mariko ATA*, Atsushi Iio*, Chiharu YOROZUYA*, Mari WADA*,
Fumiko NAGAI* and Ken HAMAMOTO**

*Central Radiology Division, Ehime University Hospital, Faculty of Medicine, Ehime University

**Department of Radiology, Faculty of Medicine, Ehime University

I. はじめに

β_2 -microglobulin (以下 β_2 -MG) は、尿細管性蛋白から分離された分子量 11,800 の低分子量蛋白質で¹⁾、HLA 抗原の一部と共に構造を持っている²⁾が、その機能に関してはなお明らかでない。産生された HLA 抗原の細胞内移送と関連があるという報告もある³⁾。 β_2 -MG は、リンパ球をはじめ有核細胞で産生され⁴⁾、血清、尿、髄液、初乳、羊水などに存在している^{1,5)}。 β_2 -MG は、腎糸球体でろ過され、尿細管で吸収されて異化される⁶⁾。したがって、腎疾患における血中 β_2 -MG の異常高値は、糸球体ろ過機能低下を意味し、尿中 β_2 -MG の異常高値は、尿細管再吸収能の低下を意味するため、 β_2 -MG の測定は、糸球体性蛋白尿、尿細管性蛋白尿の診断に有用と考えられる。さらに悪性腫瘍⁷⁾、自己免疫疾患⁸⁾との関連も示唆さ

れている。

β_2 -MG 測定には、従来固相法を用いるキットが使用されてきたが、最近二抗体法を用いるキットが栄研イムノケミカル研究所から開発されたので、その基礎的検討ならびに主として腫瘍マーカーとなり得るか否かについての臨床的検討の結果を報告する。

II. 方 法

1. キットの内容および調製

- 1) ^{125}I - β_2 -MG (凍結乾燥品): 精製水 14 ml を加えて溶解する。
- 2) β_2 -MG 抗血清 (凍結乾燥品): 精製水 14 ml を加えて溶解する。
- 3) 標準 β_2 -MG (溶液): 調製不要
 $0, 1, 2, 4, 8, 16, 32 \mu\text{g}/\text{ml}$
- 4) 第二抗体 (凍結乾燥品): 精製水 14 ml を加えて溶解する。

2. 測定操作

操作法は、キットの説明書に従った。すなわち Fig. 1 に示すように、標準品および血清を 10 μl 、または尿検体を 200 μl 分注し、 ^{125}I - β_2 -MG 溶液 200 μl を加え、室温 (15~28°C) で、2 時間静置し、

Key words: β_2 -microglobulin, Radioimmunoassay.

* 愛媛大学医学部附属病院中央放射線部

** 同 放射線科

受付: 59年2月16日

最終稿受付: 59年5月2日

別刷請求先: 愛媛県温泉郡重信町大字志津川

(番号 791-02)

愛媛大学医学部附属病院放射線部

阿多まり子

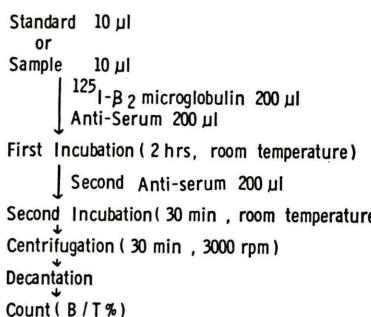


Fig. 1 Procedure for measurement of β_2 -microglobulin.

第二抗体溶液 200 μ l を加え、30 分後に遠心分離し、沈渣の放射能量をウエル型シンチレーションカウンターで計測した。試験管に加えた ^{125}I - β_2 -MG の全カウント (T) に対する沈渣のカウント (B) の割合 (B/T%) を求め、標準血清の B/T% を用いて標準曲線を作製した。この曲線から検体中の未知 β_2 -MG 濃度の値を求めた。

3. 測定対象

コントロール血清は、低値、中間値、高値を示した患者血清をそれぞれプールして、3種類を作製した。患者血清は、愛媛大学医学部付属病院に入院中、または外来通院中の患者から分離し、正常血清は、愛媛大学医学部付属病院勤務者で、臨床的に健康と認められる者から分離した。これら血清は、測定時まで -20°C で保存した。

4. 基礎的検討

1) インキュベーション時間

第1回のインキュベーション時間を、15分、30分、1時間、2時間、6時間と変えて、標準曲線を作製した。なおインキュベーション温度は全て 25°C とした。同時にコントロール血清をそれぞれの条件で測定し、それらの測定値を比較した。

2) インキュベーション温度

第1回のインキュベーション温度を、 4°C 、 25°C 、 37°C と変えて、標準曲線を作製した。なおインキュベーション時間は、全て 2 時間とした。同時にコントロール血清をそれぞれの条件で測定し、それらの測定値を比較した。

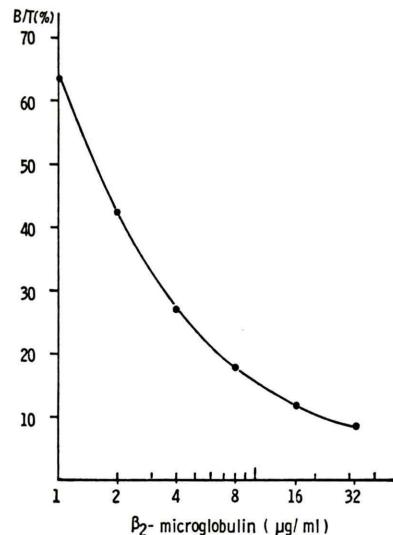


Fig. 2 Standard curve for measurement of β_2 -microglobulin.

3) 回収率

3種類の患者血清に、標準 β_2 -MG 1, 2, 4、および 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を添加したものについて測定し、 β_2 -MG の実測値の計算値に対する割合を回収率とした。

4) 希釈曲線

高値を示す患者血清 2 検体を、0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の標準溶液を用いて、2倍、4倍、8倍、16倍に希釈したもの、および希釈しない血清について測定した。

5) 再現性

前記の 3種類のコントロール血清を同時に 10 回測定し、それぞれの同時再現性を求めた。また、別の機会に測定した値で、日差再現性を求めた。

6) 他キットによる測定値の比較

本キットと他社の固相法キットとで 48種類の患者血清を測定して相関関係を検討した。

5. 臨床的検討

1) 健常人 18 例の血清を測定し、正常値を求めた。

2) 良性疾患 14 例、食道癌 3 例、肺癌 17 例、胃癌 23 例、肝癌 15 例、脾癌 4 例、結腸癌 8 例、直腸癌 12 例、および前立腺癌 3 例を測定し正常群と比較した。

Table 1 Recovery

Patient serum ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Standard serum ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Calculated value ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Measured value ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Recovery* (%)
1.6	+1	1.3	1.4	108
	+2	1.8	1.9	106
	+4	2.8	2.9	104
	+8	4.8	4.4	92
5.2	+1	3.1	3.3	106
	+2	3.6	3.7	103
	+4	4.6	4.6	100
	+8	6.6	6.1	92
7.6	+1	4.3	4.7	109
	+2	4.8	5.0	104
	+4	5.8	6.0	103
	+8	7.8	7.6	97

(mean: 102)

$$* \text{Recovery}(\%) = \frac{\text{Measured value}}{\text{Calculated value}} \times 100$$

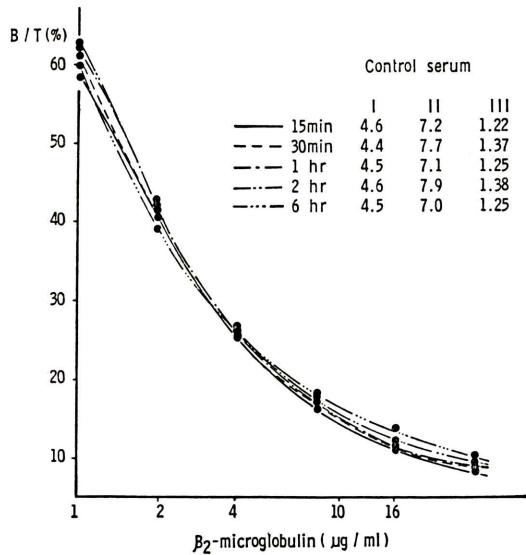


Fig. 3 Effect of incubation time on standard curve and measured values in control sera.

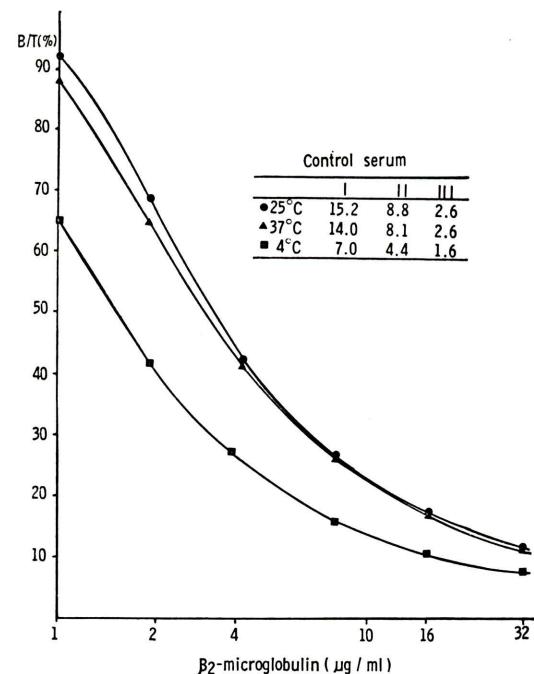


Fig. 4 Effect of incubation temperature on standard curve and measured values in control sera.

Figure 2 に、本キットの説明書の方法を用いて作製した標準曲線を示す。 β_2 -MG 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ から 32 $\mu\text{g}/\text{ml}$ までの標準曲線が得られるが、16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上では勾配が緩やかになるため、標準曲線上上

り測定可能な最少 β_2 -MG 濃度は 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、最大濃度は 16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ が適當と思われる。

インキュベーション時間が、 β_2 -MG の測定値

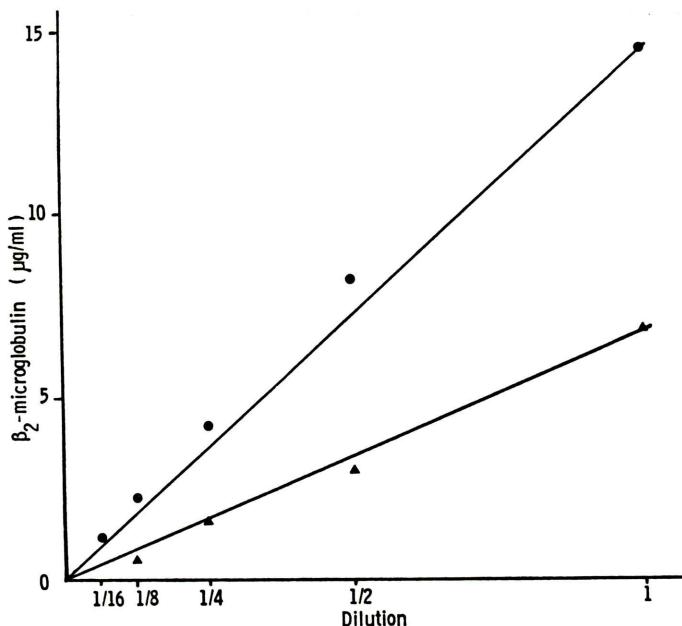


Fig. 5 Dilution curves made by using two kinds of patients' sera.

Table 2 Reproducibility

Intra-assay

N	Mean ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	S.D.	C.V. (%)
10	4.4	0.19	4.3
10	8.2	0.43	5.2
10	1.2	0.05	4.2

Inter-assay

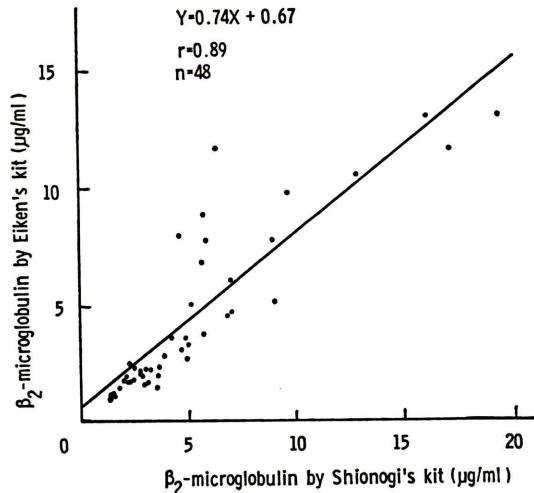
N	Mean ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	S.D.	C.V. (%)
10	4.3	0.14	3.3
10	7.6	0.62	8.2
9	1.3	0.07	5.4

N: Number of measurement

C.V.: $\frac{\text{S.D.}}{\text{Mean}} \times 100$

に及ぼす影響については、Fig. 3 に示すように、15分～6時間では標準曲線に影響はみられず、これらのインキュベーション時間から求めた3種類のコントロール血清の測定値は、ほぼ等しい結果が得られた。

インキュベーション温度が、 β_2 -MG の測定値に及ぼす影響は、Fig. 4 に示すように、25°C と

Fig. 6 Relationship between β_2 -microglobulin values measured by two kinds of kits.

37°C の標準曲線に差はみられなかったが、4°C では結合率が低く、勾配が緩やかになった。これらのインキュベーション温度から求めた3種類のコントロール血清の測定値は、25°C と 37°C では

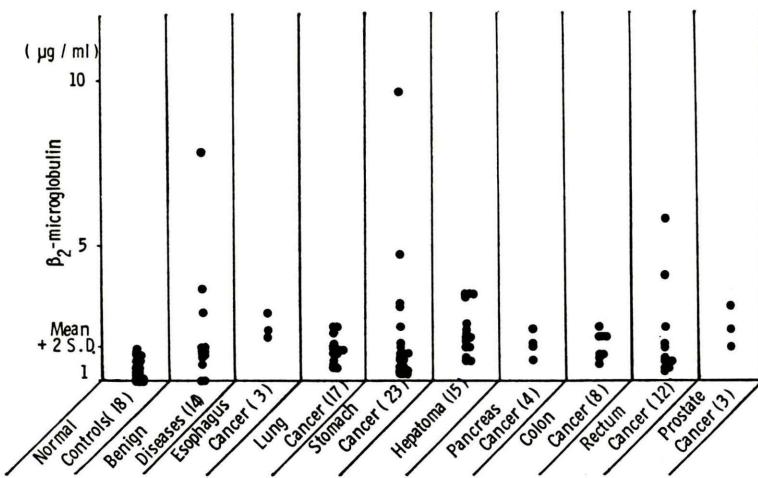


Fig. 7 Beta 2-microglobulin levels in various disorders and normal controls. The number of subjects in each disease group is given in parentheses.

差がなく、4°Cで低値を示した。

回収率を検討した結果は、Table 1に示すように、回収率は92%から109%の間に分布し、その平均値は、102%であった。

希釈曲線は、Fig. 5に示すように、ほぼ直線を示した。

再現性について検討した結果はTable 2に示すように、同時測定の変動係数は、4.2~5.2%に分布し、平均は、4.6%であった。日差変動係数は、3.3~8.2%に分布し、平均は、5.6%であった。

本キットと固相法との相関を、Fig. 6に示す。相関係数0.89であり、後者をX、前者をYとすると回帰直線は、 $Y=0.74X+0.67$ であった。

臨床的検討の結果をFig. 7に示す。健常者18人の血清中 β_2 -MGの平均値 ± 1 標準偏差は、 $1.38 \pm 0.33 \mu\text{g}/\text{ml}$ であった。平均値 $+2$ 標準偏差、すなわち $2.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以下を正常範囲とした。良性疾患14例は、 2.29 ± 3.50 、食道癌3例は、 2.60 ± 0.72 、肺癌17例は、 2.04 ± 1.16 、胃癌23例は、 2.21 ± 3.65 、肝癌15例は、 2.51 ± 1.47 、脾癌4例は、 2.05 ± 0.74 、結腸癌8例は、 2.04 ± 0.77 、直腸癌12例は、 2.27 ± 2.71 、前立腺癌3例は、 $2.57 \pm 1.20 \mu\text{g}/\text{ml}$ であった。 $2.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上を異常値とした場合の陽性率は、良性疾患21.4%、胃癌26.1%、肝癌66.7%，

肺癌29.4%、脾癌50.0%、結腸癌50.0%、直腸癌33.3%、前立腺癌66.7%、食道癌100%であった。またこれら全悪性腫瘍85例中に36例の異常値を認め、陽性率は42.4%であった。

IV. 考 案

第1回インキュベーション時間は、15分から6時間まで安定した結果が得られ、急ぐ場合には、15分でよいと思われる。

インキュベーション温度は、検討した4°C、25°C、37°Cのうち、4°Cで標準曲線が緩やかになり精度が低下するが、25°C、37°Cでの曲線には差異はみられなかったので、室温であれば、問題はないと思われる。

再現性は、intra-assay, inter-assayともほぼ満足すべき結果と考えられる。希釈試験における直線も満足すべき結果と考えられる。回収率試験は、92%~109%の分布でほぼ良好であった。

また他キットとの相関も良好であった。健常人18例のわれわれが測定した β_2 -MG値の平均 \pm 標準偏差は、 $1.38 \pm 0.33 \mu\text{g}/\text{ml}$ であって、従来の報告と一致した^{8,9)}。

β_2 -MGは他の低分子量血漿蛋白の多くと同様^{10,11)}、腎尿細管で異化される⁶⁾。したがって血

中 β_2 -MG の異常高値は、通常腎機能障害の存在を意味するが、そのほかに悪性疾患にも高値を示す場合があるといわれている⁷⁾。しかし、良性疾患においても高値を示す場合があり^{8,12,13)}、中野ら¹⁴⁾は、良性疾患の陽性率は 30% であり、悪性疾患の陽性率も 28% とほぼ等しく、 β_2 -MG に CEA と ferritin 値を加えると診断能は上昇するが、false positive の率も上ると報告している。われわれが検討した症例においては、悪性疾患の陽性率(42.4%)は、良性疾患の陽性率(21.4%)に比べると高値であり、また、悪性疾患の平均値は、正常者に比べると有意な高値を示した疾患が多く認められた。しかし、良性疾患の平均値も比較的高値であり、悪性疾患の値は良性疾患の値に比べると高値ではなかった。この理由として、 β_2 -MG は、正常の有核細胞でも産生されるが、悪性細胞から比較的多量に産生分泌される事実⁴⁾、およびリンパ球が刺激されると β_2 -MG の産生分泌が増加する事実¹⁵⁾から、自己免疫疾患や細胞増殖を伴う良性疾患でも血中 β_2 -MG が増加すると考えられる。われわれが検討した悪性腫瘍における結果からも、 β_2 -MG は腫瘍マーカーとして必ずしも有用であるとは考えられない。しかし悪性腫瘍などの進行の程度と β_2 -MG 値との間の関連性の有無については検討の余地が残されている。

V. 結論

本キットは、被検血清が 10 μ l と微量であり、被検血清を希釈せず直接測定でき、また、インキュベーション時間が短く、 β_2 -MG を迅速、簡便に測定できる。測定感度、再現性、他キットとの相関も良好であり、日常検査に十分供用可能と考えられる。

最後に、 β_2 -MG キットを提供していただいた栄研イムノケミカル研究所に深謝致します。

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**: 4095-4102, 1968
- 2) Nakamuro K, Tanigaki N, Pressman D: Multiple common properties of human beta-2-microglobulin and the common portion fragment derived from HL-A antigen molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* **70**: 2863-2865, 1973
- 3) Sege K, Rask L, Peterson PA: Role of β_2 -microglobulin in the intracellular processing of HLA antigens. *Biochemistry* **20**: 4523-4530, 1981
- 4) Evrin PE, Nilsson K: β_2 -microglobulin in vitro by human hematopoietic, mesenchymal and epithelial cells. *J Immunol* **112**: 137-144, 1974
- 5) Evrin PE, Peterson PA, Wide L, et al: Radioimmunoassay of β_2 -microglobulin in human biological fluids. *Scand J Clin Lab Invest* **28**: 439-443, 1971
- 6) Peterson PA, Evrin PE, 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
- 7) Kithier K, Cejka J, Balamaric J, et al: Beta 2-microglobulin: occurrence in fetal life and malignancy. *Clin Chim Acta* **52**: 293-299, 1974
- 8) 池窪勝治, 遠藤啓吾, 福永仁夫, 他: Radioimmunoassay (Phadebas β_2 -micro Test) による血清 β_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
- 9) 河合 忠: 血漿蛋白・血清酵素. 医学のあゆみ **106**: 318-327, 1978
- 10) Strober W, Mogielnicki RP, Waldmann TA: The role of the kidney in the metabolism of serum proteins. A Ciba Foundation Symposium No. 9: 25-45, 1972
- 11) 飯尾 篤: 臨床検査 MOOK. 血漿蛋白, 山中 学, 村地 孝, 林 康之, 高月 清, 金原出版舖, 東京, p. 20, 1982
- 12) 斎藤 宏, 林太三郎, 山田英雄, 他: 肝臓および血液疾患における人血清中 β_2 ミクログロブリンのラジオイムノアッセイ. 核医学 **14**: 341-344, 1977
- 13) 畑 立子, 網野信行, 川島 実, 他: Radioimmunoassay による血中 β_2 -microglobulin の基礎的検討と臨床応用. 核医学 **14**: 99-104, 1977
- 14) 中野 哲, 綿引 元, 北村公男, 他: Tumor marker としての β_2 -microglobulin 測定の臨床的意義. 臨床成人病 **10**: 171-178, 1980
- 15) Bernier GM, Fanger MW: Synthesis of β_2 -microglobulin by stimulated lymphocytes. *J Immunol* **109**: 407-409, 1972