

《ノート》

β_2 -microglobulin 測定用 RIA キット「SD-8567」の 基礎的、臨床的検討

Fundamental and Clinical Evaluations of β_2 -microglobulin
Radioimmunoassay Kit "SD-8567"

垣崎 純子* 宮崎 忠芳*

Junko KAKIZAKI and Tadayoshi MIYAZAKI

Kyoto Prefectural University of Medicine, Department of Radiology

I. はじめに

β_2 -microglobulin (以下 β_2 -MG) は、1968 年、Berggard ら¹⁾ によって尿細管性蛋白尿を伴った Wilson 氏病および慢性カドミウム中毒患者の尿中から分離された分子量 11,800、100 個のアミノ酸残基からなる血漿タンパクであり、正常人の血清、尿、髄液、唾液、羊水、腹水、関節液、乳汁、精液など体液、分泌液中に存在する。その機能に関しては、不明であるが、構造的には、そのアミノ酸配列が免疫グロブリンの H 鎖、L 鎖の CH₃ と類似しており²⁾、リンパ球表面の組織適合性抗原 (HL-A) の L 鎖と共通した構造になっていることが報告されている^{3,4)}。臨床的には、糸球体濾過値 (GFR) 低下とともに血中 β_2 -MG が上昇し、腎尿管再吸収障害により、尿中 β_2 -MG 濃度が高くなるといった腎病態を知るだけでなく、自己免疫疾患、悪性腫瘍のマーカーとして CEA, AFP, Ferritin, hCG といった他の tumor marker と組み合わせ測定されることも多い。現在、市販され

ているキットとしては、セファデックス粒子に結合した抗体に対する競合反応を利用した「 β_2 -マイクロテストシオノギ」(Pharmacia 社) および二抗体法による「 β_2 -マイクログロブリン「栄研」」(栄研化学)があるが、今回、検体希釈を必要としない血中および尿中 β_2 -MG 測定キット「SD-8567」(Pharmacia 社) をシオノギ製薬より入手し使用する機会を得たので、その基礎的および臨床的検討結果を報告する。

II. 測定原理および測定方法

本品は、標準または検体に、標識抗原、第一抗体および Decanting suspension (マイクロセファローズに結合した第二抗体) を同時添加し、反応時間 45 分でプラトーに達する固相二抗体法 Radioimmunoassay である。検体希釈を必要とせず血清 50 μ l にて、0.4~16 mg/l の血中濃度、尿 200 μ l にて、100~4,000 μ g/l の尿中濃度が測定可能である。また、試薬を加えた後、攪拌を必要とせず、手技的にも簡便な方法といえる。Fig. 1 に測定手順を示す。計測は、シンチレーションカウンター (Packard Model A 521000) にて、1 分間計測を行い、microcomputer Wang 2200 にて logit log 2 次多項式もしくは、logistic 曲線のいずれか

* 京都府立医科大学附属病院放射線科

受付：59 年 6 月 4 日

最終稿受付：59 年 8 月 29 日

別刷請求先：京都市上京区河原町通広小路上る

梶井町 465 (☎602)

京都府立医科大学放射線科

垣 崎 純 子

Key words: β_2 -microglobulin, Double antibody method, Radioimmunoassay.

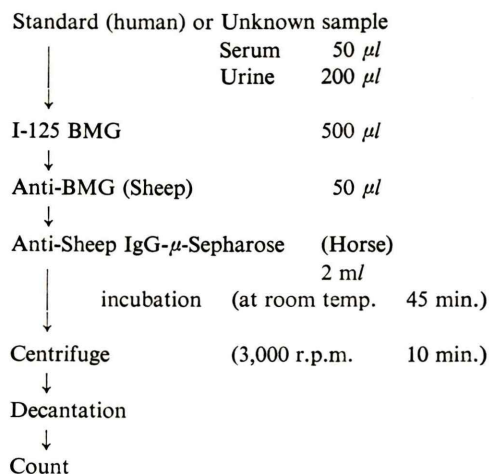


Fig. 1 Assay procedure of SD-8567.

により濃度の読みとりを行った。

III. 検討項目

1. 基礎的検討項目

1) 標準曲線, 2) インキュベーション時間および温度, 3) 再現性, 4) 回収率, 5) 希釈試験, 6) 最少検出感度, 7) 検体量による測定値の相関, 8) 他キットとの相関。

2. 臨床的検討項目

1) 正常者ならびに慢性腎炎患者の血清および尿中 β_2 -MG 値, 2) 慢性腎炎における血清 β_2 -MG 濃度と血清クレアチニン濃度の関係。

IV. 結果

1. 基礎的検討

1) 標準曲線

Figure 2 に $N=10$ における標準曲線を示す。結合率 ($B_0/T\%$) は, 52~75% にあり, 平均結合率は, 63% であった。また各濃度での変動係数は, 2.2~11.1% 平均 5.5% であった。

2) インキュベーション時間および温度

Figure 3 にインキュベーション時間を, 15, 30, 45, 60 分, 2 時間, 19 時間と変化させた時 (インキュベーション温度 25°C 一定) の標準曲線, およびサンプル濃度を示す。いずれのインキュベ

ーション時間にも良好な標準曲線が得られ, 血中 β_2 -MG 値も問題ないと思われるが, 低濃度における尿中 β_2 -MG 値は同一測定内でのバラツキが大きかった。45 分以上 19 時間の範囲において, 標準曲線はほぼ一致するため, 45 分で平衡に達するものと思われる。Fig. 4 にインキュベーション温度を 4°C, 25°C, 37°C と変化させた時 (インキュベーション時間 45 分一定) の標準曲線およびサンプル濃度を示す。25°C, 37°C, においてほぼ一致した検量線が得られた。したがって, 以降の検討では, インキュベーション時間 45 分以上, インキュベーション温度は室温 (15~30°C) にて測定を行うことにした。

3) 再現性

3 種類の血清および尿を用いて行った intraassay ($N=13$) の結果を Table 1 に, 3 種類の血清, 2 種類の尿を用いて行った interassay ($N=10$) の結果を Table 2 に示す。血清に関しては, 同時再現性, 日差再現性とも, CV 5% 前後と安定してい

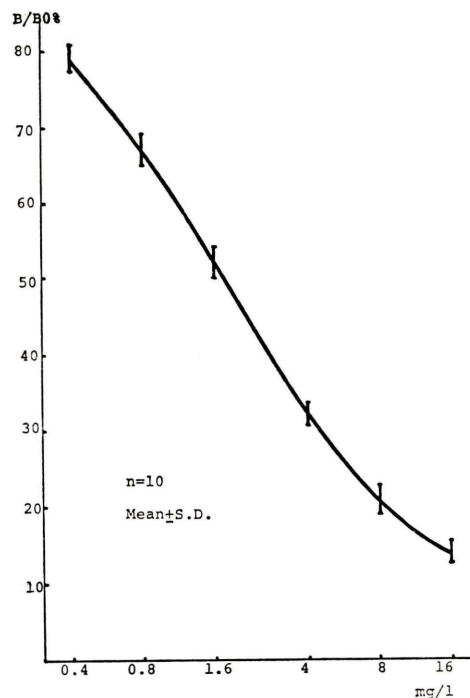


Fig. 2 Standard curve.

n=6	Serum A		Serum B		Serum C		Urine D		Urine E	
	mg/l	CV%	mg/l	CV%	mg/l	CV%	μ g/l	CV%	μ g/l	CV%
15 min.	1.7	2.4	2.6	2.6	5.9	7.8	180	6.8	350	6.3
30 min.	1.5	5.8	2.4	5.4	5.5	3.1	170	9.4	300	8.0
45 min.	1.6	2.8	2.6	4.4	5.4	7.7	210	9.1	350	3.9
60 min.	1.4	4.3	2.5	8.0	5.7	4.3	160	11.5	320	7.5
2 hrs.	1.4	5.0	2.5	2.7	5.4	2.7	160	9.0	320	5.7
19 hrs.	1.5	4.2	2.4	5.8	5.2	7.2	140	11.8	270	6.0

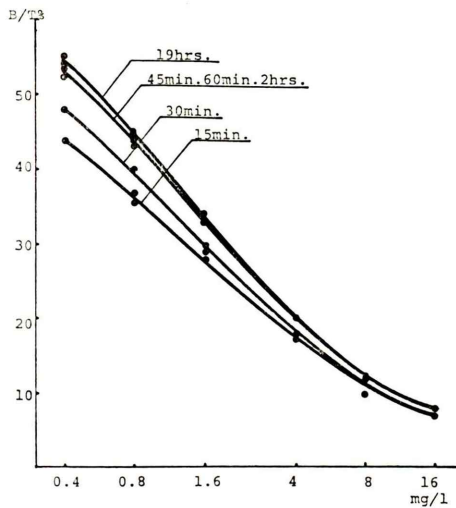


Fig. 3 Effect of incubation time on the standard curves.

n=6	Serum F		Serum G		Serum H		Urine I		Urine J	
	mg/l	CV%	mg/l	CV%	mg/l	CV%	μ g/l	CV%	μ g/l	CV%
4°C	1.4	5.9	2.6	3.3	9.1	3.5	320	5.6	3,100	3.6
25°C	1.3	7.3	2.6	6.3	8.5	6.2	320	4.5	2,800	7.3
37°C	1.4	4.9	2.6	3.7	8.7	4.7	360	10.1	3,200	7.8

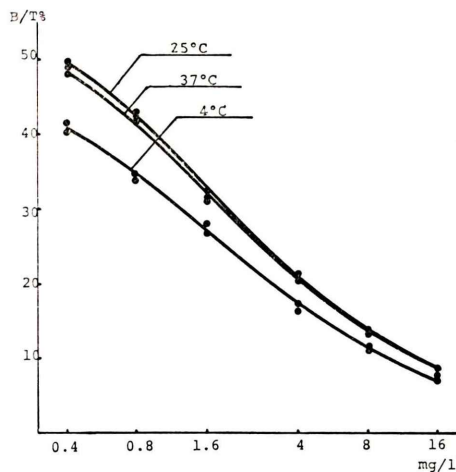


Fig. 4 Effect of incubation temperature on the standard curves.

Table 1 Intraassay reproducibility of serum and urine β_2 -microglobulin values

n=13	Serum K mg/l	Serum L mg/l	Serum M mg/l
Mean	1.3	2.5	8.2
S.D.	0.087	0.10	0.31
CV%	6.7	4.1	3.8

n=13	Urine N μ g/l	Urine O μ g/l	Urine P μ g/l
Mean	190	730	1700
S.D.	25	51	156
CV%	13.6	7.1	9.2

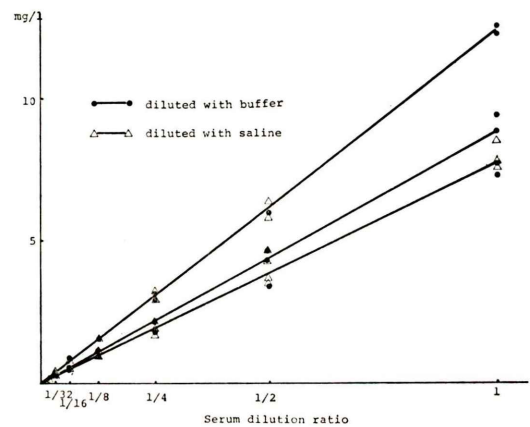


Fig. 5 Dilution test of three serum samples.

たが, 尿サンプルについては, CV が 10% を超えるものもあり, 濃度を問わず血清よりバラツキがおおきかった. ただし, 尿サンプルによる interassay は, pH 6 以上のものを分注後 -30°C 保存, 1 か月半に渡り行った. この間, 経時的な測定値の減少はみられなかった.

4) 回収率

3 種類の血清および 2 種類の尿に, キット添付の標準液を $50\ \mu\text{l}$ ずつ加えて行った回収率の結果を Table 3 に示す. 平均回収率は, 血清 100%, 尿 102% であった.

5) 希釈試験

3 種類の高濃度血清および尿を Phosphate buffer (牛血清アルブミンを含む) および 0.9% 生食で順次希釈した結果を Fig. 5, Fig. 6 に示す. 血清

Table 2 Interassay reproducibility of serum and urine β_2 -microglobulin values

Lot No.	Serum Q mg/l	Serum R mg/l	Serum S mg/l	Urine T μ g/l	Urine U μ g/l
831214	1.3	2.5	8.8	420	1,080
840113	1.4	2.7	8.2	450	1,030
840113	1.3	2.4	7.8	380	1,010
840113	1.4	2.7	8.1	450	980
840113	1.5	3.0	8.4	500	1,020
840113	1.3	2.7	8.7	330	890
840207	1.3	2.7	8.2	410	1,110
840207	1.4	2.7	7.8	440	1,040
840207	1.4	2.6	8.6	390	820
840223	1.4	2.6	8.8	470	1,030
Mean	1.4	2.7	8.3	420	1,000
S.D.	0.067	0.16	0.38	50	87
CV%	4.9	5.9	4.6	11.7	8.7

Table 3 Recovery

	Added mg/l	Measured mg/l	Calculated mg/l	Recovery %
Serum V	0	1.4	—	—
	0.4	1.9	1.8	106
	0.8	2.4	2.2	109
	1.6	3.1	3.0	103
	4.0	5.2	5.4	96
Serum W	0	2.6	—	—
	0.4	3.0	3.0	100
	0.8	3.4	3.4	100
	1.6	4.0	4.2	95
	4.0	6.2	6.6	94
Serum X	0	5.5	—	—
	0.4	5.9	5.9	100
	0.8	5.9	6.3	94
	1.6	7.0	7.1	99
	4.0	9.9	9.5	104
Mean=100%				
Urine Y	0	560	—	—
	0.4	980	960	102
	0.8	1,450	1,360	106
	1.6	2,220	2,160	103
Urine Z	0	1,190	—	—
	0.4	1,590	1,590	100
	0.8	2,010	1,990	101
	1.6	2,740	2,790	98
Mean=102%				

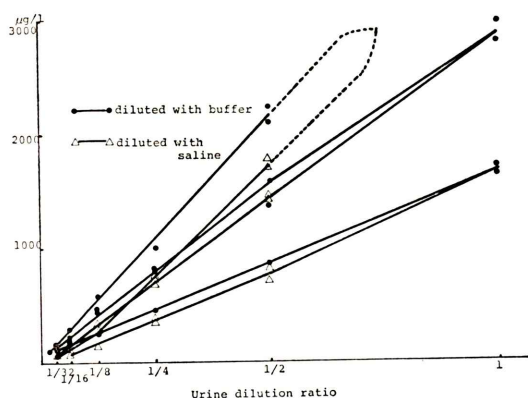
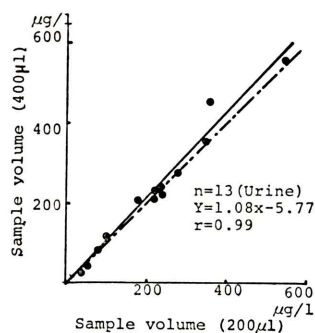
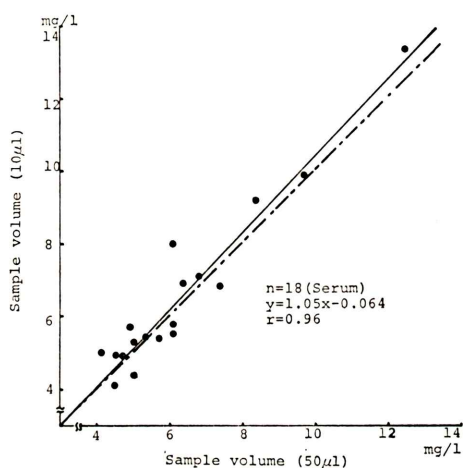
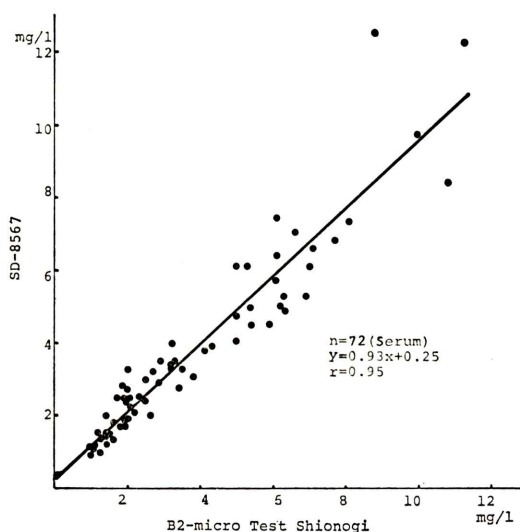


Fig. 6 Dilution test of three urine samples.

Fig. 8 Correlation of urine β_2 -microglobulin values between the original method (sample volume 200 μ l) and the modified method (sample volume 400 μ l).Fig. 7 Correlation of serum β_2 -microglobulin values between the original method (sample volume 50 μ l) and the modified method (sample volume 10 μ l).Fig. 9 Relationship between serum β_2 -microglobulin values measured by β_2 -micro Test Shionogi and SD-8567.

では、希釈液による差はみられず原点をとる直線が得られたが、尿の場合、生食希釈の方が緩衝液による希釈よりも低値であった。

6) 最少検出感度

0.4 mg/l の標準液を緩衝液で順次希釈し、バウンドカウント数の有意差検定を行った、危険率 1% で差があると認められる最少濃度は、0.1 mg/l であった。

7) 検体量による実測値の相関

本キットは、通常、血清 50 μ l、尿 200 μ l を使

用するため、測定範囲は、血中 β_2 -MG 0.4~16 mg/l、尿中 100~4,000 μ g/l である。しかし、日常検査において血中 β_2 -MG 16 mg/l 以上、尿中 β_2 -MG 100 μ g/l 以下の検体も少なくはない。本キットの内容には、緩衝液が含まれておらず高濃度検体を希釈測定することができないため、検体量を少なくすることにより上限を広げることができるかどうか原法との相関をもとめた。Fig. 7 に血清 10 μ l を用いた時の原法との相関を示す。r=0.96

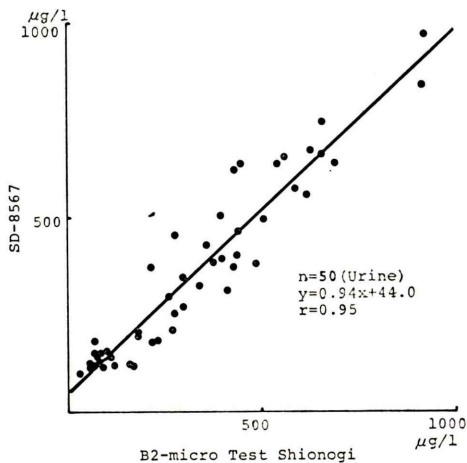


Fig. 10 Relationship between urine β_2 -microglobulin values measured by β_2 -micro Test Shionogi and SD-8567.

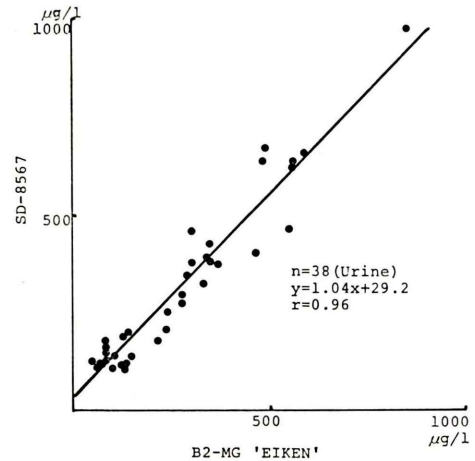


Fig. 12 Relationship between urine β_2 -microglobulin values measured by β_2 -MG 'EIKEN' and SD-8567.

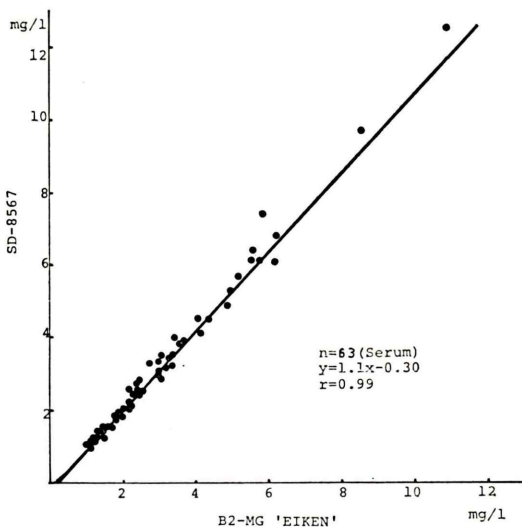


Fig. 11 Relationship between serum β_2 -microglobulin values measured by β_2 -MG 'EIKEN' and SD-8567.

であった。また、尿中 β_2 -MG に関しては、検体量を多くすることにより下限を上げることができるかどうか原法との相関をもとめた。Fig. 8 に尿 400 μ l を用いた時の原法との相関を示す。r=0.99 であった。両者とも原法と良好な相関を示すことから、血清 10 μ l 使用により上限は 80 mg/l まで

測定可能、尿 400 μ l 使用により下限は 50 μ g/l まで延長することができる。

8) 他キットとの相関

Figure 9 に、 β_2 -マイクロテストシオノギを用いて測定した血中 β_2 -MG 値の相関を示す。y=0.93x+0.25 (n=72) r=0.95 であった。Fig. 10 に同じく尿中 β_2 -MG 値の相関を示す。y=0.94x+44.0 (n=50) r=0.95 であった。Fig. 11 に、 β_2 -マイクログロブリン '栄研' を用いて測定した血中 β_2 -MG 値の相関を示す。y=1.1x-0.30 (n=63) r=0.99 であった。Fig. 12 に、同じく尿中 β_2 -MG 値の相関を示す。y=1.04x+29.2 (n=38) r=0.96 であった。

2. 臨床成績

1) 正常者ならびに慢性腎炎患者の血清および尿中 β_2 -MG 値

Figure 13 に正常例 25 例、慢性腎炎患者 30 例における血清および尿中の β_2 -MG 値を示す。正常者は、0.9~1.9 mg/l に分布し、平均値 1.3 ± 0.2 (S.D.) mg/l であった。慢性腎炎では、1.2 から 12.5 mg/l と広く分布したが、ほとんどの例が 2 mg/l 以上の高値を示した。その平均は、 5.6 ± 2.8 (S.D.) mg/l であった。また随意尿中 β_2 -MG 値は、正常例 20 例では、40 μ g/l から 201 μ g/l に分布し、

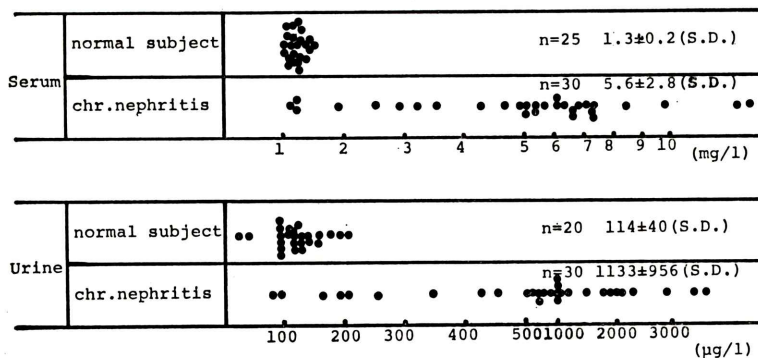


Fig. 13 Serum and urine β_2 -microglobulin concentration in normal subjects and chronic nephritis.

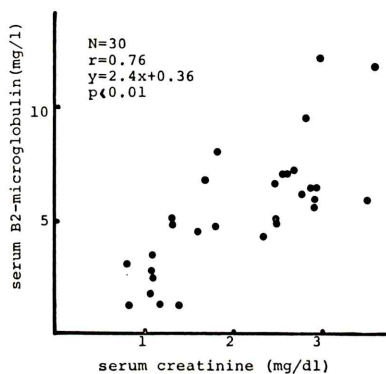


Fig. 14 Relationship between serum concentration of β_2 -microglobulin and creatinine in 30 cases with renal disease.

その平均は、 114 ± 40 (S.D.) $\mu\text{g/l}$ であった。慢性腎炎では、 $80 \sim 3,500 \mu\text{g/l}$ と血清に比較し、さらに広い分布を示した。その平均は、 $1,133 \pm 956$ (S.D.) $\mu\text{g/l}$ に分布した。

2) 慢性腎炎における血清 β_2 -MG 濃度と血清クレアチニン濃度の関係

Figure 14 に慢性腎炎 30 例の血清 β_2 -MG 濃度と血清クレアチニン濃度の関係を示すが、両者の間には、 $r=0.76$ の正の相関がみられた。

V. 考 案

β_2 -MG は、その臨床的意義も幅広く、依頼件数の多い項目のひとつである。現在使用している β_2 -マイクロテストシオノギは、血清、尿とも前

処理として希釈を必要とし、また結合率が10数%と低く、count error を少なくするためには、2分間測定を必要とすること、さらに3回の遠心洗浄操作など手技上も煩雑である。今回検討した本品は、マイクロセファローズに第二抗体を結合させている固相二抗体法であり、インキュベーション時間も短く、取扱い上、簡便なキットといえる。

基礎的検討について

まず、標準曲線に関しては、血清濃度 $0.4 \sim 16 \mu\text{g/l}$ の範囲を精度よく測定でき再現性もよい。インキュベーション時間は、45分でプラトーに達し、温度は、室温 ($15 \sim 30^\circ\text{C}$) でよく測定条件に幅がある。再現性に関しては、血清の場合は、同時再現性、日差再現性とも良好であるが、尿中 β_2 -MG では、変動がおおきかった。回収率は、血清、尿とも良好であった。希釈試験については、血清の場合、緩衝液、生食いずれで希釈しても原点をとる直線が得られたが、尿の場合、生食希釈においては、緩衝液による希釈直線を下方に平行移動したような直線が得られた。原因は明らかでないが、この測定系には、一定の蛋白濃度が必要と思われる。

測定範囲については、血清 $10 \mu\text{l}$ を使用することにより血中 β_2 -MG、 $80 \mu\text{g/l}$ まで測定可能、尿 $400 \mu\text{l}$ を使用することにより尿中 β_2 -MG $50 \mu\text{g/l}$ 以上を定量できる。キットの相関に関しては、 β_2 -マイクロテストシオノギ、 β_2 -マイクログロブリン

‘栄研’とも、ほぼ1:1に対応した。ただし、尿低値(100 $\mu\text{g/l}$ 以下)においては、両キットによる測定値に比べて高くでる傾向があった。以上、基礎的検討を通じ、尿中 $\beta_2\text{-MG}$ 量を正確に測ることの困難さが窺われた。検体側の問題として、ひとつには、尿中 $\beta_2\text{-MG}$ の安定性の問題があげられる。酸性尿、特に pH 5.2 以下では分解されやすく pH 5.5 以上の正常プール尿についての実験では、37°C、2時間、20°C、24時間、-20°C、4週間の保存ではほとんど変化がなく、pH 4では、-20°C (50% 残存) 以外は、ほとんど分解される^{5,6)}。との報告がある。筆者らの経験からも pH 5 の尿検体は、-30°C の保存にて、2週間後には、1/2~1/3 に分解されていたが、pH 6 の尿検体は、2か月後も測定値に変化なかった。次に、尿の混濁がある。尿中に排出される細菌、塩類、細胞により測定値に変動がみられる⁷⁾。第三には、尿中 $\beta_2\text{-MG}$ においては、日内、日差変動とも差が大きく、尿量、排泄時間により随意尿での測定値のバラツキは大きい⁸⁾。さらには、希釈試験の結果より、標準溶液と尿中の pH、塩濃度、蛋白量のちがいなども反応条件の違いとして考えられる。

臨床的検討について

慢性腎炎では、血清クレアチニンと良好な相関が認められた。これは、従来からの報告²⁾ とよく一致している。また尿中 $\beta_2\text{-MG}$ 値は、正確な尿量がわからないと、一日排泄量を求めることは困難であるが、今回の検討では、正常者と慢性腎炎患者では、一部重なりがみられるが大多数において慢性腎炎患者では尿中 $\beta_2\text{-MG}$ 値が上昇していた。

VI. 結 論

$\beta_2\text{-MG}$ 測定用キット「SD-8567」の基礎的、臨床的検討をし、以下の成績を得た。

1) 本法の手段は、簡便で、特に希釈を必要と

しないことは、ルーチン検査上、きわめて省力化と言える。

2) 室温 (15~30°C) で、45 分間のインキュベーションと短時間で検査が終了し再現性も良好であった。

3) 本法の測定成績は、慢性腎炎患者において血清クレアチニン値と良好な相関を示した。また、慢性腎炎患者では、ほとんどの例が随意尿中の $\beta_2\text{-MG}$ 値が高値を示した。

謝辞：本キットを提供して頂いたシオノギ製薬(株)に深謝いたします。

文 献

- 1) Berggard 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, Berggard I, et al: β_2 -microglobulin-a free immunoglobulin domain. *Proc Nat Acad Sci* **69**: 1697-1701, 1972
- 3) Nakamuro K, Tanigaki N, Pressman D: Multiple common properties of human β_2 -microglobulin and the common portion fragment derived from HL-A antigen molecules. *Proc Nat Acad Sci* **70**: 2863-2865, 1973
- 4) Tanigaki N, Nakamuro K, Appella E, et al: Identity of the HL-A common portion fragment and human β_2 -microglobulin. *Bioch Biophys Res Comm* **55**: 1234-1239, 1973
- 5) Evrin PE, Wibell L: The serum levels and urinary excretion of β_2 -microglobulin in apparently healthy subjects. *Scand J Clin Lab Invest* **29**: 69-74, 1972
- 6) Wibell L, Evrin PE: Urinary β_2 -microglobulin excretion in patients with renal disease-a study during augmented diuresis. Doctor thesis Univ Uppsala: 1-24, 1974
- 7) 中尾隆夫, 大沢 保: 混濁尿における $\beta_2\text{-MG}$ 測定値の変動について. *核医学技術* **3**: 9-10, 1983
- 8) 高橋和男, 高橋郁代, 大場操児: 血清および尿中 β_2 -Microglobulin の検討. *衛生検査* **31**: 1031-1034, 1982