血中および尿中 β_2 -microglobulin の臨床的研究†

—Radioimmunoassay による基礎的検討—

高杉昌幸, 廣田達哉, 長谷川 治, 木村耕太郎, 坂本 茂, 井林 博

九州大学医学部第3内科

812 福岡市東区馬出3-1-1

1977年4月9日受理

1. はじめに

β_2 -microglobulin (β_2 -m) は, 正常人の血清, 尿, 髄液, 初乳などに証明される¹⁾が, 血中 β_2 -m はほぼ自由に糸球体基底膜を通過し, 正常ではほとんどすべて尿細管で再吸収されるため^{2),3)}, 尿細管障害の鑑別に有用であるとされている^{3),4)}。また β_2 -m の化学構造は IgG の H 鎖上の constant domain C_H3 に酷似し^{5)~7)}, HL-A の small component と同じで⁸⁾, 自己免疫疾患や骨髄腫などの悪性疾患で高値を示すとの報告がみられるが^{9)~11)}, その生物学的機能や臨床的意義についてはなお不明の点が多い。

著者らは β_2 -m RIA の基礎的検討をおこない, 健康者および各種疾患で血中・尿中 β_2 -m を測定し臨床的検討を加えた。

2. 方法および対象

使用した RIA キット (Pharmacia 社) は抗 β_2 -m 抗体を Sephadex に結合させた固相法 RIA で, 検体の β_2 -m と 125 I- β_2 -m の競合作用により抗体と結合させ, 結合型と遊離型の分離は遠沈により簡単に行うことができる。

2.1 キットの組成および測定手技

1 キットは試験管50本分, duplicate で18検体用で, Sephadex-Anti- β_2 -m complex, 標準 β_2 -m, 125 I- β_2 -m, Tween 溶液, 緩衝剤が含まれている。被検血清, 尿

は緩衝液でそれぞれ200倍, 10倍に希釈, その後の測定操作は Table 1 のように原法に従った。

Table 1 Radioimmunoassay procedure for β_2 -microglobulin

Sample	(Serum 200×dilution) (Urine 10×dilution)	100μl
	+ 125 I- β_2 -m	100μl
	+ Sephadex-Anti- β_2 -m complex	100μl
↓		
Incubation (3 hrs, room temperature, on shaker)		
↓		
Washing 3 times	(+2ml 0.9% saline Cfg 2,000×g, 2 min Remove the supernatant to 5 mm from the bottom of the tube)	
↓		
Counting		
↓		
Calculation of the results		

2.2 実験方法および実験対象

基礎的検討として, 再現性, 血清・尿の保存条件, 特異性などについて検討した。臨床的検討として当科入院・外来の各種疾患106例を対象とし, 対照群は定期健康診断でタンパク尿陽性であった大学生38例(すべて一過性ないし体位性タンパク尿), 関連病院で脳卒中後リハビリテーション中の azotemia のない60歳以上の13例とした。

3. 成績

3.1 基礎的検討

3.1.1 標準曲線

室温 incubation で1.5, 3, 6, 12時間の零サンプルの結合型 β_2 -m のカウント数 B_0 と全カウント数 T の比

† Clinical Significance of Serum and Urinary β_2 -microglobulin. Masayuki TAKASUGI, Tatsuya HIROTA, Osamu HASEGAWA, Kotaro KIMURA, Shigeru SAKAMOTO and Hiroshi IBAYASHI: Third Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Kyushu University, Fukuoka 812, Japan.

Fig. 1 Standard curve for β_2 -microglobulin determination.

$B_0/T(\%)$ は 7, 10, 11.2, 11.5% で, 時間とともに結合率は増加するが, 3 時間以後の変化は小である。Fig. 1 に室温 3 時間 incubation による標準曲線を示す。変動係数 (CV) は 3.1~5.6% で良好な再現性を示した。

3.1.2 再現性

同一キット内, 各種濃度の 7 検体, 各 6 回測定による CV は 6.2~15.4%, 平均 10.6%, さらに異なるキ

Fig. 3 Chromatography on Sephadex G200 of 5ml serum and concentrated urine from a patient with tubular proteinuria. The distribution of protein in the eluent determined by the absorbance at 280 nm and β_2 -microglobulin by radioimmunoassay.

ット間で各種濃度 18 検体の duplicate 測定では CV 1.6~17.2%, 平均 8.3% であった。

3.1.3 血清・尿の保存による変化

血清および尿を 0.4M リン酸緩衝液 (pH 5.4, 6.4, 7.4, 8.0) で 200 倍および 10 倍希釈, 4°C 保存, 3, 7, 14, 21 日目に測定した。血清では pH 6.4 以上で 21 日目まで, 103~92%, 尿では pH 5.4, 1 時間で低下を示さず, 3~21 日で 71~82%, 他の pH では 21 日まで 100~90% であった。

3.1.4 特異性

慢性腎不全患者の血清, 濃縮尿を Sephadex G 200 でゲルろ過, 1.0M NaCl 加 0.1 M Tris-HCl 緩衝液, pH 8.0 で溶出させ, 各フラクションのタンパク量, β_2 -m を測定

Fig. 2 β_2 -microglobulin in serum and urine buffered to different pH levels and stored at 4°C for 21 days.

した。血清・尿試料とも β_2 -m はアルブミンより小分子域で単一ピークを示して検出され、他のタンパク部分では検出されない。

3・2 臨床成績

3・2・1 対照群

大学生38例の血中 β_2 -m は 0.94 ± 0.37 (Range 0.48 ~ 2.32) mg/l, 老年者13例では 1.32 ± 0.57 (0.20 ~ 2.5) mg/l, 大学生群の尿 β_2 -m 濃度は 59.4 ± 62.3 (8~230) μ g/l であった。

3・2・2 疾患群の血清 β_2 -m 濃度

慢性糸球体腎炎24例で 1.6 ± 0.6 (0.6~2.6) mg/l, ネフローゼ症候群 1.5 ± 0.5 (0.5~2.8) に対し、慢性腎不全群では平均 21.9 (2.5~98.3) mg/l と明らかに高値、痛風、SLE や尿細管性アシドーシスなどの自己免疫疾患、白血病や骨髄腫などに高値を示すものが多く、今回検索した慢性肝炎や肝硬変などでは異常値を認めなかった。

3・2・3 血清と尿 β_2 -m 濃度の関係

血清・尿同時測定慢性糸球体腎炎、慢性腎不全群についてみると、血中 β_2 -m 3mg/l 以下では尿 β_2 -m は正常範囲内、それ以上では血中濃度に比例して尿 β_2 -m 濃度は上昇している。これに対し尿細管性アシドーシスやネフローゼ症候群の一部では血中 β_2 -m に比して尿濃度が高く、尿細管再吸収障害を示しているものと考えられる。

Fig. 4 Serum β_2 -microglobulin concentration in various diseases.

Fig. 5 Correlation between serum and urinary β_2 -microglobulin.

4. 考 察

4・1 基礎的検討

本 RIA 法では3時間 incubation で、ほぼ6~12時間 incubation に近い B_0/T %が得られ、再現性のよい標準曲線を示すところから、室温、3時間の incubation で十分と考えられる。また Sephadex G 200 分画中の β_2 -m RIA では、血清・尿とも単一ピークを示して検出されるのみで、他のタンパクと交差反応を示さない特異性の高いアッセイ系であると考えられる。測定値の再現性はキットでの intraassay CV10.6%, interassay 8.3% で、ほぼ良好と考えられた。

4・2 臨床的検討

臨床的には健康人正常値として、Evrin らは血中濃度 1.5 ± 0.4 (1.0~2.0) mg/l, 尿中排泄量 73 ± 33 (30~140) μ g/日, 唾液中 1.1 ± 0.55 (0.3~2.4) mg/l と報告¹⁾, 血中 β_2 -m は年齢とともに漸増するが、性差を欠くので筋肉量とは無関係であるとし²⁾, 悪性腫瘍や膠原病・自己免疫疾患で有意の上昇をみることを指摘している³⁾。

われわれの成績では対照群大学生の血中 0.9 ± 0.4 , 老年者群 1.3 ± 0.6 mg/l と上記の報告と一致する。疾患群では慢性腎不全の全例に血中 β_2 -m 高値を認めたが、 β_2 -m は血清クレアチニン値と高い相関性を有するといわれ^{3), 13)}, 腎不全の指標となり得るものと考えられる。さらに白血病、骨髄腫などで血中 β_2 -m 高値を示すものが多く、造血細胞の増殖との関連が強く示唆され、SLE や尿細管性アシドーシスなどでも高値を示すものがあつたが、血中免疫グロブリン濃度との関

係は明らかでなかった。

尿中 β_2 -m について Peterson ら³⁾ は尿中のアルブミン/ β_2 -m 比が尿細管のタンパク処理の異常をよく表現すると強調しているが、われわれの成績では血中 β_2 -m が 3 mg/l を超えるまでは尿 β_2 -m 濃度は正常範囲にあり、血中濃度がそれ以上になると血中濃度に比例して β_2 -m 尿は上昇しており、この関係から血清・尿 β_2 -m 同時測定によって、尿細管障害を比較的早期に診断できるものと考えられる。

5. ま と め

固相法 β_2 -microglobulin RIA kit (Phadebas β_2 -micro Test) の基礎的、臨床的検討をおこなった。

測定可能濃度域は 3~96 μ g/l で、再現性、特異性ともに良好であった。

対照群の血中濃度 $1.0 \pm 0.5 (0.2 \sim 2.5)$ mg/l, 尿中濃度 $59 \pm 62 (8 \sim 230)$ μ g/l で、血中濃度は慢性腎不全では全例高値を示し、白血病、骨髄腫や自己免疫疾患で高値を示すものが認められた。尿中濃度は血中濃度が 3 mg/l を超えると血中濃度に比例して増加し、尿細管機能異常症例では血中濃度に比して尿中濃度が明らかに高値で、血中・尿中同時測定により尿細管機能異常の発見が可能であると考えられた。

文 献

- 1) Evrin, P.-E., et al.: *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **28**, 439 (1971)
- 2) Bernier, G.M., et al.: *Amer. J. Physiol.*, **217**, 1359 (1969)
- 3) Peterson, E.A., et al.: *J. Clin. Invest.*, **48**, 1189 (1969)
- 4) Wibell, L., et al.: *Nephron*, **10**, 320 (1973)
- 5) Cunningham, B.A., et al.: *Biochemistry*, **12**, 4811 (1973)
- 6) Peterson, E.A., et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **69**, 1697 (1972)
- 7) Smithies, O., et al.: *Science*, **175**, 187 (1972)
- 8) Nakamuro, K., et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**, 2863 (1973)
- 9) Evrin, P.-E., et al.: *Clin. Chim. Acta*, **43**, 183 (1973)
- 10) Kithier, K., et al.: *ibid.*, **52**, 293 (1974)
- 11) Shuster, J., et al.: *ibid.*, **67**, 307 (1976)
- 12) Evrin, P.-E., et al.: *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **29**, 69 (1972)
- 13) Bernier, G.M., et al.: *Nature*, **218**, 598 (1968)