技術報告

 β -Thromboglobulin リアキットの検討†

金森勇雄, 矢橋俊丈, 松尾定雄, 樋口ちづ子, 馬場健碩,

中野 哲, 水口一衛*, 野村和子*

大垣市民病院特殊放射線センター, *同病院集中治療室

503 大垣市南頰町 4-86

1983年 8月12日 受理

Key Words: β -thromboglobulin, radioimmunoassay

1. はじめに

血小板に特異的なタンパク質である β -thromboglobulin (β -TG) については, 血小板放出反応のさいに上昇し, 糖尿病, 虚血性心疾患, 脳血管障害, 子癇, 術後深部静脈血栓症などの血栓形成の傾向を有する疾患について諸家により多数の検索が行われている^{1)~3)}。

近年, この β -TG の測定用ラジオイムノアッセイ (RIA) キットが Amersham 社より開発され, 診断に用いられるようになってきている^{2)~4)}。今回われわれも, このキットを使用する機会を得, 本キットの基礎的検討を行ったので報告する。

2. 対象および方法

大垣市民病院を受診した患者の早朝空腹時に採血された血漿を対象とした。

採血は肘静脈より, 21G注射針, ポリエチレン注射器を使用し, 急激な採血を避け, 可能な限り駆血帯も使用せず, 静脈圧により吸引, 2.5ml の血液を採取し碎水中に静置冷却する。ついで, 可及的速やかに血漿を分離し-20°Cで保存, 測定時に室温に戻し二重測定で行った。

測定方法は Fig. 1 に示すとおりである。原理は β -

Fig. 1 Assay procedure of β -TG.

TG 特異抗体の結合部位に対する, β -TG と ^{125}I 標識 β -TG との競合反応を利用したものである。すなわち, 抗体と結合する ^{125}I β -TG の割合は検体中の β -TG 濃度に逆比例する。反応より生じた抗体結合 ^{125}I β -TG は硫酸溶液で沈殿させ, 遠心分離後に放射能を測定する⁵⁾。

検討事項は, 注射器内血液中 β -TG 値の経時的変化, すなわち採血は一般に病室, 外来採血室で行われるが, それらの採血条件により β -TG 値が変動することより, その経時の変化について検討した。また, 血漿分離は検査室内で行われるが, その血漿遠心分離時間の適否についても検討した。ついで, 標準曲線, インキュベーション条件, 同時および日差再現性, 回収率, 希釈試験, 正常域 (基礎値) についても検討した。

† Fundamental Studies of β -Thromboglobulin RIA Kit. Isao KANAMORI, Toshitake YABASHI, Sadao MATSUO, Chizuko HIGUCHI, Kenseki BABA, Satoshi NAKANO, Kazue MINAKUCHI* and Kazuko NOMURA*: Department of Radio-nuclear Medicine, *Intensive Care Unit, Ohgaki Municipal Hospital, 4-86, Minaminokawa-machi, Ohgaki-shi 503.

3. 結 果

3.1 注射器内血液中の β -TG 値の経時的変化

試料 A, B とともに 2~8 分の間ではほぼ安定したプラトー状態にあるが, 8~10 分の間では急激に β -TG 値が上昇する傾向が認められた (Fig. 2)。

3.2 血漿遠心分離時間の検討

遠心分離温度は 4°C に保った。サンプル C, D とともに 10~20 分の間では急激な β -TG 値の減少を示すが, 以後 20~40 分の間ではほぼ安定したプラトー状態が認められた (Fig. 3)。

3.3 標準曲線

11 回測定における各測定濃度の B/T % の mean $\pm$ S.D. は 10 ng/ml の濃度で 57.3 ± 2.8 %, 202 ng/ml の濃度で 15.5 ± 2.1 % であり, 良好な勾配の曲線が得られた。また, 各測定濃度での変動係数 (C.V.) は 4.8~13.3% の間にあり, 良好な成績が得られた (Fig. 4)。

3.4 インキュベーション条件

インキュベーション時間の検討は, 室温の設定条件で, 設定時間の延長に伴い, いずれの標準液, 検体ともにわずかず B/T % は上昇するが, 60~180 分の間ではほぼ安定したプラトー状態が認められた。

一方, インキュベーション温度の検討は, インキュ

Fig. 2 The variation of β -TG values due to time from withdrawal of blood to mixing in with EDTA and theophyllin.

Fig. 3 Effect of centrifugation time.

Fig. 4 Standard curve.

ベーション時間を60分と一定に設定した状態で, 設定温度が 4~45°C と変化しても B/T % は大きく変動せず, ほぼ安定したプラトー状態が認められる (Fig. 5)。

3.5 再現性

同時再現性の C.V. は試料 A, B, C でおおの 5.7%, 2.6%, 3.3% と良好な結果が得られた。一方, 測定日を変え, ロット番号の異なるキットを使用し

Fig. 5 Effect of incubation condition.

日差再現性の C.V. は試料 D, E, F でおおの 10.1%, 6.3%, 3.7%であり, ほぼ満足すべき良好な結果が得られた。

3・6 回収率

おおのの既知濃度の試料血清に β -TG 標準濃度液 10, 18, 44, 83, 202 ng/ml を添加測定したときの回収率は, 試料 A, B, C でおおの 81.1~100.8%, 85.6~121.1%, 81.7~124.4%の間にあり, 平均もおおの 93.5%, 107.1%, 104.8%であり, ほぼ満足すべき結果であった。

3・7 希釈試験

生食水での希釈は理論値よりかなりかけ離れた高値の測定値が得られ, 血小板プール血漿での希釈でも, 測定値はわずかではあるが理論値より高値を示す傾向が認められた (Fig. 6)。

Fig. 6 Dilution test.

3・8 正常域 (基礎値)

20~60歳の健常者と思われる当院職員での早朝空腹時の血中 β -TG 値は 16.8~56.9 ng/ml の間に分布し, mean $\pm$ S.D. は 35.3 ± 11.0 ng/ml ($n=48$) であった (Fig. 7)。

mean $\pm$ S.D. = 35.3 ± 11.0 ng/ml

Fig. 7 Concentrations of plasma β -TG in healthy subjects.

4. 考 察

血栓形成には, ①血管壁の性状の変化, ②血流の変化, ③血液性状の変化が関与するといわれ, 血栓形成準備状態を判定する有用な方法として, 最近では血小

板凝集能, 血小板自然凝集, 血小板寿命, 血小板放出反応などの血小板の各種機能検査が注目されている¹⁾。 β -TG は血小板中の α -顆粒の marker で, 放出反応にさいして循環血中に放出される血小板特異タンパクであり, RIA による血中 β -TG の測定は, *in vivo* における血小板反応の様相を把握し得るといわれている⁵⁾。

RIA による血中 β -TG の測定にさいしての採血時の溶血や過度のうっ血状態は, その値を異常高値にするといわれ⁴⁾, 採血時に一度で採血針が血管内に入らなかったり, 針が血管内膜を引っかいたりした場合は, 人工的に β -TG は異常高値を呈する⁶⁾。また, 採血条件 (時間や温度), 血漿遠心分離時間や温度により大きく影響を受けることから⁷⁾, 採血には細心の注意が必要である。今回われわれの検討でも, これらのことを再認識させられた。採血後に実施される血漿遠心分離時間も30分 (4℃) をある程度厳密に守ることが必要であることが示唆され, β -TG 測定用血漿の取り扱いには綿密な心がけが肝要であるといえる。

標準曲線の再現性は RIA の基礎であるが, われわれの検討での変動係数は 4.8~13.3% の間にあり RIA 系としては問題はないと考える。

インキュベーション条件は設定条件がある程度変動しても, 測定値に及ぼす影響は少なく, 操作性に優れているキットである。また, 同時再現性 (C.V.) も 2.5~4.0%²⁾, 3.8~5.0%⁴⁾, 日差再現性 (C.V.) は 8.1~11.1%²⁾, 2.98~17.9%³⁾ の報告があり, 回収率でも 110.3~127.8%²⁾, 80.4~123%⁵⁾ と報告されている。今回われわれの検討でもほぼ同様な結果が得られている。この点でも本キットにおける測定系上の問題点は少ないと考えられる。

希釈効果はほぼ理論値と一致し原点に収束される直線性を示す RIA キット^{8),9)}, これに反して希釈効果が明確に認められないキット^{10),11)}があるが, 本法は両者の中間的である。血小板プール血漿でも測定値は理論値より高値を示す傾向があることから, 希釈が必要な検体ではこの点を十分に考慮に入れて測定する必要があると考えられる。

一方, 正常域 (基礎値, mean $\pm$ S.D.) で松田ら¹²⁾は 34 $\pm$ 20 ng/ml で男女差はないが, 加齢とともに増加し 60歳台では 26 $\pm$ 16 ng/ml に比し, 80歳台では 41 $\pm$ 21 ng/ml であったと報告している。われわれの検討は

60歳以下であることから年齢による差は認められなかったが, 高齢者の正常域については今後とも検討をつづける必要があると考えている。

5. 結 語

今回われわれは β -TG リアキットの基礎的検討を行い, つぎのような結論を得た。

- (1) 標準曲線の再現性, 同時および日差再現性, 回収率はいずれもほぼ満足すべき結果が得られた。
- (2) インキュベーション時間は60分, 温度は室温で良好な測定結果が得られる。
- (3) 希釈による測定値は, 理論値よりやや高値を呈する傾向が認められる。
- (4) 正常域は 35.3 $\pm$ 11.0 ng/ml (mean $\pm$ S.D., $n=48$) であった。
- (5) 採血条件により β -TG 値は大きく影響を受ける。

以上のように, 本法は採血条件を正確に実施すれば, 再現性, 回収率等の基礎的検討の諸条件は優れていることから, 日常検査に十分活用し得るキットである。

文 献

- 1) 小久保光治: 日本外科学会雑誌, **82**, 717~30 (1981)
- 2) 橋本信雄, 埤本勝司: 現代医療, **11**, 1109~13 (1979)
- 3) 大熊稔, 他: 血液と脈管, **10**, 540~44 (1979)
- 4) 上原総一郎, 他: 医学と薬学, **1**, 409~15 (1979)
- 5) 与那原良夫, 他: *Geriatric Medicine*, **17**, 1259~65 (1979)
- 6) 松田保: 薬の知識, **30**, 13~17 (1979)
- 7) 金尾啓右, 他: *Radioisotopes*, **28**, 391~98 (1979)
- 8) 金森勇雄, 他: *Radioisotopes*, **32**, 175~78 (1983)
- 9) 金森勇雄, 他: *ibid.*, **32**, 245~48 (1983)
- 10) 金森勇雄, 他: 現代医療, **13**, 1011~20 (1981)
- 11) 金森勇雄, 他: *Radioisotopes*, **29**, 395~97 (1980)
- 12) 松田 保, 他: 血液と脈管, **10**, 562~66 (1979)