

# SRID法を用いた同一孔多検体同時測定による 尿中 $\beta_2$ -マイクログロブリンのマススクリーニングについて

赤司俊二、太原博史、片山 章、山本英明\*

埼玉県立小児医療センター 腎臓科、\*放射線部

## 1. 序 言

学校検尿の普及によって小児期の慢性腎炎の早期発見が可能となり、慢性腎炎の進展防止に多大な貢献をしている。小児期の慢性腎不全の基礎疾患として慢性腎炎の占める割合は年々減少し、現在小児慢性腎不全の基礎疾患として最も頻度の高いものは、両側性低形成腎、異形成腎、嚢胞腎、水腎症などの先天性腎尿路奇形である。<sup>1)</sup>先天性腎尿路奇形の臨床的特徴としては、腎機能障害が強くなるまで臨床症状が出現し難く、末期に見られる臨床症状も発育不全、貧血など特徴的なものが少ない。また尿所見も蛋白、血尿は腎機能が保たれている状態では出現し難く、低張尿による多尿、夜間尿が目立ってくる場合が多い。我々の施設で診断が確立されている先天性腎尿路奇形の尿所見をみても、約 $\frac{1}{3}$ には蛋白尿、血尿は認められておらず、比較的特徴とされている低張尿も保たれている症例が多い。一方、尿の低分子蛋白である $\beta_2$ -マイクログロブリン( $\beta_2$ -microglobulin; $\beta_2$ -m)濃度は全例正常値上限を大幅に上回っており、腎障害を来たすような先天性腎尿路奇形をスクリーニングするには蛋白尿、血尿あるいは尿比重を用いるより尿中 $\beta_2$ -mを用いることが適していると考えられる(表1)。著者らは尿中 $\beta_2$ -mのマス・スクリーニング導入について、測定法の簡便化と低コスト化を目的として、一元放射状免疫拡散法(single radial immunodiffusion method;SRID法)による同一孔多検体同時測定法を開発したので報告する。

## 2. 方法と対象

(1) SRID法による同一孔多検体測定の原理

## と測定方法

SRID法とは、寒天に抗体を混合したゲル平板と抗原試料との抗原抗体反応によって生じる沈降輪の面積を測定し、抗原濃度を換算する測定法である。<sup>2)</sup>本研究に使用した栄研化学(株)製SRID法測定キット(マイプレート $\beta_2$ -M“栄研”)の測定検出感度は $1000\mu\text{g/l}$ であり、正常児の尿中 $\beta_2$ -m濃度が約 $100\mu\text{g/l}$ であることより、正常児の約10倍以上の濃度でなければ沈降輪は形成されない。そこで、同一孔に多検体を分注し、沈降輪の生じた孔の検体についてのみ精密測定を行なうことによって、尿中 $\beta_2$ -mのスクリーニングが可能になるのではないかと考えた。

同一孔に複数検体を分注し、検体間での希釈を防止するには、前の検体が孔から寒天内に十分拡散し孔内に検体が残存していない状態で分注しなければならない。我々は、図1に示した如く検体の組み合わせにより同一孔10検体測定を試みた。その測定手順を次に示す。

① プレートの孔(A~J)に1から10までの尿検体をそれぞれ $10\mu\text{l}$ ずつ分注後、約10分間静置し、検体を寒天内に拡散させる。

② 同様の操作を繰り返し行ない、それぞれの孔に10検体を分注する。

③ 室温にて約48時間反応させる。

④ 観察箱にて沈降輪の直径を読み取る。

## (2) 対象とした材料

基礎的検討には、標準液として $\beta_2$ -m濃度を125,250,500,1000,5000,10000,20000,40000および $80000\mu\text{g/l}$ に生理食塩水にて濃度調製したものをを用いた。次に、埼玉県大宮市内小学1

年生の一次検尿 489 検体について尿中  $\beta_2$ -m のスクリーニングを試みた。同時に全検体の尿比重、蛋白および潜血反応、また一部検体についてはラジオイムノアッセイ法によって  $\beta_2$ -m の測定を行ない比較検討をした。

### 3. 成績

#### (1) 同一孔 10 検体測定の妥当性

高濃度  $\beta_2$ -m 精製抗原を用いて、80000  $\mu$ g/l から 125  $\mu$ g/l までの各段階の標準液を作成し、同一孔多検体同時測定の問題点を抽出して検討した。

#### 1) 多重分注における測定可能範囲の検討

同一孔に同一濃度の標準液を 1 回から 10 回分注し、生じた沈降輪の変化を図 2 に示した。 $\beta_2$ -m 濃度が 125  $\mu$ g/l および 250  $\mu$ g/l の標準液は、10 回重複分注しても沈降輪は認められなかったが、500  $\mu$ g/l の標準液では 3 回分注から沈降輪が出現した。一方、 $\beta_2$ -m 濃度が 1000  $\mu$ g/l 以上の標準液では 1 回の分注から沈降輪の直径はその分注回数に比例して拡大した。しかし、10000  $\mu$ g/l の標準液では 5 回までの重複分注で沈降輪が確認されたが、それ以上では沈降輪が確認されたが、それ以上では沈降輪が消失した。同様に、20000  $\mu$ g/l の標準液では 2 回まで、40000  $\mu$ g/l の標準液では 1 回の分注では沈降輪が確認されたが、それ以上の重複分注では消失した。また 80000  $\mu$ g/l の標準液では 1 回の分注でも沈降輪は認められなかった。したがって、同一孔に分注した 10 検体中 1 検体が高濃度  $\beta_2$ -m 尿であった場合の検出可能範囲は、1000 から 40000  $\mu$ g/l であった。

#### 2) 標準液の分注回数によって生ずる沈降輪の変化

同一孔に  $\beta_2$ -m 濃度が 1000  $\mu$ g/l の標準液を 1 回分注後、つづいて 125  $\mu$ g/l の標準液を 1 回から 9 回の分注に伴う沈降輪の変化をみると、1000  $\mu$ g/l に調整した標準液のみを 1 回分注した孔には、直径 7.4mm の沈降輪が生じたのに対して、その後 125  $\mu$ g/l の標準液を加えた試

料孔では、その分注回数に比例して拡大した沈降輪が生じた。

#### (2) 同一孔 10 検体同時測定法によるスクリーニングの実施

同一孔 10 検体同時測定法によるスクリーニングを試みた。測定した 489 検体 49 試料孔のうち、2 孔から沈降輪が認められた。ラジオイムノアッセイ法によって、沈降輪が認められた 2 試料孔、20 検体について尿中  $\beta_2$ -m の定量を行なったところ、正常値の 10 倍以上の濃度に相当する 2000 から 3000  $\mu$ g/l の  $\beta_2$ -m 異常高濃度尿 3 検体が発見された (表 2 中の p4456, 4466, 4739)。沈降輪の生じなかった 20 孔、197 検体についても尿中  $\beta_2$ -m の定量を行なったが、1000  $\mu$ g/l 以上の高値検体は認められなかった (図 3)。同時に測定した尿蛋白、潜血反応は 489 検体すべて異常検査所見は認められず、尿比重は 1003 から 1043 に分布していた。

### 4. 考察

$\beta_2$ -m は、分子量 11800 の低分子蛋白で、腎糸球体を容易に通過し、尿細管において大部分が再吸収され異化されるが、糸球体ろ過値が低下した場合や、尿細管障害では  $\beta_2$ -m の尿中への排泄が増加し、先天性腎尿路奇形では腎機能障害の程度に比して大量の  $\beta_2$ -m の尿中排泄が見られることが多い。 $\beta_2$ -m の測定は、大部分はラジオイムノアッセイ法で、一部分はエンザイムイムノアッセイ法で行なわれているが、マス・スクリーニングに導入するには導入するには多数の検体を測定しなければならず、これらの測定法ではその費用と労力は莫大なものになる。我々は、SRID 法による  $\beta_2$ -m 測定キットを用いて、同一孔多検体同時測定法を考案した。SRID 法による  $\beta_2$ -m の測定は、孔に検体を 10  $\mu$ l 分注し 2 日後に沈降輪を確認するだけの簡便な測定法で、作業の簡素化と低コスト化を図ったものである。本法では健康児の尿中  $\beta_2$ -m 濃度である 250  $\mu$ g/l 以下のものを、同一試料孔に 10 検体分注しても沈降輪は認められず、

その中に  $\beta_2$ -m 濃度  $1000 \mu\text{g/l}$  以上のものが 1 検体でも含まれていれば沈降輪が形成され、尿中  $\beta_2$ -m 高値検体のスクリーニングに応用可能なことが確認できた。一方、同一孔 10 検体同時測定法の問題点としては、同一孔に  $\beta_2$ -m 異常高濃度検体が複数検体分注された場合に沈降輪が消滅することと、尿中  $\beta_2$ -m 濃度が  $40000 \mu\text{g/l}$  以上の異常高値では沈降輪が、確認できないことおよび沈降輪の大きさが分注順序によって変化することが上げられる。前の 2 者の問題点は、抗原である  $\beta_2$ -m 濃度が抗体量に比し過剰量であるため最適比の抗原抗体結合物が形成されず、拡大した薄い沈降輪のため肉眼では検出できないものとする。しかし、本法の対象疾患の有病率から考えると尿中  $\beta_2$ -m 濃度が  $10000 \mu\text{g/l}$  を超える異常高値が 10 検体中に 1 検体以上存在する可能性は極めて少ないものと考えられ、また尿中  $\beta_2$ -m 濃度が  $40000 \mu\text{g/l}$  以上の異常高値検体の見落としは、反応時間の途中 (24 時間後) で沈降輪の有無を認識することによって防止することが可能である。分注順序による沈降輪の変化は、スクリーニングのための定性には問題とならない。

我々が試験的に実施した小学 1 年生 489 例では、49 試料孔中 2 孔に沈降輪が生じ、3 例の尿中  $\beta_2$ -m 異常高値検体が発見された。同時に行なった尿比重は各々 1032、1031 および 1025 で、尿蛋白、血尿は 3 例とも陰性であった。この 3 例の病態については不明であるが、少なくとも尿比重、蛋白および血尿ではスクリーニングできなかった低分子蛋白尿のスクリーニングが可能であることが確認できた。また本法でスクリーニングされなかった 197 検体の尿中  $\beta_2$ -m の定量を行なったところ、尿中  $\beta_2$ -m が  $1000 \mu\text{g/l}$  以上のものが 1 検体中存在しなかったことより、本法のマス・スクリーニングへの適用の妥当性が裏づけられた。尿中  $\beta_2$ -m が高値となる態は必ずしも先天性腎尿路奇形ばかりではなく、間質性腎炎、各種の機能的尿細管疾患、重金属中毒、腫瘍性疾患などが疑われ、その疾患

の診断は慎重に行なう必要がある。

先天性腎尿路奇形の起因する慢性腎不全は、特徴的な臨床症状あるいは蛋白尿、血尿などの異常所見が出現しにくく、比較的末期になるまでその存在に気付かないものが多い。近年、保存期慢性腎不全の進行が食事療法あるいは腎不全の進行が食事療法あるいは腎不全状態そのものの是正により、防止できることが指摘されている。<sup>3)</sup> 腎機能障害を来たすような先天性腎尿路奇形の大部分は、根治的治療は望めないが、早期に発見し全身管理を行なうことにより透析導入時期を遅らせることができれば、発達期にある小児にとって身体面ばかりでなく、生活面にも利点が多く、また経済面から考えても有用なことを考えられる。学校検尿の普及により、小児期では慢性腎炎に起因する慢性腎不全の移行が減少している現在、もう一つの大きな原因である腎尿路奇形の早期発見に対してこの尿  $\beta_2$ -m スクリーニングは有効な手段になるものと思われた。

表 1 16 例の先天性腎尿路奇形における臨床所見と検査所見

diagnosis	case	c.c.	onset age y/m	Ser. mg/dl	prot.	occult	urinalysis	$\beta_2$ -micro. $\mu\text{g/l}$	$\beta_2$ -cr $\mu\text{g/mg}$
	1	gr.	2.6	1.5	-	-	1013	3923	14
	2	gr.	0.3	2.1	±	-	1010	39000	83
	3	gr.	0.4	2.5	+	±	1007	33150	237
	4	gr.	0.3	1.7	+	+	1010	43000	430
Hypoplastic kidney	5	gr.	0.6	2.4	±	-	1009	23250	332
	6	glucosuria	3.0	1.0	-	-	1015	4884	11
	7	gr.	5.2	2.2	-	-	1004	20880	149
	8	gr.	6.2	2.0	+	-	1015	28400	73
	9	gr.	3.7	2.9	+	-	1006	19100	51
	10	glucosuria	5.9	1.6	-	-	1012	24500	88
	11	gr.	1.6	1.4	+	-	1013	32200	79
Polycystic kidney	12	gr.	0.9	1.7	-	-	1010	27500	63
	13	gr.	5.7	3.4	±	±	1009	17030	199
Hydro nephrosis	14	UTI	1.0	1.4	±	-	1014	2050	27
	15	UTI	0.4	1.1	±	±	1018	1131	11
	16	UTI	0.6	1.2	+	±	1008	4400	15

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
91	92	93	94	95	96	97	98	99	100

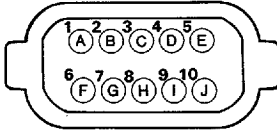


図1 SRID法による同一孔10検体同時測定

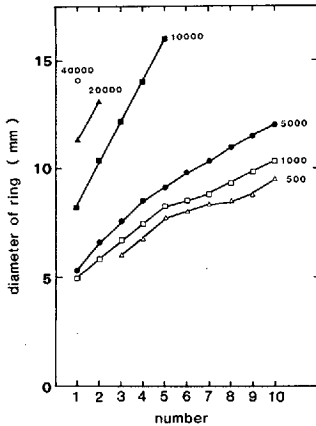


図2 同一孔多検体同時測定における標準液の重複分注での検出可能範囲

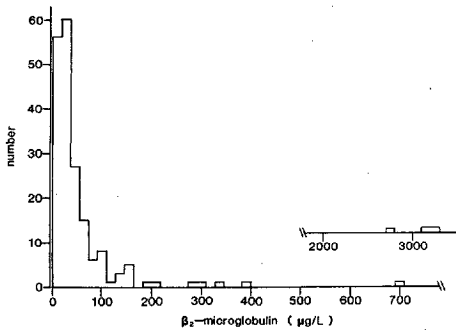


図3 6~7歳児の尿中 $\beta_2$ -microglobulin濃度分布

表2 分注した10検体の検査所見

1-2

n	p-no	$\beta_2$ -m (µg/L)	$\alpha_1$ -m (mg/L)	s.g.	prot.	occult.
1	4446	21.7	-	1029	-	-
2	4456	2700.2	3.8	1032	-	-
3	4466	3270.2	4.4	1031	-	-
4	4476	9.9	0.4	1023	-	-
5	4486	8.5	0.5	1033	-	-
6	4496	53.1	0.2	1018	-	-
7	4506	-	0.3	1032	-	-
8	4516	18.1	0.3	1034	-	-
9	4526	23.7	0.7	1024	-	-
10	4536	33.8	0.7	1016	-	-

3-5

n	p-no	$\beta_2$ -m (µg/L)	$\alpha_1$ -m (mg/L)	s.g.	prot.	occult.
1	4649	11.5	0.4	1035	-	-
2	4659	36.5	0.4	1013	-	-
3	4669	6.0	0.7	1024	-	-
4	4679	5.2	0.5	1025	-	-
5	4689	46.3	0.4	1023	-	-
6	4699	49.4	0.8	1019	-	-
7	4709	67.0	1.6	1018	-	-
8	4719	99.2	0.8	1019	-	-
9	4729	205.5	0.6	1038	-	-
10	4739	2137.0	3.7	1025	-	-

## 5. 文 献

- 1) 伊藤克己: 本邦における透析患児の現況、小児腎不全研究会誌 5;212~217, 1985.
- 2) 右田俊介: 一元放射状免疫拡散法の実施、臨床検査 20;259~271, 1976.
- 3) 望月 弘、他: 慢性腎不全の食事療法におけるリン制限の意義について、小児腎不全研究会誌 5;194~198, 1985.



## 検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



### 1. 序言

学校検尿の普及によって小児期の慢性腎炎の早期発見が可能となり、慢性腎炎の進展防止に多大な貢献をしている。小児期の慢性腎不全の基礎疾患として慢性腎炎の占める割合は年々減少し、現在小児慢性腎不全の基礎疾患として最も頻度の高いものは、両側性低形成腎、異形成腎、嚢胞腎、水腎症などの先天性腎尿路奇形である。先天性腎尿路奇形の臨床的特徴としては、腎機能障害が強くなるまで臨床症状が出現し難く、末期に見られる臨床症状も発育不全、貧血など特徴的なものが少ない。また尿所見も蛋白、血尿は腎機能が保たれている状態では出現し難く、低張尿による多尿、夜間尿が目立ってくる場合が多い。我々の施設で診断が確立されている先天性腎尿路奇形の尿所見をみても、約 1/3 には蛋白尿、血尿は認められておらず、比較的特徴とされている低張尿も保たれている症例が多い。一方、尿の低分子蛋白である 2-マイクログロブリン( 2-microglobulin: 2-m)濃度は全例正常値上限を大幅に上回っており、腎障害を来たすような先天性腎尿路奇形をスクリーニングするには蛋白尿、血尿あるいは尿比重を用いるより尿中 2-m を用いることが適していると考えられる(表 1)。著者らは尿中 2-m のマス・スクリーニング導入について、測定法の簡便化と低コスト化を目的として、一元放射状免疫拡散法(single radial immunodiffusion method:SRID 法)による同一孔多検体同時測定法を開発したので報告する。