

12) 赤血球凝集反応による人ミオグロビンの微量測定と 各種ミオパチーにおける血中、尿中ミオグロビン量

三 好 和 夫*

研究協力者 川井 尚臣* 長田 淳一* 岩朝 勝*
日下 香苗* 日浅 光春* 多田 嘉明*
佐々木尚子* 住友 辰次*

はじめに

進行性筋ジストロフィー症をはじめ、各種のミオパチーでは持続的は筋細胞の融解、すなわち、myolysisが特徴とされ、血中に異常に多量のCPKなどの酵素の流出がみとめられるが、このような状態における筋細胞中のミオグロビンの流出態度の如何は非常に大きな関心のあるところである。

私達は、これまで、進行性筋ジストロフィー症をはじめ、各種のミオパチー症例における血中ならびに尿中ミオグロビン(Mb)量の微量定量法の確立に多大な努力をつづけてきたが、今回、affinity chromatographyを用いて抗人Mb抗体を精製し¹⁾この抗Mb抗体をヒツジ赤血球に感作、これを用いて赤血球凝集反応をおこなうことを創案し、微量Mbの測定という当初の目的を達成することができた。また、この方法によって、筋ジストロフィー症をはじめ、各種のミオパチー、ならびに心筋硬塞、外科手術例、その他における血中、尿中のMbの成績をえた²⁾

資料と方法

被検資料は、筋ジストロフィー症、Duchenne型病者(11例、8~16才)と女性保因者(5例)、肢帯型(2例)、多発性筋炎(5

例)、ミオグロビン尿症(1例)、心筋硬塞(6例)、外科手術例(3例)、その他、脊髄性進行性筋萎縮症、重症筋無力症、周期性四肢麻痺、Kugelberg-Welander病などの血液(血清)と、尿であり、健常人のそれらを対照として検索した。

Mbの測定には、赤血球凝集反応による微量測定法を用いたが、ヒツジ赤血球感作用の精製抗人Mb抗体をaffinity chromatographyによって自製の抗人Mb家兔血清から分離して用いた。人Mbは人屍骨格筋よりSinger法、およびsephadex G-75 column chromatographyにより抽出し、精製した。ついで、この精製Mbで家兔を感作し、抗人Mb家兔血清をえた。精製抗人Mb抗体は、まず、この抗血清からDEAE-cellulose column chromatographyにより、 γ -globulinを分離し、これを別にCN-Br-activated sepharose 4Bとカプリングさせておいた精製Mbと反応させた後、1Mプロピオン酸pH3.0で溶出して作製した。

赤血球凝集反応の実施は、えられた抗Mb抗体(0.1mg/ml)をホルマリン固定タンニン酸処理ヒツジ赤血球に感作し、この感作赤血球を用いて、適当に稀釈した血清および尿と反応させて行ない、凝集結果を判定した。

* 徳島大学医学部第一内科

結 果

精製抗人 Mb 抗体の検定：

抗 Mb 家兔血清より DEAE-column chromatography (pH7.2 0.01M) で分離した γ -globulin 分画から既述の方法でえた抗 Mb 抗体 (Fr. II) は、初め用いた γ -globulin の約 5% であった。この精製抗 Mb 抗体 (Fr. II) の抗体活性を精製 Mb を使って、Ouchterlony 法で検索した結果、Mb との間には一本の沈降線が認められ、精製抗 Mb 抗体 (Fr. II) には抗体活性のあることを確かめた。本法による Mb の検出感度：

本法による Mb 検出感度を知るために、2つの方法すなわち、精製 Mb とミオグロビン尿症症例の血清と尿について検討を行なった。まず精製 Mb を 0.75% 牛血清アルブミンで 10 倍稀釈し $1 \text{ mg/ml} \sim 10^{-8} \mu\text{g/ml}$ の Mb 濃度列を作り、各々の 0.5 ml を凝集反応用トレーにとり、感作血球 2.5% 浮遊液 2 滴と混合して、6 時間後観察の結果はつぎのごとくであった。すなわち、Mb 濃度が $10 \sim 10^{-3} \mu\text{g/ml}$ のところで smooth mat 状の凝集がみられ、また $1 \text{ mg/ml} \sim 0.1 \text{ mg/ml}$ の Mb 濃度の高いところでは明らかなプロゾーン現象が認められた。この結

表 1 抗人 Mb 抗体感作赤血球凝集反応による血清および尿中ミオグロビンの検索成績表

病 患 名	血 清			尿		
	例数	陽性	陽性率	例数	陽性	陽性率
PMD: Duchenne 型	9	0	0/9	11	0	0/11
同女性保因者				5	0	0/5
肢帯型				2	0	0/2
ミオグロビン尿症	1	1	1/1	1	1	1/1
外科手術例	1	1	1/1	3	2	2/3
多発性筋炎	4	2	2/4	3	0	0/3
心筋梗塞	7	2	2/7	3	0	0/3
溶血性貧血				1	1	1/1
Kugelberg-Welander 病				2	0	0/2
重症筋無力症	1	0	0/1			
周期性四肢麻痺	1	0	0/1			
腎臓性進行性筋萎縮症	1	0	0/1			
健康人	3	0	0/3	3	0	0/3
計	28	6	6/28	34	4	4/34

果は本法による Mb 検出感度が 1 mg/ml であることを示している。

ついで 1 例のミオグロビン尿症患者 (本例の資料は東大病院杉田講師を通して入手したものである。) の血清と尿を 10 倍の倍数稀釈して、同様にこの方法で検索したが、血清では上と同じ感度に、尿中ではわずかに低感度に Mb を検出することができた。

各種疾患症例での成績 (表 1)：

1) 対照としての健康人では、現在までの成績では、血清中、尿中ともに Mb を検出することができなかった。

2) 前述のミオグロビン尿症 (1 例) では血清、尿ともに Mb が陽性、とくに尿中には 2×10^3 倍まで陽性であった。尿中の Mb の検出感度は僅かに低下することを考慮すると、この患者の尿中ミオグロビン量は $100 \mu\text{g/ml}$ と計算される。

3) 外科手術例では血清 1 例 (開胸術) に陽性、尿 3 例中 2 例に陽性。多発性筋炎は、血清 4 例中 2 例に陽性、しかし、尿は 5 例全例陰性であった。後天性溶血性貧血 (1 例) では、尿のみ検索をおこなったが陽性であった。

4) これらに対し、筋ジストロフィー症 Duchenne 型 (11 例、8~16 才)、同女性保因者 (5 例)、肢帯型 (2 例) では血清中、尿中いずれにも Mb は検出されなかった。

5) その他、重症筋無力症、脊髄性進行性筋萎縮症、Kugelberg-Welander 病、周期性四肢麻痺の血清あるいは尿のいずれかを検索したが Mb はすべて陰性であった。

考 察

人の血液や尿中の Mb の微量測定法を新しく開発して、これによるいくつかの病態における陽性成績を示し、併せて、Duchenne 型病者と女性保因者を主とする筋ジストロフィー症における陰性結果を示した。

1) まず、Mb 測定に関する方法についてであるが、最近では、主として心筋硬塞などの診断や病態の把握のため、患者血中、および尿中の微量ミオグロビンの測定が試みられるよ

うになった。微量 Mb 測定法としては従来 Ouchterlony 法、一元平板免疫拡散法²⁾がおこなわれていたが、検出感度は $5 \mu\text{g/ml} \sim 10 \mu\text{g/ml}$ であった。最近、Kagen³⁾らは、補体結合反応を利用して人血清中および尿中 Mb の測定を行い、 $0.1 \sim 0.3 \mu\text{g/ml}$ の感度で試料中の Mb を検出している。Mb の検出法としては、その他 radioimmunoassay による方法なども考案され 1 ng/ml の感度で Mb を検出することができる。

これらの方法の内、測定感度のよいのは Kagen の方法と radioimmunoassay であるが、前者は、著者らが追試実験した結果では、安定性に乏しく、一般臨床検査としてはおこなない難い。また感度も $0.1 \mu\text{g} \sim 0.3 \mu\text{g/ml}$ である。また後者は、特殊な装置や場所が必要であり、結果が出るまでに長時間を有する、などの欠点がある。

今回著者らが開発した、抗 Mb 抗体を抽出分離し、これを使用しての抗 Mb 抗体感作ヒツジ赤血球凝集反応をおこなう方法は、比較的短時間で、簡単に人血清中ならびに尿中の微量の Mb を測定する方法であり、その感度は 1 ng/ml と、radioimmunoassay 法と同じレベルである。この方法では資料を倍数稀釈することによって、Mb を定量的に表現することもできる。

2) 本法による各種の疾患の血清中ないしは、尿中ミオグロビンの測定結果。本法によって、ミオグロビン尿症、多発性筋炎、外科手術例、心筋硬塞、溶血性貧血などの血清中ないし尿中に Mb を検出することができた成績は文中に示した。しかし、筋ジストロフィー症 Duchenne 型 (血中 C P K 活性 $300 \sim 500$ 単位)、その女性保因者、肢帯型では、血清、尿中ともに 1 ng/ml の感度測定によっても Mb は陰性であった。

血清 C P K などの血中酵素活性が著明に高い筋ジストロフィー症 Duchenne 型において血清ならびに尿中 Mb が検出されなかったことは、予想外の結果であるが、本症の病因を考える上で非常に興味深い。本症で血中ない

し尿中に Mb の検出できない理由としては、Mb の分解ないし排泄 (分子量が小さいため) が他の酵素と比較して速いなども考えられるが、Mb 生成不良説 (当教室) を裏付けている成績であるかも知れず検索を進めたい。

結 論

1) 家兎の抗人 Mb 血清から affinity chromatography を用いて抗 Mb 抗体を純粋に分離し、これによって感作したヒツジ赤血球を用いる赤血球凝集反応によって、人 Mb (血中、尿中) を微量測定する方法を創案、開発した。本方法の感度は 1 ng/ml であり、資料の稀釈倍数によって Mb 量を定量的に表現することができる。

2) 本法による各種疾患症例の成績では、ミオグロビン尿症、多発性筋炎、外科手術例、心筋硬塞、溶血性貧血などの血清ないし尿中 Mb を検出できた。しかし、筋ジストロフィー症 Duchenne 型、その女性保因者、肢帯型では血清、尿中とも Mb は陰性であった。

3) 血中 C P K の顕著な流出がみられるにもかかわらず、筋ジストロフィー症 Duchenne 型で血清中、尿中に Mb が検出されないことは興味深い。多発性筋炎、外科手術例、その他では Mb が検出される。このことは筋ジストロフィー症 Duchenne 型における Mb 生成の不良であることを示唆するものかも知れず検索を進めたい。

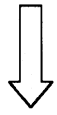
文 献

- 1) Boegman, R.J. : Comparison of immunoadsorbents prepared by coupling sperm-hole myoglobin to a variety of insoluble polymers, *Biochem.J.*, 120 : 373~379, 1970
- 2) Saranchak, H.J., and Bernstein, S.H. : A new diagnostic test for acute myocardial infarction. The detection of myoglobinuria by radial immunodiffusion assay. *JAMA*, 228 : 1251~1255, 1974
- 3) Kagen, L.J. et al : Myoglobinemia following acute myocardial infarction, *Amer.*

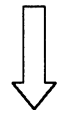
J. Med, 58 : 177~182, 1975

回日本神経学会総会, 1976年5月発表予定

4) 三好和夫, 川井尚臣, 長田淳一, 他 : 第17



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



はじめに

進行性筋ジストロフィー症をはじめ,各種のミオパチーでは持続的は筋細胞の融解,すなわち,myolysis が特徴とされ,血中に異常に多量の CPK などの酵素の流出がみとめられるが,このような状態における筋細胞中のミオグロビンの流出態度の如何は非常に大きな関心のあるところである .