

《ノート》

## ラジオイムノアッセイによる血清胆汁酸の測定

—キットの基礎的検討および臨床応用—

Measurement of Serum Bile Acid Concentration by Radioimmunoassay

—Fundamental Evaluation and Clinical Application of Glycocholic Acid RIA Kit—

西野 執\* 成木 行彦\* 大塚 幸雄\*

Mamoru NISHINO, Yukihiko NARUKI and Sachio OTSUKA

The First Department of Internal Medicine, Toho University School of Medicine

## I. 緒 言

胆汁酸はコレステロールから肝臓において特異的に合成され、腸肝循環を行っている。肝で合成された一次胆汁酸、すなわちコレール酸とケノデオキシコレール酸が胆汁中に排泄され腸内細菌により7- $\alpha$ 脱水酸化を受け二次胆汁酸、すなわちデオキシコレール酸およびリトコレール酸となり腸管より吸収され門脈を経て肝へ帰る。胆汁酸はグリシンまたはタウリンのようなアミノ酸と抱合しており、ごく一部は硫酸抱合型として存在している。また一次胆汁酸は総胆汁酸の75~80%を占めている。

血中胆汁酸のレベルは主として肝臓での胆汁酸の摂取能、腸管からの吸収などによりコントロールされているが肝胆道疾患においては血中胆汁酸レベルの異常上昇が以前から知られていた<sup>1~4)</sup>。

血中胆汁酸レベルの測定を肝機能検査として役立てようとする試みは古くから行われてきたが、従来のガスクロマトグラフィー<sup>5)</sup>による方法は、かなりその測定操作が複雑であり、また手法上臨

床で多数の試料をスクリーニング的に処理することは困難である。1973年Simmonds<sup>6)</sup>らはグリココール酸に対するRadioimmunoassayを確立し肝疾患の診断予後に血中胆汁酸レベルが有用であると報告している。

今回、われわれは栄研イムノケミカル研究所のグリココールRIAキットを入手したので基礎的検討および臨床的応用の可能性を検討したので報告する。

## II. 対象および方法

対象は東邦大学医学部付属大森病院で諸検査ならびに肝生検、手術、剖検による組織学的検査により診断された急性肝炎14例、慢性肝炎46例、肝硬変症49例、原発性肝癌9例、胆石症20例、閉塞性黄疸20例ならびに健常者20例の総計184例である。

## 測定法

## 1) キットの内容

グリココール酸RIAキット(70テストキット、35検体用)で内容は以下の如くである。<sup>125</sup>I-グリココール酸：<sup>125</sup>Iでラベルされたグリココール酸(1 $\mu$ Ci以下)1バイアル。

**Key words:** Glycocholic acid, Radioimmunoassay, <sup>125</sup>I-glycocholic acid, Hepato-biliary disease.

\* 東邦大学医学部第一内科

受付：57年3月3日

最終稿受付：57年5月20日

別刷請求先：大田区大森西5-21-16 (番143)

東邦大学医学部第一内科

西野 執

抗グリココール酸血清：抗グリココール酸家兎血清凍結乾燥品 1 バイアル。

標準グリココール酸血清：16 n mol/ml グリココール酸 1 バイアル。

グリココール酸フリー血清：グリココール酸馬血清 1 バイアル。

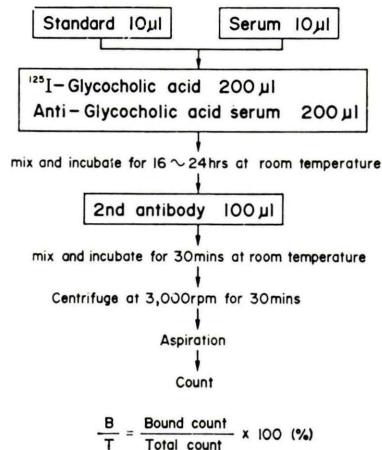


Fig. 1 Assay procedure.

第二抗体：抗家兎 IgG 山羊血清 1 バイアル。

## 2) 測定操作法 (Fig. 1)

(1) 7 水準の標準血清および被検血清 10  $\mu$ l を duplicate に栄研 2 号チューブに入れる。

(2) 全てのチューブに  $^{125}\text{I}$ -グリココール酸 200  $\mu$ l を、次いでグリココール酸抗血清 200  $\mu$ l を分注して混合する。

(3)  $25^\circ\text{C}$  で 16~24 時間 incubate する。

(4) 全てのチューブに第 2 抗体 100  $\mu$ l を分注してよく混合する。

(5)  $25^\circ\text{C}$  で 30 分間 incubate する。

(6) 3,000 rpm で 30 分間遠心分離を行い、上清を吸引除去する。

(7) 加えた放射能 (T), 各チューブの放射能 (B) をウェル型シンチレーションカウンターにて測定し次の式を用いて B/T を計算する。

$$\frac{B}{T} = \frac{\text{Bound count}}{\text{Total count}} \times 100 (\%)$$

各標準血清の B/T の二重測定による平均値を片対数グラフにプロットして検量線を作製し、被験

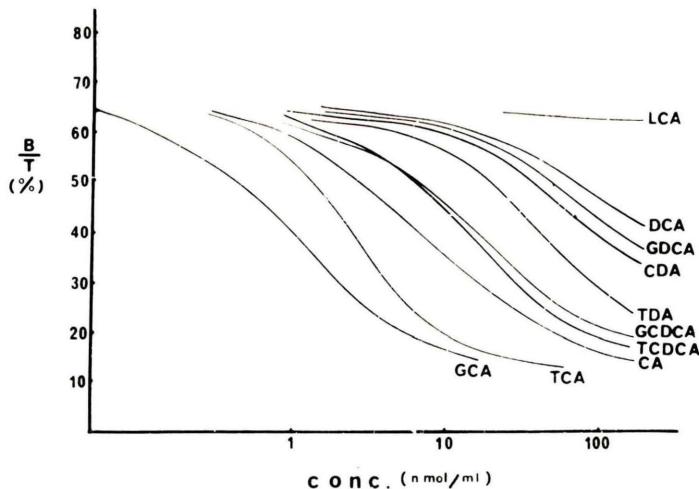


Fig. 2 Cross reaction.

The studies were performed about various bile acids such as glycocholic acid (GCA), taurocholic acid (TCA), cholic acid (CA), taurochenodeoxycholic acid (TCDCA), glycochenodeoxycholic acid (GCDCA), taurodeoxycholic acid (TDA), chenodeoxycholic acid (CDA), glycodeoxycholic acid (GDCA), deoxycholic acid (DCA), lithocholic acid (LCA).

血清の B/T を検量線に照合して グリココール酸の値を求める。

### III. 成 績

#### 1. 抗体の生物学的特異性

抗グリココール酸血清は Fig. 2 の如くグリココール酸と 100%, コール酸と 14.4%, タウロコール酸と 44.7%, デオキシコール酸 0.4%, グリコデオキシコール酸 6.6%, ケノデオキシコール酸 0.9%, グリコケノデオキシコール酸 6.6%, タウロケノデオキシコール酸 8.2%, リトコール酸, グリコリトコール酸, タウロリトコール酸とは 0.1% 以下の交差反応を呈した (Fig. 2).

#### 2. インキュベーション時間と温度

1) 第一抗体の結合率の推移 : 37°C, 25°C, 4°C での結合率は第 2 抗体操作時の温度を 25°C に一定とした場合, 37°C と 25°C が結合率が高く, 4°C では結合率の低下を示した (Fig. 3).

2) 第 2 抗体の結合率の推移 : 第 1 抗体の反応温度を 25°C とし, 反応時間を 24 時間一定にして行った場合, 第 2 抗体反応時の温度を 37°C, 25°C, 4°C と分けてその時間的結合率の推移をみると, 4°C, 25°C では結合率が高くしかも一定であるが, 37°C の場合は結合率が低く時間とともに

にわずかながら低下の傾向を示した (Fig. 4).

#### 3. 感 度

年齢 29~40 歳の健康人男性 14 人, 女性 6 人のグリココール酸レベルは平均 1.00 n mol/ml, SD=0.18 となった. そこで患者血清グリココール酸濃度 6.4 n mol/ml を倍々希釈を行うと, B/T は 0.20 n mol/ml で 98.7±0.78% (平均値 ± 2 SD, n=4) で, 0 n mol/ml の Bo/T (%) と明らかに差がみられ, 本キットでの最小検出感度は 0.2 n mol/ml であった.

#### 4. 標準曲線の検討

標準血清を胆汁酸フリー血清で希釈した場合と 50 mM phosphate buffer (pH 7.4) で希釈した場合に作製した標準曲線は 2 n mol/ml 以下ではほとんど差異を認めなかった (Fig. 5).

#### 5. 再現性

キット間の再現性を調べるため 5 種類の被検血清を 5~8 回測定した. その変動係数は 2.1~7.0% と良好な成績が得られた (Table 1).

#### 6. 回収率

6.4 n mol/ml のグリココール酸濃度の血清に 2, 4, 8, 16 n mol/ml の標準グリココール酸血清を添加して回収率を測定した結果, 予測値に対する実測値はそれぞれ 110.0%, 95.0%, 100.0%, 103.8%

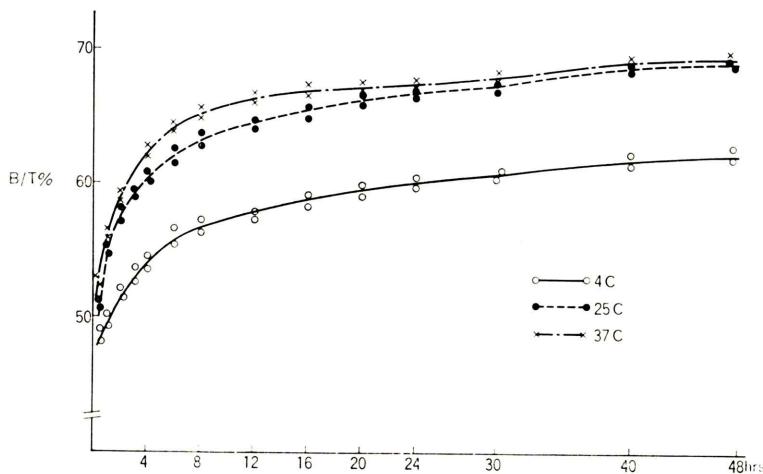


Fig. 3 Effect of 1st incubation temperature on  $^{125}\text{I}$ -glycocholic acid binding. (The 2nd incubation was performed at 25°C)

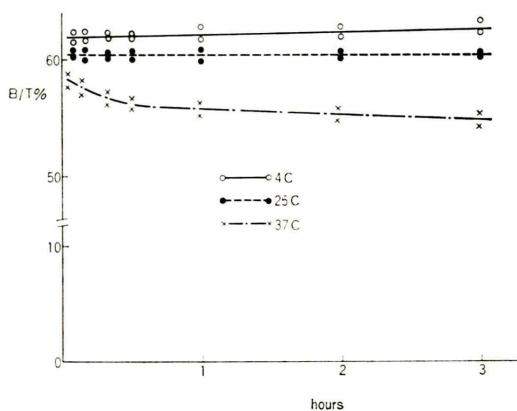


Fig. 4 Effect of 2nd incubation temperature on  $^{125}\text{I}$ -glycocholic acid binding. (The 1st incubation was performed at 25°C)

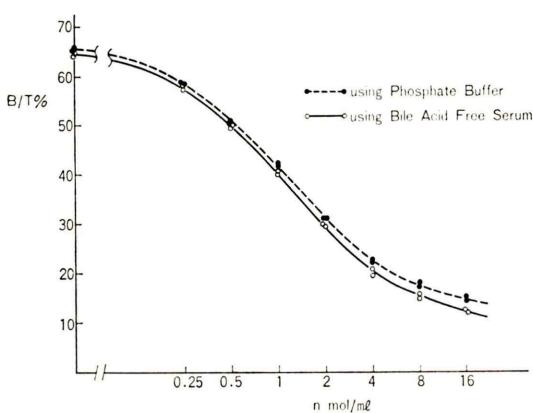


Fig. 5 Comparison of standard curve between bile acid free serum and phosphate buffer.

と良好な成績を得た (Table 2).

### 7. 希釈試験

原発性肝癌患者血清 (グリココール酸レベル 8.5 n mol/ml) を胆汁酸フリー血清で希釈測定した。希釈曲線はほぼ直線上にあり良好な成績が得られた (Fig. 6).

### 8. ラジオイムノアッセイとガスクロマトグラフィとの比較検討

ガスクロマトグラフィは猪川<sup>7)</sup>らの方法に準じて測定した。同一患者血清をガスクロマトグラフィとラジオイムノアッセイで測定した成績は  $r=0.911$ ,  $y=1.015x+2.155$  の回帰曲線を示し良好な成績が得られた (Fig. 7).

Table 1 Interassay reproducibility with 5 pooled sera.

	Sample 1 (n mol/ml)	Sample 2 (n mol/ml)	Sample 3 (n mol/ml)	Sample 4 (n mol/ml)	Sample 5 (n mol/ml)
1	1.1	1.35	1.4	5.2	6.3
2	0.92	1.35	1.6	5.0	5.5
3	1.0	1.35	1.25	5.3	6.2
4	0.92	1.4	1.45	5.3	6.3
5	1.0	1.3	1.4	5.3	6.2
6		1.45	1.4	5.1	
7		1.35		5.2	
8				5.3	
Mean	0.99	1.36	1.42	5.21	6.10
S.D.	0.07	0.04	0.10	0.11	0.30
C.V. (%)	7.0	2.9	7.0	2.1	4.9

Table 2 Recovery test

Added GCA (n mol/ml)	Measured GCA (n mol/ml)	Recovery (%)
0	6.4	
16	23	103.8
8	14.4	100.0
4	10.2	95.0
2	8.6	110.0

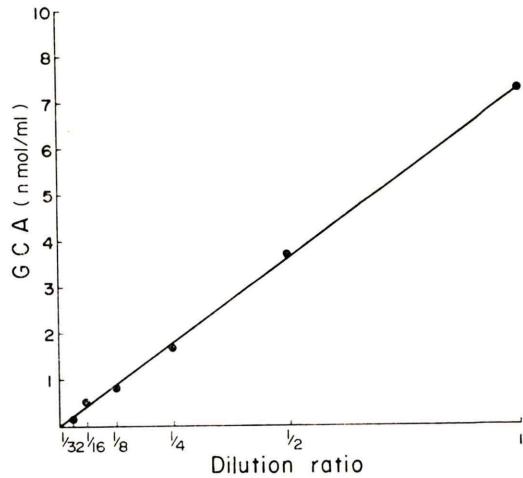


Fig. 6 Dilution test: Dilution with bile acid free serum.

0.911,  $y=1.015x+2.155$  の回帰曲線を示し良好な成績が得られた (Fig. 7).

### 9. 正常者および各種肝胆道疾患患者の血中グリココール酸レベル

正常人 20 例のグリココール酸レベルは平均

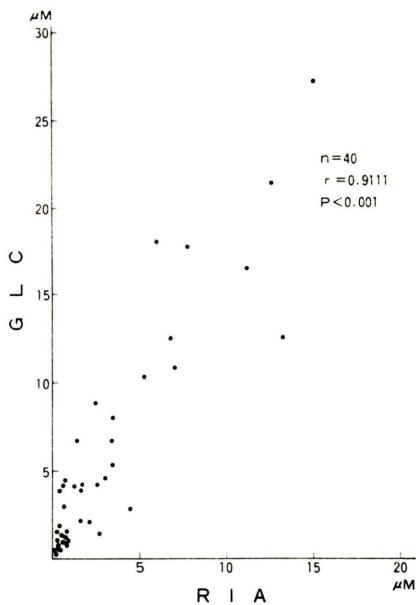


Fig. 7 Relationship between GLC and RIA in total cholic acid levels with normal subjects and patients with various hepato-biliary diseases. GLC=Gas liquid chromatography. RIA=Radioimmunoassay.

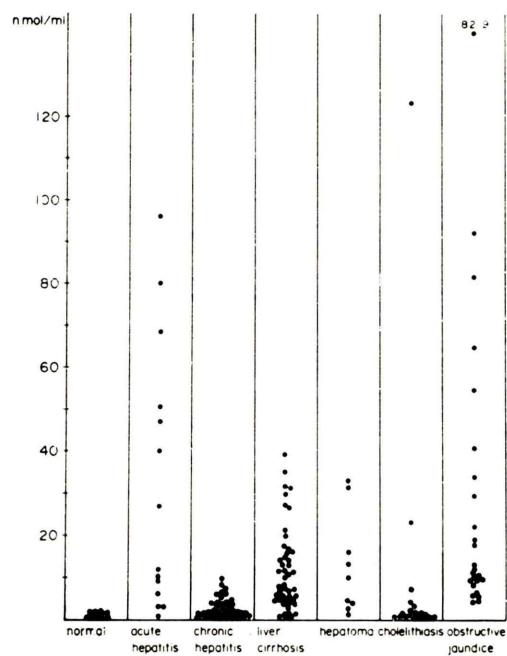


Fig. 8 Serum glycocholic acid levels in normal subjects and patients with various hepato-biliary diseases.

$1.00 \pm 0.18$  nmol/ml であり、正常値を  $1.36$  nmol/ml 以下とした。急性A型肝炎14例では平均  $66.4 \pm 23.09$  nmol/ml を示した。慢性肝炎46例は平均  $2.55 \pm 2.30$  nmol/ml, 肝硬変症49例は平均  $11.23 \pm 9.74$  nmol/ml, 原発性肝癌9例は平均  $12.92 \pm 12.73$  nmol/ml, 胆石症20例の平均  $8.32 \pm 26.77$  nmol/ml, 閉塞性黄疸26例は平均  $30.82 \pm 39.82$  nmol/ml であった (Fig. 8)。

急性A型肝炎において血中グリココール酸レベルの下降は GOT, GPT の下降よりも早期にかつ著明にみられた (Fig. 9)。

慢性肝炎活動型の経過中、血中グリココール酸レベルは GOT, GPT 再上昇前に上昇を示した (Fig. 10)。

悪性閉塞性黄疸患者の初期治療に減黄効果を目的として Percutaneous transhepatic cholangial Drainage (以下 PTCD と略す) が施行されることが多いが、PTCD 施行後の血中グリココール酸レベルの変動をみた。減黄効果の判定には清水の

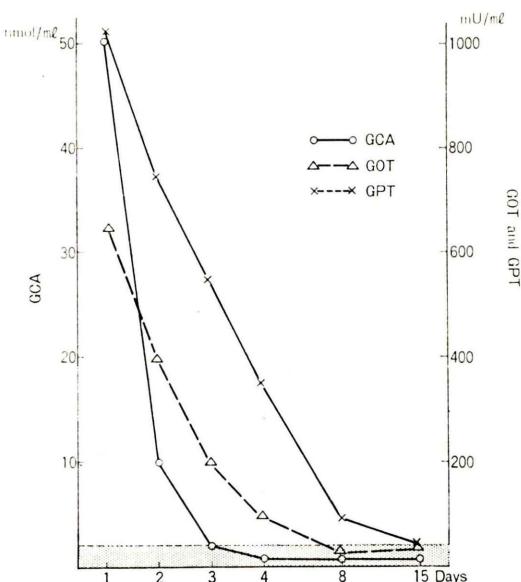


Fig. 9 Change of serum glycocholic acid, GOT and GPT levels after treatment with acute hepatitis.

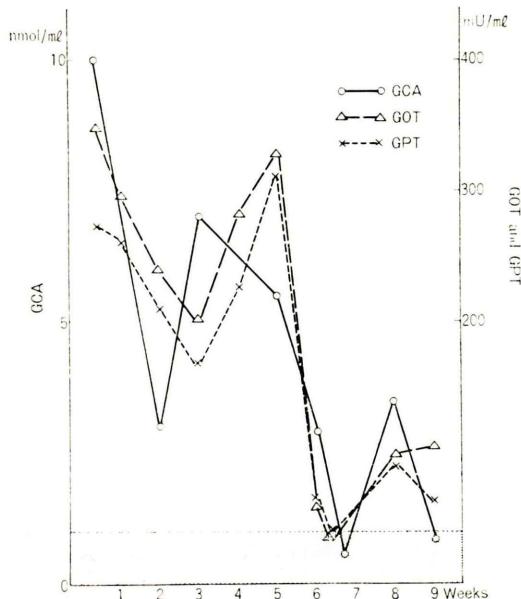


Fig. 10 Change of serum glycocholic acid, GOT and GPT levels after treatment with chronic active hepatitis.

減黄率  $b$  値を用いた<sup>8)</sup>。10例中6例が減黄効果良好群でPTCD後36時間以内にほぼ正常域内まで低下を示した。減黄効果不良群は4例であり、1例は60時間で正常域に達し、1例は42時間で前値より半減(42%)し、漸時減少を示し、1例は6時間後2/3(66%)に低下を示したが、以降は漸時増加し高値を維持し、さらに1例は緩慢な減少を示したが、108時間で約1/3(30%)の減少を示した。これらの成績より閉塞性黄疸時のグリココール酸レベルはPTCD後の減黄効果の良い指標となりえると考えられた(Fig. 11)。

#### IV. 考 案

胆汁酸の分析法は古くは硫酸クロモーゲン法<sup>1)</sup>、酵素法<sup>9)</sup>、薄層クロマトグラフィー<sup>10)</sup>、ガスクロマトグラフィー<sup>5)</sup>があり、最近では酵素蛍光法<sup>11)</sup>、高速液体クロマトグラフィー<sup>12)</sup>、ガスクロマトグラフィーマススペクトルメトリー<sup>13)</sup>があるが、血中胆汁酸レベルは低く、従来法では血中胆汁酸レベルの測定は実用上困難で臨床検査への応用が

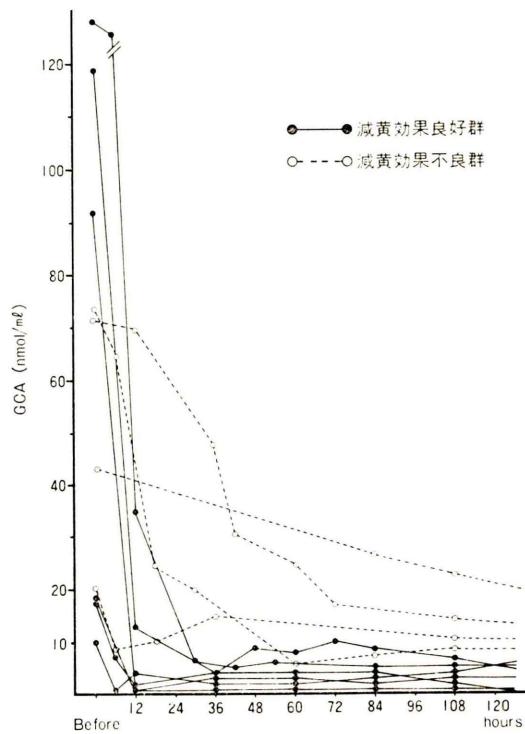


Fig. 11 Change of glycocholic acid levels after PTCD in 10 patients with obstructive jaundice.

困難であった。臨床応用という立場から酵素蛍光法、ラジオイムノアッセイ、エンザイムノアッセイ<sup>14)</sup>が開発され、確立が進められてきている。ラジオイムノアッセイは1973年Simmonds<sup>6)</sup>らによりグリココール酸に対するアッセイ系を開発したのが始まりであり、わが国でもいくつかの報告<sup>15~19)</sup>がみられている。

栄研社のイムノケミカル研究所のグリココール酸RIAキットの基礎的検討において、このキットはグリココール酸を抗原として抗体を作製しているが交差反応を示し、他の胆汁酸たとえばタウロコール酸と44.7%、コール酸と14.4%の交差反応を示すが、抱合型ケノデオキシコール酸が7%程度である以外は他の胆汁酸の交差反応は低く、したがって総コール酸を測定しているものと考えてよかろう。またガスクロマトグラフィーでの総コール酸との比較検討した結果、相関係数 $r=0.911$ ,  $y=1.015x+2.155$ であった。したがつ

て本キットは実用上血中総コレsterol酸を測定していると考えてよいことを裏付けるものである。

本ラジオイムノアッセイで第1抗体の結合率は37°C, 25°Cで結合率が高いが4°Cでは結合率は低く、しかし第2抗体の結合率では逆に4°Cで結合率が高いが、25°Cではやや低くなり37°Cではさらに低くかつ時間とともに低下傾向を示した。このため良好な測定を得るために25°C近くでの操作が最適と考えられる。最小検出感度は0.20 n mol/mlであり、再現性は%CV 2.1~7.0%，回収率95.0~110%であり、また希釈試験も良い直線性を示し、満足し得る成績を得た。前田ら<sup>20)</sup>のSCG, CGのキットの検討の成績と比べても良い成績と思われる。

各種肝胆道疾患における血中グリココレsterol酸では、閉塞性黄疸が最も高いレベルを示し、続いて急性肝炎、肝硬変症、原発性肝癌、慢性肝炎、胆石症の順であった。閉塞性黄疸では以前より胆汁酸特にコレsterol酸、ケノデオキシコレsterol酸の上昇をみると、ことにコレsterol酸の上昇が著明であると言われており<sup>21)</sup>、われわれの猪川<sup>7)</sup>らの方法に準じてのガスクロマトグラフィーによる検討でもコレsterol酸レベルの著明な上昇を反映し、C/CDC比が1以上の症例が大部分であり、ラジオイムノアッセイのグリココレsterol酸レベルの高値を裏付けた。

急性肝炎は、その発見時期の難かしさ、当院における肝機能検査 GOT, GPT でも 1,000 mu/ml 以上を示す症例が少ないためか、グリココレsterol酸レベルが著明な高値を示す症例が少なかった。肝硬変症では中等度の上昇を示し、代償期、非代償期とも差異を認めず、これらの成績は最近の高速液体クロマトグラフィーの測定<sup>22)</sup>結果とも一致している。原発性肝癌では肝硬変症とほぼ同様の成績を示した。これは肝硬変症の合併例が多いためと思われる。慢性肝炎では、活動型は非活動型より高い傾向を示したが有意差はなく、その分布は正常域から 10 n mol/ml まであり、肝硬変症の 10 n mol/ml 以上の症例 47 例中 29 と差異を認めた。胆石症の有黄疸例では高値を示した。閉塞性黄疸では、PTCD 施行後のグリココレsterol酸

レベルが 36 時間以内にほぼ正常域に達する症例は減黄効果が良好であり、減黄効果のよい指標となりえると考えられた。

このキットを使用してのグリココレsterol酸レベルの測定は肝胆道疾患での鑑別診断的な応用には限界があるが、使用血清量が微量の 10  $\mu$ l のため、採血量が少量でよく、小児科領域での応用も可能でしかも、ラジオイムノアッセイによる二重測定、三重測定によるデーターの確実性が得られる。また肝・胆道疾患のスクリーニング検査として有用であり、ことに空腹時のグリココレsterol酸レベルは総胆汁酸レベルよりも肝障害の程度を反映していることも報告<sup>23)</sup>されており、スクリーニング検査として有用である。急性肝炎、慢性肝炎の経過の検討、および閉塞性黄疸時のPTCD 施行後の減黄効果の良い指標となりえると考えられた。

胆汁酸と肝障害について考えると、肝細胞性障害の場合は、肝細胞の変性、壊死に基づく代謝障害が引きおこされる。胆汁うっ滞では(それをひき出している原因が肝内性、肝外性をとわず)胆汁酸の生理的腸肝循環が遮断され、胆汁酸プールの大部分は大循環へ流出する結果種々の胆汁酸代謝異常が出現する。そのうちでも血中胆汁酸の異常上昇と尿中への流出増加、硫酸抱合、グルクロン酸抱合の作動、胆汁酸生成における alternated pathway の亢進がとりわけ重要である。事実、肝実質障害と肝汁うっ滞における胆汁酸の代謝を考えると、胆汁酸の生成が低下するが、血清プールは増加しているので、胆汁酸代謝の面から両者を鑑別するのは困難である。

閉塞性黄疸における胆汁うっ滞は肝細胞内逆流がきわめて主要な役割をはたしている。しかも他の胆汁成分とくに胆汁酸やコレステロールあるいは諸酵素などが胆汁うっ滞の病態に関与している。これらの病態は胆汁酸という指標が肝の病態を反映していると思われる。われわれは一次胆汁酸のグリココレsterol酸の変動から検討し、良好な成績を得た。しかし他の一次胆汁酸や二次胆汁酸のラジオイムノアッセイ等による簡便な測定法の確立とその病態解明が望まれる。

## V. 結 語

グリココール酸 RIA キットを用い、正常者、各種肝胆道疾患、PTCD で減黄効果を試みた症例など 184 例について血中グリココール酸測定結果より基礎的ならびに臨床的検討を行い次の成績を得た。

1) 抗体の特異性として、グリココール酸 100%，コール酸 14.4%，タウロコール酸 44.7%，抱合型ケノデオキシコール酸 8.2% との交差反応を生じた。ある意味で血中総コール酸を測定していると考えられる。しかし主にグリココール酸を測定している。

2) 本キットではインキュベーション時間と温度は第一抗体反応で、25°C で 24 時間。次に第二抗体反応は 25°C または 4°C で 30 分のいずれでも測定可能であった。

3) 測定の精度、再現性は良好であり、回収試験も満足できる成績を得た。最小検出感度は 0.20 n mol/ml とした。

4) 本法による正常健康人の血中グリココール酸レベルは  $1.00 \pm 0.18$  n mol/ml (平均値  $\pm$  SD) であった。

5) ガスクロマトグラフィーによる総コール酸と本キットのグリココール酸の間には、 $r=0.911$  と良好な成績を得られた。

6) 臨床的には急性肝炎、慢性肝炎(活動期)の肝機能として良い指標を得た。同様に閉塞性黄疸時の PTCD による減黄効果とグリココール酸レベルとは良い相関が得られた。

7) 使用血清量が 10  $\mu$ l であるので、採血量が少量でよく小児科領域への応用が可能である。しかもラジオイムノアッセイ測定による二重、三重測定による成績の確実性を得られる。

本論文の要旨は第20回核医学会総会で発表した。グリココール酸測定キットを御提供下さいました栄研イムノケミカル研究所に深謝します。

稿を終わるに当たり鳥取大学医学部付属ステロイド医学研究施設ステロイド化学猪川嗣郎教授に深謝いたします。

## 文 献

- 1) Carey JB Jr: The serum trihydroxy-dihydroxy bile acid ratio in liver and biliary tract disease. *J Clin Invest* **37**: 1494-1503, 1958
- 2) Rudman D, Kendall FE: Bile acid content of human serum I. Serum bile acids in patient with hepatic diseases. *J Clin Invest* **36**: 530-537, 1957
- 3) Sherlock S, Walshe V: Blood cholate in normal subjects and liver disease. *Clin Sci* **6**: 223-234, 1948
- 4) Makino I, Nakagawa S, Mashimo K: Conjugated and unconjugated serum bile acid levels in patients with hepatobiliary disease. *Gastroenterology* **56**: 1033-1039, 1969
- 5) Sandberg DH, Sjövall J, Sjövall K, et al: Measurement of human serum bile acids by gas-liquid chromatography. *J Lipid Res* **6**: 182-192, 1965
- 6) Simmonds WJ, Korman MG, Go WLW, et al: Radioimmunoassay of conjugated cholyl bile acids in serum. *Gastroenterology* **65**: 705-711, 1973
- 7) Kawasaki H, Yamanishi Y, Kishimoto Y, et al: Abnormality of oral ursodeoxycholic acid tolerance test in the Dubin-Johnson syndrome. *Clin Chim Acta* **112**: 13-19, 1981
- 8) 清水武昭, 吉田奎介: 高度閉塞性黄疸患者の減黄術後の血清ビリルビン濃度減少の法則について. 肝臓 **19**: 479-485, 1978
- 9) Iwata T, Yamasaki K: Enzymatic determination and thin layer chromatography of bile acids in blood. *J Biochem (Tokyo)* **56**: 424-431, 1964
- 10) Panveliwala D, Lewis B, Woottton IDP, et al: Determination of individual bile acids in biological fluids by thin-layer chromatography and fluorimetry. *J Clin Path* **23**: 309-314, 1970
- 11) 真重文子, 柳沢悦子, 大管俊明: 血中胆汁酸の簡易微量定量法. 臨床化学 **4**: 312-318, 1976
- 12) 馬場茂明, 住ノ江啓子, 上野山林造, 他: 高速液体クロマトグラフィによる血中胆汁酸分画. 医学と生物学 **97**: 219-223, 1978
- 13) Angelin B, Björkhem I, Einarsson K: Individual serum bile acid concentrations in normo and hyperlipoproteinemia as determined by mass fragmentography: relation to bile acid pool size. *J Lipid Res* **19**: 527-537, 1978
- 14) 尾崎史郎, 田城明子, 牧野 熊, 他: 血清中胆汁酸の酵素免疫学的測定. 肝臓 **19**: 286-291, 1978
- 15) 石橋みゆき, 山路 徹, 横山信治, 他: 胆汁酸の Radioimmunoassay の基礎的検討. 肝臓 **17**: 316, 1976
- 16) 山路 徹, 石橋みゆき, 牧野 熊, 他: リトコール酸の Radioimmunoassay に関する基礎的検討. 肝臓 **18**: 129, 1977
- 17) 田城明子, 橋本博介, 田尻久男, 他: 血中 Ursodeoxycholic acid の Radioimmunoassay による基礎的検討. 肝臓 **19**: 292-296, 1978

deoxycholic acid radioimmunoassay 法による測定の開発と確立に関する研究. 肝臓 **18**: 203, 1977

18) 橋本博介, 田城明子, 田尻久男, 他: 肝疾患における glycocholate 負荷試験に関する研究 (胆汁酸 radioimmunoassay 法による). 肝臓 **18**: 419-425, 1977

19) 田城明子: 肝疾患における Ursodeoxycholic acid の経口負荷試験の臨床的意義. 肝臓 **20**: 369-375, 1979

20) 前田貞美, 佐々木康人, 千田麗子, 他: 血清胆汁酸のラジオイムノアッセイによる測定. 核医学 **16**: 805-813, 1979

21) 牧野 勲: ガスクロマトグラフィーによる血中胆汁酸の定量分析, 正常人と肝疾患について. 日内誌 **56**: 1297-1307, 1967

22) 上野山林造: 肝疾患における血中胆汁酸測定の意義, とくに胆汁酸分画よりみた肝胆道系疾患の診断. 臨床病理 **24**: 478-484, 1981

23) 日野一成, 山本晋一郎, 山下佐知子, 他: 肝疾患における血中胆汁酸 (TBA, CG) 測定の比較検討——空腹時および UDCA 経口負荷時の相違. 日消病会誌 **78**: 2197, 1981