

《原 著》

Dextran-coated charcoal 法による B・F 分離に及ぼす 遊離脂肪酸の影響について

多田 正己* 坂本 健一* 岡本 晃* 猪尾 和弘*
宮村 敬* 池田 裕**

要旨 日常臨床に広く利用されている radioimmunoassay (RIA) の結合型 (B) と遊離型 (F) の分離には多くの方法が利用されているが、吸着法の一つである dextran-coated charcoal 法 (D.C.C. 法) において、分離の際生じる B/T 比の上昇要因について検討した結果、遊離脂肪酸が D.C.C. による遊離型標識ステロイド吸着を阻害することにより、B/T 比の上昇をきたし、測定値としては underestimate されることになることを estriol (E₃) の RIA について明らかにした。

B・F 分離に D.C.C. を利用したステロイド物質の RIA では、この事実を考慮する必要がある。

I. 緒 言

Radioimmunoassay (RIA) の開発¹⁾以来20年余の現在では、インスリンをはじめとするホルモンやホルモン以外の蛋白、薬剤などの測定にも応用されているが、結合型 (B) と遊離型 (F) の分離は、RIA の重要な部分であり多くの方法が実用化されている。

今回われわれは、吸着法の一つである dextran-coated charcoal (D.C.C.) 法による estriol (E₃) RIA に際し、糖尿病患者数名の血清において結合型標識ホルモンの異常増加、すなわち B/T 比の上昇のため定型的な検量線の適用に基づく血中 E₃ 濃度の読み取りは不可能となった。RIA の技術的発展を振り返ると B/T 比の低下する原因が経験的にも、理論的にも解明されているのに比して B/T 比の異常上昇する機序の解明された例は少ない。

D.C.C. 法が B・F 分離法の一つとして普及している現状を考え、典型的に B/T 比異常上昇を起

こす患者血清中の要因検討は、意義あるものと考えた。

II. 方 法

1) CIS-ミドリ十字社製の estriol radioimmunoassay kit [tracer; ³H] を使用して糖尿病患者38名の血清 E₃ 濃度の測定を Fig. 1 に従って行った。

2) プール血清 30 ml に D.C.C. 懸濁液 8 ml を加え24時間攪拌し、3,000回転10分間遠心後上清を low-E₃ 血清とし、low-E₃ 血清 3.0 ml にエチルエーテル 30 ml を加え 2 分間 vortex mixing し、2,000 回転にて 5 分間遠心後上清を 0.5 ml (血清の 50 μ l 相当量) ずつとり蒸発乾固後、標準溶液 0.1 ml とリン酸緩衝液 0.2 ml 加え RIA を行い標準曲線を作製し血清由来成分を含まない通常の標準曲線と比較した。

3) 2) と同様の過程にて、B・F 分離を D.C.C. を用いずに 30% polyethylene glycol (PEG) 0.5 ml とプール血清 0.1 ml を加え 3,000 回転 10 分間遠心する PEG 法にて行い D.C.C. 法と比較した。

4) 1) の方法にて標準曲線の E₃ 濃度 0 pg/ml のカウントより高いカウントを示し、血中 E₃ 濃度の読み取り値が 0 pg/ml 以下となる糖尿病患者 3 名の血清を用いて Fig. 2 に従って血清中の各成分を得て、これらのおのおのを加えて RIA を行い

* 和歌山県立医科大学内分泌内科

** 同 中央検査室

受付: 57 年 5 月 11 日

最終稿受付: 57 年 10 月 18 日

別刷請求先: 和歌山市七番丁 1 (☎ 640)

和歌山県立医科大学附属病院内分泌内科

多 田 正 己

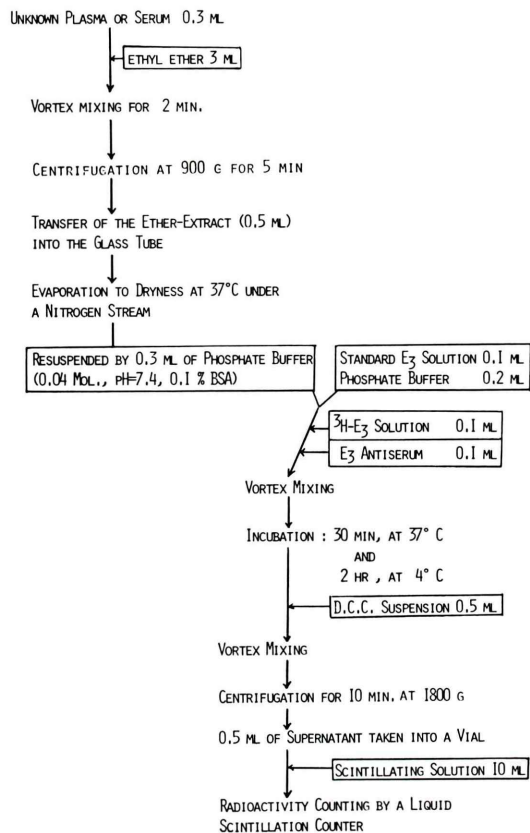


Fig. 1 Assay procedure of estriol RIA kit studied.

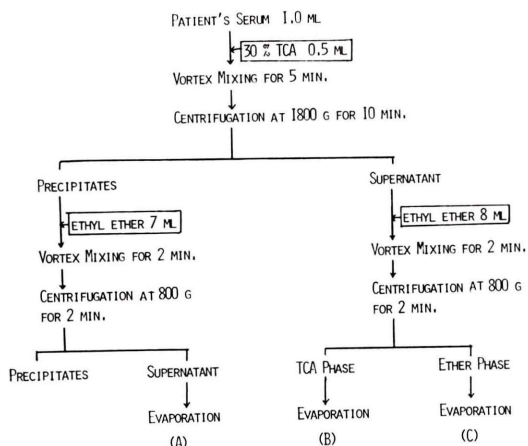


Fig. 2 Separation process for fractionation of patient's serum.

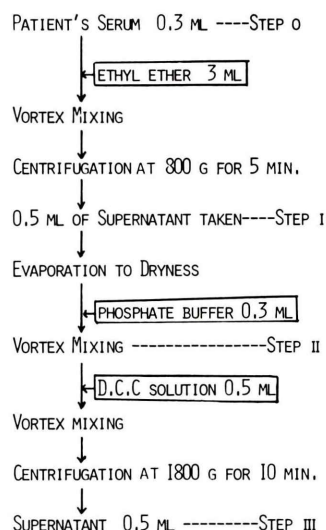


Fig. 3 Protocol for estimation of residual free fatty acid at various RIA steps.

各成分の及ぼす影響を検討した。

5) Fig. 2 に示した (c) 分画を蒸発乾固後冷アセトン 5 ml を加え 2 分間攪拌後 3,000 回転 30 分遠心分離し蒸発乾固後 RIA を行い、単純脂質と複合脂質の影響を検討した。

6) 内因性 FFA 増加が測定系への程度干渉しているかを検討した。

a) FFA が通常の RIA の各ステップにどの程度含まれているかを Fig. 3 に示した抽出の途中で分画測定した。なお FFA は、ITAYA-UI 法²⁾にて測定した。

b) $^3\text{H-E}_3$ が D.C.C. に吸着される段階にて、FFA 濃度の高低によって影響を受けることを確かめるため Fig. 4 に従って回収試験を行った。なお radioactivity の有意差検定は、累積計数 4,000 カウント以上においては、fractional standard deviation が 5% 以下になるものとして正規検定した。

III. 結 果

方法 1)~6) に対応する結果を述べる。

1) Fig. 1 に従って通常の RIA を行なったとこ

EXPERIMENTAL SAMPLE NUMBER	(1)	(2)	(3)
STANDARD FFA* ADDED (ML)	0	0.05	0.1
ETHYL ETHER ADDED (ML)	0	0.5	1.0
↓ EVAPORATION TO DRYNESS			
PHOSPHATE BUFFER ADDED (ML)	0.3	0.3	0.3
³ H-ESTRIOL SOLUTION ADDED (ML)	0.1	0.1	0.1
↓ VORTEX MIXING			
↓ INCUBATION: 30 MIN. AT 37°C AND 2 HR. AT 4°C			
Dextran-coated-CHARCOAL SUSPENSION ADDED (ML)	0.5	0.5	0.5
↓ VORTEX MIXING			
↓ CENTRIFUGATION AT 1800×G FOR 10 MIN.			
SUPERNATANT TAKEN (ML)	0.5	0.5	0.5
↓ RADIOACTIVITY COUNTING OF THE SUPERNATANTS			

* STANDARD FFA CONTAINS 5.0 M EQ / L Na-STEARATE

Fig. 4 Preparation of experimental samples for estimation of ³H-estriol binding to dextran-coated-charcoal under the presence or absence of free fatty acid.

Table 1 Effect of the ether extract from patients' sera on the bound radioactivity of standard curves by the D.C.C. method

Description on Assay Tubes	Bound radioactivity (counts/2 min)	
	with ether extract from low-E ₃ serum	without ether extract from low-E ₃ serum
Total Activity	6257±78	6257±78
Standard 0 (pg/ml)	4890±70**	4647±68*
62.5	4347±66	4486±67
125	3886±62	4283±65
250	3406±58	3434±59
500	2754±52	2635±52

Back ground radioactivity: 22 cpm, **>* (p<0.002)

ろ、糖尿病患者 38 名中 13 名にて、標準曲線用の E₃ 濃度: 0 pg/ml の radioactivity を上まわる結合型 radioactivity が認められ、読み取り不可能であった。

2) 検討結果を Table 1 に示した。Table 1 において、エチルエーテル抽出物存在下での結合型 radioactivity の増大は、E₃ 濃度: 0 pg/ml にて有意で、(p<0.002) また between assay にてもこの現象が再現できた。

Table 2 Effect of the ether extract from patients' sera on the unbound radioactivity of standard curve by the PEG method

Description on assay tube	Unbound Radioactivity			
	with ether extract from low-E ₃ serum		without ether extract from low-E ₃ serum	
	counts/2 min	F/T (%)	counts/2 min	F/T (%)
Total Activity (T)	7454±83	100	7454±83	100
Standard				
0(pg/ml)	2683±51**	36	2546±50*	34
31	2903±54**	39	2828±53*	38
62	3047±55**	41	2921±54*	39
125	3501±59**	47	3008±55*	40
250	3670±60**	49	3537±54*	47
500	4245±65	57	4081±64	54
1000	4631±68	62	4780±69	64

Back ground radioactivity: 22 cpm, **>* (p<0.05)

3) 前述の検討から想定された B/T 比上昇要素が、B・F 分離法の違いにより差があるかを検討した結果を Table 2 に示す。Table 2 は、エチルエーテル抽出物が同一 kit 由来の抗体、標識 E₃ を用いる PEG 法において、標準曲線に与える影響を示すもので、low E₃ 血清を加えた標準曲線の方が、E₃ 濃度: 0~250 pg/ml にて有意に F/T が高くなっている (p<0.05)。すなわち PEG 法によれば、B/T 比の低下を認めたのであり、結合型標識 E₃ が増加することはなかった。同じ一抗体法でも、D.C.C. 法では B/T の上昇が、PEG 法では B/T の低下が認められ両法にて解離がある。以上より、D.C.C. 懸濁液を用いた B・F 分離に際して、ある種の血清成分が、D.C.C. による遊離型 E₃ 吸着を阻害していると推察された。

4) B/T 上昇を認めた糖尿病患者 3 名の血清を各成分に分け、RIA への影響を検討した結果を Table 3 に示した。(c) 分画の radioactivity が大きく、エーテル層 (脂質) に B/T を上昇させる因子が含まれていることがわかる。なお、(A) (B) (C) 分画蒸発乾固後、0.3 M リン酸緩衝液再溶解後の pH には、変化は認めなかった。

5) 2 名の患者の血清中の結合型 E₃ 増加物質

Table 3 Effects of the serum fractions (A), (B) and (C) from three patients on "antibody-bound" radioactivity after elimination of the "free" radioactivity by the D.C.C. method

Patient	Antibody-bound radioactivity (counts/10 min.)		
	(A)	(B)	(C)
1	6164±79	3873±64*	7439±89***
2	7130±87	4340±66*	7305±86***
3	6904±85	5630±77*	7196±86**

Total radioactivity added: 17506 counts/10 min.

Bound radioactivity at zero (pg/ml) standard without serum fraction: 7133 cpm†.

***>†: (p<0.004), **>*: (p<0.002), **vs†: non significant

(A): 30% TCA insoluble fraction

(B): 30% TCA soluble, ether insoluble fraction

(C): 30% TCA soluble, ether extractable fraction

Table 4 Effect of the acetone-soluble fraction of ether extracts from sera on "antibody-bound" radioactivity after cleavage of "free" radioactivity by the D.C.C. method

Patient	Antibody-bound radioactivity (counts/2 min)	
	with Acetone-soluble fraction	with Acetone-insoluble fraction
1	4928±70**	4645±69*
2	5107±72**	4833±70*

Antibody-bound radioactivity at zero standard without any ether extracts: 4906 counts/2 min.

**>*: (p<0.005)

に関して、エーテル層の複数の成分中、いずれの寄与が大きいかわかるべく予備的分画を行った結果を Table 4 に示した。分画の原理は、単純脂質すなわち中性脂肪やコレステロール、FFA がアセトンに可溶であり、複合脂質すなわち、リン脂質や糖脂質がアセトンに不溶であるという溶媒分画法を利用しており、この結果、アセトン可溶な単純脂質であることが示された。

6) (a) 通常の RIA 各ステップにて測定した FFA 濃度を Table 5 に示した。患者血清中の FFA は、エチルエーテルに平均 74% 抽出され、リン酸緩衝液に平均 55% 回収されていた。

Table 5 Recovery of FFA at various Radioimmunoassay steps

		Steps	FFA Concentration (Eq/ml)	Recovery (%)
Patient 1	0		1.403	100
	I		0.065	92
	II		0.161	69
	III		0.052	—
Patient 2	0		1.424	100
	I		0.052	73
	II		0.114	48
	III		0.045	—
Patient 3	0		1.393	100
	I		0.040	57
	II		0.108	47
	III		0.041	—

0, I, II, III: Sampling steps (see Fig. 3)

6) (b) FFA 添加量の多い試料 (2), (3), (Fig. 4 experimental sample number 参照) の bound radioactivity は、それぞれ 1558, 1634 counts/10 分で FFA 非添加の試料 (1) の 1178 counts/10 分より高値となった。すなわち FFA の高値なほど、標識 E₃ の D.C.C. による吸着が阻害されることが確かめられた。

IV. 考 察

近年日常臨床検査法として広く利用されている RIA の B・F 分離に際して、血液成分がさまざまな影響を及ぼすことが知られている。今回われわれが検討を行った D.C.C. 法は、Herbert ら³⁾が最初にインスリンの測定に使用して以来、現在広く用いられている。一定量のデキストラン炭末懸濁液を加えて遠沈すれば、遊離型は沈澱し、結合型は上清に残るという非特異的な吸着現象を利用している。高遊離脂肪酸血症を示す糖尿病患者にて、Bo のカウントより高いカウントを認めたことより種々の検討を加えた。低 E₃ 血清を加えた標準曲線と加えない標準曲線と比較すると、低濃度領域にて B/T の上昇が認められた。また低 E₃ 血清を加えた標準曲線を同じ一抗体法の溶解性を利用した PEG 法にて検討した結果、D.C.C. 法では、

B/T の上昇が、PEG 法では、B/T の低下があり両法に解離を認めた。すなわち B・F 分離の際、血清成分により D.C.C. が遊離型標識 E₃ を吸着するのを阻害されていると考えられた。各血清成分を分画して検討した結果、TCA soluble・ether extractable 分画に B/T の上昇を認めた。すなわち脂質と考えた。さらにアセトンを利用して分画した結果、単純脂質と考えた。梶原ら⁴⁾も estradiol (E₂) RIA にて、血中の lipid などにより immunoassay が阻害され、値は underestimate されたことより defatting の必要性を述べているが詳細な要因については検討していない。また池田⁵⁾は、血清 FFA が Thyopac-3 測定系の sephadex 吸着段階で阻害的に干渉していると報告し、Shaw ら⁶⁾は、T₄ の CPBA 法において、FFA による阻害を認め、その程度は無視でき得たと報告している。

今回われわれは、D.C.C. 法にても同様に FFA が、D.C.C. による遊離型標識 E₃ 吸着を阻害していることを明らかにした。またその程度も E₃ 値としては無視し得ないものであった。通常の RIA 過程にて、エチルエーテル抽出段階では、添加した FFA の平均 74% が抽出されており、蒸発乾固後のリン酸緩衝液には添加の平均 55% が溶解回収されており、許容できない量の FFA が、D.C.C. の B・F 分離の際含まれていることがわか

った。また各濃度の FFA を添加してその影響をみてみると、FFA の高いほど標識 E₃ の D.C.C. による吸着が阻害され Bo/T の上昇を招いていた。

このような機序により通常の RIA では、B/T の上昇すなわち測定値としては、underestimate されることになり、B・F 分離に D.C.C. を利用したステロイド系物質の RIA では、この事実を勘案する必要がある。

文 献

- 1) Yalow RS, Berson SA: Assay of plasma Insulin in human subjects by immunological methods. *Nature* **184**: 1648-1649, 1959
- 2) Itaya K, Ui M: Colorimetric determination of free fatty acids in biological fluids. *J Lipid Res.* **6**: 16-20, 1965
- 3) Herbert V, Lau KS, Gottlieb C, et al: Coated Charcoal Immunoassay of Insulin. *J Clin Endocrinol Metab* **25**: 1375-1384, 1965
- 4) 梶原健伯, 立山浩道, 宇津宮隆史, 他: 血中 estradiol radioimmunoassay 時の defatting について, 産科と婦人科 **44**: 1191-1194, 1977
- 5) 池田 裕: 血中脂質降下剤「Dextran Sulfate」の甲状腺ホルモン測定におよぼす影響——THYOPAC-3 kit, THYOPAC-4 kit への遊離脂肪酸の干渉——, 医療 **32**: 977-983, 1978
- 6) Shaw W, Powell J, Hubert IL, et al: A comparison of the interference of fatty acids in the competitive binding radioassay and radioimmunoassay for serum T₄. *Clinica Chimica Acta* **73**: 25-29, 1976

Summary

Effect of Free Fatty Acids on the Separation of Bound from Free Hormone by Dextran-coated Charcoal Method

Masami TADA*, Kenichi SAKAMOTO*, Akira OKAMOTO*, Kazuhiro IWO*,
Kei MIYAMURA* and Hiroshi IKEDA**

**Department of Internal Medicine, Division of Endocrinology, Wakayama Medical School*

***Department of Clinical Laboratory, Wakayama Medical School*

In a radioimmunoassay utilizing dextran-coated charcoal as an adsorbent of unbound hormone after the incubation, addition of free fatty acids caused an apparent increase in antibody-bound estriol (E_3) present in the supernatant fraction of reaction mixture after the final centrifugation in the assay procedure.

Such unwarranted interference by free fatty acids was shown to occur at the adsorption step of unbound E_3 by the dextran-coated charcoal, and the radioactivity due to erroneously remaining

E_3 in the bound fraction was shown to results in false elevation of "bound"/"total" ratio, and hence, underestimation of E_3 concentration.

Influence of free fatty acids on the determination of E_3 and presumably other steroid hormones should be taken into consideration for radioimmunoassays in which dextran-coated charcoal is to serve as an adsorbent of the unbound moieties.

Key words: Dextran-coated charcoal, the separation of 'bound' from 'free' hormone (B·F separation), Free fatty acids.