

《ノート》

³H-folic acid assay kit の基礎的検討とその臨床応用The Fundamental Evaluation and Clinical Application of ³H-folic Acid Assay Kit

千葉 進* 菊池 進* 松本 博之*

Susumu CHIBA, Susumu KIKUCHI and Hiroyuki MATSUMOTO

The First Department of Internal Medicine, Sapporo Medical College

はじめに

従来血中葉酸濃度は bioassay により測定されてきたが、微生物を用いるため臨床応用には種々の制約があり、簡便で正確な物理化学的測定法の開発が望まれていた。

今回われわれは radioassay (RA) の 1 つとして登場した Diagnostic Products Corporation (USA) 開発の ³H-folic acid assay kit を検討する機会を得たので、その基礎的検討ならびに臨床応用の結果を報告する。

材料および方法

RA に用いた試薬の調製および測定法はキット使用説明書に準じた。

1) 試薬の調製

(1) borate saline buffer: 蒸留水 900 ml に borate 3.1 g, sodium chloride 8.5 g を溶解し, 1N-sodium hydroxide で PH 9.2 に調整した後蒸留水を加え 1,000 ml とし 4°C に保存した。

(2) saline mercaptoethanol borate buffer (SM BB): 上記の borate saline buffer 100 ml に mercaptoethanol 0.3 ml を加えて作製し, 4°C で保存し 1 週間以内に使用した。

* 札幌医科大学内科学第 1 講座 (主任: 和田武雄教授)
受付: 53 年 9 月 5 日
最終稿受付: 54 年 1 月 22 日
別刷請求先: 札幌市中央区南一条西十六丁目 (☎ 060)
札幌医科大学内科学第 1 講座

千葉 進

(3) β -lactoglobulin (BLG): 凍結乾燥品を SM BB 10 ml で溶解し, 4°C 保存とし 30 日以内に使用した。

(4) ³H-folic acid (³H-PGA): 凍結乾燥品を SM BB 11 ml で溶解し遮光の上で 4°C 保存し 30 日以内に使用した。

(5) N-5 methyl tetrahydrofolate (N-5 methyl THF): 凍結乾燥品を SMBB 3 ml で溶解し, 4°C で保存し 24 時間以内に使用した。

(6) folic acid free human serum (FFHS): 凍結乾燥品を SMBB 6 ml で溶解し, -20°C に保存し標準曲線作製の際使用した。

(7) BF 分離用 charcoal dextran 懸濁液: 蒸留水 80 ml に gelatin 100 mg を加え温浴中で攪拌溶解後室温冷却し charcoal dextran 2.2 g を加え, 再び攪拌しながら蒸留水を加え 100 ml とした。作製後は 4°C に保存し 30 日以内に使用した。

2) 検 体

早期空腹時滅菌試験管に採血し, 遮光下に血清分離を行いその 100 μ l を RA に供した。

3) RA 測定方法とその検討

RA の操作は説明書に準じ行なった (Table 1)。検体はすべて duplicate とし, BF 分離後の上清を Instagel (Packard) 10 ml に溶解し ³H 放射活性 (CPM) を automatic external standardization を用いて, Packard 社製液体シンチレーションカウンター (3255 型) で 10 分間測定した。

Key words: folic acid, radioassay, malignancy.

Table 1 Flow Chart of RA Method

Tube in duplicate		Total Counts	Max Binding	Standard	Sample	Blank
Add	SMBB (μ l)	1,100	500	400	500	600
	FFHS (μ l)	100	100	100		100
	Standard or					
	Sample (μ l)			100	100	
Vortex the contents thoroughly and heat in a boiling water bath for 15 minutes Cool to room temperature for 10 minutes						
Mix thoroughly						
H-Folic acid (μ l)		100	100	100	100	100
BLG Solution (μ l)		100	100	100	100	100
Mix and incubate at room temperature for 30 minutes						
Charcoal dextran (μ l)		500	500	500	500	500
Mix and wait for 5 minutes, centrifuge at 2,000 g for 20 minutes Decant contents into 10 ml of Instagel solution Shake and count for 10 minutes						

標準曲線は既知 N-5 methyl THF 濃度 (0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 16.0, 32 ng/ml) を横軸に, それに対応する % bound* を縦軸にいずれも対数目盛でとり作製した. その後回収率, 再現性および稀釈曲線についても吟味検討した.

$$\text{*sample counts—blank} \times 100 \\ \text{Max. binding—blank}$$

4) 測定対象

正常対照は健康成人20例 (男10例, 女10例, 20歳代3例, 30歳代4例, 40歳代5例, 50歳代6例, 60歳代2例) とし, 疾患対象として担癌患者29例を選び, そのうちわけは胃癌11例, 肝癌4例, 肺癌3例, 多発性骨髄腫5例, 慢性骨髄性白血病3例, 悪性細網症, 慢性リンパ性白血病, 腹膜偽粘液腫1例である. なお, 上記の症例はいずれも methotrexate を除く各種抗腫瘍剤の投与をうけているが, 葉酸製剤の投与は行なわれていない. さらに, 葉酸投与をうけている胃癌患者4例, 悪性細網症1例について外因性葉酸投与の影響を検討した.

結 果

1) 標準曲線: 本法による標準曲線は Fig. 1 に示したごとく 0.5 ng/ml~32 ng/ml において % bound と直線関係を示した.

2) 回収率: 平均回収率は $99.8 \pm 8.5\%$ と良好な結果を得た (Table 2-a).

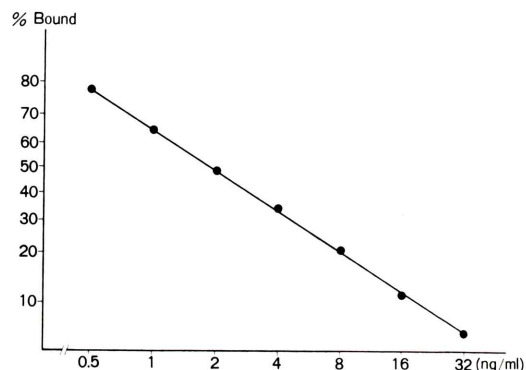


Fig. 1 Standard Curve.

3) 再現性: 4種血清サンプルをおのおの5回測定した結果は, Table 2-b に示したとおりで, 測定内変動係数 (CV) はそれぞれ 6.1%, 7.9%, 7.2%, 5.6% であった.

4) 稀釈曲線: 血中葉酸濃度の高値 (Fig. 2-A) 正常値 (同 B), 低値 (同 C) を示す3検体を用い, SMBB で倍数稀釈を行ない葉酸濃度を測定し, 稀釈倍数を横軸に, 葉酸濃度を縦軸にプロットすると, それぞれ満足すべき直線関係を示した (Fig. 2).

5) 正常値および臨床応用: 本法による健康成人の血清葉酸濃度は 7.57 ± 2.37 ng/ml であった.

各種悪性腫瘍患者の血清葉酸濃度は 胃癌 3.6 ± 1.7 ng/ml, 肝癌 2.9 ± 1.5 ng/ml, 肺癌 2.2 ± 1.5 ng/ml, 多発性骨髄腫 4.4 ± 1.2 ng/ml, 慢性骨髄性白血

Table 2a Recovery

Folate in serum (ng/ml)	Folate added (ng/ml)	measured (ng/ml)	Recovery (%)
5.1	9.6	12.5	85.6
3.1	9.6	12.5	98.4
5.2	4.8	11.0	100.0
6.1	4.8	12.5	114.6
5.2	2.4	7.4	97.6
5.4	2.4	8.0	102.6
mean ± S.D. 99.8 ± 8.5			

Table 2b Reproducibility

Sample No.	asaay (ng/ml)					$\bar{X} \pm S.D.$	C.V. (%)
	1st	2nd	3rd	4th	5th		
1	3.8	4.2	4.5	4.5	4.2	4.24 ± 0.26	6.1
2	4.8	4.2	3.9	4.4	4.8	4.42 ± 0.35	7.9
3	2.8	2.6	2.4	2.7	2.8	2.66 ± 0.16	5.6
4	2.8	2.4	2.6	2.4	2.3	2.50 ± 0.18	7.2

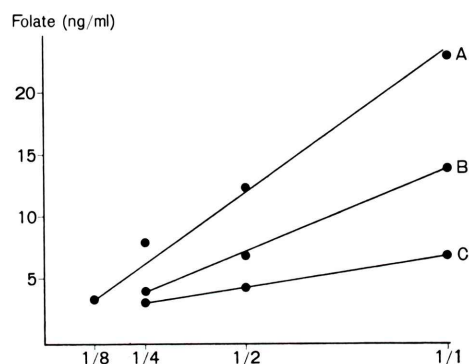


Fig. 2 Dilution Curves of Serum A, B, and C.

病 3.9 ± 1.3 ng/ml, 悪性細網症 1.5 ng/ml, 慢性リンパ性白血病 1.0 ng/ml, 腹膜偽粘液腫 1.5 ng/ml であり, いずれも正常対照に比して著明な低値を示した。

しかし, 葉酸投与をうけた胃癌患者 4 例の血清葉酸濃度は 8.1 ± 2.4 ng/ml, また悪性細網症患者では 15.5 ng/ml と, 葉酸非投与悪性腫瘍患者に比し明らかな高値を示した (Fig. 3)。

考 案

従来葉酸濃度は bioassay で測定され, とりわけ血中に存在する葉酸の大部分を占める補酵素型の N-5 methyl THF 濃度を測定しうる L. casei 法

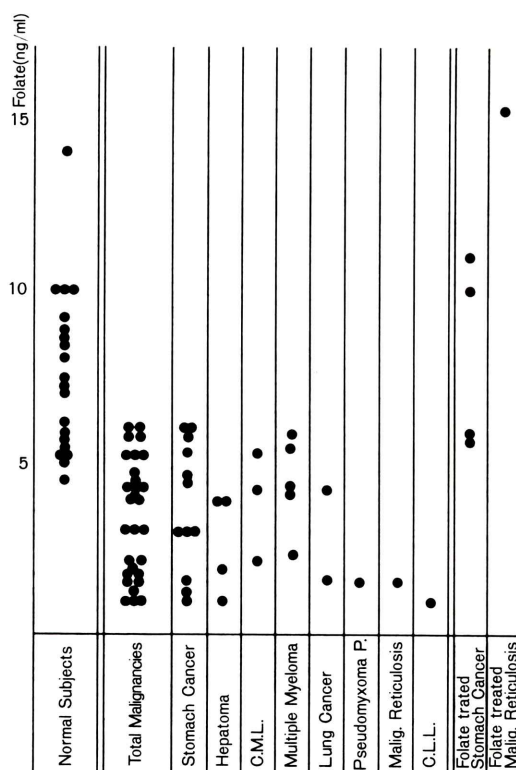


Fig. 3 Serum Folate Levels of Normal Subjects and Malignancies.

が頻用されてきた。しかし, その測定に際しては

菌種の維持が困難であること、雑菌の混入による培地の汚染防止のための滅菌的操作が煩雑であることなど、手技上の問題点のみならず、微生物を用いる関係上、抗生物質や抗腫瘍剤が投与されている症例の測定値は信頼性がなく、これらの制約をうけない測定法の開発が望まれていた。

Ghitis¹⁾ らにより牛乳中に葉酸と特異的に結合する蛋白が存在すること、さらに Salter ら²⁾によりこの蛋白が BLG であることが報告されて以来、この蛋白を利用した competitive protein binding assay が考案され、BLG を binder とし ³H-PGA を用いる RA 法へと発展した³⁾。しかし、本法による血中葉酸濃度測定ではいわゆる“serum blank”の問題が指摘されている^{4,5)}。すなわち、牛乳中に葉酸結合物質として BLG が存在するのと同様に人血清中にも folic acid binding protein (FABP) が存在し、しかもその親和力は N-5 methyl THF よりも PGA に強い⁶⁾ため ³H-PGA を用いた RA の場合、添加した ³H-PGA は BLG だけでなく血清 FABP に対しても血清中の N-5 methyl THF と競合的結合をすること、さらに FABP と結合した ³H-PGA は charcoal dextran で吸着除去ができない性質をもつことなどのため、本法による ³H-PGA のカウントは真の値よりも高値を示すことが解明されてきた。

今回われわれが検討した ³H-folic acid assay kit も、BLG を binder としているが“serum blank”に対し標準曲線作製時に葉酸を含まない FFHS を使用していること、また、あらかじめ検体を沸騰することにより、FABP を除蛋白する配慮が施されている点は特異である。

本法で得られた標準曲線は 0.5 ng/ml から 32 ng/ml の間では直線を描き満足すべきものであった。また、ヒト血清希釈曲線の検討でも葉酸濃度高値例、正常値例、低値例いずれも満足すべき直線関係を示し、32 ng/ml をこえる高値例では希釈により正確な葉酸濃度の測定が可能であることが確認された。さらに、N-5 methyl THF 添加による回収率および測定値の再現性も良好であった。

本法による健康成人の血清葉酸濃度は $7.57 \pm$

2.37 ng/ml であったが、これは従来の bioassay および radioassay による報告^{3,4,6)}と一致をみた。

臨床応用としてわれわれが対象とした悪性腫瘍患者は全例が抗腫瘍剤の投与を、また、一部の症例では合併する感染症に対し抗生剤投与をうけていたため、従来の bioassay は適用できないと考えられる症例であったが、このような悪性腫瘍患者においても葉酸濃度の正確な測定が可能であり、それらにおける血清葉酸濃度は正常対照に比し 1% の危険率で推計学的に有意の低値を示した。

一方、葉酸が投与された悪性腫瘍患者では明らかな血清葉酸濃度の上昇が認められたので、この事実は間接的ながら抗腫瘍剤や抗生物質投与例についても本法が有用な血清葉酸測定法であることを示すものと考えられた。

ま と め

RA を応用した ³H-folic acid assay kit について葉酸測定上の基礎的検討を行なった上で悪性腫瘍患者の血清葉酸濃度を測定し次のような結果を得た。

- 1) 本キットによる葉酸濃度測定の信頼性は高く、0.5~32 ng/ml の範囲で測定可能であった。
- 2) 健康成人の血清葉酸濃度は 7.57 ± 2.37 ng/ml であった。
- 3) 悪性腫瘍患者では明らかな血清葉酸濃度の低下が認められた。

本研究の一部は北海道老年医学研究振興会の援助による。

文 献

- 1) Ghitis J: Folate binding in milk. *Am J Clin Nutr* **20**: 1, 1967
- 2) Salter DN, Ford JE, Scott KJ et al: Isolation of the folate binding protein from cow's milk by the use of affinity chromatography. *FEBS Letters* **20**: 302, 1972
- 3) Waxmann S, Schreiber C: Measurement of serum folate level and serum folic acid binding protein by ³H-PGA radioassay. *Blood* **42**: 281, 1973
- 4) Rothenberg SP, da Costa M: Correspondence. *Blood* **43**: 310, 1974
- 5) Shaw W.: Correspondence. *Blood* **43**: 312, 1974
- 6) Herbert V, Zalusky R: Interrelation of vitamin B and folic acid metabolism. Folic acid clearance studies. *J Clin Invest* **41**: 1263, 1962