

《会長講演》

## RI 二重標識法の血液学研究への応用

脇 坂 行 一\*

近年血液学領域における研究にも広く放射性同位元素が利用されているが、その多くは単独使用法で、2種以上の検査を行なう場合には、検査期間が長期にわたること、同一条件で検査することが困難なことなど、種々の欠点がある。われわれはこの欠点を克服し、さらに放射性同位元素の利用価値を高めるために、放射性同位元素二重標識法の血液学研究への応用について、検討を加えてきた。今回はそのうちの2,3についてのべたいと思う。

放射性同位元素二重標識法には (A) 異種元素による二重標識法と、(B) 同一元素の異なる核種による二重標識法とがある。異種元素による二重標識法においては、① 検査期間の短縮、② 同一患者において、ほとんど同一条件下で2つの異なる機能の比較が可能であること、③ 異種元素の性質の差を利用する新しい研究方法の考案が可能であることなどの利点がある。また同一元素の異なる核種による二重標識法においては、① 2つの異なる化合物や条件を使用して、その間の代謝の比較を同一生体内で行なうこと、② 新しい代謝解析法の考案が可能であることなどの利点がある。

### I. $^{51}\text{Cr}$ と $^{32}\text{P}$ の放射能の分離測定

$^{51}\text{Cr}$  の測定には Medical spectrometer,  $^{32}\text{P}$  の測定には gasflow counter を用いている。 $^{51}\text{Cr}$  は  $\gamma$  線のみ、 $^{32}\text{P}$  は  $\beta$  線のみを放出するので、分離に困難はない。実際の測定条件 ( $^{51}\text{Cr}$  100~150  $\mu\text{c}$ ,  $^{32}\text{P}$  30~100  $\mu\text{c}$  投与)において、 $^{51}\text{Cr}$  の soft X ray が gasflow counter にかかる率は  $^{32}\text{P}$  の放射能の 0.2~0.6%， $^{32}\text{P}$  の Bremsstrahlung が well type scintillation counter にかかる率は  $^{51}\text{Cr}$  の放射能の 0.07~0.3% であって、これらはいずれも実際上は無視しうる値である。なお血液疾患においては、同時に  $^{59}\text{Fe}$  を用いて鉄代謝の検査を行なうことが多いが、この場合には Alminium filter により、 $^{32}\text{P}$ ,  $^{59}\text{Fe}$  の  $\beta$  線のエネルギー差を利用して分離している。

### II. $^{51}\text{Cr}$ , $^{32}\text{P}$ 二重標識による諸種疾患時の赤血球寿命

正常例、鉄欠乏性貧血、溶血性貧血、再生不良性貧血、

その他の症例について、 $^{51}\text{Cr}$  法による赤血球半寿命と  $^{32}\text{P}$  法による赤血球寿命とを比較すると、両者は一般に平行するが鉄欠乏性貧血においては、両者の間に解離が認められ、正常例あるいは他の貧血例の場合に比べて、 $^{51}\text{Cr}$  法により測定した赤血球の半寿命が  $^{32}\text{P}$  法により測定した赤血球寿命に比し、比較的長くなっている。換言すれば、鉄欠乏性貧血の場合には、 $^{32}\text{P}$  法で測定した赤血球の寿命は、正常例に比し、かなり短縮しているが、 $^{51}\text{Cr}$  法により測定した赤血球の半寿命は正常例と大差がないが、軽度に短縮しているに過ぎない。 $^{32}\text{P}$  法と  $^{51}\text{Cr}$  法による赤血球の寿命測定結果から、 $^{51}\text{Cr}$  の Elution rate を算出すると、鉄欠乏性貧血においては、正常例や他の貧血例に比べて、 $^{51}\text{Cr}$  の Elution rate が小さい。上述の鉄欠乏性貧血における  $^{51}\text{Cr}$  法により測定した赤血球の半寿命と、 $^{32}\text{P}$  法により測定した赤血球寿命との間の解離は、鉄欠乏性貧血において  $^{51}\text{Cr}$  の Elution rate が小さいことが関係しているものと思われ、このことは赤血球の寿命測定における  $^{51}\text{Cr}$  法があくまでも見かけの赤血球寿命を現わすものに過ぎないことを示している。なお鉄欠乏性貧血において  $^{32}\text{P}$  法で測定した赤血球寿命と血漿鉄クリアランス PIDT  $\frac{1}{2}$  の間には相関が認められる。

### III. $^{32}\text{P}$ と $^{51}\text{Cr}$ による自家赤血球および他家赤血球の寿命の同時測定

自家赤血球の寿命を  $^{32}\text{P}$  による in vivo labeling により測定すると同時に、一方血液型適合健康人赤血球を  $^{51}\text{Cr}$  で標識して輸血し、他家赤血球寿命を測定する。交叉輸血による赤血球の寿命測定は赤血球の寿命短縮の原因が赤血球自身にあるのか、それ以外の原因によるのかを鑑別するのに必要な方法であるが、 $^{32}\text{P}$  法と  $^{51}\text{Cr}$  法を同時に用いることにより、測定期間を短縮することができ、臨床上貧血の診断ならびに病因の究明に有用である。鉄欠乏性貧血の1例では  $^{32}\text{P}$  法による自家赤血球寿命および  $^{51}\text{Cr}$  法による自家赤血球寿命はいずれも短縮しているが、 $^{51}\text{Cr}$  法による他家赤血球寿命は正常で、赤血球寿命短縮の原因が赤血球自身にあることと示している。これに反して再生不良性貧血の1例では、 $^{32}\text{P}$  法

\* K. Wakisaka (教授): 京都大学内科。

による自家赤血球寿命,  $^{51}\text{Cr}$  法による自家赤血球寿命が短縮しているとともに,  $^{51}\text{Cr}$  法による他家赤血球寿命も短縮している。したがって本症例においては、赤血球寿命の短縮には赤血球自身のみならず、それ以外にも原因のあることが推定される。

#### IV. $^{51}\text{Cr}$ , $^{59}\text{Fe}$ による出血量の測定

$^{51}\text{Cr}$  で標識した赤血球を輸血し、糞便中に排泄される  $^{51}\text{Cr}$  量を測定することによって算出した消化管よりの出血量と、 $^{59}\text{Fe}$  利用率曲線より算出した出血量は、消化管における  $^{59}\text{Fe}$  の再吸収がない場合にはよく一致した。また  $^{59}\text{Fe}$  により出血量を測定することにより、 $^{51}\text{Cr}$  法を用いる赤血球寿命測定法において、出血による見かけの寿命短縮を補正することができる。

#### V. $^{51}\text{Cr}$ , $^{59}\text{Fe}$ による脾臓の赤血球抑留作用の研究

$^{51}\text{Cr}$  で標識した赤血球を静注し30~60分後の脾臓部対心臓部の表面計測値の比(spleen/heart ratio)と、 $^{59}\text{Fe-globulinate}$  を静注し、直後および  $^{59}\text{Fe}$  が赤血球中に最大に取り入れられた時期における spleen/heart ratio を比較すると、溶血性貧血、鉄欠乏性貧血では、 $^{51}\text{Cr}$ ,  $^{59}\text{Fe}$  のいずれの場合にも標識赤血球の spleen/heart ratio が高くなっている。これに反して  $^{59}\text{Fe-globulinate}$  投与直後で  $^{59}\text{Fe}$  がまだほとんど全部血漿中にある場合の spleen/heart ratio は溶血性貧血でも、鉄欠乏性貧血でも高くない。この成績から、溶血性貧血、鉄欠乏性貧血においては脾臓において赤血球の抑留、血液の濃縮化がおこることがわかる。Banti 症候群においても同様の傾向が認められる。

遺伝性球状赤血球症の患者に  $^{51}\text{Cr}$  標識自家赤血球を静注し、noradrenalin を注射すると、末梢血液中の  $^{51}\text{Cr}$  の放射能は低下する。これは脾臓中に抑留されていた標識されていない赤血球が noradrenalin の注射により、脾臓から放出されるためと考えられる。 $^{51}\text{Cr}$  標識自家赤血球静注後2週間目に  $^{59}\text{Fe-globulinate}$  を静注し、2日後に noradrenalin を注射すると、末梢血液中の  $^{51}\text{Cr}$  の放射能は低下するが、 $^{59}\text{Fe}$  の放射能は逆に上昇する。この末梢血液中における  $^{59}\text{Fe}$  の放射能の上昇は、2日以内に  $^{59}\text{Fe}$  で標識された新生赤血球が選択的に脾臓に多く集まり、これが noradrenalin の注射により、末梢血中へ放出されたためと考えられる。

#### IV. $^{55}\text{Fe}$ および $^{59}\text{Fe}$ 二重標識法による鉄代謝の研究

従来鉄代謝の研究には、主として  $^{59}\text{Fe}$  の単独使用が行なわれてきたが、2種類の放射性鉄すなわち  $^{55}\text{Fe}$  および

$^{59}\text{Fe}$  の同時使用はさらに有力な鉄代謝研究の手段を提供するものである。 $^{59}\text{Fe}$  は半減期45.1日の  $\beta^-$ 崩壊により3本の  $\gamma$ 線を放射して  $^{59}\text{Co}$  に変換する。一方  $^{55}\text{Fe}$  は半減期2.60年 5.9KeV の KX線を放射するのみである。したがって、この両核種の量は、その放射線の相違や半減期の差を利用して、同一試料より別個に測定しうる。このうち、 $^{59}\text{Fe}$  の測定は、その  $\gamma$ 線を利用し、NaI(Tl)scintillation counter を使用することにより、その試料のいかんにかかわらず、また  $^{55}\text{Fe}$  放射活性の影響を受けることなしに、測定しうる。これに反して、 $^{55}\text{Fe}$  はその X線のエネルギーが弱いために、試料中より鉄のみを純粋に取り出した後に測定を行なう必要がある。このために、灰化後銅板上に電気メッキした鉄試料が用いられる。

$^{55}\text{Fe}$  と  $^{59}\text{Fe}$  を同時に含んだ試料の放射活性測定法としては、 $^{59}\text{Fe}$  の  $\gamma$ 線エネルギーが  $^{55}\text{Fe}$  の X線エネルギーよりも非常に強いことを逆に利用して、薄い NaI(Tl) 結晶を使用することにより  $^{59}\text{Fe}$  の計数ができるだけ排除した状態で  $^{55}\text{Fe}$  活性の測定を試みた。この目的のために厚さ 0.15mm のベリリウムと 0.005mm のアルミニウム箔で覆った厚さ 3mm、直経 1 $\frac{3}{4}$  inch の NaI (Tl) 結晶を使用した。

いま、銅板上にメッキした  $^{55}\text{Fe}$  標準試料を使用し、ベリリウムより 5mm 離れた位置におき、波高分析器で  $^{55}\text{Fe}$  のスペクトルを画かせてみると、5.9KeV に一致して単峰のピークが認められる。 $^{59}\text{Fe}$  の標準試料では、この部分にピークは認められない。discriminator bias を次第に上昇せしめて、その総計数値の変動を求めてみると、 $^{55}\text{Fe}$  の計数値の減少に比し  $^{59}\text{Fe}$  および background 計数値の減少が急激であり、かつ  $^{55}\text{Fe}$  の実用効率  $\frac{(^{55}\text{Fe})^2}{(\text{B})}$  (B: background) の最大となる点が  $\frac{^{55}\text{Fe}}{^{59}\text{Fe}}$  計数比の最大部分に一致したので、この点における条件を  $^{55}\text{Fe}$  活性測定のための条件として採用した。

この条件における両核種に対する測定効率は、 $^{55}\text{Fe}$  4.4%,  $^{59}\text{Fe}$  5.7%, background 計数率は約 150 cpm である。一方  $^{59}\text{Fe}$  活性測定のためには、2 inch NaI (Tl) 結晶付 well type scintillation counter を使用したが、この装置における測定効率は、 $^{55}\text{Fe}$  に対しては O,  $^{59}\text{Fe}$  に対しては試験管 (2ml) では 22.0%,  $^{55}\text{Fe}$  測定用銅板においては 6.5% で、background 計数率は約 100 cpm であった。

#### VII. $^{59}\text{Fe}$ および $^{55}\text{Fe}$ による網内系機能の研究

網内系は congo red, 墨汁などの色素やその他のコロ

イド粒子を摂取するとともに、摂取された物質を処理する能力をもっている。われわれは放射性鉄で標識したコロイド鉄の1種であるコンドロイチン硫酸鉄、および放射性射鉄で標識した熱処理赤血球を用いて、主として鉄代謝の見地から、網内系機能を摂取能と処理能に分けて観察した。

網内系細胞のコロイド鉄処理能の定量的解析を行なうためには、<sup>59</sup>Feコロイド鉄と<sup>55</sup>Fe-globulinateを同時に静脈内に投与した後の血漿中の放射活性を頻回測定して、単位時間内にコロイド鉄が網内系細胞によって処理され血漿中に遊離する<sup>59</sup>Fe量を測定した。この場合、コロイド鉄投与後のある時期では、血漿中にまだ網内系細胞に摂取されないコロイド鉄中の<sup>59</sup>Fe活性と網内系による処理を受け、血漿中にトランスフェリン鉄として、でてきた<sup>59</sup>Fe活性が共存する。この両者を分離するため、一定量の血漿に中性で0.1%の濃度になるようにrivanolを添加し、コンドロイチン硫酸鉄を沈澱せしめた。この条件ではトランスフェリン鉄を含む $\beta$ -globulinは沈澱しない。網内系細胞より単位時間内に遊離した<sup>59</sup>Fe量は、トランスフェリン<sup>59</sup>Fe活性とその時間内の<sup>55</sup>Fe-globulinateのクリアランスの速度より算出した。コロイド鉄の<sup>59</sup>Fe赤血球への最大利用率と<sup>55</sup>Fe-globulinateの利用率の差は網内系細胞のコロイド鉄処理能を表現するものと考えられる。

またコロイド鉄由来の<sup>59</sup>Feの最大利用率に<sup>55</sup>Fe-globulinateの赤血球への転入曲線をあてはめた曲線は、網内系細胞より遊離し、トランスフェリン鉄となった<sup>59</sup>Feを一時に生体に投与したと仮定した場合の転入曲線になるから、この曲線と実際の<sup>59</sup>Fe赤血球転入曲線との時間的な差は網内系細胞からの<sup>59</sup>Feの遊離速度を表現することになる。

上述の方法で計算した<sup>59</sup>Fe標識コロイド鉄投与後6時間内の網内系細胞からの遊離鉄量を正常例および各種疾患についてみると、鉄欠乏性貧血例では正常対照に比べて遊離鉄量多く、治療後は減少している。リウマチ性関節炎、獲得性溶血性貧血例でも遊離鉄量は減少している。

<sup>59</sup>Feコロイド鉄より由来した<sup>59</sup>Feの赤血球転入率と、この投与6時間内の<sup>59</sup>Fe遊離量との間には正の相関がある。またコロイド鉄由来の<sup>59</sup>Feとglobulinateとして投与した<sup>55</sup>Feの赤血球利用率の比と、6時間内の<sup>59</sup>Fe遊離量との間にも正の相関がある。すなわち投与初期6時間内の遊離量はコロイド鉄全体の処理される量と密接な関連がある。また<sup>59</sup>Feと<sup>55</sup>Feの赤血球ヘムへの転入速度の時間

差は、鉄欠乏性貧血、Banti症候群では正常に比べて短くなっている。<sup>59</sup>Feコロイド鉄と<sup>55</sup>Fe-globulinateとの赤血球利用率の比とそれらの赤血球への利用速度の時間差との間には負の相関がある。すなわちコロイド鉄の処理能の悪い場合には、網内系細胞よりの鉄の遊離速度も遅い。以上の事実から、網内系細胞のコロイド鉄処理能力は鉄欠乏性貧血では亢進し、リウマチ性関節炎などではコロイド鉄摂取能は正常と変わらないにもかかわらず、鉄処理能は著明に低下していることが明らかである。

次ぎに再生不良性貧血患者に<sup>59</sup>Fe-globulinateと<sup>55</sup>Fe-コンドロイチン硫酸鉄を同時に静脈内に投与し、放射性鉄の赤血球利用曲線に及ぼすステロイドホルモン投与の影響をみると、ステロイドホルモン投与により<sup>59</sup>Fe-globulinate、<sup>55</sup>Fe-コンドロイチン硫酸鉄とともにその赤血球利用曲線は上昇を示すが、とくに<sup>55</sup>Fe-コンドロイチン硫酸鉄利用曲線の方が、<sup>59</sup>Fe-globulinate利用曲線よりも上昇度が大きく、赤血球中の $\frac{^{55}\text{Fe}}{^{59}\text{Fe}}$ は上昇する。この成績は、ステロイドホルモンの投与により、網内系の鉄処理能あるいは鉄放出能が促進されることを示している。

### VIII. <sup>55</sup>Feおよび<sup>59</sup>Fe二重標識法による鉄吸収の研究

トレーサー量の放射性鉄<sup>55</sup>Feまたは<sup>59</sup>Feを、投与直前に生理的食塩水に混じて、その一定量を静脈内投与し、その後、10、20、30~40分後と少なくとも3回の採血を行なう。次に他種の放射性鉄で標識した硫酸鉄溶液(鉄量として1mg)をpH2に調整し、アスコルビン酸100mgを加えてその一定量(通常50ml)を経口投与する。その後、数時間、通常15分間隔で頻回採血し、さらに、そのうち2~3週間適宜採血する。血漿鉄消失の速やかな対象(たとえば鉄欠乏性貧血患者)においては、静注した放射性鉄の消失率測定を正確ならしめるために、1.5~2.5時間間隔でその放射性鉄の静注を繰り返す。かくしてえられた血漿ならびに全血試料について、<sup>55</sup>Feならびに<sup>59</sup>Fe活性の測定を行ない、Hallbergらに従って単位時間内の鉄吸収量を求める。また2~3週間後の全血試料よりえられた<sup>55</sup>Feならびに<sup>59</sup>Feに測定値からSaylorらの原理により総鉄吸収量を求める。この方法により、経口投与した放射性鉄の吸収曲線を求めるとき、この曲線は2つの指數函数の差として表わしうることがわかる。すなわち、片対数座標上の放射性鉄吸収曲線の傾斜は2時間以後一定となり、かつ静脈内投与放射性鉄消

失曲線の傾斜と一致するので、この両曲線を重ね、両曲線の差を図表上に plot していくと、胃切除者においてはすべて、また、非胃切除者では最初の15分値を除いてすべての点が一直線上に位置する。これは鉄吸収を 2 compartment system によって解析しうることを示している。このモデルにおいて、腸管プールに入った鉄が血漿プールに移動する rate constant を  $\alpha_1$ 、血漿プールから体内組織へ鉄が流出する rate constant を  $\alpha_2$ 、腸管プール中の鉄が非吸収性の鉄化合物となるか、あるいは腸粘膜絨毛上皮細胞中に沈着する rate constant を  $\alpha_3$  とすると、鉄の吸収率(AB)は  $AB = \frac{\alpha_2}{\alpha_1 + \alpha_3}$  で計算できる。

この場合、静脈投与 Fe 曲線の傾斜と、経口投与 Fe 曲線の 2 時間以上の傾斜は同一となるので、鉄の静脈内投与を省略し、経口投与に  $^{59}\text{Fe}$  と  $^{55}\text{Fe}$  の 2 種の放射性鉄を用いて、ほとんど同時に、同一条件下において、鉄の吸収動態を比較することができる。

たとえば 2 種の異なる鉄量、 $50\mu\text{g}$  と  $1\text{mg}$  を投与した場合の鉄の吸収量を比較すると、鉄欠乏のない正常例では、 $1\text{mg}$  投与の場合の方が  $50\mu\text{g}$  投与の場合よりも鉄の吸収の絶対量は大きくなるが、吸収率は低下する。これに反し鉄欠乏性貧血例においては、 $1\text{mg}$  投与の場合の方が  $50\mu\text{g}$  投与の場合よりも、吸収の絶対量のみならず、吸収率も増加する例がある。なお鉄欠乏性貧血例においては、正常例に比べて鉄吸収の絶対量、吸収率ともに増加するが、この場合主として増加するのは rapid phase の吸収である。

また 3 倍の鉄と、2 倍の鉄の吸収率を同一条件で比較するために、 $^{59}\text{Fe}$  で標識した  $\text{FeCl}_3$   $1\text{mg}$  と  $^{55}\text{Fe}$  で標識した  $\text{FeSO}_4$   $1\text{mg}$  を 2 時間の間隔をおいて経口投与し、その吸収をみると、 $\text{FeCl}_3$  よりも  $\text{FeSO}_4$  の方が rapid phase の吸収率、総吸収率ともに大で、2 倍の鉄の方が 3 倍の鉄よりも吸収されやすいことがわかる。

さらに鉄吸収に及ぼす還元 glutathione の影響をみるために、奇数日には  $^{59}\text{FeSO}_4$ 、偶数日には  $^{55}\text{FeSO}_4$  と還元 glutathione を経口投与して、それぞれ 5 日間交互に反覆し、その吸収率を比較した。その結果は還元 glutathione を同時投与した場合の方が鉄の吸収率が増加することを認めた。なお、ビタミン C の同時投与も鉄の吸収を増加させるが、これにさらに還元 glutathione を添加した場合には、鉄の吸収率はそれ以上著明に増加することはない。このことから還元 glutathione の鉄吸収増加作用は主として、その還元力によるものと推定され

る。

#### IX. $^{60}\text{Co}$ , $^{57}\text{Co}$ によるビタミン B<sub>12</sub> 代謝の研究

ビタミン B<sub>12</sub> (以下 B<sub>12</sub> と略) の代謝の研究には放射性コバルト標識した B<sub>12</sub> がよく用いられているが、この場合  $^{62}\text{Co}$  と  $^{57}\text{Co}$  を用いることにより、異なった B<sub>12</sub> の誘導体の代謝を同時にしらべることができる。 $^{60}\text{Co}$  は半減期 5.24 年、 $^{57}\text{Co}$  は半減期 270 日でこの両者は  $\gamma$  線 spectrometer を用いて分離測定が可能である。

1958 年 Barker らによって補酵素型 B<sub>12</sub> が発見せられ、その B<sub>12</sub> 活性型としての意義が注目されているが、B<sub>12</sub> と補酵素型との代謝を同時にしらべるため、 $^{57}\text{Co}$  で標識した B<sub>12</sub> と  $^{60}\text{Co}$  で標識した補酵素型 B<sub>12</sub> をシロネズミに同時に静脈内注射し、その血中よりの消失速度をみると、補酵素型 B<sub>12</sub> の方が B<sub>12</sub> より速やかに血中濃度が低下する。またこの場合ブタ内因子を同時投与すると、B<sub>12</sub>、補酵素型とともに、単独投与の場合に比べて血中濃度の低下が著明である。またこの場合肝臓への摂取率をみると、内因子を同時投与しない場合には補酵素型 B<sub>12</sub> の方が B<sub>12</sub> よりも肝臓の摂取率が大である。

内因子同時投与の場合には、補酵素型 B<sub>12</sub>、B<sub>12</sub> とともに肝臓の摂取率が著明に増加するが、とくに補酵素型 B<sub>12</sub> の摂取率の方が B<sub>12</sub> よりも長く高値を持続する。四塩化炭素障害シロネズミに  $^{57}\text{Co}$  で標識した B<sub>12</sub> と  $^{60}\text{Co}$  で標識した補酵素型 B<sub>12</sub> を同時に静脈内注射し、その肝臓摂取率をみると、四塩化炭素障害シロネズミでは正常に比し補酵素型 B<sub>12</sub> の摂取率は低下するが、なお B<sub>12</sub> に比べれば肝臓摂取率が大である。

また cyanocobalamin と hydroxocobalamin の代謝を比較するために、 $^{60}\text{Co}$  で標識した cyanocobalamin と  $^{57}\text{Co}$  で標識した hydroxocobalamin をそれぞれ  $30\mu\text{g}$ 、正常人に同時に静脈内注射し、その血中濃度および尿中排泄率をみると、hydroxocobalamin の方が cyanocobalamin よりも血中濃度の低下が早く、しかも尿中排泄率は少ない。これは hydroxocobalamin の方が cyanocobalamin よりも組織親和性の大きいことを示している。

以上二重標識法の血液学研究への応用の 2, 3 について、われわれの成績を中心にのべた。本法は血液学領域においても、種々の新しい研究手段を提供し、多くの問題の解決に寄与するところが大きいと考える。

協同研究者：内野治人 剱米重夫 高田重良  
白川 彰 高橋 豊 矢切良穂