

S-III-9. ^{59}Fe による TIBC, UIBC の測定法の開発

名古屋大学 放射線科

斎藤 宏

〔目的〕 不飽和血清鉄結合能 (UIBC) の測定が ^{59}Fe を用いて容易に行なわれるようになったのに総血清鉄結合能 (TIBC) の測定には ^{59}Fe を用いる方法がなく不便であった。比色法には鉄汚染の問題などがあり、迅速簡単な TIBC の測定法を確立したい。他方従来の UIBC の測定法にも問題があることを発見したのでその解決をしたい。

〔方法〕 トランスフェリンから血清鉄 (SI) を遊離させるには pH を下げればよいので安定な酸につき検討を加えた。遊離した SI を吸着除去するレジンについても酸との組合せで種々検討を加えた。SI 除去血清の中和には重曹を用いた。トランスフェリンに結合後の鉄イオン除去には UIBC 同様のレジンを用いた。TIBC の測定には血清 1 ml, UIBC の測定には 0.5 ml を用いた。正常人ならびに各種疾患患者について他の方法とも比較した。

〔成績ならびに考按〕 SI 除去用酸にはクエン酸がすぐれていた。トランスフェリンの免疫測定、比色法による SI と UIBC との和による TIBC 値との比較では互に良く一致した値を示した。また本 TIBC 値は高い再現性を示した。それ故、TIBC から UIBC を差引いて血清鉄を測定することも可能であった。しかし、鉄欠乏性貧血の血清では比色法の SI 値と一致しないことがあったので種々検討の結果、UIBC が 250 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ をこえる場合、UIBC の大なる血清ほど鉄とトランスフェリンとの結合に時間がかかることが明らかになった。すなわち鉄欠乏性貧血の血清 (漿) の UIBC 測定時鉄と血清とのインキューベーションは20分では不十分で90分以上を必要とした。添加鉄量が多い時は反応は早くなったがフリーの除去が問題である。TIBC の測定ではこのような現象は全くなかった。そこで UIBC 用鉄液に重曹を少量添加したところ反応は20分以内に完了した。また一夜放置しても値に変化がなかった。また、そのさい交換反応は3%以下であった。本 TIBC 法で反応が速やかなのは脱 SI 操作があり、余分のイオンも除かれていることにもよると考えられる。UIBC 同様に ^{59}Fe を用いて TIBC を用いる方法を開発した。UIBC 法も改良でき、ルーチンに応用している。

S-III-10. Vitamin B₁₂ Radioassay の問題点

—Solidphase Intrinsic Factor

の調製とその性質—

札幌医科大学 癌研内科

名取 博 福田 守道 松村 瑞江
漆崎 一朗

Vitamin B₁₂ (B₁₂) の radioassay は一般に competitive protein binding を利用して行なわれるが種々の B₁₂ 結合蛋白の中でも内因子 (IF) はその性質が良く知られており B₁₂ に対する特異性が高く結合力も強い。IF による B₁₂ の radioassay には従来 Lau の alb.-charcoal 法が用いられて来たが IF は不安定で失活やガラス管壁への吸着等の問題があり、さらに低濃度域の測定が出来なかった。そこで IF を不溶性粒子に共有結合させたいわゆる solid phase IF を調製するため IF 固相化における不溶性粒子の選択と IF の処理および両者の結合法を検討し、調製された solid phase IF の性質を調べて B₁₂ radioassay system を組み、Lau の charcoal 法と比較した。

〔方法〕 Hog IF concentrate を Sephadex G-150 により gel 濾過し IF monomer 分画を取り Porath の方法に従って BrCN を用い Sepharose CB, Sephadex G-25 super fine に結合させた。Sephadex G-25 ultrafine-IF は Pharmacia 製を用いた。放射性 B₁₂ は [^{57}Co]-Cyanocobalamin (180 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$) を用いた。

〔成績と考按〕 用いた IF 蛋白の60%以上が不溶性粒子に結合し B₁₂ 結合能も保存されていた。1) 結合能の保存に関しては B₁₂ 結合にともなう IF 分子の高次構造の変化を妨げず、B₁₂ binding site が立体障害を受けないように結合すること、2) 不溶性粒子の effective pore radius による IF 分子結合位置の制限とこれに対する B₁₂ 結合時の分子篩効果、3) 遠心分離による B/F 分画の容易さ、4) 安定性等を考慮するに、1), 2), 4) については Sepharose 6B, Sephadex G25 superfine, ultrafine 3 者ともに4ヵ月間以上安定で (4°C), 標準曲線と time course は粒子の種類に特徴的だが、直線性、再現性良好で incubation 5分後ですでに測定は可能であった。感度は放射性 B₁₂ の specific activity に依存するが 25 pg/ml まで実用となった。3) については Sephadex が良好であった。Dilution test, 添加 test 等、本 System の細部について検討した。Lau 法で測

定出来ぬ低濃度域を除けば本法との相関は比較的良好であった。最近入手した同様の原理に基づく B₁₂ test kit (Pharmacia, Sweden) による成績も比較し、微生物学的測定法との関係を考察する。

S-III-11. ヒトおよびラット α -fetoprotein の Radioimmunoassay

——二抗体法および固相法の基礎的検討——

神戸大学 第二内科

石井 勝 馬場 茂明

〔目的〕 ヒト α -fetoprotein の Radioimmunoassay について感度、精度、特異性などの点から二抗体法および固相法の測定条件とその長短について基礎的検討を行ない、他方 α -fetoprotein (α f) の基礎的研究に必要なラット α f の Radioimmunoassay (RIA) 法の確立と測定条件の基礎検討を試みた。

〔材料、方法〕 ヒトおよびラット精製 α f は、肝癌患者腹水およびラット胎児組織抽出液から夾雑蛋白に対する抗体を用いた免疫吸着法で純化した標品を用いた。各特異 α f 抗体は各精製 α f をフロイントアジュバントを用い家兎に免疫し作製した。標識 α f の作製は、各精製 α f 10~50 μ g に ¹²⁵I 1 mCi を Hunter & Greenwood の方法で標識後 Sephadex G-75 カラムクロマトにより

行なった。二抗体法は Morgan らの方法に準じたが、第一抗体濃度、反応時間、標識 α f 量、第二抗体濃度、反応時間などを検討し、一方固相法はポリエスチレンチューブを用いて pH 9.6, 0.1 M 炭酸緩衝液で α f 抗体をチューブに固着させたが、抗体濃度、固着反応時間、標識 α f 量 incubation 時間について最適条件を探索した。

〔成績〕 ヒトおよびラット α f の ¹²⁵I 標識率はほぼ同率で約 6~10 mCi/mg であった。二抗体法は第一抗体ヒト 5,000 倍、ラット 1,000 倍稀釈液 0.1 ml、標識 α f 量 10,000 cpm. α f 4 m μ g, 第一、第二反応時間は 48 時間、24 時間が最適で、 α f 8~500 m μ g/ml で容量反応曲線を示した。 α f 抗体を用いた affinity chromatography で処理した正常ヒトあるいはラット血清添加標準 α f 容量反応曲線は上記曲線とほぼ一致した。固相法は α f 抗体濃度ヒト 500 倍、ラット 100 倍稀釈液 1 ml、固着反応時間 6 時間、標識 α f 量 50,000 cpm. α f 20 m μ g/ml, incubation 時間 24 時間が最適条件で、 α f 1~16 m μ g/ml で容量反応曲線を示した。二抗体法、固相法の精度は、それぞれ $\pm 7\%$, $\pm 20\%$, 再現性は、 $\pm 10\%$, $\pm 30\%$ であった。

〔結論〕 ヒト、ラットともに同様の成績を得た。二抗体法に比し固相法は感度が鋭敏で、1 m μ g/ml の α f が測定可能であったが、精度、再現性は劣った。両法とも特異性は十分であった。