

## 《ノート》

## Two-site Immunoradiometric Assay 法による 血中フェリチン測定の検討

Evaluation of Measuring Blood Ferritin Levels by Two-site Immunoradiometric Assay

辻野大二郎\* 佐々木康人\* 千田 麗子\* 染谷 一彦\*  
富樫 修\*\* 秋田 誠\*\* 松野 和彦\*\* 新発田杏子\*\*\*

Daijiro TSUJINO\*, Yasuhito SASAKI\*, Reiko CHIDA\*, Kazuhiko SOMEYA\*,  
Osamu TOGASHI\*\*, Makoto AKITA\*\*, Kazuhiko MATSUNO\*\* and Kyoko SHIBATA\*\*\*

\*The 3rd Department of Internal Medicine, St. Marianna University School of Medicine

\*\*Hoechst Japan Ltd. Development Laboratories

\*\*\*Hoechst Japan Ltd. Pharmaceutical Division, Section of Radioisotopes

### I. はじめに

フェリチンは人体における主要な鉄貯蔵物質であり、肝、脾、骨髄、心、腎、胎盤などを中心にあらゆる組織中に見出される。分子構造は分子量約45万の蛋白の殻と鉄を含む核とより成る。核の鉄成分は変動するので全体の分子量も鉄の分子量により変化する<sup>1,2)</sup>。近年の放射性免疫学的測定法の進歩により微量の血清中フェリチンの存在が知られるようになり、これが臨床的鉄欠乏及び過剰状態を非常によく反映することが知られている<sup>3,4)</sup>。最近では、これ以外にも肝疾患<sup>5)</sup>をはじめとする良性疾患、白血病や悪性リンパ腫<sup>6)</sup>、癌疾患<sup>7)</sup>などで血清中フェリチン値が生体内鉄貯蔵とは相関せずに上昇することが知られ、その臨床的応用の有用性が期待されている。

血清中フェリチン濃度の測定法としては、im-

munoradiometric assay 法<sup>3,8)</sup>、2抗体法による radioimmunoassay 法<sup>9)</sup>などが報告されている。今回我々は two-site immunoradiometric assay 法を用いた RIA-gnost® Ferritin kit (Behringwerke 社製) を使用する機会を得たので、その基礎的検討の結果と臨床応用について報告する。

### II. 方法と対象

RIA-gnost Ferritin Kit は、抗フェリチン抗体のついているプラスチック球を固相とするサンドイッチ型の two-site 固相アッセイの原理による immunoradiometric assay 法である。実際の測定は、試験管に抗フェリチンプラスチック球(以下抗フェリチン球)を1つずつ入れ、これに緩衝液 200  $\mu$ l と検体血清か血漿、又はスタンダード血清 100  $\mu$ l を入れ、混和し、37°C で 5 時間インキュベートする(第一反応)。溶液を吸引除去したのち蒸留水 2 ml で抗フェリチン球を洗浄し、再度洗浄液を吸引除去する。<sup>125</sup>I-抗フェリチン抗体 300  $\mu$ l を加え、37°C で 15~17 時間インキュベートする(第2反応)。溶液を吸引除去したのち、抗フェリチン球を蒸留水 2 ml で洗浄する。洗浄液を吸引除

\* 聖マリアンナ医科大学第3内科

\*\* ヘキストジャパン㈱ 総合開発研究所

\*\*\* ヘキストジャパン㈱ 医薬品事業部 RI 課

受付: 54年1月10日

最終稿受付: 54年3月16日

別刷請求先: 川崎市高津区菅生 2095 (〒213)

聖マリアンナ医科大学第3内科

辻野 大二郎

**Key words:** Ferritin, Two-site immunoradiometric assay

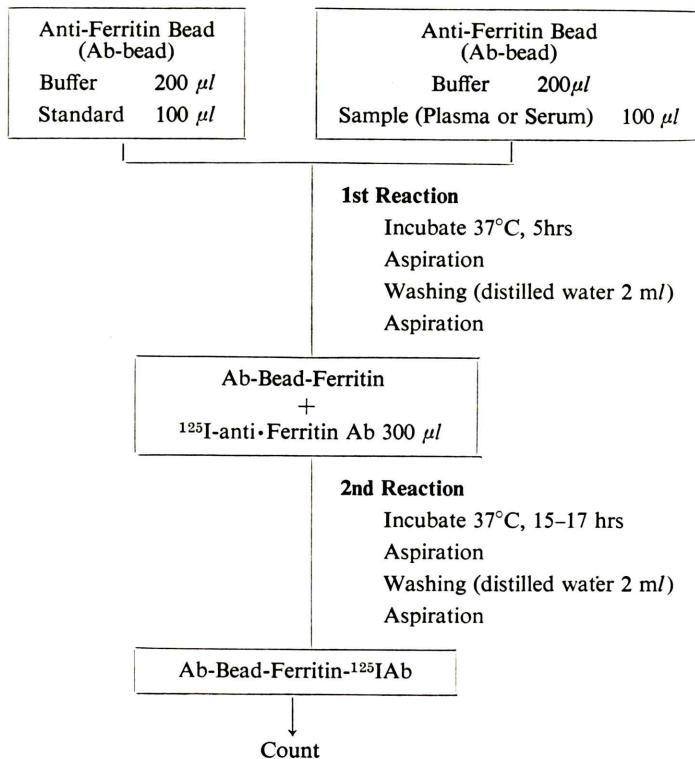


Fig. 1 Assay procedures.

去したのち、抗フェリチン球の放射活性 (Bound. B) をオートウェルシンチレーションカウンターで測定する (Fig. 1)。同時に全放射能 (Total. T) も測定する。片対数のグラフの横軸に濃度、縦軸に B/T% をとり標準曲線を描き、これを用いて検体中フェリチン濃度を求めた。フェリチン濃度 200 ng/ml 以上の場合は、Kit に付けられた希釈用血清で希釈再検した。

Kit の基礎的検討として、インキュベーション時間、温度の影響、抗フェリチン球洗浄の影響、再現性、回収率、希釈試験を行なった。

臨床応用の対象は正常対照男女各19例、良性疾患患者55例、悪性腫瘍患者70例である。良性疾患のうちわけは、急性肝炎10例、慢性肝炎5例、肝硬変6例、胃・十二指腸潰瘍10例、胃炎5例、胆石症5例、その他14例であり、悪性腫瘍疾患は胃癌23例、大腸直腸癌18例、肝癌6例、肺癌8例、乳癌5例、血液疾患7例、その他の癌3例である。

### III. 結 果

#### 1. 基礎的検討

1) 標準曲線：代表的標準曲線を Fig. 2 に示す。測定可能範囲は 4~270 ng/ml でこの範囲内での結合率 (B/T%) は 10~40% である。

2) インキュベーション時間と温度の影響：第1反応でのインキュベーション時間の影響を検討した結果、Fig. 3 に示すように 5 時間のインキュベーションで抗フェリチン球に対する検討フェリチンの結合率はプラトーに達したので、第1反応時間は 5 時間とした。

第2反応では、インキュベーション時間 1~6 時間で B の計数率は急速に上昇し、以後 15~24 時間でも緩徐な上昇を示した。また第2反応のインキュベーション温度による影響をみると、37°C では室温に比し高い結合率がみられた (Fig. 4)。

3) 抗フェリチン球洗浄の影響：抗フェリチン

球洗浄回数の標準曲線におよぼす影響をみたが、洗浄1~3回の間で有意な影響はみられなかった。この結果より洗浄は1回のみとした。洗浄の溶媒による影響を蒸留水と0.1M Borate Buffer (pH 8.6, 0.5% BSAを含む)で比較したが、Bufferで洗浄した場合蒸留水に比し測定結果はやや高値を示したが有意の差はみられず、再現性もほぼ同様であった。この結果より実際の測定にはより簡便な蒸留水を洗浄液として使用した。

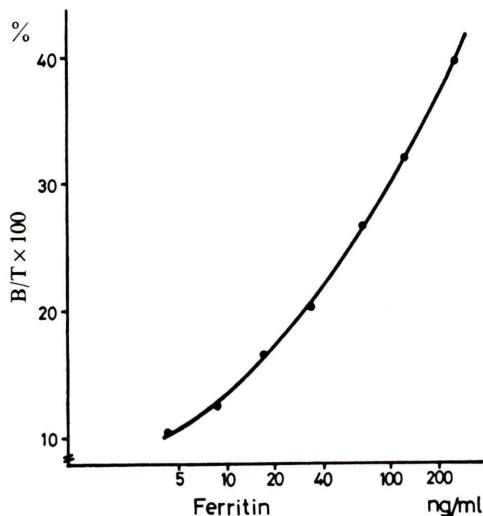


Fig. 2 A typical standard curve.

4) 再現性：濃度の異なる3種の検体を各々10回同時に測定した結果、得られたwithin assay errorは平均濃度23.25 ng/mlの検体で変動係数(C.V.)7.3%, 42.95 ng/mlの検体でC.V. 6.9%, 170.0 ng/mlの検体でC.V. 8.5%であった。3種の検体を各々10回連続して測定し得たbetween assay errorは平均濃度22.24 ng/mlでC.V. 6.1%, 42.0 ng/mlでC.V. 7.6%, 162.5 ng/mlでC.V. 7.8%であった(Table 1)。

5) 回収率：3種のプール血清に既知の濃度の標準血清を各々加えて測定し、理論値と実測値を

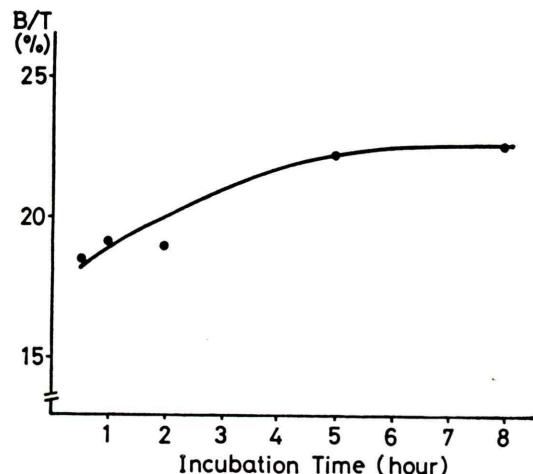


Fig. 3 Effect of Incubation time on the 1st reaction.

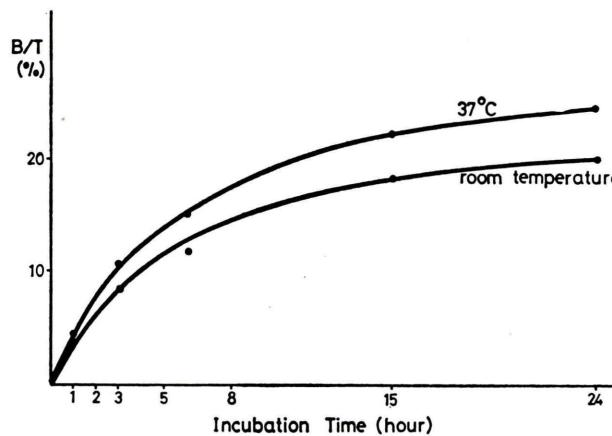


Fig. 4 Effects of Incubation time and temperature on the 2nd reaction.

比較して回収率を求めた。回収率は89~113%，平均103%であった(Table 1)。

6) 希釈試験：未希釈でのフェリチン値が200 ng/ml以上を示した患者検体5例につき、kitに付いている希釈用血清を用いて希釈試験を行った。2例は20倍希釈より、他の3例は8倍希釈より測定を行い、全例理論値とよく一致する測定値を得

Table 1

## 1. Within assay error

	n=10		
	$\bar{m}$ (ng/ml)	1SD	CV (%)
(1)	23.25	1.69	7.3
(2)	42.95	2.97	6.9
(3)	170.00	14.49	8.5

## 2. Between assay error

	n=10		
	$\bar{m}$ (ng/ml)	1SD	CV (%)
(1)	22.24	1.35	6.1
(2)	42.00	3.20	7.6
(3)	162.50	12.69	7.8

## 3. Recovery rate

	Calculated values (ng/ml)	Observed values (ng/ml)	Recovery (%)
(1)	26.2	27.7	106
(2)	37.3	33.0	89
(3)	79.0	92.0	113

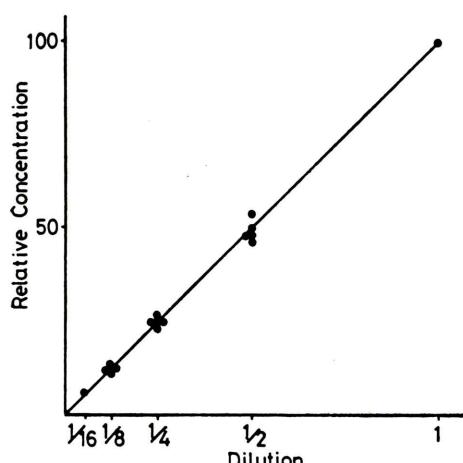


Fig. 5 Dilution test.



Fig. 6 Serum ferritin levels in normal controls.

た(Fig. 5)。

## 2. 臨床応用

正常対照男女各19例の血清中フェリチン値を測定した結果、全例の平均値  $110.8 \pm 83.0$  ng/ml で最高が 309 ng/ml であった。性別では男性  $159.9 \pm 71.9$  ng/ml、女性  $51.4 \pm 50.6$  ng/ml と性差がみられた( $P < 0.01$ ) (Fig. 6)。

良性疾患患者55例の血清中フェリチン値を疾患別にみると、肝胆道疾患で高値を示したものが多々、胃・十二指腸潰瘍、胃炎では、これに比し低値なものが多くみられた(Fig. 7)。

悪性腫瘍患者70例の血清中フェリチン値は肺癌に高値例が最も多く、次いで血液悪性疾患、肺癌に高値例が多かった。血液悪性疾患で高値を示した2例は急性白血病である。胃癌、大腸癌でも一部症例で高値を示すものがあり、これらの多くは肝転移例であった(Fig. 8)。

## IV. 考 案

## 1. RIA-gnost® Ferritin kit の検討

フェリチンの測定法としては、古くは immunoprecipitin 法、immunodiffusion 法があったが感度が悪く微量の血中フェリチン濃度の測定には不十分であった。1972年 Addison ら<sup>3)</sup>が初めて immunoradiometric assay 法を開発し微量のフェリチン測定が可能となった。その後 Miles ら<sup>4)</sup>による two-site immunoradiometric assay 法、新津ら<sup>5)</sup>の2抗体法による radioimmunoassay 法などが報告されている。今回検討した本 kit は、競合結合によらない immunoradiometric assay の原理に基づく血清フェリチンの in vitro 測定用 kit であり、

	Ferritin(ng/ml)						
	0	300	600	800	1000	2000	3000
acute Hepatitis	• •	•	•	•	•	•	•
chronic Hepatitis		•	•	•		•	•
Liver Cirrhosis	•	•	•	•	•	•	•
Gastroduodenal ul.	• • •	•					
Gastritis	• •	•	•				
Cholelithiasis	• •		•	•	•		
Other Disease	• • •	•	•	•			

Fig. 7 Serum ferritin levels in benign diseases.

	Ferritin(ng/ml)						
	0	300	600	800	1000	2000	3000
Gastric Ca.	• • •	•	•	•	•	•	•
Colorectal Ca.	• •	•		•	•		
Hepatoma	• •	•		•	•	•	•
Pulmonary Ca.	•	•	•	•	•	•	•
Breast Ca.	• •	•					
Other Ca.	• •						
Hematologic dis.	• •	• •		•			

Fig. 8 Serum ferritin levels in various malignancies.

抗フェリチン抗体のついているプラスチック球を固相とするサンドイッチ型の two-site 固相相アッセイの原理によっている。測定操作は簡便であり、測定時間は夜間のインキュベーションを入れ、1 日半で終了する。我々の検討では、within assay error, between assay error とも 10% 以下であり、良好な精度、再現性を示した。

本 kit のような two-site solid phase 系は、高濃度では high dose hook effect といわれる効果<sup>8)</sup>が知られているため、フェリチン濃度 200 ng/ml 以上の場合は検体を kit に付いている希釈用血清で希釈測定する必要がある。今回の検討では希釈試験の結果も良好であり、高濃度検体の希釈による測定も特に問題はないと思われた。また固相法であるため抗フェリチン球洗浄による測定値への影響が心配されたが、検討の結果では1回の洗浄で十分であり3回までは特に有意の影響は及ぼさなかった。

インキュベーション時間は kit の指示通り行ったが、特に <sup>125</sup>I-抗フェリチン抗体を入れた第2反応では15時間ではまだ反応は完結しておらず、時間の差による変動がみられるので注意を要する。

以上のように本 kit による血中フェリチン濃度の測定は、精度、再現性、感度、安定性など臨床検査法として満足すべきものと考える。

## 2. 臨床応用

血清フェリチンの測定は生体内鉄貯蔵の反映として、鉄欠乏や過剰状態の良い臨床的指標となることが知られている<sup>2~4)</sup>。正常人の血清フェリチン値については男女差があることが知られ<sup>2)</sup>、この性差は貯蔵鉄量の性差とされている。我々の結果でも男性 159.9 ng/ml、女性 51.4 ng/ml と性差がみられた。臨床的には男性に比し女性は常に隠された鉄欠乏状態と考えられ、フェリチンに関しては正常対照とはいえないかも知れない。

臨床例では他の報告<sup>5)</sup>と同様、良性疾患では肝

胆道疾患で高値例が多くみられた。この場合のフェリチンの上昇は、組織破壊からの組織フェリチンの血中への流入が主な原因と考えられている。悪性腫瘍性疾患では、肺癌、肝癌、胃癌、大腸癌の肝転移例などに高値例が多くみられた。血液悪性疾患では急性白血病が高値を示した。悪性腫瘍での血清中フェリチン値の上昇機序は未だ不明の点が多いが、いくつかの報告<sup>6,7,10)</sup>にあるように腫瘍細胞からの腫瘍特異フェチン(carcinofetal isoferritin)の存在も考えられ、腫瘍による組織破壊や悪性腫瘍時の無効造血の影響などを含め、今後の検討が待たれる。

#### IV. おわりに

Immunoradiometric assay法によるフェリチン測定用kit(RIA-gnost® Ferritin)を検討した結果、精度、感度、再現性など良好であり、測定操作も簡便で臨床検査法として満足すべき結果を得た。臨床的には鉄欠乏や過剰状態の判定や加療の指標としての利用以外にも、肝疾患をはじめとする良性疾患、白血病をはじめとする悪性腫瘍性疾患での臨床応用が期待される。臨床例の詳細な検討は別に報告する。

#### 文 献

- 1) Crichton RR: Ferritin: structure, synthesis and function. *N Eng J Med* **284**: 1413-1422, 1971
- 2) Jacobs A, Path FRC, Worwood M: Ferritin in serum: Clinical and biochemical implications. *N Eng J Med* **292**: 951-956, 1971
- 3) Addison GM, Beamish MR, Hales, CN, et al.: An immunoradiometric assay for ferritin in the serum of normal subjects and patients with iron deficiency and iron overload. *J Clin Pathol* **25**: 326-329, 1972
- 4) Lipschitz DA, Cook JD, Miles LEM, et al: Ferritin in serum: Diagnosis of iron deficiency and iron overload. *Amer J Clin Nutr* **27**: 681-687, 1974
- 5) Prieto J, Barry M, Sherlock S: Serum ferritin in patients with iron overload and with acute and chronic liver disease. *Gastroenterol* **68**: 525-533, 1975
- 6) Jones PAE, Miler FM, Worwood M, et al: Ferritinemia in leukemia and Hodgkin's disease. *Brit J Cancer* **27**: 212-217, 1973
- 7) Hazard JT, Drysdale JW: Ferritin in cancer. *Nature* **265**: 755-756, 1977
- 8) Miles LEM, Lipschitz DA, Bieber CP, et al: Measurement of serum ferritin by a 2-site immunoradiometric assay. *Anal Biochem* **61**: 209-224, 1974
- 9) Niitsu Y, Kohgo Y, Yokota M, et al: Radioimmunoassay of serum ferritin in patients with malignancy. *Ann NY Acad Sci* **259**: 450-452, 1975
- 10) 浅川英男, 田口智也, 酒井亮二, 他: 悪性腫瘍と ferritin. *医学のあゆみ* **106**: 259-265, 1978