

《ノート》

ラジオアッセイによる TIBC, UIBC の微量測定法

Micro-method for radioassaying TIBC and UIBC

林 大三郎* 斎藤 宏** 牧 健太郎*** 中沢 信彦***

Daisaburo HAYASHI*, Hiroshi SAITO**, Kentaro MAKI***
and Nobuhiko NAKAZAWA***

*Division of Clinical Chemistry, Radioisotope Laboratory, Nagoya University Hospital

**Radioisotope Laboratory and Department of Radiology, Nagoya University School of Medicine

***Daiichi Radioisotope Labs., Ltd.

はじめに

アイソトープによる UIBC 測定法は Bothwell ら¹⁾により開発され、その後種々の変法が試みられた。それらの測定法での相違点はトランسفェリンに結合した ^{59}Fe と未結合の ^{59}Fe の分離方法にある。鉄イオン吸着剤として炭酸マグネシウム、チャコール、イオン交換樹脂、などが用いられたが、いずれも遠心分離操作が必要であった。遠心を必要としない方法としてはレジンの顆粒を用いることができるが、静置後上清を取り分けなければならない。またレジンスポンジを用いても遠心は省けるがレジンスポンジの洗浄が必要であり、この方法では鉄イオンの吸着除去能力が不十分であった。

斎藤の開発したレジンストリップ法²⁾ではピペット操作は血清を鉄バイアルに加える時のみであり、遠心分離操作も不要になった。また、斎藤は^{3,4)} TIBC のラジオアッセイ法を開発した。この方法は血清鉄の除去に酸とレジンを用い、その

あと UIBC と同様にレジンストリップと ^{59}Fe を用いて測定するもので、鉄の汚染のない精度の高い方法である。現在ではこの方法は UIBC 測定法と共にレゾマット Fe キット（第一ラジオアイソトープ研究所）として広く普及しているが、TIBC (1.0 ml), UIBC (0.5 ml) 合わせて 1.5 ml の血清量を必要としている。開発当初は比色法に比べれば、これでも血清使用量は少ない方であったが、種々の測定法が微量化されつつある現在の傾向にそって乳幼児までも適用できる微量測定法が必要になってきた。そこで従来法の 1/5 量の血清で測定できるよう微量化を試み従来法との相関性、精度の比較など検討を加えた結果、臨床的に十分、使用できることを確認した。

検討事項

- 1) 操作法の検討
- 2) 血清量の影響
- 3) 誤差要因の検討
- 4) 従来法と微量法の精度
- 5) 微量法の日差再現性
- 6) 従来法と微量法の相関性
- 7) 正常値および臨床成績

* 名古屋大学医学部附属病院アイソトープ検査室
** 名古屋大学医学部放射線医学教室
*** 第一ラジオアイソトープ研究所
受付：54年8月27日
最終稿受付：54年8月27日
別刷請求先：名古屋市昭和区鶴舞町65 (番466)
名古屋大学医学部放射線医学教室
斎 藤 宏

Key words: Total iron-binding capacity, Unsaturated iron-binding capacity, Serum iron, Micro-radioassay, Saturation analysis

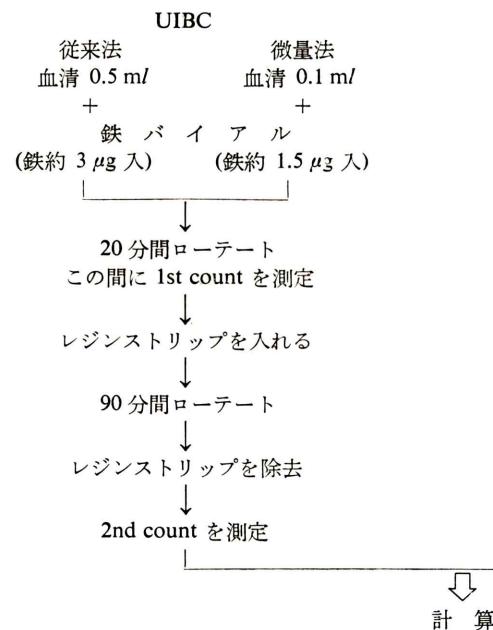
試薬および方法

試薬

従来法と微量法の主な相違点を Table 1 に示す。ここで特記すべき点は、鉄バイアル（クエン酸アノミウム鉄）中の鉄量である。従来法では使用

Table 1 The difference between the present method and newly developed micro-method.

	Present method	Micro-method
Serum for TIBC	ml	1.0
Serum for UIBC	ml	0.5
Citric acid	%	0.6
” ”	ml	1.0
Resin granules	mg	150
Carrier iron	μg	3.0
⁵⁹ Fe radioactivity	μCi	0.1



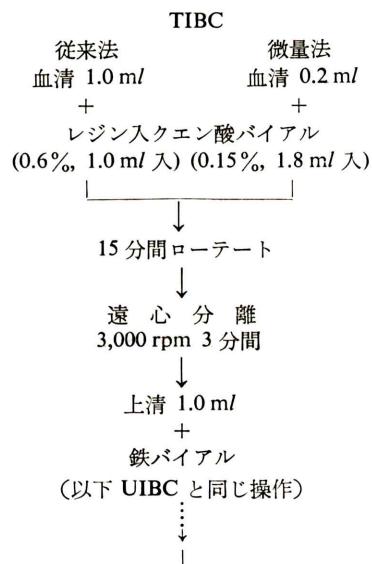
$$\frac{\text{net 2nd counts}}{\text{net 1st counts}} \times \text{鉄量} \times 200 \quad \text{または} \quad 1000^* = \mu\text{g/dl}$$

* 最終使用血清量は従来法では 0.5 ml だったので 100 ml 当たりの結合能として表現するためには 200 倍したが、微量法では最終使用血清量は 0.1 ml となったので 1,000 倍する。

血清量 0.5 ml に対して約 3 μg (約 600 μg/dl に相当) であったのが、微量法では血清量 0.1 ml に対して約 1.5 μg (約 1,500 μg/dl に相当) にした点である。すなわち鉄バイアル中の鉄量は従来法に比較して約半量になっているが、使用血清 0.1 ml に対しては従来法の約 2.5 倍量の鉄量になっている。次に TIBC 測定時における血清鉄除去用のクエン酸濃度が従来法では 0.6% (使用血清量が 1.0 ml なので最終濃度は 0.3% になる) であったのに対して、微量法では 0.15% にした。今回はクエン酸 1.8 ml に対して血清 0.2 ml を加えるので血清の Buffer 効果が期待できない。その結果、血清が万一にも変性することのないようにクエン酸の濃度を低く押えた。

操作法

従来法と微量法の操作手順を下記に示す。



結果および考察

1) 操作法の検討

従来法では血清を鉄バイアルに加えてローテートしながら、血清と鉄イオンとの結合反応のため 20 分間、回転攪拌 (プレインキュベーション) を

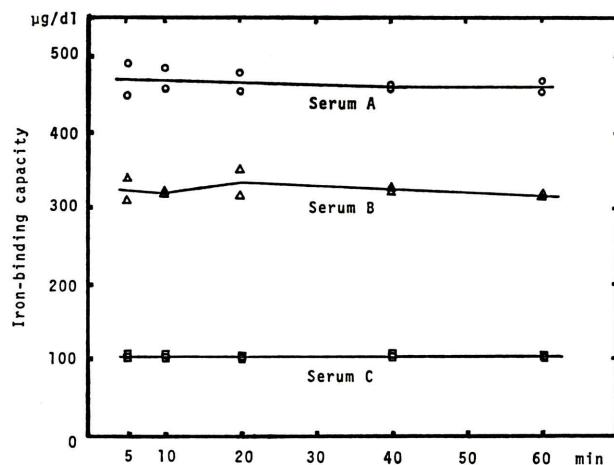


Fig. 1 The time course of UIBC saturation with iron in three kinds of serum A, B and C.

行なったが、微量法においても同じ条件で良いのか否かにつき3種類の血清を用いて検討した(Fig. 1)。

その結果、血清Cは20分以内でも十分であるが、血清A, Bは20分未満ではまだ十分に鉄がトランスフェリンに結合していないことが示唆された。したがって、鉄のbinding capacityの高値が予想される血清は少なくとも20分以上のプレインキュベーションが必要である。

次にトランスフェリンに結合しなかったフリーの鉄イオンの除去に必要な時間を検討した(Fig. 2)。

その結果、血清Bは60分以後で完全に一定(完全除去)となった、血清Cもほぼ一定となったが血清Aについては、かなり変動している。これはバラツキの範囲であって、一応は60分以後は一定になっていると判断すべきものと思われる。フリーの鉄の除去には最低でも60分以上のローテーションは必要であり、さらに慎重を期するならば、従来法どおりに90分で行なえばなお一層よい。なお、血清を加えてない状態の鉄バイアルにあってはレジンストリップの鉄除去効率は平均で98.6%であり、また、鉄でUIBCを飽和した血清1.0mlを加えた鉄バイアルでも97.8%の除去効率であった。

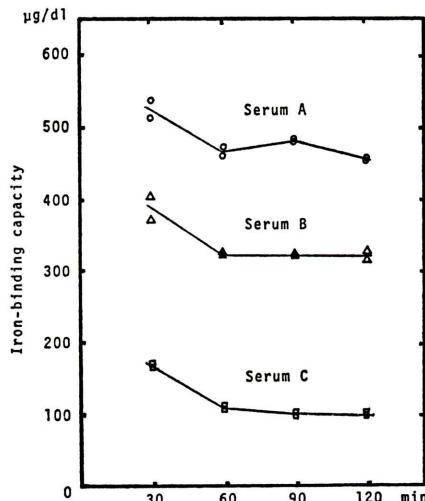


Fig. 2 The time course of elimination of iron ion by a piece of resin strip in three kinds of serum A, B and C.

2) 血清量の影響

トランスフェリンの鉄に対する結合量の直線性を検討してみた。すなわち鉄バイアルに血清を0.1~0.7ml加えて各血清量における鉄の結合量を調べてみた(Fig. 3)。

その結果、実線は血清0.1~0.7mlについて測定した場合の予想期待値で、点線が実際に測定した各血清量における鉄の結合量である。このこと

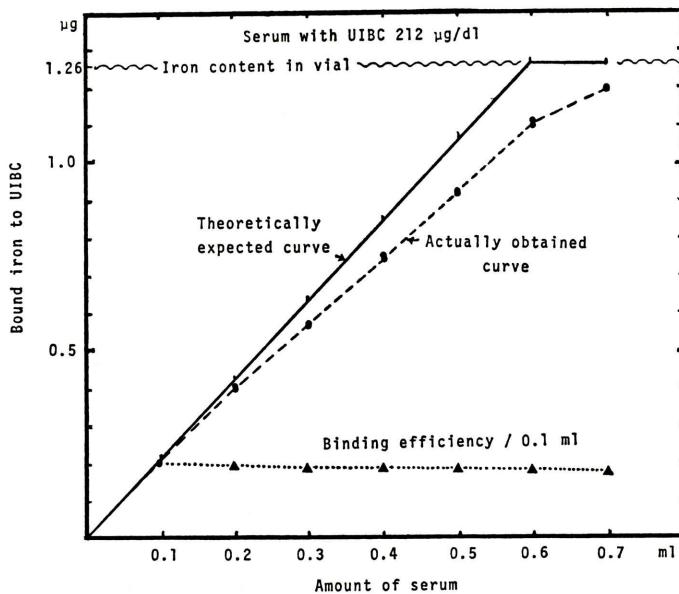


Fig. 3 Relationship between the amount of serum and iron ion in iron-binding reaction.

から血清量が増えるにしたがい、期待値と実測値の解離が広がった。この実験では、UIBC=212 $\mu\text{g}/\text{dl}$ の血清と Fe 量=1.26 μg の鉄バイアルを用いたので、当然 0.6 ml 以上の血清量では頭打ちになることは予想されたが、まだ鉄量に十分に余裕のあるはずの 0.2 ml~0.3 ml の血清量すでに期待値との解離が始まっている。このことは血清中のトランスフェリン以外の蛋白や、その他の含有物質の影響と思われる。

そこで、トランスフェリン以外の蛋白がない条件で、しかも液量を一定にして直線性を検討した (Fig. 4)。検討方法はトランスフェリン (純度、約 80%) を 0.1~3.5 mg を各鉄バイアルに加えて各トランスフェリン量における鉄の結合量を調べた結果、トランスフェリン 2.4 mg まで直線性を示した (Fig. 4 の A)。これは全鉄量 (1.71 $\mu\text{g}/\text{バイアル}$) の 86.5% まで直線性があることになる。また、トランスフェリン 2.7 mg 以上では平衡に達し全鉄量の 91.8% であった。ここで一つの疑問が生じた。それはトランスフェリンの純度が 80% であることを考慮しても、トランスフェリン量の割には鉄の結合量が少ないとことである。

そこで、トランスフェリンに、かなりの鉄が結合していることが予想されたので、トランスフェリンをレジン入りクエン酸バイアルで除鉄してから実験した結果 (Fig. 4 の B) のようになった。この結果 A に比較して、かなり鉄の結合量が増加したが、直線性は全鉄量の 78.4% までと低下した。これは A と B では使用したトランスフェリンの液量の相違によるのかもしれない。また液量の差が溶液の pH にも影響したかもしれない。すなわち A は鉄バイアルにトランスフェリン溶液 0.2 ml を加えたのに対して B はクエン酸 1.6 ml にトランスフェリン溶液 0.4 ml 加えて除鉄した後に、その 2.0 ml のうちの 1.0 ml を鉄バイアルに加えたからである。鉄バイアルに 1.0 μg の鉄量があれば 784 $\mu\text{g}/\text{dl}$ までの binding capacity の広い範囲をカバーできる。それ故、臨床的には直線性の範囲内に含まれるので測定には支障はない。

3) 誤差要因の検討

微量法は従来法に比べて使用する血清量が少なく、また、鉄バイアルの総 count (1st count) に対する結合 count (2nd count) が、かなり低くなることが予想されるので、この点の検討をした

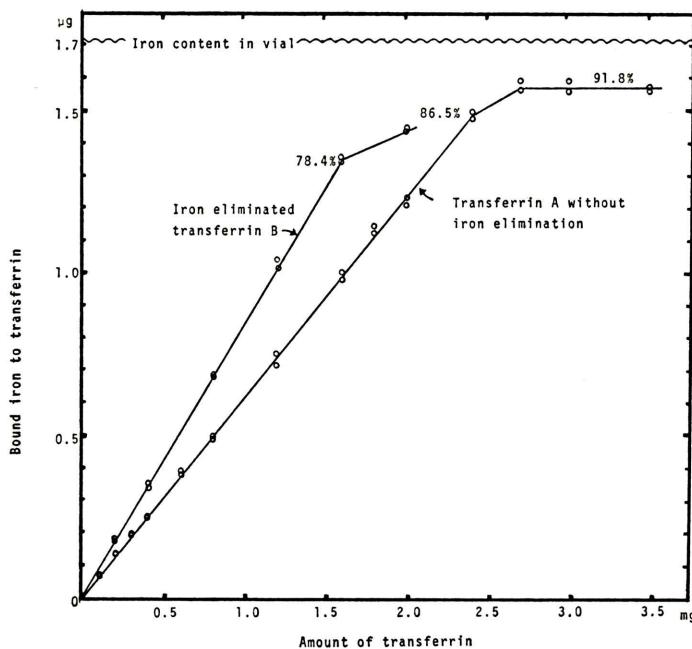


Fig. 4 Iron-binding reaction between the constant amount of iron and different amount of transferrin.

(Table 2). また、3種類の血清を用いて微量法での5重測定を行なってみた (Table 3)。

ピペットはエッペンドルフのマイクロピペット (100 μ l, 200 μ l) について検討した。方法は水を採取して化学天秤で秤量し、それを10回測定した結果、CVは100 μ lで0.4%, 200 μ lで0.6%であった。ウェルカウンターは3種類のcountレベルのものをおののおの5回測定した。その結果 \bar{x} =399 cpm (バックグラウンド), CV=7.9%であった。 ^{59}Fe の低レベルcountは \bar{x} =2394 cpm, CV=2.3%であり、高レベルcountは \bar{x} =28008 cpm, CV=0.6%であった。次に微量法による血清A, B, Cの5重測定をした結果をTable 3に示す。血清Bについては全く問題はなかったが、血清AのSIと血清CのUIBCに問題がある。血清Aはきわめて低いSI量の血清である点と血清CのUIBCも、かなり低い値であることを考慮すれば、この程度のバラツキは当然ありうる。ピペットイングの技術的問題よりも放射能のcountによるバラツキが大きな原因と思われる。なぜならば、こ

の実験に用いた鉄バイアルはTable 3に示すように鉄量1.55 μ gでTIBCの1st countは27982 cpmで、UIBCは29333 cpmであった。なお、鉄バイアル間のcountのバラツキはCV=1.27%であった。そこでかりに155 μ g/dlのbinding capacityの血清であれば、その結合countはTIBCで2798 cpmとなり、UIBCならば2933 cpmとなる。このこととTable 2の実験とからcountのバラツキはCV=2%前後となり得る。また、Table 3に示すようにTIBCでは1 cpm当たり0.0554 μ g/dlの鉄量に相当するから100 cpmでは5.54 μ g/dlとなり、CV=2%のcountのバラツキは測定値に大きな誤差となる。そのためにも鉄バイアルのcountを大きくすることにした。現在、試用中の鉄バイアルはわれわれのウェルカウンターで6~7万 cpm (integral countingの場合)程度になっているので測定精度上CV=2%以下になり得る。

4) 従来法と微量法の精度

血清鉄の低い血清(A)をプールしたものと、中程度の血清鉄の血清(B)をプールしたものについ

Table 2 Reproducibility in micropipetting and counting in micro-method

	Reproducibility in micropipetting		Reproducibility in Well-scientillation counting			
	100 μl mg	200 μl mg	Counts per minute			
1	100.1	197.8	1	466	2456	27909
2	99.7	201.5	2	394	2322	28032
3	99.8	200.6	3	356	2398	28067
4	99.6	199.5	4	420	2450	27747
5	100.0	199.4	5	379	2344	28288
6	100.4	198.8				
7	99.2	199.8				
8	99.6	199.9	Mean	399.0	2394.0	28008.6
9	99.4	199.7	SD	31.4	54.2	179.1
10	99.4	197.7	CV	7.9	2.3	0.6
Mean	99.7	199.5				
SD	0.4	1.1				
CV	0.4	0.6				

Table 3 Reproducibility test using three kinds of serum

	Serum A			Serum B			Serum C		
	TIBC	UIBC	SI	TIBC	UIBC	SI	TIBC	UIBC	SI
1	451	446	5	434	285	149	271	43	228
2	460	443	17	438	303	135	268	40	228
3	461	445	16	439	295	144	278	51	227
4	469	464	5	443	292	151	277	52	225
5	451	451	0	447	290	157	273	50	223
n	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Mean	458.4	449.8	8.6	440.2	293.0	147.2	273.4	47.2	226.2
SD	6.8	7.6	6.7	4.4	6.0	7.4	3.7	4.8	1.9
CV	1.5	1.7	78.0	1.0	2.0	5.0	1.4	10.2	0.9

Amount of Fe in radioiron solution = 1.55 μg TIBC 1st count (net) 27982 cpm 1550/27982 = 0.0554 $\mu g/dl$ UIBC 1st count (net) 29333 cpm 1550/29333 = 0.0528 $\mu g/dl$ Table 4 Reproducibility test using two kinds of serum A and B.
Ten determinations were performed for each serum

	Present method						Micro-method					
	Serum A (n=10)			Serum B (n=10)			Serum A (n=10)			Serum B (n=10)		
	TIBC	UIBC	SI	TIBC	UIBC	SI	TIBC	UIBC	SI	TIBC	UIBC	SI
Mean	357.2	329.3	27.9	260.5	236.6	123.9	369.5	338.8	30.3	368.0	239.0	129.0
SD	7.5	6.6	9.9	7.8	3.8	10.5	6.5	13.3	10.1	7.1	5.3	7.0
CV	2.1	2.0	35.6	2.2	1.6	8.5	1.8	3.9	33.3	1.9	2.2	5.4

て、従来法と微量法についておのおの 10 重測定をした (Table 4)。その結果、微量法は従来法に比較してなんら遜色のない精度が得られた。

5) 微量法の日差再現性

TIBC, UIBC 値の高い血清 (A) と中程度の血清 (B) それに低値の血清 (C) の 3 種類のプール血清

について TIBC, UIBC おのおの、二重測定を行ない、その平均値と差を \bar{x} -R 管理図上にプロットして連続 6 日間測定した (Fig. 5~7)。

その結果、血清 (A) での \bar{x} 値が 1SD を越えたものは TIBC, UIBC でおのおの 1 例であり、また、CV は TIBC 1.2%, UIBC 1.6% であった。血

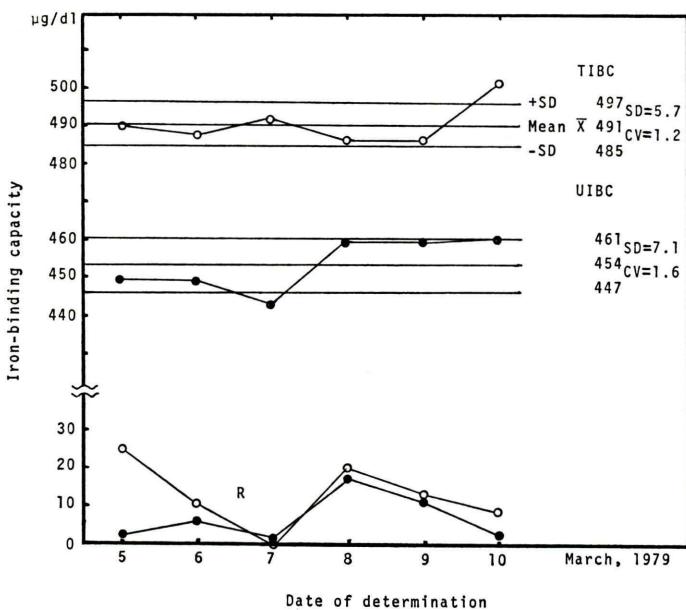


Fig. 5 Reproducibility test as indicated by \bar{X} (mean) and R (difference).
Duplicate determination performed daily for a week using serum A.

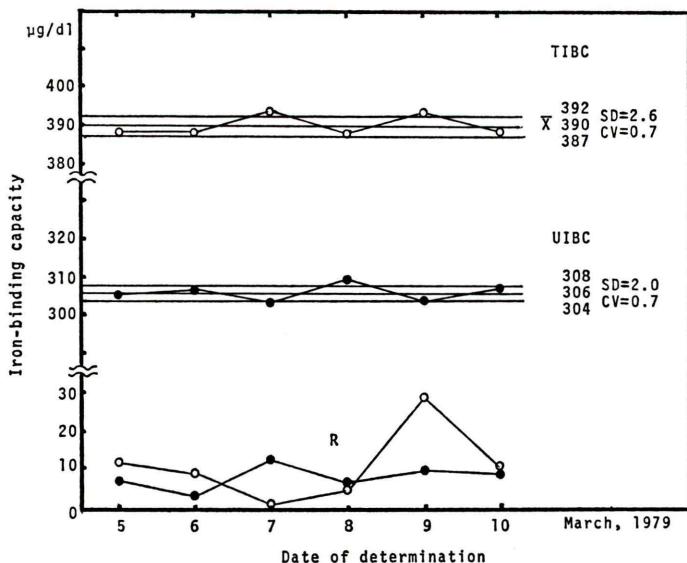


Fig. 6 Reproducibility test as indicated by \bar{X} (mean) and R (difference).
Duplicate determination performed daily for a week using serum B.

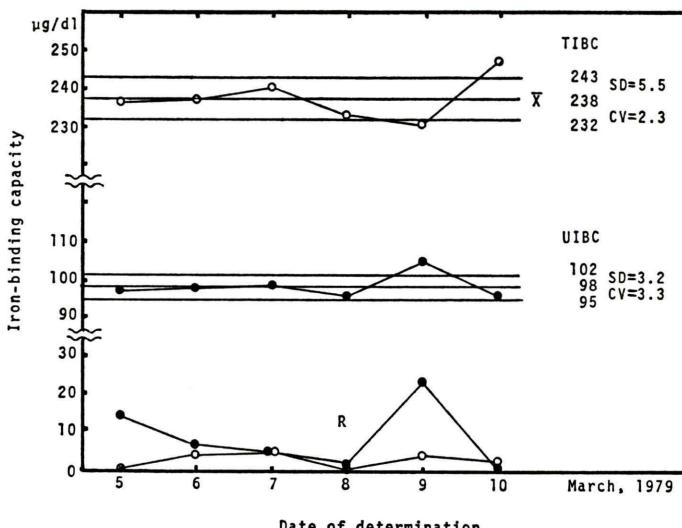


Fig. 7 Reproducibility test as indicated by \bar{X} (mean) and R (difference).
Duplicate determination performed daily for a week using serum C.

清(B)も同様に $1SD$ を越えた例はあるが SD 幅が非常に小さいことから問題にならない。また、血清(C)は TIBC で、 $CV=2.3\%$ 、UIBC は $CV=3.3\%$ と (A)(B) に比較して大きいのが気がかりであるが、いずれにしても $2SD$ 内に入っているので臨床的には問題はないように思われる。TIBC、UIBC が低値の場合は先にも述べたように、カウンターの測定誤差が大きく影響するようである。

6) 従来法と微量法の相関性

TIBC、UIBC および SI (TIBC/UIBC) について従来法(X)と微量法(Y)の相関性を検討してみた (Fig. 8~10)。

その結果、相関係数は TIBC で $r=0.982$ 、UIBC は $r=0.995$ 、SI は $r=0.962$ で、いずれも良好であった。回帰直線も、ほぼ原点に近い直線となったが TIBC、UIBC、SI とも従来法に比較して微量法の方が若干、高値になっている。低値では、それほどでもないが、高値ではっきりその差が表われている。従来法では血清量に対して鉄量が少ないために TIBC、UIBC が高値の場合は直線性の限界近く、すなわち結合残鉄イオン量のほとんどない状態で測定していた可能性があったが、それに対して微量法は全鉄量のせいぜい $1/3$ 程度の鉄量し

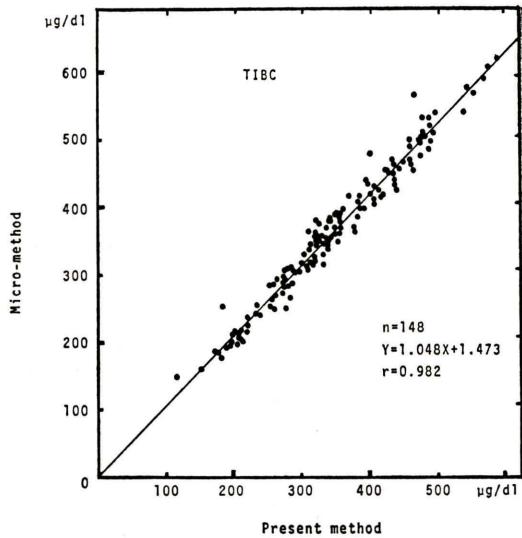


Fig. 8 Correlation of TIBC between present method and micro-method.

か結合に使われない。したがって、鉄量に十分余裕がある。言い換えれば binding capacity の割には鉄の濃度勾配が大きいことからトランスフェリンを十分に速やかに飽和させることができる。いずれにしろ、臨床的に問題になるほどの差ではないが TIBC、UIBC の高値の領域では、むしろ鉄濃

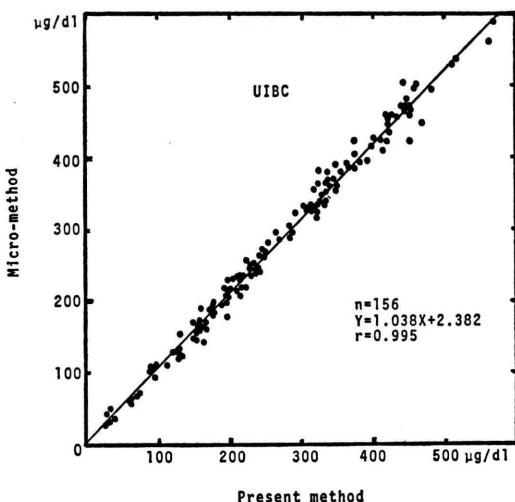


Fig. 9 Correlation of UIBC between present method and micro-method.

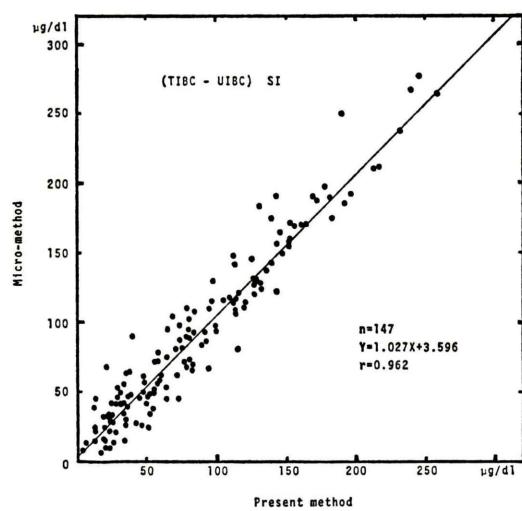


Fig. 10 Correlation of serum iron between present method and micro-method.

度が相対的に高くしてある微量法による値の方が、より正しい値であると思われる。

7) 正常値および臨床成績

某銀行職員のうち血液学的検査成績の異常例および肝炎の症例を除外した 68 名（男 33 名、女 35 名）の正常人および各種血液ならびに肝疾患者について TIBC, UIBC および SI を求めた。その成績を平均値±標準偏差として示す (Table

Table 5 TIBC, UIBC and SI in normals and in patients with blood and liver diseases

normal male (33 subjects)	TIBC μg/dl	UIBC μg/dl	SI μg/dl	
345.1±48.5	223.4±51.8	122.3±28.9		
normal female (35 subjects)				
343.1±37.6	244.4±42.7	98.7±27.3		
Iron overload (3 cases)	297.0±28.1	30.7±1.2	266.3±28.8	
Hemochromatosis treated by phlebotomy	214	109	105	
Pregnancy with iron deficiency anemia* (22 cases)	494.2±73.1	444.6±80.7	49.6±25.1	
Aplastic anemia treated with steroid	465	234	251	
Myelofibrosis	228	207	21	
Proxysmal nocturnal hemoglobinuria	351	325	26	
Polycythemia vera	398	381	17	
Secondary polycythemia	345	283	62	
Lymphosarcoma	177	38	137	
Chronic active hepatitis (3 cases)	407.7±68.4	193.3±109.6	214.3±46.0	
Liver metastasis of stomach cancer	78	26	52	
Liver cirrhosis (3 cases)	314.0±161.3	221.0±201.7	93.0±58.6	

* Serum ferritin level less than 10 ng/ml, and Hb level less than 12 g/dl.

5) 正常人男性の TIBC は $345.1 \pm 48.5 \mu\text{g/dl}$, UIBC $223.4 \pm 51.8 \mu\text{g/dl}$ および SI $122.3 \pm 28.9 \mu\text{g/dl}$ であった。それに対して正常人女性は TIBC $343.1 \pm 37.6 \mu\text{g/dl}$, UIBC $244.4 \pm 42.7 \mu\text{g/dl}$ および SI $98.7 \pm 27.3 \mu\text{g/dl}$ であった。

臨床成績は鉄欠乏性貧血を伴った妊娠 22 例について調べた結果 TIBC で $494.2 \pm 73.1 \mu\text{g/dl}$, UIBC $444.6 \pm 80.7 \mu\text{g/dl}$, SI $49.6 \pm 25.1 \mu\text{g/dl}$ であった。この妊娠例中で特に注目すべき点は TIBC の成績が最低値でも $393 \mu\text{g/dl}$, 最高値では実に $723 \mu\text{g/dl}$ であり, UIBC でも最低値が $344 \mu\text{g/dl}$, 最高値で $677 \mu\text{g/dl}$ であった。TIBC が $723 \mu\text{g/dl}$ の例は十分の結合鉄量を有する微量法で測定した

ことにより、発見できた症例であろうと思われる。他の疾患例はそれぞれの疾患の特徴を示しており問題になるような値はみられなかった。

結論

以上、述べたように微量法は従来の1/5量の血清で測定することができ、かつ操作手順も全く変わりはない。また、血清量に対する鉄量を多くしたことによる効果があった反面、結合countの低下による精度への影響は想像したより小さかった。

微量法での鉄バイアル中の鉄量の少なくとも78.4%までは直線性があったので、臨床的に十分対応できる広い測定範囲を持っている。よって従来法の測定値での500 $\mu\text{g}/\text{dl}$ 以上の血清を、より正確に測定することができる。

また、今まででは血清量が多くいることから再検査の必要が生じても、それができない場合があった。ましてデュプリケートで測定することなどは

とうていかなわぬ。しかし、微量法では、それが可能となり、より正確さを高めることになる。

微量法による正常人ならびに各種疾患患者の成績は、それぞれ正常ならびに病態生理状態を良く反映していた。本法は従来法に代わりうる精度の高い測定法である。

文 献

- 1) Bothwell TH, Jacobs P and Kamener R: The Determination of the unsaturated iron-binding capacity of serum using radioactive iron. South African J Med Sci 24: 93-98, 1959
- 2) 斎藤 宏: レヂンストリップによる不飽和血清鉄結合能の測定法. Radioisotopes 19: 15-19, 1970
- 3) Saito H: Method for determining total iron-binding capacity of serum (TIBC) with radioiron by eliminating iron from transferrin. J Nucl Med 12: 489-492, 1971, ibido Acta Haem. Jap 33: 555-559, 1970
- 4) 斎藤 宏, 井口健次, 小田原美津, 中根清司: 放射性鉄を用いて総血清鉄結合能を測定する簡便法. Radioisotopes 22: 12-18, 1973