

《ノート》

TIBC マイクロテスト「第一」、UIBC マイクロテスト「第一」の検討

Assessment of TIBC Micro Test "Daiichi" and UIBC Micro Test "Daiichi"

海野 政治* 木村 秀夫* 田中鉄五郎* 松田 信*
内田 立身* 刈米 重夫*

Masaharu UMINO*, Hideo KIMURA*, Tetsugoro TANAKA*, Sin MATSUDA*,
Tatsumi UCHIDA* and Shigeo KARIYONE*

*Second Department of Internal Medicine, Fukushima Medical College

I. 緒 言

生体内における鉄代謝状況を知る指標として、血清鉄と共に血清総鉄結合能「TIBC」および血清不飽和鉄結合能「UIBC」の測定は重要であり、広く臨床診断に用いられている。これらは化学的に測定されるが操作は比較的複雑であり、使用器具の鉄汚染を防ぐにも細心の注意を要し、測定にはあるていどの習熟を要する。第一ラジオアイソトープ研究所の開発したレゾマット Fe キット「TIBC」、「UIBC」は、化学的方法に比べて操作ははなはだ簡便であり精度も高く、また誰にでも正確な値を出すことができるため現在広く普及している。しかし「TIBC」、「UIBC」の測定には、両方合わせて1.5mlの血清を必要とし、今日たいのラジオアッセイないしラジオイムノアッセイが血清量0.1~0.3mlを必要とするに過ぎないのに比べて、はなはだ大量を要することになり、その微量化が望まれている。今回われわれは、第一

ラジオアイソトープ研究所より必要血清を微量化したTIBCマイクロテスト「第一」(血清量0.2ml)およびUIBCマイクロテスト「第一」(血清量0.1ml)の提供をうけ、使用する機会を得たので基礎的検討を行い、また現行法の結果と比較検討したので報告する。

II. 実験方法

特別の検討を行う実験以外は、TIBC、UIBC マイクロテスト「第一」の使用法の指示に従った。

1) UIBCキットでは、被検血清0.1mlをクエン酸アンモニウム鉄(⁵⁹Fe)溶液に加え20分間室温でローテートして血清中の不飽和トランスフェリンに⁵⁹Fe鉄を結合させる。その間にバイアル中の総放射能を計測する……(A cpm)

ローテート終了後レジンストリップを1枚ずつバイアル中に入れ、結合しなかった残余の⁵⁹Fe鉄を除去するため90分間再びローテートする。ローテート終了後レジンストリップをバイアル中より捨てたのち⁵⁹Fe放射能を計測する……(B cpm)

UIBC値(μg/dl)

$$= \frac{B-BG}{A-BG} \times \text{バイアル中の鉄量}(\mu\text{g}) \times 1000(\text{Table 1})$$

* 福島県立医科大学第一内科

受付: 55年1月20日

最終稿受付: 56年3月9日

別刷請求先: 福島市杉妻町4-45 (☎960)

福島県立医科大学第一内科教室

海野 政治

Key words: TIBC, UIBC, SI, radioassay

Table 1 UIBC 測定法

血清 0.1 ml
↓
クエン酸アンモニウム鉄 (⁵⁹ Fe) 溶液バイアル
↓
20分間ローテート
↓
第1回カウント (Acpm)
↓
レジストリップを1枚加える
↓
90分間ローテート
↓
レジストリップを捨てる
↓
第2回カウント (Bcpm)
↓
UIBC = $\frac{B-BG}{A-BG} \times Fe (\mu g) \times 1000$

Table 2 TIBC 測定法

血清 0.2 ml
↓
レジンバイアル
↓
15分間ローテート
↓
遠沈 (3000 rpm 3分間)
↓
上清 1 ml
↓
クエン酸アンモニウム鉄 (⁵⁹ Fe) 溶液バイアル
↓
20分間ローテート
↓
第1回カウント
↓
レジストリップを1枚加える
↓
90分間ローテート
↓
レジストリップを捨てる
↓
第2回カウント
↓
TIBC = $\frac{B-BG}{A-BG} \times Fe (\mu g) \times 1000$

2) TIBC キットでは、被検血清 0.2ml をレジンバイアルに加えて、pH2.4 のその溶液中で鉄をトランスフェリンより分離すると共にレジンに吸着させるため室温で15分間ローテートする。ローテート終了後、3,000 rpm で3分間遠心分離する。完全に鉄を除去されたトランスフェリンを含む上清 1 ml を採取し、クエン酸アンモニウム鉄(⁵⁹Fe) 溶液に加えトランスフェリンを⁵⁹Fe 鉄と結合せしめるため20分間室温でローテートする。その間にバイアル中の総放射能を計測する……(A cpm)

ローテート終了後レジストリップを1枚ずつバイアル中に入れ、余剰の鉄を除くために90分間ローテートする。ローテート終了後レジストリ

ップをバイアル中より捨てたのち⁵⁹Fe 放射能を計測する……(B cpm)

TIBC 値 ($\mu g/dl$)

$$= \frac{B-BG}{A-BG} \times \text{バイアル中の鉄量}(\mu g) \times 1,000(\text{Table 2})$$

III. 実験結果

1) トランスフェリンと鉄の結合に及ぼすインキュベーション時間の影響

現行法では、血清をクエン酸アンモニウム鉄(⁵⁹Fe) 溶液に加えトランスフェリンと鉄を十分に結合させるために、20分間インキュベーションを行っているが、微量法においては何分間が適切か検討を行った。5検体を用いておのおの血清0.1ml をクエン酸アンモニウム鉄(⁵⁹Fe) 溶液に加え、インキュベーション時間だけを10分、20分、60分に変えて UIBC 値を測定し比較検討した。その結果は、Fig. 1 に示すごとくインキュベーション時間を10分、20分、60分に変えても UIBC 値は、ほぼ同じ値を示した。すなわちトランスフェリンと鉄は急速に結合し、インキュベーション時間は、

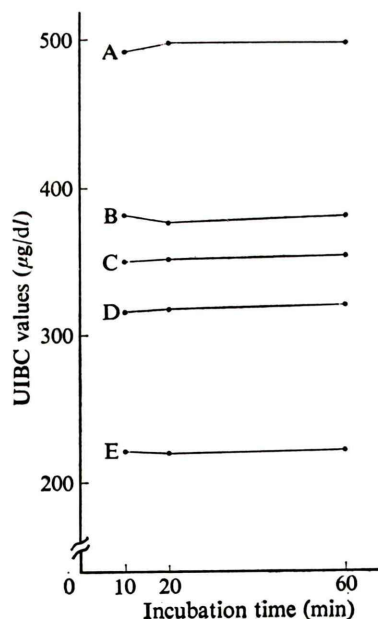


Fig. 1 Effect of incubation time on transferrin saturation with iron.

10分間でも十分であると考えられた。

2) レジストリップの遊離鉄吸着能に及ぼすローテーション時間の影響

3種類の血清を用いUIBCキットについて血清と ^{59}Fe 鉄を結合せしめたのち、レジストリップを加えてローテートする時間の測定値に及ぼす影響について検討した。その結果は、Fig. 2に示すごとく30分間のローテーションでは、UIBC値は全例高値を示し、この段階では遊離鉄イオンの除去がまだ不完全であると思われた。しかし60、90および120分間ローテートした場合にはUIBC値はその間ほぼ一定の値を示した。ただしUIBC値の低い血清では、60分間のローテート後においてもなおやや高値を示し、90分、120分でなおUIBC値の減少がみられた。従って、遊離鉄イオンの除去には、現行法通り90分間ローテートしたほうが安全であると思われた。

3) クエン酸アンモニウム鉄(^{59}Fe)溶液中の鉄量によるUIBC値への影響

シノテストで血清TIBCおよび血清鉄を測定し、減算法により求めたUIBC値 $231\mu\text{g}/\text{ml}$ と $115\mu\text{g}/\text{dl}$ の2種類の血清について、UIBCマイクロテスト「第一」鉄量として $1.51\mu\text{g}$ 入りのクエン酸アンモニウム鉄(^{59}Fe)溶液中の鉄量を $1.51\mu\text{g}$ 、 $1.76\mu\text{g}$

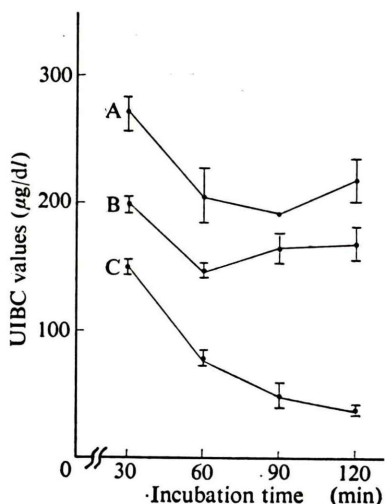


Fig. 2 Effect of incubation time of resin strip with unbound iron on UIBC values.

Table 3

シノテスト	(TIBC-Fe) 値 231 (μg dl)	(TIBC-Fe) 値 115 (μg/dl)
鉄量 (μg)	UIBC (μg/dl)	UIBC (μg/dl)
1.51	221	104
1.76	233	117
2.01	258	136
2.27	284	160
2.52	324	257

$2.01\mu\text{g}$ 、 $2.27\mu\text{g}$ 、および $2.52\mu\text{g}$ に増加させてUIBC値を測定したところTable 3に示すように加える鉄量が多くなるほどUIBC値は高値を示した。すなわちクエン酸アンモニウム鉄(^{59}Fe)溶液中の鉄量が増えるにつれ ^{59}Fe の非結合分が多くなり、レジストリップが吸着しのごす量が増加したためと思われた。しかし、UIBCマイクロテスト「第一」のクエン酸アンモニウム鉄(^{59}Fe)溶液中の鉄量は $1.51\mu\text{g}$ ほどで、これで求めたUIBC値とシノテストで求めたUIBC値とは、5~10%しか違わず、更にクエン酸アンモニウム鉄(^{59}Fe)溶液中の鉄量を $1.76\mu\text{g}$ に増やしてもUIBC値は、5~10%増加するだけであり、UIBC値が低い血清でも十分正確な測定値が得られると思われる。

4) UIBC値に及ぼす温度の影響

3種類の血清を 5°C の低温室内、 21°C の室温および 33°C のフラン器中で、UIBC測定的全操作を行い、UIBC値を測定したところFig. 3に示すごとく、 5°C の場合高値を示すものもあったが、 21°C と 33°C ではほぼ同じ値を示した。従って通常の室温で操作する限りは、温度の影響を考慮する必要はないものと考えられた。

5) 再現性の検討

3種類のTIBC、血清のUIBC値についてのおの5重測定を行った結果をTable 4に示した。UIBC値と比較してTIBC値の方が、ややバラツキが大きいですが、それでもなお両検査とも良い再現性がみとめられた。

6) 検定日の異なったキット間におけるUIBC値

2種類の血清A・Bを、 5°C の冷温室に保存しておいた検定日の異なった3キットを室温に戻し

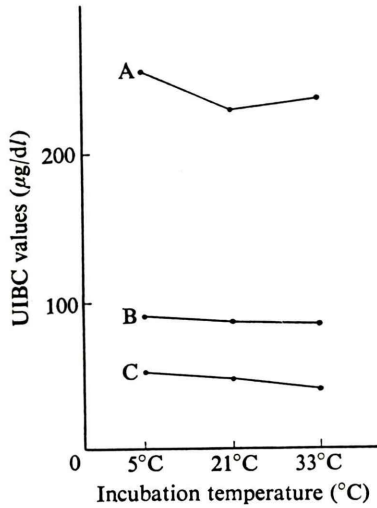


Fig. 3 Effect of incubation temperature on UIBC values.

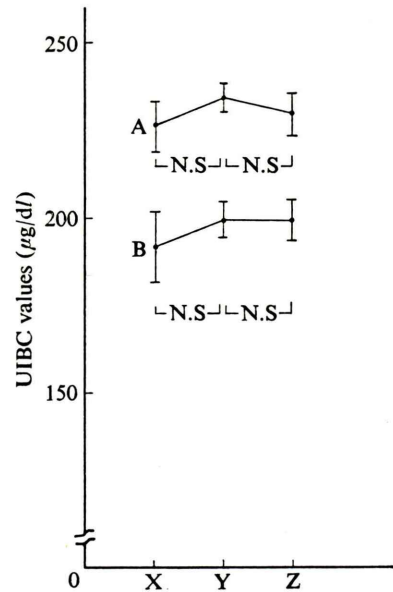


Fig. 4 Difference of UIBC values between kits having different assay date.

Table 4 Reproducibility of UIBC & TIBC values

	Serum A		Serum B		Serum C	
	UIBC	TIBC	UIBC	TIBC	UIBC	TIBC
1	211	313	239	305	169	280
2	194	302	221	347	166	302
3	186	307	219	306	168	294
4	182	302	226	309	172	298
5	190	331	228	299	169	379
mean	192.6	311.0	226.6	313.2	168.8	310.6
S.D.	10	10.8	7	17.2	1.9	35
C.V.	5.2	3.5	3.1	5.5	1.1	11.3

てから UIBC 値について 5 重測定を行ったが、Fig. 4 に示すごとく、測定値に有意の差を認めなかった。

7) 現行法と微量法の相関性について

種々の TIBC, UIBC 値をもつ血清試料について現行法と微量法で TIBC, UIBC 値を測定し、その値を比較検討した。

a) TIBC 値に関しては、微量法で測定した値の方が、現行法で測定した値より約 20µg/dl ほど高値を示し、その差は、TIBC 値が高くなるほど大きくなった。しかし両測定法の相関係数は Fig. 5

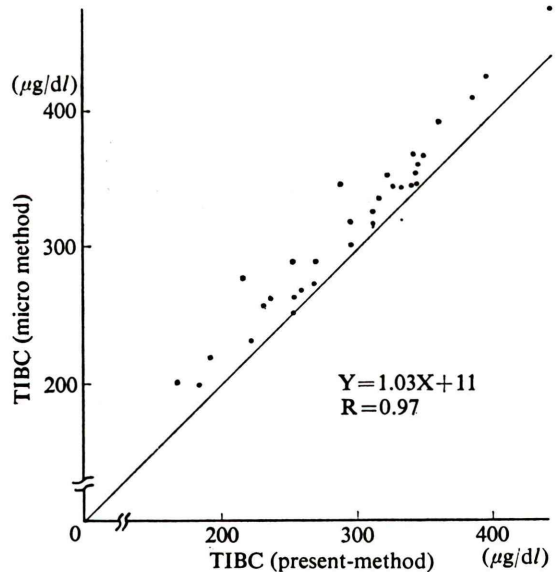


Fig. 5 Relationship between TIBC values determined by micro method and present method.

に示すごとく、 $r=0.97$ と良い相関を示した。

b) UIBC 値について現行法と微量法で求めた

値を比較検討したところ、UIBC 値が高値を示す血清では、微量法で求めた値の方が若干高値を示す傾向にあるが Fig. 6 に示すごとく、両者の値はきわめて良い相関を示した ($\gamma=0.99$)。すなわち微量法で測定した UIBC 値はほぼ現行法で測定した値と一致するものと考えられる。

8) 本法 TIBC 値と炭酸マグネシウム法による TIBC 値との関係

シノテストで測定した化学的 TIBC 値と微量法で測定した TIBC 値を比較検討したところ Fig. 7 に示すごとく、シノテストで測定した値よりも微量法で測定した値のほうが、約 $20\mu\text{g/dl}$ ほど高い値を示した。その差は TIBC 値が高くなるにつれて広がった。しかし、両測定法の間には $\gamma=0.97$ と良い相関を認めた。

9) 微量法による TIBC -UIBC 値と化学的測定による血清鉄値との関係

微量法により測定した TIBC、UIBC 値から減算して求めた Fe 値とシノテストで測定した Fe 値を比較検討した。Fig. 8 に示すごとく、血清鉄値の

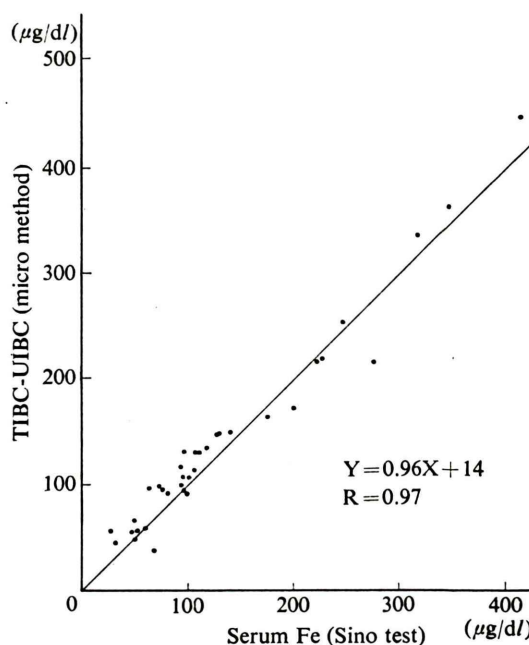


Fig. 7 Relationship between TIBC values determined by micro method and magnesium carbonate method.

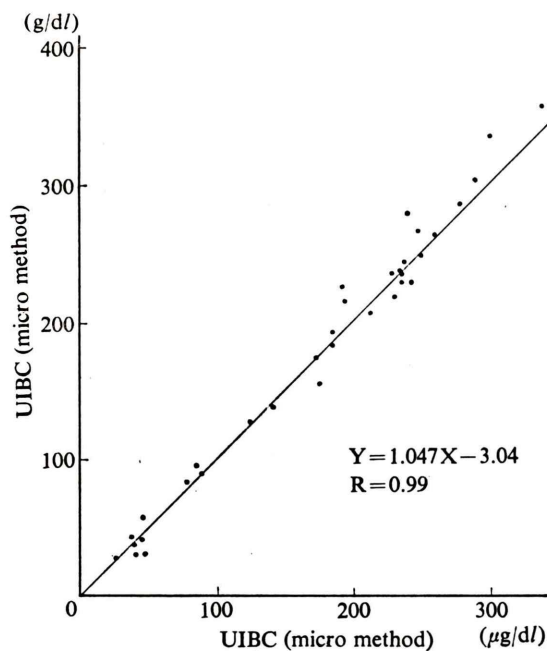


Fig. 6 Relationship between UIBC values determined by micro method and present method.

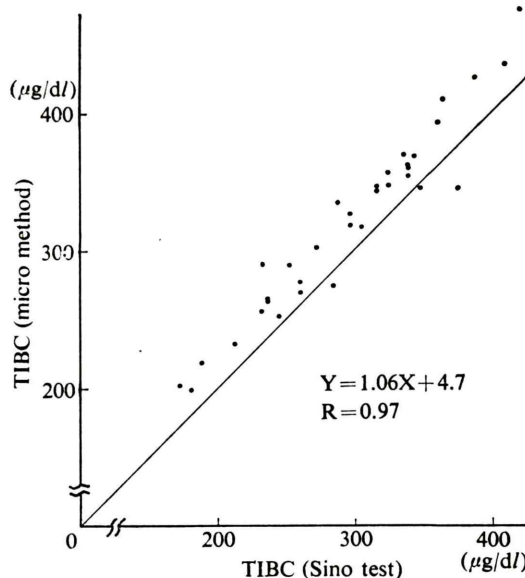


Fig. 8 Relationship between TIBC UIBC values determined by micro method and Fe values determined by sino test.

Table 1 Serum Levels of TIBC UIBC and Serum Iron

	No.	TIBC ($\mu\text{g/dl}$)	UIBC ($\mu\text{g/dl}$)	Serum Iron ($\mu\text{g/dl}$)
		Mean \pm SD	Mean \pm SD	Mean \pm SD
Normal	10	335.2 \pm 36.5	225.7 \pm 42.2	109.4 \pm 36.7
Iron Deficiency A.	12	447.9 \pm 88.4	369.9 \pm 80.8	78.0 \pm 24.6
Aplastic A.	6	300.0 \pm 57.8	58.3 \pm 32.4	241.7 \pm 78.9
Polycythemia Vera	2	388.0	269.5	118.5
Hemolytic A.	1	218.0	83.0	135.0
Acute Leukemia	4	258.3 \pm 36.8	92.0 \pm 61.9	166.3 \pm 66.7
Malignant Tumor	2	257.0	185.5	71.5
Chr. Renal Failure	2	301.0	204.0	97.0
Infection	3	323.3 \pm 17.6	264.0 \pm 17.2	59.3 \pm 1.3

やや低い血清では、シノテストで測定した血清鉄値より微量法で測定した値のほうがやや高値を示したが、血清鉄値の高めの血清では、両測定法で求めた血清鉄値はほぼ一致し、相関係数も $r=0.97$ と良い相関を示した。

10) TIBC, UIBC マイクロテスト「第一」にて測定した各種疾患患者のTIBC, UIBC及び血清鉄値を Table 4 に示す。

IV. 考 案

レゾマット Fe キットは ^{59}Fe をトレーサーとして用い操作が簡便で安定した TIBC, UIBC 値が得られるので、臨床検査として広く用いられてきた。しかし、現在市販されているレゾマット Fe キットは、TIBC (1 ml), UIBC (0.5 ml) 合わせて 1.5 ml の血清量を必要としている。今日、たいていのラジオアッセイないしラジオイムノアッセイでは、血清量は 0.1~0.3 ml を必要とするに過ぎず、TIBC UIBC 測定にも血清の微量化が望まれている。今回われわれは、第一ラジオアイソトープ研究所から微量化された TIBC (0.2 ml), UIBC (0.1 ml) のキットの提供を受けその検討をおこなった。現行法では、トランスフェリンと鉄の結合のためにインキュベーション時間は、20分間と表示されているが、微量法でインキュベーション時間を10分、20分および60分に変えて UIBC 値を測定したところほぼ同一の値を示し、トランスフェリンと鉄の結合のためのインキュベーション時間は、10分間で

も十分であると思われた。またレジンストリップの遊離鉄吸着能におよぼすローテート時間を検討したところ、60, 90 および 120 分間ローテートして求めた測定値は、ほぼ一定の値を示した。ただ UIBC 値の少ない場合には、60分間のローテート後においてもやや高値を示し、遊離鉄イオンの除去には、現行法どおり90分間ローテートしたほうが良いと思われた。測定値に及ぼす温度の影響は、ほとんど差違が認められず、室温で操作する限りでは問題ないと思われた。再現性に関しては、UIBC 値より TIBC 値のほうが操作が余分にかかるためややバラツキが多かったが、それでもなお両検査とも良い再現性が認められた。また、5°C の冷温室に保存しておいた検定日の異なったキットで同一血清を測定し、UIBC 値を求めたが測定値に有意差は認められなかった。現行法で測定した TIBC 値と微量法で測定した TIBC 値を比較したところ、微量法で測定した TIBC 値のほうがやや高値を示したが、両測定法の相関は良好であった。UIBC 値に関しては、UIBC 値が高値を示す血清ではやや微量法で測定した UIBC 値のほうが、現行法で測定した値より高値を示したが両測定法の相関は、きわめて良く、微量法で測定した値は UIBC 現行法で測定した値とほぼ一致するものと思われた。また、微量法で測定した TIBC 値とシノテスト測定した TIBC 値を比較検討したところ、やや微量法で測定した値のほうが高値を示したが両測定法は良い相関を示した。血清鉄値に関しては血清鉄値のやや低い血清では、シノテス

トで求めた値より微量法で測定した値のほうがやや高値を示したが、血清鉄値の高めの血清では、両測定法で求めた血清鉄値はほぼ一致するものと思われた。

V. 結 語

微量法による測定は、現行法の使用法と同一条件で安定した値が得られ、現行法で求めた TIBC、UIBC 値およびシノテストで測定した TIBC 値および血清鉄値とも良い相関を示した。微量法は血清量が現行法の 1/5 ですみ、しかも現行法より TIBC、UIBC 値が高値を示す血清まで正確に測定可能である。

文 献

- 1) 斎藤 宏：レジ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
- 2) 刈米重夫, 佐藤道明, 藤森克彦, 三木昌宏, 内田立身, 脇坂行一, 中島言子：放射性鉄 ^{59}Fe を用いる血清不飽和鉄結合能測定の見直し. *Radioisotopes* **21**: 710-716, 1972
- 3) 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
- 4) 刈米重夫, 佐藤道明, 藤森克彦, 三木昌宏, 内田立身, 脇坂行一, 中島言子：放射性鉄 ^{59}Fe を用いる血清不飽和鉄結合能測定の見直し. *Radioisotopes* **22**: 19-24, 1973
- 5) 秋月 健, 鈴木孝雄, 田中鉄五郎：放射性鉄を用いた TIBC 測定法の臨床的検討. *臨床血液* **14**: 795-799, 1973
- 6) 刈米重夫, 佐藤道明, 藤森克彦, 三木昌宏, 内田立身, 脇坂行一, 中島言子：放射性鉄 ^{59}Fe を用いる血清総鉄結合能測定に関する検討. *Radioisotopes* **22**: 503-508, 1973
- 7) Gregory J Buffone, Susan A Lewis, Mariet Iosefsohn, Jocelyn M Hicks: Chemical and immunochemical measurement of total iron binding capacity compared. *Clin Chem* **24**: 1788-1791, 1978
- 8) 林大三郎, 斎藤 宏, 牧健太郎, 中沢信彦：ラジオアッセイによる TIBC, UIBC の微量測定法. *核医学* **16**: 1431-1440, 1979