

《ノート》

2-site immunoradiometric assay 法を用いた Phadebas Ferritin PRIST® キットの基礎的検討と臨床応用

Measurement of Plasma Ferritin by 2-site Immunoradiometric Assay
 (Phadebas Ferritin PRIST®)
 —Evaluation of the Kit and Clinical Application—

辻野大二郎* 佐々木康人** 千田 麗子* 染谷 一彦*

Daijiro TSUJINO*, Yasuhito SASAKI**, Reiko CHIDA*,
 and Kazuhiko SOMEYA*

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

**Department of Radiology, Toho University School of Medicine

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存在している。化学的構造は24のサブユニットから成る分子量約45万のアポフェリチン蛋白の殻と鉄を含む核より成る。各臓器のフェリチンは生化学的に不均一性を示し、イソフェリチンの集合と考えられている¹⁾。

1972年Addison²⁾らが immunoradiometric assay (IRMA) 法によるフェリチン測定法を報告した。これにより微量の血清中フェリチンの存在が知られ、この濃度が臨床的鉄欠乏や過剰状態をよく反映することが報告された^{2,3)}。最近ではこれ以外にも肝疾患^{3,4)}をはじめとする良性疾患、白血病や悪性リンパ腫^{5,6)}、癌^{7~9)}などで血清中フェリチン値が生体内鉄貯蔵と相関せず上昇することが知られ臨床的応用が期待されている。

今回われわれは 2-site IRMA 法¹⁰⁾を用いた Pha-

debas Ferritin PRIST キット (Pharmacia 社製、塩野義製薬提供) を使用する機会を得たので、その基礎的検討の結果と他のキットとの相関および癌を中心とする臨床検討について報告する。

II. 方法と対象

本キットは抗フェリチン抗体を付けたペーパーディスクを固相とする 2-site IRMA 法によっている。使用されている標準フェリチンは人脾より得たものであり、抗フェリチン抗体も人脾フェリチンを抗原として家兎を免疫して得たものである。実際の測定は試験管に抗フェリチン抗体を固相化したペーパーディスクを 1 枚づつ入れ、これに標準血清または希釈検体（血清か血漿）50 μl を入れ水平振盪機で振盪ながら室温で 1 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 0.9% 食塩水 2.5 ml でペーパーディスクを洗浄し、洗浄液を吸引除去する。この洗浄を再度行った後 ¹²⁵I-抗フェリチン抗体 50 μl を加え、水平振盪機で振盪しながら室温で 2 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ペーパーディスクの放射活性 (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)。

Key words: 2-site immunoradiometric assay, Ferritin, Tumor marker

* 聖マリアンナ医科大学第 3 内科

** 東邦大学医学部放射線科

受付：56 年 2 月 10 日

最終稿受付：56 年 4 月 28 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

片対数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。検体は血清または血漿をキットに添付された希釈液で10倍に希釈し測定に供した。測定値が 500 ng/ml 以上の場合にはさらに希釈し再検した。

キットの基礎的検討としてインキュベーション時間の影響、再現性、回収率、希釈試験、検体として血清と血漿の比較、検体凍結解凍の影響および SPAC フェリチンキット(第一ラジオアイソトープ社製)、RIA-gnost フェリチンキット(Behringwerke 社製、ヘキスト社)との測定値の相関をみた。

臨床対象は正常対照男女各14例、癌患者67例、良性疾患患者36例である。癌患者のうちわけは大腸癌11例、食道癌、胃癌、肝癌、膀胱癌各10例、肺癌9例、乳癌7例であり、良性疾患は肝疾患18例、胆石症4例、胃・十二指腸潰瘍4例、その他の疾患10例である。

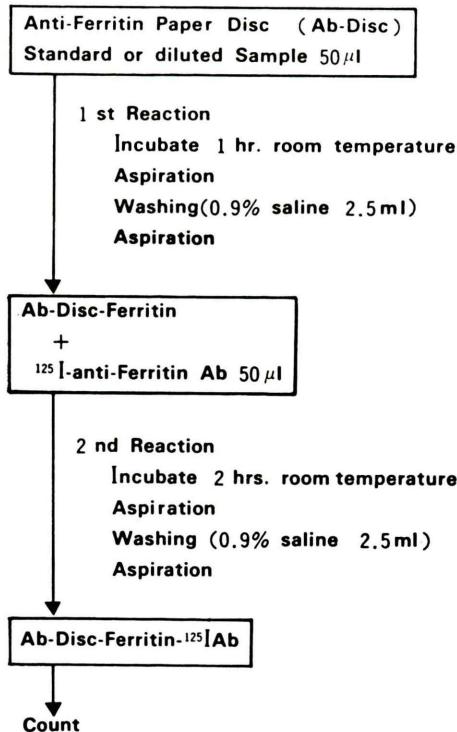


Fig. 1 Assay Procedures.

臨床検体は EDTA 加採血による血漿を用いた。

III. 結 果

1) 基礎的検討

(1) 標準曲線：9回測定の平均による標準曲線を Fig. 2 に示した。測定可能範囲は $0.5\sim50 \text{ ng/ml}$ (10 倍希釈で $5\sim500 \text{ ng/ml}$) でこの範囲での結合率($B/T\%$)は $2\sim50\%$ である。各標準液での9回測定の変動係数(C.V.)は $4.7\sim8.9\%$ と良好であり、毎回安定した標準曲線が得られた。

(2) インキュベーション時間の影響：第一反応でのインキュベーション時間の影響を検討すると Fig. 3 に示すように抗フェリチンペーパーディスクに対するフェリチンの結合率は90分でプラトーに達した。第2反応ではインキュベーション時間180分まで検討したが B の計数率はまだ緩徐な上昇を示した(Fig. 4)。

(3) 再現性：濃度の異なる3種の検体をおのおの2重測定で9回測定した結果より測定内誤差と測定間誤差を Rodbard らの方法¹¹⁾により計算した。2重測定の測定内誤差は C.V. $2.5\sim3.5\%$ 測定間誤差は C.V. $7.3\sim14.5\%$ であった(Table 1)。

(4) 回収率：フェリチン濃度 2.5 ng/ml の正常

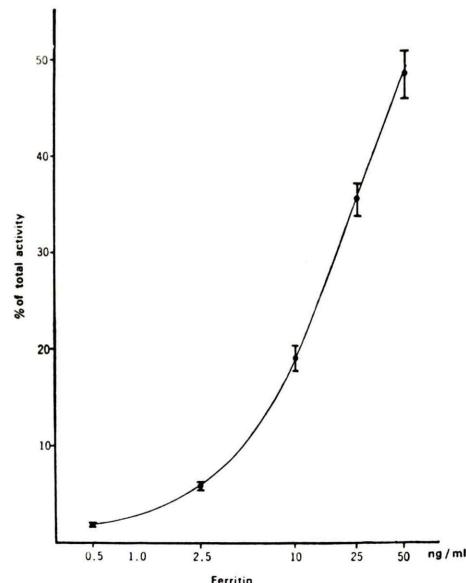


Fig. 2 Standard Curve.

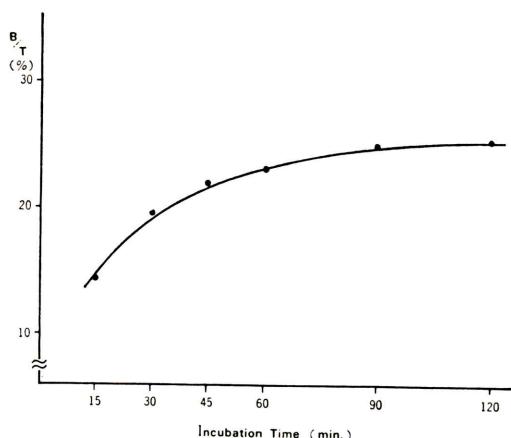


Fig. 3 Effect of Incubation Time on the 1st Reaction.

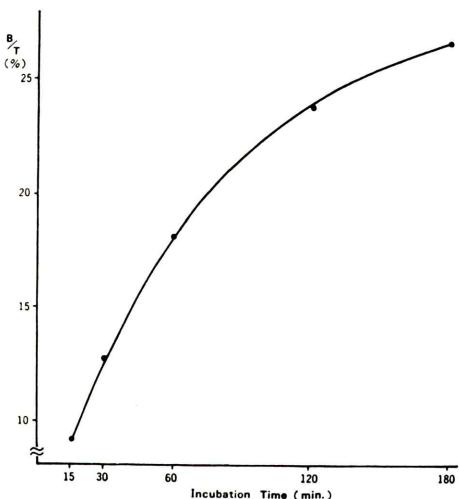


Fig. 4 Effect of Incubation Time on the 2nd Reaction.

対照血漿に 1.3~25.0 ng/ml の濃度の標準フェリチンをおののおの加えて測定した結果より回収率を求めた(Table 1)。回収率は 76~103%，平均 85.5% であった。

(5) 希釈試験：未希釈でフェリチン値が 33.6 を ng/ml 示した正常対照血漿をキットに添付された希釈液で倍々希釈し測定した。32 倍まで理論値を示す直線をよく一致した値が得られた (Fig. 5)。

(6) 血漿試料と血清試料による差：検体としての血清または血漿を用いた場合の測定値の差を検討するため正常対照男性 11 名より同時に採血して

Table 1 Evaluation of precision, reproducibility and recovery

1. Within assay error

n=9

\bar{M} (ng/ml)	1 S.D.	C.V. (%)
46.8	1.4	3.3
134.0	4.7	3.5
358.0	8.8	2.5

2. Between assay error

n=9

\bar{M} (ng/ml)	1 S.D.	C.V. (%)
46.8	3.4	7.3
134.0	10.4	7.8
358.0	52.0	14.5

3. Recovery test

Std. Ferritin added (ng/ml)	Ferritin assay (ng/ml)	Recovery (%)
—	2.5	—
1.3	3.4	76
5.0	6.1	73
12.5	13.7	90
25.0	28.2	103

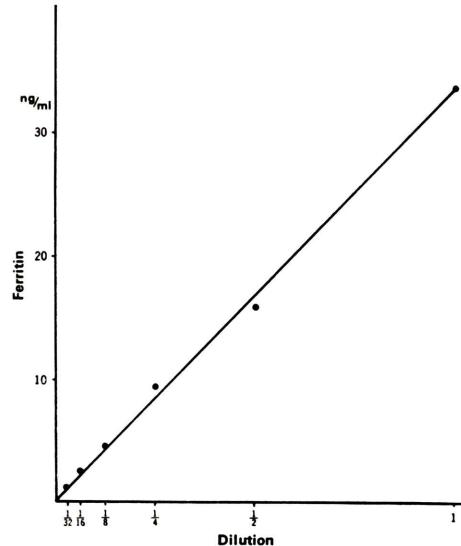


Fig. 5 Dilution Test.

得た血清と EDTA 加採血による血漿を同時に測定し結果を比較した。血清で平均値±標準偏差は 109.6 ± 50.6 ng/ml、血漿が 110.1 ± 51.0 ng/ml であ

り、相関係数 $r=0.996$ と良い相関を示し両者との間には有意の差はみられなかった ($p<0.01$)。

(7) 検体の凍結解凍による影響：検体の凍結解凍をくり返すことによる測定値への影響をみるため正常対照血漿（フェリチン濃度 155.7 ng/ml）を用い凍結解凍を 0～8 回まで行い測定した。測定値は凍結解凍回数増加に伴う一定の増減の傾向は示さず C.V. は 8.1% であった。

(8) SPAC フェリチンキットとの相関：本キット (X) と SPAC フェリチンキット (Y) の両者で同一検体を測定できた良性疾患 36 例、癌 56 例計 92 例でその測定値の相関をみた。両測定法による測定結果は相関係数 $r=0.987$ 、回帰方程式 $Y=1.09X - 17.3$ と非常によく相関した (Fig. 6)。

(9) RIA-gnost フェリチンキットとの相関：本キット (X) と RIA-gnost フェリチンキット (Y) で良性疾患 37 例、癌 62 例についてその測定値の相関をみた。両者の相関は $r=0.899$ 、 $Y=1.60X - 30.4$ であり、全体に本キットでの測定値が低値をとる傾向であった (Fig. 7)。両測定法の結果が一致しない症例の多くは癌であった。

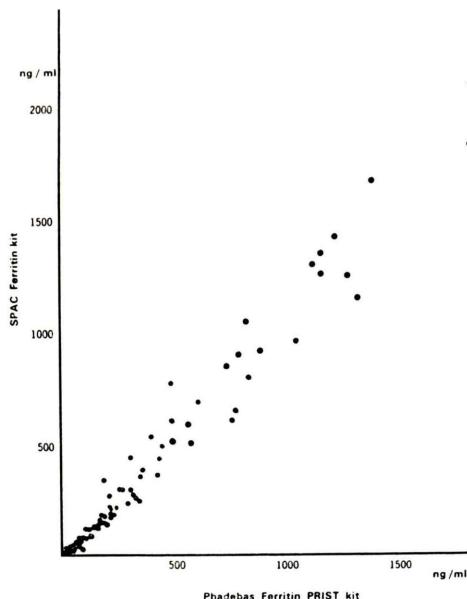


Fig. 6 Correlation of Ferritin Levels between Phadebas Ferritin PRIST Kit and SPAC Ferritin Kit.

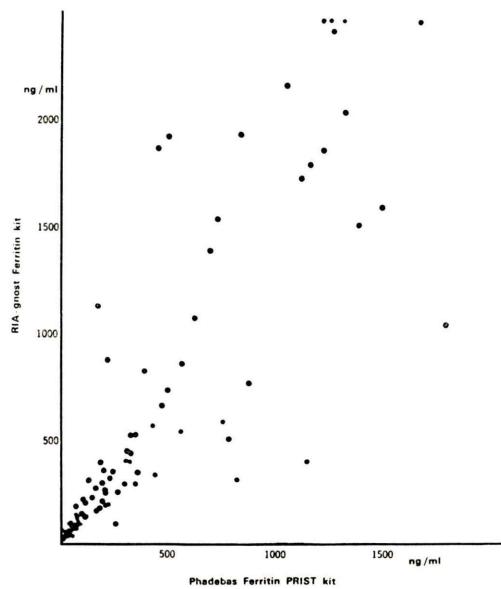


Fig. 7 Correlation of Ferritin Levels between Phadebas Ferritin PRIST Kit and RIA-gnost Ferritin Kit.

2) 臨床検討

正常対照男女各 14 例の血漿中フェリチン濃度を測定した結果、男性 107.9 ± 47.5 ng/ml、女性 35.1 ± 31.6 ng/ml と性差がみられた。臨床的には女性は男性に比し常に隠れた鉄欠乏状態にあり、フェリチンに関しては正常対照とはいえないと考えられる。それゆえ血漿中フェリチン値の正常範囲は男性の平均 ± 2 標準偏差をとり $13 \sim 200$ ng/ml とした。今回の臨床検討では血漿中フェリチン値 200 ng/ml 以上をフェリチン陽性と表現した。

癌 65 例につき臨床診断時の血漿中フェリチン値をみると全体で 416 ± 684 ng/ml で陽性率は 52% であった。原発巣別にみると食道癌 (10 例) で 252 ± 346 ng/ml (陽性率 30%)、胃癌 (10 例) 545 ± 714 ng/ml (60%)、大腸癌 (11 例) 191 ± 366 ng/ml (36%)、肝癌 (10 例) 303 ± 259 ng/ml (60%)、肺癌 (9 例) 393 ± 263 ng/ml (67%)、乳癌 446 ± 673 ng/ml (29%) であった (Fig. 8)。各種良性疾患 36 例中の血漿中フェリチン値は 422 ± 580 ng/ml で、陽性率 50% であり、特に肝疾患 18 例では 668 ± 716 ng/ml 陽性率は 72% であつ

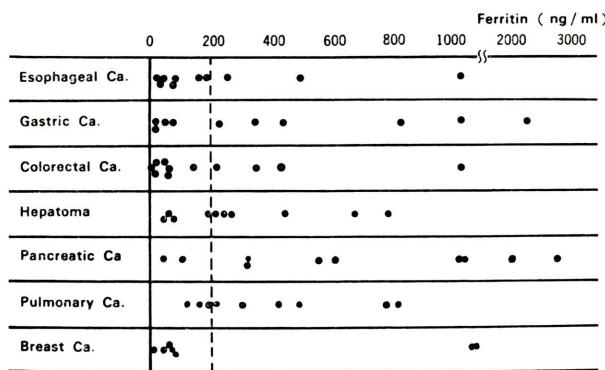


Fig. 8 Plasma ferritin levels in various carcinomas.

た。

血漿中フェリチン値と CEA, AFP の関係を追えた代表的癌症例を 2 例示す。

症例 1：血中 AFP 陰性肝癌症例(男性)である。全経過中 AFP は 20 ng/ml 以下であった。フェリチン, CEA はともに癌床経過とよく一致した動きを示した(Fig. 9)。

症例 2：胃癌で多くの皮膚転移がみられた症例(女性)である。血漿中 CEA は死亡前臨床経過とは一致しない低下、いわゆる paradoxical reduction¹²⁾ がみられた。フェリチン値は逆に死亡前上昇傾向を示した。肝転移はみられず、末期までの GOT, GPT は正常範囲であった(Fig. 10)。

IV. 考 察

フェリチンの測定法として古くは immunoprecipitation 法, immunodiffusion 法, counterelectrophoresis 法などがあったが感度が悪く微量の血中フェリチン測定には不十分であった¹³⁾。Addison ら²⁾により IRMA 法が開発され微量のフェリチン測定が可能となった。今回われわれの検討した Phadebas Ferritin PRIST® キットは固相化された抗体と抗原を反応させ、その後標識抗体をさらに加え、固相化された抗原と反応させるサンドイッチ型の 2-site IRMA の原理¹⁰⁾によっている。測定操作は簡便であり測定は約 5 時間で終了する。キットの基礎的検討では精度、再現性とも良好な

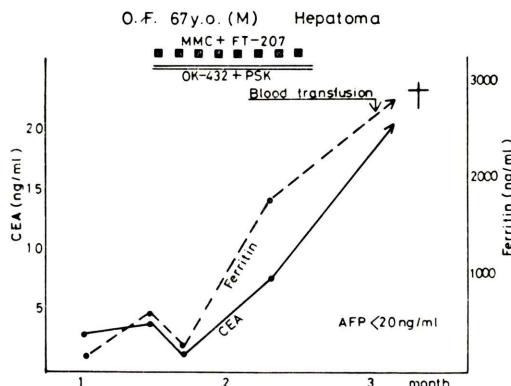


Fig. 9 Case 1. O.F. 67 y.o. (M) Hepatoma.

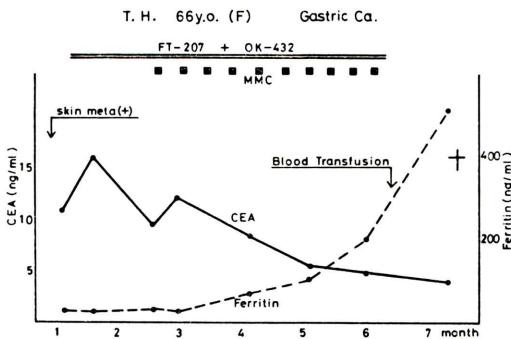


Fig. 10 Case 2. T.H. 66 y.o. (F) Gastric Carcinoma.

結果であった。本キットのような 2-site IRMA 法では、高濃度では high dose hook effect がみられるのが短所である。これを避けるためキットの指

定では検体は10倍希釈にて測定し 500 ng/ml 以上の結果が得られた場合にはさらに希釈して再検するようになっている。希釈試験の結果は良好であり、高濃度検体の希釈による測定も特に問題ないと思われた。

インキュベーションはキットの指示通り行ったが、われわれの検討では第1反応で90分でプラトーに達し、第2反応では180分まで検討したが B の計数率は緩徐な上昇を示した。この結果からすればキット指示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が必要と思われる。

検体の血清と血漿との差が測定値に影響するかを検討したが差はみられなかった。検体としては両者とも使用でき測定値も同様に比較できると思われた。他に検体の凍結解凍試験でも測定値に明らかな差はみられなかった。

以上のように本キットによる血中フェリチン濃度測定の基礎的検討の結果は日常臨床検査として満足すべきものであった。

本キットと同様の 2-site IRMA 法による SPAC フェリチンキットおよび RIA-gnost フェリチンキットにつき本キットとの測定値の相関をみたが、前者とは非常に良い相関を示した。後者では測定値は本キットの約 1.6 倍を示すとともに癌を中心に相関の悪い症例がみられた。本キットで使用されている標準フェリチン、抗体ともに人脾フェリチンによっている。SPAC キットでは脾フェリチンと生化学的に類似する人肝フェリチンを使用している。RIA-gnost キットでは標準フェリチンと固相抗体は人肝フェリチンにより、標識抗体は生化学的に脾フェリチンとは異なる胎盤フェリチンに対する抗体を使用している。測定法はほぼ同様なので測定結果の相関の差の原因の一つはこれらの組合せの差によると想像される。

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、この性差は貯蔵鉄量の性差と考えられている¹⁴⁾。われわれの結果でも正常対照男性 107.9 ng/ml、女性 35.1 ng/ml と多くの報告のように性差がみられた。女性は常に隠れた鉄欠

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と思われる。

今回の臨床検討では癌を中心に血漿中フェリチン値を測定した。現在、癌胎児性蛋白の一つとして期待されている血中フェリチン濃度の臨床的意義は AFP や CEA ほど明らかではない。癌での血中フェリチン濃度の上昇の原因としては癌胎児性蛋白としての性格がより強いといわれる酸性イソフェリチン¹⁵⁾などの腫瘍そのものによる產生も考えられるが、他に腫瘍による組織破壊からの組織フェリチンの血中への流入、癌のための無効造血の影響、治療として用いる輸血による鉄過剰、肝障害や感染症など血中フェリチンの上昇を示す合併症など多くの因子が考えられる。また逆に消化管癌などでは失血によるフェリチン値の低下の要因がさらに加わる。それゆえ悪性腫瘍患者での血中フェリチン値の臨床的解釈判断はより困難になる。生化学的面から言えばより腫瘍性といわれる酸性イソフェリチンが重要で興味深い。癌臨床では可能であればこのような癌胎児性といわれるイソフェリチンに感度の良い測定法^{9,10)}を用いたいが、今回は現在臨床的に利用可能な脾フェリチンによる本キットを使用し癌における血漿フェリチン濃度の臨床検討を行った。

癌臨床診断時の血漿中フェリチン値は対照群となる良性疾患群と比べ濃度も陽性率も明らかな差はみられなかった。癌原発巣別では他の報告と同様脾癌において濃度も陽性率も高かった点が注目されるが明らかな臓器特異性はなかった。消化管癌では肝転移例で高値例が多く、また良性肝疾患でも高値例が多かった。肝はフェリチンに富む実質臓器であり、腫瘍そのもののフェリチン産生だけでなく腫瘍による周辺の正常肝組織破壊でもかなり血中フェリチン濃度は上昇すると思われる。いずれにせよ癌での血中フェリチン濃度の解釈ではキットの使用しているフェリチンの種類と癌胎児性フェリチンに対する感度が重要と思われる。また他の臨床検査により肝疾患をはじめとする他の血中フェリチン値の変動する因子の検討も合わせて行い、臨床的解釈をする必要があると思われ

る。

今回は症例数が少ないので癌における血漿中フェリチン値と AFP, CEA との関係は明らかではないが 3 者が同様の動きを示す場合は少ないようである。今後それらの組合せ判定による有用性の向上や、今回示した 2 症例のような AFP, CEA が臨床経過観察の指標として使えない、いわゆる paradoxical reduction 症例や、AFP 非産生性肝癌症例などで新しい腫瘍マーカーとして利用し得るのではないかと考えられる。

V. おわりに

2-site immunoradiometric assay 法によるフェリチン測定用キット (Phadebas Ferritin PRIST®) 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における利用以外にも悪性腫瘍での応用も期待される。

文 献

- 1) 漆崎一朗 : Serum Ferritin 東洋書店編, 東京, 1980
- 2) 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
- 3) Jacobs A, Miller F, Worwood M, et al: Ferritin in the serum of normal subjects and patients with iron deficiency and iron overload. *Br Med J* **4**: 206-208, 1972
- 4) 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
- 5) Jones PAE, Miler FM, Worwood M, et al: Ferritinaemia in leukemia and Hodgkin's disease. *Brit J Cancer* **27**: 212-217, 1973
- 6) White GP, Worwood M, Parry DH, et al: Ferritin synthesis in normal and leukaemic leukocytes. *Nature* **250**: 584-586, 1974
- 7) Richter GW: Comparison of ferritin from neoplastic and non-neoplastic human cells. *Nature* **207**: 616-618, 1965
- 8) Niitsu Y, Kohgo Y, Yokota M, et al: Radioimmunoassay of serum ferritin in patients with malignancy. *Ann NY Acad Sci* **259**: 450-452, 1975
- 9) Hazard JT, Drysdale JW: Ferritin in cancer. *Nature* **265**: 755-756, 1977
- 10) Miles LEM, Lipschitz DA, Bieber CP, et al: Measurement of serum ferritin by a 2-site immunoradiometric assay. *Anal Biochem* **61**: 209-224, 1974
- 11) Rodbard D: Statistical quality control and routine data processing for radioimmunoassay and immunoradiometric assays. *Clin Chem* **20**: 1255-1270, 1974
- 12) Rarry M, Moertel CG, Schutt AJ, et al: Usefulness of serial serum carcinoembryonic antigen (CEA) determinations during anticancer therapy or long-term follow up gastrointestinal carcinoma. *Cancer* **34**: 1230-1234, 1974
- 13) Reissmann KR, Diertrich MR: On the presence of ferritin in the peripheral blood of patients with hepatocellular disease. *J Clin Invest* **35**: 588-595, 1956
- 14) Jacobs A, Path FRC, Worwood M: Ferritin in serum: Clinical and biochemical implications. *N Eng J Med* **292**: 951-956, 1971
- 15) Urushizaki I, Ishitani K, Natori H, et al: Heterogeneity of ferritin from 3-methyl-(dimethyl amine)-azobenzen-induced hepatoma. *Gann* **64**: 237-246, 1973
- 16) Mori W, Asakawa H, Taguchi T, et al: Human isoferitin and malignant neoplasms. *Acta Haemat. Jap* **41**: 1309-1317, 1978