《ノート》

ペーパーディスク法 radioimmunoassay キットによる血中 ferritin 値測定の検討

Fundamental and Clinical Evaluation of Ferritin RIA kit using Paper Disc Method

吉井　正雄*　中島　言子*　森田　陸司*　鳥塚　莞爾*

Masao YOSHII*, Kotoko NAKAJIMA*, Rikushi MORITA* and Kanji TORIZUKA*

Department of Radiology and Nuclear Medicine, Kyoto University Hospital, Kyoto

I. 緒　言

Ferrtin は生体内の主要な鉄貯蔵蛋白質で，肝，脾，骨髄および胎盤などに多く含まれている[1,2]．

1972年 Addison ら[3]が radioimmunometric assay を開発し血中の微量な ferritin が測定できる様になると，血中 ferritin 値は生体の鉄欠乏または過剰状態をよく反映するものと認められ，血液疾患や鉄代謝の分野で広く利用されている[4]．さらに白血病，悪性リンパ腫および悪性腫瘍などで血中 ferritin 値が非常に高値を示す事が知られ，最近では tumor-marker としての役割も注目されている[5~7]．

現在わが国においては数社から各種測定法による血中 ferritin 値測定用のキットが市販されているが，今回著者らはペーパーデスクを使い sandwitch 法を用いた固相法 RIA による血中 ferritin 値測定用キット Phadebas Ferritin PRIST® (Pharmacia Diagnostics AB 社，塩野義製薬㈱) を試用する機会を得たので，その基礎的検討ならびに臨床的評価について報告する．

* 京都大学医学部附属病院放射線核医学科
受付：56年4月6日
最終稿受付：56年6月25日
別刷請求先：京都市左京区聖護院川原町54 (〒606)
京都大学医学部附属病院放射線核医学科
吉井正雄

II. 対　象

健常人男子56例，女子62例 (計118例) は一般検血および血液生化学検査で正常範囲内にあり通常の日常生活を営んでいる者とした．妊婦15例はおよそ妊娠8か月前後に採血した．各種疾患患者381例の病名は各種臨床検査によって診断されたが，悪性腫瘍については生検病理診，手術または剖検によって確定診断されている．

III. 方　法

1. Phadebas Ferritin PRIST®キットの構成キットの構成は，

(1) ^{125}I-Ferritin 抗体 (3.5 μCi, 5 m*l*), 1 バイアル

(2) 標準 Ferritin 溶液 (5 種), 5 バイアル

(3) ペーパーディスクカセット (フェリチン抗体ディスク30枚入), 3 カセット

(4) 希釈液 (20 m*l*), 2 バイアル

であり，これにより90回分の測定が可能であるが被検血清は38人分測定できる．

2. Phadebas Ferritin PRIST® キットの測定方法

本キットの測定原理はペーパーディスクを用い

Key words: Ferritin, Radioimmunoassay, Paper Disc

Presented by Medical*Online

てsandwitch法によって行う固相法radioimmunoassay である．測定手順は下記の通りで概略はFig. 1 に示す．

検体(血清)は希釈液を用い10倍に希釈し，その50 μl を測定に用いる．

各試験管にペーパーディスク1枚づつ入れて後，標準 ferritin 溶液(5種)または希釈済未知検体50 μl を加える．室温にて水平振盪を1時間行った後，アスピレーターを用い反応液を吸収除去し，さらに 2.5 ml の生理食塩水を加え 10 分間放置後，吸収除去の操作を2回繰り返す．次に各試験管に ^{125}I-ferritin 抗体 50 μl を加え，別に total count 用に2本の試験管に 50 μl ごとを採り，室温で2時間水平振盪を行う．この後，先と同様の吸収除去操作を繰り返し，抗体ディスクを洗浄し，その放射能量を測定する．別に操った total count より B/T(%) を求め，標準 ferritin 溶液の各濃度の B/T (%) をプロットし，標準検量曲線 (standard curve) を作成する．これより未知検体の濃度を読み取り，希釈倍数を乗じて未知の検体の ferritin 濃度を求める．

IV. 成　績

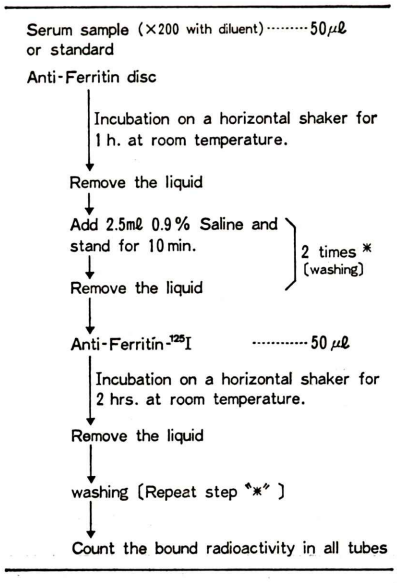


Fig. 1 Procedures of Phadebas Ferritin PRIST® Kit

1. 基礎的検討

1) 標準曲線の再現性

Fig. 2 に10回の測定における標準曲線の再現性の成績を示す．各濃度における変動係数はおのおの 0.5 ng/ml で 9.0%, 2.5 ng/ml で 6.4%, 10ng/ml で 4.9%, 25 ng/ml で 3.1%, 50 ng/ml で 3.9%でありいずれも良好な成績が得られた．

2) 反応時間の検討

抗体ディスクと被検検体との最初の incubation において，反応温度を室温 (20°C) に一定とし反応時間を 30, 45, 90 および 120 分と変化させた場合の標準曲線の変化と3検体の値を検討した結果を Fig. 3 に示す．これによると反応時間が30分の短い場合や 120 分の長い場合には高い値の検体は60分の場合に比べて低値を示した．Fig. 3 よりみて反応時間は指示書通り60分で適当であると考えられ以後60分で行った．

つぎに ^{125}I-Ferritin 抗体を加えた後の第2反応時間を，室温 (20°C) とし，60, 90, 120, 150, 180 分と変化させた場合の標準曲線の変化と3検体の値を検討し Fig. 4 に示す．これによると incubation の時間が長くなるとともに，Bound%は上昇するが各検体の値には大きな差は認められず，120 分で十分であると考えられた．

以後の検討では添付の指示書通りに第1反応時間を室温で60分，第2反応時間を 120 分として行った．

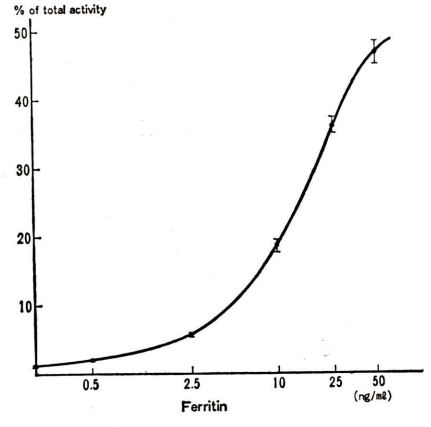
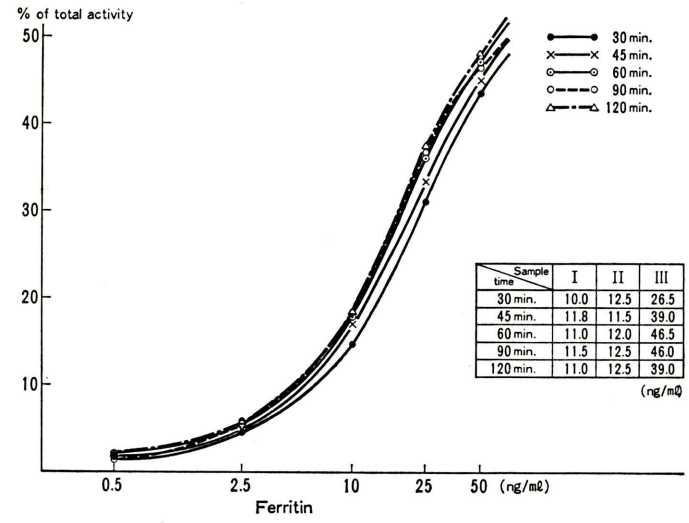


Fig. 2 Standard Curve.

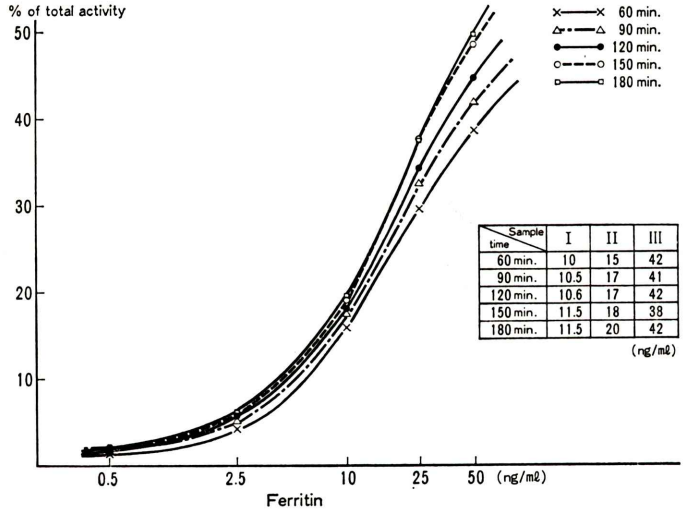
Presented by Medical*Online



Sample / time	I	II	III
30 min.	10.0	12.5	26.5
45 min.	11.8	11.5	39.0
60 min.	11.0	12.0	46.5
90 min.	11.5	12.5	46.0
120 min.	11.0	12.5	39.0

(ng/mℓ)

Fig. 3 Effect of first incubation time on standard curve.



Sample / time	I	II	III
60 min.	10	15	42
90 min.	10.5	17	41
120 min.	10.6	17	42
150 min.	11.5	18	38
180 min.	11.5	20	42

(ng/mℓ)

Fig. 4 Effect of second incubation time on standard curve.

3) 同一測定内 (within assay) および異なる測定間 (between assay) での再現性の検討

3種の ferritin 濃度の検体を同一測定内でおのおの 10 回測定した再現性の成績と異なる 10 回の測定で別の 3 種の検体を測定した再現性の成績を Table 1 に示す．これによると within assay でも between assay でも変動係数はいずれも低く良好な成績が得られた．

4) 回収率 (Recovery Test) の検討

3 種の検体におのおの 1.25, 5.0, 12.5, 25.0ng/ml の 4 種の標準 ferritin 液を添加したのち測定した値の成績を Table 2 に示す．検体 Sample 3 で実測値と期待値に少し差がみられたが，全体としては回収率は99.8％で標準偏差は3.8％となり良好な成績が得られた．

5) 希釈試験 (Dilution Test)

Presented by Medical*Online

Table 1 Reproducibility

	Sample	n	Ferritin (ng/m*l*)		C. V. (%)
			mean	S. D.	
Within assay	I	10	7.73	0.38	4.9
	II	10	10.10	0.39	3.9
	III	10	36.20	1.61	4.5
Between assays	IV	10	10.70	0.54	5.0
	V	10	21.65	1.57	7.2
	VI	10	41.85	21.9	5.2

Table 2 Recovery Test

added (ng/m*l*)	Original (ng/m*l*)						mean Recovery (%)
	Sample I		Sample II		Sample III		
	16		19		16		
	expected	measured	expected	measured	expected	measured	
1.25	17.3	17.5	20.3	24.5	17.3	16.5	104
5.0	21.0	21.0	24.0	26.0	21.0	21.0	103
12.5	28.5	28.0	31.5	31.0	28.5	25.0	95
25.0	41.0	41.0	44.0	44.0	41.0	37.0	97
						mean	99.8
						S.D.	3.8

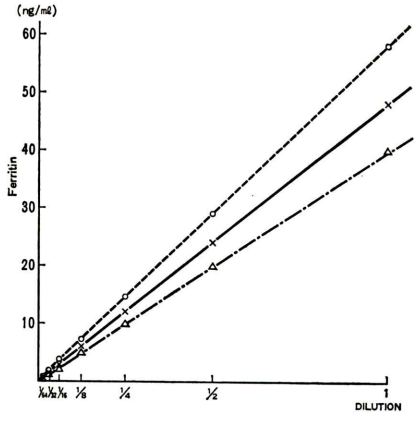


Fig. 5 Dilution Test.

3種の検体を添付の希釈液にて倍々希釈を行った結果を Fig. 5 に示す．これより 50 μg/m*l* 以下の濃度では直線性を示しており，検体を 0.5～50 μg/*l* の間に希釈し測定すれば原血清の値は希釈倍数を乗算して得ることができる．

6) 本キットと Spac-Ferritin キットとの相関関係

本キット (X) と Spac-Ferritin キット (Y) (第1ラジオアイソトープ研究所) でともに測定した77検体についてその測定値の相関関係をみたのが Fig. 6 である．相関係数 (γ) は0.98で回帰直線式は $Y=0.82X+13.18$ であり，両者は非常によく相関した．

2. 臨床成績

1) 健常人，妊娠および各種疾患患者の血中 ferrtin 値

健常人男56例，女62例，妊婦15例および各種疾患患者381例 (合計514例) の血中 ferritin 値の分布を Fig. 7 に示す．

健常人男子56例の平均値および標準偏差は 98.7±33.9 ng/m*l* で，健常人女子62例で50.6±25.1 ng/m*l* であり，女子で低い値をとる傾向がみられた．妊婦15例では1例で 30 ng/m*l* を示す例もあったが他はいずれも 10 ng/m*l* 以下で，平均値は6.9±

Presented by Medical*Online

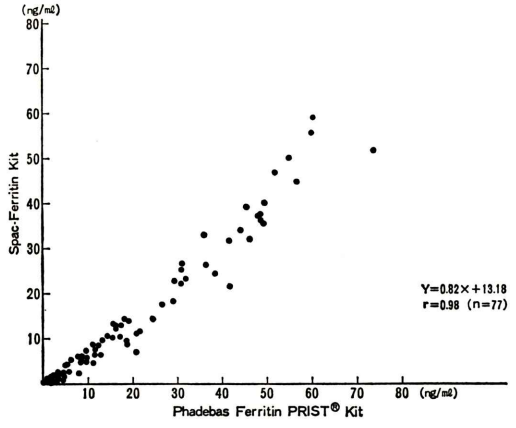


Fig. 6 Correlation between Phadebas Ferritin PRIST® and Spac-Ferritin Kit.

6.4 ng/m*l* であった．鉄欠乏性貧血 66 例は 1 例を除いて他はすべて 8 ng/m*l* 以下で，平均値は 3.9 ±2.1 ng/m*l* であった．

人工透析を受けている慢性腎不全患者17例や再生不良性貧血17例ではいずれも 100 ng/m*l* 以上を示し 3,000 ng/m*l* を超える例もみられた．肝炎 37 例や肝硬変42例では低値から高値まで広く分布したが，急性肝炎の 4 例はいずれも 900 ng/m*l* 以上を示した．

悪性腫瘍性疾患では全体として高値を示す例が多かったが，特に膵癌11例ではいずれも 300 ng/m*l* 以上と高値を示した．なお白血病では慢性骨髄性白血病 6 例ではすべて 200 ng/m*l* 以下であり急性リンパ性白血病 2 例はともに 1,000 ng/m*l* を示し，この両者は ferritin 濃度では異なる分布を示した．なお急性骨髄性白血病 9 例では 150 ng/m*l* から 3,000 ng/m*l* 以上まで広く分布した．

2) 健常人，妊婦および鉄欠乏性貧血患者の血中 ferritin 値と血清鉄値の関係

「健常人」については血液 Ht 値，UIBC 値および血清鉄値が正常範囲内にあるものとしたが，これらが正常範囲内にあるにもかかわらず血中 ferritin 値が 20 ng/m*l* 以下と非常に低い値を示す例 (△印) がみられた (Fig. 8).

血中 ferritin の正常範囲をいくらにするかは一概に決定し難いが，Fig. 8 の△印の例では「潜在性の鉄欠乏状態」にあるものと思われる．なお Fig. 8 でみられる如く，鉄欠乏性貧血では血中 ferritin 値，血清鉄値ともに著しく低く，妊婦では血中 ferritin 値は著しく低いが血清鉄値は正常値よりやや低い程度であった．

3) 悪性腫瘍患者における血中 ferritin 値の長期経過観察例

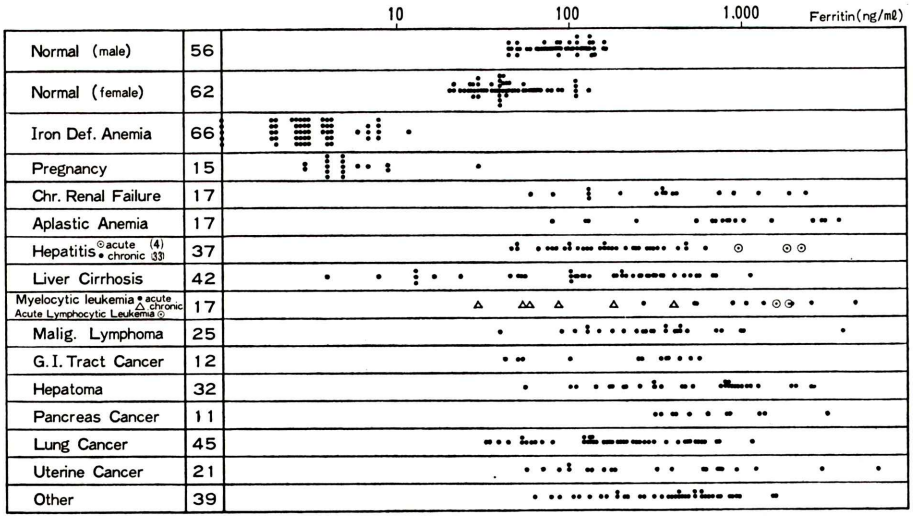


Fig. 7 Serum ferritin concentration in various disorders.

Presented by Medical*Online

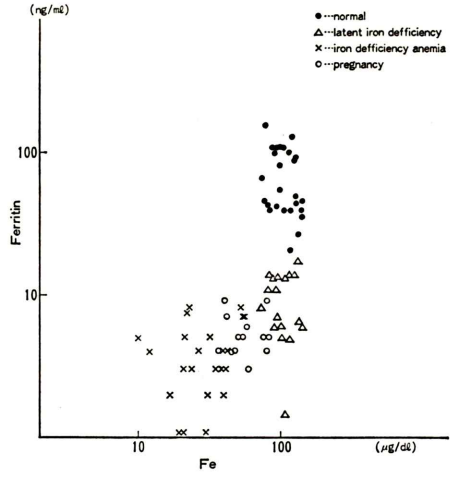


Fig. 8 Relationship between serum concentration of ferritin and Iron in normal and various disorders.

a) 症例1：最終的に Hepatoma であった肝硬変症の症例の血中 ferritin 値, α-FP 値および GPT 値の推移

Fig. 9 は53歳女性の例で肝硬変症として昭和53年12月より血中 ferritin 値などを測定し始めた．昭和55年1月までは血中 ferritin 値，GPT 値および α-FP 値はいずれも正常範囲にあったが，昭和55年2月に突然血中 ferritin 値が 1000 ng/m*l* 以上，GPT 5,200 IU/*l* になった．その後 ferritin 値と GPT は一時すぐに正常範囲にもどったが，このころより次第に α-FP 値が上昇し，同年10月には 1,000 ng/m*l* 以上になった．また ferritin 値と GPT 値も異常高値にとどまる様になった．同年10月の X 線 CT 撮影にて肝に腫瘍像が認められた．この症例で昭和55年2月に突然 ferritin 値が急上昇した原因については不明であるが，この後，α-FP が上昇し出しているのが興味深い．

b) 症例2：卵巣癌患者での血中 ferritin 値の推移

Fig. 10 は昭和55年7月初診，8月中旬に手術を受けた卵巣癌第3期の症例の術前術後の血中 ferritin, CEA, sGOT および β2-microglobulin 値の推移をみたものである．この症例では11月に CT で骨盤腔内の転移巣が指摘されており，術後の経過は思わしくないが，血中 ferritin 値も CEA や SGOT 値と共に常に上昇し続けており，患者の経

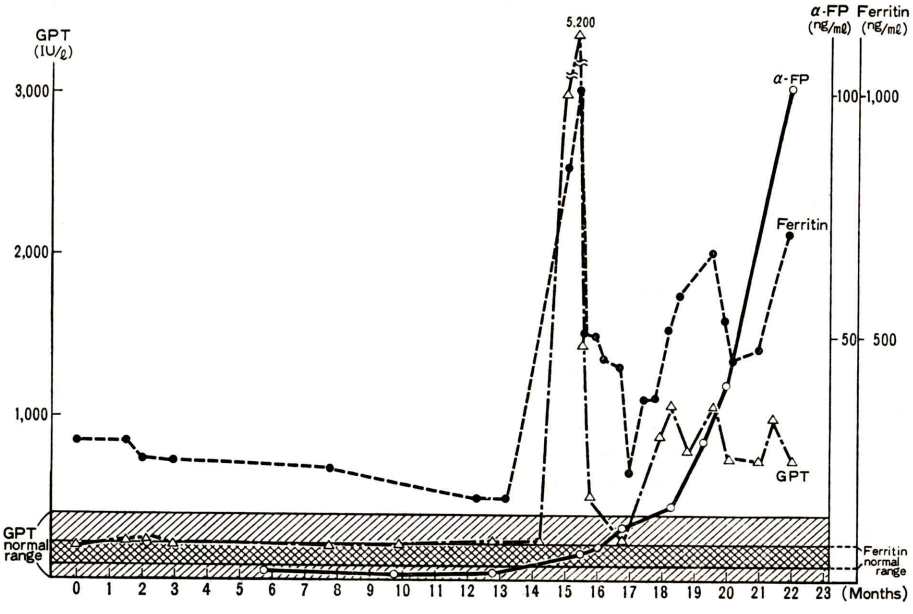


Fig. 9 Case 1. Change in serum ferritin, α-FP and GPT levels in a patient with liver cirrhosis.

Presented by Medical*Online

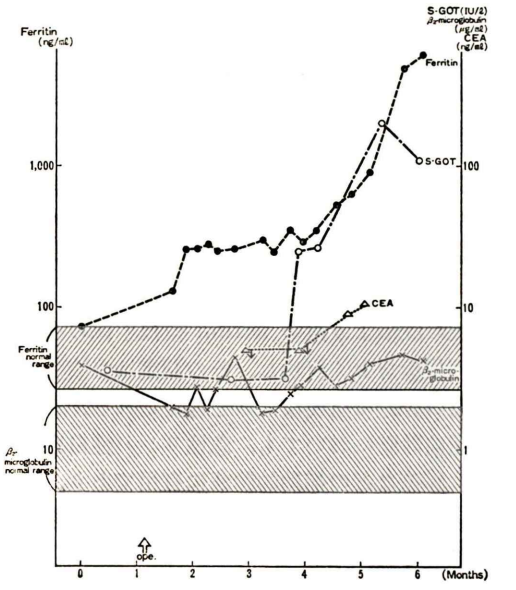


Fig. 10 Case 2. Change in serum level of ferritin and other factors in a patient with uterin cancer.

過と ferritin 値の推移は平行している．

V. 考　案

1) Phadebas Ferritin PRIST® キットの検討

血中 ferritin 値の測定法は，二抗体法 RIA 法など各種の方法があり，それぞれキット化され市販されている．本キットは抗体を付着させたペーパーディスクを用いる sandwitch 法によって行う固相法で radioimmunoassay ある．

本キットの操作手順は非常に簡便で，測定は約3時間と非常に短時間で終了する．また反応温度は室温で充分で，遠沈が不要であるなどの利点を有している．

反応時間についての著者らの検討ではキットに添付の説明書に示されている通りに行うのが適当であった．

同一測定内および異なる測定間での再現性の検討では，低値から高値までの3種の異なる検体の10回測定の成績はいずれも変動係数は小さく良好な成績が得られた．

回収試験では3種の検体に，1.25, 5.0, 12.5 および 25.0 ng/m*l* の標準液を添加して行ったが，実測値と期待値とはよく一致し全体では回収率 99.8%，標準偏差 3.8%と良好な成績であった．

次に希釈試験においても3種の検体の倍々希釈した値は直線性を示した．標準曲線よりみて測定可能な範囲は 1.0～50 ng/m*l* であるから，多くの例で希釈が必要となるが，ferritin 高値の検体でもその希釈して得られた値の信頼性は高いと考えられる．逆に鉄欠貧血患者などの ferritin 異常低値の検体は，希釈せずに原血清で再測定する必要がある．

本キットと Spac ferritin キットとの相関は77検体の測定値では相関係数 $\gamma=0.98$ と非常に良い相関が得られた．

著者らはこれまでに6種の ferritin キットを試用し検討したが，各キット相互の相関係数は非常に良好であるが，各キットでの ferritin 精製法，抗体の特異性，測定法の相違などによって，測定値には多少高低の差がみられる．

2) 臨床成績について

血中 ferritin 値は生体の鉄欠乏または過剰状態をよく反映するものとして認められている[1~3]．

本キットでの健常人男子の値は 98.7±33.9 ng/m*l*, 女子は 50.6±25.0 ng/m*l* であり，女子に低い傾向がみられた．健常人の血中 ferritin 値の正常範囲をどう設定するかは難かしい問題は残るが，本キットでは Fig. 7 の値の分布および平均値と標準偏差などから考えて，男子は40～170 ng/m*l*, 女子では20～150 ng/m*l* が妥当ではないかと思われる．

鉄欠乏性貧血では1例 (12 ng/m*l*) を除いて他はすべて 10 ng/m*l* 以下であり，妊娠8か月前後の妊婦15例も1例 (30 ng/m*l*) を除いてすべて 10 ng/m*l* 以下であった．これらは患者の鉄欠乏状態や，母体の鉄需要亢進による相対的鉄欠乏状態をよく反映したものと考えられる[8]．しかし Fig. 8 で示した如く，Ht 値や血清鉄値などが正常範囲にあり通常の日常生活を送り何ら自覚症状のない者でも血中 ferritin 値が 20ng/m*l* 以下を示す例が18例みられたが，これらはちょうど鉄欠乏性貧血の患

Presented by Medical*Online

者の血中 ferritin 値と同様の分布をとり，潜在性の鉄欠乏状態にあると現えられ，そして鉄不足の状況に際して最初に貯蔵鉄である ferritin が遊離して利用されることを示している．

非腫瘍性疾患では低値より高値まで広く分布しているが，慢性腎不全，再生不良性貧血および急性肝炎では 1,000 ng/ml 以上の非常な高値を示す例がみられた．炎症性疾患で血中 ferritin 値が高値を示すのは炎症による細胞の崩壊によって ferritin が逸脱してくるためと考えられており[9]，特に急性肝炎や膵炎で非常な高値になると報告されている[9]．

悪性腫瘍性疾患では全体に高値を示す例が多く，特に肝癌，膵癌および急性白血病の例で著明であった．

悪性腫瘍において血中 ferritin が増加する機序については種々な原因が考えられているが[10]，①腫瘍の組織破壊による逸脱，②腫瘍による腫瘍特異性の産生，③腫瘍のための貧血による相対的鉄過剰に伴う網内系への鉄貯蔵の反映，などが挙げられている．

特に②の腫瘍特異性 ferritin は acidic isoferritin[11] または carcino-fetal isoferritin と呼ばれ tumor marker としての役割が期待されている[12]．

しかし現在市販されているキットでは炎症や組織破壊で逸脱して来た ferritin も腫瘍由来の ferritin もともに検出するため，Fig. 7 でみられるごとく，血中 ferritin 値は非腫瘍性疾患と悪性腫瘍ではその分布にかなりの重複がみられ，血中ferritin 値だけでは悪性腫瘍診断の有効な指標とはなり難いと考えられる．

著者ら[13]は先に血中 ferritin 値と血清鉄値を同時に測定し，その比をみることによって悪性腫瘍診断の一つの指標になり得る事を報告した．さらに α-FP や CEA など他の tumor markers との組み合わせによって，ferritin の有効な利用法を考えねばならないと思われる[14]．

Fig. 9 では肝硬変症の経過観察中に次第にα-FP 値が上昇し遂に Hepatoma が発見された例であるが，α-FP が上昇し始める直前に血中 ferritin 値の一過性の急激な上昇がみられた．この時点で肝に，肝炎などの実質障害が起ったか，肝癌組織の増殖が始まったのか，あるいは偶然の上昇なのか判らないが興味ある出来事であった．もしこの様な上昇が多くみつかれば(肝硬変症において)肝癌の発見が血中 ferritin 値によって α-FP より早期に出来ると期待される．

Fig. 10 では患者の臨床経過を血中 ferritin 値および CEA 値がよく平行した例を示した．

以上の成績より血中 ferritin 値は生体の鉄欠乏や過剰状態をよく反映し，その測定は血液疾患や鉄代謝の分野で重要なものと考えられる．さらに悪性腫瘍診断においても，急性リンパ性白血病，肝癌，膵癌などの補助的診断に有用であり，他の tumor marker との組み合わせによっても有効な利用法が考えられる．

VI. 結　語

Sandwitch 法を用いた solid phase radioimmunoassay 法による血中 ferritin 値測定用キット，Phadebas Ferritin PRIST® キットの基礎的検討を行い，次いで臨床的意義について検討し報告した．

稿を終るに臨み，Phadebas Ferritin PRIST キットを供給されました塩野義製薬株式会社に厚く御礼申し上げます．

文　献

1) Munro HN, Linder MC: Ferritin, structure, biosynthesis, and role in iron metabolism. Physiol Rev **58**: 2, 318–396, 1978
2) Mason DY and Taylor CR: Distribution of transferrin, ferritin, and lactoferrin in human tissues. J Clin Pathol **31**: 316–327, 1978
3) Addison GM, Beamish MR, Hales CM, 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) Drysdale W, Ramsay WNM: The separation of ferritin and haemosiderin for studies in the metabolism of iron. Biochem J **95**: 282–288, 1965
5) Akahonai Y, Yachi A, Wada T: Isoferritins: Clinical application. Carcino-Embryonic Proteins **II**: 441–450, 1979

Presented by Medical*Online

6) 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**: 5, 259–265, 1978
7) Mori W, Asakawa H, Taguchi T: Antiplacental ferritin antiserum for cancer diagnosis. Ann N Y Acad Sci **259**: 446–449, 1975
8) Segall ML, Dommisse J, Toit ED, et al: Serum ferritin estimation in the assessment of iron stores in severe iron deficiency anemia in pregnancy and the responce to treatment. S Afr Med J **55**: 8, 287–289, 1979
9) Prieto J, Barry M, Sherlock S: Serum ferritin in patients with iron overload and with acute and chronic liver diseases. Gastroenterology **68**: 3, 525–533, 1975
10) 高後 裕, 新津洋司郎, 渡辺直樹, 他：血清 ferritin の radioimmunoassay 法とその消化器疾患における臨床的応用に関する研究. 日消誌 **73**: 12, 1553–1566, 1976
11) Urushizaki I, Ishitani K, Natori H, et al: Heterogeneity of ferritin from 3′-methyl-4-(dimethyamino) azobenzeneinduced hepatomas. Gann **64**: 237–246, 1973
12) Jones BM, Worwood M: An immunoradiometric assay for acidic ferritin of human heart: application to human tissues, cells and serum. Clin Chim Acta **85**: 81–88, 1978
13) 吉井正雄, 高坂唯子, 中島言子, 他：悪性腫瘍診断における血清フェリチン値および血清鉄値測定の有用性について. 核医学 **17**: 3, 317–323, 1980
14) Gropp C, Havemann L, Lehmann F: Serum ferritin levels in patients with lung cancer before and during therapy and in comparison to CEA determinations. Carcino-Embryonic Proteins II: 451–454, 1979

Presented by Medical*Online