

《ノート》

Radioassay 法による血中ビタミン B₁₂ および葉酸同時測定法の基礎的・臨床的検討

Simultaneous Radioassay of Vitamin B₁₂ and Folic Acid in Blood

田中 信夫* 稲葉 敏* 坂戸 秀吉* 山崎 泰範*
 山田 尚* 鈴木 英史* 佐野 茂顕* 長山 泰士*
 名越 温古* 板鼻 文子* 白石 正孝**

Nobuo TANAKA*, Toshi INABA*, Hideyoshi SAKATO*, Yasunori YAMAZAKI*,
 Hisashi YAMADA*, Hidefumi SUZUKI*, Shigeaki SANO*, Yasushi NAGAYAMA*,
 Harushisa NAGOSHI*, Fumiko ITAHANA* and Masataka SHIRAISHI**

*Department of Internal Medicine, **Central Laboratory,
 Aoto-Hospital, Jikei University School of Medicine, Tokyo

I. はじめに

ビタミン B₁₂ および葉酸は造血ビタミンとして知られ、生体内におけるこれらビタミンの欠乏は貧血の発生に関与し、とくに巨赤芽球性貧血を起こすことは周知の事実である¹⁻³⁾。他方、血液中のビタミン B₁₂ 含有量が異常に増加する、いわゆる高ビタミン B₁₂ 血症^{4,5)}は今日まで慢性骨髄性白血病 (CML), 急性前骨髄球性白血病 (APL), 急性骨髄性白血病 (AML), 急性肝障害^{6,7)}およびある種の悪性腫瘍^{8,9)}において報告されてきているが、ことに CML および肝障害時にみられる血中ビタミン B₁₂ 値はきわめて高く、これら疾患の臨床診断に有意義とされている。

ビタミン B₁₂¹⁰⁾および葉酸^{11,12)}の測定法は従来いずれも微生物学的定量法 (bioassay) が用いられてきたが、近年アイソトープの臨床応用により、

ビタミン B₁₂¹³⁻¹⁶⁾および葉酸¹⁷⁾の測定においても⁵⁷Co 標識ビタミン B₁₂ や ⁷⁵Se あるいは ¹²⁵I 標識葉酸を用いるアイソトープ法 (radioassay) が普及し、その測定精度および臨床的有用性が報告され広く臨床に応用されてきている^{18,19)}。

今回、著者らはビタミン B₁₂ および葉酸を同時に測定できる試薬 (Corning 社製 radioassay キット) を使用する機会を得たので、本法の基礎的検討とともに従来より使用してきている bioassay および radioassay と比較し、その臨床的意義について報告する。

II. 対象および方法

1) 対 象

検査対象は東都慈恵会医科大学青戸分院内科およびその関係病院長外来、入院患者で診断した健康者63例 (男性33例, 女性30例), 悪性貧血6例, 葉酸欠乏症4例, 鉄欠乏性貧血21例, 再生不良性貧血9例, 急性リンパ性白血病 (ALL) 5例, AML 8例, APL 5例, CML 7例, CML 急性転化例4例, 急性肝炎14例, 肝硬変症9例, 胃癌11例, 胃

* 東京慈恵会医科大学青戸分院内科

** 同 中央検査部

受付: 59年7月2日

最終稿受付: 60年3月22日

別刷請求先: 東京都葛飾区青戸6-41-2 (☎ 125)

東京慈恵会医科大学青戸分院内科

田 中 信 夫

Key words: Vitamin B₁₂, Folic acid, Radioassay.

摘出例8例, 肺癌7例, 慢性腎不全9例, 糖尿病43例, 甲状腺機能亢進症11例, 甲状腺機能低下症7例, アルコール中毒症11例, リウマチ性関節炎16例および妊娠23例の合計301例で, それらの血清または血漿(EDTA添加)を用いた. 赤血球中葉酸測定には抗凝固剤EDTAを含むガラス製試験管に採血し, ヘマトクリット値を測定し, 全血100 μ l をアスコルビン酸溶液2 ml (10 mg/ml 溶液)に加え, 採血後2~3時間内に測定する場合には4°Cで保存し, 不可能の場合には冷凍して保存した.

2) 方法

A) Corning 社製ビタミン B₁₂・葉酸同時測定用 radioassay キットの方法

1) 試薬 1キット(120検体用)の内容は下記のごとくである.

ビタミン B₁₂・葉酸結合蛋白 1バイアル
牛乳から精製して得た葉酸結合蛋白, および精製した豚内因子をガラス微粒子に共有結合しリン酸緩衝生理食塩水に懸濁した液剤 (60 ml)

トレーサー (⁵⁷Co-ビタミン B₁₂, ¹²⁵I-葉酸) 1バイアル
比放射能: ⁵⁷Co=100~300 μ Ci/ μ g
¹²⁵I=2,700~3,500 μ Ci/ μ g

ジチオスレイトール (DDT) 1バイアル
標準血清 6バイアル

ビタミン B₁₂ (0~2,000 pg/ml) および葉酸 (0~20 ng/ml) を含有するビタミン B₁₂・葉酸乾燥品

2) 試薬の調製

凍結乾燥粉末試薬のビタミン B₁₂・葉酸標準血清およびジチオスレイトール (DDT) に蒸留水1 mlを加え, 溶解後バイアルを2~3秒間回転させながら混合し, 10分間室温に放置する. トレーサー液の調製は DDT 1容量に対しトレー

サー 120容量を加えて作製する.

3) 測定操作

測定操作の概略は Fig. 1 に示すごとくである.

a) 試験管に標準ビタミン B₁₂・葉酸溶液あるいはサンプル(血清あるいは全血)0.1 mlを加える.

b) トレーサー (⁵⁷Co-ビタミン B₁₂・¹²⁵I-葉酸溶液) 1.0 ml を各試験管に加えた後, 95°C 以上の boiled water 中に15分間放置する.

c) incubation 後15分間室温で放置した後ビタミン B₁₂・葉酸結合蛋白溶液 0.5 mlを加え, 60分間室温で incubate する.

d) 3,000 rpm で10分間遠心分離し, 上清を吸引除去し, ついで沈渣部の ⁵⁷Co および ¹²⁵I の放

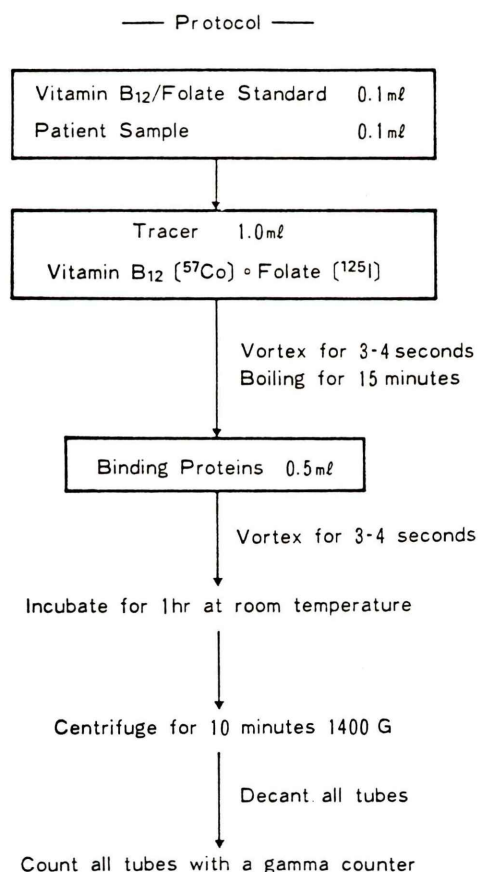


Fig. 1 Simultaneous radioassay of vitamin B₁₂ and folate (RIA B₁₂/folate).

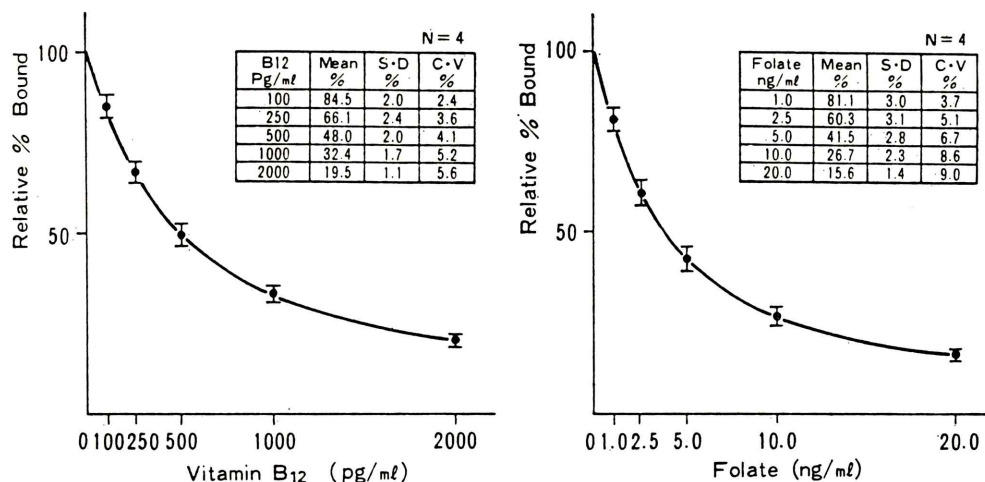


Fig. 2 Standard curves.

Table 1 Intraassay

Sample	Vitamin B ₁₂ pg/ml		Folate ng/ml	
	A	B	C	D
N	10	10	10	10
Mean	281	939	2.0	9.2
S.D.	11.2	17.1	0.1	0.2
C.V.%	4.0	1.8	5.0	2.2

Table 2 Interassay

Sample	Vitamin B ₁₂ pg/ml		Folate ng/ml	
	A	B	C	D
N	5	5	5	5
Mean	291	932	2.4	9.1
S.D	19.9	28.6	0.2	0.4
C.V.%	6.8	3.1	8.3	4.4

射能を γ -カウンターを用いて計測する。

e) 標準ビタミン B₁₂, 葉酸のカウント値より次式を用いて相対結合率を計算する。

相対結合率(%)

$$= \frac{\text{標準血清あるいは被検体のカウント (cpm)}}{\text{ゼロ濃度標準血清のカウント (cpm)}} \times 100$$

標準血清の相対結合率より Fig. 2 に示すごとく標準曲線を作製し、被検血清の相対結合率よりビタミン B₁₂, 葉酸値を算出する。

f) 赤血球中葉酸値は下記の式によって計算する。

赤血球葉酸値 (ng/ml)

$$= \frac{(\text{全血溶血液の葉酸値 ng/ml}) \times 21 \times 100}{\text{ヘマトクリット値 (\%)}}$$

B) ビタミン B₁₂ および葉酸の bioassay

ビタミン B₁₂ の bioassay は日本ビタミン学会

ビタミン B₁₂ 定量小委員会で定められている *L. leichmannii* ATCC 7830 菌株を用いる方法により、葉酸の定量は *L. casei* 菌株を用いる bioassay によった。

C) 他のビタミン B₁₂, 葉酸の radioassay

ビタミン B₁₂ の radioassay は PHADEBAS ビタミン B₁₂ test により、葉酸は folate radioassay test により定量した。

III. 結 果

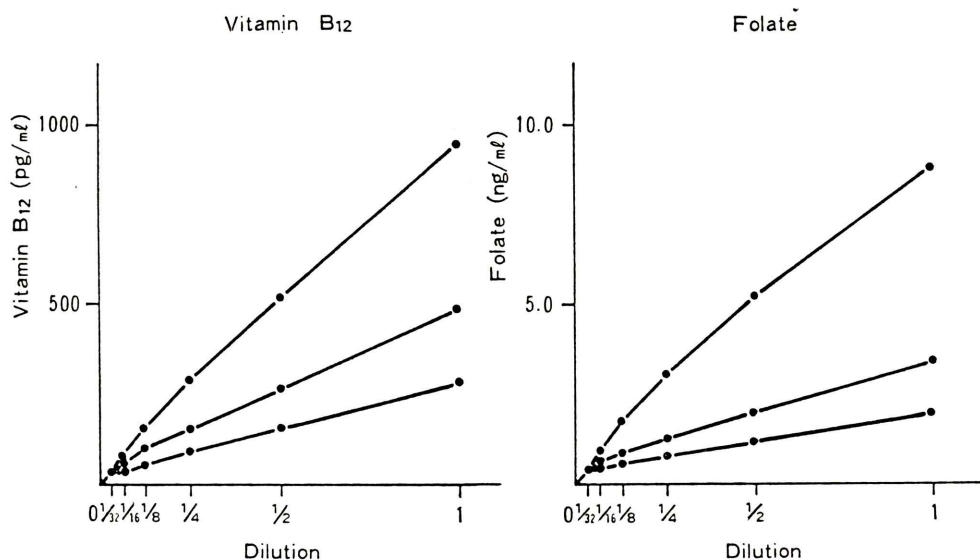
1) 基礎的検討

A) 標準曲線

ビタミン B₁₂ および葉酸の標準曲線は Fig. 2 に示すごとく、各種濃度における結合率の変動は平均4.2%および6.0%と良好な標準曲線を示す。

B) Intraassay および interassay variation

Table 2 は2種類の血清を用いて、ビタミン B₁₂ および葉酸を同時に10回くり返し測定した

Fig. 3 Dilution test in RIA B₁₂/folate assay.Table 3 Recovery test in vitamin B₁₂

Sample	Added pg/ml	Measured pg/ml	Recovery %
E	0	263	
	50	319	112.0
	125	382	95.2
	250	512	99.6
	500	740	95.4
	1,000	1,388	112.5
F	0	306	
	50	361	110.0
	125	412	84.8
	250	541	94.0
	300	781	95.0
	1,000	1,375	106.9
G	0	450	
	50	502	104.0
	125	587	109.6
	250	736	114.4
	500	910	92.0
	1,000	1,313	86.3

Table 4 Recovery test in folate

Sample	Added ng/ml	Measured ng/ml	Recovery %
H	0	1.5	
	0.5	2.1	120.0
	1.25	2.8	104.0
	2.5	4.2	108.0
	5.0	6.2	94.0
	10.0	12.8	113.0
I	0	2.0	
	0.5	2.5	100.0
	1.25	3.2	96.0
	2.5	4.2	88.0
	5.0	6.5	90.0
	10.0	12.4	104.0
J	0	4.0	
	0.5	4.5	100.0
	1.25	5.4	112.0
	2.5	6.7	108.0
	5.0	8.8	96.0
	10.0	13.4	94.0

intraassay を, Table 2 は異なるロットを使用し, 日を変えて測定した場合の interassay を示すが, C.V. はそれぞれ 1.8~5.0 および 3.1~8.3% とほぼ良好な成績を示す.

C) 希釈試験

Figure 3 はビタミン B₁₂ および葉酸濃度の異

なる 3 種類の血清を生理的食塩水で 1/2 から 1/32 倍希釈した試料のビタミン B₁₂ および葉酸値を示す. 高濃度の血清はやや高めのスロープを示すが, 満足できる直線性を認める.

D) 回収率

Table 3 はビタミン B₁₂ 濃度の異なる 3 検体に

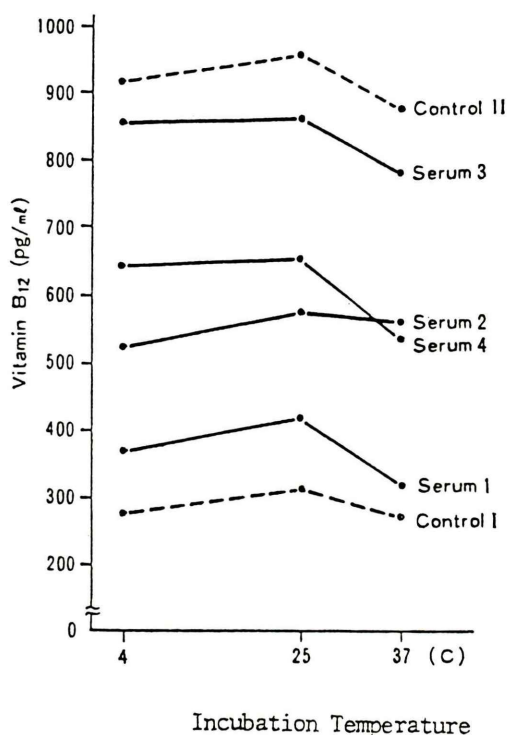


Fig. 4 Effect of incubation temperature on serum vitamin B₁₂ concentration.

キット添付標準血清を等量混合して 50, 125, 250, 500 および 1,000 pg/ml のビタミン B₁₂ を添加した回収率を示す。また Table 4 は葉酸濃度の異なる 3 検体にキット添付標準血清を等量混合して 0.5, 1.25, 2.5, 5.0 および 10.0 ng/ml の葉酸を添加したその回収率を示すが、それぞれ平均 100.8% および 101.8% である。ビタミン B₁₂ および葉酸いずれも添加量の低値群で回収率が高値の傾向を示す。

E) 血清ビタミン B₁₂ 値に及ぼす incubation 温度と時間の影響

Figure 4 および Fig. 5 は血清中ビタミン B₁₂ 値に及ぼす incubation 時の温度とその時間の影響を示す。incubation 温度では 4°C から 25°C で上昇し、37°C でやや低下の傾向を示し、時間は 30分から60分ではあまり変化せず、25°C, 60分が incubation として良好である。

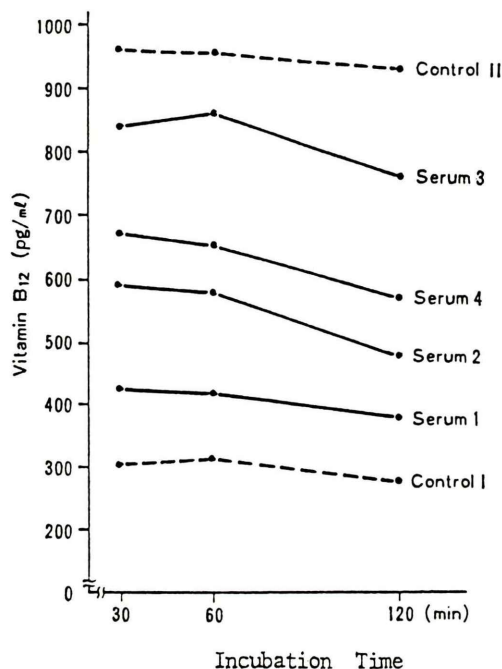


Fig. 5 Effect of incubation time on serum vitamin B₁₂ concentration.

F) 血清葉酸値に及ぼす incubation 温度と時間の影響

Figure 6 は血清葉酸値に及ぼす incubation 温度の影響を示すが、25°C から 37°C にかけてかなり急峻な低下がみられる。incubation 時間にかんしては、Fig. 7 に示すごとく 60分から120分にかけて低下傾向を認め、ビタミン B₁₂ および葉酸結合蛋白の反応は 25°C, および 60分が最適な条件と考えられる。

G) ビタミン B₁₂ および葉酸測定における他の方法との比較

1) 血清ビタミン B₁₂ 測定における bioassay あるいは PHADEBAS ビタミン B₁₂ radioassay との比較

Figure 8 および Fig. 9 は本法による血清ビタミン B₁₂ 値と bioassay あるいは PHADEBAS ビタミン B₁₂ radioassay による血清ビタミン B₁₂ 値の相関を示す。前者は $r=0.959$, $y=0.985x-39.9$ および後者は $r=0.955$, $y=0.922x-70.1$ と良好な

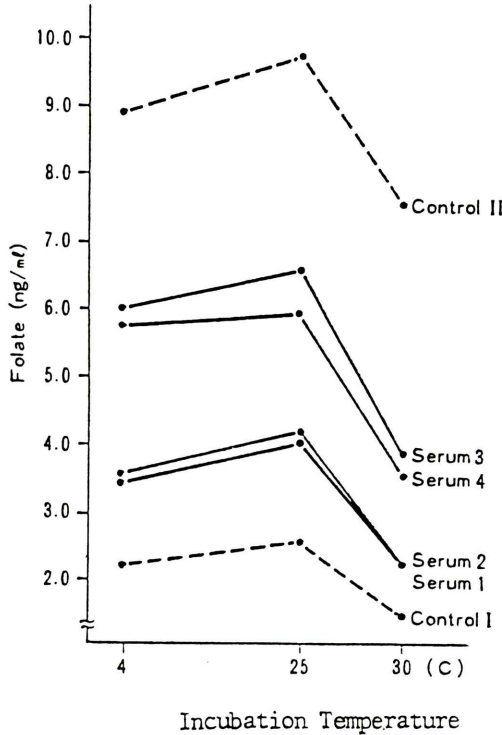


Fig. 6 Effect of incubation temperature on serum folate concentration.

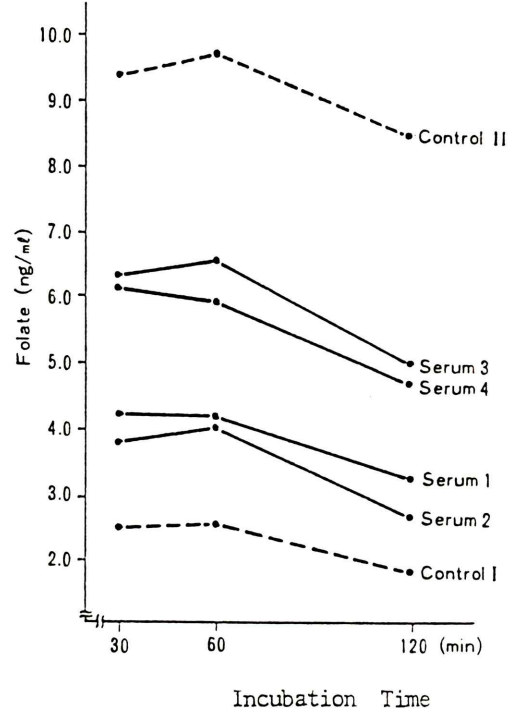


Fig. 7 Effect of incubation time on serum folate concentration.

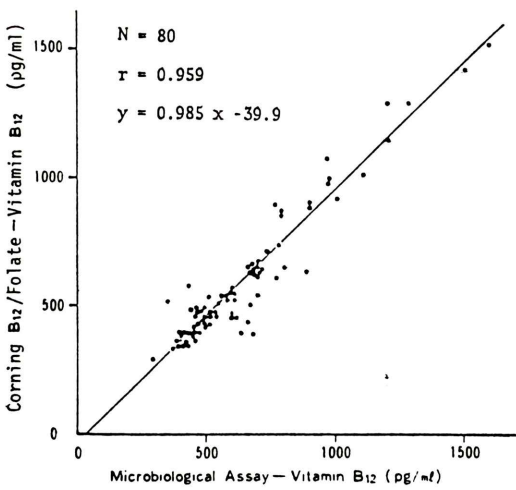


Fig. 8 Relation between serum vitamin B₁₂ concentration by Corning B₁₂/folate and microbiological assay.

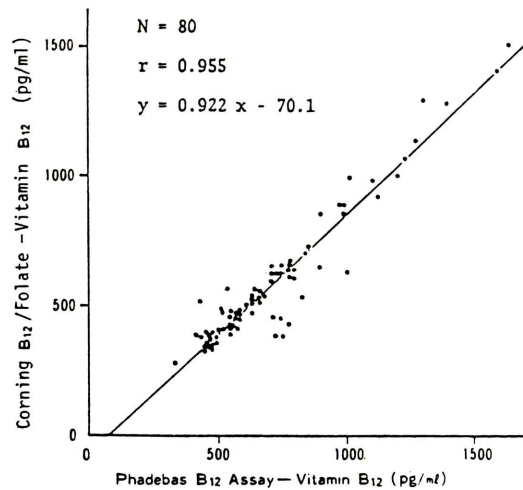


Fig. 9 Relation between serum vitamin B₁₂ concentration by Corning B₁₂/folate and phadebas B₁₂ assay.

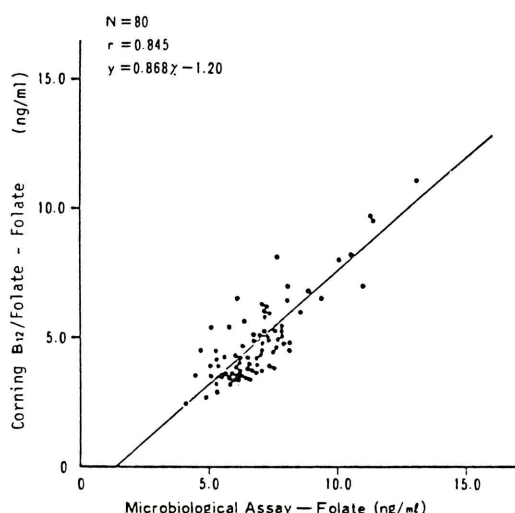


Fig. 10 Relation between serum folate concentration by Corning B₁₂/folate and microbiological assay.

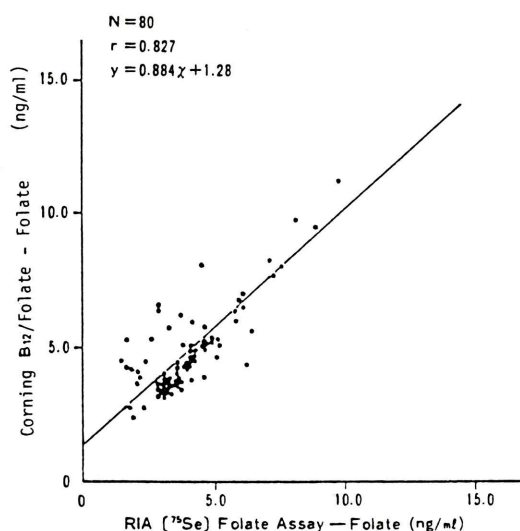


Fig. 11 Relation between serum folate concentration by Corning B₁₂/folate and RIA (⁷⁵Se) folate assay.

Table 5 Content of vitamin B₁₂ and Folic acid in blood from normal individuals and patients with various diseases

Diseases		No. of Cases	Vitamin B ₁₂		Folic acid	
			Serum M ± SD (pg/ml)		Serum M ± SD (ng/ml)	
Normal	Male	33	486 ± 93		4.8 ± 1.6	246 ± 76
	Female	30	445 ± 78		4.6 ± 1.4	231 ± 61
Pernicious anemia		6	112 ± 16		7.1 ± 2.6	287 ± 103
Folic acid deficiency		4	586 ± 202		0.7 ± 0.3	192 ± 41
Iron deficiency anemia		21	522 ± 223		4.9 ± 2.1	256 ± 81
Aplastic anemia		9	456 ± 156		6.1 ± 2.4	277 ± 111
Acute lymphocytic leukemia		5	392 ± 123		1.3 ± 1.2	242 ± 146
Acute myelocytic leukemia		8	1,576 ± 556		1.1 ± 1.2	283 ± 131
Acute promyelocytic leukemia		5	4,127 ± 982		0.9 ± 1.1	296 ± 156
Chronic myelocytic leukemia		7	5,452 ± 1,124		2.9 ± 1.4	201 ± 121
Myeloid blastic crisis		2	3,478		1.6	302
Lymphoid blastic crisis		2	1,017		1.4	286
Acute hepatitis		14	1,817 ± 432		5.2 ± 2.3	291 ± 156
Liver cirrhosis		9	406 ± 303		2.7 ± 1.9	222 ± 107
Gastric cancer		11	443 ± 103		4.1 ± 1.7	263 ± 86
Postgastrectomy		8	289 ± 76		3.9 ± 2.1	206 ± 67
Lung cancer		7	437 ± 202		4.2 ± 1.7	227 ± 83
Chronic renal failure		9	456 ± 59		3.1 ± 1.1	197 ± 81
Diabetes mellitus		43	433 ± 107		4.3 ± 2.7	253 ± 89
Hyperthyroidism		11	461 ± 145		3.1 ± 2.1	198 ± 86
Hypothyroidism		7	409 ± 133		6.1 ± 2.9	246 ± 117
Alcoholism		11	369 ± 89		2.9 ± 1.1	178 ± 96
Rheumatoid arthritis		16	446 ± 103		5.1 ± 2.1	261 ± 67
Pregnancy		23	398 ± 127		2.7 ± 1.9	202 ± 61

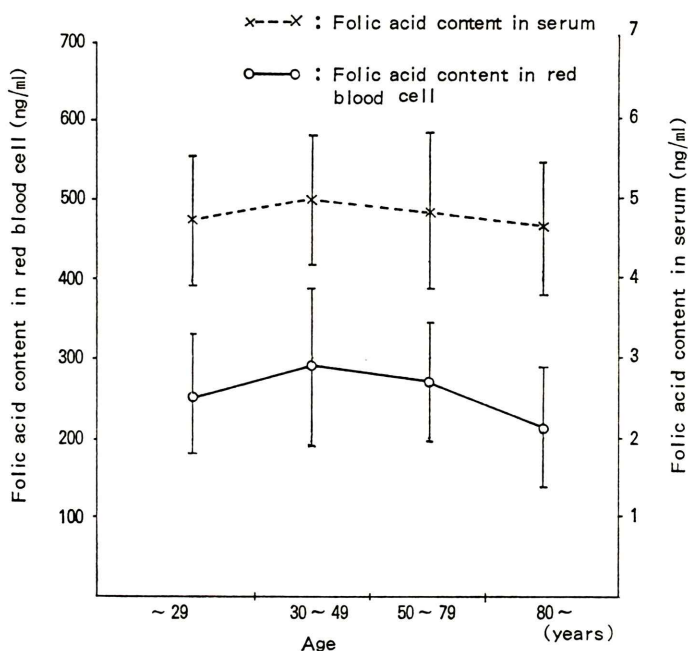


Fig. 12 Age distribution of folic acid content in serum and red blood cell in normal individuals.

正の相関を示す。

- 2) 血清葉酸測定における bioassay あるいは ^{75}Se 標識葉酸を用いる folate radioassay test との比較

Figure 10 および Fig. 11 は本法による血清葉酸値と bioassay あるいは folate radioassay による血清葉酸値の相関を示す。前者は $r=0.845$, $y=0.868x-1.20$, 後者は $r=0.829$, $y=0.884x-1.28$ と正の相関を示す。

2) 臨床的検討

A) 血清ビタミン B_{12} 値

Table 5 は健常者および各種疾患患者における血清ビタミン B_{12} , 血清葉酸および赤血球葉酸値をまとめたものである。

男性健康者の血清ビタミン B_{12} 値 $486 \pm 93 \text{ pg/ml}$ に比して女性健康者では $445 \pm 78 \text{ pg/ml}$ とやや低値を示すが、統計学的に有意の差を認めない。血清ビタミン B_{12} 値は悪性貧血では $112 \pm 16 \text{ pg/ml}$ と他疾患に比してきわめて有意に減少し ($p < 0.01$), 胃切除例 $263 \pm 58 \text{ pg/ml}$ でかなり減少し ($p < 0.05$), ついでアルコール中毒, 妊娠, 慢性

腎不全, 胃癌, 肝硬変症, ALL および糖尿病で軽度の減少傾向を示す。他方, 白血病とくに CML, APL および AML における血清ビタミン B_{12} 値は高く, ことに CML および APL では ALL に比してきわめて高い ($p < 0.01$)。CML の急性転化例では慢性期に比して減少し, 骨髄性急性転化例で $2,478 \text{ pg/ml}$, リンパ性急性転化例で $1,017 \text{ pg/ml}$ と減少する。肝障害例では, 急性肝炎で $1,817 \pm 232 \text{ pg/ml}$ と高く, 他方肝硬変症では 401 ± 103 と低く, 両者間に有意に差を認める ($p < 0.01$)。葉酸欠乏症, 鉄欠乏性貧血, 再生不良性貧血, 肺癌, 甲状腺機能亢進症およびリウマチ性関節炎における血清ビタミン B_{12} 値はほぼ正常範囲にある。

B) 血清葉酸値

男性および女性健康者における血清葉酸値はそれぞれ 4.8 ± 1.6 および $4.6 \pm 1.4 \text{ ng/ml}$ で, 男女間に統計学的に有意の差を認めない。

血清葉酸値は葉酸欠乏症できわめて低く ($p < 0.01$), ついで白血病, とくに ALL, AML, APL および CML の急性転化例でも低く, 肝硬変, アルコール中毒および妊婦においても減少傾向を示す。

他方悪性貧血、再生不良性貧血でやや高値の傾向を認めるが、鉄欠乏性貧血、胃癌、急性肝炎、肺癌、糖尿病、甲状腺機能低下症およびリウマチ性関節炎においてはほぼ正常範囲の血清葉酸値を示す。

C) 赤血球葉酸値

男性および女性健康者における赤血球葉酸値はそれぞれ 246 ± 76 および 231 ± 61 ng/ml と男女間に統計学的に有意の差を認めない。健康者における血液葉酸値の年齢別推移は Fig. 12 に示すごとく、血清葉酸値は30～49歳でやや高く、以後加齢とともに僅かに減少傾向を示すが、赤血球葉酸値では血清葉酸値に比して、より顕著にその減少傾向を示す。赤血球葉酸値は葉酸欠乏症で 192 ± 41 ng/ml と最も低く ($p < 0.01$)、ついでアルコール中毒、妊婦、慢性腎不全、甲状腺機能亢進および胃摘出例においてその減少傾向を示す。

IV. 考 察

Bioassay による血中ビタミン B₁₂ あるいは葉酸の測定は以前より行われ、十分の感度を有し、現在でも臨床的に応用されている。しかし bioassay にあたっては、定量に使用する細菌の継続維持、雑菌の混入防止、培地の汚染防止および器具の滅菌などの操作上の煩雑さとともに24時間以上の長時間を必要とすることから限られた実験室のみで測定されている現状であろう。また細菌を使用するために抗生物質および抗腫瘍剤投与中の患者の試料は測定不能である不利な点もある。

他方、radioassay は操作が簡単で、短時間で結果を得ることができ、また抗生物質および抗腫瘍剤の共存でも測定可能で、かつ再現性が良く現在、臨床面で広く使用されてきている。今日使用されている radioassay はビタミン B₁₂ および葉酸ともに別個の操作によって測定されているが、今回使用する機会を得た Corning 社製 radioassay キットはビタミン B₁₂ と葉酸が同時に測定できるより簡便なビタミン B₁₂、葉酸測定キットと言える。

本法の基礎的検討においては、標準曲線、同時・日差再現性、希釈試験、添加回収率試験、

incubation 温度・時間いずれにおいても良好な結果を示す。また従来使用されてきた bioassay および radioassay と良好な相関を認め、臨床的応用が可能と考えられる。

本法による男性および女性健康者の血清ビタミン B₁₂ 値はそれぞれ 486 ± 93 および 445 ± 78 pg/ml と従来の報告値とほぼ同様である。各種疾患における血清ビタミン B₁₂ 値は、悪性貧血ではきわめて低く、胃切除例でもかなり減少し、ついでアルコール中毒、妊娠、慢性腎不全、胃癌、肝硬変症および糖尿病で軽度の減少傾向を認め、これらの疾患においてもビタミン B₁₂ 代謝異常の存在が示唆される。他方、非リンパ性白血病においてはリンパ性白血病に比して血清ビタミン B₁₂ 値は増加しその診断的意義は高く、とくに CML の急性転化例では慢性期に比して減少することがことにリンパ性転化例でその減少は著しく、骨髓性急性転化例との鑑別診断に有意義である。また肝障害例では血清ビタミン B₁₂ 値は一般に高値を示すが、とくに急性肝炎では肝硬変に比してきわめて高く、これは肝細胞障害に基づく肝細胞よりのビタミン B₁₂ の逸脱によると考えられている。

男性および女性健康者における血清葉酸値はそれぞれ 4.8 ± 1.6 および 4.6 ± 1.4 ng/ml であり、また赤血球葉酸値はそれぞれ 246 ± 76 および 231 ± 61 ng/ml と従来の報告値とほぼ同様である。健康者の血清葉酸値は50歳以後加齢とともに僅かに減少傾向を示すが、赤血球葉酸値は血清葉酸値に比してその減少傾向が顕著で体内葉酸動態は血清葉酸値より赤血球葉酸値がより反映するものと考えられる。

各種疾患における血清葉酸値は葉酸欠乏症できわめて低く、白血病、肝硬変、アルコール中毒および妊婦においてもその減少傾向を認めるが、白血病における血清葉酸値の減少は白血病細胞による葉酸需要増大によるものと考えられている。赤血球葉酸値はアルコール中毒、妊婦および慢性腎不全患者においてもみられ、血清葉酸値に比してその変化が著しく、その欠乏症の診断に有意義と考えられる。

ビタミン B₁₂ および葉酸の欠乏はともに巨赤芽球性造血の発生に関与しており、本キットのごとくビタミン B₁₂ および葉酸が同時に簡単に測定できることは、本キットが臨床上多くの診断、病態究明上に、より有力な測定方法であると考えられる。

V. おわりに

以上、ビタミン B₁₂ と葉酸を同時に測定できる本キットの基礎的臨床的検討を行った。その結果、標準曲線、同時・日差再現性、希釈試験、添加回収率試験、incubation 温度・時間いずれにおいても良好な結果を認め、また今日、使用されている bioassay および radioassay とともに良好な相関を認める。また各種疾患における血中ビタミン B₁₂・葉酸測定においても従来の報告と同様の傾向を示し、臨床的応用が可能で、本キットが臨床上、鑑別診断、病態究明にあたってより有力な測定方法であると考えられる。

ビタミン B₁₂/Folate radioassay kit をご提供いただいたコーニングメディカル株式会社に深謝致します。

文 献

- 1) Chanarin I: The Megaloblastic Anemias, Blackwell Sci. Oxford and Edinburgh, 1969
- 2) 田中信夫, 土本泰三: 巨赤芽球性骨髓造血. 臨床血液 **11**: 279, 1970
- 3) 田中信夫: 巨赤芽球性造血. 第20回日本医学会総会誌, II, p. 1866, 1979
- 4) 内野治人, 田中信夫: 白血症におけるビタミン B₁₂ の代謝異常とその発生機序. 臨床血液 **14**: 1347, 1973
- 5) 田中信夫, 内野治人: 高ビタミン B₁₂ 血症, ビタミン B₁₂——基礎と臨床——(内野治人編). 科学評論社, p. 296, 1978
- 6) Jones PN, et al: The effect of liver diseases on serum Vitamin B₁₂ Concentration. J Lab Clin Med **49**: 910, 1957
- 7) Rachmilewitz M, et al: Serum Concentration of Vitamin B₁₂ in acute and chronic liver disease. J Lab Clin Med **48**: 339, 1956
- 8) Waxman S, Gilbert HS: A tumor-related vitamin B₁₂ binding protein in adolescent hepatoma. New Engl J Med **289**: 1053, 1973
- 9) Waxman S, Gilbert HS: Characteristics of a novel serum vitamin B₁₂-binding protein associated with hepatocellular carcinoma. Brit J Haematol **27**: 229, 1974
- 10) ビタミン B₁₂ 定量小委員会: 血中ビタミン B₁₂ 定量法. ビタミン **19**: 438, 1960
- 11) 岩井和夫: 葉酸, マイクロバイオアッセイ, 共立出版, p. 64, 1965
- 12) 田中信夫: 正常血液葉酸値, 葉酸——基礎と臨床——(内野治人, 外林秀紀編). 科学評論社, p. 149, 1977
- 13) Barakat RM, Ekins RP: Assay of vitamin B₁₂ in blood, A simple method. Lancet **2**: 25, 1961
- 14) Grossowicz N, et al: Isotopic determination of vitamin B₁₂ binding capacity and concentration. Proc Soc Exp Biol Med **109**: 604, 1962
- 15) Lau K, et al: Measurement of serum vitamin B₁₂ level using radioisotope dilution and coated charcoal. Blood **26**: 202, 1965
- 16) 内山幸信, 奥田邦雄: Solid phase を用いる血清ビタミン B₁₂ の radioassay に関する検討. ビタミン **47**: 567, 1973
- 17) 外林秀紀: 放射性同位元素を用いる葉酸測定法, 葉酸——基礎と臨床——(内野治人, 外林秀紀編). 科学評論社, p. 142, 1977
- 18) 田中信夫, 他: ビタミン B₁₂・葉酸の測定とその臨床的意義. 臨床病理 **29**: 554, 1981
- 19) 田中信夫: ビタミン B₁₂ と葉酸の測定法. 臨床検査 **26**: 33, 1982
- 20) 満間照典, 他: Radioassay 法による血清 vitamin B₁₂, folate の測定——コーニング社製キットの検討——. 医学と薬学 **6**: 1873, 1983