

《ノート》

共沈法を用いた新しい TIBC・UIBC 測定法の開発

—方法論と基礎的検討—

Development of a New Method for Measurement of TIBC

and UIBC Using Coprecipitation Method

—Methodology and Fundamental Evaluation—

川崎 芳正* 堀野 嘉宏* 宮本 佳一*

Yoshimasa KAWASAKI, Yoshihiro HORINO and Yoshikazu MIYAMOTO

JMC

I. はじめに

貧血の診断にあたって最初に実施する検査には、ヘモグロビン、ヘマトクリット、血清鉄などとともにその血清鉄を輸送する蛋白（トランスフェリン）の鉄結合能がある。この検査は不飽和鉄結合能（unsaturated iron binding capacity, UIBC）と総鉄結合能（total iron binding capacity, TIBC）の二種類あり後者は前者と血清鉄の和である。

また、測定方法においては滴定法、レジン法、吸着法などがあるが、現在日常検査として普及しているのは、Ramsey の開発した炭酸マグネシウム吸着を用いた方法¹⁾、Peters らの開発したレジン法²⁾である。しかし現在市販化されているラジオアッセイキットを用いる測定では測定に2時間以上を要し、また前処理を必要とするため操作が煩雑になることが欠点である。この点を改良する目的で、レジンストリップに代え共沈法を用い、また2価の放射性鉄を用いることにより前処理を

省略できる方法を考案し従来法（レジンを用いた方法³⁾）との比較検討を行った。

II. 測定原理と操作方法

1) 測定原理（従来法³⁾との相違）

従来法（レジンを用いた方法³⁾）でUIBCにおいては、鉄含有量のわかっている放射性鉄（⁵⁹Fe(III)）を血清に加えトランスフェリンの鉄不飽和部を取り込ませ、取り込まなかった余りをレジンストリップ（陰イオン交換膜）で吸着除去し測定している。その結果、加えた総放射能との比によりUIBC値が算出される。また、TIBCはまず被検血清に酸性の緩衝液を加え、トランスフェリンに最初から結合している血清鉄を遊離させ、さらにこの血清鉄を陰イオン交換樹脂で吸着除去している。その結果、トランスフェリンは鉄が全く結合していない状態になるので、以後これを前述のUIBCと同じ操作をすることにより全ての鉄結合能（TIBC）を算出している。

一方、本法でUIBCの測定には、レジンストリップの代わりに担体としてクロムイオン（Cr(III)）を用いた凝集沈殿による共沈を行うことに

* 締ジェイ エム シー (JMC)

受付：60年3月8日

最終稿受付：60年12月16日

別刷請求先：京都市左京区東竹屋町通

川端東入東竹屋町 63-2 (番606)

締ジェイ エム シー (JMC)

川 崎 芳 正

Key words: Total iron binding capacity (TIBC), Unsaturated iron binding capacity (UIBC).

よりトランスフェリンに取り込まれず余った放射性鉄を除去する。

また、TIBC の測定においては、血清鉄を遊離させるために液性を下げて 2 倍の放射性鉄 (^{59}Fe (II)) を $1,500 \mu\text{g}/\text{dl}$ 加える。これは 2 倍の鉄イオン (放射性鉄) は 3 倍の鉄イオン (血清鉄) より迅速にトランスフェリンへ取り込まれる現象⁴⁾を利用したもので、その結果、トランスフェリンには放射性鉄 (^{59}Fe (II)) が主に取り込まれることになる。以後 UIBC と同様に凝集沈殿による共沈を行い TIBC 値を算出する。

2) 使用試薬

a) 放射性鉄 クエン酸鉄 (III) アンモニウム液 {1 ml 当たり 約 $0.033 \mu\text{Ci}$ (1.33 KBq), non-carrier free} に L-アスコルビン酸を使用時に加え 2 倍の放射性鉄に還元し使用する。

b) 担体 硫酸クロムアンモニウム水溶液。

3) 操作方法

操作方法は Fig. 1 に示した。遊離の放射能測定にはウェル型シンチレーションカウンター (Auto-Logic) を用い、1 分間測定した。そして標準血清

の計測結果との対比により、microcomputer (Olivetti P6040) を使い未知試料の濃度の読み取りを行った。

III. 検討項目

検討内容

- 1) 使用血清量の検討
- 2) インキュベーション時間と温度の影響
- 3) 添加 ^{59}Fe 量の影響
- 4) 測定系に対する血清鉄の影響 (鉄 (II) と鉄 (III) のトランスフェリンへの取り込みの相違)
- 5) 精度と再現性
- 6) 従来法 (レジンを用いた方法³⁾) との相関

IV. 方 法

1) 使用血清量の検討

使用する血清の適量を決定する目的で、使用血清量を $50, 75, 100, 125 \mu\text{l}$ と変化させ、3 種の異なる濃度の血清に対しそれぞれ 10 回の同時測定を行い、各濃度、各血清量ごとの測定値の変動係数を比較した。

2) インキュベーション時間と温度の影響

本測定系では 2 つのインキュベーションがある。最初のインキュベーションは TIBC のみで、これはトランスフェリンから血清鉄を遊離させるのに必要なインキュベーションである。また、もう一つのインキュベーションは TIBC・UIBC とも必要で、これはトランスフェリンが放射性鉄 (II) を取り込むのに必要なインキュベーションである。これら 2 つのインキュベーションの必要時間、また最適温度を決定するため次の方法で行った。

- a) 第 1 インキュベーション (トランスフェリンから血清鉄を遊離する時間。TIBCのみ)について

TIBC $401 \mu\text{g}/\text{dl}$, 血清鉄 $98 \mu\text{g}/\text{dl}$ のプール血清に pH 2.2 のクエン酸緩衝液を加え、インキュベーション時間を変化させた。遊離した血清鉄は Nitroso-PSAP で発色、760 nm で比色し血清鉄の濃度を算出した。

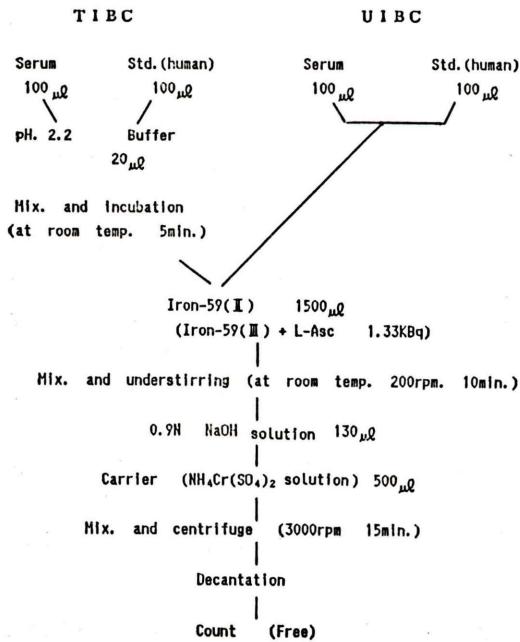


Fig. 1 Assay procedures.

- b) 第 2 インキュベーション（トランスフェリンが放射性鉄 (II) を取り込む時間、TIBC・UIBC とも）について

3 種類の濃度の血清を用い、インキュベーション時間を、5, 10, 15, 20 分と変化させおののおの 10 回、同時測定を行った。

3) 添加 ^{59}Fe 量の影響

トランスフェリンが放射性鉄 (II) を取り込む際、トランスフェリンの鉄結合能力 (Iron binding capacity) に比べ加える放射性鉄 (II) 量が少なければ反応系の頭打ち現象が起きることが推察されたので、どの程度で生じるかを検討した。365 $\mu\text{g}/\text{dl}$ の鉄結合能力を持つプール血清に対し加える放射性鉄 (II) 量を 300~1,020 $\mu\text{g}/\text{dl}$ に変化させ測定を行った。

4) 測定系に対する血清鉄の影響

(鉄 (II) と鉄 (III) のトランスフェリンへの取り込みの相違)

本法はトランスフェリンに結合している血清鉄を緩衝液で遊離させ、放射性鉄 (II) を加え、2 倍の鉄イオン (放射性鉄) が 3 倍の鉄イオン (血清鉄) より迅速にトランスフェリンへ取り込まれる現象⁴⁾を利用することにより TIBC を測定している。その原理である鉄 (II) と鉄 (III) のトランスフェリンへの取り込みの相違について検討した。

鉄結合能が既知であるプール血清に鉄 (II) (放射性鉄) と鉄 (III) (非放射性鉄) の各濃度を互いに変化させた物を同時に加えた。そしてプール血清中のトランスフェリンが取り込んだ鉄の放射能を計測し濃度を算出することにより鉄 (II) (放射性鉄) が取り込まれた割合を見た。

5) 精度と再現性

使用血清量 100 μl 、第 1 インキュベーション時間 5 分・室温、第 2 インキュベーション時間 10 分・室温に設定し、この条件下での測定系の精度と再現性を次の方法で検討した。

a. 精 度

プレシジョン・プロフィール⁵⁾ (precision profile: 横軸に標準血清の濃度をとり、縦軸にその濃度に対する平均分散から計算された標準偏差をプロッ

トし、線で結んだ図) により測定系の 95% 信頼レベルにおける最小検出濃度の測定を行った。

b. 再現性

3 種類の血清 (高、中、低濃度) を用いて、同一アッセイ内で 40 回の同時測定を行い同時再現性を検討した。また、異なるアッセイ間で 11 日間の測定を行い日差再現性を検討した。

⑥ 従来法 (レジンを用いた方法³⁾) との相關

TIBC マイクロテスト『第一』、UIBC マイクロテスト『第一』を用いて測定した TIBC・UIBC 値との相關を検討した。

V. 結 果

1) 使用血清量の検討

UIBC 濃度 471.0 $\mu\text{g}/\text{dl}$ の血清 A, 310.0 $\mu\text{g}/\text{dl}$ の血清 B, 235.0 $\mu\text{g}/\text{dl}$ の血清 C の 3 種類の血清を用いて血清量を、50, 75, 100, 125 μl と変化させたところ、10 回の同時測定における測定結果の変動係数は血清 A ではそれぞれ 13.9, 8.7, 3.3, 3.2% であった。同様に血清 B では 20.5, 13.1, 8.9, 6.3% であった。血清 C では 16.5, 9.3, 5.6, 3.2% であった (Fig. 2)。

各濃度とも 100 μl 以上の血清量では同時測定における変動係数は 10% 以下に収まった。

2) インキュベーション時間と温度の影響

a) 第 1 インキュベーションについて

第 1 インキュベーション時間を 1, 2, 4, 5 分と変化させた時、また温度を、室温, 37°C, 4°C と変化させた時、いずれも全ての血清鉄の 90% 以上が、pH 2.2 の緩衝液によってトランスフェリンから遊離することが示唆された (Fig. 3)。

b) 第 2 インキュベーションについて

UIBC 濃度 428.0 $\mu\text{g}/\text{dl}$ の血清 D, 319.0 $\mu\text{g}/\text{dl}$ の血清 E, 159.0 $\mu\text{g}/\text{dl}$ の血清 F の 3 種類の濃度の血清を用いてインキュベーション時間を 5, 10, 15, 20 分と変化させたところ、10 回の同時測定における測定結果の変動係数は血清 D ではそれぞれ 8.3, 4.9, 3.3, 2.9% であった。同様に血清 E では 7.0, 4.1, 2.4, 2.8% であった。血清 F では 5.8, 3.4, 1.8, 2.3% であった (Fig. 4)。

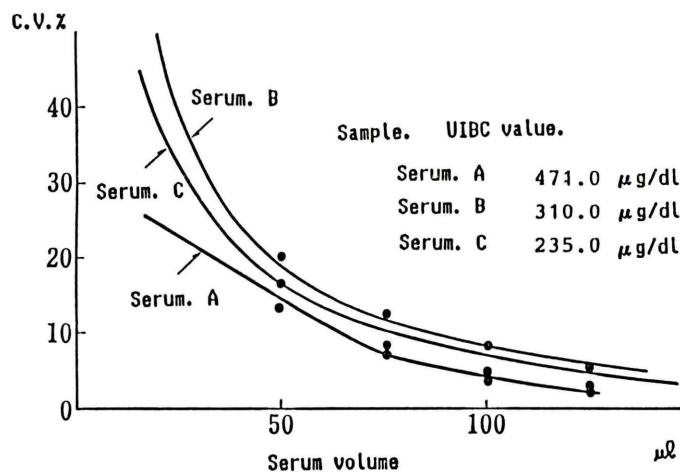


Fig. 2 Effect of serum volume on variance of measured values.

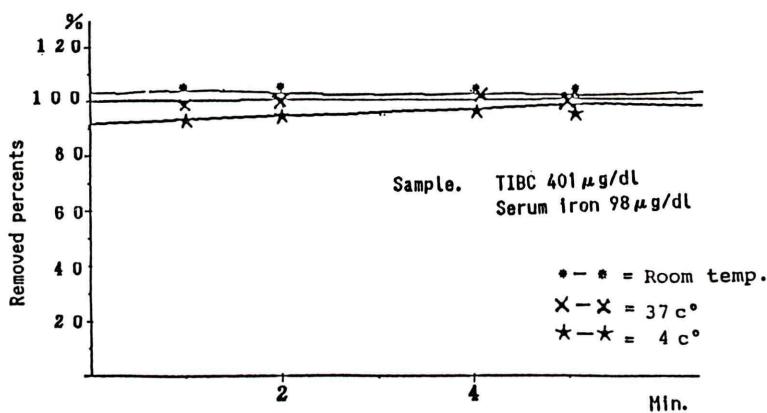


Fig. 3 Effect of 1st inc. temp. and time on removed iron percents.

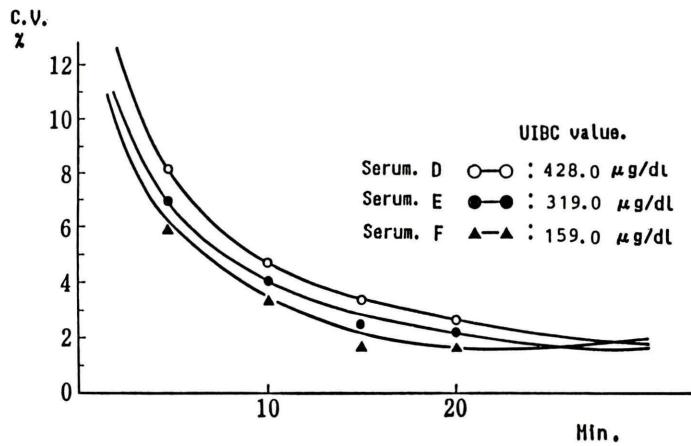


Fig. 4 Effect of 2nd inc. time on bound percents.

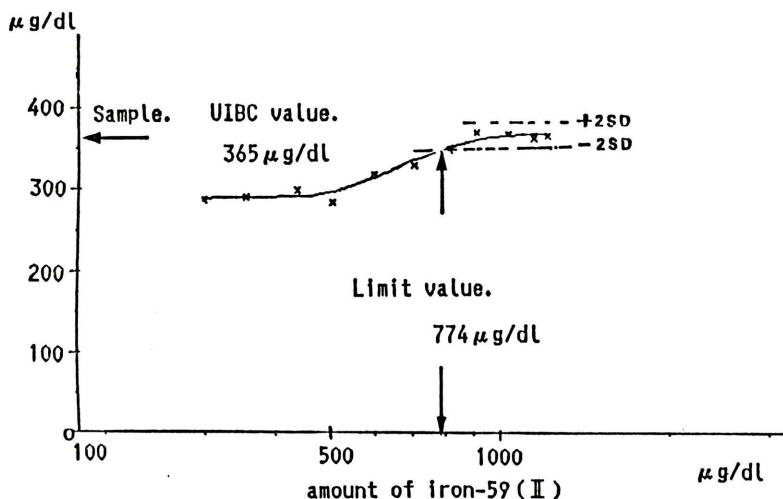


Fig. 5 Iron-binding reaction between the constant amount of transferrin and different amount of iron-59 (II).

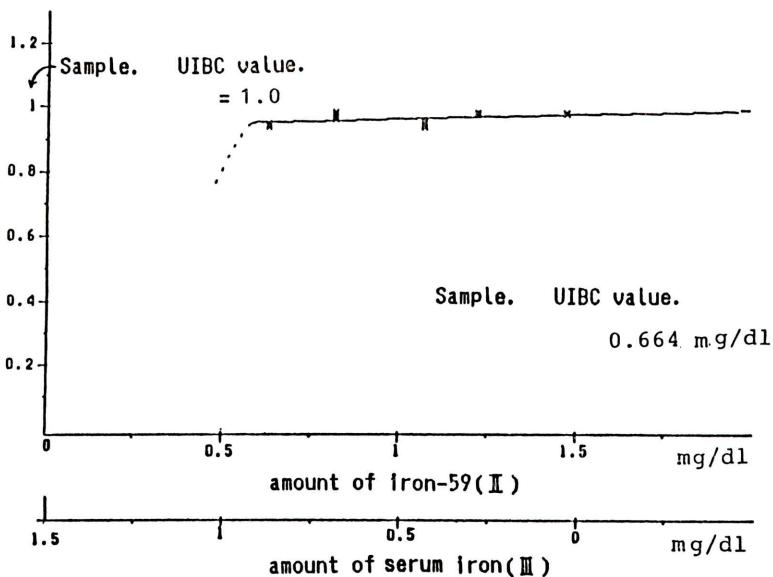


Fig. 6 Relationship between the amount of iron-59 (II) ion and serum iron ion in iron-binding reaction.

各濃度とも10分以上のインキュベーション時間で同時測定における変動係数は6%以内に収まった。

3) 添加⁵⁹Fe量の影響

365 $\mu\text{g/dl}$ の鉄結合能力を持つプール血清に放射性鉄(II)量を変化させ加えたところ、加える放

射性鉄(II)量が774 $\mu\text{g/dl}$ 以下(血清の鉄結合能力の2.12倍以下)になると、測定値の頭打ち現象が起った(Fig. 5)。

なお、頭打ち現象が生じたか否かの判断は、プール血清の鉄結合能力365 $\mu\text{g/dl}$ に対しその標準偏差の2倍を許容限度としこの範囲を下回ったも

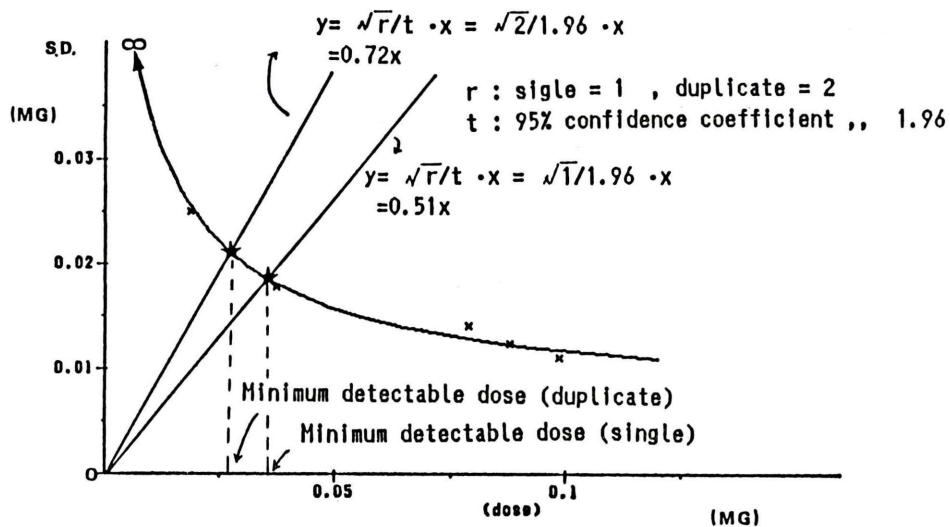


Fig. 7a TIBC precision profile.

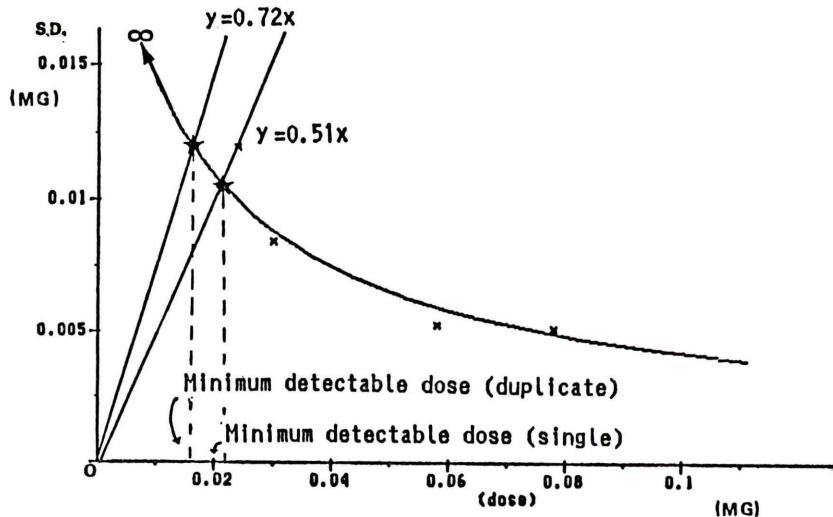


Fig. 7b UIBC precision profile.

のに対しては頭打ち現象が生じたとした。

4) 測定系に対する血清鉄の影響

(鉄(II)と鉄(III)のトランスフェリンへの取り込みの相違)

0.664 mg/dl の鉄結合能力を持つプール血清に鉄(II)と鉄(III)の各濃度を互いに変化させ総鉄量 1,500 $\mu\text{g}/\text{dl}$ に調製した鉄溶液を加えた。鉄(II)と鉄(III)の濃度が変化してもプール血清の鉄結合能 0.664 mg/dl に対し、その 0.95~1.03 倍の値

を示した (Fig. 6)。この結果によりトランスフェリンには鉄(II)が鉄(III)より迅速に取り込まれる傾向が示唆された。

5) 精度と再現性

a. 精 度

プレシジョン・プロフィールによる本測定系の 95%信頼レベルにおける 2 重測定の最小検出濃度は、TIBC で約 35 $\mu\text{g}/\text{dl}$, UIBC で約 20 $\mu\text{g}/\text{dl}$ であった (Fig. 7a, 7b)。

Table 1 Intraassay reproducibility

TIBC	Sample G	Sample H	Sample I
Sample	40	40	40
Mean	456.9	322.8	211.5
S.D.	23.9	16.1	20.8
C.V.	5.2	5.0	9.8 (%)

UIBC

UIBC	Sample J	Sample K	Sample L
Sample	40	40	40
Mean	367.0	228.2	170.2
S.D.	14.4	17.4	12.5
C.V.	3.9	7.7	7.3 (%)

Table 2 Interassay reproducibility

TIBC	Sample G	Sample H	Sample I
Sample	11	11	11
Mean	435.7	324.2	201.0
S.D.	13.7	17.9	16.6
C.V.	3.2	5.5	8.2 (%)

UIBC

UIBC	Sample J	Sample K	Sample L
Sample	11	11	11
Mean	360.2	224.1	171.4
S.D.	18.4	10.4	12.4
C.V.	5.1	4.6	7.2 (%)

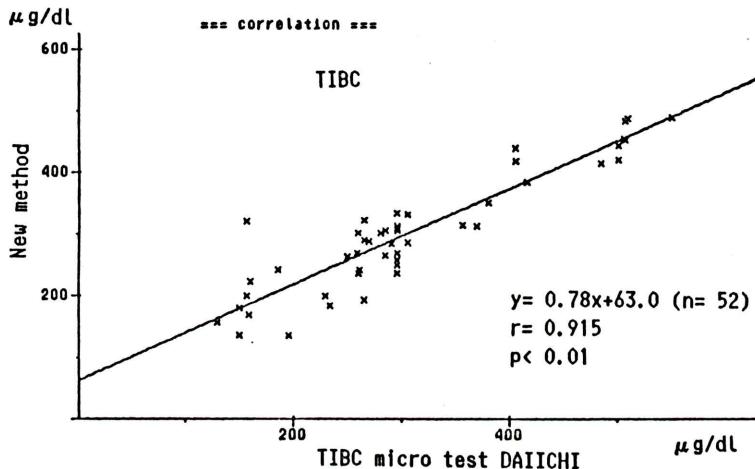


Fig. 8a Correlation between new method and TIBC micro test DAIICHI.

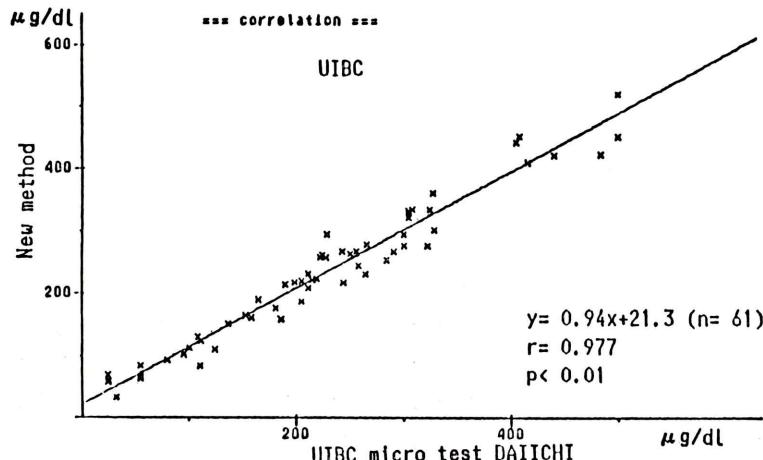


Fig. 8b Correlation between new method and UIBC micro test DAIICHI.

b. 再現性

同一アッセイ内における同時再現性は、TIBCで5.0～9.8%，UIBCで3.9～7.7%であった(Table 1)。

異なるアッセイ間における日差再現性は、TIBCで3.2～8.2%，4.6～7.2%であった(Table 2)。

⑥ 従来法(レジンを用いた方法³⁾)との相関

TIBCでは $y=0.78x+63.0$ ($n=52$) $r=0.915$ 、またUIBCでは $y=0.94x+21.3$ ($n=61$) $r=0.977$ であった。なお、両者とも $p<0.01$ である(Fig. 8a・8b)。

VI. 考 察

TIBC・UIBCは、貧血の検査としてよく用いられる項目のひとつである。現在使われているTIBC・UIBCマイクロテスト『第一』は、2時間以上の検査時間を必要とし、またTIBCにおいては、トランスフェリンから血清鉄を遊離させ、それを別のバイアルに移して放射性鉄を取り込ませるという操作があり、手技が煩雑である。それに加えてその際、血清鉄を遊離させるための陰イオン交換樹脂が放射性鉄の入ったバイアルに移す時混入し易く測定値の誤差になり易かった。

今回、われわれの開発した測定方法は凝集沈殿による共沈法を用い、インキュベーション時間も短く簡単に操作できる方法といえる。

基礎的検討について

インキュベーション時間は、1st, 2nd、それぞれ5, 10分でプラトーに達し、温度は日常の温度なら問題なかった。また、再現性に関しては、同時・日差再現性とも、良好な結果が得られた。最小検出濃度に関しても良い結果が得られた。

測定範囲については、前述のとおりTIBC・UIBCとも、測定しようとするトランスフェリンの鉄結合能力に比べ加える放射性鉄(II)量が少なければ反応系の頭打ち現象が起こり、測定値が真の値より低くなることがわかった。それ故、頭打ち現象を起こさぬように一般に血清の鉄結合能の高値として予想される $600 \mu\text{g/dl}$ の2.12倍($1,272 \mu\text{g/dl}$)以上の放射性鉄(II)、実際には少なくとも、

$1,500 \mu\text{g/dl}$ 以上の放射性鉄(II)を添加しなければいけないことが示唆された。

本測定系の問題点と解決するための手段

現在使用されているTIBC・UIBCマイクロテスト『第一』に比較し、本測定系の劣る点をいくつか挙げる。

まず、TIBC・UIBCマイクロテスト『第一』では、トランスフェリンに放射性鉄を加え、取り込み余った鉄をレジンストリップ(陰イオン交換膜)で除去・分離しているが、この分離率はほぼ100%であり完全除去可能である³⁾。それ故、計測結果から測定値を算出する際、加えた放射性鉄の濃度との比較により簡単に算出できる。

これに対し本測定系では、クロムイオンを担体とした凝集沈殿による共沈法を用いているが、これの真の共沈率は約70%で完全除去できない。それ故単純に、加えた放射性鉄濃度との比較だけで測定値を算出することはできない。なぜなら、もし全く鉄結合能がない血清を測定した場合完全分離できるなら計数結果は、ほぼバックグラウンドカウント程度だが、本測定系のように完全分離できない場合、本来除去されなければならない放射性鉄まで計数してしまう結果になるためである。この問題点を解決し、簡単に測定結果を算出するためには、標準血清(幾種類かの鉄結合能を持つ血清)を用意し、測定の度に用いてその対比により未知試料の濃度の読み取りを行う必要がある。

次に試薬の保存における安定性が挙げられる。TIBC・UIBCマイクロテスト『第一』では、放射性鉄(III)を用いているので、放射性物質としての半減期による放射能減衰だけを考慮すれば良いが、本測定系では、放射性鉄(II)を用いているので、その化学的性状の不安定さ、という問題がある。鉄(II)化合物は空気中では、すみやかに酸化されて鉄(III)化合物に変わり⁶⁾、それ故、放射性鉄(II)のまま保存するには、調製段階において完全に密封する必要があるが、これは一般に使用する場合は困難である。したがって本測定系では保存時には放射性鉄(III)の状態にしておき使用する際には、還元剤(L-アスコルビン酸)を加える

ことにより放射性鉄(II)に還元させ、調製次第すぐに使用している。さらにこの還元剤(L-アスコルビン酸)は、溶媒に溶解させると非常に不安定になり還元作用を失い易い⁷⁾。そのため、この還元剤を使用する場合、保存期間が数日間なら還元作用を保ち易い25%シュウ酸溶液、5%メタリン酸溶液などに溶解させておく必要がある。また、長期保存するなら溶解せず固型状で保存する必要がある。

VII. 結論

凝集沈殿による共沈法を用いた新しいTIBC・UIBC測定法を開発し基礎的検討を行い、下記の成績を得た。

- 1) 本法の手段は、簡便で、30分間の操作で検査が終了し、ルーチンの検査において省力化したといえる。
- 2) 測定値の再現性は良好であり、変動係数は同時アッセイ内で3.9~9.8%，異なるアッセイ間で3.2~8.2%であった。

3) 従来法(レジンを用いた方法³⁾)との相関は、TIBCで $y=0.78x+63.0$ $r=0.915$ ，UIBCで $y=0.94x+21.3$ $r=0.977$ であった。

文 献

- 1) Ramsey WNM: The determination of the total iron-binding capacity of serum. *Clin Chim Acta* **2**: 221-226, 1957
- 2) Peters T, Gioranniello TJ, Apt L, et al: A new method for the determination of serum iron binding capacity. *I J Lab Clin Med* **48**: 274-279, 1956
- 3) 林大三郎、斎藤 宏、牧健太郎、他：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
- 4) 斎藤正行、丹波正治：臨床化学、初版、講談社、東京、1978, pp. 204-207
- 5) 杉沢慶彦：ラジオイムノアッセイの精度管理. *Radioisotope* **33**: 502-509, 1984
- 6) 岩波理化学辞典、第3版増補版、岩波書店、東京、1981, p. 875
- 7) 横田浩充、真重文子、亀井幸子、他：化学発光反応におけるアスコルビン酸の作用機序及び測定. 臨床病理補冊**32**: 87, 1984