

《ノート》

[⁵⁷Co]ビタミンB₁₂/[¹²⁵I]葉酸ラジオアッセイキット
(バクスター・トラベノール)の基礎的および臨床的検討

Basic and Clinical Studies on the Simultaneous Measurement of Serum and Red Blood Cell Folate and Vitamin B₁₂ Concentrations Using Baxter Travenol
[⁵⁷Co]Vitamin B₁₂/[¹²⁵I]Folate Radioassay Kit

坂田 裕行* 飯野 優子* 木原 敦弘* 杉村 英一*
佐藤 邦夫* 出村 黎子* 出村 博*

Hiroyuki SAKATA, Yuuko IINO, Kazuhiro KIHARA, Hidekazu SUGIMURA,
Kunio SATO, Reiko DEMURA and Hiroshi DEMURA

The Radioassay Center, Tokyo Women's Medical College

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、これらの欠乏はヒトにおける巨赤芽球性貧血の主要原因となる¹⁾。

また、肝障害時や慢性骨髓性白血病、急性骨髓性白血病およびある種の悪性腫瘍では高ビタミンB₁₂血症を伴うことが知られている。

従来、これらの測定は微生物学的測定法やラジオイムノアッセイ法(RIA)が利用されているが、後者は操作が簡便で感度も鋭敏なことから広く利用されている²⁾。現在のところ、ビタミンB₁₂・葉酸ともにおののの単独で測定されているが、[⁵⁷Co]と[¹²⁵I]の放出γ線エネルギー特性の差異を利用して同一試料からビタミンB₁₂と葉酸を同時測定できるキットが開発された。

今回、われわれは牛乳葉酸結合蛋白と豚内因子

を用いた Competitive Protein Biding Assay 法によりビタミンB₁₂と葉酸を同時測定可能な Vitamin B₁₂/Folate Radioassay キット(バクスター・トラベノール社)を試用する機会を得たので、その基礎的および臨床的検討成績につき報告する。

II. 測定原理

標準液または測定検体にトレーサーとして [⁵⁷Co]ビタミンB₁₂と[¹²⁵I]葉酸を加え、pH 9.2, 100°Cで加熱することにより内因性結合蛋白を破壊し、冷却後、ビタミンB₁₂・葉酸結合蛋白を加え、競合反応終了後、1,400×g, 10分の遠心分離によっておののの蛋白に結合した [⁵⁷Co]ビタミンB₁₂と[¹²⁵I]葉酸を前述の [⁵⁷Co]と[¹²⁵I]の放射γ線エネルギー特性の差異を利用し、それぞれの放射γ線エネルギー部分を測定することにより求める。

III. キットの構成(1キット120テスト用)

本キットは次の試薬で構成されている。

1) ビタミンB₁₂・葉酸結合蛋白

牛乳から精製した葉酸結合蛋白および豚内因子

* 東京女子医科大学附属病院ラジオアッセイ科
受付: 62年7月3日
最終稿受付: 63年10月3日
別刷請求先: 新宿区河田町8-1 (☎ 162)
東京女子医科大学附属病院
ラジオアッセイ科
坂田 裕行

Key words: Vitamin B₁₂, Folate, Radioassay, Simultaneous measurement.

をガラス微粒子に結合させたものを、保存剤アジ化ナトリウム含有リン酸緩衝食塩液に分散。

2) トレーサー

[⁵⁷Co] 標識ビタミン B₁₂ および [¹²⁵I] 標識葉酸混合液、0.001% シアン化カリウム、保存剤としてアジ化ナトリウム含有ホウ酸緩衝液。

3) Dithio threitol (DTT)

トレーサー液に添加混合して使用。

4) ビタミン B₁₂・葉酸混合標準液

6 濃度のビタミン B₁₂ および N-5 Methyl tetrahydro folic acid 混合標準液 0/0, 100/1.0, 250/2.5, 500/5.0, 1,000/10.0, 2,000/20.0 (ビタミン B₁₂ pg/ml, 葉酸 ng/ml) をヒト血清アルブミンおよび保存剤アジ化ナトリウム含有リン酸緩衝食塩液で溶解。

5) ビタミン B₁₂/葉酸コントロール血清

2 種類の濃度の異なるビタミン B₁₂ および N-5 Methyl tetrahydro folic acid に脱線維素ヒト血漿および保存剤としてアジ化ナトリウムを含む。

IV. 検体処理および測定方法

1. 血清または血漿 (EDTA 添加) を用いるが、本検討ではおもに血清を使用した。

2. 赤血球中葉酸

EDTA 含有採血管で採血を行いヘマトクリット値を測定後、全血 100 ml をアスコルビン酸溶液 (4.56 μM/ml 溶液) 2 ml に加え泡立てないように混和し、均一な濃度とする。

3. 測定方法

測定方法は Fig. 1 方に示すとおりに行った。なお、ビタミン B₁₂ が光により分解される性質をもっているため遮光には注意した。

4. 標準曲線の作成

ビタミン B₁₂・葉酸の各種標準液を用いて各濃度における B/B₀% を求め、ビタミン B₁₂・葉酸用の標準曲線を作成し、おのおの検体の B/B₀% を外挿することによりビタミン B₁₂、および葉酸値を求めた。また、赤血球中葉酸値については標準曲線より読みとった値を次式にて補正を行って求めた。

赤血球中葉酸値 (ng/ml)

$$= \frac{\text{全血葉酸値} \times 21 - \text{血清葉酸値}}{\text{ヘマトクリット値} (\%)} \times 100$$

(× 21 : 希釈倍率)

V. 基礎的検討

1. 反応時間

ビタミン B₁₂・葉酸結合蛋白添加後の反応温度を 22°C (室温) と一定にし、反応時間を 15 分、30 分、60 分、180 分と変化させた場合の標準曲線とそれらを用いたプール血清 (VB₁₂ 3 種類、葉酸 3 種類)、プール赤血球 (葉酸のみ 2 種類) の測定値について検討した (Fig. 2)。

ビタミン B₁₂・葉酸とも反応時間が長くなるに従って各濃度における結合率は低下傾向を示したが、60 分から 180 分の範囲では安定した標準曲線が得られた。

反応時間が 30 分まででは、使用したプール血清、プール赤血球のビタミン B₁₂・葉酸値はいずれもバラツキが大きく 60 分以上で安定した値が得られ、反応時間は 60 分が適当と思われた。

2. 反応温度

反応時間を 60 分と一定にし、反応温度を 4°C, 22°C, 37°C と変化させた場合の標準曲線の変化と

- Vitamin B₁₂/Folate standard, Control, Patient's sample 0.1 ml
- Tracer Vitamin B₁₂ [⁵⁷Co], Folate [¹²⁵I] 1.0 ml

↓
voltex for 3~4 seconds
boil for 15 minutes

↓
Binding Protein 0.5 ml

↓
voltex for 3~4 seconds
↓
incubate for 1 hour at room temperature
↓
centrifuge for 10 minutes at 1400×g
↓
decant all tubes
↓
count in a gamma counter

Fig. 1 Assay procedure.

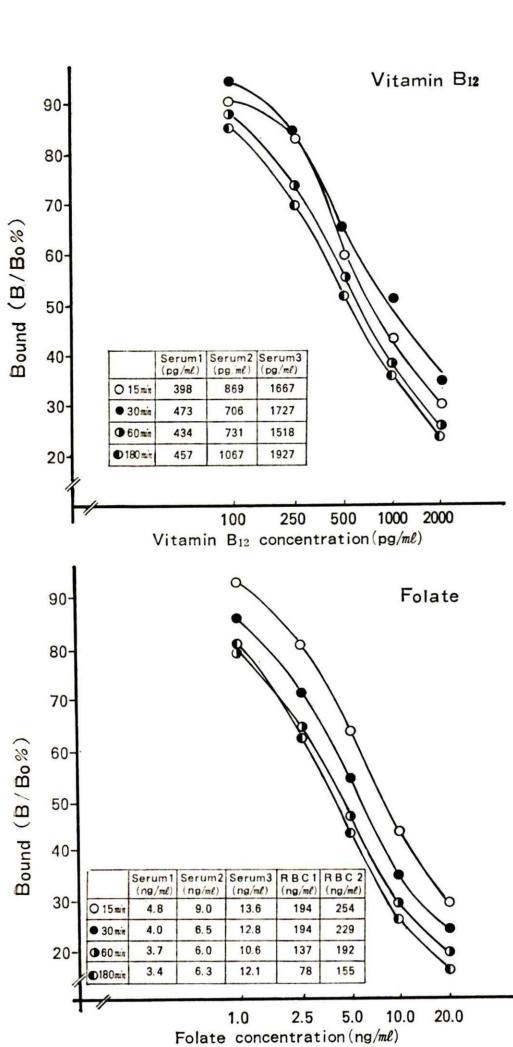


Fig. 2 Influence of incubation time on the standard curve.

各種プール血清、プール赤血球の測定値を検討した(Fig. 3)。

ビタミン B₁₂・葉酸とも反応温度が高くなるに従って結合率の低下がみられ、プール血清のビタミン B₁₂ 値は 22°C, 37°C で安定した値を示した。

一方、葉酸においてはすべてのプール血清、プール赤血球とも反応温度が高くなるに従って測定値が低値を示す傾向にあった。

以上のことから反応温度は両者とも安定した測

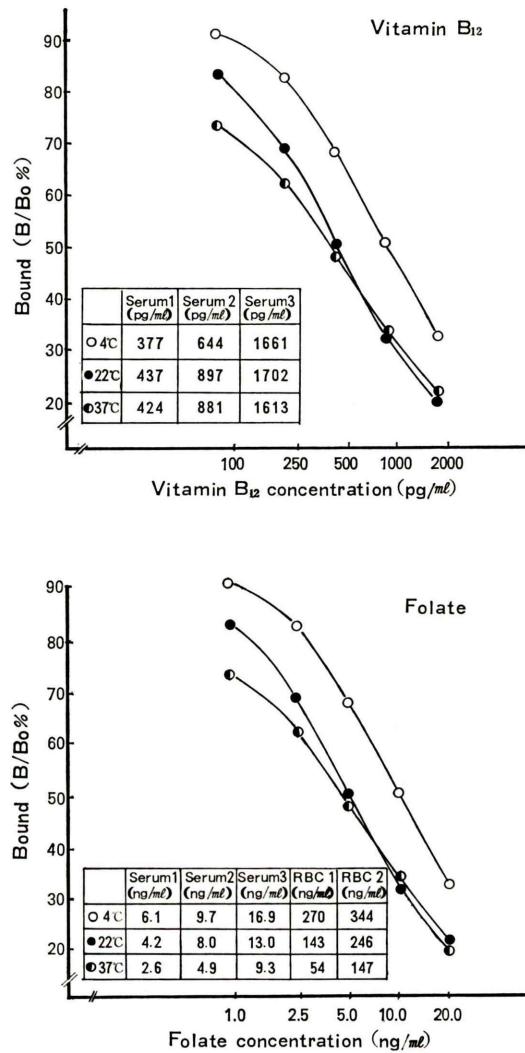


Fig. 3 Influence of incubation temperature on the standard curve.

定が得られ、簡便な 22°C(室温)が適当と思われた。

3. 再現性

濃度の異なる 3 種類のプール血清と 2 種類のプール赤血球の日内、日差変動についておののおの 10 検体を用いてそれぞれの変動係数を求めた(Table 1)。

日内変動はビタミン B₁₂ が 4.1~5.1%, 葉酸は 3.3~4.9% となり、一方、日差変動ではビタミン

Table 1 Reproducibility

Intra-assay

	Vitamin B ₁₂ (pg/ml)			Folate (ng/ml)				
	Serum 1	Serum 2	Serum 3	Serum 1	Serum 2	Serum 3	RBC 1	RBC 2
n	10	10	10	10	10	10	10	10
mean	453	768	1588	3.7	5.9	10.9	181.8	252.7
S.D.	± 23.4	± 32.0	± 72.2	± 0.13	± 0.24	± 0.36	± 8.60	± 12.50
C.V. (%)	5.1	4.1	4.5	3.5	4.1	3.3	4.7	4.9

Inter-assay

	Vitamin B ₁₂ (pg/ml)			Folate (ng/ml)				
	Serum 1	Serum 2	Serum 3	Serum 1	Serum 2	Serum 3	RBC 1	RBC 2
n	10	10	10	10	10	10	10	10
mean	435	753	1665	3.8	6.0	11.0	184.3	245.5
S.D.	± 26.9	± 36.0	± 84.0	± 0.16	± 0.26	± 0.33	± 6.69	± 17.00
C.V. (%)	6.1	4.7	5.0	4.2	4.3	3.0	3.6	6.9

Table 2 Recovery test

Vitamin B₁₂

	(Low) Serum 1	(Mid) Serum 2	(High) Serum 3
Recovery (%)	109.3	118.1	109.6
S.D.	± 13.3	± 6.8	± 7.4

n=15
 $\bar{x}=112.3\%$
 S.D.=±10.4
 C.V.=9.3 (%)

Folate (Serum)

	(Low) Serum 1	(Mid) Serum 2	(High) Serum 3
Recovery (%)	105.8	108.0	99.4
S.D.	± 9.0	± 7.0	± 4.7

n=15
 $\bar{x}=104.4\%$
 S.D.=±8.0
 C.V.=7.6 (%)

Folate (RBC)

	RBC 1	RBC 2
Recovery (%)	93.5	101.9
S.D.	± 7.8	± 9.2

n=10
 $\bar{x}=97.7\%$
 S.D.=±9.5
 C.V.=9.7 (%)

B₁₂ が 4.7~6.1%，葉酸は 3.0~6.9% で、全体としてほぼ満足できる結果であった。

4. 回収試験

キット添付の 5 種類の標準液を添加溶液とし、3 種類のプール血清と 2 種類のプール赤血球を用いて回収試験を実施した。回収率の算出には、(添加後測定値-対照血清測定値)÷(添加濃度)×100% の式を使用した (Table 2)。

ビタミン B₁₂ の場合、97.2~134.0% と低濃度

域で高い回収率を示したもの、平均回収率は 112.3±10.4% であった。逆に、葉酸は血清の場合、95.2~121.6% の回収率を示し、平均回収率は 104.4±8.0% であった。一方、赤血球では 80.0~118.0% の回収率となり、低濃度域ではビタミン B₁₂ とは逆に低い回収率を示したが、平均回収率は 97.7±9.5% とほぼ満足できる成績が得られた。

5. 希釈試験

濃度の異なる 3 種類のプール血清と 1 種類の患者血清 (VB₁₂ のみ) を用いて、それぞれ生理食塩液と 0 濃度標準液で希釈した場合の希釈曲線を比較検討したところ、Fig. 4 に示すとおり両者とも良好な結果が得られた。

6. アッセイ間における標準曲線のバラツキ

10 回の異なるアッセイにおける標準曲線の変動係数は、ビタミン B₁₂ 4.2~5.4%，葉酸 2.7~5.0% と良好な標準曲線が得られた。

7. 他社キットとの比較

ビタミン B₁₂ : 93 例の患者血清を用いて本キットとファルマシア社「VB₁₂ テストシオノギキット」との相関を求めた (Fig. 5)。

その結果、両者の相関係数は $r=0.91$ 、回帰直線 $Y=0.68X-8.90$ と本キットにおいて若干の低値を示す傾向にあった。

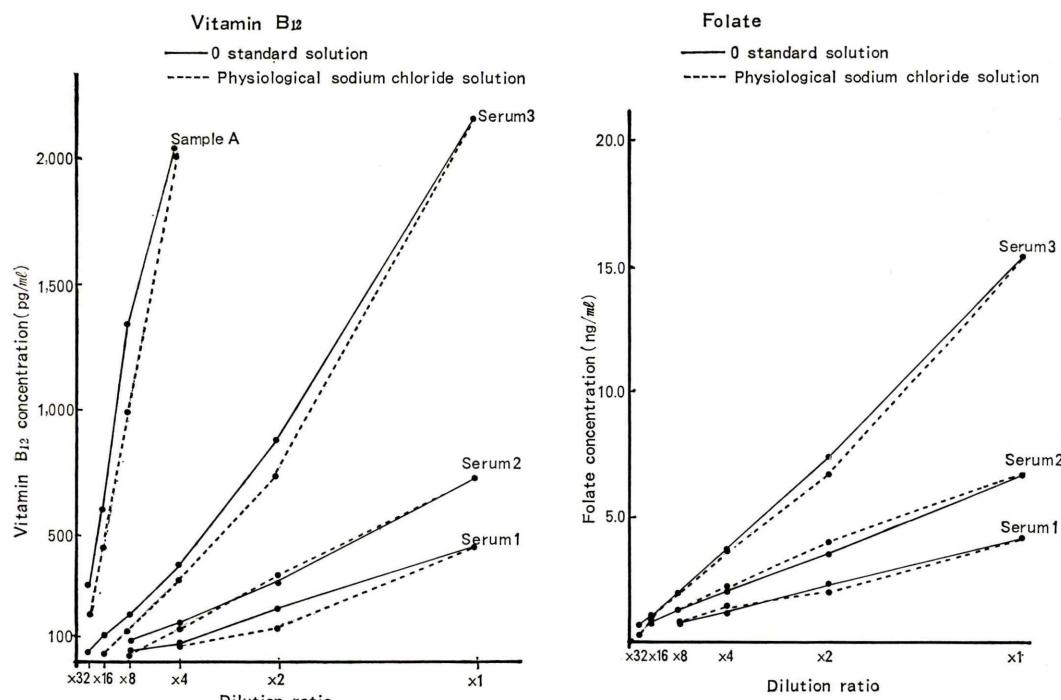
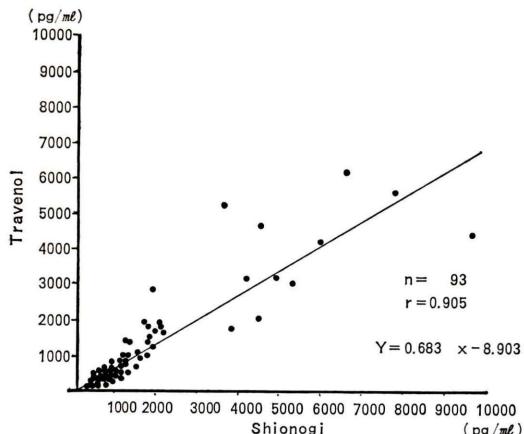


Fig. 4 Dilution test.

Fig. 5 Correlation between serum vitamin B₁₂ values measured by Shionogi kit and those by Travenol kit.

8. In vitro におけるビタミン B₁₂・葉酸添加による赤血球中葉酸値に対する影響

健常者の赤血球 (A, B, C) に濃度の異なるビタミン B₁₂ 製剤 (シアノコバラミン注射液) と、同一濃度の葉酸製剤 (葉酸注射液) を添加し、室温

にて反応させ、24 時間後、72 時間後に赤血球中の葉酸値を測定した。

添加濃度はビタミン B₁₂ 製剤は、0, 2,000, 10,000, 50,000 pg/ml と変化させたものを、葉酸製剤の方は 30,000 ng/ml と一定にした。なお、対照にはビタミン B₁₂ 製剤、葉酸製剤とも無添加の赤血球葉酸値を測定した (Fig. 6)。

Case 1, Case 2, Case 3 ともにコントロール値は経時的にほぼ安定した値を示したが、ビタミン B₁₂、葉酸添加赤血球葉酸値はビタミン B₁₂ の濃度差による影響はないものと思われたが、一定濃度の葉酸添加によって赤血球葉酸値はインキュベーション時間に比例して上昇傾向が認められた。

VI. 臨床的検討

健常者 (ビタミン B₁₂ : 81 例、葉酸 : 血清 86 例、赤血球 50 例)、各種血液疾患 (悪性貧血を含む巨赤芽球性貧血 VB₁₂ : 21 例、葉酸 : 17 例、骨髄性白血病 VB₁₂ : 8 例、葉酸 : 血清 4 例、赤血球 4 例、急性リンパ性白血病 葉酸 : 血清 2 例、赤血

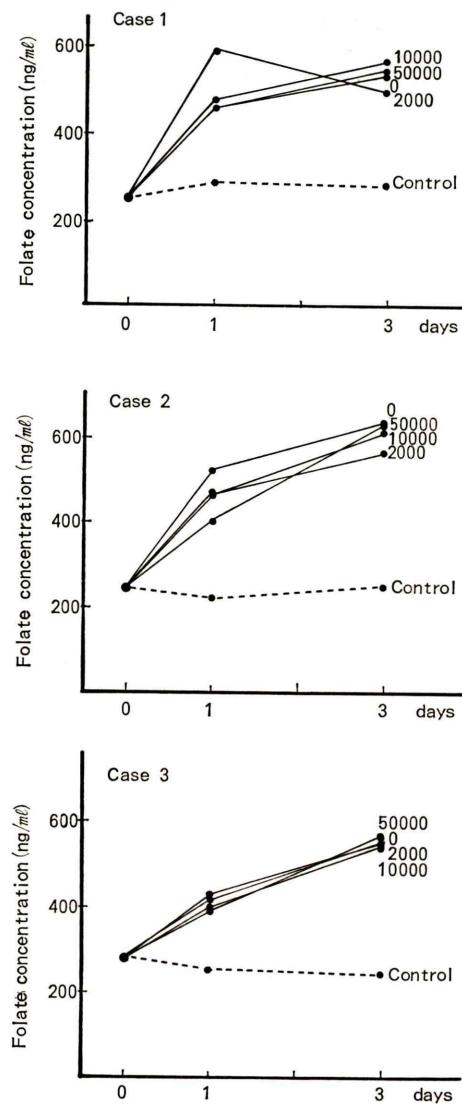


Fig. 6 Effects of various amounts of vitamin B₁₂ on folate concentrations in RBC in 3 individuals.

球2例、再生不良性貧血VB₁₂:3例、葉酸:血清3例、赤血球3例、鉄欠乏性貧血VB₁₂:8例、溶血性貧血VB₁₂:1例)、肝疾患(肝炎VB₁₂:24例、葉酸:10例、肝硬変VB₁₂:6例、葉酸:8例、肝癌VB₁₂:6例、葉酸:10例)、腎疾患(慢性腎不全VB₁₂:12例、葉酸:血清21例、赤血球21例)、骨髓線維症(VB₁₂:1例、葉酸:血清1例、赤血球:1例)を対象として血清ビタミン

B₁₂、血清および赤血球葉酸値を測定した。なお、いずれもビタミンB₁₂製剤および葉酸製剤の投与を受けていないものについて行った。統計検定は値を対数変換しStudent t テストにより求めた(Fig. 7)。

【ビタミンB₁₂】

1) 健常者のビタミンB₁₂値

健常者血清81例におけるビタミンB₁₂値の測定結果は149~929 pg/mlに分布し、平均539±195(S.D.) pg/mlであった。

2) 各種疾患におけるビタミンB₁₂値

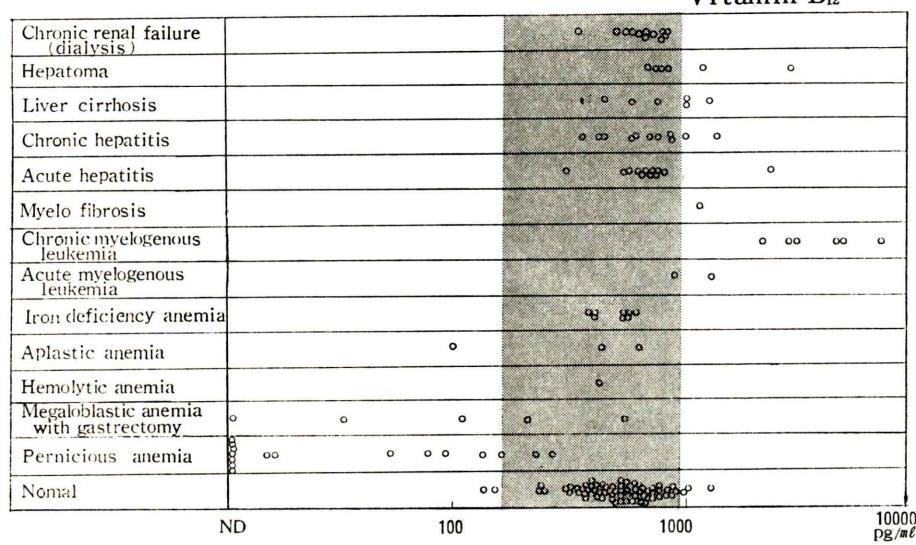
悪性貧血では平均59.8 pg/mlと16例中14例が正常値より明らかな低値を示し(p<0.01)、胃切除後の巨赤芽球性貧血では5例中3例が低値で、再生不良性貧血でも3例中1例が85 pg/mlと明らかな低値を示した。これに対して肝疾患群では肝癌で6例中2例が1,016 pg/ml, 2,940 pg/ml、肝硬変で6例中3例が969 pg/ml, 998 pg/ml, 1,250 pg/ml、慢性肝炎で12例中2例が963 pg/ml, 1,325 pg/ml、急性肝炎で13例中1例が2,370 pg/mlと正常値より高値であった。また、慢性骨髄性白血病では2,160~7,420 pg/mlと正常値をはるかに上まわる値を示し(p<0.01)、急性骨髄性白血病では平均1,076 pg/mlと正常値よりも若干の高値を示した。

【葉酸】

1) 健常者血清86例と健常者赤血球50例における葉酸値は、血清で2.4~9.4 ng/mlに分布し、平均5.9±1.8(S.D.) ng/ml、赤血球では117~313 ng/mlに分布し、平均215±48.9(S.D.) ng/mlとなり、血清葉酸値に比べはるかに高値を示した。

2) 各種疾患における葉酸値

慢性腎不全による透析患者での血清葉酸値は5.9~12.3 ng/mlに分布し、正常値に比べ明らかな高値を示した(p<0.001)。悪性貧血での血清葉酸値は健常者との間に有意差がなく、胃全摘後の巨赤芽球性貧血の1例では血清葉酸値が1 ng/mlと著明な低値を示したほか、急性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病の一部においても低値が認められた。肝疾患群での血清葉酸値は、ほぼ正常範囲に

Vitamin B₁₂

Folate

●: Serum plasma ○: RBC

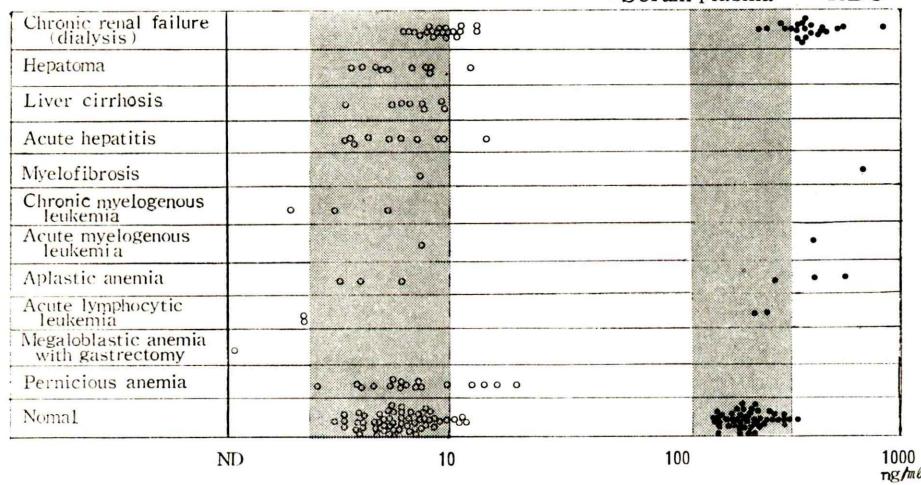


Fig. 7 Vitamin B₁₂ and folate concentrations in normal subjects and patients with various diseases.

分布しており、赤血球葉酸値が高値傾向にあったものには慢性腎不全による透析患者のほか、症例は少ないものの骨髄線維症、急性骨髄性白血病、再生不良性貧血などの症例が含まれていた。

VII. 考 察

本キットは [¹²⁵I] と [⁵⁷Co] の放射 γ 線エネルギー

を利用して 2 種類の物質を測定できるきわめて優れた特性をもつ。また、本法は広い表面積を有するガラス微粒子に共有結合により固相化した結合蛋白を用いた競合的蛋白結合測定法 (CPBA) であり、従来のキットに比較して操作手順が簡便でアッセイ所要時間も約 2 時間と短縮されている。

基礎的検討の成績から、反応時間は 60 分、反

応温度は22°C(室温)が適当であり、再現性、回収試験、希釈試験などでも満足できる結果が得られた。また、ビタミンB₁₂においてはファルマシア社製「VB₁₂ テストシオノギ」と比較検討した結果、本キットは若干の低値傾向を示し、臨床的検討成績においても本キットで測定したビタミンB₁₂の健常者の平均値は539±195 pg/mlと従来の報告^{3,4)}よりもやや低値であった。これは、両キットに使用されている内因因子の純度による差ではないかと推定される。

葉酸値の健常者平均値は、血清が5.9±1.8 ng/ml、赤血球は215±48.9 ng/mlであった。

本検討でみられた慢性腎不全による透析患者で若干ビタミンB₁₂値が高値を示したのは、健常者に比べ尿中からのビタミンB₁₂の排泄が悪く、血中にビタミンB₁₂が蓄積されるためと推定される²⁾。悪性貧血ではビタミンB₁₂の欠乏状態にあるため、当キットによる測定は診断上きわめて有意義であるといえる。肝疾患では一部の症例で高ビタミンB₁₂血症を呈したが、これは主として肝実質組織の崩壊によるビタミンB₁₂の逸脱によるものと考えられる⁵⁾。

健常者の葉酸値は、血清、赤血球ともに他の報告に準ずる値が得られた⁶⁾。

胃全摘後に発症した大球性貧血の1例では血清葉酸が著しく低値を示した。この症例は胃全摘後1年間にわたり流動食をとっていたものであった。悪性貧血の少数例では血清葉酸値が高値を示したが、これはビタミンB₁₂欠乏が葉酸代謝に関与しているためと考えられる。慢性骨髄性白血病、および急性リンパ性白血病でも血清葉酸値が低値を示した例があった。これは抗癌剤投与による葉酸の生成障害によるものと考えられた。巨赤芽球性貧血の中で最も頻度の高いものは、ビタミンB₁₂欠乏症、ついで葉酸欠乏症であり両者は共通の身体所見、血液像、骨髄像、およびその他無効造血に基づく検査所見を有するため、これらの所見のみでは両者の鑑別は困難である。

したがって確定診断の際には、ビタミンB₁₂と葉酸の測定が不可欠となってくる⁷⁾。

血清葉酸値と赤血球葉酸値について注目してみると、われわれの成績では、必ずしも一致した分布を示さなかった。内田ら⁸⁾は、血漿(血清)葉酸値の測定は葉酸欠乏症の診断にとって不可欠な方法であるが、赤血球中葉酸含有量は血清葉酸値よりも、より組織中葉酸値を反映すると述べている。

また、ビタミンB₁₂製剤と葉酸製剤を全血に添加し、赤血球との反応をみる実験では、ビタミンB₁₂の濃度変化に関係なく、インキュベーション時間に比例して赤血球葉酸値が上昇する結果が得られた。このことは、赤血球の外にあった葉酸が、何らかのかたちで赤血球内に移行したと考えられる。

VIII. 結 語

本キットはビタミンB₁₂・葉酸を同時に測定できるキットであり、測定に要する時間も短く、操作も簡便であった。基礎的検討、臨床的検討成績も良好な結果が得られ、ルーチン検査においても十分対応できるものである。

また、廃棄物も少なく、今後広く検査室において利用されるものと思われる。

謝辞：今回の検討にあたりキットをご提供いただいたバクスター・ラベノール株式会社(現バクスター社)に深謝いたします。

文 献

- 1) Scott JM, Weir DG: Folate Composition, Synthesis and Function in Natural Materials. Clin Haematol 5: 547-568, 1976
- 2) 木原数弘、中村宏紀、坂田裕行：コーニングビタミンB₁₂(⁵⁷Co)/葉酸(¹²⁵I)ラジオアッセイキットの基礎的および臨床的検討。核医学 22: 223-224, 1985
- 3) 稲葉瑞江、名取博、福田守道：固相法によるVitamin B₁₂のRadioassayに関する検討。ビタミン 47: 567-575, 1973
- 4) 奥田邦雄、内山幸信：ビタミンB₁₂。日本臨牀秋季臨時増刊号 40: 334-337, 1982
- 5) 田中信夫、内野治人：ビタミンB₁₂基礎と臨床。科学評論社、東京, 1978, pp. 305-307
- 6) 鈴木賀己、和田義郎：葉酸。日本臨牀秋季臨時増刊号 40: 331-333, 1982
- 7) 三輪史郎：血液病学1巻、三輪史郎編、文光堂, pp. 526-542
- 8) 田中信夫、山崎泰範、山田尚：ビタミンB₁₂・葉酸の測定とその臨床的意義。臨床病理 29: 554-563, 1981

日本核医学地方会開催予定

地方会	世話人	会 場	日 時
第30回関東甲信越地方会	秋貞 雅祥(筑 波 大)	富士フィルム本社講堂	元年 2月25日(土)
第24回九州地方会	高橋 隆正(熊 本 大)	ニュースカイホテル	3月10日(金)
第22回近畿地方会	内田日出夫(奈良医大)	奈良新公会堂	6月10日(土)
第23回中部地方会	久田 欣一(金 沢 大)	金沢市	6月24日(土) ～25日(日)
第25回北日本地方会	坂本 澄彦(東 北 大)	労働福祉会館(予定)	7月 7日(金) ～8日(土)
第31回関東甲信越地方会		富士フィルム本社講堂	7月中旬予定

訂 正

核医学 26巻 2号掲載の論文中に表示の誤りがありました。

下記のごとく訂正いたします。

論文名 : $[^{57}\text{Co}]$ ビタミン B_{12} / $[^{125}\text{I}]$ 葉酸ラジオアッセイキット(バクスタートラベノール)の
基礎的および臨床的検討

著者名 : 坂田裕行他

誤

正

p. 266 Table 2 Recovery test

Vitamin B_{12}	(High)	
	Serum 3	
	Recovery (%)	109.6.
Folate (Serum)	(Mid)	
	Serum 2	
	Recovery (%)	108.0.

→ 109.6

→ 108.0

p. 269 Fig. 7 Folate ● : Serum plasma ○ : RBC → ○ : Serum plasma ● : RBC