

《原 著》

ヒト肝フェリチンの Radioimmunoassay に関する基礎的研究

中 治 隆 宏*

I. はじめに

フェリチンは鉄貯蔵蛋白質として組織中に認められる蛋白質であり、哺乳動物の肝臓、脾臓、骨髓、腎臓、心臓、小腸粘膜、骨格筋、胎盤などあらゆる組織中に見出され、その分子形態は蛋白の殻の中に鉄ミセルを持つとされている。その分子量は44万～48万^{1,2)}であり、その分子は20³⁾～24⁴⁾個の均一な subunit から成り立っているといわれている。血中でのフェリチンの検出は1956年、Reissman & Dietrich⁵⁾にはじまるが、彼等は血中へのフェリチンの出現は肝細胞死によって、フェリチンが血中へ逸脱してくると考えた。しかし、その後の研究によって肝障害患者のみならず、種々の疾患（白血病、再生不良性貧血、悪性リンパ腫など）で血中フェリチンの増加することが報告されるとともに、高感度の免疫放射測定法⁶⁾の進歩によって病的患者血清のみならず、健常人血清中でも測定することが可能となつた⁷⁾。

著者はフェリチンが肝細胞の細胞分画法においてマイクロゾーム分画に大量に含まれること、またこの蛋白が免疫電気泳動上 α_2 位にくることを利用して超遠沈による細胞分画法、電気泳動法、ゲル濾過法を組み合わせてヒト肝フェリチンの分離

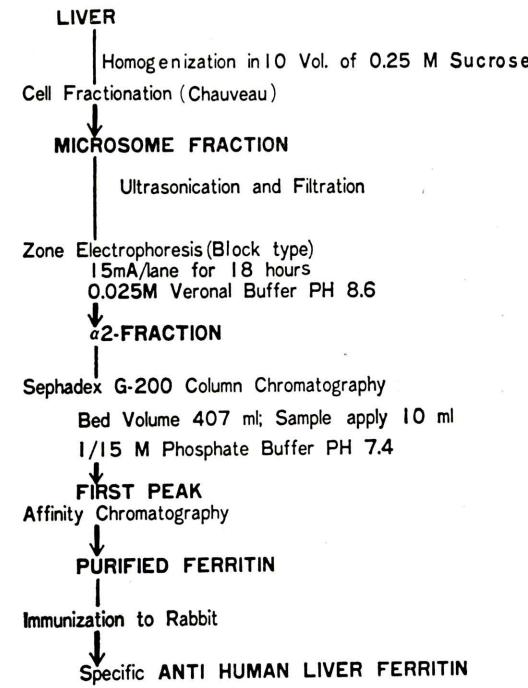
精製を試みた。さらにこの精製フェリチンを家兎に免疫し、特異ヒト肝フェリチン抗体を作製し、2抗体法によるフェリチンの微量測定法を検討確立したので報告します（以下フェリチンと統一する）。

II. 材料ならびに方法

A. 材 料

1. フェリチンの精製手技：自験法によってその精製標品を得たが、その内容は Table 1 に示す

Table 1 Purification procedures for human liver ferritin



* 神戸大学医学部内科学第2講座(指導:馬場茂明教授)
受付:52年3月18日

最終稿受付:52年5月9日

別刷請求先:神戸市垂水区曙町1070(〒673)

兵庫県玉津福祉センター

リハビリテーションセンター附属中央病院
内科 中治 隆宏

ように剖検肝 30 g をポッターのホモゲナイザーを用い、0.25 M 蔗糖溶液にて homogenize, Chauveau の細胞分画法⁸⁾に準じて核成分、細胞断片、ミトコンドリア成分を除外しマイクロゾーム分画を集めた。このマイクロゾーム蛋白を pevikon C 870 を支持体とし pH. 8.6 の veronal 緩衝液を用いたゾーン電気泳動にかけ黄褐色を呈した α_2 分画のブロックを切り出し、pH 7.4 のリン酸緩衝液を用いて蛋白質を溶離した。この溶離液を濃縮後、内径 2.5 cm, 長さ 100 cm のカラムを用いて sephadex G-200 column chromatography にて分画採取した。このうちフェリチンの溶出される最初の分画を、抗正常ヒト血清とのゲル内免疫反応にて検定し、混入蛋白のないことを確認して精製フェリチンとした。また、ゲル内免疫反応にて混入蛋白が存在した場合には、抗正常ヒト血清をくっつけた sepharose 4B を用いて affinity chromatography を施行精製した。

2. 抗ヒト肝フェリチン家兎血清

自験精製フェリチンを感作抗原とした。ヒト肝フェリチン 50 μg を含む生食 0.5 ml と等量のフロイント完全アジュバンドを混和したエマルジョンを家兎の腹壁皮下、大腿皮下に分割注射した。その後 2 週間ごとに 4 回同量の抗原で追加免疫し、抗血清を作製した。採血した抗血清は 56°C, 30 分間非効化した。

3. 抗家兎 γ -globulin 山羊血清(第 2 抗体)

第一ラジオアイソトープ研究所社製の標品を使用した。

4. 標識基 New England Nuclear (米) 社製 Na^{125}I を使用した。

5. 緩衝液: 1% ウシ血清アルブミン、0.01M, EDTA および 0.05% 塗化ソーダを含む pH. 7.5, 0.07 M. リン酸緩衝食水 (BSA-PBS と略す) を用いた。

6. 測定用試験管: プラスチック製シオノギチューブ ϕ 1.0 cm, 長さ 7.0 cm を用いた。

7. 放射能測定器: Packard 社製 Auto- γ -counter を使用した。

B. 方 法

1. ^{125}I 標識法および標識フェリチンの精製法 Hunter & Greenwood¹⁰⁾ の方法に準じて標識した。精製フェリチン 100 μg に 400 μCi の Na^{125}I とクロラミン T 溶液 0.1 ml (100 μg) を手早く注入し、60 秒間混和後、メタ重亜硫酸ソーダ 240 μg (0.1 ml) を加え反応を停止させた。2 分後ヨードカリ 1 mg (0.1 ml) を添加し、総量を 0.5 ml とした。この溶液を、ウシ血清アルブミン 20 mg をあらかじめ通した内径 1.0 cm, 長さ 20 cm の sephadex G-200 によるゲル濾過を行なった (Fig. 1). 0.5 ml ずつ分画採取し標識フェリチンを分離精製した。なお精製フェリチンが凍結保存すると不溶性変性物を生ずることから、著者は標識フェリチンの変性崩壊を少なくする意味で、保存を 4°C とした。

2. 測定方法

結合 ^{125}I - フェリチン (B) と遊離 ^{125}I - フェリチン (F) との分離は Morgan, Lazarow¹¹⁾ らの 2 抗体法を採用した。assay system は Table 2 のごとく行なった。すなわちシオノギ製チューブに各基準フェリチン液あるいは、被検血清 0.1 ml, ^{125}I 標識フェリチン希釈液 0.1 ml, ついで第一抗体の BSA-PBS 希釈液 0.1 ml を添加し 0.5 ml の diluent (BSA-PBS) で全量を 0.8 ml にした後、4°C で第一反応を行なった。第一反応終了後 carrier protein

Table 2 Procedures of radioimmunoassay for human serum ferritin

FERRITIN RADIOIMMUNOASSAY SYSTEM

Two antibody system

0.5 ml	Diluent (1/15 M PBS, 1.0% BSA, 0.01M EDTA)
0.1 ml	standard or assay sample
0.1 ml	^{125}I -Ferritin (10-20 ng)
0.1 ml	anti-Ferritin rabbit serum (1 : 8000)

First reaction at 4°C for 36 hours

0.1 ml	normal rabbit serum (1 : 50)
0.1 ml	Anti-rabbit γ -globulin goat serum (1 : 10)

Second reaction at 4°C for 24 hours

Centrifuge at 3000 rpm for 30 min.

Precipitate count (bound count)

として正常家兎血清 50 倍希釈液 0.1 ml, 第 2 抗体希釈液 0.1 ml を順次加え, 4°C で第 2 反応を行なった。第 2 反応を終了後, 全放射能 (T) を測定し, 3,000 rpm. 30 分間遠心後, 上清を捨て試験管壁に残存する上澄を濾紙で吸いとり, その後, 沈澱物 (B) の放射能を測定した。一方, 対照として基準フェリチン第 1 抗体の代わりに, おのおの BSA-PBS 液 0.1 ml を用いた検体の全放射能 (To) 沈澱物の放射能 (Bo) を測定した。標準曲線は縦軸に全放射能に対する結合率 (bound rate), 横軸に基準フェリチン濃度 ng/ml の対数値を用いて作製した。結合率 bound rate = $B - Bo / T - back ground$ にて算出した。また基準フェリチン 3.9, 7.8, 15.6, 31.2, 62.5, 125, 250, 500, 1,000 ng/ml 濃度に BSA-PBS 液で希釈調製した溶液 0.1 ml を用いた。

III. 実験成績

A. フェリチン, ^{125}I -フェリチンと抗フェリチン家兎血清の検討

1. 自験法と Granick 法による精製フェリチンの比較

著者の方法でヒト肝より抽出, 精製したフェリチンと, 従来行なわれている Granick によったそれを対比して検討を行なった。まず自験標品は, 7.5% ポリアクリルアマイドを用いた disc 電気泳動で単一の鉄染色陽性のバンドであることを確かめた。immunolectrosyneresis, micro-Ouchterlony 法による免疫学的検定法においても抗正常ヒト血清蛋白と反応せず, 抗ヒト肝フェリチン家兎血清と sharp な 1 本の沈降線として反応し, Granick フェリチンとも完全に一致した。一方 Granick 法により抽出したフェリチンは immunolectrosyneresis, 7.5% disc 電気泳動で微量の他の蛋白の混入を認めた。

2. 標識フェリチンの検討

標識 ^{125}I -フェリチンの精製は sephadex G-200 column chromatography にて行ない Fig. 1 に示すごとき, 比放射能 0.3 mCi~0.4 mCi/mg の標識フェリチンを得た。 ^{125}I -フェリチンの pH. 8.6, 0.05 M veronal 緩衝液を用いたアガロースゲル内免疫

電気泳動, ならびにその autoradiography は Fig. 2, 3 に示すごとくで, 標識 ^{125}I -フェリチンは, 抗正常ヒト血清蛋白と反応沈降線を示さず, 抗ヒト肝フェリチン家兎血清と反応し, その反応沈降線は α_2 位で放射活性を持った。またこの沈降線は反応時間が長くなると, 2 本~3 本に split する現象が見られることがあった。しかし, それぞれ放射活性を持った。

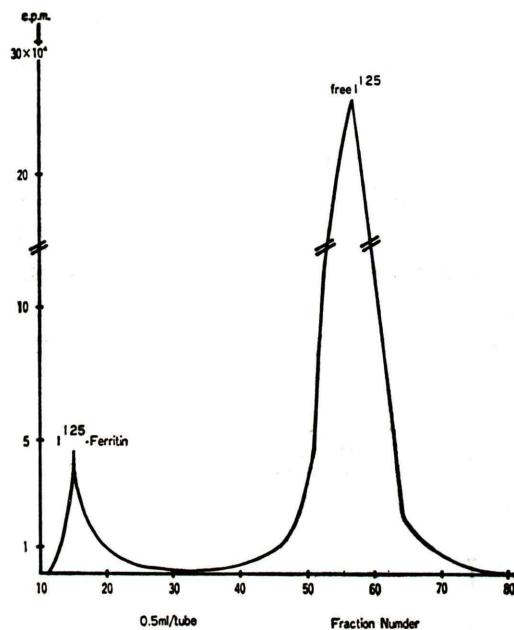


Fig. 1 Separation of ^{125}I -ferritin from Na^{125}I by sephadex G200 column chromatography, (counts of $5 \mu\text{l}$ in every fraction)

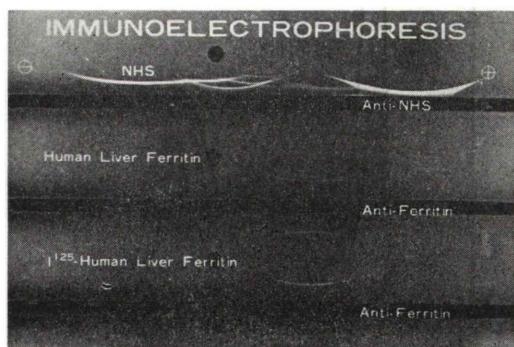


Fig. 2 Immunoelectrophoretic patterns of human ferritin and normal human serum

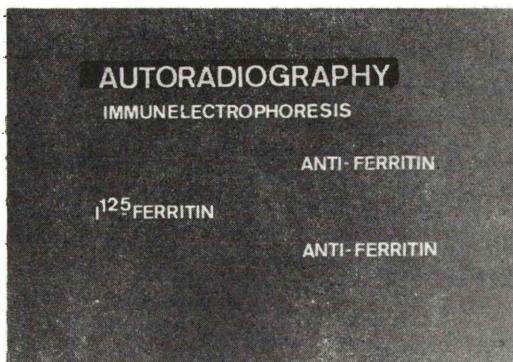


Fig. 3 Autoradiography in immunoelectrophoretic patterns of ^{125}I -ferritin

3. 標識 ^{125}I -フェリチンの崩壊

クロラミン T にてヨード化後, sephadex G-75 column chromatography にて分離精製した ^{125}I -フェリチンを 20 日, 45 日, 75 日間 4°C の低温室に BSA-PBS 液として保存した。その後, この ^{125}I -フェリチン溶液の 0.5 ml を 0.07M リン酸緩

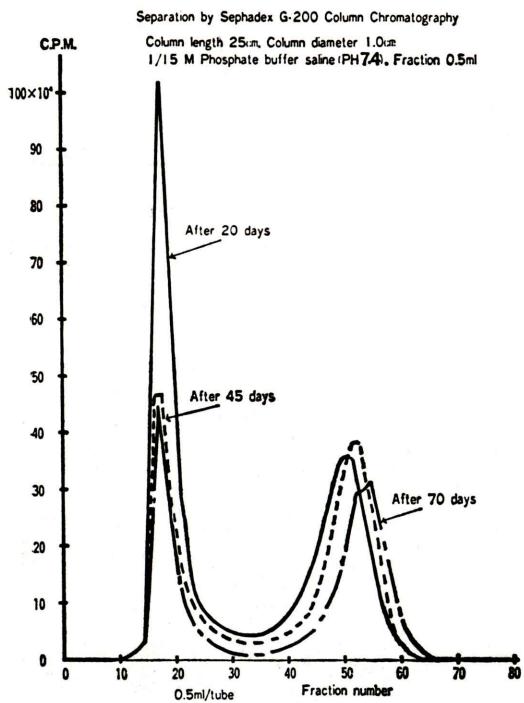


Fig. 4 Rechromatographic patterns of ^{125}I -ferritin at various period kept in 4°C after labelling

衝液 pH. 7.4 を用いて, sephadex G-200 によって rechromatography を行なった。Fig. 4 に示すように崩壊していない ^{125}I -フェリチンは, 第 1 ピーク放射能(未崩壊 ^{125}I -フェリチンの放射能)の試料全放射能(カラムから溶出された全分画の総放射能)に対する割合から, 20 日後で約 50%, 45 日後で約 37%, 70 日後で約 40% であった。すなわち, 標識 20 日後で約半量の ^{125}I -フェリチンが崩壊していることを知った。このため, 異なった時期に labelling を行ない, sephadex G-75 column chromatography によって精製した ^{125}I -フェリチンについて, 再度, 経時的に sephadex G-200 re-chromatography を施行したところ, label 後 2 日目で 89%, 7 日目で 85%, 21 日目で 79% が崩壊をうげずに残った。これらの結果より, 標識フェリチンは標識時の条件によって, 崩壊を強くうける場合と, 比較的崩壊が軽い場合とがあることを知った。いずれにしても, 標識フェリチンはできるだけ, 再精製などによって調製後使用することが好ましいと考えられる。

4. 抗ヒト肝フェリチン家兎血清の検討

この抗血清の特異性は microOuchterlony 法で

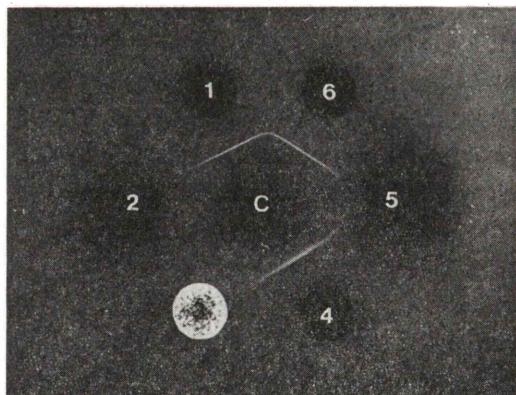


Fig. 5 Double immunodiffusion in agar gel. The center well contains the anti-ferritin rabbit serum. The peripheral wells contain the following:

- 1) Our Purified Ferritin
- 2) Normal human serum
- 3) Human liver necrosis Homogenate
- 4) Our Purified Ferritin
- 5) Patient's Serum
- 6) Ferritin by GRANICK Method

検定した。Fig. 5 に示すように、自験フェリチンは Granick フェリチンと完全に結合して反応するが健常人血清とは反応せず、白血病患者血清と弱い反応沈降線を形成した。以上より、この抗血清はフェリチンに特異性を有すると判定した。

B. 測定条件の設定

自験法によって得た精製ヒト肝フェリチンならびに抗血清の検討によって、純度、特異性の面から十分使用可能の標品であることが認められた。これらを用いて radioimmunoassay のための測定条件の検討を以下のとく行なった。

1. 標識フェリチン量

標識フェリチン量の標準曲線に及ぼす影響を検討した。一定濃度の第 1 抗体 8,000 倍希釈液、第 2 抗体 10 倍希釈液、各 0.1 ml を用い、標識フェリチン量 10 ng (約 5,000 cpm), 20 ng (約 10,000 cpm), 40 ng (20,000 cpm) について各標準曲線を作製検討した。得られた結果、5,000 cpm ではバラツキが大きく、20,000 cpm では bound rate が低下するので、感度、精度の面から 10,000 cpm を採用した。

2. 第 1 抗体濃度

第 1 抗体濃度変化による標準曲線の相違を一定の標識フェリチン量 (10,000 cpm) で、抗ヒト肝フェリチン家兎血清 4,000, 8,000, 16,000 倍希釈液、第 2 抗体、10 倍希釈液を用い、各標準曲線を作製し検討した。Fig. 6 に各標準曲線を示すがフェリチン検出感度は 4,000 倍希釈液使用時、62.5 ng/ml 以上、8,000 倍希釈液使用時、15.6 ng/ml 以上で bound rate の減少率が大きいのに対し、16,000 倍希釈抗体の使用時のそれは小さいため、精度上から 8,000 倍希釈抗ヒト肝フェリチン抗体の標準曲線の方がすぐれていた。この成績から抗血清希釈濃度は 8,000 倍を使用するのが適切であると判断した。

3. 第 2 抗体濃度

第 2 抗体濃度の bound rate に及ぼす影響を検討するために基準フェリチンの代わりに BSA-PBS 液 0.1 ml、標識フェリチン 10,000 cpm、第 1 抗体 8,000 倍希釈液 0.1 ml を用い、抗家兎 IgG

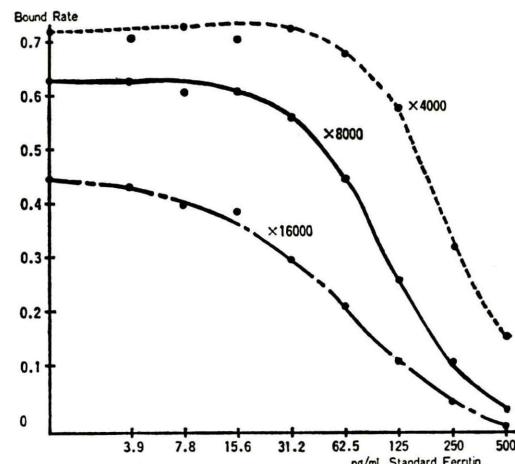


Fig. 6 The changes of standard curves and the concentration of anti-ferritin rabbit serum.

ブリン山羊血清を 5, 10, 20, 40 倍に希釈した液 0.1 ml 使用時の各 bound rate を求め推移曲線を作製した。なお第 2 反応時間は 24 時間とした。その結果 10 倍希釈抗血清の場合に最高の bound rate が得られたので、これを第 2 抗体至適濃度とした。

4. 第 1 および第 2 反応時間

第 1 反応時間の bound rate に及ぼす影響を検討するために、基準フェリチンの代わりに BSA-PBS 液 0.1 ml を標識フェリチン 10,000 cpm (約 20 ng 相当)、第 1 抗体として抗フェリチン家兎血清 8,000 倍希釈液 0.1 ml を使用し、反応時間 6, 24, 48, 72, 96 時間にについて各 bound rate を求め、その推移曲線を作製した。Fig. 7 にその成績を示したが、24 時間まで漸次時間の経過とともに bound rate の増加を見た。以後はほぼ一定の bound rate を呈した。その結果 ^{125}I -フェリチンの damageなどを考慮して 36 時間を第 1 反応時間とした。第 2 反応時間の bound rate に与える影響も同様に検討した。第 2 抗体濃度は 10 倍希釈液を用い、反応時間 6, 12, 24, 48, 96 時間で各 bound rate の推移曲線を作製した。Fig. 7 の下段の推移曲線から 24 時間を採用した。

C. 標準曲線

前項で検討した成績から、至適測定条件、 ^{125}I -

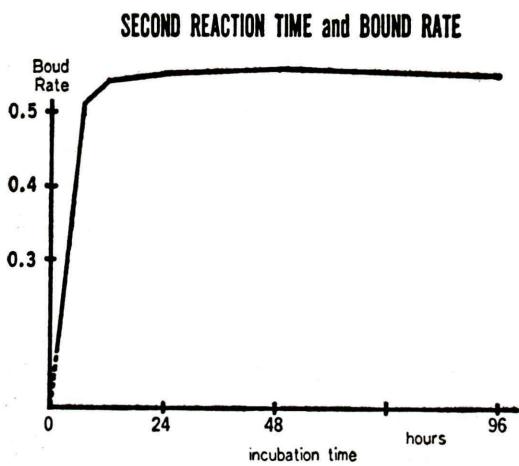
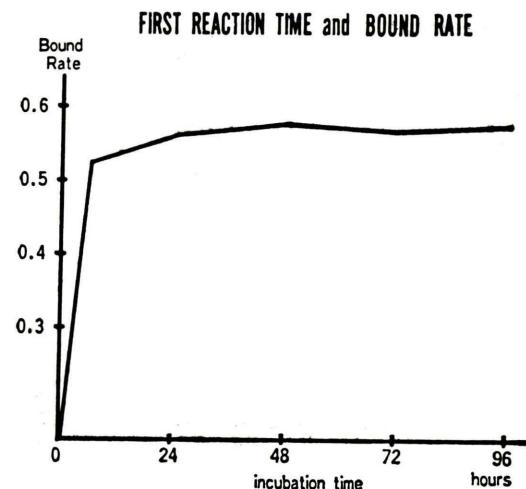


Fig. 7 The relation to bound rate and incubation time

フェリチン量 10,000 cpm (約20 ng), 第1抗体として抗フェリチン家兔血清 8,000 倍希釈液 0.1 ml、第1反応時間 36 時間、第2抗体として抗家兔 γ グロブリン山羊血清 10 倍希釈液 0.1 ml、第2反応時間 24 時間を採用し、Table 2 に示した測定系で標準曲線を作製した。血清検体を測定するためには、血清蛋白の影響を考慮する必要があるため基準フェリチンの溶媒を BSA-PBS とフェリチン除去ヒト血清とで比較検討した。フェリチン除去血清の作製はセファローズ 4B を BrCN で活性化し¹²⁾、それに batch 法で 24 時間、4°C で特異抗

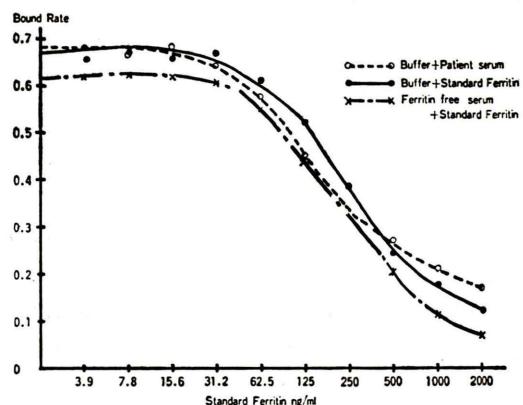


Fig. 8 The changes of standard curves in two standard ferritin diluents, 1% BSA-PBS solution and ferritin free human serum solution.

フェリチン家兔血清を付着させ、リン酸緩衝食水 pH. 8.0 で十分洗浄後、混合正常ヒト血清を反応させ作製した。BSA-PBS に溶解した基準フェリチンとフェリチン除去血清に溶解した基準フェリチンとの標準曲線の違いは、フェリチン除去血清希釈による標準曲線の方が bound rate において約 0.05 程低下した。しかし精度、感度ともに差は見られなかった (Fig. 8)。その感度は 31.2 ng/ml であった。

D. 測定法の特異性と再現性

1. 特異性

2,000 ng/ml のフェリチン濃度をもつ患者血清によって標準曲線を作製し、その特異性をみた。BSA-PBS によりこの血清を希釈し、基準フェリチン BSA-PBS 系の標準曲線と比較検討した。250 ng/ml 以下のフェリチン濃度では両方の標準曲線はほぼ平行であったが、500 ng/ml 以上では患者血清希釈の標準曲線の bound rate が高く、基準フェリチンによる標準曲線と少し異なるパターンを呈した。しかしおおむね特異性を持つと判断した (Fig. 8)。

2. 再現性

フェリチン除去血清で希釈した基準フェリチンによる標準曲線の再現性を検討した。標識フェリチンを 10,000 cpm/0.1 ml に希釈してすぐに測定

をはじめたもの、希釈後 24 時間後に測定を開始したものとで、その標準曲線を比較した。その結果、希釈後 24 時間の ^{125}I -フェリチンを用いた標準曲線の bound rate が 0.1 程度低下した(Fig. 9)。しかし標準曲線のパターンは両者とも平行であった。一方凍結保存しておいた ^{125}I -フェリチンを使ってフェリチン除去血清希釈基準フェリチンによる標準曲線でも bound rate の低下が見られた。また Fig. 10 は異なった時に作製した標準曲線を示している。基準フェリチンは同じものを使用し

たが、標準曲線のパターンは少し変動している。この 2 つの標準曲線で同一人血清について測定値の再現性を見た。Table 3 に示すごとく 7 人の血清の測定値の $\text{CV} = \pm 2.35\%$ であった。このことから著者は、測定のたびごとに標準曲線を作製すれば検体の定量値の再現性が保たれると判断した。

Table 3 The reproducibility of 7 samples in two times assay

Name	Ferritin ng/ml		Deviation $\times 100$
	1	2	
1 M. K.	32.6	35	± 3.6
2 T. N.	104.0	94	± 5.1
3 I. N.	152	165	± 4.1
4 I. M.	173	172	± 0.3
5 M. K.	210	210	± 0
6 A. A.	420	420	± 0
7 H. O.	450	420	± 3.4

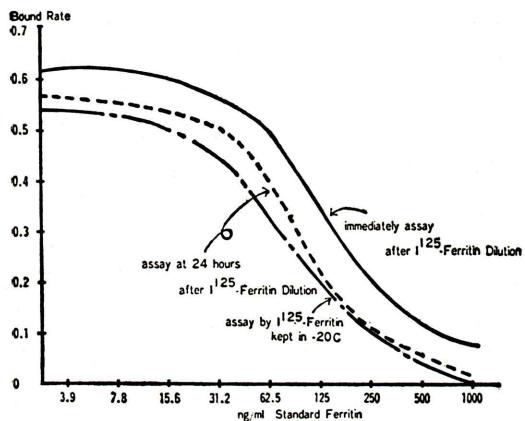


Fig. 9 The changes of standard curves and the time after dilution of ^{125}I -ferritin.

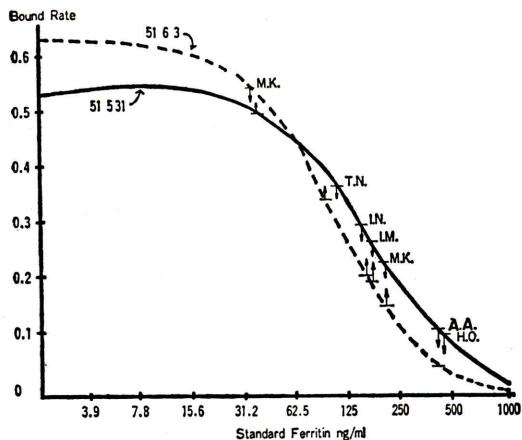


Fig. 10 The measurements of 7 samples in two times assay.

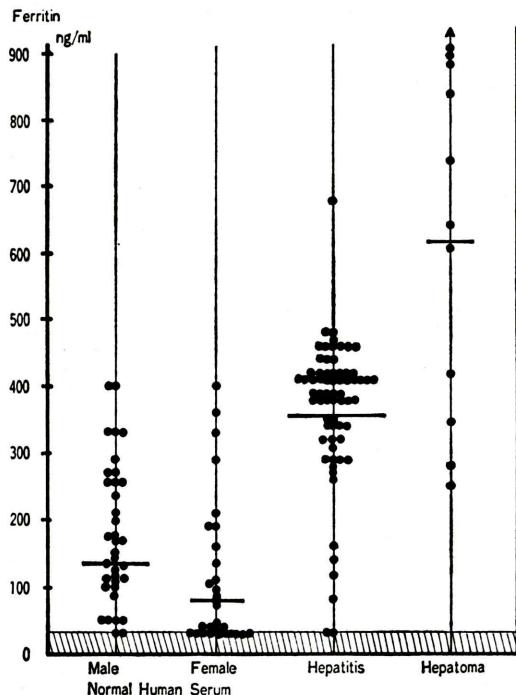


Fig. 11 Serum ferritin concentration in normal human serum and liver disease serum.

E. 正常人, 肝障害患者血清の血中フェリチン濃度

前記 Table 2 に示す測定条件のもとに正常人男 36 例, 女 30 例の肝障害患者血清 67 例の血中フェリチン濃度を測定した。著者の作製した標準曲線の感度は 31.2 ng/ml あるいは 15.6 ng/ml であったため血中フェリチン濃度がこの感度以下のものは 31 ng/ml として計算することとした。その結果, 正常男子の平均フェリチン濃度 $177 \pm SD 103$ ng/ml, 女子 $107 \pm SD 109$ ng/ml であった。肝障害患者血清では $369 \pm SD 111$ ng/ml, 最も高いもので 680 ng/ml の検体が存在した。肝癌症例はまだ少ない例であるが, その 11 例の平均値 $628 \pm SD 255$ ng/ml であった (Fig. 11)。

IV. 考 案

血清フェリチン検出のためには, ゲル内拡散法にもとづく種々の免疫学的検出法があるが, 感度, 定量性に相当の巾があることが知られている¹³⁾。免疫電気泳動法では感度も低く検出しにくい。immunolectrosyneresis では 50 $\mu g/ml$ 以上で検出は可能であるが定量性は持たない。immunoelectro-diffusion では 1.25 mg/dl 以上で検出可能で, 10 mg/dl~1.25 mg/dl の範囲内で定量性をもっている。また single radial immunodiffusion 法でも 10 mg/dl~1.25 mg/dl で用量反応曲線を得る。したがってこれらの方法は微量のフェリチンの定量性を欠き, 臨床的応用を考慮すると, さらにより高い定量性をもつ測定系が要求される。そこで著者は 2 抗体法による radioimmunoassay の確立を試みた。2 抗体法によるフェリチンの radioimmunoassay に関して, F. Stanley¹⁴⁾は, フェリチンのもつ鉄含量の標準曲線へ及ぼす影響を述べ, フェリチンよりも, むしろアポフェリチンの方が免疫反応性が高いと報告している。また Y. Niits¹⁵⁾は 2 抗体法による radioimmunoassay によって癌患者血清中のフェリチン濃度の分布を報告している。しかし ^{125}I -フェリチンの崩壊については, なお検討の余地があると考えられる。従来フェリチンは, その分子構造, アミノ酸構成の問題から標

識しにくいといわれている。著者も Fig. 1 に示すように, 低い specific radioactivity の ^{125}I -フェリチンしか得ることができなかつことより, 標識の難しい蛋白であることを確認した。

このことから Walter ら⁷⁾の開発した immuno-radiometric 法が用いられてきている。この方法は直接フェリチンの ^{125}I での標識を避け, フェリチンの特異抗体を標識し, それを tracer として測定する方法である。

著者は, 熱処理操作を行なわず, 細胞分画法, ゾーン電気泳動, ゲル濾過法を組み合わせてフェリチンを精製した。この方法は熱処理操作を省いたため, 比較的緩和な精製条件を考えた。この精製フェリチン 100 μg を Hunter & Greenwood¹⁰⁾ の方法に準じて ^{125}I で標識後, ゲル濾過にて精製して得た ^{125}I -フェリチンの比放射能は 0.3~0.4 $\mu Ci/\mu g$ でかなり低いものであった。この ^{125}I -フェリチンは免疫電気泳動による autoradiography (Fig. 3) で抗ヒト肝フェリチン家兎血清とのみ反応し, 放射能を有する沈降線を得た。このことからフェリチン分子そのものがヨード化されたと確認した。しかしこの ^{125}I -フェリチンは subunit をもつ分子構造のためか, 他の蛋白抗原に比べ damage がかなり早く進行した。この崩壊の様子を観察するために行なった ^{125}I -フェリチンの sephadex G-200 による rechromatography の結果 (Fig. 4) から ^{125}I -フェリチンは崩壊を起こしやすいことを知った。このことは標識中の強い酸化剤, 温度などによる実験条件, 標識抗原の構造上の問題, ヨード分子の結合状態の不安定性の影響によると考えられる。最初の分離を sephadex G75 のゲル濾過で分離した ^{125}I -フェリチンのピーク分画と, 最初から sephadex G200 で分離した ^{125}I -フェリチンのピーク分画との ^{125}I -フェリチン溶液 0.5 ml の sephadex G-200 による rechromatography 像を比較すると前者の方が damage の率が高かった。このことは標識中の反応でフェリチン分子がかなり損傷をうけ, 種々の分子量段階の分子破片の存在が推定され, このことが標識 ^{125}I -フェリチンの崩壊や免疫反応に何らかの関係があるのでないか

と考えられる。著者は chloramine T で標識後 sephadex G-200 column chromatography によって ^{125}I -フェリチンを分離精製し、比較的均一な ^{125}I -フェリチンを取り出したと考えたが、放射能被爆の点から、溶出時間の早い sephadex G-75 で分離し測定前に再調整することが望ましいと考えた。Fig. 9, 10 に示したように標準曲線は、前記 ^{125}I -フェリチンの不安定によって再現性が低く、測定のたびに標準曲線が多少変化する。このため測定ごとに標準曲線を作成する必要性を認めた。

フェリチン濃度 2,000 ng/ml の患者血清の BSA-PBS 希釈による標準曲線では、精製基準フェリチンの BSA-PBS 希釈による標準曲線と類似のパターンを呈したが、500 ng/ml 以上で bound rate に差が見られた。このことはフェリチン分子の血中存在状態が不均一であるためか、精製フェリチンと血中フェリチンとの分子構造の差によるものかは不明である。

以上の基礎的検討の結果、2抗体法によるフェリチンの radioimmunoassay を Table 2 のごとくすることが最も妥当と考える。しかしながらフェリチンの血中存在様式など不明な点も多くあり、今後臨床患者血清の測定を行ないつつ解明したい。

V. むすび

1. フェリチンの微量測定に radioimmunoassay を適用、2抗体法による測定法を検討した。

2. ヒト肝フェリチンを精製し、これを用いて抗ヒト肝フェリチン家兎血清および ^{125}I 標識フェリチンを作成して第1反応に用い、さらに第2反応として正常家兎血清および抗家兎γグロブリン山羊血清を用いた。

3. 測定至適条件について検討した結果、以下の系が最も良いと判断された。すなわち、被検血清 0.1 ml, ^{125}I 標識フェリチンは測定前必ず再精製して 0.1 ml (約 10,000 cpm) をそれぞれ添加後、第1反応時間 36 時間 4°C にて反応させた。その後 carrier protein として正常家兎血清 50 倍希釈 0.1 ml を添加後、第2反応時間として 24 時間 4°C にてよく反応させた。全放射能を測定後、3,000

rpm で遠心分離にて結合型 ^{125}I -フェリチンと遊離型 ^{125}I -フェリチンを分離し、上澄の遊離フェリチンを除去した後、bound のカウントを測定した。

4. さらに血清検体測定に対して、基準フェリチンの溶媒をフェリチン除去血清を用い標準曲線を作成した。

5. 標準曲線の再現性については、 ^{125}I -フェリチンの崩壊のため、今後なお検討が必要であるが、測定時ごとに標準曲線を作成することによって、検体の測定値の再現性を保つことができた。

6. 血清フェリチンの検出感度は 31.2 ng/ml 以上であった。

7. 正常人、肝障害患者血清の血中フェリチン濃度を定量した。正常人男子平均 $177 \pm \text{SD}103\text{ng/ml}$ 、女子平均 $107 \pm \text{SD}109\text{ ng/ml}$ であった。肝障害血清では $369 \pm \text{SD}111\text{ ng/ml}$ 、肝癌では $628 \pm \text{SD}255\text{ ng/ml}$ の高値を認めた。

なお本研究の要旨は第15回 Radioimmunoassay 研究会、ならびに第16回核医学会において発表した。稿を終わるにあたり、本研究に御指導、御校閲を賜りました馬場茂明教授、および研究について御助言、御指導を頂いた埼玉ガンセンター石井勝博士、兵庫医科大学戸沢辰雄助教授、神戸大学第2内科助手池原英夫先生、共同研究者の中村功、小島幹代両学士、ならびに教室員諸兄に深謝の意を表します。

文 献

- 1) Bjork I, Fish WW: Native and subunit molecular weights of apoferritin. Biochemistry **10**: 2844, 1971
- 2) Harrison PM: The structures of ferritin and apoferritin. Some preliminary X-ray data. J. Mol. Biol. **1**: 69, 1959
- 3) Harrison PM: The structure of apoferritin; Molecular size, shape and symmetry from X-ray data. J Mol Biol **6**: 404-422, 1963
- 4) Bryce CFA, Crichton RR: The subunit structure of horse spleen apoferritin. I. The molecular weight of the subunit. J Biol Chem **246**: 4198, 1971.
- 5) Reissman KR, Dietrich MR: On the presence of ferritin in the peripheral blood of patients with hepatocellular disease. J Clin Invest **35**: 588-595, 1956
- 6) 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 Path* **25**: 326-329, 1972
- 7) Walters GO, Miller FM, Worwood M: Serum ferritin concentration and iron stores in normal subjects. *J Clin Patholog* **26**: 770-772, 1973
 - 8) 村松正実: 動物細胞からの核および核小体の分離法 蛋白質、核酸、酵素, **12**: 421, 1967
 - 9) Granick S: Ferritin. I. Physical and chemical properties of horse spleen ferritin. *J Biol Chem* **146**: 451, 1942
 - 10) Hunter WN, Greenwood FC: Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity. *Nature* **194**: 495, 1962
 - 11) Morgan CR, Lazarow A: Immunoassay of insulin; Two antibody system, plasma insulin levels of normal, subdiabetic and diabetic rats. *Diabetes*. **12**: 127, 1963
 - 12) 尾上 薫: 日本免疫実験操作法(I), 日本免疫学会編 27, 1971
 - 13) 中治隆宏, 中村 功, 小島幹代他: フェリチンの精製と免疫学的検出法, 第26回電気泳動学会春季, 6. 1976
 - 14) Stanley PF: The effect of iron content on the behavior of human ferritin in an inhibition-type radioimmunoassay. *J. Lab. Clin. Med.* **83** (1): 147, 1974
 - 15) Niits Y, et al: Radioimmunoassay of serum ferritin in patients with malignancy. *Ann NY Acad Scie.* **259**: 450, 1975

Summary

Studies on a Double Antibody Radioimmunoassay for the Determination of Human Ferritin

Takahiro NAKAJI, M. D.

*The Second Department of Internal Medicine, Kobe University School of Medicine
(Director: Shigeaki, Baba, M.D.)*

A double antibody radioimmunoassay method for the determination of human liver ferritin was studied to establish its validity of microassay. We purified serum protein-free ferritin from human livers, and made anti-human liver ferritin rabbit serum by immunizing with the purified ferritin. A modified method of Hunter and Greenwood was used for the ^{125}I -labelling of the ferritin.

^{125}I -labeled ferritin was separated through a sephadex-G75 column and repurified through G-200 column before assay. The specific radioactivity of the labeled ferritin ranged from 0.3 to 0.4 μCi of ^{125}I -per microgram of protein. All dilutions were made with 1/15M phosphate buffered saline, PH 7.5, containing 1% bovine serum albumin (1% BSA-PBS). One hundred μl of serum sample or standard ferritin was added to 100 μl of anti-human liver ferritin rabbit serum (1:8000) and 500 μl of buffer. Then, ^{125}I -labeled ferritin (10,000 cpm=20 ng) was added. The solutions were mixed and incubated at 4°C for 36 hours.

One hundred μl of the normal rabbit serum (1:50) and 100 μl of the second antibody (1:10) were added to the solutions, followed by incubation at 4°C for 24 hours.

The above assay conditions were found to be optimum, and the total and precipitated counts were measured by Packard auto- γ -counter. The standard ferritin was diluted in both the 1% BSA-PBS and the ferritin-free human serum obtained by sepharose 4B affinity chromatography using the anti-ferritin rabbit serum as ligand. The standard curves in these diluents were almost the same and showed that the ferritin-free human serum protein did not interfere with the assay system.

The minimal ferritin concentration in normal serum detectable by this assay method was 31 ng/ml, and the mean value of ferritin in normal human serum was $177 \pm \text{SD } 103$ ng/ml for male (36 samples) and $107 \pm \text{SD } 109$ ng/ml for female (30 samples), respectively.