

## 《ノート》

## コーニングビタミン B<sub>12</sub> [<sup>57</sup>Co] / 葉酸 [<sup>125</sup>I] ラジオ アッセイキット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 Serum Vitamin B<sub>12</sub> Concentrations Using  
Corning Vitamin B<sub>12</sub> [<sup>57</sup>Co]/Folate [<sup>125</sup>I] Radioassay Kit

木原 数弘\* 中村 宏紀\* 坂田 裕行\* 杉村 英一\*  
佐藤 邦夫\* 角田 新一\* 出村 博\* 堀川 直史\*\*  
田中 朱美\*\*

Kazuhiro KIHARA\*, Hiroki NAKAMURA\*, Hiroyuki SAKATA\*, Hidekazu SUGIMURA\*,  
Kunio SATO\*, Shinichi TSUNODA\*, Hiroshi DEMURA\*,  
Naoshi HORIKAWA\*\* and Akemi TANAKA\*\*

*\*The Radioassay Center, \*\*Department of Neuropsychiatry,  
Tokyo Women's Medical College, 10 Kawada-cho, Ichigaya, Shinjuku-ku, Tokyo*

### I. はじめに

ビタミン B<sub>12</sub> または葉酸欠乏はヒトにおける巨赤芽球性貧血の主要な原因である。この診断のためにはビタミン B<sub>12</sub> または葉酸の測定が必要となる。葉酸は血中で N-5-methyltetrahydrofolic acid として多く存在する<sup>1)</sup> のでこの測定が行われる。ビタミン B<sub>12</sub> および葉酸の測定は、微生物学的測定法や、ラジオイムノアッセイ法(RIA)で行われているが、後者が操作手順が簡便で感度も鋭敏なことから広く用いられている。RIA ではこれまでビタミン B<sub>12</sub> や葉酸をおののおの個別に測定していくが、ビタミン B<sub>12</sub> に <sup>57</sup>Co の核種を用い葉酸に <sup>125</sup>I を用いることで同時に両者を測定できるキット

\* 東京女子医科大学附属病院ラジオアッセイ科

\*\* 同 神経精神科

受付：59年5月17日

最終稿受付：59年8月21日

別刷請求先：東京都新宿区市ヶ谷河田町10 (番162)

東京女子医科大学附属病院

ラジオアッセイ科

木原 数弘

トが開発された。<sup>57</sup>Co と <sup>125</sup>I とは放出ガンマ線エネルギーが異なり放射スペクトルの重複部分が少なく測定できるので同時測定が可能である。われわれは牛乳葉酸結合蛋白と豚内因子を用いた competitive protein bidding assay (CPBA) 法による同時測定可能な Vitamin B<sub>12</sub>/Folate Radioassay キット(コーニング社)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について報告する。

### II. キットの構成

本キットは次の試薬で構成されている。

#### 1. binding protein

(牛乳から精製した葉酸結合蛋白および豚内因子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水に分散)

#### 2. トレーサー (<sup>57</sup>Co 標識ビタミン B<sub>12</sub> および <sup>125</sup>I 標識葉酸混合液)

**Key words:** Vitamin B<sub>12</sub>, Folate, Radioassay, Simultaneous measurement.

**Table 1** Assay procedure

1. Add 100  $\mu\text{l}$  of the appropriate standard, control or patient sample.
2. Add 1.0 ml of tracer to each tube.
3. Vortex for 3–4 seconds.
4. Cover with a loosely fitting cap or aluminum foil.
5. Incubate in a biling water bath or equivalent ( $>95^\circ\text{C}$ ) for 15 minutes. Protect from light.
6. Remove from incubator and allow to sit at room temperature for 15 minutes or in an ambient temperature water bath for 5 minutes. Protect from light.
7. Remove the cap or foil and add 500  $\mu\text{l}$  of binding proteins.
8. Vortex for 3–4 seconds.
9. Incubate for one hour at room temperature. Protect from light.
10. Centrifuge for ten minutes.
11. Decant all tubes.
12. Count all tubes with a gamma counter capable of counting [ $^{57}\text{Co}$ ] and [ $^{125}\text{I}$ ] simultaneously or separately.

(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. dithiothreitol (トレーサー液に添加混合して使用)

4. ビタミン B<sub>12</sub>/葉酸混合標準液

(6種濃度のビタミン B<sub>12</sub> および N-5-methyltetrahydrofolic 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 B<sub>12</sub> 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に溶解)

5. ビタミン B<sub>12</sub>/葉酸対照血清

(2種類の濃度のビタミン B<sub>12</sub> および N-5-methyltetrahydrofolic 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)

### III. 検体処理および測定方法

#### 1. 血清または血漿

本キットの測定には血清または血漿を用い、血漿の場合は EDTA 添加採血を行う。本検討では血清を用いた。

#### 2. 赤血球中葉酸

抗凝固剤 EDTA を含む採血管に採血しヘマトクリットを測定する。全血 100  $\mu\text{l}$  を 0.2% アスコルビン酸溶液 2.0 ml に加えて溶血させ均一な濃度とする。

#### 3. 測定方法

測定方法は Table 1 に示した。Fig. 1 に  $^{57}\text{Co}$  と  $^{125}\text{I}$  の放出  $\gamma$  線エネルギーのスペクトルと測定に使用したエネルギーの幅を示した。放射能カウントは Auto Well Gamma System ARC-251 (Aloka Co.) を用い  $^{57}\text{Co}$  と  $^{125}\text{I}$  のおのおのを図示したごとく放射線スペクトルの重ならない部分で測定した。また赤血球中の葉酸値は次の式から求めた。

赤血球中葉酸値 (ng/ml)

$$= \frac{\text{全血葉酸値 (ng/ml)} \times 21}{\text{ヘマトクリット} (\%)} \times 100 (\times 21 : \text{希釈倍率})$$

### IV. 基礎的検討

#### 1. 反応時間

binding protein 添加後の反応温度を  $22^\circ\text{C}$  と一定にし、その時の反応時間を 15 分, 30 分, 60 分, 120 分, 240 分と変化させた場合の標準曲線の変化と 2種類のコントロール血清測定値を検討した (Figs. 2, 3)。

その結果、ビタミン B<sub>12</sub>、葉酸とともに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したが 60 分以上の反応時間ではほぼ安定した標準曲線が得られた。ビタミン B<sub>12</sub> ではコントロール血清値にあまり変動が認められなかったが、葉酸では反応時間 15 分でコントロール血清がやや高い値を示した。

以上のことより反応時間は安定した標準曲線が得られ最も短い 60 分が適当と思われた。

#### 2. 反応温度

反応時間を 60 分とした上で反応温度を  $4^\circ\text{C}$ ,  $22^\circ\text{C}$ ,  $37^\circ\text{C}$  と変化させた場合の標準曲線の変化と 2種類のコントロール血清の測定値を検討した (Figs. 4, 5)。

ビタミン B<sub>12</sub> では反応温度に影響されず安定な標準曲線が得られたが、 $37^\circ\text{C}$  においてコント

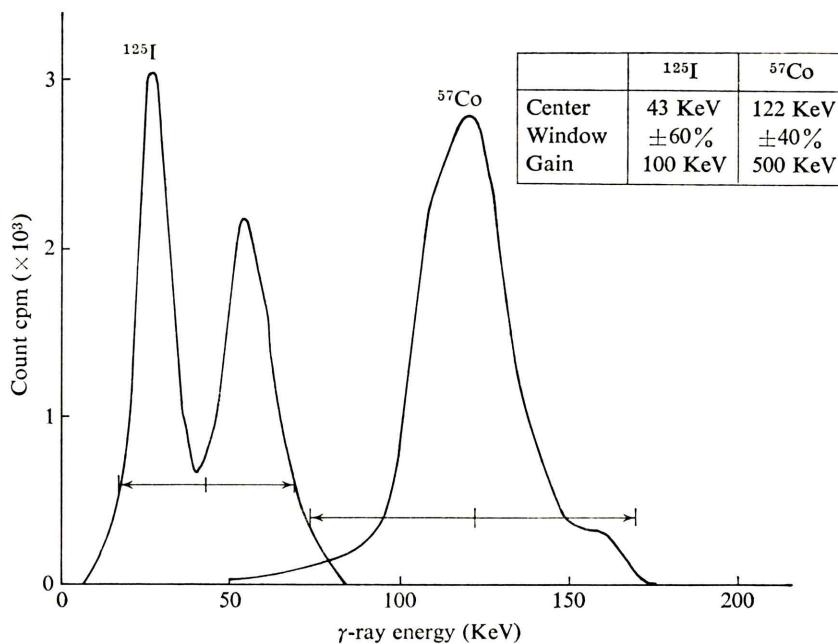


Fig. 1  $\gamma$ -ray spectra of <sup>125</sup>I and <sup>57</sup>Co. Arrows indicate the ranges in assays of <sup>125</sup>I-folate and <sup>57</sup>Co-vitamin B<sub>12</sub>.

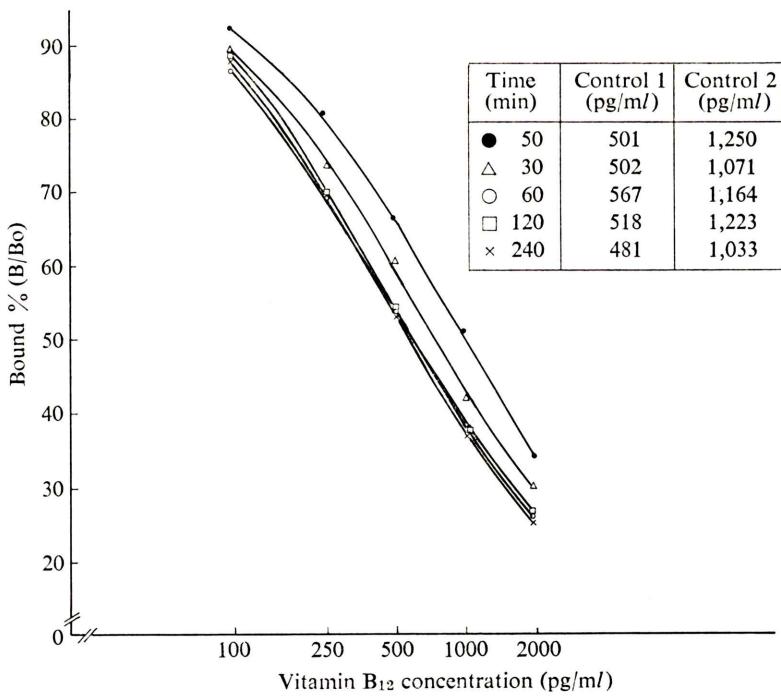


Fig. 2 Influence of incubation time on the vitamin B<sub>12</sub> standard curve.

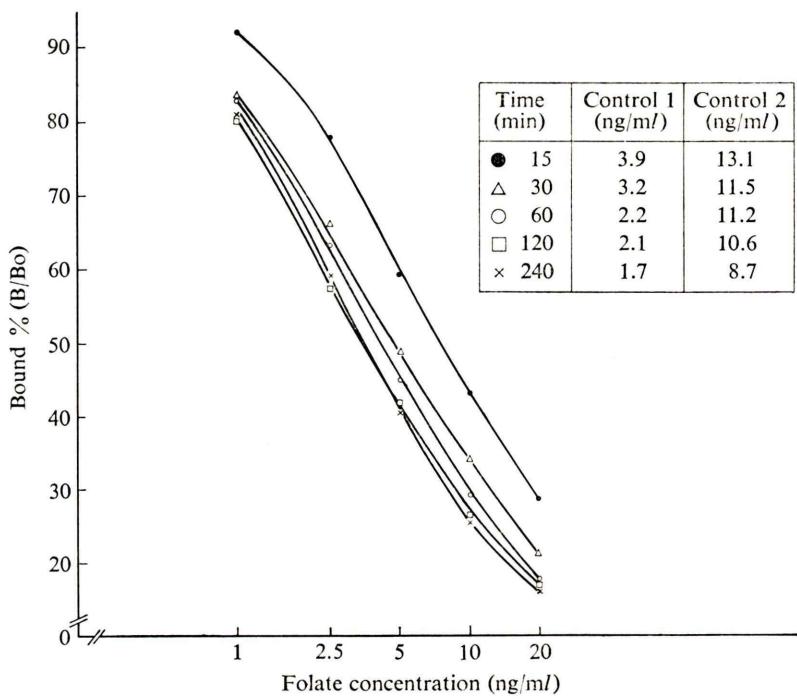
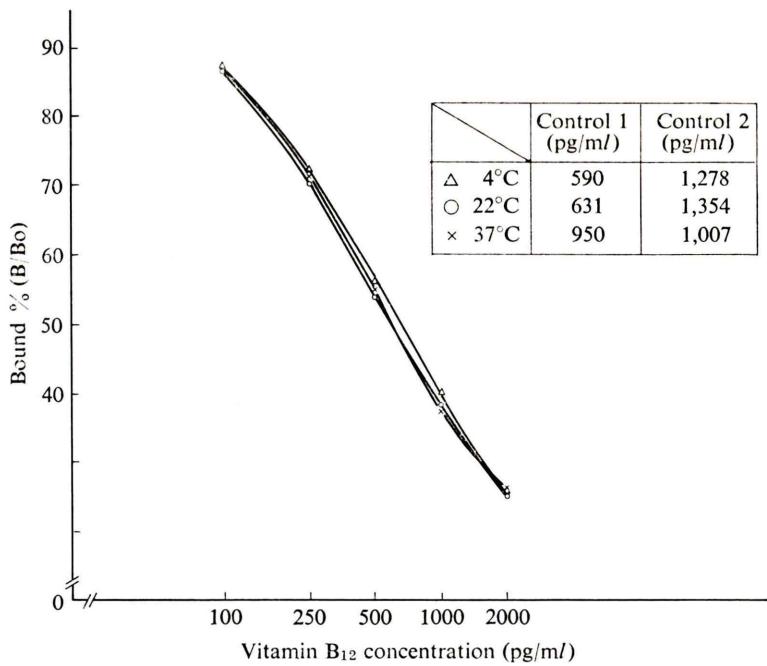


Fig. 3 Influence of incubation time on the folate standard curve.

Fig. 4 Influence of incubation temperature on the vitamin B<sub>12</sub> standard curve.

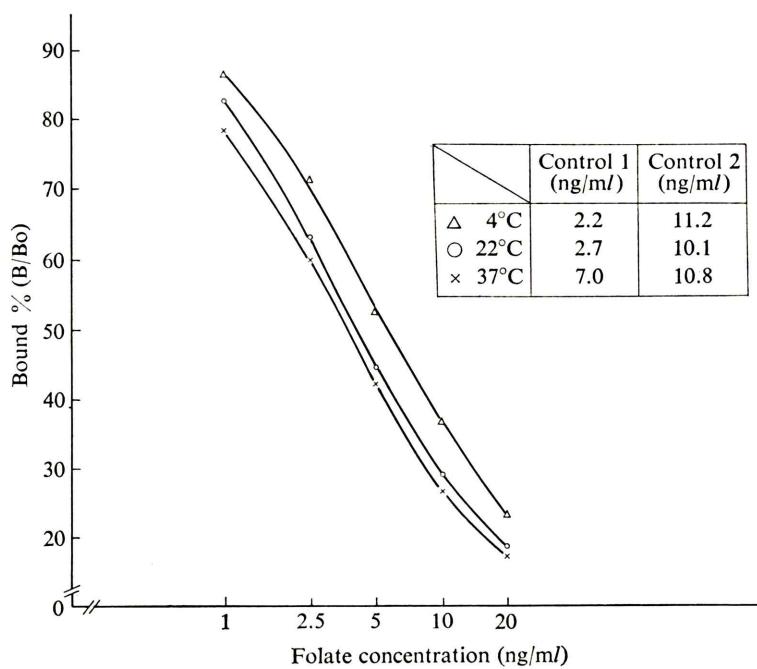
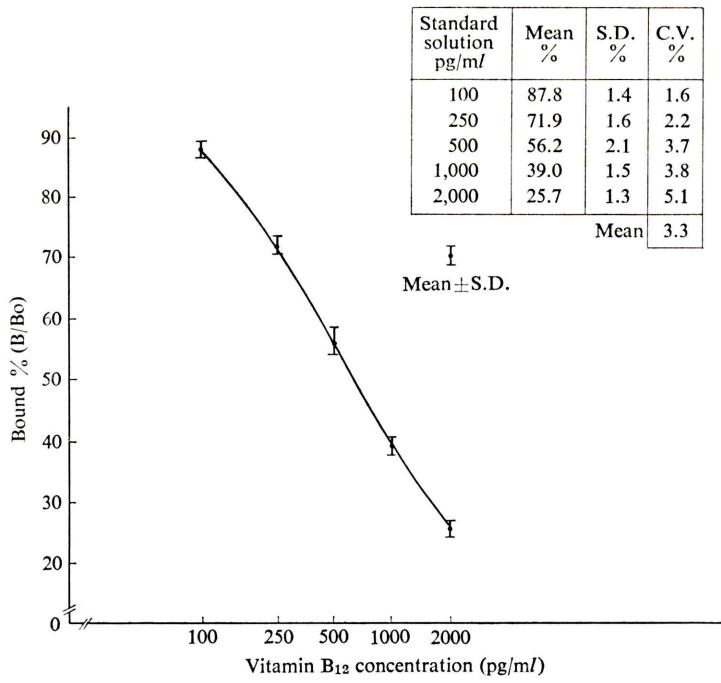


Fig. 5 Influence of incubation temperature on the folate standard curve.

Fig. 6 Vitamin B<sub>12</sub> standard curve.

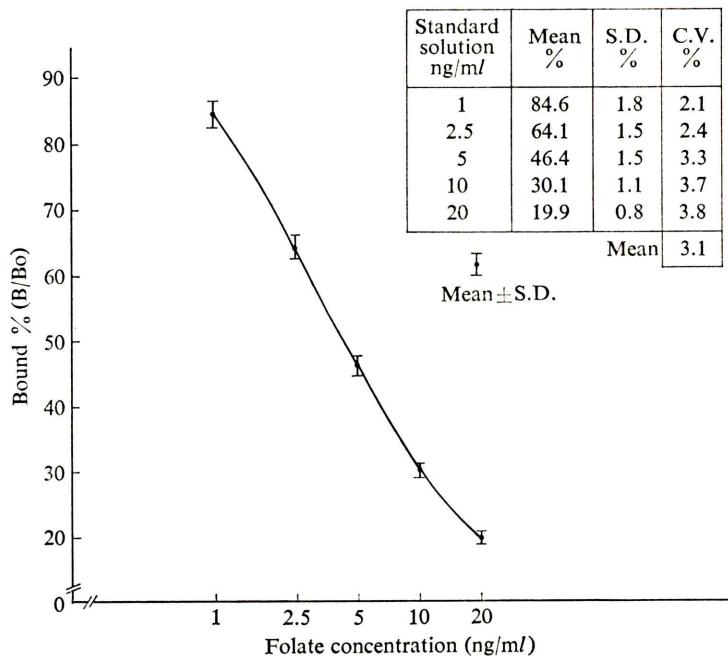


Fig. 7 Folate standard curve.

Table 2 Reproducibility of vitamin B<sub>12</sub>

Serum	Intraassay			Interassay		
	A (pg/ml)	B (pg/ml)	C (pg/ml)	D (pg/ml)	E (pg/ml)	C (pg/ml)
154	718	1,657	261	578	1,711	
147	785	1,570	277	542	1,636	
157	758	1,651	239	623	1,629	
161	711	1,534	298	568	1,540	
167	730	1,505	277	566	1,544	
160	697	1,612	261	584	1,582	
167	697	1,615	269	593	1,558	
165	749	1,536	272	586	1,511	
167	748	1,503	276	586	1,583	
163	765	1,508	267	617	1,562	
n	10	10	10	10	10	10
Mean	160.8	736.1	1,569.1	269.7	584.3	1,585.6
S.D.	6.2	29.9	57.4	14.3	22.5	55.6
C.V.	3.9	4.1	3.7	5.3	3.9	3.5

コレル血清1が高値を示しコントロール血清2が低値を示した。

葉酸では反応温度が高くなるほど各濃度における結合率は低下したが、22°Cと37°Cでほぼ安定した標準曲線が得られた。37°Cにおいてはコレル血清1が高値を示した。

以上のことから反応温度は簡便である室温(22°C)が適当と思われた。

### 3. アッセイ間における標準曲線

8回のアッセイにおける標準曲線の変動を検討した(Figs. 6, 7)。

その結果ビタミンB<sub>12</sub>、葉酸ともに良好な標準

Table 3 Reproducibility of folate

Intraassay		Interassay	
Serum A (ng/ml)	Red blood Cell A (ng/ml)	Serum B (ng/ml)	Red blood Cell B (ng/ml)
4.3	147	5.0	247
4.2	147	5.0	220
3.9	139	5.2	205
4.1	143	4.6	236
4.1	155	4.6	252
4.2	147	4.9	221
4.3	134	4.9	228
4.1	134	5.0	221
4.3	139		
4.3	139		
n	10	10	8
Mean	4.2	142	5.0
S.D.	0.1	6.7	0.3
C.V.	3.1	4.7	6.4

Table 4 Recovery test of vitamin B<sub>12</sub>

Standard solution	Added	Predicted	Determined	Recovery
0 (pg/ml)	208 (pg/ml)	104 (pg/ml)	127 (pg/ml)	122.1 (%)
100	"	154	169	109.7
250	"	229	230	100.4
500	"	354	377	106.5
1,000	"	604	603	104.3
2,000	"	1,104	1,112	100.7
Mean				107.3
0	364	182	214	117.6
100	"	232	239	103.0
250	"	307	295	96.1
500	"	432	450	104.2
1,000	"	682	724	106.2
2,000	"	1,182	1,260	106.6
Mean				105.6
0	793	397	404	101.8
100	"	447	453	101.3
250	"	522	530	101.5
500	"	647	668	103.2
1,000	"	897	994	110.8
2,000	"	1,397	1,474	105.5
Mean				104.0

曲線が得られた。

#### 4. 再現性

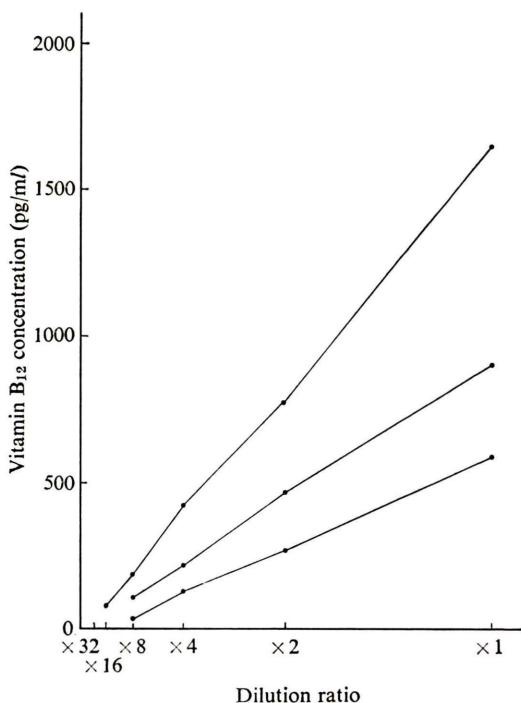
ビタミン B<sub>12</sub>において濃度の異なる 5 種類 (A, B, C, D, E) の血清の intraassay および interassay

は良好な変動係数 (C.V.) を示した (Table 2).

また葉酸においても血清および赤血球の intraassay および interassay で、良好な変動係数 (C.V.) が得られた (Table 3).

Table 5 Recovery test of folate

Standard solution	Added	Predicted	Determined	Recovery
0 (ng/ml)	2.1 (ng/ml)	1.1 (ng/ml)	1.5 (ng/ml)	136.4 (%)
1.0	—	1.6	2.1	131.3
2.5	—	2.3	2.7	117.4
5.0	—	3.6	4.3	119.4
10.0	—	6.1	6.7	109.8
20.0	—	11.1	11.5	103.6
			Mean	119.7
0	6.5	3.3	3.1	93.9
1.0	—	3.8	4.2	110.5
2.5	—	4.5	5.1	113.3
5.0	—	5.8	5.5	94.8
10.0	—	8.3	9.3	112.8
20.0	—	13.3	11.6	87.2
			Mean	102.1
0	9.5	4.8	5.4	112.5
1.0	—	5.3	7.1	134.0
2.5	—	6.0	7.4	123.3
5.0	—	7.3	8.9	121.9
10.0	—	9.8	10.6	108.2
20.0	—	14.8	18.1	122.3
			Mean	120.4

Fig. 8 Dilution test of vitamin B<sub>12</sub>.

## 5. 回収率試験

濃度の異なる3種類の血清を標準液に等量添加し測定値を検討した(Table 4, 5).

ビタミンB<sub>12</sub>では0濃度標準液混和で一部やや高い回収率を示し、また葉酸においても低濃度標準液混和においてやや高い回収率を示したものがあったほかは、ビタミンB<sub>12</sub>および葉酸とともに回収率は良好であった。

## 6. 希釈試験

濃度の異なる3種類の血清を0濃度標準液で希釈した場合の希釈曲線はビタミンB<sub>12</sub>、葉酸とともにほぼ原点を通る直線であり良好な結果であった(Figs. 8, 9).

## 7. 他社キットとの相関

ビタミンB<sub>12</sub>:86例の血清について本キットとファルマシア社「VB<sub>12</sub> テストシオノギキット」の相関を求めた結果、相関係数rは0.96と良好であったが回帰係数Y=0.79X-52.0と本キットは若干低値を示した(Fig. 10).

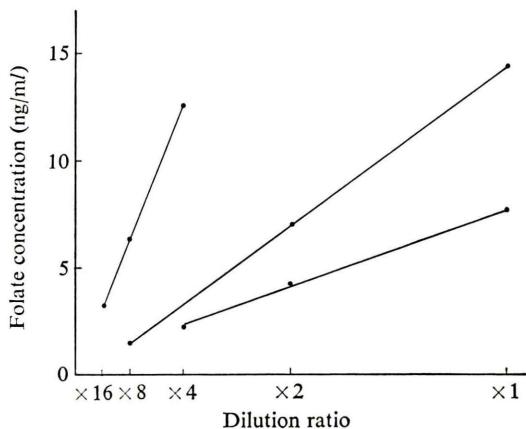


Fig. 9 Dilution test of folate.

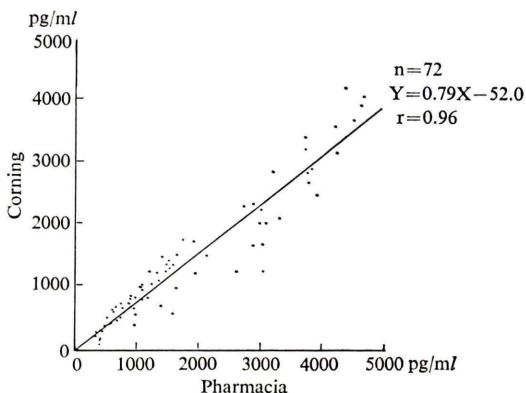
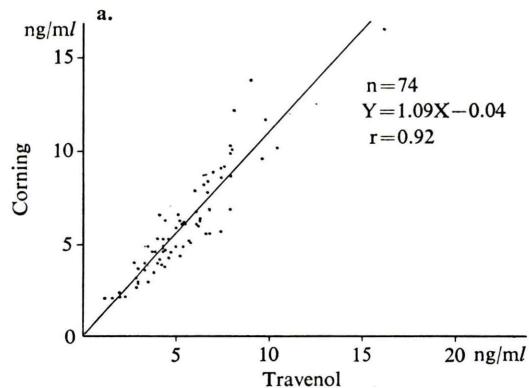
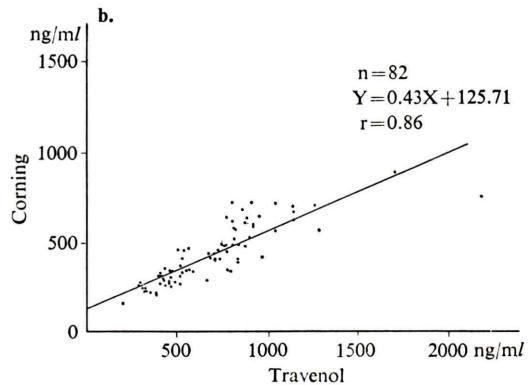
Fig. 10 Correlation between vitamin B<sub>12</sub> values measured by Pharmacia kits and those by Corning kits.

Fig. 11a Correlation between serum folate values measured by Travenol kits and those by Corning kits.



b Correlation between folate values in red blood cell measured by Travenol kits and those by Corning kits.

葉酸：74例の血清および82例の赤血球について本キットとトラベノール社「Folate ラジオアッセイキット」の相関を求めた結果、血清中葉酸値はきわめてよく相関した(Fig. 11a)。赤血球中葉酸の検討では本キットはトラベノール社に比べ低値を示した(Fig. 11b)。

以上の基礎的検討で良好な成績が得られたので次に臨床的検討を行った。

## V. 臨床的検討

正常者、血液疾患(悪性貧血を含む巨赤芽球性貧血、各種白血病)、肝疾患(肝炎、肝硬変、肝

癌)、腎疾患(慢性腎不全)などを対象として、血清ビタミン B<sub>12</sub>、血清および赤血球葉酸を測定した。対象はビタミン B<sub>12</sub> 剤および葉酸剤の投与がないものについて行った。統計検定は値を対数変換しステューデント t テストによった。

### ビタミン B<sub>12</sub> : (Fig. 12)

1) 正常者血清 50 例におけるビタミン B<sub>12</sub> 値の測定の結果 123～873 pg/ml に分布し平均 473±159.3 (S.D.) pg/ml であった。

2) 各種疾患におけるビタミン B<sub>12</sub>

悪性貧血では正常値より明らかな低値を認め(p <0.01), 胃切除後の巨赤芽球性貧血では低値を示

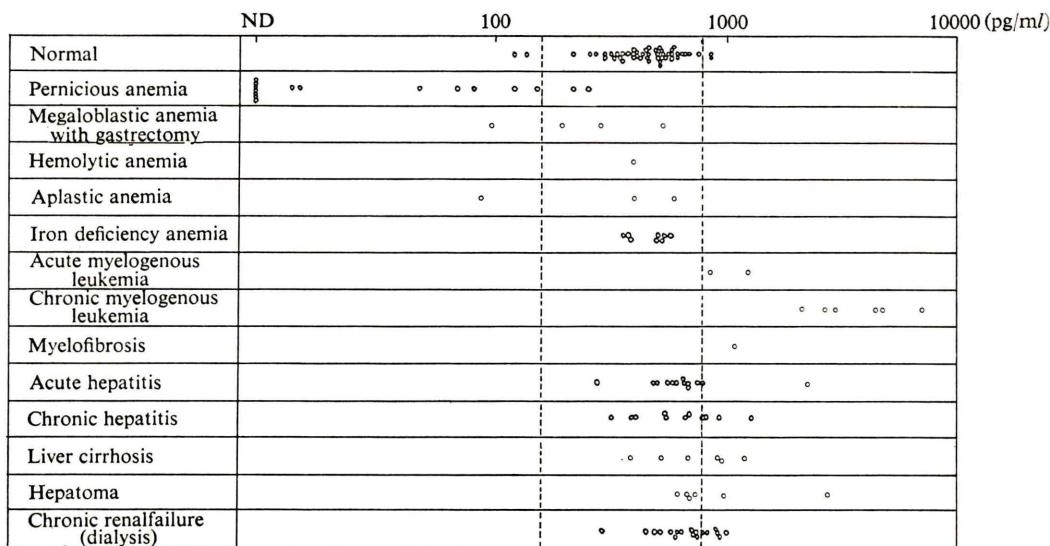
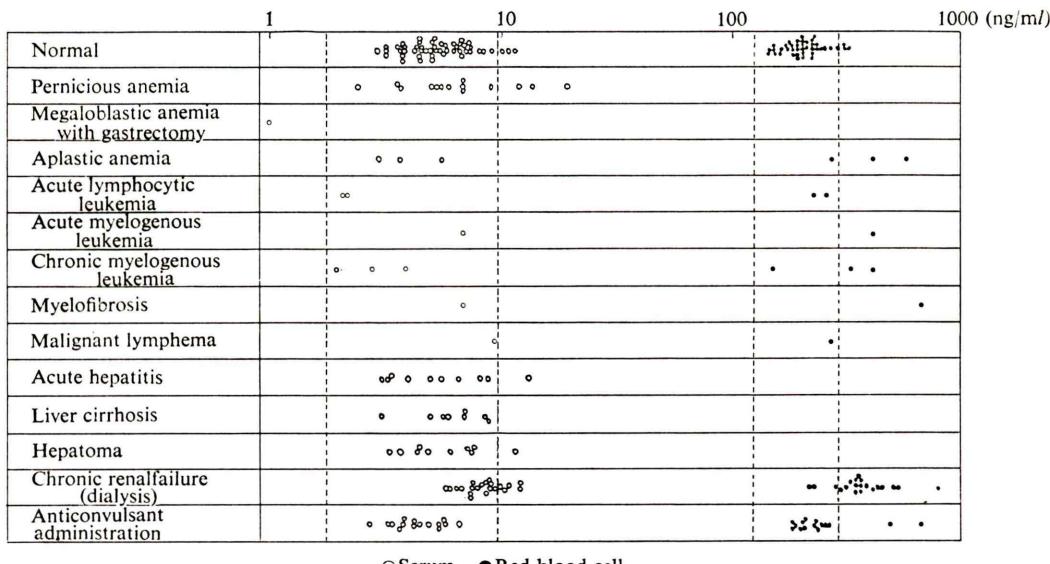


Fig. 12 Serum vitamin B<sub>12</sub> concentrations in normal subjects and in patients with various diseases. Dotted lines indicate the range, mean±2 S.D., of normal subjects.



○ Serum ● Red blood cell

Fig. 13 Folate concentrations in serum and red blood cell in normal subjects and in patients with various diseases. Dotted lines indicate the ranges, mean±2 S.D., of normal subjects.

す例のほか一部正常域の値を示す例が認められた。

慢性骨髓性白血病では正常域より明らかな高値を示し( $p<0.01$ )、急性骨髓性白血病では若干の高値を示した。

その他急性肝炎、慢性肝炎、肝硬変および肝癌の一部の例で高値が認められた。慢性腎不全透析患者では高値を示す例が多く、統計的に正常人との間に有意差がみられた( $p<0.01$ )。

## 葉 酸 : (Fig. 13)

### 1) 正常者の葉酸

正常者血清葉酸値は 3~12 ng/ml に分布し 5.7 ± 2.0 (S.D.) ng/ml であった。正常者赤血球中葉酸の分布は 124~296 ng/ml で 210 ± 42.8 (S.D.) ng/ml と血清値に比べ高値を示した。

### 2) 各種疾患における葉酸値

悪性貧血では血清値は正常者と有意差がなく、胃全摘後の大球性貧血の 1 例は血清値が 1.0 ng/ml と著明な低値を示した。

慢性骨髄性および急性リンパ性白血病の少数例で血清値が低値を示し、再生不良性貧血、急性および慢性骨髄性白血病の少数例で赤血球値が高値を示す例がみられた。

肝疾患の血清値は正常域とほぼ同じ分布であった。

慢性腎不全透析患者では血清値は高値傾向を示し ( $p < 0.01$ )、赤血球値は明らかに高値を示した ( $p < 0.01$ )。

神経精神科領域においてカルバマゼピン、フェニトイン、フェノバルビタールなどの抗痙攣剤を 1 年以上投与された者では、血清値はほぼ正常域と同じ分布を示したが赤血球値はやや高い値を示した例が一部にみられた。

## VI. 考 察

本キットは 2 種の異なる核種を導入し同時に 2 種の物質を測定できるというきわめて便利なものである。さらに competitive protein binding assay (CPBA) 法で蛋白をガラスビーズに結合させた固相法を用いていることから従来のキットに比べ操作手順が簡便化され、所要時間も約 3 時間と短縮されたものである。

基礎的検討ではビタミン B<sub>12</sub>、葉酸とともに反応時間は 60 分、反応温度は 22°C で安定した標準曲線が得られ指示書どおりの方法が適当と思われた。本キットの再現性は intraassay, interassay ともに安定しており、また回収率試験および希釈試験でほぼ満足する結果が得られた。

本キットとファルマシア社のビタミン B<sub>12</sub> の相

関は良好であったが本キットはやや低値を示す傾向にあった。これは本キットが結合蛋白に純度の高い内因子を使用しているため、特異性が高くかつより鋭敏にビタミン B<sub>12</sub> 濃度を測定できることによると思われる。また本キットとトラベノール社の血清葉酸値の相関はきわめて良好であったが赤血球中葉酸値は本キットでは低値を示した。血球値が低値を示した理由は明らかではないが、トラベノール社キットではサンプルを熱湯浴後トレーサーとミルク結合蛋白を加え、さらにチャコール分離をするという測定操作の違いが特に血球中葉酸測定に関係しているのかもしれない。

臨床的検討において、本キットで測定したビタミン B<sub>12</sub> の正常者平均値は従来の報告<sup>2,3)</sup> より低値であった。以下各疾患においても従来の報告値<sup>3,4)</sup> よりも低値が得られた。

本検討でみられた悪性貧血の低ビタミン B<sub>12</sub> 値はその欠乏状態を示すもので診断上有用である。

慢性骨髄性白血病では正常者に比して有意な高ビタミン B<sub>12</sub> 血症を示したが、これは主として白血球中に含まれていたビタミン B<sub>12</sub> が白血球の崩壊により遊出して高ビタミン B<sub>12</sub> 血症をきたすものと推定されている。

肝疾患において一部の症例で高ビタミン B<sub>12</sub> 血症を示したが、これは主として肝実質組織の崩壊によるビタミン B<sub>12</sub> の逸脱と考えられている<sup>5)</sup>。

慢性腎不全透析患者において若干の高値を示したこととは、正常者では尿中にごく少量のビタミン B<sub>12</sub> が排泄されるが慢性腎不全透析患者においては尿排泄が悪くなるため血中にビタミン B<sub>12</sub> が蓄積し若干の高ビタミン B<sub>12</sub> 血症をきたすものと推定される。

正常者における血清および赤血球中葉酸値は他報告<sup>6)</sup> にほぼ準ずる値を示した。採血時や検体処理などにおいて溶血があると測定値は高く出ることがある。これは今回の検討でもみられたように、赤血球中の葉酸が流出するため注意を要する。

胃全摘後に生じた大球性貧血の 1 例は血清葉酸値が著明な低値を示した。この症例は胃全摘後約 1 年間にわたり流動食にたよったものであった。

悪性貧血で血清葉酸値が高値を示すものが少數例あったが、これはビタミンB<sub>12</sub>欠乏が葉酸代謝に関連していることによると思われる。すなわちビタミンB<sub>12</sub>依存性メチオニン生成反応の際、5-methyltetrahydroxyfolic acid が tetrahydroxyfolic acid に代謝される<sup>7)</sup>が、ビタミンB<sub>12</sub>欠乏ではこの転換が行われず、葉酸は前者の形で蓄積されることになり、血清値が高値に測れたものと思われる。

慢性骨髄性白血病および急性リンパ性白血病においても血清葉酸値が低値を示した例が認められたが、これはメソトレキセート製剤などの抗癌剤による葉酸の生成障害によると考えられる。

てんかんの患者に抗痙攣剤を投与した場合に生ずる薬剤性の葉酸欠乏が報告されている<sup>8,9)</sup>が、抗痙攣剤投与者15例の血清および赤血球中葉酸値において低値を示した例は認められなかった。

## VII. まとめ

以上 CPBA 法による Vitamin B<sub>12</sub>/Folate radioassay Kit の基礎的ならびに臨床的検討を行った。本キットはビタミンB<sub>12</sub>と葉酸を同時に測定することができるものだが、基礎的検討からルーチン検査で十分使用可能であることがわかった。また臨床的にも巨赤芽球性貧血の原因診断に加え、他

の疾患においてもビタミンB<sub>12</sub>と葉酸の同時検索に有用であると思われた。

謝辞：キットを提供していただいたコーニング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) 奥田邦雄, 内山幸信: ビタミンB<sub>12</sub>. 日本臨床秋季臨時増刊号 40: 334-337, 1982
- 3) 稲葉瑞江, 名取博, 福田守道: 固相法による Vitamin B<sub>12</sub> の Radioassay. 基礎と臨床 7(13): 323-330, 1973
- 4) 内山幸信, 奥田邦雄: Solid Phase を用いる血清ビタミンB<sub>12</sub> の Radioassay に関する検討. ビタミン 47(12): 567-575, 1973
- 5) 田中信夫, 内野治人: ビタミンB<sub>12</sub>. 基礎と臨床, 内野治人編, 科学評論社, 東京, 1978, pp. 305-307
- 6) 鈴木賀己, 和田義郎: 葉酸. 日本臨床秋季臨時増刊号 40: 331-333, 1982
- 7) Sae H, Wilmanns W: Cobalamin Dependent Methionine Synthesis and Methyl-Folate-Trap in Human Vitamin B<sub>12</sub> Deficiency. Br J Haematol 36: 189-198, 1977
- 8) McNeall MJ: Megaloblastic anemia in anticonvulsant therapy. Lancet i: 487, 1966
- 9) Reynolds EH, Milner G, Matthews DM, et al: Anticonvulsant therapy, megaloblastic haemopoiesis and folic acid metabolism. Q J Med 35: 521-537, 1966