

《ノート》

Magnetic Ferritin [^{125}I] RIA キット (Corning) の 基礎的、臨床的検討

Fundamental and Clinical Evaluations of Magnetic Ferritin RIA Kit (Corning)

鈴木 義信* 黒田 久元* 石川 信* 平岩 正基*
篠原 和代* 松田 弘子** 笠井貴久男* 下田 新一*

Yoshinobu SUZUKI*, Hisamoto KURODA*, Makoto ISHIKAWA*,
Masaki HIRAIWA*, Kazuyo SHINOHARA*, Hiroko MATSUDA**,
Kikuo KASAI* and Shin-ichi SHIMODA*

*Department of Endocrinology, Internal medicine, **Clinical Research Center,
Dokkyo University School of Medicine

I. はじめに

鉄貯蔵蛋白であるフェリチンが微量ながら血中に存在することがわかり^{1,2)}、各種疾患においてその臨床的意義が注目されるようになった。近年キットの開発が進んで比較的容易に血清フェリチンの測定が可能となり日常の臨床に用いられつつある。今回われわれは Corning 社より開発された強磁性体粒子(鉄・スラリー)³⁾に化学的に固定された抗体を用いて、B/F 分離に磁石を用いる簡単なフェリチン RIA キット(サンドイッチ法)の提供を受け、その基礎的・臨床的検討を行ったので報告する。

II. 研究方法

1. キットの組成

(1) フェリチン抗体 55 ml 1 バイアル
ヤギ抗ヒトフェリチン抗体はウシ血清アルブミ

ンを含んだリン酸緩衝液中に強磁性体粒子を結合させてある。

(2) ^{125}I 標識フェリチン抗体 20 ml 3 バイアル
 ^{125}I でラベルした家兎抗ヒトフェリチン抗体は馬血清および正常家兎血清を含んだリン酸緩衝液中に溶解してある。判別を容易にするために赤色色素が添加されている。おのおののキットは 5 μCi 以下である。

(3) 標準フェリチン溶液

ウシ血清アルブミンを含んだリン酸緩衝液で希釈した 7 種類の濃度(0, 5, 20, 50, 200, 500, 1,000 ng/ml)のヒト脾フェリチン標準液が作成してある。

2. 測定方法

本キットは 2-site immunoradiometric (Sandwich) assay の原理に基づいており、強磁性体粒子に結合したフェリチン抗体と ^{125}I でラベルされたフェリチン抗体を用いて、フェリチン(抗原)と反応させるものである。反応後、強磁性体粒子結合抗体—抗原—標識抗体の複合体が形成され、それをマグネットセパレーターを用いて分離する。

(1) フェリチン抗体 500 μl と ^{125}I 標識フェリチン抗体 500 μl を測定用チューブに分注する。

Key words: Ferritin, Paramagnetic particle, 2-site immunoradiometric (Sandwich) assay.

* 独協医科大学内分泌内科

** 同 臨床共同研究室

受付: 59 年 6 月 11 日

最終稿受付: 59 年 10 月 25 日

別刷請求先: 栃木県下都賀郡壬生町大字北小林 880

(☎321-01)

独協医科大学内分泌内科

鈴木 義信

- (2) 3~4秒間攪拌する。
 - (3) 被検血清およびフェリチン標準血清を 50 μ l ずつ加える。
 - (4) 3~4秒間攪拌する。
 - (5) 37°C で60分間反応させる。
 - (6) マグネチックセパレーター上に3分間放置する。
 - (7) セパレーターを転倒させ、デカンテーションする。
 - (8) 沈渣をガンマカウンターにて計測する。
- フェリチン標準血清より標準曲線を作成し、被検血清のフェリチン値を算出する。

III. 成 績

1. 基礎的検討

- (1) インキュベーション温度、時間および B/F 分離時間の標準曲線への影響

Figure 1 にインキュベーション時間を60分とし、4°C、室温および37°Cで測定した標準曲線を示してある。37°Cにおいて最大結合率を示した。

Figure 2 には、インキュベーション温度を37°Cとし、インキュベーション時間を30, 60, 90, 120分とした標準曲線を示してある。時間経過とともに

に B/T% が高値を示す傾向が認められたが、60, 90, 120分では著差はなかった。

Figure 3 には、37°C、60分の条件において、異なる B/F 分離時間(3, 5, 10分)による標準曲線を示す。いずれもほぼ一致した曲線が得られた。したがって以下の検討はキット指定の37°C、60分のインキュベーションおよび3分の B/F 分離時間にて行った。

(2) 精度・再現性

1) Within run variation (Table 1)

低~高濃度5種類の血清を用い、同一測定内において各12本測定し、mean \pm SD および C.V. (変動係数)を求めた。すべての血清において C.V. は 5% 以下と良好な結果が得られた。

2) Between run variation (Table 1)

低~高濃度5種類の血清を用い、異なる lot 間の測定を8回行った。すべての血清が C.V. 10% 以下を示した。

(3) 回収率

低、中、高濃度(57.9, 139.3, 380.2 ng/ml)の3種類の被検血清にそれぞれ 6.0, 79.3, 769.7 ng/ml の血清を等量ずつ加えて回収率を求めた。Table 2 に示すように回収率 88.9~104.1%，平均 96.9% と良好な結果が得られた。

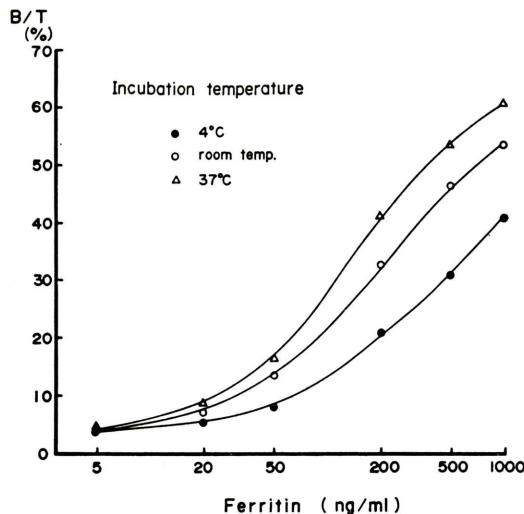


Fig. 1 Effect of incubation temperature on standard curve.

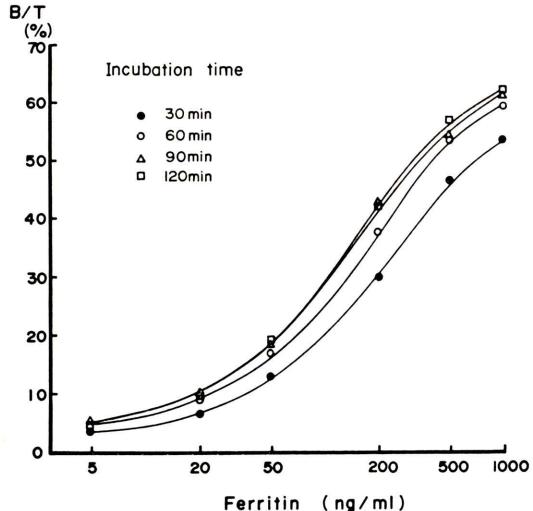


Fig. 2 Effect of incubation time on standard curve.

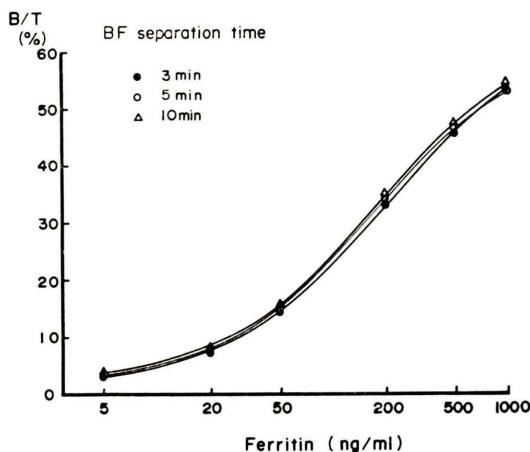


Fig. 3 Effect of separation time on standard curve.

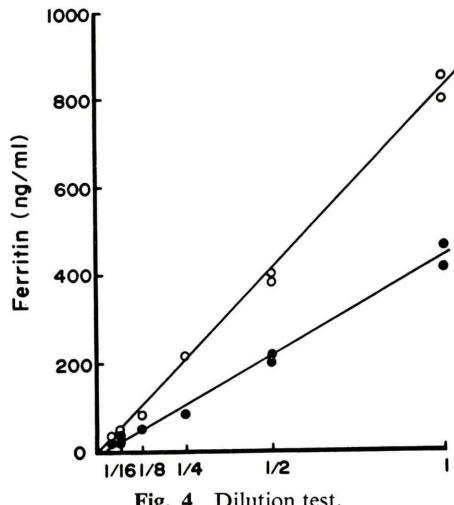


Fig. 4 Dilution test.

Table 1 Precision and reproducibility

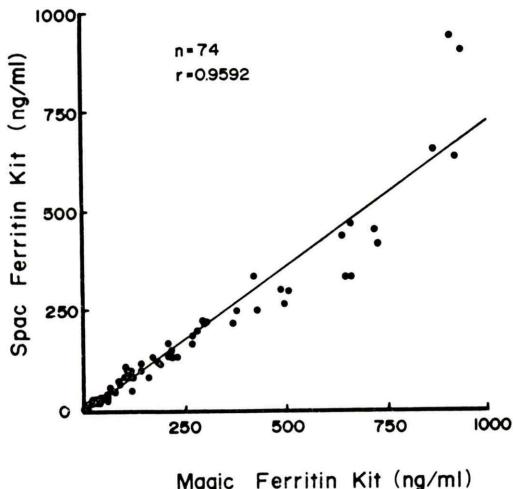
Within run variation		n=12
Sample	Mean \pm SD (ng/ml)	C.V. (%)
A	58.7 \pm 0.9	1.5
B	127.7 \pm 5.9	4.6
C	383.6 \pm 9.2	2.4
#1	7.2 \pm 0.2	2.9
#2	78.3 \pm 1.0	1.3
Between run variation		n=8
Sample	Mean \pm SD (ng/ml)	C.V. (%)
A	56.6 \pm 1.4	2.5
B	130.9 \pm 8.5	6.5
C	377.8 \pm 22.6	6.0
#1	7.1 \pm 0.4	5.5
#2	77.5 \pm 3.4	4.4

(4) 希釈試験

2種類の高濃度血清を標準0濃度血清を用いて、 $1/2 \sim 1/32$ まで希釈測定した。Fig. 4 に示すようにいずれも直線性が認められた。

(5) 他社キットとの相関関係

スパックフェリチンキット(第一ラジオアイソトープ研究所)を用いて、74例の被検血清について本キット測定値との相関を検討した。Fig. 5 に示すように回帰直線 $Y=0.737X-7.924$ 、相関係数 $r=0.9592$ ($p<0.001$) できわめて良好な相関が認められた。

Fig. 5 Correlation between Magnetic Ferritin RIA kit and spac ferritin kit ($p<0.001$).

2. 臨床的検討

正常者51例(男性26、女性25、年齢20~33歳、平均24.5歳)、鉄欠乏性貧血8例、各種肝疾患45例(急性肝炎7、慢性肝炎22、肝硬変症12、原発性肝癌4)、悪性腫瘍41例(胃癌8、総胆管癌8、直腸癌4、肺癌3、甲状腺癌7、その他の悪性腫瘍11)の計145例について、本キットを用いて血清フェリチン値の測定を行った。その結果を Figs. 6, 7 に示す。

Table 2 Recovery test

Recovery study

Sample	Added sample	Expected value	Measured value	Recovery (%)
57.9 ng/ml	6.0 ng/ml	32.0 ng/ml	30.5 ng/ml	95.3
	79.3	68.6	66.1	96.4
	769.7	413.8	404.9	97.8
139.3 ng/ml	6.0	72.6	67.3	92.7
	79.3	109.3	97.1	88.9
	769.2	454.5	452.7	99.6
380.2 ng/ml	6.0	193.1	184.3	95.4
	79.3	229.8	239.4	104.1
	769.7	574.9	585.0	101.7
Mean recovery 96.9 (%)				

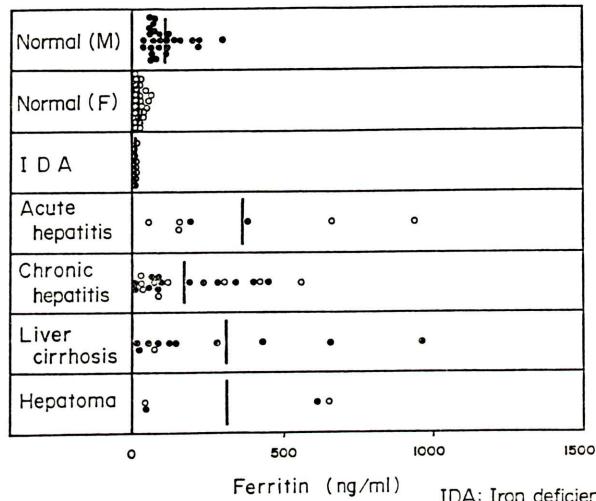


Fig. 6 Serum Ferritin values in normal subjects and in patients with various hepatic diseases.

(1) 正常値

今回は健常者として20~30歳代の比較的若い年齢層を用いたが、本キットにおける血清フェリチン値の正常値は、男性 106.2 ± 65.6 ($M \pm SD$) ng/ml、女性 17.7 ± 15.8 ng/ml であった。また最低濃度は 0.6 ng/ml であった。

(2) 各種疾患における血清フェリチン値

鉄欠乏性貧血女性 8 例の血清フェリチン値は 4.4 ± 3.1 ng/ml と全例が健常者に比して著明に減少していた。

肝疾患45例では、急性肝炎男性 286.7 ng/ml、女

性 392.2 ± 388.1 ng/ml、慢性肝炎男性 151.3 ± 126.1 ng/ml、女性 170.6 ± 195.0 ng/ml、肝硬変症男性 330.2 ± 348.6 ng/ml、女性 71.8 ng/ml、原発性肝癌男性 284.9 ng/ml、女性 344.9 ng/ml であった。Fig. 6 に男女別血清フェリチン値を示した。急性肝炎、肝硬変症では女性全例に高値が認められた。原発性肝癌では男女ともに 2 例中 1 例に高値が認められた。

各種悪性腫瘍については、胃癌男性 92.36 ± 105.4 ng/ml、女性 369.3 ng/ml、総胆管癌男性 617.4 ± 226.9 ng/ml、女性 $1,563.7 \pm 1,015.6$ ng/ml、直腸癌

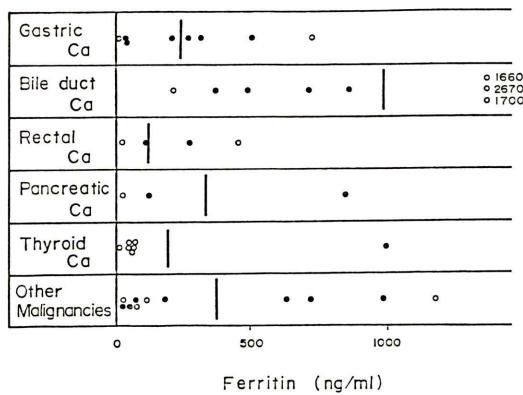


Fig. 7 Serum Ferritin values in patients with various malignant tumors.

男性 191.3 ng/ml, 女性 20.7 ng/ml, 膵癌男性 493.9 ng/ml, 女性 20.7 ng/ml, 甲状腺癌男性 1,028.2 ng/ml, 女性 54.6 ± 24.6 ng/ml であった。Fig. 7 に男女別に血清フェリチン値を示した。中でも総胆管癌に 1,660, 2,679, 1,700 ng/ml と測定感度以上の異常高値が認められた。その他、食道癌 2 例、乳癌、肺癌、子宮癌、悪性リンパ腫、慢性骨髄性白血病、副腎腫瘍 1 例について測定したが、正常範囲から異常高値を示すものまで広範囲に及んでいた。

IV. 考 察

本キットは抗体と強磁性体粒子を結合させており、反応時間が短く、また B/F 分離の際に遠心操作を行わずマグネチックセパレーターを用いて分離させるものである。このため操作が簡便で短時間で行える利点を有している。

基礎的検討では、キット指定のインキュベーション温度 (37°C), 時間 (60分) および B/F 分離時間 (3 分) において精度・再現性もよく、また回収率・希釈試験でも良好な結果が得られた。他社キットとの比較でも良好な相関が認められた。

臨床的検討では、正常値男性 106.2 ± 65.6 ng/ml, 女性 17.7 ± 15.8 ng/ml で正常上限を男性 230 ng/ml, 女性 50 ng/ml とした。従来の報告どおり男女差が認められた^{4~6}。新津ら⁷は 40 歳後半より女性の正常値が上昇し男女差が少なくなるとして

いるが、われわれが用いた対象は 20~30 歳代の若い年齢であった。

鉄欠乏性貧血では全例が 10 ng/ml 以下の低値を示し、組織内貯蔵鉄の欠乏を反映し診断的意義があるものと考えられた。

肝疾患では、肝実質細胞の破壊から肝フェリチンが血中に動員され血中フェリチン値が上昇すると言われているが⁸、今回の検討でも上昇傾向が認められた。特に女性の急性肝炎では全例に高値を認めた。また原発性肝癌でも 50% に高値を認め、血清フェリチン値のみでは良性疾患と悪性疾患の鑑別はできなかった。中野らの報告⁹にあるように他の腫瘍マーカー (AFP, CEA など) の同時測定により悪性腫瘍との鑑別がある程度できるものと思われ、今後検討していきたいと考えている。

各種悪性腫瘍でも血清フェリチン値の上昇が認められ、とくに総胆管癌では異常高値を含めて全例が上昇していた。胃癌、脾癌でも 50% に上昇が認められた。腫瘍特異性という点では血清フェリチンは不十分であるが、腫瘍マーカー (Tumor marker) としての診断的意義はあるものと思われた。

V. おわりに

Corning 社製フェリチン RIA キットは操作方法が簡便で短時間で行い得、その基礎的・臨床的成績から日常臨床に十分応用可能であることを示した。

謝辞：なお、フェリチンキットを提供いただいた Corning 社に謝意を表わします。

文 献

- 1) 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 overload. *J Clin Pathol* 39: 326-335, 1972
- 2) 漆崎一朗：血液における ferritin の意義。日本血液学会誌 39: 571-583, 1976
- 3) Pourfarzaneh M, Sandy K, Johnson C, et al: Production and use of magnetizable particles in immunoassay. *The Ligand Quarterly* 5 (1):

41-47, 1982

- 4) 白石正孝, 杉原ゆう子, 永原慶子, 他: 各種疾患における血清フェリチン値測定の意義. 臨床検査 **28** (4): 453-457, 1984
- 5) 倉根理一, 宮崎 保, 若田朝子, 他: スパックフェリチンキットの基礎的ならびに臨床的研究. 臨床血液 **21** (3): 308-319, 1980
- 6) 斎藤 宏, 石川 薫: フェリチン. 日本臨床 **40**: 秋季臨時増刊号: 90-92, 1982

- 7) 新津洋司郎, 小関純一, 渡辺直樹, 他: 血清 ferritin による潜在性鉄欠乏状態の診断. 臨床研究 **20**: 1-7, 1979
- 8) 金子 昭, 久保保彦, 長崎嘉和, 他: 原発性肝細胞癌および肝硬変における血清フェリチンの臨床的意義. 肝臓 **21** (6): 87-94, 1980
- 9) 中野 哲, 太田博郷, 熊田 卓, 他: 肝悪性腫瘍における Tumor marker としての血清フェリチン測定の臨床的意義. 臨床薬理 **9**: 1629-1633, 1980