

《技術報告》

新標準試料を用いた Non boil radioassay による 血清ビタミン B₁₂・葉酸の測定

石渡 幸久* 槌居 敬志* 遠藤 紀子* 池田 律子*
安田 和人*

要旨 血清にアルカリを加え内因子性結合タンパクを変性させることによって解離させ、磁性鉄微粒子にコーティングした結合蛋白(精製ブタ内因子, 精製牛乳葉酸結合蛋白)を用いて磁力で B/F 分離を行う non boil 法の測定値は従来の boil 法より低値を示すことが知られており, 問題となっている. そこでわれわれは新標準試料を用いた non boil 法における血清ビタミン B₁₂, 葉酸の測定精度を検討し, 従来の標準試料を用いた non boil 法ならびに boil 法との比較を行い, 特に葉酸測定の検討に重点を置いて検討した. そこでわれわれは non boil 法の測定精度ならびに正常値について boil 法と比較した.

1. 新標準試料を用いた non boil 法の同時再現性は, ビタミン B₁₂ で CV 4.5±2.5%, 葉酸 3.5±0.2% と良好であった.
2. CN-Cbl, 局方葉酸による回収試験は新標準試料を用いた non boil 法でビタミン B₁₂: 95.2~99.0%, 葉酸: 101.0~108.0% であり, 従来の non boil 法の回収率(ビタミン B₁₂: 99.4~100.6%, 葉酸: 100.8~101.8%)と同等であった. しかし 5-CH₃-H₄-葉酸による回収率は新標準試料を用いた non boil 法で 101.0~104.0% と従来の non boil 法の 60.0~94.5% に比較して良好な成績が得られた.
3. 新標準試料を用いた non boil 法と boil 法との相関はビタミン B₁₂: $r=0.987$, $y=0.97x+73.59$, 葉酸: $r=0.932$, $y=1.02x-0.08$ であり, 両測定値は一致した. また血清葉酸において *Lactobacillus casei* による microbioassay との相関は $r=0.984$, $y=1.10x+2.87$ であり, 良好な相関が得られた.
4. 新標準試料を用いた non boil 法による血清ビタミン B₁₂ の正常値は 210~920 pg/ml, 血清葉酸の正常値は 2.5~9.2 ng/ml であり, 従来の boil 法の正常値と一致した.
5. 本標準試料を用いた non boil 法は正確に血清ビタミン B₁₂, 葉酸濃度を測定していると考え, 正常値として, 正確であると思われた.

(核医学 31: 619-627, 1994)

I. 緒 言

巨赤芽球性貧血の主要な病因にはビタミン B₁₂ 欠乏と葉酸欠乏があり, 両者の鑑別には血清ビタミン B₁₂ および葉酸の測定が必須である. また先

天性トランスコバラミン II 欠損症¹⁾, 5-メチル-H₄メチルトランスフェラーゼ欠損症²⁾では巨赤芽球性貧血がみられるにも関わらず, 低ビタミン B₁₂ 血症または低葉酸血症をきたすことがない. 両ビタミンは摂取不足による欠乏は少ないが, 薬剤の影響すなわちコルチヒン, ネオマイシン, 大量のビタミン C³⁾ が血清ビタミン B₁₂ 値, ジフェニルヒダントイン等の抗けいれん薬⁴⁾ が血清葉酸を低下させることが知られている. さらに慢性骨髄性白血病, 真性多血症, 肝障害では高ビタミン B₁₂

* 帝京大学医学部臨床病理学教室

受付: 6 年 1 月 10 日

最終稿受付: 6 年 3 月 29 日

別刷請求先: 東京都板橋区加賀 2-11-1 (☎ 173)

帝京大学医学部附属病院中央検査部

石渡 幸久

血症をきたし、特に慢性骨髄性白血病が疑われた場合には血清ビタミン B₁₂ の測定が有用と考えられている^{3,5)}。したがって血清ビタミン B₁₂ と葉酸の両者の測定が必要な症例は多く、そのような場合に最近ではもっぱら non boil radioassay による血清ビタミン B₁₂、葉酸同時測定が用いられることが多い。一般に葉酸測定の標準法として用いられてきた *Lactobacillus casei* (Lacto. casei) による microbioassay は生物活性のある物質を測定し、radioassay と測定範囲が異なることが知られている。さらに radioassay においても non boil 法の葉酸値は boil 法に比較し低値を示すことが知られており、血清中の葉酸結合タンパクの解離方法の違いによって正常値が異なることが問題となっている。そこでわれわれは新標準試料を用いた non boil 法における血清ビタミン B₁₂、葉酸の測定精度を検討し、従来の標準試料を用いた non boil 法ならびに boil 法との比較を行い、特に葉酸測定の検討に重点を置いて検討した。

II. 実験方法

1. 対象

血液学および血液化学検査に異常を認めなかった病院職員 259 名 (男性: 114, 女性: 145) ならびに血液疾患、肝疾患の入院・外来患者 42 名を対象とした。

2. 方法

1) Non boil 法

測定試薬は M-ビタミン B₁₂/葉酸 (コーニング) 測定キットを用いた。測定方法は血清 200 μ l ずつ試験管に取り dithiothreitol 混合トレーサ (⁵⁷Co 標識ビタミン B₁₂ および ¹²⁵I 標識ヨウ化チラミン化葉酸混合液) を加え 15 分放置後、さらに NaOH を加えて 15 分間放置し、血清中の結合タンパクを変性させビタミン B₁₂ を解離させる。次に精製ブタ内因子および精製牛乳葉酸結合蛋白をコーティングした磁性鉄微粒子を加えて 1 時間インキュベートし、検体中のビタミン B₁₂、葉酸を競合的に反応させ、磁石を用いて B/F 分離し、上清を除去した後、磁性微粒子に結合している

⁵⁷Co 標識ビタミン B₁₂、¹²⁵I 標識ヨウ化チラミン化葉酸を核種により放出される放射線スペクトルの異なることを利用し、 γ カウンターによりおのおのを測定して検量線からそれぞれの量を算出するものである。

2) 新標準試料

non boil 法を boil 法と比較するとビタミン B₁₂ は両法とも同じ測定値が得られるのに対し、葉酸は前者が低値を示すことが知られている⁸⁾。これを補正するために両法の測定値の相関を求め、その回帰式を用いて boil 法の値に一致させるよう標準試料を調整したものを新標準試料 (コーニング) とした (補正係数は明記されていない)。

また boil 法として B₁₂/葉酸ラジオアッセイキット immophase (コーニング) を用いた。

III. 実験結果

1. 新標準試料を用いた non boil 法の基礎的検討

(1) 再現性

3 種類の濃度の血清について同時再現性 (n=10) を検討した。ビタミン B₁₂ は $CV=4.5\pm2.5\%$ 、葉酸: $3.5\pm0.2\%$ 、また日差再現性 (n=7) は、ビタミン B₁₂: $CV=9.2\pm1.2\%$ 、葉酸: $9.3\pm1.0\%$ となった (Table 1)。

(2) 希釈直線性

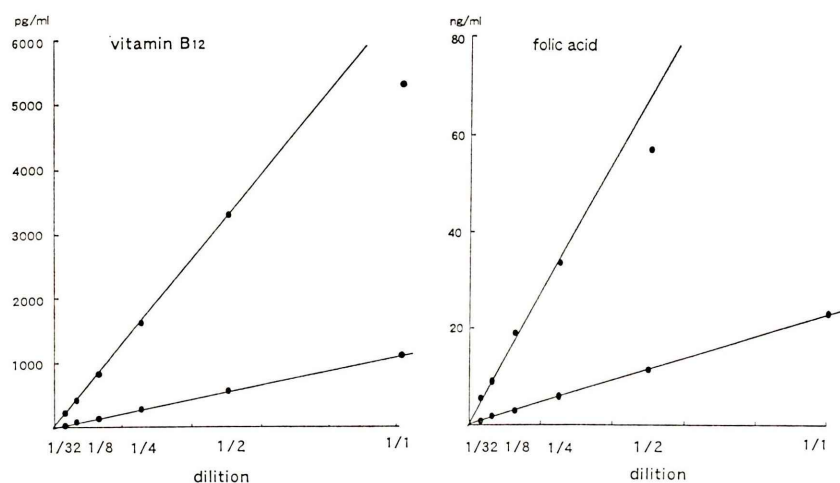
ビタミン B₁₂ および葉酸が高濃度の検体について希釈直線性を測定した。血清を 0 濃度標準試料で各段階に希釈し測定したところ、原点を通る直線となり、ビタミン B₁₂ は、3,300 pg/ml、葉酸は 37 ng/ml まで直線性が確認された (Fig. 1)。

(3) 添加回収試験

正常血清に局方シアノコバラミン (CN-Cbl) および局方葉酸 (PteGlu) を加えて添加回収試験を試みた。ビタミン B₁₂ の回収率は 95.2~99.0%、葉酸は 101.0~108.0% であった。また血清中の主な存在型であるメチルコバラミン (CH₃-Cbl) および 5-CH₃-H₄-葉酸を加えた回収試験を行った結果、CH₃-Cbl は 95.6~103.5%、5-CH₃-H₄-葉酸は 101.0~104.0% と良好な成績であった (Table 2)。

Table 1 Precision on measurement of serum vitamin B₁₂ and folic acid

| | vitamin B ₁₂ (pg/ml) | | | folic acid (ng/ml) | | |
|----------|---------------------------------|------|---------|--------------------|------|----------|
| | mean | S.D. | C.V.(%) | mean | S.D. | C.V. (%) |
| A (n=10) | 875.8 | 22.3 | 2.5 | 13.37 | 0.44 | 3.3 |
| B (n=10) | 306.8 | 12.0 | 3.9 | 6.60 | 0.23 | 3.4 |
| C (n=10) | 165.3 | 12.0 | 7.3 | 3.86 | 0.14 | 3.7 |

**Fig. 1** Linearity of serum vitamin B₁₂ and folic acid.**Table 2** Recovery test of serum vitamin B₁₂ and folic acid

| vitamin B ₁₂ (added CN-Cbl) | | | folic acid (added pteroylglutamic acid) | | |
|--|---------------|--------------|--|---------------|--------------|
| added (pg/ml) | found (pg/ml) | recovery (%) | added (ng/ml) | found (ng/ml) | recovery (%) |
| 0 | 271 | — | 0 | 2.5 | — |
| 250 | 509 | 95.2 | 2.5 | 5.2 | 108.0 |
| 500 | 756 | 97.0 | 5.0 | 7.7 | 104.0 |
| 1000 | 1261 | 99.0 | 10.0 | 12.6 | 101.0 |
| vitamin B ₁₂ (added CH ₃ -Cbl) | | | folic acid (added 5-CH ₃ -H ₄ -pteGlu) | | |
| added (pg/ml) | found (pg/ml) | recovery (%) | added (ng/ml) | found (ng/ml) | recovery (%) |
| 0 | 243 | — | 0 | 5.0 | — |
| 250 | 482 | 95.6 | 2.5 | 7.6 | 104.0 |
| 500 | 752 | 101.8 | 5.0 | 10.2 | 104.0 |
| 1000 | 1278 | 103.5 | 10.0 | 15.1 | 101.0 |

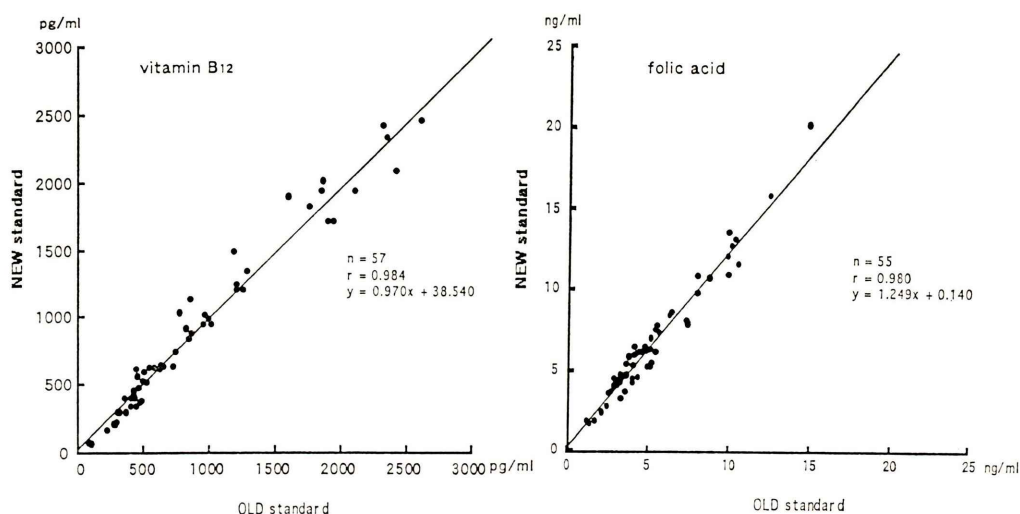


Fig. 2 Correlation between "Old" and "New" standard by non boil method on serum vitamin B₁₂ and folic acid.

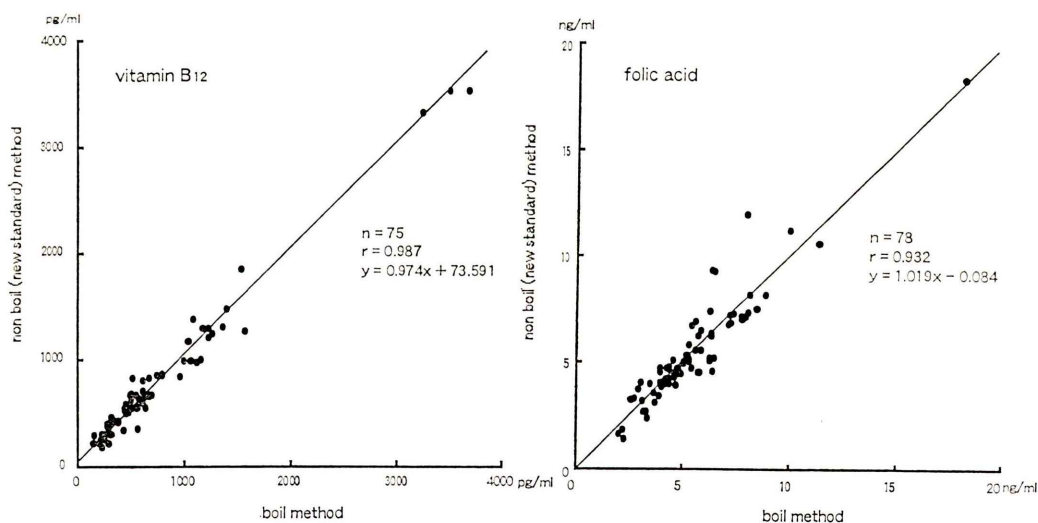


Fig. 3 Correlation between boil and non boil (New standard) method on serum vitamin B₁₂ and folic acid.

(4) 相 関 性

日常検体を用いて新標準試料を用いた non boil 法と従来の non boil 法および boil 法との相関について検討した。従来および新標準試料を用いた non boil 法どうしの相関はビタミン B₁₂ : $r=0.984$, $y=0.97x+38.54$ ($n=57$), 葉酸 : $r=0.980$,

$y=1.25x+0.14$ ($n=55$) となった (Fig. 2).

また boil 法と新標準試料を用いた non boil 法との相関はビタミン B₁₂ : $r=0.987$, $y=0.97x+73.59$ ($n=75$), 葉酸 : $r=0.932$, $y=1.02x-0.08$ ($n=78$) となった (Fig. 3).

さらに健常者に局方葉酸 20mg 経口投与した血

清を用いて Lact. casei による microbioassay と新標準試料を用いた non boil 法による血清葉酸の相関は $r=0.984$, $y=1.099+2.870$ ($n=8$) となった (Fig. 4).

2. 正常値

当院職員のうち血液学, 血液化学検査で異常を認めなかった者から定期検診時採取した血液を用いて, 血清ビタミン B₁₂, 葉酸を測定した. 新標準試料を用いた non boil 法による血清ビタミン B₁₂ の正常値は 210~920 (484 ± 160) pg/ml ($n=259$, 男性 114, 女性 145) であり, また血清葉酸の

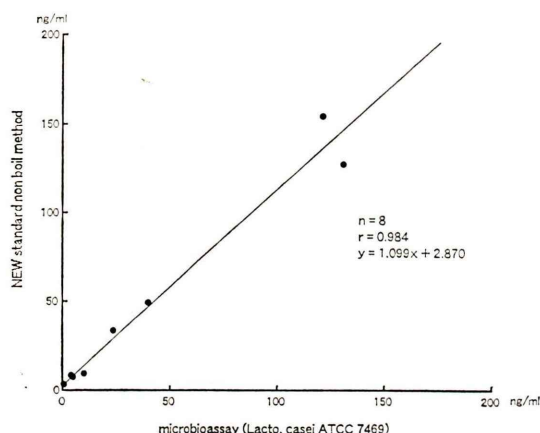


Fig. 4 Correlation between microbioassay and non boil (New standard) method on serum folic acid.

正常値は 2.5~9.2 (5.2 ± 1.4) ng/ml ($n=257$, 男性 113, 女性 144) となった. 測定値の分布はビタミン B₁₂, 葉酸ともに対数正規型を示した. 性差は認められなかった (Fig. 5).

3. 臨床的検討

血液疾患, 肝疾患などを対象として, 血清ビタミン B₁₂ および葉酸濃度を測定した. 血清ビタミン B₁₂ 濃度については血液疾患では, 急性リンパ性白血病は 1083 ± 869 pg/ml ($n=4$), 非ホジキンリンパ腫は 2097 ± 1166 pg/ml ($n=4$) と正常値より高値を示した. 鉄欠乏性貧血は 620 ± 139 pg/ml ($n=8$) とほぼ全例が正常領域内の値を示したが, ビタミン B₁₂ が高値を示した症例が 1 例あった. 急性骨髄球性白血病の 2 例は 2,157 および 233 pg/ml であった. 慢性骨髄球性白血病の 1 例は 1,436 pg/ml であった. 肝疾患では肝硬変は 2601 ± 1764 pg/ml ($n=10$), 慢性肝炎は 658 ± 343 pg/ml ($n=10$) であり, 肝硬変は 10 例中 9 例が高値を示した. 血清葉酸濃度については血液疾患では急性リンパ性白血病では 10.50 ± 7.24 ng/ml ($n=4$) と高値を示した. 非ホジキンリンパ腫は 4.54 ± 2.31 ng/ml ($n=4$) と正常領域内であった. 鉄欠乏性貧血は 6.18 ± 3.02 ng/ml ($n=8$) とほぼ全例が正常領域内の値を示した. 急性骨髄球性白血病の 2 例は 6.34 および 5.28 ng/ml であった. 慢性骨髄球性白血病の 1 例は 3.57 ng/ml であった. 肝疾患では, 肝硬変は 8.77 ± 4.03 ($n=10$), 慢

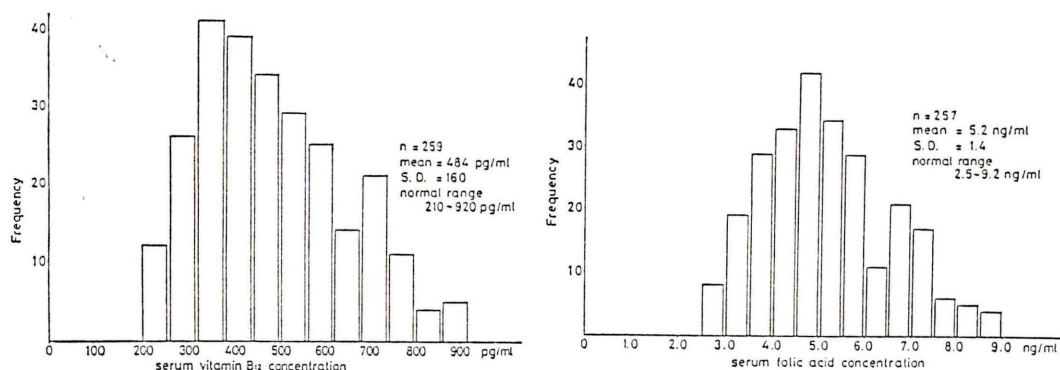


Fig. 5 Histogram of serum vitamin B₁₂ and folic acid concentration by non boil (New standard) method in normal subjects.

Table 3 Content of vitamin B₁₂ and folic acid in serum from normal individuals and patients with various diseases

| Diseases | n | Vitamin B ₁₂ | Folic acid |
|-----------------------------|-----|-------------------------|-----------------------|
| | | Serum M±SD (pg/ml) | Serum M±SD (ng/ml) |
| Normal subject | 259 | 484 ± 160 | 5.20 ± 1.40 |
| Iron deficiency anemia | 8 | 620 ± 139 | 6.18 ± 3.02 |
| Acute lymphocytic leukemia | 4 | 1083 ± 869 | 10.50 ± 7.24 |
| Acute myelocytic leukemia | 2 | 2157, 233 | 6.34, 5.28 |
| Chronic myelocytic leukemia | 1 | 1436 | 3.57 |
| non Hodgkins disease | 4 | 2097 ± 1166 | 4.54 ± 2.31 |
| Chronic hepatitis | 10 | 658 ± 343 | 8.88 ± 5.41 |
| Liver cirrhosis | 10 | 2601 ± 1764 | 8.77 ± 4.03 |

性肝炎では 8.88 ± 5.41 ng/ml ($n=10$) とどちらも高値を示したが、慢性肝炎のうち 4 例は正常領域内であった (Table 3)。

IV. 考 察

⁵⁷Co 標識ビタミン B₁₂, ¹²⁵I 標識葉酸を加えた後、アルカリ変性によって試料中のビタミン B₁₂, 葉酸結合タンパクを変性させる。次に磁性鉄微粒子をコーティングさせた精製ブタ内因子、精製牛乳葉酸結合タンパクを加えて radioassay により血清ビタミン B₁₂, 葉酸を同時測定する non boil 法は測定キットが市販されており、試料に放射性同位元素を加えて 15 分煮沸する過程を含む boil 法に比較して汚染の恐れが少なくかつ操作が簡便であるとして、広く利用されている。

再現性について山田ら⁶⁾は boil 法でビタミン B₁₂: 6.0~7.6%, 葉酸: 8.4~8.7%, 木原ら⁷⁾は同じく boil 法でビタミン B₁₂: 3.7~5.3%, 葉酸: 3.1~6.8% と報告している。新標準試料を用いた non boil 法はビタミン B₁₂: 2.5~4.4%, 葉酸: 3.3~3.7% とほぼ同等の数値が示された。すなわち、non boil 法と boil 法は再現性の点では大差がないと考えられた。

回収試験について、従来の non boil 法を用い

て葉酸の主な血清中の存在型である 5-CH₃-H₄-葉酸による回収試験では 2.25 ng 添加で 94.5% と良好であるのに対し、10.0 ng 添加では 60.0% と低値を示したとの報告⁸⁾があるが、新標準試料を用いた non boil 法の回収率は 2.5~10.0 ng/ml の添加で 101.0~104.0% と安定した成績が得られた。また CN-Cbl や局方葉酸による回収試験はビタミン B₁₂: 95.2~99.0%, 葉酸: 101.0~108.0% と boil 法に比べて同様な成績が得られた。

従来の標準試料と新標準試料を使用した non boil 法間での相関はビタミン B₁₂ について $r=0.984$, $y=0.97x+30.54$ ($n=57$) であり、低、中、高濃度ともにほぼ一致した成績が得られたが、葉酸については $r=0.980$, $y=1.25x+0.14$ ($n=55$) と高濃度検体において新標準試料を用いたものが高値を示す結果となった。また boil 法と新標準試料を用いた non boil 法との相関は、ビタミン B₁₂ で $r=0.987$, $y=0.97x+73.59$ ($n=75$), 葉酸で $r=0.932$, $y=1.02x-0.08$ ($n=78$) と良好な成績を得た。すなわち boil 法、新標準試料を用いた non boil 法はほぼ一致した測定値が得られるものと考えられた。また葉酸測定において標準法である Lacto. casei を用いた microbioassay との相関は、 $r=0.984$, $y=1.099x+2.878$ と新標準試料を用い

た non boil 法が若干高値を示したが、使用した血清は PteGlu 20 mg 経口投与後のものであり、すなわち血清総葉酸濃度に PteGlu の占める割合が多いことが示唆され、よって PteGlu よりも CH₃-H₄-葉酸に感受性が高いとされる Lacto. casei が実際の総葉酸値よりも低値を示したことが考えられた。

ビタミン B₁₂ の正常値は、microbioassay で奥田ら⁹⁾によれば 168~612 pg/ml、田中¹⁰⁾によれば 385~638 pg/ml と多数の報告がある。radioassay では内因子を結合タンパクとし、B/F 分離に炭素末を用いたものは Kolhouse ら¹¹⁾により 136~656 pg/ml、固相法で同じく精製ブタ内因子を用いた例は Osifo ら¹²⁾により 655±251 pg/ml、そのほか、R タンパクを結合タンパクに用いた場合は Kolhouse ら¹¹⁾により 282~1,064 pg/ml と報告されている。また従来の non boil 法の正常値は安田ら⁶⁾により 229~847 (465±155) pg/ml と報告されており、新標準試料を用いた non boil 法の正常値：210~920 (484±160) pg/ml と従来の radioassay と大差がなかった。

血清葉酸の正常値は microbioassay で Herbard¹³⁾により 7.5~24.0 ng/ml、Cooper¹⁴⁾により 4.0~18.0 ng/ml、radioassay のうち boil 法では山田ら⁷⁾により 4.6~9.8 ng/ml、満間ら¹⁵⁾により 2.4~8.4 ng/ml と報告されている。新標準試料を用いた non boil 法の正常値は 2.5~9.2 (5.2±1.4) ng/ml であり、安田ら⁶⁾による従来の non boil 法の正常値：2.34~7.08 (4.23±1.19) ng/ml に比べて高値を示した。これはすでに述べたように 5-CH₃-H₄-葉酸による回収率が従来の標準試料を用いた non boil 法に比較して良好な成績が得られたためと考えられ、正常値としてもより正確な値であると思われる。

ビタミン B₁₂ または葉酸の欠乏の検査所見として大球性高色素性貧血が比較的早期に出現することは広く知られており、従来はまず、血液学的検査によって異常が見いだされ、血中ビタミンの測定は病因の確認に用いることが多かった。しかし血液学的検査によって両者を鑑別することは難し

く、葉酸の欠乏よりビタミン B₁₂ の欠乏症が比較的頻度が高いため、まずビタミン B₁₂ が測定される。そのため葉酸代謝の検討が後回しになったり、時には欠乏が見落とされる恐れがある。そこで、両者の測定を同時または短時間に行うことは臨床上意義があると考えられる。

血液疾患における血清ビタミン B₁₂ 測定成績については、高ビタミン B₁₂ 血症をきたす血液疾患として急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病などがあげられるが、われわれの成績も同様であった。非ホジキンリンパ腫では低値を示すとの報告があるが、われわれの症例では高値を示すものが多かった。肝疾患ではビタミン B₁₂ は肝実質細胞からの逸脱により高値を示すことが知られており、われわれの成績も同様で肝硬変で高値を示した。

血清葉酸濃度については、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病などで低値を示すとの報告¹³⁾もあるが、われわれの症例では高値を示すものが多かった。また非ホジキンリンパ腫では低値を示すとの報告¹³⁾もあるが、われわれの症例では高値を示すものが多かった。また肝疾患では減少傾向をきたすとの報告¹⁶⁾もあるが、われわれの症例では肝硬変で高値を示していた。

V. 結 論

血清にアルカリを加え内因子性結合タンパクを変性させることによって解離させ、磁性鉄微粒子にコーティングした結合蛋白（精製ブタ内因子、精製牛乳葉酸結合蛋白）を用いて磁力で B/F 分離を行う non boil 法により、boil 法との相関の回帰式により boil 法の値に近づけるよう標準物質を設定したものと従来の non boil 法および boil 法と比較した。

1. 新標準試料を用いた non boil 法の同時再現性はビタミン B₁₂ で CV 4.5±2.5%、葉酸 3.5±0.2% と良好であった。

2. CN-Cbl、局方葉酸による回収試験は新標準試料を用いた non boil 法でビタミン B₁₂ : 95.2~

99.0%, 葉酸: 101.0~108.0% であり, 従来の non boil 法⁸⁾ の回収率 (ビタミン B₁₂: 99.4~100.6%, 葉酸: 100.8~101.8%) と同等であった. しかし 5-CH₃-H₄-葉酸による回収率は新標準試料を用いた non boil 法で 101.0~104.0% と従来の non boil 法⁸⁾ の 60.0~94.5% に比較して良好な成績が得られた.

3. 新標準試料を用いた non boil 法と boil 法との相関はビタミン B₁₂: $r=0.987$, $y=0.97x+73.59$, 葉酸: $r=0.932$, $y=1.02x-0.08$ であり, 両測定値は一致した. また血清葉酸において Lacto. casei による microbioassay との相関は $r=0.984$, $y=1.10x+2.87$ であり, 良好な相関が得られた.

4. 新標準試料を用いた non boil 法による血清ビタミン B₁₂ の正常値は 210~920 pg/ml, 血清葉酸の正常値は 2.5~9.2 ng/ml であり, 従来の boil 法の正常値と一致した.

文 献

- 1) Barshop BA, Wolff J, Nyhan WL, Aprodanos C, Jones G: Transcobalamin II deficiency presenting with methylmalonic aciduria and homocystinuria and abnormal absorption of cobalamin. *Am J Med Genet* **35**: 222-228, 1990
- 2) Herbert V: Symposium on folic acid deficiency. *Proceedings of the royal society of medicine* **57**: 13-20, 1964
- 3) 田中信夫: 葉酸, 内野治人, 外林秀紀編, 科学評論社, 東京, 1975, pp. 149-173
- 4) Rothenberg SP, deCosta M, Lawson J, Rosenberg Z: The determination of erythrocyte folate concentration using a Two-Phase Ligand-Binding radioassay. *Blood* **43**: 437, 1974
- 5) 近藤春樹, 奥田邦雄: ビタミン B₁₂. *日本臨床* **43** (秋季臨時増刊): 401-404, 1985
- 6) 山田秀雄, 前田秀明, 加藤泰治, 大西一功, 加納孝子: B₁₂/葉酸ラジオアッセイキット immophase (コーニング) による B₁₂・葉酸の同時測定. *医学と薬学* **12** (2): 443-453, 1984
- 7) 木原数弘, 中村宏紀, 坂田裕行, 杉村英一, 佐藤邦夫, 角田新一, 他: 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** (2): 233-244, 1985
- 8) 安田和人, 石渡幸久, 池田律子: Non boil radiodilution assay による血清ビタミン B₁₂・葉酸同時測定法の基礎的並びに臨床的検討. *ビタミン* **64**: 567-577, 1990
- 9) 奥田邦雄, 内山幸信: ビタミン B₁₂. *日本臨床* **40** (秋季臨時増刊): 334-337, 1982
- 10) 田中信夫: ビタミン学実験法 [II], ビタミン学会編, 東京化学同人, 東京, 1985, pp. 242-246
- 11) Kolhouse JF, Kondo H, Allen NC, Podell E, Aleen RH: Cobalamin analogues are present in human plasma and can mask cobalamin deficiency because current radioisotope dilution assays are not specific for true cobalamin. *New Engl J Med* **299**: 785, 1978
- 12) Osifo BOA, Ehigie-Osifo EM, Parmentie Y, Gerard P, Nicolas JP: Serum unsaturated vitamin B₁₂ proteins in adult patients with sickle cell anaemia. *Acta Haemat* **81**: 117-121, 1989
- 13) Herbert V, Zalusky R: Interrelations of vitamin B₁₂ and folic acid metabolism, Folic acid clearance studies. *J Clin Invest* **41**: 1263-1276, 1962
- 14) Cooper BA, Lowenstein L: Evaluation of assessment of folic acid deficiency by serum folic acid activity measured with L. casei. *Canad MA* **28** (58): 967-988, 1961
- 15) 満間照典, 野木森剛, 中尾直樹, 加藤珠子: Radioassay 法による血清 vitamin B₁₂, folate の測定. *医学と薬学* **9** (6): 1873-1888, 1983
- 16) 田中信夫, 稲葉 敏, 坂戸秀吉, 山崎泰範, 山田尚, 鈴木英史, 他: Radioassay 法による血中ビタミン B₁₂ および葉酸同時測定法の基礎的・臨床的検討. *核医学* **22** (6): 929-938, 1985

Summary

Determination of Serum Vitamin B₁₂ and Folic Acid by Non Boil (New Standard) Radioassay

Yukihisa ISHIWATA, Keiji TUCHII, Noriko ENDO,
Ritsuko IKEDA and Kazuto YASUDA

Department of Clinical Pathology, Teikyo University School of Medicine

On purpose to study the radioassay of serum vitamin B₁₂ and folic acid using non boil methods in with these two vitamins were released from their endogenous binding proteins with alkalin denaturation and separated the bound vitamins from the free ones with the magnetic iron particles coated these vitamin binders (purified hog intrinsic factor and β -lactoglobulin from cow milk) were evaluated on precision and accuracy, compared with boil radioassay.

1. The reproducibilities of non boil method were $4.5 \pm 2.5\%$ on vit. B₁₂ and $3.5 \pm 0.2\%$ on folate (n=10), respectively.

2. The recovery test of the two serum vitamins with the use of cyanocobalamin and pteroylglutamic acid (J.P.) were finely showed the ratios of 95.2–99.0% for vit. B₁₂ and 101.0–108.0% for folic acid. And that of folic acid use of 5-methyl-

tetrahydropteroylglutamic acid was showed the ratios of 101.0–104.0%. The values of folic acid measured by this method were found slightly higher than non boil method using conventional standard.

3. The correlation coefficient between non boil method and boil method were 0.987 and regression equation was showed $y = 0.97x + 73.59$ for vit. B₁₂ (n=75) and $r = 0.932$, $y = 1.02x - 0.08$ (n=78) for folic acid.

4. Normal range of serum total vit. B₁₂ concentration was 210–920 (484 ± 160 pg/ml, n=259) and that of folic acid was 2.5–9.2 (5.2 ± 1.4 ng/ml, n=257), as well as boil method.

5. Accordingly it was considered that non boil (new standard) method was excellent for estimation of vitamin B₁₂ and folic acid clinical status.

Key words: Vitamin B₁₂, Folic acid, Non boil method, Radioassay.