放射性鉄 ^{59}Fe を用いる血清総鉄結合能測定に関する検討

刈米重夫, 佐藤道明, 藤森克彦, 三木昌宏, 内田立身, 脇坂行一, 中島言子*

京都大学医学部内科一講座

*京都大学医学部附属病院中央放射線部

1973年 6月14日 受理

血清を弱酸性液中で鉄を遊離せしめ, レジンにこれを吸着して除去したのち, ^{59}Fe 標識鉄を一定量加えて, 血清総鉄結合能を測定する, 第一ラジオアイソトープ研究所の TIBC Kit について検討した。

クエン酸にて血清中の鉄を遊離してレジンに吸着除去する脱鉄試薬は, きわめて安定した鉄除去能を示し, 脱鉄率は97~99%であった。この操作により血清トランスフェリンは変性することなく, ついで加える ^{59}Fe 標識鉄とよく結合し, ほぼ正確な TIBC 値を測定し得た。

この値は免疫法によるトランスフェリン換算値, また炭酸マグネシウムを用いる化学法ともよく一致した。

1. 緒 言

血清中の鉄は通常すべて血清中のトランスフェリンと結合している。トランスフェリンはその1分子に4原子の鉄と結合し, およそ1gのトランスフェリンは1.25mgの鉄と結合する能力を有する。トランスフェリンの鉄結合力は強く, 血清に無機の鉄を加えると選択的にトランスフェリンと結合し, 残余の一部はアルブミン等のタンパクと弱く結合するものと考えられる。しかしトランスフェリン結合鉄以外の鉄は血流中では速やかに肝臓等の実質臓器に摂取せられ, 存在し得ない。

試験管内で過剰の ^{59}Fe 標識鉄を血清に加えたのち, 遊離の鉄を何らかの方法で除去し, 血清と結合した鉄量より不飽和鉄結合能を測定できることは既報に示したごとくである。

この不飽和鉄結合能にすでに鉄の結合している量, すなわち血清鉄値を加えれば総鉄結合能を表わすことになる。しかし放射性鉄を用いて測定した UIBC 値に, 化学的に定量した血清鉄値を加えて総鉄結合能値を出すことは異質の方法による測定値の和ということになり好ましくない。

最近斎藤¹⁾は, 血清にアスコルビン酸を加え酸性にして, 血清鉄を遊離し, それをレジンで吸着して鉄を除去したのち, 一定量の過剰の ^{59}Fe 標識鉄を加えて, 総鉄結合能を測定する方法を考案した。

第一ラジオアイソトープ研究所の TIBC 測定 kit²⁾ はこれと同様な方法でクエン酸を用いて鉄を遊離して, レジンに鉄を吸着せしめたのち, 過剰の ^{59}Fe 標

識鉄を加えて TIBC 値を測定するものである。

われわれはこの方法について検討する機会を得たので, その成績を述べる。

2. 実験材料ならびに方法

2.1 TIBC 測定用 kit は第一ラジオアイソトープ研究所より提供されたものを用いた。

すなわち,

脱鉄用試薬: 小試験管に0.6%クエン酸溶液1mlとアンバーライト CG 400 0.15gを含む。

TIBC 測定用バイアル: UIBC 用と同様のバイアルに ^{59}Fe 約0.1 μCi を含むクエン酸鉄アンモニウム(鉄として3 μg) 溶液3mlを入れてある。

レジンストリップ: UIBC 用と同様。

Kit に指示された原法はつぎのごとくである。

1) 脱鉄用試験管に被験血清1mlを加え混和し, 15分間ローテートする。この操作で血清中の結合鉄は遊離してアンバーライトレジンに吸着される。

2) 沈殿した上澄みの1ml(全量の1/2)を採り, TIBC 測定用バイアルに入れ, 脱鉄した血清に ^{59}Fe 標識鉄(通常3 μg Fe)が結合するように20分間ふ置する。その間に ^{59}Fe 放射能を測定する(A cpm)。

3) レジンストリップを加え90分間ローテートしたのち, ストリップを除き, 2回目のカウントをする(B cpm)。

4) TIBC ($\mu\text{g}/\text{dl}$) は次式で算出される。

$$\text{TIBC } (\mu\text{g}/\text{dl}) = \frac{B}{A} \times 3.0 \times 200$$

2・2 脱鉄率の検討に用いた被検血清は、種々の血清鉄値、UIBC 値をもつ血清にトレーサー量の ^{59}Fe -クエン酸第一鉄約 $0.1 \mu\text{Ci}$ を加え、 37°C 30分間ふ置したものをを用いた。

2・3 TIBC 値を比較するための、免疫学的トランスフェリンの定量は、ハイランド社製トランスフェリン定量用インムノプレートを用いた。トランスフェリンの鉄結合能の換算はトランスフェリン 1 g あたり 1.25 mg の鉄量として行なった。

3. 実験結果

3・1 血清よりの脱鉄率のふ置時間による影響

血清鉄値約 $130 \mu\text{g/dl}$ の血清に ^{59}Fe を標識したのち、その 1 ml ずつを脱鉄用試験管に入れ、ローテート時間を変えてふ置したのち、上澄みの $\frac{1}{2}$ 量を採り、 ^{59}Fe 残余放射能を測定し、前値との比較から脱鉄残余率を算出した。

Fig. 1 に示すごとく10分間のふ置では脱鉄残余率は 4% 、15分で 3% 、以降漸次減少して60分では約 2% である。レジンを2倍量加えると脱鉄残余率は15分で 2.3% に減少した。すなわち15分以上のふ置時間では血清鉄の $97\sim 98\%$ が除去されることが明らかである。

Fig. 1 Effect of incubation time on iron remaining ratio after treatment of iron removal.

3・2 血清鉄値の脱鉄率に及ぼす影響

血清鉄値およそ $20, 100, 200, 300 \mu\text{g/dl}$ を有する血清を ^{59}Fe で標識したのち、脱鉄操作を行ない、その脱鉄残余率、残余鉄量の相違を検索した。その結果は Fig. 2 に示したごとく、残余率は血清鉄量のすくないほど高く、 $20 \mu\text{g/dl}$ の血清で 3% であった。しかし残余鉄量としては血清鉄値の多いものほど多かった。しかし $300 \mu\text{g/dl}$ の血清で約 1% の鉄が残るのみで TIBC 値はそれよりさらに高いと考えられるので、残余鉄が測定結果に及ぼす影響は 1% 以下でほとんど問題にならない。

Fig. 2 Relationship between serum iron values and amount of remaining iron after treatment of iron removal.

3・3 脱鉄率に及ぼす添加血清量の影響

脱鉄試薬には通常 1 ml の被検血清を添加するが、血清量を変えた場合に、脱鉄効率にいかなる影響があるかを検討した成績を Fig. 3 に示した。血清鉄値 $145 \mu\text{g/dl}$ の血清において血清量を 0.25 ml にした場合の脱鉄残余率は $6.5\sim 7\%$ で、血清量を増すに従って残余量は低下し、 1.5 ml の血清量では約 2.2% であった。

Fig. 3 Relationship between amount of serum and iron remaining ratio or amount of remaining iron.

残余鉄量としてみた場合には、血清量の多いほど鉄量も多く残るが、その差は比較的すくなく、試験管あたり $0.025\sim 0.05\ \mu\text{g}$ の範囲である。したがって血清量の多少は測定 TIBC 値にあまり影響をあたえないものと考えられる。

3・4 脱鉄率と測定 TIBC 値の均一性

血清鉄値 $112\ \mu\text{g/dl}$ の血清を ^{59}Fe で標識したのち、各 $1\ \text{ml}$ ずつ 7 本の脱鉄用試験管に分け室温において操作し、脱鉄率を比較した成績は Table 1 および Fig. 4 に示した。

Table 1 Variation of iron remaining ratio and TIBC values on the same samples

Number of sample	Ratio of iron remaining (%)	TIBC values ($\mu\text{g/dl}$)
1	2.55	234
2	2.75	234
3	2.68	248
4	2.84	237
5	2.69	234
6	2.55	234
7	2.68	240
Average values	2.68 ± 0.103	237.29 ± 5.25

Fig. 4 Variation of iron remaining ratio and TIBC values on same sample.

7 試料における脱鉄残余率は $2.6\sim 2.85\%$ の間にあり、平均値は $2.68\pm 0.093\%$ である。すなわち脱鉄率は 7 試料においてきわめて一致した値を示した。さら

にこれらの脱鉄した血清を TIBC 測定用バイアルに入れ、TIBC 値を測定した結果、測定値は $234\sim 250\ \mu\text{g/dl}$ の間にあり、平均値は $238.5\pm 5.15\ \mu\text{g/dl}$ で、さらに高い均一性を示した。

すなわち本法による TIBC 測定値はきわめて安定しているものと考えられる。

3・5 TIBC 測定値の温度による影響

血清鉄値 $126\ \mu\text{g/dl}$ の血清に ^{59}Fe を標識したのち、各 $1\ \text{ml}$ あて 5 本の脱鉄用試薬に加え、うち 3 試料は 8°C の低温室内で、あと 2 試料は 37°C のふらん器内で脱鉄操作を行なった。脱鉄残余率は 37°C 操作で 0.8% 、 8°C 操作で約 1.4% で両者の間に有意の差をみとめた。さらにそれらの血清について同じ環境で TIBC 値を測定し、両者を比較した結果は Fig. 5 のごとく、有意の差をみとめない。

Fig. 5 Effect of temperature on the determination of TIBC values.

すなわち $8^\circ\text{C}\sim 37^\circ\text{C}$ の間の温度差では、脱鉄残余率には若干の相違があるが、それは TIBC 値に影響をあたえるほど大ではなかった。

3・6 本法 TIBC 値と免疫法トランスフェリン定量値との比較

TIBC 測定値は血清トランスフェリン量と平行するはずであるが、トランスフェリンにもっとも特殊性をもつ免疫法によるトランスフェリン定量を行なってその結果と比較した。免疫法はハイランド社製のトランスフェリン定量用のインムノプレートを用いた。得られたトランスフェリン値をその鉄結合能に換算した値と本法 TIBC 値との比較を Fig. 6 に示した。両者個々の値には相当ひらきのある場合もあるが、全体的にはほぼ相関関係がみとめられた。

Fig. 6 Relationship between Res-O-Mat TIBC values and immunological transferrin values.

3・7 本法 TIBC 値と炭酸マグネシウム法による TIBC 値との関係

エフイーテスト「ワコー」キットによる化学的 TIBC 値を本法 TIBC 値と比較した成績は Fig. 7 に示した。両者の値はほぼ一致したが、TIBC 値の高い血清では、化学的 TIBC 値のほうがやや高い値を示す傾向がみられた。両者の相関係数は 0.950 で、その回帰直線は $y = 8.52 + 1.0x$ であらわされる。

Fig. 7 Relationship between TIBC values determined by Res-O-Mat and magnesium carbonate method.

3・8 本法による TIBC 正常値

40例（男子21例，女子19例）の正常例（血液学的諸検査で異常を認めないもの）における本法 TIBC 値を Table 2 に示した。全例における平均は $318.9 \pm 40.3 \mu\text{g/dl}$ (254~416)，男子平均 $319.6 \pm 40.3 \mu\text{g/dl}$ ，

女子平均 $318.2 \pm 41.4 \mu\text{g/dl}$ であった。男子と女子の平均値の間には有意の差を認めなかった。

Table 2 Normal values of TIBC measured by Res-O-Mat Fe method

	male	female	total
Number of cases	20	20	40
Average values	319.6 ± 40.3	318.2 ± 41.4	318.9 ± 40.3

4. 考 案

Rath and Finch³⁾ は血清に鉄を滴定によって加えてゆき，トランスフェリン結合鉄の吸光度がプラトーに達する点を見出して，総鉄結合能値を測定した。また血清に過剰の鉄を加えたのち，トランスフェリンと結合しなかった余分の鉄を，レジソ，炭酸マグネシウム等で吸着したのち鉄量を測定して TIBC 値を算出する方法が広く用いられる。⁵⁹Fe をトレーサーとして鉄を加え，⁵⁹Fe のトランスフェリンに結合する量から不飽和鉄結合能を測定する方法は数多くの文献があり，われわれもそれらの二，三の方法について検討して報告した^{4)~6)}。しかし，あらかじめ血清には血清鉄として若干の鉄があるため，⁵⁹Fe をトレーサーとして総鉄結合能を測定することはそのままではできない。

トランスフェリンに結合している鉄を何らかの方法で除いたのち，鉄の結合していないトランスフェリンに，⁵⁹Fe を標識した過剰の鉄を加え，UIBC 値測定の場合と同様にして TIBC 値が測定される。

かかる方法で TIBC 値を正しく測定するためには，
1)被検血清より完全に鉄を除去すること。
2)脱鉄操作によりトランスフェリンが変性して，鉄結合能に変化を生ずることのないこと。
3)脱鉄した血清の鉄結合能が正しく測定されること。
の3つの条件を満足させなければならない。

斎藤は，弱酸性の有機酸であるアスコルビン酸を用いて，トランスフェリンを変性させることなく，血清より鉄を遊離せしめ，遊離鉄をレジソに吸着させて除去したのち，⁵⁹Fe 標識鉄を過剰に加えて，TIBC 値を測定した。

第一ラジオアイソトープ研究所は，アスコルビン酸の代わりに安定な有機酸であるクエン酸を用い，同様な方法で TIBC を測定するキットを作製した。われわれはこのキットについて，上記3つの条件を満足す

るか否かを検討した。

脱鉄試薬による血清よりの脱鉄については、血清鉄の多少により脱鉄率は若干異なり、97～99%の間にあった。一般に血清鉄値の低い場合脱鉄率はやや低く、血清鉄値の高いものは脱鉄率は高かった。

残余鉄量としては血清鉄値の高いものほど多いが、脱鉄率が高いので、のちの TIBC 値に誤差を生ずるほどでなくほとんど無視しようと考えられた。脱鉄試薬に対する血清量の多少についても同様の傾向であり、指定どおりの血清 1 ml の使用で適当と考えられる。

血清を試薬とふ置する時間は15分までは急速に脱鉄率は増加するが、以後60分までの間に徐々に増加するのみで、その差は1%内外であった。脱鉄効果は非常に良いので、のちの TIBC 測定値にはほとんど影響をあたえず、15分間のふ置時間で十分である。

脱鉄操作は試薬に血清 1 ml を加え、15分間ローテートするという、きわめて単純な操作のため脱鉄率のバラツキは少なかった。さらに TIBC 値の測定結果でも、きわめて安定した値を示したことは、本法の操作が簡単であることによるすぐれた点であろう。

操作中の外界の温度についても、8°C の場合と 37°C の場合で脱鉄率には差をみとめたが、TIBC 値にはほとんど影響を及ぼさなかった。すなわち脱鉄率の差は TIBC 値を左右するほど大きくなく、それを無視するものとする。また脱鉄試薬と血清量、ないし血清鉄量の多少も、脱鉄率には影響があるが、その差は非常にすくなく、TIBC 値には有意の影響をあたえない。

脱鉄率は極端な場合を含めて 93～99% であり、残余鉄量は血清の TIBC 測定にほとんど無視しうること、さきに述べた血清より完全に鉄を除去するという条件をほぼ満足しているものといえよう。

本法により測定した TIBC 値と、免疫法により測定したトランスフェリン量から換算した鉄結合能とが、ほぼ相関することは、本法脱鉄操作によってトランスフェリンは変性することなく、つづいて TIBC 値を測定するさいの鉄結合能は完全に保たれていることを裏書きしていると考ええる。

炭酸マグネシウムを用いた化学的測定による TIBC 値と本法の値とも高い相関を示した。しかし一般に化

学的方法のほうがいくぶん高値を示す場合が多かったことは、いずれの方法かに問題があるものと考えられ、なお検討を要する。いずれにしても、この両法による TIBC 値の差はあまり大きなものではなく、本法 TIBC の値はほぼ正確に測られているものと考えて差し支えないであろう。

正常男女40名の平均値は $318.9 \pm 40.3 \mu\text{g/dl}$ であった。この値は諸家の報告による TIBC 値とほぼ一致した。われわれの値では男子、女子の平均値に有意の差をみとめなかったが、各20例という少数の比較のことではあり、男女差についてはなんともいえない。いずれにしても、本法による TIBC 測定値も、従来の他法による TIBC 値と同様な意味で比較使用して差し支えないものとする。

5. 結 論

本法による TIBC 値測定は、操作がきわめて簡単で単純なため、安定した値を得るに適しており、温度による影響もほとんどない。

また、得られた TIBC 値は、炭酸マグネシウム法による化学的方法の値とほぼ一致し、免疫法による値とも相関するので、真に近い値を表現しているものと考えられる。したがって本法は血清 TIBC 値測定法として実用的ではなはだ優秀な方法であるとする。

文 献

- 1) 斎藤 宏: 日血会誌, **33**, 555～59 (1970)
- 2) 中沢信彦, 牧健太郎, 新田一夫, 小川 宏, 斎藤 宏: 核医学, **4**, 388 (1972)
- 3) Rath, C.A. and Finch, C.A.: *J. Clin. Invest.*, **28**, 79～85 (1949)
- 4) 刈米重夫, 佐藤道明, 藤森克彦, 三木昌宏, 内田立身, 脇坂行一, 中島言子: *Radioisotopes*, **21**, 710～16 (1972)
- 5) 刈米重夫, 佐藤道明, 藤森克彦, 三木昌宏, 内田立身, 脇坂行一, 中島言子: *Radioisotopes*, **21**, 717～23 (1972)
- 6) 刈米重夫, 佐藤道明, 藤森克彦, 三木昌宏, 内田立身, 脇坂行一, 中島言子: *Radioisotopes*, **22**, 19～24 (1973)

Abstract**Investigation on the Determination of Total Iron Binding Capacity of Serum Using Radioactive Iron ^{59}Fe**

Shigeo KARIYONE, Michiaki SATOH, Katsuhiko FUJIMORI,
Masahiro MIKI, Tatsumi UCHIDA,
Gyoichi WAKISAKA and Kotoko NAKAJIMA*

The First Division, Department of Internal Medicine,
Faculty of Medicine, Kyoto University, Kyoto,

* Central Radioisotope Laboratory, Kyoto University Hospital, Kyoto

The determination of total iron binding capacity of serum was investigated. The reagents were supplied from Daiichi Radioisotope Laboratories as a TIBC Kit.

One ml of serum was added to a vial containing one ml of citric acid and Amberlite CG400 resin and then the vial was rotated for 15 minutes in order to isolate iron from transferrin and to remove it by the resin. By this treatment, almost 97 to 99 percent of serum iron was removed from transferrin.

One ml of liquid layer of the vial was taken and was added to another incubation vial containing 3 μg of ^{59}Fe labelled ferric ammonium citrate. During 20 minutes of incubation, ^{59}Fe radioactivity of the vial was counted (Acpm).

After the incubation, the resin strip was added and the vial was rotated for 90 minutes. After elimination of the resin strip ^{59}Fe radioactivity of the vial was again counted (Bcpm). Then

$$\text{TIBC } (\mu\text{g/dl}) = \frac{B}{A} \times \text{Fe}(\mu\text{g}) \times 200$$

The iron removal ratio was investigated using ^{59}Fe labelled serum as a tracer of the serum iron. Ninety seven to 99% of iron was removed from the serum after 15 minutes incubation. Three % of iron remained in serum with 20 $\mu\text{g/dl}$ of serum iron, but only 1% of iron remained in serum with 300 $\mu\text{g/dl}$ of iron, after the treatment. The amount of serum in the vial did not affect the amount of remaining iron.

The changes of iron removal ratio in each citric acid vial with same serum were tested on seven samples and their TIBC values were determined. Both iron removal ratios and TIBC values showed quite similar results in every sample. Iron removal ratio somewhat decreased at 8°C. However, TIBC values showed no significant differences between 8°C and 37°C of temperature. There was a good correlation between the TIBC values by this method and TIBC values calculated from the amount of transferrin which were determined by immunological method. Also, there was a significant good correlation between TIBC values by this method and by chemical method using magnesium carbonate.

The determination of TIBC values of serum became easier than before by the application of this method. Also, it gave a correct values of TIBC and the data were quite steady for repeated determination.

(Received June 14, 1973)