技術報告

ラジオイムノアッセイ法による血清フェリチンの測定

——マグネチックフェリチンキットの検討——†

満間照典, 茶谷雅裕, 加藤珠子, 村上 研, 中尾直樹

愛知医科大学第四内科

480-11 愛知県愛知郡長久手町大字岩作字雁又 21

1984年6月2日 受理

Key Words: ferritin, radioimmunoassay, paramagnetic particle

1. はじめに

フェリチンは分子量約44万の鉄貯蔵タンパク質で、肝臓、脾臓、骨髄などに多く分布することが知られている。血中フェリチンの測定法としてラジオイムノアッセイ (RIA) 法が導入されて以来、RIA 法が広く用いられている。今回コーニング社により two-site immunoradiometric assayを用い、簡便に短時間に血中フェリチンを測定するキットが開発された。その入手の機会を得、基礎的ならびに臨床的検討を行ったので報告する。

2. 対 象

愛知医科大学第四内科外来および入院患者で、臨床症状、所見および諸検査にて診断した、正常者100例 (女性65例, 男性35例), 鉄欠乏性貧血31例, 再生不良性貧血5例, 急性白血病6例, 悪性リンパ腫6例, 急性肝炎10例, 慢性肝炎14例, 肝硬変14例, 肝がん6例, 肺がん5例, 胃がん6例, 胃潰瘍5例, 子宮筋腫5例, 子宮がん5例, 糖尿病7例, 慢性腎不全7例の計232例を対象として午前9時に採血し、血清分離後測定まで-20℃に保存した。

3. 方 法

3・1 マグネチックフェリチンキットの方法

3・1・1 キットの構成 (100テスト用)

①標準フェリチン (0, 5, 20, 50, 200, 500, 1000 ng/ml)

②抗フェリチン抗体を磁気粒子に結合させたもの: 1 ボトル

③¹²⁵I-抗フェリチン抗体: 3 バイアル

3・1・2 測定操作方法

①抗フェリチン抗体および¹²⁵I-抗フェリチン抗体をおのおの 500 μl ずつ全試験管に加える。

②標準フェリチンまたは被検血清 50 μl を試験管に加え、3-4 秒間混和後 37℃で 60 分間インキュベートする。

③全試験管をマグネチックセパレータ上に 3 分間放置した後、デカンテーションにて上清を除去する。

④残渣部の放射能をガンマカウンタにて計測する。

⑤次式を用いて B/T% を計算する。

$$B/T\% = \frac{\text{パウンド部のカウント}}{\text{全カウント}} \times 100$$

標準フェリチン B/T% を用い標準曲線を作製後、被検血清の B/T% よりフェリチン値を算出する。

3・2 ダイナボット社製キットの方法

ダイナボット社製 RIA キットの方法によって行った。

† The Measurement of Serum Ferritin by Radioimmunoassay Method—The evaluation of Magnetic ferritin kit—. Terunori MITSUMA, Masahiro CHAYA, Tamako KATO, Ken MURAKAMI and Naoki NAKAO: 4th Department of Internal Medicine, Aichi Medical College, 21, Karimata, Yazako, Nagakute-cho, Aichi-gun, Aichi Pref. 480-11.

4. 実験結果

4.1 基礎的検討

4.1.1 インキュベーション温度の標準曲線に及ぼす影響

Fig. 1 に示したように 4°C のインキュベーションでは $B/T\%$ が最も低く, 22, 37°C のインキュベーション順に $B/T\%$ が高くなることが認められた。

4.1.2 インキュベーション時間の標準曲線に及ぼす影響

インキュベーション時間の標準曲線に及ぼす影響を検討するため, 37°C で 30 - 120 分間 インキュベートした。その結果を Fig. 2 に示した。図のように, 30 分間のインキュベーションでは $B/T\%$ が低い傾向を示したが, 60 - 120 分間のインキュベーションではほぼ同様な標準曲線が得られた。

4.1.3 マグネチックセパレータ上の放置時間の標準曲線に及ぼす影響

Fig. 1 The effect of incubation temperature on the standard curve.

Fig. 2 The effect of incubation time on the standard curve.

マグネチックセパレータ上の放置時間の標準曲線に及ぼす影響を検討するため, マグネチックセパレータに 2 - 8 分間放置したところ, Fig. 3 に示すように 2 - 8 分間の放置ではほぼ同様な標準曲線が得られた。

4.1.4 標準曲線および高フェリチン血清の希釈曲線

標準曲線は Fig. 4 に示したように 5 - 1,000 ng/ml まで急峻な曲線が得られた。また高フェリチン血清の希釈曲線は標準曲線にはほぼ平行であった。

4.1.5 回収率

3 種類の濃度のフェリチン血清を正常者, 鉄欠乏性貧血, 肝がん患者血清に添加して回収率を検討したところ, 平均 $100.8 \pm 4.6\%$ であった。

4.1.6 同一測定内および測定間の変動

3 種の濃度のフェリチン血清について同一測定内の変動を検討したところ Table 1-1 に示したように 2.9 - 4.9% であった。また, 測定間の変動は Table 1-2 に示したように 3.6 - 7.7% であった。

Fig. 3 The effect of separation time on the magnetic separator on the standard curve.

Fig. 4 Standard curve and the dilution test's result.

Table 1 Reproducibility

1) Intraassay reproducibility

Sample	Mean±S.D. (ng/ml)	C.V.(%)
A	73.4±3.32	4.5
B	146.0±6.99	4.9
C	341.0±9.90	2.9

2) Interassay variation

Sample	Mean±S.D. (ng/ml)	C.V.(%)
A	71.4±5.48	7.6
B	145.5±11.36	7.7
C	342.8±12.23	3.6

4・1・7 同一サンプルを本キットおよびダイナボット社製キットで測定したさいの測定値の相関
各種フェリチン濃度の65検体について、本キットおよびダイナボット社製キットで測定したさいの測定値の相関は $r=0.997$ と推計学上有意味な($p<0.001$)正の相関が認められた。

4・2 臨床的検討

4・2・1 正常者における血清フェリチン値 (Fig. 5)

正常者100例における血清フェリチン値は10-180 ng/mlに分布し、平均 54.3 ± 37.0 ng/ml (mean±S.D.)であった。そのうち、女性65例では12-150 ng/mlに分布し、平均 47.4 ± 34.4 ng/dl, 男性35例では10-180 ng/mlに分布し、平均 64.5 ± 38.8 ng/mlと女性において血清フェリチン値は低い傾向を示したが有意ではな

かった。

4・2・2 各種疾患における血清フェリチン値 (Fig. 6)

鉄欠乏性貧血31例における血清フェリチン値は5 ng/ml以下より20 ng/mlに分布を示し平均 10.7 ± 4.6 ng/mlと正常者に比し有意に($p<0.01$)低値であった。再生不良性貧血5例における血清フェリチン値は520-3,000 ng/mlに分布を示し、平均1,684 ng/mlと正常者に比し、有意に($p<0.01$)高い値であった。白血球6例における血清フェリチン値は110-3,000 ng/mlに分布し、平均1,375 ng/mlと正常者に比し、高値であった。悪性リンパ腫6例の血清フェリチン値は54-1,600 ng/mlに分布し、平均892.3 ng/mlと正常者に比し、高値であった。急性肝炎10例では70-900 ng/mlに分布し、平均353 ng/mlと正常者に比し高値であった。慢性肝炎14例では15-360 ng/mlに分布を示し、平均214.1 ng/mlと正常者に比し高値であった。肝硬変14例における血清フェリチン値は70-500 ng/mlに分布し、平均273.6 ng/mlと正常者に比し高値であった。肝がん6例における血清フェリチン値は160-2,380 ng/mlに分布し、平均840 ng/mlと正常者に比し、有意に($p<0.01$)高値であった。糖尿病7例における血清フェリチン値は20-200 ng/mlに分布し、平均72.8 ng/mlと正常者とほぼ同様な値であった。慢性腎不全7例における血清フェリチン値は80-300 ng/mlに分布し、平均194.2 ng/mlと正常者に比し高値であった。肺がん5例における血清フェリチン値は100-2,000 ng/mlに分布し、平均776 ng/mlと正常者に比し高い傾向を示したが有意で

Fig. 5 Serum ferritin concentration in various diseases.

はなかった。胃がん6例における血清フェリチン値は50-1,200 ng/ml に分布し, 平均641.7 ng/ml と正常者に比し高値であった。胃潰瘍5例における血清フェリチン値は12-100 ng/ml に分布し, 平均64.4 ng/ml と正常者と同様な値であった。子宮筋腫5例における血清フェリチン値は10-120 ng/ml に分布し, 平均56 ng/ml と正常者とほぼ同様な値であった。子宮がん5例における血清フェリチン値は40-1,500 ng/ml に分布を示し, 平均500 ng/ml と正常者に比し高い傾向を示したが有意ではなかった。

5. 考 察

近年, 血中のフェリチンの測定法として, ラジオイムノアッセイ法や, イムノラジオメトリックアッセイ法が導入され, その有用性が諸家¹¹⁻¹⁹⁾により認められている。現在では多種類のキットが発表されている。今回コーニング社により抗フェリチン抗体を磁気粒子に結合させ, 短時間に遠沈操作を必要とせず, フェリチンが測定できるイムノラジオメトリックアッセイ法によりキットが開発され, その基礎的ならびに臨床的検討を行った。

まず本キットの測定条件について検討したところ, 反応温度では4, 22, 37°Cの順にB/T%が高く, 37°Cで最も急峻な標準曲線が得られた。反応時間では30分間のインキュベーションではB/T%が低い傾向が見られたが, 60-120分間のインキュベーションではほぼ同様な標準曲線が得られた。また magnetic separator上の放置時間について検討したところ, 2-8分間の放置時間ではほぼ同様な標準曲線が得られた。以上の成績はインキュベーション温度は37°C, インキュベーション時間は60分間, magnetic separator上の放置時間は2分以上行えば良好な成績が得られることを示している。標準曲線は5-1,000 ng/ml まで急峻な曲線が得られた。また高フェリチン血清の希釈曲線は標準曲線にほぼ平行であった。以上の結果は, 1,000 ng/ml 以上の血清は希釈後測定すればよいことを示している。回収率, 同一測定内および測定間の変動とも良好であった。さらに同一検体を他のキットで測定したさいの測定値の相関は良好な正の相関が得られた。以上の成績は本キットがフェリチン測定法として日常臨床において十分用い得る方法であることを示唆している。

本キットで測定した血清フェリチン値は正常者で10-180 ng/ml に分布し, 平均54.3 ng/ml であった。鉄

欠乏性貧血で低値, 再性不良性貧血で高値を示し, 鉄貯蔵状態をよく反映することが認められ, 諸家¹¹⁻¹⁹⁾の成績と一致した。肝疾患においても, 急性肝炎, 慢性肝炎, 肝硬変においてやや高値を示し, 従来の報告²¹⁻²⁹⁾に一致した。白血病, 悪性リンパ腫, 肝がん, 肺がん, 胃がん, 子宮がん例において, しばしば血清フェリチン値が高値であった。この成績は血清フェリチン値の測定が腫瘍マーカーの一つとしてある程度用い得ることを示している。

6. お わ り に

コーニング社製フェリチン測定キットの検討を行い以下の成績を得た。

1) 測定条件は37°Cで60分間インキュベーションを行えば良好な結果が得られることを認めた。

2) 標準曲線は5-1,000 ng/ml まで急峻な曲線を示した。高フェリチン血清の希釈曲線は標準曲線にほぼ平行であった。回収率, 同一測定内および測定間の変動も良好であった。

3) 本法で測定した血清フェリチン値は正常者で平均54.3 ng/ml を示し, 鉄欠乏性貧血で低値, 再生不良性貧血で高値を示し, 生体内における鉄貯蔵状態をよく反映することが認められた。

4) 悪性腫瘍の多くの例で血清フェリチン値は高値を示し, 腫瘍マーカーの一つとして, ある程度用い得ることが示唆された。

フェリチン測定キットを提供下さったコーニングメディカル社に謝意を表します。

文 献

- 1) Addison, G.M., et al.: *J. Clin. Path.*, **25**, 326 (1972)
- 2) Miles, L.E.M., et al.: *Anal. Chem.*, **61**, 209 (1974)
- 3) Lipschitz, D.A., et al.: *New Engl. J. Med.*, **290**, 1213 (1974)
- 4) 新津洋司郎, 他: 生物物理化学, **22**, 111 (1978)
- 5) 吉井正雄, 他: 核医学, **16**, 785 (1979)
- 6) 伊藤秀臣, 他: ホと臨, **29**, 1305 (1981)
- 7) 吉井正雄, 他: 同上, **30**, 873 (1982)
- 8) 石原睦夫, 他: 医学と薬学, **8**, 183 (1982)
- 9) 満間照典, 他: 同上, **9**, 590 (1983)