

## 学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	伊藤 巧
<p>学位論文題目</p> <p>Functional validation and clinical significance of newly established non-transferrin-bound iron assay system utilizing conventional automated analyzer (汎用自動分析装置対応非トランスフェリン結合鉄新規測定系の機能的評価及び臨床的意義の検討)</p> <p>共著者名</p> <p>生田克哉, 加藤大介, 新関紀康, 田中宏樹, Addo Lynda, 土岐康通, 畑山真弓, 稲村純季, 進藤基博, 佐々木勝則, 飯塚直美, 藤谷幹浩, 鳥本悦宏, 高後 裕</p> <p>未公表</p> <p>研究目的</p> <p>鉄は生体内において必須金属元素である一方、過剰になると臓器に沈着し、フリーラジカル産生を介した酸化ストレス・臓器障害の原因となり、患者の予後にも影響する。そのため、生体内鉄量は厳密に調節されているが、長期間の輸血などによって鉄代謝のバランスが崩れると、トランスフェリンが飽和され、血液中にトランスフェリンと結合し得なくなった非トランスフェリン結合鉄 (NTBI: Non-transferrin bound iron) が出現してくる。NTBIは全身の細胞・臓器に容易に取り込まれ障害をもたらすため、鉄過剰の患者の状況を把握するのにNTBIをモニタリングすることは臨床的に重要である。これまで複数のNTBIの測定法が報告されてきたが、いずれも非常に複雑であり、ほとんどの施設では定量できないのが現状であった。そのため、本研究では臨床検査室で広く汎用されている自動分析装置が利用できる簡便な新しいNTBI測定系を開発し、その機能的評価を行うとともに、その臨床的意義の検討を行った。</p>			

## 材料・方法

### (1) NTBI mobilizerおよび鉄キレート発色素

自動分析装置に対応したNTBIの測定段階として、試薬1と試薬2の試薬の2段階構成とした。試薬1はNTBIのmobilizerであるnitrilotriacetic acid (NTA)を使用し、NTBIをNTBI-NTAとして捕捉し、その後試薬2として発色剤を加え、比色定量する系を構築した。発色剤として4種類の鉄キレート発色素を候補とし、各々にヒト血清中の遷移金属として標準金属液（鉄、銅、コバルト、ニッケル）（和光純薬工業）を加え、U3900-Hスペクトロメーター（日立）を用い450-800nmのスペクトラム測定で干渉を検討、最終的に750 nmにおいて他の金属の影響を受けずに鉄を定量できたNitroso-PSAPを、本法の発色剤とした。

### (2) 自動分析対応NTBI測定試薬の調整

試薬1 (R1) は200 mM Good's Bufferに0-2.0 mM NTAを混合し作成した。試薬2 (R2) は200 mM Good's Bufferに還元剤および0.05-5.0 mMのNitroso-PSAPを混合し作成した。分析には日立7180形もしくは7700形自動分析装置を用い、反応時間は第一反応および第二反応とも5分に設定した。

### (3) クエン酸鉄・アルブミン結合鉄 (NTBI) とトランスフェリン結合鉄の測定

クエン酸鉄およびアルブミン (BSA) 結合鉄をNTBI、ヒトホロトランスフェリンをトランスフェリン結合鉄とし、各々含有する溶液を作成した。含有する鉄量はあらかじめ血清鉄測定キット（シノテスト）で測定しておき、本測定系で得られたNTBI値から鉄回収率(%)を計算した。

### (4) 直線性の評価

10  $\mu$ Mクエン酸鉄の連続希釈液を用意し、0.1-4.0  $\mu$ Mの範囲で5回の反復測定を行い、平均NTBIと標準偏差から、本測定法の直線性を検討した。

### (5) ヒト血清におけるNTBI測定

同意が得られた41人の健常人血清と118人の患者血清において、NTBIを測定した。また、ヘモグロビン、トランスアミナーゼ、血清クレアチニン、C反応性蛋白 (CRP)、アルブミン、血清鉄、不飽和鉄結合能、血清フェリチンとNTBIとの関連性を検討した。

### (6) トランスフェリン飽和度とNTBIの関連

鉄標準液をヒトプール血清に添加しトランスフェリン飽和度を上げ、NTBIとの関連を検討した。プール血清は健常人血清を無作為に集め混合し作成した。また患者血清におけるトランスフェリン飽和度とNTBIの関連も検討した。

### (7) 自動分析装置対応NTBI測定法とnon-metal HPLC法の相関

13人の患者血清に関して、従来使用されてきたnon-metal HPLC法と本自動分析装置対応試薬の両方でNTBIを測定し、測定値の互換性を検討した。

#### (8) 動物実験モデル

鉄過剰モデルマウスを作成するため、12週齢C57BL/6マウスにiron-dextranを1 mg/日または10 mg/日で5日間腹腔内投与した。PBSのみを投与する群をコントロール群とした。投与完了から2日後にマウスを屠殺し、血清を採取した。NTBIの血清中での動態を検討するため、17週齢Wisterラットに10 mg/kgのiron sucroseを静脈注射にて投与した。投与前、投与終了後1時間、3時間、6時間後に血清を採取した。

#### (9) 統計処理

Student's T検定とMann-Whitney U検定を行い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

### 成 績

(1) 本測定法では、クエン酸鉄およびアルブミン結合鉄の平均添加回収率は各々96.3%、95.5%と極めて良好であった。一方、ホロトランスフェリン溶液からは2.1%の鉄が検出されるのみであり、トランスフェリン結合鉄は測定しないことが明らかとなった。

(2) 0.1から4.0  $\mu\text{M}$ の範囲のクエン酸鉄濃度において、高い直線性を示し、かつ、良好な同時再現性を示した。

(3) 従来用いられてきたnon-metal HPLC法と本自動分析装置対応試薬で測定したNTBI値は高い相関性を示した ( $y = 1.08x - 0.002$ ,  $r = 0.923$ )。

(4) 健常人血清におけるNTBIは、 $0.44 \pm 0.076 \mu\text{M}$ であり、健常人においてもNTBIは血液中に存在することが確認された。男性は $0.45 \pm 0.078 \mu\text{M}$ 、女性は $0.43 \pm 0.075 \mu\text{M}$ であり、性差は認めなかった。

(5) 患者血清での検討では、健常人よりもNTBIは低値を示した。各種生化学項目との相関に関しては、血清鉄と軽度の正の相関を示したが、血清フェリチン値とは明らかな相関を示さなかった。また、炎症マーカーCRPに関しては、CRP高値群でNTBIは低値を示した。

(6) ヒトプール血清に鉄を添加していった溶液において、トランスフェリン飽和度が80%を超えると急激なNTBIの上昇を認めた。また、患者血清におけるトランスフェリン飽和度とNTBIの測定でもトランスフェリン飽和度が80%を超えるとNTBIは急激に上昇していた。

(7) 鉄過剰マウスでは、コントロール群に比較して有意にNTBIの増加を認めた。

(8) 鉄剤静注ラットでは、鉄剤投与1時間で急激なNTBIの出現を認めたが、その後3時間および6時間と時間が経過するに従って、急速に低下した。

## 考 案

本研究で開発した自動分析装置対応NTBI測定試薬は、クエン酸鉄およびアルブミン結合鉄はNTBIとして良好に測定できたが、逆にトランスフェリン結合鉄は測定せず、NTBIを特異的に測定できると考えられた。本測定系は0.1-4.0  $\mu\text{M}$ の範囲で高い直線性を示し、かつ、測定の再現性も良好であった。従来用いられてきたnon-metal HPLC法とも値の互換性が確認できた。本測定系は、臨床の現場で汎用される自動分析装置に広く対応可能で、簡便かつ多数の検体処理が短時間で可能である。従来のnon-metal HPLC法では、試料の前処置や測定自体が煩雑で、検体の処理能力にも問題があったが、本測定法はこうした問題点を解決しつつNTBIを正確に測定でき、幅広く臨床応用できる能力を有すると考えられた。

本測定系によって、実際の健常人および患者血清でのNTBI測定も問題なく行えた。鉄を投与したプール血清や患者血清での検討では、従来の報告と同様にトランスフェリン飽和度が高くなるとNTBIが出現してくるが確認されたが、健常人やまだトランスフェリンが飽和していない患者血清においても血清中にNTBIが認められた。この結果は、NTBIが単にトランスフェリンが飽和された際に出現するだけでなく、血清中に恒常的に存在することで何らかの生理学的機能を有している可能性も示すと考えられた。

鉄過剰モデルマウスにおいてNTBIが上昇していたことから、鉄過剰に関連してNTBIが出現することは確認されたが、一方で、患者血清での検討ではNTBIと血清フェリチンの間には明らかな相関を認めなかった。また、血清フェリチンの臨床上の弱点として、炎症状態では鉄の状態にかかわらず上昇してしまうことがあるが、NTBIは炎症状態において逆に有意に減少していた。また、ラットへの経静脈的鉄剤投与では、血清中の急速なNTBIの変動が確認できた。これらの結果は、NTBIが、鉄過剰のマーカーではあるが、血清フェリチンとは異なるマーカーであり、特に炎症状態における鉄代謝や、血液中の鉄の動的な変化を見るのに非常に適している可能性を示唆するものと考えた。

## 結 論

臨床検査室で広く簡便に利用可能であり処理能力に優れた自動分析装置対応の新たなNTBI測定法を開発した。また、本検討から、NTBIが現在最も汎用されている鉄代謝マーカーである血清フェリチンとは異なったマーカーであることを明らかにした。特に、NTBIは、炎症状態における鉄動態の検討や血液中での鉄の動きを動的に捉えるマーカーであることも示唆された。本自動分析装置対応NTBI測定法は、NTBIの生理学および臨床的な重要性を研究していくために有力な手段となると考える。




## 引 用 文 献

1. Hershko C, Graham G, Bates GW and Rachmilewitz EA: Non-specific serum iron in thalassaemia: an abnormal serum iron fraction of potential toxicity. *Br J Haematol* 40: 255-263, 1978
2. Gosriwatana I, Loreal O, Lu S, Brissot P, Porter J and Hider RC: Quantification of non-transferrin-bound iron in the presence of unsaturated transferrin. *Anal Biochem* 273: 212-220, 1999.

## 参 考 论 文

1. Sasaki K, Ikuta K, Tanaka H, Ohtake T, Torimoto Y, Fujiya M, Kohgo Y. Improved quantification for non-transferrin-bound iron measurement using high-performance liquid chromatography by reducing iron contamination. *Mol Med Rep.*4(5):913-8, 2011.
2. Kohgo Y, Ikuta K, Otake T, Torimoto T, Kato J. Body iron metabolism and pathophysiology of iron overload. *Int J Hematol* 88; 7-15, 2008.

## 学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士 (医学)	氏 名	伊藤 巧
審査委員長 清水 恵子  審査委員 若宮 伸隆  審査委員 高後 裕 			
学 位 論 文 題 目  Functional validation and clinical significance of newly established non-transferrin-bound iron assay system utilizing conventional automated analyzer [汎用自動分析装置対応非トランスフェリン結合鉄新規測定系の機能的評価 及び臨床的意義の検討]			
<p>鉄は生体内で必須金属であり、血液中では主にトランスフェリン ( Tf ) と結合している。非トランスフェリン結合鉄 ( NTBI: Non-transferrin bound iron ) は、鉄過剰状態で血清中に出現する Tf と結合していない鉄であり、全身臓器に容易に取り込まれ、フリーラジカル産生による酸化ストレスを介した臓器障害をもたらす。従来、体内貯蔵鉄の評価として、血清フェリチンが汎用されているが、鉄過剰状態を把握する為に、NTBI モニタリングの臨床的重要性が指摘されている。従来の NTBI 測定法は、感度や操作手技の煩雑性などの問題から一般に普及せず、NTBI 臨床研究進展の制約となっていた。本研究では、全国の臨床検査室で汎用される生化学自動分析装置を使用した新規 NTBI 測定系を開発し、その機能的評価と臨床的意義の検討を行った。</p> <p>その結果、従来法である non-metal HPLC 法と高い相関性を有する汎用的新規 NTBI 測定法が樹立された。健常人における微量な NTBI ( 平均値 <math>0.44 \pm 0.076 \mu\text{M}</math> ) を、高感度かつ再現性良く測定できるようになり、ヒト血清および動物実験において、NTBI は鉄過剰状態で上昇することを確認した。炎症状態における血清フェリチン動態とは異なり、NTBI では</p>			

低下が認められ、血清フェリチンの臨床的弱点を克服する新規マーカーであることが明らかとなった。本測定系の開発及びこれを用いた検討による新たな知見は、鉄による臓器障害のリスク評価、鉄過剰症に対する治療効果判定モニタリング等、幅広い臨床領域での貢献が期待され、NTBI の生理的・臨床的意義を明らかにする上で大きく貢献し、意義深いものである。

論文提出者は試問審査において、非常に適切で論理的回答がなされ、関連分野に関する十分な知識を有していることが認められた。審査委員会は本論文が医学博士の学位論文として値するものと判断した。