

学位論文（要約）

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 ）

旭川医科大学大学院医学系研究科博士課程医学専攻

伊 藤 巧

（ 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 ）

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)

著 者 名 : 伊 藤 巧

(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)

研 究 目 的

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。

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 μ M クエン酸鉄の連続希釈液を用意し、0.1-4.0 μ 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 μM 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 ($y = 1.08 x - 0.002$, $r = 0.923$)。
- (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 μM 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的弱点として、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 の生理学的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 論 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.