

## 学 位 論 文 の 要 旨

|       |     |     |                       |
|-------|-----|-----|-----------------------|
| 学位の種類 | 博 士 | 氏 名 | Takeshi Saito (齋藤 豪志) |
|-------|-----|-----|-----------------------|

  

学 位 論 文 題 目

Novel automated measuring system for evaluating labile plasma iron in serum  
(血清labile plasma iron (LPI) の新規自動測定系開発)

共 著 者 名

Katsuya Ikuta, Mayumi Hatayama, Kotoe Shibusa, Kozo Matsui, Riki Tanaka, Yasumichi Toki,  
Daisuke Kato, Naomi Iizuka, Toshikatsu Okumura  
Annals of Clinical Biochemistry. 56:654-661, 2019.

研 究 目 的

鉄は生体にとって必須の元素であるが、体内に過剰な状態になるとフリーラジカルの生成を介して各種の臓器障害を引き起こし、予後にも悪影響を及ぼすことから、体内の鉄の量的バランスは厳密に調整されている。しかし、我々の身体には体内の鉄を体外に積極的に排泄する機構がないため、血液疾患などで長期や頻回の赤血球輸血を必要とする貧血患者では鉄過剰が引き起こされてしまう。

血液中を鉄はトランスフェリン(transferrin、以下Tf)に結合して運搬されており、鉄のTf飽和率は通常30%程度である。そのため、体外からのある程度の鉄負荷があっても、鉄は、まだ鉄と結合していないTfと結合する。しかし鉄が増え続けると最終的にはTfが完全に飽和されてしまい、非Tf結合鉄(non-transferrin-bound iron、以下NTBI)と呼ばれる「Tfと結合しない鉄」が血清中に出現してくる。

NTBIは全身の臓器に非選択的に容易に取り込まれ、フリーラジカル生産を介して臓器障害を引き起こすとされ、その測定が鉄過剰時における鉄の毒性を直接評価するのに有用であると報告されてきたが、これまでの臨床研究は十分とは言えない。その理由は測定が非常に難しい事が一番の理由であった。そのため、我々の研究室ではNTBIを生化学自動測定装置で測定できる系を構築した(引用文献1)。しかし、NTBIと臓器障害の関与を検討するうちに、NTBI測定だけでは限界がある可能性が生じてきた(引用文献2)。これは、NTBIは「Tfと結合していない鉄」を総称したもので、形態としては鉄がアルブミンやクエン酸など様々な物質と緩く結合している不均一な存在であるためと考えられる。NTBIの中でも特にフリーラジカルを産生しやすい、labile plasma iron(LPI)と呼ばれる酸化活性が高い分画を測定することが、鉄過剰患者の臓器障害や予後予測により望ましいとの報告もあるが、既報のLPI測定も極めて煩雑で臨床的応用は困難である(引用文献3)。そこで今回、血清LPIの生化学自動分析装置対応測定系の構築を目指した。

## 材 料 ・ 方 法

### 1. 反応系の構築

血清サンプルの酸化活性の測定のため、ferricyanideがferrocyanideに還元する際に4-aminoantipyrine (4-AA) とN-(2-carboxyethyl)-N-ethyl-m-toluidine (CEMB) を酸化縮合させ、比色定量ができるTrinder反応と呼ばれる反応系を利用した。

このTrinder反応に血清を加えると、血清中のセルロプラスミン(Ceruloplasmin、以下Cp)が有する酸化力によってTrinder反応がある程度進行する。しかし、Cpは一度酸化に関与すると還元型になり、それ以上は反応は進行しない。しかし、測定する血清サンプルにLPIが存在すると、LPIのもつ酸化活性で還元されたCpが再び酸化力を得て、反応が大きく進行すると考え、測定系を構築した。

### 2. 自動分析装置への対応と吸光度測定

構築した測定系は、汎用されている血清生化学自動分析装置に搭載できるよう、第1試薬(potassium ferricyanide+4-AA+非イオン性界面活性剤)、第2試薬(CEMB+Trisバッファー+非イオン性界面活性剤)として調整した。

本検討には自動分析装置7180(日立ハイテック)を使用した。血清10  $\mu$  Lに第1試薬150  $\mu$  Lを加えて5分保温・混和し、そこに第2試薬50  $\mu$  Lを加えさらに5分混和後に550 nmでの吸光度変化を測定している。

### 3. 検体の入手法

検討は市販ヒト血清検体として、プールヒト血清(Access Biologicals LLC)、個別血清(Trina Bioreactives AG)を用いた(倫理委員会承認番号: 18042)

## 成 績

### 1. 血清蛋白の影響について

プール血清を測定したところ吸光度はある程度計測されたが、血清中蛋白の影響を確認する目的で、プール血清を限外濾過処理すると吸光度変化はほとんど認めなかった。限外濾過後の血清にCpを加えると吸光度変化は添加Cp濃度に応じて上昇することが確認された。一方Tf結合鉄として鉄イオンを加えても、塩化銅にて銅イオン(II)を加えても、Cp非添加状況下では吸光度は変化しなかった。

### 2. 鉄負荷時に測定されるLPI

プール血清のみの測定でも軽度の吸光度変化が確認されたが、ここにLPIのモデルとして硫酸アンモニウム鉄を加えていくと濃度依存的に吸光度の上昇が認められた。一方、金属イオンのキレート剤であるEDTAやNTAを添加すると、この吸光度変化は強く抑制された。

### 3. 血液中の他の金属の影響

血液中の他の金属の酸化反応への関与を検討するために、Zn、Mg、Co、Mn、Ni、Pbをプール血清に加え検討を行った。鉄以外の各種金属イオンでは吸光度変化は認めなかった。

### 4. 既報のLPI測定系との比較

市販されているFeROS™ LPI Kit®(Aferrix社)との比較検討を、20人分の個別購入血清検体で行った。本測定系での測定値とは相関係数は0.1705で相関は認められなかった。

### 5. NTBIとLPIの相関

100検体の個人血清について、以前我々が構築したNTBI測定系と今回構築したLPI測定系での測定を行った。相関係数は0.3695と強い相関は認めなかった

## 考 案

血液中の過剰鉄が有する酸化活性を測定することがこの研究の目的である。

本測定系にて血清を測定すると酸化活性が認められたが、血清を限外濾過して測定を行うと、この酸化活性は抑制された。このことより血清中の蛋白が本測定系で測定される酸化活性に関与しているためと考えられた。血清中で酸化力を示す蛋白としてCpが知られているが、今回の検討でも限外濾過した血清にCpを添加していくと、吸光度変化が濃度依存的に上昇した。また、限外濾過したプール血清にCpを添加していない状態では、Tf鉄および銅イオンを加えても酸化活性は全く上昇しなかった。これらの結果より、プール血清における酸化活性はCpが有する酸化力によるものと考えられた。

プール血清が示す酸化活性は軽微な値であったが、ここに過剰鉄のモデルとして硫酸アンモニウム鉄を添加していくと、濃度依存的に吸光度変化が認められた。一方、添加した鉄が容易に反応できないようにキレート剤を添加すると、こうした吸光度変化は著明に抑制された。このことより、血清中に反応しやすい形態で鉄が存在すると強い酸化活性を示すことが確認された。

血液中には鉄以外にも様々な金属イオンが存在するが、本検討では鉄以外の金属では、酸化活性が上昇することはなかった。

以上の結果より、本研究で構築した測定系は、Trinder反応による比色定量を利用し、血清蛋白Cpの酸化力を利用した形で、過剰鉄由来の酸化活性、すなわちLPIを測定できており、血清検体がもつ酸化能全体を評価していると考えられる。

本測定系での測定値は、既報のLPI測定キット (FeROS™ LPI Kit® (Aferrix社)) と比較すると明らかな正の相関は認めなかった。この原因としては、既報の測定方法では鉄そのものの酸化活性能を、酸化感受性蛍光プローブの発する蛍光により測定しているが、我々の新規測定系では血清検体中のCpの酸化能を利用する形で鉄の酸化活性能を測定しており、根本的な測定原理の違いが測定値の差となっている可能性を考えている。

LPIはNTBIが示す酸化活性であるが、NTBIとLPIの相関係数は0.3695であり、明らかな相関は認めなかった。NTBI高値でもLPI低値の検体もあれば、NTBI低値でLPI高値の検体も認めた。NTBIはアルブミンやクエン酸など血液中の様々な物質と緩く結合している分子形態的には不均一なものであることから、個々の血液中の過剰鉄と結合する様々な物質の濃度や、鉄と直接は結合しないが酸化活性に影響を及ぼす物質の濃度、などによって、同じNTBI値であっても異なるLPIを呈するものと考えている。

以上より本研究で開発したLPI新規測定系の利点は、既報のNTBIやLPI測定では検出できなかった過剰鉄由来の組織障害となりうる酸化活性能を評価できている可能性があることと、自動分析装置対応試薬としてデザインされていることで多数の検体を短時間で測定する処理能力に加え、実臨床で即使用可能な高い汎用性を持つことにある。この利点を生かすことで、今後様々な病態におけるLPI測定の臨床的意義についての検討が可能になった。

## 結 論

本研究で構築したLPI新規測定系は、これまで計測・評価が難しかった過剰鉄による臓器障害の評価や予測として有用な可能性があり、さらに短時間で大量の検体を自動で処理することが可能であり、過剰鉄が持つ毒性についての基礎研究、臨床研究の両方に大きく貢献しうる。

## 引用文献

(重要な引用文献 3 編以内を掲載すること。)

1. Ito S, Ikuta K, Kato D, et al. Non-transferrin-bound iron assay system utilizing a conventional automated analyzer. *Clin Chim Acta*. 2014;437:129-135.
2. Goto T, Ikuta K, et al. Hyperferritinemia after adult allogeneic hematopoietic cell transplantation: quantification of iron burden by determining non-transferrin-bound iron. *Int J Hematol*. 2013;97:125-34
3. Cabantchik ZI. Labile iron in cells and body fluids: physiology, pathology, and pharmacology, *Front Pharmacol*. 2014;5:45.

## 参考論文

(参考論文 5 編以内を掲載すること。)

1. Hatayama M, Ikuta K, Ishioh M, Saito T, Toki Y, Yamamoto M, Shindo M, Torimoto Y, Okumura T. Pseudogout Attack after Pegfilgrastim Administration in Anaplastic Large Cell Lymphoma. *Intern Med*. 2018;57:1779-1782.
2. Igarashi S, Nozu T, Ishioh M, Kumei S, Saito T, Toki Y, Hatayama M, Yamamoto M, Shindo M, Tanabe H, Okumura T. Centrally administered orexin prevents lipopolysaccharide and colchicine induced lethality via the vagal cholinergic pathway in a sepsis model in rats. *Biochem Pharmacol*. 2020;182:114262.
3. Takahashi K, Fujiya M, Ueno N, Saito T, Sugiyama Y, Murakami Y, Iwama T, Sasaki T, Ijiri M, Tanaka K, Sakatani A, Ando K, Nomura Y, Kashima S, Goto M, Moriichi K, Okumura T. White coat status is a predictive marker for post-esophageal endoscopic submucosal dissection stricture: a retrospective study. *Esophagus*. 2019;16:258-263