

血清 Transferrin Receptor の Radioimmunoassay 法の 開発とその臨床応用

近藤 仁

札幌医科大学内科学第4講座 (主任 漆崎一朗 教授)

Development of Radioimmunoassay for Serum Transferrin Receptor and Its Clinical Application

Hitoshi KONDO

*Department of Internal Medicine (Section 4), Sapporo Medical College
(Chief : Prof. I. Urushizaki)*

The transferrin receptor is a transmembrane glycoprotein composed of two disulfide-linked 95,000 molecular weight subunits, and has an essential role to deliver iron-loaded transferrin into the cells. In the present paper, a new purification method of the transferrin receptor from human placenta and evidence of a circulating transferrin receptor in the sera using a sandwich radioimmunoassay are described.

The results obtained were as follows;

(1) Transferrin receptor with a molecular weight of 95,000 daltons was isolated from human placenta by a combination of Sephacryl S-300 column chromatography and affinity chromatography immobilized with anti-transferrin antibody. The yield of the receptor was about 0.8 mg from 500g of the placenta.

(2) A quantitative method for measuring immunoreactive transferrin receptor by using anti-transferrin receptor monoclonal antibodies, B3/25 and OKT9 was developed. Circulating transferrin receptor was detected in human serum with this assay and the mean concentrations of the serum transferrin receptor in healthy males and females were 251 ± 94 (mean \pm SD) ng/ml and 256 ± 99 ng/ml, respectively.

(3) The mean serum transferrin receptor concentration of patients with iron deficiency anemia (IDA), autoimmune hemolytic anemia (AIHA) and aplastic anemia were 730 ± 391 ng/ml, 1452 ± 1078 ng/ml and 182 ± 39 ng/ml, respectively. The values of those with IDA and AIHA were significantly higher than that of normal controls and the values for aplastic anemia were lower than that of normal controls.

(4) The mean serum transferrin receptor concentration of patients with polycythemia vera and secondary polycythemia, bone marrow findings of which are usually very cellular, were 800 ± 125 ng/ml and 1033 ± 203 ng/ml, respectively. Both of them were significantly higher than that of normal controls.

(5) There was a good correlation between serum transferrin receptor values and reticulocyte counts in patients with IDA, AIHA and aplastic anemia. In patients with IDA, serum transferrin receptor values had a significant positive correlation with total iron binding capacity and significant negative correlations with serum iron and serum ferritin concentration, whereas no correlations were observed in AIHA and aplastic anemia.

Therefore, the number of circulating transferrin receptors in patients with anemia and polycythemia may reflect the level of bone marrow erythropoiesis and is a potential new index for red cell production.

(Received October 22, 1987 and accepted November 27, 1987)

Key Words: Transferrin receptor, Transferrin, Radioimmunoassay, Anemia, Polycythemia

1 緒 言

Transferrin (Tf)は血清中に存在する分子量 80,000 ダルトンの glycoprotein で、骨髄、胎盤などの生体の鉄需要の盛んな臓器へ鉄を供給することがその機能と考えられている¹⁾。Jandl and Katz²⁾は網赤血球表面に Tf が特異的に結合して鉄イオンを細胞に受け渡す現象を見出し、細胞表面にその receptor が存在する可能性を示唆した。以来、網赤血球ばかりでなく胎盤絨毛膜³⁾、レクチン刺激リンパ球⁴⁾、各種継代培養細胞⁵⁾にも transferrin receptor (Tf・R) の存在が報告されるようになった。Tf・R は分子量 190,000 ダルトンの細胞表面上の glycoprotein で分子量 95,000 ダルトンの相同の 2 つの subunit より構成されている^{6,7)}。細胞内への鉄イオン取り込みは、血清中の Tf がこの細胞表面の Tf・R に結合することにより開始されることが明らかにされた⁸⁾。Tf は Tf・R と結合した後、細胞内の endosome に運搬され、pH の低下に伴い鉄を cytosol に放出して Tf・R とともに再び細胞表面に recycle する receptor-mediated endocytosis を行うと考えられている⁹⁾。生体内において Tf・R は肝細胞¹⁰⁾、黒質神経細胞¹¹⁾、扁平上皮基底層、臍ランゲルハンス島細胞¹²⁾などにわずかながら認められるが、分布の主体はヘモクロビン合成のための鉄を必要とする骨髄赤芽球や網赤血球である¹³⁻¹⁵⁾。

近年、Pan and Johnstone¹⁶⁾は羊網赤血球が、*in vitro* で培養液中に Tf・R を shedding する現象を見だし、さらに教室の Kohgo *et al.*¹⁷⁾も慢性骨髄性白血病由来培養株 K562 細胞が細胞表面の Tf・R をリガンドの存在下で時間依存性に shedding することを確認した。したがって、血清などの体液中にもエリスロン由来の Tf・R が存在することが予想される。

そこで著者は、ヒト胎盤絨毛膜から短時間にリガンドとの結合性を有する Tf・R を抽出しうる方法を新たに考案するとともに、抗 Tf・R モノクローナル抗体である B3/25¹⁸⁾及び OKT-9¹⁹⁾と精製 Tf・R を用いた Tf・R の radioimmunoassay 法(RIA)を開発した。本論文では、正常人、貧血及び多血症患者の血清中に Tf・R を検出したこととともに、その臨床的意義について検討を加えたので報告する。

2 実験方法

2.1 対 象

健康人男性 38 例(年齢 18~72 歳)、女性 54 例(15~78 歳)の血清と札幌医科大学第 4 内科を受診した

鉄欠乏性貧血(iron deficiency anemia; IDA) 41 例、自己免疫性溶血性貧血(autoimmune hemolytic anemia; AIHA) 5 例、再生不良性貧血 5 例、真性多血症(polycythemia vera; PV) 3 例、2 次性多血症(secondary polycythemia; SP) 3 例の治療開始前血清を用いた。また 7 例の IDA、5 例の AIHA でそれぞれ鉄剤あるいはステロイドホルモン(プレドニゾロン)投与後の治療経過中、採血した。採血は原則として早朝空腹時に肘静脈より施行した。すべての血清は使用まで -20℃で凍結保存した。

2.2 ヒト胎盤 transferrin receptor の抽出

2.2.1 ヒト transferrin の抽出

ヒト Tf の抽出は、Aisen *et al.*²⁰⁾、Okada *et al.*²¹⁾の方法に従った。北海道赤十字血液センターの保存血 200 ml を 12,000 rpm、5 分間遠心、血漿成分を得た。0.5 M 硫酸(III)アンモニウム溶液 50 μ l と 0.5 M 炭酸水素ナトリウム 400 μ l を加えて室温で 1 時間反応させ血漿を 35%硫酸アンモニウムで 4 時間、4℃で塩析した後、10,000×g、30 分間遠心し、その上清をさらに 60%硫酸アンモニウムで塩析後、10,000×g、30 分間遠心して沈澱物を得た。この沈澱物を 0.05 M Tris-HCl, pH 8.0 に溶解、同緩衝液で平衡化した DEAE Sephadex A-50 (Pharmacia 社) カラム(5×40 cm)に添加し、0.05 M から 0.3 M の This-HCl, pH 8.0 の直線濃度勾配で溶出した。溶出された各分画の 470 nm 及び 410 nm における吸光度(O.D.)を分光光度計(日立社製 U 3200)を用いて測定し、その比(O.D. 470/O.D. 410)が 1.0 以上の鉄飽和 Tf の分画を回収した。この分画を再び 0.05 M Tris-HCl, pH 8.0 で透析後、同緩衝液で平衡化した DEAE Sephadex A-50 カラム(5×40 cm)に添加し 0.05 M から 0.2 M の Tris-HCl, pH 8.0 の直線濃度勾配で溶出し、O.D. 470/O.D. 410 比が 1.2 以上の分画を回収した。この分画を Diaflow membrane PM 30 (Amicon 社)で濃縮後、さらに 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0 で平衡化した Sephadex G-150 (Pharmacia 社) カラム(2.5×90 cm)に添加して、同緩衝液で溶出し、O.D. 470/O.D. 410 比が 1.3 以上の分画を精製 Tf とした。精製 Tf の純度は sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) で確かめた²²⁾。

2.2.2 ヒト transferrin の ¹²⁵I 標識

ヒト Tf(40 μ g)の ¹²⁵I 標識はビーズに固定化された lactoperoxidase, glucose oxidase (Enzymobeads, Bio-Rad 社)と Na ¹²⁵I(第 1 ラジオアイソトープ研究所、比活性 1 mCi/10 μ l) 10 μ l を用いて²³⁾行なった。

反応は1%β-D-glucose 50 μl を添加して開始し、20分後遠心によりビーズを分離して終了させた。この試料を0.2 M リン酸緩衝液、pH 7.4 で平衡化した Sephadex G-25 カラム (1×10 cm) に添加し同緩衝液で0.5 ml ずつ溶出し、第4~6分画に相当する放射能の第1ピークに出現した¹²⁵I 標識 Tf を回収した。得られた¹²⁵I 標識 Tf の比活性は2.5~3.5 μCi/μg 蛋白であった。

2・2・3 抗ヒト transferrin 抗体固相化 affinity カラムの作製

ヒト Tf 100 μg を同量の Freund's complete adjuvant (Difco 社) と混和後、家兎(雄(2.5 kg) 背部皮下に2週間の間隔をおいて3回接種した。抗血清の力価は、最終的には1%agar (Difco 社) による Ouchterloney 法²⁴⁾ で16倍であった。この抗血清から Fahey *et al.*²⁵⁾ の方法に準じ以下のように IgG 分画を精製した。すなわち33%硫酸アンモニウム塩析で生じた沈澱物を回収して5倍量の蒸留水に溶解した。これを0.01 M リン酸緩衝液、pH 8.5 で透析した後、同緩衝液で平衡化した DEAE sephadex A-50 (Pharmacia 社) カラム (3.5×15 cm) に添加し、その pass-through 分画を回収して精製 IgG とした。IgG 分画の Sepharose 4B ゲルへの固定化は van Eijk *et al.*²⁶⁾ の方法に従って行った。乾燥 CNBr-activated Sepharose 4B (Pharmacia 社) 7 g を 1 mM HCl 1500 ml で膨潤、洗浄した後、0.1 M 炭酸緩衝液、0.5 M NaCl, pH 8.3 で透析した精製 IgG (100 mg) と 4°C, 24 時間混和してカップリングさせた。ゲルに残存する活性基は、ゲルを 0.2 M グリシン緩衝液、pH 8.0 中で室温、2 時間インキュベーションしてブロックした。さらにゲルを、0.1 M 炭酸緩衝液、0.5 M NaCl, pH 8.3 及び 0.1 M 酢酸緩衝液、0.5 M NaCl, pH 4.0 で交互に4回洗浄して余剰のリガンドを除去した後、抗 Tf 抗体固相化 affinity カラムとして使用した。

2・2・4 ヒト胎盤 transferrin receptor の抽出

抽出方法の概略を Fig. 1 に示した。正常分娩後 30 分以内に得た新鮮ヒト胎盤(約 500 g) を 1~2 cm に細切り、氷冷した 2 mM phenyl methyl sulphonyl fluoride (PMSF, Sigma 社) 及び 500 U/ml のアプロチニン (バイエル・武田製薬) を含む 0.1 M 塩化カルシウム溶液中で洗浄し、血液成分をできるだけ除去した。ついでこの細切片を 2 mM PMSF, 500 U/ml のアプロチニンを含む 0.01 M Tris-HCl, 0.15 M NaCl, pH 7.4 中で Polytron Blender (Kinematica 社, Switzerland) を用い氷冷中で出力 5, 5 分間ホモジナイズした

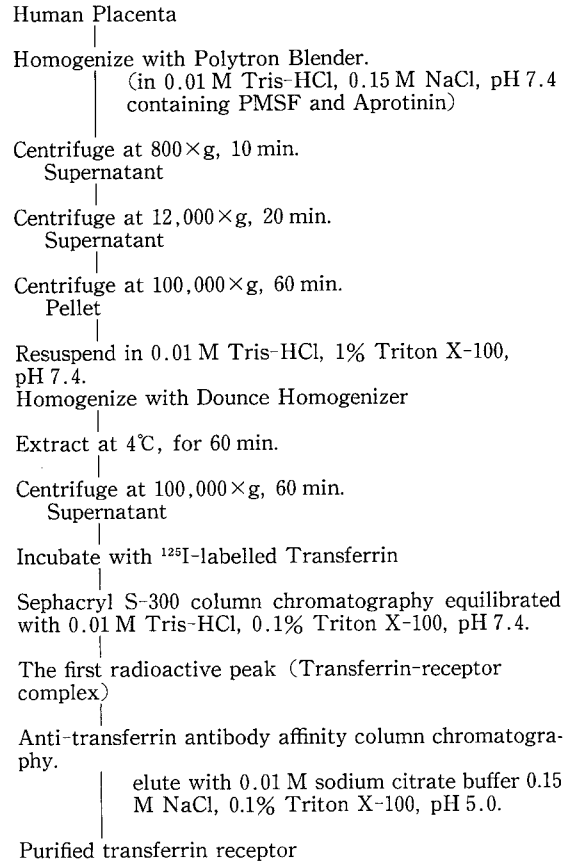


Fig. 1 Method for purification of transferrin receptor from human placenta.

後 800×g, 10 分間, 4°C で遠心して上清を得た。この上清を 12,000×g, 20 分間, 4°C で遠心した後、さらにその上清を 100,000×g, 60 分間遠心し(遠心機: Hitachi SCP 70H, ローター; Hitachi RP45T) ベレットを回収した。10 g のベレットに 100 ml の 1% Triton X-100, 0.01 M Tris-HCl, 0.15 M, NaCl, pH 7.4 を加え、Dounce ホモジナイザーで上下動 20 回行った後、4°C, 60 分間攪拌して可溶化した。その後 100,000×g, 4°C, 60 分間遠心し、上清を回収して可溶化膜分画とした。これに 2・2・2 で作製した¹²⁵I 標識 Tf (25 ng, 1×10⁶ cpm) と非標識 Tf 1 mg を添加、4°C, 60 分間インキュベーションし、膜分画に含まれる Tf・R に Tf を結合させ Tf-Tf・R 複合体とした。この膜分画を Diaflow membrane PM30 (Amicon 社) を用いて 30 ml まで濃縮した後、0.1% Triton X-100, 0.01 M Tris-HCl 0.15 M, NaCl, pH 7.4 で平衡化した Sephacryl S-300 カラム (6×150 cm) に添加し同緩衝液で溶出した。5 ml 毎に分画採取した溶出液の¹²⁵I

放射能を測定し、第65~75分画に溶出された Tf-Tf・R 複合体と第85~110分画に溶出された非結合の Tf を分離した。この Tf-Tf・R 複合体溶液を 0.1% Triton X-100, 0.1 M Tris-HCl, 0.15 M NaCl, pH 7.4 で平衡化した抗ヒト Tf IgG 固相化 affinity カラム (2×10 cm) に流速 3 ml/時で添加、同複合体をカラムに結合させた。このカラムを 200 ml の 0.1% Triton X-100, 0.1 M Tris-HCl, 0.15 M NaCl, pH 7.4 で洗浄した後、0.1% Triton X-100, 0.01 M クエン酸緩衝液, 0.15 M NaCl, pH 5.0 を用いて Tf から鉄イオンを遊離させ apo 化して Tf と receptor の結合を解離させ²⁷⁾、Tf・R を溶出し、ただちに 0.5 M Tris-HCl, pH 8.0 で滴定して pH 7.4 とした。この精製 Tf・R を 0.1% Triton X-100, 0.01 M Tris-HCl, pH 7.4 で一昼夜、3 回透析を繰り返した後、Diaflow membrane PM30 を用いて約 2 ml まで濃縮した。精製 Tf・R の純度は 1% sodium dodecyl sulfate を含む polyacrylamide gel electrophoresis で確かめた。

2・2・5 Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

Fairbanks *et al.*²²⁾ の方法に準拠し、SDS-PAGE で 2・2・1 の精製 Tf 及び 2・2・4 の精製 Tf・R の純度を検定した。泳動装置は 0.2×12×14 cm のスラブゲル電気泳動装置 (Bio-Rad 社) を用いた。試料用緩衝液には 2% SDS, 0.02 M 2-mercaptoethanol, 20% glycerol を含む 0.01 M Tris-HCl, pH 8.0 を用い試料を当量混合し、100°C, 5 分間処理後、試料溝に添加した。泳動ゲルは 1% SDS, 5.6% polyacrylamide gel, 0.04 M Tris-酢酸緩衝液, pH 7.4 とし定電流 60 mA で 3 時間室温で泳動させた。泳動後、ゲルを 0.2% Coomassie brilliant blue R-250, 13% 酢酸, 27% メタノール溶液中で染色し、ついで 10% 酢酸, 10% メタノール溶液を用いて脱色した。分子量決定の標準蛋白として SDS-PAGE 用 Low molecular protein set (Pharmacia 社) を用い相対移動度から分子量を算出した。

2・2・6 精製 transferrin receptor のリガンドの結合の活性の測定

精製 Tf・R 50 µg を ¹²⁵I 標識 Tf (10 ng, 4×10⁴ cpm) あるいは、同量の ¹²⁵I 標識 Tf と非標識 Tf 1 mg を 0.01 M リン酸緩衝液, 0.15 M NaCl, pH 7.4 (PBS) 中で 1 時間、4°C で混和した後、同緩衝液で平衡化した Sephadex G-150 (Pharmacia 社) カラム (2×90 cm) に添加した。PBS で溶出された各分画 (3 ml) の ¹²⁵I 放射能を γ-counter (LKB Wallac 社, LKB-1282) で測定した。

2・3 血清 transferrin receptor の radioimmunoassay 法

2・3・1 抗 transferrin receptor モノクロナール抗体, B3/25 の ¹²⁵I 標識

抗 Tf・R モノクロナール抗体 B3/25 (Hydritech 社) の ¹²⁵I 標識は、Hunter²⁸⁾ の方法に従った。30 µg の B3/25 と 50 µg の 0.5 M リン酸緩衝液, pH 7.4 及び Na ¹²⁵I (第 1 ラジオアイソトープ研究所, 1 mCi/10 µl) 10 µl を混和した後、Chloramine-T (2 mg/ml) 10 µl を加え、30 秒間室温でインキュベーションし、メタ重亜硫酸ナトリウム (10 mg/ml) 50 µl, 1 M ヨウ化カリウム 5 µl を加え反応を止めた。0.1% bovine serum albumin (BSA, Sigma 社) を含む 0.01 M リン酸緩衝液, 0.15 M NaCl, pH 7.4 (PBS) で平衡化された Sephadex G-25 カラム (1×15 cm) に試料を添加し、同緩衝液で溶出して 0.5 ml ずつ分画採取した。第 6~8 分画に相当する放射能の第 1 ピークに溶出された ¹²⁵I 標識 B3/25 を回収した。得られた ¹²⁵I 標識 B3/25 の比活性は約 5 µCi/µg 蛋白であった。

2・3・2 Radioimmunoassay (RIA) 法

2 種類の抗 Tf・R モノクロナール抗体, OKT-9 (Ortho Diagnostic 社), B3/25 を用いた sandwich-RIA 法で血清中 Tf・R を測定した。

平底 96 multi-well plate (Dynatech 社) に 10 µg/ml の OKT-9 を各 well に 50 µl ずつ分注し、12 時間、4°C でインキュベーションして OKT-9 を固定化した。各 well を 1% BSA 加 PBS で 3 回洗浄後、同緩衝液で 60 分間室温で静置して非特異的吸着をブロックした。40 µl の各種濃度の精製 Tf・R (0~2,000 ng/ml) または PBS で 4 倍希釈した被検血清を加え 4°C, 4 時間インキュベーションした。0.1% BSA 加 PBS で 3 回洗浄した後、¹²⁵I 標識 B3/25 (3×10⁵ cpm/well) を 40 µl 加え、4°C, 12 時間反応させ、その後、0.1% BSA 加 PBS でさらに 3 回洗浄し、各 well の ¹²⁵I 放射能を γ-counter で測定した。総結合放射能より抗原を加えなかった well の非特異的結合放射能を差し引いて特異的結合を算出した。すべての検体は 3 回同時に測定し、その平均値で結果を示した。

2・4 その他の血液学的検査

末梢血網赤血球数、ヘモグロビン濃度、血清鉄値、総鉄結合能及び血清フェリチン値を測定し、血清 Tf・R 値との相関を検討した。末梢血網赤血球数は Pappenheim 法²⁹⁾ により末梢赤血球 1,000 個に対する網赤血球の割合から血液 1 µl あたりの絶対数として求めた。ヘモグロビン濃度はシアンメトヘモグロビン法³⁰⁾、血清鉄

値はトリビロジルトリアジン法³¹⁾、総鉄結合能はTIBCマイクロテスト「第一」(第1ラジオアイソトープ研究所)を用いて測定した³²⁾。血清フェリチン値はSPAC ferritin キット(第1ラジオアイソトープ研究所)を用いて測定した³³⁾。

2.5 蛋白定量法

蛋白質濃度はBSAを標準蛋白としてBio-Rad Protein Assay Kit (Bio-Rad社)を用いて測定した。Triton X-100を加えた試料はBSA標準蛋白としてWang *et al.*³⁴⁾の方法に準じて蛋白濃度を測定した。

2.6 統計学的検定

検定はStudent's t testを用い、危険率5%以下を有意差とした。相関関係は一次直線回帰分析により危険率5%以下を有意した。

3 結果

3.1 ヒト胎盤 transferrin receptor の抽出と同定

3.1.1 ヒト transferrin receptor の抽出

Tf・Rの精製は超遠心を用いた胎盤可溶化膜分画の分離、Sephacryl S-300 カラムクロマトグラフィーによるTf-Tf・R複合体の回収、抗Tf抗体カラムによるTf・Rの抽出の3段階から成る。Sephacryl S-300 カラム溶出パターンではFig. 2に示すように2つの¹²⁵I放射能のピークを認めキャリブレーションの結果から第1峰は分子量約350,000~400,000ダルトン、第2峰は分子量約80,000ダルトンであり、それぞれTf-Tf・R複合体及び、非結合のTfと考えられた。このTf-Tf・R

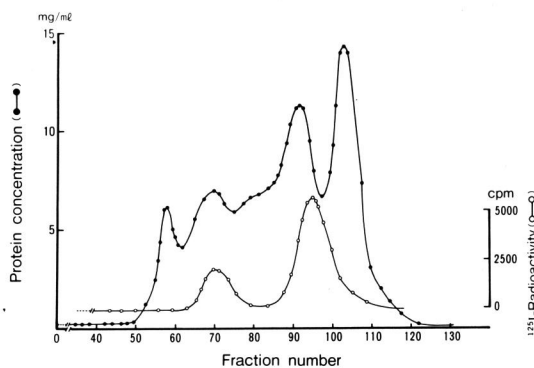


Fig. 2 Sephacryl S-300 chromatogram of Triton X-100 extract from human placenta. The extract from one placenta (500 g) was incubated with 25 ng of ¹²⁵I-labelled transferrin and 1 mg of unlabelled transferrin for 1 hour at 4°C. Then, the mixture was chromatographed through a Sephacryl S-300 column (6×150 cm).
○—○ ¹²⁵I-labelled transferrin radioactivity.
●—● protein concentration.

複合体分画を回収した後、抗Tf抗体固着化 affinity カラムに添加した。ゲルを洗浄後0.1% Triton X-100, 0.01 M クエン酸緩衝液, 0.15 M NaCl, pH 5.0でTfをapo化する事によりreceptorのみを解離させて精製Tf・Rを得た。

Fig. 3に抗Tf抗体 affinity カラム添加前後のTf・RのSDS-PAGEの所見を示した。抗Tf抗体 affinity カラム添加前のTf-Tf・R複合体分画は分子量95,000ダルトン、80,000ダルトン及び14,000ダルトン主体に数本のバンドが認められたが(Fig. 3-A)、抗Tf抗体 affinity カラムを用いることにより分子量95,000ダルトンの単一のバンドに精製された(Fig. 3-B)。

Tf・R精製過程における回収率と蛋白量をTable 1に示した。ヒト胎盤500gから1% Triton X-100による可溶化で得られた膜分画の総蛋白質量は平均2,100mgで1.2 mgのTf・Rが含まれていた。この可溶化膜分画

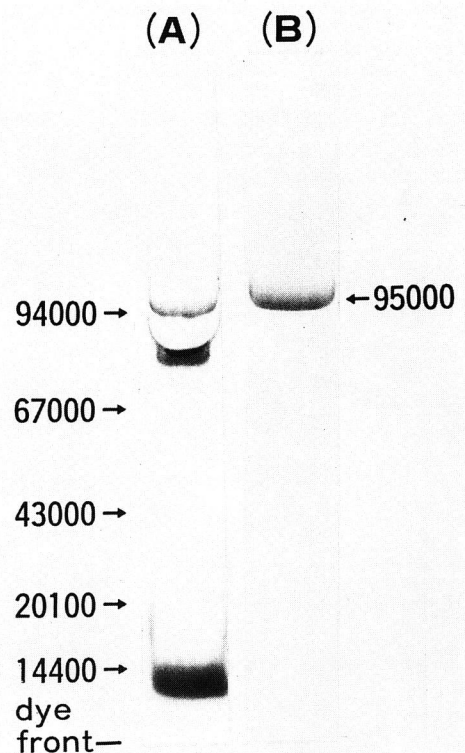


Fig. 3 SDS-PAGE of the first radioactive peak of Sephacryl S-300 elution (A) and purified transferrin receptor (B). The molecular weight markers were phosphorylase b (Mr. 94,000), albumin (Mr. 67,000), ovalbumin (Mr. 43,000) trypsin inhibitor (Mr. 20,100) and α -lactalbumin (Mr. 14,400).

Table 1 Recovery ratio of purified transferrin receptor from human placenta.

	Protein concentration ^{a)}	Total protein ^{a)}	Total transferrin receptor ^{a)} (μg)	Relative recovery ratio (%)
Triton X-100 extract	21.1 \pm 2.3(mg/ml)	2100 \pm 230(mg)	1240 \pm 210	100
Sephacryl S-300 column	4.3 \pm 0.5(mg/ml)	216 \pm 21(mg)	1070 \pm 160	86.3
Anti-transferrin antibody affinity column	320 \pm 38 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	800 \pm 95(μg)	800 \pm 95	64.5

a) Mean \pm SD of 3 experiments.

から Sephacryl S-300 カラム, 抗 Tf 抗体固相化 affinity カラムを用いることにより, 最終的に Tf \cdot R の約 65% が回収され, 収量は約 800 μg であった.

3.1.2 精製 transferrin receptor のリガンドとの結合活性

精製 Tf \cdot R (50 μg) と ^{125}I 標識 Tf (10 ng, 4×10^4 cpm) を PBS 中で 4 $^{\circ}\text{C}$, 1 時間インキュベーションした後, Sephadex G-150 カラムクロマトグラフィーを行った. Fig. 4 に示すように分子量 350,000 \sim 400,000 ダルトンの分画に ^{125}I 放射能のピークが認められた. このピークは 1 mg の非標識 Tf の添加により消失することから, Tf と特異的に結合する Tf-Tf \cdot R 複合体と考えられた. したがって精製 Tf \cdot R は Tf との結合活性を保持した状態であった.

3.2 Transferrin receptor radioimmunoassay (RIA) の基礎的検討

3.2.1 標準曲線

精製 Tf \cdot R と 2 種類の抗 Tf \cdot R モノクローナル抗体, OKT-9, B 3/25 を用いて sandwich 法による RIA を確

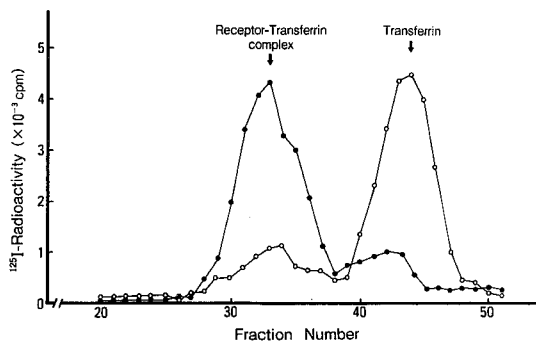


Fig. 4 Sephadex G-150 chromatogram of purified transferrin receptor incubated with ^{125}I -transferrin. An aliquot (50 μg) of transferrin receptor was incubated with 10 ng of ^{125}I -labelled transferrin for 1 hour at 4 $^{\circ}\text{C}$ in the presence (\circ — \circ) or absence (\bullet — \bullet) of unlabelled transferrin (1 mg).

立した. その標準曲線を Fig. 5 に示したが, 精製 Tf \cdot R 濃度 5 \sim 1,000 ng/ml の間で良好な定量的測定曲線が得られた.

3.2.2 特異性の検討

各種濃度 (20, 500, 3,000 ng/ml) の Tf \cdot R, ヒト血清アルブミン, ヒト Tf, ヒト IgG を本法で測定した特異性を検討した. その結果を Fig. 6 に示したが, 精製 Tf \cdot R のみが本法に反応し他の試料とは反応しなかった.

3.2.3 血清の希釈効果の検討

正常ヒト血清 2 検体を, PBS で 2 倍, 4 倍, 10 倍に希釈して, 本法をおこなった結果を Fig. 7 に示した. 2 \sim 10 倍の各希釈段階で直線性が得られ, 血清の希釈効果は認められなかった. したがって本法では PBS で 4 倍希釈した血清を用いた.

3.2.4 再現性

同時再現性について正常血清 1 例, 鉄欠乏性貧血 1 例, 溶血性貧血 1 例の 3 検体で 15 回測定検討した. 日差再現性については同時に 3 検体を測定日を変えて 7 回ずつ測定し, それぞれ変動係数を算出した³⁵⁾. Tabel 2 に示すように同時再現性では coefficient of variation

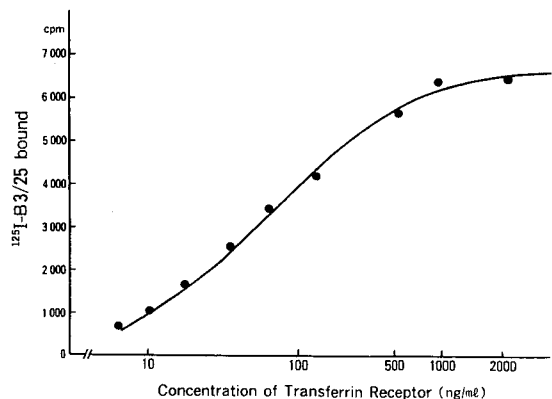


Fig. 5 Standard curve of radioimmunoassay for transferrin receptor.

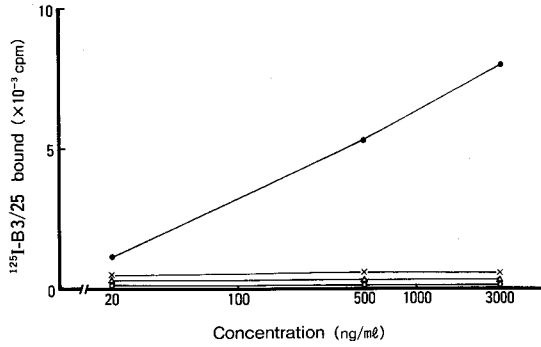


Fig. 6 Specificity of radioimmunoassay for transferrin receptor. Various concentrations (20, 500, 3000 ng/ml) of human transferrin receptor (●), human albumin (○), human IgG (△) and human transferrin (×) were added to the wells coated with OKT-9 and the assay was carried out.

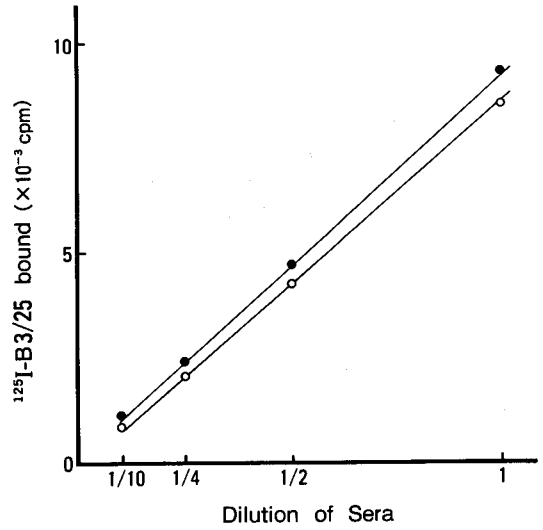


Fig. 7 Effect of serum dilution on radioimmunoassay using two kinds of normal sera.

(C. V.) は 6.4-8.2%, 日差再現性では C. V. は 7.4-9.5% といずれも変動係数は 10% 以下であった。

3.3 血清 transferrin receptor assay

3.3.1 正常人, 貧血患者及び多血症患者血清における transferrin receptor 濃度

健康人男性 38 例, 健康人女性 54 例, 鉄欠乏性貧血 (IDA) 41 例, 自己免疫性溶血貧血 (AIHA) 5 例, 再生不良性貧血 5 例, 真性多血症 (PV) 3 例及び 2 次性多血症 (SP) 3 例の血清 Tf・R 濃度を測定した結果を Fig. 8 に示した。健康人男性の血清 Tf・R 値は 251 ± 94 ng/ml (mean \pm SD), 健康人女性は 256 ± 99 ng/ml で性差はなく, また Fig. 9 に示したように年齢差も認められなかった。IDA 及び AIHA 患者の未治療時血清中の Tf・R 値はそれぞれ 730 ± 391 ng/ml, $1,452 \pm 1,078$ ng/ml であり正常人のそれに比べて有意に高値を示した。一方, 再生不良性貧血患者の未治療血清中の

Tf・R 値は 182 ± 39 ng/ml で有意に低値を示した。IDA 症例への鉄剤投与後, 末梢血網赤血球数が $2.4 \pm 1.0 \times 10^4 / \mu\text{l}$ から $7.3 \pm 4.1 \times 10^4 / \mu\text{l}$ と増加する時期には血清 Tf・R 値も $1,016 \pm 326$ ng/ml と著明に上昇した。さらに貧血改善後は末梢血網赤血球数の低下 ($5.2 \pm 1.6 \times 10^4 / \mu\text{l}$) について血清 Tf・R 値は 350 ± 147 ng/ml と低下し正常値と有意差を認めなくなった。同様に, AIHA においてもプレドニゾン投与後, 末梢血網赤血球数が $36.1 \pm 6.4 \times 10^4 / \mu\text{l}$ から $15.7 \pm 5.8 \times 10^4 / \mu\text{l}$ への減少するに伴い血清 Tf・R 値は 538 ± 150 ng/ml と低下した。真性多血症 (PV), 2 次性多血症 (SP) の血清 Tf・R 値はそれぞれ 800 ± 125 ng/ml, $1,033 \pm 203$ ng/ml で正常値に比べて有意に高値を示した。

Table 2 Coefficient of intra- and inter- assay variation.

sample	Number of measurement	Transferrin receptor level (ng/ml) Mean \pm SD	Coefficient of variation (%)
Intra-assay	1	232 ± 19	8.2
	2	967 ± 62	6.4
	3	2025 ± 167	8.2
Inter-assay	4	242 ± 23	9.5
	5	954 ± 71	7.4
	6	2077 ± 177	8.5

Sample 1, 4 : normal
 2, 5 : iron deficiency anemia
 3, 6 : autoimmune hemolytic anemia

Diagnosis	Serum Transferrin Receptor (ng/ml)					mean ± SD	significances ^{a)}	
	500	1000	1500	2000	2500			
Normal male (n=38)	[Dot plot]					251 ± 94	—	
Normal female (n=54)	[Dot plot]					256 ± 99	—	
Iron deficiency anemia	before therapy (n=41)	[Dot plot]					730 ± 391	P<0.001
	during therapy (n=14)	[Dot plot]					1016 ± 326	P<0.001
	after therapy (n=7)	[Dot plot]					350 ± 147	ns ^{b)}
Autoimmune hemolytic anemia	before therapy (n=5)	[Dot plot]					1452 ± 1078	P<0.05
	after therapy (n=5)	[Dot plot]					538 ± 150	P<0.01
Aplastic anemia (n=5)	[Dot plot]					182 ± 39	P<0.02	
Polycythemia vera (n=3)	[Dot plot]					800 ± 125	P<0.005	
Secondary polycythemia (n=3)	[Dot plot]					1033 ± 203	P<0.01	

Fig. 8 Concentration of serum transferrin receptor in normal subjects and patients with anemias and polycythemias.

The bars indicate the mean value of each group.

a) Statistically significant difference from normal values by Student's t test.

b) ns: no significance.

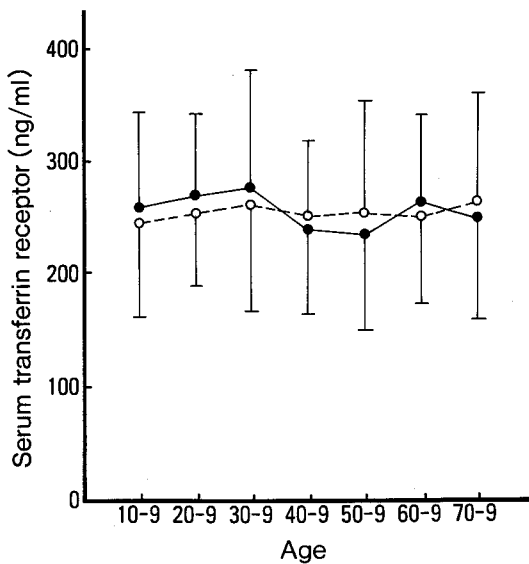


Fig. 9 Age distribution of serum transferrin receptor. (○—○) male, (●—●) female.

3・3・2 貧血患者血清 transferrin receptor 値と他の血液学的検査との相関

貧血患者の血清 Tf・R 値と網赤血球数、ヘモグロビン濃度、総鉄結合能、血清鉄値及び血清フェリチン値との相関 Table 3 に記した。IDA, AIHA, 再生不良性貧血のいずれの疾患においても血清 Tf・R 値は網赤血球数との高い正の相関を示した。血清 Tf・R 値は IDA では総鉄結合能と正の相関、血清鉄値及び血清フェリチン値とは負の相関を示したが、AIHA 及び再生不良性貧血ではこれらの間に有意な相関は認められなかった。

3・3・3 鉄欠乏性貧血、自己免疫性溶血性貧血の治療による血清 transferrin receptor 値の推移

IDA 症例に鉄剤を経静脈的に投与して貧血所見の改善に伴う血清 Tf・R 値、末梢網赤血球数及びヘモグロビン濃度の経時的推移を Fig. 10-A に示した。治療前 1,100 ng/ml あった血清 Tf・R 値は鉄剤の投与直後に一過性に 1,700 ng/ml まで上昇したが治療 5 日目に 950 ng/ml まで一時的に低下した。その後、末梢血網赤血球の増加と並行して血清 Tf・R は再度上昇し、貧

Table 3 Correlation coefficient between serum transferrin receptor and other parameters in patients with iron deficiency anemia, autoimmune hemolytic anemia and aplastic anemia.

Parameters	Iron Deficiency Anemia		Autoimmune Hemolytic Anemia		Aplastic Anemia	
	Number of Cases (n)	Correlation Coefficient (r)*	Number of Cases (n)	Correlation Coefficient (r)*	Number of Cases (n)	Correlation Coefficient (r)*
Reticulocyte counts	36	0.688 [†]	5	0.755 [†]	5	0.791 [†]
Hemoglobin concentration	36	-0.200	5	-0.446	5	0.239
Total iron binding capacity	10	0.593 [†]	5	-0.217	5	-0.708
Serum iron	10	-0.651 [†]	5	0.347	5	-0.610
Serum ferritin	10	-0.703 [†]	5	0.460	5	0.530

* Correlation between serum transferrin receptor and various parameters.

[†] Statistically significant linear regression ($p < 0.05$).

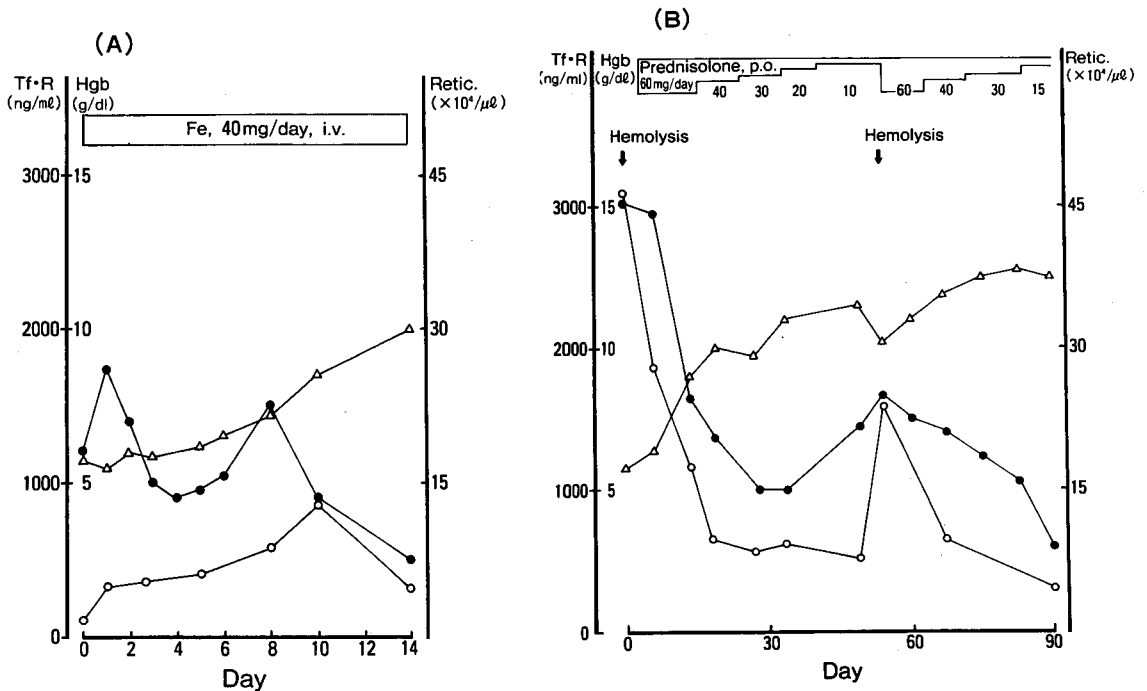


Fig. 10 Changes of serum transferrin receptor (Tf·R), hemoglobin concentration (Hgb) and peripheral reticulocyte counts (Retic).

(A) A patient with iron deficiency anemia during iron supplementation.

(B) A patient with autoimmune hemolytic anemia during treatment with prednisolone.

Tf·R, ●; Hgb, △; Retic, ○.

血が改善し網赤血球数の減少と共に低下して正常値となった。

Fig. 10-Bには経ロプレドニゾン投与で治療したAIHAの臨床経過を示した。溶血発作後3,000 ng/mlと高値を示した血清Tf·R値は、治療によって一時1,000 ng/mlまで低下したが、再度の溶血発作後の末

梢血網赤血球数への増加に一致して再度上昇を認めた。プレドニゾン増量による溶血性貧血の改善により末梢血網赤血球数が低下するにつれて血清Tf·R値も次第に低下した。いずれの治療経過においても血清Tf·R値は網赤血球数とほぼ並行して変動した。

4 考 察

哺乳動物において細胞への鉄イオンの取り込みは血清中の担鉄 Tf と細胞表面上の glycoprotein である Tf・R を介して行われる³⁾。胎児は母体内での成長過程に約 300 mg の鉄をヘモグロビンや他の鉄含有蛋白質合成のために必要とし³⁶⁾、鉄はこの receptor を介して能動的に胎児に供給されるためヒト胎盤は極めて Tf・R に富んでいる^{3,37)}。既に Wada *et al.*³⁸⁾ はヒト胎盤絨毛膜を ¹²⁵I 標識 Tf・R 抗体を用い免疫沈降法により Tf・R を抽出し、Seligman *et al.*³⁹⁾ は、Tf 固相化 affinity カラムを用いてヒト胎盤可溶性膜分画から Tf・R を単離し報告している。しかし、前者は収量が少なく、後者は母体由来の endogenous Tf による Tf・R のカラムへの結合阻害⁴⁰⁾、カラムへの非特異的な蛋白の吸着が多いなどの理由から精製不十分でありいずれも満足すべき方法と思われない。そこで著者は Fig. 1 に示したように抗 Tf 抗体 affinity カラムを用いた Tf・R の新たな抽出方法を開発し精製を試みた。Tf・R の結合活性を維持したまま抽出するために、胎盤の可溶性膜分画を ¹²⁵I 標識 Tf とプレインキュベーションしてカラムクロマトグラフィーを行い、Tf-Tf・R 複合体を回収し、さらにこの複合体を抗 Tf 抗体 affinity カラムに吸着させた後 receptor のみを溶出精製した。一般に膜 receptor 蛋白は不安定でリガンドとの結合活性を容易に失い易いことから、著者は最終的段階の affinity カラムからの Tf・R 解離を 0.01 M、クエン酸緩衝液、0.15 M NaCl, pH 5.0 を用い、Tf を apo 化して receptor との結合を失わせる²⁷⁾ という温和な条件を用いた。その結果、精製された Tf・R は Tf の結合活性を保っており (Fig. 4)、SDS-PAGE による検討で単一なバンドとして泳動される満足すべき純度であり、分子量は 95,000 ダルトンと諸家の報告に一致していた^{6,7)}。また、Tf・R の収量は胎盤 1 個当り約 800 μ g で、短時間に出発材料中の Tf・R の 65% が回収可能であった。

1983 年、Pan and Johnstone¹⁶⁾ は網赤球表面の Tf・R が培養液中に shedding される現象を報告し、教室の Kohgo *et al.*¹⁷⁾ も培養細胞 K562 が Tf の存在下でその細胞膜 Tf・R を培養液中に同様に shedding していることを確認した。従来、細胞表面にのみ存在すると考えられていた Tf・R が、体液中にも存在することが予想されたため、著者は精製 Tf・R を標準抗原として抗 Tf・R モノクローナル抗体 B 3/25 及び OKT-9 を用いた sandwich RIA 法を開発し血清 Tf・R の測定を行った。B 3/25, OKT-9 は両者とも Tf の receptor への結

合を阻害せず⁴¹⁾ かつお互いに Tf・R の異なる epitope を認識しているため (未発表データ) sandwich RIA 法の抗体として最適であると考えられた。本法は Tf・R を特異的に測定し、receptor への Tf の結合の有無による影響を受けず、標準抗原の測定範囲は 5~1,000 ng/ml と広範囲であり、再現性の上からも十分臨床的使用に耐えうと思われた。その結果、本法を用いて正常人血清中に immunoreactive な Tf・R が 70~440 ng/ml の濃度で平均 250 ng/ml と少なからぬ量が循環していることを初めて明らかにするとともに、その臨床的意義についても検討を加えることができた。

Lebman *et al.*¹³⁾ は抗 Tf・R モノクローナル抗体 L 5.1 を用いた flow cytometry を使って骨髄中の Tf・R 陽性細胞を調べ顆粒球 (myeloblast を除く) リンパ球の陽性率が 3.4~4.5% と低率なのに対し赤芽球系細胞は実に 88.2% と高い陽性率を示すことを報告しているが、ヒト生体内において多くの Tf・R がエリスロンに存在することを考えると血清 Tf・R 値が造血機能を反映している可能性が高い、そこで、貧血及び多血症患者血清を対象に本法を行った結果、IDA, AIHA など骨髄で赤芽球優位を示す病態では血清 Tf・R 値は健常者より有意に高値を示し、骨髄低形成の再生不良貧血では血清 Tf・R 値は低下していることが判明した。細胞表面の Tf・R 数は細胞内の鉄イオン濃度により調節を受け、培養液中への diferric Tf の添加によりその数を減じ⁴²⁾、desferrioxamine などの鉄キレーターによりその数を増す⁴³⁾ ことが知られている。さらに牟田ら⁴⁴⁾ は、各種血液疾患における赤芽球 Tf・R 数を検討し、正常人赤芽球 1 個あたりの Tf・R が $10.7 \pm 4.4 \times 10^5$ であるのに対し IDA では $17.0 \pm 3.6 \times 10^5$ とその数が有意に上昇していることを報告している。したがって、IDA では骨髄における赤芽球過形成に加えて、個々の赤芽球の Tf・R そのものが増加していることも、血清 Tf・R が高値を示す原因となっているのであろう。また骨髄が過形成を示し、赤血球系統の旺盛な増殖を示す赤血球增多症においても血清 Tf・R 値は有意に高値であった。

血清 Tf・R 値と他の血液学的検査との相関の検討では (Table 3) IDA, AIHA, 再生不良性貧血のいずれにおいても末梢網赤血球数と高い正の相関を示し、血清 Tf・R が赤血球産生能の指標として有効であることが示された。従来、生体の造血能を観察するために⁵⁹ Fe を用いた ferrokinetics による放射能鉄の体内動態測定が一般に行われているが操作が繁雑で、測定に約 2 週間必要とするという欠点を有する。さらに、ferrokinetics において造血能の指標とされてきた血奨鉄交替率

(plasma iron turnover, PIT) が血清中 Tf 飽和度に影響をうけることが報告⁴⁵⁾され、簡単、迅速に行える血清 Tf・R の測定は臨床上有効な検査となろう。

典型的な IDA の鉄剤の経静脈投与による治療過程における血清 Tf・R 値の変動は 2 相性であった (Fig. 10-A)。治療前の網赤血球数が正常範囲の時期にも血清 Tf は骨髄中の赤芽球過形成を反映してすでに高値を示し、次いで鉄剤投与開始直後一過性にさらに血清 Tf・R は上昇した。この時点での赤芽球の分裂・増殖はまだ考えがたくむしろ鉄飽和 Tf の増加により Tf・R の細胞内 recycle が亢進し血中への shedding が一過性に増加したために血清 Tf・R が上昇したと考えるのが妥当と思われる。

一方、鉄剤抗与 7,8 日後にみられた 2 度目の血清 Tf・R の増加は、網赤血球増多とはほぼ並行していることから、鉄剤投与に反応して赤芽球が骨髄中で増加していることを反映していると考えられる。特に、血清 Tf・R の上昇が末梢網赤血球増加の 2,3 日前に認められることは、骨髄における赤芽球の増殖の早期診断の有用性からも注目に値する。以後、ヘモグロビン濃度が改善するにつれて血清 Tf・R は網赤血球とともに低下して正常値となり治療が効果的であったことを示している。

また、AIHA では溶血発作後、骨髄における赤血球産生の亢進により血清 Tf・R 値、網赤血球数ともに著しく増加していたがブレドニゾロン治療に反応して貧血が改善するにつれ次第に低下した。経過中、再度溶血発作をみたため赤血球の産生が亢進し血清 Tf・R 値は再上昇したが最終的に網赤血球数の減少とともに低下した。

このように、いずれの病態においても血清 Tf・R は骨髄赤芽球系の分裂・増殖を的確に反映しており新しい造血のパラメーターとして意義は高いものと思われる。

5 結 語

1) ヒト胎盤より transferrin receptor を抽出、精製した。精製 Tf・R は SDS-PAGE にて分子量 95,000 ダルトンを示し、Tf との結合性を有していた。

2) 抗 Tf・R モノクローナル抗体、B 3/25, OKT-9 を用いて sandwich 法による Tf・R の RIA を確立した。正常男性 251 ± 94 ng/ml, 正常女性 258 ± 99 ng/ml の血清 Tf・R を検出し、性、年齢による差は認めなかった。

3) 各種貧血の治療前血清 Tf・R を測定し IDA 730 ± 391 ng/ml (n=41), AIHA $1,452 \pm 1,078$

ng/ml (n=5) で正常血清 Tf・R 値と比較して有意に高値であり、また再生不良性貧血では 182 ± 39 ng/ml (n=5) と有意に低値であった。IDA, AIHA の血清 Tf・R 値は治療による末梢網赤血球数の減少につれて低下した。

4) 真性多血症, 2 次性多血症の血清 Tf・R 値はそれぞれ 800 ± 125 ng/ml, $1,033 \pm 203$ ng/ml でありいずれも正常血清 Tf・R 値と比較して有意に高値を示した。

5) IDA, AIHA, 再生不良性貧血の血清 Tf・R 値は網赤血球数とよく相関した。IDA において血清 Tf・R 値は総鉄結合能と正の相関、血清鉄値、血清フェリチン値とは負の相関を示したが、AIHA や再生不良貧血では一定の相関を認めなかった。以上、貧血及び多血症において血清 Tf・R は骨髄赤血球産生を反映し、新しい造血の指標として有用であると考えられた。

本稿を終えるにあたり、御指導、御校閲下さった本学内科学第 4 講座、漆崎一郎教授に深謝致します。また、直接御指導、御協力いただいた高後裕講師に深謝致します。並びに教室諸兄に心から感謝致します。

文 献

1. Aisen, P. and Listowsky, I.: Iron transferrin and storage proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **49**, 357-393 (1980).
2. Jandl, J. H. and Katz, J. H.: The plasma to cell cycle of transferrin. *J. Clin. Invest.* **42**, 314-326 (1963).
3. Loh, T. T., Higuchi, D. A., van Bockxmeer, F. M., Smith, C. H. and Brown, E. B.: Transferrin receptor of the human placental microvillous membrane. *J. Clin. Invest.* **65**, 1182-1191 (1980).
4. Galbraith, G. M. P., Goust, J. M., Mercurio, S. M. and Galbraith, R. M.: Transferrin binding by mitogen activated human peripheral blood lymphocytes. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **16**, 387-395 (1980).
5. Hamilton, T. A., Wada, H. G. and Sussman, H. H.: Identification of transferrin receptor on the surface of human cultured cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 6406-6410 (1979).
6. Schnider, C., Sutherland, R., Newman, R. and Greaves, M.: Structural features of the cell surface receptor for transferrin that is recognized by monoclonal antibody OKT-9. *J. Biol. Chem.* **257**, 8516-8522 (1982).

7. Omary, M. B. and Trowbridge, I. S.: Covalent binding of fatty acid to transferrin receptor in cultured human cells. *J. Biol. Chem.* **256**, 4715-4718 (1981).
8. Pearse, B. M. F. and Bretscher, M. S.: Membrane cycling by coated vesicles. *Annu. Rev. Biochem.* **50**, 85-101 (1981).
9. Dautry-Varsat, A., Ciechanover, A. and Lodish, H. F.: pH and the recycling of transferrin during receptor-mediated endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 2258-2260 (1983).
10. Young, S. P., Bomford, A. and Williams, R.: Dual pathways for the uptake of rat asialotransferrin by rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **253**, 4972-4976 (1983).
11. Hill, H. M., Ruff, M. R., Weber, R. J. and Pert, C. B.: Transferrin receptor in rat brain: Neuropeptide-like pattern relationship to iron distribution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 4533-4557 (1985).
12. Gatter, K. G., Brown, G., Trowbridge, I. S., Woolston, R. E. and Mason, D. Y.: Transferrin receptors in human tissues; their distribution and possible clinical relevance. *J. Clin. Pathol.* **36**, 539-545 (1983).
13. Lebman, D., Trucco, M., Bottero, L., Lange, B., Pessano, S. and Rovera, G.: A monoclonal antibody that detects expression of transferrin receptor in human erythroid precursor cell. *Blood* **59**, 671-678 (1982).
14. Nunez, M. T., Glass, J., Fischer, S., Lavidor, L. M., Lenk, E. M. and Robinson, S. H.: Transferrin receptors in developing murine erythroid cells. *Br. J. Haematol.* **36**, 519-526 (1972).
15. Iacopetta, B. J., Morgan, E. H. and Yoeh, G. C. T.: Transferrin receptors and iron uptake during erythroid cell development. *Biochim. Biophys. Acta* **687**, 204-210 (1982).
16. Pan, B. and Johnstone, R. M.: Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selected externalization of the receptor. *Cell* **33**, 969-977 (1983).
17. Kohgo, Y., Niitsu, Y., Nishisato, T., Urushizaki, Y., Kondo, H., Fukushima, M., Tsushima, N. and Urushizaki, I.: Transferrin receptors of tumor cells potential tools for diagnosis and treatment of malignancies, In: Spik, G., Montreuil, J., Crichton, R. R., Mazurier, J., eds.: *Proteins on iron storage and transport*. 155-169 Elsevier Science Publishers, Amsterdam (1985).
18. Trowbridge, I. S. and Omary, M. B.: Human cell surface glycoprotein related to cell proliferation in the receptor for transferrin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 3039-3043 (1981).
19. Goding, J. W. and Burns, G. F.: Monoclonal antibody OKT 9 recognizes the receptor for transferrin on human acute lymphocytic leukemia cells. *J. Immunol.* **127**, 1256-1258 (1981).
20. Aisen, P., Leibman, A. and Reich, H. A.: Studies on the binding of iron to transferrin and conalbumin. *J. Biol. Chem.* **241**, 1666-1671 (1966).
21. Okada, S., Jarvis, B. and Brown, E. B.: *In vivo* evidence for the functional heterogeneity of transferrin-bound iron. V. Isotransferrins: An explanation of the Fletcher-Huehns phenomenon in the rat. *J. Lab. Clin. Med.* **93**, 189-198 (1979).
22. Fairbanks, G., Steck, T. L. and Wallach, D. F. H.: Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* **10**, 2606-2617 (1971).
23. Morrison, M. and Bayse, G. S.: Catalysis of iodination by lactoperoxidase. *Biochemistry* **9**, 2995-3000 (1970).
24. Ouchterloney, O.: Diffusion-gel methods for immunological analysis II. *Prog. Allergy* **6**, 30-154 (1962).
25. Fahey, J. L. and Terry, E. W.: Ion exchange chromatography and gel filtration. In: Weier, D. M., Blackwell, eds.: *Handbook of Experimental Immunology*. 8. 1-8. 16 Scientific Pub., Oxford. (1978).
26. van Eijk, H. G. and van Noort, W. L.: Isolation of rat transferrin using CN-Br activated Sepharose 4B. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **14**, 475-478 (1976).
27. Kohgo, Y., Urushizaki, Y., Kondo, H., Fukushima, M., Niitsu, Y. and Urushizaki, I.: Binding characteristics of transferrin receptors on tumor cells. In: Urushizaki, I., Aisen, P., Listowsky, I. and Drysdale, J. W. eds.: *Structure and function of iron storage and transport proteins*. 299-304, Elsevier, Amsterdam, (1983).
28. Hunter, W. M.: ¹²⁵I Radioimmunoassay. In: Weir, D. M. ed.: *Handbook of experimental immunology*. 2nd ed. 1-36, Blackwell Scientific, Oxford (1973).
29. Hunt, G. A.: A study of the Pappenheim stain a stable modification. *J. Lab. Clin. Med.* **29**, 207-210 (1944).
30. Matsubara, T., Okuzono, H. and Senba, U.: A

- modification of van Kampen Zijlstra's reagent for the hemoglobin cyanide method. *Clin. Chim. Acta* **93**, 163-164 (1979).
31. Ichida, T. Osaka, T. and Kojima, K.: A simple method for the determination of serum iron. *Clin. Chim. Acta* **22**, 271-275 (1968).
32. 林 三郎, 斎藤 宏, 牧健太郎, 中沢信彦: ラジオアッセイによる TIBC UIBC の微量測定法, *核医学* **16**, 1431-1440 (1979).
33. Koseki, J., Niitsu, Y., Goto, Y. and Urushizaki, I.: An evaluation of spac kit for serum ferritin measurement. *Radioisotopes* **28**, 38 (1979).
34. Wang, C. S. and Smith, L. R.: Lowly determination of protein in the presence of Triton X-100. *Anal. Biochem.* **63**, 414-417 (1975).
35. Rodbard, D.: Statistical quality control and routine data processing for radioimmunoassay and immunoradiometric assays. *Clin. Chem.* **20**, 1255-1270 (1974).
36. Pribilla, W., Bothwell, T. H., and Finch, C. A.: In: Wallerstein, R. D. and Mettier, S. eds.: *Iron in clinical Medicine*. 58-64, University of California Press, Berkely, CA. (1958).
37. Galbraith, M. P., Galbraith, R. M., Temple, A. and Faulk, W. P.: Demonstration of transferrin receptor on human placental trophoblast. *Blood* **55**, 240-242 (1980).
38. Wada, H. G., Hass, P. E. and Sussman, H. H.: Transferrin receptor in human placental brush border membrane. *J. Biol. Chem.* **254**, 12629-12635 (1979).
39. Seligman, P. A., Scheicher, R. B. and Allen, R. H.: Isolation and characterization of the transferrin receptor from human placenta. *J. Biol. Chem.* **254**, 9943-9946 (1979).
40. Tunoo, H. and Sussman, H. H.: Placental Transferrin receptor evaluation of the presence of endogenous ligand on specific binding. *J. Biol. Chem.* **258**, 4118-4122 (1983).
41. Mendelsohn, J., Trowbridge, I. S. and Castagnola, J.: Inhibition of human lymphocyte proliferation by monoclonal antibody to transferrin receptor. *Blood* **62**, 821-826 (1983).
42. Rao, K. K., Shapiro, D., Mattia, E., Bridges, K. and Klausner, R.: Effect of alterations in cellular iron on biosynthesis of transferrin receptor in K562 cells. *Mol. Cell. Biol.* **5**, 595-600 (1985).
43. Mattia, E., Krishnomurthy, R., Shapiro, D. S., Sussman, H. H. and Klausner, R. D.: Biosynthetic regulation of the human transferrin receptor by desferrioxamine in K562 cell. *J. Biol. Chem.* **259**, 2689-2694 (1984).
44. 牟田耕一郎, 西村純二, 井林 博: 各種血液疾患における, 赤芽球トランスフェリンレセプターの動態. *日本血液学会雑誌* **50**, 105-107 (1987).
45. Uchida, T., Akitsuki, T., Kimura, H., Tanaka, T., Matsuda, S. and Kariyone, S.: Relationship among plasma iron, plasma iron turnover and reticuloendothelial iron release. *Blood* **61**, 799-812 (1983).

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学内科学第4講座 近藤 仁