

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591363

研究課題名(和文)新規鉄代謝指標・生体内不安定鉄NTBIの革新的測定法開発・実用化研究及び臨床応用

研究課題名(英文)Nobel quantification system of non-transferrin-bound iron utilizing automated analyzer

研究代表者

佐々木 勝則 (Sasaki, Katsunori)

旭川医科大学・医学部・特任准教授

研究者番号：60336394

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：生体にとって悪影響を及ぼす非トランスフェリン結合鉄(non-transferrin bound iron, NTBI)の血中レベルを正確に把握する目的で、臨床応用可能なワン・ステップ型同時多検体測定システムの開発を試みた。生体にとって重要なトランスフェリン結合鉄をほとんど奪いことなく、NTBIを補足することが可能な発色型キレート剤を自動分析装置に導入した新規プロトコルを開発した。鉄毒性モニタリング法として、NTBIの有用性を検討した結果、輸血後鉄過剰症の治療効果判定に加え、化学療法後の臓器傷害予測においてもNTBI測定の有用性が示された。

研究成果の概要(英文)：Iron overload causes various organ damages. When transferrin is fully saturated, non-transferrin-bound iron (NTBI) appears in the serum. Since NTBI relates to oxidant stress, monitoring serum NTBI levels is crucial for iron-overloaded patients. In the present study, we aimed to develop the novel NTBI measuring reagent corresponding to the automatic analyzer by modifying the high-performance liquid chromatography (HPLC)-based NTBI assay (the gold standard method). The correlation coefficient for NTBI values between our system and HPLC method was 0.923, indicating that the accuracy of our system is comparable to the gold standard method. Our novel NTBI assay system should be a powerful tool for studying physiological and clinical importance of NTBI.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：鉄 不安定鉄 NTBI 鉄過剰 トランスフェリン HPLC 自動分析装置 バイオマーカー

## 1. 研究開始当初の背景

生体にとって鉄は必要不可欠な必須元素であるが、過剰に存在すると細胞傷害/臓器機能障害を引き起こし、DNA 損傷 (癌化) も促進することが明らかとなってきた (Free Radic Biol Med. 20: 553-66, 1996)。そのため、生体内では鉄は多くの分子が関与しながら巧妙に制御されている (Int J Biochem Cell Biol. 33: 940-59, 2001)。循環血液中では、鉄は主にトランスフェリン (transferrin, Tf) に結合し、必要な組織へと運搬される。健康人においては Tf の鉄飽和度は 25-30% であり、フリー (自由) な鉄を捕捉するための予備力を十分に残しているため、血液中にはフリーな鉄がほとんど存在しない。しかし、厳密に制御されているはずの生体内鉄代謝調節が何らかの原因により崩れ、鉄過剰状態に傾くと、まず Tf が過剰な鉄を捕捉しはじめる。その後、Tf の鉄飽和状態が 100% に近づくにつれ Tf に結合しきれなかった鉄がフリーの状態の血液中出现してくることになり、これを総称して非トランスフェリン結合鉄 (non-transferrin bound iron, NTBI) と呼ぶ (Br J Haematol. 40: 255-63, 1978)。生体内鉄代謝が崩れ鉄過剰状態に傾く原因として、サラセミア、骨髄異形成症候群、再生不良性貧血などの輸血依存性を呈する血液疾患、遺伝性ヘモクロマトーシス、透析患者への鉄剤の投与などが知られている。さらに最近の報告では、全身感染症、C 型慢性肝炎、アルコール性肝障害、各種の化学療法時や心肺バイパス時などの際にも NTBI が検出されている。以前は Tf の鉄飽和度が 100% 近くになってはじめて血液中に NTBI が出現すると考えられていたが、必ずしもそうではなく、Tf の鉄結合能がある程度残っていても NTBI が血液中に存在すると考えられるようになってきた (Br J Haematol. 99: 337-43, 1997)。ここで問題になるのが NTBI の挙動である。鉄が結合した状態の Tf は細胞表面のトランスフェリン受容体 1 を介して細胞内に取り込まれる制御ルートが存在するのに対して、NTBI には選択的な取り込みシステムはなく無秩序に細胞に入り込むため、細胞内鉄過剰状態をもたらす (Ann N Y Acad Sci. 202: 1-9, 2010)。フリーな状態で存在する鉄は活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) を産生する酸化還元反応に容易に関与することができ、この ROS 産生などを介して臓器機能障害が生じる。つまり、多くの疾患で生体にとって悪影響を及ぼす NTBI の血中レベルを正確に把握することが臨床で大変重要な要素であることを示唆するものであ

る。しかし、生体内における NTBI は多様な存在形態をとり、かつ、フリーな状態の鉄イオンは極めて不安定であることより、NTBI の測定方法の統一・標準化が困難な状況にあり、NTBI に関してはこれまで国内での測定報告がない現状である。

## 2. 研究の目的

生体にとって悪影響を及ぼす非トランスフェリン結合鉄 (non-transferrin bound iron, NTBI) の血中レベルを正確に把握することは臨床で大変重要な要素である。しかし、NTBI 測定システムはその不安定さ故、厳密な標準化が困難であり、これまで国内での NTBI 測定報告はない。そこで、既存の HPLC を用いた NTBI 測定システムを本邦で初めて導入し、信頼性の高いシステムへと改善を行ってきた結果、安定した高感度測定システムを確立することができ、この改善型システムを比較対象として設定することで、まったく新しいワン・ステップ型同時多検体測定システムのプロトタイプを作製し NTBI の定量解析に最適な新しいワークフローを構築する。さらに、得られた NTBI 値と既存の鉄代謝マーカーとの関連性を検討するとともに、NTBI が新規鉄代謝マーカーとして重要でかつ必要不可欠な内容であることを裏付け、バイオマーカーとしての評価・検証、確立を目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 新規鉄キレート剤の剤型開発: 既存の HPLC を応用した NTBI 測定システムは 2 種類のキレート剤 (NTBI 捕捉用キレート剤と定量用発色キレート剤) を使用していることは、測定完了までの工程が多数段階におよぶことから、サンプル調整の煩わしさ、システムの不安定、測定値の信頼度を低下させる要因となる。このような問題点を想定して、NTBI 捕捉剤として汎用されている NTA キレート剤に代わり、トランスフェリン結合鉄には作用せず、NTBI とのみ反応する新規鉄キレート剤の開発を進めた。さらに非水溶性の高分子骨格に新規鉄キレート剤を化学結合させた高分子鉄キレート剤を作製し機能性・有効性の評価を行った。

(2) ハイスルット測定システム開発: Non-metal HPLC を用いた血中 NTBI 測定方法に代わる、前処理を必要としない、迅速な測定が可能な自動分析装置対応の NTBI 測定試薬の開発と臨床検査試薬としての実用化を検討した。

(3) 既存の鉄代謝マーカーと比べて、NTBI 測定は鉄代謝異常を早期に診断できる可能性が高く、鉄による毒性予測を可能にするマーカーとしての有用性を検証した。

#### 4. 研究成果

(1) NTBI を選択的にキレート可能であり、水に不溶で体内での代謝プロセスに取り込まれない、非水溶性の高分子鉄キレート剤を作製した。この新規鉄キレート剤をクエン酸鉄錯体溶液と混合することでキレート剤の色が淡い黄土色から濃い黄土色に変化し、鉄イオンを奪取する能力を有することが確認できた。一方、生体にとって必要なトランスフェリン結合鉄はほとんど奪取しないことが確認された。そこで、本キレート剤を血清と混合し、室温、30 分間反応させた後、血清を NTBI 測定用 HPLC にアプライし、残存 NTBI を測定したところ、1 回の吸収操作で血中 NTBI を 39-57%除去することができた。この非水溶性高分子鉄キレート剤が NTBI に対して有効に作用する点、さらに遠心操作により試料から本キレート剤を簡単に分離できる点は産業上極めて有用である。

(2) 日立 7700 型自動分析装置対応の NTBI 測定試薬を開発した。基礎性能評価の結果、本測定系ではトランスフェリン結合鉄をほとんど奪うことなく、NTBI を 0.34 - 10  $\mu$ M の範囲で非常に高い直線性・定量性を持って測定することができた。さらに、臨床使用の鉄キレート剤 desferrioxamine および deferasirox による影響を受けずに NTBI を測定することができた。そこで、高単位の輸血により鉄過剰な状態が惹起された輸血後鉄過剰症に対する鉄キレート療法の前後で血中 NTBI を測定したところ、輸血後の高い NTBI 値がキレート療法開始とともに徐々に低下することが確認できた。このように輸血後鉄過剰症における鉄キレート療法の効果判定において NTBI が新たな指標となる可能性が示された。今回の自動化試薬は検体の前処理を必要とせず、患者血清をそのままサンプルとして利用できる点は、臨床検査の現場での実用性の高い試薬として評価できる。

(3) 鉄毒性モニタリング法として、NTBI の有用性を検討した結果、前出の輸血後鉄過剰症の治療効果判定に加え、化学療法後の臓器傷害予測においても NTBI 測定の有用性が示された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

1. Katsunori Sasaki, Katsuya Ikuta, Hiroki Tanaka, Takaaki Ohtake, Yoshihiro Torimoto, Mikihiro Fujuya and Yutaka Kohgo : Improved quantification for non-transferrin-bound iron measurement

using high performance liquid chromatography by reducing iron contamination. Mol. Med. Reports, 4:913-918 (2011)

2. Li Jiang, Shinya Akatsuka, Yoriko Yamashita, Hirotak Nagai, Hiroki Ohara, Shan-Hwu Chew, Yasumasa Okazaki, Yutak Yoshikawa, Hiroyuki Yasui, Katsuya Ikuta, Katsunori Sasaki, Yutaka Kohgo, Seishiro Hirano, Yasushi Shinohara, Norihiko Kohyama, Takashi Takahashi, Shinya Toyokuni : Iron overload signature in chrysotile-induced malignant mesothelioma. J Pathol 228:366-377 (2012)

3. Tatsunori Goto, Katsuya Ikuta, Yoshihiro Inamoto, Sonoko Kamoshita, Emi Yokohata, Daisuke Koyama, Koichi Onodera, Aika Seto, Keisuke Watanabe, Nobuhiko Imahashi, Shokichi Tsukamoto, Yukiyasu Ozawa, Katsunori Sasaki, Masafumi Ito, Yutaka Kohgo and Koichi Miyamura : Hoerferritinemia after adult allogeneic hematopoietic cell transplantation: quantification of iron burden by determining non-transferrin-bound iron. Int J Hematol 97: 125-134 (2013)

[学会発表] (計 8 件)

1. 2011 IBIS Meeting BioIron (2011.05.22-26, Vancouver, Canada)  
Reliable quantification of non-transferrin-bound iron (NTBI) in healthy volunteers by improved high sensitive method using HPLC.  
Takaaki Hosoki, Katsuya Ikuta, Takaaki Ohtake, Hiroki Tanaka, Katsunori Sasaki, Yoshihiro Torimoto and Yutaka Kohgo

2. 日本薬学会第 132 年会 (2012.3.28-31, 札幌)  
Non-metal HPLC を用いた高感度 NTBI 測定法の確立  
佐々木 勝則, 生田 克哉, 田中 宏樹, 大竹 孝明, 藤谷 幹浩, 鳥本 悦宏, 高後 裕

3. 第 36 回日本鉄バイオサイエンス学会学術集会 (2012.09.1-2, 札幌)  
自動分析装置による NTBI 測定試薬の開発。  
加藤 大介, 飯塚 直美, 生田 克哉, 佐々木 勝則, 高後 裕

4. 第 23 回生物試料分析科学会年次学術集会 (2013.02.10-11, 大阪)  
自動分析装置による NTBI 測定試薬の開発  
加藤 大介, 飯塚 直美, 生田 克哉, 佐々木 勝則, 高後 裕

5. 2013 IBIS Meeting BioIron (2013.04.14-18, London, UK)  
Nobel quantification system of non-transferrin-bound iron (NTBI) utilizing automatic analyzer.  
Katsuya Ikuta, Satoshi Ito, Lynda Addo, Mayumi Hatayama, Yasumichi Toki, Junki Inamura, Motohiro Shindo, Hiroki Tanaka, Katsunori Sasaki, Yoshihiro Torimoto, Yutaka Kohgo

6. 第 37 回日本鉄バイオサイエンス学会学術集会 (2013.09.7-8, 東京)  
自動化試薬を用いた血清中 NTBI の測定。  
加藤 大介, 飯塚 直美, 生田 克哉, 佐々木 勝則, 高後 裕

7. 第 75 回日本血液学会学術集会 (JSH2013) (2013.10.11-13, 札幌)  
Nobel quantification system for non-transferrin-bound iron utilizing automated analyzer.  
Junki Inamura, Katsuya Ikuta, Daisuke Kato, Naomi Iizuka, Yasumichi Toki, Satoshi Ito, Hiroki Tanaka, Katsunori Sasaki, Motohiro Shindo, Yoshihiro Torimoto, Yutaka Kohgo

8. 第 60 回日本臨床検査医学会学術集会 (2013.10.31-11.3, 神戸)  
自動分析装置による血清非トランスフェリン結合鉄 (NTBI) 測定。  
生田 克哉, 伊藤 巧, 新関 紀康, 紀野 修一, 高後 裕

〔図書〕 (計 2 件)

1. 細木 卓明, 生田 克哉, 佐々木 勝則, 鳥本 悦宏, 高後 裕: 鉄代謝状態の評価の現状と今後の展望. 血液内科 2011 年 6 月 62 巻 6 号、774-780 (総説)

2. 佐々木 勝則, 生田 克哉, 鳥本 悦宏, 高後 裕: <検査指標> 非トランスフェリン結合鉄. 臨床検査 2012 年 10 月 第 56 巻 第 10 号、1070-1082 (総説)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称: 高分子鉄キレート剤  
発明者: 高後 裕, 西田 雄三, 生田 克哉, 佐々木 勝則  
権利者: 国立大学法人旭川医科大学  
種類: 特許権  
番号: PCT/JP2012/000153  
出願年月日: 2012 年 1 月 12 日  
国内外の別: 国際出願

○取得状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 勝則 (SASAKI, Katsunori)  
旭川医科大学・医学部・特任准教授  
研究者番号: 60336394

(2) 研究分担者

生田 克哉 (IKUTA, Katsuya)  
旭川医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 00396376

大竹 孝明 (OHTAKE, Takaaki)  
旭川医科大学・医学部・特任教授  
研究者番号: 10359490

高後 裕 (KOHGO, Yutaka)  
旭川医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 10133183

田中 宏樹 (TANAKA, Hiroki)  
旭川医科大学・医学部・特任助教  
研究者番号: 70596155  
※平成 24-25 年度は研究分担者から削除。

(3) 連携研究者

該当者無し  
研究者番号: