
トピックス

血清ビタミン B₁₂ レベルが高い患者にみられる**ビタミン B₁₂ 欠乏とマクロビタミン B₁₂****Vitamin B₁₂ deficiency in patients with elevated serum vitamin B₁₂ level
in relation to macro vitamin B₁₂****はじめに**

血清ビタミン B₁₂ (以下 B₁₂) 低値とは反対に、血清 B₁₂ 濃度が上昇している場合の病理生理学的および臨床的な帰結 (アウトカム) はこれまであまり研究されていない。血清 B₁₂ 濃度の異常な上昇は骨髄増殖性血液疾患、固形がん、がん肝転移、腎不全などの疾患で見られることが知られていたが重視されてこなかった。しかし最近では逆説的であるが血清 B₁₂ 濃度上昇は B₁₂ の組織取り込みと B₁₂ の作用に関係する質的な異常と関連している機能的な欠乏を反映している場合があり、血清 B₁₂ 値低下時と同様の臨床的な帰結 (アウトカム) をもたらす可能性があると考えられるようになってきた。折しも、ヒドロキソコバラミン (以下 OH-B₁₂) を筋肉注射することによって改善できた神経症状が、注射を止めた後、血清 B₁₂ 濃度が十分高いにもかかわらず再発し、OH-B₁₂ の注射を再開すると 2~3 か月後に症状が徐々に解消した症例が報告されている。今回、血清 B₁₂ 濃度が高い状態で起こる B₁₂ 欠乏と、その原因と見られているマクロ B₁₂ についての最近の知見を紹介する。なお、引用したすべての文献中で、通称「免疫測定法 (イムノアッセイ)」と呼ばれている方法を使用して総血清 B₁₂ 濃度が測定されている。すなわち、遊離型の B₁₂ と結合型 B₁₂、すなわちトランスコバラミン (以下 TC) やハプトコリン (以下 HC) などの B₁₂ 結合タンパク質、あるいは免疫グロブリンと結合した形の B₁₂、の両者を測定している。したがって、測定される総血清 B₁₂ 濃度の値は必ずしも細胞内 B₁₂ レベルを反映するとは限らず、B₁₂ として機能する状態の B₁₂ の低下が隠蔽されている可能性があることに留意する必要がある。

血清 B₁₂ レベルが高いにもかかわらず B₁₂ 欠乏に陥った症例

Wolfenbittel ら¹⁾によって報告された症例の概要を以下に示す。13 歳女性の患者は手の震え、舌のしゃく熱感、全身の筋肉痛、手足の知覚障害、筋肉のけいれん、倦怠感、集中力と記憶の減退および頭に霧がかかったような症状を呈しており、患者の血清 B₁₂ 濃度は 150 pmol/L で、性別・年齢階層別に血清 B₁₂ 基準値を示している報告中の 13 歳女性に該当する値 252 pg/mL (186 pmol/L) より低かった。B₁₂ 欠乏の指標である血清メチルマロン酸 (以下 MMA) 濃度は 357 nmol/L で、基準値の上限とされる 220 nmol/L より高かった。これらの生化学検査結果と臨床診断から開業医によって B₁₂ 欠乏症と診断された。患者の食餌から摂取されている B₁₂ 量は十分と判断されたので、B₁₂ 欠乏の原因としては腸からの吸収障害が推測されたが、これに関しての検査は行われなかった。1,000 µg の OH-B₁₂ を毎週 2 回注射する治療が開始されたが、注射の回数は徐々に減らして最終的には 6 週間毎に 1 回になった。その結果患者の神経症状は軽快した。しかし、治療開始後 2 年が経過し OH-B₁₂ 注射を止めたところ、数か月後に倦怠感、手の震え、そして足の軽い知覚障害からなる神経症候が再発した。患者は神経科を受診したが、血清 B₁₂ 濃度が 1,476 pmol/L を超える高値を示し (基準値は 175~675 pmol/L)、さらに MMA 濃度が 222 nmol/L、総ホモシステイン (以下 Hcy) 濃度が 7.8 µmol/L (基準値は 10 µmol/L 未満) で、それぞれ基準値の上限付近あるいはそれ以下だったことから、患者の以前の病歴にもかかわらず神経症状の原因が B₁₂ 欠乏である可能性は見落とされた。

患者の体重は安定しており、食物摂取は肉、卵、ミルクのような動物由来の製品を含めて普通であり、心

臓・血管と胃腸および排便頻度に異常はなかった。通常の血液学的な検査結果には特別な異常はなく、肝臓の酵素活性、腎機能および CRP (C-reactive protein) にも異常はなかった。抗胃壁細胞抗体、抗内因子抗体、甲状腺ペルオキシダーゼ抗体の検査結果は陰性だった。血清の B₁₂ レベルが低い患者における臨床上的特徴と診断上の精密検査については多数の総説があるものの、血清 B₁₂ レベルが上昇している患者の処置についての文献は多くない。Wolfenbittel ら¹⁾は彼らの患者において血清の総 B₁₂ 濃度が異常に高いにもかかわらず、B₁₂ 欠乏時と同じ神経症状を呈する理由を検索する必要があった。

高血清 B₁₂ 値とマクロ B₁₂

血清 B₁₂ 濃度高値の原因を Andrés ら²⁾は次の三つに分類している。すなわち、①過剰な摂取または投与による血清 B₁₂ の直接的な増加で、これに含まれるのは B₁₂ 欠乏の治療を目的に行われる長期間の B₁₂ 非経口投与、患者による B₁₂ を含む総合ビタミン剤の服用、そして現在は行われていないが B₁₂ 吸収試験-Schilling test における大量 B₁₂ の筋肉注射。②アルコール依存症や肝疾患などにみられる体内の貯蔵から遊離してくる B₁₂ による血清 B₁₂ の直接的な増加。③腎疾患、アルコール依存症、肝疾患、自己免疫疾患、長期間の B₁₂ 非経口投与、肝細胞がん、肝腫瘍、乳がん、結腸がん、胃がん、膵腫瘍など種々の病因によって起こる産生過剰またはクリアランス低下による血中の HC の増加、および TC の量的不足または TC の B₁₂ に対する親和性の欠如。

TC と HC

ここで、参考までに TC と HC について簡単に説明しておく。TC は血清中で B₁₂ を特異的に輸送する糖を含まない分子量 42 ~ 47 kDa のタンパク質である。TC は B₁₂ を細胞や組織に輸送するために必須なタンパク質であるが、血液中の B₁₂ の 20% を結合・輸送するに過ぎない²⁾。血液中では TC に結合している B₁₂ が生物学的に活性を有し、全ての DNA 合成細胞へ運搬される。TC の産生部位は第一に肝細胞であり、次いで内皮、単球、腸である。HC は分子量が 60 ~ 70 kDa の糖タンパク質で種々の組織と体液に含まれており、血液中の B₁₂ の ~ 80% を結合している。HC は顆粒球由来であり、このことが骨髄増殖性の疾患において HC が増加する理由である。HC に抗菌の役割があると示唆されている以外には何の機能も解明されていない²⁾が、種々の固形腫瘍および慢性骨髄性白血病や真性多血症

を含む種々の血液学的悪性腫瘍においては、HC の高レベルが血清 B₁₂ レベルの上昇の原因とされている。また、多くの感染性の疾患および自己免疫性の疾患が、HC および TC の産生上昇による血清 B₁₂ レベル上昇を引き起こすことが知られている。肝臓の疾患においては損傷した肝細胞からの B₁₂ または HC の放出、または HC のクリアランスの減少による HC 増加にともない血清 B₁₂ の上昇が起こる。

高 B₁₂ 血症の病態

Wolfenbittel ら¹⁾の患者の検査結果および治療過程から血清中の B₁₂ 濃度が上昇した原因は先に述べた Andrés ら²⁾の分類の①であると考えられた。血清 B₁₂ が高値だった患者についての Remacha ら³⁾の報告によると、血清 B₁₂ 高値の頻度は 1.3% あり、その原因は主として治療を目的として B₁₂ を注射または経口で投与されたことが考えられるとしている。そして、彼らは高 B₁₂ 血清試料の 25 ~ 38% で血清の B₁₂ 結合タンパク質と結合した免疫複合体 (以下 ICs) が生成していることを分子篩クロマト法によって証明した。このような血清にポリエチレングリコール (以下 PEG) を加えてから遠心分離すると上記の ICs は沈殿し、上清中の B₁₂ 濃度は基準範囲内であった^{3,4)}。血清中に ICs が確認された Remacha らの症例では自己免疫疾患あるいは血液学的疾患との関連が示唆された³⁾。しかし Remacha ら³⁾の報告では血清 B₁₂ が異常高値を示した 7 例が B₁₂ 欠乏の症状を呈したのかどうか、またどのような治療が試みられたかについては述べられていない。

Soleimani ら⁵⁾は PEG で沈殿する区分の重要性に注目し、その危険性が過小評価されている現状に対して警鐘を鳴らしている。彼ら⁵⁾は血清 B₁₂ 濃度が 1,476 pmol/L 以上の 50 人中 15 人の血清に ICs の存在を証明した。この頻度は Remacha ら³⁾の報告中の 25 ~ 38% と近似していた。彼らはその ICs をマクロ B₁₂ (macro-B₁₂) と呼ぶことにした。マクロ B₁₂ が検出された 15 人の患者のうち 6 人に関節リウマチまたは橋本病のような自己免疫疾患があったが、この点も Remacha ら³⁾の知見と一致した。

Soleimani ら⁵⁾の患者の一人の血清 B₁₂ 濃度は 1,484 pmol/L と基準値よりはるかに高かったが、PEG 沈殿処理後の上清の B₁₂ 濃度は 83.1 pmol/L で、基準値下限以下だったことからマクロ B₁₂ の存在が推定された。PEG 処理後の血清 B₁₂ 濃度が基準値下限以下という結果から、この患者は B₁₂ 欠乏状態にあることが考えられるが、B₁₂ 欠乏症状を呈していたのかどうか、またどのような治療が行われたのかについては述べられていない。しかし、この患者の例から Soleimani ら⁵⁾は

血清そのものの B₁₂ 濃度が高値であることを根拠に B₁₂ 欠乏ではないと判断すると間違いを冒す危険があることを初めて示した。しかし彼らはどの B₁₂ 濃度以上を高値と考えてマクロ B₁₂ の存在を疑ってみるべきかについては、まだ決めかねているように思われた。なお、Soleimani ら⁵⁾はマクロ B₁₂ のように B₁₂ 濃度測定を妨害する物質の存在を確認する方法として分子篩クロマト法が最も信頼できることを示したが、この方法は費用、技術、設備に関して難点がある。そこでプロラクチンや TSH(甲状腺刺激ホルモン)に対する自己抗体により形成されるそれぞれの多量体形態で、生物学的に不活性な血中のマクロプロラクチンやマクロ TSH を検索する際に役立てられている PEG 沈殿法が価格、迅速性、簡便性から見て実用であると述べている。そして、PEG 沈殿法の結果からマクロ B₁₂ の存在を予測するための指標として PEG 処理後の上清の B₁₂ 濃度の回収率ではなく、PEG 処理後の B₁₂ 濃度を健康なヒトの基準範囲(reference interval)と比較すべきであると述べている。その方が分子篩クロマト法による結果とよく一致したからである。実際に彼らは PEG 処理後の B₁₂ の回収率が高いにもかかわらずマクロ B₁₂ の存在が確認された例を示している。彼らはマクロ B₁₂ による妨害は測定法によって変わるものではなかったと述べているが、この点は Duim ら⁶⁾がマクロ B₁₂ を含む同一血清を Atellica IM B₁₂[®](Siemens Healthcare Diagnostics)と Elecsys[®] B₁₂ assay(Roche Diagnostic)で測定したところ、後者は前者より 40%も高い値を示したと報告しているのとは相反する。

Jeffery ら⁷⁾は血清 B₁₂ 濃度が上昇していた 431 個の検体中で IgG と複合体を作っている B₁₂ が検出された割合は 8%だったと報告しており、この値は Remacha ら³⁾や Soleimani ら⁵⁾に比べるとかなり低かった。

なお、一般に免疫測定法では異種親和性抗体(異種動物の抗原と反応する異好性抗体)が偽陽性反応を引き起こすことが知られているが、B₁₂ の免疫測定法においては本抗体の関与はなかったと報告されている⁸⁾。

治療再開

Wolffenbuttel ら¹⁾は Remacha ら³⁾の報告に基づいて、患者の血清に同量の 40% w/v の PEG6000[®]を加えて 37°C で 30 分間インキュベート後、1,100×g で遠心分離した上清の B₁₂ 濃度を測定した。もとの血清に換算した値は 136 pmol/L で PEG 処理前の血清の総 B₁₂ 濃度 4,400 pmol/L の僅か 3%に過ぎなかったが、この B₁₂ 濃度は患者が最初に B₁₂ 欠乏と診断された時とほぼ同じだった。この結果は、この患者の血清中に高濃度に存在する B₁₂

の大部分が PEG 処理により沈殿する区分にあり、この区分の B₁₂ は体内で働くことができない生理的に不活性な B₁₂ であることを示唆した。その後 B₁₂ による治療が再開された。すなわち、OH-B₁₂、1,000 μg の筋肉注射を一週間に 2 回行ったところ症状は 2~3 か月で徐々に解消し、筋肉注射の頻度を月 1 回にまで減らすことができた。その結果、手の軽い震えは残ったものの、症状のほとんどが消失した。この Wolffenbuttel ら¹⁾の報告は、B₁₂ 欠乏の治療のために B₁₂ 注射を継続し、神経症状は軽快したが血中に B₁₂ 結合タンパク質と一体になった免疫複合体、すなわちマクロ B₁₂ が形成されたため注射治療停止後に血清中の B₁₂ 濃度が著しく高いにもかかわらず神経症状を再発した患者に対してさらなる B₁₂ 注射によって症状を改善させることに成功した初めての症例と思われる。Wolffenbuttel ら¹⁾は、初期の知見と診断に基づけば、この患者にとってこの治療は一生続く治療と考えられなければならないと述べている。

マクロ B₁₂ の正体——B₁₂ 結合タンパク質

以上述べたように血清 B₁₂ 濃度が十分高いにもかかわらず B₁₂ 欠乏の症状が発現する原因の重要な一つが免疫複合体マクロ B₁₂ と考えられる。マクロ B₁₂ は血液中で B₁₂、B₁₂ 結合タンパク質、免疫グロブリンが一体になった複合体で、細胞内には取り込まれないので生理的には B₁₂ としての活性を持たない。そのためマクロ B₁₂ が生成すると血清中の総 B₁₂ 濃度は、一般的に採用されている免疫測定法で測定した場合には高い値を示すが細胞性 B₁₂ 欠乏状態をきたす厄介な複合体である。では、マクロ B₁₂ の正体は何か、その成分についての研究が行われ、少しずつではあるが明らかになりつつある。

血清中の B₁₂ 濃度が著増する原因のうち前記の Andrès ら²⁾の分類で③に含まれる固形腫瘍、慢性骨髄性白血病および真性多血症などの骨髄増殖性腫瘍、肝疾患、感染症などでは、多くの場合 B₁₂ 結合タンパク質のうち HC が著しく増加することが知られている。これに対して、マクロ B₁₂ が形成されている場合には血清中の TC が増加しており、HC 濃度は変わらなかったという⁶⁾。すなわち、マクロ B₁₂ 症においては ICs 中に含まれる B₁₂ 結合タンパク質は TC と考えられる。

マクロ B₁₂ の正体——免疫タンパク

次に免疫タンパク部分であるが、Bowen ら⁸⁾は血清 B₁₂ 濃度が高値を示す原因の中で、Andrès ら²⁾の分類の③に属する疾患がないにもかかわらず、B₁₂ 濃度が異

常に上昇している一例に見られたマクロ B₁₂ について報告している。その患者は貧血のために直近の数か月間 B₁₂ (メチルコバラミン) を 15 mg × 3 回/週の頻度で筋肉注射されており、血清の B₁₂ 濃度は 42,600 pmol/L という高値だった。患者の血液検査データは、血清 B₁₂ 濃度以外は基準範囲内およびその付近であり、抗内因子抗体、抗胃壁細胞抗体、リウマチ因子抗体は陰性、B₁₂ 欠乏時に上昇する血清中の MMA や総 Hcy は基準範囲内であり、ホロ TC、すなわち B₁₂ を結合した TC、総 TC、すなわち B₁₂ を結合した TC と遊離 TC の合計、総 HC も基準範囲内およびその付近であり、患者は B₁₂ 欠乏の症状を発現していなかった。患者の血清中の B₁₂ に遊離型は含まれず全て結合型で、その 80% は分子篩クロマト法で V₀ (排除容量) に溶出されたので、B₁₂ はかなり大きな分子量を持った成分中にあることが分かった。さらに血清の Protein G-Sepharose の溶出液中の B₁₂ 濃度は対照の 100 倍以上の 7,380 pmol/L だったので血清中で B₁₂ と IgG が一体になっていることが分かった。さらに同溶出液中のタンパク質を SDS-ポリアクリルアミド電気泳動法およびマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析法と捕捉抗体を抗-IgM、検出抗体を抗-IgG とした改良 ELISA 法により分析した結果は IgG に IgM の 5 量体が結合していることが明らかになった。対照血清ではこの分画に IgM は認められなかった。B₁₂ は血清の Protein G-Sepharose の溶出液から Protamine-Sepharose で回収した IgM に含まれていたため、B₁₂ は IgM に結合していると判断された。

マクロ B₁₂ の検査値に対する影響

確立した方法とされている測定法に対し、マクロ B₁₂ は重大な影響を及ぼして誤った測定結果をもたらすことがある。従来免疫アッセイ法による B₁₂ の測定値に対するマクロ B₁₂ の影響の例として、前述のように同一血清試料を Atellica IM B₁₂[®] (Siemens Healthcare Diagnostics) と Elecsys[®] B₁₂ assay (Roche Diagnostics) の 2 法で測定した結果、後者の方が 40% 高い値を示したことが報告されている⁶⁾。またシリカに TC を吸着させて沈殿させることにより TC と HC を分別測定する方法⁹⁾においてマクロ B₁₂ が共存すると TC の沈殿が妨げられるので、誤って TC 量を HC 量に加算することがあるという⁶⁾。このようにマクロ B₁₂ は診断に重大な影響を及ぼす恐れがある。

マクロ B₁₂ の臨床上的影響

マクロ B₁₂ が患者に与える影響についてはさまざま

な知見がある。Wolffenbuttel ら¹⁾は先に述べたように、神経症状を呈した患者に B₁₂ を注射したところ一時的に効果があったものの、マクロ B₁₂ が形成されたために注射停止後に症状が再発し、B₁₂ 注射を再開することによって改善に至ったことを報告している。すなわちマクロ B₁₂ が B₁₂ 欠乏症状を引き起こしたのである。血清 B₁₂ 濃度が高いにもかかわらず機能できる B₁₂ が不足しているために B₁₂ 欠乏の状態と同様になることが他にも報告されており、そのようなことが起こる原因は細胞による取り込みや細胞内処理、輸送や利用の障害である²⁾。細胞による取り込み減少は TC 以外の B₁₂ 結合タンパク質の病的な増加²⁾、あるいは免疫グロブリン-B₁₂ 複合体 (マクロ B₁₂) の形成⁷⁾によるものである。免疫複合体 (マクロ B₁₂) に組み込まれた B₁₂ は細胞内に取り込まれることがなく、したがって生物学的に B₁₂ としての活性がない。

しかしながら、これらとは逆にマクロ B₁₂ が形成されて血清中の B₁₂ レベルが上昇している場合においても臨床的症候との関連は限定的だったという報告もある⁵⁾。マクロ B₁₂ が形成されたので血清中の B₁₂ が高レベルを示したある症例において、B₁₂ 欠乏の特徴を全く示すことがなく、血清中の遊離の B₁₂ の濃度が基準範囲内であることが示唆された⁷⁾。実際に血清からマクロ B₁₂ を沈殿させた後に B₁₂ レベルを測定すると基準範囲内だった例が報告されている³⁾。また、前記の Duim ら⁶⁾の報告においてもマクロ B₁₂ が形成されている患者で、血清中の MMA と総 Hcy の濃度が基準範囲内だったことから、マクロ B₁₂ の存在は B₁₂ の代謝上の活性を妨害しなかったことを示している。さらに B₁₂ 関連の代謝状態を評価するための一つとして血清葉酸濃度を調べた結果、19 nmol/L という基準値だったこともこのことを支持した。彼ら⁶⁾は患者の体内で機能している B₁₂ は不足していなかったと考え、細胞内への取り込みに際してマクロ B₁₂ が TC-B₁₂ と競合することはないと考えた。そして、血清中の B₁₂ の濃度が高いことはこの患者の臨床所見に影響せず、また B₁₂ 注射を中止したことは患者の症候を改善しなかったと述べている。ただし、この患者は研究の進行中に死亡したことが記述されていてそのような経過に到った事情については触れられていない。

血清 B₁₂ 濃度が異常に高い患者では、マクロ B₁₂ の形成を考慮して血清を PEG 処理したのちに B₁₂ 濃度を測定することが重要だろう。また、血清 B₁₂ 濃度が高いという理由のみで B₁₂ 欠乏ではあり得ないと断定すると B₁₂ の機能上の欠乏を見落とす恐れがあるので、B₁₂ 欠乏のもう一つの生物学的指標、たとえば血清中

のホロ TC, 総 Hey, 総 MMA レベル等の評価をすることが望ましい。

まとめ

以上述べてきたように, マクロ B₁₂ に関する研究はまだ端緒についたばかりであり, 未知のことが多いので今後さらなる研究が必要であろう。中でも高血清 B₁₂ レベルに対する解釈に関して, 新しい診断ガイドラインを作成するためのデータを得る研究が必要である。他にも明らかにされなければならないこととして, (1)なぜ血清 B₁₂ 濃度が高い患者の一部においてのみマクロ B₁₂ が形成されるのか? (2)血清 B₁₂ 濃度がどのくらい高い場合にマクロ B₁₂ の存在を疑うべきなのか? (3)マクロ B₁₂ の機能や意味? (4)マクロ B₁₂ が血清中で形成されていても B₁₂ 欠乏の症状を呈さない患者がいるのは何故か? (5)マクロ B₁₂ が形成されている患者にさらに大量の B₁₂ を投与すると, マクロ B₁₂ の形成を促進しないか? 等さまざまな課題がある。

Key words :functional vitamin B₁₂ deficiency, macro vitamin B₁₂, transcobalamins, immunoglobulins, immunocomplexes

¹Hokkaido University of Education,

²Sapporo Medical University

Shoji Yamada¹, Keiko Yamada²

¹北海道教育大学, ²元・札幌医科大学

山田 正二¹, 山田 恵子²

利益相反自己申告: 申告すべきものなし

(2023.11.12 受付)

文 献

- 1) Wolffenbuttel BHR, Kobold ACM, Sobczyńska-Malefola A, Harrington DJ (2022) Macro-B₁₂ masking B₁₂ deficiency. *BML Case Rep* **15**: e247660. doi: 10.1136/bcr-2021-247660.
- 2) Andrès E, Serraj K, Zhu J, Vermorken AJM (2013) The pathophysiology of elevated vitamin B₁₂ in clinical practice. *QJM: Int J Med* **106**, 505–515. doi: 10.1093/qjmed/hct051.
- 3) Remacha AF, Zapico E, Sarda MP, Rojas E, Simó M, Remacha J, Homs R, Queralto JM (2014) Immune complexes and persistent high levels of serum vitamin B₁₂. *Int J Lab Hematol* **36**, 92–97. doi: 10.1111/ijlh.12131. Epub 2013 Sep 3.
- 4) Van Tö, Demir L (2023) Presence of macroproteins on the measurement of vitamin B₁₂: studying high vitamin B₁₂ levels using polyethylene glycol and heterophile antibody blocking tubes. *Scand J Clin Lab Invest* **83**, 125–132. doi: 10.1080/00365513.2023.2175328. Epub 2023 Feb 7.
- 5) Soleimani R, Favresse J, Roy T, Gruson D, Fillée C (2020) Macro vitamin B₁₂: an underestimated threat. *Clin Chem Lab Med* **58**, 408–415. doi: 10.1515/cclm-2019-0999.
- 6) Duim SN, Vlasveld LT, Mezger STP, Mingels AMA, Ramakers CRB, de Boer D, Heil SG Nexø E, van Rossum AP (2022) Macro transcobalamin causing raised vitamin B₁₂: Case-based laboratory investigation. *Ann Clin Biochem* **59**, 302–307. doi: 10.1177/00045632221087132. Epub 2022 Apr 25.
- 7) Jeffery J, Millar H, MacKenzie P, Fahie-Wilson M, Hamilton M, Ayling RM (2010) An IgG complexed form of vitamin B₁₂ is a common cause of elevated serum concentrations. *Clin Biochem* **43**, 82–88. doi:10.1016/j.clinbiochem.2009.08.022. Epub 2009 Sep 8.
- 8) Bowen RAR, Drake SK, Vanjani R, Huey ED, Grafman J, Horne MK III (2006) Markedly increased vitamin B₁₂ concentrations attributable to IgG-IgM-vitamin B₁₂ immune complexes. *Clin Chem* **52**, 2107–2114. doi: 10.1373/clinchem.2006.073882.
- 9) Jacob E, Herbert V (1975) Measurement of unsaturated “granulocyte-related” (TC I and TC III) and “liver-related” (TC II) B₁₂ binders by instant batch separation using a microfine precipitate of silica (QUSO G32). *J Lab Clin Med* **86**, 505–512. doi: 10.5555/uri:pii:0022214375900578.