

《ノート》

PTH RIA Kit (CIS) による血中副甲状腺ホルモンの測定

Measurement of Parathyroid Hormone in Blood with PTH RIA Kit (CIS)

福永 仁夫* 森田 陸司* 高坂 唯子* 土光 茂治*
山本 逸雄* 鳥塚 莞爾*

Masao FUKUNAGA*, Rikushi MORITA*, Tadaki KOSAKA*, Shigeharu DOKOH*,
Itsuo YAMAMOTO*, and Kanji TORIZUKA*

*Kyoto University Hospital, Department of Radiology and Nuclear Medicine

I. はじめに

副甲状腺ホルモン (PTH) の radioimmunoassay (RIA) による測定は、1963年、Berson らにより初めて報告された¹⁾。その後、PTH の測定は多くの研究室で行われるようになり、カルシウム (Ca) 代謝や骨代謝の研究の進歩に貢献した。最近では、PTH の生合成、分泌や代謝の解明にも、PTH の測定は利用されている。

著者らは、高度精製ウシ副甲状腺抽出物をスタンダードおよびトレーサーに、これで免疫したウサギ抗血清を抗体に用いた、PTH RIA Kit (CIS) を使用し、その基礎的検討を行なうと共に、ヒト血中の PTH 濃度を測定したので報告する。

II. 測定方法および検討対象

1. キットの内容

diluent は 0.5% BSA, 0.05% NaN₃, 0.09% EDTA-Na₂ を含む 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.5) を用い、スタンダード、抗体、トレーサーの希釈に使用した。

PTH のスタンダードは、0.02 M アンモニウ

ム・アセテート (pH 4.8) に溶解されたウシ PTH (Inolex) を使用した。PTH の濃度は、MRC 71/324の reference standard にて、ウシ PTH 1 mg = 2,700 ± 450 IU から計算された。

抗体は、ウシ PTH をウサギに免疫して得られたものを使用した。

トレーサーは、ウシ PTH (Inolex) を¹²⁵I で標識したものを用いた。

第2抗体は、活性化されたセルロースに固定された凍結品を、使用時 0.5% Tween 20 を含む diluent にて希釈して使用した。

2. 測定方法

スタンダード PTH は、その濃度が 0, 1, 2, 5, 10, 25 mU/ml になるように調整した。スタンダードおよび検体は、duplicate にて測定した。

Fig. 1 に示すように、diluent 100 μ l, スタンダードまたは検体 100 μ l, 抗体 100 μ l の合計 300 μ l を加え、よく混和後 4°C, 3日間、インキュベーションを行なう。なお、PTH 濃度 0 mU/ml のチューブには diluent を 200 μ l, また非特異的結合の検討用の抗体 (-) のチューブには diluent を 300 μ l 加えた。3日間の pre-incubation 後、¹²⁵I-PTH 100 μ l を加え、よく混和後更に3日間、4°C でインキュベーションを行なった。B と F の分離

Key words: Parathyroid Hormone, C-terminal Assay, Radioimmunoassay Kit, Primary Hyperparathyroidism, Calcium Metabolism

* 京都大学医学部附属病院放射線核医学科

受付: 54年5月2日

最終稿受付: 54年7月25日

別刷請求先: 京都市左京区聖護院川原町 (☎ 606)

京都大学医学部附属病院放射線核医学科

福永 仁 夫

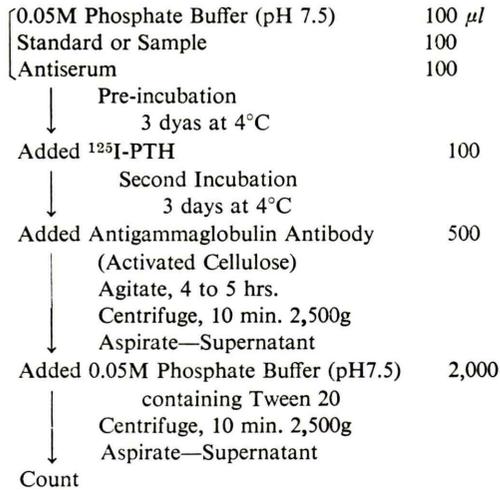


Fig. 1 Protocol for radioimmunoassay of PTH

は、スターラーにて混和中のセルロース吸着第2抗体 500 μ l をチューブに加えた。4～5時間、ローターにて混和後、2,500 g, 10分間遠沈した。上清を吸引後、0.5% Tween 20を含む diluent 2,000 μ l を加え、再度 2,500g, 10分間遠沈した。同様に上清を吸引し、沈渣をカウントした。

PTH 高値の血清の希釈には、PTH free 血清(術後性副甲状腺機能低下症患者血清)を使用した。

検体は、採血後速やかに血清分離し、測定まで -20°C で保存した。

3. 基礎的検討

1) standard curve : 横軸は PTH 各濃度を、縦軸は $B/Bo \times 100$ (%) をとった。原発性副甲状腺機能亢進症および慢性腎不全患者血清の希釈曲線(1, 2, 4, 8, 16倍)との平行性を検討した。

2) sensitivity study : PTH 濃度 0 mU/ml での $B/Bo \times 100$ (%) から $-2SD$ の点の PTH 濃度の読みを、最小検出値とした。

3) specific study : 本キットの特異性を検討するために、合成ウシ (1-34) PTH (Beckman)²⁾, 2種類 (Brewer³⁾ と Niall⁴⁾ の合成ヒト (1-34) PTH の 10～1,000 ng/ml を使用して、その交叉反応をみた。

4) precision : intra-assay, inter-assay 共に、値の異なる 2 種類の検体を 8 回測定し、平均値と

SD を計算し、その CV (%) を検討した。

5) accuracy :

(1) recovery test : 未知検体に種々の濃度の PTH スタンダードを加え、その濃度を測定し、回収率を検討した。

(2) dilution test : PTH 高値の原発性副甲状腺機能亢進症患者の血清を、PTH free 血清にて、1, 2, 4, 8, 16倍に希釈し、測定値の直線性をみた。

6) 著者らの PTH 測定法との相関 : 高度精製ウシ PTH (Inolex) をスタンダードおよびトレーサーに、これで免疫したモルモット抗血清 (Wellcome) を使用した RIA 系⁵⁾ で測定した値と、本キットでの測定値とを比較した。

4. 臨床的検討

1) PTH 測定対象 : 20～40歳の正常者19例、人工透析中の慢性腎不全症37例(うち10例は1回透析前後について測定)、原発性副甲状腺機能亢進症13例、高 Ca 血症を合併した悪性腫瘍 7 例、副甲状腺機能低下症 9 例(うち特発性 7 例、偽性 2 例)、ステロイド剤投与による骨粗鬆症 7 例、甲状腺髄様癌13例、骨パジェット病 3 例の計 108 例を用いた。

2) EDTA 負荷試験 : 正常者10例について、EDTA-Na₂ 50 mg/kg を 5%ブドウ糖 500 ml, 2%塩酸プロカイン 20 ml と共に 2時間かけて点滴静注し、注射前、注射開始後 1, 2 時間目および終了後 1 時間目に採血し、PTH 濃度を測定した。

3) Ca 負荷試験 : PTH 高値の 4 例について、Ca 15 mg/kg を生食 400 ml と共に、4時間かけて点滴静注し、注射前、注射開始後 1, 2, 3, 4 時間目に採血し、その PTH 濃度を測定した。

III. 結果

1. 基礎的検討の成績

1) standard curve および sensitivity study : Fig. 2 は、代表的な standard curve を示す。1 mU/ml の濃度で、結合の抑制が有意に認められ、この濃度を最小検出感度とした。また、この standard curve で 1～25 mU/ml の範囲の測定が可能であり、原発性副甲状腺機能亢進症および慢性腎不全患者

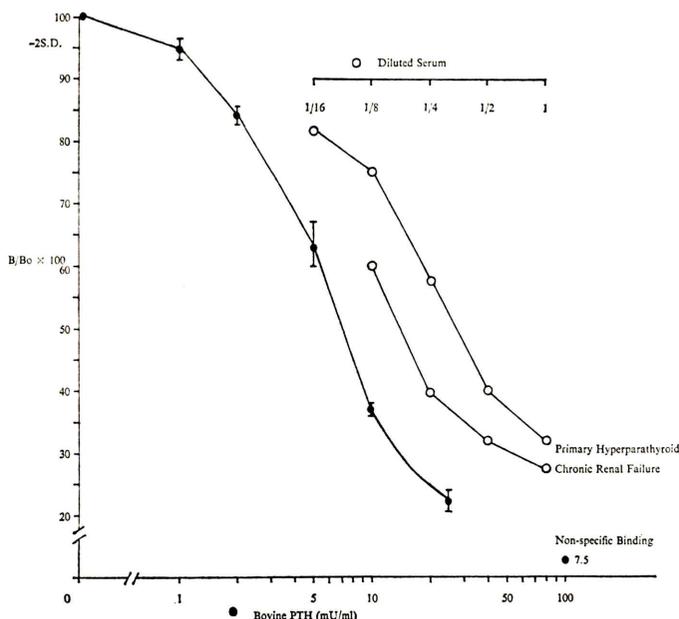


Fig. 2 Representative standard curve for PTH (•) and dilution curves of serum (◦) from a patient with primary hyperparathyroidism or chronic renal failure.

者の血清の希釈曲線は、standard curve と平行性を示した。非特異結合は7.5%であった。

2) specific study : N 末 PTH との交叉反応は、100 ng/ml 以下の濃度では、ウシ、ヒト両方の N 末 PTH は何ら交叉を示さなかった。1,000 ng/ml の濃度で、ウシ (1-34) PTH は8%の、ヒト (1-34) PTH (Brewer) は13%の交叉を示した (Fig. 3)。

3) precision : アッセイ内の変動係数は、PTH 高濃度では11.9%、低濃度では18.5%であった。一方、アッセイ間の変動係数は、PTH 高濃度では15.0%、低濃度では18.2%であった (Table 1)。

4) accuracy : 理論値と実測値とは、ほぼ一致し、かつ相関は直線性を示し、良好な recovery が認められた (Fig. 4)。

dilution test は、Fig. 5 に示すごとく、1 倍から16倍の希釈で同一直線上にのることが認められた。

5) 著者らの PTH 測定法との相関 : Fig. 6 に示すように、著者らの方法による PTH 値と、本 Kit での PTH 値との間には、良好な相関 ($r=0.9276, P < 0.01, y=0.2799x-0.4072$) が認めら

れた。

2. 臨床成績

1) 正常血中 PTH 値 : 正常者19例の血中 PTH 値は、 2.15 ± 0.90 mU/ml (平均 \pm SD) を示し、1 mU/ml から4 mU/ml の範囲に分布した。

2) 各種疾患患者の血中 PTH 値 (Fig. 7) : 人工透析中の慢性腎不全患者37例の血中 PTH 値は、透析直前では全例高値を呈した。1回透析前後の PTH 値を比較した10例では、全例透析後 PTH 値が低下するのが観察された。

原発性副甲状腺機能亢進症13例では、1例を除き12例が PTH 高値を示した。

高 Ca 血症を合併した悪結腫瘍7例では、4例が PTH のやや高値 (3 ~ 5 mU/ml) を示した。

副甲状腺機能低下症のうち、特発性では3例が測定感度以下、残り4例は1 ~ 2 mU/ml の値を示した。一方、偽性の2例では、明らかに PTH 値は高かった。

ステロイド剤投与による骨粗鬆症患者7例では、全例正常 PTH 値であった。

甲状腺髄様癌の13例中6例に、PTH 高値を認

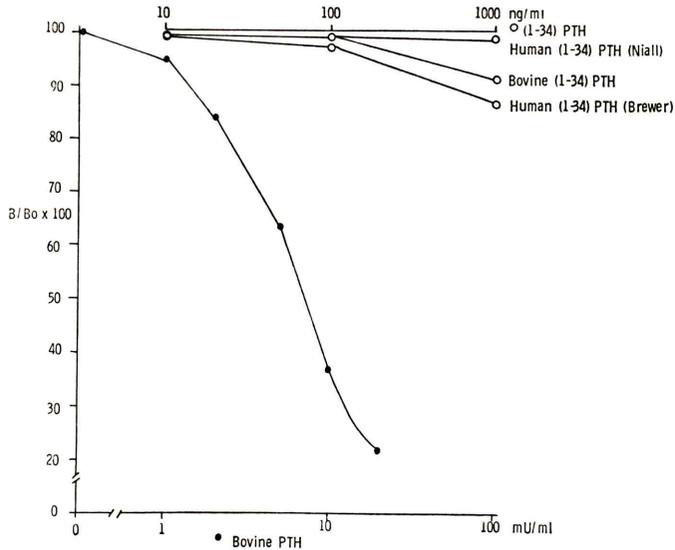


Fig. 3 Specific study, using with synthetic bovine (1-34) PTH and synthetic human (1-34) PTH.

Table 1 Precision study

1. Intra-assay			
No. of Assay	Mean (mU/ml)	S D	C V (%)
8	10.1	1.20	11.9
8	1.68	0.31	18.5
2. Inter-assay			
No. of Assay	Mean (mU/ml)	S D	C V (%)
8	10.3	1.54	15.0
8	2.20	0.40	18.2

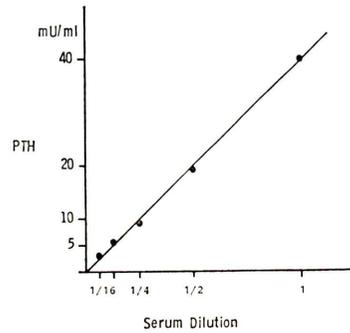


Fig. 5 Dilution test

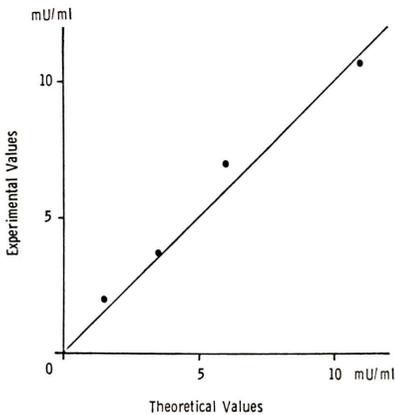


Fig. 4 Recovery test

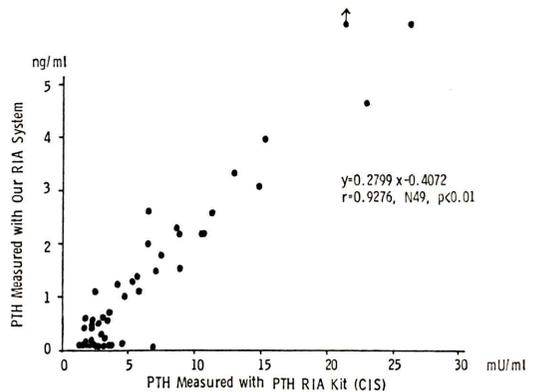


Fig. 6 Correlation between serum PTH values with PTH RIA Kit (CIS) and those with our assay system.

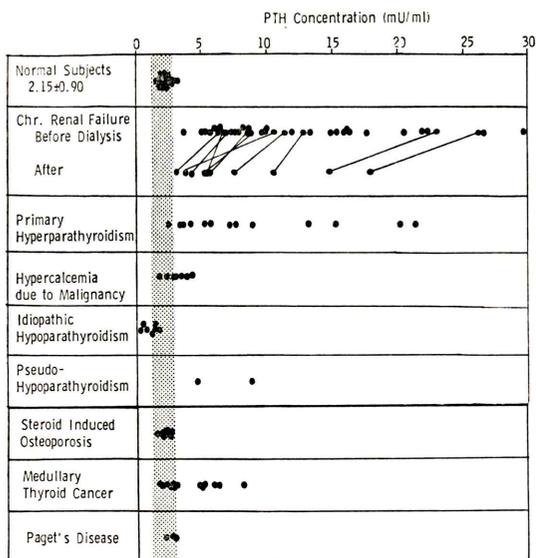


Fig. 7 Serum PTH concentrations in normal subjects and in patients with various diseases.

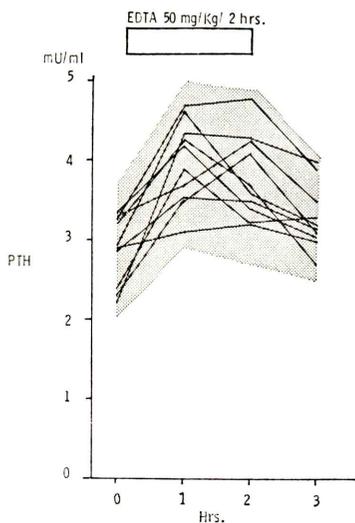


Fig. 8 Changes of serum PTH concentrations in EDTA infusion test on normal subjects.

めた。

骨パジェット病3例では、全例正常 PTH 値を示した。

3) EDTA 負荷試験：EDTA 負荷による血中 PTH 濃度の変動は、負荷前 2.9 ± 0.8 mU/ml から、負荷後1時間目 3.9 ± 1.1 mU/ml、2時間目 3.7 ± 1.0

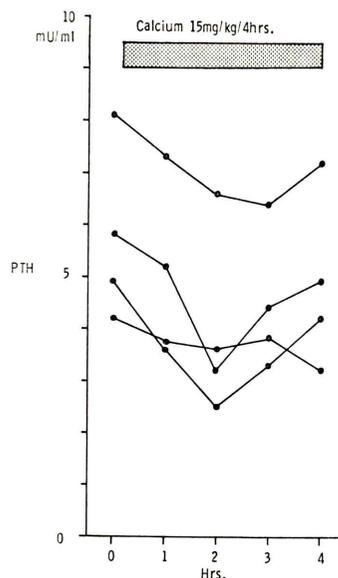


Fig. 9 Changes of serum PTH concentrations in calcium infusion test on patients with high basal PTH level.

mU/ml へと上昇し、負荷終了後1時間目には 3.3 ± 0.8 mU/ml へと低下するのが観察された (Fig. 8).

4) Ca 負荷試験：PTH 高値を呈した症例における Ca 負荷による PTH 値の変動は、Ca 負荷後 PTH 値が低下するのが認められた (Fig. 9).

IV. 考 案

本 Kit は、ヒト血中 PTH 値を測定するのに、高度精製ウシ PTH をスタンダードおよびトレーサーに、これで免疫した抗ウサギ抗血清を抗体に用いた RIA Kit である。この heterologous な系は、従来より広く使用されている方法である⁶⁾。

本 Kit では、B, F 分離に第2抗体を吸着させたセルロースを用いているが、従来の報告のデキストラン・チャコール法⁵⁾や2抗体法⁶⁾と比較しても、再現性がよく、十分実用に耐えることが示された。最小検出感度は 1 mU/ml であり、25 mU/ml まで測定が可能であった。¹²⁵I-PTH は、標識後速やかにダメージを受けると報告されているが⁷⁾、インキュベーション期間での非特異的結合は 7.5% であり、ダメージを受けるのは少ないと

推察された。precision は, intra-assay, inter-assay 共に, 低濃度での成績がやや悪かったが, 十分満足される成績を得た。recovery test および dilution test 共に良好で, ヒト血中の内因性 PTH と本 Kit の PTH スタンダードとは免疫学的に差がないことが示された。本キットの抗体は, PTH の各種 N 末端とは殆んど交叉反応を示さず, C 末端に特異的なアッセイ系であることが認められた。

正常値は, 1.0~3.2 mU/ml に分布し, 全例測定可能であった。

慢性腎不全症例では, 全例 PTH が高値であり, 二次性副甲状腺機能亢進症の存在の他, 腎障害のため, 代謝されない, 活性のない, 主として C 末端の PTH フラグメントが存在することが示唆された。腎不全での PTH 値は, N 末端アッセイでは, それほど高値でないという報告⁸⁾があり, 今後 N 末端アッセイと比較検討する必要がある。人工透析により, PTH 値が低下したが, その原因として, 透析により血中 Ca レベルが上昇すると共に PTH の分泌が抑制されることや, 透析により低分子の PTH のフラグメントが血中から除去される可能性が示唆された。原発性副甲状腺機能亢進症の13例中12例(93%)に, PTH 高値が認められた。PTH 値正常の1例は, 尿路結石症を主訴とし, 骨病変を認めない症例であった。高 Ca 血症を合併する悪性腫瘍7例のうち, 4例に PTH 高値を認めた。これら4例は, 腎障害がなく, 腫瘍から PTH 様物質の産生, すなわち異所性 PTH 産生腫瘍の可能性が示唆された⁹⁾。副甲状腺機能低下症の中, PTH 分泌の欠乏状態である特発性では, PTH 値の正常または低値を, PTH の receptor 不応症である偽性では高値を示し, 鑑別が可能であった。ただ, 特発性で, PTH 値が測定感度以下を示したのが, 7例中4例であったのが注目される。ステロイド剤の長期投与による骨粗鬆症では, PTH 値が全例正常であった。老人性または閉経後骨粗鬆症では, 時に PTH の高値を認める例があり, 骨粗鬆症の発症機序は明らかに異なるものと考えられた¹⁰⁾。甲状腺髄様癌13例のうち, 7例に PTH 高値を認めた。甲状腺髄様

癌は, Sipple 症候群として, 副腎髄質の褐色細胞腫の他に, 副甲状腺の腺腫または過形成を, 時に合併することが知られている¹¹⁾。これら7例では, 副甲状腺病変の合併が示唆された。骨形成, 骨吸収が共に亢進している骨パジェット病では, 全例正常 PTH 値を示した。EDTA または Ca 負荷による血中 Ca 値の急激な変動に対する, PTH の分泌状態を検討するには, N 末端 PTH アッセイが良いと報告されている⁸⁾。今回, EDTA または Ca 負荷試験における PTH 値の動きを観察したところ, 本 Kit で十分, PTH の分泌状態を知ることが可能であった。

PTH 測定時の問題点として, ヒト血中の PTH を測定するのに, heterologous 系を利用することや, 血中には種々の PTH のフラグメントが intact な PTH の他に存在することが指摘されている。本 Kit を使用した場合にも, 同様の問題点が残る。今後ヒト N 末端 PTH や intact な PTH を用いたアッセイ系による測定が必要と思われる。しかし, Ca 代謝や骨代謝の異常を呈する疾患のスクリーニング検査として, 本 Kit は有用であろうと思われる。

V. 結 論

PTH RIA Kit (CIS) は, sensitivity, precision および accuracy 共に, 十分満足される成績が得られ, また C 末端に特異的なアッセイ系であることが示された。

PTH 高値は, 慢性腎不全, 原発性副甲状腺機能亢進症, 偽性副甲状腺機能低下症の他に, 高 Ca 血症を合併する悪性腫瘍や甲状腺髄様癌の一部に認められた。

EDTA または Ca 負荷により, PTH 分泌状態の観察が可能であった。

本 Kit による, ヒト血中 PTH 値の測定は, Ca 代謝や骨代謝の異常を呈する疾患の診断だけでなく, その病態を知る上に, 有用であった。

最後に, 本 Kit を御提供下さいましたミドリ十字株式会社に深謝致します。

文 献

- 1) Berson SA, Yalow RS, Aurbach GD et al: Immunoassay of bovine and human parathyroid hormone. *Proc Natl Acad Sci (USA)* **49**: 613-617, 1963
- 2) Klerekoper M, Ingham JP, McCarthy SW et al: Parathyroid hormone assay in primary hyperparathyroidism: Experiences with a radioimmunoassay based on commercially available reagents. *Clin Chem* **20**: 369-375, 1974
- 3) Brewer HB Jr, Fairwell T, Ronan R et al: Human parathyroid hormone: Amino-acid sequence of the amino-terminal residues 1-34. *Proc Natl Acad Sci (USA)* **69**: 3585-3588, 1972
- 4) Niall HD, Sauer RT, Jacobs JW et al: The amino-acid sequence of the amino-terminal 37 residues of human parathyroid hormone. *Proc Natl Acad Sci (USA)* **71**: 384-388, 1974
- 5) Morita R, Fukunaga M, Dokoh S et al: Differential diagnosis of hypercalcemia by measurement of parathyroid hormone, calcitonin, and 25-hydroxyvitamin D. *J Nucl Med* **19**: 1225-1230, 1978
- 6) Conaway HH, Anast CS: Double-antibody radioimmunoassay for parathyroid hormone. *J Lab Clin Med* **83**: 129-138, 1974
- 7) Deftos LJ: Parathyroid hormone. in *Methods of hormone radioimmunoassay*. edited by Jaffe BM, and Behrman HR, Academic Press, New York, 231-247, 1974
- 8) 深瀬正晃, 藤田拓男: 副甲状腺ホルモンの基礎. ワークショップ「カルシウム調節ホルモンの基礎と臨床」. 第26回日本内分泌学会西部部会(口演), 広島, 1978
- 9) Blair AJ Jr, Hawker CD, Utiger RD: Ectopic hyperparathyroidism in a patient with metastatic hypernephroma. *Metabolism (Clin Exp)* **22**: 147-154, 1973
- 10) Fujita T, Orimo H, Okano K et al: Clinical application of parathyroid hormone radioimmunoassay. in *Clinical aspects of metabolic bone disease*. edited by Frame B, Parfitt AM, and Duncan H, Excerpta Medica, Amsterdam, 274-280, 1972
- 11) Sipple JH: The association of pheochromocytoma with carcinoma of the thyroid gland. *Am J Med* **31**: 163-170, 1961