

《ノート》

抗ヒト C 末端 (46~84) PTH 抗体を用いた RIA-キット (ヒト PTH ‘栄研’[®]) の基礎的および臨床的検討

Fundamental and Clinical Evaluation of Human PTH RIA kit,
PTH ‘Eiken’, using Antihuman C-terminal (46–84) PTH Antibody

野口 和哉* 鈴木 邦治* 中畑 元伸*

Kazuya NOGUCHI*, Hoji Suzuki* and Motonobu NAKAHATA*

*Second Department of Internal Medicine, Hokkaido University School of Medicine

I. はじめに

血中カルシウム濃度は副甲状腺ホルモン (PTH), ビタミン D, カルシトニンなどのカルシウム調節ホルモンが複雑に関与することによって微妙に調節されていることから, カルシウム代謝異常を呈する疾患の病態を解明する上で血中 PTH 濃度の測定は不可欠である.

血中 PTH 濃度の測定は Berson らによるラジオイムノアッセイの開発¹⁾以来, 多数の報告^{2~4)}があり, また本邦においても PTH 測定用キットが発売されるに至っている. しかしヒト PTH を大量に入手することが困難であるなどの理由により, これらの測定法の多くはウシやブタの PTH に対する抗体を用いたもので感度, 確度, 精度などの点に若干問題があった.

今回著者らは, 最近開発された⁵⁾ヒト C 末端 (46~84) PTH に対する抗体を用いたラジオイムノアッセイキット, ヒト PTH ‘栄研’ (栄研イムノケミカル研究所) を使用する機会を得て, その基礎的, 臨床的検討を行ったので報告する.

II. 方法および対象

キットの内容および測定手順を Table 1 に示した. 標準血清のヒト (46~84) PTH 濃度はヒト (1~84) PTH 等価として表示され, ngEq/ml という単位が使われているが, 以下 Eq は省略する. また本キットの指示書は当初 100 μ l サンプルングを用いるよう記載されていたが, 後に高濃度血清の正確な測定を意図して 20 μ l サンプルングが標準法とされたことからその後に検討した標準曲線, 希釈試験, 臨床的検討の一部を除いては 100 μ l サンプルングを用いている.

1. 基礎的検討

1) 標準曲線および測定感度

キットには 8 種類の標準血清が付いているが, これをゼロ血清による希釈でさらに低濃度, すなわち 0.05, 0.075, 0.1 ng/ml の標準血清を調製した. さらにサンプル量を 10, 20, 50, 100, 200 μ l と変えて各濃度の標準血清について 7 重測定を行い, サンプル量の標準曲線と測定感度に及ぼす影響を検討した.

2) 再現性

3 種類の患者血清を同一アッセイでそれぞれ 10

* 北海道大学医学部第二内科

受付: 57 年 7 月 6 日

最終稿受付: 57 年 9 月 16 日

別刷請求先: 札幌市北区北 14 条西 7 丁目 (☎ 060)

北海道大学医学部第二内科

野口 和哉

Key words: Parathyroid Hormone, Radioimmunoassay, Human Carboxyl Terminal PTH.

Table 1 Kit content and assay procedure**Kit content**

(1) Anti PTH serum, lyophilized	7.0 ml	1 vial
(2) 125-I labeled PTH, lyophilized	7.0 ml	1 vial
(3) PTH standard, solution	0.5 ml	8 vials (0-12.8 ngEq/ml)
(4) Second antibody, lyophilized	7.0 ml	1 vial

Assay procedure

Patients serum or standard solution	20 or 100 μ l
Anti-PTH solution	100 μ l
125-I labeled PTH solution	100 μ l

Second antibody solution	↓ 4°C, 2 days	100 μ l
	↓ at room temp., 30 min.	
	↓ centrifuge for 30 min. at 3,000 rpm	
	↓ aspiration or decanting count	

回測定し、また他の3種類の患者血清を異なる6回のアッセイにて測定し、それぞれの再現性を検討した。

3) 回収率

2種類の濃度既知血清 50 μ l に6種類の標準血清 50 μ l を加えて測定し、理論値に対する実測値のパーセントを回収率として算出した。

4) 希釈試験

慢性腎不全、原発性副甲状腺機能亢進症患者血清を PTH ゼロ血清で16倍まで段階的に希釈し、20 μ l サンプル法と 100 μ l サンプル法にて測定した。

5) インキュベーション時間

インキュベーション時間が測定系に及ぼす影響を検討する目的で、第一反応時間を12時間から72時間まで変えてそれぞれの標準曲線における B/T パーセントの推移をプロットした。

2. 臨床的検討

20歳から40歳までの健常人26例、原発性副甲状腺機能亢進症患者3例、特発性副甲状腺機能低下症患者3例、70歳以上で尿素窒素、血清カルシウム濃度の正常な非内分泌疾患患者19例について基礎値の測定を行った。

血液透析をうけている慢性腎不全患者20例について透析前後の PTH 濃度を比較検討した。

1 α -Hydroxycholecalciferol (1 α -OH-D₃) により治療されている偽性副甲状腺機能低下症の1例について、治療前および治療経過中の PTH 濃度を測定した。

特発性副甲状腺機能低下症の1例、および原発性副甲状腺機能亢進症の2例に EDTA 負荷試験を行い、負荷前、負荷開始30分後の PTH 濃度を測定した。

他の測定法との相関を検討する目的で種々の疾病患者50例のサンプルについて、従来のウシ C 末端抗体を用いた旧 PTH ‘栄研’キットと本キットにより測定した PTH 濃度を比較した。

III. 結 果**1. 基礎的検討****1) 標準曲線および測定感度 (Fig. 1)**

種々のサンプル量による標準曲線を7重測定の平均値でプロットした。サンプル量が少量の場合高濃度域の傾きが急峻となり、良好な直線性が得られる一方低濃度域の傾きが小さくなり感度が悪くなる。逆にサンプル量を多くすると感度は上がるが高濃度域における傾きが小さくなった。

測定感度をゼロ点での反応の 2 SD 以上の反応を示す最小濃度とすると 200 μ l サンプルングで最小であり、0.075 ng/ml であった。また各サンプル量における B₅₀ 値すなわち B/Bo が 50% を示す濃度は 10 μ l で 7.8 ng/ml, 20 μ l で 4.4 ng/ml, 50 μ l で 1.5 ng/ml, 100 μ l で 0.9 ng/ml, 200 μ l で 0.45 ng/ml だった。

各サンプル量における Bo/T パーセントの平均値は 10 μ l で 45.5%, 20 μ l で 47.5%, 50 μ l で 47.7%, 100 μ l で 44.4%, 200 μ l で 42.6% とそれぞれの間で有意差はなかった。また図には示さなかったが、各サンプル量で含有する PTH 量を pgEq/Tube で表示し、その B/Bo パーセントをプロットすると 5 pgEq/Tube から 640 pgEq/Tube までサンプル量の違いにかかわらず一致した直線性が得られた。

2) 再現性 (Table 2)

3種類の血清における10回の Intraassay の C.V.

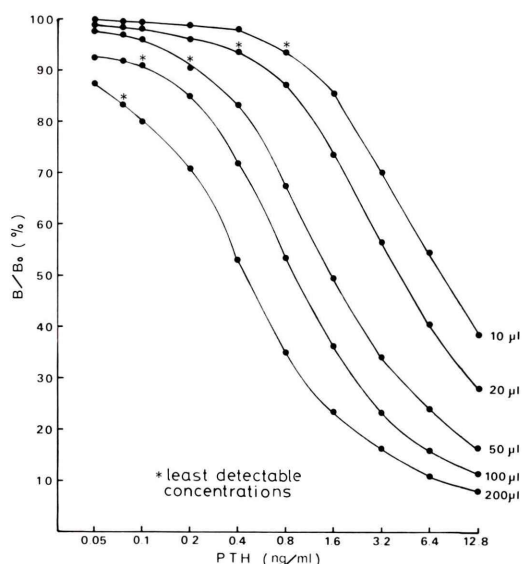


Fig. 1 Standard curve and least detectable concentrations in various sample volumes.

Table 2 Reproducibility

	Intraassay (ng/ml)			Interassay (ng/ml)		
	Serum I	Serum II	Serum III	Serum IV	Serum V	Serum Vi
1	0.27	2.25	1.90	0.80	1.65	3.00
2	0.29	2.15	2.00	0.82	1.72	3.25
3	0.25	1.98	2.00	0.78	1.70	3.10
4	0.30	2.00	2.12	0.82	1.68	3.35
5	0.23	1.95	2.12	0.80	1.77	2.50
6	0.25	2.12	2.05	0.70	1.50	2.48
7	0.27	2.00	2.10			
8	0.23	1.99	2.30			
9	0.25	1.97	2.20			
10	0.24	2.12	2.20			
Mean	0.26	2.05	2.10	0.79	1.67	2.95
S.D.	0.02	0.09	0.11	0.04	0.08	0.34
C.V.	7.7	4.4	5.2	5.1	5.0	11.5

値はそれぞれ 7.7%, 4.4%, 5.2% であった。また 6 回の Interassay における C. V. 値はそれぞれ 5.1%, 5.0%, 11.5% であった。

3) 回収率 (Table 3)

回収率は A 血清で 96.5 から 105.4%, 平均 99.6%, B 血清で 95.5 から 102.4%, 平均 99.3% であった。

Table 3 Recovery of PTH assayed to two different serum samples.

Predicted Value (ng/ml)	Determined Value (ng/ml)	Recovery (%)
Serum A (0.26 ng/ml)		
0.23	0.24	104.3
0.33	0.29	87.9
0.53	0.52	98.1
0.93	0.98	105.4
1.73	1.67	96.5
3.33	3.50	105.1
Mean ± S.D.		99.6 ± 6.3
Serum B (2.0 ng/ml)		
1.10	1.05	95.5
1.20	1.18	98.3
1.40	1.41	100.7
1.80	1.78	98.9
2.60	2.60	100.0
4.20	4.30	102.4
Mean ± S.D.		99.3 ± 2.2

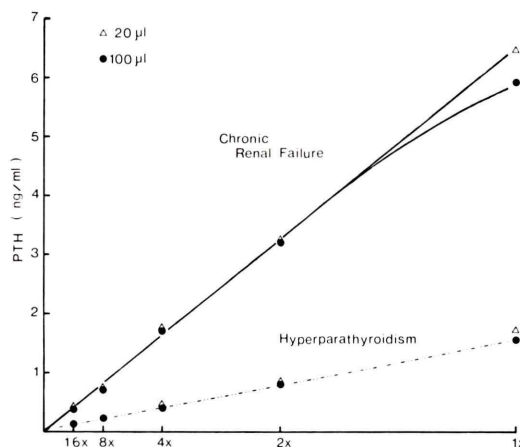


Fig. 2 Dilution test.

4) 希釈試験 (Fig. 2)

PTH 高値を示す慢性腎不全患者血清では 100 μl サンプルングで若干直線性を欠いたが、20 μl サンプルングでは良好な直線性がみとめられた。また原発性副甲状腺機能亢進症患者血清では 100 μl, 20 μl サンプルングの両者ともそれぞれの測定可能範囲内で良好な直線性を示した。

5) インキュベーション時間 (Fig. 3)

インキュベーション時間の延長とともに B/T

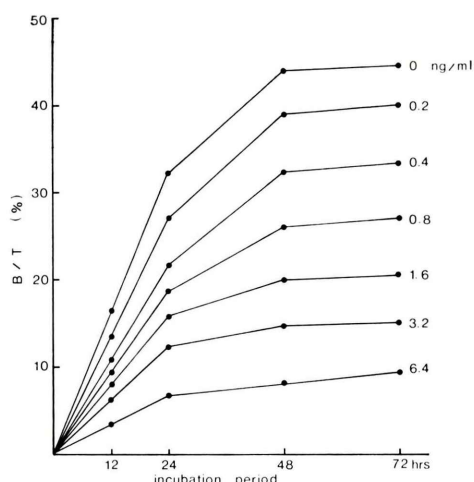


Fig. 3 Effect of first incubation time on B/T percent.

パーセントは上昇したが、48時間以降はいずれの標準血清においてもプラトーに達した。

2. 臨床的検討 (Fig. 4, Fig. 5)

健常人26例の100 μ l アッセイによる血中 PTH 濃度は0.20 から0.36 ng/ml の範囲にあり、平均値は0.26 ng/ml、標準偏差0.04 ng/ml であった。また20 μ l アッセイでは23例測定したが5例が測定感度以下を示した。

以下の臨床的検討はすべて100 μ l アッセイにて行った。

原発性副甲状腺機能亢進症患者3例における PTH 濃度は1.32 から3.25 ng/ml の範囲にあり、平均値2.21 ng/ml、標準偏差0.97 ng/ml で健常人に比べ有意に高値であった ($p < 0.001$)。

特発性甲状腺機能低下症患者3例では全例測定感度以下を示した。

70歳以上の尿素窒素、血清カルシウム濃度が正常な非内分泌疾患患者19例では0.11 から0.32 ng/ml の範囲にあり、平均値0.22 ng/ml、標準偏差0.66 ng/ml で健常人に比べ有意に低値であった ($p < 0.02$)。

血液透析をうけている慢性腎不全患者20例における透析前の PTH 濃度は0.64 から6.85 ng/ml の範囲にあり、平均値2.51 ng/ml、標準偏差1.45 ng/ml であった。一方透析後は0.47 から6.18 ng/ml の範囲にあり、平均値2.10 ng/ml、標準偏差

1.40 ng/ml で透析前と比較すると $p < 0.01$ で有意に低下していた。しかし透析前後ともに健常人と比較すると有意に高値であった ($p < 0.001$)。

偽性副甲状腺機能低下症の1例に行った 1α -OH-D₃ 治療の前後における血清カルシウムおよび PTH 濃度は治療前でそれぞれ5.7 mg/dl、1.75 ng/ml、 1α -OH-D₃ 2 μ g 投与1か月後でそれぞれ7.5 mg/dl、1.02 ng/ml、6 μ g 投与1か月後でそれぞれ8.4 mg/dl、0.33 ng/ml と血清カルシウムの回復に伴って PTH 濃度は正常範囲内の値まで低下した。

EDTA 負荷時の PTH 濃度は特発性副甲状腺機能低下症患者では上昇はみられなかったが、原発性副甲状腺機能亢進症患者の2例では著明な増加がみとめられた。

従来のウシ C 末端抗体を用いた旧 PTH ‘榮研’による測定値と本キットによる測定値の相関を Fig. 5 に示した。 $r = 0.88$, $y = 2.72x + 0.38$ なる有意の正相関がみとめられた ($p < 0.001$)。

IV. 考 案

生物活性はないが、免疫活性を有するといわれる C 末端 PTH は N 末端 PTH に比べ血中半減期が長く、また正常人血清の多くが測定感度内に入るなどの利点があり、その血中濃度の測定は原発性副甲状腺機能亢進症をはじめとする種々の疾患の診断や治療効果判定上有用である。しかし従来のウシやブタの C 末端 PTH に対する抗体を用いた方法による測定値はヒト C 末端 PTH の相対的量を表わしているにすぎなかった。最近、抗ウシ C 末端 PTH 抗体を用いる系にヒトの C 末端 (65~84) PTH のトレーサーと標準品を使ったキットも開発されている⁶⁾が、今回検討したヒト PTH ‘榮研’はヒトの C 末端 (46~84) PTH に対する抗体を用いているのが特長である。抗体の特異性については今回、種々の PTH フラグメントの入手が不能のこともあり検討できなかったが矢野は (53~84), (51~84) PTH とほぼ 100% の交叉をみとめるものの (1~34) PTH とは 1,000 ng Eq/ml まで交叉性をみとめず C 末端に特異性

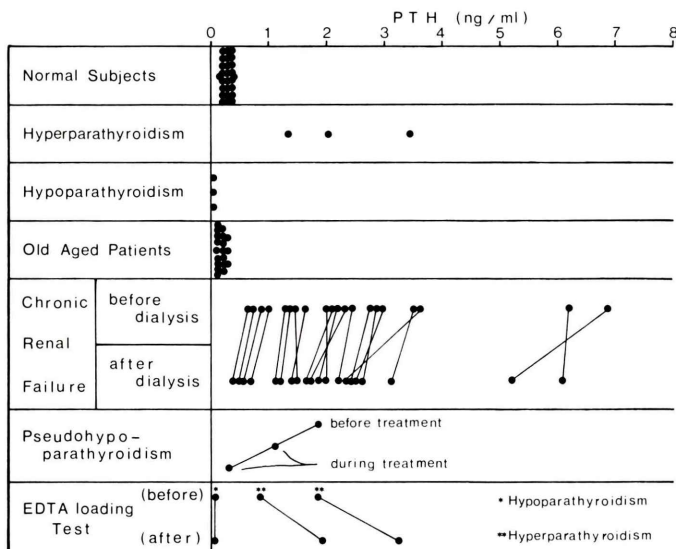


Fig. 4 Serum PTH concentrations in normal subjects and patients with various diseases.

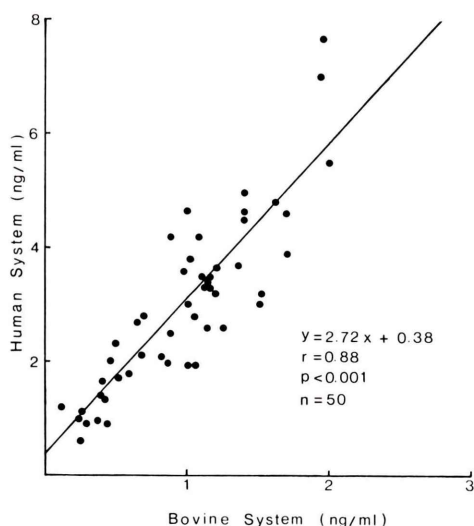


Fig. 5 Relation between human system and bovine system.

が高いことを示している⁵⁾。

本キットの標準曲線はサンプル量を $100\mu\text{l}$ 以上とすると感度は良好となるが、高濃度域の傾きが小さくなり、慢性腎不全患者など高濃度が予測されるサンプルの測定上難点がある。一方サンプル量を $20\mu\text{l}$ 以下とすると高濃度域での精度が上がるが正常人の約20%が感度以下となるように低濃

度域の測定上問題がある。こうしたことから測定するサンプルによって使用血清量を使いわければ 0.075 ng/ml から 12.8 ng/ml までの広範囲で満足できる精度、確度、感度を得ることが可能である。

再現性は Intraassay で 4.4 から 7.7%, Inter-assay で 5.0 から 11.5% とほぼ満足できる結果であり、またこれは旧 PTH ‘榮研’で著者らが検討した値^{7,8)} に比べはるかに良好であった。

確度については回収率、希釈試験ともに良好であった。高濃度血清の希釈において $100\mu\text{l}$ サンプルングで若干直線性を欠いた理由は、標準曲線の傾きが高濃度域で小さくなることによるものと思われる。

第一反応時間は48時間でプラトーに達することから指示書通り48時間が適当と思われる。

健常人の基礎値から正常値を平均値 $\pm 2\text{ S.D.}$ と定めると正常範囲は 0.18 ng/ml から 0.34 ng/ml となる。従来の測定法では健常人で感度以下となる場合が少なくなく^{7,8)}、正常値の下限の設定は困難であった。しかし本キットにおいて著者らが検討した範囲では $100\mu\text{l}$ サンプルング法によって感度以下を示した健常人はなく、正常下限の設定の可能性が示唆された。この点については今後さらに検討する予定である。

原発性副甲状腺機能亢進症, 慢性腎不全, 偽性副甲状腺機能低下症患者では健常人に比べ高値を示し, また特発性副甲状腺機能低下症, 老年患者では健常人に比べ低値であった. これらは従来の報告と一致し⁶⁻¹⁰⁾, 本キットの臨床応用上における有用性を示すものである. また EDTA やカルシウム負荷時の PTH 分泌動態をとらえるには C 末端アッセイよりも N 末端アッセイの方が有用であるといわれているが¹¹⁾, 今回著者らの EDTA 負荷試験における結果をみる限り, 本キットによる末端アッセイによっても十分変化を把握することができることが示された.

旧 PTH ‘栄研’ によるアッセイでは血液透析前後の PTH 濃度に差はなかったが⁷⁾, 今回の検討から血中 C 末端 PTH は透析により低下するという結果が得られた. しかし変化しないとする報告もあり⁵⁾ 今後さらに詳細な検討を要するものと思われる.

以上より本キットは血中 PTH 濃度の変化をよく反映し, かつ感度, 精度, 確度が高いことがみとめられた.

旧 PTH ‘栄研’ による測定値と本キットによる測定値との間には $r=0.88$ なる有意の正相関がみとめられたが, 旧 PTH ‘栄研’ の測定値は本キットによる測定値の30ないし40%の値を示した. これは旧キットがウシ PTH を標準品として用いているのに対し, 本キットはヒト (1~84) PTH 等価として表示しているヒト (46~84) PTH を標準品に用いていることによる差と考えられる. 他社のキットでは mIU/ml で表示されているものもあり¹²⁾, 今後測定値を統一する意味で PTH の標準品の規格化が望まれる.

V. 結 語

最近開発されたヒト C 末端 PTH 測定用キット, ヒト PTH ‘栄研’ の基礎的, 臨床的検討を行った. 本キットは従来のウシ C 末端抗体を用いた旧 PTH ‘栄研’ と比較し感度, 精度, 確度が良好であった. またサンプル量の調節によって低濃度血清, 高濃度血清それぞれの測定上精度を高めるこ

とが可能であること, 種々の病態における血中 PTH 値変化を鋭敏に反映することから臨床応用上有用であり, 今後広く利用されることが期待される.

稿を終えるにあたり, ご校閲いただいた中川昌一教授, 老年患者血清を提供いただいた創成えんどう病院, 遠藤正博士, ならびにキットを提供していただいた栄研化学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* **49**: 613-617, 1963
- 2) O'Riordan JLH, Aurbach GD and Potts JT: Immunological reactivity of purified human parathyroid hormone. *Proc Natl Acad Sci* **63**: 692-697, 1969
- 3) Schopman W, Hackeng WHL, Lequin RM: A radioimmunoassay for parathyroid hormone in man. *Acta Endocrinol* **63**: 643-654, 1970
- 4) Arnaud CD, Tsao HS, Littledike T: Radioimmunoassay of human parathyroid hormone in serum. *J Clin Invest* **50**: 21-34, 1971
- 5) 矢野喬史: 46-84 ヒト PTH フラグメントを用いる Homologous Radioimmunoassay. *医学と薬学* **7**(1): 165-175, 1982
- 6) 福永仁夫, 中島信夫, 森田陸司, 他: ヒト C 末端 (65-84) PTH を使用した, RIA mat PTH の基礎的および臨床的検討. *核医学* **19**: 453-460, 1982
- 7) 嘉手納成之, 鈴木邦治, 野口和哉: ラジオイムノアッセイキット (PTH ‘栄研’) による血中副甲状腺ホルモン測定法の検討. *ホルモンと臨床* **28**: 791-795, 1980
- 8) 野口和哉, 鈴木邦治, 嘉手納成之, 他: ラジオイムノアッセイキット PTH ‘栄研’ による血中副甲状腺ホルモン測定法の検討 (第2報). *医学と薬学* **7**(7): 1842-1848, 1982
- 9) 福永仁夫, 森田陸司, 高坂唯子, 他: PTH ‘栄研’ の基礎的および臨床的検討. *核医学* **17**: 59-67, 1980
- 10) Lequin RM, Hackeng WHL and Scopman W: A radioimmunoassay for parathyroid hormone in man. *Acta Endocrinol* **63**: 655-666, 1970
- 11) Goldsmith RS, Furszyfen J, Johnson WJ, et al: Etiology of hyperparathyroidism and bone disease during chronic hemodialysis. III. Evaluation of parathyroid suppressibility. *J Clin Invest* **52**: 173-180, 1973
- 12) 弓田 滋, 孫 孝義, 海上 寛, 他: PTH-RIA キット (CIS) の基礎的検討とその臨床応用. *ホルモンと臨床* **29**: 113-118, 1981