

《ノート》

PTH (Parathyroid Hormone) キット「ヤマサ」の基礎的および臨床的検討

Fundamental and Clinical Study for PTH (Parathyroid Hormone)
Kit 'Yamasa'

福永 仁夫* 大塚 信昭* 古川 高子* 森田 陸司*

Masao FUKUNAGA, Nobuaki OTSUKA, Takako FURUKAWA
and Rikushi MORITA

Department of Nuclear Medicine, Kawasaki Medical School

I. 緒 言

血中副甲状腺ホルモン (Parathyroid Hormone, PTH) の測定は, Radioimmunoassay (RIA) により行われているが, 周知のごとく, 血中には PTH の免疫学的多様性が存在し, しかも生物学的に不活性な PTH が大部分を占めている¹⁾. したがって, 用いる標識抗原, スタンダードあるいは抗体により, 測定値は異なり, 測定値の評価も異なり得る.

臨床的に望ましい PTH 測定の条件としては, (1) 副甲状腺機能低下症では PTH の測定値が低値であること, (2) 正常者の 95% の PTH の測定が可能であり, しかも血中イオン化カルシウム (iCa) 値と負の相関関係にあること, (3) PTH の分泌過剰以外の原因 (悪性腫瘍を除く) による高カルシウム血症では, PTH が低値であること, (4) 原発性副甲状腺機能亢進症の 90% 以上が PTH の高値であることなどが挙げられる. 今回, PTH 分子の中間部位に抗原性を有する, PTH キット「ヤマサ」(ヤマサ醤油 K.K.) を使用する機会を得たので, 前記の好ましい測定系としての条件

を中心に, 基礎的および臨床的検討を行ったので報告する.

II. 対象と方法

対象は, 正常者 41 例 [年齢: 59.1±9.1 歳 (平均±標準偏差)], 原発性副甲状腺機能亢進症 (1° HPT) 7 例, 高カルシウム血症を合併した悪性腫瘍 (MAH) 25 例, 腎・尿路系結石症 21 例, 副甲状腺機能低下症 5 例 (特発性 4 例, 術後性 1 例), 骨軟化症 (正常腎機能 4 例, 腎機能低下 1 例) 5 例, 骨粗鬆症 26 例および人工透析中の慢性腎不全症 65 例の計 195 例である.

PTH キット「ヤマサ」は, スタンダードにヒト (1-84) PTH を, 抗体にウシ (1-84) PTH ニワトリ血清を, 標識抗原に ¹²⁵I-tyr⁴²-ヒト (43-68) PTH を, 第 2 抗体に抗ニワトリ IgG ヤギ血清を使用した系よりなっている.

測定手順は, スタンダードまたは被験血清 200 μ l を分注後, 抗体 100 μ l を加え, 混和し, 室温にて 4 時間インキュベーションする. 次いで, 標識抗原溶液 100 μ l を加えた後, 氷水中でさらに 18 時間インキュベーションする. その後, 第 2 抗体 1,000 μ l を加え, 混和し, 氷水中で 1 時間インキュベーションする. 抗体との結合部分と非結合

Key words: PTH, Radioimmunoassay, Mid-portion PTH, Calcium metabolism.

* 川崎医科大学核医学科

受付: 61年 8月12日

最終稿受付: 61年11月28日

別刷請求先: 倉敷市松島 577 (〒701-01)

川崎医科大学核医学科

福永 仁夫

部分の分離は遠心分離(3,000 rpm, 4°C, 20分間)にて行い、上清を吸引除去後、試験管の放射能を測定する。

PTH キット「ヤマサ」の基礎的検討としては、以下の項目について行った。つまり、(1)最小検出濃度、(2)特異性、(3)再現性(測定内および測定間)、(4)希釈試験、(5)添加回収試験である。なお、最小検出濃度は PTH スタンダード 0 pg/ml における B/B_0 (1.0) と有意に異なる点の濃度とし

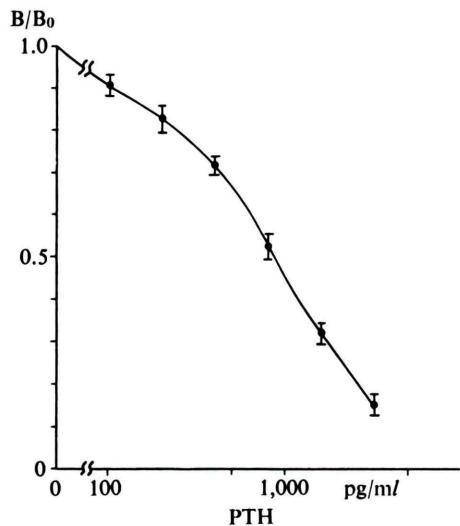


Fig. 1 Standard curve for PTH Kit 'Yamasa'.

た。特異性の検討は、ヒト PTH のフラグメント(1-34, 1-44, 13-34, 39-68, 39-84, 69-84)を使用して行い、抗体との結合部分(%)の 50% 結合阻害を示す濃度にて表示した。希釈試験には PTH 高値の 1 例の慢性腎不全症と 1 例の 1° HPT の血清を使用し、その希釈には PTH 濃度 0 pg/ml のスタンダードにて行った。

他方、PTH キット「ヤマサ」の臨床的検討としては、(1)正常値の範囲の決定と正常者における検出可能者の割合、(2)カルシウム代謝の異常を呈する各種疾患における濃度、(3) iCa 濃度と PTH 濃度との相関、(4)他の PTH 測定系[C 末端 PTH (C-PTH)、中間部位の PTH (M-PTH)、N 末端 PTH (N-PTH) や (1-84) PTH]による測定値との相関を慢性腎不全症について検討した。なお、iCa の測定はカルシウム・イオン分析装置(SERA 250, HORIBA)にて行い、腎・尿路系結石症患者 21 例および MAH 患者 24 例について検討した。血中 iCa の正常値は 1.00~1.20 mmol/L である。C-PTH の濃度は PTH の C 末端に特異性を有する PTH '栄研' キット(栄研)にて、M-PTH の濃度は、(44-68) PTH に対し高い特異性をもつ PTH-MM RIA キット(ダイナポット)にて、N-PTH と (1-84) PTH の濃度は抽出と濃縮法を利

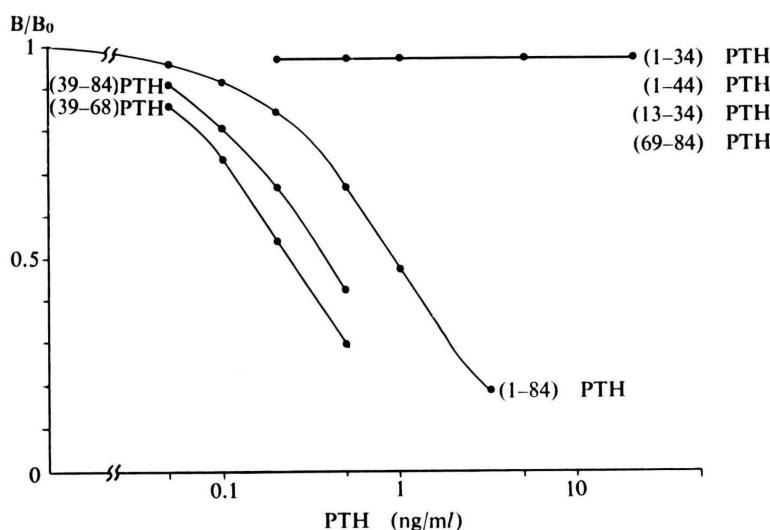


Fig. 2 Specificity study using PTH fragments.

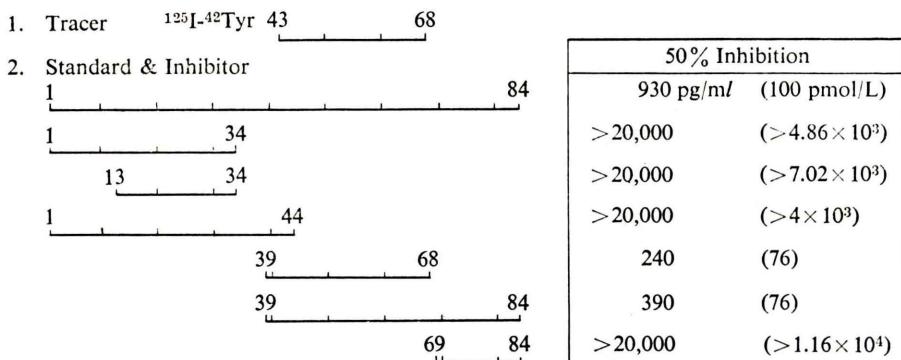


Fig. 3 Specificity study evaluated by 50% inhibition.

Table 1 Reproducibility study

Intra-assay		
No.	Mean ± S.D. (pg/ml)	C.V. (%)
6	507 ± 34	6.7
6	927 ± 58	6.3
6	2,390 ± 333	13.9

Inter-assay

No.	Mean ± S.D. (pg/ml)	C.V. (%)
3	321 ± 20	6.2
3	714 ± 58	8.1

用した N-tact PTH assay kit (Immuno Nuclear Corp.) にて、それぞれ測定した。

III. 結 果

1. 基礎的検討

ロットが異なる 7 回の測定における標準曲線を Fig. 1 に示す。PTH 濃度 100 pg/ml の時点の B/B_0 は、0 pg/ml のそれと有意に低いため、この 100 pg/ml を最小検出濃度とした。

本測定系の特異性の検討の成績を Fig. 2 と Fig. 3 に示す。PTH のフラグメントのうち、(1-34), (1-44), (13-34), (69-84) PTH とは何ら、交叉反応を示さず、(39-68), (39-84) PTH とは良好な交叉反応性が認められた。したがって、本測定系は、N-PTH や C-PTH とは交叉反応性をもたず、M-PTH に特異性を有することが認められた。(39-68) PTH と (39-84) PTH との 50% 結合阻害に関する比較・検討では、両者ともに 76 pmol/L

Table 2 Recovery study

Added	Calculated (pg/ml)	Measured	Recovery (%)
0	—	227	—
	—	509	—
	—	1,210	—
50	277	286	103
	559	568	102
	1,260	1,260	100
100	327	327	100
	609	592	102
	1,310	1,318	101
200	427	382	89
	709	710	100
	1,410	1,346	95
400	627	635	101
	909	912	100
	1,610	1,682	104
800	1,027	1,013	99
	1,309	1,373	105
	2,010	2,145	107
1,600	1,827	1,779	97
	2,109	2,224	105
	2,810	2,892	103
			100.5 ± 2.0 (mean ± S.D.)

を要し、同等であることが示された。

再現性の検討の結果を Table 1 に示す。測定内の変動係数は 6.3~13.9% で、測定間の変動係数は 6.2~8.1% であり、十分満足できる再現性が得られた。

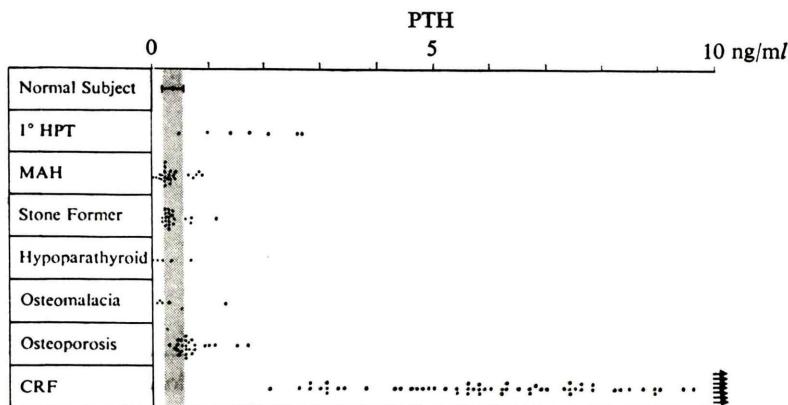


Fig. 4 Serum PTH concentrations in normal subjects and patients with deranged calcium metabolism.

1° HPT: Primary hyperparathyroidism

MAH: Malignancy associated with hypercalcemia

CRF: Chronic renal failure

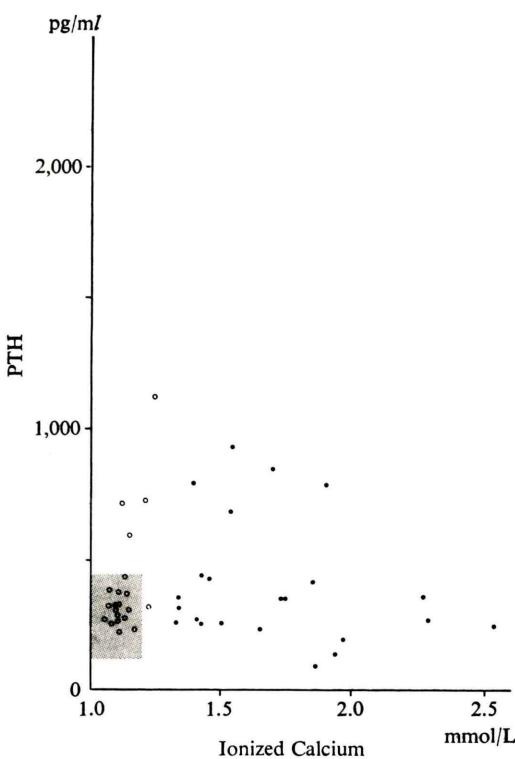


Fig. 5 Correlation between PTH and ionized calcium concentrations.

Open circle: Stone former

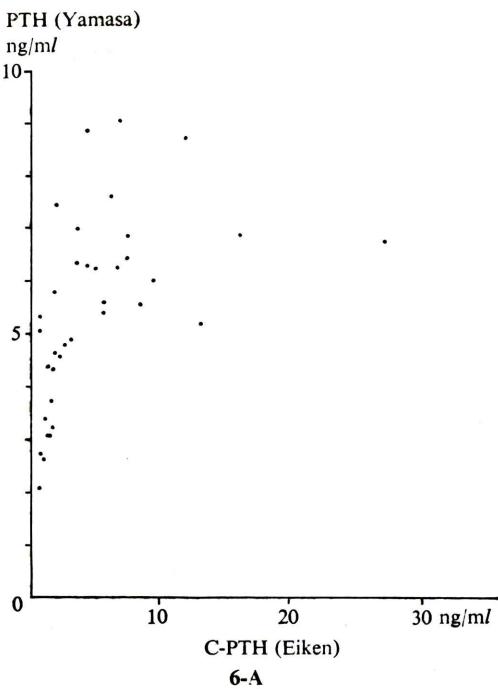
Closed circle: Malignancy associated with hypercalcemia

希釈試験は、慢性腎不全症および1° HPT患者のPTH高濃度血清とともに、その希釈は直線性を示し、しかも0点にほぼ良好に収束することが認められた。

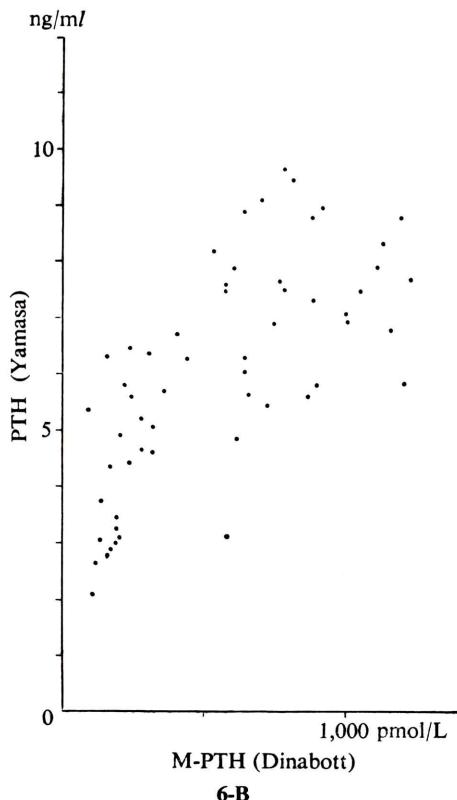
添加回収試験の結果をTable 2に示す。3種類の血清に既知濃度のPTHを加えた際の、回収率は $100.5 \pm 2.0\%$ を示し、良好な結果が得られた。

2. 臨床的検討

正常者のPTH濃度は $392 \pm 208 \text{ pg/ml}$ であり、全41例の血中濃度の測定が可能であった。したがって、正常者のPTH濃度の(平均値+1標準偏差)である 600 pg/ml を正常上限値に、その(平均値-1標準偏差)である 184 pg/ml を正常下限値に設定し、これらの範囲を超えるものをそれぞれ高値または低値とした。このように、正常下限の設定が可能であった。各種カルシウム代謝の異常疾患における血中PTH濃度をFig. 4に示す。高カルシウム血症のうち、1° HPTでは7例中6例にPTHの高値が観察されたが、MAHではPTHの高値は25例中5例にしか認められなかった。腎・尿路系結石症では21例中3例にPTHの高値がみられた。副甲状腺機能低下症では、1例の術後性と1例の特発性を除き、残り3例の特発性は正常値以下に分布した。骨軟化症では1例の



6-A



6-B

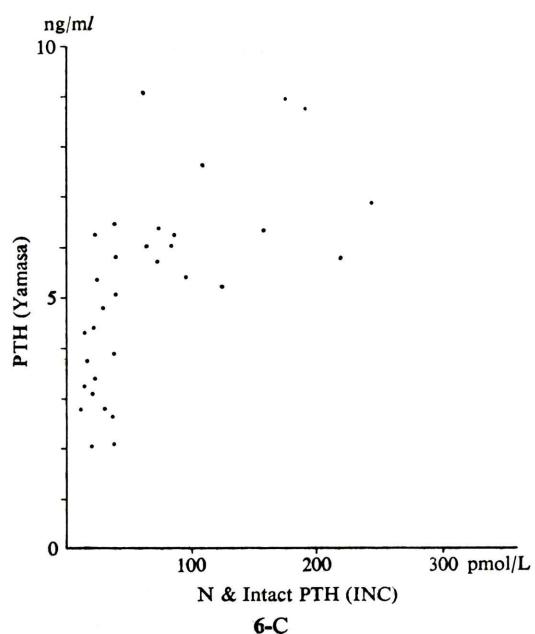


Fig. 6 Correlation between PTH measured with PTH Kit 'Yamasa' and C-PTH (A), M-PTH (B) or N, intact PTH (C) concentrations in chronic renal failure.

腎機能障害を伴う症例は PTH のやや高値を示したが、他の腎機能正常の 4 例は正常ないし低値であった。骨粗鬆症の 38% (26 例中 10 例) は血中 PTH 濃度が高値であった。慢性腎不全症 65 例は全部 PTH の高値を示した。

iCa 濃度と PTH 濃度の相関を Fig. 5 に示す。腎・尿路系結石症では両者の間には有意の正相関 ($r=0.59$, $p<0.005$, $y=2.492x-2.414$, $N=21$) が観察されたのに対し、MAH では両者の間には何ら相関性を認めなかった ($r=-0.21$, N.S., $y=-151x+659$, $N=24$)。

各種 PTH キットにより測定された慢性腎不全症患者の血中 PTH 濃度の比較を Fig. 6A~C に示す。Fig. 6-A は PTH キット「ヤマサ」により測定された PTH 濃度と C-PTH 濃度との、Fig. 6-B は M-PTH 濃度との、Fig. 6-C は N-PTH および (1-84) PTH 濃度との相関を示す。本キットにより測定された PTH 濃度は、C-PTH, M-PTH, N-PTH および (1-84) PTH 濃度との間に有意の

正相関性が観察された(それぞれ $r=0.43$, $p<0.01$, $y=0.0696x+5.047$, $N=38$, $r=0.70$, $y=0.0390x+3.799$, $N=57$, $r=0.56$, $p<0.001$, $y=0.0130x+4.316$, $N=33$).

IV. 考 察

PTH の初めての RIA は、1963 年、Berson らにより報告されたが、(1) 血中には PTH の免疫学的多様性が存在すること、(2) しかも生物学的活性を有する N-PTH や (1-84) PTH は血中ではその濃度が低いこと、など種々の問題点があるため、引き続き測定系の改善が試みられた²⁾。例えば、C-PTH, M-PTH, N-PTH, (1-84) PTH のそれぞれに特異性を有する RIA が開発された^{3~6)}。しかし、感度、特異性をともに満足できる優れた測定系は少ないため、現在でも PTH の測定は臨床家を悩ます測定法の 1 つである。一方、腎スライスにおける glucose 6-phosphate dehydrogenase の細胞化学測定法や腎の adenylate cyclase assay を用いた方法は、一部の施設で良好な成績が挙げられているが、日常検査としては煩雑過ぎる欠点を有する^{7,8)}。

今回、スタンダードにヒト (1-84) PTH を抗体に抗ウシ (1-84) ニワトリ血清を、標識抗原に ^{125}I -tyr⁴²-ヒト (43-68) PTH を使用した PTH キット「ヤマサ」の基礎的検討を行ったところ、測定感度、再現性、希釈試験、添加回収試験において良好な成績が得られた。また本測定キットは、PTH 分子の (45-68) 位、つまり中間部位に抗原決定基を有することが認められた。PTH の血中の代謝は、N-PTH や (1-84) PTH はきわめて早く、他方、C-PTH は遅く、そのため、前者の血中濃度は低く、後者は高いことが知られている。したがって、N-PTH や (1-84) PTH の測定には、抽出や濃縮が必要である。この点 C-PTH や本キットのような M-PTH などの C フラグメントの測定法は、PTH の急激な分泌の変化を捉えるには不適であるが、1° HPT のような持続的な PTH 過剰状態を知るには適している。

臨床的検討から、正常者の全例において血中

PTH の検出が可能であった。従来の PTH の RIA キットでは、測定感度が不十分なため、正常者でも検出不能の場合が少なくなかったのに対し、本キットで全例が検出可能であったことは注目される。このことは、正常者と副甲状腺機能低下者との鑑別に使用し得ることを示している。事実、今回の検討では、特発性副甲状腺機能低下症の 3 例は PTH 濃度の明らかな低下がみられた。さらに、1 例は正常値を示したが、血中カルシウム濃度の低値を考え併せると、PTH 分泌の低下が推測し得る。1 例の術後性の症例は、低カルシウム血症と PTH 高値という相反する現象がみられたが、本例は術後 1 か月の時点での測定であり、低カルシウム血に反応して代償的に残存副甲状腺からの PTH 過剰分泌が生じたものと解される。高カルシウム血症を呈する代表的な疾患のうち、1° HPT では 7 例中 6 例に、他方 MAH では 25 例中 5 例に PTH の高値が観察された。臨床上、PTH の測定が最もしばしば要求される場合は、高カルシウム血症の鑑別診断、換言すれば 1° HPT の診断である。PTH の測定系として、PTH の過剰分泌に基づく高カルシウム血症では PTH 濃度が高く、その他の原因による高カルシウム血症では PTH 濃度が低いことが理想的である⁹⁾。この観点から本キットを評価すると、既報の C-PTH や M-PTH 測定系による成績とほぼ同等であった^{10,11)}。正常 iCa 濃度の腎・尿路系結石症の少数例に PTH の高値が認められ、しかも iCa 濃度と PTH 濃度との間には有意の正相関性が観察された。これらの腎・尿路系結石症の一部は将来 1° HPT に進展するか否か興味深い。骨軟化症のうち、腎機能障害を伴う 1 例で、PTH の高値が観察されたが、PTH 濃度の意義を C-PTH や M-PTH 測定系で解釈する時は、絶えず腎機能の程度を念頭に入れて考慮すべきであろう。骨粗鬆症の 38% に PTH の高値が観察された。骨粗鬆症を 1 つの疾患単位というより、いくつかの病態を含む症候群と考えると、一部の症例では PTH の高値が骨塩の低下をきたす可能性が示唆される¹²⁾。人工透析中の慢性腎不全症では全例 PTH の高値が観察された。周知の

ごとく、PTH の C フラグメントの代謝は腎で行われるため、腎機能の低下は C フラグメントの血中での増加を導く。このため、2 次性副甲状腺機能亢進症による PTH の高値との鑑別が重要となる。慢性腎不全症について、本キットによる PTH 測定値は、それぞれ C-PTH, M-PTH, または N-PTH および (1-84) PTH 濃度と有意の正相関性を示した。特に生物学的活性を有する N-PTH および (1-84) PTH との相関が認められたことは、副甲状腺剔出術の適応を知る上で有用であると思われる。

このように、PTH キット「ヤマサ」による PTH 濃度の測定は、基礎的および臨床的検討から、十分臨床応用が可能であり、カルシウム代謝の異常を呈する疾患の PTH 分泌状態の解明に有用であることが認められた。

V. 結 論

ヒト PTH を使用した測定系である PTH キット「ヤマサ」の基礎的および臨床的検討を行った。

本キットの抗原決定部位は PTH 分子の中間部位にあることが認められた。また、測定感度、再現性、希釈試験、添加回収試験も良好であった。正常者の全例で血中 PTH の検出が可能であり、そのため、正常値の下限が設定できた。

PTH の高値は 1° HPT (6/7) や人工透析中の慢性腎不全症 (41/41) に高率に観察された。一方、MAH では PTH の高値例 (5/25) は少なく、PTH 測定により高カルシウム血症の鑑別はある程度、可能であることが示された。

本キットで測定された慢性腎不全症患者の血中の PTH は、C-PTH, M-PTH や N-PTH および (1-84) PTH 濃度と有意の正相関性がみられ、2 次性副甲状腺機能亢進症の存在を知る一助となり得ることが示唆された。

このように、PTH キット「ヤマサ」は基礎的および臨床的検討より、十分臨床使用が可能でカルシウム代謝の解明に有用であると思われた。

PTH キット「ヤマサ」をご提供戴いたヤマサ醤油株式会社に深謝致します。

文 献

- 1) Arnaud CD: Assay of Calcium-regulating Hormones, Bikle D ed, Springer-Verlag, New York, 1983, p. 1
- 2) Berson SA, Yalow RS, Aurbach GD, et al: Immunoassay of bovine and human parathyroid hormone. Proc Natl Acad Sci (USA) **49** : 613-617, 1963
- 3) Di Bella EP, Gilkinson JB, Flueck J, et al: Carboxyl-terminal fragments of human parathyroid hormone in parathyroid tumors: Unique new source of immunogens for the production of antisera potentially useful in the radioimmunoassay of parathyroid hormone in human serum. J Clin Endocrinol Metab **46** : 604-612, 1978
- 4) Marx SJ, Sharp ME, Krudy A, et al: Radioimmunoassay for the middle region of human parathyroid hormone: Studies with a radioiodinated synthetic peptide. J Clin Endocrinol Metab **53** : 76-84, 1981
- 5) Hawker CD, Di Bella FP: Radioimmunoassays for intact and carboxyl-terminal parathyroid hormone: Clinical interpretation and diagnostic significance. Ann Clin Lab Sci **10** : 76-88, 1980
- 6) Shiraki M, Kawada N, Akiguchi I, et al: 1-34 Human parathyroid hormone radioimmunoassay: Properties of antiserum against synthetic 1-34 human parathyroid hormone and its clinical application. Endocrinol Japon **28** : 239-244, 1981
- 7) Chayen DJ, Dunkam J, Zanelli JM, et al: A sensitive bioassay of parathyroid hormone in plasma. Clin Endocrinol (Oxf) **9** : 375-379, 1978
- 8) Nissenson RA, Abbott SR, Teitelbaum AP, et al: Endogenous biologically active human parathyroid hormone: Measurement by a guanyl nucleotide-amplified renal adenylate cyclase assay. J Clin Endocrinol Metab **52** : 840-846, 1981
- 9) Purnell D, Scholz DA, Smith LH, et al: Treatment of primary hyperparathyroidism. Am J Med **56** : 800-809, 1974
- 10) 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
- 11) 福永仁夫, 柳真佐子, 大塚信昭, 他: Mid-molecule PTH 測定の臨床的意義. ホルモンと臨床 **33**: 81-85, 1985
- 12) Riggs BL: Osteoporosis, Christiansen C, Arnaud CD, Nordin BEC, Parfitt AM, Peck WA, Riggs BL eds, Copenhagen International Symposium on Osteoporosis, Copenhagen, 1984, p. 743