

## 《ノート》

## Osteocalcin RIA kit の基礎的および臨床的検討

## Fundamental and Clinical Study for Osteocalcin RIA Kit

永井 清久\* 福永 仁夫\* 大塚 信昭\* 古川 高子\*  
森田 陸司\*

Kiyohisa NAGAI, Masao FUKUNAGA, Nobuaki OTSUKA, Takako FURUKAWA  
and Rikushi MORITA

*Department of Nuclear Medicine, Kawasaki Medical School*

## I. はじめに

$\gamma$ -カルボキシグルタミン酸 (Gla) 残基を含有する蛋白は、カルシウム結合能を持つことで知られている。オステオカルシン (Osteocalcin, OC) は、1975年 Hauschka ら<sup>1)</sup>により報告された Gla 含有蛋白であり、骨に存在するため bone Gla protein とも呼ばれている。その働きや意義は未だ確定されていないが、骨のカルシウム (Ca) 動態を解析する手掛りとして注目されている。また、1980年に Price ら<sup>2)</sup>により OC の radioimmunoassay (RIA) が確立され、OC が血清中に存在することが示されて以来、各種 Ca、骨代謝の異常を呈する疾患について測定がなされて、その病態の解明に供されている。今回、われわれは、オステオカルシン RIA kit (ミドリ十字) を試用する機会を得、その基礎的および臨床的検討を行ったので報告する。

## II. 対象および方法

## 1. 対 象

本研究には、健常人79例 (男性48例, 女性31例), 甲状腺機能亢進症10例, 甲状腺機能低下症 3 例,

\* 川崎医科大学核医学科

受付: 61 年 10 月 24 日

最終稿受付: 62 年 1 月 23 日

別刷請求先: 倉敷市松島 577 (☎ 701-01)

川崎医科大学核医学科

永 井 清 久

原発性副甲状腺機能亢進症 3 例, 骨粗鬆症27例, 人工透析中の慢性腎不全症40例, 前立腺癌41例, 高 Ca 血症を合併した悪性腫瘍17例の計 220 例を対象とした。

## 2. 測定方法

本 RIA kit は、OC スタンダードにはウシ OC を、トレーサーには <sup>125</sup>I 標識ウシ OC を、抗体には抗ウシ OC ウサギ抗血清を使用した系である。本 RIA kit の測定操作は Fig. 1 に示すごとくである。つまり、第 1 反応として OC スタンダードまたは検体 100  $\mu$ l, トレーサー (20,000–30,000 cpm) 200  $\mu$ l および抗体 100  $\mu$ l を添加後 2~8°C で 20~24 時間インキュベートする。次いで、第 2 抗体 (250–500 倍希釈) 1,000  $\mu$ l を加え、さらに 2~8°C 15 分間インキュベートする。その後、2~8°C, 3,000 rpm で15分間遠沈し、bound と free の分離を行う。上清を吸引除去後、沈渣のカウントを測定する。

## 3. 基礎的検討

(1) 第 1 反応の反応温度および反応時間の検討  
第 1 反応の反応温度および反応時間は、室温で 3 時間、2~8°C で 16, 19 および22時間について検討した。

## (2) 検体量の検討

検体量の多少が標準曲線に及ぼす影響を知るた

**Key words:** Osteocalcin, Metabolic bone disease, Radioimmunoassay.

めに、血清量 50 および 100  $\mu$ l を用いて検討した。

### (3) OC の標準曲線の再現性および最小検出濃度の検討

第1反応の反応温度、反応時間および検体量の決定後、9回のアッセイを行い、標準曲線を得て、標準曲線の再現性を検討した。さらに、スタンダードの OC 各濃度について B/B<sub>0</sub> (%) の mean  $\pm$  S.D. を求め、OC の 0 ng/ml の B/B<sub>0</sub> (%) つまり 100% と有意に異なる OC の濃度つまり、B/B<sub>0</sub> (%) が 90% を示す濃度を最小検出濃度とした。

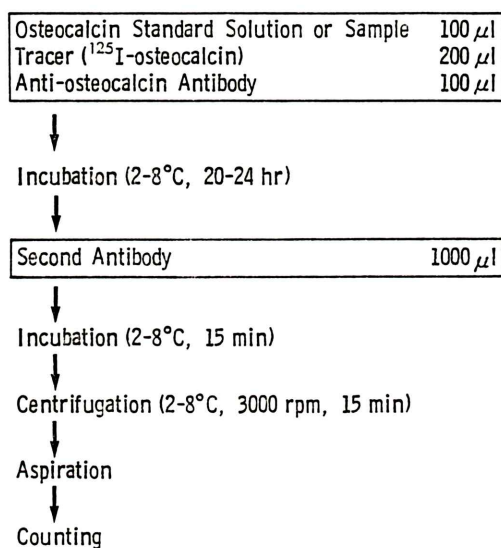


Fig. 1 Assay procedure.

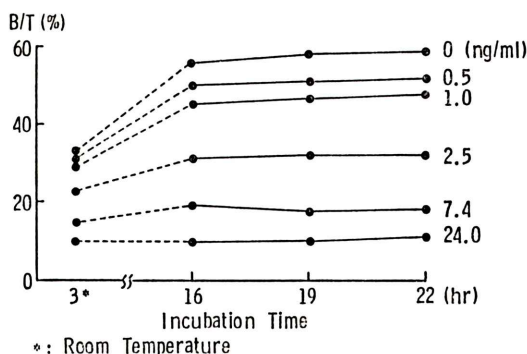


Fig. 2 The effect of incubation temperature and time on the bound percent (B/T). Incubation temperature 2-8°C except \*room temperature.

### (4) アッセイ内およびアッセイ間の再現性の検討

アッセイ内の再現性については、OC 濃度の異なる 3 種の検体を 3 回測定し、その C.V. (%) を求めた。他方、アッセイ間の再現性については、OC 濃度の異なる 3 種の検体を 4 回測定し、その C.V. (%) を求めた。

### (5) 希釈試験

OC 濃度の異なる 3 種類の検体を、キット添付の 0 濃度スタンダードにて倍々希釈し、その直線性と 0 点への収束性を検討した。なお、高濃度血清には慢性腎不全例を、中、低濃度血清には腎機能正常例を用いた。

### (6) 添加回収試験

OC 濃度が既知である 2 種類の異なる検体に、種々の濃度のスタンダードを添加し、実測値と理論値から回収率を求めた。

## 4. 臨床的検討

20歳以降の健常者および各種疾患患者の血中 OC 濃度を測定した。健常者については、性差および年齢別の OC 濃度の測定値を比較した。さらに血中 OC 濃度と血中 BUN 濃度との相関を高年齢者女性 38 例 (72-89 歳) について検討した。前立腺癌患者については、骨転移の有無と血中 OC 濃度との関係を検討した。骨転移の診断は  $^{99m}$ Tc-MDP を用いた骨シンチグラフィおよび骨 X 線像から行い、骨転移例 21 例と骨転移なし例 13 例に分けて検討した。また、経時的に骨シンチグラフィを施行できた前立腺癌例について、血中 OC 濃度を測定し、骨転移の消長、血中前立腺由来酸性フォスファターゼ (PAP) およびアルカリ・フォスファターゼ (ALP) 濃度との関係を検討した。

## III. 結 果

### 1. 基礎的検討

(1) 第1反応の反応温度および反応時間の検討  
第1反応の反応温度および反応時間と B/T (%) との関係を図 2 に示す。反応温度が 2~8°C で反応時間が 16 時間以上であれば、B/T (%) は 56% 以上と良好であった。Fig. 3 に第1反応の異なる

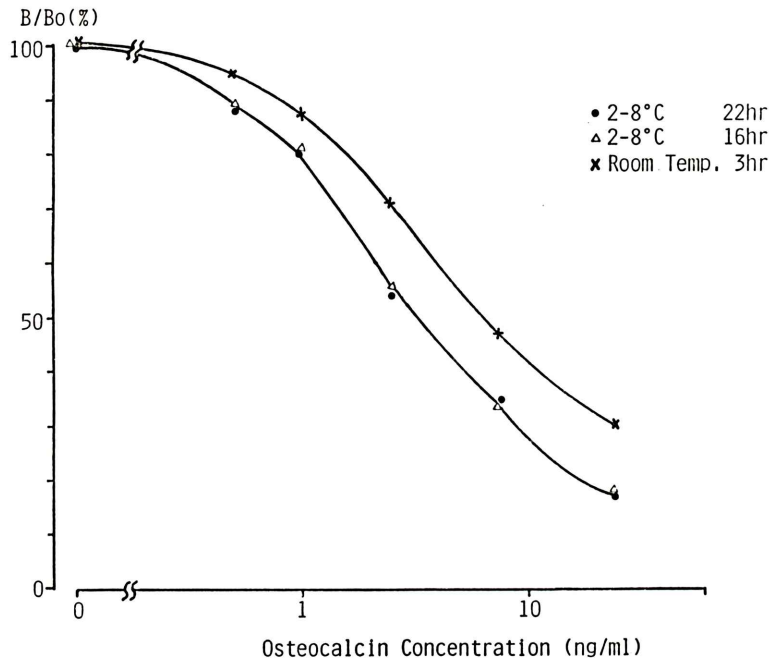


Fig. 3 The effect of incubation temperature and time on the standard curve for osteocalcin.

反応温度および反応時間における標準曲線を示す。2~8°C, 16および22時間での標準曲線は、室温3時間のそれよりも良好であった。反応時間の16時間と22時間の比較では両者に差はみられなかった。したがって、第1反応の反応温度および反応時間は2~8°Cで16時間以上と設定した。

#### (2) 検体量の検討

検体量の多少による標準曲線の影響を Fig. 4 に示す。低濃度域 (1 ng/ml 以下) では明らかに 100  $\mu$ l の方が 50  $\mu$ l よりも B/Bo (%) の inhibition が強く、感度が良好であることが示された。

以上の結果から、以下の検討は第1反応の反応温度および反応時間を、2~8°Cで16~22時間に、検体量を 100  $\mu$ l にて行った。

#### (3) 標準曲線の再現性および最小検出濃度の決定

9回のアッセイでの標準曲線を Fig. 5 に示す。スタンダードの OC 各濃度でのバラツキは少なく、標準曲線の再現性は良好であった。また、OC 濃

度 0.5 ng/ml での B/Bo (%) は、0 濃度のそれと有意に異なったので、この 0.5 ng/ml を最小検出濃度とした。本アッセイ系においては、0.5~24 ng/ml の範囲での測定が可能であった。

#### (4) アッセイ内およびアッセイ間の再現性の検討

アッセイ内およびアッセイ間の再現性の結果を Tables 1, 2 に示す。アッセイ内の C.V. は 1.2~4.4%, アッセイ間の C.V. は 2.7~8.2% と、両者ともにほぼ満足できる成績が得られた。

#### (5) 希釈試験

希釈試験の結果を Fig. 6 に示す。低、中濃度検体の希釈では、ほぼ良好な直線性と 0 点への収束性が得られたのに対し、高濃度検体の希釈では 0 点への収束はみられなかった。

#### (6) 添加回収試験

添加回収試験の結果を Table 3 に示す。回収率は 88.6~97.8% を示し、ほぼ満足できる成績が得られた。

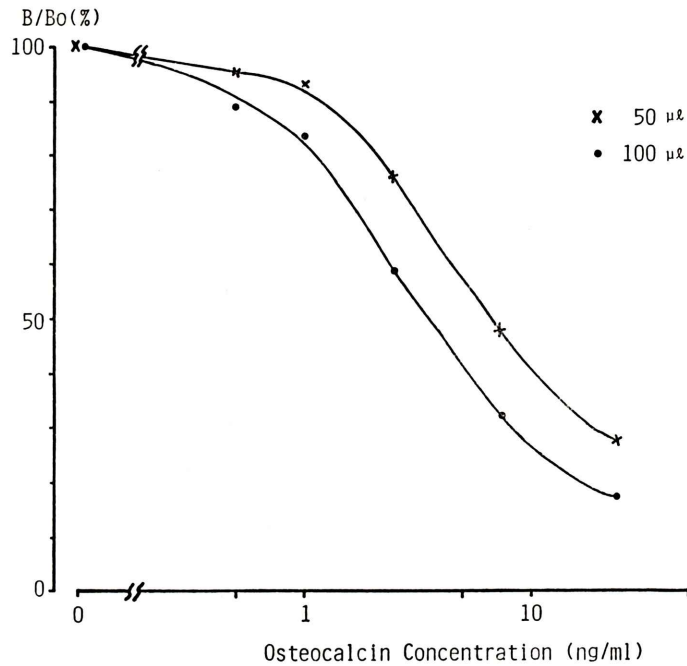


Fig. 4 The effect of sample volume on the standard curve for osteocalcin.

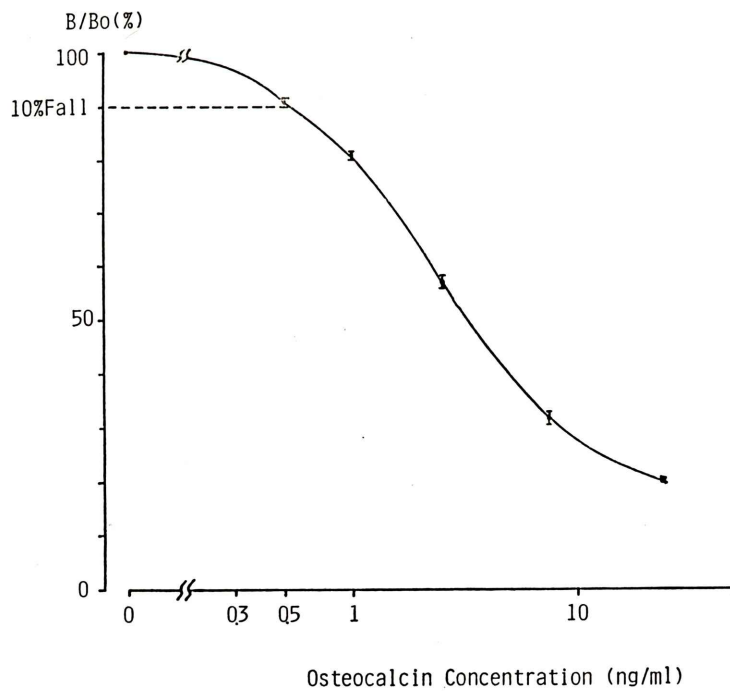


Fig. 5 Reproducibility of standard curve for osteocalcin (N=9). Mean  $\pm$  S.D.



## 2. 臨床的検討

### (1) 健常者の血清 OC 濃度

健常者の血清 OC 濃度を Fig. 7 に示す。男性では  $4.1 \pm 1.5$  ng/ml (mean  $\pm$  S.D.), 女性では  $4.4 \pm 1.7$  ng/ml の値が得られ, 測定値は 1.0 ng/ml から 8.1 ng/ml に分布した。したがって血中 OC 濃度の正常値は, mean  $\pm$  2 S.D. から計算された 1.0 ~ 7.8 ng/ml とした。また, 男性では加齢に伴い, 低下する傾向が観察された ( $N=48$ ,  $y = -0.0326x + 5.54$ ,  $r = -0.376$ ,  $p < 0.01$ )。一方, 女性では一定

の傾向がみられず, 加齢とともに幅広い分布を示した。

### (2) 各種疾患患者における血清 OC 濃度

各種疾患患者の血清 OC 濃度を Fig. 8 に示す。甲状腺機能亢進症では 10 例中 5 例が高値を示し, 甲状腺機能低下症では亢進症に比し, やや低値の傾向がみられた。原発性副甲状腺機能亢進症の 3 例中 2 例で高値が得られた。骨粗鬆症ではやや高値の傾向を示しており, 慢性腎不全症では 40 例中 32 例が高値を示した。前立腺癌症例では 41 例中 5

Table 1 Intra-assay reproducibility

Sample	N	Mean (ng/ml)	S.D. (ng/ml)	C.V. (%)
1	3	8.64	0.10	1.2
2	3	6.60	0.29	4.4
3	3	2.69	0.08	2.9

Table 2 Inter-assay reproducibility

Sample	N	Mean (ng/ml)	S.D. (ng/ml)	C.V. (%)
1	4	8.76	0.72	8.2
2	4	5.42	0.16	2.8
3	4	2.59	0.07	2.7

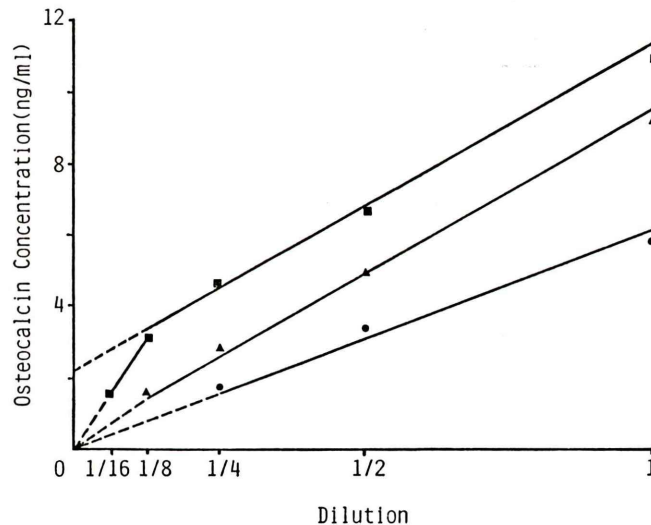


Fig. 6 Dilution test.

Table 3 Recovery test

Sample		Added osteocalcin (ng)				Mean $\pm$ S.D. (%)
		0	1.25	3.70	12.00	
1	Measured (ng/ml)	1.65	2.75	5.26	12.10	
	Recovery (%)	—	94.8	97.8	88.6	93.7 $\pm$ 3.8
2	Measured (ng/ml)	3.20	4.03	6.74	14.34	
	Recovery (%)	—	90.6	97.7	94.3	94.2 $\pm$ 2.9

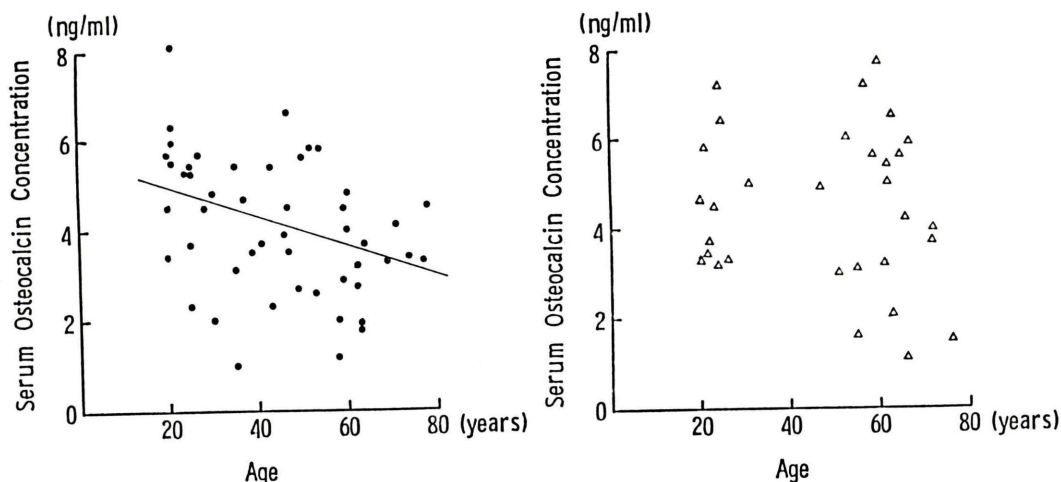


Fig. 7 Relationship between serum osteocalcin concentration and aging in healthy males (left) and females (right).

	N	Serum Osteocalcin Concentration (ng/ml)				Mean $\pm$ S.D. (ng/ml)
		1	5	10	20	
Hyperthyroidism	10	•	•	•••••	•	8.1 $\pm$ 3.7
Hypothyroidism	3		•••			
Primary Hyperparathyroidism	3		•	•	••	
Osteoporosis	27		•••••	•••••	••	6.8 $\pm$ 2.6
Chronic Renal Failure	40	•	•••••	•••••	•••••	34.0 $\pm$ 41.8
Prostatic Cancer	41	••	•••••	•••••	•••••	5.7 $\pm$ 2.5
Malignancy Associated Hypercalcemia	17	••	•••••	•••••	••	5.9 $\pm$ 3.0

Fig. 8 Serum osteocalcin concentration in patients with various diseases.

例に、悪性腫瘍に合併した高 Ca 血症症例では 17 例中 4 例に、血中 OC 濃度の高値が認められた。

(3) 血中 OC 濃度と血中 BUN 濃度との相関  
血中 OC 濃度と血中 BUN 濃度との関係を Fig. 9 に示す。両者の間には、有意の正相関 ( $N=38$ ,  $y=0.739x+10.36$ ,  $r=0.492$ ,  $p<0.005$ ) が認められた。

(4) 前立腺癌における骨転移の有無と血中 OC 濃度との関係

前立腺癌患者の骨転移の有無と血中 OC 濃度との関係を Fig. 10 に示す。両者には有意の差は認められなかったが、9 ng/ml 以上の 3 例はすべて骨転移を有する症例であった。さらに、1 例の前立腺癌患者の血中 OC 濃度の変動を Fig. 11 に示

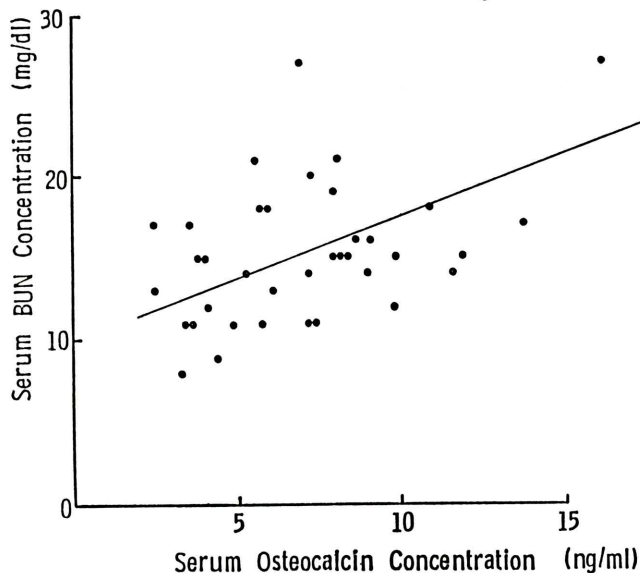


Fig. 9 Correlation between serum osteocalcin concentration and serum BUN concentration in the aged females.

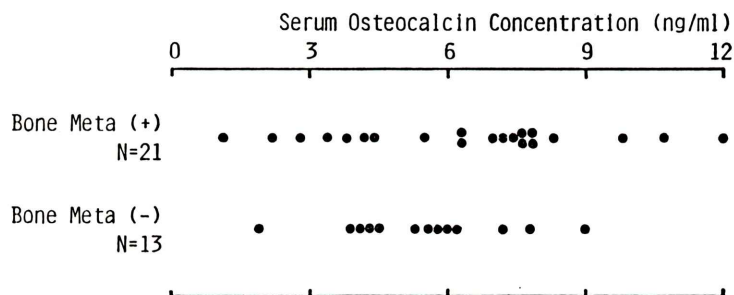


Fig. 10 Serum osteocalcin concentration in patients with prostatic cancer with or without bone metastasis.

す。血中 OC 濃度は正常域にあるが、骨転移の出現とともに、その値は上昇した。本症例では、血中 OC 濃度の測定が骨転移の出現を知る上で、PAP または ALP よりも有用であった。

#### IV. 考 察

OC は、骨に含まれる非コラーゲン蛋白のうちでは最も多いことが知られている<sup>3)</sup>。その分子量は約 5,900 であり 49 個のアミノ酸残基からなり、そのアミノ酸配列も近年明らかにされている<sup>4)</sup>。その生合成は、ビタミン K およびビタミン D 依

存性であり、osteoblast 様細胞で行われるといわれている<sup>5-13)</sup>。したがって、OC の増減は、骨形成の指標となり得ると思われる。OC は、骨中ではハイドロキシアパタイトと強く結合しており<sup>14,15)</sup>、骨表面における骨塩平衡を調節している<sup>16,17)</sup>、骨の代謝機構を知る上で興味深い蛋白の 1 つである。

今回、オステオカルシン RIA キット (ミドリ十字) を使用する機会を得て、基礎的および臨床的検討を行った。本キットの測定操作は簡便であり、第 1 反応の反応温度および反応時間を 2~8°C で

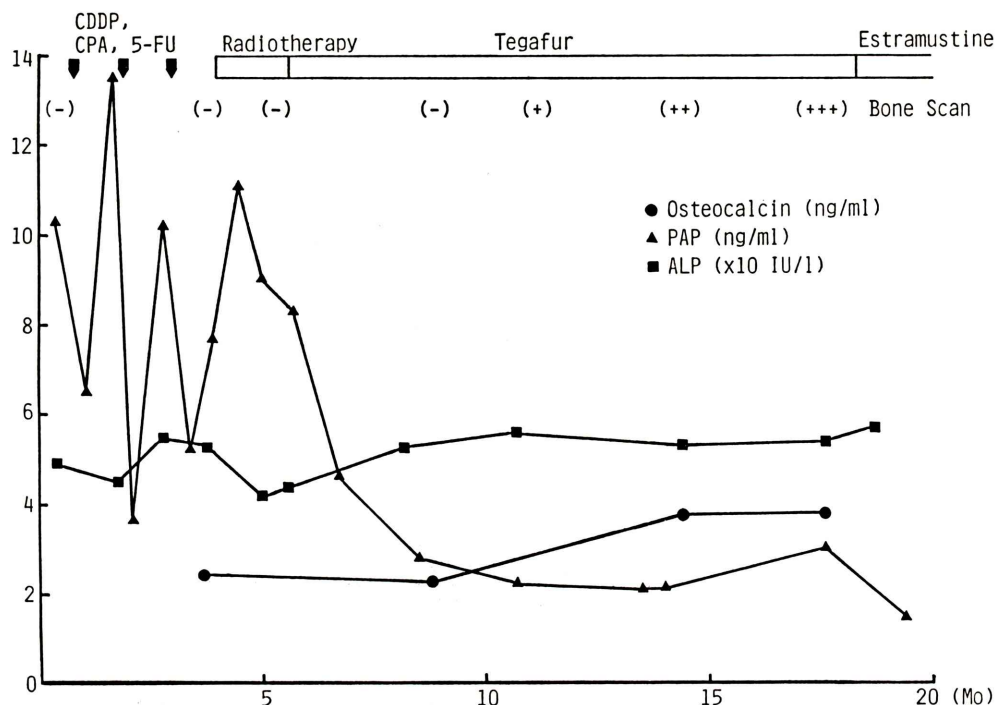


Fig. 11 Chronological changes of serum osteocalcin concentration in a patient with prostatic cancer.

16時間以上に、検体量を  $100\mu\text{l}$  に設定すると、標準曲線の再現性、感度、アッセイ内およびアッセイ間の再現性、添加回収試験の基礎的検討では、ほぼ満足すべき結果が得られた。ただし、希釈試験において、慢性腎不全例の高濃度検体の希釈は0点への収束性がみられなかった。このことは、慢性腎不全例の血清中には、OCの免疫学的な heterogeneity が存在する可能性を示唆するものであり、今後の詳細な検討が必要と考えられた。

健常者の血中 OC 濃度は、男性では  $4.1 \pm 1.5 \text{ ng/ml}$ 、女性で  $4.4 \pm 1.7 \text{ ng/ml}$  であり、諸家の報告<sup>18-20)</sup> とほぼ同様であった。健常者の血中 OC 濃度の  $\text{mean} \pm 2 \text{ S.D.}$  の範囲は男性では  $1.1 \sim 7.1 \text{ ng/ml}$ 、女性では  $1.0 \sim 7.8 \text{ ng/ml}$  であり、そのため本 kit では  $1.0 \sim 7.8 \text{ ng/ml}$  を正常値として設定した。20歳以後の加齢に伴う血中 OC 濃度の変動は、不変であるとする報告、あるいは上昇傾向を示すという報告があり一致をみない<sup>20-24)</sup>。今回のわれわれの検討では男性で有意の低下傾向が観察さ

れ、加齢とともに骨形成の低下が生じることが示唆された。一方、女性では有意の関係が見いだされなかったが、高齢者では血中 OC 濃度が低値から高値まで幅広い分布を示した。

OC は代謝を受けて腎から排泄される<sup>25)</sup>。そのため糸球体濾過率が  $30 \text{ ml/分}$  以下の腎機能障害時には OC の排泄低下により血中 OC 濃度は高値を呈する<sup>26)</sup>。今回、高年女性例について血中 OC 濃度と血中 BUN 濃度との相関性を検討したところ、両者の間には有意の正相関性が得られた。したがって、血中 OC の測定値を評価する際には、絶えず腎機能の因子を考慮すべきであろう。また、血中 OC 濃度は日内変動がみられるので<sup>27)</sup>、測定値の評価には、採血時刻を一定にする注意も必要である。

骨・Ca 代謝の異常を呈する疾患の血中 OC レベルを知ることは興味深い。甲状腺機能亢進症では高値の、甲状腺機能低下症では低値の、原発性副甲状腺機能亢進症では高値の傾向が得られた。



これらの成績は諸家の報告<sup>18,28,29)</sup>とほぼ同様であり、それぞれ骨形成状態を反映しているものと考えられる。骨粗鬆症患者の血清 OC 濃度については、比較的低値を示すものや高値を示すものがあり一定の傾向が観察されなかった。Brownらは、骨粗鬆症の high osteoid formation 群では OC 濃度が高く、逆に low osteoid formation 群では低いと述べている<sup>30)</sup>。また、今回のわれわれの成績でも、骨粗鬆症は単一の病態ではなく、heterologous な病態からなっていることを示唆するものである。慢性腎不全症では血中 OC 濃度の高値が観察された。この原因として、腎機能低下に基づく OC の腎からの排泄障害<sup>31)</sup>のほかに、2 次性副甲状腺機能亢進症の合併による骨形成の亢進も加味しているものと考えられる。悪性腫瘍の骨転移例では、血中 OC 濃度が上昇するといわれている<sup>18,28)</sup>。OC は osteoblast 様細胞により合成されるので、造骨性の転移のマーカーとして期待された。われわれは、造骨性の骨転移をきたしやすい前立腺癌症例について血中 OC 濃度の測定を試みたが、骨転移の診断には不適であった。しかし、骨転移の経過観察には、血中 OC 濃度の測定は有用であると思われた。つまり、ALP は骨以外の要因により変動し得るのに対し、OC は骨に特異性が高く、治療効果の判定に利用できるし<sup>18)</sup>、ALP よりも骨の代謝状態の指標として感度が良いことが挙げられ<sup>32)</sup>、このほかに、骨 Paget 病、Cushing 症候群、副甲状腺機能低下症、リウマチ様関節炎などでも、血中 OC 濃度の変動が報告されており<sup>18,28,31-35)</sup>、各種骨疾患の病態解明の一助に広く使用し得ると考えられた。

## V. まとめ

オステオカルシン RIA kit (ミドリ十字) の基礎的および臨床的検討を行い、以下の結果を得た。

- 1) 基礎的検討から本 kit は、高濃度検体の希釈に若干の検討の余地はあるものの、感度、再現性、添加回収試験などほぼ満足できる成績が得られ、十分臨床使用に耐え得ることが示された。
- 2) 健常者の血中 OC 濃度は 1.0~7.8 ng/ml で

あり、男性では加齢とともに低下を示した。また血中 OC 濃度は血中 BUN 濃度と有意の正相関性を示し、腎障害時での OC 測定値の評価には注意が必要であった。

3) 代謝性骨疾患 (甲状腺機能亢進症および低下症、原発性副甲状腺機能亢進症、骨粗鬆症)、慢性腎不全症、高 Ca 血症を合併した悪性腫瘍の血中 OC 濃度の測定は、骨形成状態を知る一助として有用であった。さらに、造骨性骨転移をきたす前立腺癌の経過観察にも、OC 濃度測定は利用し得ることが示された。

本 kit をご提供頂いたミドリ十字社に深謝致します。

## 文 献

- 1) Hauschka PV, Lian JB, Gallop PM: Direct identification of the calcium-binding amino acid,  $\gamma$ -carboxyglutamate in mineralized tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* **72**: 3925-3929, 1975
- 2) Price PA, Nishimoto SK: Radioimmunoassay for the vitamin K-dependent protein of bone and its discovery in plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* **77**: 2234-2238, 1980
- 3) Termine JD, Belcourt AB, Conn KM, et al: Mineral and collagen-binding proteins of fetal calf bone. *J Biol Chem* **256**: 10403-10408, 1981
- 4) Poser JW, Esch FS, Ling NC, et al: Isolation and sequence of the vitamin K-dependent bone protein from human bone. *J Biol Chem* **255**: 8685-8688, 1980
- 5) Nishimoto SK, Price PA: Secretion of the vitamin K-dependent protein of bone by rat osteosarcoma cells. *J Biol Chem* **255**: 6579-6583, 1980
- 6) Nishimoto SK, Price PA: Proof that the  $\gamma$ -carboxyglutamic acid-containing bone protein is synthesized in calf bone: Comparative synthesis rate and effect of coumadin on synthesis. *J Biol Chem* **254**: 437-441, 1979
- 7) Price PA, Baukol SA: 1,25-dihydroxy-vitamin D<sub>3</sub> increases synthesis of the vitamin K-dependent bone protein by osteosarcoma cells. *J Biol Chem* **255**: 11660-11663, 1980
- 8) Price PA, Baukol SA: 1,25-dihydroxy-vitamin D<sub>3</sub> increases serum levels of vitamin K-dependent bone protein. *Biochem Biophys Res Comm* **99**: 928-935, 1981
- 9) Gundberg CM, Cole DE, Lian JB, et al: Serum osteocalcin in the treatment of inherited rickets

- with 1,25-dihydroxy-vitamin D<sub>3</sub>. *J Clin Endocrinol Metab* **56**: 1063-1067, 1983
- 10) Beresford JN, Gallagher JA, Poser JW, et al: Production of osteocalcin by human bone cells in vitro: Effects of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, parathyroid hormone, and glucocorticoids. *Metab Bone Dis Rel Res* **5**: 229-234, 1984
  - 11) Kaplan GC, Eilon G, Poser JW, et al: Constitutive biosynthesis of bone Gla protein in a human osteosarcoma cell line. *Endocrinology* **117**: 1235-1238, 1985
  - 12) Skjødtt H, Gallagher JA, Beresford JN, et al: Vitamin D metabolites regulate osteocalcin synthesis and proliferation of human bone cells in vitro. *J Endocrinol* **105**: 391-396, 1985
  - 13) Lian JB, Coutts M, Canalis E: Studies of hormonal regulation of osteocalcin synthesis in cultured fetal rat calvariae. *J Biol Chem* **260**: 8706-8710, 1985
  - 14) Price PA, Williamson MK, Lothringer JW: Origin of the vitamin K-dependent bone protein found in plasma and its clearance by kidney and bone. *J Biol Chem* **256**: 12760-12766, 1981
  - 15) Poser JW, Price PA: A method for decarboxylation of  $\gamma$ -carboxyglutamic acid in proteins. *J Biol Chem* **254**: 431-436, 1979
  - 16) Price PA, Otsuka AS, Poser JW, et al: Characterization of a  $\gamma$ -carboxyglutamic acid-containing protein from bone. *Proc Natl Acad Sci USA* **73**: 1447-1451, 1976
  - 17) Price PA: Osteocalcin. *Bone and Mineral Research Annual*, vol. 1, Peck WA ed, Excerpta Medica, Amsterdam, 1983, p. 157
  - 18) Price PA, Parthemore JG, Deftos LJ: New biochemical marker for bone metabolism: Measurement by radioimmunoassay of bone Gla protein in the plasma of normal subjects and patients with bone disease. *J Clin Invest* **66**: 878-883, 1980
  - 19) Zerwekh JE, Sakhaee K, Pak CYC: Short-term 1,25-dihydroxy-vitamin D<sub>3</sub> administration raises serum osteocalcin in patients with postmenopausal osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* **60**: 615-617, 1985
  - 20) Galli M, Caniggia M: Osteocalcin in normal adult humans of different sex and age. *Horm Metab Res* **17**: 165-166, 1985
  - 21) Delmas PD, Stenner D, Wahner HW, et al: Increase in serum bone  $\gamma$ -carboxyglutamic acid protein with aging in women: Implications for the mechanism of age-related bone loss. *J Clin Invest* **71**: 1316-1321, 1983
  - 22) Epstein S, Poser J, McClintock R, et al: Differences in serum bone Gla protein with age and sex. *Lancet* **i**: 307-310, 1984
  - 23) Gundberg CM, Lian JB, Gallop PM: Measurement of  $\gamma$ -carboxyglutamate and circulating osteocalcin in normal children and adults. *Clin Chim Acta* **128**: 1-8, 1983
  - 24) 森内幸子, 石黒幸子, 秋田美千代, 他: ヒト血清中の骨 $\gamma$ -カルボキシグルタミン酸含有タンパク質の加齢による変動. *ビタミン* **57**: 311-316, 1983
  - 25) Shah DV, Tews JK, Harper AE, et al: Metabolism and transport of  $\gamma$ -carboxyglutamic acid. *Biochem Biophys Acta* **539**: 209-217, 1978
  - 26) Delmas PD, Wilson DM, Mann KG, et al: Effect of renal function on plasma levels of bone-Gla protein. *J Clin Endocrinol Metab* **57**: 1028-1035, 1983
  - 27) Gundberg CM, Markowitz ME, Mizruchi M, et al: Osteocalcin in human serum: A circadian rhythm. *J Clin Endocrinol Metab* **60**: 736-739, 1985
  - 28) Slovik DM, Gundberg CM, Neer RM, et al: Clinical evaluation of bone turnover by serum osteocalcin measurements in a hospital setting. *J Clin Endocrinol Metab* **59**: 228-230, 1984
  - 29) Orimo H, Nakai R, Sakaguchi C, et al: Role of osteocalcin in the pathophysiology of metabolic bone disease. *Endocrine Control of Bone and Calcium Metabolism*, vol. 8A, Cohn DV, Fujita T, Potts Jr JT, et al eds, Excerpta Medica, Amsterdam, 1984, p. 461
  - 30) Brown JP, Delmas PD, Malaval L, et al: Serum bone Gla-protein: A specific marker for bone formation in postmenopausal osteoporosis. *Lancet* **i**: 1091-1093, 1984
  - 31) 米田正弘, 富田明夫: オステオカルシン. *ホルモンと臨床* **33**: 943-948, 1985
  - 32) Delmas PD, Wahner HW, Mann KG, et al: Assessment of bone turnover in postmenopausal osteoporosis by measurement of serum bone Gla protein. *J Lab Clin Med* **102**: 470-476, 1983
  - 33) Riss BJ, Als OS, Christiansen C, et al: Bone turnover in rheumatoid arthritis. *Calc Tissue Int* **36**: S4, 1984
  - 34) Orth RW, Weisman MH, Catherwood BD, et al: Bone loss in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **26**: S25, 1983
  - 35) Sambrook PN, Ansell BM, Foster S, et al: Bone turnover in early rheumatoid arthritis. 1. Biochemical and kinetic indexes. *Ann Rheum Dis* **44**: 575-579, 1985