

《ノート》

Immunoradiometric assay (IRMA) 法によるヒト副甲状腺
ホルモン (Intact PTH) 測定用キットの使用経験

Measurement of Circulating Intact Human PTH

高坂 唯子* 山本 逸雄* 滋野 長平* 北村 暢康*
 曾根 照喜* 塩見 一樹* 李 啓充* 小西 淳二*
 岩元 則幸** 山本 則之*** 永原 国彦**** 岡田 裕作*****

Tadako KOUSAKA*, Itsuo YAMAMOTO*, Chohei SHIGENO*, Nobuyasu KITAMURA*,
 Teruki SONE*, Kazuki SHIOMI*, Kaechoong LEE*, Junji KONISHI*,
 Noriyuki IWAMOTO**, Noriyuki YAMAMOTO***,
 Kunihiko NAGAHARA**** and Yusaku OKADA*****

*Central Radioisotope Division and Nuclear Medicine, Kyoto University School of Medicine

**Department of Urology, Kyoto First Red Cross Hospital

***Tojinkai Hospital

****Department of Otolaryngology, Kyoto National Hospital

*****Department of Urology, Kyoto University School of Medicine

I. 結 言

副甲状腺ホルモン(Parathyroid hormone; PTH)は、副甲状腺より分泌される84個のアミノ酸からなるペプチドであり、生体内でのカルシウム代謝調節に重要な働きをしている。血中 PTH 濃度を測定することにより、種々のカルシウム代謝異常の病態把握、診断にきわめて重要な情報がもたらされる。従来、血中 PTH 濃度の測定は、ラジオイムノアッセイ (RIA)¹⁻⁶⁾ によりなされてきた。

現在臨床に用いられている PTH-RIA の大部分は、PTH の C 端フラグメント²⁻⁴⁾ や中間部フラグメント^{5,6)} に特異的な抗体を用いている (C 端アッセイ)。ところが、このような C 端フラグメントや中間部フラグメントは PTH としての生理活性を有さない。しかも、これらのフラグメントはいずれも、生理活性を有する PTH (1-84) (Intact PTH) の腎における末梢代謝産物⁷⁻¹⁰⁾ である。さらに、Intact PTH の血中での半減期 (5 分以内) に比べて C 端フラグメントや中間部フラグメントはきわめて長い半減期 (少なくとも Intact PTH の5~15倍) を持つ^{11,12)} ことが知られている。したがって、C 端アッセイは高感度で多くの臨床病態において有用ではあるものの、腎臓における PTH 代謝異常の影響を大きく受けるという欠点を有する。例えば、腎不全患者の副甲状腺機能を C 端アッ

* 京都大学医学部附属病院放射線部, 核医学科

** 京都第一赤病院泌尿器科

*** 桃仁会病院

**** 京都国立病院耳鼻科

***** 京都大学医学部附属病院泌尿器科

受付: 63 年 2 月 17 日

最終稿受付: 63 年 5 月 18 日

別刷請求先: 京都市左京区聖護院川原町 54 (☎ 606)

京都大学医学部附属病院放射線部

高坂 唯子

Key words: IRMA, PTH, Calcium metabolism, Hyperparathyroidism, Hypercalcemia.

セイにより評価することは困難である。そこで Intact PTH 濃度を測定することが最も理想的であると考えられてきたが、Intact PTH の生理的血中濃度 (1 pmol/L) がきわめて低い^{7,13)} こともあり、近年まで簡便な測定法が存在しなかった。ところが最近、米国マサチューセッツ総合病院 (MGH) の Potts らのグループにより、高感度、高特異性かつ簡便な Intact PTH の immunoradiometric assay (IRMA) が開発され¹⁴⁾、ニコルス Inc. においてキット化され供給されるようになった。今回、そのキットを用いる機会を得、若干の基礎的、臨床的検討を行ったので報告する。

II. 測定原理および測定方法

1. 測定原理

本法の測定原理は Two-site immunoradiometric assay (IRMA) である。すなわち、本法では 2 種類の抗体が用いられている。これらの抗体は精製ヒト PTH (1-84) をヤギに免疫し、ヒト PTH (1-34) あるいはヒト PTH (39-84) をそれぞれ結合したアフィニティカラムにてそれぞれに特異的な抗体として精製することにより得られた。そのヒト PTH (39-84) に特異的な抗体はプラスチックビーズに固相化されており、N 末端 PTH (1-34) を認識する抗体は ¹²⁵I で標識されている。したがって、本法では両者の抗体でサンドイッチ結合させることにより intact な PTH (1-84) の測定が行える。

2. 測定方法

キットの構成

- 1) ヤギに免疫し、アフィニティ精製された抗 PTH (39-84) 固相化ポリスチレンビーズ 100 個
- 2) ヤギに免疫し、アフィニティ精製された ¹²⁵I-抗 PTH (1-34) 2 バイアル
- 3) Intact 合成ヒト PTH (1-84) 標準品 6 バイアル
- 4) 濃縮洗浄液 (リン酸緩衝液) 50 ml
- 5) コントロール血清 2 濃度

測定手技

本法の測定手技の概略は以下のとおりである。

- 1) 試験管に標準品または検体 200 μ l を入れる。
- 2) 次に、¹²⁵I 標識 PTH 抗体 100 μ l を加える。
- 3) PTH 抗体固相化ビーズを 1 個ずつ加える。
- 4) 室温で 22 \pm 2 時間インキュベートする。
- 5) インキュベート後、洗浄液 2 ml を加え洗浄を行う。この操作を 2 回繰り返す。
- 6) 残液を丁寧に吸引した後、ビーズの放射能をカウントする。
- 7) 標準品の結合カウントより、標準曲線を作成し、検体の PTH 濃度を読み取る。

III. 実験方法

基礎的検討として、インキュベーション温度、時間、最小検出感度、検体の保存条件、希釈試験、回収試験および再現性について検討した。

臨床的検討としては、健常人 36 例 (19~47 歳、男女各 18 例)、原発性副甲状腺機能亢進症 7 例、副甲状腺機能低下症 22 例 (特発性 3 例、続発性 19 例)、悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症 9 例、腎不全 35 例 (うち二次性副甲状腺機能亢進症 12 例) などの検体につき測定した。また、1 例の健常人につき 2 分ごとに計 19 回採血しその変動を検討した。また、1 例の原発性副甲状腺機能亢進症につ

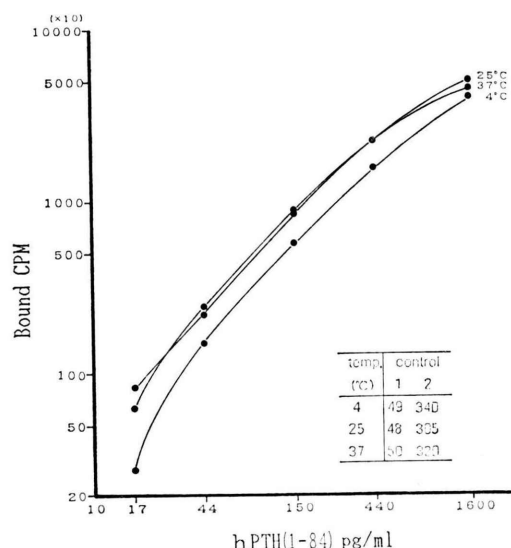


Fig. 1 Effect of incubation temperature.

手術後の経時的な変化を検討した。さらに従来の測定系との比較のため、ヤマサ醤油社製の PTH キット「ヤマサ」(中間部フラグメント アッセイ)、CIS 社製 hPTH・I-125 (C 端アッセイ) キットによる測定値と比較検討した。

IV. 結 果

1. 基礎的検討の結果

1) インキュベーション温度の影響

Figure 1 にインキュベーションを 4, 25, 37°C

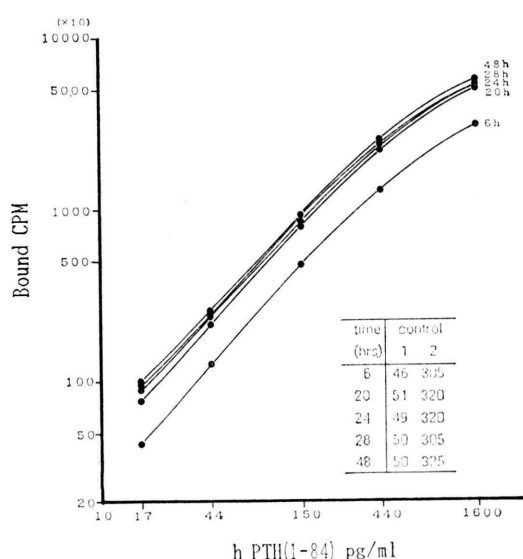


Fig. 2 Effect of incubation time.

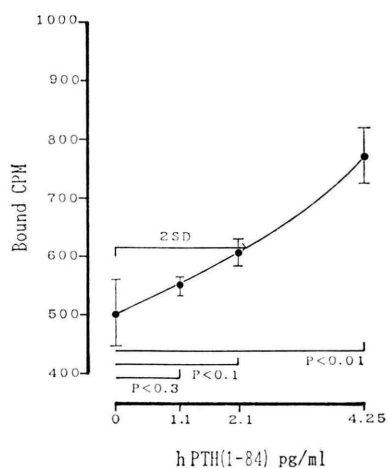


Fig. 3 Lower limit of detection.

で行った場合の標準血清の各濃度およびコントロール血清の結合カウントを示す。4°C では結合率が低かったが、25°C, 37°C ではほぼ平衡状態で、温度条件としては 25°C で十分と考えられた。

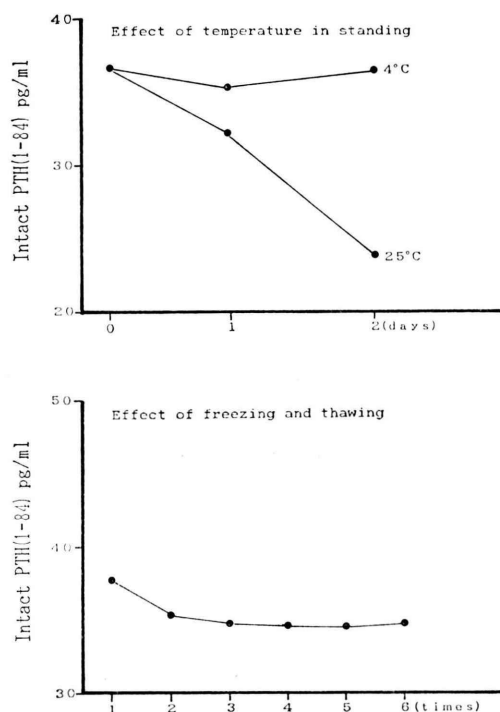


Fig. 4 Effect of sample stock intervals on the assay.

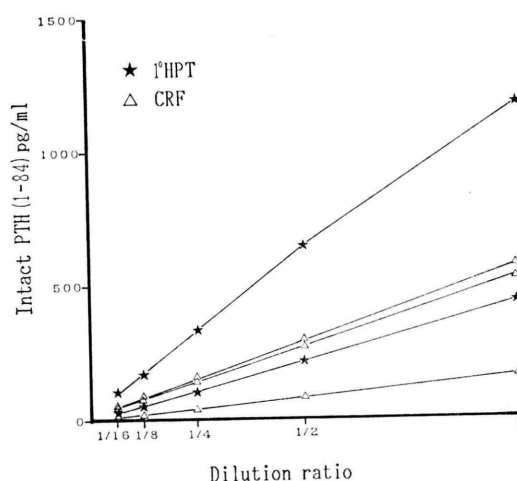


Fig. 5 Dilution test (1° HPT: Primary hyperparathyroidism, CRF: Chronic renal failure).

Table 1 Recovery test

| | Added PTH (1-84) concentration (pg/ml) | | | | | |
|--------------|----------------------------------------|-------|------|-------|-------|-------|
| | 0.0 | 8.5 | 22.0 | 75.0 | 220.0 | 800.0 |
| Measured | 27.9 | 35.2 | 48.0 | 98.7 | 256.2 | 925.6 |
| Recovered | | 7.3 | 20.1 | 70.8 | 228.3 | 897.7 |
| Recovery (%) | | 85.9 | 91.4 | 94.4 | 103.8 | 112.2 |
| Measured | 16.0 | 26.1 | 37.9 | 102.5 | 233.4 | 760.7 |
| Recovered | | 10.1 | 21.9 | 86.5 | 217.4 | 744.7 |
| Recovery (%) | | 118.8 | 99.5 | 115.3 | 98.8 | 93.1 |

Mean recovery (%)±SD: 101.3±10.8

2) インキュベーション時間の影響

インキュベーション温度を 25°C にして、時間を 6, 20, 24, 28, 48 時間と変えた場合の結合率を Fig. 2 に示す。6 時間では結合率が低く、20~28 時間では緩やかな上昇を示し、28~48 時間ではほぼ平衡状態に達した。原法では 22±2 時間と指定されているが、この前後での結合率の変化はわずかであり、コントロール血清の結合率も平行して変化するため、実際の読み取り値に大きな変化はなかった。

3) 最小検出感度

標準血清 (17 pg/ml) を 0 濃度の標準血清で希釈し最小検出限界を求めた。Fig. 3 に各濃度について 3 回ずつ測定した平均値と標準偏差 (SD) を示す。0 濃度のカウンターの 2 SD より求めた最小検出感度は約 2 pg/ml であったが $p<0.1$ とやや大きく、アッセイ間の変動を考慮すると 4 pg/ml ($p<0.01$) 程度が妥当と考えられた。

4) 検体の保存条件

採血した検体の保存条件について温度と凍結融解の影響について検討した。

Figure 4 上段は採血後速やかに血清分離を行い、その後 4°C と室温 (25°C) で 1~2 日放置した場合の PTH の測定値を示す。採血後直ちに -20°C で凍結した検体の値と 4°C で 2 日まで放置した値との間に有意の変化は認められなかったが、室温で放置した場合には 1 日目では約 9%、2 日目では約 35% 低下することが認められた。

下段は検体を 1~6 回凍結融解を繰り返して測定した場合の PTH 値を示す。採血、血清分離後

直ちに凍結、1 回の融解で測定した場合と 2 回以上凍結融解を繰り返した場合では若干測定値が低下したが、2~6 回では変化はなく凍結融解の影響は比較的少ないと考えられた。

5) 希釈試験

副甲状腺機能亢進症 2 例、透析中の腎不全 3 例の患者検体を 0 濃度の標準血清で 2~16 倍まで希釈した結果を Fig. 5 に示す。いずれも良好な直線性が得られた。

6) 回収試験

健常人 2 例に PTH 標準血清を 0~800 pg/ml 添加して測定を行った。

回収率は 85.9~118.8% の間で、平均回収率は 101.3±10.8% であった (Table 1)。

7) 再現性

キット添付の 2 つの異なる濃度のコントロール血清を用いて測定した intra-, interassay の測定値の平均値 (mean) と標準偏差 (SD), 変動係数 (CV%) を Table 2 に示す。intraassay (N=10) で mean±SD は 43.78±2.26, 286.07±11.29 で CV はそれぞれ 5.2, 3.9% であった。同様に inter-assay (N=5) では 46.20±2.77, 319.32±10.09 で

Table 2 Reproducibility of the assay

| S. No. | Intra-assay (n=10) | | Inter-assay (n=5) | |
|--------|-----------------------|--------|----------------------|--------|
| | 1 | 2 | 1 | 2 |
| Mean | 43.78 | 286.07 | 46.20 | 319.32 |
| SD | 2.26 | 11.29 | 2.77 | 10.09 |
| CV (%) | 5.2 | 3.9 | 6.0 | 3.2 |

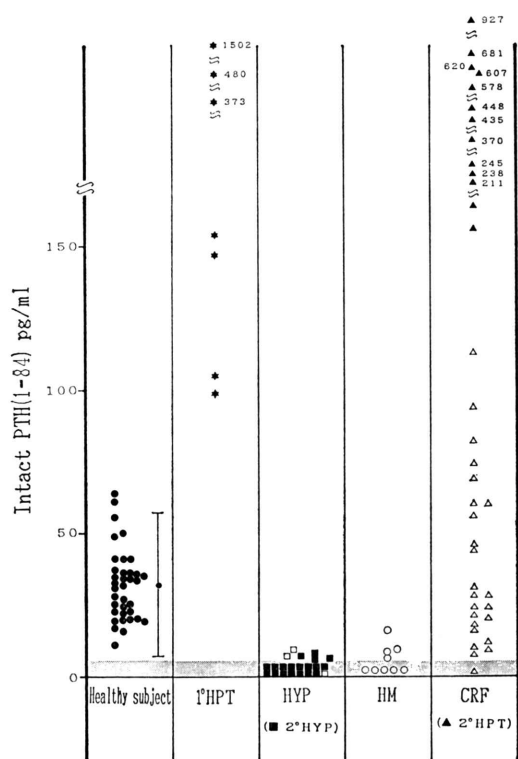


Fig. 6 Values for Intact PTH in healthy subjects and patients with various diseases.

1° HPT: Primary hyperparathyroidism

HYP: Hypoparathyroidism (□: primary, ■: secondary)

HM: Hypercalcemia with malignancy

CRF: Chronic renal failure (▲: secondary hyperparathyroidism)

CV% は 6.0, 3.2% と良好であった。

2. 臨床的検討の結果

1) 健常人および各種疾患における Intact PTH 濃度

Figure 6 に健常人および副甲状腺機能亢進症、副甲状腺機能低下症、悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症および腎不全例の測定結果を示す。健常人 36 例は 32.0 ± 12.6 (mean \pm SD) で、一方原発性副甲状腺機能亢進症は $98.6 \sim 1,502$ pg/ml に分布し健常人と完全に識別できた。さらに副甲状腺機能低下症は 4 pg/ml 以下 ~ 9.1 pg/ml の間に分布しこれも全例健常人と鑑別可能であった。悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症例は 4 pg/ml 以下 ~ 16.2 pg/ml に分布し明らかに低値を示し、副甲状腺機能亢進症とは完全に識別できた。腎不全例は 4 pg/ml 以下 ~ 927 pg/ml と幅広く分布したが、156 pg/ml 以上の症例は全て臨床的に二次性副甲状腺機能亢進症をきたしていた症例であり、本アッセイによりそれらの例の識別が可能であった。

2) Intact PTH の基礎分泌パターン

PTH はパルス状の分泌をしているといわれている (Segre GV よりの私信)。そこで、健常人 1 例について 2 分ごとの採血による変動を観察したが、パルス状の分泌を示唆する所見は得られず、比較的安定した値が得られた (Fig. 7)。

3) 原発性副甲状腺機能亢進症の術後 PTH 濃度の変動

原発性副甲状腺機能亢進症例(腺腫)での腫瘍摘

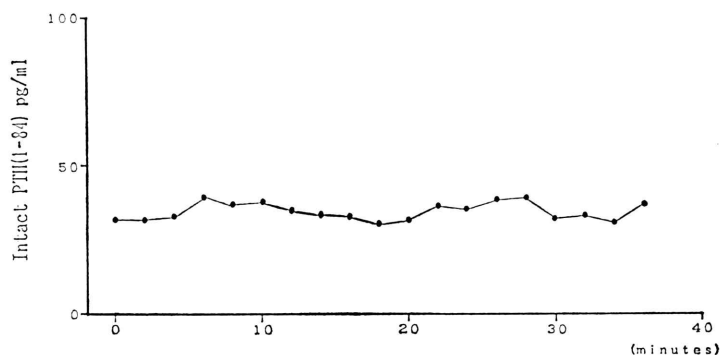


Fig. 7 Variation of Intact PTH in serum sampled every two minutes in a healthy subject.

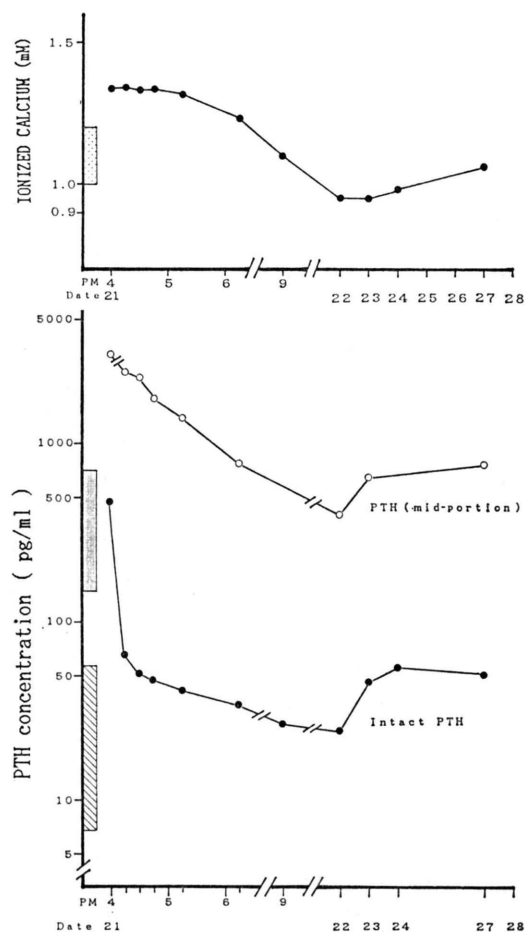


Fig. 8 Time course of intact PTH, mPTH and ionized calcium levels after parathyroidectomy (PTX) in a patient with primary hyperparathyroidism. Normal ranges indicated (Intact PTH assay; \square , YAMASA's assay; \square and ionized calcium; \square).

手術前後における Intact PTH および C 端 PTH の変化を検討した (Fig. 8). 副甲状腺腫への血流遮断後, Intact PTH 値は速やかに減少したのに対して (見かけの半減期約 4.5 分), C 端 PTH 値は緩やかに減少した (同 70 分). したがって, Intact PTH は C 端 PTH よりはるかに鋭敏かつ正確な副甲状腺ホルモン分泌の指標であると考えられた.

4) 他法との相関

Figure 9 に hPTH・I-125・キット, Fig. 10 に

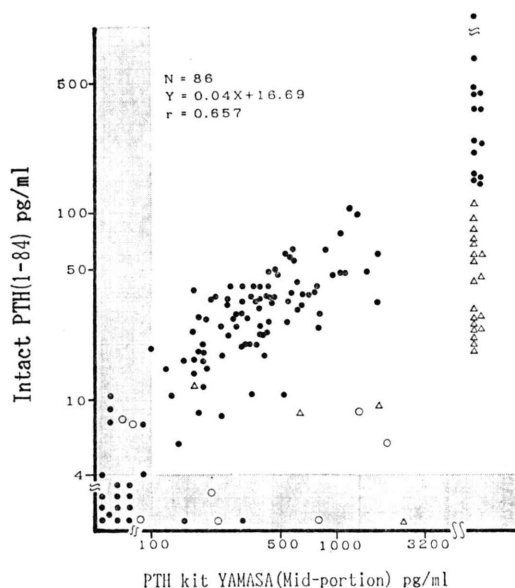


Fig. 9 Correlation between cPTH (CIS) assay and Intact PTH assay (Δ : CRF, \circ : 1° HPT).

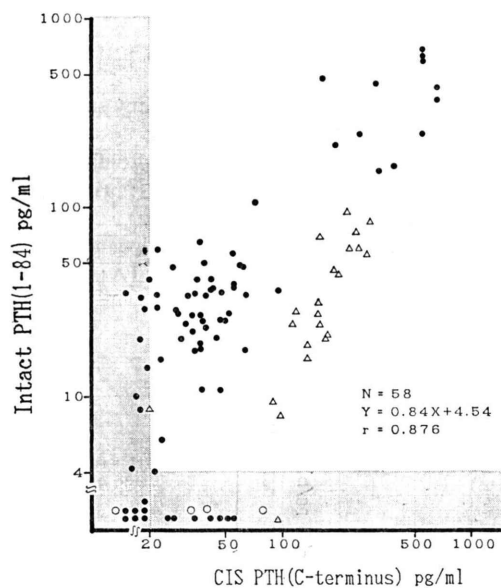


Fig. 10 Correlation between mPTH (YAMASA) assay and Intact PTH assay (Δ : CRF, \circ : 1° HPT).

PTH キット「ヤマサ」キットと本法による測定値の関係を示す. 腎不全例(Δ 印)では本法の測定

値に比し, CIS, 栄研いずれのキットでも高値を示し, 特にヤマサキットでその傾向は顕著であった. 悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症の症例 (○印) では本法による測定値が感度以下であったのに対し, CIS キットでは4例中3例が, 栄研キットでは8例中5例が中～高値に測定された. これらの症例および検出限界をはずれた検体を除いた症例での相関はそれぞれ $r=0.876, 0.657$ と有意の相関が認められた.

V. 考 察

生物活性のある副甲状腺ホルモン (PTH) を簡便に測定することは長年の課題であった. これは PTH の RIA が 1963 年 Yalow, Potts¹⁾ らにより比較的早く開発されたにもかかわらず, その測定しているものの大部分が生物活性のない C フラグメントであり N 端部に対する高感度なアッセイがその後20年近くも開発できなかったということによる. これは, 血中で PTH が急速に代謝され, その血中レベルが $10\sim60$ pg/ml 程度ときわめて低いことによる. 今回, MGH のグループにより開発され, ニコルスによりキット化された IRMA は, 従来よりの種々の懸案を一度に全て解決したといえる. つまり, 高感度かつ簡便であり, しかも生物活性のある PTH が特異的に測定できるようになったのである. 今回のわれわれの検討においても健常人の全例においてその値が測定でき, また原発性副甲状腺機能亢進症および低下症の全例が健常人とこのアッセイのみで鑑別可能であり, また従来の C 端アッセイでは鑑別困難である悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症と副甲状腺機能亢進症とが完全に分別できるという結果を得た. 悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症例は多くの例で腎機能の低下を伴っており, したがって, 従来の C 端アッセイでは高値を示したが, Intact PTH アッセイではほとんどの例で低値を示した. また, 腎不全症例は従来の C フラグメントアッセイではいずれも高値を示すのに対し, Intact PTH アッセイでは正常値～高値に分布し, このうち, 原発性副甲状腺機能亢進症と同程度に高

値を示した例はいずれも臨床的に二次性副甲状腺機能亢進症の症候を示す症例であった. 以上のことから Intact PTH 測定により, 腎不全における二次性副甲状腺機能亢進症の診断が可能と考えられた.

C 端アッセイとの比較では腎不全例と悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症を除いてほぼ良好な相関を得たが, C 端アッセイの測定値は Intact PTH の値の約10倍であり, Intact PTH と C フラグメントの比は副甲状腺機能亢進症例でやや高く, 腎不全例は低かった. このことは, 健常人, とりわけ, 腎不全例では従来の C 端アッセイによる測定値の大部分がやはり C フラグメントを反映していることを示しており, C 端アッセイという名にふさわしいと思われた.

健常人の Intact PTH の値が測定できたということ, また腎機能の影響を全く除去できるアッセイができたということ, このことにより高カルシウム血症の鑑別がより完璧になったことなど, 本アッセイキットの臨床的価値は計りしれない. 今後, 本アッセイにより, より正確な副甲状腺機能の評価がなされるものと期待される.

VI. 結 語

ニコルス (Mediphsics) Intact PTH キットを使用し, きわめて良好な成績を得た.

文 献

- 1) Berson SA, Yalow RS, Aubach GD, et al: Immunoassay of bovine and human Parathyroid hormone. Proc Natl Acad Sci USA 49: 613-617, 1963
- 2) 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
- 3) 福永仁夫, 森田陸司, 高坂唯子, 他: PTH RIA Kit (CIS) による血中副甲状腺ホルモンの測定. 核医学 17: 69-75, 1980
- 4) 福永仁夫, 中島言子, 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
- 5) 福永仁夫, 大塚信昭, 古川高子, 他: PTH (parathyroid hormone) キット「ヤマサ」の基礎的検討および臨床的検討. 核医学 24: 319-325, 1987
- 6) 山本逸雄, 高坂唯子, 阿曾沼和代, 他: Mid-Region

- 副甲状腺ホルモン測定用キット (PTH-MM RIA Kit) の使用経験. 現代医療 **17**: 1976-1979, 1985
- 7) Martin KJ, Hruska KA, Freitag JJ, et al: The peripheral metabolism of parathyroid hormone. *N Engl J Med* **301**: 1092-1098, 1979
 - 8) Segre GV, D'Amour P, Potts JT Jr: Metabolism of parathyroid radioiodinated hormone in the rat. *Endocrinol* **99**: 1645-1652, 1976
 - 9) Segre GV, Niall HD, Sauer RT, et al: Edman degradation of radioiodinated hormone: application to sequence analysis and hormone metabolism in vivo. *Biochem* **16**: 2417-2427, 1977
 - 10) Segre GV, Perkins AS, Witters LA, et al: Metabolism of parathyroid hormone by isolated rat Kupffer cells and hepatocytes. *J Clin Invest* **67**: 449-457, 1981
 - 11) Segre GV, D'Amour P, Hultman A, et al: Effects of hepatectomy, nephrectomy and nephrectomy/uremia on the metabolism of parathyroid hormone in the rat. *J Clin Invest* **67**: 439-448, 1981
 - 12) Barson SA, Yalow RS: Immunochemical heterogeneity of parathyroid hormone in plasma. *J Clin Endocrinol Metab* **28**: 1037-1047, 1968
 - 13) Mayer GP, Keaton JA, Hurst JG, et al: Effects of plasma concentration on the relative proportion of hormone and carboxyl fragments in parathyroid venous blood. *Endocrinol* **104**: 1778-1784, 1979
 - 14) Nussbaum SR, Zahradnik RJ, Lavingne JR, et al: A highly sensitive two-site immunoradiometric assay of parathyrin (PTH) and clinical utility in evaluating patients with hypercalcemia. *Clin Chem* **33**: 1364-1367, 1987