

《技術報告》

リコンビジエン EPO キットによる 血清エリスロポエチン濃度の測定と臨床応用

正木 洋治* 岡 暢之* 古家 寛司* 大國 智司*
高木千恵子* 佐藤 利昭* 野津 和巳* 加藤 讓*

要旨 血清エリスロポエチン (EPO) の RIA キット (DPC 社) の臨床応用について検討した。本法による健常成人 180 名の血清 EPO 濃度は、 $18.6 \pm 5.6 \text{ mU/ml}$ (平均値士標準偏差) であり、性差を認めなかった。70 歳代の高齢者は若年者より高値を示した。腎機能健常者では、血清 EPO 濃度は Ht 値と負の相関を示した。慢性腎不全患者の血清 EPO 値は健常範囲にあり、貧血の程度に比較して相対的に低値であった。糖尿病患者、甲状腺機能低下症患者の血清 EPO 値は健常人より高値を示した。急性白血病、多発性骨髓腫、骨髓異形成症候群、再生不良性貧血、赤芽球病の血清 EPO 値は著しい高値を示した。赤芽球病におけるステロイドパルス療法に伴う血清 EPO 濃度の低下は、貧血の改善や網状赤血球の増加に先行して観察された。したがって血清 EPO 濃度の測定は貧血の鑑別診断のみでなく、治療経過の指標としても有用である。

(核医学 29: 701-707, 1992)

I. はじめに

エリスロポエチン (EPO) は分子量約 38,000 の糖蛋白で、赤芽球系前駆細胞に作用し、赤血球の産生を調節するホルモンである¹⁾。EPO は主として腎臓で産生される²⁾が、EPO の産生は組織内の低酸素状態によって促進される³⁾。一般に貧血になると腎臓での EPO 産生は亢進し、血中 EPO 濃度は高くなる。しかし、慢性腎不全では EPO 産生能が低下しているため貧血が存在するにもかかわらず血中 EPO 濃度は高値を示さない⁴⁾。したがって血中 EPO 濃度の測定は貧血症の鑑別診断や病態の把握に有用と考えられる。

血中 EPO 濃度の測定には当初 bioassay 法が用いられたが⁵⁾、最近遺伝子組み換えヒト EPO (rHuEPO) の合成が可能になり抗 EPO 抗体を用

いた RIA による測定法が開発された⁶⁾。しかし多数の正常人の血清 EPO 濃度について、年齢や性別に詳細に検討した報告はない。今回われわれは RIA 法を用いて健常成人の健常値を設定するとともに各種疾患者における血清 EPO 濃度について検討したので報告する。

II. 対象および方法

1. 測定方法

血中 EPO 濃度は rHuEPO を抗原として作製した RIA キット (DPC 社製) によって測定した。本法は検体中の EPO をあらかじめ抗 EPO 抗体と結合させ、その後 ¹²⁵I 標識 rHuEPO を加えて競合させる 2 ステップ 2 抗体法である。測定手順を Fig. 1 に示す。

2. 基礎的検討

キットの基礎的検討として以下の項目について検討した。

1) 標準曲線および測定感度

標準曲線は各濃度の標準液を 10 回ずつ測定した。最小測定限界は標準 0 濃度の放射能活性の平均値

* 島根医科大学第一内科

受付: 3 年 10 月 18 日

最終稿受付: 4 年 4 月 2 日

別刷請求先: 出雲市塩治町 89-1 (〒693)

島根医科大学第一内科

加藤 讓

-2SD 値が標準曲線と交わる点とした。

2) 再現性

異なる2種類の検体血清を用い同一測定内に各5回、異なった測定日に各15回測定した。

3) 希釈試験

3種類の検体血清を0濃度標準液で倍々希釈し測定した。

4) 添加回収試験

2種類の検体血清にそれぞれ5, 10, 20, 40, 80 mU/mlの標準EPOを添加した場合の回収率を求めた。

3. 臨床的検討

1) 健常成人の血清EPO濃度

われわれが施行した一般住民検診受診者のうち、問診、打聴診ならびに各種血液生化学検査で異常を認めなかった21~80歳までの健常成人男性76名、女性104名、計180名を対象とした。早朝空

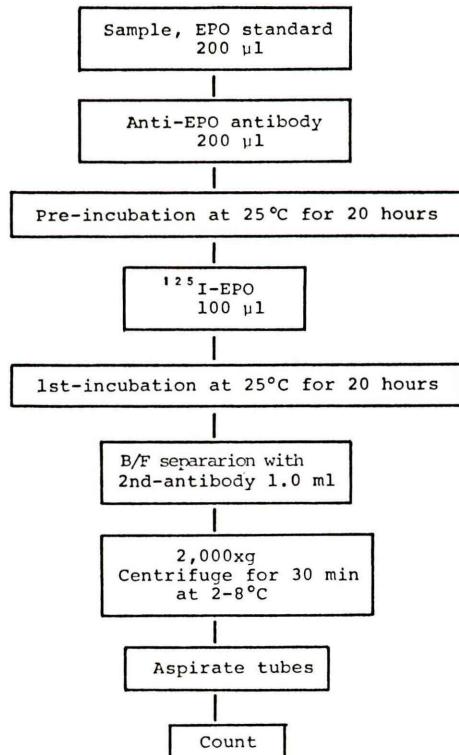


Fig. 1 Assay procedure.

腹時に肘静脈より採血し、血清を分離し血清中のEPO濃度を測定した。

2) 各種疾患患者における血清EPO濃度について

当院に入院あるいは外来通院中の未治療および治療中の患者171名を対象とした。その内訳は慢性腎不全17例、糖尿病85例、甲状腺機能亢進症26例、甲状腺機能低下症22例、急性白血病7例、多発性骨髄腫4例、骨髄異形成症候群6例、再生不良性貧血4例である。貧血の診断基準として、Hb値で男性は13 g/dl未満、女性は12 g/dl未満を用いた。いずれの患者においても早朝空腹時、安静状態で採血し、血清中EPO濃度を測定した。なお慢性腎不全はいずれも透析前に、血液疾患は輸血前に採血した。

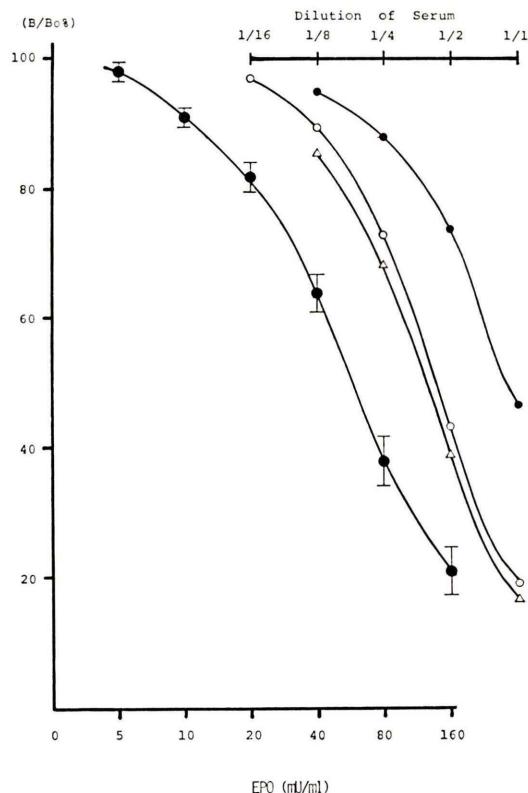


Fig. 2 Reproducibility of standard curve and dilution effects of serum samples. Mean(\pm SD) values of 10 standards are shown.

結果はすべて平均値 \pm SD で示し、二群間の有意差検定は unpaired Student's t-test、三群間以上の有意差検定は一元配置分散分析後、multiple range test を用いた。p<0.05 を有意と判定した。

III. 結 果

1. 基礎的検討

1) 標準曲線および測定感度

標準曲線を Fig. 2 に示す。各標準液をそれぞれ 10 回測定した際の変動係数 (CV) は 1.4~7.1% (平均 3.2%) であった。0 濃度標準液添加時の沈渣の放射能 ($B_0\%$) の平均値 (土標準偏差) は $36.7 \pm 0.9\%$ であり、本キットの最小検出量は 5.1 mU/ml であった。

2) 再現性

EPO 濃度の異なる 2 種類の血清 (30.2 mU/ml , 51.0 mU/ml) の同一測定内の CV はそれぞれ 3.8%, 9.7%，異なる測定間の CV は 3.5%, 8.9% で、両者ともに良好な再現性を示した。

3) 希釈試験

3 種類の血清を 0 濃度標準液で希釈した場合には、標準液と平行した希釈曲線が得られた (Fig. 2)。

4) 添加回収試験

2 種類の血清検体に標準 EPO を添加した場合の平均回収率はそれぞれ 102.1% と 93.3% であった。

2. 臨床的検討

1) 健常成人の血清 EPO 濃度

健常成人 180 名の血清 EPO 濃度の度数分布は正規分布を示し、その平均値 (土標準偏差) は $18.6 \pm 5.6 \text{ mU/ml}$ であった。平均値 \pm 2 標準偏差に相当する $7.4 \sim 29.8 \text{ mU/ml}$ を健常範囲と設定した。性別では男性 $18.5 \pm 6.1 \text{ mU/ml}$ 、女性 $18.6 \pm 5.1 \text{ mU/ml}$ と性差を認めなかった。

各年齢層別の血清 EPO 濃度は 20 歳代 $18.7 \pm 5.6 \text{ mU/ml}$ 、30 歳代 $17.3 \pm 4.9 \text{ mU/ml}$ 、40 歳代 $16.9 \pm 4.7 \text{ mU/ml}$ 、50 歳代 $19.0 \pm 5.1 \text{ mU/ml}$ 、60 歳代 $19.1 \pm 5.6 \text{ mU/ml}$ 、70 歳代 $21.6 \pm 6.9 \text{ mU/ml}$ であった。70 歳代の血清 EPO 濃度は 30 歳代ならびに 40 歳

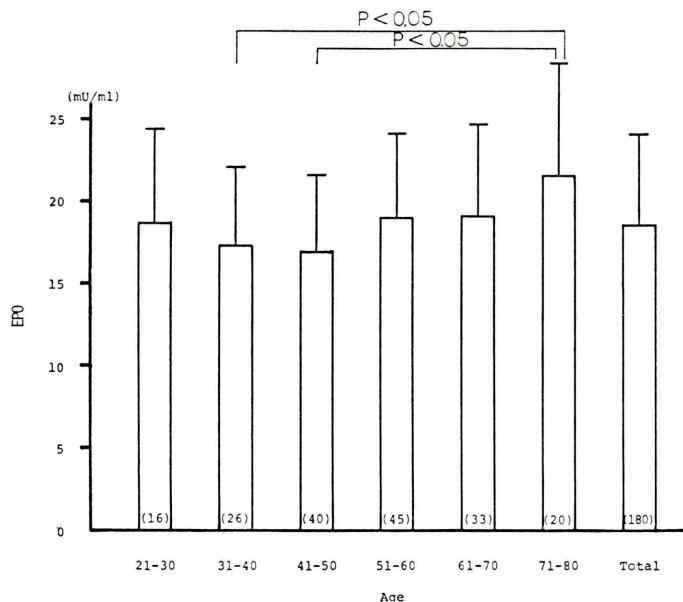


Fig. 3 Age-related distribution of serum EPO levels in normal adults. Mean (\pm SD) serum EPO levels are shown. Number of subjects are indicated in parentheses.

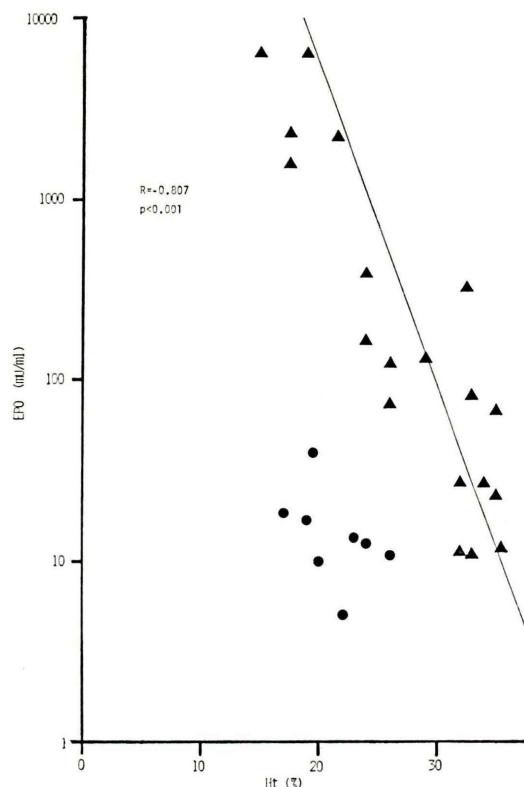


Fig. 4 Relationship between serum EPO and hematocrit (Ht) in anemic patients without renal disease (▲) and in patients with chronic renal dysfunction (●).

代に比べ有意 ($p < 0.05$) に高値を示した (Fig. 3).

2) 各種疾患患者における血清 EPO 濃度

腎機能障害を認めない場合には Ht 値と血清 EPO 濃度との間に有意の負の相関関係を認めた (Fig. 4, $R = -0.81$, $p < 0.001$)。慢性腎不全患者の血清 EPO 濃度は $20.2 \pm 8.2 \text{ mU/ml}$ と健常範囲にあった。しかし、同一の Ht 値を有する腎機能正常者と比較すると血清 EPO 濃度は低値を示した (Fig. 4)。糖尿病患者の血清 EPO 濃度は $25.4 \pm 8.1 \text{ mU/ml}$ と有意に高値を示した (Fig. 5)。これら糖尿病患者のうち腎機能の指標の一つである尿中アルブミン/クレアチニン比 (ACR) が 15 mg/g Cr 以上の群の血清 EPO 濃度は 15 mg/g Cr 以下の群より有意に高値を示した ($29.0 \pm 10.0 \text{ vs. } 20.4 \pm 2.8 \text{ mU/ml}$, $p < 0.05$)。また ACR が 300 mg/g Cr 以上

で貧血を有する群の血清 EPO 濃度は貧血を伴わない群に比し有意に低値であった ($21.0 \pm 6.7 \text{ vs. } 29.4 \pm 7.5 \text{ mU/ml}$, $p < 0.05$) (Fig. 6)。

甲状腺機能亢進症の血清 EPO 濃度は $20.0 \pm 8.9 \text{ mU/ml}$ と健常範囲にあった。一方、甲状腺機能低下症では $22.0 \pm 6.7 \text{ mU/ml}$ と有意に高値を示した ($p < 0.025$)。

血液疾患患者の血清 EPO 濃度は急性白血病 $358.4 \pm 191.9 \text{ mU/ml}$, 多発性骨髄腫 $92.0 \pm 21.9 \text{ mU/ml}$, 骨髄異形成症候群 $5401.3 \pm 4443.1 \text{ mU/ml}$, 再生不良性貧血 $10059.9 \pm 15517.3 \text{ mU/ml}$ といずれも著しい高値を示した。赤芽球病 (PRCA) の一例の血清 EPO 濃度は、治療前 5950.3 mU/ml と著しい高値を示した。しかしステロイドパルス療法後には明らかな低下 (87.4 mU/ml) が認められた。血清 EPO 濃度の低下は網状赤血球の増加や貧血の改善に先行して観察された (Fig. 7)。

IV. 考 察

RIA による血中 EPO 濃度測定の有用性についてはすでにいくつかの報告がある^{6~12)}。しかしながら多数の健常人の血中 EPO 濃度について、年齢や性別に詳細に検討した成績はきわめて少ない。

われわれの成績では、健常成人 180 名の血清 EPO 濃度は $18.6 \pm 5.6 \text{ mU/ml}$ で、少数例を対象とした瀬口ら⁷⁾の $13.4 \pm 3.3 \text{ mU/ml}$, 桑木ら⁸⁾の $14.0 \pm 4.3 \text{ mU/ml}$ にくらべ若干高値であるが、金尾ら⁹⁾の $19.6 \pm 5.6 \text{ mU/ml}$, 寺山ら¹⁰⁾の $18.3 \pm 5.1 \text{ mU/ml}$, 梅津ら¹¹⁾の $17.1 \pm 7.2 \text{ mU/ml}$ とほぼ一致していた。

これまでの年齢層別の血中 EPO 濃度に関する報告では、各年代間に有意差は認められていない^{7,12)}。しかし、多数例を対象とした今回のわれわれの検討では、70 歳代では 30 歳代や 40 歳代に比べ有意な高値が認められた。加齢とともに血清 EPO 濃度增加の原因は明らかでないが、高齢者における潜在的な造血能の低下を反映している可能性が考えられる。

慢性腎不全患者の血中 EPO 濃度については健常者とくらべ低値であるとの報告⁷⁾や有意差を認

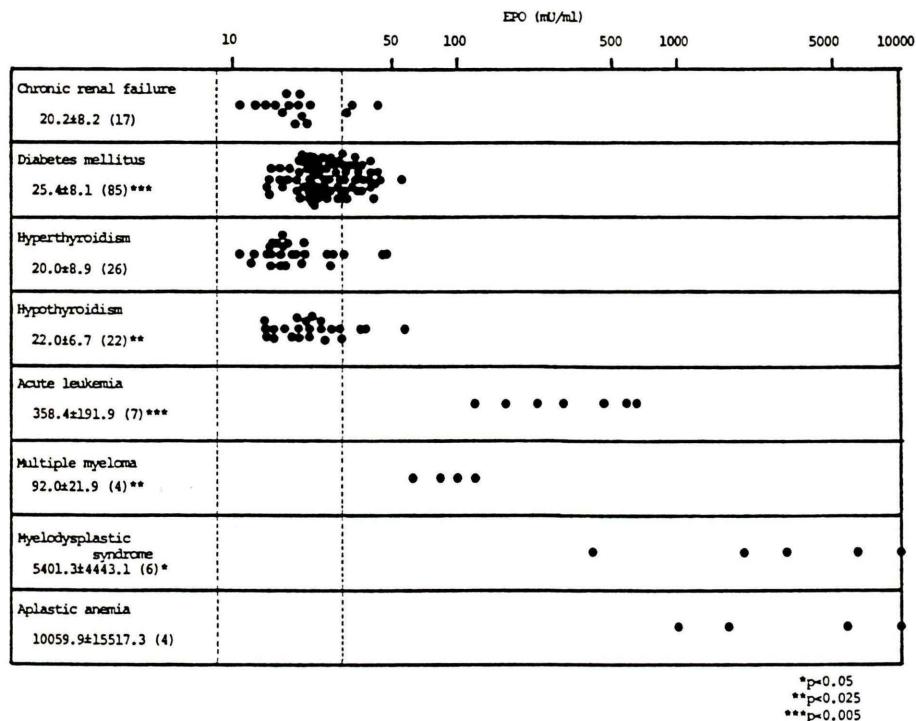


Fig. 5 Serum EPO values in patients with various diseases. Dotted lines indicate the normal range (mean \pm 2SD).

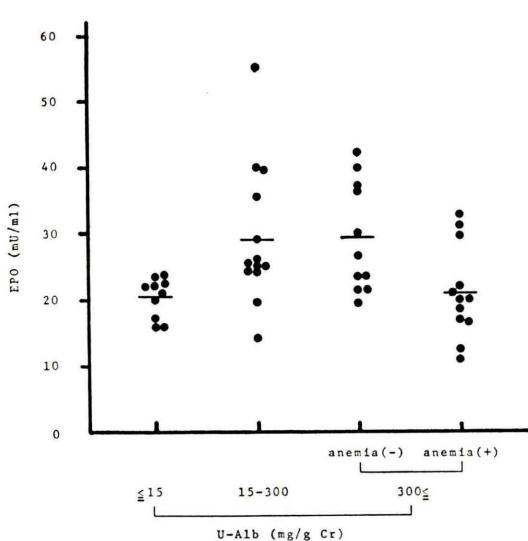


Fig. 6 Serum EPO values in patients with diabetes mellitus which were grouped by the grade of albuminuria and anemia.

めない報告がある¹¹⁾。われわれの検討においても健常者との間に有意差を見いだせなかった。しかし貧血を有する慢性腎不全患者の血中 EPO 濃度が健常人と同じレベルにあることは、血中 EPO 濃度が相対的に低値であることを示している¹¹⁾。

われわれは今回の検討において、糖尿病および甲状腺機能低下症患者において血清 EPO 濃度が健常者に比較して高値を示すことを初めて明らかにした。これらの疾患においては腎臓の細胞レベルの低酸素状態を介して EPO 産生が亢進することが考えられる。糖尿病患者において micro-albuminuria を呈する群で明らかな貧血が存在しないにもかかわらず血清 EPO 濃度が有意に高値を示したことは、これらの患者における顕性の腎機能低下に先行した潜在的な造血能の低下を反映している可能性があり興味深い。

造血器疾患における血清 EPO 濃度は幅広く分

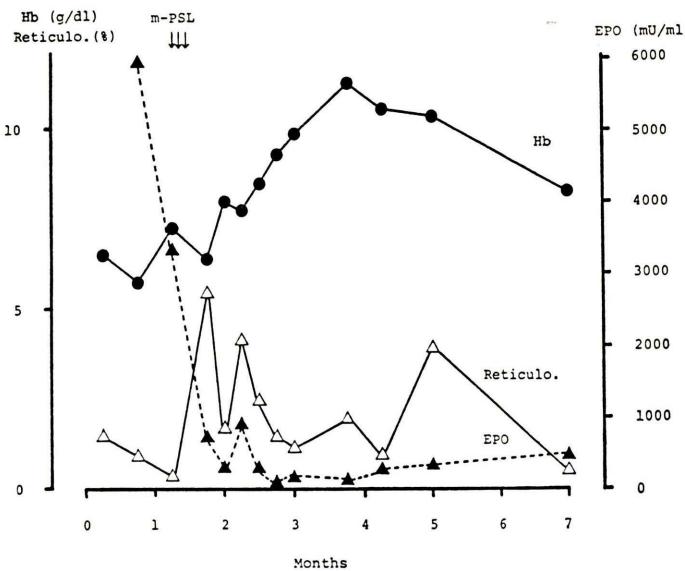


Fig. 7 Clinical course and changes in serum EPO levels in a patient with pure red cell aplasia following steroid pulse therapy. m-PSL indicates methyl prednisolone administration.

布し、とくに骨髓異形成症候群および再生不良性貧血例では急性白血病や多発性骨髓腫例に比較して著しい異常高値を示した。赤芽球病(PRCA)例では貧血の改善に先行して血清EPO濃度の低下が観察された。したがって血清EPO濃度は貧血症の鑑別診断のみでなく、治療経過の指標としても有用であることが示唆される。

V. まとめ

リコンビジエンEPOキットの基礎的および臨床的検討を行い以下の結論を得た。

- 1) 本法は測定法が簡便で、種々の基礎的検討でもほぼ満足できる結果を得た。
- 2) 健常成人180名の血清EPO濃度の平均値($M \pm SD$)は $18.6 \pm 5.6 \text{ mU/ml}$ で、 $M \pm 2SD$ に相当する健常範囲は $7.4 \sim 29.8 \text{ mU/ml}$ と考えられた。
- 3) 高齢者の血清EPO濃度は若年者より高値を示した。したがって高齢者の健常範囲は若年者と別に考える必要がある。
- 4) 慢性腎不全患者の血清EPO濃度は健常範囲にあったが、貧血の程度を考慮すると相対的低

値と考えられた。

- 5) 糖尿病および甲状腺機能低下症では血清EPO濃度は若干高値を示した。
- 6) 血液疾患のうち骨髓異形成症候群および再生不良性貧血例の血清EPO濃度は異常高値を示した。これらの疾患の鑑別や治療効果判定に血清EPO濃度の測定は有用である。

文 献

- 1) Brown JK, Cohen AM, Egrie JC, et al: Erythropoietin: gene cloning, protein structure and biological properties. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* **51**: 693-702, 1986
- 2) Jacobson LO, Goldwasser E, Fried W, Plzak L: Role of the kidney in erythropoiesis. *Nature* **179**: 633-634, 1957
- 3) Kubanek B, Ferrari L, Tyler WS, et al: Regulation of erythropoiesis. XXIII. Dissociation between stem cell and erythroid response to hypoxia. *Blood* **32**: 586-596, 1968
- 4) Ersiev AJ: Erythropoietin Titers in Health and Disease. *Seminars in Hematology* **28** (Suppl 3): 2-8, 1991
- 5) 千葉省三: エリスロポエチンの定量. 検査と技術 **7**: 1003-1010, 1979

- 6) 木原数弘, 木原優子, 杉村英一, 他: リコンビジンEPO KIT の基礎的および臨床的検討. ホルモンと臨床 **38**: 385-394, 1990
- 7) 瀬口忠一, 財田至啓, 嶋 照夫, 他: 遺伝子組み換えヒトエリスロポエチンを用いたRIA法による慢性血液透析患者の血清エリスロポエチン値の検討. 医学と薬学 **21**: 665-674, 1989
- 8) 桑木知朗, 浦部晶夫, 高久史磨, 他: 各種血液疾患における血中エリスロポエチン——ラジオイムノアッセイによる測定——. 医学と薬学 **21**: 933-936, 1989
- 9) 金尾啓右, 松井香都代, 森馬初子, 他: エリスロポエチン(EPO)のRIAキットに関する基礎的検討.
- 10) 寺山百合子, 五十嵐隆子, 二川原和男, 他: エリスロポエチン測定RIAキットの有用性について. 医学と薬学 **24**: 1491-1499, 1990
- 11) 梅津道夫, 多川 斎, 斎藤恒博, 他: 血中エリスロポエチン濃度測定用の新しい放射免疫測定法の開発と透析患者における臨床的検討. 透析会誌 **21**: 913-918, 1988
- 12) Matsubara K, Yoshimura T, Kamachi S, et al: Radioimmunoassay for erythropoietin using anti-recombinant erythropoietin antibody with high affinity. Clin Chim Acta **185**: 177-184, 1989

Summary

Clinical Use of Serum Erythropoietin Determination by Recombigen EPO RIA Kit

Yohji MASAKI, Nobuyuki OKA, Hiroshi FURUYA, Satoshi OHGUNI, Chieko TAKAGI, Toshiaki SATO, Kazumi NOTSU and Yuzuru KATO

First Division, Department of Medicine, Shimane Medical University

Serum erythropoietin (EPO) levels were determined by the recombinant EPO RIA kit (DPC) in normal subjects and patients with renal dysfunction, diabetes mellitus, hypothyroidism and a variety of hematological disorders. Mean(\pm SD) serum EPO levels were 18.6 ± 5.6 mU/ml in 180 normal subjects and no sex difference was obtained. Serum EPO levels in older subjects were slightly greater than those in younger subjects. There was a negative correlation between serum EPO levels and Ht values in anemic patients with normal renal function, whereas serum EPO levels were within the normal range in anemic patients with renal disorders, suggesting that serum EPO levels were relatively low in patients with chronic renal failure. Serum EPO levels were rather in-

creased in patients with diabetes mellitus and hypothyroidism. High serum EPO levels were obtained in patients with a variety of hematological disorders such as acute leukemia, multiple myeloma, myelodysplasia syndrome, aplastic anemia and pure red cell aplasia. In a patient with pure red cell aplasia treated with glucocorticoids, serum EPO levels were lowered before anemia was recovered and reticulocytes were increased. These findings indicate that measurement of serum EPO levels are useful for not only differential diagnosis of anemia but also clinical evaluation of the treatment.

Key words: Erythropoietin (EPO), RIA, Diagnosis of anemia, Renal function, Pure red cell aplasia.