

《技術報告》

血中 1 型プロコラーゲン C 端プロペプチド(P1CP) の測定

山本 逸雄* 高田 政彦* 大中 恭夫* 游 逸明*

山本 裕子* 浜津 尚就** 森田 陸司*

要旨 血中 1 型プロコラーゲン C 端プロペプチド (P1CP) の RIA が開発され、その使用経験について報告する。本アッセイは、ヒト 1 型プロコラーゲンの C 端蛋白に対するウサギ抗体を用い、分離法として抗ウサギヤギ抗体を共有結合させた小粒体を用いており、手技が容易であり、感度、再現性などは良好であった。骨転移症例における検討では、骨硬化性転移を起こす前立腺癌例において高値を示した。また、副甲状腺機能亢進症や甲状腺機能亢進症でも高値を示す症例がみられた。他の骨代謝マーカーとの比較検討においても本アッセイは、1 型コラーゲンの合成の指標として、また骨形成の指標として、より優れたアッセイであると考えられた。

(核医学 30: 563-569, 1993)

I. はじめに

1 型コラーゲンは最も多いタイプのコラーゲンであり、皮膚、骨、腱、象牙質のコラーゲンの主体をなすものである¹⁾。特に骨は代謝の盛んな臓器であり、1 型コラーゲンの代謝に最も関連をもっている。従来コラーゲンの代謝を臨床的に評価する場合、尿中ハイドロキシプロリン (HP) の測定が行われていたが、尿中 HP はアッセイが複雑な上、食物中のコラーゲンや骨以外のコラーゲン含有組織の崩壊あるいは合成にも影響され、骨代謝のマーカーとしては不十分なものであった。1 型コラーゲンは、骨や皮膚の細胞より 3 重ラセン構造のプロコラーゲンとして分泌され、特異的な N- および C- プロテアーゼによって分子の両端がきられ、コラーゲン分子となる。これらの酵素欠損症は、臨床的に骨形成不全症の 3 型として知られているように、コラーゲン線維形成に不可欠の

過程である²⁾。このとき遊離された C 端ペプチド (Carboxyterminal Propeptide of Human Type 1 Procollagen, P1CP) は循環血中に存在することが知られており、その測定はプロインスリンにおける C ペプチドと同じように、コラーゲン合成のきわめて特異的な評価法となり得る。P1CP の測定は 1974 年にすでに報告があり³⁾、その臨床的有用性は知られていたが、一般に広く用いることができなかつたため、充分評価がなされていない。最近、P1CP に対する polyclonal ウサギ抗体を用いた P1CP の radioimmunoassay 系がキット化され、簡便に使用可能となった⁴⁾。今回、そのキットを用い若干の基礎的検討を行い、また、特に骨転移を有する悪性腫瘍患者を中心に、臨床的検討をする機会を得たので報告する。

II. 方 法

対象：健常人は健康診断時に採取された検体を用いて検討した。対象は 225 名 (25-78 歳、男性 25 名、女性 200 名、うち 50 歳以下の女性 148 名、51 歳以上の女性 52 名) である。また臨床的検討に際しては、乳癌、肺癌、前立腺癌等の担癌患者 140 名につき骨シンチグラフィの所見をもとに、骨転移の数によって (転移が 1-2 か所のもの

* 滋賀医科大学放射線科

** 同 放射線部

受付：5 年 2 月 3 日

最終稿受付：5 年 3 月 12 日

別刷請求先：滋賀県大津市瀬田月輪町 (〒520-21)

滋賀医科大学放射線科

山 本 逸 雄

を+, 3か所以上および1か所であっても広範囲のものを++)骨転移の程度を分類した。骨転移なしと診断されたもの92例, 骨転移+のもの11例, 骨転移++のもの37例である。そのほか, 原発性副甲状腺機能亢進症3名, 副甲状腺機能低下症2名, 甲状腺機能亢進症6名, 関節リウマチ症例5名, 骨折症例(受傷6か月以内)5名, 胃切後症例81名, 悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症例4名, 腎不全症例6名など, 諸種の疾患患者計112名である。以上の対象につき血清を採取し, -20°Cにて保存しアッセイ試料とした。

P1CPアッセイの方法:アッセイはOrion Diagnostica社製(Turku, Finland)プロコラーゲンP1CP radioimmunoassay(RIA)キットによった⁴⁾。本キットによるアッセイ法の概略をFig.1に示す。血清100μlと¹²⁵I標識-P1CP 200μl(30,000~40,000 cpm, in 0.1 M phosphate buffered saline, pH 7.2, 0.2%牛アルブミン)と抗P1CP抗体(ウサギ血清)希釈液200μlとをプラスチックチューブに入れ混和し37°C, 2時間インキュベート後, 抗ウサギ抗体を小ビーズに共有結合させた混合液(500μl)を加え混和し30分室温に放置後, 4°C, 2,000×gにて15分遠沈し, 上清を吸引除去

後ペレットを含むチューブの放射能をオートガルマ計測器(Aloka, ARC-1000 M)にて計測した。データの分析はアロカカーブ法を用いて行った。

P1CPアッセイの基礎的検討:基礎的検討として同一サンプルのアッセイ内, アッセイ間の再現性, 希釈の検討を行った。つまり, 同一サンプルを10本のチューブにとり, 同一アッセイ内にて測定し, その測定値の平均値および標準偏差を求め変動係数(C.V.)を算出した。また低値および高値を示した検体を11本に分け-20°Cに保存し, おのおの2週間おきに測定し, アッセイ間の測定値の変動を検討した。また高値を示した骨転移症例2検体につき, 生理食塩水にて倍々希釈し測定し, 標準曲線との比較を行った。0スタンダードの標準偏差の2倍の値より最小検出感度を求めた。

P1CPアッセイの臨床的検討:健常人, 骨転移例を含む諸種の骨疾患患者につき測定を行い, 同一サンプルにつき他の骨代謝マーカーの測定値との比較検討を行い, また同時期に採取した尿についても同様の検討を行った。なお, 骨転移症例において前立腺癌症例に関しては, 臨床所見より骨転移活動性例および寛解例に分けて検討した。

他の骨代謝マーカーの測定:同一サンプルにつき, 血中オステオカルシンをCIS Bio International社製測定RIAキット(C端アッセイ)にて測定し⁵⁾, また, 血中アルカリ性fosfotáserをp-nitrophenyl phosphateを基質とする発色法によって測定した(単位はSigma Unitであり国際単位の16.7分の1の値をとる)⁶⁾。同時期に採取した尿のサンプルにつき, 尿中ピリヂノリンをすでに報告したHPLC法により測定した⁷⁾。

III. 結 果

P1CPアッセイ系の基礎的検討:本アッセイによるP1CP測定の代表的な標準曲線をFig.2に示す。最低検出感度は1.2 ng/mlであり, また測定は少なくとも500 ng/mlまでは可能であった。同一サンプルによるアッセイ間の測定値の変動は $123.1 \pm 5.1 \text{ ng/ml}$ (平均±S.D., n=11; C.V.=4.2%)

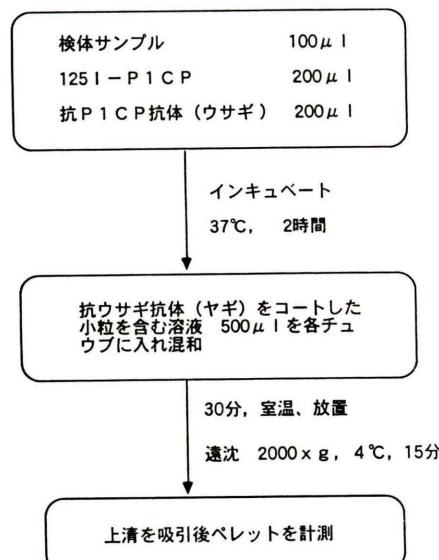


Fig. 1 Diagram of procedure for the P1CP assay.

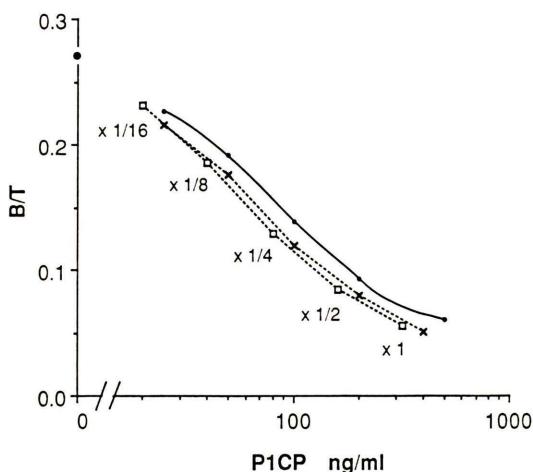


Fig. 2 Standard curve of the P1CP assay (●—●). Dotted lines represent assay results of serially diluted serum samples (□, ×), which paralleled well with the standard curve.

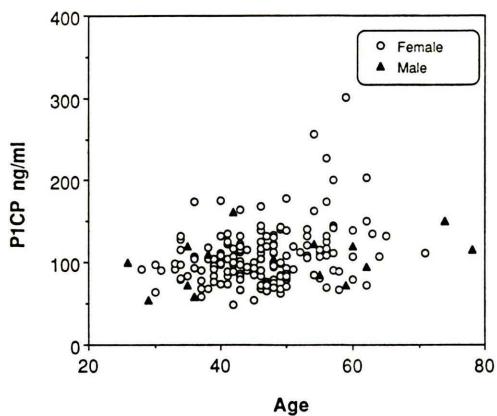


Fig. 3 Serum P1CP values in healthy volunteers. In female, serum P1CP values tend to elevate after 50 years.

および $377.6 \pm 32.2 \text{ ng/ml}$ (平均±S.D., n=11; C.V.=8.5%) であった。またアッセイ内変動は $296 \pm 25.1 \text{ ng/ml}$ (平均±S.D., n=10; C.V.=8.5%) であった。希釈試験の成績も Fig. 2 に示しているが、標準曲線とほぼ平行した希釈曲線を示した。

臨床的検討：健常男女225名の血中P1CP値の分布を Fig. 3 に示す。50歳以降の女性において高値を示す傾向がみられ、女性において50歳以下とそれ以上とに分けると、50歳以下で $100 \pm$

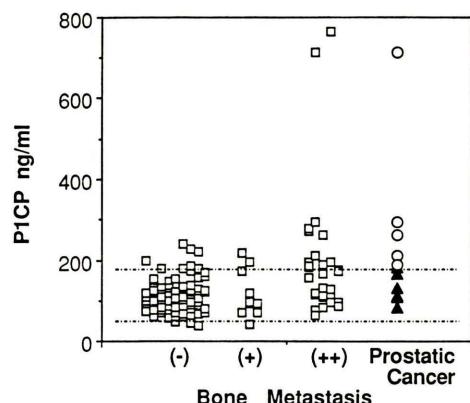


Fig. 4 Serum P1CP values in patients with malignancy. Patients were divided into three groups according to absence (−) or presence (mild: (+), extensive (++) of bone metastasis. Patients with prostatic cancer and bone metastasis were divided into two groups; uncontrolled (○) and controlled (▲).

26 ng/ml (平均±1 S.D., n=148), 51歳以上で $127 \pm 50 \text{ ng/ml}$ (平均±1 S.D., n=52) と 51歳以上にて高値とばらつきを示した。一方、男性の平均値は $102 \pm 30 \text{ ng/ml}$ (平均±1 S.D., n=25) であった。したがって P1CP の値の解釈には、年齢という要素を考慮に入れる必要があるかがわかった。またすべての健常人の平均値は $107 \pm 35 \text{ ng/ml}$ であり、この値より 2 標準偏差以内 (37 – 177 ng/ml) を今回便宜的に正常範囲とした。転移性骨腫瘍症例における成績を Fig. 4 に示すが、骨転移のない担癌患者においては 4 例を除き正常範囲内にあり、かつ、すべての症例において 250 ng/ml 以下であった。異常高値を示した 4 例中 1 例は肝硬変を伴っており、1 例は 16 歳という若年者であり、残りの 1 例は関節疾患を伴っていた。また骨転移の + 群例のうち 2 例が異常高値を示し、 200 ng 以上を示した 1 例は肝硬変を伴っていた。広範な骨転移にかかわらず、72% の症例は正常範囲内であった。高値を示した 11 例のうち 4 例は前立腺癌の転移、また 1 例は肝硬変に肝癌を合併した例、残りの 6 例は乳癌、肺癌と直腸癌の骨転移であり、そのうち 4 例は骨硬化を伴う転移例であった。前立腺癌の骨転移例 11 例中 5 例は、ホルモン療法

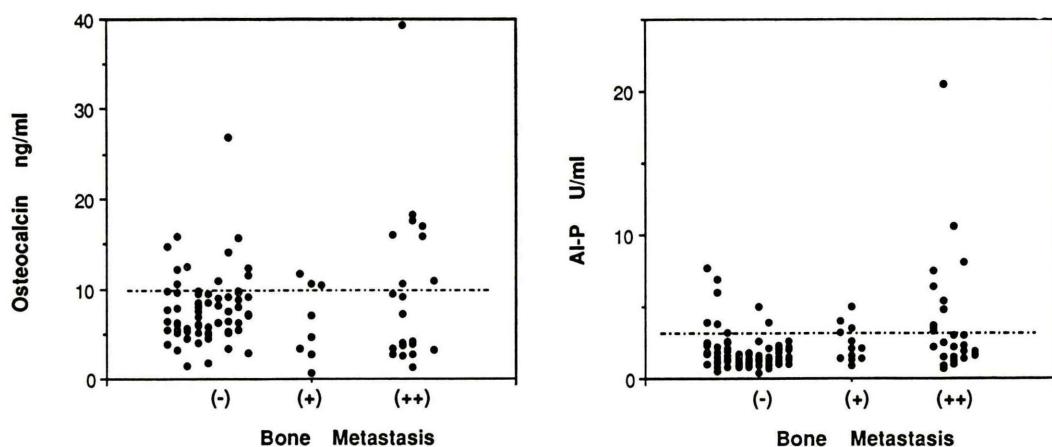


Fig. 5 Serum concentrations of osteocalcin and alkaline phosphatase in patients with malignancy. Essentially the same samples used in P1CP assay described in Fig. 3 were examined.

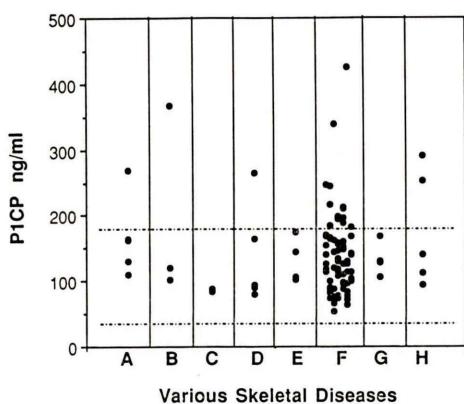


Fig. 6 Serum P1CP values in patients with various skeletal diseases. Diseases are; A: Hyperthyroidism, B: Primary hyperparathyroidism, C: Hypoparathyroidism, D: Fracture, E: Hypercalcemia of malignancy, F: Postgastrectomy, G: Rheumatoid arthritis, and H: Chronic renal failure.

によく反応してコントロールされている寛解症例であったが、それらはすべて正常範囲内であり、一方活動性の骨転移例6例全例が異常高値であった。同一例において血中オステオカルシン、アルカリ性フォスファターゼを測定したが、多くの例において相関する傾向がみられたが、オステオカル

ルシンもアルカリ性フォスファターゼも、骨転移を伴わない担癌患者においても高値を示す例が多くみられ(Fig. 5)、おのおのにおける骨転移症例に対する感度はほぼ同様と思われたが、P1CPにおいては偽陽性が少なく、特に前立腺癌の骨転移の検出に関しては有用と考えられた。そのほか、副甲状腺機能亢進症をはじめとする諸種の骨疾患における測定成績をFig. 6にまとめているが、副甲状腺機能亢進症例や甲状腺機能亢進症例、さらに胃切後患者や慢性腎不全患者において高値を示す例が認められた。悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症症例においては異常高値を示さなかった。血中クレアチニンが3mg/dl以上の腎不全患者においてもP1CPは正常の例もあり、血中P1CPは腎機能の影響が少ないと考えられた。Table 1に健常者、各種疾患患者を併せた例中の血中P1CP値と血中オステオカルシン、アルカリ性フォスファターゼおよび尿中ピリヂノリンとの相関を示している。血中オステオカルシンとは相関係数0.446、アルカリ性フォスファターゼ値とは0.563($p < 0.01$)とわずかに相関が認められたが、骨吸収のマーカーである尿中ピリヂノリンとは相関が全く認められなかった。

Table 1 Correlation between serum P1CP values and other bone metabolic markers

	Simple regression equation	Coefficient (r)	p value
vs. Osteocalcin	$y = 0.039x + 4.51$	0.446	0.124
vs. Alkaline Phosphatase	$y = 0.018x + 0.39$	0.563	0.008
vs. Urinary Pyridinoline	$y = 0.072x + 28.3$	0.194	—

IV. 考 案

P1CP は 1 型プロコラーゲンの C 端ペプチドであり、今回アッセイに用いられた P1CP は、ヒトの皮膚線維芽細胞の培養液中のプロコラーゲンからコラーゲナーゼによって分離された分子量約 10 万の球状蛋白であり、 $\alpha 1$ (I) の C 端を 2 ケ、 $\alpha 2$ (I) の C 端を 1 ケもっている。コラーゲンの線維化は、このプロコラーゲンの N 端および C 端の蛋白が、細胞外で切り放されることにより開始する。切り放された C 端蛋白は血中に存在し、主として肝によって代謝されると考えられている。したがって、この C 端蛋白 (P1CP) を測定すれば、1 型コラーゲンの合成の指標とすることができる。これはインスリン分泌の指標としての C-ペプチドの測定とよく似ている。1 型コラーゲンは皮膚や腱にも含まれているが、その多くは骨に存在する。したがって、血中 P1CP は骨形成の指標となることが考えられる。1974 年にこの P1CP のアッセイは開発され、その有用性が知られていたが、一部の研究室でのみ行われていたため広く普及しなかった³⁾。今回、Orion Diagnostica 社より P1CP の簡便な測定キットが開発され、使用する機会を得たが、本キットの再現性や、感度、操作法自体には何ら問題はなく、測定も半日で可能であり、優秀なキットであると考えられた。今回健常者の多くの例について測定できていないが、測定した範囲では成人健常者における血中 P1CP 値は安定しており、37-177 ng/ml にほとんど分布した。これは、従来の報告とほぼ同様である⁴⁾。50 歳以上の特に女性においては高値を示す傾向が認められ、閉経後骨粗鬆症との関連で興味深いが、今後の検討が必要である。アッセイ値は、肝硬変を伴う症例において高値を示す傾向がみられ

たものの、250 ng/ml 以上になることはなかった。しかし肝機能は、その値の解釈において考慮する必要があると思われた。腎不全症例においては、透析例においても正常範囲内にある症例があり、腎機能の影響はないと考えられた。諸種の骨疾患特に骨転移症例において測定したが、骨転移に対する感度は高いとはいえるが、オステオカルシンや、血中アルカリ性fosfataーゼの測定と大差なかったが、前立腺癌の骨転移に関しては未治療の 6 例全例が異常値を示し、また、寛解例は正常範囲内であり、治療効果や、病変の拡がりとよく相関していた。前立腺癌は骨硬化解の骨転移を起こす代表的な疾患であり、このような骨硬化解骨転移の発見や経過観察に有用であることを示唆していると同時に、P1CP が骨形成を反映していることも示している。特に他のマーカーに比し偽陽性が少なく、また腎機能の影響がないことも有利な点である。諸種の骨疾患、副甲状腺機能亢進症や甲状腺機能亢進症あるいは、胃切後症例、慢性腎不全等の一部の症例が高値を示したが、それも骨形成亢進の表れであると思われるが、今後の検討が多く残されている。血中 P1CP 値は他の骨形成マーカーといわれるオステオカルシンや血中アルカリ性fosfataーゼ値とは相関傾向ないし相関を認めたが、骨吸収マーカーである尿中ピリヂノリンとは相関を認めず、この意味でも骨形成を忠実に反映していることが伺われた。現行のオステオカルシンは、純粹な骨形成マーカーであるとはいえるが、骨吸収によっても血中にそのフラグメントが放出される⁵⁾。さらにその保存時の安定性は悪く、3 か月以上保存がきかない⁵⁾。またアッセイは、腎機能の影響を強く受けることも知られている。一方、血中アルカリ性fosfataーゼ値はその測定が簡便であるものの、特異性に問題

が残されている。従来純粹な骨形成の指標がなかったが、今回 P1CP というその生理的代謝の明らかな蛋白のアッセイが可能となったことの意味は計り知れない。つまり、骨生検などの侵襲的な検査をしなくとも骨形成が推し量れ、したがって臨床的には、骨粗鬆症の病態評価や薬効評価、ステロイドなどの薬剤の副作用のモニターや、腎不全患者やそのほか諸種の代謝性骨疾患の評価への応用が期待される。

V. まとめ

Orion Diagnostica 社製ヒト 1 型プロコラーゲン C 端蛋白の測定キットの使用経験を得たが、本キットは簡便であり、臨床的に、コラーゲンの合成を推し量る手段を得たことの意味はきわめて大きいと考えられた。

謝辞：P1CP 測定用キットを提供いただきました中外製薬診断薬開発部の方々に感謝いたします。

文 献

- 1) Miller ED, Gay S: The collagens; An overview and update. In "Methods in Enzymology", edited by Cunningham LW, vol. 144, D, Academic Press, New York, 1987, pp. 3-40
- 2) 畑隆一郎：コラーゲンの基礎. Bone (大阪) 3 (3): 33-40, 1989
- 3) Taubman MB, Goldberg B, Sherr CJ: Radioimmunoassay for human procollagen. Science 186: 1115-1117, 1974
- 4) Melkko J, Niemi S, Risteli L, Risteli J: Radioimmunoassay of the carboxyterminal propeptide of human type 1 procollagen. Clin Chem 36: 1328-1332, 1990
- 5) 高坂唯子, 山本逸雄, 北村暢康, 青木 純, 采野進, 曽根照喜, 他 : Radioimmunoassay (オステオカルシン・I-125 キット)による血中オステオカルシンの測定. 核医学 24: 891-897, 1987
- 6) Bessey OA, Lowry OH, Brock MJ: A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. J Biol Chem 164: 321-329, 1946
- 7) 関根恭一, 堀江 均, 畠 啓視, 南条正季, 佐藤克彦, 西井易穂, 他 : 融光検出高速液体クロマトグラフィによる尿中ピリヂノリン及びデオキシピリヂノリンの定量. 臨床化学 21: 18-25, 1992
- 8) 白木正孝, 細田健治, 陳 瑞東, 中村利孝 : Bone matrix Protein-N-fragment と Intact osteocalcin の臨床的検討. 日骨代謝誌 10: 104 (抄), 1992

Summary

Measurement of Serum Concentration with Radioimmunoassay for Carboxyterminal Propeptide of Type 1 Procollagen

Itsuo YAMAMOTO*, Masahiko TAKADA*, Yasuo OHNAKA*, Itsuaki YUU*,
Yuuko YAMAMOTO*, Hisatoshi HAMAZU** and Rikushi MORITA*

*Department of Radiology, **Central Radioisotope Division, Shiga University of Medical Science

A radioimmunoassay kit for measurement of carboxyterminal propeptide of type 1 procollagen (P1CP) was developed and can be purchased commercially for clinical use. Using the kit, we measured serum concentration in healthy controls and in patients with bone metastasis and other various skeletal disorders. In healthy controls, serum concentration of P1CP ranged within 37-177 ng/ml under age 50, while in serum concentration of women over 50, it elevated upto 350 ng/ml. In patients with skeletal metastasis, in most of patients, it stayed within a normal range, whereas in patients with bone metastasis from prostatic cancer, it raised significantly. In some of patients with primary hyperparathyroidism or hyper-

thyroidism, serum concentration for P1CP was also elevated. In comparison with other serum bone metabolic markers such as osteocalcin or alkaline phosphatase, P1CP showed less occurrence of an elevation in patients with non-skeletal disease. Serum concentration of P1CP was not affected by renal function, while mild elevation was observed in patients with severely damaged liver diseases. In conclusion, the newly developed radioimmunoassay for P1CP was an excellent assay system and would provide us easily evaluation of type 1 collagen formation.

Key words: Procollagen, Bone formation, P1CP, Radioimmunoassay, Osteocalcin.