

## 《ノート》

## PTH ‘栄研’の基礎的および臨床的検討

Fundamental and Clinical Study of PTH ‘Eiken’

福永 仁夫\* 森田 陸司\* 高坂 唯子\* 土光 茂治\*  
 山本 逸雄\* 鳥塚 菁爾\*

Masao FUKUNAGA\*, Rikushi MORITA\*, Tadako KOSAKA\*, Shigeharu DOKOH\*,  
 Itsuo YAMAMOTO\* and Kanji TORIZUKA\*

*Kyoto University Hospital, Department of Radiology and Nuclear Medicine*

## I. はじめに

副甲状腺ホルモン(PTH)は、カルチトニン、ビタミンDと共に、カルシウム(Ca)代謝を調節する重要なホルモンの1つである。1963年、Bersonらにより、radioimmunoassay(RIA)を用いた、ヒト血中PTHの測定が初めて紹介されて以来<sup>1)</sup>、高度精製ウシPTH、ヒト副甲状腺抽出物、合成ウシ(1-34)PTH、合成ヒト(1-34)PTHを用いたRIAが開発された<sup>2,3,4,5)</sup>。

近年、Ca代謝異常を呈する疾患への関心が強まり、その病態の解明には、血中のPTH値の測定が重要であるが、PTHの測定は我国では一部の施設でしか行なわれていないのが、現状である<sup>6)</sup>。今回、我々はPTHのRIA Kit(PTH‘栄研’)を使用する機会を得て、その基礎的および臨床的検討を行なったので報告する。

## II. 方 法

## 1. PTHの測定

シオノギ・チューブに、PTH free 血清にて調整された各濃度の標準溶液(0, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5,

\* 京都大学医学部附属病院放射線核医学科

受付：54年4月2日

最終稿受付：54年7月25日

別刷請求先：京都市左京区聖護院川原町(番606)

京都大学医学部附属病院放射線核医学科

福永 仁夫

20 ng/ml)または被検血清100 μlを入れる。次いで、PTH抗血清100 μlを加え、Vortexミキサーにてよく混和し、4°Cで2日間インキュベーションする。<sup>125</sup>I標識PTH100 μlを加え、混和後更に4°Cで2日間インキュベーションする。boundとfreeの分離は、2抗体法にて行なう。すなわち、第2抗体100 μlを加え、混和し、30分間室温で放置する。その後、3,000 rpmで25分間遠心分離する。上清を吸引除去し、沈渣をカウントする(Fig. 1)。

血清成分によるまたは分離における非特異的結合を評価するために、抗血清の代わりに1% BSAを含む0.05 Mリン酸緩衝液(pH 7.5)100 μlを加えた。

腫瘍組織からのPTHの抽出は、0.1 N塩酸にて行なった<sup>7)</sup>。

手術時に無菌的に得られた副甲状腺腺腫の細胞培養は、山本ら<sup>8)</sup>の方法に準じて行ない、その培養液中のPTH濃度を測定した。

血清、組織抽出物および細胞培養液の稀釈には、術後性副甲状腺機能低下症患者の血清を使用した。

合成ウシ(1-34)PTHおよび合成ヒト(1-34)PTHは、Beckman社のものを用いた。

## 2. 血中Ca値の測定

オート・アライザーサマ12/60)に行なっ

**Key words** PTH radioimmunoassay, primary hyperparathyroidism, hypoparathyroidism, bovine (1-84) PTH

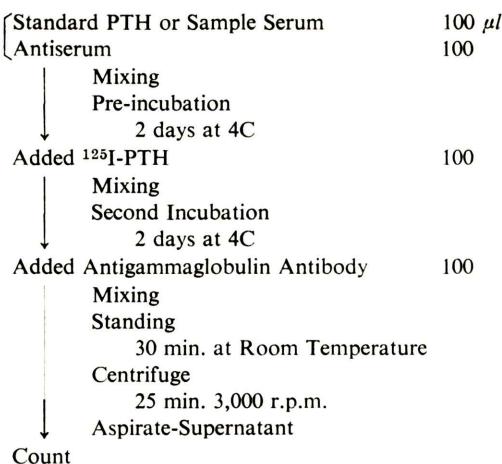


Fig. 1 Protocol for radioimmunoassay of PTH.

た。正常値は、8.5~10.5 mg/100 ml であった。

### 3. EDTA 負荷試験

EDTA-Na<sub>2</sub> 50 mg/体重 kg を 5 % ブドウ糖 500 ml と共に、2 時間点滴静注し、注射前、開始後 1, 2 時間目と終了後 1 時間目に採血し、その PTH 濃度を測定した。

### III. 対象

正常者は、年齢20~40歳のもの15例、60~80歳のもの18例の計33例を用いた。原発性副甲状腺機

能亢進症26例、および高 Ca 血症を伴う悪性腫瘍 23例は、腎機能障害を認めない時点での測定した。副甲状腺機能低下症は、術後性 5 例、特発性 8 例、偽性特発性 1 例、偽性 6 例であり、特発性と偽性の鑑別は、Ellsworth-Howard 試験にて行なった<sup>9</sup>。偽性特発性の診断は、Nusynowitz らの報告を参考とした<sup>10</sup>。その他、クル病および骨軟化症 5 例、老人性および閉経後骨粗鬆症 8 例、Paget 病 6 例、甲状腺髓様癌 9 例、腎結石症 17 例および人工透析中の慢性腎不全 23 例について、その血中の PTH 濃度を測定した。

腫瘍組織中の PTH 濃度は、副甲状腺腺腫と高 Ca 血症を呈した食道癌患者の原発巣について測定した。

## IV. 結 果

### 1. 基礎的検討

1) 標準曲線および測定感度：Fig. 2 は、PTH の代表的な標準曲線を示す。縦軸は  $B/Bo \times 100$  を、横軸は PTH 濃度を示す。なお、B は PTH 各濃度における  $^{125}\text{I}$ -PTH との bound パーセントを、Bo は PTH 0 ng/ml における bound パーセントを表わす。 $B/Bo \times 100$  が 90, すなわち 0 ポイントの 10% 低下した点 ( $-2SD$ ) の PTH 濃度は、

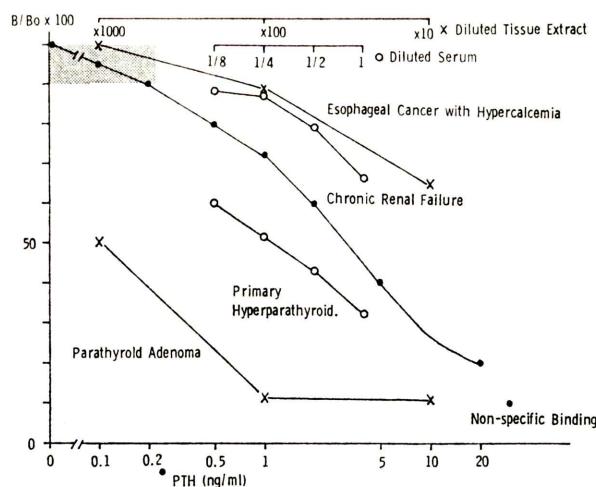


Fig. 2 Representative standard curve for PTH (●) and dilution curves of serum (○) from a patient with primary hyperparathyroidism or chronic renal failure, and extracts (×) from parathyroid adenoma or esophageal cancer with hypercalcemia.

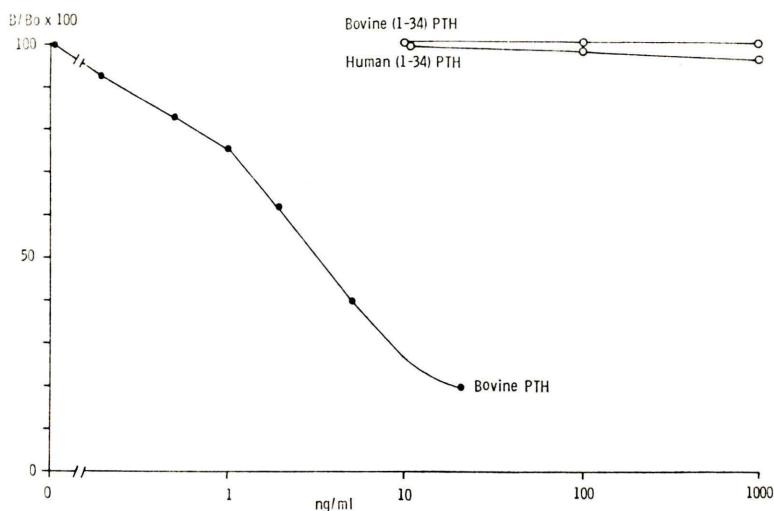


Fig. 3 Specific study, using synthetic bovine (1-34) PTH and synthetic human (1-34) PTH.

0.2 ng/ml であった。この濃度を最小検出感度とすると、PTH 0.2~20 ng/ml の範囲で測定が可能であった。

原発性副甲状腺機能亢進症および慢性腎不全患者血清の稀釈曲線は、標準曲線とほぼ平行した。また、腫瘍組織からの PTH 抽出物の稀釈曲線も、同様の傾向を示した。

2) 特異性：本アッセイ系における、合成ウシ(1-34) PTH と合成ヒト(1-34) PTH との交叉反応を検討した。合成ウシ(1-34) PTH は、100 ng/ml の濃度まで bound を抑制しなかった。一方、合成ヒト(1-34) PTH は、100 ng/ml の濃度で、約 4% の bound の抑制を示した(Fig. 3)。

3) 稀釈試験：Fig. 4 に示す如く、濃度の異なる 2 種類の血清を、PTH free 血清を用いて、1 倍から 8 倍に稀釈を行ない、検討した。各々の検体について、ほぼ良好な直線性を認めた。

4) 精度：本法の再現性を、PTH 値の異なる 3 種類の血清について検討した結果、Table 1 に示す如く、変動係数(CV)は、アッセイ内 4.7~15.1%，アッセイ間 5.6~17.1% と、ほぼ満足される結果が得られた。

5) 回収率：既知量の PTH を被検血清に加え、その濃度を測定し、回収率を検討した。表 2 に示

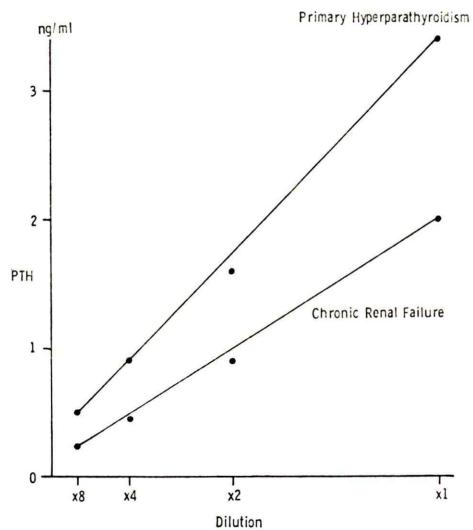


Fig. 4 Dilution study.

す如く、回収率は 90~110% を示した。

6)  $^{125}\text{I}$ -PTH のチューブ壁への吸着：シオノギ・チューブおよびパイレックス・チューブに、 $^{125}\text{I}$ -PTH 100  $\mu\text{l}$ 、PTH free 血清 100  $\mu\text{l}$ 、0.05 M リン酸緩衝液(pH 7.5) 200  $\mu\text{l}$  を加え、2 時間室温にて放置後、吸引し、更に脱イオン水 1 ml を加え吸引し、カウントを測定した。両チューブ共、投与  $^{125}\text{I}$ -PTH の 2% がチューブに吸着した。

Table 1 Precision

## 1. Intra-assay

No. of Assay	Mean $\pm$ SD (ng/ml)	C V (%)
10	0.53 $\pm$ 0.08	15.1
10	1.49 $\pm$ 0.07	4.7
10	2.59 $\pm$ 0.19	7.3

## 2. Inter-assay

No. of Assay	Mean $\pm$ SD (ng/ml)	C V (%)
8	0.35 $\pm$ 0.06	17.1
10	2.86 $\pm$ 0.16	5.6
10	6.89 $\pm$ 0.76	11.0

Table 2 Recovery of PTH added to two different serum samples.

Added PTH (ng/ml)	PTH Concentration (ng/ml)	Recovery (%)
0	0.50	—
1.0	1.4	90
2.5	3.4	116
10	10.8	103
0	2.0	—
1.0	2.9	90
2.5	4.3	92
10	11.8	98

7)  $^{125}\text{I}$ -PTH の安定性：キット到着後 3 日以内に使用した場合、20 ng/ml の PTH 濃度での  $B/B_0 \times 100$  は、 $15.8 \pm 3.7$  (平均土標準偏差) を示したのに対して、1 週間後では 25% であった。

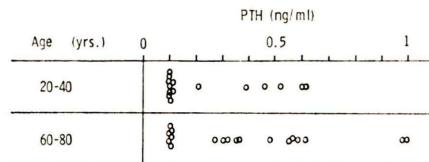
## 2. 臨床的検討

1) 正常値：20~40 歳の正常者では 15 例全例が、60~80 歳の老年者では 18 例中 16 例の計 33 例中 31 例 (94%) が 0.6 ng/ml 以下であった。一方、20~40 歳では 9 例、60~80 歳では 6 例の計 15 例 (45%) が検出感度以下であった (Fig. 5)。

2) 各種疾患での血中 PTH 値 (Fig. 6)：原発性副甲状腺機能亢進症 26 例のうち、24 例は PTH 高値を示した。正常値を示した 2 例は、骨病変を認めず、尿路結石症を主訴とした症例であった。

高 Ca 血症を呈した悪性腫瘍 23 例のうち、8 例では血中 PTH の検出が可能であった。

副甲状腺機能低下症では、術後性および特発性の 13 例全例が、検出感度以下であった。他方、偽



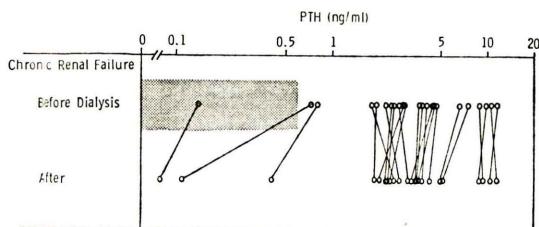


Fig. 7 Comparative study of serum PTH concentration in patients with chronic renal failure before and after dialysis.

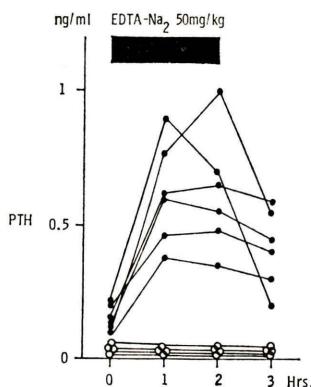


Fig. 8 EDTA infusion test in normal subjects (●) and idiopathic hypoparathyroidism (○).

甲状腺機能低下症4例について、EDTA-Na<sub>2</sub>溶液を負荷して、PTHの反応を観察した。正常者では、0.38～1.0 ng/mlに増加したが、特発性副甲状腺機能低下症では無反応であった(Fig. 8)。

4) 甲状腺静脈血中のPTH濃度：原発性副甲状腺機能亢進症患者の副甲状腺病変の術前部位診断のため、選択的に甲状腺静脈にカテーテルを挿入し、その静脈血中のPTH濃度を測定した。図9に示す如く、右下甲状腺静脈血中のPTH値は6.8 ng/mlと他に比して、有意に高値であった。手術により右下副甲状腺腫が確認された。

5) 副甲状腺腺腫細胞の培養液中のPTH濃度測定：培養液中のPTH濃度の経時的变化を観察すると、培養後3日目には、15.4 ng/mlであり、以後56日目までPTHの分泌が認められた(Fig. 10)。

6) 血中PTH濃度と血中Ca値との関係：原発性副甲状腺機能亢進症では、血中PTH値と

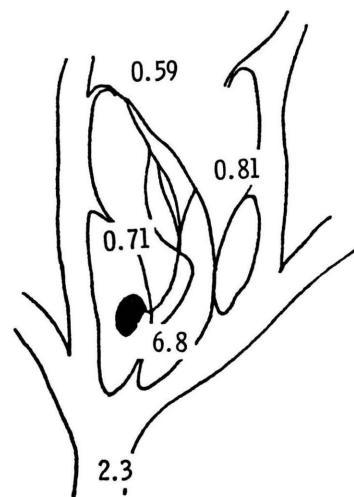


Fig. 9 PTH concentration in selective thyroid venous sampling.

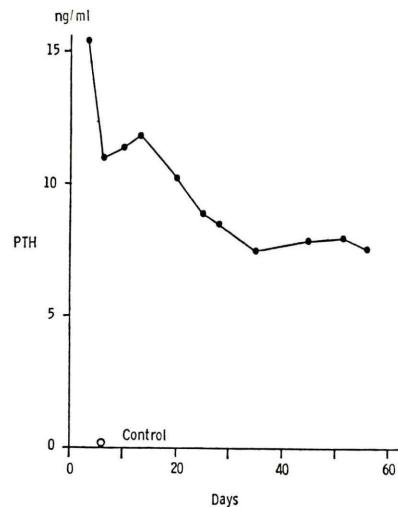


Fig. 10 Chronological changes of PTH concentration in cell culture of parathyroid adenoma.

Ca値は、ほぼ正の相関を示した( $r=0.62, y=0.57x - 5.33, P < 0.02$ )。一方、高Ca血症を伴う悪性腫瘍では、5例はPTH値が高く、PTH産生腫瘍が強く示唆された。15例ではPTH値が感度以下であり、高Ca血症の原因として、骨転移とか腫瘍からの高Ca血症を来たすPTH以外の物質

の産生が考えられた。副甲状腺機能低下症では、特発性および術後性では低Ca血症でしかもPTH低値を、偽性および偽性特発性ではPTH高値にもかかわらずCa低値を示した(Fig. 11)。

## V. 考 案

近年、Ca、ビタミンD代謝に対する研究の急速な進歩により、手軽に測定可能なPTHのKitの開発が強く望まれていた。今回、PTHのRIA Kit、PTH‘栄研’について、基礎的および臨床的検討を行なった。

本Kitの特徴の一つとして、測定手技が簡単で、しかもインキュベーションの時間が比較的短かくて済むという利点が挙げられる。測定感度は、高度精製ウシPTH(Wilson)とその抗モルモット抗体(Wellcome)を用いたRIA系とほぼ同等で、0.2 ng/mlであった<sup>2,12)</sup>。一般にウシ(1-84)PTHで免疫し、抗体を作成する場合、Cフラグメントに対する抗体ができやすいといわれている。このアッセイ系でも、PTHのNフラグメントである合成ウシ(1-34)PTHおよび合成ヒト(1-34)PTHとは殆んど交叉反応を示さず、Cフラグメントに特異的な測定系であることがわかった。血清および腫瘍抽出物の稀釀曲線は、標準曲線にほぼ平

行し、血中および腫瘍中のPTHは、ウシ(1-84)PTHと免疫学的に同一の態度を示すことが認められた。精度、回収率についても、ほぼ満足される成績が得られた。PTH測定時の問題点として、PTHのチューブ壁への吸着が指摘されている。本Kitのアッセイの蛋白濃度条件では、殆んど吸着は認められなかった。Yalowらは、標識PTHは不安定で、速やかにdamageを受けると報告している<sup>13)</sup>。PTHの標識後は、できるだけ早く、アッセイする方が良いと思われる。

20~40歳のPTH値は全例0.6 ng/ml以下を示したのに対して、60~80歳では18例中2例が高値を示した。そのため、PTHの正常値は0.6 ng/ml以下で良いと思われるが、Fujitaらは閉経後骨粗鬆症ではPTHの高値の傾向があると報告しており<sup>14)</sup>、老年者の場合、骨粗鬆症の有無を十分チェックする必要があろう。正常者の45%のPTH値は、検出感度以下であったが、本Kitではウシ(1-84)PTHをスタンダードおよび標識ホルモンに、それで免疫した抗血清を抗体に使用した、heterologousなアッセイのためであろう。そのため、今後homologousなアッセイの開発が望まれる。

原発性副甲状腺機能亢進症26例中24例(92%)が、

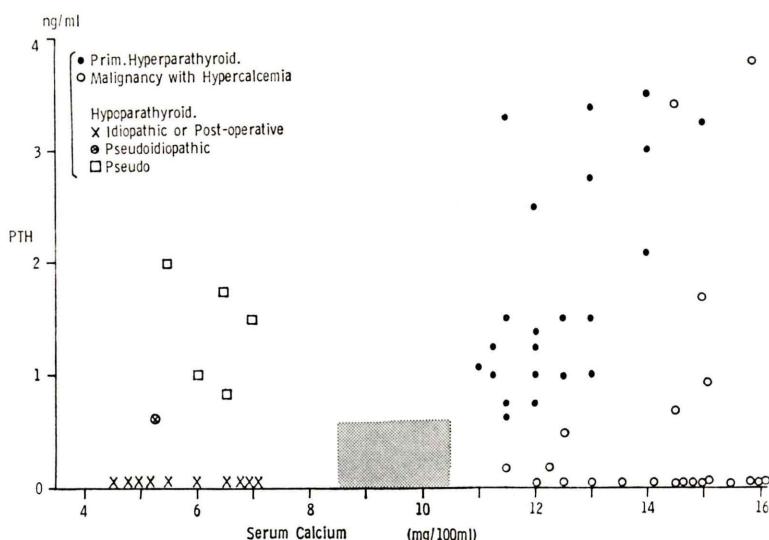


Fig. 11 Relation between serum PTH and calcium concentration.

PTH 高値であり、極めて診断的価値があった。従来、原発性副甲状腺機能亢進症の診断には N フラグメント・アッセイの方が良いという意見と、C フラグメント・アッセイの方が感度が良いという報告<sup>16)</sup> があり一致をみない。本 Kit を使用した場合、原発性副甲状腺機能亢進症の 92% に、PTH 高値を認め、C フラグメント・アッセイで十分診断が可能であった。正常 PTH 値を呈した 2 例は、骨病変がなく尿路結石症を示した症例であり、経過観察中に PTH 値の上昇が認められた<sup>15)</sup>。

高 Ca 血症を呈した悪性腫瘍 23 例のうち、8 例に血中 PTH が検出された。PTH の分泌は血中 Ca 値の上昇により抑制されるが、これら 8 例では、PTH 産生腫瘍の存在が示唆された。一方、PTH が検出されない 15 例では、高 Ca 血症の原因として、骨転移や腫瘍からのプロスタグランдин、ビタミン D 様ステロール、OAF などの産出が考えられた<sup>17-19)</sup>。

副甲状腺機能低下症の診断、特に特発性と偽性特発性または偽性との鑑別に、PTH 測定は有用であった。すなわち、特発性では低値を、偽性特発性および偽性では高値を示した。

クル病または骨軟化症では、2 次性副甲状腺機能亢進症を示す症例に、PTH 高値を認めた。

老人性または閉経後骨粗鬆症の原因として、Riggs はエストロゲンの欠乏、 $1\alpha$  水酸化の低下、ビタミン D 摂取の不足と共に、2 次性の副甲状腺機能亢進症の存在を挙げている<sup>20)</sup>。今回、我々が検討した骨粗鬆症 8 例では、1 例にしか PTH 高値を認めたにすぎず、その成因は複雑であり、今後の検討が必要であろう。

Paget 病では、全例血中 PTH 値が低い結果が得られた。Deftos らは、Paget 病では、血中カルチトニンの分泌低下を指摘している報告と併せ、興味深い<sup>21)</sup>。

甲状腺髓様癌 9 例のうち、1 例に PTH 高値を認めた。甲状腺髓様癌では、時に副腎褐色細胞腫の他に、副甲状腺腺腫または過形成の合併を認めるが<sup>11)</sup>、PTH 測定により副甲状腺の病変の存在が示唆された。

腎結石症 17 例のうち、1 例に PTH 高値を認めた。この例は、PTH 分泌過剰に基づく高 Ca 尿症が腎結石の成因として考えられた。

慢性腎不全では、2 次性副甲状腺機能亢進症のほか、PTH の不活性化の障害による PTH のフラグメントの存在が報告されている。そのため C フラグメント・アッセイでは高率に PTH 高値を示すことが期待され、事実、本 Kit を使用した場合、23 例中 22 例に PTH 高値を認めた。透析により血中 Ca 値が上昇すると共に、18 例で血中 PTH 値の低下が観察された。

Ca 負荷とか EDTA 負荷による急激な血中 Ca 値の変動時における、PTH 分泌の動態を知るには、N フラグメント・アッセイの方が有用であるといわれている<sup>22)</sup>。本 Kit を使用して、EDTA 負荷による PTH 反応を、血中 PTH 低値の正常者と特発性副甲状腺機能低下症患者で検討した。PTH 分泌の有無から、明らかに区別が可能で、C フラグメント・アッセイでも有用なことが示された。

PTH の測定は、副甲状腺腫瘍の術前の局在診断にも利用できる<sup>23)</sup>。選択的に左右の上、中、下甲状腺静脈にカテーテルを挿入し、その血中 PTH を測定したところ、右下甲状腺静脈中の PTH 濃度は、他の甲状腺静脈血中より有意に高値であった。右下副甲状腺腺腫と診断され、手術により同部の 1 g の腺腫が確認された。

また PTH の測定は、副甲状腺腺腫の培養細胞を用いた、PTH の分泌を指標とする実験にも有用であった。

血中 PTH の測定値を評価する場合、血中 Ca 値と相関させて考えることが重要であり、Ca 代謝異常を示す疾患の病態を知る一助になると思われた。

PTH 測定時の問題点として、血中には PTH の immunological heterogeneity が存在すること、ウシ PTH を用いた系にてヒト血中 PTH を測定していることなどが知られている。本 Kit でも、同様の問題点が存在するが、臨床上有用な情報を提供することが、示された。

## VI. 結論

PTH '栄研' Kit は、感度、特異性、稀釈試験、精度、回収率共、ほぼ満足される結果が得られた。また、手技も簡単で、しかも従来の PTH 測定に比してアッセイ時間も短かく、ルーチン検査に十分使用に耐えるものと思われた。

正常者の94%が、PTH 値 0.6 ng/ml 以下を示した。PTH 高値は、原発性副甲状腺機能亢進症(24/26)、高 Ca 血症を伴った悪性腫瘍(8/23)、偽性副甲状腺機能低下症(6/6)、偽性特発性副甲状腺機能低下症(1/1)、クル病および骨軟化症(3/5)、慢性腎不全(22/23)に高率に認められた。その他、骨粗鬆症、甲状腺髓様癌、腎結石症に、それぞれ 1 例の PTH 高値の症例を認めた。

PTH 測定は、EDTA 負荷による PTH の反応性や、選択的甲状腺静脈サンプリングを用いた術前の副甲状腺腫瘍の部位診断にも有用であった。

本 Kit は、血中のみならず、腫瘍組織中および培養液中の PTH 濃度の測定が可能であった。

PTH '栄研' Kit を提供下さいました、栄研化学株式会社に深謝致します。

## 文 献

- 1) Berson SA, Yalow RS, Aurbach GD, et al: Immunoassay of bovine and human parathyroid hormone. Proc Nat Acad Sci (USA) **49**: 613-617, 1963
- 2) Morita R, Fukunaga M, Dokoh S, et al: Differential diagnosis of hypercalcemia by measurement of parathyroid hormone, calcitonin, and 25-hydroxyvitamin D. J Nucl Med **19**: 1225-1230, 1978
- 3) Fischer JA, Binswanger U, Dietrich FM: Human parathyroid hormone. Immunological characterization of antibodies against a glandular extract and the synthetic amino-terminal fragments 1-12 and 1-34 and their use in the determination of immuno-reactive hormone in human sera. J Clin Invest **54**: 1382-1394, 1974
- 4) Tanaka M, Abe K, Adachi I, et al: Radioimmunoassay specific for amino (N) and carboxyl (C) terminal portion of parathyroid hormone. Endocrinol Japon **22**: 471-477, 1975
- 5) Segre CV, Potts Jr JT: Immunological comparisons of two synthetic human parathyroid hormone-(1-34) peptides. Endocrinology **98**: 1294-1301, 1976
- 6) カルシウム調節ホルモンのradioimmunoassay. 第16回 radioimmunoassay 研究会, 京都. 最新医学 **34**: 437-443, 1979
- 7) Aliapoulios MA, Voelkel EF, Munson PL: Assay of human thyroid glands for thyrocalcitonin activity. J Clin Endocrinol Metab **26**: 897-901, 1966
- 8) 山本逸雄, 福永仁夫, 土光茂治, 他: 培養骨細胞におけるサイクリック AMP. 日内分泌誌 **54**: 517, 1978
- 9) 山本通子, 古川洋太郎, 尾形悦郎, 他: Ellsworth-Howard 試験の実施法と問題点. 最新医学 **32**: 2023-2029, 1977
- 10) Nusynowitz ML, Klein MH: Pseudodiopathic hypoparathyroidism. Hypoparathyroidism with ineffective parathyroid hormone. Am J Med **55**: 677-686, 1973
- 11) Sipple JH: The association of pheochromocytoma with carcinoma of the thyroid gland. Am J Med **31**: 163-170, 1961
- 12) Tanaka M, Abe K, Adachi I, et al: Radioimmunoassay of parathyroid hormone in human plasma and tissue using commercially available antiserum and modified iodination. Endocrinol Japon **21**: 173-178, 1974
- 13) Yalow RS, Berson SA: Purification of <sup>131</sup>I-parathyroid hormone with microfine granules of precipitated silica. Nature **212**: 357-358, 1966
- 14) Fujita T, Orimo H, Okano K, et al: Clinical application of parathyroid hormone radioimmunoassay. in Clinical aspects of metabolic bone disease. edited by Frame B, Parfitt AM, and Duncan H, excerpta medica, Amsterdam, 274-280, 1972
- 15) 福永仁夫, 土光茂治, 山本逸雄, 他: 高カルシウム血症に於けるカルシウム調節ホルモンの測定について. 第50回日本内分泌学会, 福岡, 1977
- 16) Arnaud CD, Goldsmith RS, Bordier PJ, et al: Influence of immunoheterogeneity of circulating parathyroid hormone on results of radioimmunoassay of serum in man. Am J Med **56**: 785-793, 1974
- 17) Bretone HD, Halushka PV, Alexander RW, et al: Indomethacin-responsive hypercalcemia in a patient with renal-cell adenocarcinoma. N Engl J Med **291**: 83-85, 1974
- 18) Gordan GS, Gantino TJ, Erhardt L, et al: Osteolytic sterol in human breast cancer. Science **151**: 1226-1228, 1966
- 19) Mundy GR, Luben RA, Raisz LG, et al: Bone-resorbing activity in supernatants from lymphoid cell lines. N Engl J Med **290**: 867-871, 1974
- 20) Riggs BL: Postmenopausal and senile osteoporosis: Current concepts of etiology and treatment. in Satellite symposium on aging and metabolic bone disease. XI International congress of gerontology, Kyoto 1978

- 21) Deftos LJ, Roos BA, Knecht GL, et al: Calcitonin secretion. in Endocrinology of calcium metabolism. editted by Cops DH, and Talmage RV, Excerpta media, Amsterdam, 134-142, 1978
- 22) Goldsmith RS, Fursyfen J, Johnson WJ, et al: Etiology of hyperparathyroidism and bone disease during chronic hemodialysis. III. Evaluation of parathyroid suppressibility. *J Clin Invest* **52**: 173-180, 1973
- 23) Fukunaga M, Odori T, Dokoh S, et al: Preoperative localization of hyperfunctioning parathyroid tumors by selective venous catheterization combined with radioimmunoassay using synthetic human amino-terminal (1-34) parathyroid hormone. *Endocrinol Japon* (to be submitted)