

《ノート》

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Fundamental and Clinical Study of RIA-mat PTH Using
Human C-terminal (65-84) PTH

福永 仁夫*	中島 言子*	森田 陸司*	高坂 唯子*
日野 恵*	滋野 長平*	鳥塚 莞爾**	岩元 則幸**
小野 利彦*			

Masao FUKUNAGA, Kotoko NAKAJIMA, Rikushi MORITA, Tadako KOSAKA,
Megumu HINO, Chohei SHIGENO, Kanji TORIZUKA, Noriyuki IWAMOTO*
and Toshihiko ONO*

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

**Department of Urology, Kyoto First Red Cross Hospital*

I. はじめに

近年, カルシウム (Ca) 代謝に関する研究の進歩は著しく, Ca 代謝異常を呈する疾患の病態解明には副甲状腺ホルモン (PTH), カルチトニン, ビタミン D などの Ca 調節ホルモンの測定が必須のものとなった. というのは, これら Ca 調節ホルモンは相互に複雑に関与し, 血中 Ca 濃度を微妙にコントロールしているためである.

副甲状腺から分泌された PTH は, 血中では intact な (1~84) PTH の他に, 生物学的活性をもった N 末端フラグメントや不活性な C 末端フラグメントが存在する¹⁾. したがって, 血中に存する PTH は免疫学的に多様性を示すので, radioimmunoassay (RIA) で測定する場合には, 用いる抗

体の特性により, 異った PTH 値を示すことがある. PTH の RIA の第 1 の問題点は, この血中 PTH の immunological heterogeneity であり, 第 2 はヒトの (1~84) PTH の合成が現在のところ不可能であるので, ウシやブタの PTH を使用した系で, ヒト血中の PTH 濃度を測定していることである²⁾.

今回, 著者らはヒト C 末端 (65~84) PTH を tracer およびスタンダードに使用した RIA kit (RIA-mat PTH, Byk-Mall inckrodt 社) 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ったので, 報告する.

II. 測定方法および検討対象

1. kit の内容

スタンダードのヒト (65~84) PTH 濃度は, ヒト (1~84) PTH 等価として表示されている. スタンダードは, 10 ng/ml を溶媒 (0.4% BSA, 0.1 M

Key words: Parathyroid Hormone, Radioimmunoassay, Human Carboxyl Terminal PTH, PTH Fragment, Immunoheterogeneity.

* 京大放射線・核医学科

** 京都第一赤病院泌尿器科

受付: 56 年 7 月 14 日

最終稿受付: 56 年 12 月 2 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核医学科

福永 仁 夫

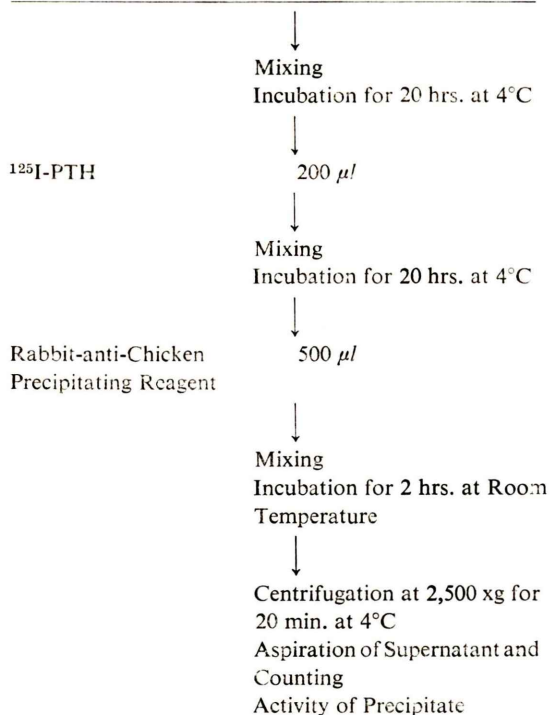
borate buffer, pH 8.4) にて倍々希釈し, 5, 2.5, 1.25, 0.62, 0.31, 0.15 ng/ml の濃度にして使用した. tracer は, ^{125}I -ヒト tyr-(65~84) PTH を用い, 抗体は, intact bovine PTH で免疫して得られた chicken 抗血清を使用した. 第2抗体としては, rabbit anti-chicken precipitating complex を用いた.

2. 測定方法

RIA-mat PTH の測定方法を Table 1 に示す. スタンダードまたは患者血清 100 μl に, 抗体 200 μl を加え, 混和後 4°C, 20 時間にて incubate した. なお, 比特異性の結合を評価するために, 溶媒のみ 300 μl を加えたチューブを同様に incubate した. その後, tracer 200 μl を加え, さらに 4°C, 20 時間 incubate した. 次いで, 第2抗体 500 μl

Table 1 Protocol for Human (65~84) PTH RIA

	Standards or Sample	Non-specific Binding
Diluent	0 μl	300 μl
Standard or Sample	100	0
PTH Antibody	200	0



を加え, 混和後, 室温で 2 時間 incubate した. B/F の分離は, 4°C, 20 分間, 2,500 g にて遠心後行った. 上清を吸引後, 沈渣部分のカウントを測定した.

III. 結 果

1. 基礎的検討

1) 標準曲線および感度

Fig. 1 に代表的な標準曲線を示す.

PTH 濃度 0.16 ng/ml での B/Bo (%) は, $97 \pm 1\%$ を示し, 0 ng/ml のそれとは統計学的に有意に異なるので, この点 (0.16 ng/ml) を最小検出感度とした. したがって, 本 kit では, 0.16~10 ng/ml の範囲で血中 PTH の測定が可能であった. また, non-specific binding は 0.94% を示した.

2) 特異性の検討

Fig. 2 は, PTH の種々のフラグメントを用いた RIA-mat PTH の specific study を示す. ヒト (65~84) PTH の標準曲線とヒト (53~84) PTH お

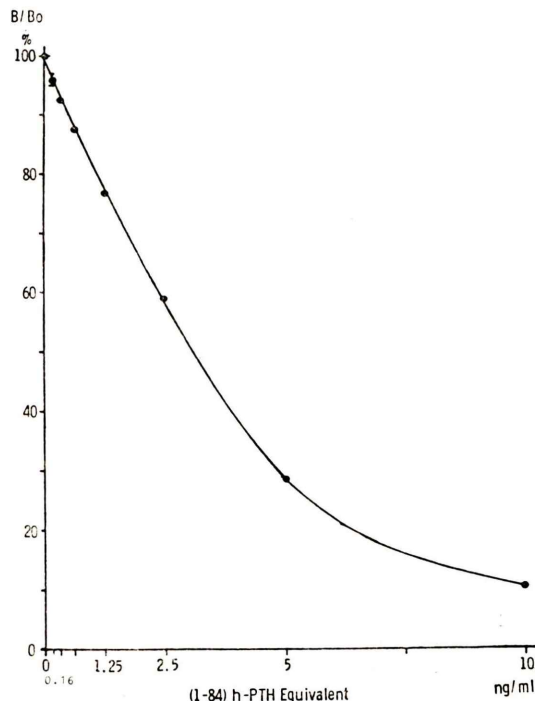


Fig. 1 Standard curve and assay sensitivity.

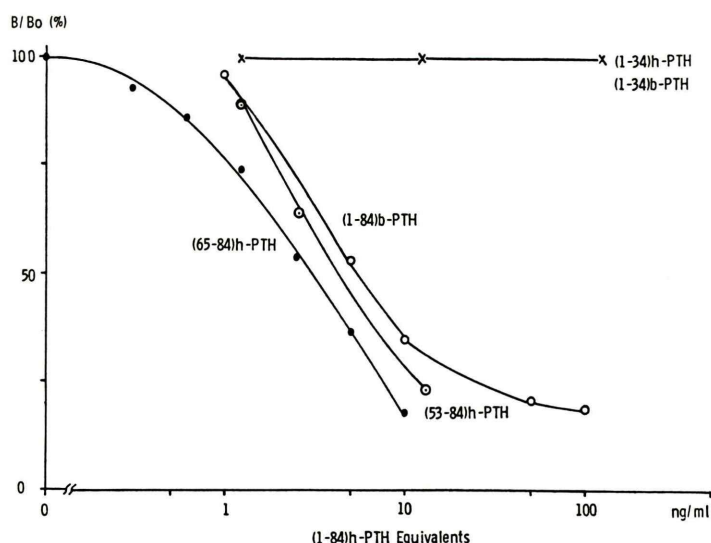


Fig. 2 Specific study using (1-84) b-PTH, (53-84) h-PTH, (1-34) h-PTH and (1-34) b-PTH.

よびウシ (1~84) PTH の稀釈曲線とは平行し, 50% inhibition の検討では, それぞれ 72 および 56% の交叉を認めた. 一方, ヒト (1~34) PTH およびウシ (1~34) PTH とは, 100 ng/ml の濃度でも交叉反応は観察されなかった.

3) precision

Table 2 は, intra および inter-assay の precision を示す. intra-assay での CV は, 低濃度検体では 10.9%, 高濃度検体では 3.6% であった. 一方, inter-assay での CV は, 低濃度検体では 19.0%, 高濃度検体では 8.0% であった.

4) accuracy

i) recovery test

Fig. 3 は, recovery test の結果を示す. 慢性腎不全, 原発性副甲状腺機能亢進症検体共に, 5 ng/ml 以下の PTH 濃度では, 実測値と理論値は良好な一致を示した. しかし, 5 ng/ml 以上の濃度では, 実測値の方が理論値より高値であった.

ii) dilution test

Fig. 4 は, dilution test の成績を示す. 慢性腎不全検体では, 5 ng/ml 以下の PTH 濃度で良好な直線性を示した. 一方, 1.8 ng/ml の basal PTH 濃度を示した原発性副甲状腺機能亢進症では, 32

Table 2 Precision study

Intra-assay		
No.	Mean \pm S.D. (ng/ml)	C.V. (%)
6	0.23 \pm 0.025	10.9
6	3.02 \pm 0.11	3.6
Inter-assay		
No.	Mean \pm S.D. (ng/ml)	C.V. (%)
6	0.30 \pm 0.057	19.0
6	3.62 \pm 0.29	8.0

倍稀釈まで十分な直線性が観察された.

5) PTH「栄研」測定 kit による PTH 濃度との相関性

RIA-mat PTH による測定値 (x) と PTH「栄研」による測定値 (y) との相関関係を Fig. 5 に示す. $y = 0.417x + 0.150$ なる関係が得られ, また相関係数 $r = 0.90$ と良好な正相関が認められた.

2. 臨床的検討

1) 正常値

20~30歳20例のの正常 PTH 濃度は, 0.25 ± 0.15 ng/ml であった.

2) 各種 Ca 代謝異常疾患における PTH 濃度

Fig. 6 は, 各種 Ca 代謝異常疾患における PTH 濃度を示す. 原発性副甲状腺機能亢進症 14 例の

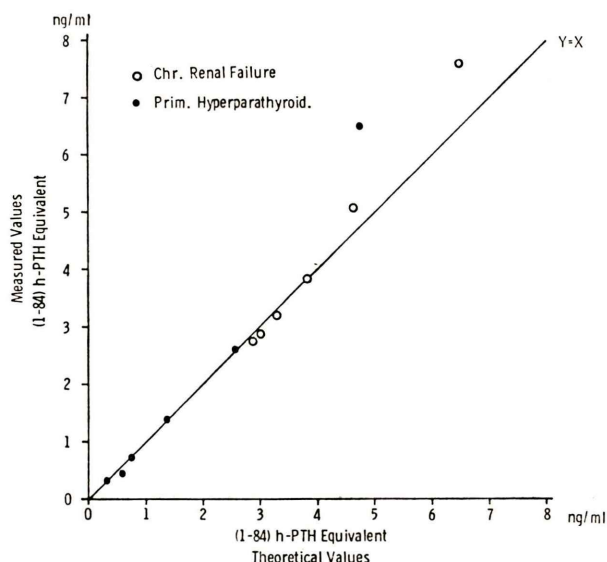


Fig. 3 Recovery test.

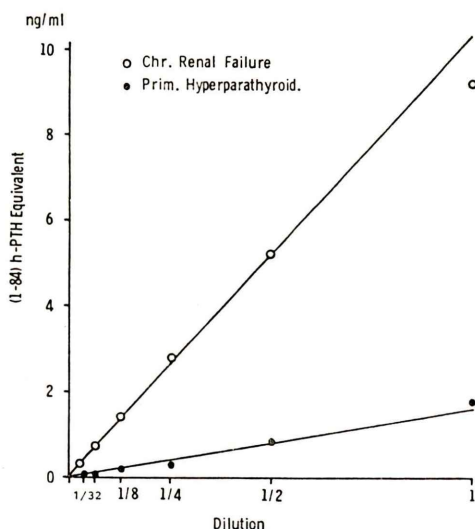


Fig. 4 Dilution test.

うち腎結石型 1 例を除き、全て高値であった。特発性副甲状腺機能低下症では 4 例全例が、悪性腫瘍による高 Ca 血症では 4 例中 3 例が PTH の低値を示した。慢性腎不全では 7 例全例が極めて高値を呈した。骨軟化症 3 例のうち 2 例と腎・尿路

結石のうち 2 例が、PTH の高値を示した。骨粗鬆症 2 例では正常値であった。

3) parathyroidectomy 前後の PTH 濃度の変動

Fig. 7 は、renal osteodystrophy を合併した慢性腎不全例の parathyroidectomy 前後の PTH 濃度の変動を示す。parathyroidectomy の不成功例の 2 例では、術後 1 週間目でも PTH 濃度の低下が観察されなかった。一方、成功例の 3 例では、術後 1 週間目に有意の低下を認めた。

4) 原発性副甲状腺機能亢進症患者における甲状腺静脈血中の PTH 濃度

頸部静脈血中の PTH 濃度の成績を Fig. 8 に示す。右鎖骨下静脈血中では 2.0 ng/ml、右下甲状腺静脈血中では 1.6 ng/ml の PTH 濃度を示し、他の部位よりやや高値であり、右下副甲状腺腫瘍と診断された。手術により同部に 2 g の腺腫が確認された。

5) EDTA 負荷試験

EDTA 負荷時の血中 PTH 濃度の変動を Fig. 9 に示す。RIA-mat PTH により測定された PTHの方が、PTH「榮研」kit により測定された PTHより、強く反応することが観察された。

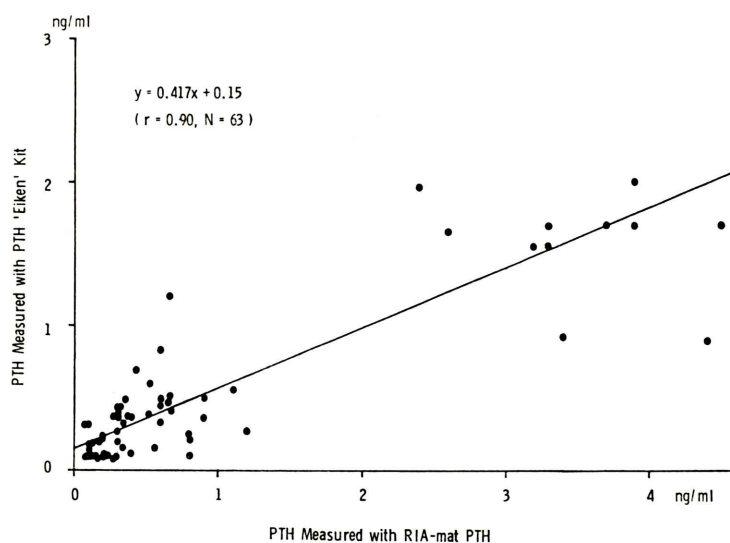


Fig. 5 Relationship between PTH value measured with RIA-mat PTH and PTH value measured with PTH 'Eiken' kit.

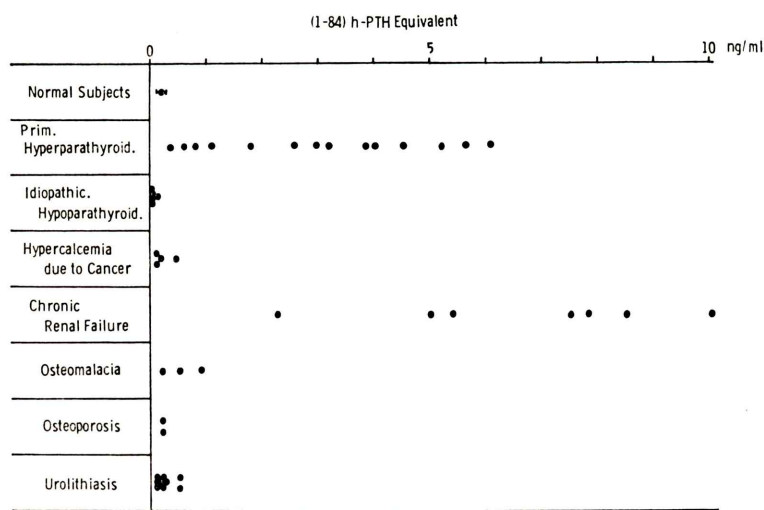


Fig. 6 Serum PTH concentration in normal subjects and patients with various disorders of deranged Ca metabolism.

IV. 考 案

PTH の RIA は、従来より種々の問題点が指摘されている。その第 1 は、血中には PTH の免疫学的な多様性が存在することである。つまり、完

全な (1~84) PTH の他に、(1~34) の N 末端 PTH、(35~84) の C 末端 PTH、(17~39)、(48~63)、(65~78) などの種々のサイズの PTH フラグメントが血中に存在している¹⁾。

したがって、使用する抗体の特性の違いにより、

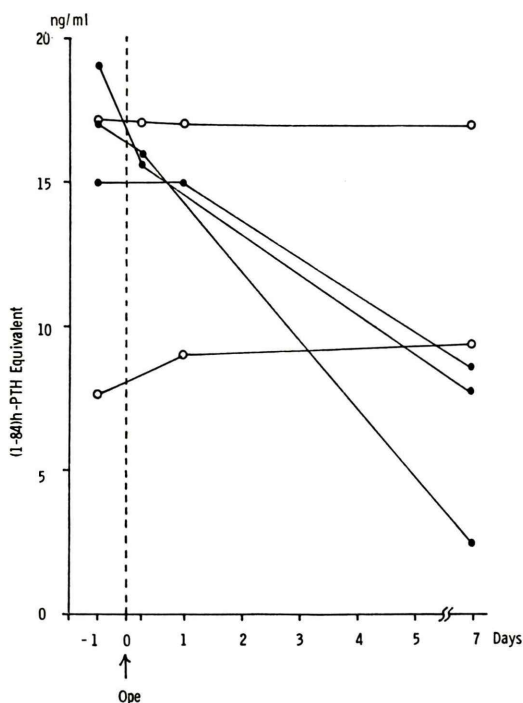


Fig. 7 Time course of serum PTH levels in chronic renal failure with renal osteodystrophy before and after parathyroidectomy.

Closed circle: successful case

Open circle: unsuccessful case

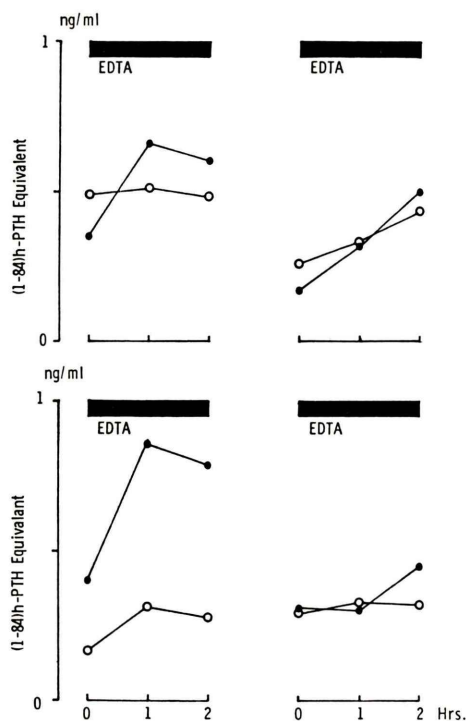


Fig. 9 Changes in serum PTH levels in EDTA infusion test.

Closed circle: PTH value measured with RIA-mat PTH

Open circle: PTH value measured with PTH 'Eiken' kit

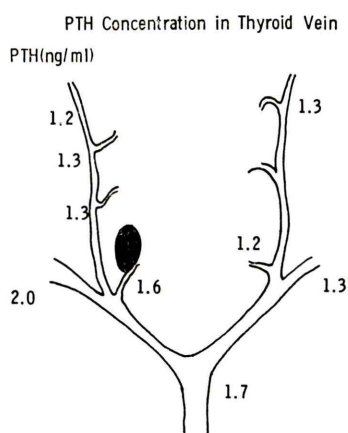


Fig. 8 PTH concentration in selective thyroid venous sampling in a patient with right lower parathyroid adenoma.

血中 PTH は異なる値をとり, assay 系が異なれば, 各研究室間の相互の比較が困難となる. 第2の問題点としては, ヒト (1~84) PTH の完全な合成が未だ不可能なため, スタンダードや tracer にウシやブタの高度精製 PTH を用い, それらで作成した抗体の交叉反応性を利用し, ヒト血中 PTH の測定を行っていることである⁴⁾. 現在まで, ヒト PTH の全アミノ酸構造は決定され, N 末端のヒト (1~34) PTH や C 末端のヒト (53~84) PTH を用いた RIA 系が開発されている^{5,6)}. 今回, 著者らは, (53~84) PTH よりも C 末端により近いフラグメントである, ヒト (65~84) PTH を標準および tracer として使用した RIA kit, RIA-mat PTH の基礎的および臨床的有用性を検討した.

RIA-mat PTH は, 最小検出感度は 0.16 ng/ml

であり, 10 ng/ml までの範囲で血中 PTH の測定が可能であった. この成績は, 従来の PTH 測定 kit と同等以上であった³⁾. 本 kit はウシおよびヒト (1~34) PTH とは全く交叉反応を示さず, ヒト (53~84) PTH およびウシ (1~84) PTH と, おおの 72, 56% の交叉反応性を認め, C 末端に特異的な系であることが示された. precision に関しては, 低濃度での intra, inter-assay の C. V. は, それぞれ 10.9, 19.0% とやや大であったが, 高濃度では 10% 以下であり, ほぼ満足される結果が得られた. accuracy の点では, recovery test, dilution test 共に, 5 ng/ml 以下の濃度で良好な成績が示された. しかし, 5 ng/ml 以上の検体, 特に慢性腎不全症の血清では希釈して測定することが必要であった. PTH「栄研」kit による PTH 測定値は RIA-mat PTH による測定値の約 40% を示した. また, 両者の間には $r=0.90$ と有意の正相関が認められた.

正常者の PTH 濃度は, 0.25 ± 0.15 ng/ml を示し, 比較的狭い範囲に分布した. 原発性副甲状腺機能亢進症の 14 例中 13 例が, PTH 濃度の高値を示し, 診断に極めて有用であることが示された. 特発性副甲状腺機能低下症では, PTH 分泌欠乏を反映して, 全例 PTH 低値を呈した. 慢性腎不全では, PTH 濃度は著明に高値であった, この原因としては二次性甲状腺機能亢進症の存在の他に, PTH の腎での代謝障害が考えられた. つまり, 副甲状腺から分泌された intact な PTH は, 肝で生物学的活性をもつ N 末端 PTH と生物学的活性のない C 末端 PTH とに切断され, C 末端 PTH は腎尿細管から排泄される⁷⁾. ところが, 腎障害時には, C 末端 PTH は排泄されずに, 血中に長く滞まる. この不活性なフラグメントは, RIA-mat PTH で強く検出されるためと考えられた.

PTH RIA kit を臨床的に評価する基準の一つとしては, 正常者と PTH 過剰または欠乏者を明確に区別できるか否かである. RIA-mat PTH は, 各種疾患の血中 PTH 濃度の成績から, この基準は十分満足することが示された. この点, 従来のキットよりも優れているが, renal osteodystrophy

を合併した慢性腎不全での parathyroidectomy 後の血中 PTH 濃度の変動は, 手術成功例では術後 3 時間 ~ 1 日では明らかでなく, 1 週間目に有意の PTH 濃度の低下が観察された. これは, 腎障害のない原発性副甲状腺機能亢進症での parathyroidectomy 後の C 末端 PTH の動きとは異なる. 腎障害のない場合の血中 C 末端 PTH の正常化は数時間と報告されているのに比して, 腎障害時は明らかに延長しており, 腎障害の際には C 末端の評価には十分注意することが必要と思われる⁸⁾.

原発性副甲状腺機能亢進症例の術前の副甲状腺腫瘍の局在診断として, 選択的に得られた甲状腺静脈血中の PTH 濃度の測定を行った. 右下副甲状腺腺腫が手術により確認されたが, 右下甲状腺または右鎖骨下静脈の PTH 濃度は, 他の部位に比して, 1.2~1.7 倍に過ぎず, 明らかな有用性は認められなかった.

PTH 分泌刺激試験として広く施行されている EDTA 負荷試験では, RIA-mat PTH にて測定された PTH が, ウシ PTH を用いた系よりも, 低 Ca 血刺激に対し, 強く反応することが認められた. したがって, 機能検査としては, RIA-mat PTH での測定が有用であると思われる.

上記のように, RIA-mat PTH による血中 PTH 濃度の測定は, 基礎的検討でほぼ満足される成績が得られ, 臨床的検討でも十分有用な情報が与えられることが認められたので, 今後広く使用されるべき kit と思われる.

V. 結 論

ヒト (65~84) PTH を使用した, RIA-mat PTH を用い, 基礎的および臨床的検討を行った.

最小検出感度は 0.16 ng/ml であり, C 末端に特異的な系であることが認められた. precision, accuracy 共に, ほぼ満足される結果が得られ, PTH「栄研」kit との相関性では, $y=0.417x+0.150$, $r=0.90$ なる関係が認められた. 正常値は 0.25 ± 0.15 ng/ml を示し, 原発性副甲状腺機能亢進症では 14 例中 13 例が, 慢性腎不全では 7 例全例が

PTH 高値を示した。一方、特発性副甲状腺機能低下症では 4 例全例が PTH 低値であった。慢性腎不全で renal osteodystrophy を合併し、parathyroidectomy が施行された 5 例のうち、手術の成功した 3 例では、術後 1 週間目に PTH 濃度の有意の低下を認めた。原発性副甲状腺機能亢進症で、術前の副甲状腺腫瘍の局在診断のために、選択的に得られた甲状腺静脈血中の PTH 濃度測定では、腺腫部と非腺腫部の PTH 濃度到大差がなく、余り有用ではなかった。EDTA 負荷による PTH 分泌状態の観察には、本 kit による PTH 濃度の測定が鋭敏であることが示された。

以上のように、RIA-mat PTH は、基礎的および臨床的検討から、十分に有用性が認められ、今後広く使用されることが期待される。

RIA-mat PTH の御提供を戴いた第一ラジオアイソトープ研究所に感謝致します。

文 献

- 1) 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**: 786-793, 1974
- 2) Deftos LJ: Parathyroid hormone. In methods of hormone radioimmunoassay. edited by Jaffe BM, and Behrman HR, Academic Press, New York, 1974
- 3) 福永仁夫, 森田陸司, 高坂唯子, 他: PTH ‘榮研’の基礎的および臨床的検討. *核医学* **17**: 59-67, 1980
- 4) Berson SA, Yalow RS, Aurbach GD, et al: Immunoassay of bovine and human parathyroid hormone. *Proc Nat Acad Sci (USA)* **49**: 613-617, 1963
- 5) Papapoulos SE, Manning RM, Hendy GN, et al: Studies of circulating parathyroid hormone in man using a homologous amino-terminal specific immunoradiometric assay. *Clin Endocrinol* **13**: 57-67, 1980
- 6) Hendy GN, Manning RM, Rosenblatt M, et al: Immunological properties of synthetic human parathyroid hormone 53-84 fragment. *J Endocrinol* **80**: 153-155, 1979
- 7) Martin KJ, Hruska KA, Freitag JJ, et al: The peripheral metabolism of parathyroid hormone. *N Engl J Med* **301**: 1092-1098, 1979
- 8) 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