

《ノート》

ヒトカルシトニン RIA キット [第一] の基礎的、臨床的検討

Evaluation of Radioimmunoassay Kit (Daiichi) for Determination of human Calcitonin.

福江 晴* 空閑 好秋* 岡野 繁* 金地 嘉夫*
長瀨 重信**

You FUKUE*, Yoshiaki KUGA*, Shigeru OKANO*, Yoshio KANAJI*,
and Shigenobu NAGATAKI**

*Kanaji Hospital

**First Dept. of Medicine, Faculty of Medicine, University of Nagasaki.

I. はじめに

高感度のヒトカルシトニン(CT)のラジオイムノアッセイ法(R.I.A.)の開発により、甲状腺癌の術前診断および治療後の経過観察が容易になった。また本症は散在性のほか家族性の発症が多い¹⁾ため、CT測定の普及はこれらの早期発見にも有用と考えられる。今回第一ラジオアイソトープ研究所の開発によるヒトCTのRIAキットを入手する機会を得て、金地病院における甲状腺外来および入院患者419例、健常者14例について、臨床応用を試み、また同キットの基礎的検討を行ったのでその成績を報告する。

II. 基礎的検討

1. 材料と方法

使用した試薬はカルシトニンキット[第一]であり、その内容は次の如くである。

* 金地病院

** 長崎大学医学部第一内科

受付: 56年10月21日

最終稿受付: 57年3月8日

別刷請求先: 東京都北区中里1-5-6 (番号114)

金地病院

福江 晴

標準カルシトニン 1バイアル

(ヒトカルシトニン 6400 pg)

カルシトニン抗血清 1バイアル

¹²⁵I-カルシトニン 1バイアル

リン酸緩衝液 1バイアル

家兎γ-グロブリン抗血清 1バイアル

(第二抗体)

これらの試薬を Table 1 の如く操作した。測定はすべて二重測定で行った。

2. 結 果

(1) 標準曲線と感度

代表的標準曲線は Fig. 1 の如くであり、その測定範囲は25~6,400 pg/ml であった。

(2) 再現性試験

異なる測定間の再現性に関して、正常人プール血清および腫瘍患者プール血清を使用して、5回測定を行い検討した。結果は Table 2 の如くであり、正常人プール血清, $50.2 \pm 10.8 \text{ pg/ml}$ (Mean \pm S. D.), 患者血清 $710 \pm 51 \text{ pg/ml}$ (Mean \pm S. D.) であった。また同一測定内再現性については3例のCT高値腫瘍患者血清を使用し、それぞれ多重

Key words: Calcitonin, Thyroid, Medullary carcinoma of the thyroid, C-cell, Radioimmunoassay.

Table 1 Assay Procedure

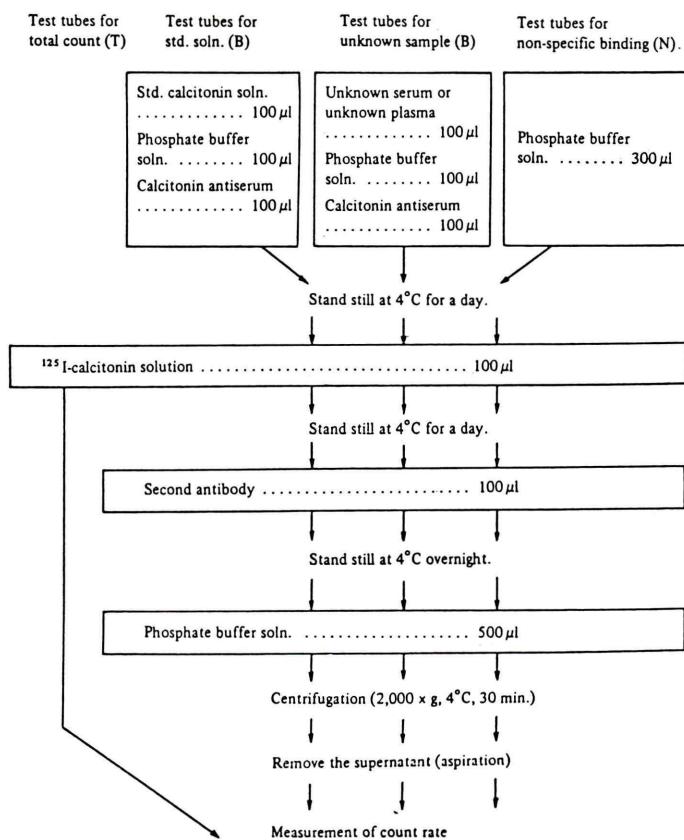


Table 2 Inter-assay reproducibility

* pooled serum from patients with medullary carcinoma					
No.	1	2	3	4	5
CT(pg/ml)	790	710	671	661	720
mean±S.D.	710±51 pg/ml	(C.V. 7.2%)			

* pooled normal serum					
No.	1	2	3	4	5
CT(pg/ml)	46.9	67.1	37.9	46.7	52.5
mean±S.D.	50.2±10.8 pg/ml	(C.V. 21.5%)			

測定を行った。結果は Table 3 の如く、No. 1 749 ± 48.4 、No. 2 551 ± 31.1 、No. 3 720 ± 68.3 pg/ml (Mean±S. D.) であり、C. V. (%) はそれぞれ、6.5, 5.6, 9.5 であった。

(3) 回収率試験

2 例の正常人血清 (CT 値 75 pg/ml および 42 pg/

Table 3 Intra-assay reproducibility

	No. 1	No. 2	No. 3	(pg/ml)
mean	790	504	730	
S.D.	790	546	760	
C.V. (%)	790	536	650	
	770	549	610	
	680	590	760	
	770	580		
	730			
	760			
	650			
	760			
mean	749	551	720	
S.D.	48.4	31.1	68.3	
C.V. (%)	6.5	5.6	9.5	

ml) に対して標準ヒトカルシトニン溶液、0, 100, 200, 400, 800, 1,600, および 3,200 pg/ml を、1:1

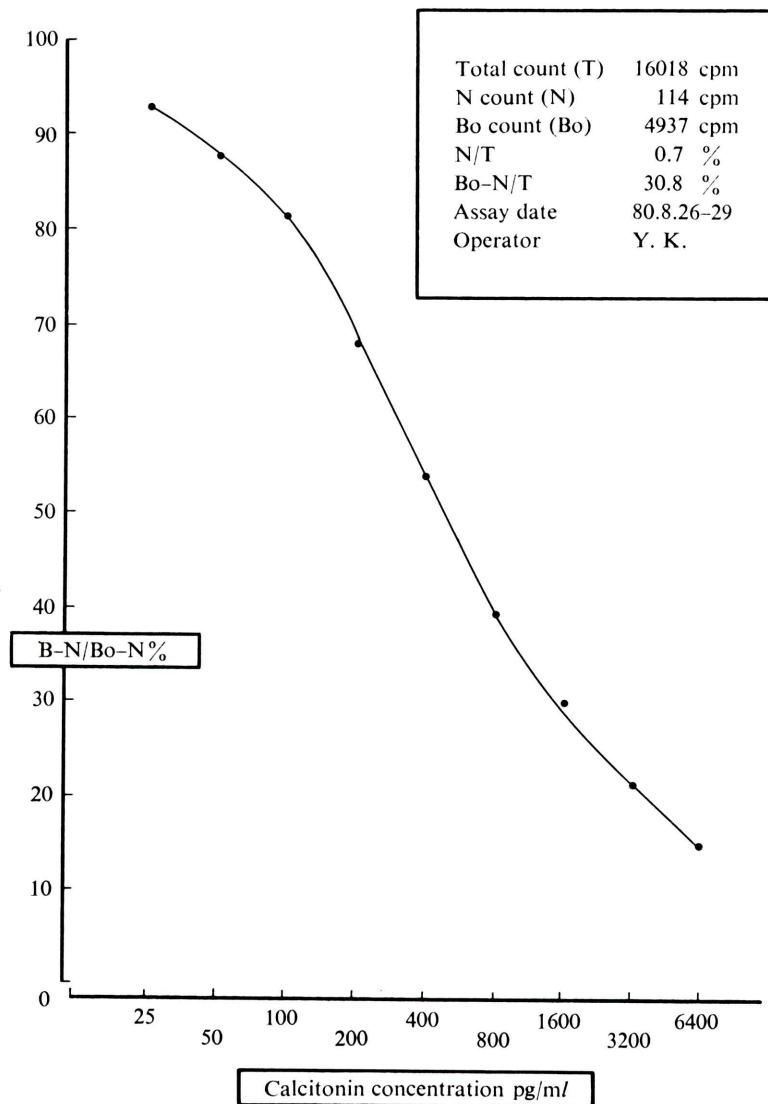


Fig. 1 Standard curve.

の割合に混和し回収率を検討した。結果は、Table 4 の如く、98.6% および 91.8% であった。

(4) 希釈試験

甲状腺髓様癌患者 3 例の血清を使用し、キット添付バッファーにて、それぞれ倍数希釈して測定した。結果は、Fig. 2 の如く、いずれも標準曲線と良好な平行性を示した。

(5) 血清と血漿による測定値の比較

高 CT 値の髓様癌患者の血清と血漿を使用して測定値間の差の有無をしらべた。

血清 $\bar{x} = 76.5 \pm S. D. 42.7$

血漿 $\bar{x} = 70.2 \pm S. D. 68.3$ が測定され、血漿を使用した場合、やや低値であった。

(6) 検体の保存と測定値

正常者および髓様癌患者血清を、室温で、72 時

Table 4 Recovery

	CT added (pg/ml)	CT measured (pg/ml)	Recovery (%)
Sample 1	0	32.5	—
	100	145.2	112.7
	200	213.8	90.7
	400	393.1	90.2
	800	836.6	100.5
	1600	1645.9	100.8
	3200	3132.6	96.9
mean			98.6%
Sample 2	0	21.0	—
	100	113.4	92.4
	200	192.8	85.9
	400	386.3	92.0
	800	801.2	97.5
	1600	1354.7	83.4
	3200	3199.0	99.3
mean			91.8%

Table 5 Stability of h-CT in serum

* h-CT 800 pg/ml plus Normal serum (1:1)		
0 min.	No. 1	No. 1** (% of initial value)
0 min.	100%	100%
30 min.	90.7	106.9
1 hr.	102.8	93.6
4 hr.	99.2	97.8
24 hr.	86.5	90.5
72 hr.	65.2	95.9
* h-CT 800 pg/ml plus serum with high CT concentration		
	No. 2	No. 2** (% of initial value)
0 min.	100%	100%
30 min.	112.1	90.0
1 hr.	111.1	102.1
4 hr.	107.7	100.9
4 hr.	107.7	100.9
24 hr.	89.0	89.5
72 hr.	74.3	90.3

** inactivation to sample

間まで放置した場合の測定値の変化の有無をしらべた。それぞれの血清に、標準ヒト CT 800 pg/ml 溶液を 1:1 (V/V) の割合で添加し、6 分割して 0, 30 min, 1 hr, 4hr, 24hr, 72 hr, 放置後、それぞれ冷凍保存し、後に同時測定した。結果は Table 5 の如くで、24hr および 72hr では、測定値が低下することが示された。しかし血清を 56°C 30 分間非効化した検体では、測定値の低下率は非常に少なかった。

III. 臨床的検討 (Fig. 3)

(1) 正常者

当院職員を含む健常成人14例での朝食前採血による血清 CT 値は、測定感度 25 pg/ml 以下のもの 6 例で、他の 8 例は 26.4~70.0 pg/ml の範囲に分布し、測定感度以下を 25 pg/ml として算出した平均値は、 40.5 ± 18.2 pg/ml (Mean \pm S. D) であった。

(2) 良性甲状腺腫患者

病理組織学的に良性腫瘍と判定された papillary adenoma 32 例、follicular adenoma 50 例、adenomatous goiter 50 例および臨床的に良性と考えられる結節性甲状腺腫90例の、計 222 例では、測定

感度以下が74例で、ほかの148例は 25~125 pg/ml の範囲に分布し、平均は 42.1 ± 24.3 pg/ml であった。

(3) 悪性甲状腺腫患者

(a) papillary adenocarcinoma 69 例については測定感度以下は46例で、残りの23 例は 25~116 pg/ml の範囲に分布し、平均は 43.7 ± 18.9 pg/ml であった。

(b) follicular adenocarcinoma 29例については、測定感度以下、18 例、残りの11例では、29.2~100.7 pg/ml に分布し、平均 35 ± 19.9 pg/ml であった。

(c) 未分化癌患者12例では、感度以下 6 例、他の 6 例で、 $41.5 \sim 308.5$ pg/ml、平均 84.1 ± 84.2 pg/ml であった。

(d) 臨床的に甲状腺腫が、硬くかつ不整で可動性も乏しく、リンパ節転移もふれるため、悪性と診断され、手術予定の患者17例に関しては、測定感度以下12例、残りの 5 例は、31.0~52.4 pg/ml、 40.9 ± 7.1 pg/ml、平均であった。

(e) バセドウ病患者 26 例では、1 例で 75.7 pg/ml であった他は測定感度以下であった。

(f) 橋本病患者33例では、23例が測定感度以下で、残りの10例が、25~88.5 pg/ml、平均 $33.3 \pm$

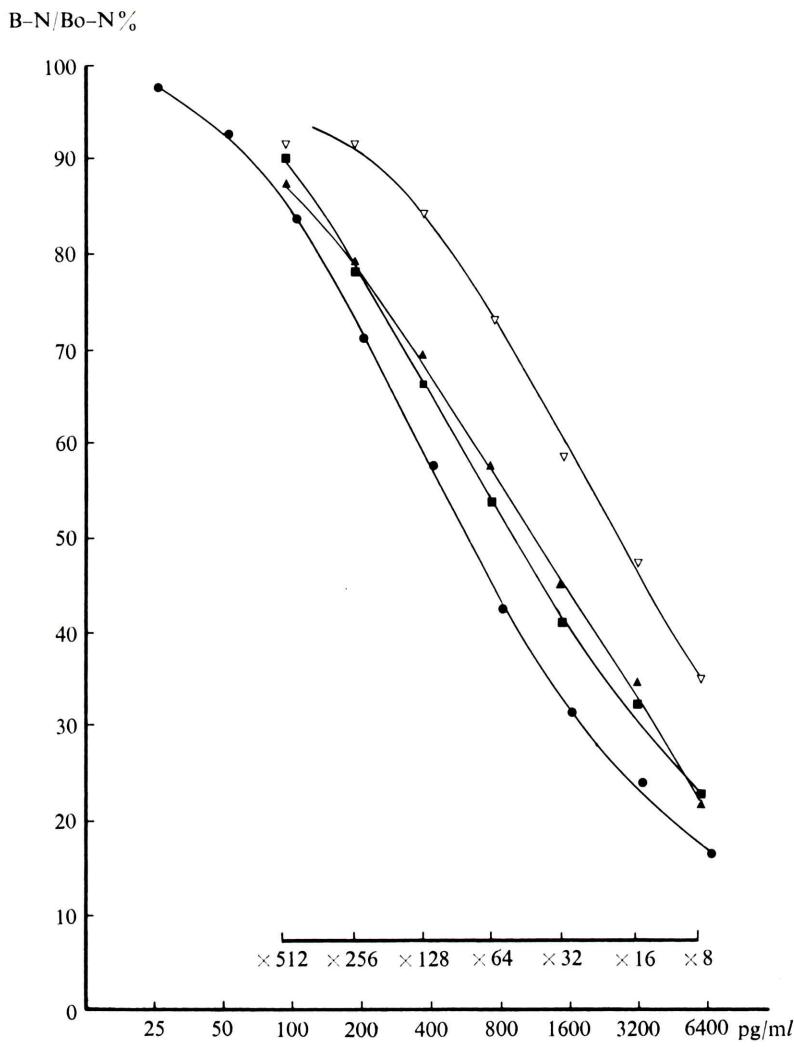


Fig. 2 Dilution Curve.

16.6 pg/ml であった。

(g) 甲状腺髓様癌患者 5 例では、全例異常高値で、1,100, 1,421, 1,858, 2,300, 75,340 pg/ml であった。

(h) その他の甲状腺疾患患者では、粘液水腫 3 例、副甲状腺癌 1 例、同 adenoma 1 例、および亜急性甲状腺炎 1 例の計 6 例を測定した。粘液水腫 1 例で 40 pg/ml であったほかは、すべて測定感度以下であった。

IV. 考 察

甲状腺髓様癌はカルシトニン産生細胞である C- 細胞由来であり、血中カルシトニンの上昇がその特徴である。このため、本症を術前に速やかにかつ正確に診断し、また治療後の観察を適正に行うためには、血中カルシトニン濃度を測定することが重要である。われわれの施設での甲状腺外来および入院患者 419 例のうちで甲状腺髓様癌患者は 5 例であり、いずれも血清 CT 濃度は著しく

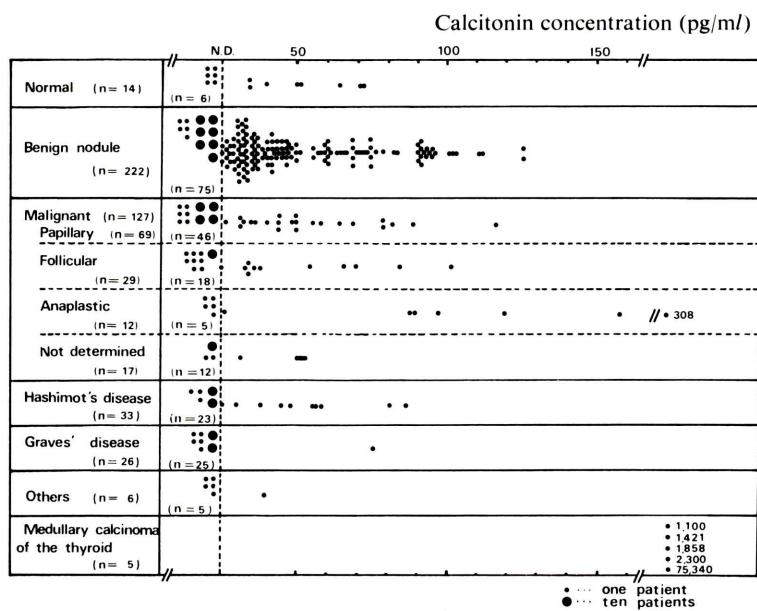


Fig. 3 Serum calcitonin levels in various thyroid diseases.

Table 6 Summary of CT concentrations in normal serum or plasma

Reporter	Source	Sample number	N.D.	Concentration (pg/ml)	Mean
Tashjian (1970)	(3)	58	0.	20-40	—
Melvin (1972)	(4)	140	in 50% in all	<100 <380	—
Samaan (1973)	(5)	12	—	—	270+240 2SD
Sizemore (1973)	(6)	16	—	65-393	—
Tashjian (1974)	(7)	2000	— in 75%<100 in all <250	— in 75%<100 in all <250	—
Silva (1974)	(8)	50	—	63-450	182
Heynen (1974)	(9)	166	103	10-580	108
Gautvik (1976)	(10)	250	in 15%	50-450	230
Adachi (1976)	(11)	50	—	<50	—
Parthemore (1978)	(12)	55	in 10%	<10-75	2418 SD + 2 SE
Emmertsen (1980)	(13)	8	5	<100	—

高値で、1,100～75,340 pg/ml に分布した (Fig. 3)。本邦における甲状腺髓様癌の広範な調査研究²⁾によれば、本症の sporadic 群には、核出術のみで根治をみるような悪性度の低いものがある一方術後早期に死亡する悪性度の高い症例もみられており、familial 群で、一侧葉のみの手術では、術後全例で残存甲状腺に再発がみられている。われわれの

経験でも、本症の治療には、甲状腺全摘術が必要と考えられる例が多く、癌周囲の正常甲状腺を含め十分広範囲の切除を行っても、術後 CT 値が低下しないことがあり、腺癌に比して再発が多い印象を受ける。また本症では、周囲への発着が少ないと認め術前および術中の悪性癌の臨床診断は困難の症例が多い。また術後の組織診断において、未

分化癌、悪性リンパ腫および橋本病との鑑別が難しいことがあり、現に未分化癌と診断され、血清カルシトニン高値により見直された症例もあった。さらに、軟X線撮影所見で特徴的な小斑点石灰化像を認める症例のほかは見逃す危険があることも指摘されている²⁾。以上の、本症の術前診断の困難さは、本症122例中で、術前に髓様癌と診断された症例は1/4であり、なかでも sporadic 群では約1割であったという報告²⁾をみてもうなづけるところである。本症の治療には、腺癌とは異なる手術式が必要でもあり、術前診断が強く求められる所以である。同研究²⁾の術前診断率を示す数字は、血中 CT 値を測定できなかった頃の症例が多く含まれているものであるが、今後は感度のよい血中 CT 値測定用 RIA の普及により、家族調査を含め、適正なるスクリーニングが行われることで、本症の早期発見の機会が増すことが期待される。血清 CT の正常値については、われわれの結果は Fig. 3 の如く平均 40.5 ± 18.2 、レンヂ $<25\sim70\text{pg}/\text{ml}$ であった。諸家の報告^{3~13)}を表にまとめたが、相当の変動がみられる。これは、使用抗血清や標準 CT の差によると考えられるが、CT の heterogeneity の影響の可能性も否定できない。日内変動に関しては Hillyard (1977)¹⁴⁾らは、正午前後に $100\text{pg}/\text{ml}$ を越えないピークが存在し、この変動は必ずしも食事摂取に伴うものでないことを報告している。性差については、男性平均、 $49\text{pg}/\text{ml}$ 、レンヂ $<25\sim73\text{pg}/\text{ml}$ 、女性平均 $31\text{pg}/\text{ml}$ 、レンヂ $<25\sim51\text{pg}/\text{ml}$ で、有意に ($p<0.001$) 男性の CT 基礎値の高いことを、Hunter Heath III ら (1977)¹⁵⁾ が報告している。また年齢の影響については、生後1時間から60歳までの男女合計342例の検索で、加齢により CT 値の減少がみられたことを、Samaan (1977)¹⁶⁾ が報告している。われわれの正常対照は、朝食前空腹時に採血されたが、数が14例と少なく、また良性腫瘍222例を正常とみなすとしても、これらは外来時の採血が多く、採血条件が一定でない。これらの理由で、性差や年齢別による統計処理は割愛した。しかし正常人14例で、55% 以上が感度内に測定されたことは、Emmertsen

(1980)¹³⁾ らの 65% 感度内検出という結果にはほぼ近いもので良好な成績と評価できる。また再現性、回収率および希釈試験の結果も満足のゆくものであった。安定性の実験では、サンプルの室温放置72時間で、測定値の低下は約30% であったが、 56°C 30分間非効化サンプルでは測定値の低下はきわめて少なかった (Table 5)。またデータは示されていないが、採血後、速やかに -20°C 凍結保存した血清では、6か月後でも安定であった。これらに関連して、Raisz (1972)¹⁷⁾ らは、骨培養系の ^{45}C 放出の抑制率比較による CT-bioassay で、非効化処理による血清中 CT 分解酵素の不活化¹⁸⁾を利用している。また不活化した血清サンプルの保存は、 -20°C で、6か月後でも CT の力価は維持されたことを記載している。われわれの結果とともに血清中 CT 分解に関与する熱に不安定な酵素の存在が示唆される。Deftos (1971)¹⁹⁾ らは、安定性に關し、サンプルの -20°C 以下の保存で少なくとも 6か月安定、一方 24°C では、47時間で 1/2 減少を報告している。これらの報告は、CT 測定のサンプルの、採取後速やかなる凍結保存の必要を示している。最後に、甲状腺未分化癌患者12例の中で、血清 CT 値 $308.5\text{ pg}/\text{ml}$ が測定された症例に関してであるが、最近、再検査およびカルシュウム注入テストを行ったが、CT 値はすべて $100\text{ pg}/\text{ml}$ を越えなかった。また慢性腎不全も否定され、この患者についての先の CT 高値 ($308.5\text{ pg}/\text{ml}$) の原因は現在のところ不明である。

V. 結 語

ヒトカルシトニン (CT) 測定用の第一ラジオアイソトープ研究所製 RIA キットの基礎的および臨床的検討を行った。

- (1) 精度、再現性および回収率はすべて良好であった。
- (2) 標準曲線と甲状腺髓様癌患者 CT 高濃度血清の希釈曲線とは、良好な平行性を示した。
- (3) 測定感度は $25\text{ pg}/\text{ml}$ であり、正常人の 55% 以上が $26.7\sim70.0\text{ pg}/\text{ml}$ の範囲に測定された。
- (4) 甲状腺髓様癌 5 例では、 $1,100\sim75,340\text{ pg}/\text{ml}$

ml の著しい高値が測定された。

(5) 検体は24時間以上室温に放置した場合、測定値の低下傾向が認められたので、測定検体は採取後速やかに冷凍保存することが必要である。

終りに、本キットを提供下さった第一ラジオアイソトープ研究所に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) 安達 勇, 阿部 薫: 甲状腺髓様癌. 日本臨牀 **38**: 163-171, 1980
- 2) 神前五郎, 高井新一郎, 宮内 昭, 他: 本邦における甲状腺髓様癌. 癌の臨床 **24**: 799-812, 1978
- 3) Tashjian AH Jr, Barbara G, Howland BA, et al: Immunoassay of human calcitonin. New Engl J Med **283**: 890-895, 1970
- 4) Melvin KEW, Tashjian AH Jr, Miller HH: Studies in familial (medullary) thyroid carcinoma. Rec Prog Horm Res **28**: 399-470, 1972
- 5) Samaan NA, Stratton Hill C Jr, Beceiro JR, et al: Immunoreactive calcitonin in medullary carcinoma of the thyroid and in maternal and cord serum. J Lab Clin Med **81**: 671-681, 1973
- 6) Sizemore GW, Vay LW Go, Kaplan EL, et al: Relation of calcitonin and gastrin in the Zollinger-Ellison syndrome and medullary carcinoma of the thyroid. New Engl J Med **288**: 641-644, 1973
- 7) Tashjian AH Jr, Wolfe HJ, Voelkel EF: Human calcitonin immunoassay, cytologic localization and studies on medullary thyroid carcinoma. Amer J Med **56**: 840-849, 1974
- 8) Silva OM, Snider RH, Becker KL: Radioimmunoassay of calcitonin in human plasma. Clin Chem **20**: 337-339, 1974
- 9) Heynen G, Franchimont P: Human calcitonin radioimmunoassay in normal and pathological conditions. Europ J Clin Invest **4**: 213-222, 1974
- 10) Gautvik KH, Norman T, Vigdis Teig SO, et al: Radioimmunoassay of human calcitonin from healthy individuals and patients with medullary thyroid carcinoma. Scand J Clin Lab Invest **36**: 323-329, 1976
- 11) Adachi I, Abe K, Tanaka M, et al: Plasma human calcitonin (hCT) levels in normal and pathological conditions, and their responses to short calcium or tetragastrin infusion. Endocrinol Japon **23**: 517-526, 1976
- 12) Parthemore JG, Deftos LJ: Calcitonin secretion in normal human subjects. J Clin Endocrinol Metab **47**: 184-188, 1978
- 13) Emmertsen K, Nielsen HE, Mosekilde L, et al: Pentagastrin, calcium, and whisky stimulated serum calcitonin in medullary carcinoma of the thyroid. Acta Radiol Oncol **19**: 85-89, 1978
- 14) Hillyard CJ, Cooke TJC, Coombes RC, et al: Normal plasma calcitonin circadian variation and response to stimuli. Clin Endocrinol **6**: 291-298, 1977
- 15) Hunter Heath III, Sizemore G: Plasma calcitonin in normal man: differences between men and women. J Clin Invest **60**: 1135-1140, 1977
- 16) Samaan NA, Anderson GD, Adam-Mayne ME: Immunoreactive calcitonin in the mother, neonate, child, and adult. Amer J Obstet Gynecol **121**: 622-625, 1975
- 17) Raisz LG, William YW Au, Simmons H: Calcitonin in human serum: Detection by tissue culture bioassay in medullary carcinoma of the thyroid and other disorders. Arch Intern Med **129**: 889-893, 1972
- 18) Tashjian AH Jr, Voelkel EF: Studies of inactivation of calcitonin by serum. In Talmage, RV, and Berlanger, RF, (eds) Parathyroid Hormone and Thyrocalcitonin. Amsterdam, Excerpta Medica Foundation, 1968, p. 108-118
- 19) Deftos LJ: Immunoassay for human calcitonin. Metabolism **20**: 1122-1128, 1971