

《原 著》

Immunoradiometric assay によるヒト副甲状腺ホルモン-(1-84) の迅速測定法の確立および術中測定法としての応用

高坂 唯子* 滋野 長平* 北村 暢康* 岩元 則幸***
 塩見 一樹* 李 啓充* 曽根 照喜* 菊池 晴揮*
 大田 秀一** 山本 逸雄**** 土光 茂治***** 小西 淳二*

要旨 2-site immunoradiometric assay 法に基づくインタクト PTH 測定法を改良し血中インタクト PTH 濃度を迅速、正確に測定する方法を開発した。反応条件を 37°C 振盪水浴下、反応時間 15 分とすることにより、良好な再現性を得ることができた。迅速測定法の最小検出感度は 27.8 pg/ml であり、広範なホルモン濃度で通常測定法による測定値と良好な正相関を示した ($r^2 = 0.979$, $p < 0.001$)。原発性副甲状腺機能亢進症(単発腺腫、2 例)において、腺腫への血流遮断後インタクト PTH 濃度は急速に低下し、血流遮断後 20 分でのインタクト PTH 濃度は、手術前のホルモン濃度のそれぞれ 10.6%, 13.5% まで減少した。インタクト PTH の迅速測定法を術中アッセイ法として用いることにより、副甲状腺機能亢進症の外科的治療の成否を手術中に判断するうえで有益な情報が得られることが期待される。

I. はじめに

副甲状腺機能亢進症は副甲状腺ホルモン (parathyroid hormone, PTH) の過剰分泌による高カルシウム血症を特徴とする疾患である。臨床症状を有する副甲状腺機能亢進症の治療法の第一選択は過機能副甲状腺の外科的切除を原則とするが、副甲状腺機能亢進症の解剖学的、病理学的および臨床的多様性(過形成、異所性腺や過多腺の存在、再手術例など)のため、症例によっては、治癒せしめるに十分な過機能腺組織を手術中に同定し切除することが困難である場合がある^{1~4)}。そこで、副甲状腺機能亢進症での過機能副甲状腺の外科的切除の成否を手術中に判断することを目的として、

尿中サイクリック AMP 排泄量の術中測定が諸家により提唱されたが^{5~9)}、低い感度と煩雑な手技、特殊な計測装置を必要とすることなどから臨床的に広く用いられるには至っていない。一方、ヒト副甲状腺より分泌される PTH の大部分は 84 個のアミノ酸からなる PTH-(1-84)(インタクト PTH) である¹⁰⁾。インタクト PTH の末梢代謝と副甲状腺からのホルモンフラグメントの分泌のため^{11~13)}、末梢血中には微量のインタクト PTH(10^{-11} M 以下)のほか、大量の C 端 PTH を含む多様な PTH ペプチドが存在する。このうち、インタクト PTH のみが PTH としてのホルモン活性を有すると考えられている¹⁴⁾。近年、Nassbaum ら¹⁴⁾により immunoradiometric assay (IRMA)¹⁵⁾ の測定原理に基づき、感度、特異性、簡便性に優れたインタクト PTH 測定法が開発された。インタクト PTH の血中半減期は著しく短い(5 分以下)ことから、末梢血中インタクト PTH 濃度は副甲状腺からのホルモン分泌をきわめて忠実に反映する指標と考えられている^{16~18)}。したがって、副甲状腺機能亢進症での過機能副甲状腺の外科的切除の成否を手術中に判断するうえで、末梢血中インタクト

* 京都大学医学部放射線核医学科

** 同 整形外科

*** 京都第一赤十字病院泌尿器科

**** 京都市立病院内科

***** 同 放射線科

受付：元年 7 月 21 日

最終稿受付：元年 11 月 20 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部

滋 野 長 平

PTH濃度の変化を手術中に知ることができれば臨床上有用であることが期待される。しかし、本測定法はアッセイに22時間を使い¹⁴⁾、術中アッセイとして本法を用いるにはアッセイの迅速化が不可欠である。そこで著者らは本アッセイの反応諸条件を変更することにより、迅速で(反応時間:15分)、しかも正確な血中インタクトPTH濃度の定量法を開発した。また、副甲状腺腺腫症例2例において過機能副甲状腺切除前後での血中インタクトPTH濃度の経時変化を観察し、アッセイの迅速化によりもたらされる臨床的利点を検討した。

II. 材料および方法

1. 迅速アッセイの反応諸条件の最適化

通常のインタクトPTH測定法(AllegroインタクトPTHアッセイキット、日本メジフィジックス社、宝塚)では、標準品または検体200μlに¹²⁵I標識抗PTH-(1-34)抗体100μlと抗PTH-(39-84)抗体を固相化したポリスチレン球を同時に添加し、室温にて22時間静置した後、ポリスチレン球に結合した放射能をガンマカウンターにて測定する¹⁹⁾。そこで、アッセイの迅速化のため、反応条件を37°C振盪水浴下(Yamato Scientific、東京)として反応時間の最適化を検討した。次に、反応時間を15分に固定し、迅速測定法のアッセイ内再現性、アッセイ間再現性、最小検出感度を検討した。また、43症例(健常者31名、原発性副甲状腺機能亢進症9名、二次性副甲状腺機能亢進症3名)につき、迅速測定法と通常測定法で得られたホルモン値の相関を検討した。放射能の計測にはマルチウエルガンマカウンター(ARC-600、Aloka社、東京)を用い、標準曲線の作成にはLog-Logit三次変換を使用した¹⁹⁾。

2. 副甲状腺腺腫切除術前後の血中インタクトPTH濃度の経時変化

原発性副甲状腺機能亢進症と診断され病理学的に単発腺腫であった2症例で、腺腫摘出術中および術後に末梢血の経時的採血を行い、retrospectiveにインタクトPTH濃度および中間部PTHフラグメントに特異的な抗体により認識されるPTH

(M-PTH)濃度の測定を行った。M-PTH濃度はPTHキット「ヤマサ」(ヤマサ醤油社、銚子)により測定した²⁰⁾。

3. 統計的方法

得られたデータの初期処理は、Lotus 1-2-3(ver. 2-1J)(Lotus社、東京)によりパーソナルコンピュータ(PC-9801、NEC社、東京)で行った。統計量の正規性は χ^2 testにより、統計学的有意性は分散分析、共分散分析およびpaired and non-paired Student's t testsにより、統計処理プログラム²¹⁾を用いて検定した。

III. 結 果

1. 迅速アッセイの反応諸条件の最適化

反応条件を37°C振盪水浴下とし、反応時間を5~20分の間に段階的に変化させた場合の標準曲線をFig. 1に示した。結合放射能は反応時間に

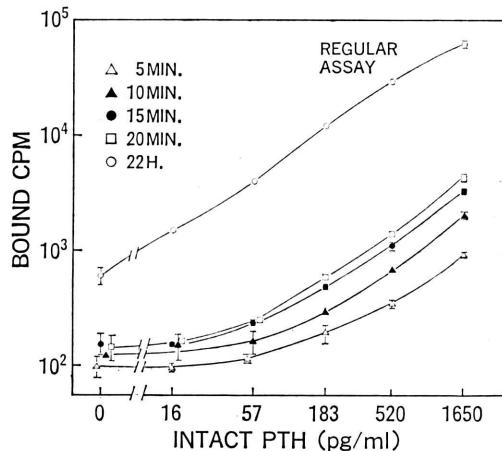


Fig. 1 Time dependence of bound form radioactivity. Graded doses of standard intact PTH were incubated, either at 25°C for 22 h without shaking (regular assay), or at 37°C with shaking (rapid assay) for the varying periods of time as indicated. After incubation, beads were washed and the total bound form radioactivity was determined as described under "Materials and Methods." Data are expressed as the mean \pm SD of triplicate determinations and plotted over log scales. Representative data from two similar experiments are shown.

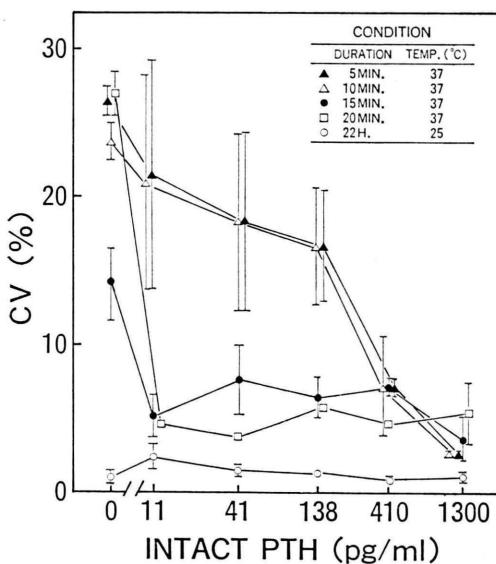


Fig. 2 Time and dose dependence of assay variance. Graded doses of standard intact PTH were incubated, in triplicate, either for 22 h at 25°C without shaking or at 37°C with shaking for the indicated time periods, and total bound form radioactivity was determined as described in "Materials and Methods." Coefficients of variation were plotted as a function of dose. Data are the mean \pm SD from three separate experiments.

依存し、反応初期の10分間で急速に上昇し、15分以降では漸増した。反応時間5~20分での、これらの標準曲線の各濃度における変動係数をFig. 2に示した。変動係数も反応時間に依存し、反応時間が15分以上の場合は、検討したゼロ濃度を除く全てのホルモン濃度において10%以下であった。そこで、以下の検討では反応条件を37°C振盪水浴下、15分とした。

2. 最小検出感度

PTHを含まないゼロスタンダード液の結合放射能の平均値(B_0) $+2\text{SD}$ に相当する結合放射能を示す濃度を最小検出感度と定義する場合、 $27.8 \pm 11.5 \text{ pg/ml}$ (Mean \pm SD, n=4)となった(Fig. 3)。

3. 再現性

キットに添付された2種類の異なる濃度のコントロール血清を用いて迅速測定法のアッセイ内再

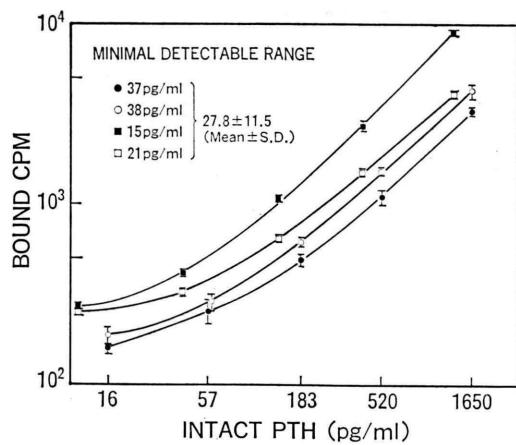


Fig. 3 Determination of minimal detectable levels in rapid assay. Graded doses of standard intact PTH were incubated at 37°C under shaking for 15 min, and the dose-radioactivity regression curves were computed as described in "Materials and Methods." Minimal detectable level was defined as the hormone concentration which yielded the total bound form radioactivity equivalent to the $\text{cpm}+2\text{SD}$ of the hormone-free sample. Results were from four independent experiments performed in triplicate, each using assay kits of different batches.

Table 1 Assay reproducibility

Experiment	Intra-assay		Inter-assay	
	A	B	A	B
1	46.9	227	43.0	230
2	42.3	297	37.8	277
3	39.7	258	44.6	262
4	37.6	241	47.4	247
Mean	41.6	256	43.2	254
SD	4.0	30.6	4.0	20.0
CV (%)	9.6	12.0	9.3	7.9

Serum intact PTH concentrations in two different control sera (A and B) were measured by rapid assay as described under "Materials and Methods." Data represent the mean values determined in triplicate.

現性およびアッセイ間再現性を検討した(Table 1)。アッセイ内再現性では、それぞれのコントロール血清のインタクト PTH 濃度は、 $41.6 \pm 4.0 \text{ pg/ml}$, $256 \pm 30.6 \text{ pg/ml}$ (Mean \pm SD, n=4)であり、変動

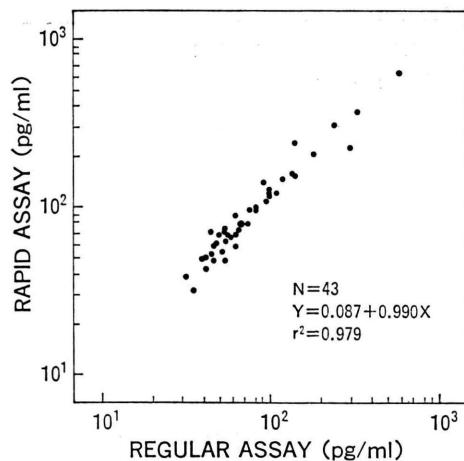


Fig. 4 Correlation between intact PTH concentrations determined by rapid and regular assays. Serum samples from 31 normal subjects, 9 patients with primary hyperparathyroidism and 3 patients with secondary hyperparathyroidism were assayed, in triplicate, by both rapid and regular assay protocols. Data were plotted after conversion to logarithm.

係数はそれぞれ 9.6%, 12.0% であった。また、アッセイ間再現性では、 $43.2 \pm 4.0 \text{ pg/ml}$, $254 \pm 20 \text{ pg/ml}$ であり、変動係数はそれぞれ 9.3%, 7.9% と良好な再現性が示された。

4. 通常測定法との相関

43 例での血中インタクト PTH 濃度を通常測定法および迅速測定法により測定した (Fig. 4)。常用対数に変換後、ホルモン濃度は正規性を示した。迅速測定法により計測されたホルモン濃度は通常測定法により測定されたホルモン濃度ときわめて良好な正相関 ($r^2=0.979$, $p<0.001$) を示し、その回帰直線は原点を通過した (95% 信頼限界, $-0.002 \leq Y \leq 0.178$)。また、迅速測定法による測定値は通常測定法による測定値よりも僅かに高値を示した ($p<0.001$)。

5. 副甲状腺腺腫切除術前後の血中インタクト PTH 濃度の経時変化

原発性副甲状腺機能亢進症 2 例 (A, B) で、腺腫摘出術中および術後に末梢血の経時的採血を行い、retrospective にインタクト PTH 濃度 (迅速

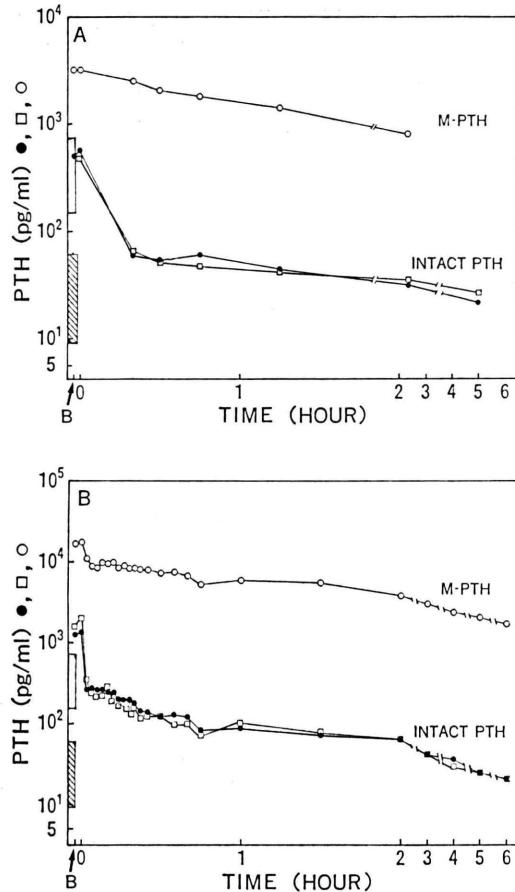


Fig. 5 Time series of serum intact PTH levels immediately after parathyroidectomy. Two patients with primary hyperparathyroidism due to single adenoma underwent surgical removal of hyperfunctioning glands. Peripheral blood samples were taken at indicated time points¹⁸ and serum intact PTH concentrations were determined in triplicate, retrospectively, by rapid assay (●) and regular assay (□). In addition, serum PTH values, as determined by a radioimmunoassay with an antibody specific to the mid-region of PTH, were plotted (○). "B" indicates the preparative hormone levels. Vascular pedicle to adenoma was ligated at the time 0. The shaded areas alongside the abscissa indicate the normal ranges for intact PTH (▨)¹⁹ and mid-region PTH (▨)²⁰.

測定法および通常測定法) および M-PTH 濃度を測定した (Fig. 5A, 5B)。腺腫への血流遮断前での血中インタクト PTH および M-PTH 濃度はそれぞれ 603 pg/ml, 0.88 ng/ml (症例 A), 1,300 pg/ml, 16.7 ng/ml (症例 B) と高値を示した。腺腫への血流遮断後、インタクト PTH 濃度は急速に低下し、血流遮断後 20 分では、それぞれ、前値の 10.6% (症例 A), 13.5% (症例 B) まで減少した。このうち、インタクト PTH 濃度はさらに持続的に減少し、症例 A では血流遮断後 30 分、症例 B では 120 分で正常域まで低下した。また、両症例において血流遮断前後のインタクト PTH 濃度の急激な変動は、迅速測定法、通常測定法のいずれによっても正確に把握できた。一方、M-PTH 濃度はきわめて緩徐な低下を示し、血流遮断後 20 分では、それぞれ前値の 47.1% (症例 A), 78.1% (症例 B) までの減少に留まり、観察した時間内 (症例 A, 140 分; 症例 B, 360 分) では M-PTH 値の正常化は認められなかった。

IV. 考 察

著者らは市販のインタクト PTH-IRMA キットのアッセイ方法を改良することにより末梢血中インタクト PTH 濃度を迅速に、しかも正確に定量する方法を確立した。

一般的に抗原抗体反応は拡散律速反応と考えられている²²⁾。アッセイの迅速化にあたり、反応条件を 37°C 振盪水浴下とすることにより測定時間を短縮することが可能となり、反応時間 15 分でアッセイ内変動係数を 10% 以下に抑制することができた。また、37°C 振盪水浴下において反応時間をさらに延長した場合の迅速法での標準曲線は、反応時間 1 時間以降では通常法による標準曲線に平行し、反応時間 3 時間まで漸増を示した。37°C, 22 時間静置の反応条件下で得られる標準曲線は通常法での反応曲線とほとんど一致することから¹⁹⁾、37°C の反応条件下では、振盪の有無に関わらず、インタクト PTH はきわめて安定であると考えられる。

今回の検討で反応時間を 15 分とした場合、血清

分離、アッセイ操作、結合放射能の計測、アッセイ結果の検討まで含めると、結果が判明するまでに約 40 分必要であった。実際に術中測定法として応用する際には検体の採取、手術室から検査室への運搬に要する時間も加算しなければならず、アッセイの一層の迅速化、手術室との on-line 化の工夫が必要である。例えば、同一キットを使用して検査当日にあらかじめ標準曲線を作成しておくことにより、同時測定するポイント数を少なくしアッセイ規模を縮小する、また、マルチチャンネルオートガンマカウンターを使用することにより、計測に要する時間を短縮するなどの方法が考えられる。

迅速法での最小検出感度は $27.8 \pm 11.5 \text{ pg/ml}$ (Mean \pm SD, n=4) であった。通常法における最小検出感度は 4 pg/ml であるので¹⁹⁾、迅速測定法は通常法に比較して約 7 倍感度が低い。しかし、血中インタクト PTH 濃度が高値を示す副甲状腺機能亢進症における術中測定法としては十分な検出感度であると考えられる。

アッセイの再現性については、2 種類の異なる濃度のコントロール血清を用いて検討され、良好なアッセイ内再現性、アッセイ間再現性を得た。通常測定法では検体、標準ホルモンとともに 2 重測定される^{14, 22)}。しかしながら、迅速測定法では結合放射能が通常測定法の 1/10 程度と小さいこと、術中測定において再検査は不合理かつ不可能であることを考慮し、多重測定などアッセイ内変動に対する慎重な配慮が必要と考える。

正常者や原発性および二次性副甲状腺機能亢進症患者において、迅速測定法と通常測定法で得られたインタクト PTH 濃度は広い濃度範囲できわめて良好な正相関を示した。さらに、原発性副甲状腺機能亢進症例での手術前後のインタクト PTH 濃度の経時的变化についても、迅速測定法と通常測定法によるホルモン濃度はよく一致した。ただし、迅速測定法では通常測定法よりも若干高値を示すことから、迅速測定法によるホルモン濃度と通常測定法によるホルモン濃度を全く同一と考えることはできない。

インタクト PTH の血中半減期は著しく短い(5分以下)^{14,15)}ことから、末梢血中インタクト PTH 濃度は副甲状腺からのホルモン分泌を忠実に反映すると考えられる^{14,16~18)}。過機能副甲状腺摘除によりインタクト PTH 分泌が急速に減少し末梢血ホルモン濃度の急速な低下が起こることが予測される。実際に、今回観察した単発性副甲状腺腺腫症例では腺腫への血行遮断後、末梢血中インタクト PTH 濃度は急速に減少し、血流遮断後20分では手術前値の $12.1 \pm 2.1\%$ (Mean \pm SD, n=2) まで低下した。以上のわれわれの成績は、Thompson ら²³⁾、Nassbaum ら²⁴⁾の成績と類似している。

以上のことから、今回開発したインタクト PTH 迅速測定法は、副甲状腺機能亢進症の存在および質的診断のみならず、有効な外科的治療方針の選択および成否の判断に関わるきわめて有用な情報を迅速に、正確に、しかも、簡便に提供し得る検査手段であると考えられる。

V. 結 論

1. 2-site IRMA 法によるインタクト PTH 測定法を改良することにより、血中インタクト PTH 濃度を迅速に、かつ、正確に測定する方法を開発した。

2. 反応条件を、37°C 振盪水浴下、反応時間15分とすることにより、良好な再現性を得ることができた。

3. 迅速測定法の最小検出感度は 27.8 pg/ml であり、広範なホルモン濃度にわたり、通常測定法による測定値と良好な正相関を示した。

4. 原発性副甲状腺機能亢進症(単発腺腫2例)において、腺腫への血流遮断により急速なインタクト PTH 濃度の低下が認められ、血流遮断後20分でのインタクト PTH 濃度は、手術前のホルモン濃度の $12.1 \pm 2.1\%$ であった。

5. インタクト PTH の迅速測定法を術中アッセイ法として用いることにより、副甲状腺機能亢進症の外科的治療の成否を手術中に判断するうえできわめて有益な情報が得られると考えられる。

謝辞：Allegro インタクト PTH キットを提供していただいた日本メジフィジックス株式会社、および、PTH キット「ヤマサ」を提供していただいたヤマサ醤油株式会社に深謝します。また、正井美佳、森田郁美、小林香津子、西村めぐみ諸氏の協力に感謝します。

文 献

- Norton JA, Aurbach GD, Marx SJ, et al: Surgical management of primary hyperparathyroidism. In Endocrinology (DeGroot LJ, Cahill GF, Odell WD, et al. (Eds.), WB Saunders, Philadelphia, Vol. 2 1989, pp. 1013-1031
- Wang C: Parathyroid re-exploration. A clinical and pathological study of 112 cases. Ann Surg 186: 140-145, 1977
- Beazley RM, Costal J, Ketcham AS: Reoperative parathyroid surgery. Am J Surg 130: 427-429, 1975
- Martin KJ, van Heerden JA, Edis AJ, et al: Persistent postoperative hyperparathyroidism. Surg Gynecol Obst 151: 764-768, 1980
- Spiegel AM, Marx SJ, Brennan MF, et al: Urinary cAMP excretion during surgery: An index of successful parathyroidectomy in patients with primary hyperparathyroidism. J Clin Endocrinol Metab 47: 537-542, 1978
- Spiegel AM, Eastman ST, Attie MF, et al: Intraoperative measurements of urinary cyclic AMP to guide surgery for primary hyperparathyroidism. New Engl J Med 303: 1457-1460, 1980
- Kaplan EL, Fang VS, Sugimoto J, et al: Serum calcium, parathyroid hormone, and urinary cyclic adenosine monophosphate after parathyroidectomy. Surgery 92: 822-826, 1982
- Kohri K, Kataoka K, Yachiku S, et al: Changes in cyclic AMP and electrolytes after parathyroidectomy in primary hyperparathyroidism. Clin Endocrinol 18: 371-376, 1983
- Norton JA, Brennan MF, Saxe AW, et al: Intraoperative urinary adenosine monophosphate as a guide to successful reoperative parathyroidectomy. Ann Surg 200: 389-395, 1984
- Keutmann HT, Sauer MM, Hendy GN, et al: Complete amino acid sequence of human parathyroid hormone. Biochemistry 17: 5723-5729, 1978
- Berson SA, Yalow RS: Immunochemical heterogeneity of parathyroid hormone in plasma. J Clin Endocrinol Metab 28: 1037, 1968
- Segre GV, D'Amour P, Potts JT Jr, et al: Metabolism of parathyroid radioiodinated hormone in the rat. Endocrinology 99: 1645, 1976
- Martin KJ, Hrushka KA, Freitag JJ, et al: Periph-

- eral metabolism of parathyroid hormone. *N Engl J Med* **301**: 1092, 1979
- 14) Nassbaum SR, Zahradnik RJ, Lavigne JR, et al: A highly sensitive two-site immunoradiometric assay of parathyroid hormone (PTH) and clinical utility in evaluating patients with hypercalcemia. *Clin Chem* **33**: 1364-1367, 1987
- 15) Miles LEM, Hales CN: Labeled antibodies and immunological assay systems. *Nature* **219**: 186-189, 1968
- 16) Magliaro DB, Harris ST, Neer RM, et al: Pulsatile secretion of parathyroid hormone in humans. *Calcif Tissue Int* **35**: 685 (Abstr), 1983
- 17) Brent GA, Leboff MS, Seely EW, et al: Relationship between the concentration and rate of change of calcium and serum intact parathyroid hormone levels in normal humans. *J Clin Endocrinol Metab* **67**: 944, 1988
- 18) Kitamura N, Shigeno C, Shiomi K, et al: Episodic fluctuation in serum intact parathyroid hormone concentration in men. *J Clin Endocrinol Metab*, in press for January 90 issue.
- 19) 高坂唯子, 山本逸雄, 滋野長平, 他: Immunoradiometric assay (IRMA) 法によるヒト副甲状腺ホルモン (Intact PTH) 測定用キットの使用経験. *核医学* **25**: 813-820, 1988
- 20) 山本逸雄, 高坂唯子, 阿曾沼和代, 他: Mid-region 副甲状腺ホルモン測定用キット (PTH-MM RIA Kit) の使用経験. *現代医療* **17**: 1976-1979, 1985
- 21) 若林克己: 実験データの整理. *培風館*, 東京, 1984
- 22) Levison SA, Jancsi AN, Dandliker WB: Temperature effects on the kinetics of the primary antigen-antibody combination. *Biochem Biophys Res Comm* **33**: 942-948, 1968
- 23) Thompson AR, Wang CA, Gaz RN, et al: Use of a rapidly performed immunoradiometric assay for PTH 1-84 for intraoperative determination of surgical cure of hyperparathyroidism. *The Endocrine Society, Program and Abstracts* 1989, 43 (Abstr)
- 24) Nussbaum SR, Thompson AR, Hutcheson KA, et al: Intraoperative measurement of parathyroid hormone in the surgical management of hyperparathyroidism. *Surgery* **104**: 1121-1127, 1988

Summary

Rapid Measurement of Human Parathyroid Hormone-(1-84) by Immuno-radiometric Assay for Use in Intraoperative Determination of Hyperfunctioning Parathyroid Glands

Tadako KOUSAKA*, Chohei SHIGENO*, Nobuyasu KITAMURA*, Noriyuki IWAMOTO****,
 Kazuki SHIOMI*, Kaechoong LEE*, Teruki SONE*, Haruki KIKUCHI*,
 Shuichi OHTA**, Itsuo YAMAMOTO***, Shigeharu DOKOH****
 and Junji KONISHI*

**Department of Radiology and Nuclear Medicine,*

***Department of Orthopedics, Kyoto University School of Medicine*

****Department of Internal Medicine, ****Department of Radiology, Kyoto City Hospital*

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

Rapid measurement of serum intact parathyroid hormone concentration was achieved by modification of an immunoradiometric assay for the hormone. Incubation of serum samples for 15 min at 37°C under shaking gave optimal results in terms of assay variance and reproducibility: intra-assay CVs were less than 10% over the hormone concentrations of 11–1,600 pg/ml; intra- and inter-assay CVs for two control sera at different hormone levels were less than 12%. The minimal detectable hormone concentration was found at 27.8 pg/ml. The serum hormone levels of 43 subjects (31 healthy subjects, 9 patients with primary hyperparathyroidism, and 3 patients with second-

ary hyperparathyroidism) determined by either rapid or regular assay well correlated with each other ($r^2=0.979$, $p<0.001$). In two patients with parathyroid adenoma serum intact PTH levels fell rapidly to 12.1% of the preoperative values 20 min after ligation of the vascular pedicle to the hyperfunctioning glands. We conclude that the modified assay protocol allows rapid, accurate, and simple estimation of intact PTH concentrations, and can be used as an intraoperative measure to aid both diagnosis and surgical cure of hyperparathyroidism.

Key words: IRMA, Intact PTH, Intraoperative measurement, Rapid assay, Hyperparathyroidism.