

《ノート》

尿中ネオプテリン測定用 RIA キットの基礎的および臨床的検討

Studies on Radioimmunoassay Kit for Measuring Urinary Neopterin

花 博一* 北村 真弓* 真重 文子* 吉野谷定美*
 久保田 憲*** 佐々木憲夫*** 井廻 道夫*** 内村 英正**
 大久保昭行**

Hirokazu HANA*, Mayumi KITAMURA*, Fumiko MASHIGE*,
 Sadayoshi YOSHINOYA*, Ken KUBOTA***, Norio SASAKI***,
 Michio IMAWARI***, Hidemasa UCHIMURA** and Akiyuki OHKUBO**

*University of Tokyo Hospital, Diagnostic Center

**University of Tokyo, Department of Laboratory Medicine

***University of Tokyo, The Third Department of Internal Medicine

I. はじめに

ネオプテリンはいわゆるプテリジン化合物の1つで、マクロファージが生成分泌とすると考えられている¹⁾。In vitro の実験でもTリンパ球をインターフェロンガンマで刺激すると培養液中にネオプテリンが増加することが報告されている²⁾。血清や尿あるいは他の体液中のネオプテリン濃度が増加する疾患として高フェニールアラニン血症や各種の感染症、骨髄移植を受けた際に拒絶反応が起こっている時、細胞増殖の著明な悪性腫瘍などが知られている¹⁾。

従来、その測定は high performance liquid chromatography (HPLC) により行われていたが^{3,4)}、近年血中ネオプテリン測定用の特異的なRIAも開発された⁵⁾。われわれはすでに HPLC

による臨床的検討を行い、その成績を報告したが⁶⁾、今回、尿中ネオプテリン測定用 RIA として新たに開発されたキットにつき基礎的ならびに臨床的検討を試みたので、その成績を報告する。

II. 方 法

患者および健常者から採取した新鮮尿に0.01%のEDTAを加え-80°Cで保存したものを測定に供した。測定には解凍した尿に二倍量の蒸留水を加え、0.22μmのフィルターを用い2,000g5分間遠心濾過した試料を用いた。

対象患者には東大病院の外来あるいは入院患者を当てた。その内訳は、肝疾患23(肝硬変15、肝細胞癌7、慢性活動性肝炎1)、リウマチ様関節炎(RA)18、血液疾患9(白血病5、ホジキン病1、refractory anemia with excess blasts(RAEB)1、骨髄腫1、再生不良性貧血1)、肺疾患4(肺癌3、メゾテリオーマ1)、SLE5、循環器疾患3(高血圧症2、細菌性心内膜炎1)、その他の自己免疫疾患8(ベーチェット病3、重症筋無力症1、PSS1、シェーグレン症候群1、皮膚筋炎1)、その他6(腎不

* 東京大学医学部附属病院検査部

** 同 臨床検査医学

*** 同 第三内科

受付: 2年2月28日

最終稿受付: 2年5月15日

別刷請求先: 東京都文京区本郷7-3-1 (郵113)

東京大学病院検査部

内村 英正

Key words: Neopterin, Urine, RIA, Liver diseases.

全、糖尿病、肥満、胃癌、胆道癌)、の計76例である。健常者は東大病院の職員、男性24、女性34の計59人につき検討した。

HPLCによる測定は Howells らの方法⁴⁾に準じて行った。使用機器は島津 LC-6A 型を用いカラムはシムパック CLC-ODS を、溶離液は 20 mM リン酸緩衝液 pH 6.1 を用いた。流速は 0.8 ml/min でカラム温度は 4°C で行った。RIA は Henning 社の尿中ネオプテリン測定用 RIA キット IMMU test neopterin を用いた。

キットの構成は

1. ^{125}I -ネオプテリン (2 vials, 11 ml/vial)
2. 第一抗体は抗ネオプテリン抗体 (ヤギ血清)
第二抗体として抗ヤギ IgG 抗体 (ロバ血清) 2 vials (11 ml/vial) がすでに加えられている。
3. 洗浄液 (105 ml)
4. ネオプテリン標準液 (0.4 ml)
0, 0.8, 2.3, 6.8, 20.5, 61.5, 184 ng/ml (それぞれ 0, 3, 9, 27, 81, 243, 729 nmol/l 相当)
ネオプテリンコントロールサンプル I, II (0.4 ml)

測定法の手順を Table 1 に示す。

III. 成績

1. 標準曲線 (Fig. 1)

0.8 から 60.0 nmol/l の範囲でほぼ直線を示す標準曲線が得られ、測定間の再現性も良好であった。

Table 1 Assay procedures of RIA for urinary neopterin concentration

1. Pipette neopterin standards or samples 20 μl
2. Pipette ^{125}I -neopterin 100 μl
3. Incubate 1 h at room temperature under the exclusion of light
4. Pipette washing solution 1,000 μl
5. Centrifuge 2,000 $\times g$, 10 min
6. Decant supernatants
7. Measure radioactivity (1 min)
8. Calculate from standard curve

2. 反応時間の影響

Figure 1 に incubation 時間の影響を示す。反応時間 30 分、1, 2, 3 時間の間では標準曲線への影響はほとんどなかった。尚、以下の検討では室温にて反応時間は 1 時間とした。

3. 添加回収試験

患者尿に 500, 2,500, 10,000 nmol/l のネオプテリンを各々添加して測定した成績を Table 2 に示す。患者尿は 170 nmol/l の値を示し、いずれの濃度でもほぼ 100% の回収率が得られた。

4. 測定の再現性

日差と日内の変動につき 3 種類の検体を用い検討した成績を Table 3 に示す。日差、日内の再現性は、それぞれ 3 種および 2 種類の濃度について検討したが CV は 8~16% であった。

5. 交叉反応

ネオプテリン類似のプテリン化合物であるビオ

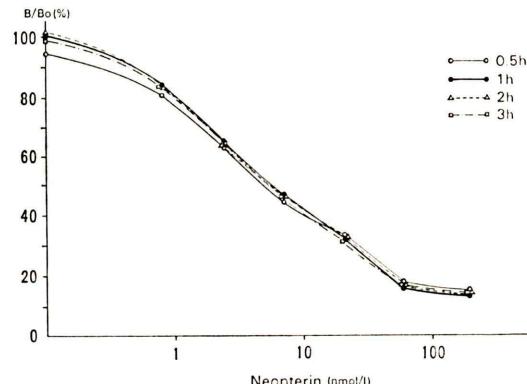


Fig. 1 Standard curve for neopterin assay.
(Effect of incubation time)

Table 2 Recovery test of neopterin

Added neopterin (nmol/l)	Measured values (nmol/l)	Recovery (%)
0	170*	—
500	662.5	98.5
2,500	2,407.5	89.5
10,000	11,170	111.0
mean		99.7

* Neopterin was added to the urine from one patient as shown in the table.

Values depict mean of duplicate determinations.

Table 3 Reproducibility of neopterin assay

Samples	Intraassay (n=5) (nmol/l)	Interassay (n=5)
1	*5.73±0.92 (16.1)	—
2	12.76±2.05 (16.1)	—
3	56.82±4.50 (7.9)	—
4	—	14.79±2.39 (16.2)
5	—	58.24±5.77 (9.9)

*mean±SD (CV%)

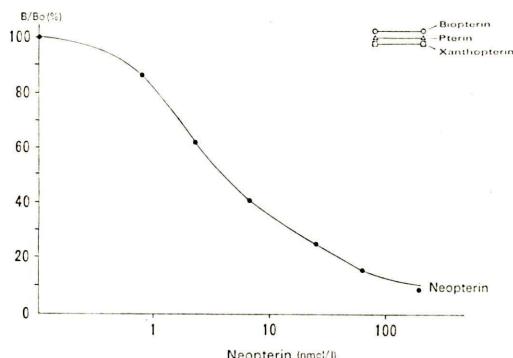


Fig. 2 Crossreaction of neopterin assay.

プテリン、プテリン、キサントプテリンにつき、50 および 200 nmol/l の濃度を加え交叉反応を検討したが、検討範囲内では交叉反応はみとめられなかった (Fig. 2)。

6. 正常値

男性24人、女性34人、合計59人における測定範囲を Table 4 に示す。RIA による値と HPLC による値を同時に表に示した。RIA による値は若干高めに測定された。また、女性は男性に比較して高値であった。本キットによる尿中ネオプテリン濃度の正常値は、クレアチニン比として男性 133 ± 44 、女性 $189 \pm 62 \mu\text{mol/mol}$ であった。

7. 年齢差

健常者における尿中ネオプテリン濃度を年齢別に区分し、クレアチニン比として Fig. 3 に示す。

10歳以下の小児で高値の傾向がみられたが10歳以上では60歳まではほぼ一定であった。

8. RIA と HPLC による測定値の比較

Figure 4 に各種疾患患者での尿中ネオプテリン濃度を RIA と HPLC による測定値の比較を示す。

Table 4 Urinary neopterin concentrations in normal subjects

	RIA ($\mu\text{mol/mol}^*$)	HPLC ($\mu\text{mol/mol}^*$)
Male (n=25)	133 ± 44	120 ± 38
Female (n=34)	189 ± 62	177 ± 56
Total (n=59)	165 ± 61	153 ± 56
(mean \pm SD)		

* Neopterin/Creatinine

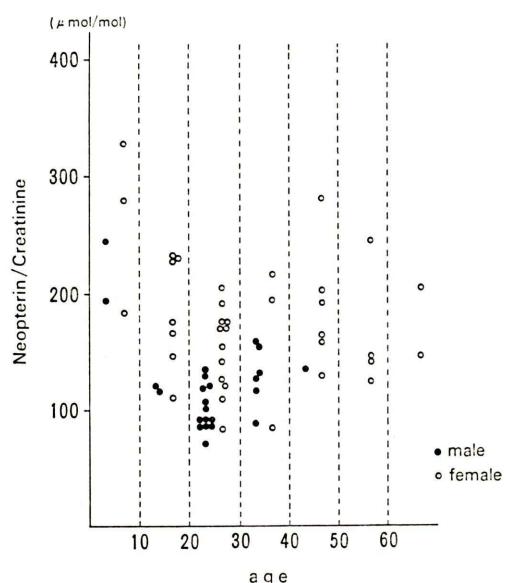


Fig. 3 Urinary neopterin concentration in various age.

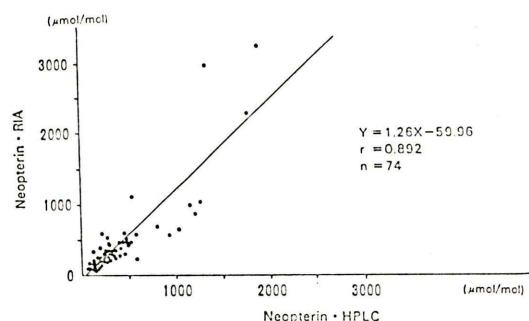


Fig. 4 Correlation between urinary neopterin concentrations by HPLC and by RIA in patients with various diseases.

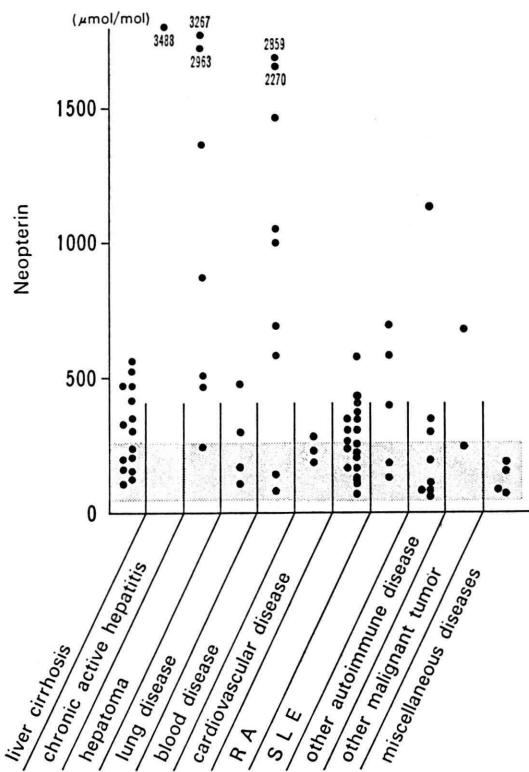


Fig. 5 Urinary neopterin concentrations in various diseases.

両者は、 $Y=126X-60$, $\gamma=0.892$ と良好な相関関係を示すが、RIA による値は HPLC による値と比較して若干高値であった。

9. 各種疾患患者における尿中ネオプテリン濃度

Figure 5 に各種疾患患者における尿中ネオプテリン値を示す。

肝疾患患者では非B型肝炎による肝硬変患者で正常値以上の高値を示す例が 58% あった。また、1例の慢性活動性肝炎、7例の肝細胞癌の内6例で著しい高値を示した。

血液疾患では、白血病、再生不良性貧血で高値を示した。リウマチ様関節炎では 50% で正常値以上を示し、Systemic lupus erythematosus (SLE) でも約半数で高値例がみられた。

IV. 考 案

尿中のネオプテリン濃度が最近あらたに注目されているのは、悪性腫瘍の存在と関連して増加することと、acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) あるいは AIDS 関連の疾患⁷⁾ や肝炎⁸⁾、リウマチ様関節炎^{9,10)} などの免疫異常状態に関係してその濃度が変化することが明らかになったことによる。さらに骨髄移植や腎移植の際の拒絶反応の発現と尿中ネオプテリンあるいはビオプテリンの排泄増加が関連することが報告され^{11,12)}、その測定の臨床的有用性が再認識された。

しかし、ネオプテリンの測定はかつては HPLC が用いられたため、日常の臨床的検査としては難点があった。その後血中測定用 RIA キットが開発されたが、実用化には至らなかった。

今回われわれは Henning 社が新たに開発した尿中のネオプテリン測定用 RIA キット IMMU test neopterin につき基礎的および臨床的検討を行ったが、検体は EDTA 処理により -80°C で 1 年間保存しても測定値に差をみとめず、長期間保存が可能であった。

標準曲線は測定間の差はほとんどなく、安定した測定系であった。

反応時間の影響は室温30分ではゼロ結合が僅かに低下する傾向をみとめたが、3時間までは標準曲線に大きな変化はなかったことから、1時間の反応時間が実用的で最適と思われた。

添加回収試験もほぼ 100% であり、測定の日内、日差の変動も CV で 8~16% であり、低濃度領域では若干高く、その理由は明らかでなかったが、患者尿の測定に支障はなかった。

検体中に混在する可能性のある他のプテリジン化合物との交叉反応は全くなく、本キットがネオプテリンに極めて特異的な測定系であることが確認できた。

健常者の尿中ネオプテリン排泄は、女性は男性に比較して多く、また小児は成人に比較して多い結果が得られ、従来の報告と一致した³⁾。肝疾患の場合肝硬変(非 B)、慢性活動性肝炎や肝細胞癌

で著しく高い値を示す例がみとめられた。高値を示した血液疾患は、白血病、骨髄腫、再生不良性貧血など予後不良疾患がほとんどであった。自己免疫性疾患である RA や SLE の患者でも高値を示す例が多くなったが、疾患の活動性や病期と尿中ネオプテリン排泄量との関連は認められなかった。

血中ネオプテリンの測定法として HPLC の他にすでに RIA も報告されており、臨床的検討結果も報告されている。しかし最近、肝炎や臓器移植時の拒絶反応の状態さらに AIDS 感染の指標としてネオプテリンが注目されている¹³⁾。今回尿中ネオプテリン測定用として新たに開発された本キットは、多数の検体を簡便に処理することが可能であることからも、本測定値が悪性腫瘍の marker としてのみならず、自己免疫疾患関連の marker としても臨床的に有用と期待される。

本論文の一部は第 37 回日本臨床病理学会にて発表した。

文 献

- 1) Hyland K, Howells DW: Analysis and clinical significance of pterins. *J Chromat* **429**: 95-121, 1988
- 2) Huber C, Batchelor JR, Fuchs D, et al: Immune response-associated production of neopterin. Release from macrophages primarily control of interferon-gamma. *J Exp Med* **160**: 310-316, 1984
- 3) Hausen A, Fuchs D, König K, et al: Determination of neopterin in human urine by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromat* **227**: 61-70, 1982
- 4) Howells DW, Smith I, Hyland K: Estimation of tetrahydrobiopterin and other pterins in cerebrospinal fluid using reversed-phase high-performance liquid chromatography with electrochemical and fluorescence detection. *J Chromat* **381**: 285-294, 1986
- 5) Rokos H, Rokos K: A radioimmunoassay for determination of neopterin. In: Blair JA, ed. *Chemistry and biology of pteridines*.: Water de Gruyter, Berlin: 815-819, 1983
- 6) 花 博一, 真重文子, 吉野谷定美, 他: 尿中ネオプテリン測定の臨床的評価. *臨床病理* **36**: 105, 1988
- 7) Abita JP, Cost H, Milstien S, et al: Urinary neopterin and biopterin levels in patients with AIDS and AIDS-related complex. *Lancet* **II**: 51-52, 1985
- 8) Prior C, Fuchs D, Hausen A, et al: Potential of urinary neopterin excretion in differentiating chronic non-A, non-B hepatitis from fatty liver. *Lancet* **II**: 1235-1237, 1987
- 9) Reifnegger G, Egg D, Fuchs D, et al: Urinary neopterin reflects clinical activity in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism* **29**: 1063-1070, 1986
- 10) MacWhannell A, Leeming RJ, Davies S, et al: Neopterin as markers in bone marrow transplantation. *Lancet* **I**: 829, 1988
- 11) Krause A, Protz H, Goebel KM: Correlation between synovial neopterin and inflammatory activity in rheumatoid arthritis. *Ann of the Rheumat Dis* **48**: 636-640, 1989
- 12) Dhondt JL, Walter MP, Bauters T, et al: Biopterin and organ transplantation *Lancet* **I**: 1109, 1988
- 13) Neopterin in clinical medicine. Editorial *Lancet* **I**: 509-511, 1988