

《技術報告》

1 型コラーゲンのピリヂノリン架橋 C 端蛋白 (1CTP) の
血中濃度の測定

——測定キットの基礎的検討と諸種疾患における臨床的検討——

山本 逸雄* 高田 政彦* 游 逸明* 大中 恭夫*
木上 裕輔* 山本 裕子* 浜津 尚就** 森田 陸司*

要旨 1 型コラーゲンの代謝産物であるピリヂノリン含有 1 型コラーゲン C 端ペプチド (1CTP) の血中 RIA キットの基礎的、臨床的検討を行った。本アッセイは、再現性良好で短時間に測定可能で従来の尿中ピリヂノリン測定系に比しきわめて簡便である。健常人の検討では、24 歳以下の若年者と 45 歳以上の高齢者において高値を示す傾向が認められた。骨吸収をきたす疾患、特に転移性骨腫瘍の早期に異常高値を示す例が多く、骨転移の評価に関し他の骨代謝マーカーより有用であると考えられた。また、副甲状腺機能亢進症や甲状腺機能亢進症、胃切症例、悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症の代謝性骨疾患をはじめ骨髄腫、関節リウマチ、変形性関節疾患などの骨吸収状態に関連して高値を示す症例が認められた。このように 1 型コラーゲンの代謝を鋭敏に反映するアッセイの登場は、骨代謝の評価においてきわめて有意義であると考えられ、今後の広範な検討が期待される。

(核医学 30: 1411-1417, 1993)

I. はじめに

1 型コラーゲンは、骨や腱や皮膚の主要なコラーゲンであるが、特に骨においては有機物質の 90% 以上を占める蛋白である。骨の代謝は盛んであり 1 型コラーゲンの合成、分解を知ることは骨の形成、破壊の指標となり得る。1 型コラーゲンの形成に関しての指標としては、1 型プロコラーゲンの C 端ペプチド (PICP) の RIA が開発され報告されている¹⁾。一方 1 型コラーゲンの分解に関しての指標としては、尿中ハイドロキシプロリン (HYP) の測定や、また最近では尿中ピリヂノ

リン (PYR) 等の測定がなされている²⁾。しかしながら尿中 HYP は諸種のコラーゲンの代謝産物であり特異性に欠け、また、PYR は、特異性は HYP より高いものの、2 型コラーゲンの崩壊からも由来し、しかもアッセイが高速液体クロマトグラフィ法によるという煩雑性がある³⁾。PYR 架橋は成熟コラーゲンにのみ認められるので、その測定はコラーゲンの崩壊の理想的な指標であり、簡便なアッセイ法の開発が望まれていた。近年、ピリヂノリン含有ヒト 1 型コラーゲン C 端ペプチド (Pyridinoline Cross-Linked Carboxy-Terminal Telopeptide of Type 1 Collagen; 1CTP 分子量約 12,000) の RIA が開発され、簡便に血中 1CTP 濃度の測定が可能となり、Orion Diagnostica 社よりキット化され入手可能となった⁴⁾。今回、その 1CTP 測定用キットを使用する機会を得、基礎的および臨床的検討を加え、測定の簡便性および、臨床的有用性を認めたので報告する。

* 滋賀医科大学放射線科

** 同 放射線部

受付: 5 年 6 月 3 日

最終稿受付: 5 年 9 月 3 日

別刷請求先: 大津市瀬田月輪町 (☎ 520-21)

滋賀医科大学放射線科

山 本 逸 雄

II. 方 法

対象 健康人については、健康診断時に採取された検体を用いて検討した。対象は 307 名 (19-72 歳, 男性 58 名, 女性 249 名, 平均年齢 47.6 ± 10.4 歳 (平均 \pm S.D.)) である。また臨床的検討に際しては、乳癌、肺癌、前立腺癌等の担癌患者 124 名につき、骨シンチグラフィの所見をもとに、骨転移の数によって骨転移の程度を分類した。転移が 1-2 か所のものを +, 3 か所以上および 1 か所であっても広範囲のものを $++$ とした。骨転移なしと診断されたもの 74 例, 骨転移 + のもの 15 例, 骨転移 $++$ のもの 35 例である。そのほか、原発性副甲状腺機能亢進症 4 名, 副甲状腺機能低下症 1 名, 甲状腺機能亢進症 56 名, 関節リウマチ症例 4 名, 変形性関節疾患 13 例, 骨折症例 (受傷 6 か月以内) 3 名, 胃切除症例 81 名, 悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症例 8 名, 腎不全症例 19 名等, 諸種の疾患患者, 計 189 名である。以上の対象につき血清を採取し, -20°C にて保存し, アッセイ試料とした。また一部の症例に関しては, 尿中 PYR 測定のため一時尿を採取し, その一部を血清と同様に -20°C にて保存し, アッセイ試料とした。

1CTP アッセイの方法 アッセイは Orion Diagnostica 社製 (Turku, Finland) 1 型コラーゲンの PYR 架橋 C 端蛋白 (1CTP) radioimmunoassay (RIA) キットによった⁴⁾。本キットは、ヒト大腿骨より得られたコラーゲンより精製された 1CTP を抗原とし、ウサギに対して免疫し得られた抗体と 1CTP を、クロラミン T 法にて ^{125}I 標識した標識抗原を用いる競合アッセイである。そのアッセイ法の概略を Fig. 1 に示す。血清あるいはスタンダードサンプル $100\ \mu\text{l}$ と, ^{125}I 標識-1CTP $200\ \mu\text{l}$ (30,000-40,000 cpm, 0.2% 牛アルブミンを含む 0.1 M phosphate buffered saline (PBS), pH 7.2, 液中) と, 抗 1CTP 抗体 (1,000 倍希釈抗 1CTP ウサギ血清) 希釈液 $200\ \mu\text{l}$ とを, プラスチックチューブに入れ, 混和し, 37°C , 2 時間インキュベートした。その後, 抗ウサギ抗体とポリエ

チレングリコール (分子量, 約 6,000) と 0.5% Tween 20 を含む混合 PBS 液 ($500\ \mu\text{l}$) を加え, 混和後 30 分室温に放置し, 4°C , $2,000 \times g$ にて 30 分遠沈し上清を吸引除去した。そして, ペレットを含むチューブの放射能をオートガンマ計測器 (Aloka, ARC-1000M) にて計測した。データ分析はアロカカーブ法を用い行った。

1CTP アッセイの基礎的検討 基礎的検討として, 同一サンプルのアッセイ内, アッセイ間の再現性, 血清の保存の安定性, 希釈等の検討を行った。つまり, 同一サンプルを 9 本のチューブにとり, 同一アッセイ内にて測定し, その測定値の平均値および標準偏差を求め, 変動係数 (C.V.) を算出した。また, 低値および高値を示した検体を 15 本に分け, -20°C に保存し, おのおの 2 週間おきに測定し, アッセイ間の測定値の変動, ならびに血清保存の安定性を検討した。また, 高値を示した骨転移症例 2 検体につき, 生理食塩水にて倍々希釈して測定し, 標準曲線との比較を行った。0 スタンダードの標準偏差の 2 倍の値より最小検出感度を求めた。

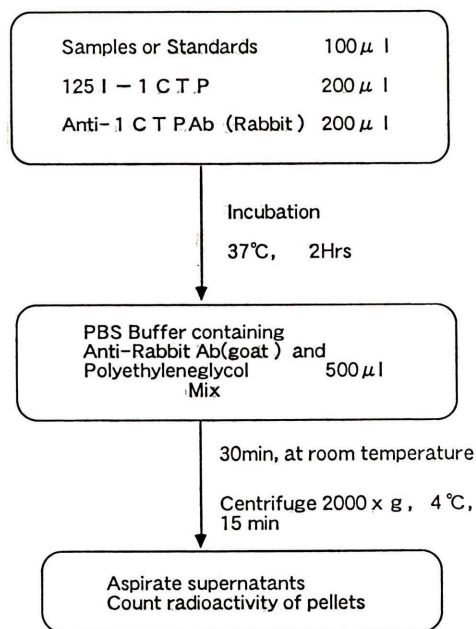


Fig. 1 Diagram of procedure of the 1CTP assay.

1CTP アッセイの臨床的検討 健康人, 骨転移例を含む諸種の骨疾患患者につき測定を行った. 同一サンプルにつきアルカリ性フォスファターゼ (AL-P) やオステオカルシン (OC), さらに 1 型プロコラーゲン C 端ペプチド (PICP) 等, 他の骨代謝マーカーを測定し, 比較検討を行った. また, 同時期に採取した尿について, PYR, デオキシピリジノリン (DPYR) との比較検討を行った. なお, 骨転移症例に関しては, 臨床所見より骨転移活動性例, および寛解例に分けて検討した. また甲状腺機能亢進症例に関しては, 血中甲状腺ホルモン値との比較検討を行った.

他の骨代謝マーカーの測定 同一サンプルにつき, 血中 OC を CIS Bio International 社製測定 RIA キット (C 端アッセイ) にて測定し⁵⁾, また, 血中 AL-P を p-nitrophenyl phosphate を基質とする発色法によって測定した (単位は Sigma Unit であり, 国際単位の 16.7 分の 1 の値をとる)⁶⁾. 同時期に採取した尿のサンプルにつき, 尿中 PYR をすでに報告した HPLC 法により測定した³⁾.

III. 結 果

1CTP アッセイ系の基礎的検討 本アッセイによる, 1CTP 測定の代表的な標準曲線を Fig. 2 に示す. 最低検出感度は 0.5 ng/ml 以下であり, また, 測定は少なくとも 50 ng/ml までは可能であった. 同一サンプルによるアッセイ間の測定値の変動は, 10.55 ± 0.35 ng/ml (平均 \pm S.D., $n=15$; C.V.=3.34%), および 34.69 ± 1.91 ng/ml (平均 \pm S.D., $n=15$; C.V.=5.51%) であった. また, アッセイ内変動は 8.91 ± 0.36 ng/ml (平均 \pm S.D., $n=9$; C.V.=4.02%) であった. 希釈試験の成績も Fig. 2 に示しているが, 標準曲線とほぼ平行した希釈曲線を示した. また, 少なくとも半年間の -20°C での保存は, アッセイ値になんら影響を与えなかった.

臨床的検討 健康男女, 287 名の血中 1CTP 値の分布を Fig. 3 に示す. 24 歳以下の若年者において高値を示し, また, 46 歳以上の高齢者においても高値を示す傾向が認められた. 25-45 歳の健

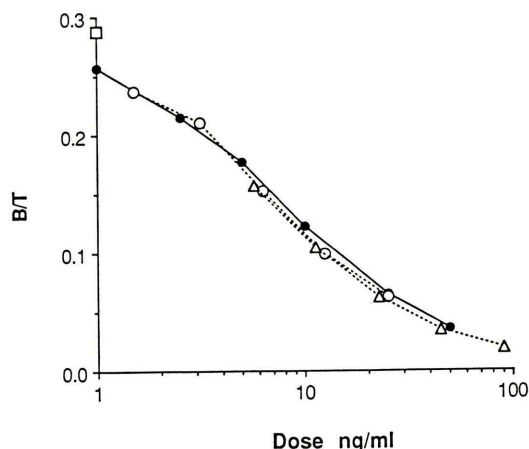


Fig. 2 Standard curve of the 1CTP assay (●—●). Dotted lines represent assay results of serially diluted serum samples (Δ , \circ), which paralleled well with the standard curve. B/T at zero standard: \square .

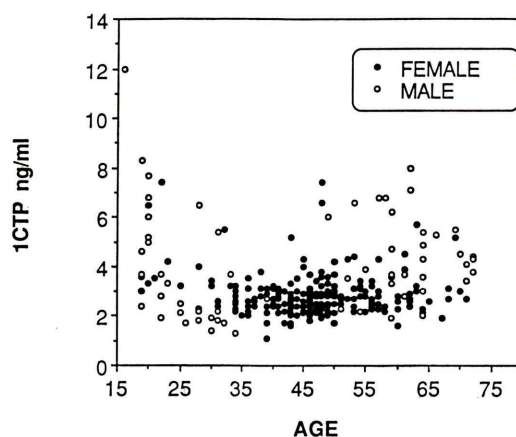


Fig. 3 Serum 1CTP values in healthy volunteers. Samples from under age 25 and over age 46 showed higher values than those between age 25 and 45.

常人, 114 名 (男性 17 名, 女性 97 名, 平均年齢 37.7 ± 5.2 歳 (平均 \pm S.D.)) の 1CTP の平均値は 2.68 ± 0.84 ng/ml (平均 \pm S.D.) であったが, 46 歳以上の健康人, 173 名 (男性 31 名, 女性 142 名, 平均年齢 54.2 ± 7.2 歳 (平均 \pm S.D.)) の 1CTP の平均値は, 3.20 ± 1.22 ng/ml (平均 \pm S.D.) と有意に ($p < 0.001$) 高齢者において高値を示した. した

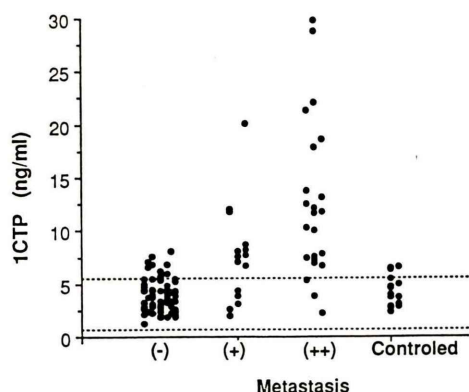


Fig. 4 Serum 1CTP values in patients with malignancy. Patients were divided into four groups according to absence (-), or presence (mild (+), extensive (++), or controlled) of bone metastasis. Patients with bone metastasis showed elevated 1CTP levels, whereas patients with well-controlled bone metastasis showed almost same levels from those with absence of bone metastasis.

がって、1CTP 値の解釈に関しては年齢を考慮に入れる必要があると考えられた。25 歳から 72 歳までの 287 例、全例の平均値は、 3.00 ± 1.12 ng/ml (平均値 \pm S.D.) であり、平均値より 2 標準偏差以内を正常値とすると、25 歳以上の全年齢では $0.76 - 5.24$ ng/ml であり、今回、便宜的にこの範囲を正常値とした。

転移性骨腫瘍症例における成績を Fig. 4 に示すが、骨転移のない担癌患者 74 例においては、11 例を除き (85%)、正常範囲内であり、その平均値は 3.90 ± 1.53 ng/ml (平均値 \pm S.D.) であった。また、すべての症例において、8 ng/ml 以下であった。また、骨転移の + 群例の 15 例中、10 例 (67%) が異常高値を示した。広範な骨転移を示した 35 例中、32 例 (91%) が異常高値を示した。広範な骨転移を有しながら異常値を示さなかった 3 例は、全例前立腺癌による骨硬化性転移症例であった。一方、骨転移がありながら、臨床的にホルモン療法によく反応してコントロールされている寛解症例 14 例のうち 11 例は正常値を示し、その平均値は 4.10 ± 1.49 ng/ml であり、骨転移のない例との

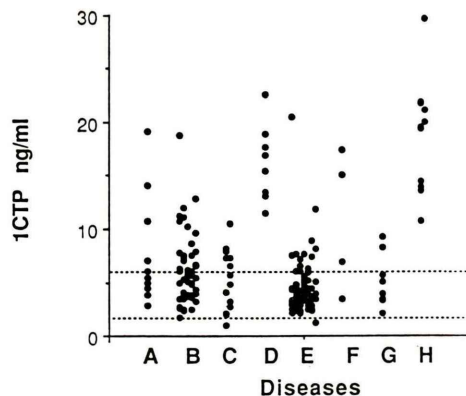


Fig. 5 Serum 1CTP values in patients with various skeletal diseases. Diseases are; A: Primary hyperparathyroidism, B: Hyperthyroidism, C: Multiple myeloma, D: Hypercalcemia of malignancy, E: Post-gastrectomy, F: Rheumatoid arthritis, G: Extensive degenerative arthritis, H: Chronic renal failure.

間に差を認めなかった。同一例において、血中 OC、AL-P を測定したが、多くの例において相関する傾向がみられたものの、OC と AL-P は骨転移のない担癌群において、おのおの、85%、91% の正常値を示し、一方骨転移 (+) 群で、おのおの、38%、25% の異常値を示した。さらに、(++) 群で、おのおの、38%、36% の異常値を示した。このことは 1CTP に比し、特異性はほぼ同じであるが、感度に関しては骨転移を有しながらも正常値を示す例が多くみられ、1CTP の方が感度が高かった。そのほか、副甲状腺機能亢進症をはじめとする諸種の骨疾患における測定成績を Fig. 5 にまとめているが、副甲状腺機能亢進症例や甲状腺機能亢進症例、さらに胃切除後患者や関節疾患患者、骨髄腫患者において、高値を示す例が認められた。また、悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症症例においては、全例、異常高値を認めた。これらの疾患において、血中 1CTP 値は骨病変をよく反映していると考えられた。その一例として甲状腺機能亢進症における血中サイロキシン値との相関を Fig. 6 に示すが、サイロキシンとの間に弱いながらも相関の傾向が認められ、甲状腺機能亢進症に伴う骨病変を反映していると考えられた。

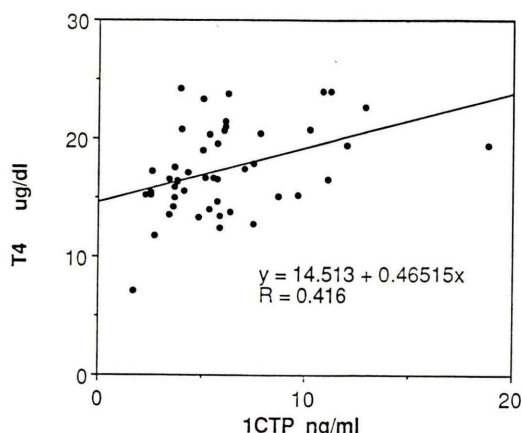


Fig. 6 Relationship between circulating ICTP levels and thyroxine levels in patients with hyperthyroidism. There is a tendency of positive correlation between those two groups.

Table 1 Correlation between serum ICTP values and other bone metabolic markers

vs.	Simple regression	Coefficient value
Pyridinoline	$y = 11.22 + 6.68x$	0.884
Deoxypyridinoline	$y = 2.68 + 0.73x$	0.688
Alkaline Phosphatase	$y = 5.19 - 0.0098x$	0.036
Tartrate-Resistant Acid Phosphatase	$y = 0.375 + 0.03x$	0.353
Osteocalcin	$y = 6.09 + 1.31x$	0.238
P1CP	$y = 78.94 + 9.15x$	0.491

血中クレアチニンが 1.5 mg/dl 以上の腎不全患者においては、ICTP 値は全例異常高値を示し、血中 ICTP の値の解釈に関しては、腎機能の影響を考慮に入れる必要があると考えられた。健常例と骨転移例を含む症例における、ICTP 値と、尿中 PYR、デオキシ PYR、AL-P、OC、酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ、P1CP 等との相関を Table 1 に示すが、ICTP は、尿中 PYR、DPYR と、おのおの、0.884、0.688 と高い相関を示したが、そのほかのマーカーとは、P1CP を除き、相関が認められなかった。

IV. 考 案

近年、多くの骨代謝マーカーが開発されている

が、その中でも、尿中 PYR の測定は最も骨吸収に関連したマーカーとして注目されている^{7,8)}。PYR は、成熟コラーゲンに認められるコラーゲン分子間の架橋物質であり、それはコラーゲンが壊された時のみに血中に流出し、したがってコラーゲンの分解のよきマーカーであると考えられる。尿中 PYR の測定は、すでに臨床にも骨破壊の指標として用いられつつある。しかしながら、PYR は 1 型のみならず 2 型コラーゲンの架橋物質でもあり、2 型コラーゲンの崩壊にも由来する。さらにそのアッセイは、酸分解後に高速液体クロマトグラフィにてその蛍光光度を測定するという煩雑なものである。今回、PYR 含有 1 型コラーゲン C 端ペプチドの RIA が開発され、その血中レベルの測定が可能になった。これは 1 型コラーゲンの PYR 架橋のみを測定するため、より骨吸収に特異的であり、かつ、大量のサンプルを簡便に測定できるという利点を有している。今回、キット化された ICTP のアッセイを検討する機会を得たが、キットは再現性も良好であり、感度も良好で、健常人のすべての血中レベルが測定可能であった。操作性も良好で、4 時間ですべての操作を終えることができ、測定系自体はなんら問題ないと思われた。健常人の血中 ICTP 値は、24 歳以下、および 46 歳以上で高く、25-45 歳までの健常人では、1.05-4.36 ng/ml に分布した。性差に関して年齢を併せて詳しく検討できていないが、大差ないという印象であった (Fig. 3)。25 歳以上の全年齢では、0.76-5.24 ng/ml に分布し、今回、この範囲を正常範囲とした。この値は、報告値⁴⁾とほとんど同じであった。高齢者における ICTP 値の高値は、骨粗鬆症との関連において興味深い結果であるが、今後の詳細な検討が残されている。骨転移症例において、血中 ICTP 値は骨転移の有無、程度をよく反映していると考えられた。つまり、骨転移のない担癌患者の 85% は正常範囲内であり、かつ、すべての症例で 8 ng/ml 以下であったが、骨転移を有する例においては高値を示し、骨シンチグラム上、1-2 か所の転移例においても、半数以上の例において異常高値を示した。

さらに広範な骨転移例においては、前立腺癌に伴う骨硬化性骨転移の一部の例を除き、全例、異常高値を示した。そして、ホルモン療法などによりよくコントロールされている転移症例においては、ほとんど正常値を示し、対照の骨転移のない担癌症例とほとんど同じレベルの値を示した。このことは、1CTP 値が骨転移の発見、病態の把握、治療効果判定などに有用であることを示唆している。また、他の AL-P や OC 等のマーカーより、骨転移に対する感度は明らかに高かった。

一方、他の代謝性骨疾患においては、原発性副甲状腺機能亢進症、甲状腺機能亢進症、悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症例、胃切除例、関節疾患等において、高値を示す症例があり、その病態把握に有用と考えられた。特に、悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症例においては、全例、高値を示し、骨破壊の亢進を反映していると考えられた。また、甲状腺機能亢進症においても血中サイトキシン濃度との間に若干の関連が認められ、その病勢に伴う骨代謝亢進を反映していると思われる (Fig. 6)。1CTP は腎より排泄されるとされており、事実血清クレアチニン濃度 1.5 mg/dl 以上の腎不全症例においては、全例高値を示し、その値の解釈において腎機能を考慮に入れる必要があると考えられた。他の骨代謝マーカーとの関連では、当然のことながら、尿中 PYP, DPYR 値とよく関連し、PYR を測定しているということがうらづけられた (Table 1)。他のマーカーとは、ほとんど相関が認められなかった。

以上のように、簡便な骨吸収のマーカーが登場したことの臨床的意義は大きい。尿中ピリヂノリンの測定は、骨吸収の指標として有用であることが知られていたが、アッセイに、高速液体クロマトグラフィーを用いるという、煩雑さがあり、経費もかかる。血中 1CTP の RIA の登場は、この問題を解決すると同時に、1 型コラーゲンに対し、より特異的であるという利点すら有している。先に報告した PICP¹⁾ によって、1 型コラーゲンの合成が評価でき、さらに 1CTP アッセイによって 1 型コラーゲンの評価ができることとなり、骨代

謝の評価が、より正確になり、その臨床的意義は大きいと思われる。

V. 結 論

新たに、血中 PYR 含有 1 型コラーゲン C 端ペプチドのアッセイ系が開発され、その使用経験を得たが、再現性、操作性ともに良好であり、従来の尿中 PYR 測定系に比しきわめて簡便であった。健常人において、若年者と高齢者において高値をとる傾向があったが、25-45 歳の成人では、1.0-4.36 ng/ml に分布し、25 歳以上の全例では、0.76-5.24 ng/ml に分布した。骨転移症例において高値を示し、その感度は従来の骨代謝マーカーに比し、高かった。悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症や甲状腺機能亢進症、副甲状腺機能亢進症、胃切除例、骨髄腫等において高値を示し、また、その血中レベルは腎機能の影響を受けると考えられた。尿中 PYR との相関係数は、0.884 であった。本アッセイは簡便であり、骨吸収のよいマーカーであると考えられた。

謝辞：1CTP アッセイキットを提供いただきました中外製薬診断薬開発部の方々に感謝いたします。

文 献

- 1) 山本逸雄, 高田政彦, 大中恭夫, 游 逸明, 山本裕子, 浜津尚就, 他: 血中 1 型プロコラーゲン C 端プロペプチド (PICP) の測定. 核医学 30: 563-569, 1993
- 2) Eyre D: Editorial: New Biomarkers of bone resorption. J Clin Endocrinol Metab 74: 470a-470c, 1992
- 3) 関根恭一, 堀江 均, 畠 啓視, 南条正季, 佐藤克彦, 西井易穂, 他: 蛍光検出高速液体クロマトグラフィーによる尿中ピリヂノリン及びデオキシピリヂノリンの定量. 臨床化学 21: 18-25, 1992
- 4) Risteli J, Elomaa I, Niemi S, Novamo A, Risteli L: Radioimmunoassay for pyridinoline cross-linked carboxy-terminal telopeptide of type 1 collagen: a new serum marker of bone collagen degradation. Clin Chem 39: 635-640, 1993
- 5) 高坂唯子, 山本逸雄, 北村暢康, 青木 純, 曾根照喜, 鳥塚莞爾: Radioimmunoassay による血中オステオカルシンの測定. 核医学 24: 891-897, 1987
- 6) Bessey OA, Lowry OH, Brock MJ: A method for the rapid determination of alkaline phosphatase

- with five cubic millimeters of serum. *J Biol Chem* **164**: 321-329, 1946
- 7) Paterson CR, Robins SP, Horobin JM, Preece PE, Cuschieri A: Pyridinium crosslinks as markers of bone resorption patients with breast cancer. *Br J Cancer* **64**: 884-886, 1991
- 8) Body JJ, Delmas PD: Urinary pyridium cross-links as markers of bone resorption in tumor-associated hypercalcemia. *J Clin Endocrinol Metab* **74**: 471-475, 1992

Summary

Radioimmunoassay for the Pyridinoline Cross-Linked Carboxy-Terminal Teloepitope of Type 1 Collagen (ICTP) —Some Basic Aspects of the RIA Kit and Clinical Evaluation in Various Bone Diseases—

Itsuo YAMAMOTO, Masahiko TAKADA, Itsuaki YUU,
Yasuo OHNAKA, Yuusuke KIGAMI, Yuuko YAMAMOTO,
Hisatoshi HAMAZU and Rikushi MORITA

*Department of Radiology and Radioisotope Division,
Shiga University of Medical Science*

A radioimmunoassay for circulating levels of the pyridinoline cross-linked carboxy-terminal telopeptide of type 1 collagen (ICTP) was developed and can be available as a kit on a commercial base. Using the kits, we evaluated basically and clinically the assay. The assayed values were reproducible and the assay can detect as low as 0.5 ng/ml of ICTP. In healthy volunteers, circulating level was high under age 24 and over age 46. In patients with bone metastasis, serum levels elevated even in its early stage and correlated well with clinical status. In other bone diseases, such as primary hyperparathyroidism, hyperthyroidism, post-gastrectomy, hypercalcemia of malignancy and myeloma, serum levels elevated

according to their clinical conditions. In patients with chronic renal failure, serum levels were high, suggesting decrease of renal clearance of ICTP. The circulating ICTP levels seemed to reflect well clinical bone destructive status. A high correlation between serum ICTP level and urinary pyridinoline ($r=0.884$) was shown, whereas essentially no correlation was observed between bone formation markers such as osteocalcin and alkaline phosphatase. Thus, the measurement of circulating ICTP seems to be a simple and sensitive method to monitor bone destruction.

Key words: Collagen, Bone resorption, Pyridinoline, Metabolic bone disease, Bone metastasis.