《技術報告》

Radioimmunoassay を用いる血中 1,25-dihydroxyvitamin D 測定法

山本　逸雄*　　浜津　尚就*　　木上　裕輔*　　森田　陸司*

要旨　RIA を用いる血中 1,25-dihydroxyvitamin D の新しい測定キットの基礎的および臨床的検討を行った．再現性，回収率，他のビタミン D 代謝物との交叉等は問題なく，また従来の測定法との相関も良好であった．本法によって測定した 111 例の 19–78 歳健常者の血中レベルの平均値は 40.5±14.2 pg/ml であった．また未治療の腎不全症例や副甲状腺機能低下症患者において低値を示し，一方，原発性副甲状腺機能亢進症患者や，サルコイドーシスに伴う高カルシウム血症患者において，高値を示した．本測定法は，従来の方法と異なり，β 線を用いないので扱いが容易であり，臨床的に有用と考えられた．

(核医学 **34**: 243–250, 1997)

I. はじめに

1,25-dihydroxyvitamin D (1,25-$(OH)_2$ D) は，腸管からのカルシウム吸収や破骨細胞形成などカルシウム代謝調節の重要なホルモンであり，コレステロールや食事中のエルゴステロールより皮膚にて紫外線によってビタミン D となり，肝，腎での水酸化を経て形成される[1]．血中 1,25-$(OH)_2$ D レベルは，各種カルシウム代謝疾患において変動し，その測定は，それらカルシウム代謝疾患の診断や，活性型ビタミン D_3 治療患者における血中薬物レベルの評価などに重要である[2,3]．血中活性型ビタミン D レベルの測定としては，高速液体クロマトグラフィ (HPLC) による精製後，1,25-$(OH)_2$ D レセプターを用いてのレセプターアッセイ法 (RRA) が，最初に開発された[4]．その後，簡易法として HPLC のかわりにミニカラムを用いる方法が導入され，アッセイ法の簡便化がはかられた[5~7]．今回，ミニカラムによる精製後，1,25-$(OH)_2$ D に対する特異抗体を用い，^{125}I 標識の 1,25-$(OH)_2$ D アナログを用いた 1,25-$(OH)_2$ D の RIA キットが INCSTAR 社にて開発され，使用する機会を得，基礎的，臨床的検討を行ったので報告する．本法は，測定法そのものが，簡便であり，従来の ^{3}H 標識 1,25-$(OH)_2$ D_3 を用いる方法に比し，取り扱いが容易となっている．

今回，1. 基礎的検討として，再現性，回収率，他のビタミン D との交叉性，2. 従来の測定法との比較，3. 臨床的検討としての健常人，諸種疾患での測定の 3 点につき検討を行った．

II. 方　法

1. 測定方法

1,25-$(OH)_2$ D 測定キットは INCSTAR 社製のものを用いた．本測定キットの測定法の概略を Fig. 1 に示す．本法では 1,25-$(OH)_2$ D に対するヤギ抗体とヤギ血清に対するロバ抗血清を用いた 2 抗体法を用いている．また血清を，C_{18}OH カートリッジとシリカミニカラムを用いて精製している．抽出法そのものは従来の方法[5,7] と同様であ

* 滋賀医科大学放射線科・放射線部
受付：8 年 12 月 26日
最終稿受付：9 年 3 月 5 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

Procedure for Sample Extraction

Pipette 0.75 m*l* of each standard, control and patient sample into borosilicate glass tubes
↓
Add 0.75 m*l* of acetonitrile, vortex
↓
Centrifuge at 760 × *g* for 10 min at 20–25°C
↓
Decant the sample supernatants into test tubes, discard pellets
↓
Add 0.75 m*l* of Sodium Periodate solution and vortex
↓
Incubate samples for 30–60 min at 20–25°C
↓
Apply samples to C_{18}OH cartridge, vacuum and discard eluents
↓
Add 2 m*l* of water, vacuum and waste
↓
Add 5 m*l* of 70 : 30 Methanol/water, vacuum and waste
↓
Add 5 m*l* of 90 : 10 Hexane/Methylene Chloride, vacuum and waste
↓
Add 5 m*l* of 99 : 1 Hexane/Isopropanol, vacuum and waste
↓
Place C_{18}OH cartridge onto Silica cartridge and add 5 m*l* of 92 : 8 Hexane/Isopropanol, vacuum and waste
↓
Remove C_{18}OH cartridge and add 5 m*l* of 80 : 20 Hexane/Isopropanol, vacuum and collect eluates
↓
(Store samples at −20°C)

Fig. 1A Procedure for extraction and purification of 1,25-dihydroxyvitamin D from serum.

るが，本法では回収率を別に計算するかわりに，スタンダードをも患者サンプルと全く同様に処理している．測定にかかる時間は，検体の前処理に約2時間，RIA に約3時間で，1日での測定が可能である．測定検体として今回は血清を用いたが EDTA 添加血漿にても測定可能である．

2. 基礎的検討

再現性に関して同時，およびアッセイ間で検討した．同じサンプルを10検体に分け同じアッセイ内で10回測定しその変動係数 (C.V.) を求め

Procedure for Radioimmunoassay

Dry the eluates under a hood using nitrogen gas
↓
Reconstitute each dried extracts with 50 μ*l* of 95% Ethanol, mix gently
↓
Pipette 20 μ*l* of the reconstituted standard, control, and sample extracts into borosilicate glass tubes
↓
Add 50 μ*l* of tracer into all tubes
↓
Add 250 μ*l* of primary antibody into all tubes except NSB tubes (add NSB buffer)
↓
Mix and incubate for 2 hours at 20–25°C
↓
Add 0.5 m*l* of anti-goat antibody complex solution, incubate for 20 min at 20–25°C
↓
Centrifuge all tubes for 20 min at 20–25°C at 1800 × *g*
↓
Decant the supernatants and place the inverted tubes onto absorbent paper for 2–3 min
↓
Measure the radioactivity of all tubes in a gamma counter

Fig. 1B Procedure for the radioimmunoassay of purified samples.

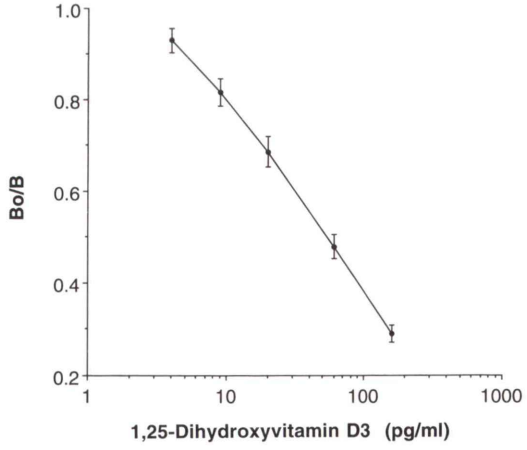


Fig. 2 Standard curve of RIA for 1,25-dihydroxyvitamin D. Each point represents mean±1SD of 8 different assays.

た．また同じサンプルを 5 検体に分け，−20°C にて保存し，別の 5 回のアッセイにて測定しその C.V. を求めた．また添加回収試験を行った．つまり同一の血清検体を 4 つに分け，そのうちの 3 つに既知量の 1,25-$(OH)_2$ D_3 を加え，他の 1 つにエタノールのみを加え，スタンダードと同様に抽出し測定を行い回収率を求めた．希釈テストを 2 検体につき行い，測定値が期待どおりであるかどうか検討した．希釈はキット付属のゼロスタンダード溶液にて行い抽出処理後測定した．

アッセイに干渉するビタミン D 代謝物やアナログの影響を検討する目的で，24,25-dihydroxyvitamin D_3 (24,25-$(OH)_2$ D_3)，25-hydroxyvitamin D_3 (25-OH D_3)，1α-hydroxyvitamin D_3 (1α-OH D_3)，および 1,24-dyhydroxyvitamin D_3 (1,24-$(OH)_2$ D_3) (いずれも中外製薬社製) の既知量をキット付属のゼロスタンダード溶液にて溶解し，サンプルと同様の抽出操作で測定し，アッセイにおける影響を検討した．

従来の測定法との比較検討の目的で，同一 30 検体を HPLC を用いて精製，すでに報告したごとく，鶏卵 1,25-$(OH)_2$ D レセプター (ヤマサ) を用いて測定した[8]，また同様に同一 27 検体につき簡易ミニカラム法による精製を行い，すでに報告したごとく，牛胸線 1,25-$(OH)_2$ D レセプターを用いる 1,25-$(OH)_2$ D 測定キット (メジフィジックス社) を用いて測定した[5]．それぞれの測定成績につき比較検討した．

試薬，溶媒はいずれも HPLC グレードあるいはキット付属のものを用いた．HPLC は東洋ソーダ製のものを用い，プレカラムを装着したメルク社製 C18 逆層カラム (4.2×150 mm) を用いた．

3. 臨床的検討

健常人における値を検討するため，検診などに

Table 1 Intra- and inter-assay variations. A sample was aliquated to ten and assayed in a same assay (intra-assay variation). Another sample was aliquated to five, stored at −20°C and assayed in five different assays (inter-assay variation), C.V. of intra-assay was 11.3% and C.V. of inter-assay was 12.2%

Intra-assay Variation

Sample No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mean ±S.D.
1,25-D (pg/m*l*)	22.4	24.4	24.9	24.4	28.2	24.3	22.1	28.6	25.2	31.1	25.6 ±2.9

Inter-assay Variation

Assay No.	1	2	3	4	5	Mean ±S.D.
1,25-D (pg/m*l*)	29.3	25.2	32.6	25.0	31.2	28.7 ±3.5

Table 2 Recovery rate of known amounts of 1,25-dihydroxyvitamin D_3 added to a sample. Mean recovery rate was 102±35 (mean±S.D.) %

Sample No.	Basal Value (pg)	Added (pg)	Expected Value (pg)	Measured Value (pg)	Recovery Rate (%)
1	10.5	0	10.5	9.3	
2	10.5	3.3	13.8	15.2	142
3	10.5	9.8	20.3	19.4	91
4	10.5	19.7	30.2	25.1	74
Mean±S.D.					102±35

て得られた健常人 111 名(男性 30 名，女性 81 名，年齢 19–78 歳，平均年齢 37.0±16.3 歳)につき，その血中レベルを測定した．

さらに，各種疾患患者の検討として，急性腎不全患者 (4 例)，活性型ビタミン D_3 未投与慢性腎不全患者 (71 例)，活性型ビタミン D_3 投与慢性腎不全患者 (14 例)，原発性副甲状腺機能亢進症患者 (5 例)，悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症患者 (5 例)，未治療副甲状腺機能低下症患者 (8 例)，活性型ビタミン D_3 投与副甲状腺機能低下症患者 (21 例)，偽性副甲状腺機能低下症患者 (2 例)，サルコイドーシスに伴う高カルシウム血症患者 (2 例) の血中 1,25-$(OH)_2$ D の測定を行った．

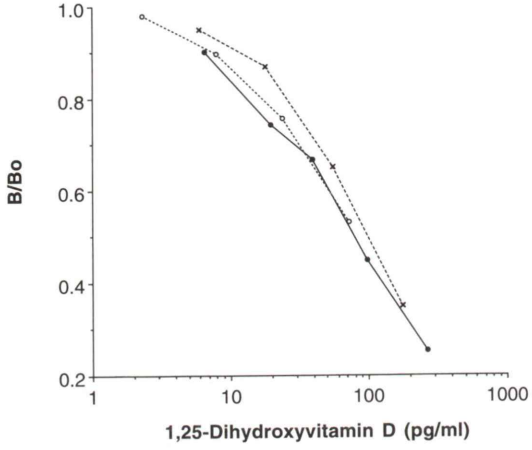


Fig. 3 Dilution analysis of two samples. Two samples were diluted with zero-standard solution and measured by RIA. Expected values were obtained in both samples.

III. 結　果

1. 基礎的検討

Fig. 2 に本測定系の標準曲線を示すが，8 回の測定の平均値と標準偏差を示している．4 pg/ml から 180 pg/ml まで容量反応曲線が得られ，この範囲内での測定が可能と考えられた．

Table 1 に同時および日差再現性の成績を示すが同一測定では C.V. が 11.3%，測定間では C.V. が 12.2% であった．

Table 2 に添加回収試験の結果を示す．既知量のサンプルに 3 つの既知量の 1,25-$(OH)_2$ D_3 を加えて回収率を計算したが，その平均値と標準偏差は 102±35% であった．

Fig. 3 に 2 つの検体の希釈試験の結果を示すが，希釈曲線は標準曲線と平行していた．

Fig. 4 に各種ビタミン D 代謝物あるいはアナロ

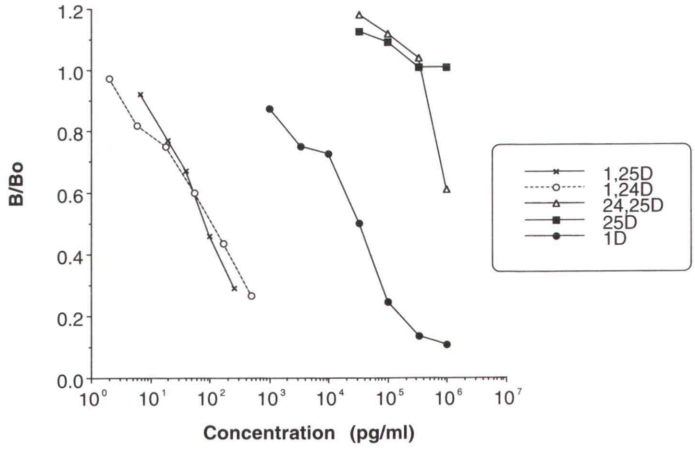
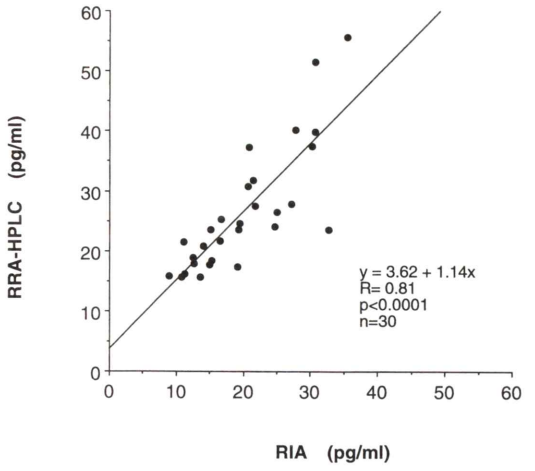


Fig. 4 Cross-reactivity of vitamin D metabolites or analogues. 1,25D: 1,25-dihydroxyvitamin D_3, 1,24D: 1,24-dihydroxyvitamin D_3, 24,25D: 24,25-dihydroxyvitamin D_3, 25D: 25-hydroxyvitamin D_3, 1D: 1α-hydroxyvitamin D_3



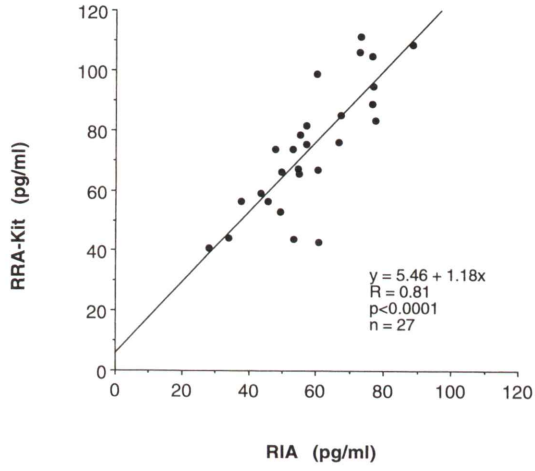


Fig. 5 Correlation between conventional HPLC purification-RRA method and mini column purification-RIA method (upper panel). Correlation between mini column purification-RRA method and mini column purification-RIA method (lower panel).

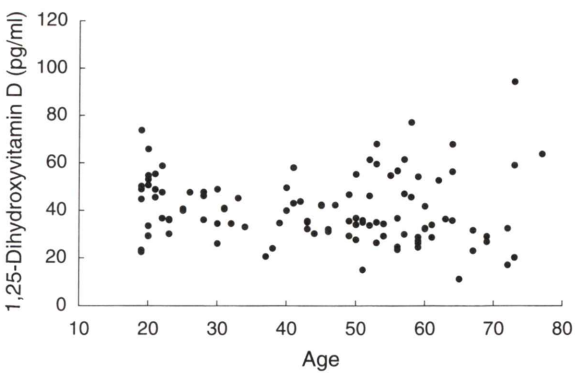


Fig. 6 Circulating 1,25-dihydroxyvitamin D levels in healthy adults.

グの交叉試験の結果を示す．1,24-$(OH)_2$ D_3 とはほぼ 100% 交叉した．また 1α-OH D_3 とは約 500 倍，また 24,25-$(OH)_2$ D_3 とは約 10,000 倍の濃度にて交叉が認められた．25-OH D_3 とは検討した範囲内の濃度では交叉が認められなかった．

Fig. 5 に他の測定法による 1,25-$(OH)_2$ D 測定成績との相関を示す．HPLC 法と相関係数 0.81，メジフィジックス社のキットでの成績との相関係数 0.81 でともに有意の相関を認めたが，本 RIA キットの測定値は約 15% ほど低い値を示した．

2. 臨床的検討

健常成人の測定値の年齢分布を Fig. 6 に示す．20 歳前後でやや高値例があり，高齢者において値がばらつく傾向が認められる．1,25-$(OH)_2$ D の測定平均値 (平均値±1S.D.) は男性 42.4±12.0 pg/m*l*，女性 39.8±15.0 pg/m*l* と有意の性差は認めず，全例で 40.5±14.2 pg/m*l* であった．この値より平均値±2S.D. の範囲は 12～69 pg/m*l* であると計算される．

各種疾患患者における測定成績を Fig. 7 に示す．血中 1,25-$(OH)_2$ D は，急性腎不全，慢性腎不全，副甲状腺機能低下症，偽性副甲状腺機能低下症の患者において低値を示し，一方，原発性副甲状腺機能亢進症やサルコイドーシスに伴う高カルシウム血症患者において高値を示した．また活性型ビタミン D_3 投与中の慢性腎不全症例や，副甲状腺機能低下症例における血中レベルは正常範囲内にあった．悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症例では低い例と正常範囲内にとどまる例とが存在した．

IV. 考　察

1,25-$(OH)_2$ D は腎にて産生されるカルシウム調節ホルモンの一つであり，カルシウム代謝におい

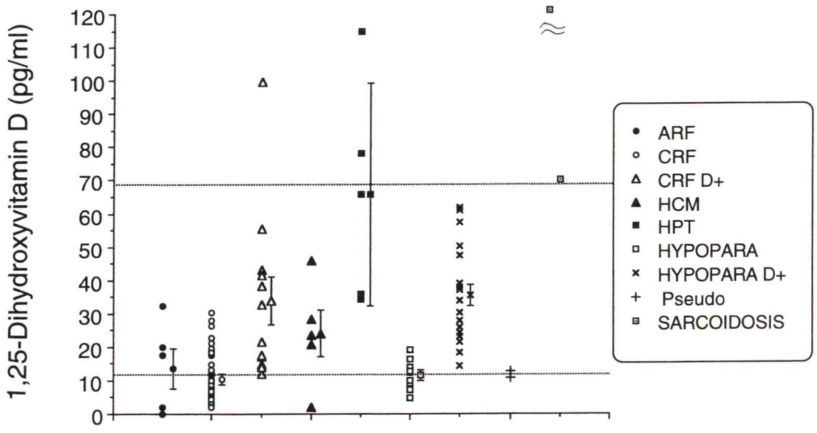


Fig. 7 Circulating 1,25-dihydroxyvitamin D levels in patients with various diseases. Measured values and mean±S.E. of those are shown. Alleviations; ARF: Acute renal failure, CRF: Chronic renal failure, CRF D+: Chronic renal failure with vitamin D_3 treatment, HCM: Hypercalcemia of malignancy, HPT: Primary hyperparathyroidism, Hypopara: Hypoparathyroidism, Hypopara D+: Hypoparathyroidism with vitamin D_3 treatment, Pseudo: Pseudohypoparathyroidism

て重要な役割を果たしており，その血中レベルの測定は臨床的にも重要である[1~3]．

従来，血中 1,25-$(OH)_2$ D レベルの測定は血清より脂質成分を抽出後，HPLC を用いて精製し，1,25-$(OH)_2$ D 受容体を用いるレセプターアッセイにて行われてきた．そしてレセプターアッセイのためには，生物活性を有する ^{3}H 標識 1,25-$(OH)_2$ D_3 が放射性標識物質として不可欠であった．最近になって，HPLC による精製にかわって，簡易カラムを用いる方法がキット化されて登場し[5,7]，このキットによる測定が広く行われている．測定は比較的簡便となったが，従来のキットはなおウシ胸腺レセプターを用いる RRA であり，放射性標識物質としてなお β 核種を用いる必要があり，その取り扱いに問題があった．今回，レセプターのかわりに特異抗体を用いる RIA キットが登場し，放射性標識物質として ^{125}I 標識 1,25-$(OH)_2$ D アナログを用いることが可能となり，ガンマカウンターにて放射能測定が可能となり，さらに測定が簡便となった．

本キットの基礎的検討を行ったが，再現性，希釈試験などにおいて問題なく，また標準曲線はキットのロットごとにばらつきも少なく安定であった．臨床的に問題となる各種ビタミン D 代謝物との交叉性においても，抽出操作後においては，1α-OH D_3 で 500 倍，24,25-$(OH)_2$ D_3 で 1 万倍，25-OH D_3 では 1 万倍以上の濃度にて影響があると考えられたが，これらは通常の臨床においてはほとんどあり得ないレベルであり，問題がないと考えられた．この理由として，これらのビタミン D の代謝物は，RIA には干渉し得るが，ミニカラムによる前処置にてほとんど問題のないレベルにまで除外されているためと考えられる．血中 1,25-$(OH)_2$ D のレベルは低いためなお血清サンプルの前処置 (精製) は必要であるが，本キットの手順どおりの抽出精製操作にて，他のビタミン D 代謝物の影響は除外できると考えられた．ただ，通常は体内にはあり得ない物質であるが 1,24-$(OH)_2$ D_3 は 1,25-$(OH)_2$ D と全く同様に抽出され，アッセイでも完全に交叉し，1,25-$(OH)_2$ D と区別できない．ミニカラムによる抽出精製は簡易法であり，過去特に問題は指摘されていないが，臨床的に不可解な値が算出されたとき，アッセイに干渉する代謝物を考慮して HPLC などによる精査を

考えるべきである．

従来の測定系との測定成績の比較では，HPLC 法，および，ウシ胸腺受容体を用いるメジフィジックス社のキットでの測定成績との間にいずれも相関係数 0.81 の正相関が認められた．これは，HPLC 法 (三菱 BCL) とメジフィジックス社のキットとの間の相関を検討した成績での相関係数 0.77 という報告[7] とほぼ同様である．また本キットの測定値は従来の測定系，特にメジフィジックス社のキットに比し低い値 (約 15%) を示した．その理由は明らかでないが，用いているスタンダードの違いによる可能性もある．ちなみに，従来のメジフィジックス社のキットは HPLC法 (三菱 BCL) に比し約 9% 高い値を示していることが報告されており[7]，1,25-$(OH)_2$ D 測定系においては測定系間での測定値に若干の相違があることは従来より指摘されていることである．より多くのサンプルでの比較検討が必要と思われるがデータの解釈において注意が必要である．

111 名の健常者の測定成績では，平均値 40.5±14.2 pg/m*l* であった．これは，従来の HPLC 法を用いての 45±15 pg/m*l* という成績[8] や，メジフィジックス社のキットでの 49.1±11.8 pg/m*l* (ただし 19 歳以下も含む) という成績[7] に比し若干低いが前記理由によるものと思われる．また 20 歳前後の例で高い例が認められ，また高齢者においては値がばらつく傾向も，従来の報告と同様に認められた[8]．

各種疾患患者の成績においては，従来の多くの成績と一致して[2,3,7]，腎不全症例や，副甲状腺機能低下症例において低値を，原発性副甲状腺機能亢進症患者やサルコイドーシスに伴う高カルシウム血症患者において高値 (一例は 400 pg/m*l* に達した) を示した．また，活性型ビタミン D_3 投与中の患者においては，正常範囲内にそのレベルが上昇していた．従来言われているごとく，これらの骨カルシウム代謝性疾患の診断や，治療経過や病態の観察に有効であると考えられた．

V. 結　論

簡易カラムを用いて血清を前処置し，^{125}I 標識 1,25-$(OH)_2$ D アナログをトレーサとし，1,25-$(OH)_2$ D に対するヤギ抗体を用いて 1,25-$(OH)_2$ D を測定する RIA のキットの使用経験につき述べた．本キットは，測定精度，再現性など問題がなく，また γ 線核種を用いるという点で従来のキットに比し取り扱いやすくなっており，さらに臨床的にも従来の測定成績ともほぼ合致する成績を得，臨床的にも有用と考えられた．

文　献

1) DeLuca HF: The vitamin D system in the regulation of calcium and phosphorus metabolism. Nutrition Rev **37**: 161–193, 1979
2) 山本逸雄，滋野長平，日野　恵，青木　純，北村暢康，曽根照喜，他: 各種疾患における血中ビタミン D 代謝物の測定——特に血中 1,25-Dihydroxyvitamin D 濃度について——．ビタミン **61**: 1–12, 1987
3) 土光茂治，森田陸司，福永仁夫，山本逸雄，滋野長平，山本厚江，他: 人血中 vitamin D 誘導体測定に関する研究．第三編　諸種疾患患者における vitamin D 誘導体の血中濃度．日内分泌会誌 **58**: 758–770, 1982
4) 土光茂治，森田陸司，福永仁夫，山本逸雄，滋野長平，山本厚江，他: 人血中 vitamin D 誘導体測定に関する研究．第二編　諸種 vitamin D 誘導体の同一試料からの同時測定に関する基礎的研究．日内分泌会誌 **57**: 1223–1238, 1981
5) 高田政彦，山本逸雄，大中恭夫，浜津尚就，森田陸司，青木悦雄，他: 血漿のミニカラムによる精製を用いた 1,25-Dihydroxyvitamin D の測定——高速液体クロマトグラフィによる精製との比較——．核医学 **28**: 659–664, 1991
6) Hollis BW: Assay of circulating 1,25-dihydroxyvitamin D involving a novel single cartridge extraction and purification procedure. Clin Chem **32**: 2060–2063, 1986
7) 松本俊夫，黒川　清，山本逸雄，小林　正，尾形悦郎: 簡易カラムを用いた 1,25-$(OH)_2$ D 測定キットの検討．ホルモンと臨床 **41**: 491–498, 1993
8) 山本逸雄，阿曽沼和代，山村聡子，土光茂治，北村暢康，青木　純，他: 日本人の健常者における血中 1,25-Dihydroxyvitamin D 測定について．ビタミン **60**: 371–377, 1986

Summary

Measurement of Circulating 1,25-Dihydroxyvitamin D Employing Radioimmunoassay

Itsuo YAMAMOTO, Hisatoshi HAMAZU, Yuusuke KIGAMI and Rikushi MORITA

Department of Radiology and Isotope Division, Shiga University of Medical Science

Measurement of serum 1,25-dihydroxyvitamin D levels is important for diagnosis of various calcium metabolism disorders. Conventional assays for 1,25-dihydroxyvitamin D employed specific 1,25-dihydroxyvitamin D receptor as binding site for the ligand and thus, biologically active 1,25-dihydroxyvitamin D ligand, which is labeled with ^{3}H, was required. Usage of ^{3}H made assays cumbersome works. A new assay which uses specific antibody as the binding site and the radioligand labeled with ^{125}I is now available as a commercial kit. Using these kits, we first studied basically the reproducibility, recovery, cross-reactivity and comparison with conventional assays. All of those results were satisfactory. Secondly, we measured clinically in 111 healthy adults and in patients with various disorders such as renal failure, primary hyperparathyroidism, hypoparathyroidism and sarcoidosis. This newly available kit for measurement of circulating 1,25-dihydroxyvitamin D is proved to be useful in clinical evaluation of calcium metabolic disorders.

Key words: 1,25-dihydroxyvitamin D, Radioimmunoassay, Calcium metabolism, Radioreceptor assay.