高感度 PTH 測定法による健常者の血中 PTH 動態と 各種疾患の病態解析

神戸大学医学部第3内科

深瀬 正 晃, 藤 田 拓 男

東京大学医学部第4内科

松 本 俊 夫, 尾 形 悦 郎

ヤマサ醤油株式会社研究所

飯 島 隆, 竹 沢 順 一, 斎 藤 健 一

石 毛 英 幸, 藤 本 正 雄

Clinical Studies Using a Highly Sensitive Radioimmunoassay for
Mid-Region and Carboxy Terminus of Parathyroid Hormone in
Normal, Hypo- and Hypercalcemic States

Masaaki FUKASE and Takuo FUJITA

Third Division, Department of Medicine,
Kobe University School of Medicine, Kobe 650, Japan

Toshio MATSUMOTO and Etsuro OGATA

The Fourth Department of Internal Medicine,
Tokyo University School of Medicine, Tokyo 112, Japan

**Takashi IJIMA, Junichi TAKEZAWA, Kenichi SAITO,
Hideyuki ISHIGE and Masao FUJIMOTO**

Research Laboratories, YAMASA SHOYU Co., Ltd.,
Choshi 288, Chiba, Japan

Parathyroid hormone radioimmunoassay (RIA), specific for mid-region of the PTH molecule, has been proven to be extremely useful for the differential diagnosis of abnormal calcium metabolism.

Recently, we developed a highly sensitive RIA for PTH, consisting of PTH antiserum (CH9), ^{125}I labelled Tyr⁴² hPTH (43–68) and synthetic hPTH (1–84) as standard. This RIA cross-reacted with mid-region and carboxyl terminals of PTH. The within-assay and between-assay coefficients of variation were less than 4.6% and less than 8.6%, respectively. The limit of detection was 50pg/ml. The levels of serum calcium, serum phosphate, serum creatinine, Tmpo₄/GFR and creatinine clearance (Ccr) in normal healthy volunteers aged 20 to 50 years remained almost constant and showed $9.24 \pm 0.34\text{mg/dl}$ (mean $\pm$ SD, $n = 242$), $3.34 \pm$

0.38mg/dl ($n=242$), 0.870 ± 0.121 mg/dl ($n=242$), 3.20 ± 0.54 mg/dl GF ($n=189$) and 103 ± 17 ml/min ($n=137$), respectively. All healthy volunteers ($n=326$) had measurements of PTH in the blood. From 20 to 50 years, normal PTH mean was 374 ± 97 pg/ml ($\pm$ SD, $n=237$) and ranged from 180–568pg/ml, and from 60 to 80 years it was 471 ± 133 pg/ml ($n=34$) and ranged from 205–737pg/ml.

Since we found that PTH was markedly elevated above normal when Ccr was below 40ml/min, and PTH was very significantly correlated with the reciprocal of Ccr ($r=0.8996$, $P<0.001$) using a multivariate analysis, all of the patients whose Ccr was higher than 40ml/min were selected and examined in the following studies. Serum PTH values completely separated patients with surgically proven primary hyperparathyroidism (1° HPT) from malignant associated hypercalcemia (MAH), and patients with idiopathic hypoparathyroidism (IHP) from pseudohypoparathyroidism (PHP), both of which were diagnosed by Ellsworth-Howard test. PTH values in all of the patients with 1° HPT ($n=23$) were above normal, but those with MAH ($n=6$) were below the normal or lower normal range. PTH values in patients with PHP ($n=7$) showed above normal, while those with IHP ($n=5$) were below the normal range. PTH was normalized in post operative status in all patients after parathyroidectomy ($n=6$).

These results indicate that this PTH RIA is extremely useful for the differential diagnosis in diseases with calcium abnormalities.

緒 言

血中副甲状腺ホルモン (PTH) は、これまで radioimmunoassay により INTACT, C 端, N 端などいくつかの測定系が開発され臨床に供されてきたが、従来の測定系は健常者の血中 PTH を全例測定できるものではなく、PTH をマーカーとして各種疾患を診断し、その病態を解析する場合、おのずと限界があった。すなわち、従来の方法では正常者でも測定感度以下のものがあり、そのため特発性副甲状腺機能低下症 (IHP) と正常者の区別が出来ず、また偽性副甲状腺機能低下症 (PHP) の PTH 値も測定感度限界をとる例があるなどの問題があった。さらには原発性副甲状腺機能亢進症 (1° HPT) の PTH 値が、正常者のそれと区別が出来ない場合もあるなどの難問をかかえてきた。

今回私共は、Slatopolsky らが作製した抗血清 (CH9) ⁷⁾、標準品として合成ヒト PTH (1-84) 及びトレーサーには新たに ^{125}I -Tyr⁴²ヒト PTH (43-68) を使用する高感度キット「ヤマサ」を確立し、326名の健常ボランティアの血中 PTH を全例測定できることを確認した。しかも高 Ca、低 Ca 血症をきたした疾患の鑑別も可能となったことより、従来の問題点をほぼ全面的に解決しうる結果を得たので報告する。

対 象 と 方 法

1) 正常対象

正常対象群は、予備検診で過去に特記すべき疾患や投薬歴のないボランティアで健康であると判定し得た336名を抽出し、以下の方法に従って採血、採尿を行った。原則として採血は朝 (8～10時)

空腹状態で行い、血清及び血漿を分離後 -20°C 以下で凍結保存した。採尿は同日起床時に排尿後約200ml飲水し、8～10時の時間尿を採り、尿量を計測した後その10mlを -20°C で凍結保存した。

2) カルシウム (Ca), リン (P), クレアチニン (Cr), 尿細管最大再吸収量 (TmPO_4/GFR) 及び cyclic AMP 測定法

血清及び尿中 Ca は O—CPC 法, P は酵素法, Cr は Jaffe 法による自動分析機 (日立736オートアナライザー) により測定した。 TmPO_4/GFR は Walton, Bijvoet らの方法¹⁹⁾に準じて行った。血漿及び尿中 cyclic AMP はサイクリック AMP キット「ヤマサ」⁹⁾を使用し、腎原性サイクリック AMP (Nephrogenous cyclic AMP, NcAMP)²³⁾¹⁷⁾を測定した。

3) PTH 測定法

PTH キットの構成試薬は、抗血清液として抗ウシ PTH (1—84) ニワトリ血清を、トレーサーは ^{125}I -Tyr⁴²ヒト PTH (43—68), 標準液はヒト PTH (1—84) [W.H.O.から提供されたヒト PTH (ロットNo79/500) により校正した合成ヒト PTH (1—84) (Peptide Inst. Osaka, Japan)] を、また第2抗体液は抗ニワトリ IgG ヤギ血清を用いた。

操作方法は検体または PTH 標準液200 μl に抗血清100 μl を加え混和し、室温で4時間静置した後、トレーサー100 μl を加えて低温 ($0\sim 8^{\circ}\text{C}$) で18時間静置した。B/F 分離に第2抗体1mlを加え低温 ($0\sim 8^{\circ}\text{C}$) で1時間静置後、遠心分離 ($2\sim 8^{\circ}\text{C}$, 3,000rpm, 20分間) し沈渣をカウントした。

本測定法の基礎的検討

①特異性：特異性の検討には、ヒト合成 PTH (1—34), PTH (1—44), PTH (39—68), PTH (39—84), PTH (69—84) (以上 Peptide Inst.) PTH (44—68) (Calbiochem, Hoechst, Japan) の合成フラグメントを用い、それぞれを分子量換算して cross-reactivity を比較した。

また各種ホルモン (calcitonin, prolactin, ACTH, HCG, TSH) についてもその交叉性を検討した。交叉性は各種標準曲線において B/Bo を50%抑制するに必要な PTH の濃度 (ID_{50}) を求め、PTH (1—84) の ID_{50} に対する比として求めた。

②測定限界：標準液の6重測定の結果より標準曲線を求め、最小測定限界は $\text{Bo}-2\text{SD}$ における標準 PTH (1—84) の濃度とのインターセプトより求めた。

③希釈試験：正常対象者、原発性副甲状腺機能亢進症、偽性副甲状腺機能低下症及び腎不全による2次性副甲状腺機能亢進症、各1例の血清を使用し、標準液との平行性を検討した。

④添加回収試験：5つの異なる検体の保存プール血清に、PTH 標準液を1:1に添加した試料を使用し、回収率を求めた。

⑤精度再現性試験：同時再現性試験は、3種類の異なる濃度の各検体を同一ロットで計6回繰り返し2重測定し、その平均値 $\pm 2\text{SD}$ より変動係数(%CV)を求めた。また、ロット間再現性試験は、3種類の異なる濃度の各検体を製造時期の異なる4ロットのキットを用いて各々6回繰り返し2重測定し、%CV値を求めた。

⑥採血条件の検討：10例の正常対象者より静脈採血し、血清と4mM EETA 血漿 (テルモ社製, VT-070NA) に分けて測定し、比較検討した。

⑦検体の保存条件の検討：正常対象者、透析患者及び健常人血清に標準 PTH を添加した検体を、3つの異なる温度条件下 (-20°C , 4°C , 22°C) で最大160時間まで保存した試料、並びに -20°C の温度条件下で最大5カ月まで保存したものを測定した。

⑧凍結融解の影響：原発性副甲状腺機能亢進症の 2 例及び健常人の 2 例の血清及び血漿を，最大15回凍結融解を繰り返しその安定性を検討した。

4) 各種疾患の選定条件

腎機能と血中 PTH の関係は，Ccr が40ml/min を境として，Ccr の低下に対応した血中 PTH の著しい上昇を認めたことから各種疾患の対象患者の選定は，Ccr が40ml/min 以上の腎機能低下の認められない症例を選んだ (Fig. 7)。さらに，各疾患の診断—1°HPT 根拠を明らかにするため，次に示す診断基準に適合する症例のみを選んだ：原発性副甲状腺機能亢進症 (1°HPT) は，手術によって1°CHPT と診断し，組織学的に腺腫ないし過形成と確認し得た23例。高カルシウム血症を伴う悪性腫瘍 (MAH) は，組織学的に癌と証明し得た 6 例 (乳癌，膀胱癌，卵巣癌，腎臓癌，肺癌，白血病の各 1 例)。偽性副甲状腺機能低下症 (PHP) は，厚生省ホルモン受容異常調査研究班の偽性副甲状腺機能低下症分科会による Ellsworth-Howard テストの判定基準¹⁴⁾に従い， Δ cAMP ($< 1 \mu\text{mole/h}$)，cAMP 比 (< 10) 及び Δ P ($< 35\text{mg}/2 \text{ h}$) を確認し得た 7 例。特発性副甲状腺機能低下症 (IHP) は，低カルシウム及び高リン血症を示し上記と同様 Ellsworth-Howard テストにより Δ cAMP ($\geq 1 \mu\text{mole/h}$)，cAMP 比 (≥ 10) 及び Δ P ($\geq 35\text{mg}/2 \text{ h}$) を確認し得た 5 例。

5) 血中 PTH と NcAMP の関係を比較検討するため各疾患における血中 PTH と NcAMP を同時測定し，次式により SD 比を求めた。

$$\text{SD 比} = \frac{[\text{各実測値}] - [\text{正常対象者の平均値}]}{[\text{正常対象者の S. D. 値}]}$$

6) 統計処理はコンピュータ (PC9801VX, 日本電気) を用いて多変量解析⁸⁾及び Student t. ¹⁶⁾により検定し，それぞれ $P < 0.001$, $P < 0.05$ を有意と判定した。

結 果

1) PTH 測定法の基礎的検討

①測定法の特異性 (Fig. 1, Table 1)

本測定法は WHO 標品の PTH (1—84) を 1 とした場合，PTH 分子の中間部及び中間部を含む C 端側である PTH (39—68)，PTH (44—68)，PTH (39—84) の交叉性はいずれも 1.59 であり，一方 N 端側から中間部にかけての PTH (1—34)，PTH (1—44) 及び C 端側 (69—84) とは交叉性を認めなかった。また本測定法は prolactin (1—100ng/ml)，ACTH (0.1—10ng/ml)，HCG (1—100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)，TSH (0.1—10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 及び calcitonin (1—100ng/ml) とともに交叉性を認めなかった。

②測定感度と測定範囲 (Fig. 2)

抗原として PTH を含まない標準液との抗体との結合率 (Bo) から求めた平均値マイナス 2 SD に対応する PTH 値は 50pg/ml であり，最小測定感度を 50pg/ml においた。また 100—3,200pg/ml の測定範囲内での 6 点におけるそれぞれの変動係数は，5.7% 以下であった。

③希釈試験 (Fig. 3)

各検体を希釈し，標準曲線との平行性を logit—log 変換を用い検討したところ，健常人及び各症例とも十分な平行性が得られた。

④添加試験 (Table 2)

添加回収率は，最大値は，110.5%，最小値は 91.0% であり，その平均値 $\pm$ SD は $98.7 \pm 7.2\%$ であった。

Fig. 1. Regional specificity of anti-PTH serum. The intact PTH and the six fragments studied were (●) hPTH (1-84), (▲) hPTH (1-34), (■) hPTH (1-44), (○) hPTH (39-68), (□) hPTH (44-68), (△) hPTH (39-84) and (▽) hPTH (69-84). All assays received 2.2×10^4 – 1.4×10^4 dpm/tube (125 I)-Tyr⁴² hPTH (43-68) and anti-PTH chicken serum (CH9, final dilution $\times 16,000$). The percent of maximum specific binding is plotted as a function of the amount of intact PTH and its fragments on a semilogarithmic scale.

Table 1. Cross-reactivity of the anti-PTH serum (CH9) estimated by ID_{50} against (125 I)-Tyr⁴² hPTH (43-68).

PTH	Cross-reactivity
hPTH (1-84) (WHO 79/500)	1
hPTH (1-34)	<0.029
hPTH (1-44)	<0.036
hPTH (39-68)	1.59
hPTH (44-68)	1.59
hPTH (39-84)	1.59
hPTH (69-84)	<0.012

This antiserum recognized chiefly the 44-68 region in this assay system. The formula for calculating ID_{50} is: the amount of hPTH (1-84) required for a 50% inhibition from maximum binding in the absence of standard, divided by that of each PTH fragment for a 50% inhibition from maximum binding in the absence of these fragments.

Fig. 2. Typical standard curve for human PTH assay with antiserum (CH9), $(^{125}\text{I})\text{-Tyr}^{42}$ hPTH (43–68) and hPTH (1–84) as standard. The ordinate represents specific binding as percent of maximum in the absence of standard (expressed as B/Bo). The dashed line depicts the assay limit of detection (50pg/ml). The solid line represents the standard curve.

Fig. 3. Assessment of parallelism between plasma PTH in various human samples and the standard. (○) Normal subject and a patient with (▲) primary hyperparathyroidism (1° HPT), (■) secondary hyperparathyroidism (2° HPT) due to chronic renal failure, or (△) pseudohypoparathyroidism (PHP) were used in this study. The percent of specific binding of each diluted plasma (×1–×8) was plotted on a logit-log scale. All these samples were in parallel to the standard.

Table 2. Recoveries of the unlabelled standard PTH added to sera in patients with (A) idiopathic hypoparathyroidism, (B, C) normal and (D, E) primary hyperparathyroidism.

Sample	Added PTH (pg/ml)	Measured PTH (pg/ml)	Recovered PTH (pg/ml)	Recovery (%)
A	0	75	—	—
	200	278	203	101.5
	400	474	399	99.8
	800	850	781	97.6
	1,600	1,742	1,667	104.2
B	0	213	—	—
	200	421	221	110.5
	400	610	397	99.3
	800	1,003	790	98.8
	1,600	1,850	1,637	102.3
C	0	168	—	—
	200	361	193	96.5
	400	575	407	101.8
	800	941	773	96.6
	1,600	1,758	1,590	99.4
D	0	842	—	—
	200	1,024	182	91.0
	400	1,276	434	108.5
	800	1,611	769	96.1
	1,600	2,353	1,511	94.4
E	0	1,185	—	—
	200	1,372	187	93.5
	400	1,606	421	105.3
	800	2,011	826	103.3
	1,600	2,712	1,527	95.4

98.7±7.2
(Mean±S.D.)

The mean per cent of recovery was 98.7% in this study.

⑤精度再現性試験 (Table 3)

同時再現性及びロット間再現性の変動係数は, それぞれ4.6%以下, 8.6%以下であった。

⑥採血条件 (Table 4)

健康人10例の血清及び EDTA 血漿での測定値は, それぞれ 298 ± 51.8 , 296 ± 51.2 pg/mlであり測定値間に差は認めなかった。

⑦検体の保存条件 (Fig. 4)

採血後の検体の保存条件は, 22°C 保存でも24時間まで採血直後の測定値と差がなく, 4°C では72時間安定であった。また, -20°C の保存条件では採血後5ヵ月を経過しても測定値に差を認めなかった。

⑧凍結融解の影響 (Table 5)

凍結融解を最大15回繰り返し行っても, 原発性副甲状腺機能亢進症及び健康人とも, 凍結融解の前後での血中 PTH に変化を認めなかった。

2) 健康人の血清 Ca, P, Cr 及び TmPO_4/GFR , Ccr と血中 PTH 値の経年的変化

①血清 Ca の経年的変化 (Fig. 5)

各年齢における血清 Ca は, 10歳代までの若年者において高値を示し高齢化と共に低下した。しかし20~50歳代までの血清 Ca 値はほぼ一定であり, その平均値 $\pm$ SD は 9.24 ± 0.34 mg/dl ($n=242$) であった。

Table 3. The intra-assay and inter-assay coefficients of variation (C.V.) for the samples with different serum PTH levels.

Intra-assay			
Sample	No.	Mean $\pm$ S.D.(pg/ml)	C.V.(%)
1	6	262 ± 9.3	3.5
2	6	668 ± 30.9	4.6
3	6	$1,657 \pm 46.7$	3.5
Inter-assay			
Sample	No.	Mean $\pm$ S.D.(pg/ml)	C.V.(%)
1	4	278 ± 24.0	8.6
2	4	676 ± 47.4	7.0
3	4	$1,777 \pm 120.9$	6.8

The per cent of C.V. was less than 4.6% in intra-assay and less than 8.6% in inter-assay, respectively.

②血清 P の経年的変化 (Fig. 6)

各年齢における血清 P は、10歳代までの若年者において高く、20～50歳まではほぼ一定し、その傾向は60歳代以降でも同様であった。20～50歳代の平均値±SD は $3.34 \pm 0.38 \text{ mg/dl}$ ($n=242$) であった。

③血清 Cr の経年的変化 (Fig. 7)

各年齢における血清 Cr は、20歳代までは低く年齢と共に上昇し、以後成人ではほぼ一定した。20～50歳代までの Cr 値の平均値±SD は $0.870 \pm 0.121 \text{ mg/dl}$ ($n=242$) であった。

④ Tmpo₄/GFR の経年的変化 (Fig. 8)

各年齢における血清 Tmpo₄/GFR は10歳代までは高値を示し、以後20～50歳代までほぼ一定であり、60歳代以降は軽度上昇する傾向を示した。20～50歳代までの Tmpo₄/GFR の平均値±SD は $3.20 \pm 0.54 \text{ mg/dl}$ ($n=189$) であった。

Table 4. Comparison of PTH levels in serum with those in EDTA-treated plasma from the same normal subjects ($n = 10$).

Sample	Serum (pg/ml)	EDTA plasma (pg/ml)
1	226	229
2	367	368
3	362	370
4	264	258
5	269	288
6	332	313
7	335	312
8	228	220
9	292	281
10	307	317
Mean ±S.D.	298 ± 51.8	296 ± 51.2

There was no significant difference between serum and plasma PTH levels.

⑤ Ccr の経年的変化 (Fig. 9)

各年齢における Ccr は10歳代までの若年者において高値を示したが³, 20~50歳代ではほぼ一定の値を示し, その Ccr の平均値 $\pm$ SD は 103 ± 17.0 ml/min ($n=137$) であり, 60歳以上では低下する傾向を示した。

⑥血中 PTH の経年的変化 (Fig. 10)

各年齢における血中 PTH は, 10歳代までの若年者では低値を, 高齢者では高値を示し, 健常人326例の全例が測定可能であった。20~50歳代の血中 PTH はほぼ一定であり, その平均値 $\pm$ SD は 374 ± 97 pg/ml ($n=237$), 平均値 $\pm$ 2 SD の範囲は $180 \sim 568$ pg/ml, 最小から最大値の範囲は $180 \sim 727$ pg/mlであった。なお60歳代以降の平均値 $\pm$ SD は 471 ± 133 pg/mlで最小から最大の範囲は $197 \sim 762$ pg/mlであった。

3) 血中 PTH と Ccr との関係 (Fig. 11)

健常人 (137名) 及び慢性腎不全患者 (36名) において Ccr の増減に対する PTH 値変動を検討した。血中 PTH 値は Ccr が 40 ml/min を境として Ccr の低下に対応した PTH 値の著しい上昇を認めた。($r=0.8996$, $p<0.001$)

Fig. 4. The effects of time course and/or temperature on serum PTH levels. PTH levels were unaltered, at least, for 24 hours at room temperature, for 72 hours at 4°C and for five months at -20°C .

Table 5. Effect of repeated times of freezing and thawing on PTH levels in serum or plasma from normal subjects and patients with primary hyperparathyroidism (1° HPT).

Sample		PTH (pg/ml)			
		Repeated times of freezing and thawing			
		1*	5	10	15
1. Normal subject (A)	serum	380±15.5	390	403	395
	plasma	383±22.4	407	393	416
2. Normal subject (B)	serum	462±21.6	475	471	460
	plasma	492±20.3	469	464	462
3. 1° HPT	serum	804±45.1	826	767	860
	plasma	845±32.6	854	816	819
4. 1° HPT	serum	1,017±51.8	1,096	1,090	1,094
	plasma	1,051±42.7	1,082	1,064	1,053

*: Mean±S.D. n=3

Although PTH measurements were performed in duplicated, original samples were assayed at three different times.

Fig. 5. Serum calcium levels in healthy children and adults between 0 and 86 years old. This parameter remained almost constant between ages 20 and 50 yr.

Fig. 6. Serum phosphate levels in healthy children and adults between 0 and 86 years old. This parameter remained almost constant between ages 20 and 50 yr.

Fig. 7. Serum creatinine levels in healthy children and adults between 0 and 86 years old. This parameter remained almost constant between ages 20 and 50 yr.

Fig. 8. TmpO_4/GFR values in healthy children and adults between 0 and 86 years old. This parameter remained almost constant between ages 20 and 50 yr.

Fig. 9. Creatinine clearance values in healthy children and adults between 10 and 80 years old. This parameter remained almost constant between ages 20 and 50 yr.

Fig. 10. Blood PTH levels in normal subjects, as a function of age. PTH levels remained almost constant between ages 20 and 50 yr. Plasma PTH levels in normal subjects between ages 20 and 50 yr. were 374 ± 97 pg/ml (mean $\pm$ S.D., $n = 237$) and 471 ± 133 pg/ml (mean $\pm$ S.D., $n = 34$) between 60 and 80 yr.

Fig. 11. Blood PTH levels as a function of creatinine clearance (Ccr) in normal subjects and patients with chronic renal failure. Increasing levels of blood PTH with a decrease of Ccr were observed at each Ccr value below 40 ml/min.

4) NcAMP と Ccr との関係 (Fig. 12)

健常人 (137名) 及び慢性腎不全患者 (26名) において Ccr の増減に対する NcAMP 値変動を検討した。PTH と Ccr の間にみられるほど強い相関はないが、NcAMP 値は Ccr が 40ml/min を境として Ccr の低下に対応した NcAMP 値の著しい上昇を認めた。

($r=0.4638$, $p<0.001$)

5) 各種疾患における血中 PTH 測定値 (20~50歳代) (Fig. 13)

① 高カルシウム血症をきたした疾患

1°HPT (血清 Ca 値22例が $10.8\sim 12.4\text{mg/dl}$, 他の1例が 10.0mg/dl と正常上限値) では、23例全例血中 PTH は健常人 (20~50歳代) の平均値 $\pm 2\text{SD}$ 以上と異常高値を示し、健常人と完全に区別し得た。このうち同一患者で、術前、術後の血中 PTH を測定できた6症例において術前異常高値を示した血中 PTH は、副甲状腺切除術後血清 Ca 値が明らかに正常化ないし低値 (hungry bone) を示した時点で正常化していた (Table 6)。

1°HPT と同様に高カルシウム血症を伴う悪性腺瘍 (MAH) 群 (血清 Ca 値 $10.6\sim 15.2\text{mg/dl}$) では、血中 PTH 値が低値ないしは正常値を示し1°HPT 群から完全に区別し得た (6例中3例は正常範囲以下, 3例は正常値)。

② 低カルシウム血症をきたした疾患

低カルシウム血症をきたした PHP (血清 Ca 値6例が $4.3\sim 7.1\text{mg/dl}$, 1例が $8.5\sim 8.7\text{mg/dl}$ で normocalcemic PHP) と IHP (血清 Ca 値 $6.8\sim 8.2\text{mg/dl}$) のうち、IHP では5例全例が正常範囲以下ないしは測定感度以下であった。一方、PHP では7例全例が高値を示した。

Fig. 12. Nephrogenous cyclic AMP as a function of creatinine clearance in normal subjects and patients with chronic renal failure.

Fig. 13. Blood PTH levels in patients with clinical, pathological and biochemical evidence of 1° HPT, MAH, PHP and IHP. Shaded area represents the normal range of PTH.

Table 6. Serum calcium and PTH levels before and after operation (parathyroidectomy) in 6 patients with primary hyperparathyroidism.

No.	Serum Ca (mg/dl)		PTH (pg/ml)	
	pre-op	post-op	pre-op	post-op
1	11.6	8.2	2,540	570
2	11.0	8.4	1,360	650
3	12.0	8.8	2,150	660
4	10.9	8.0	11,600	508
5	11.4	9.3	900	334
6	11.1	8.9	1,800	256

After the operation, serum PTH levels were normalized in all cases.

6) 各疾患における血中 PTH と NcAMP の関係の比較検討 (Fig. 14)

23例の1°HPTのうち18例のNcAMPを測定した。全例PTH及びNcAMPは共に正常範囲以上の値を示した。さらにMAHではPTHは低値～正常値を示したが、NcAMPは3例中2例が高値を示し、1例は正常下限値であった。

一方、低Ca血症で血中PTHが正常下限以下であった4例のIHP患者のNcAMPは、正常下限又はそれ以下の値を示した。またNcAMPを測定し得たPHP 6例において、NcAMP値は低値～高値を示した。NcAMPが高値を示した3例中2例は明らかな低カルシウム血症を示した症例であり、1例はnormocalcemic PHPであった。

Fig. 14. Correlation of PTH and NcAMP values in patients with 1° HPT, MAH, PHP and IHP.

考 察

一般に良い血中ホルモン測定系とは、限りなく生理的及び病的状態を反映しうる系であることが要求される。しかし、従来の副甲状腺ホルモンの測定系は、正常者を全例測定し得ず、そのため病的状態、とりわけPTH値が低い特発性副甲状腺機能低下症や、逆にPTHの受容体機能異常症であり血中PTHが少なくとも低くないことが予想される偽性副甲状腺機能低下症の診断が困難であり、その病態生理の解明の障害となっていた。

この困難な問題に取り組みそれを解決すべく、私共は高感度PTH測定系を開発した。基礎的検討(添加回収, 希釈試験, 同時再現性及びロット間再現性試験)よりヒト血中PTHの測定結果は良好な再現性が得られ、また最小測定限界は50pg/mlであった(Fig. 2, 3, Table 2, 3)。このPTH測定法はPTH分子の中間部を含まないN端側及びC端側とは交叉性を認めず、中間部を含むPTH分子〔(39—68), (44—68), (39—84)〕と完全交叉性を認め、しかもPTH(1—84)に対してモル比で1.59であったことから、本測定法はとりわけPTH(44—68)部分を認識するものといえる(Fig. 1, Table 1)。さらに本法での血中PTH測定結果に高い信頼性がおける理由として、

検体の採取条件の差による PTH 値は血清と EDTA 血漿との間に差を認めず, 採取後室温条件では 24 時間まで安定であり, -20°C 凍結保存では 5 ヶ月間までその値に変化を認めず (Fig. 4, Table 4), しかも血清及び血漿を 15 回凍結融解を繰り返しても PTH 値は不変であったことがあげられる (Table 5)。

さて本測定系により健康人における血中 PTH を測定し正常値を求めた。その際カルシウム代謝に関与する因子を考慮し, 血清 Ca, P, Cr, TmPO_4/GFR 及び Ccr と加齢の関係をそれぞれ多変量解析により分析したところ, いずれも 20~50 歳代ではほぼ一定した値が得られ (Fig. 5—9), この年齢の範囲では血中 PTH 値も同様に一定の値を示した。このことから, 血中 PTH の正常値を 20~50 歳代までの年齢に限って求めると 237 例全例が測定可能であり, その平均値 $\pm$ SD は 374 ± 97 pg/ml で, 平均値 $\pm$ 2 SD を正常域とすると, その範囲は $180 \sim 568$ pg/ml であった (Fig. 10)。なお血中 PTH は 10 歳代以下の若年者で低く, 60 歳代以降は上昇する傾向を認めた (Fig. 10)。60 歳以上の老人では Ccr が低下しており (Fig. 8), 活性型ビタミン D である $1,25\text{-dihydroxyvitamin D}$ の合成が障害されるため腸管からのカルシウム吸収が低下し⁴⁾¹⁰⁾, そのため副甲状腺からの PTH 分泌が亢進しているものと解釈される (Fig. 10)。血清 Ca, P, Cr や TmPO_4/GFR , Ccr, PTH と加齢の関係を小児から高齢者 (0~86 歳) まで多変量解析により詳細に検討した報告は私共の報告がはじめてである。Marcus ら⁹⁾は 20 歳以上の健康人を対象に Ccr, TmPO_4/GFR , 及び血中 PTH と加齢の関係を一次回帰により解析しており, Ccr は高齢化と共に低下し血中 PTH は上昇することを認めている。

さて, 腎機能障害により血中 PTH 値が上昇することはよく知られた事実である⁵⁾¹¹⁾。そこで腎機能障害が血中 PTH 値にどのような影響を与えるかを本測定を用いて検討したところ, Ccr が $40\text{ml}/\text{min}$ 以上では血中 PTH は正常範囲内であったが, Ccr が $40\text{ml}/\text{min}$ 未満では Ccr の低下と共に血中 PTH 値が急上昇することが明らかとなった。この結果は Arnaud¹⁾の報告と一致する成績である。したがって Ccr が $40\text{ml}/\text{min}$ 以上の症例を選び, 各種疾患の PTH 濃度を測定する必要性が生じた (Fig. 11) ため, この条件を満足する高カルシウム, 低カルシウム血症をきたした症例を対象に血中 PTH を測定した。1°HPT は 23 例が全例高値を示し健康人と区別することができ (Fig. 13), 副甲状腺切除術後の PTH 濃度と比較しても術後明らかに低下を示した事から (Table 6), 本測定法は 1°HPT を確実に診断し得るものと考えられた。また, 高カルシウム血症を伴う悪性腫瘍 (MAH) では血中 PTH 値は低値~正常値を示し, 同じ高カルシウム血症を示す 1°HPT から完全に区別することができた。この結果は高 Ca 血症の一義的原因として血中 PTH が抑制されるとする従来の報告によく一致する成績であった¹³⁾¹⁶⁾ (Fig. 13)。一方, 低カルシウム血症を示す IHP と PHP については, 6 例の PHP の血中 PTH は全例高値を示し, IHP では全例正常以下の低値ないし感度以下の値をとり, 同じ低カルシウム血症をきたす群で病態の異なる PHP と IHP とを区別し得た (Fig. 13)。

次に NcAMP を血中 PTH と同時測定した疾患につき比較検討した (Fig. 14)。PHP では血中 PTH が全例高値を示したが NcAMP は低値または高値であった。このことより PTH 受容体機能異常症のある本疾患の PTH の腎作用の程度に差があることが考えられ, 今後さらに検討する必要がある。

高カルシウム血症を示す 1°HPT では NcAMP も血中 PTH 値と同様に全例正常以上であり, MAH においては血中 PTH は抑制されていたが NcAMP 値は高い症例と正常を示す症例に分か

れた。このことは MAH における高 Ca 血症誘発因子の腎作用の病理態生理を考える上で興味深い結果である。すなわち、近年骨吸収作用により高カルシウム血症をきたす液性因子を産生する悪性腫瘍の研究が飛躍的に進歩し、MAH の原因がインターロイキン (IL-1) tumor necrosis factor (TNF) や PTH 関連蛋白 (PTHrP) などであることが次々と明らかにされてきた¹⁰⁾¹²⁾¹⁸⁾。特に遺伝子操作により明らかとなった PTH 関連蛋白は141個のアミノ酸 (分子量17,000) からなり、特にその分子の N 端側のアミノ酸構造が PTH に近似しており、しかも PTHrP (1-34) は骨芽細胞様細胞 (UMR106) や腎臓での cAMP 産生刺激能が hPTH (1-34) と同程度に強力であり、PTH の腎における受容体に結合し cAMP 産生を増加させるものと考えられる。しかし、その生物作用の類似性に比べ、PTH 関連蛋白は免疫学的にヒト PTH (1-34) と異なっており¹⁰⁾、そのため HHM (humoral hypercalcemia of malignancy) の原因が PTH 関連蛋白である場合には、本 PTH 測定法が PTH 分子の中間部及びそれを含む C 末端側を認識するため交叉反応性を持たないか、またはきわめて弱い可能性が強い。従って血中 PTH が低値ないし正常で、NcAMP が高値を示した 2 例の HHM は PTH 関連蛋白の産生腫瘍であり、PTH が低く NcAMP も正常であった 1 例はこれ以外の物質 (たとえば私共の実験より IL-1 は PTH 反応性の腎培養細胞の NcAMP 産生能を増加させない。データは示していない。) である可能性があり、今後さらに詳細な検討が必要である。

一方、低カルシウム血症を示した IHP では血中 PTH は全例低値を示したことは先に述べたが、NcAMP も正常下限～低値を示した。PHP では血中 PTH が高値であったにも係わらず、NcAMP は低値ないし高値を示した。この事は PHP の診断が血清 Ca、血中 PTH の測定から予測でき PTH 負荷試験を行えば PHP の診断がさらに確実となることを示している。

これらの事実から、PTH と NcAMP との関係は副甲状腺機能疾患を鑑別し、その作用機序を検討する糸口を与えるものと考えられた。しかし腎機能が低下している疾患 (<Ccr 40ml/min) では、NcAMP は血中 PTH と同様に高値をとる事が明らかであり (Fig. 12)、NcAMP 値は血中 PTH 値と同様にその評価に慎重である必要がある。

結 語

小児から高齢者までの健常人の血清 Ca、P 及び Tmpo₄/GFR、Ccr を測定した。それらのいずれの指標も 20～50 歳代までほぼ一定した値を示したが、血清 Ca 及び Ccr は 20 歳以下で高値を示し高齢化と共に低下した。血清 P 及び Tmpo₄/GFR は 20 歳以下で高値を示したが、20 歳以上ではほぼ一定していた。これらの基礎データにもとづき、PTH 分子の中間部を認識する高感度 PTH 測定法を用いて、健常人及び各種疾患の血中 PTH を測定した。

- 1) 本測定法では健常人の血中 PTH は全例測定可能であり、その値は 20～50 歳代でほぼ一定しており、20 歳以下では低値を示し 60 歳以降では上昇する傾向を示した。この関係は血清 Ca、Ccr の加齢に対する変化と鏡像関係にあった。
- 2) 血中 PTH 値は慢性腎不全例において Ccr の低下 (40ml/min) と共に急上昇することが判明した (NcAMP も同様の傾向を示した)。
- 3) 血中 PTH の測定により Ccr ≥ 40ml/min 以上の高カルシウム血症を示す病態 (1°HPT, MAH) 及び低カルシウム血症 (IHP, PHP) を示す疾患の鑑別が可能であった。
- 4) 高カルシウム、低カルシウム血症を示す疾患の病態生理の解明に、血中 PTH と NcAMP が相補的な役割を果たすものと考えられた。

謝辞

血液サンプルの提供に御協力いただいた東北大学医学部第2内科, 千葉大学医学部小児科, 名古屋大学医学部第1内科, 大阪大学医学部小児科, 大阪市立大学医学部第2内科及び国立ガンセンターに深謝いたします。

本論文の要旨は, First International Conference on New Actions of Parathyroid Hormone (1987年10月26日-31日, 神戸) において発表した。

文 献

- 1) Arnaud, C.: Hyperparathyroidism and renal failure. *Kidney Int.*, 4: 89-95, 1973.
- 2) Broadus, A.E., Kaminsky, N.I., Hardman, J.G., Sutherland, E.W. and Liddle, G.W.: Kinetic parameters and renal clearances of plasma adenosine 3',5'-monophosphate and guanosine 3',5'-monophosphate in man. *J. Clin. Invest.*, 49: 2222-2236, 1970.
- 3) Broadus, A.E., Mahaffey, J.E., Bartter, F.C. and Robert, M.: Nephrogenous cyclic adenosine monophosphate as a parathyroid function test. *J. Clin. Invest.*, 60: 771-783, 1977.
- 4) Dostal, L.A. and Toverud, S.U.: Effect of vitamin D3 on duodenal calcium absorption in vivo during early development. *Am. J. Physiol.*, 246: G528-G534, 1984.
- 5) Hawker, C.D. and Dibella, F.P.: Parathyroid hormone in chronic renal failure: Studies with two different parathyroid hormone radioimmunoassays. *Contr. Nephrol.*, 20: 21-37, 1980.
- 6) Honma, M., Satoh, T., Takezawa, J. and Ui, M.: An ultrasensitive method for the simultaneous determination of cyclic AMP and cyclic GMP in small-volume samples from blood and tissue. *Biochem. Med.*, 18: 257-273, 1977.
- 7) Hruska, K.A., Kopelman, R., Rutherford, W.E., Klahr, S. and Slatopolsky, E.: Metabolism of immunoreactive parathyroid hormone in the dog: The role of the kidney and the effects of chronic renal disease. *J. Clin. Invest.*, 56: 39-48, 1975.
- 8) 医療向統計システム, V2.0ユーザーマニュアル: 日本能率協会総合研究所, 東京, 1985.
- 9) Marcus, R., Madvig, P. and Young, G.: Age-related changes in parathyroid hormone and parathyroid hormone action in normal humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 58: 223-230, 1984.
- 10) Martin, T.J., Kemp, B.E., Mosely, J.M., Raisz, L.G., Suva, L.J. and Wood, W.I.: PTH-related protein of cancer-A novel gene product with some actions like PTH. First International Conference on New Actions of Parathyroid Hormone, Oct. 26-31, Kobe, Japan 1987.
- 11) Morrissey, J., Martin, K., Hruska, K.A. and Slatopolsky, E.: Abnormalities in parathyroid hormone secretion in primary and secondary hyperparathyroidism. *Proceedings of the 6th International Workshop on Phosphate and Other Minerals*. Verona, Italy, Plenum Press, 1984.
- 12) Moseley, J.M., Kubota, M., Diefenbach-Jagger, H., Wettenhall, R.E.H., Kemp, B.E., Suva, L.J., Rodda, C.P., Ebeling, P.R., Hudson, P.J., Zajac, J.D. and Martin, T.J.: Parathyroid hormone-related protein purified from a human lung cancer cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 84: 5042-5048, 1987.
- 13) Mundy, G.R.: Pathogenesis of hypercalcemia of malignancy. *Clin. Endocrinol.*, 23: 705-714, 1985.
- 14) 尾形悦郎, 山本通子, 松本俊夫, 藤田拓男, 深瀬正晃, 木下芳一,

古川洋太郎, 孫 孝義, 中島博徳, 安田敏行: ヒト PTH- (1-34) による Ellsworth-Howard 試験の実施法と判定基準。副甲状腺機能低下症患者における検討。日内分泌会誌, 60: 971-984, 1984.

15) Powell, D., Singer, F.R., Murray, T.M., Minkin, C. and Potts, J.T.: Nonparathyroid humoral hypercalcemia. *New Eng. J. Med.*, 289: 176-181, 1973.

16) Snedecor, G.W. and Cochran, W.G.: *Statistical Methods*, 7edit. Iowa State University press, Ames., 1980.

17) 孫 孝義, 古川洋太郎, 弓田 滋, 三浦 良, 吉永 馨, 山根良太: 血漿 cyclic AMP 測定の基礎的検討と腎原性 cyclic AMP 測定の臨床応用。日内分泌会誌, 61: 912-923, 1985.

18) Suva, L.J., Winslow, G.A., Wettenhall, R.E.H., Hammonds, R.G., Moseley, J.M., Diefenbach-Jagger, H., Rodda, C.P., Kemp, B.E., Rodriguez, H., Chen, E.Y., Hudson, P.J., Martin, T.J. and Wood, W.I.: A parathyroid hormone-related protein implicated in malignant hypercalcemia: Cloning and expression. *Science*, 237: 893-896, 1987.

19) Walton, R.J. and Bijvoet, O.L.M.: Nomogram for derivation of renal threshold phosphate concentration. *Lancet*, 16: 309-310, 1975.

20) Yeh, J.K. and Aloia, J.F.: Effect of hypophysectomy and 1,25-dihydroxyvitamin D on duodenal calcium absorption. *Endocrinology*, 114: 1711-1717, 1984.

(受付日: '88. 2. 26)