血液透析患者における副甲状腺ホルモン(PTH) 測定法の精度評価

野村 幸範 高瀬 敦 塚本 雄介* 安藤 貞二**

森下記念病院内科 北里大学内科* (株)帝人バイオ・ラボラトリーズ**

key words : parathyroid hormone (PTH), hemodialysis (血液透析), uremic patients, radioimmunoassay (RIA), immunoradiometric assay (IRMA)

〈要旨〉

血液透析を受けている慢性腎不全患者において3種類のPTH測定キット(C-PTH, HS-PTH, AI-PTH)の精度評価を行い下記の結果を得た。

(1) 標準血清を用いて求めた検出曲線は3種のPTHとも良好な反応曲線が得られた。検出感度は、C-PTHは0.3~0.4 ng/ml, HS-PTHは120 pg/ml付近, AI-PTHは2 pg/mlであった。(2) 血液透析患者における同時再現性(intra-assay)と測定間再現性(inter-assay)は変動係数でそれぞれ、C-PTHが4.4%, 3.9%, HS-PTHが4.5%, 7.0%, AI-PTHで3.4%, 8.5%であり、いずれも良好な測定精度が得られた。(3) 採血後全血状態での放置時間が安定性に及ぼす影響を検討したところ、C-PTHは15分から24時間まで安定、HS-PTHは15分から8時間まで安定で24時間では有意に低下、AI-PTHは30分から2時間までバラツキの少ない安定した測定値が得られたが、15分でやや高値、4時間以降有意な低値を示した。従って、血液透析患者で安定したPTHの測定値を得るにはC-PTHは採血後15分から24時間、HS-PTHは15分から8時間、AI-PTHは30分から2時間放置して血清分離することがおすすめされる。(4) 同一条件下に管理された患者での週差変動は変動係数で、C-PTHが8.1%, HS-PTHが9.7%, AI-PTHが20.7%であった。

PTH measurement validation in uremic patients on hemodialysis

Masanori Nomura, Osamu Takase, Yusuke Tsukamoto*, Teiji Ando**

Internal Medicine, Morishita Memorial Hospital; Medicine, Kitasato University, School of Medicine*; Hamura Laboratory, Teijin Bio Laboratories, Inc.**

A validation study of three different PTH measuring kits (C-PTH, HS-PTH, and AI-PTH) was conducted on patients with chronic renal insufficiency undergoing hemodialysis, and yielded the following results.

(1) Satisfactory response curves for all three types of PTH were obtained from the detection curves determined by using standard sera. Detection sensitivity was 0.3~0.4 ng/ml for C-PTH, about 120 pg/ml for HS-PTH, and 2 pg/ml for AI-PTH. (2) The coefficients of variation for intra-assay (simultaneous reproducibility) and inter-assay (reproducibility between measurements) in the hemodialysis patients were 4.4% and 3.9% (C-PTH), 4.5% and 7.0% (HS-PTH), and 3.4% and 8.5% (AI-PTH), respectively. These data show good precision and reproducibility with these 3 PTH assays in serum from hemodialysed patients. (3) When the influence of standing time of whole blood after sampling on stability was investigated, the measuring values were as follows : for C-PTH, stable from 15 min to 24 hr ; for HS-PTH, stable from 15 min to 8 hr, but with a significant drop after 24 hr ; and for AI-PTH, stable from 30 min to 2 hr with few variations, but with slightly higher values obtained after 15 min, and with a significant drop after 4 hr. These results suggest that serum be separated from 15 min to 24 hr after sampling for C-PTH, from 15 min to 8 hr for HS-PTH, and from 30 min to 2 hr for AI-PTH to obtain reliable PTH values in hemodialysed patients. (4) The coefficient of variation for weekly differences in patients managed under the same conditions was 8.1% for C-PTH, 9.7% for HS-PTH,

and 20.7% for AI-PTH.

緒 言

二次性副甲状腺機能亢進症は血液透析を受けている慢性腎不全患者によくみられる合併症であり、その発症頻度は透析期間の長期化とともに増加する^{1,2)}。その診断や経過観察、治療効果の把握に際しては血清中の副甲状腺ホルモン(PTH)が測定されている。ヒト PTH は 84 個のアミノ酸からなる分子量約 9500 のポリペプチドであるが、PTH の測定にあたっては本邦において種々の測定キットの利用が可能である。しかし、測定キットにより PTH の認識部位が異なるため³⁻⁶⁾、それぞれに異なった測定意義があり、臨床使用するに際してはそれぞれの測定方法の特徴を理解しておくことが重要である。

また、血清 PTH を正確に測定するためには、完全に血清分離を行うことが重要であるが、腎不全患者の血液は凝血しにくく腎機能正常者に比べ長時間血液を放置する必要がある。放置が不十分な場合には析出するフィブリンが測定値に影響を与えることが経験されるが、血液を長時間放置した場合は PTH の安定性が懸念される。しかしながら本邦においては、慢性腎不全患者の血清を用いた再現性や安定性に関する報告はない。

今回、実地臨床の場で比較的ポピュラーに測定されている 3 種類の PTH、すなわちデイド株式会社のイムノ PTH-C (C-PTH)、PTH キット「ヤマサ」(HS-PTH)、日本メジフィジックス社のアレグロ Intact PTH (AI-PTH) を用いて、慢性腎不全患者における副甲状腺機能の経過観察等を行うに際して有用と考えられる若干の知見を得たので報告する。

I. 目 的

血液透析を受けている慢性腎不全患者において PTH を測定する場合の特徴と注意点を把握することを目的に 3 種類の PTH (C-PTH, HS-PTH, AI-PTH) を用いて以下に示す項目の検討を行った。

① 同時再現性 (intra-assay) と測定間再現性 (inter-assay) を検討する。

② 採血した血液の放置時間が試料の安定性に及ぼす影響を検討し、安定した測定値を得るための血液サンプルの適切な処理条件を把握する。

③ さらに、患者を統一の管理条件下において PTH

の過差変動に関する臨床的検討を行い、経過観察の際に有意と考えるべき変動幅について検討する。

II. 方 法

1. 対 象

森下記念病院腎センターを受診している患者のうち、本試験の内容について説明を聴き内容を十分理解した上で試験の参加に同意を得られた維持期の慢性血液透析患者 6 名を対象とした。被験者の PTH は低値を示すものから高値を呈する者まで幅広く分布させた。対象はいずれも、週 3 回午前中に血液透析を受けている外来患者であった。

2. 被験者の管理

被験者には AI-PTH の測定値に影響を及ぼさないよう採血当日のカルシウム製剤の服用やカルシウムを多く含む食物や飲料の摂取は避けるよう指示した。

試験期間中、カルシウム代謝に影響がないよう、新たな薬剤の投与、以前から投与していた薬剤の投与量・投与方法の変更、透析方法の変更などは行わなかった。その他、PTH の値に影響を及ぼさないよう被験者の管理条件は一定とした。

3. 血液サンプルの採取

採血は 1 週間間隔で 1 人の被験者当たり 3 回血液回路の動脈側より行った。なお、採血は毎週の第 1 回目の透析前の同一時刻に全員同時に行った。PTH の測定値への影響を避けるため血液にはヘパリンや EDTA が含まれないようにした。1 回目と 2 回目の採血量はそれぞれ 2 ml とし、いずれも過差変動の検討用とした。3 回目の採血量は 14 ml とし、過差変動の検討の他、4 名分は採血から血清分離までの時間が測定値に及ぼす影響の検討用とし (保存時間の影響試験)、残り 2 名分の血清は混合し、同時再現性試験と測定間再現性試験用サンプルとした。

血清分離には冷却遠心機を用い、遠心分離条件はいずれも 3000 rpm×15 min とし、血清分離後は速やかに凍結保存した。

なお、同時再現性と測定間再現性の検討に際し、血清サンプルは C-PTH で 11 倍希釈し、HS-PTH で 100 倍希釈し、AI-PTH では希釈せずに用いた。その他の検討でも血清サンプルを必要に応じて希釈して用いたが、AI-PTH では全て希釈せずに用いた。

4. PTH 測定キット、測定方法

C-PTH, HS-PTH, AI-PTH の測定には表 1 に示

表 1 各種 PTH の測定方法と使用キット

	C-PTH	AI-PTH	HS-PTH
使用キット	イムノ PTH-C	アレグロ Intact PTH キット	PTH キット「ヤマサ」
認識部位	65-84	1-84	44-68
測定原理	ラジオイムノアッセイ (RIA) 法	イムノラジオメトリックアッセイ (IRMA) 法	ラジオイムノアッセイ (RIA) 法
製造会社	INCSTAR Corporation 社	Nichols Institute Diagnostics 社	ヤマサ醤油株式会社
販売会社	デイド株式会社	日本メジフィジックス株式会社	ヤマサ醤油株式会社

すキットを用い、それぞれの取り扱い説明書に記載されている方法に準拠して測定を行った。

5. 同時再現性 (intra-assay) の検討

同時再現性を検討するため、3種類の測定方法について同一の血清サンプルを同一測定者がそれぞれ1試験ロットで繰り返し8回測定を実施し、平均値、標準偏差、変動係数 (%CV) を求めた。

6. 測定間再現性 (inter-assay) の検討

測定間再現性検討のため、血清を5本に分注し、測定日・測定キットのロットを変えて5回測定した。1回当たりの測定では3重測定しその平均値を1回の値として用い、5回の平均値、標準偏差、変動係数 (%CV) を求めた。

7. 血液サンプルの保存時間が測定値に及ぼす影響の検討

採血から血清分離までの時間が測定値に及ぼす影響を検討するため、採血後の血液を室温で15分、30分、1時間、2時間、4時間、8時間、24時間放置してから血清分離を行った。血清は直ちに -20°C で凍結保存し同一ロットで3重測定し、平均値を1回の値として用いた。採血後1時間で血清分離した場合の測定値を100%とした場合について血液保存時間ごとの平均値と標準偏差を求め、その推移を検討した。

8. 血液透析患者の PTH の過差変動の検討

血液透析患者の PTH の過差変動を検討するため、5名の患者について1週間毎に計3回採血を行い、血液サンプルを室温で1時間放置した後、血清分離し測定用に供した。1回について3重測定し平均値を1回の値として用いた。各患者について3回の変動係数を求め、各測定法毎に変動係数の平均値を求めた。

III. 結 果

1. 標準曲線と検出感度

C-PTH の標準曲線 ($n = 3$) は、 0.3 ng/ml から 10.0 ng/ml まで良好な反応曲線が得られ、各濃度の変動係数 (%CV) は $0.4 \sim 6.1\%$ であった (図1)。HS-

PTH の標準曲線 ($n = 3$) も、 100 pg/ml から 3200 pg/ml まで良好な反応曲線が得られ、各濃度の変動係数 (%CV) は $0.4 \sim 6.1\%$ であった (図2)。抗原として PTH を含まない標準液との結合率から 3SD 減じた値に対応する PTH 値を最小検出感度とする場合、C-PTH は $0.3 \sim 0.4 \text{ ng/ml}$ であり、HS-PTH は 120 pg/ml 付近であった。

AI-PTH の標準曲線 ($n = 3$) は、 17 pg/ml から 1750 pg/ml で良好な反応曲線が得られ、各濃度の変動係数は $1.5 \sim 8.3\%$ であった (図3)。AI-PTH の最小検出感度は、抗原として PTH を含まないときのカウントの 3SD に対応する PTH 値より求めたところ 2 pg/ml であった。

2. 同時再現性試験 (intra-assay)

同時再現性の検討 (表2) において、3種類の PTH 測定キットを用いて8回測定して得られた平均値 $\pm$ 標準偏差、変動係数 (%CV) は、C-PTH で $13.1 \pm 0.6 \text{ ng/ml}$, 4.4% , HS-PTH で $61139 \pm 2731 \text{ pg/ml}$, 4.5% , AI-PTH で $341 \pm 12 \text{ pg/ml}$, 3.4% であった。3種類の PTH 間の測定値の比率は、C-PTH/AI-PTH で 38.4 , HS-PTH/AI-PTH で 179.3 , HS-PTH/C-PTH で 4.7 であった。

3. 測定間再現性試験 (inter-assay)

3重測定した5回の平均値は C-PTH が 13.3 ng/ml , HS-PTH が 65496 pg/ml , AI-PTH が 351 pg/ml であり、測定間再現性は、変動係数 (%CV) で C-PTH が 3.9% , HS-PTH が 7.0% , AI-PTH が 8.5% であった (表3)。

4. 血液サンプルの保存時間が測定値に及ぼす影響の検討

採血から血清分離までの時間を変えて、3種類の PTH の測定を行い、1時間の測定値に対する割合の平均により全血状態での安定性を検討した (図4)。

C-PTH は採血後1時間で血清分離した場合に対して24時間までのいずれの時点でも統計学的に有意な変化はみられず、15分から24時間のいずれの時点で血清分離しても安定した測定値が得られた。

図 1 Standard curve of C-PTH

図 2 Standard curve of HS-PTH

図 3 Standard curve of AI-PTH

HS-PTH は8時間まで安定した測定値が得られたが, 24時間では1時間に対して6.0%の低下がみられ, 統計学的にも有意(両者とも $P < 0.05$)な低下であった。

AI-PTH は採血後1時間で血清分離した場合に対

して15分で3.7%高い測定値を示したが, 30分～1時間にかけてはバラツキも少なく非常に安定した測定値が得られた。4時間以降は1時間で血清分離した測定値に対して有意(いずれの時点も $P < 0.05$)な低下がみられた。

表 2 同時再現性 (intra-assay)

項目 回数	C-PTH (ng/ml)	HS-PTH (pg/ml)	AI-PTH (pg/ml)
1	12.9	63705	343
2	14.1	64387	352
3	12.4	58974	317
4	13.2	60166	336
5	12.3	60515	355
6	13.3	57832	343
7	13.4	58821	341
8	13.2	64710	338
Mean	13.10	61138.8	340.6
S. D.	0.58	2731.3	11.6
%CV	4.4%	4.5%	3.4%

表 3 測定間再現性 (inter-assay)

項目 回数	C-PTH (ng/ml)	HS-PTH (pg/ml)	AI-PTH (pg/ml)
1	13.6	69491	334
2	14.0	70888	395
3	12.6	63946	317
4	13.3	63458	363
5	13.2	59699	345
Mean	13.34	65496.4	350.8
S. D.	0.52	4615.1	29.8
%CV	3.9%	7.0%	8.5%

図 4 採血から血清分離までの時間が測定値に及ぼす影響 (1 hr を 100%とした場合)

5. 血液透析患者の PTH 過差変動

C-PTH の 3 週間の過差変動を変動係数 (%CV) で検討した結果, C-PTH は 8.1%, HS-PTH は 9.7%, AI-PTH は 20.7%であった (表 4).

IV. 考 察

慢性腎不全患者の副甲状腺機能の状態を知るために PTH の測定は広く行われているが, 意外にも血液透析患者における PTH の測定精度や血液の保存条件に関する報告はなかった. しかし, これらの基本的な情報は PTH を正確に測定し正しく評価する上で必要不可欠であると考えられる.

血液透析患者で PTHを測定する場合, 透析前に比べ透析後に低値となることが報告されていることから⁵⁾, 臨床の場合においても通常透析前に採血されているので, 今回の検討でも全て透析前の採血とした.

再現性の検討に用いた血清の PTH はいずれの測定法においてもそれぞれの正常域に比べ高値を示したが, 同時再現性の変動係数は 3.4~4.5%といずれも小さく, 標準血清を用い PTH 高値のサンプルで検討したこれまでの報告と同様に良好な成績が得られた^{3,6,7)}. 測定間再現性では, C-PTH で最も良好な成績が得られたが, HS-PTH と AI-PTH では 7.0~8.5%と同時再現性に比べややバラツキが大きかった.

血液透析患者では採血後に室温放置して血清分離する場合, 放置時間が 30 分以内と短いと, 後でフィブリンが析出することがしばしば経験される. 析出したフィブリンを除去せずに PTH の測定を実施した場合, PTH は高値となることが多く測定精度は著しく悪化するものと考えられる. そのため, 透析患者の血液の放置時間を短くしても完全に血清分離が可能なような試薬が市販され, 信頼性確保の努力がなされている.

表 4 PTH 週差の変動係数 (%CV)

被験者	C-PTH	HS-PTH	AI-PTH
A	6.7%	17.3%	44.2%
B	8.4%	7.3%	13.8%
C	11.3%	9.9%	18.8%
D	4.3%	3.3%	14.0%
E	9.7%	10.6%	12.6%
Mean	8.1%	9.7%	20.7%

特に Intact PTH は生体内半減期が短い^{3,8,9)}、血液中でも不安定であるとの誤解から、完全に血清分離がなされていない状態での検査も多いと考えられる。一方、血液サンプル状態での保存時間、すなわち、採血から血清分離までの時間が測定値に及ぼす影響に関するこれまでの報告では、健常者 2 例の検討で 1, 6, 24 時間放置後血清分離した場合、6 時間以降では通常の血清分離のときと比較して低値を示すとされている¹⁰⁾。今回、血液透析患者の全血状態での安定性を経時的に検討したが、採血後 30 分から 2 時間で血清分離した場合、バラツキの少ない安定した測定値が得られた。従って、血液透析患者で AI-PTH を測定する場合は、採血後短い放置時間で血清分離するよりは、むしろ十分に室温放置した後に血清分離し凍結保存することが推奨される。

C-PTH は PTH が低値を示す患者では十分に経過が追えないという問題があるが、血液透析患者の二次性副甲状腺機能亢進症のように異常高値を呈する患者の経過観察には適性があると考えられる。特に、ある程度期間をおいて測定する場合、その期間における PTH の分泌状態を反映していると考えられ、測定精度、再現性とも良好で、血液中でも 24 時間まで安定した測定値が得られた。しかも、個人内変動が小さいことから 10% 程度の比較的小さな変化についても意味のある変化と認識することができる。また、AI-PTH をもとに透析患者の正常域を設定すると、腎機能に異常のない一般的な場合に比べ 3 ～ 4 倍高値となる。

HS-PTH は高感度であることが最大の特長であるが、腎機能の低下に伴い著しく高値を示すため¹¹⁾、測定に際しては血清の希釈を必要とするケースも少なくない。AI-PTH をもとに透析患者の正常域を設定すると、腎機能に異常のない一般的な場合に比べ 10 ～ 20 倍高値となる。著しい高値となる理由は必ずしも明確でないが、腎機能廃絶に伴う PTH の代謝・排泄の低下や副甲状腺で代謝された PTH が多量に分泌されることなどが原因と考えられている^{8,12,13)}。今回の検討からも明らかなように、慢性腎不全患者においても測定精

度、再現性とも良好で、血液状態で保存しても 8 時間まで安定した測定値が得られ、個人内変動もさほど大きくなかった。採血時のハンドリングが容易な点から臨床の現場では繁用されていると考えられた。

今回検討した 3 種類の PTH の中で、AI-PTH は副甲状腺からの生物活性を有する PTH の分泌状態を最も正確に反映していると考えられるが、それと引き換えに電解質のコントロール状態の影響を受けやすい。これは血中のカルシウムイオン濃度の変化に対して副甲状腺が鋭敏に反応し、PTH の分泌量を変化させるという生体反応に基づくものであると理解されている。今回週差変動を検討するに当たって患者の管理、採血時間など一定条件で採血、血清分離、測定を行ったが、AI-PTH の週差変動は平均で 20.7% と大きく、著しく変動の大きかった被験者 A を除いても 14.8% と他の 2 種類の PTH に比べやや大きな変動を示した。治療効果などを評価する際には透析患者の個人内変動を十分考慮する必要がある、最低 15 ～ 20% を超えた変化がみられた場合を意味のある変化と認識すべきであろう。AI-PTH は測定時に患者の管理や血清分離時間など多少の制限があるものの、検出感度 2 pg/ml は PTH が低値の患者、すなわち最近話題となっている透析患者の無形成骨の診断にも利用可能であり^{14,15)}、しかも PTH が異常高値を呈する患者に対しても測定範囲が広範であるため検体を希釈せずに測定することが可能である点で優れていると考えられる。また、生物活性を有する PTH を測定しているため HS-PTH や C-PTH とは異なり腎不全患者の正常域と一般の正常域に大きな隔たりがなく、臨床的利用価値は高いと考えられた。

謝辞：アレグロ Intact PTH キットを提供いただいた日本メジフィジックス株式会社に深謝いたします。

文献

1) Coburn JW, Salusky IB : Hyperparathyroidism in Renal Failure. In “The Parathyroids, Basic and Clinical Concepts” ed Bilezikian JP, Marcus R, Levine MA, p 721-745, Raven Press, New York, 1994

2) 渡邊有三, 伊藤恭彦, 山崎親雄, 湯沢由紀夫, 吉田 太, 原 相俊, 玉井宏史, 深津敦司, 松尾清一, 坂本信夫 : 3 種類の PTH 測定系による透析患者の二次性副甲状腺機能亢進症の評価 (栄研 PTH-C, INC 社 PTH-C, M 領域 PTH). 腎と透析 28 : 503-510, 1990

3) 高坂唯子, 山本逸雄, 滋野長平, 北村暢康, 曾根照喜, 塩見一樹, 李 啓充, 小西淳二, 岩元則幸, 山本則之,

- 永原国彦, 岡田裕作: 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
- 4) 西尾正一, 前川たかし, 奥 浩子, 鳴嶋真人, 太田喜一郎: 透析患者の副甲状腺ホルモンについて. 腎と透析 24: 265-272, 1988
- 5) Nussbaum SR, Zahradnik RJ, Lavigne JR, Brennan GL, Nozawa-Ung K, Kim LY, Keutmann HT, Wang C, Potts JT Jr, Segre GV: Highly sensitive two-site immunoradiometric assay of parathylin, and its clinical utility in evaluating patients with hypercalcemia. Clin Chem 33: 1364-1367, 1987
- 6) 水梨一利, 弓田 滋, 三浦 良, 孫 孝義, 古川洋太郎: PTH キット「ヤマサ」の基礎的および臨床的検討. ホルモンと臨床 35: 1061-1065, 1987
- 7) 森馬初子, 石原静盛, 三島千穂: 生物活性をもつ完全分子副甲状腺ホルモン (intact PTH1-84) の測定に関する基礎的臨床的検討. 衛生検査 37: 1107-1113, 1988
- 8) Martin KJ, Hruska KA, Freitag JJ, Klahr S, Slatopolsky E: The peripheral metabolism of parathyroid hormone. N Engl J Med 301: 1092-1098, 1979
- 9) Segre GV, D'Amour P, Hultman A, Potts JT Jr: Effects of hepatectomy, nephrectomy, and nephrectomy/uremia on the metabolism of parathyroid hormone in the rat. J Clin Invest 67: 439-448, 1981
- 10) 小堺加智夫, 宮地幸孝, 関東 繁, 入江 実: PTH IRMA kit (Allegro INTACT PTH) による血中 PTH の測定. ホルモンと臨床 36: 779-784, 1988
- 11) 富樫和美, 安藤研司, 高橋裕一郎, 野村幸範, 永岡 隆, 吉田 照, 明石敏彦, 塚本雄介, 丸茂文昭: 慢性腎不全患者の二次性副甲状腺機能亢進症の発症および進展に関する検討. 腎と骨代謝 1: 217-224, 1988
- 12) D'Amour P, Lazure C, LaBelle F: Metabolism of radioiodinated carboxy-terminal fragments of bovine parathyroid hormone in normal and anephric rat. Endocrinology 117: 127-134, 1985
- 13) MacGregor RR, Jilka RL, Hamilton JW: Formation and secretion of fragments of parathormone. Identification of cleavage sites. J Biol Chem 261: 1929-1934, 1986
- 14) Sanchez CP, Goodman WG, Ramirez JA, Gales B, Belin TR, Segre GV, Salusky IB: Calcium-regulated parathyroid hormone secretion in adynamic renal osteodystrophy. Kidney Int 48: 838-843, 1995
- 15) 秋澤忠男, 黒川 清, 秋葉 隆, 塚本雄介, 衣笠えり子: 長期透析患者における副甲状腺機能低下症に関する実態の調査と対策. 平成 6 年度厚生科学研究腎不全医療研究事業研究報告書. 56-61, 1995