

放射免疫測定법에 의한 血中副甲狀腺 호르몬의 濃度 測定에 對한 檢討

嶺南大學校醫科大學 附屬病院 核醫學科

李 準 逸

Evaluation of Radioimmunoassay for Serum Parathyroid Hormone (PTH-C Kit)

Joon Il Lee

Dept. of Nuclear Medicines, Yeungnam University Hospital, Daegu City, Korea

目 次

- I. 緒 論
- II. 測定對象 및 方法
- III. 測定結果
- IV. 考 察
- V. 結 論
- 參考文獻

II. 測定對象 및 方法

본 실험은 嶺南大學校醫科大學 附屬病院 職員 및 本院 核醫學科에서 檢査를 실시한 患者의 血清을 對象으로 하였으며, 採血은 肘靜脈에서 採血하여 加급적 빨리 血清을 分離한 후 -20°C 냉동고에 保管하였다가 測定時에는 室溫에서 測定하였고, 또한 모든 測定은 Duplicate로 실시 하였으며, 本實驗은 Eiken의 PTH-C RIA Kit 를 使用하였다.

그리고 測定方法은 Fig.1과 같았으며, 檢討項目은 標準曲線의 再現性, Incubation 時間과 溫度, 同時 및 日差再現性, 希釋試驗, 回收率, 正常值 등이었다.

III. 測定結果

1. 標準曲線의 再現性

PTH-C standard solution의 各濃度測定에서의 B/Bo (%)는 mean \pm S. D. 로서 0.2 ngEq/ml 가 $96.14 \pm 1.8\%$ 이고, 12.8 ngEq/ml 는 $36.46 \pm 2.1\%$ 로 양호한 標準曲線이 얻어졌으며, 그리고 各測定濃도에 있어서의 變動係數(C. V.)는 1.87에서 5.76% 사이로 安定된 標準曲線이 얻어졌다.(Fig. 2)

2. Incubation 時間

첫번째 Incubation 時間의 檢討에서는 6 時間, 24 時

I. 緒 論

副甲狀腺 Hormone은 副甲狀腺 疾患의 診斷뿐만 아니라 骨軟化症, 慢性腎不全등의 病態에 있어 骨·Ca 代謝異常을 究明하기 위해서는 C-terminal parathyroid hormone (PTH-C)의 測定은 필수적인 것으로 되어 있다¹⁾.

이 血中 副甲狀腺 Hormone의 Radioimmunoassay (RIA)는 1963年 Berson과 Yalow에 의해 開發²⁾ 되었으나 測定에 사용된 Kit의 抗體가 대부분 소의 PTH에 對한 抗體여서 사람의 PTH와의 사이에 種差의 相違에 의한 交叉反應性에 限界가 있어 사람 PTH에 依한 RIA Kit의 開發을 기대하고 있었다²⁻⁵⁾.

이에 금번 Human PTH-C에 對한 抗體를 使用한 築研 I. C. L.의 PTH-RIA Kit 를 入手할 기회가 있어 이에 對한 基礎的 檢討를 실시 하였기에 報告하는 바 이다.

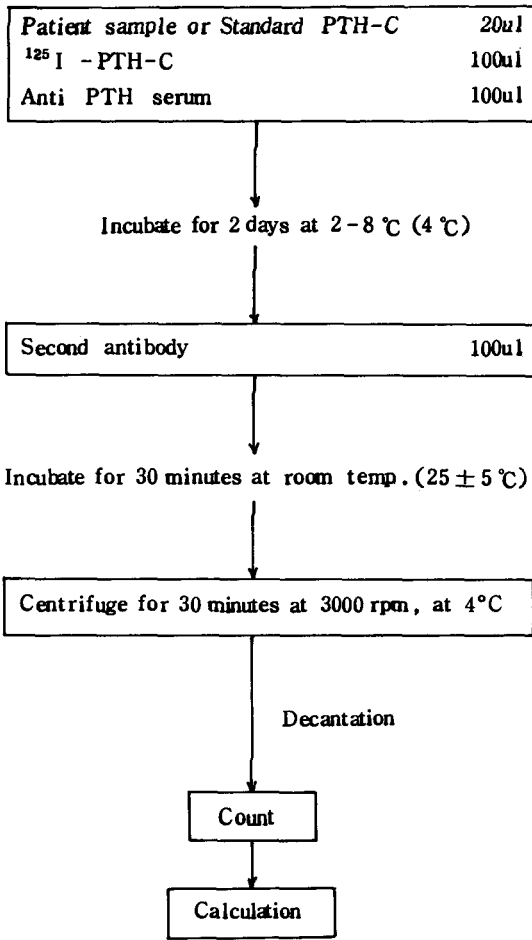


Fig. 1. Assay Procedure of PTH-C

PTH-C (ngEq/ml)	B/B (mean, %)	S.D. (%)	C.V. (%)
0.2	96.14	1.8	1.87
0.4	93.46	2.4	2.56
0.8	88.82	2.5	2.81
1.6	79.61	2.6	2.26
3.2	64.86	2.0	3.08
6.4	48.82	1.6	3.28
12.8	36.46	2.1	5.76

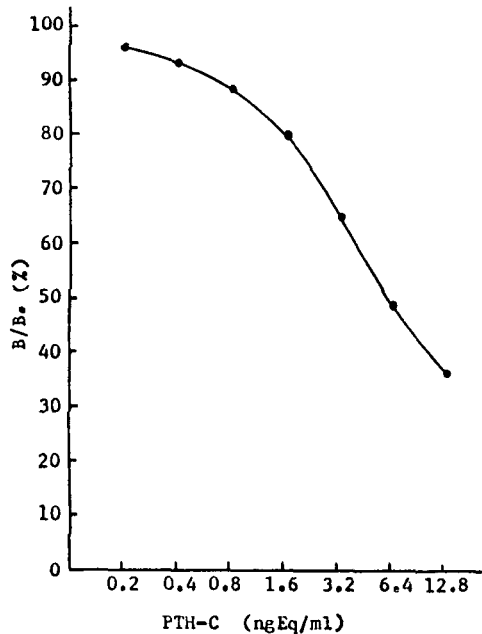


Fig. 2. PTH-C Standard Curve

間, 48時間, 72時間으로 時間을 변경시켜 가며 測定한 結果 B/T (%)는 設定時間이 延長됨에 따라 上昇하나, 48時間以後 72時間 사이에서는 Fig. 3과 같이 安定된 狀態를 유지하였다.

그리고 두번째 Incubation 時間의 檢討에서는 Fig. 4과 같이 15에서 30분사이의 設定時間이 다른 設定時間 5분과 60분에 비해 높은 B/T (%)를 나타냈다.

3. Incubation 溫度

첫번째 Incubation 溫度의 檢討는 4°C, 25°C, 37°C로 溫度를 變化시켜가며 測定한 結果, 設定溫度의 上昇에 따라 B/T (%)는 급격히 減少하는 傾向을 나타내었으며, 4°C가 다른 設定溫度에 비해 가장 높은 結果

値를 나타내었고 (Fig. 5), 두번째 Incubation 溫度의 檢討에서는 設定溫度 4°C에서 25°C사이에서는 거의 安定된 狀態를 유지하나 37°C로 溫度를 上昇시키에 따라 B/T (%)은 減少하는 傾向이었다. (Fig. 6)

4. 再現性

PTH-C의 濃度測定에 있어서의 再現性 實驗은 同時再現性과 日差再現性을 檢討 하였으며, 먼저 sample A, B, C를 各各 5個의 試驗管에 넣어서 同一한 方法과 條件으로 測定한 同時再現性實驗을 실시한 結果, 變動係數 C.V.는 Table 1과 같이 sample A, B, C에서 各各 13.43%, 9.33%, 3.26%였다.

또한 sample D, E, F를 5日間에 걸쳐 同一한 方法

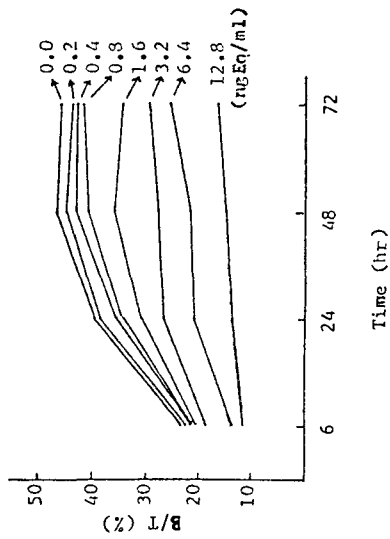


Fig. 3. 1st Incubation Time

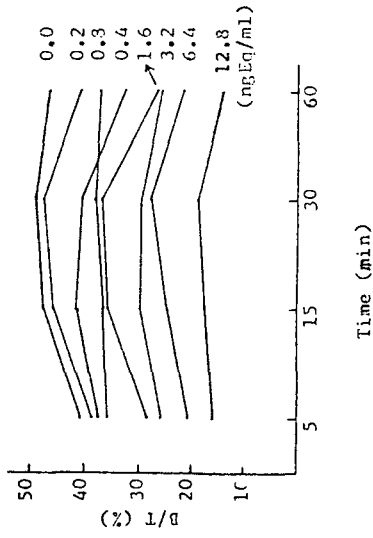


Fig. 4. 2nd Incubation Time

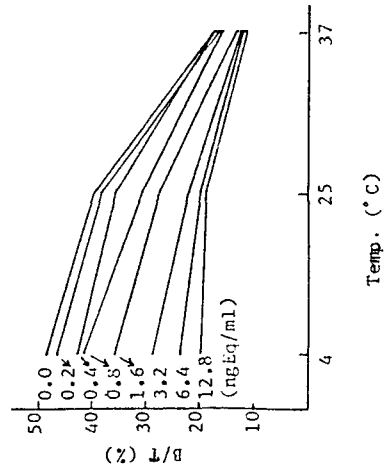


Fig. 5. 1st Incubation Temperature

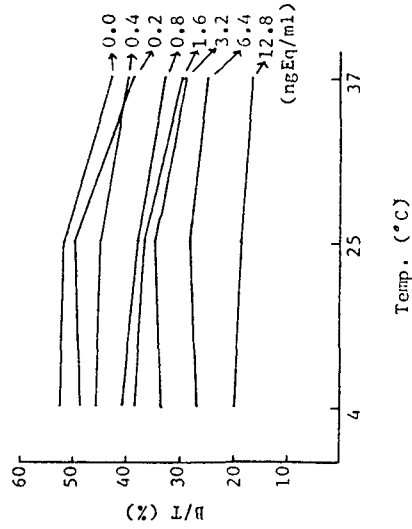


Fig. 6. 2nd Incubation Temperature

Table 1. Repeatability

Assaytube No.	PTH-C (ngEq/ml)		
	Sample A	Sample B	Sample C
1	0.73	2.83	8.61
2	0.59	2.32	8.34
3	0.64	2.67	8.03
4	0.58	3.06	7.92
5	0.81	2.52	8.51
mean	0.67	2.68	8.28
S. D.	0.09	0.25	0.27
C. V. (%)	13.43	9.33	3.26

Table 2. Reproducibility

Assay day	PTH-C (ngEq/ml)		
	Sample D	Sample E	Sample F
1	0.83	3.21	9.32
2	0.65	2.83	9.63
3	0.74	3.17	8.88
4	0.69	3.31	9.51
5	0.76	3.62	8.93
mean	0.73	3.23	9.25
S. D.	0.06	0.25	0.30
C. V. (%)	8.22	7.74	3.24

Table 3. Dilution Test

Dilution X	PTH-C (ngEq/ml)		
	Sample A	Sample B	Sample C
110	5.04	2.44	3.51
20	2.82	1.20	1.72
30	1.85	0.83	1.18
50	1.06	0.49	0.68

과 條件으로 測定한 日差再現性實驗에서의 變動係數 C. V.는 Table 2와 같이 sample D, E, F에서 各各 8.22%, 7.74%, 3.24%로 同時再現性的 低濃度 PTH sample 血清을 測定하고는 양호한 結果였다.

5. 希釋試驗

生理食鹽水를 使用한 希釋試驗에서는 Table 3과 같이 sample A, B, C를 各各 10배, 20배, 30배, 50배, 希釋하여 測定한 結果 만족할만한 直線성을 나타내었다.

6. 回收率

回收率試驗에서는 sample A, B의 回收率은 各各 83.46~120.58%, 91.98~117.62%였으며 平均値는 102.43%와 101.42%로 만족할만한 結果였다.

7. 正常值

20名을 對象으로 한 早期空腹時의 血中 PTH値는 男性이 ND~0.72 ngEq/ml 사이에 分布하여 mean ± S. D.는 0.27 ± 0.20 ngEq/ml였으며, 女性은 ND~0.38 ngEq/ml 사이에 分布해 mean ± S. D는 0.15 ±

Sample No.	Sex	PTH-C (ngEq/ml)
1	M	0.13
2	M	0.31
3	M	0.01
4	M	0.14
5	M	0.23
6	M	0.52
7	M	0.18
8	M	0.15
9	M	0.35
10	M	0.72
mean		0.27
S. D.		0.20
11	F	0.23
12	F	0.01
13	F	0.31
14	F	0.05
15	F	0.38
16	F	0.26
17	F	0.07
18	F	0.14
19	F	0.02
20	F	0.01
mean		0.15
S. D.		0.13
Total mean		0.21
S. D.		0.18

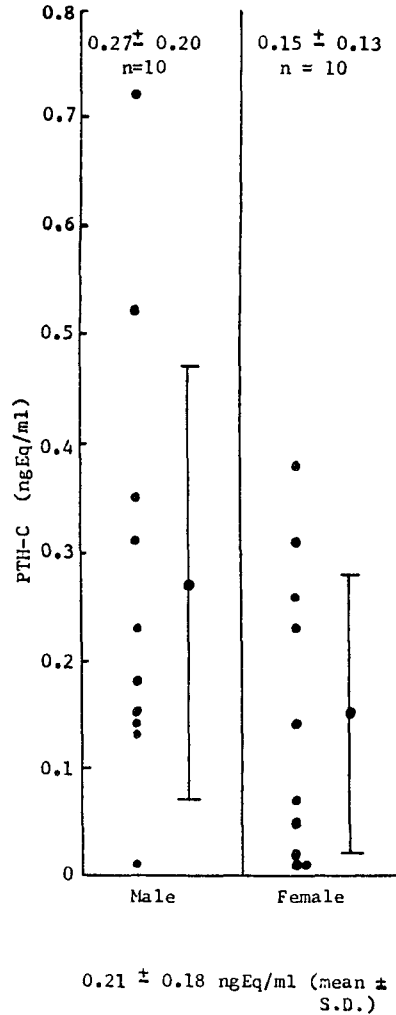


Fig. 7. Normal Value

0.13 ngEq/ml 었다.(Fig. 7)

IV. 考 察

原發性 副甲狀腺 機能亢進症²⁾, 骨代謝, 인·칼슘代謝異常症³⁾, 高Ca血症을 수반한 尿路惡性腫瘍⁶⁾에 있어서의 診斷, 病態의 解析등에 重要한 因子로 PTH가 測定되어 왔다.

이 PTH의 測定에 제공되고 있는 RIA Kit에 使用되고 있는 抗體는 生物活性이 있는 N-terminal 과 半減期가 길고 蓄積效果가 있다고 하는 C-terminal 兩

者가 있다.

이 Kit 는 사람 PTH-C terminal의 製品에 對한 抗體를 使用했기 때문에 從來의 交叉免疫을 利用한 소의 PTH에 비해 特異性이 一定하다고 하고 있다^{4,6)}.

또 測定感度에 있어서도 소 PTH 系와 別차이가 없다고 하나⁶⁾, 0.05 ngEq/ml⁷⁾, 0.1 ngEq/ml 以下^{1,5,8,9)}의 報告도 있어 正常者의 血中 PTH 值가 測定可能하므로 이 Kit 는 상당히 改善되어 있다고 생각된다.

그리고 RIA의 基礎가 되는 標準曲線의 C. V. 는 다른 報告에 의하면 5.2~10.0%⁴⁾, 1.9~11.3%⁶⁾, 1.9~6.5%⁹⁾ 이었고 本院에서의 測定에서는 1.87~

5.76%로 본 방법의 표준곡선도安定된 곡線이라 생각한다.

그리고測定結果를 좌우하는 Incubation 時間의設定에서는 弓田등⁵⁾은 첫번째 Incubation 은 24時間, 두번째 Incubation 은 10分,金森등⁹⁾은 第1 Incubation을 48時間, 第2 Incubation을 30分으로報告하였으며,本院에서의檢討에서도 이와 비슷한結果를 얻었다.

또 Incubation 溫度的設定에서도金森등⁹⁾의報告에는 第1 Incubation은 4°C, 第2 Incubation은 25°C로本院에서의檢討와同一하였다.

다음은再現性的 C.V.로同時再現性은 1.4~10.9%¹⁾, 5.9~12.5%³⁾, 3.9~13.2%⁵⁾, 7.4~14.0%⁶⁾, 5.15~9.04%⁷⁾, 5.0~12.8%⁸⁾, 3.5~14.49%⁹⁾였고,日差再現性은 5.0~13.8%¹⁾, 5.4~9.2%³⁾, 6.7~19.3%⁵⁾, 5.9~8.7%⁶⁾, 9.4~22.5%⁸⁾, 10.87~15.17%⁹⁾등 여러報告가 있었으며 이번試驗에서의結果도大同小異하였다.

希釋試驗은 대단히良好했다는報告^{1,3,4,6-9)}가 많았으며,原發性副甲狀腺機能亢進症과慢性腎不全患者의 PTH高濃度血清도希釋操作을 실시하면正確한 PTH의濃도가測定可能하다고 생각된다.

그리고正常範圍의設定은臨床應用에의基礎値로 이용되나 mean ± S. D.에서 $0.26 \pm 0.06 \text{ ng/ml}^{1)}$, $0.26 \pm 0.12 \text{ ngEq/ml}$ (血漿)³⁾, $0.31 \pm 0.19 \text{ ng/ml}^{4)}$, $0.26 \pm 0.09 \text{ ng/ml}^{5)}$ 등의報告가 있었으며,性差는 인정되지 않는다¹⁾고 되어 있었다.금번本院에서의試驗結果男性($0.27 \pm 0.20 \text{ ngEq/ml}$)은女性($0.15 \pm 0.13 \text{ ngEq/ml}$)에 비해 근소하지만 높은値를 나타내었고, 이는金森등⁹⁾의報告와 비슷한傾向이었으며, 0.5 ngEq/ml 以下^{8),9)}를正常値로設定할 경우健康者の 거의大部分이 포함되므로 이를基礎値로 하는 것이 타당하리라 생각한다.

V. 結 論

PTH-C 築研 RIA Kit 를 사용한基礎的檢討에서 다

음과 같은結論을 얻었다.

(1) 標準曲線의 C. V.는 1.87~5.76%사이 에 있어安定된 標準曲線을 얻었다.

(2) Incubation은 第1이 4°C에서 48時間, 第2는 25°C에서 30分으로良好한測定結果를 얻을수 있었다.

(3) 再現性的 C. V.는 同時再現性이 3.26~13.43%, 日差再現性은 3.24~8.22%로 만족할만한結果였다.

(4) 希釋試驗에서는良好한直線性을 얻었으며,回收率도 83.46~120.58%사이 에 있어 거의 만족할만한結果였다.

(5) 正常範圍는 $0.21 \pm 0.18 \text{ ngEq/ml}$ (mean ± S. D.)였다.

以上에서檢討한 바와 같이本測定法은測定에必要한血清도 20μl로極少量이며測定方法도 간편하고再現性도 우수하여基礎値도良好하게測定可能하므로 다른 RIA用 Kit와 함께血中 PTH의測定에 충분히利用될 수 있으리라 생각된다.

(本試驗을 위하여 PTH-C 築研 RIA Kit 를 제공하여준(株)二元洋行에感謝드린다.)

參 考 文 獻

1. 吉成元孝 外:醫學と藥學, 7, 1059~63, 1982
2. Berson S. A. and Yalow, R. S.: Proc. Natl. Acad. Sci., 49, 613, 1963
3. 藤田仁子 外:ホト臨, 31, 239~45, 1983
4. 米田正弘 外:上同, 31, 379~83, 1983
5. 弓田滋 外:上同, 31, 233~38, 1983
6. 野々村克也 外:西日本泌尿科, 45, 83~87, 1983
7. 關口昌之 外:衛生檢査, 32, 698~701, 1983
8. 西山宗六 外:ホト臨, 31, 253~56, 1983
9. 金森勇雄 外:Radioisotopes, 33, 467~70, 1984