

《ノート》

Radioimmunoassay によるヒト血清 TSH の測定

— Thyro-SHure キットの検討 —

Fundamental and Clinical Evaluation of Serum TSH Measurement
by Thyro-SHure kit

小西 淳二* 高坂 唯子** 飯田 泰啓* 笠木 寛治*
池窪 勝治* 鳥塚 菁爾*

Junji KONISHI*, Tadako KOUSAKA**, Yasuhiro IIDA*, Kanji KASAGI*,
Katsuji IKEKUBO*, Kanji TORIZUKA*

*Department of Radiology and Nuclear Medicine, and
**Radioisotope Division, Kyoto University School of Medicine

I. はじめに

血清中の TSH の測定は甲状腺疾患、特に甲状腺機能低下症の早期診断および鑑別診断に不可欠の検査である。その測定法としては Odell ら¹⁾により開発された 2 抗体法 radioimmunoassay (RIA) が用いられているが、従来用いられてきた RIA のキットでは、一般に長時間のインキュベーション時間を必要とし、結果を得るまでに日数を要するのが難点であった^{2~4)}。そこで近年この問題を解決すべく、短時間インキュベーションでの測定を可能にするような種々の工夫が行われるようになっている^{5,6)}。今回、著者らは測定時間の短縮化をはかった TSH の RIA キットとして Thyro-SHure キット (Nuclear- Medical Laboratories, Inc. 製、中外製薬) を試用する機会を得、その基礎的な検討を行うとともに臨床的有用性について検討を行ったのでその成績を報告する。

II. 材料および方法

Thyro-SHure キットによる TSH 測定の原理は通常の 2 抗体法 RIA にもとづいており、測定操作の概略は Fig. 1 に示すごとくである。

本キットの特徴としては、(1) 最初に抗 TSH 抗体を添加して一定時間インキュベーションした後、¹²⁵I 標識 TSH を加える遅延添加法を用いていること、(2) インキュベーション温度を 37°C として時間の短縮をはかっていること、(3) B·F 分離のための沈降液には、第 2 抗体の抗家兎 γ グロブリンヤギ血清と 7.9% の polyethylene glycol (PEG) が含まれており、第 2 抗体が不溶性となっていることにより、B·F 分離の促進がはかられていることなどがあげられる。

最終的に得られた沈渣のカウントを添加した ¹²⁵I-TSH の総カウントにより除して、結合%を求め、各標準血清に対する結合%より標準曲線を得る。なお標準血清はウマ血清により作成されている。

基礎的検討：インキュベーション温度および時間、第 2 抗体との反応時間および温度、抗体の特

* 京都大学医学部放射線核医学科

** 京都大学医学部附属病院中央放射線部

受付：56年1月21日

最終稿受付：56年2月27日

別刷請求先：京都市左京区聖護院川原町54 (〒606)

京都大学医学部放射線核医学科

小 西 淳 二

Key words: Radioimmunoassay, Thyroid stimulating hormone, Thyroid disease

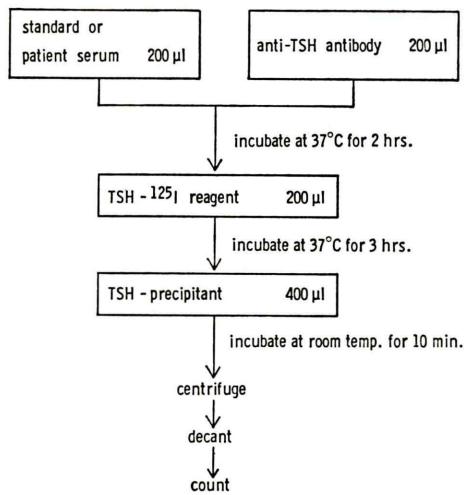


Fig. 1 Assay procedure of Thyro-SHure kit.

異性、回収率、希釈試験および測定値の再現性について検討した。

臨床的検討: 臨床的有用性に関しては健常者および各種の甲状腺疾患患者、合計 96 例の血清 TSH 濃度を測定して検討した。さらに一部の症例では従来より用いている TSH キット「第一」による測定値との比較検討を行った。なお TSH キット「第一」の標準 TSH は未治療バセドウ病患者の血清を用いて作成したものを用いた²⁾。

III. 結 果

1) インキュベーション温度と時間

^{125}I -TSH 添加前の抗 TSH 抗体と標準血清とのインキュベーション（第 1 インキュベーション）を 2 時間、種々の温度で行ったときの標準曲線の変化は Fig. 2 のごとくである。反応温度の上昇とともに標準曲線は急峻な勾配を示し、37°C が最も良い結果であった。

A, B 二つのプール血清の測定値では、TSH 低値の A 血清で 25°C と 37°C ではよく一致していたのに対し、4°C ではやや高値であった。TSH 高値の B 血清については差を認めなかつた。

次に 37°C で第 1 反応を 1~4 時間行って標準曲線の変化をみると Fig. 3 のごとくで、時間とともに標準曲線の勾配は急となり、感度が上昇する

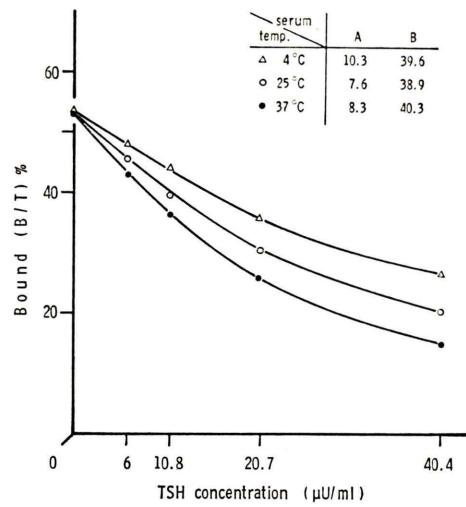


Fig. 2 Effect of temperature during the 1st incubation on standard curve and TSH values of pooled sera A and B.

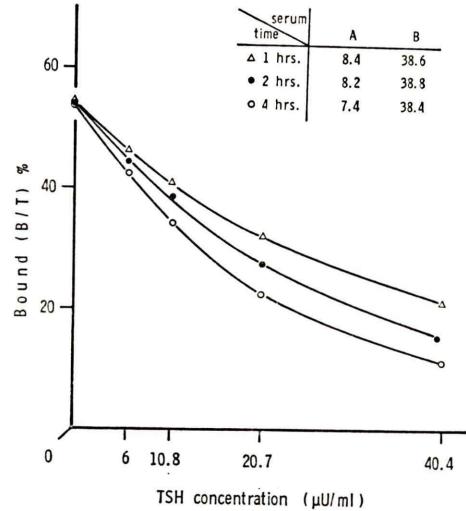


Fig. 3 Effect of length of the 1st incubation time on standard curve and serum TSH values of pooled sera A and B.

ことが認められた。A, B の 2 プール血清の測定値にはこの範囲で特に著差はみられなかつた。

そこで第 1 インキュベーションをキットに指示されている通り 37°C, 2 時間として、 ^{125}I -TSH 添加後の第 2 インキュベーションについて同様の検討を行つた。

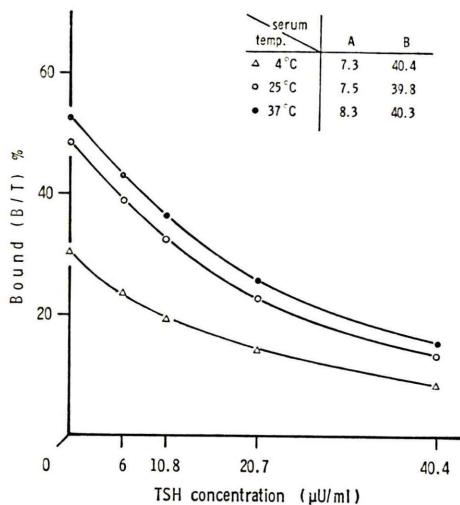


Fig. 4 Effect of temperature during the 2nd incubation on standard curve and TSH values of pooled sera A and B.

Fig. 4 は第 2 インキュベイションを 3 時間、種々の温度で行った際の標準曲線の変化を示す。4°C では平坦な曲線であるが、25°C, 37°C では相似した良好な標準曲線が得られた。二つのプール血清の測定値も 25°C と 37°C ではほぼ一致していた。

第 2 インキュベイションを 37°C で 1~6 時間行ったときの標準曲線の変化を Fig. 5 に示した。

1 時間に比し 3 時間では $B_0\%$ の著しい上昇がみられたが、さらに 6 時間まで延長してもその変化は軽度であり、3 時間のインキュベイションがよいと考えられた。

2) 第 2 抗体との反応時間および温度

第 2 抗体を含む沈降液を添加して混和した後、室温にて 5, 10, 20 および 40 分間静置して標準曲線の変化をみたが、検討した時間の範囲内では標準曲線に殆んど差異が認められなかった。また 10 分の静置時間で、4, 25 および 37°C と温度を変えた場合にも Fig. 6 に示すごとくその差はごく僅かであった。いずれの場合も検討した条件下で、二つのプール血清の測定値に著差はみられず、安定した B·F 分離が行われることが認められた。

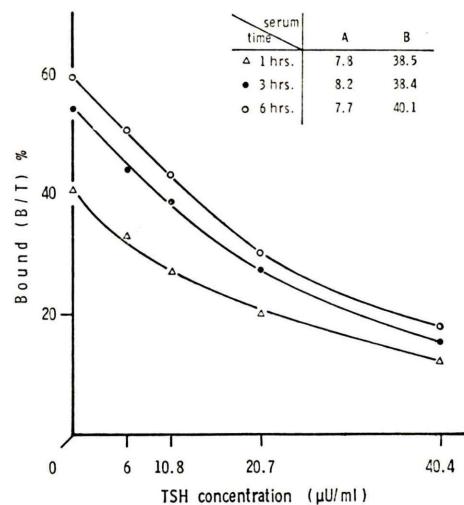


Fig. 5 Effect of length of the 2nd incubation time on standard curve and TSH values of pooled sera A and B.

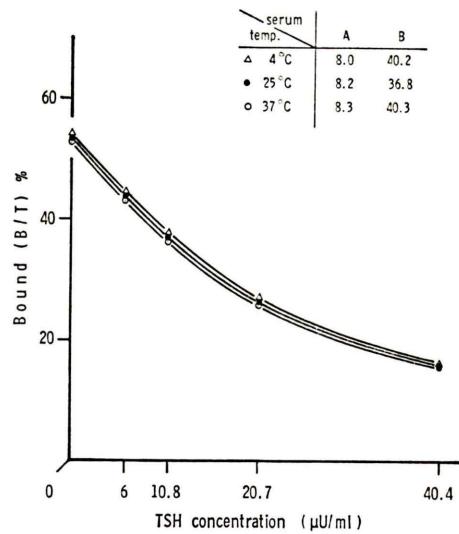


Fig. 6 Effect of temperature during the 10 minutes reaction with the precipitant solution on standard curve and TSH values of pooled sera A and B.

3) 標準曲線と測定感度

以上の検討より、第 1 および第 2 インキュベイションは 37°C でそれぞれ 2 および 3 時間とし、沈降液添加後は室温で静置し 10 分後に遠沈操作に移る方法を用いたときの標準曲線は Fig. 6

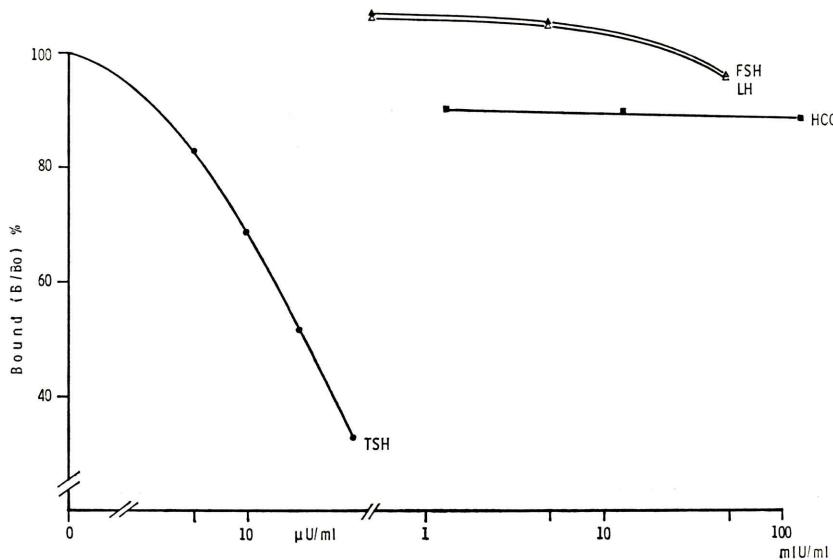


Fig. 7 Cross reactivity of the anti-hTSH antibody of Thyro-SHure kit.

の 25°C の曲線のごとくで、標準 TSH 0~40 μU/ml の範囲で良好な曲線が得られた。

TSH 0 における ^{125}I -TSH の結合カウントと 1.3 μU/ml での結合カウントとの間には推計学的に有意差が認められたことより、本法では 1.3 μU/ml の TSH まで測定することが可能である。

^{125}I -TSH の結合率が 1/2 となる標準 TSH 濃度 (1/2 B max) は 20 μU/ml 前後であった。

4) 抗体の特異性

hCG (CIS キット標準品) および FSH, LH (「第一」キット標準品) をこのアッセイ系に添加して、抗体の特異性につき検討した。Fig. 7 に示すごとく hCG では 100 mIU/ml まで全く交叉反応はみられず、FSH, LH では 50 mIU/ml でごく軽度 (TSH 1 μU/ml 程度に相当) の ^{125}I -TSH の結合阻害が認められた。

5) 回収率と希釈試験

血清 TSH 濃度の異なる 2 血清にキットの標準 TSH を種々の濃度添加して、その回収率を求めた成績を Table 1 に示した。平均回収率は 105.8% と良好であった。なお本キットの標準 TSH は World Health Organization の標準 TSH 68/38 を用いて検定されている。

Table 1 Recovery test.

| added TSH (μU/ml) | 0 | 5.4 | 10.4 | 20.2 |
|----------------------|--------------|------|------|-------|
| 1) 4.6 μU/ml | measured | 4.6 | 9.8 | 14.8 |
| | recovered | — | 5.2 | 10.2 |
| | recovery (%) | — | 96.3 | 98.1 |
| 2) 15.3 μU/ml | measured | 15.3 | 20.2 | 28.0 |
| | recovered | — | 4.9 | 12.7 |
| | recovery (%) | — | 90.7 | 122.2 |
| mean recovery 105.8% | | | | |

原発性甲状腺機能低下症にて血清 TSH 高値の 3 血清をキット添付の希釈液により、2~16 倍希釈して、その TSH 濃度を測定した結果は Fig. 8 に示すごとく、いずれも原点に向かうほぼ直線性の分布を示した。

6) 測定値の再現性

TSH 濃度 9.3~39 μU/ml の範囲の 3 血清を同一アッセイ内でそれぞれ 10 回測定したときの変動係数は 1.6~2.4% であった (Table 2, 左)。一方、TSH 9.8 および 29 μU/ml の 2 血清について 10 回の異なるアッセイでの測定値の変動をみると、Table 2(右) に示すごとく、その変動係数は 3.7 および 4.2% であった。

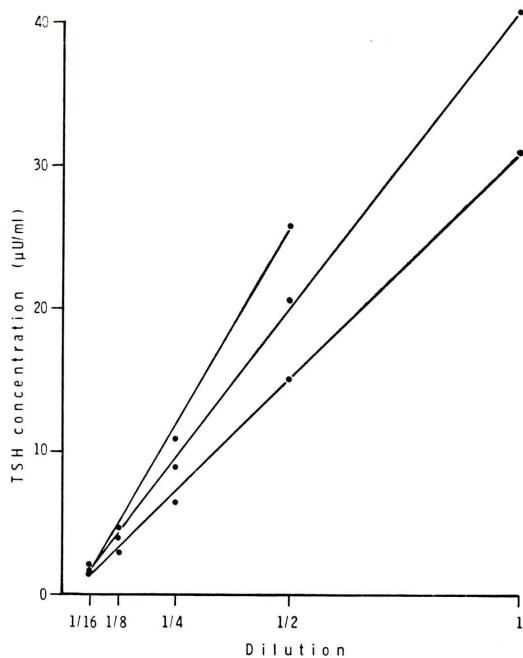


Fig. 8 Dilution curves of 3 sera from patients with primary hypothyroidism.

7) 健常者および各種甲状腺疾患患者における血清 TSH 濃度 (Fig. 9)

本キットを用いて測定した健常者 33 例の血清 TSH 濃度は $2.0 \sim 10 \mu\text{U}/\text{ml}$ に分布し、その平均値は 4.0 ± 2.0 (SD) $\mu\text{U}/\text{ml}$ であった。

未治療バセドウ病患者 26 例では測定感度以下から $3.3 \mu\text{U}/\text{ml}$ の間に分布しており、平均値は 2.0 ± 0.7 (SD) $\mu\text{U}/\text{ml}$ で、健常者との間に重なり合いがみられた。一方、橋本病を主とする原発性甲状腺機能低下症患者 18 例では、全例 $14 \mu\text{U}/\text{ml}$ 以上の高値を示し、その平均値は 113.6 ± 143.7 (SD) $\mu\text{U}/\text{ml}$ であった。そのほか、甲状腺癌 (5 例) では 1 例が $23 \mu\text{U}/\text{ml}$ の高値を示したほかは、正常範囲内にあった。TBG 減少症の 3 例、妊婦 11 例はいずれも正常値を示した。妊婦の平均値は 5.9 ± 1.5 (SD) $\mu\text{U}/\text{ml}$ であった。

8) 他のキットを用いて測定した TSH 値との比較

22 例について本キットによる測定値と TSH キット「第一」による測定値を比較した (Fig. 10)。

Table 2 Reproducibility of the assay. intra-assay

| No. | Serum | | |
|----------|-------|-------|-------|
| | A | B | C |
| 1 | 9.5 | 26.6 | 39.8 |
| 2 | 9.5 | 26.8 | 39.7 |
| 3 | 9.3 | 25.8 | 38.6 |
| 4 | 9.7 | 25.9 | 37.4 |
| 5 | 9.2 | 26.5 | 37.4 |
| 6 | 9.5 | 26.1 | 39.2 |
| 7 | 9.3 | 26.7 | 39.1 |
| 8 | 9.3 | 26.5 | 39.7 |
| 9 | 9.0 | 25.7 | 40.2 |
| 10 | 9.0 | 26.7 | 38.7 |
| Mean | 9.33 | 26.33 | 39.16 |
| S.D. | 0.23 | 0.41 | 0.80 |
| C.V. (%) | 2.4 | 1.6 | 2.0 |

inter-assay

| No. | Serum | |
|----------|-------|-------|
| | A | B |
| 1 | 10.1 | 29.1 |
| 2 | 9.8 | 29.6 |
| 3 | 9.7 | 29.1 |
| 4 | 9.8 | 26.7 |
| 5 | 9.8 | 26.5 |
| 6 | 9.9 | 29.4 |
| 7 | 9.1 | 29.7 |
| 8 | 9.5 | 29.4 |
| 9 | 10.5 | 28.3 |
| 10 | 9.8 | 27.6 |
| Mean | 9.80 | 28.54 |
| S.D. | 0.36 | 1.21 |
| C.V. (%) | 3.7 | 4.2 |

両キットによる測定値の間には相関係数 0.98 と極めてよい正相関が認められた。回帰直線式にみられるように、絶対値においては、本キットによる測定値が若干高値の傾向を示した。

IV. 考 案

血清 TSH の測定には、今日 RIA が広く用いられ、多くのキットが市販されている。従来の RIA キットでは、比較的長時間のインキュベーションを必要とするため、測定値を得るのに 2 ～ 5 日間を要していたが、最近ではキットの改良により、早く結果が得られるよう測定時間の短縮が

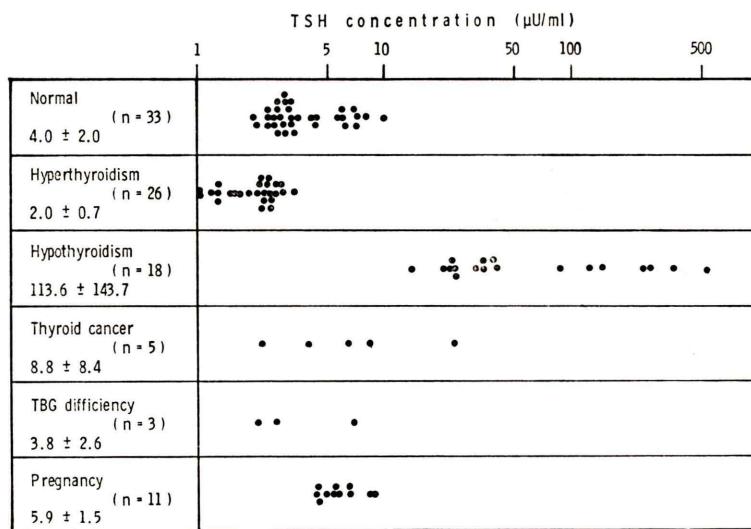


Fig. 9 Serum TSH concentration in normal controls, patients with various thyroid diseases and pregnant women measured by Thyro-SHure kit.

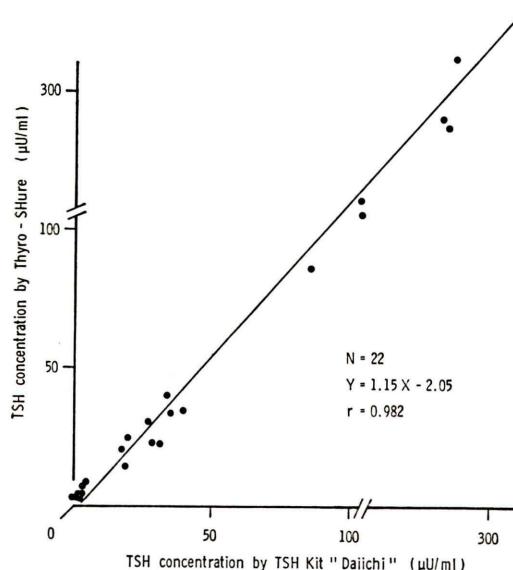


Fig. 10 Relation of serum TSH values obtained by TSH kit "Daiichi" and those by Thyro-SHure kit.

はかられている。今回、検討した Thyro-SHure キットでは 37°C でのインキュベーションで時間が短縮され、また PEG を添加した第 2 抗体を用いて、B-F 分離の促進がなされており、1 日で結果を得ることができる点に特徴を有する。

そこで先ずインキュベーションの条件についての検討を行ったが、 ^{125}I -TSH の遅延添加の前後のインキュベーション時間は、それぞれキットに指示されている 2 時間、3 時間で良好な結果が得られる事を確認した。温度も規定通り 37°C で行うのが最もよい結果であった。

第 2 抗体との反応は、よく混和した後、5~40 分間静置して検討したが、5 分でも 40 分でも殆んど標準曲線に変化がみられず、反応が速やかであることが示された。この際の温度は室温で十分と考えられた。第 2 抗体を含む沈降液に PEG が添加されて、第 2 抗体が不溶化されているため、遠心操作により、B-F 分離は容易に行われる。

測定範囲は $1.3\text{~}40 \mu\text{U}/\text{ml}$ であり、感度は他の TSH 測定用キットとほぼ同程度といえる^{2~4,6)}。

抗体の特異性に関しては、高濃度の FSH と LH で軽度の交叉反応が認められたが、臨床的に考えられるこれらホルモンの濃度からは TSH 測定値に与える影響は無視し得る程度と考えられた。

添加 TSH の回収率は満足すべきものであった。また TSH 高値の血清の希釈曲線も直線性を示している。したがって、本法による測定値は内因性 TSH をよく反映するものと考えられた。また 40

$\mu\text{U}/\text{ml}$ 以上の高値血清については添付の希釈液で希釈を行って正しい測定値を得ることができる。同一アッセイ内および異なるアッセイ間での測定値の再現性はいずれも極めて良好であった。

本キットにより測定した血清 TSH 濃度は健常者で $2.0 \sim 10 \mu\text{U}/\text{ml}$ に分布し、平均 4.0 ± 2.0 (SD) $\mu\text{U}/\text{ml}$ であった。未治療バセドウ病患者の血清 TSH 濃度は低値であるが、健常者のそれと重なりがあり、血中甲状腺ホルモンレベルが正常の *thyroid Graves' disease* などでは鑑別診断のために TRH 負荷試験を行って血清 TSH の反応性增加の有無をみることが必要である。なお、従前のキットにおいても、バセドウ病患者と健常者の値に重なりがみられる点は同様であり^{2-4,6)}、より高感度なアッセイへの改良が望まれる。健常者およびバセドウ病患者の測定値はいずれも他のキットによる値とほぼ同じであったが^{2-4,6)}、高感度な RIA により報告されている値⁷⁻⁹⁾よりは高値である。標準血清にウマ血清を用いていることによる可能性も考えられ、キャリヤ蛋白の問題は今後の検討課題である。

一方、橋本病を主とする原発性甲状腺機能低下症では著明な TSH 増加が認められ、診断上の有用性が示された。

本キットを用いて測定した TSH 値と従来より用いられている TSH キット「第一」による測定値との間には良好な相関関係が認められた。本キットでの測定値の方が高い点については、著者らが「第一」のキットで標準 TSH を未治療バセドウ病患者の血清を用いて作製していること²⁾に起因すると考えられ、キャリヤ蛋白の影響と思われる。

V. 結 論

Thyro-SHure キットについて基礎的ならびに臨床的検討を行い、以下のような成績を得た。

- 1) インキュベーションは 37°C で、 $^{125}\text{I-TSH}$ 添加前に 2 時間、添加後 3 時間で良好な結果が得られた。
- 2) 第 2 抗体との反応は、室温でよく、5~10

分の静置で B・F 分離操作に移ることができる。

3) 抗体の特異性は良好で、回収率、希釈試験の結果も満足すべきものであった。標準曲線は $0 \sim 40 \mu\text{U}/\text{ml}$ までの範囲で得られ、最小検出感度は $1.3 \mu\text{U}/\text{ml}$ であった。

4) 測定値の再現性は、同一アッセイ内の変動係数 $1.6 \sim 2.4\%$ 、異なるアッセイでの変動係数 $3.7 \sim 4.2\%$ と良好であった。

5) 臨床測定の結果、健常者の平均値は 4.0 ± 2.0 (SD) $\mu\text{U}/\text{ml}$ であった。原発性甲状腺機能低下症では明らかな高値を示し、診断上、有用である。他の TSH 測定キットによる測定値とも良い相関が認められた。

稿を終わるに際し、Thyro-SHure キットを提供して頂いた中外製薬㈱に謝意を表します。

文 献

- 1) Odell WD, Wilber JF, Paul WE: Radioimmunoassay of thyrotropin in human serum. *J Clin Endocrinol Metab* **25**: 1179-1188, 1965
- 2) 竹田洋祐、池窪勝治、鳥塚莞爾、他：二抗体法 TSH kit の使用経験。ホルモンと臨床 **22**: 313-318, 1974
- 3) 遠藤啓吾、中島言子、小西淳二、他：固相法による TSH 測定キット「Phadebas TSH テスト」の基礎的ならびに臨床的検討。ホルモンと臨床 **25**: 593-599, 1977
- 4) 遠藤啓吾、中島言子、笠木寛治、他：TSH radioimmunoassay キット (CIS 製) に関する基礎的ならびに臨床的検討。ホルモンと臨床 **26**: 493-498, 1978
- 5) 森 徹、小野芳子、千種貞子、他：二抗体法 HTSH キットを用いた室温短時間インキュベーション法の検討。核医学 **12**: 301-305, 1975
- 6) 小西淳二、中島言子、飯田泰啓、他：TSH リアバックによる血中 TSH の測定。ホルモンと臨床 **27**: 1303-1307, 1979
- 7) Rekary AE, Hershman JM, Parlow AF: A sensitive and precise radioimmunoassay for human thyroid-stimulating hormone. *J Clin Endocrinol Metab* **41**: 676-684, 1975
- 8) Smith SR, Burton DW, Izenstark JL: Levels of serum thyroid-stimulating hormone in hyperthyroidism. *Arch Intern Med* **139**: 757, 1979
- 9) 森 徹、玉木長良、石原 隆、他：TSH ラジオイムノアッセイにおける高感度測定法の検討ならびにその臨床的意義。日内分泌会誌 **56**: 1231-1239, 1980