

《ノート》

Immo Phase TSH RIA キットの使用経験

Radioimmunoassay of TSH with Immo Phase TSH RIA Kit

海瀬 和郎* 海瀬 信子* 吉田 克己* 貴田岡博史*
 深沢 洋* 山本 蒔子* 桜田 俊郎* 斉藤慎太郎*

Kazuro KAISE, Nobuko KAISE, Katsumi YOSHIDA, Hiroshi KITAOKA, Hiroshi FUKASAWA, Makiko YAMAMOTO, Toshiro SAKURADA and Shintaro SAITO

2nd Department of Internal Medicine, School of Medicine, Tohoku University Sendai

I. 緒 言

血中甲状腺刺激ホルモン (TSH) の測定は、Radioimmunoassay (RIA) による測定法が開発され^{1,2)}、測定用キットが市販されて以来臨床検査として広く用いられている。われわれは Corning 社製のサンドイッチ法による Immo Phase RIA キットを入手する機会を得たので、基礎的および臨床的検討を行った。

II. 方 法

1) キットの内容

- ① 抗 TSH ヤギ血清：60 ml
- ② ¹²⁵I 標識抗 TSH 家兔血清：凍結乾燥品 3 バイアル
- ③ 標準 TSH 血清：凍結乾燥品 7 バイアル (TSH をそれぞれ 0, 1.5, 3, 6, 15, 30, および 60 μ U/ml を含む)。
- ④ コントロール血清：凍結乾燥品 2 バイアル
- ⑤ 希釈用血清 (TSH 0 μ U/ml)：凍結乾燥品 4

バイアル。

2) 試薬の調製

① ¹²⁵I 標識抗 TSH 抗体は、各バイアルに再蒸留水 10 ml を加えて溶解する。

② 標準血清、コントロール血清および希釈用血清の各バイアルに、再蒸留水 3 ml を加えて溶解する。

3) 測定操作

① 各濃度の標準 TSH、コントロール血清および被検血清の各 0.2 ml を各試験管に分注する。

② ¹²⁵I-抗 TSH 抗体 0.2 ml を全ての試験管に加え、ボルテックスミキサーにて混和する。

③ 37°C にて 2 時間インキュベーションする。

④ 抗 TSH 抗体 0.5 ml を全ての試験管に加え、ボルテックスミキサーにて混和する。

⑤ 37°C にて 30 分間インキュベーションする。

⑥ 全ての試験管に再蒸留水 2 ml を加え、3,000 rpm 10 分間遠心した後上清を吸引除去する。

⑦ 各試験管の沈査の放射能を γ カウンターにて測定し、次式により B/B₆₀% を求め、各濃度の標準 TSH における B/B₆₀% を片対数方眼紙にプロットして標準曲線を描き、被検血清の B/B₆₀% より TSH 濃度を読みとる。

* 東北大学医学部第二内科
 受付：56年2月3日
 最終稿受付：56年3月31日
 別刷請求先：仙台市星陵町 1-1 (☎ 980)

東北大学医学部第二内科

海瀬 和 郎

Key words: Radioimmunoassay, Thyrotropin, Thyroid diseases

$$B/B_{60}\% = \frac{\text{標準 TSH または被検血清の cpm} - \text{TSH } 0\mu\text{U/ml の cpm}}{\text{TSH } 60\mu\text{U/ml の cpm} - \text{TSH } 0\mu\text{U/ml の cpm}} \times 100$$

4) 第一ラジオアイソトープ社製 TSH RIA キット(第一)による測定

従来の方法³⁾にて行った。

5) FSH および LH は、第一ラジオアイソトープ社製 FSH および LH RIA キット中の標準品を用いた。

III. 対象

対象として、正常人30例、甲状腺機能亢進症10例、原発性甲状腺機能低下症10例および下垂体性甲状腺機能低下症5例を選んだ。

IV. 結果

1) 代表的な標準曲線を Fig. 1 に示す。1.5~60 $\mu\text{U/ml}$ の間でゆるい曲線を描いた。同一測定内で4回測定した各濃度の標準 TSH の $B/B_{60}\%$ の変動係数は 18~4.5%、平均 7.5% であった。またこの時の TSH 0 $\mu\text{U/ml}$ および 1.5 $\mu\text{U/ml}$ における $B/B_{60}\%$ は、それぞれ 0 ± 1.2 および $8.2 \pm 1.5\%$ であり、この二つの値の間には明かな有意 ($p < 0.01$)

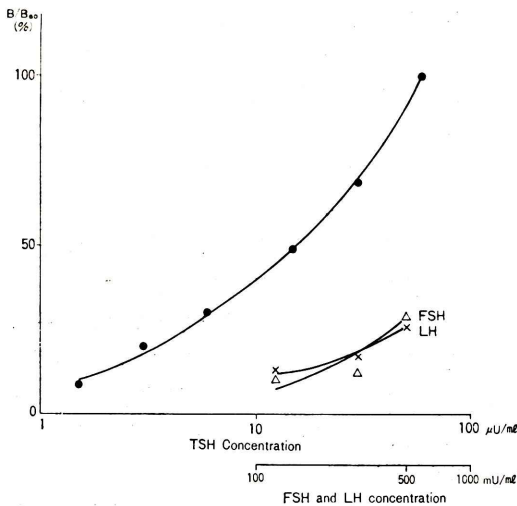


Fig. 1 Standard curve and cross reactivity with FSH and LH.

の差を認めたことから、本アッセイの最小検出感度を 1.5 $\mu\text{U/ml}$ とした。

2) インキュベーション温度および時間の検討

37°C および 20°C でインキュベーションした場合 (Fig. 2), 20°C の場合に 37°C はの場合に較べ、低濃度の TSH の場合に B/B_{60} の差が小さくなり、 B/B_{60} が 50% となる時の TSH 濃度が高値となった。インキュベーション温度を 37°C とし、第一および第二インキュベーションの時間を変化させて検討した (Fig. 2)。第二インキュベーションを 30 分間とし、第一インキュベーションを 1, 2 および 3 時間と変化させると、2 時間および 3 時間では標準曲線は殆んど変化しなかったが、1 時間では B/B_{60} が低値をとる傾向を認めた。また第一インキュベーションを 2 時間とし、第二インキュベーションを 30 分および 1 時間とした場合には、標準曲線は殆んど変化しなかった。以上のことより 37°C で第一インキュベーション 2 時間、第二インキュベーション 30 分が適当と思われたので以下の検討はこの条件で行った。

3) 抗体の特異性について

FSH あるいは LH と本キットの抗体との交叉反応を見たところ、Fig. 1 に示す如くそれぞれに対して軽度の交叉反応を認めた。TSH を 1 とすれば、交叉反応性は、FSH は 1.0×10^{-5} , LH は 5.2×10^{-6} となった。

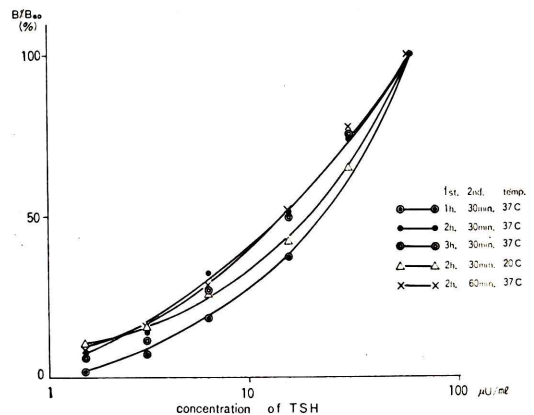


Fig. 2 Effects of incubation time and temperature.

4) 希釈の検討

高濃度の TSH を有する血清を、希釈用血清、0.1% BSA を含むリン酸バッファーあるいは甲状腺機能亢進症患者血清にて希釈して測定した結果を Fig. 3 に示す。いずれの場合でも良好な結果が得られた。

5) 回収率

2.2 および 1.5 $\mu\text{U/ml}$ の TSH 濃度を有する血清に、15 および 30 $\mu\text{U/ml}$ の標準 TSH を添加した時の回収率は (Table 1) は 93.6~99.6% であった。

6) Intrassay variation

TSH濃度がそれぞれ38.2(sample 1), 15.4(sample 2) および 2.5 $\mu\text{U/ml}$ (sample 3) の血清を同一キットにて各々 7 回測定した場合の変動係数は、それぞれ 8.1, 5.8 および 12.0% であった (Table 2)。

7) Interassay Variation

TSH濃度がそれぞれ37.8(sample 1), 17.5(sample 2) および 2.9 $\mu\text{U/ml}$ (sample 3) の血清を異なるキットにておのおの 4 回測定した場合の変動係数は、それぞれ 6.6, 8.5 および 10.3% であった (Table 2)。

8) TSH キット (第一) による測定値との相関

TSH キット (第一) による測定値と本キットを用いて測定した場合の測定値との間には、 $r=0.97$, $p<0.01$, $Y=-0.08+0.95x$ の良好な相関を示した (Fig. 4)。

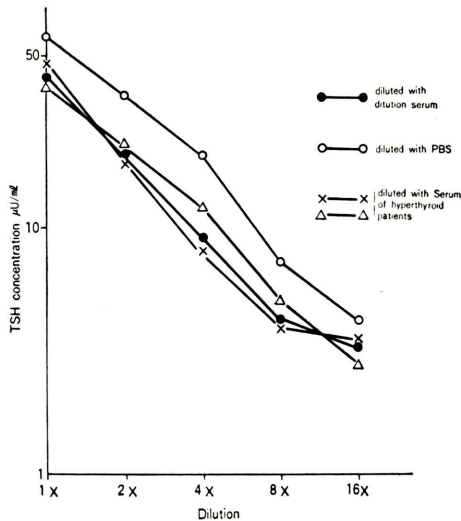


Fig. 3 Effect of dilution.

Table 1 Recovery

| Added TSH ($\mu\text{U/ml}$) | TSH values calculated ($\mu\text{U/ml}$) | measured ($\mu\text{U/ml}$) | Recovery (%) |
|--------------------------------|--|-------------------------------|--------------|
| Sample serum | | 2.2 | |
| 15 | 17.2 | 16.1 | 93.6 |
| 30 | 32.2 | 31.1 | 96.2 |
| Sample serum | | 1.5 | |
| 15 | 16.5 | 16.4 | 99.3 |
| 30 | 31.5 | 31.4 | 99.6 |

Table 2 Reproducibility

1. Intraassay variation (n=7)

| Sample | Mean ($\mu\text{U/ml}$) | S.D. | C.V. (%) |
|--------|---------------------------|------|----------|
| 1. | 38.2 | 3.1 | 8.1 |
| 2. | 15.4 | 0.9 | 5.8 |
| 3. | 2.5 | 0.3 | 12.0 |

2. Interassay variation (n=4)

| Sample | Mean ($\mu\text{U/ml}$) | S.D. | C.V. (%) |
|--------|---------------------------|------|----------|
| 1. | 37.8 | 2.5 | 6.6 |
| 2. | 17.5 | 1.5 | 8.5 |
| 3. | 2.9 | 0.3 | 10.3 |

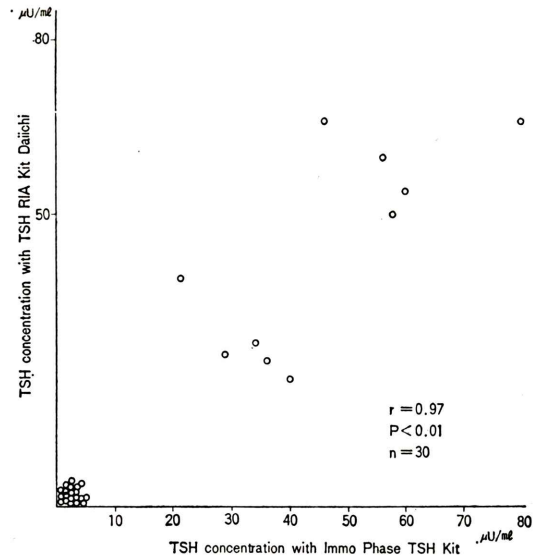


Fig. 4 Correlation between vales for TSH Concentration as measured with Immo Phase TSH Kit and TSH Kit Daiichi.

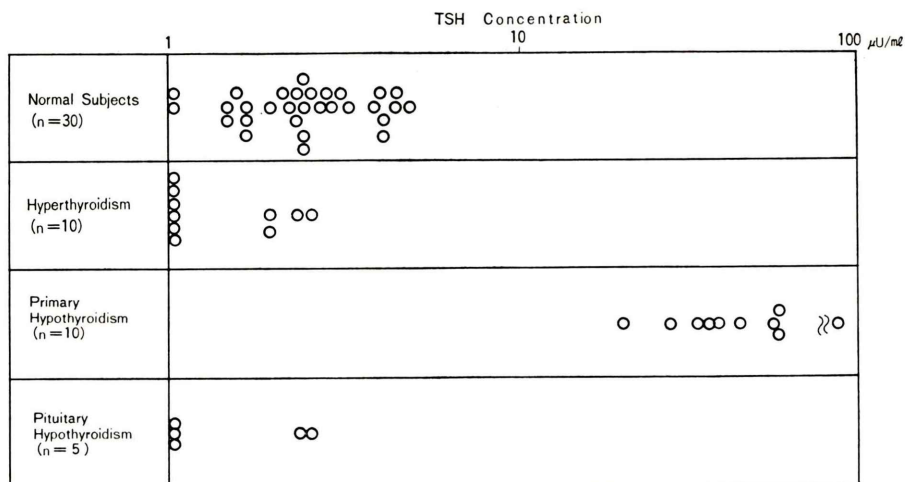


Fig. 5 Serum TSH concentrations of normal subjects and thyroid diseases.

9) 臨床的検討

正常人における血清 TSH の平均値±SDは、測定感度以下の場合を 0 μU/ml として計算すると、2.7±1.2 μU/ml となり、正常範囲を正常者の平均値±2SD とすれば、本キットにおける正常範囲は 5.2 μU/ml 以下となった。甲状腺機能亢進症では 10例中 6例は測定感度以下の値であったが、他の 4例は 2.0~2.6 μU/ml の値となった。原発性甲状腺機能低下症では全例 22~60 μU/ml 以上と高値であった。下垂体性甲状腺機能低下症の 5例では、3例は測定感度以下、他の 2例は 2.6 および 2.5 μU/ml であった (Fig. 5)。

V. 考案

RIA による血清 TSH の測定は、従来¹²⁵I 標識 TSH との競合を利用した方法が用いられてきた^{1,2)}。今回検討した Immo Phase TSH RIA キットは¹²⁵I 標識抗 TSH 抗体を血中の TSH と反応させ、ガラス粒子に結合させた抗 TSH 抗体をさらに反応させるサンドイッチ法が用いられている点が従来のキットと異なる点である。このため反応時間が短く、抗体に結合した TSH の分離が容易であるという利点を持つ。

本キットによる測定においては、標準曲線は 1.5 ~ 60 μU/ml の間で比較的急峻であり、またその再現性も良好であったことから、低濃度 TSH の測定結果が良好となる可能性を示すと思われた。またインキュベーション温度および時間の検討から、37°C で、第一インキュベーション 2 時間、第二インキュベーション 30 分で充分であると思われた。希釈による測定結果が良好であったことより、高濃度 TSH を有する血清では希釈することにより測定が可能であることを示すものと考えられた。FSH および LH との間に交叉反応性が認められたが、軽度であり臨床的には無視できる程度のものと考えられた。

本キットによる測定における再現性は良好であり、また回収率も 93.6~99.6% と良好であった。また従来用いられている TSH キット (第一) による測定値との間の相関も良好であった。

正常者における血清 TSH の平均値は 2.7±1.2 μU/ml (±SD) であった。また正常範囲は 5.1 μU/ml 以下となり、従来の方法による測定値とほぼ同様の値であった^{3,4)}。最小検出濃度は 1.5 μU/ml であり、甲状腺機能亢進症患者および正常者の血清 TSH 値には差異は認められなかった。また甲状

腺機能亢進症患者10例中4例で血清 TSH が 2.0～2.6 $\mu\text{U/ml}$ であったが、本症では TSH の分泌は抑制されているとされており、血清蛋白による非特異的結合による影響と考えられた。下垂体性甲状腺機能低下症では5例中2例で測定感度以上の値となったが、同様に血中甲状腺ホルモンが低値となる原発性甲状腺機能低下症では血清 TSH は高値となることから、この両者の鑑別は容易であった。

VI. ま と め

Immo Phase TSH RIA キットの基礎的および臨床的検討を行った。インキュベーション温度および時間は、37°C、第一インキュベーション2時間、第二インキュベーション30分で充分であり、また

再現性および回収率は良好であった。正常者の血清 TSH の平均は $2.7 \pm 1.2 \mu\text{U/ml}$ 正常範囲は 5.1 $\mu\text{U/ml}$ 以下であった。

文 献

- 1) Odell WD, Wilber JF, Paul WE: Radioimmunoassay of Thyrotropin in Human Serum. *J Clin Endocrinol* **25**: 1179-1188, 1965
- 2) Utiger RD: Radioimmunoassay of Human Plasma Thyrotropin. *J Clin Invest* **44**: 1277-1285, 1965
- 3) 竹田洋祐, 池窪勝治, 鳥塚莞爾, 清水百合, 森 徹: 二抗体 TSH kit の使用経験. *ホルモンと臨床*, **22**: 313-318, 1974
- 4) 小豆沢瑞夫, 宮井 潔, 小豆沢久子, 熊原雄一: HTSH Radioimmunoassay の臨床応用に関する基礎的検討. *核医学*, **12**: 377-383, 1975