《ノート》

アマレックスTSHキットによる血中TSH濃度測定法の基礎的ならびに臨床的検討

Basic and Clinical Study on Measurement of Serum TSH Concentration Using Amerlex TSH Kit

伴　良雄*　田上　光益*　飯野　史郎*

Yoshio BAN*, Mitsumasu TANOUE* and Shiro IINO*

Division of Endocrinology and Metabolism, Department of Internal Medicine, Showa University, Fujigaoka Hospital

I. はじめに

甲状腺刺激ホルモン(TSH)は，視床下部から分泌されるTSH分泌ホルモン(TRH)によって刺激を受け，下垂体前葉より分泌され，甲状腺を刺激し，甲状腺ホルモンの合成，分泌を調節する．またTRHおよびTSHの分泌は，血中甲状腺ホルモンによるnegative feed backによって調節されている．したがって，血中TSH濃度の測定は，甲状腺機能の把握の上できわめて重要である．

Radioimmunoassay (RIA)による血中TSH測定法は，すでに多くの方法がキット化され市販されており，われわれもそれぞれを検討し報告してきた[1~5]．今回，Amersham International-科研製薬よりアマレックスTSHキットが開発され，これを試用する機会を得たのでその結果を報告する。本法の特徴は，第二抗体にアマレックス粒子が結合されており，第二抗体法の欠点とされていた，非特異的結合による結合率に及ぼす影響が少なくなるよう工夫されている点と，標準血清にヒトホルモン除去血清が添加されている点にある．

* 昭和大学藤が丘病院内科内分泌代謝科
受付：57年9月13日
最終稿受付：57年12月22日
別刷請求先：横浜市緑区藤が丘1-30 (〒227)
昭和大学藤が丘病院内科
伴　良雄

II. 対象および方法

対象は正常者20例，未治療バセドウ病患者20例，同治療中の患者39例，寛解期バセドウ病患者12例，未治療甲状腺機能低下症患者11例，同治療中の患者28例，慢性甲状腺炎患者12例，単純性甲状腺腫患者8例およびその他の疾患患者105例，計249例で，基礎的検討には，正常者および甲状腺機能低下症患者血清をプールして用いた．

方法は第一および第二インキュベーション時間の標準曲線および血清の結合率に及ぼす影響，インキュベーション温度の標準曲線および血清の結合率に及ぼす影響，同時および日差再現性，添加回収試験，希釈試験，本法および他法による測定値の相関などを求めた．

III. キットの組成(50テスト用)

1. ^{125}I-TSH液　1バイアル

1バイアル5.5 mlで，^{125}Iの放射活性は5 μCi以下で，調製済みであり，室温に戻して使用する．赤色表示である．

2. 抗血清　1バイアル

抗血清は，抗TSH家兎血清で，1バイアル

Kev words: TSH, Radioimmunoassay.

Presented by Medical*Online

5.5 m*l* で，調製済みであり，室温に戻して使用する．暗青色表示である．

3. アマレックス第二抗体懸濁液　1ボトル

1ボトル 55 m*l* で，調製済みであり，室温に戻して使用する．青色表示である．

4. 標準ヒト TSH 血清　7バイアル

凍結乾燥品で，約 0, 2, 5, 10, 20, 40, 100, μU/m*l* の7濃度で，正確な濃度は各バイアルに表示しており，これらに再蒸留水 2 m*l* を加え，泡立てないように完全に溶解する．調製後は 2～4°C で保存すれば4週間は使用できる．

IV. 測定法

測定法は Fig. 1 に示すごとくである．

1) チューブに標準血清または検体を 200 μ*l* とる．2重測定で行う．

2) 暗青色の抗血清を 100 μ*l* 加える．

3) ボルテックスで混合後，パラフィルムで封をし，37°C, 90 分間インキュベーションする．

4) 赤色の ^{125}I-TSH 液を 100 μ*l* 加える．

5) ボルテックスで混合後，パラフィルムで封をし，37°C, 90 分間インキュベーションする．

6) 青色のアマレックス第二抗体懸濁液を攪拌混合しつつ，チューブに 1 m*l* 加える．

7) ボルテックスで混合後，室温で10分間インキュベーションする．

8) 室温で，10分間，1500 g で遠心分離する．

9) 上清を吸引除去する．

10) 沈澱の放射活性を γ-シンチレーションカウンターで計測する．

11) 標準血清の放射活性をプロットし，検体の放射活性から濃度を読みとる．

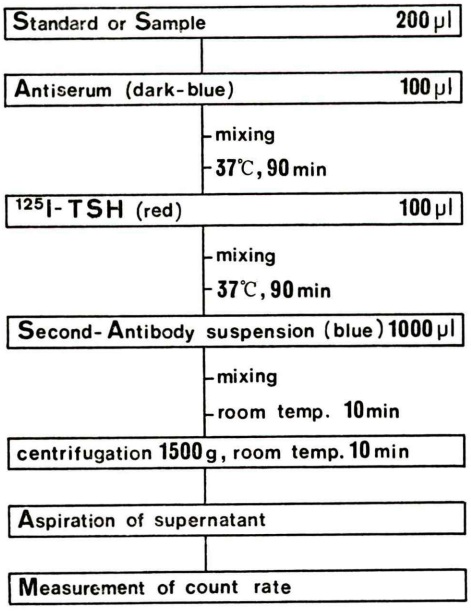

Fig. 1　Assay procedure.

V. 結　果

1. 第1インキュベーション時間の標準曲線および血清を用いた場合の結合率に及ぼす影響

37°C において，第2インキュベーション時間90分とした場合の第1インキュベーション時間の影響は Fig. 2 に示すごとくで，インキュベーション時間を 30 分～1 晩 (18 時間) と変化させると時間の経過とともに TSH 0～20 μU/m*l* の範囲では，0 濃度結合率と各濃度結合率の差が大きくなるが，TSH 45～125 μU/m*l* の範囲では，逆に結合率の差が少なくなるのが認められ，標準曲線と

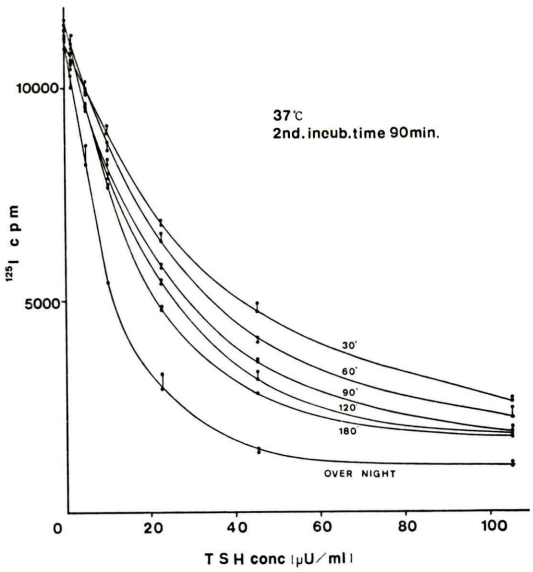

Fig. 2　Effect of 1st incubation time on the standard curve.

Presented by Medical*Online

しては60～120分間のインキュベーションが適当であると考えられ，低濃度域の測定には37°C，一晩のインキュベーションがよいと考えられた．

また，低，中，高 TSH 濃度の血清を用いた場合の結合率は，低濃度においては30分～20時間までほとんど低下がみられなかったが，中および高濃度でのそれは時間の経過とともに低下し，その低下の程度は90分まで大きく，以後は小さくなり，かつ高濃度で大きかった．

2. 第2インキュベーション時間の標準曲線および血清を用いた場合の結合率に及ぼす影響

37°C において，第1インキュベーション時間90分とした場合の第2インキュベーション時間の影響は Fig. 3 に示すごとくで，時間を30～180分間と変化させると，時間の経過とともに各濃度における結合率は上昇し，この上昇は低濃度になる程大きく，高濃度ではわずかであった．

また，低，中，高 TSH 濃度の血清を用いた場合の結合率は3濃度とも時間の経過とともに結合率は上昇し，その上昇は低，中，高濃度の順で大きかった．

3. インキュベーション温度の標準曲線および血清を用いた場合の結合率に及ぼす影響

第1および第2インキュベーション時間90分におけるインキュベーション温度の標準曲線に及ぼす影響は Fig. 4 に示すごとくで，4°C, 室温 (21～22°C) および 37°C と温度の上昇とともに結合率は上昇し，その上昇は TSH 0～低濃度域で大きく，精度も高くなり，37°C によるインキュベーションが適当と考えられた．

また，低，中，高 TSH 濃度の血清を用いた場合の結合率は 4°C における結合率に比し，室温におけるそれは3濃度共に上昇し，37°C におけるそれは高濃度では不変であったが，低，中濃度ではさらに上昇した．

4. 第1インキュベーション条件の最低検出量に及ぼす影響

37°C, 第2インキュベーション90分において，第1インキュベーション条件を90分 (A), 24時間 (B), 90分で，かつ抗体量を半量 (C) にした場合の

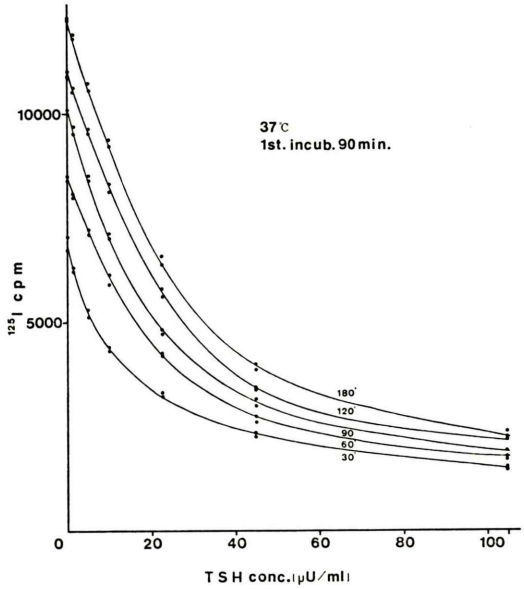

Fig. 3 Effect of 2nd incubation time on the standard curve.

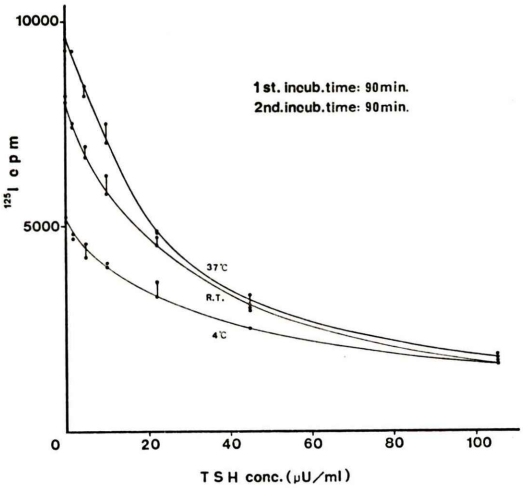

Fig. 4 Effect of incubation temperature on the standard curve.

最低検出量に及ぼす影響は Fig. 5 に示すごとくで，A においては結合率の上昇は僅少であり，最低検出量は TSH 1.9 μU/m*l*, B におけるそれは TSH 0.48 μU/m*l*, C におけるそれは TSH 0.95 μU/m*l* と考えられた．

Presented by Medical*Online

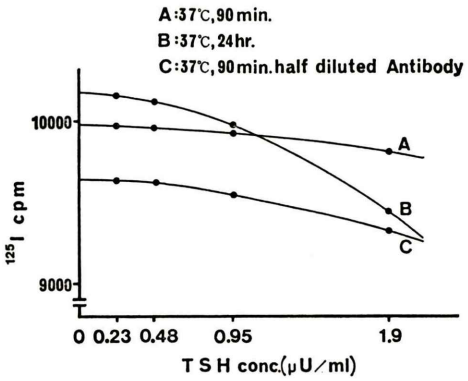

Fig. 5 Effect of incubation time and temperature on minimal sensitivity of standard curve.

以上の結果から，以後の測定条件は 37°C, 第 1 および第 2 インキュベーション90分で行った.

5. 同時および日差再現性

同時および日差再現性を，それぞれ 12 検体の Intraassay および二重測定による 6 回の Interassay の変動係数 (CV) から求めた. CV は Table 1 に示すごとくで，Intraassay の CV は TSH 1.74 μU/m*l* の血清 I においては 30.33%, TSH 10.08 μU/m*l* の血清 II においては 4.45%, TSH 30.04 μU/m*l* の血清 III においては 1.67% であるのが認められた.

Interassay の CV は TSH 1.92 μU/m*l* の血清 I においては 13.63 %, TSH 9.92 μU/m*l* の血清 II においては 7.75%, TSH 31.83 μU/m*l* の血清 III おいてはに 3.10% であった.

6. 添加回収試験

標準血清 100 μ*l* に TSH 2 μU/m*l* の血清 100 μ*l* 添加し，求めた添加回収試験は Table 2 に示すごとくで，回収率は 84.1～106.8% であり，その平均値は 94.8% であった.

7. 血清希釈試験

2 種の TSH 高値の血清を 0 濃度血清を用いて 1/2～1/6 に希釈した場合の血清希釈試験は Fig. 6 に示すごとくで，いずれの場合にも，原点を通る希釈直線が得られた.

8. 交叉反応性試験

LH, FSH, HCG, PRL の標準物質を用いて行った交叉反応性試験では, LH および FSH は 2～500 mIU/m*l*, HCG は 1～100 mIU/m*l*, PRL は 1.3～160 ng/m*l* の範囲で交叉反応性は認められなかった.

9. 本法および他法で求めた血中 TSH 濃度の相関

Table 1 Coefficient of Variation

Intraassay

	I	II	III
n	12	12	12
x̄ (μU/m*l*)	1.74	10.08	31.04
±SD	0.53	0.45	0.52
CV%	30.33	4.45	1.67

Interassay

	I	II	III
n	6	6	6
x̄ (μU/m*l*)	1.92	9.92	31.83
±SD	0.26	0.77	0.99
CV%	13.63	7.75	3.10

Table 2 Recovery

TSH μU/m*l*			recovery
added	calculated	measured	(%)
0.95	2.95	2.5	84.7
2.4	4.4	4.7	106.8
4.85	6.85	6.6	96.4
9.75	11.75	11.5	97.9
19.0	21.0	18.5	88.1
47.5	49.5	47.0	94.9
			Mean 94.8%

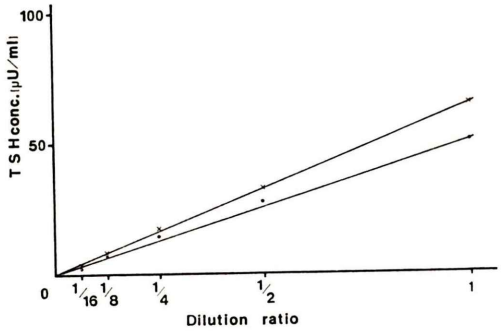

Fig. 6 Dilution curve of serum samples.

Presented by Medical*Online

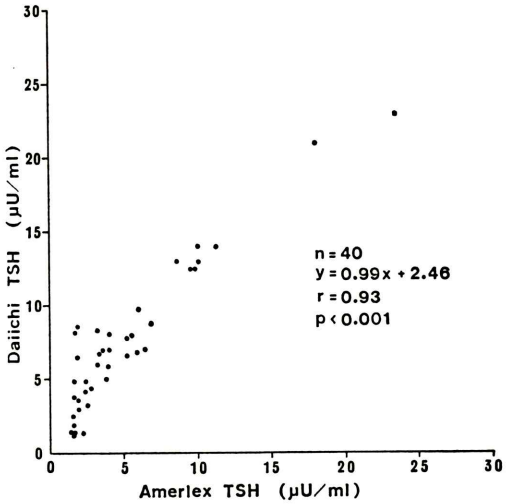

Fig. 7 Relationship of serum TSH values between Amerlex kit and TSH kit Daiichi.

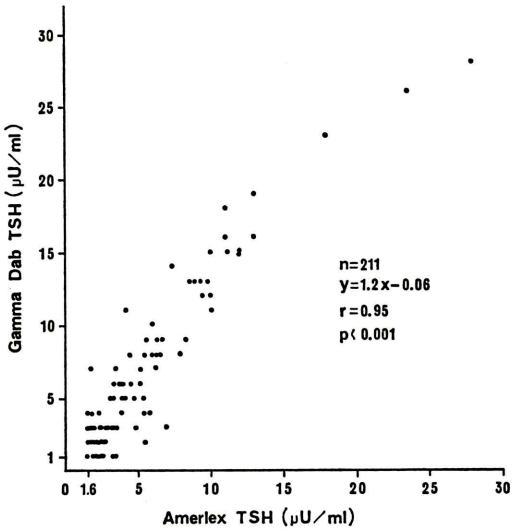

Fig. 8 Relationship of serum TSH values between Amerlex kit and Gamma Dab kit.

1) 本法および TSH キット「第一」で求めた血中 TSH 濃度の相関

40例において本法および TSH キット「第一」[1] で求めた血中 TSH 濃度の相関は Fig. 7 に示すごとくで，その相関係数 r は 0.92 ($p<0.001$), その回帰直線は $y=0.99x+2.46$ であった．

2) 本法および Gamma Dab キットで求めた血中 TSH 濃度の相関

本法および Gamma Dab キットで求めた血中 TSH 濃度の相関は Fig. 8 に示すごとくで，本法で TSH 1.6 μU/ml 以下，Gamma Dab キット[4] で TSH 1.0 μU/ml 以下を示した 38 例を除く 211 例より求めた相関係数 r は 0.95 ($p<0.001$)，回帰直線は $y=1.2x-0.06$ であった．

10. 各種甲状腺疾患における本法による血中 TSH 濃度

各種甲状腺疾患における本法による血中 TSH 濃度は Fig. 9 に示すごとくで，正常者 20 例における TSH 濃度は 1.6 以下～5.6 μU/ml に分布し，TSH 1.6 μU/ml 以下を示した者は 25% に認められた．

バセドウ病患者71例においては，未治療同病患者20例の TSH 濃度は 1.6 以下～2.5 μU/ml に分布し，1.7 μU/ml 以上を示した者は25%であり，治療中の同病患者 39 例は 1.6 以下～28 μU/ml を示し，寛解期同病患者 12 例は 1.6 以下～9.5 μU/ml に分布した．

未治療甲状腺機能低下症患者 11 例における TSH 濃常は 39～240 μU/ml に分布し，治療中の同症患者28例は 1.6 以下～12 μU/ml に分布した．

慢性甲状腺炎患者12例の TSH 濃度は 1.6 以下～12 μU/ml に分布し，単純性甲状腺腫患者 8 例のそれは 1.6 以下～3.4 μU/ml に分布した．

VI. 考　案

RIA による血中 TSH 濃度測定においては，通常，血清と抗血清をインキュベーション後，標識 TSH を加える 2 段階法がいずれのキットにおいても用いられ，B・F 分離には第二抗体法が用いられており[1,3~6]，本法においても 2 段階，第二抗体法が用いられている．従来から第二抗体を用いる分離法においては，非特異的反応による測定値の上昇が指摘されている．この非特異的反応の原因の 1 つは，標準物質に血清が加えられていない[1,4]ためであり，この場合には，通常，TSH がきわめて低値である[7] と考えられる未治療バセドウ病患者血清が測定の際に加えられる．また

Presented by Medical*Online

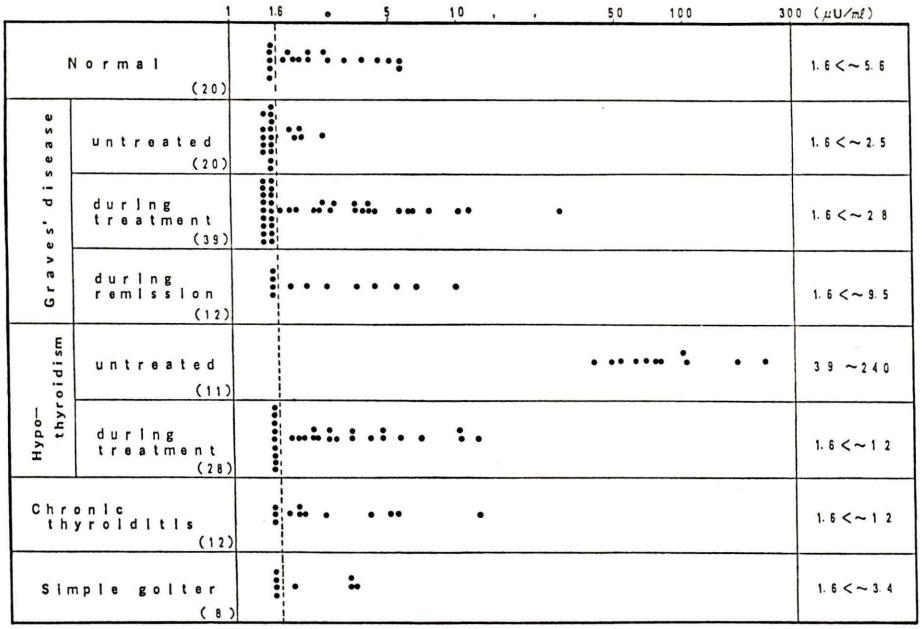

Fig. 9 Serum TSH values of various thyroid disease by Amerlex TSH kit.

TSH キット II (ダイナボット)[3] や CK-RTS (中外製薬)[5] では馬血清が添加されている．本法においては，T_3 負荷により TSH 低値としたヒト血清を，固相化抗 TSH 抗体で処理した TSH 0 μU/ml の血清が，1st International Reference Standard により検定した各濃度 TSH に添加されており，標準血清としては，ほぼ理想的なものと考えられる．第二抗体による分離においては長時間を要するために，沈殿安定剤 (デキストラン)[6] を加えたり，PEG 混合液[3,5] が用いられ，B・F 分離時間の短縮が図られている．本法においては第二抗体にアマレックス粒子を結合させた固相法が用いられ，10 分間のインキュベーションで B・F 分離が可能である．

正常者の血中 TSH 濃度の下限値と，未治療バセドウ病患者の血中 TSH 濃度の分離は，従来から市販のキットでは不可能であった．本法においては 37°C，第 1 インキュベーション 24 時間のアッセイ条件で，その分離がかなり良好になったが，CV の点からもまだ満足のいくものはないと考えられ，このアッセイ条件において，逆に TSH 高値域の分離が悪くなるため，本研究では 37°C，第 1 および第 2 インキュベーション時間をそれぞれ 90 分で行ったが，このアッセイ条件によって TSH 1.6 μU/ml を最低検出量とすると，正常者とバセドウ病患者のそれぞれ25%が交叉したにすぎず，従来のキットよりかなり改善されている[2~6] と考えられた．

Intrassay および Interassay の CV は，TSH 低値ではそれぞれ30%および14%と幾分大きいが，この点は従来のキットによるそれとほぼ一致する[1~6] ものであり，また，中等度および高濃度における CV は良好であった．また，添加回収試験，希釈試験はいずれも良好であり，本キットの抗 TSH 抗体の交叉反応性を LH, FSH, HCG, PRL について検討したが，検討した範囲内では認められず，交叉反応性はきわめて小さく，血中 TSH の測定には影響しないものと考えられた．また，本キットの標準血清における β-HCG, FSH, LH の混在は，それぞれ，10 mIU/ml 以下，30 mIU/ml 以下，40 mIU/ml 以下といわれる．本法および他のキットによる測定値の相関も r=0.95, 0.92

Presented by Medical*Online

($p<0.001$) ときわめて良好であった.

正常者の血中 TSH 濃度は，本法によっては1.6以下～5.6 μU/ml に分布し，正常範囲は 6 μU/ml 以下と考えられ，従来のキットによる正常上限値の中でも低値に属するものであった.

未治療バセドウ病患者においてはその 75% が TSH 1.6 μU/ml 下を示し，治療中の同患者は，抗甲状腺剤投与によって 1.6 以下～28 μU/ml に分布し，治療による下垂体機能をよく反映していると考えられ，寛解期の同病患者は 1.6 以下～9.5 μU/ml に分布し，その甲状腺機能を反映しているものと考えられた.

甲状腺機能低下症患者においては未治療患者で 39～240 μU/ml に分布し，治療中の患者で 1.6 以下～12 μU/ml に分布し，その甲状腺機能をよく反映しているものと考えられた.

慢性甲状腺炎患者においては大部分は正常範囲に分布したが，1例においては，血中甲状腺ホルモンは正常範囲にあるにもかかわらず TSH 濃度は 12 μU/ml と上昇しており，本症においては経過観察を要することを示している．また，単純性甲状腺腫患者においてはいずれも正常範囲に分布し，よく甲状腺機能を反映しているものと考えられた.

VII. 結　論

1) 本法の測定条件は 37°C，第 1 および第 2 インキュベーションはそれぞれ 90 分で，TSH 濃度 1.6～105 μU/ml が測定可能であった.

2) 測定条件を 37°C，第 1 および第 2 インキュベーション時間を，それぞれ24時間および90分にすることにより，0.48～45 μU/ml の範囲の測定が可能であると考えられた.

3) Intraasaay および Interassay の CV は，TSH 低濃度で幾分大きかったが，中等度および高濃度ではほぼ満足のいくものであった.

4) 添加回収試験，希釈試験はいずれも良好であった.

5) 本法と TSH キット「第一」および Gamma Dab キットによる測定値の相関は，それぞれ $r=0.92$ ($p<0.001$) および 0.95 ($p<0.001$) であり，それぞれの回帰直線は $y=0.99x+2.46$ および $y=1.2x-0.06$ であった.

6) 本法による正常範囲の上限値は 6 μU/ml であり，1.6 以下を示した正常者は 25% であった.

7) バセドウ病患者は 2.5 μU/ml 以下に分布し，その 75% は 1.6 μU/ml 以下を示し，甲状腺機能低下症患者は 39 μU/ml 以上に分布し，両疾患の治療中の患者の大部分は正常範囲を示し，少数例において幾分高値を示し，よく甲状腺機能を反映していると考えられた.

8) 血中甲状腺ホルモンが正常範囲にある慢性甲状腺炎患者および単純性甲状腺腫患者は，1例を除き正常範囲に分布し，よく甲状腺機能を反映していると考えられた.

9) 以上の結果から，本法は臨床応用にきわめて有用であり，また簡便さの点からも，従来のキットに優るものであると考えられる.

本研究に用いたアマレックス TSH キットは科研製薬より提供されたものである.

本論文要旨は第17回日本核医学会関東甲信越地方会において発表した.

文　献

1) 伴　良雄，渡辺恭行，長島則夫，他：Radioimmunoassay による血中 TSH 測定法の基礎的・臨床的検討，含 TRH 試験．ホルモンと臨床 **21**: 1289–1292, 1973
2) 伴　良雄，飯野史郎：Phadebas TSH RIA kit の基礎的ならびに臨床的検討．ホルモンと臨床 **25**: 221–226, 1977
3) 伴　良雄，木村　肇，井上　健，他：TSH RIA kit II による血中 TSH 濃度測定法の基礎的ならびに臨床的検討．現代医療 **11**: 1093–1098, 1979
4) 伴　良雄，木村　肇，井上　健，他：ガンマー・ダブによる血中 TSH 測定法の基礎的ならびに臨床的検討．ホルモンと臨床 **27**: 927–932, 1979
5) 伴　良雄，沖　卓史，長谷川真，他：Radioimmunoassay (CK-RTS) による血中 TSH 濃度測定法の基礎的ならびに臨床的検討．ホルモンと臨床 **30**: 223–226, 1982
6) 佐藤龍次，伴　良雄：沈澱安定剤を使用した TSH キット第一改良法の検討．ホルモンと臨床 **28**: 1335–1339, 1980

Presented by Medical*Online

7) 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．日本内分泌学会雑誌 **56**: 1231-1239, 1980

Presented by Medical*Online