

## 《ノート》

# 高感度ラジオメトリックアッセイ (RIA-gnost hTSH) による血中甲状腺刺激ホルモン濃度の測定

New Sensitive Immunoradiometric Assay (RIA-gnost hTSH)  
for Human Thyrotropin

今野 則道\* 田口 英雄\*\* 中島 詳\*\* 萩原 康司\*\*  
田口 静子\*\*\*

Norimichi KONNO\*, Hideo TAGUCHI\*\*, Akira NAKAJIMA\*\*,  
Kohji HAGIWARA\*\* and Shizuko TAGUCHI\*\*\*

\*Department of Internal Medicine, \*\*Department of Radiology, \*\*\*Department of Clinical Immunology,  
Hokkaido Central Hospital for Social Health Insurance, Nakanoshima, Sapporo 062, Japan

## I. はじめに

血中甲状腺刺激ホルモン (TSH) の RIA による測定は Utiger, Odell らの報告<sup>1,2)</sup> 以来, 各方面で広く行われている。しかし一部の研究者により開発された高感度 TSH 測定方法<sup>3-6)</sup> を除くと, 従来の方法では正常値の下限値を規定できるほどの測定感度を備えていない<sup>7)</sup>。したがってこの方法では正常人とバセドウ病患者の TSH 濃度を明瞭に区別できないことが多い。最近モノクローナル抗体を用いた高感度 TSH 測定方法が開発され, その臨床上的有用性について, いくつかの報告がなされている<sup>8-12)</sup>。今回筆者らは one-step sandwich 法による高感度 TSH immunoradiometric assay (RIA-gnost hTSH, Hoechst) を使用する機会を得たので, この測定方法の臨床上的有用性について検討を加えてみた。

## II. 対象および測定方法

**対象** 正常人としては当院での健康診断で異常を認めなかった 147 名 (男 74 名, 女 73 名, 年齢 18-64 歳) を対象とした。甲状腺疾患患者は, 当院甲状腺外来にて臨床所見および甲状腺機能検査成績を基に診断し得た対象を含めた。妊婦は 3rd trimester の正常妊婦 16 名およびバセドウ病を合併した妊婦 3 名を対象とした。さらに非甲状腺疾患患者 (NTI) として低 triiodothyronine (T<sub>3</sub>) を呈した患者 19 名を含めた。これら NTI の原因疾患としては, 悪性腫瘍, 心不全, 呼吸不全, 尿毒症, 末梢動脈閉塞症, 脳血栓症, リューマチ様関節炎があった。

**RIA-gnost hTSH 測定原理** TSH  $\beta$ -subunit に対するモノクローナル抗体を固相化し, これにスタンダードまたは被験血清を加え, さらに <sup>125</sup>I で標識した TSH  $\beta$ -subunit に対する抗体を加え, 一定時間インキュベートした後, 非結合標識抗体を buffer にて洗浄し, 結合抗体の放射能から TSH 濃度を知る immunoradiometric assay である。測定条件として血清量 200  $\mu$ l, インキュベーション

\* 北海道社会保険中央病院内科

\*\* 同 放射線部

\*\*\* 同 検査科臨床免疫部門

受付: 60 年 9 月 30 日

最終稿受付: 60 年 12 月 12 日

別刷請求先: 札幌市豊平区中の島一条八丁目 (☎ 062)

北海道社会保険中央病院内科

今野 則道

**Key words:** Immunoradiometric assay, Thyrotropin, Thyroid status.

温度 25°C, インキュベーション時間 3 時間, 標識抗体液量 100  $\mu$ l, 洗浄用 buffer 量 1,000  $\mu$ l, 洗浄回数 2 回を採用した。

**その他の検査方法** 血中 thyroxine ( $T_4$ ),  $T_3$ , thyroxine-binding globulin (TBG) 各濃度は, すでに報告した方法によった<sup>13,14</sup>。また二抗体法による TSH の radioimmunoassay はすでに報告した方法で測定した<sup>7</sup>。血清総蛋白濃度は屈折計法 (日立血清蛋白計) で測定した。血清  $\gamma$ -globulin は single radial immunodiffusion (SRID) で測定した IgG, IgA, および IgM の総和として求めた。血清 Albumin (Alb), thyroxine-binding prealbumin (TBPA) は免疫比濁法により測定した。本法は Laser nephelometry (LN) に用いる抗血清 (rabbit antialbumin LN, rabbit anti-prealbumin, Hoechst) を用い, これとアクセレーターで稀釈

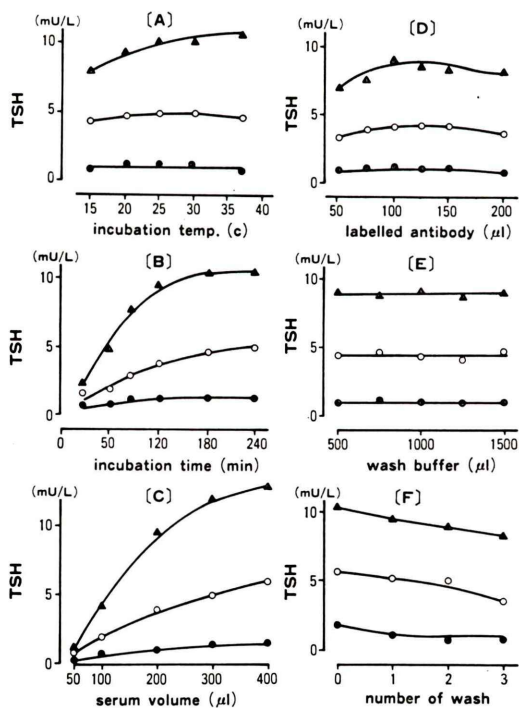
した血清とをインキュベートした後生じる濁度を分光光度計 (日立 105-40) にて, 波長 340 nm で測定する方法である。この方法では Alb で 910-9,100 mg/dl の間, TBPA で 7-70 mg/dl の間で直線性が得られ, inter-assay CV (%) は Alb で 4.7% (n=13), TBPA で 6.9% (n=13) であった。また回収率は Alb で 96%, TBPA で 86% であった。本法での測定値 (Y) と SRID による測定値 (X) との相関は Alb で  $r = 0.877$  (n=80,  $p < 0.001$ ), TBPA で  $r = 0.951$  (n=80,  $p < 0.001$ ) で両者間の回帰直線は Alb で  $Y = 0.98X + 197.9$ , TBPA で  $Y = 0.86X + 3.8$  であった。TRH-test は thyrotropin-releasing hormone (TRH) (田辺製薬 k.k.) 500  $\mu$ g iv 前および 30 分後の血清 TSH 濃度の変動をみる方法によった。

**統計学的分析方法** 平均値の差の有意性の検定は Student's t-test によった。回帰分析は最小二乗法によった。

### III. 結 果

#### 測定条件に関する検討

測定操作上のいくつかの条件について, 3 種類のコントロール血清を用いて検討した (Fig. 1)。TSH 測定値はインキュベーション温度 (A) および時間 (B) とともに高くなった。とくにインキュベーション温度については, 本 kit の使用説明書では 17-27°C とされているが, 一定の温度に定める必要があると考えられ, 以下の測定は 25°C で行った。また TSH 値は用いる血清量が多くなるにつれて上昇したが (C), 200  $\mu$ l 以上では必ずしも直線的な上昇を示さなかった。さらに標識抗体量と TSH 値との関係を見ると (D), 100  $\mu$ l において最大の TSH 値を示し, 本 kit のごとく 1-step sandwich assay において固相化された抗体量が一定の場合, 標識抗体濃度にも至適濃度が存在することが推測された。洗浄用 buffer 量は 1,000  $\mu$ l で十分と考えられた (E)。また洗浄回数は F に示したごとく, 3 回までで測定値に大きな影響を与えとは考えられず, 以下の測定では 2 回行うことにした。以上の結果から操作上の条件として,



**Fig. 1** Alterations in assay conditions using three different sera. A; incubation temperature, B; incubation time, C; serum volume, D; volume of labelled antibody solution, E; wash buffer volume, F; number of wash.

**Table 1** Standard and modified procedure for determining thyrotropin

	Standard procedure	Our modification
Standard or serum, $\mu\text{l}$	200	200
Incubation temperature, $^{\circ}\text{C}$	17–27	25
Incubation time, min	120	180
Mass of labeled antibody, $\mu\text{l}$	100	100
Wash buffer, $\mu\text{l}$	1,000	1,000
Number of wash	2	2

**Table 2** Intra- and inter-assay precisions

Intra-assay (n=5)	Serum I	Serum II	Serum III
mean (mU/L)	50.2	1.23	0.28
SD	1.73	0.07	0.02
CV (%)	3.45	5.69	7.14
Inter-assay (n=8)	Serum A	Serum B	Serum C
mean (mU/L)	10.09	4.55	0.91
SD	0.76	0.38	0.12
CV (%)	7.6	8.4	12.8

血清量 200  $\mu\text{l}$ , インキュベーション温度 25 $^{\circ}\text{C}$ , インキュベーション時間 3 時間, 標識抗体液量 100  $\mu\text{l}$ , 洗浄用 buffer 量 1,000  $\mu\text{l}$ , 洗浄回数 2 回にて以下の測定を行った (Table 1).

#### 精度および再現性

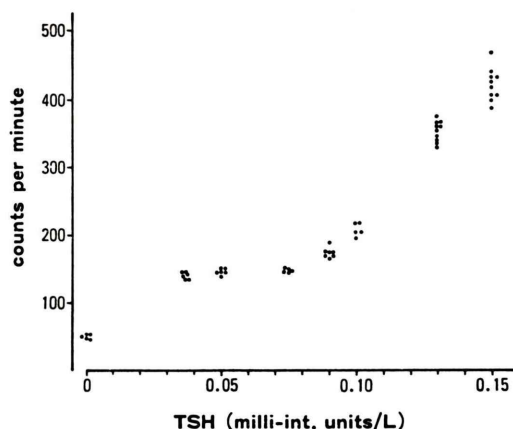
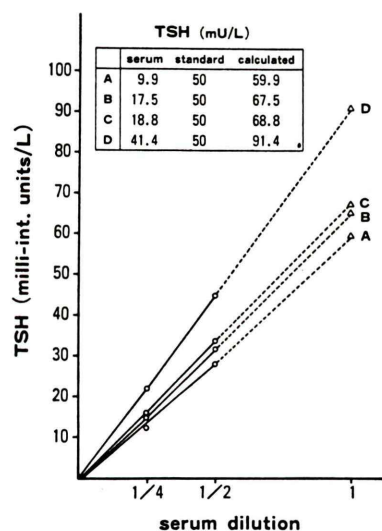
3 種類のコントロール血清から得た intra-assay CV (%) は 3.45–7.15% であり, inter-assay CV (%) は 7.6–12.8% であった (Table 2).

#### 最小検出濃度

本 kit の 0.15 mU/L 標準液を 0 濃度標準液で希釈し, 放射能の分布をしらべた (Fig. 2). 0.09 mU/L 濃度 TSH までは, カウントは次第に低下し, お互いに重なりがなかったが, 0.075 mU/L 以下では重なりが著しく, この濃度以下の TSH 濃度を正確に読みとることはできなかった. この結果から本 kit の最小検出濃度を 0.08 mU/L とした.

#### 希釈血清による高 TSH 濃度の測定

本 kit の標準曲線から読みとれる最大 TSH 濃度は 50 mU/L であり, これ以上の血清 TSH 値

**Fig. 2** Lower limit of detection of TSH. TSH standard of 0.15 mU/L was diluted with zero standard solution.**Fig. 3** Effect of serum dilution on TSH concentration. Four different sera containing TSH less than 50 mU/L were added to the 50 mU/L standard solution.  $\Delta$ ; calculated values,  $\circ$ ; measured values.

を測定するには希釈血清を用いる必要がある. 4 種類の既知 TSH 濃度をもつ血清に標準 TSH 液の中から 50 mU/L の液をえらび, これを加え, 0 濃度標準液で希釈し, 測定された TSH 濃度と希釈倍数から, 計算された TSH 濃度を求めることができるかどうかをしらべた. Fig. 3 に示すと



Table 3 Concentrations and characteristics of the RIA-gnost hTSH kit standard

	Nominal TSH (mU/L)	Total protein (g/dl)	Albumin (mg/dl)	TBG (mg/l)	TBPA (mg/dl)	$\gamma$ -globulin (mg/dl)
1	0	7.2	3,300	10.5	16	731
2	0.15	7.3	3,325	10.7	17	957
3	0.50	6.6	3,362	10.5	13	729
4	1.5	5.8	2,753	10.7	15	708
5	5.0	6.0	3,701	11.0	19	931
6	15.0	5.4	2,960	10.7	18	849
7	50.0	5.4	3,109	11.5	18	818
Normal range		6.0–8.5	3,100–5,000	12.0–28.0	20–50	860–2,400

Albumin and TBPA were measured by immunoturbidimetric method. TBG was measured by RIA.

$\gamma$ -globulin was measured by single radial immunodiffusion method.

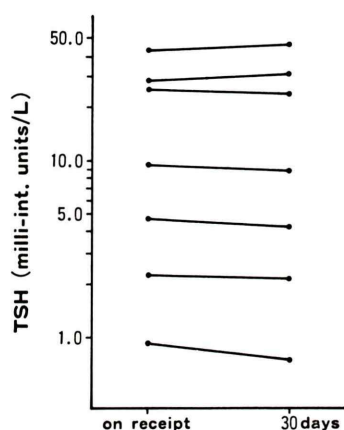


Fig. 4 Stability of the kit reagents. The kit (Lot No. E-1018) was stored at 4°C for 30 days.

おり、いずれも原点を通る直線が得られ、50 mU/L以上の血清 TSH 値は稀釈血清を用いることにより測定可能であると考えられた。また、この成績から得た添加 TSH の回収率は  $97.7 \pm 10.0\%$  (mean  $\pm$  S.D.,  $n=8$ ) であった。

#### 本 kit 標準液の性状

7 種類の標準液中の蛋白成分のうち、総蛋白濃度、albumin、TBPA、TBG、および  $\gamma$ -globulin を測定した (Table 3)。総蛋白濃度は 5.4–7.3 g/dl であり、albumin 濃度は 2,753–3,362 mg/dl に分布し、TBG は 10.5–11.5 mg/l に分布していた。また TBPA は 13–19 mg/dl の間に、 $\gamma$ -globulin は 708–957 mg/dl の間に分布し、これらの蛋白濃度は、いずれも正常範囲の下限あるいは、その近くに分布していた。一方二抗体法 TSH 測定用 RIA

kit の標準液について同様な点をみると、総蛋白濃度は 1.2–1.4 g/dl、albumin は 406–445 mg/dl、TBPA は 10–12 mg/dl に分布し、TBG および  $\gamma$ -globulin は全く検出されなかった。とくに  $\gamma$ -globulin は電気泳動法でも検出されなかった。

#### Kit の試薬の安定性

kit を入手した直後と、4°C で 30 日間保存した場合とで、TSH 測定値に差があるかどうかをしらべた。同一 Lot No. の kit で 7 種類の血清 TSH を測定した (Fig. 4)。入手直後の kit で得た値を 100 とすると、30 日間保存した kit での値は  $96.3 \pm 9.0$  であった。

#### 本 kit と二抗体法による TSH 濃度との相関関係

本 kit の測定可能上限値 (50 mU/L) と、二抗体法での最小検出濃度 (0.625 mU/L) の間に分布する 40 検体の TSH 値の相関係数は  $r=0.984$  ( $p<0.001$ ) であった。

#### 各種疾患群における血清 TSH 濃度 (Fig. 5)

正常人 147 名の TSH 値は 0.25–5.75 mU/L の間に分布し、log 変換により算出した平均値は 1.42 mU/L であった。また 95% 信頼限界は 0.38–5.25 mU/L であった。39 名の甲状腺機能亢進症 ( $T_3$ :  $352 \pm 144$  ng/dl,  $T_4$ :  $17.1 \pm 4.5$   $\mu$ g/dl, mean  $\pm$  S.D.) では全例が 0.1 mU/L 以下で、正常人との重なりは一例もなかった。一方 12 名の未治療甲状腺機能低下症 ( $T_3$ :  $83 \pm 31.4$  ng/dl,  $T_4$ :  $3.6 \pm 1.6$   $\mu$ g/dl) では全例が 9.0 mU/L 以上に分布していた。また  $T_4$  補充中の甲状腺機能低下症 19 名では、TSH は

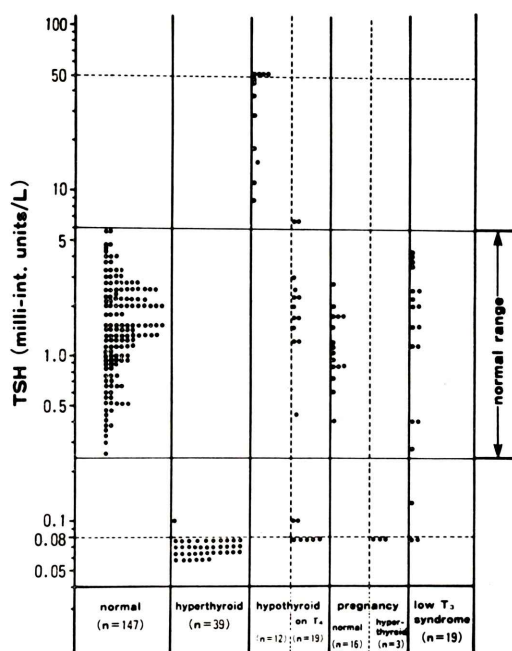


Fig. 5 Serum TSH concentrations measured by immunoradiometric assay in the various clinical conditions. Dotted lines show lower and upper limits of detection.

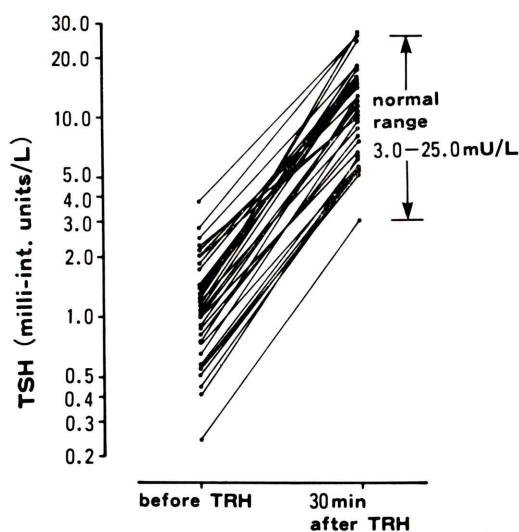


Fig. 6 TSH response to TRH (500 µg, iv) in 41 normal subjects. TSH was measured before and 30 min after TRH injection.

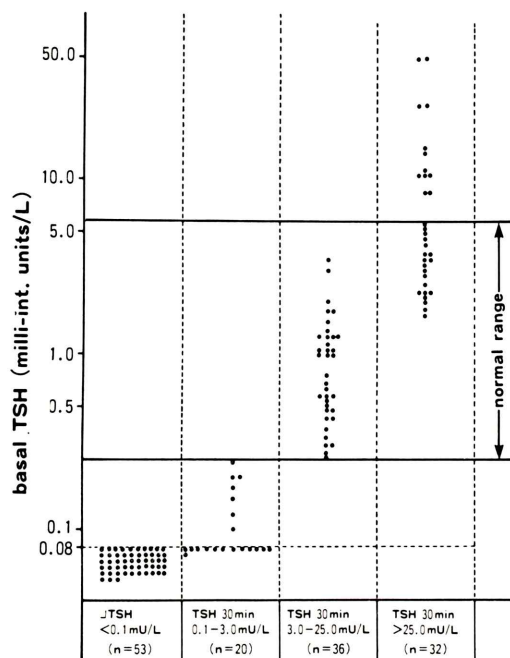


Fig. 7 Serum concentrations of basal TSH in patients with various responsivenesses to TRH.

6.75 mU/L 以下に分布していた。正常妊婦 (3rd trimester) 16 名 ( $T_3$ ;  $159 \pm 29$  ng/dl,  $T_4$ ;  $12.9 \pm 2.9$  µg/dl, TBG;  $42.0 \pm 11.9$  mg/L) では全例正常範囲内に分布し、平均 TSH 濃度は 1.05 mU/L で、mean±S.D. の範囲は 0.60–1.75 mU/L であった。バセドウ病を合併した妊婦 3 名 ( $T_3$ ;  $515 \pm 203$  ng/dl,  $T_4$ ;  $32.9 \pm 6.8$  µg/µl, TBG;  $44.7 \pm 4.0$  mg/L) の TSH はすべて測定感度以下であった。この 3 例の TSH を二抗体法 RIA で測定すると  $0.75 \pm 0.45$  mU/L であった。低  $T_3$  症候群 19 名 ( $T_3$ ;  $60 \pm 12$  ng/dl,  $T_4$ ;  $7.2 \pm 1.5$  µg/dl) の TSH は、3 名を除き他はすべて正常範囲内に分布していた。

#### TRH 刺激に対する血清 TSH の反応性

正常人 41 名に TRH (500 µg) iv を投与し、投与前および投与後 30 分における TSH 濃度の変動をしらべた (Fig. 6)。TRH 後 30 分の TSH 値は 3.0–25.0 mU/L の間に分布し、平均 10.6 mU/L であった。次に未治療甲状腺機能亢進症 6 名、寛解しているバセドウ病 8 名、治療中バセドウ病 49 名、

未治療甲状腺機能低下症7名,  $T_4$ 服用中甲状腺機能低下症56名, その他の甲状腺腫を有する患者15名の合計141名に TRH-test を行った。これらの対象を TRH 後30分における TSH 濃度を基準に4群に分類した (Fig. 7)。TRH 投与によっても TSH 濃度の変動が  $0.1 \text{ mU/L}$  以下であった53名では, その TSH 基礎値は, すべて最小検出濃度以下であった。次に TRH に対する TSH の上昇が  $0.1\text{--}3.0 \text{ mU/L}$  である群20名の TSH 基礎値は全例が  $0.25 \text{ mU/L}$  以下であり, そのうち12名(60%)は測定感度以下であった。一方 TRH に対する TSH 反応が正常な36名では, TSH 基礎値は全例正常範囲内に分布していた。また TRH に対する TSH の反応が過剰な32名では, 20名(63%)が正常 TSH 基礎値を示し, 残りの12名は高 TSH 血症を示した。

#### IV. 考 案

従来から広く使用されている TSH 測定法では, 最小検出濃度が比較的高く, 二抗体法による RIA を例にとっても, 正常人の14%が測定感度以下であり<sup>7)</sup>, 正常値の下限を規定できないとされている。このような標本は統計学的に「打ち切り標本」と呼ばれ<sup>16)</sup>, 最尤推定法で統計学的に下限値を算出することができる。筆者らが先にこの方法で計算した正常 TSH 濃度の95%信頼限界は  $0.39\text{--}4.8 \text{ mU/L}$  で<sup>7)</sup>, これは今回モノクローナル抗体を用いた IRMA で得た正常値の95%信頼限界  $0.38\text{--}5.25 \text{ mU/L}$  ときわめて良く一致した。今回の IRMA における最小検出 TSH 濃度は  $0.08 \text{ mU/L}$  で, 従来の方法にくらべ約8倍感度が高く, 正常人147名全例の TSH 値が測定可能であった。筆者らの得た正常値全例を含む範囲は  $0.25\text{--}5.75 \text{ mU/L}$  で, これは IRMA による Seth ら<sup>9)</sup>, Cobb ら<sup>10)</sup>, Immunoenzymometry による Watanabe ら<sup>11)</sup> および RIA による Evans ら<sup>15)</sup> の報告に良く一致した。

本法における TSH 測定の精度および再現性は良好であった。また測定操作上のいくつかの条件について検討した結果でも, インキュベーション

温度および時間をそれぞれ  $25^\circ\text{C}$ , 3時間に変更した方が良好な結果が得られたが, それ以外の点については, とくに変更する必要はないと考えられた。また本 kit では,  $50 \text{ mU/L}$  以上の TSH 濃度を測定するには検体を希釈する必要がある, 実際に  $0$  濃度標準液にて血清を希釈して測定した場合でも, 原血清 TSH 濃度の実測値と理論値はきわめて良く一致し, 高 TSH 血清では希釈血清を用いて測定することが可能であると考えられた。

従来の二抗体 RIA では, 血清の非特異的影響を除くため TSH フリー血清を標準曲線作成の際に加える必要がある<sup>3,7,17,18)</sup>。TSH フリー血清としては  $T_3$  抑制後の未治療バセドウ病血清が用いられることが多く<sup>3,7,17)</sup>, この効果の一つとして,  $\gamma$ -globulin あるいは  $\alpha_2$ -macro-globulin の影響が考えられている<sup>17)</sup>。今回用いた kit では, とくに TSH フリー血清を加える必要がなかった。この理由は明らかでないが, 少なくとも今回測定した標準液中の蛋白成分濃度の結果から推定する限り, 本 kit の標準曲線用液はヒトの血清成分にきわめて近い, あるいは希釈ヒト血清を用いていると考えられる。これに対し従来の二抗体 RIA 用の標準曲線用液中の蛋白濃度は著しく低く, この相異が TSH フリー血清を加える必要性の有無と関係しているかもしれない。

従来の TSH RIA では chorionic gonadotropin との間に軽度ながら交叉反応のあることが知られている<sup>2)</sup>。今回筆者らが測定した3名のバセドウ病を合併した妊婦の血清 TSH は, 二抗体 RIA ではいずれも測定され得たのに対し, IRMA 法では, 全て測定感度以下で, これは患者の甲状腺機能亢進症を良く反映した。同様な結果はモノクローナル抗体を用いた Rattle ら<sup>8)</sup>, Watanabe ら<sup>11)</sup> の報告に一致し, 本 kit の特異性の高さを証明している。

高感度 RIA によって血清 TSH を測定する最も重要な有用性の一つは, バセドウ病における TSH 濃度と正常人のそれを明瞭に区別できる点にあるとされている<sup>8~12)</sup>。対象とした39名甲状腺機能亢進症の血清 TSH は全て  $0.1 \text{ mU/L}$  以下で



あり、正常人との間に一例の重なりもなかった。また原発性甲状腺機能低下症では、全例が高 TSH 値を示した。これは今回用いた IRMA 法が、甲状腺機能異常の診断にきわめて有用であることを示している。また低  $T_3$  症候群では 3 例を除き、他の TSH は正常であった。最近 Wehmann らは、重症な低  $T_4$  血症を伴う NTI では TSH が正常以下に低下することを報告している<sup>19)</sup>。筆者らの得た低 TSH を示した NTI の 3 例は、いずれも他の対象にくらべ  $T_4$  値が低く、この Wehmann らの報告に一致するものと考えられる。

Seth らは甲状腺機能亢進症において、高感度 RIA 測定法で得た TSH 基礎値は TRH-test の反応性を良く反映するとしている<sup>9)</sup>。Bernutz らも TRH に対する TSH の反応性の有無と、TSH 基礎値は良く関連するとしている<sup>12)</sup>。TRH-test には全く副作用がないとは言えないから<sup>20)</sup>、TSH 基礎値から TRH-test の結果をすることができれば、臨床的にもきわめて有用なことと言えよう。筆者らは、種々の甲状腺疾患についてこの点を検討した。今回は TRH-test の方法として TRH 投与後 30 分の TSH 値の変動をみる方法を用いた。正常人 41 名から得た TRH 後 30 分の TSH 値は 3.0–25.0 mU/L であった。TRH 後の TSH の上昇が全くないか、あるいは正常範囲以下であった例では、その TSH 基礎値は全例が正常以下であり、TRH-test が正常反応を呈した群と一例の重なりもなかった。ただし、TSH 基礎値が感度以下であっても、TRH-test では軽度ながら反応のある例が存在することに注意すべきであろう。いずれにしても、TSH 基礎値が低値を示した場合、TRH-test も低反応を示すであろうと予測することができ、この点でも高感度 TSH 測定法の臨床上の有用性は大きいものと考えられる。

一方 TRH-test が過剰反応を呈している例の TSH 基礎値は必ずしも高値を示すとは限らず、63% は正常値を示した。甲状腺機能低下症の中でも subclinical な例では、TRH-test のみが過剰反応を呈することがしられているから<sup>21)</sup>、こうした症例の診断には、TSH 基礎値のみでは不十分で、

TRH-test の結果を考慮に入れる必要があると考えられる。

## V. 要 約

TSH  $\beta$ -subunit に対する monoclonal 抗体を用いた immunoradiometric assay (IRMA) (Riagnost hTSH, Hoechst) を使用し、種々の対象の TSH 濃度を測定した。

1) 最小検出濃度は 0.08 mU/L であり TSH 濃度 50 mU/L 以上の血清については、希釈血清を用いて正確に測定することができた。

2) intra-assay CV (%) は 3.45–7.15% であり inter-assay CV (%) は 7.6–12.8% であった。

3) kit 入手後 4°C にて 30 日間保存した場合でも測定値は一定しており、試薬の安定性が確認された。

4) 二抗体 RIA と本測定法での TSH 濃度の相関は  $r=0.984$  ( $p<0.001$ ) であった。

5) 正常人 147 名から得た正常範囲は 0.25–5.75 mU/L であった。甲状腺機能亢進症 39 名の TSH 濃度は全例 0.1 mU/L 以下であり、甲状腺機能低下症では 9.0 mU/L 以上であった。またバセドウ病を合併した妊婦 3 名では、いずれも測定感度以下であった。

6) TRH-test において TSH の反応が無または低かった例 53 名の TSH 基礎値は全例 0.25 mU/L 以下であった。また TRH-test が正常反応を呈した群の TSH 基礎値は 36 名全例正常値を示した。一方 TRH-test で過剰反応を示した対象の 63% は正常基礎 TSH 濃度を示した。

以上から本 TSH 測定法は良好な感度を持ち、再現性も良く、甲状腺機能亢進症の診断に有用であると考えられた。また低 TSH 血症を示した甲状腺疾患では、その TRH-test の反応も低いことを推測させる結果が得られ、この点でも臨床上有用であることが示唆された。

終わりに RIA-gnost hTSH kit の提供をいただいた Hoechst Japan k.k. に感謝致します。

## 文 献

- 1) Utiger RD: Radioimmunoassay of human plasma thyrotropin. *J Clin Invest* **44**: 277, 1965
- 2) Odell WD, Wilber JF, Paul WE: Radioimmunoassay of thyrotropin in human serum. *J Clin Endocr Metab* **25**: 1179, 1965
- 3) Patel YC, Burger HG, Hudson B: Radioimmunoassay of serum thyrotropin: sensitivity and specificity. *J Clin Endocr Metab* **33**: 768, 1971
- 4) Pekary AE, Hershman JM, Parlow AF: A sensitive and precise radioimmunoassay for human thyroid-stimulating hormone. *J Clin Endocr Metab* **41**: 676, 1975
- 5) Nisula BC, Louvet JP: Radioimmunoassay of thyrotropin concentrated from serum. *J Clin Endocr Metab* **46**: 729, 1978
- 6) Wehmann RE, Rubenstein HA, Nisula BC: A sensitive, convenient radioimmunoassay procedure which demonstrates that serum h-TSH is suppressed below the normal range in thyrotoxic patients. *Endocr Res Comm* **6**: 249, 1979
- 7) 今野則道: 最尤推定法による血中甲状腺刺激ホルモンの濃度の正常範囲. *日内分泌誌* **56**: 1649, 1980
- 8) Rattle SJ, Purnell DR, Williams PIM, et al: New separation method for monoclonal immunoradiometric assay and its application to assays for thyrotropin and human choriogonadotropin. *Clin Chem* **30**: 1457, 1984
- 9) Seth J, Kellett HA, Caldwell G, et al: A sensitive immunoradiometric assay for serum thyroid stimulating hormone: a replacement for the thyrotropin releasing hormone test? *Brit Med J* **289**: 1334, 1984
- 10) Cobb WE, Lamberton RP, Jackson MD: Use of a rapid, sensitive immunoradiometric assay for thyrotropin to distinguish normal from hyperthyroid subjects. *Clin Chem* **30**: 1558, 1984
- 11) Watanabe Y, Amino N, Tamaki H, et al: Highly sensitive immunoenzymometric assay for human thyrotropin. *Clin Chem* **31**: 634, 1985
- 12) Bernutz C, Kewenig M, Horn K: Detection of thyroid disorders by use of basal thyrotropin values determined with an optimized "sandwich" enzyme immunoassay. *Clin Chem* **31**: 289, 1985
- 13) Konno N, Morikawa K: Seasonal variation of serum thyrotropin concentration and thyrotropin response to thyrotropin-releasing hormone in patients with primary hypothyroidism on constant replacement dosage of thyroxine. *J Clin Endocr Metab* **54**: 1118, 1982
- 14) Konno N, Nakazato T, Hagiwara H, et al: A comparison of measurements of serum free T<sub>3</sub> concentration by equilibrium dialysis, free T<sub>3</sub> index, and T<sub>3</sub>: TBG ratio in thyroidal and non-thyroidal illnesses. *Acta Endocrinol* **103**: 501, 1983
- 15) Evans M, Croxon MS, Wilson TM, et al: The screening of patients with suspected thyrotoxicosis using a sensitive TSH radioimmunoassay. *Clin Endocr* **22**: 445, 1985
- 16) Cohen AC Jr: Simplified estimators for the normal distribution when samples are single censored or truncated. *Technometrics* **1**: 217, 1972
- 17) Sluiter WJ, van Kersen F, van Zanten AK, et al: A radioimmunoassay of human TSH, employing a solid phase second antibody, and a purified globulin preparation for standardization of non-specific protein interactions. *Clin Chim Acta* **42**: 255, 1972
- 18) Golstein J, van Haelst L: Influence of thyrotropin-free serum on the radioimmunoassay of human thyrotropin. *Clin Chim Acta* **49**: 141, 1973
- 19) Wehmann RE, Gregerman RI, Burns WH, et al: Suppression of thyrotropin in the low-thyroxine state of severe nonthyroidal illness. *New Eng J Med* **312**: 546, 1985
- 20) McFarland KF, Strickland AL, Metzger WT, et al: Thyrotrophin-releasing hormone test: an adverse reaction. *Arch Intern Med* **142**: 132, 1982
- 21) Evered D, Yound ET, Ormston BJ, et al: Treatment of hypothyroidism: a reappraisal of thyroxine therapy. *Brit Med J* **3**: 131, 1973