

《ノート》

SUCROSEP TSH IRMA の基礎的ならびに臨床的検討

Fundamental and Clinical Evaluation on an Immunoradiometric Assay Kit for Serum TSH: SUCROSEP TSH IRMA

原 秀雄* 伴 良雄* 長倉 穂積* 九島 健二*
佐藤 龍次*

Hideo HARA, Yoshio BAN, Hozumi NAGAKURA, Kenji KUSHIMA, Ryuji SATO

The Third Department of Internal Medicine, Showa University School of Medicine

I. はじめに

甲状腺刺激ホルモン(以下 TSH と略)は、分子量約 30,000 の糖蛋白で、 α , β 鎖より成りたち、下垂体前葉から分泌され、血中 triiodothyronine, thyroxine の negative feed back 機構により thyrotropin releasing hormone (以下 TRH と略)を介して調節されている。この血中 TSH 濃度の測定は、下垂体前葉機能低下症、原発性甲状腺機能低下症を始め、バセドウ病における治療判定の際の TRH 試験などに広く用いられているが、現在用いられている radioimmunoassay (以下 RIA と略)¹⁻³⁾では、最低検出濃度が $2 \mu\text{U/ml}$ であり、TSH 正常上限、TSH 高値の際の疾患の鑑別、治療動態の判別には有用であるが、TSH 低濃度域における臨床応用には十分とはいえない。このたびわれわれは、2 種類のモノクローナル抗体、1st IRP 68/38 による検定および B/F 分離に SUCROSE を用いる SUCROSEP TSH IMMUNORADIOMETRIC ASSAY (以下 IRMA と略) キットを入手し、基礎的ならびに臨床的検討を行ったのでこの結果を報告する。

* 昭和大学医学部第三内科

受付: 61 年 1 月 30 日

最終稿受付: 61 年 8 月 4 日

別刷請求先: 品川区旗の台 1-5-8 (☎ 142)

昭和大学医学部第三内科

原 秀 雄

II. 方 法

1) 試 薬

本キットには以下の試薬が含まれている。

1. ^{125}I で標識した抗 TSH モノクローナル抗体 (MAB 323) 0.25 M の Tris-HCl 緩衝液, 2% ウシ血清を含む。

2. Solid phase reagent: Sephacryl particle 結合抗 β 鎖モノクローナル抗体 (MAB 42) 0.25 M の Tris-HCl 緩衝液, 2% ウシ血清を含む。

3. 標準 TSH は 0, 0.1, 0.35, 1, 4, 16, 64, 250 $\mu\text{U/ml}$ で 1st IRP 68/38 で検定されている。

4. Prewash buffer: 0.25 M Tris-HCl 緩衝液, pH 8.5 で, 2% ウシ血清, 1% Tween 20, 0.1% sodium azide を含む。

5. Sucrosep separation reagent: 10% sucrose, 1% tween 20, 0.1% sodium azide, 0.01% brilliant blue を含む。

2) 操作方法

方法は Fig. 1 のごとく、血清 $100 \mu\text{l}$ に ^{125}I 標識モノクローナル抗体を加え、室温 ($15-25^\circ\text{C}$) にて 2 時間インキュベーション後、solid phase reagent $100 \mu\text{l}$ を加え 1 時間攪拌。洗浄液 1 ml を加え 5 分放置し、Sucrosep separation reagent 2 ml

Key words: Monoclonal antibody, 1st IRP 68/38, Immunoradiometric assay, Thyroid-stimulating hormone.

を加えて 15 分後吸引除去し、再度 1 ml の洗浄液を加えてからの操作を行い、 γ カウンターにて放射活性を測定する。

III. 対 象

対象は、健常者 94 例 (年齢 18 から 65 歳, 男性 37 例, 女性 57 例), バセドウ病患者 52 例, 慢性

甲状腺炎患者 31 例, 他の疾患患者 (単純性甲状腺腫, 腺腫様甲状腺腫, Sheehan 症候群, 末端肥大症) 38 例, 計 215 例である。基礎的検討には健常者, 甲状腺機能低下症患者, 未治療バセドウ病患者の血清をプールして用いた。

IV. 結 果

1) 同時および日差再現性

異なる 4 種類の血清を用いて 10 回測定した同時再現性, および 6 日間に渡り別々のキットで測定した日差再現性の変動係数 (C.V.) を Table 1 に示す。同時再現性においては, TSH 濃度 $0.84 \mu\text{U}/$

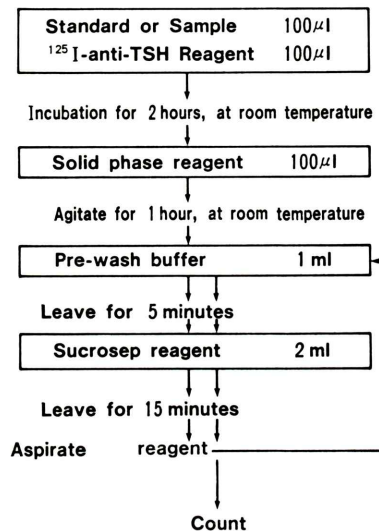


Fig. 1 Assay procedure.

Table 1 Coefficient of variation

Intraassay				
(n=10)	I	II	III	IV
Mean ($\mu\text{U}/\text{ml}$)	0.84	2.66	4.24	9.76
S. D.	0.10	0.14	0.33	0.31
C. V. (%)	12.8	5.3	7.8	3.2
Interassay				
(n=6)	I	II	III	IV
Mean ($\mu\text{U}/\text{ml}$)	0.88	2.62	4.33	9.66
S. D.	0.14	0.14	0.21	0.21
C. V. (%)	15.9	5.4	4.9	2.2

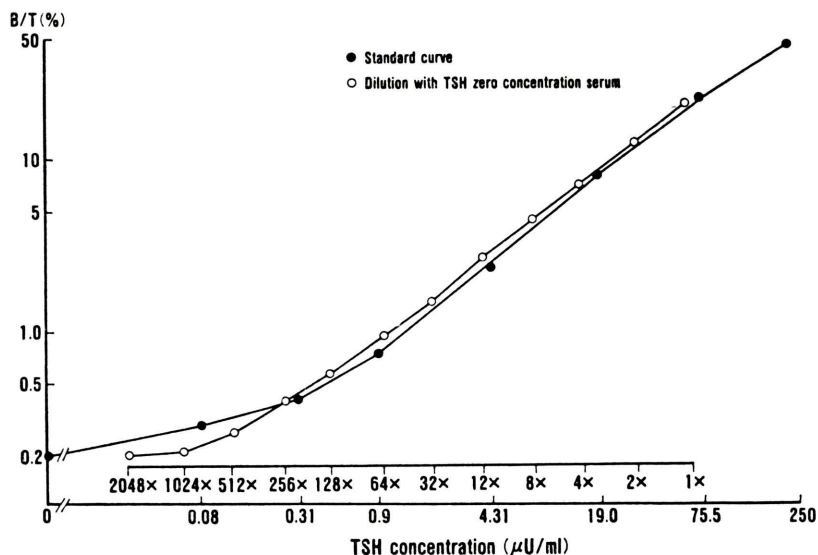
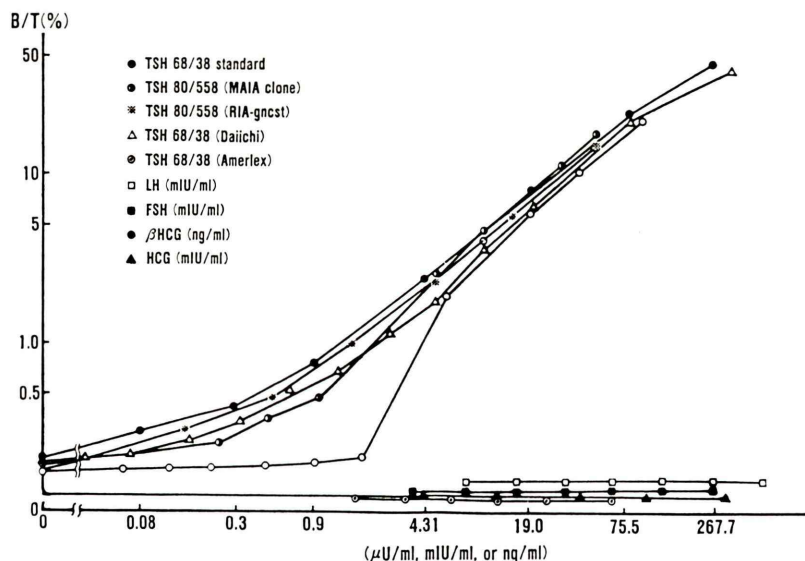


Fig. 2 Dilution test.

Table 2 Recovery test

Pooled serum TSH (0.7 μ U/ml)				Pooled serum TSH (2.5 μ U/ml)			Pooled serum TSH (10 μ U/ml)		
added standard solution (μ U/ml)	measured value (μ U/ml)	recovered value (μ U/ml)	recovery (%)	measured value (μ U/ml)	recovered value (μ U/ml)	recovery (%)	measured value (μ U/ml)	recovered value (μ U/ml)	recovery (%)
0	0.55	—	—	1.8	—	—	7.2	—	—
0.08	0.62	0.07	87.5	1.88	0.08	100.0	7.3	0.1	125.0
0.26	0.8	0.25	96.1	2.1	0.3	115.3	7.5	0.3	115.4
1.24	1.8	1.25	100.8	3.1	1.3	104.0	8.5	1.3	104.9
4.48	5.0	4.45	99.3	6.0	4.2	93.7	11.5	4.3	95.9
18.2	19.0	18.45	101.4	20.0	18.2	100.0	25.0	17.8	97.8
Mean recovery \pm S.D. 97.1 \pm 5.71(%)				102.6 \pm 9.99			107.8 \pm 12.28		

Fig. 3 Cross reaction between antiserum and LH, FSH, β HCG, HCG standards.

ml の血清 I で C.V. は 12.8%, 2.66 μ U/ml の血清 II で 5.3%, 4.24 μ U/ml の血清 III で 7.8%, 9.76 μ U/ml の血清 IV で 3.2%, 平均 C.V. は 7.23% であった。また、日差再現性においては、TSH 濃度 0.88 μ U/ml の血清 I で C.V. は 15.9%, 2.62 μ U/ml の血清 II で 5.4%, 4.33 μ U/ml の血清 III で 4.9%, 9.66 μ U/ml の血清 IV で 2.2% であり、平均 C.V. は 7.1% であった。

2) 希釈試験

TSH 濃度 60 μ U/ml のヒト血清を TSH 濃度 0 μ U/ml の標準溶液を用い 2 倍から 2,048 倍まで倍々希釈した場合の希釈試験の結果を Fig. 2 に示す。512 倍まで標準曲線と平行するのが認められ、0 濃度の B/T% と有意差が認められたのは 512 倍希釈の B/T% であったことより、最低検出濃度は 0.1 μ U/ml と考えられた。

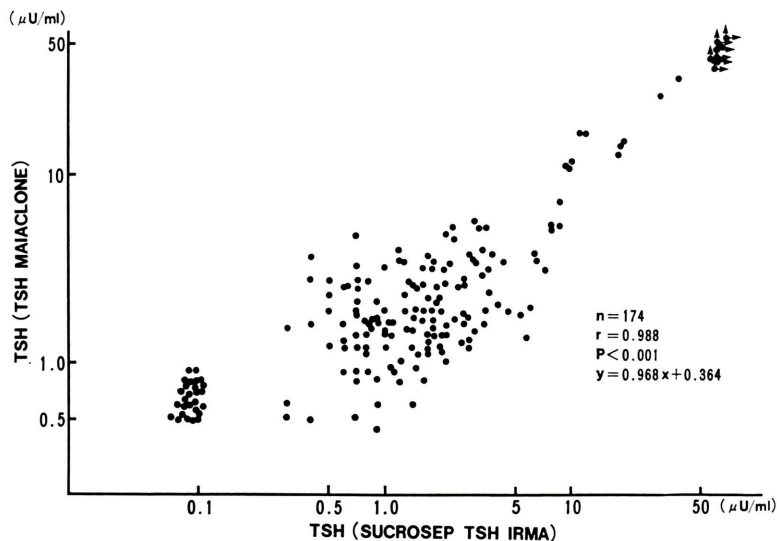


Fig. 4 Correlation of serum TSH concentrations between SUCROSEP TSH IRMA and MAIA clone.

3) 添加回収試験

3 種類のプール血清に TSH 標準血清を加えて求めた回収率を Table 2 に示す. TSH 濃度 $0.7 \mu\text{U/ml}$ のプール血清での回収率は 87.5 から 101.4%, 平均回収率 $97.1 \pm 5.71\%$, $2.5 \mu\text{U/ml}$ のプール血清では回収率 93.7 から 115.4%, 平均回収率 $102.6 \pm 9.99\%$, $10 \mu\text{U/ml}$ のプール血清では回収率 95.9 から 125%, 平均回収率 $107.8 \pm 12.28\%$ であった.

4) 交叉反応試験と特異性

各種 TSH 標準溶液および LH, FSH, HCG, βHCG を用いて行った交叉反応試験の結果を Fig. 3 に示す. LH (2nd IRP-HMG により検定) 7.8 から 500 mIU/ml, FSH (2nd IRP-HMG により検定) 3.9 から 250 mIU/ml, HCG (2nd IS MRC 61/6 により検定) 2.3 から 300 mIU/ml, βHCG (Dr. Franchimont による) 3.1 から 50 ng/ml で検討した範囲では交叉反応性は認められなかった. また, 1st IRP 68/38 により検定された Amerlex TSH および TSH 第一, 2nd IRP 80/558 の検定を用いる RIA-gnost TSH Ultrasensitive および TSH MAIA clone の標準血清との比較では, Amerlex TSH にて $5.6 \mu\text{U/ml}$ 以下で B/T% が低

下した他は 0 から $50 \mu\text{U/ml}$ の範囲ではほぼ平行した.

5) ヒトヘモグロビン, ヒトアルブミン, オレイン酸の添加による影響

ヒトヘモグロビン (Sigma), ヒトアルブミン (Sigma), オレイン酸 (和光) の添加による測定系への影響を検討した. 血清成分の影響をさけるために, リン酸緩衝液にヒトヘモグロビンを 0.093 から 1.5 g/dl, ヒトアルブミンを 0.625 から 10 g/dl, オレイン酸を 0.125 から 4 mM それぞれ加えた場合, 測定値に変化はなかった. また, TSH 濃度 0.95, 2.7, $4.5 \mu\text{U/ml}$ の血清にヒトヘモグロビン, ヒトアルブミン, オレイン酸を上記と同様に添加した場合にも測定値の変化を認めず, ヒトヘモグロビン, ヒトアルブミン, オレイン酸添加による測定系への影響はないものと考えられた.

6) 本法と他の IRMA 法による血中 TSH 濃度の相関

1. 本法と TSH MAIA clone で求めた血中 TSH 濃度の相関

174 例において本法と TSH MAIA clone (最低検出濃度 $0.5 \mu\text{U/ml}$) で測定し求めた血中 TSH 濃

度の相関を Fig. 4 に示す. TSH MAIA clone 0.5 から $50 \mu\text{U/ml}$, 本法 0.1 から $50 \mu\text{U/ml}$ の範囲では, 相関係数 $r=0.988$, 危険率 $p<0.001$, 回帰式 $y=0.968x+0.364$ であった.

2. 本法と RIA-gnost TSH Ultrasensitive で求めた血中 TSH 濃度の相関

140 例において本法と RIA-gnost TSH Ultrasensitive で測定し求めた血中 TSH 濃度の相関を Fig. 5 に示す. RIA-gnost TSH Ultrasensitive 0.08 から $50 \mu\text{U/ml}$, 本法 0.1 から $50 \mu\text{U/ml}$ の範囲では, 相関係数 $r=0.982$, 危険率 $p<0.001$, 回帰式 $y=0.989x+0.143$ であった.

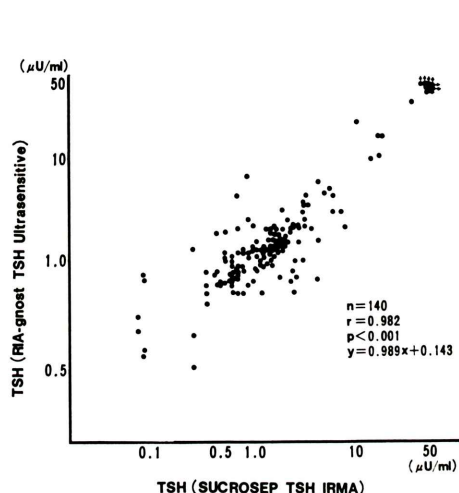


Fig. 5 Correlation of serum TSH concentrations between SUCROSEP TSH IRMA and RIA-gnost TSH Ultrasensitive.

7) 健常者および各種甲状腺疾患患者, 他の疾患患者における血中 TSH 濃度

健常者および各種甲状腺疾患患者, 他の疾患患者における本法による血中 TSH 濃度を Fig. 6 に示す. 健常者 94 例における血中 TSH 濃度は 0.3 から $8.2 \mu\text{U/ml}$ に分布し, 平均 \pm S.D. は $1.63 \pm 1.36 \mu\text{U/ml}$, 対数確率紙にて求めた正常範囲は 0.25 から $4.5 \mu\text{U/ml}$ であった.

パセドウ病患者 52 例では, 未治療患者 29 例の血中 TSH 濃度は全例測定感度 ($0.1 \mu\text{U/ml}$) 以下を示し, 寛解期患者 11 例, 抗甲状腺剤治療中

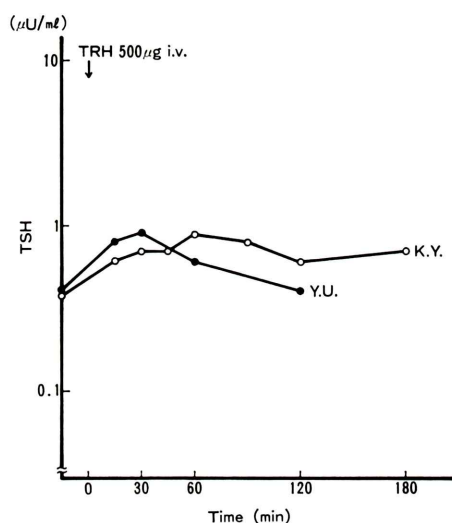


Fig. 7 TRH test in two patients with Sheehan syndrome.

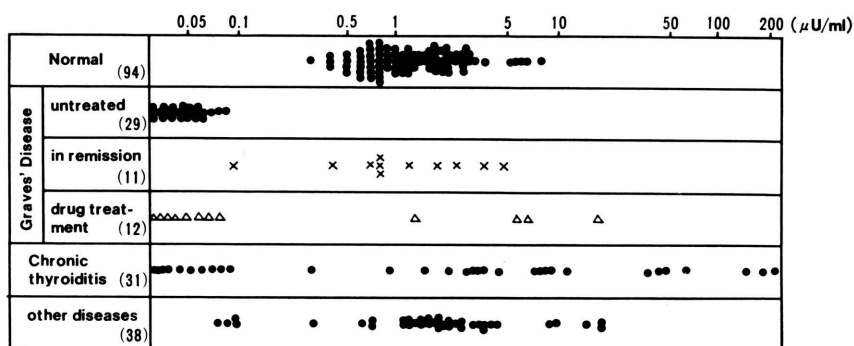


Fig. 6 Serum TSH levels in normal subjects and patients with various diseases.

患者12例の血中TSH濃度はそれぞれ0.1から4.6 $\mu\text{U/ml}$, 18 $\mu\text{U/ml}$ 以下に分布した。

慢性甲状腺炎患者31例では、機能亢進例、低下例、正常例を含め、0.1以下から250 $\mu\text{U/ml}$ と幅広く分布した。

単純性甲状腺腫、腺腫様甲状腺腫、Sheehan症候群など上記以外の疾患患者38例の血中TSH濃度は0.1以下から23 $\mu\text{U/ml}$ に分布した。

8) Sheehan症候群2症例におけるTRH負荷テスト

Sheehan症候群と診断された2例においてTRH負荷テストを行った結果をFig. 7に示す。第1例(K.Y.)ではTSH前値0.4, 15分値0.6, 30分値0.7, 45分値0.7, 60分値0.9, 90分値0.8, 120分値0.6, 180分値0.7 $\mu\text{U/ml}$, 第2例(Y.U.)ではTSH前値0.4, 15分値0.8, 30分値0.9, 60分値0.6, 120分値0.4 $\mu\text{U/ml}$ とわずかなTSHの上昇反応が認められた。

V. 考 案

血中TSHのradioimmunoassayによる測定は、Utigerら⁴⁾, Odellら⁵⁾によって試みられて以来、2抗体法を用いたRIAが登場し良好な結果を得るに至ったが、その最低検出濃度は2 $\mu\text{U/ml}$ とTSH低値の際の疾患の鑑別には未だ十分とはいえない。免疫学の進歩により、ポリクローナル抗体からモノクローナル抗体の作製が可能となりTSH測定にも応用され、より感度のよい測定法が開発された。われわれも、2種類のモノクローナル抗体とmagnetic separatorを用いるTSH IRMA: TSH MAIA cloneと固相化チューブによる2種類のモノクローナル抗体を用いるRIA-gnost TSH Ultrasensitiveについて検討し、その最低検出濃度はそれぞれ0.5, 0.08 $\mu\text{U/ml}$ であった。すでに森ら⁶⁾は最低検出濃度が0.156 $\mu\text{U/ml}$ のTSH第一の改良法を報告し、また、enzyme immunoassayによる方法⁷⁾では最低検出濃度が0.5 $\mu\text{U/ml}$ と報告されている。本法の最低検出濃度は0.1 $\mu\text{U/ml}$ で最高検出濃度は250 $\mu\text{U/ml}$ と広い範囲が測定可能であった。

本法の標準物質は、従来用いられてきた1st IRP 68/38を用いたものであるが、Cotesら⁸⁾の報告のごとく測定系は安定しており、特異性においても本法は良好であった。

健常者の血中TSH濃度は、RIAによるWehmannら⁹⁾の報告では平均 $1.49 \pm 0.10 \mu\text{U/ml}$, Cobbら¹⁰⁾によるIRMAでは平均 $2.0 \pm 0.4 \mu\text{U/ml}$, Weeksら¹¹⁾のimmunochemiluminometric assayでは平均1.44 $\mu\text{U/ml}$ と報告している。本法による測定では平均 $1.63 \pm 1.36 \mu\text{U/ml}$ と他の報告と一致するものであった。

甲状腺機能亢進症患者の血中TSH濃度は、Wehmannら⁹⁾, Weeksら¹¹⁾はそれぞれ0.33 $\mu\text{U/ml}$, 0.03 $\mu\text{U/ml}$ 以下と報告しており、本法による結果でも測定感度(0.1 $\mu\text{U/ml}$)以下を示し健常者との鑑別が可能であった。

本法はヒトアルブミン、ヒトヘモグロビン、オレイン酸添加による測定系への影響は認められなかったところから、溶血、低アルブミン血症、高脂血症による測定系への影響はないものと考えられた。

今回、Sheehan症候群の2例でのTRHテストの結果を報告したが、本法によりTSHが低濃度域にあっても下垂体のTSH分泌能が明らかとなり、甲状腺疾患のみならず下垂体疾患においても本法の有用性が示唆され、RIAに代わってIRMAによる血中TSH測定が普及するものと考えられた。

VI. 結 語

2種類のモノクローナル抗体および1st IRP 68/38を用いたSUCROSEP TSH IRMAについて基礎的な並びに臨床的検討を行った結果、次のような結論を得た。

1) 本法の再現性、交叉反応性、回収率、希釈試験の結果はいずれも良好であり、最低検出濃度は0.1 $\mu\text{U/ml}$ であった。

2) ヒトヘモグロビン、ヒトアルブミン、オレイン酸添加による測定系への影響は、検討した範囲では認められなかった。

3) TSH MAIA clone とは $0.5\text{--}50\ \mu\text{U/ml}$ の範囲で, RIA-gnost TSH Ultrasensitive とは $0.08\text{--}50\ \mu\text{U/ml}$ の範囲で良好な相関を得た。

4) 健常者血中 TSH 濃度は $1.63\pm 1.36\ \mu\text{U/ml}$ (平均 \pm S.D.) であり, 対数確率紙にて求めた正常範囲は $0.25\text{--}4.5\ \mu\text{U/ml}$ で, 未治療バセドウ病患者は $0.1\ \mu\text{U/ml}$ 以下であり, 健常者との鑑別が可能であった。

以上より, SUCROSEP TSH IRMA は血中 TSH 低濃度域における臨床応用に有用であると結論された。

稿を終えるにあたりご校閲いただいた昭和大学医学部第三内科教授新谷博一先生に深謝します。

測定に際しご協力いただいた SRL 社に感謝します。

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. ホルモンと臨床 **21**: 1289-1292, 1973
- 2) 伴 良雄, 田上光益, 飯野史郎: 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. 核医学 **20**: 223-230, 1983
- 3) 仁瓶礼之, 広岡良文, 山内一征, 他: HTSH キット『第一』の基礎的, 臨床的検討. ホルモンと臨床 **21**: 1047-1054, 1973
- 4) Utiger RD: Radioimmunoassay of Human Plasma Thyrotropin. J Clin Invest **44**: 1277-1286, 1965
- 5) Odell WD, Wilber JF, Paul WE: Radioimmunoassay of Thyrotropin in Human Serum. J Clin Endocrinol Metab **25**: 1179-1188, 1965
- 6) 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臨床的意義. 日内分泌誌 **56**: 1231-1239, 1980
- 7) 斉藤一二三, 石川直文, 井野英治, 他: TSH- β サブユニットに特異的モノクローナル抗体を用いたサンドイッチ法 EIA による血中 TSH 測定法の基礎的, 臨床的検討. ホルモンと臨床 **32**: 669-673, 1984
- 8) Cotes PM, Gaines Das RE, Kirkood TBL, et al: The Stability of Standards for Radioimmunoassay of Human TSH: Research Standard A and The International Reference Preparation Initially 68/38. Acta Endocrinologica **88**: 291-297, 1978
- 9) Wehmann RE, Rubenstein HA, Pugeat MM, et al: Extended Clinical Utility of a Sensitive and Reliable Radioimmunoassay of Thyroid-Stimulating Hormone. Sou Med J **76**: 969-976, 1983
- 10) Cobb WE, Lamberton RP, Jackson IMD, et al: Use of a Rapid, Sensitive Immunoradiometric Assay for Thyrotropin to Distinguish Normal from Hyperthyroid Subjects. Clin Chem **30**: 1558-1560, 1984
- 11) Weeks I, Sturgess M, Siddle K, et al: A High Sensitivity Immunochemiluminometric Assay for Human Thyrotropin. Clin Endocrinol **20**: 489-495, 1984