

《ノート》

低濃度 TSH 測定法としてのリアグノスト TSH キット に関する基礎的ならびに臨床的検討

Basic and Clinical Evaluation of RIA-gnost TSH Kit as a High Sensitive Assay Method

長谷川 眞* 久岡 俊彦* 岡川 行重* 真弓 克彦*
高慶 承平* 小柳 博司* 松岡 功樹* 栗屋 保男*
井上 健* 鈴木 晟時* 飯野 史郎*

Makoto HASEGAWA, Toshihiko HISAOKA, Yukishige OKAGAWA,
Katsuhiko MAYUMI, Syouhei KOUKEI, Hiroshi OYANAGI, Yoshiki MATSUOKA,
Yasuo AWAYA, Takeshi INOUE, Seiji SUZUKI and Shirou IINO

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

I. はじめに

甲状腺機能の評価には、数多くの指標が利用されており、血中 TSH 濃度もその一つである。下垂体機能が正常であれば、血中 TSH 濃度は末梢組織レベルでの甲状腺ホルモンによる代謝状態をよく反映するものと考えられている。しかし、従来の TSH 測定法では、低濃度域の TSH を正確に測定することができないため、甲状腺機能亢進症患者を正常者から区別することができなかった¹⁾。

近年、モノクローナル抗体を使った immuno-radiometric assay が TSH の測定に応用され、低濃度 TSH の測定が可能となった。今回、われわれは IRMA 法を応用した高感度 TSH 測定法で

あるリアグノスト TSH キット(ヘキスト社)を使用する機会を得、基礎的ならびに臨床的検討を行ったので報告する。

II. 対象と方法

1) 対 象

対象は、本院通院中の各種甲状腺疾患患者 176 例、末治療パセドウ病患者 16 例、および正常参考域を求めるため本院での健康診断で異常を認めなかった病院職員と本学学生の健常者 110 例(男性 69 例、平均年齢 26.3 ± 4.3 歳、女性 41 例、平均年齢 31.2 ± 10.9 歳)である。

2) 方 法

リアグノスト TSH の測定操作法の概略は Fig. 1 に示すごとくで、試験管内壁に固相化された抗体およびトレーサーとして用いる抗体の TSH β サブユニットに対する 2 種のモノクローナル抗体

* 昭和大学藤が丘病院内科内分泌代謝科

受付: 61 年 4 月 15 日

最終稿受付: 61 年 10 月 28 日

別刷請求先: 神奈川県横浜市緑区藤が丘 1-30 (☎ 227)

昭和大学藤が丘病院内科内分泌代謝科

長谷川 眞

Key words: IRMA, Monoclonal antibody, TSH, One step method.

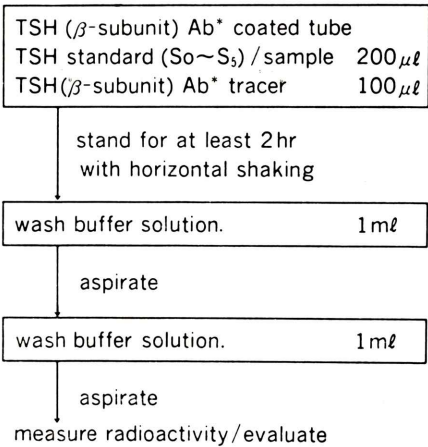


Fig. 1 Assay procedure of RIA-gnost TSH.
*Here, two kinds of anti TSH (β -subunit) monoclonal antibodies as coated antibody and tracer which can detect an epitope on TSH β -subunit and that located on nearby bridge site between α - and β -subunit.

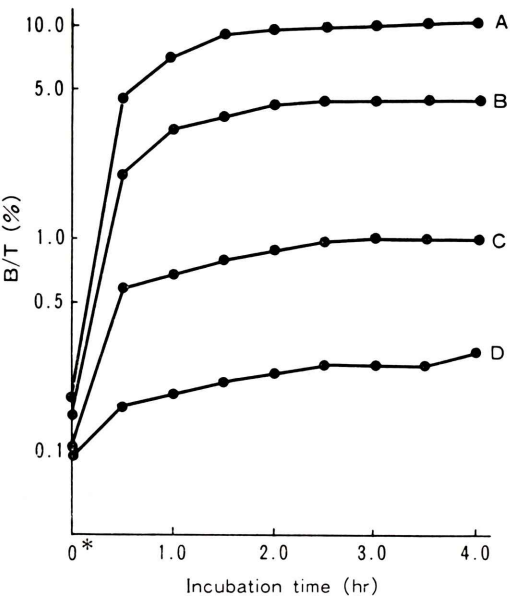


Fig. 2 Optimal reaction time: Influence of reaction time at room temperature on B/T (%) in RIA-gnost TSH assay method.
* The time 0 represents here the time soon after the addition of tracer, that is within several minutes.

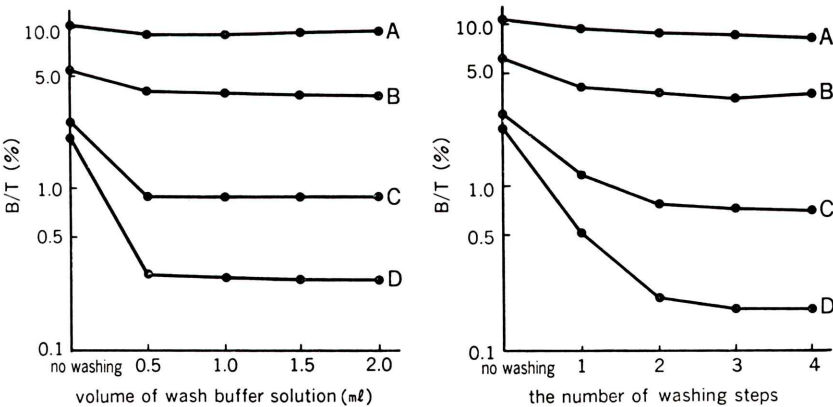


Fig. 3 Optimal washing condition: Influence of the volume of wash buffer (left side) as well as the number of washing steps (right side) on B/T (%) in RIA-gnost TSH assay method.

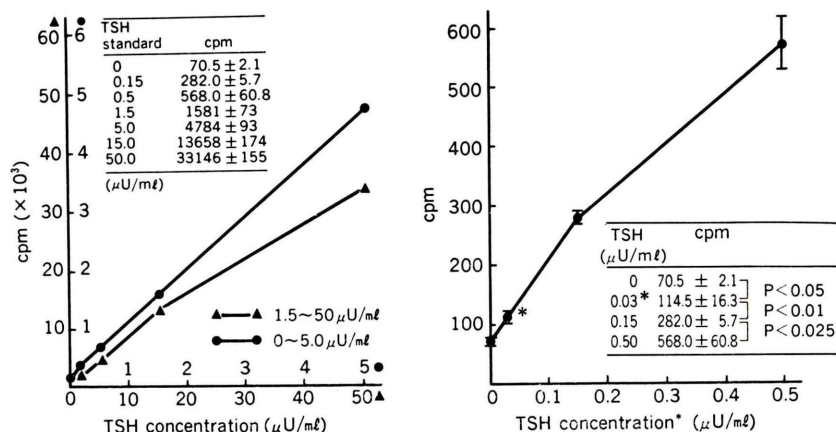


Fig. 4 Standard curves of RIA-gnost TSH assay method for its conventional use (left side) and for sensitive use (right side).

* For drawing the latter standard curve, standard point of 0.03 $\mu\text{U/ml}$ was prepared by diluting S_1 (0.15 $\mu\text{U/ml}$) in S_0 (0 $\mu\text{U/ml}$).

(マウス) を用いる immunoradiometric assay (IRMA) 法である。

このキットの構成試薬 (100テスト用) は下記のとおりである。

(1) ヨウ化ヒト TSH (モノクローナル, マウス) 抗体 (^{125}I) 8 μCi , 10.3 ml, 赤色溶液. (2) ヒト TSH (モノクローナル, マウス) 抗体固相化チューブ 100 本. (3) ヒト TSH 標準血清 $S_0 \sim S_6$ 各 1 ml, 濃度 0~50 $\mu\text{U/ml}$ (WHO, 2nd IRP 80/558 にて検定). (4) コントロール血清 1 ml, (5) 洗浄用緩衝剤, 3錠を精製水 300 ml に溶解し, 0.05 M リン酸緩衝化食塩水とする。

測定操作上の至適条件を評価するため, まず操作中の抗原抗体反応の時間的变化, そして特に低濃度域の測定に影響を与えると考えられる反応試験管の洗浄条件について検討した。また, 最小検出限界, 測定値の再現性, 希釈後および標準品添加後の測定値の定量性などについて基礎的な検討を行うとともに本法による測定値と従来の市販キット (Amerlex TSH (アマシャム社)) および他の高感度 TSH キット (SUCROSEP TSH (SRL 社)) による測定値を比較検討を行った。さらに, 臨床的評価として正常参考域を求め, 未治療パセドウ病患者の正常者からの区別について検討した。

III. 結 果

1) 反応時間および洗浄条件

反応時間を室温下で 0.5 時間から 4 時間まで 0.5 時間ごとに变化させ, 検体 A~D の示す B/T% の変化を追跡した結果は Fig. 2 に示すごとく, 反応は検体およびトレーサの添加直後から速やかに進み, 濃度に関わらず 2~3 時間でほぼ平衡状態に達するのが認められた。

洗浄液の量については, Fig. 3 (左) に示すごとく, 洗浄回数 2 回では, 0.5 ml 以上の液量で B/T% はほぼ一定となった。

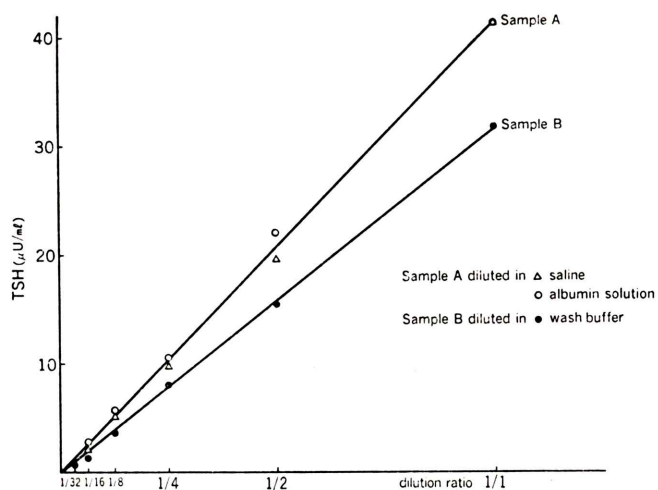
洗浄回数については, 洗浄液量 1 ml とした場合, 2 回以上の洗浄で B/T% はほとんど変化を示さなくなるが, B/T% が 5% (TSH 濃度として約 3 $\mu\text{U/ml}$) 以下の低濃度域においては, 洗浄条件の差のもたらす効果がわずかに認められた。

2) 標準曲線

Figure 1 に示した測定条件によって得られた標準曲線は Fig. 4 (左) に示すごとくであるが, キットの最低濃度標準液である S_1 (0.15 $\mu\text{U/ml}$) を S_0 (0 $\mu\text{U/ml}$) で希釈して 0.03 $\mu\text{U/ml}$ 液を調製し, これを用いて作成した低濃度域の拡大標準曲線は Fig. 4 (右) に示すごとくである。低濃度域

Table 1 Intraassay (sample ①-④) and day to day variation (sample ⑤-⑧) determined by RIA-gnost TSH assay method

sample tube No	①	②	③	④
1	0.05	0.49	3.56	9.5
2	0.04	0.58	3.70	10.0
3	0.05	0.53	3.85	10.0
4	0.04	0.53	3.75	10.0
5	0.04	0.54	3.65	9.5
6	0.04	0.53	3.65	10.0
7	0.05	0.58	3.60	9.5
8	0.06	0.56	3.70	9.5
9	0.04	0.56	3.60	10.0
10	0.05	0.57	3.55	10.0
\bar{X}	0.05	0.55	3.66	9.8
S.D.	0.007	0.028	0.092	0.26
CV(%)	14.0	5.0	2.5	2.7
sample ($\mu\text{U}/\text{ml}$) day	⑤	⑥	⑦	⑧
1	0.10	1.25	10.0	32.5
2	0.10	1.20	11.5	34.5
3	0.10	1.15	9.5	30.0
4	0.10	1.10	11.0	31.5
\bar{X}	0.10	1.18	10.5	32.1
S.D.	0.00	0.065	0.91	1.89
CV(%)	—	5.5	8.7	5.9

**Fig. 5** Dilution study of TSH determination in which high TSH samples were diluted in saline, albumin solution (5%) and wash buffer (0.05 M phosphate buffered saline).

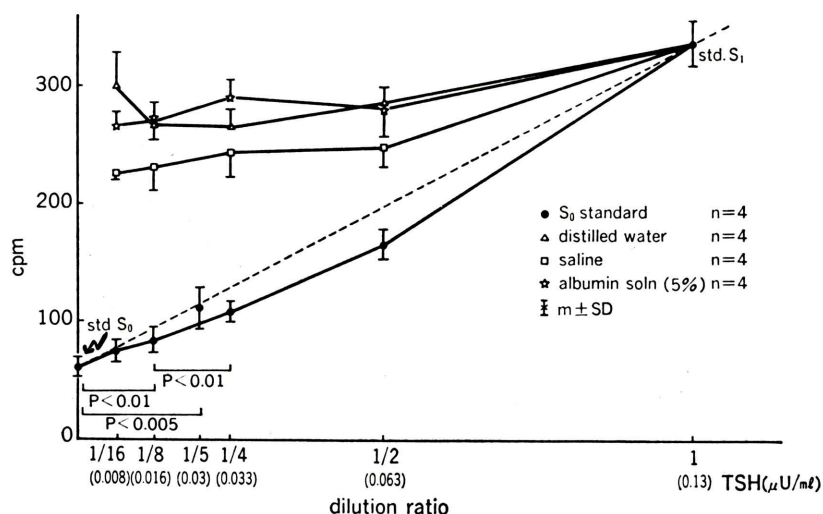


Fig. 6 Dilution study of standard S_1 ($0.13 \mu\text{U/ml}$) in the kit by using various kinds of candidate diluents for extrapolating lower end of the standard curve.

Table 2 Recovery study of RIA-gnost TSH assay method

	sample L				sample M				sample N			
TSH added* ^a ($\mu\text{U/ml}$)	—	0.50	5.0	15.0	—	0.50	5.0	15.0	—	0.50	5.0	15.0
TSH calculated* ^b ($\mu\text{U/ml}$)	—	0.9	3.15	8.15	—	5.75	8.0	13.0	—	14.5	16.75	21.75
TSH found* ^c ($\mu\text{U/ml}$)	1.3	0.9	3.0	8.0	11.0	6.0	8.0	12.5	28.5	17.0	18.0	21.5
recovery* ^d (%)	—	100	95.2	98.2	—	104.3	100	96.2	—	117.2	107.5	98.9
mean recovery (%)	—	97.8			—	100.2			—	107.9		

* a~d; $b = (a + c)/2$, $d = (c/b) \times 100\%$

の各測定点の4重測定から求めた変動係数は3~14%で $0 \mu\text{U/ml}$ と $0.03 \mu\text{U/ml}$ の間にはカウント数のかさなりは認められず、この標準曲線からは少なくとも $0.03 \mu\text{U/ml}$ までは測定可能であると考えられた。

3) 測定値の再現性

アッセイ内再現性はTable 1に示すごとくで、検出限界付近の濃度の検体①では $\text{mean} \pm \text{SD}$ は $0.05 \pm 0.007 \mu\text{U/ml}$, CVは14%とFig. 4(右)に示した標準曲線の $0.03 \mu\text{U/ml}$ が示したカウント数の変動係数に近い結果が得られた。また、正常

参考域下限付近と考えられる検体②, 上限付近の検体③および高値の検体④では, CVは5%以下とよい再現性が認められた。

また, アッセイ間の再現性(4日間の連続測定による)においてもTable 1に示すごとく, 低濃度から高濃度に至るまでCVが8.7%以下のよい再現性が認められた。

4) 希釈試験および最小検出感度

$30 \sim 40 \mu\text{U/ml}$ の高いTSH濃度を示した検体A, Bをキットの洗浄用緩衝液, 5%アルブミン溶液および生理的食塩水を用いて倍数希釈した結果

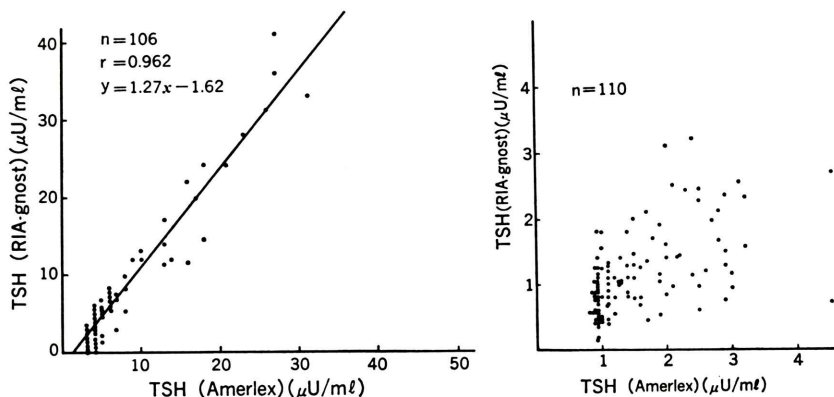


Fig. 7 Correlation between TSH values determined by RIA-gnost TSH kit and Amerlex TSH kit in euthyroid as well as hypothyroid patients (left side) and in normal subjects (right side).

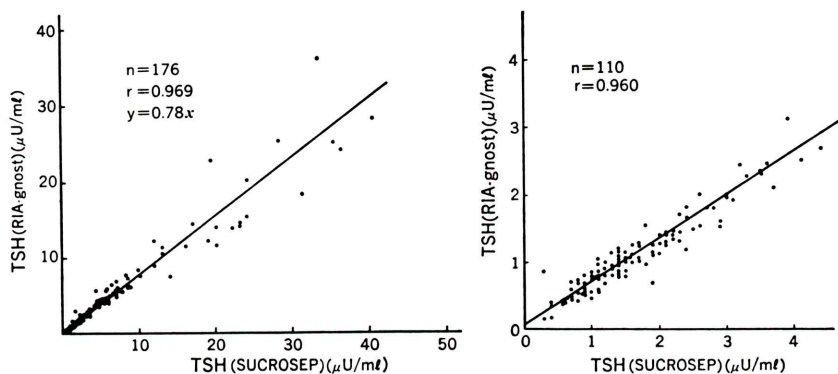


Fig. 8 Correlation between TSH values determined by RIA-gnost TSH kit and SUCROSEP TSH kit in euthyroid as well as hypothyroid patients (left side) and in normal subjects (right side).

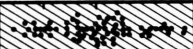

は Fig. 5 に示すごとくで、少なくとも16倍希釈、測定値として1~2 μU/ml までは0 μU/ml に向う直線性を示し計算値ともほぼ一致した。また、低濃度域における希釈については、 S_1 (0.13 μU/ml) を4種類の溶液 (S_0 , 生理的食塩水, 5% アルブミン溶液, 蒸留水) で倍数希釈して検討した。その結果は Fig. 6 に示すごとくで、 S_0 による希釈のみが図中の0.13 μU/ml (S_1) と0 μU/ml (S_0) を結ぶ直線に添って計算値に近い値を示したが、他の溶液を用いた場合は、希釈後の測定値は計算値よりも高く、希釈は不可能であった。

最小検出感度については、 S_1 を S_0 で希釈した

希釈曲線 (Fig. 6) において最低0.016 μU/ml までが S_0 (0 μU/ml) と推計学上区別可能 ($p < 0.01$) であったが、カウント数の実測値では両者にかさなりを認めるため、 S_0 とのかさなりを認めない最小濃度0.03 μU/ml を最小検出感度とした。

5) 添加回収試験

あらかじめ本キットで測定し、それぞれ1.3, 11.0, 28.5 μU/ml であった検体 L, M, N に0.50, 5.0, 15.0 μU/ml の標準血清を等量加え、得られた測定値と計算値から回収率を求めた結果は Table 2 に示すごとくで、回収率はいずれの検体でも、また、いずれの添加量でも97.8~107.9% とよい

Kit	sample	n	TSH(μ U/ml)	0.03	0.1	0.5	1	5
RIA-gnost	Normal male	69	1.17 ± 0.68	*	..			
	Normal female	41	1.11 ± 0.52					
	Graves' disease	16	<0.05	***	..			

* Detection limit determined in this work

Fig. 9 Serum TSH levels in normal subjects and patients with untreated Graves' disease determined by RIA-gnost TSH.

定量性が得られた。

6) 他の TSH キットとの比較

従来の RIA 法であるアマレックス TSH キットおよびリアグノスト TSH キットによる測定値の相関性については、高濃度 TSH の症例を含む TSH 1μ U/ml 以上の外来通院患者群 (A 群) と比較的 TSH 濃度の低い健常者群 (B 群) に分けて検討した。A 群では Fig. 7 に示すごとく $r=0.962$ とよい相関が認められたのに比べ、B 群においては Fig. 7 に示すごとく、測定感度以下の症例を除外しても、相関係数は $r=0.40$ とあまりよい相関性は認められなかった。また、同様の検討を上記二群について高感度 TSH キットであるスクロセップ TSH キットで行うと、Fig. 8 に示すごとくスクロセップ TSH キットによる測定値がリアグノスト TSH キットによる値より約 20% 高くなるが、相関係数は A, B 群でそれぞれ 0.969, 0.960 とよい相関性が認められた。

7) 正常参考域の設定および未治療バセドウ病患者の正常者からの区別

正常男子 69 例、女子 41 例における血中 TSH 値の分布は Fig. 9 に示すごとくで、測定値は対数正規分布に近く、男子は $0.15 \sim 3.2$ 、女子は $0.39 \sim 2.4 \mu$ U/ml の範囲に分布し、 $\text{mean} \pm \text{SD}$ はそれぞれ 1.17 ± 0.68 , $1.11 \pm 0.52 \mu$ U/ml であった。また、対数変換後に統計処理し、 $\text{mean} \pm 2 \text{SD}$ を正常参考域とすると、男子は $0.28 \sim 3.40$ 、女子は $0.40 \sim 2.53$ となり、両者に有意差は認められなかった。

IV. 考 案

低濃度 TSH 測定の試みは、すでに 1970 年代から行われており²⁻⁶⁾、その測定結果を一般臨床に適用している施設もある⁷⁾。しかし、これらの方法は、従来の市販 TSH-RIA キットを使用し、インキュベーション時間の延長、 ^{125}I -TSH の添加遅延、抗体の希釈などの操作を加えることにより測定感度をあげるものであり、実際の測定操作時間は 1~5 日を要し、ルーチン検査としては不適であった。リアグノスト TSH キットは、その操作上の特徴として、第一に抗体を固相化した試験管に検体とトレーサを同時に加えるワンステップ法であること、第二に反応時間が 2 時間と短いこと、第三に洗浄などの煩雑な操作が少ないことの三点に要約され、従来法を改良した高感度 TSH 測定法はもとより、従来の市販 TSH-RIA キットと比べても、より簡便な検査法となっている。本キットは、従来法の競合反応とは異なる、いわゆるサンドイッチ法 (IRMA) であり、使用する抗体は、TSH- β サブユニットの異なる epitope に対する 2 種類のモノクローナル抗体である。

本キットの至適条件については、インキュベーション時間 2 時間、洗浄液量 1 ml、洗浄回数 2 回でほぼ満足できる結果が得られたが、低濃度域の測定では、インキュベーション時間を 3 時間とし、洗浄回数を 3 回とすることにより、より高い精度が期待できるものと考えられる。

最小検出感度を設定する際に考えなければならない問題点として、バックグラウンドカウントの

影響, カウント数のバラツキ, 標準曲線の傾斜ならびに直線性, 最小濃度標準血清の作製, および標準曲線から測定値の読みとり方法などがあげられる。特に低いカウント数を測定する場合は, ガンマ・カウンターの性能や標準血清, 被検血清および希釈溶液の非特異結合なども重要な問題である。当院のガンマ・カウンターのバックグラウンドは 20~30 cpm で, その誤差の S_0 のカウント数 (50~100 cpm) への影響はほとんど認められなかった。また, 本キットの標準曲線は, 低濃度域においても傾斜, 直線性ともによく保たれ, S_1 を S_0 で 5 倍希釈して得られた $0.03 \mu\text{U/ml}$ の標準血清は, 標準曲線上の S_1 と S_0 を結ぶ直線上に示され, S_1 および S_0 とは有意に区別できた。 S_1 を S_0 で倍数希釈した場合, 推計学上 S_0 と区別できる最低濃度は $0.016 \mu\text{U/ml}$ であったが, この濃度は実測値において S_0 とかさなりを認めたため, 全くかさなりを認めない $0.03 \mu\text{U/ml}$ を最小検出感度と考えた。測定値の読みとりについては, 今回はコンピュータを用いず, 高・中・低濃度域の 3 本の標準曲線を描き, マニュアルでもほぼ正確に読みとることができた。

測定値の再現性は, intraassay, interassay ともに良好で, $0.05 \mu\text{U/ml}$ 付近の CV 値でも 14% とよい再現性を示す成績が得られた。

希釈試験において, TSH 濃度の高い検体を希釈する場合は, 生理的食塩水, 5% アルブミン溶液, 洗浄用緩衝液のいずれの溶液を用いても希釈は可能であったが, TSH 濃度の低い検体では, S_0 以外の溶液による希釈は不可能であった。これは, 生理的食塩水, 5% アルブミン溶液, 蒸留水, 洗浄用緩衝液では非特異結合がそれぞれ 0.12, 0.11, 0.23, $0.18 \mu\text{U/ml}$ と高いためと考えられた。

従来の RIA 法との比較において, TSH 高値の症例を含む群では測定値の相関性は高く ($r=0.962$), 健常者に限った群では, 測定感度以下の症例を除外しても相関性はよくなかった。一方, 他の高感度法との比較においては, 上記両群ともに測定値の相関性は高く ($r=0.969$, $r=0.960$), 従来の RIA 法による値は, 比較的 TSH 濃度が高

い場合には信頼できるが, $5 \mu\text{U/ml}$ 以下の濃度では, 正確性に欠けると考えられた。

血中 TSH 濃度の正常参考域については, 男子が $0.28\sim3.40$, 女子が $0.40\sim2.53 \mu\text{U/ml}$ で両者に有意差は認められず, 全体では $0.32\sim3.07 \mu\text{U/ml}$ であった。これは, 従来の RIA 法を改良した高感度法の結果 (正常下限値: $0.3\sim0.5$, 正常上限値: $3.2\sim4.2 \mu\text{U/ml}$)^{3,4,6,9)} や統計学的手法により算出した結果 ($0.5\sim4.5 \mu\text{U/ml}$)¹⁰⁾ とほぼ一致する結果であった。また, 未治療バセドウ病患者 16 例中 13 例が測定感度以下であり, 測定可能であった 3 例も $0.04\sim0.05 \mu\text{U/ml}$ の範囲で, 未治療バセドウ病患者の健常者からの区別は 100% 可能であった。バセドウ病で測定可能であった 3 例の測定値が真の値であるかは不明だが, TRH テストの結果はいずれも無反応であり, 真の値でない可能性が示唆された。その点では, 最小検出感度については若干訂正する必要があると思われる。

V. おわりに

リアグノスト TSH キットを用いる低濃度 TSH 測定法について基礎的ならびに臨床的検討を行い次の結論を得た。

- 1) 本キットの最小検出感度は $0.03 \mu\text{U/ml}$ であり, $0.03 \mu\text{U/ml}$ の標準血清の調製には洗浄用緩衝液でなく, S_0 による希釈が必要である。
- 2) 同時再現性の CV は $2.5\sim14\%$ で, 日差再現性の CV は 8.7% 以下と良好であった。
- 3) 本キットによる血中 TSH 濃度の正常参考域は $0.32\sim3.07 \mu\text{U/ml}$ で, 未治療バセドウ病患者の血中 TSH 濃度 ($0.05 \mu\text{U/ml}$ 以下) との区別は 100% 可能であった。
- 4) 本キットは操作が簡便で, 短時間での測定が可能であり, 精度・感度ともに従来法と比べ優れていた。

以上の結果から, 本測定法は, 低濃度 TSH 測定法として臨床的にきわめて有用であると結論された。

文 献

- 1) 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: 223-229, 1983
- 2) Patel TC, Burger HG, Hadson B: Radioimmunoassay of serum thyrotropin: sensitivity and specificity. J Clin Endocrinol Metab 33: 768-776, 1971
- 3) Pekary AE, Harshman JM, Parlow AF: A sensitive and precise radioimmunoassay for human thyroid-stimulating hormone. J Clin Endocrinol Metab 41: 676-684, 1975
- 4) Smith SR, Burton DW, Izenstark JL: Levels of serum thyroid-stimulating hormone in hyperthyroidism. Arch Intern Med 139: 757-760, 1979
- 5) 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. 日内分泌誌 56: 1231-1239, 1980
- 6) 長田篤雄, 上野雅子, 松本 生, 他: ラジオイムノアッセイによる甲状腺刺激ホルモン高感度測定法の開発. Radioisotopes 34: 501-504, 1985
- 7) 森 徹, 石原 隆, 尾藤早苗, 他: 高感度 TSH-RIA のルチン使用経験. 日内分泌誌 59: 941-948, 1983
- 8) Wood WG, Waller D, Hantke U: An evaluation of six solid phase thyrotropin (TSH) kits. J Clin Chem Clin Biochem 23: 461-471, 1985
- 9) Allen KR, Watson D: Thyrotropin as the initial screening test for thyroid disease. Clin Chem 30: 502-503, 1984
- 10) 今野則道: 最大推定法による血中甲状腺刺激ホルモン濃度の正常範囲. 日内分泌誌 56: 649-654, 1980