

《ノート》

Radioimmunoassay による血中 TSH- β サブユニット
濃度測定法の基礎的ならびに臨床的検討Fundamental and Clinical Evaluation of Radioimmunoassay
for Serum TSH- β Subunit原 秀雄* 伴 良雄* 佐藤 龍次* 長倉 穂積*
九島 健二* 海原 正宏*Hideo HARA, Yoshio BAN, Ryuji SATO, Hozumi NAGAKURA,
Kenji KUSHIMA and Masahiro KAIHARA*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, α , β サブユニットより成り立つ糖蛋白で, β サブユニット (TSH- β) に TSH の免疫学的活性および生物学的活性があることが知られている. このたびわれわれは, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (N.I.D.D.K.) より TSH- β , 抗 TSH- β 抗体を入手し, 血中 TSH- β 濃度測定法を確立し, 基礎的ならびに臨床的検討を行ったので報告する.

II. 対象ならびに方法

対象は, 健常者 (理学的, 生化学的に異常を認めない者で, 年齢は 19 から 54 歳) 24 例, 未治療バセドウ病患者 16 例, 原発性甲状腺機能低下症患者 15 例, 非腫瘍性高 TSH 血症 (Syndrome of Inappropriate Secretion of TSH; SITSH) 患者 7 例, 計 62 例である.

* 昭和大学医学部第三内科

受付: 62 年 7 月 17 日

最終稿受付: 62 年 12 月 14 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

TSH- β の ^{125}I の標識は, Kourides^[1] の方法に従い, クロラミン T 法^[2] で行い, それをセルロフエインのカラム (1.5×50 cm) で精製分離し, Fig. 1 に示すような 2 抗体法による radioimmunoassay で行った. 測定手技の概略は, 標準溶液または血清 100 μl に抗 TSH- β 抗体を 100 μl 加え, 6 時間室温でインキュベーションし, ^{125}I TSH- β を 100 μl 加えて 18 時間室温でインキュベーションする. さらに, 第 2 抗体 (抗家兎ガンマグロブリン羊血清) 100 μl を加え, 5 時間室温でインキュベーションした後, 遠心分離し, 沈渣の放射能を測定する.

血中 TSH 濃度, 血中 Free thyroxine (FT₄) 濃度, 血中 Free triiodothyronine (FT₃) 濃度の測定は, それぞれ, RIA-gnost TSH Ultrasensitive, Amerlex-M Free T₄ キット, Amerlex-M Free T₃ キットで行った.

TRH 負荷試験においては, TRH (タナベ) を 500 μg 静注し, 負荷前 (基礎値), 15, 30, 60, 90, 120, 180 分に採血し, 血中 TSH 濃度, 血中 TSH- β 濃度を測定した. また, 負荷前血清においては, 血中 FT₄ および FT₃ 濃度を測定した.

Key words: TSH- β subunit, TSH, Radioimmunoassay, SITSH, TRH test.

III. 結 果

1. 比放射能

¹²⁵I で標識した TSH-β をカラムで分離し 1.5 ml ずつに分け、その放射活性をキュリーメーターで測定した結果は、Fig. 2 に示すように、No.

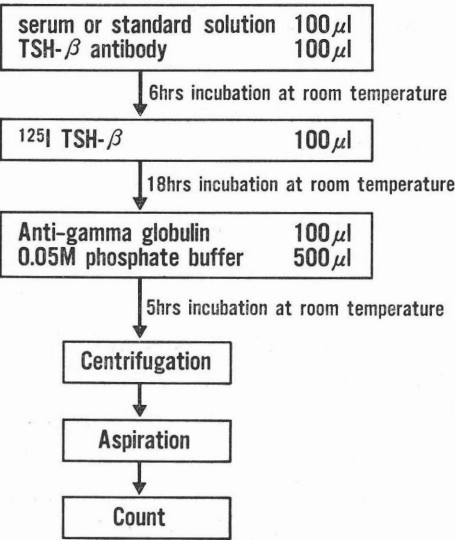


Fig. 1 Assay procedure.

12 と No. 17 でピークが得られ、抗 TSH-β 抗体を塗布した RIA-gnost TSH チューブとの結合で前者に免疫学的活性を認めた。以降 No. 12 を使用した。この方法の比放射能は、50 から 100 μCi/μg であった。

2. 標準曲線

TSH-β の標準曲線を Fig. 3 に示した。TSH-β 濃度が 0.1 から 4 ng/ml で直線性を有し、B₀ に

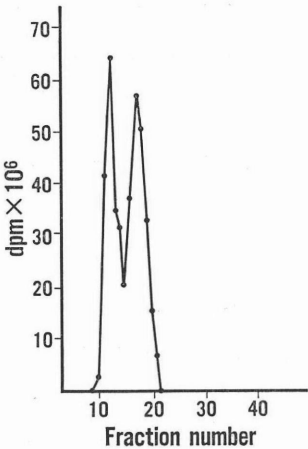


Fig. 2 Separation of iodinated TSH-β from unreacted ¹²⁵I on cellulofine on a 1.5 × 50 cm column.

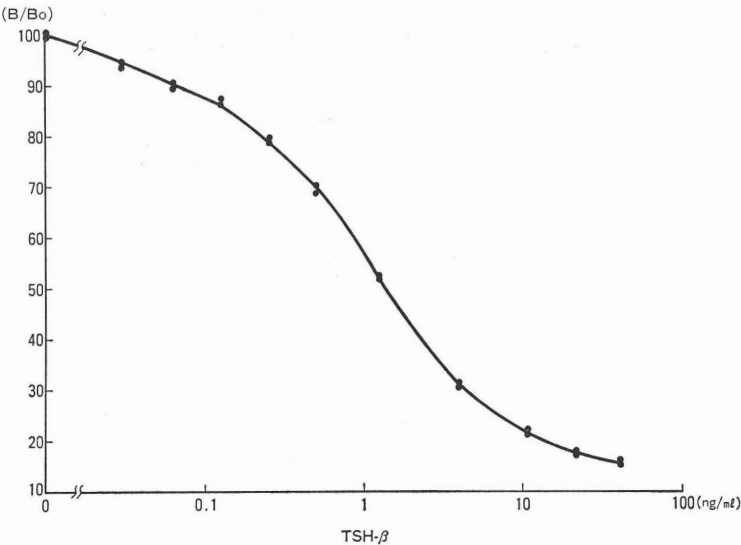


Fig. 3 Standard curve of TSH-β.

対する 90% の測定値は 0.066 ng/ml が得られたが、0.12 ng/ml との結合率の差が僅かであったため、最低検出濃度を 0.2 ng/ml とした。

Table 1 Coefficient of variation

Intraassay			
(n=5)	I	II	III
Mean (ng/ml)	0.36	0.59	1.28
S.D.	0.02	0.03	0.04
C.V. (%)	6.4	5.6	3.9
Interassay			
(n=5)	I	II	III
Mean (ng/ml)	0.35	0.60	1.28
S.D.	0.02	0.04	0.06
C.V. (%)	5.7	6.1	4.7

3. 同時および日差再現性

3 種類の異なる血清を用いて行った同時および日差再現性の結果を Table 1 に示した。同時再現性の変動係数は、6.4, 5.6, 3.9% であり、日差再現性の変動係数は、5.7, 6.1, 4.7% であった。

4. 添加回収率試験

異なる 3 種類の血清に 4 つの濃度の異なる標準血清を加えて行った回収率を Table 2 に示した。平均回収率はそれぞれ、96.3 \pm 3.2 (S.D.), 111.5 \pm 25.6, および 107.9 \pm 17.4% であった。

5. 交叉試験

抗 TSH- β 抗体と N.I.D.D.K. より入手した TSH- α , TSH, LH, FSH, HCG との交叉試験の結果を Fig. 4 に示した。交叉率は、TSH とは 1.0%。

Table 2 Recovery test

added standard solution (ng/ml)	Pooled serum THS- β (0.64 ng/ml)			Pooled serum TSH- β (0.95 ng/ml)			Pooled serum TSH- β (2.2 ng/ml)		
	measured value	recovered value	recovery	measured value	recovered value	recovery	measured value	recovered value	recovery
	(ng/ml)	(ng/ml)	(%)	(ng/ml)	(ng/ml)	(%)	(ng/ml)	(ng/ml)	(%)
0	0.43	—		0.63	—		1.47	—	
0.08	0.51	0.08	100.0	0.7	0.07	87.5	1.55	0.08	100.0
0.18	0.6	0.17	94.4	0.88	0.25	138.9	1.7	0.23	127.8
0.71	1.1	0.67	94.4	1.4	0.77	108.5	2.05	0.68	95.8
Mean \pm S.D.=96.3 \pm 3.2				Mean \pm S.D.=111.5 \pm 25.6			Mean \pm S.D.=107.9 \pm 17.4		

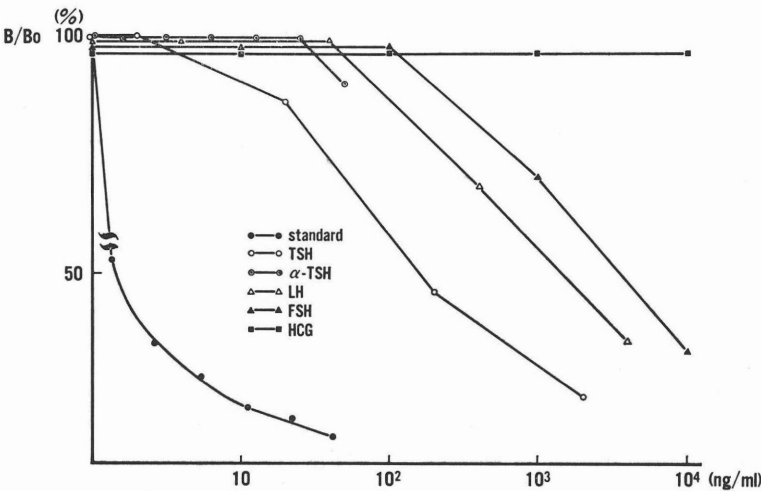


Fig. 4 Cross reactivity of anti TSH- β .

LH, FSH とはそれぞれ, 0.12, 0.05% であり, TSH-α とは 50 ng/ml まで, HCG とは 10 μg/ml まで交叉はみられなかった.

6. 健常者, バセドウ病患者, 原発性甲状腺機能低下症患者, SITSH 患者の血中 TSH-β 基礎値

健常者24例, 未治療バセドウ病患者16例, 原発性甲状腺機能低下症患者 15 例, SITSH 患者 7 例の血中 TSH-β 基礎値を, Fig. 5 に示した. 血中 FT₄ 濃度が 0.8 から 2.3 ng/dl, 血中 FT₃ 濃度が 3.1 から 6.4 pg/ml を示した健常者の血中 TSH-β 基礎値は, 0.64 ng/ml 以下に分布し, 平均値 ± S.D. は 0.49 ± 0.55 ng/ml で, 対数確立紙にて求めた正常範囲は 0.7 ng/ml 以下であった. 血中 FT₄ 濃度が 2.5 ng/dl 以上, 血中 FT₃ 濃度が 7.4 pg/ml 以上を示した未治療バセドウ病患者の血中 TSH-β 基礎値は 0.2 ng/ml 以下であり, また, 血中 FT₄ 濃度が 1.0 ng/dl 以下, 血中 FT₃ 濃度が 3.2 pg/ml 以下を示した原発性甲状腺機能低下症患者的血中 TSH-β 基礎値は, 0.34 から 9.0 ng/ml であった. 血中 FT₄ 濃度, FT₃ 濃度がそれぞれ, 1.1 から 7.4 ng/dl, 2.8 から 28.5 pg/ml を示した SITSH 患者の血中 TSH-β 基礎値は, 6.4 ng/ml 以下にあり, 7 例中 5 例 (71%) は 0.7 ng/ml 以上と高値であった.

7. TRH 負荷試験

1) 健常者の TRH 負荷試験

健常者 10 例の TRH 負荷に対する血中 TSH と

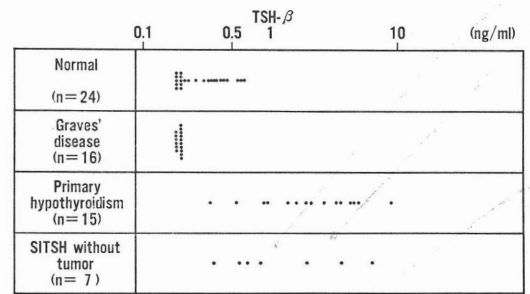


Fig. 5 Basal TSH-β concentrations in normal subjects, in patients with Graves' disease, in patients with primary hypothyroidism, and in patients with SITSH without tumor.

TSH-β の反応の結果を Fig. 6 に示した. 血中 TSH 濃度の平均値 ± S.D. は, 基礎値 2.25 ± 0.97 μU/ml, 15 分値 18.63 ± 8.24 μU/ml, 30 分値 17.34 ± 7.09 μU/ml, 60 分値 14.32 ± 7.46 μU/ml, 90 分値 8.88 ± 3.57 μU/ml, 120 分値 6.90 ± 3.59 μU/ml, 180 分値 4.72 ± 3.38 μU/ml と 15 分で有意に上昇し, そのピークは 15 から 30 分にあった.

一方, 血中 TSH-β 濃度のそれは, 基礎値 0.27 ± 0.10 ng/ml, 15 分値 0.34 ± 0.16 ng/ml, 30 分値 0.47 ± 0.13 ng/ml, 60 分値 0.36 ± 0.10 ng/ml, 90 分値 0.32 ± 0.16 ng/ml, 120 分値 0.32 ± 0.13 ng/ml, 180 分値 0.25 ± 0.20 ng/ml と 30 分でピークに達したが, 基礎値とは有意な差はなく, 血中 TSH のピーク時間と異なったものが 4 例 (40%) に認められた.

2) バセドウ病患者および原発性甲状腺機能低下症患者的 TRH 負荷試験

甲状腺機能亢進状態にある未治療バセドウ病患者 3 例, 原発性甲状腺機能低下症患者 2 例の TRH 負荷に対する血中 TSH-β の反応の結果を Fig. 7 に示した. バセドウ病患者では全く反応は見られず, 原発性甲状腺機能低下症患者 2 例のピークはそれぞれ, 1.25, 2.4 ng/ml と過大に反応するのが認められたが, その内の 1 例のピーク時間

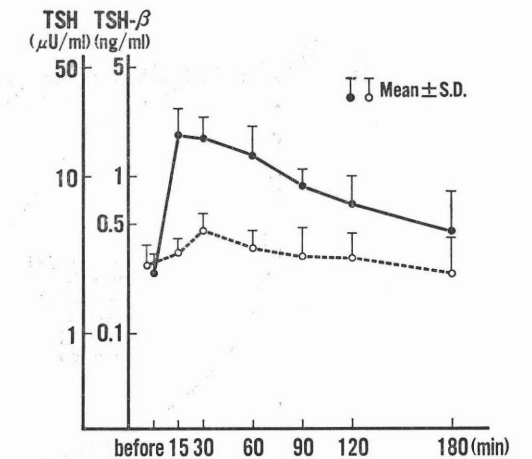


Fig. 6 TSH and TSH-β responses to TRH 500 μg i.v. in normal subjects. Results are Mean ± S.D. ●; TSH ○; TSH-β

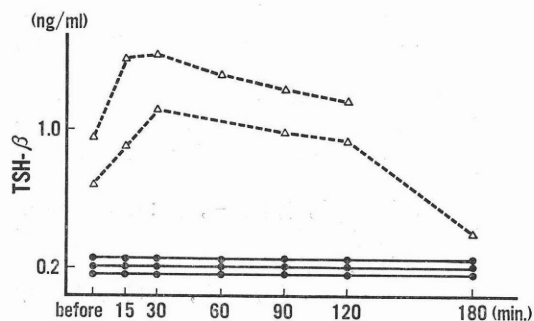


Fig. 7 TSH- β responses to TRH 500 μ g i.v. in patients with Graves' disease, and primary hypothyroidism.

●; Graves' disease
 Δ; primary hypothyroidism

は血中 TSH のそれと異なっていた。TSH の反応は図には示さなかったが、バセドウ病患者では無反応，原発性甲状腺機能低下症患者では過大であった。

IV. 考 案

TSH は α , β サブユニットより成り立ち，それぞれ下垂体前葉で別個に作られ，TSH- β がその免疫学的活性および生物学的活性を担っていることが明らかとなっている³⁾。

今回われわれは，radioimmunoassay により血中 TSH- β 濃度の測定を行ったが，添加回収率，同時および日差再現性といった基礎的検討は良好な結果を得た。交叉反応に関しては標準品に混入する TSH- β の存在の可能性も否定できないが，Kourides ら⁴⁾ の報告とほぼ一致するものであり，TSH- β の血中濃度の測定には影響を及ぼさないものと考えられた。

健常者の血中 TSH- β 濃度は，Kourides ら⁴⁾ は 0.5 ng/ml 以下とし，Cooper ら⁵⁾ は 0.18 ng/ml 以下と報告し，また，宮井ら⁶⁾ はモノクローナル抗体を用いた enzyme immunoassay で正常範囲を 0.4 ng/ml (測定感度) 以下と報告した。今回の検討では，0.64 ng/ml 以下に分布し，対数確立紙にて求めた正常範囲は 0.7 ng/ml 以下といくぶん高値であった。われわれの用いた抗 TSH- β 抗体は

ポリクローナル抗体であったが，測定感度は 0.2 ng/ml，TSH との交叉率は 1% と臨床応用に支障はないと考えられた。

TRH 負荷試験においては，健常者で TSH- β は 30分でピークに達したが，基礎値との間には有意な差はなく，これは Kourides ら⁴⁾ の報告と一致する。また，TSH の反応は高感度 TSH IRMA である RIA-gnost TSH Ultrasensitive⁷⁾ での測定で有意な上昇を認めたが，TSH- β と平行した反応ではなく，また，TSH- β のピーク時間と異なるものが 4 例 (40%) に認められたことより，TSH- β の分泌動態の解明に本測定法は有用であると考えられた。

甲状腺機能亢進状態にある未治療バセドウ病患者の TRH 負荷試験において，TSH- β は無反応であり，TSH と同様に TSH- β の分泌も抑制されていること⁴⁾ が再認識された。一方，原発性甲状腺機能低下症患者では Kourides ら⁸⁾ の報告のように，2 例とも TSH と同様に TSH- β は過大に反応し，本症においては TSH- β の合成・分泌能が高まっているためと考えられた。

非腫瘍性 SITSH 患者においては基礎値のみであったが，TSH- β 濃度は 7 例中 5 例 0.7 ng/ml 以上と高く，Kourides ら⁹⁾ の結果と一致するものであった。今後 TRH 負荷での TSH- β の分泌動態を検討する必要があると思われた。また，腫瘍性 SITSH 患者での TSH- β の分泌を検討する際に本法は有用になると考えられた。

V. 結 語

血中 TSH- β 濃度測定法の基礎的・臨床的検討を行った結果，以下のような結論を得た。

1. 標準曲線は，0.2 から 4 ng/ml で直線性を有し，最低検出濃度は 0.2 ng/ml であり，同時・日差再現性，交叉反応試験，添加回収率の結果は良好であった。

2. 健常者の血中 TSH- β 濃度は 0.64 ng/ml 以下に分布し，正常範囲は 0.7 ng/ml 以下であり，TRH 負荷後の上昇は有意ではなく，TSH の反応とは必ずしも平行しなかった。

3. 原発性甲状腺機能低下症患者の TRH 負荷試験で TSH- β は過大に反応した。

以上より TSH- β と TSH の分泌動態は異なるものがあると考えられた。

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新谷博一教授に深謝いたします。

文 献

- 1) Kourides IA, Weintraub BD, Levko MA, et al: Alpha and beta subunits of human thyrotropin: purification and development of specific radioimmunoassay. *Endocrinology* **94**: 1411-1421, 1974
- 2) Greenwood FC, Hunter WM: The preparation of ^{131}I -labelled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochem J* **89**: 114-123, 1963
- 3) Piece JG, Parsons TF: Glycoprotein hormones: structure and function. *Ann Rev Biochem* **50**: 465-495, 1981
- 4) Kourides IA, Weintraub BD, Ridgway EC, et al: Pituitary secretion of free alpha and beta subunit of human thyrotropin in patient with thyroid disorders. *J Clin Endocrinol Metab* **40**: 872-885, 1975
- 5) Cooper DS, Klibanski A, Ridgway EC: Dopaminergic modulation of TSH and its subunits: in vivo and in vitro studies. *Clin Endocr* **18**: 265-275, 1983
- 6) 宮井 潔, 飯島康史, 遠藤雄一, 他: モノクローナル抗体を用いた TSH- β サブユニット EIA 法の開発と基礎的検討. *日内分泌誌* **63**: 445, 1987
- 7) 原 秀雄, 伴 良雄, 長倉穂積, 他: 高感度血中 TSH 濃度測定法 (RIA-gnost TSH Ultrasensitive) の基礎的ならびに臨床的検討. *核医学* **23**: 1647-1655, 1986
- 8) Kourides IA, Weintraub BD, Ridgway EC, et al: Increase in the beta subunit of human TSH in hypothyroid serum after thyrotropin releasing hormone. *J Clin Endocrinol Metab* **37**: 836-840, 1973
- 9) Kourides IA, Ridgway EC, Weintraub BD, et al: Use of alpha and beta subunit levels to identify patients with pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab* **45**: 534-543, 1977