

《 使用経験 》

Radioimmunoassay kit による血中 Thyrotropin (TSH) の測定並びにその臨床応用

吉 本 祥 生* 森 寺 邦 三 郎* 井 村 裕 夫*

緒 言

TSH の測定法には、生物学的測定法と免疫学的測定法とがある。生物学的測定法のうち、現在最もよく用いられている Mc Kenzie 法は TSH 測定以外に LATS を測定できるという利点を有するが、測定感度が低く、正常人血漿レベルの測定は不可能で、一般の臨床に応用されるまでには至っていない。一方、免疫学的測定法としては、1965 年 Utiger ら¹⁾、Odell ら²⁾ が Radioimmunoassay を確立し、血漿 TSH の微量定量が可能となった。しかし、ヒト TSH (HTSH) 及び抗 HTSH 血清の入手が困難なため、日常の臨床検査法として十分普及するまでには至らなかった。今回、第一ラジオアイソトープ研究所より、HTSH Radioimmunoassay kit が製品化され、試用する機会を得たので、基礎的検討を行うと共に、その臨床応用特に TRH 試験への応用を試みたので、その成績を報告する。

方 法

1. キットの構成及び調整³⁾

本キットには、50 検体用と 100 検体用とがあるが、100 検体用について述べる。

A) HTSH 抗血清：希釈抗血清が 1 ml 入って

* 神戸大学医学部第 3 内科

受付：48 年 8 月 17 日

別刷請求先：神戸市生田区楠町 7 丁目

13・14 合併地 (〒 650)

神戸大学医学部第 3 内科

吉 本 祥 生

いるので、緩衝液 II を 10 ml 加える。

B) HTSH Standard: 500 μ U が 1 ml に溶解してあるので、緩衝液 III で希釈し、適当な濃度の標準液を調整する。

C) ¹²⁵I-HTSH: 1 ~ 2 μ Ci が 1 ml になっているので、緩衝液 I を 10 ml 加える。ただし、この 1 ml の溶液中には、正常家兎血清が 0.1 ml 含まれている。

D) 抗ウサギ γ -グロブリンヤギ血清 (第二抗体): 抗ウサギ γ -グロブリンヤギ血清の 1 ml に、緩衝液 I を 10 ml 加える。

E) HCG (Human Chorionic Gonadotropin): 100 IU/ml の溶液が 11 ml 入っている。

F) 緩衝液 I (0.1% BSA): 0.2% BSA を含む緩衝液が 10.5 ml 入っているのので、蒸留水 10.5 ml を加える。

G) 緩衝液 II (0.1% BSA, 0.05 MEDTA): 0.1% BSA 及び 0.05 M EDTA を含む緩衝液が 11 ml 入っている。

H) 緩衝液 III (1% BSA): 10% BSA を含む緩衝液が 7 ml 入っているのので、蒸留水 63 ml を加える。

2. 測定操作法

各試験管に緩衝液 III 0.5 ml, 標準 TSH あるいは、被検血漿 0.1 ml, ¹²⁵I-TSH 溶液 0.1 ml, H-TSH 抗血清 0.1 ml, HCG 0.1 ml (10 IU) (HCG の添加は、HTSH 抗血清に含まれる HLH 抗体と標識抗原に含まれる ¹²⁵I-HLH との結合を HLH と HCG との交叉反応を利用しておさえるため) を加え、よく混和し、4°C で 4 日

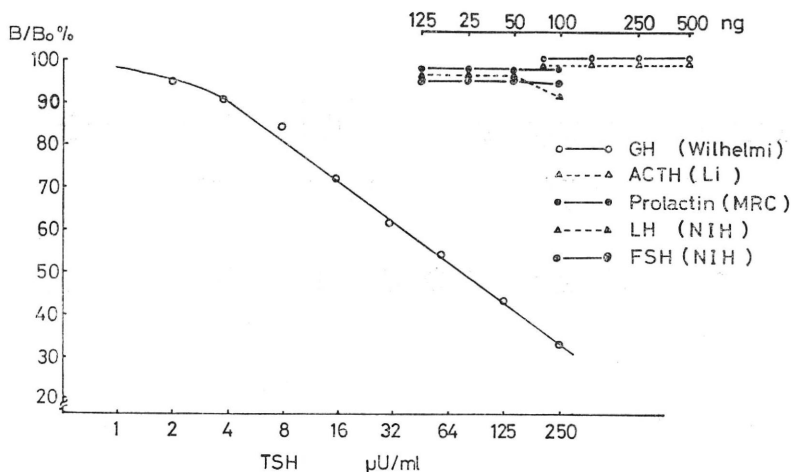


図1 Standard Curve and Specificity of Radioimmunoassay for TSH

間放置し、次いで第二抗体 0.1 ml を加え混和後、4°C で 1 日放置する。ウェル型シンチレーションカウンターで、各試験管の全放射能を測定したのち、3,000 rpm で 30 分間遠心分離し、上清を傾瀉で除き、試験管内の水滴を濾紙で拭きとる。次いで、各試験管の沈澱物の放射能を測定し、ゼロサンプル (標準 HTSH 濃度 0) に対する標準 TSH または血漿の計数率比 (B/B_0) または、全放射能に対する標準 TSH または、血漿の計数率比 (B/T) を算出する。片対数グラフの \log 側に標準 TSH 濃度を、 \ln 側に計数率比をプロットして、標準曲線を作成する。標準曲線より各血漿の TSH 濃度を読みとる。

結 果

1. 測定法の検討

1) 標準曲線について

HTSH Radioimmunoassay kit を用いて得た標準曲線の 1 例を図 1 に示した。最小検出量 (2 $\mu\text{U/ml}$)、測定範囲とも満足できるものであった。20 回測定した場合の全放射能に対するゼロ濃度の沈澱物の放射能比 (B_0/T) は、平均 38.3% (25.3 ~ 53.6%) であった。標準曲線における蛋白濃度補正について、未治療バセドウ病患者血漿並びに下垂体機能低下症患者の T_3 抑制血漿を用い検討

した。必ずしも一定の結果ではなかったが、TSH ゼロ濃度で、血漿添加群は、 B_0/T で 0.5 ~ 4% 非添加群に比し低値を示した。従つて、血漿非添加群標準曲線で読みとると、見かけ上高値を示すので、標準曲線作成時には、上記血漿を加え蛋白補正を行った。

2) 基礎的問題

本測定系の特異性を、HGH, ACTH, Human Prolactin, Human LH, Human FSH を用いて検討したが、図 1 に示すごとく、HLH の高濃度の範囲のみで、やや交叉性が認められた。LH 製剤には、TSH の contamination もあるので、これを直ちに交叉反応に帰することはできない。またこの濃度は、生理的濃度をはるかに越えており、実際の TSH 測定には干渉しないものと考えられる。その他のホルモンでは全く影響がみられなかった。回収率は、125, 62.5, 31.2, 15.6, 7.8, 3.9 μU の異なつた濃度の TSH を加えて観察したが、それぞれ 104.8, 98.9, 84.2, 88.7, 81.7, 111.5% の回収率を得、平均 95.0% であった。同一血漿 (濃度の異なる 3 種の血漿) を異なつた日に、4 回測定した際の再現性は、変異係数で表すと $\pm 13.5\%$ であった。しかし、同一試料測定の際の duplicate 間の差は、大部分 5% 以下であったが、低濃度では、標準曲線の傾斜がゆるやかで、10% を越える

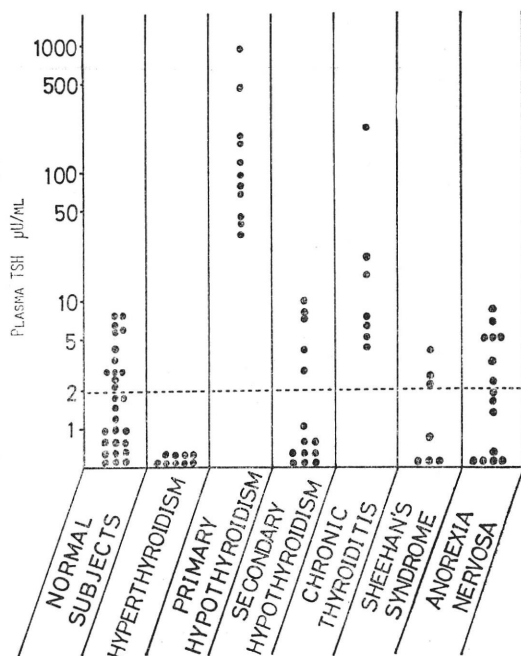


図 2 Scattergram of Plasma TSH in Normal Subjects and Patients with Various Disorders.

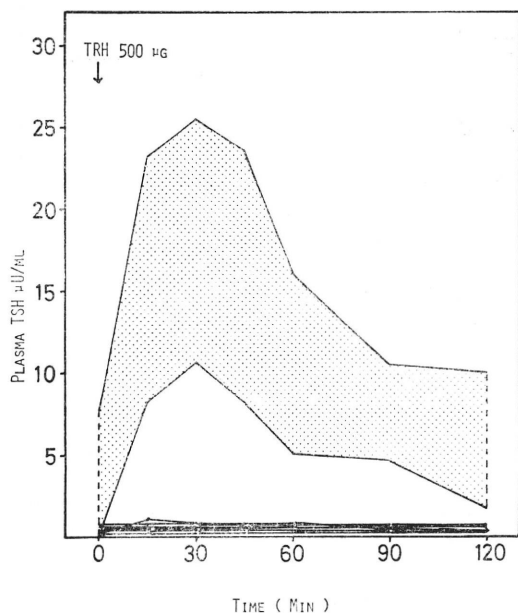


図 4 Plasma TSH Response to TRH in Hyperthyroidism.

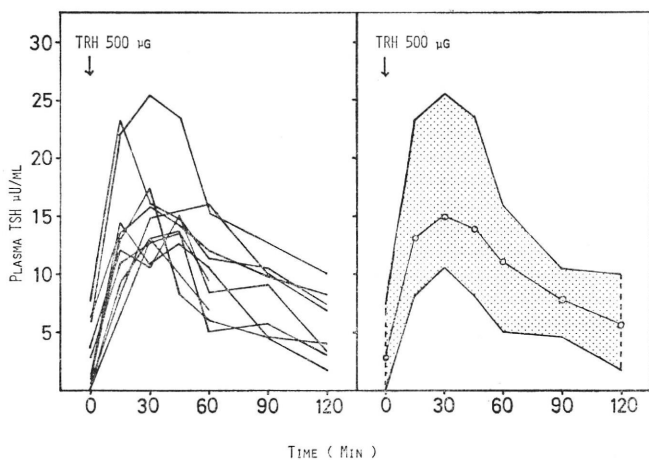


図 3 Plasma TSH Response to TRH in Normal Subjects

場合が少なくなかった。原発性甲状腺機能低下症血漿を倍数希釈して得られた曲線と標準曲線は、平行性を示した。

2. 臨床応用

1) 正常者及び各種内分泌疾患患者の血漿 TSH 濃度 (図 2)

健康成人 28 名の血漿 TSH 濃度は、 $7.7 \mu\text{U/ml}$ 以下で、測定感度 ($2 \mu\text{U/ml}$) 以下が約 60% を占めていた。甲状腺機能亢進症 9 例では、全例測定感度以下で、原発性甲状腺機能低下症 (甲状腺腫がなく、抗甲状腺抗体陰性のもの及び外科手術後機能低下を来したもの) の全例、慢性甲状腺炎 (堅いび慢性甲状腺腫があり、病理学的に、または抗甲状腺抗体陽性のもの) の一部で高値を示し、続発性甲状腺機能低下症では、測定感度以下のものと、測定感度内に位置する症例があつた。シーハン症候群、神経性食思不振症

では、特に一定の傾向はみられなかった。

2) TRH 試験

基礎状態で 1 回の血漿 TSH 濃度の測定では、一部の症例を除き、測定感度以下が大多数を占

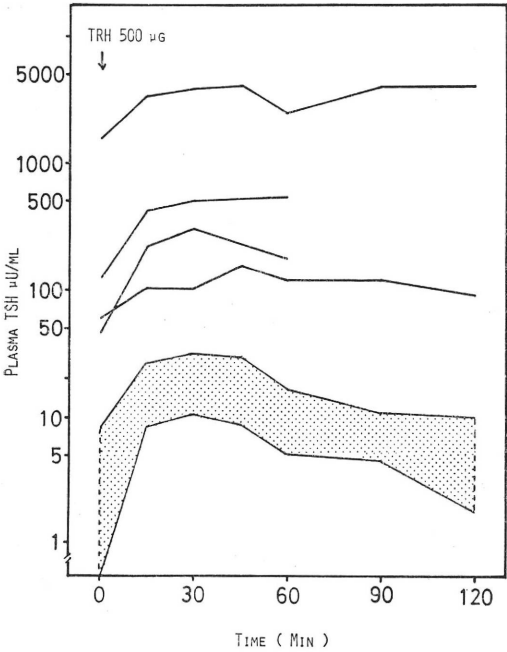


图 5 Plasma TSH Response to TRH in Primary Hypothyroidism.

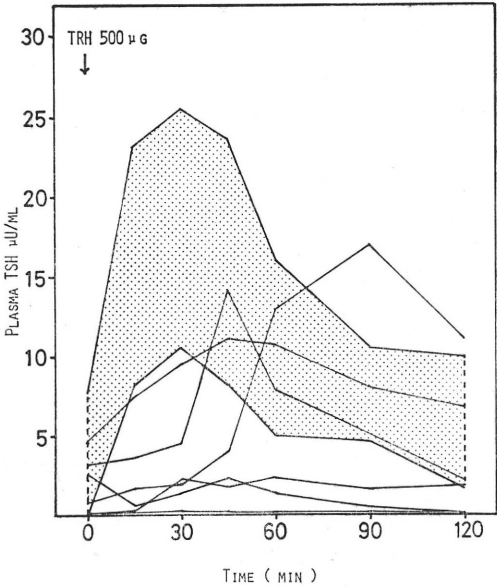


图 7 Plasma TSH Response to TRH in Sheehan's Syndrome.

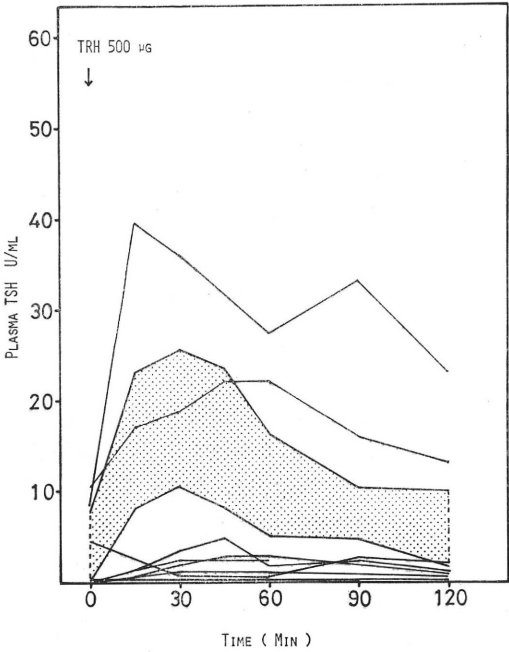


图 6 Plasma TSH Response to TRH in Secondary Hypothyroidism.

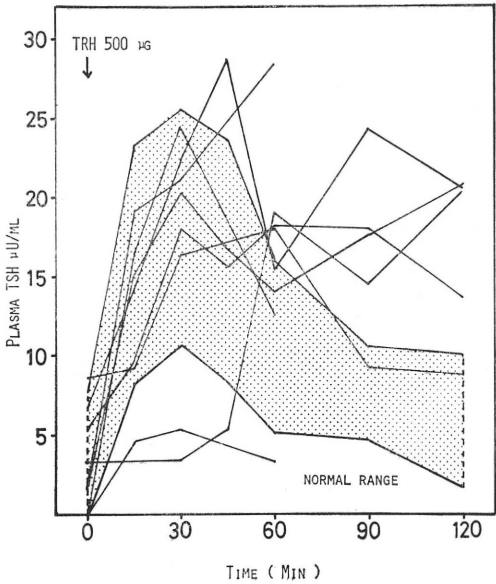


图 8 Plasma TSH Response to TRH in Anorexia Nervosa.

め、また正常人と各種疾患群との間には overlap があって、その診断的価値は少ない。そこで、正常者、各種疾患患者に TRH 500 μ g を静注負荷し、血漿 TSH 値の変動を観察した。

イ) 正常者 (図3)

正常人 10 例の血漿 TSH の前値は 2.9 ± 0.8 μ U/ml (mean \pm S.E.) で、TRH 500 μ g 静注負荷後、全例で血漿 TSH 値は速やかに上昇し、大部分の例で、頂値は15分から45分の間にみられた。図の右側に正常域を陰影で、反応の平均値を実線で示した。各時間の平均 TSH 値は、前値 2.9, 15分 13.0, 30分 15.0, 45分 14.0, 60分 11.1, 90分 7.7, 120分, 5.6 μ U/ml であった。

ロ) 甲状腺機能亢進症 (図4)

6 例の症例につき検討したが、前値、TRH 投与後いずれも感度以下で全く反応がみられなかった。

ハ) 原発性甲状腺機能低下症 (図5)

4 例の症例につき観察したが、前値はいずれも高値を示し、TRH の投与により、更に著明な増加を来し、高値が持続した。

ニ) 続発性甲状腺機能低下症 (図6)

症例の内訳は、結核性髄膜炎後遺症 2 例、頭蓋咽頭腫 1 例、松果体腫瘍 2 例、異所性松果体腫瘍 1 例、原因不詳で視床下部障害により甲状腺機能低下症を来していると考えられる 2 例である。異所性松果体腫瘍例及び原因不詳の視床下部障害例では、前値もやや高く正常ないし過剰の反応を示した。その他の症例では、結核性髄膜炎後遺症の 1 例を除き、すべて前値は測定感度以下で、TRH 投与後の反応も全例が不良であった。

ホ) シーハン症候群 (図7)

6 例につき検討した。出産時大出血を来してから、3 カ月の症例から13年の経過を経た症例まであり、比較的軽症例から重症例まで含まれている。3 例では、正常ないし遅延反応を認め、残りの 3 例では、ほとんど反応は認められなかった。

ヘ) 神経性食思不振症 (図8)

8 例につき検討した。甲状腺機能は、BMR を除き、すべて正常範囲内にあり、1 例の低反応例

を除き、正常の反応を示したが、頂値はやや遅延するものもあった。

考 按

最近の下垂体ホルモン測定の進歩はめざましく、視床下部ホルモンの発見、合成と相まって、視床下部一下垂体系の病態生理が次第に明らかとなりつつある。しかし従来一般検査室では、これらのホルモンの測定を行うことは困難で、routine 化はされていなかった。今回、第一ラジオアイソトープ研究所より、TSH 測定 kit が製品化され、我々も試用する機会を得た。まずこの kit を用いた場合の最小検出量は、従来の NIH より配布されていた抗血清及び標準 TSH を用いた radioimmunoassay による最小検出量の報告¹⁾²⁾⁷⁾⁸⁾とほぼ一致するものである。また 0 点の B 値、すなわち B_0/T も平均 38% で従来の NIH の radioimmunoassay の場合とほぼ同じであった。回収率、再現性、duplicate assay における 2 点間のばらつきについては、なお若干の改善の余地があるとはいえ、ほぼ満足できるものであった。特異性についても種々の下垂体ホルモンを用いて検討したが、大量の LH を用いた場合を除いて、ほとんど交叉反応を認めなかった。LH と TSH の間には、それぞれの α -subunit に類似性があるので、交叉反応も否定できないが、HLH 製剤中に含まれている HTSH の contamination が関与している可能性が大きい。いずれにしても、交叉反応がみられるのは、非生理的高濃度の場合であつて、通常の血中濃度では、LH が TSH の測定に干渉するとは考え難い。次にこの測定キットを実際の臨床に応用したが、これによつて得られた血漿 TSH の基礎値は従来の報告とほぼ一致したものであった。また TRH 負荷に対し、甲状腺機能亢進症では、血漿 TSH の反応性がみられず、原発性甲状腺機能低下症では、顕著な反応がみられたが、この点も既に報告されている点と一致した^{4)~6)}。続発性甲状腺機能低下症では、通常前値は低値で、TRH に対する反応は正常ないしは過剰なものと、不良なものがあった。前者は臨床

的にも、視床下部障害が推定された症例であり、下垂体前葉が障害されていないため TRH に反応したものと考えられる。視床下部障害例で、TRH に対し過剰反応を示す例があることは、他にも報告されており、血中甲状腺ホルモンの低下による下垂体抑制の欠如が原因と推定される。しかし、一部の症例で基礎 TRH 値がやや高値をとる場合があるが、その理由は明らかでない。

シーハン症候群では、正常の反応がみられるものと、ほとんど反応しないものとがあつた。このことは残存している下垂体組織の量が症例によって異なるためと一応考えられる。しかし、同一症例で、LH-RH 試験も併せて実施すると、TRH に対する反応低下例と、LH-RH に対する反応低下例は必ずしも一致しなかつた。すなわち、症例によって残存しているホルモン分泌能が異なることが明らかとなつた。その理由は必ずしも明らかでないが、シーハン症候群における下垂体機能低下の成立機序として、視床下部障害もしくは、視床下部と下垂体との連絡路の障害が関与している可能性を示唆するものといえよう。

神経性食思不振症では、BMR を除いて通常甲状腺機能は正常であるが、TRH に対する TSH の反応もほぼ正常であつた。しかし、頂値がやや遅延する傾向を認めたが、これは、TSH の代謝が遅延していることを示唆するものであろう。

むすび

HTSH radioimmunoassay kit について若干の基礎的検討を行い、併せて臨床への応用を試みた。この測定キットによる最小検出量は、 $2 \mu\text{U/ml}$ であり、測定値のばらつき、再現性はほぼ満足できるものであつた。また、特異性の点でも血漿 TSH の測定に際し問題となるような交叉反応は認められなかつた。この kit を血漿 TSH の測定、特に TRH 試験に応用したが、他の測定法を用いた従来の報告とほぼ一致した成績が得られた。

最後に長期間にわたり、kit を提供していただきました第一ラジオアイソトープ研究所並びに TRH を提供していただきました田辺製薬研究所に対し、深謝致します。

文 献

- 1) Utiger, R. D.: J. Clin. Invest., 44: 1277 (1965).
- 2) Odell, W. D. et al.: J. Clin. Endocrinol, 25: 1179 (1965).
- 3) HTSH キット“第一”使用説明書.
- 4) Fleischer, N. et al.: J. Clin. Endocrinol, 31: 109 (1970).
- 5) Hershman, J. M. et al.: J. Clin. Endocrinol, 31: 457 (1970).
- 6) 宮井 潔ら: ホルモンと臨床, 19: 427 (1971).
- 7) 弘重尚久ら: ホルモンと臨床, 19: 299 (1971).
- 8) 宮井 潔ら: 日内分泌誌, 44: 233 (1968).