

《使用経験》

二抗体法HTSHキットを用いた室温
短時間インキュベーション法の検討

森 徹* 小野芳子* 千種貞子*
遠藤啓吾* 小西淳二*

緒 言

血中甲状腺刺激ホルモン (TSH) の測定にラジオイムノアッセイが導入され、各種疾患異常時ににおける TSH 濃度がかなりの精度及び感度をもって測定可能となった。さらに最近では脳下垂体前葉の TSH 分泌細胞を刺激するより高位 (間脳など) から分泌される TSH 放出ホルモン (TRH) が合成され、TRH 試験として広く臨床的に応用されるに至り、甲状腺疾患はもとより、下垂体及び間脳等の疾患異常の診療上 TSH 測定の占める意義は極めて大となり、ルチンの *in vitro* RI 検査として主要なもの一つに数えられる²⁾。

さて、TSH のラジオイムノアッセイには一般に精度の優れる二抗体法が用いられ、本邦では既に第一ラジオアイソトープ研究所より TSH キット 「第一」 が市販され、広く用いられている。このキットは最近改良が進み、優れた精度とともに感度も著しい上昇を示している¹⁾。但し、規定の方法は 5 日間の長いインキュベーションを要し³⁾、簡便性に欠ける難点がある。

優れたルチン検査には精度・感度の良いことは必然であるが、それとともになるべく簡便である

ことが望まれる。従来より著者らはこの面に注目し、感度及び簡便性に優れるプラスティックカップを用いる固相法を開発し⁴⁾、また市販のキットを用いてはその感度を上昇させるために ¹²⁵I-HTSH を遅れて添加する方法 (delayed addition) を採用する⁵⁾などの検討を行って来た。

今回、最近のキットの改良に応じ、二抗体法でのインキュベーション時間短縮の可能性につき若干の検討を加えた結果、20数時間で充分満足出来る成績がえられることを認めたので、その成績を報告し、多くの利用に資したい。なお、実験方法・成績を示すに先立ち、その動機となった TSH キット 「第一」 の測定経験について述べる。

TSH キット「第一」の B_{50} 値の変動

ラジオイムノアッセイの感度の表現には、(1)最小検出閾値と(2)結合カウントが非標識抗原の添加によって下降して丁度 B_0 (抗原非満加時のカウント数) の 1/2 になった点 (B_{50}) の抗原量が用いられているが、後者がより信頼度が高い²⁾。

著者らは47年12月より TSH のルチン検査に第一ラジオアイソトープ研究所のキットを用いており、標準物質と共に未治療バセドウ病患者血清を添加する以外おおむね規定の方法によって測定を行っている⁵⁾。図 1 は最近までのキットによる B_{50} 値の変動及び本年 1 月以降使用開始したコントロール血清の測定値の変動を示す。使用開始時のキットは感度が不十分であり、 B_{50} 値は 60~100 μ U/

*京大放射線部及び放射線科

受付: 50年1月17日

別刷請求先: 京都市左京区吉田近衛町
京都大学医学部放射線科

森 徹

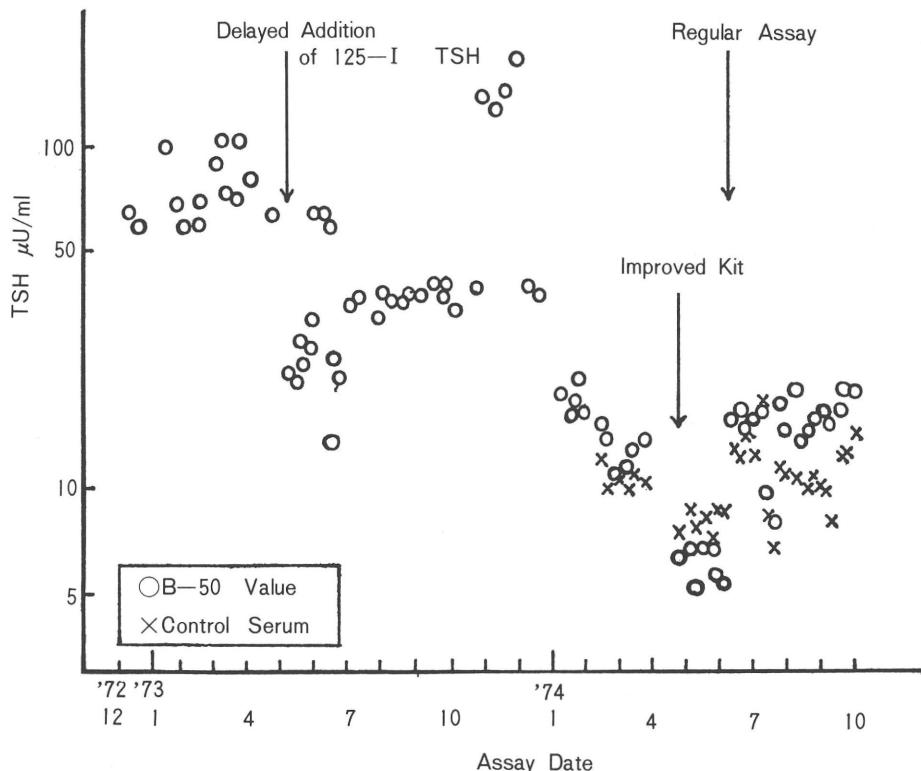


図 1 TSH キット「第一」の B_{50} 値及びコントロール血清測定値の経時的変動

ml を示した。昨年 5 月から既報の如く ^{125}I -TSH を遅れて添加する delayed addition を応用し⁵⁾、所要時間は 1 日延長したが、感度は約 3 倍に上昇した。途中 delayed addition を怠った際には B_{50} は元に復し、以後ほぼ安定した測定が続いた。途中 48 年 11 月に突然感度が一過性に不良となつたが、これはキット製品の状態が好ましくなつたことによる。キットには種々の改良が試みられ、図に明らかな如く、本年に入つてより B_{50} 値の急激な下降がみられ、さらに、本年 4 月試薬として凍結乾燥品が用いられるに及び、一段と感度が上昇した。これと共にコントロール血清の測定値にも若干の低下がみられ、また、測定域が狭くなつて TRH 試験の試料測定に不都合を来たしたので、6 月からは delayed addition を中止して規定の第 1 反応 4 日、第 2 反応 1 日に戻し、 B_{50} は 15~20、コントロール血清 10~15 $\mu\text{U}/\text{ml}$ とほぼ安定した良好な測定が行なわれている。この様なキット

の改良が以下の簡便法検討を意図する動機となつた。

検討方法

TSH キット「第一」を用いて、標準物質のキャリヤー蛋白として未治療かつ TRH 試験無反応のバセドウ患者プール血清を添加して測定を行なつた。その他の点に関しては、以下に述べる検討事項以外、緩衝液、 ^{125}I -HTSH、第 1 抗体及び第 2 抗体の濃度及び量、インキュベーション液量など全て規定の方法に従つた³⁾。

インキュベーションの時間及び温度について第 1 反応、第 2 反応のそれぞれへの影響を観察した。さらに 4 週までに至る影響、キャリヤー蛋白の影響、原発性甲状腺機能低下症患者血清の希釈曲線などについての検討を行い、原法と短時間法の同一試料測定成績を比較した。

検討成績並びに考按

1) 4°Cにおけるインキュベーション時間の検討

図2は4°Cにおいてインキュベーション時間を規定の第1反応4日、第2反応1日から短縮した場合の標準曲線を結合カウントで示したものである。第2反応を1日とした場合、第1反応時間の短縮によって結合カウントは著明に低下し、 B_0 は48時間で78%，24時間で60%を示した。更に第1反応20時間、第2反応6時間の成績は24時間、24時間に比してさらに低く、従って、4°Cでは短縮しても第1反応48時間、第2反応24時間が精一杯と判断された。なお、 $B/B_0\%$ の比較では時間の短縮によって著差はみられなかったが、カウント数の減少は精度を損うことが必然である。

2) 25°Cにおけるインキュベーションの検討

図3は25°Cの水槽中でインキュベーションを行なった場合の成績を示す。第1反応20時間と6時間の比較では結合カウントに大きな差異が認められた。一方、第1反応20時間において第2反応を3時間と6時間で比較した場合、両標準曲線には殆んど差異が認められなかった。さらに、第1反応6時間で第2反応を6時間と24時間とした場合の比較においても結合カウントには大差がなかった。従って、第1反応は長い方が望ましいが、第2反応は25°Cでは短時間で十分進行すると考えられた。これらの成績から25°Cでの時間短縮の可能性を認め、一応短時間法として第1反応20時間、第2反応6時間を探用して検討した。

図4は原法と短時間法の標準曲線を $B/B_0\%$ 及び結合カウントの両者で示したものである。カウント上は短時間法は原法の約80%に減少を示したが、 $B/B_0\%$ においては両方法ともに0.05μUが検出可能で、 B_{50} 値の比較では僅かに短時間法が

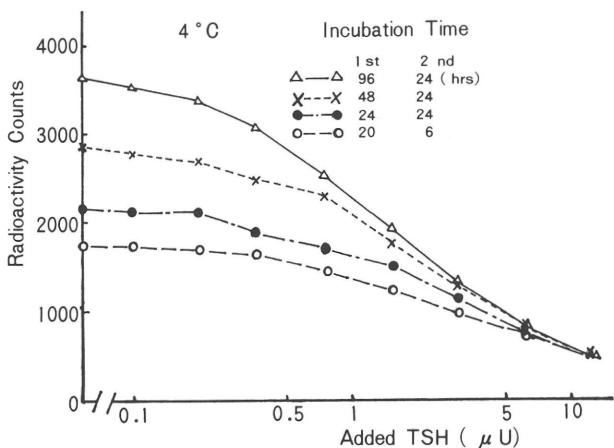


図2 4°Cインキュベーション時の第1反応、第2反応時間短縮による結合カウント数の変化

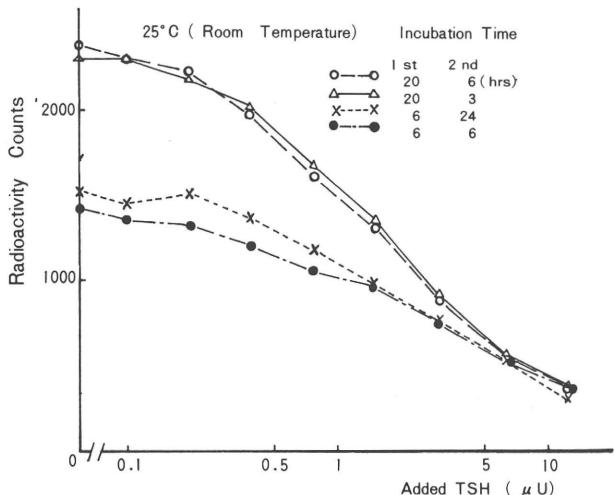


図3 25°Cインキュベーション時の第1反応、第2反応時間短縮による結合カウントの変化

大きい傾向を認めた。従って短時間法は感度、精度ともに僅かではあるが原法に劣るが、その差異は僅少であり、実際の測定上殆んど問題にならない程度である。

3) インキュベーションダメージの観察

$^{125}\text{I}-\text{HTSH}$ のみならず一般に標識ホルモンは安定性が乏しく、長時間の保存やインキュベーション、ないし高温の下では容易に変性をおこしうる。

表1は原法と短時間法について、一つのキットを入手直後から4週後まで保存した場合の B_0 カ

ウント、 B_{50} 値及びプランク値の変動を観察した成績を示す。両法とも保存により B_0 カウントの低下が明らかであり4週後においてはともに約70%にまで下ったが、両者間に差異はみられなかった。一方、 B_{50} 値については、原法では殆んど差がみられず、短時間法でも2~4週にやや高い値が得られたが有意の差とは云えない。ダメージが高度になれば変性物質は沈澱しプランク値が上昇する。プランクの比較では、原法では、やや高くなる傾向を認めたが、短時間法では著差を認めなかった。以上の検討から短時間における高温でのインキュベーションは少なくともインキュベーションダメージを助長することはないと判断された。

4) キャリヤー蛋白の影響

極めて低濃度の抗原抗体反応を利用するラジオイムノアッセイ系では測定系内の蛋白の量及び質がその反応に影響しうる。ことに人血清には一般に阻害性が認められる⁶⁾。著者らは原法においても未治療バセドウ血清を標準系に添加し、この非特異的阻害の影響の除外を意図している⁵⁾が、図5は原法と短時間法におけるキャリヤーの影響を観察した成績を示す。両法ともにTSH低濃度域及び B_0 においてはキャリヤー添加時に結合カウントの低下を軽度ではあるが認めた。従って低TSHレベルの正確な測定にはキャリヤーの使用が望まれる。未治療バセドウ病患者血清は真のTSHフリー血清とは云えないかも知れないが、正常人血清に比してTSHがはるかに低いことはTRH試験からも明らかであり、現在のTSHイムノアッセイの感度からは問題にならない低レベルであり、入手も容易であり理想的なキャリヤーと考える⁶⁾。

原発性甲状腺機能低下症患者血清をバセドウ病プール血清で3倍希釀系列を作成し測定したが、この希釀曲線は両法においてバセドウ血清添加時の標準曲線と良好に平行

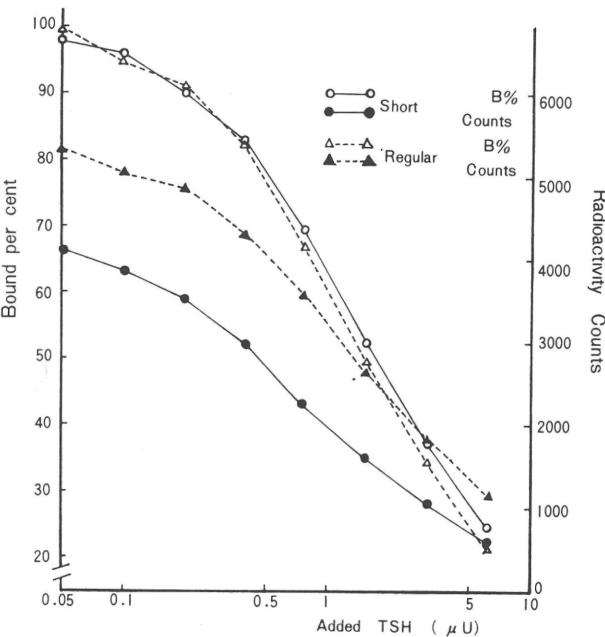


図4 原法と短時間法における標準曲線の比較

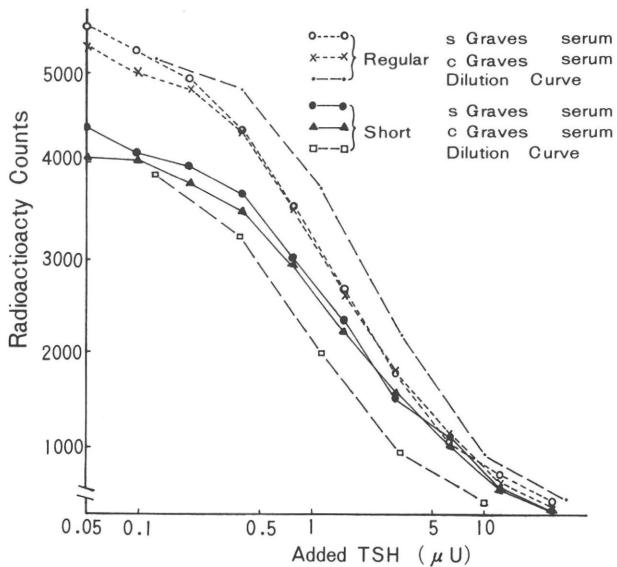


図5 原法と短時間法におけるバセドウ血清添加の影響及び高TSH血清の希釀曲線

表 1 原法と短時間法におけるキット保存による変性の観察成績

Storage	B ₀ Counts	B-50 TSH	Background
Regular	0	3635	16.5
	1	3295	15.5
	2	2891	14.5
	4 w	2523	15 μ U/ml
Short	0	2823	18
	1	2379	17.5
	2	2086	20
	4	1996	20

した。従って短時間法においてもバセドウ血清の標準系への添加が望ましいと考える。

5) 原法と短時間法の測定値の比較

各種甲状腺疾患患者33例について両法でTSH濃度を測定した。図6に示す如く、測定下限(1 μ U/ml)から上限(250 μ U/ml)に至る全範囲を通じて両法による測定値は極めて良好な一致を示し、相関係数は0.93であり、対象軸 $y=x$ に対して一方にズレる傾向は認められなかった。但し、低TSHレベルにおいて原法で下限以下の若干例に短時間法で2.2 μ U/mlまでの値が認められ、感度が僅かに劣ることによるものと考えられた。

総括並びに結論

TSHキット「第一」を用いてそのインキュベーション時間の短縮による簡便化を検討した。

4°Cでは時間短縮による結合カウントの低下が著明であったが、25°Cにおいては第1反応20時間第2反応6時間で原法の80%のカウントが得られた。この短時間法の最少検出TSH濃度は0.5~1 μ U/mlで原法と変らず、B₅₀値は15~20 μ U/mlで原法に比し3~5 μ U/ml高いが、高温によるインキュベーションダメージの懸念は否定された。キャリヤー蛋白としてのバセドウ病患者血清は原法同様短時間法にも添加が望まれ、バセドウ患者血清による高TSH血清の希釈曲線も良く標準曲線と平行した。原法と短時間法の測定成績は33例

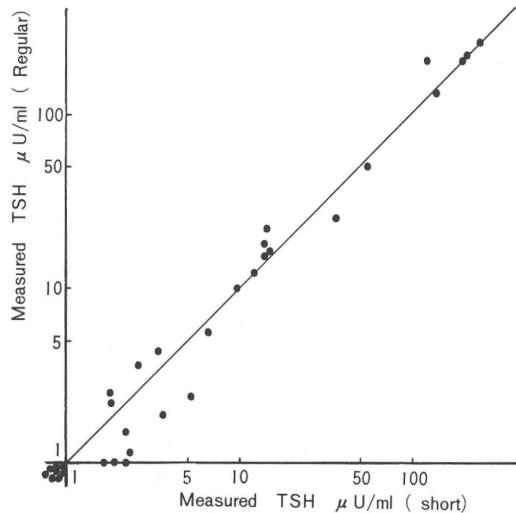


図 6 原法と短時間法による各種甲状腺疾患者血中TSH濃度測定の成績の相関関係

の患者血清で相関係数0.93と極めて良好な成績を示し、対象軸からのズレもなく良く一致した。

以上から短時間法は原法の優れた精度及び感度を損なうことが少なく、ルチン検査として有用であると結論した。本簡便法によれば、第1日目午前中に測定を開始し正午頃にインキュベーションに入れれば、翌朝第2反応が開始出来、その午後には遠沈によるB/F分離が可能であり、測定の能率化の面で極めて有用である云える。

稿を終るに際し、検討用キットを御提供下さった第一ラジオアイソトープ研究所に深謝する。

本論文の要旨は第22回日本内分泌学会西部々会総会(昭和49年10月、徳島)において発表した¹⁾。

文 献

- 1) 森 徹他: 第22回日本内分泌学会西部々会総会口演(昭和49年11月、徳島)
- 2) 森 徹他: 血液・尿化学検査、改訂4版、日本臨床社、大阪、1973、p. 1591
- 3) TSHキット「第一」使用説明書
- 4) 竹田洋祐: 日本内分泌学会誌、印刷中
- 5) 竹田洋祐他: ホルモンと臨床 22: 313, 1973
- 6) 森 徹: 臨床化学 2: 398, 1974