

## 《ノート》

## Thyro-SHure キット (TSH) の基礎的検討

## Fundamental Studies of Thyro-SHure KIT (TSH)

及川 克也\* \*富樫 和美\* 石神 達三\* 佐藤 誠也\*\*

Katuya OIKAWA\*, Kazuyoshi TOGASHI\*, Tatzuo ISHIGAMI\* and Seiya SATO\*\*

\*Kitasato Biochemical Laboratories and \*\*Kitasato University of Medicine

## I. はじめに

ヒト血中 Thyroid Stimulating Hormone (TSH) の測定が開発されて以来, TSH の測定は甲状腺機能検査あるいは下垂体機能検査として起用されている。

我が国でも多数の TSH-RIA キットが市販されているが, これら TSH キットのみならず RIA キット一般の最近の傾向は操作の簡単化, 測定時間の短縮を目的として改良されつつある。今回私共は Nuclear Medical Laboratories, Inc. (NML, 中外製薬㈱ CK-RTS) の新しい TSH 測定用キット, Thyro-SHure を使用する機会を得た。本キットは反応系にプレインキュベーションを採用した非平衡法 RIA で B/F 分離に第2抗体マクロゴール 6000 (PEG) を使用して時間短縮を図っている。以下本キットの基礎的ならびに一部臨床的検討の結果について述べる。

## II. 測定方法と検討内容

## 1) キットの試薬

本キット (40テスト用) は以下のものより構成されている。

a)  $^{125}\text{I}$ -TSH 溶液 (9 ml), 1 vial,  $^{125}\text{I}$ -TSH の

\* 北里バイオケミカルラボラトリーズ

\*\* 同上および北里大学医学部

受付: 55年12月23日

最終稿受付: 56年1月30日

別刷請求先: 相模原市北里 1-15-1 (☎228)

及川 克也

比放射能は  $0.34 \mu\text{Ci/ml}$  以下で,  $0.05\text{M}$  Tris-HCl Buffer (NaCl, 0.1% Gelatin, EDTA, および 0.2% Sodium Azide を含む) に溶解されている。

b) 第1抗体: 抗ヒト TSH 家兔血清 (9 ml) 1 vial; 抗体の力価は 1: 100,000 で,  $0.05\text{M}$  Tris-HCl Buffer (NaCl, 0.1% Gelatin, EDTA, および 0.2% Sodium Azide) に溶解してある。

c) 第二抗体 (17ml), 1 vial; 抗家兔ガンマグロブリン山羊血清の力価は 1: 25 以上で,  $0.05\text{M}$  Tris-HCl Buffer (1.25% 正常家兔血清, 7.9% PEG, NaCl, EDTA および 0.2% Sodium Azide) に溶解されている。

d) TSH 標準血清 (各 4 ml), 5 vials; 精製ヒト TSH は WHO 標準品でその力価を検定したものを使用している。標準液は 0, 5, 10, 20, 40  $\mu\text{U/ml}$  付近の各濃度に設定され, その濃度はロット毎に表示値が異っている。これらの TSH は 0.2% Sodium Azide を含む馬血清に溶解されている。

e) TSH 高濃度血清希釈溶液 (9 ml), 1 vial;  $0.05 \text{ M}$  Tris-HCl Buffer, NaCl, 0.1% Gelatine, EDTA, および 0.2% Sodium Azide を含む。

## 2) 測定操作

本キットの操作内容は Fig. 1 にフローチャートで示した。測定に要する日数はデータ処理まで基本的には1日で終了するため TSH 測定法としては他キットに比較して迅速である。

**Key words:** Thyroid Stimulating Hormone, Radioimmunoassay, Thyro-SHure, Thyroid disease

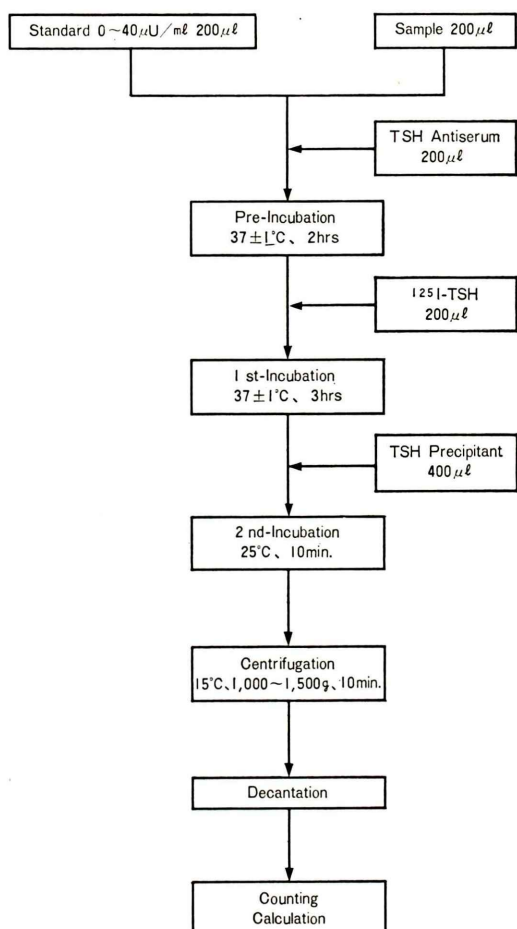


Fig. 1 Assay procedure.

### 3) 基礎的検討の内容

上記の測定法について incubation 条件, 測定感度, 抗体の交差性, 希釈試験, 回収率試験, 溶血の影響, Precision (精度), 他キットとの比較などを検討した。

### 4) 臨床的検討の対象

臨床的検討の対象は甲状腺機能正常者18例, 甲状腺機能亢進症21例, 甲状腺機能低下症4例について血中 TSH 値を測定した。

## III. 成績

### 1) 標準曲線に及ぼす incubation 時間の影響

本キットによる測定には3段階の incubation

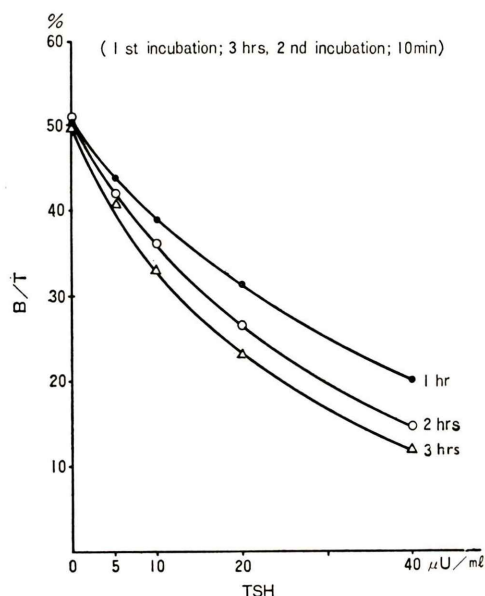


Fig. 2 Effect of pre-incubation time on the standard curve.

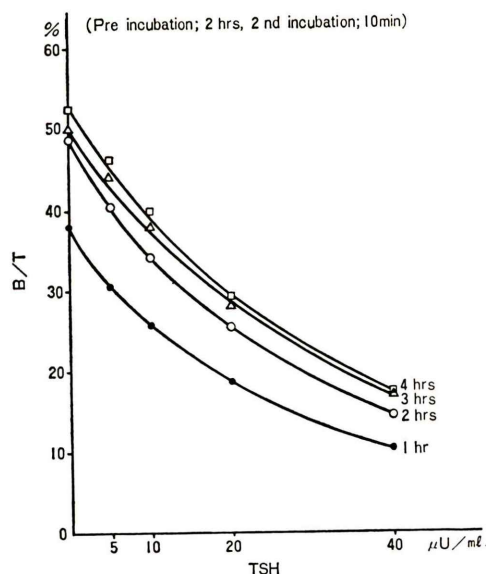


Fig. 3 Effect of 1st-incubation time on the standard curve.

が含まれる。そこで各 incubation の時間を変化させた場合, 標準曲線がどのような影響を受けるかを検討した。温度は指示書に従い, Pre- 及び

1st-incubation は 37°C, 2nd incubation は室温 (25°C) で行った. Pre-incubation 時間の検討は 1st incubation を 3 時間, 2nd incubation を 10 分間にそれぞれ固定して, 1 時間, 2 時間, 3 時間の経時の変化を検討した (Fig. 2).

1st incubation に関しては, Pre-及び 2nd incubation をそれぞれ 2 時間及び 10 分間に固定して,

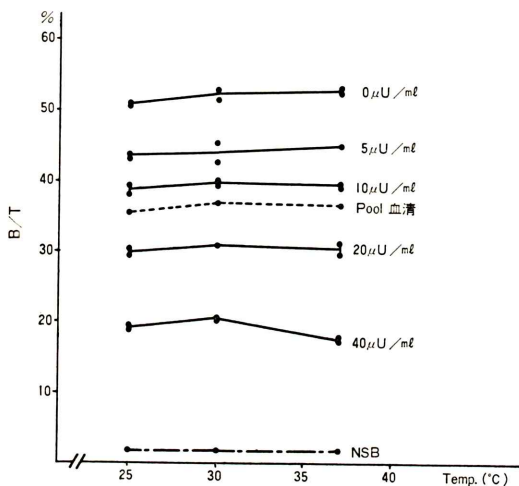


Fig. 4 Influence of incubation temperature on the bound percent of standard solution and pool serum.

1 時間, 2 時間, 3 時間, 4 時間の各時間についてチェックした (Fig. 3).

また 2nd incubation は pre-incubation を 2 時間, 1st incubation を 3 時間行なった後に, 5 分, 10 分, 15 分, 20 分の各時間について調べた.

まず pre-incubation 時間はキットで設定している 2 時間よりも長時間の方が標準曲線の勾配が鋭敏になり, かつ高濃度域ほどその傾向が認められた. しかしその差は測定に有意の影響を及ぼす程度とは考えられないため迅速化のためには 2 時間で充分と思われる. 次に 1st incubation 時間についてみると, 3 時間で  $^{125}\text{I}$ -TSH と Cold TSH 抗体結合物の競合反応はほぼ平衡に達していると考えられる. なお 2nd incubation 時間については 5 分から 20 分の間で何等有意の差が認められなかったため, キットの指示通り 10 分で充分と思われる.

## 2) incubation 温度の影響

pre-及び 1st-incubation の温度を変化させた場合の B/T% について検討した (Fig. 4).

それぞれの incubation 時間および 2nd incubation の条件は指示書通りに行った. その結果, pre-及び 1st incubation の温度が 25°C から 37°C まで変化しても反応は大きな影響を受けないことが判明した. また同時に検討した プール血清の

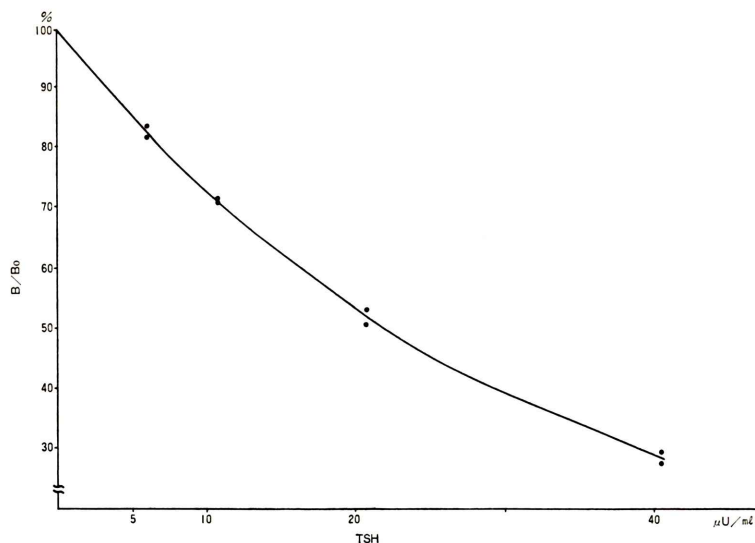


Fig. 5 Typical standard curve of Thyro-SHure

Table 1 Reproducibility of standard curves obtained from 9 different assays

標準液濃度( $\mu\text{U}/\text{m}\ell$ )	5	10	20	40
n	9	9	9	9
B/B <sub>0</sub> % (mean $\pm$ SD)	84.9 $\pm$ 1.0	73.2 $\pm$ 1.2	54.9 $\pm$ 1.5	30.7 $\pm$ 1.1
C.V.%	1.2	1.6	2.7	3.6

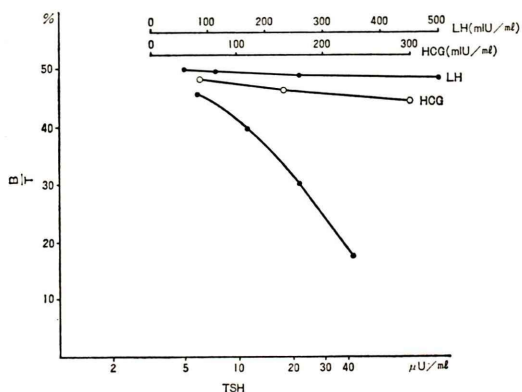


Fig. 6 Specificity of the anti-serum.

B/T% (破線) も特に温度条件によって変化は認められなかった。

### 3) 標準曲線の再現性および測定感度

Fig. 5 に本キットの標準曲線の代表的な例を示した。標準曲線の形が assay ごとにどの程度変化するかを見るため、5種類のロットにつき9回の測定を行った (Table 1)。この結果、各濃度ともその B/B<sub>0</sub>% の変動係数 (C.V.) は 3.6% 以下でそのバラツキは極めて少く標準曲線の再現性は非常に良好であることが明らかとなった。

各測定における NSB 値 (B/T%) および B<sub>0</sub>/T% 値は、有効期限内 (1ヶ月間) でそれぞれ 1.3 $\pm$ 0.1%, 51 $\pm$ 2% (n=10) であって、標識 TSH の damage 等各試薬の経時的な変化は少ないと考えられる。

次に本キットの測定感度を知る目的で、最低濃度の標準血清 (5.1  $\mu\text{U}/\text{m}\ell$ , lot No. 54) を添付の希釈用 diluent でさらに希釈し、各濃度間の有意差検定を行った。その結果希釈倍数 1/4 すなわち

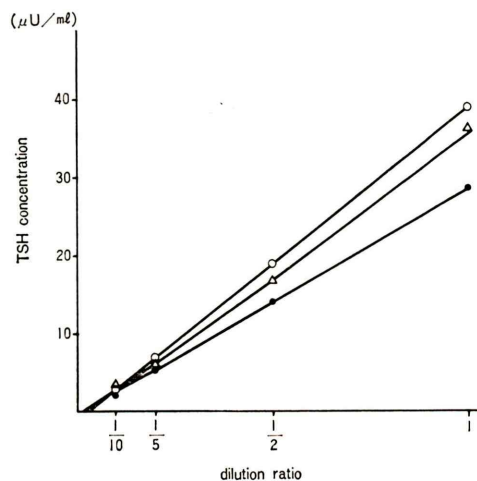


Fig. 7 Dilution curves obtained from three different sera.

1.3  $\mu\text{U}/\text{m}\ell$  まで各濃度間に有意差 ( $p < 0.001$ ,  $n = 5$ ) が認められた。従って本法の最小感度は約 1  $\mu\text{U}/\text{m}\ell$  であると考えられる。

### 4) 抗体の特異性

高濃度の LH 及び HCG が本 assay 系に影響するか否かの検討を行って抗体の特異性を調べた (Fig. 6)。

LH は MRC の 2nd IRP-HMG により検定した標準溶液 (500 mIU/ml) をまた HCG は CIS 社 HCG-RIA キットの標準溶液 (300 mIU/ml に調製) をそれぞれ TSH 希釈用溶液で調製し使用した。Fig. から明らかなように生理的な LH および HCG は実際上本測定系に影響をあたえないことが判明した。しかし HCG が異常高値を示す疾患では注意が必要である。

### 5) 希釈試験

TSH 濃度が 20  $\mu\text{U}/\text{m}\ell$  以上の高値を示す 3 種類



**Table 2** Recovery of exogenous TSH added to pool serum.

Sample	TSH濃度( $\mu\text{U}/\text{m}\ell$ )			回 収 率 (%)	平均回収率 (%)
	添 加 量	計 算 値	測 定 値		
1	0	—	2.3		99
	2.5	4.8	4.9	102	
	5.1	7.4	8.1	110	
	9.0	11.3	9.8	87	
	9.9	12.2	11.9	98	
2	0	—	8.9		100
	5.1	14.0	14.3	102	
	8.8	17.7	17.6	99	
	9.9	18.8	18.8	100	

**Table 3** Effect of added hemoglobin on the assay system

ヘモグロビン添加量( $\text{mg}/\text{m}\ell$ )	0	1.5	3.0	6.0	12.0	15.0	30.0
TSH ( $\mu\text{U}/\text{m}\ell$ )	12.6	11.6	11.0	12.3	10.9	11.7	10.0
	12.6	12.9	11.6	11.6	11.3	11.5	11.6
平 均 値	12.6	12.3	11.3	12.0	11.1	11.6	10.8

**Table 4** Accuracy

Sample	Within-assay variation(n=20)		Between-assays variation(n=9)	
	mean $\pm$ SD ( $\mu\text{U}/\text{m}\ell$ )	CV %	mean $\pm$ SD ( $\mu\text{U}/\text{m}\ell$ )	CV %
I	2.7 $\pm$ 0.3	11.1	2.9 $\pm$ 0.4	13.8
II	14.5 $\pm$ 0.7	4.8	14.3 $\pm$ 1.4	9.8
III	35.6 $\pm$ 0.8	2.2	35.4 $\pm$ 1.3	4.0
		6.0		9.2

の血清に関する希釈試験を試みた (Fig. 7). 血清の希釈はすべてキット添付の TSH-Diluent を用いて行った. その結果, いずれの濃度でも良好な直線性が得られ, 本法における定量性 (正確性) に問題のないことが明らかとなった.

#### 6) 回収率試験

2 種類のプール血清に既知濃度の標準液を添加してその回収率を検討した (Table 2). 両血清の場合ともそれぞれ平均回収率 99% および 100% であり, 満足すべき結果が得られた.

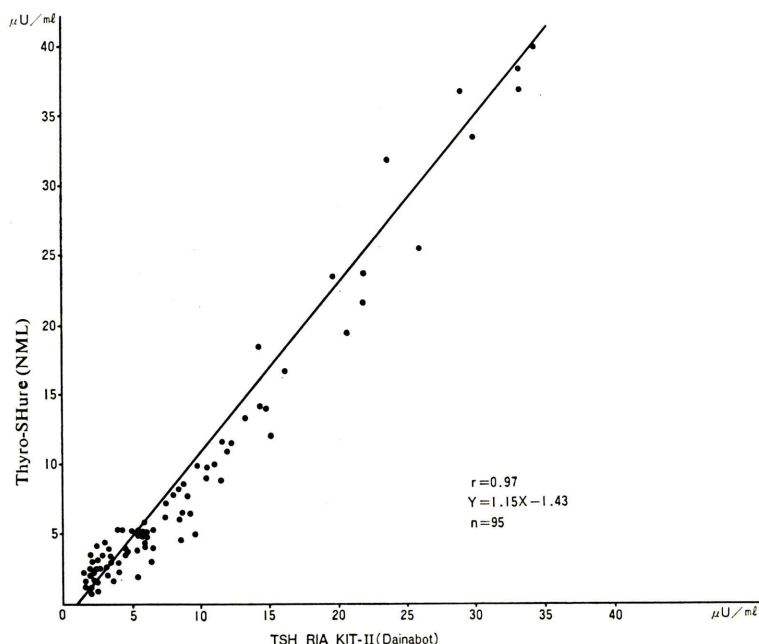


Fig. 8 Correlation between serum TSH values obtained with Thyro-SHure and TSH RIA KIT II

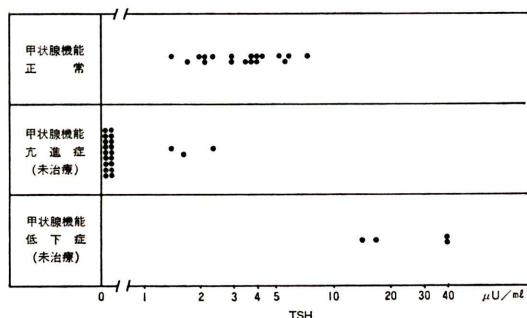


Fig. 9 Serum TSH values in several thyroid functions.

### 7) 溶血による影響

既知濃度のヘモグロビンを pool 血清に添加して測定値への溶血の影響を検討した (Table 3). あらかじめヘモグロビン濃度を定量した血液の血球浮遊液 (生理的食塩水) を凍結融解して得たヘモグロビン溶液を検討に用いた. Table から明らかのように 30 mg/ml の強溶血でやや低値傾向を示しているが平均値のパラツキは  $11.7 \pm 0.7$ , C.V. 6.0% で within-assay variation と有意差が認めら

れないため、本キットの測定には溶血による影響はないと思われる。

### 3) Assay の precision

TSH 濃度が低値、中値、高値を示す 3 種類のプール血清について within assay variation ( $n=20$ ) を調べた (Table 4).

低値域では変動係数が 11.1% とやや大きいですが、他の濃度域では C.V. 4.8% ( $\text{mean} \pm \text{SD} = 14.5 \pm 0.7 \mu\text{U/ml}$ ) および 2.2% ( $\text{mean} \pm \text{SD} = 35.6 \pm 0.8 \mu\text{U/ml}$ ) と良好な成績を示した。一方これと同一のプール血清を用いてそれぞれ 5 重測定で 9 回測定して between assay variation は平均 C.V. 9.2% で、ほぼ良好な成績を示した。

### 9) 他キットとの相関

本法とダイナボット社の TSH RIAKIT II との相関を各種濃度を示す 95 例の血清を用いて検討した (Fig. 8). 結果は相関係数,  $r=0.979$ , 回帰式  $Y=1.15x-1.43$  と良好な相関々係を示したが、TSH 濃度  $15 \mu\text{U/ml}$  以下の領域では、本法の方がやや低値に測定される傾向が窺われた。

#### 10) 正常値および臨床成績

甲状腺機能正常者の18例, 甲状腺機能亢進症21例および甲状腺機能低下症4例計43例の検体について血清 TSH を測定した (Fig. 9). 甲状腺機能正常値の血清 TSH 値は  $1.5 \sim 8 \mu\text{U/ml}$  (mean  $\pm$  SD =  $4.1 \pm 1.8 \mu\text{U/ml}$ ) に分布し, 甲状腺機能亢進症患者では  $1.0 \sim 2.5 \mu\text{U/ml}$  (mean  $\pm$  SD =  $2.2 \pm 0.3 \mu\text{U/ml}$ ), 機能低下症では全例  $10 \mu\text{U/ml}$  以上に分布した.

#### IV. 考 察

T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub> 等の甲状腺ホルモンの血中濃度測定法が改良され, 生化学的血液検査に匹敵する迅速さで甲状腺機能の検査が行われつつある現在, その上位ホルモンである TSH も同程度の迅速性が診断上臨床家によって要望されてきた.

現在, 臨床的に応用されている TSH 測定用キットは, そのほとんどが測定に2日乃至それ以上の日数を要している.

本法で採用している第2抗体, PEG 法は測定に要する時間を短縮するために開発され<sup>1)</sup> 普及しつつある B/F 分離法であるが, この操作によって 2nd incubation 時間を大幅に短縮することが可能となった. 本キットは Preincubation 2 時間, 1st incubation 3 時間, 2nd incubation 10 分間と全操作を1日で終了することができ, 従来の TSH 測定法<sup>2-4)</sup> と比較して本法の大きな特長となっている.

incubation 温度の影響について,  $25^{\circ}\text{C}$  から  $37^{\circ}\text{C}$  まで検討した. その結果 B/T% は大きな影響を受けないが, 0 濃度と  $40 \mu\text{U/ml}$  との間の差から,  $37^{\circ}\text{C}$  のキットの指定どおりの温度での incubation が適切であるといえる.

本法の最小測定感度は  $1 \mu\text{U/ml}$  前後で, 従来の TSH 測定キット<sup>7-9)</sup> と比較して同程度である.

本法による標準曲線は各測定間で極めて安定しており, 標準曲線の各点の C.V. は  $1.2 \sim 3.6\%$  で, pool 血清の測定値にはロット間差が若干認められる程度で, 標準曲線は全く安定している点非常に良好なキットである.

各測定における NSB 値 (B/B<sub>0</sub>%) および B<sub>0</sub>/T% 値は, 有効期限内 (1 ケ月間) でそれぞれ  $1.3 \pm 0.1\%$ ,  $51 \pm 2\%$  ( $n=10$ ) であって標識 TSH の damage 等各試薬の経時的な変化は少ないと考えられる. このような標準曲線に関する安定性は, 検査室での扱いやすさと精度管理のしやすさを示している.

LH, HCG との交差反応試験の結果より, 通常の場合, これらの物質の測定値への影響はほとんど無視できると思われる. 他のキットでも同様の問題点を抱えているが, 胞状奇胎, 絨毛性上皮腫および妊婦の場合, HCG レベルは今回交差試験に添加したレベルよりさらに高くなるために, 今後, さらに高濃度の HCG との交差性をみる必要があると考えられる.

稀釈試験および回収試験の結果は他の測定方法同様良好であった (Fig. 7, Table 1).

溶血の測定値へおよびその影響を検討したが, 通常考えられる溶血の程度では全く測定値に影響が見られず, 採血状態の悪い血清からも信頼し得る測定値が得られると思われる. このことは, 日常のルーチン検査を行なっていくうえで大きな利点となると考えられる.

また, 本法の精度を示す Withinassay variation と betweenassay variation は低濃度域で若干大きい, 平均でそれぞれ  $6.0\%$ ,  $9.2\%$  と他の TSH 測定法を用いた諸家の報告<sup>5,6)</sup> と同程度であった.

さらに私共は, ダイナボット社 TSHRIA Kit II による測定値との比較を行った結果, わずかに本キットによる測定値が  $15 \mu\text{U/ml}$  以下の濃度域で低値に測定される傾向をうかがわせたが, 相関は極めてよいものであった. 従って, これらの結果より本キットは従来用いられている他の TSH 測定用キットと同様, 十分, ルーチン検査使用に耐えられると考える.

なお, 本法による正常値は例数が少ないため追加する必要があるが, 従来の報告<sup>3,5)</sup> と良く一致していた. 原発性機能低下症ではいずれも  $14 \mu\text{U/ml}$  以上を示しており, 臨床診断上本キットは充分有用性があるものと考えられる.

## V. 結 語

中外製薬の新しい TSH 測定用キット (Thyro-SHure) の基礎的検討を行ない、TSH 測定用キットとして満足し得る結果を得た。

本法は第2抗体-PEG法を採用することによって迅速な TSH 測定を実現し、また極めて安定した系であることから、日常の TSH 測定法として適していると考えられる。

終りに、今回の検討にあたりキットを提供いただいた中外製薬㈱に謝意を表します。

## 文 献

1) Wood WG, Stalla G, Mueller OA, et al: J Clin

Chem Clin Biochem 17: 111, 1979

- 2) 渡辺清次, 村本秀樹, 大津 直, 他: 臨床と研究 54: 673, 1977
- 3) 下田新一, 笠井尊久男, 鈴木 仁, 他: ホルモンと臨床 25: 81, 1977
- 4) 稲田満夫, 風間善雄, 蔵田駿一郎, 他: ホルモンと臨床 22: 547 1973
- 5) 渡辺清次, 村本秀樹, 大津 直, 他: 薬理と治療 7: 97, 1979
- 6) 仁瓶礼之, 広岡良文, 山内一征, 他: ホルモンと臨床 21: 1047, 1973
- 7) 三好正規, 竹久義明, 鈴木信也, 他: ホルモンと臨床 21: 115, 1973
- 8) 新美仁男, 松本 生, 首村紀夫, 他: 小児科臨床 26: 95, 1973
- 9) 伴 良雄, 渡辺恭行, 長島則夫, 他: 医学と薬学 1: 107, 1979