

## 《ノート》

## RIAgnost hTSH Tachisorb の基礎的および臨床的検討

## Basic and Clinical Evaluation of RIAgnost hTSH Tachisorb

鈴木志保子\* 内村 英正\* 三橋 知明\* 久保田 憲\*  
葛谷 信明\* 池田 斉\* 今井 康雄\* 松崎 宸\*

Shihoko SUZUKI\*, Hidemasa UCHIMURA\*, Tomoaki MITSUHASHI\*,  
Ken KUBOTA\*, Nobuaki KUZUYA\*, Hitoshi IKEDA\*,  
Yasuo IMAI\* and Fukashi MATSUZAKI\*

\*The Third Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, University of Tokyo, Hongo, Tokyo Japan

**要旨** TSH RIA キット RIAgnost hTSH (Tachisorb) の基礎的、臨床的検討を行った。標準曲線の各濃度における B/Bo の変動係数は 6.1%, 0  $\mu$ U/ml の Bo/T の平均は 47.6%, 最小検出濃度は 2  $\mu$ U/ml であった。incubation 時間は第一反応 24 時間, 第 2 反応 15 分, 温度は室温 (24°C) で十分であった。

intra-および inter-assay variation はそれぞれ高濃度 13.5, 16.9, 中等濃度 6.4, 23.2, 低濃度 12.4, 16.1% であった。

希釈の影響では 8 倍希釈までは大きな影響をみとめなかった。

甲状腺疾患患者血清における検討では, 血中 T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub> 濃度との関係, および TRH テストにおける反応などで TSH 濃度測定の意義が確認された。

## I. はじめに

甲状腺機能低下症の診断には, 血中 TSH の測定は欠かせない検査の一つである。特に, 血中甲状腺ホルモン濃度が正常であるのに血中 TSH 濃度が正常値を上まわっているような軽度の甲状腺機能低下症や, 新生児にまれにみられる先天性甲状腺機能低下症の発見のためのスクリーニング検査として, 血中 TSH の測定はきわめて重要と思われる。

近年, 血清 TSH の測定には, <sup>125</sup>I-hTSH との

競合により検出する competitive binding assay が用いられてきたが, 遊離ホルモンと抗体と結合した。抗体 TSH complex との分離には, 第 2 抗体を用いて沈殿させ, これを分離する方法, 抗体をあらかじめプラスチックのチューブや beads などにコーティングしておき, 遊離 TSH をインキュベーション後, 液を除去するのみで行うものなどが用いられている。今回, ヘキスト社製の加熱により不活化したホルムアルデヒド処理 Staphylococcus aureus 菌に抗家兎 r-globulin を付着させたものを用いて, 遊離 TSH と抗体 TSH complex を分離する方法を用いる TSH 測定用 RIA キット (RIAgnost hTSH Tachisorb) を使用する機会を得たので, その基礎的および臨床的検討を試みた。

\* 東京大学第三内科

受付: 59年2月24日

最終稿受付: 59年5月10日

別刷請求先: 文京区本郷 7-3-1 (☎ 113)

東京大学医学部附属病院第三内科

内村 英正

**Key words:** TSH, RIA, Thyroid disease.

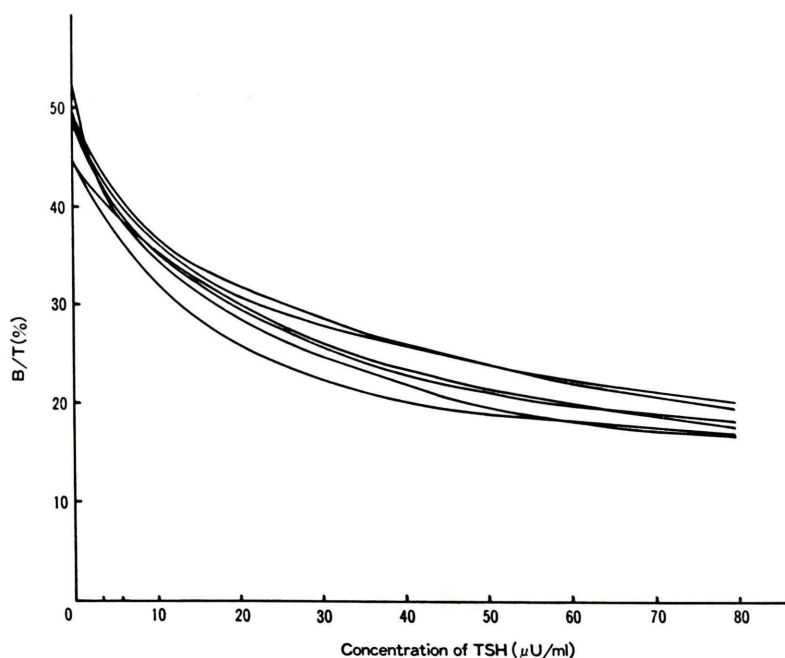


Fig. 1 Standard curves on different days.

## II. 方 法

### 1) キットの内容

- ①  $^{125}\text{I}$ -hTSH, 16 mg, 3  $\mu\text{Ci}$ , 凍結乾燥品 1 バイアル
- ② 抗 h-TSH 家兎血清, 凍結乾燥品 1 バイアル
- ③ 標準 hTSH ( $\text{So-S}_6$ ), 凍結乾燥品 (0, 2.8, 5.5, 10, 20, 40, 80  $\mu\text{U/ml}$ ) 各 1 バイアル
- ④ テスト血清, 凍結乾燥品 1 バイアル
- ⑤ 希釈用血清, 凍結乾燥品 1 バイアル
- ⑥ B/F 分離用液 (Tachisorb TSH) 55 ml

### 2) 試薬の調製

- ①  $^{125}\text{I}$ -hTSH, 10 ml の蒸留水にて溶解する
- ② 抗 hTSH 家兎血清, 10 ml の蒸留水にて溶解する
- ③ 希釈用血清, 4 ml の蒸留水にて溶解する
- ④ 標準 hTSH, 500  $\mu\text{l}$  の希釈用血清にて溶解する
- ⑤ テスト血清, 500  $\mu\text{l}$  の蒸留水にて溶解する

### 3) 測定手技

- ① 試験管に各濃度の標準 hTSH, テスト血清,

および被検血清 0.1 ml を分注する。

- ②  $^{125}\text{I}$ -hTSH 液 0.1 ml をすべての試験管に加える。
- ③ 抗 hTSH 抗血清液 0.1 ml をすべての試験管に加え, 十分に混和する。
- ④ 室温にて 17-24 時間インキュベーションを行う。
- ⑤ B/F 分離用液 (Tachisorb TSH) 0.5 ml をすべての試験管に加えて十分に混和する。
- ⑥ 室温にて少なくとも 15 分 (3 時間以内) 放置後, 500~1,000 g で 20 分間, 遠沈を行い上清を吸引除去する。
- ⑦ 沈渣の放射活性をカウントする。
- ⑧ 標準曲線を描き, 被検血清の hTSH 濃度を算出する。

### 4) 比較した他の測定法

他の hTSH アッセイキットとしては, 第一ラジオアイソトープ社製 TSH RIA キット (第一) により測定した。

- 5) TRH に対する TSH の反応についての検討  
TRH テストは, 合成 TRH 400  $\mu\text{g}$  を静注後,

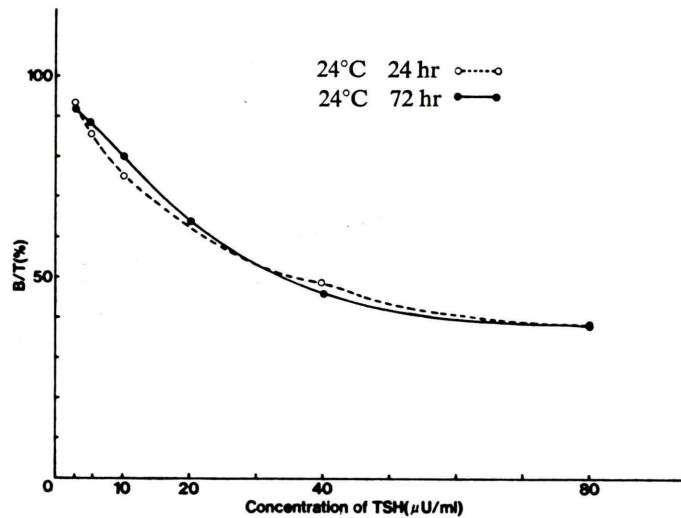


Fig. 2 Effect of first incubation time on standard curve in TSH assay.

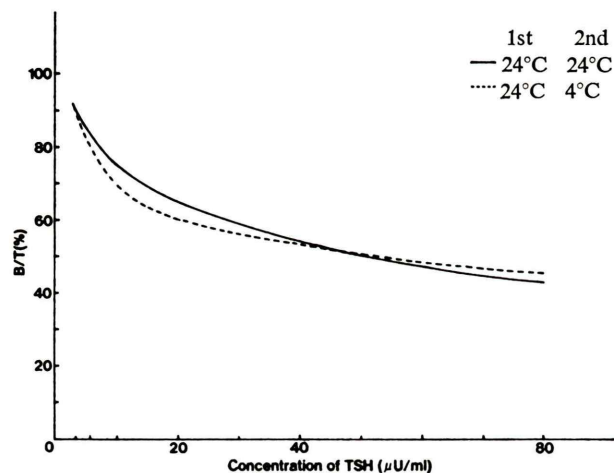


Fig. 3 Effect of incubation temperature on standard curve in TSH assay.

15, 30, 60, 90, 120 分に採血を行い, TSH の反応について調べた。

### III. 対 象

正常人	15例
甲状腺機能亢進症	25例
甲状腺機能正常者	36例
甲状腺機能低下症	38例
合 計	114例

以上の 114 例の血清について検討を行ったが、一部の患者では TRH テスト時の TSH の測定を行った。

### IV. 結 果

#### 1. 基礎的検討

##### 1) 標準曲線

6 回の異なる assay における標準曲線の標準 TSH の各濃度における B/Bo の変動係数の平均

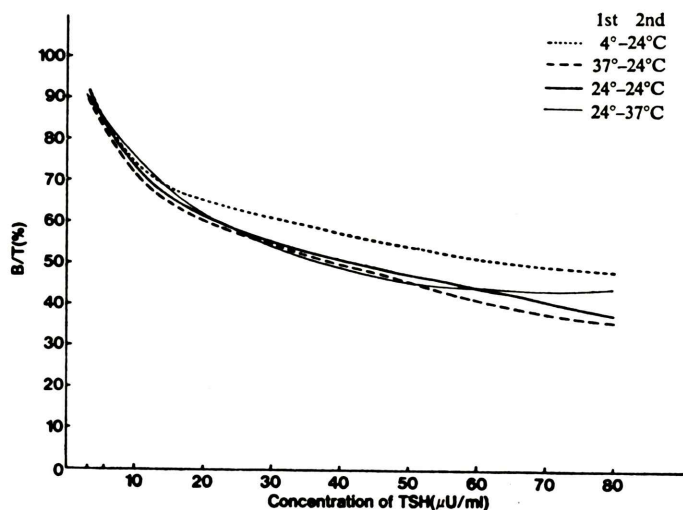


Fig. 4 Effect of temperature in first and second incubations on standard curve in TSH assay.

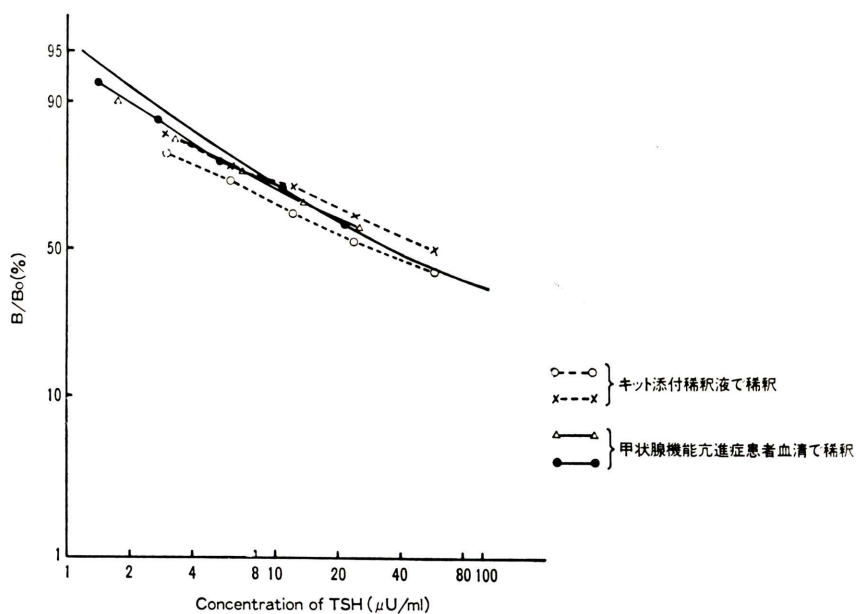


Fig. 5 Dilution curves in TSH assay.

は6.1%であり、 $0\mu\text{U/ml}$ の $\text{Bo/T}$ の平均は47.6%であった。また各 assay 内で最小の検出濃度は $2\mu\text{U/ml}$ 相当であった (Fig. 1)。

## 2) インキュベーション時間の検討

Figure 2 は、第1反応の時間を $24^\circ\text{C}$ 、24時間

とした場合と、 $24^\circ\text{C}$ 、72時間とした場合の標準曲線を示す。両条件の曲線には全く差がみとめられないことがわかる。したがって、第1反応時間は24時間で十分であることがわかる。

## 3) インキュベーション温度の検討

第1および第2反応をともに室温 24°C の場合と第2反応を 4°C とした場合では、標準曲線に大きな差をみとめなかった (Fig. 3). また、第1反応 4°C、第2反応 24°C (4°C-24°C)、以下、37-24°C、24-24°C、24-37°C などの種々の温度の条件で標準曲線を調べてみたが、4-24°C の条件では、TSH が 15  $\mu$ U/ml 以上になると他と比較して高値となる傾向をみとめた (Fig. 4).

#### 4) intraassay および interassay variation

TSH 濃度の低い血清 (A)、中等度のもの (B)、高い濃度のもの (C) の3種のプール血清について、

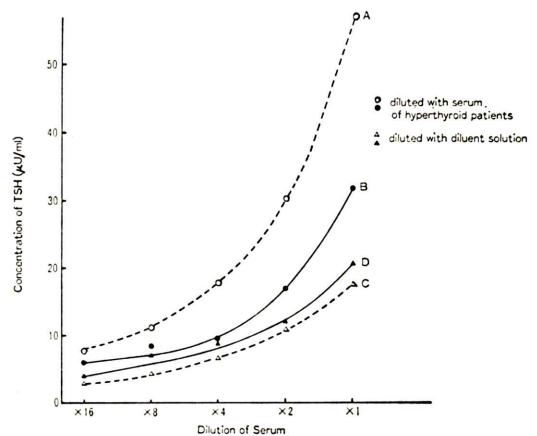
**Table 1** Intra-and inter-assay variation of serum TSH determination

Sample	Intra-assay variation		Inter-assay variation	
	M $\pm$ SD ( $\mu$ U/ml) (n)	CV %	M $\pm$ SD ( $\mu$ U/ml) (n)	CV %
A	7.9 $\pm$ 1.1 (10)	13.5	9.0 $\pm$ 1.5 (4)	16.9
B	35.8 $\pm$ 2.3 (10)	6.4	98 $\pm$ 22.7 (4)	23.2
C	223.3 $\pm$ 27.6 (10)	12.4	187 $\pm$ 30 (4)	16.1

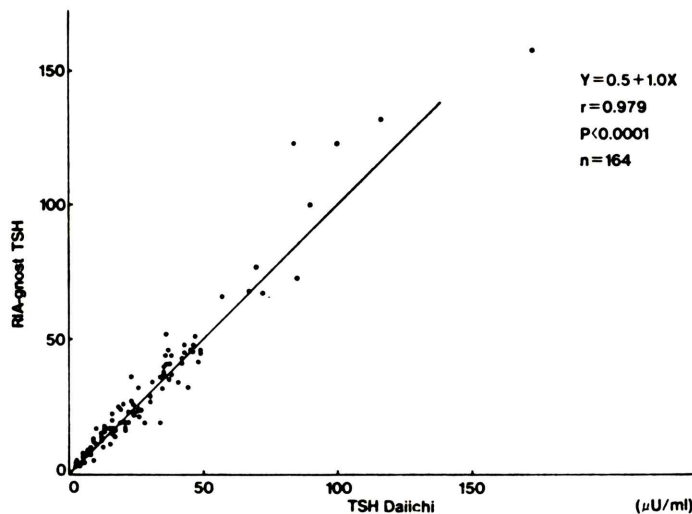
(n) number of results

intraassay variation と interassay variation の検討を行った。結果を Table 1 に示す。intraassay variation は、各血清を同時に 10 回測定したものであり、変動係数は、A 13.5%、B 6.4%、C 12.4%であった。interassay variation は異なる日に 4 回行った assay 間の各血清の測定値を示し、変動係数は、16.9、23.2、16.1%であった。

#### 5) 希釈試験 (Figs. 5, 6)



**Fig. 6** Effects of dilution on serum TSH concentrations.



**Fig. 7** Relationship between serum TSH concentrations by RIA-gnost TSH kit and those by TSH daiichi kit in patients with thyroid disease.

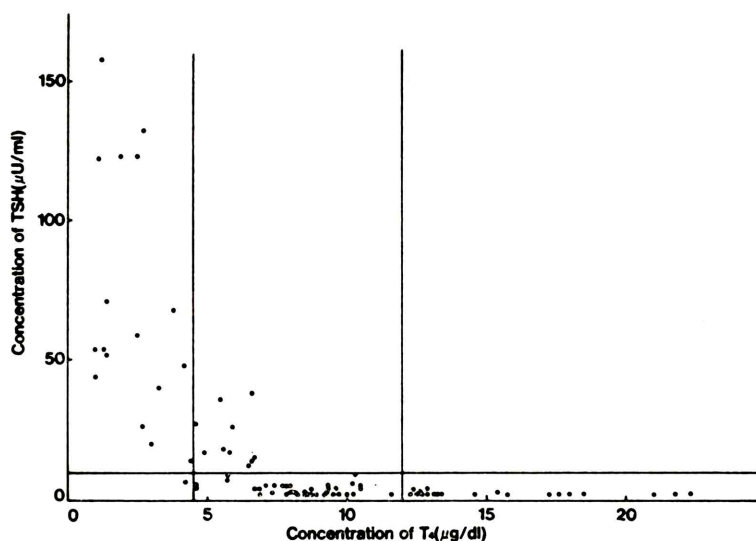


Fig. 8 Correlation between serum TSH and  $T_4$  concentrations in patients with thyroid disease.

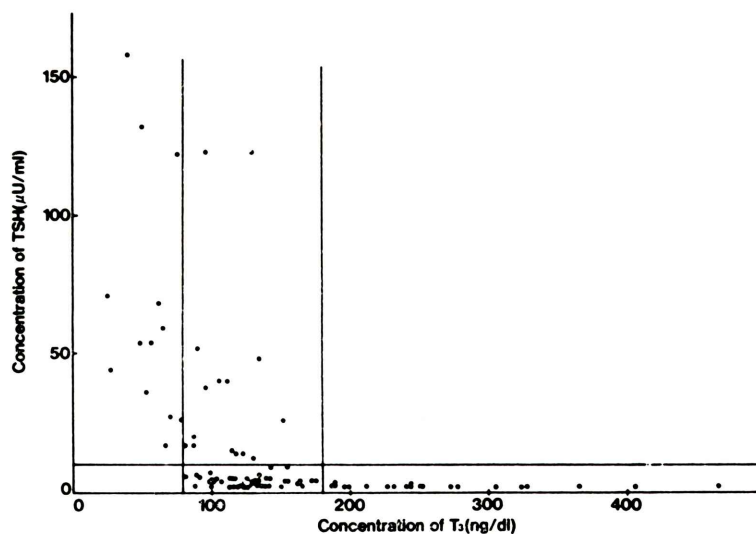


Fig. 9 Correlation between serum TSH and  $T_3$  concentrations in patients with thyroid disease.

A, B, C, D 4 種の甲状腺機能低下症の患者血清を, A, B は TSH が存在しないと考えられる甲状腺機能亢進症患者の血清で希釈した場合, C, D は本キットについている希釈用液で希釈したものである。いずれの方法でも, 8 倍希釈くらいまでは, ほぼ希釈程度に一致した濃度が得られている。

6) 本法と他のキットによる測定値との比較

甲状腺患者 164 名の血清について, 本キットによる測定値と TSH キット第一による測定値との関係を示したのが Fig. 7 である。TSH 低値の場合でも高値の場合でも, 両キットによる測定値はよく一致しており, 相関係数も  $r=0.979$  ( $p<0.0001$ )



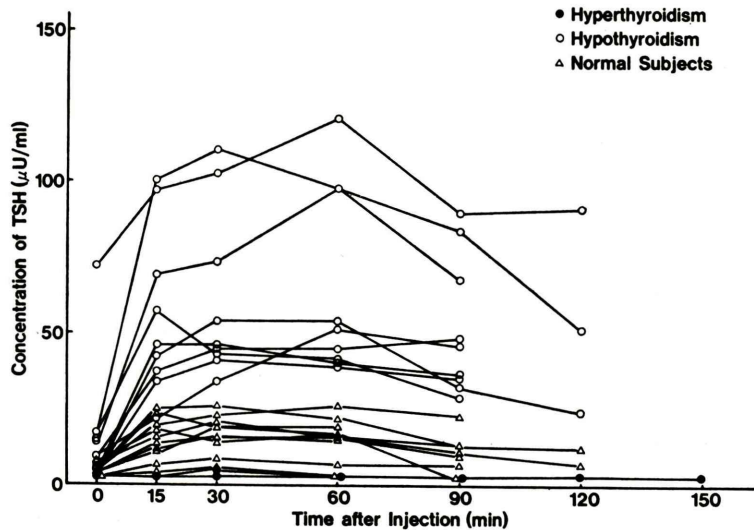


Fig. 10 TSH responses to TRH in normal subjects and patients with hyper- and hypothyroidism.

で非常に良好な相関関係を示している。

## 2. 臨床的検討

### 1) 正常者

本キットにおける正常者15名の平均値は、 $4.8 \pm 1.6 \mu\text{U/ml}$ であった。

### 2) 甲状腺疾患患者における血中 TSH 濃度と $T_4$ 濃度との関係

種々の機能状態にある甲状腺疾患患者の血清の TSH と  $T_4$  を測定し、その両者の関係を Fig. 8 に示した。 $T_4$  が正常値 ( $12 \mu\text{g/dl}$ ) をこえる患者の TSH 濃度は感度以下 ( $2.0 \mu\text{U/ml}$ ) であった。また、 $T_4$  が正常値以下 ( $4.5 \mu\text{g/dl}$ ) の患者では、TSH は異常高値をとっていることがわかる。もちろん、 $T_4$  が正常値の患者でも、TSH が異常値をとるものもあり、これは治療経過中によくみとめられる状態である。

### 3) 甲状腺疾患患者における血中 TSH 濃度と $T_3$ 濃度との関係

同様に血清の TSH と  $T_3$  の関係を示したのが、Fig. 9 である。 $T_3$  の濃度が正常値 ( $180 \text{ ng/dl}$ ) 以上である患者の TSH 濃度は感度以下 ( $2.0 \mu\text{U/ml}$ ) であった。また、 $T_3$  濃度が正常値 ( $80 \text{ ng/dl}$ ) 以下の場合には、TSH 濃度は異常高値を示していることがわかる。この場合にも、 $T_3$  濃度が正

常で TSH 濃度の上昇している例が、 $T_4$  の場合よりも多くみとめられる。

### 4) TRH に対する血中 TSH 反応

Figure 10 は、正常者 10 名、甲状腺機能亢進症 6 名および甲状腺機能低下症 14 名における TRH に対する TSH の反応を示したものである。甲状腺機能亢進症患者では TRH による TSH の反応をみとめず、また、甲状腺機能低下症患者では TSH の反応が過大となる傾向を示した。

## V. 考 案

血中 TSH 濃度が RIA により測定可能となり、日常の臨床検査として使用されるようになってから、甲状腺の生理および甲状腺疾患の診断、治療は飛躍的に進歩した<sup>1)</sup>。測定法に関しては、従来 B/F 分離の方法として最も多く用いられてきた 2 抗体法から、最近の固相法があるが、測定の原理に大きな相違はない。

本キットにおいても、反応温度、時間について検討した結果、データには示さなかったが、over night 反応 (14~18 時間) による標準曲線は 24, 72 時間とも差をみとめず、室温、over night 反応で安定した成績が得られるものと考えられる。

一般的に TSH の RIA で問題となるのは、最

小検出濃度と高濃度の場合の希釈による影響である。本キットでも甲状腺機能亢進症患者では感度  $2.0 \mu\text{U/ml}$  以下であるが、正常と考えられる者の平均は  $4.6 \mu\text{U/ml}$  と測定され、甲状腺機能亢進症と識別可能であった。

高濃度領域では  $80 \mu\text{U/ml}$  まで未希釈で測定可能であるが、これ以上では希釈が必要となる。希釈は10倍以上を必要とする例はまれであるが、数倍以下であることが望ましい。われわれの検討でも、高濃度の TSH 測定は、一般的に variation が大きく、一人の患者の経過を追う際には、同一ロットのキットを用いて同一希釈で assay を行った方がよいと思われた<sup>2-4)</sup>。

TSH の RIA における B/F 分離法には種々の方法が知られているが、2抗体法は其中最も一般的である。従来の2抗体法の RIA では、第2抗体を加えてからさらに、1日第2反応を行うのが普通であったが、この第2反応の時間を短縮する工夫がなされてきた。非特異的に TSH-抗体 complex を沈澱させるポリエチレングリコールによる B/F 分離もその目的で用いられたことがある。

本キットの特徴は B/F 分離に際して、Staphylococcus aureus の死菌に抗家兎  $\gamma$ -globulin を付着させたもので、TSH-抗体 complex を沈澱させる点である。Staphylococcus aureus 菌体はイムノグロブリンの Fc フラグメントに特異的に結合しており、TSH-抗体 complex との結合が短時間で成立し沈降を促進する。従来の2抗体法に比較して、第2反応時間が短かくてよく、沈澱量も多く上清の吸引除去による分離が容易である。

臨床的検討の成績では、甲状腺機能亢進症患者血中 TSH は検出できず、下垂体からの TSH 分泌が抑制されていることを示す。逆に、血中  $T_3$ 、 $T_4$  が正常範囲以下にあるものでは、血中 TSH 濃度の上昇がみとめられる。しかし、血中 TSH 濃

度を測定することが臨床的にきわめて意義があるのは、血中  $T_3$ 、 $T_4$  値が正常範囲にありながら TSH 濃度が上昇している患者の群を見出すことができる点で、われわれの検討成績でもこのような患者が少なくないことがわかる。さらに、血中  $T_3$ 、 $T_4$ 、TSH が正常範囲であっても、TRH を負荷することにより TSH の反応が過剰であれば潜在性の甲状腺機能低下症であり、血中 TSH の測定が大きな意味を持つことが今回のわれわれの成績でも明らかとなった。

## VI. ま と め

1. B/F の分離に Staphylococcus aureus の死菌に結合させた第2抗体を用いる TSH の RIA (Riagnost TSH Tachisorb) について、基礎的・臨床的検討を行った。

2. 甲状腺疾患を有する患者における臨床的検討の成績は血中 TSH 濃度の測定が有意義であることを示した。

高久教授のご校閲を感謝いたします。キットを提供してくださったヘキストジャパンに感謝の意を表します。

## 文 献

- 1) Utiger RD: Thyrotropin, In Behrman H, Jaffe B (eds): Methods of Hormone Radioimmunoassay. New York, Academic Press. 1974, pp. 161-171
- 2) 長滝重信, 内村英正, 池田 斉, 他: 我が国における RIA による in vitro 甲状腺機能検査の現状. 核医学 12: 33-41, 1975
- 3) Uchimura H, Nagataki S: An Evaluation of Thyroid Testing by kits. Proceedings of Asia and Oceania Throid Association. Workshops on Endemic Goiter and Thyroid Testing. Singapore, pp. 120-123, 1978
- 4) 内村英正, 三橋知明, 久保田憲, 他: in vitro 甲状腺機能検査キットの精度管理について. 核医学 17: 1114, 1980