

《ノート》

MAGIC TSH 測定法の検討

Evaluation of Magic TSH Radioimmunometric Assay

稻葉 妙子* 黒田 彰* 矢田部タミ* 山田 英夫*

Taeko INABA, Akira KURODA, Tami YATABE and Hideo YAMADA

Department of Nuclear Medicine and Radiological Sciences, Tokyo Metropolitan Geriatric Hospital, Tokyo

I. はじめに

近年 RIA, IRMA などの immunoassay においては測定法の簡略化が指向されている。磁化し得る粒子を用いて固相化する方法もその一つである¹⁾。このたび、米国コーニング社により、鉄スラリーに抗体をつけ、B. F 分離に遠心操作を要せず、磁石のついた特殊なチューブラック(セパレータ)に反応試験管を数分間静置するだけで、B. F 分離が行える簡単なキットが開発・実用化された。われわれは、このキットを使用する機会を得、その基礎的検討と有用性の検討を行ったので、その結果を報告する。

II. 方 法

本キットの測定法は、immunoradiometric assay IRMA に基づき、その標準的測定法は、Fig. 1 に示すとくである。この測定法につき以下の基礎的検討を行った。また、各測定時に、濃度の異なる三種類のオルゾ・リーガンドアッセイ・コントロール血清 I, II, III(以下コントロール血清 I, II, III)を管理血清として用いた。

1) インキュベーション温度と時間の影響

第一インキュベーション、第二インキュベーシ

ョンとともに 37°C、室温(15~25°C)および低温(2~8°C)の条件で測定を行い、インキュベーション温度の標準曲線と測定値に及ぼす影響を観察した。この際、インキュベーション時間は標準測定法にしたがい、第一インキュベーション 120 分、第二インキュベーション 30 分で行った。

また室温にてインキュベーション時間を変化させて、インキュベーション時間の標準曲線および

1. Add 100 μ l of standard, control, or patient sample to tube.
2. Add 100 μ l of (I-125) TSH tracer to each tube.
 - Vortex 3 to 4 seconds.
3. Incubate for 2 hours at room temperature.
4. Add 500 μ l of antibody slurry to each tube.
 - Vortex 3 to 4 seconds.
5. Incubate for 30 minutes at room temperature.
6. Add 50 μ l of distilled water to each tube.
7. Magnetically separate for 10 minutes.
8. Decant all tubes (except total count tubes).
9. Count all tubes in gamma counter.

Fig. 1 A diagram of standard assay method for MAGIC TSH.

Key words: IRMA, TSH magnetic separatio.

* 東京都養育院附属病院核医学放射線部

受付: 59年3月26日

最終稿受付: 59年6月20日

別刷請求先: 東京都板橋区栄町35-2 (番173)

東京都養育院附属病院核医学放射線部

稻葉妙子

測定値に及ぼす影響を検討した。第一インキュベーションを60分、90分、120分、150分とし、第二インキュベーションを30分で行い第一インキュベーション時間の影響を観察した。また第二インキュベーションの時間を15分、30分、45分、60分とし、その影響を検討した。

2) 回収率

低、中、高濃度のコントロール血清に3, 15, 30, 60 $\mu\text{IU}/\text{ml}$ の標準TSHを加え、おのおのの濃度における回収率を求めた。

3) 希釈試験

高濃度のTSHを示したヒト血清と標準血清を0濃度血清で8倍～32倍まで倍々希釈して測定し、希釈性の検討を行った。

4) 他社キットによる測定値との比較

当検査室で日常検査に使用しているTSHキット(栄研)を用いて測定した患者血清の値と、同一検体を本キットで測定した値とを比較し、その相関を求めた。

5) 測定値の再現性

低濃度、中濃度、高濃度のコントロール血清I, II, IIIを測定し、測定内精度、測定間の測定精度、異なる測定者による測定値の差異について検討した。

6) 最低測定濃度

キット添付の最低濃度の標準血清を0濃度血清で希釈し、0.5 $\mu\text{IU}/\text{ml}$, 0.25 $\mu\text{IU}/\text{ml}$, 0 $\mu\text{IU}/\text{ml}$ の各濃度の血清を10本ずつ測定した。次に各濃度のカウントと0濃度のカウントとを比較し、t検定により最低測定可能濃度を求めた。

7) RER (Response-Error-Relationship) と推定精度プロフィール (predicted precision profile)

パーソナル・コンピュータP6060(オリベッティ)を用い、当検査室にて開発したプログラムによりRERを求めた²⁾。RER作成に当たっては異なるロットのキット6回の標準曲線作成時のカウントを用いて求めた。さらに標準曲線をLogisticで近似した際の推定精度プロフィールを作成した。

8) 正常値

われわれが第22回核医学学会総会に報告したよ

うに、血清TSH濃度には年齢による差はあまり明らかではない³⁾。そこで当病院の入院・外来患者の検体より、甲状腺疾患患者と、T₃, T₄, TBGのいずれか一つでも異常値を示したもの除外したTSH測定値を用いて、正常老年者のTSH値とした。

III. 結 果

1) インキュベーション温度と時間の影響

第一インキュベーション、第二インキュベーションとともに、低温では高濃度域のB/T(%)がやや低くなる傾向を示したが、室温と37°Cでは、ほぼ同じ結合率を示した(Figs. 2, 3)。一方コントロール血清I, II, IIIの測定値には、ほとんど差を認めなかった(Table 1)。

第一インキュベーションの時間を変化させた場合、60分、90分、120分と時間が経過するにつれて、結合率B/T(%)は上昇し、特に高濃度域でその差は著明であった。120分と150分の間では結合率の差はあまりなかった(Fig. 4)。

第二インキュベーションの場合にも15分より30分、60分と時間の経過とともに、結合率は上

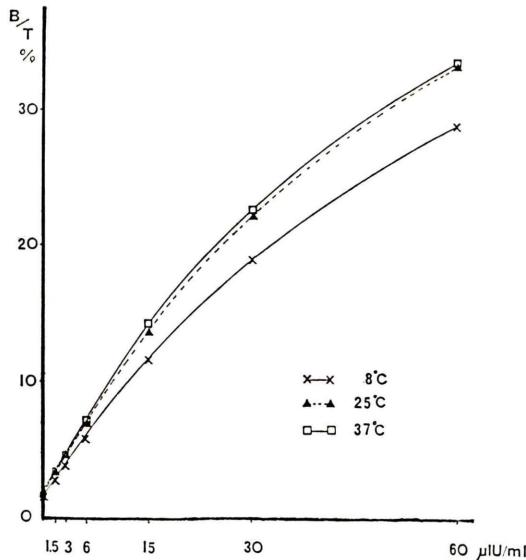


Fig. 2 Effects of temperature during first incubation period on standard curves.

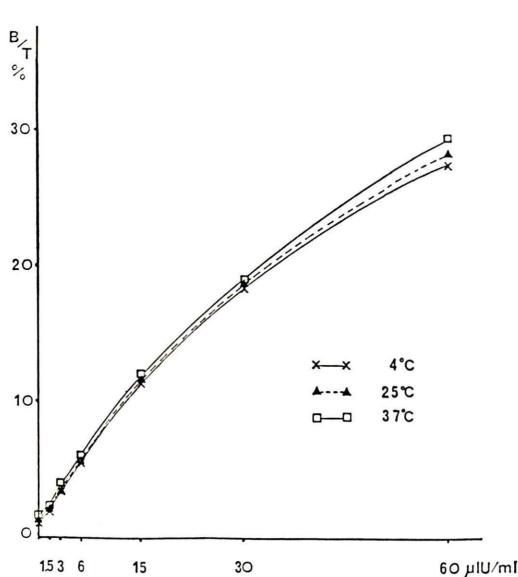


Fig. 3 Effects of temperature during second incubation period on standard curves.

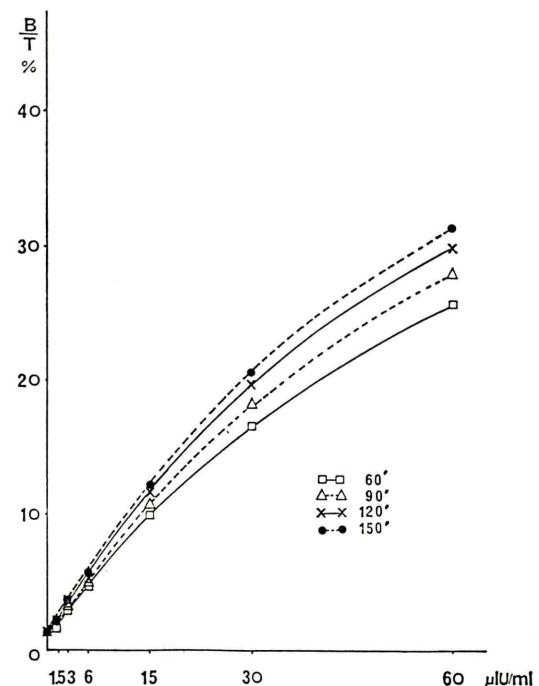


Fig. 4 Effects of different incubation periods (first incubation) on standard curves.

Table 1 Effects of temperature during incubation on assayed values.

First incubation

	Temperature		
	4°C	24°C	37°C
I	49.7	56.0	52.1
II	17.6	17.4	16.7
III	7.1	6.1	5.9

Second incubation

	Temperature		
	4°C	24°C	37°C
I	53.3	54.0	50.8
II	17.6	17.4	17.9
III	6.6	6.0	6.3

mean concentration (Unit: $\mu\text{IU}/\text{ml}$)

昇しその差は高濃度域で著明であった。しかし、45分と60分の間ではあまり大きな差はなかった (Fig. 5)。

このようにインキュベーション時間によって結合率は変化したが、コントロール血清の測定値には差は認めなかった (Table 2)。

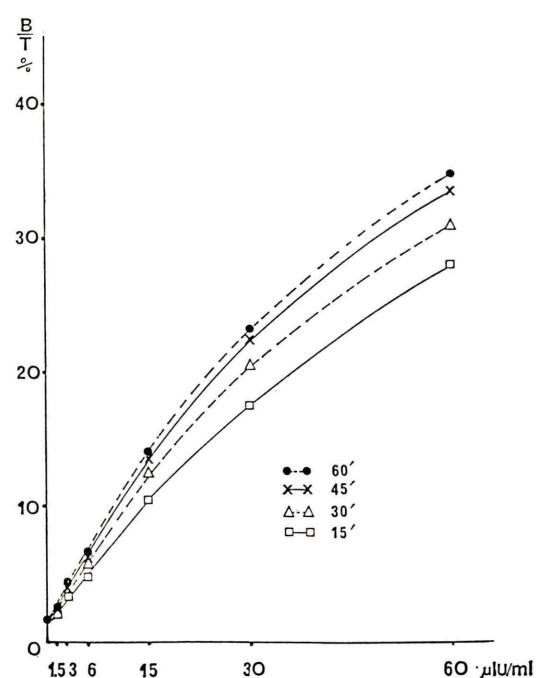


Fig. 5 Effects of different incubation periods (second incubation) on standard curves.

Table 2 Effects of incubation periods on assayed values

First incubation

	Time (minutes)			
	60	90	120	150
I	48.7	48.9	52.5	40.4
II	12.8	11.8	11.9	16.0
III	11.3	11.0	10.5	7.0

Second incubation

	Time (minutes)			
	15	30	45	60
I	48.1	46.9	45.9	46.6
II	16.4	16.8	16.7	16.5
III	6.3	6.2	6.1	6.3

mean concentration (Unit: $\mu\text{IU}/\text{ml}$)**Table 3** Recovery test

Serum 1

Added	Measured	Expected	Recovery (%)
0	2.3	—	—
1.5	3.3	3.8	86.8
7.5	8.7	9.8	88.1
30.0	29.7	32.3	92.0

Mean: 89.20

Serum 2

Added	Measured	Expected	Recovery (%)
0	7.9	—	—
1.5	9.3	9.4	98.9
7.5	13.9	15.4	90.3
30.0	35.6	37.9	93.9

Mean: 94.37

Serum 3

Added	Measured	Expected	Recovery (%)
0	16.0	—	—
1.5	18.0	17.5	103.9
7.5	22.7	23.5	96.6
15.0	29.8	31.0	96.1

Mean: 98.87

2) 回收率

低濃度コントロール血清における平均回収率は 89.2%，中濃度コントロール血清で，94.4%，高濃度コントロール血清で平均 98.8 % であり，い

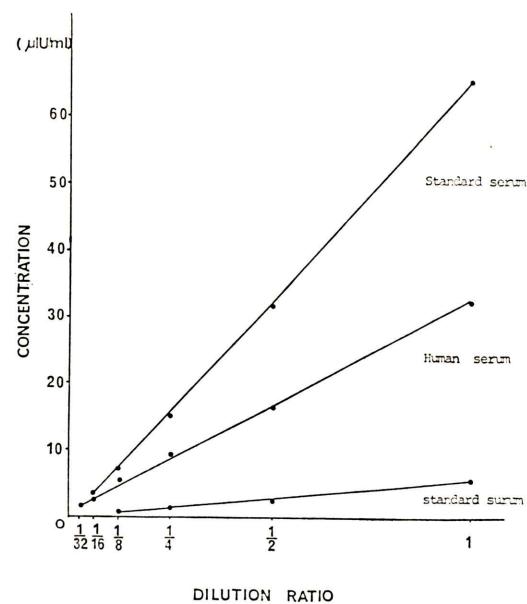


Fig. 6 Dilution test.

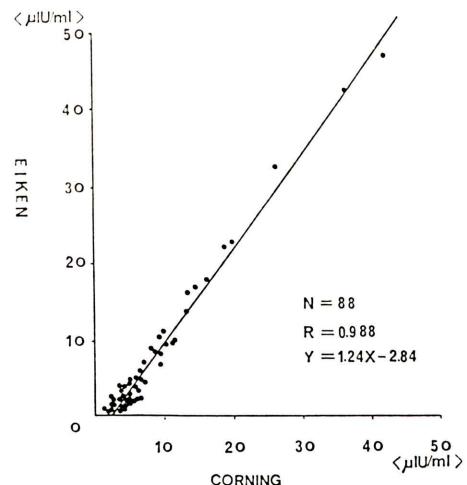


Fig. 7 Correlation between values measured by MAGIC TSH and TSH KIT (EIKEN).

ずれもほぼ良好な回収率を示した (Table 3)。

3) 希釈試験

標準血清，ヒト血清とともに，原点に収束する直線性を示した (Fig. 6)。

4) 他社キットによる測定値との比較

本キットと栄研キットにて測定した 88 血清の値を比較し (Fig. 7) に示した。相関係数は 0.988 ときわめて高かった。コーニング社の測定値は栄研キットによる測定値に比して、低濃度部分でやや高く、高濃度部分でやや低い傾向が見られた。

5) 測定精度 (Table 4)

低・中・高濃度領域における測定内精度を CV % で表わすと Table 4 に示すごとく、いずれも 4 % 前後ときわめて良好な値を示した。また測定間精度も 4.4~6 % であり、いずれも高い再現性を示したと言える。

Table 4 Within-assay, between-assays and inter-technologists precision

Within assay variation

	Sample I	Sample II	Sample III
Mean	51.37	17.65	6.35
S.D.	2.17	0.69	0.29
C.V. (%)	4.22	3.89	4.57
N	20	20	20

Between assay variation

	Sample I	Sample II	Sample III
Mean	51.60	17.48	6.15
S.D.	3.06	0.79	0.27
C.V. (%)	5.93	4.52	4.39
N	9	9	9

Inter-technologists variation

	Sample I	Sample II	Sample III
Mean	A 51.37	17.65	6.35
(μ IU/ml)	B 48.42	17.29	5.61
S.D.	A 2.17	0.69	0.29
	B 2.20	0.93	0.27
C.V. (%)	A 4.22	3.89	4.57
	B 4.54	5.38	4.74
N	20	20	18

Table 5 Data for calculation of minimal detectable concentration

Concentration	n	Mean count	S.D.
0 μ IU/ml	10	574	59.8
0.25 μ IU/ml	10	657	22.3
0.5 μ IU/ml	10	827	84.7

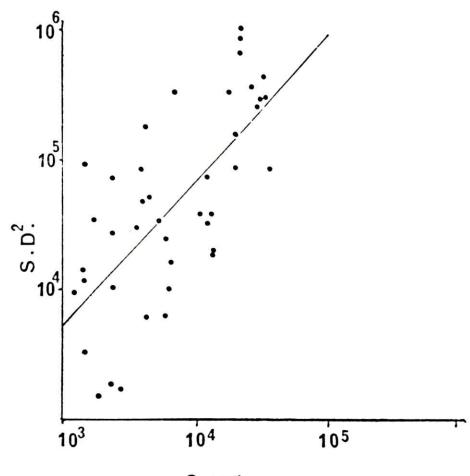
また異なる測定者 A, B による測定値の比較でも、平均測定値、標準偏差ともに差はなく、全体として再現性は良好であると言える。

6) 最低測定濃度

0 濃度、0.25 μ IU/ml, 0.5 μ IU/ml のカウントと標準偏差を Table 5 に示した。自由度=18 で Student の t 分布表を用いて t 検定を行った。0.25 μ IU/ml は 2.5 % 以下の危険率で 0 濃度との間に有意差を示した。一般的有意水準 5 % を用いれば、さらに低濃度まで測定可能となる。

7) RER と推定精度プロフィール

RER と推定精度プロフィールによると、測定内精度をより広い範囲にわたって推定することが可能となる。Fig. 8 に示したごとく、IRMA である本キットにおいても、カウントと分散の間には有意の相関が得られた。相関係数 $r=0.7013$ であり、回帰式 $\log(\sigma^2+1) = \log A + J \times \log Y$ におけるパラメータ A, J の値は、それぞれ $A=1.9890$, $J=1.1399$ であった。また本キットにおける回帰直線は、カウントによる統計誤差のみを表わす直線とほぼ平行した。これは一般の RIA では、ばらつきの多い低濃度部分でカウントが高いのに対し、IRMA である本キットでは、低濃



$$\log(\sigma^2+1) = \log A + J \times \log Y$$

Fig. 8 Response-error-relationship of MAGIC TSH.

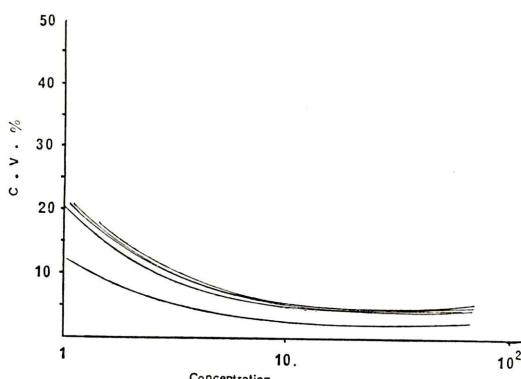


Fig. 9 Predicted precision profile of MAGIC TSH.

度部分でカウントが低いために生じた現象と思われる。いずれにしても推定精度プロフィールに見られるごとく、低濃度部分でやや精度は悪い (Fig. 9)。しかし、コントロール血清 I, II, III の範囲では、Precision Profile における CV% に差がなく、III-5) で示した測定精度にも差がなかったことと一致する。また、コンピュータ解析により求めた最小測定可能濃度は⁴⁾ 5% の危険率で $0.14 \mu\text{IU}/\text{ml}$ であった。

8) 正常値

60 血清より求めた正常値は、平均値 $\pm 2\text{SD}$ として $4.33 \pm 2.14 \mu\text{IU}/\text{ml}$ であった。この値は、当検査室で使用している現在の正常値 1.44 ± 0.67 と比較して、やや高めであった。この結果は他社キットとの比較で示した結果とよく一致し、当然考えられる値である。

IV. 考 案

本キットは簡便な上、従来多くの RIA で必要とした冷却遠心器を必要としない点、経済性の上でも利点がある。

ここまで検討してきた結果をまとめると次のとくなると思われる。

測定は室温で十分であり、第一インキュベーション時間は 120~150 分、第二インキュベーション時間は 30~60 分と考えられる。いずれにしても、これらの条件がかなり変化しても、測定値そのものには影響を与せず、その点では比較的諸

条件に影響され難いキットと言えよう。希釈試験、回収試験の結果は良好で、本キットが間違いなく TSH を測定していることを示している。

測定内精度はよく、キット間の差を表わす測定間精度も十分良好であった。測定内精度と測定間精度にあまり差がないことは、二変量の密度分布が真円に近いことを示している⁵⁾。このことは、TSH 測定法としては従来法に比しかなりすぐれた点と思われる。

IRMA においても良い Response-Error-Relationship があることが示された ($r=0.701$)。RER, Precision profile にみられるごとく、測定精度はごく低濃度の部分を除けば、きわめて平坦で広い測定範囲にわたって安定した CV% を示すと考えられる。またキット間の precision profile にも大差はなかった。

本キットと栄研キットの間には $r=0.988$ ときわめて良い相関を示した。しかし、本キットにおいては、栄研キットによる測定値に比し、低濃度部分でやや高く、高濃度部分で低い傾向があった。このことは正常値の比較にもみられ、栄研キットでは従来 $1.44 \pm 0.67 \mu\text{IU}/\text{ml}$ を正常値としてきたが、本キットでは $4.33 \pm 2.14 \mu\text{IU}/\text{ml}$ となった。しかし、本キットの最低測定可能濃度は、 $0.25 \mu\text{IU}/\text{ml}$ 以下と非常に Rodbard 法では $0.17 \mu\text{IU}/\text{ml}$ (5% 危険率) と計算された。つまり十分低濃度まで測定できる性能を有していると言える。すなわち、正常値が栄研キットに比してやや高いのは、本キットが低濃度の測定ができないためではない、むしろ、本キットが十分低濃度まで測定できるために生じた現象とも考えられるが、この点に関しては、他キットも含めてさらに検討が必要であろう。

V. ま と め

以上 Magic TSH キットの測定法について検討を行った。本キットは簡便で、高い再現性を有し、また最低測定濃度も十分低いと言える。これらの点から、本キットは、基礎的検討結果からは TSH 測定法とし十分利用し得るものと考える。

文 献

- 1) Pourfarzaneh M, Sandy K, Johnson C, et al: Production and use of magnetizable particles in immunoassay. *Ligand Quart* **5**: 41-47, 1982
- 2) 山田英夫, 黒田 彰, 矢田部タミ, 他: log-logistic および log-logit 三次式モデルによる RIA 標準曲線の解析. *Radioisotopes* **30**: 15-21, 1981
- 3) 稲葉妙子, 黒田 彰, 矢田部タミ, 他: 老年者における甲状腺ホルモン, 老人ホーム入居者, 外来・入院患者の比較. *核医学* **19**: 1357, 1982
- 4) Rodbard D: Statistical estimation of the minimal detectable concentration ("sensitivity") for radio-rigand assays. *Anal. Biochem* **90**: 1-12, 1978
- 5) 山田英夫, 黒田 彰, 稲葉妙子, 他: 二変量解析による RIA の精度管理. *Radioisotopes* 投稿中.