

《ノート》

B/F 分離に磁力を応用した TSH RIA の検討

Evaluation of TSH Radioimmunoassay by Using the Magnetic Separation System for Bound and Free

長田 篤雄* 上野 雅子*

Atsuo NAGATA and Masako UENO

Radioisotope Laboratory, Saitama Medical School

I. はじめに

TSH の RIA は、2 抗体法¹⁾を原点として硫酸アンモニウム²⁾やデキストラン³⁾による分離促進や、ポリエチレングリコールを使用する 1 抗体法⁴⁾、固相を使った IRMA 法⁵⁾、第 2 抗体を固相化した 2 抗体法⁶⁾など、多くの方法が報告されている。しかしビーズ固相法⁷⁾を除くすべての方法で遠心分離操作が必要であり、RIA のシステム化⁸⁾を考える上で重要な関門となっていた。新しく開発された Amerlex-M TSH キットは、Amerlex 粒子中に微細な鉄心を入れ、また粒子表面に第 2 抗体をコーティングした固相法 2 抗体法であり、磁力によって B/F 分離を行う点で、従来の方法と大きく異なっている。基本的には 2 抗体法であるため、第 1 抗体を添加してプレインキュベーションが行えるので、低値における感度を維持でき、また磁力を使って B/F 分離が短時間で終了でき、RIA のシステム化が容易になるものと考えられる。

キットの構成と測定方法

本キットには標準濃度 (0, 0.8, 2.5, 5, 10, 25, 50 $\mu\text{U/ml}$, キットのロットにより多少異なる), 抗

* 埼玉医科大学 RI 研究施設

受付: 60 年 9 月 18 日

最終稿受付: 60 年 11 月 14 日

別刷請求先: 埼玉県入間郡毛呂山町本郷 38 (☎ 350-04)

埼玉医科大学 RI 研究施設

長 田 篤 雄

TSH 家兎抗体, ^{125}I -TSH (10 $\mu\text{Ci}=370 \text{ KBq}$), Amerlex-M 第 2 抗体懸濁液, および NSB 用サンプルが含まれている。基準となる測定方法を Fig. 1 に示す。この方法は Amerlex TSH キット⁶⁾とほぼ同一である。

II. 実験と対象

基礎検討として、インキュベーション条件、再現性、回収率、希釈試験などについて検討し、またマグネチックセパレータを使用した場合と、遠心分離の場合で結果の比較をした。他の測定法との相関性は、第一ラジオアイソトープ研究所の TSH キット (第一)⁹⁾とアマーシャムの Amerlex TSH キット⁶⁾について検討した。また Amerlex M 粒子の錆が結果に与える影響を観察した。

臨床検討としては、健常者 50 例 (男性 35 例, 女性 15 例, 年齢 18 歳~56 歳, 平均 32.5 歳) を測定して正常範囲を設定し、また甲状腺機能亢進症 37 例 (未治療 23 例, 治療 14 例), 甲状腺機能低下症 14 例, 慢性甲状腺炎 14 例, 亜急性甲状腺炎 8 例の測定を行い比較をした。

III. 結 果

1. 基礎検討

1) インキュベーション時間

インキュベーション時間が測定系におよぼす影

Key words: Thyroid stimulating hormone, Radioimmunoassay, Iron cored second antibody particle, Magnetic separation.

響を観察するため、プレインキュベーションを1, 1.5, 2, 3, 24時間と変えて標準曲線と血清試料の値を比較した。また第1インキュベーション時間も1, 1.5, 2, 3, 24時間と変えて、同様な検討を行った。これらの実験において、他のインキュベーション時間は基準時間に固定し、温度はウォーターバスにおいて37°Cを維持した。

プレインキュベーション時間の検討結果を Fig. 2A に示す。1時間でも十分急峻な標準曲線が得られ、時間を延長するに従って結合率が低下し、24時間では24 $\mu\text{U/ml}$ 以上の結合率差が顕著に低下した。同時に測定した血清試料は、中濃度から低濃度にかけて安定した結果が得られたが、高濃度では24時間方法で低値が観察された。

第1インキュベーション時間を変えた場合の標準曲線を Fig. 2B に示す。プレインキュベーションとは逆に、時間延長に伴って急峻な標準曲線となり、測定範囲全体に感度の上昇が認められた。とりわけ24時間方法では、低濃度における結合率の上昇が大きい。同時に測定した血清試料は、中および低濃度では安定しているが、高濃度では時間の増加とともにやや低く測定される傾向を認めた。

2) インキュベーション温度

インキュベーション温度が測定系に与える影響を観察するため、すべてのインキュベーションを

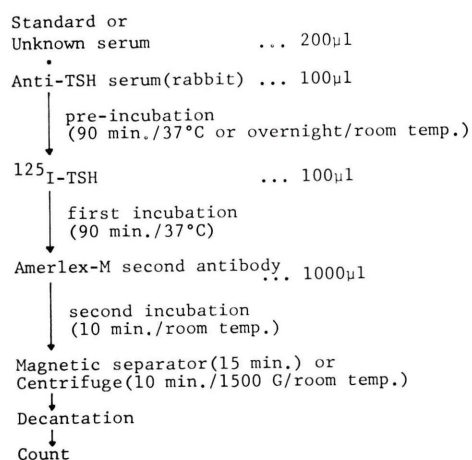


Fig. 1 Assay procedure of the Amerlex-M TSH kit (Amersham).

室温 (23°C), 37°C, 4°C のそれぞれに固定し、標準曲線と血清試料の値を比較した。この実験では、他の測定条件を基準方法に固定した。Fig. 3 に示

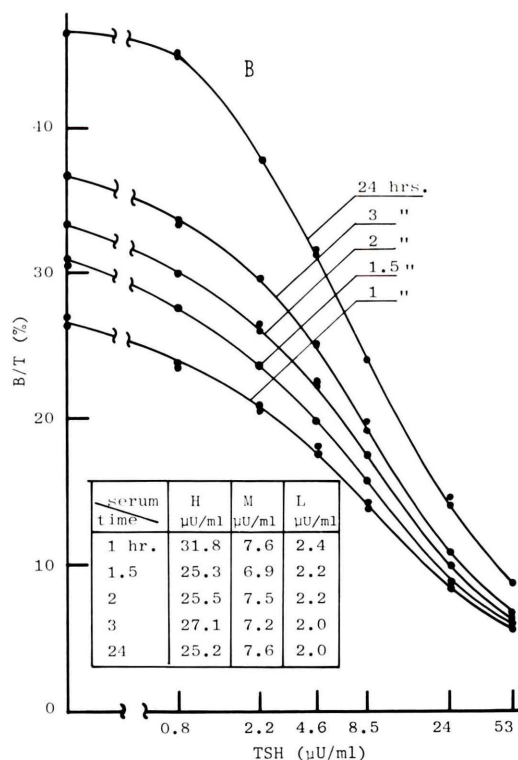
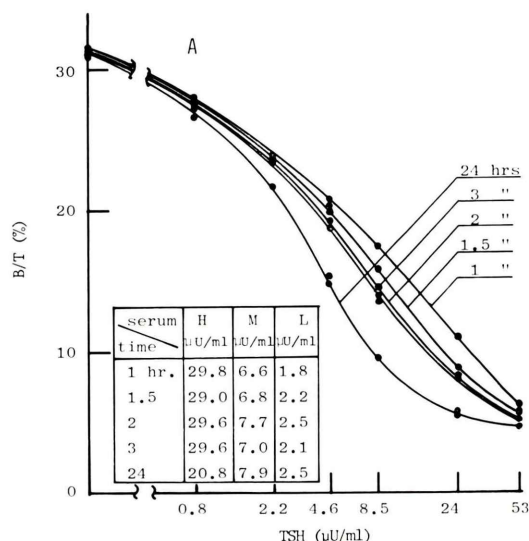


Fig. 2 Influence of the pre (A) and the first incubation time (B) on the standard curve.

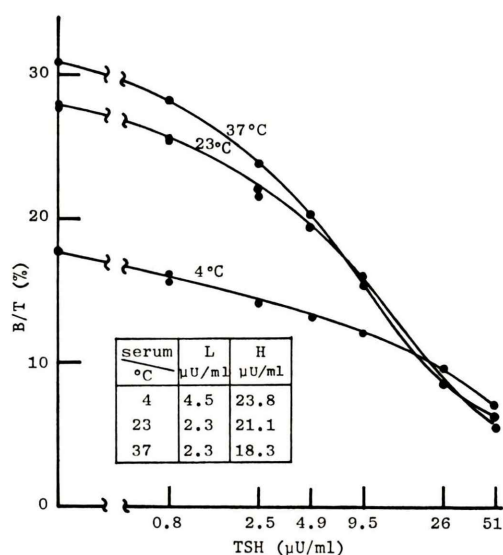


Fig. 3 Influence of the incubation temperature on the standard curve by the original short time assay method.

Table 1

A. Intraassay variance

Control-1	Control-2	Control-3
24.9 μU/ml	8.1	2.5
24.9	7.9	2.2
24.1	7.6	2.2
27.6	7.8	2.0
24.3	7.7	2.1
24.7	7.4	2.1
22.7	7.5	2.7
23.9	7.0	2.4
21.7	7.0	2.4
23.0	7.7	1.9
N=10	10	10
Mean=24.2	7.6	2.3
S.D.= 1.59	0.36	0.25
C.V.= 6.57%	4.74	10.87

B. Interassay variance

Control-1	Control-2	Control-3	kit lot No.
24.2 μU/ml	7.6	2.3	17
23.9	7.2	2.2	15
22.1	7.2	2.5	15
26.0	7.1	3.0	15
N= 4	4	4	
Mean=24.1	7.3	2.5	
S.D.= 1.60	0.22	0.36	
C.V.= 6.64%	3.01	14.4	

すように、室温と 37°C の条件では 5 μU/ml 以上の範囲では大きな差は見られないが、5 μU/ml 以下の低濃度では 37°C の条件が良好であった。

Table 2 Experiments to measure the standard recovery

Base serum	Added standard (μU/ml)	Measured (μU/ml)	Recovered (μU/ml)	Recovery %
A 3.8 (μU/ml)	0	1.7		
	2.2	2.9	1.2	109.1
	8.5	6.3	4.6	108.2
	24.0	13.5	11.8	98.3
B 18.1 (μU/ml)	0	7.5		
	2.2	8.7	1.2	109.1
	8.5	12.3	4.8	112.9
	24.0	19.1	11.6	96.7

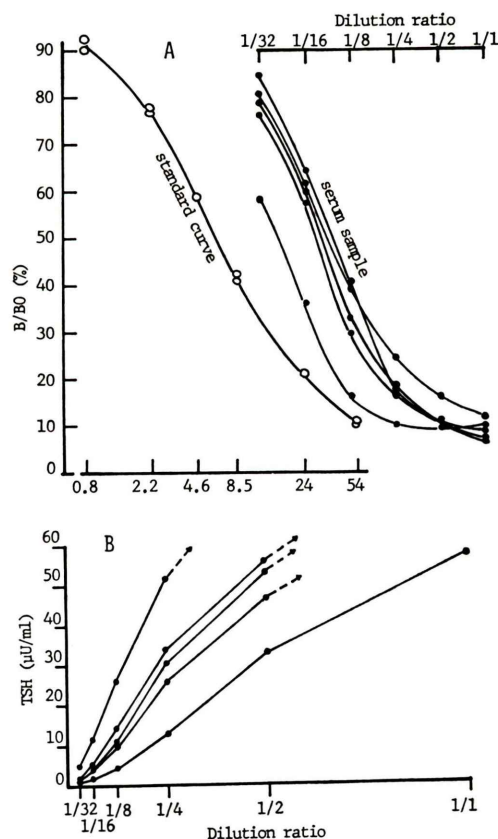


Fig. 4 Comparison of the dose-response curves between the standard preparations and high TSH sera (A), linearity indication of the calibration values by each dilution ratios (B).

3) 再現性

3 種類の血清試料を10回同時測定し、それぞれの結果から変動係数を求めた。Table 1A に示すように平均値 $2.3 \mu\text{U/ml}$ (C) の場合でも $\text{CV}=10.87\%$ であった。

アッセイ間変動は、4 回の測定で 3 種類の血清試料を測定し、変動係数を求めた。Table 1B に示すように低値コントロール血清で $\text{CV}=14.4\%$ と、やや大きい変動が見られた。

4) 回収試験

血清 A と血清 B に等量の標準を添加し、得られた測定値から回収率を求めた。回収率は市原ら

の指摘する方法¹⁰⁾により計算した。Table 2 に示すように、ほぼ $100\pm 10\%$ 以内であったが、測定値が低値では回収率が高く、また測定値が $10 \mu\text{U/ml}$ 以上では 100% 以下を示す傾向があった。

5) 希釈性試験

高濃度血清試料の希釈測定を、原濃度が測定範囲内にある血清と、測定範囲以上を示した血清について、ゼロ濃度標準液で32倍まで希釈し、標準曲線との平行性を観察した。Fig. 4A に示すように最大標準濃度 $54 \mu\text{U/ml}$ 以上の試料では、希釈に伴って若干の結合率の逆転が観察される試料も見られた。すなわち、 $50 \mu\text{U/ml}$ 付近から抗体の

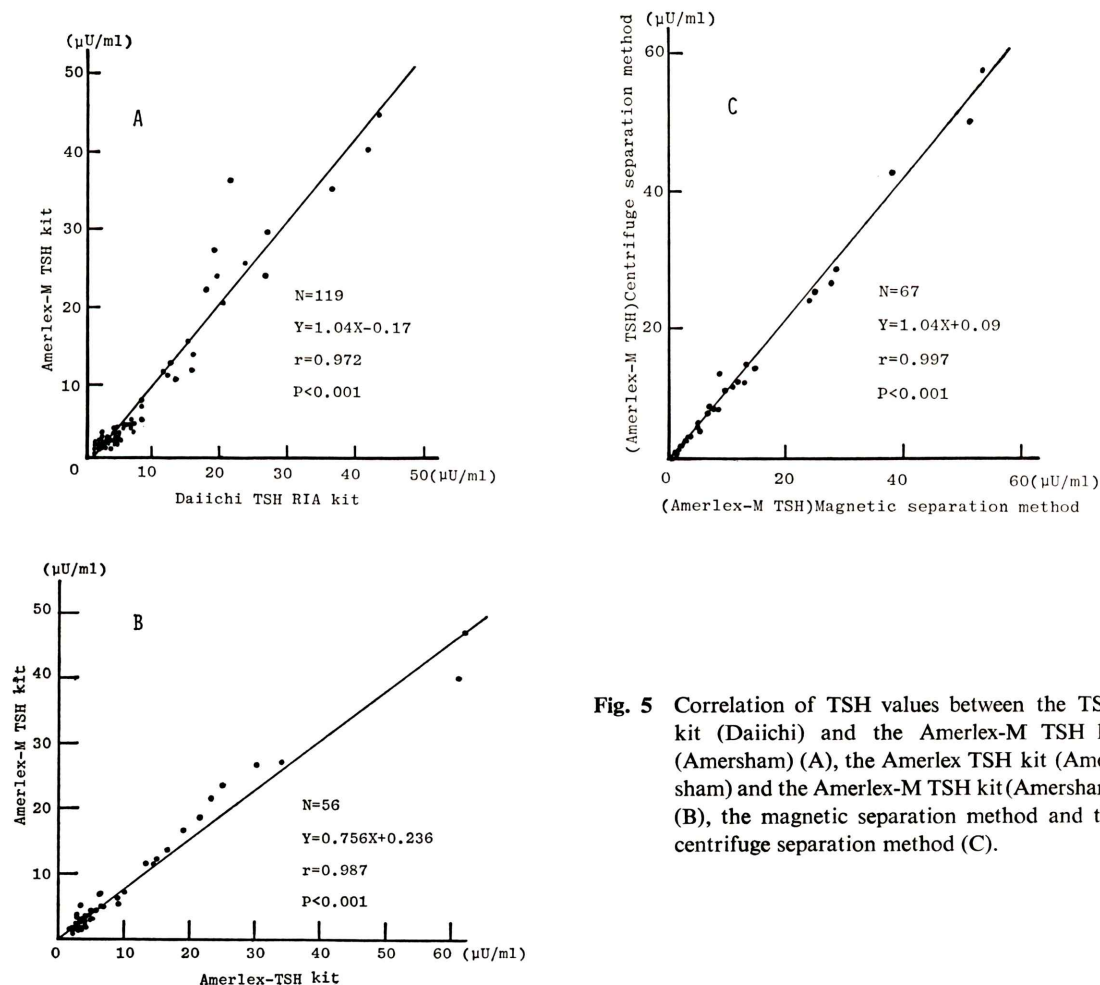


Fig. 5 Correlation of TSH values between the TSH kit (Daiichi) and the Amerlex-M TSH kit (Amersham) (A), the Amerlex TSH kit (Amersham) and the Amerlex-M TSH kit (Amersham) (B), the magnetic separation method and the centrifuge separation method (C).

飽和が始まっているものと考えられる。データは示さないが、 $40 \mu\text{U/ml}$ 以下ではこれらの現象は見られなかった。Fig. 4B に測定値と希釈比率の関係を示すが、希釈測定値であっても $50 \mu\text{U/ml}$ に近い場合はやや頭打ちの傾向が見られた。しかし高倍率希釈になるに従って、ほぼ原点を通る直線に近似した。

6) 他の測定方法との相関

他の TSH 測定方法として TSH キット (第一) と、本キットの前身である Amerlex TSH キットについて比較した。Fig. 5A に示すように TSH キット (第一) との間には $Y=1.04X-0.17$, 相関係数 $=0.972$ が得られた。また Amerlex TSH との相関を Fig. 5B に示すが、 $Y=0.756X+0.236$, 相関係数 $=0.987$ が得られた。測定母集団は少ないが、 $30 \mu\text{U/ml}$ までは良く一致している。

7) 遠心分離法との比較

本キットは B/F 分離を磁力で行うよう設計されているが、遠心分離によっても B/F 分離ができる。そこで両法における相関を Fig. 5C に示した。 $Y=1.04X+0.09$, 相関係数 $=0.997$ が得られ、両法の差異はみられなかった。

8) Amerlex M 粒子の錆の影響

Amerlex M 粒子は微細鉄粉にプラスチック膜をコートし、表面に第 2 抗体を結合してあるが、鉄の錆が測定に影響をおよぼす可能性がある。そこで Amerlex M 第 2 抗体液に 9% (w/w) の食塩を加えて錆化を助長するようにし、2 週間放置後、抗 TSH 抗体との結合能力を食塩を加えない Amerlex M 第 2 抗体液と比較した。Fig. 6A に示すように両者間に有意な差は見られなかった。また錆によってプラスチック面が鉄心から剝離し、磁力による分離が不可能な場合も考えられるので、最初に Amerlex M 粒子をマグネットで分離し、この上清について抗 TSH 抗体との結合能力を調べた。Fig. 6B に示すように未処理 Amerlex M との間に、ほとんど差が見られなかった。

2. 臨床検討

健常者と甲状腺疾患患者の TSH 濃度を Fig. 7 に示す。健常者 50 名の測定値について、平均値 (M), 標準偏差 (SD) を求め、 $M \pm 2 \text{SD}$ を正常範囲とすると、 $0.83 \sim 2.9 \mu\text{U/ml}$ が得られた。また対数正規分布性に基いて計算すると、 $0.95 \sim 3.3 \mu\text{U/ml}$ であった。両者にほとんど差がみられないことから、前者の範囲を正常範囲とした。未治

Amerlex-M (lot. 25A) + 9 % (w/w) NaCl ↓ NaCl treated Amerlex-M				
A				
Anti-TSH antibody	100μL	Total counts	Non treated Amerlex-M	Treated Amerlex-M
$^{125}\text{I-TSH}$	100μL	27470	N=5	N=5
↓ incubation (1 hr., 37°C)			Mean (B/T%) = 29.80	Mean (B/T%) = 29.58
Amerlex-M	1000μL		SD = 0.436	SD = 0.398
↓ magnetic separation				
B				
Amerlex-M antibody		Total counts	N=5	N=5
↓ magnetic separation		27470	Mean (B/T%) = 1.754	Mean (B/T%) = 1.826
↓ supernatant recovered			SD = 0.309	SD = 0.169
Anti-TSH antibody	100μL			
$^{125}\text{I-TSH}$	100μL			
↓ incubation (1 hr., 37°C)				
Supernatant	1000μL			
↓ centrifuge (3000 rpm, 30 min.)				
↓ aspiration				

Fig. 6 Comparison of the bound percentages with the non treated Amerlex-M second antibody and NaCl treated Amerlex-M second antibody.

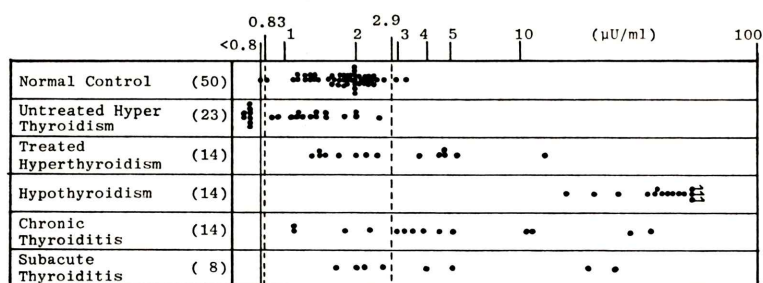


Fig. 7 TSH values with the Amerlex-M TSH kit (Amersham) in various thyroid diseases.

療甲状腺機能亢進症23例では、 $0.8 \mu\text{U/ml}$ 以下から $2.5 \mu\text{U/ml}$ に分布しており、 $0.83 \mu\text{U/ml}$ 以下は 34.8% であった。これに対し治療群では $1.3 \sim 12.5 \mu\text{U/ml}$ に分布した。甲状腺機能低下症 14 例では、全例 $15.5 \mu\text{U/ml}$ 以上に分布し、正常例とは明瞭に区分された。また慢性甲状腺炎 14 例では $1.1 \sim 36 \mu\text{U/ml}$ に、亜急性甲状腺炎 8 例では $1.6 \sim 26 \mu\text{U/ml}$ に分布していた。

IV. 考 察

本キットは従来の Amerlex TSH キット⁶⁾に、磁力による B/F 分離を応用したものであり、検体の希釈剤や NSB 用サンプル試薬が追加され、また標準液も改良されるなど、内容的に改善されている。

インキュベーション時間を検討したところ、Amerlex TSH と同様な影響がみられた。とくに第 1 インキュベーション時間では指定より長時間とすると十分な結合率が得られ、より急峻な標準曲線となるので望ましい条件と考えるが、測定値に影響はみられなかった。したがって 37°C でプレインキュベーションを 90 分、第 1 インキュベーションを 3 時間とする方法が、最も良好な条件と考える。

測定範囲は、添付標準液の $0.8 \sim 53 \mu\text{U/ml}$ (ロットによって多少変わる) であるが、高値血清試料を希釈して標準曲線との平行性を観察すると、 $50 \mu\text{U/ml}$ 前後から抗体の飽和状態が存在する場合も経験され、このことより $40 \mu\text{U/ml}$ 以上では希釈測定が望ましい。希釈方法は、後述するよう

に本キットが従来法に比較して相当高感度測定に対応しているので、直接 10 倍に希釈し、高精度な範囲で測定することが良いと考える。

測定値の変動率から判断すると、従来からの Amerlex TSH⁶⁾と比較してさらに再現性が改善されている。

他の測定法として、TSH キット (第一)⁹⁾と比較したところほぼ一致する結果が得られ、相関性は良好であった。また Amerlex TSH キットと比較すると、やや高値を示す結果であった。このことは TSH キット (第一) に対しての、Amerlex TSH キットとの関係からも確認された。そこで Amerlex TSH キットの標準液を本キットで測定し、また逆の測定も行ったところ、それぞれの標準液による標準曲線は一致しなかった。いずれの測定法で検討しても、Amerlex TSH キットの標準液に対して、Amerlex M TSH キットの標準液は、 $20 \mu\text{U/ml}$ 以上では高い結合率を示し、 $10 \mu\text{U/ml}$ 以下では低かったので、両者の測定値の関係は標準濃度の違いに起因しているものと考えられる。

B/F 分離を遠心分離によって行い、磁力分離による結果と比較したが、両者はほとんど一致し、いずれを採用しても結果に影響はみられない。しかし磁力分離には遠心分離と異なった現象があるので注意が必要である。すなわち、本法のマグネットは平板で試験管底に密着して使用するが、本来磁力は距離が近いほど強力に作用する力であり、遠心分離による重力のように、分離系全体に均一には作用しないので、分離時には試験管底を磁力

板に密着することが重要である。また液高も影響するので径の大きい試験管を使い、底部の尖った形状のものは避けるべきである。本法の場合最終液量が $1,400 \mu\text{l}$ と多いが、Amerlex M 粒子は Amerlex 粒子より重くまた複数粒子が一团となっているため、液上面に近い粒子は重力で落ち始め、しだいに磁力が加わることから、液上面の粒子が落ちにくい場合には、分離操作中に軽く振盪すれば促進される。

Amerlex M 粒子の鉄心の錆が測定に影響を与える可能性を考えて、食塩を加えた状態を検討したが全く影響はみられなかった。酸性液による処理は pH を変えてしまうため検討の対象としなかった。

臨床成績では、健常者測定値から正常範囲を $0.83 \sim 2.9$ とした。これは Amerlex TSH キットの $6 \mu\text{U/ml}$ 以下⁶⁾ より低値で、下限のある範囲となった。われわれはすでに Amerlex TSH キットの高感度変法で、正常範囲を $0.45 \sim 4.0 \mu\text{U/ml}$ ¹¹⁾ としているが、これと比較すると下限値がやや高い。原因の一つとして、低濃度での標準液と血清検体との間に結合率の解離があることが考えられる。

未治療の甲状腺機能亢進症 23 例の成績では、正常範囲への重なりが 65%、正常範囲以下が 35% であり、正常例と亢進症例の完全な分離には現状の方法では対応できない。そこで本法の最低検出感度を同一ロットのキットによる 4 回の測定の平均によって、Precision Profile 法¹²⁾ で求めたところ $0.17 \mu\text{U/ml}$ であった。これは理論的最低検出感度と考えられ、実測上では $0.4 \mu\text{U/ml}$ 付近が限界なので、高感度変法も検討した。データは示さなかったが、検体量を $200 \mu\text{l}$ のまま、抗 TSH 抗体、 ^{125}I -TSH を $50 \mu\text{l}$ とし、プレインキュベーションを 2 時間、 37°C 、第 1 インキュベーションを 18~24 時間、 37°C とする条件で $0.2 \mu\text{U/ml}$ 以下まで測定可能であった。

本キットの特徴は第 2 抗体を鉄粒子につけたことであるが、すでに報告されている磁力分離法のマグネチック TSH (コーニング)^{13~14)} は、 ^{125}I -TSH 抗体と抗 TSH 抗体結合鉄粒子による IRMA

である点で、本法と大きく異なっている。2 種類のポリクローナル抗体による IRMA は、互いの抗体が displacement を起こす可能性があるが短時間測定に有利である。一方、本法は従来からの 2 抗体法そのものであり安定した測定が可能で、磁力による B/F 分離を応用することで、2 抗体法の進む一つの方向を示したものと言えよう。

V. まとめ

B/F 分離に磁力を応用した 2 抗体法 Amerlex M TSH キットについて検討し、以下の結論を得た。

- 1) インキュベーション条件は、標準法でも可能であるが、第 1 インキュベーション時間を延長することでより急峻な標準曲線が得られる。
- 2) 本法は従来の Amerlex TSH に比較して、より高感度となっており、低濃度における安定性に改善がみられる。しかし正常例と甲状腺機能亢進症例の判別には十分でない。このため $0.2 \mu\text{U/ml}$ まで測定可能な変法も報告した。

また $40 \mu\text{U/ml}$ 以上の高値試料は希釈測定することが望ましい。

- 3) 磁力および遠心操作による B/F 分離法の間、測定値の差は観測されないが、磁力分離の特徴についての理解が必要である。また鉄分の錆が測定に影響を及ぼさないことを確認した。

文 献

- 1) Odell WD, Wilber JF, Paul WE: Radioimmunoassay of thyrotropin in human serum. *J Clin Endocrinol Metab* 25: 1179-1188, 1965
- 2) 長田篤雄, 坂岸良克, 宮前達也: TSH RIA キットの基礎検討. *Radioisotopes* 29: 37-40, 1979
- 3) 満間照典, 野木森剛, 鏑部春松, 他: Radioimmunoassay 法による人血清 TSH 測定. *ホルモンと臨床* 27: 329-334, 1979
- 4) 海瀬和郎, 海瀬信子, 吉田克己, 他: RIA-gnost TSH テストキットの使用経験. *核医学* 18: 555-559, 1981
- 5) 長田篤雄, 上野雅子, 坂岸良克: IMMO PHASE TSH キットの基礎および臨床的検討. *Biomedical Journal* 5: 93-99, 1981
- 6) 長田篤雄, 上野雅子: アマレックス TSH RIA キットの基礎検討. *核医学* 21: 253-261, 1984

- 7) 一矢有一, 馬場裕子, 桑原康雄, 他: HTSH RIA BEAD による血清 TSH の測定. 核医学 20: 99-103, 1983
- 8) 長田篤雄, 宮前達也: RIA キットのシステム化処理の有用性と問題点. 核医学 15: 731-737, 1978
- 9) 竹田洋祐, 池窪勝治, 鳥塚莞爾, 他: 2 抗体 TSH kit の使用経験. ホルモンと臨床 22: 313-318, 1974
- 10) 市原清志, 宮井 潔: RIA の添加回収試験. 臨床検査 26: 114-116, 1982
- 11) 長田篤雄, 上野雅子, 松本 生, 他: ラジオイムノアッセイによる甲状腺刺激ホルモン高感度測定法の開発. Radioisotopes 34: 501-504, 1985
- 12) Hall PE, Ekins RP, Jeffcoate SL, et al: Round Table Discussion on Assay Design, Standardization and Within Laboratory Quality Control (1977), pp. 3-79, IAEA Vienna (1978)
- 13) 小西淳二, 高坂唯子, 御前 隆, 他: イムノラジオメトリック法による血中甲状腺刺激ホルモン濃度の測定. Radioisotopes 33: 643-646, 1984
- 14) 小堺加智夫, 井上和子, 佐藤かつ未, 他: マグネチック TSH (コーニング) キットによる血中 TSH 測定法の検討. 核医学 22: 107-114, 1985