

《ノート》

高感度 TSH 測定 RIA キット RIA-gnost hTSH の 基礎的および臨床的検討

Fundamental and Clinical Study on Serum TSH Using a RIA-gnost hTSH Kit

板垣 洋一* 桜田 俊郎* 吉田 克己* 海瀬 和郎*
海瀬 信子* 深沢 洋* 鈴木 道子* 野村 隆*
米満 京子* 山本 蒔子* 斉藤慎太郎*

Yoichi ITAGAKI, Toshiro SAKURADA, Katsumi YOSHIDA, Kazuro KAISE,
Nobuko KAISE, Hiroshi FUKAZAWA, Michiko SUZUKI, Takashi NOMURA,
Kyoko YONEMITSU, Makiko YAMAMOTO and Shintaro SAITO

Second Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Tohoku University, Sendai, Japan

I. 緒 言

血中 TSH 測定用のキットは現在多数市販されているが、低濃度域の測定に問題があり^{1~4)}、血中 TSH 濃度測定による Euthyroidism と Hyperthyroidism の鑑別は困難であった。また従来の高感度アッセイ⁵⁾ ないし従来のキットの測定法を変更しての高感度アッセイ⁶⁾ は、手技が繁雑となり日数を要する等の難点があり一般化するに至らなかった。このたびわれわれは、血中 TSH 濃度を簡便かつ高感度に測定できる TSH immunoradiometric assay kit (RIA-gnost hTSH kit) を使用する機会を得、基礎的および臨床的検討を行ったので報告する。

II. 方 法

1. キットの内容 (1 キット 100 テスト用)

① ¹²⁵I-抗 TSH マウスモノクローナル抗体 (1 ボトル 10.3 ml)

* 東北大学医学部附属病院第二内科

受付: 60年10月18日

最終稿受付: 61年1月22日

別刷請求先: 仙台市星陵町 1-1 (☎ 980)

東北大学医学部附属病院第二内科

板垣 洋一

② 抗 TSH マウスモノクローナル抗体被覆チューブ (100 本)

③ pH 7.2, 0.05 M リン酸緩衝生理食塩水の洗浄バッファー (錠剤 3 個, 1 個を 100 ml の再蒸留水に溶解して使用)

④ 標準 TSH 血清

0, 0.15, 0.5, 1.5, 5.0, 15 および 50 μ U/ml (各 1.0 ml)

2. 測定手技

キットに示された方法に従い、以下のように行った (Fig. 1).

① キット付属の抗 TSH マウスモノクローナル抗体被覆チューブに、TSH 標準血清または被検血清を 200 μ l 加える。

② ¹²⁵I-抗 TSH 抗体を 100 μ l 加える。

③ 室温で 2 時間、振盪しながらインキュベートする。

④ 洗浄バッファーを 1 ml 加えた後、液体成分を吸引除去する。

⑤ ④の操作を再度行う。

⑥ チューブ壁に結合した ¹²⁵I の放射能をガン

Key words: TSH, Thyroid, Radioimmunoassay, Immunoradiometric assay.

マカウターで測定する。

⑦ 標準血清の測定値から標準曲線を求め、被検血清中の TSH 値を読みとる。

III. 実験内容および対象

基礎的検討として、インキュベーション時間および温度の標準曲線への影響、キット内ならびに

キット間の再現性、回収率、被検血清希釈の影響などについて検討を行った。

臨床的検討は、東北大学第二内科入院中および外来通院中の未治療バセドウ病33例、原発性甲状腺機能低下症12例、結節性甲状腺腫22例、亜急性甲状腺炎(急性期)10例、Silent thyroiditis 12例、Nothyroidal illness 10例、妊婦28例(妊婦第1期8例、第2期9例、第3期11例)および正常対照者132例(男性53例、女性79例)を対象として行った。

IV. 結 果

1. 基礎的検討

1) インキュベーション時間の検討

室温にて、インキュベーション時間を1時間、2時間および3時間とした時の標準曲線は Fig. 2 のごとくであり、結合率は時間とともに増大し、高濃度においてその影響がみられたが、インキュベーション時間の変化による標準曲線の勾配の変化は少なく、いずれのインキュベーション時間においても良好な標準曲線が得られた。

2) インキュベーション温度の検討

インキュベーション時間は2時間とし、温度を、

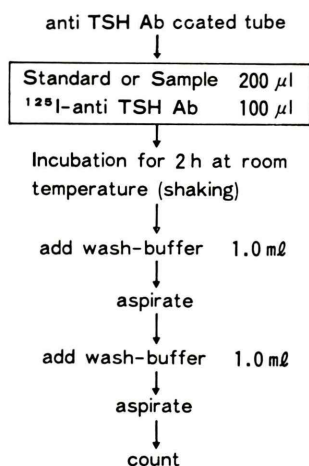


Fig. 1 Assay procedure for RIA-gnost hTSH kit.

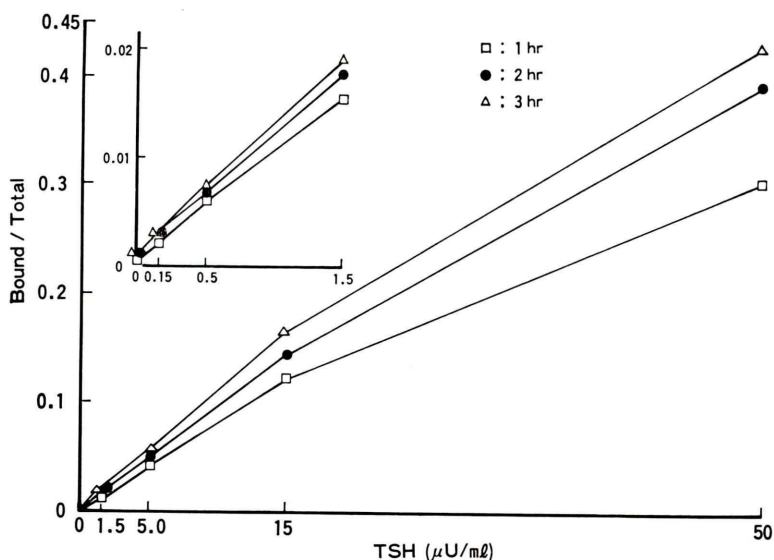


Fig. 2 Effect of incubation time on TSH standard curve.

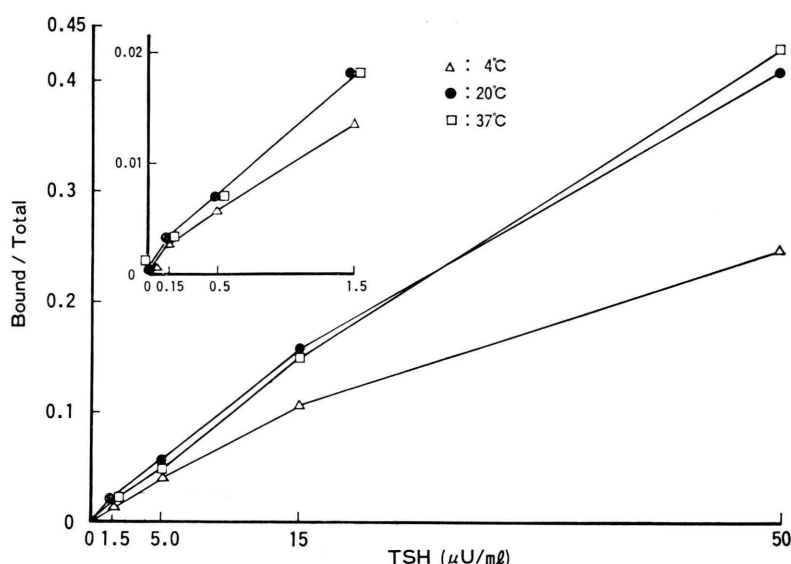


Fig. 3 Effect of incubation temperature on TSH standard curve.

Table 1 Recovery rate

Sample	Added TSH (μU/ml)	Measured TSH (μU/ml)	Recovery (%)
A	0	0.46	
	0.075	0.59	110
	0.25	0.68	96
	0.75	1.12	93
	2.5	2.35	79
	7.5	6.17	77
B	0	4.78	
	0.075	5.82	120
	0.25	5.82	116
	0.75	6.33	114
	2.5	7.62	105
	7.5	11.89	97
C	0	0.35	
	0.075	0.52	122
	0.25	0.62	103
	0.75	1.05	95
	2.5	2.46	86
	7.5	6.63	84

mean ± S.D. 99.8 ± 14.1

4°C, 20°C, および 37°C としたときの標準曲線は Fig. 3 にみるごとく, 20°C, 37°C ではほぼ同一の良好な標準曲線が得られ, 4°C ではそれぞれの濃度で結合率の若干の低下が認められた。

3) 回収率

3 種類の血清に, キット標準血清を種々の TSH

濃度にて添加し, 求めた回収率を Table 1 に示した。回収率は 77~122% であり, 平均値は 99.8% であった。

4) 希釈試験

キット付属の洗浄バッファーおよび本キットによる測定で not detectable (n.d.) であったバセドウ病血清を用いて, TSH 高値の血清を 2~16 倍に希釈し, その TSH 濃度を測定した。結果は Fig. 4 のごとくであり, バセドウ病血清による希釈では直線性を示し期待値とも一致した。しかし洗浄バッファーによる希釈では, 期待値よりも高値に出る傾向があり, 特に 2 倍希釈時には差異が大であった。

5) 測定値の再現性

(1) Intraassay variation (Table 2)

TSH 濃度低値から高値の 4 種類の血清を用いて, それぞれ 10 検体を測定し, その変動係数 (C.V.) を求めた。検体 A では TSH 濃度が低値のため C.V. が 11% であったが, 他の結果は良好であった。

(2) Interassay variation (Table 3)

3 種類の血清について, ロットの異なるキットを用いて 5 回測定した結果を示す。TSH 濃度低

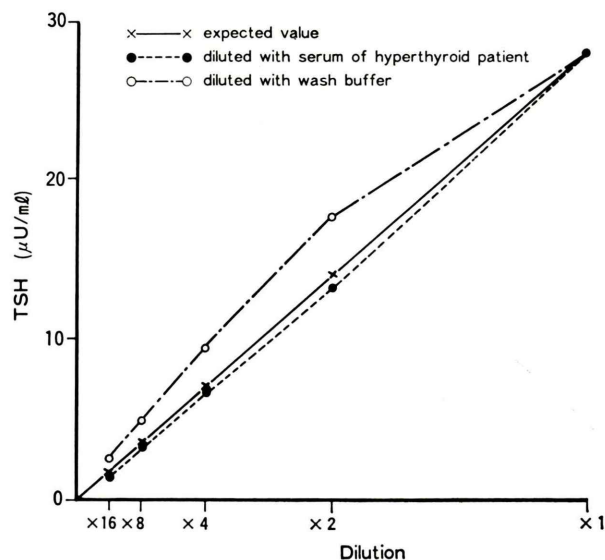


Fig. 4 Effect of serum dilution with wash buffer or TSH free serum.

Table 2 Intraassay variation

No.	TSH ($\mu\text{U/ml}$)			
	Sample A	Sample B	Sample C	Sample D
1	0.20	4.39	12.7	31.5
2	0.21	4.12	11.9	29.9
3	0.18	4.23	11.5	29.4
4	0.18	4.19	11.8	31.6
5	0.17	3.97	12.7	34.6
6	0.25	3.86	13.4	31.0
7	0.19	4.19	12.9	30.4
8	0.20	4.11	12.6	31.4
9	0.21	4.15	12.5	34.3
10	0.22	3.95	11.8	29.1
mean	0.20	4.12	12.4	31.3
S.D.	0.02	0.15	0.6	1.8
C.V. (%)	11	3.5	4.4	5.6

Table 3 Interassay variation

No.	TSH ($\mu\text{U/ml}$)		
	Sample A	Sample B	Sample C
1	0.13	4.39	15.9
2	0.09	3.78	21.5
3	0.11	3.77	18.1
4	0.12	3.80	19.7
5	0.20	4.60	20.9
Mean	0.13	4.07	19.2
S.D.	0.04	0.36	2.03
C.V. (%)	28.8	8.7	10.6

値の検体 A 以外は良好な結果であった。

6) 測定感度

TSH 濃度が $0 \mu\text{U/ml}$ の標準血清 8 サンプルの測定カウント値は $25.3 \pm 17.5 \text{ cpm}$ (mean \pm S.D.) であり, mean + 2 S.D. の cpm 値から求めた最低測定感度は $0.03 \mu\text{U/ml}$ であった。

7) 交叉反応試験

FSH, LH (第 1 ラジオアイソトープ社 RIA キット標準物質) および hCG (Sigma 社) を用いて交叉反応をみた。Fig. 5 のごとく hCG は 5~5,000 U/ml の間で全く交叉反応を認めず, FSH, LH も 2.5~250 mU/ml の間では同様に交叉反応は認められなかった。

2. 臨床的検討

1) 各種甲状腺疾患患者および健常者における血中 TSH 濃度 (Fig. 6)

本キットを用いて測定した健常者 132 例の血中 TSH 濃度は, $0.21 \sim 5.13 \mu\text{U/ml}$ に分布し mean \pm S.D. は, $1.19 \pm 0.81 \mu\text{U/ml}$ であり, 性別では男性 $0.98 \pm 0.43 \mu\text{U/ml}$ (n=53), 女性 $1.33 \pm 0.88 \mu\text{U/ml}$ (n=79) であった。log TSH 値は正規分布を示し, 対数変換後の mean \pm 2 S.D. から求めた正常範囲は, $0.28 \sim 3.42 \mu\text{U/ml}$ であった。

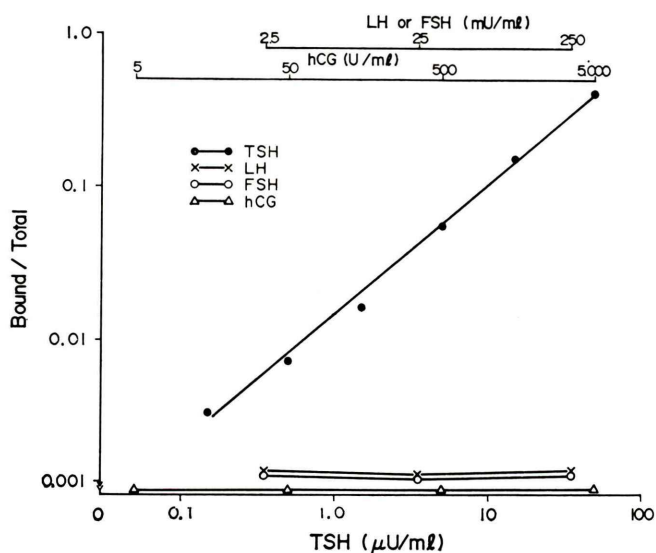


Fig. 5 Cross reaction of TSH antibody with LH, FSH and hCG.

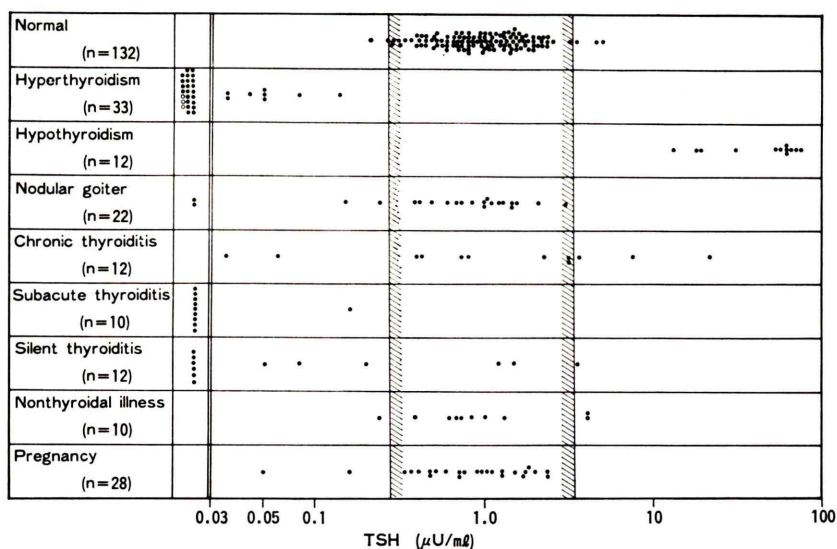


Fig. 6 Serum TSH values of normal control and various thyroid diseases by RIA-gnost hTSH kit (shaded area: normal range, open symbol: postmenopausal women).

未治療バセドウ病では測定感度以下から 0.14 $\mu\text{U/ml}$ に分布し、健常者値との間に重なり合いを認めず、健常者より有意に低値であった。未治療バセドウ病患者に行った TRH test (TRH 500 μg , 静注, 30 分値) では、6 例全例の TSH 値は無反応であった。LH および FSH が高値となる閉

経期以後⁷⁾ のバセドウ病婦人においても TSH 値は低値を示した。また hCG が高値となる妊娠バセドウ病においても TSH 値は低値であった。

原発性甲状腺機能低下症 12 例では、全例が 10 $\mu\text{U/ml}$ 以上で、健常者に比し明らかな高値を示した。

結節性甲状腺腫では、測定感度以下から $3.0 \mu\text{U/ml}$ に分布し、22例中18例は正常値を示した。

亜急性甲状腺炎の急性期では、1例のみが $0.16 \mu\text{U/ml}$ であったが、残りの9例では測定感度以下と全例低値であった。

Silent thyroiditis では、低値ないし正常域に分布した。

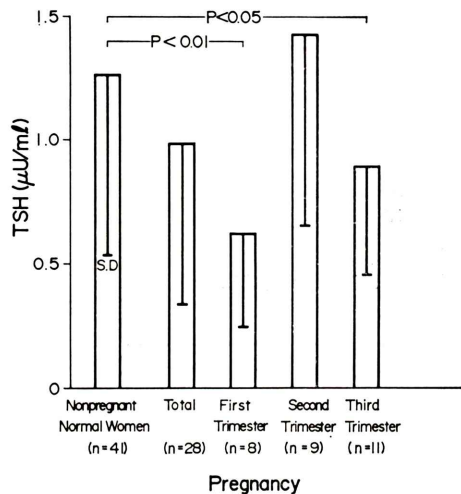


Fig. 7 Serum TSH values of normal control and pregnant women.

low T_3 syndrome を呈した nonthyroidal illness では、 $0.24 \sim 4.22 \mu\text{U/ml}$ に分布し、平均 $1.42 \pm 1.41 \mu\text{U/ml}$ と健常者との間に有意差を認めず、10例中7例が正常値を示した。

妊婦28例では、 $0.05 \sim 2.35 \mu\text{U/ml}$ に分布し、平均 $0.99 \pm 0.65 \mu\text{U/ml}$ であり、19歳から39歳までの非妊娠健常女性41例の TSH 値は $1.27 \pm 0.73 \mu\text{U/ml}$ と両者の間に有意差は認められなかった (Fig. 7). なお妊娠第1期は $0.63 \pm 0.38 \mu\text{U/ml}$, 第2期 $1.43 \pm 0.77 \mu\text{U/ml}$ および第3期 $0.90 \pm 0.44 \mu\text{U/ml}$ と妊娠第1期の TSH 値が最も低値であった。

2) 本キットと他の TSH 測定キットによる測定値の比較 (Fig. 8)

TSH キット Daiichi による TSH 測定値と、本キットによるそれを86例において比較した。血中 TSH 濃度が高値の例では、本キットによる測定値は Daiichi キットによる値より低値を示す傾向がみられたが、両キット測定値の間には相関係数 0.99 ときわめてよい相関が認められた。健常者20例中本キットでは全例の TSH 値は測定可能であったが、Daiichi キットではその測定感度は $1.2 \mu\text{U/ml}$ であり、7例でのみ測定可能であった。

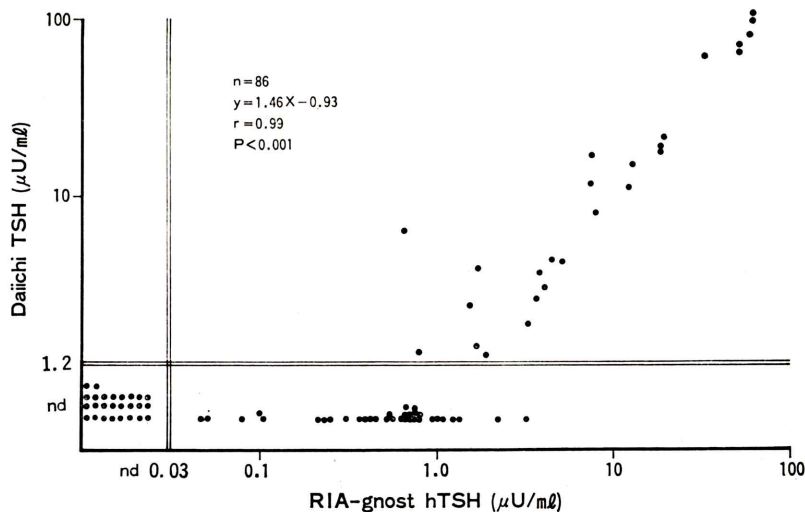


Fig. 8 Relationship of serum TSH values between RIA-gnost hTSH kit and TSH kit Daiichi.

V. 考 案

本キットの抗体としては、TSH の β chain と結合する二種類の異なるモノクローナル抗体が用いられており、一方は Tube の壁に、他方は Tracer に結合している。この二つの抗体が TSH と結合してサンドイッチを形成することにより TSH が測定される。このような測定原理の改良や、特異性の高い抗体を用いることにより測定感度は上昇した。さらに本法は簡便かつ短時間に操作することができ、日常の臨床的使用に適していると考えられた。

基礎的検討では、インキュベーション時間による結合率の差異は少なかった。またインキュベーション温度 20°C および 37°C ではほぼ同一の標準曲線が得られたが、4°C では軽度の結合率の低下を認めた。これらより測定条件としては、キット指示どおりの室温下、2 時間インキュベーションで問題はないと考えられた。

再現性については、Intra および Interassay でともに良好な結果を得た。

また測定感度は 0.03 $\mu\text{U/ml}$ であり、現在市販されている TSH キットの測定感度が 1 $\mu\text{U/ml}$ 前後であることと比較して高感度といえる。

稀釈試験では、キットに付属している洗浄バッファーを用いた場合、期待値よりも若干高い値が得られる傾向がみられたが、バセドウ血清を用いた場合は良好であり、被検血清希釈にはバセドウ血清を用いる方が望ましいと考えられた。回収率の検討でも良好な結果が得られ、内因性の TSH を正確に反映するものと考えられた。

In vitro では、LH、FSH、および hCG のいずれとも交叉反応は認められず、閉経期以後ならびに妊娠バセドウ病患者においても TSH 値は低値となったことから、本法では LH、FSH および hCG による交叉反応の影響はほとんど受けないことが示された。

本法による健常者 132 例の血中 TSH 値は、全例測定感度以上で 0.21~5.23 $\mu\text{U/ml}$ に分布し、平均 1.19 ± 0.81 (S.D.) $\mu\text{U/ml}$ であった。これま

での報告にみられる TSH の正常平均値とその分布は、それぞれ 1.48 ± 0.65 (S.D.) $0.31 \sim 3.1^{(6)}$, 1.49 ± 0.10 (S.E.) $0.5 \sim 4.5^{(10)}$, および 2.0 ± 0.2 (S.E.) $0.5 \sim 5.6^{(11)}$ $\mu\text{U/ml}$ であり、本法による測定値の方が若干低値の傾向を示したもののほぼ一致していた。甲状腺機能亢進症では、ほとんどが測定感度以下ないし低値を示し、正常者との重なりは認められなかった。従来の測定法では、TSH 値による正常者と甲状腺機能亢進症との鑑別は困難であったが本法によりそれが可能となった。また高感度 TSH アッセイによる TSH 基礎値と TRH test の結果が一致することにより、甲状腺機能亢進症の診断には TRH test の必要性が少なくなったとの報告¹²⁾があり、本法を用いた場合も同様のことが言えると考えられた。

亜急性甲状腺炎の急性期ではほとんどの例で血中 TSH は低値であり、甲状腺ホルモン上昇後短期間内に下垂体-甲状腺系のフィードバック機構により、TSH 分泌が抑制されることが示唆された。

結節性甲状腺腫の 22 例中 2 例で TSH 値は測定感度以下であったが、この 2 例の血中甲状腺ホルモン値は正常であり、TSH 低値となる機序に関して検討を要する。

Silent thyroiditis では、TSH 値は多くの例で低値を、少数の例では正常値を示したが、これらの結果には採血の時期や病状の程度が関与しているものと推察された。

Nonthyroidal illness における TSH 値のレベルに関しては多数の報告^{13~16)}がみられるが、low T_3 を呈した今回の例ではほとんどが正常値を示した。

妊婦の TSH 値は、妊娠第 1 期および第 3 期において非妊娠女性より低値であり、特に第 1 期に低い傾向がみられた。妊娠初期において TSH が低下するという結果は、これまでの報告^{17~19)}と一致し、hCG による甲状腺刺激作用²⁰⁾のため TSH は抑制されていることが考えられる。また hCG が高値となる妊娠第 1 期においても、hCG の交叉反応による TSH 値への影響を受けておらず、free T_4 や free T_3 ²¹⁾とともに妊娠時の甲状腺機能のよい指標になると考えられた。

本キットと Daiichi キットとの比較では、両キットによって得られた TSH 値の間には、良好な相関関係を認め、さらに Daiichi キットでは測定感度以下の例でも本キットでは測定可能な健常者例が多数みられた。

以上のように、高感度アッセイが可能となったこと、交叉反応の影響がないこと等の点において本キットの有用性が示されたが、さらに結節性甲状腺腫および慢性甲状腺炎の抑制療法の際における TSH 抑制効果を知ることができ、また甲状腺機能低下症における補充療法中の TSH 値から過剰投与になった場合をも推測することができる等の有用性も考えられた。

VI. 結 論

本キットは最低測定感度が $0.03 \mu\text{U/ml}$ と改善されていることより、TSH 基礎値のみで健常者と甲状腺機能亢進症との鑑別が可能と考えられ、臨床上有用と思われた。

ご校閲を賜った吉永馨教授および妊婦血清を提供して頂いた岡村州博先生に感謝します。

文 献

- 1) 伴 良雄, 田上光益, 飯野史郎: アマレックス TSH キットによる血中 TSH 濃度測定法の基礎的ならびに臨床的検討. 核医学 **20**: 223-229, 1983
- 2) 小西淳二, 中島言子, 飯田泰啓: TSH リアパックによる血中 TSH の測定. ホルモンと臨床 **27**: 1303-1307, 1979
- 3) 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
- 4) 伴 良雄, 渡辺恭行, 長島則夫, 他: Radioimmunoassay による血中 TSH 測定法の基礎的・臨床的検討——含 TRH 試験——. ホルモンと臨床 **21**: 1289-1292, 1973
- 5) Pekary AE, Hershman JM, Parlow AF: A sensitive and precise radioimmunoassay for human thyroid-stimulating hormone. J Clin Endocrinol Metab **41**: 676-684, 1975
- 6) 森 徹, 玉木長良, 石原 隆, 他: TSH ラジオイムノアッセイにおける高感度測定法の検討ならびにその臨床的意義. 日内分泌会誌 **56**: 1231-1239, 1980
- 7) 水口弘司: FSH・LH. ホルモンと臨床 **21** 巻増刊: 42-44, 1973
- 8) Simpson ER, MacDonald PC: Textbook of Endocrinology, 6th edition, W. B. Saunders Company, Philadelphia, 1981, p. 417
- 9) 森 徹: TSH. 日本臨床 **38**: 463-472, 1980
- 10) Wehmann RE, Rubenstein HA, Pugeat MM, et al: Extended clinical utility of a sensitive and reliable radioimmunoassay of thyroid-stimulating hormone. Southern Med J **76**: 969-976, 1983
- 11) Cobb WE, Lamberton RP, Jackson I: Use of a rapid, sensitive immunoradiometric assay for thyrotropin to distinguish normal from hyperthyroid subjects. Clin Chem **30**: 1558-1560, 1984
- 12) Seth J, Kellett HA, Caldwell G, et al: A sensitive immunoradiometric assay for serum thyroid stimulating hormone: a replacement for the thyrotropin releasing hormone test? Brit Med J **289**: 1334-1336, 1984
- 13) Chopra IJ, Hershman JM, Pardridge WM, et al: Thyroid function in nonthyroidal illness. Ann Intern Med **98**: 946-957, 1983
- 14) Wong ET, Bradley SG, Schultz AL: Elevations of thyroid-stimulating hormone during acute nonthyroidal illness. Arch Intern Med **141**: 873-875, 1981
- 15) Wehmann RE, Gregerman RI, Burns WH, et al: Suppression of thyrotropin in the low-thyroxine state of severe nonthyroidal illness. N Eng J Med **312**: 546-552, 1985
- 16) Tibaldi JM, Surks MI: Animal models of nonthyroidal disease. Endocrine Rev **6**: 87-102, 1985
- 17) Yamamoto T, Amino N, Tanizawa O, et al: Longitudinal study of serum thyroid hormones, chorionic gonadotropin and thyrotropin during and after normal pregnancy. Clin Endocrinol **10**: 459-468, 1979
- 18) Harada A, Hershman JM, Reed AW, et al: Comparison of thyroid stimulators and thyroid hormone concentrations in the sera of pregnant women. J Clin Endocrinol Metab **48**: 793-797, 1979
- 19) Guillaume J, Schussler GC, Goldman J, et al: Components of the total serum thyroid hormone concentrations during pregnancy: high free thyroxine and blunted thyrotropin (TSH) response to TSH-releasing hormone in the first trimester. J Clin Endocrinol Metab **60**: 678-684, 1985
- 20) Nisula BC, Ketelslegers JM: Thyroid-stimulating activity and chorionic gonadotropin. J Clin Invest **54**: 494-499, 1974
- 21) 桜田俊郎, 吉田克己, 深沢 洋, 他: Free T_3 の甲状腺機能異常症診断上の意義. ホルモンと臨床 **33**: 81-100, 1985