

《ノート》

## 高感度 TSH IRMA キット : TSH MAIA clone の基礎的ならびに臨床的検討

Fundamental and Clinical Evaluation on a High Sensitive  
Immunoradiometric Assay kit for Serum TSH:  
TSH MAIA Clone Kit

原 秀雄\* 伴 良雄\* 長倉 穂積\* 九島 健二\*  
佐藤 龍次\*

Hideo HARA, Yoshio BAN, Hozumi NAGAKURA, Kenji KUSHIMA and Ryuji SATOU

*The Third Department of Internal Medicine, Showa University School of Medicine*

### I. はじめに

甲状腺刺激ホルモン (以下TSH と略) の血中濃度の測定は, 甲状腺機能の把握, TSH 分泌動態の把握にきわめて重要であり, radioimmunoassay (以下 RIA と略) が確立されて以来, 日常臨床検査に繁用されている。しかし, 現在多くの施設で使用されている RIA キットでは, 最低検出濃度が  $2 \mu\text{U/ml}$  であり<sup>1,2)</sup>, 血中 TSH 濃度が正常上界ないし TSH 高値例における指標としては有用であるが, TSH 低値例での疾患の鑑別や治療の指標としては難点があり, さらに感度のすぐれた血中 TSH 測定法の開発が望まれていた。今回, われわれは frolescence isothiocyanate (以下 FITC と略) 標識抗  $\beta$  鎖モノクローナル抗体, および 2nd. IRP 80/558 を用いた感度のよい TSH キット (TSH Magnetic Immunoradiometric Assay: TSH MAIA clone) を入手し, 基礎的ならびに臨床的検討を行ったので, その結果を報告する。

\* 昭和大学医学部第三内科

受付: 60年12月2日

最終稿受付: 61年4月23日

別刷請求先: 東京都品川区旗の台1-5-8 (☎142)

昭和大学医学部第三内科

原 秀 雄

### II. 方 法

1. 試薬: 本キットの構成は以下のごとくである。

1) 2種類の<sup>125</sup>Iで標識したTSH架橋部に対するモノクローナル抗体(マウス)と, FITC標識抗 $\beta$ 鎖モノクローナル抗体を含むリン酸緩衝液6.6 ml.

2) マグネット粒子結合抗FITC抗体(ヒツジ)を含むリン酸緩衝液13.2 ml.

3) 標準TSHは, 0, 0.5, 1.0, 5.0, 10, 30, 50  $\mu\text{U/ml}$ で, ヒト血清およびアジ化ナトリウムを含み, 2nd. IRP 80/558で検定されている。

4) 洗浄用緩衝液は, phosphate buffer saline 15 ml.

2. 測定操作: 本キットの測定操作の概略をFig. 1に示す。標準TSHあるいは血清試料に2種類の標識抗体を加えてインキュベーションした後, 抗FITC抗体を加えインキュベーションした。そこに洗浄用緩衝液を加え, magnetic separatorに静置分離後, 上清を吸引除去し,  $\gamma$ カウンターにて放射活性を測定した。

**Key words:** 2nd. I.R.P. 80/558, TSH, Immunoradiometric assay, Monoclonal antibody.

III. 対象

対象は、健常者(健康診断にて、問診、理学的所見、血液・生化学検査、検尿を行い異常を認めなかった者) 110例、バセドウ病患者 75例、慢性

甲状腺炎患者40例、単純性び慢性甲状腺腫、結節性甲状腺腫および腺腫様甲状腺腫患者 47例、計 273例で、基礎的検討には、健常者、甲状腺機能低下症患者、未治療バセドウ病患者の血清をプールして用いた。

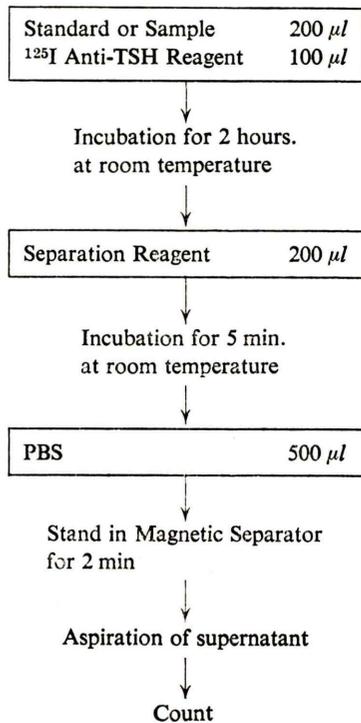


Fig. 1 Assay procedure of TSH MAIA clone.

IV. 結果

1. 同時および日差再現性

異なる4種類の血清で、5回測定した同時再現性および4種類の血清を5回の異なる測定間で測定した場合の日差再現性を変動係数(C.V.)で評価したところ、Table 1に示すとき結果が得られた。すなわち、同時再現性では、TSH濃度 0.6 μU/mlの血清 IにおけるC.V.は8.4%、1.0 μU/mlの血清 IIのそれは8.0%、9.7 μU/mlの血清 IIIでは6.6%、15.9 μU/mlの血清 IVでは3.6%、平均C.V.は6.7%であった。日差再現性は、TSH濃度 0.6 μU/mlの血清 I、1.1 μU/mlの血清 II、9.6 μU/mlの血清 III、15.4 μU/mlの血清 IVにおけるC.V.はそれぞれ16.6%、10.9%、5.9%、4.3%であり、平均C.V.は9.4%であった。

2. 希釈試験

血中TSH濃度 60 μU/mlの血清試料を標準TSH 0濃度血清を用いて、1/2~1/256に希釈した際の希釈試験の結果は、Fig. 2に示すごとくで、128倍まで標準曲線と平行し、0濃度と、256倍希

Table 1 Reproducibility on TSH MAIA clone

I. Within run reproducibility

II. Day-to-day reproducibility

	Serum TSH (μU/ml)					Serum TSH (μU/ml)			
	I	II	III	IV		I	II	III	IV
1	0.6	1.0	9.0	15.0	1	0.5	1.1	10.0	16.0
2	0.6	0.9	9.1	16.0	2	0.7	0.9	9.5	15.5
3	0.5	1.1	10.0	16.0	3	0.6	1.0	9.0	15.0
4	0.6	0.9	10.5	16.5	4	0.7	1.2	10.2	16.0
5	0.5	1.0	9.5	15.6	5	0.5	1.1	9.0	14.5
$\bar{x}$	0.6	1.0	9.7	15.9	$\bar{x}$	0.6	1.1	9.6	15.4
±S.D.	0.05	0.08	0.64	0.56	±S.D.	0.10	0.12	0.56	0.66
C.V.(%)	8.4	8.0	6.6	3.6	C.V.(%)	16.6	10.9	5.9	4.3

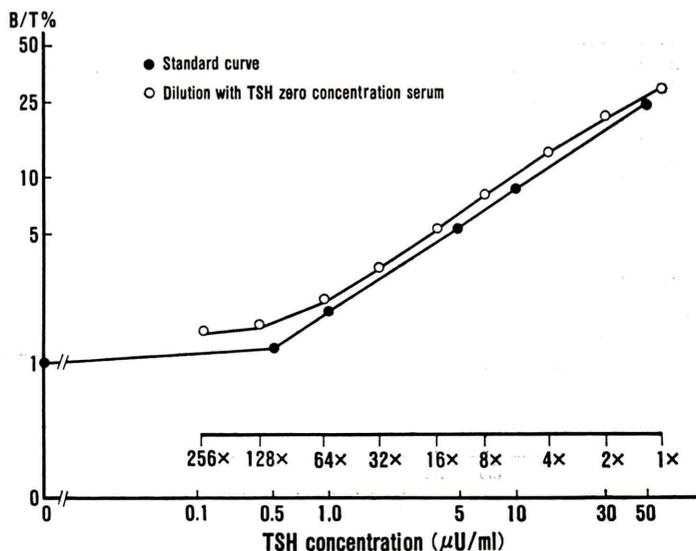


Fig. 2 Dilution test on TSH MAIA clone.

Table 2 Recovery test on TSH MAIA clone

Pooled serum TSH (0.5 μU/ml)				Pooled serum TSH (11.0 μU/ml)		
added standard solution (μU/ml)	measured value (μU/ml)	recovered value (μU/ml)	recovery (%)	measured value (μU/ml)	recovered value (μU/ml)	recovery (%)
0	0.05	—	—	5.3	—	—
0.25	0.35	0.3	120.0	5.6	0.3	120.0
0.5	0.6	0.55	110.0	5.8	0.5	100.0
2.5	2.7	2.65	106.0	8.0	2.7	108.0
5.0	5.0	4.95	99.0	10.0	4.7	94.0
15.0	17.0	16.95	113.0	22.8	17.5	116.6
Mean recovery ±SD			109.6 ±7.82(%)	107.7 ±10.97(%)		

積の B/T%とは有意差がなく、64 倍希釈の B/T%とは有意差がみられたことから、最低検出濃度は 0.5 μU/ml と推定された。

### 3. 添加回収率試験

2 種類のプール血清に、標準 TSH 血清を添加し求めた回収率は Table 2 に示すごとくで、回収率はそれぞれ 99~120% および 94~120% の範囲に分布し、平均回収率はそれぞれ 109.6±7.82% および 107.7%±10.97% であった。

### 4. 交叉試験

特異性をみる目的で各社の TSH 標準溶液および LH, FSH, HCG, β-HCG を用い交叉試験を行ったところ Fig. 3 に示すごとき結果が得られた。LH (2nd. IRP-HMG により検定) とは 8~500 mIU/ml, FSH (2nd. IRP-HMG により検定) とは 8~225 mIU/ml, HCG (2nd. IS, MRC 61/6 により検定) とは 0~3,000 mIU/ml, β-HCG (Dr. Franchimont による) とは 0.06~50 ng/ml で検討した

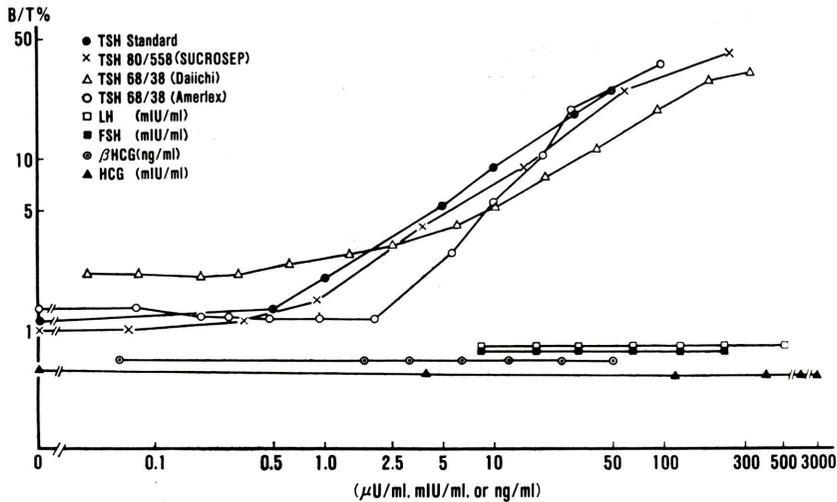


Fig. 3 Cross reaction between antiserum and LH, FSH, β-HCG, HCG standard.

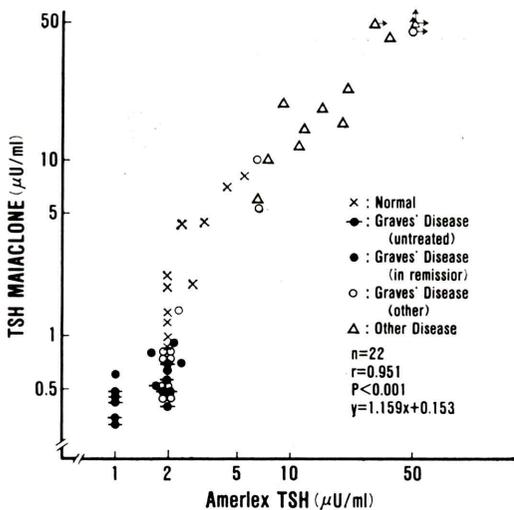


Fig. 4 Correlation of serum TSH concentration between MAIA clone and Amerlex TSH.

が、検討範囲内では交叉性は認められなかった。また、1st. IRP 68/38 により検定された Amerlex TSH, TSH 第一の標準 TSH 血清との比較では、前者では 2.4 μU/ml 以下で B/T% に差は認められず、後者では B/T% の低下の程度が小さいとの結果が得られた。その他、SUCROSEP の標準

TSH 血清との比較も行ったが、0~50 μU/ml の範囲で平行することが確かめられた。

5. 本法と他法との血中 TSH 濃度測定結果の比較

1) Amerlex TSH との比較

50 検体において本法と Amerlex TSH で求めた血中 TSH 濃度を比較したところ Fig. 4 に示すごとくであった。Amerlex TSH 2~50 μU/ml, 本法 0.5~50 μU/ml の範囲の 22 検体における検討では、相関係数は  $r=0.951$ , 危険率  $p<0.001$ , 回帰式  $y=1.159x+0.153$  であった。

2) 森らの変法との比較

30 検体において本法と森らの変法による TSH 第一<sup>3)</sup> で求めた血中 TSH 濃度を比較したところ、Fig. 5 に示すごとくであった。TSH 第一 1.0~50 μU/ml, 本法 0.5~50 μU/ml の範囲にある 18 検体でみると相関係数は  $r=0.939$  で、危険率  $p<0.001$ , 回帰式は  $y=1.693x-2.153$  であった。

3) Enzyme immunoassay (以下 EIA と略) との比較

15 検体において本法および EIA (ベーリンガーマンハイム山之内) で求めた血中 TSH 濃度の比較では、Fig. 6 に示すごとくで、EIA 0.5~50 μU/



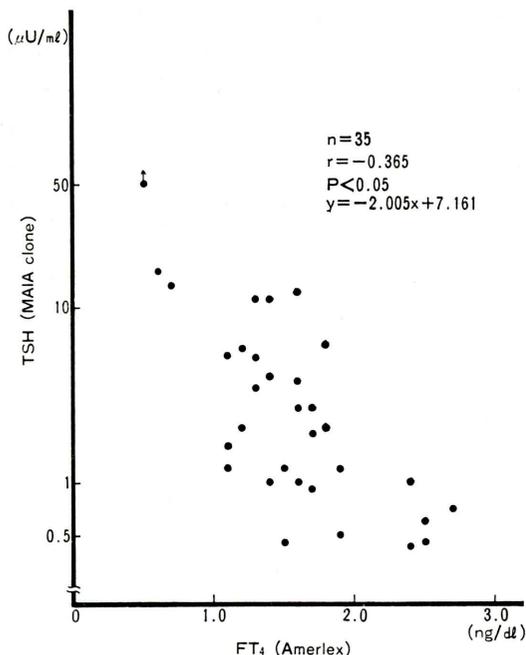


Fig. 8 Correlation between serum TSH and Free T<sub>4</sub>.

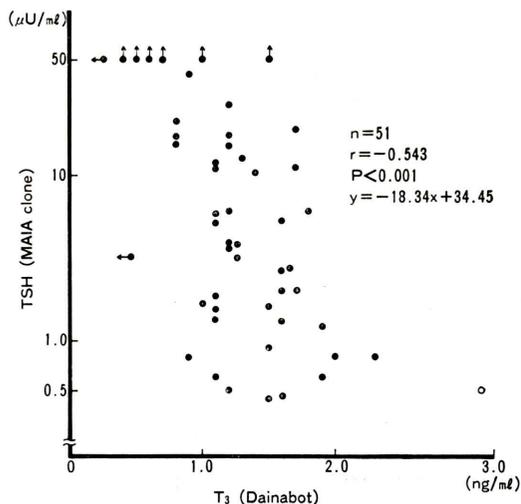


Fig. 9 Correlation between serum TSH and T<sub>3</sub>.

慢性甲状腺炎 40 例のうち、未治療群 10 例では 0.5 μU/ml 以下～50 μU/ml 以上を示し、甲状腺ホルモン剤投与群 30 例では、0.5 μU/ml 以下～11 μU/ml であった。

単純性び慢性甲状腺腫、結節性甲状腺腫、腺腫様甲状腺腫を含むその他の疾患患者 47 例では、治療群、未治療群を含め最低検出濃度以下～50 μU/ml 以上まで広い範囲に分布する成績であった。

一方、血中遊離型 T<sub>4</sub> 値 (FT<sub>4</sub>)、血中総 T<sub>3</sub> 値 (TT<sub>3</sub>) と血中 TSH 濃度の比較を検討しそれぞれ、Fig. 8, Fig. 9 に示した。FT<sub>4</sub> と TSH, TT<sub>3</sub> と TSH との間にはそれぞれ  $r = -0.365$ ,  $p < 0.05$ ,  $y = -2.005x + 7.161$ ,  $r = -0.543$ ,  $p < 0.001$ ,  $y = -18.34x + 34.45$  と負の相関が認められた。

V. 考 案

従来用いられてきた TSH RIA 測定法<sup>1-3)</sup> では、インキュベーション時間が長く、血中 TSH の最低検出濃度も 2 μU/ml 程度であるため血中 TSH 濃度が低値の際の疾患の鑑別に問題があった。森ら<sup>3)</sup> は、さらに感度のよい測定法を開発し、最低検出濃度は 0.156 μU/ml と報告している。今回われわれが希釈試験において最低検出濃度を検討した成績では、0.156～0.5 μU/ml の範囲では有意の差がなく測定は不能との結果であった。一方、Cobbら<sup>5)</sup> は、a new three-site immunoradiometric assay で最低検出濃度 0.2 μU/ml と、Weeksら<sup>6)</sup> は、a two site immunochemiluminometric assay で最低検出濃度 0.004 μU/ml とより感度のよい TSH 濃度測定法が開発が検討され報告されている。今回われわれが検討した TSH MAIA clone は、最低検出濃度は 0.5 μU/ml、その測定範囲は 0.5～50 μU/ml で、インキュベーション時間が 120 分と比較的短時間に測定結果をうる事が可能であった。森ら<sup>3)</sup> の変法は 4 日間を要し、また、EIA<sup>7)</sup> では、その測定範囲は 0.5～50 μU/ml と本法と同様であったが、操作時間が長く、測定が煩雑であった。

あり、ヨード、リチウム、手術、放射性ヨード療法など他の治療を受けているバセドウ病患者 8 例では、最低検出濃度以下～50 μU/ml 以上に分布する成績であった。

本法は標準 TSH として、2nd. IRP 80/558 を用いた最初のキットであり、本キットは 80/558 の濃度

決定にも用いられているが、本法による 80/558 の測定結果は 47 U/Ampule であった。この 2nd. IRP 80/558 は 1st. IRP 68/38 に比べ TSH fragmentation, contamination などの不純物の混入がきわめて少ないと評価されており<sup>8)</sup>、今後の標準 TSH には 2nd. IRP 80/558 が用いられるものと考えられる。

Smith ら<sup>9)</sup>、Pekary ら<sup>10)</sup>、Adams ら<sup>11)</sup>、Cobb ら<sup>5)</sup>、Weeks ら<sup>6)</sup>、森ら<sup>12)</sup>、飯田ら<sup>13)</sup> の成績では、正常成人における血中 TSH 濃度の正常値は、1.4～2.5  $\mu\text{U/ml}$  と報告されているが、本法での健常者血中 TSH 濃度は平均  $2.30 \pm 1.53 \mu\text{U/ml}$  であり、これらの報告とも一致する成績であった。また、甲状腺機能亢進症状を有する患者の成績は 0.5  $\mu\text{U/ml}$  以下に分布し、健常者と未治療バセドウ病患者との間に有意差 ( $p < 0.01$ ) が認められた。寛解期バセドウ病患者や、抗甲状腺剤治療中のバセドウ病患者の血中 TSH 濃度は平均値±標準偏差がそれぞれ  $1.39 \pm 1.21 \mu\text{U/ml}$ 、 $1.53 \pm 1.30 \mu\text{U/ml}$  であり、未治療バセドウ病患者と抗甲状腺剤で治療中のバセドウ病患者および寛解期バセドウ病患者との間にそれぞれ有意差 ( $p < 0.05$ ) が認められ、健常者と寛解期バセドウ病患者との間には差は認められなかった。これらのことから本法は、健常者とバセドウ病患者との鑑別、バセドウ病患者の治療効果の評価に有用であると考えられる。

## VI. 結 語

TSH MAIA clone について基礎的ならびに臨床的検討を行った結果、次のような結論を得た。

- 1) TSH MAIA clone は再現性、特異性にすぐれ、回収率、希釈試験の成績もいずれも良好であり、最低検出濃度も 0.5  $\mu\text{U/ml}$  とすぐれていることが確かめられた。
- 2) Amerlex TSH とは 2～50  $\mu\text{U/ml}$  の範囲で、森らの変法による TSH 第一とは 1～50  $\mu\text{U/ml}$  の範囲で、また、EIA とは 0.5～50  $\mu\text{U/ml}$  の範囲で良好な相関が得られた。
- 3) 健常者血中 TSH 濃度は 0.59～3.4  $\mu\text{U/ml}$  であり、平均値は  $2.30 \pm 1.53 \mu\text{U/ml}$ 、未治療バセ

ドウ病患者では 0.5  $\mu\text{U/ml}$  以下に分布し、健常者との区別が可能であった。

以上の結果より、TSH MAIA clone は血中 TSH 低濃度域における甲状腺機能、下垂体 TSH 分泌機能の評価に有用であり、臨床上多くの利点を有していると結論された。

TSH MAIA clone kit は、スイス、Sereno 社より提供を受けた。

稿を終えるにあたり、新谷博一教授のご校閲に深謝いたします。

## 文 献

- 1) 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. ホルモンと臨床 **21**: 1289-1292, 1973
- 2) 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**: 223-230, 1983
- 3) 森 徹, 尾藤早苗, 伊藤秀臣, 他: 高感度 TSH-RIA 法の基礎的検討. 核医学 **20**: 707-712, 1983
- 4) 斉藤一二三, 石川直文, 井野英治, 他: TSH- $\beta$ サブユニットに特異的モノクローナル抗体を用いたサンドイッチ法による血中 TSH 測定法の基礎的・臨床的検討. ホルモンと臨床 **7**: 669-673, 1984
- 5) Cobb WE, Lamberton RP, Jackson IMD: Use of a Rapid, Sensitive Immunoradiometric Assay for Thyrotropin to Distinguish Normal from Hyperthyroid Subjects. Clin Chem **30**: 1558-1560, 1984
- 6) Weeks I, Sturgess M, Siddle K, et al: A High Sensitivity Immunochemiluminometric Assay for Human Thyrotropin. Clin Endocrinol **20**: 489-495, 1984
- 7) 畑 直成, 海藻明美, 遠藤雄一, 他: エンザイム免疫アッセイによる血中 TSH 測定. ホルモンと臨床 **32**: 907-912, 1984
- 8) Gaines Das RE, Bristow AF: The Second International Reference Preparation of Thyroid-Stimulating Hormone, Human, for Immunoassay: calibration by bioassay and immunoassay in an international collaborative study. J Endocr **104**: 367-379, 1985
- 9) Smith SR, Burton DW, Izenstark JL: Levels of Serum Thyroid-Stimulating Hormone in Hyperthyroidism. Arch Intern Med **139**: 757-760, 1979
- 10) Pekary AE, Hershman JM, Parlow AF: A Sensitive and Precise Radioimmunoassay for Human Thyroid-Stimulating Hormone. J Clin Endocrinol Metab **41**: 676-684, 1975

- 11) Adams DD, Kennedy TH, Utiger RD: Comparison of Bioassay Measurements of Serum Thyrotropin (TSH) and Study of TSH Levels by Immunoassay of Serum Concentrates. *J Clin Endocrinol Metab* **34**: 1074-1079, 1972
- 12) 森 徹: TSH. *日本臨床* **38**: 463-472, 1980
- 13) 尾藤早苗, 伊藤秀臣, 森 徹, 他: 高感度 TSH-RIA 法の基礎的検討. *核医学* **20**: 707-712, 1983
- 14) 飯田泰啓, 高坂唯子, 御前 隆, 他: イムノラジオメトリック法による TSH の測定. *ホルモンと臨床* **32**: 85-90, 1984
- 15) John R, Jones MK: An Automated Immunoradiometric Assay for Human Thyrotropin. *Clin Chem* **30**: 1396-1398, 1984