

## 《ノート》

## モノクローナル抗体を用いた TSH の Immunoradiometric Assay Kit (Sucrosep™) の基礎的ならびに臨床的検討

Fundamental and Clinical Evaluation of Immunoradiometric Assay for TSH Using Monoclonal Antibodies (Sucrosep™)

飯田 泰啓\* 笠木 寛治\* 高坂 唯子\* 御前 隆\*  
 新井 圭輔\* 徳田 康孝\* 小西 淳二\* 鳥塚 莞爾\*  
 森 徹\*\* 井村 裕夫\*\*

Yasuhiro IIDA\*, Kanji KASAGI\*, Tadako KOUSAKA\*, Takashi MISAKI\*,  
 Keisuke ARAI\*, Yasutaka TOKUDA\*, Junji KONISHI\*, Kanji TORIZUKA\*,  
 Toru MORI\*\* and Hiroo IMURA\*\*

\*Department of Radiology and Nuclear Medicine,

\*\*Department of Internal Medicine, Kyoto University School of Medicine, Kyoto

## I. はじめに

甲状腺刺激ホルモン (TSH) は、下垂体前葉より分泌される糖蛋白ホルモンであり、甲状腺ホルモンの分泌調節に重要な役割を果している。今日、血中 TSH の測定は、甲状腺疾患、とりわけ甲状腺機能低下症の診断、経過観察には不可欠なものとなっている<sup>1)</sup>。しかしながら従来の、TSH のラジオイムノアッセイは、感度が不十分であり、甲状腺機能亢進症患者と、健常者との分離ができず、この目的のためには TRH 負荷試験が不可欠であった<sup>2,3)</sup>。これまで TSH の高感度アッセイの開発のため種々の方法が試みられてきたが<sup>4,6)</sup>、最近、モノクローナル抗体を用いた immunoradiometric assay に応用することによって、TSH 測定法の感度を著しく改善することが可能となった。今回、この

方法による Sucrosep™ TSH-IRMA kit を使用する機会を得たので、基本的検討を加えるとともに、その臨床応用を試みた。

## II. 対象および方法

対象は、健常者としては、本院の職員で健康診断で異常なく、血中 thyroxine (T<sub>4</sub>), triiodothyronine (T<sub>3</sub>), T<sub>4</sub> 結合蛋白濃度が正常であった40例と、京大病院甲状腺外来を受診した未治療バセドウ病26例、寛解中のバセドウ病8例、および Euthyroid Graves 病17例、補償療法中の甲状腺機能低下症53例のほか、TRH 負荷試験を実施した60例である。これらの症例を含め、種々の甲状腺疾患患者125症例について TSH 測定用キット「第一」<sup>7)</sup> (以下従来法と略) による TSH 濃度と比較した。

血清 TSH 濃度の測定は Boot-Celltech Diagnostic 社により開発された two-site immunoradiometric 法による Sucrosep™ を用いて行った。本測定キットの測定手順は、まず [<sup>125</sup>I] 標識した intact TSH に対する抗 TSH モノクローナル抗体

\* 京都大学医学部放射線核医学科

\*\* 同 第二内科

受付: 61年1月16日

最終稿受付: 61年6月9日

別刷請求先: 京都市左京区聖護院川原町 54 (☎ 606)

京都大学医学部放射線核医学科

飯田 泰 啓

**Key words:** TSH, Immunoradiometric assay, Monoclonal antibody, Thyroid diseases.



100  $\mu$ l と被検血清 100  $\mu$ l を室温 (15–30°C) で 2 時間反応させた後、TSH の  $\beta$ -subunit に対する固相化抗 TSH モノクローナル抗体 100  $\mu$ l をさらに室温で 1 時間反応させる。このようにして生じた反応複合体に 1 ml の洗滌用緩衝液を加えた後、2 ml の蔗糖溶液を反応液下に注入して 15 分静置する。これによって固相上の反応複合体を遠心操作することなく効率よく沈降分離させ、上清を吸引除去する。再度、同様の操作で反応複合体を洗浄した後沈渣の放射能を測定する。基礎的検討として標準曲線と抗体の特異性、希釈試験および測定値の再現性を検討した。臨床的検討としては、健常者およびバセドウ病患者における血清 TSH 濃度、高感度 TSH 測定値と従来の TSH 測定キットによる測定値との相関、TSH に対する TSH 反応性との関係および甲状腺機能低下症の補償療法の指標としての TSH 測定について検討した。有意差検定は Student の t 検定を用いて行った。

### III. 結 果

#### 1. 基礎的検討

##### 1) 標準曲線と抗体の特異性

標準 TSH 濃度 0.07–244  $\mu$ U/ml の間で良好な標準曲線が得られ、precision profile 法により求めた最小検出感度は 0.1  $\mu$ U/ml であった。また抗体の特異性を検討するため、アッセイ系に MRC の 2nd IRP-HMG により検定されている LHRIA 「第一」キット (第一ラジオアイソトープ研究所製) の標準 HMG および hCG (シグマ社製) を添加した。LH 5–500 mU/ml 相当量の HMG の添加で交叉反応を認めなかった。しかし hCG 5,000 mU/ml の添加ではわずかな結合パーセントの低下がみられた (Fig. 1)。

##### 2) 希釈試験

原発性甲状腺機能低下症患者の TSH 濃度が 320  $\mu$ U/ml の血清を未治療バセドウ病患者の血清を用いて希釈した際の測定値は 640 倍まで直線的な低下を示した (Fig. 2)。

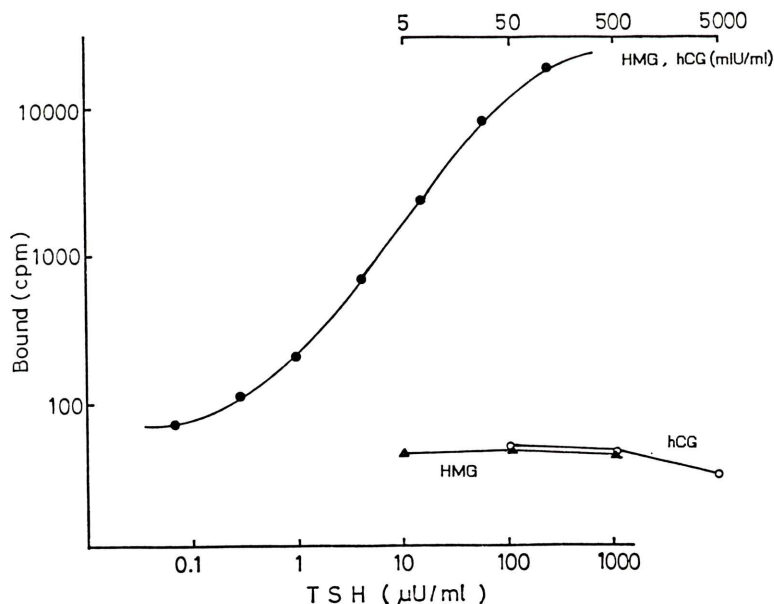


Fig. 1 Standard curve and cross-reactivity of the anti-TSH antibody.



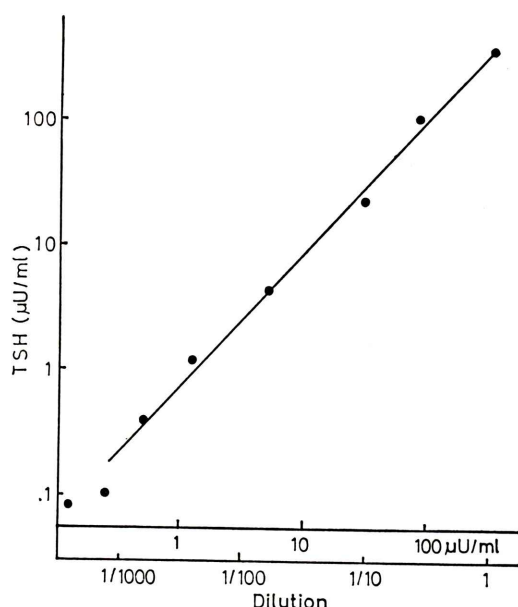


Fig. 2 Dilution curve of the serum from a patient with primary hypothyroidism.

Table 1 Reproducibility of the assay

Intra-assay		Inter-assay	
L	H	L	H
4.9 $\mu\text{U/ml}$	25 $\mu\text{U/ml}$	4.7 $\mu\text{U/ml}$	22.1 $\mu\text{U/ml}$
5.0	25	4.3	21.1
4.9	25	4.9	25.0
4.7	26	4.1	22.0
5.1	26	4.7	26.0
mean	4.9	25	4.5
C.V.	3.0%	2.2%	7.1%
			9.1%

### 3) 測定値の再現性

2種類の異なる TSH 濃度を有する血清を用いて、同一アッセイ内および異なるアッセイ間における測定値の再現性をみた。Table 1 に示すように同一アッセイ内での変動係数はおおよそ 3.0% および 2.2% であり、異なるアッセイ間での変動係数は 7.1% および 9.1% であった。

### 2. 臨床的検討

#### 1) 健常者およびバセドウ病患者における血清 TSH 濃度 (Fig. 3)

健常者 40 例における血清 TSH 濃度は 0.2–9.0

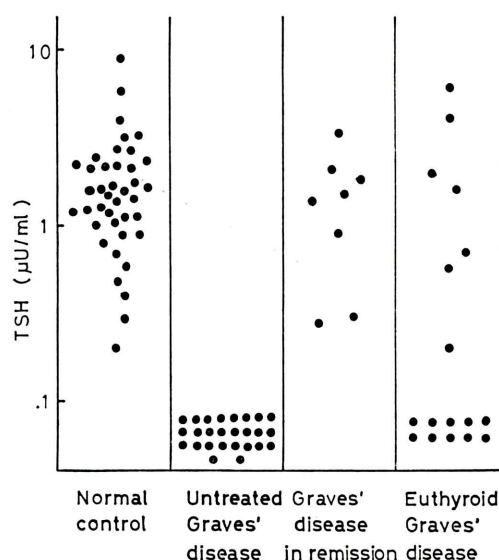


Fig. 3 Serum TSH concentration in normal controls and patients with Graves' disease.

$\mu\text{U/ml}$  に分布し、対数確率紙より求めた 95% 限界値は 0.3–6.5  $\mu\text{U/ml}$  であった。未治療バセドウ病 26 例は全例がアッセイの検出限界である 0.1  $\mu\text{U/ml}$  以下を示し健常者の値と完全に分離された。一方、寛解中のバセドウ病 8 例の TSH 値は 0.3–3.4  $\mu\text{U/ml}$  に分布し、健常者のレベルと同じであった。Euthyroid Graves 病では 0.1 以下から 5.9  $\mu\text{U/ml}$  に分布し、TRH 試験のピーク TSH 値とも有意の相関を示した ( $r=0.832$ ,  $n=7$ ,  $p<0.01$ ).

#### 2) 本キットによる血中 TSH 測定値と従来法による測定値との比較

本キットによる測定値と、従来法による測定値とを 135 検体について比較した (Fig. 4)。両測定値間には  $r=0.926$  と有意の正相関が認められた ( $p<0.001$ )。しかし低値域において本法では従来法に比較して測定値が高値になる傾向が認められ、従来法の測定限界値である 0.5  $\mu\text{U/ml}$  以下を示す 25 検体の測定値は 0.1 以下から 2.7  $\mu\text{U/ml}$  に分布した。また従来法で感度以下であるにもかかわらず本法を用いることにより、TSH 濃度の測定が可能になったものが 11 例あった。



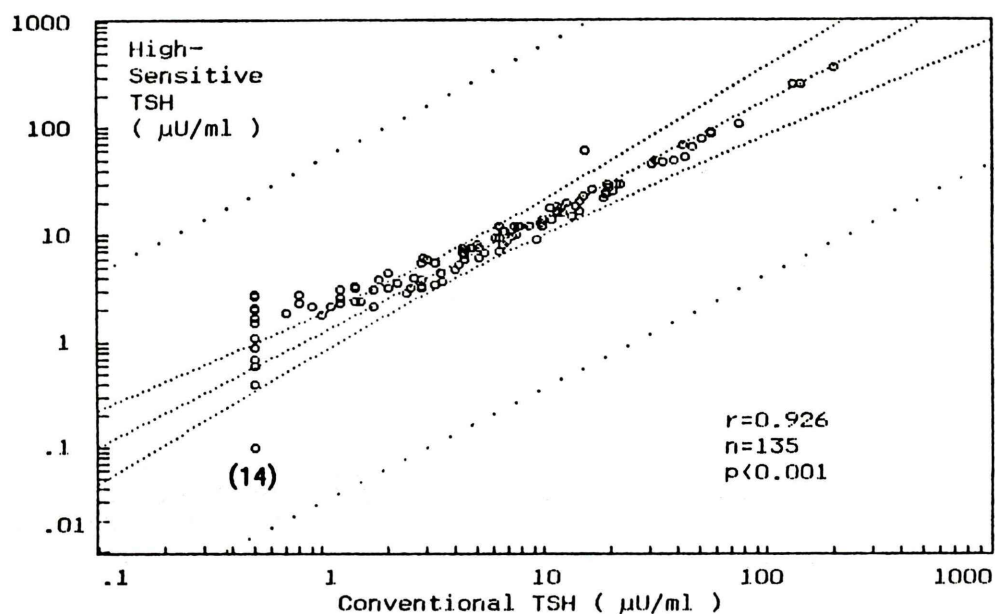


Fig. 4 Relationship between serum TSH values obtained by Sucrose kit and those by conventional RIA kit.

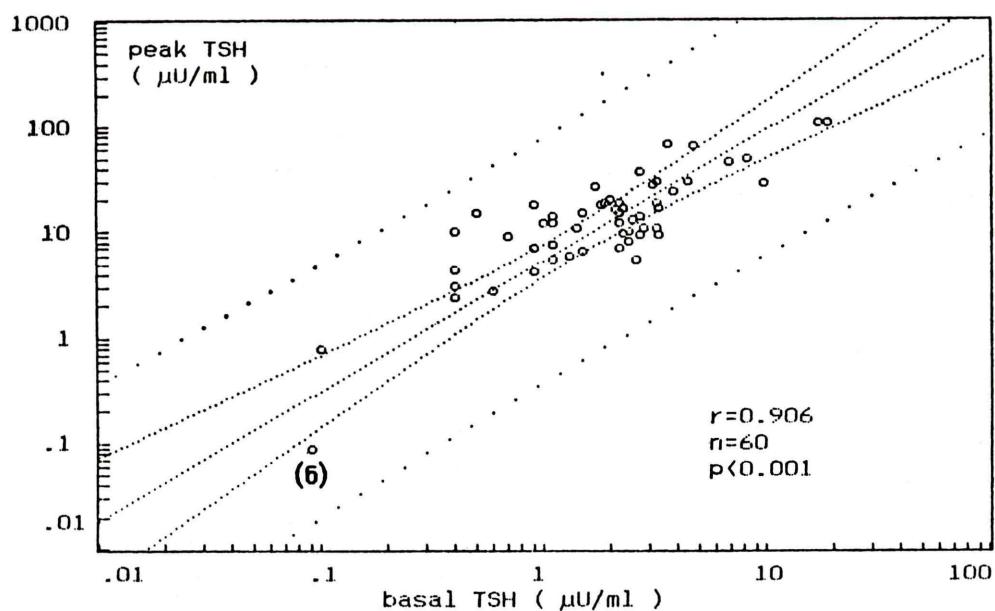


Fig. 5 Relationship between basal TSH value and peak TSH after TRH administration.



## 3) TRH に対する TSH の反応性との関係

本キットでの TSH 測定値と、TRH 試験に対する TSH の反応性との関係を検討するために、TSH の基礎値と TRH 負荷後のピーク TSH 値との相関を検討した (Fig. 5)。TSH 基礎値が測定感度の  $0.1 \mu\text{U}/\text{ml}$  以下の 6 例では全例でピーク TSH 値が  $0.1 \mu\text{U}/\text{ml}$  以下と無反応で、ピーク TSH 値が  $5 \mu\text{U}/\text{ml}$  以下の低反応群では TSH 基礎値が  $0.9 \mu\text{U}/\text{ml}$  以下であったのに対して、ピーク値が  $40 \mu\text{U}/\text{ml}$  以上の過剰反応群での TSH 値は  $2.7 \mu\text{U}/\text{ml}$  以上に分布していた。両者の間には  $r=0.906$  と有意の相関を認めた ( $p<0.001$ )。

また Fig. 4 で示した従来法による TSH 測定値が感度  $0.5 \mu\text{U}/\text{ml}$  以下であった 25 症例のうち 20 症例で TRH 試験を実施した。その結果 TSH 値が本法で  $0.1 \mu\text{U}/\text{ml}$  以下を示した 4 例では TRH 試験は無反応であったのに対して、TRH 反応性を有している症例では全例が本キットによる TSH 測定が可能域にあり、TRH に対する TSH の反応性との間に  $r=0.942$  と有意の正相関が認められた ( $p<0.001$ )。

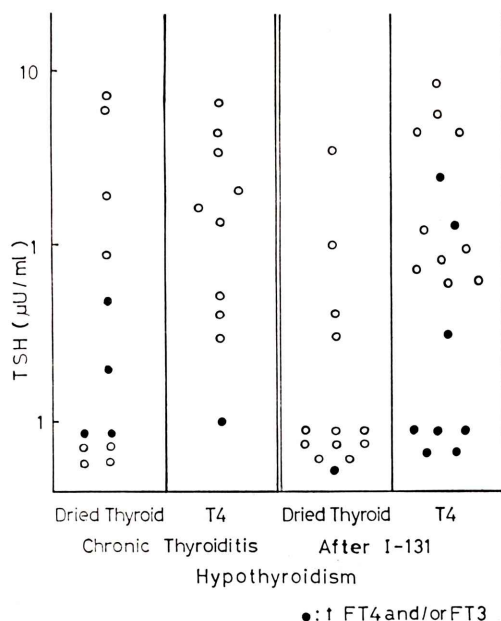


Fig. 6 Serum TSH concentration in the patients with hypothyroidism under replacement therapy.

## 4) 甲状腺機能低下症の補償療法の指標としての TSH 測定

慢性甲状腺炎による甲状腺機能低下症およびバセドウ病のアイソトープ治療後の晩発性機能低下症で、それぞれ乾燥甲状腺末、またはサイロキシン投与で補償療法を行い、従来法での血中 TSH 値が  $10 \mu\text{U}/\text{ml}$  以下で、臨床的に補償療法が良好と判定された症例について得られた TSH 濃度の分布を Fig. 6 に示した。

全体として 53 例中 20 例 (37.7%) で、TSH 濃度が  $0.1 \mu\text{U}/\text{ml}$  以下に抑制されており、乾燥甲状腺末、またはサイロキシンの投与が過剰と考えられた。これらのうち、遊離 T<sub>4</sub> (GammaCoat, トラベノール社製)、または遊離 T<sub>3</sub> (Amerlex, アマーシャム社製) が、高値を示した症例は 8 例であり、他の 12 例では、遊離 T<sub>4</sub> も、遊離 T<sub>3</sub> も正常範囲内であるにもかかわらず、TSH 値が  $0.1 \mu\text{U}/\text{ml}$  以下を示した。

## IV. 考 案

血清 TSH の測定は Odell<sup>8)</sup> らにより、二抗体法ラジオイムノアッセイ (RIA) が開発されてから、広く用いられるようになり、今日では多くの RIA キットが市販され、利用されている。

しかし、これら従来より用いられているキットの感度は、いずれも不十分であり、健常者と、未治療バセドウ病患者との TSH 濃度を分離することはできなかった。最近になり、細胞融合技術の進歩とともに、モノクローナル抗体が RIA にも応用されるようになってきた。TSH の RIA においても、モノクローナル抗体が導入され、従来、不十分であった感度を上昇させることが可能であることがわかってきた<sup>9,10)</sup>。

今回検討したキットは、<sup>125</sup>I 標識した intact TSH に対するモノクローナル抗体と、検体中の TSH とを反応させた後、固相化した  $\beta$ -subunit に対するモノクローナル抗体を反応させるという reverse two-site immunoradiometric assay である。標識したモノクローナル抗体を、アッセイに用いることの利点は、抗原である TSH を標識する場



合に生ずる抗原の変性をより標識操作の容易な抗体標識法を用いることにより回避できること、質的に均一な抗体を無制限に供給できることである。また、モノクローナル抗体は TSH 分子の限られた epitope を認識しており、ポリクローナル抗体を用いる RIA で、常に問題となる交叉反応を減少させることができ、より特異性の高い測定系が作成できる。

ポリクローナル抗体を用いた一部の TSH-RIA においては、低濃度域の感度が上昇する反面、高濃度域の TSH 濃度の測定が不可能にもかかわらず<sup>4,6)</sup>、本キットにおいては、標準 TSH 濃度は、 $0.07\text{--}244\ \mu\text{U}/\text{ml}$  という広範囲で良好な標準曲線が得られ、広範囲の TSH 濃度の血清を希釈することなく測定が可能であった。

交叉反応においても HMG とは全く交叉性を認めなかった。しかし hCG は  $5,000\ \text{mU}/\text{ml}$  の高濃度で、わずかな干渉が認められ、妊娠などの hCG が高値となる場合に TSH の値を低く見積る可能性が示唆された。

希釈試験では、TSH 濃度  $320\ \mu\text{U}/\text{ml}$  の血清を、未治療バセドウ病血清で希釈して実施したが、640 倍の希釈まで、良好な直線性が得られた。しかし血清のかわりに、リン酸緩衝液で希釈した場合には、直線性は失われ、immunoradiometric 法によくみられるアッセイ系の蛋白濃度により、影響を受けることが認められた。

再現性は、アッセイ内およびアッセイ間の変動係数が、いずれも 10% 以下であり、良好な成績であった。

本キットによる、血清 TSH 濃度の正常域は、 $0.3\text{--}6.5\ \mu\text{U}/\text{ml}$  となり、従来法によるものと同等の値であり、また従来法では、測定が不能であった低値域の下限も、測定が可能となっている。未治療バセドウ病では、全例が本キットの測定限界である  $0.1\ \mu\text{U}/\text{ml}$  以下の値を示し、完全に健常者の値と分離することができ、TSH 濃度の測定が甲状腺機能低下症のみならず、甲状腺機能亢進症の鑑別にも有用であることが認められた。抗甲状腺剤治療によって、寛解に至ったバセドウ病の

症例では、全例 TSH 値は健常者のレベルにまで回復しており、軽症バセドウ病の診断とともに、抗甲状腺剤の投与量決定の上でも、良い指標となると考えられた。Euthyroid Graves 病においては、17 例中 10 例 (58.8%) で、TSH 濃度が  $0.1\ \mu\text{U}/\text{ml}$  以下を示し、これらの症例は TRH 試験に無反応であった。この所見は、本疾患においては、甲状腺機能が正常であるにもかかわらず、甲状腺刺激性の抗体によって、甲状腺が刺激された状態にあり、TSH が抑制されていることを示すものである<sup>11)</sup>。

本キットによる測定値と、従来法による TSH 測定値との間には、全体として有意の正相関を認めた。さらに、従来法での測定限界である  $0.5\ \mu\text{U}/\text{ml}$  以下を示した 25 例中 11 例 (44.0%) において、本キットで測定値が得られ、より高感度な測定が可能となっている。TRH 試験における TSH 反応性と TSH の基礎値との間には、有意の正相関があり、本キットで TSH 値の測定限界以下のものは、全例が TRH に対する反応性がなかった。今後、TSH の高感度測定法の普及に伴って、甲状腺疾患においては、TRH 試験に対する依存度が軽減し、TRH 試験の適応は、下垂体や視床下部疾患などで、甲状腺・下垂体系のフィードバック機構を、診断する<sup>1)</sup>場合に限られるようになると考えられる。

甲状腺機能低下症における補償療法のコントロールの指標として、従来、 $T_4$ 、 $T_3$  濃度の測定とともに、TSH 濃度の測定が行われてきたが、TSH 濃度は、正常下限が測定できなかったため、甲状腺ホルモン製剤の過剰投与か否かの判定が困難であった。近年、ラジオイムノアッセイの応用により、遊離  $T_4$  や  $T_3$  の測定が容易となり、過剰投与判定が幾分容易となった<sup>12-14)</sup>。しかし、本キットによる TSH の測定によると、遊離  $T_4$  や遊離  $T_3$  が、正常域にあるにもかかわらず、TSH 濃度が正常域以下に抑制されている症例が存在することが明らかになった。特に、乾燥甲状腺末で補償療法を行っている場合に多い傾向が認められた。



以上の成績より、本キットは甲状腺機能低下症における甲状腺ホルモン製剤の投与量を正しく決めるための指標としても臨床的な意義があると考えられた。

## V. まとめ

モノクローナル抗体を用いた two-site immunoradiometric 法による TSH の測定法 (Sucrosep™) について基礎的ならびに臨床的検討を行った。

1) 標準 TSH 濃度  $0.07\text{--}244\ \mu\text{U}/\text{ml}$  の間で良好な標準曲線が得られ、最小検出感度は  $0.1\ \mu\text{U}/\text{ml}$  と感度にすぐれていることが確かめられた。

2) hCG の  $5,000\ \text{mU}/\text{ml}$  の添加で軽度の干渉があったが、LH  $5\text{--}500\ \text{mU}$  相当量の HMG とは全く交叉反応を認めなかった。

3) 希釈試験および測定値の再現性については満足する結果が得られた。

4) 臨床応用の結果、正常域は  $0.3\text{--}6.5\ \mu\text{U}/\text{ml}$  となり、未治療バセドウ病は、全例が  $0.1\ \mu\text{U}/\text{ml}$  以下に分布し、寛解中の症例では正常域に、また、Euthyroid Graves 病では  $0.1$  以下から  $5.9\ \mu\text{U}/\text{ml}$  であった。

5) 従来法との間には  $r=0.926$  と有意の正相関があったが ( $p<0.001$ )、低値域では高値となる傾向が認められ、従来法で感度以下であったもので、本キットで TSH が測定可能であるものが  $44\%$  あった。

6) TRH 試験に対するピーク TSH 値と TSH 基礎値との間には、 $r=0.906$  と有意の正相関を認め ( $p<0.001$ )、TSH 基礎値の測定で TRH 試験に代わりうると考えられた。

7) 補償療法中の甲状腺機能低下症の中に TSH 濃度が、 $0.1\ \mu\text{U}/\text{ml}$  以下に抑制されているものが  $37.7\%$  みられた。本キットによる血清 TSH の測定は、甲状腺ホルモン製剤の過剰投与の防止にも有用と考えられた。

稿を終るにあたり、キットを提供頂きましたスペシャル・レファレンス・ラボラトリー社に深謝致します。

## 文 献

- 1) Utiger RD: Assay and secretory physiology in man in *The Thyroid*, Werner SC and Ingbar SH eds. Harper & Row, pp. 196–205, 1978
- 2) Ormston BJ, Garry R, Cryer RJ, et al: Thyrotrophin-releasing hormone as a thyroid function test. *Lancet* 2: 10–14, 1971
- 3) Jackson IMD: Thyrotrophin-releasing hormone. *N Engl J Med* 306: 145–155, 1982
- 4) Pekary AE, Hershman JM, Parlow AF: A sensitive and precise radioimmunoassay for human thyroid-stimulating hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 41: 676–684, 1975
- 5) Smith SR, Burton DW, Izenstark JL: Levels of serum thyroid-stimulating hormone in hyperthyroidism. *Arch Intern Med* 139: 757–760, 1979
- 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. *日本内分泌会誌* 56: 1231–1239, 1980
- 7) 竹田洋祐, 池窪勝治, 鳥塚莞爾, 他: 二抗体 TSH kit の使用経験. *ホルモンと臨床* 22: 313–318, 1974
- 8) Odell WD, Wilber JF, Paul WE: Radioimmunoassay of thyrotrophin in human serum. *J Clin Endocrinol Metab* 25: 1179–1188, 1965
- 9) Malter JS, Manotti SE, Knee GR, et al: Identification of hyperthyroid patients by means of a sensitive assay for thyrotrophin. *Clin Chem* 31: 642–644, 1985
- 10) Evans M, Croxson MS, Wilson TM, et al: The screening of patients with suspected thyrotoxicosis using a sensitive TSH radioimmunoassay. *Clin Endocrinol* 22: 445–451, 1985
- 11) 小西淳二, 飯田泰啓, 笠木寛治, 他: Euthyroid Graves' disease におけるヒト甲状腺刺激性 IgG と TSH 結合阻害性 IgG について. 厚生省特定疾患ホルモン受容体異常症調査研究班, 昭和55年度総括研究事業報告書, pp. 105–110, 1981
- 12) 小西淳二, 高坂唯子, 飯田泰啓, 他: Radioimmunoassay によるフリー・サイロキシン測定の臨床的有用性に関する検討. *ホルモンと臨床* 30: 15–21, 1982
- 13) 小西淳二, 高坂唯子, 御前 隆, 他: Radioimmunoassay による血中遊離トリヨードサイロニン濃度の測定. *医学と薬学* 11: 173–180, 1984
- 14) 笠木寛治, 高坂唯子, 御前 隆, 他: 甲状腺疾患における Free  $T_3$  測定の有用性について. I. バセドウ病における Free  $T_3$ , II. 甲状腺機能低下症における Free  $T_3$ —補償療法との関連. *ホルモンと臨床* 33 (秋季増刊号): 101–111, 1985