

## 《ノート》

# 高感度血中 TSH 濃度測定法 (RIA-gnost TSH Ultrasensitive) の基礎的ならびに臨床的検討

Fundamental and Clinical Evaluation on a Highly Sensitive Immunoradiometric  
Assay kit (RIA-gnost TSH Ultrasensitive) for Serum TSH

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 SATO

*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) は, 視床下部より分泌される thyrotropin releasing hormone (以下 TRH と略) により刺激分泌され, 甲状腺ホルモンの合成・分泌を促し, 視床下部・下垂体・甲状腺の feed back mechanism により調節されている. この血中 TSH 濃度の測定は, radio-immunoassay (以下 RIA と略) の登場以来日常臨床で広く用いられているが, 現在使用されている RIA キットは, 最低検出濃度が  $2 \mu\text{U}/\text{ml}^{1-3)}$  であり, TSH 高値を示す原発性甲状腺機能低下症, TSH 産生腫瘍などの臨床応用には有用であるが, TSH 低値の際の疾患の鑑別や治療の指標とすることはむずかしく, TRH 負荷テストによる TSH の反応性から診断されているのが現状である. われわれはすでに, 最低検出濃度が  $0.5 \mu\text{U}/\text{ml}$  であり, 2 種類のモノクローナル抗体を用いた血中 TSH 濃度測定法, TSH Magnetic Immunoradio-

metric assay (IRMA) : TSH MAIA clone を報告したが, このたびチューブ固相法による 2 種類のモノクローナル抗体, すなわち, 抗 TSH  $\beta$  鎖モノクローナル抗体および抗 TSH  $\alpha$ ,  $\beta$  架橋領域モノクローナル抗体, そして 2nd. IRP 80/558 (37 U/Ampule) を用いた TSH IRMA : TSH RIA-gnost Ultrasensitive に関して, 基礎的ならびに臨床的検討を行い良好な結果を得たので, その結果を報告する.

## II. 方 法

### 1. 試 薬

本キットには以下のチューブ, 試薬が含まれている.

- 1) 抗 TSH  $\beta$  鎖モノクローナル抗体 (マウス) をコーティングしたチューブ.
- 2)  $^{125}\text{I}$  標識抗 TSH  $\alpha$ ,  $\beta$  架橋領域モノクローナル抗体 (マウス).
- 3) 標準 TSH は 0, 0.13, 0.45, 1.45, 5, 15, 50  $\mu\text{U}/\text{ml}$  で, ヒト血清を含み, 2nd. IRP 80/558 で検定されている. また,  $2.1 \mu\text{U}/\text{ml}$  のコントロール血清がある.

\* 昭和大学医学部第三内科

受付: 61年1月30日

最終稿受付: 61年8月4日

別刷請求先: 品川区旗の台 1-5-8 (☎ 142)

昭和大学医学部第三内科

原 秀 雄

**Key words:** TSH, Immunoradiometric assay, Monoclonal antibody, Human, Serum.

4) リン酸緩衝液用錠剤.

## 2. 操作方法

本キットの測定操作は Fig. 1 に示すごとくで、200  $\mu$ l の血清を固相化チューブに入れ、 $^{125}$ I 標識抗体を 100  $\mu$ l 加え、室温 (17 から 27°C) にて 2 時間水平回転振盪器にて攪拌混和後、溶液を吸引

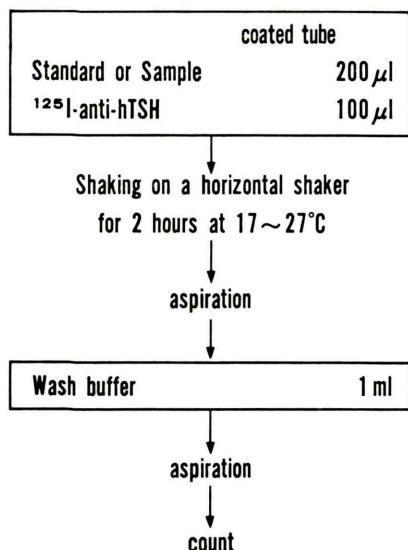


Fig. 1 Assay procedure of RIA-gnost TSH Ultra-sensitive.

除去し、リン酸緩衝液 1 ml にて洗浄し、洗浄液を吸引除去後、 $\gamma$  カウンターにて放射活性を測定する。

## III. 対 象

対象は、健常者 (問診, 理学的所見, 血液・生化学, 尿検査にて異常のない者, 男性 37 例, 女性 58 例, 年齢 18 から 65 歳) 95 例, バセドウ病患者 83 例, 慢性甲状腺炎患者 43 例, 上記以外の疾患患者 (単純性甲状腺腫, 腺腫様甲状腺腫, 末端肥大症, Sheehan 症候群) 49 例, 計 270 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使用した。

## IV. 結 果

### 1. インキュベーション時間

インキュベーション時間を 30, 60, 90, 120 分とした場合の標準曲線の変化を Fig. 2 に示した。30 から 90 分で標準曲線は時間の経過とともに急峻となり、B/T% の上昇が認められたが、90 分以上での B/T% の上昇はほとんどなく、インキュベーション時間は 90 から 120 分で十分と考えられた。

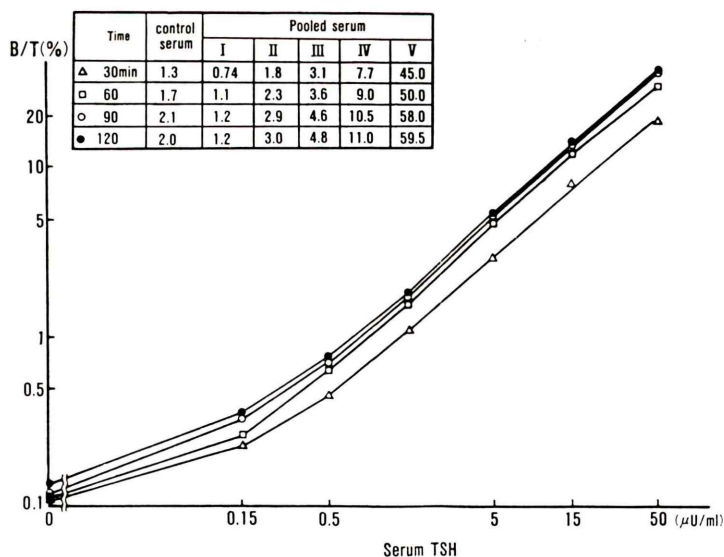


Fig. 2 Effect of incubation time on standard curve.

Table 1 Coefficient of variation

Intraassay (n=10)	Serum I	Serum II	Serum III	Serum IV
mean ( $\mu\text{U/ml}$ )	0.15	1.13	2.59	15.29
S.D.	0.017	0.10	0.12	0.89
C.V. (%)	11.3	8.8	4.6	5.8
Interassay (n=5)	Serum I	Serum II	Serum III	Serum IV
mean ( $\mu\text{U/ml}$ )	0.15	1.12	2.54	14.96
S.D.	0.023	0.08	0.12	0.83
C.V. (%)	15.3	7.2	4.8	5.6

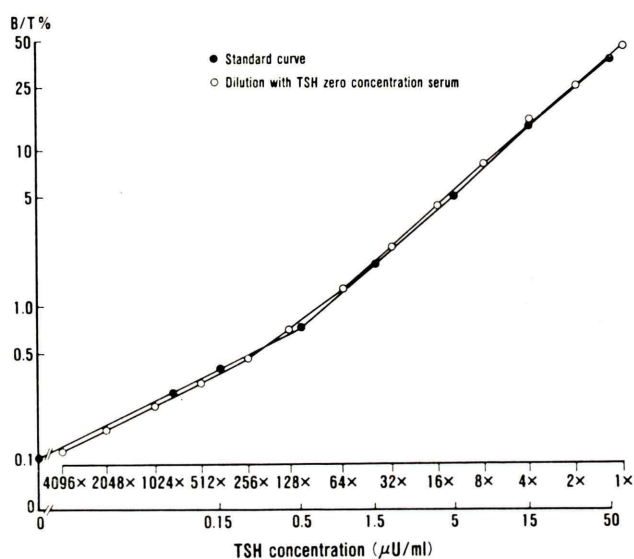


Fig. 3 Dilution curve of serum sample.

## 2. 同時および日差再現性

異なる4種類の血清を用いて行った同時再現性および日差再現性の変動係数(C.V.)をTable 1に示す。同時再現性のC.V.は4.6から11.3%。日差再現性のC.V.は4.8から15.3%であった。

## 3. 希釈試験

TSH 濃度  $50 \mu\text{U/ml}$  のヒト血清を TSH 濃度  $0 \mu\text{U/ml}$  の標準溶液を用いて2から4,096倍に希釈した場合の希釈試験の結果をFig. 3に示す。4,096倍まで標準曲線と平行し、0濃度のB/T%と $0.075 \mu\text{U/ml}$ のB/T%との間に有意差があり、0濃度のB/T%と $0.0375 \mu\text{U/ml}$ のB/T%には

差を認めなかったため、本キットの最低検出濃度は $0.08 \mu\text{U/ml}$ と考えられた。

## 4. 添加回収試験

3種類のプール血清にTSH標準溶液を添加し求めた回収率をTable 2に示す。TSH  $1.2 \mu\text{U/ml}$ のプール血清での回収率は $91.5 \pm 6.47$  (平均値 $\pm$ S.D.)%, TSH  $2.5 \mu\text{U/ml}$ での回収率は $102.0 \pm 4.27$ %, TSH  $10 \mu\text{U/ml}$ での回収率は $91.6 \pm 12.87$ %であった。

## 5. 交叉反応試験と特異性

各種TSH標準溶液およびLH, FSH, HCG,  $\beta\text{HCG}$ を用いて行った交叉反応試験の結果は

Table 2 Recovery

Pooled serum TSH (1.2 $\mu$ U/ml)				Pooled serum TSH (2.5 $\mu$ U/ml)			Pooled serum TSH (10 $\mu$ U/ml)		
added standard solution ( $\mu$ U/ml)	measured value ( $\mu$ U/ml)	recovered value ( $\mu$ U/ml)	recovery (%)	measured value ( $\mu$ U/ml)	recovered value ( $\mu$ U/ml)	recovery (%)	measured value ( $\mu$ U/ml)	recovered value ( $\mu$ U/ml)	recovery (%)
0	0.82	—	—	1.6	—	—	6.8	—	—
0.05	0.86	0.04	80.0	1.65	0.05	100.0	6.84	0.04	80.0
0.19	1.0	0.18	94.7	1.8	0.2	105.2	6.95	0.15	83.4
0.56	1.35	0.53	94.6	2.2	0.6	107.1	7.3	0.5	89.2
1.87	2.6	1.78	95.2	3.4	1.8	96.3	7.5	0.7	112.9
5.62	6.0	5.18	92.8	7.3	5.7	101.4	12.0	5.2	92.5
Mean recovery			91.5	102.0			91.6		
$\pm$ S.D.			$\pm$ 6.47	$\pm$ 4.27			$\pm$ 12.87		

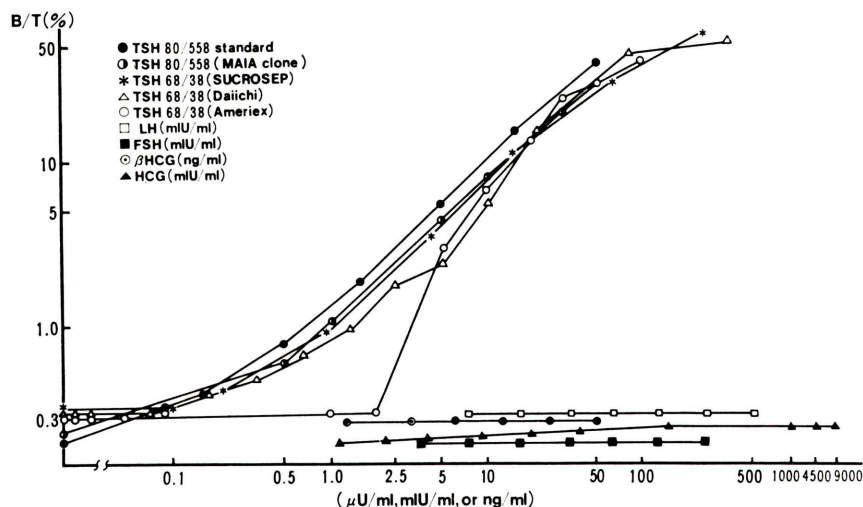
Fig. 4 Cross reaction between antiserum and LH, FSH, HCG,  $\beta$  HCG standard.

Fig. 4 に示すごとくである。LH (2nd. IRP-HMG により検定) 7.8 から 500 mIU/ml, FSH (2nd. IRP-HMG により検定) 3.9 から 250 mIU/ml, HCG (2nd. IS, MRC 61/6 により検定) 1.1 から 9,000 mIU/ml,  $\beta$ HCG (Dr. Franchimont による) 1.5 から 50 ng/ml の検討した範囲では交叉反応性は認められなかった。また, 1st. IRP 68/38 により検定された TSH 第一, Amerlex TSH での標準溶液との比較では, Amerlex TSH 標準溶液 5  $\mu$ U/ml 以下, TSH 第一標準溶液 10  $\mu$ U/ml 以

下で平行性がなくなり B/T% が低下したが, SUCROSEP TSH IRMA では 0 から 50  $\mu$ U/ml の範囲で平行するのが認められた。

#### 6. ヘモグロビン, アルブミン, オレイン酸添加による影響

リン酸緩衝液にヒトヘモグロビン (Sigma) を 0.093 から 1.5 g/dl, ヒトアルブミン (Sigma) を 0.625 から 10 g/dl, オレイン酸 (和光) を 0.125 から 4 mM 添加した場合, 添加前・後で測定値に変化はなかった。また, TSH 濃度 0.95, 2.7,



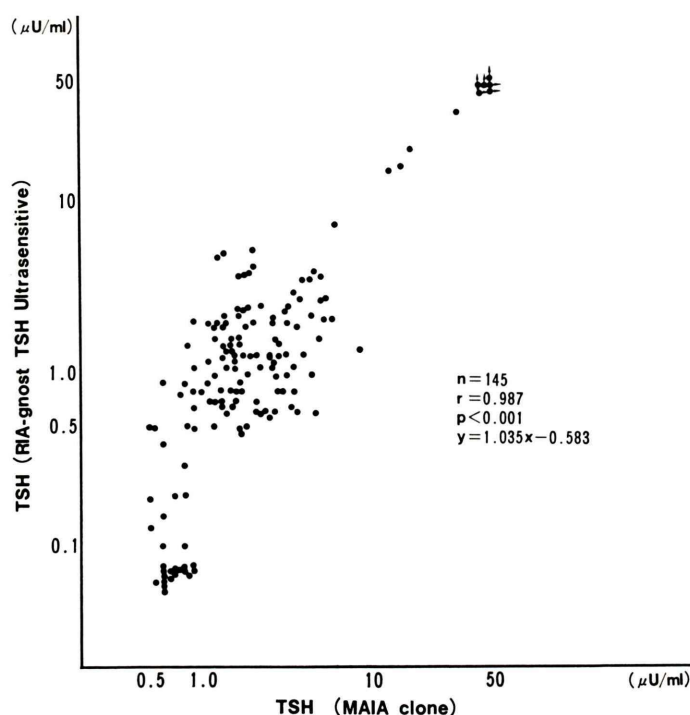


Fig. 5 Correlation of serum TSH concentrations between RIA-gnost TSH Ultrasensitive kit and TSH MAIA clone kit.

4.5  $\mu\text{U/ml}$  のそれぞれの血清にヒトヘモグロビンを 0.375 から 1.5 g/dl, ヒトアルブミンを 2.5 から 10 g/dl, オレイン酸を 0.5 から 4 mM 添加した場合にも測定値に変化を認めなかった。このことにより, ヒトヘモグロビン, ヒトアルブミン, オレイン酸添加による測定系への影響はないものと考えられた。

#### 7. 本法と他法による血中 TSH 濃度の相関

##### 1) 本法と TSH MAIA clone で求めた血中 TSH 濃度の相関

145 検体において本法と TSH MAIA clone (最低検出濃度 0.5  $\mu\text{U/ml}$ ) で求めた血中 TSH 濃度の相関を Fig. 5 に示す。TSH MAIA clone 0.5 から 50  $\mu\text{U/ml}$ , 本法 0.08 から 50  $\mu\text{U/ml}$  の範囲で, 相関係数は  $r=0.987$ , 危険率は  $p<0.001$ , 回帰式は  $y=1.035x-0.583$  であった。

##### 2) 本法と SUCROSEP TSH IRMA で求めた血中 TSH 濃度の相関

140 検体において, 本法および SUCROSEP TSH IRMA (最低検出濃度 0.1  $\mu\text{U/ml}$ ) で求めた血中 TSH 濃度の相関を Fig. 6 に示した。SUCROSEP TSH IRMA 0.1 から 50  $\mu\text{U/ml}$ , 本法 0.08 から 50  $\mu\text{U/ml}$  の範囲で求めた相関係数は  $r=0.982$ , 危険率は  $p<0.001$ , 回帰式は  $y=0.989x+0.143$  であった。

#### 8. 健常者および各種甲状腺疾患患者, 他の疾患患者における血中 TSH 濃度

健常者, パセドウ病患者, 慢性甲状腺炎患者, 他の疾患患者 (単純甲状腺腫, 腫瘍様甲状腺腫などを含む) における本法による血中 TSH 濃度を Fig. 7 に示す。健常者 95 例における測定範囲は 0.25 から 6.2  $\mu\text{U/ml}$ , その平均値  $\pm$  S.D. は  $1.50 \pm 1.31 \mu\text{U/ml}$  であり, 対数確立紙にて求めた正常範囲は 0.3 から 3.4  $\mu\text{U/ml}$  であった。

パセドウ病患者 85 例においては, 未治療パセドウ病患者 32 例の血中 TSH 濃度は全例 0.2  $\mu\text{U/ml}$

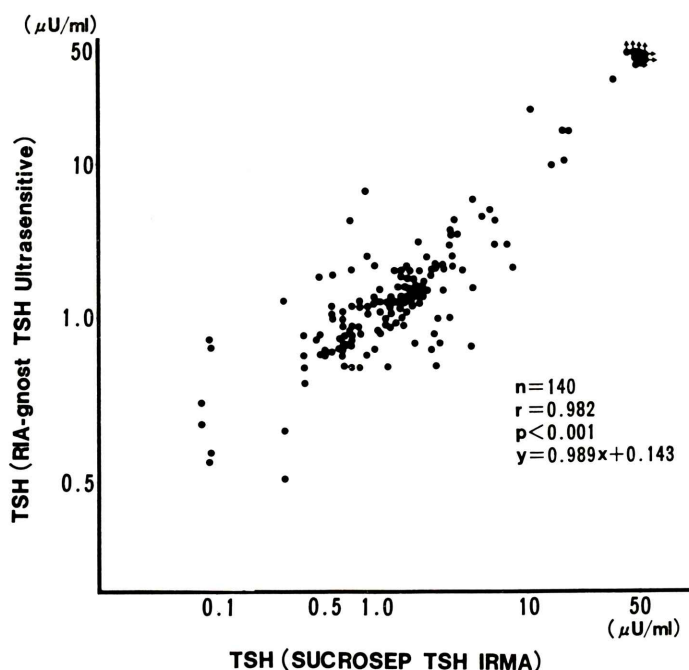


Fig. 6 Correlation of serum TSH concentrations between RIA-gnost TSH Ultrasensitive kit and SUCROSEP TSH IRMA kit.

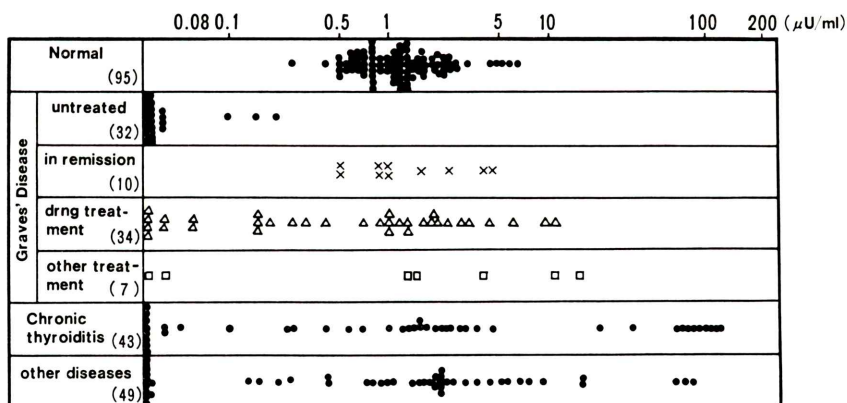


Fig. 7 Serum TSH concentrations in normal subjects and patients with various diseases.

であった。また、寛解期バセドウ病患者 10 例では、ほぼ正常範囲であった。抗甲状腺剤治療中バセドウ病患者 34 例の血中 TSH 濃度は、0.08 以下から 10.8  $\mu\text{U}/\text{ml}$  であった。放射性ヨード療法、手術療法、リチウム療法によるバセドウ病患者 7

例での血中 TSH 濃度は、甲状腺機能が正常、亢進症、低下症であるものを含め、0.08 以下から 30  $\mu\text{U}/\text{ml}$  に分布した。

慢性甲状腺炎患者 43 例では、0.08 以下から 50  $\mu\text{U}/\text{ml}$  以上に分布した。

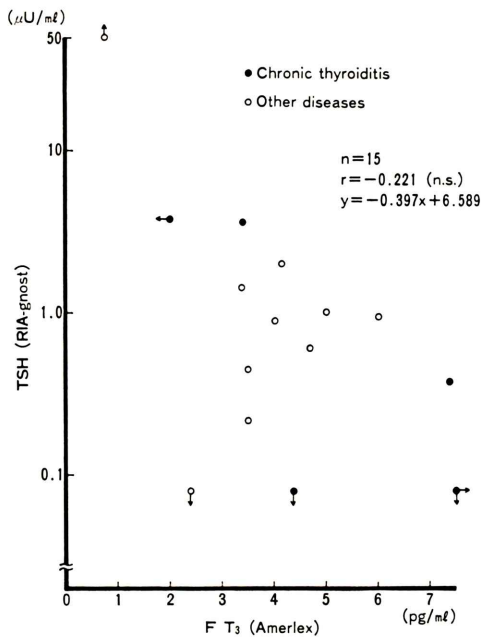


Fig. 8 Correlation between serum TSH and Free T<sub>3</sub> concentrations.

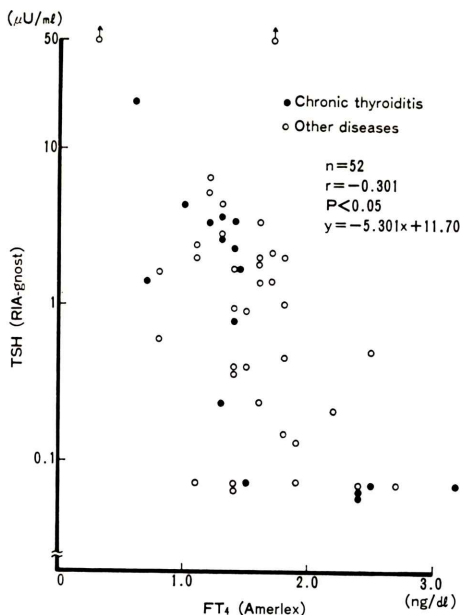


Fig. 9 Correlation between serum TSH and Free T<sub>4</sub> concentrations.

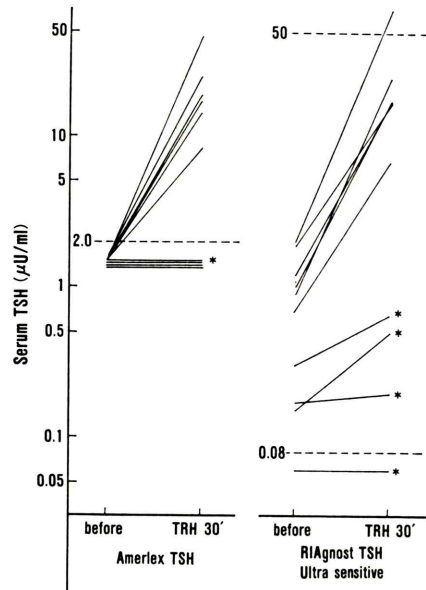


Fig. 10 TRH test in the patients with Graves' disease.

単純性甲状腺腫、腺腫様甲状腺腫などの他の疾患患者 49 例におけるその血中 TSH 濃度は、甲状腺末投与例、未投与例、手術例などを含め 0.08 以下から 50  $\mu\text{U}/\text{ml}$  以上の分布を示した。

#### 9. 血中 TSH 濃度と Free triiodothyronine (Free T<sub>3</sub>), Free thyroxine (Free T<sub>4</sub>) との相関

慢性甲状腺炎患者および他の疾患患者の血中 TSH 濃度と Free T<sub>3</sub>, Free T<sub>4</sub> との相関を Fig. 8, Fig. 9 に示す。TSH と Free T<sub>4</sub> との間には有意 ( $p < 0.05$ ) な負の相関がみられたが、TSH と Free T<sub>3</sub> との間には相関は認められなかった。

#### 10. TSH 低値例における TRH テスト

治療中のバセドウ病患者で、血中 TSH 基礎値が低値 (radioimmunoassay で 2  $\mu\text{U}/\text{ml}$  以下) 例における TRH 負荷 30 分後の TSH の反応結果を Fig. 10 に示す。TRH 負荷 30 分後の血中 TSH が radioimmunoassay では無反応であった 4 例 (図中 \* 印で示す) 中 2 例で、本法ではわずかな TSH の上昇反応が認められ、本法で TSH 基礎値が 0.5  $\mu\text{U}/\text{ml}$  以下の例は、TRH 負荷に対し TSH は低いし無反応であった。

また、異常分娩後、甲状腺剤のみを不規則に服用していた患者で、感染を契機に発症したと思われる Sheehan 症候群の 1 例における TRH テストで TSH 前値 0.41, 15 分値 0.71, 30 分値 0.95, 45 分値 0.97, 60 分値 0.76, 90 分値 0.71, 120 分値 0.61, 180 分値  $0.5 \mu\text{U}/\text{ml}$  とわずかな TSH の上昇反応が認められ、末端肥大症にてハーデイの手術を施行した 1 例での TRH テストで前値 0.9, 15 分値 5.1, 30 分値 8.1, 60 分値 5.4, 120 分値  $3.4 \mu\text{U}/\text{ml}$  と明らかな TSH の上昇反応が認められた。

## V. 考 察

血中 TSH 濃度の測定は、1950 年代から bioassay が行われ、1965 年の Odell ら<sup>4)</sup>の radioimmunoassay による方法が開発され、TSH の測定が日常臨床検査に広く用いられるようになったが、現在普及している radioimmunoassay キットでは  $2 \mu\text{U}/\text{ml}$  が最低検出濃度であり、 $2 \mu\text{U}/\text{ml}$  以下の低濃度が測定できる血中 TSH 濃度測定法の開発が望まれていた。森ら<sup>5)</sup>は、TSH 第一キットの改良で  $0.156 \mu\text{U}/\text{ml}$  まで測定可能であると報告しており、enzyme immunoassay (EIA) による方法<sup>6)</sup>では  $0.5 \mu\text{U}/\text{ml}$  まで測定可能であると報告されている。われわれも最低検出濃度が  $0.5 \mu\text{U}/\text{ml}$  である TSH MAIA clone について検討し報告したが、今回検討した本法では最低検出濃度が  $0.08 \mu\text{U}/\text{ml}$  と優れたものであり、インキュベーション時間も 120 分と短く、希釈試験も良好であった。

本法の標準物質はこれまでのものとは異なり、2nd. IRP 80/558 を用いたものであり、これは 1st. IRP 68/38 と比べて純度が高いものといわれ<sup>7)</sup>、今後この 2nd. IRP 80/558 が標準物質として用いられるであろう。

本法は、ヒトヘモグロビン、ヒトアルブミン、オレイン酸添加により測定系への影響を受けなかったところから、溶血、低アルブミン血症、高脂血症による影響はないものと考えられた。

成人における TSH の正常値は、Cobb ら<sup>8)</sup>の three-site immunoradiometric assay や Weeks ら<sup>9)</sup>

の two-site immunochemiluminometric assay、また、EIA による方法<sup>6)</sup>やわれわれの報告した TSH MAIA clone より  $4 \mu\text{U}/\text{ml}$  以下に分布し、平均 TSH 濃度は 1.4 から  $2.5 \mu\text{U}/\text{ml}$  と考えられ、少なくとも  $0.2 \mu\text{U}/\text{ml}$  を最低検出濃度とする方法が、健常者と TSH 低値を示す疾患の鑑別に必要であろう。われわれが今回求めた本法による正常値は、対数確立紙にては 0.3 から  $3.4 \mu\text{U}/\text{ml}$  で、平均値  $\pm$  S.D. は  $1.50 \pm 1.31 \mu\text{U}/\text{ml}$  と他の報告と一致するものであった。

本法による血中 TSH 濃度と血中遊離甲状腺ホルモンとは、TSH と Free  $\text{T}_4$  との間に有意の負の相関が認められた。一方、他の報告<sup>10)</sup>にもあるように、TSH と Free  $\text{T}_3$  との間には相関は認められなかった。

甲状腺機能亢進症における血中 TSH 濃度は、two-site immunoradiometric assay による方法を報告した John ら<sup>11)</sup>は  $0.2 \mu\text{U}/\text{ml}$  以下を示すとし、Cobb ら<sup>8)</sup>、Weeks ら<sup>9)</sup>はそれぞれ平均値で 0.2,  $0.3 \mu\text{U}/\text{ml}$  と報告しており、われわれが以前検討した TSH MAIA clone においても全例  $0.5 \mu\text{U}/\text{ml}$  以下に分布した。本法では全例  $0.2 \mu\text{U}/\text{ml}$  以下に分布し、未治療バセドウ病患者と健常者との間に明らかな差が認められ、鑑別可能と考えられた。

従来よりバセドウ病患者の治療中の下垂体機能の動態把握に、TRH テストが一段として用いられてきた。今回、治療中のバセドウ病患者において radioimmunoassay による TSH 基礎値が低値の例で TRH テストの反応性を本法で検討した。基礎値が  $0.5 \mu\text{U}/\text{ml}$  以上の患者では正常反応を示し、基礎値が  $0.2 \mu\text{U}/\text{ml}$  以下の患者では無ないし低反応を示したことより、本法による基礎値で TRH 負荷後の TSH の反応も予測しうると考えられた。また、このことからバセドウ病においては immunoradiometric assay による TSH 値が TRH テストにとってかわり、TSH 基礎値のみで視床下部・下垂体・甲状腺の feed back mechanism を推測できる可能性があると考えられた。

今回、異常分娩後感染を契機に発症したと思わ



れる Sheehan 症候群と術後末端肥大症の各 1 例の TRH テストの結果を報告したが、TSH 予備能の把握が本法により今までと比べ正確に評価できると考えられた。

## VI. 結 語

RIA-gnost TSH Ultrasensitive 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) 本法は、再現性、交叉反応性、回収率、希釈試験はいずれも良好であり、最低検出濃度は  $0.08 \mu\text{U}/\text{ml}$  と考えられた。

2) ヒトヘモグロビン、ヒトアルブミン、オレイン酸添加による測定系への影響は、検討した範囲では認められなかった。

3) TSH MAIA clone とは  $0.5$  から  $50 \mu\text{U}/\text{ml}$  の範囲で、SUCROSEP TSH IRMA とは  $0.1$  から  $50 \mu\text{U}/\text{ml}$  の範囲で良好な相関を認めた。

4) 健常者血中 TSH 濃度は  $1.50 \pm 1.31$  (平均  $\pm$  S.D.)  $\mu\text{U}/\text{ml}$  であり、対数確立紙にて求めた正常範囲は  $0.3$  から  $3.4 \mu\text{U}/\text{ml}$  で、パセドウ病患者未治療群は  $0.2 \mu\text{U}/\text{ml}$  以下に分布し、両者の間に差を認めた。

5) Sheehan 症候群、術後末端肥大症患者各 1 例の TRH テストで、TSH の軽度の上昇反応を認めた。

以上より本法は、血中 TSH 低濃度域における甲状腺機能の把握、下垂体 TSH 分泌動態などの臨床応用に有用であると結論された。

稿を終えるにあたり、ご校閲いただいた昭和大学医学部第三内科教授新谷博一先生に深謝します。キットを提供して下さった Hoechst Japan K.K. に感謝します。

## 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) 仁瓶禮之, 広岡良文, 山内一征, 他: HTSH キット『第一』の基礎的, 臨床的検討. ホルモンと臨床 **21**: 1047-1054, 1973
- 4) Odell WD, Wilber JF, Paul WE: Radioimmunoassay of Thyrotropin in Human Serum. J Clin Endocrinol Metab **25**: 1179-1188, 1965
- 5) 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. 日内分泌誌 **56**: 1231-1239, 1980
- 6) 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 EIA 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 **32**: 669-673, 1984
- 7) 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 Endocrinol **104**: 367-379, 1985
- 8) Cobb WD, Lamberton RP, Jackson IM: Use of a Rapid, Sensitive Immunoradiometric Assay for Thyrotropin to Distinguish Normal from Hyperthyroid Subjects. Clin Chem **30**: 1558-1560, 1984
- 9) Weeks I, Sturgess M, Siddle K, et al: High Sensitive Immunochemiluminometric Assay for Human Thyrotropin. Clin Endocrinol **20**: 489-495, 1984
- 10) 尾藤早苗, 伊藤秀臣, 森本義人, 他: Free Thyroxine RIA キット (Amerlex) の基礎的ならびに臨床的検討. 核医学 **19**: 149-156, 1982
- 11) John R, Jones MK: An Automated Immunoradiometric Assay for Human Thyrotropin. Clin Chem **30**: 1396-1398, 1984