



Title	甲状腺刺激ホルモン酵素免疫測定法の開発に関する研究
Author(s)	石橋, 嘉一郎
Citation	大阪大学, 1982, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/33507
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名・(本籍)	石 橋 嘉 一 郎
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	第 5 8 0 0 号
学位授与の日付	昭和57年10月6日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	甲状腺刺激ホルモン酵素免疫測定法の開発に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 宮井 潔 (副査) 教授 藪内 百治 教授 熊原 雄一

論 文 内 容 の 要 旨

〔目 的〕

甲状腺刺激ホルモン (thyrotropin, TSH) の測定は先天性甲状腺機能低下症 (クレチン症) のマススクリーニングなど広く下垂体甲状腺機能検査に用いられている。血中 TSH は非常に微量であるため、その測定は従来専ら高感度のラジオイムノアッセイ (radioimmunoassay, RIA) によっていたが、本法は標識試薬が長期に使用できないことのほか、放射性同位元素 (RI) を用いるため特殊な使用施設や廃棄物処理が必要であるなど多くの隘路があった。そこでこのような問題を解消することを目的として RI を用いない酵素免疫測定法 (Enzyme immunoassay, EIA) の開発を試みた。

〔方法ならびに成績〕

A. Alkaline phosphatase 標識 TSH (Alp-TSH) を用いた二抗体法:

Alp-TSH は Avrameas の方法で作製した。すなわち純化ヒト TSH 100 μ g と alkaline phosphatase 500 μ g の混液に glutaraldehyde を加え、25 $^{\circ}$ C で 3 時間反応後、緩衝液で透析して得た。測定操作は希釈液として 0.05% 牛血清 albumin を含む 0.01 M リン酸緩衝液 pH7.8 を用い、次の通りに行った。標準 TSH 100 μ l または被検血清 100 μ l に Alp-TSH (1% 正常家兔血清を含む希釈液で 1:1600 に希釈) 100 μ l と抗 TSH 家兔血清 (1:16,000 に希釈) 100 μ l を加え 4 $^{\circ}$ C で 72 時間孵置し、次いで第二抗体 100 μ l を加えて 24 時間孵置後、遠心して得た沈澱を 2 回洗浄し、その酵素活性を Kind-King 変法で測定した。

本法による最少測定感度は 1.0 μ U/assay tube であり、血清 100 μ l を用いて 10~320 μ U/ml の測定が可能であった。血清希釈曲線は TSH 標準曲線と良く平行し、希釈度と測定値の間には原点を通

る直線関係が得られた。血清に標準 TSH を20~320 $\mu\text{U}/\text{ml}$ の範囲で添加した際の回収率は79~120% (平均97%) であった。本法での測定精度は同時再現性の変動係数 (C.V.) が2~7%, 日差再現性のC. V.) が10~15% であった。種々の濃度を有する血清検体 (n=10, <10~400 $\mu\text{U}/\text{ml}$) について本法 (x) とRIA法 (y) での測定値を比較したところ、相関係数 $r=0.97$, 回帰直線 $y=1.03x-14.2$ が得られた。

B. β -D-galactosidase 標識抗 TSH 抗体 (Gal-抗 TSH) を用いたサンドイッチ法:

自家製抗ヒト TSH 家兎血清を DE-52 カラムで IgG 分画とし、Yang の方法でポリスチレン試験管に固相化した。一方この抗 TSH-IgG 分画を TSH 結合 Sepharose 4B カラムに付して純化抗 TSH-IgG を作製し、石川の方法に準じ maleimide 化したのち、 β -D-galactosidase と反応させ Gal-抗 TSH を作製した。測定操作は一段階サンドイッチ法と二段階サンドイッチ法で行なった。一段階サンドイッチ法は希釈液として 1 mM MgCl_2 , 0.1 % NaN_3 および 0.1 % 牛血清 albumin を含む 0.01 M PBS 緩衝液 pH7.0 を用い、標準 TSH 血液濾紙または検体血液濾紙からの 3 mm disc 2 枚、正常家兎 γ -globulin 溶液 (1 mg/ml) 50 μl と Gal-抗 TSH (1:250 に希釈) 100 μl を抗 TSH 固相化試験管に加え 37°C で 4 時間、次いで 4°C で 24 時間孵置した。内容液を除去して 0.1% Tween 20 洗浄液で 2 回洗浄し、1% 4-methylumbelliferyl- β -D-galactopyranoside 溶液 250 μl を加え 37°C で 40 分間孵置後、0.1 M グリシン緩衝液 pH10.3 を 2.5 ml 加え、遊離の 4-methylumbelliferone 量を蛍光測定した。二段階サンドイッチ法ではあらかじめ 3 mm disc 2 枚と希釈液 150 μl を TSH 抗体固相化試験管に加え 37°C で 4 時間、さらに 4°C で 24 時間孵置したのち内容液を吸引除去し、2 ml の希釈液で 2 回洗浄後同様の操作を行った。

TSH 標準液を用いた際の最少測定感度は B 法で 0.05 $\mu\text{U}/\text{assay tube}$ であり、B' 法 (0.15 $\mu\text{U}/\text{assay tube}$) に比し感度が高かった。血液濾紙 (3 mm disc 2 枚, 血液 5.4 μl 相当) での最少測定感度は 6 $\mu\text{U}/\text{ml blood}$ であり、700 $\mu\text{U}/\text{ml}$ までは定量性を認めた。血液濾紙での測定精度は同時再現性の C. V. 10.6~13.0 %, 日差再現性の C. V. 11.6~18.3 % であった。種々の濃度の血液濾紙検体について本 EIA 法 (y) と RIA 法 (x) による測定値を比較したところ、相関係数 $r=0.96$ 回帰直線 $y=1.6x+1.2$ であり、RIA との相関は良好であったが、本 EIA での測定値が高値となる傾向を示した。

[総括]

TSH の酵素免疫測定法として Alp-TSH を用いた二抗体法 (A) 及び Gal-抗 TSH を用いたサンドイッチ法 (一段階法 B, 二段階法 B') を開発して次の結果を得た。

1. 希釈試験で直線性を示し、回収試験は 97% でともに良好であった (A)。
2. 測定感度は assay tube 当り 1 μU (A), 0.15 μU (B'), 0.05 μU (B) であり、一段階サンドイッチ法が最良であった。
3. 測定可能範囲はそれぞれ 10~320 $\mu\text{U}/\text{ml}$ (A), 10~160 $\mu\text{U}/\text{ml}$ (B) であった。
4. 測定精度 (C. V.) は測定内 2~7% (A), 10.6~13.0% (B), 測定間 10~15% (A), 11.6~18.3% (B) であった。

5. 本 EIA と RIA で得た測定値の相関係数は 0.97 (A), 0.96 (B) で、両者は良く相関した。

以上の結果から本法により血清 TSH (A) 及びクレチン症マスキリング用血液濾紙 TSH (B) の測定が可能で、いずれも原発性甲状腺機能低下症の診断に有用なことを明らかにした。

論文の審査結果の要旨

本研究は RI を用いない酵素免疫測定法 (EIA) による甲状腺刺激ホルモン (TSH) の微量測定法をはじめて開発したものである。すなわち alkaline phosphatase 標識 TSH を用いた二抗体法と、 β -D-galactosidase 標識抗 TSH を用いた一段階サンドイッチ法の二方法を試み、とくに後者によって濾紙血液中の微量 TSH を迅速、簡便に測定することができるようになり、クレチン症マスキリングへの応用が可能となった。このように本研究は予防医学に役立つ検査法の開発という点で非常に価値あるものと評価される。