

《原著》

Radioimmunoassay 法による血中 T_3 値の測定

八 谷 孝* 越 智 幸 男* 宮 崎 忠 芳*
 塩 見 勝 彦* 吉 村 学* 岡 本 邦 雄**

はじめに

Thyroxine (T_4) のみならず Triiodothyronine (T_3) も甲状腺の病態生理に重要な役割を演じて いることが最近次第に明らかになってきている。

血中 T_3 の測定法としては、まず Sterling¹⁾ によつて開発された competitive binding 法があるが、本法はその方法の繁雑なことや T_4 の T_3 への混入等の難点があるため、一般臨床検査として 使用できなかつた。

最近各種ホルモンの測定法として radioimmunoassay (RIA) が開発され、微量の血中ホルモンの測定が可能となつた。

この RIA 法を用いて 1970 年 Brown²⁾ が血中 T_3 測定の可能性を発表以来、Gharib³⁾、Mitsuma⁴⁾、Lieblich⁵⁾、Larsen⁶⁾、等が相次いで T_3 の RIA を報告している。本邦でも、八谷⁷⁾、桜田⁸⁾ が T_3 特異抗体を作製し、 T_3 RIA の基礎的検討をしている。

今回、著者らは T_3 RIA をさらに改良し、諸種 甲状腺機能異常患者の血中 T_3 および治療による 血中 T_3 値の変動を検討した。また最近、作製された Dainabot 社の T_3 RIA 用 kit を併せて検討したので、これらを報告する。

実験方法

1) T_3 抗体の作製 (一次抗体)

Chopra⁹⁾ らの方法に準じて L- T_3 と bovine serum albumin (BSA) と carbodiimide (CDI) で結合させたのち、Freund complete adjuvant (Difco) を加えてウサギに免疫し T_3 に特異抗体を作つた⁷⁾。

2) ヤギ抗ウサギ γ -グロブリン (γ -gl) 血清 (第二抗体)。

Micro-Ouchterlony 法で 8 倍希釈まで沈降反応陽性である抗体を用いた。

3) T_3 の RIA 法。

RIA を行うにあたつて、 T_3 free 血清としてプールヒト血清と等量の dextran coated charcoal 液で処置した血清を用いた場合 (DCC-NHS) と、粘液水腫患者血清の両者で標準曲線を描いたが、両者の曲線はきわめて類似していたので⁷⁾、通常前者を用いて標準曲線を描いた。

血清の T_3 結合蛋白から T_3 を解離させるために、サリチル酸、8-alinilo-1-naphthalen sulfonic acid (ANS) または diphenyl hydantoin (DPH) を用いた。被検血清 0.1 ml に対して、サリチル酸の場合 $10^{-2}M$ (最終濃度) を加え、ANS の場合 100 から 1000 μg まで、DPH の場合 10 から 100 μg まで加えて検討した。

実際の測定には DCC-NHS (被検血清の場合 0.1 ml) に $^{125}I-T_3$ 16 pg と、 $10^{-2}M$ サリチル酸 (最終濃度)、ANS または DPH を加え、抗 T^3 血清 (最終濃度 400 倍), pH 7.8, 0.15 M リン酸緩衝液で全量を 1.0 ml とし、5°C 48 時間静置

* 京都府立医科大学 第二内科

** " 中央検査部

受付：48年5月

別刷請求先：京都市上京区河原町通リ広小路上ル
梶井町 465 (〒 602)

京都府立医科大学 第二内科

八 谷 孝

し、第二抗体を加え、さらに 5°C 24 時間静置後、3000 rpm 20 分遠心し、上清 (F) および沈殿物 (B) を分離し well type の scintillation counter で count し B/F を求めた。

4) 抗 T₃ 血清の特異性の検討。

T₃ RIA の標準曲線を作製し、¹²⁵I-T₃ の B/F+B% が 50 % のときの T₃ の量を分子とし、同じ場合に要する T₃ の誘導体、T₄ と T₄ の誘導体および diiodotyrosine (DIT), monoiodotyrosine (MIT) の量を分母として両者の比でもつて交叉反応をあらわした。

5) 患者血清は本院外来および入院患者で臨床的および諸検査で診断された甲状腺機能亢進症、機能低下症および正常甲状腺機能者を用いた。また被検血清は -20°C で測定時まで凍結保存した。

血中 T₃ 値は被検血清を 2 回測定し、その平均値であらわした。

6) Dainabot 社の T₃ RIA kit を用いた血中 T₃ 測定。

方法は(図 1)に示すごとく、被検血清(0.1 ml)に緩衝液 1.0 ml と、¹²⁵I-T₃ と抗 T₃ 血清を 0.1 ml ずつ入れ、5°C 24 時間静置後、dextran coated charcoal で B/F を求めた。

標準曲線には、kit の標準曲線用血清を用いて

緩衝液

検体または標準T₃溶液

¹²⁵I-T₃

抗T₃家兎血清

4° ± 2°C 20~24時間 Incubation

Dextran Coated Charcoal

攪拌後 24°C 15分間放置

3000 rpm 15分 遠心分離

沈殿および全カウント測定

標準曲線の作成、T₃濃度の読みとり

図 1 Dainabot kit により T₃ Radioimmunoassay 法の操作

作製した。

7) 血清 T₄ 値は Tetrasorb 法 (Dainabot) で測定した。

実験成績

1) 被検血清 0.1 ml に 10⁻²M のサリチル酸を添加した場合には B/F=0.35 であつたが、ANS 添加時には ANS 150 µg より B/F は上昇し 200 µg で B/F=0.35 と最大となり、以下 ANS を增量しても B/F の変化は認められなかつた。DPH は 10 µg から 100 µg まで添加してみたが、B/F = 0.18 で分離が悪かつた(図 2)。

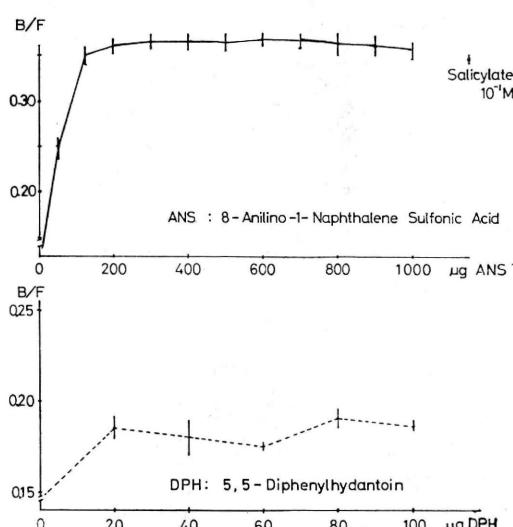


図 2 ANS または DPH による血清蛋白からの T₃ 遊離状態 被検血清 0.1 ml にサリチル酸 10⁻²M(最終濃度) ANS 100~1000 µg, DPH 10~100 µg を添加し、二抗体法で B/F を求めた。

2) DCC-NHS を用いた標準曲線。

DCC-NHS 0.2 ml, ANS 300 r および抗 T₃ 血清(最終濃度 400 倍) 0.1 ml を加えて、0.15 M, pH 7.8 リン酸緩衝液で全量 1.0 ml とし、二抗体法で標準曲線を描いた。T₃ は 16 pg から 600 pg まではカーブは急激であり、それ以上の 900 pg まではカーブはゆるやかであつた(図 3)。

3) 抗 T₃ 血清の T₄, T₄ 誘導体、T₃ 誘導体、MIT, DIT との交叉反応。

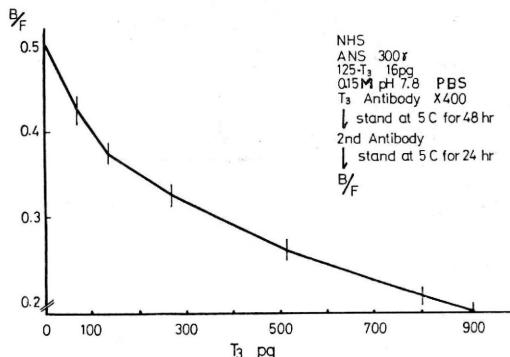


図 3 ANS を用いた二抗体法による T_3 Radioimmunoassay の標準曲線。

T_3 と抗 T_3 血清の結合を 100 % として、各種誘導体、 T_4 、DIT、MIT の交叉反応を表 1 に示した。 T_3 誘導体である triiodothyropropionic acid, triiodothyroacetic acid, および desaminotriiodothyronine とは 100 % の交叉反応があつた。 T_4 とは 0.17 %, T_4 誘導体である tetraiodothyroacetic acid とは 0.002 %, desaminothyronine とは 0.001 % の交叉反応があり、MIT, DIT とは 0.001 % 以下の交叉反応があつた。

4) 諸種甲状腺疾患患者の血中 T_3 値および T_4/T_3 比。

未治療の甲状腺機能亢進症 25 名の本法で得られた血中 T_3 値は 200 ng% から 900 ng% までの範囲にあり、その平均値は 397 ± 190 ng% であつ

表 1 抗 T_3 血清と、 T_3 誘導体、 T_4 および T_4 誘導体、MIT, DIT との交叉反応。

T_3 と抗 T_3 血清の結合を 100 % として、各誘導体の抗 T_3 血清との結合を % で表した。

COMPOUND	CROSS-REACTIVITY (%)
L-Triiodothyronine	100
Triiodothyroacetic acid	100
Triiodothyropropionic acid	100
Desaminotriiodothyronine	100
L-Thyroxine	0.17
Tetraiodothyroacetic acid	0.002
Desaminothyronine	0.001
Monoiodotyrosine	<0.001
Diiodotyrosine	<0.001

	N	T_3 ng %	T_4 r%	T_4/T_3
Euthyroid	19	108 ± 39	11.2 ± 1.8	121.4 ± 59.8
Hyperthyroid	25	397 ± 190	23.3 ± 5.0	66.8 ± 26.3

表 2 各種甲状腺疾患の血中 T_3 および T_4 値と T_4/T_3 比 甲状腺機能低下症は血中 T_3 が測定感度以下である例があるので表示していない。各値は mean \pm S.D. を示す。

た。甲状腺機能正常者（正常者）19名では 90 ng % から 200 ng % の範囲で平均 108 ± 39 ng % であった。未治療の甲状腺機能低下症では 90 ng % 以下であり、相当数が測定感度以下であつた（表 2）。

Tetrasorb 法で得られた血中 T_4 値から T_4/T_3 比を算出した。甲状腺機能亢進症では 66.8 ± 26.3 であり、正常者では 121.4 ± 59.8 であった。甲状腺機能低下症では、血中 T_3 値の測定できた症例では T_4/T_3 は、機能亢進症よりも高値であつたが、血中 T_3 値が測定感度以下の場合もかなりあり、 T_4/T_3 は算出不可能であつた。

5) アイソトープ治療による甲状腺機能亢進症患者血清の T_3 値と T_4/T_3 の変動。

症例 1, 46 歳、女性、甲状腺 ^{131}I -uptake (24 時間) 57 %, T_3 resin sponge uptake (T_3 RSU, Triosorb) 52 %, 血中 T_4 値 20.9 r%, T_3 値 570 ng%, $T_4/T_3 = 36.7$, と機能亢進症の患者に ^{131}I 3.6 mCi 投与したところ、甲状腺機能亢進症状の改善とともに、血中 T_4 値および T_3 値は次第に低下した。また治療前低下していた $T_4/T_3 = 36.7$ は次第に上昇してアイソトープ投与後 9 カ月で正常範囲の 120 になり、甲状腺機能も正常となり、良好な経過を得ている（図 4）。

症例 2, 44 歳、女性、アイソトープ投与前の甲状腺 ^{131}I uptake 24 時間 47 %, T_3 RSU 40.4 %, 血中 T_4 値 21.5 r%, T_3 値 460 ng%, $T_4/T_3 = 45.6$ であり、 ^{131}I 3.0 mCi を投与した。アイソトープ投与 3 カ月後には、 T_3 RSU 33.4 %, T_4 3.0 r% と Euthyroid の域に低下したが、血中 T_3 値は 430 ng% と高値であり、 $T_4/T_3 = 7.0$ と低値のままで、あたかも T_3 toxicosis の状態であり、こ

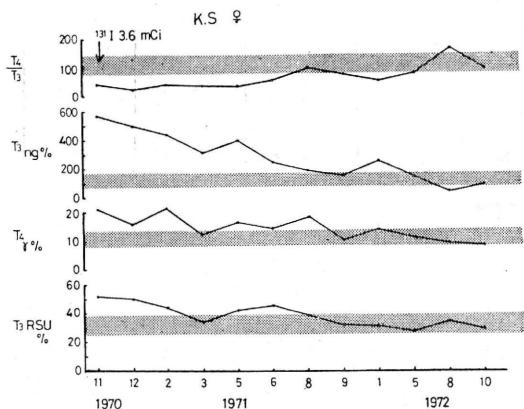


図4 症例1 血中 T_3 および T_4 値, T_4/T_3 比の治療による変動。

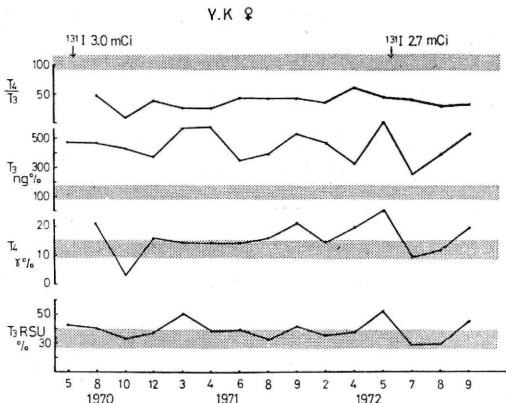


図5 症例2 血中 T_3 および T_4 値, T_4/T_3 比の治療による変動。

の状態が約1年間持続してのち、再び血中 T_4 値、 T_3 -RSU 値も上昇した。再度 ^{131}I 2.7 mCi 投与したが、この場合も T_4/T_3 は正常範囲に上昇せず、血中 T_4 および T_3 値も高値を持続し治療効果が不良であった(図5)。

症例3、44歳、女性、治療前の甲状腺 ^{131}I uptake 57.1%， T_3 RSU 44%，血中 T_4 値 22%，血中 T_3 値 190 ng% であった。この患者に ^{131}I 5 mCi 投与した所、血中 T_3 値は急速に低下し測定感度以下となり、 T_4/T_3 比は算出不能となつた。この患者はアイソトープ投与3カ月後に、血中 T_4 値 47%， T_3 RSU 22%，血中 T_3 値は0となり機能低下症となつた(図6)。

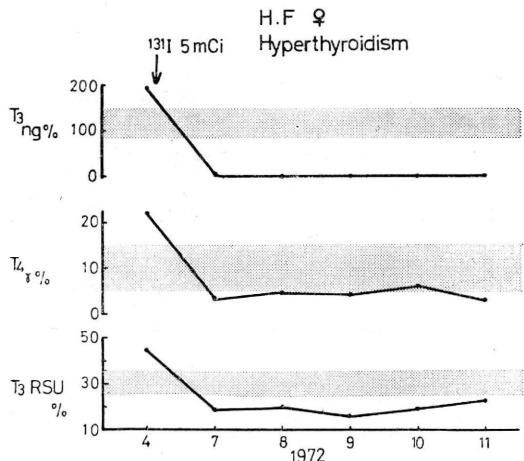


図6 症例3 血中 T_3 および T_4 値, T_4/T_3 比の治療による変動。

治療用 ^{131}I を投与して、甲状腺機能亢進症を治療した患者28名で、アイソトープ投与後の T_4/T_3 を検討した。普通アイソトープ投与後から6カ月で T_3 -RSU は正常化したのでこの時点での T_4/T_3 を求めた。治療前の T_3 -RSU、血中 T_4 および T_3 値を100%とし、アイソトープ投与後のおのおのの値の変化率を検討した。図7の上段に示すように、 T_3 -RSU は低下しても、血中 T_4 および T_3 値の低下が軽微で、特に T_4/T_3 比が治療前よりも上昇しない場合は、アイソトープによる治癒傾向がみられなかつた。

一方図7の下段に示すように、治癒または良好なコントロールを得ている患者では、血中 T_4 値よりも T_3 値の減少率が大で、 T_4/T_3 比は治療前よりも必ず大となり、 T_4/T_3 比が治療前の100%以上増量した時には常に治癒傾向がみられた。

6) PTU 治療による血中 T_4 および T_3 値の変化率。

甲状腺機能亢進症9名にPTUを投与して治療した。PTU投与後2~3カ月で T_3 -RSU は正常範囲25~38%に低下し、Euthyroidとなつた時の血中 T_4 および T_3 値、 T_4/T_3 比を前述の方法と同時に検討した。

図8にみられるように、血中 T_4 値よりも T_3 値の減少率が大であり、そのため T_4/T_3 比は治

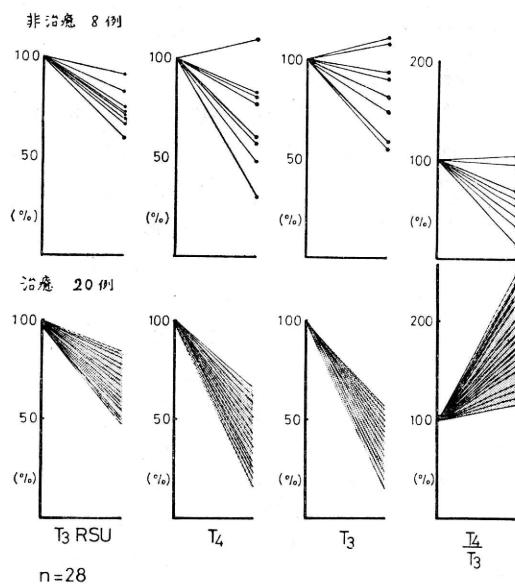


図 7 アイソトープ治療による血中 T_3 および T_4 値と T_4/T_3 比の変動治療前の血中 T_3 および T_4 値, T_4/T_3 比を 100 % と, 治療後の変化率を % で表した。

療前よりも上昇し, 中には治療前の 200 % 以上になるものも認められた。しかし治療により甲状腺機能低下症となり, 血中 T_3 値が測定不可能の場合には, T_4/T_3 比は図示できなかつた。

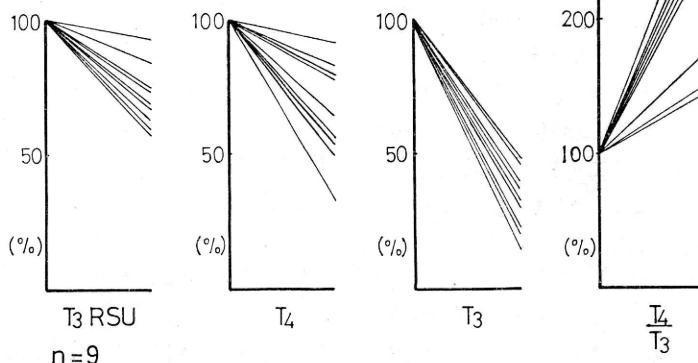


図 8 PTU 治療による血中 T_3 および T_4 値, T_4/T_3 の変化率 治療前の値を 100 % とし, 治療後の変化率を % で表した。

7) Dainabot kit による T_3 RIA の標準曲線。標準曲線は 800 pg まで T_3 測定可能であつた。 T_3 400 pg までは B/F は急激な変化を示すカーブであり, それ以後 800 pg まではゆるやかなカーブが得られた (図 9)。

8) Dainabot kit と著者等の二抗体法による T_3 RIA で, 同一検体で血中 T_3 を測定しその相関を求めた。38名の患者血清で得られた血中 T_3 値の相関係数は $r=0.86$ であつた。両者の方法で得た

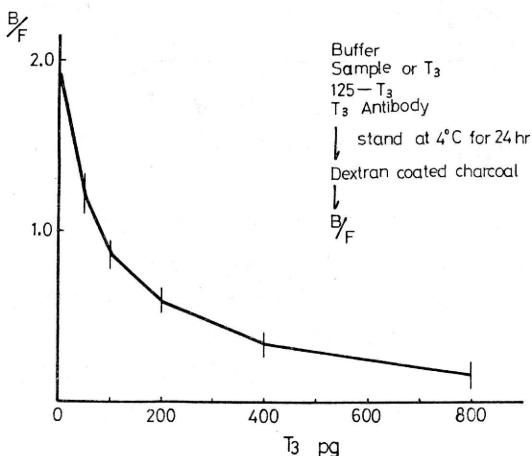


図 9 Dainabot kit による T_3 Radioimmunoassay の標準曲線。

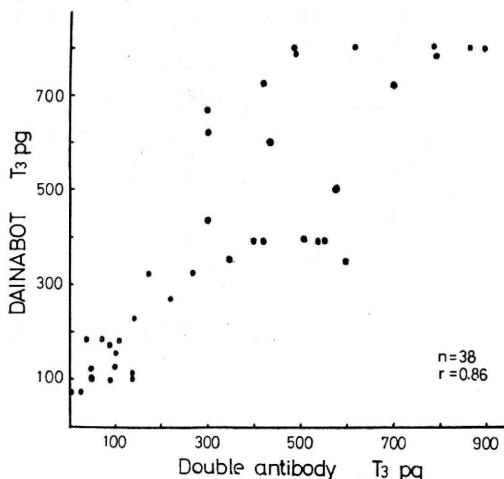


図 10 二抗体法と Dainabot kit とで得られた血中 T₃ 値の相関。

血中 T₃ 値を比較すると、血中 T₃ 値の低い値では、Dainabot kit で得た値が、著者らの二抗体法よりも高値を示し、たとえば二抗体法での血中 T₃ 値 0 が、kit で 50 pg となつたりした。また血中 T₃ 値が 400 pg 以上を示す場合、両者で得た T₃ 値に解離がみられる例もあつた(図 10)。

考 案

T₃ RIA を行うにあたつて、T₃ と T₃ 結合蛋白を阻止するものとして、Mitsuma⁴⁾ は tetrachlorothyronine, Lieblich⁵⁾ は DPH, Larsen⁶⁾, 八谷⁷⁾ はサリチル酸を用いて測定しているが、しかし最近では ANS が繁用されている。著者らも DPH, ANS, サリチル酸の 3 者を比較検討した。DPH は阻止剤としては B/F が低値であるところから、使用できなかつた。サリチル酸は 10⁻²M 以上を用いると、二抗体法の場合第二抗体による沈澱物が減少し、B/F の低下が起こるという難点もある。一方 ANS は上記のような難点もなく比較的良好な阻止剤として使用可能であつた。

著者らの作製した抗 T₃ 血清は、T₄ との交叉反応は 0.17 % と低値であつたが、用いた T₄(Sigma) には少量の T₃ の混入があることから、精製した T₄ を用いるならば交叉反応は痕跡的であり、血中 T₃ 測定時の T₄ の混入は無視できるものと思

われる。したがつてこの抗 T₃ 血清を用いた RIA 法で測定された T₃ 値は、血清の真の T₃ の近似値を意味するものと思われる。

従来用いられていた Sterling¹⁾ による competitive binding 法による正常者の血中 T₃ 値は 220 ± 27 ng% である。しかしこれは測定中に T₄ の deiodination があり T₃ 値が真の値よりも高いとされている¹⁰⁾¹¹⁾。T₃ RIA による正常者の血中 T₃ 値は Gharib³⁾ は 218 ± 55 ng%, Mitsuma⁴⁾ は 138 ± 23 ng%, Larsen¹²⁾ は 110 ± 25 ng% である。著者らがサリチル酸で T₃ RIA を行った血中 T₃ 値は、正常者は 132 ± 43 ng% であつた。ANS を用いた今回の方法では 108 ± 39 ng% であつたので、正常者では血中 T₃ 値は 70 から 140 ng% の範囲と推定される。Tetrasorb で得た血中 T₄ 値より算出された T₄/T₃ 比は、正常者で、121.4 ± 55.8, 甲状腺機能亢進症では 66.8 ± 26.3 であつた。この値は Larsen¹³⁾ の正常者で、71 ± 3, 機能亢進症で 53 ± 3 に比して高値であつた。これは今回著者らが測定した血中 T₄ 値は、正常者 11.2 ± 1.8 r%, 機能亢進症で 23.3 ± 5.0 r% と比較的高値であつたためと考えられる。

この T₄/T₃ 比から推定すると、機能亢進症で T₄/T₃ 比が正常者より低値であることは、機能亢進症では甲状腺より T₄ に比して T₃ がより多く分泌されているのであろう。事実血中 T₄ 値は甲状腺機能亢進症では正常者の 2~3 倍の増加であるのに、一方血中 T₃ 値は正常者の 2~10 倍程度の値を示している。T₄ よりも T₃ は、甲状腺機能亢進状態でより変動しやすいので、この T₃ が甲状腺機能状態の重要な生理作用を起こしていると考えられる。また Chopra¹⁴⁾ はヒト甲状腺内の T₄/T₃ 比を RIA より算出し、Graves 病の甲状腺が正常人甲状腺内の T₄/T₃ より低値であつたと報告している。

甲状腺機能低下症時の T₄/T₃ 比は、甲状腺機能亢進症よりも低値¹⁰⁾¹⁵⁾ であるとの報告もあるが、著者らの例では、機能低下症では血中 T₃ 値は 90 ng% 以下であり、また半数では測定感度以下であつた。したがつて、測定可能な比は T₄/T₃

機能亢進症 66.8 よりも高値であつた。Larsen¹³⁾ は甲状腺機能低下症の約 1/3 では血中 T₃ 値が正常範囲であると報告し、これは T₄ から T₃ の転化のためとも推定しているが、血中 TSH 値が比較的高値であるので、甲状腺での T₃ 産生量の増加の可能性も否定できないと思われる。

28 例の甲状腺機能亢進症にアイソトープ治療後の血中 T₃ および T₄ 値の変動を検討したところ、治癒した 20 例では T₄ よりも T₃ の減少率が大であり、したがつて T₄/T₃ 比は上昇し、正常範囲の 120 に近づいている(図 7)。一方治癒傾向のみられない例では、血中 T₄ 値、T₃ RSU 値らは正常化しても、血中 T₃ 値がまだ機能亢進症の範囲にあつたり、T₄/T₃ 比が上昇しない症例 2 のような現象がみられた。またアイソトープ治療により機能低下症になる症例では、血中 T₃ 値の低下が著明で、症例 3 のごとく血中 T₃ 値が感度以下になる例もみられたことから、血中 T₃ 値の変動を知ることは治療上きわめて重要であり、血中 T₃ 値と T₄/T₃ 比の両者は経過のよき指標となりうると思われる。Larsen¹³⁾ も、機能亢進症患者に PTU を投与し、血中 T₄ および T₃ 値の変動を経日的に測定したところ、PTU 投与第一日で、T₃ は治療前の約 30 % に低下し、3 日目で T₄/T₃ 比は 37.3 から彼等の正常値 65 に近づいたと報告している。著者らも PTU で治療した 9 例では、T₄ よりも T₃ の減少率が大であり、T₄/T₃ 比は治療前より必ず上昇していて、T₄/T₃ 比が治療前の 250 % 以上大となつた場合は、良好な control を得ていることがわかつた。

以上のように甲状腺機能状態を正確に知るためにには、血中 T₄ 値のみならず T₃ 値を知ることが臨床的にきわめて重要である。

最近 Dainabot で開発された dextran coated charcoal を用いる T₃ RIA 法で測定した血中 T₃ 値と著者らの二抗体法での血中 T₃ 値とを比較検討した。同一血清についても T₃ を測定したところ、血中 T₃ 値が低値のある例では、Dainabot 法の方がやや高値となり、著者らの方法では測定感度以下のものが 50 pg を示した例もあつ

た。一方 400 pg 以上高値の T₃ 値でも、両者の測定値に解離がみられた数例があつた。これは二者の標準曲線のカーブが 400 pg 前後で相違が認められたと考えられる。しかし両者の方法で得られた T₃ 値は、相関係数 $r=0.86$ であり、一応 2 方法とも臨床検査としてじゅうぶん使用可能と思われた。

ま と め

T₃ に特異的な抗体を作り T₃ の RIA を二抗体法で検討した。この抗体は T₄ と 0.17 % の交叉反応があり、T₃ 誘導体とは 100 %、T₄ 誘導体とは 0.002 % 以下、MIT および 0.001 % 以下であった。

被検血清 0.1 ml に ANS 300 μg を加えて、二抗体法で T₃ を測定すると、16 pg から 900 pg の T₃ が測定可能な標準曲線が得られた。

この方法で測定した血中 T₃ 値は正常者 108 \pm 39 ng%，甲状腺機能亢進症 397 \pm 190 ng%，機能低下症は 90 ng% 以下で測定感度以下も相当数あつた。血中 T₄ 値を Tetrasorb 法で測定したのち T₄/T₃ 比を算出すると、正常者 121.4 \pm 59.8、機能亢進症 66.8 \pm 263 があつたが、機能低下症では T₃ が感度以下のものがあるため算出できなかつた。

甲状腺機能亢進症患者をアイソトープまたは抗甲状腺剤で治療し、甲状腺機能が正常となつた場合には血中 T₃ 値は正常範囲に低下した。また T₄/T₃ 値は治療前よりも必ず大となり、T₄/T₃ 比が治療前の 100 % 以上增量した時には常に治癒傾向がみられた。

血中 T₃ 値を著者らの二抗体法と Dainabot kit 法とで比較検討したが $r=0.86$ と良好な相関係数を得た。

文 献

- Sterling, K., D. Bellabarba, E. S. Newman and M. A. Brenner: J. clin. Invest., 48: 1150, 1969.
- Brown, B. L., R. P. Ekins, S. M. Ellis and

- W. S. Reith: Nature, 226 : 359, 1970.
- 3) Gharib, H., W. E. Maybeau and R. J. Ryan: J. clin. Endocrin., 31 : 709, 1970.
- 4) Mitsuma, T., N. Nihei, M. C. Gershengorn and C. S. Hollander: J. clin. Invest., 50 : 2679, 1971.
- 5) Lieblich, J. M. and R. D. Utiger: J. clin. Invest., 51 : 157, 1972.
- 6) Larsen, P. R.: Metabolism, 20 : 976, 1971.
- 7) 八谷 孝: 日内会誌, 61 : 1384, 1972.
- 8) 桜田俊郎, 山口 徹, 山本壽子, 出村黎子, 出村 博, 福地総逸, 斎藤慎太郎: 日内分泌誌, 48 : 559, 1972.
- 9) Chopra, I. J., J. C. Nelson, D. H. Solomon and G. N. Beall: J. clin. Endocr., 32 : 299, 1971.
- 10) Larsen, P. R.: Metabolism, 20 : 609, 1971.
- 11) Fisher, D. A. and J. H. Dussault: J. clin. Endocrin., 32 : 675, 1971.
- 12) Larsen, P. R.: J. clin. Invest., 51 : 1939, 1972.
- 13) Larsen, P. R.: Metabolism, 21 : 1073, 1972.
- 14) Chopra, I. J., D. A. Fisher, D. H. Solomon, and G. N. Beall: J. clin. Endocr., 36 : 311, 1973.
- 15) 小林良二, 津久井知直, 小谷雅宜, 女屋敏正, 山田隆司: 日内分泌誌, 49 : 304, 1973.

*

*

*

*

*

*

*

*

*

Summary

The determination of serum T₃ (triiodothyronine) by radioimmunoassay method

Takashi HACHIYA, Yukio OCHI, Manabu YOSHIMURA, Katsuhiko SHIOMI,
Tadayoshi MIYAZAKI and Kunio OKAMOTO

2nd Department of Internal Medicine, Kyoto Prefectural University of Medicine, Kyoto.

For the determination of serum T₃ level, radioimmunoassay using the double antibody method has been developed. A specific antibody to T₃ was made in rabbit immunization with T₃ conjugated to bovine serum albumin with carbodiimide. The antibody had a cross reactivity of <0.001, <0.001 and 0.17% with L-monoiodotyrosine, L-diiodotyrosine, or L-thyroxine respectively.

The incubation was performed with test serum (0.1 ml, 8-anilino-1-naphthalene sulfonic acid (300 γ), ¹²⁵I-T₃ (16 pg) and rabbit antiserum specific to T₃ in pH 7.8, 0.15 M phosphate buffer for 2 days and then the second antibody was added. By this method T₃ could be detected from 16 to 900 pg. Normal range in euthyroid subjects was 108±39 ng/dl. In hypothyroid was usually 70 ng/dl and in some cases was undetectable range. In hyperthyroid was over 200 up to 900 ng/dl. In euthyroid subjects T₄/T₃ ratio was about 121.4±59.8 and in hyperthyroid was

66.8±26.3. However it was not calculated in hypothyroid, because T₃ was undetectable in many cases. When the hyperthyroid patients became gradually euthyroid state by the treatment with radioisotope-¹³¹I, increased T₃ resin sponge uptake, serum T₄ and serum T₃ became normal range gradually respectively. Also T₄/T₃ ratio became to normal range. However, when hyperthyroid symptom did not subsided, T₃ and T₄/T₃ ratio showed still low value.

The similar results was obtained when the hyperthyroid patient was treated by anti-thyroid drug. Therefore, the determination of T₃ and T₄/T₃ ratio are valuable to speculated the prognose of hyperthyroid patient by various treatments.

Serum T₃ values were determined by Dainabot Kit using dextran-coated charcoal for the separation of free and bound, and compared with the value by our double antibody method. The determinationed values by these two methods showed good correlation ($r=0.86$).

* * * * *

* * * * *