≪技　術≫

Equilibrium dialysis による血清 free thyroxine 測定法

今野則道　萩原康司　今　寛*

はじめに

血中 thyroxine はその大部分が血漿蛋白に結合しているが[1,2]，実際に生物学的活性をもつのは，ごくわずかに存在する free thyroxine であるとされている[3]。現在まで報告されている free thyroxine の測定方法は大別して3つに分けられる。第1は filtration 法であり，これには Sephadex を用いる gel filtration 法[4]，cellulose 膜を用いる ultrafiltration 法がある[5]。第2は equilibrium dialysis 法であり[6,7,8]，free thyroxine の測定方法としてもつとも広く利用されている。第3は radioimmunoassay で[9]，これはまだ試験的段階にあると言つてよい。筆者らは当初 gel filtration 法によつて free tyroxine を測定したが[10]，多くの検体を同時に測定するには，手技上複雑で，この方法を日常の臨床検査法に採用するには難点が多いと考えられた。そこで今回は Sterling および Brenner の equilibrium dialysis 法[6]によつて free thyroxine の測定を試み，その基礎的問題について検討を加え，臨床上の応用について考察したので発表する。

対象および測定方法

用いた対象は北海道社会保険中央病院を訪れた甲状腺疾患々者および同病院の健康な職員で，血液は肘静脈から採取し，遠沈によつて血清を分離し，得た血清は使用するまで凍結保存した。

血中 thyroxine の測定は Tetrasorb kit (Abbott laboratories) によつて行い，Triiodothyronine resin sponge uptake は Triosorb kit (Abbott laboratories) によつて測定した。Free thyroxine index は Clark らの方法[11]によつて算出した。

試薬　1-thyroxine-^{125}I (specific activity; 125–250 μCi/μg)；Mallincrodt, 1-thyroxine-Na；和光純薬 kk, $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ および KH_2PO_4；関東化学 kk, Tris (hydoxymethyl) aminomethane；和光純薬 kk, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$；和光純薬 kk.。

溶解液　standard phosphate buffer (0.063 M, pH=7.4, イオン強度 =0.15)；0.063 M Na_2HPO_4 溶解液および 0.063 M KH_2PO_4 溶解液を pH meter を使用しながら混和して pH=7.4 の溶解液を作成した。なおこの溶解液中には bacteriostat として merthiolate (チメロサール，丸石製薬 kk) を 0.01 % (w/v) の割合で加えた。Carrier thyroxine；1-thyroxine-Na を 0.033 N NaOH で溶解して 1 mg/ml の液を作成した。1-thyroxine-^{125}I；0.25 % bovine serum albumin in saline で溶解し 100 μCi/ml の液を作成した。$MgCl_2$ precipitating solution；0.1 M NaCl in 0.05 M tris solution (tris-NaCl) に $MgCl_2$ を加えて 10 % $MgCl_2$ 液 (pH=9.3) を作成した。$MgCl_2$ wash solution；10 % $MgCl_2$ in tris-NaCl に 1 N HCl を加えて pH=8.7–8.8 の液を作成した。

透析装置　透析膜；Visking dialysis tubing (No. 6, 直径 19.1 mm) を使用直前に適当な長さに切つて蒸溜水にひたして一定時間 4°C で保存した。透析用試験管；容量 50 ml の polypropylene 管(ナルゲン円筒型沈澱管)を使用した。metabolic

* 北海道社会保険中央病院
受付：48年5月
別刷請求先：札幌市中ノ島1条8丁目 (〒 062)
北海道社会保険中央病院　内科
今野則道

Presented by Medical*Online

shaker; 大和 waterbath incubator を用いた。

透析方法 血清 3.2 ml に ^{125}I-thyroxine 液 0.05 ml を加えた。この結果血清の radioactivity は 150 μCi/100 ml になり，血清 thyroxine は 0.6-1.2 μg/100 ml 増加した。Labelled serum のうち 0.1 ml を counting 用試験管にとり，3.0 ml を dialysis tubing に入れた。Dialysis tubing は使用直前に水分をよくぬぐい，一端を縛り，少量の空気を入れて，中央で軽く2つに折り，血清をそそぎ，他端も固く縛つた。このようにすると血清は tubing の両端に触れることなく中央の部分に集められた。このように作成した tubing を透析用試験管に入れ，dialysis tubing の外側に standard phosphate buffer を 5 ml 入れ screwed cap をした。透析は 37°C で metabolic shaker の中で振盪回数 75 cycle/min. で19時間行つた。稀釈血清を用いる場合は，血清に ^{125}I-thyroxine を上記の濃度で加え，merthiolate を含まない standard phosphate buffer で稀釈し，その 3 ml を透析用に使用した。Reference serum はコンセーラ（日水製薬 KK）を使用した。

Dialysate 中の ^{125}I-thyroxine の分離法 incubation 終了後 dialysate 3 ml を1つの試験管に入れ，0.5 ml を他の試験管に入れた。3.0 ml の dialysate に carrier thyroxine 液 2.0 ml を加え，これに $MgCl_2$ precipitating solution 1 ml を加え Vortex mixer でよく攪拌し 2000 rpm で 15 分間遠沈し上清を捨てた。白色の沈澱に $MgCl_2$ wash solution 5 ml を加え Vortex mixer で攪拌し 2000 rpm で 15 分間遠沈し上清を捨てた。この洗浄操作をさらに2回行い，最後に得た沈澱の放射能を測定した。放射能の測定は東芝製 Well type scintillation counter を用いて行つた。

計算方法 Dialyzable fraction を DF，稀釈係数を D，% free thyroxine を $\%FT_4$，血清または稀釈血清 0.1 ml の cpm を A，dialysate 0.5 ml の cpm を a，$MgCl_2$ 沈澱の cpm を b とすると，

$$DF=\frac{\frac{8}{3}b}{30A-6a-\frac{3}{3}b}$$

$$\%\ FT_4=\frac{DF}{D}$$

ちなみに稀釈しない血清を用いた時の D は $\frac{8}{3}$ であり，血清 1 ml に稀釈液 2 ml を加えた場合の D は $\frac{8}{1}$ である。また稀釈血清の透析には dialysate 中の merthiolate 濃度も同様に稀釈する必要があつた。absolute free thyroxine (AFT_4)=% free thyroxine x serum thyroxine.

測定結果

測定方法に関する基礎的検討

（1）$MgCl_2$ による thyroxine の分離.

Carrier free ^{131}I あるいは ^{125}I-thyroxine を standard phosphate buffer に溶解し，測定方法の項で述べた方法に従い $MgCl_2$ による沈澱の count を調べた。それによると加えた ^{131}I の 92%が上清に残り，^{125}I-thyroxine の 91%が沈澱に見出された。^{125}I-thyroxine のうちその radioactivity の 10%前後が contaminate している ^{125}I であるとされているから，$MgCl_2$ による thyroxine の分離はきわめて良好であり，またこの操作によつて 92%以上のヨードが取り除かれたと考えられる。

（2）$MgCl_2$ wash solution による沈澱洗滌回数.

表1に示す通り，$MgCl_2$ wash solution による沈澱の洗浄回数は少なくとも 3 回必要であつた。

（3）incubation 温度の影響.

incubation 温度 4°C, 22°C および 37°C の3段階について検討した（図1）。いずれも同一血清を18時間 incubate して $\%FT_4$ を求めたが，温度が上昇するにつれて $\%FT_4$ は直線的に増加した。

（4）incubation 時間の影響.

Dialysate 3 ml 中の $MgCl_2$ 沈澱の radioactivity は incubation 開始後4時間まで次第に上昇し，その後低下し約10時間以後は一定になり平衡になつた（図2）。

Presented by Medical*Online

Tab. 1 Removal of contaminating iodide in Mg^{++} precipitate of dialysate by repeated washings

Procedure	cpm of precipitate	
	serum A	serum B
Mg^{++}precipitate without washing	4141	4338
1 washing	833	989
2 washings	680	672
3 washings	591	666
4 washings	599	664

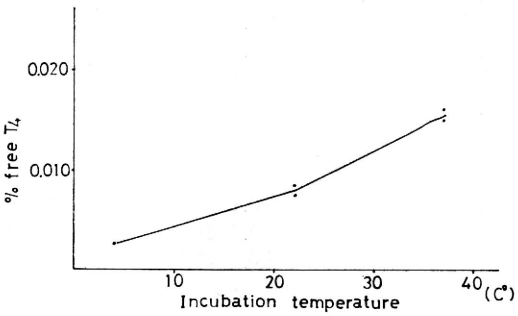

図 1 Effect of temperature on dialysis of thyroxlne from serum.

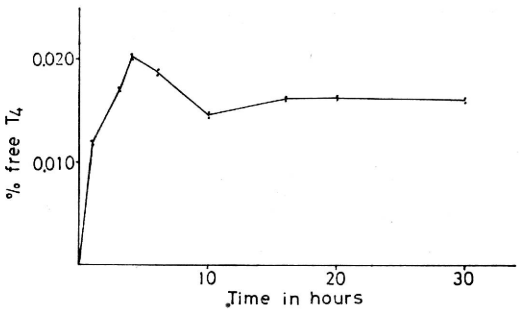

図 2 Rate of equilibration in dialysis system.

（5）Standard phosphate buffer の水素イオン濃度の影響.

pH 7.4 以上では %FT_4 に大きな変化がないが，7.4 以下では %FT_4 は次第に上昇した(図)。

（6）血清の凍結保存の影響.

血清を 2 カ月間までの種々の期間保存して %FT_4 を求めたが，保存期間 5 日で 0,0228 %，60 日で 0.0214 % と差がなかつた。

（7）血清稀釈の影響.

血清を standard phosphate buffer で稀釈して %FT_4 を測定すると，その値は稀釈倍数が高くなるにつれて，次第に低下し，稀釈倍数 16，すなわち血清 0.5 ml を用いた点でもつとも低い値を示し，それ以上の血清の稀釈でもほとんど変化がな

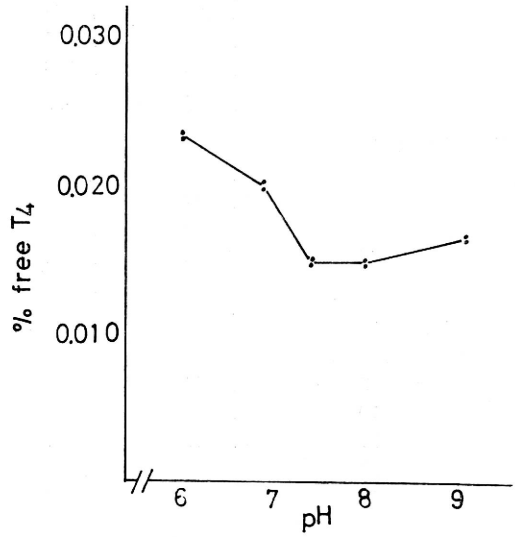

図 3 Effect of pH on dialysis of thyroxine from serum.

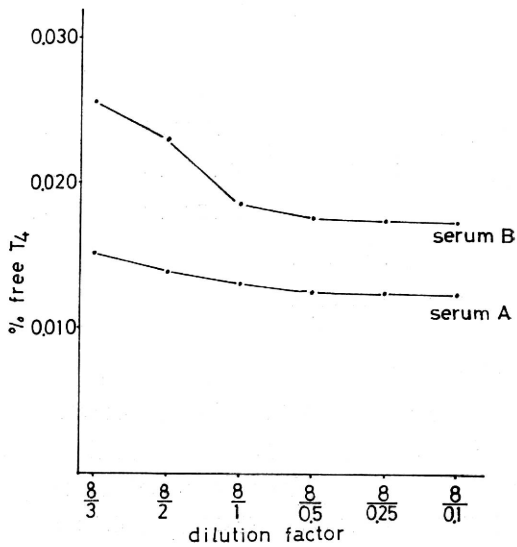

図 4 Effect of serum dilution in dialysis of thyroxine from serum.

Presented by Medical*Online

Tab. 2 Dilution effect on free thyroxine concentration of serum

	observed % free thyroxine		decrease (%) (C)	correction factor (D)	corrected % free T_4 (E)	% of value in undiluted serum (F)
	undiluted (A)	diluted (D=16) (B)				
Experiment 1						
reference serum	0.0326	0.0236	27.6	1.38		
serum 1	0.0200	0.0164	18.0		0.0227	+13
2	0.0200	0.0155	22.5		0.0214	+ 7
3	0.0205	0.0156	23.9		0.0215	+ 9
4	0.0337	0.0277	18.8		0.0383	+13
Experiment 2						
reference serum	0.0314	0.0244	22.2	1.28		
serum 5	0.0264	0.0185	30.7		0.0238	−10
6	0.0219	0.0179	18.3		0.0230	+ 5
7	0.0255	0.0190	25.5		0.0268	+ 5
8	0.0126	0.0080	34.6		0.0106	−16
Experiment 3						
reference serum	0.0299	0.0240	19.7	1.24		
serum 9	0.0204	0.0183	10.3		0.0227	+11
10	0.0527	0.0416	21.1		0.0518	− 2
11	0.0267	0.0237	11.2		0.0295	+10
12	0.0244	0.0196	19.7		0.0244	0
13	0.0241	0.0202	16.2		0.0252	+ 4

* $C=(1-B/A)\times 100$, $D=A/B$, $E=B\times D$, $F=(1-E/A)\times 100$.

Tab. 3 Per cent free thyroxine and absolute free thyroxine concentration in undiluted serum by equilibrium dialysis.

	resin T_3 uptake (%)	thyroxine (μg/dl)	free thyroxine index	% free thyroxine	absolute free thyroxine (ng/dl)
normal (22)*	32.3±3.6**	9.5±1.6	9.1±1.6	0.0159±0.0028	1.5±0.25
hyperthyroid (7)	41.0±3.3	19.6±5.5	24.6±8.8	0.0241±0.0040	4.7±1.5
hypothyroid (10)	23.7±3.2	4.6±2.7	3.3±2.0	0.0111±0.0035	0.5±0.3

* number of subjects
** mean ± S.D.

かつた（図4）。血清稀釈による $\%FT_4$ の減少率は，用いる血清，あるいは測定日によつて変化し，一定の減少率を示さなかつた。実際の検体の測定に際しては，できる限り少ない血清量で測定されることが望ましい。そこで血清 0.5 ml を用いて $\%FT_4$ を測定し，同時に reference serum 3 ml および 0.5 ml の $\%FT_4$ から稀釈による減少率を求め，これを補正係数として 0.5 ml 血清の測定値に乗じて未稀釈血清の $\%FT_4$ の予測値を算出してみた（表2）。血清稀釈による $\%TF_4$ の減少率は血清により，一定せず，また reference serum の減少率も検体の減少率に一致しなかつた。したがつて補正された $\%FT_4$ と実測値とは一致しないが，その差は大体 ±10% 以内であつ

Presented by Medical*Online

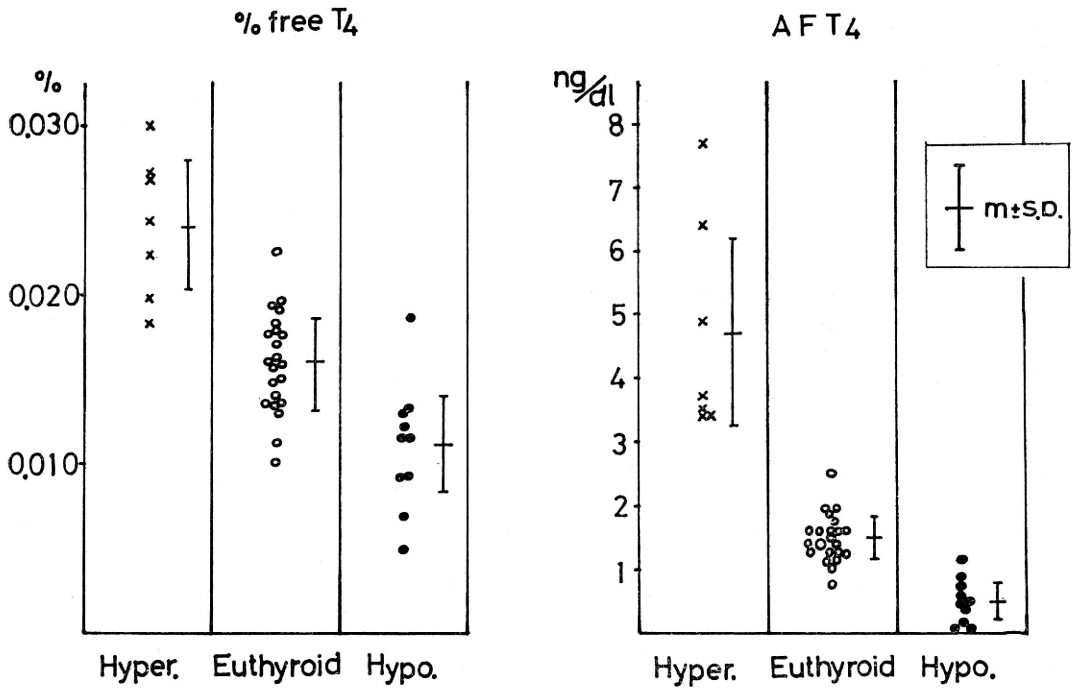

図 5 free thyroxine and absolute free thyroxine in serum.

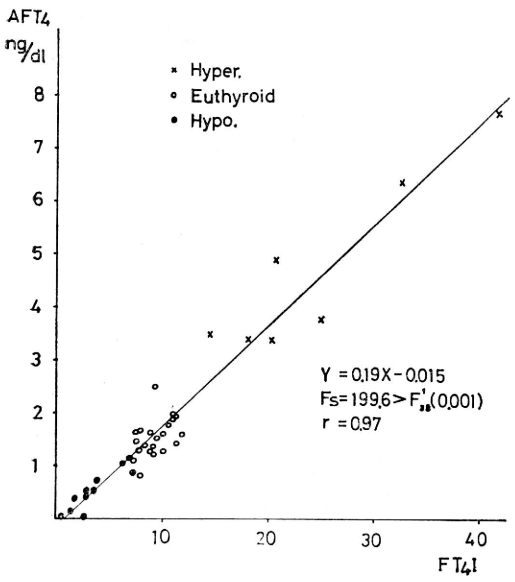

図 6 Relation between AFT_4 values and free T_4 index.

た。

（8）Free thyroxine 測定の再現性.

Pool serum を用いて同一時測定の再現性および異なつた日における測定値の再現性を検討した。Within-run precision (95% confidence limits)は ±3.9%であり，Between-run precision は ±8.0%であつて再現性はきわめて良好であつた。

甲状腺機能異常血清の free thyroxine 濃度

未稀釈血清を用いて正常人，甲状腺機能亢進症および甲状腺機能低下症の free thyroxine を測定した（表3）。$\%FT_4$ の正常値は 0.0159±0.0028% (mean±S.D.) で 95% confidence limits は 0.010−0.020%であつた。また AFT_4 の正常値は 1.5±0.25 ng/dl で正常範囲は 1.0−2.0 ng/dl であつた。甲状腺機能亢進症では $\%FT_4$ および AFT_4 のいずれも有意に上昇し，甲状腺機能低下症では，いずれも有意に低下した。これらの甲状腺疾患における $\%FT_4$ および AFT_4 の分布をみると（5図），AFT_4 では正常人と甲状腺機能亢

Presented by Medical*Online

進症との間に一例の重なりもみられないが，正常人と甲状腺機能低下症との間には数例の重なりがあつた。AFT_4 と free thyroxine index の関係をみると，両者の間には高い正の相関々係が認められた（$r=0.97$, $p<0.001$）（図6）。

考　案

Equilibrium dialysis による free thyroxine 測定法については，Sterling および Hegedus の報告[3]以来，多くの変法が報告されている[12,13]。とくに用いる血清量をできるだけ少なくするために，稀釈血清を用いる測定法が利用されている[12-14]。しかし血清を稀釈すると $\%FT_4$ が次第に低下することが知られており[6,7,15]，その測定値が未稀釈血清のそれとどのような関係にあるかは明らかでない。紫芝らによると血清を32倍まで稀釈すると，その $\%FT_4$ は未稀釈血清を用いた場合の約50％になるとしている[14]。たしかに $\%FT_4$ は稀釈倍数16ないし32まで低下し，それ以上の稀釈でも変化しないが（図4），稀釈による $\%FT_4$ の減少率は一定しない（表2）。現在までのところ，血清稀釈による $\%FT_4$ の低下の原因は明らかでない[15]。したがつて少ない血清量の free thyroxine 濃度を dialysis 法で測定しようとする限り，reference serum を用いて補正する以外に適当な方法は見当らない。Lee あるいは Fang らは reference serum を用いて稀釈血清の $\%FT_4$ から，未稀釈血清のそれを求めている[12,13]。筆者らも同様に reference serum を用いて補正係数を求め $\%FT_4$ 値を算出した（表2）。しかしこの方法では，稀釈血清から算出した値が未稀釈血清の実測値より幾分高くなり，今後 free thyroxine の正常値を稀釈血清から求めると，表3に示した正常値より少し高くなると思われる。

過去の報告から $\%FT_4$ の正常値を拾つてみると，その値には比較的大きな差異のあることがわかる[6,7,12,13,16-19]。たとえば Hershman は 0.0127±0.0011％を正常値とし[16]，Sterling らは 0.046±0.005％を正常値としている。これらの差異の原因はまつたく明らかでないが，dialysis tubing の性状，radio-thyroxine の種類，血清稀釈の有無あるいは透析装置の差異等が関係しているものと思われる。

甲状腺機能異常を診断する上で，どの parameter がもつとも適当であるかということは，臨床上きわめて重要である。Lamberg らによると甲状腺機能亢進症と正常人をもつとも明確に区別する血清中の parameter は free thyroxine であるとしている[20]。筆者の一人萩原らも，free thyroxine index を用いると両者を明確に区別できると報告したが，同時に正常人と甲状腺機能低下症についてみると，free thyroxine index を用いても完全に区別されなかつた[21]。Free thyroxine index と free thyroxine 濃度の間には，きわめて高い相関係数をもつ直線関係があつたから（図6），萩原らの報告にある free thyroxine index を free thyroxine 濃度と言いかえても良い。今回筆者らが free thyroxine 濃度を測定した場合でも，甲状腺機能亢進症と正常人の間には一例の重なりも無かつたが，甲状腺機能低下症との間には数例の重なりがあつた。したがつて機能低下症の診断には臨床上注意深い観察が必要であると考えられる。

要　約

Equilibrium dialysis による free thyroxine 測定法について，測定法に影響を与えるいくつかの因子および臨床上の応用を検討した。基本的な測定条件は，血清 3.0 ml, phosphate buffer 5.0 ml を用い 37°C, pH 7.4 で18時間 incubate し，$MgCl_2$ で radiothyroxine を分離し，$\%FT_4$ を算出した。正常人の $\%FT_4$ は 0.0159±0.0028％（mean±S.D.）で AFT_4 は 1.5±0.25 ng/dl であつた。$\%FT_4$ および AFT_4 のいずれも甲状腺機能亢進症で上昇し，甲状腺機能低下症では低下した。Free thyroxine index と free thyroxine 濃度の間には，推計学的に有意な直線関係があつた（$r=0.97$, $p<0.001$）。また，稀釈血清を用いると $\%FT_4$ は稀釈倍数が増加するにつれ，次第に低下し，稀釈倍数16ないし32で一定の値に達

Presented by Medical*Online

した。この血清稀釈による $\%FT_4$ の減少を補正するために reference serum を用いることが有用であることを示した。

文　献

1) Robbins, J. and Rall, J. E.: Physiol. Rev. **40**, 415, 1960.
2) 今野則道，杉山静子，萩原康司：ホと臨床，**21**，337. 1973.
3) Sterling, K. and Hegedus, A.: J. Clin. Invest. **41**, 1031, 1962.
4) Lee, N. D., Henry, R. J. and Golub, O. J.: J. Clin. Endocr. **24**, 486. 1964.
5) Thorson, S. C., Wilkins, G. E., Schaffrin, M. and Morrison, R. J.: J. Lab. Clin. Med. **80**, 145, 1972.
6) Sterling, K. and Brenner, M. A.: J. Clin. Invest. **45**, 153, 1966.
7) Ingbar, S. H., Braverman, L. E., Dawber, N. A. and Lee, G. Y.: J. Clin. Invest. **44**, 1679, 1965.
8) Oppenheimer, J. H. and Surks, M. I.: J. Clin. Endocr.: **24**, 785, 1964.
9) Premachandra, B. N.: J. Clin. Invest. **51**, 76 p., 1972 (abstract).
10) 今野則道，萩原康司，今　寛：臨床生理，**2**，386，1972.
11) Clark, F. and Horn, D. B.: J. Clin. Endocr. **25**, 39, 1965.
12) Lee, N. D. and Pileggi, V. J.: Clin. Chem. **17**, 166, 1971.
13) Fang, V. S. and Selenkow, H. A.: Clin. Chem. **16**, 185, 1970.
14) 紫芝良晶，清水多恵子，吉村静子，鎮目和夫：日内泌雑誌，**46**，20，1970.
15) Spaulding, S. W. and Gregerman, R. I.: J. Clin. Endocr. **34**, 974, 1972.
16) Hershman, J. M., Jones, C. M. and Bailey, A. L.: J. Clin, Endocr. **34**, 574, 1972.
17) Stein, R. B. and Price, L.: J. Clin. Endocr. **34**, 225, 1972.
18) Anderson, B. G.: J. Amer. Med. Assoc. **203**, 577, 1968.
19) Hamada, S., Nakagawa, T., Mori, T. and Torizuka, K.: J. Clin. Endocr. **31**, 166, 1970.
20) Lamberg, B. A., Heinonen, O. P., Viherkoski, M., Aro, A., Liewendahl, K., Kvist, G., Laitinen, O. and Knekt, P.: Acta En. docr. (Suppl). **146**, 7, 1970.
21) 萩原康司，沖田芳夫：第28回日本放射線技術学会総会抄録集265頁，1972.

*　　*　　*　　*　　*

*　　*　　*　　*

Presented by Medical*Online

Summary

Measurement of free thyroxine concentration in human serum by equilibrium dialysis

Norimichi KONNO, Koji HAGIWARA and Hiroshi KON

Hokkaido social insurance central hospital

A dialysis method for determing free thyroxine in undiluted and diluted serum is presented. The effect of a number of variables (pH, incubation time, incubation temperature, specimen storage and serum dilution) was studied and pertinent data was presented. Within-run precision (95% confidence limits) was ± 3.9% and between-run precision was ± 8.0%. Specimen from 22 healthy subjects were analyzed and normal range of % free thyroxine and absolute free thyroxine were 0.010–0.020% and 1.0–2.0 ng/dl respectively. Both % free thyroxine and absolute free thyroxine were markedly increased in hyperthyroid and significantly decreased in hypothyroid patients. The correlation between values for free thyroxine concentration and free thyroxine index was good ($r=0.97$, $p<0.001$) and the clinical significance of free thyroxine concentration in serum was discussed.

* * * * *

* * * *

Presented by Medical*Online