

《使用経験》

カラムを用いた T_3 RIA キット “セラリュート T_3 ” の基礎的ならびに臨床的検討

小野芳子* 高坂唯子* 遠藤啓吾**
 池窪勝治** 小西淳二* 森徹***
 鳥塚莞爾**

I. 緒言

トリヨードサイロニン（以下 T_3 ）は Gross および Pitt-Rivers によって 1952 年に発見された¹⁾。このホルモン作用も早くから注目されていたが、血中の濃度が低いためその意義は明らかでなかった。1970 年 Brown ら²⁾が T_3 のラシオイムノアッセイ（RIA）を試みて以来、高感度かつ特異性のある RIA 法が開発された。一方、 T_3 甲状腺中毒症の存在³⁾ や、血中の T_4 （サイロキシン）からの T_3 への転換⁴⁾ が知られるようになって、 T_3 測定の意義は極めて大となり、ルチンの甲状腺機能検査の一つとして不可欠のものになった。

著者等はマイルス三共社の御好意によりカラム法を用いた新しい T_3 -RIA キット“セラリュート”法につき若干の基礎的ならびに臨床的検討を行なう機会を得、本法の有用性を認めたので報告する。

II. 測定原理および測定手技

Fig. 1 は測定手技の説明図である⁵⁾。測定原理

は一般の RIA と同じで、 ^{125}I 標識 T_3 と標準物質または被検血清中の T_3 と特異抗体との競合的結合反応を利用するものであるが、本法は血清中の TBG からの T_3 の遊離と B・F の分離に特徴を有する。即ち、 T_3 -RIA では TBG から T_3 を遊離させる必要があり、一般には 6ANS やメルチオレートが用いられる⁶⁾が、本法ではセファデックスカラムをアルカリ性の pH にして、この pH の影響で TBG から T_3 を遊離させカラムに吸着させる (Fig. 1 B,C)。変性蛋白はカラムから洗い流され (D,E)，ここで特異抗体を入れ、カラム内でインキュベートし抗原抗体反応を行なわせる (F,G)。E でカラムの pH は中性に戻るため抗体は変性せず、カラム内の T_3 と充分に結合する。最終的にカラムを緩衝液で洗うことにより、抗原抗体複合体は溶出され、カラムには未反応の T_3 のみが残存する (H,I)。従って B・F の分離に二抗体法やチャコールデキストラン法等のように沈澱を促がす物質を添加する必要がなく、また分離に遠心沈澱を用いる必要もなく簡便である。

III. 実験方法および対象

A. 基礎的検討

規定の測定法について、インキュベーション時間および温度、緩衝液の溶解、抗体の量および特異性、キャリアー蛋白、高 T_3 血清の希釈曲線、回収率などについての検討を行なうとともに、

* 京大病院 中央放射線部

** " 放射線科

*** 神戸市立中央市民病院 内科

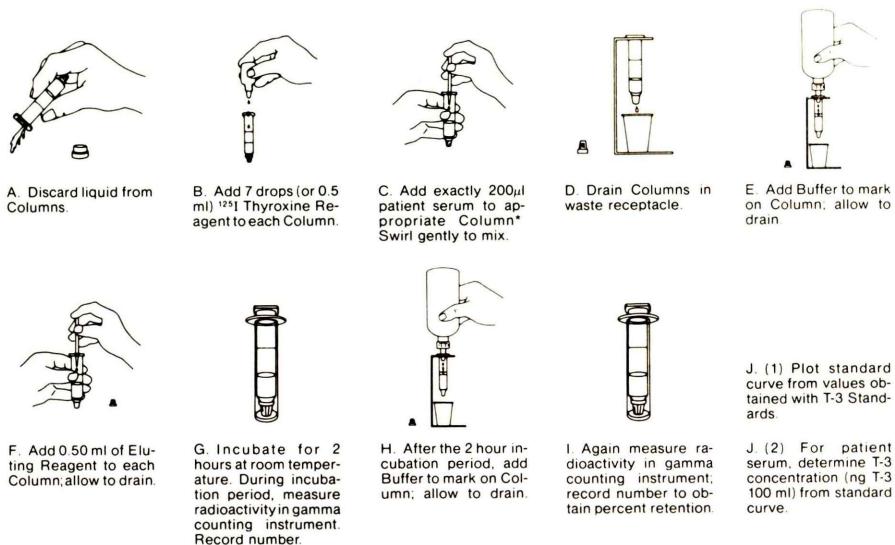
受付：50年 8月22日

採用：50年12月22日

別刷請求先：京都市左京区聖護院川原町54(〒606)

京大医学部放射線科

鳥塚莞爾



*Perform three standards:

1. Measure exactly 50 μl , 100 μl and 200 μl of reconstituted T-3 Standard.
2. Proceed per steps D-J.

Fig. 1 Illustrated Procedure for Seralute Total T-3 (RIA)

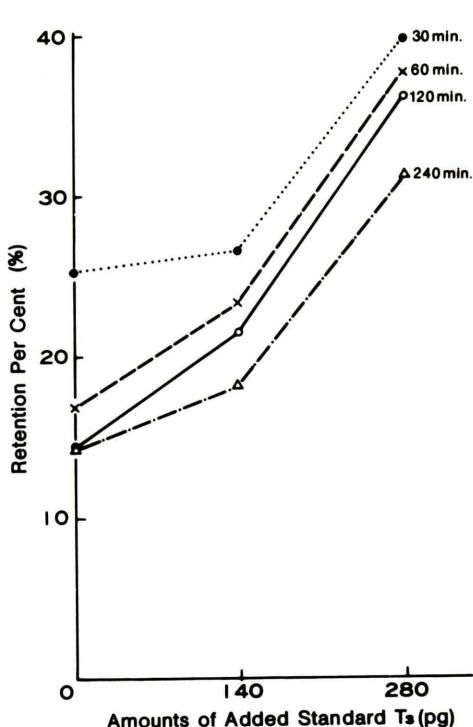


Fig. 2 Changes in radioactivity retained in the elution column (F) by various incubation time.

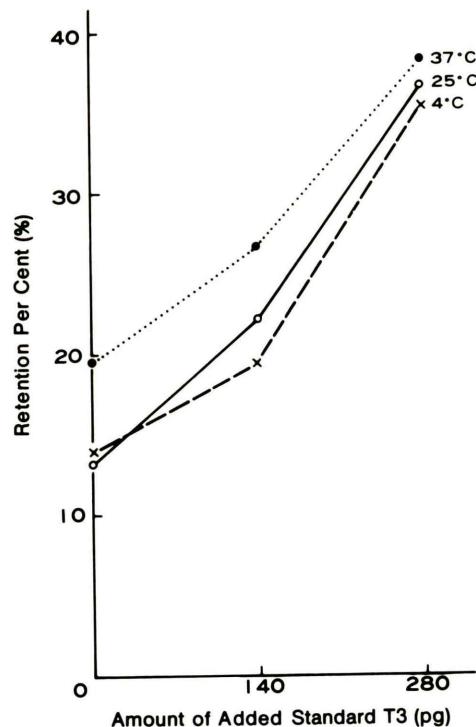


Fig. 3 Changes in radioactivity retained in the column (F) by various incubation temperature.

$^{125}\text{I}-\text{T}_3$ の注入法について 7 滴法と 0.5ml 法を比較検討した。

B. 臨床的検討

京大病院甲状腺外来を受診し、臨床所見、各種検査成績から診断の確定した各種甲状腺疾患患者 125 例、正常妊婦 3 例および京大病院勤務者 20 例について本法により血中 T_3 濃度を測定した。これら症例の同一血清についてダイナボット社の T_3 リアキットによる血中 T_3 濃度、またテトラリュート法による血中 T_4 濃度を測定し、これらの成績を比較検討した。

N. 実験結果

A. 基礎的検討成績

1) インキュベーション時間および温度の検討

Fig. 2 はインキュベーション温度を 25°C として、時間を 30 分から 4 時間まで変化させた場合の添加 T_3 量 0, 140 および 280 pg におけるカラム残留放射能量（遊離 $^{125}\text{I}-\text{T}_3$ ）の比率の変動を示す。添加 T_3 量 0 のプランク値は 30 分、60 分で高値を示し、120 分と 240 分では約 14% と一定し、抗体と T_3 の結合がほぼ 120 分で平衡に近づくと考えられた。一方、 T_3 量 280 pg 添加時の成績では 120 分値が 240 分値より高くなり、60 分値とほぼ平行した。従って、インキュベーション時間としては 60 分ないし 120 分が良く、ことに全サンプルのインキュベーション時間をほぼ一定にすることが必要であると考えられた。

Fig. 3 はインキュベーション時間を 120 分として 4° , 25° および 37°C でインキュベイトした場合の成績を示す。 4°C ではプランクが高く、しかも 280 pg T_3 添加による変動が乏しかった。 37°C においてはプランク値が著明に上昇した。以上の成績から 25°C , 60~120 分のインキュベーションが好適と判断され、以後の実験は 120 分で行なった。

2) 緩衝液の溶解液に対する検討

本法では当初強アルカリ性に保たれているカラムを緩衝液（無水ジソディウム磷酸 EDTA）で中性の pH に戻す。この緩衝液の溶解には脱イオン水とともに脱銅水の使用を規定してあるが、水道水

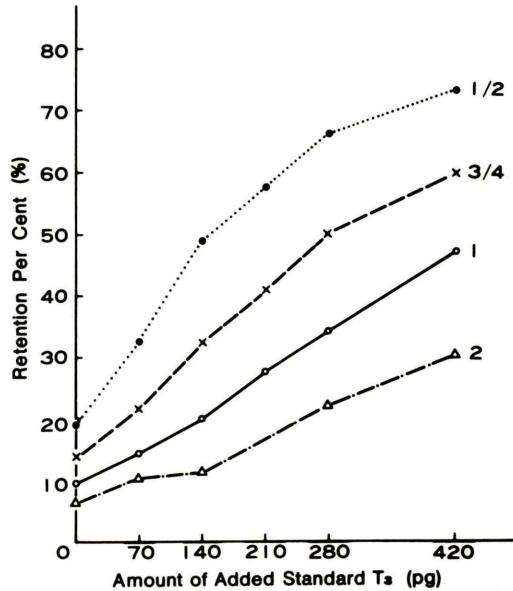


Fig. 4 Standard curves obtained with various dilution of antibody.

で緩衝液を溶解した場合には緩衝作用が失われ、プランク値が 75% 以上に止まった。EDTA の性状からいっても脱イオン水とともに二価のイオンを含まない液を用いることが必要である。

3) 抗体の性状に対する検討

Fig. 4 は使用抗体濃度を規定の 1/2, 3/4, 1 および 2 倍量と変えた場合の標準曲線を示す。（濃度のみを変化させ、液量は 0.5ml で一定とした。）規定量では添加 T_3 量 70 から 420 pg の間の変動はほぼ直線的であったが、2 倍量では全般にカラム残留量が低下し、ことに低 T_3 時の平坦化がみられた。希釈抗体使用時には逆にカラム残留量が増加し、1/2 抗体濃度では 280 pg と 420 pg の間の変動が乏しくなり、標準曲線は直線性を失なったが、低 T_3 レベルにおける変動幅は大きくなかった。なお抗体濃度変化時の血清 T_3 測定成績はほとんど不变であった。従って、標準曲線を直線化して扱う場合には規定の抗体濃度が最適であり、標準点数も少なくて良いといえるが、高感度の測定を意

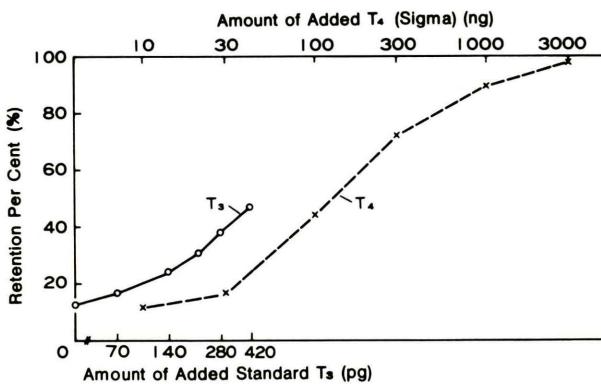
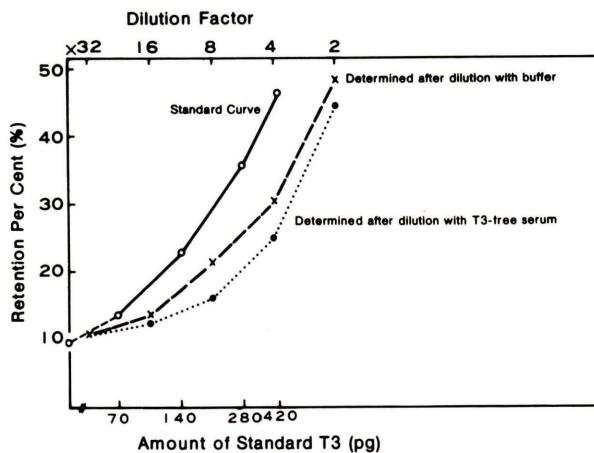
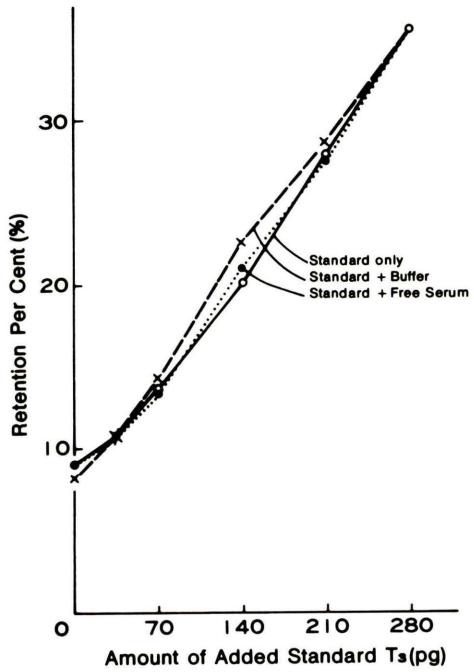
Fig. 5 Cross-reactivity of *l*-T₄ (Sigma) in the assay.

Fig. 7 Dilution curves of high T serum with provided Buffer or T free/serum.

図して多くの標準点をとり曲線のまま扱うならば抗体濃度を低くすることが有用といえる。

Fig. 5 はシグマ社製 *l* サイロキシンの交叉性から本抗体の特異性を検討した成績を示す。T₄による用量反応曲線は添加 T₄ 量 30 ないし 300ng の間において T₃ の標準曲線とほぼ平行し、3,000ng の添加ではほぼ完全な ¹²⁵I-T₃ の抗体結合の阻害を示した。この交叉反応性は 0.27% と算出された

Fig. 6 Standard curves obtained with various dilution for T₃.

が、使用した T₄ 製剤はダイナボット社 T₃-RIA キットでもほぼ同様の交叉反応を示し、本来若干の T₃ の混在を有するものと考えられ、この数値は本キット抗体の T₃ 特異性が低いことを示すとは考えられず、却って特異性は十分であり、臨床応用において血中 T₄ の影響は殆んどないといって良いと思われる。

4) 標準 T₃ の液量およびキャリヤー蛋白の検討

本法における標準 T₃ は 1 本用意されているのみで、規定によれば 50, 100 および 200μl の添加で良いとされている。標準液の量の多寡は ¹²⁵I-T₃ との混合上に問題を生じると考えられ、Fig. 6 に示す如く添付の標準液 (280pg/200μl) を添付緩衝液または T₃ フリー血清 (プール血清をアンバーライトトレジンで処理し、T₃ の 96% 以上が除去された血清) で希釈し、70, 140 および 210 pg が

Table 1 Recovery of T_3 added.

| 血清 100 μl 中の T_3 測定値 | 血清 100 μl + 標準 T_3 70 pg の測定値 | 標準 T_3 70 pg の回収成績 | 血清 100 μl + 標準 T_3 140 pg の測定値 | 標準 T_3 140 pg の回収成績 |
|-----------------------------|--------------------------------------|----------------------|---------------------------------------|-----------------------|
| 25(pg) | 105(pg) | 80(pg) | 185(pg) | 160(pg) |
| 35 | 125 | 90 | 205 | 170 |
| 95 | 175 | 80 | 248 | 153 |
| 110 | 182 | 72 | 252 | 142 |
| 130 | 200 | 70 | 270 | 140 |

Table 2 Comparison of $^{125}\text{I}-T_3$ added between 7 drops method and pipetting method (0.5ml).

7滴法

| 測定日 | 平均±標準偏差* | 変異係数(%) |
|-------|------------|---------|
| 9月11日 | 54350±4470 | 8.22 |
| 9月13日 | 61619±2177 | 3.53 |
| 9月14日 | 53135±2999 | 5.64 |
| 2月28日 | 47855±3780 | 7.90 |
| 3月8日 | 47871±6124 | 12.79 |

0.5ml 法

| 測定日 | 平均±標準偏差* | 変異係数(%) |
|-------|-----------|---------|
| 3月11日 | 56191±764 | 1.36 |
| 3月22日 | 52337±350 | 0.67 |
| 4月1日 | 43053±637 | 1.48 |
| 4月9日 | 39003±506 | 1.30 |
| 4月16日 | 35808±639 | 1.78 |

*キットの20本の全サンプルのイニシャルカウントを用い算出した。

それぞれ 200 μl になる様調整したものを用いて標準曲線を比較した。ブランクには緩衝液または T_3 フリー血清 200 μl を用いた。緩衝液使用時にはブランク値が低く、140, 210 pg T_3 添加時に高いカラム残留率を示した。これは数回の実験で常に再現された。一方、 T_3 フリー血清使用時には規定の標準曲線とほぼ一致した成績が得られた。

Fig. 7 は高 T_3 を示したバセドウ病患者血清の緩衝液および T_3 フリー血清による希釈曲線を示す。後者が標準曲線とよく平行したが、前者では4倍以上の希釈時に平行性が失われた。高 T_3 血清10例の10倍希釈液の測定成績も緩衝液のものが全て高値を示した。以上から、標準 T_3 の添加は液

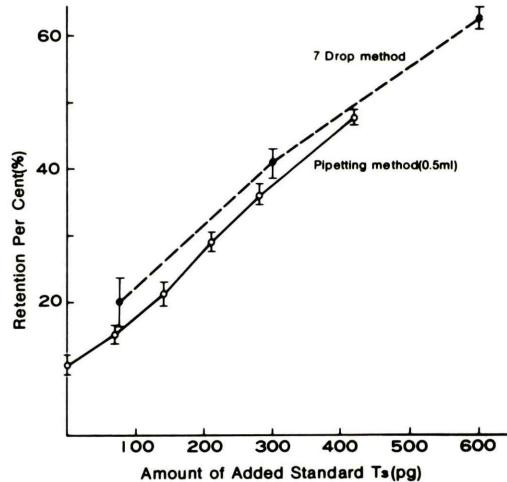


Fig. 8 Standard curves obtained by 7 drops method and pipetting method (0.5ml).

量の多寡がほとんど測定に影響しないこと、また血清希釈用には緩衝液でなく T_3 フリー血清が適することを認めた。

5) 添加 T_3 回収率

5本の患者血清 100 μl に標準 T_3 を 70 および 140 pg 添加し、その回収率を観察した。(Table 1)

70 pg 添加時の回収は 70~90 pg, 140 pg では 140~170 pg で若干の過剰回収を認め、概して原血清の T_3 レベルの低いものにその傾向が強かったが、これは本法の感度からいって原血清の測定値に問題があるものと考えられ、本法自体の回収率は満足すべきものと判断された。

6) $^{125}\text{I}-T_3$ 注入法による変動の検討

本法では $^{125}\text{I}-T_3$ を 7 滴下する方法が用いられる。競合的結合反応を利用し、抗体を正確に注入するからには $^{125}\text{I}-T_3$ の多寡は当然測定成績に影響しうると考えられる。原法ではこの補正のためインキュベーション中にイニシャルカウントを測定することを規定している。一方、0.5 ml の注入法をも推めており、両者の比較が必要である。

Table 2 は 7 滴法および 0.5 ml 法による測定日毎のイニシャルカウント (1 キット 20 本) の変動を示す。7 滴法では 3.5~12.8% の変異を示したに反し、0.5 ml 法では 0.7~1.8% と変異が少な

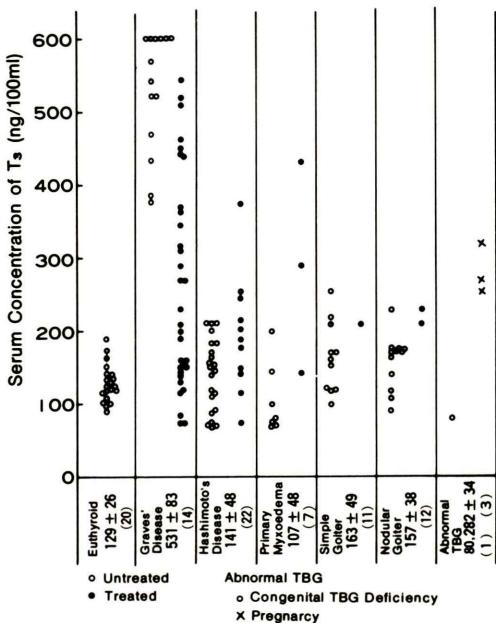


Fig. 9 Distribution of Seralute values in normal subjects and patients with various thyroid diseases.

く、0.5ml法ではイニシャルカウントの測定は必ずしも必要ないと考えられた。(但し、キットの検定の意味から1本の測定は必要である。)

Fig. 8は両法による標準曲線(各5回の平均値±標準偏差)を示す。7滴法の標準曲線が0.5ml法のそれの上方に位置するが、これはTable 2のカウント数にみられる如く、7滴>0.5mlであり¹²⁵I-T₃の量が多くなることに基づくと考えられる。各標準点のバラツキの比較ではやはり0.5ml法の変動が小さく、より優れているといえるが、7滴法ではイニシャルカウントに見られた大きな変動がかなり是正されており、比較的安定な成績が得られることが示された。

B. 臨床的検討成績

1) 各種疾患および正常人における測定成績

Fig. 9に臨床例における血中T₃濃度の測定成績を示す。

正常人20例では88~190ng/100mlに分布し、平均129±26(S.D.)であった。

バセドウ病未治療例14例は375ng/100ml以上

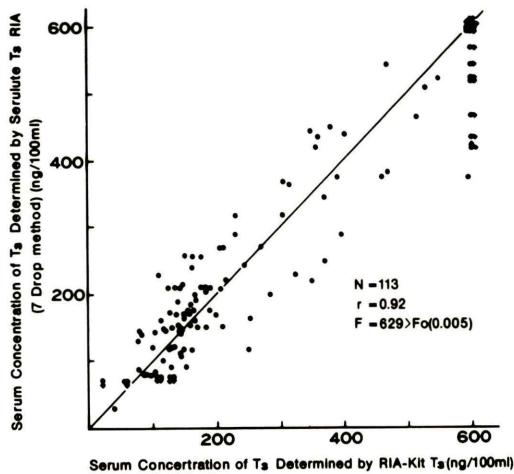


Fig. 10 Correlation between Seralute values (7 drops method) and Dainabot T₃ RIA values.

の高値を示し、治療例32例は幅広い分布(263±144)を示した。

橋本病未治療例22例は141±48ng/100mlで65~80と低いものや200以上の高値例もみられたが、正常人と有意差はなかった。治療例に195±80と高い値がみられたが375ng/100mlを示したものはT₃投与中の症例であった。

原発性甲状腺機能低下症7例では107±48と低値を示し、大部分が100以下であったが、一部には正常ないしやや高値を示すものもみられ、バセドウ病などの正常との差異がみられなかった。治療例のうちT₃投与例で高値がみられた。

単純性甲状腺腫11例は163±49ng/100ml、結節性甲状腺腫12例は157±38ng/100mlであった。先天性TBG減少症(T₄: 3.2μg/100mL T₃ RU54%)の1例は80ng/100mlと低値を示し、正常妊娠3例は282±34ng/100mlと有意の高値を示した。

2) T₃リアキット測定値との比較

Fig. 10は7滴法、Fig. 11は0.5ml法を用いた本法測定成績とダイナボットT₃リアキットによる測定成績の相関を示す。それぞれ0.92および0.83と極めて良好な相関を認め、y=xの線からの

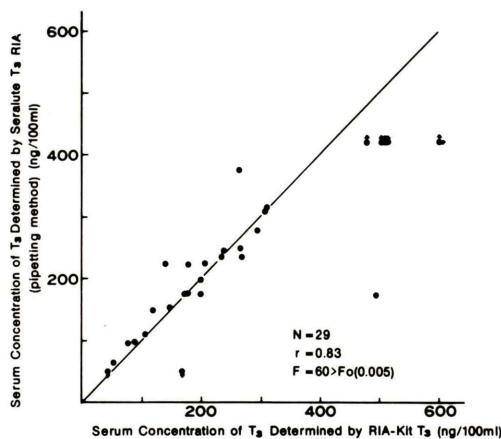


Fig. 11 Correlation between Seralute values (0.5ml method) and Dainabot T_3 RIA values.

ズレもなく両法による測定値の良好な一致が認められた。なお、0.5ml法では大部分の例で優れた一致性が認められたが、2例において右下分ヘズレ大きく相関を乱すものがあった。これらはともにカラムの一部に気泡を伴なった変質が後刻確認されており、キット取扱い上注意を要するものといえる。

3) 血中 T_4 濃度との相関

Fig. 12 は本法による血中 T_3 濃度とテトラリュート法による T_4 濃度の相関関係を示す。相関係数 0.75 と良好な相関が認められ、概して T_4 と T_3 の相互関係は密であるといえるが、一部高 T_3 を示しつつ T_4 低値をとるものがあった。このシリーズにはいわゆる T_3 中毒症はなく、この2例はともに T_3 製剤による補償療法中の患者で製剤服用後3時間以内に採血したものであり、 T_3 投与中の例における測定値には注意が必要である。

V. 考査ならびに結語

T_3 -RIA キット “セラリュート” 法の測定条件につき基礎的検討を行なったが、規定の方法でインキュベーション時間、温度、抗体濃度、添加 T_3 回収率などでほぼ満足出来る成績が得られた。標準曲線は T_3 70~420 pg に対してほぼ直線を示した。

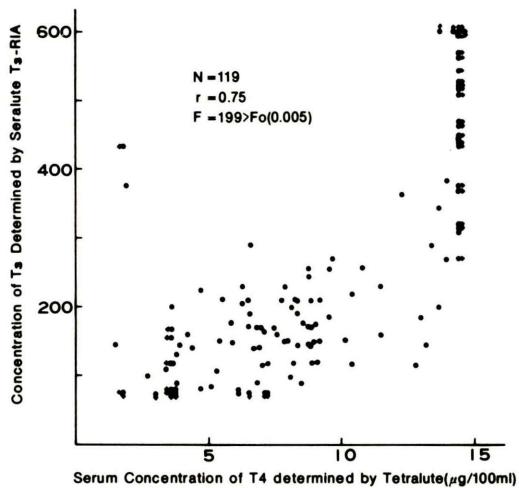


Fig. 12 Correlation between Seralute values (0.5ml method) and Tetralute values (T_4).

本法の特徴は血清中の TBG と T_3 の結合解離に強アルカリの pH を用いる点であるが、カラムに注入された $^{125}\text{I}-\text{T}_3$ は殆んど 100% に吸着され、TBG は完全に変性するものと考えられる。しかし、第2段階においてはカラムを中性に戻してから抗体との結合を進めることが必要であり、この点で緩衝液作成に脱イオン水の使用が不可欠である。今一つの本法の特徴は B・F の分離がカラムの洗浄によって簡単に行なわれることである。一般の RIA においては二抗体法でもチャコール等の吸着法においてもインキュベーション終了後に第2抗体または吸着剤のビベッティングを要し、しかも分離に遠沈をする。RIA の自動化を最も障げているのはこの遠沈操作であり、本法の様な緩衝液によるカラムの洗浄という簡便な操作は今後の RIA の自動化の可能性に対する大きな光明といえる。この目的からいえば本法において $^{125}\text{I}-\text{T}_3$ を 7 滴法で注入した場合、個々のカラムで若干 (3.5~12.8%) のバラツキがありこれが測定成績に影響するのでインキュベーション中に一度総カウント数を計測する必要があるが、これはやはり自動化簡便化に不利な点である。著者らは 0.5 ml 法を検討し、イニシャルカウントのバラツキが無視出来る (1.8% 以下) こと、標準点の変動

率も改善されることを認めた。予想に反して7滴法の成績はT₃ RIA キット(ダイナボット)の成績と良好な相関を示し、臨床的には充分通用するものであることをも確認したが、実施上7滴法が0.5ml法に優れる点はほとんどなく、後者の使用が推賞される。

本法の感度はT₃ 35pgを検出出来る。しかし抗体の量を3/4または1/2にすることによって標準曲線の直線性は失なわれるがより高感度の測定が可能(T₃ 10 pg)であり、組織抽出物などの低T₃ レベルの物質の測定にはこの様な処置が有効である。

本法による臨床測定成績は正常者および各種疾患者において従来の方法による報告と著差を認めず、個々の成績も他のキットの測定成績と極めて良好な相関を示した。但し、本法の測定値が他法の測定値に比して際立って低い値を示す場合が散見され、これはカラムが乱れて乾燥状態にあったためと結論された。カラムの状態を正しく保つことは本法の実施上一つの重要なポイントである。

以上、セラリュートT₃ キットの基礎的並びに臨床的検討結果を述べたが、その要約は以下の如くであった。

1) 基礎的検討

①インキュベーション時間および温度は25°Cで60~120分が好適である。②緩衝液の溶解には水道水などの不純なものは不適である。③標準曲線は70~420pgのT₃に対しほぼ直線を示し、最低検出量は35pgであるが、抗体量を1/2にすれば直線性は失なわれるがより高感度(T₃ 10 pg)になる。④抗体の特異性はシグマ社I-T₄により0.27%の交叉性を認めたのみで良好といえる。⑤

添加T₃の回収率、高T₃血清の希釈曲線の平行度も良好であり、キャリヤーとしては緩衝液よりT₃フリー血清が優れる。⑥¹²⁵I-T₃の注入法には7滴法の変動(3.5~12.8%)に比し0.5ml法が優れ(1.8%以下)、標準点における偏差も明らかに小さかった。

2) 臨床的検討成績

①正常者および各種疾患者148例において血中T₃濃度を測定した。正常値は129±26ng/100mlであった。未治療バセドウ病患者は375ng/100ml以上で正常者との重なり合いはなかったが、原発性甲状腺機能低下症患者は107±48ng/100mlで正常者との重なり合いを認めた。TBG減少症の1例は80ng/100mlと低く、正常妊婦は282±34ng/100mlと高値を示した。②本法測定成績とダイナボット社T₃ RIA キットの測定値は0.92および0.83と極めて高い相関度を示し、その絶対値にもズレがみられなかった。③テトラリュート法によるT₄の測定成績とも0.75と良好な相関がみられたが、T₃投与中の症例で高T₃とともに低T₄を示すものがみられた。

以上から本法は簡便でもあり臨床応用上有用であると結論された。

文 献

- 1) Gross J and R Pitt-Rivers : Lancet, 1 : 439, 1952.
- 2) Brown B L, R P Ekins S M Ellis and W S Reith : Nature, 226 : 359, 1970
- 3) Sterling K D Bellabarba E S Newman and M A Brenner : J Clin. Invest. 48 : 1150, 1969
- 4) Braverman L E, S H Ingbar and K Sterling J Clin Invert 49 : 855, 1970
- 5) セラリュートT₃ 使用説明書: Ames社
- 6) 竹田洋祐: 日内分泌誌, 51 : 36, 1974