

《使用経験》

T₃ イムノアッセイキットの基礎的ならびに臨床的検討

小 西 淳 二* 中 島 言 子* 森 田 陸 司*

遠 藤 啓 吾** 池 窪 勝 治** 鳥 塚 莞 爾**

I. 緒 言

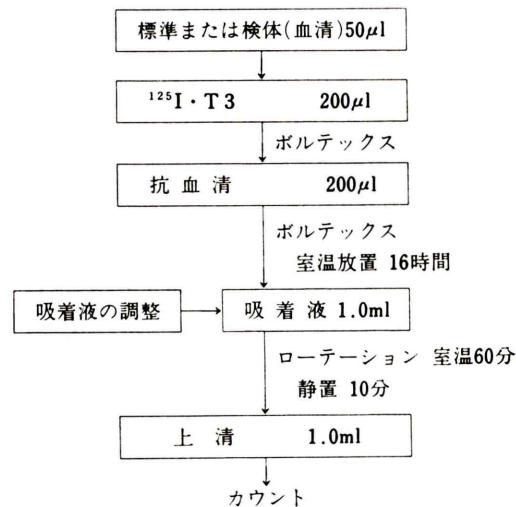
トリヨードサイロニン(以下 T₃)は 1952 年 Gross および Pitt-Rivers¹⁾により発見され、そのホルモン作用も早くから知られていた。しかしあくまで T₃ を定量することは困難であったためその役割は明らかでなかった。1970 年 Brown ら²⁾は T₃ の測定にラジオイムノアッセイ(RIA)の応用を試み、以来高感度かつ特異性のある RIA 法が開発されるに至った。それとともに T₃ 甲状腺中毒症の存在³⁾や、血中の T₄ から T₃ への変換⁴⁾などが知られるようになって、臨床的にも T₃ 測定の意義は極めて大となり、ルチンの甲状腺機能検査の一つとして不可欠のものとなって来た。

今回著者らは、科研化学社の御好意により英国 RCC 社製の T₃ 測定キット“T₃ イムノアッセイキット”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その成績を報告する。

II. 測定原理および測定手技

本キットは凍結乾燥した ¹²⁵I-T₃(比放射能 1,500 ~ 2,000 mCi/mg), 抗 T₃ 血清、および T₃ 標準血清(各バイアルにそれぞれ 0.11, 0.74, 1.89, 4.80 ng/ml

の T₃ を含む)と懸濁用吸着剤よりなり、使用に際していずれも規定量の蒸溜水に溶解して用いる。測定操作の概略は Fig. 1 に示す通りである⁵⁾。必要血清量は 50 μl で ¹²⁵I-T₃ と混合した後、抗血清を添加しインキュベイトする。TBP 阻害剤としては Barbital 緩衝液とメルチオレイト 1 mg/ml を用いている。測定原理は通常の RIA と同じで ¹²⁵I 標識 T₃ と T₃ 標準血清または被検血清中の T₃ 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、本法では B·F 分離にイオン交換樹脂系の吸着剤の懸濁液を用いている。遊離の T₃ を吸着分離し液中に残存する抗体結合 T₃ の放射能を測定するのであるが、この吸着剤は静置により容易に沈殿するので遠沈操作を必要としない。また全体を通じて操作は室温で行なう。

Fig. 1 Procedure of T₃ immunoassay kit.

* 京大病院 中央放射線部

** 京大 放射線科

受付: 50 年 10 月 8 日

採用: 51 年 3 月 11 日

別刷請求先: 京都市左京区聖護院川原町 54 (〒606)

京都大学医学部附属病院中央放射線部

小 西 淳 二

III. 実験方法および対象

1. 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、温度の検討、遠沈操作の不要性、抗体の特異性、高 T_3 血清の希釈曲線、回収率、精度、再現性、溶血の影響などについての検討を行なった。

2. 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甲状腺疾患患者 107 例（うちバセドウ病 53 例、橋本病 27 例、原発性甲状腺機能低下症 6 例、腺腫 13 例、単純性甲状腺腫 6 例、亜急性甲状腺炎 2 例）、神経性食思不振症患者 2 例、正常妊婦 3 例、および京大病院勤務者を中心とする健康人 70 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、またテトラソルブ法による血中 T_4 濃度を測定し、これらの成績を比較検討した。

IV. 実験成績

1. 基礎的検討の成績

1) インキュベーション時間および温度

Fig. 2 は最初のインキュベーションにつき室温 (20°C) にて時間を 8~48 時間まで変化させた場合の標準曲線を示す。 $T_3 0.11 \text{ ng/ml}$ の標準血清における上清カウントは時間とともに上昇を示したが 16 時間以後での変化は少なく抗体と T_3 の結合がほぼ平衡に近づくと考えられ標準曲線もよく平行した。

Fig. 3 はインキュベーション時間を 16 時間として 5, 20, 25, および 37°C でインキュベイトした場合の標準曲線を示す。 $T_3 0.11 \text{ ng/ml}$ の標準血清における上清のカウントは 5°C では極めて低値であったが $20\sim37^{\circ}\text{C}$ では著しく上昇し良好な標準曲線が得られた。更にインキュベーション時間を短縮することを目的に、 37°C で 1 時間および 4 時間のインキュベーションを試みた成績を Fig. 4 に示す。 37°C 4 時間のインキュベーションで得られた標準曲線はほぼ室温 16 時間のインキュベイ

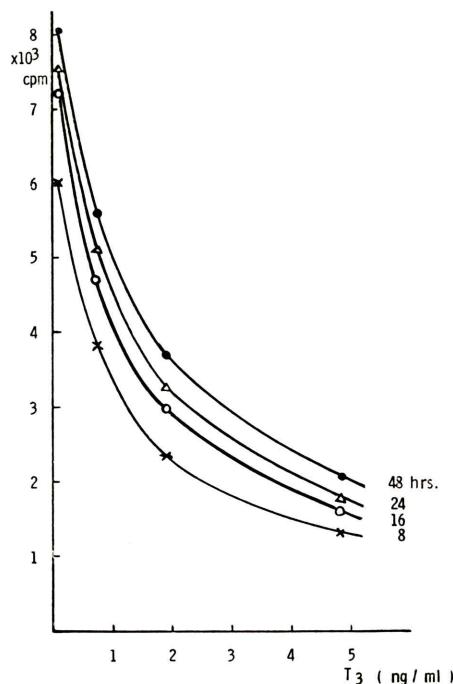


Fig. 2 Effect of incubation time on standard curves at room temperature.

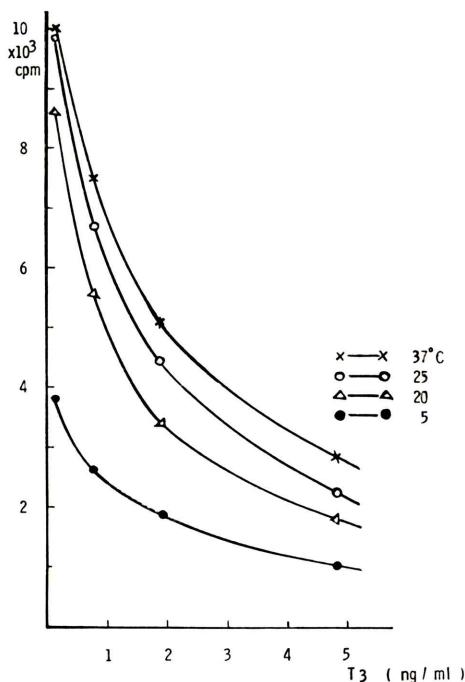


Fig. 3 Effect of incubation temperature on standard curves (Incubation time: 16 hours)

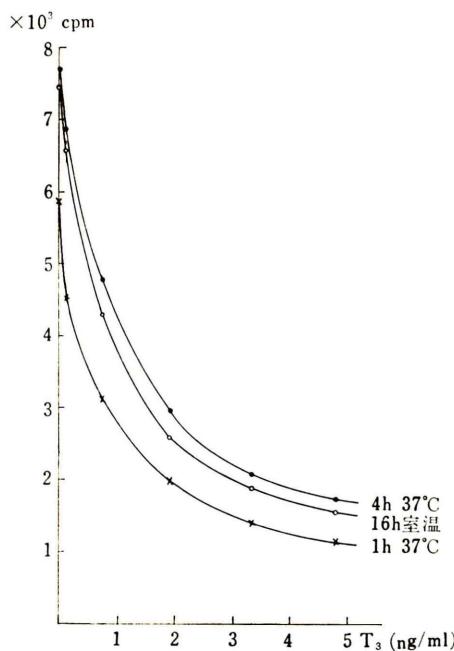


Fig. 4 Effect of incubation time on standard curves at 37°C (Compared with the 16 hours incubation at room temperature.)

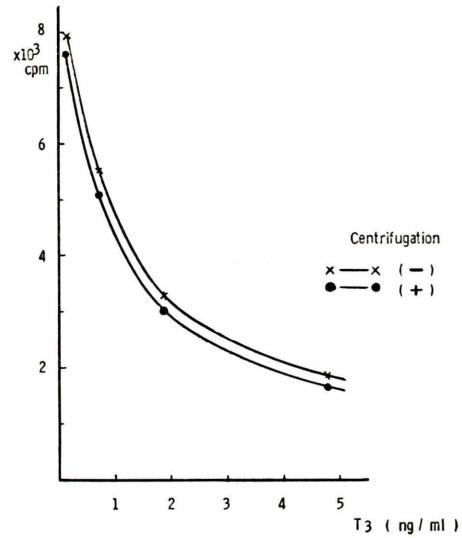


Fig. 6 Comparison of settlement method and centrifuge method for B·F separation.

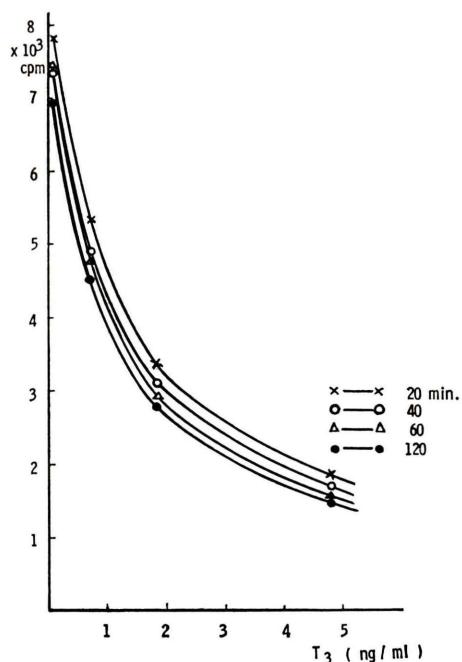


Fig. 5 Effect of adsorption time on standard curves.

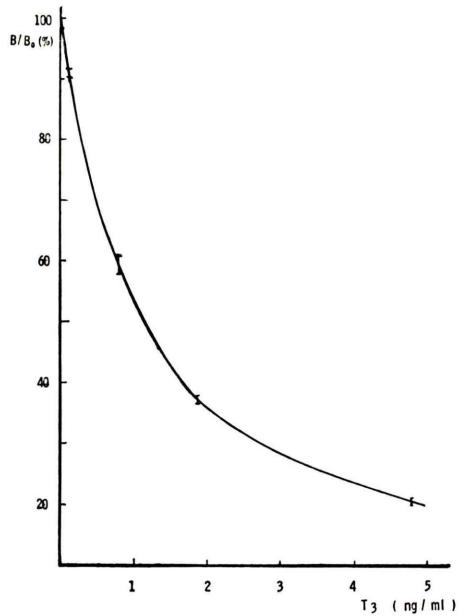


Fig. 7 Standard curve.

ヨンの場合と一致し、37°C 1時間ではややブランク値が低いがほぼ平行した曲線が得られた。

2) 吸着剤による遊離¹²⁵I-T₃の吸着及び分離操作に関する検討

吸着操作ではチューブをローティターにて混合するがこの時間についての検討成績をFig. 5に示す。吸着時間が長くなるにつれ上清のカウントは減少するが60分以後の変化は僅かでありコントロール血清の測定値も40分以上ではよく一致した。

吸着された遊離¹²⁵I-T₃と上清の結合¹²⁵I-T₃の分離について、10分間の静置による規定の方法と遠沈操作(2,000 rpm, 5分)によるものを比較検討したが遠沈により僅かに上清のカウントが減少するのみで10分間静置により十分分離が行なわれる事が示された(Fig. 6)。

3) 標準曲線の再現性

以上の様な検討の結果、規定の測定条件により作成した6回の標準曲線をT₃ free 血清における上清カウントを100として%表示で示したもののがFig. 7である。標準血清 0.11, 0.74, 1.89 および

4.80 ng/ml の各点での標準偏差は0.5~1.4%，変異係数は0.6~2.8%で良好な再現性が認められた。測定域は0.1~5 ng/mlである。

なお、標準曲線の1.89~4.80 ng/mlの間が広いため、曲線の性状に慣れるまでは両者を混じて3.35 ng/mlの中間点とし5点で標準曲線を描くと高値での再現性が良好となる。

4) 抗体の特異性

シグマ社製 Monoiodotyrosine (MIT), Diiodotyrosine (DIT), およびI-T₄とサイログロブリンを用いて抗体の特異性について検討した(Fig. 8)。MIT, DITでは10 μgまで全く交叉反応はなく、T₄では10~100 ngでT₃の標準曲線とほぼ平行した用量反応曲線を示し0.17%の交叉反応が認められたが、使用したT₄そのものが若干のT₃の混在を有するものであり、この成績は使用抗体のT₃特異性を十分裏付けるものである。サイログロブリンでは10 μgの大量で若干の交叉反応が認められた。

5) バセドウ病患者血清の希釈曲線

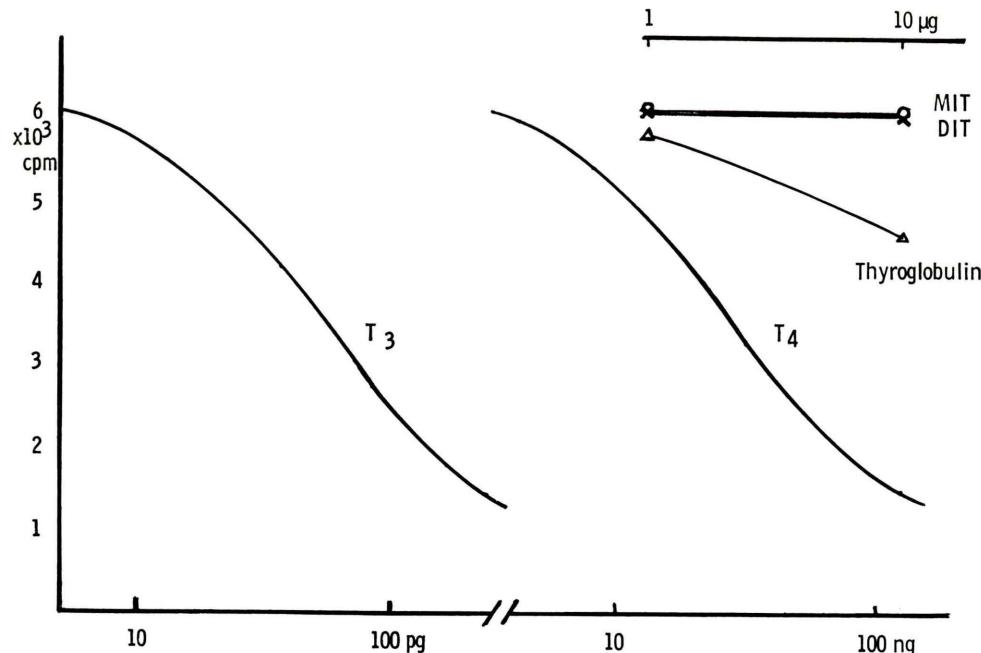


Fig. 8 Evaluation of specificity of antibody.

血中 T₃ 値が高いバセドウ病患者血清を T₃ free 血清により希釈して検討した。Fig. 9 に示す如く希釈曲線は標準曲線とよく平行し、また 3 例の高

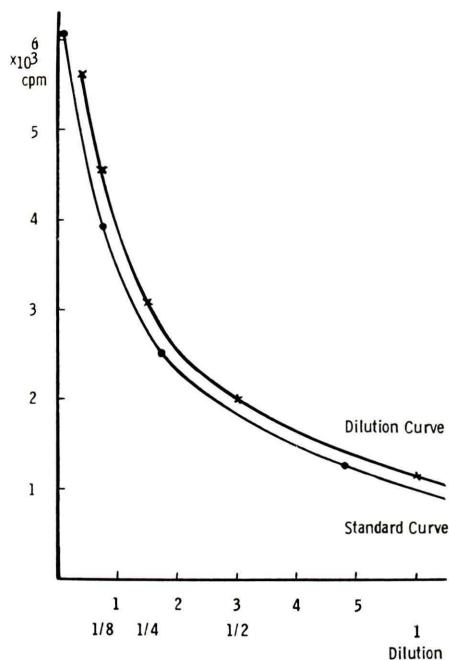


Fig. 9 Dilution curve of high T₃ serum with free T₃ serum.

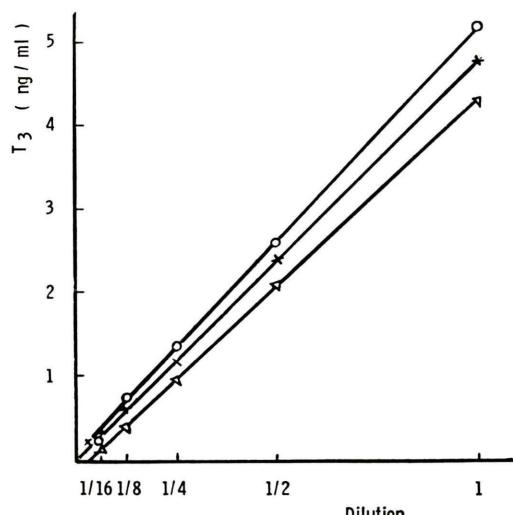


Fig. 10 Effect of doubling dilution of high T₃ serum with free T₃ serum on assay values.

T₃ 血清で何れもその希釈度と測定値は直線上にプロットされた (Fig. 10)。

6) 回収率

T₃ 濃度 37 ng/100 ml の血清に 62.5~500 ng の T₃ を添加した場合の測定値および回収率を Table 1 に示すが、回収率は 93~104% の分布を示し平均値および標準偏差は 100±5% であった。

Table 1 Recovery of T₃ added to serum.

T ₃ Conc. ng/100 ml	Calculated Values	Observed Values	Recovery (%)
500	537	500	93
250	287	293	103
125	162	164	101
62.5	99.5	103	104
Mean		100	
SD		5	

7) 精度および再現性

正常および高値の 2 つの T₃ 濃度の血清につき同一アセイで 5 回測定を行なった際の平均値および標準偏差は 133±2.4 および 340±5.2 ng/100 ml で、変異係数はそれぞれ 2.1% および 1.5% であった (Table 2)。

Table 2 Variation within an assay.

T ₃ Conc. (ng/100 ml)		
	(1)	(2)
1	135	340
2	133	343
3	132	333
4	130	346
5	136	336
Mean	133	340
SD	2.4	5.2
CV (%)	2.1	1.5

また低値から高値にわたる 5 血清について 8~10 回異なるアセイでの測定を繰返し行なった際の変異係数は 1.3~6.6% と安定した測定値が得られた (Table 3)。

Table 3 Reproducibility of assay values under various T₃ levels.

No. of assay	T ₃ Concentration (ng/100 ml)				
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
1	45	95	133	295	465
2	38	97	130	292	455
3	38	93	137	295	460
4	40	98	137	290	475
5	37	97	138	295	466
6	37	93	138	315	467
7	40	94	136	327	467
8	40	108	130	313	474
9			132		488
10			130		473
Mean	39.4	96.4	133.7	302.8	470.0
SD	2.6	5.1	3.4	13.6	6.0
CV (%)	6.6	5.3	2.5	4.5	1.3

8) 溶血の影響

凍結融解による高度溶血血清では測定値が低値を示したが、血餅分離の際の機械的障害による軽度溶血では殆んど測定値に影響がみられなかった(Table 4).

Table 4. Effect of hemolysis on T₃ assay values.

	溶血なし	弱溶血	強溶血
I (T ₃ ng/100 ml)	133	130	80
II ,,	138	140	80

2. 臨床的検討の成績

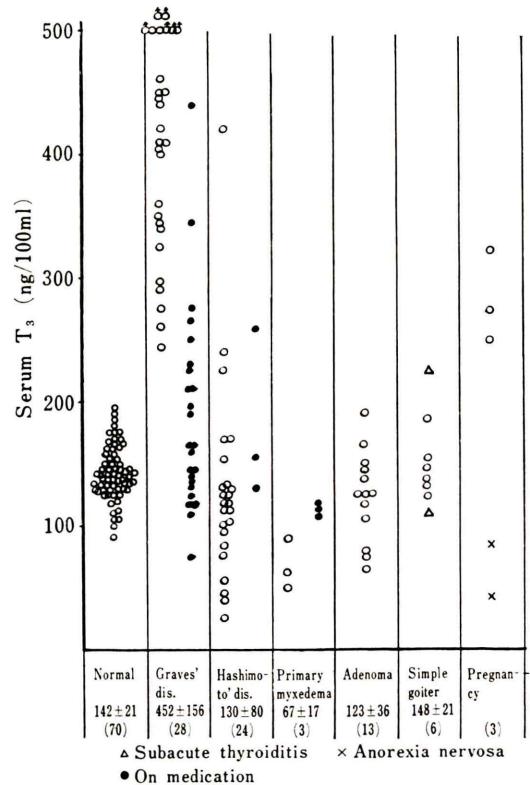
1) 各種疾患および正常人における測定成績

Fig. 11 に臨床例における血中 T₃ 濃度の測定成績を示す。

正常人 70 例では 90~195 ng/100 ml に分布し、平均 142 ng/100 ml \pm 21 (S.D.) であった。

バセドウ病治療例 28 例は 244 ng/100 ml 以上の高値を示し、平均 452 ng/100 ml \pm 156 (S.D.) であった。治療中の症例 25 例では 75~440 ng/100 ml と幅広い分布を示した。

橋本病未治療例 24 例は平均 130 ng/100 ml \pm 80 (S.D.) で 25~80 と低値のものや 200 以上の高値を

Fig. 11 Serum T₃ levels in normals and patients with various disorders by the T₃ immunoassay kit.

示すものもみられたが正常者と有意差はなかった。治療中の症例 3 例は 130~260 ng/100 ml に分布していた。原発性甲状腺機能低下症 3 例では 67 ng/100 ml±17 (S.D.) で、治療中のものは 106

~118 ng/100 ml であった。甲状腺腺腫 13 例では 123 ng/100 ml±36 (S.D.)、単純性甲状腺腫 6 例は 148 ng/100 ml±21 (S.D.) であった。亜急性甲状腺炎急性期および緩解期の各 1 例では 225 および 110 ng/100 ml であった。神経性食思不振症の 2 例では何れも 85 ng/100 ml 以下の低値であった。正常妊娠 3 例では 250~320 ng/100 ml と高値を示した。

2) T₃ リアキット測定値との比較

Fig. 12 は本法による血清 T₃ 濃度とダイナボット社 T₃ リアキットによる測定値との関係を示す。相関係数 0.97 の良好な相関が認められ、 $y = x$ の線からのズレもなく両法による測定成績の良好な一致が認められた。

3) 血中 T₄ 濃度との相関

Fig. 13 は本法による血清 T₃ 濃度とテトラソルプ法による T₄ 濃度の相関関係を示す。相関係数は 0.79 と良好な相関が認められた。一部 T₄ 正常で T₃ 高値のものがみられたが、これらの多くは治療中の甲状腺機能亢進症患者で、この対象者中にいわゆる T₃ 甲状腺中毒症はみられなかった。

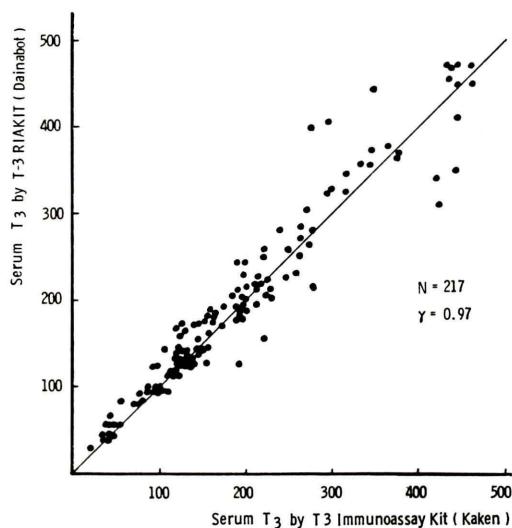


Fig. 12 Correlation between T₃ values by T₃ RIA Kit (Dainabot) and those by T₃ Immunoassay Kit (Kaken)

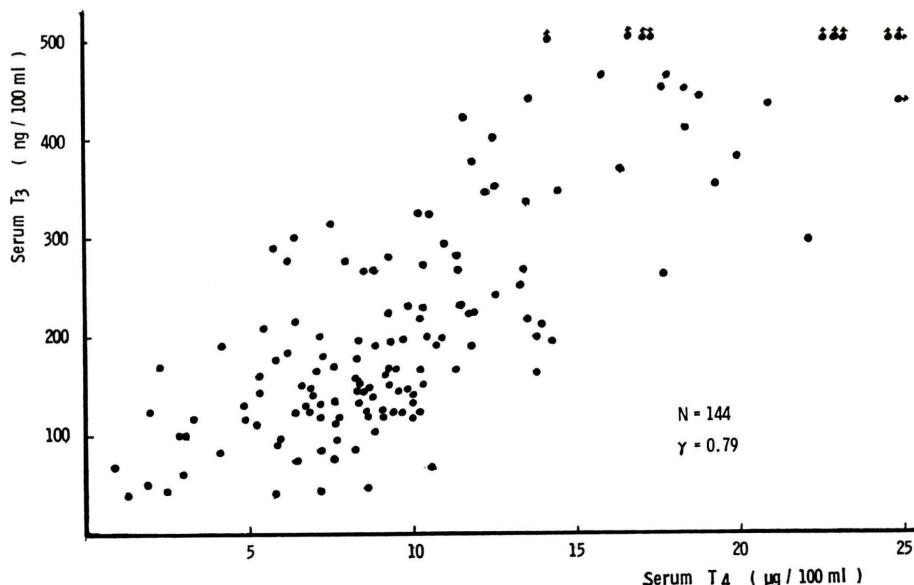


Fig. 13. Correlation between T₃ levels by T₃ RIA Kit and T₄ levels by Tetrasorb Kit.

V. 考 案

T_3 イムノアッセイキットについてその測定条件につき基礎的検討を行なったが、規定のインキュベーション時間、温度条件で添加 T_3 回収率、精度、再現性などほぼ満足出来る成績が得られた。インキュベーション時間に関しては規定の室温16時間のほか 37°C では1~4時間に短縮が可能であることが示された。

本法の特徴は **B・F 分離** にイオン交換樹脂系の吸着剤を用いている点にあるが、この吸着剤による遊離 $^{125}\text{I}-T_3$ の吸着は室温60分で安定した成績を示し、また10分間の静置で容易に沈澱するので、遠沈操作を必要としない。このことは全操作が室温で行なえる簡便さとともに、今後これらRIAの自動化が進められていくに当って大きな利点と考えられる。

抗体の特異性はシグマ社 I-T_4 との間に 0.17% の交叉反応性を認めたのみで良好であり、サイログロブリンでは極めて大量 (10 μg) で僅かに交叉反応を認めたのみで実際の測定上問題にならないことが示された。

一方本キットでは高比放射能の $^{125}\text{I}-T_3$ が用いられており 5 pg の T_3 検出が可能であり、使用血清量 50 μl で 0.1~5 ng/ml の範囲の測定が行なえる。

添加 T_3 の回収率は $100 \pm 5\%$ であり、精度および再現性はそれぞれ変異係数 1.5~2.1%，1.3~6.6% であった。

これらの成績より本法は血中 T_3 濃度の測定に十分使用しうるものと考えられた。

本法による臨床測定成績は、正常者および各種疾患患者において従来の方法による報告^{6)~9)} と著差を認めず、正常値は 142 ng/100 ml ± 21 (S.D.) であった。未治療バセドウ病患者では 452 ng/100 ml ± 156 (S.D.) で正常者との重なり合いは認められなかつたが、原発性甲状腺機能低下症患者および機能低下の橋本病患者では正常者との重なり合いが認められた。正常妊婦では T_3 高値、神経性食思不振症では低値であった。甲状腺腺腫および単

純性甲状腺腫では正常者とほぼ同様な分布を示し、亜急性甲状腺炎急性期では高値がみられた。

本法による測定成績とダイナボット社 T_3 RIA キットによる測定値を比較検討したが両者は極めて高い相関係数を示し、その絶対値もよく一致を示した。

テトラソルブ法による血中 T_4 濃度とも良好な相関がみられたが、治療中の甲状腺機能亢進症患者にはしばしば T_4 正常値で高 T_3 を示すものが認められた。

VI. 総 括

1. インキュベーション温度および時間は規定の室温、16時間で良好な結果が得られたが、更に 37°C では1~4時間に短縮することが可能と考えられた。

2. 抗体の特異性は良好であった。

3. 添加 T_3 の回収率は平均 100 ± 5 (S.D.) % で高 T_3 血清の希釈曲線の平行性も良好であった。

4. 本キットの精度は変異係数 1.5~2.1%，再現性は変異係数 1.3~6.6% であった。

5. 軽度の溶血は測定値に影響を与えたなかった。

6. 正常者の血中 T_3 濃度は 142 ± 21 ng/100 ml であり、未治療バセドウ病患者では 452 ± 156 ng/100 ml、原発性甲状腺機能低下症患者では 67 ± 17 ng/100 ml であった。

7. 橋本病患者では血中 T_3 濃度は広い範囲に分布したが、甲状腺腺腫および単純性甲状腺腫患者では正常範囲であった。一方正常妊婦では高値、神経性食思不振症では低値であった。

8. 本法による T_3 測定値はダイナボット社 T_3 RIA キットによる測定値と極めてよく一致した。

以上の成績より本キットは簡便で、感度、特異性、再現性も良好であり、臨床応用上きわめて有用であると結論された。

稿を終るに際しキットを御提供下さった科研化学社に深謝する。本論文の要旨は第8回近畿核医学研究会にて報告した。

文 献

- 1) Gross J, and Pitt-Rivers R: The identification of 3,5,3'-L-triiodothyronine in human plasma. Lancet **1**: 439-441, 1952.
- 2) Brown BL, Ekins RP, Ellis SM, et al: Specific antibodies to triiodothyronine hormone. Nature **226**: 359, 1970.
- 3) Hollander CS, Stevenson C, Mitsuma T, et al: T₃ toxicosis in an iodine-deficient area. Lancet **2**: 1276-78, 1972.
- 4) Braverman LE, Ingbar SH, and Sterling K: Conversion of thyroxine (T₄) to triiodothyronine in athyreotic human subjects. J Clin Invest **49**: 855, 1970.
- 5) T₃ イムノアッセイ キット 説明書: 科研化学社
- 6) 桜田俊郎, 山口 徹, 山本蒔子他: Triiodothyronine の Radioimmunoassay. 日内分泌会誌 **48**: 559-568, 1972
- 7) 満間照典, 広岡良文, 仁瓶禮之: トヨードサイロニン (T₃) のラジオイムノアッセイ・ホと臨床 **22**: 557-562, 1974
- 8) 伴 良雄, 井上 健, 小島孝典他: Radioimmunoassay 法による血中 Triiodothyronine 濃度の測定. 核医学 **11**: 479-485, 1974.
- 9) 竹田洋祐: 甲状腺ホルモン分泌機構及び血中 T₃ に関する臨床的研究 第2編 迅速ラジオイムノアッセイ法による血清 T₃ 測定法ならびにその臨床応用. 日内分泌会誌 **51**: 36-47, 1975