

《使用経験》

科研 T_3 RIA kit を使用した血中 Triiodothyronine (T_3) の測定

—その基礎的・臨床的検討—

嘉手納 成 之*

鈴木 邦 治*

I. はじめに

血中甲状腺ホルモンには、Thyroxine (T_4) と Triiodothyronine (T_3) があり、両者ともに生体では重要な役割をはたしていると考えられている。血中 T_3 濃度は T_4 に比較してきわめて低いため、従来行われていた Competitive protein-binding assay や Gas Liquid chromatography による方法は、煩雑な操作を要し、また測定原理上良好な感度と特異性がえられないという難点があった。

近年、Radioimmunoassay (RIA) が発展し、簡単で感度、特異性の高い T_3 の定量ができる様になり、臨床的に応用され種々の報告がなされつつある^{1)~5)}。

しかし、RIA による T_3 の正常値は、測定法により差異があり、各測定法による正常値の確立が必要である。

今回、我々は、科研 T_3 -RIA kit 使用の機会を得たので、基礎的検討・臨床的検討を加えて報告する。

II. T_3 ラジオイムノアッセイの原理

本 kit の原理は T_3 特異抗体の結合部位に対する血清 T_3 と標識 I^{125} - T_3 の競合反応によるもの

であり、遊離の T_3 を Solid matrix (陰イオン交換樹脂) で吸着分離し、液中に残存する抗体結合 T_3 の放射能を測定するものである。

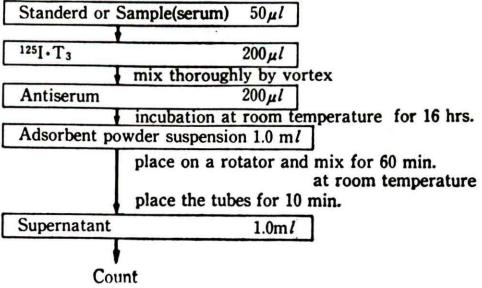
III. 測定方法

Fig. 1 は、本 kit の測定手技である。表の如く試薬の調整を行い、検体または標準血清 50 μ l に

○ Preparation of reagents

Reagents	Volume of distilled water
$^{125}\text{I}\cdot\text{T}_3$	10.5ml
Antiserum	10.5ml
Standard serum	500 μ l
Adsorbent powder	55ml

○ Procedure



○ Standard curve

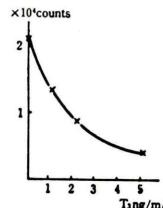


Fig. 1 Method of T_3 immunoassay Kit.

* 北海道大学医学部第二内科

受付: 50年12月12日

採用: 51年5月20日

別刷請求先: 札幌市北区北15条西7丁目(〒060)

北大医学部第二内科

嘉手納 成 之

$I^{125}\text{-T}_3$ 200 μl を加え、よく混和し、つぎに抗血清 200 μl を加えて混和し、室温にて16時間放置する。つぎに free $I^{125}\text{-T}_3$ の吸着のために、吸着液 1.0 mL (陰イオン交換樹脂 3.9 mg) を加え、室温で60分間ローテーションを行なう。その後 10分間放置、その上清 1.0 mL をとり放射能活性を測定する。同時に測定した標準血清より、Fig. 1 の如く標準曲線を作成する。それぞれの検体の放射能活性より、標準曲線から T_3 値を求める。

なお本 kit は血清の蛋白と T_3 との結合阻害剤として、チオメルサレートが 1 mg/tube の濃度になる様に調整されている。また遊離 T_3 は solid matrix (陰イオン交換樹脂) で吸着分離し、上清中に残存する抗体結合 $I^{125}\text{-T}_3$ の放射能を測定する。

IV. 方法および対象

基礎的検討として、1) Incubation time の変化、2) 回収率、3) 再現性、4) 測定血清量の変化、5) 血清希釈試験等の検討を行った。

また、6) 臨床的検討として、甲状腺機能亢進症 19名、機能低下症 3名、結節性甲状腺腫 4名、慢性甲状腺炎 8名、単純性甲状腺腫 10名、治療により euthyroid になった Basedow 病 10名およびその他の患者について、上記の方法により T_3 の測定を行った。なお control として、臨床的所見およびルーチンの甲状腺機能検査、血清の免疫学的反応が正常で他の内分泌疾患を合併していない 54

名の患者を機能正常者として同様に T_3 を測定した。さらに 7) Triosorb 8) Resomat T_4 との相関、9) ダイナボット社 T_3 RIA kit および Ames 社 T_3 RIA kit との相関を検討した。

V. 結 果

1) Incubation time の変化

Incubation time は原法では16時間であるが、48時間、16時間、2時間と変化させた。各 incubation 時間による標準曲線の変化は Fig. 2 の如く

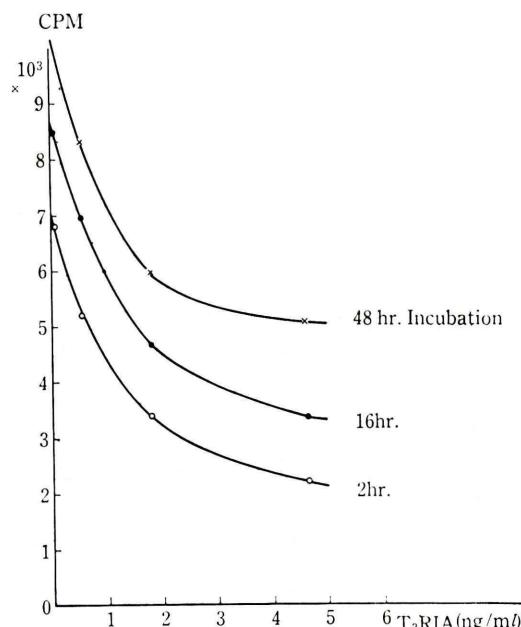


Fig. 2 Effect of incubation time on standard curve.

Table 1 Recovery of T_3 added to normal serum at different concentrations.

Pt. serum volume μl	Added standard T_3 ng/ml	Total volume μl	T_3 concentration		Recovery %
			predicted ng/ml	determined ng/ml	
50	—	50	1.85	1.85	—
25	0.04	50	0.97	0.95	97.9
25	0.30	50	1.23	1.15	93.5
25	0.90	50	1.83	1.70	92.9
25	2.86	50	3.79	4.10	108.2
			Mean	98.1	

となった。Incubation time が長くなると結合 I¹²⁵-T₃ すなわち上清中の放射能活性は高くなり、それぞれの条件で同一血清を測定してみると48時間では、2.65 ng/ml, 16時間では、1.85 ng/ml, 2時間では1.55 ng/ml であった。

2) 回収率

Table 1 の如く、既知濃度の血清 25μl にそれぞれ標準 T₃ 液 0.04 ng/ml, 0.30 ng/ml, 0.90 ng/ml, 2.86 ng/ml を加え、回収率を予測値に対する実測値の per cent で表現した。

Table 1 に示すとおり回収率は92.9%から 108.2%を示し、平均値 98.1% であった。

3) 再現性

同一 kit で同一血清を11回測定して再現性をみた。Fig. 3 の如く平均値 3.126 ng/ml 標準偏差 0.337 ng/ml となった。

4) 測定血清量の変化

原法では使用血清量は50μlであるが、ここでは 50μl, 100μl, 150μl に血清量を増やし、2人の甲状腺機能低下症血清と3人の機能正常者血清を測定した。

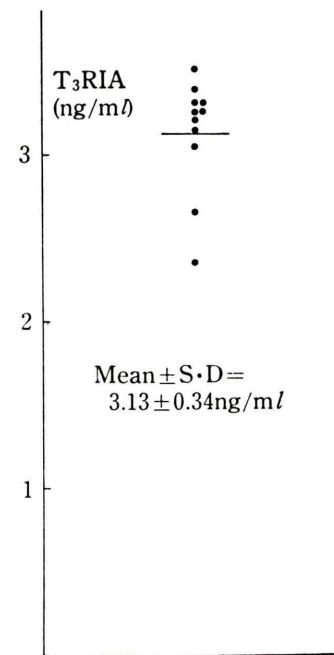


Fig. 3 Reproducibility

100μl, 150μl の血清試料による実測値を、50μl の血清量の実測値を2倍、3倍した値(予測値)に

Table 2 Variation of assay value by serum volume.

	volume Serum	T ₃ concentration		Recovery
		Determined	Predicted	
A	50 μl	0.03 ng/ml	— ng/ml	— %
	100	0.40	0.06	+666.7
	150	0.80	0.09	+888.9
B	50 μl	0.06 ng/ml	— ng/ml	— %
	100	0.38	0.12	+316.7
	150	0.75	0.18	+416.7
C	50 μl	2.20 ng/ml	— ng/ml	— %
	100	4.75	4.40	+108.0
	150	5.50	6.60	—
D	50 μl	0.60 ng/ml	— ng/ml	— %
	100	1.40	1.20	+116.7
	150	2.41	1.80	+133.9
E	50 μl	1.77 ng/ml	— ng/ml	— %
	100	3.74	3.54	+105.6
	150	5.50	5.31	—

に対する per cent で表現すると Table 2 の如くとなつた。血清を $150\mu l$ にすると機能正常者 C.E. では T_3 値は標準曲線から scale out し測定不能であったが、D では 133.9% を示した。 $100\mu l$ の時には C.D.E. それぞれ、108.0%, 116.7%, 105.6% となつた。

5) 希釈試験

原血清 $50\mu l$ 使用時、測定範囲以上の値を示した 5 人の機能亢進症患者血清を蒸留水にて 2 倍、3 倍、4 倍に希釈して測定した。

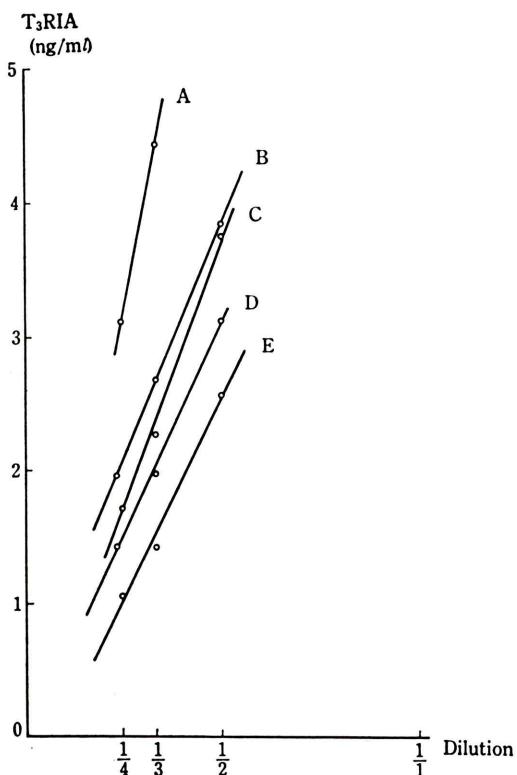


Fig. 4 Effect of dilute serum with distilled water on T_3 concentration.

Fig. 4 は A—E の 5 人の患者血清の希釈曲線を示す。いずれの血清も 2 倍ないし 4 倍の希釈の範囲内ではほぼ原点に収斂する直線を示した。

5) 臨床的検討

各疾患ごとの平均値、標準偏差を Table 3 に、また測定値の分布を Fig. 5 に示した。

Table 3 Serum T_3 concentration in various disorders.

Subjects	No. of cases	T_3 values (ng/ml)	
		Mean	S.D.
Euthyroid	54	1.252	0.427
Hyperthyroid	19	4.101	1.083
Treated hyperthyroid	10	1.517	0.678
Hypothyroid	3	0.303	
Chronic thyroiditis	8	1.513	0.483
Simple goiter	10	1.417	0.425
Nodular goiter	4	1.363	0.387
Anorexia nervosa	3	0.487	
TBG deficiency	2	1.475	

正常対照者 54 例の T_3 濃度は $0.20 \text{ ng/ml} \sim 2.55 \text{ ng/ml}$ で、平均値 1.25 ng/ml を中心とした正規分布を示した。平均値 $\pm 2 \text{ S.D.}$ を正常範囲とすれば、その値は $0.40 \text{ ng/ml} \sim 2.11 \text{ ng/ml}$ であった。

未治療の甲状腺機能亢進症患者 19 例の値は $2.55 \text{ ng/ml} \sim 5.00 \text{ ng/ml}$ で、1 例を除き正常対照者との間に重なり合いはなかった。その平均値および標準偏差は $4.10 \text{ ng/ml} \pm 1.08 \text{ ng/ml}$ で正常対照者のそれに較べて有意に高かった ($P < 0.01$)。

治療により euthyroid になった患者 11 名の値は $0.77 \text{ ng/ml} \sim 3.20 \text{ ng/ml}$ で 1 例を除く全例が正常範囲内にあり、平均値 \pm 標準偏差は $1.51 \text{ ng/ml} \pm 0.68 \text{ ng/ml}$ で未治療患者に較べて有意に低かった ($P < 0.01$)。

甲状腺機能低下症患者では 3 例中 2 例が測定感度以下の値を示した。

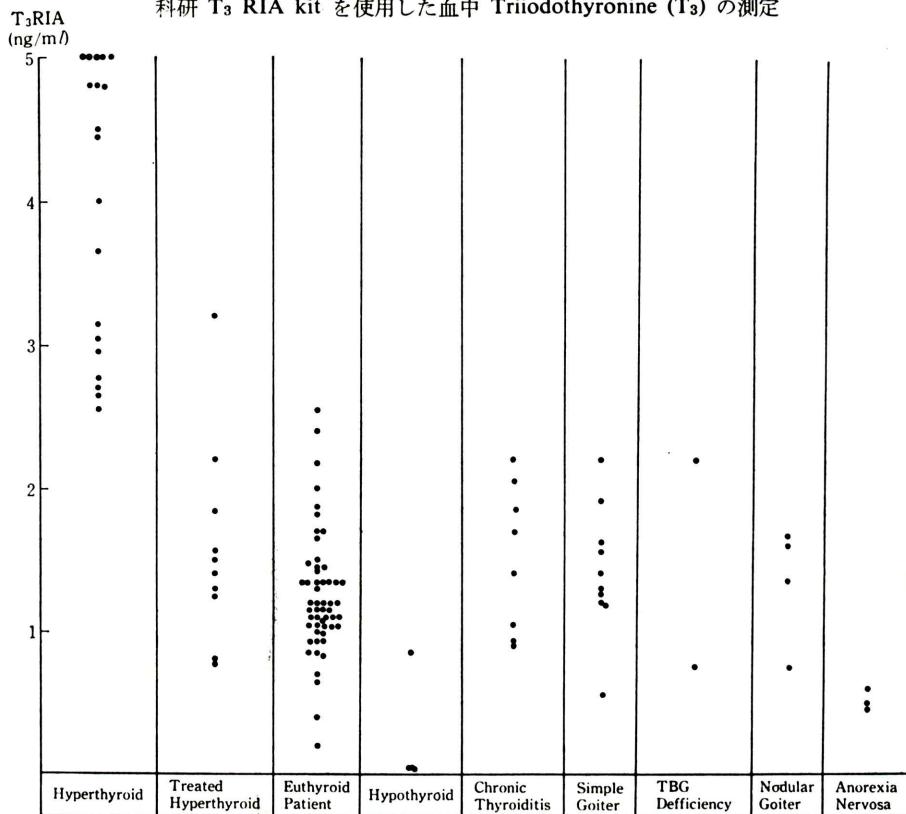
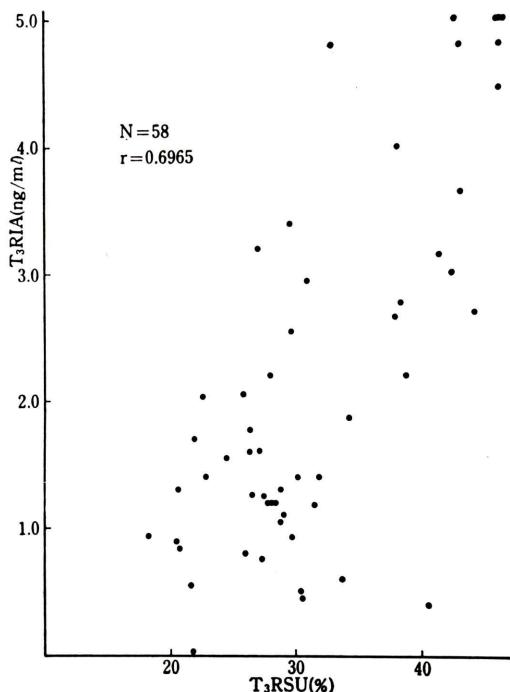
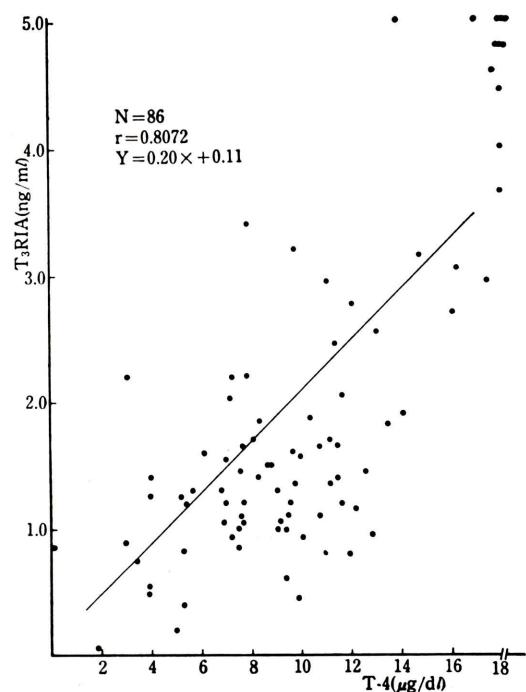
慢性甲状腺炎患者 8 例では $0.90 \text{ ng/ml} \sim 2.05 \text{ ng/ml}$ の T_3 濃度を示し、平均値 \pm S.D. は $1.51 \text{ ng/ml} \pm 0.48 \text{ ng/ml}$ で大部分が正常範囲の値を示した。

7) Triosorb との相関

Fig. 6 は 58 例の各種疾患々者血清につき T_3 と Triosorb を測定したものである。両者の間に相関係数 0.70 で有意の相関を認めた ($P < 0.01$)。

8) Resomat T_4 との相関

Fig. 7 は 86 例の Resomat T_4 を測定したものである。 T_3 との相関係数 0.81 と有意の相関々係があった ($P < 0.01$)。

Fig. 5 Distribution of serum T₃ concentrations in various diseasesFig. 6 Correlation between serum T₃ concentration and Triosorb value.Fig. 7 Correlation between T₃ value and T₄ value in serum

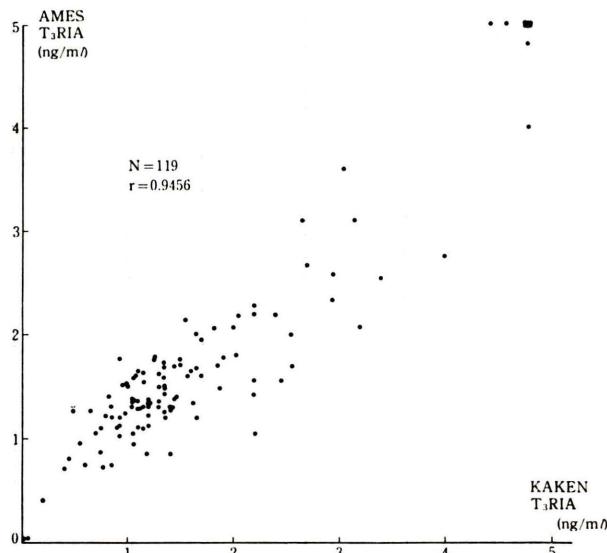
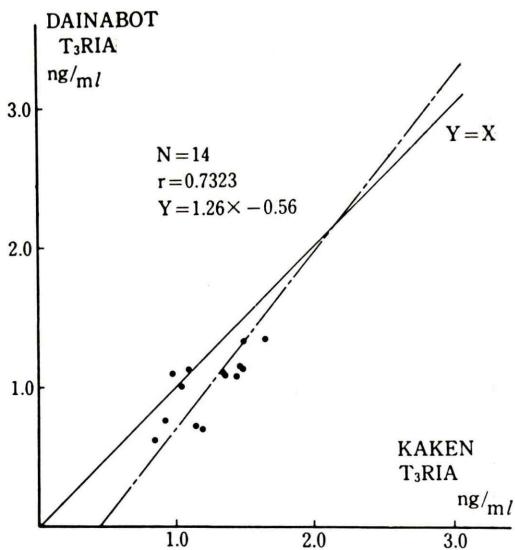
Fig. 8 Correlation between Kaken's T₃ value and Ames'.Fig. 9 Correlation between Kaken's T₃ value and Dainabot's.9) Ames 社 T₃ 測定 kit "Seralute" との比較

Fig. 8. 119例における両者の相関は相関係数 0.95 ときわめて高かった ($P < 0.01$).

10) Dainabot 社 RIA kit との相関

Fig. 9 の如く、14例の血清を両方の kit で測定した。相関係数 0.73 と有意の相関があった ($P <$

0.01).

また、Dainabot 社 T₃ kit の方は科研 T₃ RIA kit に比し有意に低値を示す傾向がみられた(回帰直線 $Y = 1.26X - 0.56$ ($P < 0.01$)).

VI. 考 案

1) Incubation time の変化

本 kit の指示書によれば、incubation 時間は 16 時間以上 3 日迄は測定結果に影響をおよぼさないといふ事であるが、我々の実験結果では incubation 時間の長いほど上清部分すなわち抗体結合 T₃ の count は高く、sample および標準血清の incubation 時間は共に一定にする必要があると考える。

2) 回収率

回収率は平均 98.1% で、良好な回収率を示した。

3) 再現性

同一血清による同一 assay 内の変異係数は、平均 10.8% で良好な再現性を示した。

4) 血清希釈

高 T₃ 濃度を示す血清を 3 倍まで希釈した測定結果で原点に収斂する直線がえられた。

血清量または濃度を変化させた時, TBG 阻害剤の作用が相対的に変化する可能性がある。本法で使用されているチオメルサレートによる T₃ と血清蛋白の結白阻害作用が不可逆的かどうか、また血清蛋白濃度により量的に変化するかどうか等の点については検討を行っていない。しかし、使用血清の何れも希釈により原点に収斂する直線を得たので、かかる影響は比較的少ないと思われる。

我々の測定した甲状腺機能亢進症患者 17 例中 5 例 29.4% は kit 附属の標準血清の最高濃度をこえる値を示した。したがって、この様な T₃ 高濃度の血清では 2~4 倍に希釈した血清より得られた値を使用して実用上差しつかえないと考えられる。

5) 血清量の変化

機能正常者血清の場合は血清量を 3 倍に増やしても測定しても良好な結果がえられたが、機能低下症血清の場合には回収率は悪かった。この理由は不明であるが、原血清の T₃ 濃度が測定感度以下のため 50 μl 使用時に正しい値がえられなかつたのか、あるいは使用血清量の変化による影響因子、例えば TBG 阻害剤の効果等の影響によると思われる。いずれにせよ血清 T₃ 濃度が低い場合、50 μl 以上の血清を使用する事は誤差を生ずる可能性があると考える。

なお T₃ 以外の甲状腺ホルモンとの交叉性については検討を行っていないが、本 kit の使用書⁶⁾によれば 1-thyroxine, 3,5-Diiodo-1-thyronine, Triiodothyroacetic acid, 3,5-Diiodo-1-tyrosine, 3-Iodo-1-tyrosine それぞれ <0.2%, <0.5%, 30~60%, <0.1%, <0.1% であり、血中 T₃ の測定にはきわめて特異性の高い方法と思われる。

6) 臨床的検討

甲状腺機能正常者血清の T₃ 値は 1.25 ng/ml ± 0.43 ng/ml であった。この値は種々の報告の正常値とほぼ一致した^{1)~4)}。

機能亢進症患者の T₃ 値と正常値との重なりはなく明らかに区別できた。

機能低下症 3 例の平均値は 0.30 ng/ml と低値を示したが、1 例に正常値との重なりがあった。

治療後、euthyroid を示している甲状腺機能亢

進症血清では平均値は正常範囲にあり、明らかに未治療甲状腺機能亢進症血清と区別できた。

また、慢性甲状腺炎、単純性甲状腺腫、結節性甲状腺腫血清の T₃ 値は大部分正常範囲内の値を示した。

神経性食思不振症の患者血清では平均値は 0.487 ng/ml と低く、本症において T₃ 値は低値を示すという種々の報告⁵⁾ と同様の結果を示した。

以上の点から、本法によってえられた各疾患における値は従来の報告と同様の傾向を示し、臨床的な甲状腺機能状態をよく反映するものと考えられる。

7) Triosorb, Resomat T₄ との相関

Triosorb との相関は r=0.70, Resomat T₄ との相関は r=0.81 とそれぞれ有意の相関があった。

8) 他の T₃ 測定キットとの相関

他の T₃ RIA kit との比較を行った結果、Ames T₃ RIA kit と同様の値を示したが、Dainabot T₃ RIA kit による値に比較して高値をとる傾向がみられた。この事から、それぞれの測定方法毎に正常値の設置が必要と考える。

VII. 結 語

科研 T₃ RIA kit の基礎的ならびに臨床的検討を行った。本法は、使用血清量 50 μl と少量ですみ、T₃ の抽出も必要がなく、incubation 時間も比較的短く、測定条件も室温で行なわれ、比較的簡便に使用できる利点をもっている。しかし、今後さらに低濃度 T₃ の測定に充分な感度の向上が望まれる。

また、各種疾患について測定値は臨床的甲状腺機能状態や他の血中甲状腺ホルモンの指標と一致し、甲状腺疾患の診断にきわめて有用と考えられる。

文 献

- 1) Larsen PR: Triiodothyronine: Review of Recent Studies of Its Physiology and Pathophysiology in Man. Metabolism 21: 1073, 1972
- 2) 瀬戸光、久田欣一：血中 Triiodothyronine の測定

- とその臨床意義. Radioisotope **23**: 30, 1974
- 3) 満間照典: トヨードサイロニン異常. 臨床科学 **11**: 164, 1975
- 4) 斎藤慎太郎: トヨードサイロニン. Medicina **12**: 1336, 1975
- 5) Miyai K, Yamamoto T, Azukizawa M et al: Serum Thyroid Hormones and Thyrotropin in Anorexia Nervosa. J Clin Endocr **40**: 334, 1975
- 6) T₃ イムノアッセイキット指示書