

《使用経験》

T₄ リアパックによる血中サイロキシン濃度の測定に関する基礎的ならびに臨床的検討

中島 言子* 小西 淳二* 森田 陸司* 奥野 龍與**
 笠木 寛治** 遠藤 啓吾** 池窪 勝治** 鳥塚 莞爾**

I. 緒 言

血中サイロキシン（以下 T₄）濃度の測定は甲状腺機能検査の中でも最も基本的なものとして不可欠のものとなっている。従来その測定には Ekins, Murphy ら^{1),2)}以来開発された Competitive protein binding assay (CPBA) 法が広く用いられて来たが、CPBA 法は T₄ 結合グロブリン (TBG) に対する標識 T₄ と血中 T₄ の競合反応を利用する測定法であるため、血清中の TBG より予め T₄ を分離する操作が必要であり、また TBG 結合に及ぼす薬剤の影響を考慮する必要がある。これに対し最近 Chopra, Mitsuma ら^{3),4)}により開発され、キット化が進められて来た Radioimmunoassay (RIA) 法は特異性に優れ広く普及しつつある。今回著者らは RIA 法による T₄ 測定用キット、T₄ リアパック (The Radiochemical Centre, 科研化学社) について、その測定に関する基礎的検討を行うとともに、臨床的有用性を検討する機会を得たのでその成績を報告する。

II. 測定原理および測定手技

T₄ リアパックの測定原理は通常の RIA 法と同様であり、血中の T₄ と標識 T₄ の抗 T₄ 抗体に対する競合的反応にもとづくものである。この際直接血中 T₄ を測定するためには血清中の T₄ 結合蛋白の影響を除く必要があるが、本法では T₄ 結合蛋白との結合阻害のためには、バルビタール緩衝液およびメルチオレート⁵⁾ を使用、37°C でのインキュベーションを行っている。また抗体と結合した ¹²⁵I-T₄ と遊離 ¹²⁵I-T₄ との分離には、イオン交換樹脂系の吸着剤を用いているのが本法の特徴である。キットの組成は 50 テスト分（標準曲線用 8 テスト分を含む）で、標準 T₄ を含むヒト血清 4 本それぞれ、0.1, 4.9, 12.0, 20.9 μg T₄/100ml を含む（凍結乾燥）、6 μCi 以下の ¹²⁵I-T₄ 1 本（凍結乾燥）、抗 T₄ 羊血清 1 本（凍結乾燥）、プラスチック容器入乾燥吸着剤 1 個、および測定用プラスチックチューブ 50 本よりなる。

試薬の調整は蒸留水で行い、標準血清のバイアルにそれぞれ 0.5ml, ¹²⁵I-T₄ 及び抗 T₄ 羊血清のバイアルにはそれぞれ 10.5ml を加えてゆるやかに転倒混和溶解する。吸着剤についてはインキュベーション中に 55ml の蒸留水を加え、スターラーで混和、浮遊液を作成する。測定の実際は Fig. 1 に示す通りである。

1) 被検血清又は標準液 0.05ml を測定用チュ

* 京都大学医学部放射線部

** 同放射線科

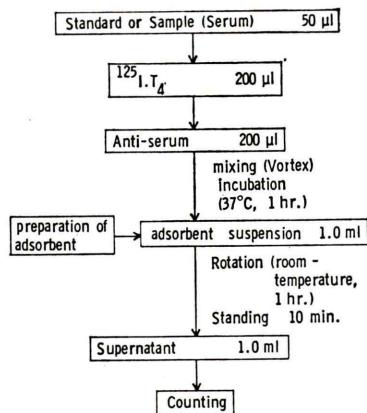
受付：51年7月22日

最終稿受付：51年9月13日

別刷請求先：京都市左京区聖護院川原町53（〒606）

京都大学医学部放射線部

中島 言子

Fig. 1 Assay procedure of T₄-RIA PAC

ーブに採り、¹²⁵I-T₄ 溶液及び抗 T₄ 羊血清をそれぞれ 0.2ml 加え混和後、37°C 溫浴中で 1 時間インキュベイトする。

2) 抗 T₄ 抗体と結合しなかった ¹²⁵I-T₄ を吸着させるための吸着剤浮遊液をかくはんしながら 1 ml 完全チューブに加える。

3) 各チューブにキャップをして室温で 1 時間ローテイトする。(科研化学社製ローテイターにより毎分約 36 回転)

4) キャップをとり、10 分間静置、吸着剤を沈澱させた後、抗 T₄ 抗体と結合した ¹²⁵I-T₄ を含む上清を 1ml 測定用チューブにとる。

5) シンチレーションカウンターで放射能を測定する。

6) 以上の測定値より、標準液の T₄ 濃度に対するカウントをグラフにプロットして標準曲線を作成、検体血清のカウントから T₄ 値を読みとる。

III. 実験方法及び対象

1) 基礎的検討

上記の測定法について、インキュベーション時間、温度、ローテイション時間の検討、抗体の特異性、高 T₄ 血清の希釈曲線、測定の精度、再現性、添加 T₄ の回収率、溶血の影響などについて検討を行った。

2) 臨床的検討

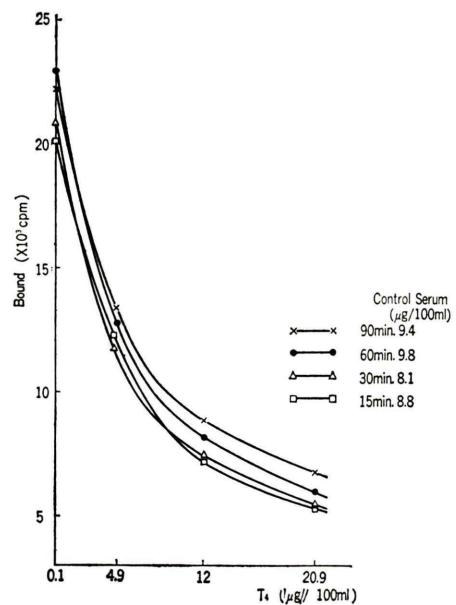


Fig. 2 Effect of incubation time at 37°C

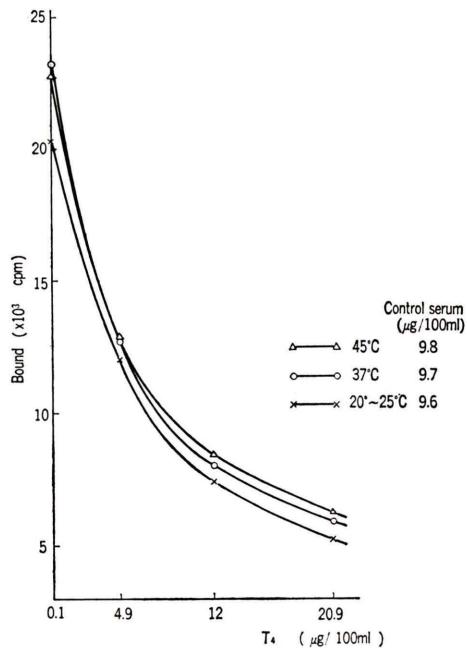


Fig. 3 Effect of incubation temperature (60 min incubation)

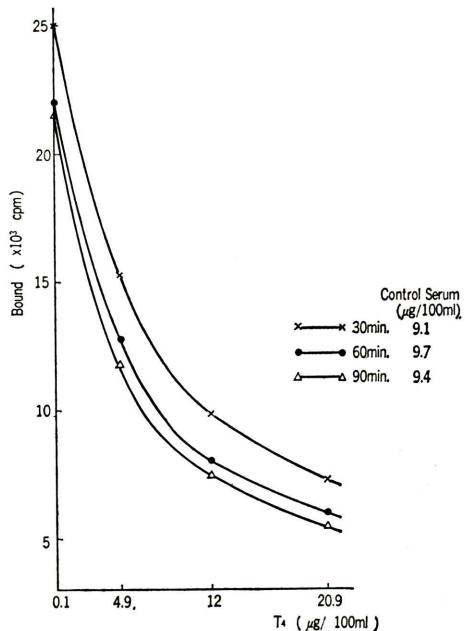


Fig. 4 Effect of rotation time at room temperature

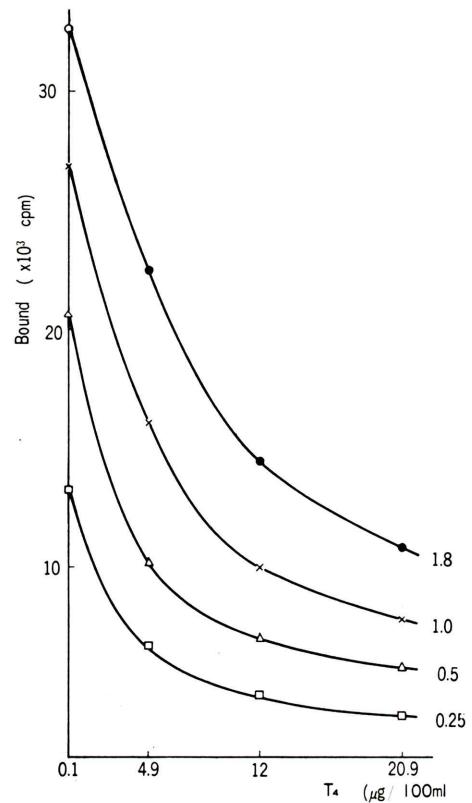
臨床例は京大病院放射線科及び甲状腺外来を受診し、臨床所見、検査成績および、甲状腺針生検による組織検査により診断の確定した甲状腺疾患244例（うちバセドウ病未治療例51例、バセドウ病治療例25例、橋本病28例、単純性甲状腺腫20例、腺腫11例、癌14例、亜急性甲状腺炎3例、TBG減少症3例でこれらのうち、甲状腺機能低下症と診断されたものは、22例であった）、正常妊婦13例、京大職員を中心とした健康人57例について血中T₄濃度の測定を行った。さらに同一血清について、CPBA法に基づくダイナボット社のテトラソルブキットによる血中T₄濃度を測定し、両測定値を比較検討した。

IV. 実験成績

1. 基礎的検討の成績

a) インキュベーション時間、温度及びローテーション時間の検討

37°Cでのインキュベーションにつき時間を変化させた場合の標準曲線の変化をFig.2に示す。

Fig. 5 Effect of dilution of anti-T₄ serum

15分、30分、では全体に結合カウントも低く、プール血清の測定値もやや低値を示した。一方インキュベーション時間を90分間に延長すると図のように高値域での結合カウントが相対的に著しく上昇し標準曲線はゆるやかとなって精度が不良となることが認められ、60分のインキュベーション時間が至適と考えられた。次に60分のインキュベーション時間で温度を変化させた場合の標準曲線とプール血清測定値をFig.3に示す。

インキュベーション温度について、室温(20°～25°C)では結合カウントが低く、45°Cと37°Cでは、後者の方が高値域での結合カウントが低く勾配の大きい標準曲線が得られた。プール血清の測定値には著しい差は認められなかった。

ローテーション時間を変化させた場合の標準曲

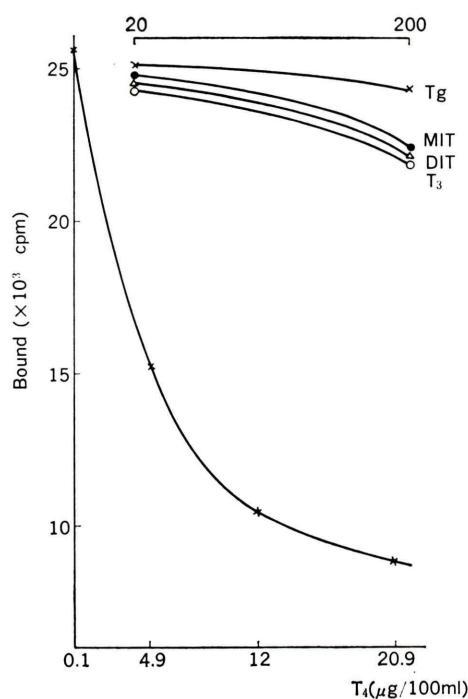


Fig. 6 Cross reaction of various substances anti-T₄ antibody

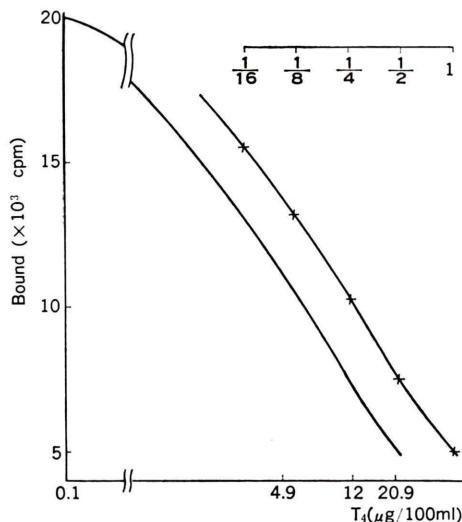


Fig. 7 Dilution curve of the high T₄ serum from a patient with Graves' disease

線を Fig. 4 に示す。30 分のローティションでは 60 分、90 分の場合に比してカウントが多く吸着剤が抗体と結合しない遊離型の ¹²⁵I-T₄ を充分吸着していないものと考えられた。60 分および 90 分のローティションでは、ほぼ近似した測定値が得られ吸着が plateau に近いことが示された。

b) 抗体濃度について

規定の濃度を I として抗体の濃度を 1.8 倍、0.5 倍、0.25 倍に変化させた場合の標準曲線を Fig. 5 に示す。1.8 倍の濃度の場合高値域での勾配が大でその他の場合に比して精度が良くなると考えられるが低値域での精度は若干低下し、また抗体濃度を 1/2, 1/4 にすると高値域で標準曲線が著しく平坦となることが認められた。この様な所見より日常検査として必要な測定域では規定の濃度で充分と考えられた。

以上の検討より、抗体は規定の濃度を用いインキュベーションは 37°C 60 分、ローティションは室温 60 分が適当と考えられたので以後はキットの説明書⁶⁾に従い以下の検討を行った。

c) 抗体の特異性について

抗体の特異性を検討するため T₄ free 血清にサイログロブリン (Tg), モノヨードチロジン (MIT), ジヨードチロジン (DIT), トリヨードサイロニン (T₃), を添加して T₄ 測定値に及ぼす影響を検討した。Fig. 6 に示す如く T₃ では 1.3 %, DIT で 1.1 %, MIT で 0.9 %, Tg で 0.4 % の交叉反応が認められた。

d) 高 T₄ 血清の希釈曲線

T₄ 高値 (20 μg/100ml) 血清の希釈曲線を Fig. 7 に示すが標準曲線と希釈曲線は良好な平行性を示した。

e) 回収率

異った T₄ 濃度の 3 血清に 2.5, 5, 10, 20 μg/100 ml の T₄ を添加した場合の測定値および回収率を Table 1 に示す。回収率は 88%~120% と良好な成績を示した。

f) 精度及び再現性

T₄ 濃度が低値、正常値および高値の 3 血清について、同一 assay で 10 回測定を行った成績を

Table 1 Recovery of T₄ added to three sera with different T₄ concentration

Serum T ₄ ($\mu\text{g}/100\text{ ml}$)	T ₄ values obtained (% recovery)			Recovery (%) mean \pm SD	
	2.5	T ₄ added ($\mu\text{g}/100\text{ ml}$) 5	10		
0.6	3.6 (120)	5.4 (96)	9.4 (88)	20.5 (100)	101 \pm 13.6
3.8	6.4 (104)	9.0 (104)	14.0 (102)	24.0 (101)	103 \pm 1.3
5.6	8.0 (100)	10.0 (100)	14.6 (90)	25.4 (99)	97 \pm 4.9
Recovery (%) mean \pm SD	108 \pm 10.6	100 \pm 4.0	93 \pm 7.6	100 \pm 1.0	

Table 2 Intra-assay variability of the assay

Case	1	2	3
1	2.5	9.4	20.4
2	2.5	9.4	19.2
3	2.8	10.0	20.0
4	2.7	9.6	19.8
5	2.6	9.8	19.7
6	2.7	9.6	19.7
7	2.5	10.0	20.0
8	2.8	9.8	18.7
9	2.5	9.5	20.0
10	2.6	9.6	18.8
mean ($\mu\text{g}/100\text{ ml}$)	2.62	9.67	19.63
SD	0.11	0.22	0.56
CV (%)	4.2	2.3	2.9

Table 3 Inter-assay variability of the assay

Case	1	2	3
1	2.5	9.6	18.5
2	2.3	9.6	19.4
3	2.4	9.5	20.0
4	2.4	9.5	19.0
5	2.6	9.3	20.4
6	2.3	9.4	20.0
7	2.2	9.2	20.0
8	2.2	9.0	19.6
9	2.4	10.2	20.4
10	2.4	9.0	20.8
mean ($\mu\text{g}/100\text{ ml}$)	2.37	9.53	19.8
SD	0.13	0.41	0.70
CV (%)	5.5	4.3	3.5

Table 2 に示す。それぞれの測定値の平均値および標準偏差は 2.62 ± 0.11 ($\mu\text{g}/100\text{ml}$) 9.67 ± 0.22 および 19.63 ± 0.56 で変異係数はそれぞれ 4.2%, 2.3%, 2.9% と良好な成績が得られた。また同様に 3 濃度の血清について 10 回の異った assay で測定を繰り返した際の再現性は Table 3 に示す如くで、それぞれの測定値の平均値および標準偏差は、 2.37 ± 0.13 ($\mu\text{g}/100\text{ml}$), 9.53 ± 0.41 および 19.8 ± 0.70 で、変異係数はそれぞれ 5.5%, 4.3%, 3.5% と安定した結果が得られた。

V. 臨床的検討の成績

1) 正常人および各種甲状腺疾患患者における

測定成績

Fig. 8 に臨床例における血中 T₄ 濃度の測定成績を示す。正常人 57 例では $6.4 \sim 12.6$ $\mu\text{g}/100\text{ml}$ の範囲に分布し、その平均値および標準偏差 (SD) は 8.54 ± 1.33 $\mu\text{g}/100\text{ml}$ であった。正常域として平均値 ± 2 SD をとると $5.88 \sim 11.20$ $\mu\text{g}/100\text{ml}$ でこの範囲に入らないものは 1 例のみであった。バセドウ病未治療症例 51 例では平均 $24.97 \mu\text{g}/100\text{ml} \pm 6.83$ (SD) で $16.5 \sim 41 \mu\text{g}/100\text{ml}$ の範囲に分布した。なお血中 T₄ 値 $20 \mu\text{g}/100\text{ml}$ 以上の血清は T₄ free 血清で希釈して測定した。バセドウ病治療症例 25 例では $4.6 \sim 18.0 \mu\text{g}/100\text{ml}$ に分布、平均 $11.0 \mu\text{g}/100\text{ml} \pm 4.03$ (SD) であった。

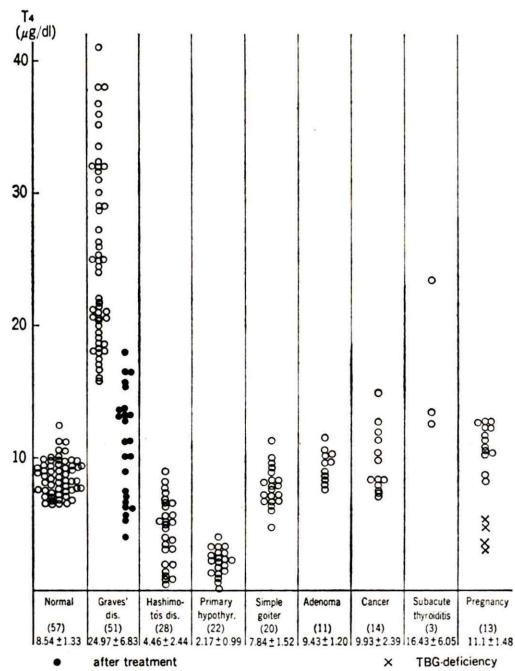


Fig. 8 Serum T_4 concentration in various conditions measured by T_4 RIA PAC

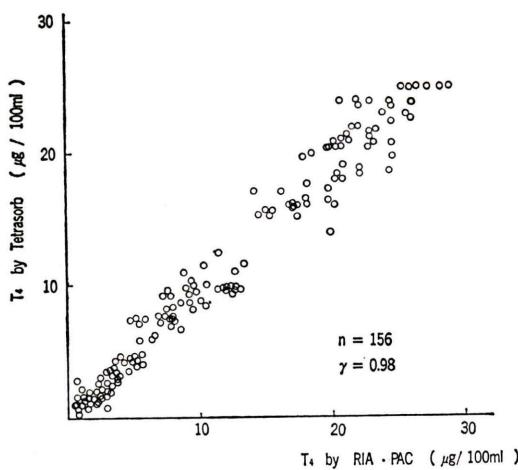


Fig. 9 Correlation of serum T_4 concentration measured by T_4 RIA PAC and Tetradsorb Kit

橋本病 37 例では平均 $4.46\mu\text{g}/100\text{ml} \pm 2.44$ (SD) で正常から低値の広範囲に分布した。これらの症例のうち甲状腺機能低下症の 22 例の平均値は $2.17\mu\text{g}/100\text{ml} \pm 0.99$ (SD) で正常者との重なり合いはみられなかった。単純性甲状腺腫 13 例では $7.84\mu\text{g}/100\text{ml} \pm 1.52$ (SD) と 1 例を除いて正常域に分布した。腺腫 11 例では平均 $9.17\mu\text{g}/100\text{ml} \pm 1.20$ (SD)、癌 14 例では平均 $9.9\mu\text{g}/100\text{ml} \pm 2.39$ (SD) であった。亜急性甲状腺炎 3 例では $16.4\mu\text{g}/100\text{ml} \pm 6.03$ (SD) と高値を示した。一方正常妊婦 13 例の平均値は $11.1\mu\text{g}/100\text{ml} \pm 1.48$ (SD) で正常人よりもやや高値に分布し、TBG 減少症の 3 例では何れも低値であった。

2) CPBA 法による T_4 値との比較

正常および甲状腺疾患患者 156 例について本キットによる血中 T_4 濃度の測定値と CPBA 法による T_4 測定キットであるテトラソルブによる測定値との相関を検討した。Fig. 9 に示す如く、相関係数 0.98 と極めて良好な相関が認められた。

VI. 考 案

RIA 法による血中 T_4 濃度測定用キット、 T_4 リアパックについて基礎的検討ならびに各種甲状腺疾患を中心とする臨床例における血中 T_4 濃度の測定を行ないその有用性を検討した。

インキュベーションの条件については、 $37^\circ\text{C} 60$ 分、結合及び遊離 $^{125}\text{I}-\text{T}_4$ 分離の為のローテーションについては室温 60 分とキット規定の条件⁶⁾で良好な結果が得られた。

従来の CPBA 法の如く T_4 の抽出操作を必要としないため RIA 法では一般に被検血清量が少量ですが、本法では $50\mu\text{l}$ でよい点は特に採血の困難な小児等の場合に有利な点である。本法の特色としては、結合および遊離 $^{125}\text{I}-\text{T}_4$ の分離に遠沈操作の必要がなく、10 分間の静置により、上清をカウントする方法が用いられている。このため測定の全操作は 50 本の検体について約 3 時間と比較的短時間で行なえ、操作は簡単である。

静置沈澱法による B·F の分離の有効性については先に同じ方法を用いている T_3 リアパックキ

ットを用いて検討したが、遠沈法による場合と同様の結果が得られることが示された⁷⁾。

この方法は検査の自動化に際しても利点となるものと考えられる。この吸着剤によるB・Fの分離は60分～90分のローテーションで、ほぼ安定した値を示すため、標準曲線の再現性は良好であり、優れたアッセイの精度、再現性が得られた。抗体の特異性についてはT₃と1.3%の交叉反応が認められたが、血中T₃濃度はT₄のそれに比し1～2%と低値であるため、殆んど影響はないと考えられる。Tg、DITについても同様にその血中濃度より考えて^{8)～10)}実地臨床上で問題になる影響は考えられない。RIA法では血中T₄を直接測定するため、T₄とその結合蛋白との間の結合阻害を必要とする。このため本法ではバルビタール緩衝液とメルチオレートを使用し⁵⁾、インキュベーションを37°Cで行っているが、この様な条件下で種々濃度の添加T₄の回収率を検討した結果は満足すべきものが得られ、高T₄血清の希釈曲線もアッセイの特異性と定量性を裏づけるものであった。

以上の諸検討より本キットは簡便かつ精度が高く、十分臨床上使用しうる測定法と考えられる。

本キットによる正常値は従来のCPBA法による正常値とほぼ同様であり^{11)、12)}、未治療バセドウ病患者の測定値との重なり合は認められなかった。甲状腺機能低下症患者においても正常者との重なり合はみられなかったが、明らかな機能低下症例のみが含められた為と考えられ、實際上は中間例の存在があるものと考えられる。その他の甲状腺疾患、TBG減少症および妊婦の測定成績もほぼ従来の報告と同様であった。

CPBA法による血中T₄測定キット、テトラソルブによる測定値と本法による血中T₄濃度の間には極めて良好な正相関が認められ、その絶対値のズレも認められなかった。

RIA法による血中T₄測定において注意すべき点として、最近自己免疫性甲状腺疾患患者血清中に抗T₄又は抗T₃自己抗体の存在することが報告されており¹³⁾、これら自己抗体の存在する場合は測定値が實際より著しく低値となることが考え

られる。著者らは実際にその様な異常値を示した橋本病患者の1症例において抗T₄抗体の存在することを先に報告したが¹⁴⁾この様な場合には抽出操作を行なってT₄を測定する必要がある。

VII. 結語

RIA法による血中T₄濃度測定キットT₄リアパックについて、その測定条件、特異性、精度、再現性等を検討した結果、本法は結合および遊離¹²⁵I-T₄の分離に用いる吸着剤の優れた特性により、簡便かつ、短時間で精度の高い測定が行なえ、十分臨床的に使用しうるものと考えられた。臨床例における測定値は従来のCPBA法によるそれとほぼ一致し、両者の相関は極めて良好であった。この様な検討成績より、本法は臨床的にも有用な測定法と考えられた。なおRIA法によるT₄値の解釈にあたって注意すべき点について考案を加えた。

謝辞：稿を終るに際しキットの御提供を頂いた科研化学生社に深謝する。

文献

- 1) Ekins RP: The estimation of thyroxine in human plasma by an electrophoretic technic. *Clin Chim Acta* **5**: 453, 1960
- 2) Murphy BEP and Pattee CJ: Determination of thyroxine utilizing the property of protein-binding. *J Clin Endocrinol Metab* **24**: 187, 1964
- 3) Chopra IJ: A radioimmunoassay for measurement of thyroxine in unextracted serum. *J Clin Endocrinol Metab* **34**: 938, 1972
- 4) Mitsuma T, Colucci J, Shenkman L, et al: Rapid simultaneous radioimmunoassay for triiodothyronine and thyroxine in unextracted serum. *Biochem Biophys Res Commun* **46**: 2107, 1972
- 5) Hesch RD and Evered DC: Radioimmunoassay of triiodothyronine in unextracted human serum. *Brit Med J* **1**: 654-648, 1973
- 6) T₄ リアパック使用説明書：科研化学生社
- 7) 小西淳二、中島言子、森田陸司、他：T₃イムノアッセイキットの基礎的ならびに臨床的検討。核医学, **13**: 193, 1976
- 8) Torrigiani G, Doniach D and Roitt IM: Serum thyroglobulin levels in healthy subjects and in patients with thyroid disease. *J Clin Endocrinol*

- Metab **29**: 305, 1969
- 9) 池窪勝治: 甲状腺疾患者の血中サイログロブリン濃度の測定に関する研究. 日内分泌会誌, **51**: 825, 1975
- 10) Nelson JC, Weiss RM, Palmer FJ, et al: Serum diiodotyrosine. J Clin Endocrinol Metab **41**: 1118, 1975
- 11) 森田陸司, 鳥塚莞爾, 浜本研, 他:Tetrasorb-125による血中 Thyroxine 量の測定に関する基礎的ならびに臨床的研究. 核医学, **7**: 180, 1970
- 12) 飯野史郎: トリオソルブ, テトラソルブ, ETR. 日本臨床, **31**: 1672, 1973
- 13) Staeheli V, Vallotton MB, and Burger A: Detection of human anti-thyroxine and anti-triiodothyronine antibodies in different thyroid conditions. J Clin Endocrinol Metab **41**: 669, 1975
- 14) 池窪勝治, 小西淳二, 中島言子, 他: 抗サイロキシン自己抗体を認めた橋本病の1例について. 日内分泌会誌 **52**: 1020, 1976