

《ノート》

ラジオイムノアッセイによる人血清 3, 3', 5'
triiodothyronine (reverse T₃) の測定Measurement of 3, 3', 5' triiodothyronine (rT₃) in Human Serum
with Radioimmunoassay

満 間 照 典*

Terunori MITSUMA

First department of internal medicine, Nagoya university school of medicine

はじめに

甲状腺ホルモンの測定法として radioimmunoassay (RIA) 法が導入され, thyroxine (T₄) や 3, 5, 3' triiodothyronine (T₃) の測定法として RIA 法が現在広く用いられている。

もう 1 つの thyronine である 3, 3', 5' triiodothyronine (rT₃) は従来生物活性がないことより, あまり注目されていなかったが, Chopra¹⁾ らにより rT₃ の測定法として RIA 法が導入され, 血清中の rT₃ 値が各種病態²⁾⁻¹⁰⁾において変動することが報告されて以来, その生理的病態生理的意義について検討が加えられている。著者も rT₃ の RIA 法の開発をこころみ, 感度良好な RIA 法を確立し, 各種疾患における血清 rT₃ 値の変動を観察したので報告する。

実験材料および方法

1) L-3, 3', 5' triiodothyronine (rT₃) L-3, 3' diiodothyronine (T₂) は西ドイツ Henning 社製のものを, L-T₄, L-T₃, L-tertraiodoacetic acid (tet-

rac), L-triiodoacetic acid (triac), L-3, 5, T₂, L-diiodotyrosine (DIT), L-monoiodotyrosine (MIT) および牛血清アルブミン (BSA) は Sigma 社製のものを使用し, 8-anilino-1-naphthalene sulfonic acid (ANS) は Eastman Kodak 社製のものを用いた。

2) rT₃-¹²⁵I はダイナボット社製のものを用いた (specific activity: 3,000~5,000 μ c/ μ g)。

3) 1-cyclohexy-3 (2, morpholinylethyl) carbodimide metho-p-toluene sulfone (morph-CDI) は Aldrich Chemical Co., Inc のものを用いた。

4) polyethylene glycol (PEG) は片山化学社製の分子量 6,000 のものを用いた。

5) Buffer としては 0.2% の BSA を含む pH 8.6 0.08 M barbital buffer を使用し, 測定の際の稀釈はすべてこの buffer にて行った。

6) 抗体作製方法: Chopra¹⁾ らの方法に準じ BSA に (morph-CDI) を用いて L-rT₃ を結合させ, この結合物 1 mg を抗原として complete Freund's adjuvant と共に 4 週間ごと家兔に感作し, おおのの感作後の 7 日目に耳静脈より採血し, 後述の assay procedure に準じて抗体の有無および抗体価の推移について検討した。

7) rT₃ free 血清の作製方法: 著者が先に報告¹¹⁾

* 名古屋大学医学部第一内科

受付: 52 年 8 月 19 日

最終稿受付: 52 年 11 月 2 日

別刷請求先: 名古屋市昭和区鶴舞町 65 番地 (☎466)

名古屋大学医学部第一内科

満 間 照 典

Key words: 3, 3', 5'-triiodothyronine (reverse T₃), 3, 5, 3' triiodothyronine (T₃)

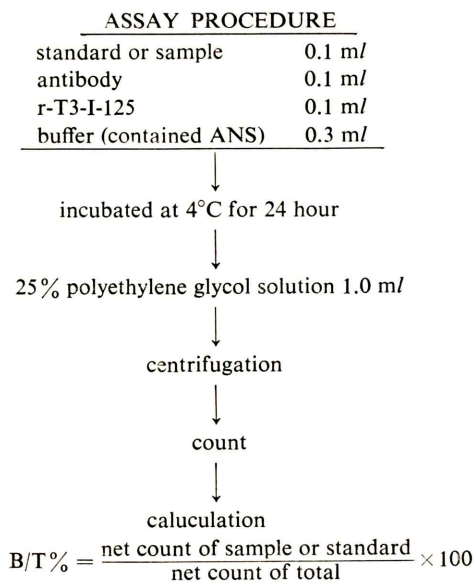


Fig. 1 Assay procedure

した T₃, T₄ free 血清の作製方法に準じて行った。すなわち正常血清 100 ml に tracer として rT₃-¹²⁵I を加えた後, activated charcoal 20 g を加え 4°C に 24 時間放置した後, 10,000G にて 3 回遠沈し, 完全に charcoal を除去した。この方法で tracer として添加した rT₃-¹²⁵I の 99% が除去できたので, この血清を rT₃ free 血清として用いた。

8) assay procedure (Fig. 1): 10×75 mm のプラスチック試験管を用い Fig. 1 のごとき手順で行った。

9) 血清 T₃, T₄ の測定法: 血清 T₃, T₄ の測定は先に報告¹¹⁾した RIA 法によって行った。

対象および採血方法

名古屋大学第 1 内科外来および入院患者で, 臨床症状所見および諸検査にて診断した正常者 17 例, 甲状腺機能亢進症 18 例, 甲状腺機能亢進症に抗甲状腺剤投与中で euthyroid state にある 45 例, 甲状腺機能低下症 10 例, 慢性甲状腺炎 15 例, 結節性甲状腺腫 6 例, 単純性甲状腺腫 6 例, 亜急性甲状腺炎 3 例および正常妊婦 4 例の計 124 例を対象として午前 9 時に採血し, 血清分離後測定まで -20°C に保存した。

Table 1 Relative reactivity of various thyroid hormone derivatives with anti-rT₃ antibody

compound	relative reactivity
L-rT ₃	100
L-T ₄	0.001
L-T ₃	0.0001
Tetrac	0.001
Triac	<0.0001
3, 5 L-T ₂	0.004
3, 3' L-T ₂	0.001
L-DIT	<0.0001
L-MIT	<0.0001
ANS	<0.0001

実験結果

1) 抗体価の推移: 感作した家兎 4 匹中 2 匹に測定に用い得る抗体を得た。その中の 1 匹では第 3 回目の感作後より抗体を認め, 第 6 回目には最終稀釈 (1:1,200) の抗体を得た。本研究にはこの抗体を用いた。

2) 抗体の特異性 (Table 1): 前述の抗体と甲状腺ホルモンおよびその analogues との免疫交叉性を rT₃ に対する反応性を 100 として表わした。判定には B/T% が B₀ の 50% なる標準曲線の最も急峻な所を用いた。LT₄ とは 0.001, L-3, 3'-T₂ とは 0.001, L-T₃ とは 0.0001, L-tetrac とは 0.001, L-triac とは 0.0001 以下, L-3, 5T₂ とは 0.004, L-DIT とは 0.0001 以下, L-MIT とは 0.0001 以下, ANS とは 0.0001 以下であり, 本研究に用いた抗体は rT₃ に対する特異的抗体であることを認めた。

3) incubation 時間の検討 (Fig. 2): 4°C で 12 時間, 24 時間および 48 時間 incubate し, incubation 時間の標準曲線に及ぼす影響を検討したところ, Fig. 2 のごとく 12, 24, 48 時間の incubation でほぼ同様の結果が得られたので, 実際の測定には 24 時間の incubation 時間を用いることとした。

4) PEG 濃度の検討 (Fig. 3): bound form と free form の分離に PEG を用いたが, その至適濃度について観察した結果が Fig. 3 である。図のごとく測定反応液量 0.6 ml に対して PEG 濃度 15% 以上のものを 1 ml 用いればほぼ同様の標準曲線が得られたので, 測定には 25% の濃度のものを用

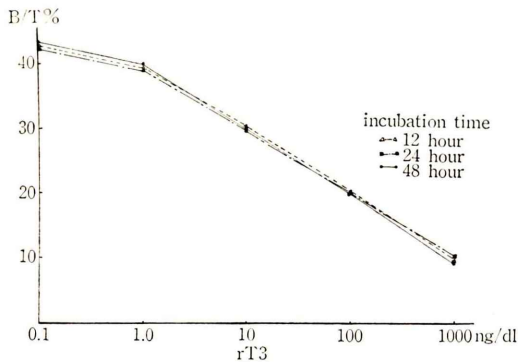


Fig. 2 Effect of incubation time on standard curve

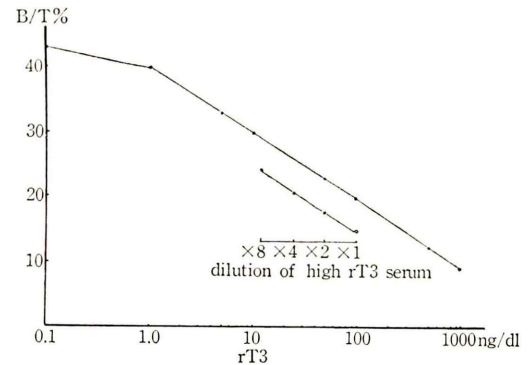
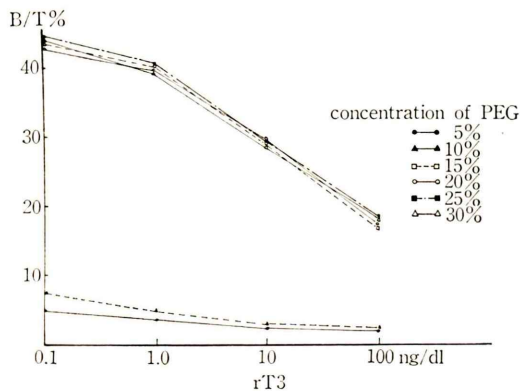
Fig. 5 Standard curve and dilution curve of high rT₃ serum

Fig. 3 Effect of PEG concentration on standard curve

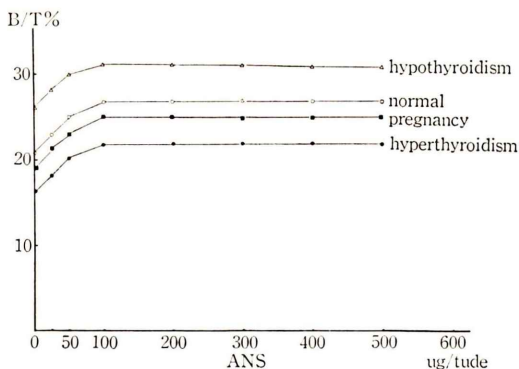


Fig. 4 Effect of ANS concentration on B/T%

いることとした。

5) ANS 濃度の検討 (Fig. 4): 血清中に存在する甲状腺ホルモン結合蛋白 (TBP) が測定系に影響を及ぼすので、血清中の rT₃ 測定には TBP の影

響をのぞく必要がある。その目的に ANS を用いたので、その至適濃度を検討したのが Fig. 4 である。図のごとく ANS 濃度が 100 μ g/tube 以上では正常者、甲状腺機能亢進症、甲状腺機能低下症および TBP の高い妊婦血清でもそれぞれの血清ではほぼ同様の B/T% が得られ、これ以上の濃度の ANS を用いれば TBP の影響をのぞくことができることを認めた。そこで測定には 200 μ g/tube を用いることとした。

6) 標準曲線および高 rT₃ 血清の希釈曲線 (Fig. 5): 標準曲線は 1~1,000 ng/dl まで直線性を示し、最低感度は 1 ng/dl であった。また高 rT₃ 血清を rT₃ free 血清で希釈した希釈曲線は標準曲線にほぼ平行であった。

7) 回収率: 正常者、甲状腺機能亢進症および甲状腺機能低下症血清に 1.0~100 ng/dl の rT₃ を加え、回収率を検討したところ、平均 $98.5 \pm 4.0\%$ であった。

8) intraassay reproducibility および interassay variation: 各種甲状腺疾患 15 例について intraassay reproducibility および interassay variation を検討したところ、それぞれ 4.0%, 6.2% であった。

9) 各種甲状腺疾患における血清 rT₃ 値 (Table 2): 正常者 17 例における血清 rT₃ 値は 15~40 ng/dl に分布し、平均 27.4 ± 8.9 ng/dl (Mean \pm SD) であった。甲状腺機能亢進症 18 例では 60~500 ng/dl に分布し平均 201.8 ± 137.4 ng/dl、甲状腺機能亢進

症を抗甲状腺剤で治療中で euthyroid state にある 45 例では $15\sim 50$ ng/dl で平均 30.6 ± 10.4 ng/dl であった。甲状腺機能低下症 10 例では測定感度の 1

Table 2 rT₃ levels in serum in various thyroid diseases

subject	n	rT ₃ levels range ng/dl	Mean \pm SD
normal	17	15-40	27.4 \pm 8.9
hyperthyroidism	18	60-500	201.8 \pm 137.4
treated hyperthyroidism	45	15-50	30.6 \pm 10.4
hypothyroidism	10	<1-10	6 \pm 4.6
chronic thyroiditis	15	10-50	23.7 \pm 13.8
nodular goiter	6	10-40	26.8 \pm 7.7
simple goiter	6	20-32	26 \pm 5.3
subacute thyroiditis	3	80, 90, 150	
pregnancy	4	40, 40, 50, 60	

ng/dl 以下より 10 ng/dl で測定感度以下の症例を除いた例の平均は 6 ± 4.6 ng/dl であった。慢性甲状腺炎 15 例では $10\sim 50$ ng/dl, 平均 23.7 ± 13.8 ng/dl, 結節性甲状腺腫 6 例では $10\sim 40$ ng/dl 平均 26.8 ± 7.7 ng/dl, 単純性甲状腺腫 6 例では $20\sim 32$ ng/dl 平均 26 ± 5.3 ng/dl, 亜急性甲状腺炎(急性期)の 3 例ではそれぞれ 80, 90, 150 ng/dl であった。正常妊婦 4 例ではそれぞれ 40, 50, 60 ng/dl であった。

10) 血清 T₄ および T₃ 値と rT₃ 値の相関: 各種甲状腺疾患 40 例について rT₃ 値と血清 T₄ 値との相関を見たところ $r=0.706$ と推計学上有意な ($P<0.001$) 正の相関を認めた。また血清 T₃ 値と rT₃ 値の相関は $r=0.775$ と推計学上有意な ($P<0.001$)

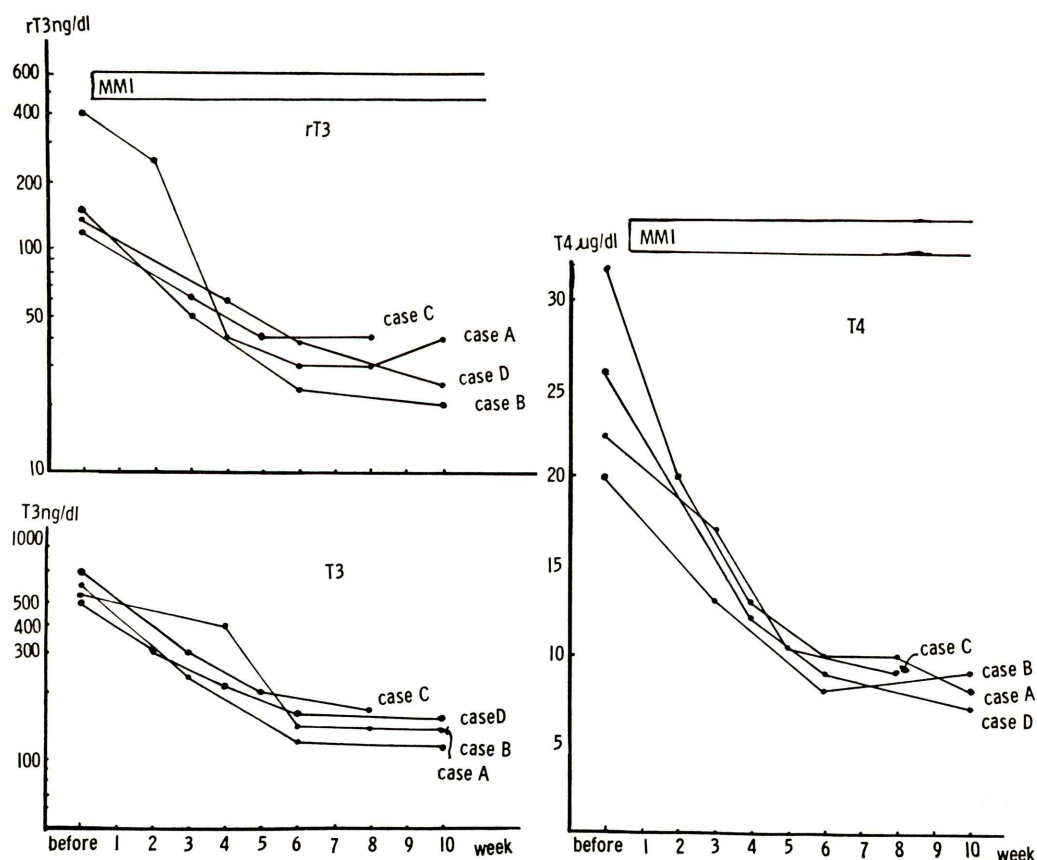


Fig. 6 Changes of rT₃, T₄ and T₃ levels in serum during antithyroid drug treatment in patients with hyperthyroidism

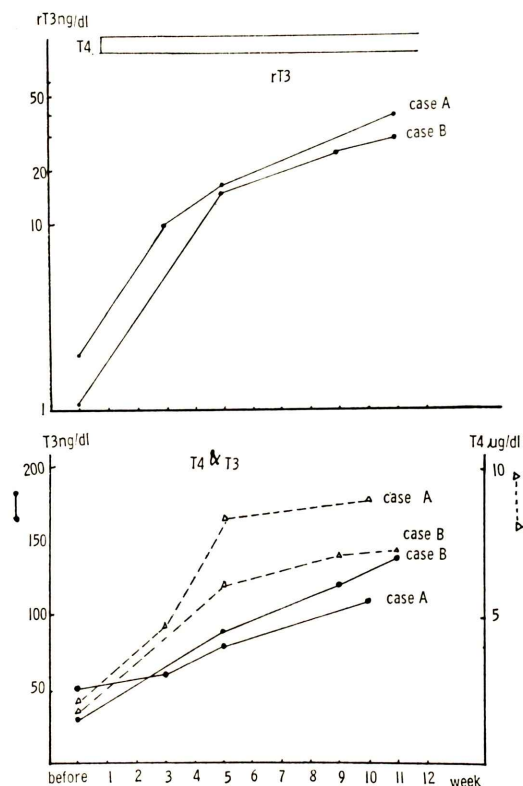


Fig. 7 Changes of rT₃, T₄ and T₃ levels in serum during T₄ treatment in patients with hypothyroidism

正の相関を認めた。

11) 甲状腺機能亢進症治療中の rT₃ 値の変動 (Fig. 6): 図は甲状腺機能亢進症 4 例に MMI 治療を行った際の血清 rT₃, T₄, T₃ 値の変動を示したものである。図のごとく rT₃ 値は T₄, T₃ 値と同様 MMI の投与期間が増すに従って低下し, T₄, T₃ 値とはほぼ同時に正常範囲内に分布するようになった。

12) 甲状腺機能低下症に T₄ 治療中の rT₃ 値の変動 (Fig. 7): 甲状腺機能低下症 2 例に T₄ 治療中の血清 rT₃ 値の変動を示したのが Fig. 7 である。図のごとく T₄ の投与期間が増すに従って増加し, T₄, T₃ とほぼ同時期に正常範囲に分布するようになった。

13) 亜急性甲状腺炎にアスピリン投与中の rT₃

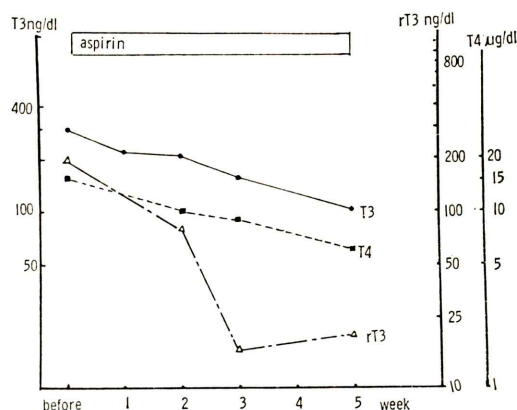


Fig. 8 Changes of rT₃, T₄ and T₃ during aspirin treatment in a patient with subacute thyroiditis

値の変動 (Fig. 8): 亜急性甲状腺炎の 1 例にアスピリン治療を行った時の血清 rT₃, T₄, T₃ 値の変動を示したのが Fig. 8 である。アスピリン投与前の急性期には血清 rT₃, T₄, T₃ 値共高値を示したが, アスピリン投与期間が増すに従って低下し, 投与開始 3 週目にはいずれも正常範囲内に分布するようになった。

考 察

近年甲状腺ホルモンの測定法として RIA 法が導入され, T₃, T₄ の測定法として広く用いられている。もう一つの thyronine である rT₃ は従来生物活性がないことによりあまり注目されていなかった。Chopra¹⁾ らにより rT₃ の測定法として RIA 法が導入されて以来, 種々の病態における血清 rT₃ の変動が報告され²⁾⁻¹⁰⁾, 血清 rT₃ の生理学的病態生理学的意義が注目されている。そこで著者は rT₃ の RIA 法の開発をこころみ, 感度良好な方法を確立すると共に各種甲状腺疾患における変動を観察したので報告する。

抗体の作製方法は Chopra¹⁾ らの方法に準じ, L-rT₃ を morph-CDI を用いて BSA に結合させ, この結合物を抗原として家兎に感作して作製した。得られた抗体は抗体価は低い, 測定には充分用い得る抗体であった。また抗体は T₄ と 0.001%, T₃ とは 0.0001%, L, 3, 5-T₂ とは 0.004%, L-tetrac

とは0.001% 3,3'-L-T₂とは0.001%の免疫交叉性を認めたが、他の甲状腺ホルモン analogues とは交叉性を認めず、rT₃に特異的抗体であることを認め、従来報告²⁾⁻¹⁰⁾されている抗体と同様 rT₃の測定に用い得る抗体であることが認められた。

incubation 時間の検討を行ったところ、4°C では12~48時間の incubation でほぼ同様の結果が得られたので、24時間の incubation 時間を用いることとした。bound form と free form の分離方法として PEG を用いたが、全反応液量 0.6 ml に対して15%以上の PEG 1 ml を用いれば良好な結果が得られたので、25%の PEG 1 ml を用いることとした。

血清中の rT₃ を測定するには血清中に存在する TBP が測定に影響を及ぼすので、この TBP の影響をなんらかの方法で除かなければならない。Chopra¹⁾ らはこの目的に血清より rT₃ を抽出後に測定を行う方法を、Nicod²⁾ は ANS を用いる方法を報告している。著者はこの目的のために ANS を用い、その至適濃度を検討したところ、tube あたり 100 µg 以上の ANS を用いれば TBP の影響を除くことができることを認め、測定には 200 µg/tube の ANS を用いることとした。この方法は抽出法に比し簡便で良い方法である。

標準曲線は 1 ng~1,000 ng/dl まで直線性を示し最低感度は 1 ng/dl であった。これは従来^{1),2)}の報告より感度は良好である。また高 rT₃ 血清の稀釈曲線は標準曲線とほぼ平行であった。

回収率はほぼ 100% と良好であり、intraassay reproducibility や interassay variation もほぼ満足すべき結果であった。

以上本法は感度良好で簡便な方法であり、血清中の rT₃ の測定に充分用い得る方法であることが示唆された。

本法で測定した血清 rT₃ 値は正常者で 15~40 ng/dl 平均 27.4 ng/dl で Chopra¹⁾ らや Nicod²⁾ らの報告に比しやや低値であったが、他の報告^{4),9),10)}とはほぼ同様の値であった。この差は測定系の差によるものと考えられた。甲状腺機能亢進症では高値、甲状腺機能低下症では低値、慢性甲状腺

炎、結節性甲状腺腫および単純性甲状腺腫では正常範囲内、妊娠では高値を示し、従来^{1),2),8)}の報告に一致した。亜急性甲状腺炎の急性期には高値を示したが、T₄, T₃ と同様甲状腺から血中への流出によるものと考えられた。血清 T₄, T₃ 値とは比較的良好な正の相関が認められたが、一部症例では差異が見られ、今後 rT₃ の病態生理学的意義を検討する上で重要な症例と考えられる。甲状腺機能亢進症に MMI 治療を行うと T₄, T₃ の正常化と共に rT₃ も正常範囲に分布するようになった。また甲状腺機能低下症に T₄ 治療を行うと T₄, T₃ の正常化とほぼ同時に正常化した。亜急性甲状腺炎にアスピリン療法を行うと T₄, T₃ とほぼ同様な変動を示した。

以上血清 rT₃ 値は T₄, T₃ とほぼ同種の変動を示したが、一部症例では必ずしも T₄, T₃ の変動に平行しなかった。今後このような rT₃ の変動を検討することにより rT₃ 値の意義が明らかにされるものと思われる。

結 語

1) rT₃ に対する特異的抗体を作製し、この抗体を用いて血清中の rT₃ を直接測定する rT₃ RIA 法を確立し報告した。

2) 本法の最低感度は 1.0 ng/dl であった。

3) 回収率 intraassay reproducibility, interassay variation も満足すべき結果が得られた。

4) 本法で測定した血清 rT₃ 値は正常者で平均 27.4±8.9 ng/dl であり、甲状腺機能亢進症で高値、甲状腺機能低下症で低値、妊娠で高値を示し、血清 T₄, T₃ 値とはほぼ同様の変動を示したが、一部症例では T₄, T₃ の変動と平行しなかった。

終わりに rT₃-¹²⁵I を提供下さったダイナボット社に謝意を表わします。

文 献

- 1) Chopra I: A radioimmunoassay for measurement of 3,3',5'-triiodothyronine (Reverse T₃). J Clin Invest 54: 584-594, 1974
- 2) Nicod PA, Burger A, Staeheli V et al: A radio

- immunoassay for 3, 3', 5'-triiodo-L-thyronine in unextracted serum. method and clinical results. *J Clin End* **43**: 823-829, 1976
- 3) Burman KD, Dimond RC, Earill JM et al: Sensitivity to lithium in treated Graves' disease. Effects on serum T₄, T₃ and reverse T₃. *J Clin End* **43**: 606-612, 1976
- 4) Burge H, Wimpheimer C, Burger A et al: Changes of circulating thyroxine triiodothyronine and reverse triiodothyronine after radiographic contrast agents. *J Clin End* **43**: 1203-1210, 1976
- 5) Burr WA, Griffiths RS Black EG et al: Serum triiodothyronine after surgical operation. *Lancet* **11**: 1277-1279, 1975
- 6) Spauling SW, Chopra I, Sherwin RS et al: Effect of caloric restriction and dietary composition on serum T₃ and reverse T₃ in man. *J Clin End*: **42**: 197-200, 1976
- 7) Chopra IJ, Chopra U, Smith SR: Reciprocal changes in serum concentration of 3, 3', 5'-triiodothyronine (reverse T₃) and 3, 3', 5'-triiodothyronine (T₃) in systemic illness. *J Clin End* **41**: 1043-1048, 1975
- 8) Burman KD, Read J, Dimond RC et al: Measurement of 3, 3', 5'-triiodothyronine (reverse T₃), 3, 3'-L diiodothyronine T₃, and T₄ in human amniotic fluid and in cord and maternal serum. *J Clin End* **43**: 1351-1359, 1976
- 9) 奥野龍与, 中島信子, 笠木寛治地: 各種甲状腺疾患及び新生児における reverse T₃ (rT₃) 濃度について. *日内泌誌* **53**: 445-445, 1977
- 10) 長滝重信, 内村英正, 池田 斉他: 各種疾患における 3, 3', 5'-L-triiodothyronine (reverse T₃) の血中濃度とその調節機序. *日内泌誌* **52**: 446-446, 1977
- 11) Mitsuma T, Colluci J, Shenkman L et al: Rapid simultaneous radioimmunoassay for triiodothyronine and thyroxine in unextracted serum. *Biochem Biophys Res Comm* **46**: 2107-2113, 1972