

《ノート》

Polyethylene Glycol (PEG) を用いた Radioimmunoassay による
血中 Thyroxine 測定法 (科研 T₄ (PEG) RIA Pac) の検討

Radioimmunoassay of Thyroxine with Polyethylene Glycol (PEG)

浮池 俊憲* 森田 昭則* 辻 百合子* 福島 泰英*
万年 孝哉** 近藤 重信** 山崎晴一朗** 沖田 信光***

Toshinori FUKE*, Akinori MORITA, Yuriko TUJI*, Yasuhide FUKUSHIMA*,
Takaya MANNEN**, Shigenobu KONDO**, Seiichiro YAMASAKI**,
Nobumitsu OKITA***

*Clinical Laboratory, Kurume University School of Medicine

**Internal Medicine and Clinical Laboratory, Kurume University School of Medicine

***First Department of Internal Medicine, Kurume University School of Medicine

緒 言

甲状腺機能検査の一つとして、血中 thyroxine (T₄) を測定することは必要欠くべからざるものである。T₄ 測定に関しては、1960 年 Ekins ら¹⁾ により saturation analysis 法が開発され、さらに Murphy²⁾ によって competitive protein binding analysis (CPBA) 法が確立された。その後、小分子の T₄ に albumin などの高分子蛋白を結合させることで抗原性をもたせ、T₄ に対する特異抗体の作製が可能となり radioimmunoassay (RIA) 法が実用化された^{3, 4)}。しかも T₄ を血中 thyroxine binding protein (TBP) から遊離させるために TBP 結合阻害剤を使用することにより血清を抽出操作なしに直接測定に供することが可能となった⁵⁾。一方 RIA 法では特異抗体との結合型 (B) と非結合型 (遊離型: F) との分離法が問題とされる。今

回、著者らは分離法の一つである polyethylene glycol (PEG) を用いた T₄ (PEG) RIA Pac を使用して実際検査室での問題点について検討を加えたので報告する。

I. 実験方法

A. 測定方法の概略 (科研: T₄ (PEG) RIA Pac)

T₄ 標準液あるいは被検血清 50 μ l, ¹²⁵I-T₄ 液 200 μ l, 抗 T₄ 血清 200 μ l を順次試験管に加え振とう混和して室温に 45 分間インキュベーションする。PEG 液 1.0 ml を加えて十分混和したのち遠心分離し、上清を除去する。沈澱のカウントを計測して、同時に作成した標準曲線から血清 T₄ 値を読みとる。以上の測定方法の概略を Fig. 1 に示す。

B. 検討項目

T₄ 測定には PEG 法を採用している T₄ PEG RIA Pac (RCC 科研化学) を使用し、以下の項目につき検討した。

1. インキュベーション温度と時間の影響

* 久留米大学：中央検査部

** 同大：病態検査科

*** 同大：第一内科

受付：52 年 12 月 20 日

最終稿受付：53 年 3 月 7 日

別刷請求先：久留米市旭町 67 (☎830)

久留米大学医学部内科学講座中央臨床

検査部

浮池 俊 憲

Key words: T₄ RIA, polyethylene glycol (PEG) method, thyroxine level of human serum, Hashimoto's thyroiditis, diagnosis of thyroid function

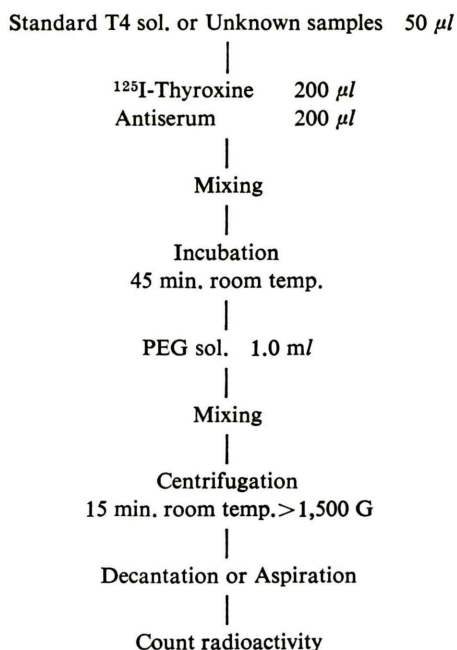


Fig. 1 T₄(PEG) RIA Pac (科研化学) の測定法

4°C, 20°C, 25°C, 37°C でそれぞれ 45 分間インキュベーションを行い、標準曲線に及ぼす影響を検討した。また、25°C で 30 分, 45 分, 60 分および 4°C で 24 時間インキュベーションを行い標準曲線に及ぼす影響を検討した。

2. 再現性

T₄ が低濃度, 中濃度および高濃度を示すプール血清を用いて同一検体を同時に 10 回測定して行った同時再現性 (intraassay), また測定日を変え, 5 回の測定を行い日差再現性 (interassay) を検討した。

3. 希釈試験

T₄ 高濃度のプール血清を生食水で 2 倍, 3 倍,

4 倍に希釈し, その影響について検討した。

4. 回収率

プール血清の各濃度に対して標準溶液の既知濃度を一定量加え, その必要量を採集し, 標準曲線と同一条件下で測定した。

5. PEG 法測定値と sponge 法測定値の比較

比較検討に用いた血清は 健康者 54 例, 甲状腺機能亢進症 19 例, 甲状腺機能低下症 18 例, 正常

妊婦 15 例・橋本病 30 例およびネフローゼ症候群 1 例, 計 137 例を対象とした。ただし橋本病については, 生検によって確定診断されたものについてのみ検討を行なった。また sponge 法はダイナボット社 kit を使用した。

1) 各種疾患における T₄ 値の比較

同一患者血清を PEG 法と sponge 法について比較した。

2) 標準溶液の検討

両 kit に添付してある標準 T₄ 溶液を他社 kit で測定し比較検討を行なった。

3) 健康者血清と橋本病患者血清における PEG 法と sponge 法での比較

両 kit で測定した値の平均値比 (sponge 法/PEG 法: S/P) を用いて, 健康者血清と橋本病患者血清の比較および血清蛋白濃度の影響について推計学的に検討を行なった。

II. 結 果

1. インキュベーション温度と時間の影響

それぞれの温度で指定の 45 分間インキュベーションすると温度の上昇するとともに各標準点での結合率 (B/T%) は増加し標準曲線の傾きも増してくる。しかし各濃度のプール血清においては温度の上昇と T₄ B/T% の増加は必ずしも標準液の場合と平行していなかった。20°C と 25°C における各濃度の T₄ 値に有意な差は認められなかった (Fig. 2)。一方インキュベーション時間は標準曲線の勾配そのものに影響を与えないがインキュベーション時間を長くすると B/T% の増加傾向を示した。各濃度プール血清においてみると時間の延長と T₄ B/T% の増加では 30 分, 120 分, 45 分の順に B/T% が高値を示した。45 分と 60 分では T₄ 値に有意な差は認められなかった。4°C 24 時間では他の温度・時間に比して B/T% が高い傾向を示した (Fig. 3)。以下の検討は室温下で 45 分インキュベーションを行なった。

2. 再現性

intraassay および interassay を 3 濃度のプール血清について示した (Table 1)。intra および in-

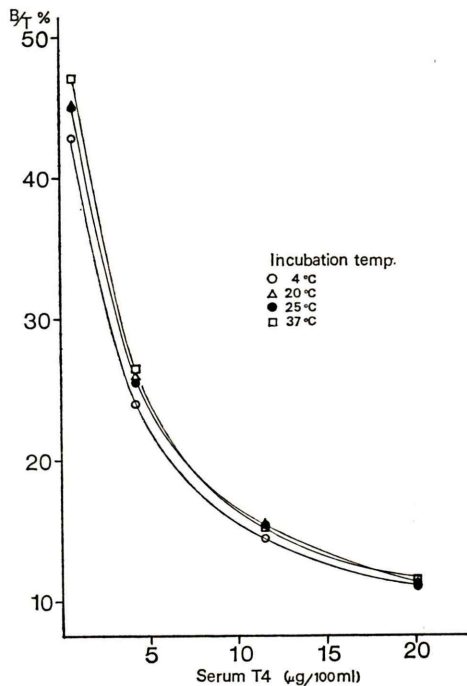


Fig. 2 標準曲線におよぼすインキュベーション温度の影響

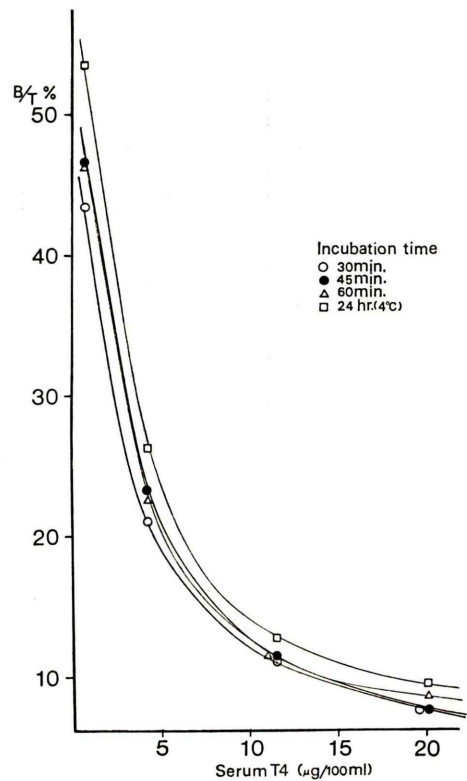


Fig. 3 標準曲線におよぼすインキュベーション時間の影響

Table 1 再現性

Sample	Intraassay n=10		Interassay n=5	
	Mean±S.D. μg/100 ml	C.V. (%)	Mean±S.D. μg/100 ml	C.V. (%)
Hypothyroid	1.29±0.08	6.53	1.12±0.19	17.32
Euthyroid	8.85±0.34	3.80	8.44±0.48	5.64
Hyperthyroid	18.75±0.82	4.34	18.02±1.30	7.23

terassay の平均変動係数 (C.V.) はそれぞれ 4.89%, 10.1% と良好な結果が得られた。

3. 希釈試験

Fig. 4 は T4 高濃度のプール血清を生食水で希釈したときの測定値と希釈度との関係を示したもので直接性が得られた。

4. 回収率

Table 2 は T4 理論値に対する実測値の百分率を求めたものであり、高濃度、中濃度、低濃度の回

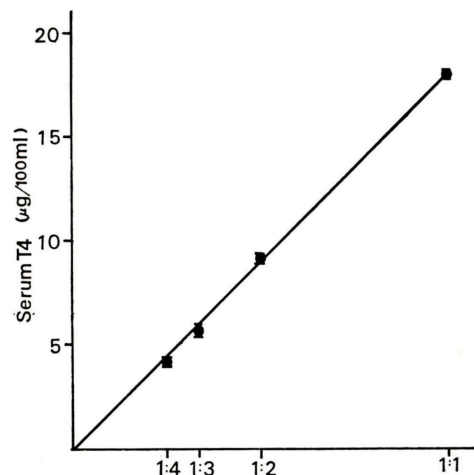


Fig. 4 希釈試験

収率は各々 107.1%, 97.0%, 115.6% で平均回収率は 106.6% と良好な結果であった。

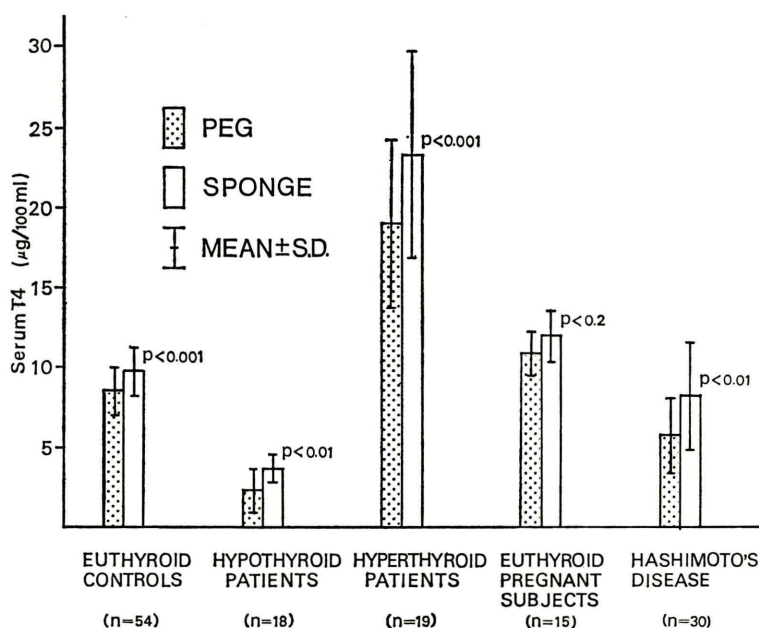
Fig. 5 各種機能状態における血清 T₄ 値

Table 2 回収率

Serum T ₄ μg/100 ml	Added μg/100 ml	Observed μg/100 ml	Calculated μg/100 ml	Recovery (%)
18.8 ¹⁾	0.7	10.5	9.8	107.1 ⁴⁾
8.9 ²⁾	4.2	6.4	6.6	97.0
1.3 ³⁾	11.5	7.4	6.4	115.6

1) Hyperthyroid 2) Euthyroid 3) Hypothyroid

4) Between value

5. PEG 法測定値と sponge 法測定値の比較

1) 各種疾患における T₄ 値の比較

同一血清を PEG 法と sponge 法で測定すると、健常者では PEG 法で $8.6 \pm 1.6 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ (Mean \pm S.D.), sponge 法で $9.7 \pm 1.6 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ 。甲状腺機能低下症患者では、PEG 法で $2.3 \pm 1.4 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$, sponge 法で $3.6 \pm 0.9 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ 。亢進症患者では PEG 法で $19.1 \pm 5.3 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$, sponge 法で $23.3 \pm 6.3 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$, 正常妊婦では PEG 法で $10.9 \pm 1.5 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$, sponge 法で $11.9 \pm 1.6 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ 。橋本病患者では PEG 法で $5.7 \pm 2.3 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$, sponge 法で $8.3 \pm 3.3 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ であった (Fig. 5)。また 137 例における血清 T₄ の測定成績は PEG 法と sponge 法の間に良好な相関がみられ相関係数

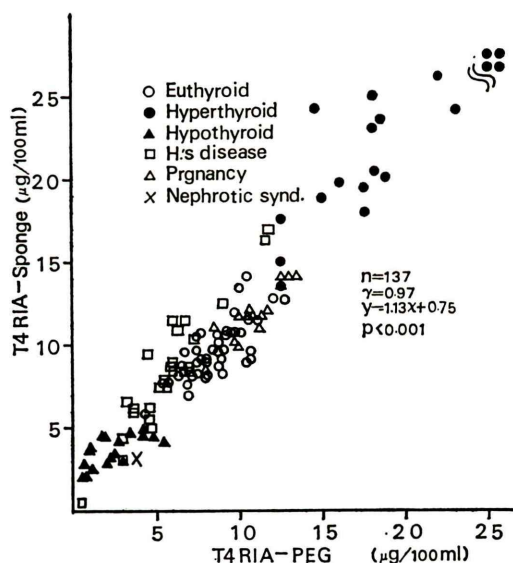


Fig. 6 PEG 法 (科研化学社) と sponge 法 (ダイナボット社) の相関

は $r=0.97$ であった (Fig. 6)。

2) 標準溶液の検討

Table 3 に示したごとく本 kit の各標準溶液をダイナボット社 kit で測定するとやや高値を示し、

Table 3 標準 T₄ 液の検討

Eng. RCC Standard 表示値	Abbott Lab. Kit による 測定値	Abbott Lab. Standard 表示値	Eng. RCC Kit による 測定値
0.7	0.8	0	0.4
4.2	4.9	5	3.8
11.5	12.8	10	7.8
20.1	21.5	15	11.5
		20	14.5

Table 4 健常者血清と橋本病患者血清における PEG 法と sponge 法での比較

Euthyroid Controls		Hashimoto's Disease	
S/P ¹⁾	S/P ¹⁾	T.P ²⁾	γ -G ³⁾
n=54	n=30	n=30	n=30
1.14±0.13	1.46±0.24	7.86±0.71	1.76±0.36 ⁴⁾
—P<0.01—		— γ =0.04—	
		— γ =0.35—	

1) Spong/PEG 2) Total Protein (g/dl)

3) γ -globulin (g/dl) 4) Mean±S.D.

ダイナボット社 kit の各標準溶液を本 kit で測定するとやや低値を示した。すなわち本 kit の標準溶液はダイナボット社 kit のそれに比して平均約 13% 低濃度であった。

3) 健常者血清と橋本病患者血清における sponge 法と PEG 法での比較

橋本病患者血清を PEG 法と sponge 法で比較してみると相関係数は $\gamma=0.93$ で良好な結果を示した。Fig. 5 に示すごとく橋本病患者と健常者と比較してみると、両測定法間の差は大きかった。そこでこの差の原因を調べるために Table 4 に示すごとく S/P 比をとってみると、橋本病患者血清は健常者血清に比して有意に低値を示した ($P<0.01$)。さらに血清蛋白の濃度の影響についてみると血清蛋白濃度と S/P 比ならびに γ -グロブリン濃度と S/P 比との相関係数は各々 0.04, 0.35 と相関は示さなかった。

考 案

今回、使用した本 kit は B.F 分離法の一つとして PEG を使用してあるため、操作が単純でかつ短時間で行ない得ることと、きわめて温和な条件

で B.F 分離ができることにありと考えられる。インキュベーション温度・時間はそれほど厳密性を要しないが、各濃度プール血清についてみると温度の上昇と B/T% の増加は必ずしも標準液のそれと平行は認められなかった。しかし 20°C と 25°C においては T₄ 値に有意差は認めず、また時間は 45 分から 60 分行なえば十分測定可能と考えられた。したがって、検体は同一標準曲線とともにインキュベーション温度・時間を平行し行なえば T₄ 値に及ぼす影響はないものと考えられる。次に本測定法の精度をみると intraassay および interassay の平均変動係数はそれぞれ 4.89%, 10.1% と良好な結果が得られた。また回収率は平均 106.6% と良好であり、さらに T₄ 高値血清は生食水で希釈すると直線性を示したことから検体の希釈には生食水でも十分に可能であると思われる。

B.F 分離の原理が異なるため厳密な比較は困難であるが PEG 法と sponge 法を用いて血中 T₄ 値を比較検討してみると両測定法の相関係数は $\gamma=0.97$ と良好で全体的に PEG 法は sponge 法に比してやや低値を示す結果であった。このことは標準溶液の差も 1 因子であると考えられるが両 kit の特異性によるものおよび B.F 分離法の違いによるものも否定できないと考えられる。一方両 kit の比 (sponge 法/PEG 法: S/P 比) について、健常者血清と橋本病患者血清を比較してみると S/P 比は橋本病患者血清で有意に高値であり ($P<0.01$)、橋本病患者血清では PEG 法が sponge 法よりなお一層低値になる傾向に示した。このことにより橋本病患者血清中には PEG 法での測定で T₄ 値を低値にさせる影響因子があると考えられる。たしかに PEG 沈澱形成に及ぼす因子として、PEG 濃度以外にタンパク質の種類、塩濃度、イオン強度、pH などの影響をうけるとする報告もある^{6), 7)}。今回は、橋本病患者血清の総蛋白濃度および γ -グロブリン濃度と S/P 比との間には特別の相関を認めることができなかったため、その因子は不明であるが、血清蛋白組成に異常をとまってくるものについては PEG 沈澱に影響が皆無とはいえないと考えられる。

ま と め

以上、本 kit を使用し測定上に及ぼす影響について若干検討を行なった。インキュベーション温度・時間は説明書通り行なえば十分測定可能であった。再現性および回収率は良好な結果が得られた。PEG 法と sponge 法の間には良好な相関が得られたが、sponge 法に比して PEG 法は全体的にやや低値を示した。橋本病患者血清は健常者血清に比して一層低値になる傾向を示した。したがって血清蛋白組成に異常を伴ってくるものには PEG 沈澱形成に十分考慮する必要があると考えられる。本法は測定に要する時間が短かく操作も簡便で甲状腺機能検査法として有用な方法であると考えられる。

(最後に、Kit をご提供いただいた 科研化学株式会社に謝意を表します。)

文 献

- 1) Ekins RP, et al: The estimation of thyroxine in human plasma by an electrophoretic technique. *Clin Chem Acta* **5**: 453, 1960
- 2) Murphy BEP: Application of the property of protein-binding to the assay of minute quantities of hormones and other substances. *Nature* **21**: 679, 1964
- 3) Chopra IJ: A radioimmunoassay for measurement of thyroxine in unextracted serum. *J Clin Endocr* **34**: 938, 1972
- 4) Mitsuma T, et al: Rapid simultaneous radioimmunoassay for triiodothyronine and thyroxine in unextracted serum. *Biochem. Biophys Res Comm* **46**: 2107, 1972
- 5) 宮崎忠芳, 他: Radioimmunoassay 法による血中 T_4 の測定. *臨床検査*, **20**: 1077, 1976
- 6) Polson A, et al: The fractionation of protein mixture by linear polymers of high molecular weight. *Biochim Biophys Acta* **82**: 463, 1964
- 7) 日本生化学会編: 生化学実験講座—タンパク質の化学 (1)—, p. 18. 東京化学同人, 東京, 1976