

《ノート》

固相化抗体を用いた  $T_3$  摂取率測定法—スパック  $T_3$  Uptake キットの検討—Fundamental and Clinical Evaluation of Serum  $T_3$  Uptake Test  
Using SPAC  $T_3$  Uptake Kit小西 淳二\* 高坂 唯子\*\* 奥野 龍興\* 遠藤 啓吾\*  
進藤 俊彦\* 笠木 寛治\* 鳥塚 莞爾\*Junji KONISHI\*, Tadaki KOSAKA\*\*, Kanji KASAGI\*, Tatsuyo OKUNO\*, Keigo ENDO\*,  
Toshihiko SHINDO\* and Kanji TORIZUKA\*

\*Department of Radiology and Nuclear Medicine, Kyoto University School of Medicine

\*\*Central Clinical Radioisotope Division, Kyoto University Hospital

## はじめに

血中のサイロキシン( $T_4$ )はその大部分が $T_4$ 結合蛋白, 主として $T_4$  binding globulin (TBG)に結合している. そこで $^{125}\text{I}$  標識トリヨードサイロニン( $T_3$ )を血清に添加して, TBG中の $T_4$ 結合部分への結合率を測定すると, 間接的にTBGの不飽和部分の量を知ることができる. この方法は, direct saturation analysis と呼ばれ, Hamolsky<sup>1)</sup>によって開発された $^{131}\text{I}$ - $T_3$  赤血球摂取率にはじまり, 以後種々の改良法が広く行なわれている. この $T_3$  摂取率は血中 $T_4$ 量により左右されるので, 甲状腺機能をあらわすことになり, また, 一方TBGそのものの変動をも反映する. CPBA法<sup>2)</sup>およびRIA法<sup>3)</sup>の進歩により血中 $T_4$ の直接測定が容易となった今日では,  $T_3$  摂取率の意義は主として後者すなわちTBG量の変動や, TBGの結合能の変化の検出にあるといえよう.

\*京都大学医学部放射線核医学科

\*\*京都大学医学部附属病院放射線部

受付: 53年6月15日

最終稿受付: 53年8月21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放射線部

小西 淳二

今回, 著者らはTBGに結合しなかった $^{125}\text{I}$ - $T_3$ を抗 $T_3$ 抗体でコートした試験管に結合させて分離する方法を用いた $T_3$  摂取率測定キット, スパック $T_3$  Uptake キット (Mallinckrodt, Inc. 第一ラジオアイソトープ研究所)を試用する機会を得, 若干の基礎的検討を行なうとともに, その臨床的有用性について検討したのでその成績を報告する.

## 測定方法と検討対象

## 1) キットの内容と測定操作

スパック $T_3$  Uptake キットの構成は50検体用および100検体用で $^{125}\text{I}$ - $T_3$  溶液 55 ml (100  $\pm$  25 pg/ml の $T_3$ , 10  $\mu\text{Ci}$  以下の $^{125}\text{I}$ を含む緩衝液) 1バイアルおよび2バイアル, 標準血清(凍結乾燥した正常プール血清, 使用に際し蒸留水 5 ml にて溶解) 1バイアル, 抗 $T_3$ 抗体でコートされた試験管それぞれ50本および100本よりなる.

測定操作は次の6ステップよりなる<sup>4)</sup>.

(1) 標準血清または被検血清の各 25  $\mu\text{l}$  を抗体試験管に加える.

**Key words:**  $T_3$  uptake, SPAC  $T_3$  Uptake kit, Antibody-coated tube

(2)  $^{125}\text{I}\text{-T}_3$  溶液を 1.0 ml/ ずつ加え、よく混和する。

(3) 室温 (20~26°C) にて 30~60 分間インキュベイトする。

(4) 内容液を捨てチューブの口をよく拭ぐって水滴を取る。

(5) 抗体試験管の放射能を測定する。

(6)  $\text{T}_3$  摂取指数を次式より算出する。

$$\text{T}_3 \text{ 摂取指数} = \frac{\text{被検血清の net cpm}}{\text{標準血清の net cpm}} \times \text{補正係数}^*$$

(\*補正係数はキットに表示されている。)

なお、 $\text{T}_3$  摂取率(%)への換算は正常値を約 34~46% としたとき以下の式を用いる。

$$\text{T}_3 \text{ 摂取率}(\%) = \text{T}_3 \text{ 摂取指数} \times 40\%$$

## 2) 測定法に関する基礎的検討

上記の測定法について、インキュベーションの時間と温度、抗体試験管洗浄の影響、溶血の影響、精度、キット間および同一キット分割使用の際の再現性に関する検討を加えた。

## 3) 臨床的検討の対象

臨床測定の対象としては京大病院受診中の各種甲状腺疾患患者、妊婦、肝炎および肝硬変症患者、TBG 減少症および京大職員を主とした健常者を用いた。

また、同一血清についてレゾマット  $\text{T}_3$  キット(第一ラジオアイソトープ研究所)による  $\text{T}_3$  binding capacity index (TBC Index) およびスパック  $\text{T}_4$  RIA キットにより  $\text{T}_4$  値を測定して測定値を比較検討した。

## 基礎的検討の成績

### 1) インキュベーションの時間および温度

甲状腺機能亢進症患者、健常者および甲状腺機能低下症患者的 3 血清と標準血清について、インキュベーション時間を 5 分から 3 時間まで変えて測定を行なったときのカウンターの変動を Fig. 1-(a) に示した。また、それぞれを  $\text{T}_3$  摂取指数であらわしたときの変動を Fig. 1-(b) に示した。30 分以下のインキュベーションでは正常血清におけるカウンターの変動が標準血清のそれと末だ平行となって

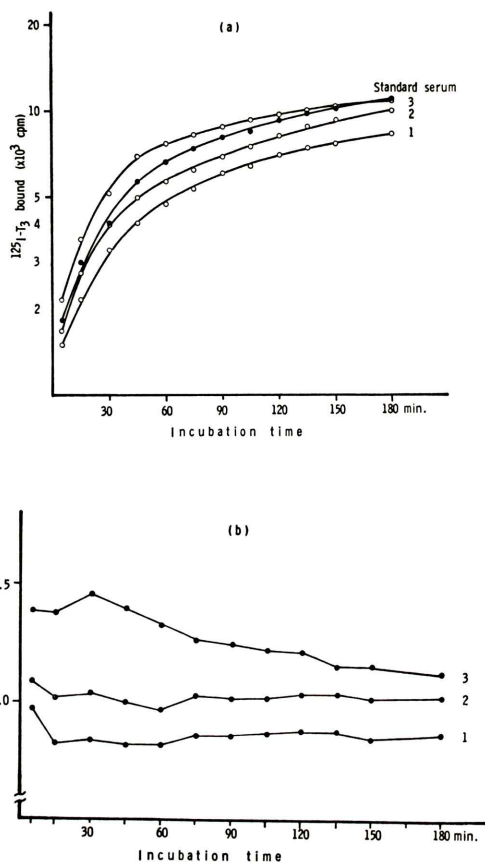


Fig. 1 Effect of incubation time on  $^{125}\text{I}\text{-T}_3$  bound (a) and  $\text{T}_3$  uptake index (b) (incubation temperature: 20°C)

Serum 1 = hypothyroid  
Serum 2 = euthyroid  
Serum 3 = hyperthyroid

おらず (Fig. 1-(a)), 従って、後者で除して求めた  $\text{T}_3$  摂取指数は急激な変化を示した (Fig. 1-(b))。一方、60 分以上では高値血清のカウントが頭打ちとなり (Fig. 1-(a)),  $\text{T}_3$  摂取指数はしだいに低下した (Fig. 1-(b))。従って、至適インキュベーション時間は 45~60 分と考えられた。そこで、以下の検討は全て 45 分のインキュベーションにて行なったが、この時間の前後でもなお若干の変動がみられるので、再現性のよいアッセイのためにはインキュベ

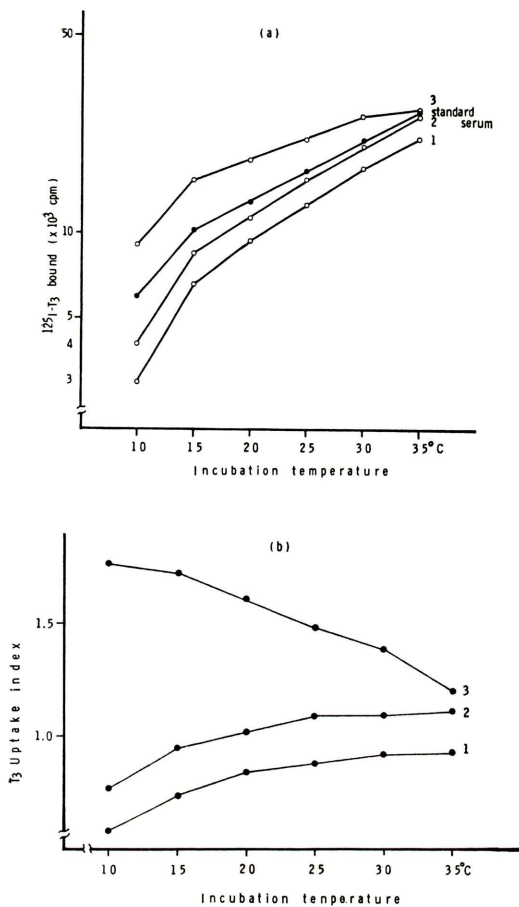


Fig. 2 Effect of incubation temperature on  $^{125}I$ - $T_3$  bound (a) and  $T_3$  uptake index (b) (45 minutes incubation)

Serum 1, 2, and 3: same as in Fig. 1

インキュベーション時間を厳密に一定にする必要がある。

インキュベーション温度を 10° から 35°C まで変化したときのカウントの変化を Fig. 2-(a) に示した。10°C では遊離  $^{125}I$ - $T_3$  の抗体試験管への結合は低かったが、15°C では著明に上昇し、以降温度の上昇とともにほぼ直線的に結合カウントの増加がみられた。しかし、温度の上昇とともに高値と低値血清におけるカウントの比率は減少し、 $T_3$  摂取指数でみても両者の分離が悪くなる傾向がみられた (Fig. 2-(b))。従って、至適温度は 20~25°C と考えられ、以下 20°C で全ての測定を行

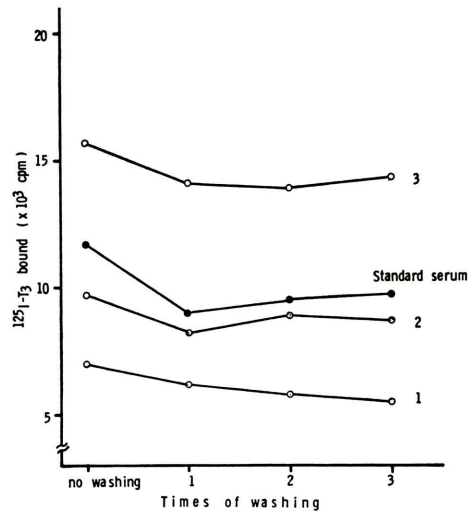


Fig. 3 Effect of washing on  $^{125}I$ - $T_3$  bound to tubes. Serum 1, 2, and 3: same as in Fig. 1

なった。

## 2) 抗体試験管洗浄の影響

本キットではインキュベーション後抗体試験管の内容物を捨て、管口を拭くのみで洗浄する必要がないとされている<sup>4)</sup>。そこで、脱イオン水 1 ml による洗浄操作を 3 回まで加えたときの測定値と、洗浄しなかったときの値とを比較検討した。Fig. 3 に示すように、1 回目の洗浄により 7~17% のカウントの低下がみられたが、以降はほとんど低下しなかった。従って、非特異的な  $^{125}I$ - $T_3$  の残留を除外するため 1 回洗浄を行なうのがよいと考えられ、 $T_3$  摂取指数における高値と低値の分離が 1 回洗浄によりよくなることが認められた。

## 3) 溶血の影響

溶血の測定値に及ぼす影響をみるため、同一検体を種々の程度に溶血させて得た血清について測定を行なった結果を Table 1 に示した。強度溶血 (Hb 濃度 240 mg/100 ml) のみでわずかな  $T_3$  摂取指数の上昇がみられたが、軽度、中等度のものでは影響がみられなかった。

## 4) 精度および再現性

$T_3$  摂取指数が低値、正常値および高値の 3 血清について、同一アッセイで 10 回くり返し測定を行なった際の測定成績を Table 2 に示した。各血



**Table 1** Effect of hemolysis on  $T_3$  uptake index.

Grade of hemolysis	n	Mean $\pm$ S.D.	
no	5	1.18	0.07
mild	5	1.17	0.02
moderate	5	1.17	0.03
marked	5	1.20	0.06

**Table 2** Intra-assay variability of the assay.

No.	serum		
	1	2	3
1.	0.82	0.95	1.46
2.	0.81	0.96	1.45
3.	0.83	0.97	1.42
4.	0.86	0.94	1.41
5.	0.81	0.94	1.46
6.	0.80	0.95	1.40
7.	0.84	0.91	1.46
8.	0.80	0.91	1.49
9.	0.82	0.93	1.36
10.	0.85	0.90	1.36
mean	0.82	0.94	1.43
S.D.	0.02	0.02	0.04
C.V. (%)	2.4	2.1	2.8

**Table 3** Inter-assay variability of the assay.

No.	serum		
	1	2	3
1.	0.82	1.00	1.46
2.	0.85	1.03	1.46
3.	0.77	0.96	1.49
4.	0.80	1.02	1.50
5.	0.84	0.99	1.47
6.	0.76	0.97	1.55
7.	0.88	1.09	1.48
8.	0.83	1.02	1.43
9.	0.84	0.97	1.44
10.	0.74	0.94	1.43
mean	0.81	1.00	1.47
S.D.	0.04	0.04	0.04
C.V. (%)	4.9	4.0	2.7

清の  $T_3$  摂取指数の変動係数は 2.1~2.8% できわめて良好であった。

また、同じ 3 血清について 10 回異なるキットで測定をくり返した際の再現性は Table 3 のごとくで、測定値の変動係数は 2.7~4.9% と良好な

**Table 4** Reproducibility of the assay when one kit was divided and used in 2 months' period.

No.	serum		
	1	2	3
78.1.14	0.84	0.97	1.44
1.20	0.86	0.97	1.43
2.3	0.86	1.05	1.50
2.17	0.78	0.97	1.45
2.25	0.83	1.02	1.43
3.4	0.88	1.02	1.48
3.13	0.70	0.94	1.47
3.28	0.76	0.91	1.44
mean	0.81	0.98	1.46
S.D.	0.06	0.04	0.03
C.V. (%)	7.4	4.1	2.1

再現性が認められた。

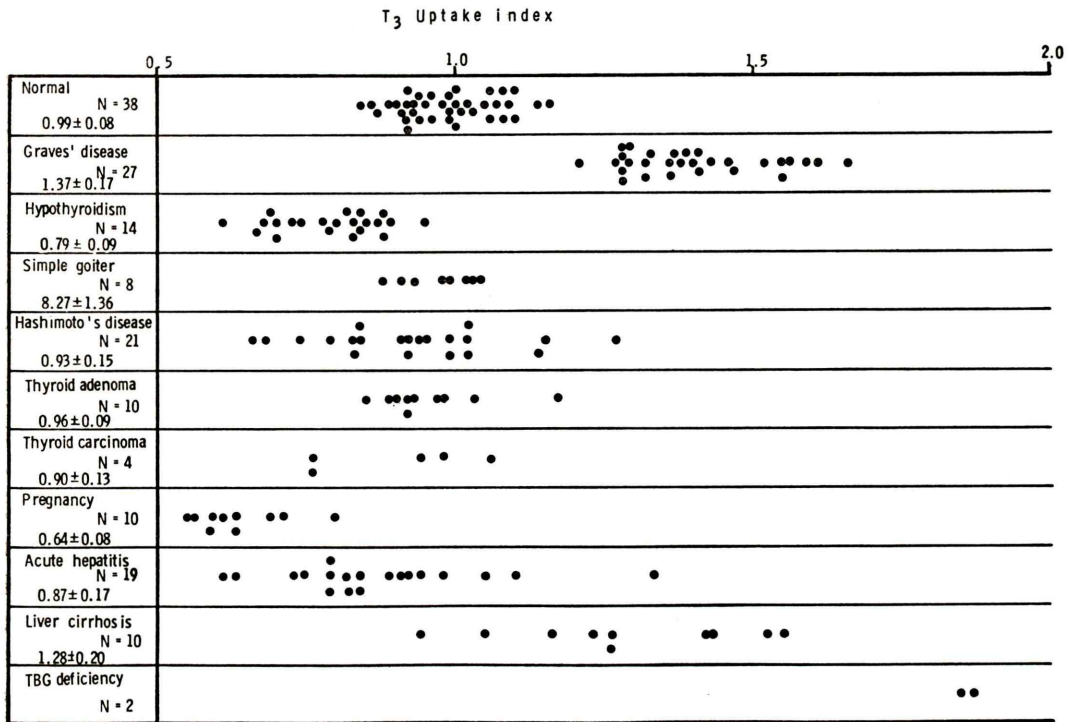
さらに、同一キットを異なる日に分割使用した場合の再現性を 8 回にわたって検討したが、その変動係数は 2.1~7.4% で 2 カ月余にわたる分割使用での再現性は良好であった (Table 4)。

### 臨床的検討の成績

#### 1) 健常者および各種甲状腺疾患患者における測定成績

臨床例における  $T_3$  摂取指数の測定成績を Fig. 4 に示した。健常者 38 例では 0.84~1.16 の範囲に分布し、平均  $0.99 \pm 0.08$  (S. D.) であった。正常域として平均値  $\pm 2$  S. D. をとると、0.83~1.15 となる。これは Mallinckrodt 社<sup>4)</sup>が示している正常値 0.86~1.15 とほぼ一致している。

甲状腺機能亢進症 29 例では  $1.37 \pm 0.17$  で全例 1.22 以上の高値を示した。甲状腺機能低下症 22 例では  $0.79 \pm 0.09$  で正常者との間に若干重なり合いがみられた。橋本病 21 例では高値から低値まで広く分布し、平均  $0.93 \pm 0.15$  であった。腺腫、癌ではほとんどが正常範囲に分布した。一方、妊婦 10 例では平均  $0.64 \pm 0.08$  で全例 0.80 以下の低値に分布し、急性肝炎 19 例では平均  $0.87 \pm 0.17$  で低値を示すものが多かった。これに対し肝硬変症 10 例では平均  $1.28 \pm 0.20$  で多くは高値を示し、TBG 減少症ではいずれも高値であった。

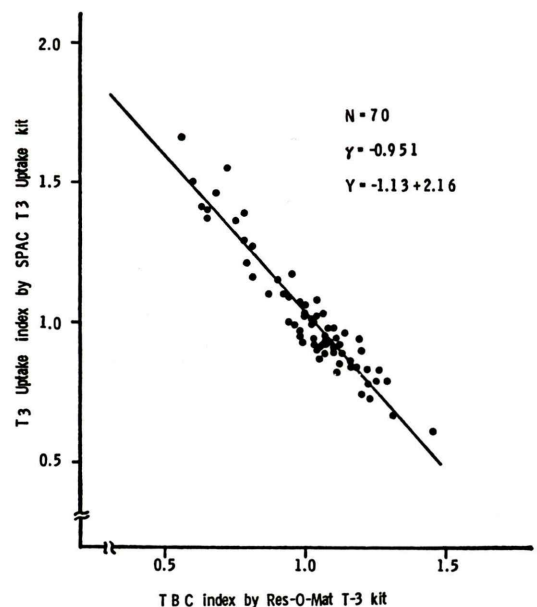
Fig. 4 T<sub>3</sub> uptake index in various conditions measured by SPAC T<sub>3</sub> Uptake kit.

## 2) レゾマット T<sub>3</sub> キットによる TBC index との比較

本法による測定値とレゾマット T<sub>3</sub> キットによる測定値の関係を Fig. 5 に示した。レゾマット T<sub>3</sub> キットではレジストリップを用いて非結合 <sup>125</sup>I-T<sub>3</sub> を分離除去し、血清に結合した放射能を測定し、標準血清の結合カウントで除して TBC index<sup>5)</sup> を求めるいわゆる scholer 法<sup>6)</sup> を用いている。一方、本法では遊離 <sup>125</sup>I-T<sub>3</sub> を測定する Mitchell 法<sup>7)</sup> を用いている。従って、両測定法は reciprocal な関係にあると言えるが、実際両測定値間にはきわめて良好な逆相関が認められた。

## 3) スパック T<sub>4</sub> RIA キットによる T<sub>4</sub> 値との関係

本法による測定値と固相法 RIA を用いたスパック T<sub>4</sub> RIA キットによる血清 T<sub>4</sub> 値との関係を Fig. 6 に示した。甲状腺疾患患者 120 例において両者の間には相関係数 0.86 の良好な相関が認められた。一方、肝硬変症、妊婦、TBG 減少症患者

Fig. 5 Relation between TBC index by Res-O-Mat T-3 kit and T<sub>3</sub> uptake index by SPAC T<sub>3</sub> Uptake kit.

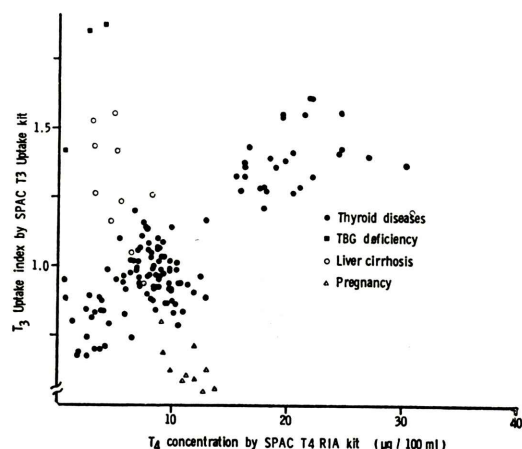


Fig. 6 Relation between serum  $T_4$  concentration measured by SPAC  $T_4$  RIA kit and  $T_4$  uptake index by SPAC  $T_3$  Uptake kit.

者ではいずれも TBG 異常のため著しく偏った分布を示している。

#### 4) スパック free $T_4$ index の検討

上述のスパック  $T_4$  RIA による  $T_4$  値と  $T_3$  摂

取指数を乗じてスパック free  $T_4$  index (FT $_4$  I) を求め、これらの各症例の分布をみると Fig. 7 のごとくであった。すなわち、甲状腺機能正常者は 5.4~12.0 に分布し、平均  $9.0 \pm 1.4$  (S.D.) で甲状腺機能亢進症では 20.7 以上を示した。甲状腺機能低下症は全例 3.3 以下に分布した。肝硬変症では 4.2~10.3 で低値のものがみられた。妊婦では平均  $7.2 \pm 0.8$ , TBG 減少症では 5.0~7.5 といずれも正常域に分布し、これらの症例の甲状腺機能をよく反映していた。

#### 考 案

$T_3$  摂取率の測定には従来すでに数種のキットが用いられており、これらはそれぞれ遊離標識  $T_3$  の分離に特徴を有している。今回、検討したスパック  $T_3$  Uptake キットでは、これまでの吸着などによる非特異的な分離法に代えて試験管壁にコートした抗  $T_3$  抗体を用いて分離を行なう点が特徴である。これにより、使用血清量 25  $\mu$ l の少量で、しかも回転混和などを必要としない簡便な測

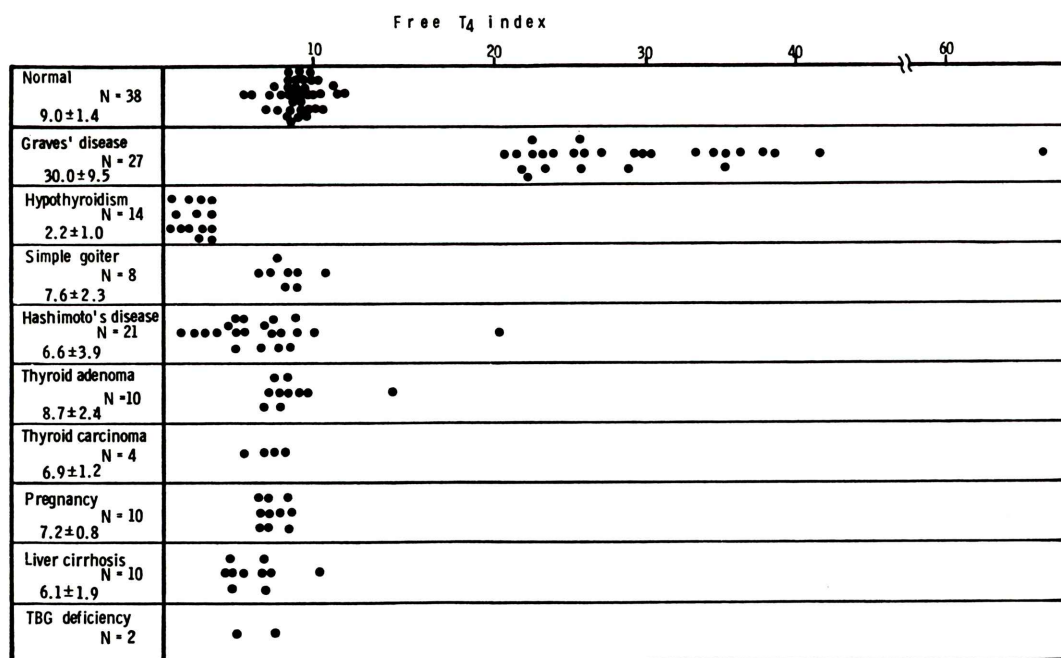


Fig. 7 Free  $T_4$  index (SPAC  $T_4$  values multiplied by  $T_3$  uptake index) in various conditions



定が可能となっている。インキュベーションの条件については 45～60 分、20～25°C が至適と考えられたが、再現性のよい結果を得るためにはできるだけ一定の時間、温度で行なうことが必要である。この点、本法ではインキュベーション後デカントにより 1 度に全試験管の内容液の除去が行なえるので、インキュベーション時間のばらつきが防止できる。20°C、45 分のインキュベーションで行なった測定の精度、再現性は満足すべきものであった。また、同一キットを 2 カ月にわたり分割して使用した場合にも、抗体の結合能に変化はみられず良好な再現性が得られた。

なお、デカントによる排液後、試験管の洗浄は不要とされているが<sup>4)</sup>、脱イオン水 1 ml による 1 回の洗浄を行なう方がよい結果が得られた。

溶血の影響はきわめて高度なものを除き認められなかった。

以上の結果より、本法は少量の使用血清で、簡便かつ短時間に再現性のよい測定が可能な優れた方法と考えられた。

本法による  $T_3$  摂取指数の正常値は平均  $\pm 2$  S.D. を取ると 0.83～1.15 であった。甲状腺機能亢進症患者は  $1.37 \pm 0.17$  で健常者との重なりあいはみられなかった。一方、甲状腺機能低下症では正常値との重なりあいが一部認められた。妊婦では全例低値を示し、急性肝炎でも低値に分布するものが多くみられた。一方、肝硬変症の大部分および TBG 減少症ではいずれも高値を示し、TBG の増減をよく反映していた。

本法による測定値と、いわゆる Scholer 法に基づくレゾマット  $T_3$  を用いた TBC index との間には良好な逆相関が認められた。すなわち、本法による測定値は血清蛋白結合  $T_3$  の比率を示す TBC index と反比例して遊離  $T_3$  の比率を反映していることが示された。

血中  $T_4$  値とスパック  $T_3$  摂取指数との間には良好な正の相関が得られたが、妊娠、肝硬変症、TBG 減少症など TBG 異常を伴う症例では著しい解離が認められ、両者の測定がこれらの異常を見出す上で有用であることが示された。このよう

な TBG や TBG 結合能に変化がみられる場合に、甲状腺機能を正確に把握するには  $FT_4I$  の算出が有用である。スパック  $T_4$  RIA による  $T_4$  値と本法による  $T_3$  摂取指数の積として  $FT_4I$  を算出すると正常機能者では 5.4～12.0 に分布していた。スパック  $T_4$  RIA の正常値は  $5.9 \sim 12.3 \mu\text{g}/100\text{ml}$  であったので<sup>8)</sup> 両測定法の正常値をかけあわせた値は  $4.90 \sim 14.1$  となり、ほぼ 5～14 が正常範囲と考えられた。この  $FT_4I$  にて機能亢進症および低下症の分離は良好であり、妊婦、TBG 減少症ではいずれも正常域に入り、甲状腺機能の指標として有用であることが認められた。

## 結 語

$T_3$  抗体をコートした試験管を用いて遊離  $T_3$  を分離するスパック  $T_3$  Uptake キットにつき、その測定条件、精度、再現性などを検討するとともに、臨床的有用性を検討した。

本法では  $25 \mu\text{l}$  の少量の血清で、精度のよい  $T_3$  摂取指数の測定が可能である。再現性のよい測定のためにはインキュベーションの温度、時間を各測定について一定にすることが必要であり、20°C、45 分のインキュベーションで良好な結果が得られた。なお、試験管の洗浄を 1 回行なうほうがよいと考えられた。

本法による  $T_3$  摂取指数の正常値は 0.83～1.15 であった。臨床例における測定値はよく血中  $T_4$  値と相関し、TBG の増減に伴い低値または高値を示し、 $T_4$  との同時測定により TBG 異常を見出す上にも有用であった。さらに、血中  $T_4$  値とかけあわせて求めた free  $T_4$  index はよく甲状腺機能を反映することが認められた。

終わりにキットを提供された第一ラジオアイソトープ研究所に謝意を表します。

## 文 献

- 1) Hamolsky MW, Stern M, Freedberg AS: The thyroid hormone-plasma protein complex in man. II. A new in vitro method for study of "Uptake" of labelled hormonal components by human erythrocytes. *J Clin Endocrinol Metab* **17**: 33-34, 1957
- 2) Murphy BEP and Pattee CJ: Determination of thyroxine utilizing the property of protein binding. *J Clin Endocrinol Metab* **24**: 187-196, 1964
- 3) Chopra IJ, Solomon DH, Ho RS: A radioimmunoassay of thyroxine. *J Clin Endocrinol Metab* **33**: 865-868, 1971
- 4) SPAC T<sub>3</sub> UPTAKE KIT manual, Mallinckrodt, Inc., 1977
- 5) Res-O-Mat T3 使用説明書
- 6) Scholer JF: A simple measure of thyro-binding by plasma: A test of thyroid function. *J Nucl Med* **3**: 41-46, 1962
- 7) Mitchell ML, Harden AB, O'Rourke ME: The in vitro resin sponge uptake of triiodothyronine-<sup>131</sup>I from serum in thyroid disease and in pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* **20**: 1474-1483, 1960
- 8) 小西淳二, 高坂唯子, 奥野龍興, 他: 固相法 Radioimmunoassay による血中サイロキシンの測定—SPAC T4 RIA kit に関する検討. *核医学*. **16**: 71-77, 1979