

《原 著》

ラジオイムノアッセイ法による人血清 $3,3'$ diiodothyronine ($3,3'-T_2$) の測定

満間 照典* 野木森 剛* 鶴部 春松*

要旨 血清中の $3,3'$ diiodothyronine の測定法としての radioimmunoassay 法を確立したので報告する。抗 $3,3'$ diiodothyronine 血清は L- $3,3'$ diiodothyronine をカルボディミドを用いて牛血清アルブミンに結合し、この結合物を抗原として complete Freund Adjuvant と共に家兎に感作して作成した。この抗血清は甲状腺ホルモン及びその誘導体とは免疫交叉性を示さず、 $3,3'$ diiodothyronine に特異的抗血清であることが認められた。bound と free form の分離には二抗体法を用いた。本法における最低測定感度は 0.5 ng/dl であった。回収率、intraassay reproducibility, interassay variation も良好であった。この方法で測定した人血清中の $3,3'$ diiodothyronine 値は正常者で平均 6.4 ng/dl 、甲状腺機能亢進症で高値、甲状腺機能低下症で低値であった。以上本法は血清中の $3,3'$ diiodothyronine 測定法として十分用い得る方法であることが認められた。

はじめに

近年各種甲状腺ホルモンの測定が可能となり、各種病態におけるこれらホルモンの変動が観察され興味深い知見が報告されている。

$3,3'$ diiodothyronine (T_2) についても、その測定法として radioimmunoassay (RIA) 法が導入され諸家により報告¹⁻⁴⁾ されている。しかし、その測定値については差異が見られ、いまだ意見の一致が得られていない。そこで、著者らは T_2 の測定法としての RIA 法の開発を試み、感度良好な方法を確立すると共に各種病態における変動を観察したので報告する。

実験材料および方法

1) L- $3,3'-T_2$, L- $3,3',5'$ -triodothyronine (rT3) は、西ドイツ Henning 社製のものを L-thyroxine (T_4), L- $3,3',5$ -triodothyronine (T_3), L-tetraiodo-

acetic acid (tetrac), L-triiodoacetic acid (triac), L- $3,5$ -diiodothyronine ($3,5-T_2$), L-diiodotyrosine (DIT), L-monoiodotyrosine (MIT) および牛血清アルブミン (BSA) は Sigma 社製のものを用い、8 anilino-1-naphthalene sulfonic acid (ANS) は Eastman Kodak 社製のものを用い、1-cyclohexy-3 (2, morpholimyl ethyl) carbodimide metho-p-toluene sulfone (morph CDI) は Aldrich chemical Co. のものを使用した。

2) $3,3'-T_2-^{125}\text{I}$ はダイナボット社製のものを用いた。なお specific activity は $4,000 \sim 5,000 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ であった。

3) 第二抗体は栄研化学研究所製の抗家兎ガンマーグロブリン羊血清を用いた。

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

5) 抗体の作製方法 : Chopra⁵⁾らの rT₃ の抗体作製方法に準じ、morph-CDI を用い、 $3,3'-T_2$ を BSA に結合させ、この結合物 1 mg を抗原として complete Freunds adjuvant と共に 4 週間ごと家兎に感作し、おのおのの感作後 7 日目に耳静脈より採血し、後述の assay procedure に準じて抗体

* 名古屋大学医学部第 1 内科教室

受付: 53 年 11 月 13 日

最終稿受付: 54 年 2 月 5 日

別刷請求先: 名古屋市昭和区鶴舞町 65 (番 466)

名古屋大学医学部第 1 内科教室

満 間 照 典

ASSAY PROCEDURE

sample or standard	0.1 ml
I-125-3, 3'-T ₂	0.1 ml
antibody	0.1 ml
buffer (contained ANS)	0.5 ml
<hr/> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">incubated at 4°C for 24 hour</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">added second antibody</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">incubated at 4°C for 24 hour</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">centrifugation</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">count</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">calculation</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">B/T% = net count of sample or standard</p> <hr/> <p style="text-align: center;">net count of total</p>	

Fig. 1 Assay procedure.

の有無および抗体価の推移を観察した。

6) 3,3'-T₂ free 血清の作製方法：著者が先に報告した T₄,T₃ free 血清の作製方法に準じて行なった。すなわち正常血清 100 ml に tracer として, 3,3'-T₂-¹²⁵I を添加した後, activated charcoal 20 g を加え, 4°C に 24 時間放置後, 10,000 G にて 3 回遠沈し, 完全に charcoal を除去した。この方法で tracer として加えた 3,3'-T₂-¹²⁵I の 99% が除去できたので, この血清を 3,3'-T₂ free の血清として使用した。

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

8) 血清 T_4 , T_3 , rT_3 の測定方法 血清 T_4 , T_3 , rT_3 の測定は、先に報告^{6,7)}した RIA 法によって行なった。

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26名、甲状腺機能亢進症49例、甲状腺機能亢進症に抗甲状腺剤投与中で euthyroid state にある50例、hyperthyroid state の14例、原発性甲状腺機能低下症19例、続発性甲状腺機能低下症5例、慢性甲状腺炎24例、単純性甲状腺腫9例、結節

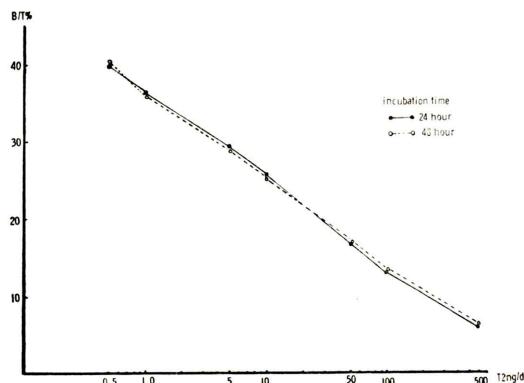


Fig. 2 Effect of incubation time on standard curve.

性甲状腺腫 16 例、亜急性甲状腺炎 5 例、原発性甲状腺機能低下症に T_4 補償療法中で euthyroid state にある 14 例、hypothyroid state の 6 例、計 237 例を対象として午前 9 時に採血し、血清分離後測定まで血清を -20°C に保存した。

実験結果

1) 抗体価の推移

感作した家兎 3 匹中 2 匹に測定に用い得る抗体を作製し得た。その中の 1 匹においては、第 3 回目の感作後より抗体を認め、第 6 回目感作後には最終稀釀に 1,600 倍の抗体を得た。本研究にはこの抗体を用いた。

2) 抗体の特異性 (Table 1)

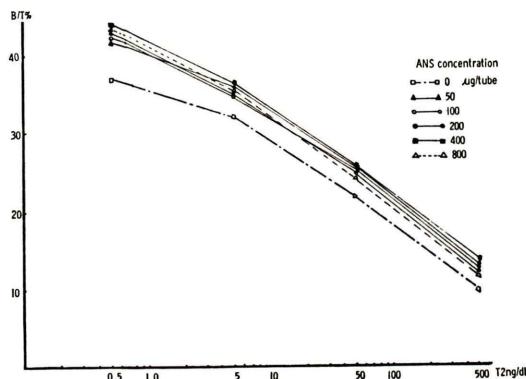
前述の抗体と甲状腺ホルモンおよびその誘導体との免疫交叉性を検討した結果が Table 1 である。表のごとく、3,3'-T₂ に対する反応性を 100% として表わした。なお、判定には B/T% が B₀ の 50% となる標準曲線が最も急峻な所を用いた。L-T₄ とは 0.001%，L-T₃ とは 0.005%，3,5-T₂ とは 0.005% の免疫交叉性を認めたが、rT₃、L-tetrac、L-triac、DIT、MIT、ANS とは免疫交叉性を認めず、3,3'-T₂ に特異的抗体であることが認められた。

3) incubation 時間の検討 (Fig. 2)

4°C で 24 時間および 48 時間 incubate し incubation 時間の標準曲線におよぼす影響を検討した結果が Fig. 2 である。図のごとく 24, 48 時間と

Table 1 Relative reactivity of various thyroid hormone derivatives with anti-3, 3'-T₂ antibody

3, 3'-T ₂	100%
T ₄	0.001
T ₃	0.005
Tetrac	<0.001
Triac	<0.0001
r-T ₃	<0.0001
3, 5KT ₂	0.005
DIT	<0.001
MIT	<0.0001
ANS	<0.0001

**Fig. 3** Effect of ANS concentration on standard curve.

もほぼ同様な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) ANS 濃度の標準曲線に及ぼす影響 (Fig. 3)

血中に存在する甲状腺ホルモン結合蛋白 (TBP) の測定系におよぼす影響を除くため、ANS を用いたが、その至適濃度を検討した結果が Fig. 3 である。図のごとく ANS なしでは B/T% は低くかったが、50~800 $\mu\text{g}/\text{tube}$ ではほぼ同様の標準曲線が得られたので実際の測定には 200 $\mu\text{g}/\text{tube}$ の ANS を用いることとした。

5) 標準曲線および高血清の稀釀曲線 (Fig. 4)

Fig. 4 のごとく標準曲線は 0.5~500ng/dl まで直線性を示し、最低感度は 0.5ng/dl であった。また高 T₂ 血清を T₂ free の血清で稀釀した稀釀曲線は標準曲線にはほぼ平行であった。

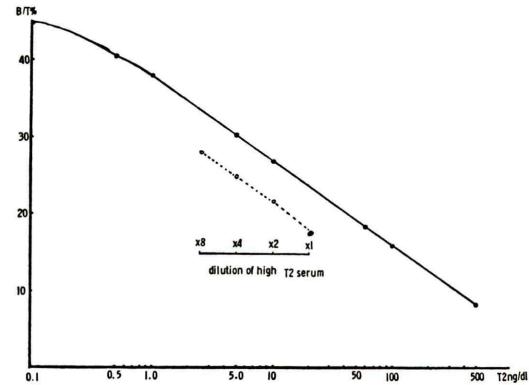
6) 回収率

正常者、甲状腺機能亢進症および甲状腺機能低

Table 2 3, 3'-T₂ levels in serum in various thyroid diseases.

UD: Below the limit of detection

Subject	No.	range ng/dl	Mean \pm SD ng/dl
Normal	26	2~12	6.4 \pm 3.3
Hyperthyroidism	49	8~60	31 \pm 18.0
Treated hyperthyroidism			
Euthyroid	50	2~14	7.2 \pm 5.0
Hyperthyroid	14	8~60	30.3 \pm 17.1
Primary hypothyroidism	19	UD-5	3.2 \pm 2.5
Secondary hypothyroidism	5	UD-3	2.1 \pm 2.0
Treated hypothyroidism			
Euthyroid	14	2~15	6.8 \pm 2.8
hypothyroid	6	UD-2	1.1 \pm 1.2
Chronic thyroiditis	24	1.0~13	8.1 \pm 4.5
Simple goiter	9	4~9	6.2 \pm 3.0
Nodular goiter	16	4~12	7.2 \pm 3.0
Subacute thyroiditis	3	10~15	13.0 \pm 2.6

**Fig. 4** Standard curve and dilution curve of high 3,3'-T₂ serum.

下症血清に 5, 10 および 20 ng/dl の T₂ を添加し、その回収率を検討したところ平均 101 \pm 35% であった。

7) intraassay reproducibility および interassay variation

各種甲状腺機能疾患で T₂ 濃度が 2~20ng/dl の 10 検体について intraassay reproducibility および interassay variation を検討したところ、それぞれ 4.0%, 6.4% であった。

8) 各種甲状腺疾患における血清 T₂ 値 (table 2)

正常者 26 例における血清 T₂ 値は 2~12 ng/dl

に分布を示し、平均 $6.4 \pm 3.3 \text{ ng/dl}$ (Mean \pm SD) であった。甲状腺機能亢進症 49 例では $8 \sim 60 \text{ ng/dl}$ に分布し、平均 $31 \pm 18.0 \text{ ng/dl}$ であった。甲状腺機能亢進症に抗甲状腺剤投与中で euthyroid state にある 50 例では $2 \sim 14 \text{ ng/dl}$ に分布し、平均 $7.2 \pm 5.0 \text{ ng/dl}$ 、hyperthyroid state の 14 例では $8 \sim 60 \text{ ng/dl}$ に分布し、平均 $30.3 \pm 17.1 \text{ ng/dl}$ であった。原発性甲状腺機能低下症 19 例では測定感度以下 (0.5 ng/dl 以下) より 5 ng/dl に分布し、測定感度以下の例を除いた例では平均 $3.2 \pm 2.5 \text{ ng/dl}$ であった。続発性甲状腺機能低下症 5 例では測定感度以下より 3 ng/dl に分布し、測定感度以下の例を除いた例では平均 $2.1 \pm 2.0 \text{ ng/dl}$ であった。原発性甲状腺機能低下症に T_4 補償療法中で euthyroid state にある 14 例では $2 \sim 15 \text{ ng/dl}$ に分布し、平均 $6.8 \pm 2.8 \text{ ng/dl}$ 、hypothyroid state の 6 例では測定感度以下より 2 ng/dl に分布し、測定感度以下の例を除いた例の平均は $1.1 \pm 1.2 \text{ ng/dl}$ であった。慢性甲状腺炎 24 例では $1.0 \sim 13 \text{ ng/dl}$ に分布し、平均 $8.1 \pm 4.5 \text{ ng/dl}$ であった。単純性甲状腺腫 9 例では $4 \sim 9 \text{ ng/dl}$ に分布し、平均 $6.2 \pm 3.0 \text{ ng/dl}$ 、結節性甲状腺腫 16 例では $4 \sim 12 \text{ ng/dl}$ に分布し、平均 $7.2 \pm 3.0 \text{ ng/dl}$ であった。亜急性甲状腺炎の急性期の 5 例では $10 \sim 15 \text{ ng/dl}$ に分布し、平均 $13.0 \pm 2.6 \text{ ng/dl}$ であった。以上多くの症例では血清 T_2 値は T_4 、 T_3 、 rT_3 値と平行して変動を示したが、甲状腺機能低下症、原発性甲状腺機能低下症に T_4 補償療法中および慢性甲状腺炎の一部の症例では T_4 、 T_3 、 rT_3 値とことなる変動を示した。

9) 血清 T_2 値と T_4 値の相関

各種甲状腺疾患 122 例について血清 T_4 値と T_2 値の相関を検討したところ、 $r=0.674$ と推計学上有意な ($p<0.001$) 正の相関が認められた。

10) 血清 T_2 値と T_3 値の相関

各種甲状腺疾患 115 例について血清 T_2 値と T_3 値の相関を観察したところ、 $r=0.591$ と推計学上有意な ($p<0.001$) 正の相関が認められた。

(1) 血清 T_2 値と rT_3 値の相関: 各種甲状腺疾患 92 例について血清値と rT_3 値の相関を検討したところ $r=0.680$ と推計学上有意な ($p<0.001$)

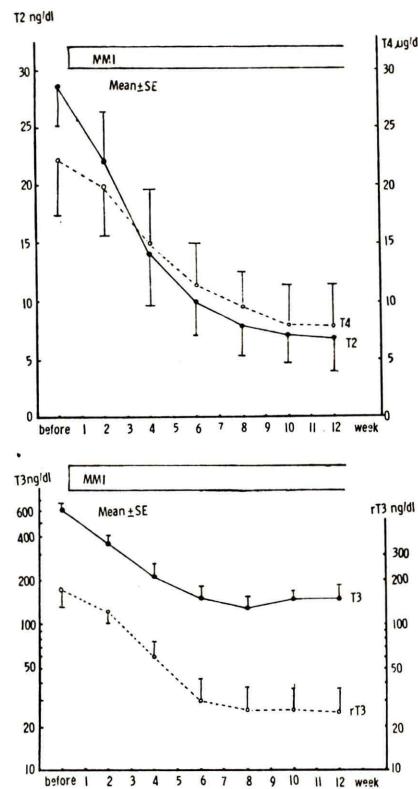


Fig. 5 Changes of $3, 3'$ - T_2 , T_4 , T_3 and rT_3 levels in serum during antithyroid drug treatment in patients with hyperthyroidism.

正の相関が認められた。

(2) 甲状腺機能亢進症に抗甲状腺剤治療中の血清 T_2 値 (Fig. 5): Fig. 5 は甲状腺機能亢進症 8 例にメチマゾール (MMI) 治療を行なった際の血清 T_2 、 T_4 、 T_3 および rT_3 値の変動を示したもので図のごとく血清 T_2 値は、 T_4 、 T_3 、 rT_3 と同様に MMI 投与期間が増すに従って低下し、 T_4 、 T_3 、 rT_3 とほぼ同時に正常域に分布するようになった。

13) 原発性甲状腺機能低下症に T_4 補償療法中の血清 T_2 値の変動 (Fig. 6)

Fig. 6 は原発性甲状腺機能低下症の 3 例に T_4 補償療法中の血清 T_2 、 T_4 、 T_3 および rT_3 値の変動を示したもので、血清 T_2 値は T_4 投与の期間および投与量の増加と共に上昇し、 T_4 、 T_3 、 rT_3 とほぼ同時に正常域に分布するようになった。

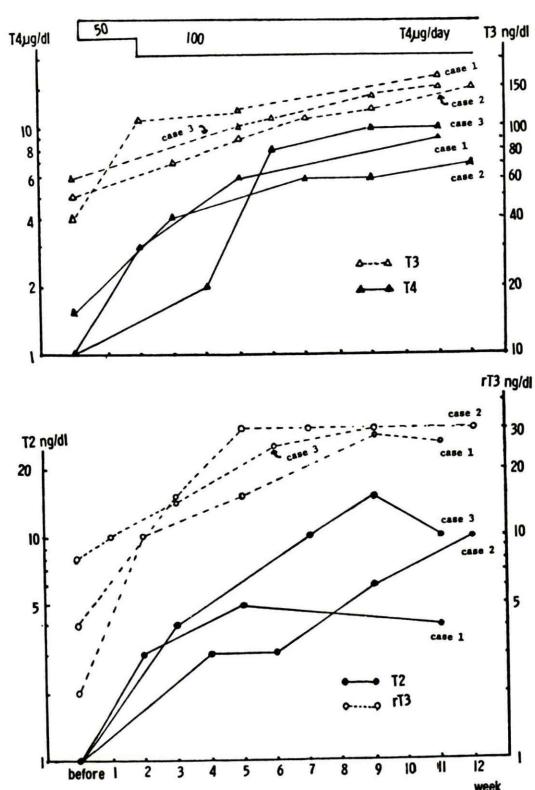


Fig. 6 Changes of 3,3'-T₂, T₄, T₃ and rT₃ levels in serum during T₄ treatment in patients with hypothyroidism.

考 察

3,3'-T₂ の測定法として RIA 法が導入され、諸家により報告^{1~4)} されている。しかし、その測定値については差異が見られ、いまだ意見の一致が得られていない。そこで、著者らは 3,3'-T₂ の測定法としての RIA 法の開発を試み、感度良好で特異性の高い方法を確立すると共に、各種甲状腺疾患における血清値の変動を観察したので報告する。

抗体の作製方法は Chopra⁵⁾ らの rT₃ の抗体作製方法に準じ morph-CDI を用いて、L-3,3'-T₂ を BSA に結合し、この結合物を抗原として家兔に感作して作製した。得られた抗体の抗体価は最終稀釀に 1,600 倍と諸家の報告^{1,2)} より低いが、測定には十分用い得る抗体であった。またこの抗体

の特異性を検討したところ、L-T₄ とは 0.001%，L-T₃ とは 0.005%，3,5T₂ とは 0.005% の免疫交叉性を示したが、rT₃, tetrac, triac, DIT, MIT, ANS などとは免疫交叉性を認めず、3,3'-T₂ に特異的抗体であることが認められ、諸家により報告^{1~4)} されている抗体と同様に 3,3'-T₂ の測定に使用し得る抗体であることが示唆された、incubation 時間を検討したところ、4°C で 24 時間、48 時間共ほぼ同様な標準曲線が得られたので、実際の測定には 24 時間の incubation 時間を用いることとした。

血清中には TBP が存在し、血中の T₂ を直接測定する場合には、この TBP が測定に影響を及ぼす。そこで TBP の影響をなんらかの方法で除く必要がある。著者⁶⁾ らは T₄, T₃, rT₃ の測定に用いている ANS をこの目的に用いることとして、その至適濃度を検討したところ、ANS を 50 μg/tube 以上用いられれば TBP の影響を除くことができる事を認めた。そこで、実際の測定には 200 μg/tube を用いることとした。また T₂ free の血清の作製方法を検討したところ、チヤコール処置血清が T₂ free 血清として十分用い得ることを認めた。

標準曲線は 0.5~500 ng/dl まで直線性を示し、最低感度は 0.5 ng/dl であった。この成績は従来の報告^{1~3)} より良好な結果であった。回収率もほぼ 100% であり、intraassay reproducibility interassay variation も良好であった。以上の成績は本法が血清中の 3,3'-T₂ の測定法として十分用い得る方法であることを示唆したものと思われる。

本法で測定した血清 3,3'-T₂ 値は正常者で平均 6.4 ng/dl と Wu¹⁾ ら、長瀧⁴⁾ らの成績とほぼ同様であったが、Burman³⁾ の報告より低い値であった。この差異は用いた抗体、標準 3,3'-T₂ など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正常者に比し高値、甲状腺機能低下症では低値、慢性甲状腺炎、単純性甲状腺腫および結節性甲状腺腫では正常者と同様の値を示し、従来の報告に一致した。亜急性甲状腺炎の急性期では高値を示したが、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 T_4 , T_3 , rT_3 値とは比較的良好な正の相関を示したが、慢性甲状腺炎、甲状腺機能低下症および甲状腺機能低下症に T_4 補償療法中などの症例中の一部に T_4 , T_3 , rT_3 とは異なる変動を示す例が見られ、今後このような症例の T_2 の変動を観察することは T_2 の病態生理学的意義検討する上で重要なことと考えられる。また、甲状腺機能亢進症および甲状腺機能低下症にそれぞれの治療を行なうと血清 T_2 値は正常域に分布するようになることも認めた。

以上、血清 T_2 値は、 T_4 , T_3 , rT_3 とほぼ同様な変動を示すが、一部症例では、 T_4 , T_3 , rT_3 の変動とは必ずしも平行を示さなかった。今後このような T_2 の変動を観察することにより、血清 T_2 値測定の意義が明らかにされるものと思われる。

結 語

1) $3,3'-T_2$ 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 $3,3'-T_2$ を直接測定する RIA 法を確立した。

2) 本法の最低感度は 0.5 ng/dl であった。

3) 回収率、intraassay reproducibility および interassay variation も満足すべき結果であった。

4) 本法で測定した血清 $3,3'-T_2$ 値は正常者で平均 $6.4 \pm 3.3 \text{ ng/dl}$ 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を示し、多くの症

例で、血清 T_4 , T_3 , rT_3 値とほぼ平行して変動を示したが、慢性甲状腺炎、甲状腺機能低下症などの一部の症例で、血清 T_4 , T_3 , rT_3 値とは異なった変動を示した。

終わりに $3,3'-T_2-^{125}\text{I}$ 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) Wu S., I.D. Chopra, Y Nakamura et al: A radioimmunoassay for measurement of $3,3'-\text{L}-\text{diiodothyronine}$ (T_2). *J Clin End* **43**: 682-685, 1976
- 2) Burger A and C Sakoloff: Serum $3,3'-\text{L}-\text{diiodothyronine}$, a direct radioimmunoassay in human serum: Method and clinical results. *J Clin End* **45**: 384-391, 1977
- 3) Burman K., D.D. Strum, RC Dimond et al: A radioimmunoassay for $3,3'-\text{L}-\text{diiodothyronine}$ ($3,3'-\text{T}_2$). *J Clin End* **45**: 339-352, 1977
- 4) 長滝重信、内村英正、池田 齊他：奇胎妊娠血中 $3,3',5'-T_3$ 及び $3,3'-T_2$ 濃度について、*日内誌* **54**: 587-587, 1978
- 5) Chopra I: A radioimmunoassay for measurement of $3,3',5'-\text{triiodothyronine}$ (Reverse T_3). *J Clin Invest* **54**: 584-594, 1974
- 6) Mitsuma T., J Collucci, L Shenkman et al: Rapid simultaneous radioimmunoassay for triiodothyronine and thyroxine in unextracted serum. *Bioch Bioph Res Comm* **46**: 2107-2113, 1972
- 7) 満間照典：ラジオイムノアッセイによる人血清 $3,3',5'-\text{triiodothyronine}$ (reverse T_3) の測定。核医学 **15**: 605-611, 1978

Summary

A Radioimmunoassay for Measurement of 3, 3'-L-diiodothyronine in Unextracted Human Serum

Terunori MITSUMA, Tsuyoshi NOGIMORI and Shumatsu WANIBE

First Department of Internal Medicines Nagoya University School of Medicine

A sensitive, specific and reproducible radioimmunoassay for measurement of 3,3'-L-diiodothyronine (T₂) in unextracted human serum is described. The binding antiserum was prepared by immunization of rabbits with T₂-bovine serum albumin conjugate. This antiserum did not cross-reacted significantly with various thyroid hormone derivatives. Assay sensitivity was considered to be 0.5 ng/dl by stastical criteria. The mean recovery of different concentrations was 101%. Intraassay reproducibility averaged and interassay variation were 4.0%, 6.4%, respectively. 8-anilino-1-naphthalene sulfonic acid (200 ug/tube) was used to inhibit T₂ to binding to serum protein.

The mean (Mean+SD) serum T₂ concentration

was 6.4+3.3 ng/dl in normal subjects, 31+18 ng/dl in hyperthyroidism, 3.2+2.5 ng/dl in hypothyroidism.

T₂ levels in serum were decreased to normal range in patients with hyperthyroidism during antithyroid drug treatment.

T₂ levels in serum were increased to normal range in patients with hypothyroidism during thyroxine treatment.

These data suggest that this assay system renders attractive for clinical determination of T₂ in human serum.

Key words: 3,3' diiodothyronine, 3',3',5' triiodothronine, radioimmunoassay