

《ノート》

Thyroxine-Binding Globulin (TBG) のラジオ

イムノアッセイ

—RIA-gnost TBG Kit の基礎的ならびに臨床的検討—

Radioimmunoassay of Thyroxine-Binding Globulin

—Fundamental and Clinical Studies of RIA-gnost TBG Kit—

三国 龍彦*

Tatsuhiko MIKUNI

Department of Endocrinology, Internal Medicine, Niigata Hospital of Japanese National Railway

1. はじめに

Thyroxine-binding globulin (TBG) は inter-alpha globulin に位置する分子量約 60,000 の糖蛋白で、甲状腺ホルモンの血中における主たる担体として、その末梢動態に重要な役割をはたしている。血中の TBG 濃度は各種の疾患や妊娠などの生理的变化、あるいは薬剤投与^{1,2)}によって変動することが知られており、先天性の TBG 減少症(欠損症)および増多症^{3,4)}の報告もある。TBG は血中にごく微量にしか存在しないため、直接その濃度を測定することがむずかしく、従来 TBG の T₄ 結合能がその指標とされてきたが、近年、Laurell の Rocket 免疫電気泳動法⁵⁾、competitive Ligand-binding assay (CLBA) 法¹⁾、Radioimmunoassay (RIA) の開発によって direct assay が可能になった。なかでも TBG の RIA は 1971 年、Levy ら²⁾によって最初に報告されて以来、多くの報告がなされている。最近、Behringwerke AG

から B・F 分離に polyethylene glycol を用いた RIA kit (RIA-gnost TBG) が開発され、臨床に供せられるようになったので、今回その基礎的検討と甲状腺疾患における測定の意義について若干の考察を試みた。

2. 測定方法

RIA-gnost TBG kit の内容は、凍結乾燥された ¹²⁵I-TBG、抗 TBG 羊血清、TBG 標準血清 (0~48 µg/ml, 6 バイアル)、既知濃度のテスト血清および TBG を含まない希釈用血清と polyethylene glycol (PEG) 溶液からなる。測定操作は説明書に従い、下記のごとく行なった。すなわち、標準血清および被験血清 20 µl に、溶解した ¹²⁵I-TBG 液と抗 TBG 血清各 200 µl を加えて反応させたのち、PEG 溶液 1 ml を加えて抗体結合型 TBG を沈殿分離し、その放射能を測定するものである (Fig. 1)。

TBG の maximal T₄ binding capacity (TBC) は Tanaka Starr⁶⁾の方法に準じ、セルロースアセテート膜電気泳動 (barbital buffer, pH 8.6) により測定した。

Key words: thyroxine binding globulin, radioimmunoassay, thyroid disease

* 新潟鉄道病院内内分泌内科

受付: 54年3月6日

最終稿受付: 54年5月31日

別刷請求先: 新潟市八千代1-3-1 (☎950)

新潟鉄道病院

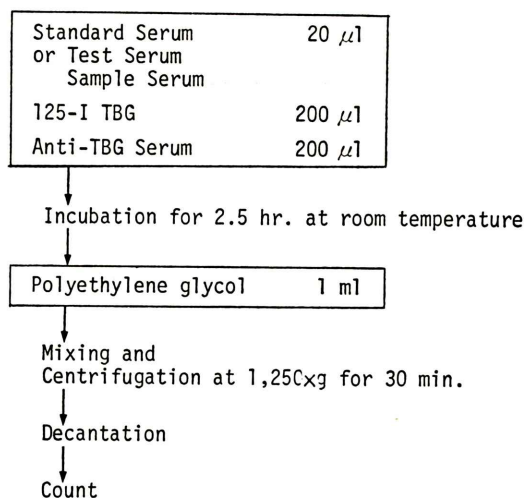


Fig. 1 Assay procedure

血清 T_4 値は RIA-Mat T_4 kit (第一ラジオアイソトープ研究所), T_3 値は T_3 RIA kit II (ダイナボット RI 研究所) を使用して測定した。

3. 結 果

1) 標準曲線に及ぼす incubation 温度と時間の影響

標準血清の TBG 濃度と bound % を片対数グラフ上に plot して標準曲線を作成した。3.8 μ g/ml より 24 μ g/ml までほぼ直線性を示し、それ以上は勾配がややゆるやかになるものの、48 μ g/ml まで十分測定に耐えうると考えられた。incubation の温度と時間を変化させたときの標準曲線は、20°C では 2.5 時間と 24 時間とでほとんど差はなく、4°C, 24 時間でもほぼ同様の曲線が得られたが、37°C, 1 時間では低濃度部でわずかに結合率の低下がみられた (Fig. 2)。10 μ g/ml 以上の濃度では結合率に有意の差はなく、同時に測定したテスト血清の測定値は、いずれの条件下でも表示の値ときわめて近似していた。これらの成績から、以下の測定は、20°C, 2.5 時間 incubation を標準として行なった。

2) 再現性

3 種類の検体について、同一 Lot で同時に 10 回連続して測定したときの変動係数 (CV) は平均

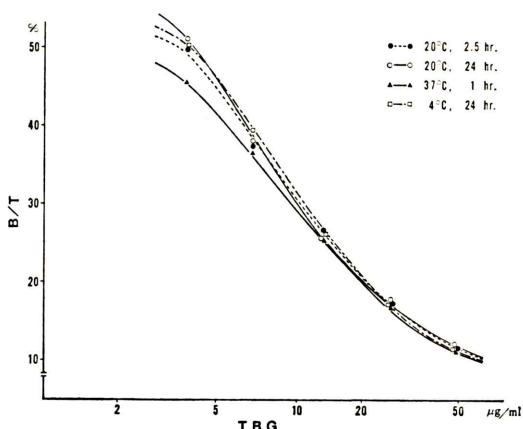


Fig. 2 Effect of incubation temperature and time on standard curve

4.25% と非常に良好な再現性が示された。異なる 4 Lot を用い、測定日を変えて測定した場合、低濃度の血清では CV 3.4% と良好であったが、高濃度ではかなりのばらつきがみられた (Table 1)。

3) 回収率

任意の血清に等量の標準血清を加え、それぞれの予測値に対する実測値の比をもって回収率をあらわした。回収率は 98.1~105.1%, 平均 101.6% ときわめて良好な成績であった (Table 2)。

4) 希釈試験

kit に用意された TBG free 血清を用い、TBG 高濃度の妊婦血清を倍数希釈して assay を行なうと、1~1/16 までほぼ原点に収斂する直線関係が得られた (Fig. 3)。しかし、同一血清を生理的食塩水または蒸留水で希釈した場合には、全く直線関係は得られなかった。

5) 交叉試験

TBG 抗血清の特異性を検討するため、市販の人 albumin および γ -globulin を用いて 125 I-TBG に対する抗血清の結合に及ぼす影響を検討した。albumin を加えた場合、 5×10^4 μ g/ml の濃度でわずかに結合率の低下が認められ、 2×10^5 μ g/ml で 50% 以上低下したが、 γ -globulin には全く交叉性を示さなかった (Fig. 4)。

Table 1 Reproducibility

1) Intraassay (n=10)

	Sample A	Sample B	Sample C
Mean ($\mu\text{g/ml}$)	21.41	27.79	37.27
SD	1.39	0.90	1.12
CV (%)	6.49	3.24	3.01

2) Interassay (n=4)

	Sample D	Sample E	Sample F
Mean ($\mu\text{g/ml}$)	9.50	19.93	46.68
SD	0.32	1.76	4.75
CV (%)	3.37	8.83	10.18

Table 2 Recovery

Added TBG ($\mu\text{g/ml}$)	TBG Values		Recovery (%)
	Calculated ($\mu\text{g/ml}$)	Determined ($\mu\text{g/ml}$)	
(Sample Serum)		10.7	
0	10.7	10.5	98.1
1.9	12.6	12.5	99.2
3.5	14.2	14.5	102.1
6.8	17.5	18.4	105.1
13.0	23.7	24.6	103.8
24.0	34.7	35.1	101.2
Mean			101.6

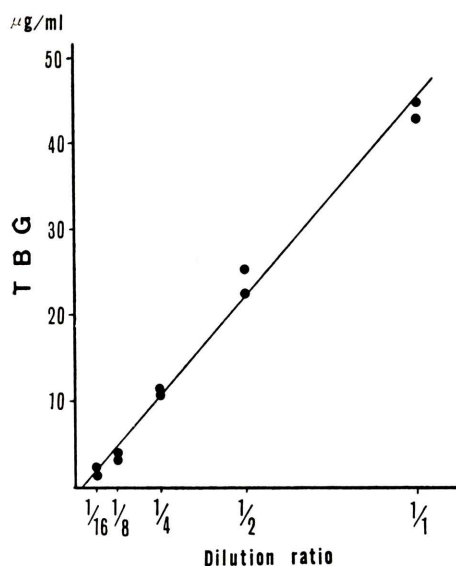


Fig. 3 Dilution test.

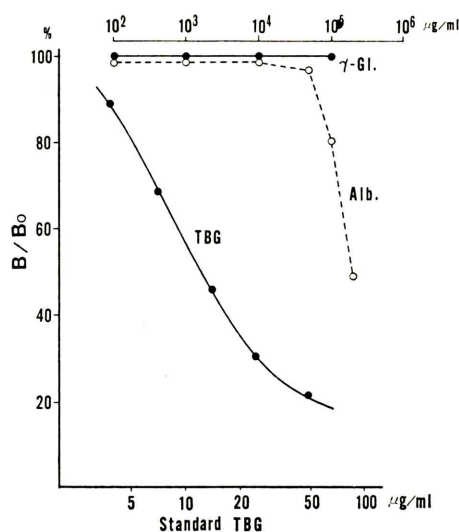
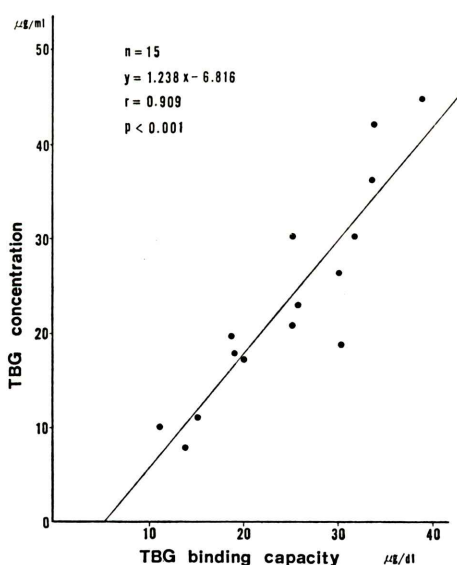


Fig. 4 Cross reactivity of antiserum to human albumin and gamma-globulin.

Fig. 5 Correlation of serum TBG concentration with the maximal binding capacity of serum TBG for T_4 .

6) TBG binding capacity (TBC) との比較

種々の濃度の血清 15 例について TBC を測定し、TBG 濃度と比較した。両者間には相関係数 0.909 と顕著な相関関係が認められた (Fig. 5)。

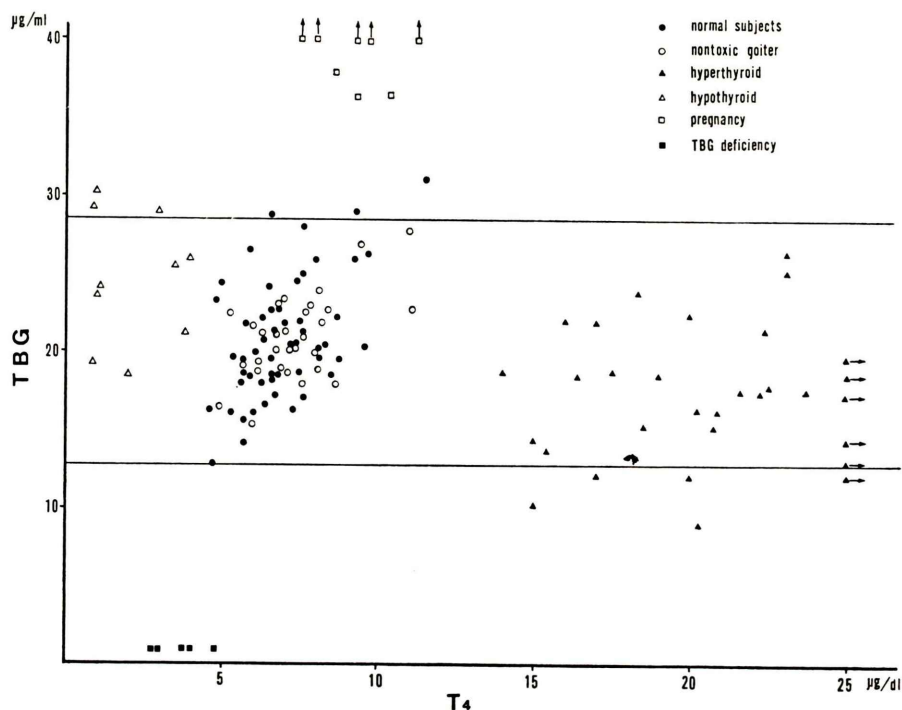


Fig. 6 Relationship between TBG concentration and serum T_4 level.

7) 血清 T_4 および T_3 値との比較

健康正常者, 各種甲状腺疾患および妊婦の血清 TBG と血清 T_4 および T_3 値を比較検討した. T_4 との関係を見ると, 全体では両者間になんらの相関を認めないが, 正常者と非中毒性甲状腺腫のみを選択した場合には有意の相関 ($r=0.536$, $p<0.001$) がみられた (Fig. 6). しかし, T_3 との間には, 上記の機能正常群のみを対象とした場合でも, 有意の相関はみられなかった ($r=0.253$, $p<0.1$).

8) 正常者, 各種甲状腺疾患および妊婦における血清 TBG 濃度

15歳から77歳まで (平均 42.3 歳) の健康正常者 57例の血清 TBG 値は 12.8 から 31.1 $\mu\text{g/ml}$ に分布し, 平均 20.7 ± 3.9 ($M \pm SD$) $\mu\text{g/ml}$ であった. これを年齢別に20~50歳34例と51歳以上18例にわけると, 前者は平均 20.4 ± 4.0 $\mu\text{g/ml}$, 後者は 20.0 ± 2.7 $\mu\text{g/ml}$ で両者間に全く差はなかった. 男女別でも, 女性が若干高値を示したものの有意差は認められなかった. 未治療の甲状腺機能亢進症32例

では平均 17.1 ± 4.5 $\mu\text{g/ml}$ とやや低下しており, 機能低下症では 24.7 ± 4.0 $\mu\text{g/ml}$ と軽度上昇していた. しかし, 両者共正常値との間に有意の差はなかった ($0.2 > p > 0.1$). 非中毒性甲状腺腫29例の平均は 20.9 ± 2.7 $\mu\text{g/ml}$ で, 全て正常範囲内にあり, びまん性と結節性甲状腺腫との間に差はなかった. 妊娠では平均 41.4 ± 4.0 $\mu\text{g/ml}$ と著増しており, 先天性 TBG 欠損症の5例は全て測定感度以下であった (Fig. 7). そのほか, T_3 toxicosis の1例 (T_4 7.6 $\mu\text{g/dl}$, T_3 7.07 ng/ml) では, TBG は 8.0 $\mu\text{g/ml}$ と低下していた. また, 妊娠を合併した機能亢進症では 25.4 $\mu\text{g/ml}$ と正常範囲内にあった.

9) T_4 /TBG ratio

T_4 /TBG ratio は下記の式で求めた.

$$\frac{T_4(\mu\text{g/dl})}{\text{TBG}(\mu\text{g/ml})} \times 10$$

正常者の平均値は 3.37 ± 0.66 ($M \pm SD$) で, 男女差はなかった. 甲状腺機能亢進症は著しく高値,

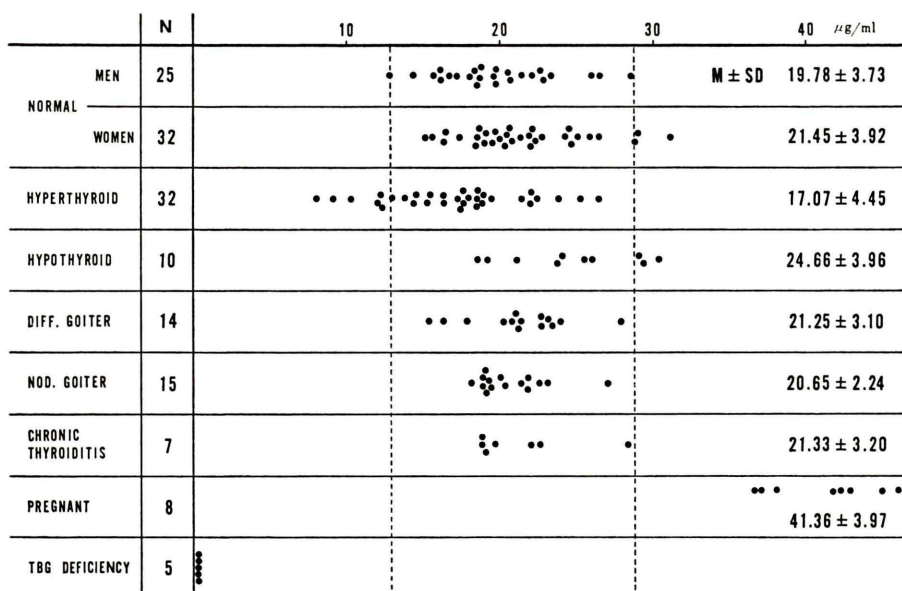
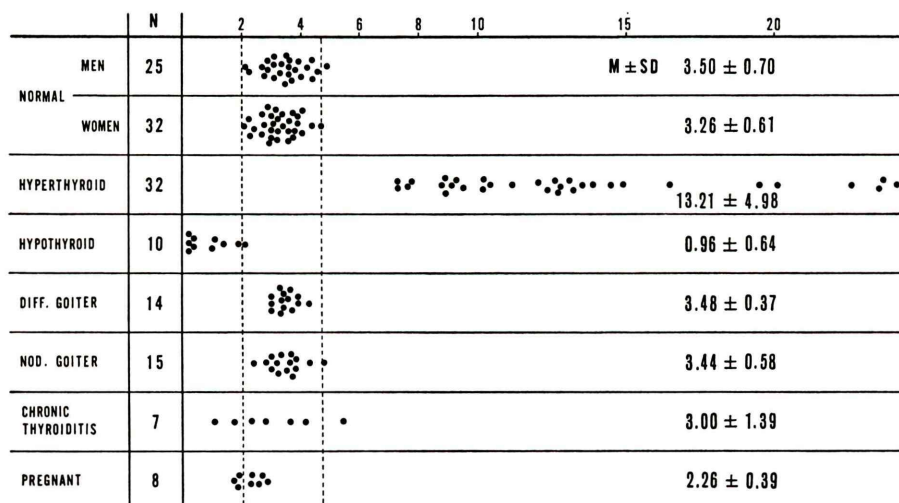


Fig. 7 Serum TBG concentrations in normal, various thyroid diseases and pregnancies.

Fig. 8 T_4 /TBG ratio.

低下症は低値を示し、正常値と明確に分離していた。妊婦では正常もしくはやや低値であった (Fig. 8)。以上、 T_4 /TBG ratio は甲状腺機能とよく一致している成績であった。

4. 考 案

RIA-gnost TBG kit は測定に特別の手技を必要

とせず、比較的簡便に行なうことができるうえ、使用血清量も $20 \mu\text{l}$ と微量である。測定範囲は約 $4 \mu\text{g/ml}$ から $48 \mu\text{g/ml}$ まではほぼ満たしており、妊娠などを除いた通常の血清では、實際上希釈を行なうことなく測定可能と思われる。incubation における温度と時間の変化に対しては、 37°C 、1 時間の場合に低濃度部でわずかに結合率の低下がみ

られたほか、安定しており、指定された条件、すなわち、室温 2.5 から 24 時間の間では標準曲線に差はないため、測定上問題はないと考えられる。再現性については、interassay で高濃度血清に Lot 間のばらつきがみられたが、同一 assay 内ではきわめて良好な再現性が認められた。交叉試験では γ -globulin との交叉性はなく、albumin に対しても $5 \times 10^4 \mu\text{g/ml}$ 以上の濃度で結合率の低下がみられたが、通常の血清濃度ではほとんど影響されないものと推定される。そのほか、回収率、希釈試験ともに良好な成績であり、このことから本 kit は測定上の基礎的条件を十分満足しているものと考えられた。

TBG は等分子の T_4 を結合するため、TBG 濃度とその T_4 最大結合能とは平行することが知られており^{1,2,7)}、今回行なった TBC との比較でも、少数例ではあるが密接な相関関係が認められた。また、TBG 濃度と T_4 値との関係は、他の報告^{8,9)}と同様、甲状腺機能正常群において有意の相関がみられたが、 T_3 値とは相関がなかった。これは両ホルモンの TBG への結合力および量的な差と考えられる。今回検討しなかったが、TBG 濃度は free T_4 および free T_3 と逆相関を示すといわれ¹⁰⁾、これらの事実は TBG が末梢におけるホルモン調節に深く関与していることを示唆している。

従来、TBG の direct assay の報告は多くみられるが、その正常値の平均は 9.5 から $34 \mu\text{g/ml}$ と報告者^{1,2,7-15)}によってかなり相違がみられる。今回測定した健康正常者の TBG 濃度は $20.7 \pm 3.9 \mu\text{g/ml}$ で、これらのほぼ平均的な値であった。また、正常域を $M \pm 2SD$ とすると $12.9 \sim 28.6 \mu\text{g/ml}$ であり、正常値はかなり広い範囲に分布していることが知られた。男女差はほとんどないとされているが、年齢には強く影響され、思春期以前と老年で上昇するといわれている^{10,12-14,16)}。著者の成績では 50 歳以下とそれ以上の症例に差はみられなかったが、正常値の判定には年齢を考慮する必要がある。甲状腺疾患における TBG 値は、機能亢進症で軽度低下しており、低下症では増加傾向を示す。Chopra ら¹⁾、Levy ら²⁾ は亢進症と正常との

差は有意であるとし、治療により正常化することを認めている。しかし、両者とも正常値とのかさなりあいが大きく、TBG のみを単独に測定しても甲状腺機能の判定には不適當で、診断的価値はないと思われる。これに反し、血清 T_4 と TBG との比、すなわち T_4/TBG ratio は甲状腺機能をよく反映しており、臨床上有意義である。Burr ら⁹⁾ は free thyroxine index (FTI) とよく相関し、しかも FTI より甲状腺機能と一致するとしている。したがって、血中甲状腺ホルモン濃度が機能状態と平行しない症例においては TBG になんらかの変化がある場合が多く、 T_4/TBG ratio がきわめて有用な指標になると考えられる。

5. ま と め

RIA-gnost TBG kit を使用して血清 TBG 濃度を測定した。測定感度、再現性、回収率、希釈試験、交叉試験において満足すべき結果が得られた。TBC とは良好な相関関係にあり、甲状腺機能正常群では血清 T_4 値と有意の相関を示した。しかし、 T_3 値とは相関が認められなかった。正常値は $20.7 \pm 3.9 \mu\text{g/ml}$ で、甲状腺機能亢進症でわずかに低値、低下症では高値を示したが有意差はなく、TBG 単独では診断的価値をみいだせなかった。しかし、 T_4/TBG ratio は明らかに甲状腺機能を反映しており、臨床上有用と考えられた。

文 献

- 1) Chopra IJ, Solomon DH, Ho RS: Competitive Ligand-Binding Assay for Measurement of Thyroxine-Binding Globulin (TBG). *J Clin Endocrinol Metab* 35: 565-573, 1972
- 2) Levy RP, Marshall JS, Velayo NL: Radioimmunoassay of Human Thyroxine-Binding Globulin (TBG). *J Clin Endocrinol Metab* 32: 372-381, 1971
- 3) Jones JE, Seal US: X-Chromosome Linked Inheritance of Elevated Thyroxine-Binding Globulin. *J Clin Endocrinol Metab* 27: 1521-1528, 1967
- 4) 紫芝良晶, 清水多恵子, 吉村静子, 他: 遺伝性サイロキシシン結合グロブリン増加症の一家系. *日内分泌誌* 46: 1002-1004, 1970
- 5) Nielsen HG, Buus O, Weeke B: A Rapid Determination of Thyroxine-Binding Globulin in Human Serum by Means of the Laurell Rocket Immuno-

- electrophoresis. *Clin Chem Acta* **36**: 133-138, 1972
- 6) Tanaka S, Starr P: Clinical Observations on Serum Globulin Thyroxine-Binding Capacity, using a Simplified Technique. *J Clin Endocrinol Metab* **19**: 84-91, 1959
- 7) Gershengorn MC, Larsen PR, Robbins J: Radioimmunoassay for Serum Thyroxine-Binding Globulin: Results in Normal Subjects and in Patients with Hepatocellular Carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* **42**: 907-911, 1976
- 8) Hesch RD, Gatz J, McIntosh CHS, et al: Radioimmunoassay of Thyroxine-Binding Globulin in Human Plasma. *Clin Chim Acta* **70**: 33-42, 1976
- 9) Burr WA, Ramsden DB, Evans SE, et al: Concentration of Thyroxine-Binding Globulin: Value of Direct Assay. *Brit Med J* **1**: 485-488, 1977
- 10) Rudorff KH, Herrmann J, Kröll HJ, et al: Bestimmung des Thyroxin-bindenden Globulins (TBG) mit Hilfe des Competitive Ligand-Binding Assay (CLBA): Methodik und Ergebnisse. *J Clin Chem Biochem* **14**: 31-36, 1976
- 11) Cavalieri RR: Preparation of ^{125}I -Labeled Human Thyroxine-Binding Alpha Globulin and Its Turnover in Normal and Hypothyroid Subjects. *J Clin Invest* **56**: 79-87, 1975
- 12) Fisher DA, Sack J, Oddie TH, et al: Serum T_4 , TBG, T_3 Uptake, Reverse T_3 , and TSH Concentrations in Children 1 to 15 Years of Age. *J Clin Endocrinol Metab* **45**: 191-198, 1977
- 13) Burrows AW, Cooper E, Shakespear RA, et al: Low Serum L- T_3 Levels in the Elderly Sick: Protein Binding, Thyroid and Pituitary Responsiveness, and Reverse T_3 Concentration. *Clin Endocrinol* **7**: 289-300, 1977
- 14) Pickardt CR, Bauer M, Horn K, et al: Vorteile der direkten Bestimmung des Thyroxin-bindenden Globulins (TBG) in der Schilddrüsenfunktionsdiagnostik. *Internist* **18**: 538-543, 1977
- 15) Gavin LA, McMahon FA, Castle JN, et al: Alterations in Serum Thyroid Hormones and Thyroxine-Binding Globulin in Patients with Nephrosis. *J Clin Endocrinol Metab* **46**: 125-130, 1978
- 16) Hesch RD, Gatz J, Rape J, et al: Total and Free Triiodothyronine and Thyroid-Binding Globulin Concentration in Elderly Human Persons. *Europ J Clin Invest* **6**: 139-145, 1976