

《ノート》

固相法を用いたサイロキシン radioimmunoassay 法

— Corning T₄ RIA キットの基礎的ならびに臨床的検討 —Solid Phase Radioimmunoassay for Thyroxine—Fundamental and Clinical Studies of Corning T₄ RIA Kit

満間 照典* 野木森 剛*

Terunori MITSUMA* and Tsuyoshi NOGIMORI*

Fourth department of internal medicine Aichi Medical University

I. はじめに

血清中のサイロキシン (T₄) の測定法としては従来より Competitive protein binding analysis¹⁻²⁾ (CPBA) 法が用いられ、広く日常臨床検査法として使用されている。近年ラジオイムノアッセイ (RIA) 法³⁻⁷⁾が T₄ の測定にも用いられるようになり、現在では多種類のキットが発売されている。

今回多孔性のガラスビーズに抗体を固定した固相法による T₄ RIA キットの入手の機会を得、その基礎的ならびに臨床的検討を行うと共に日常検査法としての有用性についても検討したので報告する。

II. 方 法

1. T₄ RIA の方法(1) Corning T₄ RIA の方法

A. キットの内容 (100 検体用)

- ①抗 T₄ 抗体：ガラスビーズに固定した抗血清 1 バイアル (96.0 ml)
- ②T₄-¹²⁵I：2 バイアル。

③標準 T₄ 血清乾燥品：1.5~21.2 μg/dl 1 バイアルずつ、

B. 試薬の調整

- ①T₄-¹²⁵I：バイアル各々に 6.0 ml の蒸留水を加えて溶解する。
- ②標準 T₄：各々のバイアルに 3.0 ml の蒸留水を加えて溶解する。

C. 操作方法

- ①検体用およびスタンダード用チューブに 25 μl の被検血清又は標準 T₄ 血清を添加する。
- ②全チューブに 0.1 ml の T₄-¹²⁵I 溶液を加える。
- ③全チューブに 0.8 ml の抗 T₄ 抗体溶液を加える。
- ④30分間室温に放置する。
- ⑤1,400~1,600 G で10分間遠沈した後に、アスピレータにて上清を除去する。
- ⑥沈渣部の radioactivity を γ カウンターにて測定する。
- ⑦次式を用いて B/T% を計算する。

$$B/T \% = \frac{\text{標準 T}_4 \text{ または検体のカウント}}{\text{total のカウント}} \times 100$$

標準 T₄ の B/T % より標準曲線を作製後、検体の B/T % より T₄ 値を算出する。

(2) 著者の方法

* 愛知医科大学第4内科

受付：54年9月17日

最終稿受付：54年10月26日

別刷請求先：愛知県愛知郡長久手町岩作雁又 21

(〒480-11) 愛知医科大学第4内科

満間 照典

Key words: radioimmunoassay, thyroxine, triiodothyronine

先に報告³⁾した方法によった。

(3) ダイナボット T₄ RIA キットの方法

ダイナボット社製 T₄ RIA キットによった。

2. T₃ レジンスポンジ摂取率

ダイナボット社製キットによった。

3. T₃ RIA の方法

先に報告³⁾した方法によった。

4. TSH 測定法

第一ラジオアイソトープ社製の RIA キットによった。

III. 対 象

名古屋大学第1内科及び愛知医大第4内科外来及び入院患者で、臨床症状、所見及び諸検査にて診断した正常者15例、甲状腺機能亢進症22例、甲状腺機能亢進症に抗甲状腺剤投与中で euthyroid state にある60例、hyperthyroid state の12例、hypothyroid state の5例、T₃ toxicosis の3例、甲状腺機能低下症16例、慢性甲状腺炎28例、単純性甲状腺腫9例、結節性甲状腺腫7例、正常妊娠5例、腎不全10例の計192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。

IV. 実験結果

1. 基礎的検討

1) 抗体の特異性：本キットに用いられている抗 T₄ 抗体と T₄ 誘導体との免疫交叉性を検討したところ、T₄ に対する反応性を100とすると T₃ とは0.001以下 reverse T₃ とは0.001以下、3,5 diiodothyronine とは0.001、3,3' diiodothyronine, diiodothyrosine, monoiodotyrosine とは0.001以下の免疫交叉性を示した。以上の成績は本抗体が T₄ に特異的抗体であることを示している。

2) incubation 温度及び時間の標準曲線に及ぼす影響：incubation 温度及び時間の標準曲線に及ぼす影響を検討するため、20°C の室温及び 37°C で種々の時間 incubate した成績を示したのが図1, 2である。図に示したごとく、37°C では室温に比し B/T % が高い傾向が認められた。又、

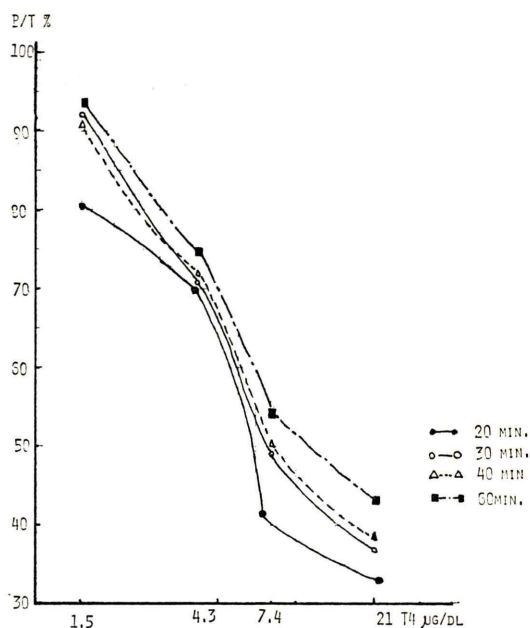


Fig. 1 Effect of incubation time on standard curve at 20°C.

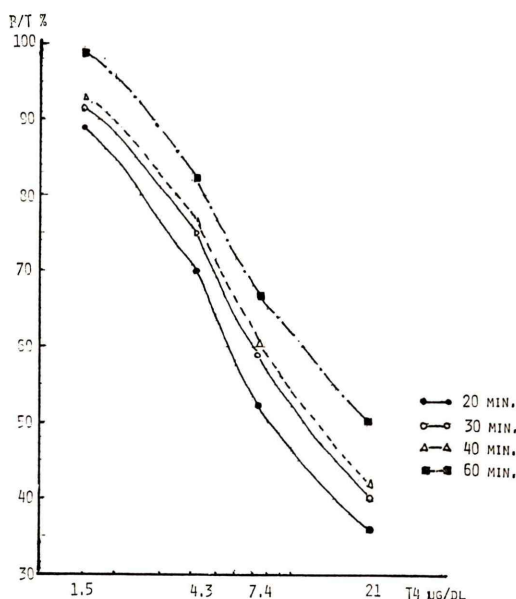


Fig. 2 Effect of incubation time on standard curve at 37°C.

incubation 時間では室温、37°Cとも20分間の incubation では B/T % が低く、60分間の in-

cubation では高い傾向が認められたが、30, 40 分間の incubation 時間ではほぼ同様の結果が得られた。以上の成績は 37°C でも室温でも 30~40 分間の incubation を行なえば良好な結果が得られることを示唆したものと思われる。

3) 標準曲線及び高 T₄ 血清の稀釈曲線：標準曲線は 1.5~21.2 µg/dl まで急峻な曲線が得られた。又、高 T₄ 血清の稀釈曲線は標準曲線にほぼ平行であった。

4) 回収率：正常者、甲状腺機能亢進症、甲状腺機能低下症の血清に 2 µg, 5.0 µg, 12 µg/dl の濃度の T₄ を添加して、回収率を検討したところ、平均 102.4±3.7% の回収率が得られた。

5) intraassay reproducibility, interassay variation: 各種疾患 15 検体について intraassay reproducibility を検討したところ 4.6% であった。又、interassay Variation を 10 検体について検討したところ 36.8% であった。

6) 同一検体を本キット及び著者の方法で測定した際の測定値の相関：各種甲状腺疾患 58 例について、本キット及び著者の方法で血清 T₄ 値を測定

し、測定値の相関を検討したところ、 $r=0.992$ と推計学上有意な ($p < 0.001$) 正の相関が認められた。

Table 1 Recovery

Added T ₄	T ₄ values Calculated µg/dl	Determined µg/dl	Recovery (%)
Sample serum		7.2	
2.0	9.2	9.8	107.8
5.0	12.2	12.0	98.3
12.0	19.2	19.6	102.0
Sample serum		16.0	
2.0	18.0	17.5	97.2
5.0	21.0	21.6	102.9
12.0	28.0	29.0	103.5
Sample serum		1.8	
2.0	3.8	4.0	105.2
5.0	6.8	7.2	105.9
12.0	13.8	13.6	98.5

Table 2 Reproducibility

1 Intraassay (N=5)

Sample	Mean(µg/dl)	SD	CV (%)
1	7.2	0.34	4.7
2	2.1	0.10	4.8
3	3.6	0.23	6.4
4	8.0	0.27	3.4
5	22.0	1.32	6.0
6	16.0	0.77	4.8
7	7.2	0.22	3.0
8	4.8	0.17	3.6
9	19.6	0.94	4.8
10	3.0	0.15	5.0
11	4.6	0.19	3.6
12	1.7	0.11	6.5
13	8.0	0.30	5.0
14	7.6	0.22	2.9
15	15.0	0.69	4.6

2 Interassay (N=4)

Sample	Mean(µg/dl)	SD	CV (%)
1	2.2	0.20	9.2
2	7.5	0.51	6.8
3	4.2	0.25	6.0
4	19.0	1.29	6.8
5	22.0	1.63	7.4
6	6.8	0.33	4.8
7	21.0	1.80	8.6
8	3.8	0.17	4.5
9	7.6	0.49	6.5
10	4.8	0.35	7.3

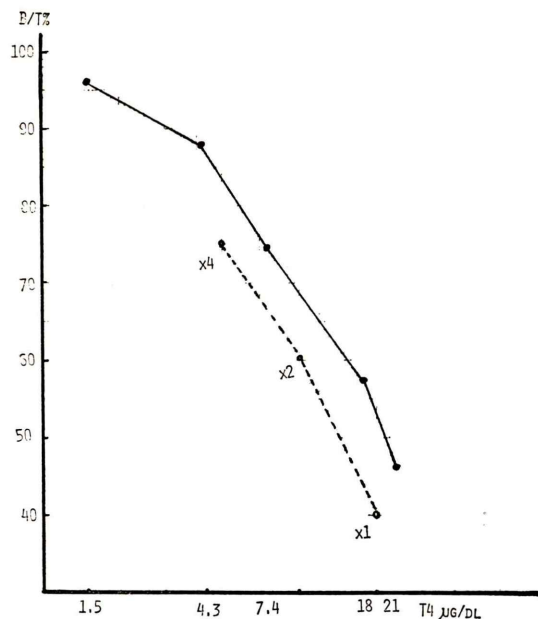


Fig. 3 Standard curve and dilution curve of high T₄ serum.

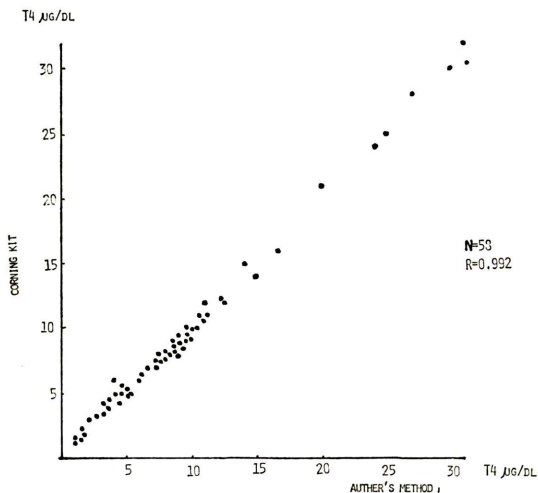


Fig. 4 Correlation between values for T4 concentration as measured with Corning kit and author's method.

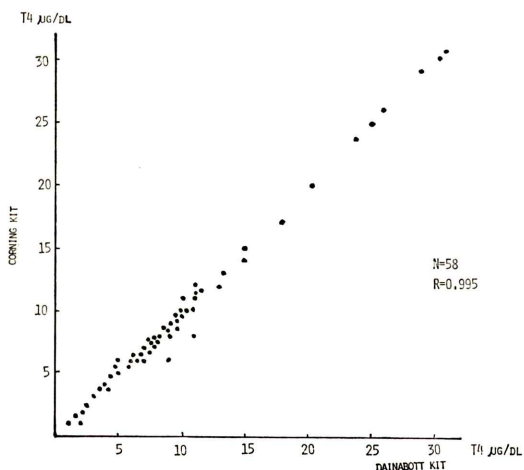


Fig. 5 Correlation between values for T4 concentration as measured with Corning kit and Dainabott kit.

7) 同一検体を本キット及びダイナボットキットで測定した際の測定値の相関：各種甲状腺疾患58例について、本キット及びダイナボットキットで血清T4値を測定したところ、 $r=0.995$ と推計学上有意な($P < 0.001$)正の相関が認められた。

2. 臨床的検討

1) 正常者および各種疾患における血清T4値：正常者15例における血清T4値は5.4～11.0 µg/dl

Table 3 Serum concentration in various physiological and pathological states

Subject	No.	Range µg/dl	Mean ± SD µg/dl
Normal	15	5.4–11.0	7.7 ± 1.6
Hyperthyroidism	22	13.0–32.0	19.6 ± 6.6
Treated hyperthyroid			
Euthyroid	60	5.0–11.0	8.0 ± 1.8
Hyperthyroid	12	12.0–20.0	16.2 ± 3.4
Hypothyroid	5	1.5–4.0	3.2 ± 1.6
T ₃ Toxicosis	3	5.0, 6.0, 9.0	
Hypothyroidism	16	<1.5–4.4	2.8 ± 1.1
Chronic thyroiditis	28	4.2–10.5	6.8 ± 2.4
Simple goiter	9	6.0–11.0	8.2 ± 1.4
Nodular goiter	7	5.2–10.0	7.6 ± 1.2
Pregnancy	5	10.0–13.0	11.2 ± 1.6
Renal failure	10	2.0–9.0	6.0 ± 2.0

に分布し、平均 7.7 ± 1.6 µg/dl (Mean ± SD), 甲状腺機能亢進症22例では13～32 µg/dl に分布し、平均 19.6 ± 6.6 µg/dl, 甲状腺機能亢進症に抗甲状腺剤投与中で euthyroid state の60例では5.0～11.0 µg/dl に分布し、平均 8.0 ± 1.8 µg/dl, hyperthyroid state の12例では12～20 µg/dl に分布し、平均 16.2 ± 3.4 g/dl, hypothyroid state の5例では1.5～4.0 µg/dl に分布し、平均 3.2 ± 1.6 µg/dl, T₃ toxicosis の3例では5.0, 6.0, 9.0 µg/dl であった。甲状腺機能低下症の16例では1.5 µg/dl 以下より4.4 µg/dl に分布を示し、1.5 µg/dl 以下の例を除いた10例では平均 2.8 ± 1.1 µg/dl, 慢性甲状腺炎28例では4.2～10.5 µg/dl に分布を示し、平均 6.8 ± 2.4 µg/dl であった。単純性甲状腺腫では6.0～11.0 µg/dl に分布し、平均 8.2 ± 1.4 µg/dl, 結節性甲状腺腫7例では5.2～10 µg/dl に分布を示し、平均 7.6 ± 1.2 µg/dl, 正常妊娠5例では10～13.0 µg/dl に分布し、平均 11.2 ± 1.6 µg/dl であった。腎不全10例では2.0～9.0 µg/dl に分布を示し、平均 6.0 ± 2.0 µg/dl であった。

2) T₃ レジンスポンジ摂取率値と血清T4値の相関：各種疾患56例について、T₃ レジンスポンジ摂取率値と血清T4値の相関を検討したところ、 $r=0.800$ 推計学上有意な($P < 0.001$)正の相関が認められた。

3) 血清T4値とT3値の相関：各種疾患58例

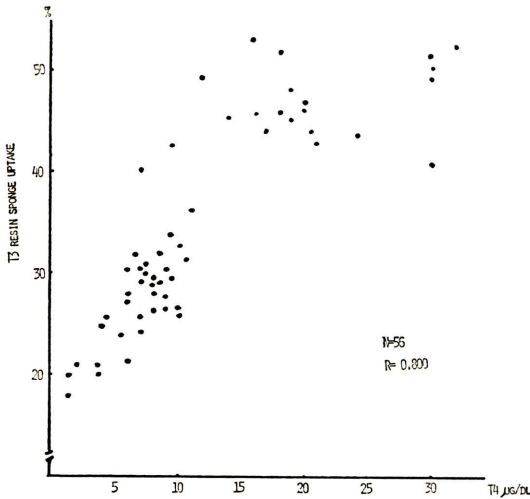


Fig. 6 Correlation of serum T4 concentration with T3 resin sponge uptake.

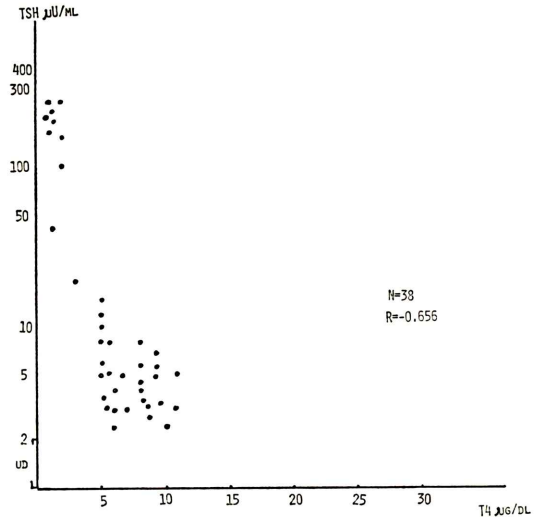


Fig. 8 Correlation of serum T4 concentration with serum TSH concentration.

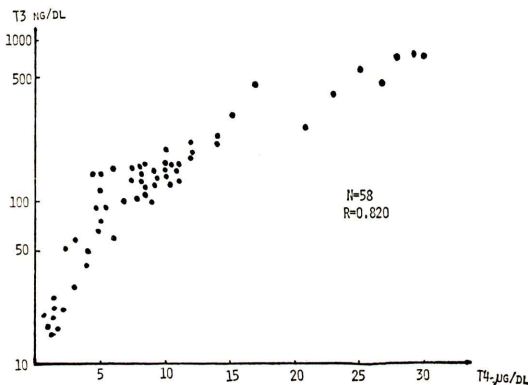


Fig. 7 Correlation of serum T4 concentration with serum T3 concentration.

について血清 T₄ 値と T₃ 値の相関を検討したところ、 $r=0.820$ と推計学上有意な ($P < 0.001$) 正の相関が認められた。

4) 血清 T₄ 値と TSH 値の相関：各種疾患 38 例について、血清 T₄ 値と TSH 値の相関を観察したところ、 $r=-0.656$ と推計学上有意な ($P < 0.001$) 負の相関が認められた。

V. 考 察

固相法を用いた RIA 法は簡便に測定を行うことが出来種々の RIA 法に用いられている。本キ

ットもガラスビーズに抗体を固定化し、操作が簡便になるように作られている。

まず本キットに用いられている抗 T₄ 抗体の特異性について観察したところ、T₄ 誘導体とは免疫交叉性を示さず、T₄ に特異的抗体であり、T₄ の測定に十分用い得る抗体であることが認められた。incubation 時間及び温度について検討したところ、incubation 温度では 20°C の室温、37°C でも良好な結果が得られた。又、incubation 時間では 30~40 分間の incubation ではほぼ同様な結果が得られた。以上の結果は短時間で血清 T₄ 値を測定出来ることを示しており、日常検査法として有利な方法であることを示唆したものと思われる。

標準曲線は 1.5~21.2 μg/dl まで急峻な曲線を示した。又、高 T₄ 血清の希釈曲線は標準曲線にほぼ平行であった。以上の成績は 1.5~21.2 μg/dl の血清は直接測定し、それ以上の濃度の血清は希釈測定すれば良いことを示している。回収率は 100% 前後の良好な結果であった。又、intraassay reproducibility および interassay variation も満足すべき結果であった。

本キットで測定した血清 T₄ 値と著者の方法および他のキットで測定した T₄ 値との間に良好な正の相関が認められた。以上の成績は本キットが

少量の血清で短時間に血清 T_4 値を測定出来、日常臨床検査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。

本キットで測定した血清 T_4 値は正常者で平均 $7.7 \mu\text{g/dl}$ 、甲状腺機能亢進症で $19.6 \mu\text{g/dl}$ 、甲状腺機能低下症で $2.8 \mu\text{g/dl}$ を示し、三者間にかさなりは認められず、諸家の報告³⁻⁷⁾ に一致した。さらに甲状腺機能亢進症に抗甲状腺剤治療中の例において、甲状腺機能状態と血清 T_4 値とはよく一致した。又、 T_3 レジンスポンジ摂取率値、 T_3 値とは正の相関、TSH とは負の相関が血清 T_4 値との間に認められた。以上の成績は本キットで測定した血清 T_4 値が甲状腺機能状態を良く反映することを示しており、日常臨床検査法として広く用い得る方法であることを示唆したものと思われる。

VI. ま と め

固相法を用いた Corning 社製 T_4 RIA キットの基礎的並びに臨床的検討を行い次の結果が得られた。

- 1) 本キットに用いられている抗 T_4 抗体は T_4 に特異的抗体であることを認めた。
- 2) incubation 時間は 30~40 分間、温度は 20°C 又は 37°C で行なえば良いことを認めた。
- 3) 標準曲線は $1.5\sim 21.2 \mu\text{g/dl}$ まで急峻な曲線を示した。又、これ以上の濃度の血清は稀釈後測定すれば血清 T_4 値を測定出来ることを認めた。
- 4) 回収率は平均 102%, intraassay reproducibility は 4.6%, interassay variation は 6.8% であ

った。

5) 本キットで測定した血清 T_4 値は他のキットで測定した T_4 値と良好な正の相関を示した。

6) 本キットで測定した血清 T_4 値は正常者で平均 $7.7 \mu\text{g/dl}$ 、甲状腺機能亢進症で $19.6 \mu\text{g/dl}$ 、甲状腺機能低下症で $2.8 \mu\text{g/dl}$ であった。又、 T_3 レジンスポンジ摂取率、 T_3 値とは正の相関、TSH とは負の相関が認められた。

T_4 RIA キットを提供下さった Corning 社に謝意を表わします。

文 献

- 1) Ekins RR: The estimation of thyroxine in human serum by an electrophoretic technique. Clin Chim Acta 5: 453, 1960
- 2) Murphy BEP, Pattee CJ: Determination of thyroxine utilizing the property of protein binding. J Clin End 24: 187, 1964
- 3) Mitsuma T, Colucci J, Shenkman L, et al: Rapid simultaneous radioimmunoassay for triiodothyronine and thyroxine in unextracted serum. Biochem Bioph Res Comm 46: 2107, 1972
- 4) Larsen PR, Dockalova J, Sipula D, et al: Immunoassay of thyroxine in unextracted human serum. J Clin End 37: 177, 1973
- 5) 山内一征, 鰐部春松, 今井幸宏, 他: リアマット T_4 キットによる血中サイロキシン等の測定. ホと臨床 455, 1977
- 6) 池窪勝治, 中島信子, 遠藤啓吾, 他: RIA-Mat T_4 キットの基礎的ならびに臨床的検討. ホと臨床 25: 25: 313, 1977
- 7) 満間照典, 鰐部春松, 広岡良文, 他: 固相法を用いた radioimmunoassay 法によるサイロキシンの測定. —Konsul T_4 RIA キットの検討—. ホと臨床 26: 411, 1978