

《ノート》

コーニング IMMO PHASE T_3 RIA キットによる 血中 T_3 測定法の検討

Measurement of Serum T_3 Concentration by Corning IMMO PHASE RIA kit

野木森 剛* 満間 照典*

Tsuyoshi NOGIMORI* and Terunori MITSUMA*

*Fourth department of Internal Medicine Aichi Medical University

I. はじめに

血清中の Triiodothyronine(T_3) の測定は, Nau-man¹⁾, Sterling²⁾ らによる CBPA 法, Brown³⁾, Gharib⁴⁾, Mitsuma⁵⁾ らによる Radioimmunoassay 法が開発されてから, 日常臨床検査法として広く用いられており, 多数のキットが各社より発売されている。

今回, 固相法を利用した Corning 社製の T_3 RIA キット (Immo Phase T_3 Radioimmunoassay Test System) の入手の機会を得, 基礎的ならびに臨床的検討を行なうとともに, 日常検査法としての有用性をもあわせ検討したので報告する。

II. 対 象

名古屋大学第 1 内科と愛知医科大学第 4 内科の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 12 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の 79 例, 甲状腺機能低下症 24 例, 甲状腺機能低下症に T_4 補償療法中の 16 例, 慢性甲状腺炎 18 例,

* 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 11 月 7 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

野木森 剛

単純性甲状腺腫 7 例, 結節性甲状腺腫 2 例, T_3 toxicosis 1 例, 神経性食欲不振症 3 例, 慢性腎不全 22 例の計 206 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。

III. 方 法

1. T_3 RIA 法

1) Immo Phase T_3 RIA Test System の方法
キットの組成: 100 テスト用

(1) $^{125}\text{I}-\text{T}_3$ 溶液: 3 バイアル (4 $\mu\text{Ci}/5.0 \text{ ml}$)

(2) 家兔抗 T_3 抗体: 1 瓶, 96 ml (多孔性のガラス粒子に抗体を結合させたもので, BSA, thimerosal, phosphate buffer を含んだ懸濁液)

(3) T_3 血清標準液: 0, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 ng/ml

(4) T_3 コントロール血清 I および II: 0.55 \pm 0.3 ng/ml, 2.3 \pm 0.5 ng/ml 各 1 瓶

操作方法

(1) T_3 標準血清, コントロール血清, および被検血清を 50 μl , それぞれのチューブにとる。

(2) $^{125}\text{I}-\text{T}_3$ 溶液 100 μl を全チューブに入れる。

(3) 抗 T_3 抗体溶液 800 μl を静かに各チューブに入れ, 2~3 秒震盪混和。

(4) 室温にて 2 時間インキュベーションする。

(5) 1,400~1,600 g で 10 分間遠沈後, 上清を捨て, 沈殿物の radioactivity を γ -カウンターで

Key words: Triiodothyronine, Radioimmunoassay

測定.

(6) 次式を用いて $B/B_0\%$ を計算する.

$$B/B_0\% = \frac{\text{標準 } T_3 \text{ または被検血清のカウント}}{\text{標準 } T_3 0 \text{ ng/ml のカウント}} \times 100$$

標準 T_3 の $B/B_0\%$ より標準曲線を作製し、検体の $B/B_0\%$ より濃度を算出した.

2) 著者らの方法

先に報告⁵⁾した方法によった.

2. T_4 測定法

先に報告⁶⁾した方法によった.

IV. 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 T_3 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ところ、 T_3 に対する反応性を 100% すると、 T_4 とは 0.005, Triac とは 0.02, 3,3'- T_2 とは 0.003, 3,5- T_2 とは 0.003 の免疫交叉性を認めたが、 rT_3 , DIT, MIT とは免疫交叉性を認めず、 T_3 に特異的な抗体であることが確認された.

2) incubation 温度の影響

incubation 温度の bound count に及ぼす影響を検討するため、 T_3 血清標準液の 0, 0.25, 1.0, 2.0, 8.0 ng/ml を用い、4°C, 室温および 37°C で 2 時間 incubate して、そのカウントを観察した。その結果は Fig. 1 のごとく、各濃度で、室温に比し、4°Cにおいては低く、37°C では高い結果が得られた。室温および 37°C では、標準曲線はほぼ平行で、この間の温度内であれば実際の測定にはさしつかえないことが認められた。

3) incubation 時間の影響

Table 1 Cross reactivity

Thyroid hormone and its derivatives	Relative reactivity
1-triiodothyronine	100 %
1-thyroxine	0.005
triiodothyroacetic acid	0.02
3, 3'-diiodothyronine	0.003
3, 5-diiodothyronine	0.003
reverse T_3	<0.001
monoiodotyrosine	<0.001
diiodotyrosine	<0.001

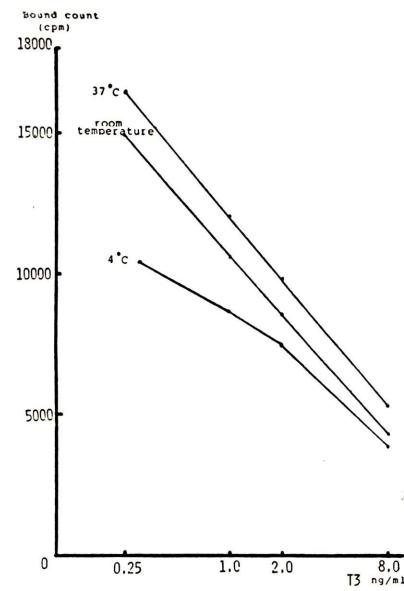


Fig. 1 Influence of incubation temperature on bound count.

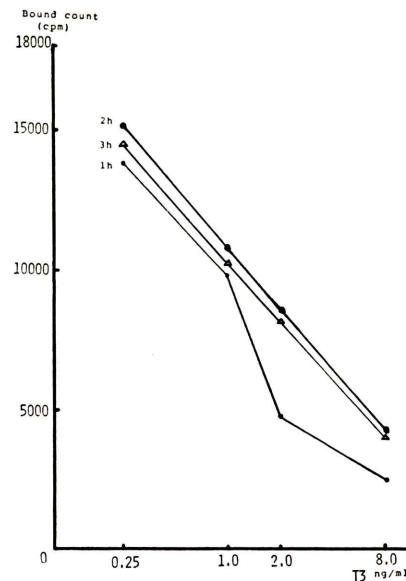


Fig. 2 Influence of incubation time on bound count.

T_3 血清標準液の 0.25, 1.0, 0.2, 8.0 ng/ml を用い、室温で 1 時間、2 時間および 3 時間 incubate し、incubation 時間の bound count に及ぼす影響について検討した。Fig. 2 はそれを示したものであるが、2 時間および 3 時間の incubation では、標

準曲線はほぼ平行で、この時間内であれば、いずれの時間でもよいことが認められた。

4) 標準曲線および高 T₃ 血清の稀釀曲線

標準曲線は、0.25~8.0 ng/ml まで急峻な曲線を示し、最低感度は 0.25 ng/ml であった。また、高 T₃ 血清を T₃ 0 ng/ml の血清で稀釀した稀釀曲線は、標準曲線とほぼ平行であった。

5) 回 收 率

正常者、甲状腺機能低下症および甲状腺機能亢

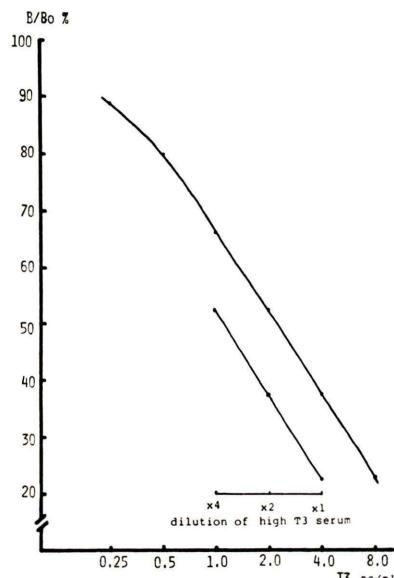


Fig. 3 Standard curve and dilution curve of high T₃ serum.

Table 2 Recovery

Added T ₃ ng/ml	T ₃ values calculated ng/ml	determined ng/ml	Recovery (%)
Sample serum		1.2	
0	1.2	1.3	108.3
0.5	1.7	1.6	94.1
4.0	5.2	4.8	92.3
Sample serum		3.2	
0	3.2	2.8	92.3
0.5	3.7	3.2	91.9
4.0	7.2	6.6	91.7
Sample serum		0.5	
0	0.5	0.5	100.0
0.5	1.0	0.9	90.0
4.0	4.5	4.6	102.2

進症血清に、0, 0.5, 4.0 ng/ml の T₃ を添加して、回収率を検討したところ、平均 96.0% であった。

6) Intraassay reproducibility および Interassay variation

各種 T₃ 濃度の10検体について、intraassay reproducibility を観察したところ、4.5% であった。また、10 検体について interassay variation を検討したところ、6.5% であった。

7) 同一検体を本キットおよび著者らの T₃ RIA 法で測定した際の測定値の相関

各種甲状腺疾患44例について、本キットおよび

Table 3 Intraassay reproducibility and interassay variation estimated with 10 pooled sera.

Sample	1 Intraassay (n=8)			2 Interassay (n=8)		
	Mean (ng/ml)	SD	CV (%)	Mean (ng/ml)	SD	CV (%)
1	0.4	0.024	6.0	0.4	0.033	8.3
2	1.2	0.053	4.4	1.0	0.054	5.4
3	1.0	0.043	4.3	1.4	0.081	5.8
4	1.4	0.053	3.8	1.2	0.058	4.8
5	0.8	0.040	5.0	3.2	0.250	7.8
6	2.4	0.077	3.2	0.8	0.053	6.6
7	1.0	0.065	6.5	2.5	0.190	7.6
8	0.5	0.027	5.4	1.0	0.052	5.2
9	3.0	0.087	2.9	4.0	0.312	7.8
10	1.2	0.043	3.6	0.6	0.034	5.7

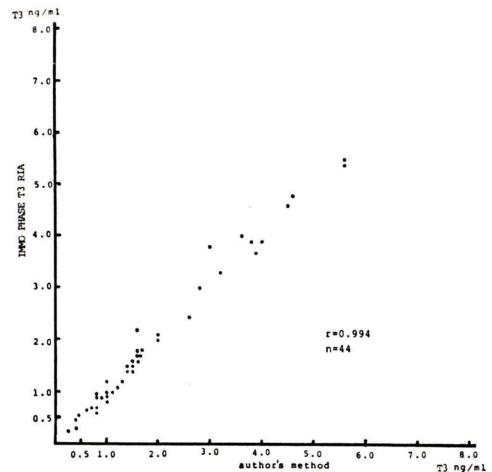


Fig. 4 Correlation between values for T₃ concentrations as measured with IMMO PHASE T₃ RIA SYSTEM and author's method.

著者らの T_3 RIA 法で測定し、両法による測定値の相関を検討したところ、Fig. 4 のごとく、 $r=0.994$ 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) 正常者および各種甲状腺疾患における血清 T_3 値

正常12例における血清 T_3 値は $0.9\sim1.6 \text{ ng/ml}$ に分布し、平均 $1.25\pm0.22 \text{ ng/ml}$ (Mean \pm SD) であった。未治療甲状腺機能亢進症の22例では、 $2.5\sim8.0 \text{ ng/ml}$ 以上に分布し、 8.0 ng/ml 以上の例を除いた平均は $4.02\pm0.94 \text{ ng/ml}$ 、甲状腺機能亢進症で、抗甲状腺剤投与により、euthyroid state の51例では、 $0.7\sim2.1 \text{ ng/ml}$ に分布し、平均 $1.50\pm0.51 \text{ ng/ml}$ 、hypothyroid state の9例では、平均 $0.52\pm0.12 \text{ ng/ml}$ 、hyperthyroid state の19例では、平均 $3.37\pm0.58 \text{ ng/ml}$ であった。未治療甲状腺機能低下症24例では 0.25 ng/ml 以下より 0.6 ng/ml に分布し、 0.25 ng/ml 以下の症例を除いた17例では平均 $0.47\pm0.12 \text{ ng/ml}$ であった。甲状腺機能低下症で、 T_4 により補償療法中の患者のうち、euthyroid state の13例では $0.7\sim1.5 \text{ ng/ml}$ に分布し、平均 $1.03\pm0.24 \text{ ng/ml}$ であった。慢性甲状

腺炎18例では、 $0.6\sim1.7 \text{ ng/ml}$ に分布し、平均 $1.06\pm0.39 \text{ ng/ml}$ 、単純性甲状腺腫では平均 $1.49\pm0.38 \text{ ng/ml}$ 、結節性甲状腺腫では平均 $1.55\pm0.07 \text{ ng/ml}$ 、神経性食欲不振症では平均 $0.77\pm0.15 \text{ ng/ml}$ 、慢性腎不全では平均 $0.97\pm0.39 \text{ ng/ml}$ であった。

2) T_3 値と T_4 値の相関

各種甲状腺疾患52例について、 T_3 値と T_4 値の相関を検討したところ、 $r=0.809$ と推計学上有意な ($p<0.001$) 正の相関が認められた。

V. 考 案

このキットの特徴は、抗体塗布チューブを用いるかわりに、多孔性のガラス粒子に抗体を結合させ、遠沈により BF 分離を行なうというところにある。これにより、BF 分離の簡便化とともに、沈殿量を増すことが可能なため、バラつきが少な

Table 4 Serum T_3 concentrations in various thyroidal illness

Subjects	No.	Range ng/ml	Mean \pm SD ng/ml
Normal	12	0.9-1.6	1.25 ± 0.22
Hyperthyroidism	22	$2.5\sim8.0 <$	4.02 ± 0.94
Treated hyperthyroidism			
euthyroid	51	$0.7\sim2.1$	1.50 ± 0.51
hypothyroid	9	$0.3\sim0.6$	0.52 ± 0.12
hyperthyroid	19	$2.4\sim4.2$	3.37 ± 0.58
T ₁ toxicosis	1	3.0	
Hypothyroidism	24	$<0.25\sim0.6$	0.47 ± 0.12
Treated hypothyroidism			
euthyroid	13	$0.7\sim1.5$	1.03 ± 0.24
hypothyroid	3	$0.3\sim0.6$	0.42 ± 0.13
Chronic thyroiditis	18	$0.6\sim1.7$	1.06 ± 0.39
Simple goiter	7	$1.0\sim2.2$	1.49 ± 0.38
Nodular goiter	2	$1.5\sim1.6$	1.55 ± 0.07
Anorexia nervosa	3	$0.6\sim0.9$	0.77 ± 0.15
Chronic renal failure	22	$0.4\sim1.5$	0.97 ± 0.39
	206		

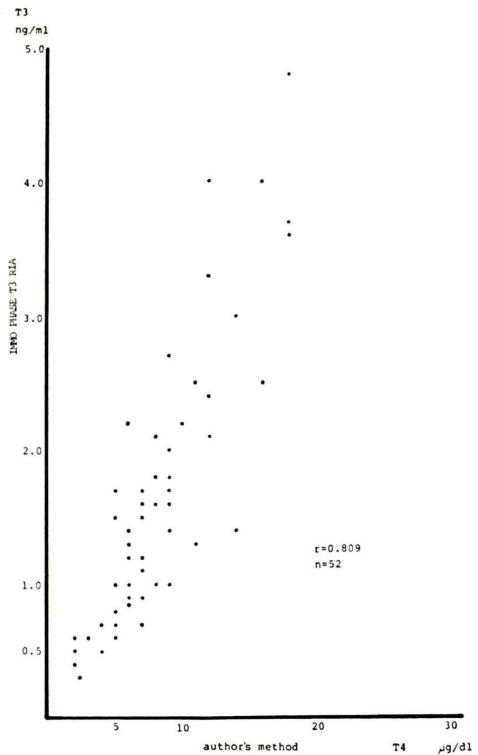


Fig. 5 Correlation between T_3 values as measured with IMMO PHASE T_3 RIA SYSTEM and T_4 values as measured with author's method.

くなることが考えられる。また、測定に要する時間も短縮された。使用する抗体は T₃ に特異的な抗体であることが確認された。incubation 時間および温度についての検討では 2~3 時間の incubation でほぼ同様の成績が得られ、温度については、37°C で最も高い Bound% が得られた。これらの結果は比較的短い時間で測定が可能であり、日常検査法として有用である。標準曲線は 0.25~8.0 ng/ml まで急峻な曲線を示し、広い範囲の T₃ 値が直接測定できることを示している。また、高 T₃ 血清の dilution curve は標準曲線にほぼ平行であり、高 T₃ 血清は稀釀後測定を行なえばよいことが認められた。

回収率は 100% 前後の良好な結果であった。また、intraassay reproducibility および interassay variation も満足すべき結果であった。

著者らの T₃ RIA 法で測定した T₃ 値と本キットで測定した T₃ 値の間に良好な正の相関を認めた。以上、本キットは少量の血清で、短時間に簡便に血清 T₃ 値を測定することができ、日常臨床検査法として十分用い得る方法であることを認めた。

本キットで測定した血清 T₃ 値は、正常者で平均 1.25 ± 0.22 ng/ml, 甲状腺機能亢進症で平均 4.02 ± 0.94 ng/ml, 甲状腺機能低下症で平均 0.47 ± 0.12 ng/ml を示し、諸家の報告に一致した^{5,7~10}。また、甲状腺機能亢進症で抗甲状腺剤治療中や、甲状腺機能低下症で T₄ 補償療法中の症例においても、甲状腺機能状態と T₃ 値との間に比較的良好な一致を認めた。また、T₄ とも良好な相関を認めた。

以上の結果は、本キットで測定した T₃ 値が、甲状腺機能状態をよく反映することを示しており、本キットが日常臨床検査において、甲状腺機能を把握するうえで、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。

VI. おわりに

1) Immo Phase T₃ RIA キットの基礎的、臨床的検討を行ない、本キットが短時間に簡便に血清

中の T₃ 値を測定できることを認めた。

- 2) 回収率、intraassay reproducibility および interassay variation は満足すべき結果であった。
- 3) 本キットで測定した T₃ 値は、著者らの T₃ RIA 法での測定値と良好な正の相関を認めた。
- 4) 本キットで測定した T₃ 値は、甲状腺機能状態をよく反映し、日常臨床検査法として甲状腺機能状態を把握する上で、十分用い得る方法であることを認めた。

Immo Phase T₃ RIA キットを提供下さった、Corning 社に謝意を表します。

文 献

- 1) Nauman JA, Nauman A, Werner SC: Total and free triiodothyronine in human serum. *J Clin Invest* **46**: 1346, 1967
- 2) Sterling K, Bellabarba D, Newman ES, et al: Determination of triiodothyronine concentration in human serum. *J Clin Invest* **48**: 1150, 1969
- 3) Brown BL, Ekins RP, Ellis SM, et al: Specific antibodies to triiodothyronine hormone. *Nature* **226**: 359, 1970
- 4) Gharib H, Ryan RT, Mayberry WE, et al: Radioimmunoassay for triiodothyronine (T₃): 1 affinity and specificity of the antibody for T₃. *J Clin Endocrinol Metab* **33**: 509, 1971
- 5) Mitsuma T, Nihei N, Gershengorn MC, et al: Serum triiodothyronine: Measurements in human serum by radioimmunoassay with corroboration by gas-liquid chromatography. *J Clin Invest* **50**: 2679, 1971
- 6) Mitsuma T, Colucci J, Shenkman L, et al: Rapid simultaneous radioimmunoassay for thyroxine and triiodothyronine in unextracted serum. *Bioch Bioph Res Comm* **46**: 2107, 1972
- 7) Larsen PR: Direct immunoassay of triiodothyronine in human serum. *J Clin Invest* **51**: 1939, 1972
- 8) 仁瓶禮之、鰐部春松、妹尾久雄、他：トリヨードサイロニン (T₃) “栄研” キットによる血中 T₃ の測定。ホルモンと臨床 **26**: 261, 1978
- 9) 満間照典、鰐部春松、広岡良文、他：固相法による Triiodothyronine radioimmunoassay: Konsul T₃ RIA キットの検討。ホルモンと臨床 **26**: 817, 1978
- 10) 竹田洋祐、中島育子、奥野龍興、他：Phadebas T₃ RIA キットによる血中 T₃ 濃度測定の基礎的ならびに臨床的検討。ホルモンと臨床 **26**: 405, 1978