

## 《ノート》

# IMMO PHASE Free T<sub>4</sub> RIA キットによる血清 free T<sub>4</sub> の測定

## Measurement of Free Thyroxine in Serum with IMMO PHASE Free T<sub>4</sub> RIA Kit

貴田岡博史\* 桜田 俊郎\* 吉田 克巳\* 深沢 洋\*  
海瀬 信子\* 海瀬 和郎\* 山本 蒼子\* 斎藤慎太郎\*

Hiroyuki KITAOKA\*, Toshiro SAKURADA\*, Katsumi YOSHIDA\*, Hiroshi FUKAZAWA\*,  
Nobuko KAISE\*, Kazuo KAISE\*, Makiko YAMAMOTO\* and Shintaro SAITO\*

\*The 2nd Department of Internal Medicine, Tohoku University School of Medicine, Sendai, Japan

### I. 緒 言

血清中の thyroxine (T<sub>4</sub>) の大部分は T<sub>4</sub> 結合蛋白と結合しており、遊離状態の T<sub>4</sub> (free T<sub>4</sub>) は微量で、0.1% 以下とされている<sup>1,2)</sup>。しかし、free の型となった T<sub>4</sub> は代謝の面からみて、生理的効果をあらわすと考えられ、また T<sub>4</sub> は実際にホルモンとしての作用を発揮する T<sub>3</sub> の前駆物質とも考えられている<sup>3~6)</sup>。血清総 T<sub>4</sub> (total T<sub>4</sub>) 濃度は T<sub>4</sub> 結合蛋白、特に thyroxine binding globulin (TBG) の濃度の変化によって影響されるのに対し、free T<sub>4</sub> ではそのようなことはなく、したがって甲状腺機能の状態を知る上において最も正確な指標になると考えられている<sup>3)</sup>。一方、血清 free T<sub>4</sub> 濃度の測定にはこれまでに平衡透析法<sup>2,7)</sup>、限外濾過法<sup>1)</sup>、ゲル濾過法<sup>8,9)</sup>などが行われているが、手技が繁雑であり、一度に多数の検体を処理することが困難なため、日常の臨床検査法として用いられるには至っていない。今回我々は Corning 社製、IMMO PHASE free T<sub>4</sub> radioimmunoassay (RIA) キットを試用する機会を得たので、その基礎的並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。

### II. 測 定 原 理

Free T<sub>4</sub> 定量法の原理は、抗 T<sub>4</sub> 抗体が蛋白結合 T<sub>4</sub> とは反応せずに、free T<sub>4</sub> とのみ反応して T<sub>4</sub>・抗体複合体を形成し、沈殿する事実を利用している。しかし、この反応が完了するには数十時間要し、その間に free T<sub>4</sub> が測定系内から減少すると、

(蛋白結合 T<sub>4</sub>)  $\rightleftharpoons$  (free T<sub>4</sub>) + (不飽和蛋白)  
の平衡が右へ移動して、更に free T<sub>4</sub> が解離してバランスを保とうとするため、完全に free T<sub>4</sub> をとり出すことは不可能である。したがって、

(抗体) + (free T<sub>4</sub>)  $\longrightarrow$  (T<sub>4</sub>・抗体複合体)  
の反応系における初期速度が free T<sub>4</sub> の初期濃度に比例すること<sup>10)</sup>から、本キットでは短時間でこの反応を停止させ、前記解離反応を最小限に抑える条件で血清 free T<sub>4</sub> 濃度を測定している。

### III. 測 定 方 法

#### A. 本キットの内容

##### 1) 抗 T<sub>4</sub> 抗体

抗 T<sub>4</sub> 家兎血清は多孔質のガラス粒子 (直径 1 ミクロン、比表面積 300 m<sup>2</sup>/g) に共有結合され、0.1% の bovine serum albumin (BSA) および

Key words: Free thyroxine, Radioimmunoassay

\* 東北大学医学部第2内科

受付: 55年6月3日

最終稿受付: 55年9月3日

別刷請求先: 仙台市星陵町1-1 (番号980)

東北大学医学部第2内科

貴田岡 博史

0.02% の sodium azide を含む 0.03 M phosphate-0.15 M NaCl buffer, pH 7.4 に懸濁されている。

### 2) free T<sub>4</sub> および total T<sub>4</sub> 測定用 <sup>125</sup>I 標識 T<sub>4</sub>

血清 free T<sub>4</sub> および total T<sub>4</sub> 測定のため, <sup>125</sup>I-T<sub>4</sub> (4  $\mu$ Ci 以下) が 0.1% の BSA を含む 6 ml の phosphate-NaCl buffer に溶解された後, 凍結乾燥されている。また, free T<sub>4</sub> 用の <sup>125</sup>I-T<sub>4</sub> には赤色染料 (0.02% amaranth) が, total T<sub>4</sub> 用の <sup>125</sup>I-T<sub>4</sub> には緑色染料 (0.01% brilliant blue+0.01% tartarazine) が, 分注の際に便利なように加えてある。さらに total T<sub>4</sub> 用 <sup>125</sup>I-T<sub>4</sub> には 46.2 g/l の thimerosal が T<sub>4</sub> 結合蛋白への T<sub>4</sub> の結合を阻害するために加えてある。使用時にはそれぞれ 6 ml の再蒸留水を加えて溶解する。

### 3) Free T<sub>4</sub> 標準血清

標準血清として free T<sub>4</sub> 濃度が 0.3, 1.0, 2.0, 4.0 および 6.0 ng/100 ml となるように調製されたヒト血清が凍結乾燥されており, そのおのおのの total T<sub>4</sub> 濃度は 1.5, 4.3, 7.4, 18.0 および 21.2  $\mu$ g/100 ml である。使用時にはそれぞれ 3 ml の再蒸留水を加えて溶解する。

### 4) コントロール血清

Total T<sub>4</sub> および free T<sub>4</sub> 濃度が既知の 2 種類のコントロール血清が凍結乾燥されている。使用時にはそれぞれ 3 ml の再蒸留水を加えて溶解する。

## B. 本キットの測定方法

キットに示された方法にしたがって, 次のように行なった (Fig. 1)。

1) 標準血清, コントロール血清, 患者血清のおのおの 25  $\mu$ l を試験管に加える。

### 2) <sup>125</sup>I-T<sub>4</sub> の添加

i) A シリーズ用試験管 (free T<sub>4</sub> 用) および A シリーズ total count 用試験管のおのおのに, 赤色の <sup>125</sup>I-T<sub>4</sub> 溶液を 100  $\mu$ l ずつ加え, 2~3 秒間攪拌する。

ii) B シリーズ用試験管 (total T<sub>4</sub> 用) および B シリーズ total count 用試験管のおのおのに, 緑色の <sup>125</sup>I-T<sub>4</sub> 溶液を 100  $\mu$ l ずつ加え, 2~3 秒間攪拌する。

### 3) 20 分間室温で incubate する (first incub-

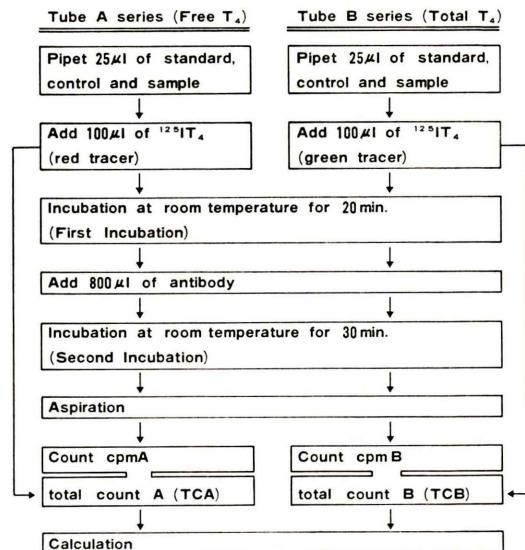


Fig. 1 Assay procedure.

ation).

4) 抗 T<sub>4</sub> 抗体懸濁液を 800  $\mu$ l ずつ, 各試験管に加え, 2~3 秒間攪拌する。

5) 30 分間室温で incubate する (second incubation).

6) 1,400~1,600  $\times$  g で 10 分間遠心した後, 30 分以内に上清を吸引除去する。

7) 全試験管の放射能をガンマシンチレーションカウンターで測定する。

8) B シリーズの標準血清から得られた cpm B/total count B (TCB) % より標準曲線を作製し, コントロール血清および患者血清の total T<sub>4</sub> 値を求める。

9) A シリーズの標準血清から得られた cpm A/total count A (TCA) % に, B シリーズから得られた total T<sub>4</sub> 値を乗じた積, (cpm A/TCA)  $\times$  T<sub>4</sub> より free T<sub>4</sub> 標準曲線を作製し, コントロール血清および患者血清の free T<sub>4</sub> 値を求める。

C. 平衡透析法による % free T<sub>4</sub>, 血清 total T<sub>4</sub> 値に % free T<sub>4</sub> を乗じた absolute free T<sub>4</sub> (AF T<sub>4</sub>) の測定は従来の方法<sup>11~13)</sup> にしたがって行った。血清 total T<sub>4</sub> 値は本法により得られた total T<sub>4</sub> 値の他に, ダイナボット社製 RIA キットで測定し

た。血清 TBG 濃度はヘキスト社製 RIA キットで測定した。また、試験管の内壁に抗 T<sub>4</sub> 抗体がコーティングされているトラベノール社製 Gamma Coat free T<sub>4</sub> RIA キットの測定は、キットに示されている方法にしたがって行った。各値はすべて duplicate で得られた。

#### IV. 対象

東北大学第二内科の入院および外来患者の中で、甲状腺機能正常者 (Euthyroid) 39 例、甲状腺機能低下症 (Hypothyroid) 10 例、甲状腺機能亢進症 (Hyperthyroid) 29 例、TBG 減少症 (Low TBG) 9 例、急性期の亜急性甲状腺炎 (Subacute thyroiditis) 10 例および産婦人科受診中の正常妊婦 (Pregnant) 7 例、妊娠中の甲状腺機能亢進症 (Pregnant hyperthyroid) 7 例を対象とした。

#### V. 結果

##### A. 基礎的検討

###### 1) incubation 温度の影響

Incubation 温度の標準曲線における影響を検討するために、第 1 および第 2 incubation の温度を 4°C, 20°C (本キットの指示) および 37°C にした時の total T<sub>4</sub> および free T<sub>4</sub> の標準曲線を作製した。total T<sub>4</sub> の標準曲線 (Fig. 2) についてみると、4°C では cpm B/TCB % が低い傾向がみとめられたが、20°C および 37°C ではほぼ同様の良好な曲線が得られた。また、free T<sub>4</sub> の標準曲線 (Fig. 3) についてみると、20°C では良好な曲線が得られたが、(cpm A/TCA) × T<sub>4</sub> の値は 37°C では高い傾向が、4°C では低い傾向がみとめられた。total T<sub>4</sub> および free T<sub>4</sub> が既知の 2 種類 (①および②) のコントロール血清について、上記の各温度で測定した場合の値を Table 1 に示すが、コントロール血清①の free T<sub>4</sub> 値が 4°C および 37°C で幾分高値を示していた。

###### 2) incubation 時間の影響

Free T<sub>4</sub> 濃度が正常の血清について、第 1 incubation 時間 (本キットの指示では 20 分間) を 10 分間、20 分間および 30 分間にした時の free T<sub>4</sub> 値

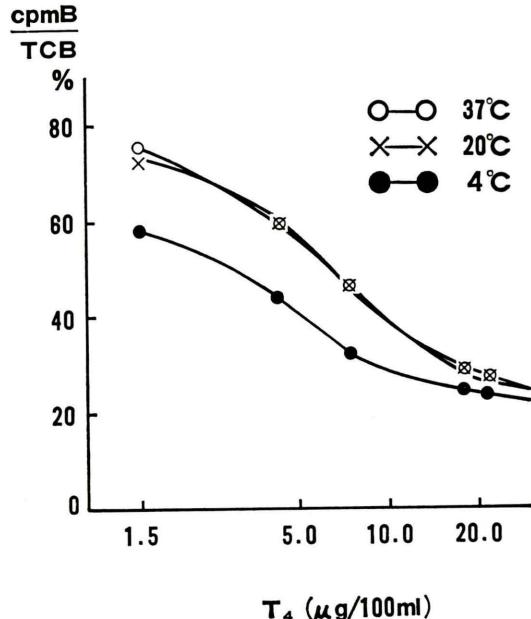


Fig. 2 Effect of incubation temperature on total T<sub>4</sub> standard curve.

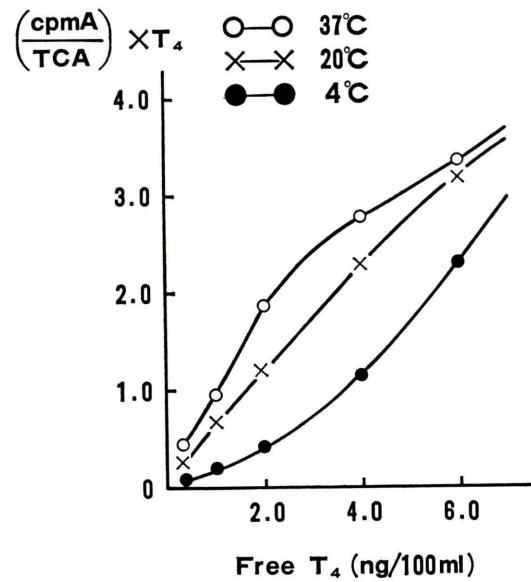


Fig. 3 Effect of incubation temperature on free T<sub>4</sub> standard curve.

を測定した (Fig. 4)。Free T<sub>4</sub> 値は 20 分間で幾分高値を示したが、10 分間および 30 分間の時の free T<sub>4</sub> 値とほとんど差はなかった。同様に第 2 incub-

**Table 1** Total and free T<sub>4</sub> values obtained at different temperature.

Expected values	Total T <sub>4</sub> (μg/100 ml)		Free T <sub>4</sub> (ng/100 ml)	
	①	②	①	②
37°C	4.2	6.1	1.1	1.8
20°C	4.0	6.5	0.9	2.0
4°C	4.4	6.2	1.0	2.1

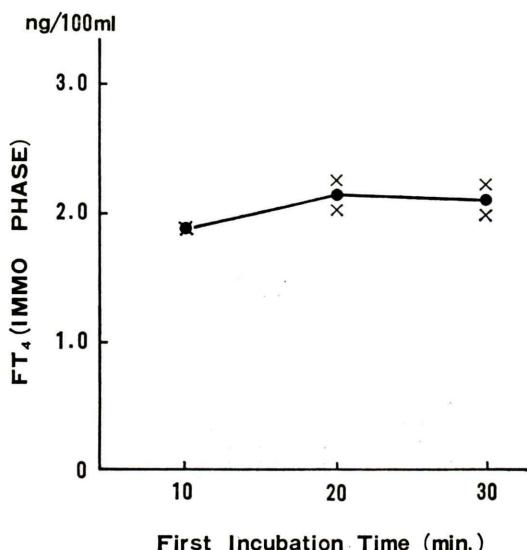


Fig. 4 Influence of first incubation time.

ation 時間 (本キットの指示では30分間) を15分間, 30分間および45分間にした時の free T<sub>4</sub> 値を測定した (Fig. 5). Free T<sub>4</sub> 値は15分間, 30分間, 45分間と時間を経るにしたがって, わずかながら増加の傾向がみとめられた。

### 3) 交叉反応 (Fig. 6)

本キットの抗 T<sub>4</sub> 抗体の特異性について調べるために, 非放射能性の T<sub>3</sub> および reverse T<sub>3</sub> (rT<sub>3</sub>) をそれぞれ 10, 100, 1,000 および 10,000 μg/100 ml ずつ加え, これらの <sup>125</sup>I-T<sub>4</sub> の結合におよぼす免疫交叉性について検討した. T<sub>4</sub> が 0 μg/100 ml の bound を 100% とした場合の 50% 抑制値をみると, T<sub>3</sub> および rT<sub>3</sub> との交叉反応はそれぞれ 8.8% および 5.2% であった。

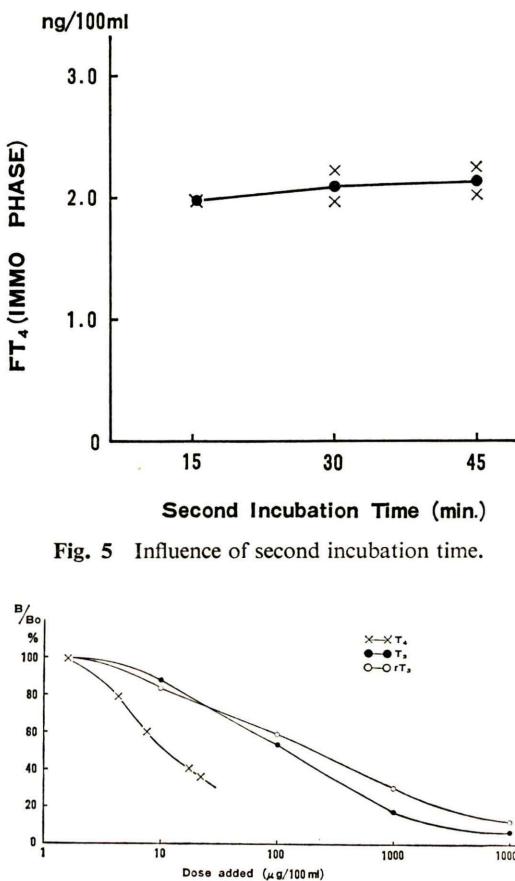
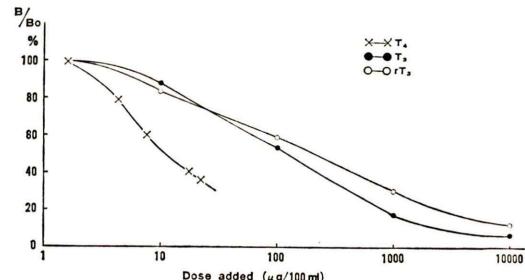


Fig. 5 Influence of second incubation time.

Fig. 6 Cross reaction of T<sub>3</sub> and rT<sub>3</sub> with anti-T<sub>4</sub> antibody.

### 4) 精度および再現性

#### i) intraassay variation (Table 2)

Free T<sub>4</sub> 濃度が低値, 正常値および高値の 3 血清について検討した. Free T<sub>4</sub> 値に直接関係してくる total T<sub>4</sub> 値, cpm A/TCA% およびこれらから求められた free T<sub>4</sub> 値を同一 assay で 10 回測定した際の平均 ± 標準偏差 (Mean ± S.D.) は, total T<sub>4</sub> 値でそれぞれ 4.0 ± 0.295, 10.0 ± 0.856 および 17.6 ± 1.143 μg/100 ml であり, それぞれの変動係数 (C.V.) は 7.5, 8.6 および 6.5% であった. cpm A/TCA% では, それぞれ 9.0 ± 0.785, 15.2 ± 0.328 および 17.9 ± 1.023% であり, これらの C.V. はそれぞれ 8.6, 2.2 および 5.7% であった. また, free T<sub>4</sub> 値でそれぞれ 0.58 ± 0.063, 1.98 ±

Table 2 Intraassay variation

Assay No.	Sample No.								
	1			2			3		
	total T <sub>4</sub> ( $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ )	cpmA TCA (%)	free T <sub>4</sub> ( $\text{ng}/100\text{ ml}$ )	total T <sub>4</sub> ( $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ )	cpmA TCA (%)	free T <sub>4</sub> ( $\text{ng}/100\text{ ml}$ )	total T <sub>4</sub> ( $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ )	cpmA TCA (%)	free T <sub>4</sub> ( $\text{ng}/100\text{ ml}$ )
1	4.3	9.2	0.70	8.6	15.2	1.7	16.4	17.0	5.4
2	4.4	8.7	0.60	9.4	15.5	1.9	17.4	18.0	5.7
3	4.3	9.3	0.60	10.1	14.5	1.9	16.4	20.5	6.6
4	3.9	8.0	0.60	10.7	15.6	2.2	18.2	17.9	6.3
5	3.7	8.4	0.50	10.3	15.3	2.1	16.2	17.5	5.1
6	4.0	7.6	0.50	10.6	15.2	2.1	17.4	17.7	5.8
7	3.8	9.9	0.60	11.0	14.8	2.1	17.2	16.8	5.3
8	3.8	9.2	0.60	8.6	15.3	1.7	19.0	17.1	6.1
9	3.8	10.0	0.60	10.1	15.4	2.1	18.2	17.6	6.1
10	3.5	9.4	0.50	10.6	15.1	2.1	19.6	18.6	7.3
Mean	4.0	9.0	0.58	10.0	15.2	1.98	17.6	17.9	5.97
S.D.	0.295	0.785	0.063	0.856	0.328	0.175	1.143	1.023	0.662
S.V. (%)	7.5	8.6	10.9	8.6	2.2	8.8	6.5	5.7	11.1

Table 3 Interassay variation

Kit No.	Total T <sub>4</sub> ( $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ )	Free T <sub>4</sub> ( $\text{ng}/100\text{ ml}$ )
1	9.4	1.80
2	8.9	1.80
3	8.9	1.90
4	8.5	1.85
5	8.6	1.70
Mean	8.8	1.81
S.D.	0.217	0.074
C.V. (%)	2.5	4.1

0.175 および  $5.97 \pm 0.662 \text{ ng}/100\text{ ml}$  であり、これらの C.V. はそれぞれ 10.9, 8.8 および 11.1% であった。

#### ii) interassay variation (Table 3)

Free T<sub>4</sub> 濃度が正常の血清について、異ったキットでの assay を 5 回繰り返して行った際の total T<sub>4</sub> 値および free T<sub>4</sub> 値は平均  $8.8 \pm 0.217 \mu\text{g}/100\text{ ml}$  および  $1.81 \pm 0.074 \text{ ng}/100\text{ ml}$  であり、それぞれの C.V. は 2.5% および 4.1% であった。

#### B. 臨床的検討

1) ダイナボット社製 total T<sub>4</sub> RIA キットおよび本キットによる血清 total T<sub>4</sub> 値の関係 (Fig. 7, Table 4)

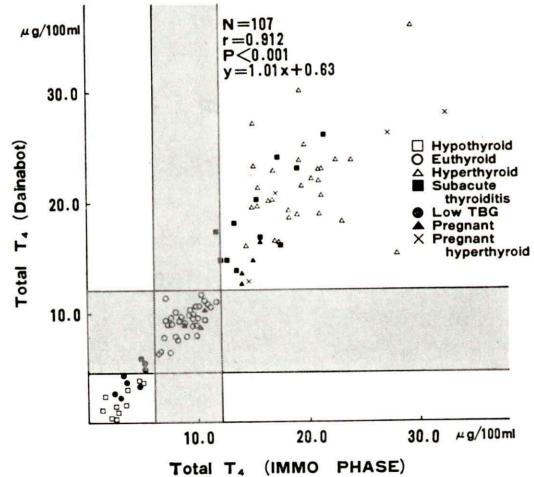


Fig. 7 Correlation of serum total T<sub>4</sub> values obtained by IMMO PHASE FT<sub>4</sub> RIA kit with those by Dainabot TT<sub>4</sub> RIA kit

正常者および各種甲状腺疾患について、ダイナボット社製 RIA キットと本キットのおのおのにより得られた血清 total T<sub>4</sub> 値 (Mean  $\pm$  S.D.) を比較したところ、Hypothyroid, Low TBG および pregnant で本キットから得られた血清 total T<sub>4</sub> が幾分高値であった他は、ダイナボット社製 RIA キットから得られた血清 total T<sub>4</sub> の方が高値を示し

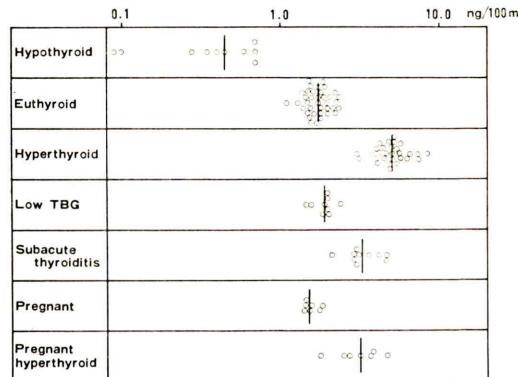
Table 4 Serum total T<sub>4</sub>, free T<sub>4</sub> and TBG values

	IMMO PHASE total T <sub>4</sub> (μg/100 ml)		Dainabot total T <sub>4</sub> (μg/100 ml)		%free T <sub>4</sub> (%)		AF T <sub>4</sub> (ng/100 ml)		IMMO PHASE FT <sub>4</sub> (ng/100 ml)		Gamma Coat FT <sub>4</sub> (ng/100 ml)		TBG (μg/ml)
	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Hypothyroid	10	2.62 ± 1.34	12	2.01 ± 1.45	11	0.0156 ± 0.00192	11	0.34 ± 0.23	10	0.44 ± 0.23	12	0.16 ± 0.15	
Euthyroid	39	8.96 ± 1.47	50	9.43 ± 1.51	36	0.0190 ± 0.00183	36	1.76 ± 0.28	39	1.75 ± 0.29	51	1.34 ± 0.33	45 22.6 ± 4.5
Hyperthyroid	29	19.74 ± 3.83	32	21.19 ± 4.15	21	0.0338 ± 0.00812	21	7.35 ± 2.51	29	5.11 ± 1.21	29	5.02 ± 1.41	
Low TBG	9	3.84 ± 1.00	6	3.65 ± 1.31	6	0.0329 ± 0.00883	6	1.13 ± 0.26	9	1.86 ± 0.28	6	0.85 ± 0.20	5 6.34 ± 4.0
Subacute thyroiditis	10	15.50 ± 3.27	10	19.07 ± 4.01					10	3.31 ± 0.96			
Pregnant	7	12.60 ± 2.58	7	12.17 ± 2.98	6	0.0163 ± 0.00203	6	2.00 ± 0.35	7	1.51 ± 0.24	7	1.28 ± 0.22	5 36.1 ± 6.2
Pregnant hyperthyroid	7	20.74 ± 6.66	7	21.50 ± 5.90					7	3.20 ± 0.97			

ていた。しかし、正常者および各種甲状腺疾患107例について、両キットから得られた血清 total T<sub>4</sub> 値の関係を検討した結果、両者の間には相関係数  $r=0.912$  と有意 ( $p<0.001$ ) の正の相関がみとめられた。

### 2) 正常者および各種甲状腺疾患における血清 free T<sub>4</sub> 値 (Fig. 8)

Euthyroid 39例では 1.10~2.35 ng/100 ml の間に分布し、平均  $1.75 \pm 0.29$  ng/100 ml であった。正常範囲を Mean  $\pm 2$  S.D. より求めると  $1.17 \sim 2.33$  ng/100 ml であった。また、Hypothyroid 10例では  $0.10 \sim 0.70$  ng/100 ml の間に分布し、平均  $0.44 \pm 0.23$  ng/100 ml と低値を示し、Hyperthyroid 29例では  $3.00 \sim 8.40$  ng/100 ml、平均  $5.11 \pm 1.21$  ng/100 ml と高値を示し、三者の間には重なり合いはみとめられなかった。Low TBG 9例では  $1.43 \sim 2.30$  ng/100 ml、平均  $1.86 \pm 0.28$  ng/100 ml と全例正常範囲であった。Subacute thyroiditis 10例では  $2.10 \sim 4.70$  ng/100 ml の間に分布し、平均  $3.31 \pm 0.96$  ng/100 ml と 1 例が正常範囲にあったほかは全例高値であった。Pregnant 7例では  $1.40 \sim 1.85$  ng/100 ml、平均  $1.51 \pm 0.24$  ng/100 ml と全例正常範囲であった。Pregnant hyperthyroid 7例では  $1.80 \sim 4.70$  ng/100 ml の間に分布し、平

Fig. 8 Free T<sub>4</sub> concentration by IMMO PHASE

均  $3.20 \pm 0.97$  ng/100 ml と 1 例が正常範囲であったほかは全例高値であった。

### 3) 本キットにより得られた血清 total T<sub>4</sub> 値と free T<sub>4</sub> 値との関係 (Fig. 9, Table 4)

正常者および各種甲状腺疾患111例について、本キットにより得られた血清 total T<sub>4</sub> 値と free T<sub>4</sub> 値との関係を検討した結果、血清 total T<sub>4</sub> 値が血清 TBG 濃度に影響を受ける Pregnant, Pregnant hyperthyroid および Low TBG を除く 88例では、両者の間には相関係数  $r=0.963$  と有意 ( $p<0.001$ ) の正の相関がみとめられた。しかし、Pregnant は 7 例中 4 例の血清 total T<sub>4</sub> は高値を示し、平均

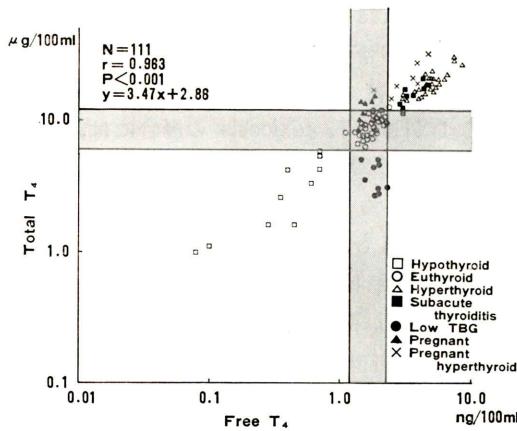


Fig. 9 Correlation of serum free T<sub>4</sub> values with serum total T<sub>4</sub> values obtained by IMMO PHASE FT<sub>4</sub> RIA kit.

でも 12.6 µg/100 ml と正常範囲より高値であったのに対し、血清 free T<sub>4</sub> 値は全例正常範囲であった。一方、Low TBG では血清 total T<sub>4</sub> は全例低値を示し、平均 3.8 µg/100 ml と正常範囲より低値であったのに対し、血清 free T<sub>4</sub> 値は全例正常範囲であった。また、Pregnant hyperthyroid では 7 例中 6 例の血清 total T<sub>4</sub> は高値を示し、平均でも 20.7 µg/100 ml と高値で、血清 free T<sub>4</sub> も全例高値であった。

#### 4) % free T<sub>4</sub> 値および血清 TBG 濃度 (Table 4)

% free T<sub>4</sub> 値は Euthyroid に比べ、Hypothyroid および Hyperthyroid では、それぞれ有意に低値 ( $p < 0.001$ ) および高値 ( $p < 0.001$ ) であった。Pregnant では % free T<sub>4</sub> 値および血清 TBG 濃度は Euthyroid に比べて、それぞれ有意に低値 ( $p < 0.01$ ) および高値 ( $p < 0.005$ ) を示し、また AF T<sub>4</sub> 値も平均  $2.00 \pm 0.35$  ng/100 ml と、Euthyroid の  $1.76 \pm 0.28$  ng/100 ml に比べてやや高値であったが、有意ではなかった。一方、Low TBG では % free T<sub>4</sub> 値および血清 TBG 濃度は Euthyroid に比べて、それぞれ有意に高値 ( $p < 0.05$ ) および低値 ( $p < 0.001$ ) を示し、AF T<sub>4</sub> 値も平均  $1.13 \pm 0.26$  ng/100 ml と Euthyroid に比べて有意に低値 ( $p < 0.001$ ) であった。

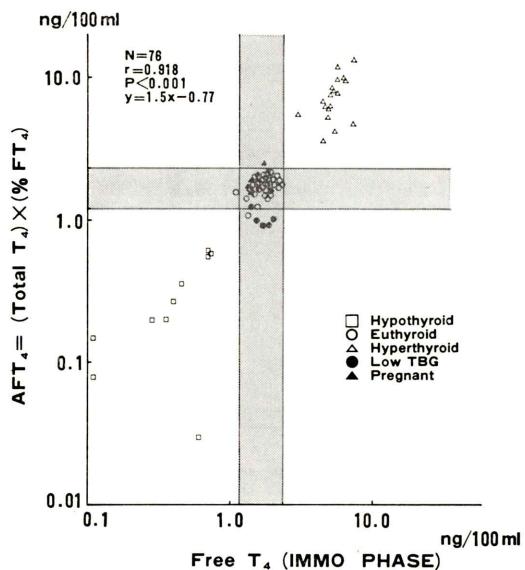


Fig. 10 Correlation of serum free T<sub>4</sub> values obtained by IMMO PHASE FT<sub>4</sub> RIA kit with these by total T<sub>4</sub> × %FT<sub>4</sub>

#### 5) AF T<sub>4</sub> 値と本キットによる血清 free T<sub>4</sub> 値との関係 (Fig. 10, Table 4)

正常者および各種甲状腺疾患について、AF T<sub>4</sub> 値と本キットにより得られた血清 free T<sub>4</sub> 値の平均値を比較したところ、Hypothyroid および Low TBG では AF T<sub>4</sub> 値の方が、その他では本キットより得られた血清 free T<sub>4</sub> 値の方が低値を示していた。しかし、正常者および各種甲状腺疾患 74 例について、両者の関係を検討した結果、相関係数  $r = 0.918$  と有意 ( $p < 0.001$ ) の正の相関がみとめられた。

#### 6) Gamma Coat free T<sub>4</sub> RIA キットおよび本キットによる血清 free T<sub>4</sub> 値の関係 (Fig. 11, Table 4)

正常者および各種甲状腺疾患 81 例について、Gamma Coat free T<sub>4</sub> RIA キットと本キットのおののにより得られた血清 free T<sub>4</sub> (Mean  $\pm$  S.D.) を比較したところ、本キットより得られた血清 free T<sub>4</sub> 値の方が若干高値の傾向 ( $y = 0.98x - 0.39$ ) を示したが、両者の間には相関係数  $r = 0.933$  と有意 ( $p < 0.001$ ) の正の相関がみとめられた。

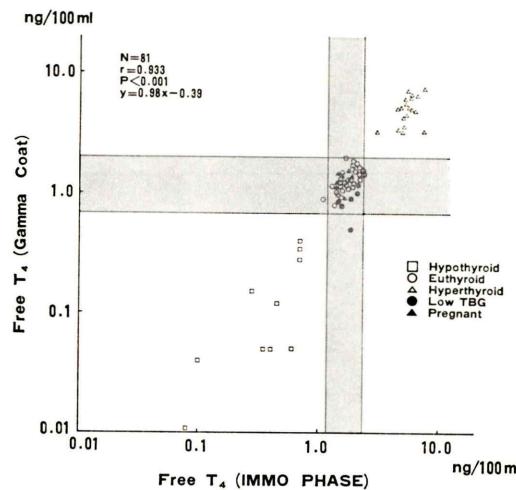


Fig. 11 Correlation of serum free T<sub>4</sub> values obtained by IMMO PHASE FT<sub>4</sub> RIA kit with those by Gamma Coat FT<sub>4</sub> RIA kit.

## VI. 考 察

まず、本キットの基礎的検討についてみると、total および free T<sub>4</sub> の標準曲線におよばす incubation 温度の影響を 4°C, 20°C および 37°C で検討したが、それぞれの温度で測定した total および free T<sub>4</sub> 値はコントロール血清の既知の値に近く、ほぼ満足すべき結果が得られ、温度による影響はほとんど受けないものと考えられた。

また、incubation 時間は第 1 incubation 時間が 10~30 分の間では、血清 free T<sub>4</sub> 値はほとんど変動せず、第 2 incubation 時間も 15~45 分の間では増加の傾向をみとめるが、ごく軽度に変動するのみであった。したがって、第 1 および第 2 incubation 時間はそれぞれ 20 分間および 30 分間に指示されているが、それほど厳密にこだわらなくても測定誤差は少ないと考えられた。しかしながら、再現性のよい assay をするためには、指示された incubation 時間にしたがって測定する必要があると思われる。

本キットに用いられた抗 T<sub>4</sub> 抗体と、T<sub>3</sub> および rT<sub>3</sub> との交叉反応について検討したところ、T<sub>4</sub> 値が 0 μg/100 ml の bound を 100% とした場合の 50% 抑制値はそれぞれ 8.8% および 5.2% であっ

た。血中の free T<sub>3</sub> および rT<sub>3</sub> 濃度は free T<sub>4</sub> のそれぞれ約 15% および数 % とされている<sup>14)</sup>ので、これらの影響はほとんど無視できるものと考えられる。しかし、T<sub>3</sub> toxicosis の場合には、血清 total T<sub>3</sub> 値は 260~840 ng/100 ml<sup>15,16)</sup> の間にあることが多く、% free T<sub>3</sub> 値を 0.3% とすると free T<sub>3</sub> 値は高くとも 2.52 ng/100 ml となり、8.8% の交叉反応があれば、0.22 ng/100 ml という free T<sub>4</sub> に相当する値が得られ、Euthyroid の free T<sub>4</sub> の平均 1.75 ng/100 ml の約 13% にあたることになる。したがって、大きく左右されることはないにしても、T<sub>3</sub> toxicosis の場合には本キットの抗 T<sub>4</sub> 抗体による free T<sub>4</sub> の測定値は幾分影響を受けることもあると考えられ、成績の判定にあたっては、このことを考慮に入れておく必要があると思われる。

再現性について、intraassay および interassay により検討したが、共に満足すべき結果が得られた。

次に臨床的検討についてみると、ダイナボット社製 total T<sub>4</sub> RIA キットおよび本キットのおののおのにより得られた血清 total T<sub>4</sub> 値は、正常者および各種甲状腺疾患でほぼ同様の平均値が得られ、両者の間には有意の正の相関がみとめられた。

本キットで測定した血清 free T<sub>4</sub> 値は、Euthyroid, Hypothyroid および Hyperthyroid の三者の間において重なり合いはみとめられず、良好な成績が得られた。また、Pregnant および Low TBG における血清 free T<sub>4</sub> 値は全例正常範囲にあった。急性期の Subacute thyroiditis および Pregnant hyperthyroid ではおのおの 1 例が正常範囲であったほかは全例高値であった。

本キットにより得られた血清 total T<sub>4</sub> 値と free T<sub>4</sub> 値との間には、Pregnant, Pregnant Hyperthyroid および Low TBG を除く 88 例で、有意の正の相関がみとめられた。しかし、血清 total T<sub>4</sub> 値は Pregnant では 7 例中 4 例で高値を示し、Low TBG では 9 例中 5 例で低値を示しており、このように T<sub>4</sub> 結合蛋白 (特に TBG) が増減する場合には血清 total T<sub>4</sub> 値がそれに伴って増減するため、この値は甲状腺機能の状態を知る上での正確な指

標とはならないと思われる。これに対して、本キットによる血清 free T<sub>4</sub> 値は T<sub>4</sub> 結合蛋白の増減する場合でも影響を受けず、全例正常範囲にあり、正確に甲状腺機能の状態を反映していた。

本キットにより得られた血清 free T<sub>4</sub> 値と AF T<sub>4</sub> 値、および Gamma Coat free T<sub>4</sub> RIA キットにより得られた血清 free T<sub>4</sub> 値の間には、いずれも良好な正の相関が得られたが、血清 free T<sub>4</sub> 値は本キットにより得られた値の方が、Gamma Coat free T<sub>4</sub> RIA キットにより得られた値より幾分高値の傾向にあった。これは測定原理の相違によるものなのか、現在のところ不明である。また、Low TBG における平衡透析法による AF T<sub>4</sub> 値は低値であったが、Hypothyroid のそれよりは有意 ( $p < 0.001$ ) に高値であった。最近、Chopra ら<sup>17)</sup> は我々と同様に、IMMO PHASE free T<sub>4</sub> RIA キットによる血清 free T<sub>4</sub> 値と平衡透析法による AF T<sub>4</sub> 値の検討を試み、今回と類似した結果を得ている。しかし、Low TBG の AF T<sub>4</sub> 値は有意 ( $p < 0.001$ ) に低値ではあったものの正常範囲にあったという。% free T<sub>4</sub> によって求められた Low TBG の血清 free T<sub>4</sub> については、我々の例を含めて<sup>18,19)</sup> いくつかの報告があり<sup>20~22)</sup>、これらの中には % free T<sub>4</sub> は高値であるが、血清 free T<sub>4</sub> 値は正常より低い例がいくつかみとめられている。さらに、透析外液を直接 RIA によって測定した甲状腺機能正常者の血清 free T<sub>4</sub> 値は 0.76<sup>23)</sup> および 0.83<sup>24)</sup> ng/100 ml と報告されており、真の血清 free T<sub>4</sub> 値がどの範囲にあるかということを含めて、測定方法についても、今後さらに検討されることが必要と思われる。

## VII. 結 語

Corning 社製 IMMO PHASE free T<sub>4</sub> RIA キットについて、基礎的並びに臨床的検討を行い、次の結果が得られた。

- 1) incubation 温度による測定値におよぼす影響はほとんどみとめられなかった。キットに指示された室温では、良好な標準曲線が得られた。
- 2) incubation 時間は指示された20分間および

30分間より多少ずれても、測定値に影響をおよぼさなかった。

3) T<sub>3</sub> および rT<sub>3</sub> と本キットの抗 T<sub>4</sub> 抗体との交叉反応は、測定値に影響しないと考えられた。

4) intraassay および interassay は満足すべき結果が得られた。

5) ダイナボット社製 total T<sub>4</sub> RIA キットおよび本キットにより得られた血清 total T<sub>4</sub> 値との間には、極めて良好な正の相関がみとめられた。

6) 本キットにより得られた血清 free T<sub>4</sub> 値は、Euthyroid で平均  $1.75 \pm 0.29$  ng/100 ml, Hypothyroid で  $0.44 \pm 0.23$  ng/100 ml, Hyperthyroid で  $5.11 \pm 1.21$  ng/100 ml と三者の間にはまったく重なり合いはみとめられなかった。

7) TBG が増減する Pregnant および Low TBG の中には、血清 total T<sub>4</sub> が高値および低値の例がいくつか存在したが、血清 free T<sub>4</sub> 値は全例正常範囲にあった。

8) 急性期の Subacute thyroiditis および Pregnant hyperthyroid の血清 free T<sub>4</sub> 値は、おのおのの 1 例を除き、全例高値であった。

9) 本キットにより得られた血清 free T<sub>4</sub> 値と AF T<sub>4</sub> 値および Gamma Coat free T<sub>4</sub> RIA キットにより得られた血清 free T<sub>4</sub> 値の間には、極めて良好な正の相関がみとめられた。

以上の成績より、本キットによれば、血清 free T<sub>4</sub> を簡便かつ迅速に測定することができ、精度および再現性にもすぐれ、かつ少量の血清で一度に多数の検体を処理することができる。これらの点において、本キットは日常臨床検査法として十分に利用できるものと思われる。

吉永馨教授のご校閲を感謝します。

キットをご提供下さいました Corning 社に感謝します。

## 文 献

- 1) Schussler GC, Plager JE: Effect of preliminary purification of I<sup>131</sup>-thyroxine on the determination of the free thyroxine in serum. *J Clin Endocr* 27: 242~250, 1967
- 2) Sterling K, Brenner MA: Free thyroxine in human serum: Simplified measurement with the aid of

- magnesium precipitation. *J Clin Invest* **45**: 153-163, 1966
- 3) Robbins J, Rall JE: Proteins associated with the thyroid hormones. *Physiol Rev* **40**: 415-489, 1960
- 4) Beierwaltes WH, Robbins J: Familial increase in the thyroxine-binding sites in serum alpha-globulin. *J Clin Invest* **38**: 1683-1688, 1959
- 5) Ingbar SH, Freinkel J: Regulation of peripheral metabolism of the thyroid hormones. *Recent progr Horm Res* **16**: 353-403, 1960
- 6) Robbins J, Rall JE: The interaction of thyroid hormones and protein in biological fluids. *Recent progr Horm Res* **13**: 161-208, 1957
- 7) Oppenheimer JH, Squef R, Surks MI, et al: Binding of thyroxine by serum proteins evaluated equilibrium dialysis and electrophoretic techniques. Alternations in nonthyroidal illness. *J Clin Invest* **42**: 1769-1782, 1963
- 8) Lee ND, Henry RJ, Golub OJ: Determination of the free thyroxine content of serum, *J Clin Endocrinol* **24**: 486-495, 1964
- 9) Sakurada T, Saito S, Inagaki K, et al: Quantitative determination of total and free triiodothyronine and thyroxine. *Tohoku J exp Med* **99**: 179-188, 1969
- 10) Hertl W, Odstrchel G: Kinetic and thermodynamic studies of antigen-antibody interactions in heterogeneous reaction phases 1. L-thyroxine (T<sub>4</sub>) with specific antibody immobilized on controlled pore glass. *Molecular Immunology* **16**: 173-178, 1979
- 11) Spaulding SW, Gregerman RI: Free thyroxine in serum by equilibrium dialysis: Effect of dilution, specificities and inhibitions of binding. *J Clin Endocrinol* **34**: 974-982, 1972
- 12) Davis PJ, Hsu T, Bianthine JR: Effect of new hypoalipidemic agent, MK-185, on serum thyroxine binding globulin (TBG) and dialyzable fraction thyroxine. *J Clin Endocrinol* **34**: 200-208, 1972
- 13) 吉田克巳, 桜田俊郎, 貴田岡博史, 他: Gamma Coat free T<sub>4</sub> RIA キットによる血清 free T<sub>4</sub> の測定——平衡透析法との比較——核医学 **17**: 229-236, 1980
- 14) Chopra IJ: Reciprocal changes in serum concentrations of 3,3',5'-triiodothyronine (reverse T<sub>3</sub>) and 3,3',5'-triiodothyronine (T<sub>3</sub>) in systemic illness. *J Clin Endocrinol Metab* **41**: 1043-1049, 1975
- 15) Hollander CC, Stevenson C, Mitsuma T, et al: T<sub>3</sub> toxicosis in an iodine-deficient area. *Lancet* **ii**: 1276-1278, 1972
- 16) Ahmed M, Doe RP, Nuttall FO: Triiodothyronine thyrotoxicosis following iodide ingestion: A case report. *J Clin Endocrinol Metab* **38**: 574-576, 1974
- 17) Chopra IJ, Van Herle AJ, Chua Teco GN, et al: Serum free thyroxine in thyroidal and nonthyroidal illness: A comparison of measurements by radioimmunoassay, equilibrium dialysis, and free thyroxine index. *J Clin Endocrinol Metab* **51**: 135-143, 1980
- 18) 桜田俊郎, 山口徹, 山本薫子, 他: TBG 減少症の1家系における血清中の total および free の thyroxine および triiodothyronine とこれに対する estrogen の影響について. 日内分泌誌 **49**: 1198-1206, 1973
- 19) 桜田俊郎, 山口徹, 吉田克巳, 他: 甲状腺機能低下症を伴った TBG 欠損症の1例における thyroxine および triiodothyronine の代謝について. 日内分泌誌 **49**: 1354-1361, 1973
- 20) Cavalieri RR, Searle GL: The kinetics of distribution between plasma and liver of <sup>131</sup>I-labeled L-thyroxine in man: Observations of subjects with normal and decreased serum thyroxine-binding globulin. *J Clin Invest* **45**: 939-949, 1966
- 21) Bayley AT, Higgins PH, Row VV, et al: The metabolic significance of thyroxine-binding globulin. Studies in a family with decreased thyroxine-binding globulin. *Acta Endocrinol* **61**: 137-150, 1969
- 22) Heinonen OP, Lamberg BA, Virtamo J: Inherited decrease of the binding capacity of thyroxine-binding globulin (TBG). *Acta Endocrinol* **64**: 171-180, 1970
- 23) Jiang N, Tue KA: Determination of free thyroxine in serum by radioimmunoassay. *Clin Chew* **23**: 1678-1983, 1977
- 24) Yeo PPB, Lewis M, Evered DC: Radioimmunoassay of free thyroid hormone concentrations in the investigation of thyroid disease. *Clin Endocrinol* **6**: 159-165, 1977