

《ノート》

固相法 radioimmunoassay による血中サイロキシン およびトリヨードサイロニンの測定

— アマレックス T₄, T₃ に関する検討 —

Solid Phase Radioimmunoassay of Serum Thyroxine and Triiodothyronine
—Fundamental and Clinical Evaluation of Amerlex T₄ and T₃—

小西 淳二* 高坂 唯子** 飯田 泰啓* 笠木 寛治*
池窪 勝治* 鳥塚 莞爾*

Junji KONISHI*, Tadako KOUSAKA**, Yasuhiro IIDA*,
Kanji KASAGI*, Katsuji IKEKUBO* and Kanji TORIZUKA*

*Department of Radiology and Nuclear Medicine, Kyoto University School of Medicine

**Central Clinical Radioisotope Division, Kyoto University Hospital

I. はじめに

血中サイロキシン (T₄) およびトリヨードサイロニン (T₃) の測定は甲状腺機能検査の中でも最も基本的なものとして広く行われている。T₄ の測定にはかつて competitive protein binding analysis¹⁾ が用いられたが、特異性および簡便性にすぐれる radioimmunoassay (RIA) の出現により、今日では T₃ とともに RIA による測定が一般的となっている²⁻⁴⁾。

RIA においては bound (B) と free (F) の分離法が測定の精度、再現性に大きな影響を与える要因であるとともに、その操作の簡便性を左右する重要な因子であり、今日まで種々の改良工夫が行われている。今回、ラテックスの微粒子に抗体を結合させた固相法 RIA であるアマレックス T₄ およびアマレックス T₃ キット (RCC 製, 科研化学) を

使用する機会を得たので、若干の基礎的検討を行うとともに、臨床例での測定および他法との比較検討を行った成績を報告する。

II. 測定方法と検討対象

1) キットの内容と測定操作

アマレックス T₄ キット (以下 T₄ キット) は ¹²⁵I-T₄ 溶液 (赤色液, thiomersalate 含有), ラテックス微粒子に結合させた抗 T₄ 抗体の懸濁液 (青色液) および標準 T₄ ヒト血清 (凍結乾燥品で使用時に 0.5 ml の蒸留水を加えて溶解, 0, 2.4, 5.5, 11.7 および 22.5 μg/100 ml の T₄ を含む) より構成されている。

アマレックス T₃ キット (以下 T₃ キット) の場合は, ¹²⁵I-T₃ 溶液 (赤色液, thiomersalate 含有), ラテックス微粒子に結合させた抗 T₃ 抗体の懸濁液 (青色液) および標準 T₃ ヒト血清 (凍結乾燥品で使用時に 0.5 ml の蒸留水を加えて溶解, 0, 78, 184, 376 および 747 ng/100 ml の T₃ を含む) より成る。両キットは抗体をラテックス微粒子に結合

* 京都大学医学部放射線核医学科

** 京都大学医学部附属病院放射線科

受付: 55 年 9 月 4 日

最終稿受付: 55 年 9 月 4 日

別刷請求先: 京都市左京区聖護院川原町 54 (☎ 606)

京都大学医学部放射線核医学科

小 西 淳 二

Key words: Solid phase radioimmunoassay, Thyroxine, Triiodothyronine

させた固相法であるため、B・F分離が簡単、迅速であることおよび抗体が懸濁液となっていることより、溶液法の持つ均一性をも保持し得る点を共通の特徴としている。

測定操作の概略は Fig. 1 に示すごとくで、両キットとも検体は 25 μ l である。T₄キットと T₃キットではインキュベーション条件に若干の相違がみられるのみで基本的操作はまったく同様である⁵⁾。

2) 測定法に関する基礎的検討

上記の両キットについて、インキュベーション時間および温度、測定精度および再現性、抗体の特異性、希釈試験および回収率などの検討を行った。

3) 臨床的検討の対象

臨床測定の対象としては、京大病院甲状腺外来を受診した各種甲状腺疾患患者および正常妊婦、京大病院職員を主とする健常者を用いた。また、同一血清についてダイナボット社の T₄リアキット II および T₃リアキット II を用いて、T₄および T₃の測定を行ってそれぞれの測定値を比較検討した。

III. 成績

1. 基礎的検討の成績

1) インキュベーションの温度および時間

インキュベーションを T₄キットでは 45 分、T₃キットでは 1 時間、それぞれ 4、25 および 37°C で

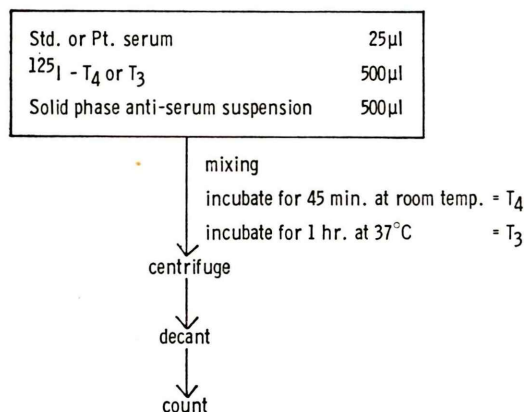


Fig. 1 Assay procedure of Amerlex T₄ and T₃.

行った時の標準曲線および 3 種類のプール血清の測定値を Fig. 2 に示した。温度の上昇とともに Bo% の上昇がみられたが、T₄キットでは 25°C と 37°C でほぼ相似した標準曲線となり、測定値もほぼ一致していた。一方、T₃キットでは 25°C よりも 37°C でより急峻な標準曲線が得られ、感度の上昇がみられた。そこで次に T₄キットの場合 25°C で、30、45、90 および 180 分、T₃キットの場合は 37°C で、30、60、120 および 240 分のインキュベーションを行ってインキュベーション時間の影響を検討した。Fig. 3 に示すごとく、T₄キットでは 30 分の場合に比して 45 分の時結合率の上昇

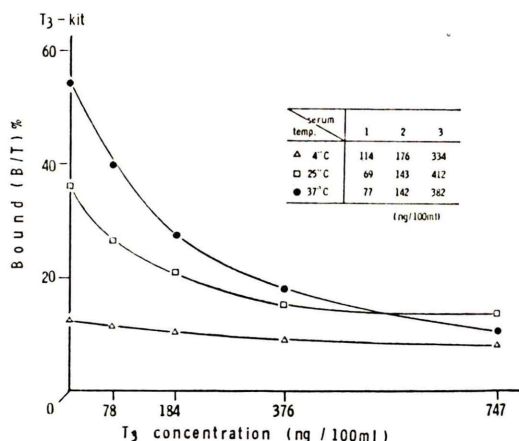
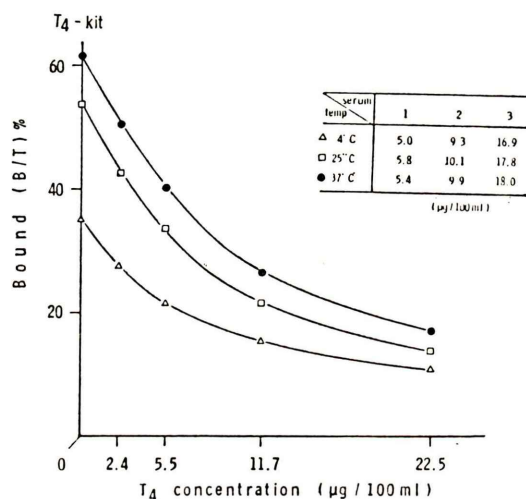


Fig. 2 Effect of incubation temperature on standard curves and assay values.

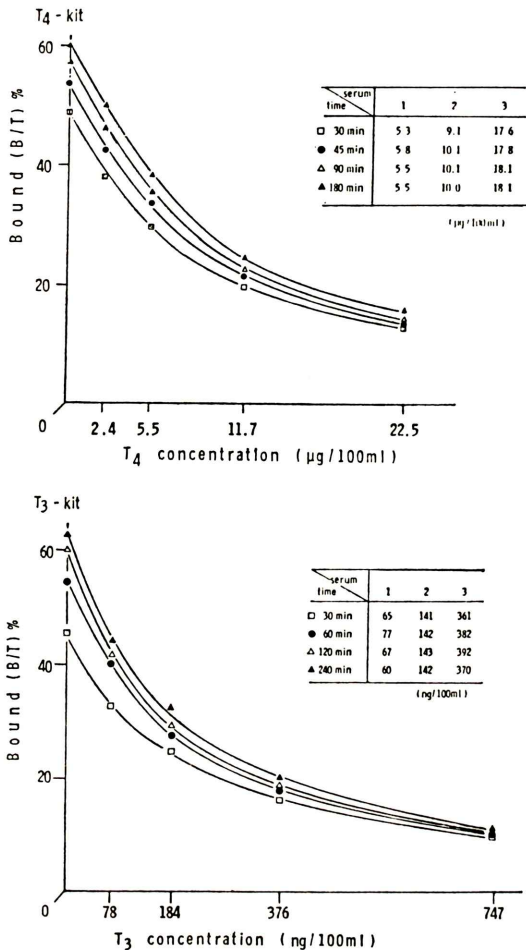


Fig. 3 Effect of incubation time on standard curves and assay values.

が比較的大きかったが、以後の増加は少なく測定値もよく一致していた。一方、T₃キットでは30分の時に比べ60分で著しくBo%の上昇がみられ、標準曲線が急峻となったが、以後の変化は少なく測定値はいずれの条件でも良好であった。

以上の成績より、規定の通りT₄キットでは、25°C、45分、T₃キットでは37°C、1時間のインキュベーションを行うのがよいと考えられた。

2) 抗体の特異性

ラテックス微粒子に結合した抗体の特異性について検討するため、抗T₄抗体についてはT₄ free 血清にT₃, monoiodotyrosine (MIT) および di-

iodotyrosine (DIT) (いずれもSigma社)をそれぞれ1~1,000 μg/100 ml 添加して¹²⁵I-T₄の結合におよぼす影響をみた。T₃では81 μg/100 mlで50%結合阻害を示し、9.5%の交叉反応が認められたが、その他ではまったく交叉反応がみられなかった。一方、T₃キットの抗T₃抗体については、T₃ free 血清にL-T₄(Sigma社), MITおよびDITを100 ng~100 μg/100 ml まで添加したものをを用いて¹²⁵I-T₃の結合におよぼす影響をみた。T₄では50 μg/100 mlで50%の結合阻害がみられ、0.38%の交叉反応であった。その他ではまったく影響がみられなかった。

3) 希釈試験

T₄高値の5血清をT₄ free 血清で希釈してT₄キットで測定した成績およびT₃高値の4血清をT₃ free 血清で希釈してT₃キットで測定した成績をFig. 4に示したが、いずれも原点に向う直線上に

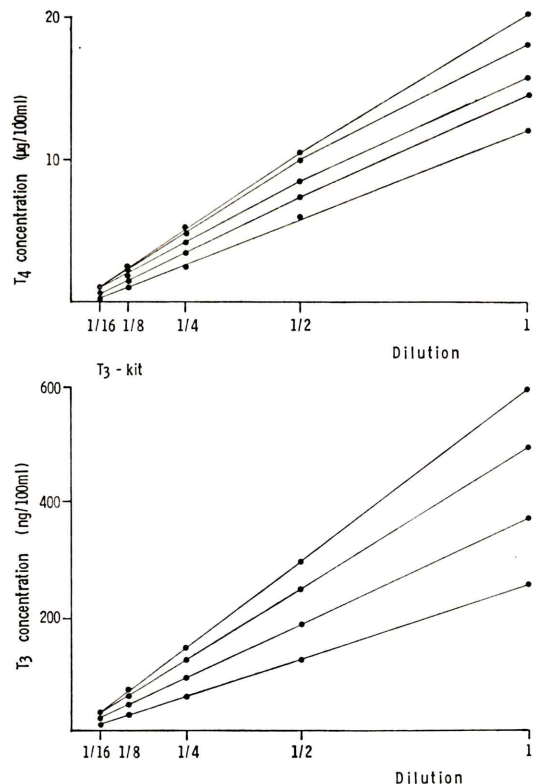


Fig. 4 Dilution test.

プロットされた。

4) 回収率

回収率はプール血清に各キット添付の標準血清を加えて検討した。Table 1 に示すごとく T₄ キットでは 81.1~105.8%, 平均回収率 96.3% であり, T₃ キットのそれは 95.7~118.9% で平均 104.4% であった。

5) 精度および再現性

T₄ および T₃ 濃度がそれぞれ低値から高値の 3 種類のプール血清を用いて, 同一アッセイで 10 回繰返し測定を行った際の測定成績は Table 2 の左

Table 1 Recovery study.

T ₄ -kit		Added T ₄ (μg/100 ml)	2.75	5.85	11.25
1) 3.04 μg/100 ml	recovered	2.44	5.53	11.02	
	recovery (%)	88.7	94.5	98.0	
2) 3.48 μg/100 ml	recovered	2.91	5.91	11.37	
	recovery (%)	105.8	101.0	101.1	
3) 6.13 μg/100 ml	recovered	2.23	5.90	10.77	
	recovery (%)	81.1	100.9	95.7	

T ₃ -kit		Added T ₃ (ng/100 ml)	92	188	394
1) 65.5 ng/100 ml	recovered	94.5	223.5	426.5	
	recovery (%)	102.7	118.9	108.2	
2) 129.0 ng/100 ml	recovered	88.0	182.0	410.0	
	recovery (%)	95.7	96.8	104.1	

Table 2 Precision and reproducibility of the assays.
T₄-kit

Serum	intra-assay (n=10)			inter-assay (n=4)		
	1	2	3	1	2	3
Mean	5.03	9.48	15.82	5.25	10.35	17.80
s.d.	0.26	0.33	0.43	0.19	0.42	0.18
c.v. (%)	5.2	3.5	2.7	3.6	4.1	1.0

T ₃ -kit						
Serum	intra-assay (n=10)			inter-assay (n=5)		
	1	2	3	1	2	3
Mean	74.7	134.8	390.8	69.0	135.2	383.2
s.d.	2.4	3.3	4.9	7.2	5.8	4.4
c.v. (%)	3.2	2.4	1.3	10.4	4.3	1.2

に示すごとくで, その変動係数は T₄ キットで 2.7~5.2%, T₃ キットでは 1.3~3.2% であった。

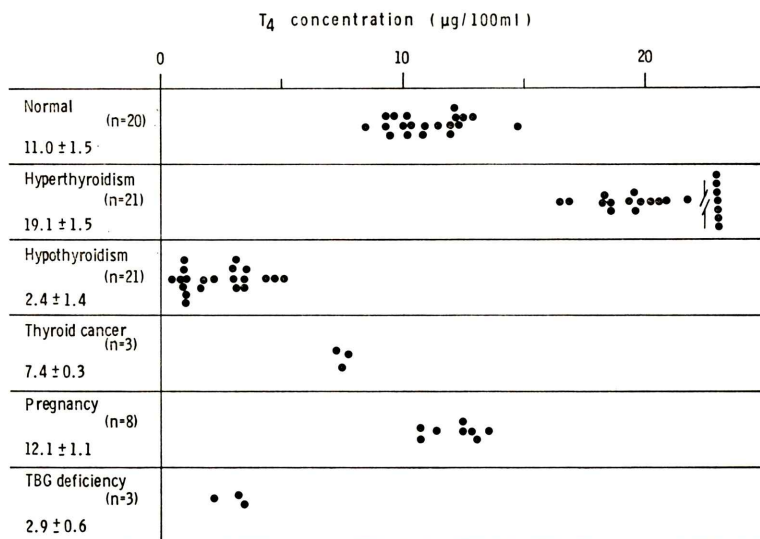
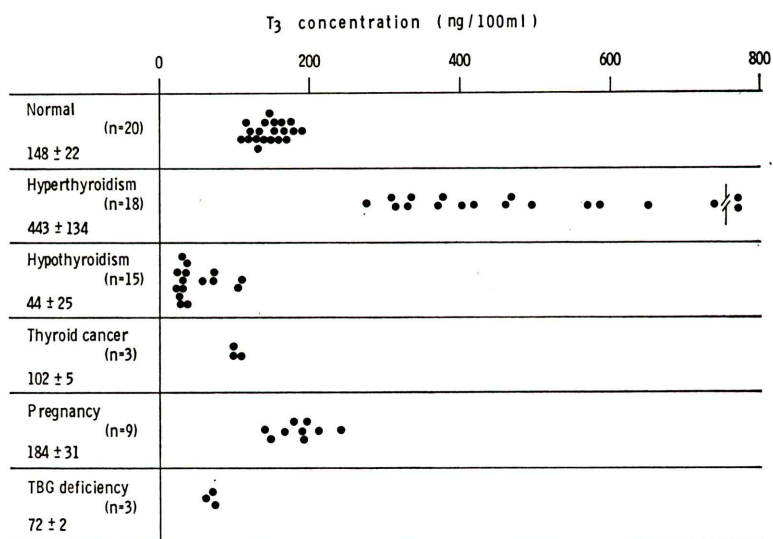
一方, これらの 3 血清について T₄ キットで 4 回, T₃ キットで 5 回異なったアッセイによる測定を繰り返した際の再現性は Table 2 右に示すごとくで, 変動係数は T₄ キットで 1.0~4.1%, T₃ キットで 1.2~10.4% であった。

2. 臨床的検討の成績

1) 健常者および各種甲状腺疾患患者における測定成績

T₄ キットを用いて臨床例における血中 T₄ 濃度の測定を行った成績を Fig. 5 に示した。健常者 20 例では 8.5~14.7 μg/100 ml の間に分布し, 平均 11.0±1.5 (S.D.) μg/100 ml であった。正常域として平均値 ±2 S.D. を取ると 8.0~14.0 μg/100 ml となり, この範囲に入らないものは 1 例のみであった。バセドウ病 21 例のうち 22.5 μg/100 ml 以上の 7 例を除いた 14 例では平均 19.1±1.5 μg/100 ml で全例 16.4 μg/100 ml 以上の値を示した。甲状腺機能低下症 21 例では 0.5~5.1 μg/100 ml に分布し, 平均 2.4±1.4 μg/100 ml であった。甲状腺癌 3 例では 7.4 ±0.3 μg/100 ml とやや低値であった。一方, 妊婦 8 例では 12.1±1.1 μg/100 ml で正常高値ないし, やや高値に分布し, サイロキシン結合グロブリン (TBG) 減少症 3 例ではいずれも低値であった (2.9±0.6 μg/100 ml)。

T₃ キットによる血中 T₃ の臨床測定成績は Fig. 6 に示すごとくである。すなわち, 20 例の健常者では 112~188 ng/100 ml に分布し, その平均値および標準偏差は 148.±22 ng/100 ml であった。正常値として平均値 ±2S.D. を取ると 104~192 ng/100 ml となり, 全例がこの範囲に入った。バセドウ病 18 例では 276 ng/100 ml 以上の高値を示し, 747 ng/100 ml 以上の高値を示した 2 例を除く 16 例の平均は 443±134 (S.D.) ng/100 ml であった。甲状腺機能低下症 15 例では 24~109 ng/100 ml に分布し, 平均 44±25 ng/100 ml であり一部健常者との重なり合いがみられた。甲状腺癌 3 例では 102±5 ng/100 ml と正常下限ないし低値であった。妊婦 9 例では 184±31 ng/100 ml と正常高値

Fig. 5 Serum T₄ concentration in various conditions measured by Amerlex T₄.Fig. 6 Serum T₃ concentration in various conditions measured by Amerlex T₃.

ないしやや高値に分布し、TBG 減少症 3 例では 72 ± 2 ng/100 ml と低値であった。

2) 他キットによる測定値との比較

T₄ キットによる血中 T₄ 濃度とダイナボット社 T₄ リアキット II による測定値との関係を Fig. 7 に示した。両測定値の間には相関係数 0.974 の良好な正相関が認められ、絶対値においてもほぼ一

致する成績が得られた。

同様に、T₃ キットによる血中 T₃ 濃度とダイナボット社 T₃ リアキット II による測定値の関係をプロットした成績を Fig. 8 に示した。両測定値の間には相関係数 0.983 の良好な正相関が認められたが、高値域では T₃ キットによる測定値が T₃ リアキット II による測定値よりやや高値となる傾向

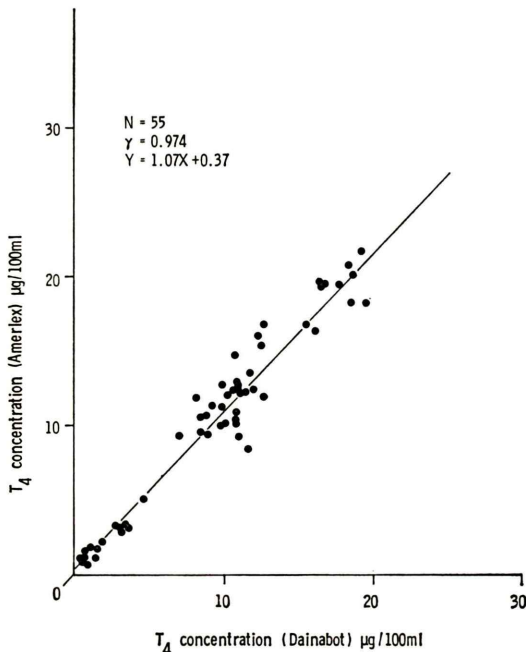


Fig. 7 Correlation of serum T_4 values by T_4 RIA kit II with those by Amerlex T_4 .

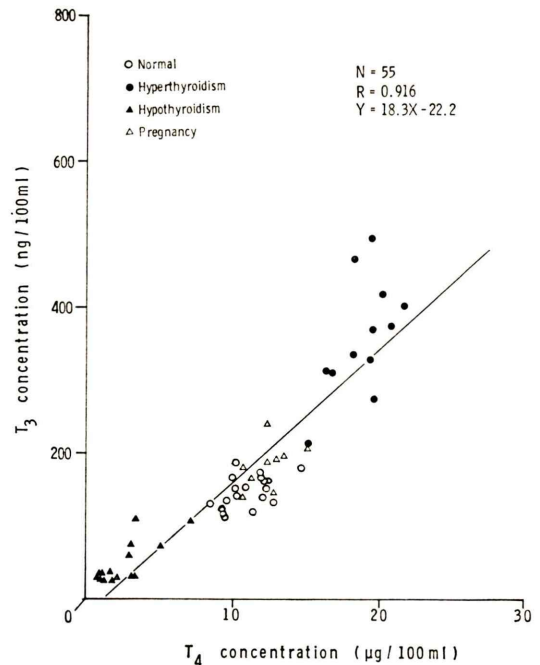


Fig. 9 Correlation between T_4 levels by Amerlex T_4 and T_3 levels by Amerlex T_3 .

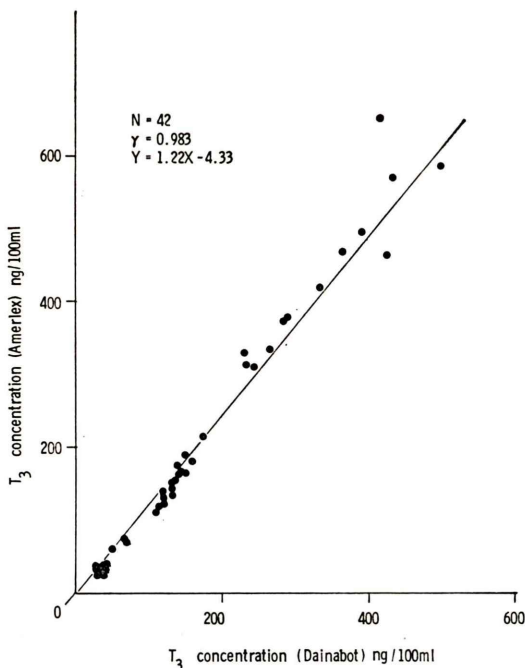


Fig. 8 Correlation of serum T_3 values by T_3 RIA kit II with those by Amerlex T_3 .

が認められた。

3) 血中 T_4 濃度と T_3 濃度の関係

55例についてアマレックス T_4 および T_3 を用いて測定した血中 T_4 および T_3 濃度の関係を Fig. 9 に示した。両者の間には相関係数0.916と良好な正相関が認められた。甲状腺機能亢進症では T_4 に比し T_3 が相対的に高値の傾向がみられた。一方、機能低下症でも T_3 が T_4 に比し相対的に高いものが認められた。

IV. 考 案

抗体をラテックス微粒子に結合させた固相法RIA, アマレックス T_4 , T_3 の両キットについて基礎的検討ならびに臨床的有用性の検討を行った。

一般に固相法ではB・F分離が簡単かつ短時間で行える特徴を有しているが⁶⁻¹⁴⁾、本法ではラテックスの微粒子に抗体を結合させており、反応後のB・F分離は単に遠心操作を行うのみでよい。さらに抗体結合ラテックス微粒子はその反応面積が大

きく、また長時間懸濁状態が保たれることより、抗原抗体反応が均一かつ迅速である利点を有している。このことは一般に固相法では結合カウントが低いといわれるのに対し、両キットともに50%以上の Bo/T% が得られたことに反映されており、測定精度の向上、反応時間の短縮などの上で有利である。なお、本法では T₄ あるいは T₃ と結合蛋白との結合阻害剤として thiomersalate が用いられている。

インキュベーションの温度および時間については、T₄ キットでは 25°C, 45分、T₃ キットでは、37°C, 1時間という規定条件でそれぞれ良好な結果が得られた。時間に関してはこれ以上であれば3時間程度まで長くなっても、測定値には殆ど影響はみられなかった。

抗体の特異性については、T₄ キットで T₃ との交叉反応が9.5%認められたが、血中 T₃ 濃度が T₄ の1~2%程度である点より、临床上測定値への影響は殆ど無視しうるものと考えられた。一方、T₃ キットでは T₄ の交叉反応が0.38%みられた。これはキットの使用説明書に記されている<0.3%⁵⁾よりやや高値であるが、使用した T₄ の純化を特に行わなかったため、この交叉反応は T₄ そのものに若干の T₃ の混在があることによる可能性を否定できない。

高 T₄ および高 T₃ 血清の希釈試験ではそれぞれ良好な成績が得られ、また、両キットによる T₄ および T₃ の回収率は満足すべきものであった。したがって、これら両キットによる測定値は内因性 T₄ および T₃ をよく反映しているものと考えられる。

測定値の精度および異なるアッセイでの再現性は T₄ キット、T₃ キットともに極めて良好であった。

以上の諸検討より、両キットは極めて簡便で、かつ精度のよい血中 T₄ および T₃ 濃度測定法として十分临床上使用しうるものと考えられた。

臨床成績では、T₄ キットによる血中 T₄ 濃度の正常値は平均値 ± 2 S.D. を用いると 8.0~14.0 $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$ であった。バセドウ病では 16.4 $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$

以上の高値を示し、甲状腺機能低下症では 5.1 $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$ 以下に分布し、両者とも健常者の値との重なり合いはなく、よく甲状腺機能を反映していた。また、妊婦ではやや高値、TBG 減少症では低値を示し、TBG の変化に伴う血中 T₄ 量の変動をよく反映していた。

一方、T₃ キットによる血中 T₃ 濃度の正常値は 104~192 ng/100 ml であった。バセドウ病では 276 ng/100 ml 以上の高値を示し、健常者の値との重なり合いはみられなかった。これに対し、甲状腺機能低下症では 109 ng/100 ml 以下に分布し、健常者の値との重なり合いがみられた。また、T₄ の場合と同様、T₃ においても妊婦ではやや高値、TBG 減少症では低値となり、TBG の変化に伴う T₃ 量の変動が反映されていた。

他法との比較検討では、T₄ キットによる測定値をダイナボット社の T₄ リアキット II による測定値と比較したが、両者は極めて高い相関係数を示し、その絶対値もよく一致していた。一方、T₃ キットによる測定値とダイナボット社の T₃ リアキット II による測定値の比較では同様に高い相関係数が得られたが、高値域で T₃ キットによる測定値が T₃ リアキット II による測定値よりやや高値となる傾向が認められた。

本法による T₄ および T₃ 測定値の関係では、両者の間に良好な正相関が認められたが、甲状腺機能亢進症では T₄ に比し相対的に T₃ が高値であり、T₃ の診断的価値が高いことが示された。一方、甲状腺機能低下症では T₃ が正常域にあるものが存在するため、T₄ の方が診断価値が高いといえる。妊婦など TBG 増多を来す場合には T₄、T₃ ともに健常者と同様な比率で増加することが認められた。

V. 結 語

抗体をラテックス微粒子に結合させた固相法 RIA による T₄、T₃ 測定キット、アマレックス T₄、T₃ について、その測定条件、特異性、精度、再現性などを検討するとともに臨床的有用性を評価した。本法は B・F 分離が簡便で、短時間に精度の高

い測定が行えることが認められた。臨床例における測定値は他のRIA法のそれと良好な相関を示し、 T_4 、 T_3 キットいずれも甲状腺機能検査法として有用であることが認められた。本法による血清 T_4 および T_3 濃度の正常値はそれぞれ $8.0 \sim 14.0 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ および $104 \sim 192 \text{ ng}/100 \text{ ml}$ であった。

終わりに、キットを提供された科研化学株式会社に謝意を表します。

文 献

- 1) Murphy BEP, Pattee CJ: Determination of thyroxine utilizing the property of protein binding. *J Clin Endocrinol Metab* **24**: 187-196, 1964
- 2) Chopra IJ, Solomon DH, Ho RS: A radioimmunoassay of thyroxine. *J Clin Endocrinol Metab* **33**: 865-868, 1971
- 3) Brown BL, Ekins RP, Ellis SM, et al: Specific antibodies to triiodothyronine hormone. *Nature* **226**: 359, 1970
- 4) Charib H, Ryan RJ, Mayberry WE, et al: Radioimmunoassay for triiodothyronine (T_3): I. Affinity and specificity of the antibody for T_3 . *J Clin Endocrinol Metab* **33**: 509-516, 1971
- 5) Amerlex T_4 and T_3 RIA kit package insert. The Radiochemical Centre, Amersham, England.
- 6) Catt K, Niall HD, Tregear GW: Solid phase radioimmunoassay. *Nature* **213**: 825-827, 1967
- 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. *ホルモンと臨床* **26**: 411-415, 1978
- 8) 木下文雄, 前川 全, 鳥屋城男, 他: Gamma Coat T_4 による血中 T_4 の測定. *Radioisotopes* **27**: 40-43, 1978
- 9) 中川 毅, 信田憲行, 田口光雄: コンスル T_4 RIA による血中サイロキシンの測定. *核医学* **16**: 55-62, 1979
- 10) 小西淳二, 高坂唯子, 奥野龍興, 他: 固相法 Radioimmunoassay による血中サイロキシンの測定——スバック T_4 RIA キットに関する検討. *核医学* **16**: 71-77, 1979
- 11) 満間照典, 鰐部春松, 広岡良文, 他: 固相法による Triiodothyronine radioimmunoassay: Konsul T_3 RIA キットの検討. *ホルモンと臨床* **26**: 817-820, 1978
- 12) 竹田洋祐, 中島言子, 奥野龍興, 他: Phadebas T_3 RIA キットによる血中 T_3 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**: 405-409, 1978
- 13) 中川 毅, 信田憲行, 田口光雄: コンスル T_3 RIA による血中トリヨードサイロキシンの測定. *核医学* **16**: 47-54, 1979
- 14) 野木森剛, 満間照典: コーニング IMMOPHASE T_3 RIA キットによる血中 T_3 測定法の検討. *核医学* **17**: 337-341, 1980