

《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 菁爾*

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 の蒸溜水を加えて溶解、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 の蒸溜水を加えて溶解、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部

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 (西 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に示すとくで、両キットとも検体は25 μl 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、測定の精度および再現性、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

Std. or Pt. serum	25 μl
125I-T ₄ or T ₃	500 μl
Solid phase anti-serum suspension	500 μl

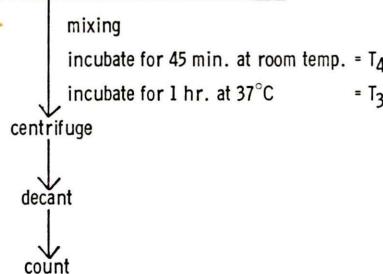


Fig. 1 Assay procedure of Amerlex T₄ and T₃.

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

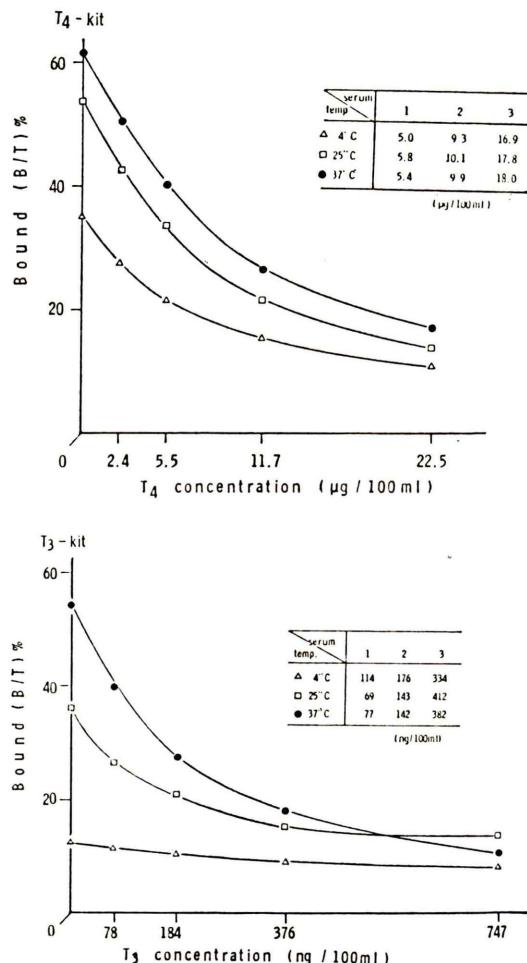


Fig. 2 Effect of incubation temperature on standard curves and assay values.

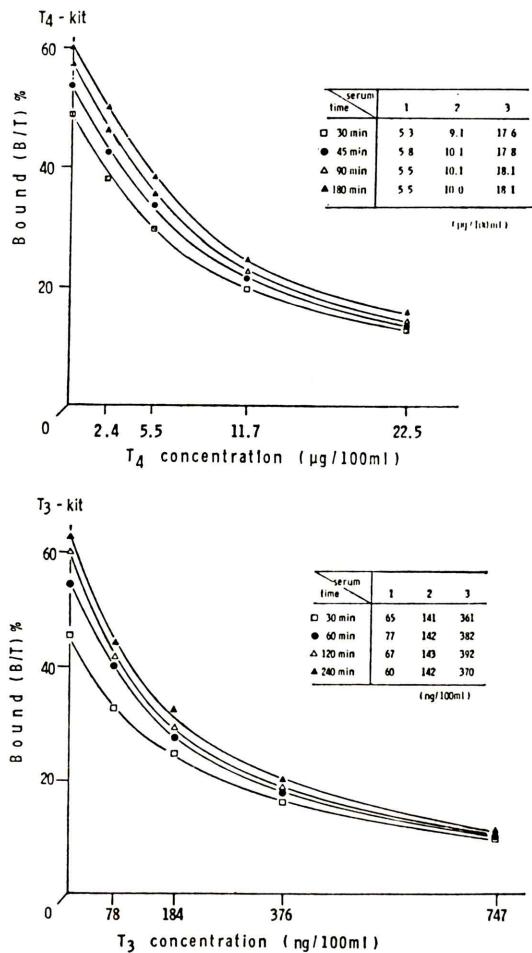


Fig. 3 Effect of incubation time on standard curves and assay values.

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B₀%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T₄free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、T₃free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T₄free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T₃free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

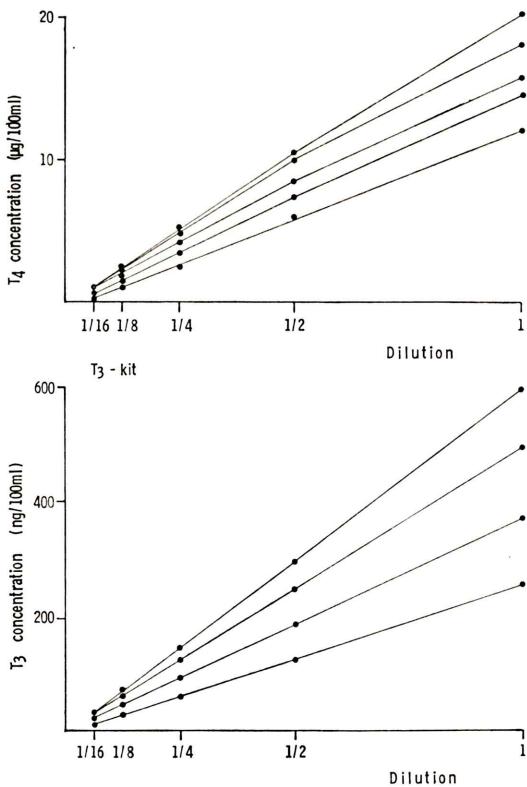


Fig. 4 Dilution test.

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 ($\mu\text{g}/100 \text{ml}$)	2.75	5.85	11.25
1)	3.04 $\mu\text{g}/100 \text{ml}$	recovered recovery (%)	2.44 88.7	5.53 94.5	11.02 98.0
2)	3.48 $\mu\text{g}/100 \text{ml}$	recovered recovery (%)	2.91 105.8	5.91 101.0	11.37 101.1
3)	6.13 $\mu\text{g}/100 \text{ml}$	recovered recovery (%)	2.23 81.1	5.90 100.9	10.77 95.7

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

Table 2 Precision and reproducibility of the assays.

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

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、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。

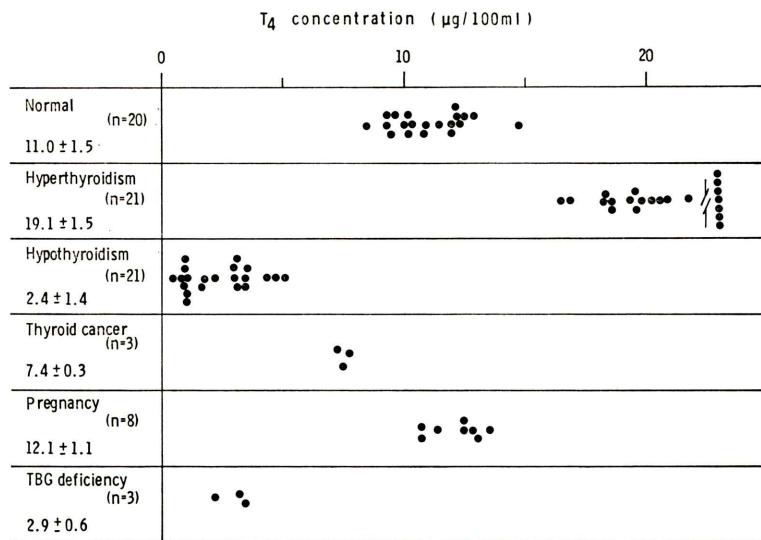
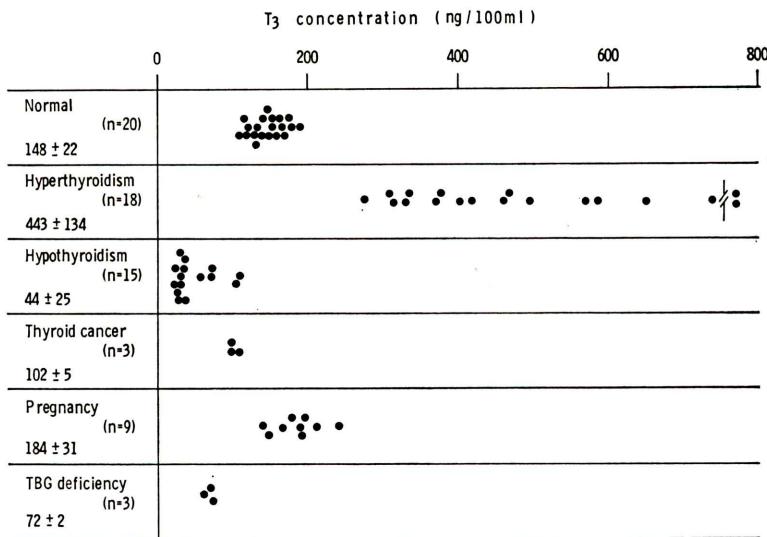
一方、これらの 3 血清について T₄ キットで 4 回、T₃ キットで 5 回異なるアッセイによる測定を繰り返した際の再現性は Table 2 右に示すごとく、変動係数は T₄ キットで 1.0~4.1%，T₃ キットで 1.2~10.4% であった。

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 $\mu\text{g}/100 \text{ml}$ の間に分布し、平均 11.0 ± 1.5 (S.D.) $\mu\text{g}/100 \text{ml}$ であった。正常域として平均値 ± 2 S.D. を取ると 8.0~14.0 $\mu\text{g}/100 \text{ml}$ 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 $\mu\text{g}/100 \text{ml}$ 以上の 7 例を除いた 14 例では平均 $19.1 \pm 1.5 \mu\text{g}/100 \text{ml}$ で全例 16.4 $\mu\text{g}/100 \text{ml}$ 以上の値を示した。甲状腺機能低下症 21 例では 0.5~5.1 $\mu\text{g}/100 \text{ml}$ に分布し、平均 $2.4 \pm 1.4 \mu\text{g}/100 \text{ml}$ であった。甲状腺癌 3 例では $7.4 \pm 0.3 \mu\text{g}/100 \text{ml}$ とやや低値であった。一方、妊婦 8 例では $12.1 \pm 1.1 \mu\text{g}/100 \text{ml}$ 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 ($2.9 \pm 0.6 \mu\text{g}/100 \text{ml}$)。

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 $\text{ng}/100 \text{ml}$ に分布し、その平均値および標準偏差は $148. \pm 22 \text{ ng}/100 \text{ ml}$ であった。正常値として平均値 ± 2 S.D. を取ると 104~192 $\text{ng}/100 \text{ ml}$ となり、全例がこの範囲に入った。バセドウ病 18 例では 276 $\text{ng}/100 \text{ ml}$ 以上の高値を示し、747 $\text{ng}/100 \text{ ml}$ 以上の高値を示した 2 例を除く 16 例の平均は 443 ± 134 (S.D.) $\text{ng}/100 \text{ ml}$ であった。甲状腺機能低下症 15 例では 24~109 $\text{ng}/100 \text{ ml}$ に分布し、平均 $44 \pm 25 \text{ ng}/100 \text{ ml}$ 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 $102 \pm 5 \text{ ng}/100 \text{ ml}$ と正常下限ないし低値であった。妊婦 9 例では $184 \pm 31 \text{ ng}/100 \text{ ml}$ 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 $72 \pm 2 \text{ ng/100 ml}$ 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

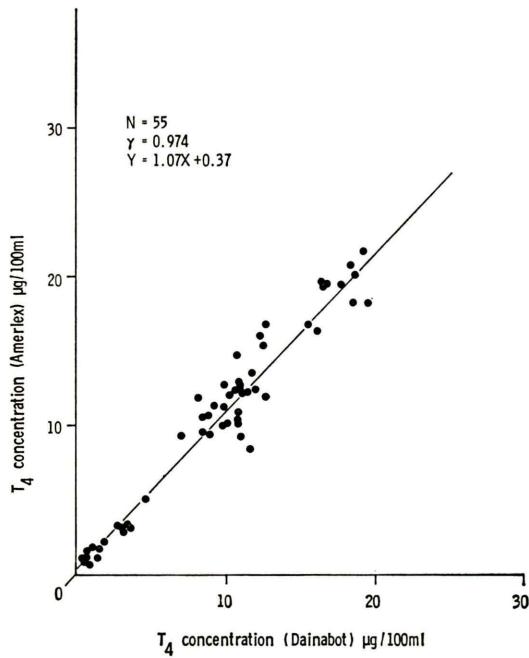


Fig. 7 Correlation of serum T₄ values by T₄ RIA kit II with those by Amerlex T₄.

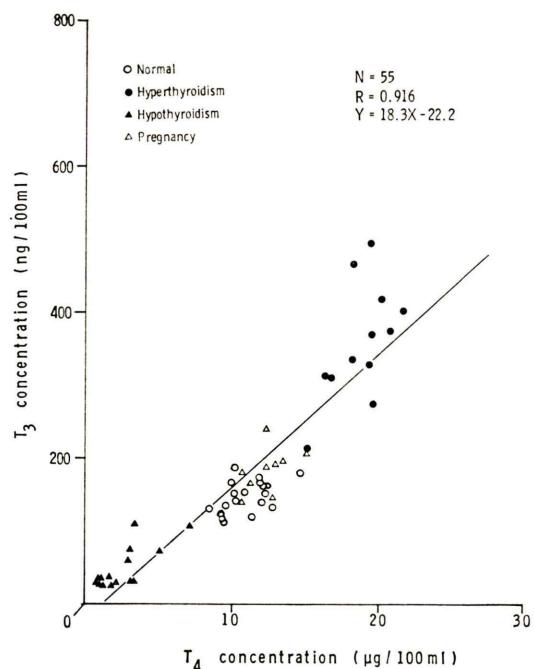


Fig. 9 Correlation between T₄ levels by Amerlex T₄ and T₃ levels by Amerlex T₃.

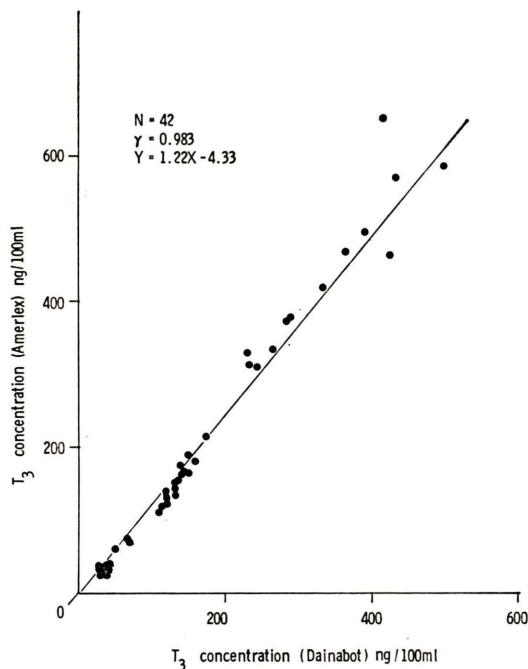


Fig. 8 Correlation of serum T₃ values by T₃ RIA kit II with those by Amerlex T₃.

が認められた。

3) 血中 T₄ 濃度と T₃ 濃度の関係

55例についてアマレックス T₄ および T₃ を用いて測定した血中 T₄ および T₃ 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 T₄ に比し T₃ が相対的に高値の傾向がみられた。一方、機能低下症でも T₃ が T₄ 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 T₄, T₃ 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 T_4 あるいは T_3 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、 T_4 キットでは 25°C , 45分、 T_3 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、 T_4 キットで T_3 との交叉反応が9.5%認められたが、血中 T_3 濃度が T_4 の1~2%程度である点より、臨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、 T_3 キットでは T_4 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 T_4 の純化を行わなかったため、この交叉反応は T_4 そのものに若干の T_3 の混在があることによる可能性を否定できない。

高 T_4 および高 T_3 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 T_4 および T_3 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 T_4 および T_3 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 T_4 キット、 T_3 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 T_4 および T_3 濃度測定法として十分臨床上使用しうるものと考えられた。

臨床成績では、 T_4 キットによる血中 T_4 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 T_4 量の変動をよく反映していた。

一方、 T_3 キットによる血中 T_3 濃度の正常値は 104~192 $\text{ng}/100\text{ ml}$ であった。バセドウ病では 276 $\text{ng}/100\text{ ml}$ 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 $\text{ng}/100\text{ ml}$ 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、 T_4 の場合と同様、 T_3 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 T_3 量の変動が反映されていた。

他法との比較検討では、 T_4 キットによる測定値をダイナボット社の T_4 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、 T_3 キットによる測定値とダイナボット社の T_3 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 T_3 キットによる測定値が T_3 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 T_4 および T_3 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 T_4 に比し相対的に T_3 が高値であり、 T_3 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 T_3 が正常域にあるものが存在するため、 T_4 の方が診断価値が高いといえる。妊婦など TBG 増多を来たす場合には T_4 、 T_3 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 T_4 、 T_3 測定キット、アマレックス T_4 、 T_3 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、T₄、T₃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T₄およびT₃濃度の正常値はそれぞれ8.0～14.0 μg/100 mlおよび104～192 ng/100 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 (T₃): I. Affinity and specificity of the antibody for T₃. *J Clin Endocrinol Metab* **33**: 509-516, 1971
- 5) Amerlex T₄ and T₃ 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 T₄ 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 T₄による血中T₄の測定. *Radioisotopes* **27**: 40-43, 1978
- 9) 中川毅, 信田憲行, 田口光雄: コンスルT₄ 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, 奥野龍與, 他: 固相法 Radioimmunoassayによる血中サイロキシンの測定——スパックT₄ 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 T₃ 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, 奥野龍與, 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**: 405-409, 1978
- 13) 中川毅, 信田憲行, 田口光雄: コンスルT₃ RIAによる血中トリヨードサイロニンの測定. 核医学 **16**: 47-54, 1979
- 14) 野木森剛, 満間照典: コーニングIMMOPHASE T₃ RIAキットによる血中T₃測定法の検討. 核医学 **17**: 337-341, 1980