

## 《ノート》

# Gamma Coat Total/Free T<sub>4</sub> ラジオイノムアッセイキット による血清 “Free T<sub>4</sub>” の測定の意義

——測定機序の検討および他の方法との比較——

Determination of Serum “Free T<sub>4</sub>” by GammaCoat  
Total/Free T<sub>4</sub> Radioimmunoassay Kits  
—Principle of The Assay and Comparative Studies with  
Equilibrium Dialysis and Free T<sub>4</sub> Index—

浜田 哲\* 今村理喜代\*\* 吉政 康直\*

Satoshi HAMADA\*, Rikiyo IMAMURA\*\* and Yasunao YOSHIMASA\*

\*Department of Endocrinology and Nuclear Medicine, and Radioisotope Division,  
Department of Clinical Pathology, Tenri Hospital

## はじめに

血中のサイロキシン (T<sub>4</sub>) は大部分が血清 T<sub>4</sub> 結合蛋白と結合し、正常人ではその 0.03% が遊離型であるが、この遊離型 T<sub>4</sub> (Free T<sub>4</sub>) が細胞内に入りホルモン作用を呈するとされている。当初 Free T<sub>4</sub> は、トレーサー T<sub>4</sub> を用いて平衡透析法<sup>1-3)</sup> あるいは限外濾過法により測定された % Free T<sub>4</sub> と、血清総 T<sub>4</sub> 濃度との積で求められたが、近年ラジオイノムアッセイ (RIA) により平衡透析外液中の Free T<sub>4</sub> が直接測定されるに至った<sup>5-7)</sup>。

しかし、これらの従来の方法は煩雑で長時間を要し、また比較的多量の血清を必要とする。最近、微量 (50  $\mu$ l) の血清を用いて、短時間の操作で“遊離型 T<sub>4</sub>”を測定する RIA キットが発売された。本キットは、その操作法を変えるだけで、濃度が 5,000 倍異なる血清総 T<sub>4</sub> 濃度を測定することがで

きる特異な方法である。本法がはたして真の Free T<sub>4</sub> を測定するものであるか否かを検討し、種々の甲状腺疾患について臨床的評価を行なうとともに、平衡透析による Free T<sub>4</sub> 値およびわれわれがルーチンに使用している遊離型 T<sub>4</sub> 指数<sup>8)</sup>と比較した。

## I. 方法および測定試料

測定試料は天理よろづ相談所病院を受診した甲状腺機能亢進症 33 例、機能低下症 8 例、慢性甲状腺炎 13 例、先天性 TBG 欠損症 1 例、正常妊娠 20 例および正常甲状腺機能とみられる結節性甲状腺腫 19 例の合計 94 例であった。これらの診断は臨床所見のほか、血清 T<sub>4</sub>、T<sub>3</sub>、T<sub>3</sub> 摂取率 (T<sub>3</sub> U)、TSH、甲状腺<sup>131</sup>I 摂取率およびシンチグラム、血中甲状腺抗体並びに一般検査により行われた。

血清 T<sub>4</sub> は通常第 1 ラジオアイソトープ社製の SPAC-T<sub>4</sub> キット、血清 T<sub>3</sub> 摂取率 (T<sub>3</sub>U) は同社製の SPAC-T<sub>3</sub> キットにより測定し、両測定値の積を遊離型 T<sub>4</sub> 指数 (FT<sub>4</sub> I) とした。これらの測定の

**Key words:** Free Thyroxine, Radioimmunoassay, Equilibrium dialysis, Free Thyroxine index, Thyroid function test

\* 天理よろづ相談所病院内内分泌科

\*\* 同臨床病理部 RI 部門

受付：55年10月3日

最終稿受付：55年10月3日

別刷請求先：天理市三島町 200 (☎632)

天理よろづ相談所病院内内分泌科

浜田 哲

基礎的および臨床的検討の成績は、先に報告された<sup>8, 9)</sup>。

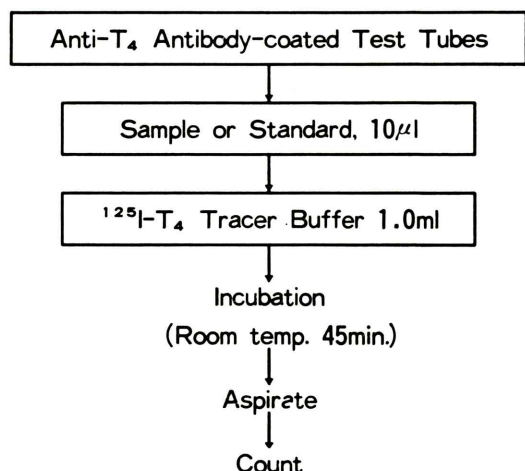


Fig. 1 Radioimmunoassay for Total Serum Thyroxine.

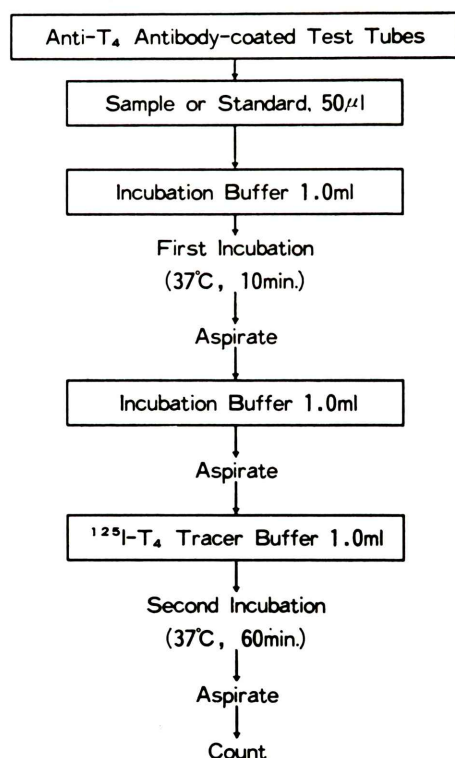


Fig. 2 Radioimmunoassay for Free Thyroxine in Serum.

トラベノール社製の Gamma Coat [<sup>125</sup>I] Total and/or Free T<sub>4</sub> ラジオイノムアッセイキットは、血清総 T<sub>4</sub> または遊離型 T<sub>4</sub> を同一キットで、操作方法を一部変更するだけで測定しうる。

### (1) キットの構成

A. <sup>125</sup>I-T<sub>4</sub> 液: Tris-buffered saline 10 ml 中に約 5 μCi のトレーサー T<sub>4</sub> および 0.03 M 窒化ナトリウムを含む。

B. 抗 T<sub>4</sub> 家兎血清で内面を被覆したプラスチック試験管。

C. T<sub>4</sub> Reagent buffer 濃厚液: Tris-buffered saline, 4mM ANS, 6mM サルチル酸ソーダおよび 0.03M 窒化ナトリウムを含む。10 ml/バイアル。

D. T<sub>4</sub> 血清ブランク: 総 T<sub>4</sub>, 0 μg/100ml; Free T<sub>4</sub>, 0 ng/100 ml.

E. T<sub>4</sub> スタンダード: 総 T<sub>4</sub>, 1.0, 4.0, 12, 30 μg/100 ml; 遊離型 T<sub>4</sub>, 0.15, 0.65, 2.2, 4.3 8.2 ng/100 ml (それぞれ標示されている)。

F. インキュベーション緩衝液: 0.01M 窒化ナトリウムを含む Tris-buffered saline.

### (2) 血清総 T<sub>4</sub> の標準測定法 (Fig. 1).

1) 抗体被覆試験管に被検血清または各種の標準血清 (0~30 μg/100 ml) を 10 μl 加える。

2) 各試験管に Tracer-buffer (A 液および C の各 1 バイアル (10 ml) に蒸留水 90 ml を加えたもの) を 1.0 ml 加える。

3) 室温 (20~25°C) で 45 分間インキュベートする。

4) 各試験管の内容を吸引除去する。

5) 試験管に残存する <sup>125</sup>I をカウントし、標準曲線より総 T<sub>4</sub> 値を読みとる。

### (3) 遊離型 T<sub>4</sub> の標準測定法 (Fig. 2).

1) 抗 T<sub>4</sub> 家兎血清で被覆した試験管に、被検血清または標準血清 (0~8.2 ng/100 ml) 50 μl を加える。

2) 各試験管にインキュベーション緩衝液 (F 液) 1.0 ml を加えて、37°C で 10 分間インキュベートする (第一反応)。

3) 内容液を吸引除去したのち、新しい同緩衝液 1.0 ml を各試験管に加え、再び吸引除去する。

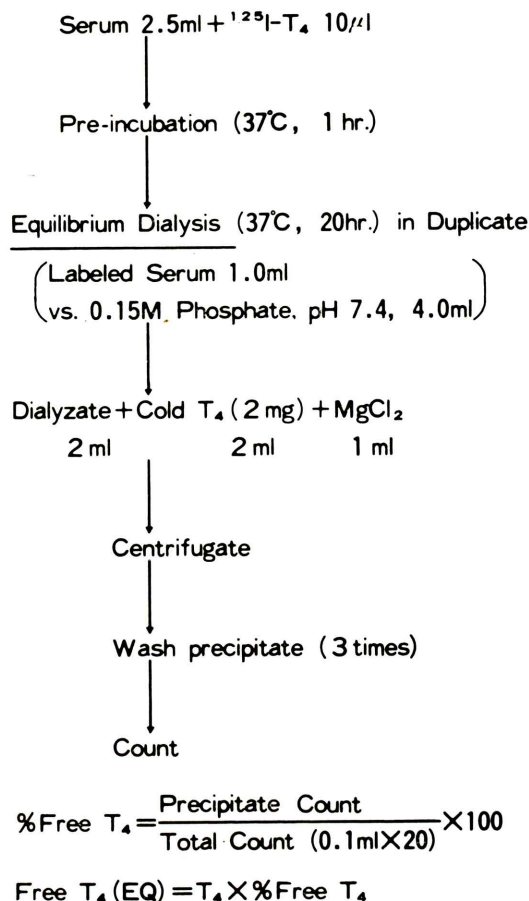


Fig. 3 Determination of Free Thyroxine in Serum by Equilibrium Dialysis.

4) 各試験管に Tracer-buffer (A 液および C 液の各 1 バイアルに蒸留水 90 ml を加えたもの) 1.0 ml を加え, 37°C で 60 分間インキュベートする(第二反応)。

5) 反応終了後内容物を吸引除去し, 試験管に残存する <sup>125</sup>I の放射能をガンマカウンターで測定する。

6) 標準血清よりえられた標準曲線から Free T<sub>4</sub> 値を読み取る。

この“遊離型 T<sub>4</sub>”測定の原理は, 先ず, 一定量の抗 T<sub>4</sub> 抗体でコーティングした試験管に血清を入れてインキュベートし, その遊離型 T<sub>4</sub> を抗体に結合させる。次に, 血清を除去して結合型 T<sub>4</sub> を

除いたのちに, トレーサー T<sub>4</sub> を加えると, トレーサー T<sub>4</sub> は遊離型 T<sub>4</sub> が結合していない抗 T<sub>4</sub> 抗体に結合するため, その結合率の多寡により遊離型 T<sub>4</sub> が求められる。

平衡透析法による遊離型 T<sub>4</sub> は濃度の測定。Sterling らの方法<sup>1)</sup>に準じ, Fig. 3 に示す方法で測定した。被検血清 2.5 ml に <sup>125</sup>I 標識 T<sub>4</sub> (比放射能 40 ~ 60 μCi/μg Radiochemical Centre 社 Amersham, U.K.) 10 μl を加えて, 37°C で 1 時間 Pre-incubation を行なう。反応終了後, 標識 T<sub>4</sub> 添加血清 1.0 ml を予め塩酸処理洗浄を行なった透析チューブ (Visking 社製) に入れ, 0.15M 磷酸緩衝液, pH 7.4, の 4.0 ml に対して 37°C で 20 時間振盪しつつ平衡透析を行なった。透析容器は 50 ml 用セルローズ・ニトレート製遠心管を使用し, ゴム栓で密栓した。透析終了後, 透析外液 2.0 ml を試験管にとり, 非標識 T<sub>4</sub> 液 (1 mg T<sub>4</sub>/ml) 2.0 ml を加えたのち, 塩化マグネシウム液 (10% MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O—0.05M Tris—0.1M NaCl, pH 9.3) 1.0 ml を加えて遠沈する。沈渣は更に洗浄液 (10% MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O—0.05M Tris—0.1M NaCl, pH 8.7) 5 ml を加えて攪拌・遠沈を 3 回反復して洗浄する。最終沈渣を 10 分間カウントし, 透析前の血清の計数率との比から, “% Free T<sub>4</sub>” を求める。これに Total T<sub>4</sub> を乗じて Total Free T<sub>4</sub> を算出する。

平衡透析による Free T<sub>4</sub> の測定に先立って, 標識 T<sub>4</sub> のペーパークロマトグラフィーによる純度検定, Schussler 法<sup>4)</sup>による標識 T<sub>4</sub> の予備透析の効果の検討, 被検血清の希釈あるいは透析外液の量の % Free T<sub>4</sub> に及ぼす影響, および透析外液の組成の影響などの基礎的検討を行なった。その結果, 使用された標識 T<sub>4</sub> は 98% 以上の高純度で, 予備透析に影響されなかった。透析外液として, 種々の緩衝液を検討した結果, 0.15M 磷酸緩衝液は Krebs-Ringer 液, phosphate-buffered saline に比較して % Free T<sub>4</sub> 値が稍高値であったが, 再現性に優れていたため使用した。また, 透析内液の血清量と透析外液量との割合が % Free T<sub>4</sub> 値にどのような影響を与えるかを検討し, 4 倍量の透析外液では, % Free T<sub>4</sub> 値にほとんど影響はみられない



が、10倍量以上では% Free T<sub>4</sub> 値の低下が認められた。この成績は、従来の成績と一致した。

## 2. 成 績

### A. 基礎的検討

(1) 抗体結合試験管に結合する“% Free T<sub>4</sub>”の測定。

本キットによる Free T<sub>4</sub> 測定の原理の一つは、第一反応において Free T<sub>4</sub> を固定化抗体に結合させて分離することである。この反応において血中総T<sub>4</sub>の何%が抗体に結合するか、すなわち、“% Free T<sub>4</sub>”値を知るために、下記のトレーサー実験を行なった。まず、正常人、甲状腺機能亢進症および機能低下症の各1例の患者血清にトレーサー量の標識T<sub>4</sub>を添加し、37°Cで1時間あらかじめインキュベートして充分平衡に達せしめた。次に、これらの血清を抗体結合試験管に入れ、標準操作法にしたがって第1インキュベートを行い、標識T<sub>4</sub>の結合率(% Free T<sub>4</sub>)を求めた。正常人(9.9 μg T<sub>4</sub>/100 ml)では1.43%に対し、甲状腺機能亢進症(23.2 μg/100 ml)では1.01%と逆に低値であり、機能低下症(2.2 μg/100 ml)では1.52%と高値であった。また、プール血清を用いてインキュベーション時間の影響をみると、10分間のインキュベ

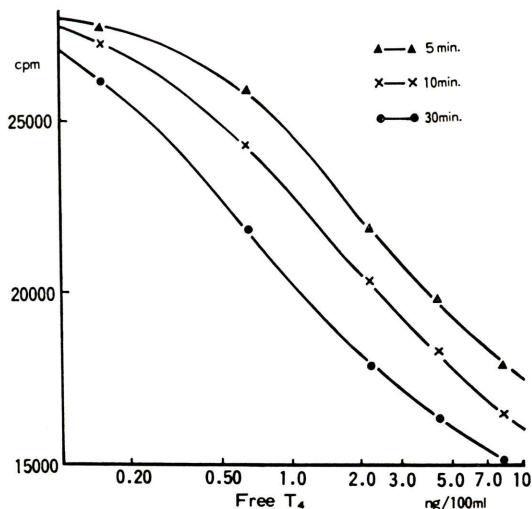


Fig. 4 Effect of First-Incubation Time on Standard Curves in Radioimmunoassay for Free T<sub>4</sub>.

ーションでは1.43%, 30分間では1.92%で、時間の延長と共に標識T<sub>4</sub>の結合率が増加した(以上の

**Table 1** Effect on First-Incubation Time on Free Thyroxine Values determined by Radioimmunoassay  
(All the values were means of duplicate determinations)

Control Serum	Incubation Time		
	5 min	10 min	30 min
Low-free T <sub>4</sub>	0.33	0.33	0.36
Medium-free T <sub>4</sub>	1.62	1.40	1.35
High-free T <sub>4</sub>	4.82	3.00	3.60

**Table 2** Dilution Test

	1×	2× Dil	4× Dil	8× Dil
F T <sub>4</sub> Value expected (ng/ml)	8.20	4.10	2.05	1.03
F T <sub>4</sub> Value measured (ng/ml)	8.20	2.95	1.40	0.64
Recovery (%)	—	72.0	68.3	62.7

**Table 3** Reproducibility in the Intra-assay

	A	B	C
1	0.30	1.05	3.95
2	0.30	0.81	3.70
3	0.26	0.89	3.95
4	0.25	0.88	4.30
5	0.32	0.99	4.10
m	0.29	0.91	4.00
S.D.	0.029	0.088	0.221
C.V.	10.0%	9.6%	5.5%

(ng/100 ml)

**Table 4** Reproducibility in the Inter-assay

	A	B	C
1	0.29	1.25	3.70
2	0.33	1.18	3.02
3	0.31	1.13	3.00
4	0.30	1.00	3.00
5	0.31	1.30	3.60
m	0.31	1.17	3.26
S.D.	0.014	0.116	0.354
C.V.	4.5%	9.9%	10.8%

(ng/100 ml)

**Table 5** Free Thyroxine Values by Radioimmunoassay and Free Thyroxine Index in Sera from Various Thyroid Diseases and Normal Pregnancy

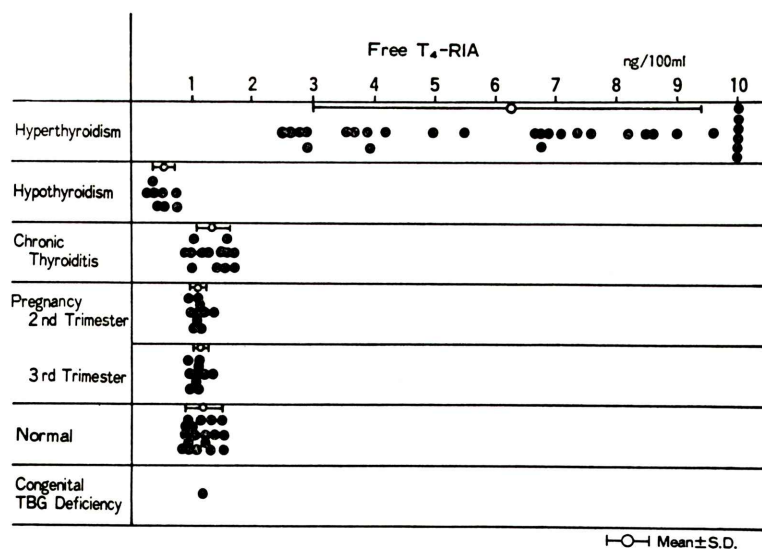
	No. of Cases	T <sub>4</sub>	T <sub>3</sub> U	FT <sub>4</sub> I	FT <sub>4</sub> -RIA
Hyperthyroidism	33	20.1±8.5*	1.16±0.12***	23.9±7.8*	6.20±3.24*
Hypothyroidism	8	4.5±1.8*	1.02±0.06†	3.8±1.6*	0.50±0.17*
Chronic thyroiditis	13	8.0±1.3**	0.97±0.08†	7.7±1.4***	1.34±0.28†
Pregnancy					
2nd Trimester	10	10.0±1.2	0.71±0.05*	7.1±1.0*	1.11±0.11†
Pregnancy					
3rd Trimester	10	9.5±3.5	0.70±0.05*	7.2±0.7*	1.16±0.13†
Normal	19	9.1±1.8	1.01±0.22	9.67±1.93	1.21±0.33
Congenital TBG deficiency	1	2.4	2.00	4.8	1.20
	94				

\*P&lt;0.001 \*\*P&lt;0.05 \*\*\*P&lt;0.01 †N.S.

**Table 6** Total and Percent Free Thyroxine Values in Various Thyroid Diseases

	No. of Cases	Equilibrium Dialysis		Radioimmunoassay	
		% FT <sub>4</sub> measured	FT <sub>4</sub> calculated	% FT <sub>4</sub> calculated	FT <sub>4</sub> measured
Hyperthyroidism	27	0.067±0.032††	16.07±11.55*	0.030±0.009*	6.20±3.24*
Hypothyroidism	7	0.026±0.007†	0.87±0.33*	0.014±0.003†	0.50±0.17
Chronic thyroiditis	10	0.027±0.004†	2.19±0.40**	0.017±0.003***	1.34±0.28†
Normal	13	0.029±0.008	2.88±0.88	0.013±0.003	1.21±0.33

\* P&lt;0.001 \*\*P&lt;0.05 \*\*\*P&lt;0.01 †N.S. \*† Mean±S.D.

**Fig. 5** Free Thyroxine Values by Radioimmunoassay in Sera from Various Thyroid Diseases and Normal Pregnancy.

測定値は2重測定の平均値であった)。すなわち、本測定の第1インキュベーションにおける“% Free T<sub>4</sub>”値は、正常者では平衡透析法の約48倍で、しかも時間とともにさらに増加し、また、甲状腺機能亢進症および低下症における成績は平衡透析法と逆の結果であった。

(2) インキュベーション時間の標準曲線および測定値に及ぼす影響。

遊離型 T<sub>4</sub> の測定における第1インキュベーション時間を5分、10分、30分とした場合の標準曲線を Fig. 4 に示す。反応時間が長くなるにつれて、標準曲線、すなわち第2反応における標識 T<sub>4</sub> の結合率が低下した。これらの標準曲線を用いて、Free T<sub>4</sub> 濃度の異なる3種類のコントロール血清を測定すると、Table 1 に示すように、5分間のインキュベーションでは高濃度および中濃度の Free T<sub>4</sub> コントロール血清の測定値が、10分および30分間のインキュベーションに比べて高値であった。

(3) 血清の希釈の影響

被検血清を生食水で倍数希釈して Free T<sub>4</sub> 値を測定すると、Table 2 のように、期待値より低値を示した。

(4) Intra-assay の再現性

Free T<sub>4</sub> 濃度の異なる3種類の血清について同

時に5重測定を行なった (Table 3)。変動係数は5.5~10.0%であった。

(5) Inter-assay の再現性

Free T<sub>4</sub> 濃度の異なる3種類の血清について日をかえて5回測定を行なった (Table 4)。変動係数は4.5~10.8%であった。

B. 臨床的評価

(1) 諸疾患におけるRIA法による Free T<sub>4</sub> 値。

RIA法による“Free T<sub>4</sub>”値を Fig. 5 および Table 5 に示す。正常機能者の平均値±標準偏差は、 $1.21 \pm 0.33$  ng/100 ml であった。甲状腺機能亢進症では  $6.20 \pm 3.24$  ng/100 ml と高値を、機能低下症では  $0.50 \pm 0.17$  ng/100 ml と低値を示し、正常者との重なり合いはみられなかった。これに対して、慢性甲状腺炎、妊娠の中期および後期、並びに先天性 TBG 欠損症の1例では正常域に分布した。

(2) 種々の甲状腺疾患における平衡透析法による % Free T<sub>4</sub> および Total Free T<sub>4</sub> 値。

% Free T<sub>4</sub> 値は、正常者では  $0.029 \pm 0.008\%$  であり、甲状腺機能亢進症では  $0.067 \pm 0.032\%$  と有意 ( $P < 0.001$ ) の高値を示した。慢性甲状腺炎では正常者と差異はみられず、甲状腺機能低下症では  $0.026 \pm 0.007\%$  で低下の傾向を示すが、有意差はみとめられなかった (Table 6)。

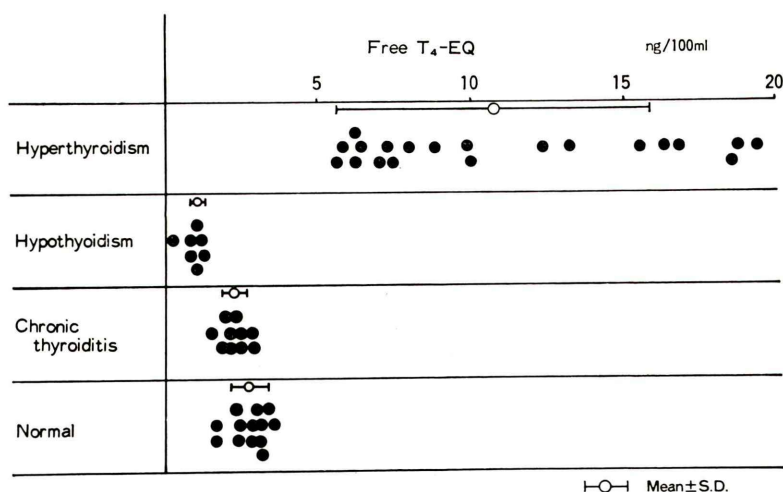


Fig. 6 Free Thyroxine Values by Equilibrium Dialysis in Sera from Various Thyroid Diseases.

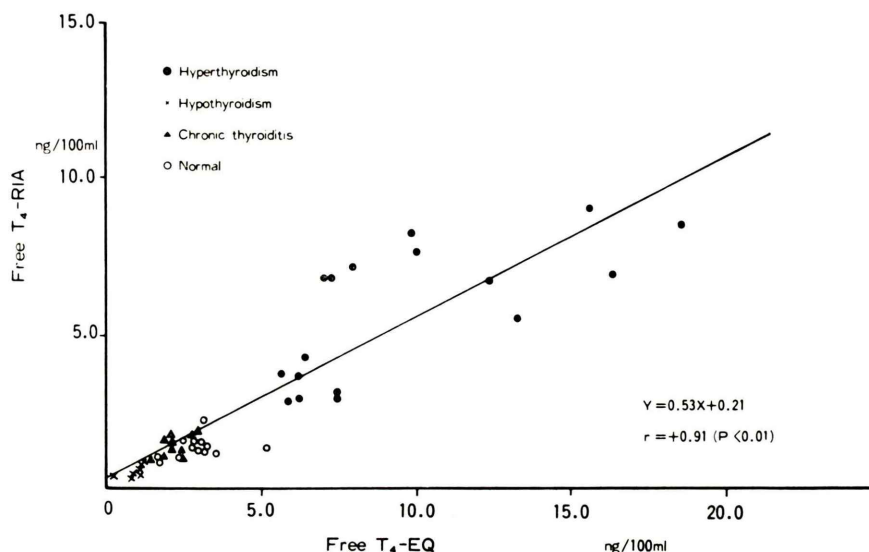


Fig. 7 Comparison Between Free Thyroxine Values by Radioimmunoassay and by Equilibrium Dialysis in Various Thyroid Diseases.

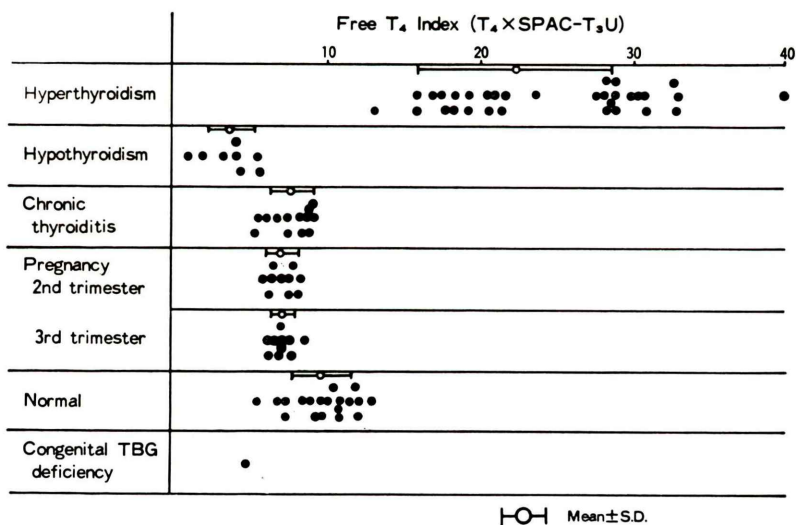


Fig. 8 Free Thyroxine Indices in Sera from Various Thyroid Diseases and Normal Pregnancy.

平衡透析法による Total Free T<sub>4</sub> 値は、正常者では  $2.88 \pm 0.88$  ng/100 ml であり、甲状腺機能亢進症では高値に、甲状腺機能低下症では低値に分布し、正常者との間に重なり合いはみられなかった (Fig. 6 および Table 6)。慢性甲状腺炎では正常

域に分布した。

(3) RIA 法と平衡透析法における Free T<sub>4</sub> 値の比較。

Fig. 7 は、46例の各種甲状腺疾患および正常者について、2つの方法による Free T<sub>4</sub> 値を比較し



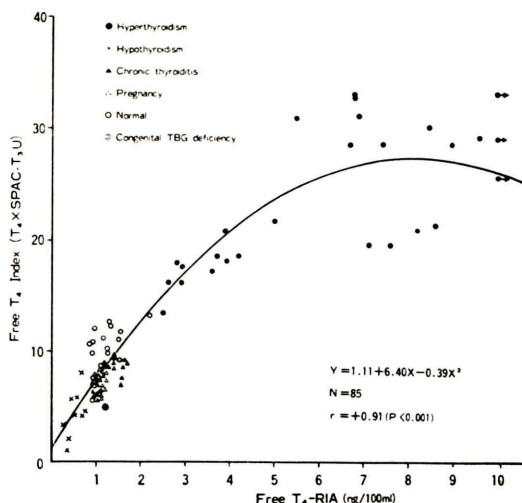


Fig. 9 Comparison Between Free Thyroxine Values by Radioimmunoassay and Free Thyroxine Index in Sera from Various Thyroid Diseases and Normal Pregnancy.

たものである。両者間には有意の正相関(相関係数+0.91,  $p < 0.01$ )がみられ, その関係は直線的で,  $Y = 0.53x + 0.21$  の回帰直線がえられた。

#### (4) 諸疾患における遊離型 $T_4$ 指数 ( $FT_4 I$ )

$FT_4 I$  と RIA 法による Free  $T_4$  値との診断的意義を比較するために, 同一症例について  $FT_4 I$  を求めた。Fig. 8 および Table 5 に示すように, 正常群の  $FT_4 I$  は  $9.67 \pm 1.93$  で, 甲状腺機能亢進症では高値に, 機能低下症では低値に分布し, 正常群との重なり合いは極めて少なかった。慢性甲状腺炎では正常低値に分布し, 13例中2例が正常平均値より2 S.D. 以下の低値を示した。妊娠の中期および後期では正常低値に分布したが, いずれも正常平均値より2 S.D. 以内に留った。また, 先天性 TBG に欠損症の1例では稍低値を示した。

(5) RIA による Free  $T_4$  値と遊離型  $T_4$  指数との比較。

Fig. 9 は, 85例の各種甲状腺疾患, 妊娠, 正常者および TBG 欠損症について, RIA による Free  $T_4$  値と  $FT_4 I$  との関係を示す。両者間には有意の正相関(相関係数+0.91,  $p < 0.001$ )がみとめられるが, その関係は非直線的で,  $Y = 1.11 + 6.40x -$

$0.39x^2$  の回帰曲線がえられた

### 3. 考 案

遊離型  $T_4$  は各種の血清  $T_4$  結合蛋白, すなわち, 血清  $T_4$  結合グロブリン (TBG),  $T_4$  結合プレアルブミン (TBPA), およびアルブミンに結合した  $T_4$  と可逆的結合平衡にあり, トレーサーを用いた平衡透析により, 総  $T_4$  濃度の 0.02~0.04% とされている<sup>3,10</sup>。近年, ラジオイノムアッセイ<sup>5-7</sup>あるいは放射化分析<sup>11</sup>) により透析外液中の遊離型  $T_4$  を直接測定する試みがなされた。これに対して本キットは, 遊離型  $T_4$  を固相の抗  $T_4$  抗体で分離し, 次に,  $T_4$  を結合していない抗体の結合部位を  $^{125}I$ - $T_4$  の結合率で求めて, 間接的に抗体に結合する遊離型  $T_4$  を測定するもので, 従来の方法とは原理的に異なっている。

そこで, 抗  $T_4$  抗体で分離される  $T_4$  量が, 上述の可逆的結合平衡により生じる遊離型  $T_4$  量と等しいか否かが問題となる。従来の平衡透析では, 透析外液中の遊離型  $T_4$  は透析内液の血清中の遊離型  $T_4$  と平衡しており, 膜などへの  $T_4$  の吸着および外液の希釈効果を除けば, 血中の遊離型  $T_4$  濃度に最も近いものと考えられる。また, セファデックス・ゲル濾過による遊離型  $T_4$  の分離も行われた<sup>12</sup>) が, セファデックスが  $T_4$  を吸着するために, 遊離型  $T_4$  のほかに結合型  $T_4$  を解離して結合する可能性があった。しかし, セファデックスの  $T_4$  に対する親和性は, 血清  $T_4$  結合蛋白よりはるかに弱いために, 小カラムを用いればゲル濾過中に結合型  $T_4$  を解離・吸着することは少ないとみられた。これに対して本キットでは,  $T_4$  に対する親和性が TBG より一層大きい抗体を使用して, 遊離型  $T_4$  を分離する点が問題となる可能性がある。

標識  $T_4$  を甲状腺機能亢進症, 低下症および正常の人血清に結合させ, 本キットの第1インキュベーションにおける抗体への結合率をみると, 正常人血清では 1.43% であった。これは平衡透析法により得られた %Free  $T_4$  (0.02~0.04%) の約 50 倍である。本測定では被検血清が緩衝液で 21 倍希



積されているので、この希釈係数を乗じると、“% Free T<sub>4</sub>”は平衡透析法の約 1,000 倍となる。すなわち、第 1 インキュベーションにおいて抗体に結合する T<sub>4</sub> 量は、可逆的結合平衡で血中に存在する遊離型 T<sub>4</sub> 量より遙かに大きい。本キットの抗体固定試験管は、10  $\mu$ l の血清中の総 T<sub>4</sub> 量を測定できるように抗体量を調節されている。(Fig. 1)。このような抗体量で血中総 T<sub>4</sub> 濃度の約 1/5000 の“遊離型 T<sub>4</sub>”量を測定しうるのは、第 1 インキュベーションにおいて解離した多量の T<sub>4</sub> が抗体の結合部位をふさぐためと考えられる。

もう一つの問題点は、甲状腺機能亢進症および低下症の患者血清を用いて、同様に第 1 インキュベーションにおけるトレーサー T<sub>4</sub> の結合率(%)を求めると、機能亢進症では 1.01% と正常よりかえって低値であり、機能低下症では 1.52% と正常より高値であった。これは、従来の平衡透析法と逆の成績である。この理由として、添加されたトレーサー T<sub>4</sub> が内因性 T<sub>4</sub> と異なる行動をとる可能性も考えられるが、透析外液中の遊離型 T<sub>4</sub> をラジオイノムアッセイで直接測定してもこのような現象はみられず、この可能性は除外される。したがって、最も可能性が大きいのは次の理由であろう。本キットは微量の T<sub>4</sub> を測定するために、一定量の比較的少量の抗体が試験管に固定されている。甲状腺機能亢進症では血中総 T<sub>4</sub> 濃度は高いが、抗体に結合する“遊離型 T<sub>4</sub>”量は、抗体量が少ないために相対的に少ない。機能低下症では血中総 T<sub>4</sub> 濃度は低い、抗体に結合する“遊離型 T<sub>4</sub>”量は抗体の強い親和性のために比較的多く、その結合率(“% Free T<sub>4</sub>”)は相対的に高値となる。このような“% Free T<sub>4</sub>”の paradoxical な変動は、この測定系に起こる人工的な現象と考えられる。

以上のように、本キットの第 1 反応で抗体に結合される T<sub>4</sub> は、本来存在した遊離型 T<sub>4</sub> のみでなく、結合型 T<sub>4</sub> の解離したものを多量に含んでいるとみられる。しかし、抗体に結合する“遊離型 T<sub>4</sub>”の総量は、機能亢進症では増加し、機能低下症では減少し、その結果抗体の未結合部位の数は機能亢進症では減少し、機能低下症ではなお大き

い。第 2 反応においてこの未結合部位の数が添加したトレーサー T<sub>4</sub> の結合率によって表われ、これにより、“遊離型 T<sub>4</sub>”量が算出される。したがって、原理的にみて、本法は遊離型 T<sub>4</sub> 自身のラジオイノムアッセイではなく、それに平行する 1 つの指標であり、本法の“Free T<sub>4</sub>”はこの結合率を何らかの遊離型 T<sub>4</sub> の規準値と対比させたものと推定される。本キットの測定値は平衡透析法による測定値より低く、他のラジオイノムアッセイの測定値に類似しているが、上記の理由から本法の絶対値を評価することは意味がないと考えられる。

この測定の機序を別にすれば、得られた“遊離型 T<sub>4</sub>”値は従来の方法により得られた成績と良く一致した。すなわち、その測定値は平衡透析法で得られた測定値とほぼ直線関係を示した。種々の甲状腺疾患の機能異常をよく反映して、甲状腺機能亢進症では高値に、機能低下症では低値に分布し、ほとんど重なり合いを認めなかった。

更に注目すべきことは、TBG が著しく変動する妊娠および 1 例の先天性 TBG 欠損症で、本キットによる“遊離型 T<sub>4</sub>”値が正常を示したことである。この点も平衡透析法による成績と一致し、遊離型 T<sub>4</sub> の指標としての有用性を示している。

現在、遊離型 T<sub>4</sub> 濃度の指標として総 T<sub>4</sub> 値と T<sub>3</sub>U 値とから算出される種々の遊離型 T<sub>4</sub> 指数 (FT<sub>4</sub>I) が臨床的に用いられている<sup>8,10,13-16</sup>。これらは甲状腺機能亢進症および低下症を正常群から区別するのに有用であるが、平衡透析による測定値との関係は、その 1 つ<sup>10</sup>を除くと、必ずしも直線的ではない。本キットの測定値と通常の FT<sub>4</sub>I 値 (T<sub>4</sub> × T<sub>3</sub>U) とを種々の甲状腺疾患について比較すると、両者間に非直線関係がみられた。これは、本キットの測定値は平衡透析による測定値と平行するが、FT<sub>4</sub>I 値はそうでないためである。また FT<sub>4</sub>I 値は、妊娠および先天性 TBG 欠損症で正常低値ないし低値を示す。したがって本キットの測定値は一般の FT<sub>4</sub>I より優れていると結論された。

本キットの標準曲線および測定値は第 1 インキュベーション時間により影響を受ける。したがって、再現性を高めるためには、インキュベシ

ン時間および温度を一定にする必要がある。遊離型  $T_4$  濃度の異なる3種類の血清について測定値の再現性をみると、inter-assay および intra-assay とともに5~10%で満足すべき成績であった。希釈試験および回収率試験の成績は必ずしも良好ではないが、これは遊離型  $T_4$  濃度が、その中に含まれる結合蛋白と  $T_4$  濃度とから規定され、希釈あるいは他のスタンダードの添加によって算術的に定まるものではないことから当然の結果といえる。本キットは微量の試料を用いて短時間のうちに、簡易に再現性よく“遊離型  $T_4$ ”値を測定することができ、臨床検査として有用と考えられる。

#### 4. 結 論

GammaCoat Total and/or Free  $T_4$  RIA キットによる血清“遊離型  $T_4$ ”測定の機序を検討するとともに、各種甲状腺疾患、正常妊娠および先天性TBG欠損症の血清“Free  $T_4$ ”を測定し、これらと平衡透析によるFree  $T_4$ の測定値、および遊離型  $T_4$  指数との比較を行った。

① 本法のFree  $T_4$  測定原理は、遊離型  $T_4$  を一定量の抗  $T_4$  抗体に結合させ、残余の非結合の抗体量を標識の結合量により測定するものである。しかし、トレーサー  $T_4$  を用いた基礎検討の結果、抗体に結合する  $T_4$  量は平衡透析法でみられる遊離型  $T_4$  量の100倍以上であり、抗体に結合される“% Free  $T_4$ ”は、甲状腺機能亢進症では正常より少なく、機能低下症では正常より多い。この抗体に結合する総  $T_4$  量は、平衡透析法で測定される  $T_4$  量より遙かに多いが遊離型  $T_4$  量に平行する。このため、抗体の unbound sites より求められる“Free  $T_4$ ”値は平衡透析法による値と平行する。本法の“Free  $T_4$ ”値は、Free  $T_4$  の実測値ではなく、それに平行する一つの指標であり、その数値は任意的なものと考えられた。

② 本キットによる“Free  $T_4$ ”値は、平衡透析法によるFree  $T_4$  値と直線関係( $r=+0.91$ )を示し、FT<sub>4</sub>I値とは良好な正相関( $r=+0.91$ )を示すが、その関係は非直線であった。

③ 諸疾患における本キットによる“Free  $T_4$ ”

値は、正常群では  $1.21 \pm 0.33$  (平均 $\pm$ 標準偏差)、甲状腺機能亢進症では  $6.20 \pm 3.24$ 、機能低下症では  $0.50 \pm 0.17$  であり、正常群とこれら疾患群との間に重なり合いはみられなかった。また、TBGが変動する妊娠の中期・後期および先天性TBG欠損症の1例ではそれぞれ  $1.11 \pm 0.11$ ,  $1.16 \pm 0.13$  および1.20で、正常域に分布した。したがって甲状腺機能異常症の診断に有用と考えられた。

④本測定のIntra-assay および Inter-assay の再現性は良好であった。本キットは、50  $\mu$ l の検体量で、簡単な操作で遊離型  $T_4$  濃度を示す指標が得られ、日常検査として有用と考えられた。

キットをご提供いただいた日本トラベノール株式会社に謝辞致します。

#### 文 献

- 1) Sterling K, Brenner MA: Free thyroxine in human serum: Simplified measurement with the aid of magnesium precipitation. *J Clin Invest* 45: 153-163, 1966
- 2) Ingbar SH, Braverman LE, Dawber NA, et al: A new method for measuring the free thyroid hormone in human serum and analysis of the factors that influence its concentration. *J Clin Invest* 44: 1679-1689, 1965
- 3) Oppenheimer JH, Squef R, Surks MI, et al: Binding of thyroxine by serum proteins evaluated by equilibrium dialysis and electrophoretic techniques. Alterations in nonthyroidal illness. *J Clin Invest* 42: 1769-1782, 1963
- 4) Schussler GC, Plager JE: Effect of preliminary purification of  $^{131}$ I-thyroxine on the determination of free thyroxine in serum. *J Clin Endocrinol Metab* 27: 242-250, 1967
- 5) Ekins RP, Ellis SM: The radioimmunoassay of free thyroid hormones in serum. In “Thyroid Research,” Proc VIIth Internatl Thyroid Conference, (ed. J. Robbins, LE Braverman) Excerpta Medica, Amsterdam-Oxford, American Elsevier Publ Co Inc New York, 1975, pp. 597-600.
- 6) Jiang N-S, Tue KA: Determination of free thyroxine in serum by radioimmunoassay. *Clin Chem* 23: 1679-1683, 1977
- 7) Yeo PBB, Lewis M, Evered DC: Radioimmunoassay of free thyroid hormone concentrations in the investigation of thyroid diseases. *Clin Endocrinol* 6: 159-165, 1977



- 8) 浜田 哲, 石原 明, 今村理喜代, 他: 抗体固定試験管法 (SPAC-T<sub>3</sub> キット) による血清トリヨードサイロニン摂取率測定の基礎的検討および臨床評価ならびにこれを用いた血中遊離型サイロキシン指数の診断意義について. 核医学 **16**: 611-617, 1979.
- 9) 石原 明, 浜田 哲, 今村理喜代, 他: 抗体固定試験管法 (SPAC-T<sub>4</sub> キット) による血中チロキシンのラジオイノムアッセイの基礎的検討と臨床評価. Radioisotopes **29**: 39-41, 1980
- 10) Hamada S, Nakagawa T, Mori T, et al: Re-evaluation of thyroxine-binding and free thyroxine in serum by paper electrophoresis and equilibrium dialysis, and a new free thyroxine index. J Clin Endocrinol Metab **31**: 166-179, 1970.
- 11) Hamada S, Torizuka K, Hamamoto K, et al: Determination of free thyroxine in human serum by neutron activation analysis. Radioisotopes **18**: 354-358, 1969
- 12) Lee ND, Henry RJ, and Golub OJ: Determination of the free thyroxine content of serum. J Clin Endocrinol Metab **24**: 486-495, 1964
- 13) Clark F, Horn DB: Assessment of thyroid function by the combined use of the serum protein-bound iodine and resin uptake of <sup>131</sup>I-triiodothyronine. J Clin Endocrinol Metab **25**: 39-45, 1965
- 14) Clark F, Brown H: Free thyroxine index. Brit Med J **2**: 543, 1970
- 15) 森 徹, 高坂唯子, 浜田 哲, 他: Thyopac Free T<sub>4</sub> Index の臨床的評価. Radioisotopes **22**: 170-177, 1973
- 16) Hamada S, Kosaka T & Torizuka K: Clinical evaluation of new indicators of free thyroxine concentration and thyroxine-binding globulin capacity. Clin Chim Acta **63**: 129-137, 1975