

《ノート》

Gamma Coat Total/Free T₄ ラジオイノムアッセイキット による血清 “Free T₄” 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 T₄” by GammaCoat
Total/Free T₄ Radioimmunoassay Kits

—Principle of The Assay and Comparative Studies with
Equilibrium Dialysis and Free T₄ 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(T₄)は大部分が血清T₄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T₄(Free T₄)が細胞に入りホルモン作用を呈するとされている。当初Free T₄は、トレーサーT₄を用いて平衡透析法¹⁻³⁾あるいは限外濾過法により測定された%Free T₄と、血清総T₄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 T₄が直接測定されるに至った⁵⁻⁷⁾。

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 μl)の血清を用いて、短時間の操作で“遊離型T₄”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T₄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 T₄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 T₄値およびわれわれがルーチンに使用している遊離型T₄指数⁸⁾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T₄、T₃、T₃摂取率(T₃U)、TSH、甲状腺¹³¹I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T₄は通常第1ラジオアイソトープ社製のSPAC-T₄キット、血清T₃摂取率(T₃U)は同社製のSPAC-T₃キットにより測定し、両測定値の積を遊離型T₄指数(FT₄I)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分泌内科

** 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(番632)

天理よろづ相談所病院内分泌内科

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^{8, 9)}。

Anti-T₄ Antibody-coated Test Tubes

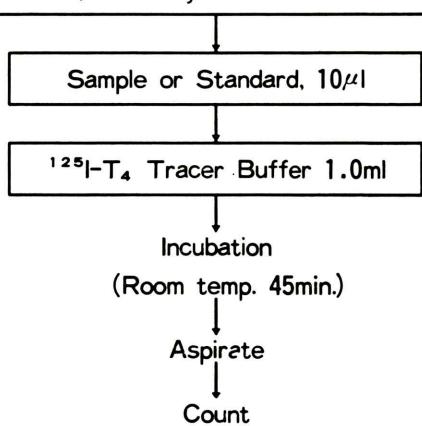


Fig. 1 Radioimmunoassay for Total Serum Thyroxine.

Anti-T₄ Antibody-coated Test Tubes

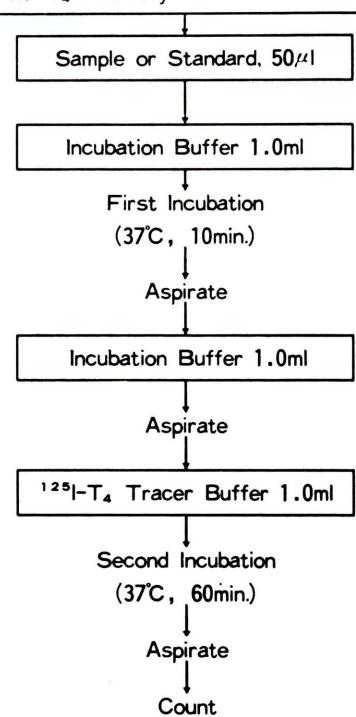


Fig. 2 Radioimmunoassay for Free Thyroxine in Serum.

トラベノール社製の Gamma Coat [¹²⁵I] Total and/or Free T₄ ラジオイノムアッセイキットは、血清総 T₄ または遊離型 T₄ 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. ¹²⁵I-T₄ 液: Tris-buffered saline 10 ml 中に約 5 μCi のトレーサーT₄ および 0.03 M 窒化ナトリウムを含む。

B. 抗 T₄ 家兎血清で内面を被覆したプラスティック試験管。

C. T₄ 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. T₄ 血清プランク: 総 T₄, 0 μg/100ml; Free T₄, 0 ng/100 ml.

E. T₄ スタンダード: 総 T₄, 1.0, 4.0, 12, 30 μg/100 ml; 遊離型 T₄, 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 T₄ 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 ¹²⁵I をカウントし、標準曲線より総 T₄ 値を読みとる。

(3) 遊離型 T₄ の標準測定法 (Fig. 2).

1) 抗 T₄ 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。

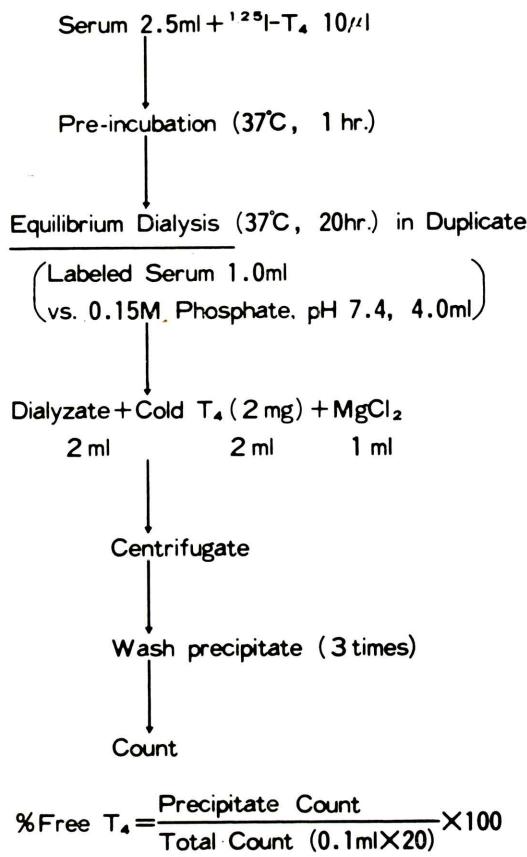


Fig. 3 Determination of Free Thyroxine in Serum by Equilibrium Dialysis.

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) 反応終了後内容液を吸引除去し、試験管に残存する ^{125}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 T₄ 値を読み取る。

この“遊離型 T₄”測定の原理は、先ず、一定量の抗 T₄ 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 T₄ を抗体に結合させる。次に、血清を除去して結合型 T₄ を

除いたのちに、トレーサー T₄ を加えると、トレーサー T₄ は遊離型 T₄ が結合していない抗 T₄ 抗体に結合するため、その結合率の多寡により遊離型 T₄ が求められる。

平衡透析法による遊離型 T₄ は濃度の測定。Sterling らの方法¹⁾に準じ、Fig. 3 に示す方法で測定した。被検血清 2.5 ml に ^{125}I 標識 T₄ (比放射能 40 ~ 60 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ 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 T₄ 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・ニトロ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 T₄ 液 (1 mg T₄/ml) 2.0 ml を加えたのち、塩化マグネシウム液 (10% MgCl₂ · 6H₂O - 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% MgCl₂ · 6H₂O - 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 T₄”を求める。これに Total T₄ を乗じて Total Free T₄ を算出する。

平衡透析による Free T₄ の測定に先立って、標識 T₄ のペーパークロマトグラフィーによる純度検定、Schüssler 法⁴⁾による標識 T₄ 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 T₄ 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 T₄ 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 T₄ 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 T₄ 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 T₄ 値にほとんど影響はみられない

が、10倍量以上では% Free T₄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 T₄”の測定。

本キットによるFree T₄測定の原理の一つは、第一反応においてFree T₄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T₄の何%が抗体に結合するか、すなわち、“% Free T₄”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T₄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T₄の結合率(% Free T₄)を求めた。正常人(9.9μg T₄/100 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

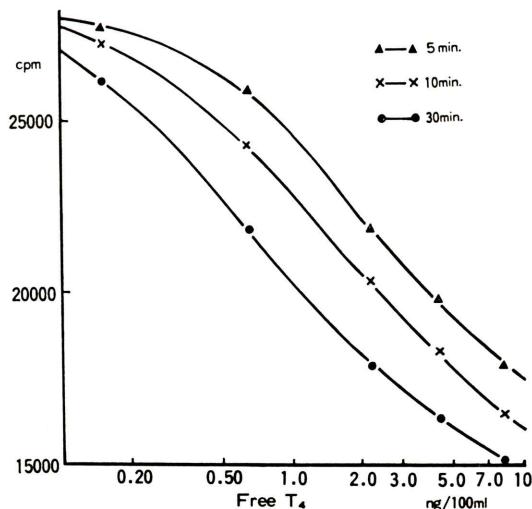


Fig. 4 Effect of First-Incubation Time on Standard Curves in Radioimmunoassay for Free T₄.

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T₄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 Radic-immunoassay

(All the values were means of duplicate determinations)

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

Table 2 Dilution Test

	1×	2×Dil	4×Dil	8×Dil
F T ₄ Value expected (ng/ml)	8.20	4.10	2.05	1.03
F T ₄ 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 ₄	T ₃ U	FT ₄ I	FT ₄ -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<0.001 **P<0.05 ***P<0.01 †N.S.

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

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

* P<0.001 **P<0.05 ***P<0.01 †N.S.

†† Mean±S.D.

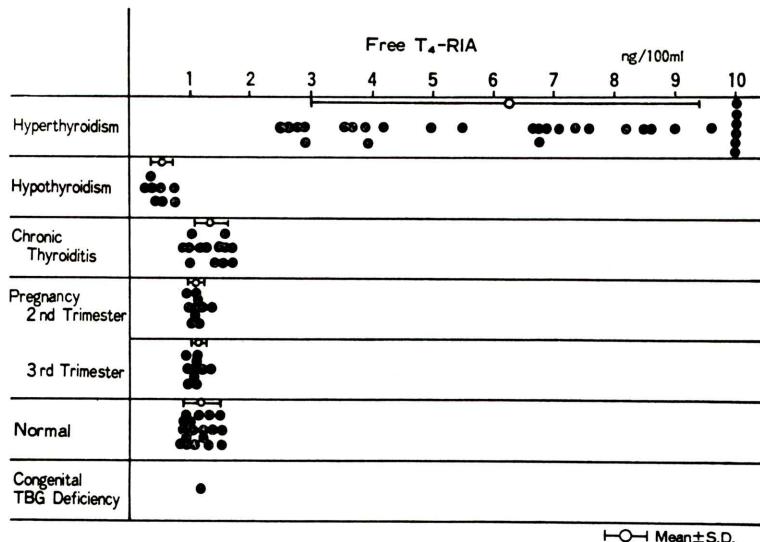


Fig. 5 Free Thyroxine Values by Radioimmunoassay in Sera from Various Thyroid Diseases and Normal Pregnancy.

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 T₄”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T₄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T₄の結合率が低下した. これらの標準曲線を用いて, Free T₄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 T₄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 T₄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 T₄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 T₄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 T₄値.

RIA法による“Free T₄”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±0.33 ng/100 ml であった. 甲状腺機能亢進症では6.20±3.24 ng/100 mlと高値を, 機能低下症では0.50±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 T₄およびTotal Free T₄値.

% Free T₄値は, 正常者では0.029±0.008%であり, 甲状腺機能亢進症では0.067±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±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).

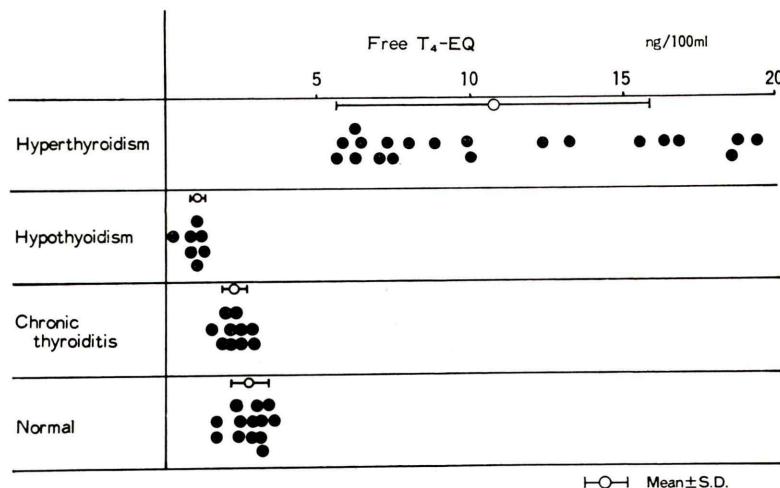


Fig. 6 Free Thyroxine Values by Equilibrium Dialysis in Sera from Various Thyroid Diseases.

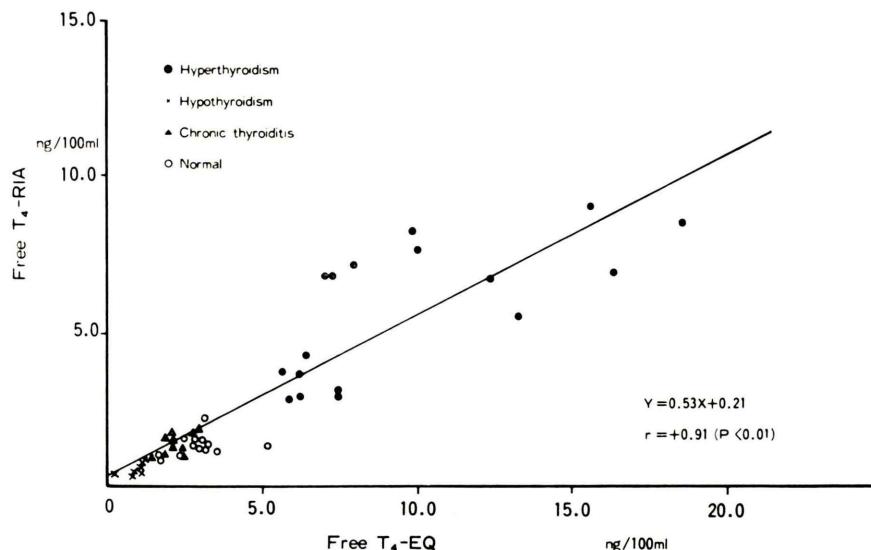


Fig. 7 Comparison Between Free Thyroxine Values by Radioimmunoassay and by Equilibrium Dialysis in Various Thyroid Diseases.

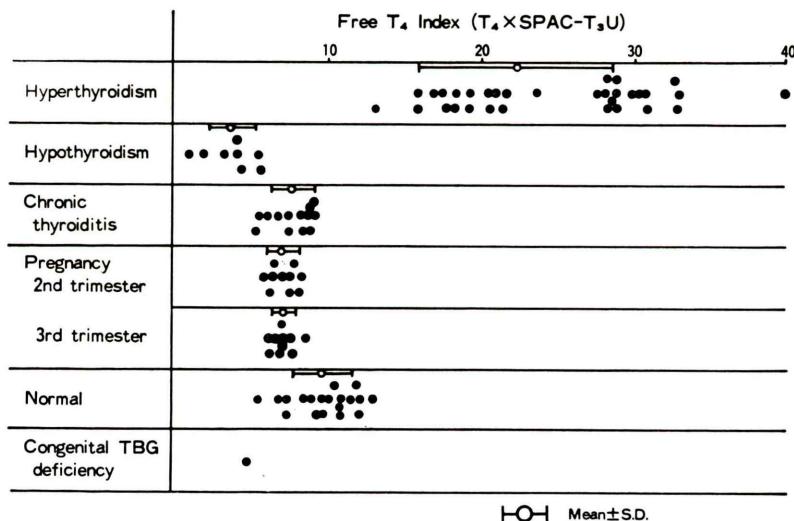


Fig. 8 Free Thyroxine Indices in Sera from Various Thyroid Diseases and Normal Pregnancy.

平衡透析法による Total Free T₄ 値は、正常者では $2.88 \pm 0.88 \text{ ng}/100 \text{ ml}$ 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 T₄ 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 T₄ 値を比較し

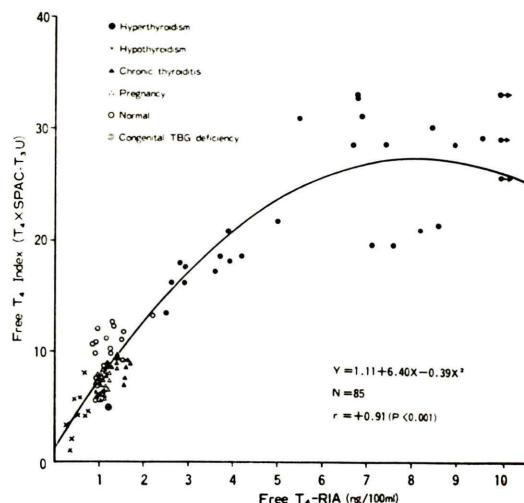


Fig. 9 Comparison Between Free Thyroxine Values by Radioimmunoassay and Free Thyroxine Index in Sera from Various Thyroid Diseases and Normal Pregnancy.

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 T₄ 指数(FT₄I)

FT₄I と RIA 法による Free T₄ 値との診断的意義を比較するために、同一症例について FT₄I を求めた。Fig. 8 および Table 5 に示すように、正常群の FT₄I は 9.67 ± 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 T₄ 値と遊離型 T₄ 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 T₄ 値と FT₄I 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 T₄ は各種の血清 T₄ 結合蛋白、すなわち、血清 T₄ 結合グロブリン(TBG)、T₄ 結合プレアルブミン(TBPA)、およびアルブミンに結合した T₄ 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 T₄ 濃度の 0.02~0.04% とされている^{3,10}。近年、ラジオイノムアッセイ⁵⁻⁷あるいは放射化分析¹¹により透析外液中の遊離型 T₄ 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 T₄ を固相の抗 T₄ 抗体で分離し、次に、T₄ を結合していない抗体の結合部位を¹²⁵I-T₄ の結合率で求めて、間接的に抗体に結合する遊離型 T₄ を測定するもので、従来の方法とは原理的に異なる。

そこで、抗 T₄ 抗体で分離される T₄ 量が、上述の可逆的結合平衡により生じる遊離型 T₄ 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 T₄ は透析内液の血清中の遊離型 T₄ と平衡しており、膜などへの T₄ の吸着および外液の希釈効果を除けば、血中の遊離型 T₄ 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 T₄ の分離も行われた¹²が、セファデックスが T₄ を吸着するために、遊離型 T₄ のほかに結合型 T₄ 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 T₄ に対する親和性は、血清 T₄ 結合蛋白よりも弱いために、小カラムを用いればゲル濾過中に結合型 T₄ を解離・吸着することは少ないと思われる。これに対して本キットでは、T₄ 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 T₄ を分離する点が問題となる可能性がある。

標識 T₄ 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 T₄ (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

釈されているので、この希釈係数を乗じると、“% Free T₄”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T₄量は、可逆的結合平衡で血中に存在する遊離型T₄量より遙かに大きい。本キットの抗体固定試験管は、10 μlの血清中の総T₄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T₄濃度の約1/5000の“遊離型T₄”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T₄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T₄の結合率(%)を求めるとき、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T₄が内因性T₄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T₄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T₄を測定するために、一定量の比較的小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T₄濃度は高いが、抗体に結合する“遊離型T₄”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T₄濃度は低いが、抗体に結合する“遊離型T₄”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 T₄”)は相対的に高値となる。このような“% Free T₄”のparadoxicalな変動は、この測定系に起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T₄は、本来存在した遊離型T₄のみでなく、結合型T₄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T₄”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T₄の結合率によって表わされ、これにより、“遊離型T₄”量が算出される。したがって、原理的にみて、本法は遊離型T₄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 T₄”はこの結合率を何らかの遊離型T₄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T₄”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T₄”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T₄の指標としての有用性を示している。

現在、遊離型T₄濃度の指標として総T₄値とT₃U値とから算出される種々の遊離型T₄指数(FT₄I)が臨床的に用いられている^{8,10,13~16)}。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¹⁰⁾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FT₄I値(T₄×T₃U)とを種々の甲状腺疾患について比較すると、両者間に非直線的関係がみられた。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、FT₄I値はそうでないためである。またFT₄I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FT₄I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、インキュベーショ

ン時間および温度を一定にする必要がある。遊離型 T₄ 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 T₄ 濃度が、その中に含まれる結合蛋白と T₄ 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 T₄” 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 T₄ RIA キットによる血清“遊離型 T₄”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 T₄”を測定し、これらと平衡透析による Free T₄ の測定値、および遊離型 T₄ 指数との比較を行った。

① 本法の Free T₄ 測定原理は、遊離型 T₄ を一定量の抗 T₄ 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 T₄ を用いた基礎検討の結果、抗体に結合する T₄ 量は平衡透析法でみられる遊離型 T₄ 量の 100 倍以上であり、抗体に結合される “% Free T₄” 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 T₄ 量は、平衡透析法で測定される T₄ 量より遙かに多いが遊離型 T₄ 量に平行する。このため、抗体の unbound sites より求められる “Free T₄” 値は平衡透析法による値と平行する。本法の “Free T₄” 値は、Free T₄ 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 T₄” 値は、平衡透析法による Free T₄ 値と直線関係 ($r=+0.91$) を示し、FT₄I 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 T₄”

値は、正常群では 1.21 ± 0.33 (平均土標準偏差)、甲状腺機能亢進症では 6.20 ± 3.24 、機能低下症では 0.50 ± 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 ± 0.11 , 1.16 ± 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 μl の検体量で、簡単な操作で遊離型 T₄ 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深謝致します。

文 献

- Sterling K, Brenner MA: Free thyroxine in human serum: Simplified measurement with the aid of magnesium precipitation. *J Clin Invest* **45**: 153-163, 1966
- 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
- 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
- Schüssler GC, Plager JE: Effect of preliminary purification of ¹³¹I-thyroxine on the determination of free thyroxine in serum. *J Clin Endocrinol Metab* **27**: 242-250, 1967
- Ekins RP, Ellis SM: The radioimmunoassay of free thyroid hormones in serum. In “Thyroid Research,” Proc VIIth Internat Thyroid Conference, (ed. J. Robbins, LE Braverman) Excerpta Medica, Amsterdam-Oxford, American Elsevier Publ Co Inc New York, 1975, pp. 597-600.
- Jiang N-S, Tue KA: Determination of free thyroxine in serum by radioimmunoassay. *Clin Chem* **23**: 1679-1683, 1977
- 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-T₃ 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-T₄ 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-found iodine and resin uptake of ¹³¹I-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 T₄ 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