

《ノート》

Immophase T₃ RIA Kit の 使用 経 験

Studies on the Measurement on Serum Triiodothyronine with Immophase T₃ RIA kit

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

Nobuko KAISE*, Kazuro KAISE*, Katsumi YOSHIDA*,
Hiroyumi KITAOKA*, Hiroshi HUKASAWA*, Toshiro SAKURADA*,
Makiko YAMAMOTO* and Shintaro SAITO*

*The Second Department of Internal Medicine, Tohoku University School of Medicine
1-1, Seiryocho, Sendai

I. は じ め に

血中 triiodothyronine (T₃) の測定は、その血中濃度が微量であるため繁雑な手抜を要し¹⁾、多数検体の処理は困難であった。しかし近年になり T₃ に特異的な抗体が作製され、radioimmunoassay (RIA) が開発されたことにより^{2,3)}、臨床に広く T₃ が測定される様になった。この RIA にはその Bound と Free fraction (B.F) を分離するのに二抗体法³⁾、チャーコール法⁴⁾、ポリエチレングリコール法⁵⁾ および固相法など種々の方法がある。今回我々は、T₃ 結合蛋白と T₃ の結合阻害剤として 8-anilino-1-naphthalene sulfonic acid (ANS)⁷⁾ と Thimerosal を用い、B.F 分離には、抗 T₃ 抗体を多孔性のガラス微粒子に化学的に結合させて用いる固相法による T₃ の RIA kit (Immophase T₃ RIA Test) を試用する機会を得たので、その基礎的なならびに臨床的検討について報告する。

II. 測 定 法

本法の特徴は、抗 T₃ 抗体を化学的に結合させた多孔性のガラス微粒子を用いる固相法であることで、標準血清あるいは患者血清中の T₃ が、標識 T₃ と、incubation 中に、多孔性のガラス微粒子に結合された抗 T₃ 抗体の binding site において競合して結合する。B.F の分離は、ただ単に遠沈するのみで良い。又 T₃ の結合蛋白と T₃ との結合阻害剤として Thimerosal 及び ANS が用いられており、抽出等の操作を必要としない。

本キットには、抗 T₃ 抗体を化学的に結合させた多孔性のガラス微粒子の懸濁液 (0.02% の BSA と 0.01% の Thimerosal を含む 0.15 M saline-0.03 M phosphate buffer P.H. 7.4 に懸濁)、標準 T₃ 血清 (T₃ 濃度が 0, 25, 50, 100, 200, 400 および 800 ng/100 ml) の凍結乾燥品、T₃ 低値および T₃ 高値の control 血清の凍結乾燥品、および ¹²⁵I-T₃ の凍結乾燥品 (0.02% BSA, 0.02% Thimerosal および 0.1% ANS を含む 0.15 M saline-0.03 M phosphate buffer P.H. 7.4) が含まれている。

使用にあたり、標準及び control 血清は 1 バイ

* 東北大学医学部附属病院第二内科

受付：55年7月17日

最終稿受付：55年10月6日

別刷請求先：仙台市星陵町1-1 (番号980)

東北大学医学部附属病院第二内科

海瀬 信子

Key words: Radioimmunoassay, Triiodothyronine hyperthyroidism, hypothyroidism

アルをそれぞれ3mlの再蒸留水で、又¹²⁵I-T₃は1バイアルを5mlの再蒸留水で溶解する。

以下説明書に記された測定操作を示す。

- 1) 標準血清, control 血清および被検血清の50μlをそれぞれの測定用試験管に加える。
- 2) ¹²⁵I-T₃の100μlをそれぞれに加える。
- 3) 多孔性のガラス微粒子に結合した抗T₃抗体の懸濁液の800μlをそれぞれに加える。
- 4) 各試験管を3~4秒間ミキサーで振盪する。
- 5) 室温で2時間incubateする。
- 6) 1,500×g 4°Cで10分間遠心する。
- 7) 上清をdecantし、各々の試験管の放射能を測定し、以下の式によりB/Bo%を算出し、T₃の標準曲線を作製し、それより被検血清のT₃濃度を読みとる。

$$\frac{\text{標準 } T_3 \text{ および各々の sample の bound count (B)}}{\text{標準 } T_3 \text{ 濃度 } 0 \mu\text{g/ml の bound count (Bo)}} \times 100$$

放射能の測定にはウエル型のシンシチレーショングカウンターを用いた。

III. 実験方法ならびに対象

基礎的検討としてincubation温度ならびに時間、intraassay reproducibility, interassay variation, 回収率, 希釈試験, T₄およびrT₃とのcross reactivity, T₃の測定値におよぼすT₄の影響について検討した。

臨床的検討には未治療の甲状腺機能亢進症(甲状腺機能亢進症)25例、正常者30例、および、未治療の原発性甲状腺機能低下症(原発性甲状腺機能低下症)13例の、計68例を対象とした。

IV. 成績

1. 基礎的検討

1) 標準曲線

Fig. 1に本法による標準曲線を示す。Boを100%とし、B/Bo×100で表わしてある。800ng/100mlの濃度では17%に低下し、良好な標準曲線が得られた。

2) Incubation 温度ならびに時間

Fig. 2にincubation温度による影響を、また

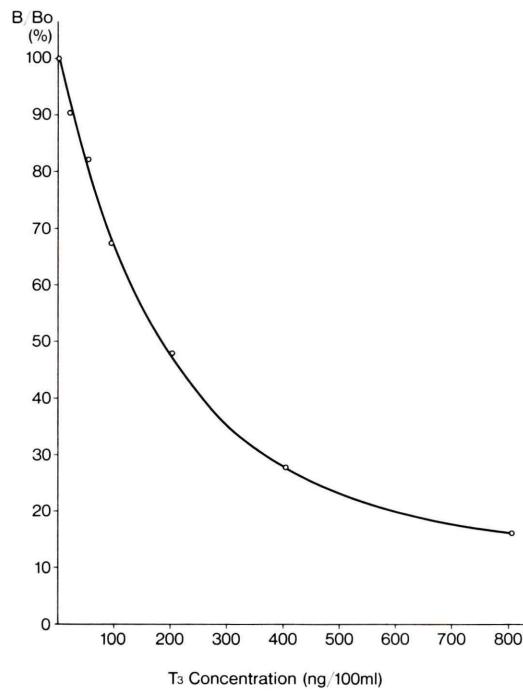


Fig. 1 Standard Curve.

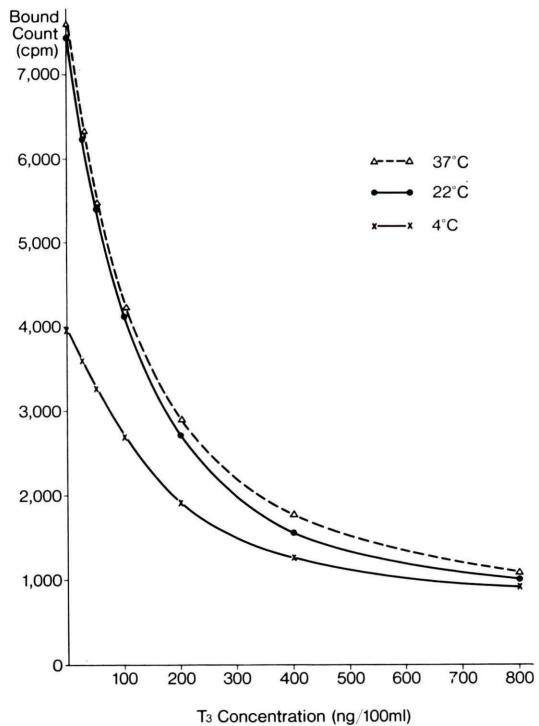


Fig. 2 Influence of incubation temperature.

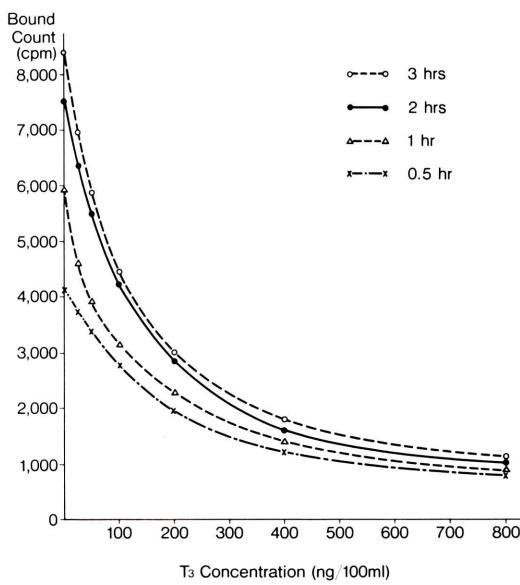


Fig. 3 Influence of incubation time.

Fig. 3 に incubation 時間による影響を示す。incubation 温度は、4°Cではboundする¹²⁵I-T₃のcountの低下が認められたが、22°Cおよび37°Cではほぼ同様の良好な曲線が得られた。incubation 時間は、30分間および1時間ではboundする¹²⁵I-T₃のcountの低下が認められたが、2および3時間ではほぼ同様の良好な曲線が得られた。そこで以後のincubationは22°C、2時間で行った。

3) Intraassay reproducibility 及び interassay variation

T₃濃度が、低値(Serum A)、正常値(Serum B)、及び高値(Serum C)の3種の血清を用い、同一assay内で10回測定して intraassay reproducibility を検討した。結果をTable 1に示す。各血清におけるT₃の変動係数は、T₃低値のSerum Aでは17%とやや高かったが、T₃が正常値および高値のSerum BおよびSerum Cでは、それぞれ6.4%および5.1%と良好であった。

T₃濃度が、低値のSerum D、正常値のSerum Eおよび高値のSerum Fの3種の血清を用い、異なるLotのkitを用い5回測定して interassay variation を検討した結果をTable 2に示す。Serum D、Serum EおよびSerum FにおけるT₃の変動係数はそれ

Table 1 Intraassay reproducibility

No.	Serum A	Serum B	Serum C
1	8	128	400
2	8	136	395
3	12	145	405
4	9	145	410
5	12	137	420
6	8	151	435
7	8	131	460
8	9	160	440
9	10	138	436
10	12	141	455
Mean (ng/100 ml)	9.6	141.2	425.5
S.D.	1.7	9.0	21.7
C.V. (%)	17	6.4	5.1

Table 2 Interassay variation

No.	Serum D	Serum E	Serum F
1	26	136	567
2	34	140	475
3	27	145	486
4	28	155	500
5	32	148	520
Mean (ng/100 ml)	29.4	144.8	508.4
S.D.	3.4	7.3	37.3
C.V. (%)	11.6	5.0	7.3

Table 3 Recovery Test

T ₃ added (ng/100 ml)	Measured (ng/100 ml)	Recovery of added T ₃ (%)
0	54	
50	110	112
100	152	98
200	260	103
400	450	99
	Mean±S.D. 103±5.5 (%)	
0	135	
50	187	104
100	244	109
200	342	103
400	510	93
	Mean±S.D. 102±5.8 (%)	

ぞれ11.6%、5.0%および7.3%と良好であった。

4) 回収率

血清T₃濃度が、54および135ng/100mlの血

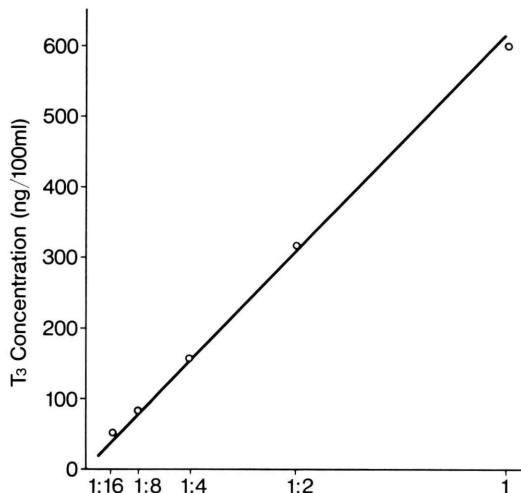


Fig. 4 Dilution test

清に、0, 50, 100, 200 および 400 ng/100 ml の濃度の標準 T₃ 血清を添加して回収率を検討した。Table 3 に示すごとく、加えた T₃ の回収率は 98～112% および 93～109% と良好であった。

5) 希釈試験

甲状腺機能亢進症患者より得た血清を、 T_3 濃度が $0 \text{ ng}/100 \text{ ml}$ の標準血清で、1:2 から 1:16 に希釈して希釈試験を行った。Fig. 4 に示すごとく、良好な直線性が得られ、又、希釈直線もほぼ 0 点に向った。

6) Cross reactivity

T_3 を 100 とすると本キットに用いられた抗 T_3 抗体と L-T₄ との Cross reactivity は 0.31% であり、また rT₃ との cross reactivity は 0.006% であった。

さらに T_3 濃度が $125 \text{ ng}/100 \text{ ml}$ の血清に T_4 をそれぞれ、 $5, 10, 15, 20$ および $25 \text{ ng}/100 \text{ ml}$ 加えて測定した結果は、 T_3 は $122\sim136 \text{ ng}/100 \text{ ml}$ とほぼ変化がなかった。

2. 臨床的檢討

- ### 1) 甲状腺機能亢進症、正常者および原発性甲状腺機能低下症における血清 T₃ 濃度

Fig. 5 に示すごとく、正常者30例における血清 T₃ 濃度の平均値および標準偏差 (S.D.) は 135.9 ± 21.2 ng/100 ml であった。平均値 ± 2 S.D. を正常域とすると、正常域は 93～178 ng/100 ml であった。甲状腺機能亢進症25例では、496 ± 182 ng/100 ml に分布し、正常者に比し 0.1% 以下の危険率で有意の高値を示した。甲状腺機能亢進症で、正常域の T₃ 値を示した例はなかった。原発性甲状腺機能低下症 13 例では、19.8 ± 22.4 ng/100 ml に分布し、正常者に比し 0.1% 以下の危険率で有意の低値を示した。これらの例においても、正常域の T₃ 値を示した例はなかった。

2) 他の RIA キットによる T_3 値との比較

B.F. 分離に polyethyleneglycoal を用いる。T₃ RIA kit II (ダイナボット社) による測定値と、本法による測定値を同一症例において比較検討した。Fig. 6 に示すごとく、両者の相関係数は 0.94 と良好であった。

V. 考案

固相法を用いた radioimmunoassay には、抗体で試験管をコーティングする方法等が報告されて

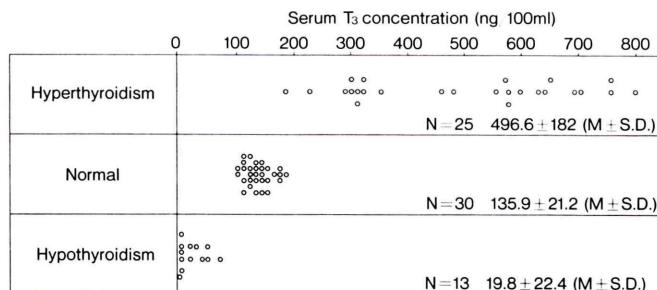


Fig. 5 Serum T₃ concentrations in normal subjects and patients with hyperthyroidism and hypothyroidism.

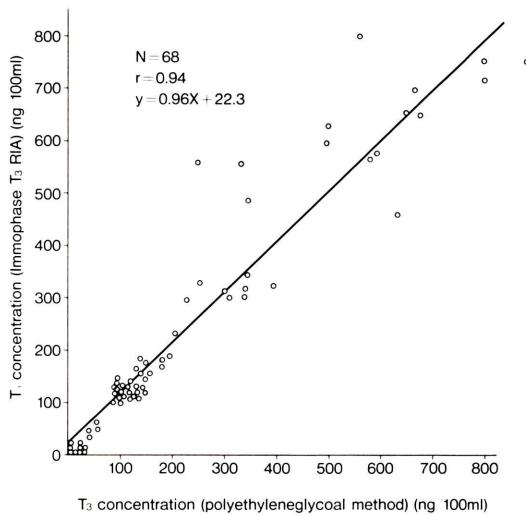


Fig. 6 Correlation of serum T₃ concentrations by T₃ RIA Kit II and Immophase T₃ RIA Kit.

いるが、本法は、抗 T₃ 抗体を化学的に結合させた多孔性のガラス微粒子を懸濁液として用いることが特徴である。そのため B.F. の分離は incubation 後、ただ単に遠沈するのみで良く、簡便であり、又完全な B.F. の分離が得られる。測定操作も簡単で、特に熟練を必要としない。又被検検体量は 50 μ l と、少量で T₃ の測定が可能である。

Incubation 温度ならびに incubation 時間については、22°C および 37°C、また 2 および 3 時間では、ほぼ同様の結果が得られ、incubation 条件は、22°C、2 時間で十分と思われ、短時間で測定を終了することが出来る。

同一 assay 内における intraassay reproducibility は、T₃ 低値の血清ではやや変動係数が高かったが、正常及び高値の血清では良好であった。又異なる Lot 間における interassay variation は、T₃ 値が、低、正常及び高値のいずれの血清でも良好であった。

回収率は平均 103% および 102% と良好であった。また希釈試験も満足できる結果であり、T₃ 高値の血清は希釈して測定することも可能であると思われた。

本抗体の T₄ および rT₃ との cross reactivity は、T₄ との間には 0.31% であったが、実際の測定系に

T₄ を加えて検討した結果では、T₃ の測定値にはほとんど変化はなかった。rT₃ との cross reactivity は低値であった。

臨床成績では、正常者の平均 \pm 2 S.D. を正常域とすると、93~178 ng/100 ml であり、甲状腺機能亢進症では 496 \pm 182 ng/100 ml、原発性甲状腺機能低下症では 19.8 \pm 22.4 ng/100 ml に分布した。両値とも正常域との重なり合いはなく、よく甲状腺機能を反映した。

本法による測定値と従来の polyethyleneglycoal を用いた RIA キットによる測定値との間には良好な相関を認めた。

以上より、本キットは簡便で、精度の良い T₃ の測定キットとして、臨床上有用と思われた。

VI. 結 語

多孔性のガラス微粒子に抗 T₃ 抗体を結合させて用いる固相法による血清 T₃ 測定用キットについて、その基礎的ならびに臨床的検討を行った。本法は B.F. の分離は単に遠沈を行うのみで良く、測定操作も簡単であり、被検検体量も 50 μ l と少量であり、また臨床例における測定値も従来法によるものとよく相関し、臨床上有用なキットと思われた。

本測定に使用した Immophase T₃ RIA kit はコーニング社より提供された。吉永馨教授の御校閲に感謝します。

文 献

- Sterling K, Bellabarba D, Newman ES, et al: Determination of triiodothyronine Concentration in Human Serum. J Clin Invest **48**: 1150, 1972
- Brown BL, Ekins RP, Ellis SM, et al: Specific Antibodies to Triiodothyronine Hormone. Nature **226**: 359, 1970
- Chopra IJ, Solomone DH, Beall GN: Radioimmunoassay for Measurement of Triiodothyronine in Human Serum. J Clin Invest **50**: 2033, 1971
- Sakurada T, Saito S, Yamaguchi T, et al: Radioimmunoassay of Triiodothyronine. Tohoku J exp Med **110**: 329, 1973
- Sekadde CB, Slaunwhite WR Jr, Aceto T Jr:

- Rapid Radioimmunoassay of Triiodothyronine.
Clin Chem **19**: 1016, 1973
- 6) Siegel SJ, Line WF, Yang NS-T, et al: Solid-Phase Triiodothyronine Radioimmunoassay. J Clin Endocrinol Metab **37**: 526, 1973
- 7) Chopra IJ, Ho RS, Lam R: An Improved Radioimmunoassay of Triiodothyronine in Serum: Its Application to Clinical and Physiological Studies. J Lab. Clin Med **80**: 729 1972