

《ノート》

CK-R3A KIT (TRI-TAB RIA) による血中 T₃ 測定法の基礎的ならびに臨床的検討

Fundamental and Clinical Studies of T₃ Radioimmunoassay
by CK-R3A KIT (TRI-TAB RIA)

斎藤 隆* 宮城 英子* 渡辺 正好* 井野 英治*
伊藤 國彦*

Takashi SAITO*, Eiko MIYAGI*, Masayoshi WATANABE*,
Eiji INO* and Kunihiko ITO*

*Ito Hospital

I. 緒 言

現在甲状腺機能検査法の一環として血中トリヨードサイロニン濃度 (T₃) の測定は、日常臨床検査として定着している。その測定法は、1970年 Brown¹⁾らによって抗 T₃ 抗体が得られたことから始まり、RIA 法により確立されたが、現在では各社より多種類のキットが発売されている。今回われわれは、新たに開発された中外製薬 KK のチャコールデキストラン法を用いた CK-R3AKIT (TRI-TABRIA) を試用する機会を得たので、基礎的ならびに臨床的検討の結果を報告する。

II. 対象および方法

対象は、当院を受診した甲状腺機能亢進症20例、機能低下症28例、および正常者69例である。基礎的検討には、甲状腺機能亢進症、機能低下症、および正常者の血清をそれぞれプールしたものを使

用した。

方法は基礎的検討においては、同時再現性、ロット間による測定値の変動、incubation 時間の影響、incubation 温度の影響、回収率、高濃度 T₃ 血清の稀釈による測定値への影響、溶血血清の測定値への影響、交差性試験等を検討した。臨床的検討においては、各種甲状腺疾患の血中 T₃ 値を測定するとともに、甲状腺機能の他の指標である T₄RIA 値 (T₄RIAkitII : ダイナボット RI 研究所)、ならびに PEG 法による T₃RIA 値 (T₃RIAkitII : ダイナボット RI 研究所) との相関を検討した。

キットの内容 (40 テスト用)

1 ²⁵ I-T ₃ 液	18 ml
(3 μ Ci 以下、サリチル酸塩、	
アジ化ナトリウム含有)	
T ₃ 抗体液	18 ml
(アジ化ナトリウム含有)	
吸着錠	40錠 (チャコール含有)
標準血清 A, B, C, D, E 各 4 ml	
(濃度は各バイアルに表示)	
アジ化ナトリウム含有)	

Key words: Triiodothyronine, Radioimmunoassay, Thyroid disease

* 伊藤病院

受付: 55年12月17日

最終稿受付: 56年3月26日

別刷請求先: 渋谷区神宮前436 (〒150)

伊藤病院

斎藤 隆

標準曲線用グラフ 4枚

測定法

- (1) 標準血清および検体 $200\mu\text{l}$ をそれぞれの試験管に分注する。
- (2) $^{125}\text{I}-\text{T}_3$ 液 $400\mu\text{l}$ を加え、よく混和する。
- (3) T_3 抗体液 $400\mu\text{l}$ を加え、よく混和する。
- (4) 室温に $60\sim90$ 分静置する。
- (5) 吸着錠をピンセットで1錠ずつ加えキャップをする。
- (6) (5分以内に) 5秒間激しく振盪、続いて30秒転倒混和する。
- (7) $2,000\sim2,500$ rpm で10分間遠心分離する。
- (8) 上清をアスピレーションまたはデカンテーションにて除去する。
- (9) 沈殿の放射能をカウントする。
- (10) 次式により標準曲線を描き、 T_3 濃度を読みとる。

$$F(\%) = \frac{\text{標準血清(または被検血清)カウント}}{\text{総カウント}} \times 100$$

III. 結 果

1) 基礎的検討

(1) Incubation 時間

incubation 時間の標準曲線に及ぼす影響は Fig. 1 に示すとおりである。incubation 時間を 45 分, 75 分, 105 分と変化させてみたところ、時間の経過と共に $F\%$ がわずかに低下するのがみられたが、ほぼ同様の反応域をもつ平行な標準曲線が得られた。この時間内であればいずれの時間でもよいと思われたので、以下の incubation 時間は、75 分を用いた。

(2) Incubation 温度

incubation 温度の標準曲線に及ぼす影響をみるため incubation 温度を 5°C , 23.5°C (室温), 37°C と変化させてみた結果は Fig. 2 に示すとおりである。標準曲線はほぼ平行し、いずれの温度においてもほぼ同様な反応域が得られた。

(3) 再現性

3 群のプール血清を用いて同時再現性を検討した結果は Table 1 に示すとおりで、各群 10 検体に

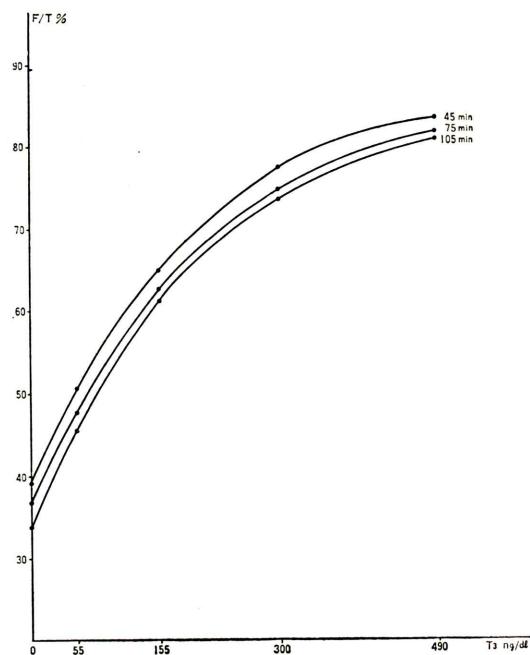


Fig. 1 Effect of incubation time on standard curve.

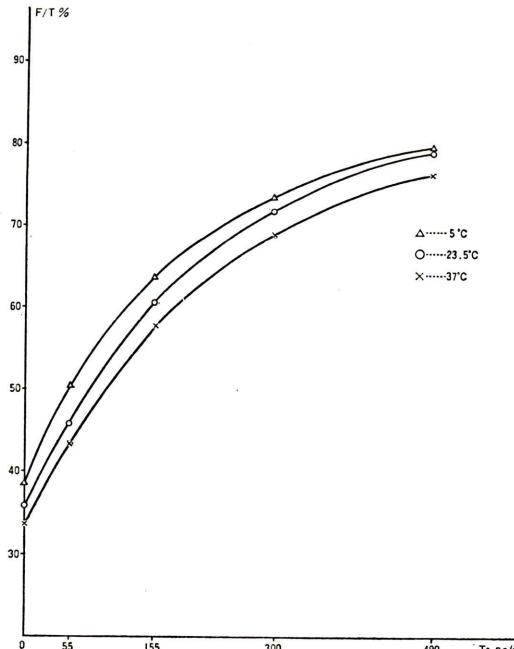


Fig. 2 Effect of incubation temperature on standard curve.

Table 1 Reproducibility

Intra assay			
n	Hypothyroid	Euthyroid	Hyperthyroid
1	101 ng/dl	175 ng/dl	350 ng/dl
2	101	172	357
3	114	183	383
4	102	186	357
5	103	184	359
6	99	173	366
7	115	181	383
8	102	186	370
9	98	202	387
10	98	198	367
m	103	184	368
SD	6.1	9.9	13.5
CV	5.9%	5.4%	3.7%

Inter assay			
Lot	Hypothyroid	Euthyroid	Hyperthyroid
R3-60	104 ng/dl	178 ng/dl	404 ng/dl
R3-61	105	188	425
R3-62	109	196	420
R3-63	100	188	395
R3-64	102	199	385
m	104	189	405
SD	3.4	8.1	16.7
CV	3.3%	4.3%	4.1%

よる平均値(m) ± 標準偏差(SD)、および変動係数(CV)は、甲状腺機能亢進症プール血清では、それぞれ $368 \pm 13.5 \text{ ng/dl}$, 3.7%, 正常者プール血清では、 $184 \pm 9.9 \text{ ng/dl}$, 5.4%, 甲状腺機能低下症プール

血清では、 $103 \pm 6.1 \text{ ng/dl}$ 5.9% であった。また異なるロットによる測定値の変動係数は、甲状腺機能亢進症プール血清で 4.1%，正常者プール血清で 4.3%，機能低下症プール血清で 3.3 % であり、3 群とも再現性は良好であった。

(4) 回収率

回収率は Table 2 に示すように、既知 T₃ 値血清に濃度 55 ng/dl, 155 ng/dl, 300 ng/dl の T₃ を添加して検討したところ、平均 107 % であった。

(5) 稀釀試験

高濃度 T₃ 血清の稀釀による測定値の結果は Fig. 3 に示すとおりである。3 種類の高濃度 T₃ 血清(A, B, C) を 0 濃度標準血清で倍々稀釀して測定したところ、それぞれほぼ一直線上にプロットされた。

(6) 溶血血清による影響

溶血血清の血清 T₃ 値に及ぼす影響を検討した結果を Table 3 に示した。Hb 濃度 0 mg/dl の測定値に対して Hb 濃度 2,130 mg/dl の測定値まではほぼ同様の結果が得られ、軽度の溶血による影響はみられなかった。

(7) 交差性試験

抗 T₃ 抗体の特異性を検討した結果を Fig. 4 に示した。10 mg/dl から 100 mg/dl まで 10 倍ずつ稀釀した T₃ 類似物質と抗 T₃ 抗体との間の交差率は DIT, MIT とは 0.0005% 以下であり、T₄ とは 0.204% であった。今回使用した T₄ は Sigma 社製

Table 2 Recovery test

Sample serum	Added T ₃ values	Calculated values	Observed values	Recovered values	Recovery
65 ng/dl	55 ng/dl	120 ng/dl	145 ng/dl	80 ng/dl	145%
	155	220	233	168	108
	300	365	355	290	97
98 ng/dl	55	153	158	60	109
	155	253	264	166	107
	300	398	389	291	97
181 ng/dl	55	236	243	62	113
	155	336	334	153	99
	300	481	450	269	90
					mean 107%

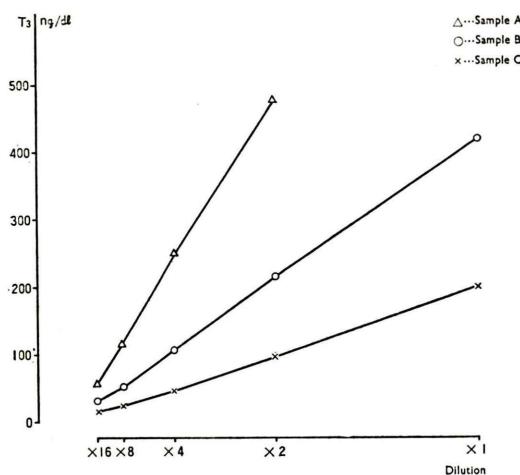


Fig. 3 Dilution test of three sera with high T₃ concentration.

で多少のT₃の混入が考えられ、これまでの報告²⁻⁶でもほぼ同様の結果が示されている。従って本キットの抗体の特異性が劣るとは思われず、血中T₄の影響はほとんど問題にならないと考えられた。

2) 臨床的検討

(1) 各種甲状腺疾患および正常者における血清T₃値

各種甲状腺疾患および正常者における血清T₃値はTable 4に示すとおりで、甲状腺機能亢進症20例では245~560 ng/dlに分布し、平均371±77 ng/dl (mean±SD)であり、機能低下症28例では52~109 ng/dlに分布し、平均83±16 ng/dl、また正常者69例では112~219 ng/dlに分布し、平均163±24 ng/dlであった。同じ血清をPEG法で測定し

Table 3 Effect of hemoglobin on T₃ values

Sample A			Sample B			Sample C		
Hb mg/dl	B/T %	T ₃ ng/dl	Hb mg/dl	B/T %	T ₃ ng/dl	Hb mg/dl	B/T %	T ₃ ng/dl
0	52.3	66	0	66.6	168	0	82.4	426
250	52.4	67	188	65.9	161	800	82.9	439
500	52.6	68	375	65.1	154	1600	80.6	381
1500	52.1	65	750	65.3	155	2130	81.3	396

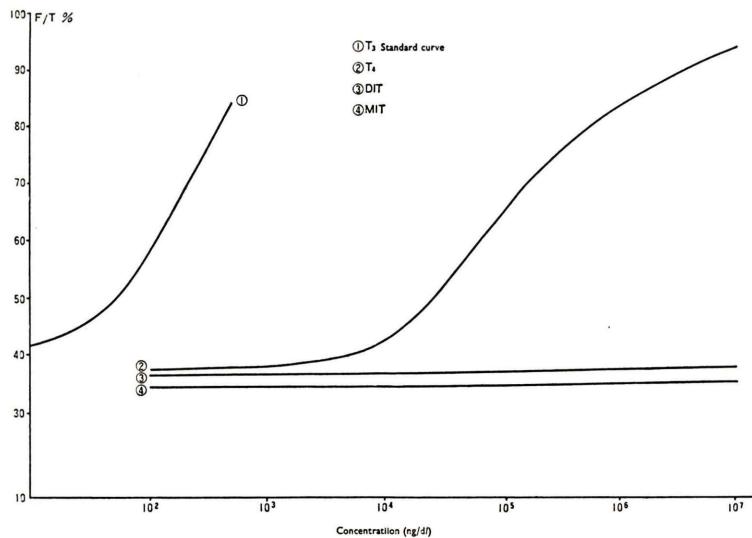
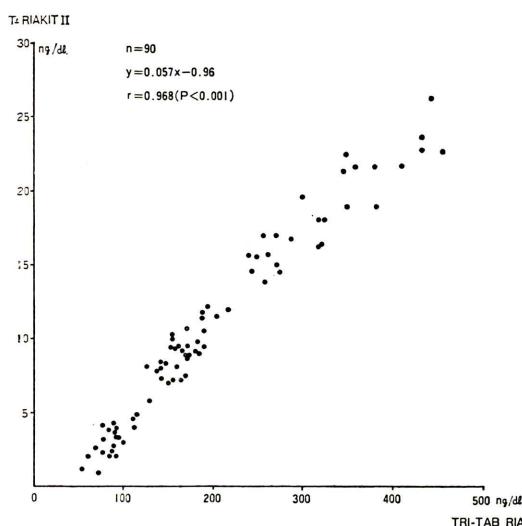
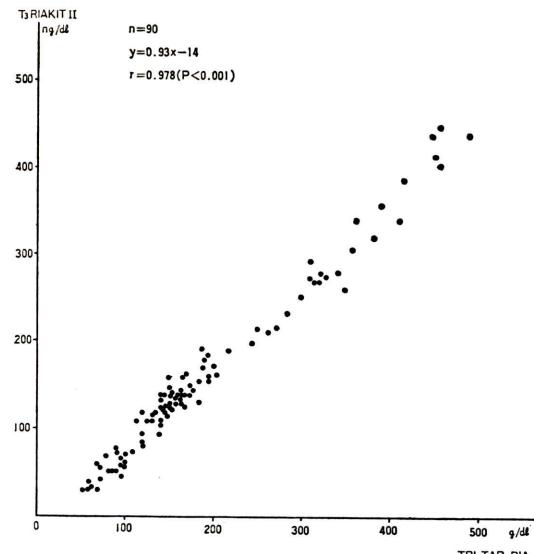


Fig. 4 Evaluation of specificity of anti T₃ antibody.

Table 4 Serum T₃ levels in normal subjects and patients with various thyroid diseases

Subject	n	Range ng/dl	m±SD ng/dl
Euthyroid	69	112~219	163±24
Hyperthyroid	20	245~560	371±77
Hypothyroid	28	52~109	83±16

Fig. 5 Correlation between serum T₄ values by T₄ RIA kit II and serum T₃ values by TRI-TAB RIA.Fig. 6 Correlation between serum T₃ values by T₃ RIA kit II and those by TRI-TAB RIA.

た値は、甲状腺機能亢進症で 210~450 ng/dl に分布し平均 322 ± 77 ng/dl、機能低下症で 30~75 ng/dl に分布し平均 53 ± 15 ng/dl、正常者では 95~195 ng/dl に分布し平均 143 ± 21 ng/dl であり本法による測定値は PEG 法に対して全体的にやや高値となる傾向が見られた。

(2) TRI-TAB RIA と血清 T₄ 値との相関

各種疾患 90 例について、TRI-TAB RIA 値と血清 T₄ 値の相関を検討した結果は Fig. 5 に示すとおりで、相関係数 $r=0.968$ と有意な ($p<0.001$) 正の相関が認められた。

(3) TRI-TAB RIA と T₃ RIA II との相関

各種疾患 90 例について、T₃ RIA II による血清 T₃ 値との相関を検討した結果は Fig. 6 に示すように、相関係数 $r=0.978$ と有意な ($p<0.001$) 正の相関が認められた。

IV. 考 察

日常臨床検査に用いられる RIA キットに望まれることは、精度が優れていること、操作手順が簡便なことであると思われる所以、以下この点について考察してみる。本キットの操作上の長所としては、まず室温で短時間に測定が可能である。血清量 $200 \mu\text{l}$ という量は他キットに比べて多い方ではあるが、むしろ分注しやすい量であると思われる。また、BF 分離においては、チャコールが錠剤であるため 1 個ずつ加えるだけによく、チャコール液の場合のように攪拌をしながら分注を行う繁雑さが無くなり、同時にチャコール液の分注誤差による測定値のバラツキもかなり解消されると思われた。遠心の後われわれはただちにアスピレーションで上清の除去を行ったが、200 検体を 10 分間位で処理する間、チャコールが浮上することもなくしっかりと BF 分離が行えるものと思われた。さらに一検体あたりの放射能量も比較的多いので Count のバラツキが少ないことも大きな利点である。以上の点より本キットは室温で操作手順も簡便であるところから検体の大量処理も可能と考えられた。

測定値の精度に関しては、intraassay の CV は甲

状腺機能亢進症血清で3.7%，正常者血清で5.4%，機能低下症血清で5.9%であり，intraassayでのCVはそれぞれ4.1%，4.3%，3.3%あり，でいずれも良好であった。今回使用した機能低下症のプール血清は intrassay での平均値が 103 ng/dl であり，PEG 法による値は 78 ng/dl と，やや正常域に近い値となつたが，もっと低値を示すようなプール血清を用いれば，CVはもう少し大きくなることが予想される。

incubation 時間については，45分～105分までいずれの時間においてもほぼ同様な成績であったので，この時間内ではいずれの時間でも測定にさしつかえないものと思われた。また incubation 温度についても，室温，4°C，37°C といずれの温度でもほぼ同程度の反応域をもつて平行した標準曲線が得られたので，incubation 温度の許容幅はわりあい広いと考えられた。しかしながら通常の測定では室温によるものが最も簡便な方法であろう。

回収率も平均 107% と良好であった。また稀釀試験も良好であったので，高濃度 T₃ 値が予測される血清では，0 濃度標準血清であらかじめ稀釀することにより十分測定し得ると考えられた。溶血血清の測定値に及ぼす影響では，Hb 濃度 2,130 mg/dl までの溶血では測定値に影響はみられず，軽度の溶血はほとんど問題にならないと思われた。

交差性試験では DIT, MIT との交差は全くみられず，T₄ とは 0.204% の交差率があったが，用いた T₄ に多少の T₃ の混入が考えられることから，本キットの抗 T₃ 抗体の特異性はほぼ満足できるものであり，血清 T₄ の影響はほとんど問題にならないと考えられた。

正常者の T₃ 平均値は 163 ng/dl で，その範囲は 112～219 ng/dl に分布し，甲状腺機能亢進症例の下限値は 245 ng/dl であり，機能低下症例の上限値は 109 ng/dl で，正常者と機能亢進症との分離はきわめて良好であった。またこれまでの報告によると正常者と機能低下症はわずかに重り合いがみられるのが多いが，今回のわれわれの測定では，機能低下症に 1 例のみ正常者との重なり合いがみられただけで，比較的良好に分離された。また甲

状腺機能の他の指標である血清 T₄ 値との相関は相関係数 $r = 0.968$ であり，他キットによる血清 T₃ 値との相関も $r = 0.978$ といずれも良好であった。

今回の測定では PEG 法による値に対して全体的に高めの結果が得られたが，従来の方法による正常者 T₃ 値の報告としては，チャコール法(ダイナボット RI 研)によるものでは，原ら⁷⁾ は 135.8 ± 24.9 (ng/dl) でその範囲は 55～230 ng/dl，カラム法(マイルス三共社)によるものでは，斎藤ら⁸⁾ は 157 ± 23 ng/dl で範囲は 117～214 ng/dl，小野ら⁶⁾ は 129 ± 26 ng/dl で範囲は 88～190 ng/dl であり，陰イオン交換樹脂法(科研化学)によるものでは，嘉手納ら⁹⁾ は 125 ± 42 ng/dl で範囲は 40～211 ng/dl としている。同じチャコール法による報告⁷⁾ でも本法による平均値はわずかに高値を示し，むしろカラム法による斎藤ら⁸⁾ の報告と，平均値，範囲共にほぼ同様の値であった。また同じキットを用いた報告でも多少の差がみられる。これらの差の生ずる原因是 BF 分離法の違いだけでなく，T₃ 標準血清の作成法，TBG 結合阻害剤，T₃ 抗体の性状の相違などその他に，対象とする正常者の数など，種々の要因が考えられるが，そのいずれとも断定はできない。しかしながら本法も含めていずれもキットとしての基礎的条件を満たしており，施設ごとあるはキットごとに正常値の設定を注意して行えば，日常の臨床検査法としては十分満足し得るものであると考えられた。

V. 結論

中外製薬の KK TRI-TAB RIA KIT は，従来の方法に比べて測定のための特別な器具を必要とせず，室温で短時間に測定が可能であり，しかも温度，時間，溶血等による影響もほとんどなく，優れた精度をもつキットである。また甲状腺機能状態をよく反映し，日常の臨床検査法として甲状腺機能の診断に有用であることが認められた。

文 献

- 1) Brown BL, Ekins RP, Ellis SM, et al: specific antibodies to triiodothyronine. Nature 226: 359,

1970

- 2) 伴 良雄, 井上 健, 児島孝典, 他: Radioimmuno assay 法による血中 Triiodothyronine 濃度の測定. 核医学 **11**: 479-485, 1974
- 3) 鎮目和夫, 熊谷雄一: 新版ラジオイムノアッセイ. ○○○出版社 (○○年) p.
- 4) 小西淳二, 中島言子, 森田陸司, 他: T_3 イムノアッセイキットの基礎的ならびに臨床的検討. 核医学 **13**: 196, 1976
- 5) 中川 豊, 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ニンの測定. 核医学 **16**: 50, 1979
- 6) 小野芳子, 高坂唯子, 遠藤啓吾, 他: カラムを用いた T_3 RIA キット “セラリュート T_3 ” の基礎的ならびに臨床的検討. 核医学 **13**: 34, 1976
- 7) 原 正雄, 佐藤一明, 柏森 亮, 他: ラジオイムノアッセイキットによる血中 T_3 の測定. Radioisotopes **23**: 98, 1974
- 8) 斎藤 鑿, 鈴木順一, 太田顕成, 他: Seralute Total T_3 RIA kit の使用経験. 核医学 **12**: 586, 1975
- 9) 嘉手納成之, 鉄木邦治: 科研 T_3 RIA kit を使用した血中 Triiodothyronine (T_3) の測定. 核医学 **13**: 508, 1976