

《ノート》

Tri-Tab RIA KIT (T3) の基礎的検討

Basic Studies of T3 Radioimmunoassay (Tri-Tab RIA KIT)

藤田 祥司* 富樫 和美* 石神 達三* 佐藤 誠也**

Shozi FUZITA*, Kazuyoshi TOGASHI*, Tatsuzo ISHIGAMI*
and Seiya SATO**

*Kitasato Biochemical Laboratories and **Kitasato University School of Medicine

I. はじめに

血中 3, 3', 5-triiodothyronine (トリヨードサイロニン, 以下 T₃) 測定用のラジオイムノアッセイ (RIA) キットは本邦でも数種市販されているが, おのおの B・F 分離法を異にしている¹⁻³⁾. 今回私どもはチャコールを錠剤にして操作の簡易化を試みた新しいキットとして Tri-Tab RIAkit (Nuclear Medical Laboratories 社製) CK-R3A を中外製薬 (株) より入手する機会を得たので以下本キットの基礎的および臨床的検討の結果, ならびにその有用性について報告する.

II. 測定方法

1) 試薬 (40テスト用)

- (1) ¹²⁵I-T₃ (総放射能 < 3 μCi/vial) 18 ml/0.025 M Tris-HCl 緩衝液中に 0.1% ゼラチン, 3% サリチル酸ナトリウム, 0.2% 窒化ナトリウムを含む.
- (2) 抗 T₃ 家兔血清 18 ml/vial
0.025 M Tris-HCl 緩衝液中に 0.1% 家兔血清, 0.2% 窒化ナトリウムを含む.
- (3) adsorbent tablet (吸着錠) 40錠

* 北里バイオケミカルラボラトリーズ

** 同上および北里大学医学部

受付: 56年1月22日

最終稿受付: 56年4月8日

別刷請求先: 相模原市北里 1-15-1 (☎ 228)

北里バイオケミカルラボラトリーズ

藤田 祥 司

錠剤にしたデキストラン-チャコールで, 単位重量当り2~7%のチャコールを含む.

(4) T₃ 標準血清 4 ml/5 vials

T₃ 標準血清は各濃度ごとに調製され, 濃度は各バイアルに表示されている.

これらの試薬は使用時まで4°C 冷蔵庫中に保存する.

2) 測定操作

測定はインキュベーション時間を除き, すべて指示書に従い, 以下の手順で行った.

- (1) 被検血清または標準血清 200 μl を試験管にとる.
- (2) ¹²⁵I-T₃ 溶液 400 μl を加えよく攪拌する.
- (3) T₃-抗体溶液 400 μl を加え攪拌後, 室温で120分間インキュベートする.
- (4) 吸着錠を1錠ずつ加えキャップをした後30秒間攪拌し, 5~10分以内に遠心分離する.
- (5) 2000 rpm で10分間遠心分離 (25°C) 後, 上清を除去する.
- (6) 沈澱物の放射能を γ-counter で計測する.
- (7) 次式より percent free を算出し, 検量線から被検血清の値を読みとる.

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

3) 検討内容

基礎的検討として assay のインキュベーション

Key words: Triiodothyronine Radioimmunoassay
Tri-Tab RIA CK-R3A Thyroid disease

時間および adsorbent tablet 投入後のインキュベーション時間、希釈試験、回収率試験、抗体の特異性などを実施した。またキットの再現性を明らかにする目的で within assay, between assays variation ならびにロット間差を検討した。なお他キットとの相関および臨床的検討は正常人29例、甲状腺機能亢進症21例、および甲状腺機能低下症9例について行った。

III. 成績

1) インキュベーション時間と F/T%との関係 assay のインキュベーション時間を 30, 60, 90, 120, および150分の5段階に分け、T₃ 標準血清ならびにプール血清について F/T% の経時的变化を検討した。結果は Fig. 1 に示したように各濃度とも 120 分以上で平衡に達していることが明らかになった。したがって以下の検討はインキュベーション時間をすべて 2 時間に設定して行った。

2) チャコール錠 (adsorbent tablet) 投入後のインキュベーション時間の検討

B・F分離剤のチャコール錠をチューブ中に投入後の分離能をプール血清を用いて検討した成績を Fig. 2 に示した。

錠剤投入後 5 分間室温静置した場合にはチャコールに吸着される ¹²⁵I-T₃ 量はほぼ一定であり、統

計的に有意な差を見出すことはできなかったが、5分以上放置すると時間とともに free ¹²⁵I-T₃ の吸着量が増加した。したがってチャコール錠を加える操作は、1バッチのすべてのチューブに対して5分以内に終了することが必要と考えられる。つぎに吸着錠を投入後ただちに全チューブを攪拌し、free ¹²⁵I-T₃ のチャコールへの吸着量を時間を

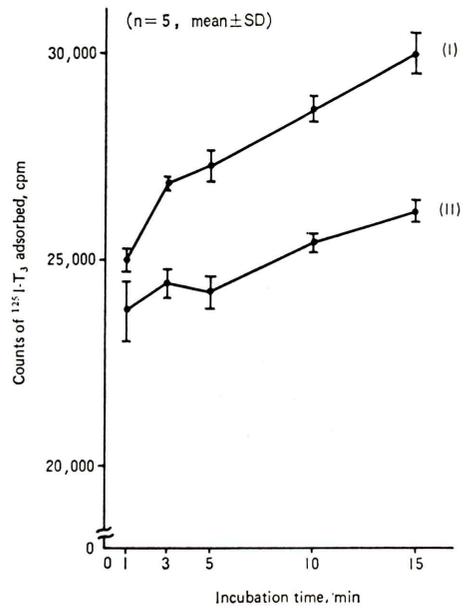


Fig. 2 Effect of incubation time on the adsorption of free ¹²⁵I-T₃ to adsorbent tablet with (I) and without (II) pre-mixing step

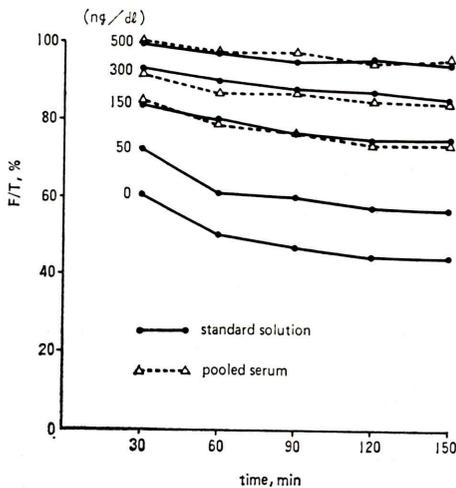


Fig. 1 Effect of incubation time on F/T %

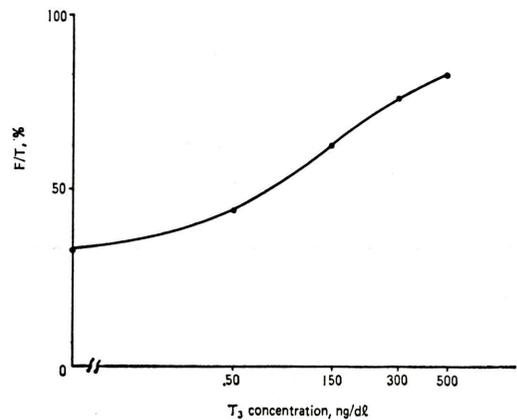


Fig. 3 Standard curve

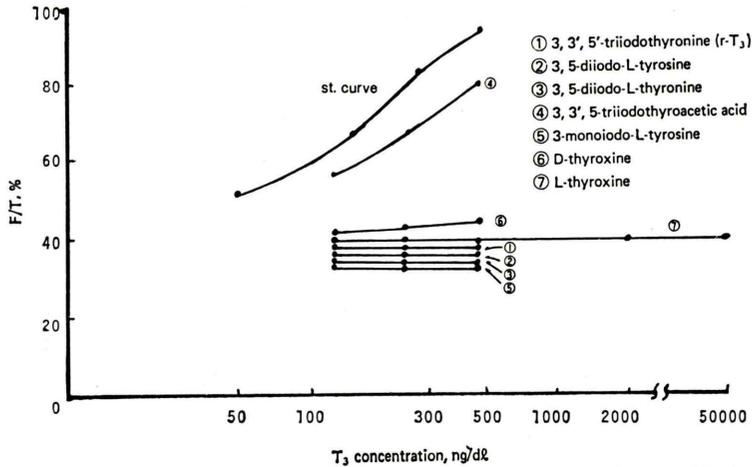


Fig. 4 Cross reactivity of various iodoaminoacids against anti-T3 antibody.

追って検討した。投入後室温放置した場合よりも free% は明らかに高値を示しており、また時間の経過とともに増加する傾向がみられた。以上のように錠剤投入後に攪拌するか否かによって free T₃ の吸着量が著しく変化するため、特に多数検体処理の場合には本操作の時間を厳守する必要がある。

3) 検量線

Fig. 3 に本キットの代表的な検量線を示した。測定範囲は最高濃度 500 ng/dl, 感度は有意差検定 (p<0.05) の結果 30 ng/dl であった。

4) 抗体の特異性

本キットに使用されている抗血清の特異性を調べるために、各種類似ヨード化合物の交叉試験を行った。その結果、Fig. 4 に示したように 3, 3', 5-triiodothyroacetic acid が高い交叉性を示したが、L-thyroxine 以下の他の化合物にはすべて有意の交叉性は見られなかった。

5) 希釈試験

濃度の異なる 3 種類の血清をキット添付のゼロ濃度標準血清で希釈して測定した結果、Fig. 5 に示したように原点を通る良好な希釈曲線が得られた。

6) 回収率試験

既知濃度のプール血清に 3 濃度の標準血清を添加してその回収率を調べたところ、Table 1 に示

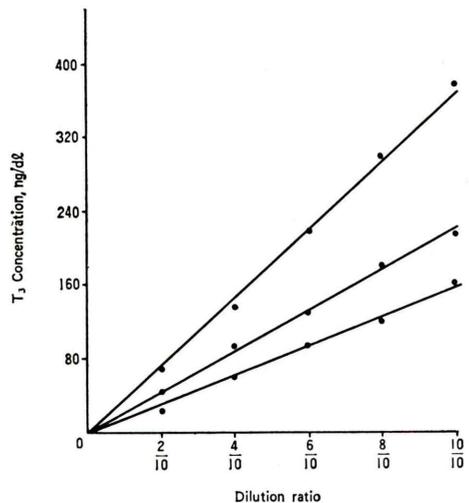


Fig. 5 Dilution test.

したように平均97%と良好な結果が得られた。

7) assay precision

T₃ 濃度低値, 正常値, および高値の 3 種類の血清について within assay variation を検討した結果、Table 2 に示したように平均 CV 5.4%ときわめて良好な成績を示した。同一の血清を用いて検討した between assays variation は低値で CV10.6%のやや大きなバラツキを示したが、平均値は 7.9% と全体としては良好であった。これらの成

Table 1 Recovery test

added	T ₃ (ng/dl) concentration			recovery (%)
	deter-mined	calcu-lated	re-covered	
0	93	—	—	—
75	166	168	73	97
145	233	238	140	97
290	375	383	282	97

Table 2 Accuracy

sample	within assay varia-tion (n=10)		between assays variation (n=5)	
	mean±SD (ng/dl)	CV(%)	mean±SD (ng/dl)	CV(%)
1	47±3.5	7.4	48± 5.1	10.6
2	151± 6.0	4.0	153± 9.8	6.4
3	226±11.1	4.9	225±15.2	6.8
mean		5.4		7.9

績から本キットの precision は充分満足できるものであると結論できる。

8) ロット間変動

有効期間内の異なる4ロットのキットを用いてそれぞれ3濃度のプール血清を同時測定した結果をTable 3に示した。各濃度のCV値はいずれもwithin assay variationのそれとほぼ同程度にとどまっており、検討した範囲内では本キットに有意のロット間差は認められなかった。

9) 他キットとの相関

75例の被検血清について、本キットとダイナボット社のT₃-RIA KIT IIを用い同時測定を行い、その測定値の比較を行った。結果はFig. 6に示したが、両キットの間には相関係数 $r=0.97$ 、回帰直線 $y=1.02x+8.12$ (y: Tri-Tab RIA KIT, x: Dainabot T₃-RIA KIT II)とときわめて良好な相関が認

められた。

IV. 臨床成績

健康成人29例、甲状腺機能亢進症21例、甲状腺機能低下症9例、計59例について測定した結果をFig. 7に示した。

本キットで測定した正常人のT₃濃度は80~180 ng/dlに分布し、mean±SDは 126 ± 22 ng/dlであった。甲状腺機能亢進症では全例180 ng/dl以上に分布し、正常域との重なりはほとんどみられなかった。これに対して甲状腺機能低下症ではT₃濃度が100 ng/dl以下に分布し、一部正常域との重なりが認められた。

V. 考察

甲状腺ホルモンのRIAキットは本邦でも数多く市販されており、最近ではB・F分離法を改善することによって測定の迅速化や簡易化を計る傾向が著しい。今回私どもが検討したNML社のTri-Tab RIA KITはB・F分離法として繁用されているデキストラン・チャコール法の欠点すなわち分注時の不均一性を除く目的でチャコールを錠剤化した点、他キットと異なる特徴といえよう。このような錠剤の採用は均一性のみならず操作の簡易性や迅速性の向上にも大きく寄与している。その反面、他のT₃RIAキットの使用血清量が100 μlを標準としている現状では200 μlを要する点、微量化という観点から今後の改善が望まれる。インキュベーション時間については私どもの成績で明らかかなようにすべての濃度におけるT₃の競合反応は120分で完全に平衡に達している。したがって、今回の検討では120分のインキュベーション

Table 3 Lot-to-lot variation

sample	lot number				mean±SD T ₃ (ng/dl)	CV (%)
	R3-63 T ₃ (ng/dl)	R3-64 T ₃ (ng/dl)	R3-65 T ₃ (ng/dl)	R3-66 T ₃ (ng/dl)		
1	86	87	96	89	90±4.5	5.0
2	139	137	141	156	143±8.7	6.1
3	258	263	264	253	260±5.1	2.0

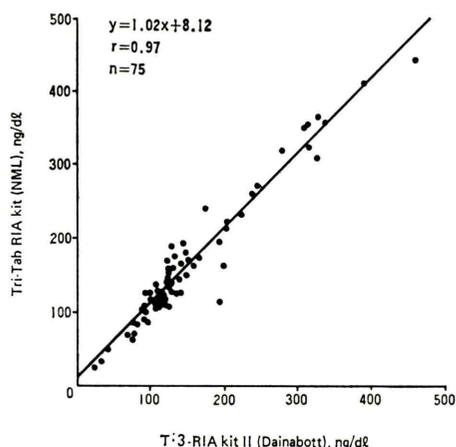


Fig. 6 Correlation between T3 values by Tri-Tab RIA kit and T3 RIA kit II.

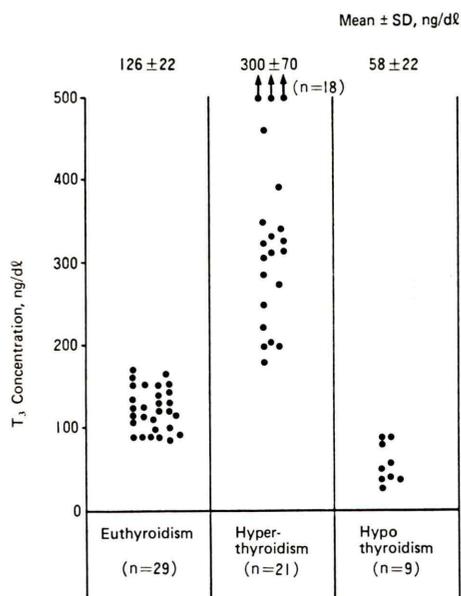


Fig. 7 Serum T3 values by Tri-Tab RIA kit in various thyroid functions.

時間を採用したが、60～90分のインキュベーションでも120分のそれと比較して低濃度域での若干の変動を除けば実用上ほとんど問題はないと考えられる。

吸着錠を投入した後に攪拌を行うか行わないかにより、チャコールに吸着する free の $^{125}\text{I-T}_3$ 量

が大きく異なることが明らかになった。またチャコール添加後のインキュベーションでは時間とともに吸着が進行することから、吸着錠投入後一定時間内での迅速な操作と慎重な取扱いが重要である。

希釈試験の結果は良好な直線性が認められた。今回は最大で5倍希釈までしか検討しなかったが、キットの実用性を知る上では充分であると考えられる。回収率試験の結果も平均97%で良好であった。

抗体の特異性を調べるため、各種のヨードアミノ酸化合物との交差反応性を検討したところ、生理的には存在しない 3, 3', 5-triiodothyro acetic acid とのみ高い交叉性を示した。これに対して reverse T_3 , T_4 , MIT, DIT などとはほとんど交差性を示さず、本抗体の T_3 に対する特異性は極めて高いことが明らかとなった。

本法の精度は within assay variation, between assays variation 共に CV 10% 以下で良好な成績を示しており、他のキットと比較しても遜色のない信頼性が得られた⁴⁻⁹⁾。また本法とダイナボット社の T-3-RIAKIT II との測定値は低値レベルから高値レベルにわたってきわめて高い相関性を示し個々の測定値もほぼ一致していた。

本キットによる正常人29例の測定値は80～180 ng/dl にほぼ正規分布し、mean±SD は 126 ± 22 ng/dl であった。この結果から少数例ではあるが平均値の2SDを正常範囲として計算すると82～170 ng/dl となり、従来のキットで報告されている正常値とほぼ一致していた^{6,7)}。甲状腺機能低下症9例の血清値 T_3 は100 ng/dl 以下に分布し、若干正常域との重なりが見られたが、甲状腺機能亢進症21例では、全例180 ng/dl 以上に分布した。このように本キットによる血中 T_3 値の測定は従来報告されている市販キットとほぼ同様に、甲状腺機能を把握する上で有用な測定法であることが示唆された。

VI. 結 論

私どもは NML 社製 Tri-TAB RIA KIT の基礎

的ならびに臨床的検討を行い、下記の結果から本キットが甲状腺疾患の診断に有用な簡易でかつ迅速な測定法であることを確認した。

(1) インキュベーション時間はキット添付の指示書に記載される60～90分よりも、2時間がより適当であると考えられる。

(2) 吸着錠投入後は攪拌ならびに放置時間等、その操作に十分な注意を要する。

(3) 再現性、回収率および希釈試験の結果はいずれも良好であった。

(4) 本キットとダイナボット社 T-3-RIA KIT II との測定値は相関係数0.97と強い相関を示した。

(5) 本法による正常値の範囲は82～170 ng/dl, mean±SD は126±22 ng/dlであった。また甲状腺疾患患者30例についての測定では従来のキットとほぼ同様甲状腺機能を良く反映しており、操作の簡便な本キットは臨床的に有用であると考えられた。

稿を終るにあたりキットを提供していただいた中外製薬㈱に深謝いたします。

文 献

- 1) 宮井 潔, 中谷清美: Triiodothyronine radioimmuno assay (Gamma coat-Solid phase) の基礎検討と臨床応用. 基礎と臨床 12: 261-266, 1978
- 2) 伊藤国彦: Gamma coat T₄ Radioimmunoassay kit, ならびに Gamma coat T₃ Radioimmuno assay kit の使用経験. 現代医療 10: 1383-1388, 1978
- 3) 宮本正治, 伴 良雄, 飯野史郎, 他: RIA-gnost T₃ による血中 T₃ 値の測定について. ホルモンと臨床 27: 401-406, 1979
- 4) 仁瓶禮之, 池田 靖: 固相法を用いたトリヨードサイロニンラジオイムノアッセイ法の検討. ホルモンと臨床 26: 417-420, 1978
- 5) 中川光二, 小原孝雄: トリヨードサイロニン“榮研”による血清トリヨードサイロニンの測定. ホルモンと臨床 26: 193-195, 1978
- 6) 満間照典, 鰐部春松, 山内一征: Triiodothyronine radioimmunoassay-T₃ リアキット II の検討—ホルモンと臨床 24: 1297-1301
- 7) 伴 良雄, 貴田智子, 飯野史郎, 他: 固相法による Phadebas T₃ RIA キットの基礎的ならびに臨床的検討. ホルモンと臨床 27: 397-400, 1979
- 8) 分校久志, 杉原政美, 久田欣一: レジンストリップ法によるトリヨードサイロニンラジオイムノアッセイキットの基礎的・臨床的検討. 核医学 15: 111-115, 1978
- 9) 高原淑子, 石橋章彦, 与那原良夫: スパック T₃ RIA キットによる血中 triiodothyronine (T₃) の測定. ホルモンと臨床 27: 1313-1317, 1979