

《ノート》

ダイナボット T₃ RIA KIT III による血清 T₃ の測定Measurement of Serum T₃ Concentration by Dainabot T₃ RIA KIT III

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

Hirofumi KITAOKA*, Toshiro SAKURADA*, Katsumi YOSHIDA*, Hiroshi FUKAZAWA*,
Nobuko KAISE*, Kazuo KAISE*, Makiko YAMAMOTO* and Shintaro SAITO*

*The 2nd Department of Internal Medicine, Tohoku University School of Medicine, Sendai, Japan

I. 緒 言

Yallow¹⁾ らによって、insulin の測定法として開発された radioimmunoassay は、甲状腺ホルモンの測定にも応用され、Brown²⁾ らにより triiodothyronine (T₃) の測定にも導入された。その後、諸家³⁻⁹⁾ により改良がほどこされ、現在では甲状腺機能の日常検査法として、多種の T₃ 測定用キットが発売され、広く臨床に用いられるようになっていく。

今回、われわれは B-F 分離に抗 T₃ 抗体をコーティングしたプラスチックビーズを用いた固相法のダイナボット T₃ RIA KIT III を入手する機会を得たので、その基礎的および臨床的検討を行うとともに、日常臨床検査法としての有用性についても検討した。

II. 方 法

A. 本キットの内容 (50 検体用)

1) ¹²⁵I 標識 T₃ 溶液 (11 ml, 1 バイアル)

¹²⁵I-T₃ が ANS を含む 0.01 M bicarbonate buffer

に希釈されている。

2) T₃ 標準液 (各 0.5 ml, 6 バイアル)

牛血清中の T₃ 濃度が 0, 50, 100, 200, 400 および 800 ng/100 ml となるように調製されている。

3) 抗 T₃ 抗体コーティングビーズ (50個) 抗 T₃ 家兎血清が直径 1/4 インチのプラスチックビーズにコーティングされている。

B. 測定方法 (Fig. 1)

キットに示された方法にしたがって、次のように行った。

1) T₃ 標準液および被検血清のおのおの 50 μ l を試験管に加える。

2) すべての試験管および total count 用試験管に ¹²⁵I-T₃ 溶液 200 μ l を加える。

3) 抗 T₃ 抗体コーティングビーズをビーズデイスペンサーを用いて、各試験管に 1 個ずつ入れ、ボルテックスミキサーで十分に混和する。

4) 室温で 2 時間 incubation する。

5) incubation 終了後、蒸留水 1 ml をすべての試験管に加える。

6) Aspiration または decantation により反応液を除去する。

7) すべての試験管および total count 用試験管の放射能を γ シンチレーションカウンターで測

Key words: Triiodothyronine, Radioimmunoassay, Solid Phase Method

* 東北大学医学部第二内科

受付: 56 年 3 月 23 日

最終稿受付: 56 年 6 月 12 日

別刷請求先: 仙台市星陵町 1-1 (☎ 980)

東北大学医学部附属病院第二内科

貴田岡 博 史

定し, Bound (B) および Total (T) を求める.

8) それぞれの B/T% を計算する.

9) 標準液の B/T% より標準曲線を作成し, 被検血清の濃度を求める.

III. 対 象

東北大学医学部第2内科外来および入院患者で, 臨床症状および諸検査にて診断した, 甲状腺機能正常者 (Euthyroidism) 68 例, 甲状腺機能低下症 (Hypothyroidism) 21 例, 甲状腺機能亢進症 (Hyperthyroidism) 28 例, 甲状腺機能亢進症に抗甲状腺剤治療中で euthyroid state にあるもの (Treated hyperthyroidism) 10 例, 亜急性甲状腺炎 (Subacute thyroiditis) 10 例および正常妊婦 (Pregnancy) 20 例の計157例を対象とした.

IV. 結 果

A. 基礎的検討

1) Incubation 温度の影響

Incubation 温度の標準曲線に及ぼす影響を検討するために, incubation の温度を 4°C, 室温 (本キットの指定温度) および 37°C とした時の血清 T₃ の標準曲線 (Fig. 2) を作成した. それぞれの温度の標準曲線は, 温度の低下とともに B/T% の低下の傾向を示していたが, 室温と 37°C ではほぼ同様の曲線が得られた. それぞれの標準曲線から

求めた甲状腺機能低下症, 正常者および機能亢進症の3例の血清 T₃ の測定値を Table 1 に示すが, 4°C で得られた値は室温および 37°C の値にくらべて高値であった.

2) Incubation 時間の影響

Incubation 時間の標準曲線におよぼす影響を検討するために, incubation 時間を1時間, 2時間 (本キットの指定時間) および3時間とした時の標準曲線 (Fig. 3) を作成したが, incubation 時間の延長とともに B/T% の上昇がみとめられた. それぞれの標準曲線から求めた三種類の血清 T₃ の測

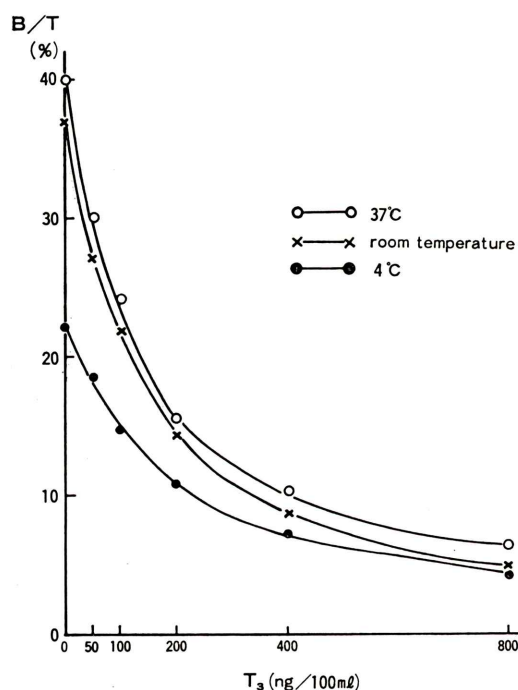


Fig. 2 Effect of incubation temperature on T₃ standard curve.

Table 1 T₃ values obtained at different incubation temperature

Incubation temperature	Serum No.		
	1	2	3
37°C	80	123	276
20°C	87	143	292
4°C	158	205	365

(ng/100 ml)

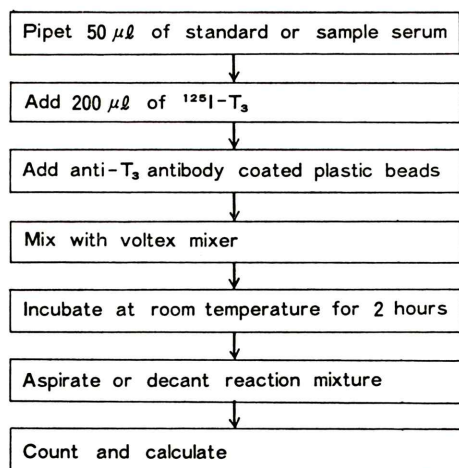


Fig. 1 Assay procedure.

定値を Table 2 に示す。1 時間の incubation による甲状腺機能低下症、正常者および亢進症の 3 例の血清 T₃ 値は、2 および 3 時間の incubation により得た値より高値を示していた。

3) 交叉反応 (Fig. 4)

本キットの抗 T₃ 抗体の特異性について調べるために、非放射性的 reverse T₃ (rT₃) および T₄

をそれぞれ 100, 1,000, 10,000, 100,000 および 1,000,000 ng/100 ml ずつ加え、これらの ¹²⁵I-T₃ の結合におよぼす免疫交叉性について検討した。血清 T₃ 濃度が 0 ng/100 ml の ¹²⁵I-T₃ と抗 T₃ 抗体との結合を 100% にした場合に、これを 50% 抑制する rT₃ および T₃ の % 交叉率は、それぞれ 0.046% および 0.023% 以下であった。

4) 精度および再現性

i) Intraassay reproducibility (Table 3)

血清 T₃ 濃度が低値、正常値および高値の三種類の血清について、同一の assay で 10 回測定した際の平均標準偏差 (Mean ± S.D.) はそれぞれ 52.2 ± 3.8, 142.1 ± 8.3 および 368.3 ± 17.5 ng/100 ml であり、それぞれの変動係数 (C.V.) は 7.2, 5.8 および 4.7% であった。

ii) Interassay variation (Table 4)

血清 T₃ 濃度が低値、正常値および高値の三種類の血清について、異なった Lot のキットで 7 回繰返して測定した際の血清 T₃ 値は平均 80.7 ± 6.6, 134.6 ± 10.6 および 325.6 ± 23.7 ng/ml であり、そ

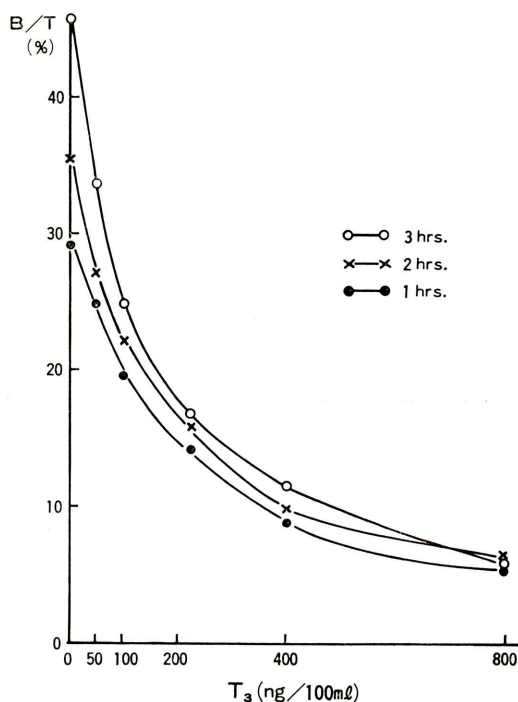


Fig. 3 Effect of incubation time on T₃ standard curve.

Table 2 T₃ values obtained at different incubation time

Incubation Time	Serum No.		
	1	2	3
1 hr	120	156	328
2 hrs	77	126	334
3 hrs	72	125	316

(ng/100 ml)

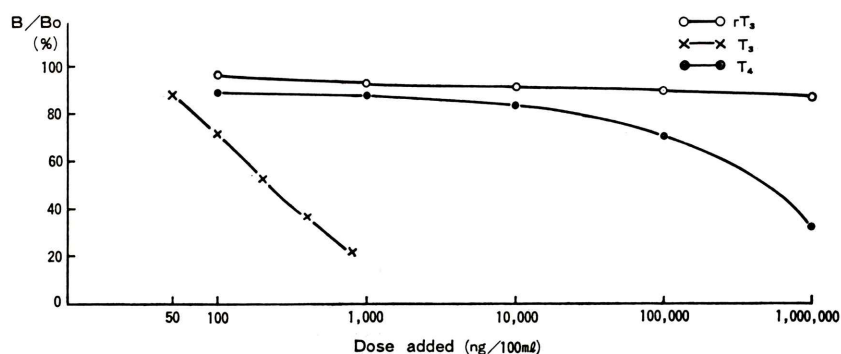


Fig. 4 Cross reaction of T₄ and rT₃ with anti-T₃ antibody.

Table 3 Intraassay reproducibility

Assay No.	Serum		
	1	2	3
1	47	127	367
2	49	144	345
3	52	145	344
4	48	148	375
5	58	138	344
6	52	150	375
7	56	140	385
8	52	138	385
9	51	138	385
10	57	153	378
Mean	52.2	142.1	368.3
S.D.	3.8	8.3	17.5
C.V. (%)	7.2	5.8	4.7

(ng/100 ml)

Table 4 Interassay variation

Lot No.	Serum		
	1	2	3
1	90	138	295
2	77	126	334
3	87	143	292
4	75	121	322
5	73	149	341
6	85	125	350
7	78	140	345
Mean	80.7	134.6	325.6
S.D.	6.6	10.6	23.7
C.V. (%)	8.1	7.6	7.3

(ng/100 ml)

それぞれの C.V. は 8.1, 7.6 および 7.3% であった.

5) 希釈試験 (Fig. 5)

未治療の甲状腺機能亢進症患者血清を T_3 濃度が 0 ng/100 ml の標準血清で 2, 4, 8 および 16 倍に希釈して得た希釈曲線は 0 点に向うほぼ一直線となり, 良好な結果が得られた.

6) Recovery test (Table 5)

血清 T_3 濃度がそれぞれ 50, 100 および 200 ng/100 ml の三種類の血清 25 μ l に標準血清 0, 50, 100, 200, 400 および 800 ng/100 ml をそれぞれ 25 μ l ずつ加えて行って得た回収率は平均 101.2, 99.6

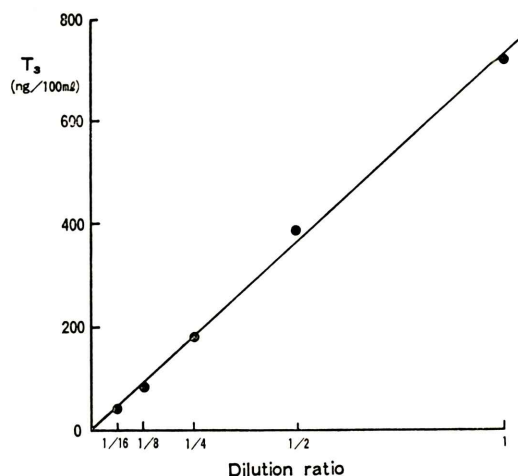


Fig. 5 Dilution curve.

Table 5 Recovery test

Original T_3 + T_3 added (ng/100ml)	Calculated value (A) (ng/100ml)	Measured value (B) (ng/100ml)	$\frac{B}{A} \times 100$ (%)	Average (%)
50+0	25	24	96	101.2
50+100	75	80	107	
50+200	125	130	104	
50+400	225	234	104	
50+800	425	410	96	
100+0	50	46	92	99.6
100+50	75	77	103	
100+200	150	155	103	
100+400	250	256	102	
100+800	450	440	98	
200+0	100	101	101	101.2
200+50	125	135	108	
200+100	150	145	97	
200+400	300	302	101	
200+800	500	493	99	

および 101.2% であり, きわめて良好な結果が得られた.

B. 臨床的検討

1) 正常者, 各種甲状腺疾患および正常妊婦における本キットによる血清 T_3 値 (Fig. 6, Table 6)

甲状腺機能正常 68 者例では 87~185 ng/100 ml の間に分布し, 平均 137.0 ± 23.2 ng/100 ml であった. 正常範囲を $\text{Mean} \pm 2 \text{ S.D.}$ より求めると 90.6~183.4 ng/100 ml であった. また, 甲状腺機能低下症 21 例では 42~87 ng/100 ml の間に分布し, 平均 63.6 ± 13.9 ng/100 ml と低値を示し, 甲

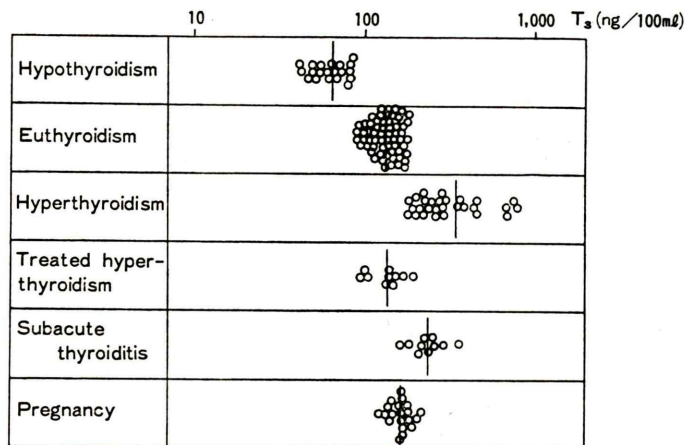

Fig. 6 Serum T₃ concentration by Dainabot T₃ RIA KIT III.

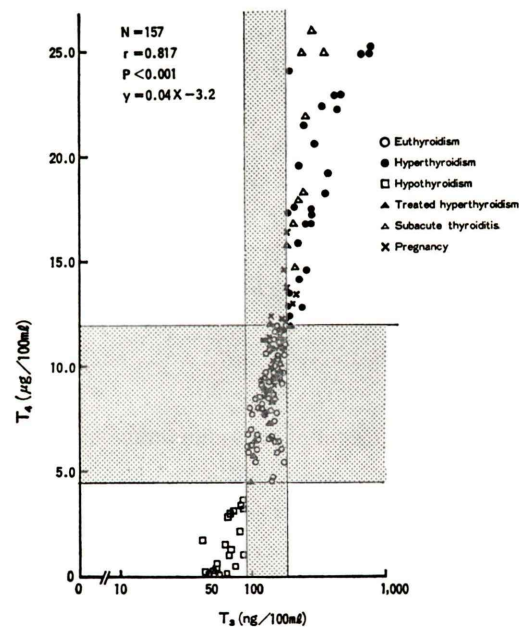
Table 6 Serum T₃ concentrations in various thyroidal illness and pregnancy

Subjects	No.	Range (ng/100ml)	Mean±S.D. (ng/100 ml)
Euthyroidism	68	87-185	137.0± 23.2
Hypothyroidism	21	42- 87	63.6± 13.9
Hyperthyroidism	28	180-800	343.2±181.0
Treated hyperthyroidism (euthyroid state)	10	95-195	137.2± 30.8
Subacute thyroiditis	10	164-358	238.5± 56.1
Pregnancy	20	122-212	164.8± 22.8

甲状腺機能亢進症28例では180～800 ng/100 ml の間に分布し、平均 343.2±181.0 ng/100 ml と高値を示していた。治療中の甲状腺機能亢進症(euthyroid state) 10 例では95～195 ng/100 ml の間に分布し、平均 137.2±30.8 ng/100 ml で10例中 1 例が高値を示していた。亜急性甲状腺炎10例では164～358 ng/100 ml の間に分布し、平均 238±56.1 ng/100 ml で10例中 8 例が高値を示していた。また、正常妊婦20例では 122～212 ng/100 ml の間に分布し、平均 164.8±22.8 ng/100 ml で20例中 2 例が高値を示していた。

2) 本キットにより得られた血清 T₃ 値とダイナボット T₄ RIA KIT II による血清 T₄ 値との関係 (Fig. 7)

正常者、各種甲状腺疾患および正常妊婦計 157


Fig. 7 Correlation of serum T₃ values obtained by Dainabot T₃ RIA KIT III with serum T₄ values obtained by Dainabot T₄ RIA KIT II.

例について検討した結果、本キットによる血清 T₃ 値とダイナボット T₄ RIA KIT II による血清 T₄ 値の間には相関係数 $r=0.817$ と有意 ($p<0.001$) の正の相関がみとめられた。

3) 本キットにより得られた血清 T₃ 値とダイ

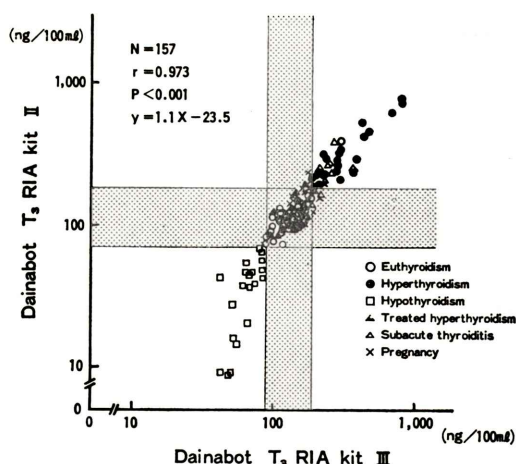


Fig. 8 Correlation of serum T_3 values obtained by Dainabot T_3 RIA KIT III with those by Dainabot T_3 RIA KIT II.

ナボット T_3 RIA KIT II による血清 T_3 値との関係 (Fig. 8)

正常者, 各種甲状腺疾患および正常妊婦計 157 例における本キットによる血 T_3 清値とダイナボット T_3 RIA KIT II による血清 T_3 値との間には相関係数 $r=0.973$ と有意 ($p<0.001$) の正の相関がみとめられたが, 全体として, 本キットにより得られた血清 T_3 は, やや高値を示していた。

V. 考 察

Catt¹⁰⁾ らは solid phase radioimmunoassay をはじめて成長ホルモンの測定に導入し, さらにチューブの内壁に抗体をコーティングする方法¹¹⁾に発展させた。その結果, radioimmunoassay の測定操作の簡略化が可能となった。 T_3 の solid phase radioimmunoassay に関しても, Siegel¹²⁾ らの最初の報告以来, 種々の solid phase radioimmunoassay のキットが開発され, 検討されている¹³⁻¹⁷⁾。

今回われわれが検討したダイナボット T_3 RIA KIT III は, B-F 分離に抗 T_3 体をコーティングしたプラスチックビーズを用いた solid phase radioimmunoassay 法で, これにより従来より少ない検体量で血清 T_3 を測定でき, さらに B-F 分離の際の遠心操作が省略され, 簡便化された。

基礎的検討についてみると, incubation 温度の変化により B/T% は影響を受け, 室温および 37°C ではほぼ同様の標準曲線が得られたが, 4°C では B/T% が低下し, 急峻な標準曲線は得られなかった。また, incubation 温度を変えて求めた三種類の血清の T_3 値は室温および 37°C ではほぼ同様であった。したがって, 他のいくつかの固相法による T_3 の RIA キットは 37°C の incubation 温度で行われているが, 本キットでは指定された室温で十分であると思われる。

一方, incubation 時間を変化させることによっても, B/T% は影響を受け, incubation 時間が長いほど, B/T% は高値となる傾向を示していた。また, 三種類の血清では 1 時間の incubation による甲状腺機能低下症および正常者の T_3 値は 2 時間および 3 時間の incubation で得られた値にくらべ, 高値を示していた。したがって, 正確な血清 T_3 値を得るためには, 本キットに指定された 2 時間あるいはそれ以上の incubation が必要と考えられる。

交叉反応についてみると, rT_3 および T_4 との %交叉率は 0.046 および 0.023% 以下であり, 本キットの抗 T_3 抗体は T_3 に特異的で日常検査に十分使用し得ることが確認された。

Intraassay reproducibility および interassay variation で検討した本キットの精度および再現性は良好であった。

高 T_3 血清を T_3 0 ng/100 ml の標準血清で稀釈して求めた稀釈曲線は 0 点に向うほぼ一直線となり, 高 T_3 血清を稀釈して測定しても支障がないものと思われた。

T_3 の回収率を三種類の血清で検討したが, いずれの平均値も 100% 前後で非常に良好な結果であった。

臨床的検討についてみると, 本キットで測定した血清 T_3 値は甲状腺機能正常者で平均 137.0 ± 23.2 ng/100 ml, 甲状腺機能低下症で平均 63.6 ± 13.9 ng/100 ml, および甲状腺機能亢進症で平均 343.2 ± 181.0 ng/100 ml であり, 正常者と機能低下症および機能亢進症の間には一部重なり合いが

みとめられたものの、諸家^{5, 7, 8, 13, 14, 16, 17, 19)}の報告とほぼ一致した成績であった。また、治療中の甲状腺機能亢進症 (euthyroid state) は平均 137.2 ± 30.8 ng/100 ml で正常者の平均値とほぼ一致していた。亜急性甲状腺炎は平均 238.5 ± 56.1 ng/100 ml で、正常者に比べ有意 ($p < 0.001$) に高値を、また機能亢進症に比べ有意 ($p < 0.001$) に低値を示していた。正常妊婦では平均 164.8 ± 22.8 ng/100 ml で正常者に比べ有意 ($p < 0.001$) に高値を示していたが、これは thyroxine binding globulin (TBG) の増加によることが考えられた。

また、本キットによって得られた血清 T₃ 値とダイナボット T₄ RIA KIT II による血清 T₄ 値およびダイナボット T₃ RIA KIT II による血清 T₃ 値の関係を比較検討したが、いずれも良好な正の相関が得られた。

VI. 結 語

ダイナボット T₃ RIA KIT III の基礎的および臨床的検討を行ない、つぎの結果が得られた。

1) Incubation 温度は室温に指定されているが、37°C でも同様の測定値が得られた。

2) Incubation 時間は2時間以上が望ましいと思われた。

3) rT₄ および T₄ と本キットの抗 T₃ 抗体との交叉反応は低値であり、rT₃ および T₄ が測定値に影響をおよぼす可能性はほとんどないと考えられた。

4) Intraassay reproducibility および interassay variation において、ともに満足すべき結果が得られた。

5) 稀釈曲線は良好で、高血 T₃ 清を稀釈して測定できることが確認された。

6) 回収率は良好であった。

7) 本キットにより得られた血清 T₃ 値は甲状腺機能状態をよく反映していた。

8) 血清値および他キットによる血清 T₃ 値と本キットによる血清 T₃ 値の間には、良好な正の相関がみとめられた。

以上の結果により、本キットは簡便で、感度、

特異性、精度および再現性にすぐれており、かつ少量の検体を用いて一度に多数の測定を行うことが可能であり、日常の臨床検査法として有用であると考えられる。

吉永馨教授のご校閲を感謝します。

キットをご提供下さいましたダイナボット社に感謝します。

文 献

- 1) Yallow RS, Berson SA: Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J Clin Invest* **39**: 1157-1175, 1960
- 2) Brown BL, Ekins RP, Ellis SM, et al: Specific antibodies to triiodothyronine hormone. *Nature* **226**: 359, 1970
- 3) Gharib H, Ryan RJ, Mayberry WE, et al: Radioimmunoassay for triiodothyronine (T₃): I. affinity and specificity of the antibody for T₃. *J Clin Endocrinol Metab* **33**: 509-516, 1971
- 4) Chopra IJ, Solomon DH, Beall GN: Radioimmunoassay for measurement of triiodothyronine in human serum. *J Clin Invest* **50**: 2033-2041, 1971
- 5) Mitsuma T, Nihei N, Gershengorn MC, et al: Serum triiodothyronine: measurements in human serum by radioimmunoassay with corroboration by gas-liquid chromatography. *J Clin Invest* **50**: 2679-2688, 1971
- 6) Lieblisch J, Utiger RD: Triiodothyronine radioimmunoassay. *J Clin Invest* **51**: 157-166, 1972
- 7) Larsen PR: Direct immunoassay of triiodothyronine in human serum. *J Clin Invest* **51**: 1939-1949, 1972
- 8) 桜田俊郎, 山口 徹, 山本蒨子, 他: Triiodothyronine の radioimmunoassay. *日内分泌誌* **48**: 559-568, 1972
- 9) 満間照典: 甲状腺ホルモン triiodothyronine (T₃) の radioimmunoassay. *最新医学* **28**: 1983-1989, 1972
- 10) Catt K, Niall HD, Tregear GW: Solid-phase radioimmunoassay of human growth hormone. *Biochem J* **100**: 31C, 1966
- 11) Catt K, Tregear GW: Solid-phase radioimmunoassay in antibody-coated tubes. *Science* **158**: 1570-1572, 1967
- 12) Siegel SJ, Line WF, Yang NST, et al: Solid-phase triiodothyronine radioimmunoassay. *J Clin Endocrinol Metab* **37**: 526-532, 1973
- 13) 竹田洋祐, 中島言子, 奥野龍興, 他: Phadebas T₃ RIA キットによる血中 T₃ 濃度測定の基礎的ならび

- に臨床的検討. ホルモンと臨床 **26**: 405-409, 1978
- 14) 稲田満夫, 中崎利彦, 高橋 浩, 他: Phadebas® T₃ RIA キットの基礎的検討とその臨床応用について. ホルモンと臨床 **26**: 699-702, 1978
- 15) 小泉 潔, 一柳健次, 分校久志, 他: 固相法による T₃ ラジオイムノアッセイキットの基礎的臨床的検討: KONSUL T₃ RIA. ホルモンと臨床 **26**: 703-706, 1978
- 16) 満間照典, 鰐部春松, 広岡良文, 他: 固相法による triiodothyronine radioimmunoassay: Konsul T₃ RIA キットの検討. ホルモンと臨床 **26**: 817-820, 1978
- 17) 野木森剛, 満間照典: コーニング IMMO PHASE T₃ RIA キットによる血中 T₃ 測定法の検討. 核医学 **17**: 337-341, 1980
- 18) 小泉 潔, 松田博史, 大口 学, 他: 固相化抗体法に基づくトリヨードサイロニン (T₃) ラジオイムノアッセイキットの基礎的, 臨床的検討: スパック T₃ RIA キット. 核医学 **17**: 833-838, 1980
- 19) 仁瓶禮之, 鰐部春松, 妹尾久雄, 他: トリヨードサイロニン (T₃) “栄研” キットによる血中 T₃ の測定. ホルモンと臨床 **26**: 261-264, 1978