

《ノート》

固相化抗 T₄ 抗体を用いた FT₄ RIA キットの基礎的臨床的検討

Measurement of Free Thyroxine Concentration
Employing Solid-supported Anti-T₄ Antibody

小豆沢瑞夫* 芦田 信之*** 三木 哲郎* 土井 啓****

宮井 潔** 熊原 雄一*

Mizuo AZUKIZAWA*, Nobuyuki ASHIDA***, Tetsuro MIKI*,
Kei Dori****, Kiyoshi MIYAI**, and Yuichi KUMAHARA*

* Department of Medicine and Geriatrics

** Department of Laboratory Medicine, Osaka University Medical School;

*** Osaka-Kessei Research Laboratory

**** Center for Adult Disease of Osaka

I. はじめに

血中甲状腺ホルモンであるサイロキシン(T₄)は大部分が血清蛋白に強く結合しており、わずかに遊離した部分(Free T₄)が細胞に入り、生物活性をあらわすとされている。したがって、血中 Free T₄ の測定は甲状腺機能のもっともよい指標と考えられる。FT₄ を直接定量するには、FT₄ が総 T₄ 量の約0.03%にすぎないため非常に高感度な測定系が必要であること、また、FT₄ が結合蛋白と T₄ との平衡により決定される量であるため、測定中に新たな平衡状態へ移行する可能性があることなどの問題がある。

現在行われている FT₄ 値の測定法としては透析による方法が一般的である。それには、透析率(% dialysable T₄) %を求めて total T₄ を乗じて算定

する方法^{1,2)}や透析外液中の T₄ を高感度 RIA にて直接定量する方法³⁾がある。また抗 T₄ 抗体を用いて血清中の T₄ より FT₄ 量に応じた量を抽出し RIA にて定量する方法もある。最近、著者らは Corning 社の IMMOPHASE FT₄ RIA キットを試用する機会を得たので基礎的臨床的検討を行った。

II. 方 法

Corning 社 IMMOPHASE FT₄ RIA キットは固相化抗 T₄ 抗体による血中 T₄ の抽出率(A/T)を求める A シリーズと、thimerosal 添加により血中 TBP と T₄ の結合を阻害し、血中 total T₄ を RIA にて測定する B シリーズより構成される。グラフの縦軸に A・B シリーズより算出された A/T × total T₄ を用い、添付されている標準 FT₄ 濃度の FT₄ 値を横軸とする標準曲線を引き FT₄ 濃度を読みとるものである。

1) 試薬と調製

①抗 T₄ 抗体スラリー：抗 T₄ 抗体を結合させたガラスビーズの懸濁液(96 ml)

②¹²⁵I-T₄ : thimerosal 非添加(Aシリーズ) また

Key words: FT₄, FT₄ RIA, free thyroxine FT₄ index

* 大阪大学医学部付属病院第四内科

** 同 中央臨床検査部

*** 大阪血清微生物研究所

**** 大阪府立成人病センター

受付: 56年4月14日

最終稿受付: 56年6月24日

別刷請求先: 大阪府和泉市室堂町840 (番 590-02)

大阪府立母子保健総合医療センター検査部

小豆沢 瑞夫

は thimerosal 添加 (B シリーズ) の凍結乾燥品であり、使用前に純水 6.0 ml にて溶解する。このトレーサーはそれぞれ赤色・緑色にあらかじめ着色してある。

③標準血清、コントロール血清：凍結乾燥品、使用前に純水 3.0 ml を加え溶解する。

なお、基礎検討に際して T_4 free 血清は Mitsuma の方法⁴⁾により pool 血清を活性炭素処理して作製した。また、標準 T_4 溶液は l-thyroxine free acid (Sigma 社製) を 0.1N NaOH にて溶解し、0.25% BSA, 50 mM PBS pH 7.6 にて使用範囲まで希釈して作成した。

2) 操作法

Fig. 1 に示すとおりであり、キット使用書に示された方法に従った。すなわち、

①標準血清、コントロール血清および被験血清を 25 μ l ずつサンプリングする。

②thimerosal 非添加もしくは添加 ^{125}I T_4 溶液 100 μ l を加えた後、室温 (25°C) 30分放置する。

③抗 T_4 抗体スラリー 800 μ l を加えた後、室温 30分間放置する。

④2,500 rpm にて10分間遠心する。

⑤上清をアスピレーションにより吸引除去する。

⑥沈殿のカウントを測定する。なお A シリーズ、B シリーズは同時に平行して行った。

また $T_3\text{U}$ 値はダイナボット社製トリオソルブキットを用いて測定した。血中 TBG 濃度はコーニング社製 IMMOPHASE TBG RIA キットを用いて測定した。また、透析法による Free T_4 濃度は、山本ら⁵⁾の方法によって透析膜チューブによる ^{125}I \cdot T_4 添加血清の透析を行い、%dialysable T_4 を求め total T_4 \times %FT $_4$ より算出した。

III. 成 績

1. 標準曲線

Fig. 2 に標準曲線の一例を示した。A シリーズでのカウントにより A/T を求め、B シリーズより総 T_4 を求め、A/T \times total T_4 を算定し、これ

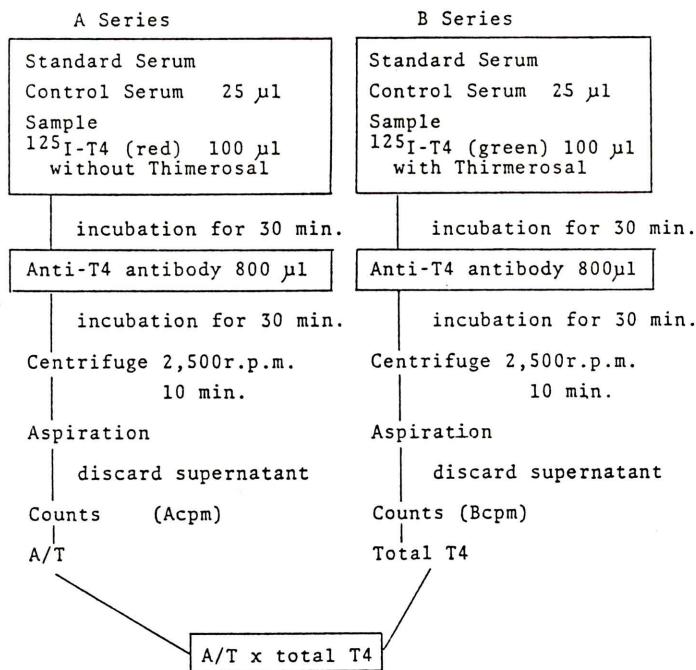


Fig. 1 Assay procedure of Corning FT4 RIA kit.

を縦軸とし、横軸を FT₄ 濃度でプロットすると FT₄ 濃度 0.3 ng/dl から 6.0 ng/dl の間で、ほぼ直線に近い増加曲線が得られた。なお本法 B シリーズによる総 T₄ RIA の検討は、すでに、報告した⁶⁾。

2. 血清蛋白および T₄ の ¹²⁵I-T₄ 結合率に対する影響 (Fig. 3, 4)

標準 T₄ 溶液を 0.25% BSA または T₄ free 血清

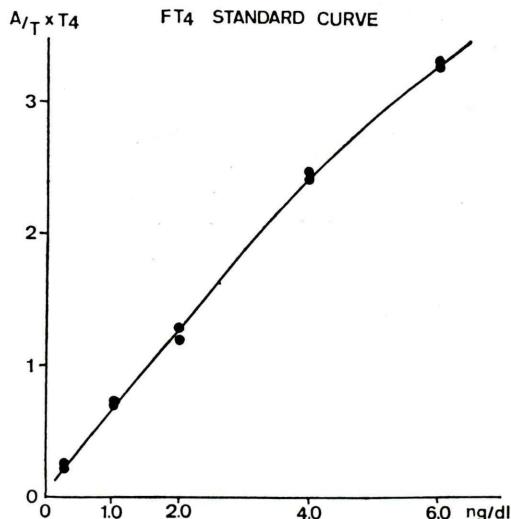


Fig. 2 Standard curve for calculation of FT₄ concentration.

で希釈し、0~32 μg/dl の T₄ 溶液を作成した。これを A シリーズおよび B シリーズの手順にしたがいインキュベートし ¹²⁵I-T₄ の抗体結合率を測定した (Fig. 3)。B シリーズすなわち thimerosal 存在下では結合率は血清蛋白の違いによる影響をほとんど受けず、もっぱら T₄ により影響された。

しかし、A シリーズすなわち thimerosal 非存在下においては、TBG や TBPA を含まない BSA 溶液では、T₄ の増加に伴ない ¹²⁵I-T₄ 結合率が減少するが、血清溶液中では ¹²⁵I-T₄ 結合率は全体に抑制され、反応系内に存在する T₄ の影響は少なくなることが示された。この現象をより詳しく調べるため、A シリーズにおいて TBG 濃度がおのの 0, 10, 20, 40 μg/ml になるよう T₄ free 血清を希釈し、これにて上記と同様に T₄ 溶液を T₄ 濃度 0~20 μg/dl となるように希釈して、同様の実験を行ったところ、Fig. 4 の如き結果が得られた。すなわち、thimerosal 非存在下では、T₄ と T₄ 結合蛋白 (TBP) のいずれの増加においても ¹²⁵I-T₄ の結合率が低下することが示された。したがって total T₄ × A/T のうち A/T 値は T₄ と TBP の両者で変化するファクターといえる。

3. 希釈実験

FT₄ 濃度はある程度の希釈範囲ではほとんど変

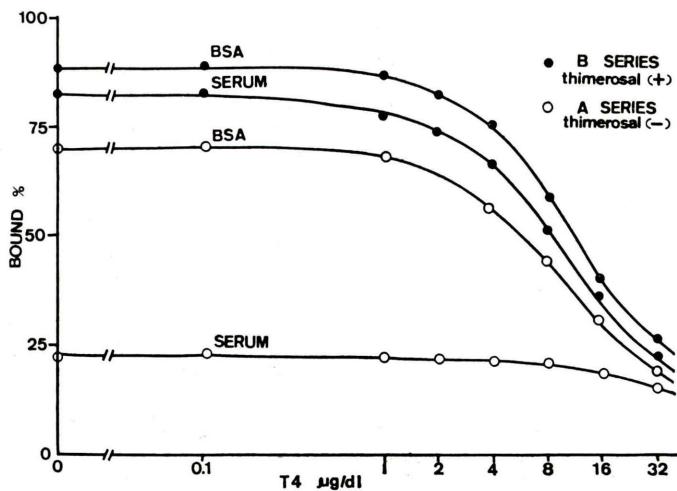


Fig. 3 Percent binding of ¹²⁵I-T4 to solid phase anti-T₄ antibody in the presence (●—●) or absence (○—○) of thimerosal.

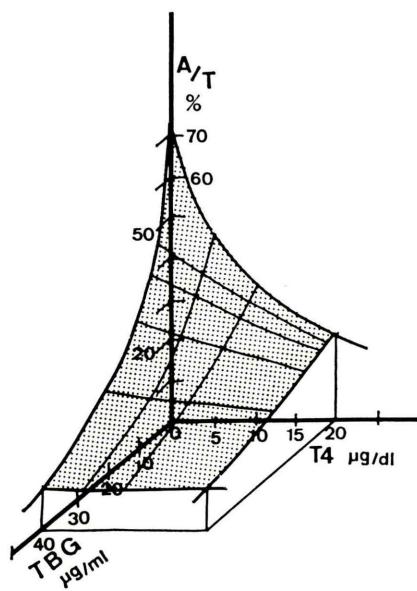


Fig. 4 Inhibition of the binding of ^{125}I -T₄ to anti-T₄ antibody in the absence of thimerosal by T₄ and T₄-binding proteins in the serum.

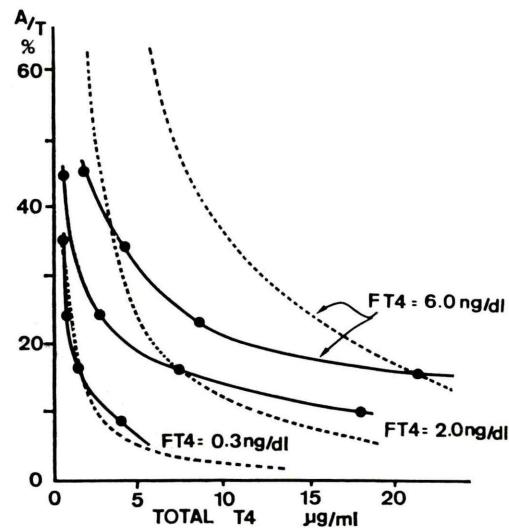


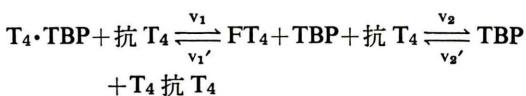
Fig. 5 Relation between serum dilution and $\text{T}_4 \times \text{A}/\text{T}$ values. Serum was diluted serially by distilled water. Dotted line shows theoretical equi-free T_4 line by the equation $\text{T}_4 \times \text{A}/\text{T} = \text{constant}$.

化しないと考えられるので希釈した血清を測定した際の total $\text{T}_4 \times \text{A}/\text{T}$ 値は一定であることが期待される。そこでキットに添付された FT₄ 濃度が既知の標準血清 (FT₄=0.3, 2.0, 6.0 ng/dl) を、脱イオン水にて 1~16 倍に希釈し実験を行った。

B シリーズすなわち total T₄ 濃度は希釈倍数を反映して正確に減じたが、A シリーズの A/T 値は $\text{A}/\text{T} \times \text{total T}_4 = \text{Constant}$ の仮定に基づき描いた曲線 (Fig. 5 破線で示す) には沿わないことが判明した。 (Fig. 5)

4. Free T₄ の速度論的解析

A シリーズの ^{125}I -T₄ と抗 T₄ 抗体との結合速度より、反応系内での $\text{T}_4 \cdot \text{TBP} \rightleftharpoons \text{FT}_4 + \text{TBP}$ の平衡状態の移行の計算を行なった。



いま、この反応の律速段階が $\text{T}_4 \cdot \text{抗 T}_4$ Complex の形成速度にあるとすれば、 $v_1, v_1' \gg v_2, v_2'$ であり、 $v_2 = k [\text{FT}_4] [\text{抗 T}_4]$ である⁷⁾ ので $[\text{抗 T}_4]$ が一定であれば、 v_2 ($\text{T}_4 \cdot \text{抗 T}_4$ Complex 形成速度)

は $[\text{FT}_4]$ に比例する。多くの抗原抗体反応でみられるように、 $v_2 \gg v_2'$ であれば、 $\text{T}_4 \cdot \text{抗 T}_4$ Complex を形成した T_4 は TBP との平衡反応の系外にあると考えられ、残った T_4 があらたな $\text{T}_4 \cdot \text{TBP} \rightleftharpoons \text{FT}_4 + \text{TBP}$ の平衡状態へ移行すると考えられる。そこで、単位時間に形成される $\text{T}_4 \cdot \text{抗 T}_4$ Complex 量を測定し、その刻々における FT₄ 濃度 $[\text{FT}_4]_t$ の計算を行ってみた。その計算過程は次のとおりである。

$$\begin{aligned} [\text{T}_4 \cdot \text{TBP}]_t &= [\text{total T}_4] - [\text{T}_4 \cdot \text{抗 T}_4]_t \\ [\text{TBP}]_t &= [\text{total TBP}] - [\text{T}_4 \cdot \text{TBP}]_t \\ [\text{FT}_4]_t &= \frac{1}{K_a} \frac{[\text{T}_4 \cdot \text{TBP}]_t}{[\text{TBP}]_t} \\ &= \frac{1}{K_a} \frac{[\text{total T}_4] - [\text{T}_4 \cdot \text{抗 T}_4]_t}{[\text{total TBP}] - [\text{T}_4 \cdot \text{TBP}]_t} \\ &= \frac{1}{K_a} \frac{[\text{total T}_4] - [\text{T}_4 \cdot \text{抗 T}_4]_t}{[\text{total TBP}] - [\text{total T}_4] + [\text{T}_4 \cdot \text{抗 T}_4]_t} \end{aligned}$$

ここで $[\text{T}_4 \cdot \text{抗 T}_4]_t$ は t 時間に形成された $\text{T}_4 \cdot \text{抗 T}_4$ Complex 濃度であり $\text{T}_4 \times \text{A}/\text{T}$ 値の時間的変化として求められる。Fig. 6 は上記計算式より求めた $[\text{FT}_4]_t$ 値の時間変化を示したものである。

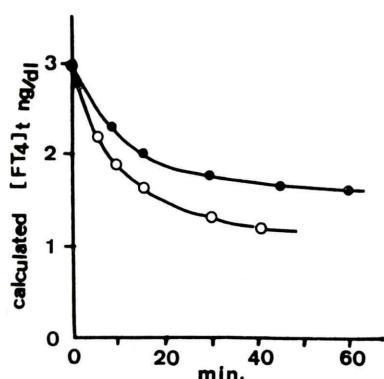


Fig. 6 Time dependent changes of calculated Free T₄.
 (●—●): T₄ 7.4 $\mu\text{g}/\text{dl}$, TBG 18.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$.
 (○—○): Diluted serum to one half by distilled water.

Total T₄ 濃度 7.4 $\mu\text{g}/\text{dl}$, TBG 濃度 18.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 平衡定数 K_a は 10^{10}M^{-1} とした⁸⁾. TBPA およびアルブミンの影響は計算上省略した. t=0 においては, [T₄·抗 T₄]_{t=0}=0 となり [FT₄]₀=3.0 ng/dl と計算される. (●—●). 血清が 1/2 に希釈された場合にも [FT₄]₀=3.0 ng/dl となり変化しない. (○—○). 反応の時間経過とともに [T₄·抗 T₄] Complex の形成が進むため [FT₄]_t はしだいに減少するが, その減少は原血清(●—●)に比し希釈血清(○—○)の方が著明である.

本法における A/T×total T₄ 値は抗体に結合し

た [FT₄]_t の総和と比例するものであり, $k \sum_{t=0}^t [FT_4]_t$ で表わされる. A/T×total T₄ 値は t=0 においては等しいが時間経過とともに希釈血清において低くなり, これにより求めた FT₄ 濃度は真値より低く算定される.

5. 再現性

本法での FT₄ 濃度は A/T と total T₄ の値の積の関数であるので, それぞれ 2 つの因子の変動を調べた. プール血清でのアッセイ内変動は A/T= $14.9 \pm 0.23\%$ (mean \pm SD) であり total T₄=4.11 \pm 0.21 $\mu\text{g}/\text{dl}$ であった. これより FT₄ 濃度の同一アッセイ内変動は $0.85 \pm 0.1 \text{ ng}/\text{dl}$ C.V.=11.7% n=10 であった. FT₄ 濃度のアッセイ間変動は 2 種のコントロール血清により行ったところ, 1.48 \pm 0.18 ng/dl および $2.72 \pm 0.18 \text{ ng}/\text{dl}$ であった. (C.V.=6.6~12.2% n=8)

6. 臨床応用

健常人および各種甲状腺疾患における血清 FT₄ 濃度を本法で測定したところ Fig. 7 のような成績が得られた. 健常人男子 20 例 (25~50 歳) 女子 10 例 (23~37 歳) での血清 FT₄ 濃度は $1.74 \pm 0.25 \text{ ng}/\text{dl}$ (mean \pm SD) であり 健常妊婦 19 例 (TBG $43.5 \pm 5.6 \mu\text{g}/\text{ml}$, T₄ $10.9 \pm 0.9 \mu\text{g}/\text{dl}$) での FT₄ 濃度は $1.41 \pm 0.14 \text{ ng}/\text{dl}$, TBG 減少症および欠損症で euthyroid である 5 例については, FT₄ 濃度は

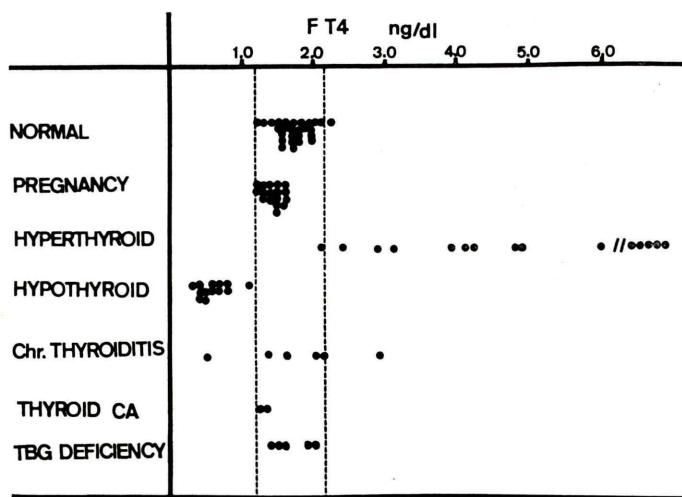


Fig. 7 Serum FT₄ concentrations by Corning FT₄ kit.

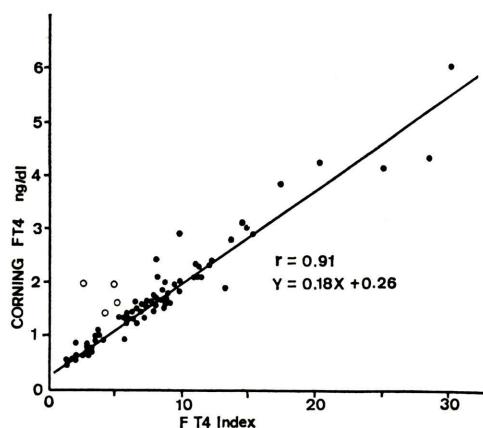


Fig. 9 Correlation between FT₄ index and FT₄ values by Corning FT₄ kit. Open circles show TBG deficient patients.

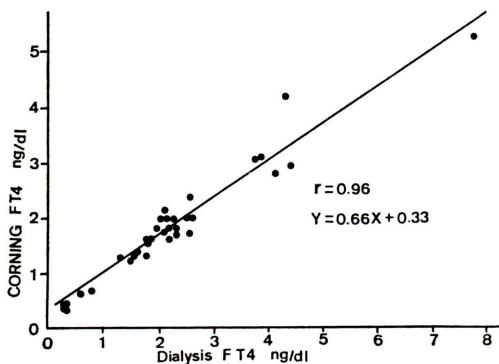


Fig. 9 Correlation between FT₄ values by equilibrium dialysis and by Corning FT₄ kit.

1.4～2.0 ng/dl であった。

甲状腺機能亢進症 15 例はいずれも血清 FT₄ 濃度 2.1 ng/dl 以上の高値を示し、甲状腺機能低下症 12 例では、1.0 ng/dl 以下と健常人と明確に区別された⁹⁾。

7. FT₄ index, T₄/TBG ratio との相関

Howorth の方法¹⁰⁾ すなわち

$$\text{total T}_4 \times \frac{\text{T}_3\text{U}}{\text{T}_3\text{U} \text{正常値}} = \text{FT}_4 \text{ index}$$

より求めた FT₄ index と本法での FT₄ 濃度の相関を各種血清 80 例にて調べた。結果は Fig. 8 に示すように、相関係数 $r=0.91$ $Y=5.7X-1.5$ の回帰直線を得た。しかし TBG 減少症の 4 例は

FT₄I 値が相対的に低く算定される傾向がみとめられた。また T₄/TBG ratio との相関は $r=0.97$ $Y=2.97X+0.34$ の回帰直線を得た。なお T₄/TBG ratio 算定の際には TBG 欠損症例は対象より除いた。

8. 透析法との相関

平衡透析法と本法との FT₄ 濃度の相関を各種血清 36 例にて調べた。結果は Fig. 9 に示すように $r=0.96$ $Y=0.66X+0.33$ の回帰直線を得た。また、Ekins¹¹⁾ らの報告した本キットでの FT₄ を求める計算式 $A/(1/B-1/Bo)$, $A/(1-B/T) \times (1/B-1/Bo)$ および他の計算式 A/B によって求めた血清 FT₄ 濃度と平衡透析法との相関を調べたところ、それぞれ $r=0.95$ $Y=0.68X+0.42$, $r=0.94$ $Y=0.58X+0.52$ および $r=0.73$ $Y=0.5X+0.35$ の回帰直線が得られた。したがって、現行の $A/T \times \text{total}$ がもともと適していると判断された。

IV. 考 察

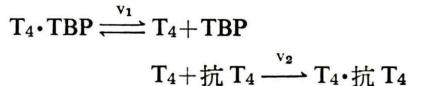
現在、FT₄ は次のような計算によって求められる指標である。① total T₄ × % FT₄, ② total T₄ × T₃U, ③ total T₄ × 1/TBG, ④ total T₄ × 1/T₄ binding capacity.

①式は平衡透析法によるものであり、②は FT₄ index として、③は T₄/TBG ratio ④は FT₄I 変法¹²⁾ として用いられている。本法の total T₄ × A/T は、抗 T₄ 抗体と TBP の競合反応の指標として A/T 値を利用したものであり FT₄ Index の変法と言える。Fig. 2 に示したように A/T × total T₄ 値は平衡透析法によって求めた FT₄ 濃度と直線に近い相関を示し、これを標準曲線として血清中の FT₄ 濃度を求めることが可能である、と考えて、このキットが構成されている。

Fig. 3, 4 で明らかにされたように A/T 値は TBP の増加によって減少する。これは①～④式での % FT₄, T₃U, 1/TBG, および 1/T₄ binding capacity と同じ挙動を示す。しかしながら TBP が一定で T₄ が増加した場合 T₃U は増加するのに対し Fig. 4 に示すように、A/T 値は減少する。この際③式の 1/TBG は一定であり、④式の 1/T₄ binding capacity

は増加する。total T₄ × A/T の計算式において A/T 値は減少するが total T₄ 値が増加するので、結果として A/T × total T₄ は増加関数となり、この点において従来の T₃U を用いた FT₄ Index とは若干性質が異なる。

本法での FT₄ の測定原理は抗 T₄ 抗体への T₄ の結合速度が FT₄ 濃度に比例しているという実験的および理論的事実に基づいている⁷⁾。



の反応を考えると、実験的に T₄・抗 T₄ Complex の形成速度 v₂ は、 $v_2 = k[\text{T}_4][\text{抗 T}_4]$ と二次反応であることが確かめられている⁷⁾。いま、[抗 T₄] は一定であるので、 $v_2 = k'[\text{T}_4]$ と、FT₄ に比例した関数となる。また $v_2 = \frac{d[\text{T}_4 \cdot \text{抗 T}_4]}{dt}$ であり、

$[\text{T}_4 \cdot \text{抗 T}_4] = A/T \times \text{total T}_4$ と表わされるので、 $A/T \times \text{total T}_4 \propto \text{FT}_4$ となる。ところが、Fig. 6 に示すように、T₄・抗 T₄ Complex の形成がすすめば、反応系内の T₄ が減少し、結果として T₄・抗 T₄ Complex の形成速度も減少する。実際に 30 分の A/T 値は 10~30% 程度であるので FT₄ 値の減少は無視できない。この FT₄ の減少率は、希釈によって異なるため、結果として、求めた血清 FT₄ 濃度は希釈によって変化する。この現象は抗 T₄ 抗体への遊離 T₄ の結合速度を指標とする FT₄ 測定キットに共通して言えることであり、これらの方法では限られた条件下でのみ FT₄ 濃度を正しく表わしうることを念頭におく必要がある。

一方、標準血清の上限値以上の高 FT₄ 濃度の測定も困難である。例えば、T₄ free 血清によって、あらかじめ希釈して測定しても、被験血清の TBP 濃度と異なった T₄ free 血清であれば正確な値は得られない。したがってバゼドウ病の治療経過等の指標とするためには、より高濃度の標準血清が必要と思われる。

本法による健常人の FT₄ 値は $1.74 \pm 0.25 \text{ ng/dl}$ であったが、正常域として $\text{mean} \pm 2\text{SD}$ をとると $1.2 \sim 2.2 \text{ ng/dl}$ であり、本キット添付の説明書で

の正常域とほぼ一致した。また男女間に有意差はみとめられなかった。この FT₄ 濃度は従来透析法で報告されている値より若干低値であった。健常妊婦 19 例では健常人に比べやや低値傾向を示し 5% の危険率で有意差があったが、健常人値の範囲内に含まれた。

TBG 減少症および欠損症で euthyroid である 5 例は FT₄ $1.4 \sim 2.0 \text{ ng/dl}$ と正常域にあった。甲状腺機能亢進症および低下症は健常人と明確に区別された。

本法の測定値と平衡透析法による FT₄ 濃度、FT₄ I および T₄/TBG ratio はともによい相関を示した。このことは本キットでは前述したような TBG 異常等の影響が比較的よく抑えられていることを示している。また、Ekins は Corning の FT₄ キットに対して 3 つの計算方法を提示しているが、これらの計算による標準曲線を用いた FT₄ 濃度はいずれも透析法と良好な相関を示したが、A/B の計算式による FT₄ 値と透析法との相関は低く特に高 TBG 血清において大きな解離を示した。再現性については intraassay, interassay とも充分満足できるものであった。

V. まとめ

本法は再現性、操作性、正常値と異常値の判別という面では、充分実用に耐えるものと考えられ、得られた FT₄ 値は標準曲線の範囲内では、従来の測定法とよく相関した。しかし高濃度域の測定については、対応する標準血清を設けることが望ましく、今後の課題と考えられる。

文 献

- 1) Sterling K, Hegedus A: Measurement of free thyroxine concentration in human serum. *J Clin Invest* 41: 1031-1039, 1962
- 2) Norman DL, Vincent JP: Measurement of "Free" thyroxine in serum. *Clin Chem* 17: 166-173, 1971
- 3) Nai-Siang Jiang, Kathleen AT: Determination of free thyroxine in serum by radioimmunoassay. *Clin Chem* 23: 1679-1683, 1977
- 4) Mitsuma T, Colucci J, Shenkman L, et al.: Rapid Simultaneous Radioimmunoassay for triiodo-

- thyronine and thyroxine in unextracted serum. *Biochem Biophys Res Comm* **46**: 2107-2113, 1972
- 5) 山本智英, 土井 啓, 熊原雄一: 平衡透析を用いた血清遊離サイロキシンおよびトリヨードサイロニン分画の同時測定法の検討. *日本内分泌学会雑誌* **51**: 76-84 1975
- 6) 小豆沢瑞夫, 肯田信之, 三木哲郎, 他: 固相法によるT₄ラジオイムノアッセイ. *臨床検査* **24**: 1085-1088, 1980
- 7) Hertl W, Odstrchel G: Kinetic and thermodynamic studies of antigen-antibody interactions in heterogeneous reaction phase-1. *Molecular Immunol* **16**: 173-178, 1979
- 8) Ladislav K, Milton T: Thyroxine-protein interactions. *J Biol Chem* **251**: 3558-3562, 1976
- 9) Chopra IJ, Andre JH, Guadalupe NCT, et al: Serum free thyroxine in thyroidal and nonthyroidal illness. *J Clin Endocrinol & Metab* **51**: 135-143, 1980
- 10) Howorth PJN, MacLagan NF: Clinical application of serum total thyroxine estimation, resin uptake, and free thyroxine index. *The Lancet* **1**: 224-228, 1969
- 11) Ekins R: Commercial radioimmunoassay for free thyroxine. *The Lancet* **1**: 1191-1192, 1979
- 12) Hamada S, Nakagawa W, Mori T, et al: Re-evaluation of thyroxine binding and free thyroxine in human by paper electrophoresis and equilibrium dialysis, and a new thyroxine index. *J Clin Endocrinol & Metab* **31**: 166-179, 1970