

《ノート》

Free Thyroxine RIA キット (Amerlex) の基礎的 ならびに臨床的検討

Evaluation of a Free Thyroxine RIA Kit (Amerlex)

尾藤 早苗* 伊藤 秀臣* 森本 義人* 大城 徳成*
池窪 勝治* 石原 隆** 森 徹**

Sanae BITO*, Hidetomi ITO*, Yoshito MORIMOTO*, Norishige OSHIRO*,
Katsuji IKEKUBO*, Takashi ISHIHARA** and Toru MORI**

*Division of Nuclear Medicine and **Department of Internal Medicine,
Kobe Central Municipal Hospital, Chuo-ku, Kobe

I. 緒 言

甲状腺機能の最良の指標は、血中 free T₄ 濃度である。しかし、この濃度は正常人では全 T₄ 濃度の 0.02% 程度の微量であり、その測定には平衡透析法など煩雑かつ高度の手技を要し、ルチン的測定は困難であった^{1,2)}。最近、血清を直接使用して、free T₄ の近似値を導きうる簡便な radioassay キットが開発され、そのルチン的使用が注目されている。著者らは RCC 社製 Amerlex RIA キット³⁾について若干の検討を行った。

II. 測 定 原 理

本キットの特徴は tracer として T₄-conjugate の標識物を用い、抗体がアマレックス顆粒に吸着されている点にある³⁾。¹²⁵I-T₄ conjugate は TBG への結合性を持たない。したがって、他の同様なキ

ットと異なり、one step でインキュベーションが終了する利点を有する。すなわち、血清 100 μl, ¹²⁵I-T₄ conjugate および抗体結合顆粒を一度に混和し、37°C 1 時間インキュベートする。血清中の free T₄ と tracer T₄ は競合的に抗体結合顆粒に結合し、遠心分離にて顆粒を管底に残し、カウントすることによって抗体結合 ¹²⁵I のカウントが得られる。未知検体血清と同様に平衡透析法にて free T₄ 既測定の標準血清を処理し、この B/B₀ を semilog にプロットし、外挿法にて未知検体の free T₄ 濃度が読み取られる。

III. 方法および対象

正常対象は本院の勤務者を主とした健康成人 37 例を用いた。各種甲状腺疾患者 106 例は本院内分泌内科にて診断の確定したものであり、そのほかに non thyroidal illness として本院に入院または通院中の各種疾患者 36 例を対象とした。同一血清について T₄ RIA II にて T₄ を、スパック T₃ にて T₃U を、T₃ RIA II にて T₃ を、高感度 RIA⁴⁾ にて TSH を、リアグノスト法にて TBG を、Gamma Coat⁵⁾ 法にて free T₄ を測定した。free T₄

* 神戸市立中央市民病院核医学科

** 同 内科

受付：56年4月14日

最終稿受付：56年7月22日

別刷請求先：神戸市中央区港島中町4丁目6番地
(☎ 650)

神戸市立中央市民病院核医学科
尾 藤 早 苗

Key words: Radioimmunoassay, Free Thyroxine, Slid phase, Amerlex, Evaluation.

index は $T_4 \times T_3U$ によって算出した。基礎的検討成績に基づいて、本法での free T_4 測定は指示書³⁾通りに行った。

IV. 成績および考案

A. 基礎的検討

1) インキュベーション時間

Fig. 1 はインキュベーション時間を10分から2時間まで変化させたときの結合 cpm (左) および $B/B_0\%$ を示す。時間の長い程結合 cpm は増加したが、1時間と2時間にはわずかの差異しかみられなかった。また B/B_0 の比較では10分では上方に偏したが、30分以上では著差がみられず、1時間のインキュベーションが好適と考えられた。温度は全て 37°C で行った。

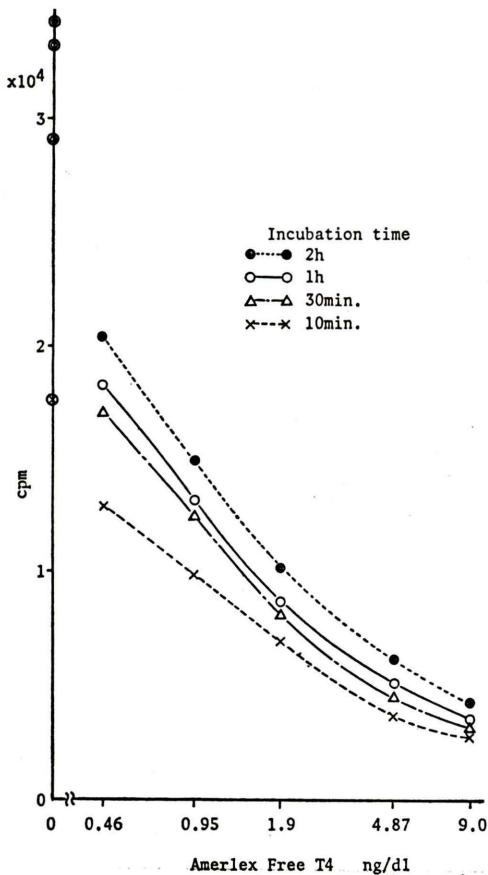


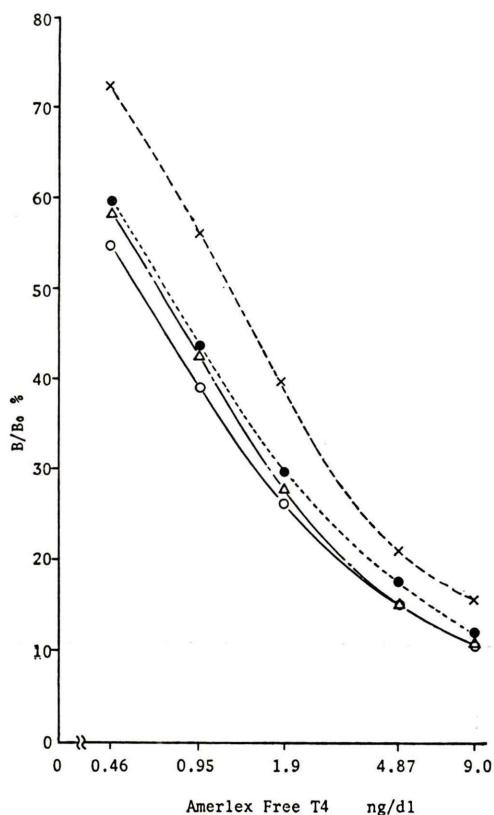
Fig. 1 Effects of Incubation Time in Amerlex Free T4 RIA.

2) 標準曲線

Fig. 2 は連続 7 回測定時の標準曲線の変動を示す。最少点 0.17 ng/dl の B/B_0 は 76% であり、きわめて高感度であることが示され、標準物質の増加による B/B_0 の下降も急峻で、9.0 ng/dl は約 10% を示し、良好な用量反応性を示した。また、各標準点ごとの標準偏差は十分に小さく、本キットの安定性がうかがわれた。

3) アッセイ内およびアッセイ間変動係数

free T_4 低、中および高濃度の各 3 血清について、アッセイ内およびアッセイ間の変動を観察した。Table 1 に示すごとく、低値血清では 13.8 および 15.4% と少し大きい変動を示したが、中および高濃度の変動は 8.6% 以下と良好であった。このような微量測定時の C. V. 値としての本法の値はき



わめて満足すべきものであり、著者ら⁵⁾の Gamma Coat 法による検討成績に比して明らかにすぐれた。

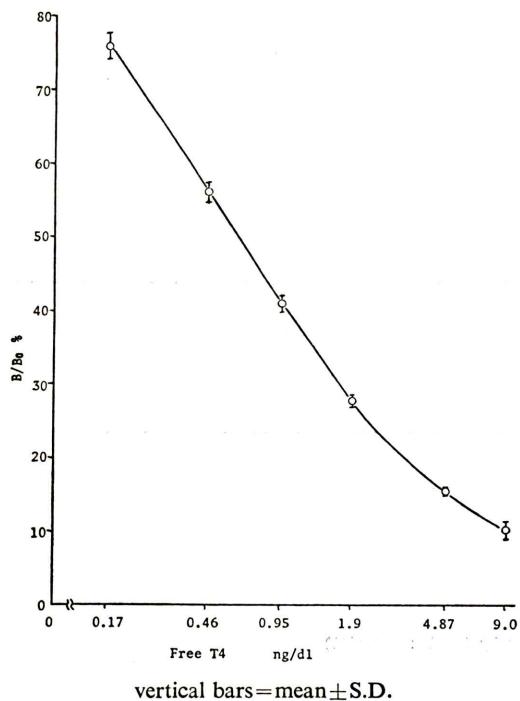


Fig. 2 Standard curves of Amerlex Free T₄ RIA.

Table 1 Intra- and Interassay variabilities of Amerlex Free T₄ RIA kit
Intraassay variability

	N	Mean±S.D.	C.V. (%)
Low	10	0.80±0.11	13.8
Median	10	1.20±0.03	2.5
High	10	3.38±0.12	3.6

Interassay variability

	N	Mean±S.D.	C.V. (%)
Low	5	0.26±0.04	15.4
Median	5	1.17±0.06	5.1
high	5	3.98±0.34	8.6

以上の成績は本キットがきわめて信頼度の高い安定したものであることを示し、Amerlex 頸粒による抗体量の均一性、抗体の結合親和性および結合能の好適性がうかがわれた。

4) 血清の凍結、融解による影響

同一血清を用いて各種の RIA を行う場合、凍結、融解が繰り返される可能性がある。Fig. 3 は TBG 高、中、低の 3 血清を採血遠沈後に 4 分し、そのまま凍結保存したものと 10 回まで完全に凍結、

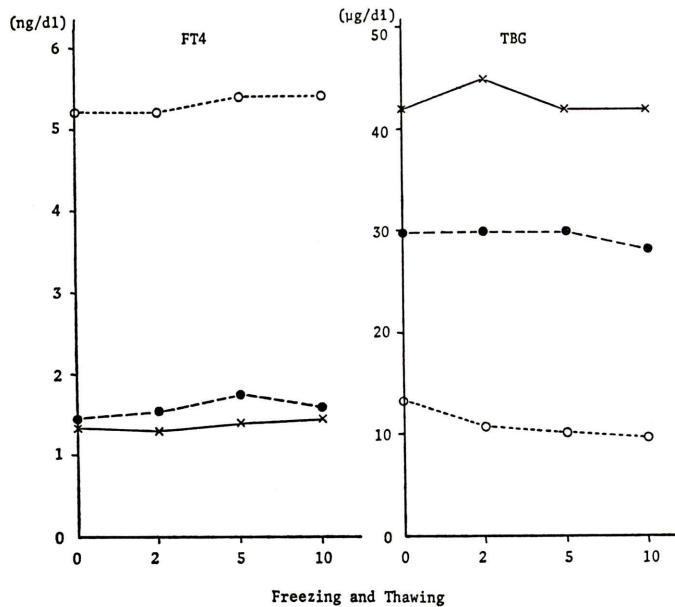


Fig. 3 Effects of Freezing and Thawing on Free thyroxine and TBG.

融解を繰り返したものについて同時に free T₄, TBG を測定した成績を示す。3 血清とも free T₄ は10回の試料で4~10%の上昇を示した。一方, TBG は free T₄ の変動と平行した変動傾向は明らかではなかったが、やはり減少傾向がみられた。この検討は2日間の短時間で行われたものであり、

少數回の凍結融解は free T₄ や TBG の測定に影響が少ないと言えるが、長期保存時にはいっそう TBG などの蛋白の変性による free T₄ の上昇がおこりうると想像された。

5) TBG からの T₄ の引き出し(pull out)の検討

Tab.e 2 Results of pull out by Amerlex Free T4 RIA kit using various patients sera.

serum No.	T ₄ µg/dl	T ₃ U %	FT4I	T ₃ ng/ml	TBG µg/dl	TSH µU/ml	FT ₄ ng/dl	Calculated FT ₄ fraction	%bound	bound pg
1	>24.0	43	>10.3	6.11	20.0	<0.156	>9.0	(0.038)	1.62	389
2	10.0	29	2.9	1.32	24.5	2.7	1.66	0.017	3.50	350
3	2.8	21	0.59	1.09	32.2	72.0	0.41	0.014	5.31	149
4	17.8	18	3.20	2.18	62.0	1.25	1.60	0.0099	2.01	358
5	4.4	41	1.80	0.32	8.2	<0.156	0.50	0.011	6.74	297

added ¹²⁵I-T₄=100 pg/100 µl negligible

Approximately 1 µCi aliquots of highly specific ¹²⁵I-T₄ (1200 µCi/µg) were mixed with 500 µl serum samples. After incubation at 37°C for 30 min 2×100 µl aliquots of each mixtures were subjected to the Amerlex Free T₄ assay system. Assay procedures were performed regularly but the incubation buffer was used instead of the provided tracer. The percent bound was calculated by (Amerlex bound cpm/added ¹²⁵I-T₄)×100.

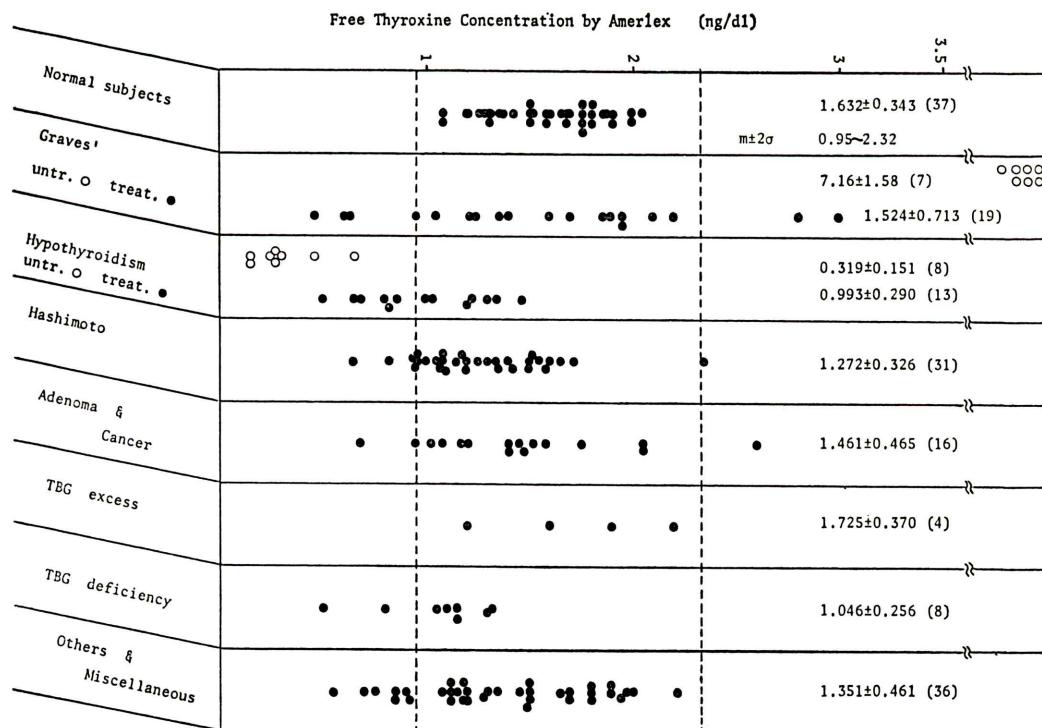


Fig. 4 Serum Free T₄ concentration in normal subjects and various disorders by Amerlex RIA kit.

先に著者ら⁵⁾は Gamma Coat free T₄ キットについて、TBG 結合 T₄ の pull out が大きく、低 T₄ ことに TBG 減少症の測定上問題があることを示した。Table 2 は T₄ 高、中、低および TBG 高、低の 5 血清に 1,200 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ と比活性の高い ^{125}I -T₄ を添加し、37°C 30 分インキュベートして平衡に達した後、本キットの ^{125}I -T₄ conjugate を省いて assay を行った結果を示す。添加 ^{125}I -T₄ は血清 100 μl あたり 100 pg であり、これは低 T₄ 血清の T₄ 量 (2.8 ng/100 μl) に比して小さい。抗体に結合した ^{125}I -T₄ は高 T₄ 血清で 1.62%，高 TBG で 2.01%，中 T₄ で 3.50% であったが、低 T₄ では 5.31% さらに低 TBG では 6.74% を示した。本法による free T₄ 測定値から算出した

free T₄ fraction に比してこの値は 45~600 倍に達する。Gamma Coat 法によって今回同時に同一の ^{125}I -T₄ を用いて検討した成績との比較⁶⁾では、Amerlex 法がやや大きい値を示した。したがって、本法でも低 TBG 時の測定上の問題が示唆され、No. 5 の低 TBG 血清の測定値も free T₄ index, TSH からみて低値に過ぎると思われる。

しかし、本法では Gamma Coat 法などと異なって被検血清とともに ^{125}I -T₄ conjugate を加えてインキュベーションを行うので、抗体には血清中の T₄ と ^{125}I -T₄ conjugate が競合的に結合する。したがって実際上の pull out はこの成績よりはかなり小さいものであり、他法に比して pull out の影響は少ないものと考えられる。

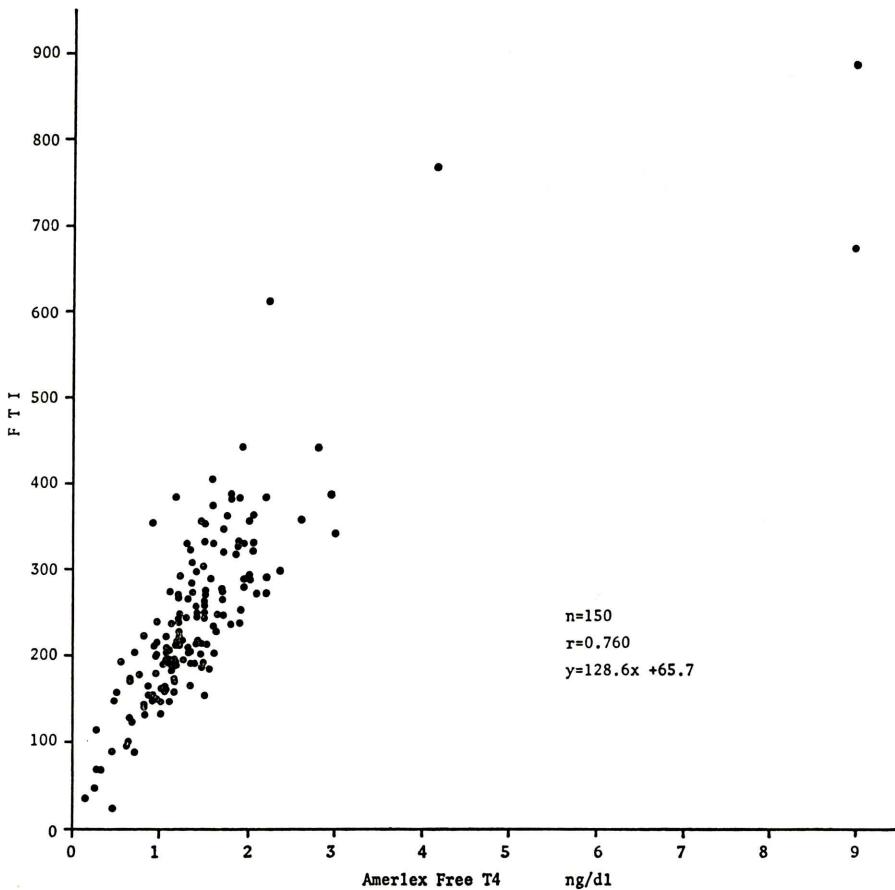


Fig. 5 Relation between Free T4 concentration (Amerlex) and Free T4 Index in various conditions.

B. 臨床的検討

Fig. 4 は正常人および各種疾患者 179 例の測定成績を示す。正常人は 1.08 から 2.05 ng/dl の間に分布し、平均 1.632 ± 0.343 (s.d.) を示し、2 s.d. をとると正常範囲は 0.95～2.32 ng/dl となり、Gamma Coat 法⁵⁾に比して若干高値を示した。未治療バセドウ病 7 例は全例 4.15 ng/dl 以上を示し、正常人とは良好な識別を認めた。バセドウ病治療例は巾広い変動を示した。未治療の機能低下症 8 例は 0.65 ng/dl 以下に分布し、 0.319 ± 0.151 ng/dl の平均値を示し、やはり正常人とは重り合いがなかった。治療中の例も正常低値以下に分布した。なお、大部分の例は治療開始早期のものであり、十分な

補償が行われていなかった。31 例の橋本病では 1 例が 2.35 ng/dl と高値を、4 例が低値を示し、平均 1.272 ± 0.326 ng/dl であった。甲状腺腫瘍の 16 例では、1 例が高値、2 例が低値に分布し、平均 1.461 ± 0.465 ng/dl を示した。低値例は多くが術後の補償例である。TBG 過剰症 4 例は 1.20 から 2.20 と正常範囲に分布した。(平均 1.725 ± 0.370 ng/dl)一方、TBG 減少症 8 例では、1.32 ng/dl 以下に分布し、2 例は低値を示し、平均 1.046 ± 0.256 ng/dl であった。各種疾患者(non thyroidal illness)36 例のうち 28 例は正常範囲に分布したが、0.55 ng/dl を最低として 7 例が低値を示し、ステロイド投与例、クッシング症候群、low T₃ 症候群など

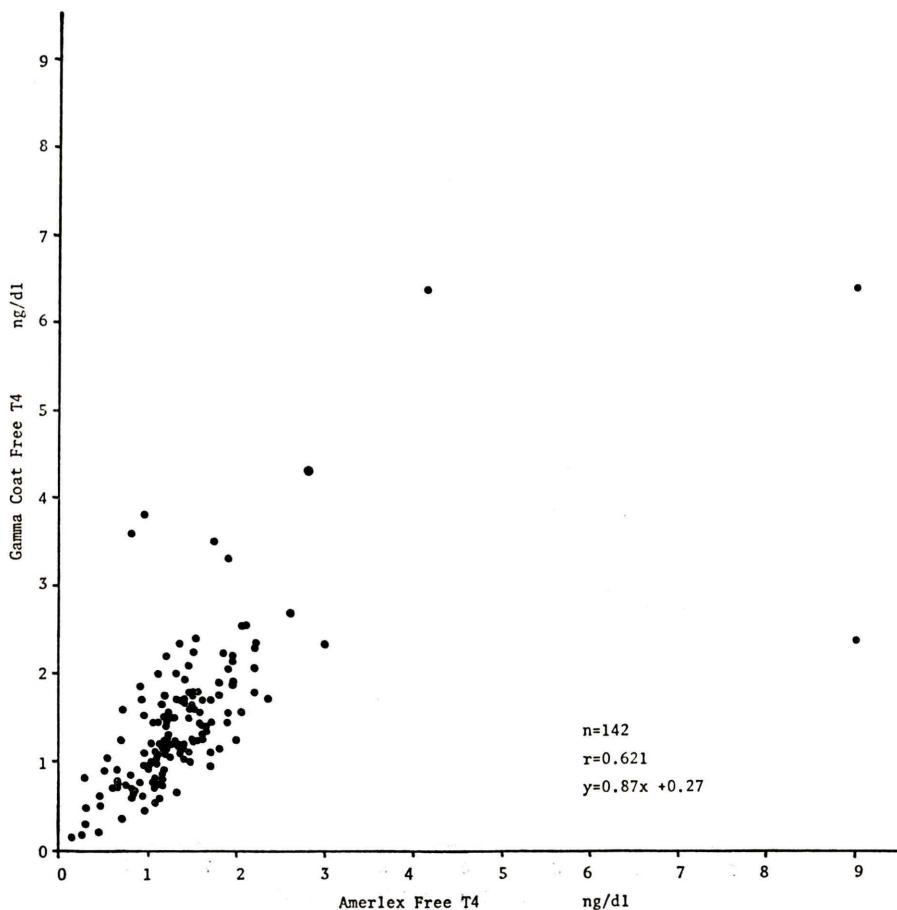


Fig. 6 Correlation of Free T₄ concentration measured by Amerlex kit and Gamma Coat kit in various conditions.

が含まれた。本法の測定値は甲状腺機能をよく反映し、亢進症および低下症は正常人と明瞭に識別された。ただし、TBG 減少症ではやや低値に分布した。また、non thyroidal illness では高値例は少なく、却って低値例が散見された。透析法では異常高値例が報告され⁷⁾、また Gamma Coat 法でも異常高値例が認められる⁸⁾が、少なくとも今回の検討では本法での高値例は認められなかつた。本法を含めた radioassay では pull out が大きいため、透析法の高値例は看過される可能性があるが、non thyroidal illness での甲状腺機能については、代謝面も含めて今後の検討にまたねばならない。

Fig. 5 は free T₄ index と本法測定値の相関を

示す。150例において相関係数 0.760 と良好な正相関がみられたが、上方に偏する例が散見され、TBG 減少症例が多かった。一方、Fig. 6 は Gamma Coat 法測定値との相関を示し、142 例で $r=0.621$ と良好な相関がみられた。回帰直線の勾配は 0.87 を示し、本法測定値が 15%ほど高値を示した。さらに Gamma Coat 法で異常高値 (3.8, 3.6 ng/dl) を示した 2 例 (FT₄I : 1.50, 2.23. TSH : 2.1, 3.9 μ U/ml) はともに本法ではやや低値 (0.95, 0.80 ng/dl) を示し、両法の測定系に質的な差異がうかがわれた。標準血清の異同なども測定成績のズレに関連しうると思われるが、いづれにしろ現状の free T₄ radioassay は真の free T₄ の測定法とは言い難く、方法による成績のズレはそれほど問題ではないであろう。

Fig. 7 は TSH との相関を示す。双曲線的な分布を示し、有意の逆相関 ($r=-0.347$, $p<0.01$) を認めた。なお、TSH が 0.156 μ U/ml 以下の低値例は全て free T₄ は 1.9 ng/dl 以上を示した。この TSH 値から考えると free T₄ の正常上界は 2.26 ng/dl よりやや低くあるべきかと思われるが、より多数例での検討が必要である。

V. 結 論

Amerlex free T₄ RIA キットを検討し、以下の結論を得た。

1) 本キットは one step のインキュベーションで測定が可能であり、規定通りの 37°C 1 時間が好適であった。

2) 標準点 0.17 から 9.0 ng/dl の間に B/B₀% 上広い変動幅を示し、アッセイ内、アッセイ間の変動係数も小さく、良好な RIA キットと判断された。

3) 血清の凍結融解により若干 free T₄ が上昇し、TBG が減少する傾向を認めた。

4) 正常範囲は 0.95~2.32 ng/dl と判定され、未治療バセドウ病は 4.15 ng/dl 以上、低下症は 0.65 ng/dl 以下に分布し、甲状腺機能状態を良く反映した。

5) TBG 過剰症は正常範囲に分布したが、TBG

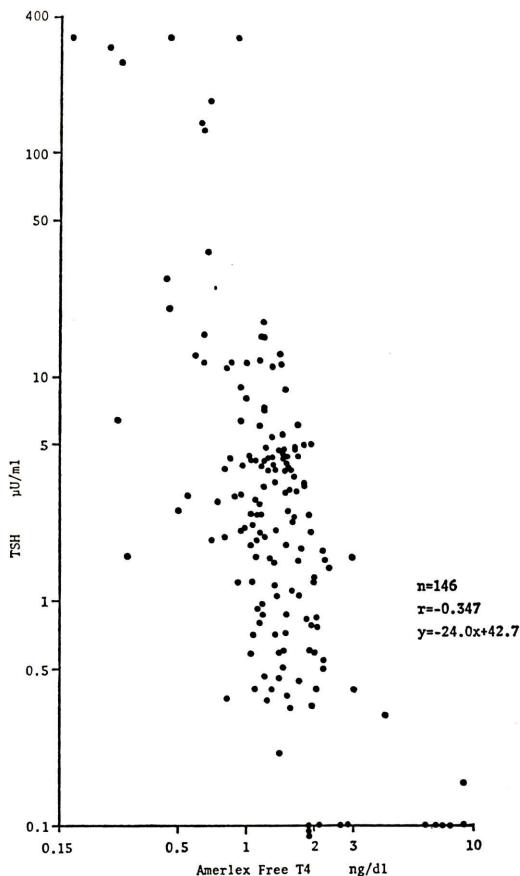


Fig. 7 Relation between TSH and Free T₄ concentration (Amerlex) in various conditions.

減少症は 1.32 ng/dl 以下と低値域に分布し, free T₄ index, TSH などから判断して本法測定値に過小評価の傾向を認めた。

6) free T₄ index, Gamma Coat 法 free T₄ とは良好な正相関を示し, TSH とは有意の逆相関を認めた。

以上からも本キットは簡便性, 精度にすぐれ, 臨床的にも有用なキットと結論された。

キットを御提供下さった科研化学 KK に深謝する。

文 献

- 1) Christensen LK: Scand J Clin Lab Invest 11: 326, 1959
- 2) Sterling K and Hegedus A: J Clin Invest 41: 1031, 1962
- 3) Amerlex free T₄ RIA キット使用説明書, RCC 社.
- 4) 森 徹, 他: 日内分泌会誌, 56: 1231, 1980
- 5) 尾藤早苗, 他: ホルモンと臨床, 28: 1289, 1980
- 6) 未発表データー
- 7) Chopra IJ, et al: J Clin Endocrinol Metab 49: 63, 1979