

《ノート》

アマレックスフリー T₃ RIA Kit による血清 free T₃ の測定 —平衡透析法, free T₃ index との比較—

Radioimmunoassay of Serum Free T₃ by Amerlex Free T₃ Radioimmunoassay
Kit Compared with Equilibrium Dialysis and Free T₃ Index

吉田 克巳*	桜田 俊郎*	野村 隆*	鈴木 道子*
海瀬 信子*	海瀬 和郎*	貴田岡博史*	深沢 洋*
ヤコブヤウヒ*	板垣 洋一*	山本 莎子*	斎藤慎太郎*

Katsumi YOSHIDA*, Toshiro SAKURADA*, Takashi NOMURA*, Michiko SUZUKI*,
Nobuko KAISE*, Kazuro KAISE*, Hirofumi KITAOKA*, Hiroshi FUKAZAWA*,
Jauwhie JACUB*, Yoichi ITAGAKI*, Makiko YAMAMOTO* and Shintaro SAITO*

**The Second Department of Internal Medicine, Tohoku University School of Medicine, Sendai*

I. 緒 言

トリヨードサイロニン(T₃)は、血中では大部分血清のサイロキシン(T₄)結合グロブリン(TBG)をはじめとするT₄結合蛋白(TBP)と結合しているが^{1,2)}、実際に個体の代謝に密接な関係を持っているのは、TBPと結合していない遊離のT₃(free T₃)と考えられている^{3,4)}。血清 free T₃濃度の測定は、血清に tracer 量の ¹²⁵I-T₃ を加え、平衡透析法^{5,6)}、限外濾過法⁷⁾あるいはゲル濾過法などにより、free の状態で存在する ¹²⁵I-T₃ が加えた ¹²⁵I-T₃ のうちに占める割合(% free T₃ (%FT₃))を求め、その値と血清 total T₃濃度の積(Absolute free T₃ (AFT₃)=total T₃ × %FT₃)から算出されている。しかしながら、これらの方法では多くの検体を同時に処理するためには手技が煩雑であり、ルーチンの検査法として広く行われるには至って

いない。このたびわれわれは、血清 free T₃ 濃度を直接に、簡便かつ単時間に測定する radioimmunoassay kit (アマシャム薬品株式会社のアマレックスフリー T₃ RIA Kit) を試用する機会を得て、基礎的ならびに臨床的検討を行ったので、その成績を報告する。

II. 測定原理

本 RIA では、トレーサーとして、抗 T₃ 抗体とは結合するが、TBG とは結合しないという性質を有する ¹²⁵I-T₃ 誘導体(¹²⁵I-T₃-X)を、また抗体としては、微細なプラスチック粒子上に固相化した抗 T₃ 抗体(Amerlex 抗 T₃ 抗体)を用いている。したがって、上記のような ¹²⁵I-T₃-X の性質により、検体血清中に TBG が存在していても、直接 free T₃ 量を測定することができる⁹⁾。さらに抗 T₃ 抗体の T₃ に対する親和性が強く、ごく少量の抗体を使用しているので、TBG に結合している T₃ と、free T₃ との間の平衡関係に与える影響は最小限におさえられている。

* 東北大学医学部第二内科

受付：58年7月28日

最終稿受付：58年10月21日

別刷請求先：仙台市星陵町1-1 (〒980)

東北大学第二内科

吉田 克巳

Key words: Free Triiodothyronine, Radioimmunoassay.

III. 測定方法

1. 本キットの内容および調製(1キット100テスト用)

1) ^{125}I -T₃-誘導体液: 1ボトル 55 mL. ^{125}I -T₃-X (10 μCi 以下) が 0.9% BSA を含む 0.1M トリス buffer, pH7.8 に含まれている。

2) Amerlex 抗 T₃ 抗体懸濁液: 1ボトル 55 mL. アマレックス粒子に結合した抗 T₃ 抗体が, 0.1 M リン酸 buffer, pH7.8 中に含まれている。使用直前に均一な懸濁液として使用。

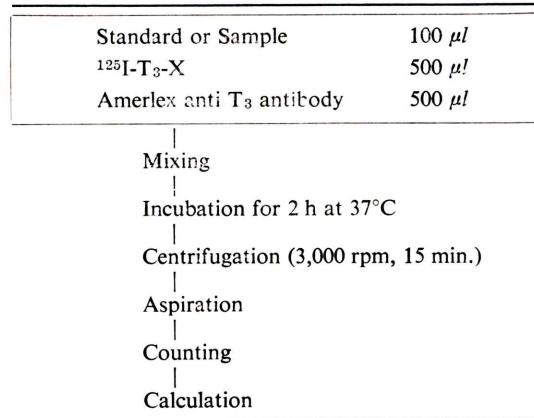
3) 標準 free T₃ ヒト血清(凍結乾燥品): 7 バイアル。各バイアルは、おのおの 0, 0.9, 2.4, 4.7, 9.7, 18.5 および 35 pmol/l の free T₃ を含む。各バイアルに蒸留水 2 mL ずつを加え、室温に 10 分間放置し、溶解させてから使用。

2. 測定方法

キットに示された方法に従い、以下のように行った。その概要を Fig. 1 に示す。

- 1) 標準血清または検体 100 μl を測定用チューブに入れる。
- 2) ^{125}I -T₃-誘導体液 500 μl を加える。
- 3) Amerlex 抗 T₃ 抗体懸濁液 500 μl を加える。
- 4) 泡立てないように混和する。
- 5) 37°C で 2 時間インキュベートする。
- 6) 3,000 rpm で 15 分間遠心分離する。
- 7) 上清液を吸引する。

Fig. 1 Free T₃ assay procedure.



8) 沈渣の放射能を γ -scintillation counter で測定する。

9) 標準曲線の測定値から標準曲線を描き free T₃ 値をよみとる。

なお、測定値は pmol/l を ng/100 mL に換算して表わした。

3. その他の方法による free T₃ の測定

すでに報告した方法に従い^{10,11,12}、平衡透析法により % FT₃ を測定し、血清 total T₃ 値(ダイナボット社製 T₃ RIA キット)に乘じて、AF T₃ を求めた。また、total T₃ および T₃ レジンスポンジ摂取率(ダイナボット社製トリオソルプテスト)の両者の積から free T₃ index (FT₃I) を算出した。

また、血清 free T₄ 値はアマレックス free T₄ キットを用いて測定した。

IV. 実験方法および対象

基礎的検討としては、インキュベーション時間および温度の変化による標準曲線の変動、kit 内(intra-) ならびに kit 間(inter-) の assay の再現性、および希釈した際の測定値について検索を行った。また、free T₃ 測定値に及ぼすアルブミンの影響についても検討した。臨床的検討は、東北大学第二内科に入院中および外来通院中の甲状腺機能低下症(Hypothyroid) 15例、甲状腺機能亢進症(Hyperthyroid) 27例、TBG 減少症(low TBG) 8例、当院産婦人科入院中の出産時の正常妊婦(Pregnant) 9例、ネフローゼ症候群による低アルブミン血症 2 例(血清アルブミン濃度 3.5 g/100 mL および 3.6 g/100 mL) および正常対照者(Euthyroid) 61 例を対象とした。妊婦からは出産後 1 時間以内に採血を行った。

V. 結 果

1. 基礎的検討

1) インキュベーション温度の影響

インキュベーション温度の標準曲線に及ぼす影響をみるために、インキュベーション温度を 4°C, 22°C(室温) および 37°C(キットの指定温度) とし、

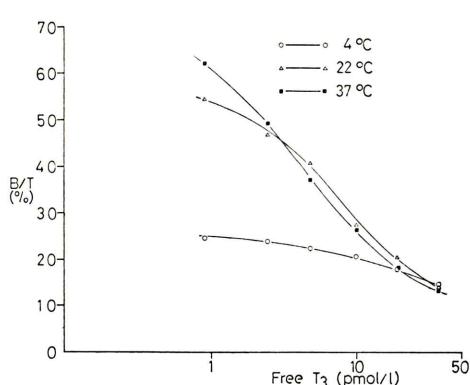


Fig. 2 Effect of incubation temperature on free T₃ standard curve (incubation for 120 min.).

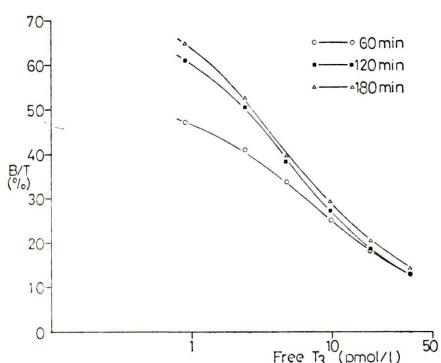


Fig. 3 Effect of incubation time on free T₃ standard curve (at 37°C).

120分インキュベートした際の標準曲線を Fig. 2 に示す。37°C で最も急峻なカーブが得られた。

2) インキュベーション時間の影響

インキュベーション時間を60分、120分(キットの指定時間)および180分とした際の37°Cにおける標準曲線を Fig. 3 に示す。60分に比べ120分および180分でより急峻なカーブが得られた。

3) 精度および再現性

① Intraassay variation: free T₃濃度が高値(No. 1), 正常値(No. 2)および低値(No. 3)の3例について, 同一キットで10回測定した時の結果を Table 1 に示す。平均土標準偏差値(Mean±SD)は, 各々 1.16 ± 0.06 , 0.339 ± 0.010 および 0.141 ± 0.012 ng/100 ml であり, これらの変動係数(CV)は, それぞれ 5.2, 2.9 および 8.8% であった。

Table 1 Intraassay Variation

Experiment No.	Free T ₃ (ng/100 ml)		
	1	2	3
1	1.18	0.332	0.156
2	1.23	0.332	0.143
3	1.03	0.345	0.137
4	1.12	0.345	0.163
5	1.19	0.345	0.150
6	1.18	0.358	0.130
7	1.10	0.332	0.130
8	1.17	0.345	0.124
9	1.22	0.332	0.137
10	1.16	0.326	0.137
Mean	1.16	0.339	0.141
S.D.	0.06	0.010	0.012
C.V. (%)	5.2	2.9	8.8

Table 2 Interassay Variation

Kit No.	Free T ₃ (ng/100 ml)		
	1	2	3
1	1.16	0.442	0.137
2	1.07	0.404	0.130
3	1.08	0.410	0.117
4	1.08	0.391	0.104
5	1.19	0.417	0.124
Mean	1.12	0.413	0.122
S.D.	0.055	0.019	0.013
C.V. (%)	4.9	4.6	10.3

② Interassay variation: free T₃ 濃度が高値(No. 1), 正常値(No. 2)および低値(No. 3)を示す3例について, ロットの異なった5キットによるassayを行った際の結果を Table 2 に示す。Mean±SD は, おのおの 1.12 ± 0.055 , 0.413 ± 0.019 , 0.122 ± 0.013 ng/100 ml であり, CVはそれぞれ 4.9, 4.6 および 10.3% であった。

4) free T₃ が 0 である血清による希釈の影響

free T₃ 値が高値を示す例について, 添付された free T₃ が 0 である血清を用いて希釈した際の測定結果を Fig. 4 に示す。理論的に得られる値に比して低値を示す傾向にあった。

5) アルブミンの影響

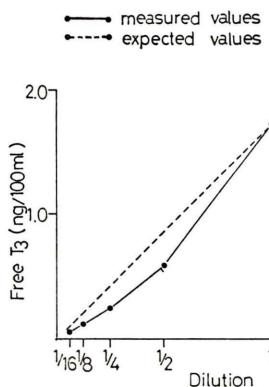


Fig. 4 Effect of serum dilution with T_3 free serum on serum free T_3 value.

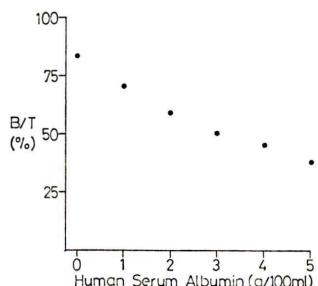


Fig. 5 Effect of human serum albumin on the binding of T_3 -analog to solid-phase T_3 antibody.

① 濃度が 0, 1, 2, 3, 4 および 5 g/100 ml の Human Serum Albumin (HSA) の再蒸留水溶液 100 μ l を本 assay 系に加えた場合の Bound/Total % に及ぼす影響を Fig. 5 に示す。アルブミンの濃度が増加するにつれて Bound/Total % は低下し、アルブミンが ^{125}I -T₃-X と抗体との結合を抑制した。

② 2 例の低アルブミン血症患者血清に、HSA 0.5, 1.0, 1.5 および 2.0 g/100 ml を各々添加した場合の本キットで測定した free T_3 値に及ぼす影響を Fig. 6 に示す。加えたアルブミン量が増加するにつれて、free T_3 値は上昇した。

2. 臨床的検討

1) 各種甲状腺機能状態における血清 free T_3 値

甲状腺機能正常者および各種疾患における本法による free T_3 の測定結果を Fig. 7 に示す。甲状

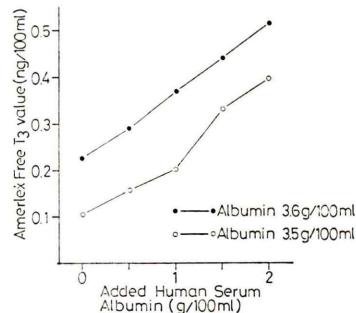


Fig. 6 Effect of albumin to sera obtained from two patients with nephrotic syndrome with low serum albumin.

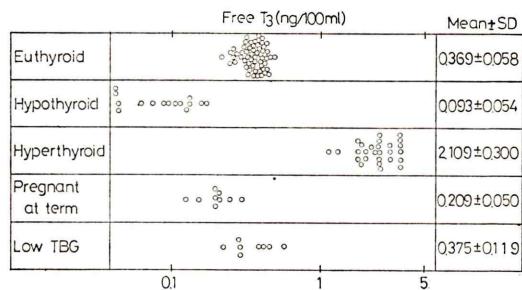


Fig. 7 Serum free T_3 concentration by Amerlex free T_3 RIA Kit.

腺機能正常者 61 例では、0.221～0.495 ng/100 ml の間に分布し、平均 0.369 ± 0.058 (Mean \pm SD) ng/100 ml であった。正常域として平均値 $\pm 2\text{SD}$ をとると、0.253～0.485 ng/100 ml となる。甲状腺機能低下症 15 例では 0～0.176 ng/100 ml、平均 0.093 ± 0.054 と全例低値を示し、甲状腺機能亢進症 27 例では 1.16 ng/100 ml 以上に分布し、17 例で測定限界の 2.28 ng/100 ml 以上を示し、平均 2.109 ± 0.300 ng/100 ml で、3 者の間には全く重なりはみられなかった。(なお、統計的処理に際し、測定限界を逸脱した例については、その測定限界値を用いて処理した。) TBG 減少症 8 例では、0.228～0.592 ng/100 ml、平均 0.375 ± 0.119 ng/100 ml と、正常者に比べ有意差はみられなかった。正常妊婦(出産時) 9 例では 0.130～0.306 に分布し、平均 0.209 ± 0.050 ng/100 ml で、正常に比べて有意に ($p < 0.001$) 低い値を示し、7 例で正常範囲より低値を示し、そのうち 2 例で機能低下

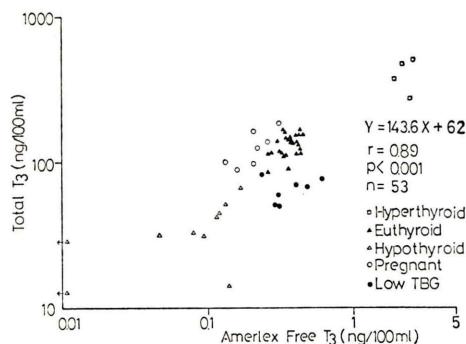


Fig. 8 Correlation of serum free T₃ with serum total T₃.

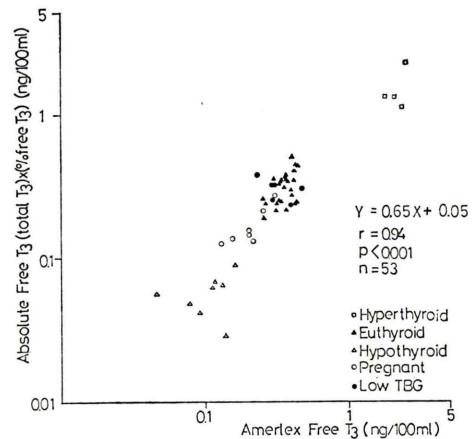


Fig. 10 Correlation of serum free T₃ values obtained by Amerlex free T₃ RIA Kit with absolute free T₃.

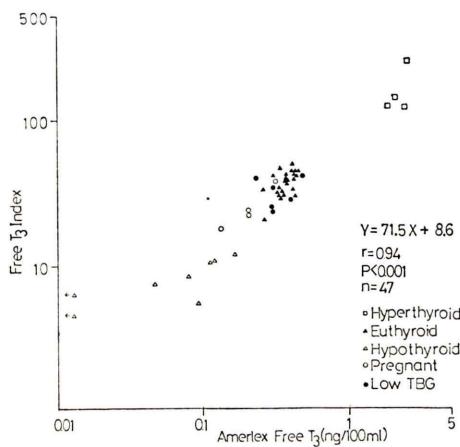


Fig. 9 Correlation of serum free T₃ with serum free T₃ index.

症の範囲に入った。

2) Total T₃ 値との関係

本法で得られた血中 free T₃ 値と total T₃ 値との関係を Fig. 8 に示す。両者の間には、相関係数 $r=0.89$ と有意の正の相関がみられたが、妊婦および TBG 減少症では、それぞれ回帰直線の上方および下方に分布し、total T₃ に比べて free T₃ は妊婦では低値を、TBG 減少症では高値を示した。

3) FT_{3I} および AFT₃ との関係

本法で得られた血中 free T₃ 値と FT_{3I} (Fig. 9) および AFT₃ (Fig. 10) との間には、ともに $r=0.94$ と有意の正の相関がみられた。出産時妊婦で

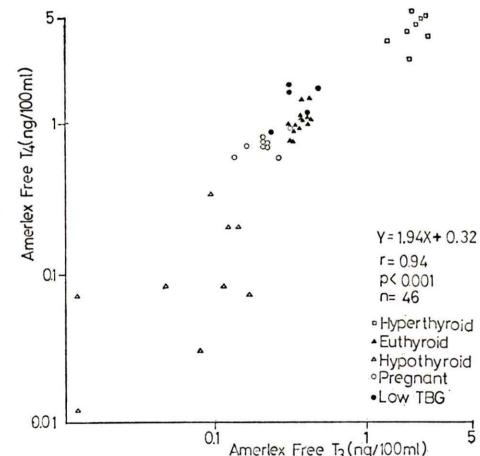


Fig. 11 Correlation of serum free T₃ with serum free T₄.

は、FT_{3I} および AFT₃ のいずれも正常対照に比べて有意に ($p<0.001$, $p<0.001$) 低下しており、また、TBG 減少症では FT_{3I} および AFT₃ はいずれも正常と変りなく、total T₃ の時とは異なり、妊婦および TBG 減少症において得られた値は、いずれもほぼ回帰直線上に分布した。

4) free T₄ 値との関係

本法で得られた free T₃ 値と、アマレックス free T₄ キットにより測定した free T₄ 値との間に

は、 $r=0.94$ と有意の正の相関がみられた (Fig. 11) 出産時妊婦では、free T₄ 値も正常対照者より低下傾向を示したが、free T₃ 値とは異なり、機能低下症との重なりはみられなかった。

VI. 考 察

冒頭にも述べたように、free T₃ の測定は、tracer 量の ¹²⁵I-T₃ を血清に加え、平衡透析法、限外濾過法あるいはゲル濾過法などにより %FT₃ を求め、それと血清の total T₃ との積から算出されている。なかでも平衡透析法が現在最も広く行われているが、標識 T₃ 中に、混在しているヨードの影響⁵⁾、および希釈効果⁵⁾など、いくつかの問題点が残されている。一方、最近になり、¹²⁵I-T₃ を加えずに平衡透析を行い、透析外液中の微量の free T₃ を直接に RIA で測定することが可能になり^{13,14)}、従来の tracer を用いた方法による問題点もかなり改善されるようになった。しかしながら、この方法では、TBP と結合力の弱い T₃ の代謝産物 (Triiodothyroacetic acid, Triiodothyropionic acid 等) が透析外液中に多く存在することが考えられ、RIA に用いる T₃ 抗体と T₃ 代謝産物との交叉反応^{15,16)}が問題になると思われる。

本法の原理は Amerlex Free T₄ Kit と同じで、T₃ 抗体には結合するが、TBG には結合しない T₃ 誘導体標識化合物 (¹²⁵I-T₃-X) と、微粒子に結合させた高力価の T₃ 抗体とを測定系に用い、free T₃ と ¹²⁵I-T₃-X との競合反応により free T₃ を測定するもので、one-tube, one-step assay のため、測定操作がきわめて簡単で、短時間で測定できる利点がある。

本キットの基礎的検討のうち、インキュベーション温度については、37°C で 22°C および 4°C に比べて最も急峻な標準曲線が得られた。また、インキュベーション時間については、時間が長くなるほど、各濃度での結合率は上昇しているが、標準曲線は120分および180分で60分よりも急峻であった。従って、インキュベーションの条件としては、キットの指示どおり 37°C、120 分で十分と

考えられる。

再現性については、intra-および inter-assay でいずれも良好な結果を得ることができた。

また、free T₃ 高値の血清について、free T₃ が 0 の血清で希釈し測定したところ、理論値に比して低値を示したことより、希釈による測定は避ける方が望ましいと考えられた。

Amino ら¹⁷⁾ は、アマレックス free T₄ キットでは、アルブミンが ¹²⁵I-T₄-X と抗体との結合を阻害することより、そのキットを用いた場合には、低アルブミン血症の free T₄ 値が実際の値よりも低値を示すと報告している。今回の実験では、アルブミンの生理的濃度内の変動が、本キットの Bound/Total % に影響を及ぼしたこと、および低アルブミン血症の患者血清に HSA を添加することにより、本キットで測定した free T₃ 値が上昇したことは、本キットでもアマレックス free T₄ キットと同様の現象がおこることを示しており、血清アルブミン濃度が低下している疾患における本キットで測定された free T₃ 値は、実際の値よりも低値を示すものと思われる。

本測定法による甲状腺機能正常者 61 例の血清 free T₃ 濃度は $0.369 \pm 0.058 \text{ ng}/100 \text{ ml}$ で、正常域として Mean $\pm 2 \text{ SD}$ をとると $0.253 \sim 0.485 \text{ ng}/100 \text{ ml}$ となる。甲状腺機能低下症では全例低値を、また、甲状腺機能亢進症では全例高値を示し、3 者の間に全く重なりはみられなかった。甲状腺機能低下症において、free T₃ の値がその最高値を示した例では、正常対照者の最低値を示した例の約 80% の値であったのに対し、甲状腺機能亢進症において、free T₃ の値がその最低値を示した例では、正常対照者の最高値を示した例の 2.3 倍の値を示し、本測定法が、特に軽症の甲状腺機能亢進症の診断および機能亢進症の治療経過の指標として有用と考えられた。

8 例の TBG 減少症では、total T₃ は 5 例で低値、3 例で正常低値を示したのに対し、free T₃ 値は 1 例で若干高値、1 例で若干低値を示したほかは全例正常範囲内にあり、平均値も正常対照者とほとんど同じ値を示した。

一方、出産時妊婦では、本キットで測定した free T₃ 値は 9 例中 7 例で低値を示し、そのうちの 2 例では、機能低下症の値と重なりがみられた。AFT₃ および FT_{3I} も正常対照者に比べて低下傾向を示したが、これらの値は全例機能低下症よりは高値であった。一方、free T₄ 値も正常対照者に比べ低下傾向を示したが、機能低下症より全例高値であった。このことは、アマレックス free T₄ キットで指摘された¹⁷⁾ように、妊娠時の低アルブミン血症の影響をうけて、本キットにより測定された。free T₃ 値が、実際の値よりも低値を示したであろうことに加えて、free T₃ 濃度が実際に低下していることを示していると考えられ、出産がストレス¹⁸⁾となって、T₄ からの T₃ への転換が減少している可能性が考えられた。

VII. 結 語

アマシャム薬品株式会社のアマレックスフリー T₃ RIA Kit について、基礎的および臨床的検討を行い、次の結果を得た。

- 1) インキュベーションの条件は、キットの指示通り、37°C、2 時間で十分と考えられる。
- 2) intra および interassay では、満足できる結果が得られた。
- 3) 測定操作はきわめて簡便であり、しかも、¹²⁵I-T₃-X および抗 T₃ 抗体溶液が着色されているため、操作ミスも最小限におさえ得ると考えられる。
- 4) 本キットで得られた血清 free T₃ 値の Mean \pm SD は、甲状腺機能正常者で 0.369 \pm 0.058 ng/100 mL、甲状腺機能低下症で 0.093 \pm 0.054 ng/100 mL、甲状腺機能亢進症で 2.109 \pm 0.300 ng/100 mL であり、3 者の間には全く重なりあいはみられなかった。
- 5) TBG 減少症では、total T₃ は低下していたが、free T₃ はほぼ正常であった。
- 6) 出産時妊婦では、free T₃ は低値を示した。
- 7) 血清アルブミン濃度が低下している疾患では、本キットで得られた free T₃ 値は実際の値よりも低値を示すことが考えられる。

以上、本法は血清 free T₃ をきわめて簡便かつ迅速に測定でき、その精度、再現性ともにすぐれていることから、日常の臨床応用上有用であると考えられる。

吉永鑑教授のご校閲を感謝します。

キットをご提供頂いたアマシャム薬品株式会社に感謝します。

文 献

- 1) Oppenheimer JH: Role of plasma proteins in the binding, distribution and metabolism of the thyroid hormones. N Eng J Med 278: 1153-1162, 1968
- 2) Nicoloff JT: Thyroid hormone transport and metabolism: Pathophysiologic implications. In Werner SC, Ingbar SH eds. The Thyroid ed 4. Harper and Row, New York, 1978, p. 88-99
- 3) Robbins J, Rall JE: Proteins associated with the thyroid hormones. Physiol Rev 40: 415-498, 1960
- 4) Ingbar SH, Freinkel N: Regulation of the peripheral metabolism of the thyroid hormones, Recent Prog Hormone Res 16: 353-403, 1960
- 5) Nauman JA, Nauman A, Werner SC: Total and free triiodothyronine in human serum. J Clin Invest 46: 1346-1355, 1967
- 6) Yoshida K, Davis PJ: Estimation of intracellular free triiodothyronine in man. J Clin Endocrinol Metab 50: 667-670, 1980
- 7) Pedersen KO: Simultaneous determination of the free thyroxine and triiodothyronine fractions in serum. Scand J Clin Lab Invest 34: 241-246, 1974
- 8) Sakurada T, Saito S, Inagaki K, et al: Quantitative determination of total and free triiodothyronine and thyroxine. Tohoku J exp Med 99: 179-188, 1970
- 9) Midgley JEM, Wilkins TA: The direct estimation of free hormones by a simple equilibrium radioimmunoassay. The Radiochemical Center Amersham, England, 1981
- 10) 吉田克巳, 桜田俊郎, 貴田岡博史, 他: Gamma Coat Free T₄ RIA キットによる血清 free T₄ の測定——平衡透析法との比較——. 核医学 17: 229-236, 1980
- 11) 吉田克巳, 桜田俊郎, 海瀬信子, 他: 甲状腺機能亢進症における thyroxine binding globulin の thyroxine に対する affinity の検討. 日内分泌会誌 57: 1571-1580, 1981
- 12) Yoshida K, Sakurada T, Kaise N, et al: Serum free thyroxine and triiodothyronine concentrations in subacute thyroiditis. J Clin Endocrinol Metab 55: 185-188, 1982

- 13) Weeke J, Örskov H: Ultrasensitive radioimmunoassay for direct determination of free triiodothyronine concentration in serum. *Scand J Clin Lab Invest* **35**: 237-244, 1975
- 14) Yeo PPB, Lewis M, Ewer DC: Radioimmunoassay of free thyroid hormone concentrations in the investigation of thyroid disease. *Clin Endocrinol* **6**: 159-165, 1977
- 15) Sakurada T, Saito S, Yamaguchi T, et al: Radioimmunoassay of triiodothyronine. *Tohoku J exp Med* **110**: 329-340, 1973
- 16) Nakamura Y, Chopra IJ, Solomon DH: An assessment of the concentration of acetic acid and propionic acid derivatives of 3, 5, 3'-triiodothyronine in human serum. *J Clin Endocrinol Metab* **46**: 91-97, 1978
- 17) Amino N, Nishi K, Nakatani K, et al: Effect of albumin concentration on the assay of serum free thyroxine by equilibrium radioimmunoassay with labeled thyroxine analog (Amerlex Free T₄). *Clin Chem* **29**: 321-325, 1983
- 18) Burr WA, Griffiths RS, Black EG, et al: Serum triiodothyronine and reverse triiodothyronine concentrations after surgical operation. *Lancet* **2**: 1277-1279, 1975