

《ノート》

Free T<sub>3</sub> 測定に及ぼす抗 T<sub>3</sub> 自己抗体の影響Influence of Anti T<sub>3</sub> Autoantibody on Free T<sub>3</sub> Measurements

土井 啓\* 竹内由美子\* 前川 美恵\*  
 中橋 宣子\* 長谷川恭一\* 置塩 達郎\*

Kei Dor\*, Yumiko TAKEUCHI\*, Mie MAEKAWA\*, Yoshiko NAKAHASHI\*  
 kyoichi HASEGAWA and Tatuio OKISHIO\*

\*The Center for Adult Diseases, Osaka, Japan

## I. はじめに

甲状腺ホルモンであるサイロキシン (T<sub>4</sub>) トリ  
 ョードサイロニン (T<sub>3</sub>) は血液中では特異結合蛋  
 白と可逆的に結合し、その結合型と遊離型との間  
 には平衡関係の成立することが知られている。甲  
 状腺ホルモンが実際に作用を示すのは遊離型  
 (FT<sub>4</sub>, FT<sub>3</sub>) と考えられ<sup>1,2)</sup>、特に血中濃度の低い  
 FT<sub>3</sub> は末梢標的細胞において、核に結合しその作  
 用を発揮すると報告されている<sup>3)</sup>。そのため最近  
 では RIA による FT<sub>3</sub> 測定キットが開発されつつ  
 ある。

今回われわれは Corning 社の IMMOPHASE  
 Free T<sub>3</sub> RIA キットおよび Amersham 社の  
 Amerlex Free T<sub>3</sub> RIA キットを用い FT<sub>3</sub> 値を測定  
 し、従来の平衡透析法による値と比較検討すると  
 ともに、われわれが経験した抗 T<sub>3</sub> 自己抗体を有  
 する症例においてそれが、これら FT<sub>3</sub> 測定に何  
 如なる影響を及ぼすかを検討した。

## II. 対象および方法

## 1. 対象

対象は甲状腺機能亢進症 10、機能低下症 10、正  
 常 10、非甲状腺疾患 7 例の計 37 例である。抗 T<sub>3</sub>  
 自己抗体を認めた症例は 55 歳男子で 56 年 7 月喉頭  
 癌のため喉頭全摘術をうけた。術後の甲状腺機能  
 検査は Table 1 に示すごとく機能低下症と考えら  
 れる成績であった。血中 T<sub>3</sub> は polyethylenglycol  
 (PEG) 法では感度以下であったが、二抗体法では  
 380 ng/dl と異常高値を示し両測定値に解離がみ  
 られたため、抗 T<sub>3</sub> 自己抗体の存在が疑われ種々  
 の検討を行った。なお本症例は、その後一時乾燥  
 甲状腺末の補充療法を行ったが約 4 か月後から補  
 充療法を中止しても、甲状腺機能正常の状態を維  
 持している。

2. FT<sub>3</sub> 測定法

## a) 平衡透析法

Schussler Plager<sup>4)</sup> の方法に準じて予備透析を行  
 った <sup>125</sup>I-T<sub>3</sub> を追跡子として、Sterling Brenner<sup>5)</sup>  
 の変法にしたがい血清 1.0 ml に約 0.03 μCi 添加  
 し室温にて 30 分間放置する。この 0.5 ml を透析  
 チューブに封じ 9.0 ml のリン酸緩衝液<sup>6)</sup> に対し

**Key words:** Free T<sub>3</sub>, equilibrium dialysis, ra-  
 dioimmunoassay, anti T<sub>3</sub> autoantibody.

\* 大阪府立成人病センター

受付：58 年 10 月 3 日

最終稿受付：59 年 1 月 9 日

別刷請求先：大阪市東成区中道 1-3-3 (☎ 537)

大阪成人病センター臨床検査

土井 啓

Table 1 Thyroid function of patient

	Patient	Normal range
T <sub>4</sub> (μg/dl)	2.0	5.5 - 11.0
Free T <sub>4</sub> (ng/dl)	0.22	0.78- 2.12
T <sub>3</sub> (ng/dl)	N.D.	90 -180
% Free T <sub>3</sub>	0.09	0.19- 0.30
rT <sub>3</sub> (ng/dl)	3.1	13 - 43
T <sub>3</sub> RSU (%)	20.8	23 - 35
TSH(μU/ml)	123.9	<10
TBG(μg/ml)	28.8	10 - 42
Thyroid test	<1: 10 <sup>2</sup>	<1: 10 <sup>2</sup>
Microsome test	1: 6.4 × 10 <sup>3</sup>	<1: 10 <sup>2</sup>
T <sub>3</sub> : PEG method	N.D.: not detectable	

18~20時間, 37°C 水浴内で振盪透析を行う. 透析終了後 1.0 ml の pool 血清を透析外液に混じり Rexyn-201, 0.2g にて無機ヨードを除き, 外液 3.0 ml の放射能を測定する. 一方透析内液 0.1 ml の放射能も同時測定し, 内液と外液の比率より % FT<sub>3</sub> を求める. % FT<sub>3</sub> と Total T<sub>3</sub>(TT<sub>3</sub>) の積より FT<sub>3</sub> を算出する. 抗 T<sub>3</sub> 自己抗体を有する血清 TT<sub>3</sub> 測定は, エタノール抽出後 RIA により測定した.

#### b) IMMOPHASE Free T<sub>3</sub> RIA 法

本法は A series と B series (8-anilino-1-naphthalensulfonic acid, [ANS] を含む) から成っている. まず A, B series おおのこのチューブに標準血清および被験血清 50 μl を入れ, A, B の各トレーサーを 100 μl 添加し室温で20分間インキュベーションを行う. 次に両チューブに抗体 800 μl を加え室温で60分間第2インキュベーションを行う. インキュベーション終了後遠心分離を行い上清を吸引除去し, 沈澱物の放射能を測定する. A, B 両 series の放射活性より次式の計算を用い標準曲線を作成し FT<sub>3</sub> を求める.

$$\frac{\text{cpm A}}{\text{Total count A}} \times \text{T.T}_3 \text{ (B series より求める)}$$

#### c) Amerlex Free T<sub>3</sub> RIA 法

標準血清および被験血清 100 μl を各チューブにとり, <sup>125</sup>I-T<sub>3</sub> 誘導体液 500 μl, 均一に懸濁させたアマレックス抗 T<sub>3</sub> 抗体 500 μl を添加し十分混和する. 混和後 37°C 2 時間インキュベーションを行い遠心分離後上清を吸引除去する. この沈澱

物の放射能を測定し標準曲線を作成, これより FT<sub>3</sub> を求める.

### 3. 抗 T<sub>3</sub> 自己抗体の検索

#### a) 血清成分と <sup>125</sup>I-T<sub>3</sub> との結合

患者および健常人血清 100 μl に <sup>125</sup>I-T<sub>3</sub> (0.01 μCi) を加え ANS を含む 0.05 M, PH 8.6 のバルビタール緩衝液にて全量 500 μl とし, 4°C 24 時間インキュベーションを行った. ついで 25% の PEG 500 μl を加え遠心分離を行い, 沈澱の放射能から血清成分の <sup>125</sup>I-T<sub>3</sub> との結合率を求め, これを抗体価として用いた.

#### b) Specific precipitation

患者および健常人血清 100 μl に <sup>125</sup>I-T<sub>3</sub> (0.01 μCi) と抗ヒト IgG, IgA, IgM 血清を添加し, 4°C 20 時間インキュベーションを行い, 遠心分離後沈澱の放射活性を測定し抗ヒト免疫グロブリンへの結合の検索を行った.

#### c) 電気泳動法による分析

患者および健常人血清 100 μl に <sup>125</sup>I-T<sub>3</sub> (0.2 μCi) を添加, 4°C 20 時間インキュベーションを行った. この血清を 0.15 M のグリシン, アセテート緩衝液 PH 8.6 にて cellulose acetate 膜を用い電気泳動を行い radioautography により <sup>125</sup>I-T<sub>3</sub> の結合分画を確認した.

## III. 結 果

### 1. 3 法による FT<sub>3</sub> 値の相関

甲状腺機能亢進症 10 例, 機能低下症 10 例, 正常 10 例, 非甲状腺疾患 7 例の FT<sub>3</sub> 値を平衡透析法 (Eq) と Amerlex Free T<sub>3</sub> RIA キット (Am), IMMOPHASE Free T<sub>3</sub> RIA キット (IMM) を用い測定した. 平衡透析法と Amerlex Free T<sub>3</sub> RIA キットとの相関関係は Fig. 1 に示すごとく相関係数  $r=0.98$  ( $p<0.001$ ), 回帰式  $Y_{(Am)} = 1.07 X_{(Eq)} + 0.39$  と良好な相関関係が認められた. 平衡透析法と IMMOPHASE Free T<sub>3</sub> RIA (IMM) との間にも  $r=0.97$  ( $p<0.001$ ),  $Y_{(IMM)} = 1.12 X_{(Eq)} + 0.32$  と良好な相関関係が得られた.

### 2. 抗 T<sub>3</sub> 自己抗体の検討

本症例における抗 T<sub>3</sub> 自己抗体の検索に関する

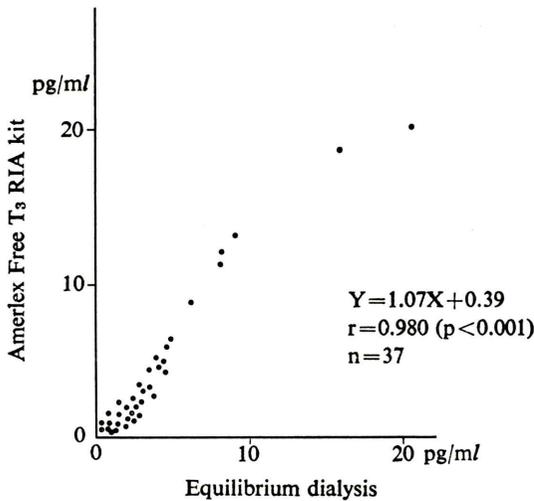


Fig. 1 Correlation between serum free T<sub>3</sub> values measured by equilibrium dialysis and Amerlex Free T<sub>3</sub> RIA kit.

成績は以下のとおりである。まず患者血清に <sup>125</sup>I-T<sub>3</sub> を添加し PEG 法を用い、結合率をみると 79.4% (ANS 添加時) であり正常対照群の 9.3±1.5% (Mean±SD) に比較し高い結合率を示した。次に患者血清に <sup>125</sup>I-T<sub>3</sub> を添加し抗ヒト IgG, IgA, IgM を抗体として用い各 immunoglobulin との結合をしらべると、抗ヒト IgG との結合は 40.9% であり正常対照の 11.9% に比し高値を示した。一方抗ヒト IgA, IgM では、正常対照との間には差は認められなかった (Fig. 2)。したがって患者血清中に存在する <sup>125</sup>I-T<sub>3</sub> との結合因子は IgG 分画に存在すると考えられた。

また正常人血清と患者血清に <sup>125</sup>I-T<sub>3</sub> を添加し電気泳動を行い <sup>125</sup>I-T<sub>3</sub> の分布を radioautography にて観察すると正常人血清では thyroxine binding globulin (TBG) 領域のみに放射活性が認められたのに対し、患者血清では TBG 領域と  $\gamma$ -globulin 領域に放射活性が確認された。これらの事より  $\gamma$ -globulin 分画に T<sub>3</sub> 結合物質の存在することが明らかとなり T<sub>3</sub> 自己抗体の存在が立証された。

### 3. 抗 T<sub>3</sub> 自己抗体の FT<sub>3</sub> 測定におよぼす影響

抗 T<sub>3</sub> 自己抗体を有する本症例の FT<sub>3</sub> を経過を追って、各測定法を用い測定し、その時の抗体価

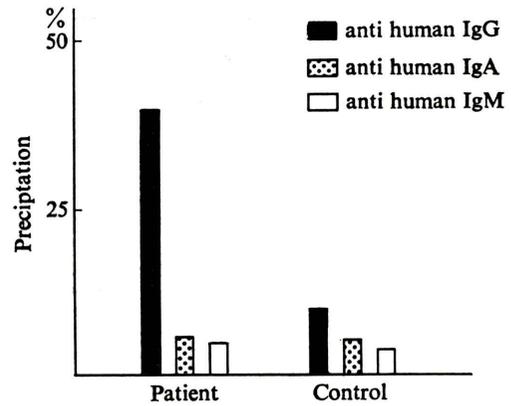


Fig. 2 Specific precipitation.

とともに Table 2 に示した。抗体価が 74% を呈した時期には FT<sub>3</sub> は平衡透析法では 2.6 pg/ml と正常範囲にあったが、Amerlex Free T<sub>3</sub> RIA キットでは >23.0 pg/ml、IMMOPHASE Free T<sub>3</sub> RIA キットでは >19.0 pg/ml とともに高値を示した。抗体価が 34% の時には両 RIA キットの値はおのおの 22.9, 12.0 pg/ml、抗体価が 23.2% に低下した時期には 15.0, 6.8 pg/ml と低下し抗体価の減少にしたがい FT<sub>3</sub> 値も順次低下の傾向が認められた。一方平衡透析法による FT<sub>3</sub> 値は抗体値の変動と関係なく正常値の下限にあった。この期間の T<sub>4</sub>, FT<sub>4</sub>, TBG は正常域を示し、TSH のみ高値であった (Fig. 3)。

## IV. 考 察

FT<sub>3</sub> の測定は Ingber ら<sup>7)</sup> により報告されて以来最近では RIA による測定用キットが開発されつつある。従来より用いられている平衡透析法は、T<sub>3</sub> が T<sub>4</sub> に比べ血漿蛋白への結合が弱いため一部問題はあがあるが FT<sub>3</sub> の標準測定法と考えられている。今回われわれは平衡透析法と Amerlex Free T<sub>3</sub> RIA および IMMOPHASE Free T<sub>3</sub> RIA キットとの相関を求めた。ここで用いた平衡透析法は FT<sub>4</sub> の Scatchad-plot<sup>8)</sup> 解析より T<sub>4</sub> 結合蛋白の親和定数、結合能を求め本法の妥当性を裏づけた山本<sup>9)</sup> らの方法を用いた。

Table 2 Values of Free T<sub>3</sub> and anti T<sub>3</sub>-autoantibody titer in patient's serum

method	normal range	1982		
		Jan.	June	Sept.
Equilibrium dialysis	(1.6-4.5)	2.6	2.0	2.0 pg/ml
Amerlex Free T <sub>3</sub> RIA kit	(2.8-5.7)	>23.0	22.9	15.0
IMMOPHASE Free T <sub>3</sub> RIA kit	(2.3-7.0)	>19.0	12.0	6.8
Anti-T <sub>3</sub> -autoantibody titer		74.0	34.0	23.2 %

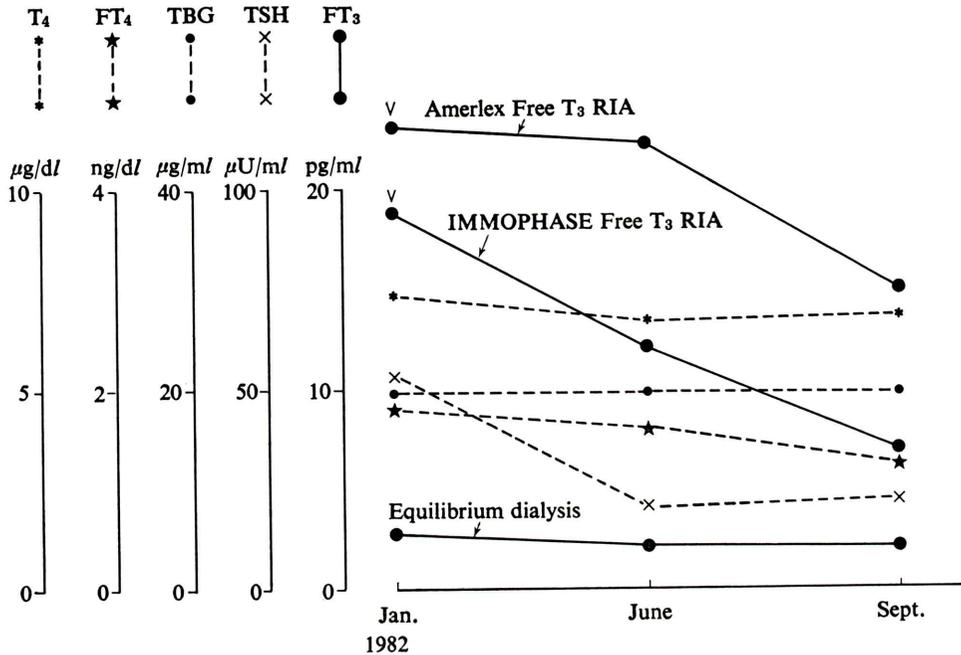


Fig. 3 Changes of T<sub>4</sub>, FT<sub>4</sub>, TBG, TSH and FT<sub>3</sub> values in patient's serum.

平衡透析法と Amerlex Free T<sub>3</sub> RIA キット、および IMMOPHASE Free T<sub>3</sub> RIA キットとの間には、おのおの  $\gamma=0.98$  および  $\gamma=0.97$  と良好な相関関係があり回帰曲線も満足すべき結果が得られた。このことより RIA による FT<sub>3</sub> 測定は平衡透析法に比べ操作が簡単であり有用と考えられた。

次にこれら測定法を用い抗 T<sub>3</sub> 自己抗体を有する症例の FT<sub>3</sub> を測定し比較した。抗 T<sub>3</sub> 自己抗体の確認は 2~3 検討を行った結果、本症例は血清中 IgG に T<sub>3</sub> が特異的に結合する成分があり、これが  $\gamma$ -globulin 分画に存在した事から抗 T<sub>3</sub> 自己抗体を立証した。この抗 T<sub>3</sub> 自己抗体値の動きと

各測定法による FT<sub>3</sub> 値の変動は、平衡透析法では、抗体値の動きと関係なく正常値を示し、Amerlex Free T<sub>3</sub> RIA キット、IMMOPHASE Free T<sub>3</sub> RIA キットでは抗体価の上昇時には異常高値であり、抗体価の減少につれて両測定法による FT<sub>3</sub> も低下して来たが、なお他の甲状腺ホルモンに比し高値であった。これは Amerlex Free T<sub>3</sub> RIA キットがトレーサーとして、内因性の結合蛋白とは結合せず T<sub>3</sub> 抗体のみに結合する <sup>125</sup>I-T<sub>3</sub> 誘導体を用いているが、この誘導体が抗 T<sub>3</sub> 自己抗体に結合するため、FT<sub>3</sub> が高値を示すと考えられる。抗 T<sub>4</sub> 自己抗体が存在した場合も同様のことが報告<sup>10)</sup>されている。IMMOPHASE Free T<sub>3</sub>

RIA キットでは抗 T<sub>3</sub> 自己抗体が <sup>125</sup>I-T<sub>3</sub> に結合するため抗体に結合する放射活性が少なくなり FT<sub>3</sub> 値に影響を与えられる。平衡透析法においても若干の影響はあると考えられるが、平衡透析法による測定値が抗体価の変動に関係なく、他の甲状腺ホルモン濃度に応じた値を示していたことから、抗 T<sub>3</sub> 自己抗体の存在した場合は平衡透析法がもっとも影響が少ないと考えられた。抗 T<sub>3</sub> 自己抗体の産生機序については、まだ不明の点が多いが Staeheli<sup>11)</sup> らは、甲状腺機能低下症、自己免疫性甲状腺炎43例中10例に、また乾燥甲状腺末投与後19例中2例に抗 T<sub>3</sub> 自己抗体を見い出しており、あるいは一般的に考えられるほどまれな病態でないのかも知れない。いずれにしても抗 T<sub>3</sub> 自己抗体の存在は FT<sub>3</sub> および TT<sub>3</sub> の RIA による測定値に著明に干渉するため注意が必要であり、各種甲状腺ホルモン測定値間に解離がみられる症例は自己抗体の存在の可能性を考え検索することが重要と思われる。

## V. ま と め

平衡透析法による FT<sub>3</sub> 値と Amerlex Free T<sub>3</sub> RIA キット、IMMOPHASE Free T<sub>3</sub> RIA キットによる FT<sub>3</sub> 値との間には、おのおの良好な相関関係が得られた。

一方抗 T<sub>3</sub> 自己抗体の存在する血清での FT<sub>3</sub> 測定は、平衡透析法では自己抗体の存在による影響は少ないと思われたが、Amerlex Free T<sub>3</sub> RIA キットおよび IMMOPHASE Free T<sub>3</sub> RIA キットによる FT<sub>3</sub> 値は抗体価とともに大きな変動を示し、抗 T<sub>3</sub> 自己抗体が RIA による FT<sub>3</sub> 測定に影響を及ぼすことが示唆された。

## 文 献

- 1) Robbins J, Rall JE: Proteins associated with the thyroid hormones. *Physiol Rev* **40**: 415, 1960
- 2) Ingbar S H, Freinkel N: Regulation of the peripheral metabolism of the thyroid hormones. *Recent Prog Horm Res* **16**: 353, 1960
- 3) Oppenheimer JH: Initiation of thyroid hormone action. *New Eng J Med* **292**: 1063, 1975
- 4) Schussler GC, Plager JE: Effect of Preliminary purification of <sup>131</sup>I-thyroxine on the determination of free thyroxine in serum. *Clin Endocrinol Metab* **27**: 242, 1967
- 5) Sterling K, Brenner MA: Free thyroxine in human serum simplified measurement with the aid of magnesium precipitation. *J Clin Invest* **45**: 153, 1966
- 6) Dulbacco R, Vogt M: Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. *J Exp Med* **99**: 167, 1954
- 7) Ingbar SH, Braverman LE, Dawbar NA, Lee GL: A new method for measuring the free thyroid hormone in human serum and an analysis of the factors that influence its concentration. *J Clin Invest* **44**: 1679, 1965
- 8) Rosenthal HA: A graphic method for the determination and presentation of binding parameters in a complex system. *Anal Biochem* **20**: 525, 1967
- 9) Yamamoto T, Doi K, Ichihara K, Miyai K: Reevaluation of measurement of serum free thyroxine by equilibrium dialysis based on computational analysis of the interaction between thyroxine and its binding proteins. *J Clin Endocri* **50**: 882, 1980
- 10) Konishi J, Iida Y, Kousaka T, Ikekubo K, Nakagawa T, Torizuka K: Effect of anti-thyroxine autoantibodies on radioimmunoassay of free thyroxine in serum. *Clin Chem* **28**: 1389, 1982
- 11) Staeheli V, Vallton MB, Burger A: Detection of human anti-thyroxine and triiodo thyronine antibodies in different thyroid conditions. *J Clin Endocri* **41**: 669, 1975