

《ノート》

Magic T₃ RIA Kit による血清 T₃ の測定Measurement of Serum T₃ by Magic T₃ RIA Kit

海瀬 信子* 桜田 俊郎* 海瀬 和郎* 吉田 克巳*
 深沢 洋* 鈴木 道子* 野村 隆* 板垣 洋一*
 米満 京子* 山本 蒔子* 斉藤慎太郎* 吉永 馨*

Nobuko KAISE, Toshiro SAKURADA, Kazuro KAISE, Katsumi YOSHIDA, Hiroshi
 FUKASAWA, Michiko SUZUKI, Takashi NOMURA, Yoichi ITAGAKI, Kyoko
 YONEMITSU, Makiko YAMAMOTO, Shintaro SAITO and Kaoru YOSHINAGA

Second Department of Internal Medicine, Tohoku University, School of Medicine

I. 緒 言

血清Triiodothyronine(T₃)のradioimmunoassay (RIA)による測定は、1970年Brownら¹⁾により開発が試みられ、各種RIA kitが市販されるに及んで日常的に広く临床上に用いられ、甲状腺機能検査のためには不可欠の検査法となった。近年簡易で精度の高いT₃ RIA kitの開発が進められており、特にB・F分離の面からは従来の二抗体法、チャコール法に加えてセファデックス法、ポリエチレングリコール法および固相法による分離法も行われるにいたった。今回われわれはpara-magnetic particleに抗T₃抗体を結合させ、B・Fの分離をmagnetic separatorにて行う、遠沈操作が不要のT₃ RIA kit “Magic T₃ kit”を試用する機会を得たので、その基礎的、臨床的成績について報告する。

II. 方法ならびに対象

1. キットの構成

1) Para-magnetic particleに結合した抗T₃抗体; 50 mlにBSA 50 mg およびNaN₂ 10 mgを含む0.03 M phosphate buffered saline P.H. 7.5の懸濁液。

2) ¹²⁵I-T₃; 10 mlにANS 10 mg, BSA 2 mg およびNaN₂ 2 mgを含む0.01 M phosphate buffered saline P.H. 7.5の溶液, 3バイアル。

3) 0~8 ng/mlのT₃標準品(7種類; 0, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 および8.0 ng/ml)。

4) 甲状腺機能亢進症および低下症のコントロール血清2種。

2. 測定法

Figure 1に示すごとく、Sample量としては50 μ lを用い、室温2時間のincubationを行うもので、通常のRIAの手技と特に異なるところはない。本法の特徴は簡素化されたB・F分離法にあり、抗T₃抗体をpara-magnetic particleに結合させてあるため、incubation終了後magic magnetic separatorにsetして一定時間放置した後にdecant-

* 東北大学医学部第二内科

受付: 59年4月27日

最終稿受付: 59年7月11日

別刷請求先: 仙石市星陵町1-1 (☎980)

東北大学医学部附属病院第二内科

海瀬 信子

Key words: Radioimmunoassay, T₃, Hyperthyroidism, Hypothyroidism, Pregnancy.

ation するのみで B・F の分離が迅速かつ確実に行うことができる。

従来法としての血清 T_3 および T_4 の測定には、それぞれ T_3 RIA kit II および T_4 RIA kit (ともにダイナボット社), TSH の測定には TSH RIA kit (第一ラジオアイソトープ社) を、また TBG の測定には RIA gnost TBG (ヘキスト社) を用いた。

3. 対象

対象は当科における正常対象70例, 甲状腺機能亢進症35例, 治療後で抗甲状腺剤を中止している甲状腺機能亢進症11例, 原発性甲状腺機能低下症25例, 家族性 TBG 減少症8例および正常妊娠20例である。

III. 測定成績

1. 基礎的検討

1) 標準曲線

室温2時間 incubation にて5回測定した際の標準曲線を Fig. 2 に示す。標準 T_3 濃度 0~8.0 ng/ml の間に急峻な曲線を描き、再現性も良く、ほぼ一定した標準曲線が得られた。

2) Incubation 時間および温度の影響

Incubation 時間は Fig. 3 a に示すごとく、60~180分ではほぼ同様であった。また incubation 温度に関しては Fig. 3 b に示すごとく、4°C で結合率の低下を認めたが、室温および 37°C ではほとんど変化がなかった。

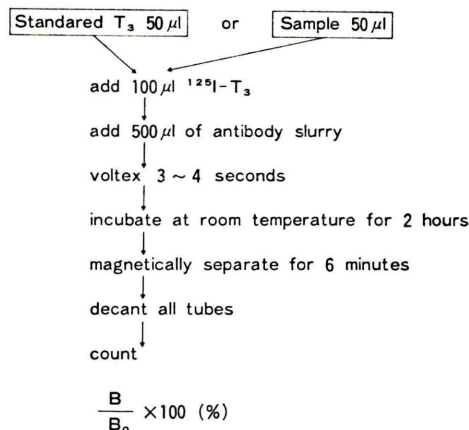


Fig. 1 Method.

3) Separation 時間の検討

本法の B・F の分離は、magic magnetic separator にセットし6分後に decant するという方法によるが、その separation 時間について検討した。Fig. 4 に示すごとく、2~8 分間の静置ではほぼ同一の標準曲線が得られ、きわめて短時間に正確な B・F の分離を終了することができると思われた。

以上の結果より、以下の検討は、kit に指示されているごとく室温で2時間の incubation を行い、separation 時間を6分間とした。

4) 同時再現性および日差再現性

Table 1 に示すごとく、 T_3 が低、中および高濃度の3種の血清(オルソコントロール血清)を用い、同一測定内において10重測定し、同時再現性を検討したところ、変動係数はそれぞれ、7.7, 4.8 および 8.3% と良好であった。また同一の血清を用い、異なる lot 間および測定日時での10回の測定により日差再現性を検討したところ、変動係数はそれぞれ、6.8, 5.1 および 7.6% と良好であった。

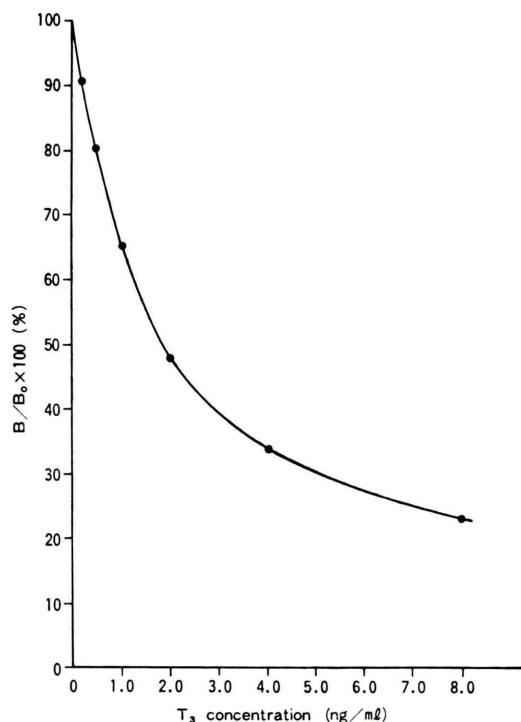


Fig. 2 Standard curve.

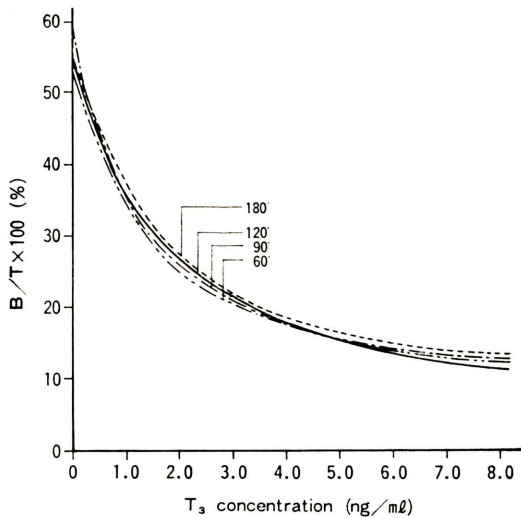


Fig. 3a Influence of incubation time.

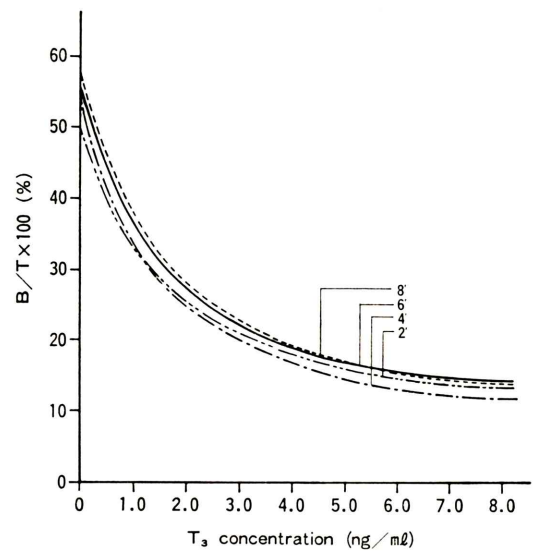


Fig. 4 Influence of separation time.

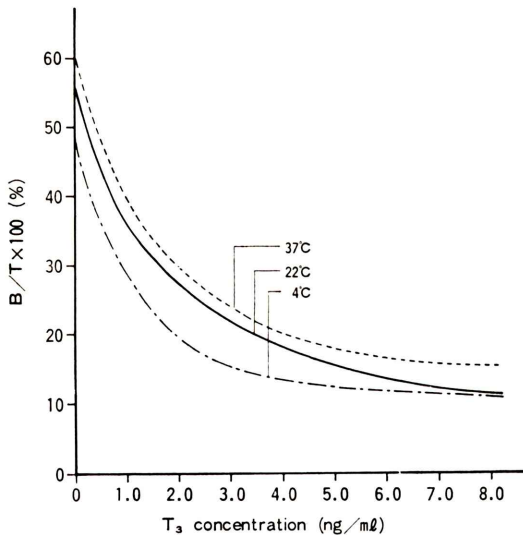


Fig. 3b Influence of incubation temperature.

5) 回収率

Table 2 に示すごとく、T₃ 濃度が 0.97 および 2.46 ng/ml の血清に標準 T₃ 溶液を加え回収率を検討したところ、平均 \pm S.D. は $102 \pm 4.3\%$ および $98 \pm 2.0\%$ と良好であった。

6) 希釈試験

T₃ 濃度が高値の 2 種の血清を T₃ 濃度が 0 ng/ml の標準血清にて 1/2～1/16 まで希釈して T₃ 濃度

Table 1

Intraassay variation			
	Mean (T ₃ ng/ml)	S.D. (ng/ml)	C.V. (%)
Control A (n=10)	0.669	0.059	7.7
Control B (n=10)	2.07	0.101	4.8
Control C (n=10)	3.61	0.301	8.3
Interassay variation			
	Mean (T ₃ ng/ml)	S.D. (ng/ml)	C.V. (%)
Control A (n=10)	0.624	0.043	6.8
Control B (n=10)	1.87	0.097	5.1
Control C (n=10)	3.95	0.302	7.6

Table 2 Recovery rate

	Added T ₃ (ng/ml)	Measured T ₃ (ng/ml)	Recovery (%)
Sample A	0	0.97	—
	0.25	1.21	96
	0.50	1.49	104
	1.00	1.99	102
	2.00	3.14	108
	Mean \pm S.D.		102 \pm 4.3
Sample B	0	2.46	—
	0.25	2.70	96
	0.50	2.96	100
	1.00	3.43	97
	2.00	4.49	101
	Mean \pm S.D.		98 \pm 2.0

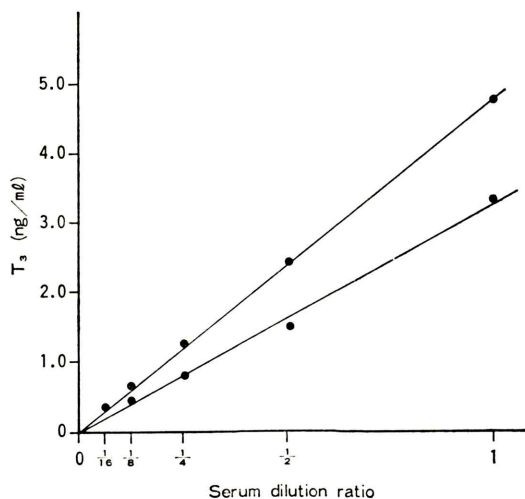


Fig. 5 Dilution test.

を測定した。Fig. 5 に示すごとく、2 種の血清はともに原点に向かう直線となった。

2. 臨床的検討

1) 正常者, 各種甲状腺疾患, 家族性 TBG 減少症および妊娠における測定成績

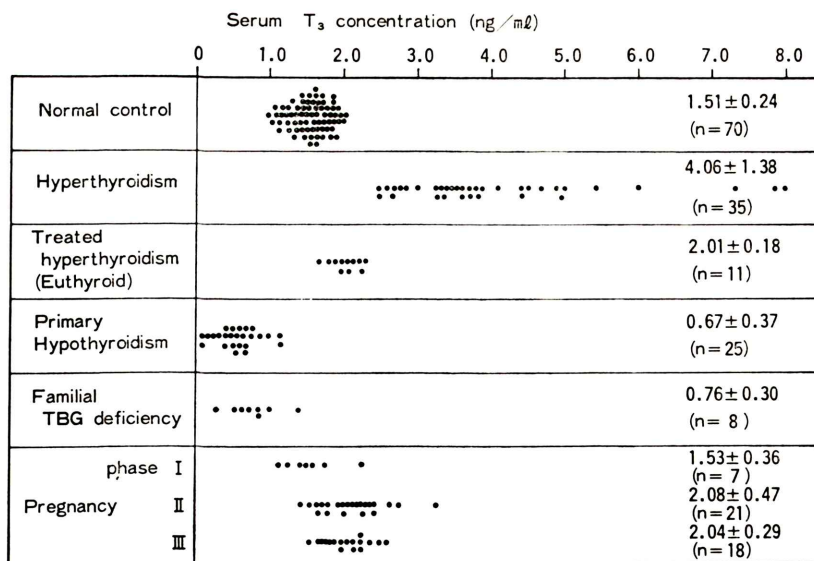
正常対照 70 例における血清 T_3 値は $0.98 \sim 1.97$

ng/ml に分布し, 平均 1.51 ng/ml, S.D. は 0.24 ng/ml であった。Mean ± 2 S.D. を正常域とすると, 正常範囲は $1.03 \sim 1.99$ ng/ml となる。

正常対照, 各種甲状腺疾患, 家族性 TBG 減少症および正常妊娠における T_3 の測定成績を Fig. 6 に示した。甲状腺機能亢進症では 4.06 ± 1.38 ng/ml (Mean \pm S.D.) と有意に ($p < 0.001$) 高値を, また甲状腺機能低下症では 0.67 ± 0.37 ng/ml と有意に ($p < 0.001$) 低値を示した。治療中の甲状腺機能亢進症では, 2.01 ± 0.18 ng/ml と正常からわずかに高い値を示した。甲状腺機能亢進症では正常域の値を示した例はなかったが, 甲状腺機能低下症では正常値にとどまる例も認められた。家族性 TBG 減少症では 0.76 ± 0.30 ng/ml と有意に ($p < 0.001$) 低値を示した。これらの例における血清 TBG 濃度は $0 \sim 14.8$ μ g/ml と低値であった。血清 TBG が増加する妊娠の例では, 妊娠第一期では 1.53 ± 0.36 ng/ml と正常対照と差はなかったが第二期と第三期ではそれぞれ, 2.08 ± 0.47 ng/ml, 2.04 ± 0.29 ng/ml と有意に ($p < 0.01$) 高値を示した。

2) 従来法の T_3 および T_4 値との相関

われわれが従来使用している RIA 法によって

Fig. 6 T_3 concentration in patients with thyroid disease.

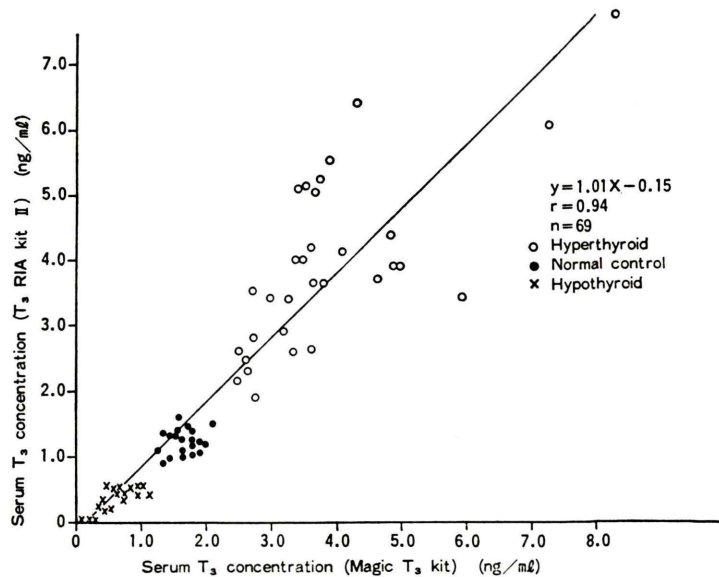


Fig. 7 Correlation of serum T₃ values obtained by magic T₃ kit with those by T₃ RIA kit II.

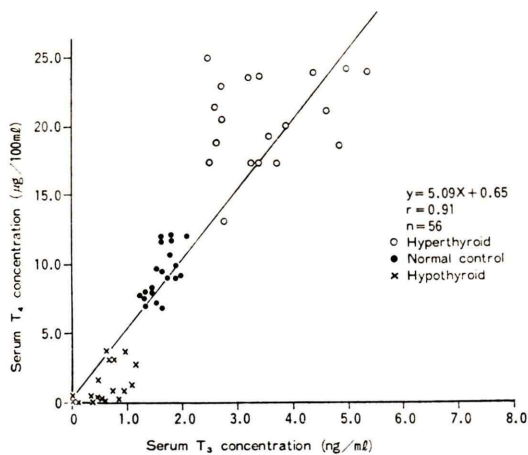


Fig. 8 Correlation of serum T₃ values obtained by magic T₃ kit with serum T₄ values obtained by T₄ RIA kit.

測定した血清 T₃ と本法による血清 T₃ 値との相関は Fig. 7 に示すごとくで、本法による T₃ 値の方がわずかに高値を示す傾向にあり、相関直線は $y = 1.01x - 0.15$ 、相関係数は 0.94 と良好であった。

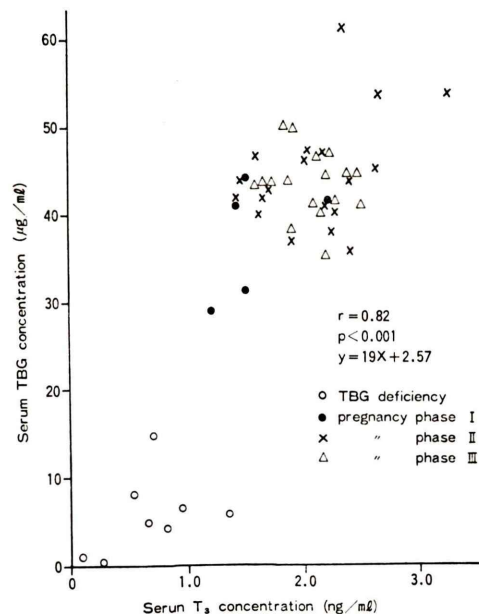


Fig. 9 Correlation between serum T₃ and serum TBG in patients with familial TBG deficiency and normal pregnant.

T₄ との相関も Fig. 8 のごとく $r = 0.91$ と良い相関を示した。

3) 血清 TBG 値との相関

家族性 TBG 減少症および正常妊娠において本法による血清 T_3 値と血清 TBG 値の相関を検討したが Fig. 9 に示すごとく $r=0.82$ と良い相関を示した。

IV. 考 案

T_3 の RIA としては現在各種の kit が市販されており、その測定手技にもしだいに改良が加えられ、簡便化されつつある。B・F の分離法の面からは二抗体法、チャコール法、セファデックス法、ポリエチレングリコール法に加え種々の固相法も開発されているが、遠沈操作を要する測定法が多い。今回試用した Magic T_3 kit は para-magnetic particle に抗 T_3 抗体を結合させてあるため、B・F の分離に際し、遠沈操作は必要なく、separator にセットし静置するだけで十分であり、その後 decantation することにより B・F 分離を一律に、迅速かつ確実に行うことができる。

基礎的検討の結果では、incubation 時間および温度の影響をうけて B/T % は変化し、incubation 時間が 30 分および温度が 4°C では B/T % の低下を認めたが、incubation 時間が 60 から 180 分、温度が室温および 37°C ではほぼ同様の結果であり、指示された 120 分、室温の測定で、標準曲線は 0 から 8.0 ng/ml まで急峻な曲線を描き、短時間に T_3 の測定が可能と思われた。

また 2 分から 8 分間の separation 時間で B/T % には変化は認められず、短時間に B・F の分離が終了していると思われた。

回収率は平均 102 % および 98 % で良好な結果であり、また稀釈試験においては T_3 濃度が 0 ng/ml の標準血清で稀釈した 2 種の血清で、いずれも原点に向かう直線となり、 T_3 高値の検体を稀釈して測定することが可能と思われた。

Intraassay variation および interassay variation は C.V. が $4.8\sim 8.3\%$ と良好な結果であり、特に、C.V. が高値をとりやすい低濃域でもそれぞれ 7.7 %、6.8 % という結果であった。

以上より本測定法は安定した精度および再現性

にすぐれた測定法と思われ、その簡便さも合わせて日常検査法として十分に用い得ると思われた。

臨床的検討についてみると、正常対照における測定成績は平均 1.51 ng/ml であり、甲状腺機能亢進症では $4.06\pm 1.38\text{ ng/ml}$ と有意に高値を、原発性甲状腺機能低下症では $0.67\pm 0.37\text{ ng/ml}$ と有意に低値を示し、諸家の報告³⁻¹¹⁾と一致した。治療中の甲状腺機能亢進症では 2.01 ± 0.18 と未治療群に比し明らかに低値であり、正常から正常高値で、臨床症状ともよく一致した。この時の血清 T_4 値は $10.9\pm 2.5\text{ }\mu\text{g/ml}$ と同様の域の値であった。

甲状腺機能亢進症では T_3 が正常域の値を示す例はなく、鑑別は容易であったが、原発性甲状腺機能低下症では正常域を示す例も 8 % に認められた。甲状腺機能低下症では T_4 値に比し T_3 値が低値をとらない場合もあり^{10,11)}、軽症の甲状腺機能低下症の鑑別診断には血清 T_4 値や、TSH 値も指標にすべきであるとされている¹⁰⁾。

血清 TBG が減少する家族性 TBG 減少症での T_3 は有意に低値を示し、血清 TBG が増加する正常妊娠での T_3 は、妊娠第一期では正常範囲を示す例が多かったが、第二期と第三期では有意に高値を示した。妊娠時の血清 TBG 濃度は 8 から 12 週までにしだいに増加し、その後はほぼ一定の値をとるため、Fig. 9 に示すように TBG の濃度に平行して T_3 値も変化したものと思われ、妊娠時の甲状腺機能の検索には free の hormon も測定すべきと思われた。

本 kit により測定した血清 T_3 値と、従来われわれが使用している T_3 RIA kit II による T_3 値との間には $r=0.94$ と良好な正の相関が認められ、また T_4 RIA kit にて測定した血清 T_4 値との間にも $r=0.91$ と良好な正の相関を認めた。

V. 結 語

Magic T_3 kit の基礎的ならびに臨床的検討を行った。本 kit では、短時間に簡便に安定した精度および再現性の良い血清 T_3 の測定を行うことができた。

本 kit にて測定した正常対照における血清 T_3

値は 1.51 ± 0.24 ng/ml であり、甲状腺機能亢進症では高値を、甲状腺機能低下症では低値を示し、甲状腺機能をよく反映し、日常検査法として臨床的に十分用い得ると思われた。

また血清 TBG が低下した場合の血清 T₃ は低値を、血清 TBG が増加した場合は血清 T₃ は高値を示した。

本測定に用いた kit はコーニングメディカル社より提供されました。

文 献

- 1) Brown BL, Ekins RP, Ellis SM, et al: Specific antibodies to triiodothyronine hormone. *Nature* **226**: 359, 1970
- 2) Pourfarzaneh M, Sandy K, Johnson C, et al: Production and use of magnetizable particles in immunoassay. *The Ligand Quarterly* **5**: 41-47, 1982
- 3) Gharib H, Mayberry WE, Ryan RJ: Radioimmunoassay for triiodothyronine; a preliminary report. *J Clin Endocrinol* **31**: 709-712, 1970
- 4) Liebllich J, Utiger RD: Triiodothyronine radioimmunoassay. *J Clin Invest* **51**: 157-166, 1972
- 5) Chopra IJ, Solomon DH, Beall GN: Radioimmunoassay for Measurement of triiodothyronine in human serum. *J Clin Invest* **50**: 2033-2041, 1971
- 6) Mitsuma T, Nihei N, Gershengorn M, et al: Serum triiodothyronine; Measurement in human serum by radioimmunoassay with corroboration by gas-liquid chromatography. *J Clin Invest* **50**: 2679-2688, 1971
- 7) Larsen PR: Direct immunoassay of triiodothyronine in human serum. *J Clin Invest* **51**: 1939-1949, 1972
- 8) Surks MI, Schadow R, Oppenheimer JH: A new radioimmunoassay for plasma triiodothyronine; Measurement in thyroid diseases and in patients maintained on hormone replacement. *J Clin Invest* **51**: 3104-3113, 1972
- 9) 桜田俊郎, 山口 徹, 山本蒔子, 他: Triiodothyronine の radioimmunoassay. *日内分泌会誌* **48**: 559-568, 1972
- 10) 齊藤慎太郎: トリヨードサイロニン (T₃). *Medicina* **12**: 1336-1337, 1975
- 11) 貴田岡博史, 桜田俊郎, 吉田克巳, 他: ダイナボット T₃ RIA kit III による血清 T₃ の測定. *核医学* **19**: 97-104, 1982