

《ノート》

マグネティックフリー T₄ RIA キットによる 血清 free T₄ の測定

The Measurement of Serum Free Thyroxine with the Magnetic FT₄ 'Corning'

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

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

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

I. 緒 言

サイロキシン(T₄)は、血中では大部分血清の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T₄(free T₄)と考えられている^{3,4)}。血清 free T₄濃度の測定は、血清にtracer量の¹²⁵I-T₄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⁸⁾などにより、freeの状態で存在する¹²⁵I-T₄が加えた¹²⁵I-T₄のうちにしめる割合(% free T₄, % FT₄)を求め、その値と血清 total T₄濃度の積(Absolute free T₄, AFT₄=total T₄ × %FT₄)から算出されている。しかしながら、これらの方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いたっていない。このたびわれわれは、血清 free T₄濃度を直接に、簡便かつ短時間に測定する radioimmunoassay kit

(コーニングメディカル株式会社のマグネティック free T₄「コーニング」)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T₄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-T₄誘導体を、また抗体として、常磁性微粒子に共有結合させた抗T₄抗体を用いている。したがって、上記のような¹²⁵I-T₄誘導体の性質により、被検血清中にTBGが存在していても、直接 free T₄量を測定することができる。さらに、magnetic separationにより boundとfreeの分離を簡単に行え、試験管たてを傾けることにより上清を除去することができるきわめて簡便な方法である。

III. 測 定 方 法

1. 本キットの内容(1キット100テスト用)

- 1) ¹²⁵I-T₄誘導体液: 1ボトル10mlが2ボトル。¹²⁵I-T₄誘導体(2.75 μCi)が0.1% bovine

Key words: Free thyroxine, Radioimmunoassay, Paramagnetic particle, ¹²⁵I-T₄ derivatives.

* 東北大学医学部第二内科

受付: 59年6月8日

最終稿受付: 59年8月3日

別刷請求先: 仙台市星陵町1-1 (☎ 980)

東北大学医学部第二内科

吉田 克巳

serum albumin (BSA) および赤色色素を含む 0.03 M phosphate buffered saline (PBS), pH 7.5 に含まれている。

2) マジック T₄ 抗体懸濁液: 1 ボトル 50 mL 常磁性微粒子に共有結合した抗 T₄ 抗体が、0.1% BSA と 0.02% sodium azide を含む 0.03 M PBS, pH 7.5 中に含まれている。

3) 標準 free T₄ ヒト血清: 6 パイアル。各バイアルは、おののおの 0, 0.3, 1, 2, 4 および 6 ng/100 mL の free T₄ を含む。

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) 標準または被検血清 50 μl を測定用チューブに入れる。
- 2) ¹²⁵I-T₄ 誘導体液 200 μl を加える。
- 3) マジック抗 T₄ 抗体懸濁液 500 μl を加える。
- 4) 2~3 秒間ボルテックスで混和する。
- 5) 37°C で 1 時間インキュベートする。
- 6) 室温で 3 分間 magnetic separation を行う。

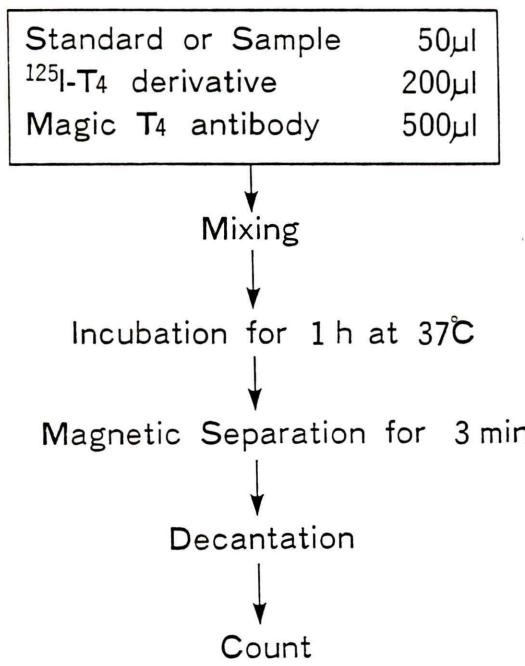


Fig. 1 Free T₄ assay procedure.

7) 上清液をデカントする。

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

9) 標準血清の測定値から標準曲線を描き, free T₄ 値をよみとる。

また, total T₄ (ダイナボット社製 T₄ RIA キット) および T₃ 摂取率 (コーニング社製 magic T₃ uptake kit⁹⁾ の両者の積から free T₄ index (FT₄I) を算出し, 本キットでの測定成績と比較した。

IV. 実験方法および対象

基礎的検討として, インキュベーション時間, 温度およびセパレーション時間を変えた時の標準曲線の変動, キット内ならびにキット間の intra-ならびに inter-assay の再現性, および希釈時の測定値について検索を行った。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亢進症 (Hyperthyroid) 18 例, 甲状腺機能低下症 (Hypothyroid) 12 例, TBG 減少症 (Decreased TBG) 5 例, 当院産婦人科入院中の出産時の正常妊娠 (Pregnant) 12 例および正常対照者 (Euthyroid) 56 例を対象とした。妊娠からは出産後 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 およびキットの指定温度である 37°C とし, 60 分間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 30 分, 60 分 (キットの指定時間), 90 分および 120 分とした際の 37°C における標準曲線を Fig. 3 に示す。30 分に比べ 60, 90 および 120 分でより急峻なカーブが得られた。

3) セパレーション時間の影響

インキュベーションを 37°C で 60 分間行い, セ

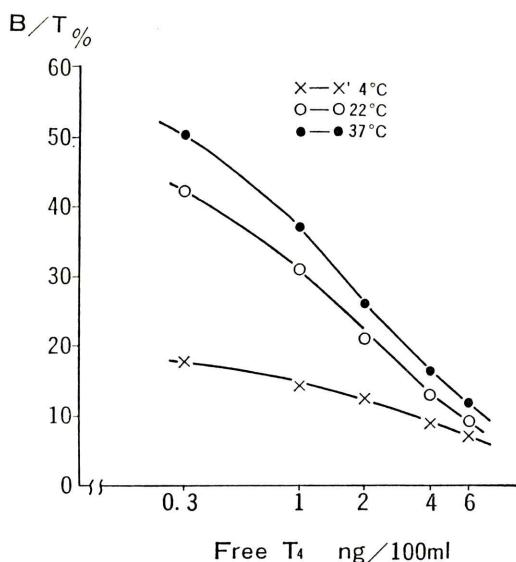


Fig. 2 Influence of incubation temperature on free T₄ standard curve.

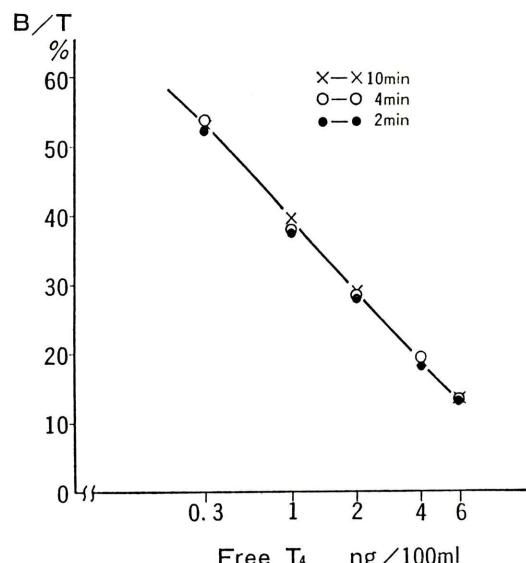


Fig. 4 Influence of separation time on FT₄ standard curve.

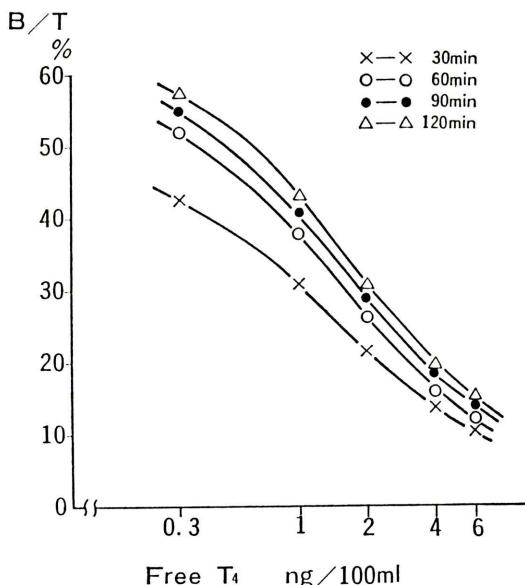


Fig. 3 Influence of incubation time on free T₄ standard curve.

パレーション時間を2分、4分および10分とした際の標準曲線をFig. 4に示す。セパレーション時間による標準曲線の変動は認められなかった。

Table 1 Intraassay variation

Sample	A	B	C
1	0.63	2.01	4.72
2	0.61	1.98	4.87
3	0.68	1.90	4.95
4	0.68	1.88	4.53
5	0.70	1.84	4.80
6	0.73	1.98	4.34
7	0.69	1.86	4.62
8	0.62	1.84	4.09
9	0.67	1.88	4.59
10	0.70	1.88	4.66
Mean	0.67	1.91	4.62
SD	0.04	0.06	0.25
CV (%)	5.8	3.3	5.5

4) 精度および再現性

① Intrassay variation: Free T₄濃度が高値(A), 正常値(B)および低値(C)の3例の血清について, 同一キットで10回測定した時の結果をTable 1に示す。平均±標準偏差値(Mean±S.D.)はおのおの 4.62±0.25, 1.91±0.06 および 0.67±0.04 ng/100 ml であり, これらの変動係数

(C.V.)は、それぞれ5.5, 3.3および5.8%であった。

② Interassay variation: Free T₄濃度が高値

Table 2 Interassay variation

Sample	A	B	C
1	0.66	1.69	4.60
2	0.72	1.89	4.39
3	0.67	1.90	4.61
4	0.64	1.84	4.10
5	0.67	1.83	4.50
Mean	0.67	1.83	4.44
SD	0.03	0.08	0.21
CV (%)	4.4	4.6	4.7

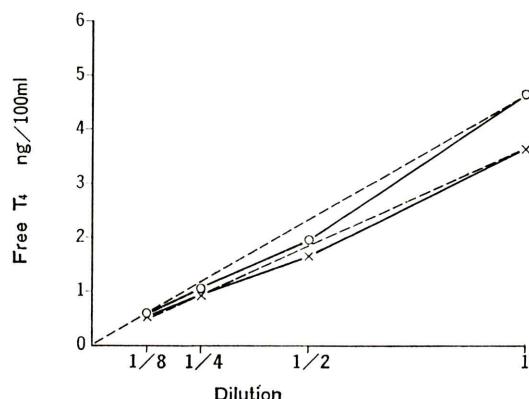


Fig. 5 Effect of serum dilution with T₄ free serum.

(A), 正常値(B)および低値(C)を示す3例の血清について、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±S.D.は、おのおの4.44±0.21, 1.83±0.08および0.67±0.03 ng/100 mlであり、C.V.はそれぞれ4.7, 4.6および4.4%であった。

5) Free T₄値が0である血清による希釈の影響

free T₄値が高値を示す例について、添付されたfree T₄値が0である血清を用いて希釈した際の測定結果をFig. 5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。

2. 臨床的検討

1) 各種甲状腺機能状態における血清free T₄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 T₄の測定結果をFig. 6に示す。甲状腺機能正常者56例では、1.19~2.68 ng/100 mlの間に分布し、平均2.02±0.34 (Mean±S.D.) ng/100 mlであった。正常域として平均値±2 S.D.をとると、1.34~2.70 ng/100 mlとなる。甲状腺機能亢進症18例では3.17 ng/100 ml以上に分布し、11例で測定上限界の6 ng/100 ml以上を示し、平均5.45±0.89 ng/100 mlであり、甲状腺機能低下症12例では0.15~0.68 ng/100 ml平均0.43±0.16 ng/100 mlと全例低値を示し、3者の中には重な

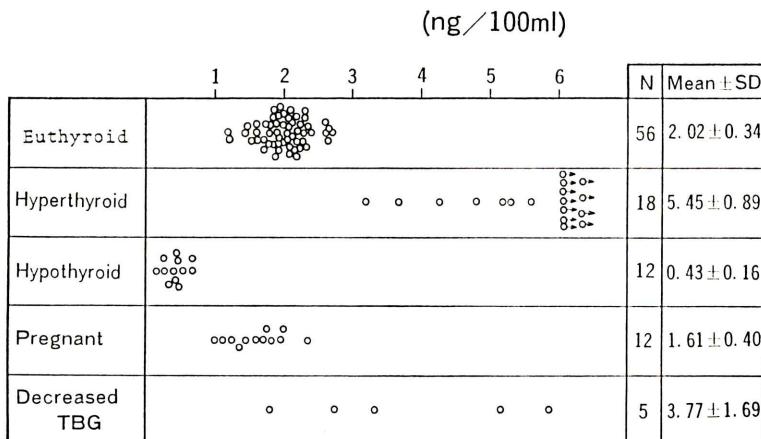


Fig. 6 Magic free T₄.

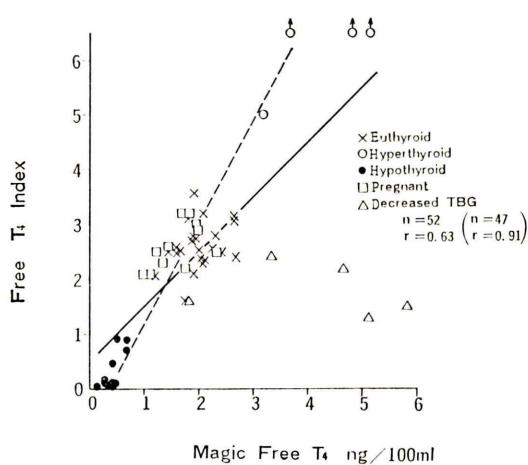


Fig. 7 Correlation of serum free T₄ with free T₄ index.

りは全くみられなかった。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。正常妊婦(出産時)12例では 0.99~2.34 ng/100 ml に分布し、平均 1.61±0.40 ng/100 ml で、正常に比べて有意に ($p<0.001$) 低い値を示し、3 例で正常範囲より低値を示したが、機能低下症よりは高値であった。TBG 減少症 5 例では、1.79~5.85 ng/100 ml に分布し、平均 3.77±1.69 ng/100 ml と正常に比べ有意に高値で、4 例で高値を示した。

2) FT_{4I} との関係

本法で得られた血中 free T₄ 値と FT_{4I} との関係を Fig. 7 に示す。TBG 減少症を除くと、両者の間には相関係数 $r=0.91$ ($n=47$) (破線) と良好な正の相関がみられた。TBG 減少症では、本法で測定した free T₄ 値が FT_{4I} に比べて著しく高値を示したため、TBG 減少症を含めると $r=0.63$ ($n=52$) (実線) となった。

VI. 考 察

冒頭にも述べたように、free T₄ の測定は、トレーサー量の ¹²⁵I-T₄ 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 %FT₄ を求め、それと血清の total T₄ との積から算出されている。なかでも平衡透析法が最も広く行われているが、標識 T₄ 中に混在しているヨードの影

響¹⁰、および希釈効果¹¹⁾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-T₄ を加えずに平衡透析を行い、透析外液中の微量の free T₄ を直接に RIA で測定する^{10,12)}ことが可能になり、従来のトレーサー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。

本法の原理はアマレックス free T₄ キット¹³⁾と同じで、T₄ 抗体には結合するが、TBG には結合しない標識 T₄ 誘導体と高力価の T₄ 抗体とを測定系に用い、free T₄ と ¹²⁵I-T₄ 誘導体との競合反応により free T₄ を測定する one tube, one step assay であるため、測定操作が簡単で短時間に測定できる。さらに常磁性微粒子に共有結合した抗 T₄ 抗体を用いているため、magnetic separation により bound と free の分離が簡単に実現でき、さらに試験管たてを傾けることにより各チューブ中の上清を一挙に除去できる利点がある。

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が長くなるほど各濃度での結合率は上昇したが、標準曲線は 60, 90 および 120 分において 30 分のときよりも急峻であった。したがって、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, 60 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 T₄ 高値の血清について、free T₄ 値が 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。

本測定法による甲状腺機能正常者 56 例の血清 free T₄ 濃度は 2.02 ± 0.34 ng/100 ml で、正常域として mean±2 S.D. をとると 1.34~2.70 ng/100 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 者の間に重なりは全くみられなかった。5 例の TBG 減少症では、total T₄ は 3 例で低値、2 例で正常低値を示したのに対し、マグネティック free

T_4 は4例で高値を示した。TBG 減少症では free T_4 は正常¹⁴⁾ または若干低値^{15,16)} と報告されており、本キットで高値を示した理由は不明である。一方、出産時妊婦では、マグネティック free T_4 値は12例中3例で若干低値を示した他は正常範囲内にあった。

TBG 減少症を除くとマグネティック free T_4 値と FT_{4I}との間には $r=0.91$ と良い相関が認められた。TBG 減少症ではマグネティック free T_4 値は FT_{4I} に比べて高値を示す傾向があり、TBG 減少症においては本キットでの測定値の解釈に注意が必要である。

今回、 T_4 結合抗体など異常なリガンドの存在する症例や nonthyroidal illness について検討を行わなかった。現在市販されている free T_4 測定用キットを用いた場合、これらの疾患では正しい free T_4 値を反映しないことがあると報告されており^{17,18)}、本法でもこれらの疾患では同様に問題がある可能性も否定できない。

VII. 結語

コーニングメディカル株式会社のマグネティック free T_4 「コーニング」RIA キットについて基礎的および臨床的検討を行い、以下の結果を得た。

- 1) インキュベーションの条件は、キットの指示どおり、37°C、60分で十分であった。
 - 2) Intra-および inter-assay 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った。
 - 4) 本キットで得られた血清 free T_4 値の mean $\pm S.D.$ は、甲状腺機能正常者で $2.02 \pm 0.34 \text{ ng}/100 \text{ ml}$ 、甲状腺機能低下症で $0.43 \pm 0.16 \text{ ng}/100 \text{ ml}$ 、甲状腺機能亢進症で $5.45 \pm 0.89 \text{ ng}/100 \text{ ml}$ であり、3者の間には重なりは全くみられなかった。
 - 5) TBG 減少症では5例中4例で高値を示した。
 - 6) 出産時妊婦では、若干低値を示した。
- 以上、本法は血清 free T_4 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おり、TBG 異常のない甲状腺疾患では有用である。

あるが、TBG 減少症では free T_4 を正しく反映しないので、成績の解釈には十分注意をはらう必要がある。

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, pp. 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 Progr Hormone Res* **16**: 353-403, 1960
- 5) Yoshida K, Davis PJ: Estimation of intracellular free triiodothyronine in man. *J Clin Endocrinol Metab* **50**: 667-670, 1980
- 6) 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
- 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* **110**: 329-340, 1973
- 9) 吉田克巳、桜田俊郎、野村 隆、他: Magic T_3 Uptake による T_3 摂取率測定法の基礎的ならびに臨床的検討. 医学と薬学 **11**: 1061-1066, 1984
- 10) Jiang N, Tue KA: Determination of free thyroxine in serum by radioimmunoassay. *Clin Chem* **23**: 1679-1683, 1977
- 11) Spaulding SW, Gregerman RI: Free thyroxine in serum by equilibrium dialysis: Effects of dilution, specific ions and inhibitors of binding. *J Clin Endocrinol Metab* **34**: 974-982, 1972
- 12) Yeo PPB, Lewis M, Evered DC: Radioimmunoassay of free thyroid hormone concentrations in the investigation of thyroid disease. *Clin Endocrinol* **6**: 159-165, 1977
- 13) 鈴木道子、吉田克巳、桜田俊郎、他: Amerlex Free T_4 Kit による血清 free T_4 の測定. 医学と薬学 **7**: 731-738, 1982
- 14) Cavalieri RR, Searle GL: The kinetics of distribution between plasma and liver of ^{131}I -labeled L-thyroxine in man: Observations of subjects with

- normal and decreased serum thyroxine-binding globulin. *J Clin Invest* **45**: 939–949, 1966
- 15) Heinonen OP, Lamberg BA, Virtamo J: Inherited decrease of the binding capacity of thyroxine-binding globulin (TBG). *Acta Endocrinol* **64**: 171–180, 1970
- 16) 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
- 17) Beck-Peccoz P, Romelli PB, Cottaneo MG, et al: Evaluation of free thyroxine methods in the presence of iodothyronine-binding autoantibodies. *J Clin Endocrinol Metab* **58**: 736–739, 1984
- 18) Kaptein EM, Grieb DA, Spencer CA, et al: Thyroxine metabolism in the low thyroid state of critical nonthyroidal illnesses. *J Clin Endocrinol Metab* **53**: 764–771, 1981