

## 《技術報告》

標識抗 T<sub>4</sub> モノクローナル抗体を用いた血中 FT<sub>4</sub> の測定

池窪 勝治\* 才木 康彦\* 太田 圭子\* 石川 昌子\*  
 山口 晴司\* 伊藤 秀臣\* 日野 恵\* 服部 尚樹\*\*  
 石原 隆\*\* 森寺邦三郎\*\* 倉八 博之\*\*

**要旨** 標識抗 T<sub>4</sub> 抗体を用いる 1 ステップ法 FT<sub>4</sub> ラジオアッセイ (Amerlex-MAB FT<sub>4</sub>) について標識 T<sub>4</sub> 誘導体によるラジオイムノアッセイ (Amerlex-M FT<sub>4</sub>) と比較検討した。本測定法は 37°C, 30 分の反応時間で、迅速かつ簡便に測定でき、精度および再現性は良好であった。Amerlex-M FT<sub>4</sub> では血清アルブミンおよび T<sub>4</sub> 自己抗体の影響を強く受けるのに反し本法ではほとんど認められなかった。本法による FT<sub>4</sub> の正常域は 0.99~1.54 ng/dl であり、甲状腺機能正常、亢進症および低下症の分離は良好であった。正常妊娠における FT<sub>4</sub> 値は妊娠初期に比べて中期および後期で若干低値を示したが、血清アルブミンや TBG 濃度の変化による測定上の問題ではなく、生理性の変動と考えられた。以上より、本法による FT<sub>4</sub> の測定は、甲状腺機能を知る上で臨床上きわめて有用であると考えられた。

(核医学 31: 379~392, 1994)

## I. 緒 言

甲状腺ホルモンのひとつであるサイロキシン (T<sub>4</sub>) は血中では大部分が TBG を主とするサイロキシン結合蛋白 (TBP) と結合しており、ごく微量 (総 T<sub>4</sub> の 0.02~0.03%) が遊離サイロキシン (FT<sub>4</sub>) として存在する。総 T<sub>4</sub> 量は TBP の増減や TBP 結合阻害物質の存在により変動するので甲状腺機能の診断には、実際に生理学的なホルモン活性をもつ FT<sub>4</sub><sup>1,2)</sup> の測定が重要である。

FT<sub>4</sub> の測定には従来平衡透析法<sup>1~4)</sup>、限外濾過法<sup>5)</sup>、ゲル濾過法<sup>6,7)</sup>などにより測定されてきたが、これらの方法は手間がかかる上に FT<sub>4</sub> が微量であり、熟練を要するため日常検査に用いられるには至らなかった。より簡便に測定する方法と

して種々の FT<sub>4</sub> 測定 RIA 法が開発された。標識 T<sub>4</sub> 誘導体法<sup>8~11)</sup>、2 ステップ RIA 法<sup>12,13)</sup>、透析膜マイクロカプセル法<sup>14)</sup>、平衡透析 RIA 法<sup>15~17)</sup>などである。これらの測定法は簡便に FT<sub>4</sub> が測定できるものの血中のアルブミン濃度<sup>8,18,26)</sup> および T<sub>4</sub> 自己抗体の影響<sup>8~11,29,30)</sup> を受け正しい測定値が得られない場合がある。平衡透析 RIA 法は透析セルを用いることにより透析を簡便化し、TBG、アルブミンおよび自己抗体の影響も少ない<sup>15~17)</sup> 優れた測定法であるが、長時間の透析後に透析外液中の FT<sub>4</sub> を RIA で測定するため、若干簡便性と迅速性に欠けるため、さらによりよい測定法の開発が望まれていた。

今回検討した Amerlex-MAB FT<sub>4</sub> (Kodak) は標識 T<sub>4</sub> モノクローナル抗体を用いて FT<sub>4</sub> を測定しようとする全く新しい考え方の測定法<sup>20,21)</sup> である。

著者らは本法につき基礎的検討を行うとともに主としてアルブミン、TBG および甲状腺ホルモン自己抗体の影響について Amerlex-M FT<sub>4</sub> (Kodak) と比較検討し、若干の知見を得たので報告する。

\* 神戸市立中央市民病院核医学科

\*\* 同 内分泌内科

受付：5年11月26日

最終稿受付：6年1月18日

別刷請求先：神戸市中央区港島中町4-6（〒650）

神戸市立中央市民病院核医学科

池窪 勝治

## II. 材料および方法

### 1. 測定原理

本法によるFT<sub>4</sub>の測定原理を模式化してFig. 1に示す。本法の特徴はT<sub>3</sub>と交叉性をもつ微量の<sup>125</sup>I標識抗T<sub>4</sub>モノクローナル抗体をトレーサとして用いる1ステップイムノアッセイである。T<sub>3</sub>は磁性粒子分離剤(Amerlex MAB)上に固相化されており、TBPとの反応はみられない。本トレーサは、T<sub>4</sub>結合蛋白とFT<sub>4</sub>の平衡関係をほとんど損わずにFT<sub>4</sub>と結合する。未反応のトレーサは固相化T<sub>3</sub>と結合し、遠沈にて沈澱させ、その放射能量を測定する。この放射能量はFT<sub>4</sub>量と逆比例する。既知の標準FT<sub>4</sub>を同時に測定して標準曲線を作成し、検体の放射能量からFT<sub>4</sub>値を読み取る。

本トレーサの比放射能は148 MBq/gであり、T<sub>4</sub>および固相T<sub>3</sub>に対する親和定数はそれぞれ $4.4 \times 10^9$  L/mol,  $6.7 \times 10^5$  L/molである<sup>20)</sup>。固相化T<sub>3</sub>の総量は163 ng/tubeである。

### 2. 測定方法

本法の測定手順をFig. 2に示す。標準液または被検血清50 μlに磁性粒子分離剤(Amerlex-MAB)500 μlを加え、次に<sup>125</sup>I標識抗T<sub>4</sub>モノクローナル抗体500 μl(約40,000 cpm)を添加後攪拌

拌し、37°C, 30分間インキュベートする。4°C, 1000×gで10分間遠沈後上清を吸引除去し、沈澱の放射能を測定する。

### 3. 基礎検討

#### 1) 測定条件

反応温度を一定にし反応時間を変化させた場合と反応時間を一定にして反応温度を変化させた場合の標準曲線の変化を比較した。

#### 2) 再現性

同一アッセイ内および異なるアッセイ間の再現性につきそれぞれFT<sub>4</sub>が低、中、高値の3血清を用いて検討した。

#### 3) アルブミンの添加による血清FT<sub>4</sub>値への影響

血清アルブミン濃度の変化によるFT<sub>4</sub>値への影響をみるために血清アルブミン濃度が低値(1.9~2.2 g/dl)の4血清(うち1例はT<sub>4</sub>0濃度の血清)に種々の濃度のヒト血清アルブミン溶液(5~25 g/dl)を4:1の割合で添加し、本法とAmerlex-M FT<sub>4</sub>によりFT<sub>4</sub>を測定した。アルブミンの希釈には生理食塩水を使用した。

またアルブミン非添加時の測定はアルブミンの代わりに生理食塩水のみを加えて測定した。添加に用いたアルブミン溶液(25 g/dl)中には7.8 μg/dlのT<sub>4</sub>が検出されたためT<sub>4</sub>0濃度の血清への

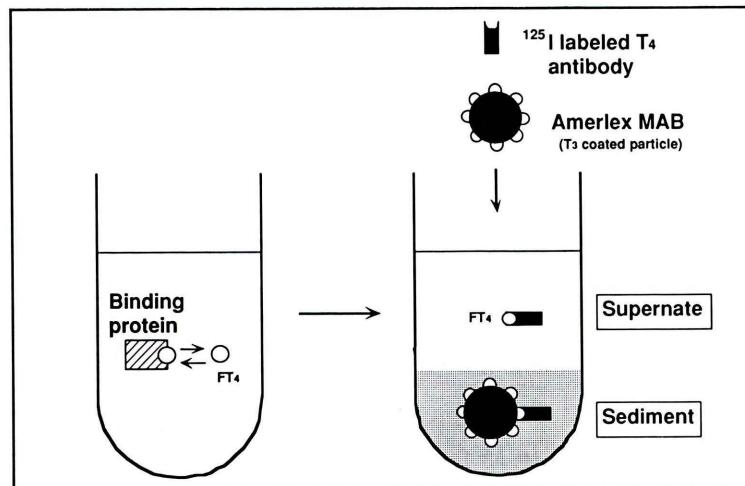
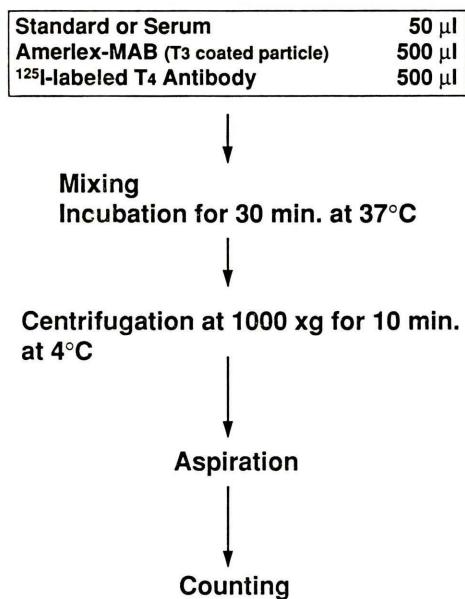


Fig. 1 Principle of Amerlex-MAB FT<sub>4</sub>.

Fig. 2 Assay procedure of Amerlex-MAB FT<sub>4</sub>.

アルブミン添加を行うことによりアルブミン溶液中の T<sub>4</sub> による FT<sub>4</sub> 測定値の変化を観察した。

#### 4) 臨床検討

本院勤務の健常者 120 例(男性 60 例、女性 60 例)と未治療各種甲状腺疾患患者 98 例、正常妊娠 174 例(妊娠初期 61 例、中期 13 例、後期 100 例)、非甲状腺疾患(NTI)患者 308 例、TBG 欠損症 3 例、甲状腺ホルモン自己抗体を有する患者 5 例の合計 708 例につき本法と Amerlex-M FT<sub>4</sub> により FT<sub>4</sub> を測定した。

妊娠 166 例については血清 TSH を測定し、健常女性 100 例における TSH 濃度と比較した。甲状腺ホルモン自己抗体患者を除く未治療甲状腺疾患患者 82 例については両測定法による FT<sub>4</sub> 値と FT<sub>4</sub> index ( $T_4 \times T_3U / 35$ ) との関係につき、98 例については FT<sub>4</sub> 値と TSH 濃度の関係につき検討した。

またこれらの甲状腺患者に加えて正常妊娠 174 例、NTI 患者 129 例の合計 401 例における本法と Amerlex-M FT<sub>4</sub> による FT<sub>4</sub> 値を比較した。NTI 患者 128 例については血清アルブミンおよび TBG 濃度を測定し両測定法による FT<sub>4</sub> 値との関

係を検討した。また別の NTI 患者 180 例については両測定法による FT<sub>4</sub> 値と遊離脂肪酸(NEFA)濃度との関係を観察した。

TSH と TBG はそれぞれリアグノスト TSH およびリアグノスト TBG(ベーリングベルケ社)を用い、T<sub>4</sub> は T-4 リアキット II(ダイナボット社)、T<sub>3</sub>U は スパック T<sub>3</sub> uptake キット(第一ラジオアイソトープ研究所)を用いて測定した。

抗 T<sub>3</sub> および抗 T<sub>4</sub> 自己抗体の測定は患者血清 100 µl に Amerlex-M FT<sub>3</sub> または Amerlex-M FT<sub>4</sub> の <sup>125</sup>I-T<sub>3</sub>, <sup>125</sup>I-T<sub>4</sub> 誘導体 100 µl を加え 37°C, 1 時間反応後 25% PEG (Carbowax 6000) 200 µl を加え混和後 3,000 rpm, 30 分遠沈し、沈渣の放射能量(B)を測定し、総放射能量(T)に対する割合 B/T(%)を求めた。対照は正常血清を用いて同様に行った。

### III. 結 果

#### 1. 基礎検討

##### 1) 反応時間と温度

反応時間および温度の標準曲線への影響について検討した成績を Fig. 3 に示す。反応温度を 37°C と一定にした場合、15 分、30 分、1 時間の反応時間ではいずれも急峻で良好な標準曲線が得られた。3 時間、6 時間ではカウントは上昇し、若干緩やかな標準曲線を示した。一方反応時間を 30 分として反応温度を 4°C, 25°C および 37°C と変化させても標準曲線には大きな変化を認めなかつた。また同時に測定したコントロール血清の FT<sub>4</sub> 実測値は反応時間および温度による影響はほとんど受けなかつた。

以上の成績より以下の本法による FT<sub>4</sub> の測定には本法規定の 37°C, 30 分の反応条件で測定した。

##### 2) 本測定法の再現性

FT<sub>4</sub> が低、中、高値の 3 血清をそれぞれ使用してアッセイ内およびアッセイ間における測定値の再現性を観察した成績を Table 1 に示す。アッセイ内での変動係数は 1.6~2.7%，アッセイ間での変動係数は 2.6~8.0% であった。

Table 1 Reproducibility

Intra-assay			
Sample	n	Mean±S.D. (ng/dl)	C.V. (%)
A	10	0.51±0.008	1.6
B	10	1.15±0.030	2.7
C	10	3.65±0.070	2.0
Inter-assay			
Sample	n	Mean±S.D. (ng/dl)	C.V. (%)
D	12	0.40±0.032	8.0
E	12	1.16±0.029	2.6
F	12	3.72±0.109	2.9

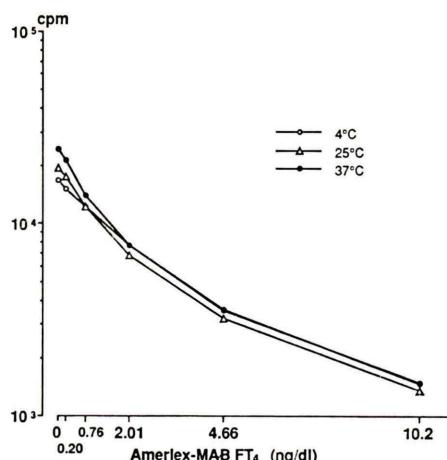
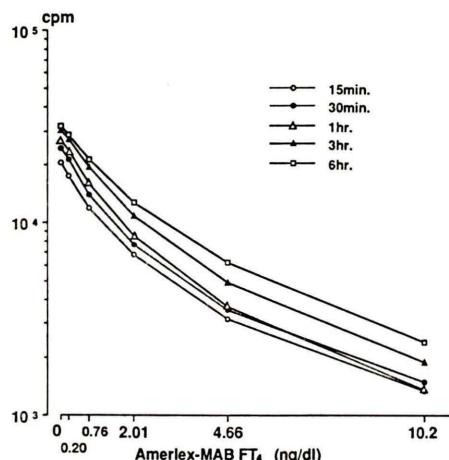


Fig. 3 Effects of incubation time and temperature on the standard curve of Amerlex-MAB FT4.

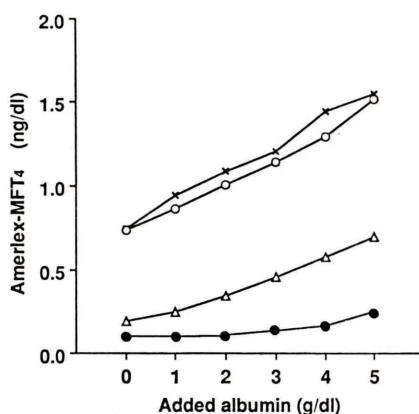
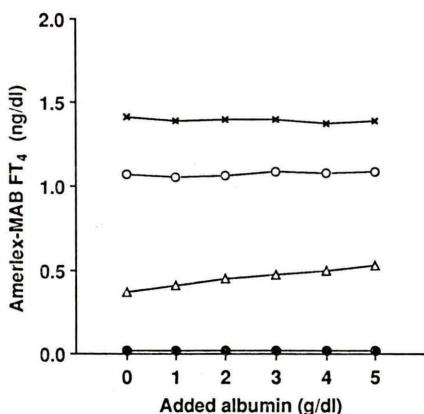


Fig. 4 Effects of added human serum albumin on serum FT4 values in patients with low serum albumin. Closed circles represent serum obtained from a patient with nondetectable serum T4.

## 3) アルブミンの添加による FT4 値への影響

4 血清に種々の濃度のアルブミンを添加し、本法および Amerlex-M FT4 により FT4 を測定した成績を Fig. 4 に示す。T4 0 血清へのアルブミン添加 (●) では本法による FT4 はすべて検出されなかった。他の 3 血清における本法 FT4 値はいずれも Amerlex-M FT4 よりも高値であり、アルブミン添加では基礎値が低濃度の血清で若干上昇がみられるが、FT4 が正常域の血清ではほとんど変動を示さなかった。一方 Amerlex-M FT4 では

	Amerlex-MAB FT <sub>4</sub> (ng/dl)	M±SD
Normal Subjects (n=120)	0.0~1.2	1.24±0.14
Graves' Disease (n=29)	1.0~13.1	4.97±2.22
Hashimoto Disease (n=18)	0.0~1.2	0.96±0.21
Primary Hypothyroidism (n=20)	0.0~1.2	0.39±0.31
Painless Thyroiditis (n=5)	0.0~3.2	3.20±1.31
Subacute Thyroiditis (n=5)	0.0~2.7	2.72±1.16
Thyroid Tumor (n=21)	0.0~1.2	1.23±0.21
TBG Deficiency (n=3)	0.0~1.0	1.00±0.18

Fig. 5 Serum FT<sub>4</sub> values in normal subjects and various thyroid diseases. Broken lines indicate reference range.

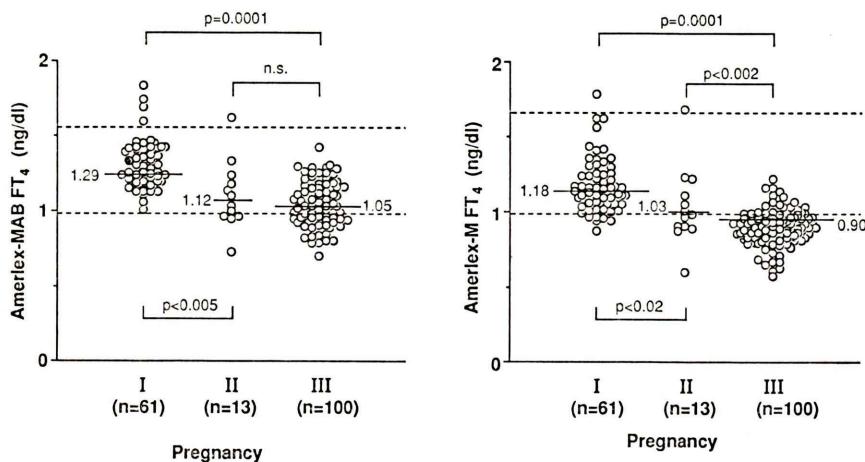


Fig. 6 Serum FT<sub>4</sub> values measured with Amerlex-MAB FT<sub>4</sub> and Amerlex-M FT<sub>4</sub> in the 3 trimesters of pregnancy. Broken lines indicate reference range.

T<sub>4</sub> 0 血清で 0.1 ng/dl の FT<sub>4</sub> 測定値を示し、アルブミン添加とともにわずかずつ上昇した。他の 3 血清においてはいずれもアルブミン添加量の増加に伴い著明な上昇を示した。

## 2. 臨床検討

### 1) 健常者および各種疾患患者における FT<sub>4</sub> 測定値

健常者 120 例および未治療各種甲状腺疾患患者 98 例および TBG 欠損症 3 例の本法による FT<sub>4</sub> の測定成績を Fig. 5 に示す。健常者の FT<sub>4</sub> は

0.90~1.77 ng/dl に分布し平均 1.24±0.14 (SD) ng/dl であった。対数変換で正規化し正常範囲を 0.99~1.54 ng/dl に設定した。Graves 病による甲状腺機能亢進症は全例高値を示した。無痛性甲状腺炎および亜急性甲状腺炎各 5 例中 4 例は高値であった。他の各 1 例はいずれも発症後約 1 か月間を経過し緩解期の症例で FT<sub>4</sub> は正常範囲内であった。橋本病では約半数が軽度低下を示した。原発性甲状腺機能低下症では大部分が低値を示した。腫瘍では大部分が正常範囲内であった。甲状腺機

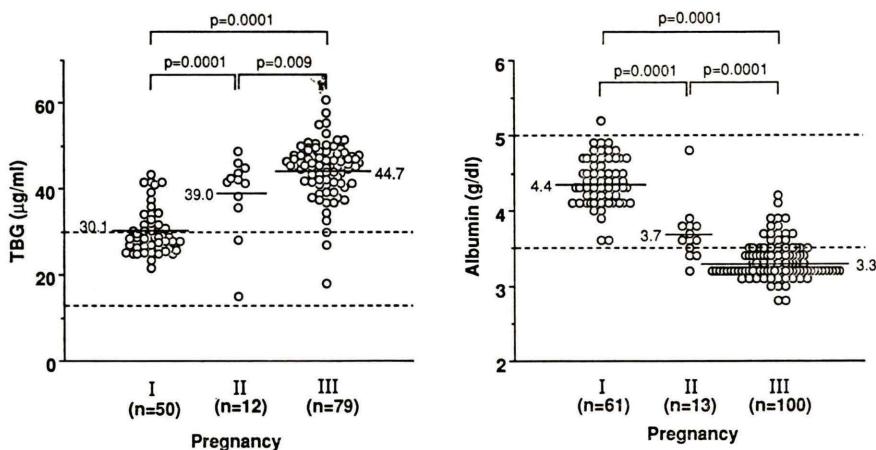


Fig. 7 Serum TBG and albumin concentrations in the three trimesters of pregnancy.

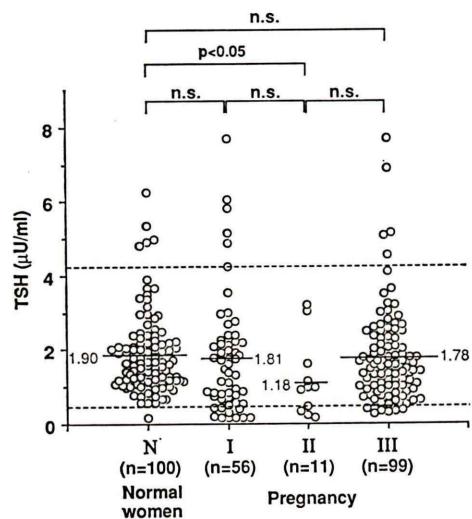


Fig. 8 Serum TSH levels in normal women and in each trimester of pregnancy.

能正常の TBG 欠損症 3 例における  $\text{FT}_4$  値は 2 例は正常範囲、他の 1 例は若干低値であった。

## 2) 正常妊娠における $\text{FT}_4$ 測定値

妊娠初期、中期、後期における本法と Amerlex-M  $\text{FT}_4$  による  $\text{FT}_4$  値を Fig. 6 に示す。本法による  $\text{FT}_4$  値は初期では 61 例中 4 例が若干高値で他は正常範囲であった。中期、後期ではそれぞれ 4 例 (31%)、37 例 (37%) が低値であり、各平均値は初期に比べて中期、後期で有意に低値を示した

が、中期と後期の間には有意差を認めなかった。なお健常女性 60 例のみでの正常範囲 (0.97~1.46  $\text{ng}/\text{dl}$ ) と比較すると中期、後期ではそれぞれ 15%、26% が低値であった。一方 Amerlex-M  $\text{FT}_4$  では妊娠初期、中期、後期となるにつれて  $\text{FT}_4$  は低値となり三者の間には有意差を認めた。後期では 77 例 (77%) が低値であった。

## 3) 正常妊娠における TBG およびアルブミン濃度

妊娠初期、中期、後期における TBG およびアルブミン濃度を Fig. 7 に示す。TBG 濃度は妊娠週数とともに有意に増加し、中期以後は大部分が  $35 \mu\text{g}/\text{ml}$  以上であった。アルブミン濃度は妊娠初期には正常であるが、中期、後期には TBG とは逆に著明に減少した。

## 4) 健常女性および正常妊娠における TSH

健常女性と正常妊娠における妊娠初期、中期、後期における血清 TSH 濃度の比較を Fig. 8 に示す。妊娠中期における TSH のみが若干低く健常女性との間に有意差を認めたが、妊娠各期の間に有意差を認めず、ほぼ正常域に分布した。なお対数変換にて有意差検定を試みたが同様の結果であった。

## 5) $\text{FT}_4$ 値と TBG 濃度の関係

正常妊娠 141 例と NTI 患者 128 例における本法と Amerlex-M  $\text{FT}_4$  による  $\text{FT}_4$  値と TBG 濃度

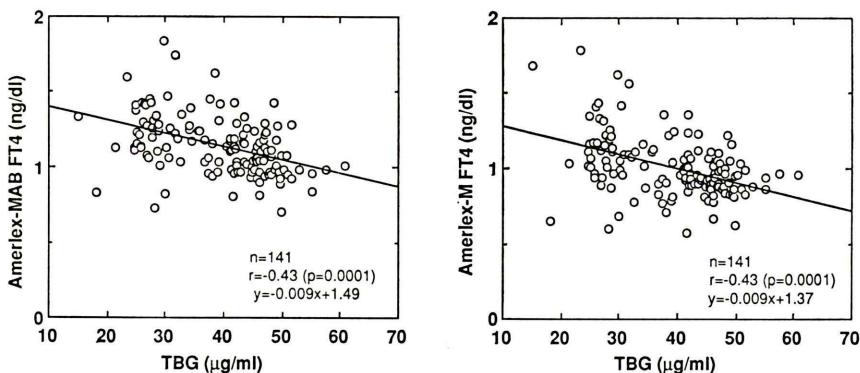


Fig. 9 Relationship between serum TBG concentrations and serum FT<sub>4</sub> measured with Amerlex-MAB FT<sub>4</sub> and with Amerlex-M FT<sub>4</sub> in 141 normal pregnant women.

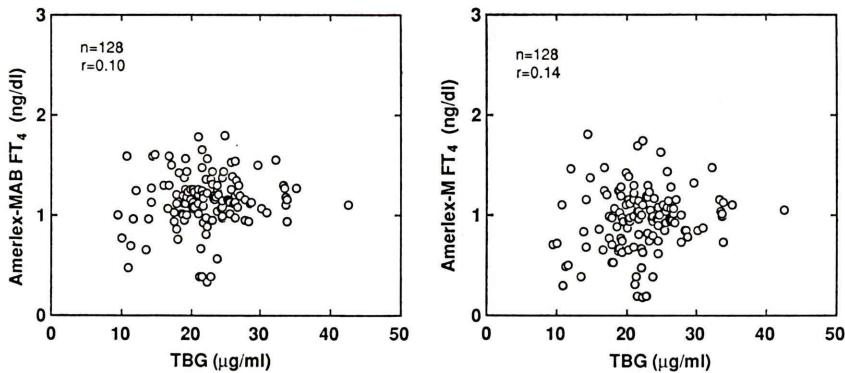


Fig. 10 Relationship between serum TBG concentrations and serum FT<sub>4</sub> results measured with Amerlex-MAB FT<sub>4</sub> and with Amerlex-M FT<sub>4</sub> in 128 NTI subjects.

の関係を Fig. 9, 10 に示す。妊婦においては両測定値とも TBG 濃度との間にはほぼ同様に有意の逆相関を認めた。一方 NTI 患者においては TBG は大部分が 35 μg/ml 以下であり、両測定法による FT<sub>4</sub> 値と TBG 濃度との間には全く相関を認めなかつた。

#### 6) FT<sub>4</sub> 値とアルブミンおよび NEFA 濃度の関係

正常妊婦 171 例と NTI 患者 128 例における両測定法による FT<sub>4</sub> 値とアルブミン濃度の関係を Fig. 11, 12 に示す。妊婦においては両法ともアルブミン濃度が 3.1~4.0 g/dl (M 群) における平均

FT<sub>4</sub> 値は 4.1~5.0 g/dl (H 群) に比べて有意に低値であった。

NTI 患者 128 例における本法 FT<sub>4</sub> 値は 10 例 (8%) が高値、26 例 (20%) が低値であった。FT<sub>4</sub> 値はアルブミン濃度が 1.5~3.0 g/dl と低い L 群では 36% が低値で、平均 FT<sub>4</sub> 値も M 群や H 群に比べて有意に低いが、M 群と H 群間では有意差を認めなかつた。L 群における FT<sub>4</sub> 正常例 (n=25) と低値例 (n=14) での平均アルブミン濃度はそれぞれ 2.57 g/dl および 2.51 g/dl で両者間に有意差を認めなかつた (p=0.61)。一方 Amerlex-M FT<sub>4</sub> による FT<sub>4</sub> 値は 128 例中 3 例

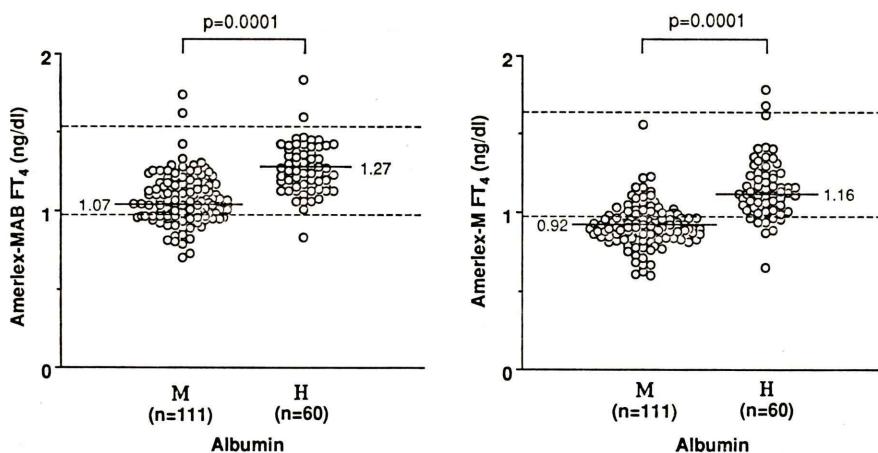


Fig. 11 Relationship between serum albumin levels and serum FT<sub>4</sub> measured with Amerlex-MAB FT<sub>4</sub> and with Amerlex-M FT<sub>4</sub> in 171 normal pregnant women. Broken lines indicate reference range. (Albumin, M: 3.1–4.0 g/dl, H: 4.1–5.0 g/dl)

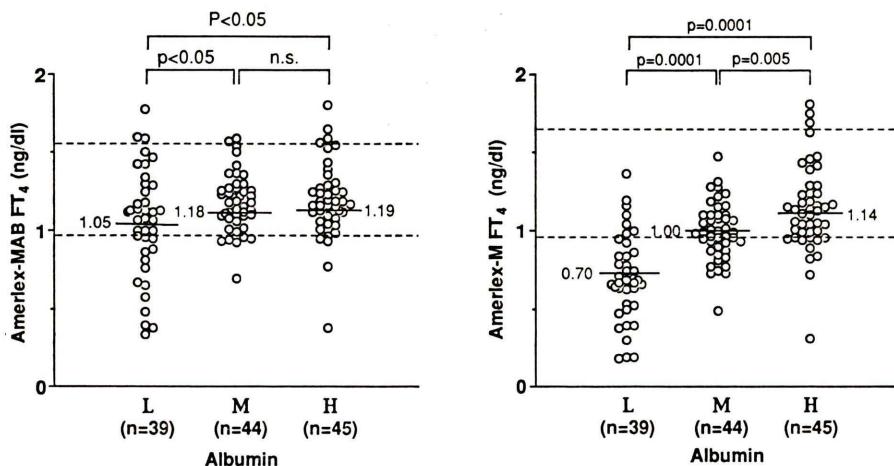


Fig. 12 Relationship between serum albumin levels and serum FT<sub>4</sub> results measured with Amerlex-MAB FT<sub>4</sub> and with Amerlex-M FT<sub>4</sub> in 128 NTI patients. (Albumin, L: 1.5–3.0 g/dl, M: 3.1–4.0 g/dl, H: 4.1–5.0 g/dl)

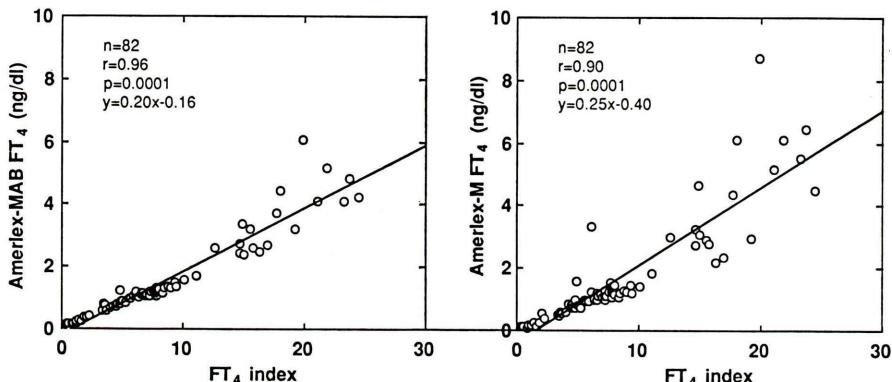
(2%) が高値、63例(49%) が低値であり、平均FT<sub>4</sub> 値は L, M, H の 3 群でいずれも有意差を認めた。

なお NTI 患者 180 例における本法と Amerlex-M による FT<sub>4</sub> 値と NEFA 濃度との関係ではそれぞれ  $r=0.08$ ,  $r=0.04$  で両測定値とも NEFA との間に有意の相関を認めなかった。

7) 甲状腺ホルモン自己抗体陽性患者における FT<sub>4</sub> 測定値  
抗 T<sub>3</sub> および抗 T<sub>4</sub> 自己抗体陽性患者 5 例における両測定法による FT<sub>4</sub> 値、TSH 濃度および抗体価の成績を Table 2 に示す。抗 T<sub>4</sub> 自己抗体陽性患者(1~3) における本法による FT<sub>4</sub> 値は甲状腺機能とよく一致したが、Amerlex-M FT<sub>4</sub> 値は

**Table 2** Free T<sub>4</sub> values with Amerlex-M, Amerlex-MAB, TSH and binding of <sup>125</sup>I-labeled T<sub>3</sub> and T<sub>4</sub> analog to serum in thyroid patients with T<sub>4</sub> and/or T<sub>3</sub>-binding autoantibodies

Patient	Diagnosis	FT <sub>4</sub> (ng/dl)		<sup>125</sup> I-T <sub>4</sub> analog binding ratio (%)	<sup>125</sup> I-T <sub>3</sub> analog binding ratio (%)	TSH ( $\mu$ U/ml)
		Amerlex-M	Amerlex-MAB			
1	Prim. hypo treated	6.34	1.02	69.0	9.7	2.1
2	Prim. hypo untreated	3.20	0.10	66.0	10.2	246.0
3	Graves' treated	3.34	1.11	44.0	16.5	1.1
4	Graves' treated	0.84	0.89	4.5	54.4	2.8
5	Graves' treated	0.62	0.95	7.7	70.7	12.4
Normal range		0.98–1.66	0.99–1.54	<10.0	<10.0	0.48–4.2



**Fig. 13** Correlation between free thyroxine index and serum FT<sub>4</sub> concentrations measured with Amerlex-MAB FT<sub>4</sub> and with Amerlex-M FT<sub>4</sub> in 82 patients with various thyroid diseases.

いずれも異常高値を示した。一方、抗 T<sub>3</sub> 自己抗体陽性患者(4, 5)における本法 FT<sub>4</sub> 値はほぼ矛盾のない値で、異常高値は示さないが、Amerlex-M FT<sub>4</sub> 値に比べ若干高値であった。

#### 8) FT<sub>4</sub> 値と FT<sub>4</sub> index の関係

甲状腺疾患患者 82 例における両測定法による FT<sub>4</sub> 値と FT<sub>4</sub> index の関係を Fig. 13 に示す。本法による FT<sub>4</sub> 値と FT<sub>4</sub> index の間には  $r=0.96$ 、Amerlex-M FT<sub>4</sub> においては  $r=0.90$  といずれも有意の正相関( $p=0.0001$ )が認められたが、本法の方がより高い相関が得られた。

#### 9) FT<sub>4</sub> 値と TSH 濃度の関係

両測定法による FT<sub>4</sub> 値と TSH 濃度の関係を Fig. 14 に示す。両測定値とも TSH とは有意の逆相関を示した。

#### 10) 本法と Amerlex-M FT<sub>4</sub> による FT<sub>4</sub> 値の関係

本法と Amerlex-M FT<sub>4</sub> による FT<sub>4</sub> 値の比較を Fig. 15 に、このうち FT<sub>4</sub> が 2 ng/dl 以下については Fig. 16 に示す。全例では  $r=0.95$  と高い正相関が認められ、回帰直線は  $y=0.74x+0.40$  であった。2 ng/dl 以下における本法の FT<sub>4</sub> 値は

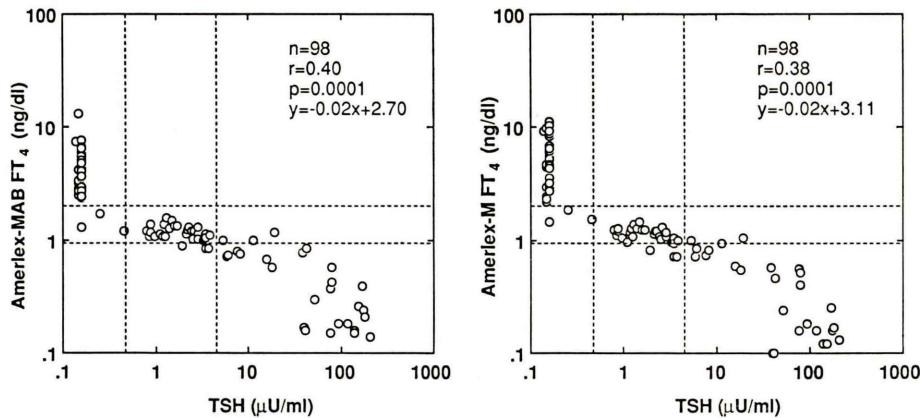


Fig. 14 Relationship between serum TSH concentrations and FT<sub>4</sub> measured with Amerlex-MAB FT<sub>4</sub> and Amerlex-M FT<sub>4</sub> in 98 patients with various thyroid diseases.

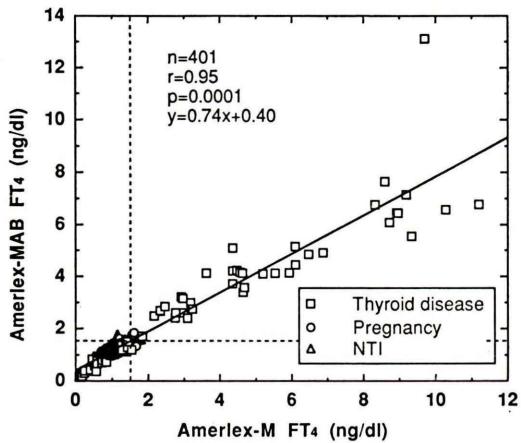


Fig. 15 Correlation between serum FT<sub>4</sub> concentrations by Amerlex-M FT<sub>4</sub> and those by Amerlex-MAB FT<sub>4</sub> in various conditions. Broken lines indicate the upper limits of reference range for each FT<sub>4</sub> assay.

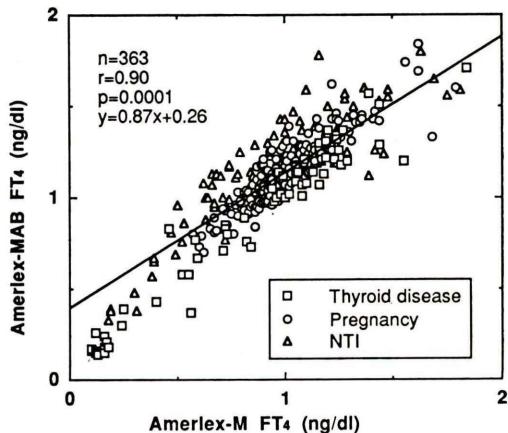


Fig. 16 Correlation of serum FT<sub>4</sub> concentrations by the two FT<sub>4</sub> assays in patients with FT<sub>4</sub> values below 2 ng/dl in Fig. 15.

Amerlex-M FT<sub>4</sub>によるFT<sub>4</sub>値に比べて若干高値を示したが、高値域では逆に本法の方が低値となつた。なお図には示していないが、健常者120例における両測定法によるFT<sub>4</sub>値の相関係数はr=0.86と良好な正相関(p=0.0001)が認められ、回帰直線はy=0.69x+0.46と本法による測定値が若干高値を示した。

#### IV. 考 案

本法の測定原理は従来のものとは全く異なるユニークな方法である。標識抗体がFT<sub>4</sub>と結合することを利用したもので、このトレーサは微量でTBPとFT<sub>4</sub>の平衡関係をほとんど乱すことなくFT<sub>4</sub>と結合し、余分のトレーサは親和性の弱い過

剰の固相 T<sub>3</sub> と結合し B/F 分離を行うように工夫されている。固相化に T<sub>4</sub> を使わず T<sub>3</sub> が使用されている理由はトレーサと FT<sub>4</sub> の結合に影響することなく、しかも完全な B/F 分離を行うためである。固相化 T<sub>4</sub> を用いるとトレーサとの結合も起りうる。また T<sub>4</sub> 自己抗体陽性血清の FT<sub>4</sub> 測定において自己抗体と固相 T<sub>4</sub> の結合により、B/F 分離が不十分となり正しい FT<sub>4</sub> 値が得られない可能性があるからである。

従来から FT<sub>4</sub> RIAにおいてはアッセイ中に TBP からの新たな T<sub>4</sub> の遊離が起れば TBP と FT<sub>4</sub> の平衡関係がくずれ正しい値が得られないため、抗体量や反応条件について種々検討されてきた。本法では反応時間と共に標準曲線の各カウントの変動およびコントロール血清の FT<sub>4</sub> 実測値の変動も少なく、TSH 値とも良好な逆相関が認められたことから TBP と FT<sub>4</sub> の平衡関係を乱すことなく測定されているものと思われる。

本法による FT<sub>4</sub> 値のアッセイ内およびアッセイ間の CV はいずれも 8% 以下であり精度および再現性は満足できるものであった。

従来の誘導体 RIA 法<sup>8,9,26)</sup> ではトレーサがアルブミンと結合するため正しい測定値が得られなくなると考えられ、アルブミンとの結合を阻害する薬剤を加えて測定する<sup>10,11)</sup> 工夫がなされている。

本法における血清 FT<sub>4</sub> 値へのアルブミン濃度の影響について検討するために行った種々の FT<sub>4</sub> 濃度の血清へのアルブミン添加実験では、アルブミン添加による影響はほとんどみられなかつたが、Amerlex-M FT<sub>4</sub> ではアルブミン添加により強く影響され明らかな FT<sub>4</sub> 値の上昇が認められた。

NTI 患者における本法 FT<sub>4</sub> 値とアルブミン濃度の関係では、アルブミンが 3.1 g/dl 以上では FT<sub>4</sub> 値は大部分正常範囲であり、M 群と H 群の平均 FT<sub>4</sub> 値に有意差は見られなかつたが、L 群 (1.5–3.0 g/dl) における FT<sub>4</sub> 値は 36% が低値であった。NTI 患者における重症度の分類は行っていないが、これらの症例はアルブミン濃度が極端に低いことから重症例が多いと推察されるが、L

群で FT<sub>4</sub> 値が正常と低い症例の間でアルブミン濃度に差が見られないことから、低アルブミン濃度による FT<sub>4</sub> 測定異常というよりは、むしろ実際に生理的に FT<sub>4</sub> 値が低い<sup>26)</sup> 可能性が高いと考えられる。すでに NTI 重症患者における本法 FT<sub>4</sub> 値とアルブミン濃度の間には相関のないことが報告<sup>26)</sup> されている。NTI 患者における両測定法による FT<sub>4</sub> 値と TBG 濃度の間にはいずれも相関が認められなかつた。ただし NTI 患者での TBG 濃度は大部分が 35 μg/ml 以下であり、35 μg/ml 以上の TBG 高値例については妊婦での検討が必要であった。

本法による FT<sub>4</sub> 値は、正常、機能亢進症と低下症の分離は良好であり、TBG 欠損症における FT<sub>4</sub> 値も機能をよく反映した。

妊婦における本法 FT<sub>4</sub> 値は、初期に比べて中・後期では低値を示した。また妊娠の進行とともに TBG は上昇し、アルブミンは低値を示した。妊婦において測定したアルブミン濃度は大部分が 3.1 g/dl 以上であり、NTI 患者における本法 FT<sub>4</sub> 値がアルブミン濃度に影響されないことから、妊婦での低値はアルブミン低値による測定値の影響ではないものと思われる。一方、Amerlex-M FT<sub>4</sub> による FT<sub>4</sub> 値は NTI 患者および妊婦ともにアルブミン濃度の低い群でより低値を示し、アルブミン添加実験でも明らかな影響を受けることからアルブミン濃度の影響が強いものと考えられた。

妊娠中期以後における TBG は、大部分が 35 μg/ml 以上で後期における TBG は中期に比べ有意に高値となるが、中期と後期で本法 FT<sub>4</sub> 値には有意差がなく、35 μg/ml 以上の TBG においても TBG 濃度による影響は少ないものと考えられた。妊婦における本法 FT<sub>4</sub> 値が妊娠初期に比べて後期で低値となるのは、TBG、アルブミン濃度の影響によるものではなく、妊娠そのものによる生理的変動ではないかと考えられる。平衡透析法でも妊娠で低値<sup>1,4,23)</sup> となることが報告されているが、正常低値であるとする報告<sup>23)</sup> もみられる。

そこで妊婦における TSH を測定し、健常女性の TSH と比較した。妊娠血清の TSH は、健常

女性のTSHに比べ妊娠中期でのみ低値となつたが、妊娠各期の間には差を認めなかつた。妊娠では正常に比べTSHが低いが、初期に比べて後期に上昇するとする報告<sup>23~25)</sup>があり、著者らの成績と異なる。この点については、妊娠各期とも同一の症例群についてより高感度かつ精度のよいTSH測定法により測定して検討する必要があると思われる。

T<sub>4</sub>RIAが開発されて初めて、その測定値と甲状腺機能の乖離からT<sub>4</sub>自己抗体が見いだされた<sup>26)</sup>。そしてT<sub>4</sub>自己抗体患者におけるFT<sub>4</sub>値は、標識T<sub>4</sub>誘導体を用いる測定法では標識T<sub>4</sub>誘導体が自己抗体と結合するために偽性高値を示す<sup>29)</sup>ことが知られるようになった。Amerlex-M FT<sub>4</sub>では異常高値を示したが、本法ではトレーサーが抗体であるため自己抗体とは結合せず、その影響を受けずに甲状腺機能をよく反映した。

次にT<sub>3</sub>自己抗体陽性血清が本法のFT<sub>4</sub>値に影響しないかどうかにつき検討した。T<sub>3</sub>抗体が固相化T<sub>3</sub>と結合し、その結合容量の減少による影響を受けてFT<sub>4</sub>が偽性高値とならないかという点である。著者らの3例でのFT<sub>4</sub>測定値は明らかなT<sub>3</sub>抗体の影響を受けず、TSH値とも矛盾しない成績であったが、さらにT<sub>3</sub>抗体値の高い症例の多数例での検討が必要と考えられる。

本法とAmerlex-M FT<sub>4</sub>のFT<sub>4</sub>値の関係は、FT<sub>4</sub>値が2ng/dl以下では若干本法FT<sub>4</sub>値が高く、高値域では逆に本法の方が低い値を示した。本法FT<sub>4</sub>値はTSH値と良好な逆相関を、FT<sub>4</sub>indexともAmerlex-M FT<sub>4</sub>よりよい正相関を示し、アルブミン濃度の影響が少ないとから本法の方がAmerlex-M FT<sub>4</sub>より優れていると思われる。

以上本法は簡便であり、アルブミン、TBG、甲状腺ホルモン自己抗体の影響がほとんど認められず、臨床上きわめて有用な測定法であると考えられる。

## V. 結論

Amerlex-MAB FT<sub>4</sub>につきAmerlex-M FT<sub>4</sub>と比較検討し以下の成績を得た。

- 1) 本測定法は簡便であり、37°C、30分のインキュベーションで良好な標準曲線が得られた。
- 2) アッセイ内およびアッセイ間のC.V.はそれぞれ1.6~2.7%, 2.6~8.0%で測定の精度および再現性は良好であった。
- 3) 本法によるFT<sub>4</sub>値は、血清アルブミン、TBG、およびNEFAの影響をほとんど受けない。
- 4) 本法によるFT<sub>4</sub>値は抗T<sub>3</sub>および抗T<sub>4</sub>抗体の影響を受けない。
- 5) 健常者のFT<sub>4</sub>値は0.90~1.77ng/dl(平均1.24±0.14ng/dl)であり、0.99~1.54ng/dlを正常域とした。健常者、甲状腺機能亢進症と低下症の分離は良好であった。妊娠におけるFT<sub>4</sub>値は妊娠初期に比べ中期・後期で若干低値となつた。以上より本法によるFT<sub>4</sub>値は甲状腺機能をよく反映しており臨床上有用であると考えられる。

本論文の要旨は第26回日本核医学会近畿地方会で発表した。

終わりに本キットをご提供下さった日本コダックダイアグノスティックス株式会社に深謝いたします。また本研究にご協力下さった真弓こずえさんに感謝いたします。

## 文献

- 1) Sterling K, Hegedus A: Measurement of free thyroxine concentration in human serum. *J Clin Invest* 41: 1031~1040, 1962
- 2) Ingbar SH, Braverman LE, Dawber NA, Lee GY: 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: 1679~1689, 1965
- 3) Oppenheimer JH, Squef R, Surks MI, Hauer H: Binding of thyroxine by serum proteins evaluated by equilibrium dialysis and electrophoretic techniques. Alterations in nonthyroidal illness. *J Clin Invest* 42: 1769~1782, 1963
- 4) Sterling K, Brenner MA: Free thyroxine in human serum: simplified measurement with the aid of magnesium precipitation. *J Clin Invest* 45: 153~163, 1966
- 5) Schussler GC, Plager JE: Effect of preliminary purification of <sup>131</sup>I-thyroxine on the determination of free thyroxine in serum. *J Clin Endocr* 27: 242~250, 1967
- 6) Lee ND, Henry RJ, Golub OJ: Determination of

- the free thyroxine content of serum. *J Clin Endocrinol* **24**: 486-495, 1964
- 7) McDonald LJ, Robin NI, Siegel L: Free thyroxine in serum as estimated by polyacrylamide gel filtration. *Clin Chem* **24**: 652-656, 1978
- 8) Amino N, Nishi K, Nakatani K, Mizuta H, Ichihara K, Tanizawa O, et al: Effect of albumin concentration on the assay of serum free thyroxin by equilibrium radioimmunoassay with labeled thyroxin analog (amerlex free T<sub>4</sub>). *Clin Chem* **29**: 321-325, 1983
- 9) 佐藤龍次, 伴 良雄, 九島健二, 原 秀雄, 長倉穂積, 海原正宏, 他: マグネット分離を用いた Amerlex M Free T<sub>4</sub> RIA キットの基礎的ならびに臨床的検討. 医学と薬学 **21**: 343-351, 1989
- 10) 笠木寛治, 高坂唯子, 幡生寛人, 徳田康孝, 飯田泰啓, 小西淳二: DPC・free T<sub>4</sub> および free T<sub>3</sub> RIA Kit による血中遊離型甲状腺ホルモン濃度の測定. 核医学 **25**: 569-578, 1988
- 11) 久保田憲, 佐々木憲夫, 高久史麿, 内村英正: 血清フリー T<sub>4</sub> およびフリー T<sub>3</sub> 濃度測定の臨床的意義——DPC フリー T<sub>4</sub>・フリー T<sub>3</sub> キットを用いた検討——. 核医学 **25**: 821-830, 1988
- 12) 岡田芳恵, 竹岡啓子, 玉置治夫, 市原清志, 網野信行, 宮井 潔: 改良法 2 ステップ“ガンマーコート FT<sub>4</sub>”による血中 Free T<sub>4</sub> の測定——基礎的および臨床的検討——. ホルモンと臨床 **38**: 497-502, 1990
- 13) 宇井一世, 才木康彦, 中西昌子, 川井順一, 富永悦二, 山口晴司, 他: Gamma Coat FT<sub>4</sub> Kit (改良法) による血中遊離サイロキシン濃度の測定——アルブミン濃度の FT<sub>4</sub> 値への影響——. ホルモンと臨床 **39**: 643-650, 1991
- 14) 笠木寛治, 小西淳二, 高坂唯子, 飯田泰啓, 池窪勝治, 鳥塚莞爾: 透析膜マイクロカプセルを用いた血中遊離サイロキシン濃度測定法について. 核医学 **18**: 973-983, 1981
- 15) 岡田芳恵, 竹岡啓子, 玉置治夫, 光田信明, 網野信行, 谷澤 修, 他: “FT<sub>4</sub> 平衡透析 RIA 法(ニコルス法)”による血中の FT<sub>4</sub> 測定——基礎的検討および臨床的応用——. ホルモンと臨床 **39**: 1087-1094, 1991
- 16) 飯田泰啓, 高坂唯子, 小林香津子, 富田恵子, 日高昭斎, 竹内 亮, 他: 平衡透析法を用いた血中遊離サイロキシン濃度測定ラジオイムノアッセイキットの検討. 核医学 **28**: 1213-1221, 1991
- 17) 末廣美津子, 尾森春艶, 村上 稔, 福地 稔: 平衡透析—ラジオイムノアッセイによる血中遊離型サイロキシン測定法に関する検討. 核医学 **28**: 1365-1373, 1991
- 18) Csako G, Zweig MH, Benson C, Ruddel M: On the albumin dependence of measurements of free thyroxin. I. Technical performance of seven methods. *Clin Chem* **32**: 108-115, 1986
- 19) 松村 要, 中川 毅, 信田憲行, 服部孝雄, 奥田康之, 田口光雄, 他: 低蛋白血症における free T<sub>4</sub> RIA 測定値の信頼性に関する検討. 核医学 **22**: 511-519, 1985
- 20) Christofides ND, Sheehan CP, Midgley JEM: One-step, labeled antibody assay for measuring free thyroxin. I. assay development and validation. *Clin Chem* **38**: 11-18, 1992
- 21) Sheehan CP, Christofides ND: One-step, labeled-antibody assay for measuring free thyroxin. II. Performance in a multicenter trial. *Clin Chem* **38**: 19-25, 1992
- 22) 佐藤龍次, 伴 良雄, 谷山松雄, 原 秀雄, 長倉穂積, 海原正宏, 他: アマレックス-MAB Free T<sub>4</sub> キットの基礎的ならびに臨床的検討. 医学と薬学 **29**: 1261-1269, 1993
- 23) Gow SM, Kellett HA, Seth J, Sweeting VM, Toft AD, Beckett GJ: Limitations of new thyroid function tests in pregnancy. *Clin Chim Acta* **152**: 325-333, 1985
- 24) Ball R, Freedman DB, Holmes JC, Midgley JEM, Sheehan CP: Low-normal concentrations of free thyroxin in serum in late pregnancy: physiological fact, not technical artefact. *Clin Chem* **35**: 1891-1896, 1989
- 25) 岡田芳恵, 竹岡啓子, 玉置治夫, 光田信明, 市原清志, 網野信行, 他: 平衡透析 RIA 法および原理の異なる他の 3 法による正常妊娠時の血中 FT<sub>4</sub> 値の比較検討——偏相関係数を用いた新たな解析——. ホルモンと臨床 **40**: 455-459, 1992
- 26) Midgley JEM, Sheehan CP, Christofides ND, Fry JE, Browning D, Mardell R: Concentrations of free thyroxin and albumin in serum in severe non-thyroidal illness: assay artefacts and physiological influences. *Clin Chem* **36**: 765-771, 1990
- 27) Wong TK, Pekary AE, Hoo GS, Bradley ME, Hershman JM: Comparison of methods for measuring free thyroxin in nonthyroidal illness. *Clin Chem* **38**: 720-724, 1992
- 28) 池窪勝治, 小西淳二, 中島言子, 遠藤啓吾, 鳥塚莞爾, 森 徹: 抗サイロキシン自己抗体を認めた橋本病の一例について. 日内分泌誌 **52**: 1020-1032, 1976
- 29) Konishi J, Iida Y, Kousaka T, Ikekubo K, Nakagawa T, Torizuka K: Effect of anti-thyroxin auto-antibodies on radioimmunoassay of free thyroxin in serum. *Clin Chem* **28**: 1389-1391, 1982
- 30) John R, Henley R, Shankland D: Concentrations of free thyroxin and free triiodothyronine in serum of patients with thyroxin- and triiodothyronine-binding autoantibodies. *Clin Chem* **36**: 470-473, 1990

## Summary

### Measurement of Serum Free Thyroxine Concentrations Using anti-T<sub>4</sub> Monoclonal Antibody

Katsuji IKEKUBO\*, Yasuhiko SAIKI\*, Keiko OHTA\*, Masako ISHIKAWA\*,  
Haruji YAMAGUCHI\*, Hidetomi ITO\*, Megumu HINO\*, Naoki HATTORI\*\*,  
Takashi ISHIHARA\*\*, Kunisaburo MORIDERA\*\* and Hiroyuki KURAHACHI\*\*

*\*Department of Nuclear Medicine, \*\*Department of Internal Medicine,  
Kobe City General Hospital*

A new one-step radiolabeled antibody radioassay for measuring free T<sub>4</sub> (FT<sub>4</sub>) in serum (Amerlex-MAB FT<sub>4</sub>) was evaluated in comparison with an analog tracer RIA of FT<sub>4</sub> (Amerlex-M FT<sub>4</sub>).

In this new method, <sup>125</sup>I-labeled anti-T<sub>4</sub> monoclonal antibody which has cross-reactivity with T<sub>3</sub> is used as a tracer. When incubated with serum sample, the tracer binds to FT<sub>4</sub> and the remaining tracer binds to a T<sub>3</sub> coated particle (Amerlex MAB). The radioactivity bound to Amerlex MAB is measured. Counts of <sup>125</sup>I bound to the T<sub>3</sub> coated particle were inversely proportional to sample FT<sub>4</sub> concentrations. The assay procedure is as follows. Fifty microliter of patient's serum or standard FT<sub>4</sub>, 500  $\mu$ l of Amerlex MAB and tracer is incubated at 37°C for 30 minutes and centrifuged. Then the radioactivity of Amerlex MAB is measured using an autowell gamma counter.

The intra- and interassay coefficients of variation were 1.6–2.7% and 2.6–8.0%, respectively.

Although Amerlex-M FT<sub>4</sub> values were significantly increased by adding human albumin to the serum, Amerlex-MAB FT<sub>4</sub> values were not effected by the change of albumin concentrations. In non-thyroidal illness patients, Amerlex-MAB FT<sub>4</sub> values were not affected by the concentrations of albumin, TBG and NEFA.

The euthyroid central 95% reference range for FT<sub>4</sub> determined by Amerlex-MAB FT<sub>4</sub> was 0.99 to 1.54 ng/dl. The FT<sub>4</sub> levels correlated well with the metabolic status. Although Amerlex-M FT<sub>4</sub> values were spuriously increased in patients with anti-T<sub>4</sub> autoantibodies, Amerlex-MAB FT<sub>4</sub> values were not affected by the autoantibodies.

Amerlex-MAB FT<sub>4</sub> values of normal pregnant women were slightly lower in the second and third trimesters than in the first trimester. These lower FT<sub>4</sub> concentrations in late pregnancy were considered likely not to be artefact by low serum albumin or high serum TBG but to be a physiological event.

Amerlex-MAB FT<sub>4</sub> values correlated well with FT<sub>4</sub> indices and inversely correlated with TSH levels. A significant correlation ( $n=401$ ,  $r=0.86$ ,  $p=0.0001$ ) was observed between Amerlex-MAB FT<sub>4</sub> and Amerlex-M FT<sub>4</sub> values in various thyroid conditions without antithyroid autoantibodies.

In summary, this new assay for FT<sub>4</sub> is simple, rapid and reproducible. The measurement is useful for the evaluation of physiological thyroid function and helpful in the management of patients with thyroid diseases.

**Key words:** Radiolabeled antibody radioassay, Analog tracer RIA, Amerlex-MAB FT<sub>4</sub>, Amerlex-M FT<sub>4</sub>, Serum albumin concentrations.