

《技術報告》

標識モノクローナル抗体を用いた遊離甲状腺ホルモン濃度の測定 —Amerlex-MAB FT4 および FT3 キットの使用経験—

笠木 寛治* 高坂 唯子** 御前 隆* 宮本 信一*

竹内 亮* 小西 淳二*

要旨 最近 ^{125}I -抗 T4(T3) モノクローナル抗体を血中 T4(T3) と結合させ、固相化 T3(T2) に結合した残りの標識抗体の量を知ることにより血中遊離 T4(T3) を測定する方法が開発された。今回この方法を用いた Amerlex-MAB FT4 および FT3 キットが試用可能になったので、その基礎的ならびに臨床的検討を行い、その成績を報告する。

インキュベーション温度および時間の検討では原法通り 37°C , 30 分間が適当と思われた。測定値の再現性は 2.1–6.2% の変動係数を示し、良好であった。遊離 T4 および遊離 T3 の正常範囲はそれぞれ $0.98\text{--}1.77 \text{ ng}/100 \text{ ml}$, $2.8\text{--}4.6 \text{ pg}/\text{ml}$ であり、甲状腺機能亢進症および低下症とを正確に分離することができた。妊婦では妊娠の進行に伴い、両測定値とも若干の低下傾向を示したが、甲状腺機能正常の他の TBG 異常症では全例正常値を示した。血清アルブミン濃度が $1.5\text{--}3.0 \text{ g}/\text{dl}$ 低い非甲状腺疾患(NTI)患者では、アルブミン濃度の低下に伴う測定値の低下が両アッセイにおいて認められたが、遊離 T4 および T3 濃度は Amerlex-M 法に比べて、有意に高く、測定値がアルブミン濃度により影響を受ける Amerlex-M 法の欠点を充分に補っているものと考えられた。血中 T4 や T3 自己抗体を有する患者においても、甲状腺機能を正しく反映する測定値が得られた。本法による測定値は、低アルブミン血症、抗 T4 や抗 T3 抗体陽性の検体を除いた場合には、Amerlex-M 法による測定値とよく一致した。以上の結論から両キットは充分に臨床応用が可能であると考えられた。

(核医学 31: 1525–1537, 1994)

I. 緒 言

血液中で thyroxine (T4) および triiodothyronine (T3) はその大部分が TBG を主とする thyroxine 結合タンパク (TBP) と結合しており、その一部分 (T4 の場合は 0.03%, T3 の場合は 0.4%) が遊離型

として存在しているにすぎない。生体内で甲状腺ホルモンとしての作用を発揮するのはこの遊離型であり、従来よりこの遊離型ホルモンの濃度を簡便にかつ正確に測定する試みがなされてきた。

従来の平衡透析法¹⁾, 限外濾過法²⁾, ゲル濾過法³⁾あるいは総 T4 濃度と TBG または T3 摂取率より遊離 T4 指数を算出する方法⁴⁾などが用いられたが、1980 年代より RIA による測定法が広く行われてきた。RIA による遊離型甲状腺ホルモンの測定は原理上 back titration 法 (2 step 法)⁵⁾, 透析膜マイクロカプセル法^{6,7)}, 誘導体法^{8~12)}, 平衡透析 RIA 法^{13,14)}などに分類される。最近従来の RIA とは測定原理を全く異なる方法、すなわち ^{125}I -モ-

* 京都大学医学部核医学科

** 同 放射線部同位元素部門

受付: 6 年 7 月 14 日

最終稿受付: 6 年 10 月 3 日

別刷請求先: 京都市左京区聖護院川原町 54 (〒606)
京都大学医学部核医学科

笠木 寛治

ノクローナルT4またはT3抗体を用いるone stepラジオアッセイ法が開発され^{15~19}、日本コダックダイアグノスティック社よりAmerlex-MAB FT4/FT3キットとして提供されるようになった。そこで著者らはこのキットの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

遊離T4測定用キットは¹²⁵I-抗T4モノクローナル抗体と固相化T3が、遊離T3測定用キットは¹²⁵I-抗T3モノクローナル抗体と固相化3,5-diiodo-l-thyronine(T2)がそれぞれ用いられている。抗T4(または抗T3)抗体のT3(T2)に対する結合親和性がT4(T3)に対するそれに比べて著しく低いことから、標識抗T4(T3)抗体が先に血中の遊離T4(T3)に結合し、未結合部分が固相化T3(T2)に結合する。固相化には磁性ポリマー粒子が用いられ、この結合体はMAB分離剤と呼ばれている。MAB分離剤に結合した標識抗体と結合していない標識抗体とは磁気により容易に分離できる。結合型標識抗体の量は血液中の遊離T4(T3)濃度が高いと減少し、低いと増加する。TBPと磁性ポリマーに結合したT3(T2)とはその立体構造からほとんど結合しない(Fig. 1)。

III. 測定方法

操作法は、①標準または検体血清50μlにMAB分離剤500μlを加え、さらに遊離T4アッセイでは¹²⁵I-抗T4溶液500μlを、遊離T3アッセイでは¹²⁵I-抗T3溶液500μlをそれぞれ加える。②37°C、30分間インキュベーションを行う。③15分間magnetic separationを行い、上清を吸引し、沈殿物の放射能を測定する。④標準検体の結合カウントを元に標準曲線を作成し、被検血清の結合カウントに相当する測定値を読み取る。

基礎的検討としてインキュベーション時間と温度の影響さらに再現性につき評価した。

IV. 対象

臨床的検討を行った対象をTable 1に示す。こ

れらの全症例においてTSH濃度を測定し、甲状腺中毒症では低値、低下症では高値、正常者では正常値を確認した。NTL患者においてはTSH正常例のみを選出した。TSHはリアグノストhTSHキット(ヘキスト社)を用いて測定した。

T4およびT3自己抗体は、Amerlex-Mキットに用いてある¹²⁵I-T4または¹²⁵I-T3誘導体を用い、以下に示した方法で測定した²⁰。血清100μlに¹²⁵I-T4または¹²⁵I-T3誘導体500μlを加え混和し、37°C、60分間インキュベーションを行った。その後20%ポリエチレングリコール溶液1mLを加え混和し、室温15分間放置後、2300×g、20分間遠心分離を行い、その後沈渣の放射能を測定し、B/T(%)を計算した。

V. 結果

1. 基礎的検討

1) インキュベーション時間と温度の影響

遊離T4アッセイでは、インキュベーション時間を使って、結合率への影響をみたところ、インキュベーション時間の経過とともに結合率の軽度の上昇が認められた(Fig. 2-a)。しかし実際の検体測定においてインキュベーション時間を一定にすることで、原法通り30分間のインキュベーションで適当であるかと思われた。

一方、遊離T3アッセイではインキュベーション時間を変えても、結合率には有意の変化はなく、原法通り30分間のインキュベーションで充分と思われた(Fig. 2-b)。

一方、インキュベーション温度を4°C、25°C、37°Cと変化させて結合率への影響をみたところ、遊離T4、遊離T3アッセイともに、37°Cでもっとも急峻な標準曲線が得られた(Fig. 3-a, b)。

2) 再現性

遊離甲状腺ホルモン値が低値、正常値、高値を示す3検体の10回の測定における変動係数は遊離T4アッセイの場合測定内が5.7%以下、測定間が5.3%以下、遊離T3アッセイの場合測定内が4.2%以下、測定間が6.2%以下であった(Table 2)。

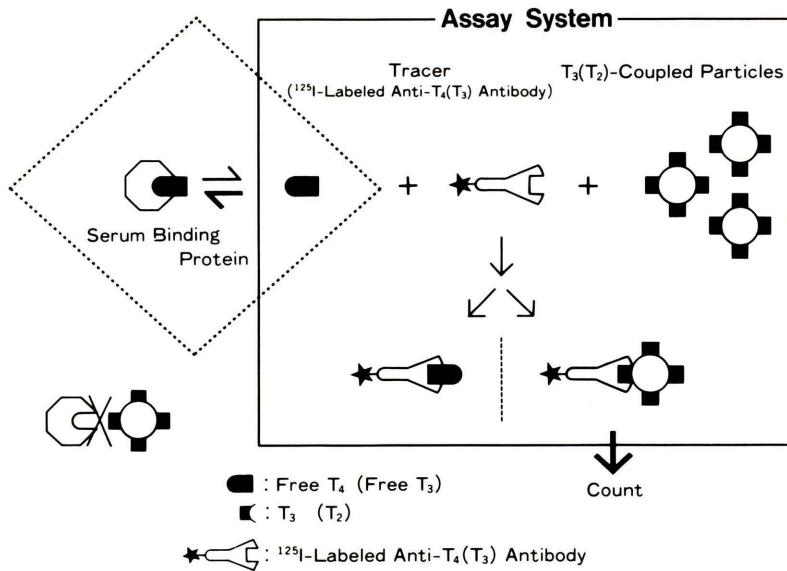


Fig. 1 Principle of labeled-antibody immunoassay.

Table 1 Subjects

	Number of subjects examined	
	Free T4 assay	Free T3 assay
Normal Subjects	66	66
Thyrotoxicosis	36	36
Graves' disease	29	29
subacute thyroiditis	3	3
silent thyroiditis	4	4
Hypothyroidism	22	23
goitrous autoimmune thyroiditis	9	10
atrophic autoimmune thyroiditis	7	7
postoperative hypothyroidism	6	6
Euthyroidism with Thyroid Diseases	52	59
adenoma	9	9
adenomatous goiter	9	9
cancer	6	6
diffuse goiter*	8	13
euthyroid ophthalmic Graves' disease	10	10
high TBG **	3	4
low TBG ***	7	8
Pregnancy	82	82
1st trimester	27	27
2nd trimester	27	27
3rd trimester	28	28
Nonthyroidal Illness ****	75	75
Comparison with "Amerlex-M" Values	122	83
thyroid diseases	97	57
nonthyroidal illness ****	19	20
anti-T3 and/or anti-T4 antibodies	6	6

* autoimmune goitrous thyroiditis (Hashimoto's disease) or simple goiter; ** TBG >40 μg/ml;
*** TBG <10 μg/ml; **** patients with nonthyroidal illness and low serum albumin concentrations.

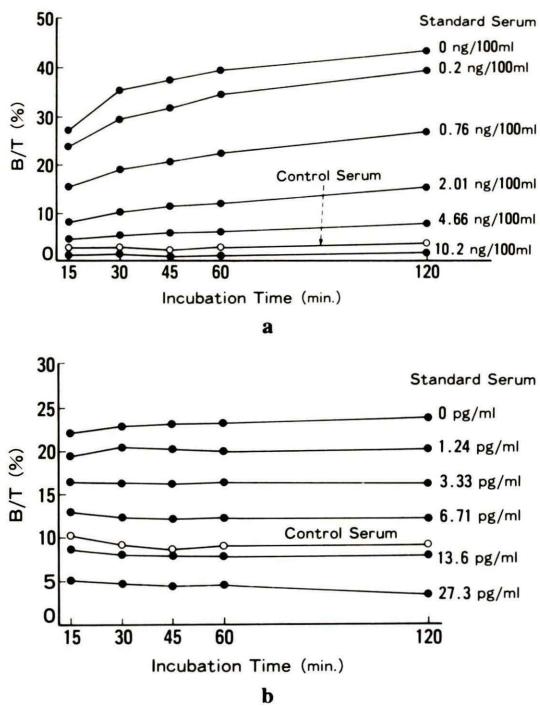


Fig. 2 Effect of incubation time on the binding of ^{125}I -labeled anti-T4 antibody (a) and ^{125}I -labeled anti-T3 antibody (b) to the solid phase in the presence of standard sera.

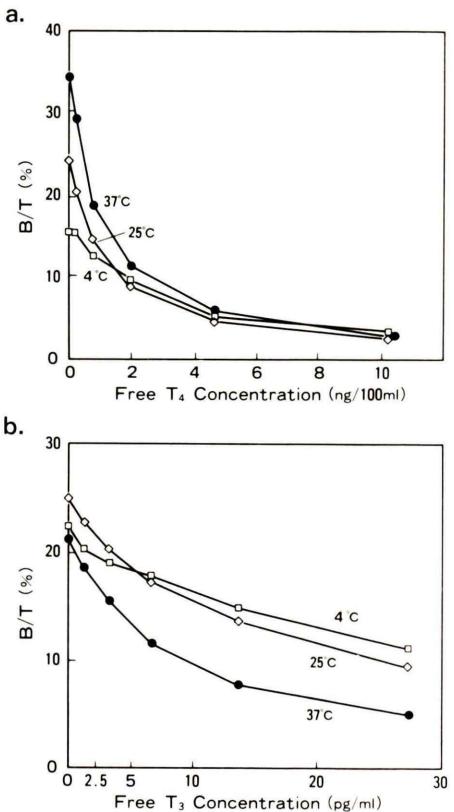


Fig. 3 Effect of incubation temperature on the standard curve for the measurement of free T4 (a) and free T3 (b).

Table 2 Reproducibility

a) Free T_4		Intraassay Variation		Interassay Variation	
Serum Samples n = 10		Mean \pm S.D.(ng/100ml)	C.V. (%)	Mean \pm S.D.(ng/100ml)	C.V. (%)
A		0.35 ± 0.02	5.7	0.34 ± 0.02	5.3
B		1.18 ± 0.04	3.0	1.12 ± 0.03	2.3
C		3.72 ± 0.12	3.3	3.73 ± 0.16	4.3

b) Free T_3		Intraassay Variation		Interassay Variation	
Serum Samples n = 10		Mean \pm S.D.(pg/ml)	C.V. (%)	Mean \pm S.D.(pg/ml)	C.V. (%)
A		1.73 ± 0.07	4.2	1.63 ± 0.10	6.2
B		3.60 ± 0.08	2.2	3.72 ± 0.11	2.8
C		8.79 ± 0.19	2.1	9.42 ± 0.38	4.1

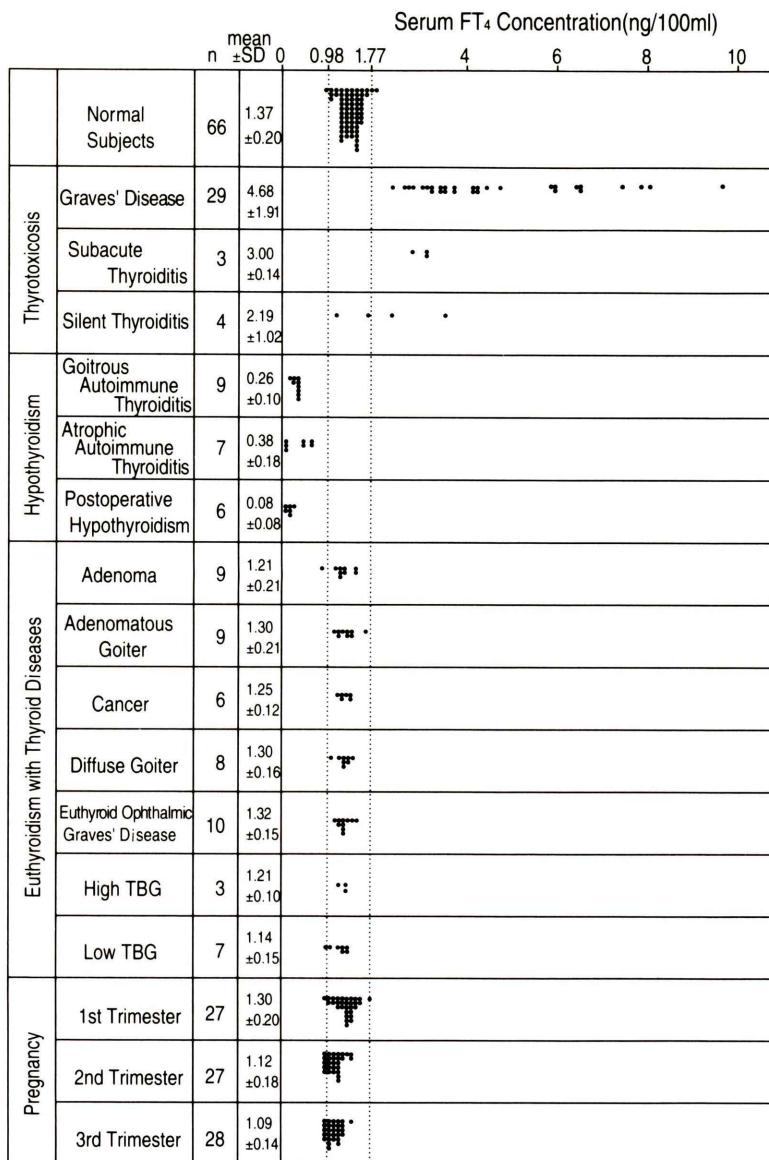


Fig. 4a

2. 臨床的検討

1) 健常者、妊婦および各種甲状腺疾患患者における遊離甲状腺ホルモン濃度

健常者 66 名の遊離 T4 濃度の正常範囲は最大対数尤度法による正規化で、0.98–1.77 ng/ml であった。甲状腺中毒症のうちバセドウ病、亜急性

甲状腺炎では全例高値、無痛性甲状腺炎では 2 例を除いて全例高値を示した。橋本病による甲状腺機能低下症、原発性粘液水腫や甲状腺全摘出後の患者では全例低値を示した。一方、甲状腺腺腫、腺腫様甲状腺腫、甲状腺癌、びまん性甲状腺腫(橋本病および単純性甲状腺腫)、バセドウ病眼症な

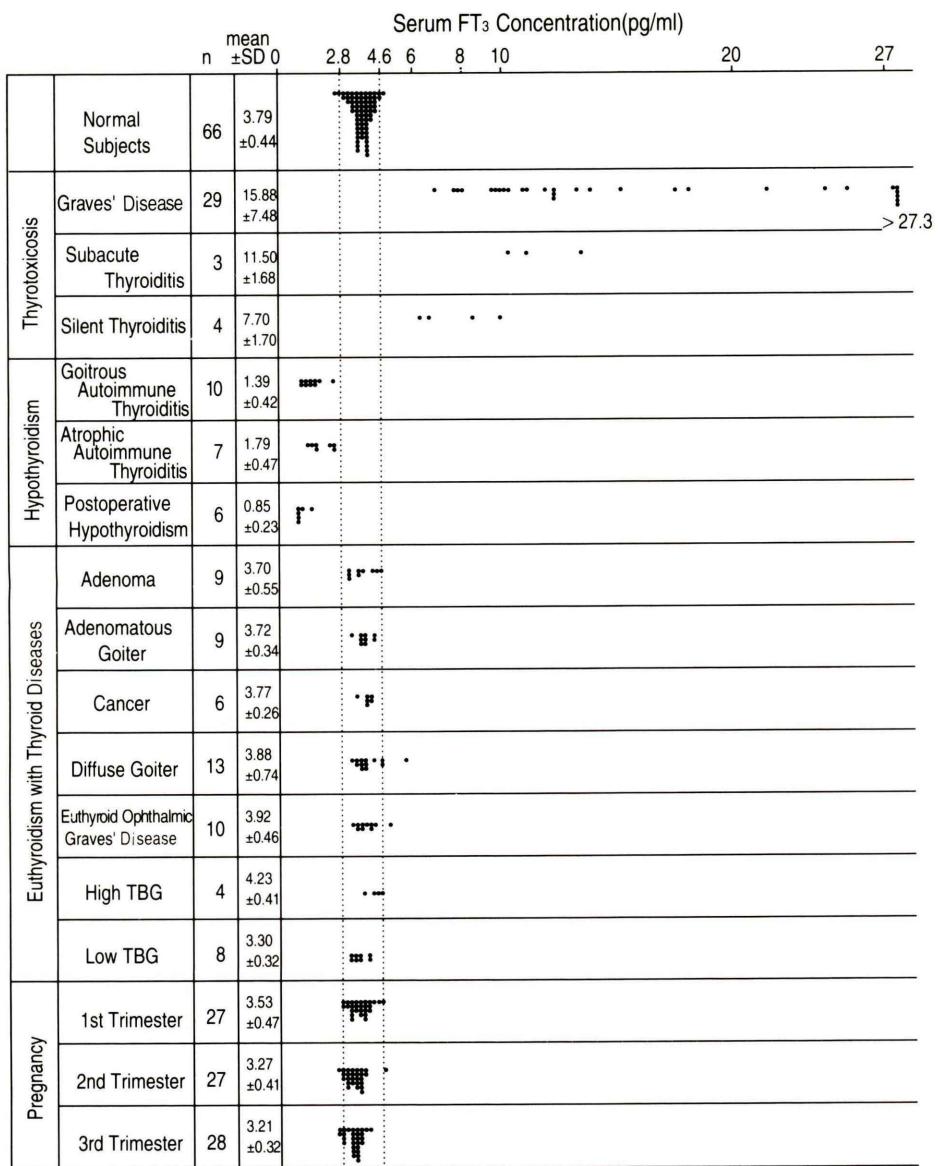


Fig. 4 Serum free T4 (a) and free T3 (b) concentrations in normal subjects, patients with various thyroid diseases and pregnant women.

どで、臨床的に euthyroid state にある症例では甲状腺腺腫の 1 例を除いて全例正常値を示した。TBG 増多症、減少症や欠損症で euthyroid state にある症例でも正常値が得られた。一方、妊婦では 1 期 1.30 ± 0.20 ng/dl, 2 期 1.12 ± 0.18 ng/dl, 3 期 1.09 ± 0.14 ng/dl であり、1 期に比べて 2 期、3 期で

低値の傾向が認められた。同年代の非妊娠女性($n=25$)における値($1.30 \pm 0.34 \text{ ng/dL}$)と比較したところ、1期では有意差なし、2期では $p < 0.001$ 、3期では $p < 0.001$ と有意差が認められた。さらに妊娠1期における遊離T4濃度は2期($p < 0.005$)および3期($p < 0.001$)における値に比べて有意に高

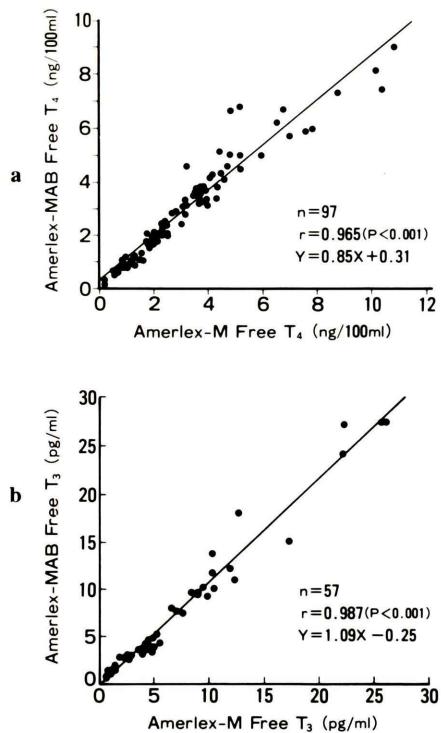


Fig. 5 Correlation between free T4 (a) and free T3 (b) concentrations measured by Amerlex-MAB kit and Amerlex-M kit.

値を示した。軽度の低値を示したものが1期27例中2例、2期27例中7例、3期28例中9例あった(Fig. 4-a)。

また健常者66名における遊離T3濃度の正常範囲は2.8–4.6 pg/mlであり、甲状腺中毒症では全例高値、甲状腺機能低下症では全例低値、臨床的にeuthyroid stateにある症例ではびまん性甲状腺腫の1例とバセドウ病眼症の1例を除いて、TBG異常症を含めて全例正常値を示した。正常妊娠における遊離T3濃度も遊離T4濃度と同様に妊娠周期の増加とともに軽度の低下傾向を示し、1期3.53±0.47 pg/ml、2期3.27±0.41 pg/ml、3期3.21±0.32 pg/mlであり、同年代の非妊娠女性(n=25)における遊離T3濃度(3.72±0.21 pg/ml)に比べて2期と3期における値がいずれも有意に(p<0.001)低値を示した。1, 2, 3期の間では1期の値が2期(p<0.05)と3期(p<0.01)に比べて有意に高値を

示した。軽度の低値を示したものが1期では27例中2例、2期では27例中4例、3期では28例中6例あった(Fig. 4-b)。

2) Amerlex-M法との測定値の比較

京大病院甲状腺外来を訪れた患者において、Amerlex-M法による遊離T4および遊離T3値と本法による測定値とを比較した成績をFig. 5に示す。両測定値は良好な相関関係を示し、よく一致した。

3) Nonthyroidal illness (NTI)における遊離型甲状腺ホルモン濃度

低アルブミン血症のNTI患者を血清アルブミン濃度別に分類し、遊離T4およびT3濃度の比較を行った(Fig. 6)。アルブミン濃度1.5–2.1 g/dlをGroup 1, 2.2–2.5 g/dlをGroup 2, 2.6–2.7 g/dlをGroup 3, 2.8–2.9 g/dlをGroup 4とした。低アルブミン血症を示した症例では4群すべてで、遊離T4、遊離T3いずれも健常者群に比べて有意に低値を示した。いずれもアルブミン濃度の低下に伴いその平均測定値は低下傾向を示した。遊離T4濃度が低値を示した症例の頻度はGroup 1で83.3% (5/6); Group 2で52.6% (10/19); Group 3で32.3% (10/31); Group 4で15.8% (3/19); 全例では37.3% (28/75)であった。一方、遊離T3が低値を示した症例はGroup 1で66.7% (4/6); Group 2で26.3% (5/19); Group 3で25.8% (8/31); Group 4で21.1% (4/19); 全例では28.0% (21/75)であった。

次に低アルブミン血症のNTI患者(アルブミン濃度1.8–2.9 g/dl)において、本法により測定した遊離T4、T3濃度とAmerlex-M法による測定値とを比較した成績をFig. 7に示す。全例で本法による測定値はAmerlex-M法による測定値に比べて有意に高値を示した。

4) T4またはT3自己抗体を有する患者における測定値

T4、T3自己抗体を有する患者の遊離T4、遊離T3濃度を本法とAmerlex-M法により測定比較した成績をTable 3に示す。T4、T3自己抗体の存在は¹²⁵I-T4誘導体および¹²⁵I-T3誘導体との結合率が高値(>10%)であることで確認した。症例1と

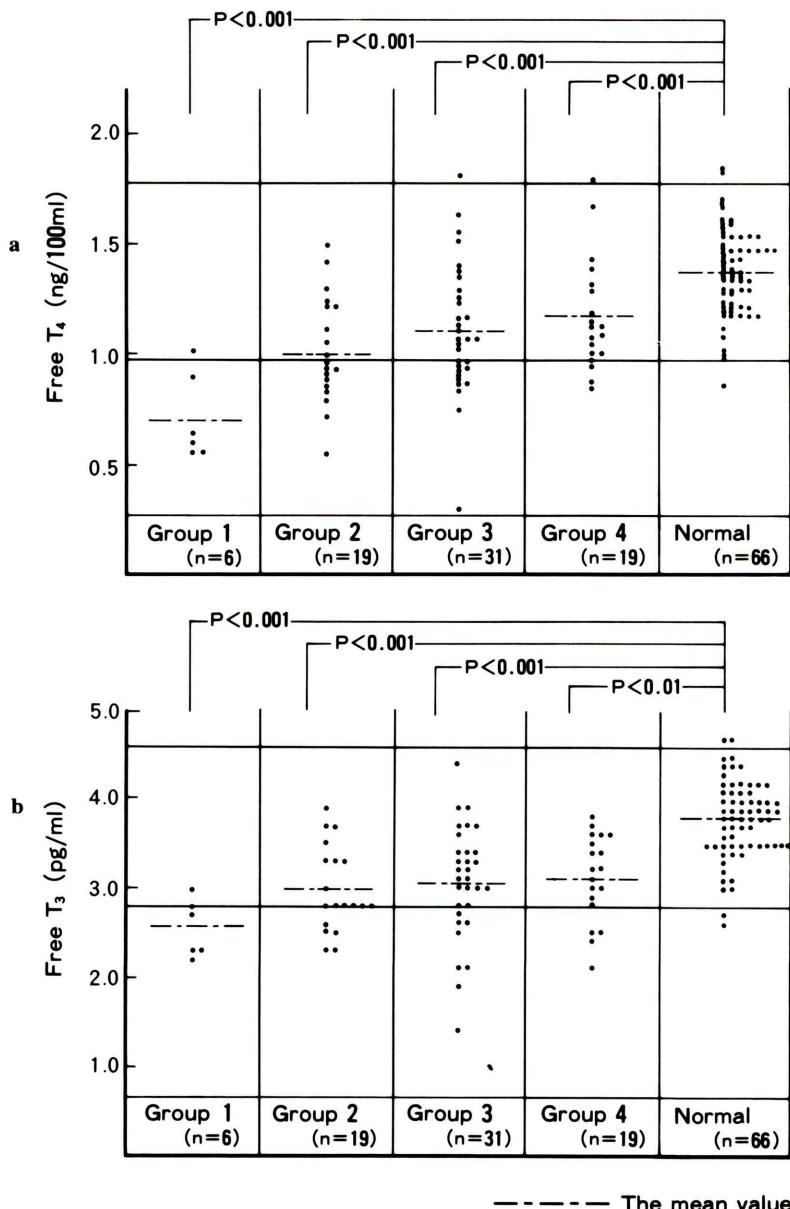


Fig. 6 Serum free T4 (a) and free T3 (b) concentrations in patients with nonthyroidal illness and their relation to serum albumin concentrations. Serum albumin concentrations are 1.5–2.1 g/dl in Group 1, 2.2–2.5 g/dl in Group 2, 2.6–2.7 g/dl in Group 3, 2.8–2.9 g/dl in Group 4. — · — the mean value

6は橋本病による甲状腺機能低下症、症例2-5はバセドウ病による甲状腺機能亢進症で治療中の症例である。症例1-3はTSH値が正常であること

から、euthyroid stateであり、本法による遊離T4、遊離T3の測定値も正常であった。一方、Amerlex-M法による測定値は、症例1では遊離T4が、症

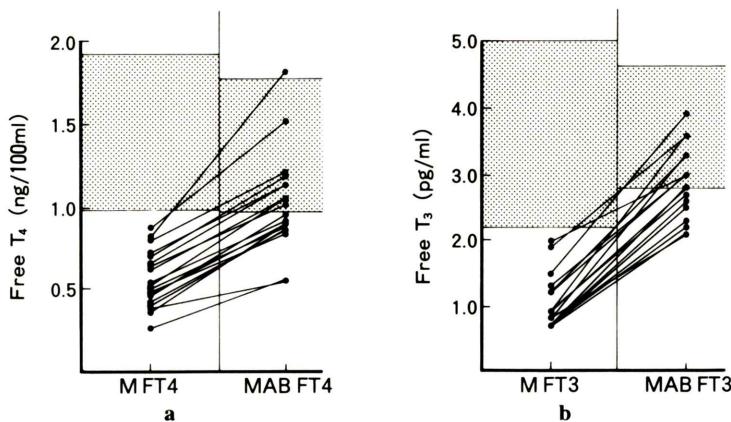


Fig. 7 Comparison of free T4 (a) and free T3 (b) concentrations measured by Amerlex-MAB kit and by Amerlex-M kit in patients with low serum albumin. The shaded area indicates the reference range.

Table 3 Serum free T4 and free T3 concentrations in patients with anti-T4 and/or anti-T3 autoantibodies measured by Amerlex-MAB kit and by Amerlex-M kit, and binding of ^{125}I -labeled T4 analog and T3 analog to the antibodies in the polyethyleneglycol-precipitates

Serum Sample	Free T4			Free T3			TSH ($\mu\text{U}/\text{ml}$)
	^{125}I -T4 Analog binding, B/T (%)	Amerlex-M (ng/100ml)	Amerlex-MAB (ng/100ml)	^{125}I -T3 Analog binding, B/T (%)	Amerlex-M (pg/ml)	Amerlex-MAB (pg/ml)	
1	20.1	2.35*	1.85	12.5	4.5	4.2	1.3
2	76.2	>10.4*	1.26	84.8	>25.5*	3.4	1.3
3	50.3	3.21*	1.31	9.6	5.3*	4.1	1.2
4	39.0	1.39	0.78	58.3	8.4*	3.1	9.6
5	81.4	7.74*	0.40	68.9	17.5*	3.1	15.3
6	71.6	3.48*	0.93	21.0	2.3	2.9	4.9
N1	7.7	1.37	1.37	8.1	4.6	4.4	
N2	7.3	0.90	1.16	7.4	3.6	3.5	
N3	7.5	1.01	1.00	7.6	3.2	3.3	
Normal Range	<10	0.99~1.92	0.98~1.77	<10	2.2~5.0	2.8~4.6	0.3~3.9

* falsely high values for free T4 or free T3

例 2, 3 では遊離 T4 および遊離 T3 が高値であった。症例 4 および 5 では TSH 値がおのおの 9.6 および $15.3 \mu\text{U}/\text{ml}$ と高く、甲状腺機能低下症が考えられ、本法による測定値が甲状腺機能をほぼ正しく反映しているのに対し、Amerlex-M 法による測定値(症例 4 では遊離 T4 および遊離 T3、症例 5 では遊離 T3)はかえって高値を示した。症例 6 では遊離 T4 値が本法 (0.93 ng/dl) と Amerlex-M 法 (3.48 ng/dl) とで解離を示したが、TSH 値から

考えて、本法による測定値が適当であると考えられた。

VI. 考 察

本法の特色は、①トレーサーとして微量の抗 T4 または T3 モノクローナル抗体が用いられていること、さらにその抗体の親和定数がそれほど高くないこと(標識抗 T4 抗体の T4 に対する結合親和定数は $4.4 \times 10^9 \text{ l/mol}$)から、遊離甲状腺ホルモン

のTBPよりのpull off現象がわずかであること、②固相化に遊離T4アッセイの場合はT3を、遊離T3アッセイの場合はT2を用いていることがあげられる。例えば遊離T4アッセイの場合、標識T4抗体の固相化T3に対する結合親和定数は $6.7 \times 10^5 l/mol$ と著しく低いが、磁性ポリマー粒子に結合しているT3がきわめて大量であり、back reaction(固相化T3への結合の解離)が制限され、反応が早く平衡に達する¹⁵⁾。したがってインキュベーション時間は30分(37°C)と短い。前述のごとく、磁性ポリマー粒子に固相化されたT3やT2はその立体構造の変化からTBPと結合することはない。磁石板を用いる簡便なB/F分離も特色の一つと言えるが、もっとも強調すべき本法の特徴は、③測定値が血中アルブミン⁸⁾や自己抗体²¹⁾により影響を受ける誘導体法RIAの欠点を充分に補っていることである。

基礎的検討ではインキュベーション時間や温度の影響など、遊離T4、遊離T3アッセイいずれも原法通り37°C、30分間が適当と考えられた。測定値の再現性も変動係数6.2%以下と良好であり、満足すべき結果と考えられた。

本法による遊離T4濃度の正常範囲は0.98–1.77 ng/dlであり、Sheehanら¹⁶⁾、佐藤ら¹⁸⁾、三浦ら¹⁹⁾の報告と一致し、他のRIAによる正常値ともおおむね一致した^{5,7,12,14)}。一方、本法による遊離T3濃度の正常範囲は2.8–4.6 pg/mlであり、他のRIAによる正常値とほぼ一致した^{10,12)}。

本法により各種甲状腺疾患患者の遊離T4および遊離T3濃度を測定したところ、甲状腺中毒症では遊離T4は無痛性甲状腺炎の2例を除いて全例高値、遊離T3は全例高値に測定された。遊離T4が正常値を示した無痛性甲状腺炎では採血が病期のピークと少しずれたためと推測された。甲状腺機能低下症患者では全例低値で、本法による測定値が甲状腺機能をよく反映していると考えられた。

TBG增多症、低下症、欠損症でTSH値が正常の症例では遊離T4および遊離T3濃度は全例正常範囲であり、他の報告と一致した^{16,18,19)}。

種々の遊離型甲状腺ホルモン測定法のうち近年では反応が早く、操作が簡便で、測定精度のよい誘導体法がもっとも広く用いられている。しかし、Amerlex法など従来の誘導体法ではトレーサーがアルブミンと結合するため、抗体と結合するトレーサ量がその影響を受ける。アルブミン濃度が低値を示す妊婦やNTIでは抗体に結合するトレーサ量が増加し、測定値は見かけ上低くなり、逆に高アルブミン血症では見かけ上高くなる⁸⁾。これに対しトレーサーとアルブミンとの結合を阻止する薬剤を使用しているキットも開発されている^{10,11)}。低アルブミン血症のNTI患者では全例で本法による遊離T4および遊離T3値がAmerlex-M法による測定値より高く、より正常に近い値を示した。Midgleyら¹⁷⁾、三浦ら¹⁹⁾も遊離T4濃度を測定し、同様の成績を報告している。しかしSheehanら¹⁶⁾、Midgleyら¹⁷⁾の遊離T4測定成績と同様、著者らの成績では遊離T4アッセイで37%、遊離T3アッセイで28%の症例で軽度低値を示した。Midgleyら¹⁷⁾、佐藤ら¹⁸⁾は、NTI患者においては血清アルブミン濃度と遊離T4濃度との間に有意の相関関係が認められないと報告し、測定値へのアルブミンの影響を否定しているが、著者らの成績ではアルブミン濃度の低下とともに、遊離T4および遊離T3濃度は若干低下した。Amerlex-MAB遊離T4測定用キットでは遊離脂肪酸の測定値への影響を軽減するため、測定系にBovine serum albumin(BSA)を添加している。しかしBSAが存在すると希釈により(実際のアッセイでは21倍に希釈される)測定値が低下することが知られており¹⁵⁾、高アルブミン血症と低アルブミン血症の2つの検体間でBSA添加による影響が微妙に異なる可能性が考えられる。これら低アルブミン血症の患者はすべて京大病院入院中で重症非甲状腺疾患有していることが予想され、したがってこのような症例では血清遊離T4濃度が実際に低下している可能性も充分考えられる²²⁾。一方、遊離T3測定用キットではBSAを使用していないため、低アルブミン血症患者での遊離T3濃度の低下は重症NTIによる低T3症候群を

反映していると思われた。NTIではアルブミン濃度以外、遊離脂肪酸濃度、原疾患の多様性、併用薬の影響など様々な要因が存在し、これらの測定結果の評価を複雑にしているが、少なくとも本法による測定値がAmerlex-M法に比べて、より正確に甲状腺機能を反映しており、その臨床的有用性は高く評価されるものと思われる。

従来の報告と同様に妊娠の進行に伴い20%以内の遊離T4および遊離T3濃度の低下を示した^{16,18,19)}。妊婦ではTBG濃度、遊離脂肪酸濃度が上昇し、血中アルブミン濃度が低下するが、これらの変動と遊離T4濃度の変動とは一致せず、アルブミンに影響されない方法により測定された遊離T4濃度も妊娠の後半には低下するという報告が多く^{5,14)}、実際に妊娠中後期に生理的に甲状腺機能低下症が起こるものと推測される^{23,24)}。妊婦では核内甲状腺ホルモン受容体が増加し、代償性に甲状腺機能を正常に保っているという報告もある²⁵⁾。

誘導体法では標識誘導体がT4またはT3自己抗体に結合し、キットの固相化抗体に結合するカウントが減少し、異常高値を示す欠点が指摘されている¹⁹⁾。著者らはT4またはT3自己抗体を有する6症例を対象に、本法とAmerlex-M法による測定値を比較した。Amerlex-M法での測定値と異なり、本法の測定値は臨床所見、TSH濃度と対応した値であった。遊離T4測定の場合は抗T3自己抗体が、遊離T3測定の場合は抗T2自己抗体が問題となるが、固相化リガンドが過剰に存在するため、たとえ固相化リガンドに自己抗体が結合しても、さらに標識抗体が結合しうる部位がまだ充分に保たれているためと考えられた。したがって従来の誘導体法で問題とされた自己抗体の影響²¹⁾は本法ではほとんど認められず^{16,18,19,26)}、今後の臨床応用が期待される。

VII. まとめ

Amerlex MAB FT4およびFT3キットの評価を行い、以下の結論を得た。

1. インキュベーション時間および温度の影響

を検討したところ、両キットとも、原法通り37°C、30分間が適当と思われた。

2. 測定値の再現性はいずれも6.2%以下の変動係数を示し、良好であった。
3. 甲状腺機能亢進症および低下症を測定値により正確に区分することができた。
4. 従来のAmerlex-Mによる測定値とよく一致した。
5. 血清アルブミンの測定値への影響はAmerlex-M法に比べて少なかった。
6. 抗T4および抗T3自己抗体を有する患者においても正確な測定値が得られた。
7. 以上の結論から、両キットは充分臨床応用が可能であると考えられた。

文 献

- 1) Sterling K, Brenner MA: Free thyroxine in human serum: simplified measurement with the aid of magnesium precipitation. *J Clin Invest* **45**: 153-163, 1966
- 2) Schussler GC, Plager JE: Effect of preliminary purification of ¹³¹I thyroxine on the determination of free thyroxine. *J Clin Endocrinol* **27**: 242-250, 1967
- 3) Lee ND, Henry RJ, Golub OJ: Determination of the free thyroxine content of serum. *J Clin Endocrinol* **24**: 486-495, 1964
- 4) Clark F, Horn DB: Assessment of thyroid function by the combined use of the serum protein-bound iodine and resin uptake of ¹³¹I-triiodothyronine. *J Clin Endocrinol Metab* **25**: 39-45, 1965
- 5) 小西淳二、高坂唯子、飯田泰啓、笠木寛治、池窪勝治、中川毅、他：固相法radioimmunoassayによる血中遊離サイロキシン測定の基礎的検討と臨床応用。核医学 **17**: 963-970, 1980
- 6) Ashkar FS, Buehler RJ, Chan T: Radioimmunoassay of free thyroxine with rebound anti-T4 microcapsules. *J Nucl Med* **20**: 956-960, 1979
- 7) 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遊離サイロキシン濃度測定法について。核医学 **18**: 973-983, 1981
- 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 T4). *Clin Chem* **29**: 321-325, 1983
- 9) Wilkins JE, Midgley JEM, Barron N: Comprehensive study of a thyroxin-analog-based assay for free

- thyroxin ("Amerlex FT4"). Clin Chem **31**: 1644–1653, 1985
- 10) 笠木寛治, 高坂唯子, 御前 隆, 中島鉄夫, 遠藤 啓吾, 小西淳二, 他: Amerlex Free T3 RIA Kit を用いたFree T3の測定. 核医学 **22**: 245–252, 1985
 - 11) Witherspoon LR, Shami AS, Shuler SE, Neely H, Sonnemaker R, Gilbert SS, et al: Chemically blocked analog assays for free thyronines. I. The effect of chemical blockers on T4 analog and T4 binding by albumin and by thyroxin-binding globulin. Clin Chem **34**: 9–16, 1988
 - 12) 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 T4 および free T3 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
 - 13) Nelson JC, Wilcox RB, Pandian MR: Dependence of free thyroxine estimates obtained with equilibrium tracer dialysis on the concentration of thyroxine-binding globulin. Clin Chem **38**: 1294–1300, 1992
 - 14) 飯田泰啓, 高坂唯子, 小林香津子, 富田恵子, 日高昭彦, 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の検討. 核医学 **28**: 1213–1221, 1991
 - 15) Christofides ND, Sheehan CP, Midgley JEM: One-step, labeled antibody assay for measuring free thyroxin. I. Assay development and validation. Clin Chem **38**: 1–18, 1992
 - 16) 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
 - 17) Midgley JEM, Sheehan CP, Christofides ND, Fry JE, Browning D, Mardell R: Concentration of free thyroxin and albumin in serum in severe nonthyroidal illness: assay artefacts and physiological influences. Clin Chem **36**: 765–771, 1990
 - 18) 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 T4 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
 - 19) 三浦義孝, 稲垣朱実, 谷 能之, 岡本秀樹, 森 祐一, 菅沼信彦, 他: 結合蛋白異常症におけるFT4 値: 標識抗体法による遊離サイロキシン測定用キット(Amerlex MAB FT4)による検討. ホルモンと臨床 **41**: 1195–1201, 1993
 - 20) 西 啓子, 網野信行, 遠藤雄一, 玉置治夫, 海藻 明美, 小豆嶋美生, 他: T4-analog を用いた血中サイロキシン自己抗体の測定について. 臨床病理 **32**: 1133–1136, 1984
 - 21) Konishi J, Iida Y, Kousaka T, Ikekubo K, Nakagawa T, Torizuka K: Effect of anti-thyroxin autoantibodies on radioimmunoassay of free thyroxin in serum. Clin Chem **28**: 1389–1391, 1982
 - 22) Wong TK, Hershman JM: Changes in thyroid function in nonthyroidal illness. Trends Endocrinol Metab **3**: 8–12, 1992
 - 23) Weeke J, Dybkjaer L, Granlie K, Jensen SE, Kjaerulff E, Laurberg P, et al: A longitudinal study of serum TSH, and total and free iodothyronines during normal pregnancy. Acta Endocrinol (Copenh) **101**: 531–537, 1982
 - 24) Ball R, Freedman DB, Holmes JC, Midgley JEM, Sheehan CP: Low-normal concentration of free thyroxin in serum in late pregnancy: physiological fact, not technical artefact. Clin Chem **35**: 1891–1896, 1989
 - 25) Kvetyň J, Poulsen HK: Nuclear thyroxine and 3,5,3'-triiodothyronine receptors in human mononuclear blood cells during pregnancy. Acta Endocrinol (Copenh) **105**: 19–23, 1984
 - 26) 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

A New One-step, Labeled-antibody Assay for Measuring Free Thyroid Hormone Concentrations

Kanji KASAGI, Tadako KOUSAKA, Takashi MISAKI, Shinichi MIYAMOTO,
Ryo TAKEUCHI and Junji KONISHI

Department of Nuclear Medicine, Kyoto University Hospital

We describe one-step labeled-antibody assays for measuring free T4 and free T3 concentrations in serum, based on a novel principle (Amerlex-MAB). Free T4 or free T3 in the sample competes with a molar excess of a cross-reactant (T3 or T2, respectively), chemically coupled to magnetizable polymer particles, for binding to ^{125}I -labeled monoclonal anti-T4 or anti-T3 antibody, respectively. ^{125}I radioactivity bound to the solid phase is inversely proportional to the serum free T4 or free T3 concentration. This one-step assay apparently proceeds to equilibrium after 30 min at 37°C. Within- and between-assay precision (CV) was <5.7% for free T4 or 6.2% for free T3. The reference range was between 0.98 and 1.77 ng/100 ml for free T4 and between 2.8 and 4.6 pg/ml for free T3.

The measurement of free T4 and free T3 concentrations could clearly discriminate hyperthyroid and hypothyroid patients from euthyroid subjects. These values correlated closely to those obtained by an analog radioimmunoassay (Amerlex-M). This method is free from interference by major T4-binding proteins in serum, showing improved performance, compared to the analog radioimmunoassay, with sera from NTI patients with low serum albumin concentrations or anti-thyroid hormone antibodies. We expect these assays to be clinically useful for the evaluation of thyroid functions.

Key words: Free T4, Free T3, ^{125}I -labeled monoclonal antibody, Nonthyroidal illness, Anti-thyroid hormone antibody.