

《原 著》

Thyopac-4 キットによる Thyroxine の Conventional 及び Dual Competitive Binding Analysis 並びにその診断的意義について

浜 田 哲¹⁾ 高 坂 唯 子²⁾ 森 徹²⁾ 竹 田 洋 祐³⁾
池 窪 勝 治³⁾ 鳥 塚 莞 爾³⁾ 植 手 鉄 男⁴⁾

緒 言

血中の遊離型サイロキシン（以下 Free T₄）は、直接細胞内に移行してホルモン作用に関与するために、一般に甲状腺機能の最も良い指標とされている¹⁾。最近トリヨードサイロニン（以下 T₃）の代謝における役割が重視されるに至っている²⁾が、一部の例を除き、その値はサイロキシン値（以下 T₄）にほぼ平行し、また末梢細胞で T₄から T₃への変換が起こることから、Free T₄の測定は依然重要な意義をもつと考えられる。

しかるに Free T₄ の平衡透析あるいは限外汎過による測定は煩雑であり、かつ長時間を要するところから、これに代わって、T₄ 値と血清 T₄ 結合グロブリン（以下 TBG）の指標とから Free T₄ に平行する Free T₄ Index を算出することが広く行われ、臨床上有用であることが認められている^{4)~6)}。この Index の算定には 2 種類のキットが必要であるが、最近 Dual Competitive Binding Analysis すなわち Res-O-Mat “Effective Thy-

roxine Ratio (ETR)⁷⁾⁸⁾, “Normalized Serum Thyroxine”⁹⁾ 及び Free Thyroxine Equivalent¹⁰⁾ が考案され、血清 T₄ 結合蛋白の変動にかかわらず、1 回の測定で Free T₄ の異常の有無を判定しうることが報告された。また稻田¹¹⁾ らは Res-O-Mat ETR kit を 2 つの Step に分けて使用し、T₄ 値と ETR 値の 2 者を測定しうることを報告した。

我々は、Resin と T₄ との結合は不可逆的結合が一部関与する¹²⁾のに対し、Sephadex と T₄ との結合は可逆的であるところから、Thyopac-4 kit を用いた Dual Competitive Binding Analysis（以下 Thyopac ETR と仮称す）を検討し、単一のキットで T₄ 値と共に Thyopac ETR 値を簡易に測定しうる成績を得た。本論文において両者の同時測定法を述べ、その診断的意義を明らかにすると共に、同一血清について Thyopac-3 値及び Free Thyopac Index を測定し、Thyopac ETR 値との関係を示した。

実験対象及び実験方法

被検血清は、京大病院中央放射線部放射性同位元素部門及び大阪北野病院臨床検査部並びに同病院産婦人科より入手され、正常者 40 例、甲状腺機能亢進症 18 例、甲状腺機能低下症 14 例、妊娠（第 29~40 週）12 例、先天性 TBG 欠損症 1 例及びネフローゼ症候群 1 例の合計 86 例であった。

Thyopac-3 値は同キットの使用の手引きに従

1) 京大放射性同位元素総合センター

2) 京大医学部付属病院 中央放射線部

3) 同 放射線科

4) 大阪北野病院臨床検査部

受付：48年9月17日

別刷請求先：京都市左京区聖護院川原町（〒606）

京都市立大学医学部付属病院

放射線医学教室

鳥 塚 莞 爾

Table 1. Summary of the results obtained in various states of thyroid function.

	No. of cases	Thyopac-4 ($\mu\text{g}/100\text{ ml}$)	Thyopac-3	Free Thyopac Index	Thyopac ETR
Normal	40	7.6 \pm 1.9*	106 \pm 9	7.2 \pm 1.8	1.00 \pm 0.03
Hyperthyroid	18	17.9 \pm 6.2 (0.005)**	78 \pm 11 (0.005)	24.0 \pm 10.7 (0.005)	1.22 \pm 0.11 (0.005)
Hypothyroid	14	1.6 \pm 1.1 (0.005)	117 \pm 12 (0.01)	1.4 \pm 1.1 (0.005)	0.87 \pm 0.04 (0.005)
Pregnant	12	11.5 \pm 2.5 (0.005)	127 \pm 5 (0.005)	9.1 \pm 2.2 (0.025)	1.02 \pm 0.05 (NS)†
TBG-deficient	1	2.8	63	4.4	0.96
Nephrotic	1	4.8	97	5.0	0.96

* Mean \pm SD

** Probability that the value in the test group is identical with the corresponding value in the normal group.

† NS=not significant (p 0.1)

つて測定された。

Free Thyopac Index は、Thyopac-3 値と以下の方法で測定された Thyopac-4 値 (T_4 値) から次式により算出された。Free Thyopac Index = $100 \times \text{Thyopac-4 値} \div \text{Thyopac-3 値}$

Thyopac-4 値及び Thyopac ETR 値の同時測定法

(1) 被検血清 0.5 ml 及びエタノール 1.0 ml を抽出用バイアルに入れてフタをしたのち、激しく振盪する。また、0 μg 及び 18 μg スタンダード血清並びに正常プール血清について、各 2 本ずつ同様に行う。

(2) Rotator で室温にて 2 分間混合する。

(3) 2,000回転 5 分間遠沈する。

(4) 上清 0.5 ml を正確にとり、Thyopac-4 バイアルに入れてフタをする。

(5) Rotator で室温にて 30 分間混合する。

(6) 2 分間静置して Granules を沈澱させる。

(7) 上清 1.0 ml を正確にとつて Counting tube に移し、 ^{125}I を測定する。

(8) それぞれにつき $\frac{10^7}{\text{Counts-BG}} = \frac{1}{C}$ を求め、標準曲線より Thyopac-4 値を求める。

(9) 上述の(7)の操作に引続いて Thyopac ETR の測定を行う。すなわち、患者原血清及び

正常プール血清 5 μl をマイクロピペットまたはマイクロシリングでとつて、Thyopac-4 値測定後の同バイアルにそれぞれ加える。なお未稀釀血清 5 μl の代わりに、20倍稀釀血清 0.1 ml を加えてよい。

(10) Rotator で室温にて 30 分間混和する。

(11) 2 分間静置して Granules を沈澱させる。

(12) 上清 1.0 ml を正確にとつて Counting tube (Thyopac-4 測定に使用するものと同種のもの) に移し、 ^{125}I を測定する。

(13) それにつき

Thyopac ETR 値

$$= \frac{\text{正常プール血清の Counts-BG}}{\text{患者血清の Counts-BG}}$$

を求める。

なお、Thyopac ETR 値のみを測定する場合は、Step 4 から Step 9 にとんで操作を行う。

成 績

被検血清 86 例についての各測定結果は Table 1. 及び Fig. 1.~3. に示すごとくである。

Thyopac-4 値は、正常者では $7.6 \pm 1.9 \mu\text{g}/100\text{ ml}$ (平均値 \pm 標準偏差、以下同様) であるのに対し、甲状腺機能亢進症では $17.9 \pm 6.2 \mu\text{g}/100\text{ ml}$ 、機能低下症では $1.6 \pm 1.1 \mu\text{g}/100\text{ ml}$ 、妊娠では $11.5 \pm 2.5 \mu\text{g}/100\text{ ml}$ であった。また先天性 TBG

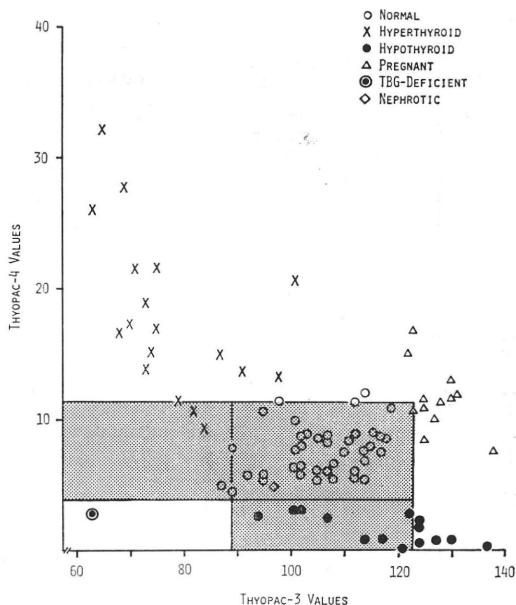


Fig. 1. Thyopac-3 and Thyopac-4 values in various thyroid conditions. The shaded area indicates a range of 2 standard deviations from the mean normal value.

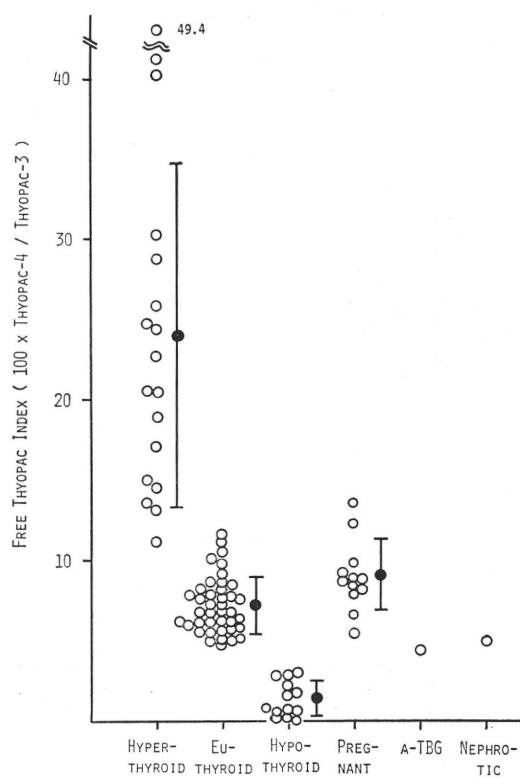


Fig. 2. Free Thyopac Index in various thyroid conditions. Closed circles indicate mean values, and bars show a range of 1 standard deviation from the mean.

欠損症及びネフローゼ症候群の各1例ではいずれも低値を示した。

Thyopac-3 値は、正常者では 106 ± 9 であるのに対し、機能亢進症では 78 ± 11 と低値を示し、機能低下症では 117 ± 12 、妊娠では 127 ± 5 でいずれも高値を示した。TBG 欠損症では低値であった。

Free Thyopac Index は、正常者では 7.2 ± 1.8 であるのに対し、機能亢進症では 24.0 ± 10.7 と高値を示し、機能低下症では 1.4 ± 1.1 と低値を示したが、妊娠 (9.1 ± 2.2) 及び TBG 欠損症ではいずれも正常域に分布した。

以上3種類の測定結果は、いずれも従来の報告に一致した^{13)~16)}。

Thyopac-4 キットを用いて測定された ETR 値は、正常者では 1.00 ± 0.03 であるのに対し、機能亢進症では 1.22 ± 0.11 と高値を示し、機能低下症では 0.87 ± 0.04 と低値を示した。これに対し妊娠 (1.02 ± 0.05)、TBG 欠損症及びネフローゼ

症候群ではいずれも正常値を示した。すなわち本 ETR 値は、TBG の増減にもかかわらず Free T₄ が正常である疾患群では、いずれも正常値を示し、Free T₄ が正常であるか否かの指標として有用であることが認められた。また、本 ETR 値は、Fig. 3. にみられるように、各疾患間に重なり合いは少ないが、その数値が接近しており、重篤の機能亢進症でも 1.50 を越えることなく、また重篤の機能低下症でも 0.80 を下ることなく、Free Thyopac Index に比し各群における分布域が狭いのが特徴であった。

Thyopac ETR 値 (X) と Free Thyopac Index (Y) との関係を Fig. 4. に示す。両者間に相関係数 +0.96 の有意の正相関が認められたが、その関係は非直線性で、関係式はゼロ点を通過せず、

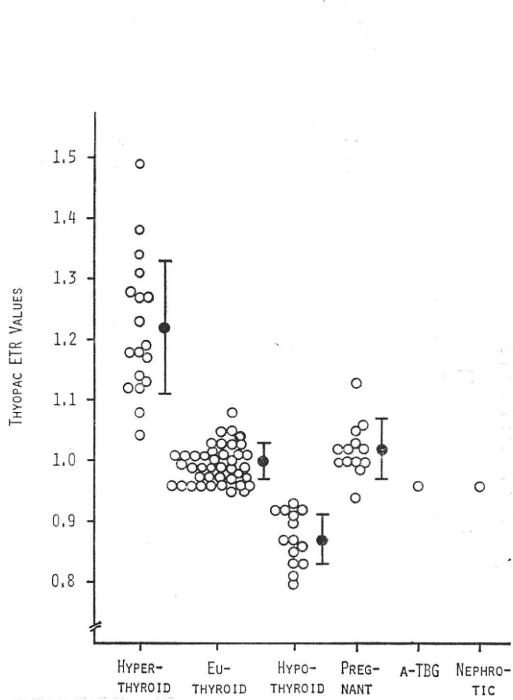


Fig. 3. Thyopac ETR values in various thyroid conditions.

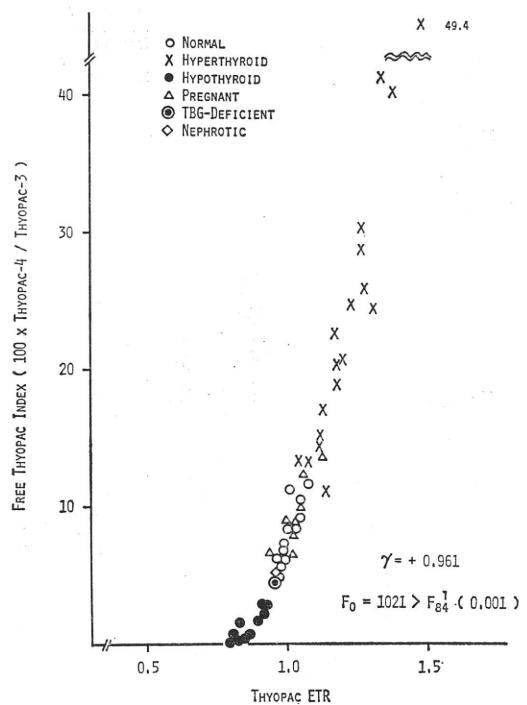


Fig. 4. Relation between Thyopac ETR (X) and Free Thyopac Index (Y), expressed by a regression equation of $Y = 71.67 X^2 - 88.40 X + 24.18$.

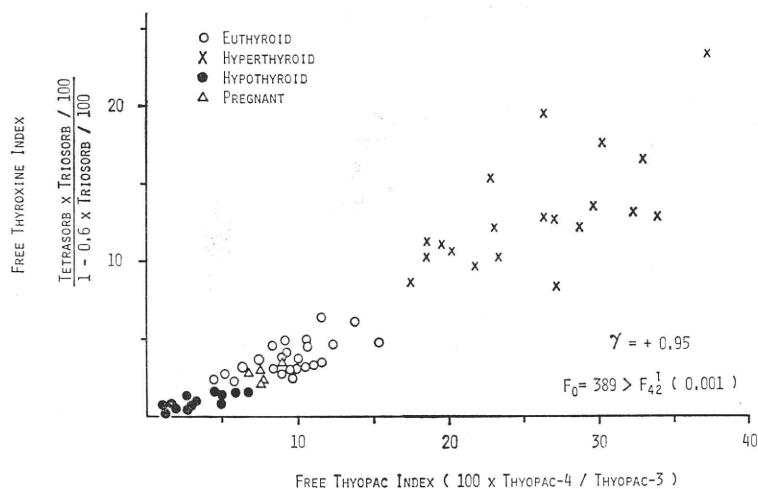


Fig. 5. Relation between Free Thyopac Index and Our Free T_4 Index ($\frac{\text{Tetrasorb} \times \text{Triosorb}/100}{1 - 0.6 \times \text{Triosorb}/100}$)

$Y = 71.67 X^2 - 88.40 X + 24.18$
なる回帰曲線式で表された。

考 案

血中の Free T_4 濃度は、血清中に含まれる T_4 量と血清 T_4 結合蛋白の濃度により定まるが故に、それぞれの測定値及び指標を用いて Free T_4 値に平行する値、すなわち Free T_4 Index を求めることが可能である。それらは市販のキットに従つて “ T_7 ”, “Res-O-Mat Free T_4 ” または “Free Thyopac Index” と呼称されているが、これらの Index は、Free T_4 と TBG との関係式 $FT_4 = \frac{(TBG \text{ 結合 } T_4)}{K(\text{Free TBG})}$ において、TBG に結合する T_4 量の代わりに総 T_4 量を用いる⁴⁾⁵⁾ために Free T_4 値と直線関係を示さない。我々は先に、 T_4 と 3 種類の血清 T_4 結合蛋白、すなわち TBG, T_4 結合プレアルブミン (TBPA) 及びアルブミン (ALB) との結合平衡に関する一般式 : $\text{Free } T_4 = \frac{(\text{総 } T_4 \text{ 量})}{1 + K_1(\text{Free TBG}) + K_2(\text{Free TBPA}) + K_3(\text{Free ALB})}$ から次の Free T_4 Index を導き、

$$\text{Free } T_4 \text{ Index} =$$

$$\frac{T_4 \text{ (または PBI)} \times \text{Triosorb}/100}{1 - 0.6 \times \text{Triosorb}/100}$$

これが Free T_4 の実測値と直線関係にあることを示した⁶⁾。Free Thyopac Index は、Fig. 5. に示すように、上述の Free T_4 Index と良好な正相関を示したが、その関係は、他の通常の Index と同様に、非直線的であった。

以上の諸種の Free T_4 Index を算出するには、 T_4 値と TBG に関する指標の 2 者を測定することが必要である。これに対し Dual Competitive Binding Analysis^{7)~10)} では、1 つの測定系に患者血清より抽出された T_4 と患者血清の一定量を加えて、一回の測定で Free T_4 の状態を知ろうとする方法である。その原理は、妊娠及び TBG 欠損症などのように Free T_4 と間脳下垂体系との間に Feedback 機構が維持されている場合には、TBG と T_4 とが平行して変動することを利用している。例えば、妊娠における TBG の増加は T_4

の増加を伴うために、 T_4 と同血清の両者を加えて得られる ETR 値は正常にとどまる。これに対し機能亢進症あるいは機能低下症では、 T_4 値と TBG の変動は相反するために、ETR 値はそれぞれ高値及び低値を示す。かくして Fig. 3. に示すように、TBG の変動の有無にかかわらず、一回の測定で Free T_4 の異常の有無を知ることができ、簡便な臨床検査法ということができる。

しかしながら ETR 値は、その測定系に一定量の TBG をあらかじめ添加しているために、一部に誤解されているように原血清中の Free T_4 を忠実に反映するものではない。Fig. 4. に示すように、ETR 値は Free Thyopac Index に比べ分布域が狭く、両者の関係式は 2 次の回帰曲線式で表され、かつゼロ点を通過しない。従つてその数値の判定には注意を要するが、本 ETR 値が Free Thyopac Index ときわめて良好な相関を有し、しかも妊娠を含む甲状腺機能の正常者と機能異常との間に重なり合いが少ないことは、本法が甲状腺機能の異常の有無の判定に有用であることを示すものである。

本 ETR 値が正常であるにもかかわらず、 T_4 が高値を示すものは妊娠をはじめとする TBG 増多症であり、逆に T_4 が低値を示すものは TBG 減少症である。従つて ETR 値と共に T_4 値を同時に測定することは、 T_4 量という重要な情報をもたらすと共に、ETR 値との解離から TBG 異常症を診断する根拠となり、臨床上更に有意義であると考えられる。

結 論

(1) Thyopac-4 キットを用いて Competitive Binding Analysis により Thyroxine (T_4 値) を測定すると共に、Sephadex と T_4 との可逆的結合を利用し、同バイアルに患者血清を追加添加して Dual Competitive Binding Analysis (Thyopac ETR と仮称) を行つた。(2) Thyopac ETR 値は Free Thyopac Index と有意の正相関 ($\gamma = +0.96$) を示し、その関係は、 $Y = 71.67 X^2 - 88.40 X + 24.18$ なる 2 次の回帰曲線式で表された。(3) 本 ETR

値は、TBG の変動にもかかわらず Free T₄ が正常値を示す妊娠及び TBG 減少症では常に正常値を示し、これに対し甲状腺機能亢進症あるいは機能低下症では、それぞれ有意に高値あるいは低値を示して正常者との間に重なり合いは少なく、血中遊離型 T₄ が正常であるか否かの判定に有用であることが認められた。(4) また同時に測定された T₄ 値との解離から、TBG 異常症の診断が可能であり、臨床検査として有用であると考えられた。

本研究に際し御協力頂いた北野病院産婦人科部長安藤暢哉博士及び電算機処理して頂いた向井孝夫氏に深謝すると共に、Thyopac-4 及び Thyopac-3 キットを提供された科研化学株式会社に謝意を表します。

文 献

- 1) Robbins, J. and Rall, J. E.: Proteins associated with the thyroid hormones. *Physiol Revs.* **40**: 415 (1960).
- 2) Sterling, K.: The significance of circulating triiodothyronine. *Recent Prog. Hormone Res.* **26**: 249 (1970).
- 3) Braverman, L. E., Ingbar, S. H. and Sterling, K.: Conversion of thyroxine (T₄) to triiodothyronine (T₃) in athyreotic human subjects. *J. Clin. Invest.* **49**: 855 (1970).
- 4) Osorio, C., Jackson, D. J., Gartside, J. M. and Goolden, A. W. G.: The assessment of free thyroxine in plasma. *Clin. Sci.* **23**: 525 (1962).
- 5) Clark, F. and Horn, D. B.: Assessment of thyroid function by clinical use of serum protein-bound iodine and resin uptake of triiodothyronine. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **25**: 39 (1965).
- 6) Hamada, S., Nakagawa, T., Mori, T. and Torizuka, K.: Re-evaluation of thyroxine binding and free thyroxine in human serum by paper electrophoresis and equilibrium dialysis, and a new free thyroxine index. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **31**: 166 (1970).
- 7) Mincey, E. K., Thorson, S. C., Brown, J. L., Morrison, R. T. and McIntosh, H. W.: A new parameter of thyroid function—the effective thyroxine ratio. *J. Nucl. Med.* **13**: 165 (1971).
- 8) 森 徹, 高坂唯子, 浜田 哲, 竹田洋祐, 池窪勝治, 鳥塚莞爾: 新しい in vitro 甲状腺機能検査法 “レゾマット ETR テスト” による Effective Thyroxine Ratio の基礎的検討並びに臨床的評価, 日本内分泌誌, **48**: 685 (1972).
- 9) Ashkar, F. S. and Bezjian, A. A.: Use of normalized serum thyroxine (T₄N). A new approach to thyroid hormone measurement. *JAMA*. **221**: 1483 (1972).
- 10) Abreau, C. M., Azizi, F., Vegenakis, A. G., Ingbar, S. H. and Braverman, L. E.: Clinical evaluation of a new indirect indicator of serum-free thyroxine concentration. *J. Nucl. Med.* **14**: 159 (1973).
- 11) 稲田満夫, 岡部純一, 風間善雄, 高山英世, 春名桃江, 高橋 浩: Res-O-Mat ETR Test による甲状腺機能の診断, 第二報, Res-O-Mat ETR Test による血中 Thyroxine 濃度並びに ETR の同時測定, 核医学 **10**: 37 (1973).
- 12) Goolden, A. W. G., Gartside, J. M. and Osorio, C.: An evaluation of the ¹³¹I-triiodothyronine resin sponge test. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **25**: 127 (1965).
- 13) Clark, F. and Brown, H. J.: Evaluation of Thyopac-3 test in the in-vitro assessment of thyroid function. *Brit. Med. J.* **1**: 713 (1970).
- 14) 森 徹, 高坂唯子, 藤田 透, 竹田洋祐, 池窪勝治, 鳥塚莞爾: Thyroxine Binding Capacity Index 測定法キット—Thyopac-3 の臨床的評価, Radioisotopes, **21**: 287 (1972).
- 15) 森 徹, 高坂唯子, 浜田 哲, 竹田洋祐, 池窪勝治, 鳥塚莞爾: Thyopac-4 法による血中 Thyroxine 濃度および Thyopac Free T₄ Index の臨床的評価, Radioisotopes, **22**: 170 (1973).
- 16) Clark, F. and Brown, H. J.: Free thyroxine index. *Brit. Med. J.* **2**: 543 (1970).

Summary

Dual competitive protein binding analysis by Thyopac-4 kit, and its evaluation in the assessment of thyroid function

Satoshi HAMADA,¹⁾ Tadako KOSAKA,²⁾ TORU Mori,²⁾ Yosuke TAKEDA,³⁾ Katsuji IKEKUBO,³⁾ Kanji TORIZUKA³⁾ and Tetsuo UETE⁴⁾

Radioisotope Research Center, Kyoto University¹⁾; Central Clinical RI Division²⁾ and Department of Radiology,³⁾ Kyoto University School of Medicine, Kyoto; and Division of Clinical Biochemistry, Kitano Hospital,⁴⁾ Osaka

Conventional and dual competitive binding analysis of thyroxine (the latter called tentatively Thyopac "ETR") were performed simultaneously using a single kit of Thyopac-4. Thyopac ETR (X) was correlated significantly ($\gamma=+0.96$) with Free Thyopac Index (Y), representing a regression equation of $Y=71.67 X^2-88.40 X+24.18$. The values obtained were significantly ($p, 0.005$) increased and decreased, respectively, in hyper-and hypo-thyroidism, whilst they

remained within the normal range in pregnancy and TBG deficiency. Further, abnormal T_4 values obtained despite normal ETR values indicated abnormality in TBG level such as TBG deficiency. It was concluded that the present method determining ETR as well as T_4 values was very useful for assessment of thyroid function, the values being irrespective of change in TBG.