

《使用経験》

サイロキシニアキットの基礎的並びに臨床的検討

笠木 寛治* 大石まり子* 西川 光重*
 蔵田駿一郎* 稲田 満夫*

1. はじめに

サイロキシニン(T_4)の血中濃度の測定には従来より、蛋白結合ヨード (PBI) 又はブタノール抽出性ヨード (BEI) として T_4 中のヨード量を化学的に測定する方法が用いられてきた。

しかし、本法は外因性のヨードの影響を受ける欠点があり、近年では主に Competitive protein binding assay (CPBA)¹⁾ により血中 T_4 濃度の測定が行われている。CPBA は T_4 及び $^{125}\text{I}-T_4$ のサイロキシニン結合グロブリン (TBG) に対する競合反応を利用しており、はじめに TBG より T_4 の遊離及び抽出の操作が必要である。ここに抽出操作を必要とせず、少量の血清量を用いての T_4 測定法として Radioimmunoassay (RIA) の応用が考えられた。

RIAによる T_4 血中濃度の測定は1971年 Chopra²⁾ による抗 T_4 血清の作成以来数々の検討がなされ^{3)~7)}、臨床応用が可能となった。我が国でも最近ダイナボット社⁸⁾ 及び第一ラジオアイソトープ社⁹⁾ より血中 T_4 測定用 RIA kit が発売されている。著者らはダイナボット社の血中 RIA kit を使用する機会を得たので、その基礎検討を行うと共に、臨床応用を試みた成績を報告する。

2. 測定方法

本 kit の特徴は、1) TBG 阻害剤として三塩化酢酸ナトリウムを用い、反応系をアルカリ性に行っている事。2) インキュベーション時間が短い事。3) 結合型 T_4 (B) と遊離型 T_4 (F) の分離にレジンスポンジを用いている事である。

測定法はキットに添付された使用説明書に従ったが、その概略は次の通りである。

1) 被検血清 0.05ml 又は各濃度 (0, 5, 10, 15, 20 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$) の T_4 標準液 0.05ml をプラスチック試験管にとる。

2) TBG 結合阻害剤 (0.5 N 三塩化酢酸ナトリウム, PH 12.3) 0.5 ml を加え、ミキサーにて 3~5 秒間室温で振盪混和後、室温にて10分間放置する。

3) $^{125}\text{I}-T_4$ ・抗 T_4 家兎血清 0.5 ml を加え、ミキサーにて 3~5 秒間振盪混和後、室温にて 18~25分間放置する。この際反応系の PH はほぼ 7.5 に戻っている。

4) 試験管を 0~1°C の氷浴に入れ、時々振盪しながら、少くとも 5 分間冷却する。

5) 氷浴中の各試験管にレジンスポンジを入れ、プランジャーでスポンジを押し、薬液とよく反応させ、B と F の分離を行う。

6) 氷浴中で水温を 0~1°C に保ちながら、1 時間インキュベーションする。

7) 各試験管のスポンジを蒸留水で洗浄する。即ち、各試験管でアスピレーターチップで全液を吸引除却し、4 回水洗を繰り返す。(尚 5)~7) の操

* 天理よろず相談所病院内分泌内科

受付：51 年 3 月 8 日

最終稿受付：51 年 4 月 20 日

別刷請求先：奈良県天理市三島町 200 (〒632)

天理よろず相談所病院内分泌内科

稲田 満夫

作は、インキュベーション時間がちょうど1時間になるように各試験管毎に時間を決めて行う。)この際、Bは除去され、Fはスポンジに吸着されている。

8) 別のプラスチック試験管3~4本に $^{125}\text{I}-\text{T}_4$ ・抗 T_4 家兎血清0.5 mlのみを取り、その放射能を測定する。…………… 1st count

9) 全ての試験管の中のスポンジの放射能を測定する。…………… 2nd count

10) レジンスポンジ摂取率即ち $\frac{2\text{nd count}}{1\text{st count}} \times 100$ (%)を各試験管で求める。

11) 標準系のスポンジ摂取率を縦軸に、既知量の T_4 濃度を横軸にプロットして標準曲線を作成する。

12) 被検血清のスポンジ摂取率を標準曲線にあてはめて、被検血清の T_4 濃度が得られる。

尚、標準試料および検体はすべて duplicate に検査を行った。

放射能の測定は東芝製自働ウェル型シンチレーションカウンターを用い、すべての検体を2分間測定した。

検体はすべて血清又は血漿分離後、測定時まで -20°C に凍結保存した。

3. 成績

a) 標準曲線と希釈テスト

Fig. 1 は本法での標準曲線とその希釈テストの結果である。 T_4 濃度が $0\mu\text{g}/100\text{ml}$ のレジンスポンジ摂取率は約16%、 T_4 濃度が $20\mu\text{g}/100\text{ml}$ のそれは約40%で良好な標準曲線が得られた。

又、その再現性を見ると、各濃度でのレジンスポンジ摂取率の変動係数は7.8~12.3%の範囲であった。

又、Fig. 1 の黒丸印は、甲状腺機能亢進症の患者で高 T_4 濃度の血清を、 $0\mu\text{g}/100\text{ml}$ の標準 T_4 溶液にて種々に倍数希釈してそのレジンスポンジ摂取率を示すが、それは標準曲線とほぼ平行に変動した。

b) インキュベーション時間の影響

標準 T_4 にTBG阻害剤を加え、10分間室温放

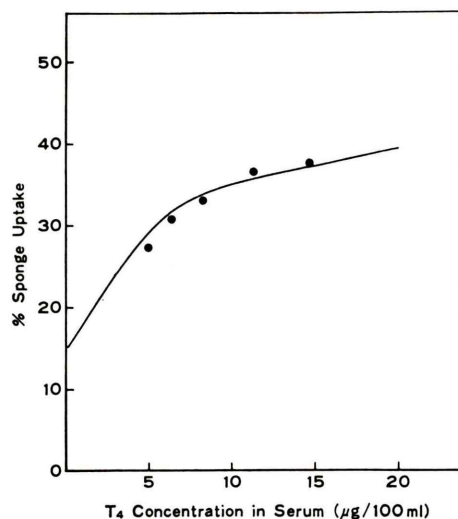


Fig. 1 Standard curve and Dilution test

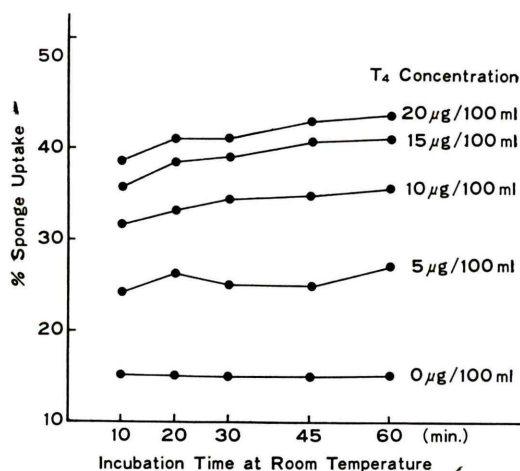


Fig. 2 Effect of incubation time on standard curve

置してから、 $^{125}\text{I}-\text{T}_4$ ・抗 T_4 血清添加後のインキュベーション時間を室温で10, 20, 30, 45, 60分としてその影響を見た。Fig. 2に示すように、 T_4 標準液の各濃度におけるレジンスポンジ摂取率は60分迄軽度ながらも上昇の傾向を示した。

c) 洗浄回数の影響

Fig. 3は各試験管のスポンジをそれぞれ1回から5回まで洗浄し、その洗浄回数による影響を見たものである。 T_4 標準液の各濃度におけるレジンスポンジ摂取率は回数が増加すると共にいずれ

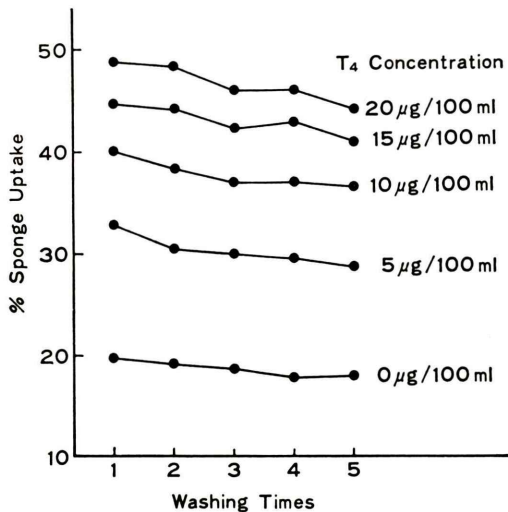


Fig. 3 Effect of washing times on standard curve

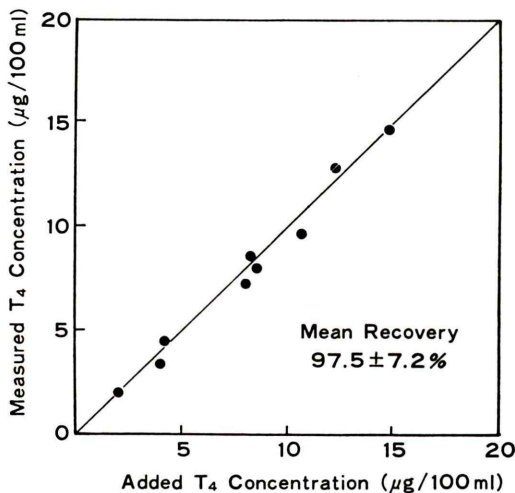


Fig. 4 Recovery test

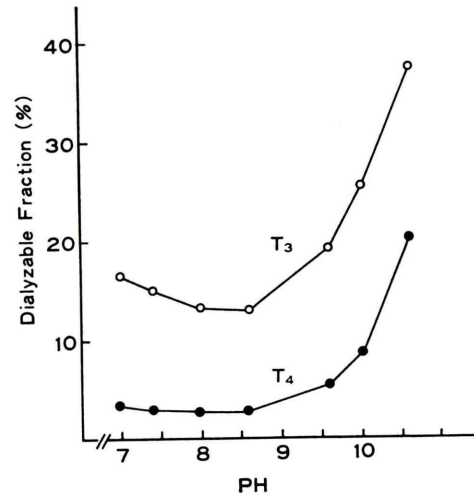
も減少の傾向を示し、洗浄回数が5回まででは一定値を取り得なかった。

d) 回収率試験

甲状腺機能低下症の血清に既知量の T_4 を添加し、それと T_4 実測値と比較して回収率を求めた (Fig. 4)。平均回収率は $97.5 \pm 7.2\%$ と良好であった。

e) TBG 阻害剤の影響

本キットでは TBG 阻害剤として三塩化酢酸ナ

Fig. 5 PH dependence of the binding reaction of T_3 and T_4 on TBG

トリウムを用い、反応系の PH をアルカリ性にする事によって TBG と T_4 の結合阻害を行っている。本法で TBG 阻害剤の影響を検討する前に、著者らはまず T_4 及び T_3 と TBG の結合に対する PH の影響を平衡透析法によって検討した。まず 0.1 M Phosphate buffer にて PH が 7.0, 7.4 及び 8.0 の緩衝液を、0.05 M Glycine-NaOH buffer にて PH が 8.6, 9.6, 10.0 及び 10.6 の緩衝液を作成した。これら 7 種の緩衝液を平衡透析膜の内側に 4.5 ml, 外側に 5.0 ml 入れた後、透析膜の内側にのみ 0.5 ml の健常者血清及び一定量の $^{125}\text{I}-T_4$ 及び $^{131}\text{I}-T_3$ を加え、 37°C にて 16 時間振盪インキュベートした。その後透析膜を通過した ^{125}I および ^{131}I の radioactivity の total count に対する率即ち dialyzable fraction (%) を各々の PH の緩衝液にて計算した。その成績は Fig. 5 に示すように、PH が上昇するにつれて dialyzable fraction が上昇し、反応系の PH をアルカリ性にする事により TBG と T_4 又は T_3 との結合が阻害される事が示されている。従って、反応系の PH をアルカリ性にする事が、TBG と T_4 結合阻害の有効な方法と考えられた。

さて、Fig. 6 は本法で TBG 阻害剤即ち三塩化酢酸ナトリウムの影響を検討した成績を示す。甲

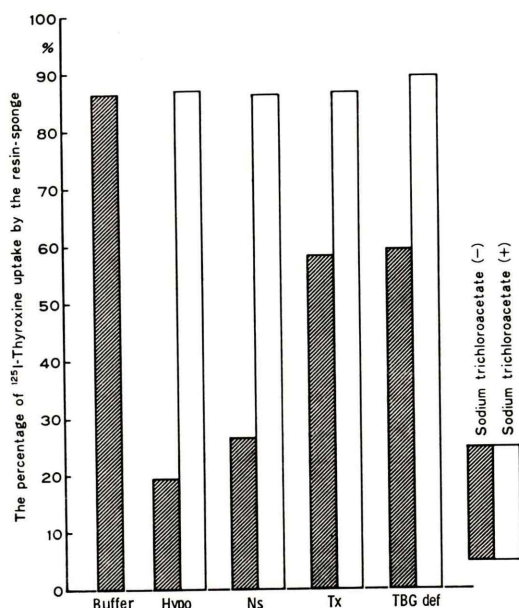


Fig. 6 Effect of sodium trichloroacetate on the elimination of binding of $^{125}\text{I-T}_4$ by TBG

Hypo: hypothyroidism, Ns: normal subject, Tx: thyrotoxicosis, TBG def: TBG deficiency

甲状腺機能低下症 (Hypo), 健常者 (Ns), 甲状腺機能亢進症 (Tx), TBG 欠損症 (TBG def) の血清に T_4 抗体を入れずに一定量の $^{125}\text{I-T}_4$ 溶液を加え, その後レジンスポンジにて TBG 結合 $^{125}\text{I-T}_4$ と遊離型 $^{125}\text{I-T}_4$ の分離を行い, そのスポンジ摂取率を見た. TBG 阻害剤を入れぬ場合は Fig. 6 の斜線棒で示すように, 対照として Buffer のみでは 86.3%, 健常者では 26.8% のレジンスポンジ摂取率を示した. 一方, TBG capacity の大きい甲状腺機能低下症では遊離型 $^{125}\text{I-T}_4$ がより少く (レジンスポンジ摂取率 19.5%), 逆に TBG 欠損症及び甲状腺機能亢進症では遊離型 $^{125}\text{I-T}_4$ がより多く, それらのレジンスポンジ摂取率はそれぞれ 59.5% 及び 58.2% であった. 即ち, TBG 阻害剤を使用しない場合には, レジンスポンジ摂取率は TBG の影響を強く受ける事を示している. 一方, TBG 阻害剤 (三塩化酢酸ナトリウム) を入れ反応系の PH を 12.3 にし, 約 10 分間室温放置後 $^{125}\text{I-T}_4$ を入れ, 本法と同様に反応系の PH を 7.5 に戻した場合は, 図の白棒で示すように 4 例共ほぼ 90

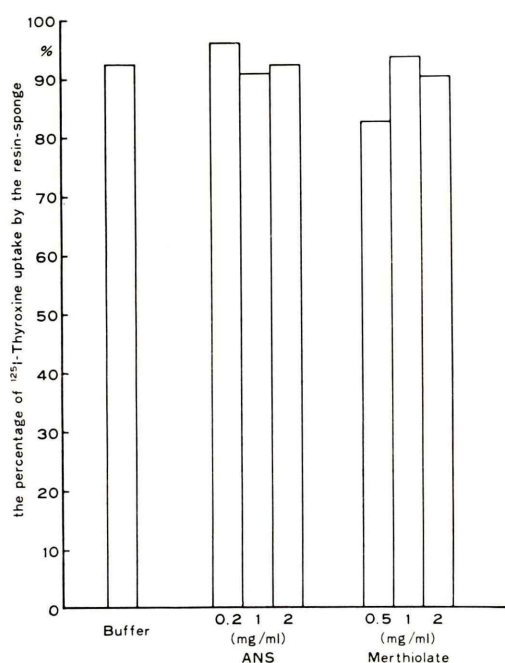


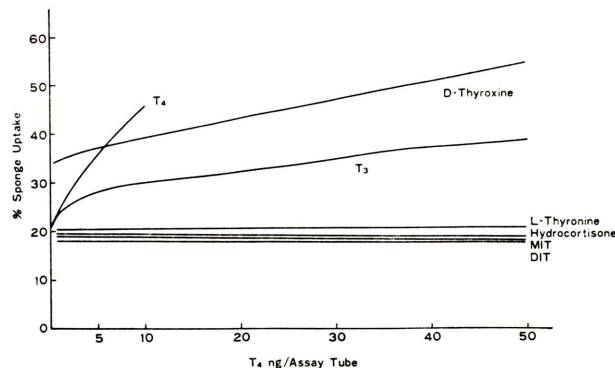
Fig. 7 Effect of ANS or Merthiolate on the elimination of binding of $^{125}\text{I-T}_4$ by TBG

% 近く遊離型としてスポンジに吸着された.

次に, TBG 阻害剤を加えてから $^{125}\text{I-T}_4$ を加えるまでの時間即ち反応系がアルカリ性である時間を 5 分より 10, 20, 30 分として, 同様にこの 4 例で ^{125}I スポンジ摂取率を見た. 4 例共 5 分より 10, 20, 30 分と時間を延長しても, その ^{125}I スポンジ摂取率は, 85~90% を示し変化は見られなかった.

又, TBG 阻害剤を加えてから $^{125}\text{I-T}_4$ ・抗 T_4 抗体を加えるまでの時間, 即ち, やはり, 反応系がアルカリ性である時間を 5, 10, 20, 30 分としてその標準曲線の変動を見たが, 著明な変化は見られなかった (C.V. 3.8% 以下).

次に, 本法で TBG 阻害剤として各濃度の 8-Anilino-1-Naphthalene sulfonic acid (ANS) 及び Merthiolate を用い, 同様にこれらの TBG 阻害剤の影響を検討した (Fig. 7). 即ち甲状腺機能亢進症患者の血清に各々 0.2, 1, 2 mg/ml の ANS 及び 0.5, 1, 2 mg/ml の Merthiolate を加えた後, 各試験管に抗体を入れずに一定量の $^{125}\text{I-T}_4$ 溶液を加え, その後レジンスポンジにて TBG 結合

Fig. 8 Cross reaction of T_4 antibody

$^{125}\text{I}-T_4$ と遊離型 $^{125}\text{I}-T_4$ の分離を行い、そのスポンジ摂取率を見た。対照として Buffer のみでは 92.4 % のスポンジ摂取率を示した。ANS を用いた場合は、Fig. 7 に示すように各濃度でいずれも 90% 以上のスポンジ摂取率を示した。0.5 mg/ml の Merthiolate を用いた場合、そのスポンジ摂取率は 85.1% であったが、1 及び 2 mg/ml の Merthiolate を用いた場合、Fig. 7 に示すようにいずれも 90% 以上のスポンジ摂取率を示した。

f) 本キットの T_4 特異性

次に、本キットの T_4 特異性を見る為に D-Thyroxine, 3,5,3'-Triiodo-L-Thyronine (T_3), 3 Iodo-L-Tyrosine (MIT), 3,5 Diiodo-L-Tyrosine (DIT), L-Thyronine, Hydrocortisone と交叉反応の有無を見た (Fig. 8)。

T_3 及び D-Thyroxine については交叉反応を認めた。 T_4 5ng (10 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$) の抑制効果に匹敵する T_3 及び D-Thyroxine の量を Fig. 8 より求めると、それぞれ 38 ng (76 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$) 及び 3.5 ng (7 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$) で、 T_4 の抑制能を 1 とすると T_3 及び D-Thyroxine はそれぞれ 0.132 及び 1.429 と推算された。Hydrocortisone, L-Thyronine, DIT, MIT とは T_4 測定範囲内では全く交叉反応が認められなかった。

g) 本キットの測定感度

5 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ の T_4 標準液を 0 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ T_4 の標準液で希釈して、0, 0.2, 0.4, 0.6, 1 及び 2 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ の T_4 濃度を有する溶液を作製した。次に、

RIA操作後各濃度でのスポンジ摂取率をduplicateで測定した。0.2 及び 0.4 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ 濃度でのレジンスポンジ摂取率は 0 濃度でのそれに比べて統計学的に有意差は認められなかった (各々 $0.4 < P\{|0.835| \geq t_0\} < 0.5$, $0.2 < P\{|1.764| \geq t_0\} < 0.3$)。0.6, 1.0, 2.0 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ の場合は、0 濃度の場合に比べてそのスポンジ摂取率は有意に上昇した (各々 $0.02 < P < 0.05$, $0.02 < P < 0.05$, $0.01 < P < 0.02$)。従って本法での測定感度は 0.6 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ と考えられた。

h) 抗凝固剤の影響

2 例の健常者及び 1 例の甲状腺機能低下症の患者で、血清と、血清にそれぞれヘパリン又は EDTA を添加した場合の三通りの方法で血中 T_4 濃度を比較検討した。Table 1 に示すように、3 例の血清中の T_4 濃度は血清にヘパリン又は EDTA 添加の場合の T_4 濃度に比べて統計学的に有意差は認められなかった (各々 $0.9 < P\{|0.042| \geq t_0\} < 1.0$, $0.9 < P\{|0.068| \geq t_0\} < 1.0$)。従って抗凝固剤の影響は殆んどないと考えられた。

i) 測定値の再現性

まず 5 例の 3 重測定に際しての測定値の変動を

Table 1 Effect of heparin or EDTA on T_4 concentration

| | Serum | Heparin | EDTA |
|------|-------|---------|------|
| M.S. | 6.5 | 7.2 | 7.3 |
| N.K. | 8.1 | 7.8 | 7.7 |
| G.E. | 4.5 | 3.9 | 4.4 |

$\mu\text{g}/100\text{ ml}$

Table 2 Reproducibility

| a) Replicate Determination | |
|---|-------------|
| T ₄ Concentration ($\mu\text{g}/100\text{ ml}$) | C.V. (%) |
| Mean \pm S.D. (N) | |
| 2.5 \pm 0.1 (3) | 4.0 |
| 7.2 \pm 0.3 (3) | 3.5 |
| 8.5 \pm 0.5 (3) | 5.3 |
| 9.1 \pm 0.1 (3) | 11.2 |
| 19.2 \pm 1.2 (3) | 6.5 |
| b) Repeated Determinations on Different Days | |
| T ₄ Concentration ($\mu\text{g}/100\text{ ml}$) | C.V. (%) |
| Mean \pm S.D. (N) | |
| 2.3 \pm 0.2 (3) | 10.2 |
| 3.0 \pm 0.5 (3) | 15.3 |
| 5.6 \pm 0.9 (3) | 15.5 |
| 7.4 \pm 0.5 (3) | 6.6 |
| 10.3 \pm 0.4 (3) | 3.9 |
| 13.0 \pm 0.3 (3) | 2.0 |
| 14.2 \pm 1.1 (3) | 7.4 |
| 19.8 \pm 1.5 (3) | 7.6 |
| (N) . . . number | |

見ると, Table 2 (a) に示すように, 変動係数11.2%の1例を除いて他はいずれも5%程度であった。次に測定値の日差変動を見た。Table 2 (b) は8例において同一検体の T₄ 濃度を日を変えて3回測定した成績を示す。低濃度で変動係数の大なるものも見られるが, 正常及び高濃度での変動係数は5%程度であった。

j) CPBA による血清 T₄ 濃度との比較

Fig. 9 は健常者及び各種疾患患者56例で, 同一検体を用いて, 本法と従来よりの CPBA 法による T₄ 濃度を比較したものである。両者の測定値間に良好な正相関が認められ, その相関係数は0.932であった。RIA による T₄ 濃度 Y と CPBA による T₄ 濃度 X 間に $Y=0.8861X+1.1149$ なる一次式が得られ, student の t test で両測定値間に有意差は認められなかった ($0.9 < P$ ($P\{|0.023| \geq t_0\} < 1.0$))。

従来より CPBA と RIA による血中 T₄ 濃度に関連のある症例の報告があり^{4), 5), 10)}, 著者らの SLE 治療中の2例でも, Fig. 9 の白丸で示すように, 血中 T₄ 濃度がそれぞれ RIA で 1.0 $\mu\text{g}/$

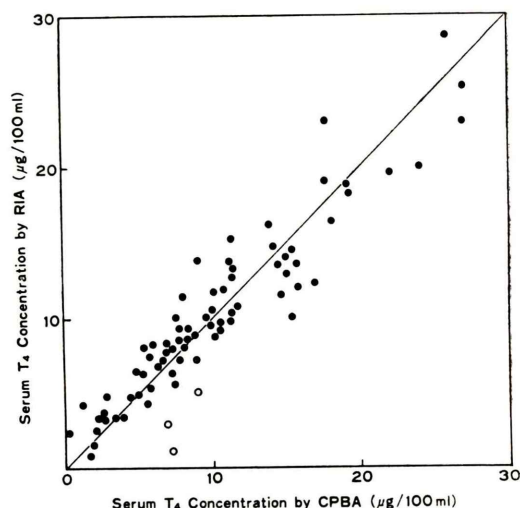


Fig. 9 Relationship between serum T₄ values obtained by RIA and those by CPBA

100ml, CPBA で 7.2 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$, (T.S. 例), RIA で 5.0 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$, CPBA で 9.0 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ (S.N. 例) と RIA による T₄ 濃度が CPBA によるそれより著明に低下していた。しかし S.T. 例は1ヶ月後再検の結果, RIA にて 8.8 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$, CPBA にて 5.9 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ で, 又, S.N. 例は2ヶ月後再検の結果, RIA にて 7.5 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$, CPBA にて 6.9 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ を示し, 治療の経過と共にこの解離は見られなくなった。更に, 糖尿病性腎症の1例で Fig. 9 白丸で示すように, RIA にて 2.8 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$, CPBA にて 6.7 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ と, RIA による T₄ 濃度が CPBA による T₄ 濃度より著明に低下した。2ヶ月後再検の結果, RIA にて 3.9 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$, CPBA にて 1.7 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ を示し, この症例も治療の経過と共に解離が見られなくなった。他の疾患では RIA による T₄ 濃度と CPBA による T₄ 濃度との間に特に解離を示す症例は見られなかった。

k) 健常者及び各種疾患患者の血清 T₄ 濃度

Fig. 10 は本法による健常者及び各種疾患患者の血清 T₄ 濃度を示す。健常者18例の平均は $9.2 \pm 1.8 \mu\text{g}/100\text{ ml}$ であった。甲状腺機能亢進症では全例高値を示し, 14.2 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ より 28.6 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ に分布した。甲状腺機能低下症では全例 3.4 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ 以下で低値を示した。又, 両者共正常値との

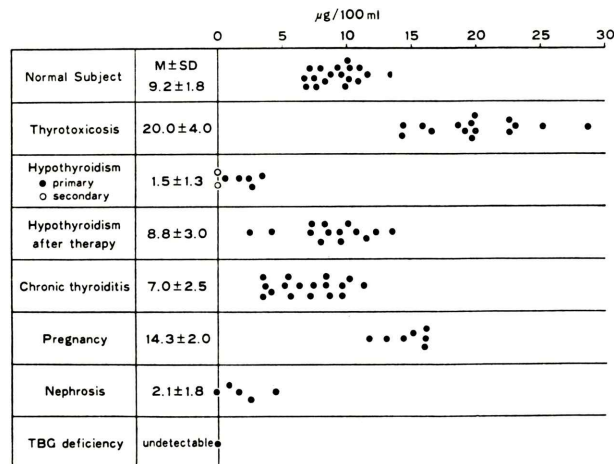


Fig. 10 Serum T4 concentration in health and disease

重なり合いは見られなかった。又、治療中の甲状腺機能低下症では $2.3 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ より $13.6 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ に分布し、橋本病では $3.6 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ より $11.4 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ に分布し、両者共正常値もしくはやや低値を示した。次に、TBG の T_4 結合能に異常を示す例についてみると、まず正常妊娠 7 例では $11.8 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ より $16.2 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ に分布し、5 例でやや高値を示した。5 例のネフローゼ症候群では全例 $4.6 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ 以下の低値を示した。又、1 例の TBG 欠損症の血清 T_4 濃度は測定感度 $0.6 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ 以下であった。

4. 考 按

T_4 は血清蛋白主に TBG と結合しているので、 T_4 RIA では T_4 抗体と T_4 の結合を阻害せずに T_4 と血清蛋白の結合を阻害する薬剤の添加が必要である。Dunn ら⁶⁾は加熱により T_4 結合蛋白を変性させる方法を用いているが、Chopra⁴⁾、Beckers ら⁵⁾、Mitsuma ら⁷⁾ 及び第一ラジオアイソトープ社の T_4 リアキット⁹⁾ではその TBG 結合阻害剤として ANS を用いており、 T_3 RIA と同様 T_4 RIA でも ANS が広く用いられている。Hufner ら¹¹⁾は T_3 RIA に於て反応系の PH を上げる事により T_3 と TBG の結合を阻害する方法を報告した。著者らも T_4 及び T_3 と TBG の結合に対する PH の影

響を平衡透析法によって検討した。PH が上昇するにつれて遊離型 $^{125}\text{I}-T_4$ 及び $^{131}\text{I}-T_3$ がより透析膜を通過し (Fig. 5)、TBG と T_4 及び T_3 の結合は PH をアルカリ性にする事により阻害されると考えた。本キットでもこの方法を利用し、TBG 結合阻害剤として三塩化酢酸ナトリウム (PH 12.3) を使用している。著者らは本法で健常者及び各種疾患患者の血清に三塩化酢酸ナトリウムを加え反応系の PH を 12.3 にし、約 10 分間放置後、一定量の $^{125}\text{I}-T_4$ のみを加え、本法と同様反応系の PH を 7.5 に戻し、その後レジンスポンジにて結合型と遊離型の分離を行った (Fig. 6)。その結果全例共対照の Buffer の場合と同様 90% 近く遊離型としてスポンジに吸着され、本法における三塩化酢酸ナトリウムの TBG 阻害は充分でしかも不可逆的であった。又、三塩化酢酸ナトリウムを加え、 $^{125}\text{I}-T_4$ 又は $^{125}\text{I}-T_4$ ・抗 T_4 抗体を加えるまでの時間を 5 分から 30 分迄変えた場合の $^{125}\text{I}-T_4$ のスポンジ摂取率又は標準曲線に著明な変化は見られなかった。従って、三塩化酢酸ナトリウムの TBG 阻害は反応系の PH をアルカリ性にしておく時間に影響を受けないと考えられた。又、本法で ANS 又は Merthiolate を用い同様に TBG 阻害の効果をみたが、その成績より三塩化酢酸ナトリウムと同様本法に TBG 阻害剤として ANS 又は Mer-

thiolate を用いる事も可能と考えられた。

インキュベーション時間は60分から90分までの報告が多く^{4)~7)}、本キットでは18分から25分と非常に短いのが特徴である。著者らはインキュベーション時間を10分から60分まで変えてその影響を見たが、 T_4 標準液の各濃度におけるレジンスポンジ摂取率は一定値を取り得ず、軽度ながらも上昇の傾向を示した。従って、各試験管につきインキュベーション時間を出来るだけ一定にする必要があった。實際上インキュベーション時間が18分から25分の間では測定値にそれほど大きな差はないと考えられた。

BとFの分離に Chopra⁴⁾、Beckersら⁵⁾は二抗体法を用いているが、インキュベーション時間が長く、又、非特異的な反応が問題となる。従って、最近ではもっぱらチャコール等を用いた一抗体法が利用されている。本キットではBとFの分離にレジンスポンジを用いており、測定時間の短い原因の一つとなっている。本キットで洗浄回数の影響を見たが、5回迄は一定値を取り得ず、洗浄がまだ不十分と思われたが、操作の簡略化上洗浄回数を一定にするなら4回が最も適当で、又測定値への影響も少ないと考えた。

T_4 RIA に於て今一つ大切な事は T_4 に特異的な抗体を作成する事である。 T_4 抗体の作成にはサイログロブリンで免疫する方法²⁾、 T_4 とアルブミンの結合物で免疫する方法⁶⁾ 等がある。これらの T_4 抗体の T_3 との交叉性は4%~10%であるが⁴⁾⁶⁾、著者らの使用した T_4 抗体は T_3 と13.2%の交叉反応を示した。しかし、血中 T_3 濃度は血中 T_4 濃度の2%以下と非常に微量であり、又、血中 T_3 濃度が血中 T_4 濃度の20%近くあるような T_3 -thyrotoxicosis¹²⁾でさえも、 T_4 濃度にわずか2.5%しか影響を与えない。従って、臨床上、測定値への T_3 の影響は殆んどないと思われる。又、本キットの T_4 抗体はD-Thyroxineと強い交叉反応を認めた。しかし、D-Thyroxineは自然界には存在しないと言われている¹³⁾。以上、本キットの T_4 抗体の特異性は充分であった。

更に、 T_4 0 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ 濃度におけるF/T (%)は

約16%で T_4 濃度20 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ まで良好な標準曲線が得られ、又、希釈テストの成績より本法による測定値は内因性 T_4 をよく反映しているものと考えられた。回収率試験の成績では平均回収率 $97.5 \pm 7.2\%$ と良好であった。測定値の多重測定時の変動、日差変動も少なく、その再現性も満足すべきものであった。以上の成績より本キットは臨床検査法として充分使用し得るものと考えられた。

次に、著者らは本法と従来よりのCPBA法で血中 T_4 濃度を比較検討した。両者間に良好な正相関があり、又、両測定値間に統計学的に有意差は認められなかった。従来、RIAによる T_4 濃度がCPBAによる T_4 濃度より高値を示す報告が多く^{4)~6)}、この原因としてCPBAではTBGより T_4 の抽出が不完全である為とされている。又、甲状腺機能亢進症及びTSH投与後の正常者の血清の一部で、RIAによる T_4 濃度がCPBAによる T_4 濃度より著明に高値を示す報告があり⁴⁾⁵⁾、その中でChopra⁴⁾は、その原因としてこれらの患者にはCPBAでのbutanol-ethanolでは抽出できないようなiodo proteinが存在している可能性を示唆している。他方、池窪ら¹⁰⁾は慢性甲状腺炎の一例でRIAによる T_4 濃度がテトラソルブ値の $1/2$ 以下の値を示す症例を報告し、これら患者血清中に T_4 に対する抗体を証明している。又Staeheleら¹⁴⁾も、甲状腺機能亢進症及び橋本病患者の一部の血清に T_4 又は T_3 抗体を証明し、 T_4 又は T_3 抗体を有する血清ではRIAによる T_4 又は T_3 濃度が低値を示すので注意すべきであると述べている。著者らが測定したSLEの2症例と糖尿病性腎症の1症例でも、RIAによる T_4 濃度がCPBAによるそれよりも著明に低値を示したが、治療の経過と共にこの解離は見られなくなった。特にSLEは代表的な自己免疫疾患でもあり、これらの血清中には T_4 抗体の存在が推定される。又、著者らは他に、 T_3 RIAによる血中 T_3 濃度が著明に低い甲状腺機能亢進症の1例¹⁵⁾を経験し、血中に T_3 抗体の存在を推定し、現在検索中である。以上、CPBAとRIAによる T_4 濃度の解離はChopraの示唆したiodo proteinの問題、そして

抗体の問題等今後検討すべき点が多く、又今後測定に関してもこれらの事に充分注意せねばならない。

本法による健常者の血清 T_4 濃度の平均値及びその標準偏差は $9.2 \pm 1.8 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ であった。甲状腺機能亢進症では $20.0 \pm 4.0 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ 、甲状腺機能低下では $1.5 \pm 1.3 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ であり、両者共正常値との重なり合いはなく、よく甲状腺機能を反映していた。TBG の T_4 結合能に異常を来す例については、正常妊娠ではやや高値、ネフローゼ及び TBG 減少症では低値を示し、今迄の CPBA による T_4 値の成績とよく一致していた。

以上、今回、著者らが使用した T_4 RIA kit では従来よりの CPBA に比べて T_4 抽出操作を不要とし、操作が簡便で、一度に多数の検体の測定が可能であり、又、抽出上のテクニカルエラーがない為測定値の再現性も良好である。又測定値の感度も $0.6 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ と良く、duplicate で 0.1 ml と少量の血清で測定可能で、特に、小児の患者血清、小実験動物の血清の測定及び同一患者血清の再検等に便利であった。今後臨床検査法として充分利用され得るものと考えられた。

5. まとめ

ダイナボット社の T_4 RIA kit の基礎的並びに臨床的検討を行った。本キットでは T_4 と TBG の結合阻害剤として三塩化酢酸ナトリウム(PH 12.3)を用いている。血清に阻害剤及び $^{125}\text{I}-T_4$ を加え、PH を 7.5 に戻して、スポンジ摂取率を測定したが、ほぼ、90%であった。従って三塩化酢酸ナトリウムによる TBG 結合阻害は充分で、しかも不可逆的と考えられた。 T_4 抗体は T_3 、D-Thyroxine と交叉反応が見られたが、Cortisol、l-Thyronine、DIT 及び MIT とは全く交叉せず、特異性は充分と考えられた。希釈試験の成績より本法による測定値は内因性 T_4 をよく反映していた。回収率試験も平均回収率 $97.5 \pm 7.2 \%$ と良好であり、又、標準曲線及び測定値の再現性もほぼ満足すべきものであった。又、本法での測定感度は $0.6 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ であった。同一血清で CPBA にて血中 T_4 濃度を

測定したが、本法による測定値とよく一致した。以上、本キットはインキュベーション時間は短く、測定操作が簡便で、又、検体量も少量ですみ、TBG 異常症以外ではよく甲状腺機能を反映し、有用な検査法と考えられた。

終りに春名桃江、吉田恵三子両氏のご協力に深謝し、また、キットを提供されたダイナボット社に謝意を表します。

文 献

- 1) Murphy BEP, and Pattee CJ: Determination of thyroxine utilizing the property of protein binding. *J Clin Endocrinol Metab* **24**: 187, 1964
- 2) Chopra IJ, Nelson JC, Solomon DH, and Beall GN: Production of antibodies specifically binding triiodothyronine and thyroxine. *J Clin Endocrinol Metab* **32**: 299, 1971
- 3) Chopra IJ, Solomon DH, and Ho RS: A radioimmunoassay of thyroxine. *J Clin Endocrinol Metab* **33**: 865, 1971
- 4) Chopra, IJ: A radioimmunoassay for measurement of thyroxine in unextracted serum. *J Clin Endocrinol Metab* **34**: 938, 1972
- 5) Beckers C, Cornette C, and Thalasso M: Evaluation of serum thyroxine by radioimmunoassay. *J Nucl Med* **14**: 317, 1973
- 6) Dunn RT, and Foster LB: Radioimmunoassay of thyroxine in unextracted serum by a single antibody technique. *Clin Chem* **19**: 1063, 1973
- 7) Mitsuma T, Colucci J, Shenkman L, and Hollander CS: Rapid simultaneous radioimmunoassay for triiodothyronine and thyroxine in unextracted serum. *Biochem. Biophys Res Comm* **46**: 2107, 1972
- 8) ダイボット社, T_4 リアキット使用説明書
- 9) 第一ラジオアイソトープ社, リアマット T_4 キット使用説明書
- 10) 池窪勝治他: Radioimmunoassay と Competitive protein binding analysis における血中 Thyroxine 濃度測定値の解離について, 第23回日本内分泌学会西部部会総会口演 (昭和50年11月, 大阪)
- 11) Hűfner M and Hesch RD: Radioimmunoassay for triiodothyronine in human serum. *Acta Endocrinol* **72**: 464, 1973
- 12) 稲田満夫: T_3 thyrotoxicosis. *内科* **31**: 1309, 1973
- 13) 三宅儀, 山本清: 内分泌学 I, 2 版, 朝倉書店, 東京 1965, p. 434
- 14) Staeheli V, Vallotton MB and Burger A: Detection of human antithyroxine and anti-triiodothyronine antibodies in different thyroid conditions. *J Clin*

Endocrinol Metab **41**: 669, 1975

15) 笠木寛治他: T_4 Radioimmunoassay の臨床応用,

第23回日本内分泌学会西部部会総会口演(昭和50年
11月, 大阪)