

《ノート》

レジンストリップ法によるトリヨードサイロニン・ラジオイムノアッセイキットの基礎的・臨床的検討

分校 久志* 杉原 政美* 久田 欣一*

1. はじめに

血中トリヨードサイロニン(T_3)はサイロキシン(T_4)濃度の1~2%とごくわずかしか存在しないが、その生物学的活性は高く、また、生体内での半減期も約1日と速く、甲状腺ホルモンの生物学的効果は大部分 T_3 によると考えられている^{1),2)}。近年、本来抗原性を有しない T_3 に対する抗体の作成が可能³⁾となり、またTBG結合阻害剤としてのANS(8-anilino-1-naphthalene sulfonate)⁴⁾の利用とあいまって特異性の高いラジオイムノアッセイ(RIA)による直接 T_3 測定が行なわれるに至っている⁵⁾。本邦でもすでにデキストラン・チャコール(DCC)をB/F分離に用いる一抗体法 T_3 RIAキットが発表されている⁶⁾。今回、著者らはレジンストリップをB/F分離に用いる一抗体法RIAキットであるリアマット T_3 キットの試用機会を得たので、その基礎的ならびに臨床的検討について報告する。

2. 方法および対象

2.1 測定操作

リアマット T_3 キットの構成は50検体用にて(1) T_3 抗血清(凍結乾燥品)1バイアル、(2)標準 T_3 溶液(0, 0.5, 1, 2, 6ng/ml)各1バイアル、(3) T_3 -

^{125}I 溶液(ANS 300 μg を含む、1ml/バイアル)50バイアル、(4)レジンストリップ50枚、(5)ピンセット1本である。

- 1) 測定に先立ち各試薬を室温(15~32°C)に戻す。この間に各バイアルの T_3 - ^{125}I の放射能をウェル型シンチレーションカウンターにて測定する(第1回カウント、T)。
- 2) T_3 抗血清に5.5mlの蒸留水を加えて完全に溶解する。
- 3) 標準 T_3 溶液または患者血清0.1mlを各バイアルに加える。
- 4) T_3 抗血清0.1mlを各バイアルに加え軽く混和する。
- 5) 全バイアルを37°C温浴に入れ45~60分間インキュベートする。
- 6) レジンストリップを1枚ずつ各バイアルに入れる。
- 7) ローテーターを用い室温(15~32°C)にて30~60分間インキュベートする。
- 8) レジンストリップを除去し、ウェル型シンチレーションカウンターにて放射能を測定する(第2回カウント、B)。
- 9) 次式より抗体結合 T_3 - ^{125}I 率を計算し、標準曲線を作成し検体 T_3 濃度を読み取る。

$$\text{B/T}(\%) = \frac{\text{第2カウント}}{\text{第1カウント}} \times 100$$

2.2 検討項目および対象

基礎的検討としてインキュベーション時間、温度による標準曲線の変動、 T_4 との交叉性、再現性、

* 金沢大学医学部核医学教室

受付: 52年2月21日

最終稿受付: 52年5月16日

別刷請求先: 金沢市宝町13-1(〒920)

金沢大学医学部核医学教室

分校 久志

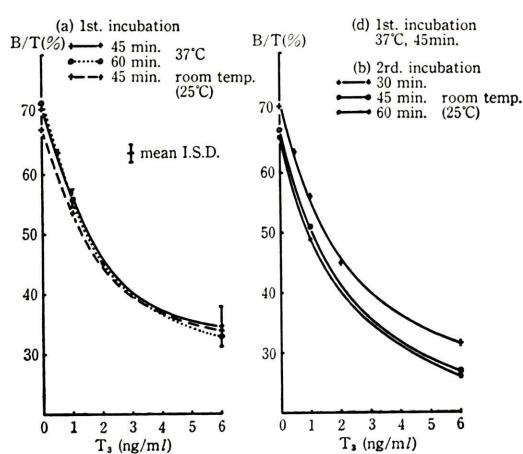


Fig. 1 Effect of incubation time and temperature on standard curve

回収率および標準検体希釈時の測定値の変動について検討した。臨床的検討としては甲状腺機能亢進症25例、甲状腺正常および治療後正常化した例59例、甲状腺機能低下症31例の計115例について、それぞれの甲状腺機能群での分布、正常値の決定、診断能力について検討した。

3. 結 果

3.1 インキュベーション条件

第1インキュベーションを37°C 45, 60分、室温

(25°C) 45分とした時、前2者ではほとんど標準曲線の変動を認めず、4 ng/ml以上でわずかに差異を認める(6 ng/mlにて1.5%)のみである。室温では全体にわずかに下方へ標準曲線が移動し、低濃度部で移動は大きい。第2インキュベーションでは時間による変動は大きいが、45~60分では比較的わずかの変動のみであった(Fig. 1)。

3.2 T_4 との交叉性

0~120 ng/mlまで倍数希釈した T_4 標準品を用いた測定では、本法による T_3 測定可能域である 6 ng/mlまでではほとんど交叉性を認めず、60 ng/mlで約5%のB/Tの低下を認めたのみであった(Fig. 2)。

3.3 再現性および回収率

本法での再現性をC.V.でみると同一アッセイ内で平均6.9%, 80~150 ng/dlの例では平均4.0%, アッセイ間では正常例検体にて5.7%であった(Table 1 (A))。また、それぞれ異なる検体の5回の測定での正常甲状腺機能例の測定では、1回目を除き各測定毎にほぼ一定の分布を示した(Table 2)。

甲状腺機能低下症患者血清に100 ng/dlの T_3 を加えた場合の回収率は4回の測定で平均99.8%ときわめて良好であった(Table 1 (B))。

3.4 希釈検体での測定

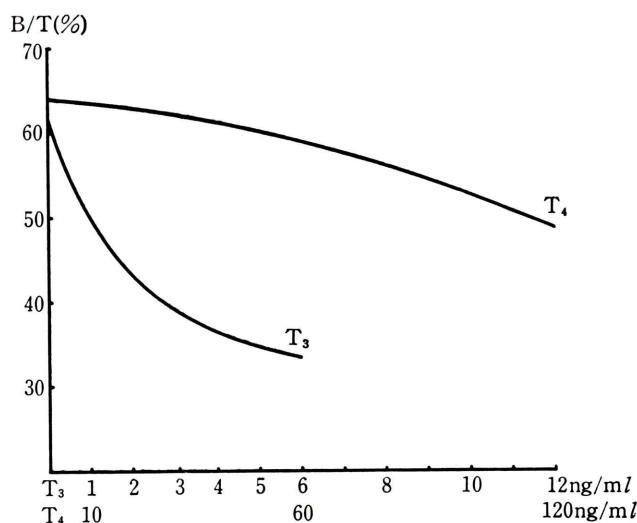


Fig. 2 Cross reactivity of T_3 values measured by RIAMAT T_3 KIT with T_4 standard

Table 1 Results of reproducibility, recovery and dilution

(A) Reproducibility

(1) Intraassay reproducibility

Sample	Mean (ng/dl)	S.D. (ng/dl)	C.V. (%)
A	24	3	12.5
B	80	3	3.1
C	113	4	3.3
D	133	6	4.5
E	150	7	4.9
F	383	51	13.3

(2) Interassay reproducibility

Sample	Mean (ng/dl)	S. D. (ng/dl)	C. V. (%)
G	139	8	5.7
(B) Recovery			
Sample (ng/dl)	Added (ng/dl)	Measured (ng/dl)	Recovery (%)
33	100	131	98.5
33	100	140	105.3
33	100	128	96.2
33	100	132	99.3
mean recovery =			99.8

(C) Dilution of standard serum with saline

Item	Dilution				
	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16
Calculated T ₃ (ng/dl)	600	300	150	75	38
Measured T ₃ (ng/dl)	600	352	224	118	79
% of Calculated T ₃	100.0	117.3	149.3	157.3	207.9

600ng/dl の標準 T₃ を生食水にて倍数希釈した時、測定値は希釈倍数の増加と共に著明に高値を示し 4 倍希釈では計算値の 149%，16 倍希釈で 208% を示した (Table 1 (c)).

3.5 臨床例での測定値と正常範囲

測定値は正常甲状腺の45例では40～200ng/dl に分布し、平均 115 ± 41 (S.D.) ng/dl であった。正常範囲を 1S.D. とすると 74～156ng/dl となるが疾患群の重なりが多いため、下限を 1S.D. 上限を 2S.D. として 70～200ng/dl を正常範囲とした (Fig. 3). この診断基準による最終診断との一致率は全

体で 81.7%，機能低下症を除くと 89.3% と良好であった。各疾患群での検出感度 (sensitivity)，特異性 (specificity) は機能亢進症が最も良好で、次いで、機能正常、低下症の順であった (Table 3)。機能正常例で 200ng/dl を越えた 4 例中 2 例は甲状腺末投与中の慢性甲状腺炎例、2 例は methylmercaptoimidazole (メルカゾール, MMI) 治療中の機能亢進症例であった (Fig. 3).

4. 考 案

血中 T₃ 濃度の測定は T₃ toxicosis⁷⁾ の診断のみ

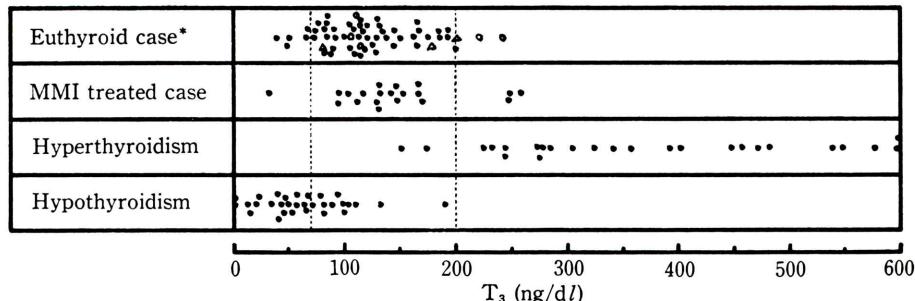


Fig. 3 Comparison of T₃ values measured with RIA-Mat T3 Kit among four different thyroid states.
*: including cases with thyroid medication (○) and thyroid cancer cases with triiodothyronine administration (△). Dotted line shows upper and lower limits of euthyroid range.

ならず、甲状腺機能亢進症の診断や治療経過の観察には欠くことのできないものである。Burkeら²⁾は甲状腺機能亢進症例の10~20%にT₃高値でT₄正常例がみられるとしているが、TBG減少を伴う甲状腺機能亢進例でT₃ toxicosis様の検査所見を呈した例⁸⁾の報告もある点、注意すべきである。また、臨床症状を現わす以前の preclinical hyperthyroidism⁹⁾ではT₃高値、TRH test無反応のみが異常所見として出現し、その後徐々にT₄増加や臨床症状の出現がみられる¹⁰⁾点、T₃測定はTRH testと共に早期診断に有用である。甲状腺機能亢進症では通常T₄に比しT₃の増加が著明でありT₄/T₃比が低値となるが、これは甲状腺内での相対的ヨード不足に由来する可能性も考えられる¹¹⁾。同様の状態は甲状腺機能亢進症の放射性ヨードおよび抗甲状腺剤治療後や橋本氏病などでもみられる^{1),2)}。とくに、放射性ヨード治療後で臨床的に正常甲状腺機能であるが、T₄低値または正常下限でTSH上昇のみられる例では、T₃のみ正常である例^{12),13)}が少なからず存在する。これらの例ではTSH分泌增加による甲状腺でのT₃分泌増加が正常甲状腺機能状態を維持していると考えられる¹²⁾。また、抗甲状腺剤治療例ではpropylthiouracil(PTU)投与例でMMI投与例に比しT₃の減少の大きい¹⁴⁾(それぞれT₄/T₃比で91および54)ことが知られており、これはPTUが末梢でのT₄からT₃への変換を阻害することによると考えられ、治療後T₃高値の一部には甲状腺のみならず末梢での変換¹⁵⁾もかなり寄与しているものと考えられる。

甲状腺機能低下症に対してはT₃測定は診断的にはあまり有用な検査法ではないが、Shenkman

Table 2 Comparison of distribution of measured T₃ values of euthyroid patients (including euthyroid with thyroid or antithyroid medication) among five different assays. No overlapping of patients was noted.

Assay No.	Mean (ng/dl)	S.D. (ng/dl)	Range
1	183	59	112~250
2	111	46	31~200
3	105	26	66~145
4	128	40	57~193
5	116	28	49~166
Total	115*	41*	

* excluding thyroid or antithyroid medication cases.

ら¹⁶⁾はTRH刺激後のT₃の反応より、甲状腺機能亢進症の¹³¹I治療後や橋本氏病などによる原発性甲状腺機能低下症での甲状腺予備能の検討に有用であるとしている。

著者らの今回の検討では、正常甲状腺機能例では115±41ng/dlと従来の報告^{17),18)}とよく一致した値を示したが、その分布が比較的広いため正常値を70~200ng/dlとやや広くとった。この診断基準による甲状腺機能亢進症の検出感度、特異性はともに92%と良好であったが、甲状腺剤投与中で正常機能の2例が高い値を示した点および機能低下症と正常例との重なりが大であった点、機能低下または亢進症との境界値例はT₄、TSH、TRH testなど¹⁸⁾により更に鑑別を進めるべきである。

本法ではTBG結合阻害剤としてANSを用いているが、T₄RIA¹⁹⁾でみられたと同様に希釈測定時に高値を示す傾向を認め、血中蛋白量の減少とともにASNによるT₃-抗T₃抗体結合の阻害²⁰⁾やアルブミンとの非特異的結合の減少が起っている可能性が考えられる。それ故高濃度検体の希釈測定にはT₃ free serumを使用する必要がある。

Table 3 Diagnostic accuracy of T₃ values measured with RIAMAT-T₃ kit.

Thyroid State	<70	T ₃ value (ng/dl) 70~200	200<	Total	Specificity	Sensitivity
HYPER	0	2	23	25	92.0%	92.0%
EU	5	52	2	59	78.8%	88.1%
HYPO	19	12	0	31	79.2%	61.3%
Total	24	66	25	115		

overall congruity=81.7%
=89.3% (except hypothyroid)

また、本法では T_4 との交叉性も少なく実際上はあまり問題とならないが、 T_4 著明高値を示す例ではある程度の交叉反応が存在する可能性も考慮する必要があるようである (Fig. 2)。

5. 結論

今回の検討より以下の結論が得られた。

- 1) 全測定操作時間 1.5~2 時間と短時間で測定可能であり、また遠心分離の必要もなく、操作は簡便である。
- 2) インキュベーション条件の変化による影響は少ないが、インキュベーション時間の影響がより大である。
- 3) T_4 との交叉性は少なく特異性が高い。
- 4) 再現性はアッセイ内平均6.9% (C.V.) と良好であったが低および高濃度域でやや不良であった。回収率は平均99.8%ときわめて良好であった。
- 5) 甲状腺機能正常例と亢進症はよく分離したが、低下症との重なりが大きく、全例での正診率は81.7%であったが低下症を除くと89.3%と良好であった。境界域の症例には他の検査法の併用が必要であると考えられた。

今回の検討に際しリアマット T3 キットを提供いただいた第一ラジオアイソトープ研究所に感謝いたします。

本論文の内容の一部は日本核医学会第19回東海地方会、第27回北陸地方会合同地方会にて報告した。

文献

- 1) Hoffenberg R: Triiodothyronine. Clin. Endocrinol **2**: 75-87, 1973
- 2) Burke CW and Eastman CJ: Thyroid hormones. Br Med Bull **30**: 93-99, 1974
- 3) Chopra IJ, Nelson JC, Solomon DH et al.: Production of antibodies specifically binding triiodothyronine and thyroxine. J Clin Endocr Metab **32**: 299-308, 1971
- 4) Mitsuma T, Colucci J, Shenkman L et al: Rapid simultaneous radioimmunoassay for triiodothyronine and thyroxine in unextracted serum. Biochem Biophys Res Commun **46**: 2107-2113, 1972
- 5) Chopra IJ, Ho RS, and Lam R: An improved radioimmunoassay of triiodothyronine in serum. J Lab Clin Med **80**: 729-739, 1972
- 6) 濑戸光、久田欣一：血中 triiodothyronine の測定とその臨床的意義. Radioisotopes **23**: 46-52, 1974
- 7) Hollander CS, Mitsuma T, Nihei N et al.: Clinical and laboratory observation in cases of triiodothyronine toxicosis confirmed by radioimmunoassay. Lancet **1**: 609-611, 1972
- 8) Wahner HW, Emslander RF and Gorman CA: Thyroid overactivity and TBG deficiency simulating " T_3 hyperthyroidism". J Clin Endocr **33**: 93-97, 1971
- 9) Gernsenjäger E, Staub JJ, Girard J et al.: Pre-clinical hyperthyroidism in multinodular Goiter. J Clin Endocr Metab **43**: 810-816, 1976
- 10) Hollander CS, Shenkman L, Mitsuma T et al.: Hypertriiodothyroninemia as a premonitory manifestation of thyrotoxicosis. Lancet **2**: 731-733, 1971
- 11) Rapoport B, and Ingbar SH: Production of triiodothyronine in normal human subjects and in patients with hyperthyroidism. Am J Med **56**: 586-591, 1974
- 12) Sterling K, Brenner MA, Newman ES et al.: The significance of triiodothyronine in maintenance of euthyroid status after treatment of hyperthyroidism. J Clin Endocr **33**: 729-731, 1971
- 13) Tunbridge WMG, Harsoulis P, and Goolden AWG: Thyroid function in patients treated with radioactive iodine for thyrotoxicosis. Br Med J **3**: 89-92, 1974
- 14) Abuid J and Larsen PR: Triiodothyronine and thyroxine in hyperthyroidism. J Clin Invest **54**: 201-208, 1974
- 15) Braverman LE, Ingbar SH, and Sterling K: Conversion of thyroxine to triiodothyronine in athyreotic human subjects. J Clin Invest: **49**: 855-864, 1970
- 16) Shenkman L, Mitsuma T, and Hollander CS: Methods for detection of incipient primary hypothyroidism. J Clin Endocr Metab **36**: 1074-1078, 1973
- 17) 原 正雄：RIA-Mat T₃ キットによる血中トリヨードサイロニンの測定. Radioisotopes, **24**: 874-877, 1975
- 18) Stahl TJ: Radioimmunoassay and the hormones of thyroid function. Sem Nucl Med **5**: 221-246, 1975
- 19) 分校久志、久田欣一： T_4 ラジオイムノアッセイ・キットの基礎的臨床的評価. Radioisotopes **25**: 563-566, 1976
- 20) Hüfner M, and Hesch RD: A comparison of different compounds for TBG-blocking used in radioimmunoassay for triiodothyronine. Clin Chem Acta **44**: 101-107, 1973