

《ノート》

固相法 Radioimmunoassay による血中サイロキシンの測定

—スパック T4 RIA キットに関する検討—

Solid-Phase Radioimmunoassay of Serum Thyroxine by Using SPAC T4 RIA Kit

小西 淳二* 高坂 唯子** 奥野 龍與* 進藤 俊彦*
 笠木 寛治* 遠藤 啓吾* 鳥塚 莞爾

Junji KONISHI*, Tadako KOSAKA**, Tatsuyo OKUNO*, Toshihiko SHINDO*,
 Kanji KASAGI*, Keigo ENDO* and Kanji TORIZUKA*

*Department of Radiology and Nuclear Medicine, Kyoto University School of Medicine

**Central Clinical Radioisotope Division, Kyoto University Hospital

はじめに

血中サイロキシン(T_4)の測定には従来の Competitive protein binding analysis (CPBA)^{1,2)}に代わって radioimmunoassay (RIA)³⁾が広く用いられるようになってきつつある。これは、抗体の持つ優れた特異性とともに、 T_4 結合蛋白の結合阻害剤を利用することにより、抽出操作なしで測定が可能であることなど簡便性においても RIA が優れているためである。

RIA における bound (B) と free (F) の分離法は精度、再現性に大きな影響を与える要因であるとともに、その操作の簡便性を左右する重要な因子であり、種々の改良工夫が加えられている。著者らはこれまで B.F 分離にレジンによる吸着法^{4~6)}、セファデックスカラム法⁷⁾、硫酸塩析法⁸⁾、ポリエチレン glycoleによる沈殿法⁹⁾などを用いた RIA キットにつき検討を行なってきたが、今回、これまでの方法とは全く異なり、抗体をコ

ートした試験管を用いる固相法 RIA、スパック T4 RIA キット (Mallinckrodt, Inc. 第一ラジオアイソトープ研究所) を使用する機会を得た。そこで、本法についての若干の基礎的検討を行なうとともに、臨床例での測定を行ない、従来法との比較検討を行なった成績を報告する。

測定方法と検討対象

1) キットの内容と測定操作

スパック T4 RIA キットの構成は 50 検体用および 100 検体用で、 ^{125}I - T_4 溶液 55 ml (ANS 900 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 含有 0.075 M バルビタール緩衝液で、放射能 10 μCi 以下) 1 バイアルおよび 2 バイアル、標準 T_4 血清 (0, 2, 5, 10, 20, 40 $\mu\text{g}/100 \text{ml}$) 6 バイアル、 T_4 抗体でコートされた試験管それぞれ 50 本および 100 本よりなる。

測定操作は次の 6 ステップよりなる¹⁰⁾。

(1) 標準血清あるいは被検血清の各 25 μl を抗体試験管に加える。

(2) ^{125}I - T_4 溶液を 1 ml ずつ加え混和する。

(3) 37°C の温浴中で 60 分間インキュベイトする。

(4) 内容液を捨てる。

Key words: Solid-phase radioimmunoassay, Thyroxine, SPAC T_4 RIA kit

*京都大学医学部放射線核医学科

**京都大学医学部附属病院放射線部

受付: 53 年 6 月 15 日

最終稿受付: 53 年 8 月 21 日

別刷請求先: 京都市左京区聖護院川原町 54 (番 606)

京都大学医学部付属病院放射線部

小 西 淳 二

- (5) 抗体試験管の放射能を測定する。
- (6) 標準血清について得られたカウントより、標準曲線を作成し、被検血清の T_4 値を読む。

2) 測定法に関する基礎的検討

上記の測定法についてインキュベーションの温度と時間、抗体試験管洗浄の影響、抗体の特異性、希釈試験、回収率、精度および再現性に関する検討を加えた。

3) 臨床的検討の対象

臨床測定の対象としては、京大病院甲状腺外来を受診した各種甲状腺疾患患者および正常妊娠婦、京大職員を主とした健常者を用いた。また、同一血清について T_4 リア (PEG) キット (ダイナボット社) および Seralute Total T_4 RIA キット (マイルス・三共社) による測定および CPBA 法にもとづくテトラソルブ (ダイナボット社) による測定を行なって測定値を比較検討した。

基礎的検討の成績

1) インキュベーションの温度および時間

インキュベーション温度の影響について 4, 25, 37 および 47°C で行なった時の標準曲線および T_4 低値、正常値および高値の 3 プール血清の測定値の変動を検討した。Fig. 1 に示すごとく、4°C の場合を除いて他はほぼ近似した標準曲線を示した。しかし、25°C と 37°C では 37°C でより急峻な曲線が得られ、さらに 47°C に上昇させても著明な変化が認められなかったことより、37°C が至適と考えられた。また、温度が低い場合、高値域の測定値が 37°C に比して低値となる傾向が認められた。

つぎに、インキュベーション時間に関する検討として、インキュベーションを 37°C で 30 分から 3 時間まで行なったときの標準曲線の変化と、プール血清測定値の変動を Fig. 2 に示した。時間の経過とともに標準曲線は急峻となる傾向が認められるが、同時に高値域では曲線が平坦化していく。従って、高値域での測定精度を維持するためには、60分のインキュベーションがよいと考えられた。ただし、用いたプール血清の T_4 値の範囲

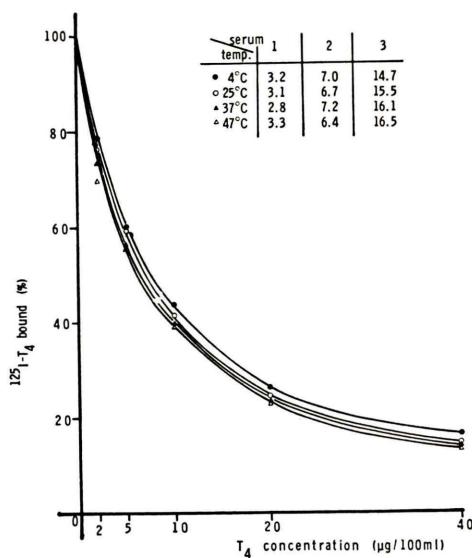


Fig. 1 Effect of incubation temperature on standard curve and T_4 values measured of 3 pooled sera. (incubation time: 60 min.)

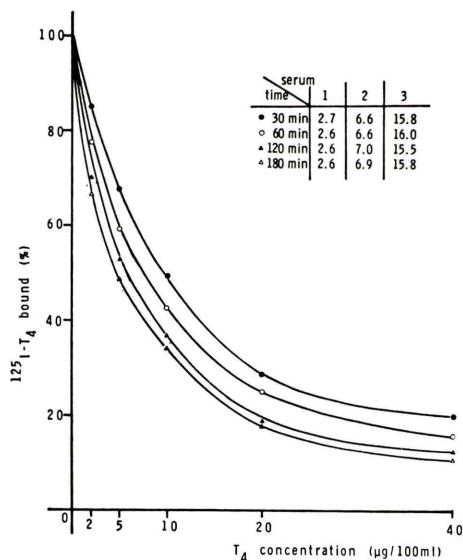


Fig. 2 Effect of incubation time on standard curve and T_4 values measured of 3 pooled sera. (incubation temperature: 37°C)

では検討したインキュベーション時間内で著明な測定値の変動は認められなかった。なお、37°C,

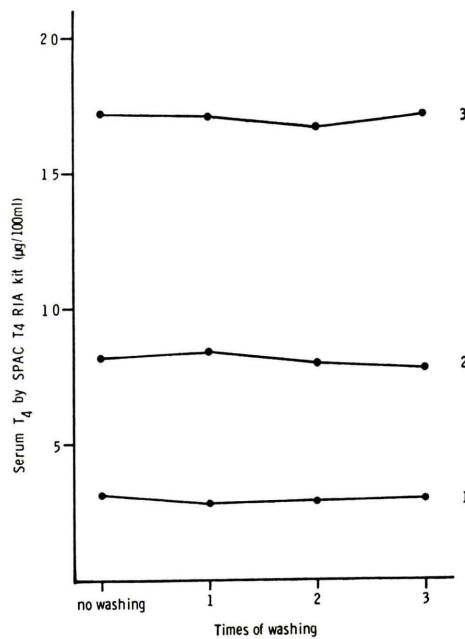


Fig. 3 Effect of washing of test tubes on T_4 values measured.

60分のインキュベーションにおける T_4 濃度0のときの結合率(B_0/T)は平均54.1%であった。

2) 抗体試験管洗浄の影響

キットではインキュベーション後、抗体試験管の内容液を捨て、管口をふくのみで洗浄する必要がないとされている。そこで、脱イオン水1mlによる洗浄操作を3回まで加えた時の測定値と、洗浄しなかった時の値とを比較検討した。標準曲線の各点におけるカウントは1回の洗浄により平均5.7%減少し、2および3回の洗浄を行なったものでは1回のものに比べほとんど変化が認められなかった。3プール血清の測定値においてはFig. 3に示すように、洗浄を行なわなかったときに比して有意の変動が認められなかった。

3) 抗体の特異性

試験管にコートされた抗 T_4 抗体の特異性について検討するため T_4 free血清にMIT、DITおよびトリヨードサイロニン(T_3)をそれぞれ10～1,000 $\mu\text{g}/100\text{ml}$ 添加して $^{125}\text{I}-\text{T}_4$ の結合におよぼす影響をみた。Fig. 4に示すごとく、 T_3 100 $\mu\text{g}/100\text{ml}$

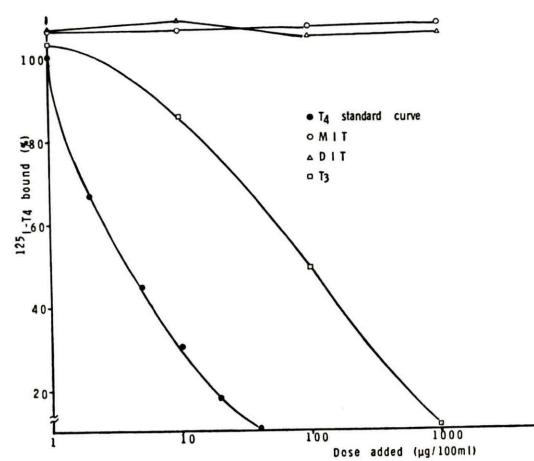


Fig. 4 Cross reaction of various substances with anti- T_4 antibody.

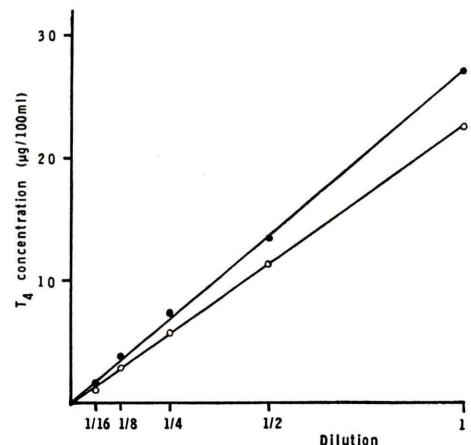


Fig. 5 Dilution test of two sera with high T_4 concentration.

100mlにて4.0%の交叉反応が認められたが、その他では1,000 $\mu\text{g}/100\text{ml}$ まで全く交叉反応が認められなかった。

4) 希釀試験

T_4 高値の2血清(22.6および27.1 $\mu\text{g}/100\text{ml}$)の希釀測定の成績をFig. 5に示したが、いずれも原点に向かう直線上にプロットされた。

5) 回収試験

T_4 低値および正常値の2血清に T_4 を10, 15,

Table 1 Recovery of added T₄.

	added T ₄ ($\mu\text{g}/100 \text{ ml}$)	20	15	10
1) 4.9 $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$	T ₄ measured	25.1	20.2	15.3
	T ₄ recovered	20.2	15.3	10.4
	(% recovery)	(101.1)	(102.0)	(104.0)
2) 11.5 $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$	T ₄ measured	31.3	27.3	23.7
	T ₄ recovered	19.8	15.8	12.2
	(% recovery)	(99.0)	(105.3)	(122.0)
				mean recovery 105.5%

Table 2 Intra-assay variability of the assay.

No.	serum		
	1	2	3
1	2.7	7.4	16.4
2	2.9	7.4	18.4
3	2.6	7.4	17.9
4	2.6	7.9	17.5
5	3.0	7.9	17.3
6	2.8	7.0	17.3
7	2.7	7.0	17.9
8	2.6	7.8	17.9
9	2.9	7.7	16.9
10	2.9	7.7	16.9
N	10	10	10
mean			
($\mu\text{g}/100 \text{ ml}$)	2.77	7.46	17.39
SD	0.15	0.35	0.67
CV (%)	5.4	4.7	3.9

Table 3 Inter-assay variability of the assay.

No.	serum		
	1	2	3
1	3.0	7.5	17.3
2	3.0	6.7	16.2
3	2.9	7.1	17.6
4	2.7	7.3	16.9
5	2.6	7.7	16.0
6	3.1	8.2	17.2
7	2.8	7.4	17.1
8	2.9	8.0	16.7
9	3.0	7.8	17.2
10	2.9	6.7	17.0
N	10	10	10
mean			
($\mu\text{g}/100 \text{ ml}$)	2.89	7.44	16.92
SD	0.15	0.51	0.50
CV (%)	5.1	6.8	2.9

20 $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$ 添加したときの回収率を Table 1 に示した。回収率は 99.0~122.0% で平均 105.5% と良好であった。

5) 精度および再現性

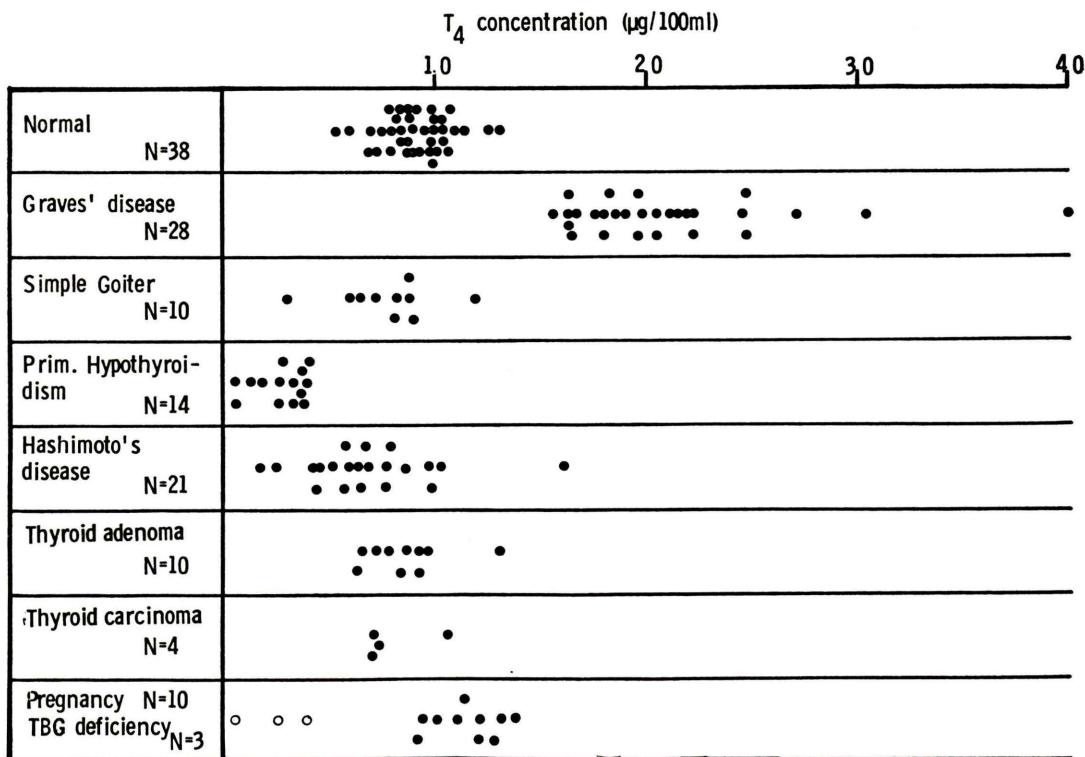
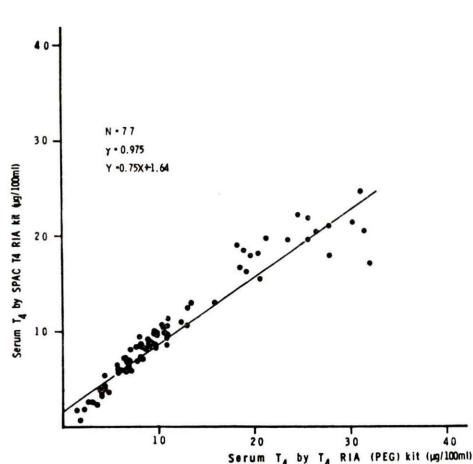
T₄ 濃度が低値、正常値および高値の 3 血清について同一アッセイで10回くり返し測定を行なった際の測定結果を Table 2 に示した。各血清の T₄ 測定値の変動係数は 3.9~5.4% と低値から高値血清まで良好であった。

また、同じ 3 血清について10回の異なるアッセイで測定をくり返した際の再現性は Table 3 のごとくで、検討した各濃度における測定値の変動係数は 2.9~6.8% と同一アッセイ内のそれに近く良好な再現性が認められた。

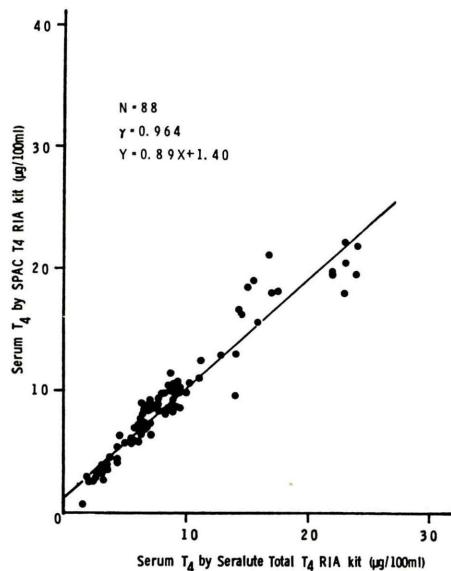
臨床的検討の成績

1) 健常者および各種甲状腺疾患患者における測定成績

臨床例における血中 T₄ 濃度の測定成績を Fig. 6 に示した。健常者38例では 5.4~13.0 $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$ の間に分布し、平均 $9.1 \pm 1.6 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ (Mean \pm S.D.) であった。正常域として平均値 ± 2 S.D. を取ると 5.9~12.3 $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$ となる。バセドウ病 28例では $21.0 \pm 5.3 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ で全例 $15.6 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ 以上の値を示した。単純性甲状腺腫 10 例では $7.7 \pm 2.3 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ であった。原発性甲状腺機能低下症 14 例では $0.6 \sim 4.0 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ に分布し、 $2.7 \pm 1.2 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ であった。橋本病 21 例では $6.9 \pm 3.1 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ で高値を示したもの 1 例のほか、正常域から低値域に広く分布した。甲状腺腫 10 例では $7.7 \pm 2.3 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ で、甲状腺癌 4 例は

Fig. 6 Serum T₄ concentration in various conditions measured by SPAC T₄ RIA kit.Fig. 7 Correlation of serum T₄ values by T₄ RIA (PEG) kit with those by SPAC T₄ RIA kit.

6.7～10.6 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ の間に分布した。一方、妊婦 10例では $11.4 \pm 1.6 \mu\text{g}/100\text{ ml}$ で健常者よりやや

Fig. 8 Correlation of serum T₄ values by Seralute Total T₄ RIA kit with those by SPAC T₄ RIA kit.

高値に分布し、TBG 減少症の3例ではいずれも低値であった。

2) 他のRIAキットによる測定値との比較

B・F分離にポリエチレングリコールによる沈殿法を用いるT₄リア(PEG)キットによる測定値と本法の測定値を77例について比較検討した成績をFig.7に示す。両者の相関はきわめて良好($r=0.98$)であったが、高値域では本法による値がT₄リア(PEG)キットの値より低値となる傾向が認められた。

一方、B・F分離をSephadexカラムで行なうSeraleute Total T₄(RIA)キット測定値との比較を88例について行なった成績をFig.8に示した。相関係数0.96と両者の間には良好な相関がみられたが、20 $\mu\text{g}/100\text{ml}$ 以上の高値域を除いて、本法による測定値が若干高値を示す傾向がみられた。

3) CPBA法によるT₄値との比較

76例について本法による測定値とCPBA法によるT₄測定キット、テトラソルブによる測定値との相関を検討した成績をFig.9に示した。相関係数0.95と両者の間には良好な相関が認められ、回帰直線式に示されるごとく絶対値においてもほぼ一致した成績が得られた。

考 案

抗体でコートされたプラスチック試験管を用いる固相法RIAはCattとTregear¹¹⁾により開発され、種々のアッセイに利用されている。固相法では抗原が抗体と反応すると同時に溶液から除かれる。すなわち、single stepのRIAであるため、操作が簡単であるとともにB・F分離過程に伴ういろいろな誤差をさけることができる利点を有している。今回検討したスペックT₄RIAキットは、この方法をT₄測定に導入してキット化した最初のものである。固相法のなかでも抗体コート試験管を用いる方法は、顆粒やディスクを用いる方法に比べ、沈殿操作が不要で、インキュベーション後内容液を捨てて試験管に残った放射能を測定すれば良い点、最も簡便である。また、試験管壁の抗体に対する抗原の結合は不可逆であり、き

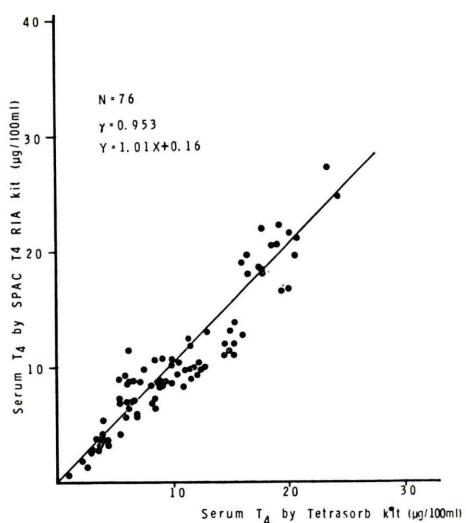


Fig. 9 Correlation of serum T₄ values by Tetrasorb kit with those by SPAC T₄ RIA kit.

わめて安定した結果が得られた。実際、試験管洗浄を3回くり返しても放射能の減少は5%程度であり、実際のアッセイでの検討でも試験管の洗浄を行なわなくてもよいことが認められた。従って、本キットでの測定操作はきわめて簡略化され、全操作時間は試料分注から計測まで約90分と従来法に比べて、B・F分離に要する時間の分短縮されている。

インキュベーションの温度および時間について、キットでは37°C±1°C、1時間±5分という厳しい条件が指示されている¹⁰⁾。今回の検討の結果でもやはり37°C、60分が至適と考えられたが、通常の測定範囲(3~16μg/100ml程度)では温度、時間ともに上記ほど厳密でなくてもよいと考えられ、特に、インキュベーション温度の許容幅は大きくしてもよいと思われた。また、試験管をラックごとデカントすることによりBの分離が多数の検体についても一瞬にして行なえるため、インキュベーション時間にばらつきがおこらないことも短時間インキュベーションの際の誤差を少なくしているものと考えられる。

抗体の特異性は良好であった。また、高T₄血清の希釈試験における直線性および回収率は満足

すべきものであり、本法による測定値は内因性T₄をよく反映していると考えられた。測定値の精度、異なるアッセイでの再現性はともに良好であった。

以上の諸検討より本キットはきわめて簡便で、かつ精度のよい血中T₄測定法として十分臨床使用しうるものと考えられた。また、遠沈操作を不要としたこのようなキットの出現は、現在進められているRIA自動化の方向にも大きな影響を与えるものと考えられる。

臨床成績では正常値は平均値±2 S.D.を用いると5.9~12.3 μg/100 mlであり、バセドウ病では、15.6 μg/100 ml以上、甲状腺機能低下症では4.0 μg/100 ml以下に分布し、両者とも健常者の値との重なり合いではなく、よく甲状腺機能を反映していた。

本法による測定値とCPBA法(テトラソルブ)によるT₄値との間には良好な相関が認められ、絶対値についてもほぼ一致する成績が得られた。一方、他の2つのRIA法キットによる測定値との比較では、いずれも良好な相関が認められたが、T₄リア(PEG)キットによる測定値に比して、高値域で本法による値が低い傾向がみられた。

上述のごとく、本法測定値はCPBA法による測定値とはよく一致したにもかかわらず、他のRIA法による値との間に相違がみられた。この理由については用いたB・F分離法の特性にもとづくことが考えられるが、なお今後の検討を要する。

結 語

抗体でコートした試験管を用いる固相法RIAによるT₄測定キット、スペックT₄RIAキットについて、その測定条件、特異性、精度、再現性などを検討するとともに臨床的有用性を評価した。本法は、従来法に比べて著しく簡便であり、短時間で精度の高い測定が行なえ、さらに自動化

にも適する長所を有している。臨床例における測定値はCPBA法および他のRIA法のそれと良好な相関を示し、甲状腺機能検査として有用であることが認められた。本法による正常値は5.9~12.3 μg/100 mlであった。

終わりに、キットを提供された第一ラジオアイソotope研究所に謝意を表します。

文 献

- 1) Ekins RP: The estimation of thyroxine in human plasma by an electrophoretic technique. *Clin Chem Acta* **5**: 453~459, 1960
- 2) Murphy BEP and Pattee CJ: Determination of thyroxine utilizing the property of protein binding. *J Clin Endocrinol Metab* **24**: 187~196, 1964
- 3) Chopra IJ, Solomon DH, Ho RS: A radioimmunoassay of thyroxine. *J Clin Endocrinol Metab* **33**: 865~868, 1971
- 4) 小西淳二、中島言子、森田陸司他:サイロキシンのRadioimmunoassay T₄-リアキットの基礎的ならびに臨床的検討. 現代医療 **8**: 999~1005, 1976
- 5) 池窪勝治、中島言子、遠藤啓吾他:RIA-Mat T₄キットの基礎的ならびに臨床的検討. ホルモンと臨床 **25**: 313~320, 1977
- 6) 中島言子、小西淳二、森田陸司他:T₄リアパックによる血中サイロキシン濃度の測定に関する基礎的ならびに臨床的検討. 核医学 **14**: 123~130, 1977
- 7) 高坂唯子、奥野龍興、笠木寛治他:Seraleute Total T₄(RIA)キットの基礎的検討ならびに臨床的評価. 核医学 **15**: 1183~1189, 1978.
- 8) 小西淳二、中島言子、奥野龍興他:Radioimmunoassayによる血中サイロキシン濃度の測定 TETRATAB-RIAキットの検討. 核医学 **15**: 135~144, 1978.
- 9) 小西淳二、中島言子、遠藤啓吾他:T₄PEGリアパックによる血中サイロキシンの測定. ホルモンと臨床 **26**: 277~281, 1978
- 10) SPAC T₄ RIA kit Manual, Mallinckrodt, Inc., 1977
- 11) Catt, K and Tregear, GW: Solid-phase radioimmunoassay in antibody-coated tubes. *Science* **153**: 1570~1572, 1967