

《原 著》

L-3, 3'-diiodothyronine の Radioimmunoassay

高木 淳* 磯崎 陽子* 倉田 邦夫* 長滝 重信**

要旨 血中 3,3'-diiodothyronine (3,3'-T₂) の Radioimmunoassay による測定法を確立した。抗 3,3'-T₂ 血清は、L-3,3'-T₂ を、カーボデイミドを用いて、牛血清アルブミンに結合し、complete Freund's adjuvant と共に家兎に感作して作製した。得られた抗血清は、甲状腺ホルモンおよびその誘導体とは免疫交叉性を示さきわめて特異的であった。3,3'-T₂-¹²⁵I は、3-monoiodothyronine より、クロラミン T 法で作製し、比放射能 3,000 μ Ci/ μ g のものを得た。本法における、最大検出感度は 0.5 ng/100 ml であった。この方法で測定した正常人血中 3,3'-T₂ は、平均 3.6 ng/100 ml (n=29) であり、甲状腺機能亢進症で高値、甲状腺機能低下症で低値であった。ウサギに、T₃ または rT₃ を投与した時の血中 3,3'-T₂ を測定すると、rT₃ を投与した時のみ血中に、3,3'-T₂ が出現し、3,3'-T₂ は、主に、rT₃ の代謝によって産生されると推察された。

I. はじめに

L-3, 3'-diiodothyronine (3, 3'-T₂) の Radioimmunoassay (RIA) には、多くの報告が有り¹⁻⁶⁾、本邦でも満間ら⁷⁾が、甲状腺疾患を中心に詳細な報告を行なっている。甲状腺ホルモンの脱ヨード代謝の経路において、3,3'-T₂ は、その化学構造から推察するに、Triiodothyronine (T₃) および Reverse Triiodothyronine (rT₃) の 2 つの経路から代謝され、血中に存在することが考えられる。今回、われわれは、3,3'-T₂ の RIA の系を確立し、各種甲状腺疾患患者の血中濃度を測定するとともに、ウサギに T₃ または、rT₃ を投与した場合の血中濃度の変化、飢餓ウサギの血中 3,3'-T₂ 濃度などを測定し、甲状腺ホルモンの脱ヨード代謝の面から若干の考察を加えた。

II. 実験材料および方法

1) 試 薬

*ダイナボット RI 研究所

**東京大学医学部附属病院第 3 内科

受付: 54 年 8 月 22 日

最終稿受付: 54 年 11 月 12 日

別刷請求先: 松戸市稔台 344 (☎271)

ダイナボット RI 研究所

高 木 淳

L-3, 3', 5'-triiodothyronine (rT₃), L-3, 3'-diiodothyronine (3, 3'-T₂), L-3', 5'-diiodothyronine (3', 5'-T₂), L-3-monoiodothyronine (3-T₁), L-3'-monoiodothyronine (3'-T₁), L-thyronine (T₀) は、西ドイツ Henning 社製のものを、L-thyroxine (T₄), L-3, 3', 5'-triiodothyronine (T₃), L-3,5-diiodothyronine (3, 5-T₂) は、Sigma 社製のものを、牛アルブミン(BSA)は、Miles 社、8-anilino-1-naphthalen-sulfonic acid (ANS) は、Kodak 社、ポリエチレングリコール (PEG) は和光社、Na¹²⁵I は、Radiochemical Center Amersham のものを用いた。

2) 3,3'-T₂ 抗体の作製方法

われわれが先に報告した⁸⁾ rT₃ 抗体作製方法に準じ、morpho-CDI を用い、3,3'-T₂ を BSA に結合させ、この結合物 1 mg を抗原として、complete Freund's adjuvant と共に、1 か月ごとに、家兎に感作し、3 回目の感作後、10 日目に耳静脈より採血した。

3) 3,3'-T₂-¹²⁵I の作製

3,3'-T₂-¹²⁵I は、rT₃-¹²⁵I の作製方法⁸⁾ と同様に CT 法で作製した。すなわち、3-T₁ に CT 法で、¹²⁵I を付加後、得られた 3,3'-T₂-¹²⁵I を、Sephadex G-25 column で分離精製した。

4) 3,3'-T₂ free serum の作製

先に報告した、rT₃-free serum の作製方法と同

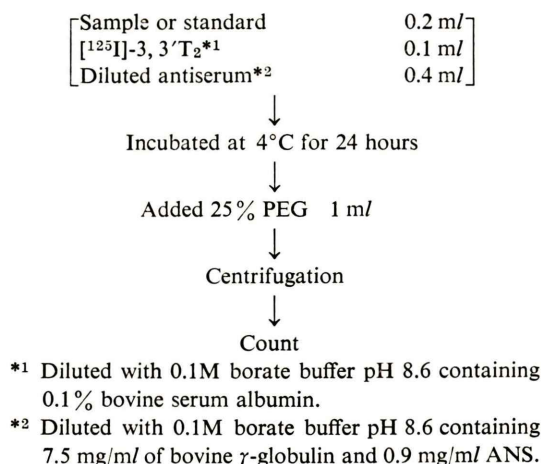


Fig. 1 Assay procedure

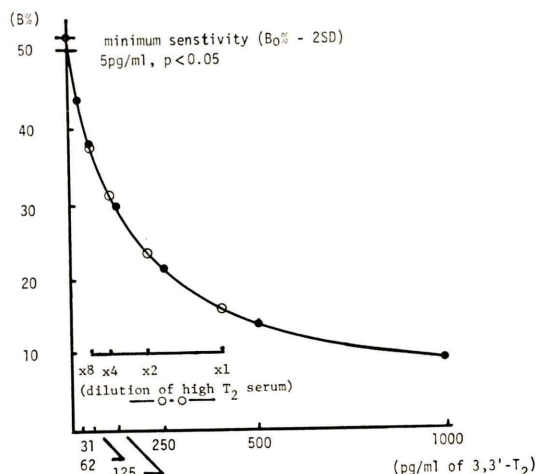


Fig. 2

様に行なった⁸⁾。

5) Assay procedure

Fig. 1 のごとき手順で行なった。その他 rT₃ は、先に報告した方法で行ない⁸⁾、T₄、T₃ は、ダイナボット社製リアキットを用いた。本測定系における人血中 3,3'-T₂ 濃度および T₄、T₃、rT₃ を測定するため、正常者29例、甲状腺機能亢進症19例、甲状腺機能低下症5例から採血しその血清を用い検策した。

6) 動物実験

体重 1.8~2.0 kg の正常なウサギ 2 匹に T₃ 100 μg を、また別の正常なウサギ 2 匹に、rT₃ 100 μg を耳静脈より投与後、経時的に採血し、血中 3,3'-T₂ を測定した。

1.8~2.0kg のオスのウサギから、甲状腺を全摘出し、1日 4 μg の L-T₄ を投与し、2週後、5匹ずつ2群に分け、一方は正常食群とし、他方を水のみを与え飢餓群とし、絶食後11日目に、血中 T₃、rT₃ および 3,3'-T₂ を測定した。

III. 実験結果

1) 3,3'-T₂- ^{125}I の作製

3-T₁ への付加反応により得られた 3,3'-T₂ ^{125}I の比放射能は、理論的には、3,300 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ と計算されるが、self-displacement 法⁹⁾ で求めた結果、2,500~3,000 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ であった。従って、われわ

Table 1 Relative reactivity of various iodinated compounds with 3, 3'-T₂ antibody*

Compounds	Relative Reactivity
L-3, 3'-T ₂	100
L-T ₄	0.001
L-T ₃	0.02
L-rT ₃	0.05
L-3, 5-T ₂	<0.0001
L-3', 5'-T ₂	<0.001
L-3-T ₁	0.005
L-3'-T ₁	0.007
L-MIT	<0.0001
L-DIT	<0.0001

* The relative reactivities of various compounds were calculated as the amounts that resulted in 50% inhibition of the binding of labeled hormone to antibody.

れの使用したシンチレーションカウンターの係数効果は、53%である故、1本の assay に 10,000 cpm の 3,3'-T₂- ^{125}I を使用すると、約 3 pg の 3,3'-T₂ に相当する。Fig. 2に示すように、最小検出感度を B₀% の、-2SD で表わすと、5 pg/ml であった。

2) 抗体の特異性

本検討に用いた抗体と、甲状腺ホルモンおよびその誘導体との免疫交叉性を検討した結果を Table 1 に示す。Table 1 に示したように、甲状腺

ホルモンおよびその誘導体とは、問題となる免疫交叉性は認められなかった。

3) 高値検体の希釈試験と 3,3'-T₂ の添加試験

高値 3,3'-T₂ 血清を, 3,3'-T₂ free serum 血清で希釈した結果, Fig. 2 に示したように, 標準曲線と平行性を示した. 正常者, 甲状腺機能低下症, および亢進症, 妊婦血清に 3,3'-T₂ を添加したところ, 平均 105 % の回収率を示した.

4) 再現性

3 種の検体を同時におのおの 10 本ずつ測定したところ, 3.0 ± 0.2 , 5.7 ± 0.4 , 15.1 ± 0.3 ng/100 ml であった. また, これらの検体を, 15 回異なる日に測定したところ, 2.9 ± 0.2 , 5.5 ± 0.1 , 15.5 ± 0.3 ng/100 ml であった.

5) 正常人および, 各種甲状腺疾患患者における, 血中 3,3'-T₂ 値

Table 2 に, 正常者 29 例における, 血中 3,3'-T₂ 値を, T₄, T₃, rT₃ 値とともに示す. 平均血中 3,3'-T₂ 値は, 3.60 ng/100 ml であり, T₄, T₃, rT₃ 値は, それぞれ, 8.3 μ g/100 ml, 123 ng/100 ml, 27.8 ng/100 ml であった. Fig. 3 に, 甲状腺機能亢進症 19 例, 甲状腺機能低下症 5 例の T₄, T₃, rT₃ および

3,3'-T₂ 値を正常者とともに示した. いずれの血中濃度においても, 正常者と比べ, 甲状腺機能亢進症で高く, 甲状腺機能低下症で低かった.

6) ウサギにおける, T₃ と rT₃ の末梢代謝

正常なウサギ 2 匹に T₃ を 100 μ g, また別な 2 匹のウサギに rT₃ を 100 μ g 投与し, 経時的に採血し, 血中 3,3'-T₂ を測定した結果を Fig. 4 に示す. rT₃ 投与 15 分後で, ただちに 3,3'-T₂ が血中出现したが, しかし, T₃ 投与においては, 5 時間後, 微量検出されるにすぎなかった.

7) 甲状腺を抽出し, 5 μ g/day の T₄ を投与した, ウサギの血中 3,3'-T₂

甲状腺を摘出し, 1 日 4 μ g の T₄ を投与した正

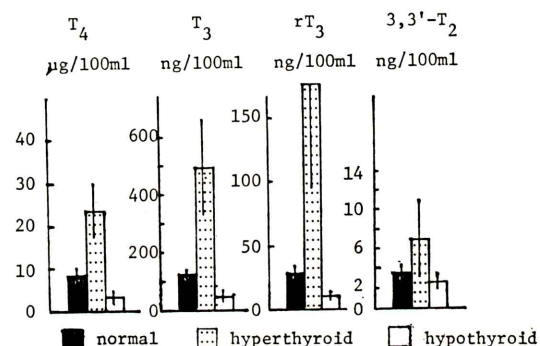


Fig. 3 Serum concentration of T₄, T₃, rT₃, and 3,3'-T₂ in hyper and hypothyroid patients.

Table 2 Serum concentrations of T₄, T₃, rT₃ and 3,3'-T₂ in 29 normal subjects.

	Mean	Range (mean \pm 2SD)
T ₄ (μ g/100 ml)	8.3	4.9- 16.6
T ₃ (ng/100 ml)	123.0	95.0-151.0
rT ₃ (ng/100 ml)	27.8	15.8- 39.8
3,3'-T ₂ (ng/100 ml)	3.6	2.1- 5.1

Table 3 Serum concentrations of T₃, rT₃, and 3,3'-T₂ in thyroidectomized normal and starved rabbits.

	T ₃	rT ₃	3,3'-T ₂
Control rabbits	131 ± 3.2	4.6 ± 0.4	1.0 ± 0.2
Starved rabbits	133 ± 2.7	30.3 ± 1.7	4.7 ± 0.4
	(ng/100 ml)		

Control thyroidectomized rabbits injected daily with 4 μ g of T₄ were fed with a standard laboratory diet and water and the starved rabbits were given only water for 11 days starting 2 weeks after thyroidectomy.

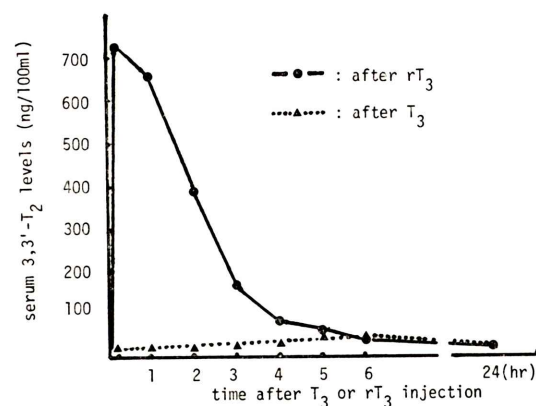


Fig. 4 Disappearance of immunoassayable 3,3'-T₂ after iv injection of 100 μ g of T₃ or rT₃ in rabbits. Serum 3,3'-T₂ concentration are plotted mean of two rabbits.

常食群と飢餓群の $3,3'$ - T_2 値を T_3 , rT_3 値とともに Table 3 に示す。 rT_3 と $3,3'$ - T_2 の血中濃度は、飢餓状態で、4.6 から 30.3 ng/100 ml および 1.0 から、4.7 ng/100 ml とそれぞれ有意に上昇した。しかし、血中 T_3 濃度には変化が見られなかった。

IV. 考 察

$3,3'$ - T_2 の RIA による測定は、Wu ら¹⁾ の報告以来、諸家により、正常値および、諸疾患における血中濃度測定とともに、多くの報告がある。今回われわれが検討の結果、抗体の作製方法は、 T_3 , rT_3 などと同様に、morpho-CDI を用い、L- $3,3'$ - T_2 を BSA に結合した免疫抗原を用いることで作製され、その特異性も、他の報告と同様に、L- T_4 , L- T_3 , L- rT_3 などと問題となる免疫交叉性は認められなかった。assay 系の条件も、他の報告と同様に^{2, 3, 4, 7)}、ANS を使用することで、TBG など結合タンパクの影響を阻止でき、回収試験、希釈試験などの結果で見られるように、われわれの assay 系は十分満足できる方法と考えられる。われわれの assay 系の最小検出感度は、0.5 ng/100 ml で、満間らの系と同様であり、従来の報告に比べ、最も良好な結果であった。この高度感の系が確立できた原因は、抗体の持つ特異性のみならず、 $3,3'$ - T_2 - ^{125}I の高比放射能によるものと考えられる。すなわち、Burman²⁾, Gavin⁵⁾ は、いずれも 500 $\mu Ci/\mu g$ 以下で、きわめて低比放射能であるのに比べ、われわれは、 $3-T_1$ への付加反応で $3,3'$ - T_2 - ^{125}I を作成し、2,500~3,000 $\mu Ci/\mu g$ の高比放射能を得たことが、高感度の系を得た最大の原因と思われる。

本法で測定した正常者血中 $3,3'$ - T_2 値は、Burman ら²⁾ の報告よりも低かったが、Wu¹⁾、満間らの結果とは同様であった。また、他の報告と同様に、甲状腺機能低下症では、正常者に比し低値で、甲状腺機能亢進症では、高値を示した。

T_4 から、 $3,3'$ - T_2 への代謝経路は、その分子構造上、 T_3 からと、 rT_3 からの2つの経路が考えられる。今回の実験において、ウサギに T_3 または、 rT_3 を投与し、 $3,3'$ - T_2 を測定した結果 (Fig. 4),

rT_3 を投与した時のみ、 $3,3'$ - T_2 が血中に出現したことは、 rT_3 から、 $3,3'$ - T_2 へ代謝される経路が主であろうと推察され、Wu ら¹⁾ が人間で、 rT_3 を経口投与し、 $3,3'$ - T_2 の代謝を検討した結果と一致した。

甲状腺を摘出し、1日 4 μg の T_4 を与えた、飢餓状態のウサギでは、血中 $3,3'$ - T_2 濃度は、 rT_3 とともに、明らかに上昇した。先にわれわれは、飢餓状態のウサギでは、血中 rT_3 が上昇し、その原因は、Metabolic Clearance Rate (MCR) の低下と、Production Rate (PR) の上昇であると報告し¹⁰⁾、さらに最近、飢餓状態のウサギにおける $3,3'$ - T_2 の MCR は、正常なウサギと変わらないことを報告した¹¹⁾。本実験において、甲状腺を摘出し、甲状腺ホルモンの分泌の影響のないウサギに、 T_4 を投与した場合においても、飢餓状態では、血中 rT_3 , $3,3'$ - T_2 濃度は、明らかに上昇した。従って、飢餓状態のウサギにおける $3,3'$ - T_2 の上昇の原因は、 rT_3 の PR の増加に起因するものと推察される。

文 献

- 1) Wu S, Chopra ID, Nakamura Y, et al: A radioimmunoassay for measurement of 3, 3'-L-diiodothyronine (T_2). J Clin End 43: 682, 1976
- 2) Burman K, Read J, Dimond RD, et al: Measurement of 3, 3', 5'-triiodothyronine (reverse T_3), 3, 3'-L-diiodothyronine, T_3 and T_4 in human amniotic fluid and in cord and maternal serum. J Clin Endocrinol Metab 43: 1351, 1976
- 3) Burger A, Sakoloff C: Serum 3, 3'-L-diiodothyronine, a direct radioimmunoassay in human serum: Method and clinical results. J Clin Endocrinol Metab 45: 384, 1977
- 4) Burman KD, Strum D, Dimond RC, et al: A radioimmunoassay for 3, 3'-diiodothyronine ($3,3'$ - T_2). J Clin Endocrinol Metab 45: 339, 1977
- 5) Gavin LA, Hammond ME, Castle JN, et al: 3, 3'-diiodothyronine production, a major pathway of peripheral iodothyronine metabolism in man. J Clin Invest 61: 1276, 1978
- 6) 長滝重信, 内村英正, 池田 斉, 他: 奇胎妊娠血中 $3, 3', 5'$ - T_3 及び $3, 3'$ - T_2 濃度について. 日内泌誌 54: 587, 1978
- 7) 満間照典, 野木森剛, 鰐部春松: ラジオイムノアッセイによる人血清 $3, 3'$ -diiodothyronine ($3, 3'$ - T_2)

- の測定. 核医学 **16**: 547, 1978
- 8) Takagi A, Isozaki Y, Kurata K, Nagataki S: A radioimmunoassay for measurement of 3, 3', 5'-triiodothyronine (reverse T₃). J Soc Nucl Med **15**: 275, 1978
- 9) Weeke J, Ørskov H: Synthesis of ¹²⁵I monolabeled 3, 5, 3'-triiodothyronine and thyroxine of maximum specific activity for radioimmunoassay. Scand J Clin Lab Invest **32**: 357, 1973
- 10) Takagi A, Isozaki Y, Kurata K, Nagataki S: Serum concentration, metabolic clearance rates and production rates of reverse triiodothyronine, triiodothyronine and thyroxine in starved rabbits. Endocrinology **103**: 1434, 1978
- 11) 高木 淳, 磯崎陽子, 倉田邦夫, 他: 飢餓状態における甲状腺ホルモンの代謝について, 日内泌誌 **55**: 319, 1979

Summary

Radioimmunoassay for 3,3'-diiodothyronine

Atsushi TAKAGI*, Yoko ISOZAKI*, Kunio KURATA* and Shigenobu NAGATAKI**

*Dainabot Radioisotope Laboratories, Ltd.

**The Third Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, University of Tokyo

A sensitive, specific and reproducible radioimmunoassay (RIA) for the measurement of 3,3'-diiodothyronine (3,3'-T₂) in serum is described. A highly specific 3,3'-T₂ binding antiserum was prepared by immunization of rabbits with 3,3'-T₂-bovine serum albumin conjugate. A method for the preparation of ¹²⁵I-3,3'-T₂ of very high specific activity which was iodinated from 3-monoiodothyronine was developed. Utilizing this RIA, a mean serum 3,3'-T₂ level of normal subjects was 3.60 ± 1.5 ng/100 ml (mean \pm SD, n=29). Serum

3,3'-T₂ was found to be increased in hyperthyroidism, and was decreased in hypothyroidism. Serum 3,3'-T₂ concentrations after iv injection of T₃ or rT₃ in rabbits increased sharply after injection of rT₃, but did not increased after T₃ injection. These results suggest that rT₃ is the major source of 3,3'-T₂ in the serum.

Key words: 3,3', 5'-triiodothyronine rT₃, 3,3'-diiodothyronine 3,3'-T₂, 3-monoiodothyronine 3-T₁, 3,3',5-triiodothyronine T₃, Thyroxine T₄.