

《ノート》

固相化抗体法およびポリエチレングリコール沈殿法による血中サイロキシン測定法の比較

Comparative Studies on the Measurements of Serum Thyroxine Using Antibody-Coated Test Tubes and Polyethylene Glycol

田中 和子* 樋口 嬌子* 土橋 宣昭* 深草 駿一*
観 弘毅* 高橋 有二**

Kazuko TANAKA*, Yoshiko HIGUCHI*, Nobuaki TSUCHIHASHI*,
Shunichi FUKAKUSA*, Hirotake KAKEHI*, and Yuji TAKAHASHI**

*Department of Radiology, Japanese Red Cross Medical Center, Tokyo

**Department of Surgery, Japanese Red Cross Medical Center, Tokyo

I. はじめに

血中サイロキシン(T_4)の測定は、従来 competitive protein binding assay¹⁾ (以下 CPBA と略す) 法が広く用いられてきた。この方法は、 T_4 と thyroxine binding protein (以下 TBP と略す)との競合的結合反応を利用しているため、測定にあたって、TBP に結合している T_4 を抽出する操作が必要であり、この時の抽出率は、測定者による個人差が出やすいなどの、手技上の欠点があった。

一方、これに代わって radioimmunoassay²⁾ (以下 RIA と略す) 法が普及してきた。これは抗原抗体反応により、抗体のもつすぐれた特異性を利用して、TBP に対する T_4 結合の結合阻害剤を使用することによって、 T_4 を抽出操作なしで分離測定することが可能になり、簡便さにおいてもすぐれている。

さらに RIA 法においては抗原抗体結合物(以下

B と略す)と遊離物(以下 F と略す)の分離を行なわなければならないが、この方法には、クロマト法、二抗体法、吸着法、塩析法などがある³⁾。塩析法の中で Polyethylene Glycol (以下 PEG と略す)をインキュベーション後の反応液に加え、 B を沈殿とし、遠心分離により $B \cdot F$ 分離する方法は、 T_4 測定に限らず、他のホルモン測定においても最近広く利用されている⁴⁾。一方、抗体をコーティングさせた試験管の中で反応を行ない⁵⁾、内容物をデカントするのみで $B \cdot F$ 分離できる固相法も普及してきた。この方法では $B \cdot F$ 分離は非常に簡便で手技の簡便さ、工程の自動化を考える上では最も望ましい方法の一つである。

本報では種々の方法の中から、代表的なものとして、PEG による沈殿法(PEG 法)と抗体を試験管にコーティングさせた固相法(固相化抗体法)によるキット一つずつをとりあげ、おのおのの精度、操作上の特徴、相互の相関などを検討した結果を報告する。

II. 試薬および操作方法の比較

対象としたキットは PEG 法のものとしては、

Key words: Thyroxine, SPAC T-4, Antibody-coated test tube, T-4 RIA KIT II

* 日本赤十字社医療センター放射線科

** 日本赤十字社医療センター外科

受付: 54年9月25日

最終稿受付: 55年1月21日

別刷請求先: 東京都渋谷区広尾 4-1-22 (番150)

日本赤十字社医療センター放射線科

田 中 和 子

Table 1 Reagents supplied by 1) T-4 RIA KIT II and 2) SPAC T-4.

1) T-4 RIA KIT II	
1.	^{125}I -Thyroxine in 0.05 M barbital buffer with 0.1% bovine serum albumin. Activity, 0.46 μCi or less/ml.
2.	Thyroxine antiserum (rabbit) in 0.05 M barbital buffer with 0.75% bovine gamma globulin and 0.03% of 8-anilino-1-naphthalene sulfonic acid.
3.	Thyroxine standards. Vials containing 0, 3, 6, 12 and 24 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ equine serum.
4.	Polyethylene glycol 6000, 18% solution in 0.09 M barbital buffer.
2) SPAC T-4	
1.	^{125}I -Thyroxine in 0.075 M barbital buffer with approximately 900 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of magnesium-8-anilino-1-naphthalene sulfonate. Activity, 5.2 μCi or less/55 ml.
2.	Thyroxine antibody tubes, containing covalently coupled equine, rabbit, sheep or goat anti-T ₄ antibody.
3.	Thyroxine standards, containing 0, 2, 5, 10, 20 and 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ T ₄ in T ₄ -free human serum.

Table 2 Assay procedures for serum T₄ measurements using T-4 RIA KIT II and SPAC T-4.

	T-4 RIA KIT II	SPAC T-4
Patients' Sera or Control Sera	25 μl (0.025 ml)	25 μl (0.025 ml)
Thyroxine Antiserum	400 μl	Coated
^{125}I -Thyroxine	100 μl	1000 μl
Incubation	37°C, 1 hour	
Precipitating Agent	PEG solution 2 ml	—
Mixing	5 sec	—
Centrifugation	1000 $\times g$ 10 min	—
	Decant	
	Count	

Table 3 Intra and inter-assay reproducibility in measurements of serum T₄ concentrations using T-4 RIA KIT II and SPAC T-4.

	SPAC T-4				T-4 RIA KIT II			
	Intra-assay		Inter-assay		Intra-assay		Inter-assay	
n	12	12	6	6	18	18	12	12
X	6.26	12.88	5.53	11.88	6.39	11.98	6.06	12.16
SD	0.42	0.75	0.87	1.27	0.22	0.36	0.45	0.83
SD/X	6.4%	5%	14.4%	9.8%	3.3%	2.9%	7.1%	6.4%
	NMS I	NMS IIa	NMS I	NMS IIa	NMS I	NMS IIa	NMS I	NMS IIa

ダイナボットラジオアイソトープ研究所販売の T-4 リアキット II, 固相化抗体法のものとしては第一ラジオアイソトープ研究所販売のスパック T-4 リアキットである。以下、おのおのの比較を行なう。

1) 試薬の比較: 両キットの試薬の内容を Table 1 に示す。双方とも、試薬の調整の必要はなく、冷蔵保存している各試薬を室温 (20°~30°C) にもどすのみで使用可能である。

2) 操作方法の比較: 両キットの操作の概要を Table 2 に示す。両キットとも、血清量は二重測定を行なっても、50 μl と微量ですみ、ピペットの操作回数もスパック T-4 は 2 回、T-4 リアキット II は 4 回であり、測定作業を始めてから B の放射能を計測するまでの時間は、スパック T-4 で 105 分、T-4 リアキット II で 125 分である。また、スパック T-4 はボルテックスミキサーによる攪拌や、遠心分離操作の必要がない。

III. 精度の検討

1) キット内、キット間の再現性: コントロール血清 NMS (栄研 ICL 発売) を用いて行なったキット内、キット間の再現性の試験の結果を Table 3 に示す。

両キットとも、キット内再現性試験で変動係数 10% 以下、キット間の再現性試験では変動係数が 15% 以下におさまった。

2) 希釈試験: T₄ 高値の血清を T₄ 濃度 0 の標準血清で 1.5 倍、2 倍、3 倍、4 倍、8 倍に希釈し、おのおの測定すると Fig. 1 に示すように両キ

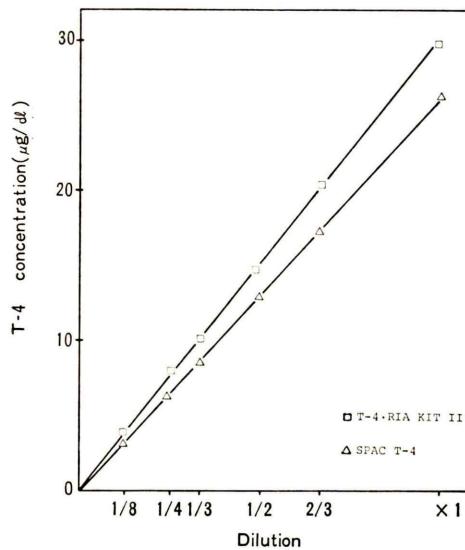


Fig. 1 Effects of dilution on the T_4 values measured by use of T-4 RIA KIT II and SPAC T-4.

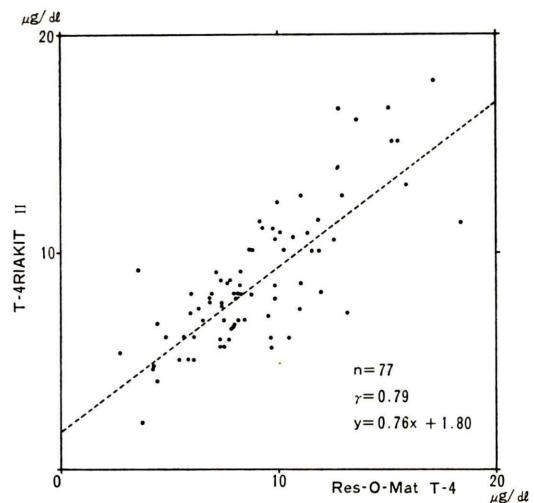


Fig. 3 Correlation between T_4 values determined by T-4 RIA KIT II and those by Res-O-Mat T-4.

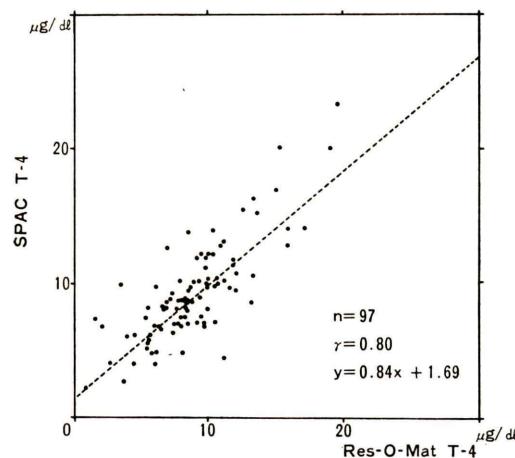


Fig. 2 Correlation between T_4 values determined by SPAC T-4 and those by Res-O-Mat T-4.

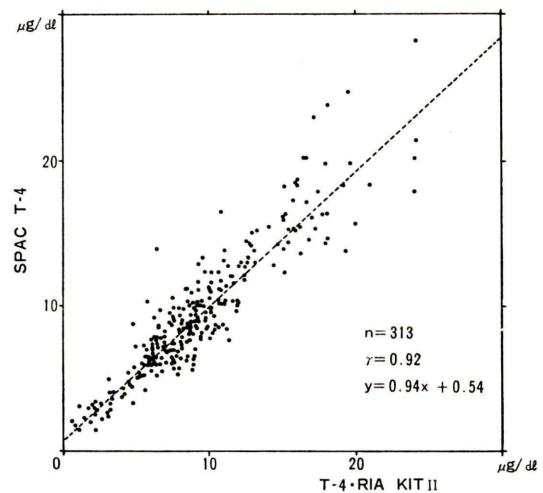


Fig. 4 Correlation between T_4 values by T-4 RIA KIT II and those by SPAC T-4.

Table 4 Recovery tests in serum T_4 measurements by T-4 RIA KIT II and SPAC T-4.

SPAC T-4				T-4 RIA KIT II			
T_4 added (μg/dl)	Observed (μg/dl)	Calculated (μg/dl)	Recovery (%)	T_4 added (μg/dl)	Observed (μg/dl)	Calculated (μg/dl)	Recovery (%)
0	4.1	4.0	102	0	3.3	3.3	100
2.0	5.5	5.0	106	3.0	4.5	4.8	101
5.0	6.4	6.5	98	6.0	6.3	6.3	100
10.0	8.8	9.0	95	12.0	9.35	9.3	101
20.0	13.2	14.0	106	24.0	15.4	15.3	103

ットとも0に収束する直線が得られた。

3) 回収試験: T₄濃度正常の血清に、種々の濃度のそれぞれのキットに付属している標準血清を添加して、T₄濃度を実測しておののの回収率を求めた。この結果をTable 4に示す。平均回収率はスパックT-4は101.4%、T-4リアキットIIは101.0%であった。

4) CPBA法との値の相関: CPBA法のレゾマットT₄とスパックT-4の相関をFig. 2に示す。レゾマットT₄とスパックT-4との相関は、相関係数rとしては0.80を得た。また、回帰直線はy=0.84x+1.69で表わされる。ただし xはレゾマットT₄、yはスパックT-4による測定値である。

レゾマットT₄とT-4リアキットIIとの相関をFig. 3に示す。T-4リアキットIIとの相関係数rは0.79である。また、回帰直線はy=0.76x+1.80で表わされる。ただし xはレゾマットT₄、yはT-4・リアキットIIによる測定値である。

5) スパックT-4とT-4リアキットIIとの値の相関: スパックT-4とT-4リアキットIIとの相関をFig. 4に示す。スパックT-4とT-4リアキットIIとの相関係数rは0.92であり、相互間でも非常に強い相関を示し、回帰直線はy=0.94x+0.54で表わされた。ただし、xはT-4リアキットII、yはスパックT-4による測定値である。

IV. 臨床的検討

対象は昭和53年5月から9月までの間に当センター放射線科核医学室に測定依頼された検体、および当センター勤務者35人である。

1) 正常値: 正常値をTable 5に示す。ここで対象とした者は、当センター勤務者のうち自他覚所見で、臨床上甲状腺に異常のない35名である。両キット共、平均値および標準偏差は、ほぼ等しい値を得た。

2) 各種甲状腺疾患におけるT₄値: 両キットを使用して、正常者、甲状腺機能低下症者、亢進症者のT₄値を測定した。この結果をFig. 5に示す。正常者とは、正常値決定に用いた当センターの職員(正常者1)、および、当センターをなんらかの疾患をもって受診したが、甲状腺機能に関しては

Table 5 Serum T₄ concentrations of healthy volunteers determined by T-4 RIA KIT II and SPAC T-4.

	SPAC T-4 RIAKIT	T-4 RIA KIT II
n	30	34
\bar{X}	8.8	8.8
SD	1.58	1.68
$\bar{X} \pm 2SD$	8.8±3.2	8.8±3.4

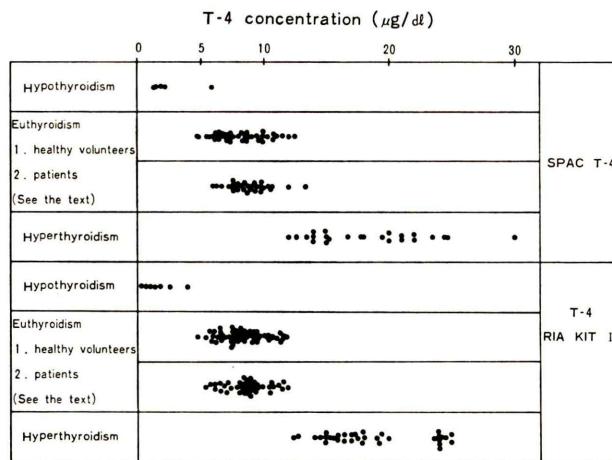


Fig. 5 Distribution of serum T₄ values in euthyroidism, hypothyroidism and hyperthyroidism, measured using T-4 RIA KIT II and SPAC T-4.

臨床的に正常とみなせる者(正常者2)である。正常者(2)のT₄の広がりは、先に求めた正常者(1)の広がり($\bar{x} \pm 2SD$; スパック T-4では5.6~12.0 $\mu\text{g/dl}$, T-4 リアキット II では5.4~12.2 $\mu\text{g/dl}$)にほぼ一致している。低下症者では4.8 $\mu\text{g/dl}$ 以下、亢進症者では12.8 $\mu\text{g/dl}$ 以上の測定値を得た。

V. 考 察

competitive radioassayによるT₄測定は、CPBA法、RIA法によるものを合わせると、20種近くのキットが使用されている。今回報告したRIA法によるスパック T-4, T-4 リアキット II とも、CPBA法のように、TBPからT₄を抽出する必要がない。このため、操作が簡便であり、T₄抽出率の差による値の変動がなくなる。また、血清量も二重測定を行なう場合、CPBA法のレゾマット T₄では1,000 μl 必要だったのが、50 μl と微量ですみ、他のRIA法によるキットに比べても少ない方である。RIA法においては、測定精度や簡便さはB·F分離法によるところが大きいが、T-4 リアキット IIにおいては、PEGでBを沈殿させるので第2反応が不要であり、遠心分離も3,000 rpm 10分間と短時間ですむ。スパック T-4 キットは、抗体を試験管底にコーティングさせた固相法に基づくもので、T-4 リアキット II のような遠心分離操作もなく、内容物をデカントするだけでB·F分離でき、操作が非常に簡便である。したがって、100検体以上の多数検体を一度に処理する施設には後述のように精度を勘案しても、適していると考えられる。また、工程全体が、自動化にじみやすく、自動化を考慮する場合に期待がもたれる。ピペット操作も、全工程を通じ、2回と少ないでの、非常に簡便かつ、ピペット操作による誤差が少なくなる。

精度に関しては、キット内、キット間の再現性、希釈試験、回収試験、CPBA法との相関、おののの相関の検討を行なった。両キット共、キット内の再現性試験で10%以下、キット間の再現性試験では15%以下におさまり、臨床使用上満足すべき結果であった。特に、T-4 リアキット II

においては、キット内変動係数5%以下、キット間においても10%以下におさまり、精度の維持には好ましい結果であった。希釈試験は両キット共、0に収束する直線が得られ、回収試験も両キットとも、ほぼ同じ回収率を得、共に良好であった。CPBA法のレゾマット T-4との相関はスパック T-4, T-4 リアキット IIとも強いが(相関係数rは0.80と0.79)、双方共低値および正常値では、CPBA法のレゾマット T₄の値よりやや高い値となり、亢進症ではやや低い値となった。

スパック T-4とT-4 リアキット IIとの相互の相関も強く(相関係数rは0.92)、しかも測定値のキットによる差がほとんどみられない。また、正常者の平均値、およびその値の広がりの範囲も両キットとも、ほぼ等しい。このことから正常値の範囲を等しく設定でき、臨床使用上非常に好ましいことと考えられる。

両キット共、正常者と低下症者との分離はよいが、正常者と機能亢進症者との分離はスパック T-4よりT-4 リアキット IIの方が良好であった。

VI. 結 論

- 1) スパック T-4, T-4 リアキット II とも操作が非常に簡便であるが、スパック T-4の方が一層簡便である。
- 2) 精度は、両者とも満足すべき結果を得たが、T-4 リアキット IIの方が再現性においてやや良好であった。
- 3) 両者の相関は非常に強く、測定値もほぼ等しく、キットによる差がきん少になった。したがって、正常値の範囲も等しく設定できた。

文 献

- 1) Murphy BEP, Pattee CJ: Determination of thyroxine utilizing the property of protein binding. *J Clin Endocrinol Metab* **24**: 187, 1964
- 2) Chopra IJ, et al: *J Clin Endocrinol Metab* **34**: 938, 1972
- 3) 入江 実, 飯尾正宏: RI インビトロ検査, 日常検査シリーズ13, 医学書院, 1977, p. 9
- 4) a) 科研化学K.K.: T₄ PEG リアパック使用説明書

- b) ダイナボット RI 研究所: α フェト・リアキット
II 使用説明書
- c) 栄研 I.C.L. : コルチゾール '栄研' 使用説明書
- 5) a) トラベノールパシフィック K.K. : ガンマーニー
ト T₃ アップテイク使用説明書
- b) 第一 RI 研究所: スパック T-3 使用説明書