

《ノート》

固相法 radioimmunoassay kit 「GammaCoat FT₄」 による 遊離サイロキシン測定の基礎的検討と臨床応用

Evaluation of a Solid-phase radioimmunoassay Kit for Free Thyroxine, GammaCoat FT₄

小西 淳二* 高坂 唯子* 飯田 泰啓* 笠木 寛治*
池窪 勝治* 中川 毅** 鳥塚 莞爾*

Junji KONISHI*, Tadako KOUSAKA*, Yasuhiro IIDA*, Kanji KASAGI*,
Katsuji IKEKUBO*, Tsuyoshi NAKAGAWA** and Kanji TORIZUKA*

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

**Department of Radiology, Mie University School of Medicine, Tsu

I. はじめに

血中サイロキシン (T₄) の大部分は T₄ 結合グロブリン (TBG) を主とする T₄ 結合蛋白に結合しており、そのごく一部分のみが遊離型として存在する。この微量の遊離 T₄ (FT₄) が細胞内に入りホルモン作用を発現するものと考えられ、甲状腺の機能状態を最もよく反映する指標とされている。しかしこれまで、FT₄ の測定に用いられた平衡透析法¹⁻³⁾、限外濾過法⁴⁾あるいはゲル濾過法⁵⁾などはいずれも手技が煩雑であるため、日常検査として用いられるには至っていない。これに代わるものとして臨床上是総 T₄ 濃度と T₃ 摂取率より計算される遊離サイロキシン指数 (free thyroxine index, FT₄I) が用いられてきた^{6,7)}。最近, radioassay を用いる FT₄ 測定法が 2, 3 開発されており, 少量の血清で, 簡便かつ短期間に測定が行なえるものとして注目されている。今回, われわれは

GammaCoat Free T₄ radioimmunoassay (RIA) Kit (日本トラベノール社) を試用する機会を得たので若干の基礎的検討を行なうとともに従来の FT₄I, 平衡透析法との比較など, その臨床の有用性に関する検討を行なった。

II. 測定原理および測定方法

本法の測定原理は抗体でコートされた試験管 (固相化抗体) を用いる RIA で, 血清を試験管に加えて血中の FT₄ 分画を結合させた後, 内容を除く。次いで ¹²⁵I-T₄ を加えて抗体に結合した T₄ と競合させ, その結合率を求めて, 標準曲線より FT₄ 濃度を得るものである。

測定方法は以下のごとくであり, その概要を Fig. 1 に示した。

- 1) 標準血清あるいは被験血清 50 μ l と incubation buffer 1 ml を抗体試験管に加え, 振盪混和する。
- 2) 37°C の温浴中に入れ, 20 分間インキュベイトする (第 1 インキュベーション)。
- 3) 試験管内容を吸引除去する。
- 4) incubation buffer 1 ml を加えて試験管を洗

Key words: free thyroxine, radioimmunoassay, free thyroxine index, equilibrium dialysis

* 京都大学医学部放射線核医学科

** 三重大学医学部放射線科

受付: 55 年 2 月 14 日

最終稿受付: 55 年 4 月 11 日

別刷請求先: 京都市左京区聖護院川原町 (☎ 606)

京都大学医学部放射線核医学科

小西 淳二

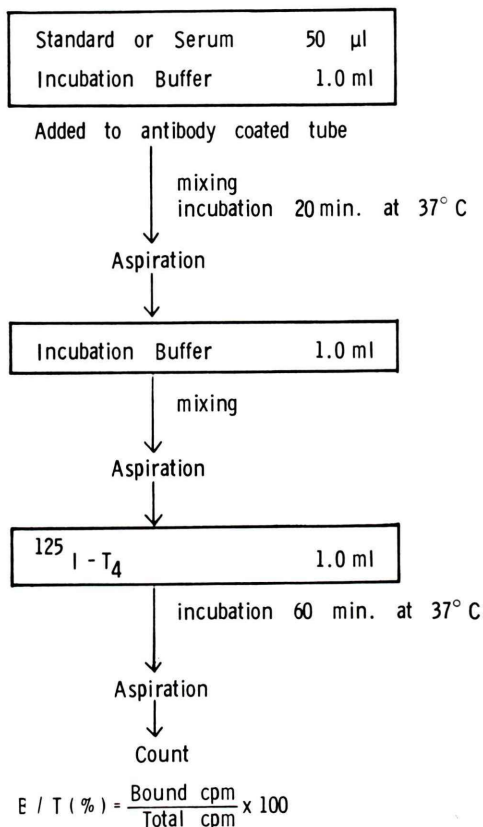


Fig. 1 Assay procedure of GammaCoat free T_4 RIA.

浄する.

- 5) $^{125}\text{I} - \text{T}_4$ 溶液を 1 ml/ 加えて振盪混和する.
- 6) 37°Cの温浴中に入れ60分間インキュベートする(第2インキュベーション).
- 7) 内容液を捨て試験管の放射能を測定する.
- 8) 標準血清について得られたカウントより標準曲線を描き, 被験血清の FT_4 値を求める.

III. 実験方法および実験対象

本測定法に関する基礎検討として, インキュベーションの温度, 時間, 測定値の精度再現性, および抗体の交叉反応性を検討した.

臨床的有用性については健常者45例, 甲状腺機能亢進症32例, 甲状腺機能低下症18例, 正常妊婦14例, TBG 減少症4例, 肝硬変症12例, 急性肝炎7例および慢性腎不全9例の計141例の血中

FT_4 を測定し, 甲状腺機能との関連を検討した. また, 同じ対象者について GammaCoat T_4 RIA キットを用いて得た総 T_4 濃度と GammaCoat T_3 Uptake による T_3 摂取率を掛け合わせて FT_4 を求め, 本測定法による FT_4 値との相関をみた. さらに一部の症例では Corning 社の IMMOPHASE free T_4 RIA キットによる測定値および平衡透析法による測定値との比較検討を行なった. なお, 平衡透析は Sterling らの方法¹⁾に以下のような改良を加えて行なった. すなわち緩衝液としては磷酸緩衝生食水を用い, $^{125}\text{I} - \text{T}_4$ は人血清アルブミンと混合して予め透析精製したものを用いた. また, 平衡透析後の処理にはマグネシウム沈殿法の代わりにプール血清を添加して TCA により沈殿させる方法を用いた.

IV. 結果

1. 基礎的検討の成績

1) インキュベーションの温度 第1インキュベーションの温度を 4°C, 室温 (25°C) および 37°C としたときの標準曲線の変化を Fig. 2 に示した. 4°C では標準曲線の勾配が緩やかであり, 規定の 37°C で最も感度のよい標準曲線が得られた.

次に, 第1反応は規定どおりとし, $^{125}\text{I} - \text{T}_4$ との第2反応の温度を同様に 4°C, 室温および 37°C

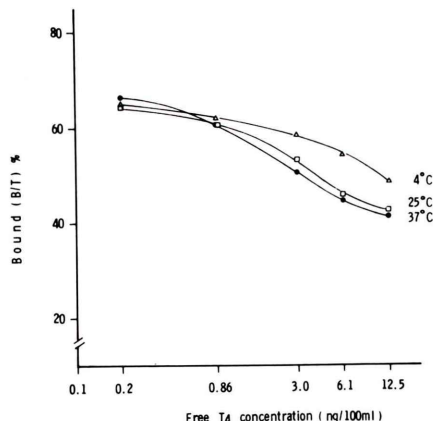


Fig. 2 Effect of temperature during the first incubation on the standard curve.

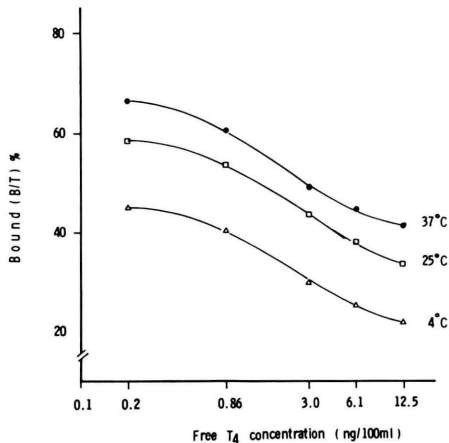


Fig. 3 Effect of temperature during the second incubation on the standard curve.

と変化させたときの標準曲線は Fig. 3 に示すごとくである。すなわち、第 2 反応では温度の上昇とともに標準曲線の結合率はほぼ平行して上昇しており、カウントの多い 37°C が最も有利と考えられた。

2) インキュベーション時間 第 1 インキュベーションを 37°C で 5, 10 および 30 分間としたときの標準曲線の変化を Fig. 4 に示した。5 分間では高値域での結合率の低下が不十分であるが、10 分と 30 分ではほとんど差が認められず、規定の 20 分で十分と考えられた。

同様に、第 2 インキュベーションの温度を 37°C として、時間を 30, 60 および 120 分としたときの標準曲線の変化を Fig. 5 に示した。30 分では勾配が緩やかであるのに対し、60 分と 120 分ではほぼ同様の勾配を有する標準曲線が得られた。従って規定の 60 分以上であればよいと考えられた。

3) 抗体への T₄ の結合に及ぼす TBG 結合 T₄ の影響 本アッセイ系では抗体試験管への T₄ の結合が FT₄ を反映すると考えているが、これが TBG 結合 T₄ の多寡により影響されないかどうかを検討した。すなわち、甲状腺機能正常の妊婦血清 (T₄ 12.9 µg/100 ml, TBG 51.9 µg/ml) と TBG 減少症の血清 (T₄ 2.4 µg/100 ml, TBG 2.9 µg/ml) の 2 つの血清を用いて、第 1 インキュベーションにお

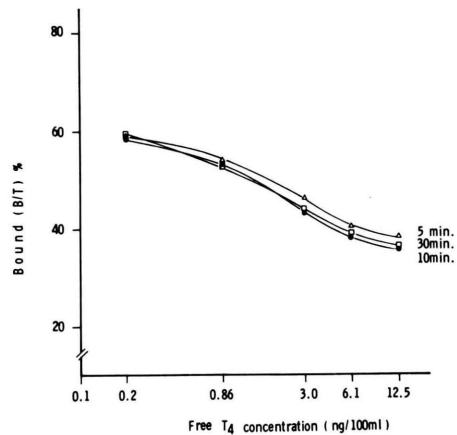


Fig. 4 Effect of the first incubation time on the standard curve (at 37°C).

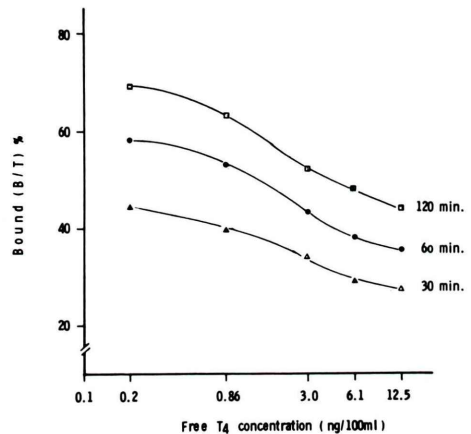


Fig. 5 Effect of the second incubation time on the standard curve (at 37°C).

ける抗体試験管への T₄ の結合の時間経過を比較した。Fig. 6 は第 2 インキュベーション後の ¹²⁵I-T₄ の結合率でその経過を示したものであるが、TBG 結合 T₄ 濃度に著明な差があるにもかかわらず、両血清よりの T₄ の抗体試験管への結合は近似しており、かつ、20 分までのインキュベーション経過中はほぼ平行している。この成績より本アッセイ系による FT₄ 測定値に対し TBG 結合 T₄ の相違は明らかな影響を及ぼさないものと考えられた。

4) 交叉反応 用いられている抗体の特異性を検討するため、FT₄ が 0 の標準血清に、L-T₄,

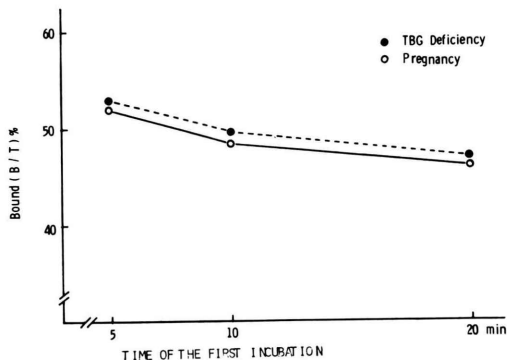


Fig. 6 Effect of the first incubation time on ^{125}I -T₄ bound (%) using 2 sera from euthyroid subjects with either low or high TBG concentration.

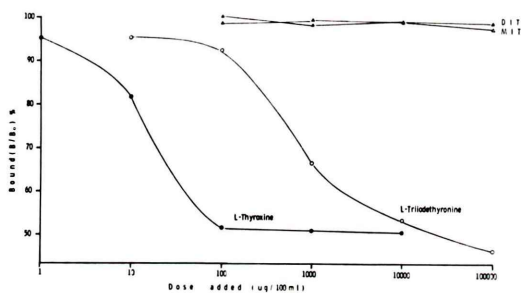


Fig. 7 Cross-reactivity of various agents against anti-T₄ antibody.

L-T₃ および MIT, DIT を種々の濃度で添加して ^{125}I -T₄ の結合に及ぼす影響を検討した (Fig. 7). 特異的結合の50%に抑制される濃度より計算した T₃ との交叉反応は 3.1% であったが, MIT および DIT では全く結合阻害が認められなかった.

5) 精度および再現性 FT₄ 濃度が低値, 正常値および高値の3血清について同一アセイ内で10回, 異なるアセイで6回, それぞれ測定をくり返した時の再現性は Table 1 に示すごとくである.

同一アセイ内での変動係数は 6.5~7.1% であり, 異なるアセイでの変動係数は 7.1~12.5% といずれも良好であった.

2. 臨床測定の成績

1) 健常者および各種疾患患者における FT₄ 測定成績 Fig. 8 に臨床例における血中 FT₄ 濃度の

Table 1 Precision and reproducibility estimated with three pooled sera.

Sample No.	Intra-assay (N=10)			Inter-assay (N=6)		
	1	2	3	1	2	3
Mean	1.66	2.91	4.68	1.68	3.02	4.82
S.D.	0.11	0.19	0.33	0.21	0.37	0.34
C.V. (%)	6.6	6.5	7.1	12.5	12.3	7.1

測定成績を示す. 健常者45例中20~50歳の26例では 0.97~2.1 ng/100 ml/ に分布し, 平均 1.50 ± 0.29 (SD) ng/100 ml/ であった. 正常域として平均値 ± 2 SD をとると 0.92~2.1 ng/100 ml/ となる. 15歳以下の若年者では 1.95 ± 0.42 と有意に高値を示した ($p < 0.001$). 一方70歳以上の高齢者では壮年者群と差がみられなかった.

甲状腺機能亢進症 32 例では 2.9~6.9 ng/100 ml/ と全例高値を示した. 一方, 甲状腺機能低下症18例では 0~0.72 ng/100 ml/ と全例低値を示し, いずれも壮年健常者群との間に重なりは全くみられなかった.

妊婦14例では 1.09~1.86 ng/100 ml/ に分布し, 全例正常範囲内であった.

TBG 減少症 4 例では 1.03~1.36 ng/100 ml/ であり, いずれも正常低値域に分布した.

肝硬変症12例では 1.12~2.3 ng/100 ml/ で1例を除き正常範囲内にあった. 急性肝炎 7 例はいずれも正常値を示した. 慢性腎不全の 9 例はわずかに低値のものから高値のものまで広い分布を示した.

2) FT₄I との関係 同じ対象者について総 T₄ 濃度および T₃ 摂取率を測定して FT₄I を算出した結果を Fig. 9 に示した. 健常者壮年群における平均値とその標準偏差より GammaCoat T₄ RIA および GammaCoat T₃ Uptake による FT₄I の正常値は 7.1~11.8 と考えられた. 甲状腺機能亢進症および甲状腺機能低下症の分布では, 先の FT₄ の場合と同様正常域との重なり合いがみられず両者の健常群よりの分離は良好であった.

しかし, 妊婦では 14 例中 5 例が低値を示し, TBG 減少症では 4 例中 3 例が低値となっている. 肝硬変症でも12例中10例が低値を示し, 急性肝炎

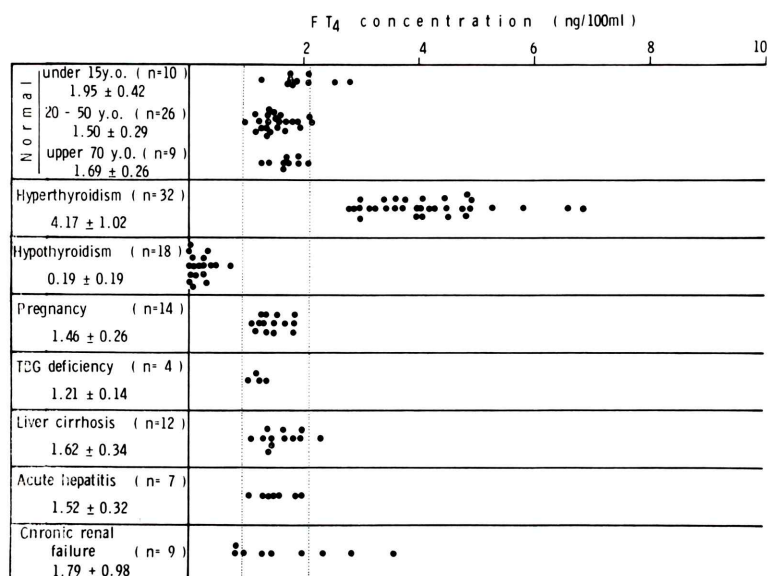


Fig. 8 Serum free T₄ concentration in various physiological and pathological conditions.

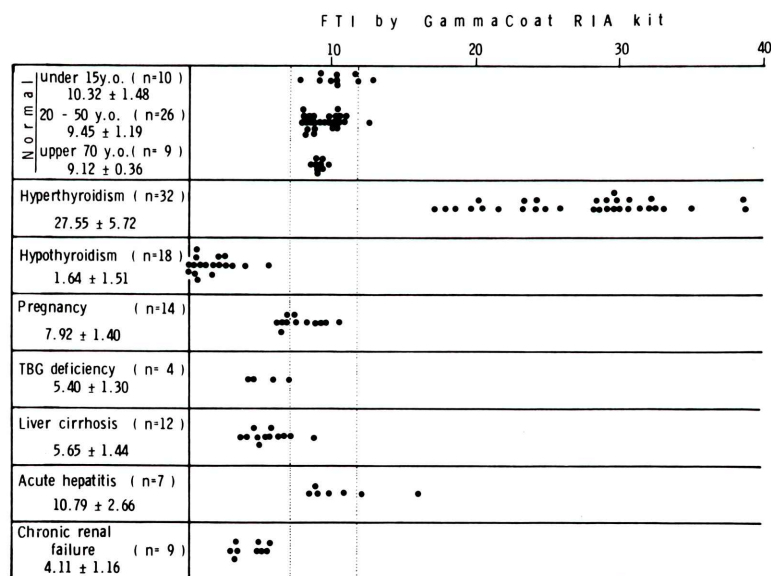


Fig. 9 Distribution of free thyroxine index in the same subjects under various physiological and pathological conditions as in Fig. 8.

では7例中2例が高値であった。慢性腎不全9例は全例低値であった。

対象症例における FT₄I と FT₄ 値との関係を Fig. 10 に示した。上述のごとく、TBG やその他

の血清蛋白に異常をきたすような種々の病態下では FT₄I がしばしば異常値となったのに対し、FT₄ 値は腎不全の場合を除いて、このような疾患でも正常範囲にあることが明らかに認められる。

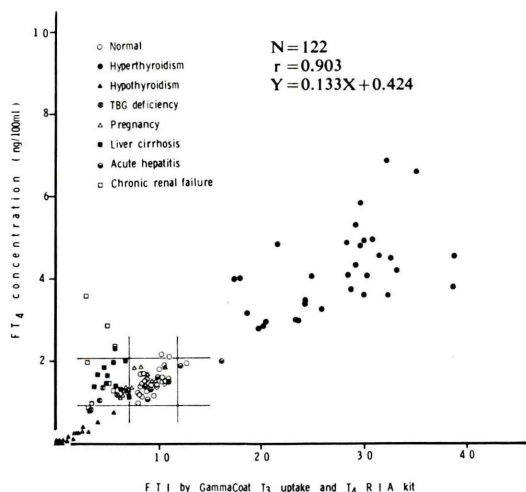


Fig. 10 Correlation between free thyroxine index and free T_4 concentration measured by Gamma-Coat RIA kit.

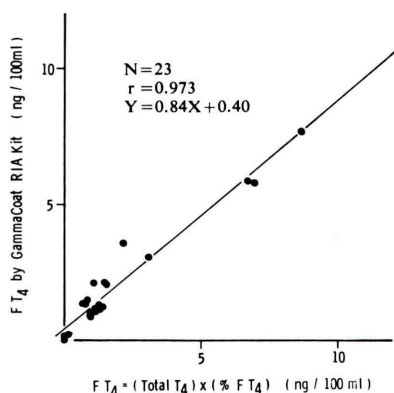


Fig. 11 Correlation between free T_4 values by equilibrium dialysis and those by GammaCoat RIA kit.

なお、全体として FT_4I と FT_4 との間には $r=0.903$ の良い正相関が認められた。

3) 平衡透析法による FT_4 値との関係 23例について平衡透析法による FT_4 の測定を行い、本キットによる測定値との関係を検討した。Fig. 11に示すごとく両者の間にはきわめて良好な正相関が認められた ($r=0.973$)。

4) IMMOPHASE FT_4 測定キットによる測定値との比較 Corning 社の IMMOPHASE FT_4

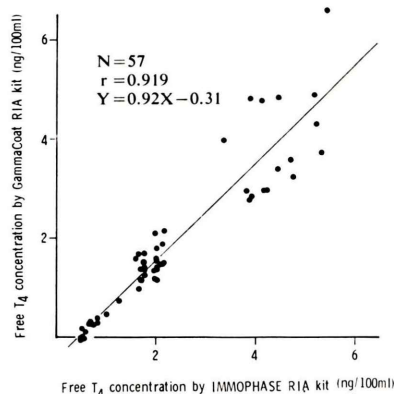


Fig. 12 Correlation between free T_4 values by Gamma-Coat RIA kit and those by IMMOPHASE RIA kit.

キットを用いて FT_4 値を測定した57例において、両測定値の関連をみると Fig. 12 に示すごとくで、両者の間には $r=0.919$ の良好な正相関が認められた。しかし、回帰直線は $Y=0.92X-0.31$ となり、絶対値においては IMMOPHASE キットによる測定値が、GammaCoat キットの値に比べ高値となる傾向が認められた。

V. 考 察

血中の FT_4 はきわめて微量であるうえ、大量の蛋白結合型 T_4 と平衡関係を保って存在しているため、その測定には独得の工夫が必要である。従来、 FT_4 を RIA にて測定しようとする試みとしては、平衡透析を行ない、その外液中の T_4 を測定する方法が行われてきた^{8,9)}。しかし、平衡透析は手技が煩雑であるため、より直接的な方法の開発が進められ、最近 2, 3 の方法がキット化されるに至った。今回検討した GammaCoat キットでは第 1 反応で固相化抗 T_4 抗体に FT_4 を結合させ、次いで第 2 反応で $^{125}I-T_4$ と競合させるという方法を用いており、その測定操作はきわめて簡単で短時間に測定が可能となっている。

測定法に関する基礎的検討では、先ずインキュベーションの温度は規定の $37^{\circ}C$ が最も良く、時間についても規定どおり第 1 インキュベーション

20分、第2インキュベーション60分で良好な標準曲線が得られた。

上述のような原理に基づいてFT₄を測定しようとする場合、FT₄が抗体に結合するにつれて蛋白に結合したT₄が解離してくるものと考えられる。そこで血清中の結合型T₄の多寡がFT₄測定値に影響を及ぼさないかどうかについて、TBG減少症および妊婦の血清を用いて検討したが、第1インキュベーションを長くしても、第2インキュベーション時の¹²⁵I-T₄結合率は両血清で平行しており、TBG結合T₄の影響はみられなかった。

抗T₄抗体の特異性の検討では、T₃との間に3.1%の交叉反応がみられたが、血中T₃濃度がT₄濃度の約1/100である点より临床上は全く問題とならないといえる。

測定の精度、および再現性はいずれも満足すべきものであった。

そこで、臨床例についての測定を行ない、測定値の妥当性について検討を加えた。

20～50歳の健常者におけるFT₄濃度は1.50 ± 0.29 (SD) ng/100 ml で、正常域は0.92～2.1 ng/100 ml と考えられたが、15歳以下の若年者では高値の傾向がみられた。

甲状腺機能亢進症では2.9 ng/100 ml 以上、機能低下症では0.72 ng/100 ml 以下であり、いずれも健常者との重なり合いは全くみられなかった。

臨床的に甲状腺機能正常の妊婦では全例正常値を示し、一方TBG減少症患者では正常低値域に分布していた。そのほかTBGあるいは、その他の血清蛋白異常を呈する急性肝炎、肝硬変症なども概ね正常域にあったが、慢性腎不全では高値を示すものがみられた。

同じ対象者について、T₄とT₃摂取率より求めたFT₄IとFT₄値との間には全体として良好な正相関が認められた。しかし、FT₄Iでは機能亢進症および低下症の分離はFT₄値の場合と同様良好であったが、妊婦やTBG減少症では低値となるものが多く、肝硬変症や慢性腎不全などでは大部分が低値を示し、明らかにFT₄値の方が甲状腺機能状態をよく反映していると考えられた。

従来より用いられてきた平衡透析法でのFT₄測定値と本法による測定値の間には相関係数0.973ときわめて良好な正相関が認められた。平衡透析法による14例（男6例、女8例）の健常者のFT₄値は1.10 ± 0.18 ng/100 ml であり本法の正常値はこれよりやや高値であったが各種疾患状態を含め両測定値はよく平行しているといえる。なお平衡透析を行なって外液中のFT₄をRIAにより測定する方法では0.76⁸⁾あるいは0.83 ng/100 ml⁹⁾の値が報告されており、FT₄の絶対値は測定法により一致していない。本法とはやや異なった原理でFT₄値を測定しようとするCorning社のIMMOPHASEキットでの値と本法による値との比較では、両者の間に良好な正相関がみられたが、本キットの測定値がIMMOPHASEに比べ明らかに低値であった。このようにRIAキット間でも測定法の相違により値に違いがみられる点も今後の検討課題である。

VI. 結 論

GammaCoat RIA キットによる血中FT₄濃度の測定について基礎的ならびに臨床的検討を行ない以下の成績を得た。

- 1) 規定の温度、時間条件で良好な標準曲線が得られ、測定の精度、再現性も満足すべきものであった。
- 2) 抗体の特異性は高く、測定値はTBG結合T₄の量に影響されなかった。
- 3) 本キットによる健常者のFT₄値は1.50 ± 0.29 ng/100 ml で甲状腺機能亢進症および低下症患者における値との重なり合いは全くみられなかった。
- 4) 妊婦、急性肝炎などTBG増加を示す場合にも正常値を示し、TBG減少症では正常低値域であった。これらTBG異常を伴う場合を含め、本法による測定値は同じ対象者におけるFT₄Iに比べて、甲状腺機能をよりよく反映していた。
- 5) 本法による測定値は平衡透析法によるFT₄値と良好な正相関(r=0.973)を示した。
- 6) 本キットによるFT₄値はIMMOPHASE

RIA キットによる値に比し低値であった。

以上のごとく本法は簡便かつ迅速に再現性のよい測定が行なえ、その測定値は従来の平衡透析法による値と相関して、甲状腺機能を良く反映していたことより、臨床的に有用な測定法と考えられる。

文 献

- 1) Sterling K, Brenner MA: Free thyroxine in human serum: Simplified measurement with the aid of magnesium precipitation. *J Clin Invest* **45**: 153-163, 1966
- 2) Oppenheimer JH, Squef R, Surks MI, et al: Binding of thyroxine by serum proteins evaluated by equilibrium dialysis and electrophoretic techniques. Alterations in nonthyroidal illness. *J Clin Invest* **42**: 1769-1782, 1963
- 3) Ingbar SH, Braverman LE, Dawber NA, et al: A new method for measuring the free thyroid hormone in human serum and an analysis of the factors that influence its concentration. *J Clin Invest* **44**: 1679-1689, 1965
- 4) Schussler GC, Plager JE: Effect of preliminary purification of ^{131}I -thyroxine on the determination of free thyroxine in serum. *J Clin Endocr* **27**: 242-250, 1967
- 5) Lee ND, Henry RJ, Golub OJ: Determination of the free thyroxine content of serum. *J Clin Endocr* **24**: 486-495, 1964
- 6) Clark F, Horn DB: Assessment of thyroid function by the combined use of the serum protein-bound iodine and resin uptake of ^{131}I -triiodothyronine. *J Clin Endocr.* **25**: 39-45, 1965
- 7) Hamada S, Nakagawa T, Mori T, et al: Re-evaluation of thyroxine binding and free thyroxine in human serum by paper electrophoresis and equilibrium dialysis, and a new free thyroxine index. *J Clin Endocr* **31**: 166-179, 1970
- 8) Jiang N, Tue KA: Determination of free thyroxine in serum by radioimmunoassay. *Clin Chem* **23**: 1679-1683, 1977
- 9) Yeo PPB, Lewis M, Evered DC: Radioimmunoassay of free thyroid hormone concentrations in the investigation of thyroid disease. *Clin Endocr* **6**: 159-165, 1977
- 10) 池窪勝治, 高坂唯子, 小西淳二, 他: IMMOPHASE キットによる血中遊離サイロキシン濃度の測定について. *ホルモンと臨床* **28**(10) 掲載予定