

《ノート》

Radioimmunoassay による血中 Free Thyroxine 量の測定

A Radioimmunoassay for Serum Free Thyroxine Concentration

今関 恵子* 堀田とし子* 川名 正直* 有水 昇*
 内山 曜** 国安 芳夫*** 中島 道也****

Keiko IMAZEKI*, Toshiko HOTTA*, Masanao KAWANA*, Noboru ARIMIZU*,
 Guio UCHIYAMA**, Yoshio KUNIYASU*** and Michiya NAKAJIMA****

*Department of Radiology, Chiba University, School of Medicine, Chiba, Japan

**Department of Radiology Chiba University Hospital

***Department of Radiology Teikyo University, School of Medicine, Tokyo, Japan

****Mito Saiseikai Hospital

I. はじめに

血清中の遊離サイロキシン量 (FT₄) は甲状腺機能状態を最もよく反映する指標の1つと考えられている^{1,2)}。その濃度は総T₄量の0.1%以下であり、従来、平衡透析法³⁾や限外濾過法などによって測定されていた。しかし、これらの測定は、いずれも煩雑で長時間を要するために、ルーチン検査として普及するに至らず、正確かつ迅速に測定できる方法の開発が望まれていた。最近、コーニング社より FT₄ の固相法による FT₄ の Radioimmunoassay キットが開発された。著者らは、このキットを使用する機会を得たので、その基礎的検討を行うとともに、FT₄ Index、他の甲状腺機能検査法と比較し、臨床使用上の有用性を検討した。

II. 測定原理および方法

本法は、Kinetic rate reaction⁴⁾ を原理とする固

相法の RIA 法である。即ち T₄ 特異抗体を小さな孔をもつガラス粒子に結合させ、これと T₄-抗 T₄ 抗体複合物を沈澱させるものである。

FT₄ の測定は原則としてキットの指示通り⁵⁾を行った。その概略を Fig. 1 に示す。キットは FT₄ 測定系 (A シリーズ) と total T₄ (TT₄) 測定系 (B シリーズ) から成る。まず $\frac{B \text{ bound}}{\text{total}} (\%)$ により TT₄ の標準曲線を作成し、TT₄ 濃度を読みとる。次に、得られた TT₄ に $\frac{A \text{ bound}}{\text{total}}$ を乗じて得た値により、別に作成した FT₄ 標準曲線から、未知検体の FT₄ 濃度を読みとった。これらの検体に対し同時に IMMOPHASE TBG・RIA キットを用いて、血中 TBG を測定し、 $\frac{\text{TT}_4 (\text{ng/ml})}{\text{TBG} (\mu\text{g/ml})}$

より FT₄ Index を求めた。又、一部検体については、トラベノール社製 Gammacoat T₄ キットによる FT₄ 値をも測定し比較を行った。さらに従来の T₄・RIA キット (Thyrotest.4.RIA) による測定値とも比較を行った。

III. 対 象

測定は95例について行った。その内訳は、千葉大学病院放射線科を受診した甲状腺機能亢進症

Key words: Free Thyroxine, Radioimmunoassay, Free T₄ Index, Kinetic rate Reaction TBG.

* 千葉大学放射線医学教室

** 同 放射線部

*** 帝京大学放射線医学教室

**** 水戸済正会病院

受付：55年1月23日

最終稿受付：55年7月7日

別刷請求先：千葉市亥鼻1-8-1 (番280)

千葉大学医学部放射線医学教室

今 関 恵 子

Assay Procedure

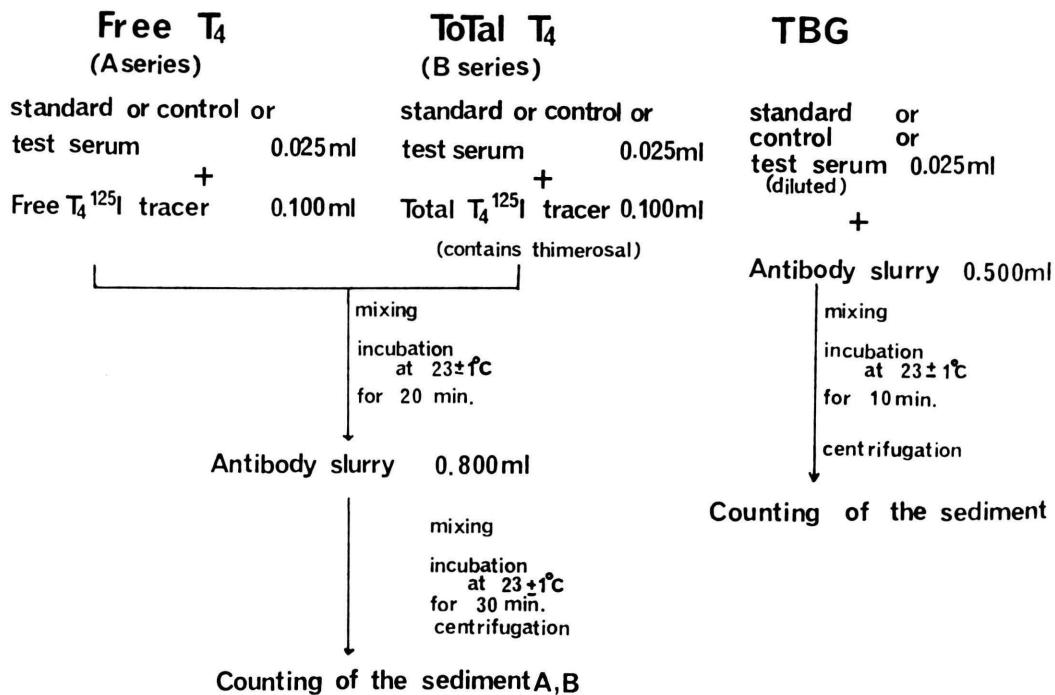


Fig. 1 Assay procedur of IMMOPHASE Free T₄ RIA kit.

(Hyperthyroid) 20例、甲状腺機能低下症 (Hypothyroid) 10例、Euthroid 状態にある各種甲状腺疾患35例（内訳は薬剤治療中16例、単純性甲状腺腫7例、結節性甲状腺腫4例、亜急性甲状腺炎1例、慢性甲状腺炎7例）と妊婦2例（その他）及びコントロールとしては放射線技師学校学生 volunteer を主とする健常人28例であった。

IV. 測定結果

A. 基礎的検討

1) インキュベーション時間の影響

a) Aシリーズ (FT₄測定系) の標準曲線に対する第2インキュベーション時間の影響 (Fig. 2).

第1インキュベーション時間を20分と固定した場合、第2インキュベーション時間10分では全体に結合率が低く、平坦な標準曲線が得られた。第

2 インキュベーション時間30分～60分では、曲線の差異はほとんどなく一致した良好な標準曲線が得られた。即ち第2インキュベーション時間は30～60分が適当と考えられた。

b) FT₄ rate に対する第1インキュベーション時間の影響 (Fig. 3)

キット添付のコントロール血清を使用し、第2インキュベーション時間を30分と固定した場合、Fig. 3 の如く、第1インキュベーション時間5分～30分では FT₄ rate に大きな差異は見られなかった。

c) FT₄ rate に対する第2インキュベーション時間の影響 (Fig. 4)

Bシリーズ (Total T₄測定系) 及び Aシリーズ (FT₄測定系) における第1インキュベーション時間は常法通り20分とし、Aシリーズの第2インキ

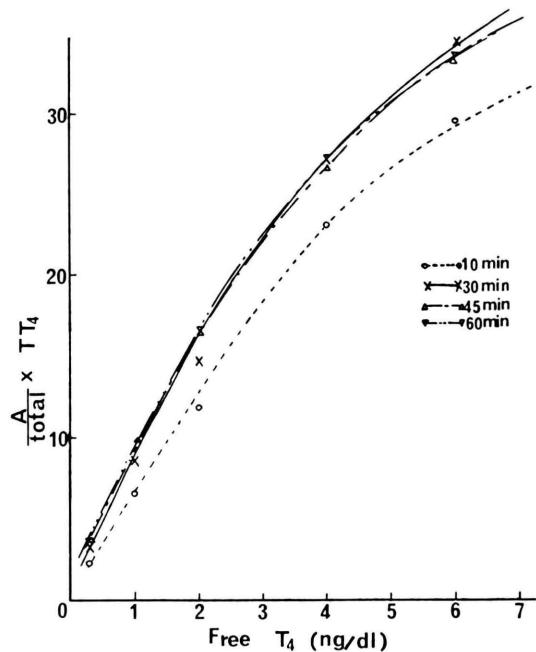


Fig. 2 Effects of secondincubation time on standard curve (at 23°C)

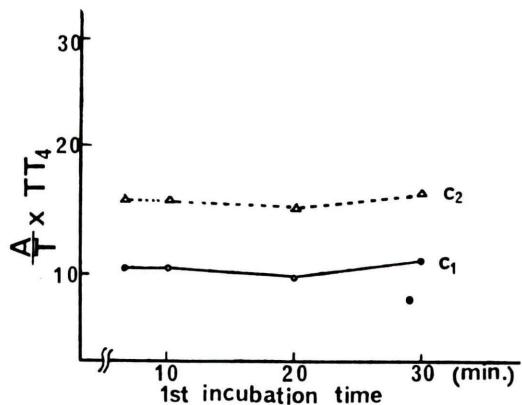


Fig. 3 Effects of first incubation time on FT₄ rate.

ュベーション時間のみを変えて検討を行った。時間の延長にともない、FT₄ rate は上昇する傾向にあった。30分～60分でその上昇の度合は非常にゆるやかではあったがやはり第2インキュベーション時間は指示通り正確に行うことが望ましい。

2) 精度及び再現性

FT₄ 濃度の異なる 3 血清について 7 回繰り返し

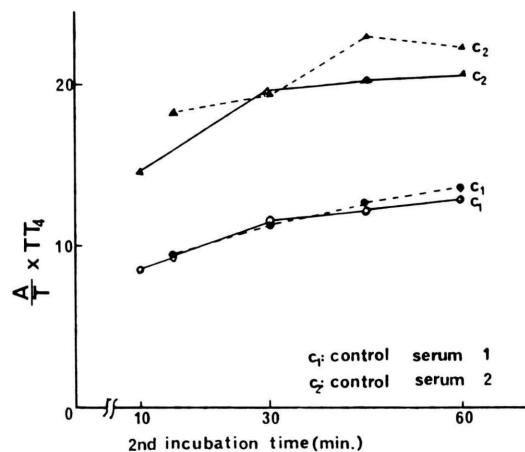


Fig. 4 Effects of secondincubation time on FT₄ rate in sample.

Table 1 Within-assay precision

Case	1 F-T ₄	2 concentration (ng/dl)	3
1	1.7	1.6	4.7
2	1.7	1.8	4.4
3	1.7	1.9	4.6
4	1.6	1.8	4.0
5	1.7	1.9	4.0
6	1.6	1.7	4.3
7	1.5	1.8	4.1
Mean ng/dl	1.6	1.8	4.3
SD	0.09	0.10	0.28
CV (%)	5.6	5.6	6.5

測定をした際の測定結果を Table 1 に示す。変動係数 5.6%～6.5% と良好であった。異なった Assay に於て 6～7 回測定した際の測定結果は Table 2 に示すとく変動係数 5.6～11.0% と良好であった。

3) 回収率試験 (Table 3)

甲状腺機能低下症の血清 (TBG 量 16.0 μg/ml) に FT₄ 標準液の 1, 2, 4, 6 ng/dl を添加した場合の平均回収率は 90.7±8.1% と良好であった。

B 臨床的検討

1) 健常人及び各種甲状腺疾患に於る FT₄ 値 (Fig. 5)

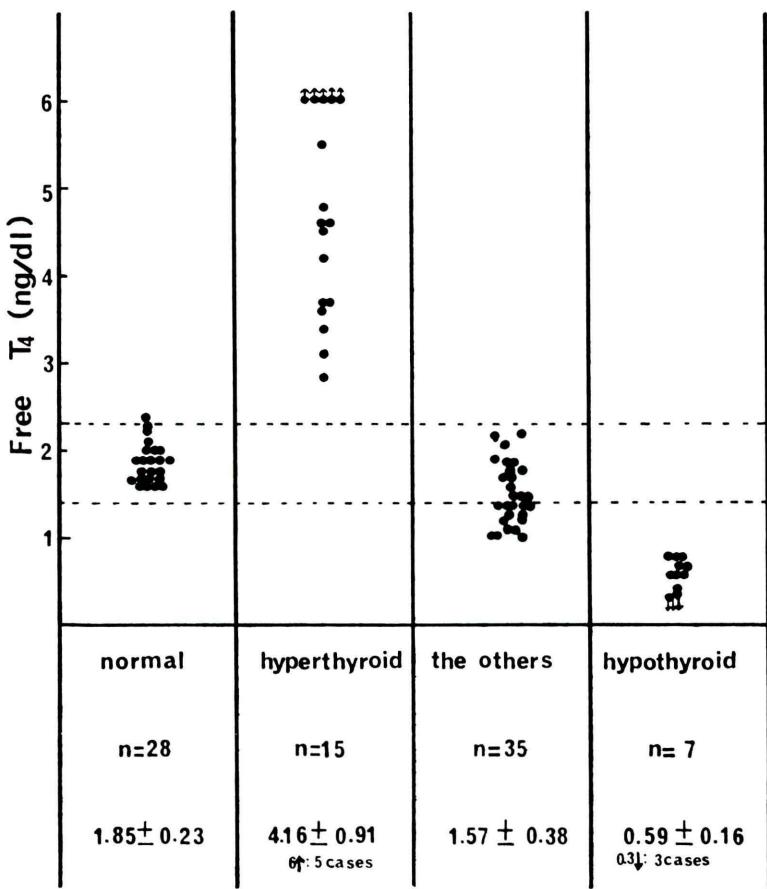
健常者 28 例では、FT₄ 値は 1.6～2.4 ng/dl に分布し、平均値と標準偏差 (S.D.) は、1.85±0.23 ng/dl

Table 2 Between-assay precision

Case	1 F-T ₄ concentration (ng/dl)	2	3
1	1.9	1.7	5.5
2	1.7	1.7	4.3
3	1.7	1.6	4.4
4	1.6	1.5	4.2
5	1.5	1.6	5.0
6	1.5	1.5	5.2
7	1.8	—	5.3
mean dg/dl	1.7	1.6	4.8
SD	0.15	0.09	0.53
CV	8.9	5.6	11.0

Table 3 Recovery study

Added FT ₄ (ng/dl)	FT ₄ Expected (ng/dl)	FT ₄ observed (ng/dl)	Recovery (%)
0	—	1.15	—
1	2.15	2.00	93.0
2	3.15	2.80	88.9
4	5.15	5.16	100.2
6	7.15	5.76	80.6
mean recovery $90.7 \pm 8.1\%$			(sample TBG: 16.0 μg/ml)

**Fig. 5** Serum FT₄ concentration in various thyroid status.

であった。2 S.D. の範囲をとると正常範囲は 1.39~2.31 ng/dl となり、これを外れたものは1例 (2.4 ng/dl) であった。甲状腺機能亢進症20例では

6 ng/dl 以上を示したものが5例、残り15例の平均値±S.D. は 4.16±0.91 ng/dl であった。甲状腺疾患のうち、Euthyroid 状態にあるもの35例では

$1.57 \pm 0.38 \text{ ng/dl}$ であり、機能低下症10例では 0.3 ng/dl 以下を示したものが3例で、7例の平均値 $\pm \text{S.D.}$ は $0.59 \pm 0.16 \text{ ng/dl}$ であった。尚ここに図示しないが妊婦2例の平均値 $\pm \text{S.D.}$ は $2.30 \pm 0.28 \text{ ng/dl}$ であった。

2) FT₄ 値と FT₄ Index との関係 (Fig. 6)

TT₄ (ng/ml) より求めた FT₄ Index と FT₄ との87例における相関図を Fig. 6 に示した。相関係数は 0.944 ($p < 0.01$) と高い正の相関が得られた。回帰直線は $y = 0.343x + 0.123$ であり、ほぼ原点を通る直線が得られた。

3) FT₄ 値と TT₄ 値との関係 (Fig. 7)

他社の RIA キット (Thyrotest RIA) により測定した TT₄ 値とは65例で相関係数 0.893 ($p < 0.01$)、回帰直線 $y = 0.212x - 0.138$ と良好な正の相関がみられた。

4) 他の固相法 RIA キットによる FT₄ 値との関係 (Fig. 8)

本法と同種のリアキット (トラベノール社製) を用いて44例につき測定した結果、両者は相関係

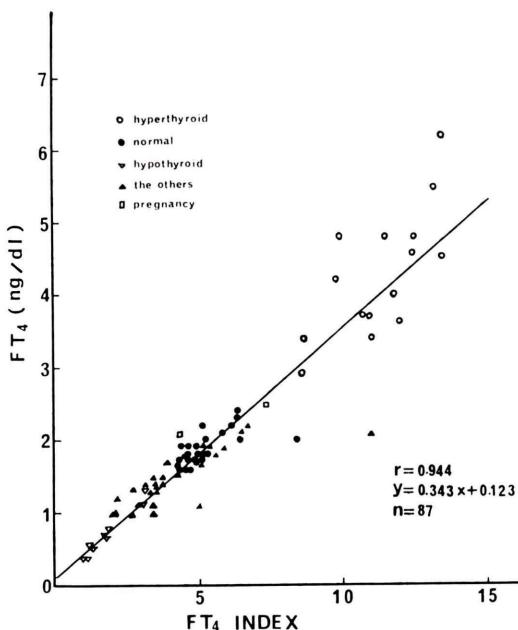


Fig. 6 Correlation of serum FT₄ values with FT₄ Index.

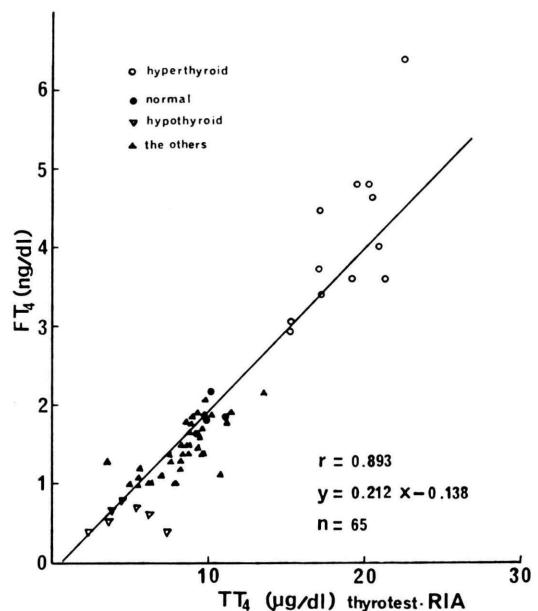


Fig. 7 Correlation of serum FT₄ values with serum TT₄ values by Thyrotest 4. kit.

数 0.925 ($p < 0.01$)、回帰直線 $y = 0.700x + 0.728$ なる高度に有意の相関が得られた。

5) 各種甲状腺機能状態の FT₄ Index 並びに TBG 値 (Table 4)

Table 4 に示す通り、FT₄ Index は28例で正常値 5.2 ± 0.9 となり機能亢進症の 11.2 ± 1.6 及び機能低下症の 1.3 ± 0.5 とは明らかな分離がみられた。TBG 濃度は機能亢進症では $15.5 \pm 2.7 \mu\text{g}/\text{ml}$ と健常人に、ほぼ一致した値を示したが、機能低下症では $27.4 \pm 4.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ と著明な増加が見られた⁶⁾。ここで健常人28例の TBG 値は $16.9 \pm 2.3 \mu\text{g}/\text{ml}$ であり、諸家⁶⁾の報告に比べやや低値を示した。

V. 考 察

甲状腺ホルモンは流血中において大部分がサイロキン結合蛋白と結合しており、その 0.1% 以下が遊離型として存在している。この遊離型 T₄ は甲状腺機能を最もよくあらわす指標の1つと考えられており、1962年 sterling³⁾らにより、その測定に平衡透析法が用いられて以来、限外濾過法、ゲル濾過法⁸⁾など種々の方法が試みられたが、ルー

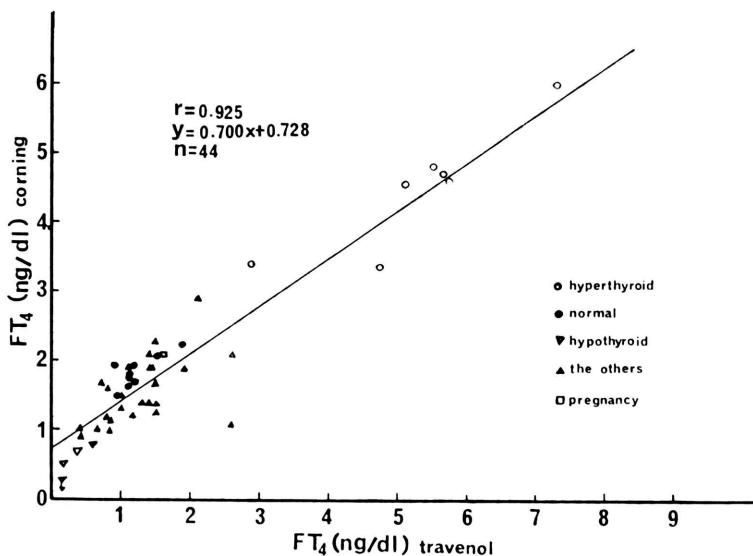


Fig. 8 Correlation of serum FT₄ values by IMMOPHASE RIA kit with those by Gammacoat RIA kit.

Table 4 Serum Free T₄, Free T₄ Index and TBG concentration

	Free T ₄ (ng/dl)		Free T ₄ Index		TBG (μg/ml)	
	n		n		n	
Normal	28	1.85 ± 0.23	28	5.2 ± 0.9	28	16.9 ± 2.3
Hyperthyroid	15	4.16 ± 0.91	13	11.2 ± 1.6	18	15.5 ± 2.7
	except 5 cases: 6 ↑					
Hypothyroid	7	0.59 ± 0.16	8	1.3 ± 0.5	9	27.4 ± 4.5
	except cases: 0.3 ↓					
Pregnancy	2	2.30 ± 0.28	2	5.80 ± 2.12	2	30.6 ± 14.1
The others	35	1.57 ± 0.38	35	4.3 ± 1.1	35	18.6 ± 1.6

チン検査室で使用するに至らなかった。最近になり、Radio immunoassay 法が、FT₄測定に導入され、現在3つの方法が確立されている。1つは Dammon 社の透析膜 microcapsule 法、1つは Travenol 社製 gammacoat T₄ キット、更に1つは今回我々が検討する機会を得た Corning 社の IMMOPHASE FT₄ キットであり、その精度及び、簡便性、かつ臨床使用上の有用性からこれら RIA 法が、FT₄測定の主流をなすものと思われる。

本キットの基礎的検討のうち、Aシリーズ(FT₄測定系)の第2インキュベーション時間については、指示通り(30±5分)正確にする必要があると考えられた。再現性に関してはキット内、キット

間変動のいずれに於ても良好な結果を示し、操作の簡便性及び血清量の僅少性及び測定濃度の微量である点を考慮すると本キットはすぐれた測定法であると思われた。回収試験も良好な結果が得られた。

本法による健常人28例の血清FT₄値は1.85±0.23 ng/dlであり、2 SDをとるとその範囲は、1.39~2.31 ng/dlであった。「機能亢進症」では、20例全例が2.8 ng/dl以上を、「機能低下症」では10例とも0.8 ng/dl以下を示し、3者の間に全く重なりはみられなかった。「その他」では、1.57±0.38 ng/dlと健常者よりやや低値を示した。

IMMOPHASE TBGRIA キットによる健常人

の TBG 値は $16.9 \pm 2.3 \mu\text{g}/\text{ml}$ であり、2 SD をとると $12.3 \sim 21.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ となり諸家の報告⁶⁾より低値を示した。血中 TBG 濃度は年齢⁸⁾、性差⁹⁾により異なるという報告があるが、今回測定に使用した健常者が20歳前後の男性に偏っていた為かさらに検討をする。

本法での FT₄ Index は $\frac{\text{TT}_4 (\text{ng}/\text{ml})}{\text{TBG} (\mu\text{g}/\text{ml})}$ 比を用いて

いる。これは Burr¹⁰⁾ らが従来の FTI より優れた指標であるとしていることによる。FT₄ Index と FT₄ 値とは高い相関が得られたが、TBG 値が低値の慢性甲状腺炎 1 例に相關しない例がみられた。本法による FT₄ 値と TT₄ 値間には相関係数 0.893 と高い相関が得られた。

Gamma coat T₄ RIA キットによる FT₄ 値と本法による値とは相関係数 0.925 と良く相關したが高濃度に於て本法による値がやや低値を示す傾向がみられた。

VI. 結 語

- 1) 本キットの血中 Free T₄ 測定の精度は、キット内、キット間ともに良好であった。
- 2) A シリーズの第 2 インキュベーション時間は常法通り正確に行なうことが望ましい。
- 3) 回収試験の結果は良好であった。
- 4) 本キットに於る健常人 28 例の FT₄ 濃度は $1.85 \pm 0.23 \text{ ng}/\text{dl}$ であり、2SD をとると範囲は $1.39 \sim 2.31 \text{ ng}/\text{dl}$ となった。Hyperthyroid の FT₄ 濃度は $4.16 \pm 0.91 \text{ ng}/\text{dl}$ であり、Hypothyroid によるそれは $0.59 \pm 0.16 \text{ ng}/\text{dl}$ と、健常人の間に完全な分離がみられた。
- 5) 妊婦では 2 例とも FT₄ 値は正常域にあり、甲状腺機能を正しく反映した。

以上より、本キットは簡便かつ短時間に操作可能で、精度もよく、他の甲状腺機能検査とよく相関し、甲状腺機能状態をよく反映し有用な検査法である。

稿を終えるにあたりキットを提供下さったコーニング社に感謝いたします。

文 献

- 1) Robbins J, Rall JE: The Interaction of Thyroid Hormones and Protein in Biological Fluids. Recent Progr Horm Res **13**: 161, 1957
- 2) Robbins J, Rall JE: Proteins Associated with the Thyroid Hormones: Physical Rev **40**: 415 1965
- 3) Sterling K, Brenner MA: Free Thyroxine in human serum: simplified measurement with the aid of magnesium precipitation. J Clin Invest **45**: 153-163, 1966
- 4) Hertl W, Odstrchel G: Kinetic and Theomodynamic studies of Antigen-antibody interaction in Heterogeneous reaction phase-1: Mol. Immunol 173-177, 1979
- 5) Corning, IMMOPHASE Free T₄ RIA kit manual.
- 6) 遠藤啓吾, 笠木寛治, 高坂唯子: Radioimmunoassay による血中 TBG 濃度測定の基礎的検討並びに臨床的意義について. 核医学 **16**: 677-684, 1979
- 7) Lee ND, Henry RJ, Golub OJ: Determination of the free thyroxine content of serum. J Clin Endocr **24**: 486-495, 1964
- 8) Hesch RD, Gatz J, McIntosh CHS, Janzen J, Hehrmann R: Radioimmunoassay of thyroxine-binding globulin in human plasma. Clin Chim Acta **70**: 33, 1976
- 9) Gershengorn MC, Larsen PR, Robbins J: Radioimmunoassay for serum thyroxine-binding globulin-Results in normal subjects and in patients with hepatocellular carcinoma. J Clin Endocrinol Metab **42**: 907, 1976
- 10) Burr WA, Ramsden DB, Evans SE, Hogan T, Hoffenberg R: Concentration of thyroxine-binding globulin-value of direct assay. Brit Med J **19**: 485, 1977