

《ノート》

配位分配サンドイッチ法 (Corning) による TBG ラジオアッセイの検討

Evaluation of TBG Radioassay using Ligand Partitioning
Sandwich Method (Corning)

浅津 正子* 星 賢二* 佐々木康人* 千田 麗子*
小野寺よう子* 関田 則昭* 染谷 一彦*

Masako ASATSU, Kenji HOSHI, Yasuhito SASAKI, Reiko CHIDA, Yohko ONODERA,
Noriaki SEKITA and Kazuhiko SOMEYA

The Third Department of Internal Medicine, St. Marianna University School of Medicine, Kawasaki

I. はじめに

サイロキシン結合グロブリン (Thyroxine Binding Globulin, TBG) は、電気泳動上 α_1, α_2 -グロブリンの中間に出現する分子量約 60,000 の糖蛋白である。血中 TBG 濃度は、肝硬変などの各種病態、妊娠、ある種の薬剤投与により変動し、先天性 TBG 欠損症・増加症も知られている。また、循環血液中のサイロキシン (T_4) とトリヨードサイロニン (T_3) は大部分が TBG と結合しているので、TBG の変動は血中全 T_4 、遊離 T_4 値に影響を与える。

従来、血中 TBG はサイロキシン結合能 (TBG capacity) として間接的に測定されていたが^{1,2)}、1971年に Levyら³⁾のラジオイムノアッセイ (RIA) 法による直接測定法が導入された。以後、いくつかの RIA 法が報告され⁴⁻⁶⁾、わが国でも TBG 測定用 RIA キットが治験されている現状である。われわれは最近 Corning 社の TBG ラジオアッセイ

キットを使用する機会を得たので、その基礎的検討と臨床応用について報告する。

II. 方 法

Corning TBG RIA キット中には、 ^{125}I -サイロキシン (^{125}I - T_4) 放射能 12 μCi 、比放射能 400 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ 、多孔性ガラス粒子に配位結合した抗 TBG 固定化抗体、TBG を 0, 10, 20, 40, 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 含む標準ヒト血清および管理検体が含まれている。測定操作はキットの指定に従った (Fig.1)。標準試料または未知検体中の TBG は全て過剰に存在する抗 TBG 抗体と結合する。ついで、添加した ^{125}I - T_4 は抗体と結合した TBG および緩衝液中の牛血清アルブミン (BSA) と結合する。TBG の量が多い程、抗体-TBG 複合体への ^{125}I - T_4 の結合が増え、BSA との結合に配分される分画が減少する。この方法を配位分配サンドイッチ法 (ligand partitioning sandwich assay) と呼んでいる。検体血清 25 μl をあらかじめ蒸留水で40倍に希釈してから使用する。B と F の分離はガラス粒子を遠沈し、上清をデカントした後、固定化抗体-TBG- ^{125}I - T_4 複合体の放射能を測定する。標準曲線は 0~60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度の TBG に対し $(B - B_0/B_{60} - B_0) \times 100(\%)$ を縦

* 聖マリアンナ医科大学第三内科

受付: 55 年 5 月 19 日

最終稿受付: 55 年 8 月 1 日

別刷請求先: 川崎市高津区菅生2095 (☎ 213)

聖マリアンナ医科大学第三内科

佐々木 康 人

Key words: TBG, Radioassay, T_4 /TBG

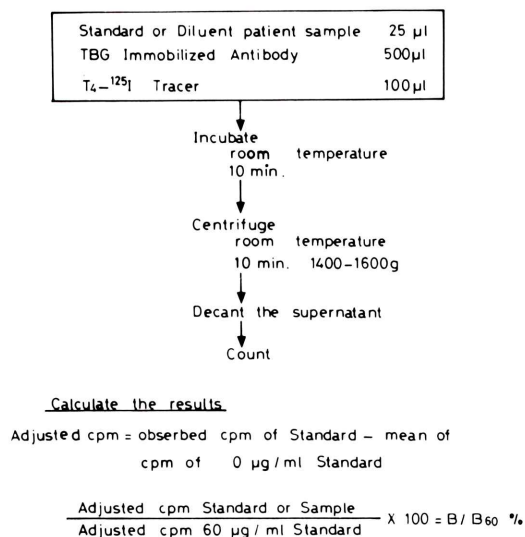


Fig. 1 Method of TBG RIA.

軸にプロットする。キットの評価のために一連の基礎的検討を行った。また、各種疾患における TBG 測定 of 臨床的意義を検討した。

III. 対 象

検討の対象としたのは、正常健康人 44名 (男23, 女21), 甲状腺機能亢進症 74 例 (149 検体), 甲状腺機能低下症 31 (63), 亜急性甲状腺炎 5, 妊婦 9, 肝硬変13, ネフローゼ症候群11, 先天性 TBG 欠損症 2, 合計 189 名, 299 検体である。この他に基礎的検討に供した検体は 2 種の精度管理用コントロール試料を含む 6 種 124 検体である。

IV. 結 果

1) 基礎的検討

a) 標準曲線

10 回の測定で得られた標準曲線の各標準 TBG 濃度の平均値 \pm 1 標準偏差を Fig. 2 に示す。各濃度の変動係数は 1.7~3.3% であった。

b) 再現性

2 種の異なる濃度のコントロール試料をそれぞれ六重測定で14回測定した結果より Within Assay Error と Between Assay Error を Rodbard⁷⁾ の方

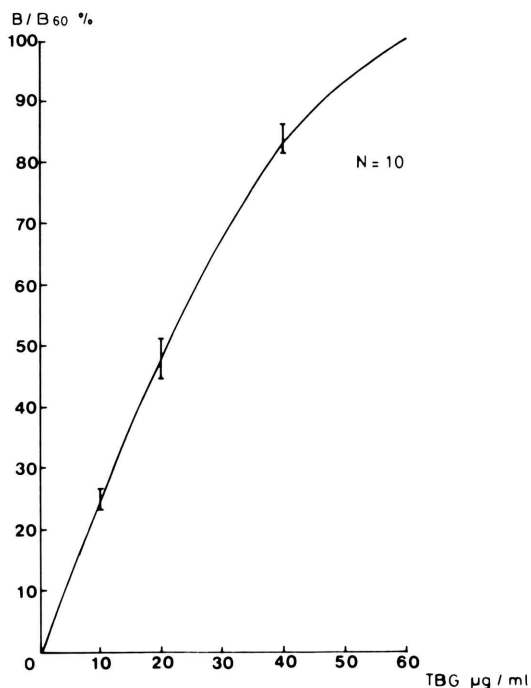


Fig. 2 TBG standard curve, mean of 10 assays. A vertical bar indicates $\bar{m} \pm 1$ S.D.

Table 1 Within- and between assay variance (N=14)

	Mean	1 S.D.	C.V. (%)
Within assay	13.3	0.14	1.1
	23.5	0.25	1.1
Between assay	13.3	0.84	6.3
	23.5	1.36	5.8

法により計算した結果を Table 1 に示す。Within Assay Error は平均濃度 13.3 μ g/ml で変動係数 (C.V.) 1.1%, 23.5 μ g/ml で C.V. 1.1% で, Between Assay Error はそれぞれ 6.3%, 5.8% であった。

c) 希釈試験

蒸留水で40倍希釈した 2 種の異なる濃度の検体を, 蒸留水で 1/2, 1/3, 1/4, 1/8 に希釈して測定した (Fig. 3)。直線で示した期待値にほぼ近い値が得られた。

d) 回収試験

2 種の異なる濃度の検体に, 7.5~45 μ g/ml の標準 TBG を加えて測定した回収率は, 平均 86.4, 78.0% であった (Table 2)。

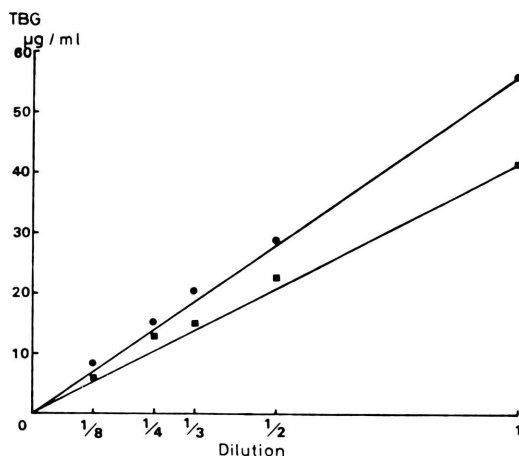


Fig. 3 Dilution test for 2 sera with different TBG concentration.

Table 2 Recovery test

	(1) TBG added $\mu\text{g/ml}$	(2) TBG measured mean \pm S.D. $\mu\text{g/ml}$	Recovery rate (2) \div (1) $\times 100$ %
Control I	0	$*4.1 \pm 0.2$	
	7.5	10.5 ± 0.7	85.3
	15	17.3 ± 0.8	88.0
	30	30.3 ± 1.5	87.3
	45	40.5 ± 2.6	80.9
		mean	86.4
Control II	0	$*7.9 \pm 0.3$	
	7.5	12.8 ± 0.9	65.3
	15	20.4 ± 0.7	83.3
	30	31.1 ± 1.2	77.3
	45	43.1 ± 2.3	78.2
		mean	78.0

e) 測定精度の検討

二重測定の標準偏差をY軸に、それぞれの平均値をX軸にとってプロットし原点を通る回帰直線 Response Error Relationship (RER) を、又その勾配を求めた (Fig. 4). 25回の測定においてRERの勾配は0.010~0.020とよい精度を示した。

f) 精度管理図

2種のコントロール試料を14回測定した結果をFig. 5に示す。黒丸はその回までの平均を示し直

線で結んだ。各測定毎の平均 ± 1 標準偏差を縦線で示した。14回の平均 ± 2 標準偏差の範囲を水平線で示した。

2) 臨床応用

正常者及び各種疾患における血中TBG濃度をFig. 6に示す。正常者44名における血中TBG値は、 $21.3 \pm 3.0 \mu\text{g/ml}$ (mean ± 1 S.D.)であった。男性23名の平均値は $21.5 \pm 3.4 \mu\text{g/ml}$ 、女性21名の平均値は $21.1 \pm 2.6 \mu\text{g/ml}$ で、性差は認められなかった。mean ± 2 S.D. を正常範囲とすると、 $15.3 \sim 27.3 \mu\text{g/ml}$ となる。甲状腺機能亢進症では、治療前の31例の平均値は $15.10 \pm 2.48 \mu\text{g/ml}$ と有意に低値を示し ($p < 0.001$)、治療後21例の平均値は $21.12 \pm 3.29 \mu\text{g/ml}$ と正常範囲に分布した。甲状腺機能低下症では、治療前14例の平均値は $29.69 \pm 5.74 \mu\text{g/ml}$ と有意に高値を示し ($p < 0.001$)、治療後14例の平均値は $21.34 \pm 3.82 \mu\text{g/ml}$ と正常範囲に分布した。妊婦では、 $34.3 \sim 62.1 \mu\text{g/ml}$ ($44.8 \pm 9.7 \mu\text{g/ml}$) と高値を示し、TBG欠損症では $0 \mu\text{g/ml}$ を示した。ネフローゼ症候群11例の平均値は $12.91 \pm 4.76 \mu\text{g/ml}$ と低値を示し、肝硬変13例では $11.0 \sim 32.5 \mu\text{g/ml}$ ($20.6 \pm 6.9 \mu\text{g/ml}$) と低値から高値までばらついた分布を示した。甲状腺機能亢進症および低下症で、治療前後で比較し得た症例では、治療後正常範囲に復帰した (Fig. 7)。

正常者及び各種疾患における全 T_4 値 (ng/ml) をTBG値 ($\mu\text{g/ml}$) で除した値 T_4/TBG をFig. 8に示す。全 T_4 は Corning RIA キットを用いて測定した。正常者の T_4/TBG は、 4.4 ± 0.8 (mean ± 1 S.D.) で mean ± 2 S.D. の範囲は $2.8 \sim 6.0$ であった。男性23名の平均値は 4.7 ± 0.7 、女性21名の平均値は 4.0 ± 0.6 であった。治療前の甲状腺機能亢進症は全例 8.0 以上の異常高値 (13.54 ± 4.84) を、甲状腺機能低下症は全例 3.0 以下の異常低値 (0.91 ± 0.53) を示した。治療後の甲状腺機能亢進症は 4.57 ± 1.27 、甲状腺機能低下症は 3.69 ± 1.33 と正常範囲に分布した。TBGの著しく増加する妊婦でも 3.06 ± 0.81 と正常範囲に分布した。一方、TBGが低値を示したネフローゼ症候群も 4.05 ± 1.21 と正常範囲に分布した。肝硬変も 3.42 ± 1.18 と正常

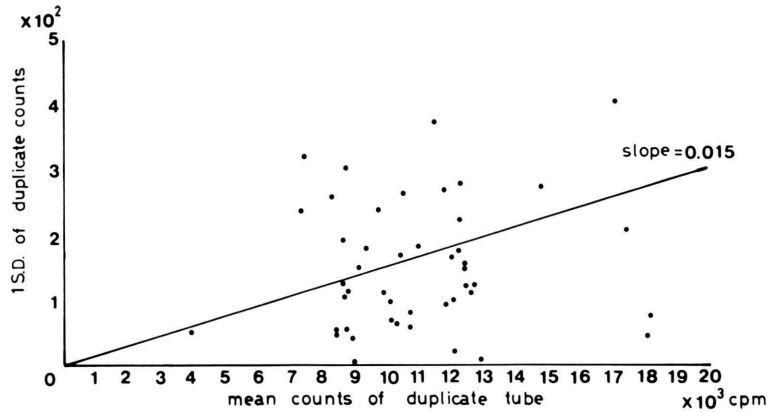


Fig. 4 An example of response error relationship

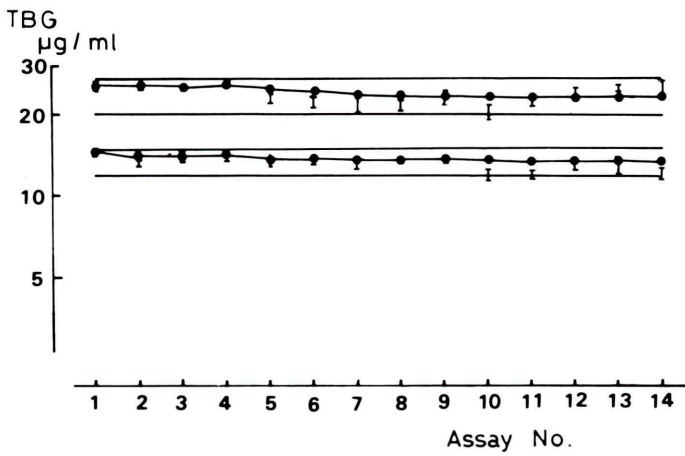


Fig. 5 Quality control chart for TBG.

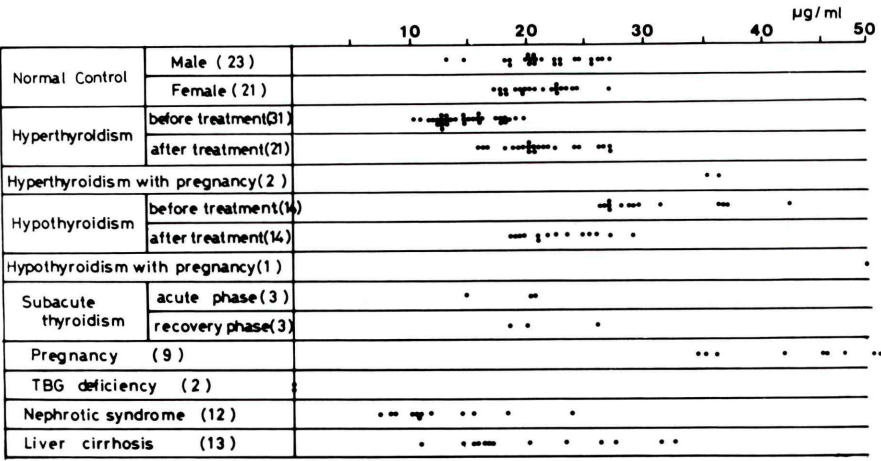


Fig. 6 Serum TBG level in normal controls and various diseases.

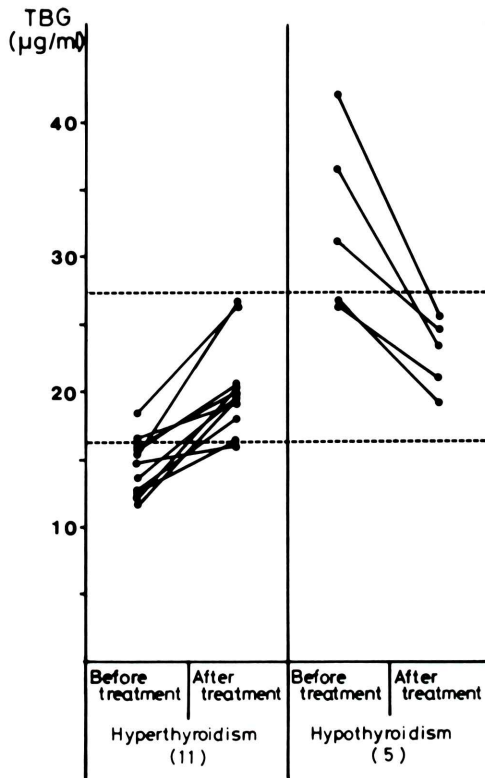
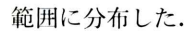


Fig. 7 Serum TBG levels before and after treatment.



Corning Free T₄ キットを用いて測定した Free T₄ と T₄/TBG の関係を Fig. 9 に示す. 両者間には良好な正相関 ($r=0.930$, $p<0.001$) が認められ

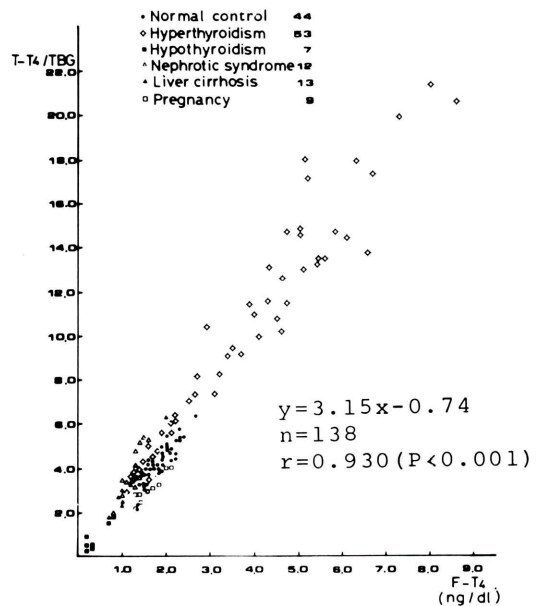


Fig. 9 Relationship between Free T_4 and T_4 /TBG.

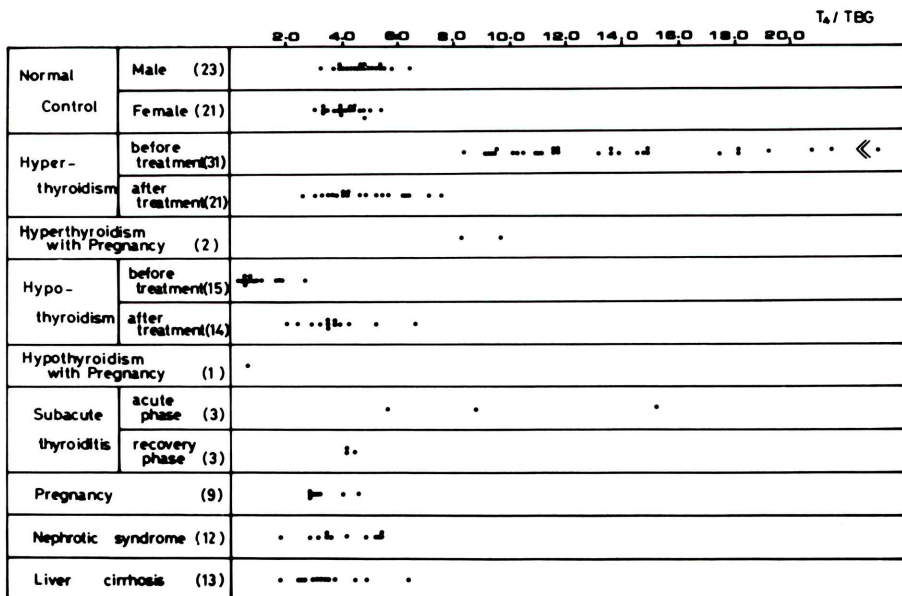


Fig. 8 T_4 /TBG in normal controls and various diseases.

た. 正常者及び各種疾患例の Free T₄ と T₄/TBG の相関係数は, それぞれ正常者 0.911, 甲状腺機能亢進症 0.914, 甲状腺機能低下症 0.962, 妊婦 0.922, 肝硬変 0.928, ネフローゼ症候群 0.439 であった.

V. 考 察

現在わが国で治験されている TBG 測定用キットには, Behringwerke Radiochemical Laboratory (ヘキストジャパン) の B と F の分離に PEG を用いる RIA-gnost TBG キットと固相法を用いた CIS-Cea (ミドリ十字) TBG radioimmunoassay キットがある. 今回, われわれが使用した Corning TBG キットは多孔性ガラス粒子に固定化された抗 TBG 抗体と結合した TBG と反応する ¹²⁵I-T₄ の放射能を測定する一種のサンドイッチ法である. 厳密には TBG と T₄ の結合能をみているわけであるが, バッファー中に十分量の BSA が存在するため患者血清中の内因性の T₄, T₃ は ¹²⁵I-T₄ と TBG の結合に影響をおよぼさないとされている.

先に述べた RIA キットがいずれも 2.5~3.0 時間以上のインキュベーションを要するのに対し, 本法では10分間で反応が終了することが利点に数えられる. また固相の分離が完全で簡便であることも特徴である.

基礎的検討で示したように, 回収率がやや低値 (78.0, 86.4%) であったことを除けば, 標準曲線の安定性, 測定精度, 再現性とも十分臨床検査の使用に耐える測定法と考えられる. 標準曲線の測定範囲は 0~60 µg/ml であるが, これ以上の濃度のものは蒸留水で希釈して測定できる.

血中 TBG の正常平均値は Levy ら³⁾は 3.4 mg/100 ml, Gerschengorn ら⁵⁾は 1.48 mg/100 ml, Burr ら⁸⁾は 1.12 mg/100 ml と報告しており, 測定法によりかなりの差がある. CIS-TBG RIA キットを用いたわが国での報告では 1.62±0.25 mg/100ml⁹⁾, 17.8±5.8 µg/ml¹⁰⁾, 19.2±3.78 µg/ml¹¹⁾, 17.20 µg/ml¹²⁾, 24.1±3.3 µg/ml¹³⁾ とされ, RIA-gnost TBG キットを用いた報告では 22.8±3.3 µg/ml¹⁴⁾, 25.6±7.0 µg/ml¹⁵⁾, 22.2±4.5 µg/ml¹⁶⁾であって, RIA-gnost キットでは CIS キットより高値を示す傾向

がみられ, 同一キットを用いても報告者により多少の差がみとめられる. Corning キットを用いたわれわれの正常人の測定値は 21.3±3.0 µg/ml で RIA-gnost キットによる正常値に近い. われわれの測定結果では正常人で性差がみとめられなかったが, 女性の方が高値を示すとの報告がある^{5,12,14,15)}.

われわれは未治療の甲状腺機能亢進症では TBG 値は有意に低値を, 機能低下症では有意に高値を示し, 両群とも治療後正常化することをみた. この結果は清水ら¹²⁾, 高坂ら¹⁷⁾, 梶田ら¹¹⁾, 中谷ら¹⁵⁾の報告と一致する. 一方, 甲状腺機能低下症では高値を示したが, 機能亢進症では正常ないしやや高値^{9,10)}, 甲状腺機能亢進症では低値であるが, 機能低下症では正常¹⁴⁾との報告もあり一定の見解は得られていない. しかし, T₄/TBG 比が甲状腺機能亢進症, 機能低下症を正常群とよく判別しうることは Burr ら⁸⁾の報告以来知られている. 特に, 妊婦など TBG の変動する状態での真の甲状腺機能の指標であることが指摘されている. われわれのデータもこのことを示しており, 特に, Corning Free T₄ キットで測定した遊離 T₄ の値と T₄/TBG 比がよく相関することを示した. Corning Free T₄ キットについては別に報告¹⁸⁾するが, 甲状腺機能の日常臨床検査として何を用いるべきかは今後の課題となるであろう.

血中 TBG が妊婦で高値を示し, TBG 欠損症で低値を示した点は諸家の報告に一致する. Levy ら³⁾は肝硬変で TBG が低値を示すと報告しているが, われわれの症例では低値を示したものは1例にすぎず, 高値を示したものが2例あり他は正常範囲であった. 清水ら¹²⁾はむしろ高値を示す肝硬変の多いことを指摘している. ネフローゼ症候群は TBG 低値を示す例が多かった.

VI. おわりに

Corning TBG キットが臨床検査として使用しうることを示した. 本法による血中 TBG 正常範囲は 15~27 µg/ml であった. 甲状腺機能亢進症では低値を, 機能低下症では高値を示し, T₄/TBG

は遊離 T_4 値とよく相関した。血清 TBG 濃度の測定は TBG に変動を示す病態における甲状腺機能異常の診断に特に有用であると考えられる。

本論文の要旨は第12回日本核医学会関東甲信越地方会に報告した。

文 献

- 1) Robbins J: Reverse-flow zone electrophoresis. A method for determining the thyroxine-binding capacity of serum protein. *Arch Biochem Biophys* **63**: 461-469, 1956
- 2) Inada M, Sterling K: Thyroxine transport in thyrotoxicosis and hypothyroidism. *J Clin Invest* **46**: 1442-1450, 1967
- 3) Lery RP, Marshall JS, Velayo NL: Radioimmunoassay of human thyroxine-binding globulin (TBG). *J Clin Endocrinol Metab* **32**: 372-381, 1971
- 4) Hesch RD, Gats J, McIntosh CHS, et al: Radioimmunoassay of thyroxine-binding globulin in human plasma. *Clin Chim Acta* **70**: 33-42, 1976
- 5) Gerschgorin 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**: 907-911, 1976
- 6) Horn K, Kubiczek T, Pickardt CR: Thyroxine-binding globulin (TBG). Preparation, radioimmunoassay and clinical significance. *Acta Endocrinol (Suppl)* **208**: 111-112, 1977
- 7) Rodbard D: Statistical quality control and routine data processing for radioimmunoassay and immunoradiometric assays. *Clin Chem* **20**: 1255-1270, 1974
- 8) Burr WA, Ramsden DB, Evans SE, et al: Concentration of thyroxine-binding globulin. Value of direct assay. *Brit Med J* **1**: 485-488, 1977
- 9) 今里理喜代, 吉政康直, 浜田哲: 甲状腺疾患, 妊婦および先天性チロキシン結合グロブリン(TBG)欠損症における血中 TBG の臨床的意義. *RADIOISOTOPES* **28**: 441-445, 1979
- 10) 満間照典, 野木寿剛, 鰐部春松: Radioimmunoassay 法による血清中 thyroxine binding globulin 濃度の測定. *ホルモンと臨床* **27**: 1293-1297, 1979
- 11) 梶田芳弘, 吉村 学, 伊地知浜夫, 他: 固相法による CIS-TBG radioimmunoassay kit の検討. *ホルモンと臨床* **27**: 921-926, 1979
- 12) 清水直容, 吉田尚義, 木野内喬, 他: 血清 Thyroxine Binding Globulin (TBG) 測定の臨床的研究. *内科* **44**: 281-285, 1979
- 13) 金尾啓右, 本田 稔, 石原静盛, 他: ラジオイムノアッセイ (CIS) による血中 TBG 濃度の測定, 基礎と臨床 **13**: 4011-4015, 1979
- 14) 小泉 潔, 伊藤 廣, 立野育郎: サイロキシン結合グロブリン (TBG) ラジオイムノアッセイキットの基礎的検討. *ホルモンと臨床* **27**: 407-410, 1979
- 15) 中谷清美, 小豆沢瑞夫, 網野信行, 他: Thyroxine binding globulin (TBG) radioimmunoassay の基礎的検討と臨床応用. *ホルモンと臨床* **27**: 813-818, 1979
- 16) 木谷健一, 佐々木康人: 成年男子健常人の血清甲状腺ホルモン. *ホルモンと臨床* **26**: 1043-1049, 1978
- 17) 高坂唯子, 笠木寛治, 小西淳二, 他: CIS TBG radioimmunoassay キットによる血中 thyroxine binding globulin 濃度測定の基礎的ならびに臨床的評価. *ホルモンと臨床* **27**: 1273-1278, 1979
- 18) 星 賢二, 佐々木康人, 小野寺よう子, 他: Immophase F- T_4 RIA kit の基礎的検討と臨床応用 (抄録) *核医学* **16**: 142, 1979