

《ノート》

アマレックス T₃ RIA による血中トリヨード サイロニンの測定

Studies on the Measurement of Serum Triiodothyronine with
“AMERLEX T₃ RIA” kit

渡辺 清次* 村木 秀樹* 筒井 一哉** 佐藤 幸示**

Seiji WATANABE*, Hideki MURAKI*, Kazuya TSUTUI** and Koji SATO**

*RI Section, Prefectural Cancer Center, Niigata Hospital

**Department of Internal Medicine, Prefectural Cancer Center, Niigata Hospital

I. はじめに

ラジオイノムアッセイ法(RIA)による血中トリヨードサイロニン(T₃)の測定は, Brown ら¹⁾, Gharib ら²⁾, 満間ら³⁾ によって開発されて以来, 諸家により種々改良が加えられ, 広く臨床応用されている。

RIA における B と F の分離法は, 精度, 再現性, 操作の簡便性, 測定時間などに大きな影響を与える因子であり, 現在多種類のキットが市販されている。今回, ラテックスの微粒子に抗体を結合させた固相法である Amerlex T₃ RIA キット(RCC 製, 科研化学)を使用する機会を得たので, 若干の基礎的検討を行うとともに, 臨床例での測定および他法との比較検討を試みた。その結果, 日常検査法として有用との成績を得たので報告する。

II. 測定方法および検討対象

1) キットの内容と測定操作

Amerlex T₃ RIA キットの構成は50テスト用(標

* 新潟県立ガンセンターアイソトープ診療室

** 同 内科

受付: 55年5月30日

最終稿受付: 55年8月12日

別刷請求先: 新潟市川岸町 2-10 (☎951)

新潟県立ガンセンターアイソトープ診療室

渡 辺 清 次

準曲線用10テスト分を含む)で, 標準ヒト血清5本(凍結乾燥), 各 0.0, 0.8, 2.0, 4.0, 8.0 ng/ml (正確な濃度はバイアルに表示)を含む。¹²⁵I-T₃ 溶液 28 ml (赤色液, thiomersalate 含有), 放射能 5 μ Ci 以下, Amerlex 抗 T₃ 抗体懸濁液 28 ml (青色液) および標準曲線用グラフ紙よりなる。標準 T₃ 液の調製は 0.5 ml の蒸留水を加えて溶かす。

測定操作は Fig. 1 に示す通りである⁴⁾

(1) 標準血清あるいは被検血清の各 25 μ l を測定チューブに採る。

(2) ¹²⁵I-T₃ 溶液 0.5ml を分注する。

(3) Amerlex 抗 T₃ 抗体懸濁液 0.5 ml を分注し, よく混和する。(使用直前にゆっくりとバイアルを回転させて, 均一な懸濁液としてから用いる)

(4) 37°C で 60 分インキュベートする。

(5) 1500 g 以上, 15分間室温で遠心分離する。

(6) 上清液をデカントする。チューブ口の残液はろ紙等で吸い取る。

(7) 沈殿の放射能をウェル型シンチレーションカウンターにて測定する。

(8) 標準血清について得られたカウントより標準曲線を作成し, 被検血清の T₃ 濃度を読む。

2) 測定法に関する基礎的検討

上記の測定法について, インキュベーションの

Key words: Solidphase Radioimmunoassay, Triiodothyronine, AMERLEX T₃ RIA Kit.

時間および温度, 測定の精度および再現性, 抗体の特異性, 希釈試験および添加 T_3 の回収率に関

する検討を行った。

3) 臨床的検討の対象

臨床測定の対象としては, 本院を受診した各種甲状腺疾患々々68例(甲状腺機能亢進症未治療39例, 同治療例8例, 甲状腺機能低下症未治療9例, 亜急性甲状腺炎4例, 甲状腺癌5例, TBG減少症2例および橋本病1例)および正常妊婦8例, 本院職員を主とした健常者78例の計154例を用いた。また, 同一血清について T_3 RIA キット II (PEG 法・ダイナボット社) による測定を行って測定値を比較検討した。

III. 基礎的検討の成績

1) インキュベーションの時間および温度

インキュベーション時間の影響について 37°C におけるインキュベーションを20分から4時間まで行ったときの標準曲線の変化と, その時の3種のプール血清 T_3 値の変化を Fig. 2 に示す。時間の経過とともに結合カウントは急激に増し, 急峻な標準曲線が得られたが, 120分以後は漸増した。

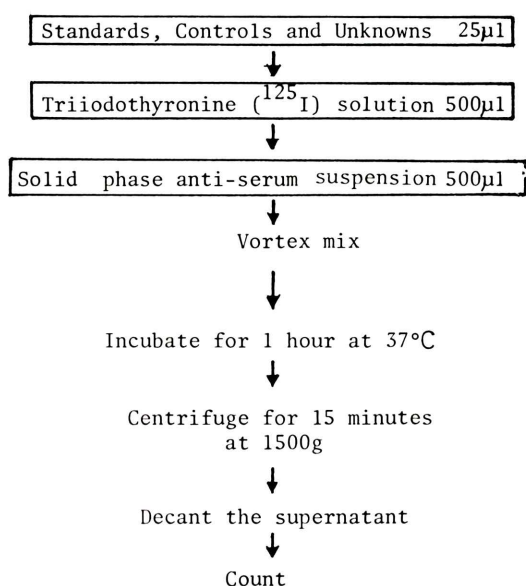


Fig. 1 Assay procedure.

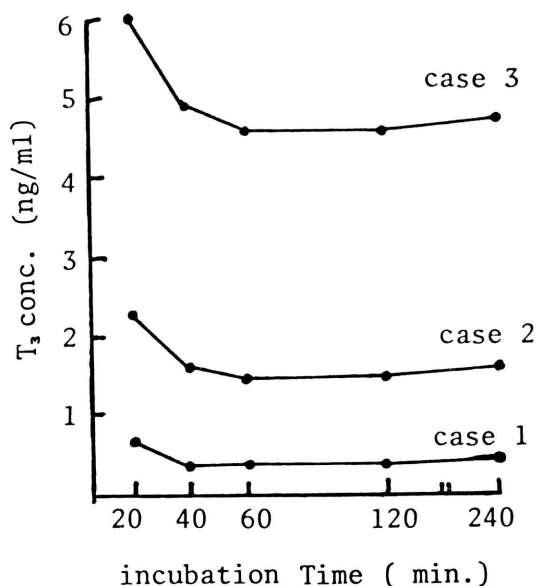
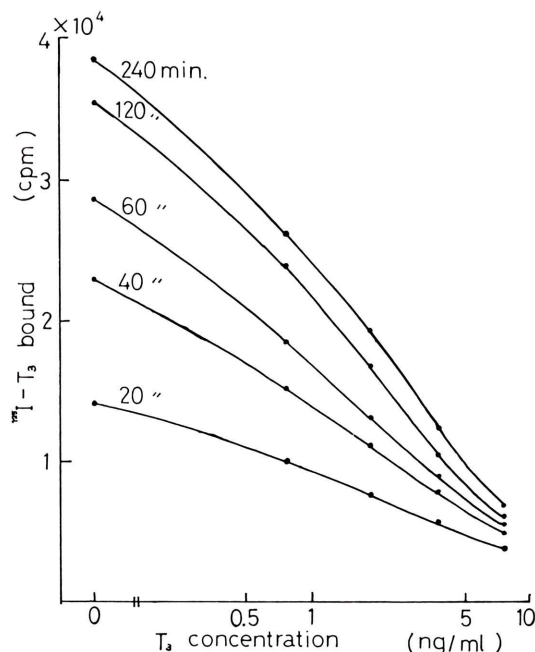


Fig. 2 Effect of incubation time on standard curve and T_3 values of 3 pooled sera, (incubation temperature: 37°C)

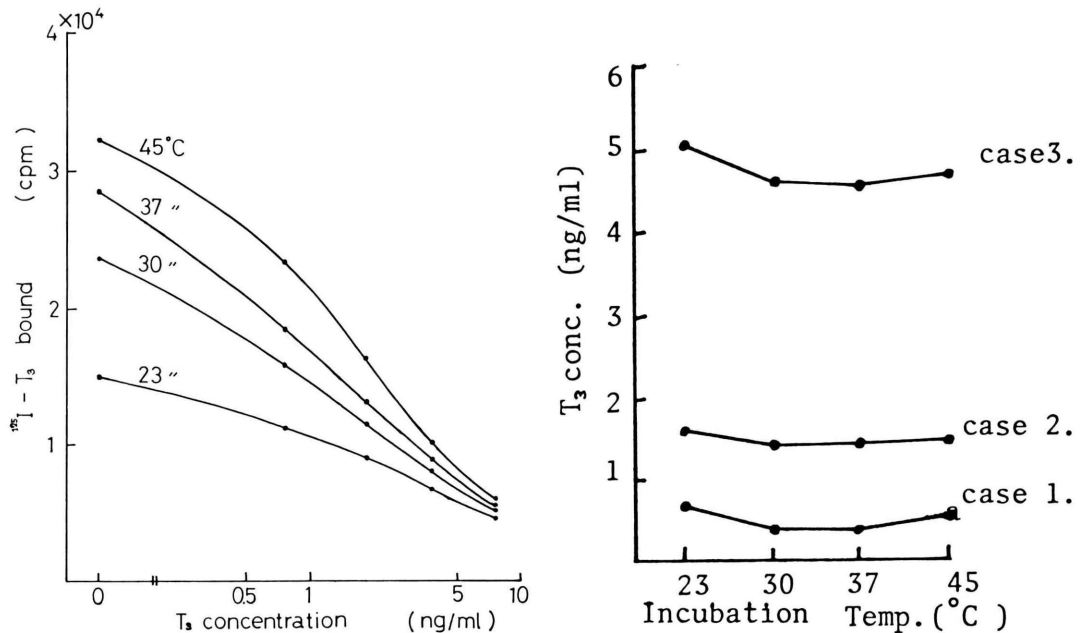


Fig. 3 Effect of incubation temperature on standard curve and T_3 values of 3 pooled sera. (incubation time: 60 min.)

血清 T_3 値は20~40分では高値を示し、60分以上で安定値に達した。標準曲線の50% B_0 値は、20分で2.28 ng/ml, 40~240分で1.56~1.9 ng/mlを示し、60分値がもっとも高感度であった。これよりインキュベーション時間は60~120分が至適と考えられた。

次に、60分のインキュベーション時間で温度を23°C(室温), 30°C, 37°C, 45°Cで行ったときの標準曲線および3種のプール血清 T_3 値の変化をFig. 3に示す。23°Cでは結合カウントも低く平坦な曲線が得られたが、温度の上昇とともに結合カウントは著明に増加し、37°Cでより急峻な標準曲線が得られた。血清 T_3 値は23°Cで高値を示したが、30°C以降は安定値に達した。この時の50% B_0 値は30~45°Cで1.56~1.83 ng/mlを示し、37°C値がもっとも高感度であった。これより37°Cのインキュベーション温度が至適と考えられた。なお37°C, 60分における B_0/T は約63%, 30000 cpmと高いカウントが得られ、測定精度上からも満足な結果であった。

2) 精度および再現性

T_3 濃度が低値、正常値および高値の3血清について、同一アッセイで15回、5つの異種ロットのアッセイで7回それぞれ測定した結果をTable 1に示す。変動係数は同一アッセイで4.3~8.6%, ロット間アッセイで3.7~7.0%と共に良好な再現性が得られた。

3) 抗体の特異性

Amerlex 抗 T_3 抗体の特異性について検討するため、 T_3 0 ng/ml の標準血清に L-T₄*, 3,5-Diiodo-L-thyronine,** 3,5-Diiodo-L-tyrosine,* 3-Iodo-L-tyrosine** を種々の濃度に添加して、 B/B_0 % が50%のときの濃度より推定した。

Table 2に示すごとく、3,3',5-Triiodo-L-thyronineを100%とした場合、L-T₄とは0.14%, 3,5-Diiodo-L-thyronineとは1.1%, ほかは、0.001%以下の低い交叉性を示した。

* 半井化学特級試薬

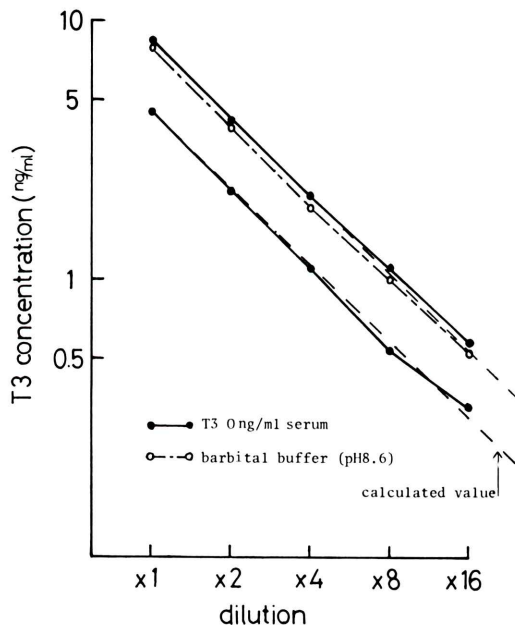
** Sigma 社

Table 1 Reproducibility test

Case	Intraassay			Interassay		
	No. 1	No. 2	No. 3	No. 1	No. 2	No. 3
n	15	15	15	7	7	7
Mean (ng/ml)	0.58	1.81	7.78	0.58	1.82	7.56
S.D. (ng/ml)	0.05	0.13	0.33	0.04	0.07	0.28
C.V. (%)	8.6	6.9	4.3	7.0	3.9	3.7

Table 2 Cross reactivity of T₃ antiserum

Compound	% Cross reactivity
3, 3', 5-Triiodo-L-thyronine	100
L-Thyroxine	0.14
3, 5-Diiodo-L-thyronine	1.10
3, 5-Diiodo-L-tyrosine	<0.001
3-Iodo-L-tyrosine	<0.001

**Fig. 4** Dilution test

4) 希釈試験

T₃ 高値の2血清について、T₃ 0 ng/ml の標準血清およびバルビタール緩衝液 (pH 8.6) を用いて、倍数希釈したときの測定成績を Fig. 4 に示す。測定値は希釈数とともに直線的に低下し、計算値とも一致した。また、T₃ 0 ng/ml 血清とバルビタ

ール緩衝液との差はなく、蛋白濃度の低下による影響は認められなかった。

5) 回収率試験

T₃ 低値、正常値および高値の3血清に T₃ 0.39, 0.92, 1.88, 3.74 ng/ml を添加したときの回収率を Table 3 に示す。平均回収率 (M±SD) は T₃ 0.3 ng/ml 血清では 99.7±1.7%, 0.9 ng/ml 血清では 92.9±7.2%, 4.3 ng/ml 血清では 106.9±12.3% と良好な成績を示した。

IV. 臨床的検討の成績

1) 健常者および各種甲状腺疾患患者の T₃ 値

臨床例における血清 T₃ 値を Fig. 5 に示す。健常者78例では 0.7~2.1 ng/ml の範囲に分布し、その平均値および標準偏差 (SD) は 1.6±0.31 ng/ml であった。正常域として平均±2.SDをとると、0.98~2.22 ng/ml となり、この範囲に入らないものは3例 (3.8%) であった。未治療甲状腺機能亢進症39例では 2.58~9.0 ng/ml に分布し、平均 5.47±1.84 ng/ml の高値を示し、健常者との重なり合いはみられなかった。なお、血清 T₃ 値が 8 ng/ml 以上の際は T₃ free 血清で希釈して測定した。甲状腺機能亢進症治療8例では平均 3.28±0.41 ng/ml

Table 3 Recovery Test

Sample T ₃ conc. (ng/ml)	T ₃ added (ng/ml)	Observed values (ng/ml)	Recovery (%)
0.3	0.39	0.68	97.4
	0.92	1.21	98.8
	1.88	2.20	101.1
	3.74	4.10	101.6
Mean±SD			99.7±1.7
0.9	0.39	1.23	84.6
	0.92	1.70	87.0
	1.88	2.75	98.4
	3.74	4.70	101.6
Mean±SD			92.9±7.2
4.3	0.39	4.80	128.2
	0.92	5.21	98.9
	1.88	6.20	101.1
	3.74	8.02	99.5
Mean±SD			106.9±12.3

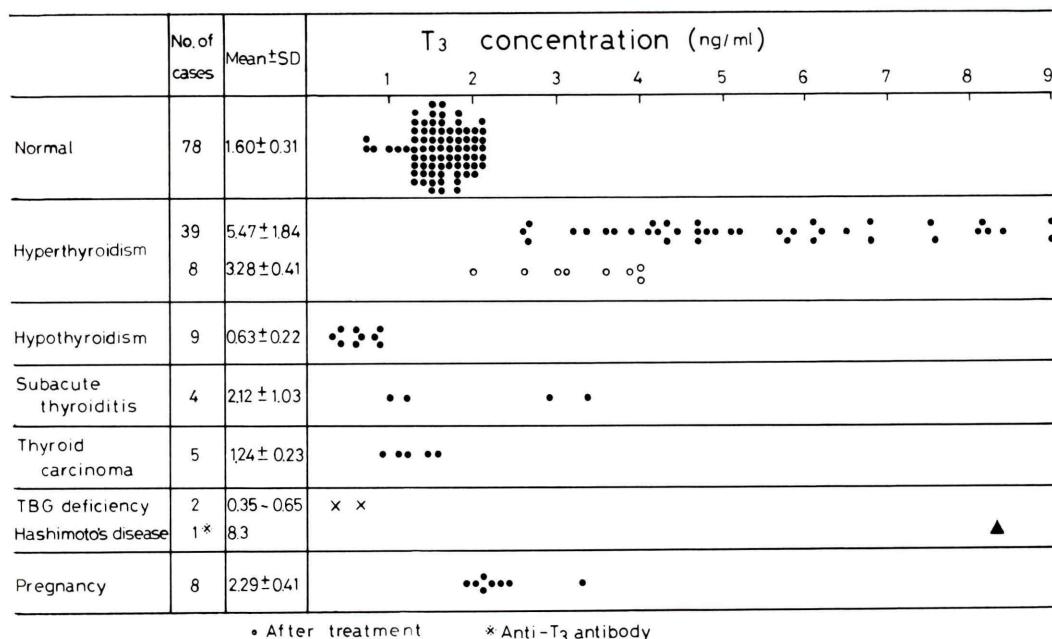


Fig. 5 Serum T₃ concentration in various conditions measured by Amerlex T₃ RIA kit.

であった。未治療甲状腺機能低下症 9 例では 0.3 ~ 0.88 ng/ml に分布し、平均 0.63 ± 0.22 ng/ml を示し、健常者との間に若干重なり合いがみられた。亜急性甲状腺炎 4 例では 1.0 ~ 3.37 ng/ml の広範囲に分布し、甲状腺癌 5 例では 0.90 ~ 1.57 ng/ml を示した。

一方、正常妊婦 8 例では 1.9 ~ 3.3 ng/ml に分布し、平均 2.29 ± 0.41 ng/ml を示し、高値の傾向がみられた。また、TBG 減少症の 2 例では低値、抗 T₃ 自己抗体の存在が推定される橋本病の 1 例では異常高値を示した。

2) T₃ RIA キット II (PEG 法) との比較

B.F 分離にポリエチレングリコールを用いる T₃ RIA キット II による測定値と、本法の測定値を 106 例について比較検討した成績を Fig. 6 に示す。両者間の相関係数は +0.981 と極めて良好な相関が認められた。回帰直線は Y (本法) = 1.08 X (PEG 法) + 0.33 と T₃ RIA キット II に比べ僅かに高値となる傾向が認められた。但し、抗 T₃ 自己抗体の存在推定例では、本キットは高値、PEG 法は低値を示し、統計処理より除外した (図中▲

印)。

V. 考 案

固相法を用いた RIA 法は、簡便性と迅速性に優れているため種々のアッセイに利用されている。本キットも Amerlex 微粒子に抗体を固定化し、操作を簡便にするとともに、溶液法のもつ反応の均一性を加味して作られている。すなわち T₃ と T₃ 結合蛋白の結合阻害剤には thiomersalate を用い、B.F 分離には特別な薬剤添加の必要もなく、遠心操作のみでよいため手技的には至って簡便である。T₃ 抗体結合 Amerlex の微粒子は反応面積が大きく、長時間懸濁状態が保たれているので、抗原抗体反応は均一かつ迅速であるため、アッセイ時間の短縮にも有利である。また、被検血量も 25 μl と少量でよい臨床検査上好都合である。

インキュベーションの条件については、37°C、60分とキットの規定条件⁴⁾で良好な結果が得られたが、時間については 60 ~ 120 分の範囲であれば厳密でなくてもよいと考えられた。一般に、固相法では結合カウントが低いといわれているが、本

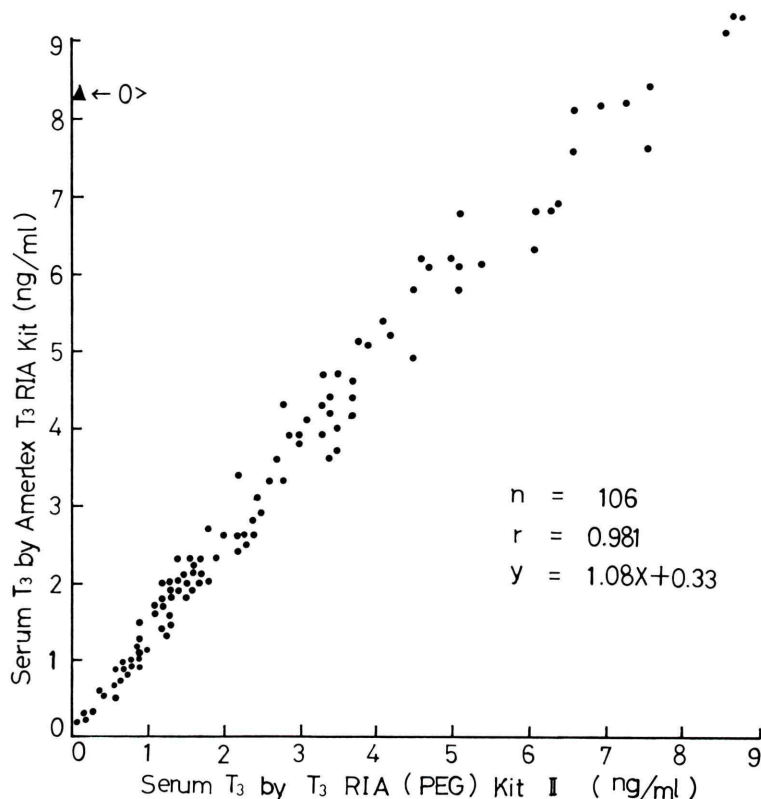


Fig. 6 Correlation of serum T_3 values by T_3 RIA (PEG) kit II with those by Amerlex T_3 RIA kit.

キットの B_0 カウントは約 30000 cpm, B_0/T は 63% が得られ, 全操作時間は試料分注から計測まで 50 テストにつき 120 分以下と短時間であった。

抗体の特異性については, T_4 と 0.14% の交叉反応が認められたが, この実験に用いた T_4 は半井化学の特級を用い, 特に純化は行わなかったもので, 微量の T_3 の混入が cross reactivity を高めたことも否定できない。高 T_3 血清の希釈試験における直線性および回収試験の回収率については極めて満足のいく結果が得られた。特に T_3 高値血清の 16 倍希釈において, T_3 0 ng/ml 血清とバルビタール緩衝液との差が認められず, 計算値とも一致することから, 蛋白量の減少に伴う TBG 結合阻害剤の影響^{5,6)}や, PEG 法における蛋白濃度の大きな変化による影響^{7,8,9)}などはないものと考えられた。

以上の諸検討より本キットは, 極めて簡便で, かつ精度のよい血中 T_3 測定法として日常検査に適したキットと考えられた。

臨床成績では, 健常者は 0.7~2.1 ng/ml の範囲に分布し, 甲状腺機能亢進症では 2.58 ng/ml 以上, 甲状腺機能低下症では 0.88 ng/ml 以下に分布し, 健常者と甲状腺機能低下症との間に若干の重なり合いがみられたが, 甲状腺機能亢進症との分別は良好であり, 諸家の報告¹⁰⁻¹⁶⁾ともほぼ一致した。また TBG の変動により, T_3 結合能に異常をきたす妊婦ではやや高値, TBG 減少症では低値を示し, T_3 量の変動をよく反映した。

T_3 自己抗体の存在が推定される例では, 本法では高値を示し, PEG 法では異常低値を示した。このことは, 本法では抗 T_3 自己抗体による標識 T_3 の結合物の大部分は, 上清液にあり, 沈殿の標

識 T₃ が減少するのに対し、PEG 法では PEG が中性～弱アルカリ溶液で γ -グロブリンを沈降し、アルブミンを上清に残す¹⁷⁻¹⁹⁾ことから、抗 T₃ 自己抗体と標識 T₃ の結合物は PEG により沈降し、沈澱の識標 T₃ は著明に増加したため、それぞれ実際の値より測定値が前者では高値、後者では異常低値となるものと考えられる。自己抗体の存在下の RIA 法では、B.F 分離の違いにより測定値に差異が生ずるものと考えられ、これまで PEG 法、レジソ吸着およびスポンジ法、硫酸塩析法などでは低値²⁰⁻²³⁾に、二抗体法、抗体チューブ固相法では高値^{20,24)}に、セクアデックスカラム法では、CPBA 法と近似値²⁴⁾にそれぞれ報告されており、本法でも同様の結果が得られた。なお、本症例の詳細については近く別に報告の予定である。

他法との比較検討では、本キットと T₃ RIA キット II (PEG 法) による測定値との間には極めて良好な正相関が認められ、絶対値についてもほぼ一致する成績が得られた。

VI. ま と め

固相法を用いた Amerlex T₃ RIA キットについて基礎的ならびに臨床的検討を行った。

本キットは使用血清量も少なく、T₃ 抗体結合 Amerlex 粒子の使用により、B.F 分離に薬剤添加の必要もなく、反応の均一性に優れ、操作が極めて簡便で、短時間に精度の高い多数試料の結果を知り得た。

臨床例における本キットと T₃ RIA キット II (PEG 法) による血清 T₃ 値とは、相関係数 0.981 と極めて良好な正相関が認められた。健常者の血清 T₃ 値は平均 1.60 ± 0.31 ng/ml であり、甲状腺機能亢進症例との重なり合いはみられなかったが、甲状腺機能低下症例とは若干の重なり合いがみられた。また、T₃ 自己抗体保有者では、本法は高値となることに注意を要する。

本キットは臨床例において、よく甲状腺機能を反映し、日常臨床検査法として甲状腺機能の診断に非常に有用であり、広く用い得る方法であると

考えられた。

終わりにキットを提供していただいた科研化学株式会社に謝意を表します。

文 献

- 1) Brown BL, Ekins Rp, Ellis SM, et al: Specific antibodies to triiodothyronine hormone. *Nature* **226**: 359, 1970
- 2) Gharib H, Ryan RJ, Mayberry WE, et al: Radioimmunoassay for triiodothyronine (T₃): Affinity and specificity of the antibody for T₃. *J Clin Endocrinol Metab* **33**: 509, 1971
- 3) Mitsuma T, Gershengorn M, Colucci J, et al: Radioimmunoassay of triiodothyronine in unextracted human serum. *J Clin Endocrinol Metab* **33**: 364, 1971
- 4) アマレックス T₃ RIA 説明書: 科研化学
- 5) Hüfner M, and Hesch RD: A comparison of different compounds for TBG-blocking used in radioimmunoassay for triiodothyronine *Clin Chem Acta* **44**: 101, 1973
- 6) 分校久志, 久田欣一: T₄ ラジオイムノアッセイ・キットの基礎的臨床的評価. *Radioisotopes* **25**: 563, 1976
- 7) Bernard D, and Aurbach GD: Use of polyethylene glycol to separate free and antibody-bound peptide hormones in radioimmunoassay. *J Clin Endocrinol* **33**: 732, 1971
- 8) 日本アイソトープ協会医学薬学部会 in vitro test 専門委員会: 第2回 RI インビトロ検査全国コントロールサーベイ報告書. **82**, 1980
- 9) 渡辺清次, 筒井一哉, 佐藤幸示, 他: PEG 法 HTSH キットの使用経験. *臨床と研究* **54**: 673, 1977
- 10) 分校久志, 杉原政美, 久田欣一: レジソストリップ法によるトリヨードサイロニン・ラジオイムノアッセイの基礎的臨床的検討. *核医学* **15**: 111, 1978
- 11) 坂井由美子, 浜田 武, 浜 聡, 他: 血中トリヨードサイロニン測定法の検討——他の甲状腺機能検査値との比較. *核医学* **15**: 117, 1978
- 12) 仁瓶禮之, 鰐部春松, 妹尾久雄, 他: トリヨードサイロニン(T₃) “栄研” キットによる血中 T₃ の測定. *ホルモンと臨床* **26**: 261, 1978
- 13) 満間照典, 鰐部春松, 広岡良文, 他: 固相法による Triiodothyronine radioimmunoassay: Konsul T₃ RIA キットの検討. *ホルモンと臨床* **26**: 817, 1978
- 14) 竹田洋祐, 中島育子, 奥野龍興, 他: Phadebas T₃ RIA キットによる血中濃度測定の基礎的ならびに臨床的検討. *ホルモンと臨床* **26**: 405, 1978
- 15) 中川 毅, 信田憲行, 田口光雄: コンスル T₃ RIA による血中トリヨードサイロニンの測定. *核医学* **16**: 47, 1979

- 16) 野木森剛, 満間照典: コーニング IMMO PHASE T₃ RIA キットによる血中測定法の検討. 核医学 **17**: 337, 1980
- 17) Iverius PH and Laurent TC: Precipitation of some plasma proteins by the addition of dextran or polyethyleneglycol. *Biochim Biophys Acta* **133**: 371, 1967
- 18) Polson A, Potgieter GM, Largier JF, et al: The fractionation of protein mixtures by Linear polymers of high molecular weight. *Biochim Biophys Acta* **82**: 463, 1964
- 19) Zeppezauer M and Brishammer S: Protein precipitation by uncharged water-soluble polymers. *Biochim Biophys Acta* **94**: 581, 1965
- 20) 中崎利彦, 高橋 浩, 大石まり子, 他: T₄ RIA (PEG) Diagnostic kit の基礎的検討と臨床応用. 核医学 **15**: 85, 1978
- 21) 笠木寛治, 大石まり子, 西川光重, 他: サイロキシンリアキットの基礎並びに臨床的検討. 核医学 **13**: 805, 1976
- 22) 中島言子, 小西淳二, 森田陸司, 他: T₄ リアパックによる血中サイロキシン濃度の測定に関する基礎的ならびに臨床的検討. 核医学 **14**: 123, 1977
- 23) 小西 淳二, 中島 言子, 奥野 龍興, 他: Radioimmunoassayによる血中サイロキシン濃度の測定——TETRA-TAB-RIA キットの検討——. 核医学 **15**: 135, 1978
- 24) 高坂唯子, 笠木寛治, 遠藤啓吾, 他: Seralute T₄ (RIA) キットの基礎的検討ならび臨床的評価. 核医学 **15**: 1183, 1978