

## 《ノート》

## Amerlex Free T<sub>4</sub> Radioimmunoassay に関する 基礎的ならびに臨床的検討

Fundamental and Clinical Evaluation of Amerlex Free T<sub>4</sub>  
Radioimmunoassay System

西川 彰治\* 原 美津子\* 福地 稔\* 永井 清保\*

Akiharu NISHIKAWA, Mitsuko HARA, Minoru FUKUCHI and Kiyoyasu NAGAI

*Division of Nuclear Medicine, RI Center, Hyogo College of Medicine*

### I. はじめに

活性型甲状腺ホルモンには、triiodothyronine (T<sub>3</sub>)<sup>1)</sup> と thyroxine (T<sub>4</sub>)<sup>2,3)</sup> の 2 種類が知られている。血中濃度でみると T<sub>3</sub>: T<sub>4</sub>=1:50 と T<sub>4</sub> が断然多いため、長らく後者が血中甲状腺ホルモンレベルの指標とされてきた。血中における T<sub>4</sub> は、そのほとんどが thyroxine 結合蛋白と結合して存在する<sup>4)</sup>が、実際のホルモン作用を発現するのは、遊離型の T<sub>4</sub> (free T<sub>4</sub>, FT<sub>4</sub>) であると考えられている<sup>5,6)</sup>。そのため、臨床的には FT<sub>4</sub> 量を測定することは、きわめて意義のあることだといえる。FT<sub>4</sub> の測定法としては、平衡透析法<sup>7,8)</sup>がすぐれた方法として知られてきた。しかし、多量の血清試料を必要とし、操作も繁雑であるなどから、日常臨床検査法として、一般的普及をみるまでにはいたらなかった。最近 radioimmunoassay (RIA) による FT<sub>4</sub> の測定が注目されるようになった<sup>9)</sup>。われわれは、今回、あらたに FT<sub>4</sub> の RIA として開発された、Amerlex FT<sub>4</sub> RIA につき、その基礎的、および臨床的検討を行ったので、その成績

につき報告する。

### II. 方法および対象

検討には Amerlex FT<sub>4</sub> RIA を用い、実際の測定手順は Table 1 に示すごとく行った。

#### 1. 基礎的検討

異なる 8 回の測定で得られた標準曲線を mean  $\pm$  S.D. で求め、その安定性および再現性をみた。

インキュベーション時間、およびインキュベーション温度が測定系に与える影響につき比較検討した。すなわち、インキュベーション時間を、30 分、60 分、90 分、および 120 分と変えた際のそれぞれの標準曲線につき比較検討した。一方、インキュベーション温度を 4°C, 37°C および室温 (23°C) とかえた際のそれぞれの標準曲線についても比較検討した。

同一測定内 (n=8) における再現性をみる目的で、濃度の異なる A, B, C の 3 種類の血清試料を用い検討した。また異なる 6 回の測定間における再現性についても、濃度の異なる D, E, F, G, 4 種類の血清試料を用い検討した。

#### 2. 臨床的検討

本測定法を用い、144 例の血中 FT<sub>4</sub> 値を測定した。これらの内訳は、甲状腺機能亢進症 42 例、甲

\* 兵庫医科大学病院 RI センター診療部

受付：56 年 3 月 19 日

最終稿受付：56 年 4 月 17 日

別刷請求先：西宮市武庫川町 1 番 1 号 (番 663)

兵庫医科大学病院 RI センター診療部

西川 彰治

**Key words:** Radioimmunoassay, Free T<sub>4</sub>, Solid phase, Amerlex.

状腺機能低下症34例, euthyroid state にある甲状腺疾患33例, TBG 欠損症1例, 妊婦11例, および健常人23例であった。

本測定法で得られた  $FT_4$  値の客観的評価を目的として同時に Free  $T_4$  index を求め, また94例については同時に GammaCoat  $FT_4$  Kit (トラベノール株式会社) で, また48例については同時に平衡透析法でもそれぞれ  $FT_4$  値を測定し, 得られた測定値を比較検討した。

TBG 異常症における Amerlex  $FT_4$  値の評価を目的として, 妊婦11例および TBG 欠損症1例については,  $FT_4$  値と同時に  $T_3$ -resin uptake, total  $T_3$ , total  $T_4$ ,  $FT_4$  index および TBG をそれぞれ測定あるいは算出し比較した。なお,  $T_3$ -resin uptake は Triosorb-S, total  $T_3$  は  $T_3$  RIA Kit II, total  $T_4$  は  $T_4$  RIA Kit II, (いずれもダイナボット RI 研究所製),  $FT_4$  index は  $T_7$  値, TBG 濃度は TBG (corning) RIA Kit でそれぞれ測定あるいは算出した。

### III. 成 績

#### 1. 基礎的検討

異なる8回の測定で得られた標準曲線を mean  $\pm$  S.D. で求め, Fig. 1 で示した。Fig. 1 でも明らかなごとく, 安定した再現性にすぐれた標準曲線が得られることが確かめられた。インキュベーション時間を, 30分, 60分, 90分, および120分と変えた際の標準曲線を Fig. 2 に示した。Fig. 2 でも明らかなごとく, インキュベーション時間が長くなるにつれ, B.% の増加が認められたが, 60分以上のインキュベーションでは, 有意の差異は認められなかった。

Table 1 Assay procedure of Amerlex  $FT_4$  Radioimmunoassay

- 1) Standards or Assay samples ..... 100  $\mu$ l
- 2) I-125-T<sub>4</sub>-X solution ..... 500  $\mu$ l
- 3) Amerlex-Anti-T<sub>4</sub> solution ..... 500  $\mu$ l
- 4) ↓ Mixed, and incubate for 60 min at 37°C
- 5) Centrifuge for 15 min at 1500 g
- 6) Decant the supernatant
- 7) Count and calculate the assay results

められず, 60分のインキュベーションで十分との成績が得られた。また, インキュベーション温度については, 4°C, 37°C, および室温(23°C)につき比較したところ, Fig. 3 に示したごとく 37°C で最も良好な標準曲線が得られることが確かめられた。

同一測定内および異なる測定間における再現性を Table 2 で一括した。この表から明らかにごとく, 同一測定内での再現性は C.V. が 4.3%~5.3% の範囲を示し, 異なる測定間での再現性も C.V. が 2.6%~7.4% の範囲を示した。

#### 2. 臨床的検討

本測定法を用い, 144例の血中  $FT_4$  値を測定した結果を Fig. 4 で一括した。Fig. 4 でも明らかにごとく, それぞれの病態を反映した成績が得られた。すなわち, 健常人23例では 1.09~1.96 ng/dl の範囲を示し, 平均  $1.47 \pm 0.24$  ng/dl であった。

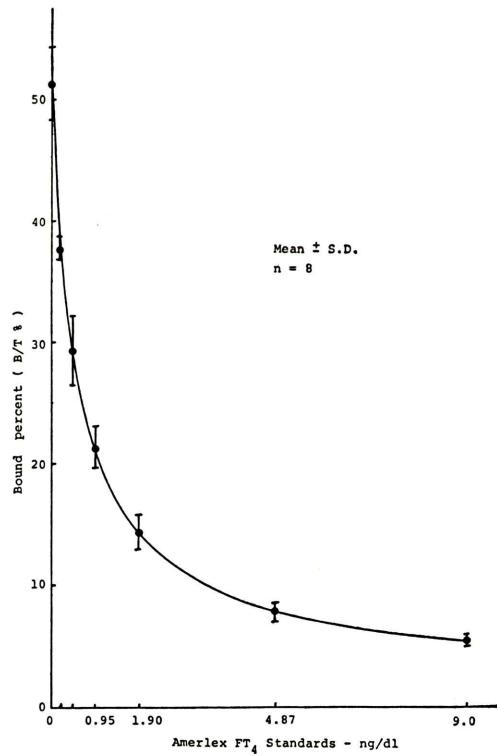


Fig. 1 Standard curve of Amerlex  $FT_4$  Radioimmunoassay.

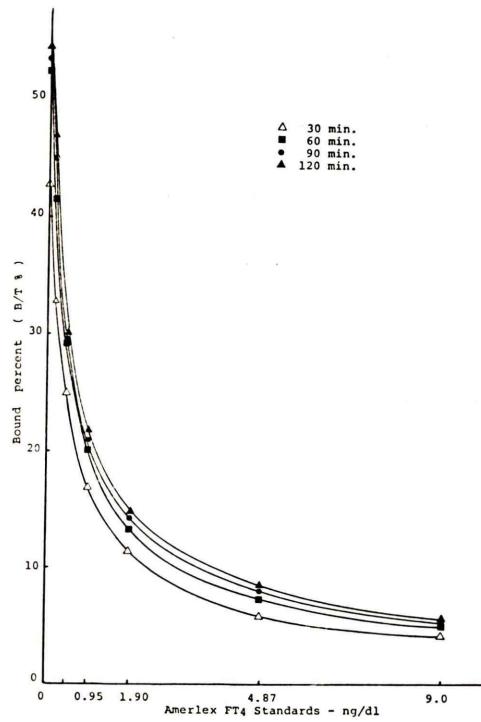


Fig. 2 Effect of incubation time on the standard curve of Amerlex FT<sub>4</sub> Radioimmunoassay.

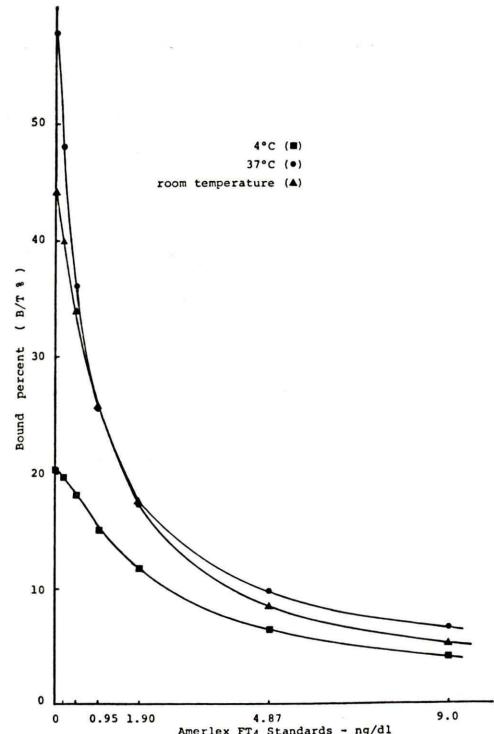


Fig. 3 Effect of incubation temperature on the standard curve of Amerlex FT<sub>4</sub> Radioimmunoassay.

Table 2 Intraassay and interassay reproducibility of Amerlex FT<sub>4</sub> radioimmunoassay system

(1) Intraassay reproducibility

	Assay results (ng/dl)								C.V. (%)		
	1	2	3	4	5	6	7	8			
Serum A.	0.67	0.66	0.59	0.65	0.64	0.63	0.64	0.68	0.65	0.03	4.3
Serum B.	1.48	1.54	1.49	1.53	1.50	1.65	1.50	1.67	1.55	0.07	4.8
Serum C.	4.81	4.72	4.78	5.42	5.21	5.29	5.12	5.13	5.07	0.27	5.3

(2) Interassay reproducibility

	Assay results (ng/dl)								C.V. (%)
	1	2	3	4	5	6	Mean	S.D.	
Serum D.	0.65	0.65	0.62	0.65	0.66	0.67	0.65	0.02	2.6
Serum E.	1.02	1.00	0.98	1.01	0.98	1.07	1.01	0.03	3.3
Serum F.	2.50	2.86	2.46	2.50	2.61	2.50	2.57	0.15	5.8
Serum G.	3.96	4.03	4.07	4.66	4.31	4.67	4.28	0.32	7.4

妊娠11例と euthyroid state の甲状腺疾患群33例とほぼこの領域に分布することが確かめられた。これに対し、甲状腺機能亢進症42例では、全例で

3.35 ng/dl 以上を示し、甲状腺機能低下症34例では、全例で 0.85 ng/dl 以下であった。これに対し、TBG 欠損症 1 例では 1.36 ng/dl であった。本測

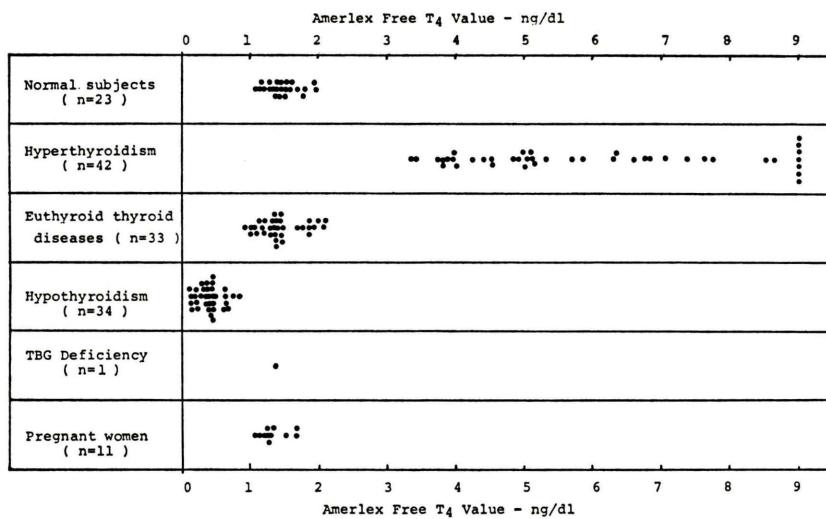


Fig. 4 Assay results of Amerlex FT<sub>4</sub> Radioimmunoassay in various thyroid diseases and normal controls.

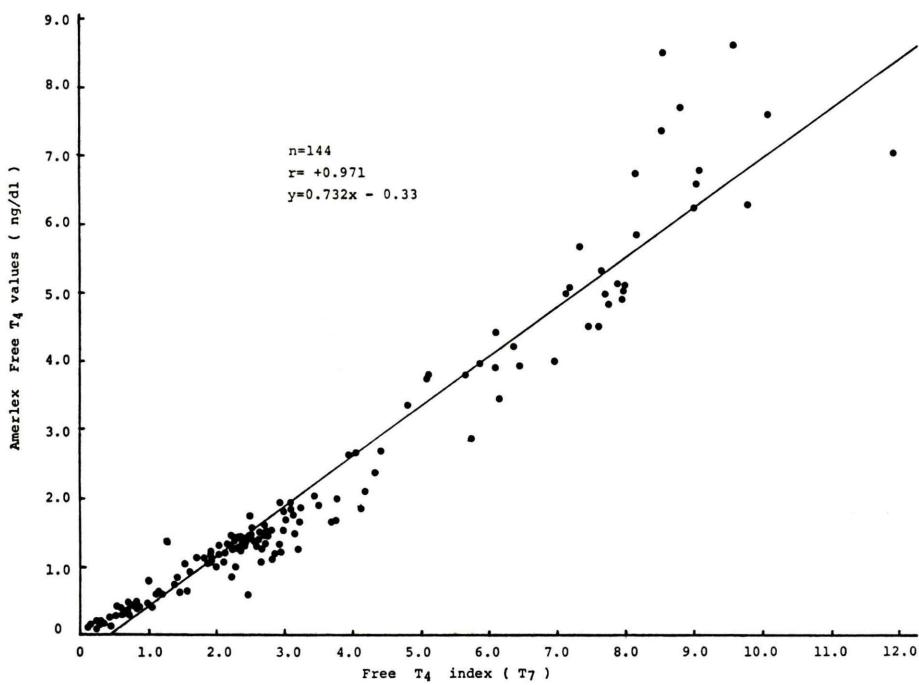


Fig. 5 Correlation between Amerlex FT<sub>4</sub> values and FT<sub>4</sub> index (T<sub>7</sub>) in various thyroid status.

定法で血中 FT<sub>4</sub> 濃度を測定した144例については同時に FT<sub>4</sub> index (T<sub>7</sub>) を求め、両者を比較した成績を Fig. 5 で示した。Fig. 5 でも明らかにとく、

両者の間には相関係数  $r=+0.971, y=0.73x-0.33$  と良好な相関関係を示すことが確かめられた。また、GammaCoat FT<sub>4</sub> RIA との測定値の比較で

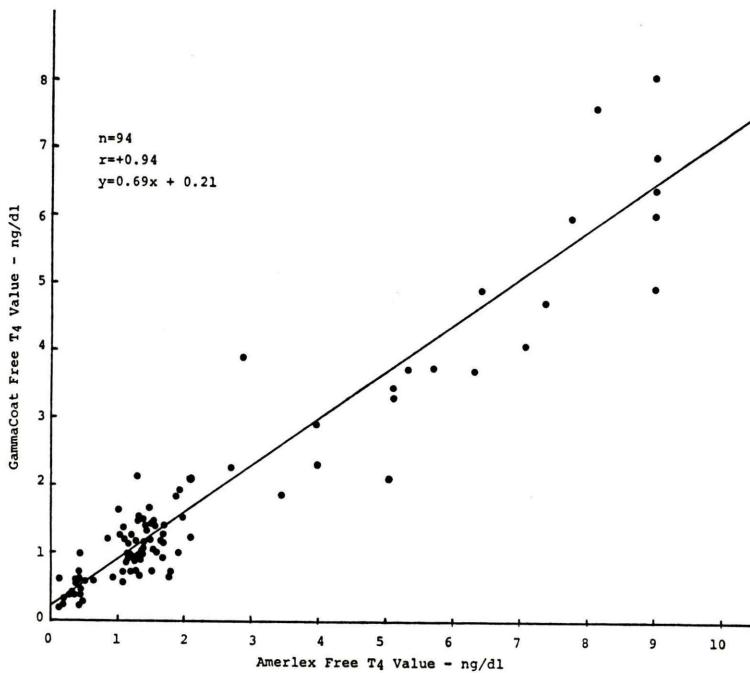


Fig. 6 Correlation between Amerlex FT<sub>4</sub> values and Gamma Coat FT<sub>4</sub> values in various thyroid status.

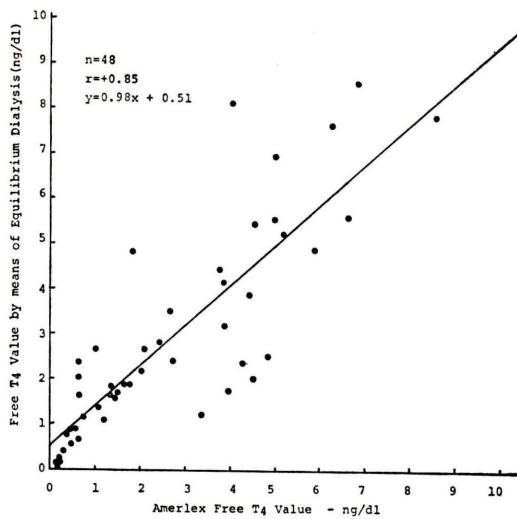


Fig. 7 Correlation between Amerlex FT<sub>4</sub> values and FT<sub>4</sub> values measured by equilibrium dialysis in various thyroid status.

は、Fig. 6 で示したごとく、両者の間には相関係数  $r=+0.94$ ,  $y=0.69x+0.21$ 。平衡透析との比較

では Fig. 7 に示したごとく、両者の間には相関係数  $r=+0.85$ ,  $y=0.98x+0.51$  と、いずれも良好な相関関係を示すことが確かめられた。

Euthyroid state にある TBG 異常症での FT<sub>4</sub> 値の評価を目的に、妊娠11例および TBG 欠損症 1 例では、さらに T<sub>3</sub>-resin uptake, total T<sub>3</sub>, total T<sub>4</sub>, FT<sub>4</sub> index, および TBG 濃度を同時に測定あるいは算出し、その成績を比較した (Fig. 8)。この表から明らかにごとく、T<sub>3</sub>-resin uptake は、妊婦では11例中 7 例で低値、1 例で正常下限を示し、また TBG 欠損症 1 例では著しく高値を示した。Total T<sub>3</sub> 値は、妊婦11例中 7 例で高値、1 例で正常上限を示し、TBG 欠損症 1 例では低値を示した。Total T<sub>4</sub> 値は、妊婦11例中 7 例で高値を示し、TBG 欠損症 1 例では低値を示した。TBG 濃度は、妊婦11例中10例で高値、1 例で正常上限を示し、TBG 欠損症 1 例では測定感度以下を示した。これらの症例の Amerlex FT<sub>4</sub> 値と FT<sub>4</sub> index をみると、いずれも正常域に分布し、特に TBG 欠損

症1例では FT<sub>4</sub> index よりも FT<sub>4</sub> 値が、その真的甲状腺機能を反映する成績が得られた。

#### IV. 考 案

血中 thyroxine は、そのほとんどが TBG を主とする thyroxine 結合蛋白と結合し、一部が free として存在する<sup>4)</sup>。この free thyroxine (FT<sub>4</sub>) は、正常人では total T<sub>4</sub> の 0.02~0.03% の割合と考えられ、ホルモン作用を発現する主役と考えられている<sup>5,6)</sup>。FT<sub>4</sub> の測定は、従来、平衡透析法<sup>7,8)</sup>が代表的方法とされているが、操作が繁雑であるなど、日常臨床検査法として応用するには難点があった。血中甲状腺ホルモン測定法の進歩に伴い、total T<sub>4</sub> については、日常臨床で簡単に測定することが可能である<sup>10)</sup>。しかし、total T<sub>4</sub> は Fig. 8 でも示したごとく TBG の影響をうけるため<sup>11,12)</sup>さらに FT<sub>4</sub> 量の測定が必要となる場合が少なくない。近年、Radioimmunoassay による血中 FT<sub>4</sub> 量の測定に関心が集まり<sup>9)</sup>、すでにいくつかの測

定法が提供されつつある。これらの測定法の原理をみると、total T<sub>4</sub> 測定用キットを用いたものや、マイクロカプセルを用いたものがある。われわれが検討した Amerlex FT<sub>4</sub> は、抗 T<sub>4</sub> 抗体を Amerlex 粒子に結合させた、いわゆる固相法で、FT<sub>4</sub> 測定用として開発されているため、TBP 結合 T<sub>4</sub> と FT<sub>4</sub> の平衡関係にほとんど影響を与えることなく、測定値が得られるよう抗体量が調整され、また、<sup>125</sup>I-T<sub>4</sub> には、T<sub>4</sub> 誘導体を用いることで、抗 T<sub>4</sub> 抗体とのみ特異的に結合し、反応液中の TBP とは結合しないよう工夫がなされている。平衡透析法との測定値の比較では、 $r = +0.85$ ,  $y = 0.89x + 0.51$  と良好な相関が認められ、GammaCoat FT<sub>4</sub> との測定値の比較でも  $r = +0.94$ ,  $y = 0.69x + 0.21$  と良好な相関関係が確かめられた。さらに今回検討に供した 144 例全例において、FT<sub>4</sub> index (T<sub>7</sub>) を求め比較したところ  $r = +0.97$ ,  $y = 0.73x - 0.33$  との成績が得られた。これらの成績は、Amerlex FT<sub>4</sub> で得られる値が、従来

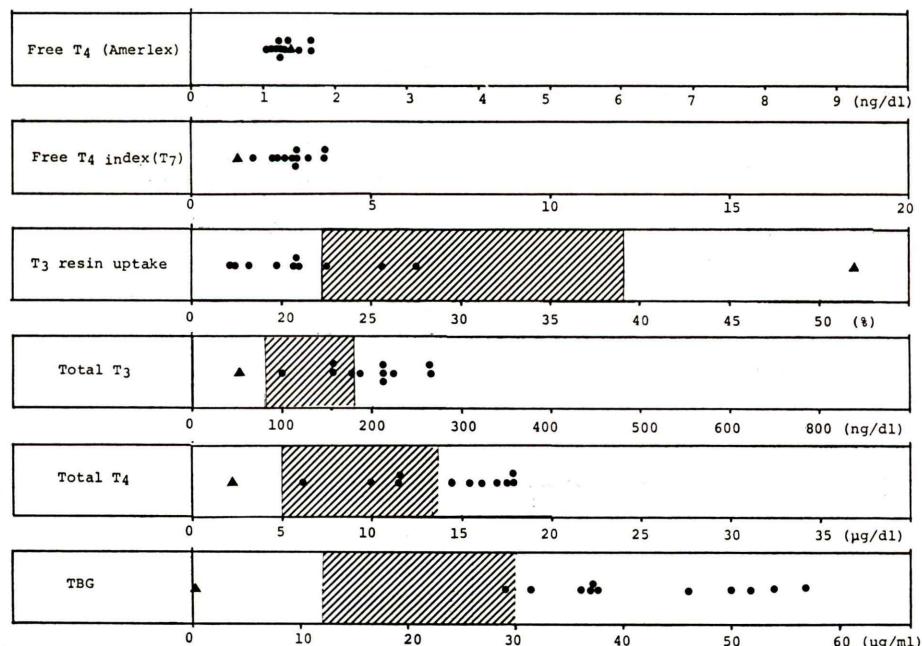


Fig. 8 Amerlex FT<sub>4</sub>, FT<sub>4</sub> index, T<sub>3</sub>-RU, total T<sub>3</sub>, total T<sub>4</sub> and TBG values in pregnant women (●) and TBG deficiency (▲).

FT<sub>4</sub> の指標とされてきた方法とよく一致することを意味している。さらに重要なことは、得られる測定値が患者の病態を反映したものであるかにあるといえる。これに関し、144例の症例を用い検討した成績では、満足できる結果が得られた。すなわち、健常人と甲状腺機能亢進症、健常人と甲状腺機能低下症との区別は明確であった。慢性甲状腺炎、結節性甲状腺腫、単純性甲状腺腫、などの euthyroid state にある甲状腺疾患群では、健常人の領域とよく一致することが確かめられた。特に妊婦11例や TBG 欠損症1例の TBG 異常症では、FT<sub>4</sub> 値は、健常人の範囲に分布することが確かめられた。これらの成績は、本測定法が血中 TBG 濃度にそれ程強い影響を受けずに真の FT<sub>4</sub> 値に近い値が得られるとする説明を、ある程度裏付けていると思われる。

RIA による血中 FT<sub>4</sub> の測定法の問題点として、TBG 増加症の FT<sub>4</sub> 値については、ほぼ満足できるが、甲状腺機能低下症や TBG 欠損症の FT<sub>4</sub> 値が、真の FT<sub>4</sub> 値を反映しうるか否かにあるとの指摘がある。これについては、Fig. 4 および Fig. 8 で示したごとく、われわれの成績では、特に問題となる成績は得られなかった。例えば、TBG 欠損症を例にとると、Amerlex FT<sub>4</sub> 値が 1.36 ng/dl と正常範囲であったが、この値は平衡透析法による値 1.2 ng/dl ともよく一致する成績であった。本症例は、T<sub>3</sub>-resin uptake (49.8%) は高値を示したが、total T<sub>3</sub> (47 ng/dl) と total T<sub>4</sub> (2.0 μg/dl) はいずれも著しく低値であった。しかし、TSH (1.3 μU/ml) は上昇しておらず、BMR (+15%)、甲状腺 I-123 摂取率 (16.7%) はいずれも正常であった。自覚症状や他覚的異常所見が全くないことから、臨床的には euthyroid state にあると思われた。しかし、FT<sub>4</sub> index (0.996) が低値であることから、検査所見と臨床所見との間に解離が生じ、本症例の病態の説明が困難であった。ところが Amerlex FT<sub>4</sub> 値でみると正常であったことから、本症例の病態の説明が容易となった。このことから、Amerlex FT<sub>4</sub> 値が甲状腺機能低下症や TBG 欠損症においても、その臨床病態を比較的よく反映した

成績が得られることを示唆していると考えられる。

FT<sub>4</sub> 値測定法にあっては、理論的にはどの測定原理に基づく方法であれ、その測定値は T<sub>4</sub>-TBG を主とする T<sub>4</sub>-TBP の影響を受けているものと考えられる。問題はその影響をいかに少なくした測定系を確立しうるかにあるといえる。その点 Amerlex FT<sub>4</sub> RIA は、その影響を最小限度にとどめた測定系ということができる。

## V. 結 語

Amerlex FT<sub>4</sub> RIA に関し、基礎的ならびに臨床的検討を行い以下の結論をえた。

(1) 標準曲線の再現性や精度、同一測定内および異なる測定間における再現性、など測定法を要求される諸条件を満足することを確かめた。

(2) インキュベーション温度は 37°C、インキュベーション時間は60分であり良好な標準曲線が得られた。

(3) 健常人 (23例) における測定値は 1.09~1.96 ng/dl の範囲を示し、平均  $1.47 \pm 0.24$  ng/dl であった。妊婦 (11例)、TBG 欠損症 (1例)、および euthyroid state の甲状腺疾患群 (33例) も、その測定値は健常人と同様の範囲に分布した。

(4) 甲状腺機能亢進症 (42例) と健常人 (23例)、健常人 (23例) と甲状腺機能低下症 (34例) との区別は明確であった。

(5) 本測定法で得られた測定値は、FT<sub>4</sub> index (T<sub>7</sub>) とは  $r=+0.97$ ,  $y=0.73x-0.33$ , GammaCoat FT<sub>4</sub> とは  $r=+0.94$ ,  $y=0.69x+0.21$ , また平衡透析法とは  $r=+0.85$ ,  $y=0.98x+0.51$  といずれも良好な相関関係が認められた。

稿を終るにあたり Amerlex FT<sub>4</sub> RIA Kit の提供をいただいた科研化学株式会社に謝意を表します。

## 文 献

- 1) Gross J, Pitt-Rivers R: The identification of 3, 5, 3'-L-triiodothyronine in human plasma. Lancet, 1: 439-441, 1952
- 2) Kendall EC: The isolation in crystalline form of the compound containing iodine which occurs in

- the thyroid. *J Amer Med Asoc*, **64**: 2042, 1915
- 3) Harrington CR: Chemistry of thyroxine, I. Isolation of thyroxine from the thyroid gland. *Bioch J*, **20**: 293-299, 1926
- 4) Robbins J, Rall JE: The interaction of thyroid hormones and protein in biological fluids. *Recent Prog Horm Res*, **13**: 161-208, 1957
- 5) Christensen LK: A method for the determination of free, non-protein bound thyroxine in serum. *Scandinav J Clin & Lab Invest*, **11**: 326-331, 1959
- 6) Sterling K, Hegedus C: Measurment of free thyroxine concentration in human serum. *J Clin Invest*, **41**: 1031-1040, 1962
- 7) Oppenheimer JH, Squef R, Surks MI, et al: Binding of thyroxine by serum proteins evaluated by equilibrium dialysis and electrophoretic techniques: Alterations in non-thyroidal illness. *J Clin Invest*, **42**: 1769-1782, 1963
- 8) Ingbar SH, Baverman LE, Dawber NA, et al: A New method for measuring the free thyroid hor-
- mone in human serum and an analysis of the factors that influence its concentration. *J Clin Invest*, **44**: 1679-1686, 1965
- 9) Henneman G, Docter R, Krenning EP, et al: Raised total thyroxine and free thyroxine index but normal free thyroxine: A serum abnormality due to inherited increased affinity of iodothyroines for serum binding protein. *Lancet*, **I**: 639-642, 1979
- 10) Chopra IJ, Solomon DH, Ho RS: A radioimmunoassay of thyroxine. *J Clin Endocr*, **33**: 865-868, 1971
- 11) Beierwaltes Wh, Robbins J: Familial increase in the thyroxine-binding sites in serum alpha globulin. *J Clin Invest*, **38**: 1683-1688, 1959
- 12) Ingbar SH: Clinical and physiological observation in a patient with an idiopathic decrease in the thyroxinebinding globulin of plasma. *J Clin Invest*, **40**: 2053-2063, 1961