

《ノート》

SPAC T₃ RIA KIT 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 "SPAC T₃ RIA kit"

信田 憲行* 中川 育** 田口 光雄**

Noriyuki SHINODA*, Tsuyoshi NAKAGAWA** and Mitsuo TAGUCHI**

Central Clinical Division of Radiology, Mie University Hospital**Department of Radiology, Mie University School of Medicine*

I. 緒 言

トリヨードサイロニン (T₃) は、1952 年 Gross および Pitt-Rivers ら¹⁾によって発見された甲状腺ホルモンである。その高いホルモン活性にもかかわらず血中に微量に存在するため測定が困難であったが、近年、ラジオイムノアッセイの開発²⁻⁶⁾により測定が容易となり、広く臨床検査に用いられている。

今回結合阻害物質に Merthiolate を用い、また B/F 分離に簡単な試験管固相法を用いた Byk-Mallinkrodt 社製のスパック T₃ キットを使用する機会を得たので、その基礎的、臨床的検討の結果を報告する。

II. 測 定 法

本キットは、B/F 分離を、抗体が内壁に Coating されている測定用チューブを用いて行っており、操作が簡便である。

一定量の検体または標準液および buffer 中に溶

解してある ¹²⁵I-T₃ を測定用チューブに加え、チューブ内壁の抗体と、競合反応させ、その後チューブ内の全液を吸引除去し、抗体と結合した ¹²⁵I-T₃ をカウントする。

本キットには上記測定用チューブ、¹²⁵I-T₃ 溶液 (TBG の T₃ 結合阻害剤として 0.3% Merthiolate が含まれている 0.05 mol Tris-Buffer pH 8.9)、各標準液 (0, 50, 100, 200, 400, 800 ng/dl) 6 バイアル等が含まれている。

以下キットの使用説明書⁷⁾に記載されている測定法を記す。

- (1) 標準液または患者血清 100 μ l を測定用チューブに加える。
- (2) ¹²⁵I-T₃ 溶液 1 ml を測定用チューブに分注し、穏やかに混和する。
- (3) 37°C の温浴で、2 時間 (\pm 5 分) インキュベートする。
- (4) 各チューブの内液をアスピレーターで吸引除去する。
- (5) 各測定用チューブの放射能を計測する。
- (6) 各標準液、および患者血清の測定値を標準液 0 ng/dl の測定値で除し、B/Bo (%) を求める。片対数グラフに標準曲線を作成し、患者血清の B/Bo (%) よりその T₃ 濃度を読み取る。

Key words: serum triiodothyronine, solid-phase, radioimmunoassay

* 三重大学医学部附属病院中央放射線部

** 三重大学医学部放射線科

受付: 56 年 1 月 29 日

最終稿受付: 56 年 5 月 18 日

別刷請求先: 三重県津市江戸橋 2-174 (番 514)

三重大学医学部附属病院中央放射線部

信田 憲行

III. 実験方法および対象

標準曲線について精度、再現性、測定感度の検定を行い、また、3種類のPool血清を用いて、検体についても、精度(intra-assay)、再現性(inter-assay)の検討を行った。これらの数値の算出には、われわれが先に報告した方法⁸⁾を用いた。

インキュベーション時間、温度の検討は、標準曲線に及ぼす影響について検討した。希釈試験は高T₃濃度の血清を0 ng/dlの標準液により希釈して行った。回収率の測定は低T₃濃度の血清に各種の標準液を添加して行った。抗体の特異性の検討において、各種T₃類似物質溶液の作成は先に報告した方法⁸⁾によった。

臨床的検討において、対象とした症例は合計99例であり、その内訳は、甲状腺疾患患者42例(甲状腺機能亢進症患者14例、甲状腺機能低下症患者6例、橋本氏病患者12例、結節性甲状腺腫患者7例、亜急性甲状腺炎3例)、正常妊娠7例、胞状奇胎患者7例、ネフローゼ症候群患者4例、妊娠末期の健康な胎児臍帯血5例、TBG減少症1例、肝硬変症患者5例、急性肝炎患者3例、悪性腫瘍患者12例で、正常者は、三重大学病院職員13例である。

IV. 実験成績

1) 標準曲線

Fig. 1は本法の標準曲線を示し、各点はduplicateで6回異なるassayを行って得た平均値および標準偏差(再現性)を示す。B/Bo(%)はT₃0濃度100(%)より、800 ng/dl, 17.7(%)まで下降し良好な標準曲線が得られた。またB₀/T(%)は38.2±6.7(%)であった。

2) 標準曲線の精度・再現性・感度

duplicateで6回のassayを行って得られた標準曲線の精度、再現性、感度をTable 1に示す。同一assay間のばらつきはC.V. 6.2(%)以下であり、異なるassay間のばらつきは、7.4(%)以下で両者とも安定した成績を示した。

最高感度は14 ng/dlであり、T₃濃度200 ng/dl

以下で15 ng/dl以下、200 ng/dl以上で80 ng/dl以下であった。

3) Pool血清より求めた測定値の精度、再現性低、中、高濃度の3種類のpool血清において、triplicateで6回の異なるassayを行い、合計18回の測定より求めた精度、再現性をTable 2に示す。Pool 1, Pool 2, Pool 3の平均値は、85.9, 160.3, 350.4 ng/dlであり、精度、再現性はおのおのC.V. 8.0(%)以下、C.V. 10.8(%)以下であった。

4) インキュベーション時間の影響

37°Cでインキュベーション時間を30, 60, 90, 120, 180分と変化させ、標準曲線に及ぼす影響について検討した結果をFig. 2に示す。いずれの濃度においても時間の延長と共にB/T(%)は増加したが、特に90分以下では低濃度領域での変動が著しかった。しかし、90分以後ではいずれの濃度

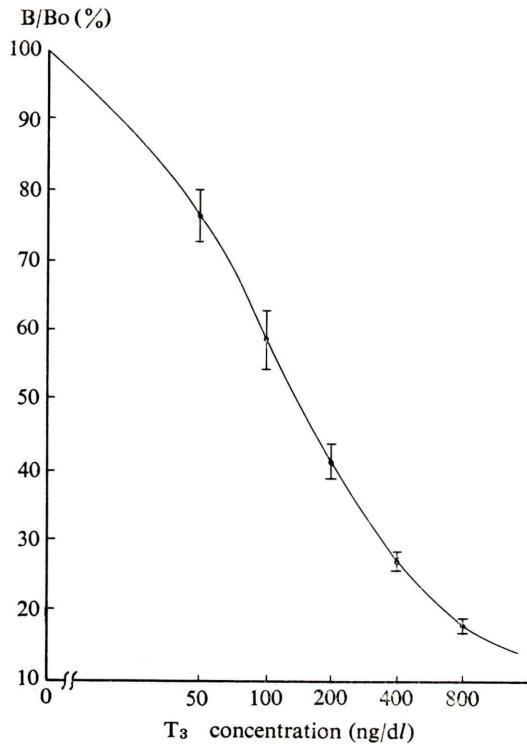


Fig. 1 Standard curve obtained by SPAC T₃ RIA Kit. Each point represents the mean±S.D. (reproducibility) of duplicate determinations in 6 different assays.

Table 1 Analysis of 6 T₃ standard curves obtained from 6 different assays performed in duplicate. Precision and Reproducibility express the variation within each assay and from assay to assay, respectively. Sensitivity express the least amount of T₃ distinguishable from the lower standards.

T ₃ concentration (ng/dl)	B/Bo (%)	Precision		Reproducibility		Sensitivity (ng/dl)
		s* (%)	c.v. (%)	s* (%)	c.v. (%)	
0	100	3.3	3.3	—	—	15
50	76.4	1.6	2.1	3.7	5.0	10
100	58.4	1.8	3.1	4.3	7.4	15
200	41.3	1.9	4.6	2.4	5.8	30
400	27.0	1.6	5.9	1.3	4.8	80
800	17.7	1.1	6.2	0.9	5.1	

*s: Estimate of standard deviation

Table 2 Precision and reproducibility estimated with three pooled sera

Samples	No. of determinations	No. of different assays	Mean (ng/dl)	Precision		Reproducibility	
				s* (ng/dl)	c.v. (%)	s* (ng/dl)	c.v. (%)
Pool 1	18	6	85.9	6.9	8.0	9.3	10.8
Pool 2	18	6	160.3	10.4	6.5	12.4	7.8
Pool 3	18	6	350.4	16.2	4.6	26.7	7.6

*s: Estimate of standard deviation

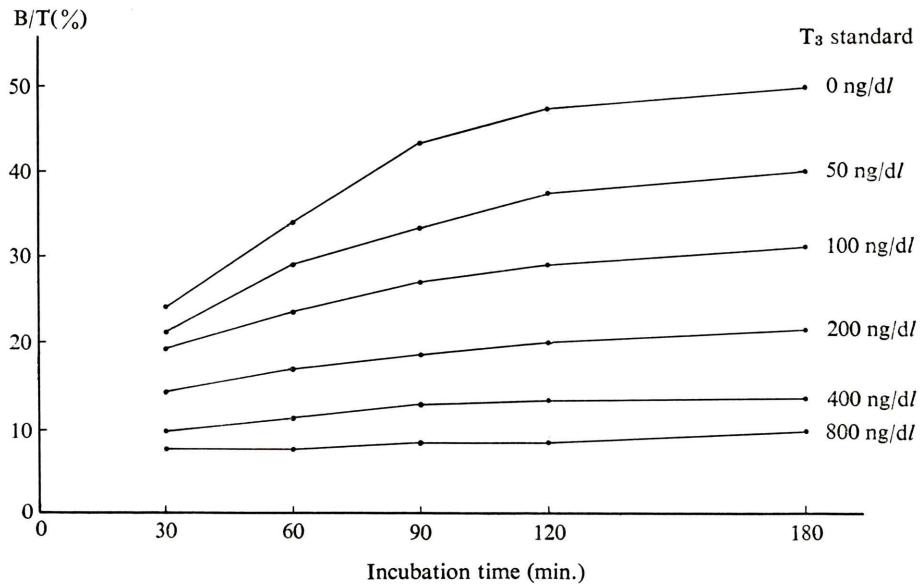


Fig. 2 Effect of incubation time on standard curve.

でもほぼプラトーに達して変動が少なかった。

5) インキュベーション温度の影響

インキュベーション時間は120分と一定にし、インキュベーション温度を25°C, 37°Cとして得た標準曲線をFig. 3に示す。25°Cでは37°Cに比し全体にB/T(%)が低値を示した。

6) 希釈試験

Fig. 4は、3例の甲状腺機能亢進症患者より得た血清を0 ng/dlのT₃標準液で2倍、4倍、8倍に希釈して求めた希釈曲線を示す。いづれも、ほぼ原点に収斂する直線上に分布した。

7) 回収率

Table 3は、T₃濃度がそれぞれ52 ng/dl, 74 ng/dl, 124 ng/dlの患者血清の3例に50, 100, 200, 400 ng/dlのT₃標準液を添加して得た回収率を示す。平均回収率は、50 ng/dlで90.8%, 100 ng/dlで91.5%, 200 ng/dlで86.9%, 400 ng/dlで92.6%で

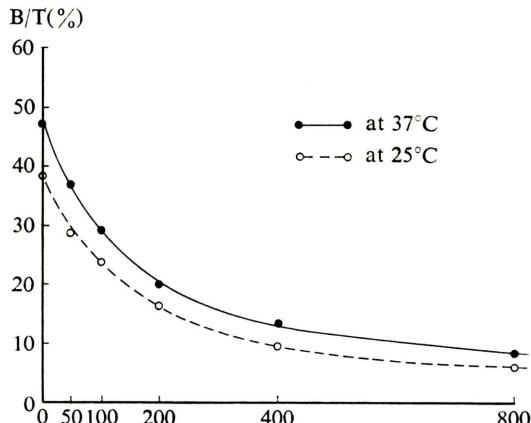


Fig. 3 Effect of incubation temperature on standard curve.

Table 3 Recovery study. Results were obtained in triplicate measurements in a single assay

T ₃ added (ng/dl)	T ₃ recovered				Percent recovery (%)
	Serum A (ng/dl)	Serum B (ng/dl)	Serum C (ng/dl)	Mean \pm S.D. (ng/dl)	
50	41.3	41.3	53.7	45.4 \pm 7.2	90.8 \pm 14.4
100	93.0	85.7	95.7	91.5 \pm 5.2	91.5 \pm 5.2
200	190.5	165.3	165.3	173.7 \pm 14.6	86.9 \pm 7.3
400	406.3	365.3	339.0	370.2 \pm 33.9	92.6 \pm 8.5

あった。

8) 抗体の特異性

0 ng/dlの標準液にL-T₄, 3, 5-diiodo-L-thyronine, DL-thyronine, 3, 5-diiodo-L-tyrosine, 3-iodo-L-tyrosineを種々の濃度に添加して得たB/Bo(%)が50%を示す濃度より推定した。

Table 4に示す如く、L-T₃を100%とした場合の% cross-reactivityは、L-T₄が0.02%, 3, 5-diiodothyronineが、0.04%を示した他は、すべて0.0001%以下であった。

9) 正常者および各種疾患例のT₃濃度

Fig. 5に示す如く、13例の正常者の平均値(m)および標準偏差(S.D.)は、132.4 \pm 16.8 ng/dlに分

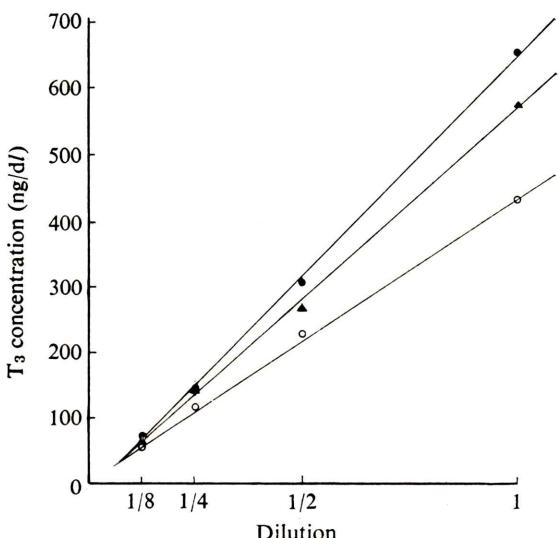


Fig. 4 Dilution curves obtained by the dilution of three samples of hyperthyroid serum with hormone free serum.

Table 4 Cross-reactivity of T₃ antiserum

Compound	% Cross-reactivity
3, 3', 5-Triiodo-L-thyronine	100
3, 5-Diiodo-thyronine	0.04
L-Thyroxine	0.02
D, L-Thyronine	<0.0001
3, 5-Diiodo-L-tyrosine	<0.0001
3-Iodo-L-tyrosine	<0.0001

布し, $m \pm 2$ S.D. から求めた正常範囲は 98.7~166.0 ng/dl となった。甲状腺機能亢進症は, 429.4 \pm 174.9 ng/dl に分布し, 正常域と重なることはなく, 0.1 % の危険率で有意の高値を示し, 甲状腺機能低下症は, 51.2 \pm 43.6 ng/dl に分布し, 1 % の危険率で有意の低値を示した。

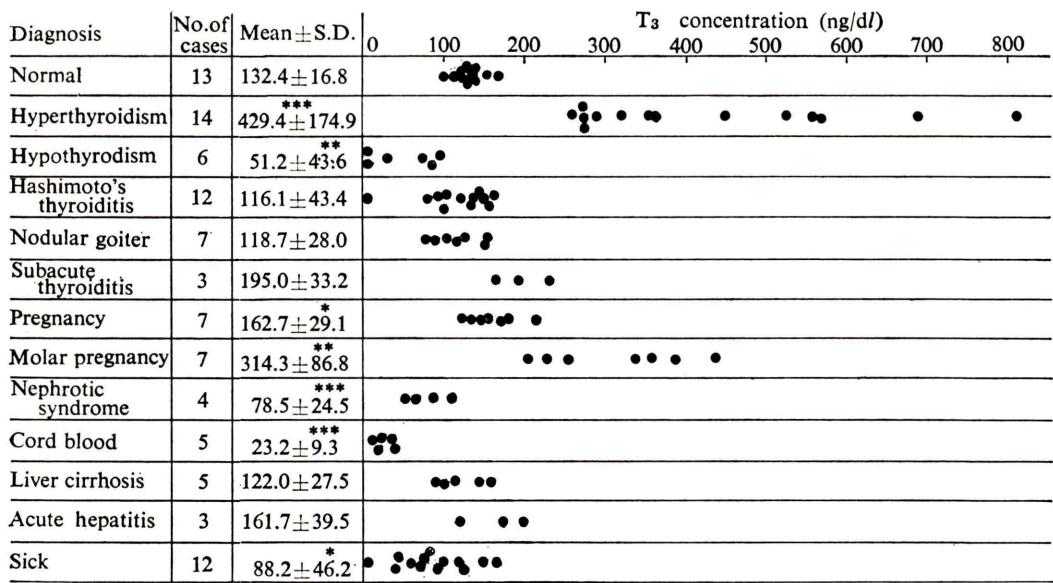
橋本氏病は, 116.1 \pm 43.4 ng/dl に分布し, 結節性甲状腺腫は, 118.7 \pm 28.0 ng/dl に分布し, 亜急性甲状腺炎は 195.0 \pm 33.2 ng/dl に分布した。正常妊娠は 162.7 \pm 29.1 ng/dl に分布し, 5 % の危険率

で有意に高値となり胞状奇胎患者は 314.3 \pm 86.8 ng/dl で, 1 % の危険率で有意の高値を示した。ネフローゼ症候群, 脾帶血は, それぞれ 78.5 \pm 24.5 ng/dl, 23.2 \pm 9.3 ng/dl とおのおの 0.1 % の危険率で有意の低値となった。肝硬変, 急性肝炎は, 122.0 \pm 27.5 ng/dl, 161.7 \pm 39.5 ng/dl に分布し, 悪性腫瘍は 88.2 \pm 46.2 ng/dl と 5 % の危険率で有意の低値を示した。1 例の TBG 減少症は 86 ng/dl と低値を示した。

10) T₃ リアキット II による T₃ 値との比較

対象とした 99 例の各種症例について, 本法により測定した T₃ 値と, T₃ リアキット II (ダイナボット RI 研究所) による測定値を比較検討した成績を Fig. 6 に示す。

両者の測定値の間には, 相関係数 0.979 で, 0.1 % 以下の危険率で有意の相関を認めた。本法による T₃ 値 (Y) と T₃ リアキット II による T₃ 値 (X) の間には $Y = 1.022X + 7.396$ の回帰直線が, 得ら



⊗ TBG deficiency

* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$

Fig. 5 Serum T₃ concentration in various physiological and pathological states.

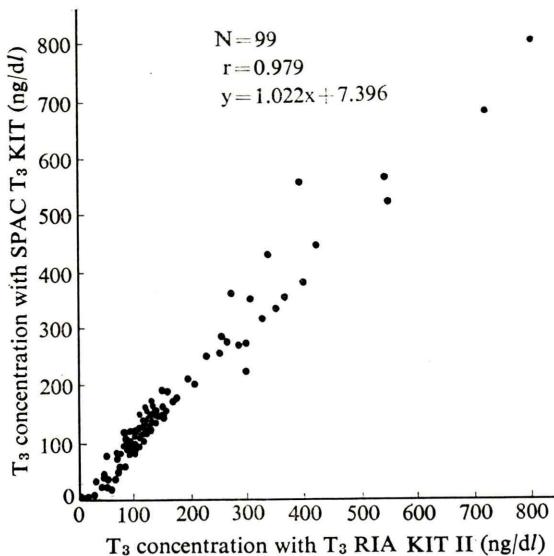


Fig. 6 Correlation between serum T₃ values with SPAC T₃ Kit and those with T₃ RIA KIT II.

れ、ほぼ一致した値が示された。

V. 考 案

固相法による RIA は、一般に簡便であり、特に本法の様な抗体を tube 内壁に coating した試験管固相法は、短時間で大量処理が可能となり、自動化においても適している。BF 分離に要する時間は、100 検体で約10分で可能であり、他の遠心操作を要する assay より著しく簡単である。

他の固相法と同様に、標準液 0 ng/dl の total に count 対する % すなわち $B_0/T(\%)$ は 6 回の測定で平均値 \pm 標準偏差 38.2 ± 6.7 であり、全体に低値の傾向があった。しかし、 $B/B_0(\%)$ により、plot した標準曲線は、安定しており、intra-assay で C.V. 6.2(%) 以下、inter-assay でも、7.4(%) 以下と良好であった。また、最高感度は 14 ng/dl、T₃ 濃度 200 ng/dl まで 15 ng/dl 以下、200~800 ng/dl で 80 ng/dl 以下であり、臨床的に十分満足される値であると思われる。

Pool 血清より求めた精度、再現性はいずれも良好でそれぞれ C.V. は 8.0% 以下、10.8% 以下であった。

インキュベーション時間の影響は標準曲線の変

動が90分以上でほぼプラトーに達しており、また、標準曲線の勾配も充分となり原法の 120 分で妥当であると思われた。また、インキュベーション温度については、25°C に比し、37°C の方が $B/T(\%)$ は全体に高くなり、この原因として反応速度の関与が推察された。この結果からインキュベーション温度は、37°C 一定で行うべきと考える。

希釈曲線は、ほぼ直線上に分布しており、800 ng/dl を越す血清については、希釈測定が可能と思われた。各種 T₃ 濃度の血清に T₃ を添加して行った回収率は平均 90.45% で幾分低値の傾向があると推察された。T₃ 類似物質に対する交差反応は、T₄ と 0.02%、T₂ と 0.04% 認めたが、実際測定上ほとんど問題とならないと思われる。

本法による正常者の平均値と標準偏差は 132.4 ± 16.8 ng/dl であり、2 S.D. までを正常範囲とすると、98.7~166.0 ng/dl となり、諸家の報告^{9,11)}とよく一致した。甲状腺機能亢進症および機能低下症は、正常値に比し有意の差で高値、低値となり、良好な分離が得られた。橋本氏病では低値のものもあり、結節性甲状腺腫は、正常範囲に、亜急性甲状腺炎は、高値となる傾向があった。正常妊娠の T₃ 濃度増加は、軽度であり TBG の増加に伴うと考えられるが、胞状奇胎の増加は、著しく甲状腺機能亢進症の領域にあり、この原因として胞状奇胎より甲状腺刺激物質が分泌され^{12,13)}、それは恐らく HCG によるものであろうと考えられている^{14,15)}。

TBG の減少するネフローゼ症候群では有意の低値を示し、TBG 減少症の 1 例も低値を示した。臍帶血は 23 ng/dl と著しい低値を示した。他の文献¹⁶⁾でも明かな低値を示すことが報告されており、この原因として T₄ から T₃ への転換が減少し、reverse T₃ への転換が増加すると考えられている。木村らの報告¹⁷⁾では出生後 2 時間で T₃ は急速に増加し、正常高値となりこれは酸素の投与によって促進されるという。肝硬変は、正常範囲に分布し、急性肝炎の中には、やや高値を示すものがあった。悪性腫瘍例の中には明らかな低値を示すものがあり、推計学的にも 5% の危険率で有意の低

値を示した。甲状腺疾患以外の重症患者¹⁸⁾、手術後¹⁸⁾、あるいは、飢餓状態¹⁹⁾などで free T₃ および T₃ が低下していることが報告されており、この原因として末梢での T₄ から T₃ への転換の低下が推定されている¹⁹⁾。

同一検体を T₃ リアキット II (ダイナボット社) にて測定した T₃ 値は、本法と良好な相関($r=0.979$) を示し、ほぼ一致した値が得られた。

VI. まとめ

固相法によるスペック T₃ キットについて基礎的、臨床的検討を行った。

- 1) 本法は、tube に抗体が coating されており、操作が簡便かつ、短時間処理が可能である。
- 2) 標準曲線は精度、再現性ともに安定している。
- 3) インキュベーション時間、温度は、原法の 120 分、37°C で満足される。
- 4) 希釈曲線は、ほぼ直線上に分布しており、回収率も平均 90.45% で良好である。交差反応は、T₄ 0.02%、T₂ 0.04% 認めるが日常検査を十分満足している。
- 5) 正常者は、98~166 ng/dl で甲状腺機能亢進症、低下症とも有意に高値、低値であり、良好な分離が認められた。その他各種甲状腺疾患およびその他の疾患で従来の報告とよく一致した。
- 6) 同一検体を T₃ リアキット II による T₃ 値との相関は $r=0.979$ と良好な相関関係を得た。

最後に検体の採取に御協力頂いた産婦人科村田和平先生、放射線科古川勇一先生に感謝します。また、キットを提供された第一ラジオアイソotope 研究所に謝意を表します。

文献

- 1) Gross J, Pitt-Rivers R: The identification of 3, 5, 3'-L-Triiodothyronine in human plasma. *Lancet* **1**: 439, 1952
- 2) Gharib H, Ryan RJ, Mayberry WE, et al: Radioimmunoassay for triiodothyronine (T₃): I. Affinity and specificity of the antibody for T₃. *J Clin Endocrinol Metab* **33**: 509, 1971
- 3) Mitsuma T, Gerhengorn M, Colucci J, et al: Radioimmunoassay of triiodothyronine in unextracted human serum. *J Clin Endocrinol Metab* **33**: 364-367, 1971
- 4) Lieblich J, Utiger RD: Triiodothyronine radioimmunoassay. *J Clin Invest* **51**: 157-166, 1972
- 5) Larsen PR: Direct immunoassay of triiodothyronine in human serum. *J Clin Invest* **51**: 1939-1949, 1972
- 6) Chopra IJ, Solomon DH, and Beall GN: Radioimmunoassay for measurement of triiodothyronine in human serum. *J Clin Invest* **50**: 2033-2041, 1971
- 7) Byk-Mallinkrodt 社: SPAC-T₃ 使用説明書
- 8) 中川 豊、信田憲行、田口光雄: コンスル T₄ RIA による血中サイロキシンの測定. 核医学 **16**: 55-62, 1979
- 9) 小野芳子、高坂唯子、遠藤啓吾、他: カラムを用いた T₃ RIA キット“セラリュート T₃”の基礎的ならびに臨床的検討. 核医学 **13**: 31-38, 1976
- 10) 分校久志、杉原政美、久田欣一: レジン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キットの基礎的、臨床的検討. 核医学 **15**: 111-115, 1978
- 11) 中川 豊、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**: 47-54, 1979
- 12) Galton VA, Ingbar SH, Fonseca JJ, et al: Alteration in thyroid hormone economy in patients with hydatidiform mole. *J Clin Invest* **50**: 1345-1354, 1971
- 13) Miyai K, Tanizawa O, Yamamoto T, et al: Pituitary-thyroid function in trophoblastic disease. *J Clin Endocrinol Metab* **42**: 254-259, 1976
- 14) Kenimer JG, Hershman JM, Higgins HP: The thyrotropin in hydatidiform moles is human chorionic gonadotropin. *J Clin Endocrinol Metab* **40**: 482-491, 1975
- 15) Higgins HP, Hershman JM, Kenimer JG, et al: The thyrotoxicosis of hydatidiform mole. *Annals of Int Med* **83**: 307-311, 1975
- 16) Chopra IJ, Sack J, Fisher DA: Circulating 3, 3', 5'-triiodothyronine (Reverse T₃) in the human newborn. *J Clin Invest* **55**: 1137-1141, 1975
- 17) 木村孔右: 妊娠母体・胎児・新生児における甲状腺機能の研究. 日産婦誌 **30**: 1385-1394, 1978
- 18) Bermudez F, Surks MI, Oppenheimer JH: High incidence of decreased serum triiodothyronine concentration in patients with nonthyroidal disease. *J Clin Endocrinol Metab* **41**: 27-40, 1975
- 19) Portnay GI, O'Brian JT, Bush J et al: The effect of stavartion on the concentration and binding of thyroxine and triiodothyronine in serum and on the response to TRH. *J Clin Endocrinol Metab* **39**: 191-194, 1974