

《ノート》

栄研サイログロブリン RIA キットの基礎的検討

Basic Evaluation of "Eiken" Thyroglobulin Radioimmunoassay Kit

山下 俊一* 和泉 元衛* 森田 茂樹* 平湯 秀司*

田辺 徹* 佐藤 賢士* 森本 勲夫* 岡本 純明*

長瀧 重信*

Shunichi YAMASHITA, Motomori IZUMI, Shigeki MORITA,
 Hidesi HIRAYU, Touru TANABE, Kenshi SATO,
 Isao MORIMOTO, Sumiaki OKAMOTO and Shigenobu NAGATAKI

First Department of Internal Medicine, Nagasaki University School of Medicine, Nagasaki, Japan 852

I. はじめに

サイログロブリン(以下 Tg)は分子量約66万の甲状腺由来の糖蛋白で甲状腺可溶蛋白の60~80%を占める。甲状腺内の Tg は甲状腺ホルモンの合成、貯蔵、分泌に際し重要な役割を演じている。1967年 Roitt & Torrigiani らによって Tg の radioimmunoassay (RIA) が確立されて以来¹⁾、甲状腺内のみならず正常人血清中にも Tg が存在し、同時に各種甲状腺疾患で血中 Tg 濃度が上昇することが報告されている^{2,3)}。さらに近年になり術後甲状腺癌の tumor marker として Tg が利用されつつある⁴⁾。

今回著者らは栄研 Tg RIA キットを用いその基礎的検討を行い臨床応用への有用性を認めたのでその結果を報告する。

II. キットの内容および操作方法

本キットには次のような試薬が含まれている。

* 長崎大学医学部第一内科

受付: 57年6月22日

最終稿受付: 57年10月7日

別刷請求先: 長崎市坂本町7-1 (番852)

長崎大学医学部附属病院第一内科

山下俊一

1) サイログロブリン(Tg) 標準液 (0, 10, 20, 40, 80, 160, 320 ng/ml)

2) ¹²⁵I 標識 Tg (凍結乾燥品)

3) 抗 Tg 抗体 (凍結乾燥品)

4) 第2抗体 (凍結乾燥品)

5) 沈殿抗体 (抗ヒト IgG 抗体)

¹²⁵I 標識 Tg は 4°C 保存で約 1か月間安定である。測定方法は Table 1, 2 に示した。はじめに Table 1 の方法に従い血清中抗 Tg 抗体の有無を検討する。¹²⁵I-Tg と結合する血清中の抗体量を沈殿抗体でおとし、この沈殿カウント (B) と Total count (T) の比が 10% 以上を抗体陽性とした。サイロイドテスト (富士臓器) と良好な相関を示し、サイロイドテスト陰性の正常健康成人では全例 B/T は 10% 以下であった。また B/T が 10% 以下では次の 2 抗体法への影響は皆無であった。そこで B/T が 10% 以下の検体について Table 2 に示す方法で Tg 濃度を測定する。Preincubation を 1 日おくため測定にかかる日数は 3 日間である。

III. 対象

抗体陰性の正常健康成人 57 例と各種甲状腺疾患

Key words: Thyroglobulin, Radioimmunoassay.

Table 1 Assay procedure (1)
Detection of anti-Tg antibody

Serum (diluted 1:10)	50 μ l
^{125}I -Tg	200 μ l
↓	incubated at 25°C for 24 hr.
Anti-IgG antibody (goat)	100 μ l
↓	incubated at 25°C for 30 min.
Centrifuge at 3,000 rpm for 30 min. at 4°C	
↓	
Counting of the precipitate (B)	

(Tg: Thyroglobulin)

* B/T \geq 10%: positive anti-Tg antibody

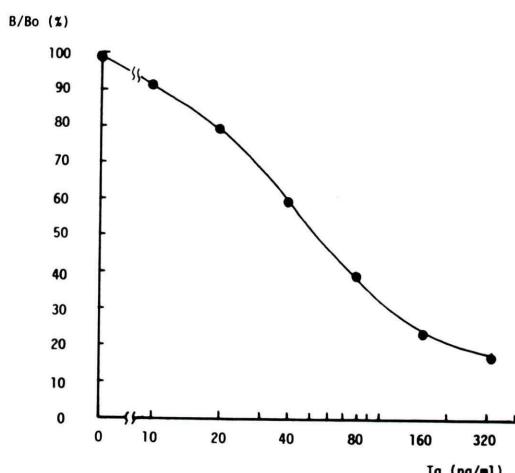


Fig. 1 Standard curve.

患者 148 例を対象とした。

IV. 結 果

1. 抗体測定

第 1 インキュベーション時間の差による B/T (%) の変動を検討したところ 24 時間室温反応で B/T は徐々に上昇し、その後平衡状態となった。サイロイドテスト陰性の健康成人 57 例ではすべて 10% 以下の B/T であった。

2. 標準曲線

Fig. 1 に、この方法による標準曲線を示した。10 から 320 ng/ml の間で良好な曲線が得られた。

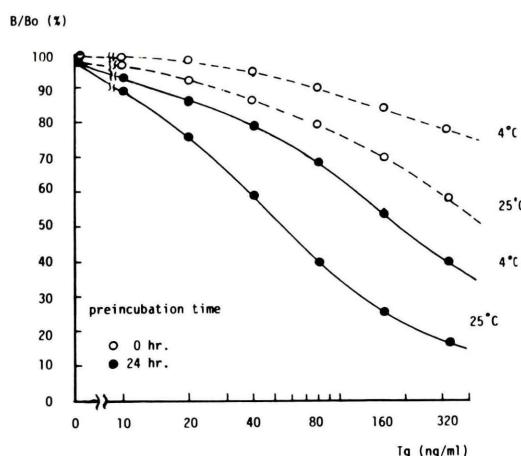


Fig. 2 Influence of first incubation time and temperature on standard curve.

Table 2 Assay procedure (2)
Measurement of Tg

Sample serum or standard	100 μ l
Anti-Tg antibody	200 μ l
↓	incubated at 25°C for 24 hr.
^{125}I -Tg	200 μ l
↓	incubated at 25°C for 24 hr.
Second antibody	100 μ l
↓	incubated at 25°C for 30 min.
Centrifuge at 3,000 rpm for 30 min. at 4°C	
↓	
Counting of the precipitate	

3. 標準曲線の incubation 時間、温度による影響

Fig. 2 は preincubation 時間を 1 日おくことで良好な標準曲線がえられた。first incubation は、1, 3, 6, 12, 24 時間と B/T の上昇を認め 24 時間に以降はほぼ均一な B/T を認めた。また second incubation 時間は 30 分、60 分で B/T に変化を認めなかった。First incubation 温度は室温で良好であり、second incubation の温度による影響はなかった。以上の結果から preincubation を 1 日おく必要があり、first incubation が温度、時間により影響をうけることが示された。以下の検討は Table 2 に示す方法で行った。

4. 希釈試験

Fig. 3 は血中 Tg 濃度の異なる 2 検体を用いて Tg free 血清を用い、倍々希釈した時の結果を示したものである。2 検体とも良好な直線性を認めた。

5. 精度および再現性

Table 3 は血中 Tg 濃度の異なる 4 検体について同時測定系における再現性を示したものである。Coefficient variation (CV) は 6.20~9.25% の範囲であった。また血中 Tg 濃度の異なる 6 検体について異時測定系における再現性を Table 4 に示したが、その CV は 3.17~9.67% の範囲にあり良好な結果であった。

本アッセイ系の感度は Tg free 血清を測定した場合 0~4.2 ng/ml であった。

6. 回収率

Table 5 は既知濃度の標準溶液を加えその回収

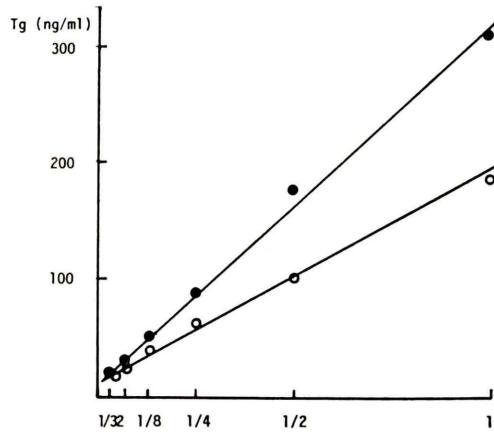


Fig. 3 Dilution curve.

率を示したものである。平均 109.1% と良好な回収率を示した。

7. 著者らの Tg RIA⁵⁾ 法との比較 (Fig. 4)

本キットを用い 57 例の健康成人の血中 Tg 濃度を測定したところ 15.1 ± 7.0 (mean \pm SD) ng/ml であった。そこで、従来著者らの教室で測定している Tg RIA 法と本キットとの測定値を比較検討したところ $r=0.937$ ($p<0.001$) ときわめて良好な相関を認めた。

8. 各種甲状腺疾患患者の血中 Tg 濃度

Fig. 5 に各種甲状腺疾患患者の血中 Tg 濃度を

Table 3 Results of intra-assay variation

Sample	A	B	C	D
1	22.7	29.3	85.9	110.7
2	23.5	32.5	81.5	116.3
3	24.3	31.9	93.3	113.3
4	23.3	32.5	88.1	114.7
5	15.5	36.3	93.0	101.9
6	25.2	34.3	88.6	118.5
7	23.0	34.9	85.5	119.9
8	23.3	32.5	88.9	111.4
9	25.2	32.3	83.3	111.4
10	23.1	35.2	87.3	102.8
11	21.6	30.1	79.1	117.8
12	23.2	30.8	82.0	118.6
13	21.5	27.9	97.7	92.3
14	23.4	29.2	86.5	99.5
15	21.5	32.3	76.0	114.7
16	21.9	29.6	86.2	107.2
17	25.2	32.3	80.4	104.2
18	21.9	32.4	85.6	105.3
19	22.3	32.0	92.4	114.5
20	/	34.1	/	93.7
mean	22.7 ± 2.1	32.1 ± 2.1	86.4 ± 5.3	109.4 ± 8.0
\pm SD				
CV (%)	9.25	6.54	6.20	7.31

Table 4 Results of inter-assay variation

Sample	A	B	C	D	E	F
1	15.8	25.6	49.3	80.2	160.2	263.5
2	14.9	28.2	46.2	81.4	158.6	290.2
3	15.5	26.5	55.2	86.3	137.8	232.6
4	18.3	23.7	48.4	80.2	172.8	272.3
5	16.5	23.9	45.5	83.6	151.5	233.8
mean \pm SD	16.2 ± 1.3	25.6 ± 1.9	48.9 ± 3.8	82.3 ± 2.6	156.4 ± 12.5	258.4 ± 25.0
CV (%)	7.14	7.30	7.77	3.17	8.00	9.67

Table 5 Results of recovery test

Serum (μ l)	Added Tg (μ l of ng/ml)	Measured (ng/ml)	Recovered (ng/ml)	Recovery (%)
100	0		26.2	
50	50 of 0	13.1	15.6	119.1
50	50 of 20	23.1	28.3	122.5
50	50 of 40	33.1	30.8	93.1
50	50 of 80	53.1	57.7	108.7
50	50 of 160	93.1	96.4	103.5
50	50 of 320	173.1	186.6	107.8

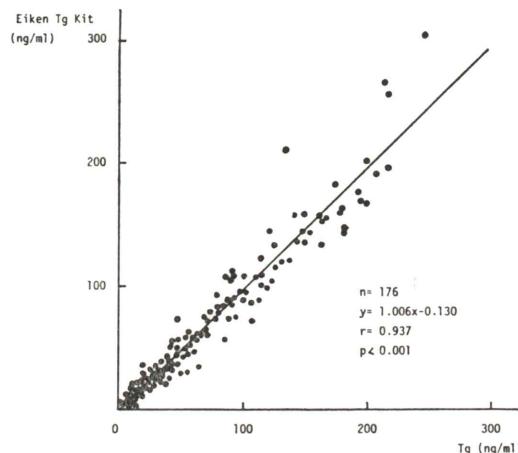


Fig. 4 Relationship between Eiken Tg Kit and our Tg RIA.

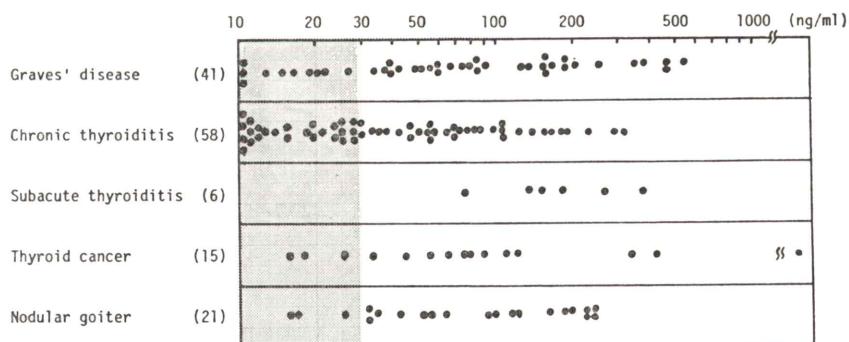


Fig. 5 Serum thyroglobulin levels in various thyroid diseases.

示した。Graves 病や橋本氏病では一定の傾向はなかった。亜急性甲状腺炎の急性期では全例高値を示した。甲状腺結節患者の血中 Tg 濃度も正常範囲内から高値まで広く分布し一定の傾向を認めなかつた。

V. 考 案

本キットは preincubation を 24 時間、first incubation を 24 時間、second incubation を 30 分で測定する 2 抗体法を利用しているが、この Tg

測定前日に自己抗体測定を行うためすべての assay にかかる日数は 3 日間である。

今回われわれの検討において自己抗体の測定は 1 日の incubation 時間で十分であることが判明した。標準曲線は 10 から 320 ng/ml の間に良好な curve を認めた。特に 10 から 160 ng/ml の間で B/Bo (%) の変化は急峻であり、生理的状況下での微少な Tg 濃度の変化⁶⁾ や、術後甲状腺癌の経過観察中の変化^{4,7)}などをとらえうるものと思われた。希釈試験の結果も良好であり高濃度 Tg の測定も適当な希釈により可能である。また B/Bo が preincubation や first incubation の時間、温度に依存して変化することが示された。Incubation 時間が長いほど、また 4°C よりも室温の方が B/Bo の上昇と急峻な curve がえられた。一般臨床検査における測定に際しては Table 1, 2 の方法により良好な Tg 濃度がえられることから、incubation 時間および温度の設定はある許容範囲内においてはそれほど厳密にする必要はないと思われた。その他、再現性や回収率においても良好な結果を認めた。

すでに各種甲状腺疾患で血中 Tg 濃度が上昇することが報告されている^{3,8)}。本キットによる正常値は平均 15.1 ± 7.0 ng/ml であり、諸家の報告^{3~5,9)}とほぼ同様な結果をえている。今回、特に著者らが従来から測定している RIA 法と比較しても $r=0.937$ と良好な相関性を認めた。特に低濃度での相関は良好であったが、比較的高濃度でやや高めにでる傾向にあった。各種甲状腺疾患における血中 Tg 濃度測定の結果、亜急性甲状腺炎全例に Tg 上昇を認めたが、他の疾患では一定の傾向を認めなかった。このため血中 Tg 濃度のみでは各種甲状腺疾患の診断的意義は少ないと考えられる。しかし、術後甲状腺癌の経過観察の示標としてだけではなく^{4,10,11)}、他の諸検査と組み合わせることにより甲状腺結節の術前診断もある程度可能である^{12,13)}。さらに、未だ血中 Tg の生理的意義や甲状腺からの分泌機序も明らかではない現在、これらの解明に血中 Tg 濃度の測定はきわめて有用と考えられる¹⁴⁾。バセドウ氏病の血中 Tg

濃度と異常甲状腺刺激物質 (TDI)との関連性もあり治療の示標としても利用可能かもしれない¹⁵⁾。さらに、血中 Tg の heterogeneity を利用した方法で良性疾患と悪性腫瘍との鑑別ができるか¹⁶⁾の検討や、抗 Tg 抗体を用いた Radioimmuno-detection などの利用に際し¹⁷⁾血中 Tg 濃度の測定は必要である。

今後、抗 Tg 抗体存在下での正確な血中 Tg 濃度測定法が望まれる。

VI. 結 語

栄研 Tg RIA キットの基礎検討の結果、感度、再現性等に良好な成績を認めた。また著者らの RIA 法⁵⁾との間に良好な相関を認めた。以上より、本キットは簡便かつ信頼性があり臨床応用が可能であるキットと考えられた。

キットの提供をうけた栄研イムノケミカル研究所に感謝致します。

文 献

- Roitt IM, Torrigiani G: Identification and estimation of undegraded thyroglobulin in human serum. *Endocrinology* 81: 421-429, 1967
- Van Herle AJ, Vassart G, Dumont JE: Control of thyroglobulin synthesis and secretion (First of two parts) *N Engl J Med* 301: 239-249, 1979
- Van Herle AJ, Vassart G, Dumont JE: Control of thyroglobulin synthesis and secretion (Second of two parts) *N Engl J Med* 301: 307-314, 1979
- Schneider AB, Line BR, Goldman JM: Sequential serum thyroglobulin determinations, ^{131}I scans, and ^{131}I uptakes after triiodothyronine withdrawal in patients with thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 53: 1199-1206, 1981
- Izumi M, Larsen PR: Correlation of sequential changes in serum thyroglobulin, triiodothyronine thyroxin in patients with Graves' disease and subacute thyroiditis. *Metabolism* 27: 449-460, 1978
- Ket JL, De Vijlder JJM, Bikker H: Serum thyroglobulin levels: The physiological decrease in infancy and the absence in athyroidism. *J. Clin Endocrinol Metab* 58: 1301-1303, 1981
- McDougall IR, Bayer MF: Follow up of patients with differentiated thyroid cancer using serum thyroglobulin measured by an immunoradiometric assay.

- Comparison with I-131 total body scans. J Nucl Med **21**: 741-744, 1980
- 8) 山下俊一, 和泉元衛, 大財 茂: 各種甲状腺疾患における血中サイログロブリンの動態. 日本臨床代謝学会記録 **XVIII**: 82-83, 1981
- 9) Torrigiani G, Doniach D, Roitt IM: Serum thyroglobulin levels in healthy subjects and in patients with thyroid disease. J Clin Endocrinol Metab **29**: 305-314, 1969
- 10) Shlossberg AH, Jacobson JC, Ibbertson HK: Serum thyroglobulin in the diagnosis and management of thyroid carcinoma. Clin Endocrinol **10**: 17-27, 1979
- 11) 和泉元衛, 長瀧重信: 血中サイログロブリンと甲状腺疾患. 臨床病理, **30**: 126-137, 1982
- 12) 山下俊一, 和泉元衛, 久保一郎: 甲状腺結節患者における血中サイログロブリン値. 日内分泌会誌, **57**: 930-940, 1981
- 13) 山下俊一, 和泉元衛, 三宅秀敏: 甲状腺結節患者における血中サイログロブリン値と甲状腺シンチグラムの有用性について. 核医学, **18**: 935-939, 1981
- 14) Hirayu H, Izumi M, Yokoyama N: Serum thyroglobulin in human neonates. The Second Asia and Oceania Thyroid Association Meeting (abstract) 54, 1982.
- 15) Tanabe T, Izumi M, Yokoyama N: Effects of thionamide therapy on serum thyroglobulin and anti-thyroglobulin antibody in patients with Graves' disease. The Second Asia and Oceania Thyroid Association Meeting (abstract) 57, 1982
- 16) Izumi M, Morita S, Yamashita S: Comparison of serum thyroglobulin obtained from patients with various thyroid diseases. American Thyroid Association (fifty-eight meeting) T-21, 1982
- 17) Izumi M, Hirayu H, Sato K: Radioimmunodetection of thyroid carcinoma using radiolabelled anti-thyroglobulin antibody. Proceedings of the third world congress of nuclear medicine and biology I: 99-102, 1982