

《ノート》

アマレックスフリー T₃ RIA kit の基礎的ならびに臨床的検討Basic and Clinical Evaluation of a Amerlex FT₃ RIA kit

多田 正己* 乾 治郎* 田畑 宏* 坂田 晃彦*
 岩橋 嘉明* 吉内 光夫** 井上 欣也*** 鳥住 和民****
 坂本 健一*****

Masami TADA*, Jiro INUI*, Hiroshi TABATA*, Akihiko SAKATA*,
 Yoshiaki IWAHASHI*, Mitsuo YOSHIUCHI**, Kinya INOUE***,
 Kazutami TORIZUMI**** and Kenichi SAKAMOTO*****

*The Third Division of Internal Medicine, Wakayama Red Cross Hospital

**Department of Clinical Laboratory, Wakayama Red Cross Hospital

***Department of Obstetrics and Gynecology, Wakayama Red Cross Hospital

****Department of Radiology, Wakayama Medical College

*****Department of Internal Medicine, Division of Endocrinology, Wakayama Medical College

I. はじめに

トリヨードサイロニン (T₃) は、サイロキシシン (T₄) と同様、大部分はサイロキシシン結合蛋白 (TBP) に結合しており、その 0.3% が遊離型として存在しているにすぎない。しかし、この少量の遊離型 T₃ (FT₃) が生理的作用を発現し、甲状腺機能状態を反映する指標とされている。従来 FT₃ は平衡透析法をはじめ種々の方法¹⁻⁴⁾ にて測定されてきたが、手枝が煩雑で熟練を要し、日常検査として普及するにはいたっていない。最近 Radioimmunoassay (RIA) により簡便に FT₃ を測定する方法が開発され、今回 TBP には結合しない T₃

誘導体を標識トレーサーとして用いた Amerlex FT₃ RIA キットを試用する機会を得たので、その基礎的ならびに臨床的検討を行ったのでその結果を報告する。

II. 対象および測定方法

本法は TBP にはほとんど結合しないが、抗 T₃ 抗体には結合する高比放射能の ¹²⁵I-T₃ 誘導体をトレーサーに用いて、血中の FT₃ と抗 T₃ 抗体に対して競合させることにより、1 段階操作で測定が行われる。また抗 T₃ 抗体は微細粒子に固相化されており、B.F 分離は遠心操作により行われる。操作方法の概要は、Fig. 1 に示した。

臨床の対象としては、健常成人 44 例、甲状腺機能亢進症 151 例、慢性甲状腺炎 132 例、抗 T₃ 抗体陽性者 2 例、甲状腺腫瘍 13 例、正常妊婦 46 例、慢性腎不全 19 例、肝硬変症 9 例、癌 20 例の計 436 例について血中 FT₃ を測定した。また同時に FT₄、total T₃、total T₄、TBG、TSH を測定した。

推計学検定は Student's t-test により行った。

Key words: free triiodothyronine, radioimmunoassay, amerlex free T₃ RIA kit, T₃/TBG ratio.

* 和歌山赤十字病院第三内科

** 同 検査部

*** 同 産婦人科

**** 和歌山県立医科大学放射線科

***** 同 内分泌内科

受付：58 年 9 月 5 日

最終稿受付：58 年 10 月 24 日

別刷請求先：和歌山市小松原通 4-1 (☎ 640)

和歌山赤十字病院第三内科

多田 正己

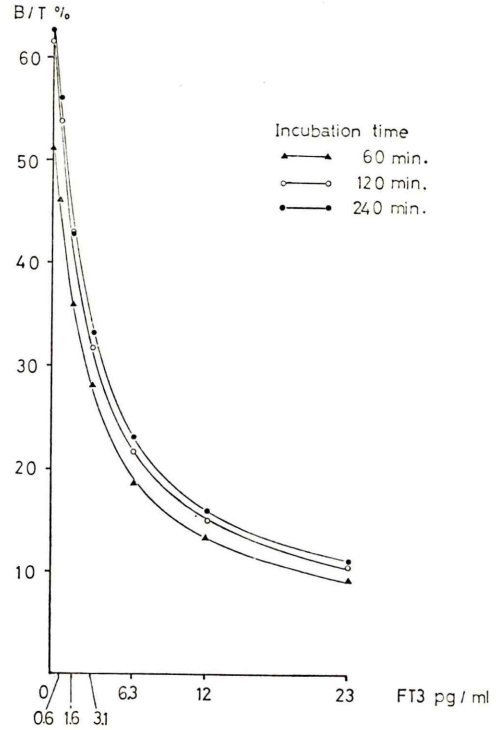
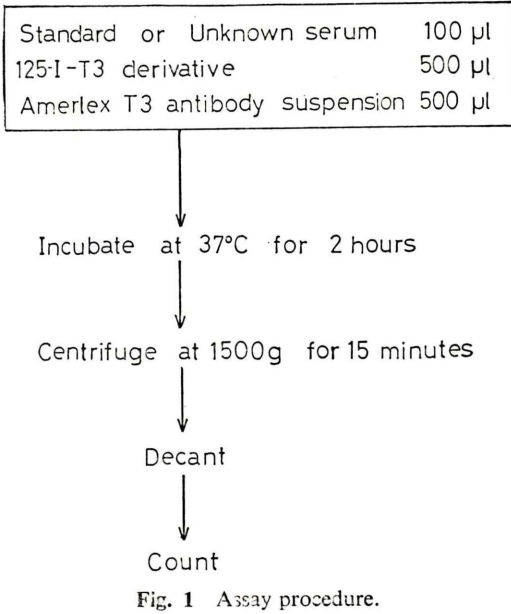


Fig. 3 Effect of incubation time.

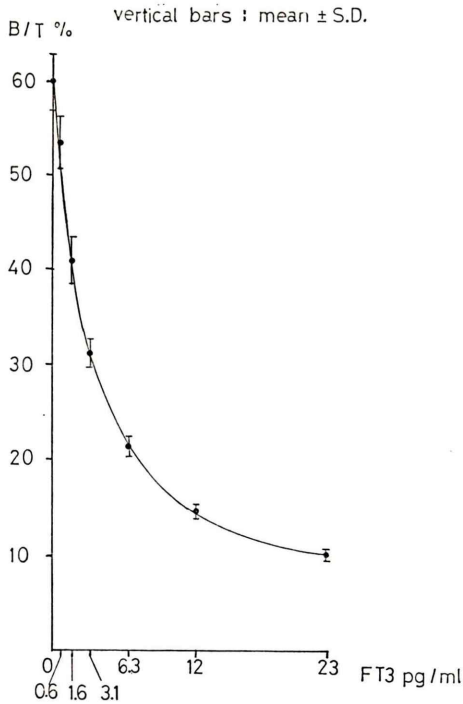


Fig. 2 Standard curve of amerlex free T3 RIA.

III. 結果

1. 基礎的検討

1) 標準曲線

連続8回測定時の標準曲線の変動を Fig. 2 に示した。Bo/T は $60.2 \pm 6.4\%$ (mean \pm S.D.) で、0~23 pg/ml (0~35 pmol/l) にて良好な用量反応相関が得られた。

2) インキュベーション時間

37°C の温度でインキュベーション時間を60, 120, 240分間と変化させたときの標準曲線を Fig. 3 に示した。時間の長い程 Bo/T は増加したが、120分と240分では、わずかの差異しか認められずインキュベーション時間は120分で十分と考えられた。

3) インキュベーション温度

温度を4°C, 室温, 37°C の条件で、それぞれ120分間のインキュベーションを行ったときの標

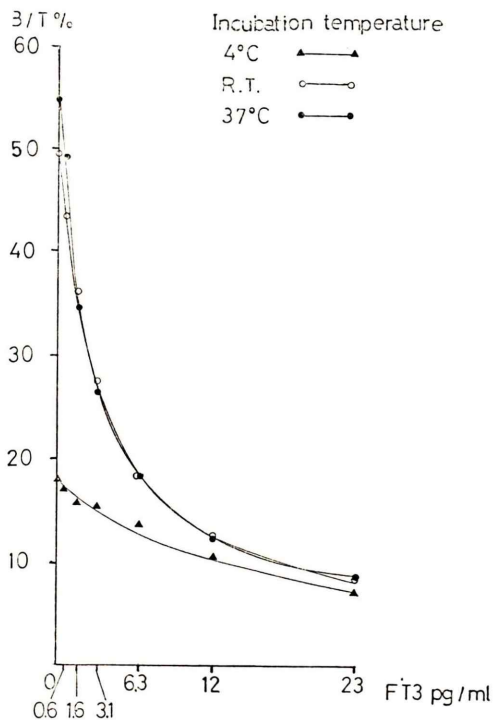


Fig. 4 Effect of incubation temperature.

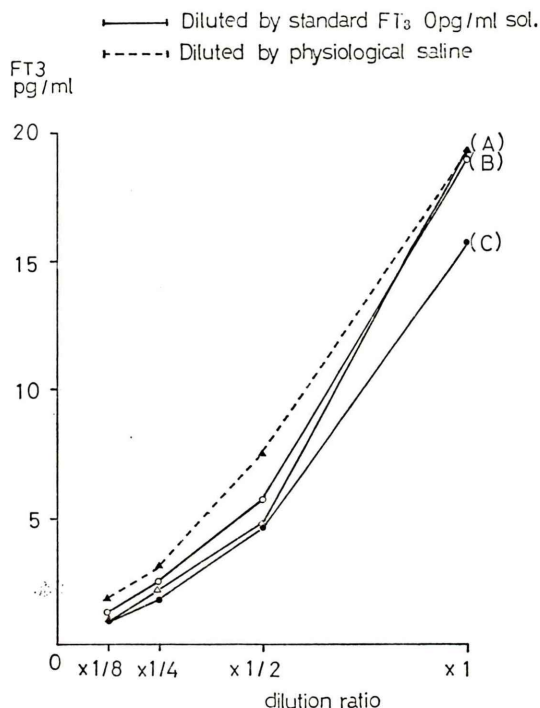


Fig. 5 Effect of dilution on FT₃

Table 1 Intra- and interassay variabilities of amerlex FT₃ RIA kit

Control serum	Intraassay variability		
	N	Mean ± S.D. (pg/ml)	C.V. (%)
1	5	1.0 ± 0.05	5.0
2	5	3.1 ± 0.19	6.1
3	5	7.5 ± 0.32	4.3
Control serum	Interassay variability		
	N	Mean ± S.D. (pg/ml)	C.V. (%)
1	4	1.0 ± 0.06	6.0
2	4	3.1 ± 0.19	6.8
3	4	7.6 ± 0.31	4.1

準曲線を Fig. 4 に示した。4°C では、十分な標準曲線は得られなかった。また室温 (R.T.) に比べて 37°C の方が Bo/T % が高く低濃度域において最も感度のよい標準曲線が得られた。

4) 精度および再現性

FT₃ 低、中および高濃度の血清について、アッ

セイ内およびアッセイ間の変動を Table 1 に示した。同一アッセイ内での変動係数 (C.V.) は、4.3~6.1% であり、異なるアッセイ間の C.V. は 4.1~6.8% で満足すべき結果が得られた。

5) 希釈試験

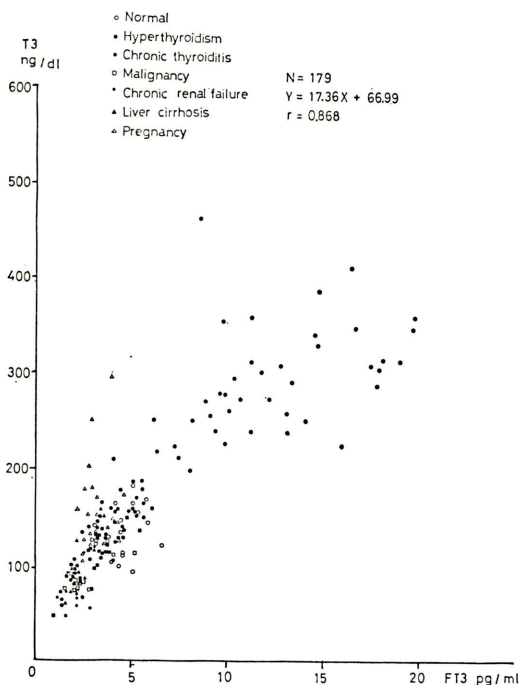
FT₃ 高値を呈した 3 症例 (TBG 濃度 (A) 16.9, (B) 17.5, (C) 15.7 μg/ml) の血清を標準 FT₃ 0 pg/ml 溶液 (TBG 22.9 μg/ml) と、また (A) については生理食塩水で 8 倍まで希釈して測定した結果を Fig. 5 に示した。標準 0 pg/ml 溶液および生理食塩水による希釈実測値は予測値より多少過少評価されていた。

2. 臨床的検討

1) FT₃ 値

正常人および各種疾患患者の FT₃ 値を Fig. 6 に示した。正常人 44 例の FT₃ 値は 4.3 ± 0.9 pg/ml (6.61 ± 1.38 pmol/l) (mean ± S.D.) で正常範囲を mean ± 2S.D. とすると、2.5~6.1 pg/ml (3.84~9.37 pmol/l) となる。未治療甲状腺機能亢進症 37 例中

	FT3 (pg / ml)	Mean ± S.D. (N)
Normal subject		4.3 ± 0.9 (44)
Untreated hyperthyroidism		14.5 ± 4.6* (37)
Treated hyperthyroidism		6.7 ± 4.7 (114)
Chronic thyroiditis euthyroid		3.7 ± 1.1 (93)
Chronic thyroiditis hypothyroid		2.4 ± 0.8* (39)
Anti-T3 autoantibody		4.0 ± 0.9 (13)
Pregnancy 1st trimester		4.0 ± 0.9 (14)
2nd trimester		3.0 ± 0.7* (11)
3rd trimester		2.8 ± 0.6* (21)
Chronic renal failure		2.3 ± 0.7* (19)
Liver cirrhosis		2.5 ± 0.7* (9)
Malignancy		2.8 ± 1.2* (20)

*Significance $P < 0.001$ Fig. 6 Serum FT₃ concentration in normal subject and various disorders.Fig. 7 Correlation between FT₃ concentration and total T₃ concentration.

19例は測定感度以上で残りの18例のFT₃値は、 14.5 ± 4.6 pg/ml (mean ± S.D.)と全例高値を示した。抗甲状腺剤による治療例114例のFT₃値は、 $0.7 \sim 23$ pg/ml以上と幅広い変動を示し、測定感度以上の3例を除いた平均は 6.7 ± 4.7 pg/ml (mean ± S.D.)であり、機能状態をよく反映していた。慢性甲状腺炎機能低下群 (TSH 10μ U/ml以上) 39例のFT₃値は、 2.4 ± 0.8 pg/ml (mean ± S.D.)で39例中19例(49%)が正常範囲にあり正常人との重なり合いが認められた。また機能正常群 (TSH 10μ U/ml以下) 93例のFT₃値は、 3.7 ± 1.1 pg/ml (mean ± S.D.)であり93例中79例(84.9%)が正常値を示した。抗T₃抗体陽性患者2例のFT₃値は、それぞれ23 pg/ml以上、 8.1 pg/mlと異常高値を示した。甲状腺腫瘍13例では、全例正常範囲であった。

妊婦のFT₃値は、妊娠第一期では 4.0 ± 0.9 pg/ml (mean ± S.D.)、第二期では 3.0 ± 0.7 、第三期では 2.8 ± 0.6 と妊娠月数の進むにつれてFT₃値が低下する傾向を示し、妊娠第二期、第三期では、

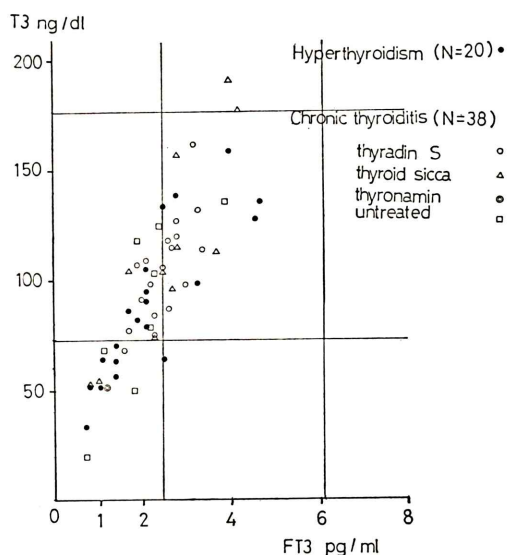


Fig. 8 Correlation between FT3 concentration and total T3 concentration in hypothyroid patients.

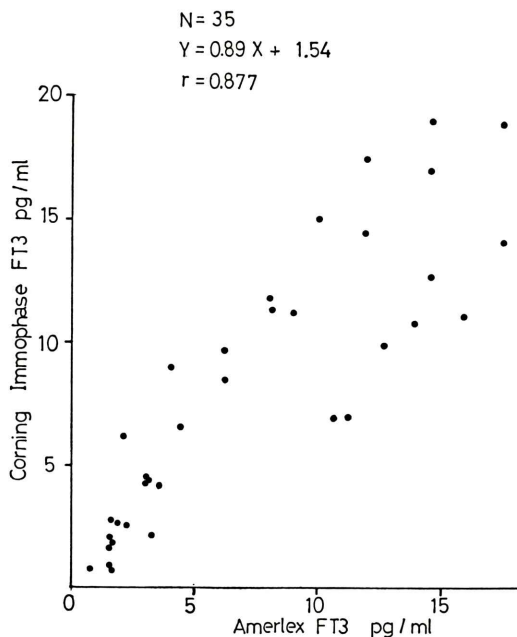


Fig. 10 Correlation of FT3 concentration measured by amerlex kit and corning immophase kit.

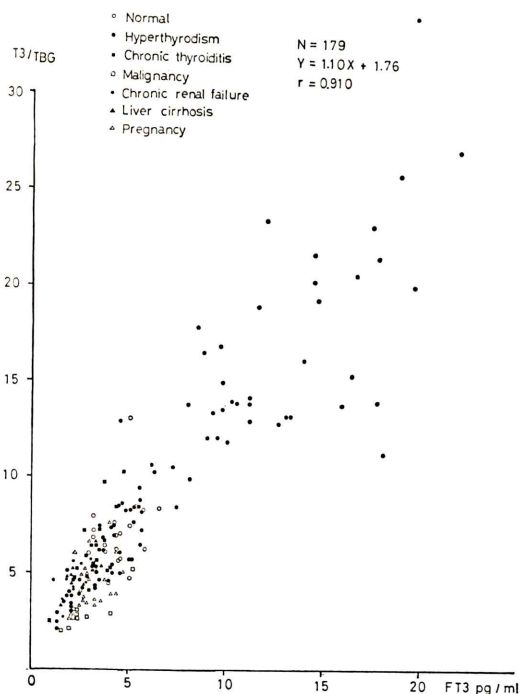


Fig. 9 Correlation between FT3 concentration and T3/TBG ratio.

正常人と比べて有意に低下していた ($p < 0.001$).

慢性腎不全19例中11例が正常以下で、 2.3 ± 0.7 pg/ml (mean \pm S.D.) と有意に低下していた。 ($p < 0.001$)。肝硬変9例中4例が正常値であったが有意の低値 ($p < 0.001$) を示した。種々の臓器の癌患者20例では、11例が正常であったが、 2.8 ± 1.2 pg/ml (mean \pm S.D.) で有意の低下を示した。

2) T₃ との関係

Fig. 7 に FT₃ と T₃ との相関を示した。179例において相関係数 0.868 と良好な正相関が認められた。しかし、一部の甲状腺機能亢進症や妊婦において FT₃ に比し T₃ が高値を示す例が認められた。

Fig. 8 に抗甲状腺剤過剰投与により甲状腺機能低下状態を呈した甲状腺機能亢進症20例と甲状腺機能低下状態の慢性甲状腺炎38例における FT₃ と T₃ との関係を示した。甲状腺機能亢進症20例中6例、慢性甲状腺炎38例中13例、TSHが10 μ U/ml以上の甲状腺機能低下状態において FT₃

が低値を示したにもかかわらず T_3 は正常値を示していた。

3) T_3 /TBG ratio との関係

FT_3 と T_3 /TBG ratio との相関を Fig. 9 に示した。両者の間には $r=0.910$ と良好な正相関が認められた。なお T_3 /TBG ratio は T_3 (ng/dl) と TBG (μ g/ml) の比より算出した。

4) Corning Immophase FT_3 RIA キットによる測定値との比較

Corning Immophase FT_3 キットによる測定値と、本キットによる測定値との関係を Fig. 10 に示した。相関係数は 0.877 であり有意の正相関を認めた。

IV. 考 察

今回検討した Amerlex FT_3 RIA キットは、TBG および TBPA に対する結合の強さが T_3 に比べて有意に低い ^{125}I - T_3 誘導体を用いることにより、 FT_3 と結合蛋白との平衡の乱れを最少限に止め、血中の FT_3 と抗 T_3 抗体に対して競合させることにより、また抗 T_3 抗体を固相化することにより操作は 1 段階で、反応時間も短縮され、簡便で迅速な測定法である。

基礎的検討では、インキュベーション時間 120 分、インキュベーション温度 $37^{\circ}C$ のキット指定の条件で、 $0\sim 23$ pg/ml ($0\sim 35$ pmol/l) の範囲で良好な標準曲線が得られた。

測定の精度、再現性においても、アッセイ内 C.V. $4.3\sim 6.1\%$ 、アッセイ間 C.V. $4.1\sim 6.8\%$ と満足すべき結果が得られた。

FT_3 高値血清の希釈試験では、標準 FT_3 0 pg/ml 溶液および生理食塩水による希釈値は予測値より多少過少評価されていた。この結果は、Oppenheimer ら⁵⁾ の報告とは一致せず、希釈にあたっては検討を要する。

臨床検討では、正常人の FT_3 値は 4.3 ± 0.9 pg/ml (6.61 ± 1.38 pmol/l) (mean \pm S.D.) で、正常域は $2.5\sim 6.1$ pg/ml ($3.84\sim 9.37$ pmol/l) と考えられた。未治療甲状腺機能亢進症では全例 7.5 pg/ml 以上の高値を示した。抗甲状腺剤治療例では $0.7\sim$

23 pg/ml 以上と幅広い変動を示し、甲状腺機能状態をよく表わしていた。慢性甲状腺炎機能低下群では、39 例中 19 例 (49%) が正常範囲にあり正常人との重なり合いが認められた。抗 T_3 自己抗体陽性患者 2 名の FT_3 値は異常高値を示した。これは ^{125}I - T_3 誘導体が患者の抗 T_3 抗体と結合し、キットの固相化 T_3 抗体への結合が低下したと思われる。Konishi ら⁶⁾ も同様に FT_4 RIA における抗 T_4 抗体の影響を認めている。

妊婦では、妊娠第二期、第三期と進むにつれ FT_3 値の有意の低下を認めた。Whitworth ら⁷⁾ は、Amerlex FT_4 RIA キットにて、Lewis⁸⁾ および Giles⁹⁾ は平衡透析法にて、Kadbury ら¹⁰⁾ は非平衡固相法にて測定した FT_4 値が、妊娠第三期に有意の低下を示したと報告しており、種々の測定法による FT_4 値の低下と同様 FT_3 値も低下することは興味深い。

慢性腎不全では、58% が正常以下で有意の低値を認めた。なおヘパリンは遊離脂肪酸を増加させ測定値に影響¹¹⁾を及ぼすため血清 FT_3 を測定した。また肝硬変および癌患者で FT_3 値は有意の低下を認めた。妊婦、慢性腎不全、肝硬変および癌患者では、 FT_3 、 FT_4 の低下にもかかわらず血中 TSH は正常であることより全身的な代謝の低下状態であると考えられる。またこれらの疾患では、血中アルブミンの低下が FT_3 測定値を低下させる一要因となっている可能性もあり非甲状腺疾患の FT_3 の解釈には注意を要する。

血中 Total T_3 とは TBG 増多に伴う高 T_3 血症を呈する妊婦¹²⁾を除いて $r=0.868$ と正相関を認めた。TSH 10 μ U/ml 以上を認めた甲状腺機能亢進症 (overtreatment group) 20 例中 6 例、慢性甲状腺炎機能低下群 38 例中 13 例において FT_3 が低値を示したにもかかわらず T_3 は正常値を示していた。以上より FT_3 の方が T_3 より鋭敏に甲状腺機能を表わしていると考えられたが、58 例中 25 例 (43%) が正常を示すことから FT_3 も機能低下の診断には血中 TSH の測定を組み合わせる必要がある。

T_4 /TBG ratio¹³⁾ と FT_4 が高い相関があり、

FT₄ の間接的指標として有用性が認められているが、T₃/TBG ratio も FT₃ と相関係数 0.910 と良好な正相関が認められ、FT₃ の間接的指標として有用と考えられた。

V. 結 論

TBP にはほとんど結合しない ¹²⁵I-T₃ 誘導体をトレーサーとして用いた Amerlex FT₃ RIA キットについて基礎的ならびに臨床的検討を行った。その結果、本キットはすぐれた精度、再現性を示し甲状腺機能をよく反映し、臨床的有用性が高いと考えられた。

文 献

- 1) Sterling K, Brenner MA: Free thyroxine in human serum: Simplified measurement with the aid of magnesium precipitation. *J Clin Invest* **45**: 153-163, 1966
- 2) Petersen BA, Giese RW, Larsen PR, et al: Measurement of free thyroid hormones in serum by dialysis and gas chromatography. *Clinical Chemistry* **23**: 1389-1396, 1977
- 3) Weeke J, Ørskov H: Ultrasensitive radioimmunoassay for direct determination of free triiodothyronine concentration in serum. *Scand J Clin Lab Invest* **35**: 237-244, 1975
- 4) Ross HA: A dialysis rate method for the measurement of free iodothyronine and steroid hormones in blood. *Experientia* **34**: 538-539, 1978
- 5) Oppenheimer JH, Surks MI: Determination of free thyroxine in human serum: A theoretical and experimental analysis. *J Clin Endocrinol Metab* **24**: 785-793, 1964
- 6) Konishi J, Iida Y, Kousaka T, et al: Effect of anti-thyroxine autoantibodies on radioimmunoassay of free thyroxine in serum. *Clin Chem* **28**: 1389-1391, 1982
- 7) Whitworth AS, Midgley JEM, Wilkins TA: A comparison of free T₄ and the ratio of total T₄ to T₄-binding globulin in serum through pregnancy. *Clin Endocr* **17**: 307-313, 1982
- 8) Lewis M: Measurements of free thyroid hormones in health and disease. International symposium on free thyroid hormones, Venice, 1978. eds. Ekins R, Faglia G, Pennisi F, Pinchera A. *Excerpta Medica* 1979, pp 167-180
- 9) Giles AF: An improved method for the radioimmunoassay of free thyroxine in serum dialysates. *Clin Endocr* **16**: 101-105, 1982
- 10) Kadbury S, John R, Woodhead JS, et al: Automated radioimmunoassay of total and free thyroxine in human serum. *Ann Clin Biochem* **18**: 97-101, 1981
- 11) Lundberg PA, Jagenburg R, Lindstedt G, et al: Effect of heparin in vivo on apparent serum free thyroxine: *Lancet*, 1255, 1982
- 12) Hotelling DR and Sherwood LM: The effects of pregnancy on circulating triiodothyronine. *J Clin Endocr* **33**: 783-786, 1971
- 13) Lecureuil M, Crouzat-Reynes G, Besnard JC, et al: Correlation of free thyroxine index and thyroxine: Thyroxine-binding globulin ratio with the free thyroxine concentration as measured by the thyroxine and thyroxine-binding globulin radioimmunoassay. *Clin Chim Acta* **87**: 373-381, 1978