

《ノート》

Free T₃ 測定キットの評価：平衡透析法および TBG より求めた free T₃ index との比較検討

Clinical Evaluation of Free T₃ Measurement by Amarlex Free T₃ RIA
Kit: Comparison to Equilibrium Dialysis and Calculated Index

梅津 美枝* 紫芝 良昌***

Yoshie UMEZU* and Yoshimasa SHISHIBA***

*Division of Endocrinology and Endocrine Research Laboratory, Toranomon Hospital

**Department of Endocrinology, Toranomon Hospital

I. はじめに

甲状腺ホルモンは血中で結合蛋白に比較的高い親和性で結合しているため、その遊離型ホルモンの量が生物学的に、また臨床的に大きな意味を持つ。free T₄ については、従来より平衡透析法で測定され、また様々な index が考案され T₄ と TBG の値から、または T₄ と RT₃U の値から推定されてきたし、最近では free T₄ を測定するキットも多種発売されている。T₃ は T₄ より蛋白との結合の affinity が小さいため、total T₃ のみを測定しても、日常の臨床的意味づけには困難を生じないことが多いが、TBG の異常の程度が大きい場合には、total T₃ のみの評価では困難を生ずることもある。

われわれは、total T₄, TBG, total T₃ の測定値から free T₃ を算出することを提案し¹⁾、また、実際に臨床応用しているが、今回アマシャム社 free T₃ キットを使用する機会を得たので、われわれの従来用いている平衡透析法や free T₃ index

との比較検討を行い、キットの臨床応用上の意義を明らかにすることを試みた。

II. 方法

1. アマレックス free T₃ RIA キット (アマシャム社)

操作手順は、キット使用説明書通り行った。

- 1) 標準液は、蒸留水 2 ml で溶解し、¹²⁵I-T₃・X 溶液 (赤色) と抗体 (青色) は室温に戻す。
- 2) 標準液または被検血清を 100 μl ずつ分注する。
- 3) 均一化した ¹²⁵I-T₃・X 溶液と抗体を 500 μl ずつ、各チューブに分注し攪拌する。
- 4) 37°C の恒温槽で 2 時間インキュベーションする。
- 5) 1,500 G 以上で 15 分間遠心分離する。
- 6) 上清を除去し γ-カウンターでカウントする。データ処理は Rodbard らの data processing program²⁾ で行った。

2. 平衡透析法 (Sterling の変法)^{3,4)}

¹²⁵I-T₃ 0.03 μCi を被検血清に混ぜ、われわれがすでに報告した希釈血清を用いる方法で equilibrium chamber を用い 37°C で 24 時間振盪しながらインキュベーションを行う。終了後 chamber

Key words: TBG, free T₄, free T₃, hyperthyroidism, hypothyroidism.

* 虎の門病院内分泌検査部

** 同 内分泌学科

受付：58年7月27日

最終稿受付：58年11月10日

別刷請求先：港区虎の門 2-2-2 (☎ 105)

虎の門病院内分泌学科

紫芝 良昌

の両側のサンプルを採取する。希釈血清側のサンプルはそのまま放射活性を測定し、緩衝液側のサンプルはカウントした後 Cold T₃ を加え、MgCl₂ により沈澱させ ¹²⁵I-T₃ を Cold T₃ と共沈せしめる。free T₃ fraction は以下の式により算出する。

$$\text{Dialyzable fraction (DF)} = \frac{8/3 \cdot b}{30A - 3a - 8/3 \cdot b}$$

$$\text{Free T}_3 \text{ fraction (FT}_3\text{F)} = \frac{\text{DF}}{\text{D}}$$

ただし、D は希釈倍数。A は血清希釈液 100 μl のカウント。a は透析液 1 ml のカウント。b は透析液 3 ml に Cold T₃ (1 mg/ml) 2 ml を加え、MgCl₂ で沈澱させたカウントとする。

3. free T₃ 算出式 (free T₃ index)¹⁾

total T₄, total T₃ は栄研イムノケミカル社の RIA キット, TBG はヘキストジャパン社の RIA キットを用いて測定し、データは Rodbard らの方法で処理した。その算出式は、われわれがすでに発表している free T₄^{5,6)} の場合と同様な考え方による。つまり、T₃ の結合にあずかる TBG は T₄ に結合していない部分であること、TBPA や Albumin と T₃ の結合は T₄ に影響されないこと、および TBPA や Albumin 自体はあまり変動しないことを前提条件として計算式により free T₃ を求めるものである。

B = K (TBGc - tT₄) - K · tT₃ + 1 とし、さらに tT₄, tT₃, TBG は μg/100 ml で表すと、以下の式で得られる F は pg/100 ml で表した free T₃ 値に近いはずである。

$$F = \frac{-B + \sqrt{B^2 + 4 \cdot K \cdot tT_3}}{2 \cdot K} \times 3,025 \quad \dots (1)$$

ただし、TBG と TBG binding capacity の関係から TBGc = 1.07 × TBG で、また、K = 0.055 とした。

[註] この式と Lecureuil らの求めた理論式⁷⁾ の関係は以下のごとくである。

(1) 式のすべてを μg/100 ml の dimension で統一すると、

$$f = \frac{-B + \sqrt{B^2 + 4 \cdot K \cdot tT_3}}{2 \cdot K} \times 3,025 \times 10^{-6};$$

$$f = \text{free T}_3 \text{ index} \times 10^{-6}$$

これを变形すると

$$\frac{f}{3,025 \times 10^{-6} K} + \frac{f \cdot B}{3,025 \times 10^{-6}} - t T_3 = 0$$

K/(3,025 × 10⁻⁶) = k, 1/(3,025 × 10⁻⁶) = J とおくと

$$f^2 k J + f k J \left(\frac{B}{k} \right) - t T_3 = 0$$

B は 1.07 · K · TBG - K · tT₄ - K · tT₃ + 1 であるから

$$f^2 k J + f k J \left\{ \frac{(1.07 \cdot TBG - tT_4 - tT_3)}{J} + \frac{1}{k} \right\}$$

$$- t T_3 = 0 \quad \dots (2)$$

一方、Lecureuil の式を T₃ について考えると次のようである。

$$F^2 k (1 + n_2 k_2 CP_2 + n_3 k_3 CP_3) + F (n_1 k_1 CP_1$$

$$+ n_2 k_2 CP_2 + n_3 k_3 CP_3 + 1 - k_1 \cdot T_3) - T_3 = 0$$

$$\dots (3)$$

(3) 式はモル濃度で表されているので μg/100 ml でこの式を考え、さらに変形し δ, ε を定数として表すと

$$f^2 k J + f k J \left\{ \frac{(\delta TBG - \varepsilon tT_4 - tT_3)}{J} + \frac{1}{k} \right\}$$

$$- t T_3 = 0 \quad \dots (4)$$

となる。δ = 1.07, ε = 1.0 とすると (2) 式と (4) 式は同じになる。

III. 結 果

アマシヤム社の free T₃ RIA キットによる測定を Rodbard らの data processing program による処理を行い、解析すると logit-log 変換で直線性は良好で (Fig. 1), また precision profile より求めた 50% intercept における CV は約 10% であった (Fig. 2 の例では 11% である)。

その測定値を各対象群ごとに分けると Fig. 3 のようになる。すなわち、正常 405 ± 110 (n = 13), 甲状腺機能低下症 121 ± 32 (n = 4), 機能亢進症 1,714 ± 782 (n = 18), 遺伝的 TBG 欠損症 295 ± 26 (n = 4), 遺伝的 TBG 増加症 383 ± 91 (n = 4) と妊娠 267 ± 36 (n = 5) pg/100 ml になった。

Fig. 4 は、キットによる測定値と平衡透析法による測定値との相関をみたものである。r = 0.89 (n = 14) で有意な相関が認められた。

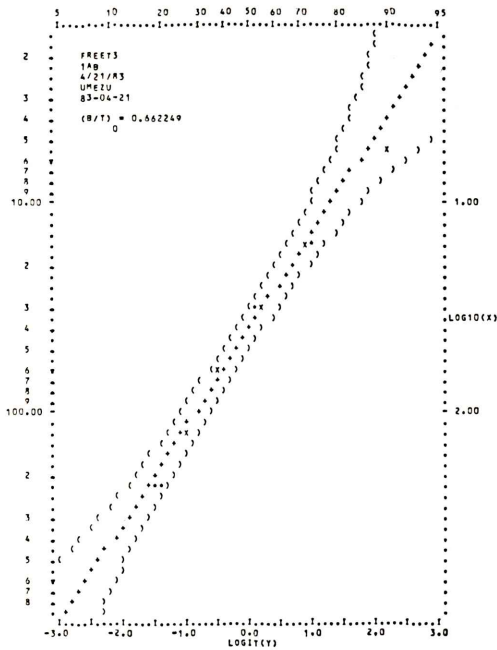


Fig. 1 Amerlex free T₃ キットの logit-log 座標による標準曲線とその 95% 信頼限界. ((文献 2) による data-processing program を利用) 縦軸は B/Bo % を, 横軸は標準物質の濃度を示す.

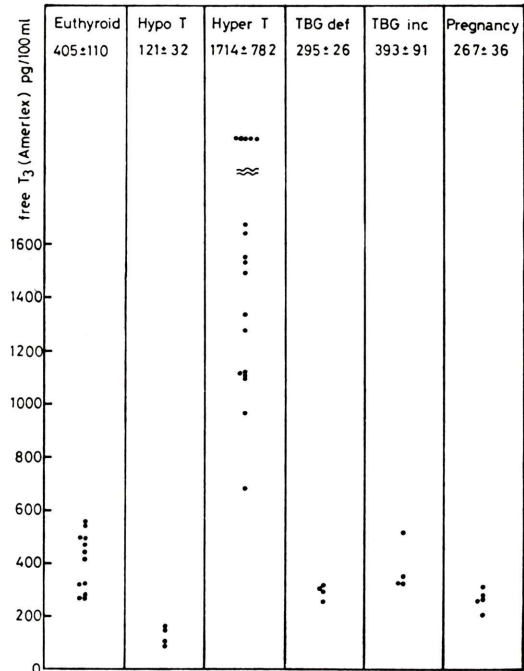


Fig. 3 Result of free T₃ measurements (Amerlex).

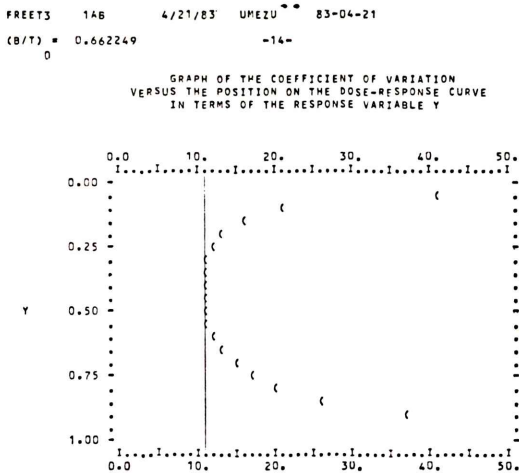


Fig. 2 Amerlex free T₃ キットの precision profile 横軸に標準曲線の位置を % intercept で表示し, 縦軸に CV % を plot してある. ((文献 2) の data-processing program を利用.)

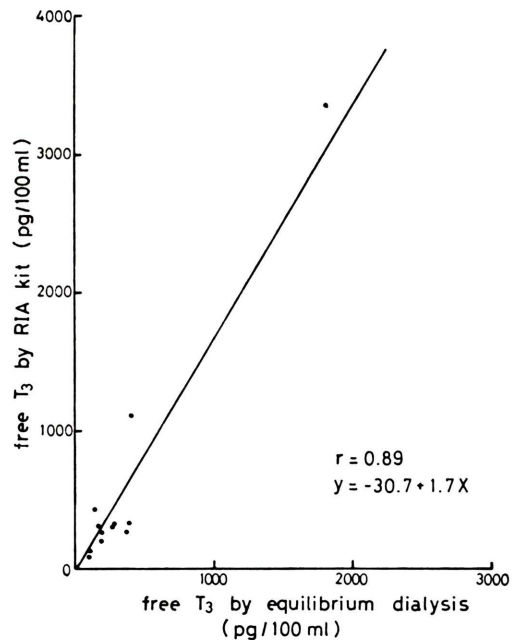


Fig. 4 Free T₃ concentration measured by equilibrium dialysis vs RIA kit (Amerlex).

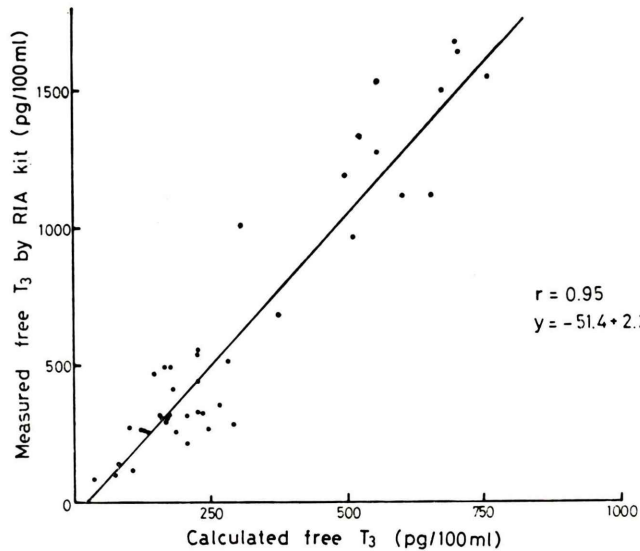


Fig. 5 Free T₃ concentration calculated vs measured by RIA kit (Amerlex).

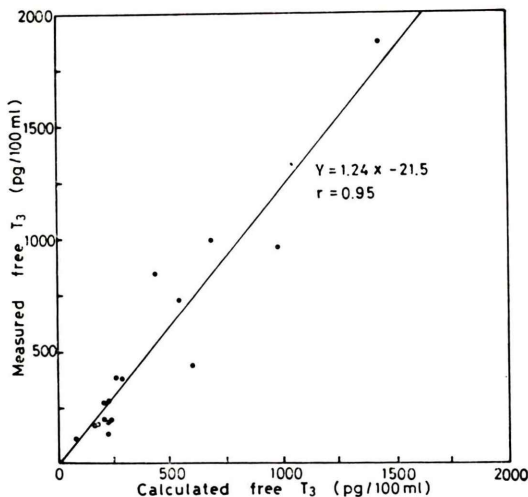


Fig. 6 Free T₃ concentration calculated vs measured by equilibrium dialysis.

Fig. 5 は、われわれの free T₃ index とキットによる値との比較である。r=0.95 (n=43) とよい相関が得られた。

Fig. 6 は、われわれの free T₃ index と平衡透析法による測定値の比較で相関係数 r=0.95 であった。

free T₃ RIA キットについて高濃度血清の希釈

による平行性をみた。希釈には、50 mM-Phosphate buffer を用いた。希釈血清と標準物質の B/Bo % を logit-log で表したものが Fig. 7 である。標準物質と希釈血清は平行した。

多数測定間の変動は調べられなかったが、2つの異なる lot のキットで異なる日時に4検体を測定した。測定値は、1回目が141, 443, 1,118, 1,675 pg/100 ml で、2回目がそれぞれ138, 394, 1,049, 1,588 pg/100 ml であった。2つの値は同じような値であり、ばらつきは precision profile から期待される範囲内であり、再現性についてはこのデータからは問題があるとは言えない。

IV. 考 察

アマシャム社の free T₃ キットは、測定時間もかからず、操作もしやすい。precision profile より求めた 50% intercept における CV も約 10% で、ばらつきも測定対象が微量であることを考えれば少なく、2回の測定ではあるが測定間のばらつきも少なく再現性は良好で、臨床的な実用上、有用なキットと思われる。free T₃ の平衡透析法、われわれの考案した free T₃ index と、その絶対値は異なるがよい相関を示し臨床的に応用でき

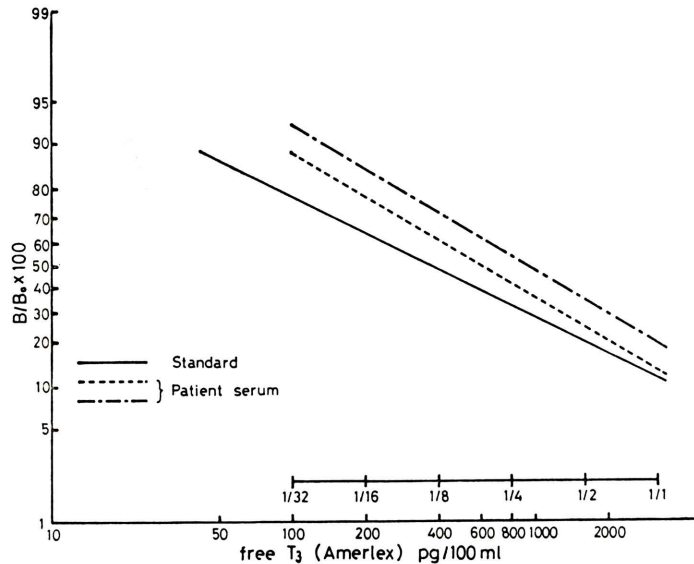


Fig. 7 Parallelism between standard and patient serum

る。しかし、その絶対値の差が平衡透析法による値が低いためか、それともアマシャム社のキットによる値が高いためか、また、その両方が原因なのかは不明である。

われわれの total T₄, total T₃, TBG の測定値から free T₃ を求める index は、臨床的に有用である¹⁾。しかし、われわれの free T₃ index の問題は、抗 T₃ 自己抗体を有する検体が二抗体法で total T₃ を高値にとるので計算が不可能になることであった。アマシャム社のキットでは、標識抗原に工夫がなされているとは言え、TBG に結合はしなくても抗 T₃ 抗体に結合する性質が残っているので、抗体を有する血清では正しい値をとらないのではないかと予測した。事実 1 検体での検索であったが、抗 T₃ 抗体を有する検体で 1,959 pg/100 ml という高値をとり、われわれの free T₃ index 同様高値に測定される可能性が示唆された。これは標識 T₃ 誘導体 (¹²⁵I-T₃·X) が TBG と結合はしなくても、抗 T₃ 抗体と結合する性質を有することが当然予測されることであったので注意を要する。

文 献

- 1) 梅津美枝, 紫芝良昌: Free T₃ calculation の clinical evaluation. 日内内分泌誌 **58**: 1139, 1982 (抄録)
- 2) Rodbard D: Statistical quality control and routine data processing for radioimmunoassay and immunoradiometric assays. Clin Chem **20**: 1255-1270, 1974
- 3) Sterling K, Brenner MA: Free thyroxine in human serum: Simplified measurement with the aid of magnesium precipitation. J Clin Invest **45**: 153-163, 1966
- 4) 紫芝良昌, 清水多恵子, 吉村静子, 他: 稀釈血清を用いる free thyroxine の測定. 日内内分泌誌 **46**: 20-27, 1970
- 5) 紫芝良昌, 梅津美枝: TBG によるフリーサイロキシンの estimation ホルモンと臨床 **30**: 39-42, 1982
- 6) 梅津美枝, 紫芝良昌: TBG-RIA による free thyroxine 測定の臨床的検討. ホルモンと臨床 **30**: 127-129, 1982
- 7) Lecureuil M, Crouzat-Raynes 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 radioimmunoassays. Clin Chim Acta **87**: 373-381, 1978