

《ノート》

マジック T4 RIA キットの検討

Evaluation of MAGIC Thyroxine (T4) Radioimmunoassay Kit

黒田 彰* 矢田部タミ* 稲葉 妙子* 山田 英夫*

Akira KURODA*, Tami YATABE*, Taeko INABA* and Hideo YAMADA*

*Department of Nuclear Medicine and Radiological Science, Tokyo Metropolitan Geriatric Hospital, Tokyo

I. はじめに

1971年, Chopra らにより¹⁾, Radioimmunoassay (RIA) を用いたサイロキシン (以下 T4) の測定が紹介されて以来, 現在まで多くの RIA が開発されている²⁻⁴⁾.

今回, われわれは米国の CORNING 社の開発した抗体を鉄粉にコーティングし, 磁石を用いて B.F. 分離を行うマグネティック T4 RIA キットを使用する機会を得たので, 基礎的検討を行った. また, 本キットの標準曲線について, コンピュータを用いた測定精度の解析も行ったので, 併せて報告する.

II. 方法および対象

使用したキットは, CORNING 社のマグネティック T4 RIA キットで, 内容を (Table 1) に示す.

測定原理は, RIA の表面固相法と類似しているが, 抗体が鉄スラリーにコーティングしてあるため, 遠心分離の操作がなく, 磁石により B/F 分離を行うことができる. 測定方法は (Fig. 1) に示すごとく, 調製された各濃度の標準溶液または, 被検血清 25 μ l にトレーサー 100 μ l を加える. 次に, T4 抗血清 (鉄スラリー) 500 μ l を添加し, ポ

ルテックスミキサーにて良く混和し, 室温 (25°C) にて 1 時間インキュベーションする. Bound と Free の分離は, マグネット・セパレーターを用いて行う. すなわち, セパレーターにセットし, 5 分間静置した後, セパレーターごと転倒し, 沈渣を r-カウンターにより 2 分間計測する.

老年者の正常域を求めるため, 当院の外来通院および入院患者で, 甲状腺疾患を有しない 65 歳以上を対象に測定を行った. また, 精度管理には, 低, 中, 高, 三種類の異なる濃度の管理血清 (ORTHO 社) を使用した.

マイクロ・コンピュータ P6060 (オリベッティ) を用いたアッセイ系の精度解析には, Rodbard らの方法^{5,6)} を基礎に, 当検査室で開発し, すでに報告した方法⁷⁻⁹⁾ により, Response-Error-Relationship (RER), Precision Profile (P.P) の作成を行い, 検討した. 測定範囲については, 標準血清を希釈して, 零濃度との有意性によって求めた. またコンピュータによる算出も試みた. 有意性の検定は, Student の t 表を用いて t 検定により行った.

III. 結 果

1. 標準曲線

すべての測定は, 添付の測定方法に従い, 標準物質は三重測定, 被検血清は二重測定にて行った. 本キットを用いた代表的な標準曲線を示す (Fig. 2).

Key words: Thyroxine, RIA, Magnetic separation, Solid phase.

* 東京都養育院附属病院核医学放射線部

受付: 59年2月28日

最終稿受付: 59年5月9日

別刷請求先: 東京都板橋区栄町 35-2 (☎ 173)

東京都養育院附属病院核医学放射線部

黒田 彰

Table 1 Reagents supplied for radioimmunoassay of MAGIC T4

Components	1 Kit (100 tests)
T4 antibody (rabbit anti-T4)	50 ml/1 bottle
T4 [125 I] tracer (less than 8 μ Ci)	10 ml/1 bottle
T4 standard (0, 2.5, 10, 15, 30 μ g/dl)	1 set (6 vials)
T4 reference control serum (hypo- and hyperthyroid rang)	1 set (2 vials)

Table 2 Effect of incubation time on control serum assays

Time	Serum				
	S1	S2	A	B	C
30 min.	2.10	11.95	1.77	8.27	15.28
60 min.	2.16	12.04	1.98	8.43	15.99
90 min.	1.87	11.81	1.74	8.40	15.34
120 min.	1.98	12.33	1.74	8.18	16.70

Table 3 Effect of incubation temperature on control serum assays

Temp.	Serum				
	S1	S2	A	B	C
4°C	1.97	10.67	1.58	7.43	15.19
25°C	2.05	11.27	1.71	7.55	15.21
37°C	2.09	11.50	1.99	7.81	16.07

Table 4 Results of recovery test

Added	Serum			
	Sample 1		Sample 2	
	Measured	Recovery	Measured	Recovery
0	2.26	—	4.05	—
2.5	5.06	106.3	6.55	100.0
5.0	7.25	99.9	8.57	94.7
10.0	11.66	95.1	13.62	96.9
15.9	15.72	91.1	18.42	96.7
Mean		98.1	Mean	97.1

Added	Serum			
	Sample 3		Sample 4	
	Measured	Recovery	Measured	Recovery
0	4.78	—	13.86	—
2.5	7.67	105.4	17.17	105.0
5.0	9.03	92.3	19.15	101.5
10.0	14.42	97.6	25.07	105.0
15.0	19.54	98.8	30.79	106.7
Mean		98.5	Mean	104.6

Standard T4, Control serum

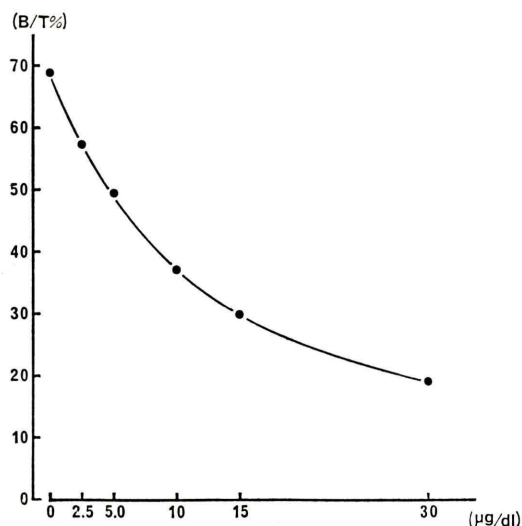
| or Sample serum 25 μ lTracer [125 I]-T4 100 μ lAntiserum 500 μ l| Mixing
(vortex for 3 to 4 seconds)Incubation for 1 hour
at room temperature

| Magnetic separation for 5 minutes

| Decant all tubes and blot

|

Counting

Fig. 1 Protocol for radioimmunoassay of MAGIC T4.**Fig. 2** Standard curve.

縦軸は B/T% を、横軸は T4 の濃度を示し、B は各濃度における Bound のカウントを、T は Tracer の全カウントを示す。

2. 標準曲線に対する インキュベーション時間と温度の影響

1) インキュベーション時間の影響

標準曲線に対する時間の影響を調べるため温度を一定 (25°C) とし、インキュベーション時間を 30, 60, 90, 120 分と変化させた場合の標準曲線を示す (Fig. 3). なお、同時に測定したキット添付の管理血清 (S1, S2), および ORTHO 社の管理

Table 5 Precisions of within assay and between assay

Within assay					
Serum	A	B	C	D	
Mean	2.00	7.26	14.61	9.32	
S.D.	0.094	0.623	0.848	0.216	
C.V. (%)	4.70	8.58	5.81	2.32	
(n=10)					
Between assay					
Serum	S1	S2	A	B	C
Mean	2.37	12.03	1.88	7.75	15.88
S.D.	0.284	0.688	0.135	0.311	0.749
C.V. (%)	11.98	5.72	7.18	4.01	4.72
(n=10)					

Table 6 Variation of the data caused by inter-individual technical differences

Sample		A	B	C
Mean	Tec. 1	2.44	7.78	15.90
	Tec. 2	2.00	7.26	14.61
S.D.	Tec. 1	0.232	0.285	0.327
	Tec. 2	0.094	0.623	0.848
C.V. (%)	Tec. 1	9.52	3.66	2.06
	Tec. 2	4.70	8.58	5.80

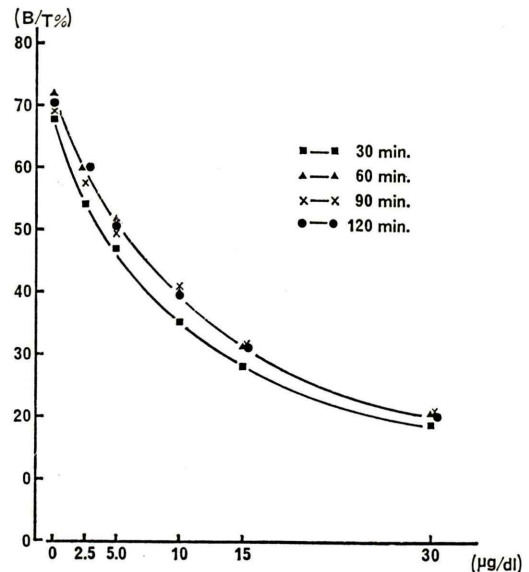
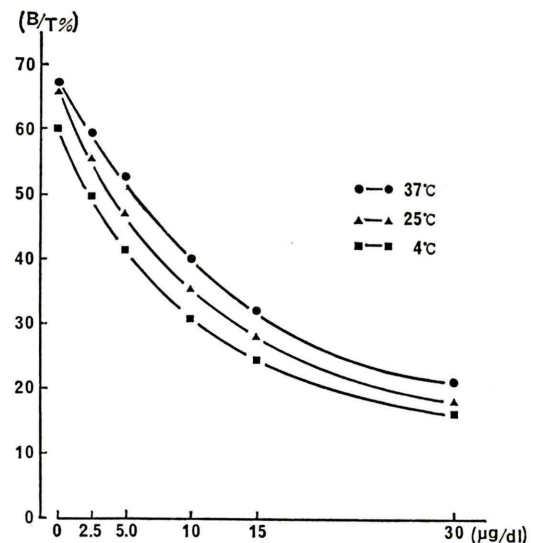
Table 7 Results of standard serum assay with MAGIC T4 kit

CONC. ($\mu\text{g/dl}$)	Y (counts)	U (variance)	N (number)
0	48541.64	1181.99	10
0.5	47201.05	1197.09	10
1.0	45163.59	916.04	10
1.5	44104.91	786.95	10
2.5	39907.73	880.45	10

血清 (A, B, C) の値を示した (Table 2)。インキュベーション時間30分において、標準曲線の結合率が他に比して、やや低値を示したが、管理血清の値は各濃度ともほぼ同様の値を示し、差は認められなかった。

2) 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を1時間とし、インキュベーション温度を4°C、25°C および 37°C に設定して測定した場合の標準曲線の変化を示す (Fig. 4)。設定温度の上昇とともに、各濃度にお

**Fig. 3** Effect of incubation time on standard curve.**Fig. 4** Effect of incubation temperature on standard curve.

ける結合率の上昇が認められた。管理血清の値も、やや上昇する傾向を示したが差はなかった (Table 3)。

3. 回収率試験

4種類の異なるヒト血清を用いて、既知濃度の

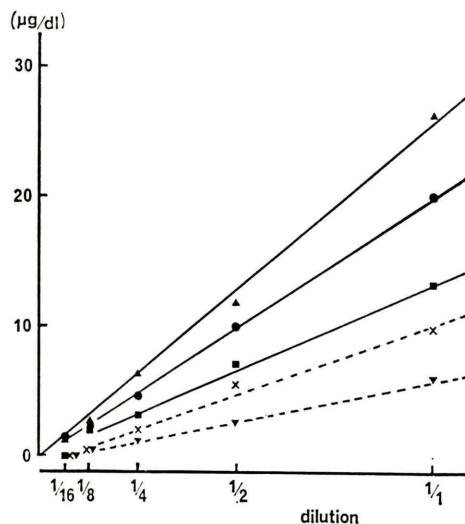


Fig. 5 Results of dilution tests.

T4 を加え、回収率を検討した (Table 4). 回収率は 97.1%~104.6%, 平均回収率 99.6% と良好な回収率を得た.

4. 希釈試験

濃度の異なる 5 種類のヒト血清を零濃度の血清で 1/2~1/16 に希釈し、検討した. 縦軸に濃度, 横軸に希釈率をとり, 測定値をプロットした (Fig. 5). おおのこの検体についてほぼ良好な直線性を認めた.

5. 測定内, 測定間および測定者間の再現性

T4 値の異なる 4 種類の血清を測定し, 測定内精度を検討した. またロット間の測定値の再現性を比較するため, T4 値の異なる 5 種類の血清を対象として同一測定者による測定を行った (Table 5).

測定内精度はいずれも 10% 以下の C.V.% を示した. 特に D で示したヒト血清は 2.32% と優れた再現性を示した. 測定間変動は, 低濃度において 7~12% であり, 中, 高濃度においては 4~5% 前後の良好な再現性が認められた. また, 同一ロットのキットを用いて測定者間の変動について検討した (Table 6). 測定値の平均でやや違いが認められたが, S.D., C.V.% の値では, 測定者による差は見られなかった.

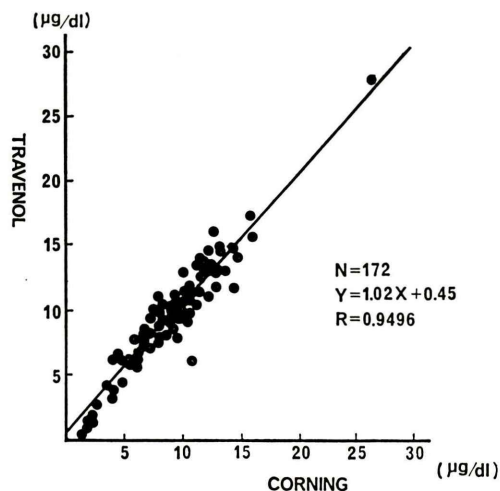


Fig. 6 Correlation between Corning's MAGIC T4 and Toravenol's Gamma Coat T4.

6. 他社キットとの相関

本キットにより測定した被検血清の値と, TRAVENOL 社製ガンマコート T4 RIA キット (チューブ固相法) により測定した値との比較を示した (Fig. 6). 相関係数 $r=0.9496$ ($n=172$), 直線式 $Y=1.02X+0.45$ と良好な回帰直線式を示した.

7. RER

標準曲線作成時のカウントを用いて, おおのこの測定時における重複測定のパラツキ (δ^2) を $\text{Log}(\delta^2+1) = \text{Log } A + J \text{Log } Y$ を用いて推定した. この場合, 1 回の測定では自由度が少なく, 有意性に問題があるため, 個々のデータを蓄積することにより, カウントと不偏分散の関係を求めた. 蓄積するデータの数が増すにつれて, A, J の値は一定の値に近くなる. 14 回分の結果を用いたものは, 10 回の直線にかさなり合った. 14 回 84 点の分布を示す (Fig. 7). 図中の点線は 95% 信頼限界の上限を示している. 直線の勾配が大きいほど, 低濃度領域でパラツキが大きいことを示している.

8. 測定範囲

標準血清を希釈して, 各濃度につき 10 回の同一測定を行った結果 (Table 7) より, t 検定を用いて¹⁰⁾求めた最低測定濃度は $0.5 \mu\text{g/dl}$ ($\alpha < 2.5\%$) であり, 一方, P.P. をもとに求めた値は¹¹⁾, 11 回

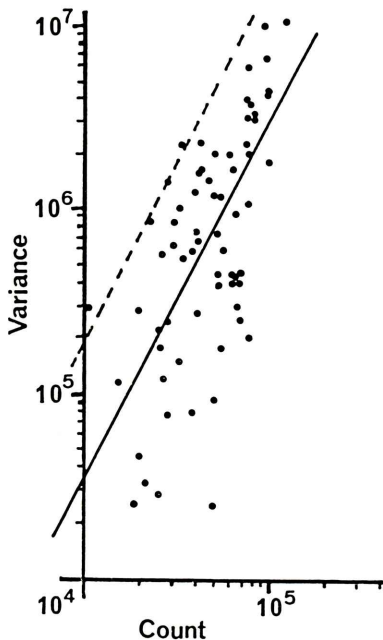


Fig. 7 Accumulated RER from standard curve of fourteen assays.

の測定の平均で $0.397 \pm 0.067 \mu\text{g/dl}$ ($\alpha < 2.5\%$) と両方法とも近い値を示した。この濃度を最低測定濃度とすると、 $0.5 \sim 30 \mu\text{g/dl}$ の範囲で測定が可能であった。

9. 標準曲線と推定精度

今回は回帰式に Logistic を用い、13回の測定結果による P.P. を作成した (Fig. 8)。本測定系においては、 $1 \mu\text{g/dl}$ における平均 C.V.% は約 25% であり、 $5 \mu\text{g/dl}$ で約 8%, $8 \mu\text{g/dl}$ より $30 \mu\text{g/dl}$ で最もバラツキが小さく、C.V.% は 5% 以下となった。図中、矢印で示した曲線は、操作中明らかに Bound の流出を認めた場合であり、バラツキの計算からは除外した。また、多重決定係数⁷⁾ (CMD%) は 99.578~99.999%, Comparative Fitting Factor⁷⁾ (CFF) は 2.670×10^{-3} から 2.743 の範囲で、ともに十分満足し得るものであり、一般臨床に用いる測定範囲においては十分な精度があると思われる。

10. 正常値

当院の外来、入院患者のうち甲状腺機能疾患を

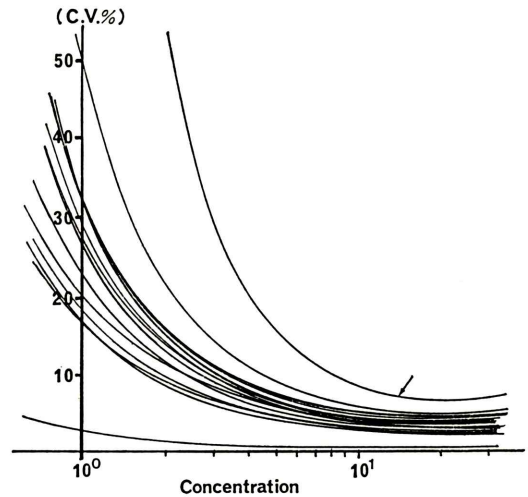


Fig. 8 Precision profiles of 13 sets of T4 measurements by Logistic.

有しない、65歳以上の老年者を対象に測定を行った。血中 T4 レベルは $5.16 \sim 12.16 \mu\text{g/dl}$ の範囲であり、平均値 \pm S.D. は $8.66 \pm 1.75 \mu\text{g/dl}$ であった。これは当検査室の正常域とよく一致した。

IV. 考 案

本測定系の特徴のひとつは、測定操作が簡便であり、B. F. 分離に磁石を用いていることが挙げられる。そのため遠心分離の必要がなく、操作時間の短縮につながると考える。インキュベーション時間および設定温度は、60分、室温 (25°C) が適切であった。今後、短縮法として、30分、 37°C 、または 15分、 37°C などを検討したいと考える。回収率試験、希釈試験とも満足すべき結果を得た。また、未知検体における他社キットとの相関も $R=0.9496$ ($n=172$) とよい値を示した。測定内および測定間の再現性は、おおよそ 2.32%~8.58%, 4.01%~11.95% と満足すべき結果を得た。これは、一般にいられている値と一致した。

最低測定濃度の決定には2つの方法を用いて行ったが、両方法ともに近い値を示した。このことは、最低測定濃度を決定するためにわざわざ希釈法による測定を行わずとも、RER を用いてその測定系の推定精度を求め、推計学的に有意な最低

測定濃度が求められることを示唆している。また、測定系の推定精度を示す P. P を作成することにより、その測定系全体の精度も推定し得ることになる。このような客観的指標を用いた推定精度の向上は、結果的に検査データの精度を良くすることにつながる重要な課題のひとつと考える。

測定可能な濃度の上限を決定することは非常に煩雑な手続きを伴うと思われるが、今回は単に標準曲線、RER、希釈試験の結果から推定した。今後、この点についても推計学的有意性をもって決定する必要があり、今後検討すべきであると考え。

文 献

- 1) Chopra IJ, Solomon DH, Ho RS: A radioimmunoassay of thyroxine. *J Clin Endol Metab* **33**: 865-868, 1971
- 2) Chopra IJ: A radioimmunoassay of thyroxine in unextracted serum. *J Clin Endocrinol Metab* **34**: 938-947, 1972
- 3) Mitsma T, Colucci J, Shenkman L, et al: Rapid simultaneous radioimmunoassay for triiodothyronine and thyroxine in unextracted serum. *Biochem Biophys Res Commun* **46**: 2107-2113, 1972
- 4) Larsen PR, Dochalova J, Sipula D, et al: Immunoassay of thyroxine in unextracted serum. *J Clin Endocrinol Metab* **37**: 177-182, 1973
- 5) Rodbard R, Lewald JE: Computer analysis of radioligand assay and radioimmunoassay data. *Endocrinol* **64** (Suppl 147): 79-103, 1970
- 6) Rodbard D: "Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine", pp. 28-31, IAEA, Vienna, 1978
- 7) 山田英夫, 黒田 彰, 矢田部タミ, 他: Log-logistic および log-logit 三次式モデルによる RIA 標準. *Radioisotopes* **30**: 311-317, 1981
- 8) 山田英夫, 黒田 彰, 矢田部タミ, 他: Radioimmunoassay のデータ解析. *Tracer* **5**: 7-14, 1981
- 9) 稲葉妙子, 黒田 彰, 矢田部タミ, 他: ラジオイムノアッセイキットの評価法——T3 固相法を例として——. *Radioisotopes* **32**: 121-124, 1983
- 10) 投稿準備中
- 11) Rodbard D: Statistical estimation of the minimal detectable concentration ("sensitivity") for radioligand assay. *Analytical Chemistry* **90**: 1-12, 1978