

《ノート》

DPC・free T₄ および free T₃ RIA Kit による血中遊離型 甲状腺ホルモン濃度の測定

Measurement of Free Thyroxine and Free Triiodothyronine
Concentrations by DPC RIA Kits

笠木 寛治* 高坂 唯子** 脇生 寛人* 徳田 康孝*
飯田 泰啓* 小西 淳二*

Kanji KASAGI*, Tadako KOUSAKA**, Hiroto HATABU*, Yasutaka TOKUDA*,
Yasuhiro IIDA* and Junji KONISHI*

**Department of Nuclear Medicine, **Division of Radioisotopes,
Kyoto University School of Medicine*

I. はじめに

血中 thyroxine (T₄) および triiodothyronine (T₃) は大部分が thyroxine binding globulin (TBG) を主とする血清蛋白と結合しており、これらのごく一部分、すなわち total T₄ の 0.02%, total T₃ の 0.2% がフリーの形で存在している。この free T₄ および free T₃ が実際に組織で利用されることによりホルモン作用が発揮されるものと考えられ、したがって甲状腺機能の検査法としては total T₄ および total T₃ の測定よりも、free T₄ および free T₃ の測定の方が重要と思われる。

これらの遊離甲状腺ホルモン濃度の測定法としては、従来平衡透析法¹⁾が主として用いられているほか、限外濾過法²⁾やゲル濾過法³⁾などもあるが、いずれも手技が煩雑であり、熟練を要するため、日常検査として用いられるには至らなかった。

最近これらの遊離型甲状腺ホルモンのラジオイムノアッセイ (RIA) が開発され、簡便かつ短時間にこれらの血中濃度を測定することが可能になった。このように現在までに種々の free T₄, free T₃ 測定用キットが市販されてきているが^{4~6)}、用いるキットによってはその測定値にアルブミン、遊離脂肪酸などが影響を及ぼすと報告されている^{4~8)}。

今回著者らはこれらの影響を受けにくいとされている free T₄ および free T₃ RIA キット (DPC・free T₄ および free T₃ キット、日本 DPC コーポレーション) 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結果を報告する。

II. 測定原理

本法は、¹²⁵I 標識甲状腺ホルモン誘導体と試験管に固相化された甲状腺ホルモンに対する抗体との結合を、血中の遊離型甲状腺ホルモンが阻止することを利用して測定される RIA である。本キットの特色として、1) トレーサーとして用いられる ¹²⁵I-T₄ または ¹²⁵I-T₃ 誘導体は抗 T₄ 抗体ま

* 京都大学医学部核医学科

** 同 放射線部

受付：63年1月20日

最終稿受付：63年3月18日

別刷請求先：京都市左京区聖護院川原町54（番606）

京都大学医学部附属病院核医学科

笠木 寛治

Key words: Radioimmunoassay, Free T₄, Free T₃, Albumin, TBG.

たは抗T₃抗体とはそれぞれT₄あるいはT₃と同様に結合するが、TBGとは親和性が低く、ほとんど結合しないこと、2)抗体としてT₄またはT₃との親和性がTBGよりもやや低いものを用いているため、遊離型甲状腺ホルモンと蛋白結合型甲状腺ホルモンとの平衡関係を変化させないこと、さらにこれらの抗体はチューブに固相化されているため遠心分離の操作が不要であること、3) ¹²⁵I-T₄および¹²⁵I-T₃誘導体と、アルブミンとの結合を阻害する薬剤が含まれているため、測定値へのアルブミンの影響がほとんどみられない^{9,10)}ことなどが挙げられる。

III. 測定方法

1) 本キットの構成および内容

- ① 抗T₄(またはT₃)ウサギ抗体固相化ポリプロピレンチューブ
- ② ¹²⁵I-T₄(またはT₃)誘導体
(アルブミンと標識誘導体との結合を阻止する物質が添加されている)
- ③ free T₄(またはfree T₃)標準血清
(free T₄キットの場合には、0, 0.1, 0.5, 1.1, 2.8, 5.6, 9.2 ng/dl の7種類の濃度の標準品が、free T₃キットの場合には、0, 0.45, 1.3, 3.0, 6.0, 21.0, 44.0 pg/ml の7種類の濃度の標準品が供給されている)

2) 操作手順

- ① 標準血清または検体血清をfree T₄の場合には100 μl, free T₃の場合には50 μl, T₄またはT₃抗体固相化チューブに加える。
- ② ¹²⁵I-T₄(またはT₃)誘導体1.0 mlを各チューブに加え、ボルテックスミキサーでゆるやかに混和する。
- ③ 37°Cでfree T₄の場合には1時間、free T₃の場合には3時間インキュベートする。
- ④ チューブ内容液をデカントまたは吸引にて完全に除去する。
- ⑤ チューブ内の放射能量をガンマカウンターにて計測し、Bound/Totalを計算する。
- ⑥ free T₄(またはfree T₃)標準血清の測定値

より標準曲線を描き、free T₄(またはfree T₃)値を読みとる。

IV. 実験方法および実験対象

測定法に関する基礎検討としてインキュベーション温度および時間の標準曲線に及ぼす影響、測定値の検出感度、精度および再現性などを検討した。また、free T₄、free T₃測定値に及ぼすアルブミンの影響についても検討した。

臨床的有用性については健常者72例、甲状腺機能亢進症14例、甲状腺機能低下症19例、癌、肝硬変、慢性腎不全などの重症非甲状腺疾患(nonthyroidal illness; NTI)患者36例、正常妊婦77例(第1期24例、第2期17例、第3期36例)、甲状腺機能が正常のTBG減少症4例(血中TBG濃度0~11.2 μg/ml)、TBG增多症3例(血中TBG濃度63~84 μg/ml)の血清free T₄およびfree T₃濃度を測定した。一部の検体においてこれらの測定値とAmerlex M FT₄およびFT₃RIAキット(Amersham社)によるfree T₄、free T₃の測定値とを比較検討した。

V. 結 果

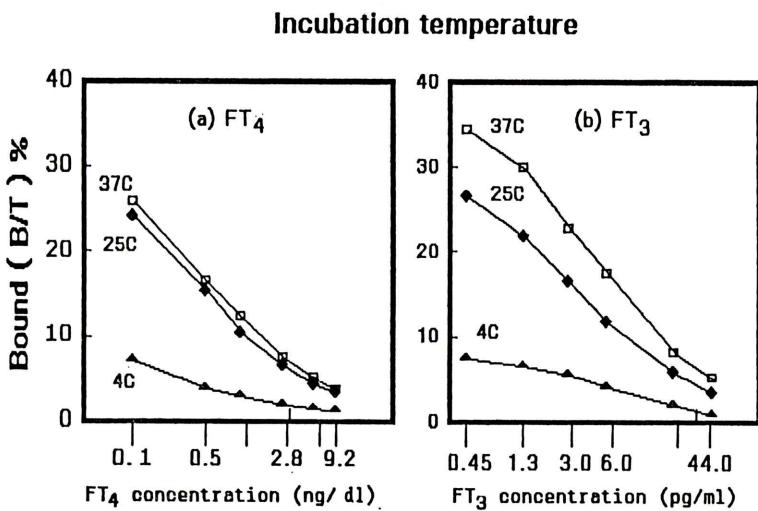
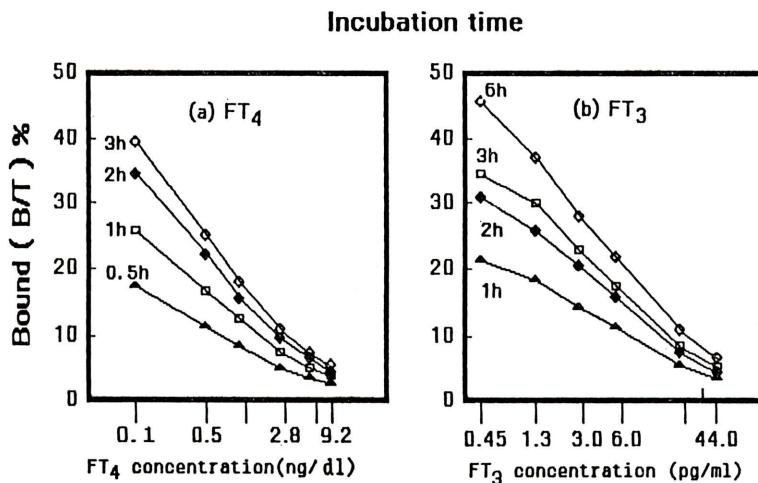
1. 基礎的検討

1) 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原法どおりfree T₄測定の際には1時間、free T₃測定の際には3時間と一定にして、インキュベーション温度を4, 25, 37°Cと変えて各種濃度の標準free T₄またはfree T₃添加時の結合カウントを見た。Fig. 1(a), (b)に示すごとく4°Cでは結合カウントが低く、標準曲線の勾配も緩やかであり、25, 37°Cと温度が高くなるにつれて結合カウントも上昇し、原法どおり37°Cで最も感度の良い標準曲線が得られた。

2) インキュベーション時間の影響

インキュベーション温度を原法どおり37°Cと一定にして、インキュベーション時間を30分、1, 2, 3, 6時間と変えて、各種濃度の標準free T₄またはfree T₃添加時の結合カウントを比較した。Fig. 2(a), (b)に示すごとくfree T₄測定の際には

Fig. 1 Effect of incubation temperature (a. free T₄ RIA; b. free T₃ RIA).Fig. 2 Effect of incubation time (a. free T₄ RIA; b. free T₃ RIA).

30分～3時間の間で、free T₃測定の際には1～6時間の間で、いずれもインキュベーション時間の増加に伴い、結合カウントも上昇した。

3) 標準曲線と最小検出感度

Figure 3に標準曲線の各種濃度における結合率(B/B₀%)の9回のアッセイの平均値およびその標準偏差を示す。B/B₀の10%低下を示すfree T₄およびfree T₃濃度はそれぞれ0.03 ng/dl, 0.45 pg/mlであった。

4) 精度および再現性

濃度の異なる3種類の血清について同一アッセイ内および異なるアッセイ間で10回測定を行い、それぞれその再現性を検討した。Table 1に示すごとく測定値の変動係数は同一アッセイ内ではfree T₄ RIAで5.4～6.1%, free T₃ RIAで5.3～9.5%，異なるアッセイ間でfree T₄ RIAで4.2～5.6%，free T₃ RIAで5.0～11.7%の値を示した。

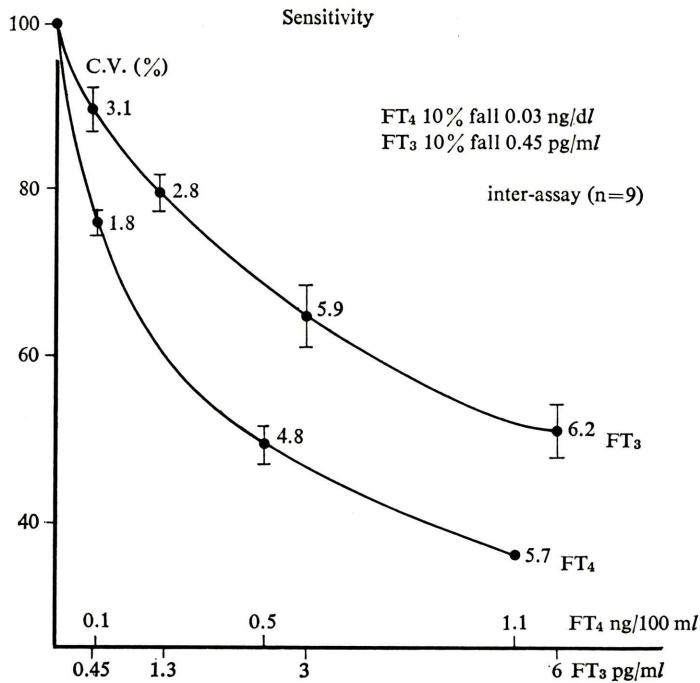


Fig. 3 Standard curves and the lowest detectable concentrations of free T₄ and free T₃. The number given at each point indicates coefficient of variation (C.V.).

Table 1 Precision and reproducibility of the assay

	FT ₄			FT ₃		
	Mean	S.D.	C.V.%	Mean	S.D.	C.V.%
Intraassay	1	.37	.02	5.4	2.22	.21
	2	1.46	.08	5.5	4.76	.25
	3	2.93	.18	6.1	11.89	.64
Interassay	4	.48	.02	4.2	2.03	.20
	5	2.73	.14	5.1	4.80	.24
	6	4.30	.24	5.6	7.72	.90

5) アルブミン添加による測定値への影響

血清アルブミン濃度低値(2.8~3.0 g/dl)のNTI患者3例の血清に種々の濃度のcharcoal-absorbed human serum albumin(CAHSA; DPC社より提供, 1.25~5.0 g/dl)を加えて測定値への影響を調べた(Fig. 4). free T₄値は2.5 g/dl添加で0.04~0.13 ng/dl, 5 g/dl添加で0.11~0.15 ng/dlの上昇が見られた。一方free T₃値は2.5 g/dlの添加で0.1~0.3 pg/ml, 5 g/dl添加で0.3~0.7 pg/mlの上昇を示した。

2. 臨床的検討

1) 健常者および各種疾患患者における血清 free T₄および free T₃濃度

健常者、甲状腺機能亢進症および低下症患者、重症非甲状腺疾患患者(NTI)、妊婦、TBG異常症例における血清 free T₄濃度を Fig. 5(a)に、free T₃濃度を Fig. 5(b)に示す。72例の健常者における血清 free T₄濃度は0.83~2.20 ng/dlに分布し、その平均士標準偏差(mean±SD)は1.48±0.30 ng/dlであり、正常域としてmean±2 SDを

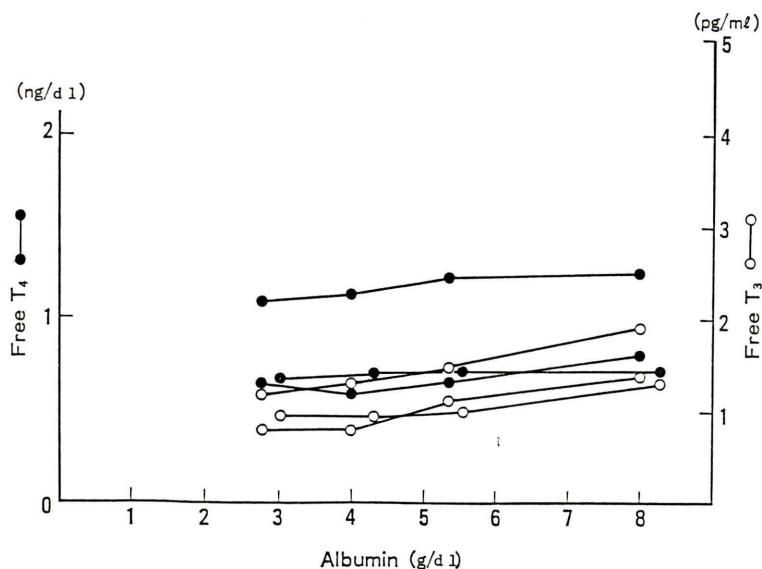


Fig. 4 Effect of human serum albumin on free T₄ and free T₃ levels. Charcoal-absorbed human serum albumin (CAHSA) was added in serum from patients with non-thyroidal illness who had low serum albumin concentrations (2.8–3.0 g/dl). The horizontal axis indicates final concentrations of serum albumin.

ると、0.88～2.08 ng/dl であった。14例の甲状腺機能亢進症患者では全例が 3.91 ng/dl 以上の高値を示し、一方19例の甲状腺機能低下症患者では全例が 0.57 ng/dl 以下の低値を示し、いずれも健常者群との重なり合いは認められなかった。NTI 患者においては36例中 8 例 (22.2%) が軽度の低値を示し、その平均は 1.20 ± 0.37 ng/dl であり、健常者群における free T₄ 値に比べて有意の低値を示した ($p < 0.001$)。正常妊婦では、1期 1.53 ± 0.39 ng/dl ($n=24$)、2期 1.39 ± 0.32 ng/dl ($n=17$)、3期 1.26 ± 0.22 ng/dl ($n=36$) であり、1期で 1 例がやや高値 (2.66 ng/dl)、3期で 3 例がやや低値 (0.80～0.86 ng/dl) を示した以外は全例正常範囲内に分布した。TBG 増多症 3 例では 1.44, 2.07, 2.79 ng/dl であり、やや高値の 1 例を除き正常、TBG 減少症 4 例では 0.70, 0.88, 0.99, 1.10 ng/dl であり、やや低値の 1 例を除き正常値を示した。

一方、72 例の健常者における血清 free T₃ 濃度は 1.16～3.57 pg/ml に分布し、その平均士標準偏差は 2.45 ± 0.50 pg/ml であり、mean士2 SD により得られた正常域は 1.45～3.45 pg/ml であった。

14例の甲状腺機能亢進症では全例 4.83 pg/ml 以上の高値を示し、健常者群との重なり合いは認められなかった。19 例の甲状腺機能低下症患者での free T₃ 濃度は 3 例が正常値を示した以外は全例低値を示した。NTI 患者においては 36 例中 24 例 (66.7%) が低値を示し、その平均は 1.64 ± 0.68 pg/ml であり、健常者における free T₃ 値に比べて有意の低値を示した ($p < 0.001$)。正常妊婦では、1期で 24 例中 1 例がやや高値 (3.76 pg/ml)、2期で 17 例中 3 例がやや高値 (3.45～3.71 pg/ml)、3期で 36 例中 4 例がやや低値 (1.26～1.41 pg/ml) を示した以外は全例正常値を示した。TBG 減少症 4 例では 1.12, 1.56, 1.63, 1.91 pg/ml であり、やや低値の 1 例を除き他は全例正常値、TBG 増多症 3 例では 2.44, 3.20, 3.88 pg/ml であり、やや高値の 1 例を除き正常値を示した。

2) 他の測定値との相關

甲状腺機能亢進症患者 6 例、低下症患者 12 例、妊婦 15 例、血清アルブミン濃度が 3.0 g/dl 以下の NTI 患者 19 例 (free T₄) または 17 例 (free T₃) において本法による測定値と本法と同じく T₄ より

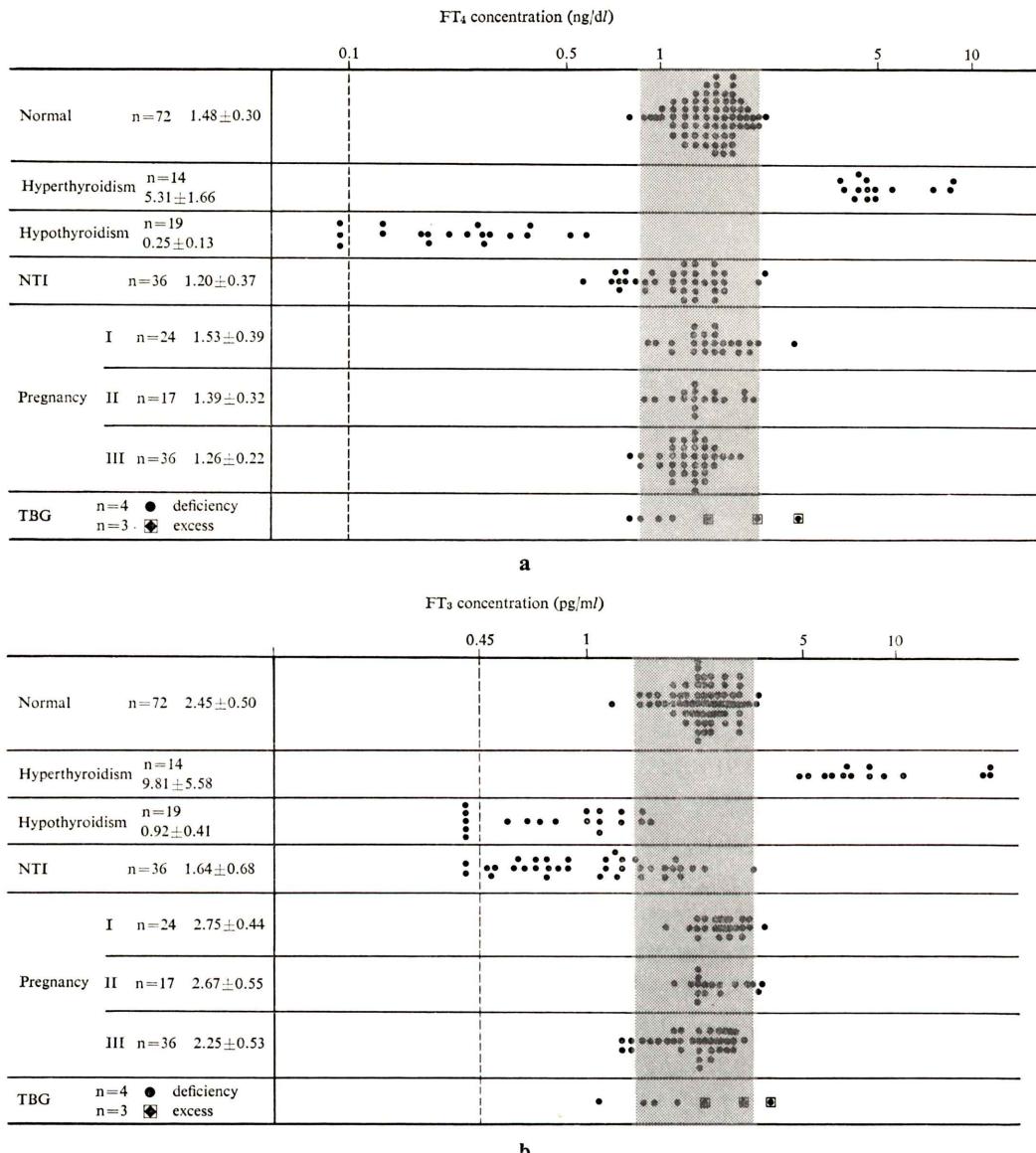


Fig. 5 Serum free T₄ (a) and free T₃ (b) concentrations in various physiological and pathological conditions. Shaded area shows the normal range.

び T_3 誘導体を用いる RIA である Amerlex M free T_4 および free T_3 RIA キット (Amersham 社) による測定値との比較を行った。Fig. 6 (a), (b) に示すごとく free T_4 RIA においても free T_3 RIA においても両測定値間にそれぞれ $r=0.982$, $r=0.956$ と良好な相関関係が認められた。

疾患別にみると、妊婦および NTI 患者において、Amerlex M free T₄ キットによる free T₄ 値が本法による測定値に比べて低値を示す傾向が認められた。一方 free T₃ 値については両測定値間に差は認められなかつたが、本法による正常値は Amerlex M free T₃ キットによる正常値よりも低

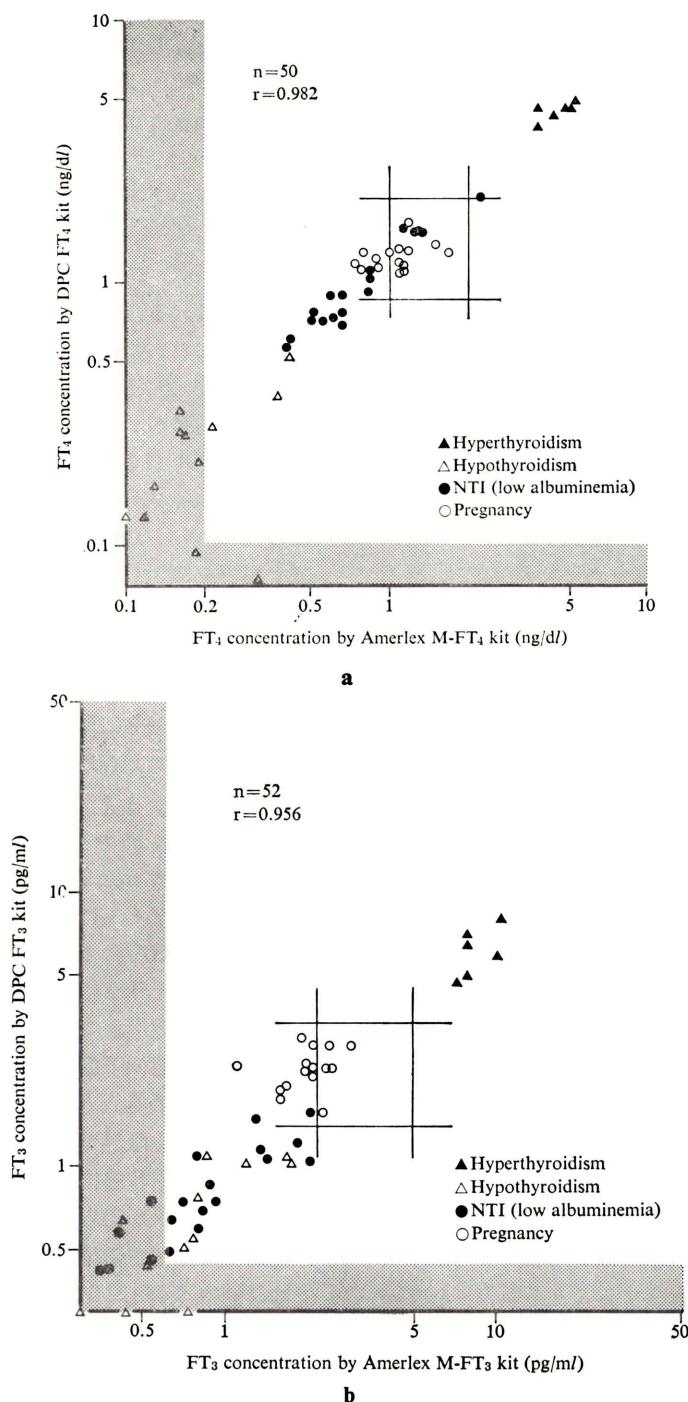


Fig. 6 Correlation between free T₄ (a) or free T₃ (b) concentrations measured by DPC RIA kit and those by Amerlex M kit. Shaded area indicates the undetectable range. Solid lines indicate both upper and lower limits of the normal range.

く、したがって妊婦における free T₃ は前者では全例正常値を示したのに対して、後者では半数以上の症例がやや低値を示した。

VI. 考 察

今回著者らが検討した DPC 社製キットによる free T₄, free T₃ 濃度の測定法は血中の遊離型甲状腺ホルモンと ¹²⁵I 標識 T₄ または T₃ 誘導体とがチューブに固相化された抗 T₄ または抗 T₃ 抗体と競合的に結合することを利用して測定される固相法 RIA であり、遠心分離の操作を必要とせずに短時間のインキュベーションで行える操作が簡便な方法である。このような誘導体を用いる方法では誘導体がアルブミンに結合するため、測定値が血清アルブミン濃度に影響されることが以前より指摘されていた^{7,8)}。本キットではこの問題点を解決すべく、誘導体とアルブミンとの結合を阻止する薬剤を使用している^{9,10)}のが特色である。

測定法に関する基礎的検討ではインキュベーションの温度について原法どおり 37°C で最も良好な標準曲線が得られた。一方インキュベーション時間の影響では free T₄ 測定で 0.5~3 時間, free T₃ 測定で 1~6 時間の間に時間の増加とともに結合率も上昇した。しかし、測定時間の短縮、アッセイの簡便性を考慮した場合、キットの指定どおり free T₄ 測定で 1 時間, free T₃ 測定で 3 時間のインキュベーションが適当だと考えられた。この条件下でキットの標準 T₄ の 0.1~9.2 ng/dl, 標準 T₃ の 0.45~44.0 pg/ml の範囲で良好な標準曲線が得られた。B/B₀ (%) の 10% 低下より求めた最小検出感度は free T₄ 0.03 ng/dl, free T₃ 0.45 pg/ml であった。測定値の再現性も良好であり、臨床検査法として十分使用可能であると考えられた。

アルブミンの添加試験ではアマレックス法では添加により測定値が上昇することが報告されている^{4~8)}。これは標識誘導体が添加したアルブミンに結合し、そのために標識誘導体の抗体への結合率が低下するためであると考えられる。著者らは本アッセイ系に種々の濃度のアルブミン(CAHSA)を加え、測定値への影響を見た。free T₄, free T₃ 値

とも 1.25~5 g/dl のアルブミン添加で軽度測定値が上昇した。しかし日常の臨床でわれわれが経験するアルブミン濃度すなわち 2~6 g/dl の範囲での測定値の差は free T₄ 0.1~0.3 ng/dl, free T₃ 0.3~0.7 pg/ml とわずかであり、測定値への影響はほとんど無視できると考えられた。同じキットを用いた吉田ら^{11,12)}, 鈴木ら¹³⁾, 萩原ら¹⁴⁾の成績でも測定値がアルブミンの添加により影響されないと報告している。さらに誘導体を用いる RIA のアッセイ系において遊離脂肪酸を少量加えた場合には測定値が低下することが知られている⁸⁾。これは遊離脂肪酸がアルブミンに結合するために標識誘導体のアルブミンへの結合が阻害され、したがって抗体への結合率が上昇するためと考えられている⁸⁾。著者らは今回遊離脂肪酸のアッセイに及ぼす影響を検討し得なかったが、DPC 社のキットを用いた場合、遊離脂肪酸添加の測定値への影響はほとんど認められないと報告されている^{13,14)}。これらの結果はいずれもアルブミンと誘導体との結合阻害剤が十分に作用を発揮していることを示唆していると考えられる。

本測定法による健常者 72 例の血清 free T₄ 濃度は平均 1.48 ng/dl で正常範囲は 0.88~2.08 ng/dl であった。一方 free T₃ 濃度は平均 2.45 pg/ml で正常範囲は 1.45~3.45 pg/ml であり、従来よりの平衡透析法、RIA による方法に比べてほぼ同程度からやや低値を示す傾向が認められた^{6,15)}。

甲状腺機能亢進症では全例が free T₄, free T₃ 高値、甲状腺機能低下症では全例が free T₄ 低値を示し、甲状腺機能低下症の診断に free T₃ の測定の有用性にやや限界があることを除いて、本法による測定値が甲状腺機能異常をよく反映していることを示す結果が得られた。

妊婦ではほぼ正常値を示した。NTI 患者においては 36 例中 8 例 (22.2%) が free T₄ 低値、36 例中 24 例 (66.7%) が free T₃ 低値を示した。NTI では一般にまず低 T₃ 症候群が見られ、さらに低 T₄ を呈するに至る。TBG の減少もしばしば伴われるほか、種々の蛋白異常が見られ、free T₄ 濃度も低値を呈することが多く、一般に総 T₄ 濃度が

低い例ほど free T₄ 濃度も異常を呈するものが多いと言われている⁴⁾。NTI あるいは妊婦などのように血中アルブミン濃度が低下する場合には前述のごとく誘導体と抗体との結合率が上昇し、測定値が低値を示す傾向があると報告されている^{4~8)}。著者らは低アルブミン血症を示す NTI 患者と妊婦において Amerlex 法 (Amerlex M キット) による free T₄, free T₃ 値と本法による測定値とおののおのの正常値を対照として比較したところ、両測定値とも Amerlex 法でより低値を示す傾向が認められ、本法による測定値が血清アルブミンの影響を受けにくいことが、臨床例においても示された。

本キットによる free T₄, free T₃ 濃度は血中 TBG 濃度に影響され、TBG 増多症で高値、減少症で低値を示すと以前報告されたが^{11,12,16)}、この点につき最近改良が加えられ¹⁰⁾、新しいキットではほとんどの症例が正常範囲内であると報告されている¹⁴⁾。著者らが測定した結果では free T₄, free T₃ 値とともに増多症でやや高値、減少症でやや低値を示す傾向が認められたが、ほとんどの症例が正常範囲内の値を示した。

本法による測定値と Amerlex M free T₄ および free T₃ キットによる測定値との間には良好な相関関係が認められた。

VII. まとめ

DPC・free T₄ および free T₃ RIA キットを用い、基礎的ならびに臨床的検討を行った。

1) キット規定の温度および時間でのインキュベーションで良好な標準曲線が得られ、測定の精度および再現性も良好であった。

2) 健常者の free T₄ 濃度は 0.88~2.08 ng/dl であり、甲状腺機能亢進症および低下症との分離は良好であった。健常者の free T₃ 濃度は 1.45~3.45 pg/ml であり、特に甲状腺機能亢進症との分離は良好であった。妊婦、TBG 減少症および増多症例ではほとんど正常域に分布した。NTI の症例では 22.2% において free T₄ 値が 66.7% において free T₃ 値が低値を示した。

3) 本法による測定値は Amersham 社の Amerlex M free T₄ および free T₃ キットによる測定値と良好な相関関係を認めた。妊婦、低アルブミン血症を示す NTI 患者では Amerlex 法による測定値がやや低値を示す傾向が認められた。

以上より本法は簡便な操作で血清 free T₄, free T₃ を測定でき、その精度、再現性ともに優れており、血清アルブミン、TBG などの影響を受けにくいことから、日常の臨床応用上有用であると考えられた。

文 献

- Sterling K, Brenner MA: Free thyroxine in human serum: Simplified measurement with the aid of magnesium precipitation. *J Clin Invest* **45**: 153-163, 1966
- Schussler GC, Plager JE: Effect of preliminary purification of ¹³¹I thyroxine on the determination of free thyroxine in serum. *J Clin Endocr* **27**: 242-250, 1967
- Lee ND, Henry RJ, Golub OJ: Determination of the free thyroxine content of serum. *J Clin Endocr* **24**: 486-495, 1964
- 小西淳二, 高坂唯子, 飯田泰啓, 他: Radioimmunoassay によるフリーサイロキシン測定の臨床的有用性に関する検討。ホルモンと臨床 **30**: 15-21, 1982
- 小西淳二, 高坂唯子, 飯田泰啓, 他: Radioimmunoassay による血中遊離サイロキシン濃度の測定—Amerlex FT₄ RIA kit の検討—。核医学 **19**: 115-124, 1982
- 笠木寛治, 高坂唯子, 御前 隆, 他: Amerlex Free T₃ RIA kit を用いた血清 Free T₃ の測定。核医学 **22**: 245-252, 1985
- Amino N, Nishi K, Nakatani K, et al: Effect of albumin concentration on the assay of serum free thyroxine by equilibrium radioimmunoassay with labeled thyroxine analog (Amerlex Free T₄). *Clin Chem* **29**: 321-325, 1983
- Wilkins TA, Midgley JEM, Barrow N, et al: Comprehensive study of a thyroxin-analogue-based assay for free thyroxine ("Amerlex FT₄"). *Clin Chem* **31**: 1644-1653, 1985
- Witherspoon LR, El Shami AS, Shuler SE, et al: Chemically blocked analog free thyronine assays I. The effect of chemical blockers on T₄ analog and T₄ binding by albumin and by thyroxine binding globulin. *Clin Chem* **34**: 9-16, 1988
- Witherspoon LR, El Shami AS, Shuler SE, et al: Chemically blocked analog free thyronine assays II.

- Use of equilibrium dialysis to optimize the displacement by chemical blockers of T₄ analog and T₃ analog from albumin while avoiding displacement of T₄ and T₃ from thyroxine binding globulin. Clin Chem 34: 17-23, 1988
- 11) 吉田克己, 桜田俊郎, 海瀬和郎, 他: DPC・フリー T₄ キットによる血清 Free T₄ の測定. 医学と薬学 17: 1193-1200, 1987
- 12) 吉田克己, 桜田俊郎, 海瀬和郎, 他: DPC・フリー T₃ キットによる血清 Free T₃ の測定. 医学と薬学 17: 1201-1207, 1987
- 13) 鈴木義信, 土屋登木彦, 小堀博文, 他: DPC 社製 Free T₄ RIA kit の基礎的, 臨床的検討. 医学と薬学 17: 1209-1215, 1987
- 14) 萩原康司, 今野則道, 田口英雄, 他: Coat-A-Count RIA Kit による血中遊離甲状腺ホルモン濃度の測定. 医学と薬学 18: 163-171, 1987
- 15) 今野則道, 今 寛, 萩原康司, 他: 血中フリー T₃ 濃度の測定—平衡透析法と RIA 法との比較—. ホルモンと臨床 33: 59-70, 1985
- 16) Hinde EJ, Haldon S: Discrepant serum FT₄ values—a TBG dependency? Clin Chem 32: 2104, 1986