

## 《技術報告》

IRMA を用いた新しい遊離サイロキシン測定キットの  
基礎的および臨床的検討

御前 隆\* 高坂 唯子\* 宮本 信一\* 竹内 亮\*  
 笠木 寛治\* 小西 淳二\*

**要旨** 固相化されたサイロキシン (T<sub>4</sub>) と <sup>125</sup>I 標識モノクローナル抗体を用いる新しい遊離サイロキシン (Free T<sub>4</sub>) の IRMA について検討したところ、37°C、60 分の反応条件で再現性に優れた測定が可能であった。健常者の測定値は 1.13±0.19 ng/dl に分布し、各種甲状腺疾患患者では甲状腺機能を反映する測定値を示し、かつ既存の二種類のキットの測定値と良好な正の相関が認められた。妊婦では妊娠の進行とともにほぼ基準範囲内で低下する傾向を認めた。TBG 減少症・増加症でも測定値はほぼ基準範囲に分布した。抗 T<sub>4</sub> 自己抗体陽性検体のなかに予想されるよりも高値を示した例があった。低アルブミン血症の検体の約 2 割に異常高値を認めたが、そのうちの大多数の症例では原疾患に対する利尿剤やヘパリンの使用など Free T<sub>4</sub> 上昇の誘因が明らかであった。本法は日常臨床で使用するのに適した Free T<sub>4</sub> の測定キットと考えられる。

(核医学 31: 629-635, 1994)

## I. はじめに

血液中に存在する甲状腺ホルモンのうち、生物学的作用を発揮するのは蛋白質と結合していない遊離型の分画と考えられている。また血中総サイロキシン (T<sub>4</sub>) 濃度は結合蛋白の量に影響を受けるので、遊離型サイロキシン (Free T<sub>4</sub>) の方が甲状腺機能の指標としてよりの確である。透析や限外濾過などの煩雑な手法を用いず簡便に Free T<sub>4</sub> を測定するラジオイムノアッセイのキットとして、これまでに試験管固相法<sup>1)</sup>、Free T<sub>4</sub> fraction と総 T<sub>4</sub> 濃度を測定する並列計算法<sup>2)</sup>、マイクロカプセル法<sup>3)</sup>、標識 T<sub>4</sub> 誘導体法<sup>4)</sup> などが開発され使用されてきた。しかし遊離型分画は総 T<sub>4</sub> 濃度の数千分の一と微量であり、かつ結合型分画と平衡関

係にあるため、各測定法には固相化抗体によるブルオフ現象、抗 T<sub>4</sub> 自己抗体の干渉、T<sub>4</sub> 結合グロブリン (TBG) 濃度やアルブミン濃度の影響、などの問題点があった<sup>5,6)</sup>。今回、新しい測定原理に基づいた immunoradiometric assay (IRMA) のキットを検討する機会を得たのでその成績について述べる。

## II. 方法と対象

本キット (D-2105) は第一ラジオアイソトープ研究所により開発・製品化されたものを同社より提供を受けて使用した。アッセイの原理は微粒子に固相化された T<sub>4</sub> 抗原に対する <sup>125</sup>I 標識モノクローナル抗体の結合を検体中の Free T<sub>4</sub> が阻害する程度を定量することであり、Free T<sub>4</sub> 濃度が高くなるにつれて微粒子に結合する放射活性は低くなる (Fig. 1)。

実際の測定手順を Fig. 2 に示す。試験管に試料 50  $\mu$ l、固相化 T<sub>4</sub> 抗原懸濁液 100  $\mu$ l、<sup>125</sup>I 標識抗体液 100  $\mu$ l の三者を加えて混和し反応させる。

\* 京都大学医学部放射線核医学科

受付: 6 年 2 月 7 日

最終稿受付: 6 年 3 月 29 日

別刷請求先: 京都市左京区聖護院川原町 54 (☎ 606)

京都大学医学部放射線核医学科

御 前 隆

次に沈澱固定化試薬を加えて遠心分離し、上清を吸引除去したあと試験管に残った放射活性をカウントする。

抗  $T_4$  自己抗体の活性測定には  $^{125}I$  標識  $T_4$  誘導体を用いて、ポリエチレングリコールによる沈降反応を行い沈降率 10% 以上を陽性と判定した<sup>7)</sup>。

検討対象は健康者 48 名、甲状腺疾患患者 84 名、TBG 減少症 8 名、妊婦 47 名、妊婦以外の TBG 增多症（一部の肝炎症例等）3 名、甲状腺ホルモン抗体陽性患者 6 例、および非甲状腺疾患患者で TSH が基準範囲 ( $0.30 \sim 3.90 \mu U/ml$ ) にあり血清アルブミン値が  $3.0 g/dl$  以下の 71 名（進行癌 25 例、心不全 18 例、腎不全 10 例、肝硬変 10 例、その他 8 例）である。

### III. 結 果

まず反応条件についての予備的検討を行った。高・中・低の 3 濃度のコントロール血清 (A, B, C) を用いて調べたところ Fig. 3 に示す通り、測定値は反応温度に影響を受けることがわかったので以下の検討では温水浴の温度は正確に  $37^\circ C$  となるよう留意した。反応時間は Fig. 4 に見られるよう

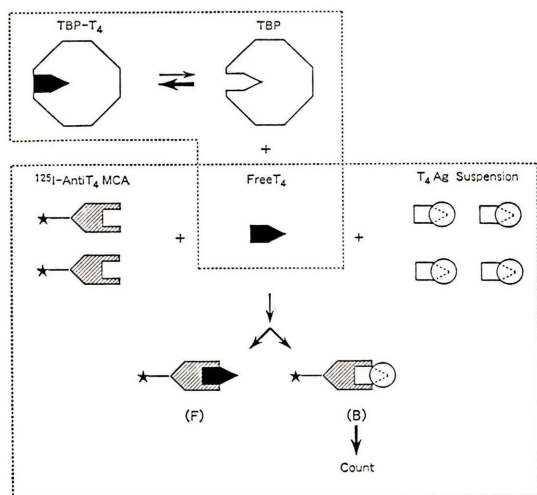


Fig. 1 Principle of the new immunoradiometric assay. TBP, thyroxine binding proteins; MCA, monoclonal antibodies; Ag, antigen.

に測定に有意の影響を与えなかったのでキットの原法に従い 60 分とした。次に、同じく 3 濃度のコントロール血清を用いてアッセイの再現性を調べたところ測定内・測定間誤差の変動係数 (C.V.)

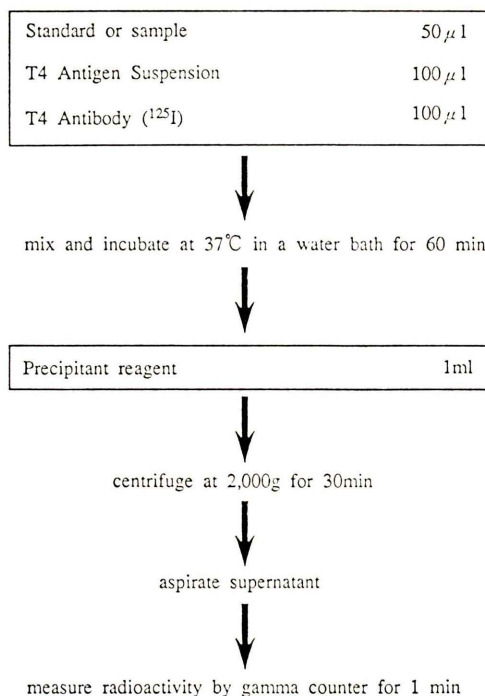


Fig. 2 Assay procedure.

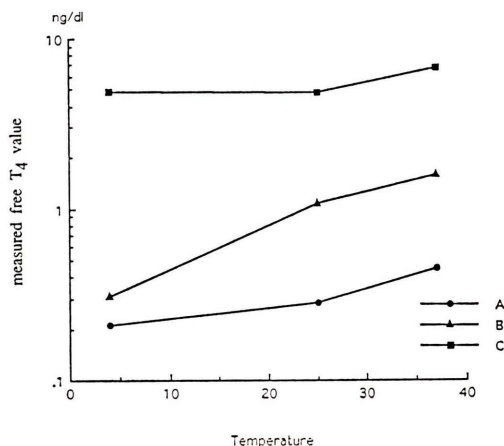
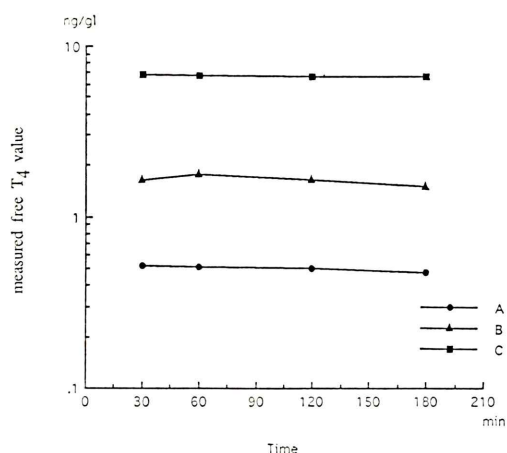
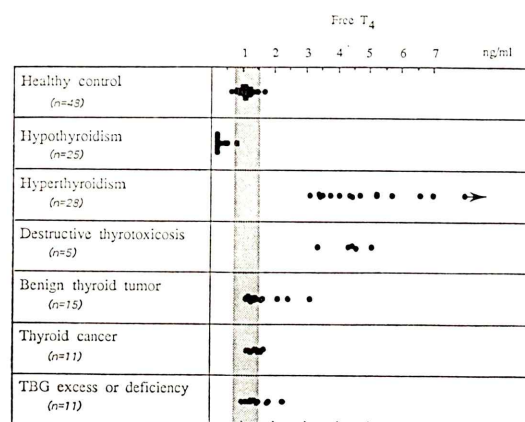


Fig. 3 Effect of incubation temperature on the measurement of free  $T_4$  in reference serum pools. Incubation time was set at 60 min.



**Fig. 4** Effect of incubation time on the measurement of free T<sub>4</sub> in reference serum pools. Incubation temperature was set at 37°C.



**Fig. 5** Free T<sub>4</sub> values measured with the new IRMA kit for various thyroid diseases. Shaded area designates reference range.

はそれぞれ 3.1%・6.7% 以下と良好であった (Table 1, 2). 健常人 48 名の測定値は  $1.13 \pm 0.19$  ng/dl (平均  $\pm$  標準偏差) に分布し, これから基準範囲を平均  $\pm$  2 標準偏差の 0.75~1.51 とした.

臨床的検討としてまず通常の甲状腺疾患患者血清を測定したところ, Fig. 5 のごとく病状にみあった測定値をとり, 特に甲状腺中毒症の健常人からの分離が良好であった. なお良性結節で高値を示した 3 例は, いずれも抑制療法のため甲状腺剤

**Table 1** Intraassay variation

	RS-A (ng/dl)	RS-B (ng/dl)	RS-C (ng/dl)
1	0.44	1.66	6.90
2	0.47	1.67	6.76
3	0.46	1.56	6.99
4	0.44	1.64	6.91
5	0.44	1.57	7.08
6	0.43	1.69	6.96
7	0.47	1.66	6.85
8	0.44	1.59	6.69
9	0.45	1.59	6.72
10	0.45	1.61	6.77
Mean	0.45	1.62	6.86
SD	0.01	0.05	0.13
CV(%)	3.1	2.8	1.9

RS : Reference serum

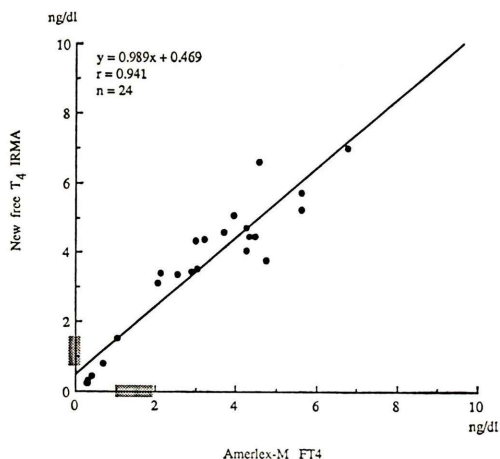
**Table 2** Interassay variation

	RS-A (ng/dl)	RS-B (ng/dl)	RS-C (ng/dl)
1	0.46	1.61	6.79
2	0.46	1.61	6.46
3	0.45	1.59	6.40
4	0.45	1.51	6.57
5	0.47	1.59	6.63
6	0.43	1.45	6.20
7	0.45	1.56	6.68
8	0.51	1.76	6.62
9	0.53	1.61	6.24
10	0.50	1.63	6.63
Mean	0.47	1.59	6.52
SD	0.03	0.08	0.19
CV(%)	6.7	5.1	3.0

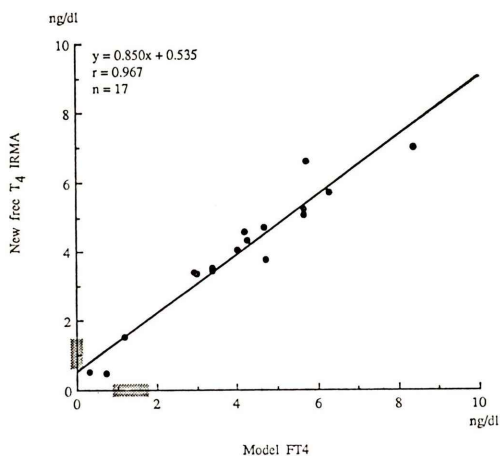
RS : Reference serum

を服用中であった. これら検体の一部では既存の 2 種類の他社キット<sup>4,8)</sup>, による測定値と比較した. その結果, 標識 T<sub>4</sub> 誘導体を用いる RIA 法 (Amerlex M Free T<sub>4</sub>, コダック社) とは相関係数  $r=0.941$  ( $n=24$ ,  $p<0.01$ ), 平衡透析 RIA 法 (モデル FT<sub>4</sub>, 日本メジフィジックス社) とは  $r=0.967$  ( $n=17$ ,  $p<0.01$ ) と良好な相関を示し, 測定値も互いに近似していた (Fig. 6, 7).

つぎに妊婦血清では Fig. 8 のように妊娠の進行

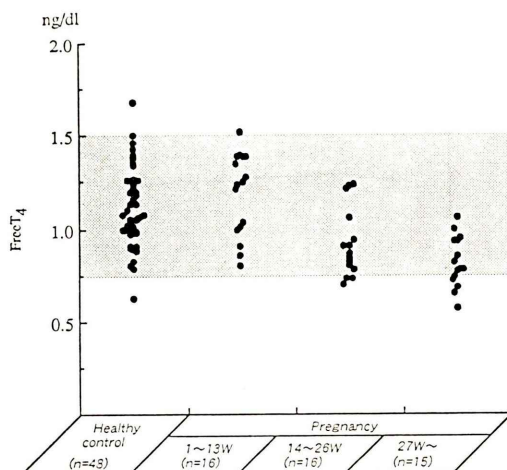


**Fig. 6** Correlation between values obtained with the new IRMA kit and an analog tracer RIA (Amerlex-M free T<sub>4</sub> kit). Hatched zones represent the reference ranges.

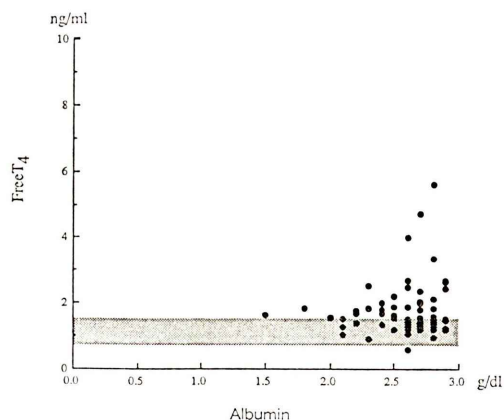


**Fig. 7** Correlation between values obtained with the new IRMA kit and an equilibrium dialysis RIA (Model FT<sub>4</sub> kit). Hatched zones represent the reference ranges.

とともに低下していく傾向を認め、後期では3分の1の症例で基準範囲より低くなったが健常群と有意差を示すには至らなかった。TBG濃度異常の検体では、TBG減少症で  $1.69 \pm 0.36$  (n=8) と全体としては健常群と有意差はなかったが、8例中3例は基準範囲よりやや高い測定値であった。



**Fig. 8** Free T<sub>4</sub> concentrations in pregnancy. Shaded area designates the reference range.



**Fig. 9** Free T<sub>4</sub> concentrations in nonthyroidal illnesses associated with hypoalbuminemia.

また TBG 増加 3 例は 0.99, 1.12, 1.32 と基準範囲に分布した (Fig. 5)。

抗 T<sub>4</sub> 自己抗体陽性例について既存の 2 種キットと本法により測定したところ、標識誘導体を用いる RIA 法ではみかけ上異常高値となるものが多く、平衡透析 RIA 法では TSH 値や臨床所見



**Table 3** Free T<sub>4</sub> values of autoantibody-positive sera measured by various assay kits  
(Numbers in the parentheses denote reference ranges)

Case	Disease	TSH	T <sub>4</sub> autoantibody	Free T <sub>4</sub> (ng/dl)		
		(μU/ml) (0.30~3.90)	(analog binding %) ( ~10.0)	Amerlex-M FT4 (0.99~1.92)	Model FT4 (0.86~1.74)	New IRMA (0.75~1.51)
N.M.	Hashimoto	2.35	20.1	2.35	2.29	<u>2.80</u>
U.K.	Hashimoto	<u>4.90</u>	71.6	<u>3.48</u>	1.13	<u>3.42</u>
F.K.	Graves	1.30	76.2	>10.4	0.93	<u>6.51</u>
S.Y.	Graves	1.90	39.0	1.26	0.97	1.30
K.Y.	Graves	1.20	50.3	<u>3.21</u>	1.20	1.63
N.S.	Graves	3.80		<u>6.98</u>	<u>0.08</u>	1.78
		<0.03		>10.40	<u>0.56</u>	3.00
		0.05		>10.40	<u>0.26</u>	2.59
		15.30	81.4	<u>7.74</u>	<u>0.00</u>	<u>1.80</u>

から予想される値より低値, IRMA 法である本キットでは高値となる検体があった (Table 3).

低アルブミン血症 71 検体のうち 26 例で基準範囲を上回っており, うち 14 例は 2.00 ng/dl を超えていた (Fig. 9).

#### IV. 考 察

今回検討した IRMA キットは, 操作性・再現性など測定試薬としての基礎検討で満足できる成績を示し, かつ通常の甲状腺疾患・TBG 減少症・増加症および妊娠においては既存の標識誘導体法や平衡透析 RIA 法のキットと同様に測定に関して大きな問題がなく, 臨床応用に適していると考えられる. 妊娠の進行に伴って Free T<sub>4</sub> の測定値が下降傾向を示す現象は, 透析法や各種の測定キットでもみられ<sup>4,8)</sup>, 生理的变化と推測される.

抗 T<sub>4</sub> 自己抗体陽性例で測定値が高くなる検体があったが, 標識誘導体法に比べればその程度は軽かった. 干渉の原因は, 固相化された T<sub>4</sub> に自己抗体が結合して標識抗体と競合してしまうためと想像されるが, アッセイへの影響の度合は症例ごとに異なり, また標識 T<sub>4</sub> 誘導体結合率とも必ずしも相関しなかった. 自己抗体はもともとポリクローナルなものであり, 測定に有意の影響を及ぼしているのはその中でも特に抗原親和性の強い

クローンのみではないかと考えられる. 今後症例数を増やして, 自己抗体陽性例のうち何割ぐらいが真に測定不適かを見極める必要がある. また臨床の場で Free T<sub>4</sub> 値を見るときには, アッセイ法の種類を問わず臨床所見や TSH 値と対比して不釣合いがないか確認する努力が望まれる.

低アルブミン血症検体中にみられた異常高値例 14 例の臨床的背景を詳細に調べたところ, 11 例において実際に血液中の Free T<sub>4</sub> fraction を増加させていると考えられる誘因がみつかった<sup>9,10)</sup>. そのうちわけは, 利尿剤フロセマイドの使用 5 例, ヘパリンの使用 3 例, 両薬剤併用 1 例, 腎不全 2 例であった. 残る 3 例 (進行肝癌・骨髄腫・顔面外傷術後) については既知の誘因は発見できず, 未知の病態ないし干渉物質の関与の可能性があり興味深い.

#### V. 結 語

固相化 T<sub>4</sub> 抗原と標識モノクローナル抗体を用いる Free T<sub>4</sub> の IRMA キット (D-2105) の基礎的ならびに臨床的検討を行い, 以下の成績を得た.

1) 37°C, 60 分の反応条件で再現性に優れた測定が可能であった.

2) 健常者の測定値は  $1.13 \pm 0.19$  ng/dl (平均 ± 標準偏差) に分布し, 各種甲状腺疾患患者では甲

状態機能を反映すると考えられる測定値となった。

3) 本キットと既存の標識  $T_4$  RIA 法および平衡透析 RIA 法のキットの測定値の間には良好な正の相関があった。

4) 妊婦では妊娠の進行とともに低下する傾向を認めたが、全体としてはほぼ基準範囲内にあった。TBG 減少症・増加症でも測定値はほぼ基準範囲に分布した。

5) 抗  $T_4$  自己抗体陽性検体 6 例中 4 例で本キットによる Free  $T_4$  の測定値は臨床所見などから予想されるよりも高値であった。

6) 低アルブミン血症検体の 19.7% に異常高値を認めたが、そのうちの大多数の症例では原疾患に対する利尿剤やヘパリンの使用など Free  $T_4$  上昇の誘因が明らかであった。

以上のように、本法は簡便・迅速で精度にも優れ、日常臨床で使用するのに適した Free  $T_4$  の測定キットと考えられる。

#### 文 献

- 1) 小西淳二, 高坂唯子, 飯田泰啓, 笠木寛治, 池窪勝治, 中川 毅, 他: 固相法 radioimmunoassay kit 「GammaCoat FT<sub>4</sub>」による遊離サイロキシン測定の基礎的検討と臨床応用. 核医学 17: 963-970, 1980
- 2) 池窪勝治, 高坂唯子, 飯田泰啓, 笠木寛治, 小西淳二, 鳥塚莞爾, 他: Free  $T_4$  RIA kit (Corning) による血中遊離サイロキシン濃度の測定について. ホルモンと臨床 28: 109-114, 1981
- 3) 笠木寛治, 小西淳二, 高坂唯子, 飯田泰啓, 池窪勝治, 鳥塚莞爾: 透析膜マイクロカプセルを用いた血中遊離サイロキシン濃度測定法について. 核医学 18: 973-983, 1981
- 4) 小西淳二, 高坂唯子, 飯田泰啓, 御前 隆, 笠木寛治, 遠藤啓吾, 他: Radioimmunoassay kit による血中遊離サイロキシン濃度の測定—Amerlex FT<sub>4</sub> RIA kit の検討—. 核医学 19: 115-124, 1982
- 5) Konishi J, Iida Y, Kousaka T, Ikekubo K, Nakagawa T, Torizuka K: Effect of anti-thyroxine auto-antibodies on radioimmunoassay of free thyroxine in serum. Clin Chem 28: 1389-1391, 1982
- 6) Ekins R: The free hormone hypothesis and measurement of free hormones (editorial). Clin Chem 38: 1289-1293, 1992
- 7) 西 啓子, 網野信行, 遠藤雄一, 玉置治夫, 海藻明美, 小豆嶋美生, 他:  $T_4$ -analog を用いた血中サイロキシン自己抗体の測定について. 臨床病理 32: 1133-1136, 1984
- 8) 飯田泰啓, 高坂唯子, 小林香津子, 富田恵子, 日高昭齊, 竹内 亮, 他: 平衡透析法を用いた血中遊離サイロキシン濃度測定ラジオイムノアッセイキットの検討. 核医学 28: 1213-1221, 1991
- 9) Stockigt JR, Lim CF, Barlow JW, Stevens V, Topliss DJ, Wynne KN: High concentration of furosemide inhibit serum binding of thyroxine. J Clin Endocrinol Metab 59: 62-66, 1984
- 10) Medel CM, Frost PH, Kunitake ST, Cavalieri RR: Mechanism of the heparin-induced increase in the concentration of free thyroxine in plasma. J Clin Endocrinol Metab 65: 1259-1264, 1987

## Summary

### Basic and Clinical Evaluation of a Novel Immunoradiometric Assay Kit for Free Thyroxine

Takashi MISAKI, Tadako KOUSAKA, Shin'ichi MIYAMOTO, Ryo TAKEUCHI,  
Kanji KASAGI and Junji KONISHI

*Department of Radiology and Nuclear Medicine, Kyoto University School of Medicine*

We have evaluated a new immunoradiometric assay for free thyroxine ( $T_4$ ) utilizing thyroxine-coated particles and radioiodinated monoclonal anti- $T_4$  antibodies. The assay results were reproducible with coefficients of variation no more than 3.1% for intraassay and no more than 6.7% for interassay. Serum free  $T_4$  values for 48 healthy subjects distributed at  $1.13 \pm 0.19$  ng/dl (mean  $\pm$  SD). In various thyroid diseases, the results with the new kit compared well with two other measurements ( $T_4$ -analog RIA and equilibrium dialysis RIA). Altered concentration of thyroxine binding globulin did not significantly affect this assay, while antithyroxine autoanti-

bodies caused factitiously elevated free  $T_4$  values in some cases. In pregnancy, free  $T_4$  concentration tended to decline mildly in late stages. About 20% of hypoalbuminemic samples from patients with nonthyroidal illnesses had free  $T_4$  concentration more than 2.00 ng/dl, probably due to renal failure or to the use of diuretics, heparin, or other drugs which may increase serum free  $T_4$  fraction in vivo. In conclusion, this new free  $T_4$  IRMA kit is convenient and reproducible, and suitable for routine measurement of clinical material.

**Key words:** Free thyroxine, Thyroxine binding globulin, Immunoradiometric assay, Thyroid diseases.