

## [原著] Radioimmunoassay による血中サイロキシン量の測定

今 関 恵 子\* 堀 田 と し 子\* 川 名 正 直\*  
有 水 昇\* 内 山 暁\*\* 国 安 芳 夫\*\*\*  
中 島 道 也\*\*\*\*

(昭和54年9月4日受付)

### 要 旨

血中サイロキシン定量用の RIA キットである「サイロテストリア・4」キットの基礎的、臨床的検討を試みた。本法は従来の CPBA 法に比較し、 $T_4$  の結合蛋白からの抽出操作を不用とし、使用血清量が非常に僅少であるという利点を持つ。

本キットの精度、希釈試験、回収試験の結果は良好であった。臨床的には他の同種 in vitro 検査法とよく相関し、正常範囲は機能正常者49例の検討より  $6.5\sim 12.1 \mu\text{g/dl}$  となり、機能亢進者、低下者との分離はきわめて良好であった。

**Key word:** radioimmunoassay, thyroxine, competitive protein binding assay,

略語一覧: CPBA: competitive proteinbinding assay  
 $T_4$ : thyroxine, RIA: radioimmunoassay

### はじめに

甲状腺疾患の診断に血中  $T_4$  量の測定が有用であることは周知のところである。1964年, Murphy<sup>1)</sup>により CPBA 法が導入されて以来血中サイロキシンの測定にはこれらキットが多用されてきた。そして1971年, Chopra<sup>2)</sup>らにより  $T_4$  の RIA 法が報告され現在測定法の主流は RIA 法である。

今回我々が使用しえた NML (Nuclear Medical Laboratories) 社のサイロテストリア・4キットは、血清量が0.01ml ときわめて僅少であり、血清中サイロキシン結合蛋白 (TBP) と結合している  $T_4$  を遊離させる

のに、希塩酸溶液を用いており、bound と free の分離剤として36.0%硫酸アンモニウム液を使用する点に特徴をもつ新キットである。

本キットの基礎的検討と臨床的有用性の検討を行ったのでその結果を報告する。

### 測定方法

#### A. 測定原理

血清中の TBP から酸性の溶液により  $T_4$  を遊離させ、これと外因性の  $^{125}\text{I}\cdot T_4$  のサイロキシン抗体への競合的結合反応を利用する。 $^{125}\text{I}\cdot T_4$  抗  $T_4$  結合物は硫酸アンモニウム溶液により沈殿させる。沈殿物の放射能をもって、標準血清についてのそれと対比すれば  $T_4$  量は

\* 千葉大学医学部放射線医学教室 \*\* 千葉大学医学部附属病院放射線部 \*\*\* 帝京大学医学部放射線科教室  
\*\*\*\* 水戸済生会病院

KEIKO IMAZEKI\*, TOSHIKO HOTTA\*, MASANAO KAWANA\*, NOBORU ARIMIZU\*, GUIO UCHIYAMA\*\*, YOSHIO KUNIYASU\*\*\*, MICHIIYA NAKAJIMA\*\*\*\*: Study on radioimmunoassay of serum thyroxine.

\* Department of Radiology, School of Medicine, Chiba University, \*\* Department of Radiology, Chiba University Hospital \*\*\* Department of Radiology, School of Medicine, Teikyo University, \*\*\*\* Mito Saiseikai Hospital,

Received for publication, September 4, 1979.

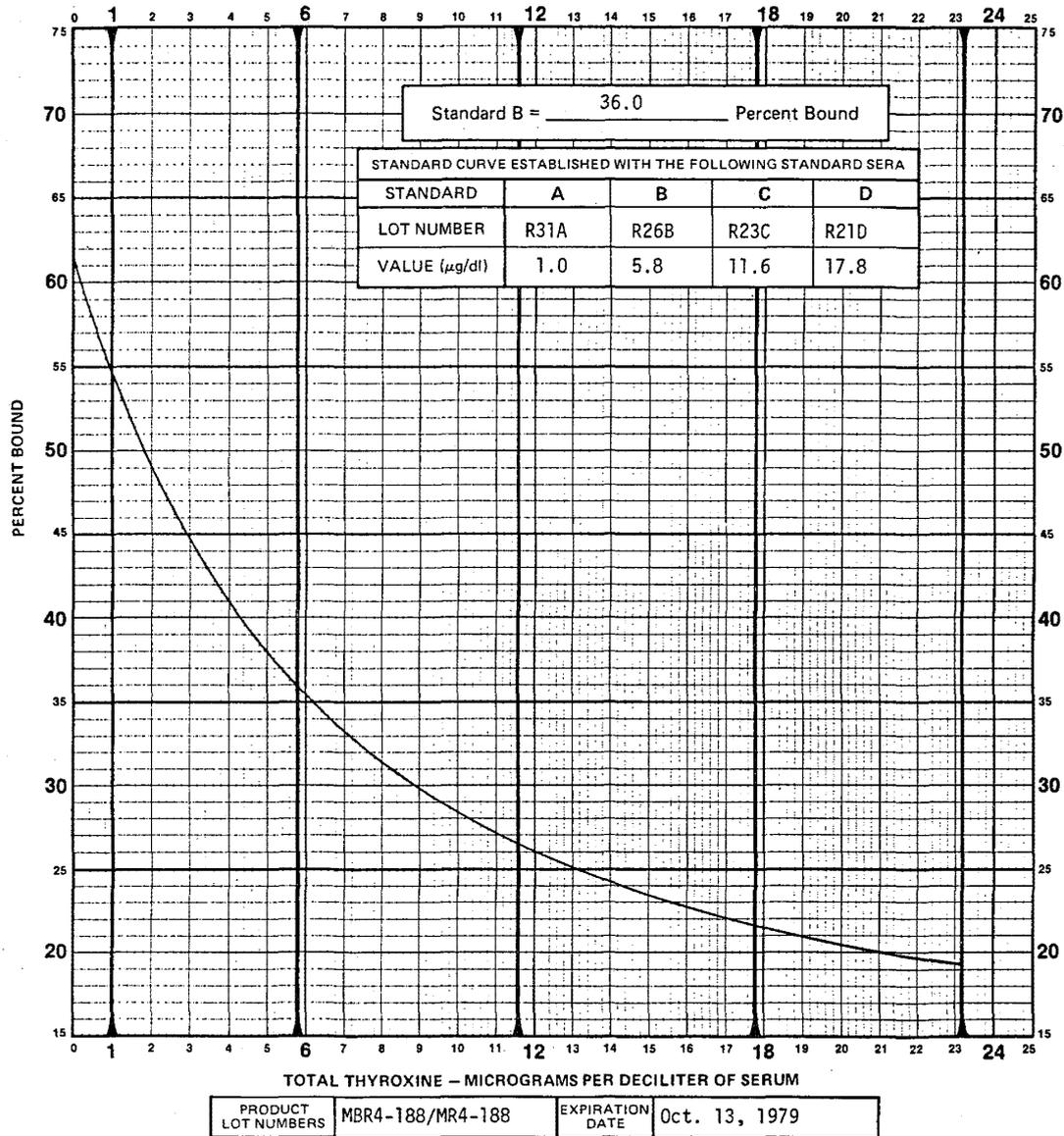


Fig. 1 Thyrotect RIA standard curve

測定できる。

B. キットの組成

<sup>125</sup>I・T<sub>4</sub> 液 (0.172~0.210 μci/17ml), 抽出用液 (塩酸0.21w/v%), T<sub>4</sub>抗体液, 沈降液 (硫酸アンモニウム36.0v/v%), 希釈液 (バルビタール緩衝液), 標準血清 A, B, C, D 液 (1, 6, 12, 18μg/dl の T<sub>4</sub> を含む)。

C. 測定操作

- 抽出用液200μl を試験管に入れる。
- 患者血清10μl を加え, 振とう混和する。
- <sup>125</sup>I・T<sub>4</sub> 液400μl を加え, 激しく振とう混和する。
- T<sub>4</sub>・抗体液400μl を加え, 振とう混和して30~60分静置する。
- 沈降液2.0ml を加え, 栓をし, 可及的に泡立てないよう10回程度, 転倒混和する。

6. 遠心分離 (2000~2500rpm, 10分間) する。

7. 上清液を傾斜し, 水滴をよくぬぐい, 沈殿物の放射能を計測する。

8. 次式により計算し, 標準曲線を作成し, 被検血清の T<sub>4</sub> 濃度を読みとる。

$$\text{結合率(\%)} =$$

$$\frac{\text{標準血清 A,B,C,D, についての cpm}}{\text{総カウント数}}$$

ただし

$$\text{総カウント数} = \frac{\text{標準血清についての cpm}}{\text{標準血清 B の表示結合率}}$$

検査対象

千大病院放射線科の甲状腺外来を受診し, 臨床所見および各種検査成績より診断の確定した甲状腺疾患患者94

例ならびに放射線技師学校学生を主とする健常人49例である。患者の内訳は、機能亢進群38例（未治療機能亢進例16例、治療中でお亢進のもの20例、慢性甲状腺炎1例、亜急性甲状腺炎1例）、機能正常群39例（薬剤治療中のもの19例、RI治療後のもの4例、甲状腺腫10例、結節性甲状腺腫2例、その他4例）、機能低下群17例（慢性甲状腺炎4例、橋本病1例を含む）である。これらについて本法により血中  $T_4$  濃度を測定した。さらに症例の一部につき、 $T_3$  リアキット II（ダイナポット社）、SPAC- $T_4$  キット（第1 RI）、Res-O-Mat  $T_4$  キット（第1 RI）を用いて測定した値の比較検討をした。

## 測定成績

## A. 基礎的検討

## 1. 標準曲線

Fig. 1 に示す。測定範囲は  $1 \sim 24 \mu\text{g/dl}$  である。キット毎に標準曲線が添付されているが、アッセイ毎に各施設で作成する。両曲線は、ほぼ一致する。

## 2. 再現性の検討

## 1) 同一 assay 内

同一ロット番号のキットを用いて、 $T_4$  濃度の異なる3種類の血清を用いて、血中  $T_4$  を10回ずつ測定した際の平均値、標準偏差、変動係数を Table 1 に示す。それぞれの変動係数は8.0, 4.2, 6.5%であり、良好な結果を示した。

## 2. キット間

濃度の異なる3種の血清について、assay 日をかえて、5回測定した際の平均値、標準偏差、変動係数を

Table 1. within-assay precision

| case             | $T_4$ concentration ( $\mu\text{g/dl}$ ) |      |      |
|------------------|--|------|------|
|                  | 1  | 2    | 3    |
| 1                | 4.7                                      | 13.1 | 9.6  |
| 2                | 5.2                                      | 12.8 | 9.2  |
| 3                | 5.6                                      | 12.6 | 9.0  |
| 4                | 4.8                                      | 12.2 | 8.5  |
| 5                | 4.9                                      | 12.6 | 10.7 |
| 6                | 4.9                                      | 12.8 | 9.6  |
| 7                | 5.7                                      | 13.5 | 9.0  |
| 8                | 4.7                                      | 13.6 | 8.6  |
| 9                | 4.8                                      | 13.0 | 9.0  |
| 10               | 4.8                                      | 14.0 | 9.8  |
| mean             |  |      |      |
| $\mu\text{g/dl}$ | 5.0                                      | 13.0 | 9.3  |
| S.D              | 0.4                                      | 0.5  | 0.6  |
| C.V(%)           | 8.0                                      | 4.2  | 6.5  |

Table 2. Between-assay precision

| case                 | $T_4$ concentration ( $\mu\text{g/dl}$ ) |      |      |
|----------------------|--|------|------|
|                      | 1  | 2    | 3    |
| 1                    | 2.4                                      | 10.4 | 18.4 |
| 2                    | 2.9                                      | 9.8  | 16.8 |
| 3                    | 2.9                                      | 11.2 | 21.0 |
| 4                    | 3.2                                      | 11.1 | 20.3 |
| 5                    | 2.7                                      | 9.6  | 21.8 |
| mean                 |  |      |      |
| ( $\mu\text{g/dl}$ ) | 2.8                                      | 10.4 | 19.7 |
| S.D                  | 0.3                                      | 0.7  | 2.0  |
| C.V(%)               | 10.7                                     | 6.7  | 10.2 |

Table 3. Effects on serum dilution

| dilution factor | $T_4$ expected ( $\mu\text{g/dl}$ ) | $T_4$ observed ( $\mu\text{g/dl}$ ) | recovery (%)    |
|-----------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-----------------|
| 1               | —                                   | 24 $\uparrow$                       | —               |
| 2               | —                                   | 15.8 $\pm$ 1.1                      | —               |
| 4               | 7.9                                 | 8.4 $\pm$ 0.1                       | 106.3           |
| 8               | 4.0                                 | 4.4 $\pm$ 0.1                       | 110.0           |
| 16              | 2.0                                 | 2.0 $\pm$ 0.1                       | 100.0           |
| 32              | 1.0                                 | 0.7 $\pm$ 0.                        | 70.0            |
|                 |                                     | mean $\pm$ S.D                      |                 |
|                 |                                     |                                     | 96.6 $\pm$ 18.2 |

Table 4. Recovery study

| added $T_4$ ( $\mu\text{g/dl}$ ) | test result ( $\mu\text{g/dl}$ ) | $T_4$ value expected | recovery (%)   |
|----------------------------------|----------------------------------|----------------------|----------------|
| 0                                | 3.2 $\pm$ 0.1                    | 3.2                  | —              |
| 5.9                              | 8.8 $\pm$ 0                      | 9.1                  | 96.7           |
| 11.8                             | 15.2 $\pm$ 0                     | 15.0                 | 98.7           |
| 17.6                             | 20.3                             | 20.8                 | 97.6           |
|                                  |                                  | mean $\pm$ S.D       | 97.7 $\pm$ 1.0 |
|                                  |                                  | C.V                  | 1.0%           |

Table 2 に示す。変動係数 6.7~10.7%と良好な再現性を示した。

## 2. 希釈試験

$T_4$  高値血清1例につき、キット添付の希釈液 (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 含有) を用いて2~32倍迄希釈測定した際の平均値と標準偏差及び測定値の期待値に対する回収率とを Table 3 に示した。

2倍血清の値を100%とすれば、4倍、8倍、16倍迄は非常に良好な結果を示した。

## 4. 回収試験

機能低下症1例 (血清  $T_4$  量  $3.2 \mu\text{g/dl}$ ) の血清に5.9,

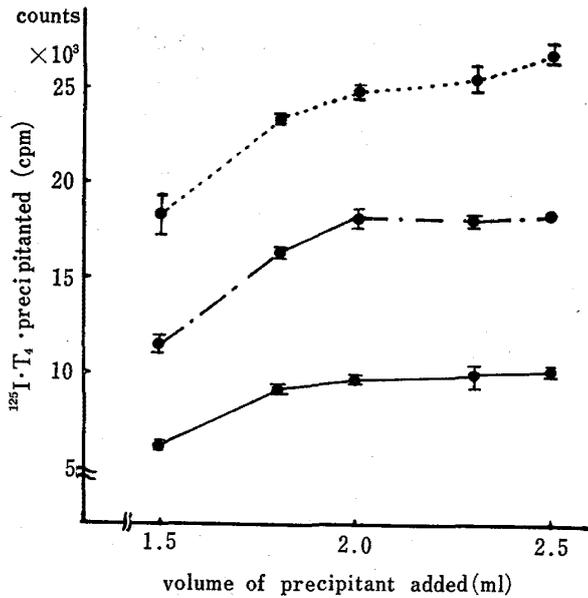


Fig. 2 Effects of precipitant volume on <sup>125</sup>I T<sub>4</sub> precipitated

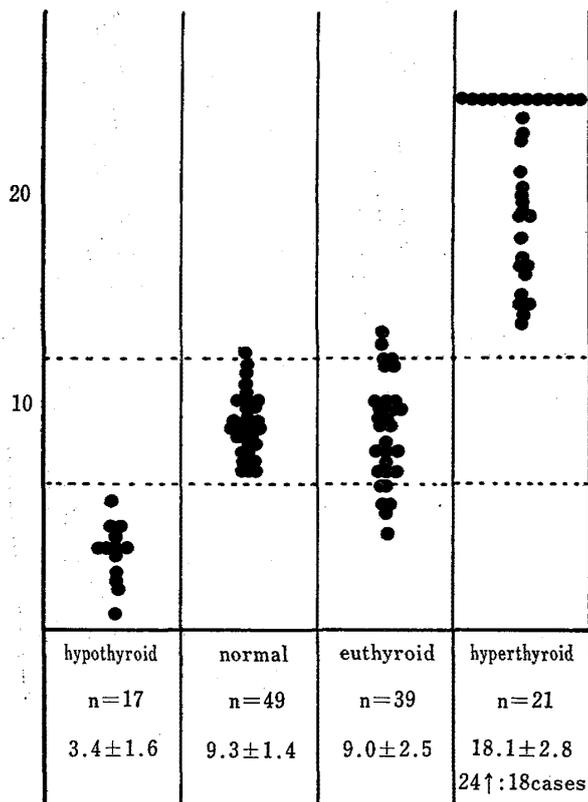


Fig. 3 Thyotest RIA-4 values in various thyroid status

11.8, 17.6 μg/dl の T<sub>4</sub> を添加した場合の回収率を Table 4 に示す。回収率は96.7~98.7%の範囲にあり、回収率の平均は97.7±1.0%で良好であった。

5. 沈降液の液量の影響

本法では、<sup>125</sup>I-T<sub>4</sub>・抗体結合物と未結合 <sup>125</sup>I-T<sub>4</sub> の分

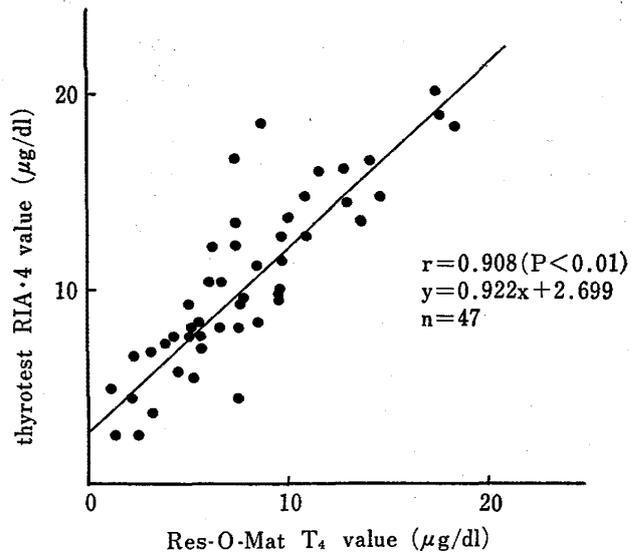


Fig. 4 Correlation of thyrotect RIA-4 values with Re-s-o-Mat T<sub>4</sub> values

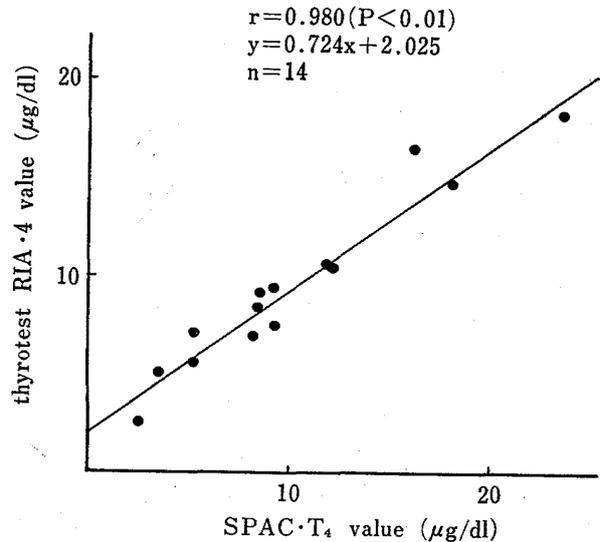


Fig. 5 Correlation of thyotest RIA-4 value with SPAC T<sub>4</sub> values

離に硫酸アンモニウム溶液を使用しているが、この量を 1.5, 1.8, 2.0, 2.3, 2.5ml と 5 段階にかえて行った。Fig. 2 に示すごとく基準量の 2.0ml 以上で沈殿カウントは、下段の 2 例では、ほぼプラトウに達した。上段の 1 例では、いく分増加傾向がみられた。

B. 臨床的検討

1. 正常ならびに各種甲状腺疾患におけるサイロテス トリア・4 値

Fig. 3 に示したとおり健常人49例では6.5~12.5 μg/dl に分布し、その平均値及び標準偏差 (S.D) は 9.3±1.4 μg/dl であった。正常範囲を 2 S.D の範囲にとると 6.5~12.1 μg/dl となり、これを外れたものは 1 例のみであった。低下症17例では 3.4±1.6 μg/dl、甲状腺腫そ

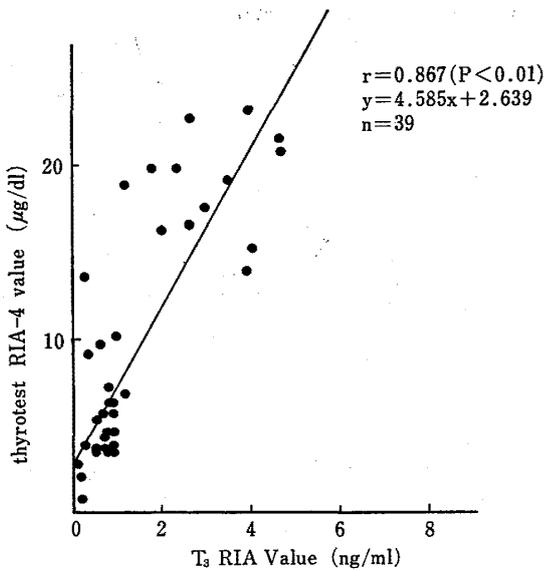


Fig. 6 Correlation of thyrottest RIA-4 values with  $T_3$  RIA values

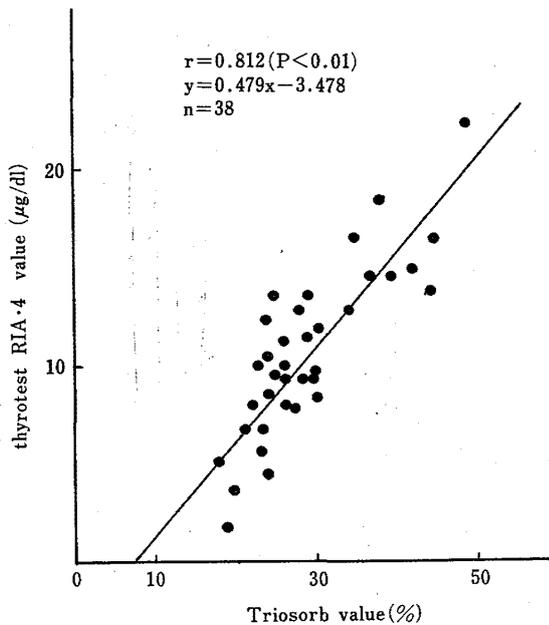


Fig. 7 Correlation of thyrottest RIA-4 values with triosorb values

の他の機能正常群39例では  $9.0 \pm 2.5 \mu\text{g/dl}$ , 機能亢進群では39例のうち  $24 \mu\text{g/dl}$  以上を示したものが18例, 残り21例の数値は  $18.1 \pm 2.8 \mu\text{g/dl}$  であった。

## 2. Res-O-Mat $T_4$ 法との相関

本法と CPBA 法の Res-O-Mat  $T_4$  法との相関図を Fig. 4 に示す。47 例の相関は  $r=0.908$ ,  $y=0.922x+2.699$  と良好な相関を示した。

## 3. SPAC- $T_4$ 法との相関

本法と同じ原理である RIA キットの SPAC  $T_4$  による測定値と本法との相関は, Fig. 5 に示すように, 14 例で  $r=0.980$ ,  $y=0.724x+2.025$  と非常に高い相関

が得られた。

## 4. $T_3$ RIA キット II との相関

39 例の相関は Fig. 6 に示すごとく,  $r=0.867$ ,  $y=4.585x+2.639$  であった。

## 5. TRIOSORB 法との相関

Fig. 7 に示す。38 例の相関係数 0.812, 回帰直線  $y=0.479x-3.478$  であった。

## 考 察

血中  $T_4$  の測定法として, 最近 RIA 法が普及し, 各種キットが発売されている。本キットについてはすでに, 小西<sup>8)</sup>, 木下<sup>4)5)</sup>らの報告があるが, 従来用いていた CPBA 法と異なり  $T_4$  の結合蛋白からの分離抽出操作を必要とせず, TBG の結合阻害剤として塩酸溶液を用いて, TBG を不可逆的に変性させたのち, PH をふたたび上げて抗原抗体反応を行なわせる方法を用いている<sup>6)</sup>。使用血清量が, 0.01 ml であるのは RIA マット  $T_4$  キットと同様, 現在市販されているキットのうち, 最も僅少であり, しかも精度は, 同一 assay 内, キット間再現性ともに, 従来法と同様に良好であった。平田<sup>5)</sup>キット間変動を4ヶ月にわたって follow した成績で従来経験したことのない安定した RIA 法であると報告している。インキュベーション温度が室温で良いこと, 又 assay に要する時間が, CPBA 法 (Res-O-Mat  $T_4$ ) に比較して20検体あたり, 約20分の短縮になるなど, 簡便性に於て大きな利点である。測定範囲以上の高値血清について, キット添付の含有  $\text{NaN}_3$  希釈液により, 2倍, 4倍, 8倍, 16倍, 32倍迄検討した結果, 16倍迄は希釈率に一致して, 正しい  $T_4$  値を示した。添加した  $T_4$  液の回収率は平均  $97.7 \pm 1.0\%$  と良好であった。

B/F 分離に於て, 硫酸液量の変化は, 中高濃度血清においては基準量の 2.0 ml の添加で, 沈殿カウントはほぼ, プラトーに達したが, 沈殿量の多い検体すなわち低濃度例においては, 沈殿カウント (結合型  $^{125}\text{I}\cdot T_4$ ) は, 液量とともに, いく分増加傾向にあり, 正確なピペット操作が必要である。なお, 硫酸液を添加した後遠沈までの静置時間が10分を過ぎると, 時間と共に沈殿カウントが, 減少するという報告<sup>9)</sup>があり, 注意を要する。

臨床的検討では, 健常人 49 例の数値より正常範囲は  $6.5 \sim 12.1 \mu\text{g/dl}$  と決定した。これは平田<sup>5)</sup>らの報告と一致した。小西らの報告<sup>8)</sup>に比較すると, いく分 ( $0.6 \mu\text{g}$  程度) 高めである。健常者が主に千大放技学校学生 Volunteer であった為, 20歳前後の男性に偏っており, また例数も少ないことから, 今後さらに検討することが必要であろう。機能亢進群では  $13.7 \mu\text{g/dl}$  以上, 低下群で

は5.8 $\mu$ g/dl 以下であり、健常者との分離は非常に良好であった。

本法による臨床成績と同一原理の SPAC-T<sub>4</sub> キットによる値との相関は極めて良好であり、CPBA 法の Res-O-Mat T<sub>4</sub> キットによる測定値とも  $r=0.908$  という高い相関が得られた。稀に RIA 法による値が CPBA 法によるそれと比較して低値を示すことがある。図4のうち、CPBA 法で7.5 $\mu$ g/dl、RIA 法で4.3 $\mu$ g/dl を示した例があった。本例は単純性甲状腺腫であったが、橋本病やバセドウ病患者の血清中に抗 T<sub>4</sub> 又は抗 T<sub>3</sub> 自己抗体が存在した場合 RIA 法による T<sub>4</sub> 値が実際より低くなるという報告<sup>7)-10)</sup>がある。臨床所見と RIA 法による T<sub>4</sub> 値に解離がある場合には、この様な可能性を考え、抽出法を用いて総 T<sub>4</sub> を測定することが必要であろう。

### SUMMARY

A Radioimmunoassay kit for thyroxine (T<sub>4</sub>) (Thyrotest. RIA. 4) has recently been developed and provided by the NML Institute.

Fundamental evaluation of the kit and clinical investigation using this kit were performed.

The results of measurement of serum T<sub>4</sub> also showed well correlation with those of Res-O-mat T<sub>4</sub> kits ( $r=0.908$ ) and SPAC T<sub>4</sub> kits ( $r=0.980$ ), and a well co-efficient of variation for sera (4.2-8.0% for within assay and 6.7-10.7% for between assay).

Dilution test of high serum was satisfactory and the recovery test was satisfactory, too.

Serum T<sub>4</sub> concentration in 49 normal subjects was  $9.3 \pm 1.4 \mu\text{g/dl}$ , and hyper-or hypo-thyroid patients were clearly separated from normal range.

Thyrotest RIA methods were considered as very useful routine-tests, especially in the simplicity of the procedure and their little requirement of the test sample.

### 文 献

- 1) Murphy, BEP and Pattee, C. J.: Determination of thyroxine utilizing the property of

protein binding. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **24**, 187-196, 1964.

- 2) Chopra, I. J., Solmon, D. H. and H. O., R. S.: A radioimmunoassay of thyroxine. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **33**, 865-868, 1971.
- 3) 小西淳二, 中島言子, 奥野龍興, 笠木寛治, 遠藤啓吾, 池窪勝治, 竹田洋祐, 鳥塚莞爾: Radioimmunoassay による血中サイロキシン濃度の測定, *核医学* **15**, 135-144(1), 1978.
- 4) 木下文雄, 前川全, 船橋哲哉, 川上亮二, 庭野幸子, 岡本二郎, 七理泰, 堀内佳代子, 鳥屋城男: TETRA-TAB.RIA による血中 T<sub>4</sub> の測定. *核医学* **14**, (6), 903-910, 1977.
- 5) 平田史郎, 武安明, 佐藤誠也: TETRA-TAB RIA を用いる血中 T<sub>4</sub> 測定法. *ホルモンと臨床* **25**, 11, 1155-1160, 1977.
- 6) Means, G. E. and Feeney, R. E.: Ch. 4, Special problems in analysis of chemically modified proteins, in *Chemical Modification of Proteins*, Holden-Day, Inc. San Francisco, 1971.
- 7) 池窪勝治, 小西淳二, 中島言子, 遠藤啓吾, 鳥塚莞爾: 抗サイロキシン自己抗体を認めた橋本病の1例について. *日内分泌会誌* **52**, 1020-1032, 1976.
- 8) Staeheli, V. Vallotton, M. B. and Burger, A.: Detection of human antithyroxine and antitriiodothyronine antibodies in different thyroid conditions. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **41**, 669-675, 1975.
- 9) Yukio Ochi, Katsuhiko Shiomi, Takeshi Hachiya, Manabu Yoshimura, and Tadayoshi Miyazaki.: Immunological Analysis of abnormal binding of Thyroid hormone in the Gamma-Globulin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **35**, 743-752, 1972.
- 10) Sing-yung wu and William, L. Green.: Triiodothyronine(T<sub>3</sub>)-binding Immunoglobulins in a Euthyroid Woman: Effects on measurement of T<sub>3</sub> (RIA) and on T<sub>3</sub> turnover. *J. Clin. Endocrinol.* **42**, 642-652, 1976.