Simultaneous Determination of Thyroxine and Simplified Free Thyroxine Index by Thyopac-4 Kit, and Their Clinical Evaluation in Assessment of Thyroid Function

**Satoshi HAMADA, Tadako KOSAKA, Toru MORI,
Yosuke TAKEDA, Katsuji IKEKUBO
and Kanji TORIZUKA**

Radioisotope Research Center, Kyoto University, Central Radioisotope Division, Kyoto University Hospital, and Department of Radiology, Kyoto University School of Medicine, Kyoto

A simplified method was devised for simultaneous determination of thyroxine (T₄) and free T₄ index (FT₄I) by using a single kit of Thyopac-4. Firstly, T₄ values of patient and pooled normal serum were determined according to the instruction. Thereafter, 5 μ l of the patient or pooled normal serum was added to each Thyopac-4 vial, and incubated for 60 min. After settlement of granules, supernatants were removed for counting. FT₄I was calculated by the following equation:

$$Y = \frac{T_4p}{T_4n} \div \frac{Fp - Ep}{Fn - En}$$

where E and F were net counts in the supernatants before and after addition of serum, and suffices p and n indicate patient and pooled normal serum. For comparison, Tetrasorb and Triosorb tests were performed using the same samples, and free T₄ indices were calculated according to Clark's, $\text{Tetrasorb} \times \text{Triosorb} / 100$, and our previously reported method, $\text{Tetrasorb} \times \text{Triosorb} / 100 \div (1 - 0.6 \times \text{Triosorb} / 100)$, which bore a straight-line relationship to measured free T₄ (Hamada et al, J. Clin. Endocrinol. Metab. **31**: 166, 1970). Dual competitive protein binding analysis of T₄, Thyopac ETR, was carried out by the method reported elsewhere: Fn/Fp (Hamada et al, J. Clin. Path. in press).

T₄ values obtained by Thyopac-4 kits bore a linear relationship to but tended to be slightly higher than those by Tetrasorb kits, as expressed by a regression equation: $Y = 0.99x + 1.35$.

Values for Thyopac ETR were significantly increased and decreased in hyper- and hypothyroidisms, respectively, whilst they remained within the normal range in pregnancy and TBG deficiency, the results confirming our previous report.

A ratio of increased radioactivity after addition of patient or pooled normal serum, $(Fp - Ep)/(Fn - En)$, was shown to have relationships reciprocal to T₃ resin sponge uptake ($r = -0.71$) and linear to the reciprocals of the latter ($r = +0.78$). Therefore, it was possible to determine the present FT₄I according to Clark's approximation to free T₄.

The simplified FT₄I values were 1.05 ± 0.36 (mean $\pm$ SD) for normal, 3.46 ± 1.25 for hyperthyroid, 0.16 ± 0.13 for hypothyroid, and 0.95 ± 0.29 for pregnant subjects. Fur-

ther, the present index was shown to bear almost linear relationships to both Clark's and our previously reported indices, correlation co-efficients of which were $+0.92$ and $+0.88$, respectively.

It was concluded, therefore, that the present method was very useful as a routine test for assessment of thyroid status, because only 0.505 ml was required to obtain the values for all the three indicators of thyroid function, namely, T4, FT4I and Thyopac ETR.

(See pp. 942~951)

Thyopac-4 キットによる簡易な Free Thyroxine Index 測定法とその臨床的評価について

京大放射性同位元素総合センター

浜 田 哲

京大病院中央放射線部

高 坂 唯 子

京大医学部放射線学教室

森 徹, 竹 田 洋 祐

池 窪 勝 治, 鳥 塚 莞 爾

(昭和49年2月6日受付)

Thyopac-4 キットを用いて Thyroxine (T4) 値を測定すると共に、同バイアルに少量の患者血清を添加して簡易 Free T4 Index を測定した。本 Index は、甲状腺機能亢進症では有意の高値を示し、機能低下症では有意の低値を示すのに対し、妊娠及び TBG 欠損症では正常値を示し、更に、Free T4 の実測値と直線関係をもつ我々の Free T4 Index とほぼ平行し、また Clark の Free T4 Index と直線関係にあつて、Free T4 濃度をよく反映した。本法の所要血清量は 0.5ml に過ぎず、日常の甲状腺機能検査法として有用と考えられた。

緒 言

血清中の遊離型 Thyroxine (Free T4) は、末梢細胞に直接移行してホルモン作用を呈すると共に、間脳・下垂体に作用してホルモンの分泌調節に関与し、甲状腺機能状態の最も良い指標であることが認められている¹⁾。最近 Triiodothyronine (T3) のホルモン作用における役割が再び重視されるに至つたが²⁾、甲状腺機能の異常が T3 のみに帰せられる場合は一部に限られており³⁾⁴⁾、一般には T3 値は T4 値に平行し⁵⁾⁶⁾、また T3 の一日生産量の20—40%は T4 よりの変換によるところから^{7)~9)}、Free T4 の重要性は変わらないと考えられる。この Free T4 の測定は平衡透析法^{10)~12)}および限外濾過法¹³⁾のいずれも煩雑であり、これに代るものとして、T4 値と血清 T4 結合グロブリン (TBG) に関する指標とから Free T4 濃度に平行する指標すなわち Free T4 Index を算出することが行なわれ^{14)~16)}、これが日常の甲状腺機能検査の First choice¹⁷⁾ であることが報告されている。

これらの Free T4 Index の算出には2種類のキットによる測定が必要であるのに対し、最近 T4 の Dual competitive Protein Binding Analysis が開発され、TBG の異常の有無に拘らず、一回の測定で甲状腺機能状態を判定しうることが示された。これには、Resin strip を用いた Res-O-Mat ETR^{18)~19)}、Resin sponge を用いた Normalized Serum T4 (T4N)²⁰⁾、Sephadex カラムを用いた Free T4 Equivalent²¹⁾ および Sephadex 顆粒を用いた Thyopac ETR²²⁾ などがあり、いずれも日常の臨床検査法として有用であることが認められた。また以上の変法として、稲田ら²³⁾は Res-O-Mat T4 キットを用い、我々²²⁾は Thyopac-4 キットを用いて T4 値を先ず測定したのち、引続き Dual competitive Binding Analysis を行うことを報告

した。この場合に、TBG 欠損症または妊娠を始めとする TBG 增多症では、Dual competitive Binding Analysis が正常値を示すにも拘らず、T4 値は前者では低値また後者では高値を示し、両測定値の解離から TBG 異常を推定することが或程度可能であつた。

しかしながら以上の Dual competitive Binding Analysis の測定値はいずれも Free T4 値と必ずしも平行せず、甲状腺機能亢進症および低下症で頭打ち現象がみられてその重症度を正しく反映しない難点がみられた。我々は先に発表した Thyopac ETR 法を改良し、Free T4 値にほぼ平行する簡易な Free T4 Index 測定法を考案し、これが甲状腺機能の診断に一層有用であることを認めたので報告する。

方法および検査対象

検査対象は京大医学部附属病院第2内科・放射線科合同甲状腺外来を受診し、臨床所見、各種甲状腺機能検査および針生検等により診断の確定した未治療甲状腺機能亢進症26例、未治療機能低下症14例、先天性 TBG 欠損症1例および大阪北野病院入院中の正常妊娠後期婦人(29—40週)15例、ネフローゼ症候群1例並びに健康者20例の合計77例であつた。

Triosorb および Tetrasorb は所定の方法に従つて測定され、両者の積即ち Clark の Free T4 Index¹⁵⁾ が算出された。

また、Free T4 の実測値と直線関係を示す著書らの Free T4 Index が次式より算出され¹⁶⁾、

$$\text{Free T4 Index} = \frac{\text{Tetrasorb} \times \text{Triosorb}/100}{1 - 0.6 \times \text{Triosorb}/100} \dots (1)$$

他の測定値と比較された。

Thyopac-4 キットによる T4 値および Thyopac ETR 値並びに Free T4 Index の簡易測定法

(1) 被検血清 0.5ml とエタノール 1.0ml とを抽出用バイアルに入れて振盪する。0 および 18 μ g スタンダード並びに正常プール血清を duplicate で同様に行う。

(2) Rotator で室温にて2分間混和する。

(3) 2000回転で5分間遠沈する。

(4) 上清 0.5ml をとり、Thyopac-4 バイアルに入れて蓋をする。

(5) Rotator で室温にて30分間混和する。

(6) 2分間静置して顆粒を沈澱させ、上清 1.0ml をとつて測定用試験管に移し、¹²⁵I を測定する。Net Count を E とする。10⁷/E=1/C を計算し、スタンダード曲線より T4 量を求める。

(7) 先の Thyopac-4 バイアルにそれぞれ原血清 5 μ l (または20倍稀釈血清 0.1ml) を加える。正常プール血清についても同様に行なう。

(8) Rotator で室温にて60分間(30分間でも可)混和する。

(9) 2分間静置して、顆粒を沈澱させ、上清 1.0ml をとつて測定用試験管に移し、¹²⁵I を測定する。Net Count を F とする。

$$\text{Thyopac ETR} = \frac{\text{正常プール血清のカウン} (Fn)}{\text{患者血清のカウン} (Fp)} \dots (2)$$

$$\text{Thyopac 4 キットによる Free T4 Index (簡易 Free T4 Index)} = \frac{T4p}{Fp - Ep} \div \frac{T4n}{Fn - En} \dots (3)$$

n : 正常プール血清

p : 患者血清

成 績

各種の甲状腺疾患および TBG 異常を伴つた疾患についてえられた成績を要約して Table 1 に示す。

Thyopac-4 キットによる T4 値 (Thyopac-4 値) は、正常者では $8.6 \pm 2.2 \mu\text{g}/100\text{ml}$ (平均値 $\pm$ 標準偏差、以下同じ) で、甲状腺機能亢進症および妊娠では有意の高値を示し、機能低下症では有意の低値を示し

Table 1. A summary of results obtained in various states of thyroid function.**

	Thyopac-4 (ug/100ml)	Thyopac ETR	$\frac{Fp-Ep}{Fn-En}$	Free T ₄ by Thyopac-4 Kit	Tetraborb (ug/100ml)	Triosorb (%)	Clark's free T ₄ index	Out free T ₄ index
Normal subjects	8.6±2.2 ^{△△} (20) [△]	0.99±0.04 (20)	0.97±0.29 (20)	1.05±0.36 (20)	9.2±1.8 (20)	27.9±3.4 (20)	2.57±0.61 (20)	2.79±0.81 (20)
Hyperthy- roidism	17.7±5.2 (26, 0.005)*	1.23±0.11 (26, 0.005)	0.63±0.15 (26, 0.005)	3.46±1.25 (26, 0.005)	20.1±4.2 (26, 0.005)	45.2±5.7 (26, 0.005)	9.13±2.63 (26, 0.005)	10.17, 4.79 (26, 0.005)
Hypothyro- idism	1.8±1.5 (14, 0.005)	0.85±0.03 (14, 0.005)	1.61±0.58 (14, 0.005)	0.16±0.13 (14, 0.005)	1.9±1.0 (14, 0.005)	21.1±2.1 (14, 0.005)	0.40±0.22 (14, 0.005)	0.42±0.21 (14, 0.005)
Pregnancy	11.3±2.4 (15, 0.005)	1.01±0.06 (15, NS)	1.86±0.58 (15, 0.005)	0.95±0.29 (15, NS)	12.7±1.9 (15, 0.005)	17.4±1.9 (13, 0.005)	2.16±0.36 (13, 0.05)	2.42±0.42 (13, NS)
Idiopathic TBC deficiency	2.8 (1)	0.96 (1)	0.25 (1)	1.79 (1)	3.6 (1)	58.9 (1)	2.12 (1)	3.28 (1)
Nephrotic syndrome	4.8 (1)	0.96 (1)	0.32 (1)	1.83 (1)	8.6 (1)	29.3 (1)	2.52 (1)	3.06 (1)

NS=not significant (p 0.10).

** See test for explanation of symbols.

^{△△} Mean±SD[△] Number of cases.

* Probability that the value in the test group is identical with the corresponding value in the normal group.

Fig. 1. Relation between T4 values by Thyopac-4 and Tetrasorb kits.

Fig. 2. Thyopac ETR values in various states of thyroid function. Closed circles represent the mean and the vertical lines, one standard deviation.

Fig. 3. Relation between Thyopac ETR values and our Free T4 Index which bore a straight-line relationship to measured free T4. A regression equation obtained was $Y = 23.5X^2 - 24.9X + 4.5$.

Fig. 4. Relation between T3 resin sponge uptake and ratio of increased radioactivity after addition of patient and pooled normal serum.

Fig. 5. Relation between reciprocals of T3 resin sponge uptake and ratio of increased radioactivity after addition of patient and pooled normal serum.

Fig. 6. Ratio of increased radioactivity after addition of patient and pooled normal serum in various states of thyroid function.

Fig. 7. Free T4 Index by Thyopac-4 kit in various states of thyroid function.

て、Tetrasorb による T4 値 (Tetrasorb 値) と同様の成績であつた。しかし Fig. 1 に示すように、Thyopac-4 値は Tetrasorb 値に比べて全体的に稍低い傾向を示し、両者の相関は相関係数+0.93 で、 $Y = 0.99X + 1.35$ なる回帰直線式で示された。

Thyopac ETR 値は、Fig. 2 に示すように甲状腺機能亢進症では有意の高値、また機能低下症では有意の低値を示して正常群との間に重り合いは少なく、これに対し妊娠および TBG 欠損症では、T4 値の異常にもかかわらず正常値を示した。これらの成績は、著者らの先の報告と一致した²²⁾。

Thyopac ETR 値と Free T4 との関係を、Free T4 の実測値と直線関係にある著者らの Free T4 Index を用いて Fig. 3 に示す。両者間に相関係数+0.88の有意の正相関が認められたが、その関係は非直線的で、 $Y = 23.5X^2 - 24.9X + 4.5$ という回帰曲線式で表わされた。

一般に Free T4 Index を算出するためには、T4 値と共に TBG に関する指標例えば Triosorb 値が必要である。しかし、もし原血清添加後の上清中の ^{125}I の増加量 (F-E) が、その血清中に含まれる TBG 量と定量的関係を有するならば、これを TBG の指標として Free T4 Index を算出することが可能である。患者血清添加時の増加量と正常プール血清添加時の増加量の比: $(F_p - E_p)/(F_n - E_n)$ と Triosorb 値との間には、Fig. 4 に示すような有意の逆相関 (相関係数, -0.71) が認められ、ほぼ双曲線上に分布した。従つて Triosorb 値の逆数との関係をみると、Fig. 5 に示すように有意の正相関 (相関係数, +0.78) が認められ、ほぼ直線上に分布して、 $Y = 0.35X - 0.21$ なる回帰直線式がえられた。更に、本増加率は、Fig. 6 に示すように、TBG 増加を来することが知られている甲状腺機能低下症および妊娠では有意に増加し、逆に TBG 減少を来することが知られている機能亢進症および TBG 欠損症では有意に減少した。以上の成績は、

Fig. 8. Relation between Free T4 Index by Thyopac-4 kit and Clark's Free T4 Index.

Fig. 9. Relation between Free T4 Index by Thyopac-4 kit and our Free T4 Index.

本増加率が血清中に含有される TBG 量に比例関係を有し, TBG の近似的指標として使用されうることとするものである. 従つて本増加率を用い, Clark らに準じて式(3)より Free T4 Index を算出した.

各種疾患における簡易 Free T4 Index 値を Fig. 7 に示す. 正常者は 1.05 ± 0.36 で0.6から2.0にわたつて分布し, 甲状腺機能亢進症は 3.46 ± 1.25 , 機能低下症は 0.16 ± 0.13 でいずれも正常者と有意に異なる値を示した. これに対し妊娠は 0.95 ± 0.29 で正常値を示し, TBG 欠損症も正常域に分布した.

本 Index と Clark の Index との関係は, Fig. 8 に示すようにほとんど直線的で, 有意の正相関(相関係数, +0.92)が認められ, また著者らの Free T4 Index との関係も, Fig. 9 に示すように有意の正相関(相関係数, +0.88)が認められて, 本 Index は Free T4 濃度にはほぼ平行することが示された.

考 按

甲状腺機能検査の First choice は Free T4 Index といわれ¹⁷⁾, 少量の血清でこれを簡易に測定するのが, 日常の甲状腺機能検査法の一つの方向と考えられる. 本法は Thyopac-4 キットのみを使用し, 0.5ml の血清で T4 値と共に Free T4 Index を容易に測定することができ, この目的に合致するものといえる.

我々が先に報告した Thyopac ETR 法²²⁾は, 他の種類の Dual Competitive Binding Analysis^{18)~21)23)}と同様に, Free T4 値が正常であるか否かの判定に有用であるが, Fig. 3 に示したように Free T4 濃度と直線関係を示さない. 例えば Thyopac ETR 値は, 重症の甲状腺機能亢進症でも1.5を越えることなく, また重篤な機能低下症でも0.75を下らない. 従つて本値は Free T4 濃度を正しく反映せず, これにより重症度を判定するにはこの点に注意が必要である.

これに対し簡易 Free T4 Index では, TBG 欠損症で正常高値を示す傾向にあるが, 甲状腺機能亢進症あるいは低下症と正常者および妊娠との間の重り合いは少なく, 更に, Free T4 の実測値と直線関係を示す著者らの Free T4 Index とほぼ平行し, また Clark の Index とほとんど平行して, 本 Index が Free T4 をより正しく反映することが示された.

Free T4 と TBG との関係は次式によつて表わされる¹⁾.

$$[\text{Free T4}] = \frac{[\text{TBG-Bound T4}]}{K [\text{Free TBG}]} \cdots (4)$$

Clark¹⁵⁾ らは Free TBG 濃度と逆数関係にある Triosorb と, TBG 結合 T4 量の代りに PBI (または T4) を用い, 両者の積を Free T4 Index としたが, 本法では, T4 値と, Triosorb 値と逆数関係にある血清添加後の ¹²⁵I-T4 の増加率との商を Free T4 Index としている. したがつて本 Index は原理的には Clark の Index と同列のものであり, 後者との直線関係はこれを裏づけるものである.

また本 Index は, Clark の Index と同様に, 式(4)の TBG 結合 T4 量の代りに T4 値を用いている. しかし TBG の最大結合能は小さく, また甲状腺機能亢進症では更に減少するために, T4 が増加した場合に TBG に結合する T4 量はプラトーに近ずき, T4 値と平行しない. このため本 Index も, Clark の Index と同様に, Free T4 濃度と直線関係を示さないと考えられる. 著者らは, T4 と3種類の血清 T4 結合蛋白との結合平衡に関する一般式(5)¹⁾から, 式(1)に示した Free T4 Index

$$[\text{Free T4}] = \frac{[\text{T4}]}{K_{\text{TBG}} [\text{Free TBG}] + K_{\text{TBPA}} [\text{Free TBPA}] + K_{\text{ALB}} [\text{Free ALB}]} \cdots (5)$$

を算出し, これが実測値と直線関係にあることを示した¹⁶⁾. Fig. 9 に示したように, 簡易 Free T4 Index が先の著者らの Index と平行関係にはあるが直線性に稍欠けるのは, 以上の事実によると考えられる.

しかしながら本 Index は, 日常の臨床検査法として Free T4 濃度の指標として十分使用しうるものであり, また同時に T4 値も測定しえて, 甲状腺機能状態の診断に極めて有用であると結論された.

本研究に御協力頂いた大阪北野病院植手鉄男博士および安藤暢哉博士並びに京大中央放射線部向井孝夫氏に深謝致します.

本論文の要旨は第46回日本内分泌学会総会(昭和48年4月9~11日, 京都)において発表した.

文 献

- 1) Robbins, J. and J.E. Rall : *Physiol. Revs.* **40** : 415 (1960).
- 2) Sterling, K. : Recent progr Hormone Res. **26** : 249 (1970).
- 3) Sterling, K., S. Refetoff, and H.A. Selenkow : *J. Amer. Med. Assn.* **213** : 571 (1970).
- 4) Hollander, C.S., T. Mitsuma, N. Nihei et al. : *Lancet* **1** : 609 (1972).
- 5) Larsen, P.R. : *J. Clin. Invest.* **51** : 1939 (1972).
- 6) Hesch, R.-D. and D. Evered : *Brit Med. J.* **1** : 645 (1973).
- 7) Braverman, L.E., S.H. Ingbar and K. Sterling : *J. Clin. Invest.* **49** : 855 (1970).
- 8) Schwarz, H.L., M.I. Surks, and J.H. Oppenheimer : *J. Clin. Invest.* **50** : 1124 (1971).
- 9) Pittman, C.S., J.B. Chambers, Jr., and V.H. Read : *J. Clin. Invest.* **50** : 1187 : (1971).
- 10) Oppenheimer, J.H., R. Squef, M.I. Surks, and H. Hauer : *J. Clin. Invest.* **42** : 1769 (1963).
- 11) Ingbar, S.H., L.H. Braverman, N.A. Dawber, and G.Y. Lee : *J. Clin. Invest.* **44** : 1679 (1965).
- 12) Sterling, K., and M.A. Brenner : *J. Clin. Invest.* **45** : 153 (1966).
- 13) Schussler, G.C., and J.E. Plager : *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **27** : 242 (1967).
- 14) Osorio, C., D.J. Jackson, J.M. Gartside, and A.W.G. Goolden : *Clin. Sci.* **23** : 525 (1962).
- 15) Clark, F. and D.B. Horn : *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **25** : 39 (1965).
- 16) Hamada, S., T. Nakagawa, T. Mori and K. Torizuka : *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **31** : 166 (1970).
- 17) Howorth, P.J.N., and R.L. Ward : *J. Clin. Path.* **25** : 259 (1972).
- 18) Mincey, E.K., S.C. Thorson, J.L. Brown, R.T. Morrison and H.W. McIntosh : *J. Nucl. Med.* **13** : 165 (1971).
- 19) 森 徹, 高坂唯子, 浜田 哲, 竹田 洋祐, 池窪勝治, 鳥塚莞爾 : 日本内分泌誌, **48** : 685, (1972).
- 20) Ashkar, S., and A.A. Bezjian : *J. Amer. Med. Assn.* **221** : 1483 (1972).
- 21) Abreau, C.M., F. Azizi, A.G. Vegenakis, S.H. Ingbar, and L.E. Braverman : *J. Nucl. Med.* **14** : 159 (1973).
- 22) 浜田 哲, 高坂唯子, 森 徹, 竹田洋祐, 池窪勝治, 鳥塚莞爾, 植手鉄男 : 核医学, **11** : 15, (1974).
- 23) 稲田満夫, 岡部純一, 風間善雄, 高山英世, 春名桃江, 高橋 浩 : 核医学, **10** : 37, (1973).