化学発光酵素免疫法による犬血清サイロキシンおよび 甲状腺刺激ホルモン濃度の基準範囲

土屋 亮^{1)†} 加山 英¹⁾ 荒川満平¹⁾ 中瀬安博²⁾ 矢島俊男³⁾

北 秀春⁴⁾ 久末正晴¹⁾ 小方宗次¹⁾ 山田隆紹¹⁾

1) 麻布大学獣医学部 (〒229-8501 相模原市淵野辺1-17-71)

2) 群馬県 開業 (〒370-0873 高崎市下豊岡町72-2)

3) 静岡県 開業 (〒413-0232 伊東市八幡野1041-49)

4) 石川県 開業 (〒929-0113 能美郡根上町大成町130-1-4-2)

(2005年2月23日受付・2006年1月4日受理)

要 約

159頭の健康家庭犬血清を採取して、犬用の化学発光酵素免疫 (CLEIA) システムによるサイロキシン (T_4) および甲状腺刺激ホルモン (TSH) 濃度の基準範囲を設定した。また、人用の化学発光免疫 (CLIA) システムを用いて、遊離 T_4 (F- T_4) 濃度の参考基準範囲も設定した。 T_4 と F- T_4 濃度のデータは正規分布を、また TSH 濃度のそれは対数正規分布を示した。そこで、常法に従い、各項目の平均値 $\pm 2 \times$ 標準偏差 (TSH は対数変換データで計算) を基準範囲とした。その結果、 T_4 濃度は $0.61 \sim 3.30 \mu\text{g/dl}$ 、TSH 濃度は $0 \sim 0.50 \text{ ng/ml}$ 、また F- T_4 参考濃度は $0.52 \sim 1.97 \text{ ng/dl}$ であった。上記健康家庭犬の T_4 および TSH 濃度と、実験用ビーグル犬 33 頭および重度疾患犬 35 頭のそれを比較した。その結果、ビーグル犬群には原発性甲状腺機能低下症の潜在が、また疾患犬群には少なからず偽甲状腺機能低下症候群の存在することが示唆された。

——キーワード：化学発光酵素免疫法，犬，基準範囲，サイロキシン，甲状腺刺激ホルモン。

----- 日獣会誌 59, 331 ~ 335 (2006)

犬の甲状腺機能低下症診断用スクリーニング検査として、血清サイロキシン (T_4) あるいは遊離サイロキシン (F- T_4) と、甲状腺刺激ホルモン (TSH) 濃度の測定が最適とされている [2, 4, 5, 15, 16]。

T_4 および TSH の測定系として近年、化学発光酵素免疫測定 (CLEIA) 法による犬用検査システムが開発され、国内にも導入されている。各種臨床化学検査に新しい分析システムを導入する場合は、従来法による基準範囲をそのまま利用すべきではない。すなわち、そのシステムでの新たな基準範囲設定が必要であり、理想的には検査機関ごとに設定することが望ましい。また地域によって動物の系統や環境要因に違いがあり、そのために測定値の分布が異なることもあり得る [19]。そこで、国内犬における CLEIA 法による血清 T_4 ならびに TSH 濃度の基準範囲を設定した。

次に、若干数の実験用ビーグル犬および重度疾患犬についても T_4 および TSH 濃度の測定を行い、基準範囲設

定に用いた健康家庭犬の成績と比較した。

なお、上記 CLEIA 法システムには犬用血清 F- T_4 濃度測定系が組み込まれていないが、このホルモン濃度も測定した方が診断精度は向上する。しかしながら現在、日本国内の検査機関では、F- T_4 測定には人用システムしか利用できない。また、犬の F- T_4 測定には平衡透析法が推奨されているが、国内における測定原理は平衡透析 RIA 法から化学発光免疫測定 (CLIA) 法等の非透析法に切り替わっている。したがって今後、犬の甲状腺機能低下症診断における非透析法による F- T_4 測定の有用性も、検討する余地がある。そこで、上記健康家庭犬のサンプルを用いて、人用 CLIA 法による血清 F- T_4 参考濃度の基準範囲も設定した。

材 料 お よ び 方 法

調査対象動物：健康家庭犬は、2002 年および 2003 年の主として 4 ~ 6 月および 9 月に、群馬県、静岡県、石

† 連絡責任者：土屋 亮 (麻布大学獣医学部獣医学科内科学第二研究室)

〒229-8501 相模原市淵野辺 1-17-71 ☎・FAX 042-769-1636

川県の動物病院3施設に来院した159頭を用いた（健康家庭犬群）。内訳は年齢7カ月齢～15歳（平均4.5歳）、体重1.5～49kg（平均17.4kg）、雄81頭（うち去勢手術済み25頭）、雌78頭（うち避妊手術済み37頭）であった。品種は雑種犬61頭、純粋犬が98頭で、内訳はゴールデン・リトリバー18頭、ラブラドル・リトリバー15頭、ミニチュア・ダックス14頭、シーズー9頭、ビーグル6頭、シェルティーおよび柴犬各5頭、グレート・ピレニーズおよびミニチュア・シュナウザー各4頭など、25犬種に及んだ。なおサンプル採取は、飼い主に目的を説明して了解を得た上で行った。

実験用ビーグル犬は、麻布大学内で飼育している健康な個体33頭を用いた（ビーグル犬群）。内訳は年齢1歳～9歳（平均3.4歳）、体重7～19kg（平均12.9kg）、雄14頭・雌19頭であった。

重度疾患犬は、主として皮膚疾患あるいは消化器疾患に罹患し麻布大学獣医学部附属動物病院に来院した35頭を対象とした（疾患犬群）。内訳は年齢8カ月齢～14歳（平均6.2歳）、体重1.5～68.5kg（平均12.8kg）、雄17頭（うち去勢手術済み4頭）、雌18頭（うち避妊手術済み8頭）であった。このうちの一部には、甲状腺ホルモン濃度に影響を及ぼすといわれる副腎皮質ホルモン剤が投与されていた。なお、臨床症状、従来法による T_4 、 T_3 あるいはF- T_4 濃度、あるいは甲状腺ホルモン製剤の治療への反応などから、甲状腺機能低下症ないしはその疑いがあると診断されたものは、この疾患犬群から除外した。

サンプル採取および測定項目：健康家庭犬群およびビーグル犬群については、各施設にて全血3mlを採取し、血清を分離後、測定まで -20°C で保存した。また疾患犬群については、臨床検査に使用された血清の残りを -20°C で保存した。

血清 T_4 およびTSH濃度は、CLEIA装置^{a)}と犬用純正キット^{b)}により測定した。また健康家庭犬群についてのみ、F- T_4 参考濃度の人用CLIAシステムによる測定を検査機関に依頼した^{c)}。

さらに健康家庭犬群については抗サイログロブリン自己抗体（TgAA）の有無も確認した。TgAAは、原発性甲状腺機能低下症の原因となるリンパ球性甲状腺炎ないしはその素因を示す指標として利用されている項目である[6, 13, 14]。本研究では、そのような素因を持つ個体を基準範囲設定サンプルから除外するために実施した。測定には市販のELISAキット^{d)}およびマイクロプレート・リーダー^{e)}を用いた。

CLEIA法による T_4 およびTSH濃度測定の信頼性確認：まず、同時再現性と日差再現性および希釈直線性試験を実施して、十分な測定精度を確認した。次いで実験用ビーグル犬20頭と疾患犬20頭（計40頭）の血清に

ついて、従来法とCLEIA法の測定値の相関性を求めた。従来法での成績を得るために、犬用 T_4 およびTSH-RIA測定を検査機関に依頼した^{f)}。

基準範囲設定のための統計処理：アメリカ臨床検査標準委員会（NCCLS）の指針に従い、パラメトリック法にて次の手順により設定した[7, 10, 20]。

まず、基準値設定に適さないサンプルの除外を行った。前述したTgAA陽性サンプルは、ホルモン濃度の如何に関わらず除外した。残ったデータのうち全体からかけ離れたものについては、Dixonの検定およびGrubbs-Smirnovの棄却検定[7, 20]を行い、外れ値か否かを確認した。いずれか1項目でも外れ値とされた個体は甲状腺に何らかの異常を持つ可能性があるものと考え、上記3項目の基準値設定サンプルから除外した。

次にデータの分布型を推定した。得られたデータの上限值から下限値までを10または11度数に分けてヒストグラムを描き、その形状が正規分布型を示すか否か検討した。正規分布型を描かない場合は、個々のデータを自然対数変換して、そのヒストグラムを作成した。そして、それが正規分布様の型を示す場合は、対数正規分布と推定した。

正規分布性または対数正規分布性の確認には、正規確率紙あるいは対数正規確率紙^{g)}を用いた。すなわち、度数分布から相対累積度数を求め、上記のとおり推定された分布型によって選んだ確率紙上にデータをプロットした。そして相対累積度数70%以上まで直線性を示すものを、正規分布型ないしは対数正規分布型と判定した[8]。さらに正規（対数正規）分布性を再確認するため、標本歪度と標本尖度を求める方法も併用した[20]。

基準範囲は、標本が正規分布する場合は平均値 $\pm 2 \times$ 標準偏差（ $M \pm 2SD$ ）から求めた。対数正規分布の場合は、変換データの $M \pm 2SD$ を求め、その上下限界値を実数に変換して、基準範囲の上限および下限とした[8, 20]。

- a) イムライズ, Diagnostic Products Corporation (DPC), U.S.A.
- b) IMMULITE Canine Total T_4 および同TSH, DPC, U.S.A.
- c) ケンタウルス（測定機器）およびケミルミACS-FT₄（試薬キット）、バイエルメディカル㈱、東京；㈱江東微生物研究所に測定依頼
- d) VT 10 Canine Thyroglobulin Kit, Oxford Laboratories, U.S.A.
- e) マイクロプレート・リーダー550型, Bio-Rad Laboratories, U.S.A.
- f) Coat A Count Canine Total T_4 および同TSH RIA, DPC; DPCに測定依頼
- g) 正規確率紙および対数正規確率紙, ReliaSoft Corporation, U.S.A.
- h) Prism, GraphPad Software Inc, U.S.A.

表1 中・大型犬と小型犬の血清 T_4 濃度およびF- T_4 参考濃度の比較

	平均値±標準偏差	
	T_4 ($\mu\text{g/dl}$) **	F- T_4 (ng/dl) **
中・大型 (n=86)	1.77±0.58	1.12±0.30
小型 (n=64)	2.17±0.75	1.39±0.39

注1: un-paired *t* testにて, 平均値の差を検定した(**: $P<0.01$).

注2: TgAA 陽性5頭およびTSH または T_4 のうちいずれかの項目が外れ値と判定された4頭のデータは除外した(表2も同じ).

健康犬の甲状腺関連ホルモン濃度に対する各種個体要因の影響

TgAA 陽性5検体および外れ値サンプルを除くすべてのデータを, 犬種, 室内飼育と室外飼育の別, 年齢, 性別, 過体重傾向の有無および飼育地域などの要因によって群分けして比較した. そしてこれらの要因によって測定値に差が生じるか否かを検討した [3, 17, 19]. 差の有意性については, 統計処理ソフト^{h)}を用いて, 一元配置分散分析 [12] あるいはun-paired *t* test [11] により検定した.

なお, 体格の区分けは, 純粋種についてはMedium-breed以上を, また雑種については体重12kg以上を, 中・大型犬とした. また, 年齢の区分けは, 1歳以下, 2~3歳, 4~5歳および6歳以上の4群とした.

ビーグル犬群および疾患犬群の血清 T_4 およびTSH濃度: 両群の平均値をそれぞれ, 健康家庭犬群のそれとun-paired *t* test [12] で有意差検定した.

成 績

TgAA: 健康家庭犬血清のうち, 陽性が5検体(2.6%)に認められた.

CLEIA法によるTSHおよび T_4 濃度測定の信頼性: 従来法(RIA法)とCLEIA法で測定した40頭のデータについて相関係数(*r*)と一時回歸式を求めたところ, T_4 濃度では $r=0.94$, $y=0.76x+0.17$, TSH濃度では $r=0.98$, $y=1.02x-0.002$ という良好な結果が得られた.

基準範囲設定: まず, 測定したホルモン濃度の分布型を調べた. 血清 T_4 濃度およびF- T_4 参考濃度においては, 同一の1検体が, また, TSH濃度においては他の3検体が外れ値と判定された. これら4検体とTgAA陽性5検体と合わせて9検体を, 基準範囲設定サンプルから除外した.

残った T_4 およびF- T_4 濃度のヒストグラムは, いずれも正規分布型と推定された(データは示さない). TSH濃度については, 残ったデータのヒストグラムは正規分布型ではなかったが, 自然対数変換データのヒストグラムは正規分布様の型を示し, 対数正規分布型と推定され

表2 年齢間の血清 T_4 , TSH濃度およびF- T_4 参考濃度の比較

年 齢	平均値±標準偏差		
	T_4 ($\mu\text{g/dl}$) **	TSH (ng/ml) **	F- T_4 (ng/dl) *
~1 (n=25)	2.24±0.83	0.08±0.05	1.37±0.42
2~3 (n=43)	2.08±0.66	0.15±0.21	1.32±0.37
4~5 (n=37)	1.84±0.57	0.13±0.11	1.18±0.31
6~ (n=40)	1.77±0.62	0.20±0.17	1.16±0.35

注1: 一元配置分散分析にて, 群間差の検定を行った

(** : $P<0.01$, * : $0.01\leq P<0.05$).

注2: 年齢不詳の個体(5例)は含まない.

た(データは示さない).

次に T_4 濃度とF- T_4 参考濃度の正規分布性およびTSH濃度の対数正規分布性を検定した. 3項目のデータの相対累積度数を, T_4 とF- T_4 については正規確率紙に, またTSHについては対数正規確率紙にそれぞれプロットした. その結果, いずれの項目においても相対累積度数70%以上まで直線性を示した(データは示さない).

また, 標本歪度と標本尖度からも, T_4 濃度およびF- T_4 参考濃度の正規分布性とTSH濃度の対数正規分布性が確認された(データは示さない).

最後に, 基準範囲を $M\pm 2SD$ から求めた. T_4 濃度($\mu\text{g/dl}$)の平均値は1.95, 標準偏差は0.67となり, 基準範囲は0.61~3.30 $\mu\text{g/dl}$ と設定した. TSH濃度(ng/ml)については, 個々のデータを自然対数に変換してその $M\pm 2SD$ を求め, その限界値(-3.71および-0.70)を逆変換した. その結果, 下限値は0.02, 上限値は0.50であった. ただしこの測定系の検出下限値は0.03であるため, 基準範囲は0~0.50ng/mlと設定した. また, F- T_4 参考濃度(ng/dl)の平均値は1.24, 標準偏差は0.36となり, 基準範囲は0.52~1.97ng/dlと設定した.

甲状腺関連ホルモン濃度に対する各種個体要因の影響: 健康家庭犬群の全個体を, 前述した各種個体要因によって群分けして比較した. その結果, 表1のとおり, T_4 濃度ならびにF- T_4 参考濃度において中・大型犬の成績が小型犬のそれよりも有意に低かった. また年齢により4群に分けて比較したところ, 表2のとおり3項目のいずれにおいても有意な年齢間の差が認められた.

その他の個体要因において, 測定値に影響するものは認められなかった.

3群の血清 T_4 およびTSH濃度比較: 健康家庭犬, ビーグル犬および疾患犬の各群の測定値分布を図1および図2に示した.

健康家庭犬群においても, T_4 低値が7例, TSH高値が3例に認められた.

ビーグル犬群においては, 血清TSH濃度が前述の基準範囲より高いものが3例存在し, 平均値も健康家庭犬

図1 血清 T_4 濃度の群間比較

図中の基準範囲は、本研究で設定したものを用いた。健康家庭犬と他の群について、平均値の差（群間差）を un-paired t test で検定した（以上、図2も同じ）：
 , $0.001 \leq P < 0.01$; *, $P < 0.001$

図2 血清 TSH 濃度の群間比較

箱ひげ図の箱は 25 % 点から 75 % 点および中央値、ひげの両端は最小値および最大値を示す。
 群間差：*, $0.01 \leq P < 0.05$; NS, 有意差なし。

群のそれより有意に高かった。血清 T_4 はすべて基準範囲内に含まれたが、平均値を健康家庭犬群のそれと比較すると、有意に低い結果となった。

そこで、 T_4 が $1 \mu\text{g/dl}$ 未満の 7 例（うち、TSH 異常高値のもの 2 例）について TSH 刺激試験を実施したところ、1 例については明らかな刺激反応の低下が認められ（データは示さない）、しかもこれは TSH 濃度が著しい高値（ 6.2 ng/ml ）を示した個体であった。

疾患犬群では、血清 T_4 濃度の基準範囲以下のものが 7 例（20 %）に認められ、また健康家庭犬群と比べて平均値も有意に低かった。しかしながら TSH 濃度は、すべての検体が基準範囲内に含まれ、その平均値についても、健康家庭犬群のそれとの間に有意差を認めなかった。

T_4 異常低値を示した健康家庭犬群と疾患犬群の各 7 例について、原発性甲状腺機能低下症と偽甲状腺機能低下症候群（euthyroid sick syndrome; ESS）[9, 18, 21] の簡易鑑別指標である T_4 (nmol/l)/TSH (ng/ml) 比 [19] を求めた。その結果、疾患犬群全体の 8.3 % にあたる 3 例が、ESS 診断指標とされる 45 を超えていたが、健康家庭犬群において 45 を超えた個体は 1 例（0.6 %）に留まった。

考 察

今回用いた CLEIA システムのメーカーでは、46 頭の

健康犬の成績から得られた仮の基準範囲を示しているのみであり、正規の基準範囲設定は各ユーザーに委ねられている。したがって今後、本システムで国内犬のサンプルを測定する場合は、今回の基準範囲に照らして評価することが適当である。

また、F- T_4 参考濃度の基準範囲は、今後、犬の甲状腺機能低下症診断における非透析法による測定意義を検討する際に有用であろう。

次に、血清 TSH および T_4 濃度について、基準範囲設定に用いた健康家庭犬群の成績を対照に、ビーグル犬群と疾患犬群を比較評価した。その結果これらの 2 群には、それぞれ異なる傾向が認められた。すなわちビーグル犬群には、有意な T_4 濃度減少と TSH 濃度増加が認められた。特に TSH については、基準範囲上限を超えた個体が 3 頭存在し、そのうち 2 頭は T_4 も比較的低値であった。そこで、 T_4 濃度が最低値からの 7 頭について TSH 刺激試験を実施したところ、1 頭に反応低下が認められ、しかもこれは、極めて高い TSH 濃度を示した個体であった。以上のことから、今回のビーグル犬群には、本犬種に高率に存在するといわれる原発性甲状腺機能低下症 [1] の潜在が示唆された。いっぽう、疾患犬群では、血清 T_4 濃度が減少傾向を示し、基準範囲以下の値も 7 例に認められた。しかしながらこの群においては、TSH 濃度はすべてが基準範囲内に含まれ、健康家庭犬群との差も認められなかった。さらに全体の 8.3 % にあたる 3 例において、 T_4 /TSH 比が、簡易な ESS 診断指標とされる

45を超えていた。今回の疾患症例はいずれも、二次診療を中心とする獣医学部附属動物病院内においても比較的重度な症状を示す個体が選定されている。疾病の種類を問わず、重度の疾患犬には高率にESSが認められるといわれている[9]ことから、今回の疾患症例においても、少なからずESSが存在したものと推定される。

以上のとおり今回用いた健康家庭犬群の成績は、他の2群のそれと有意な差を示し、これら2群の異常傾向を評価する上で有効であった。このことから上記の基準範囲は、CLEIA法による国内犬の血清T₄およびTSH濃度の判定指標として適当なものと思われた。

本調査に当たり、CLEIA法による犬のT₄およびTSHを測定していただいた榊ランスに深謝する。

引用文献

- [1] Benjamin SA, Stephens LC, Hamilton BF, Saunders WJ, Lee AC, Angleton GM, Mallinkrodt CH : Vet Pathol, 33, 486-494 (1996)
- [2] Boretti FS, Reusch CE : Schweiz Arch Tierheilkd, 146, 183-188 (2004)
- [3] Daminet S, Jeusette I, Duchateau L, Diez M, Maele VD, Rick AD : J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med, 50, 213-218 (2003)
- [4] Dixon RM, Graham PA, Mooney CT : Vet Rec, 138 : 594-595 (1996)
- [5] Dixon RM, Mooney CT : J Small Anim Pract, 40, 72-78 (1999)
- [6] Dixon RM, Mooney CT : Res Vet Sci, 66 (1999)
- [7] 細萱茂実 : 検査と技術, 28, 1361-1365 (2000)
- [8] 井上喜美雄 : 臨床検査, 7, 727-738 (1963)
- [9] Kantrowitz LB, Peterson ME, Melian C, Nichols R : J Am Vet Med Assoc, 219, 765-769 (2001)
- [10] 北村清吉, 内山幸信 : 臨床検査ハンドブック 1, 51-63, 薬事日報社, 東京 (1994)
- [11] Motulsky H : Intuitive Biostatistics, 207-216, Oxford University Press, New York (1995)
- [12] Motulsky H : Intuitive Biostatistics, 255-262, Oxford University Press, New York (1995)
- [13] Nachreiner RF, Refsal KR, Graham PA, Bowman MM : J Am Vet Med Assoc, 220, 466-471 (2002)
- [14] Nachreiner RF, Refsal KR, Graham PA, Hauptman J, Watson GL : Am J Vet Res, 59, 951-955 (1998)
- [15] Nelson RW : Small Animal Internal Medicine 3rd ed, Nelson RW, et al eds, 691-709, Mosby, Missouri (2003)
- [16] Peterson ME, Melian C, Nichols R : J Am Vet Med Assoc, 211, 1396-1402 (1997)
- [17] Reimers TJ, Lawler DF, Sutaria PM, Correa MT, Erb HN : Am J Vet Res, 51, 454-457 (1990)
- [18] Scott-Moncrieff JC, Nelson RW, Bruner JM, Williams DA : J Am Vet Med Assoc, 212, 387-391 (1998)
- [19] Stockham SL, Scott MA : Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology, 10-13 and 540-554, Iowa State Press, Ames, Iowa (2002)
- [20] 丹後俊郎 : 臨床検査への統計学, 31-64, 朝倉書店, 東京 (1986)
- [21] Torres SM, Feeney DA, Lekcharoensuk C, Fletcher TF, Clarkson CE, Nash NL, Hayden DW : J Am Vet Med Assoc, 222, 1079-1085 (2003)

Reference Ranges for Canine Serum Thyroxin and Thyrotropin Concentration Measured by Chemiluminescence Immunoassay

Ryo TSUCHIYA^{*†}, Takeshi KAYAMA, Manpei ARAKAWA, Yasuhiro NAKASE, Toshio YAJIMA, Hideharu KITA, Masaharu HISASUE, Munetsugu OGATA and Takatsugu YAMADA

^{*} School of Veterinary Medicine, Azabu University, 1-17-71 Fuchinobe, Sagamihara, 229-8501, Japan

SUMMARY

Reference ranges for serum thyroxin (T₄) and thyrotropin (TSH) in dogs in Japan were established by measuring the total T₄ and TSH concentrations in 159 healthy dogs using Chemiluminescence Enzyme Immunoassay (CLEIA) for canine samples. Reference ranges for free T₄ (F-T₄) in the same population were established using a Chemiluminescence Immunoassay (CLIA) system for human samples. The T₄ and F-T₄ data were normally distributed and TSH results followed lognormal distribution. The reference ranges were defined as the mean $\pm$ 2SD (log transformed data were used for TSH). The ranges obtained were 0.61-3.30 μ g/dl for T₄, 0-0.50 ng/ml for TSH and 0.52-1.97 ng/dl for F-T₄. In addition, serum T₄ and TSH were measured in 33 experimental beagle dogs and 35 patient dogs with severe illnesses. The results indicated subclinical primary hypothyroidism in the beagle dogs and a high rate of euthyroid sick syndrome in the patient dogs.

—Key words : CLEIA, dog, reference range, T₄, TSH.

[†] Correspondence to : Ryo TSUCHIYA (School of Veterinary Medicine, Azabu University)

1-17-71 Fuchinobe, Sagamihara, 229-8501, Japan TEL · FAX 042-769-1636

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 59, 331 ~ 335 (2006)