Sephadex column を用いた thyroxine の competitive protein binding analysis (Tetralute 法)

— 操作法・薬剤干渉の基礎検討と臨床応用 —

宮井 潔, 片山善章, 沢崎憲夫, 石橋嘉一郎, 川島 実*,
小豆沢瑞夫, 熊原雄一

大阪大学医学部付属病院 中央臨床検査部

大阪市福島区福島 1 丁目1-50

*大阪血清微生物研究所

1975年7月1日 受理

Sephadex column を用いた competitive protein binding analysis による T_4 測定法 (Tetralute 法) の検討を行なった結果, 変動係数 4% (assay 内), 6% (assay 間), T_4 -I 正常値 $4.9 \pm 0.8 \mu\text{g}/\text{dl}$, 甲状腺機能亢進症で高値, 低下症で低値で, 臍帯血, 妊婦, 絨毛性疾患でやや高値, TBG 欠損症, 神経性食思不振症で低値の傾向を示した。Res-O-Mat T_4 との相関係数は 0.96 であった。Telepaque 投与後, または DPH, salicylate, phenobarbital の血清への *in vitro* 添加で影響なく, benzbromarone 大量添加でやや高値となった。

以上, Tetralute 法は甲状腺機能検査として有用であると考えられる。

1. 緒 言

血中甲状腺ホルモンに関する検査法を大別すれば, 1) thyroxine (T_4) 濃度の測定, 2) 3,5,3'-triiodo-L-thyronine (T_3) 濃度の測定および 3) T_4 結合タンパク (TBP) の測定となる。 T_4 の測定に関しては 1964 年 Murphy ら¹⁾ によって competitive protein binding analysis (CPBA) が発表され広く臨床的に応用されるようになった。本法の原理は, 一定量の TBP と, ラジオアイソトープ (RI) 標識 T_4 との結合反応において, 非標識 T_4 を競合させるものであるが血中 T_4 の抽出法, 競合反応後の未結合と結合 RI の分離法には種々な方法が考案されている。最近 Ames Co. は Sephadex G25 column を用いた Tetralute を発表した。本法は, 抽出・競合・分離が Sephadex column 内で行なわれることが特徴的である。本法の基礎検討については, すでに一部報告をみるが²⁾⁻⁵⁾, われわれも種々な測定条件について検討を行ない, さらに種々な疾患を対象に臨床応用を試みた。また一方臨床的に用いられる薬剤のなかには, T_4 と TBP の結合を阻害するとされているものがあるので, これら薬剤の *in vitro* での添加によって, 測定がいかにか干渉されるかを検討したのでその成績を報告する。

2. 測定方法および対象

測定は, 使用説明書に従い, 以下のごとく行なった。

1) pH12~13に調整した Sephadex G-25 column に ^{125}I - T_4 を 7 滴加え, さらに血清 (または各濃度の T_4 標準血清) を 0.1ml 加え流出する。

2) 流出後, column を barbital buffer で洗浄すると pH が 8.6 に調整される。

3) 第 1 回の column の放射能を測定 (1st count)。

4) Human α -globulin 液 1.0ml を加え, 競合反応させると同時に, 結合, 未結合を分離する。

5) ふたたび barbital buffer で column を洗浄する。

6) 第 2 回の column の放射能を測定 (2nd count)。

7) 2nd count を 1st count で除し retention を求め, 同様に操作して作成した standard curve より T_4 -iodine (T_4 -I) 値を求める。 T_4 -I $\div 0.653 = T_4$ となるが, 以下はすべて T_4 -I で表示した。

測定対象は, 健常人 24 例, 健常臍帯血 24 例, 妊娠 12 例, 絨毛性疾患 14 例, パセドウ病 14 例, プラマー病 8 例, 原発性甲状腺機能低下症 11 例, TBG 欠損症 8 例, 種々の下垂体機能低下症 6 例, 下垂体腺腫 14 例, 神経性食思不振症 16 例, 仮性仮性副甲状腺機能低下症 2 例, Turner 症候群 1 例, タンパク喪失性胃腸症 1 例の計 155 例である。

一部の患者では、ヨウ素含有造影剤である Telepaque 服用後、本法で T_4 -I を測定、同時に PBI も測定した。

In vitro での薬剤干渉をみる実験では、diphenylhydantoin は溶解液 (propylene glycol 40 V/V, ethanol 10 V/V in H_2O , pH 12) に溶解, salicylate は水に溶解, phenobarbital は 2% benzyl alcohol に溶解, benzbromarone は hydrogenated castor oil に溶解した。それぞれの溶解液は容量にして 1/100 (benzbromarone のみ 1/10) になるように、健常人血清または、本測定で用いられる TBG solution に添加し、対照としては、薬剤を含まない溶媒のみを添加した。

3. 成績

3.1 操作時間および温度

本法での T_4 抽出は pH12~13 の状態で血清を添加して column 内で行なわれる。そこで column に血清を apply してから自然流出させるまでの時間を 0, 5, 10, 30 分とした場合、および自然流出後 barbital buffer で洗浄するまでの時間を 0, 5, 10, 30 分とした場合、これらの測定値を比較したが、いずれも大差はなかった。また洗浄時、流出する放射能から推定すると、本法による抽出率は、ほぼ 80% と考えられた。

つぎに操作温度について血清から T_4 を抽出吸着する段階と競合反応および結合・未結合の分離段階の 2 つに分けて検討した。それぞれ温度 6°C と 23°C について行なった結果は、Fig. 1 のとおりで、a) のごとく抽出・吸着段階は温度によって影響されないが、b) のごとく競合・分離段階では温度が高ければ、retention が減少する傾向がみられた。そこで試薬、標準血清お

よび被検血清を同一温度において操作した結果、最終の測定値はほとんど一致した (Fig. 1c)。

3.2 再現性

同一検体の T_4 -I を、同一 assay で 10 重測定したところ $7.1 \pm 0.3 \mu\text{g/dl}$ (平均 $\pm$ 標準偏差) という結果を得、これから計算した変動係数は 4% であった。また T_4 -I 3.0~9.2 の範囲の 15 検体についての 2 重測定したさいの標準偏差 (SD) を $SD = \sqrt{\frac{\sum (x_1 - x_2)^2}{2N}}$ 式で求めたところ $0.3 \mu\text{g/dl}$ という結果を得た。

つぎに同一検体を同一 kit を用いて 7 回の異なる assay で測定したところ、 T_4 -I は $5.1 \pm 0.3 \mu\text{g/dl}$ という結果を得、その変動係数は 6% であった。しかし昭和 46 年 2 月から、昭和 49 年 4 月に至る 3 年間に行なった計 22 回の assay において、管理血清の最終回での測定値を 1.00 として比較してみると、以前の assay では、その値が低く、したがってこれから求めた補正係数は 1.00 以上を乗じなければ、最近の assay と同一視できない場合が多いことがわかった (Table 1)。またこの成績から計算した変動係数は 15.5% となった。しかしそれ以降最近の assay ではこの補正係数はほぼ 1.00 に近い値を示している。

3.3 臨床成績

健常人および各種疾患患者計 155 例の血中 T_4 -I を Tetralute 法で測定した結果は、Table 2 および Fig. 2 に示すとおりである。正常値は $4.9 \pm 0.8 (3.3-6.0) \mu\text{g/dl}$ であった。臍帯血、妊婦、絨毛性疾患、プラマー病では、約半数が高値を示した。バセドウ病では高値、原発性甲状腺機能低下症、TBG 欠損症では低値であった。各種の下垂体機能低下症、下垂体腫瘍では

Fig. 1 Effect of temperature on retention (%) and T_4 -I value of Tetralute.

Table 1 Between-assay reproducibility of T_4 -I Tetralute assays from February 1971 to April 1974. Each correction factor is calculated from T_4 -I value of control serum determined by each assay when the factor equal 1.00 by the last assay No. 31

assay No.	correction factor	assay No.	correction factor
2	1.18	21	1.13
3	1.44	22	1.00
4	0.74	23	1.13
5	1.30	24	1.35
6	1.29	25	1.09
8	1.18	26	1.03
10	1.10	27	1.03
12	1.17	28	1.34
13	0.97	29	1.62
19	1.16	30	1.26
20	1.05	31	1.00

mean $\pm$ S.D. 1.16 ± 0.18

C.V. 15.5%

Fig. 2 Serum T_4 -I values determined by Tetralute in normal subjects and patients with various disorders.

Table 2 Serum T_4 -I determined by Tetralute in normal subjects and in patients with various disorders

	case	T_4 -I ($\mu\text{g/dl}$)	
		range	mean $\pm$ S.D.
Normal	24	3.3~6.0	4.9 $\pm$ 0.8
Cord Serum	24	4.8~8.7	6.4 $\pm$ 1.2
Pregnancy	12	5.0~9.4	7.1 $\pm$ 1.1
Trophoblastic disease	14	3.9~18.2	9.0 $\pm$ 3.6
Graves' disease	14	7.1~20.0	13.3 $\pm$ 4.8
Plummer's disease	8	4.4~9.4	6.3 $\pm$ 1.6
Primary hypothyroidism (pseudohypoparathyroidism 3 cases, cretinism 2 cases)	11	<2.5~3.0	
TBG deficiency	8	<2.5	
Hypopituitarism	6	2.7~8.1	5.5 $\pm$ 1.8
Pituitary adenoma (acromegaly 6 cases)	14	2.6~7.7	5.2 $\pm$ 1.4
Anorexia nervosa	16	<2.5~5.4	3.6 $\pm$ 0.7
Miscellaneous (Pseudopseudohypoparathyroidism 2 cases, Turner's syndrome 1 case, Protein losing gastroenteropathy 1 case)	4	3.1~8.9	6.5 $\pm$ 2.1

total 155

Fig. 3 Correlation between T_4 -I values determined by Tetralute and Res-O-Mat T_4 .

時に低値のものがあつた。神経性食思不振症ではやや低い傾向にあつた。

なお同一検体について T_4 -I を Tetralute 法で測定した値と、Res-O-Mat T_4 法で測定した値の関係は、Fig. 3 に示すとおり、相関係数 $r=0.96$ で相関したが絶対値にやや差がみられた。

3・4 有機ヨウ素剤投与の影響

健康人に Telepaque 6 錠を服用せしめると Fig. 4 に

Fig. 4 Effect of Telepaque administration on serum PBI and T_4 -I determined by Tetralute.

示すとおり、血中 PBI は $650\mu\text{g/dl}$ と著明に上昇したが、同時に Tetralute 法で測定した T_4 -I 値はほとんど変動を示さなかった。

3.5 *in vitro* における薬剤の干渉

臨床的に用いられる薬剤のうち、 T_4 と TBP の結合を阻害するとされているものを *in vitro* で添加したさい、Tetralute による T_4 測定への干渉について検討した。その結果は Table 3 に示すとおり、薬剤を血清に添加した場合でも TBG solution に添加した場合でも、diphenylhydantoin ($500\mu\text{g/ml}$)、salicylate (4mg/ml)、phenobarbital (1mg/ml) で、ほとんど影響はみられなかった。ただ尿酸排泄剤として最近開発された benzbromarone は、競合反応の段階、すなわち TBG solution に添加した場合は明らかに T_4 -I 測定値を高めた。しかし抽出段階前、すなわち血清に添加した場合、Res-O-Mat T_4 法では同じように高値を示したが、Tetralute 法ではその影響は少なかった。

4. 考 按

Tetralute 法は、血清からの T_4 抽出と、TBG による競合の両者を、1つの Sephadex column 内で行える点が大なる特長である。そこで column の流出速度が抽出反応に影響を及ぼす懸念があるので種々検討したが、ほとんど影響はなかった。ただ競合反応に関しては、2分以上必要であることが高坂ら⁵⁾によって示

Table 3 *In vitro* effects of diphenylhydantoin, salicylate, phenobarbital and benzbromarone on competitive protein binding analysis of T_4

Drugs		Competitive protein binding analysis (T_4 -I $\mu\text{g/dl}$)			
		Res-O-Mat T_4		Tetralute	
		serum + drug	extract + drug	serum + drug	TBG solution + drug
diphenylhydantoin ($\mu\text{g/ml}$)	(M)				
0	0	7.1	6.2	5.1	5.0
10	4×10^{-5}	7.1	5.6	4.9	4.7
50	2×10^{-4}	7.3	6.4	5.2	4.8
500	2×10^{-3}	7.3	7.5	5.0	5.6
salicylate (mg/ml)	(M)				
0	0	6.7	6.2	4.8	4.8
0.04	2.9×10^{-4}	7.1	6.0	5.0	4.9
0.4	2.9×10^{-3}	6.8	6.1	4.7	5.0
4	2.9×10^{-2}	7.1	6.4	4.9	5.2
phenobarbital (mg/ml)	(M)				
0	0	6.7	6.2	4.8	4.8
0.01	4.3×10^{-5}	7.1	6.2	5.3	4.2
0.1	4.3×10^{-4}	7.1	6.0	4.9	5.0
1	4.3×10^{-3}	5.8	6.2	4.6	4.6
benzbromarone ($\mu\text{g/ml}$)	(M)				
0	0	5.7	3.7	3.9	5.7
1	2.4×10^{-6}	6.2	5.0	4.8	5.0
10	2.4×10^{-5}	6.2	5.7	5.1	5.3
100	2.4×10^{-4}	10.3	10.4	6.7	>12.5

されている。また反応温度は、競合分離段階で影響を及ぼすが、被検血清と標準血清を同時に測定すれば問題なく、原法どおりの操作で安定した assay を行なうことができた。assay 内の変動係数 4% で、諸家の報告、すなわち 5.2% ($3.09 \pm 0.16\mu\text{g/dl}$ より計算)⁵⁾、4.4% ($4.5 \pm 0.2\mu\text{g/dl}$ より計算)²⁾、3~4%³⁾ とはほぼ同様で満足すべきものであった。assay 間の変動についてわれわれは 3 年間の長期にわたって検討した結果、最近の assay に比べ、初期の assay では管理血清値が低い傾向にあり、したがって、Table 1 に示したような補正係数を乗じなければならないという結果を得た。同じ competitive protein binding analysis による他の測定法と比較した場合、Tetralute による値が、

Tetrasorb や Res-O-Mat T_4 より低い傾向を示すことは、以前われわれも報告し⁸⁾, また、木下ら⁴⁾も指摘しているが、初期の Tetralute assay が低値の傾向であったのも一因と考えられる。そこで上に述べた補正係数を乗じたり、また最近の Tetralute kit を用いた測定値と Res-O-Mat T_4 値との相関をみると、Fig. 3 に示すように、低い範囲でなおやや低値ではあるが、比較的良好一致した。

つぎに Tetralute 法を用いた臨床成績についてみると、われわれの T_4 -I 正常値 $4.9 \pm 0.8 (3.3 \sim 6.0) \mu\text{g}/\text{dl}$ は諸家の報告、すなわち $4.9 \pm 1.0 \mu\text{g}/\text{dl}$ ²⁾, $4.6 \pm 1.2 (T_4 7.1 \pm 1.9 \text{より換算}) \mu\text{g}/\text{dl}$ ⁴⁾, $5.53 \pm 1.33 (2.93 \sim 8.13) \mu\text{g}/\text{dl}$ ⁵⁾ とほぼ同程度であった。またわれわれは、妊娠でやや高値^{2), 5)}, パセドウ病で高値、甲状腺機能低下症で低値という従来の成績^{2), 4), 5), 7)} と同傾向の結果をえた。さらにブラマー病で高値、TBG 欠損症で低値、臍帯血、絨毛性疾患で高値のものがあ、神経性食思不振症で低値の傾向を示すことは、従来からも他の方法で指摘されている事実で、Tetralute 法でもそれを確認したわけである。

本測定法に対する薬剤干渉については、原理的に T_4 と TBP の特異結合反応を利用しているので、PBI のように他の有機ヨウ素剤の影響はないと考えられるが、 T_4 -TBP の結合反応を阻害する薬剤の影響をうける可能性がある。前者については Telepaque 服用後血中 PBI は著増するが Tetralute による T_4 -I 値は不変であることを明らかにした。また T_4 と TBP の結合を阻害する薬剤として、 T_4 と TBG を阻害するてんかん治療剤 diphenylhydantoin⁹⁾, T_4 と TBG および TBPA とを阻害する解熱剤の salicylate⁹⁾, TBPA との結合を阻害する睡眠剤の phenobarbital¹⁰⁾ は Table 3 に示すごとく、常用量の推定血中最大濃度の10倍でもほとんど影響はなかった。また最近開発された尿酸排泄剤の benzbromarone は高濃度を *in vitro* で添加したさい、 T_4 -I が高値となるがこれは競合反応を阻害すると考えられ、それは Trilute に及ぼす影響と軌を一にする。ただ血清に添加したさいは、Tetralute 法では本薬剤が抽出段階でかなり除去されると考えられ影響は少なかった。いずれにしても本実験は *in vitro* なので、*in vivo* の影響は不明であるが、その量から考えれば、常用量の短期投与では、ほとんど干渉されないものと想像される。

以上 Tetralute 法は1つの column で全操作を行なうことができ、再現性、特異性もすぐれ、臨床的に T_4 を測定するのに有用な方法と思われる。

5. 結 論

Competitive protein binding analysis による T_4 測定法として Tetralute 法の基礎検討と臨床応用を試み以下の結果をえた。

競合・分離段階で温度が高いと retention % は低くなったが、被検および標準血清を同条件下で操作すれば、測定値は温度によって影響されなかった。同一試料測定のための変動係数は、4% (同一 assay 内)、6% (異なる assay 間) であったが、後者については、初期の kit では一定の補正係数 (大部分 1.00 以上) を乗じて補正すべきとの結果を得た。本法による血中 T_4 -I 値は健常人 (24例), $4.9 \pm 0.8 \mu\text{g}/\text{dl}$, パセドウ病 (14例), $13.3 \pm 4.8 \mu\text{g}/\text{dl}$, 甲状腺機能低下症 (11例) $< 2.5 \sim 3.0 \mu\text{g}/\text{dl}$ で、ブラマー病、臍帯血、妊婦、絨毛性疾患では約半数が高値、TBG 欠損症では低値、神経性食思不振症ではやや低値の傾向があった。Res-O-Mat T_4 で測定した T_4 -I 値との相関係数は 0.96 であった。Telepaque 投与後 PBI は上昇したが、Tetralute 法による T_4 -I は不変であった。また *in vitro* で diphenylhydantoin ($500 \mu\text{g}/\text{ml}$), salicylate ($4 \text{mg}/\text{ml}$), phenobarbital ($1 \text{mg}/\text{ml}$) の大量添加で T_4 -I 値に影響なく、benzbromarone ($100 \text{mg}/\text{ml}$) でわずかに高値となった。

本論文の要旨の一部は、日本核医学会総会 (第10回昭和45年10月, 第13回昭和48年8月), 第1回世界核医学会 (昭和49年9月), 日本臨床病理学会総会 (第17回昭和45年9月, 第20回昭和48年11月) および第19回日本内分泌学会西部部会 (昭和46年10月) において発表した。

終りに、Tetralute キットを提供していただいたマイルス三共および資料整理にご協力いただいた川野登美子職員に謝意を表する。

文 献

- 1) Murphy, B.E.P. and Pattee, C.J.: *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **24**, 187 (1964)
- 2) Braverman, L.S., Vagenakis, A.G., Foster, A.E. and Ingbar, S.H.: *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **32**, 497 (1971)
- 3) Watson, D. and Lees, S.: *Ann. Clin. Biochem.*, **10**, 14 (1973)
- 4) 木下文雄, 中敷領勝士, 前川 全, 小笠原幹, 岡本二郎, 七里 泰, 里和スミエ, 栗林幸夫,

- 近藤 誠：核医学，**11**，685 (1974)
- 5) 高坂唯子，森 徹，浜本 研，池窪勝治，竹田洋裕，鳥塚莞爾，浜田 哲：*Radioisotopes*，**23**，336 (1974)
- 6) 片山善章，山口久子，横田 武，小沢加寿子，宮井 潔，熊原雄一，松岡 徹：第10回日本核医学会総会講演，(1970)
- 7) Shih, S.C., Sorenson, J.A. and Piper, P.G.: *Lab. Med.*, **4**, 20 (1973)
- 8) Oppenheimer, J.H. and Tavernette, R.R.: *Endocrinol.*, **71**, 496 (1962)
- 9) Larsen, P. R.: *J. Clin. Invest.*, **51**, 1125 (1972)
- 10) Ingbar, S.H. and Freinkel, N.: *Recent Progr. Horm. Res.*, **16**, 353 (1960)

Abstract

Competitive Protein Binding Analysis for Thyroxine Using Sephadex Column (Tetralute) —Evaluation of the Procedure, Interference with Drugs and Clinical Application—

Kiyoshi MIYAI, Yoshiaki KATAYAMA, Norio SAWAZAKI,
Kaichiro ISHIBASHI, Minoru KAWASHIMA*,
Mizuo AZUKIZAWA, and Yuichi KUMAHARA

The Central Laboratory for Clinical Investigation, Osaka University
Medical School, Fukushima-ku, Osaka,

* Osaka Kessei Research Laboratory Inc., Osaka

The method of competitive protein binding analysis of T_4 using Tetralute kit was evaluated. The net retention was decreased when the procedure of competition and separation was performed under higher temperature but the final T_4 -I values were constant when the standard and test sera were identically treated. Coefficient of variation (C.V.) was 4% (within-assay) and 6% (between-assay) respectively. However, the T_4 -I values of pooled serum for quality control were slightly lower in earlier experiments in which correction factors (1.03~1.62 in 18 out of 21 assays) were necessary. T_4 -I values were determined by the Tetralute in 155 cases. These were as follows: 4.9 ± 0.8 $\mu\text{g/dl}$ (euthyroid subjects), 6.4 ± 1.2 $\mu\text{g/dl}$ (cord serum), 7.1 ± 1.1 $\mu\text{g/dl}$ (pregnant women), 9.0 ± 3.6 $\mu\text{g/dl}$ (trophoblastic disease), 13.3 ± 4.8 $\mu\text{g/dl}$ (Graves' disease), 6.3 ± 1.6 $\mu\text{g/dl}$ (Plummer's disease), $<2.5 \sim 3$ $\mu\text{g/dl}$ (primary hypothyroidism), <2.5 $\mu\text{g/dl}$ (TBG deficiency), 5.5 ± 1.8 $\mu\text{g/dl}$ (hypopituitarism), 5.2 ± 1.4 $\mu\text{g/dl}$ (Pituitary adenoma) and 3.6 ± 0.7 $\mu\text{g/dl}$ (anorexia nervosa). There was good correlation between T_4 -I values determined by Tetralute and Res-O-Mat T_4 ($r=0.96$). Following oral administration of Telepaque serum PBI was markedly elevated while T_4 -I determined by Tetralute did not change. In vitro addition of diphenylhydantoin (500 $\mu\text{g/ml}$), salicylate (4 mg/ml) and phenobarbital (1 mg/ml) had no or little effects on T_4 determination by Tetralute. Benzbromarone in high concentration (0.1 mg/ml) caused higher value of T_4 -I determined by Tetralute when added to TBG solution but only slightly increase when added to serum.

(Received July 1, 1975)