固相法を利用した血中チロキシンのラジオイムノアッセイ

——スパック T₄ RIA キットの検討——†

佐々木 治, 塩之入洋, 池田弓子, 関根重員, 氏家盛通*, 野沢武夫*

横浜市立大学医学部病院第2内科, *同病院中央放射線部

232 横浜市南区浦舟町3-46

1979年5月30日 受理

Key Words: thyroxine, solid phase method, radioimmunoassay

1. はじめに

各種甲状腺疾患における血中チロキシン (T₄) を測定する方法として, 近年 T₄ に対する抗体作成¹⁾ により, 種々の T₄ radioimmunoassay (RIA) kit が市販されるようになり, 日常検査に使用されている。今回, われわれは, 固相法²⁾を利用したスパック T₄ RIA キット (マリンクロット社製) を入手する機会を得, その基礎的ならびに臨床的検討を行ったので報告する。

2. 方法および対象

2.1 スパック T₄ RIA キット (RIA による T₄ の測定法)

2.1.1 内容 50検体用 (100検体用)

- 1) ¹²⁵I-T₄ 溶液: 55ml 10μCi 以下の ¹²⁵I を含む。
- 2) T₄ 標準血清: T₄ free 血清中に T₄ 濃度が, 0, 2.0, 5.0, 10, 20, 40μg/dl を含む溶液のおおの500μl。
- 3) 抗体固相化チューブ³⁾: 抗T₄ 抗体を底部に付着結合させたプラスチック製チューブ50本 (100本)

2.1.2 操作方法

- 1) 検体用チューブに被検血清を25μl, スタンダード用チューブに T₄ 標準血清を 25μl 入れる。
- 2) つぎに ¹²⁵I-T₄ 溶液を上記の全部のチューブに 1.0ml ずつ入れ, 軽く攪拌する。
- 3) つぎに上記全チューブを 37±1°C の水浴中にて 60±5 分間インキュベートする。

4) インキュベーション終了後, 反応液を除去してカウンターにて測定する。

2.2 レゾマット T₄ キット (CPBA³⁾ による T₄ の測定法)

スパック T₄ RIA キットで測定した同一検体をこのレゾマット T₄ キットにて同時に測定した。

2.3 臨床的検討の対象

当科外来および入院患者で, 臨床症状, 所見および諸検査により診断された正常者71名 (男24名, 女47名), 甲状腺機能亢進者68名 (男26名, 女42名), 同機能低下者16名 (男6名, 女10名) の計155例を対象とした。

3. 成績

3.1 スパック T₄ RIA キットの基礎的検討の成績

3.1.1 インキュベーション温度および時間

インキュベーション温度は34±0.2°C, 37±0.2°C, 40±0.2°Cの3種類 (60分)。インキュベーション時間は, 45±0.5分, 60分, 75±0.5分の3種類 (37°C) とし, 各種条件における標準曲線の B/T (%) を Table 1 に示した。B₀/B₄₀ は B₀/T (%) と B₄₀/T (%) の比であ

Table 1 B/T (%) of standard curves

Incubation time (min)	Incubation temp. (°C)	Concentration of standard solution and B/T (%)						B ₀ /B ₄₀	B ₂ /B ₂₀
		0	2	5	10	20	40		
45	37	44.2	34.0	23.3	16.5	11.5	7.3	5.72	2.96
60	34	49.3	33.7	24.9	17.6	10.8	7.0	7.17	3.12
60	37	49.9	35.1	25.6	17.8	11.0	6.1	8.14	3.19
60	40	51.6	36.3	24.6	17.3	10.5	7.9	6.51	3.46
75	37	55.4	37.5	26.2	18.0	11.4	6.9	8.01	3.29

† Radioimmunoassay of Thyroxine by Solid Phase Method. Osamu SASAKI, Hiroshi SHIONOIRI, Yumiko IKEDA, Shigekazu SEKINE, Morimichi UJIE and Takeo NOZAWA: Yokohama City University, School of Medicine, 3-46 Urafune-cho, Minami-ku, Yokohama 232.

り, B_2/B_{20} は $B_2/T(\%)$ と $B_{20}/T(\%)$ の比である。インキュベーション温度, 34, 37, 40°Cにおける標準曲線をFig. 1に, インキュベーション時間, 45, 60, 75分における標準曲線をFig. 2に示した。

3・1・2 回収率

回収率の結果をTable 2に示す。回収率は, 既知濃度の血清または標準液を等容量加えたものを使用し, 回収率の単純平均は100.5%であった。

Fig. 1 Incubation temperature and standard curves.

Fig. 2 Incubation time and standard curves.

3・1・3 再現性およびバラツキ

同一ロットのキットで8回の測定を標準血清 NMSI

Table 2 Recovery rate

No.	A + B	Observed values	Calculated values	Recovery rate (%)
1	2.49 + 6.05	9.57	8.47	112.9
2	4.50 + 6.05	10.53	10.55	99.8
3	6.00 + 6.05	11.83	12.05	98.2
4	7.16 + 7.90	14.33	15.06	95.2
5	20.00 + 20.55	38.85	40.55	95.8
6	10.00 + 20.00	30.41	30.00	101.3

を用いて行った結果は, 平均値 $5.17 \mu\text{g/dl}$, SE $0.044 \mu\text{g/dl}$, CV 0.85% であった。なお1回の測定でNMSIは最低で2本, 最高で20本使用しており, 8回の合計は49本である。同一回におけるバラツキは NMSI 20本の測定で平均値 $5.12 \mu\text{g/dl}$, SE $0.141 \mu\text{g/dl}$, CV 2.75% であった。

3・2 スパック T_4 RIA キットの臨床的検討の成績

1) スパック T_4 RIA キットとレゾマット T_4 キットとの臨床例での相関

正常および各種甲状腺疾患 155 例について同一検体を両キットで測定し, 両法による測定値の相関を求めるとFig. 3のごとく $r=0.843$ と推計学上有意な ($p < 0.001$) 正の相関が認められた。

Fig. 3 Correlation between SPAC T_4 RIA and Res-O-Mat T_4 .

2) スパック T_4 RIA の正常値分布

$8.50 \pm 2.16 \mu\text{g/dl}$

3) 甲状腺機能亢進者のスパック T_4 RIA 測定値分布

$11.74 \pm 4.20 \mu\text{g/dl}$

4) 甲状腺機能低下者のスパック T_4 RIA 測定値分布

4. $24 \pm 1.83 \mu\text{g}/\text{dl}$

4. 考 案

現在, 甲状腺機能を検査するための血清 T_4 測定方法としては大別して2種類(CPBA法³⁾, RIA法)あり, 各種キットも市販されており, 実用に供している。CPBA 法は, 血清 T_4 をエタノール等で抽出する必要があるが, RIA 法は抗 T_4 抗体¹⁾の作成が可能になったために, この操作が不要で血清中の T_4 を直接測定することができる。

今回, 著者らは, RIA法によるスパック T_4 RIA キットを入手する機会を得たので, その基礎的ならびに臨床的検討を行い, 本キットの実用性について評価した。

従来より抗体と結合した標識ホルモン(B)と遊離の状態で存在する標識ホルモン(F)とを分離する方法として, クロマト法, 電気泳動法, ゲルろ過法, レジン法, 二抗体法, 酵素法, 固相法²⁾など種々の方法があるが, 本キットは, Cattら⁴⁾が成長ホルモンの assay に使用した固相法, すなわち, 抗体をあらかじめ一定量ずつ付着させたプラスチック製試験管に一定量の標識ホルモンならびに非標識ホルモンまたはサンプルを入れ, 一定温度で一定時間インキュベート後, 溶液を吸引除去し, 管の内部を洗ってからカウントすればBの値が得られるという非常に簡便化された方法を使用している。このため本キットでは, 抽出, 遠心分離等の操作が不要でピペティングも2回で済み, 操作時間は解凍後ピペティング開始よりカウンティング開始まで80~90分と短く, 半日で測定結果を出すことも可能であり, ルーチンの検査としては非常に有利で

ある。

インキュベーション温度, 時間は, それぞれ37°C, 60分の条件下で0と40 μg のパウンド%の差が大きく分解能の高い標準曲線が描けた。インキュベーションの時間は長く, 温度は高いほうが標準曲線がややS字状をなし, また大部分の検体が分布する2~20 μg の範囲ではより良い分解能を示す曲線が得られるように思われる。再現性, 回収率ともに良好で, またCPBA法によるレゾマット T_4 キットで測定した T_4 値と, 本キットで測定した T_4 値との間には, $r=0.843$ と良好な正の相関が認められたので本キットによる T_4 測定値は臨床応用が可能と思われる。

5. 結 語

スパック T_4 RIA キットは, 固相法を用いた kit のため抽出, 遠沈操作が不要で, その簡便な操作性と, 少量の血清で短時間で測定可能のため, 日常の検査方法としては非常に有用な T_4 測定法であることを認めた。

最後に, スパック T_4 RIA キットを提供していただいた第一ラジオアイソトープ研究所に対し感謝します。

文 献

- 1) Chopra, I.J., et al.: *J. Clin. End. Met.*, **32**, 299 (1971)
- 2) Catt, K., et al.: *Biochem. J.*, **100**, 31 c (1966)
- 3) Murphy, B.E.P., et al.: *J. Clin. End. Met.*, **24**, 187 (1964)
- 4) Catt, K., et al.: *Science*, **158**, 1570 (1967)