技術報告

マグネチック FT₄ キットによる 血中遊離サイロキシン濃度測定に関する検討[†]

小西淳二, 高坂唯子, 新井圭輔, 御前 隆, 飯田泰啓,

笠木寛治, 遠藤啓吾, 鳥塚莞爾

京都大学医学部放射線核医学科

606 京都市左京区聖護院川原町 54

1985年6月28日 受理

Key Words: free thyroxine, radioimmunoassay, magnetic separation

1. はじめに

血中サイロキシン(T₄)の大部分はT₄結合グロブリン(TBG)を主とするT₄結合タンパクに結合しており、約0.03%が遊離型として存在する。この微量の遊離T₄(FT₄)が細胞内に移行し、ホルモン作用を発現するものと考えられ、甲状腺の機能状態を最もよく反映する指標とされている。このFT₄の測定法としては平衡透析法^{1),2)}が標準法として用いられてきたが、操作が煩雑であるため、日常検査とはならなかった。

最近、ラジオイムノアッセイ(RIA)を応用して血中FT₄を簡便に知る方法がいくつか開発され、ようやくFT₄の測定が身近なものとなってきつつある。著者らはこれまで4種のRIAによるFT₄測定法について検討を行ってきた³⁾⁻⁶⁾。今回、T₄誘導体をトレーサとして用い、B・F分離に磁力を応用した、マグネチックFT₄「コーニング」キットを試用する機会を得、基礎的ならびに臨床的検討を行ったのでその成績を報告する。

2. 測定原理と方法

本キットでトレーサとして用いられている¹²⁵I-T₄誘導体の抗体への結合は被験血清中のTBGには影響さ

れず、FT₄が多いほどその抗体への結合が低下することになり、標準血清との比較でFT₄の濃度を知ることができる。

また、抗体は鉄微粒子に共有結合されているため⁷⁾、反応後、試験管を帯磁気のラックに立てるだけでB・F分離が行え、遠沈操作を必要としない。

測定法の概略は以下の通りである。

- (1) 標準品または患者血清 50 μ l を各試験管に入れる。
- (2) ¹²⁵I-T₄ 誘導体を各 200 μ l ずつ加える。
- (3) T₄ 抗体スラリーを各 500 μ l ずつ加え、軽く振とう混和する。
- (4) 37°Cで1時間インキュベートする。
- (5) マグネットセパレータにセットし3分間放置する。
- (6) 上清をデカントし、沈渣の放射能を測定する。
- (7) 標準品のバウンド%より標準曲線を作成し、未知検体のFT₄濃度を読み取る。

3. 実験方法および対象

測定方法に関しては、インキュベーションの温度および時間、測定の再現性について検討を行った。

健常者25例および各種疾患患者94例の計119例を測定対象とした。さらに全例について、コーニング社のマグネチックT₄RIAキットおよびマグネチックT₃摂取率キットにより、それぞれT₄濃度、T₃摂取率を求め、両者の積として遊離T₄インデックス(FT₄I)を算出して、FT₄値との関係を検討した。また、47例についてガンマコートFT₄値を測定し、本キットによる測定値との関係を検討した。

[†] Evaluation of Magnetic FT₄ Kit for the Measurement of Serum Free Thyroxine Concentration. Junji KONISHI, Tadako KOSAKA, Keisuke ARAI, Takashi MISAKI, Yasuhiro IIDA, Kanji KASAGI, Keigo ENDO and Kanji TORIZUKA: Department of Radiology and Nuclear Medicine, Kyoto University School of Medicine, 54, Kawahara-cho, Shogoin, Sakyo-ku, Kyoto 606, Japan.

4. 結 果

4.1 基礎的検討の結果

4.1.1 インキュベーション温度の影響

インキュベーションを4, 25および37°Cで1時間行った場合の標準曲線と, 3種のコントロール血清の測定値をFig. 1に示した。4°Cでは結合率が著しく低かったが, 25°C, 37°Cと温度の上昇とともにB/T%が高くなり, 37°Cで最も急峻な曲線が得られた。

4.1.2 インキュベーション時間の影響

温度を37°Cとし, 30, 60, 90, 120分とインキュベーション時間を変えた場合の標準曲線とコントロール血清の測定値をFig. 2に示した。30分ではB/T%が低く, 時間とともに上昇したが, 90分以後はほとんど変化はみられなかった。60分以後の標準曲線はほぼ平行しており, コントロール血清の値にも著差がみられなかったことにより, 60分のインキュベーションで実用上十分と考えられた。

4.1.3 再現性

Table 1に同一アッセイ内および異なるアッセイ間における3つのコントロール血清の測定値の平均値と標準偏差および変動係数(C.V.%)を示した。アッセイ内のC.V.は2.6-5.5%, アッセイ間のC.V.は4.1-5.2%といずれも良好であった。

Table 2は測定者による値の変動をみたもので, インビトロ検査に3, 5, 14年間従事している3名の技師により各10回ずつの繰返し測定を行った結果を示

Fig. 1 Effect of incubation temperature on the standard curve and assay results.

Fig. 2 Effect of incubation time on the standard curve and assay results.

Table 1 Precision of the assay

	Intraassay			Interassay		
	A	B	C	A	B	C
n	10	10	10	10	10	10
Mean	0.52	1.65	3.87	0.58	1.84	4.4
S.D.	0.02	0.09	0.1	0.03	0.09	0.18
C.V. (%)	3.85	5.45	2.58	5.17	4.89	4.09

Table 2 Variability of assay results obtained by 3 different technicians

		K. T. (14 y)	K. K. (5 y)	Y. K. (3 y)
A	Mean	0.67	0.61	0.61
	S.D.	0.04	0.04	0.06
	C.V. (%)	6.30	6.80	9.50
B	Mean	1.94	1.84	1.95
	S.D.	0.09	0.06	0.08
	C.V. (%)	4.60	3.20	4.10
C	Mean	4.60	4.55	4.53
	S.D.	0.20	0.18	0.14
	C.V. (%)	4.40	3.90	3.00

す。それぞれのコントロール血清の測定値のC.V.は血清Aで6.3-9.5%, B: 3.2-4.6%, C: 3.0-4.4%で熟練度による明らかな差はみられなかった。

4・2 臨床的検討の結果

4・2・1 健常者および各種疾患患者における FT_4 濃度 (Fig. 3)

健常者25例の血中 FT_4 濃度は、1.37～2.90ng/100mlに分布しその平均値±S.D.は2.24±0.43 ng/100mlであった。平均値±2S.D.の範囲を正常値とすると1.38～3.10ng/100mlとなり、甲状腺機能亢進症では、 T_3 toxicosisを呈した2例を除き全例高値を示した。なお、統計的処理にさいし、測定限界を超えたものは測定限界値として計算した。一方、甲状腺機能低下症17例は0.14～1.15ng/100mlで全例低値であった。

妊婦では1期の11例は全例正常範囲にあった。これに対し、2期の20例では3例、3期の19例では5例が低値域に分布し、それぞれの平均値は、健常者の値に比し有意に低値であった。血清 TBG 濃度が7.0および12.0μg/mlのTBG減少症2例の FT_4 値はそれぞれ1.79および2.78ng/100mlと正常範囲内にあった。しかし、TBG欠損症の2例では、いずれも4.15、4.30ng/100mlと高値を示した。

4・2・2 FT_4I との関係

測定対象者の全例について総 T_4 濃度と T_3 摂取率を測定し、 FT_4 インデックス (FT_4I) を算出し、本法により得られた FT_4 濃度との関係をみた。Fig. 4に示すように、全体として両者間に $r=0.894$ の正相関が認められた。 FT_4I の正常値をその平均値±2S.D.より1.76～4.44とすると、妊婦では FT_4I がほぼ正常範囲内に分布したのに対し FT_4 は低値の傾向を示した。一方、TBG減少症ないし欠損症では FT_4I が正常ないし低値を示したのに対し、 FT_4 は減少症で正常、欠損症で高値を示した。TBG欠損症を除くと両者の相関係数は $r=0.928$ とさらに良好であった。

4・2・3 他のキットによる値との比較

本法とは異なる原理で、 FT_4 を測定するガンマーコート FT_4 RIA キットによる測定値と本キットによる測定値との間にはFig. 5に示すように良好な正相関が認められ、絶対値においては本キットの値が高値をとる傾向を認めた。

Fig. 3 Serum free T_4 concentration in various physiological and pathological conditions.

Fig. 4 Correlation between free T_4 index and free T_4 concentration.

Fig. 5 Correlation between FT_4 values by GammaCoat kit and those by Magnetic kit.

5. 考 案

本キットはアマレックス FT₄ RIA キット[®]と同じく T₄ 抗体には結合するが, TBG とは結合しない標識 T₄ 誘導体を用いた one tube, one step assay である。そのユニークな点は抗体が鉄微粒子に結合させてあることで, 帯磁ラックを用いて bound と free の分離が簡単に行え, また, ラックごと傾けて各チューブの上清を一度に除去することもできるなど, 簡便かつ迅速な測定を可能にしている。

測定条件に関して, インキュベーションの温度, 時間はそれぞれ 37°C, 60 分で良好な結果が得られた。

測定値の再現性は同一アッセイ内および異なるアッセイ間において, いずれも C.V. が 6% 以下と良好であった。また操作が簡単であることから, 測定者の熟練度によりほとんど左右されない結果が得られることが示された。

本測定法による正常値として 25 例の健常者の平均値 $\pm 2S.D.$ をとると 1.38–3.10 ng/100 ml となり, 従来の他法による値よりやや高値であった⁹⁾。甲状腺機能亢進症では T₃ toxicosis の症例を除きいずれも高値を示し, 甲状腺機能低下症では全例が低値を示し, よく甲状腺機能状態を反映した。

妊婦では妊娠第 1 期には全例正常値であったが, 2 期, 3 期と進むにつれ低下する傾向がみられた。これは同じ原理のアマレックスキットでも知られている現象である。しかしながら, 平衡透析を行ってその外液の FT₄ を直接測定した Weeke^ら⁹⁾ の成績でも妊娠後期における低下が認められている。したがって, 妊婦の甲状腺機能の判定にあたっては, このような正常域の変化を認識しておく必要がある。

一方, TBG 減少症ではいずれも正常値を示したのに対し, TBG 欠損症の 2 例では異常高値を示した。TBG 低下例で測定値が高値を呈することがあることはすでに吉田^ら¹⁰⁾ も指摘しているが, TBG 濃度との関係はみえていない。著者らの成績から, TBG の濃度の減少は測定値に影響を与えないといえるが, まった

く欠損している場合には FT₄ の結合タンパクとの平衡関係が著しく異なるため異常値となるものと考えられる。同様の傾向は, 軽度ながらアマレックスキットでも認められている⁹⁾。

T₄ と T₃ 摂取率より求めた FT₄I と FT₄ 値の間には TBG 欠損症を除くと良好な正相関が得られた。他のキットによる FT₄ 値との相関も良好であった。

6. ま と め

コーニング社のマグネチック FT₄ RIA キットについて基礎的ならびに臨床的検討を行った。

本法は鉄微粒子に抗体を結合させ, 反応後の結合物を磁石を用いて分離するユニークな手法を用いており, 遠沈操作が不要で簡便かつ迅速に測定できる利点があった。基礎的検討の成績も満足すべきものであった。

健常者の平均値は他キットの値よりやや高値であったが, 臨床例においては甲状腺機能状態をよく反映する測定値が得られた。ただし, 妊娠後期にやや低値, TBG 欠損症で高値となるので, その解釈にあたっては注意を要する。

文 献

- 1) Oppenheimer, J.H. et al.: *J. Clin. Invest.*, **42**, 1769 (1963)
- 2) Ingbar, S.H. et al.: *ibid.*, **44**, 1679 (1965)
- 3) 小西淳二, 他: 核医学, **17**, 963 (1980)
- 4) 池窪勝治, 他: ホと臨, **28**, 1259 (1980)
- 5) 笠木寛治, 他: 核医学, **18**, 973 (1981)
- 6) 小西淳二, 他: 同上, **19**, 115 (1982)
- 7) Pourfarzaneh, M. et al.: *The Ligand Quarterly*, **5**, 41 (1982)
- 8) 小西淳二, 他: ホと臨, **30**, 15 (1982)
- 9) Weeke, J. et al.: *Acta Endocrinol.*, **101**, 531 (1982)
- 10) 吉田克巳, 他: 核医学, **21**, 1661 (1984)