

## 7. ラジオイムノアッセイによる乾燥濾紙血液を用いたサイロキシン結合グロブリン測定法の検討

### Thyroxine binding globulin measurements from filter paper blood specimens.

福士 勝 荒井 修 水嶋 好清  
佐藤 敏雄 林 英夫 高杉 信男

Masaru Fukushi, Osamu Arai, Yoshikiyo Mizushima  
Toshio Sato, Hideo Hayashi and Nobuo Takasugi

#### 要 旨

血清サイロキシン結合グロブリン (Thyroxine binding globulin: TBG) 測定用RIAキットを用いて、測定法に改良を加えた結果、乾燥濾紙血液中の微量TBGの測定を可能とした。

#### はじめに

サイロキシン結合グロブリン (TBG) は甲状腺ホルモン ( $T_4$ ,  $T_3$ ) の特異的な結合蛋白である。血中TBG濃度は性ホルモン、肝疾患、遺伝学的要因等により変動し、 $T_4$ 濃度に影響を及ぼすことから、甲状腺機能を正しく評価するためには $T_4$ ,  $T_3$ と同様にTBGの測定も必要である。

従来TBGの測定は $T_4$ 結合能による間接的な測定法に限られていたが、1971年にLevyら<sup>1)</sup>によりTBGのラジオイムノアッセイ (RIA) が開発され、血中TBGの直接測定が可能となった。

そこで、先天性甲状腺機能低下症 (クレチン症) のマス・スクリーニングで使用している乾燥濾紙血液を用いてTBG-RIAの基礎的検討を行った結果、濾紙血液中の微量TBGの測定が可能であることが確かめられたので報告する。

#### 材 料

##### 1) 試薬の調製

測定に用いた抗TBG血清、 $^{125}\text{I}$ -TBG、ポリエチレングリコール (PEG) 溶液は市販のTBG-RIAキット (リアグノスターTBG, ヘキスト) であり、指示書に従って調製した。抽出液として20%希釈血清を含む0.05Mリン酸緩衝食塩水 (PBS, pH 8.0) を調製した。

##### 2) TBG標準濾紙血液の作製

キット添付の標準TBGを蒸留水0.5mlで溶解し、ヒトO型赤血球浮遊液を加えてヘマトクリット値を55%に調製後、濾紙にスポットしてTBG標準濾紙血液を作製した。

なお血液の一部から血漿を分離して正確なTBG値を測定し、標準TBG濃度とした。

##### 3) 濾紙血液TBGの測定法

- (1) 乾燥濾紙血液を直径3mm 2枚に打ち抜き、PBS 100  $\mu\text{l}$  を分注し、4°Cで一晩放置する。
- (2) 抗TBG血清を100  $\mu\text{l}$  加え、20°Cで1時間インキュベートする。
- (3)  $^{125}\text{I}$ -TBG溶液を100  $\mu\text{l}$  加えて20°Cで2.5時間インキュベートする。
- (4) PEG溶液を0.5ml分注して十分攪拌後、

1250×gで30分遠沈し上清を除去する。

(5) 沈査の放射能をγ-カウンターにより測定する。

なお非特異的結合(NSB)の測定のため0 ng/mlの標準濾紙血液に抗血清の代わりにPBSを100μl加えて同様の操作を行う(図1)。

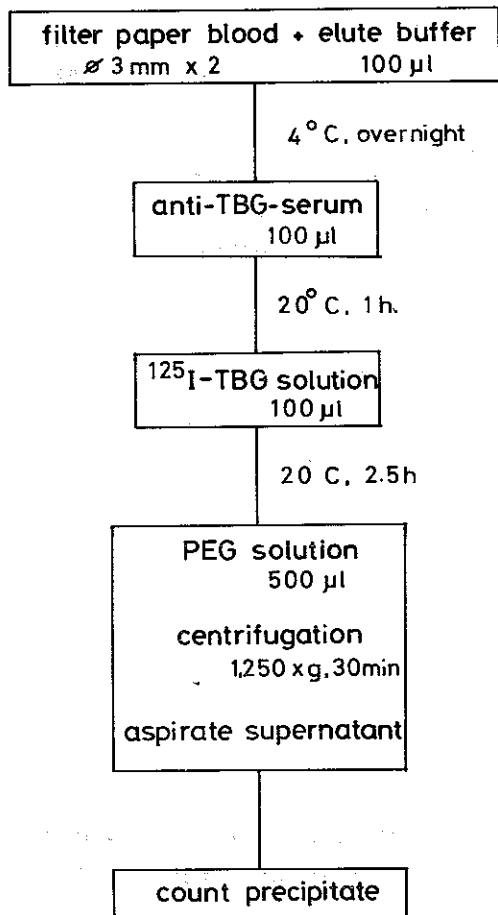


図1 Radioimmunoassay procedure of TBG using filter paper blood

#### 4) 血清 TBG の測定法

血清 TBG の測定はキットの指示書に準じて行った。

#### 5) 濾紙血液 T<sub>4</sub> の測定

濾紙血液 T<sub>4</sub> の測定は現在当所でルーチンに行

っている2抗体法によるRIAにより行った。

## 結 果

### 1) 標準曲線

本法では、第1反応のインキュベート時間を長くするにつれて低濃度域での感度が良くなったが、第2反応のインキュベート時間が2時間以上になると標準曲線に変化がなかった。また、NSBおよび0 μg/mlでの結合率(B<sub>0</sub>/T)はインキュベート時間による影響はなくほぼ一定となり、その値はNSBが約10%、B<sub>0</sub>/Tは60%前後であった。

本法の測定感度は3.6 μg/mlであり、測定可能範囲は3.6~58 μg/mlであった(図2)。

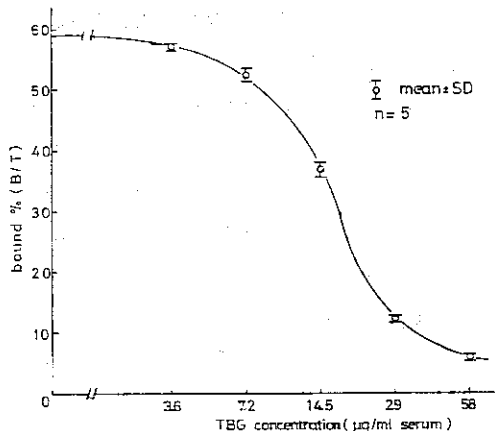


図2 Standard curve of TBG RIA using filter paper blood

### 2) 希釈試験

TBG高濃度の血液をTBGフリー血液により2倍希釈して得られた血液を濾紙にスポットして測定したところ、希釈倍数と実測値との間に原点を通る直線関係が得られた(図3)。

### 3) 測定値の再現性

本法による測定内変動係数は5.9~7.0%、測

定間変動係数は22~18.9%と良好な再現性を示した(表1)。

#### 4) 血清TBG値と濾紙血液TBG値との相関

20例の同一検体について血清TBG値と濾紙血液TBG値を比較したところ、その相関係数は $\gamma = 0.956$ 、回帰式 $Y = 1.24X - 2.39$ となり良好な相関が得られた(図4)。

#### 5) 健常新生児および健常成人のTBG値

健常新生児のTBG値は男児38例で $26.5 \pm 5.59 \mu\text{g/ml}$ 、女児40例で $28.9 \pm 4.97 \mu\text{g/ml}$ となり女児でやや高値を示したが有意差は認められなかった。

一方健常成人のTBG値は男性16例で $25.9 \pm 4.05 \mu\text{g/ml}$ 、女性6例で $36.9 \pm 3.62 \mu\text{g/ml}$ となり、女性で有意に高値を示した( $P < 0.01$ , 図5)。

#### 6) クレチン症, TBG欠損症およびTBG増加症のTBG値

クレチン症児8例のTBG値は $27.1 \pm 4.65 \mu\text{g/ml}$ と、健常新生児とほぼ一致していた。TBG欠損症児16例のTBG値はすべて $3.6 \mu\text{g/ml}$ 以下となり、TBG増加症の2例は $57.0, 49.0 \mu\text{g/ml}$ と異常高値を示した(図5)。

#### 7) 妊婦のTBG値

妊娠第1期から第3期の妊婦各5例のTBG値はそれぞれ $35.0 \pm 3.82, 53.7 \pm 7.29, 57.6 \pm 7.73 \mu\text{g/ml}$ と妊娠週令が進むにつれてTBG値は増加した(図5)。

#### 8) $T_4$ /TBG値(図6)

$T_4 (\mu\text{g/dl}) \times 10 \div \text{TBG} (\mu\text{g/ml})$ の算定式より得られた値を $T_4$ /TBG値とした。

健常新生児78例の $T_4$ /TBG値は $4.1 \pm 0.57$ 、クレチン症児8例では $1.1 \pm 0.61$ となり健常新生児と比較して有意に低値を示し( $P < 0.005$ )、それぞれの分布には重なりあいが認められなかった。

一方健常成人の $T_4$ /TBG値は男性16例で $3.0 \pm 0.44$ 、女性6例で $2.5 \pm 0.31$ と男性で有意に高値を示し( $P < 0.01$ )性差が認められた。

表1 Reproducibility test of TBG RIA using filter paper blood

assays	No.	TBG concentration (mean $\pm$ SD) ( $\mu\text{g/ml}$ )	CV (%)
intra assay			
sample 1	5	$15.9 \pm 0.94$	5.9
2	5	$26.7 \pm 1.65$	6.2
3	5	$37.8 \pm 2.64$	7.0
inter assay			
4	5	$6.5 \pm 1.23$	18.9
5	5	$10.5 \pm 0.71$	6.7
6	5	$25.2 \pm 0.55$	2.2

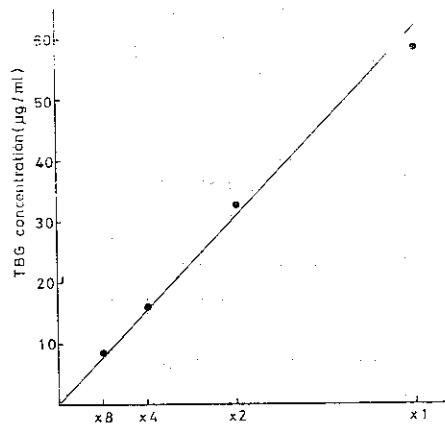


図3 Dilution test of TBG RIA using filter paper blood

また妊婦では妊娠第1期で $3.6 \pm 0.55$ とやや高値を示したが、第2, 第3期では健常成人女子とほぼ一致していた。

#### 考 察

$T_4$ を指標とするクレチン症のマス・スクリーニングでは、クレチン症のみならずTBG欠損症でも $T_4$ 低値となりTBG測定による両者の判別が必要である。また、 $T_4$ /TBG値が甲状腺機能の



cases	T <sub>4</sub> / TBG ratio	n	mean ± SD
	0 1 2 3 4 5 6		
normal newborns male		38	4.12 ± 0.53
normal newborns female		40	4.05 ± 0.62
newborns with hypothyroidism		8	1.13 ± 0.61
newborns with TBG deficiency		16	
newborns with TBG increase		2	4.57
normal adults male		16	3.03 ± 0.44
normal adults female		6	2.50 ± 0.31
pregnancy 1st		5	3.64 ± 0.55
pregnancy 2nd		5	2.56 ± 0.35
pregnancy 3rd		5	2.36 ± 0.30

图 6 T<sub>4</sub>/TBG 比值在健康和各种疾病中

cases	T <sub>4</sub> concentration (μg/ml)	n	mean ± SD
	0 5 10 15 20 25		
normal newborns male		38	11.0 ± 2.85
normal newborns female		40	11.5 ± 2.07
newborns with hypothyroidism		9	3.4 ± 1.89
newborns with TBG deficiency		16	1.8 ± 0.78
newborns with TBG increase		2	24.2
normal adults male		16	7.8 ± 1.50
normal adults female		6	9.1 ± 0.91
pregnancy 1st		5	12.8 ± 2.56
pregnancy 2nd		5	13.7 ± 1.92
pregnancy 3rd		5	13.6 ± 2.66

图 7 T<sub>4</sub> 浓度在健康和各种疾病中

していた。

クレチン症児のTBG値は $271 \pm 47 \mu\text{g}/\text{ml}$ と健常新生児とほぼ一致していたが、TBG欠損症児では $3.6 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以下であったことから、本法により判別が容易にできるものとする。

また、スクリーニングでの $T_4$ 値はクレチン症児と健常新生児との分布の境界が不明瞭であるのに対して(図7)、 $T_4/\text{TBG}$ 値の分布には両者で明確な分離が認められたことから、 $T_4$ を指標とするクレチン症マス・スクリーニングで偽陽性となる例を大巾に減少させることができるものと考えられる。

さらに、乾燥濾紙血液を材料としていることで大量の検体を一度に処理することが可能であり、コストも血清測定約1/2で済むことから、TBG欠損症および増加症の遺伝学的検索にも有用な測定法となるものとする。

#### まとめ

乾燥濾紙血液を用いてTBG-RIAの基礎的検討を行い次の結果を得た。

(1) 乾燥濾紙3mmディスク2枚を用いてTBGのRIAが可能である。

(2) 本法によるTBG値の測定はTBG異常症のスクリーニングに有効である。

(3)  $T_4/\text{TBG}$ 値は甲状腺機能をよく反映しており、クレチン症マス・スクリーニングの指標としても有効である。

#### 文 献

- 1) Levy, R. P., et al.: J. Clin. Endocrinol., 32: 372, 1971
- 2) Burr, W. A., et al.: Brit. Med. J., 19: 485; 1977
- 3) Hesch, R. D., et al.: Clinica Chimica Acta., 70: 33, 1976
- 4) Kagedal, B., et al.: Clin. Chem, 23: 1694, 1977
- 5) Gershengorn, M. C., et al.: J. Clin. Endocrinol. Metab., 42: 907, 1976.
- 6) 小泉 潔, 他: ホと臨床, 27: 407, 1979
- 7) 中谷清美, 他: ホと臨床, 27: 813, 1979
- 8) 仁瓶禮之, 他: ホと臨床, 27: 1083, 1979
- 9) 加藤亮二, 他: ホと臨床, 27: 1209, 1979
- 10) 金尾啓右, 他: ホと臨床, 28: 677, 1980