

EIAによる濾紙遊離型T4 (FT4) 測定法の反応機構

宮井 潔* 芦田信之**

【要約】 血中FT4はアルブミン、グロブリン、TBGなどのサイロキシ(T4)結合タンパク(TBP)に影響されず甲状腺機能をよく反映しているとされ、クレチン症マスキング検査にも利用されようとしているが、FT4測定キット(E社)において、なおTBG減少症で問題があることが指摘された。そこで今回、FT4測定法の反応機構を再検討した。FT4値がTBPに影響される可能性としては、次の3つのことが考えられる。

1. T4タンパクがTBPと僅かながら結合する。
2. 測定系における高倍率希釈によって解離がすすむ。
3. 抗体に抽出されるT4が多くて平衡がずれる。

第1の問題はT4タンパクによってはアルブミンに結合することによって引き起こされることがあるが今回の測定法ではTBPと反応しないことが電気泳動で確かめられているので2.と3.問題について検討した。

【見出し語】 遊離サイロキシ、FT4、クレチン症マスキング、TBG減少症

【方法】 EIAによるFT4の測定：抗T4抗体を固相化したマイクロプレートに血液濾紙から直径3mmのディスクを打ち抜き、βガラクトシダーゼを結合させたT4溶液100μlを添加し、25℃ 3時間反応させる。反応液を除去し洗浄した後、2-nitrophenyl β-D-galactopyranoside溶液を200μl加え25℃、1時間反応させ、405nmの吸光度を測定し、同時に反応させた標準濃度試料から得た検量線から濃度を算出する。

高倍率希釈による平衡状態のシミュレーション：FT4はT4とTBPとの平衡によって決定される濃度である。FT4値が希釈によってどのように変わるか、希釈倍率とFT4値の関係のシミュレーションをおこなった。¹²⁵I T4による反応機構の解析：測定系に使用される抗T4抗体のT4結合量および抗体とT4との結合速度を調べる目的で¹²⁵I T4(1250μCi/μg NEN Research Products)によるトレーサー実験をおこなった。希釈検体によるTBG減少症のモデル実験：血清を生理食塩液で希釈した希釈血清と洗浄した赤血球を混合、再構成してTBG減少症のモデルとして実験をおこなった。

【結果と考察】 T4とTBGの比が一定である血清のFT4値はほぼ同じで、この血清を希釈すると、ある程度の希釈倍数までは希釈によってもFT4値は変化せず一定であるが高倍率希釈をおこなうとFT4値は低下する。このときの低下はT4、TBGがともに低濃度である検体ほどいちじるしい。

* 大阪大学医学部臨床検査診断学 (Laboratory Medicine, Osaka University Medical School)

**大阪大学医療短期大学部 (College of Bio-Medical Technology, Osaka University)

実際測定に用いられている検体量は血清量にして $1.5\mu\text{l}$ であり、抽出の際に希釈される。その希釈倍数は約70倍と高倍率であり、T4、TBGが低濃度である場合は希釈によって問題が生じる可能性がある。次に、抗T4抗体とT4の反応では、 ^{125}I T4を用いてその結合を調べると10分から30分で飽和しており、さらに抗体のT4結合能 (Capacity) は比放射能を考慮すると約15pgT4量となった。これは正常者のFT4量の約1000倍であり正常者の総T4量の5分の1から10分の1量となる。また、T4と酵素標識T4が共存する場合の反応では、T4が60分でほぼ一定となるのに対し、酵素標識T4は3時間でもまだ反応が進行していた。(図) この実験から血清中のT4の結合率から求めた抗体の結合能は19pgT4量となり、さきの ^{125}I T4による測定と同程度であった。実際に抗体に結合したT4量は健康人において総T4の15~20%となり、TBG減少症においては抗体が過剰となるため、反応の初期におけるFT4値に比例した量とならないこと、いわゆるpull outといわれる現象が起こる可能性が示唆された。次に、実際に血液濾紙をもちいた検討をおこなったところ、希釈しない検体は標準濃度試料と同様の反応性を示したが、希釈検体は反応時間と共に低値となった。以上のことから、TBG減少症においても正確なFT4値を得るための測定法の改良の要点は、このpull outをひきおこさないようにするために、反応時間を短くする、抗体量を減らす、競合する酵素標識T4の抗体結合量を増やす、血液濾紙からの抽出の際、高倍率希釈によって平衡がずれないように注意する必要がある。測定法をさらに高感度化するのはFT4の濃度が極低濃度であるため最適化が困難であるが、測定系の構成を最適化することにより軽度なTBG減少症ではほぼ正確なFT4値を得ることができると思われる。

文献

Hata N, Miyai K et al: Clin.Chem. 31.750-753(1985)

Miyai K et al: Method of Enzymatic Analysis 3rd Ed.Vol 9 Proteins and Peptide. 532 (1986)

Abstract

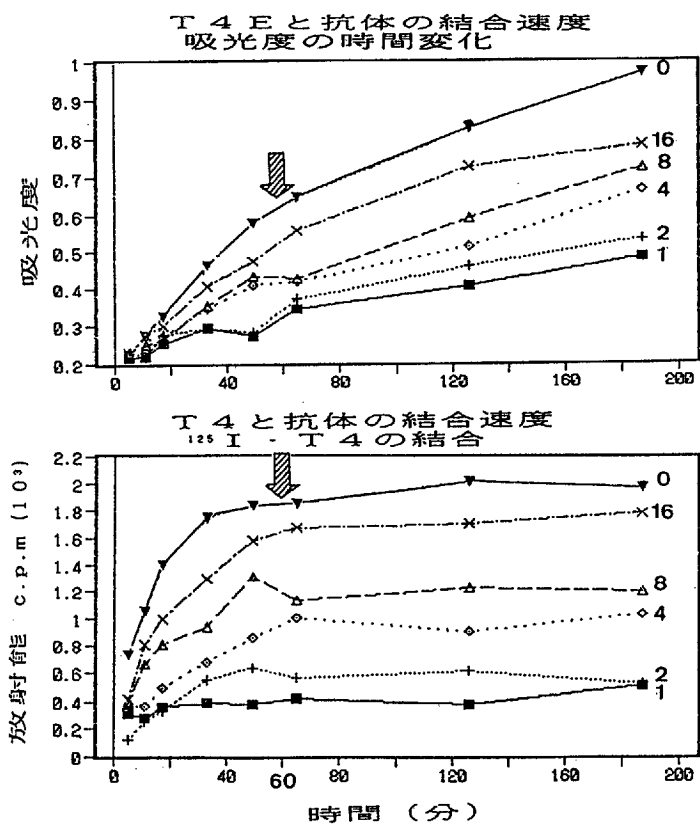
Mechanism of Free Thyroxine Measurement in Dried Spot on Filter Paper

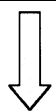
Kiyoshi Miyai Nobuyuki Ashida

Free thyroxine (FT4) in serum is not affected with the concentration of thyroxine (T4) binding protein such as thyroxine binding globulin (TBG) Therefore, measurements of FT4 in dried spot on filter paper are considered to be useful to detect not only primary congenital hypothyroidism but secondary and tertiary congenital hypothyroidism.

However, some laboratories suggest that progressing measurements of FT4 in dried spot on filter paper are still affected with TBG concentration. Samples with normal concentration of FT4 and low TBG show false low concentration of FT4. Mechanisms of measurement for false low FT4 in low TBG are considered as follows.

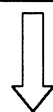
1) Small amount of T4 analog binds to TBP especially serum albumin. 2) Large scale of dilution causes new equilibrium. 3) Large amount of T4 extract from TBG to anti-T4 antibody but low TBG sample doesn't have enough T4 to be extracted. Therefore, we measured the T4 binding capacity of anti-T4 antibody and reaction rate of T4 and enzyme-conjugated T4 to anti-T4 antibody by several methods.





検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



[要約] 血中 FT4 はアルブミン、プレアルブミン、TBG などのサイロキシン(T4)結合タンパク(TBP)に影響されず甲状腺機能をよく反映しているとされ、クレチン症マスキング検査にも利用されようとしているが、FT4 測定キット(E 社)において、なお TBQ 減少症で問題があることが指摘された。そこで今回、FT4 測定法の反応機構を再検討した。FT4 値が TBP に影響される可能性としては、次の 3 つのことが考えられる。

1. T4 アナログが TBP と僅かながら結合する。
2. 測定系における高倍率希釈によって解離がすすむ。
3. 抗体に抽出される T4 が多くて平衡がずれる。

第1の問題はT4アナログによってはアルブミンに結合することによって引き起こされることがあるが今回の測定法ではTBPと反応しないことが電気泳動で確かめられているので2.と3.問題について検討した。