

放射免疫測定법에 의한 血中 遊離 Thyroxine 濃度測定에 對한 基礎的 檢討

大邱保健專門大學 放射線科

李 準 逸

Abstract

Preliminary Studies on the Measurement of the Free Thyroxine in the Serum by the Radioimmunoassay

Joon Il Lee

*Dept. of Radiotechnology, Dae Gu Health Junior College,
Daegu City, Korea*

Preliminary studies on the measurement of the free thyroxine in the serum with Amerlex FT₄ RIA kit were investigated using a tracer as ¹²⁵I-T₄ derivative which is not almost bound to thyroxine binding globulin, etc.

The results are followed:

1. Linearity was tested on standards at various concentrations, and reproducibility and accuracy was excellent.
2. The antibody specificity is also excellent, and standard calibration curve of total T₄ was similar that of adding the TBG inhibitor.
3. Each value of T₄ in serum (the normal group, the hypothyroidism patients the pregnant women and the TBG deficiency patients) was not significant.

As mentioned above, this method is more simple and rapid, compared to the other method.

I. 緒 論

血中 Thyroxine (T₄) 및 Triiodothyronin(T₃)의 대부분은 Thyroxine Binding Globulin(TBG)을 주로 하는 Thyroxine Binding Protein(TBP)에 結合되어 있으므로 정상혈청으로는 全T₄의 0.03%, T₃로는 그의 약 0.2%가 遊離型으로 存在¹⁾하는데 불과하다. 그러나 이 소량의 free T₄(FT₄)

나 free T₃가 실제의 조직에 이용되어 作用을 發現하고 있다고 생각되며, 갑상선의 기능상태를 가장 잘 반영하는 指標로 되어 있다.

지금까지 임상에서는 혈중 총 T₄ 및 총 T₃ 농도의 측정이 널리 행해지고 있으나 이는 임신을 비롯한 각종 질환과 약제의 영향 등에 의하여 TBG량이 변화된 경우에는 그 측정치가 기능상태와 일치하지 않는 단점을 가지고 있다.

FT₄의 측정법으로는 종래에 주로 이용되었던 平衡透析法^{1,2,4)} 외에 限外濾過法⁵⁾이나 gel 濾過法⁶⁾ 등도 있으나 어느 것이든 검사방법이 복잡하여 熟練을 요하므로 일상적인 검사방법으로는 별로 이용되지 못하였다.

이를 대신하여 임상에서는 총 T₄ 농도와 T₃ 섭취율을 이용하여 계산된 遊離 T₄ 指數 (free thyroxine index, FT₄I)^{1,7,8)}을 이용하였다.

근년, 放射免疫測定法 (radioimmunoassay, RIA)에 의해 血中 FT₄를 직접 측정하려는 기대와 노력으로 여러 회사에서 kit가 개발되어 시판되고 있다.

저자는 이미 외국에서 발표된 몇 회사의 kit에 대한 검토문헌⁹⁻¹¹⁾을 접하였으나, 금번 TBG 등의 결합단백에 대부분 결합되지 않는 T₄ 誘導體를 標識 tracer로 사용한 FT₄ 測定法, Amerlex RIA kit (Amersham International 製)를 사용하여 검사를 실시하였기에 그 기초적인 검토결과를 보고하는 바이다.

II. 測定原理 및 測定方法

이 측정법의 특징은, T₄ 결합단백에 거의 결합되지 않으나 항 T₄ 항체에는 T₄와 같은 交叉反應性을 나타내는 ¹²⁵I-T₄ 誘導體를 tracer로 사용하고 있다는 점이다.¹²⁾ 이와같은 標識物質을 이용하면 血中の FT₄와 ¹²⁵I-T₄ 誘導體와의 사이에서 결합 단백질과는 관계없이 항 T₄ 항체에 대해서 통상의 RIA와 같은 競合反應이 이루어 지므로 일단계의 조작으로 신속하게 측정이 행해진다. 또 항 T₄ 항체는 미세입자에 결합(固相化)되어 있으므로 B·F분리는 원심조작에 의해 간단하게 행해진다.

측정방법은 다음과 같으며, 그 개요를 Fig. 1에 나타내었다.

1) 標準血清 또는 被檢血清 100 μl, ¹²⁵I-T₄ 誘導體를 포함한 용액(적색) 500 μl 및 항 T₄ 항체 현탁액(청색) 500 μl를 시험관에 가해 振盪混和하여 37°C로 60분간 incubate 한다.

2) 각 시험관을 실온에서 1,500 g 이상으로 15분간 원심하여 B·F를 분리한다.

3) 상청액을 decantation 한 후 각 시험관의 방사능을 측정한다.

4) 標準血清의 계수를 이용하여 標準曲線을 그린 후 被檢血清의 FT₄치를 구한다.

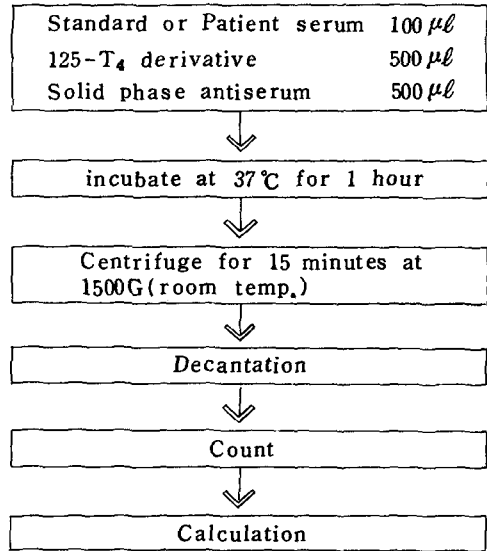


Fig. 1. Assay protocol of Amerlex free T₄ RIA kit

III. 實驗對象 및 實驗項目

본 실험은 核醫學 檢査를 실시한 患者의 血清과 control 血清을 對象으로 하였으며, 肘靜脈에서 채혈하여 가급적 빨리 血清을 분리한 후 -20°C 냉동고에 보관하였다가 測定時에는 室溫에서 測定하였고, 모든 測定은 duplicate로 실시하였다.

그리고 測定方法에 관한 기초적인 검토로서 incubation의 溫度 및 時間, 항체의 特異性 및 測定值의 精度, 再現性을 검토하였다. 또한 TBG 結合阻害劑로써 thimerosal을 첨가했을 때 얻어진 標準曲線과의 비교 및 稀釋測定의 영향에 관한 검토를 실시하였다.

IV. 結 果

1. Incubation 溫度

溫度를 4.25 및 37°C로 변화 시키면서 각각 60분간 incubation을 실시했을 때의 標準曲線의 변화를 Fig. 2에 나타내었다.

¹²⁵I-T₄ 誘導體의 결합율은 溫度가 높아질수록 높아져서 37°C에서 가장 感度가 우수한 標準曲線을 얻을 수 있었다.

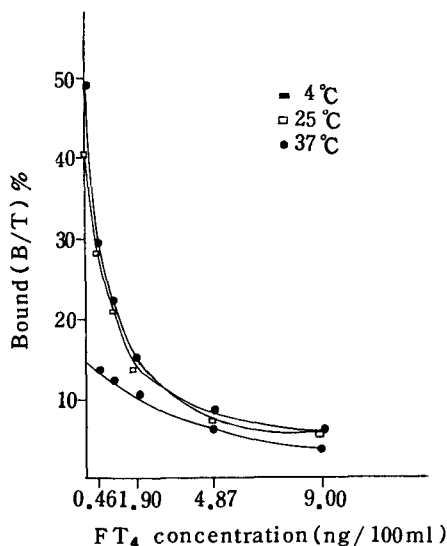


Fig. 2. Effect of incubation temperature on the standard curve

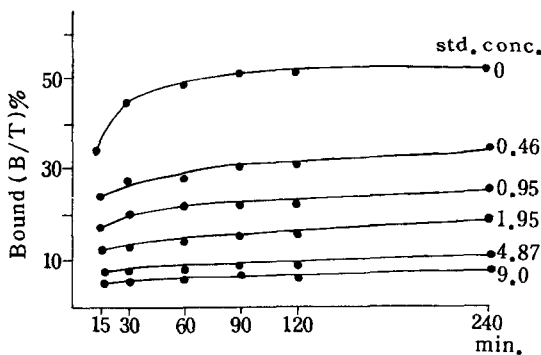


Fig. 3. Effect of incubation time on the binding of $^{125}\text{I-T}_4$ derivative (at 37°C)

2. Incubation 時間

37°C 에서 incubation을 15, 30, 60, 90, 120 및 240分間 실시하여 $^{125}\text{I-T}_4$ 誘導體의 결합율을 비교한 결과 Fig. 3과 같았다. 즉 각 농도의 標準血清을 첨가했을 때의 標識 tracer의 결합은 60~90分에서 거의 plateau에 달하는 것을 알 수 있었다.

3. 抗體의 特異性

사용하고 있는 抗體의 特異성을 검토하기 위해 0.01 M 인산완충액(pH 7.4)으로 T_4 , T_3 , reverse T_3 , MIT 및 DIT 0.1 ng/ml ~ 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 용액을

작성하여 각각 100 μl 씩 測定系에 가해서 $^{125}\text{I-T}_4$ 誘導體의 결합에 미치는 영향을 검토하였다.

特異的結合의 50%에 억제되는 농도로부터 계산한 T_3 및 r T_3 와의 交叉反應은 각각 2.2%, 9.9%였으나, MIT 및 DIT에는 전혀 결합의 억제가 인정되지 않았다.

4. 精度 및 再現性

FT_4 농도가 low, normal 및 high levels의 control 血清을 사용하여 동일측정내 및 다른 측정으로 각각 10회 반복측정을 실시한 결과는 Table 1에 나타낸 것과 같다.

동일 측정내에서의 變動係數는 4.0~12.5%였고, 다른 측정에서의 變動係數는 3.9~16.2%였다.

Table 1. Precision and reproducibility of the assay

Sample No.	Intra-assay (N=10)			Inter-assay (N=10)		
	1	2	3	1	2	3
Mean	0.12	1.01	2.70	0.13	1.03	2.53
S.D	0.02	0.04	0.11	0.02	0.04	0.25
C.V.(%)	12.5	0.4	4.1	16.2	3.9	9.9

5. TBG 結合阻害劑 添加時의 標準曲線과의 比較

이 측정법에 있어서 抗 T_4 抗體와 반응하여 $^{125}\text{I-T}_4$ 誘導體의 항체결합을 저해하고 있는 T_4 가 참으로 FT_4 를 반영하느냐의 여부를 검토하기 위해, 동시에 TBG 結合 阻害劑 존재하에서의 標準曲線을 그려서 FT_4 의 標準曲線과 비교검토 하였다.

즉 FT_4 의 각 표준혈청을 이용하여 통상의 標準曲線을 얻음과 동시에 이들의 표준혈청을 최종농도 0.02의 thimerosal 존재하에 $^{125}\text{I-T}_4$ 誘導體 및 抗體와 반응시켜, 같은 조건하에서 total T_4 의 標準曲線을 구하였다(각 표준혈청의 total T_4 농도는 DAIN-ABOT 회사의 T_4 RIA kit II를 사용하여 측정하였다). 그리고 thimerosal 添加群에서는 total T_4 1.8 $\mu\text{g}/100\text{ml}$ 의 표준혈청(FT_4 0.20 ng/100ml)을 다시 T_4 free혈청으로 2배 희석한 0.9 $\mu\text{g}/100\text{ml}$ 의 試料를 添加하는 한편 22.1 $\mu\text{g}/100\text{ml}$ 이상의 2 표준혈청은 생략하였다. 이와같이하여 얻은 두 가지의 標準曲線은 Fig. 4에 나타낸 것과 같다. 동일

Table 2. A comparison between standard curves obtained in the absence or presence of thimerosal (cf. Fig. 4)

B/T (%)	Free T ₄ (ng/100mℓ)	Total T ₄ (μg/100mℓ)	Free T ₄ / Free T ₄ (X 10 ⁻⁴)
35	0.22	1.21	1.82
30	0.36	1.95	1.85
25	0.53	3.10	1.71
20	0.80	5.00	1.60
15	1.45	7.70	1.88

mean 1.77

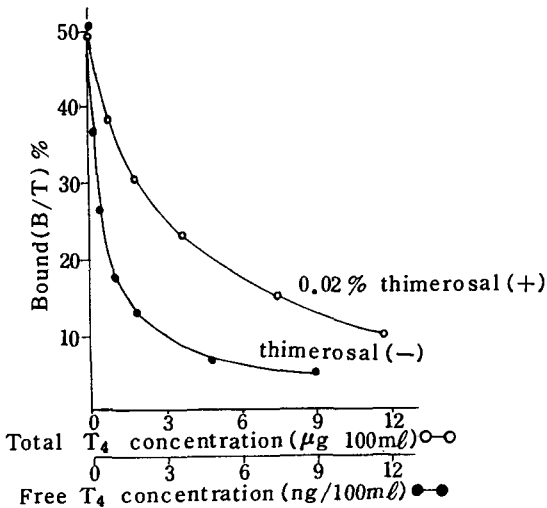


Fig. 4. A comparison of standard curves obtained in the absence or the presence of thimerosal

B/T(%)에 대한 두 곡선의 T₄ 값(FT₄ 값 및 total T₄ 값)를 비교하면 Table 2에 나타낸 것과 같으며, 兩者の比는 1.60~1.88 × 10⁻⁴의 범위로서 거의 일정한 비율이었다. 이는 兩標準曲線이 平行해 있다는 것을 나타내고 있다.

6. 血清稀釋이 測定値에 미치는 影響

건강 정상인, 甲狀腺 機能低下症, 甲狀腺 機能亢進症, 妊婦 및 TBG 減少症 各 1例의 血清을 0.45% bovine serum albumin(BSA)을 포함한 0.05 M 인산완충액(pH 7.4)으로 1~20배까지 희석하여 측정된 결과를 Fig. 5에 나타내었다.

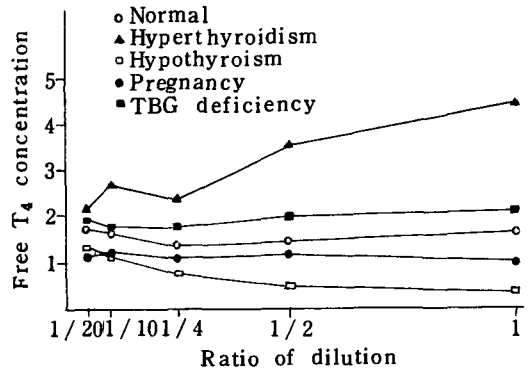


Fig. 5. Effect of dilution of sera on free T₄ values measured by Amerlex free T₄ RIA kit

건강 정상인, 甲狀腺 機能低下症, 妊婦 및 TBG 減少症에서는 2倍稀釋까지 대부분 측정치에 변화가 인정되지 않았다.

그러나 甲狀腺 機能亢進症에서는 稀釋에 의한 측정치의 저하가 인정 되었다.

4倍稀釋에서는 甲狀腺 機能亢進症의 測定値 低下는 더욱 현저하였고, TBG 減少症과 건강 정상인의 측정치도 저하를 나타내었다. 그러나 甲狀腺 機能低下症에서는 증가 경향을 나타내었다.

V. 考 察

RIA를 이용하여 FT₄를 측정하고자 하기 이전부터 平衡透析을 행하여 그 外液中の T₄를 측정하는 방법^{13,14}이 검토되었으나 平衡透析의 手技가 복잡하기 때문에 多數檢體의 處理에 부적합 하므로 일상검사로 는 이용되지 않았다.

이 FT₄測定에 대하여 近年 RIA에 의한 直接的인 測定法이 연이어 開發되어 그 평가가 향상 되어지고 있다.

FT₄는 血中에서 결합단백과 一定한 平衡關係에 있으므로 FT₄의 測定에 있어서는 그 平衡의 혼란을 最少限으로 하여, FT₄를 抗體와 ¹²⁵I-T₄와의 競合反應을 어떻게 시키느냐가 問題이다. 또 標識T₄와 T₄ 결합단백과의 직접적인 접촉을 방지하는 努力도 必要하다.

금번에 檢討한 Amerlex FT₄ RIA kit에 사용되어 있는 ¹²⁵I-T₄ 誘導體는 TBG 및 TBPA에 대

한 결합의 세기가 T_4 에 비해 각각 3.4% 및 2.6%¹⁰⁾로, 거의 有意味한 결합을 나타내고 있지 않다. 그러므로 직접 tracer와 血清을 混合하여 抗體와 FT_4 의 反應이 가능하므로 操作은 一段階로, 反應時間도 단축되어 지금까지의 方法 중 가장 간편하고 신속한 測定法으로 採用된다.

本 kit의 基礎的인 檢討 중 incubation 溫度에 있어서는 37°C로 130%가 最大로 되어 가장 感度가 우수한 標準曲線이 얻어졌으며, 37°C로의 測定은 生理的인 조건에도 근사하므로 바람직 하다고 採用된다. 37°C로 incubation을 行할 때, 各 標準血清에서의 bound %는 60~90分에서 거의 plateau에 달하였다. 그러므로 kit에 規定된 37°C, 60分의 incubation條件은 實用上 적합하다고 판단되어 以下 이 條件으로 檢討를 進行하였다.

使用되고 있는 抗 T_4 抗體의 特異性에 대해서는 T_4 와의 사이에 2.2%, rT_3 와의 사이에 9.9%의 交叉反應을 나타내었으나, 이들 遊離型의 血中濃度는 각각 FT_4 농도의 13% 및 3%정도였으므로¹¹⁾ 임상 측정에 있어서는 문제가 되지 않는다고 판단된다.

測定の 精度, 再現性은 한 血清(No. 1)에서 약간 불량하였으나 이는 測定値가 극히 낮은 값이었기 때문으로 생각되며, 다른 血清에서는 모두 만족스러운 結果였다.

FT_4 測定시와 같은 條件으로 TBG 結合阻害劑(thimerosal)를 가해서 total T_4 의 標準曲線을 作成하여, FT_4 의 標準曲線과 비교한 결과, 두 곡선은 잘 平行하고 있는 것을 알 수 있었다. 이는 이 測定系에 있어서 FT_4 濃도에 比例한 T_4 가 실제항체에 결합하여 標準曲線이 얻어진 것으로 판단된다.

試料血清의 希釋測定 성적에는 건강 정상자, 甲狀腺機能低下症, 妊婦 및 TBG 減少症의 血清을 각각 2倍 希釋하여도 거의 같은 FT_4 測定値를 얻을 수 있었다.

T_4 와 TBG의 반응은 質量作用의 法則에 기인하고 있으므로

$$T_4 + TBG \rightleftharpoons T_4 \cdot TBG$$

$$\frac{(T_4 \cdot TBG)}{(T_4)(TBG)} = K \text{의 관계에 있다.}$$

여기에서 $(T_4 \cdot TBG)$ 는 TBG結合 T_4 濃度, (T_4) 는 遊離 T_4 濃度, (TBG) 는 遊離 TBG濃度를 나타내며, K는 平衡定數이다.

이 식에서

$$(T_4) = \frac{(T_4 \cdot TBG)}{K \cdot (TBG)} \text{로 나타난다.}$$

지금 血清을 2倍 希釋하면 $T_4 \cdot TBG$ 의 解離가 약간 생겨 새로운 平衡狀態에 달하지만 본래 遊離 T_4 의 結合型 T_4 에 대한 比率는 0.02% 전후로 현저하게 적다. 따라서 새로운 平衡에 달할 때의 遊離 T_4 의 比率에 약간 증가가 보여도, 遊離에 비해서 大量으로 존재하는 結合型 T_4 와 遊離TBG의 濃度에는 인정할 정도의 변화를 주지는 않는다. 즉 $[T_4 \cdot TBG]$ 및 $[TBG]$ 는 각각 처음의 1/2이 된다고 생각할 수 있으며, 앞의 식보다 $[T_4]$ 는 不變의 상태이다.

따라서 금번의 成績은 본 方法에 의해 質量作用의 法則에 따른 FT_4 의 測定이 行해지고 있음을 나타내고 있다. 그러나 希釋이 어느정도 이상으로 高度가 되면 解離의 측정은 무시할 수 없게되어 상대적으로 $[T_4 \cdot TBG]$ 보다 $[TBG]$ 가 크게되며 $[T_4]$ 가 低下되게 된다.

특히 $[T_4 \cdot TBG]$ 에 비해 $[TBG]$ 가 적은 甲狀腺機能亢進症에서는 輕度의 希釋으로도 $[T_4]$ 의 低下가 발생하는 것은 본 kit에 의한 測定成績으로도 증명되었다. 보다 高度로 希釋한 경우에는 測定値가 1~2 ng/100ml 전후에 수렴되어 가는 경향이 인정되었다. 이것은 上述한 이론과 일치하지 않는 결과이지만 이 kit에 사용되고 있는 $^{125}I-T_4$ 誘導體가 약해지면서 albumin에 結合하므로 인한 artifact로 생각된다. 즉 희석도의 증가와 함께 希釋에 사용된 bovine serum albumin(BSA)이 試料 중의 단백질의 대부분을 접하므로 그 $^{125}I-T_4$ 誘導體 結合이 크게된 결과로 해석 된다.

특히 이 kit의 경우 血清希釋을 완충액만으로 행하면 단백질농도의 감소가 測定에 영향을 미치기 때문에 FT_4 測定値는 현저한 低下를 나타내므로 평가에 적합한 결과를 얻지 못하는 점에 注意할 必要가 있다고 採用된다.

VI. 結 論

TBG 등의 결합단백에 거의 結合되지 않는 $^{125}I-T_4$ 誘導體를 tracer로 사용하여 FT_4 의 測定을 행한 Amerlex FT_4 RIA kit에 대한 基礎的檢討를 실시하여 다음과 같은 成績을 얻었다.

1) 규정된 37°C, 60분간 incubation으로 양호한 標準曲線이 얻어졌으며, 測定の 精度, 再現性도 만

족할만 하였다.

2) 抗體의 特異性은 양호하였다. 標準曲線은 TBG 結合阻害劑를 添加하여 얻은 total T₄의 標準曲線과 平行되어 있었다.

3) 건강 정상자, 甲狀腺 機能低下症, 妊婦 및 TBG 減少症환자의 血清을 2倍 稀釋한 결과, 거의 같은 측정치가 얻어졌다.

이상과 같이, 이 방법은 종래에 이용되던 방법에 비해서 간편하며, 신속한 FT₄測定法으로써 臨床적으로 有用한 測定法이라 생각된다.

참 고 문 헌

1. 이준일 : 핵의학 기술학, 대학서림, p. 436~438, 1986.
2. Oppenheimer JH, Squief R, Surks MI, et al: Binding of thyroxine by serum proteins evaluated by equilibrium dialysis and electrophoretic techniques. Alteration in non-thyroidal illness. J Clin Invest 42: 1769-1782, 1963
3. Ingbar SH, Bbraverman LE, Dawber NA, et al: A new method for measuring the free thyroid hormone in human serum and an analysis of the factors that influence its concentration. J Clin Invest 44: 1679-1689, 1965
4. Sterling K, Brenner MA: Free thyroxine in human serum: Simplified measurement with the acid of magnesium precipitation. J Clin Invest 45: 153-163, 1966
5. Schussler GC, Plager JE: Effect of preliminary purification of ¹³¹I-thyroxine on the determination of free thyroxine in serum. J Clin Endocrinol Metab 27: 242-250, 1967
6. Lee ND, Henry RJ, Golub OJ: Determination of the free thyroxine content of serum. J Clin Endocrinol Metab 24: 486-495, 1964
7. Hamada S, Nakagawa T, Mori T, et al: Re-evaluation of thyroxine binding and free thyroxine in human serum by paper electrophoresis and equilibrium dialysis, and a new free thyroxine index. J Clin Endocrinol Metab 31: 166-179, 1970
8. Clark F, Horn DB: Assessment of thyroid function by the combined use of the serum proteinbound iodine and resin uptake of ¹³¹I-triiodothyronine. J Clin Endocrinol Metab 25: 39-45, 1965
9. 笠木寛治, 小西淳二, 高坂唯子 外: 透析膜マイクロカプセルを用いた血中遊離サイロキシン濃度測定法について. 核醫學, 18:973-983, 1981.
10. 池窪勝治, 高坂唯子, 飯田泰啓 外: Free T₄ RIA kit(Corning)による血中遊離サイロキシン濃度の測定について. ホルモンと臨床 28:1259-1264, 1980.
11. 小西淳二, 高坂唯子, 飯田泰啓 外: 固相法 radioimmunoassay kit 「Gammacoat FT₄」による遊離サイロキシン測定の基礎的検討と臨床應用. 核醫學 17: 963-970, 1980.
12. Midgley JEM, Wilkins TA: Hypothyroidism in patients on fencolofenac. Lancet ii: 704-705, 1980
13. Jiang N, Tue KA: Determination of free thyroxine in serum by radioimmunoassay. Clin Chem 23: 1679-1683, 1977
14. Yeo PPB, Lewis M, Eevered DC: Radioimmunoassay of free thyroid hormone concentrations in the investigation of thyroid disease. Clin Endocr 6: 159-165, 1977
15. Whitworth AS, Robbins CM, Wwilkins TA: Estimation of T₄-X binding strength to TBG and prealbumin relative to that of T₄. Amerlex Free T₄ RIA Kit 資料, The Radiochemical Center, 1981
16. Chopra IJ, Chopra V, Smith SR, et al: Reciprocal changes in serum concentrations of 3, 3', 5'-triiodothyronine(reverse T₃) and 3, 3', 5-triiodothyronine (T₃) in systemic illnesses. J Clin Endocrinol Metab 41: 1043-1049, 1975