

時間分解蛍光測定法による 濾紙血液 FT4 測定 の 検 討

水 嶋 好 清 扇 谷 陽 子 荒 井 修 福 士 勝
清 水 良 夫 菊 地 由 生 子

要 旨

先天性甲状腺機能低下症マススクリーニングにおける遊離型甲状腺ホルモン (FT4) の測定を時間分解蛍光測定法により可能かどうか検討を行った。本法はラジオアイソトープを用いず、迅速に再現性よく測定でき、従来の RIA 法ともよい相関を示した。また、各種疾患における FT4 値は良好な測定値となったが、RIA, ELISA などの他の測定系と同様に TBG 欠損症において低値を示した。

1. 緒 言

札幌市では昭和 53 年から先天性甲状腺機能低下症のマススクリーニングを甲状腺刺激ホルモン (TSH) の測定により開始し、その後トータルサイロキシン (TT4) および遊離型サイロキシン (FT4) も指標として取り入れ実施している¹⁾。

全国的には、TSH 単独の検査で実施されているが、視床下部性、下垂体性甲状腺機能低下症、TSH 上昇遅延型の原発性甲状腺機能低下症²⁾、母親の甲状腺機能異常に起因する一過性低 T4 血症³⁾などは TT4 や FT4 の測定によらなければ発見できない。

スクリーニングの検査法は放射性免疫測定法 (RIA) による TSH, FT4 の測定によって実施してきたが、昭和 63 年には TSH を RIA 法⁴⁾ から酵素免疫測定法 (ELISA)⁵⁾ にかえ実施している。FT4 については ELISA 法が開発されているが⁶⁾、FT4 の ELISA 法においては甲状腺ホルモン結合グロブリン (TBG) による影響が大きく、TBG 欠損症、TBG 減少症において偽陽性となることが知られている。時間分解蛍光免疫測定法 (TR-FIA) による血清用のキットが入手可能となったことから、濾紙血液による測定法の検討と、スクリーニングへ応用可能かどうか検討したので報告する。

2. 方 法

使用したキットは血清用の「デルフィア Free T4」(ファルマシア製)で、ユーロピウム標識による時間分解蛍光免疫測定法を原理としている。

試薬の組成は 1 キット 96 テスト用で、ユーロピウム

標識 T4, T4 抗体, 第二抗体ストリップウエル, 緩衝液 (トレーサー用; 淡黄色), 緩衝液 (T4 抗体用; 赤色), 増強試薬, 洗浄試薬, FT4 標準品よりなる。

測定は第二抗体固相マイクロプレートに 1 回専用の洗浄器で洗浄し、3 mm ディスク 1 枚をウエルに入れ、200 μ l の T4 抗体溶液を各ウエルに加え、25 $^{\circ}$ C, 1 時間振とうインキュベートさせる。内容の濾紙血液を吸引除去し、洗浄器で 6 回洗浄する。次に、200 μ l のトレーサー溶液を加え、4 $^{\circ}$ C, 20 分間静置インキュベートし、洗浄器で 6 回洗浄する。増強試薬 200 μ l を加えて 25 $^{\circ}$ C 5 分振とうし、時間分解蛍光測定装置 (1230 ARCUS Fluorometer) で測定する。

試薬の調製は血清測定用と同様に調製する。濾紙血液スタンダードは洗浄赤血球と標準 FT4 を等量混合し、濾紙に滴下して作製した。

FT4 の測定は RIA 法⁷⁾、ELISA 法⁸⁾ により、TSH の測定は ELISA 法⁹⁾ により、TBG 測定は RIA 法¹⁰⁾ により、抗マイクロゾーム抗体 (MCHA) の測定は凝集法¹¹⁾ により行った。

3. 結 果

血清測定での第一反応は 1 時間であり、1 時間 30 分以上インキュベーションしてはいけないこと、第二反応は 4 $^{\circ}$ C で行わなければならないことなど条件に制約があることから、血清の代わりに濾紙血液を用いること以外はすべて同一条件で行うこととした。

この条件で行った検量線は良好で、検出感度は 0.1 ng/dl であった (図 1)。また、Precision Profile は 0.5~3.0ng/dl で 20% 以下となった。

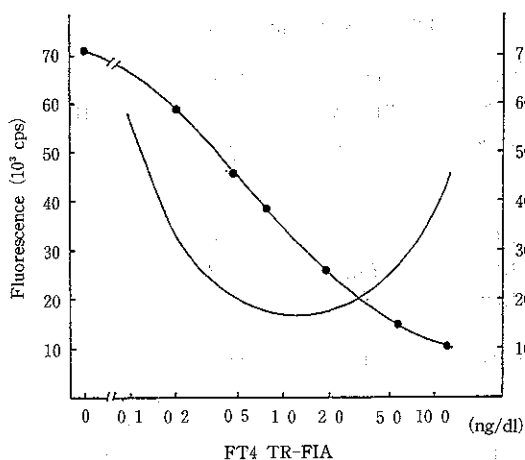


図1 濾紙血液によるFT4 TR-FIAの標準曲線とprecision profile

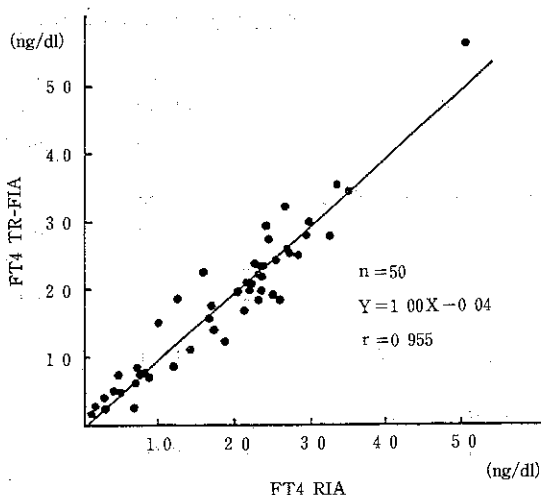


図2 濾紙血液によるFT4 RIAとFT4 TR-FIAとの相関

表1 TR-FIAによる濾紙血液FT4の再現性

	TR-FIA FT4 (ng/dl)					
	アッセイ内変動 (n=6)			アッセイ間変動 (n=4)		
	mean	± SD	CV%	mean	± SD	CV%
C-1	0.23	± 0.07	29.1	0.24	± 0.03	14.2
C-2	0.87	± 0.12	14.1	0.86	± 0.11	12.8
C-3	3.89	± 0.50	12.7	3.70	± 0.44	11.7

測定系の安定性を検討するため、3種類の検体について6回実施した測定内変動は12.7~29.1%、4回実施した測定間変動は11.7~14.2%となり、RIA法よりやや変動は大きい許容される再現性を示した(表1)。

現在使用しているFT4-RIA⁷⁾と本法で50例について相関をとったところ、 $Y=1.00X-0.04$, $r=0.955$ となり、良好な相関を示した(図2)。

甲状腺機能低下症、二次性甲状腺機能低下症、一過性低T4血症、TBG欠損症、TBG減少症の各種疾患における生後4~7日の新生児濾紙血液について、各種測定法によるFT4値、およびTSH値、TBG値を測定した(表2)。甲状腺機能低下症、二次性甲状腺機能低下症、一過性低T4血症においては、RIA法とよく一致した測定値が得られた。

ELISA法FT4測定で低値で見つけられたTBG欠損症において、RIA法は8例中4例は正常範囲内の値を示し、4例は低値となったが、TR-FIA法では7例

が低値となった。RIA法よりもTBG低下による影響が認められ、FT4測定値が低値となったが、ELISA法ではよりFT4値が低値を示した。TBG減少症のうちELISA法で低値であった例は、RIA、TR-FIA法では正常範囲の値を示した。

4. 考 察

先天性甲状腺機能低下症のマススクリーニングのための検査法として、TSH、FT4の併用によって実施することは、精度の向上と確実な検査が可能となる。TSHの検査がELISAにより測定可能となり、放射性同位元素使用施設をもたないスクリーニングセンターでも先天性甲状腺機能低下症のマススクリーニングが可能となった。精度の高い検査システムを行うため、TBGの影響の少ない非放射性の検査によるFT4測定法の開発が期待されている。

今回市販の血清用のキットによる濾紙血液を用いたTR-FIAによる簡便な測定法について検討したところ、本法は従来のRIAとの相関も良好であり、各種疾患においてもRIA法と同等な結果となった。今回検討したTBG欠損症、減少症はELISA法によってFT4低値を示した検体についてRIA、TR-FIA法で測定したが、TR-FIA法でFT4低値となり他法で正常値となる可能性はあるが、測定値を比較すると、TR-FIA法よりはRIA法で高値、ELISA法で低値の傾向が認められた。いずれにしてもTBGの影響を受け、TBG

表 2 各種疾患における生後4~7日の新生児のFT4, TSH, TBG, MCHA値

疾 患		FT4	FT4	FT4	TSH	TBG	MCHA
		TR-FIA (ng/dℓ)	RIA (ng/dℓ)	ELISA (ng/dℓ)	ELISA (μ U/ml)	RIA (μ g/ml)	
原発性甲状腺機能低下症	1	0.26	0.18	0.20	334.0	12.4	—
	2	0.16	0.11	0.07	5.6	18.6	—
	3	1.50	0.99	0.69	23.4	17.2	—
	4	1.58	1.67	2.30	19.7	18.0	—
二次性甲状腺機能低下症	1	0.74	0.75	0.44	1.6	23.0	—
一過性低T4血症 (母親バセドウ病) (低出生体重児)	1	0.50	0.41	0.48	2.6	28.3	3200
	2	0.23	0.31	0.25	3.9	15.6	3200
	1	0.74	0.46	0.77	1.6	27.4	—
	2	0.83	0.72	0.78	2.2	15.8	—
	3	0.46	0.50	0.44	3.1	20.1	—
	4	0.40	0.29	0.42	0.8	19.7	200
	5	0.61	0.71	0.50	2.3	15.7	—
	1	1.18	1.46	0.55	5.1	<1	—
	2	0.80	1.61	0.20	1.3	<1	—
	3	0.55	1.39	0.34	1.4	<1	—
4	0.74	1.38	0.28	2.1	<1	—	
5	0.45	0.96	0.08	6.9	<1	—	
6	0.56	0.76	0.06	1.6	<1	—	
7	0.39	0.53	0.22	2.4	<1	—	
8	0.45	0.53	0.10	2.2	<1	—	
TBG減少症	1	1.28	1.47	0.83	1.0	8.5	—
	2	3.28	2.17	0.78	2.8	7.5	—
	3	3.32	2.22	1.77	2.8	9.6	—
	4	1.47	1.34	0.50	3.8	10.7	—
正常新生児	(n=100)	2.28 \pm 0.56	2.16 \pm 0.43	1.92 \pm 0.57	2.8 \pm 2.6	21.6 \pm 4.0	— (<100)

欠損症においては FT4 低値となった。

本法は非放射性であるため特殊な施設を必要せず、かつ安全で、TR-FIA による濾紙血液用の TSH キットも市販品であるため同一の測定器で実施可能であり、RIA 法に変えて実施可能であった。

今後は、濾紙血液を用いる FT4 の測定で、より TBG の影響の少ない測定方法の開発が期待される。

5. 結 語

先天性甲状腺機能低下症のマススクリーニングは

TSH 単独よりは FT4 との併用が望ましいため、両者の測定を、ラジオアイソープを用いない検査法として、濾紙血液 FT4 の TR-FIA 法を検討した。FT4 の TR-FIA 法は、迅速性再現性は良好で、従来の RIA 法ともよい相関を示しており、また、各種疾患における FT4 値もよく一致し、RIA 法に変えて実施可能であった。

6. 文 献

1) 水嶋好清, 他: 札幌市衛研所報, 16, 51-58, 1989.

- 2) Dussault, J. H. and Morissette, J.: Neonatal Screening, ed by Naruse, H and Irie, M. p56-62, Excerpta Medica, (Amsterdam), 1983.
- 3) 由利賢次, 他: ホルモンと臨床, 36, 671-675, 1988.
- 4) 水嶋好清, 他: ホルモンと臨床, 30, 461-465, 1982.
- 5) 福士勝, 他: ホルモンと臨床, 37, 337-340, 1989.
- 6) 扇谷陽子, 他: 札幌市衛研所報, 17, 92-96, 1990.
- 7) 福士勝, 他: 日本小児科学会誌, 91, 5-11, 1987.
- 8) 福士勝, 他: 医学と薬学, 9, 243-246, 1983.
- 9) 水嶋好清, 他: ホルモンと臨床, 35, 589-594, 1987.

Time-Resolved Fluorometric Immunoassay of Free Thyroxine Using Dried Blood Sample

Yoshikiyo Mizushima, Yoko Ogiya, Osamu Arai
Masaru Fukushi, Yoshio Shimizu and
Yuko Kikuchi

ABSTRACT

We examined that measurements of free thyroxine (FT4) in dried blood samples by time-resolved fluorometric immunoassay (TR-FIA) for congenital hypothyroidism screening. This method was non-isotopic, rapid and precise assay. And FT4 values with this method were good correlation between those with radioimmunoassay (RIA) method. The infants of each thyroid diseases could have good FT4 values, but TBG deficiencies were low levels both FT4 values by this method and those by RIA and ELISA methods.