

1. 固相法 TSH RIA によるクレチン症 マス・スクリーニングの検討*

福士 勝 荒井 修 岸 信夫 佐藤 敏雄
林 英夫 高杉 信男 松浦 信夫

(医学のあゆみ Vol 109, No 1 に掲載)

はじめに

クレチン症は先天性の甲状腺欠損、位置異常、合成障害などに伴う甲状腺機能低下症であり、放置すると特有の身体障害と非可逆的な知能低下をきたすが、新生児期の早期発見、早期治療により、ほとんど正常人と変わらない発育が期待される。

Klein¹⁾は、生後3カ月以内に治療を開始すれば、その78%はIQ85以上に保つことが可能であると報告している。

本症の発生頻度は入江²⁾によると約1/6,000と報告されている。一方、現在行われている先天性代謝異常スクリーニングは5種目合わせて約1/10,000であり³⁾、これに比較するとクレチン症はかなり高頻度である。

クレチン症のほとんどは臨床症状による早期発見が困難であるため、新生児の血中ホルモンの測定により早期に発見しようとする試みがなされてきた。そのスクリーニングには甲状腺ホルモン(T₄)^{4, 5)} または甲状腺刺激ホルモン(TSH)⁶⁻¹⁰⁾の測定が行われ、検体としては臍帯血⁶⁾および新生児乾燥濾紙血液^{4, 5, 7, 8, 10)}が用いられている。

わが国でのマス・スクリーニングは入江^{2, 8)}

により乾燥濾紙血液 TSH 測定法が、また宮井^{10, 11)}によりその paired assay が開発されたことから、TSH 測定法が主流となっている。

しかし、乾燥濾紙血液の使用量、測定手技、および迅速性の点でマス・スクリーニングとしてはなお改善すべき余地があると考え、固相法 TSH-RIA キット(ファデバス TSH テスト)による乾燥濾紙血液 TSH の測定を試みた。今回、シオノギ製薬から「ファデバス TSH テスト」の提供をうけ、その測定法の基礎的検討とマス・スクリーニングへの実用性について検討を行ったので報告する。

方 法

ファデバス TSH テストと高濃度標準 TSH (200 μU/ml ファルマシア社製)を使用した。

1) 試薬の調製

稀釈液：稀釈剤を蒸留水 6 ml で溶解する。

緩衝液：緩衝剤を蒸留水 50 ml で溶解し、ツイン溶液 5 ml と稀釈液 4 ml を加え、全量 59 ml, pH 7.4 とする。

TSH 抗体結合セファデックス溶液：TSH 抗体結合セファデックスを緩衝液 10 ml で溶解し、

* Studies on mass-screening for congenital hypothyroidism by solid phase TSH radioimmunoassay

Fukushi, Masaru; Arai, Osamu; Kishi, Nobuo; Sato, Tosio; Hayashi, Hideo & Takasugi, Nobuo; Sapporo City Institute of Public Health 札幌市衛生研究所
Matura, Nobuo; Department of Pediatrics, School of Medicine, Hokkaido University 北海道大学医学部小児科学教室

1. $500 \times g$ で 5 分間遠沈後上清を除去する。沈澱物を緩衝液 4 ml で溶解し、使用時マグネットスターラーで懸濁状態に保つ。

ヨウ化 (^{125}I) TSH 溶液：ヨウ化 (^{125}I) TSH を蒸留水 5.5 ml で溶解する。

標準 TSH 濾紙血液：標準 TSH ($200 \mu\text{U}/\text{ml}$) に甲状腺機能亢進症および正常人の EDTA-2Na 加血液 ($1\text{mg}/\text{ml}$) を加え、2 倍希釈により 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 および $0 \mu\text{U}/\text{ml}$ の標準 TSH 血液をつくり、代謝異常のスクリーニング用の濾紙に $50 \mu\text{l}$ ずつスポットし、乾燥後 -20°C で保存した。ただし、正常人の血液を用いる場合はあらかじめその TSH 値を測定し、標準 TSH 値を補正した。

2) 測定材料

測定法の検討のため、甲状腺機能低下症、甲状腺機能亢進症および正常人の血液を採取し、ヘマトクリット値を測定後、一部を濾紙にスポットし、残りを血漿として分離しそれぞれ -20°C で保存した。マス・スクリーニングに用いた新生児乾燥濾紙血液は札幌市内の医療機関から先天性代謝異常スクリーニングのため送付されたものであり、採血は生後 5~7 日目に行われたものである。

3) 測定法

① 各試験管に標準 TSH 濾紙血液および被験濾紙血液を直径 4.25mm ($3\text{mm} \times 2$) にパンチアウトする。

② 各試験管に TSH 抗体結合セファデックス溶液を $50 \mu\text{l}$ ずつ分注する。

③ 室温で 4 時間横振しながらインキュベートする。

④ 各試験管にヨウ化 (^{125}I) TSH 溶液を $100 \mu\text{l}$ ずつ分注する。同時に空の試験管に total activity 用として同量分注する。

⑤ 室温で 18 時間横振しながらインキュベートする。

⑥ bound-free 分離のため、つぎの洗浄操

作を 3 回くりかえす。

0.9% 食塩水 2 ml を加え $2,000 \times g$ で 2 分間遠沈する。

上清を管底より 10mm 残して吸引除去する。

⑦ 各試験管の放射能をガンマカウンターで 2 分間測定する。

4) 測定結果の算出

各測定値からバックグラウンド値を引く、測定系の結合率は標準 TSH 濃度 $0 \mu\text{U}/\text{ml}$ の計数率 (B_0) を total activity の計数率 (T) で除した値の百分率 ($B_0/T\%$) で表し、この値が 10% 以上であることを確認する。各標準 TSH 濃度と未知検体については、その計数率 (B) の B_0 に対する百分率 ($B/B_0\%$) を求める。求めた百分率を標準 TSH 濃度に従って片対数グラフ上にプロットし標準曲線を得る。各検体の百分率をこの標準曲線から読み取り、血液 1 ml 中の TSH 濃度 ($\mu\text{U}/\text{ml}$) を求める。

成績

1) 測定法の基礎的検討

インキュベーション時間による標準曲線の変化：第 1 回目のインキュベーションを 0, 2, 4, 18, 48 時間と変え、第 2 回目のインキュベーションを 18 時間と一定にしたさいのそれぞれの標準曲線が図 1 であり、第 1 回目のインキュベーションを 4 時間と一定にし、第 2 回目のインキュベーションの 18, 48, 72 時間と変えたさいのそれぞれの標準曲線が図 2 である。第 1 回目のインキュベーションの時間が長くなるに従って標準曲線の傾きは増加し、感度は良好となった。第 2 回目のインキュベーションの時間を変化させても標準曲線は平行となり差違は認められなかった。第 1 回目のインキュベーションを 4 時間、第 2 回目のインキュベーションを 18 時間とした条件で全血 TSH $10 \mu\text{U}/\text{ml}$ 以上は十分測定可能であり、以後の検討はこの条件で行った。

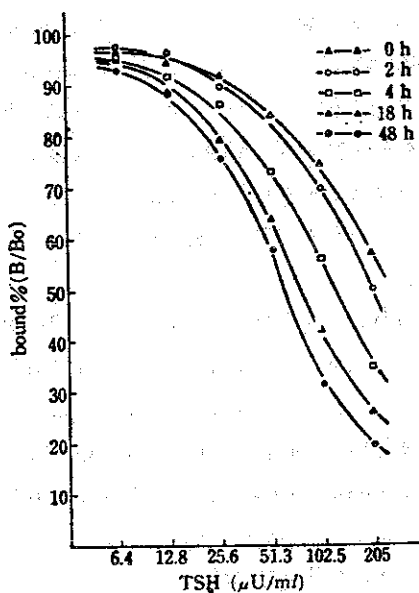


図1 Effect of first incubation time on standard curve

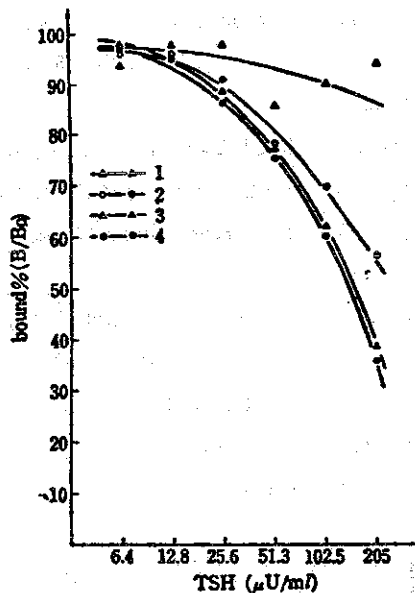


図3 Effect of washing (B.F. separation) on standard curve

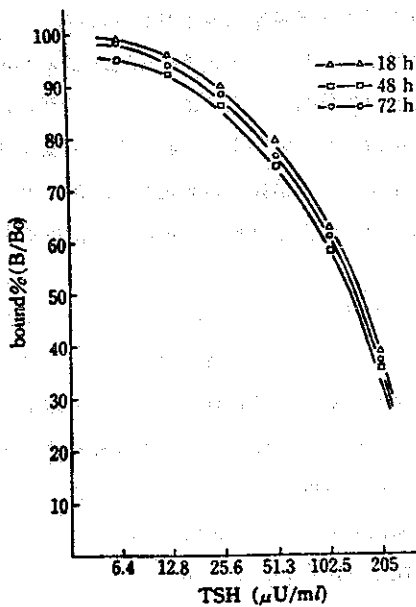


図2 Effect of second incubation time on standard curve

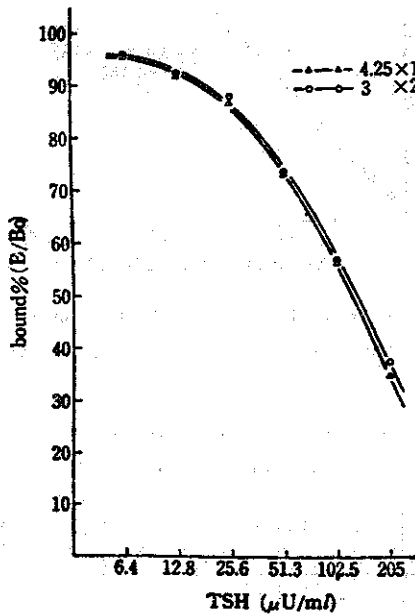


図4 Standard curves of 4.25 mm disk x 1 and 3 mm disk x 2

洗浄回数による標準曲線の変化: bound-free 分離の洗浄回数を1回から4回まで行ったさいの

それぞれの標準曲線を図3に示した。洗浄回数が1, 2回での標準曲線は非常にバラツキが多く,

3 回行うと良好な標準曲線が得られた。4 回では 3 回とほぼ平行になることから、洗浄は 3 回が適切と考えた。

4. 25mm ディスク 1 枚と 3mm ディスク 2 枚との比較：4. 25mm ディスク 1 枚と 3mm ディスク 2 枚を使用したさいのそれぞれの標準曲線はほぼ一致した（図 4）。

回収率：TSH 濃度既知の血液に標準 TSH をそれぞれ 8.3, 12.5, 25, 50 $\mu\text{U}/\text{ml}$ 添加した後濾紙にスポットし、乾燥後測定しそれぞれの回収率を求めた。その平均回収率は $94.8 \pm 10.3\%$ と良好であった（表 1）。

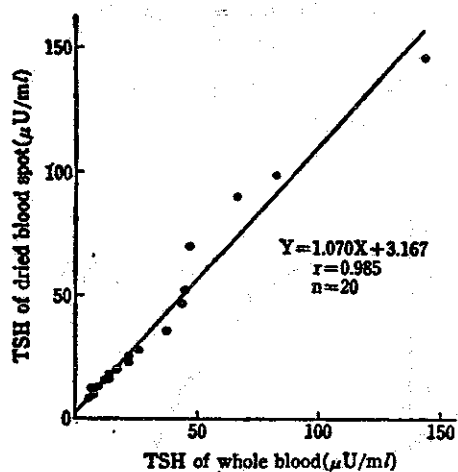


図 5 Correlation between TSH of whole blood and TSH of dried blood spot

表 1 Recovery of TSH added to normal blood

| % | added TSH ($\mu\text{U}/\text{ml}$) | estimated TSH ($\mu\text{U}/\text{ml}$) | recovery (%) |
|---------------|---------------------------------------|---|-----------------|
| 1 | 0 | (1.3) | — |
| 2 | 8.3 | 7.0 | 84.3 |
| 3 | 12.5 | 13.6 | 108.8 |
| 4 | 25.0 | 23.6 | 94.4 |
| 5 | 50.0 | 46.0 | 92.0 |
| mean \pm SD | | | 94.8 ± 10.3 |

再現性：TSH 濃度の異なる 5 例の乾燥濾紙血液を 1 回の測定につき 5 コ、5 回測定を繰り返し、再現性の検討を行った。同一測定内変動係数は低濃度で 14.8~21.8% とやや大きい、高濃度では 2.8~8.7% と小さく、異なる測定間の変動係数も 5.4~10.5% となり、良好な結果が得られた（表 2）。

全血 TSH 値と乾燥濾紙血液 TSH 値との比較：20 コの同一検体の全血 TSH 値（血漿 TSH 値を測定しヘマトクリット値により換算した値）と本法による乾燥濾紙血液 TSH 値とを比較すると、相関係数 $r = 0.985$ 、回帰式 $Y = 1.070X + 3.167$ となり、非常に良い相関を示した（図 5）。

2) マス・スクリーニング

カットオフ値：マス・スクリーニングを行うさい、そのカットオフ値をどの点にするかが問題である。カットオフ値の指標として血漿 TSH が 25 $\mu\text{U}/\text{ml}$ での乾燥濾紙血液 TSH 値は約 15 $\mu\text{U}/\text{ml}$ であり、これは新生児乾燥濾紙血液 2,149 例の TSH 値の分布では上位より 2.6 パーセントイル点に位置した（図 6）。これにより上位 3 パーセントイルに入る検体を再測定した。再測定で 15 $\mu\text{U}/\text{ml}$ 以上の検体は産科へ再採血を依頼することにした。

マス・スクリーニング：1978 年 6 月より 10 月までに札幌市内で出生した新生児 10,092 例のスクリーニングを実施し、TSH 値 15 $\mu\text{U}/\text{ml}$ 以上の検体 28 件について再採血を行い、再検査の結果 3 例がそれぞれ > 200 , 51.2, 150.1 $\mu\text{U}/\text{ml}$ と TSH 異常高値を示し、精密検査の結果 3 例ともクレチン症と診断された（表 3）。

考 察

マス・スクリーニングには測定値の信頼性、測定法の簡便さと迅速性、検体が微量であることなどが要求される。

今回われわれが行った固相法 TSH RIA キット

表2 Reproducibility of assay

| assay % | TSH of dried blood spot | | | | |
|---------|-------------------------|----------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | I | II | III | IV | V |
| 1 | < 5.3 | 14.2 ± 2.5* 17.6) | 24.5 ± 3.1 12.7 | 40.6 ± 3.9 9.6 | 101.8 ± 2.9 2.8 |
| 2 | < 5.3 | 14.9 ± 2.2 14.8 | 24.0 ± 2.8 11.7 | 36.1 ± 4.9 13.6 | 109.4 ± 5.4 4.6 |
| 3 | < 5.3 | 15.6 ± 2.6 16.7 | 26.3 ± 3.2 12.2 | 36.6 ± 3.7 10.1 | 109.8 ± 6.2 5.6 |
| 4 | < 5.3 | 17.3 ± 3.2 18.5 | 23.4 ± 2.8 12.0 | 45.4 ± 4.2 9.3 | 116.2 ± 8.6 7.4 |
| 5 | < 5.3 | 15.6 ± 3.3 21.2 | 22.5 ± 4.4 19.6 | 36.0 ± 3.8 10.6 | 103.2 ± 9.0 8.7 |
| total | < 5.3 | 15.5 ± 1.2 7.9 | 24.1 ± 1.4 5.8 | 38.9 ± 4.1 10.5 | 108.1 ± 5.8 5.4 |

* mean ± SD (μU/ml) 2) CV (%)

表3 Data in newborn infants with primary hypothyroidism discovered by TSH determination

| | % of newborns with primary hypothyroidism | | |
|------------------------------|---|------|--------|
| | 1 | 2 | 3 |
| sex | female | male | female |
| first examination age(days) | 6 | 7 | 7 |
| dried blood TSH (μU/ml) | > 200 | 67.4 | 50.2 |
| second examination age(days) | 17 | 17 | 19 |
| dried blood TSH (μU/ml) | > 200 | 51.2 | 150.1 |

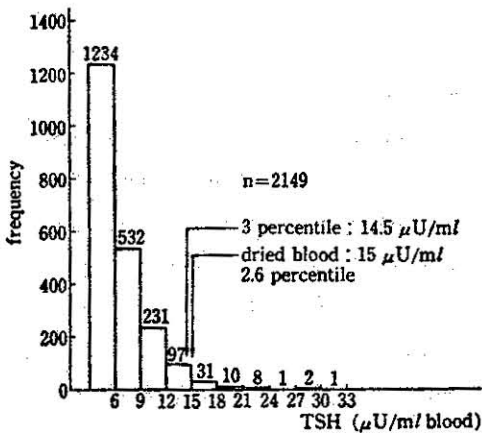


図6 Distribution of values of dried blood TSH

による乾燥濾紙血液TSH測定法は、マス・スクリーニングに要求される問題点を解決する方法と考えられる。すなわち、本法は使用する乾燥濾紙血液が4.25mmディスク1枚(3mmディスク2枚)と従来の約1/5で済み、測定法も抽出などの煩雑な操作が不要で、濾紙を試験管に入れた状態で直接測定できる。また、測定に要する時間も第1回目のインキュベーションを4時間、第2回目を18時間とすれば2日間に短縮される。つぎに、添加標準TSHの平均回収率は94.8%と良好で、再現性も全般的によい成績を示し、全血TSH値と乾燥濾紙血液TSH値との比較でも相関係数が $r = 0.985$ と非常に良いことから測定値も十分信頼性

をもっている。

マス・スクリーニングでは初回測定の上位3パーセントイルを再測定し、なおTSH値 $15 \mu\text{U}/\text{ml}$ 以上の検体を再採血、再検査するシステムを実施している。このシステムにより、10,094例のスクリーニングを行い、28例の再採血、再検査により3例のクレチン症を発見した。再検率は、われわれのシステムでは約0.3%であったが、宮井ら¹⁾は0.1%と報告している。これはわれわれのカットオフ値が $15 \mu\text{U}/\text{ml}$ bloodであり、宮井らのカットオフ値 $50 \mu\text{U}/\text{ml}$ blood¹⁾と比較しかなり低いためと考えられる。

実際にクレチン症と診断された3例を除く25例はすべて $50 \mu\text{U}/\text{ml}$ blood以下であり、カットオフ値については検討すべき余地がある。とくに、軽症のクレチン症では $50 \mu\text{U}/\text{ml}$ blood以下になる^{1a)}ことがありうるので、見逃しの危険をなくするためカットオフ値を $15 \mu\text{U}/\text{ml}$ とするのが適当であると考えられる。

以上の成績から本法はクレチン症のマス・スクリーニングに非常に適していると考えられる。

ま と め

固相法TSH-RIAキット(ファデバスタSHテスト)による乾燥濾紙血液TSH測定法の基礎的検討を行い、測定値の信頼性、測定法の簡便さおよび迅速性、微量の検体などクレチン症のマス・スクリーニングに十分満足すべき結果を得た。本法による測定法は、今後わが国におけるクレチン症のマス・スクリーニングに広く用いられるべき方法と考える。

なお、1978年6月より10月までの5カ月間に札幌市内で出産した新生児10,092例の固相法TSH-RIAキットによるマス・スクリーニングを実施し、3例のクレチン症を発見、医療機関に依頼し、ただちに早期治療を開始している。

おわりに、クレチン症のマス・スクリーニング

を開始するにあたり、御指導、御助言をいただいた東邦大学医学部第一内科入江実教授、および国立神経センター心身障害診断研究部長成瀬浩博士に謝意を表します。またキットの提供をうけたシオノギ製薬に感謝します。

文 献

- 1) Klein, A. H., Meltzer, S. & Kenny, F. M.: Improved prognosis in congenital hypothyroidism treated before age three months. *J. Pediatr.* **81**: 912-915, 1972.
- 2) 厚生省心身障害研究小児慢性疾患研究班: 先天性甲状腺機能低下症の早期発見に関する研究、小児慢性疾患に関する研究。昭和52年度報告書、1-1-1-38。
- 3) 日本医事新報。2833: 99, 1978。
- 4) Dussault, J. H., Coulombe, P., Laberge, C., Letarte, J., Guyda, H. & Khoury, K.: Preliminary report on a mass screening program for neonatal hypothyroidism *J. Pediatr.* **86**: 670-674, 1975。
- 5) Larsen, P. R. & Broskin, K.: Thyroxine (T_4) Immunoassay using filter paper blood samples for Screening of neonates for hypothyroidism. *Pediat. Res.* **9**: 604-609, 1975。
- 6) Klein, A. H., Agustin, A. V. & Foley, T. P.: Successful laboratory screening for congenital hypothyroidism. *Lancet*, **II**: 77-79, 1974。
- 7) Irie, M., Enomoto, K. & Naruse, H.: Measurement of thyroid-stimulating hormone in dried blood spot. *Lancet*, **II**: 1233-1234, 1975。
- 8) 入江 実, 榎本和子, 榎本仁志, 梅田みほ子, 成瀬 浩: 乾燥濾紙血液を用いる血中甲状腺

- 刺激ホルモンの(TSH)測定. 日内分泌会誌. **52** : 243-247, 1976。
- 9) 鶴原常雄, 長谷 豊, 森 道子, 大浦敏明, 宮井 潔, 川島 実, 前田紀夫, 久原良躬, 山村博三, 石飛由美子: 新生児におけるTSH値の変動とスクリーニング応用への検討. 日本新生児学会雑誌. **12** : 491-496, 1976。
- 10) Miyai, K., Nishi, K., Kawashima, M., Oura, T. & Tsuruhara, T. : An improved assay of thyrotropin in dried blood samples on filter paper as a screening test for neonatal hypothyroidism. *Clin. Chim. Acta.* **67** : 241-249, 1976。
- 11) 宮井 潔, 網野信行, 市原清志, 西 啓子, 藤江富子, 大浦敏明, 鶴原常雄, 長谷 豊, 川島 実, 前田紀夫, 佐竹律子, 小豆沢瑞夫, 野瀬 空: TSH測定によるクレチン症のマス・スクリーニング. ホルモンと臨床. **25** : 958-963, 1977。
- 12) 近藤昌子, 林 真夫, 山下文雄: 先天性甲状腺機能低下症のスクリーニング. ホルモンと臨床. **25** : 953-957, 1977。