

5. 「I-AB54, I-AB59」RIAキット によるクレチン症マス・スクリーニングの検討

Studies on mass screening for congenital hypothyroidism by 「I-AB54, I-AB59」 RIA kit

荒井 修 福士 勝 水嶋 好清 佐藤 敏雄
林 英夫 高杉 信男

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

要 旨

クレチン症マス・スクリーニングのためのT₄測定用2抗体法RIAキットを入手し、その測定法に基礎的検討を加えた結果、検査に要する日数を短縮でき、即日判定を可能にした。

はじめに

先天性甲状腺機能低下症(クレチン症)のマス・スクリーニングは、乾燥濾紙血液を用い、甲状腺刺激ホルモン(TSH)または甲状腺ホルモン(T₄)を指標として、ラジオイムノアッセイ(RIA)により検査が行われている。

TSH測定によるスクリーニングは主として、日本、ヨーロッパで行われており、この方法は原発性甲状腺機能低下症の発見には非常に有効であるが^{1)~3)}、二次性、三次性のものを見逃してしまうという欠点を有している⁴⁾。一方、T₄測定によるスクリーニングは主として、米国、カナダで行われており、この方法では二次性、三次性のものを発見できるが、カットオフ値の設定が難しく、false positive数が多くなることが欠点である⁵⁾。したがって現状では、クレチン症マス・スクリーニングにはTSH, T₄の同時測定が望ましい方法であると考えられている。

乾燥濾紙血液を用いるマス・スクリーニングのためのT₄測定法に関しては、検体の微量化、測定値の信頼性の向上など多くの研究結果が報告され^{6)~9)}、その有効性が国際的に認められている。

今回、われわれはT₄測定のため3mmディスク1枚を用いる2抗体法のRIAキット「I-AB54, I-AB59」を入手し、その測定法の基礎的検討を行ったので報告する。

方 法

1) キットの内容

- 抗血清(抗T₄家兔血清)
- ヨウ化(¹²⁵I)T₄溶液
- 第2抗体(抗家兔ガンマグロブリン山羊血清)
- 標準T₄濾紙血液(血清値0, 0.8, 1.6, 3.2, 6.5, 13, 26 μg/dℓ)

2) 測定法

- (1) 各試験管に標準T₄濾紙血液および被験濾紙血液を直径3mmのディスクにパンチアウトする。
- (2) 各試験管に抗血清、ヨウ化(¹²⁵I)T₄溶液をそれぞれ200 μℓずつ同時に分注する。
- (3) 攪拌し、室温で一定時間(キットで指定された方法では24時間)放置する。(第1回目のインキュベーション)

(4) 各試験管に第2抗体を100 μ l ずつ分注する。

(5) 攪拌し、4°Cで一定時間(キットで指定された方法では24時間)放置する。(第2回目のインキュベーション)

(6) 4°C, 2,000 \times g で25分間遠心分離し、上清を吸引する。

(7) 各試験管の放射能をガンマカウンターで1分間測定する。

3) 標準曲線とT₄濃度の算出

(1) 各検体の計数率からバックグラウンドをひいた値(B)を求める。

(2) 上記の値(B)をヨウ化(¹²⁵I)T₄溶液の計数率(total activity)で除した値の百分率(B/T%)を求める。

(3) 片対数グラフを用い、対数側をx軸として標準検体のT₄濃度を取り、これに対応するB/T%をy軸にプロットして標準曲線を作製する。

(4) 標準曲線により各検体の百分率からT₄濃度を求める。

4) 測定材料

血清T₄値と乾燥汚紙血液T₄値の相関を調べる目的で、正常人25例の血液および正常人の血液をT₄フリーの血清を用いて適当に調製して得られたT₄低濃度血液5例を、一部汚紙にスポットし、残りを血清として分離した。また希釈試験、アッセイの再現性の試験においては、T₄高濃度の血液にT₄フリー血液を加え、順次2倍に希釈したものを用いた。

マス・スクリーニングに用いた16,106例の新生児乾燥汚紙血液は、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を使用した。

結 果

1, 測定法の基礎的検討

1) 測定条件の標準曲線に及ぼす効果について

の検討

(1) 抗血清とヨウ化(¹²⁵I)T₄溶液分注の間の放置時間による変化

第1回目と第2回目のインキュベーションをともに24時間と固定し、抗血清とヨウ化(¹²⁵I)T₄溶液分注の間の放置時間を変化させた(図1)。

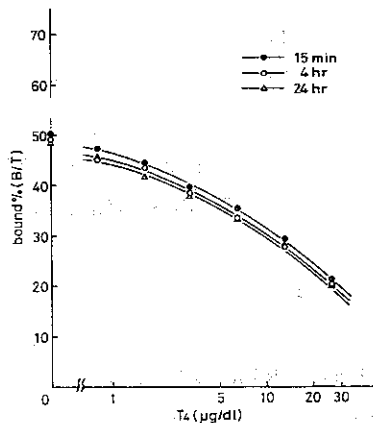


図1 Effect of incubation time between addition of antiserum and addition of ¹²⁵I-T₄ solution on standard curve

その結果、各標準曲線間に相違は見られなかったため、抗血清とヨウ化(¹²⁵I)T₄溶液の分注の間に放置時間をとる必要のないことがわかった。

(2) 第1回目のインキュベーション時間による変化

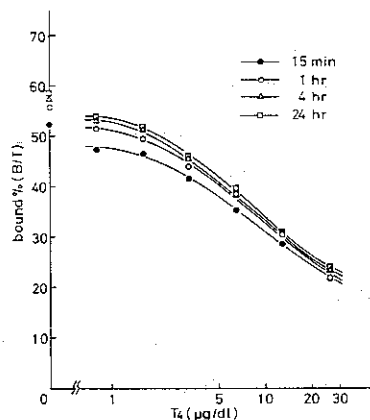


図2 Effect of first incubation time on standard curve

抗血清とヨウ化 (^{125}I) T_4 溶液を同時に分注し、第2回目のインキュベーションを24時間として、第1回目のインキュベーション時間を変化させた(図2)。1時間を超えると各標準曲線間に相違は見られなくなった。このため放置時間は1時間で十分であることがわかった。

(3) 第2回目のインキュベーション時間による変化

抗血清とヨウ化 (^{125}I) T_4 溶液を同時に分注し、第1回目のインキュベーションを24時間として、第2回目のインキュベーション時間を変化させた(図3)。各標準曲線間に相違は見られなかったため、放置時間は15分で十分であることがわかった。

2) 即日判定法についての検討

原法では測定に3日間を要するが、1)の結果から即日判定が可能であることがわかった。そこで、原法と第1回目のインキュベーションを3時間、第2回目のインキュベーションを2時間とする方法との比較実験を行った。その結果、標準曲線に相違は認められず(図4)、実際に80例の新生児乾燥濾紙血液について測定値間の差の検定を行うと、 $t = 0.41$ となり危険率10%でも有意差はなく、即日判定が可能であることが確認された。

3) 測定値の信頼性に関する検討

(1) 血清 T_4 値と乾燥濾紙血液 T_4 値の相関
測定材料で前述した30検体につき、血清 T_4 値と乾燥濾紙血液 T_4 値を比較したところ、相関係数 $r = 0.924$ 、回帰式 $Y = 1.165X - 1.328$ と良い相関を示した(図5)。

(2) 希釈試験

2種類の希釈系列について T_4 値を測定したところ、どちらもほぼ原点を通る直線関係が得られたことから、このキットが T_4 を特異的に測っていることが確認された(図6)。

(3) アッセイの再現性

4種類の濃度の異なる濾紙血液について2コず

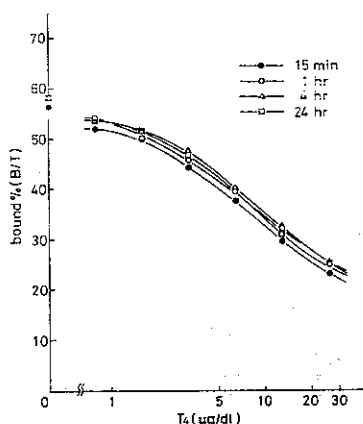


図3 Effect of second incubation time on standard curve

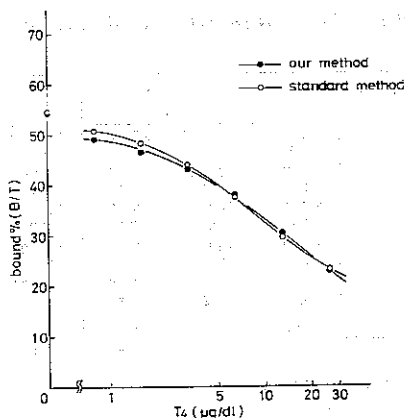


図4 Standard curves of our method and standard method

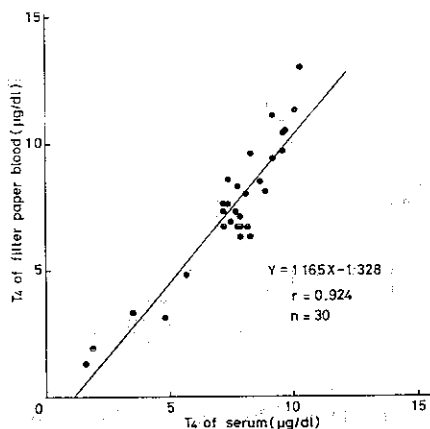


図5 Correlation between T_4 of serum and T_4 of filter paper blood

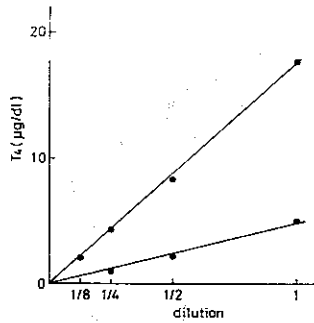


図6 Dilution test

表1 Reproducibility of assay

assay No.	sample No.			
	1	2	3	4
1	19.8 ± 1.0 ¹⁾	7.9 ± 0.4	3.6 ± 0.6	1.9 ± 0.1
	5.0 ²⁾	4.4	17.8	7.4
2	17.4 ± 0.7	7.8 ± 0.6	4.1 ± 0.4	2.1 ± 0.4
	4.1	7.3	8.5	16.7
3	16.3 ± 1.1	8.0 ± 1.1	3.8 ± 0.4	2.0 ± 0.1
	6.9	13.3	9.2	7.0
4	16.1 ± 0.7	8.6 ± 0.9	4.2 ± 0.1	1.7 ± 0.4
	4.4	10.7	1.7	24.7
5.	17.0 ± 1.1	8.3 ± 0.6	3.9 ± 0.4	2.2 ± 0.2
	6.2	6.9	10.8	9.5
interassay	17.3 ± 2.1	8.1 ± 0.5	3.9 ± 0.3	2.0 ± 0.3
	12.1	5.8	8.8	13.4

1) mean ± SD (µg/dl)

2) CV (%)

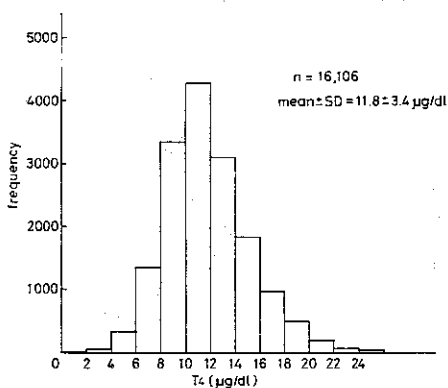


図7 Distribution of T₄ values of newborns

つ5回アッセイを行った(表1)。アッセイ内およびアッセイ間変動係数はともに許容範囲内であり、アッセイは良好な再現性を示した。

2. マス・スクリーニングの実用性について

新生児16,106例についてマス・スクリーニングを行った。T₄値の分布は正規分布を示し、mean ± SD = 11.8 ± 3.4 (µg/dl)となった(図7)。各検査ごとに分布の低値3%を再測定し、その結果、分布の-2.5 SD以下にはいるものについて再採血を依頼した。依頼数は153例(0.9%)で、再採血の結果-2.5 SD以下のもの32例に対し精密検査を行い、クレチン症3例を発見した。

考 察

「I-AB 54, I-AB 59」RIAキットによる測定法の基礎的検討を行った結果、検査に要する日数をキット指定の3日から、1日に短縮できた。このことはマス・スクリーニングで要求される測定法の迅速性をより満足させるものであり、原法に代わり、用いられるべき方法であると考えられる。また使用する乾燥汚紙血液は3mmディスク1枚で済み、測定法についても抽出操作が不要でピペット操作も3回でよいなど簡便である。更に血清T₄値と乾燥汚紙血液T₄値の相関はr = 0.924と良好で、希釈試験、アッセイの再現性の試験はいずれも良い結果を示したことから、信頼性の高いキットであることが判明した。

T₄測定によるスクリーニングは二次性、三次性甲状腺機能低下症を発見できるという利点を有し、その発生率はDussaultら⁴⁾によれば先天性甲状腺機能低下症の10%とされ、北米の広範囲なスクリーニング¹⁰⁾の結果でも6%(68,200人に1人)と報告されており、これらを含めたクレチン症児を1人でも多く発見するためにはT₄の測定が不可欠である。

しかしながら、T₄測定によるスクリーニング

においては、false positive の増加が問題であり、特に早産児¹⁾、TBG 欠損症は相対的に T₄ 値が低く、false positive の大きな原因となる。そこで false positive を極力少なくするスクリーニングについて検討した結果、アッセイごとに低値 3% を再測定し、 -2.5 SD 以下にはいるものに対し再採血を依頼し、更に -2.5 SD 以下であれば精密検査するシステムを採用した。このシステムより 16,106 例をスクリーニングし、153 例に対し再採血を依頼、32 例を精密検査した結果、クレチン症が 3 例発見された。

以上の結果から本キットは T₄ 測定によるクレチン症マス・スクリーニングに最も適したものであると考える。

おわりに

「I-AB 54, I-AB 59」RIA キットによる乾燥濾紙血液 T₄ 測定法の基礎的検討を行った結果、検査に要する日数を短縮でき、即日判定が可能であることが判明した。また検体として乾燥濾紙血液の 3mm ディスク 1 枚で済む点、測定法の簡便さ、測定値の信頼性の点でクレチン症マス・スクリーニングに必要とされる条件を満たしているものであった。

実際に 16,106 例の新生児に対し T₄ 測定によるマス・スクリーニングを行った結果クレチン症 3 例を発見した。

以上の結果より「I-AB 54, I-AB 59」RIA キットは T₄ 測定によるマス・スクリーニングに広く使用されるべきであると考えられる。

文 献

- 1) M. Irie, K. Enomoto, H. Naruse : Measurement of thyroid-stimulating hormone in dried blood spot, *Lancet* II, 1233-1234 (1975)
- 2) K. Miyai, K. Nishi, M. Kawashima, T. Oura and T. Tsuruhara : An improved assay of thyrotropin in dried blood samples on filter paper as a screening test for neonatal hypothyroidism, *Clin. Chim. Acta.*, 73, 241-249 (1976)
- 3) T. P. Foley, A. H. Klein and A. V. Agustin : Adaptation of TSH filter paper method for regionalized screening for congenital hypothyroidism, *J. Lab. Clin. Med.*, 90, 11-17 (1977)
- 4) J. H. Dussault, A. Parlow, J. Letarte, H. Guyda, and C. Laberge : TSH measurements from blood spots on filter paper : A confirmatory screening test for neonatal hypothyroidism, *J. Pediat.*, 89, 550-552 (1976)
- 5) P. R. Larsen and K. Broskin : Thyroxine (T₄) immunoassay using filter paper blood samples for screening of neonates for hypothyroidism, *Pediat. Res.*, 9, 604-609 (1975)
- 6) J. H. Dussault, P. Coulombe, C. Laberge, J. Letarte, H. Guyda, and K. Khoury : Preliminary report on a mass screening program for neonatal hypothyroidism, *J. Pediat.*, 86, 670-674 (1975)
- 7) 猪股弘明, 佐々木望, 新美仁男, 中島博徳 : クレチン症スクリーニングを目的とした 3mm 濾紙血液からの Thyroxine 測定法, *小児科臨床*, 32, 939-942 (1979)
- 8) 金尾啓右, 石原静盛, 本田 稔, 小川 正, 庄田和史, 松雪銀彦, 坂田泰昭, 西川光夫, 浜本虎太, 伊藤 裕 : 乾燥血液濾紙による T₄ 測定法の検討, *ホルモンと臨床*, 27, 553-556 (1979)
- 9) 伊東裕美子, 黒田裕子, 榎本仁志 : 乾燥濾紙血液を用いたサイロキシン測定法の検討, 並

びにその先天性甲状腺機能低下症早期発見応用に関する研究, 日本内分泌学会雑誌, 56, 786-803 (1980)

- 10) D. A. Fisher, J. H. Dussault, T. P. Foley, A. H. Klein, S. LaFranchi, P. R. Larsen, M. L. Mitchell, W. H. Murphey, and P. G. Walfish: Screening for congenital hypo-

thyroidism: Results of screening one million North American infants, *J. Pediat.*, 94, 700-705 (1979)

- 11) R. A. Cuestas: Thyroid function in healthy premature infants, *J. Pediat.*, 92, 963-967 (1978)