

## 6. クレチン症マス・スクリーニング用 キットSD-8549の基礎的検討

富士 勝 荒井 修 水嶋 好清  
佐藤 敏雄 林 英夫 高杉 信男

(基礎と臨床-Vol 14 No. 6 May '80掲載)

### はじめに

クレチン症は甲状腺ホルモンの欠乏により、発見がおけると身体の発育遅延、非可逆的な知能低下をきたすが、出生後の早期発見、早期治療により良好な予後が期待できる甲状腺疾患であり<sup>1)</sup>、発生頻度も1/4,000と高頻度である<sup>2, 8)</sup>。

クレチン症は新生児期の臨床所見による早期発見が困難であり、出生直後の乾燥汚紙血液を用いた甲状腺ホルモン(T<sub>4</sub>)、甲状腺刺激ホルモン(TSH)の測定法が開発され<sup>4~10)</sup>、マス・スクリーニングが広く実施されるようになった<sup>2, 3, 9~11)</sup>。

われわれも1977年に4.25mmディスクを用いる固相法TSHラジオイムノアッセイの検討を行い、1978年6月よりマス・スクリーニングを実施しているが<sup>9)</sup>、血清用TSH測定キットを用いるため試薬の調製が繁雑で、コストも高くつきマス・スクリーニングとしては問題があった。

今回、クレチン症マス・スクリーニングのために開発された乾燥汚紙血液測定キット、SD-8549を入手し、その測定法の基礎的検討およびマス・スクリーニングへの応用について検討を行ったので報告する。

### 材料と方法

#### 1 キットの構成

1キットは200検体用で次の試薬から構成されている。

- 1) TSH抗体結合セファデックス・4バイアル
- 2) ヨウ化TSH (<sup>125</sup>I)・2  $\mu$ Ci:4バイアル
- 3) Tween 溶液・4バイアル
- 4) 標準 TSH 乾燥汚紙血液(6濃度, 0, 5,

10, 20, 50, 100  $\mu$ U/ml)・4枚

#### 2. 試薬の調製

##### 1) TSH 抗体結合セファデックス溶液

1バイアルのTSH抗体結合セファデックスに1バイアルのTween溶液4ml全量を加え溶解する。使用時、磁気攪拌子で懸濁状態に保つ。

##### 2) ヨウ化 TSH 溶液

1バイアルのヨウ化TSHに5.5mlの再蒸留水を加え溶解する。

#### 3. 測定方法

1) 標準 TSH 汚紙血液および被検汚紙血液を直径4.25mmまたは3mm×2にパンチし試験管にとる。

2) 各試験管にTSH抗体結合セファデックス溶液を50 $\mu$ 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TSH溶液を100 $\mu$ lずつ分注する。同時に空の試験管にtotal count (T)用として100 $\mu$ lとる。

5) 室温で18時間横振しながらインキュベートする。

6) 各試験管に生理食塩水を2mlずつ分注し、2,000gで2分間遠沈後、上清を管底より10mm残して吸引除去する。この操作を3回繰り返す。

7) 各試験管の放射能をウエル型ガンマカウンタにより測定する。

#### 4. 測定結果の計算

測定系の結合率は標準TSH濃度0 $\mu$ U/mlの計数率(B0)をTで除した値(B0/T)の百分率で表わし、この値が8%以上であることを確認

する。各標準 TSH 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。求めた値を各標準濃度に従って片対数グラフにプロットし、標準曲線を得る。未知検体の値をこの標準曲線から読み取り、血液 1 ml 中の TSH 濃度を求める。

## 成 績

### 1. 測定法の基礎的検討

#### 1) インキュベート時間の検討

第 2 回目のインキュベート時間を 18 時間と一定にし、第一回目のインキュベート時間を 0, 2, 4, 18 時間と 4 段階に変化させて測定したところ、 $B_0/T$  値はほぼ一定であったが、インキュベート時間の増加に伴い標準曲線の傾きも増加し、感度が良好となった (図 1)。

一方、第一回目のインキュベート時間を 4 時間と一定にし、第 2 回目のインキュベート時間を 1, 2, 18, 48 時間と変化させて測定すると、標準曲線の形状はほとんど変化しないが、1, 2 時間のインキュベートでは  $B_0/T$  が 2.5, 3.8% と結合率が低く測定に適さなかった (図 2)。

これより、第 1 回目および第 2 回目のインキュベート時間をそれぞれ 4 時間、18 時間とした条件で、TSH  $5 \mu\text{U}/\text{ml}$  blood 以上は十分測定可能であることから、以後の検討はこの条件で行った。

#### 2) 生理食塩水による洗浄回数の検討

生理食塩水 2 ml による洗浄を 1~4 回まで行い、標準曲線の変化を検討したところ、1, 2 回では変動が大きく、傾きも鈍かったが、3, 4 回では良好な標準曲線が得られたことから、洗浄は 3 回が適切であった (図 3)。

#### 3) 4 25 mm ディスク 1 枚と 3 mm ディスク 2 枚との比較

4 25 mm ディスク 1 枚または 3 mm ディスク 2 枚を使用したさいの標準曲線はほぼ一致していた (図 4)。

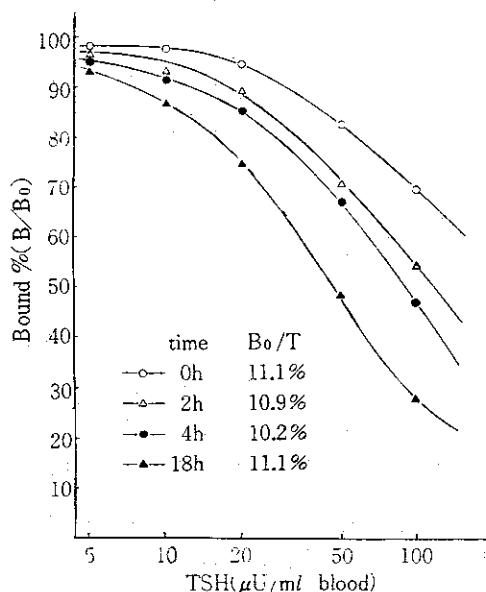


図 1 Effect of first incubation time on standard curve

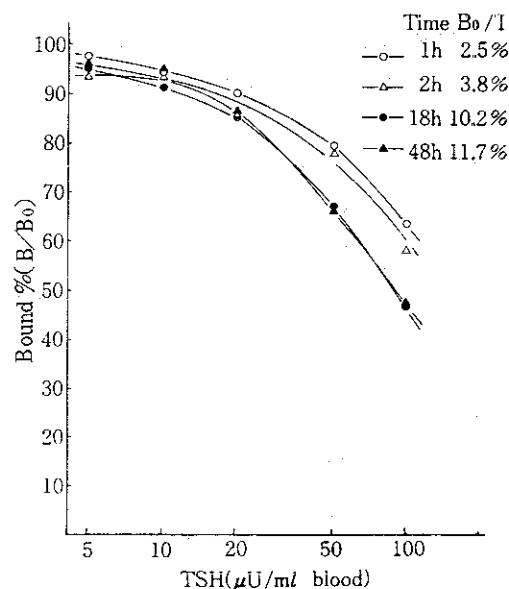


図 2 Effect of second incubation time on standard curve

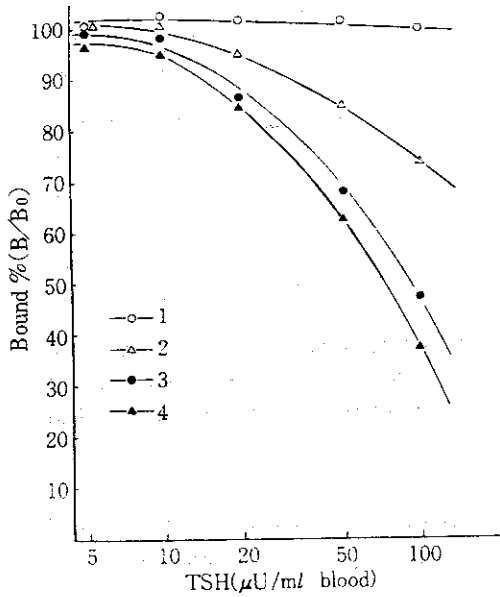


図3 Effect of washing (B-F separation) on standard curve

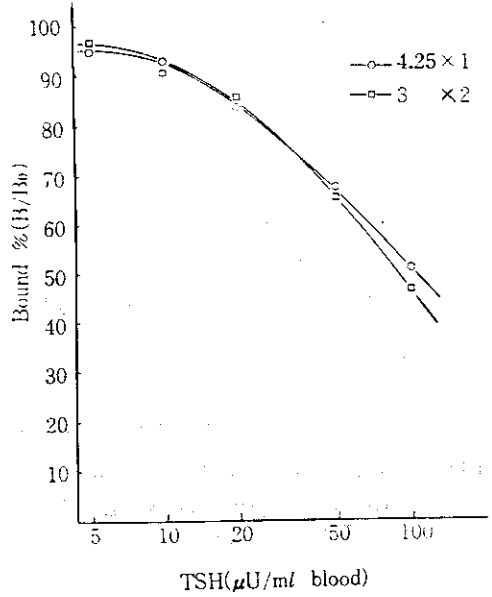


図4 Standard curves of 4.25mm disk x 1 and 3mm disk x 2

表1 Recovery rates of TSH added to normal blood

Sample No.	TSH concentration (μU/ml blood)			Recovery (%)
	Initial	Added	Measured	
1	1 2	12 5	15 5	113.1
2	1 2	25. 0	25. 3	96. 6
3	1 2	50. 0	41 9	81. 8
Mean ± SD				97.1 ± 15.6

4) 回収率

TSH濃度既知の血液に標準TSHを12.5, 25, 50 μU/mlずつ添加後、濾紙にスポットして乾燥し、それぞれの測定を行い回収率を求めた。その平均回収率は97.1 ± 15.6%であった(表1)。

5) 測定値の再現性

2種類の乾燥濾紙血液を同一のアッセイで7回測定して求めた測定内変動係数は6.1, 7.7%で

表2 Reproducibility of assay

Assays	No.	TSH concentration (Mean ± S.D.) (μU/ml)	C.V. (%)
Intraassay			
Sample 1	7	30.3 ± 1.85	6.1
Sample 2	7	60.8 ± 4.67	7.7
Interassay			
Sample 3	7	22.1 ± 2.73	12.4
Sample 4	7	60.8 ± 5.00	8.3

あり、異なるアッセイで7回測定を繰り返して求めた測定間変動係数は12.4, 8.3%となり、両者ともに良好な再現性を示した(表2)。

6) 従来法との相関

18例の同一乾燥濾紙血液について、すでに報告した固相法 TSH-RIA<sup>9)</sup>による測定値と本法に

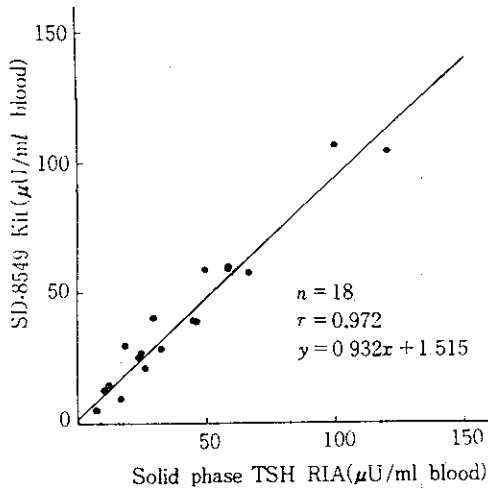


図5 Correlation of TSH value between solid phase TSH RIA and SD-8549 kit

よる測定値を比較したところ、相関係数  $r=0.972$ 、  
 帰式  $y=0.932x+1.515$  と良好な相関を示した  
 (図5)。

## 2. マス・スクリーニングへの応用

### 1) 新生児乾燥汚紙血液 TSH 値の分布

出生後5~7日目に採血された新生児1,335例の乾燥汚紙血液のスクリーニングによるTSH値の分布は、 $5\mu\text{U}/\text{ml}$  blood以下が1,070例(80.1%)で、3パーセンタイル値が $13.8\mu\text{U}/\text{ml}$  bloodとなり、従来の報告<sup>9)</sup>とほぼ一致していた(図6)。

### 2) クレチン症児のTSH値

当所で発見されたクレチン症児8例の乾燥汚紙血液TSHを測定したところ、4例は $100\mu\text{U}/\text{ml}$  blood以上、残りの4例は $38.0\sim 67.9\mu\text{U}/\text{ml}$  bloodの間に分布しており(図6)、正常新生児とクレチン症児のTSH値は明らかな相違があることから、本法で十分スクリーニングが可能である。

## 考 案

近年、クレチン症のマス・スクリーニングによる早期発見、早期治療の重要性が認められ、行政レベルでもとりあげられて全国的に広がりつつある。

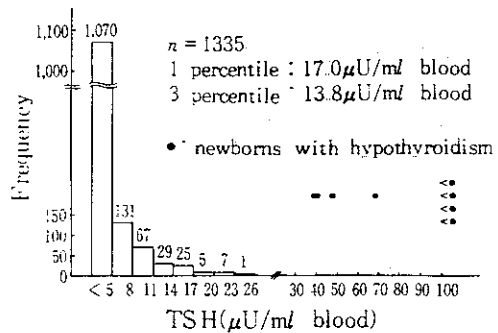


図6 Distribution of TSH values of 1,335 healthy newborns and of 8 newborns with hypothyroidism

わが国におけるクレチン症マス・スクリーニングの測定法は乾燥汚紙血液を用いた、入江、成瀬<sup>7)</sup>、宮井<sup>8)</sup>、福士<sup>9)</sup>の報告もあり、TSHの測定で行われている。

今回、クレチン症マス・スクリーニング用として開発された乾燥汚紙血液TSH測定キット、SD-8549の検討を行った結果、1)標準TSH汚紙血液が添付されている。2)試薬の調製が簡単である。3)測定感度、測定値の再現性、回収率がよい。4)現在実施している固相法TSH-RIAとの相関も良好であることから、簡便さと信頼性があり、クレチン症のマス・スクリーニングに適したキットであった。

マス・スクリーニングでのカットオフ値については、本法による新生児乾燥汚紙血液TSH値の分布が従来法<sup>9)</sup>とほぼ一致していることから、初回測定の上位3パーセンタイルを再測定し、なおTSH値が $15\mu\text{U}/\text{ml}$  blood以上の検体については再採血を依頼するか、直接精密検査を行うシステムにすれば、クレチン症児は十分発見でき、再採血率も少なくできるものと考えられる。

本キットはマス・スクリーニングのために開発されたものであり、1件当たりのコストが大幅に低くなり、経済的にもマス・スクリーニングの目的を達することが容易となる。

以上の成績から本キット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える。

### ま と め

クレチン症マス・スクリーニング用に開発されたSD 8549による乾燥濾紙血液 TSH 測定の基礎的検討の結果、測定手技の簡便さ、測定値の信頼性、経済効果の点で優れていた。

また実際にクレチン症マス・スクリーニングに使用し、従来行ってきた方法同様のよい結果が得られ、有用であったことから、今後広く使用されるべきキットであると考ええる。

### 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) Fisher, D. A., Dussault, J. H., Foley, T. P., Klein, A. H., LaFranchi, S., Larsen, P. R., Mitchell, M. L., Murphey, W. H. & Walfish, P. G. : Screening for congenital hypothyroidism, *J. Pediatr.*, 94, 700~705, 1979
- 3) Report of the newborn committee of the European thyroid association: Neonatal screening for congenital hypothyroidism in Europe, *Acta Endocr.*, 90 (Suppl. 223), 1~29, 1979
- 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, *Pediatr. 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) 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. Chem. Acta*, 67, 241~249, 1976
- 9) 福士 勝, 荒井 修, 岸 信夫, 佐藤敏雄, 林 英夫, 高杉信男, 松浦信夫 : 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, *医学のあゆみ*, 109, 37~41, 1979
- 10) 梅田みほ子, 榎本仁志, 伊前裕美子 : 日内分泌誌, 55, 1452~1468, 1979
- 11) 宮井 潔, 藪内百治, 大浦敏明, 川島 実, 菅森徳蔵, 水田仁士, 網野信行, 市原清志, 西 啓子, 藤江富子, 中谷清美, 野瀬 幸, 原田徳蔵, 鶴原常雄, 松倉一晃 : クレチン症のマス・スクリーニング, *ホルモンと臨床*, 27, 967~976, 1979