

クレチン症マスキリング用クレチンTSH栄研 キット, Protein A法の検討 (第1報)

吉岡 俊子・大森 節子・横井 博信・山階 裕子

I 緒 言

クレチン症(先天性甲状腺機能低下症)は,早期発見,早期治療を必要とする胎生期から甲状腺ホルモンの欠乏する疾病である。本症は主に身体的障害及び知能低下を来す。特に脳は不可逆的な障害を残す。厚生省統計(昭和54年度から昭和58年度の平均)では8100人に1人の発生頻度を示しており,PKUよりかなり高い。

1974年頃より入江,成瀬,宮井,大浦らによって新生児血液中のTSH測定によるクレチン症マスキリングが検討されはじめ,厚生省の先天性甲状腺機能低下症の早期発見に関する研究班(班長入江教授)が昭和51年度に組織され,以後種々検討がなされ,昭和56年度から全国的にクレチン症マスキリングが実施された。

当所においても昭和56年3月16日からラジオイムノアッセイ法(以下RIA法と略)により,TSH測定をPhadebas Dry Spot TSH Test を用い固相法にて実施して来た。固相法の検討については所報²⁾9,³⁾10号にて報告したので,ここでは,クレチンTSH栄研キット,Protein A法の基礎的検討をおこなったので報告する。

II 材料及び方法

1 材 料

クレチンTSH栄研キット(Cretin TSH Radioimmunoassay Kit),及び添付の標準TSH濾紙血液(濃度は全血表示)とコントロール濾紙血液を用いた。回収試験は既知TSH濃度血液にTSHを添加し乾燥濾紙血液を作製したものを用いた。

2 検 査 法

1) キットの内容

- (1) TSH抗血清(凍結品 抗ヒト甲状腺刺激ホルモンウサギ血清)
- (2) ¹²⁵I 標識TSH(凍結品 放薬基・ヨウ化ヒト甲状腺刺激ホルモン)
- (3) Protein A(凍結品)
- (4) 標準濾紙血液(乾燥濾紙,ヒト甲状腺刺激ホルモ

ン。

2) 測定法

- (1) ①~⑩までの番号を記入した小試験管及び検体濾紙測定用小試験管を準備する。①と②をトータル・カウント測定用とし,③~⑩は標準曲線の作成に使用する。
 - (2) 各濃度標準濾紙血液及び検体濾紙血液のスポットより直径3mmのディスクを打抜き,その2枚ずつをそれぞれの試験管に入れる。標準は二重測定とする。
 - (3) ③以降の試験管にTSH抗血清溶液を100 μ l ずつ加え,遠沈し,ボルテックスミキサーを用いて5~60秒間混和する。
 - (4) 25°Cで16~24時間インキュベートする。
 - (5) すべての試験管に¹²⁵I標識TSH溶液を50 μ l ずつ加え,遠沈し,ボルテックスミキサーを用いて混和する。ただし,①と②のトータルカウント用は遠沈後保管しておく。
 - (6) 25°Cで48時間もしくは24時間インキュベートする。
 - (7) ③以降の試験管に使用時10倍希釈したProtein A溶液を1mlずつ加え,ボルテックスミキサーを用いて混和する。
 - (8) 25°Cで10分間インキュベートする。
 - (9) 3000r.p.m(2000 $\times g$) 4°Cで10分間冷却遠心する。
 - (10) 上清を吸引除去しB・F分離をおこなう。
 - (11) 沈澱を γ -カウンターでカウント計測する。(4/200 γ -カウンター,マイクロメドック社製使用)。
- #### 3) 測定結果の計算
- (1) 各試験管のカウント数からバックグラウンドのカウント数を引く。
 - (2) 測定系の結合率(B₀/T)を求める。
 - (3) 標準0 μ U/ml bloodのカウント数の平均値を100%として,各濃度の標準及び検体の結合率B/B₀%を求める。
 - (4) 求めたTSH標準各濃度を片対数方眼紙の横軸に縦軸に各濃度の結合率(B/B₀)を取ってプロットし標準曲線を得,未知検体の結合率をこの標準曲線から読み取り,血液1ml中のTSH濃度(μ U/ml blood)を

求める。

III 結果及び考察

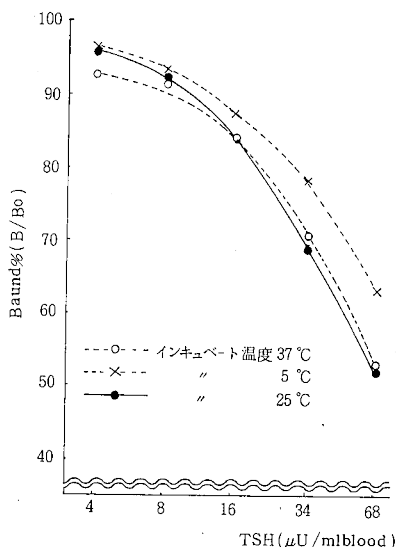
1 インキュベーション温度

クレチンTSH栄研キットを用いTSH測定をおこなう場合、温度の影響が測定値にどの程度の変動を与えるのか、次の条件により検討を加えた。

(1) インキュベーション温度37℃、25℃、5℃での標準曲線の作成。

(2) 9 μU/mlblood, 15 μU/mlblood を上記各インキュベーション温度で測定した時のそれぞれの測定値の比較。

図Iに示したようにインキュベーション温度25℃で一番感度の良い標準曲線となった。インキュベーション温度37℃では8 μU/mlblood 以下で感度が落ち、インキュベーション温度5℃では他と比べて傾きの鈍いや感度の劣った標準曲線となった。しかし、これらの標準曲線からは温度の影響による有意の差はあまり認められなかった。



図I インキュベーション温度と標準曲線

又、上記インキュベーション温度37℃、25℃、5℃の標準曲線作成時9 μU/mlblood, 15 μU/mlblood の2濃度を各々5個ずつ同処理し、同一アッセイ内で測定し変動係数(以下C.V.と略す)等を求め表1に示した。この結果から9 μU/mlblood はインキュベーション温度25℃でC.V.値が最も低く、37℃で高値を示した。15 μU/mlblood ではC.V.値が3.9~7.7%と低く温度による影響は認められず良好な値を示した。厚生省クレチン症検査結果処理基準では20 μU/mlblood をCut off point

と定めておりこれから考えると本キットを使用し検査をおこなう場合室温でのインキュベーションも十分可能であると思われる。しかし、当所では3パーセントとさらにCut off pointとして10 μU/mlblood 付近を定め再検査しているため10 μU/ml 付近の感度が要求され、25℃でのインキュベーションがより好ましいと考えられる。

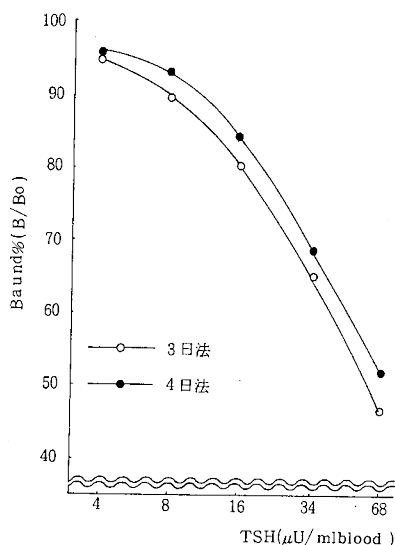
表1 インキュベーション温度による変動

インキュベーション温度	CONC (μU/ml blood)	$\bar{x} \pm SD$ (μU/ml blood)	C V(%)
37℃	9	11.6 ± 4.0	34.5
	15	23.7 ± 1.31	5.0
25℃	9	8.1 ± 0.75	9.2
	15	15.4 ± 1.19	7.7
5℃	9	8.2 ± 1.84	22.4
	15	15.5 ± 0.61	3.9

2 インキュベーション時間

抗血清を加え反応後、¹²⁵I標識TSHを加え24時間インキュベーションをおこなう3日法と、48時間インキュベーションをおこなう4日法について検討をおこなった。

図IIに示したとおり3日法がやや感度の良い標準曲線となった。又表2のように9 μU/mlblood と15 μU/mlblood のC.V.値も3日法が低くより良好であった。BIA法によるTSH測定は長時間を要する検査で、早期発見を必要とする疾病のスクリーニング目的からしても検査時間の短縮は重視すべきであり、今後は2日法等の検討も追加したいと考えている。



図II インキュベーション時間と標準曲線

表2 インキュベーション時間による変動

¹²⁵ I 標識 TSH 添加後のインキュベーション時間	CONC (μU/ml blood)	平均 ± SD (μU/ml blood)	C.V.(%)
48	9	8.1 ± 0.75	9.2
(4日法)	15	15.4 ± 1.19	7.7
24	9	9.3 ± 0.57	6.1
(3日法)	15	14.7 ± 0.47	3.19

3 回収試験

血液に標準 TSH をそれぞれ 10, 20, 50, 100 μU/ml 添加し, 先天性代謝異常検査用 濾紙にスポットし乾燥血液 濾紙を作製して各スポットより TSH 濃度を測定し回収率を求めると, 表 3 に示したように平均 100.5% と良好であった。しかし, 低濃度 10 μU/ml blood と高濃度 100 μU/ml blood の回収率は約 10% 程度低かった。

表3 Protein A法における TSH 回収率

TSH 添加量 (μU/ml blood)	濾紙血液 中 TSH (μU/ml blood)	濾紙血液中 TSH 値 - TSH 添加前値 (μU/ml blood)	回収率 (%)
0	4.2	0	
10	12.9	8.7	87.0
20	27.6	23.4	117.0
50	58.4	54.2	108.4
100	93.6	89.4	89.4
平均			100.5

4 再現性

同一検体 濾紙血液を用いて測定した場合の再現性の良否は非常に重要である。結果は表 4 に示す。

1) 同一アッセイ内変動

濾紙血液濃度 5, 10, 20, 50, 100 μU/ml blood の各濃度の同一検体を各々 10 個ずつ, 同一ロットのキットを用い, 同一アッセイ内で測定した時の変動を C.V. で表わすと 5 μU/ml blood では 31.4% と大であったが, 10~100 μU/ml blood では 13.7~3.2% であり, 現在実施されている RIA 法では良好な再現性を示しているものと考えられる。

2) 異なるアッセイ間変動

(1) 同一ロットのキットを用いた場合

濾紙血液濃度 9, 15 μU/ml blood の同一検体を各 2 個ずつ, 同一ロットのキットを用い, 異なるアッセイにて 4 回ずつ測定したときの C.V. は 16.9% と 9.7% であった。

(2) 異なるロットのキットを用いた場合

上記(1)と同一濃度の同一 濾紙を用い, 異なるロットのキットを使用して, 異なるアッセイで測定した際の C.V. 値は 18.5% と 11.6% となった。同一ロットを用いた場合と異なるロットを用いた場合のアッセイ間変動はあまり大差がないことから, ロット間の差は少ないものと考えられる。

(3) 異なる測定者による場合

(1)と同一濃度の同一 濾紙を用い異なるロットにより 4 名が交代して測定した際のアッセイ間変動は 9 μU/ml blood で C.V. 値は 24.4% であった。この濃度で測定者間の差が認められたが, 15 μU/ml blood では C.V. 値は 12.9% であり, (1), (2)の検討結果と比較しても差が認められず良好な結果を得た。当所での現在の Cut off point を考えると 10 μU/ml 付近の測定者間の C.V. 値は 20% 以内に留める必要があり, 今後は B・F 分離の手法の統一化等, 細部にわたって操作を統一すればより良い結果が得られるものと思われる。

表4 アッセイ内変動及びアッセイ間変動

		CONC (μU/ml blood)	平均 ± SD (μU/ml blood)	C.V.(%)
アッセイ内変動	5	4.2 ± 1.33	31.4	
	10	10.0 ± 1.37	13.7	
	20	23.2 ± 2.06	8.9	
	50	51.5 ± 2.17	4.2	
	100	89.3 ± 2.88	3.2	
アッセイ間変動	同一ロット	9	9.6 ± 1.63	16.9
	異なるロット	15	16.7 ± 1.62	9.7
	異なるロット	9	9.6 ± 1.78	18.5
	異なるロット	15	14.0 ± 1.62	11.6
異なる測定者による変動	9	9.3 ± 2.27	24.4	
	15	15.1 ± 1.95	12.9	

IV 結論

クレチン TSH 栄研キット (Protein A法) を用い, 乾燥 濾紙血液からのクレチン症マスキング実施のための基礎的検討をおこない, 次の結果を得た。

1 10 μU/ml blood 付近の C.V. 値を良くするためにはインキュベーション温度は 25°C が望ましい。

2 インキュベーション時間は 3 日法もしくは 4 日法のいずれにても大差はなかったが, 3 日法がより良好であった。しかし, 4 日法は日曜日を利用しての検査が可能である。

3 回収率は 100.5% と良好であった。

4 同一アッセイ内変動, 異なるアッセイ間変動及び異なるロット間変動において, $10 \mu\text{U}/\text{mlblood}$ 以上の濃度では C. V. 値は 20% 以下となり差は少ないものと思われた。又, 異なる測定者間変動の有意の差は認められなかったが $10 \mu\text{U}/\text{mlblood}$ 付近の C. V. 値をもう少し小さくするためには細部にわたって操作の統一を計る必要がある。

以上の結果から, 当所でおこなった検討条件を応用してのクレチン症 マスクリーニングは十分可能であると思われる。

文 献

1) 入江実, 成瀬浩, 中島博徳, 大浦敏明, 宮井潔, 川村

正彦, 北川照男, 松田一郎, 山下文雄, 諏訪城三, 齊藤寿一, 佐藤保: 先天性甲状腺機能低下症の早期発見方法の確立について, 厚生省心身障害研究費小児慢性疾患, 先天性甲状腺機能低下症の早期発見に関する研究班, 内分泌会誌, 56, 7, 1000~1004, (1980).

- 2) 吉岡倭子, 大森節子, 中内里美: クレチン症 マスクリーニング用 PHADEBAS DRY SPOT TSH TEST の検討 (第 1 報), 香川県衛生研究所報, 9, 47~52, (1980).
- 3) 吉岡倭子, 大森節子, 中内里美: クレチン症 マスクリーニング用 PHADEBAS DRY SPOT TSH TEST の検討 (第 2 報), 香川県衛生研究所, 10, 81~84, (1981).