

# クレチン症マス・スクリーニング用, PHADEBAS DRY SPOT TSH TEST の検討 (第2報)

吉岡 倭子・大森 節子・中内 里美

## I はじめに

クレチン症(先天性甲状腺機能低下症)は、先天的に甲状腺ホルモンの分泌欠乏状態を示す。特に甲状腺ホルモンは、中枢神経の正常な発育や骨成熟にとって必須のものであり、精神神経的な発達が遅延し、不可逆的な知能低下、及び身体的障害を来す。しかし、早期に発見し、早期に治療をおこなえばこれを予防することが出来る。そこで、先におこなわれているフェニールケトン尿症など5種疾病の先天性代謝異常症マルチプル・マス・スクリーニングに加え、入江、成瀬、宮井らにより開発された同一乾燥血液濾紙を用いる甲状腺刺激ホルモン(以下TSHと略)測定が、Radioimmunoassay(以下RIAと略)法により全国的に実施された。これにより、先天性疾患のスクリーニング対象疾病が6疾病となった。本県に於いても、昭和56年3月16日より「香川県先天性代謝異常検査等実施要綱」<sup>4)</sup>に基づき、クレチン症のマス・スクリーニングをRIA法にて実施し、TSH測定を開始した。この検査を実施するに当り、基礎的検討をおこないマス・スクリーニングへの応用をこころみ、一部は第一報<sup>5)</sup>にて報告したので、ここではインキュベーション温度、血液濾紙の保存性、回収率、再現性、カウンティングエラー等の検討をおこなったので報告する。

## II 材料及び方法

固相法(Solid Phase Method)であるPHADEBAS DRY SPOT TSH TEST 200回用(Pharmacia Diagnostics社製)塩野義製薬株式会社発売のものを使用した。又、検討用標準乾燥血液濾紙スポット(標準、対照、未知検体)から一定面積でパンチしたディスク中の非標識TSH抗原、及び標識TSH抗原とを、セファデックスに結合したTSH抗体に競合反応させ、反応後、B・F分離し、 $\gamma$ 線計測をおこない、得られた標準曲線から未知検体のTSH値を求める方法である。

### 1. キットの組成

1) ヨウ化ヒト甲状腺刺激ホルモン( $^{125}\text{I}$ )試薬(120.9  $\mu\text{g}$ )、4バイアル(凍結乾燥品)、1バイアル中、ヨウ化ヒト甲状腺刺激ホルモン( $^{125}\text{I}$ )55 $\mu\text{U}$ (総放射能 $\sim 2$

$\mu\text{Ci}$ )

2) TSH抗体結合セファデックス試薬 167.8  $\mu\text{g}$ 、4バイアル、1バイアル中、TSH抗体結合セファデックス0.25  $\mu\text{g}$

3) ツィーン溶液試薬(4 ml)4バイアル、1バイアル中、ツィーン20、0.02 ml

4) 標準TSH、対照血液濾紙各4枚、1枚中、0、5、10、20、50、100  $\mu\text{U}/\text{ml}$  blood、25、60  $\mu\text{U}/\text{ml}$  blood各1スポット

### 2. 試薬の調製

1) TSH抗体結合セファデックス懸濁液  
各バイアルに、それぞれツィーン溶液1バイアルを加え泡立たない程度に撹拌する。

2) ヨウ化ヒト甲状腺刺激ホルモン( $^{125}\text{I}$ )溶液  
各バイアルに、再蒸留水5.5 mlを加える。

### 3. 測定方法

1) 標準、対照、未知乾燥血液濾紙は3mmディスク各々2枚パンチする。標準及び対照は同一濃度標準に2 $\sim$ 3本のチューブを使用する。

2) 各チューブに、TSH抗体結合セファデックス懸濁液50  $\mu\text{l}$ を加える。これは撹拌機で泡立たぬようよく撹拌中のものを使用する。

3) 軽く遠心後、ボルテックスミキサーを用いて混和する。

4) 室温(15 $^{\circ}\text{C}$  $\sim$ 30 $^{\circ}\text{C}$ )で水平振盪(巾3.5 cm、120回/分一定)しながら16時間インキュベーションする。

5) 各管に、ヨウ化ヒト甲状腺刺激ホルモン( $^{125}\text{I}$ )液100  $\mu\text{l}$ 添加する。

6) 軽く遠心後、ボルテックスミキサーを用いて混和する。

7) 室温(15 $^{\circ}\text{C}$  $\sim$ 30 $^{\circ}\text{C}$ )で水平振盪(巾3.5 cm、120回/分一定)しながら7時間インキュベーション後25 $^{\circ}\text{C}$ のインキュベーター内で15.5時間静置し、室温(15 $^{\circ}\text{C}$  $\sim$ 30 $^{\circ}\text{C}$ )に取り出し30分間水平振盪(巾3.5 cm、120回/分一定)する。合計23時間インキュベーションする。

8) 生理食塩水(0.9%)2 ml加え、1,500  $\times\text{g}$ 以上で2 $\sim$ 5分遠心し沈殿物を吸わないように、B・F分離する。この操作を3回こなう。

9)  $\gamma$ 線計測をおこなう(4/200  $\gamma$ カウンター;マ

イクロメディック社製使用), 各管 2 分計測

#### 4. 測定結果の計算

1) 各試験管のカウンtr数 (CPM) から, バックグラウンドのカウンtr数を引く。

2) 測定系の結合率 ( $B_0/T$ ) を求め, これが 8% 以上であることを確認する。 $B_0/T$  は, 総放射能のカウンtr数平均値に対する標準  $0 \mu\text{U}/\text{ml}$  blood のカウンtr数平均値の% で現わす。

3) 標準  $0 \mu\text{U}/\text{ml}$  blood のカウンtr数の平均値を 100% として, その他の濃度の標準, 対照および検体の結合率  $B/B_0$  % を求める。結合率  $B_5/B_0$  は 80% 以上,  $B_{100}/B_0$  は 60% 以下である。

4) 求めた TSH 標準各濃度 (5, 10, 20, 50, 100  $\mu\text{U}/\text{ml}$  blood) を片対数方眼紙の横軸に, 縦軸に各濃度の結合率 ( $B/B_0$ ) を取ってプロットし標準曲線を得, 対照及び未知検体の結合率をこの標準曲線から読み取り血液 1 ml 中の TSH 濃度 ( $\mu\text{U}/\text{ml}$  blood) を求める。

### III 結果及び考察

#### 1. 第一インキュベーション及び第二インキュベーション温度

第一インキュベーション及び第二インキュベーションは室温でおこなうが, 年間の温度差がかなりあるため温度による影響がどの程度あるか, 特に温度の上昇する夏季に安定した結果が得られるかどうか, 次の条件による検討を加えた。

1. 第一インキュベーション温度のみ 37°C
1. 第二インキュベーション温度のみ 37°C
1. 第一インキュベーション温度のみ 28°C
1. 第二インキュベーション温度のみ 28°C

尚, 他のインキュベーション温度, 及びその他は前報<sup>5)</sup>と同じ条件でおこなった。

図 1 に示したように, 第一インキュベーション温度のみ 28°C では感度の良い標準曲線が得られた。又 37°C ではやや感度の劣った標準曲線となったが, 温度による著しい影響は認められなかった。一方, 第二インキュベーション温度のみ 28°C では, 第一インキュベーション温度のみ 28°C, 及び 37°C より Bound %,  $B_{100}/B_0$  が高く感度の劣った標準曲線となり, 37°C では全く使用不能な標準曲線となった。これらのことから, 第一インキュベーション温度は四季を通じ温度差がかなりあっても測定値にあまり影響を与えないが, 第二インキュベーション温度による影響は大で 30°C 前後の室温となる夏季にはアッセイ間の変動がより大きくなり測定値, 及び Cut off point 値にも大きく影響を与えるものと思われた。そこで, 少

なくとも第二インキュベーション温度は 28°C 以下に保つ必要があり, 更に一定温度で測定することがより好ましいものと考えられ, 全インキュベーションを 25°C でおこなうこととした。

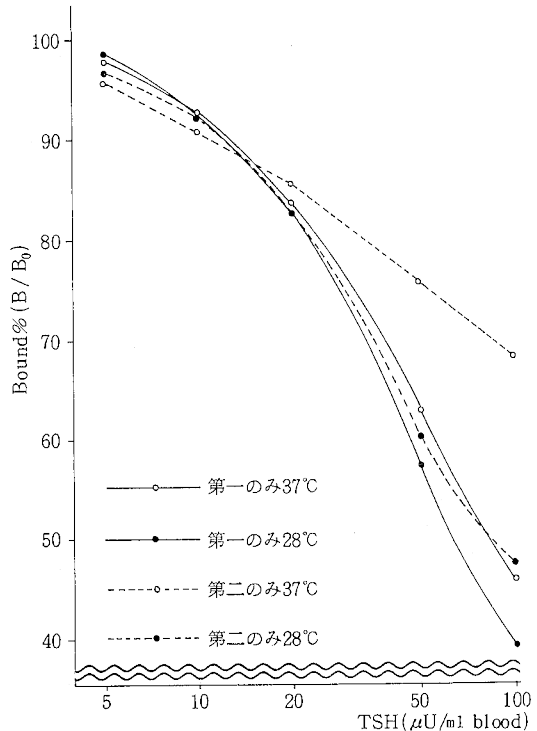


図 1 インキュベーション温度と標準曲線

#### 2. 回収率試験

既知 TSH 濃度血液に, TSH をそれぞれ 10, 20, 50, 100  $\mu\text{U}/\text{ml}$  添加し, 濾紙にスポットして乾燥血液濾紙を作製し, これよりそれぞれの回収率を求めると, 表 1 に示すように平均 101% とほぼ良好な結果を得た。

表 1 Radioimmunoassay 法における TSH 回収率

TSH 添加量 ( $\mu\text{U}/\text{ml}$ blood)	血中 TSH 値 ( $\mu\text{U}/\text{ml}$ blood)	血中 TSH 値 - TSH 添加量 ( $\mu\text{U}/\text{ml}$ blood)	回収率 (%)
0	5.2		
10	14.0	8.8	88
20	24.2	19.0	95
50	63.7	58.5	117
100	108.8	103.6	104
平均			101

### 3. 乾燥血液沚紙の保存性

乾燥血液沚紙中TSHが温度変化、及び経時変化を受けてもどの程度安定な状態にあるのか、中濃度と低濃度の乾燥血液沚紙を4℃、室温、37℃に保存し、7日、14日、28日後にそれぞれTSH測定をおこない図2を作製した。4℃では有意のTSH値低下は認められなかったが、中濃度7日後室温で15%、37℃で23%TSH値の低下を認め、28日後では約30%程度の低下を認めた。又、低濃度では7日までは有意差はあまり認められないが28日後はやはり30%程度の低下が認められた。この検討をおこなった期間は7月27日から8月24日までであり、雨期を避け湿度の影響は少なかったにもかかわらず室温7日後のTSH値が予想以上に低下していた。しかし、沚紙血液中のTSHは4℃では長期間の安定性を示しており、乾燥血液沚紙保管時の温度管理の重要性がうかがえる。これらのことから、血液沚紙の輸送時間はできるだけ短縮し、温度状態にも十分注意を払う必要がある。当所では郵送されてくる血液沚紙は少なく、ほとんどの血液沚紙は四国中検の協力によりクーラー使用による血液沚紙回収がなされており、この点保存状態は良好であると思われる。

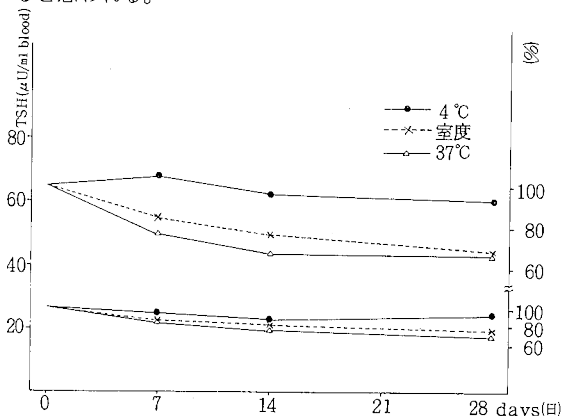


図2 乾燥血液沚紙の保存性 (7月7日～8月24日)

### 4. 再現性

同一検体を用い測定した場合の再現性の良否は非常に重要であり、次のとおり検討した。(表2)

#### 1) 同一アッセイ内変動

TSH濃度5, 10, 20, 50, 100, 25, 60 μU/ml blood (PHADEBAS DRY SPOT TSH TEST用キットに添付のもの)の各濃度の血液沚紙を各々10個づつ、同一ロットのキットを用い、同一アッセイ内で測定した際の変動を調べた。変動係数(以下C.V.と略)を求めると低濃度では平均12.6%と比較的大であるが、中濃度では平均6.2%、高濃度では5.7%であった。

#### 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

上記血液沚紙中TSH濃度25, 60 μU/ml bloodを同一ロットのキットを使用して各々1回の測定に2個づつ、10回測定しC.V.%を求めると10.7%, 9.2%であった。

##### (2) 異なるロットのキットを用いた場合

(1)と同一沚紙で同濃度を異なるロットのキットを用い各々1回の測定に2個づつ10回測定した際のC.V.%はそれぞれ11.1%, 7.1%であった。

(1)と(2)の検討結果を比較すると大差がなかったことから、ロット間の差は少ないものと考えられる。

表2 アッセイ内変動及びアッセイ間変動

		CONC. (μU/ml blood)	$\bar{x} \pm S.D.$ (μU/ml blood)	C.V.(%)
アッセイ内変動	同一ロット	10	11.7 ± 2.11	18.0
		20	22.8 ± 2.38	10.4
		50	52.0 ± 3.00	5.8
		100	96.5 ± 5.54	5.7
		25	26.1 ± 2.49	9.5
		60	63.4 ± 4.16	6.6
アッセイ間変動	異なるロット	25	25.7 ± 2.74	10.7
		60	68.4 ± 6.31	9.2
		25	27.4 ± 3.04	11.1
		60	66.0 ± 4.70	7.1

### 5. カウンティングエラー

カウンティングエラーは、B・F分離誤差、ピペッティング誤差と共に通常のRIAで生ずる実験誤差の主要部分を占めるものである。

表3のように、種々の濃度を各々10回づつ、それぞれ1分、2分、3分、5分間カウントさせた際の変動を、C.V.で表わした。いずれもC.V.は3%以内であり、他報告例の1～3%と一致している。カウント時間は長くするほどC.V.が良く、特にカウント数が約1,000以下でその傾向が強い。1分カウントと2分カウントを比較すると、C.V.が低いのは2分カウントさせた方であり、その差が比較的はっきり認められた。又、2分カウントと3分カウントでは有意の差は認められなかったが、5分カウントはC.V.が一番低く良い結果を示した。しかし、マス・スクリーニングでは5分間カウント測定をおこなうのは時間的に無理が生ずるものと思われ、この検討結果からみても2分カウントで十分スクリーニング可能であると考えられる。

表3 カウンティングエラー(10回測定)

CONC.	1 分				2 分				3 分				5 分			
	$\bar{x}$	$\pm$ SD	CV	(カウント数)	$\bar{x}$	$\pm$ SD	CV	(カウント数)	$\bar{x}$	$\pm$ SD	CV	(カウント数)	$\bar{x}$	$\pm$ SD	CV	(カウント数)
T	17470.3	$\pm$ 130.2	0.75		17493.4	$\pm$ 87.9	0.50		17489.5	$\pm$ 86.5	0.50		17360.3	$\pm$ 63.5	0.37	
0	2251.1	$\pm$ 57.5	2.55		2252.3	$\pm$ 34.2	1.52		2263.2	$\pm$ 26.0	1.15		2231.1	$\pm$ 19.6	0.88	
5	2145.0	$\pm$ 51.0	2.38		2141.1	$\pm$ 26.7	1.25		2143.7	$\pm$ 26.1	1.22		2127.1	$\pm$ 17.8	0.84	
10	2067.2	$\pm$ 59.2	2.86		2060.5	$\pm$ 23.4	1.14		2054.3	$\pm$ 22.3	1.09		2038.0	$\pm$ 24.8	1.22	
20	1784.7	$\pm$ 38.7	2.17		1787.6	$\pm$ 26.1	1.46		1796.6	$\pm$ 22.8	1.27		1764.5	$\pm$ 19.2	1.09	
50	1213.7	$\pm$ 29.3	2.41		1208.4	$\pm$ 22.7	1.88		1215.1	$\pm$ 25.0	2.06		1197.4	$\pm$ 14.3	1.19	
100	807.0	$\pm$ 23.7	2.94		801.4	$\pm$ 20.1	2.51		805.2	$\pm$ 21.3	2.65		797.1	$\pm$ 11.5	1.44	

## IV 結 論

前報<sup>5)</sup>につづき、固相法 TSH-RIA キット(PHADEBAS DRY SPOT TSH TEST) を使用し、乾燥血液濾紙からクレチン症マス・スクリーニ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. インキュベーション温度の影響は、第一インキュベーションは少ないが、第二インキュベーションでは標準曲線が大きく変動し、温度が高くなるほど著明である。
2. 回収率は平均 101 % と良好であった。
3. 乾燥血液濾紙は 4℃ では比較的長期間安定であるが、温度が高くなるほど TSH 値が減少した。
4. 同一アッセイ内の C.V. は、低濃度の 10  $\mu$ U/ml blood で 18.0 と比較的大きかったが、20  $\mu$ U/ml blood では 10.4 %、中・高濃度では 6 % 前後で良好な値を示した。又、異なるアッセイ間の変動も大差はなかった。
5. カウント時間は長くするほど安定した値を得る。特に 1,000 カウント以下でその傾向が強い。

以上の結果は他報告<sup>6)7)8)</sup>ともほぼ一致し、本 TSH キットを用い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・スクリーニングは、十分可能であると考えられる。

## 文 献

- 1) 中尾亨：小児内分泌障害，小児医学，Vol112. No1

- 2) 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，斉藤寿一，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)
- 3) 中島博徳，入江実，成瀬浩，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，斉藤寿一，佐藤保，高杉信男：マス・スクリーニングで発見された先天性甲状腺機能低下症の治療指針(暫定案)，厚生省小児慢性疾患，先天性代謝異常スクリーニング研究班，日本小児科学会雑誌，84，8，754～775 (1980)
- 4) 香川県環境保健部：先天性代謝異常検査等の実施について，環B87，(1981)
- 5) 吉岡淑子，前田里美，大森節子：クレチン症マス・スクリーニング用 PHADEBAS DRY SPOT TSH TEST の検討，香川県衛生研究所報，9，47～52 (1981)
- 6) 美澄博雄，和田洋，二宮福江，川上幹子，石田立夫，市場洋三：ラジオイムノアッセイ (Phadebas SD-8549) による新生児甲状腺機能低下マス・スクリーニング，基礎と臨床，14，6，241～246 (1980)
- 7) 福士勝，荒井修，岸信夫，佐藤敏雄，林英夫，高松信男，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，109，1，37～41 (1979)
- 8) 藤本茂紘，松田一郎：固相法 TSH RIA Kit によるクレチン症マス・スクリーニング，基礎と臨床，14，6，231～235 (1980)