

クレチン症マス・スクリーニング用PHADEBAS DRY SPOT TSH TESTの検討 (第1報)

吉岡 徹子・前田 里美・大森 節子

I はじめに

クレチン症は、歴史の古い病気であり、現在では、先天性甲状腺機能低下症の別名として用いられている。この疾患の多くは、先天性甲状腺形成異常(欠損又は形成不全、異所性)、甲状腺ホルモン合成障害等により起り、甲状腺ホルモン分泌欠乏のため身体の発育不全と、放置すれば不可逆的な知能低下を来す疾患であるが、早期に発見し、早期に治療すればこれを救うことが出来る。諸外国に於いては、1974年血中TSH、1975年T₄をラジオイムノアッセイ法にて測定し、以後、クレチン症マス・スクリーニングが行われ、米国、カナダでは、主として濾紙血液T₄測定が実施されている。ヨーロッパ及び日本では、TSH測定が実施されており、本邦では入江、成瀬ら⁽¹⁾⁽²⁾により乾燥濾紙血液TSH測定法が開発され、厚生省は、先天性代謝異常検査⁽³⁾に新たに先天性甲状腺機能低下症(クレチン症)検査⁽⁴⁾を加え、現在では、ラジオイムノアッセイ法による甲状腺刺激ホルモン(TSH)測定が全国的に実施されつつある。厚生省、昭和55年7月3日発表による54年度のクレチン症患者発見率は1人/8,200人⁽⁵⁾で、比較的高い発生頻度を示しており、本県に於いても、「香川県先天性代謝異常検査等実施要綱」⁽⁶⁾に基づき、甲状腺刺激ホルモン(TSH)測定をラジオイムノアッセイ法にて、昭和56年3月16日より開始した。

今回、検査実施に当り、測定法の基礎的検討を行い、マス・スクリーニングへの応用をこころみためて報告する。

II 材料及び方法

固相法(Solid Phase Method)であるファデバスタライスポットTSHテスト200回用(Pharmacia Diagnostics社製)を使用した。又、検討用標準乾燥血液濾紙もキット添付のものを使用した。この方法は、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抗原と標識TSH抗原とを、セファデックスに結合した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、 γ 線計測を行い、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(¹²⁵I)試薬(120.9 mg)、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(¹²⁵I)55 μ U(総放射能 \sim 2 μ Ci)

2) TSH抗体結合セファデックス試薬167.8mg、4バイアル

1バイアル中、TSH抗体結合セファデックス0.25mg

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、0.02ml

4) 標準TSH・対照血液濾紙各4枚

1枚中、0、5、10、20、50、100 μ U/ml、25、60 μ U/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攪拌する。

2) ヨウ化ヒト甲状腺刺激ホルモン(¹²⁵I)溶液

各バイアルに、再蒸留水5.5mlを加える。

3 測定方法

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

2) TSH抗体結合セファデックス懸濁液50 μ lを加える。これは攪拌機で泡立たぬようよく攪拌中のものを使用する。

3) 軽く遠心し、その後よく混和する。

4) 室温(15 $^{\circ}$ C \sim 30 $^{\circ}$ C)で水平振盪(巾3cmで150回/分ぐらい)しながら4時間から20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(¹²⁵I)液100 μ l添加する。

6) 軽く遠心し、その後よく混和する。

7) 室温(15 $^{\circ}$ C \sim 30 $^{\circ}$ C)で水平振盪(巾3cmで150回/分ぐらい)しながら16時間から20時間インキュベーションする。

8) 生理食塩水(0.9%)2ml加え1,500xg以上で2 \sim 5分遠心し沈澱物を吸わないように、B・F分離する。この操作を3回行う。

9) γ 線計測を行う。

4 測定結果の計算

1) 各試験管のカウント数(CPM)からバックグラウンドのカウント数(CPM)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、総放射能のカウント数平均値に対する標準 $0\mu\text{U}/\text{ml Blood}$ のカウント数平均値の%で現わす。

3) 各標準、対照及び未知検体の各々のカウント数の平均値は、標準 $0\mu\text{U}/\text{ml Blood}$ のカウント数の平均値を100%として結合率を求める。結合率は、 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1ml中のTSH濃度($\mu\text{U}/\text{ml Blood}$)を求める。

III 結果及び考察

1 インキュベーション時間と振盪時間について

第一インキュベーション時間、及び第二インキュベーション時間については今までに多くの報告⁷⁻⁹⁾がなされているが、今回、当所では、ガスリー検査との兼ね合等、日常検査業務の遂行上便利で測定値に影響を与えない条件を選ぶため、表1の検討条件を設定し検討した。水平振盪は室温で巾3.5cm, 120回/分一定、静置時の第一インキュベーションは室温、第二インキュベーションは25°Cにてインキュベートし測定した結果、図1に示した標準曲線を得た。(イ)の標準曲線では、 $10\mu\text{U}/\text{ml Blood}$ 以下の測定が不能で、傾きが鈍く、感度が悪いが、各濃度間のバラツキは少ない。(ロ)、(ハ)、(ニ)の標準曲線は、(イ)に比べよりシャープな曲線となり、 $10\mu\text{U}/\text{ml Blood}$ 以下の測定が可能で、各濃度間のバラツキもほとんど認められない感度の良い標準曲線となった。しかし、(ロ)は、(ハ)、(ニ)に比べ、やや傾きが鈍く感度が劣った。(ホ)は、 $10\mu\text{U}/\text{ml Blood}$ 以下の測定が不能であり、結合率が B_5/B_0 で80%以下となった。以上の結果から、いずれの標準曲線もスクリーニングに使用可能ではあるが、(イ)及び(ホ)で明らかなように、第一インキュベーション時の振盪及び時間が低濃度検出と関係が深く、感度を上げる為には、振盪第一インキュベーション時間を少なくとも4時間以上にする必要があることが示された。又、(イ)は、第一インキュベーション4時間で、2日で測定結果が出る利点があるが感度が劣る。(ニ)は、第二インキュベーションを静置で行えるが、振盪インキュベーションが原則の測定法であるため、静置につ

いてはもう少し検討を加える必要があり、以後の操作は(ハ)の条件で行った。今回の検討は、静置時の第二インキュベーションはインキュベーターで温度を一定にして行ったが、次回は、温度の変化による測定値の変動について検討を行いたい。

表1 第一・第二インキュベーション時間及び振盪時間

図1の記号	第一インキュベーション			第二インキュベーション		
	合計時間	振盪時間	静置時間	合計時間	振盪時間	静置時間
イ	4	4	0	23	23	0
ロ	24	24	0	23	23	0
ハ	17	16	1	23	7	16
ニ	17	16	1	23	0	23
ホ	24	0	24	23	0	23

* 振盪静置16時間は午後5時~翌午前9時まで

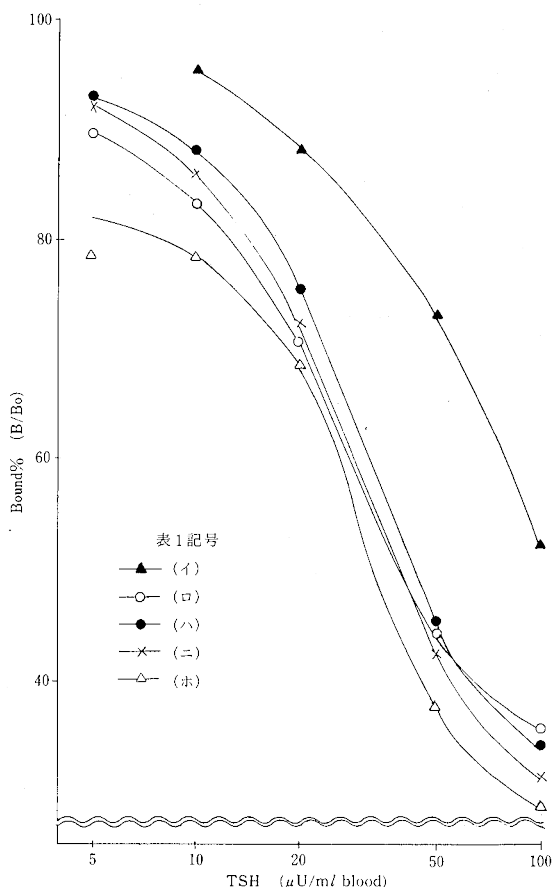


図1 第一・第二インキュベーション時間及び振盪時間

2 Bound-free分離時の洗浄回数

生理食塩水2mlによるBound-free分離の洗浄を1回から4回まで行い、それぞれの標準曲線の変化を図2に示した。1, 2回洗浄では各濃度間にバラツキが見られ、

特に1回目洗浄でそれが大きく、 $20\mu\text{U}/\text{ml}$ Blood以下でほとんど直線となり、標準曲線の作成が困難であった。3回、4回目洗浄では、ほぼ一致したシャープな曲線が得られ感度が良好となった。これらのことから、洗浄回数は3回で十分であると考えた。

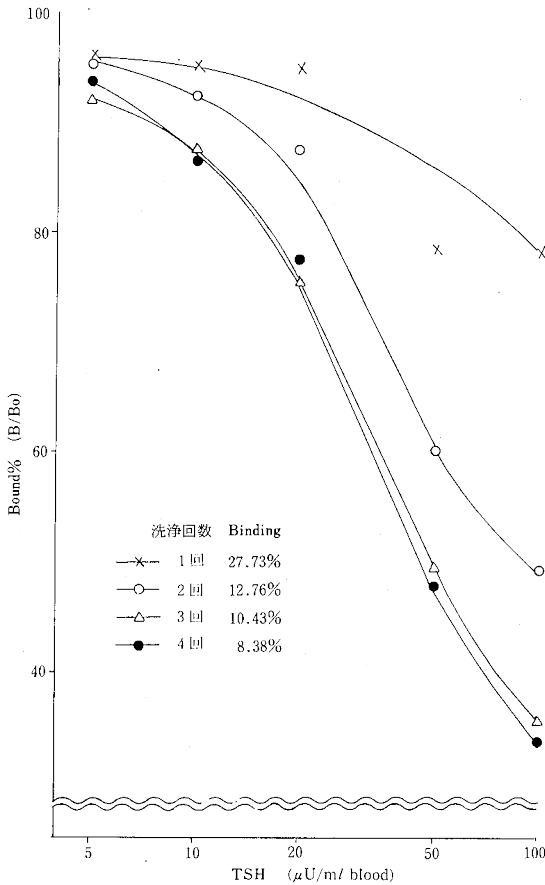


図2 洗浄回数

3 乾燥血液濾紙の比較

1) 4.25mmディスク1枚と3mmディスク2枚の比較

4.25mm乾燥血液ディスク1枚と、3mmディスク2枚を使用して各々の標準曲線を作成し、図3に示した。2つの標準曲線は、低濃度及び高濃度でBound% 1%程度の差を生じたがほぼ一致した。このことから、どちらも使用可能であると考えられるが、僅に、3mmディスク2枚使用の方が感度の良い標準曲線を得たので、3mmディスク2枚を使用することにした。

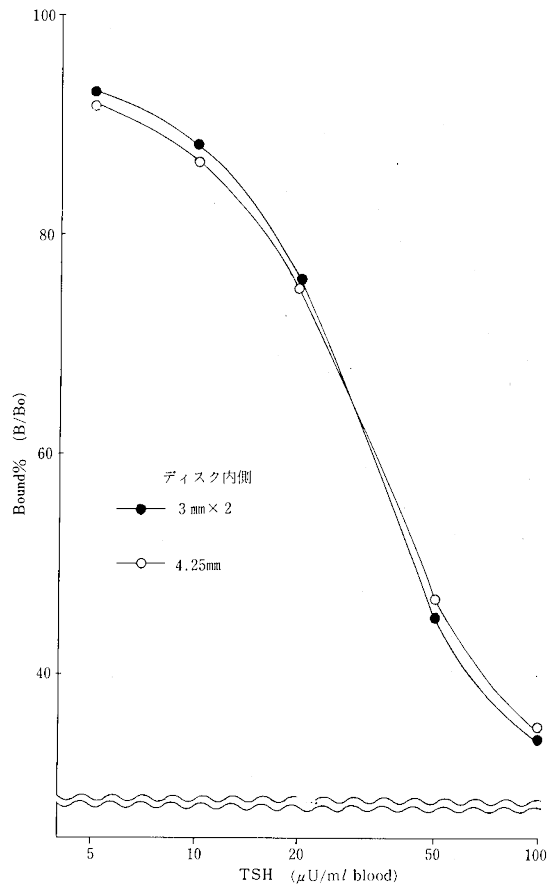


図3 3mm×2・4.25mmディスク各々内側の比較

2) 3mmディスクの内側と外側、4.25mmディスクの内側と外側の比較

径約1cmの乾燥血液濾紙スポットより、3mmディスクを内側、外側より各々2枚、4.25mmディスクを内側、外側より各々1枚パンチし、これを使用して標準曲線を作成し、図4、5に示した。どちらもディスクの外側を使用した方が、Bound%が低濃度で低く、 $60\sim 70\mu\text{U}/\text{ml}$ Blood以上の高濃度で高くなり、低濃度及び高濃度でTSH濃度差が大きくなった。又、ディスクの外側を使用した標準曲線は、低濃度でバラツキが見られ、傾きも内側と比較すると鈍かった。又、3mmディスク2枚使用の方が濃度差が大きかった。これらのことから、検体濾紙からのディスクパンチは、部位を一定として、特に内側をパンチする必要があると考えた。

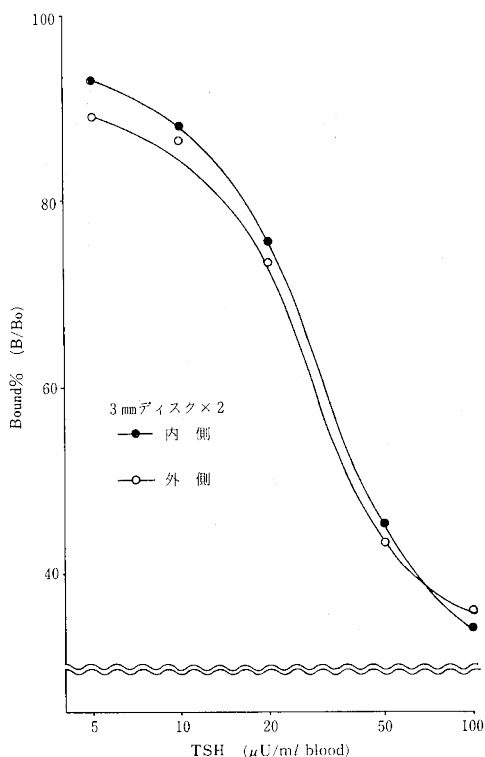


図4 3 mmディスク×2の内側と外側

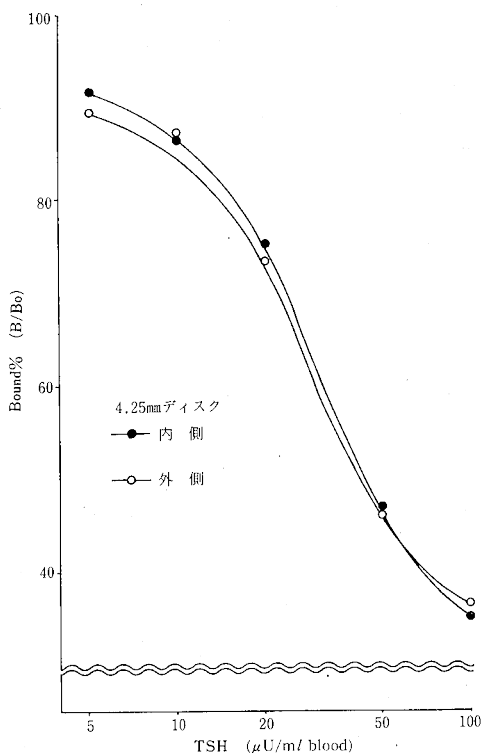


図5 4 mmディスクの内側と外側

4 ピペッティングエラー及びカウントタイム

当所手持ちのエッペンドルフピペット4780、ハミルトン分注器の分注誤差を調べ、使用可能であるか確認を行った。ハミルトン分注器は、容量5 mlを使用して、100 μ l分注で49回分注出来、エッペンドルフピペット4780は、チップ2.5 mlを使用して、100 μ lで24回、50 μ lで49回分注出来た。これを、4/200 γ カウンター（マイクロメディク社）で2分及び5分間計測し、表2、3に示した。この結果、ハミルトン分注器は、最初第1回、2回目の分注にカウント数のバラツキが大きく見られ、使用時注意を要するが、エッペンドルフピペット4780は、全量分注してもカウント数のバラツキは見られなかった。変動係

数(表4、5)は、分注量100 μ lでは、エッペンドルフピペット4780が、ハミルトン分注器より、5分間計測で0.41、2分間計測で0.29小さい値となった。又、エッペンドルフピペット4780では、分注量50 μ lより、100 μ lの方が、変動係数は小さくなった。カウント時間は、2分と5分間計測を行ったが、優位の差は認められなかった。これらの結果から、変動係数の小さい点、取り扱いの簡単な点等によりエッペンドルフピペット4780を使用することにした。以上の検討結果を基としてスクリーニングを開始するが、検討期間の都合で出来なかった再現性、回収試験、濾紙保存状態、インキュベーション温度等の検討を今後加えて行きたい。

表2 2分間カウント計測

種類	ハミルトン分注器				エッペンドルフピペット 4780				
容量	5 ml				2.5 ml				
分注量	100 μ l				100 μ l		50 μ l		
回数	カウント数	回数	カウント数	回数	カウント数	回数	カウント数	回数	カウント数
1	29,563	26	15,336	1	15,755	1	7,847	26	7,826
2	12,053	27	15,408	2	15,690	2	7,712	27	7,916
3	15,444	28	15,609	3	15,552	3	7,744	28	7,932
4	15,488	29	15,135	4	15,451	4	7,713	29	7,770

5	15,218	30	15,562	5	15,541	5	7,791	30	7,820
6	15,392	31	15,319	6	15,372	6	7,707	31	7,832
7	15,446	32	15,153	7	15,493	7	7,828	32	7,799
8	15,381	33	15,469	8	15,436	8	7,847	33	7,857
9	15,195	34	15,178	9	15,560	9	7,787	34	7,697
10	15,334	35	15,164	10	15,666	10	7,926	35	7,789
11	15,430	36	15,533	11	15,492	11	7,784	36	7,796
12	15,371	37	15,309	12	15,624	12	7,871	37	7,704
13	15,204	38	15,464	13	15,401	13	7,773	38	7,720
14	15,068	39	15,362	14	15,409	14	7,786	39	7,785
15	15,363	40	15,427	15	15,512	15	7,918	40	7,792
16	15,288	41	15,310	16	15,407	16	7,941	41	7,839
17	15,552	42	15,170	17	15,470	17	7,827	42	7,737
18	15,512	43	15,345	18	15,524	18	7,776	43	7,772
19	15,467	44	15,374	19	15,462	19	7,892	44	7,692
20	15,563	45	15,457	20	15,549	20	7,842	45	7,827
21	15,468	46	15,199	21	15,617	21	7,828	46	7,682
22	15,317	47	15,490	22	15,642	22	7,889	47	7,866
23	15,507	48	15,059	23	15,522	23	7,581	48	7,703
24	15,368	49	15,244	24	15,372	24	7,778	49	7,661
25	15,397			25		25	7,765		

表3 5分間カウント計測

種類	ハミルトン分注器				エッペンドルフピペット 4780				
容量	5 ml				2.5 ml				
分注量	100 μ l				100 μ l		50 μ l		
回数	カウント数	回数	カウント数	回数	カウント数	回数	カウント数	回数	カウント数
1	29,412	26	15,340	1	15,673	1	7,908	26	7,752
2	11,937	27	15,265	2	15,663	2	7,727	27	7,848
3	15,458	28	15,680	3	15,477	3	7,696	28	7,860
4	15,487	29	15,132	4	15,523	4	7,683	29	7,776
5	15,326	30	15,591	5	15,461	5	7,716	30	7,846
6	15,506	31	15,566	6	15,441	6	7,685	31	7,761
7	15,591	32	15,217	7	15,575	7	7,752	32	7,811
8	15,376	33	15,401	8	15,470	8	7,898	33	7,797
9	15,250	34	15,035	9	15,569	9	7,759	34	7,708
10	15,412	35	15,042	10	15,468	10	7,812	35	7,831
11	15,265	36	15,423	11	15,457	11	7,814	36	7,810
12	15,292	37	15,296	12	15,585	12	7,737	37	7,856
13	15,206	38	15,458	13	15,403	13	7,808	38	7,702
14	15,004	39	15,292	14	15,412	14	7,767	39	7,812
15	15,318	40	15,438	15	15,408	15	7,827	40	7,749
16	15,495	41	15,276	16	15,482	16	7,855	41	7,743
17	15,551	42	15,150	17	15,366	17	7,754	42	7,861
18	15,522	43	15,159	18	15,484	18	7,746	43	7,645
19	15,319	44	15,450	19	15,521	19	7,763	44	7,762
20	15,510	45	15,223	20	15,523	20	7,786	45	7,680
21	15,505	46	15,237	21	15,620	21	7,848	46	7,775
22	15,251	47	15,436	22	15,568	22	7,755	47	7,866
23	15,530	48	15,172	23	15,346	23	7,709	48	7,705
24	15,405	49	15,291	24	15,299	24	7,746	49	7,766
25	15,398			25		25	7,729		

表 4 カウン ト 時 間 2 分

種 類	容 量	分注量	最大カウ ント数	最小カウ ント数	最大-最小	\bar{x}	SD	CV
ハミルトン分注器	5 ml	100 μ l	15,609	15,059	550	15,359.1	138.01	0.96
エッペンドルフ ピペット 4780	2.5 ml	100 μ l	15,755	15,372	383	15,521.6	103.57	0.67
		50 μ l	7,941	7,581	360	7,795.2	77.29	0.99

※ ハミルトン分注器では、第1, 2回目の分注は除外した。

表 5 カウン ト 時 間 5 分

種 類	容 量	分注量	最大カウ ント数	最小カウ ント数	最大-最小	\bar{x}	SD	CV
ハミルトン分注器	5 ml	100 μ l	15,680	15,004	676	15,352.1	157.85	1.03
エッペンドルフ ピペット 4780	2.5 ml	100 μ l	15,673	15,299	374	15,491.4	95.53	0.62
		50 μ l	7,908	7,645	263	7,775.6	61.58	0.79

IV 結 論

ファデバドライスポットTSHテストを使用し、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行った。

- 1 インキュベーション時間と振盪時間について検討し、第一インキュベーション時間17時間、うち振盪16時間、静置1時間で行う。
- 2 Bound-free分離時の洗浄回数は、3回とする。
- 3 検査に使用する血液濾紙ディスクは、3mm 2枚を使用し、内側をパンチする。
- 4 エッペンドルフピペット4780を使用し、2分間カウント計測で行う。

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; 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, 1,000~1,004, 1980
- 2) 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, 齊藤寿一, 佐藤保, 高杉信男; 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

- 3) 厚生省児童家庭局; 先天性代謝異常検査の実施について, 児発441, 1977
- 4) 厚生省児童家庭局; 先天性代謝異常検査の実施についての一部改正について, 児発566, 1979
- 5) 厚生省児童家庭局母子衛生課; 昭和54年度先天性代謝異常等検査の実施状況について, 児母衛21, 1980
- 6) 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
- 7) 福土勝, 荒井修, 岸信夫, 佐藤敏雄, 林英夫, 高杉信男, 松浦信夫; 固相法TSHRIA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TSHRIA 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
- 9) 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