

TBG濃度の影響を受けない抗T4ヒツジ抗体を用いた FT4測定ELISA法

三上 篤 扇谷 陽子 福士 勝 清水 良夫

菊地由生子

要 旨

新生児マス・スクリーニング対象疾患の一つであるクレチン症の中でも、TSH単独測定では発見できない、遅発型クレチン症と中枢性クレチン症の指標となるFT4（遊離型サイロキシン）測定系の改良を試みた。本法は、抗T4抗体の免疫動物を家兎ではなくヒツジとした点で従来法と異なり、TBG濃度の影響を受けにくいことから、FT4測定によるスクリーニングで偽陽性となるTBG欠損症例を減少できると考えられる。

1. 緒 言

札幌市では、1978年6月に新生児クレチン症マス・スクリーニングをTSH（甲状腺刺激ホルモン）の測定により開始し、1979年からはTSHとT4（サイロキシン）、次いで1986年からはTSHとFT4の同時測定を行っている¹⁾。

TSH単独測定では原発性クレチン症の発見に留まり、生後4～7日ではTSH濃度の上昇が不完全な遅発型クレチン症と、TSH濃度は正常だがFT4が低値を示す中枢性クレチン症²⁾（汎下垂体機能不全を含む）を発見するためには、TSHだけではなくT4あるいはFT4の測定が不可欠である。全国のスクリーニング施設の中では、札幌市と神奈川県において、TSHとFT4の同時測定を新生児全検体について行っている。札幌市のスクリーニングでは3名の遅発型クレチン症と5名の中枢性クレチン症が発見されたことから、FT4同時測定はクレチン症スクリーニングに有用である³⁾。

しかし、現在FT4測定に使用しているCIBA・CORNINGのENZAPLATE N-FT4⁴⁾は、乾燥ろ紙血液を検体とするとTBGの影響を受け、FT4が低値を示した場合、中枢性クレチン症と、約1,000人に1人の高い頻度で存在するTBG欠損症（臨床症状は無い）の鑑別に、RIA法によるTBG測定⁵⁾を余儀なくされている。

今回、第一抗体を抗T4家兎抗体から抗T4ヒツジ抗体に変更することにより、乾燥ろ紙血液を用いてもTBG濃度の影響が小さいFT4測定法を開発し、ENZAPLATE N-FT4や最も信頼性の高いAmersham FT4（RIA法）⁶⁾と比較検討を行い、良好な結果が得られたので報告する。

2. 方 法

2-1 サンプル

先天性代謝異常症等検査に用いる乾燥ろ紙血液

検体の3.2mmディスク1枚をサンプルとし、生後4～7日目新生児正常検体50件、同FT4低値検体(FT4 < 0.9ng/dl in serum, TBG > 15μg/ml)94件、同TBG欠損症検体(TBG < 1μg/ml)8件、同TBG減少症検体(1 < TBG < 15μg/ml)17件、同原発性クレチン症検体6件、同中枢性クレチン症検体7件のFT4を測定した。

2-2 試薬

基本構成は、CIBA・CORNINGのENZAPLATE N-FT4から成るが、第一抗体はCHEMICON社の抗T4ヒツジポリクローナル抗体をキット中の緩衝液で1/30,000に希釈し、発色剤は東京化成工業のO-フェニレンジアミンをキット中の発色剤溶解液で1.0mg/mlに用時調製して使用した。また、第二抗体固相化96穴マイクロプレートは、JACKSON社の抗ヒツジ家兔抗体をリン酸緩衝液(pH7.0)で5μg/mlに調製し、NUNC社の蛋白吸着用プレートMaxisorpにコーティングして作製した。以下にキットの基本構成を示す。

- 酵素標識抗原：ペルオキシダーゼ標識T4
- ◎ 第一抗体：抗T4家兔抗体
- ◎ 第二抗体固相プレート：抗家兔IgGγ₁抗体
- ◎ 発色剤：O-フェニレンジアミン
- 発色剤溶解液：0.015%過酸化水素-クエン酸バッファー
- 反応停止液：3N硫酸
- 緩衝液：PBS-BSA緩衝液
- 濃縮洗浄液：Tween20-PBS緩衝液
- 標準ろ紙血液：0～10.0ng/dl(7濃度)FT4含有ろ紙血液

◎印のみENZAPLATEの内容を変更して使用した。

2-3 測定方法

キットの測定方法と異なるため、図1に測定操作の概略を示した。

3. 結果

3-1 標準曲線とPrecision Profile

本法の標準曲線でB/B₀の90%点は0.15ng/dl、50%点は1.70ng/dlで、Precision Profileの変動係数CVは

0.2～15ng/dlで10%以下であった(図2)。

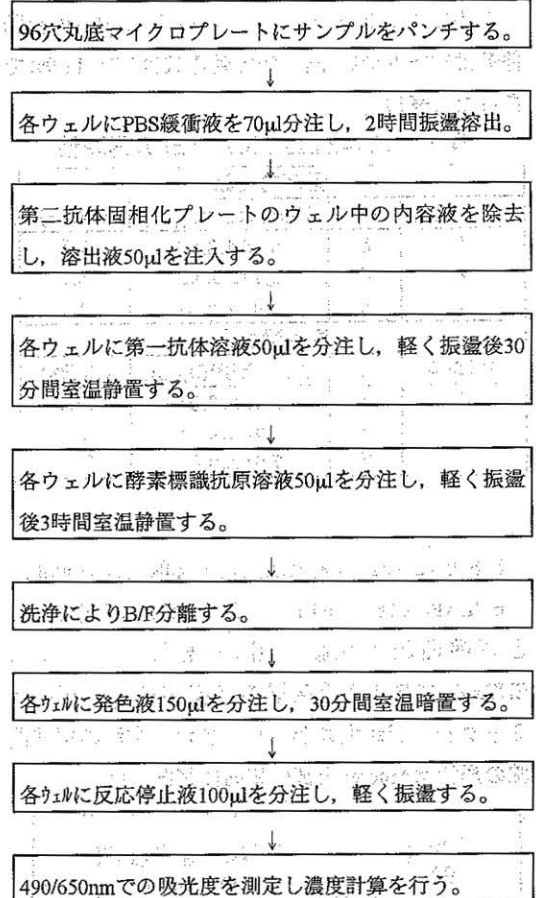


図1 FT4-ELISA(ヒツ法)の測定方法

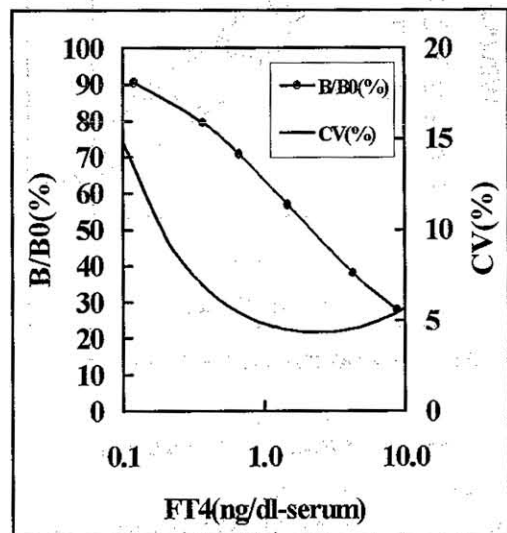


図2 標準曲線とPrecision Profile(ヒツ法)

3-2 再現性

本法による3種コントロール検体の測定内変動係数は3.0~9.5%, 測定間変動係数は3.7~11.9%であった(表1)。

表1 FT4-ELISA (ヒツジ法) の再現性

測定内変動			
コントロール	n	Mean±SD(ng/dl)	CV(%)
1	8	0.30±0.03	9.5
2	8	0.77±0.05	5.9
3	8	7.01±0.21	3.0
測定間変動			
コントロール	n	Mean±SD(ng/dl)	CV(%)
4	7	0.32±0.04	11.9
5	7	0.92±0.03	3.7
6	7	7.51±0.87	11.5

3-3 ENZAPLATE, RIA法との比較 (標準曲線)

ENZAPLATE N-FT4および, Amerex FT4(RIA)と標準曲線の比較(図3)を行ったところ, ENZAPLATEは低濃度域の感度が良く, ダイナミックレンジが大きかった。また, 本法の標準曲線の形状はAmerexと高い相同性があった。

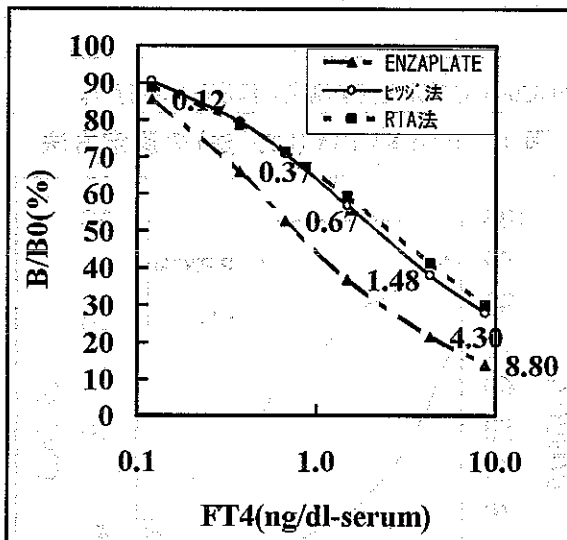


図3 FT4測定法の標準曲線の比較

3-4 生後4~7日目新生児のFT4濃度分布

ENZAPLATE N-FT4と本法により, 生後4~7日目新生児の乾燥ろ紙血液検体50件のFT4を測定した(図4,5)。ENZAPLATEは 2.11 ± 0.61 ng/dl, 本法

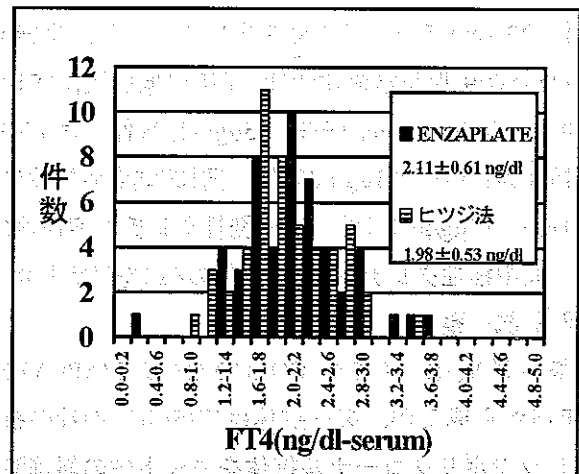


図4 ENZAPLATEとヒツジ法のFT4分布

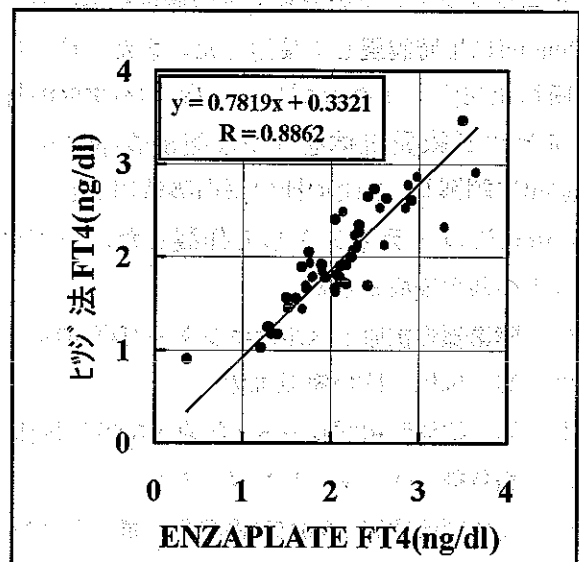


図5 生後4~7日目新生児FT4値相関

は 1.98 ± 0.53 ng/dl, 相関係数 $R=0.8862$ であった。

3-5 FT4低値検体のFT4値の比較

ENZAPLATE N-FT4と本法により, FT4低値検体 (FT4<0.9 ng/dl in serum, TBG>15 μg/ml) 94件のFT4を測定し, 濃度の比較を行った。相関係数 $R=0.7485$ であるが, FT4低値域でも十分な相関があった(図6)。

3-6 TBG欠損症・減少症児のFT4値の比較

ENZAPLATE N-FT4と本法により, TBG欠損症児検体(TBG<1 μg/ml) 8件およびTBG減少症児検体(1<TBG<15 μg/ml) 17件のFT4を測定し, 濃度の比較を行った。いずれの検体も本法による測定値が高値となった(図7)。

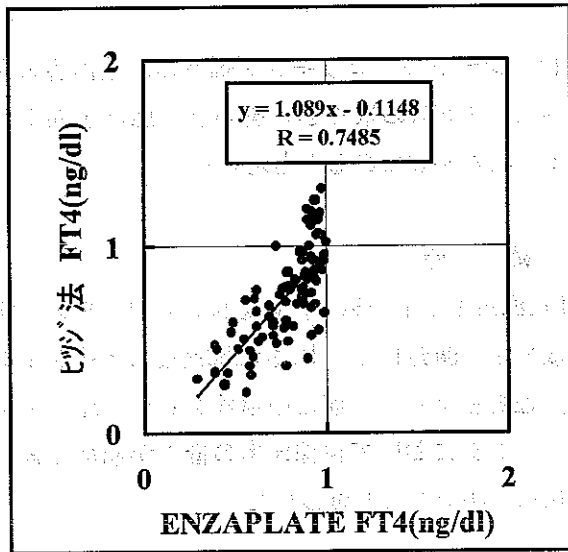


図6 FT4低値検体のFT4値相関

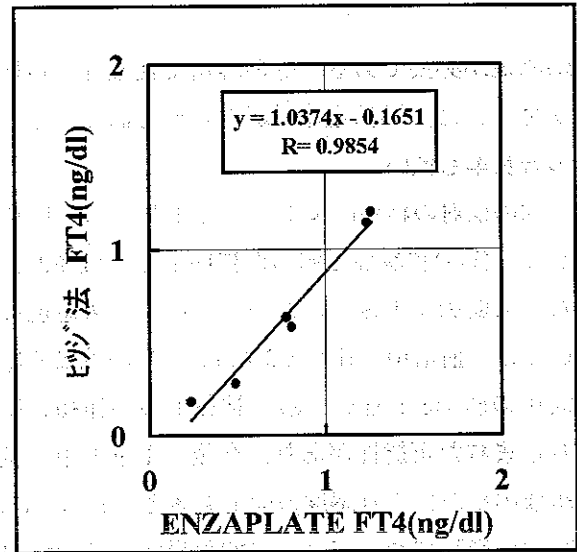


図8 原発性クレチン症のFT4値相関

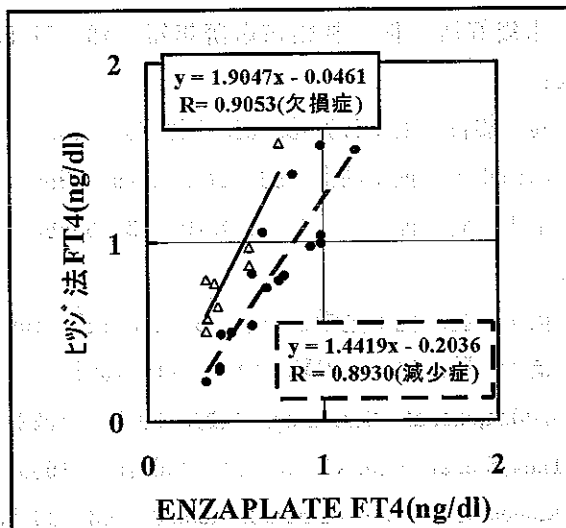


図7 TBG欠損症・減少症のFT4値相関

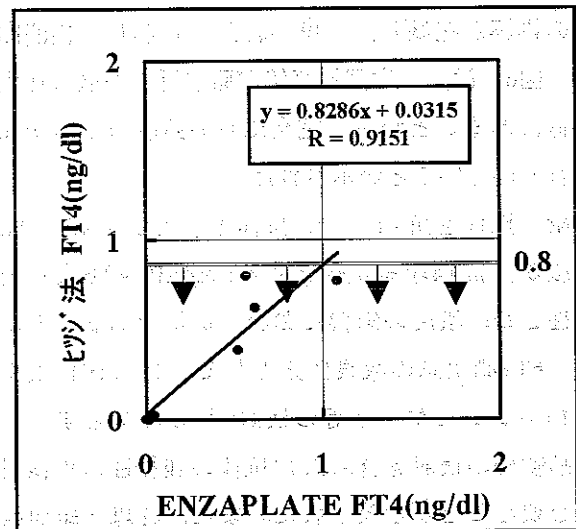


図9 中枢性クレチン症のFT4値相関

3-7 原発性・中枢性クレチン症児FT4の比較

ENZAPLATE N-FT4と本法により、原発性クレチン症児検体6件と中枢性クレチン症児検体7件のFT4を測定し、濃度の比較を行った。原発性クレチン症児FT4は相関係数 $R=0.9854$ と良好であった(図8)。中枢性クレチン症児FT4は相関係数 $R=0.9151$ と良好で、全検体がCutoff値の 0.80ng/dl 以下で、患児の発見が可能であった(図9)。

4. 考察

札幌市が独自に行っているTSH・FT4同時測定による新生児クレチン症マス・スクリーニングは、

コスト面でTSH単独測定に比して不利であるが、TSH単独測定では発見できない遅発型クレチン症と中枢性クレチン症は、FT4低値を示すことから、その発見が可能である。

しかし、測定用キットであるCIBA・CORNING社のENZAPLATE N-FT4は、(1)再現性が低いため、変動の大きい低濃度域と高濃度域の信頼性が低い。(2)感度が低いため使用する抗体量が多く、コストが高い。(3)TBG濃度の影響を受けるため、TBG欠損症児検体のFT4の正しい測定値が得られない。すなわち異常低値を示す。(4)(3)の理由で、FT4異常低値検体について、危険性の高いRIA法による

TBG測定が必要である。等の理由で便宜性と信頼性が低いため、再採血率⁷⁾が約0.4%と高く、キットの普及率も低い。

今回の検討の結果によると、改良法（ヒツジ法）に関して、(1)の再現性は明らかに向上し、広範囲にわたって変動が小さいことが判った。(2)の感度については、血清中に比べて3mmディスクの乾燥ろ紙血液中のFT4は少量なため、試薬中の添加物質に取り込まれた可能性があり、今後、キット中の試薬組成の検討により感度の向上も考えられる。(3)のTBGの影響については、TBG欠損症・減少症児検体すべてにおいてFT4値が高値となり、TBG濃度の影響が軽減したと思われた。しかし、相関関係（図6）は、一次回帰直線が原点近くを通る比例関係にあることから、完全にTBG濃度の影響が除かれていないことが示された。

第一抗体を抗T4ヒツジ抗体とするENZAPLATE変法が、抗T4家兎抗体とするENZAPLATEより再現性とTBG濃度の影響において優位であることから、FT4測定系の改良要素として、T4抗体作製用のT4コンジュゲート等の検討⁸⁾⁹⁾のみならず、免疫動物種の検討を含めたT4抗体の親和性の再検討が必要なことが示唆された。また、乾燥ろ紙血液検体を使用する上で、反応液のpHや蛋白安定剤、

固相プレートのブロッキング剤等の試薬内容の再検討によりFT4の取り込みを防ぎ、感度を向上させることが必要であると考えられた。

5. 結 語

FT4測定キットの第一抗体を抗T4ヒツジ抗体とする改良法を開発した。本法はTBG濃度の影響が少なく、遅発型クレチン症と中枢性クレチン症のスクリーニングにおいて再採血率の低下が期待できる有用な手法であると思われた。

6. 文 献

- 1) 水嶋好清, 他: 札幌市衛研年報, **16**, 51-58, 1989.
- 2) 勝又規行, 他: 日児誌, **91**, 730-737, 1987.
- 3) 原田正平, 他: 同上, **93**, 2742-2749, 1989.
- 4) 福士 勝, 他: ホルモンと臨床, **38**, 83-86, 1990.
- 5) 福士 勝, 他: 医学と薬学, **9**, 243-246, 1991.
- 6) 福士 勝, 他: 日児誌, **91**, 5-11, 1987.
- 7) Ashida, N. et al: Screening, **1(2)**, 89-97, 1992.
- 8) Hata, N. et al: Clin. Chem., **31**, 750-753, 1985.
- 9) Maeda, M. et al: J. Immunol. Method., **82**, 83-89, 1985.

Measurement of Dried Blood FT4 Using Sheep Anti T4 Antibody without an Influence of TBG Value

Atsushi Mikami, Yoko Ogiya, Masaru Fukushi,

Yoshio Shimizu and Yuko Kikuchi

An improved method for determination of free thyroxin (FT4) in dried blood samples on filter paper which is an appropriate marker for detection of late onset hypothyroidism, secondary and tertiary hypothyroidism that are not able to detect by measurement of TSH is described.

This method has a feature that sheep anti T4 antibody is used for assay instead of rabbit antibody caused low effect of thyroxin binding globulin (TBG) for FT4 values, and may contribute to decrease the false negative cases with TBG deficiency in secondary and tertiary hypothyroidism screening