

甲状腺刺激ホルモンの酵素免疫 測定法によるクレチン症マス・ スクリーニングの検討

The Evaluation of Mass-Screening for Congenital Hypothyroidism by Enzyme Immunoassay for Thyroid Stimulating Hormone

水嶋 好清 福士 勝 荒井 修
佐藤 敏雄 佐藤 勇次 林 英夫
高杉 信男 成瀬 浩*

Yoshikiyo Mizushima, Masaru Fukushi,
Osamu Arai, Toshio Satoh, Yuhji Satoh,
Hideo Hayashi, Nobuo Takasugi,
and Hiroshi Naruse

要 旨

クレチン症マス・スクリーニングのための酵素免疫測定法による TSH 測定は、RIA に匹敵する感度を有し、測定値の再現性も良く、RIA 法との相関も良好であった。

新生児 6,615 例について RIA と同時にマス・スクリーニングを行った結果、RIA との相関もよく、再採血率も同等であり、再採血が一致したのは 15 例 (0.23%) で、うち 5 例を精査し、3 例のクレチン症を発見した。

EIA による TSH 測定は RIA に匹敵するマス・スクリーニング法であり、全自動化により大量検体の処理が可能で、今後全国的に広く用いられるべき方法であると考えられる。

1. はじめに

先天性甲状腺機能低下症 (クレチン症) は発見が遅れると重症の発育障害と非可逆的な知能低下をきたすため、出生後の早期発見、早期治療の必

要性が認められ¹⁾、昭和 54 年 10 月から全国的規模でマス・スクリーニングが実施され、測定法は乾燥ろ紙血液を用いた甲状腺刺激ホルモン (TSH) の測定で行われている^{2,3,4)}。

TSH 測定はラジオイムノアッセイ (RIA) により行われているが、ラジオアイソトープ (RI) を使用するために種々の問題があり、最近、わが国において RI を用いない酵素免疫法 (EIA) による測定の研究が進められている^{5,6,7)}。

そこでわれわれは、新生児乾燥ろ紙血液を用いた TSH 酵素免疫測定法によるクレチン症マス・スクリーニングの基礎的検討を行い、同時に TSH RIA との比較について検討し、RIA に匹敵する結果を得たので報告する。

2. 材料と方法

2-1 検 体

測定対象とした新生児乾燥ろ紙血液は、札幌市内の医療機関から先天性代謝異常スクリーニング

* 国立武蔵療養所神経センター

のために送付されたものである。

2-2 試薬

2-2-1 TSH抗血清

抗ヒトTSHウサギ血清 (Calbiochem社製) は1バイアル6mlで、使用時にリン酸緩衝液で10倍に希釈する。

2-2-2 第二抗体固相化ビーズ

抗ウサギIgGヤギ血清 (富士臓器製) をポリアセタールビーズに吸着させたものである。

2-2-3 酵素標識TSH

β -ガラクトシダーゼTSHコンジュゲート (味の素中央研究所製) は1バイアル11mlで、使用時に10倍に希釈する。

2-2-4 リン酸緩衝液

1 mM MgCl₂, 0.1 M NaCl, 0.1% NaN₃, 0.025% 牛血清アルブミンを含む5 mMリン酸緩衝液で、PH7.8とする。

2-2-5 反応停止液

0.1 M グリシンNaOH緩衝液で、PH10.3とする。

2-2-6 基質

4-メチルウンベリフェリル β -ガラクトシド (Koch-Light Laboratories製) は1バイアル1.2mlで、使用時にリン酸緩衝液で31倍に希釈する。

2-3 測定法

(1) 第1試験管 ($\phi 10 \times 75$ mm) に4.25 mmディスク1枚 (あるいは3 mmディスク2枚) をパンチする。

(2) TSH抗血清100 μ lを各試験管に加えた後軽くかくはんし、室温で一夜放置する。

(3) 酵素標識TSH 200 μ lを各試験管に加えた後、軽くかくはんし、第二抗体固相化ビーズを1個入れ、室温で一夜放置する。

(4) 各試験管に冷したリン酸緩衝液を2 ml加え、吸引除去し、その後0.5 mlで2回同様に洗浄する。

(5) あらかじめリン酸緩衝液を250 μ l分注し

てある第2試験管 ($\phi 12 \times 75$ mm) に洗浄の終わったビーズを移す。

(6) 各試験管に基質を50 μ l加え、軽くかくはんし、一定の室温下で正確に1時間酵素反応を行い、反応停止液を2 ml加えてかくはんする。

(7) オートフローセル蛍光光度計にて励起波長 (Ex) 360 nm, 蛍光波長 (Em) 450 nm で測定する。

(8) 小型コンピューターを使用し、標準TSHのB/B₀から標準曲線を作成し、検体の濃度を算出する。

3. 結果

3-1 測定法の基礎的検討

3-1-1 酵素反応温度の検討

酵素反応時間を1時間と一定にし、酵素反応温度を20°C, 22°C, 25°C, 37°Cと4段階に変化させて測定したところ、温度の上昇とともに蛍光強度は増強し、標準曲線の傾きは増大したが (図1-1), B/B₀として表わすと、どの温度でも同様の標準曲線が得られた (図1-2)。

また、温度と蛍光強度について表わすと、その相関係数は $r = 0.9997$, 回帰式 $Y = 25.8X - 33.1$

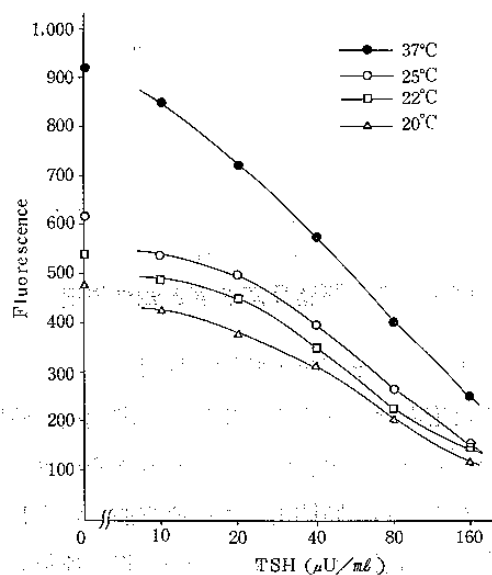


図1-1 酵素反応温度変化と蛍光強度

となる直線関係が得られ、温度1度上昇により蛍光強度が25.8上昇することが認められた(図1-3)。

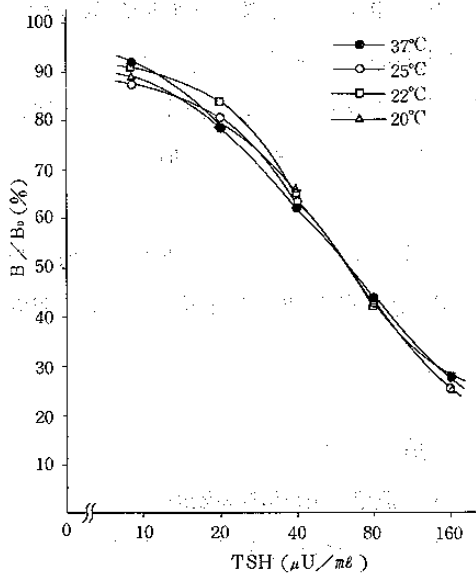


図1-2 酵素反応温度変化によるスタンダードカーブ

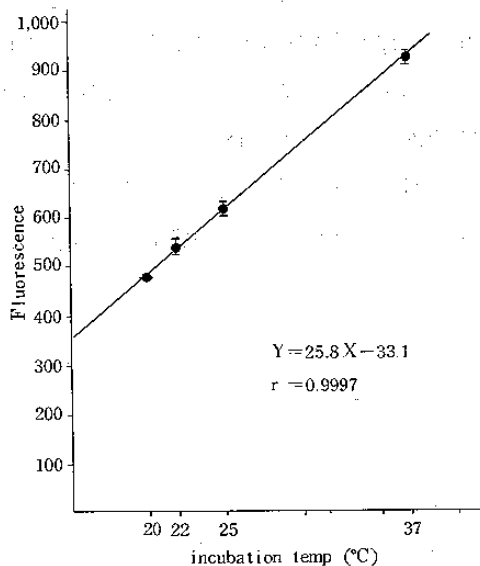


図1-3 酵素反応温度と蛍光強度

3-1-2 酵素反応時間の検討

酵素反応温度を20℃と一定にし、酵素反応時間を20分、40分、60分、90分、120分と変化させて測定したところ、時間とともに直線的に蛍光強度が増大し、回帰式 $Y = 7.6X + 2.1$ 、相関係数 $r = 0.9998$ となった(図2)。

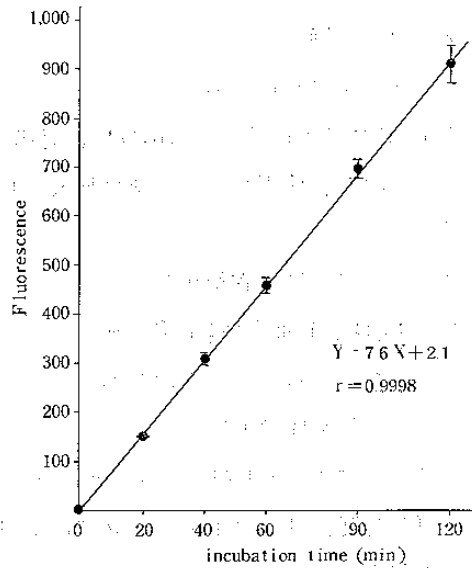


図2 酵素反応時間と蛍光強度

3-1-3 大型ビーズと小型ビーズの検討

異なるロット4、5において、大型ビーズ(自動化用)と小型ビーズ(手動用)について検討したところ、大型ビーズ、小型ビーズともに同様の標準曲線が得られた(図3)。

3-1-4 富士臓器製TSH抗体による検討

富士臓器製TSH抗体を2.5倍、5倍、10倍に希釈してTSH抗血清(Calbiochem社製)のかわりに使用し、測定したところ、希釈倍数が増加するほど標準曲線の傾きは増大したが、10倍希釈ではばらつきが大きく、また、TSH80μU/ml以上の測定はできなかった(図4)。5倍希釈ではTSH10~160μU/mlの測定が可能で、最適な希釈倍数であった。

本法のTSH抗血清ではTSH10μU/mlでB/B₀が85~90%であるのに対して、富士臓器製TSH抗体はTSH10μU/mlで80%以下となり、測定感度が増し良い抗体であるといえる。

3-1-5 測定値の再現性

3種類の乾燥ろ紙血液を同一のアッセイで5回測定した測定内変動係数は6.70~8.58%であり、異なるアッセイで8回測定を繰り返して求めた測定間変動係数は5.54~9.02%となり、両者とも

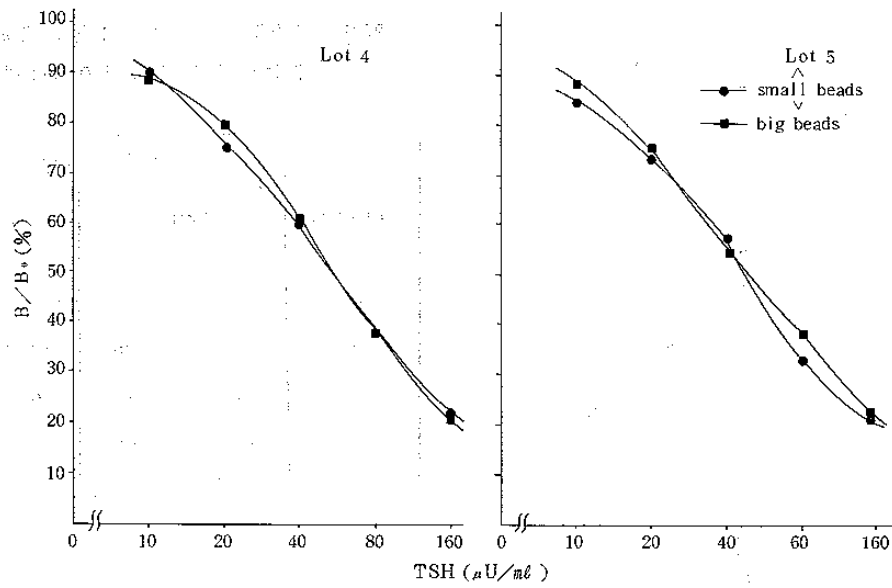


図3 大型ビーズと小型ビーズによるスタンダードカーブ

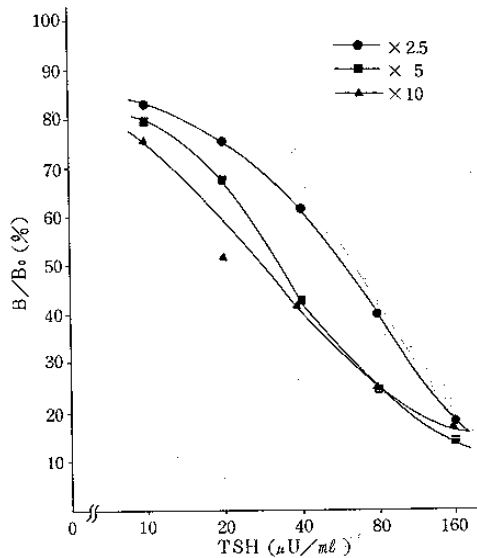


図4 富士臓器製 TSH 抗体によるスタンダードカーブ

表1 再現性

	No.	TSH ($\mu\text{U}/\text{ml}$) (mean \pm SD)	CV%	
intraassay	sample 1	5	55.2 \pm 3.77	6.82
	2	5	30.2 \pm 2.59	8.58
	3	5	17.0 \pm 1.14	6.70
interassay	sample 4	8	55.8 \pm 3.09	5.54
	5	8	28.5 \pm 2.57	9.02
	6	8	15.6 \pm 1.05	6.73

に良好な再現性を示した(表1)。

3-1-6 4.25mmディスク1枚と3mmディスク2枚との比較

4.25mmディスク1枚と3mmディスク2枚を使用したさいのそれぞれの標準曲線は4.25mmディスク1枚の方がB/B₀でやや高いが、同様の傾きを示していた(図5)。

また、3種類の乾燥ろ紙血液を測定したところ、4.25mmディスク1枚、3mmディスク2枚で測定値

に有意差は認められなかった(表2)。

3-1-7 固相法 TSH RIAキットとの相関
25例の同一乾燥ろ紙血液について、すでに報告した固相法 TSH RIA²⁾による測定値と本法による測定値を同じEIAのスタンダードで比較すると、相関係数 $r = 0.987$ 回帰式 $Y = 1.14X - 5.8$ となった。各々のスタンダードで比較すると相関係数 $r = 0.985$ 回帰式 $Y = 1.60X - 8.0$ となり、EIAスタンダードではやや高い値を示したが、良い相関を示した(図6)。

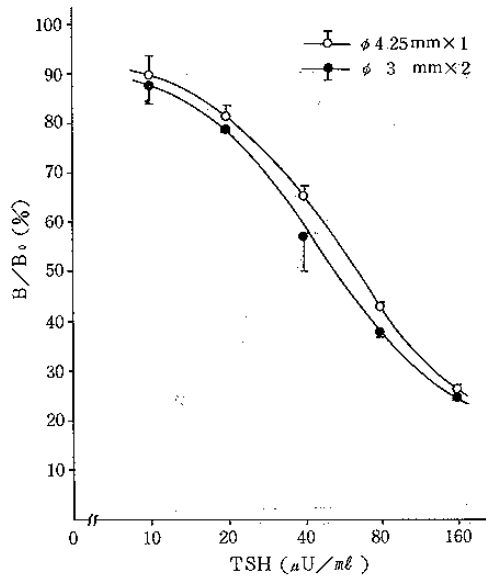


図5 4.25mm ディスク1枚と3mm ディスク2枚の比較

表2 4.25mm ディスク1枚と3mm ディスク2枚によるTSH値の比較

control	TSH ($\mu\text{U}/\text{ml}$)	
	ϕ 3 mm \times 2	ϕ 4.25 mm \times 1
	n = 3	n = 5
1	59.3 \pm 0.98	60.3 \pm 3.79
2	31.7 \pm 2.15	29.6 \pm 2.66
3	16.5 \pm 2.65	16.3 \pm 2.80

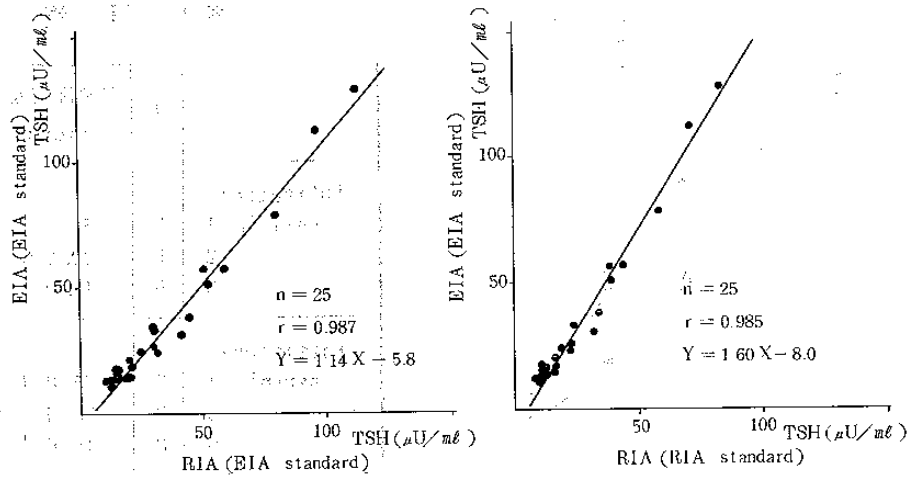


図6 EIAとRIAとの比較

3-2 マス・スクリーニングへの応用

3-2-1 TSH RIAとTSH EIAによるカットオフ値の比較

初回高値3パーセンタイルを再検, なお3パーセンタイルに入る検体を再採血するカットオフ基準にし, 新生児6,615例についてスクリーニングを行った結果, 再採血はEIAでは43例(0.65%), RIAでは35例(0.53%)となり, 両テストで一致したのは15例(0.23%)であった(表3)。

再採血の結果, なおTSHが高値となったのは5例(うち直接精査2例)で, いずれも両テスト

表3 EIAとRIAにおけるカット・オフ値の比較

	R I A			total
	1st test < 3 percentile	1st test > 3 percentile retest < 3 percentile	1st test > 3 percentile retest > 3 percentile	
E	6,209	166	15	6,390
I	165	12	5	182
A	23	5	15	43
total	6,397	183	35	6,615

表4 EIAとRIAにおけるTSH値の比較

		R I A						total
		< 10	10 - 15	15 - 20	20 - 25	25 - 30	30 <	
E I A	< 10	●●●●● □□□□□ 5,595	●□□□□ 416	□□□□□ 146	□□□ 30			6,188
	10 15	○●●●●●● ●●●●●●● ●●●●●△ □ 306	○●●●●● □△△△△△ 56	□□□□△ △ 22	□△ 4			389
	15 20	●●●△ 21	○○○○○ 6	△ 1	○ 1			29
	20 25	●● 2				○ 1		3
	25 30	● 1		○ 1				2
	30 <						○●●○ 3*	4
	total	5,926	478	170	35	3	3	6,615

- EIA RIA 3-3 percentile
- EIA 3-3 percentile
- RIA 3-3 percentile
- △ EIA RIA 1st test 3 percentile
- * 3 cases of congenital hypothyroidism

で一致した例である。これら5例を精査した結果、3例のクレチン症を発見した。

3-2-2 TSH RIAとTSH EIAによる
新生児乾燥ろ紙血液 TSH 値の比較

新生児6,615例の乾燥ろ紙血液のスクリーニングを行い、RIA法とEIA法で測定したときのTSH値の相関を調べた(表4)。

その結果、初回到10μU/ml以上を示した例はEIA法で427例(6.5%)、RIA法では689例(10.4%)であり、両テストともよく一致してい

た。両テストでカットオフ基準に入った15例は表中「○」で示してある。EIAのみでカットオフ基準に入った28例は表中「●」で示し、RIAのみでカットオフ基準に入った20例は表中「□」で示してある。両テストでTSH30μU/ml以上を示した3例は精査の結果クレチン症であったものである。

3-2-3 発見されたクレチン症児のTSH
RIAとTSH EIAの比較

6,615例のスクリーニングの結果、精査となっ

たのは5例で、TSH $30\mu\text{U}/\text{ml}$ 以上を示した3例は精査の結果クレチン症と診断された。クレチン症3例のTSH値は、表5に示すように、RIA、EIAともによく一致していた。症例2、3はTSH異常高値のために再採血を行わずに直接精査を行った例である。

表5 発見されたクレチン症の TSH 値

cases	R I A			E I A		
	TSH ($\mu\text{U}/\text{ml}$)			TSH ($\mu\text{U}/\text{ml}$)		
	1st test	retest		1st test	retest	
1 (recall)	32.4	30.8 (85.7)	27.0 (86.7)	30.3	33.2 (116.6)	34.7 (133.3)
2	250.4	> 160		231.7	> 160	
3	134.8	137.7	115.8	91.4	125.0	

4. 考 察

クレチン症マス・スクリーニングのための乾燥ろ紙血液によるTSH測定は、従来RIA法により行われてきた^{2,3,4)}。しかし、RIを用いているために種々の制約を受けており、必ずしもすべてのスクリーニングセンターで行える検査法ではなく、特別の施設、特殊技術者の必要性がある。また、¹²⁵Iは半減期が60日と短く、放射性廃棄物の問題もある。一方、EIAでは抗原抗体反応のほかに酵素反応という2段階の反応があり、簡便さでは劣るが、RIAで問題となる点を満している。

EIAによるTSH測定の報告は宮井ら⁵⁾、加藤⁶⁾によりなされているが、ろ紙血液を測定できるまでの感度には至っていなかった。石井⁷⁾は3mmディスク2枚で測定できる方法を開発し、われわれもこの方法に準じて測定し、マス・スクリーニングへの応用とRIAとの比較について検討した。

酵素反応温度は1℃の上昇で蛍光強度が25.8上昇し、室温ではCV5%の上昇となる。一方、酵素反応時間が1分増加すると蛍光強度は7.6上昇し、3分でCV5%の上昇となる。このことから

も大量検体を処理する場合に、酵素反応温度と時間は全検体について一定であることを要し、温度コントロールがより重要となる。全自動化により温度と時間を一定にすることが省力化とともに測定値の安定性を増し、スクリーニングを容易にするものとする。

大型ビーズでは洗浄時のろ紙の吸引がなく、標準曲線も小型ビーズと一致しており、自動化可能な点で大型ビーズ使用が有利であった。

4.25mmディスク1枚と3mmディスク2枚とはほぼ同様の標準曲線となり、パンチする回数が半分で済み、ろ紙血液の枚数の間違いを少なくでき、打ち抜き部位の濃度差を少なくできる点で4.25mmディスク1枚の使用が便利であった。

富士臓器製のTSH抗体は本法のTSH抗体よりも感度的にすぐれており、富士臓器製TSH抗体の使用により $10\mu\text{U}/\text{ml}$ 以下の測定も可能であった。

測定値の再現性は測定内、測定間変動係数ともにRIAに匹敵する結果を得た。また、固相法RIAキットとの相関も良好で、十分マス・スクリーニング可能であった。

初回高値3パーセントイルを再検、なお3パーセントイルに入る検体を再採血とするカットオフ基準にし、6,615例の新生児についてRIA法とEIA法で同時にスクリーニングした結果、EIAで再採血となったのは43例(0.65%)、RIAでは35例(0.53%)でほぼ同様の結果を得た。RIA法とEIA法の両方で再採血となったのは15例(0.23%)であり、再採血検体でもなおTSHが高値となった5例(うち2例は直接精査)は精査を行い、3例のクレチン症を発見した。発生頻度は1/2,200であった。RIA法のみで再採血を行った20例は再採血でTSH低値となり、精査を行った例は1例もなく、EIA法で見逃しなくスクリーニング可能であり、RIA法に匹敵するマス・スクリーニング法であった。

EIAによるTSH測定はRIAで常に問題となる放射性廃棄物の問題、試薬の安定性、特殊施設や特殊技術者の必要性がなく、全自動化による大量検体の処理が可能であり、今後、クレチン症のマス・スクリーニングにEIAによるTSH測定が取り上げられ、広く全国的に用いられるものと考ええる。

5. 結 語

酵素免疫測定法によるTSH測定はRIAによるTSH測定に匹敵する感度を有し、測定値の再現性も良く、RIA法との相関も良好で、クレチン症マス・スクリーニングに応用可能であった。

6,615例の新生児についてRIA法と同時にマス・スクリーニングを行った結果、再採血率は同等で、RIA法との相関もよく、再採血は15例(0.23%)が一致し、うち5例が精査となり、3例のクレチン症を発見した。

クレチン症マス・スクリーニングのためのEIAによるTSH測定は、RIAで問題となる放射性物質の問題、特殊技術者の必要性がなく、全自動化による大量検体の処理が可能であるEIAによるTSHスクリーニングは、今後全国的に広く用いられるべきマス・スクリーニング法であると考ええる。

6 文 献

- 1) Klein, A. H., Meltzer, S. and Kenny, F. M. Improved prognosis in congenital hypothyroidism treated before age three months, *J. Pediatr.*, 81, 912 ~ 915 (1972)
- 2) 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)
- 3) 梅田みほ子, 榎本仁志, 伊東裕美子: 乾燥濾紙血液を用いたTSHラジオイムノアッセイによる先天性甲状腺機能低下症の早期発見に関する研究, *日内分泌誌*, 55, 1452 ~ 1468 (1979)
- 4) 宮井潔, 藪内百治, 大浦敏明, 川島実, 管森徳蔵, 水田仁士, 網野信行, 市原清志, 西啓子, 藤江富子, 中谷清美, 野瀬宰, 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)
- 5) Miyai, K., Ishibashi, K. and Kumahara, Y.: Enzyme-linked immunoassay of thyrotropin. *Clin. Chim. Acta*, 67, 263 ~ 268 (1976)
- 6) 加藤進昌: 甲状腺刺激ホルモンの酵素免疫測定法の開発と臨床応用, *日内分泌誌*, 55, 720 ~ 733 (1979)
- 7) 石井澄和: 甲状腺刺激ホルモンの酵素免疫測定法, 先天性甲状腺機能低下症マス・スクリーニングへの応用, *日内分泌誌*, 57, 1027 ~ 1043 (1981)