

酵素免疫測定法による濾紙血液 TBG 測定 の 検 討

水嶋 好清 扇谷 陽子 荒井 修 福土 勝
阿部 克己 菊地由生子 高杉 信男

要 旨

先天性甲状腺機能低下症マススクリーニングの確認検査として実施している TBG 測定について、ビーズ固相 ELISA 法による検討を行った。ラジオアイソトープを用いず、試薬の入手が容易であり、迅速性再現性にすぐれ、従来の RIA 法ともよい相関を示し、RIA 法に変えて実施可能であった。

1. 緒 言

札幌市では昭和 53 年から先天性甲状腺機能低下症のマススクリーニングを甲状腺刺激ホルモン (TSH) の測定により開始し、その後トータルサイロキシン (TT4) および遊離型サイロキシン (FT4) も指標として取り入れ実施している¹⁾。

全国的には、TSH 単独の検査で実施されているが、視床下部性、下垂体性甲状腺機能低下症、TSH 上昇遅延型の原発性甲状腺機能低下症²⁾、母親の甲状腺機能異常に起因する一過性低 T4 血症³⁾などは TT4 や FT4 の測定によらなければ発見できない。

検査法として、昭和 63 年には TSH を放射性免疫測定法 (RIA)⁴⁾ から酵素免疫測定法 (ELISA)⁵⁾ にかえ、FT4 についても ELISA 法が開発されたことから⁶⁾、一次検査として実施している TSH、FT4 は放射性物質を使用せずに検査が可能となった。

FT4 の RIA 法、ELISA 法はいずれも甲状腺機能低下症ばかりでなく、低出生体重児や甲状腺ホルモン結合グロブリン (TBG) 欠損症、一過性低 T4 血症等で FT4 低値を示すことから二次検査として、マイクロゾーム抗体 (MCHA) と TBG の測定が必要である。MCHA は凝集反応で可能であるが、TBG の測定は RIA 法⁷⁾ しかないことから、アイソ

トープを用いない検査法として市販の血清測定用の ELISA キット⁸⁾ 改良により、濾紙血液による測定法を検討したので報告する。

2. 方 法

使用したキットは血清用の「グロオザイム TBG」(三洋化成製; 和光純薬工業) で、ビーズ固相法サンドイッチ ELISA を原理としている。

測定方法は 3mm ディスク 1 枚を用い、100 μ l の TBG 高値検体希釈液、300 μ l の精製水を加えて 25°C 2 時間溶出させ、抗ヒト TBG 抗体 (ヤギ) 結合ガラスビーズ (直径 6mm) 1 個を入れ、25°C 30 分第一反応させ、洗浄液 (B/F 分離液) 3ml で 3 回洗浄する。次に、100 μ l のペルオキシダーゼ結合ヒト TBG 抗体 (ウサギ)、300 μ l の精製水を加えて 25°C 30 分第二反応させ、B/F 分離液 3ml で 3 回洗浄する。次に、100 μ l の発色剤、300 μ l の精製水を加えて 25°C 15 分酵素反応させ、1ml の 1N 硫酸を加え、492/600nm での吸光度を測定する。濾紙血液スタンダードは洗浄赤血球と標準 TBG セット (0, 5, 10, 25, 40 μ g/ml) を等量混合し、濾紙に滴下して作製した。

RIA による TBG 測定は福土ら⁷⁾ の方法、TSH の測定は ELISA 法の福土ら⁵⁾ の方法、FT4 の測定

はRIA法の福士らの方法⁹⁾により行った。また、MCHAの測定は水嶋ら¹⁰⁾の方法によった。

3. 結果

第一反応の緩衝液であるクエン酸緩衝液はpH 4.0であり、血清測定用に抗原抗体反応を抑制して感度を落としており、リン酸緩衝液を用いたときの吸光度の1/3程度であり、また濾紙血液でのRIA法⁷⁾との相関も良くなかった ($n=26$, $Y=0.46X+6.3$, $r=0.746$)。そこで、第一反応の緩衝液をキット添付のクエン酸緩衝液からリン酸緩衝液である希釈液に変えることにより、再現性よく高感度に測定可能であり、以後の検討は希釈液を用いた。

第一反応条件の検討として、第二反応時間30分、第三反応(酵素反応)時間15分とし、時間の検討を行ったところ、30分ではほぼ一定となった(図1)。

第二反応時間は、他の反応を一定として、15、30、60分と増すにしたがい吸光度は上昇した。吸光度が2.0を超えると信頼性がなくなることから、この上限を超えない時間として、30分とした(図2)。

第三反応である酵素反応の時間は、第一、第二反応をそれぞれ30分とすると、時間の増加にしたが

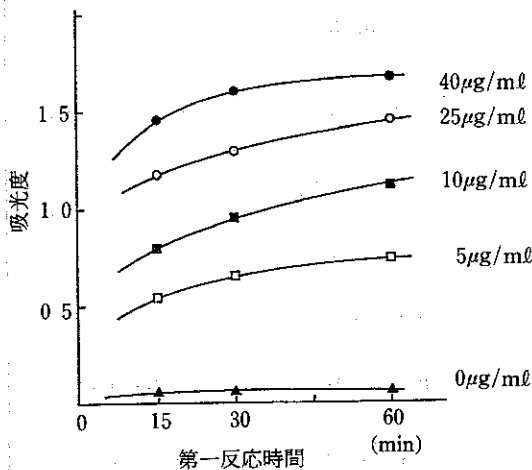


図1 第二反応時間30分、第三反応時間15分としたときの第一反応時間による変化

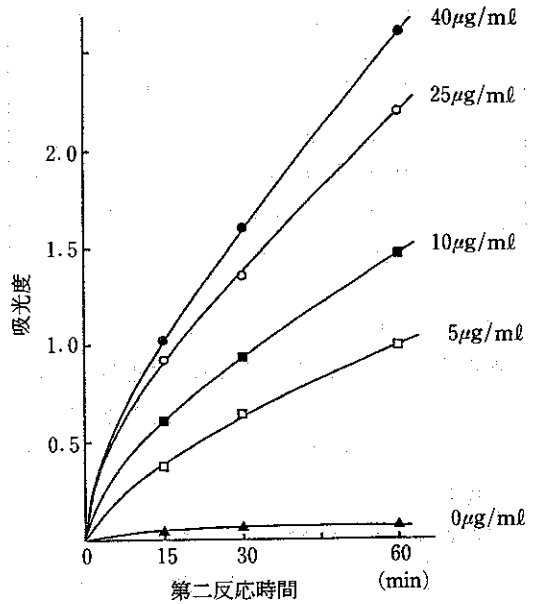


図2 第一反応時間30分、第三反応時間15分としたときの第二反応時間による変化

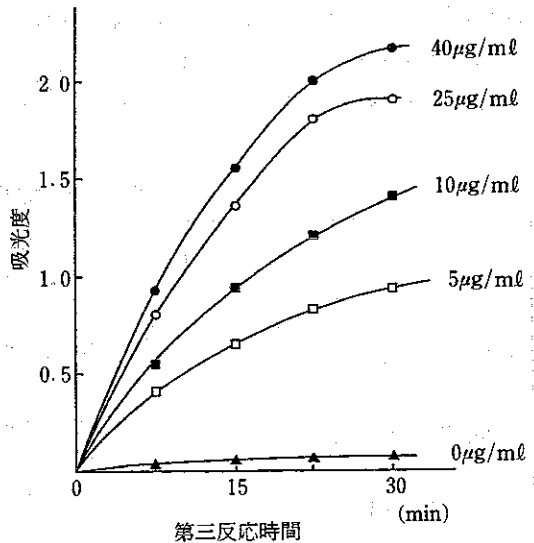


図3 第一反応時間30分、第二反応時間30分としたときの第三反応時間による変化

い吸光度は上昇するが、吸光度の上限を超えない15分とした(図3)。

以上の結果から、反応時間は第一反応30分、第

表1 再現性

	TBG ($\mu\text{g/ml}$) (n=6)			
	測定内変動		測定間変動	
	mean \pm SD	CV%	mean \pm SD	CV%
C-1	12.2 \pm 0.38	3.1	11.8 \pm 0.41	3.5
C-2	19.2 \pm 1.12	5.8	19.1 \pm 0.56	2.9
C-3	23.3 \pm 1.59	6.8	23.8 \pm 1.72	7.2

二反応30分，酵素反応15分とした。

測定系の安定性を検討するため，3種類の検体について6回実施したところ，測定内変動は3.1～6.8%，測定間変動は2.9～7.2%と，ともに良好な再現性を示した(表1)。

現在使用しているTBGの配位分配サンドイッチRIA⁷⁾と本法で26例について相関をとったところ， $Y = 0.95X + 2.84$ ， $r = 0.973$ となり，良好な相関を示した(図4)。

甲状腺機能低下症，一過性甲状腺機能低下症，一過性低T4血症，TBG欠損症，TBG減少症の各種疾患における生後4～7日の新生児濾紙血液について，TBG値，FT4値，TSH値を測定した(表2)。TBG

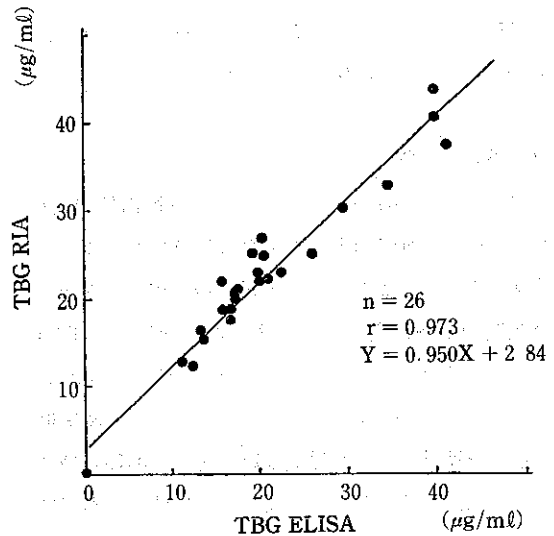


図4 乾燥濾紙血液によるサンドイッチ法ELISAと配位分配法サンドイッチ法RIAによるTBG値の相関

欠損症のTBG値は $0.1\mu\text{g/ml}$ 以下を示し，甲状腺機能低下症，一過性甲状腺機能低下症，一過性低T4血症では，それぞれ 22.7 ± 8.0 ， 20.4 ± 0.9 ， $19.7 \pm 3.5\mu\text{g/ml}$ と健常新生児の $21.6 \pm 4.0\mu\text{g/ml}$ と5%の危険率で有意差はなかった。

表2 各種疾患における測定値

	例数	TBG ($\mu\text{g/ml}$)	FT4 (ng/dl)	TSH ($\mu\text{U/ml}$)
甲状腺機能低下症	7	22.7 ± 8.0 (15.6~38.6)	$1.33 \pm 0.56^{***}$	$31.2 \pm 20.3^{***}$
一過性甲状腺機能低下症	6	20.4 ± 0.9 (18.9~21.3)	$0.86 \pm 0.41^{***}$	$54.4 \pm 56.4^{***}$
一過性低T4血症	7	19.7 ± 3.5 (15.2~24.9)	$0.49 \pm 0.20^{***}$	$1.4 \pm 1.5^{**}$
TBG欠損症	6	$< 0.1^{***}$	$0.77 \pm 0.26^{***}$	$2.0 \pm 1.9^*$
TBG減少症	7	$11.0 \pm 1.8^{***}$ (8.6~13.4)	$0.87 \pm 0.18^{***}$	$1.5 \pm 0.8^{**}$
健常新生児	100	21.6 ± 4.0 (15.1~33.5)	2.14 ± 0.41	3.8 ± 2.1

*健常新生児との有意差 *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001

4. 考 察

先天性甲状腺機能低下症のマススクリーニングのための検査法として、TSH、FT4の併用によって実施することは、精度の向上と確実な検査が可能となる。しかし、二項目の検査を実施することによって、再検査となる検体数も増加する。そのため現在、再検査を減少させるため二次検査としてTBG、MCHA等の検査を実施している。

TSHおよびFT4の検査がELISAにより測定可能となり、二次検査としてのTBG測定も非放射性的検査法が可能となれば、放射性同位元素使用施設をもたないスクリーニングセンターでも先天性甲状腺機能低下症のマススクリーニングの精度の高い検査が可能で極めて有効な検査手段となる。今回市販のキットによる濾紙血液を用いた簡便な測定法について検討したところ、本法は再現性も良く、従来の配位分配サンドイッチ法RIAとの相関も良好であった。しかし、RIA法よりは手順が多く、簡便性ではやや劣るが、非放射性であるため特殊な施設を必要せず、かつ安全で、市販品であるため入手が簡便であるなどの利点がある。

測定系はすべて試験管中で行うため、自動測定を行うには測定機としてオートシッパ型の分光光度計か試験管をそのまま測定できるダイナボット製のQuantum 2型分光光度計を用いると便利であるが、マイクロプレートに0.1または0.2mlの一定量を分取してマイクロプレートリーダーでの測定も可能である。

今後はより簡便な方法として、TSH、FT4と同様なマイクロプレートを用いた測定法の開発が期待される。

5. 結 語

先天性甲状腺機能低下症のマススクリーニングはTSH単独よりはFT4との併用が望ましいため、両者を測定したときの二次検査として実施しているTBG測定を、放射性物質を用いる検査法から、非放射性的検査として濾紙血液TBGのELISA法を検討した。TBGのELISAは、市販のキットを用いているため入手が簡単であり、再現性にすぐれ、従来のRIA法ともよい相関を示しており、二次検査法として応用可能であった。

6. 文 献

- 1) 水嶋好清他：札幌市衛研所報, **16**, 51-58, 1989
- 2) Dussault, J. H. and Morissette, J.: Neonatal Screening, ed by Naruse, H. and Irie, M. p56-62, Excerpta Medica, (Amsterdam), 1983.
- 3) 由利賢次他：ホルモンと臨床, **36**, 671-675, 1988
- 4) 水嶋好清他：ホルモンと臨床, **30**, 461-465, 1982
- 5) 富士勝他：ホルモンと臨床, **37**, 337-340, 1989
- 6) 扇谷陽子他：札幌市衛研所報, **17**, 92-96, 1990.
- 7) 富士勝他：医学と薬学, **9**, 243-246, 1983.
- 8) 三浦雅一他：ホルモンと臨床, **37**, 1045, 1989.
- 9) 富士勝他：日本小児科学会誌, **91**, 5-11, 1987.
- 10) 水嶋好清他：ホルモンと臨床, **35**, 589-594, 1987.

Enzymeimmunoassay of Thyroxine Binding Globulin Using Dried Blood Samples

Yoshikiyo Mizushima, Yoko Ogiya, Osamu Arai, Masaru Fukushi,
Katumi Abe, Yuko Kikuchi and Nobuo Takasugi

ABSTRACT

We examined that measurements of thyroxine binding globulin (TBG) in dried blood samples by enzymeimmunoassay using anti TBG coated beads for congenital hypothyroidism screening. This method was non-isotopic, rapid and precise assay, and this reagents could be procure easy. And TBG values with this method were good correlation between those with radioimmunoassay method. We would be able to change from radioimmunoassay method to this enzymeimmunoassay.