

## 酵素免疫測定法による乾燥濾紙血液遊離チロキシン測定 の基礎的検討とクレチン症スクリーニングへの応用

扇谷 陽子<sup>1)</sup>、水嶋 好清<sup>2)</sup>、荒井 修<sup>3)</sup>、福士 勝<sup>4)</sup>、  
阿部 克己<sup>5)</sup>、菊地由生子<sup>6)</sup>、高杉 信男<sup>7)</sup>

### 要 旨

酵素免疫測定法 (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, 以下 ELISA) により乾燥濾紙血液中の遊離チロキシン (Free  $T_4$ , 以下  $FT_4$ ) を測定するキットを用いて、その再現性・測定感度など基礎的な検討を行った。その結果、乾燥濾紙血液 3.2mm ディスク 1 枚で 0.2~10ng/dl の  $FT_4$  を測定でき、その精度は測定内変動係数 7.6-15.0%、測定間変動係数 9.4-18.5% と良好だった。さらに、新生児の乾燥濾紙血液検体を用いて放射性免疫測定法<sup>1)</sup> (Radio Immuno Assay, 以下 RIA) による測定値との相関および平均値を比較検討した。平均値はほぼ同一であり、相関係数も 0.95 と良好な相関を得た。

私達の検討したこの方法は先天性甲状腺機能低下症マススクリーニングにおける  $FT_4$  の測定方法として有用と考えられる。

### 1. 緒 言

チロキシン ( $T_4$ ) 及びトリヨードチロニン ( $T_3$ ) は甲状腺から分泌されるホルモンで、人体内の代謝調節に参与している。血液中においては  $T_4$  の 99.9% 以上が輸送タンパク、すなわちチロキシン結合グロブリン (TBG)、チロキシン結合プレアルブミン (TBPA) 及びアルブミンに結合しているが、実際に生理活性を有するのはタンパクに結合していない  $FT_4$  である。従って  $FT_4$  の測定は甲状腺疾患の診断において有用である。

現在わが国の新生児期における先天性甲状腺機能低下症のマススクリーニングは、甲状腺刺激ホルモン (TSH) の測定により行われているが、TSH の上昇しない視床下部・下垂体性の甲状腺機能低下症が発見できないことから  $FT_4$  の測定が有用とされている。

RIA 法による  $FT_4$  の測定は、感度・再現性等優れた方法ではあるが、放射性同位元素を使用するため、試薬の有効期限が短い、放射性物質による汚染、

廃棄物の処理などの問題があった。

今回、放射性同位元素を使用せず ELISA 法で  $T_4$  を測定するキット「エンザプレート N- $FT_4$ 」を試用する機会を得て、その基礎的検討及び新生児スクリーニングへの応用について検討したので報告する。

### 2. 方 法

#### 2-1 検 体

基礎的検討には市販のコントロール血清に洗浄赤血球を添加して濾紙にスポットして作成した乾燥濾紙血液検体を、RIA 法との比較には札幌市内の医療機関から依頼された新生児の乾燥濾紙血液検体を用いた。

#### 2-2 試 薬

チバ・コーニング社のキット「エンザプレート N- $FT_4$ 」を用いた。このキットはマイクロプレートに第 2 抗体を固相化し、これに  $FT_4$  及び酵素標識抗原を競合反応させた後、酵素基質を添加、発色

させ比色定量することを原理としている。

#### キットの構成

- (1) 酵素標識抗原  
ペルオキシダーゼ標識チロキシン
- (2) 第1抗体  
抗チロキシンウサギ抗体
- (3) 第2抗体固相化プレート  
抗ウサギ免疫グロブリンGヤギ抗体
- (4) 発色剤  
O-フェニレンジアミン
- (5) 発色剤溶解液  
3%過酸化水素水
- (6) 反応停止液  
3N硫酸
- (7) 濃縮洗浄液  
9%塩化ナトリウム液 (10倍希釈して使用)
- (8) 緩衝液  
リン酸塩緩衝塩化ナトリウム
- (9) 標準濾紙血液  
遊離チロキシン含有人血液 (0~10ng/dl  
7濃度)

#### 2-3 器具及び装置

- (1) マイクロプレートリーダー  
Inter Med社製  
Immuno Reader NJ-2000
- (2) プレート洗浄機  
Inter Med社製  
Immuno Washer NK-300
- (3) 計算用コンピューター  
NEC PC-9801VX

#### 2-4 測定方法

- (1) 第2抗体固相化マイクロプレート内の内容液を除去し、プレートの各ウェルに乾燥濾紙血液を、3.2mmにパンチして入れる。
- (2) 各ウェルに第1抗体溶液100 $\mu$ l、酵素標識抗原溶液50 $\mu$ lを分注する。ブランクのウェルには緩衝液100 $\mu$ l、酵素標識抗原溶液50 $\mu$ lを分注する。

- (3) プレートを軽く振とうする。
- (4) プレートにシールを貼り、25°Cで4時間反応させる。
- (5) ウェル内の濾紙を除去する。
- (6) 洗浄液で4回洗浄する。
- (7) 各ウェルに発色液150 $\mu$ lを分注する。
- (8) 遮光下、室温で30分間反応させる。
- (9) 各ウェルに反応停止液100 $\mu$ lを分注する。
- (10) 軽く振とうし、490nmの吸光度を測定する。
- (11) 標準曲線より測定値を計算する。

### 3. 結果

#### 3-1 標準曲線と Precision Profile

本法の標準曲線は0~10ng/dlの範囲の7点より作成されている。その標準曲線及び Precision Profileは図1に示すとおりで、標準曲線のB/B<sub>0</sub>の

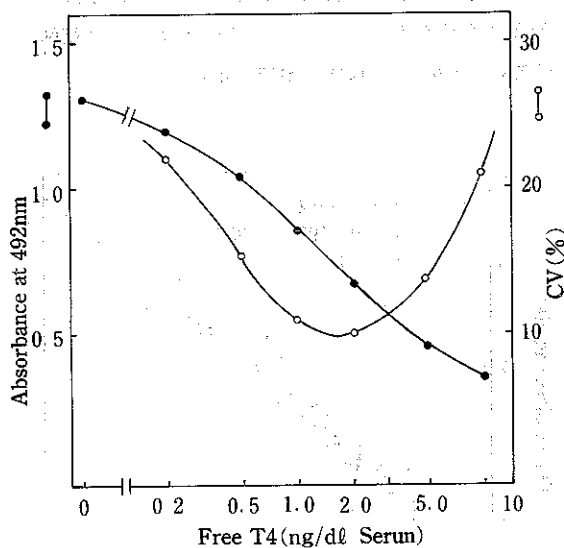


図1 標準曲線と Precision Profile

90%点は0.2ng/dl、50%点は2.0ng/dlであった。Precision Profileの変動係数が15%以下のFT<sub>4</sub>の濃度は0.5~5ng/dlであった。

#### 3-2 再現性

FT<sub>4</sub>が0.2~2.5ng/dlの範囲にある3種類の濃

表1 ELISA法による乾燥濾紙血液FT<sub>4</sub>測定の変動係数の再現性

	n	FT <sub>4</sub> (ng/ml)	CV (%)
測定内変動			
検体-1	8	0.20±0.03	15.0
検体-2	8	1.11±0.09	8.1
検体-3	8	2.51±0.19	7.6
測定間変動			
検体-4	8	0.21±0.04	18.5
検体-5	8	1.02±0.11	10.4
検体-6	8	2.58±0.24	9.4

度の乾燥濾紙血液検体を用いて、n = 8における測定内変動及び測定間変動を調べた。その結果は表1のとおり測定内変動係数は7.6%～15.0%であり、測定間変動係数は9.4%～18.5%であった。

### 3-3 RIA法との相関

新生児乾燥濾紙血液検体50例について、本法とRIA法を比較したところ、図2に示すとおり相関係数r = 0.9542の良好な相関を認めた。

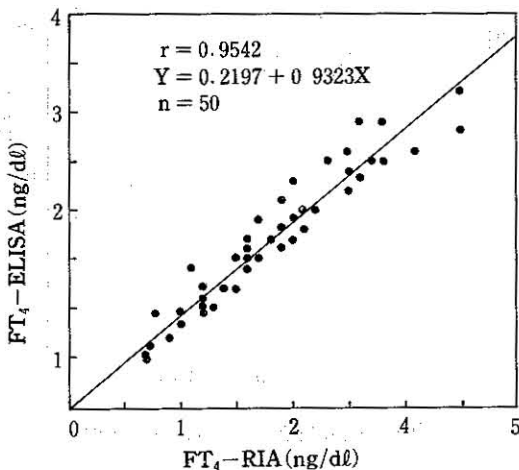


図2 ELISA法とRIA法の相関

### 3-4 出生体重によるFT<sub>4</sub>の変化

新生児を出生体重により1,500gから4,500gまで500g毎に6群に分類し、そのFT<sub>4</sub>の測定値の平

表2 生後4-7日の新生児乾燥濾紙血液FT<sub>4</sub>の出生体重による変化

出生体重	新生児数	FT <sub>4</sub> (ng/ml)
1500-1999	6	1.18±0.37
2000-2499	94	1.74±0.58
2500-2999	629	1.92±0.56
3000-3499	841	1.93±0.55
3500-3999	272	1.98±0.54
4000-4499	27	2.10±0.59

均を比較したところ、表2に示すように1,500～1,999gの低出生体重群が他群に比較して明らかに低値を示した。

### 3-5 TBGによるFT<sub>4</sub>の変化

TBG欠損症の新生児についてその測定値をRIA法による測定値と比較したところ、表3のとおりELISA法でより低値を示した。また、TBG減少症の新生児についても同様に比較したところ、ELISA法で、より低値となる傾向が認められた。

表3 TBG欠損症の新生児のRIA法及びELISA法測定FT<sub>4</sub>値

No.	RIA-FT <sub>4</sub> (ng/ml)	ELISA-FT <sub>4</sub> (ng/ml)	TBG (μg/ml)
1	0.72	0.40	<1.0
2	0.82	0.21	<1.0
3	0.80	0.27	<1.0
4	1.00	0.32	<1.0

### 3-6 新生児スクリーニングへの応用

本法により新生児1,916人について10回のアッセイでスクリーニングを実施したところ、アッセイ毎の平均値は1.7～2.3ng/dlの範囲にあり、全体としては平均値±標準偏差は1.91±0.56ng/dlであった。なお、同時に行ったRIA法での平均値±標準偏差は2.04±0.47ng/dlであり、ほぼ同様の結果が得られた。また、ELISA法でFT<sub>4</sub>が0.6以

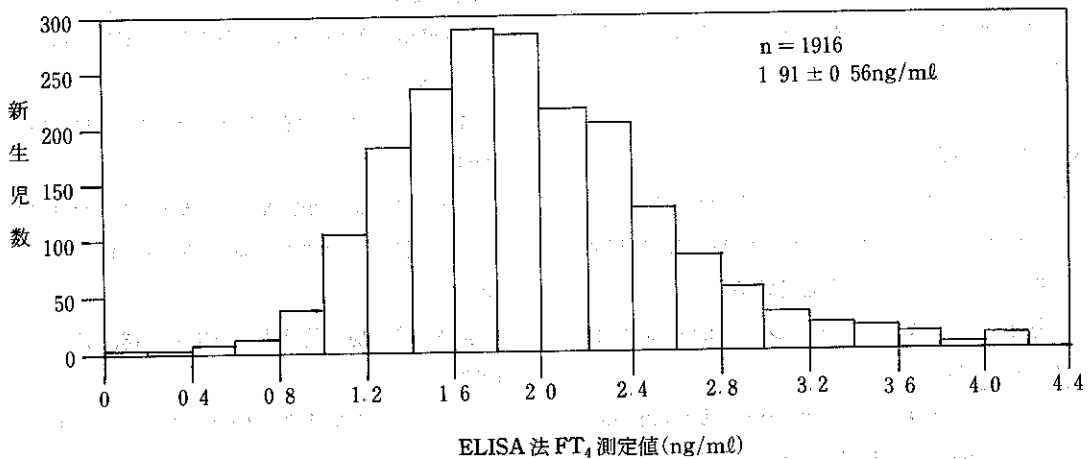


図3 ELISA法によるFT<sub>4</sub>の分布

下となった6例では4例が低出生体重児，2例がTBG欠損症であった。

#### 4. 考 察

先天性甲状腺機能低下症のスクリーニングはTSHを指標として行政レベルで実施されている。しかし，TSHの単独測定では，10万人に1人というごく低い発生率ではあるが<sup>2)</sup>TSHの上昇しない視床下部・下垂体性の先天性甲状腺機能低下症を発見できない。また，原発性甲状腺機能低下症でも，いわゆるTSH上昇遅延型<sup>3)</sup>が見逃される恐れがある。これらをスクリーニングしていく上でFT<sub>4</sub>の測定は有用である。

FT<sub>4</sub>の測定は今日までRIA法を中心として実施されてきたが，RIA法で測定を行うには施設に制約があり，先に述べたようないくつかの問題があるので，より簡便でマススクリーニングに適する方法の開発が待たれていた。

今回試用したキットは，測定感度及び再現性が良好であった。また，測定範囲が0～10ng/mlで，検出感度が0.2ng/dlと，甲状腺機能低下症は十分検出可能であった。

さらに，乾燥濾紙血液3.2mm ディスク1枚のわ

ずかなサンプル量で5時間程度で測定でき，1プレートで96検体測定できるマイクロプレートを用いることで多量の検体を同時に測定ができることからマススクリーニングに適している。

現在使用しているRIA法との比較では，新生児の乾燥濾紙血液検体と良好な相関があり，平均値もほぼ一致し良好な結果が得られた。ただし，低出生体重児及びTBG欠損症児では測定値が低くなる傾向にあった。低出生体重児ではこの傾向はRIA法と同様で，この原因としては，FT<sub>4</sub>値の低下している低出生体重児のTSH値が正常なことから<sup>4)</sup>，下垂体-甲状腺のフィードバック機構の未熟性が考えられる。一方TBG欠損症でのFT<sub>4</sub>低値原因はまだ解明されていないが，抗チロキシン抗体と酵素標識チロキシンとの反応性の相違によるものと考えられ，今後検討していく必要がある。

以上今回検討したELISA法によるFT<sub>4</sub>の測定は新生児のマススクリーニングにおいてRIA法に比較して安全かつ簡便でより有用な方法であると考えられた。

#### 5. 結 語

放射性同位元素を用いずにFT<sub>4</sub>を測定できる本

法は測定感度・再現性共に良好で、RIA法とも相関があり新生児マススクリーニングにおけるFT<sub>4</sub>の測定方法として有用である。

## 6. 文 献

- 1) 福士 勝, 他: 日児誌, **91**, 5-11, 1987
- 2) 原田正平, 他: 日児誌, **93(2)**, 2742-2749, 1989
- 3) 松浦信夫, 他: 厚生省心身障害研究 平成元年度報告書 マススクリーニングに関する研究, 36-39, 1986.
- 4) Georges Travert, Francolse Lemonnier, Yvon Fernandez: CLIN. CHEM., **31(1)**, 1829-1832, 1985.
- 5) Naoshige Hata, et al: CLIN. CHEM., **31(5)**, 750-753, 1985
- 6) 福士 勝, 他: 札幌市衛研年報, **11**, 111-114, 1983.
- 7) 野瀬 幸, 他: 周産期医学, **15(9)**, 27-39, 1985
- 8) 村田光範, 根本博文: 周産期医学, **15(9)**, 47-50, 1985.
- 9) 水嶋好清, 他: 札幌市衛研年報, **16**, 51-57, 1988.
- 10) 飯野史郎: 衛生検査, **39(2)**, 235-239, 1990.

## Examination of FT<sub>4</sub> Using Enzyme Linked Immunosorbent Assay and Its Application for Neonatal Thyroid Screening

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

### ABSTRACT

We examined an enzyme linked immunosorbent assay for free thyroxin (FT<sub>4</sub>) in dried blood on filter paper. The measurable range of FT<sub>4</sub> concentration was 0.2 to 10ng/dl. Coefficients of variation in within-run precision study were 7.6-15.0%. And those of between-run precision study were 9.4-18.5%. There was good correlation between this method and radio immuno assay ( $r = 0.95$ ). Our results suggest that the procedure we examined is useful for neonatal screening of congenital hypothyroidism.