

時間分解蛍光法による FT₄ 測定 —— 妊婦甲状腺機能検査への応用 ——

扇谷 陽子 三上 篤 荒井 修 福士 勝
清水 良夫 菊地由生子

要 旨

乾燥濾紙血液をサンプルとした妊婦甲状腺機能検査への応用を目的として時間分解蛍光法による FT₄ 測定の検討を行った。この方法の再現性は、7.1-11.0%と良好で、測定感度も 0.16 ng/dl と高感度であった。従来使用してきたラジオイムノアッセイ (RIA) 法による測定キットであるアマレックス-M FT₄ での測定値との間には、相関係数 $r=0.96$ の良好な相関関係が認められ、その平均値もほぼ一致した。また、平均値の妊婦週数による推移も従来と同様な傾向を示した。さらに従来法で FT₄ 高値となった抗 T₄ 抗体陽性者において正常範囲の測定値を得た。以上により、本方法は乾燥濾紙血液をサンプルとした妊婦甲状腺機能スクリーニングに有用な方法と考えられる。

1. 緒 言

札幌市では妊婦甲状腺機能検査における FT₄ の測定に、ラジオアイソトープ (RI) を使用した RIA 法¹⁾を用いている。この方法は感度・再現性等優れた方法ではあるが、RI の使用は廃棄物の処理や作業従事者の健康管理等問題がある。そこで RI を用いることなく高感度な測定が可能である²⁾時間分解蛍光法による測定キットを用い、妊婦甲状腺機能検査への応用を検討したので報告する。

2. 材 料

2-1 キットの構成

測定は血清測定用のキットであるデルフィア Free T₄ (Pharmacia 社) を用いた。

このキットは

- ユーロビウム標識 T₄
- T₄ 抗体 (マウス抗 T₄ 単クローン抗体)
- FT₄ 標準品
- ウサギ抗マウス IgG 抗体結合プレート
- トレーサー用緩衝液
- T₄ 抗体緩衝液
- 増強試薬 (キレート剤及び界面活性剤を含む酢酸-フタル酸水素カリウム緩衝液 pH3.2)
- 洗浄試薬

により構成されている。

2-2 サンプル

サンプルは洗浄赤血球に標準溶液を加えて作成した乾燥濾紙血液及び妊婦甲状腺機能スクリーニングに使用した乾燥濾紙血液を用いた。

3. 方 法

測定操作は以下に示すとおりキットの測定方法に準じ、洗浄回数のみを増やすことにより行った。なお、乾燥濾紙血液サンプルは、4-1の結果より 3.2 mm ディスク 1 枚を 0.1% のウシ血清アルブミン (以下 BSA と略) を添加したリン酸緩衝生理食塩液 (以下 PBS と略) 50 μ l によりあらかじめ溶出させて用いた。

3-1 操作方法

- プレートを 2 回洗浄する
- プレートにサンプル 25 μ l を分注する
- T₄ 抗体溶液 200 μ l を分注する
- プレートにシールをして室温で 1 時間振盪する
- プレートを 5 回洗浄する
- トレーサー溶液を 200 μ l 分注する
- 4°C で 20 分間インキュベートする
- プレートを 8 回洗浄する
- 増強試薬 200 μ l を分注する
- 5 分間室温で振盪する
- 10 分間室温で放置する
- 専用の時間分解蛍光測定装置 (LKB 社 1230 ARCUS Fluorometer) で蛍光強度を測定する。

m. 標準曲線より測定値を算出する

4. 結果と考察

4-1 サンプル量の検討

乾燥濾紙血液検体をサンプルとして妊婦甲状腺機能検査に必要な濃度域が高感度となる最適なサンプル量を決めるため、

a. 3.2 mm ディスク 2 枚を 50 μl の溶出液 (0.1% BSA-PBS) で溶出

b. 3.2 mm ディスク 1 枚を 50 μl の溶出液で溶出

c. 3.2 mm ディスク 1 枚を 100 μl の溶出液で溶出

の 3 タイプの組み合わせで室温で 3 時間振盪溶出したサンプルについて、それぞれの濃度の結合率 B/B_0 を求めた。結果は図 1 に示すとおりで、a では高濃度が測定されていなかった。b 及び c では、スタンダードのレンジ内において測定可能であるが、b の方が妊婦甲状腺機能検査において必要な 2.0 ng/dl 程度の濃度の感度が良く、現在妊婦甲状腺機能検査に使用している RIA 法での結合率とほぼ等しいことから、乾燥濾紙血液の溶出には b を用いることとした。

4-2 測定感度

FT_4 濃度 0 ng/dl での蛍光強度 ($n=5$) の平均値 - 2S.D. より求めた測定感度は 0.16 ng/dl であった。

4-3 再現性

測定法の再現性 ($n=5$) は、測定内及び測定間の変

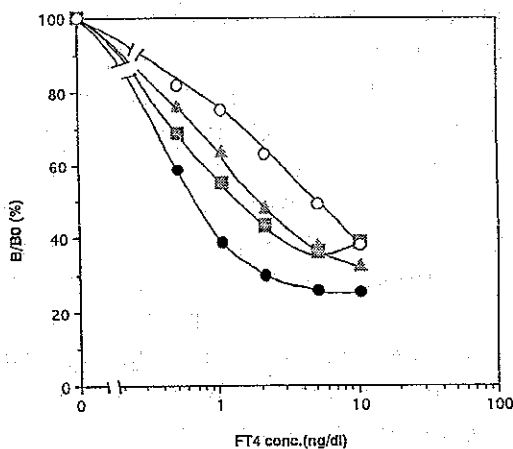


図 1 サンプル量の違いによる結合率の変化

- 3.2 mm \times 2/50 μl (a)
- ▲ 3.2 mm \times 1/50 μl (b)
- 3.2 mm \times 1/100 μl (c)
- serum

動係数が表 1 に示すとおり 7.1-11.0% と少なく、良好であった。

4-4 希釈試験

乾燥濾紙血液から溶出したサンプルを 2 から 8 倍に希釈したところ、図 2 に示すとおり、ほぼ FT_4 濃度と希釈倍数間に直線関係が得られた。

4-5 保存安定性

サンプルを 4, 25, 37°C で 1 カ月間保存し、-20°C で保存したサンプル (濃度 3.2 ng/dl) の測定値を 100% として比較した。その結果を表 2 に示すが、いずれの温度でもほとんど差が認められず、 FT_4 は 1 カ月まではかなり安定と考えられた。

4-6 RIA 法との相関

妊婦 69 名の FT_4 値を RIA 法での測定値と比較したところ、図 3 に示すとおり回帰直線 $Y=1.10 X - 0.06$ (X : RIA 法, Y : DELFIA 法), 相関係数 $r=0.96$ と良好な相関関係が認められた。

表 1 測定内及び測定間の変動

assays	No.	FT_4 concentration (Mean \pm S.D.) (ng/dl serum)	C.V (%)
intraassay sample 1	5	0.77 \pm 0.09	11.0
sample 2	5	3.51 \pm 0.34	9.7
interassay sample 3	5	0.78 \pm 0.07	9.5
sample 4	5	3.06 \pm 0.22	7.1

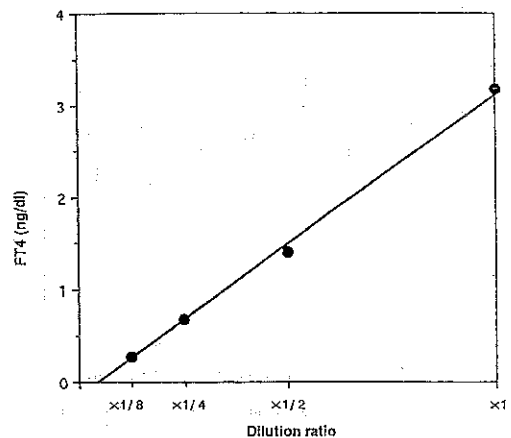


図 2 希釈試験

表2 保存安定性

保存条件	測定値(g/dl)	比率(%)
-20℃ 1ヵ月	3.26	100
4 "	3.15	96.6
25 "	3.11	95.4
37 "	3.22	98.8

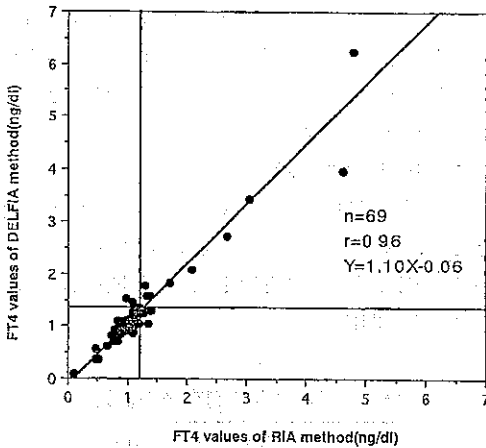


図3 RIA法とDELFIA法の測定値の相関関係

4-7 妊娠週数別の平均値

妊婦を妊娠週数により6週未満から18週以上の6つのグループ(各グループn=10)に分類し、平均値の推移についてRIA法と比較した。結果は図4に示すとおり、ほぼ同様の推移が認められた。

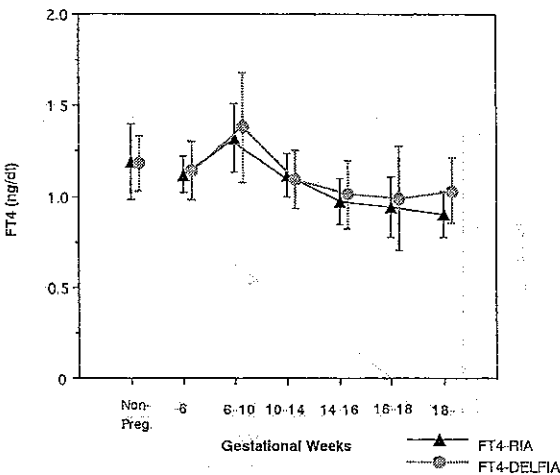


図4 妊娠週数の経過によるFT₄平均値の推移

4-8 甲状腺機能異常者の測定値

妊婦甲状腺機能スクリーニングで発見された甲状腺機能亢進症4例、甲状腺機能低下症4例及び抗T₄抗体陽性者1例のFT₄値を従来法と比較した。結果は表3に示すとおり、甲状腺機能亢進症及び低下症ではほぼ同様の値であり、RIA法で高値を示した抗T₄抗体陽性例では正常範囲の測定値が得られた。

5. 考 察

通常の蛍光色素を標識体とする蛍光イムノアッセイ(FIA)はRIAに比べて感度が低い。しかしデルフィアでは、ストークスシフトが大きく安定なユーロピウムを標識体として用いているため、励起光の影響を受けることなく非特異蛍光消失後の蛍光が測定でき、高感度な測定が可能とされている。また、専用の測定装置は1秒間に1,000回励起光を照射しその蛍光を積算するため、精密な測定ができる。

今回の結果より本方法は妊婦甲状腺機能スクリーニングに十分な感度及び再現性を有していると考えられる。

妊娠週数の推移によるFT₄の平均値の変化は、測定方法の違いにより様々な報告⁴⁾⁵⁾があるが、本方法では、非妊婦に比較して妊娠前期にその平均値が上昇し後期に下降する点で従来法とほぼ同様な傾向を示した。しかし、妊娠後期の測定値の下降が従来法ほど大きなものではなく、この点については例数を増やして比較検討する必要があると考えられる。

従来使用してきたアマレックス-M FT₄による測定では、血液中に抗T₄抗体が存在すると、測定上の抗原抗体反応に影響を及ぼし実際より高値に測定される。しかし、本方法は、特殊な緩衝液の使用により抗T₄抗体の影響を受けない特徴を有している。この点については血清での測定結果が報告されている⁶⁾が、サンプルとして乾燥濾紙血液を使用しても同様な結果が得られるかについて調べた。その結果、抗T₄抗体陽性でRIA法で高値と測定された妊婦の測定値が正常範囲にあり、本方法では抗T₄抗体の影響を受けず、これによる疑陽性を減らすことができると考えられる。また、RIA法で測定した際、抗T₄抗体の影響によるFT₄高値例では、FT₄高値にもかかわらずTSH値が十分抑制されないという生体のネガティブフィードバック機構から考えると矛盾のある測定値となり、アッセイの

表3 妊婦甲状腺機能検査で要精密検査と判定された妊婦の測定値

症 例	FT4 RIA (ng/dℓ)	FT4 DELFLIA (ng/dℓ)	TSH (μ U/ml)	MCHA	TGHA	TBG (μ g/ml)	TBII (%) (参考)
抗 T ₄ 抗体陽性者	4.72	0.81	0.1	<100	<100	24.1	0.1
甲状腺機能亢進症 A	4.61	3.96	<0.1	<100	100	14.1	55.3
＃ B	2.66	2.74	0.1	<100	<100	22.6	3.8
＃ C	4.78	6.24	<0.1	1,600	<100	18.1	30.5
＃ D	3.07	3.44	<0.1	51,200	<100	24.8	
甲状腺機能低下症 a	0.51	0.37	>52.0	<100	<100	34.6	4.2
＃ b	0.46	0.36	30.2	12,800	400	6.9	92.8
＃ c	0.11	<0.1	>52.0	800	<100	39.9	4.8
＃ d	0.46	0.55	29.1	800	<100	23.5	

※ TBII を除くそれぞれの測定値は、妊婦甲状腺機能検査に用いた乾燥濾紙血液検体の検査結果で、TBII は精密検査の際に受診病院で検査した結果を示す。

2種の方法の FT₄ 値は、同一ロットのスタンダードを用いて測定

精度管理を難しくしていたが、本方法の使用によりこの点も改善されると考えられる。

以上の結果により RI を使用せず高感度で再現性の良い本方法は、乾燥濾紙血液をサンプルとした妊婦甲状腺機能スクリーニングに有用であると考えられる。

6. 結 語

今回用いた時間分解蛍光法による FT₄ の測定は、乾燥濾紙血液をサンプルとした妊婦甲状腺機能スクリーニングにおいて従来法と同等であり、血中抗 T₄ 自己抗体の影響もないことから有用な方法である。

7. 文 献

- 1) 富士勝, 他・日児誌, 91, 5-11, 1987.
- 2) 斉藤一二三, 他・ホルモンと臨床, 39(4), 339-344, 1991.
- 3) 水嶋好清, 他・札幌市衛研年報, 18, 60-63, 1991.
- 4) 佐藤龍次, 他・医学と薬学, 29(5), 1261-1269, 1993.
- 5) 望月真人・医学のあゆみ, 164(4), 192-194, 1993.
- 6) 森田新二, 他・ホルモンと臨床, 38(10), 1059-1066, 1990.

Time-Resolved Fluoroimmunoassay of FT4 in Dried Blood Samples and Its Application to Thyroid Function Screening in Pregnant Women.

Yoko Ogiya, Atushi Mikami, Osamu Arai,
Masaru Fukushi, Yoshio Shimizu, Yuko Kikuchi

We evaluated FT4 analysis of dried blood samples by using a time-resolved fluoroimmunoassay kit which is used in FT4 analysis of serum samples.

This method was considered sensitive without using radio isotopes. The reproducibility was adequate for practical use (C V : 7.0-11.0%). The results from this method correlated well with those obtained from RIA (Amalex-M FT4). In addition, the T4 antibody was noted not to interfere with analysis.

From these results, this method was considered to be useful and appropriate for screening thyroid function in pregnant women.