

[原著]

先天性甲状腺機能低下症スクリーニング に関する研究

I. 濾紙血液 thyroxine 測定法

猪 股 弘 明*

(昭和54年8月30日受付)

要 旨

先天性甲状腺機能低下症の新生児スクリーニングを目的とした濾紙血液からの thyroxine (T_4) 測定法を検討した。測定法1は、東洋濾紙 No. 50の径10mm disc 2枚を測定材料とし、barbital buffer にて濾紙より T_4 を抽出した。抽出液に ^{125}I - T_4 と T_4 抗血清を加え、インキュベーション後レジストリップで bound と free の T_4 を分離した。測定法2は、PKU 濾紙の径10mm disc 1枚を測定材料として、測定法1と同じ方法で T_4 測定をした。測定法3は、PKU 濾紙の径3mm disc 1枚を測定材料として、glycine-acetate-gelatin buffer を含む T_4 抗血清および ^{125}I - T_4 を加えインキュベーション後、polyethylene glycol にて B-F 分離を行った。結果は、測定法1にて、濾紙血液からの T_4 抽出時間は12~16時間では安定していた。血清 T_4 と濾紙血液 T_4 とは $r=0.961$ ($n=20$) と良好な相関を有し、血清 T_4 2.2 $\mu\text{g}/\text{dl}$ の者の濾紙血液 T_4 も測定可能であり、血清 T_4 低値者は濾紙血液によっても十分に T_4 正常者から分離可能であった。測定法2においても、血清 T_4 と濾紙血液 T_4 とは $r=0.895$ ($n=25$) と良好な相関を有し、血清 T_4 1.2 $\mu\text{g}/\text{dl}$ の者の濾紙血液 T_4 も測定可能であった。最後にさらに微量の材料による測定法3の結果は、まず径11mmの濾紙血液から径3mmの disc をパンチアウトする場合、中心部と周辺部とでは T_4 の分布に差があったので周辺部からパンチアウトするように統一した。血清 T_4 と濾紙血液 T_4 とは $r=0.900$ ($n=30$) と良好な相関を有し、血清 T_4 2.0 $\mu\text{g}/\text{dl}$ の者の濾紙血液 T_4 も測定可能であった。以上、濾紙血液材料を順次微量化させて3方法の濾紙血液 T_4 の測定を行い、先天性甲状腺機能低下症スクリーニングに実用化し得る方法を確立した。

Key words: 先天性甲状腺機能低下症, 濾紙血液, thyroxine

略語一覧: T_4 : throxine, PKU: phenylketonuria, RIA: radioimmunoassay

TBG: thyroxine binding globulin

はじめに

先天性甲状腺機能低下症(クレチン症)における知能障害を未然に防ぐには早期発見・早期治療が必要である。その目的で新生児スクリーニングが試みられている¹⁾。スクリーニングの際の測定材料としてはじめに Klein

ら²⁾は臍帯血を用いたが、新生児の足底穿刺により容易に採取でき、かつ先天代謝異常症のスクリーニング、いわゆる Guthrie 法と同時施行のできる濾紙血液を用いた方が実用的である。濾紙血液からの T_4 測定法は Dussault ら³⁾、Larsen ら⁴⁾の報告がある。著者も radioimmunoassay 法による濾紙血液 T_4 測定法を検討し

* 千葉大学医学部小児科学教室

HIROAKI INOMATA: A study on the screening for congenital hypothyroidism. I. Measurement of thyroxine in filter paper blood sample.

Department of Pediatrics, School of Medicine, Chiba University.

Received for publication, August 30, 1979.

たので報告する。はじめは直径10mmの濾紙血液2枚による測定を検討し、次に検体の微量化を計り、10mm径1枚、さらに3mm径1枚による T_4 測定を検討した。

実験方法

a. 10mm disc 2枚による方法 (測定法1)

東洋濾紙 No. 50に血液を浸し、直径10mmの円に打ち抜いた濾紙血液2枚を測定材料とした。0.07M, pH 8.6の barbital buffer 1ml に濾紙血液を入れて T_4 を抽出した。抽出後濾紙を取り除き、抽出液0.7ml を T_4 未知検体とした。以下第一ラジオアイソトープ社のリアマット T_4 キットを使用し、 ^{125}I - T_4 溶液1ml と T_4 抗血清100 μl (magnesium 8-anilino-1-phthalene sulfonate および barbital buffer を含む) を抽出液に加え、37°C 温浴で30分間インキュベートする。レジンストリップを入れ室温30分間ローテーターで回転させて bound と free の T_4 を分離する。レジンストリップを取り除いて試験管の ^{125}I をカウントする。標準曲線はキットの標準 T_4 血清10 μl から得られたものを用いた^{5,6}。

b. 10mm disc 1枚による方法 (測定法2)

測定法1と基本的に変わりはないが、測定材料を先天代謝スクリーニングで用いられている PKU 濾紙 (東洋濾紙社) とし、直径10mmの濾紙血液1枚とした。そして barbital buffer 1ml で濾紙血液から T_4 を抽出後濾紙を取り除き、抽出液全量を T_4 未知検体とした。以下測定法1と同様の手順で T_4 測定を行った。

c. 3mm disc 1枚による方法 (測定法3)

血液を浸した PKU 濾紙より直径3mmの濾紙血液をパンチアウトして測定材料とした。Thyroscreen kit (ダイナボット社) の抗 T_4 血清液 (sodium salicylate を含む glycine-acetate-gelatin buffer 液) 80 μl に濾紙血液を入れ15分間インキュベートする。次に ^{125}I - T_4 溶液 (sodium salicylate, 8-anilino-1-naphthalenesulfonic acid を含む glycine-acetate-gelatin buffer 液) を300 μl 入れ室温1時間インキュベートする。bound と free の T_4 分離には polyethylene glycol 2ml を用い、3000 rpm 15分間遠心して分離する。標準曲線は、血清 T_4 値既知の血清からヘマトクリット50%になるよう作成した全血を浸した標準濾紙血液を用いた。

実験成績

a. 測定法1による成績

1) barbital buffer 0.7ml をこのキットの測定系に加えても標準曲線に変化をきたさなかった。

2) 抽出時間を2~24時間の間で変化させてみた (図

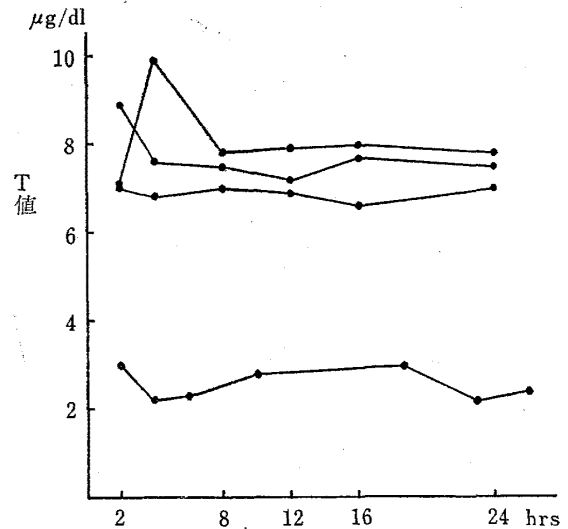


図1. 抽出時間による T_4 値の変化

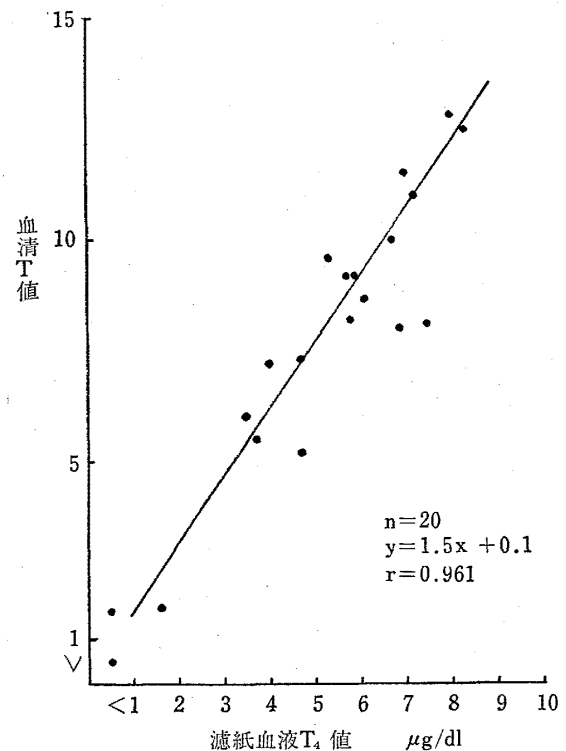


図2. 血清 T_4 と濾紙血液 T_4 との相関 (測定法1)

1)。8時間以後は安定しており、以下の測定においては抽出時間は12~16時間とした。

3) 種々の甲状腺機能状態の小児20例において、その血清 T_4 値と濾紙血液 T_4 値との間には $r=0.961$ と良好な相関があった (図2)。血清 T_4 2.2 $\mu\text{g/dl}$ の者の濾紙血液 T_4 が1.4 $\mu\text{g/dl}$ と測定され、血清 T_4 低値者は明らかに濾紙血液によっても分離可能であった。

4) 生後3~8日の新生児10例においても、その血清 T_4 値と濾紙血液 T_4 値との間には $r=0.803$ と良好な相

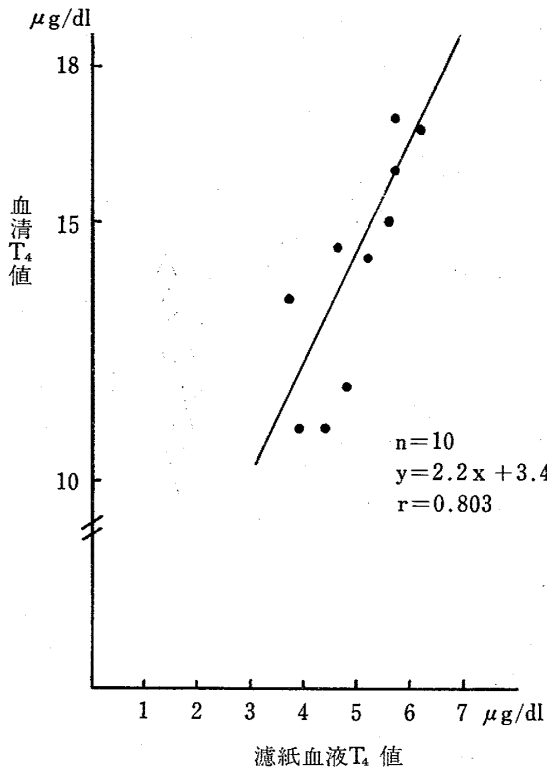


図 3. 血清 T₄ と濾紙血液 T₄ との相関 (新生児) (測定法 1)

関が認められた(図 3)。

b. 測定法 2 による成績

1) ¹²⁵I-T₄ を全血に添加して作成した濾紙血液からの抽出率は 97.3±5.2% (n=5) であった。

2) 同一被検小児の血清 T₄ 値と濾紙血液 T₄ 値との相関は図 4 のように r=0.895 と良好であった。血清 T₄ 1.2μg/dl と低値の者も濾紙血液にて 1.2μg/dl と測定し得た。

c. 測定法 3 による成績

1) 先天代謝スクリーニングにおいて、血液は PKU 濾紙の直径 11mm の円に浸される。そこで径 11mm の濾紙血液から 3mm disc をパンチアウトする場所による T₄ 値の違いを検討した。全血に ¹²⁵I-T₄ を添加して作った径 11mm の濾紙血液の中心部と周辺部とからパンチアウトした 3mm disc における ¹²⁵I のカウントを比較した。表 1 のように T₄ は周辺部より中心部に低く分布した。検体数が多く採れることから、標準濾紙血液も検体も全て周辺部からパンチアウトすることに統一した。

2) 同一被検小児の血清 T₄ 値と濾紙血液 T₄ 値との相関は図 5 のように r=0.900 と良好であった。

3) 生後 3 カ月の TBG 欠損症 2 例において、血清 T₄ が 2.3 および 2.0 μg/dl であったが、その濾紙血液 T₄

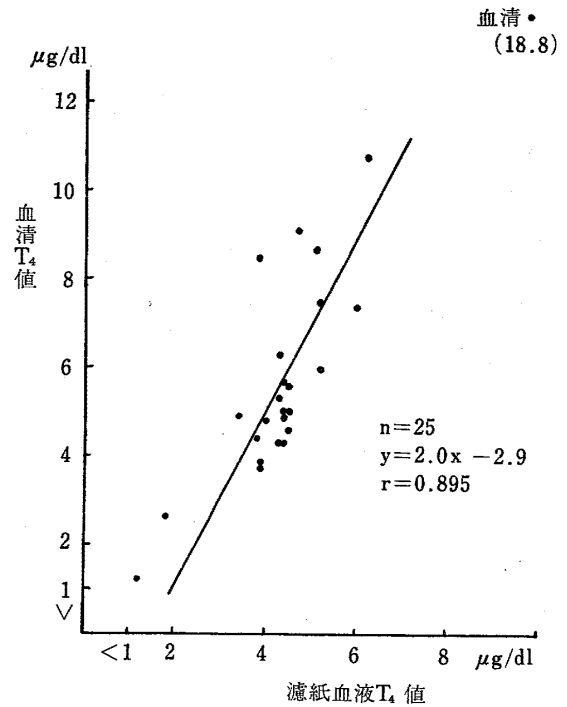


図 4. 血清 T₄ と濾紙血液 T₄ との相関 (測定法 2)

表 1. 濾紙中心部と周辺部における ¹²⁵I-T₄ の分布

	中心部	周辺部
n	10	10
cpm m	2371	2605
SD	123	302
P < 0.05		

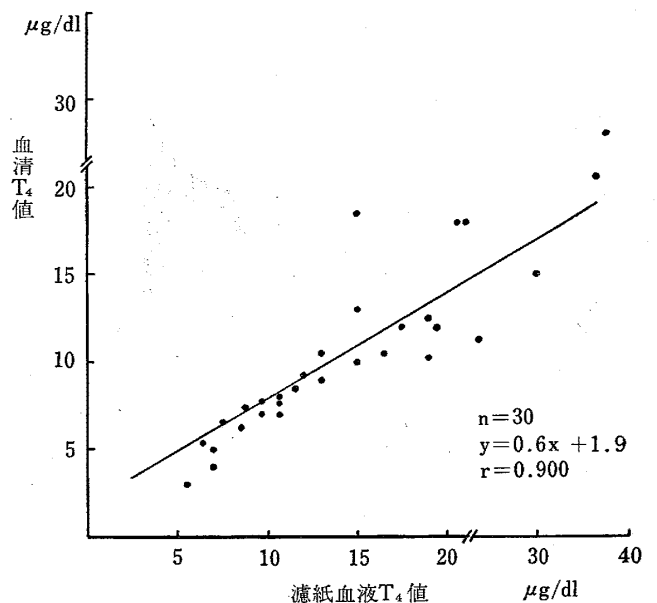


図 5. 血清 T₄ と濾紙血液 T₄ との相関 (測定法 3)

表 2. アッセイ内変動係数

mean T ₄	4.57	5.83	27.1	μg/dl
n	10	10	8	
SD	0.60	0.77	5.7	
CV	13.1	13.2	21.0	%

は2.8および2.7μg/dlと測定し得た。

4) アッセイ内変動係数(同一者の血液濾紙の数ヶ所からパンチアウトしたもの)は表2のように hypothyroid で13.1%, euthyroid で13.2%, hyperthyroid で21.0%であった。アッセイ間変動係数は19.3%であった。

5) 生後5日目の新生児241例の濾紙血液 T₄ は正規分布をし、その平均値と標準偏差は11.3±2.8μg/dlであった。

考 察

クレチン症早期発見のためのスクリーニングを目的とした濾紙血液からの T₄ 測定は Dussault ら³⁾と Larsen ら⁴⁾がはじめて報告を行っている。Dussault らは 1/2 インチ(約13mm)径の濾紙血液から barbital buffer にて T₄ を抽出し、RIA 法で測定した。Larsen らは 1/8 インチ(約3.2mm)径の濾紙血液で、T₄ 抗体と tracer T₄ および sodium salicylate を含む glycine-acetate buffer を用い、抽出操作の前処置なしに RIA 法で測定している。

これら濾紙血液からの T₄ 測定は感度の優れた RIA 法の進歩によるところが大である。著者はリアマット T₄ キットが血清10μl という微量で測定可能であること⁵⁾を利用して、Dussault らの方法に準じた barbital buffer による濾紙血液からの T₄ の抽出を行い、以下上記キットを用いて T₄ を測定した(測定法1と2)。濾紙は一般にペーパークロマトグラフィーで使われている東洋濾紙 No. 50を使用した(測定法1)が、先天代謝スクリーニングで使用されている PKU 濾紙と同じものを使用した方が実用的であるので、測定法2および3では PKU 濾紙を使用した。測定法1の10mm 径濾紙血液2枚は全血約30μl を含み、その抽出液1ml 中の0.7ml を測定検体としたので、全血として約21μl、血清としては小児(ヘマトクリット40%とすると)約13μl、新生児(ヘマトクリット50%とすると)約10.5μl が測定検体量となっている。測定法2における PKU 濾紙10mm 径1枚には約20μl の全血が浸される、抽出液全量を検体としたので血清相当量はほぼ測定法1と同様となる。従って血清10μl を検体とするリアマット T₄ キットで

抽出液の T₄ が測定可能であろうと考えられた。

測定法1および2において、小児の血清 T₄ 値と濾紙血液 T₄ 値とは極めて良好な相関が得られた。血清 T₄ 2.2および1.2μg/dl という低値のものでも濾紙血液にて測定可能であったことは十分な感度を有していると考えられる。また新生児においてはヘマトクリットが一般小児より高いので濾紙血液 T₄ 値は低く出るが、血清 T₄ とは良好な相関がみられることから実際の新生児スクリーニングにも有用であると考えられる。

測定法3は、濾紙血液 T₄ 測定用のキットである Thyroscreen キットを用いた。キットでは6mm disc が使われているが、先天代謝スクリーニングの Guthrie 法で用いられていると同じ3mm disc で測定できるように改変した。種々検討し、抗 T₄ 血清をキットでは200μl 使用しているが、80μl と少なくすることによって可能となった。測定法1および2では濾紙血液を入れたままでは測定不能で、濾紙を取り除いた抽出液を測定材料とする操作が必要であった。しかし測定法3では濾紙を取り除く必要がなく、操作がより簡便となった。ただ注意すべき点は、11mm 径の濾紙に浸された全血において、T₄ は周辺部に多く分布するので、3mm disc を打ち抜く場所を一定にしなければならないということであった。アッセイ間変動係数が19%とやや大きかったが、実際のスクリーニングの際は、多数の検体を1度にアッセイするので1回のアッセイ内において-2SD 以下を T₄ 低値とするようにすれば問題はない。血清 T₄ 2.0μg/dl の T₄ 低値者も濾紙血液にて2.7μg/dl と測定し得た。

濾紙は冷蔵庫および室温でも2カ月間保存で影響はなかったが、実際には冷蔵庫保存をした。

クレチン症早期発見のためのスクリーニングに、今回検討した濾紙血液 T₄ 測定法が十分に応用できると考えられた。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲をたまわった中島博徳教授に深謝いたします。また御助言いただいた新美仁男講師、佐々木望助手に深謝いたします。リアマット T₄ キットを提供していただいた第一ラジオアイソトープ研究所、Thyroscreen キットを提供していただいたダイナボット社に感謝いたします。

本論文の一部は第24回および第26回日本内分泌学会東部部会総会、第6回代謝異常スクリーニング研究会、第12回日本小児内分泌研究会にて発表した。

SUMMARY

For the screening of congenital hypothyroidism,

measurement of thyroxine (T₄) in filter paper blood sample was developed. In method 1: two spots of 10 mm diameter filter paper (Toyofilter paper No. 50) were used, and eluted by barbital buffer. To the eluate were added ¹²⁵I-T₄ and anti-T₄ antibody. After incubation, bound and free T₄ were separated by resin-strip. In method 2: one spot of 10 mm diameter filter paper (PKU filter paper) was used, and the following measurement was much the same method 1. In method 3: one spot of 3 mm diameter PKU filter paper was used. To it was added glycine-acetate-gelatin buffer containing ¹²⁵I-T₄ and anti-T₄ antibody. After incubation, bound and free T₄ were separated by polyethylene glycol. Results: Good correlation between serum T₄ and T₄ of filter paper blood sample was obtained (r=0.961 in method 1, r=0.895 in method 2, and r=0.900 in method 3). All the methods were sensitive enough to measure very low T₄ (1.2-2.2 μg/dl) in serum. These methods could be useful for screening of congenital hypothyroidism.

文 献

- 1) Fisher, D. A., Dussault, J. H., Foley, T. P., Jr., Klein, A. H., La Franchi, S., Larsen, P. R., Mitchell, M. L., Murphey, W. H. and Walfish, P. G.: Screening for congenital hypothyroidism: Result of screening one million North American infants. *J. Pediatr.* **94**, 700-705, 1979.
- 2) Klein, A. H., Agustin, A. V. and Foley, T. P., Jr.: Successful laboratory screening for congenital hypothyroidism. *Lancet* **2**, 77-79, 1974.
- 3) Dussault, J. H., Coulombe, P., Laberge, C., Letarte, J. L., Guyda, H. and Khoury, K.: Preliminary report on a mass screening program for neonatal hypothyroidism. *J. Pediatr.* **86**, 670-674, 1975.
- 4) Larsen, P. R. and Broskin, K.: Thyroxine (T₄) immunoassay using filter paper blood samples for screening of neonates for hypothyroidism. *Pediatr. Res.* **9**, 604-609, 1975.
- 5) 新美仁男, 猪股弘明, 佐々木望: サイロキシソリアキットの基礎的および臨床的検討 基礎と臨床 **11**, 2079-2082, 1977.
- 6) 猪股弘明, 佐々木望, 新美仁男: 新生児クレチン症スクリーニングを目的とした乾燥濾紙血液からの T₄ 測定の検討 小臨 **30**, 1756-1759, 1977.
- 7) 猪股弘明, 佐々木望, 新美仁男, 中島博徳: クレチン症スクリーニングを目的とした 3 mm 濾紙からの Thyroxine 測定法 小臨 **32**, 939-942, 1979.