

MAGIC TSHを用いたクレチン症のスクリーニングについて

神原 美鈴¹⁾, 村田 光範¹⁾, 松本 勝²⁾

1)東京女子医科大学第2病院小児科 2)東京都予防医学協会

目 的

鉄粉にTSH抗体をラベルして B/F 分離を磁力を用いて行うのがMAGIC TSH(M-TSH)であるが、このキットはTSHの測定感度が高い利点がある。そこで、クレチン症のスクリーニングに際して問題となるcut-offポイント辺りのTSH濃度を鋭敏に測定することを目的にM-TSHのクレチン症スクリーニングへの応用を検討した。

対 象 と 方 法

昭和60年12月中に当スクリーニングセンターへ郵送された3,108名の新生児(生後5~7日に採血)の乾燥濾紙血液(濾紙血)検査と過去クレチン症スクリーニングにおいて精密検査対象となった42例の濾紙血を検体とした。測定試薬はM-TSH(チバ・コーニングメディカル[®])を用いた。方法は、標準TSHおよび被検濾紙血から4.2mm disk 1枚を打ち抜き、これに¹²⁵I標識抗TSH血清(使用に際し5倍希釈)を100 μ lずつ分注し25 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートする。つぎに、鉄微粒子結合抗TSH血清(抗体スラリー)を100 μ l加え25 $^{\circ}$ Cで4時間インキュベートし、 B/F 分離を行う。 B/F 分離に際しては、アスピレーションに伴ない濾紙ディスクおよび沈殿物が流されるので、ディスク固定のために紙粘土(商品名La-Doll, 他の製品では不可)1g/l溶液1ml加え遠心分離(1,500g, 10分)にて B/F 分離を行いカウントした。標準曲線および濃度換算にはSpline関数を用いた。なお、濾紙血のTSH濃度表示は、研究班の指針によると全血表示となっているが、当施設では臨床医の希望により血清表示を行っており、スクリーニングのcut-off値は、TSH15~40 μ U/ml(全血表示で約9~25 μ U/ml)未満を再検、40 μ U/ml(全血25 μ U/ml)以上を精査対象としている。

結 果

M-TSHの測定原理は、標識に¹²⁵I・TSH抗体を使用し抗TSH血清に鉄微粒子結合液を用いた段階サンドイッチ法である。TSHは鉄微粒子と結合するため B/F 分離に磁力を用いており、遠心することなく単時間に行うことができる。しかし、濾紙血のTSH測定では、テストチューブに濾紙ディスクを残したままassayを行うため濾紙上に鉄粉が吸着し磁力による

B/F分離を行う磁気セパレーターを用いてB/F分離を行うには問題がみられた。磁気セパレーターでのB/F分離後、ディカンテーションで行うには濾紙血と共に鉄粉が分離し、アスピレーターでは標識遊離溶液と一緒に一部の鉄粉を吸引してしまうためカウント値のバラツキが大きく再現性が悪かった。そこで、測定方法に示したように分離例に紙粘土溶液を加え遠心分離による方法でB/F分離を行い以下の検討を行った。

測定方法の基礎的検討として、まず¹²⁵I標識液分注後のインキュベーション温度と時間は、TSH-C「コーニング」の濾紙血測定方法と同一条件とし、抗体スラリーのインキュベーション温度と時間について検討を行った。M-TSHの血清測定の方法は、抗体スラリーを加えて37℃、30分のインキュベートであるが、濾紙血による方法では条件が異なる。抗体スラリーを加えた後の条件として室温(10~15℃)、25℃、37℃の温度のもとにインキュベーション時間30分、2時間、4時間について比較した。室温では他の条件に比して感度十分な標準曲線を得られなく主に25℃と37℃について検討した。サンドイッチ法の第2反応は非常に速やかに進み、時間経過とともに計測値も増加したが、TSH低濃度域においては微妙な差がみられた(図1)。特にTSH 0 μ U/mlポイントでは時間経過とともにカウント値が低下し、Bo値は各 assay の off-curve 値の出現率に差がみられインキュベーション4時間で0 μ U/ml以下の出現率は8~18%にすることができた。この第2反応の条件は25℃と37℃においても同じ結果であり以後の assay は25℃、4時間で行った。

表1 M-TSHの再現性

	assay内 M \pm S.D (C.V)	assay間 M \pm S.D (C.V)
C-1	18.76 \pm 2.54 (13.5%)	19.11 \pm 2.85 (14.9%)
C-2	37.17 \pm 3.80 (10.2%)	39.76 \pm 4.77 (12.0%)
C-3	61.81 \pm 5.32 (8.6%)	59.11 \pm 5.15 (8.7%)

n=10

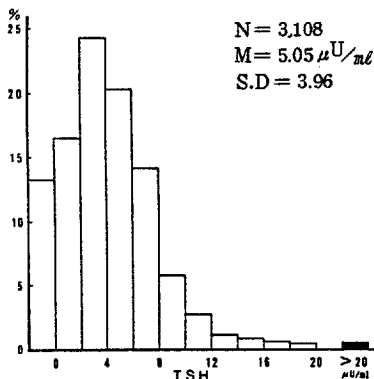


図2 TSH度数分布

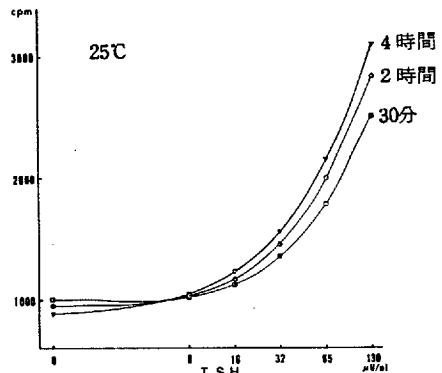


図1 インキュベーション時間

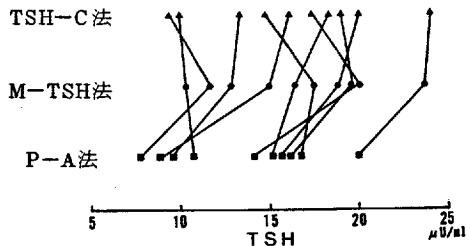


図3 他の方法との比較による順位相関

濾紙血のTSH値と血清値の比較については、 $N=45$ 、 $Y=0.975X+0.676$ 、 $r=0.924$ とよい相関を示した。また、TSHが低、中、高濃度のコントロール濾紙を用いての assay 内、assay 間の変動係数(C.V)の検討では、各10回の測定結果、assay 内C.Vは8.5~13.5%、assay 間C.Vは8.7~15.0%と良い再現性を示した(表1)。なお、同一検体による計測値の再現性では、低カウントのものほどC.Vは大きくカウント値のCVが4~8%であった。

新生児の濾紙血検体のTSH測定は、1 assay を200~300検体としてsingleにて測定し1 assay ごとに度数分布を作成しているが、度数分布は assay 系の良否の判定基準ともなる。今回、検討を行った新生児3,108名のTSH測定は10 assay に分けて測定し、assay ごとの平均値(M)、標準偏差(S.D)、cut-off 値、off-curve の出現率を比較した。assay ごとの $M \pm S.D$ は $3.8 \sim 6.2 \pm 3.2 \sim 5.4 \mu U/ml$ 、全体では $5.05 \pm 3.96 \mu U/ml$ ときれいなポアソン分布を示した(図2)。

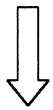
スクリーニングにおいては、TSH高濃度域よりcut-off 値付近の低濃度の再現性が要求される。そこで、1 assay の3パーセンタイルの再測定検体について他の測定試薬を用いて比較し、その濃度の順位についてSpearmanの相関係数について検定を行った。TSHコーニングとの比較では $r_s=0.904$ 、プロテインA法との比較では $r_s=0.734$ 、また、同一試薬による3回の比較では $r_s \geq 0.920$ ($P < 0.01$)と良好な結果であった(図3)。さらに、本施設においてTSH $20 \sim 100 \mu U/ml$ (プロテインA法)にて精査対象となった28例のM-TSHとの比較では $Y=0.760X+2.57$ 、 $r=0.889$ と良好な相関を示し、特にTSH $100 \mu U/ml$ (全血 $62 \mu U/ml$)以上の14例は両法において全て高値を示した。

考 察

M-TSHコーニングキットを用いて濾紙血TSHの測定を試みたが、M-TSHの特徴である磁気セパレーターを利用して B/F 分離を行うには、テストチューブ中に濾紙ディスクが残りこれが鉄粉の分離に関与するため、この方法による B/F 分離が問題となった。そして、スクリーニングで問題となるcut-off 値切りのTSH低濃度を鋭敏に再現性よく、かつ大量検体を簡易に測定するには B/F 分離に工夫を要した。このため、 B/F 分離剤に紙粘土を使用し、測定は assay の第2反応を $25^\circ C$ で4時間インキュベートして行った。この方法で濾紙血のTSHは、低濃度域まで再現性よく測定可能となり、assay の分布もきれいな分布を示したが、その平均値は、他の方法に比して全体的に高値を示した。これは、多分、標準濾紙血に問題があるかもしれない。しかし、TSH高値例の比較においては良い相関を示しており、濾紙血のTSHを測定するクレチン症マス・スクリーニング用に使用可能と思われた。今後、M-TSHの利点である磁力を用いた B/F 分離が濾紙血の測定系においても操作が可能ならば、スクリーニングの測定方法はさらに簡易、迅速となるであろう。



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用
論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



目的

鉄粉に TSH 抗体をラベルして B/F 分離を磁力を用いて行うのが MAGIC TSH(M-TSH)であるが、このキットは TSH の測定感度が高い利点がある。そこで、クレチン症のスクリーニングに際して問題となる cut-off ポイント辺りの TSH 濃度を鋭敏に測定することを目的に M-TSH のクレチン症スクリーニングへの応用を検討した。