

酵素免疫測定法によるクレチン症スクリーニング

成瀬 浩、鈴木恵美子

(国立武蔵療養所神経センター 診断研究部)

坂井由美

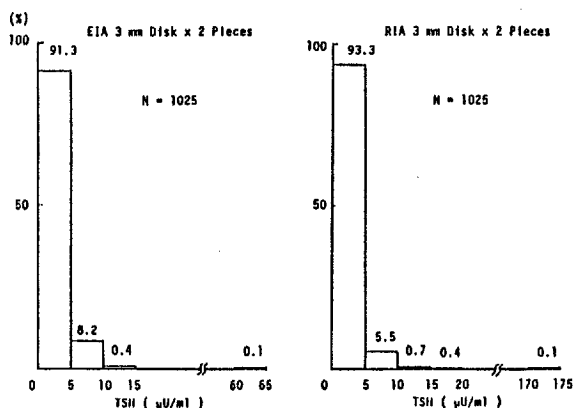
(千葉県予防衛生協会)

RIA 法によるクレチン症スクリーニングは、わが国を含め、世界各国で実施され、その有用性が証明された。併し放射性同位元素 (RI) の使用に伴う問題のため、実施不能のスクリーニングセンターも少なく、また廃棄物処理などの問題から、RI を用いない方法の開発が必要とされ、われわれは昭和54年に、酵素免疫測定法 (EIA) による TSH 測定法を発表した。その後この方法によるスクリーニングを実施し、種々の検討を行っているので、ここに、概要を報告する。

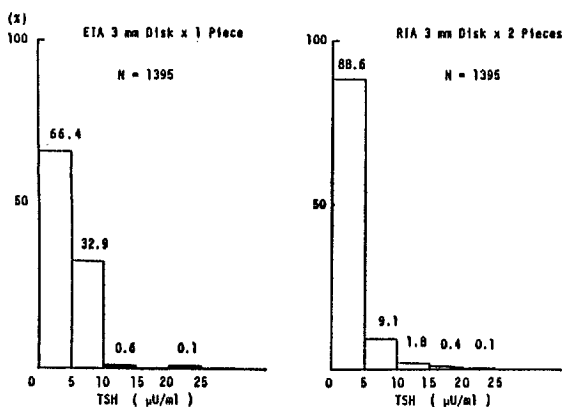
われわれが開発した方法は、競合法による EIA で、第2抗体固相化ビーズを用いており、TSH- β -galactosidase のコンジュゲートを使用した。この方法により、今迄、国立神経センター、札幌市衛生研究所、大阪府衛生研究所、京都市衛生研究所において、157,330 名の新生児が検査され、28名のクレチン症患者が発見された。今迄の所、本法による偽陰性の患者は一例も見られていない。現在、RIA を実施出来ないスクリーニングセンターは、他所に検体の一部を送付し、TSH 測定を依頼しているが、一度スクリーニングセンターに送られ冷蔵乃至冷凍されたものを他所に送る時には、余程送付方法に注意しないと、涙紙血中の TSH が変性する可能性が多い。従って、検体を他所に送っている所では、この EIA により、ガスリー法を行う実験室で直ちに TSH を測定する様に改善すべきと考える。

次に、われわれの方法は、今迄 RIA 法と同様に 3 mm ディスク 2 枚を用いて来たが、3 mm ディスク 1 枚でも、涙紙血中の TSH の測定が可能なることも確かめられた。本法は、血液ディスクに、抽出緩衝液、コンジュゲートを入れ第1回のインキュベーションを行い、次いでビーズを入れ、第2回のインキュベーションを行い、その後基質を加え酵素活性を測定する方法を採用している。このインキュベーションを、いずれも室温で17時間程度とすることにより、3 mm ディスク 1 枚でも、スクリーニングを行うことが可能であることがわかった。

第1図は、同一検体を 3 mm ディスク 2 枚を用いて、RIA と EIA で測定した結果を示し第2図は、同一検体を RIA では 3 mm ディスク 2 枚、EIA では 3 mm ディスク 1 枚を用いて測定した結果を示す。RIA としては、現在 Corning Medical 社のものを用いており、これがわれわれの試し得た範囲では、もっとも感度がすぐれていた。ただ、ロット間で多少のバラツキがあるが、比較的よいロットのものをを用うと、第1～2図の如く、殆んどの新生児検体は、5 μ U/ml 以下となる。ただこの際、標準血液検体としては、東邦大入江教授の



第1図 新生児 TSH 値の分布——RIA と EIA の比較 I)



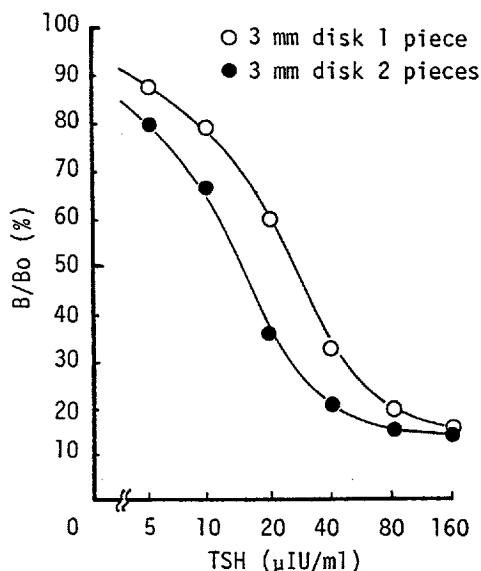
第2図 新生児 TSH 値の分布——RIA と EIA の比較 II)

作製のものを用いており、この場合0というのは、正常成人の血液のヘマトクリットを50%に調整したものである。新生児の場合も、大半は正常成人土5 $\mu\text{U}/\text{ml}$ の範囲に分布すると思われる。感度の悪い試薬を用いた場合、TSH量の少ないものは正確に測定出来ないの、分布がかなり広い範囲となるのではなからうか。

EIA の場合も、3 mmディスク2ケでは全く同様の TSH の分布をうる。標準曲線の比較では、3 mmディスク2枚を用いた場合は、RIA よりも、EIA の方がより優れている。3 mmディスク1ケの場合は、第3図に示す如く、2ケの場合よりも、多少標準曲線は劣っており、TSH 値の分布も5~10 $\mu\text{U}/\text{ml}$ のものが増え、少し分布が拡大する。ただ10 $\mu\text{U}/\text{ml}$ 以上のものは、ごく少く、RIA で3 mmディスク2ケ使用した場合と同程度であり、カットオフポイントを12~15 $\mu\text{U}/\text{ml}$ とするスクリーニングには充分使用可能であると言える。10 $\mu\text{U}/\text{ml}$ 以上の TSH 値を示す検体を、3 mmディスク2ケ用いて、RIA で測定した場合の結果と、3 mmディスク1ケを用いて EIA で測定した場合との相関も極めて良好であった。

この様に、われわれの開発した方法の感度は、既存の RIA 法よりも良好であり、3 mmディスク1ケを用いてのスクリーニングが可能と考える。

EIA は、試薬の安定性、試薬・自動化機器の安定性、使用の簡便性、RI 使用に伴う問題のない点など、RIA に比べ、多数の点で優れているが、劣る点としては、最終段階で酵素活性を測定しなければならないということがある。このため、酵素活性に影響を与える因子により、測定が妨害されることがある。免疫反応も多くの因子で妨害されるが、これは EIA も RIA も同様である。

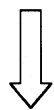


第3図 EIA による TSH 測定標準曲線
— 3mm ディスク 2枚と1枚の比較

一般的に EIA では、洗剤その他酵素活性を抑制するもので、測定が誤ることは知られている。われわれの方法では、これらの場合は偽陽性となるので、見逃しとはならない。ただ、スクリーニングを行って見た結果、札幌市衛研で、1000 ~ 2000 名に 1 名、蛍光増感作用をもつ検体があることがわかり、これが検体中の抗体様物質によることがわかった。東京大阪では、この様な検体は 1 ~ 2 万に 1 名の割合であった。京都では、冬期のみ、札幌市衛研と同様な割合で、蛍光増感物質を含む検体があることが認められている。この物質が、もしクレチン症患者検体中に含まれると偽陰性となる可能性があるので、この物質を除く研究を行っている。現在、ビーズの固

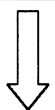
相化に用いる第二抗体を精製し、また試薬中に富士レビオ社 SAE-3 を加えること、さらにインクベーションの温度を 37℃ にすることにより、蛍光増感物質の大半の妨害は除却されることがわかった。しかしながら、この蛍光増感物質が、5000 名に 1 名の割合でも存在するとすると、クレチン症発生頻度を 8000 名に 1 名として、4 千万名に 1 名の偽陰性を生ずることとなる。現実には、極めて僅かの可能性であるとはいえ、今後尚この様な物質の影響を完全に除くための研究が必要である。

次に、汚紙血中の T4 の測定については、先にドイツベーリンガー社の Kleinhammer 博士より提供された T4-HRP コンジュゲートを用いた EIA を発表した。今回昭和大学薬学部辻章夫教授が、T4-glucose oxidase コンジュゲートを用いる方法を考案し、三共製薬中央研究所塚田氏によりそれを多少改良した試薬の提供をうけ、種々の検討を行い、3mm ディスク 1 枚中の T4 の測定が可能なることをみとめた。目下尚この方法の改善を検討中であるが、T4 に関しても、種々の型の EIA が実用可能となっている。こうして、EIA によるクレチン症スクリーニングが完全に実施可能となったものと考えられる。これらの方法は、わが国のみならず、RIA の使用により種々障害をもつ、世界各国のスクリーニングセンターに対しても、大きなプラスとなるものと期待している。



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



RIA 法によるクレチン症スクリーニングは、わが国を含め、世界各国で実施され、その有用性が証明された。併し放射性同位元素(RI)の使用に伴う問題のため、実施不能のスクリーニングセンターも少なく、また廃棄物処理などの問題から、RI を用いない方法の開発が必要とされ、われわれは昭和 54 年に、酵素免疫測定法(EIA)による TSH 測定法を発表した。その後この方法によるスクリーニングを実施し、種々の検討を行っているので、ここに、概要を報告する。