

滷紙血液及び血清中遊離型サイロキシン 測定用エンザイムイムノアッセイの開発

宮井 潔, 畑 直成, 伊藤正雄 (大阪大臨床検査診断学)
藪内百治, 野瀬 幸 (同小児科)
大浦敏明 (大阪市更生療育センター)

研究目的

クレチン症マスキングや新生児甲状腺機能の follow up に際し、滷紙血液あるいは血清中総サイロキシン (TT_4) の測定がよく用いられる。しかしながら TT_4 は甲状腺機能のみならず、血中 T_4 結合グロブリン (TBG) の変化によっても左右される欠点がある。その点活性型である遊離型 T_4 (FT_4) の測定は、TBG の変化にかかわらず甲状腺機能を反映するよい指標であることがわかっており、ラジオイムノアッセイ (RIA) が開発された。しかし FT_4 -RIA は、RI を使用しなければならないこと、アルブミンの影響を受ける欠点がある。

そこで我々は、RI を使わず、アルブミンの影響も受けない遊離型サイロキシンエンザイムイムノアッセイ (FT_4 -EIA) を開発した。

研究方法

T_4 - β -D-galactosidase 結合体 (T_4 - β GAL) : 4-(maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylic acid succinamide ester を用いて結合させ Biogel A-5 m で精製した。

標準 FT_4 血清 : 正常血清をチャコール処理して T_4 を除いた 0 濃度血清に、 T_4 を加え、その FT_4 を平衡透析法または Amerlex FT_4 RIA kit を用いて測定した。

標準 FT_4 滷紙血液 : ヘパリン加正常血液から血球をとり、洗浄後、上記 FT_4 血清を等量加え、マスキング用滷紙上に 30 μ l ずつスポットして作製した。 FT_4 濃度は、血清濃度として表示した。

血清 FT_4 測定操作 : 血清 20 μ l, T_4 - β GAL 200 μ l, 抗 T_4 200 μ l を室温 4 時間静置後第二抗体 300 μ l を添加, 4 $^{\circ}$ C-夜静置し, 遠心後沈澱を O-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside 1 ml に suspend し, 37 $^{\circ}$ C 2 時間インキュベート後 Na_2CO_3 1 ml で反応を止め, 405 nm で測定した。

滷紙血液 FT_4 測定操作 : 径 3 mm 滷紙血液ディスク 2 枚に抗 T_4 100 μ l を加え室温 20 分間静置後, T_4 - β GAL 50 μ l を加え室温 5 時間静置し, 正常家兎血清 IgG 10 μ l, 第二抗体 50 μ l を加え室温 20 分静置後, 洗浄液 2 ml を加え遠心し, 沈澱の酵素活性を上述と同じ操作で測定した。

研究結果

[A] 血清 FT₄ 測定

1. 標準曲線：図1に示す通り、血清中 FT₄ 2.8—109 ng/ℓ まで測定可能であり、感度は 56 fg/tnbe であった。なお本実験に用いた T₄-β GAL は、アルブミンとも TBG とも結合せず特異性があった。
2. 精度：変動係数 (CV) は測定内 4.6—10.8%，測定間 7.1—8.1% であった。
3. RIA との相関：同一血清中 FT₄ を本 EIA 法 (x) と、平衡透析法 (Y_E) または RIA 法 (Y_R) で測定した際の相関は、 $Y_E = 1.05x + 1.76$, $r = 0.96$, $Y_R = 1.05x - 0.31$, $r = 0.98$ (図2) と良好であった。
4. 臨床応用：健常成人血清 FT₄ は 8.4—15.5 ng/ℓ で、甲状腺機能亢進症で高値、低下症で低値であったが、TBG の増加する妊婦、低下する TBG 低下症では正常範囲であった。(図3)

[B] 濾紙血液 FT₄

1. 標準曲線：図4に示す通り、濾紙血液中 FT₄ は 1.9—93 ng/ℓ (血清換算) の範囲で測定可能であった。
2. 精度：CV は測定内 6.0—9.0%，測定間 5.6—7.1% であった。
3. RIA との相関：同一濾紙血液中 FT₄ を本 EIA 法 (x) と RIA 法 (y) で測定したところ $y = 0.9x + 0.28$, $r = 0.98$ とよく相関した。(図5)
4. 臨床応用：濾紙血液中 FT₄ は、健常成人 6.5—19.4 ng/ℓ、健常新生児 9.8—20.7 ng/ℓ、甲状腺機能亢進症で高値、低下症で低値、妊娠、TBG 低下症で正常範囲であった。(図6)

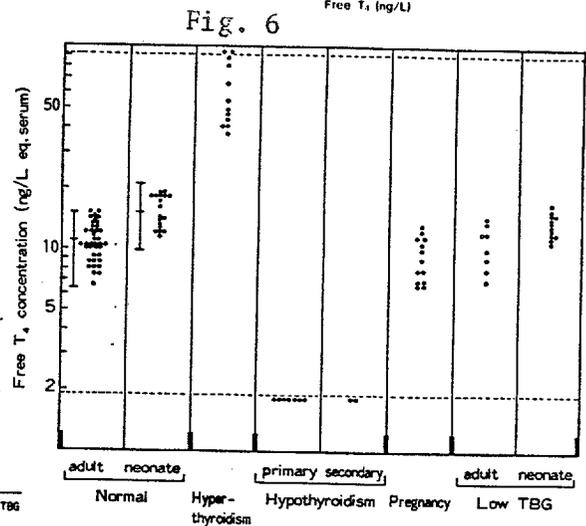
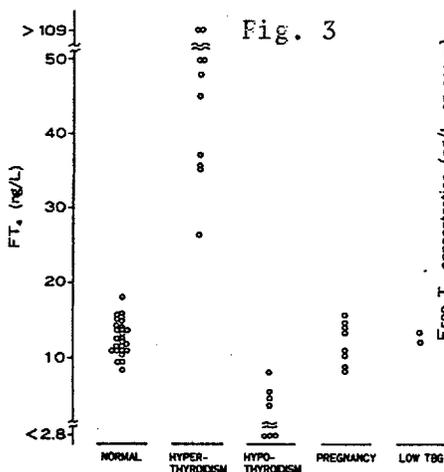
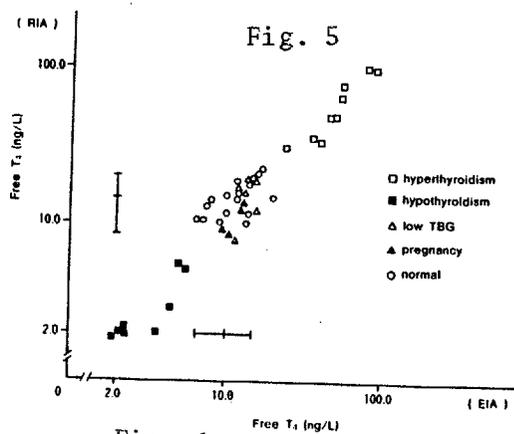
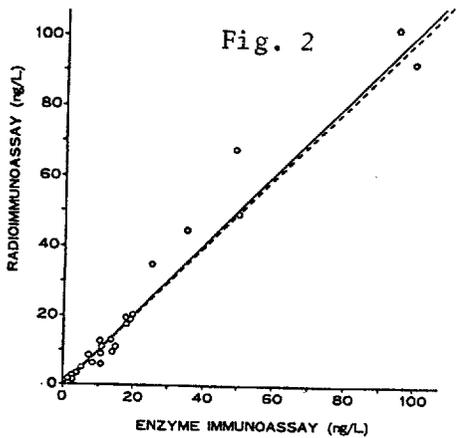
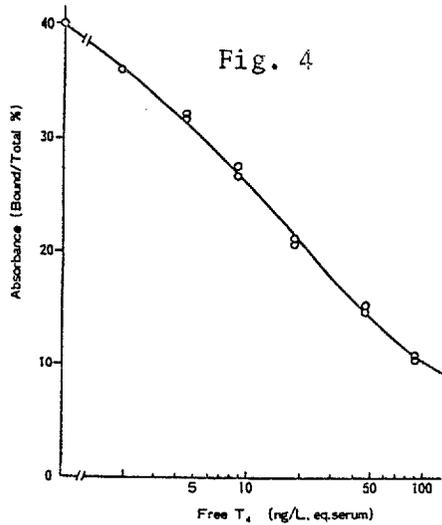
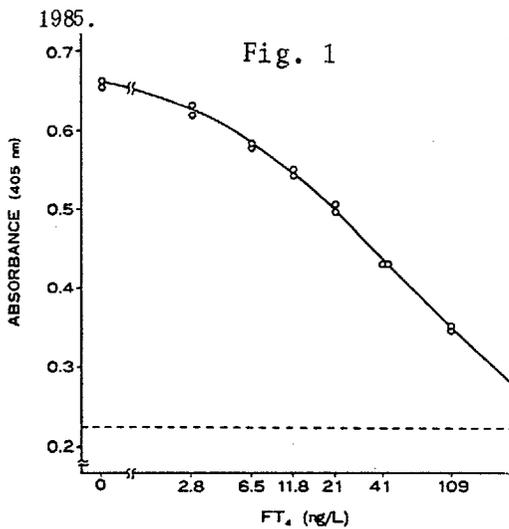
考 察

今回開発した遊離型 T₄ (FT₄) 測定用の EIA は、血清、濾紙血液中の FT₄ を測定でき、TBG に左右されずに甲状腺機能を反映し、しかも RI を用いないので一般検査室で行うことが出来るなど多くの長所を有し、新生児甲状腺機能のスクリーニングや follow up に有用と思われる。

文 献

- 1) Ito, M., Miyai, K., Doi, K., Mizuta, H. and Amino, N. Enzyme immunoassay of freethyroxin in serum. Clin. Chem. 30: 1682, 1984.
- 2) Hata, N., Miyai, K., Ito, M., Endo, Y., Iijima, Y., Mizuta, H., Amino, N., Nose, O. and Harada, T. Enzyme immunoassay of free thyroxin in dried blood samples on filter paper. Clin. Chem. 31: 750. 1985.
- 3) Miyai, K. Advances in nonisotopic immunoassay Advances in Clinical Chemistry (Academic press) vol 24. 61. 1985.

4) Miyai, K., Ito, M., Hata, N. and Endo, Y. Free thyroxine. In. Methods of Enzymatic Analysis (Verlagsgesellschaft) Ed. Bergmeyer vol 9. in press





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



研究目的

クレチン症マススクリーニングや新生児甲状腺機能の follow up に際し、炉紙血液あるいは血清中総サイロキシン(TT4)の測定がよく用いられる。しかしながら TT4 は甲状腺機能のみならず、血中 T4 結合グロブリン(TBG)の変化によっても左右される欠点がある。その点活性型である遊離型 T4(FT4)の測定は、TBG の変化にかかわらず甲状腺機能を反映するよい指標であることがわかっており、ラジオイムノアッセイ(RIA)が開発された。しかし FT4-RIA は、RI を使用しなければならないこと、アルブミンの影響を受ける欠点がある。

そこで我々は、RI を使わず、アルブミンの影響も受けない遊離型サイロキシンエンザイムイムノアッセイ(FT4-EIA)を開発した。