

時間分解蛍光免疫測定法 (TR-FIA) を用いた乾燥濾紙血 T₄ 測定に関する研究

小松 和男* 高田 五郎*

要約 時間分解蛍光免疫測定法 (TR-FIA) の原理に基づき血清用にデザインされたデルフィア Total T₄ キットを用いて、乾燥濾紙血の T₄ 測定を行った。標準曲線が低濃度域でも直線性が得られ、かつ低濃度域で競合法が成立する様に Eu 標識 T₄、T₄ 抗体および T₄ 緩衝液量を調製した。新生児の乾燥濾紙血 63 検体について測定を行い、得られた測定結果について RIA 法と比較検討を行ったところ、相関係数 0.8 と比較的良好な相関が得られた。TR-FIA により非 RIA 法にて比較的簡便に乾燥濾紙血の T₄ 測定を行い得ると考えられた。

見出し語：乾燥濾紙血 T₄、時間分解蛍光免疫測定法 (TR-FIA)、デルフィア

研究方法 時間分解蛍光免疫測定法 (TR-FIA) の原理に基づき血清用にデザインされたデルフィア Total T₄ キット (ファルマーシャ) を用い、非 RIA 法で簡便に乾燥濾紙血の T₄ 測定を行い得るかについて検討を行った。デルフィア Total T₄ キットはマイクロプレートに抗マウス IgG ウサギ抗体を固相化しており標準血清または検体 25 μl、ユウロビウム (Eu) 標識 T₄ 6.0 pg、T₄ 抗体 (抗 T₄ マウスモノクローナル抗体) 2.4 ng、T₄ 緩衝液 200 μl を入れて 90 分間反応させ、検体と Eu 標識 T₄ を競合させながら抗原抗体反応を行わせ、T₄ 抗体を介してマイクロプレートにユウロビウムを結合させた後、増強試薬にてユウロビウムをキレート化させて蛍光を増強させ、専用の時間分解測定装置を用いて測定するものである。乾燥濾紙血の 3mm ディスク

2枚の血清量は約 3 μl 程度であることから、初めに標準血清 2.5 μl を検体とし、低濃度でも直線性が得られ、かつ低濃度域の 4 μg/dl で B/B₀ が 50% 程度になるように Eu 標識 T₄、T₄ 抗体および T₄ 緩衝液量を調製した。次に標準乾燥濾紙血 3mm ディスク 2枚を検体として、得られた条件のもとで 4℃で一晩反応させ、プレート内変動、プレート間変動について検討をおこなった。さらに新生児の乾燥濾紙血 63 検体について同様の方法で T₄ 値を測定し、同一検体につきクレチン T₄ RIA キット (栄研イムノケミカル) にても測定をおこない比較検討した。

結果 標準血清 2.5 μl を検体として Eu 標識 T₄、T₄ 抗体、T₄ 緩衝液量を標準血清 2.5 μl の時と同量にすると低濃度域で直線性の

ある検量線が得られなかった。そこでEu標識 T_4 、 T_4 抗体の量を5、10、15分の1にし、1ウエルに入る T_4 緩衝液量を25、50、100、200 μ lとして測定を行った。その結果、Eu標識 T_4 、 T_4 抗体の量を10分の1にし、1ウエルに入る緩衝液量を50 μ lとした場合に低濃度域でも直線性が得られ、かつ T_4 値が4 μ g/dl程度の低濃度域でB/B₀を50%程度にすることができた。

そこで標準乾燥濾紙血3mmデスク2枚を用い、Eu標識 T_4 、 T_4 抗体の量を10分の1にし、1ウエルに入る T_4 緩衝液量を50 μ lとして、4℃で一晩反応させてプレート内変動およびプレート間変動について検討した。プレート内変動としては、6%から20%の変化率であり、またプレート間変動は14%から26%で両者ともやや大きかった。

次に新生児の乾燥濾紙血63検体について T_4 値をTR-FIA法およびRIA法で測定し比較検討したところ、平均 \pm SD値はそれぞれ7.5 \pm 2.5 μ g/dl、11.0 \pm 3.5 μ g/dlとTR-FIA法がやや低値を示したものの相関係数は0.81と比較的良好であった。2名のクレチン症患者の乾燥濾紙血の検体について、TR-FIA法およびRIA法で T_4 値を測定してみると、それぞれ1名は2.0と2.2 μ g/dl、他の1名は0.7と1.1 μ g/dlという結果で、いずれも-2SD以下の低値を示しており低濃度の測定が可能であった。

考案 クレチン症マススクリーニングは、最近ではELISA法でTSHを測定するのが主流

になってきてきている。TSHが高値を示した場合、同時に T_4 値を測定できればスクリーニング検査を行う上で非常に有用である。現在のところ乾燥濾紙血 T_4 に関して発売されている測定キットはRIA法のみである。我々の施設のように通常RIA施設外でスクリーニング検査を行っている所でも乾燥濾紙血 T_4 を測定できれば非常に有用であり、デルフィアTotal T_4 キットを用いて濾紙血 T_4 を測定できるかどうかについて検討をおこなった。本キットをクレチン症のスクリーニングに用いるためには特に低濃度で競合を成立させる必要がある。しかし本キットは血清25 μ lの検体で測定できるようにデザインされており、乾燥濾紙血3mmディスク2枚の検体で測定すると検体量がその10分の1程度しかなく、低濃度では競合が成立しないために直線性のある検量線は得られなかった。そこで標準曲線が低濃度域でも直線性が得られ、4 μ g/dl付近がB/B₀の50%程度になる様にEu標識 T_4 、 T_4 抗体、 T_4 緩衝液量を希釈調製した。

乾燥濾紙血3mmデスク2枚の検体で測定したところプレート内変動、プレート間変動は10%を越えてしまい、さらに改善の必要があった。しかし新生児の乾燥濾紙血63検体について、TR-FIA法とRIA法との相関係数は0.82と比較的良好であった。またクレチン症患者検体で実際に T_4 が低値でも測定が可能であった。以上よりTSHが高値を示した場合、本方法を用いてトータル T_4 値が低いかなかを判定することは可能であり、クレチン症のマススクリーニングには有用と思われた。

*秋田大学小児科 (Department of Pediatrics, Akita Univ.)

終わりに御協力いただいたファルマーシャ及び栄研イムノケミカルの方々に深謝致します。



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



要約 時間分解蛍光免疫測定法(TR-FIA)の原理に基づき血清用にデザインされたデルフィア TotalT4 キットを用いて、乾燥濾紙血の T4 測定を行った。標準曲線が低濃度域でも直線性が得られ、かつ低濃度域で競合法が成立する様に Eu 標識 T4、T4 抗体および T4 緩衝液量を調製した。新生児の乾燥濾紙血 63 検体について測定を行い、得られた測定結果について RIA 法と比較検討を行ったところ、相関係数 0.8 と比較的良好な相関が得られた。TR-FIA により非 RIA 法にて比較的簡便に乾燥濾紙血の T4 測定を行い得ると考えられた。