

Free T₄ ELISAキットの検討

—特にTBG濃度の与える影響について—

(分担研究：現行マススクリーニングシステムの問題点に関する研究)

小松 和男、石川 孝子、高田 五郎

要約：クレチン症のマススクリーニングにおいて、Free T₄ ELISA キットを現行のマススクリーニングに組みこめるか否かという観点から、特にTBG濃度のFree T₄ 値に与える影響について検討を行った。TBGの添加試験の結果では、20 µg/mlまではこれまでの報告のように影響を受けなかったが、それより高濃度になると急速に吸光度の低下が見られ、TBGとT₄ conjugate との結合が起こってくると考えられた。次に低濃度のTBGのFT₄ コントロール血清および乾燥濾紙血を作製し、血清および乾燥濾紙血を検体として、Amerlex-M- Free T₄ RIAキット よび Free T₄ ELISA キットで測定した。その結果、血清 100 µl を検体として RIAキットで測定した値を基準とすると、乾燥濾紙血 3 mmディスクを検体として測定した場合にはRIA法、ELISA法のいずれも相対的に高値を示した。ただ乾燥濾紙血ELISA法はRIA法ほど相対的に高値ではなかった。このことから、乾燥濾紙血でFree T₄ 値を測定した場合、TBG減少症では必ずしも正確にFree T₄ 値を表していないと考えられ、更に検討を要するものと思われる。

見出し語：乾燥濾紙血Free T₄、ELISA法、TBGの影響

はじめに：

現在、多くの施設では乾燥濾紙血TSHの測定によりクレチン症のマススクリーニングを実施しているが、乾燥濾紙血Free T₄ (FT₄) の測定を現行のマススクリーニングに組みこめるか否かという観点から最近2社より発売されたFT₄ ELISA Kit を用いて検討を行った。これまで乾燥濾紙血FT₄ の測定をRIA 法にて

測定した場合、TBG減少症の患者では低値にでるとの報告がいくつかなされていた。さらに第18回マススクリーニング学会でもTBG減少症の患者ではELISA 法で測定しても同様に低値に出ようだとの報告があった。本来、FT₄ はTotal T₄ と違い、TBGの影響を受けないということが最大の利点のはずである。

そこで本研究では主にFT₄ ELISA 測定にT

BGが影響を与えるか否かについて検討を行った。

研究方法：

(1) TBG添加試験

図1の様に、T4 抗体固相化マイクロプレートにFT4 標準血清10 μ l または種々の濃度に調整したTBG溶液10 μ l を入れ、酵素標識T4 100 μ l を加えて反応させた後、常法に従って測定を行った。

(2) 低濃度TBGのFT4 コントロール作成

図2の様に、初めに低濃度TBGの血清を作製した。小児プール血清を80℃以上30分加熱処理した後、充分ホモジネートし、15000g、30分間超遠心し、上清に10%容積のチャコールを加え、4℃で24時間混和し、15000g、1時間超遠心を3回行った。これにあらかじめ作製しておいた高濃度Thyroxin 液を種々の量添加し、低濃度TBGのFT4 コントロール血清を作製した。一方、ヘパリン採血したO型血液を2000g 15分遠心した後、赤血球分画を採取し、0.1N PBS (phosphate buffered saline PH 7.5)にて4回洗浄を行い、濃厚赤血球液を作製した。次に低TBG血清と濃厚赤血球液を等量混和し、新生児スクリーニング用濾紙に40 μ l ずつ滴下し、低濃度TBGのFT4 コントロール乾燥濾紙血を作製した。

(3) FT4 値の測定

RIA法での測定はAmerlex M Free T4 RIAキットを用い測定した。血清100 μ l を検体とした場合は、常法の通り測定した。乾燥濾紙血3mmディスク2枚を検体とした場合はPBSを100 μ l 加えて1夜静置した後、¹²⁵I-T4 誘導体液100 μ l とアマレックス-M抗T4 血清懸濁液100 μ l を加え、以後常法の通り測定した。

ELISA法での測定はE社およびC社のキットを用い、乾燥濾紙血3mmディスク1枚を検体として行った。

測定に際し、標準はいずれも正常濃度のTBGを含有しているFT4 標準血清または標準濾紙血液を用いた。

結果および考案：

(1) TBG添加試験の結果、図3に示す様にTBG濃度が20 μ g/mlまでは吸光度はほぼ一定であったが、それ以上の濃度では吸光度は急速に低下した。この結果から、TBG濃度が20 μ g/mlまではこれまでの報告の様にTBGとT4 conjugate との結合は起こらないが、TBG濃度がより高濃度では結合が起こり得ると考えられた。

(2) 低濃度TBGのFT4 コントロールの作製過程の各値の結果を表1に示した。加熱処理後チャコール処理した結果、遊離サイロキシンは感度以下に低下し、プレアルブミンおよびアルブミンも100分の1以下程度とほぼ除去された。一方、TBG値はプール血清値の約3分の1程度に低下した。濃厚赤血球液のTBG値もほぼ同様であり、乾燥濾紙血のTBG値は両者のほぼ平均を示すと思われる。

(3) 低濃度TBGのFT4 コントロール血清および乾燥濾紙血を検体として、RIA法およびELISA法で測定したFT4 値を表2に示す。血清100 μ l を検体としてAmerlex-M-Free T4 RIAキットを用いて測定した値を基準に考えると、乾燥濾紙血3mmディスク1枚を検体とした場合、RIA法、ELISA法のいずれも相対的に高値を示した。但し、ELISA法では相対的にはRIA法ほど顕著ではなかった。これらの結果は、TBGが低値の場合は一定量のT4 conjugate に対してTBGより

T4 が遊離してくる、いわゆるpull-outが起きているのではないかと考えられた。

以上より、TBG濃度が異常高値または低値の場合は、FT4 値はRIA法と同様にELISA法でも影響を受けていることが判明した。乾燥濾紙血3mmディスク1枚程度を検体とした場合、その血清量はわずか1~2μl 程度と極めて微量であり、これを検体として測定する際、適当な検量線を書かせるためには相対的にT4 conjugate およびT4 抗体の量が多くなざるを得ない。そのためTBG結合T4 と遊離T4 との平衡関係が乱されているのではないかと考えられる。今後、反応時間の延長やT4 抗体の高感度化など、平衡関係を乱さない条件作りを検討する必要があると考えられる。

謝辞：ご協力いただいた秋田大学附属病院放射線科核医学検査室のスタッフの方々をはじめ、栄研イムノケミカルおよびチバコーニングの方々に深謝致します。

図1 FT4 ELISAキットでのTBG添加試験

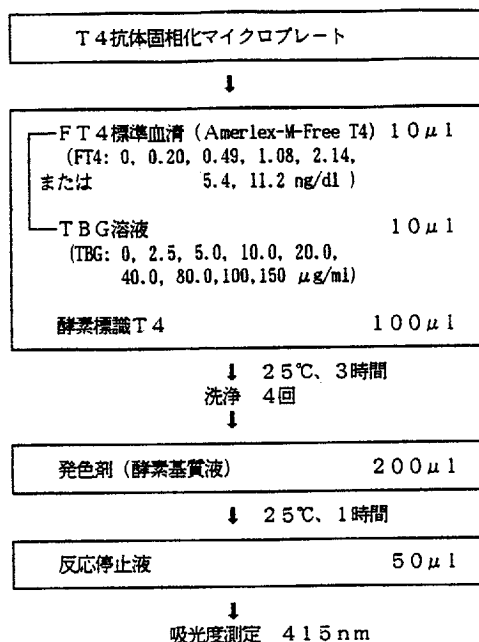


図2 低濃度TBGのFT4 コントロールの作製

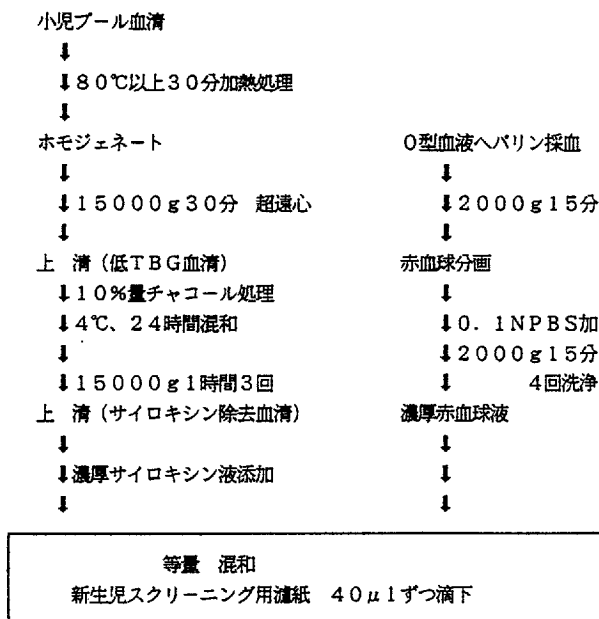


図3 TBG添加試験

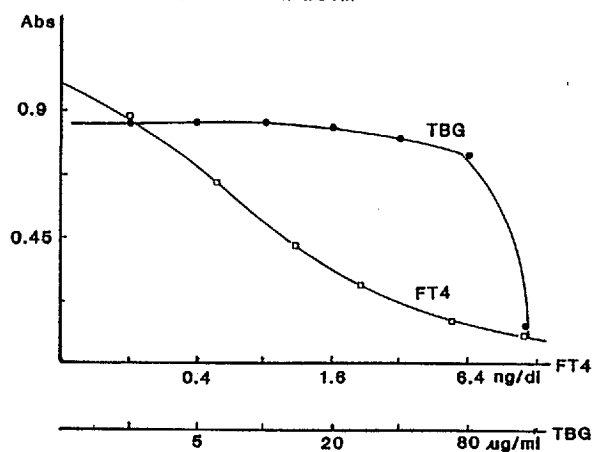


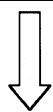
表1 低濃度TBGのFT4 コントロール作製過程のプロフィール

	遊離サイロキシ (ng/dl)	プレアルブミン (mg/dl)	アルブミン (mg/dl)	TBG (μ g/ml)
ブール血清	1.6	33.2	4050	17.0
加熱 処理後血清	4.6	-	-	3.1
チャコール 処理後血清	0.0	<0.4	0.007	3.1
濃厚赤血球液	0.1	<0.4	0.620	4.6

表2 低濃度TBGのFT4 コントロールの各FT4 値

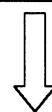
	RIA		ELISA	
	血清	乾燥濾紙血	乾燥濾紙血 (E社)	乾燥濾紙血 (C社)
C1	4.0	12.1	12.1	12.1
C2	0.7	5.8	12.1	12.1
C3	0.5	1.7	2.9	1.7
C4	0.4	2.0	1.2	1.0
C5	0.4	1.5	1.8	1.8
C6	0.2	0.8	0.6	0.4
C7	0.1	0.9	0.3	0.2
C8	0.1	1.3	0.4	0.4

FT4 : ng/dl



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:クレチン症のマススクリーニングにおいて、Free T4 ELISA キットを現行のマススクリーニングに組みこめるか否かという観点から、特に TBG 濃度の Free T4 値に与える影響について検討を行った。TBG の添加試験の結果では、20 $\mu\text{g/ml}$ まではこれまでの報告のように影響を受けなかったが、それより高濃度になると急速に吸光度の低下が見られ、TBG と T4 conjugate との結合が起こってくると考えられた。次に低濃度の TBG の FT4 コントロール血清および乾燥濾紙血を作製し、血清および乾燥濾紙血を検体として、Amerlex-M-Free T4 RIA キット よび Free T4 ELISA キットで測定した。その結果、血清 100 μl を検体として RIA キットで測定した値を基準とすると、乾燥濾紙血 3 mm ディスクを検体として測定した場合には RIA 法、ELISA 法のいずれも相対的に高値を示した。ただ乾燥濾紙血 ELISA 法は RIA 法ほど相対的に高値ではなかった。このことから、乾燥濾紙血で Free T4 値を測定した場合、TBG 減少症では必ずしも正確に Free T4 値を表していないと考えられ、更に検討を要するものと思われる。