

《ノート》

乾燥濾紙血サイロキシンを一次指標とした クレチニン症のマス・スクリーニング系

Thyroxin in Dried Blood Spot as a Primary Index in Mass Screening
Program for Neonatal Hypothyroidism

斎藤 寿一*,**,*** 佐藤かな子** 矢島由紀子** 長井 房子***
Toshikazu SAITO*,**,***, Kanako SATOH**, Yukiko YAJIMA**
and Fusako NAGAI***

*Division of Endocrinology and Metabolism, Department of Medicine, Jichi Medical School

**Department of Hormone Research, The Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science

***Division of RI assay, Jichi Medical School

I. はじめに

新生児におけるクレチニン症マス・スクリーニングは、本症の頻度、放置した時の予後の重篤性、治療の有効性等の諸点より見て、その実効性が世界的に確認されつつある。その指標としてわが国^{1,2)}、およびヨーロッパ諸国³⁾では主として甲状腺刺激ホルモン (Thyrotropin, TSH) が使用され、他方カナダ、アメリカ⁴⁾では主にサイロキシン (T₄) が使用されている。わが国においては今後 TSH を第一の指標とすることが、すでに行政レベルで方向づけられているが、クレチニン症マス・スクリーニングにおいて、T₄ が指標としていかなる役割をはたすかが、今後検討されねばならない。

われわれは、T₄ を一次指標とし TSH を確認に用いるスクリーニング系を用いて、昭和53年7月

から、54年10月まで計 37978 人の新生児につき、その乾燥濾紙血を測定した。本稿ではこのスクリーニングシステムについての成績と問題点を報告し、あわせて今後の TSH を主体としたスクリーニングにおける、T₄ の位置づけにつき考察を加えたい。

II. 材料と方法

1. 濾紙材料

対象は、東京・栃木・埼玉および群馬の各都県において出生した新生児の乾燥濾紙血検体で、当施設における月平均検体数は 2,500 であった。全検体の送付状況は以下のようであった。すなわち、(1) 新しい濾紙に、クレチニン症スクリーニング検査のためにのみ採血し、ただちに郵送したもの 26%, (2) ガスリー検査終了後の残りの濾紙を 4°C に保存し、3ないし4週間後に郵送したもの 32%, (3) ガスリー検査用に採血した 4 スポットの血液斑より 1 スポットを切り離して直ちに郵送したもの 32 % よりなっている。ディスクを打ち抜いて実際に T₄ 測定に供し得た検体の比率は、(1) は 95%, (2) は 81%, (3) は 98% で、残りは採血状態不良の

Key words: Thyroxin, Thyrotropin, Congenital hypothyroidism

*自治医科大学内分泌代謝科

**東京都立臨床医学総合研究所ホルモンプロジェクト

***自治医科大学 RI 測定室

受付: 54年12月10日

最終稿受付: 55年3月19日

別刷請求先: 栃木県河内郡南河内町(番号 329-04)

自治医科大学内分泌代謝科

斎藤 寿一

Table 1 Assay characteristics of T₄ RIA (1)

Elution	V (μl)	Concept-4	Thyro-screen	Gamma-coat
		900	25°, 2 hr	500
¹²⁵ I-T ₄ (μl)		100	300	50
Antiserum (μl)		Coated Tube	200	Coated Tube
Total Vol (μl)		1000	500	500
Incubation		37°, 60'	25°, 25' 25°, 60'	25°, 45'
B/F Separation		Decant	PEG	Decant
Disc Size (φ)		1/8"	1/4"	1/4"

ため測定に供し得なかった。

T₄測定系の検討の目的で行なった、血清T₄値および濾紙血T₄値との相関検定は、成人甲状腺機能亢進症および同低下症より採血した血液について検討を行なった。

2. T₄測定系

T₄測定キットとして次の3種を使用し、それにつき測定感度、測定内変動係数、測定間変動係数、検体処理能力、血清値との相関、ディスク打ち抜き部位の影響につき検討を加えた。

1) コンセプト-4 (Micromedic社-第一ラジオアイソトープ社)

Micromedic社の全自动測定機器コンセプト-4とネオネータルT₄キットを用いて、Table 1 第1列に示すとく測定した。すなわち抗T₄抗体被覆チューブに1/8インチ(3.0 mm)の濾紙血ディスク1枚を入れ、緩衝液900 μlを添加後25°Cで2時間溶出、次いで¹²⁵I-T₄液100 μlを添加、攪拌後37°Cで1時間孵育した。次いで、蒸留水で2回チューブ内面を洗浄し、ディスクがチューブ内に残った状態でチューブの放射能を測定し、内蔵されたコンピューターにより測定値を算出する。標準曲線は既知量のT₄を含む添加の血清を用いて作製した。

2) サイロスクリーン (Abbot社)

チューブに1/4インチ(6.0 mm)の濾紙血ディスク1枚を入れ、抗T₄抗体を含む緩衝液200 μlを加え25°Cで25分間T₄を溶出した。¹²⁵I-T₄液300 μlを加え攪拌し、25°Cで1時間孵育後ポリ

エチレングリコール液2 mlを加え攪拌後25°C、3,000回転で15分遠心分離する。ディスクがチューブ内に残った状態でチューブの放射能を測定する。標準曲線は、添付の既知濃度T₄を含む血液斑を用いて作製した(Table 1 第2列)。

3) ガンマコートT₄ (Clinical Assay社)

抗体被覆チューブに1/4インチディスク1枚を入れ、緩衝液500 μlを添加後25°Cで2時間溶出後、¹²⁵I-T₄液50 μlを加えて攪拌し、25°Cで45分間孵育する。次いでチューブ内容液とディスクを除去し、蒸留水1 mlでチューブ内面を洗浄後、チューブの放射能を測定する。標準曲線は、添付の既知濃度のT₄を含む血清を用いて作製した(Table 1 第3列)。

3. TSH測定系

第一ラジオアイソトープ研究所製TSHキット「第一」を主体とし、3.0 mmディスク2枚を使用して、Fig. 1に示すとく測定した。0.01 Mリン酸緩衝液(pH 7.6)200 μlと、希釈抗TSH抗体50 μlを加え、攪拌後37°Cで一晩孵育する。¹²⁵I-TSH50 μlを加え37°Cで一晩孵育後、18%ポリエチレングリコール液1.0 mlを加え、25°Cで3,000回転、30分間遠心分離する。ディスクがチューブ内に残った状態で、チューブの放射能を測定する。標準曲線は、添付の標準TSHをTSHが1 μU/ml以下である甲状腺機能亢進症患者のEDTA添加血液に溶解したものを、濾紙上にスポットし、乾燥させた血液斑を使用した。

4. データ処理

Fig. 2 にしたがって、データの処理を行なった。コンセプト-4は、機器に付属したコンピュ

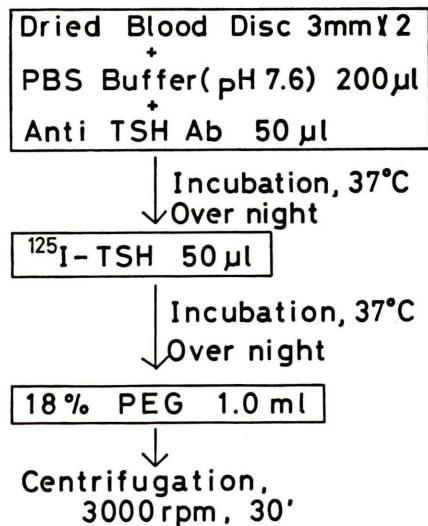


Fig. 1 Assay system of TSH in dried blood spot.

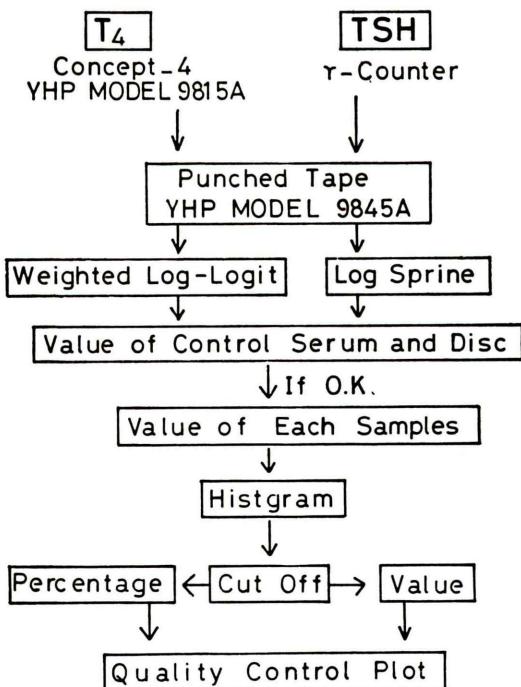


Fig. 2 Flow chart of data treatment.

ーター YHP 9815A にテープパンチ F-ACT 4070 を接続させて得られるテープを用いた。サイロスクリーンおよびガンマコート T₄ による T₄ の測定および TSH の測定は、γ-カウンターに接続させたテレタイプより得られるテープを小型コンピューター YHP 9845 A に接続したテープリーダー YHP 9883A にかけて読みこませた。回帰モデルは、(1) unweighted logit-log (2) weighted logit-log (3) linear sprine (4) four parameter (5) log sprine の 5 種類のものが選択できるが、主に T₄ は weighted logit-log model を TSH は log sprine model を用いた。標準曲線に対して最も高い近似を与える管理血清及び管理ディスクの値をおのおの duplicate で読みとった後、検体の値を読んだ。T₄ については、次に全検体についてヒストグラムを描き平均値、標準偏差を算出し、そのヒストグラム上に精度管理の目的で入れた管理ディスクまたは血清の値の位置が印される。続いて cut off する点を選ぶ。cut off 点の基準を全体のパーセントとするか、標準偏差とするか、または一定の値とするかを選択できるようにプログラムし、スクリーニングの実際は Fig. 3 に示したマス・スクリーニングのフローチャートに従って行なった。cut off 点としては、T₄ の場合低値群として全体の 18% 選び、また TSH の場合 20 μU/ml を選択すると、それぞれ低値群または高値群に属する

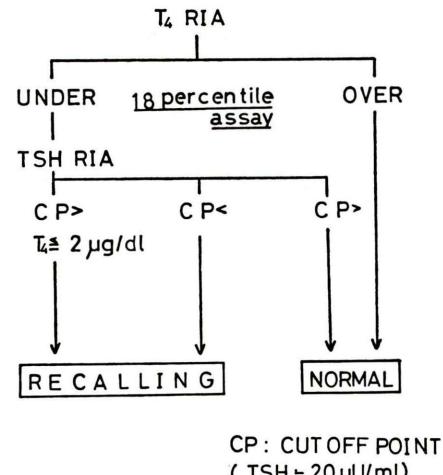


Fig. 3 Mass screening system for cretinism.

検体の番号と測定値とが選出記入される。次に精度管理の為の管理血清および濾紙の値を記憶し、管理図が作製される。

III. 結 果

1. 3種のキットの測定感度

上記3種のキットで得たT₄測定系の標準曲線をFig. 4に示す。コンセプト-4およびガンマコートは血清をスタンダードに用い、B/B₀が80%となる点より求めた感度は1 μg/dl以下であり、乾燥濾紙血をスタンダードに用いたサイロスクリーンでは2.5 μg/dlであった。

2. 測定内および測定間変動係数

Table 2に示したごとく、T₄低濃度より高濃度に至る検体での10回測定時における測定内変動は、コンセプト-4で6.0ないし9.3%，サイロスクリーンでは6.3ないし11.3%，ガンマコートT₄では7.4ないし12.0%，測定間変動ではそれぞれ6.5ないし8.1%，10.1ないし16.7%および16.2ないし17.4%であり、コンセプト-4において

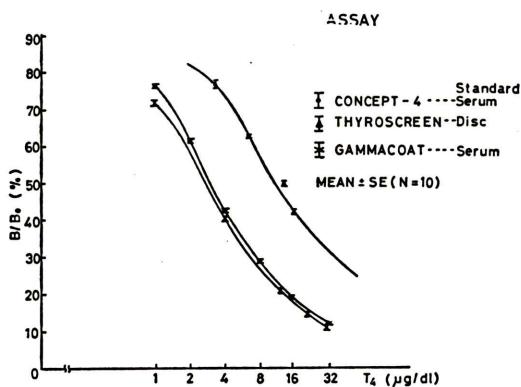


Fig. 4 Standard curves of T₄ assay for dried blood disc.

もっとも安定した値が得られた。

3. 検体処理能

以上の3キットを用いたとき、1人の技師の1日の検体処理能力はFig. 5に示したごとく、コンセプト-4は600検体、サイロスクリーン336検体、ガンマコート400検体と、コンセプト-4が最もすぐれている。

4. コンセプト-4の孵育温度の影響

コンセプト-4において孵育温度が測定値に及ぼす影響を25°C、37°Cおよび45°Cに各30分間孵育したduplicateの測定条件下で検討すると、Fig. 6の第1列に示すごとく37°Cにおいて最も高い感度が認められた。次に、37°Cの孵育温度下で、時間の影響を検討すると、Fig. 6第2列に示すごとく、60分および120分において満足すべき標準曲線をみとめた。

5. コンセプト-4測定による濾紙血T₄値と血清T₄の相関

コンセプト-4によって測定した濾紙血中T₄値(X)と、抗体被覆チューブRIA(Spac T₄)により測定した血中T₄値(Y)との相関は、Fig. 7に示すごとく相関係数r=0.96, Y=-1.07+0.99Xで高い相関が認められた。サイロスクリーンは、r=0.96, Y=0.80+1.03X、ガンマコートは、r=0.97, Y=-3.93+1.95Xであった。

6. ディスク採取部位の影響

血液斑より3mmのディスクを打ち抜く部位が、T₄測定値に及ぼす影響をコンセプト-4によるT₄測定系で検討した成績をFig. 8に示す。血液斑の周辺部から打ち抜いたディスクは、中心部や中心から3mm離れた部位より採取したディスクに比べて測定値の変動が大きく、径7mmの血液斑からのディスクは低値傾向を示した。

Table 2 Assay characteristics of T₄ RIA (2)

	Within assay n=10						Between assay n=10					
	Concept-4	Thyroscreen		Gammacoat		Concept-4	Thyroscreen		Gammacoat			
Mean (μg/dl)	4.1	7.5	17.3	2.3	11.2	14.0	3.6	7.5	10.3	1.5	7.4	19.3
SD	0.3	0.7	1.0	0.3	0.7	1.5	0.4	0.6	1.2	0.1	0.6	1.3
CV (%)	7.3	9.3	6.0	11.3	6.3	10.4	11.1	7.4	12.0	8.1	7.9	6.5

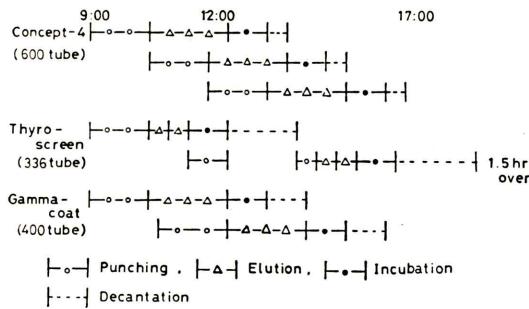


Fig. 5 Time schedule to run the assay of T₄ RIA in a day by one technician.

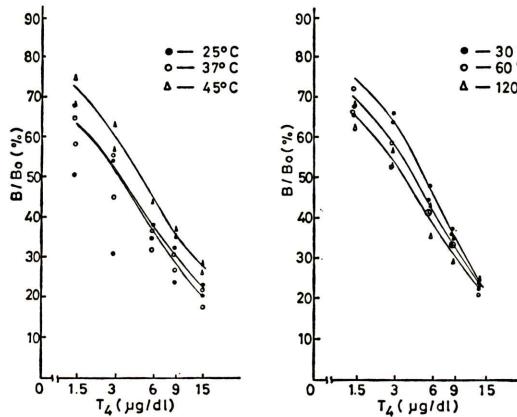


Fig. 6 Effect of incubation temperature and time on T₄ standard curve by Concept-4.

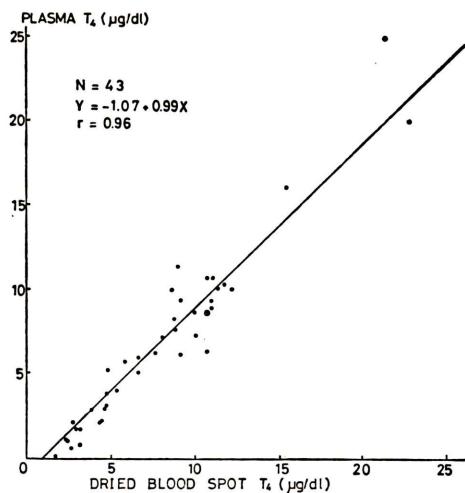


Fig. 7 Correlation between T₄ levels in plasma and dried blood spot: Concept-4.

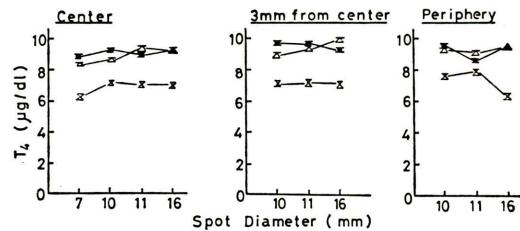


Fig. 8 Content of thyroxine in 3 mm DISC of dried blood spot (1): effect of spot diameter.
Blood Volume μ l: 20(7), 40(10), 60(11), 80(16)
(Diameter mm) ●: Sample A, △: Sample B,
×: Sample C MEAN \pm SD (n=10)

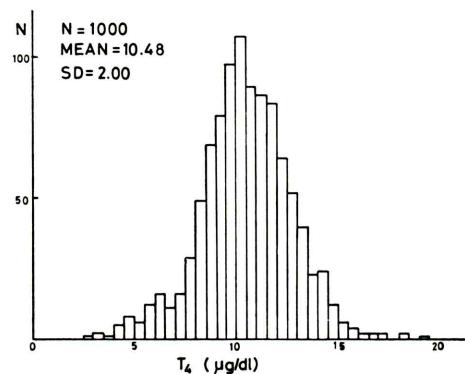


Fig. 9 Distribution of T₄ level in dried blood spot of neonates: Concept-4.

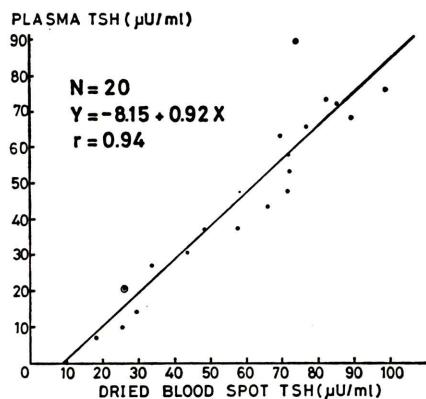


Fig. 10 Correlation between TSH in plasma and dried blood spot.

Table 3 Neonates with thyroid hormone abnormality

patient	Disc		Serum			
	T ₄ μg/dl	TSH μU/ml	T ₄ μg/dl	TSH μU/ml	TBC Index	Triosorb %
Cretinism	T.H.	<1	600	2.0	28	—
	S.T.	7.9	91.7	7.6	81	—
Transient Hypothyroidism	Y.O.	6.0	118	5.0	25	—
	N.H.	1.8	560	5.9	2.5	—
TBG Deficiency	Y.K.	1.6	<20	1.7	23	0.59
	T.S.	2.2	<20	1.4	2.7	0.49
	Y.T.	2.1	<20	1.0	5.7	0.51
	M.K.	1.5	<20	2.7	4.8	—
	R.I.	1.3	<20	1.4	3.6	—
	K.H.	1.0	<20	0.6	2.6	—
	R.F.	1.6	<20	2.0	1.4	—
	T.T.	2.2	<20	1.9	5.3	0.46
	N.H.	1.2	<20	2.4	6.5	11.2*

* TBG in plasma (μg/dl)

7. 新生児濾紙血液 T₄ 値

コンセプト-4 による新生児 1,000 人の T₄ 測定値の分布は、Fig. 9 に示すごとく $10.5 \pm 2.0 \mu\text{g}/\text{dl}$ (平均土標準偏差) であった。

8. TSH 測定系の濾紙血値と血清の相関

われわれが用いた TSH 測定系による、血清 TSH 濃度と濾紙血 TSH 濃度との相関を Fig. 10 に示す。両指標は、相関係数 $r=0.94$ と高い正の相関を示し、 $20 \mu\text{U}/\text{ml}$ 以上の TSH 濃度を示す。クレチニン症症例の検体について、十分な検出力を有するものと考えられた。

9. マス・スクリーニングシステム

以上の諸検討成績より、T₄ を一次指標とした場合最も適切なスクリーニング系としては、Fig. 3 に示したごとく、まず全検体について T₄ を測定し、次いでその一部の低値群について TSH を測定した。当初 16,971 検体については低値 8% につき、またその後、18,074 検体については低値 18% につき TSH を測定した。このうち TSH が $20 \mu\text{U}/\text{ml}$ 以上を示した患者、および TSH が $20 \mu\text{U}/\text{ml}$ 未満であっても T₄ が $2 \mu\text{g}/\text{dl}$ 以下の値を示した症例につき、患者の呼び出しによる血清中 T₄、T₃、TBC Index および TSH 測定を行なって精査するよう、当該医療機関に依頼した。

以上の測定系によるスクリーニングで発見された症例は、原発性クレチニン症 2 例、一過性甲状腺機能低下 2 例および TBG 欠損症 9 例であった。その測定値を Table 3 に一括して示す。

IV. 考 察

従来の報告^{1,2)}によれば、クレチニン症の血清中 T₄ 値は、症例によりときに正常域の値を示すこともある。宮井ら²⁾によると濾紙血採取時点での T₄ 値については明らかでないが、TSH 高値例の呼び出し精査時での血中 T₄ は、原発性クレチニン症患者 15 例中 3 例が $7 \mu\text{g}/\text{dl}$ をこえている。仮に $8 \mu\text{g}/\text{dl}$ 以下の新生児を T₄ の結果のみで呼び出せば、呼び出し率は 10% をこえ、マス・スクリーニング実施上混乱を来す高頻度となる。その点から T₄ を一次指標とした場合、TSH が確認指標として必要なことが、今回の検討成績からも明らかである。

検討した 3 種の T₄ 測定キットを比較した場合、測定感度においては 3 者間に著差を認めないものの、測定内変動係数及び検体処理能力より見て、コンセプト-4 は特に優れているものと考えられる。T₄ を一次指標とし、TSH を確認指標としたスクリーニング系において一検体の T₄ 測定に要

する時間は数時間であり、迅速に疑陽性群を濃縮することができる。この間、T₄の著しく低い緊急治療を必要とする症例を速かに検出しうることも、TSHのみを指標としたスクリーニング系にはない利点として注目しうる。

T₄を一次指標とし全検体を測定した場合、その低値群の何%をTSHによる再検にまわすかは、予測されうるクレチニン症T₄値の上限とT₄測定系の変動係数によって決定される。コンセプト-4を用いた場合、8.6 μg/dlの上限値、すなわち低値18%のT₄値をカットオフ値とすれば良いものと考えられる。

T₄を指標とした測定系で発見される異常としては、視床下部性または下垂体性甲状腺機能低下症およびTBG欠損症^{6,9)}がある。われわれのスクリーニングにおいては、視床下部性または下垂体性甲状腺機能低下症は今まで発見しえなかつたものの、TBG欠損症は7例が発見された。TBG欠損症は臨床症状を有さず、症例の予後にもなんら支障はきたさないものの、甲状腺機能にかかわる臨床検査成績を正しく理解する上で患児、家族に通達さるべき情報であると考えられる。これらはT₄を一次指標としたスクリーニング系における利点と考えられる。

われわれが発見した一過性甲状腺機能低下症のうちの1例は、特発性呼吸窮迫症候群(RDS)に合併発症した。その臨床成績はTable 3の第3例に示すごとく、特に補充療法を行なうことなく自然軽快を示した点が注目される。Cuestasら¹⁰⁾の報告に知られており、今後症例を重ねて検討を加えたい。

今後、わが国においてはTSHを一次指標としたスクリーニングを実施することが、すでに方向づけられている。TSHを一次指標とした場合、1種類のホルモンのみでスクリーニング系を構成しうること、再検にまわされる検体数は、T₄一次とTSH二次よりなる測定系に比してより少數にとどめうことの利点があり、前記したT₄一次測定とした場合の諸利点と今後比較考究るべきものと思われる。TSH一次測定のスクリーニングに

おいて、濾紙血T₄の位置づけとしてはいくつかの可能性が想定しうる。すなわち、(1)TSHと平行して全検体につきT₄を測定する、(2)一定のTSH高値群につきT₄を二次指標として測定する、(3)T₄をクレチニン症患児治療コントロールの指標として測定する、の3点が考えられる。このうち(1)に関しては、スクリーニングとして最もゆき届いた系となり望ましいことは明らかであるが、費用のかさむ点が難点となる。また(2)については、特にTSHが著しく高く治療の緊急性を要する場合に、スクリーニングセンターにおいてすでに重症度についての情報を提供しうる点で有用であると考えられる。さらに(3)に関しては、特に今後スクリーニングの普及により、血清T₄が容易には測定しえない離島ないし山間の症例の長期的な加療と、経過把握の目的でこれらへき地医療機関よりの郵送により、T₄投与量決定に必要な血中濃度を速やかに提示する系として有用性をもつものと考えられる。

VI. まとめ

新生児クレチニン症マス・スクリーニングのため乾燥濾紙血T₄値を一次指標とする系を確立した。本系では、3mmディスク2枚を使用し、全検体のT₄をラジオイムノアッセイで測定した後に、低値群18%につきTSHを測定、症例を確認した。全検体数37,978のうちから、原発性クレチニン症2例、一過性甲状腺機能低下症2例およびTBG欠損症9例を発見した。T₄を一次指標、TSHを確認指標とした場合、自動機器を用いて異常例の速やかな濃縮ができること、クレチニン症の重症度を早期に推定しうることが、TBG欠損症および視床下部性または下垂体性クレチニン症のスクリーニング系ともなることと合わせて、優れた系となりうるものと考えられた。

本研究は、厚生省心身障害研究小児慢性疾患研究班の研究費により援助を受けました。ここに深謝いたします。

文 献

- 1) 梅田みほ子, 榎本仁志, 伊藤裕美子: 乾燥濾紙血液を用いた TSH ラジオイムノアッセイによる先天性甲状腺機能低下症の早期発見に関する研究. 日内分泌会誌 **55**: 1452-1468, 1979
- 2) 宮井 潔, 蔡内百治, 大浦敏明, 他: クレチン症のマス・スクリーニング. ホト臨床 **27**: 967-976, 1979
- 3) Illig R, Gitzelmann R: Screening for Congenital Hypothyroidism. J Pediatr **91**: 348-349, 1977
- 4) Fisher DA, Burrow GN, Dussault JH, et al: Recommendations for Screening Programs for Congenital hypothyroidism. Am J Med **61**: 932-934, 1976
- 5) Dussault JH, Morissette J, Letarte J, et al: Modification of a Screening Program for Neonatal Hypothyroidism. J Pediatr **92**: 274-277, 1978
- 6) Fisher DA, Dussault JH, Foley TP, et al: Screening for Congenital Hypothyroidism. J Pediatr **94**: 700-705, 1979
- 7) Walfish PG: Screening for Neonatal Hypothyroidism Using a Dried Capillary Blood Method: Observations on Methodologic Factors, Selection Criteria and Preliminary Results: Perinatal Thyroid Physiology and Disease, Raven Press, New York, 1975, p. 239.
- 8) Sadler WA, Lynskey CP: Blood-Spot Thyrotropin Radioimmunoassay in a Screening Program for Congenital Hypothyroidism. Clin Chem **25**: 933-938, 1979
- 9) Dussault JH, Letarte J, Guyda H, et al: Serum Thyroid Hormone and TSH Concentrations in New Born Infants with Congenital Absence of Thyroxine-binding Globulin. J Pediatr **90**: 264-265, 1977
- 10) Cuestas RA, Engel RR, Thyroid: Function in Preterm with Infants with Respiratory Distress Syndrome. J Pediatr **94**: 643-646, 1979