乾燥汙紙血液を用いる血中甲状腺刺激ホルモン(TSH)の測定

—その先天性乃至若年性一次性甲状腺機能低下症
スクリーニング検査における応用

東邦大学医学部第一内科

入江 実, 榎本 和子, 榎本 仁志, 梅田みほ子

国立精神衛生研究所

成 瀬 浩

Microdetermination of TSH in Dried Blood Spot -its Use in the Mass-Screening for Congenital or Juvenile Primary Hypothyroidism

Minoru IRIE, Kazuko ENOMOTO, Hitoshi ENOMOTO and Mihoko UMEDA

The First Department of Medicine, Toho University, School of Medicine, Tokyo, Japan

Hiroshi NARUSE

Division of Biological Research on Mental Retardation, National Institute of Mental
Health, Ichikawa, Japan

Blood TSH (Thyroid Stimulating Hormone) was successfully measured by radioimmunoassay in a dried blood spot on filter paper which is obtained in newborn screening for metabolic disorders. By this method, the minimal detectable level of blood TSH was about 10 μ U/ml, which is the approximate upper limit of normal values of blood TSH. Good correlation was found between the TSH values obtained from this specimen and from liquid serum samples from the same subjects. The duplication of assay of a single sample was not necessary. A screening program using the method described here was initiated and a 4 year old infant was found to have primary hypothyroidism, later verified by other testing methods. Since the technique is simple and adequately sensitive for the detection of hypothyroidism, it could be a valuable method for use in mass-screening of newborns for congenital hypothyroidism.

緒 言

新生児期に於ける甲状腺機能低下症の診断は屢々困難であり、この時期、さらに小児期に於ても本症の存在が見逃されることがある。本症の早期診断が極めて必要であることは当然であり、なかでも本症のために惹起される発育障害、知能発達不全が重要であるが、とくに知能低下は通常不可逆性であり、放置又は加療がおくれることにより本症患者が精神薄弱児となることは社会的にも大きな問題である。

このような意味からスクリーニング法による本症の早期診断が考えられ、最近 Dussault ら¹⁾²⁾は乾燥汙紙血液を用いて血中サイロキシン (thyroxine, T₄) のラジオイムノアッセイ (radioimmunoassay, RIA)

による測定の有用性を示し, また Klein ら⁸⁾ は臍帯血中の甲状腺刺激ホルモン (Thyroid Stimulating Hormone, TSH) の測定を用い, 1 例の先天性甲状腺機能低下症を発見したと報告している。

我々は一次性甲状腺機能低下症に於てはフィードバック機構によって血中 TSH が著増する現象に着目し, 乾燥汚紙に含まれる微量の血液を用いてその TSH 測定が可能であることを見出し, さらにその応用過程に於て一例の先天性乃至若年性一次甲状腺機能低下症の確認を行ない得たのでここに報告する。

材料と方法

血液採取は Guthrie ら⁹⁾ が報告し, 我国でも現在フェニルケトン尿症 (Phenylketonuria, PKU) その他の先天代謝異常スクリーニング¹⁰⁾ に用いられている汚紙を用いて行なった。この汚紙には径 1 cm の円部が 3 つあり, 1 つの円部に血液を滲みこませることにより約 20 λ の血液が得られる。検査材料として用いた血液としては, 測定法の検討に用いるため成人甲状腺機能低下症患者, 正常人あるいは成人甲状腺機能低下症患者に於ける TRH (Thyrotropin Releasing Hormone) 500 μ g 一回静注法による TRH 試験に際しての血液を採取し, 一部は汚紙に採取, 一部は血清として保存し比較検討に用いた。スクリーニングに用いた血液は先天性代謝異常スクリーニングのために全国各地から送られてくるもの, 一部東京都内某保健センターより送られたもの, 一部臍帯血を用いた。これらの汚紙血液サンプルは到着後 -20°C に保存し測定に供した。

測定に際しては先ず前述の径 1 cm の円部をパンチャーを用いて切り抜き, 0.6 ml の pH 7.6 磷酸緩衝液で 0.05% に牛血清アルブミンを含む溶液に浸し, 4°C に放置した。一定時間後細いピンセットを用い汚紙をとり出し, 試験管上部にはりつけ数時間放置したのち取りのぞき, 残りの液を測定に供した。測定は RIA により ^{125}I -TSH と抗人 TSH 抗体を用うる Odell ら⁶⁾ の方法に準じて¹¹⁾ 行なった。即ち, 0.1 ml の希釈 ^{125}I -TSH 溶液並びに 0.1 ml の希釈抗人 TSH 抗体を加え, 3 日間 4°C にインキュベートした後に, 0.1 ml の希釈第 2 抗体 (抗家兎 γ -グロブリン山羊血清) を加え, さらに 24 時間 4°C にてインキュベーションを行なった。ついで遠沈後上清を捨て, 沈査を自動 γ -カウンターにより計測, 標準曲線を用いることにより各サンプル中の TSH 濃度を測定, 計算により $\mu\text{U/ml}$ として表わした。

成 績

乾燥汚紙血液よりの TSH 抽出時間について検討を行なったが, 汚紙円部を前述の希釈液に浸したのち, 室内温度で 2 時間以上, 48 時間までの抽出時間に於てその抽出率に差をみとめず, 抽出はこの間の任意の時間に於て行ないうると考えられた。汚紙中の TSH の安定性に関しては, 血液採取後 2 日目より 55 日目までの 7 点に於て測定を行ない検討したが, 有意の差をみとめず保存性は良好であると認められた。

Fig. 1 は乾燥汚紙血液を用いた場合の血中 TSH 値と, 同一検体の血清 TSH 値とをプロットしてその相関関係をみたものであり, $r=0.841$ とよい相関がみられた。また本法による血中 TSH 最小検出量はほぼ $10 \mu\text{U/ml}$ であることが認められた。Fig. 2 は, 同一対象者の汚紙上の 2 つの円部につき, 別々に測定しその相関関係をみたものであるが, $r=0.978$ という極めてよい相関がえられた。

現在までに先天代謝異常スクリーニングのための新生児血液では TSH の異常高値を示すものではなく, 5 例の臍帯血サンプルに於ても正常値をみとめた。しかし乍ら某保健センター患者の乾燥汚紙血液に於て, 血中 TSH 値が $245 \mu\text{U/ml}$ という異常高値を認めた。この患者について既往歴を詳しく調べてみると分娩は正常, 分娩時体重 2050 g であったが, その後の発育が遅く両親によって生後一年目には他の同年の子にくらべて発達が遅延していることが認められている。その頃から行動, 言語の緩徐, 毛髪の脱落, 寒がりなどが認められたので, 血中 TSH の異常高値とあわせて甲状腺機能低下症が疑われ, 東邦大学医学部小児科に入院した。入院時年令 4 才 1 カ月, 身長 82.2 cm, 体重 11.0 kg で, 嗄声, 舌の肥大, 非圧痕性浮腫が認められた。甲状腺は触知されなかった。手根骨の骨年令は 1 才 3 カ月, DQ は 2 才 3 カ月であった。RIA による血清 T_4 は $2.0 \mu\text{g}/100\text{ml}$, T_3 (triiodothyronine) は $0.75 \text{ ng}/100\text{ml}$ で, ^{131}I 甲状腺摂取率は 4 時間値 5.5%,

Fig. 1. Correlation between the TSH values obtained by the dried blood spot method and those obtained by the measurement of serum samples from the same subjects.

24時間値4.0%と低値が認められた。500 μg TRH一回静注法によるTRH試験では血清TSH値の著明な増加、遷延が認められた。二次性の因子を否定する目的でl-arginine 0.5g/kg投与によるアルギニン負荷試験を行なったが、90分後10.2ng/mlの血清成長ホルモンの頂値を示した。血漿11-OHCSは8.36 $\mu\text{g}/100\text{ml}$ であった。これらの所見から先天性乃至若年性の一次性甲状腺機能低下症の診断の下に、甲状腺剤による治療が開始された。

考 察 と 結 語

以上の我々の成績から、約20 λ の血液を含む乾燥濾紙血液を用いて、血中TSHの測定が可能であるということが出来る。濾紙上のTSHは長期間安定であり、抽出操作も容易でスクリーニング法に適しているといえる。Fig. 1に示すように本法による測定値と血清TSH値とはよい相関を示した。傾向としては本法による測定値は、血清を用いた測定値よりやや低値を示すが、本法の最小検出量がほぼ10 $\mu\text{U}/\text{ml}$ ではほぼ正常者の上限値であること、また一次性甲状腺機能低下症患者では血清TSH値が著増を示すこと⁶⁻⁸⁾、などの点から一次性甲状腺機能低下症のスクリーニング法として適当なものと考えられる。さらにFig. 2に示したように、濾紙のただ一つの円部を用いて測定を行える点も本法がスクリーニング法として適していることを示すものである。

血液採取の時期に関しては、Hershmanら⁸⁾、Fisherら⁹⁾の成績によると生後間もなく血中TSH上昇がみられている点から、一次性甲状腺機能低下症患者のスクリーニングとしては生後少なくとも3日以後の採

Fig. 2. Correlation between two values of TSH in two blood discs obtained from the same individuals.

取が適当であると思われる。生後の上昇とともに臍帯血中の血中 TSH の増加⁹⁾ が報告されているが、我々の限られた例数での成績では生後 1 日目 1 例、2 日目 2 例、臍帯血 5 例の血中 TSH 値は正常範囲であった。この点に関しては今後更に例数を増して検討する必要があると考えられる。

二次性乃至三次性甲状腺機能低下症では血中 TSH は低値を示すが、正常値はほぼ $0 \sim 8 \mu\text{U/ml}$ とされており、普通の血清を用いる TSH 測定法或いは他のどのような方法を用いても正常値以下の TSH 値を測定することは現時点では困難である。全ての型の甲状腺機能低下症を診断するためには血中 T_4 、 T_3 などの測定が有用であろうと考えられるが、この場合には正常よりも低値であることを証明しなければならない。そのために測定の感度がかかなり高いことが必要で、また境界値の取り扱いが煩雑で多数の再検査を要する²⁾。この点一次性甲状腺機能低下症では正常値よりはるかに高い血中 TSH 値を示し、また先天性甲状腺機能低下症のうちでは一次性のものが多く、かつ重症である点などから血中 TSH 値測定の意義は極めて大きいと考えられる。Klein ら¹⁰⁾ は先天性一次性甲状腺機能低下症の患者で、生後 3 カ月以内に発見、治療を開始した患者ではその後に治療を始めた群に比較して知能指数が高いことを報告している。先天性乃至若年性一次性甲状腺機能低下症患者をスクリーニング法により一日も早く発見し、治療を開始することはとくにその知能低下の防止という点で重要であり、我々もここに述べた方法により一例を確認したが、今後はさらに新生児を中心としてスクリーニングの努力を続ける予定である。

以上我々は乾燥汚紙血液を用いる血中甲状腺刺激ホルモン (TSH) の測定並びにその先天性乃至若年性一次性甲状腺機能低下症スクリーニング検査における応用について述べた。

尚この研究内容の概要は昭和50年9月20日第3回代謝異常スクリーニング研究会並びに昭和50年11月11日第2回アジア精神薄弱会議に於て発表した。またその大略を Lancet ii : 1233~1234, 1975 に発表した。

研究費補助に対する謝辞：本研究の遂行にあたっては一部厚生省医療助成金，東邦大学医学部プロジェクト研究費によったことを感謝する。

謝 辞

TSH 測定に用いた材料は一部米国 NIH，一部第一ラジオアイソトープ研究所提供によるもので感謝する。また協同研究者として井上和子，貫井留次郎，黒田光保，武田成正，伊東裕美子，大島鈴子，丸山雄三の諸氏に感謝し，東邦大学医学部小児科学教室中山健太郎教授，青木継稔，熊谷健伸の諸先生の御協力に深謝する。

文 献

- 1) Dussault, J.H. and Laberge, L. : Dosage de la thyroxine (T₄) par méthode radio-immunologique dans l'éluat de sang séché : nouvelle méthode de dépistage de l'hypothyroïdie neonatale?, Union Med, Canada, 102 : 2062~2064, 1973.
- 2) Dussault, J.H., Coulombe, P., Laberge, L., Guyda, H., and Khoury, K. : Preliminary report on a mass screening program for neonatal hypothyroidism, J. Pediat. 86 : 670~674, 1975.
- 3) Klein, A.H., Augustin A.V. and Foley, Jr. T. P. : Successful laboratory screening for congenital hypothyroidism, Lancet, 2 : 77~79, 1974.
- 4) Guthrie, R. and Susi, A. : A simple phenylketonuria screenig method for newborn infants, Pediat., 32 : 338~343, 1963.
- 5) 成瀬浩：先天代謝異常の早期発見と精神薄弱の予防，周産期医学，4 : 961~971, 1974.
- 6) Odell, W.D., Wilber, J.F. and Utiger, R.D. : Studies of Thyrotropin Physiology by Means of Radioimmunoassay, Rec. Prog. Hormone Res, 23 : 47~85, 1967.
- 7) 榎本和子，井上和子，榎本仁志，貫井留次郎，黒田光保，入江実：ヒト TSH の Radioimmunoassay およびその臨床応用，Radioisotopes, 23 : 101~105, 1974.
- 8) Hershman, J.M. and Pittman, J.A. Jr., : Utility of Radioimmunoassay of Serum Thyrotropin in Man, Ann. Int. Med., 74 : 481~490, 1971.
- 9) Fisher, D.A., and Odell, W.D. : Acute Release of Thyrotropin in the Newborn, J. Clin. Invest, 48 : 1670~1677, 1969.
- 10) Klein, A.H., Meltzer, M., and Kenny, F.M. : Improved prognosis in congenital hypothyroidism treated before age three months, J. Pediat., 81 : 912~915, 1972.

日本内分泌学会雑誌 第52巻 第3号

昭和51年3月15日印刷 昭和51年3月20日発行
(毎月1回発行) 1年金 6000円

発行所 日本内分泌学会 (振替京都12902番)

〒602 京都市上京区河原町通荒神橋西詰下ル
京都府立医科大学 青蓮会館内

編集兼 佐 野 豊
発行人

印刷人 田 中 弘 次

印刷所 田 中 文 進 堂 印刷 所

大津市中央三丁目2の11