

《ノート》

TSH Radioreceptor Assay キット (Smith) による TSH
binding inhibitor immunoglobulin (TBII) の測定Studies on TSH binding inhibitor immunoglobulin (TBII)
with radioreceptor assay kit (Smith)

海瀬 和郎*	桜田 俊郎*	海瀬 信子*	吉田 克己*
貴田岡博史*	深沢 洋*	鈴木 道子*	野村 隆*
ヤコブ・ヤウキ*	山本 蒔子*	斉藤慎太郎*	吉永 馨*

Kazuro KAISE*, Toshiro SAKURADA*, Nobuko KAISE*, Katsumi YOSHIDA*,
Hiroshi KITAOKA*, Hiroshi FUKASAWA*, Michiko SUZUKI*, Takashi NOMURA
Jacob JAUWHIE*, Makiko YAMAMOTO*, Shintaro SAITO* and Kaoru YOSHINAGA*

* Second Department of Internal Medicine, Tohoku University, School of Medicine

I. 緒 言

バセドウ病は、甲状腺細胞膜 Thyrotropin (TSH) レセプターに対する抗体であるところの甲状腺刺激免疫グロブリンに因る自己免疫疾患として理解されている。このレセプター抗体は、現在まで種々の方法で測定され、その測定方法に基づきさまざまな名称で呼ばれているが、この中で TSH の Radioreceptor assay (RRA) により測定する Thyrotropin Binding Inhibitor Immunoglobulin (TBII) は、測定感度が良好で、未治療バセドウ病患者における陽性率も高く^{1,2)}、このためバセドウ病の病因解明の手段として用いられるとともに、治療効果の判定にも有効であるという^{3,4)}。しかしながら従来の TBII の測定には、生物活性を有する高純度 TSH の標識や、甲状腺細胞膜分画を用いる必要があるなどの点から、日常的な臨床検

査法として TBII を測定することは困難であった。しかし最近 Smith らにより可溶性 TSH レセプターを用いた TBII 測定用の RRA キットが開発され、われわれも使用する機会があり、基礎的臨床的検討を行った。なお TSH RRA により測定する抗体の名称として本キットでは Thyrotropin Receptor Antibody (TRAb) の名称が用いられているが、現在 TBII の方が一般的であるため、今回の検討では TBII を用いることとした。

II. 方 法

1. キットの内容

- 1) ルブロール可溶性ブタ TSH レセプター：凍結乾燥品 3 バイアル。
- 2) ¹²⁵I 標識 ウシ TSH：凍結乾燥品 3 バイアル。
- 3) 緩衝液 (10 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 0.1% BSA, pH 7.5)：1 本
- 4) 30% ポリエチレングリコール (PEG), 1 M NaCl 溶液：1 本。

Key words: TBII, radioreceptor assay, Graves' disease, chronic thyroiditis, HTACS.

* 東北大学医学部第二内科
 受付：58年 4 月 4 日
 最終稿受付：58年 6 月 8 日
 別刷請求先：仙台市星陵町 1-1 (☎ 980)
 東北大学第二内科
 海瀬 和 郎

5) TBII 陽性および陰性血清：各 0.7 ml.

6) 1% ルブロール液：1 バイアル.

2. 試薬の調製

1) TSH レセプターは、緩衝液 3 ml を各バイアルに加え、室温にて溶解する.

2) ^{125}I -TSH は、緩衝液 3 ml を各バイアルに加え、溶解する.

3. キットの測定手技

1) 患者血清 50 μl または患者血清より 30% PEG を用いて作成した IgG 100 μl (約 10 mg/ml) を各試験管に分注する. 血清を用いた場合には、緩衝液 50 μl を加える. プール血清, TBII 陽性および陰性血清を同様にそれぞれ分注する.

2) 可溶性 TSH レセプター 100 μl を各試験管に分注する. この時ブランクとして、TSH レセプターの代りに 1% ルブロール液をブランク用試験管に分注する.

3) 室温にて 15 分間インキュベーションした後、各試験管に ^{125}I -TSH 溶液を 100 μl 分注する.

4) 37°C にて 60 分間インキュベーションした後、各試験管に氷冷した緩衝液 700 μl を加え、さらに 1 ml の 30% PEG, 1 M NaCl 溶液を加えた後混和し、1,500 \times G, 45 分間 4°C にて遠心し、上清を吸引除去した後、沈渣の放射能を γ カウンターにて測定する. この値から下記の式を用いて TBII Index を算出して正常対照と比較する.

TBII Index =

$$\frac{\text{各検体の cpm} - \text{ブランクの cpm}}{\text{プール血清の cpm} - \text{ブランクの cpm}} \times 100 (\%)$$

4. 従来の方法による TBII の測定

従来の方法による TBII の測定は Smith¹⁾ の方法によって行った. 用いた ^{125}I -TSH は、高純度ウシ TSH (Dr Pierce) をラクトペルオキシダーゼ法により標識し、ヒト甲状腺 10,000 \times G 分画を用いて精製した後使用した.

5. Human Thyroid Adenylate Cyclase Stimulator (HTACS) 活性の測定

バセドウ病甲状腺 10,000 \times G 分画を用いて、Orgiazzi ら⁵⁾ の方法にて測定した. 産生された cAMP は Radioimmunoassay キット (ヤマサ)

を用いて測定した.

III. 対 象

正常人 20 例, 未治療バセドウ病 33 例, 慢性甲状腺炎 17 例および抗甲状腺剤にて治療したバセドウ病 10 例を対象とした.

IV. 結 果

1. 標準曲線の検討

ウシ TSH (チトロパール®, Armar) を用いた時の標準曲線を Fig. 1 に示す. キットによる結果と従来の方法での結果を比較すると、キットを用いた場合の total binding は 35% と、従来の方法での 25% と比較して良好であった. また B/B₀ 値が 50% となる TSH 濃度で比較した測定感度もキットの値の方が良好であった.

2. インキュベーション時間および温度の検討

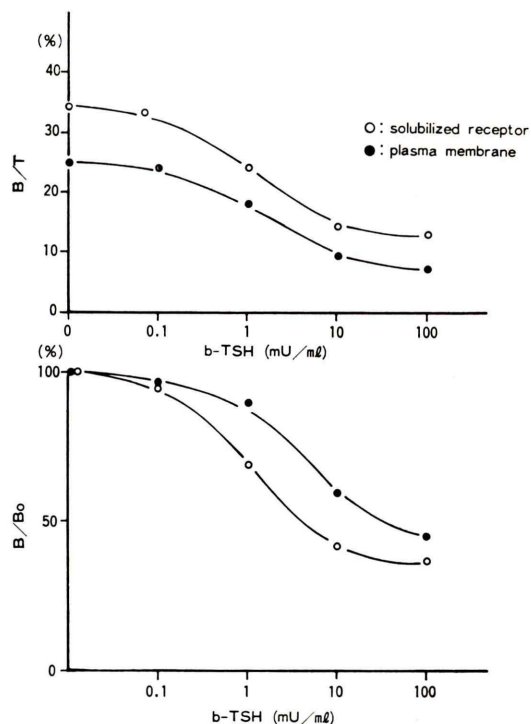


Fig. 1 Comparison of TBII kit (Smith) and radioreceptor assay using thyroid plasma membrane.

Figure 2 に示すように、 ^{125}I -TSH を加えた後の条件を 37°C あるいは 4°C で検討したところ、 37°C では60分でレセプターと ^{125}I -TSH の結合はプラトーに達したが、 4°C では24時間後の値が最も良好であった。 37°C 60分と 4°C 24時間の値ではほとんど差を認めなかった。この結果から以下の検討では、 37°C 、60分の条件で行った。

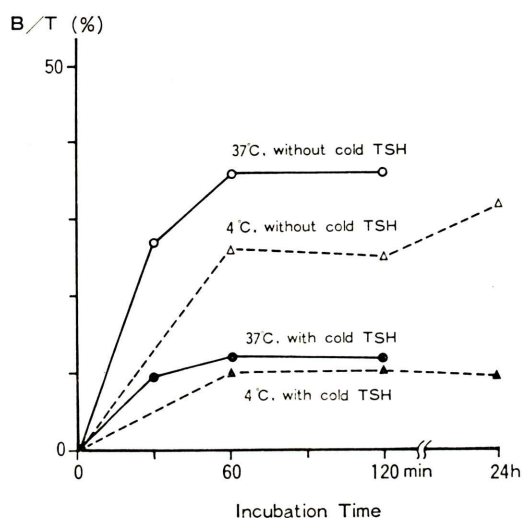


Fig. 2 The effects of incubation time and temperature on the binding of labelled TSH to TSH receptors.

3. 血清および IgG を用いた場合の TBII Index の比較

検体として患者血清および 30% PEG を用いて作成した IgG を用いて TBII Index を測定し、両者で得られた値を比較した (Fig. 3). [両者の間には $r=0.94$ ($p<0.001$) の良好な相関が得られた。したがって血清 TSH が正常な例では血清を用いて測定しても良好な結果が得られることが期待された。

4. 希釈による検討

ウシ TSH, 正常人血清および TBII 陽性患者血清を緩衝液または正常人プール血清を用いて希釈した場合の値を Fig. 4 に示す。いずれを用いて希釈して測定した場合でも良好な結果が得られ、ウシ TSH の希釈曲線とよく平行した。

5. 再現性の検討

正常者および TBII Index が, 85.3, 32.0, および 12.0% の値を有するバセドウ病患者血清を同一測定内で 10 回測定した場合の C.V. は, それぞれ 3.7, 7.5, 15.6, および 40.8% であった (Table 1). また正常者および TBII Index が, 78.6, 33.2, および 26.9% の値を有するバセドウ病患者血清を用いて, 異なる 4 回の測定で測定した場合の C.V. は, それぞれ 2.3, 12.1, 21.1 および 48.7% であ

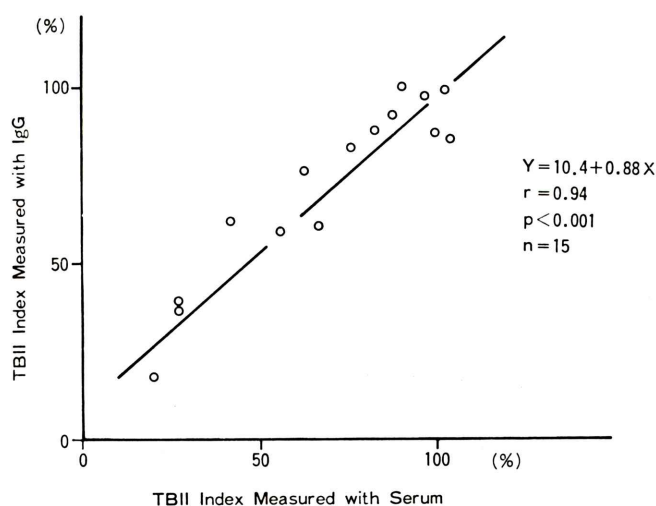


Fig. 3 Correlation of TBII Index measure with serum and IgG.

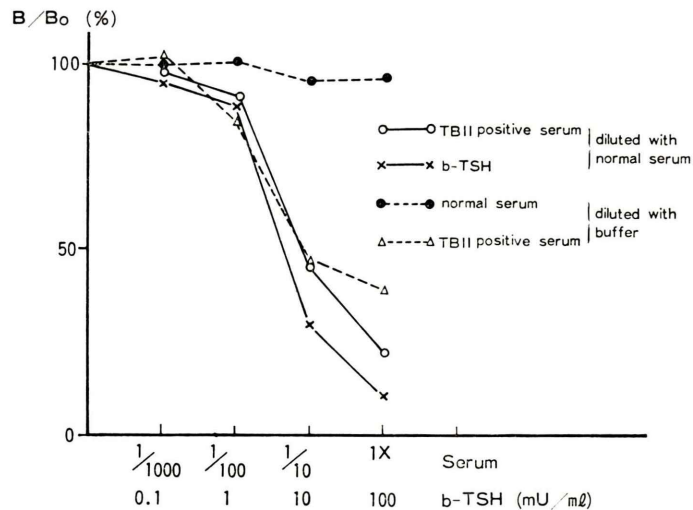


Fig. 4 The effects of unlabelled TSH, normal serum and TBII positive serum on the binding of labelled TSH to TSH receptors.

Table 1 Reproducibility of TBII kit (Smith)
Intraassay Variation (n=10)

Sample No.	Mean (%)	S.D.	C.V. (%)
1	100.0	3.7	3.7
2	85.3	6.4	7.5
3	32.0	5.0	15.6
4	12.0	4.9	40.8

Interassay Variation (n=4)

Sample No.	Mean (%)	S.D.	C.V. (%)
1	103.6	2.4	2.3
2	78.6	9.5	12.1
3	33.2	7.0	21.1
4	26.9	13.1	48.7

た (Table 1).

6. 従来の方法で測定した場合と、キットで測定した場合の TBII Index の比較

バセドウ病患者15例の血清より硫酸沈澱法にて作成した IgG (20 mg/ml) を用いて、従来の甲状腺 10,000×G 分画を用いた場合と、キットによる TBII Index について比較した (Fig. 5). 両者の間には $r=0.70$ ($p<0.01$) の良好な相関が認められた。

7. 臨床的検討

正常人20例, 未治療バセドウ病33例および慢性

甲状腺炎17例について TBII を測定した (Fig. 6). 正常人での TBII Index は 91.4 から 108.5% に分布し, 平均値±SD は $100\pm6.2\%$ であった. 正常範囲を, 平均値±2SD とし, 87.6% 未満の TBII Index を示す検体を, TBII 陽性とした. 未治療バセドウ病の29例で TBII は陽性で, 陽性率は 88% であった. また慢性甲状腺炎では2例で TBII Index が陽性であった. 未治療バセドウ病では, TBII Index と24時間 ^{131}I 摂取率との間には相関は認められなかった。

抗甲状腺剤で治療したバセドウ病10例で TBII Index と T_3 抑制試験の結果を比較したところ (Table 2), T_3 抑制試験で抑制が認められた6例中5例で TBII が陰性であったのに対して, 抑制が認められなかった4例中3例で TBII が陽性であった。

8. HTACS 活性と TBII Index との比較

正常人4例および未治療バセドウ病15例について TBII Index と HTACS 活性について比較した (Fig. 7). 両者の間には $r=-0.73$ ($p<0.001$) の有意の負の相関を認めた. しかし TBII 強陽性の例でも HTACS が陰性の場合があり, 必ずしも両活性が一致しない例も認められた。

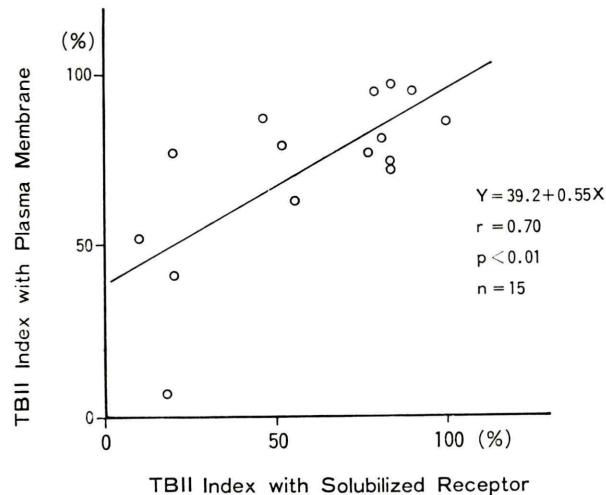


Fig. 5 Correlation of TBII Index with TBII kit (Smith) and radioreceptor assay with thyroid plasma membrane.

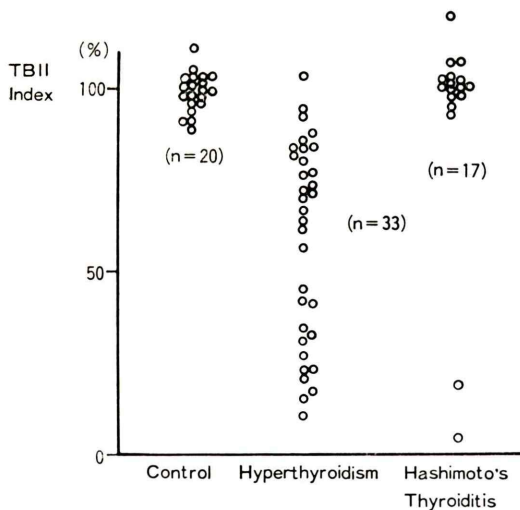


Fig. 6 TBII Index in thyroid diseases.

9. 慢性甲状腺炎患者の TBII の性質

TBII が陽性であった慢性甲状腺炎の2例について IgG を用いて Adenylate Cyclase (AC) 刺激活性を測定した (Table 3). TBII 陽性のバセドウ病では、正常対照の200%の活性を示したが、慢性甲状腺炎の1例では、正常対照の38%の値であった。さらにウシ TSH 5 mU を添加して cAMP 産生増加を比較すると、バセドウ病 IgG では正

Table 2 TBII activity and T₃ suppressibility in hyperthyroid patients treated with antithyroid drug

No.	T ₃ -Suppressibility	TBII
1	Supp.	Negative
2	Supp.	Negative
3	Supp.	Negative
4	Supp.	Negative
5	Supp.	Negative
6	Supp.	Positive
7	Non-supp.	Negative
8	Non-supp.	Positive
9	Non-supp.	Positive
10	Non-supp.	Positive

Table 3 Effect of IgG on the human thyroid adenylate cyclase activity

	pmol cAMP generated/30 min.	
	b-TSH (—)	+5mU b-TSH
Normal IgG	112 ± 8	598 ± 30
Graves' IgGx	210 ± 21†	525 ± 79
Case 1§	117 ± 38	210 ± 67†
Case 2§	42 ± 13†	227 ± 17†

(mean ± S.D. in quadruplicate)

x: TBII positive IgG

§: IgG from serum of patients with chronic thyroiditis and positive TBII.

†: p < 0.01

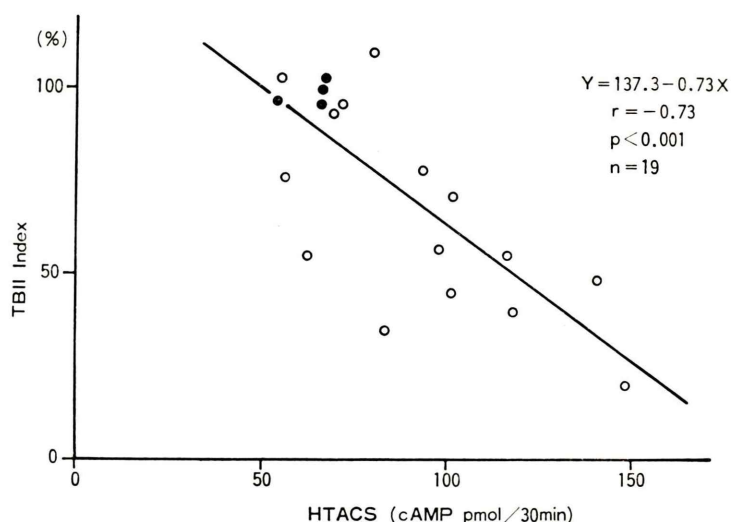


Fig. 7 Correlation between TBII Index and HTACS activity

常対照と差を認めなかったが、慢性甲状腺炎 IgG では、2 例とも明らかに TSH の作用を抑制した。

V. 考 案

バセドウ病患者の TBII 測定には、従来ヒト甲状腺細胞膜分画¹⁻³⁾または可溶性 TSH レセプター⁶⁾を用いた RRA が用いられ、未治療バセドウ病患者の 50% から 88% に TBII が検出されるという。しかし 100% には検出できず、この理由の 1 つに測定感度の問題が取り上げられている。本キットの測定感度は、b-TSH を用いた標準曲線の検討からおよそ 10 μ U であり良好であった。TBII 陽性患者血清をプール血清または緩衝液を用いて希釈しても良好な希釈が可能であり、また正常者血清を緩衝液を用いて 1,000 倍に希釈しても B/Bo 値はほとんど変化しなかった。このことは、従来の甲状腺細胞膜分画を用いた方法で認められた血清蛋白による ¹²⁵I-TSH の非特異的結合抑制の影響⁷⁾がほとんど無いために考えられた。このために血清を用いて TBII Index を測定しても、IgG を用いて測定した TBII Index とよく関連したものと考えられた。再現性の検討では、同一キットでの測定内および異なるキットを用いて

の測定間の C. V. は比較的良好であったが、TBII Index 低値を示す例の場合には C.V. が大きくなり、測定値の比較に際しては注意が必要と考えられた。また TBII が弱陽性の例では、場合によっては陰性の値を示すことがあり、結果の判定には注意を要するものと思われた。

TSH レセプターの種特異性が報告されている⁸⁾。本キットはブタ甲状腺可溶性 TSH レセプターを用いているが、従来のヒト甲状腺細胞膜分画を用いた場合の TBII Index と本キットで測定した TBII Index との間には良好な相関を認めた。

正常人 20 例について測定した TBII Index は、91.4% から 108.5%，平均値 \pm SD は $100 \pm 6.2\%$ であった。正常者の平均値 ± 2 SD を正常範囲とすれば、正常範囲は 87.6% から 112.4% となった。したがって 87.6% 未満の TBII Index の例では TBII 陽性と判定した。未治療バセドウ病患者 33 例では 29 例、88% に TBII が陽性であった。この値は従来の報告における陽性率と一致していた。

T₃ 抑制試験は、抗甲状腺剤で治療中のバセドウ病患者の予後の判定に有用だとされている。T₃ 抑制試験と TBII 検出の比較では、T₃ 非抑制例では TBII が陽性であることが多く⁹⁾、また抗甲

甲状腺剤中止後の予後で検討すると、再発例に TBII の検出率が高かった³⁾ という。われわれの検討では、少数例ではあるが、T₃ 非抑制例で TBII が陽性である例が多く、これらの結果から、バセドウ病の活動性と TBII が平行するものと考えられ、臨床的に抗甲状腺剤中止後の予後の判定に TBII の測定が用いられ得ることを示唆する。

バセドウ病 IgG の甲状腺刺激活性の指標として、Long Acting Thyroid Stimulator Protector (LATS-P)、Thyroid Stimulating Antibody (TSAb) および HTACS が検討されている。LATS-P と TBII の間の相関には意見の一致をみず^{10,11)}、また TSAb の結果とも平行しなかったという⁹⁾。われわれは甲状腺刺激活性の指標として HTACS を測定し、TBII と比較したところ、両者の間に良好な負の相関が得られた。このことより TBII の存在が、甲状腺刺激 IgG の存在とよく平行することを示すものと思われる。しかし強い TBII 活性を示す例で HTACS 活性が陰性の例もあり、この点については今後の検討が必要と考えられた。

慢性甲状腺炎患者では17例中2例で TBII が検出された。この TBII が Endo ら²⁾ の言う blocking antibody であるかどうかを AC 刺激活性を指標として検討したところ、刺激作用を有さず、TSH の作用を阻害する blocking antibody であることが判明した。しかしこのうち1例では甲状腺腫を有する慢性甲状腺炎であるところが Endo らの報告と異なるところであった。この blocking antibody が甲状腺機能の低下をひき起し、さらに甲状腺の萎縮をもたらすか、あるいは Drexhage ら¹²⁾ のいう growth blocking antibody の存在により甲状腺の萎縮がもたらされるのか、今後検討すべき問題と考えられた。またバセドウ病にも TSH の作用を阻害する IgG が検出されるといわれ¹³⁾、TBII の多様性が示唆されている。

TSH の RRA キットが開発されたことによりバセドウ病の TBII の測定が容易に可能となり、臨床的にも広く TBII の測定が行なわれ一層の知見が得られることが期待されることである。

VI. 結 論

可溶性ブタ TSH レセプターを用いた TBII 測定用の RRA キットについて検討し、以下の成績を得た。

1) ウシ TSH を用いて作成した標準曲線より求めた測定感度は、B50/Bo で比較した場合、従来の甲状腺 10,000×G 分画を用いた方法に比べ良好であった。

2) 血清および IgG のいずれを用いても測定が可能であり、その測定値は従来の方法で測定した場合の値とよく相関した。

3) キットを用いて測定した未治療バセドウ病患者における TBII の陽性率は、33 例中 29 例、88% であった。T₃ 抑制試験を行った治療後のバセドウ病10例のうちでは、T₃ 抑制例では5例中1例が、T₃ 非抑制例では5例中4例で TBII が陽性であった。

4) 未治療バセドウ病患者の TBII Index と HTACS 活性は良く相関した。

5) 以上より本キットによる TBII の測定は、バセドウ病の診断および治療効果の判定に有用であることが示唆された。

6) 慢性甲状腺炎では17例中2例で TBII が陽性であり、この2例の IgG はウシ TSH の甲状腺刺激作用を抑制した。

最後にキットを提供して頂いた日本トラベノール社に感謝致します。

文 献

- 1) Smith BR, Hall R: Thyroid-stimulating immunoglobulin in Graves' disease. *Lancet* 2: 427, 1974
- 2) Endo K, Kasagi K, Konishi J, et al: Detection and properties of TSH-binding inhibitor immunoglobulins in patients with Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis. *J clin Endocrinol Metab* 46: 734, 1978
- 3) O'Donnell J, Trokoudes K, Silverberg J, et al: Thyrotropin displacement activity of serum immunoglobulins from patients with Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab* 46: 770, 1978

- 4) Teng CS, Yeung RTT, Khoo RKK, et al: A prospective study of the changes in Thyrotropin binding inhibitory Immunoglobulins in Graves' disease treated by subtotal thyroidectomy or radioactive Iodine. *J Clin Endocrinol Metab* **50**: 1005, 1980
- 5) Orgiazzi J, Williams DE, Chopra IJ, et al: Human thyroid adenyl cyclase-stimulating activity in immunoglobulin G of Patients with Graves' Disease. *J Clin Endocrinol Metab* **42**: 341, 1976
- 6) Shewring G, Smith BR: An improved radioreceptor assay for TSH receptor antibodies. *Clin Endocrinol* **17**: 409, 1982
- 7) Beall GN, Chopra IJ, Solomon DH, et al: Serum Protein Inhibition of thyrotropin binding to human thyroid tissue. *J Clin Endocrinol Metab* **47**: 967, 1978
- 8) McKenzie JM, Zakarija: A reconsideration of a thyroid-stimulating immunoglobulin as the cause of hyperthyroidism in Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab* **42**: 778, 1976
- 9) Kuzuya N, Chiu SC, Ikeda H, et al: Correlation between thyroid stimulators and 3,5,3'-triiodo-L-thyronine suppressibility in patients during treatment for hyperthyroidism with Thionamide drugs: comparison of assays by thyroid-stimulating and thyrotropin-displacing activities. *J Clin Endocrinol Metab* **48**: 706, 1979
- 10) Ozawa Y, Maciel RHB, Chopra IJ, et al: Relationships among immunoglobulin markers in Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab* **48**: 381, 1979
- 11) 遠藤啓吾: TSH の radioreceptor assay に関する研究. *日内分泌誌* **55**: 1261, 1979
- 12) Drexhage HA, Bottazzo GF, Bitensky L. et al: Thyroid growth-blocking antibodies in primary myxoedema. *Nature* **289**: 594, 1981
- 13) Biró J: Thyroid-stimulating antibodies in Graves' disease and the effect of thyrotropin-binding globulins on their determination. *J Endocrinol* **92**: 175, 1982