

《ノート》

サイログロブリンの radioimmunoassay kit (栄研) に
関する基礎的検討

Fundamental Evaluation of "Eiken" Thyroglobulin Radioimmunoassay Kit

小西 淳二* 御前 隆* 高坂 唯子* 中島 鉄夫*
飯田 泰啓* 遠藤 啓吾* 池窪 勝治** 鳥塚 莞爾*

Junji KONISHI*, Takashi MISAKI*, Tadako KOUSAKA*, Tetsuo NAKAJIMA*,
Yasuhiro IIDA*, Keigo ENDO*, Katsuji IKEKUBO** and Kanji TORIZUKA*

*Department of Nuclear Medicine and Radiology Kyoto University School of Medicine, Kyoto

**Department of Nuclear Medicine, Kobe Central Municipal Hospital, Kobe

I. はじめに

サイログロブリン (Tg) は甲状腺細胞により合成される分子量約67万の糖蛋白であり, 甲状腺ホルモンの合成, 貯蔵および分布に重要な役割を担っている¹⁾. 1967年 Roitt および Torrigiani²⁾ は Tg が甲状腺内のみならず, 流血中にも存在することを radioimmunoassay (RIA) を用いて明らかにした. その後 RIA の改良, 普及により, 種々の甲状腺疾患で血中 Tg 濃度の上昇がみられることが相次いで報告された^{3,4)}. 近年血中 Tg の測定が, 特に甲状腺腫瘍およびその転移の診断に有用であることが認められ, tumor marker としての役割が注目されるに至っている^{4,5)}.

われわれは従来より自家アッセイにより血中 Tg の測定を行ってきたが⁶⁾, 今回, 栄研 RIA kit (栄研イムノケミカル研究所製) を試用する機会を得たので, その基礎的検討の結果を報告する.

II. 材料および方法

栄研 Tg-RIA kit の測定原理は通常の2抗体法 RIA に基づくものであるが, 患者血中に抗 Tg-自己抗体が存在すると正しい測定値が得られないため, まず Table 1 上に示す方法により抗 Tg 抗体の有無を検討する. すなわち 1 μ l 相当の血清を含む希釈検体に ¹²⁵I-Tg を加えて反応させ, 抗ヒト免疫グロブリンで沈澱させ, この沈澱カウント (B) が総カウント (T) の 10% 以上を抗体陽性としている. ついで B/T が 10% 以下の検体について, Table 1 下に示すような方法で Tg の測定を行う. 試料血清は 100 μ l で, あらかじめ抗 Tg 家兔血清と室温で24時間反応させた後, ¹²⁵I-Tg を加え, さらに24時間反応させる. 第2抗体による B・F 分離は沈澱促進剤の存在により, 30分間の反応で遠心分離に移ることができるよう短縮されているが, 全体として測定に要する日数は3日間である.

検討方法: インキュベーションの温度, ¹²⁵I-Tg 添加の時間などアッセイの基礎的条件, ならびに ¹²⁵I-Tg の安定性に関する検討をまず行い, 至適な条件でアッセイの再現性, 回収試験, 希釈試験

* 京都大学医学部放射線核医学科

** 神戸中央市民病院核医学科

受付: 58年3月17日

最終稿受付: 58年6月15日

別刷請求先: 京都市左京区聖護院川原町 54 (☎ 606)

京都大学医学部核医学科

小西 淳二

Key words: Thyroglobulin, Radioimmunoassay, Anti-thyroglobulin antibody.

を行った。臨床測定は健常者31名と各種甲状腺疾患患者181名を対象とした。全対象者について ^{125}I -Tg結合率を測定し、TRC法(サイロイドテスト;富士臓器製薬)による抗体価と比較検討し、 ^{125}I -Tg結合率10%以下のものについてTg濃度を測定した。抗Tg抗体のTg測定値におよぼす影響について、高抗体価を示す橋本病患者よりDEAE-Sephadexクロマトグラフィ⁷⁾にて精製したIgGを添加して検討した。

III. 結 果

1. インキュベーション温度

インキュベーションを 4°C および 25°C で行ったときの標準曲線をFig. 1に示したが、明らかに 25°C で結合率が高く、急峻な勾配の標準曲線が得られた。点線は ^{125}I -Tgを最初から加えて48時間、 25°C でインキュベーションしたもので、原法のごとく ^{125}I -Tgをdelayed additionにする方式が優れていることが認められた。したがって以下の検討にはTable 1の方法を用いた。

2. ^{125}I -Tgの安定性

標識Tgの安定性を検討するため、キットの検

定日より、1週間ごとに同一ロットを用いて標準曲線を描き比較した。Figure 2に示すように、1週間後わずかにbound %の低下がみられたが、以後4週間まで著明な変化は認められなかった。

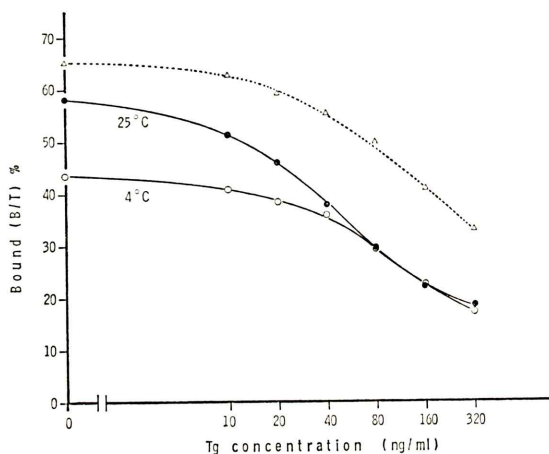


Fig. 1 Effect of incubation temperature on standard curve. A dotted line represents the standard curve obtained by the simultaneous addition of serum sample and ^{125}I -Tg.

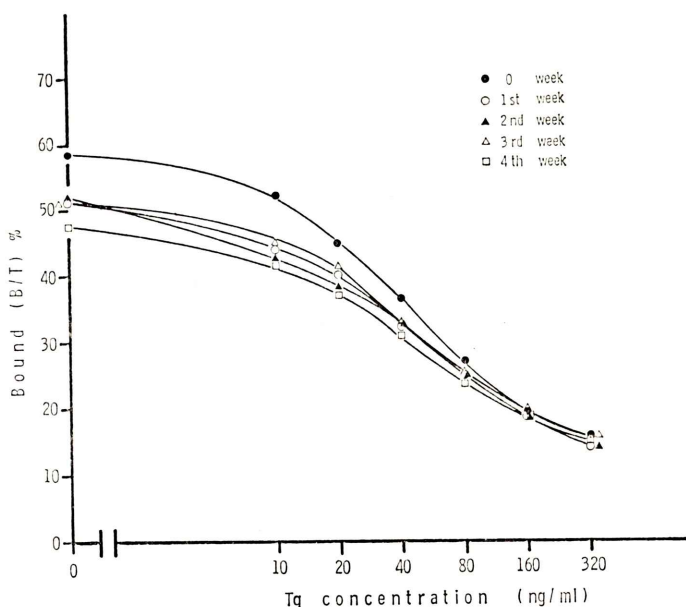


Fig. 2 Alteration of standard curves according to the time after the arrival of the kit.

Table 1 Assay procedure

Detection of autoantibody	
Sample ($\times 51$)	50 μ l
(Diluted by distilled water)	200 μ l
125 I-Tg	200 μ l
↓ incubate for 24 hrs. at room temp.	
Precipitating antiserum	100 μ l
↓ incubate for 30 min. at room temp.	
Centrifuge	
↓	
Aspiration	
↓	
Count	
Tg RIA	
Std. or sample	100 μ l
Antiserum (rabbit)	200 μ l
↓ incubate for 24 hrs. at room temp.	
125 I-Tg	200 μ l
↓ incubate for 24 hrs. at room temp.	
2nd antibody	100 μ l
↓ incubate for 30 min. at room temp.	
Centrifuge	
↓	
Aspiration	
↓	
Count	

125 I-Tg は凍結乾燥品として供給されるが、初回に溶解し、以後 4°C に保存した 125 I-Tg を用いて行った同様の実験でも、ほぼ同じ結果が得られ、本キットに用いられている標識 Tg は少なくとも 4 週間までは安定であることが認められた。

3. 精 度

血中 Tg 濃度の異なる 3 検体を用いて検討した。同一測定における再現性は Table 2 左に示すように C.V. 4.2~6.6% と良好であった。また 3 検体について 10 回の異なる測定での再現性を検討した結果は Table 2 右のごとくで、C.V. は 8.1~11.0% であった。

Table 2 Precision of the assay

	intra-assay (n=10)			inter-assay (n=10)		
	1	2	3	4	5	6
Mean	28.9	78.3	187.6	17.7	59.7	271.4
S. D.	1.9	3.3	11.3	1.8	6.6	22.0
C. V. (%)	6.6	4.2	6.0	9.9	11.0	8.1

Table 3 Recovery

	added Tg (ng/ml)	0	20	40	80	160
	measured	12.7	35.3	62.1	99.9	179.5
1) recovered	—	22.6	49.4	87.2	166.8	
recovery (%)	—	113.0	123.5	109.0	104.3	
measured	12.5	36.1	57.0	94.5	179.3	
2) recovered	—	23.6	44.5	82.0	166.8	
recovery (%)	—	118.0	111.3	102.5	104.3	
measured	10.7	30.4	53.1	91.6	165.6	
3) recovered	—	19.7	42.4	80.9	154.9	
recovery (%)	—	98.5	106.0	101.1	96.8	

mean recovery 107.4%

4. 回収率

3 検体に種々の標準溶液を加えて測定し、それらの回収率を求めた。Table 3 に示すように平均回収率 107.4% と良好な結果が得られた。

5. 希釈試験

高 Tg 濃度の 3 検体を Tg 濃度 0 ng/ml の標準液で倍々希釈したときの Tg 濃度測定値の変化を Fig. 3 に示した。1 検体では直線性がみられたが、他の 2 検体では高濃度域で希釈による測定値の低下が不十分であった。しかし 4 倍希釈以上では直線性が認められた。

6. 著者らの RIA 法による測定値との比較

39 例について得られた測定値と従来の自家アッセイによる測定値との関係を見ると、Fig. 4 に示すごとくで、両測定値の間には $r=0.938$ と極めて良好な正相関が認められた。しかし絶対値においては、回帰直線式 ($Y=0.73X+0.42$) から、キットによる測定値が自家アッセイによるそれに比べ、全般にやや低値となる傾向がみられた。

7. 各種甲状腺疾患患者の血中 Tg 濃度

俺常者 31 例の血中 Tg 濃度は Fig. 5 に示すよう

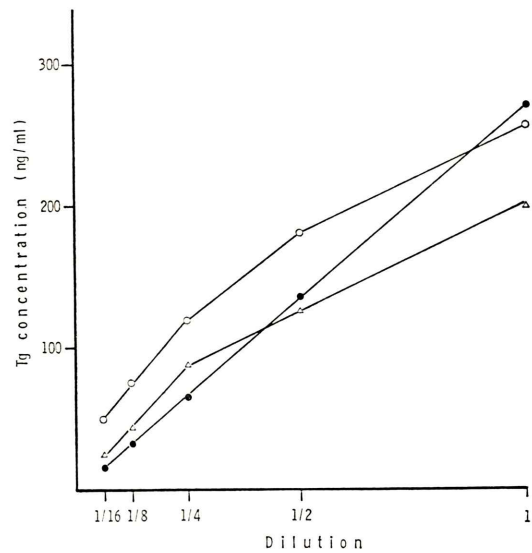


Fig. 3 Dilution curves.

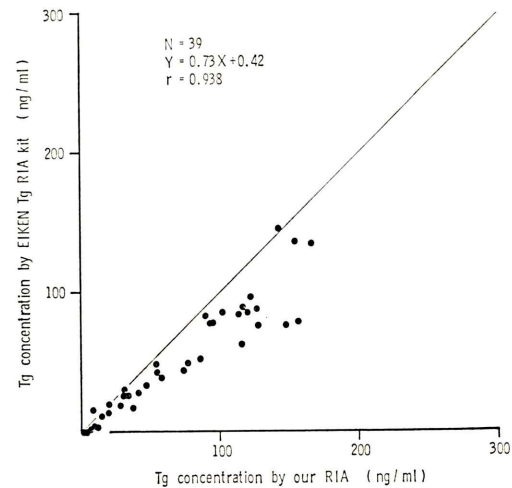


Fig. 4 Correlation between Tg concentrations obtained by the author's RIA and those by Eiken RIA kit.

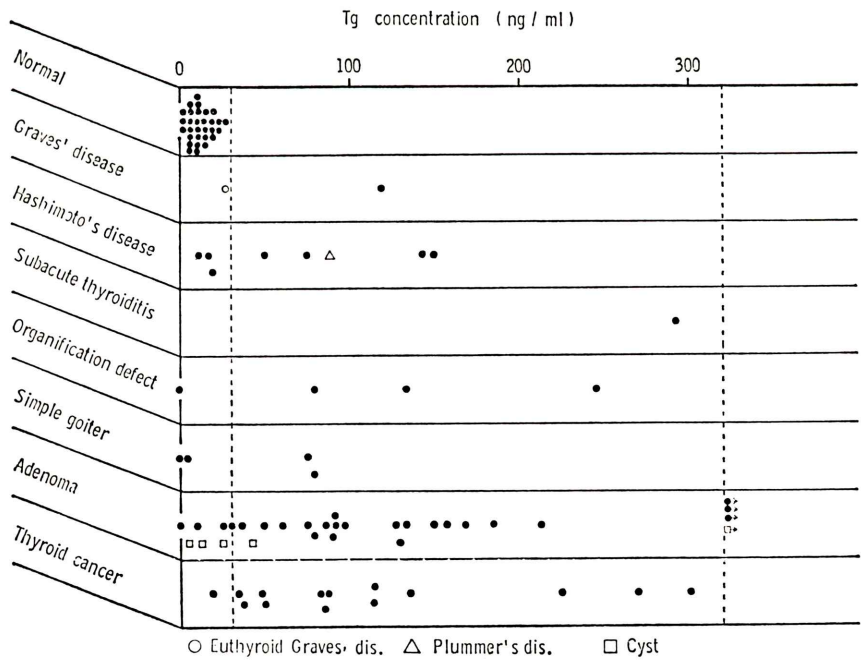


Fig. 5 Serum Tg concentration in normal controls and in patients with various thyroid diseases.

に 11.4 ± 7.6 (Mean \pm SD) ng/ml であった。

バセドウ病, 橋本病では正常ないし高値に分布し, 亜急性甲状腺炎の1例では著しい高値であった。ヨード有機化障害による甲状腺機能低下症では4例中3例が高値であった。腺腫では正常から320 ng/ml 以上の著しい高値まで広い分布を示したが, 嚢腫性病変では低値のものが大部分であった。癌では正常から高値まで幅広い分布が認められた。

8. ^{125}I -Tg 結合と TRC 抗体価

以上の検討はいずれも ^{125}I -Tg の結合率が10%以下の検体を用いて行ったが, 今回検討した対象における ^{125}I -Tg 結合 (%) と TRC 法 (サイロイドテスト) による抗 Tg 抗体価との関係は Fig. 6 に示すごとくであった。すなわち TRC 法にて抗体陽性 (100 倍希釈以上) の症例は全例 ^{125}I -Tg 結合が10%以上であり, さらに TRC 法にて陰性

Table 4 Detectability of antithyroglobulin antibodies by ^{125}I -Tg binding method (Eiken) in comparison to that by tanned red cell hemagglutination

	Detection of autoantibody	
	TRC	EIKEN
Control	0/31 (0%)	0/31 (0%)
Thyroid cancer	0/79 (0%)	27/79 (34.2%)
Adenoma	1/49 (2.0%)	14/49 (28.6%)
Graves' disease	1/9 (11.1%)	7/9 (77.8%)
Hashimoto's thyroiditis	6/25 (24.0%)	18/25 (72.0%)
Others	0/19 (0%)	5/19 (26.3%)

の症例中にも多数の ^{125}I -Tg 結合上昇例が存在することが認められた。Table 4 に TRC 法および

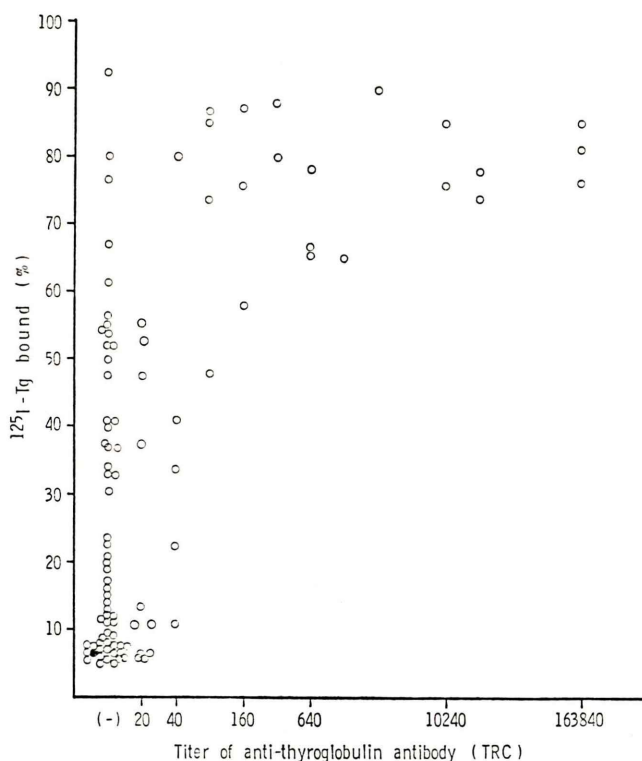


Fig. 6 Relation between the titers of antithyroglobulin antibodies by TRC and ^{125}I -Tg binding.

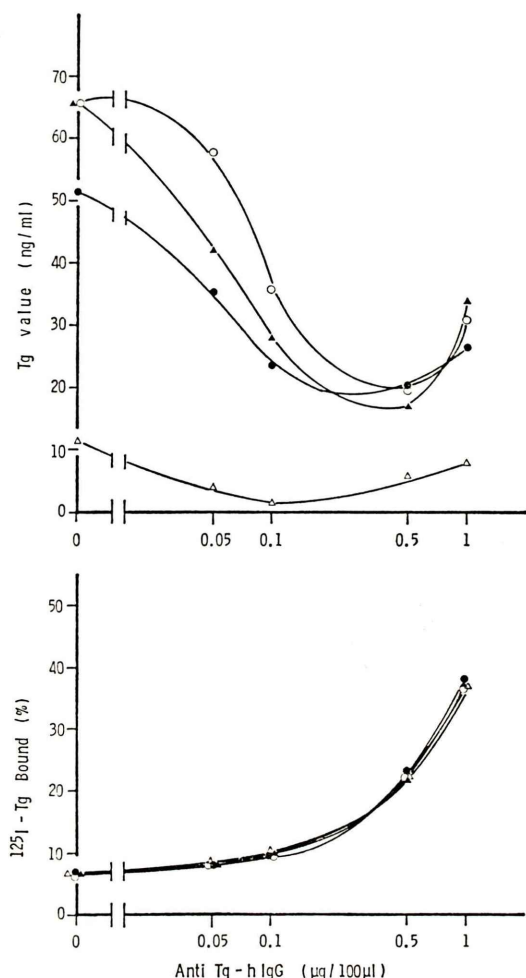


Fig. 7 Effect of the addition of antithyroglobulin antibodies on the apparent Tg concentration of the 4 test sera.

^{125}I -Tg 結合法による疾患別の抗体陽性率を対比して示した。健康者31例では両法ともに全例陰性であったのに対し、バセドウ病、橋本病では ^{125}I -Tg 結合法で70%以上が陽性となり、癌や腺腫でも約30%が陽性であった。

9. 抗 Tg 抗体の Tg 濃度測定に及ぼす影響

抗 Tg の存在が Tg 濃度測定にどのような影響をおよぼすかを明らかにするため、4つの Tg 濃度の異なる検体に高 Tg 抗体価の橋本病患者 IgG を種々の量加えて、一夜 4°C にてインキュ

ベーション後、Tg 濃度を測定し、同時に各検体の ^{125}I -Tg 結合率を測定した。Figure 7 に示すごとく、Tg 濃度測定値は抗 Tg-IgG の添加により急速に低下し、 ^{125}I -Tg 結合が10%を超える量では約半分の値となるが、さらに抗 Tg-IgG を添加し、 ^{125}I -Tg 結合が40%近くの値となる点では逆に上昇する2相性の変化を示した。なお、さらに抗 Tg-IgG を添加してもこれ以上の著しい測定値の上昇はみられなかった。

このように測定値が複雑な変化を示す原因を知るため、これらの検体のうち1例(●印)について、第1抗体および第2抗体をそれぞれ加えずにアッセイしたときの ^{125}I -Tg 結合%を求め、標準法での ^{125}I -Tg 結合%の変化と対比して Fig. 8 に示した。Tg-RIA における bound% は Tg の測定値とは逆に上に凸の2相性曲線を示す。第1抗体なしでも抗 Tg-IgG の添加量が増加すると ^{125}I -Tg が沈澱してくることも認められた。したがって抗 Tg-IgG が少ない場合の RIA 系での bound% の上昇は、これら2つの機序によると考えられた。さらに抗 Tg-IgG が多くなると点線で示したように ^{125}I -Tg の抗 Tg-IgG への結合が著明に上昇するので、結果的に RIA 系での bound% はむしろ低下することになる。しかし第1抗体なしでの bound% が上昇してくることから、さらに抗 Tg-IgG を加えても RIA 系での bound% が著明に低下して測定値が異常高値となることはない。

以上の結果より、この2抗体 RIA 系では自己抗体が存在しても異常高値となることはなく、Tg 濃度の過大評価を生ずることはないことが示された。

IV. 考 案

サイログロブリンの RIA における問題点の1つは標識サイログロブリンの放射化学的不安定性であり、 ^{125}I 標識後急速に抗原性が失われる場合のあることが知られている⁸⁾。今回検討したキットの標識抗原は水溶液にした状態でも4週間まで良好な特異的結合を示し、安定性に優れていた。

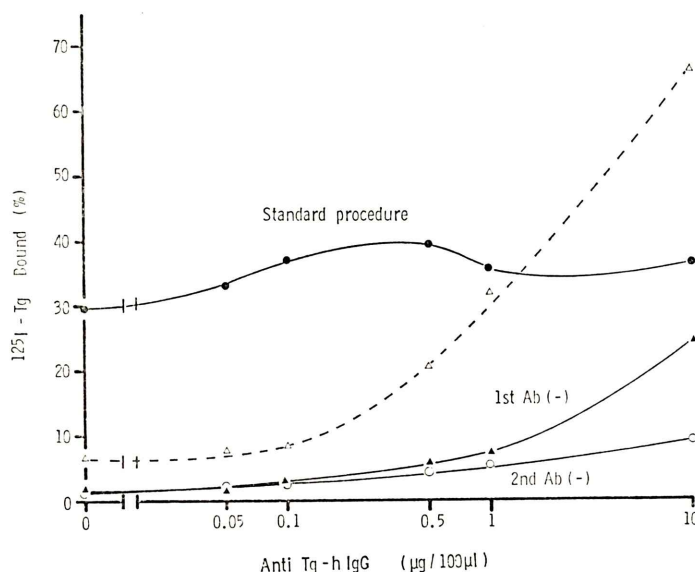


Fig. 8 Effect of the addition of antithyroglobulin antibodies on the ^{125}I -Tg precipitated in the standard procedure and in the assays which are devoid of either the 1st antibody or the 2nd antibody.

A dotted line represents ^{125}I -Tg binding by the test material.

測定条件としては 4°C より室温インキュベーションで良好な標準曲線が得られ、また標準法とされている標準抗原の delayed addition で感度の向上がみとめられた。

標準曲線は $10\sim 40\text{ ng/ml}$ の Tg で急峻な低下を示し、測定値の精度も良好であった。

添加 Tg の回収試験の結果は満足すべきものであった。一方、希釈試験においては検体によって直線性を示さないものが認められた。この原因については、標準血清と検体との蛋白組成の相違による可能性が考えられ、さらに検討を要する。

臨床例における測定値は自家アッセイによる測定値と極めて良好な相関を示した。絶対値においては若干われわれのアッセイによるものより低値の傾向であったが、このような相違は両アッセイで用いている標準 Tg のわずかな違いによって起こり得るものと考えられる。この問題を解決するため、将来的には Tg の標準品の設定が望まれるが、現時点では血中 Tg 値の比較は同じアッセイ系を用いての測定値間でのみ行うのがよいと思わ

れる。

以上の結果より、このキットは臨床応用が十分可能と考えられ、健常者における測定値は平均 $11.4\pm 7.6\text{ (SD) ng/ml}$ と、諸家の報告⁴⁾ とほぼ同様の成績であった。甲状腺疾患では腫瘍の患者などで著しい高値を呈する例が認められた。これら腫瘍患者における Tg 測定値とその臨床的意義については別に報告した⁹⁾。

RIA による血中 Tg 濃度測定 of 臨床応用に際して最も問題となるのは、自己抗体の存在である^{2,3)}。本キットでも Tg 測定の前段階として試料血清による ^{125}I -Tg 結合率の測定を行い、その上昇がみられないものについて Tg 測定を行うようになっている。

^{125}I -Tg の結合率より抗 Tg 抗体を検出する方法は Salaté の報告¹⁰⁾ 以来行われている感度の優れた方法であり、今回の検討では、10% 以上の結合率を陽性とするとき、バセドウ病や橋本病患者では 70% 以上、癌や腺腫の患者でも約 30% の陽性率であった。このように通常の TRC 法に比べ

著しく高率に抗体の存在が検出されたことは、Tg測定前の抗体スクリーニング法としてTRC法が十分でないことを示すと同時に、抗体陰性者に対象をしぼるとTg測定可能な患者がかなり限られてしまうことを示している。そこで抗Tg抗体の存在が測定値にどのような影響を与えるかを検討してみた。その結果は、一般の2抗体法RIAにおいて自己抗体の存在で予想される測定値の異常上昇とは全く異なるものであった。すなわち抗Tg-IgGの添加とともにTg測定値は一旦低下し、さらに加えると再び軽度上昇する2相性のパターンをとることが認められ、異常高値とはならなかった。このような特異な現象を生じる理由は第2抗体のヒトIgGに対する部分的交叉性と、抗原が巨大分子であり自己抗体との反応でも沈降反応を起こすことの2つの因子によるものと考えられた。

以上の検討結果より、このRIA系では自己抗体の存在によって測定値が見かけ上低値となることはあっても、異常に高値となって過大評価されることはないことが示された。したがって、抗Tg抗体陽性の血清でもTg値の上昇を認めたときには異常と考えてよく、甲状腺癌の再発などの検索には十分用いえることが示唆された。

今後、抗Tg抗体の存在下でも正確な血中Tg濃度の測定が出来る方法の開発が望まれるが、今回検討したアッセイでもある程度抗体陽性者での測定値が役立ち得る可能性が示された。

V. 結 論

栄研Tg-RIAキットについて基礎的検討を行い、以下のような成績を得た。

1) 室温インキュベーションにて、精度のよい測定値が得られた。

2) 回収率は良好であったが、希釈試験で直線性を示さないものがみられた。

3) 健常者の平均値は 11.4 ± 7.6 (SD) ng/mlであり、臨床例での測定値は自家アッセイによる値と良好な相関を示した。

4) ^{125}I -Tg結合による抗Tg抗体スクリーニング法は感度に優れ、抗体陽性例の検出に有用であった。

5) この2抗体法RIAでは自己抗体の添加により測定値が低下した。したがって、抗体陽性血清での測定値でも高値を呈する場合は異常と考えられた。

以上より、本法は簡便な血中Tg測定法として臨床応用が可能と考えられた。

文 献

- 1) Edelhoeh H, Robbins J: Thyroglobulin chemistry and biosynthesis. The Thyroid Werner SC, Ingbar SH eds. Harper and Row, Hagerstown, 1978, p. 62
- 2) Roitt IM, Torrigiani G: Identification and estimation of undegraded thyroglobulin in human serum. *Endocrinology* **81**: 421-429, 1967
- 3) Van Herle AJ, Uller RP, Matthews NL, et al: Radioimmunoassay for measurement of thyroglobulin in human serum. *J Clin Invest* **52**: 1320-1327, 1973
- 4) Van Herle AJ, Vassart G, Dumont JE: Control of thyroglobulin synthesis and secretion (Second of two parts) *N Engl J Med* **301**: 307-314, 1979
- 5) Torrigiani G, Doniach D, Roitt IM: Serum thyroglobulin levels in healthy subject and in patients with thyroid disease. *J Clin Endocrinol Metab* **29**: 305-314, 1969
- 6) Ikekubo K, Juttan J, Schneider AB: Radioimmunoassay of human thyroglobulin with use of "thyroglobulin-free" plasma prepared by ultracentrifugation as diluent. *Clin Chem* **26**: 1566-1568, 1980
- 7) Baumstark JS, Laffin RJ, Bardawill WA: A preparative method for the separation of 7S gamma globulin for human serum. *Arch Biochem Biophys* **108**: 514, 1964
- 8) Schlumberger M, Van Herle AJ: Critical analysis of [^{131}I]- and [^{125}I]-human thyroglobulin labels for radioimmunoassay use. *J Clin Endocrinol Metab* **54**: 581-586, 1982
- 9) 池窪勝治, 濱崎利子, 山田明子, 他: 甲状腺腫瘍患者の血中サイログロブリン濃度測定の有用性. *核医学* **20**: 313-319, 1983
- 10) Salabé GB, Fontana S, Andreoli M: Radioimmunoassay for human antithyroglobulin antibodies. I The relationship between tanned cell hemagglutination and a double antibody technique. *Hormones* **3**: 1-13, 1972