

《ノート》

TRAK キットによる TRAb 測定の基礎的検討 ならびに臨床的意義

Basic and Clinical Evaluation of TRAb Measurement by Using TRAK Kit

海瀬 和郎*	桜田 俊郎*	海瀬 信子*	吉田 克己*
深沢 洋*	鈴木 道子*	野村 隆*	板垣 洋一*
米満 京子*	山本 茜子*	斎藤慎太郎*	

Kazuro Kaise, Toshiro Sakurada, Nobuko Kaise, Katsumi Yoshida,
Hiroshi Fukazawa, Michiko Suzuki, Takashi Nomura, Yoichi Itagaki,
Kyoko Yonemitsu, Makiko Yamamoto and Shintaro Saito

Second Department of Internal Medicine, Tohoku University, School of Medicine, Sendai, Japan

I. 緒 言

Long Acting Thyroid Stimulator(LATS)の発見¹⁾以来、バセドウ病患者の血中にさまざまな名称の甲状腺刺激免疫グロブリンが検出されている。これらは抗 TSH レセプター抗体と考えられ、現在ではバセドウ病は自己免疫疾患と理解されている。甲状腺刺激免疫グロブリンのうち、TSH Radioreceptor Assay (RRA) を用いて測定する Thyrotropin Receptor Antibody (TRAb) は、未治療バセドウ病における陽性率が高く^{2,3)}、また治療効果の判定に用いられる可能性がある^{4,5)}など、その測定は臨床的に有用である。しかし、TRAb 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を用いる必要があるなど、臨床検査法として TRAb 測定は困難であった。最近 Smith ら³⁾により、可溶化 TSH レセプターを用いた TRAb 測定用 RRA キットが開発され、TRAK

キットとして提供され、われわれもすでに一部の検討を報告^{6,7)}したが、今回はさらに TRAb 測定の臨床的意義について検討した。なお本稿では、TSH RRA を用いて測定した抗 TSH レセプター抗体の名称を TRAb とした。

II. 方 法

TRAb は TRAK キット(トラベノール社)を用いて測定した。まず、血清、IgG または b-TSH(チトロパール、Armar 社) 50 μ l、と、1% Lubrol 可溶化ブタ甲状腺 TSH レセプター 50 μ l を室温で15分間反応させ、¹²⁵I-TSH 100 μ l を加えた後 37°C でさらに60分間反応させた。次に氷冷した緩衝液(0.1% BSA, 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.5) 800 μ l を加え、さらに 1 M NaCl に溶解した 30% ポリエチレングリコール(PEG) 1 ml を加えて混和し、1,500×G にて30分間遠心した後上清を吸引除去し、沈査の放射能を測定した。¹²⁵I-TSH の非特異的沈澱は、レセプターの代わりに 1% Lubrol 50 μ l を加えて測定した。

* 東北大学医学部第二内科

受付：59年11月6日

最終稿受付：60年3月5日

別刷請求先：仙台市星陵町1-1 (番980)

東北大学医学部第二内科

海瀬 和郎

Key words: Radioreceptor assay, TSH, Anti-receptor antibody, Hyperthyroidism, T₃ suppression test.

TRAb活性は、次式に従いTRAb indexとして算出した。

TRAb index (%)

$$= \left(1 - \frac{\text{被検血清存在下の}^{125}\text{I-TSHの特異的結合 (cpm)}}{\text{陰性 control 血清存在下の}^{125}\text{I-TSHの特異的結合 (cpm)}} \right) \times 100$$

交叉反応の検討には、Calbiochem社のLuteinizing hormone, human (LH), Follicular stimulating hormone, human (FSH)およびChorionic gonadotropin human (hCG)をそれぞれ用いた。

IgGはShewringら³⁾の方法で作成した。またT₃抑制試験はWernerら⁸⁾の方法により、甲状腺Adenylate cyclase (AC)活性はOrgiazziら⁹⁾の方法に準じて測定した。

III. 対象

正常人60例、バセドウ病124例(未治療52、治療中22、治療後50)、亜急性甲状腺炎16例、慢性甲状腺炎30例および原発性甲状腺機能低下症13例の計243例を対象とした。

IV. 結果

1) 標準曲線

b-TSHを標準品として作成した標準曲線は良好で、5μUのb-TSHの添加でも有意の結合抑制を認めた(Fig. 1)。またロットの異なる7つのキットでの標識TSHの特異的結合率は16.0%～27.8%(平均23.3%)、非特異的結合は4.9%～10.7%(平均8.9%)であった。

LH、FSHおよびhCGとの交叉反応を検討したところ、250mUのLHまたはFSHの添加でB/Tはわずかに低下し、その時のB/B₀はそれぞれ95.4%および96.9%であった。250mUのhCGの添加では、B/Tの低下は認められなかった(Fig. 1)。

2) インキュベーション温度および時間

レセプターを加えた後のインキュベーション温度を、4、25および37°Cと変化させてTRAb indexを比較した。4°Cで高値の傾向を、また37°Cでは低値の傾向を認めたが、その差はわずかであつた(Fig. 2左)。

また(Fig. 2左)。また¹²⁵I-TSHを加えた後の第2インキュベーションの温度を、25、37および42°Cと変化させてTRAb indexを比較したところ、25°Cで高値の傾向を認めた(Fig. 3左)。

レセプターを加えた後のインキュベーション時間を、10、15、30および60分と変化させたところ、60分で高値の傾向を認めた(Fig. 2右)。¹²⁵I-TSHを加えた後のインキュベーションの時間を、30、60および90分と変化させたところ、30分で高値をとる傾向を認めたが、その差はわずかであった(Fig. 3右)。以上のごとく各インキュベーション条件の変化でTRAb indexは多少変化したが、特異的結合率の変化は少なかった。

3) 血清およびIgGを用いた場合のTRAb indexの比較

検体として患者血清およびIgGを用いてTRAb indexを測定し、両者で得られた値を比較したところ両者の間にはr=0.94(p<0.01)の良好な相関が得られた(Fig. 4)。

4) 希釈試験

b-TSH、正常人血清およびTRAb陽性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。TRAb陽性血清の希釈曲線は、b-TSHのそれと平行した。また正常人血清を緩衝液で希釈しても

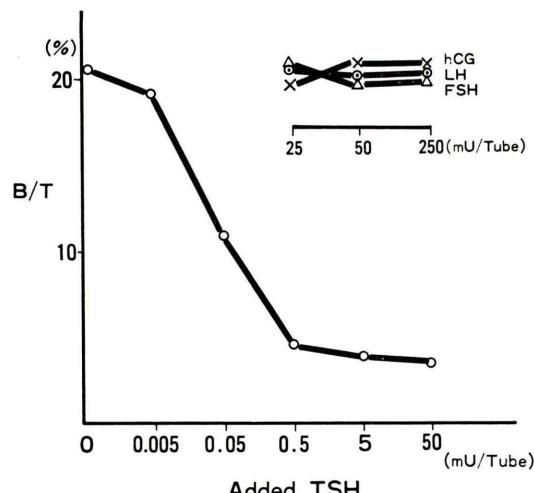


Fig. 1 Effects of unlabelled TSH, LH, FSH or hCG on the binding of labelled TSH.

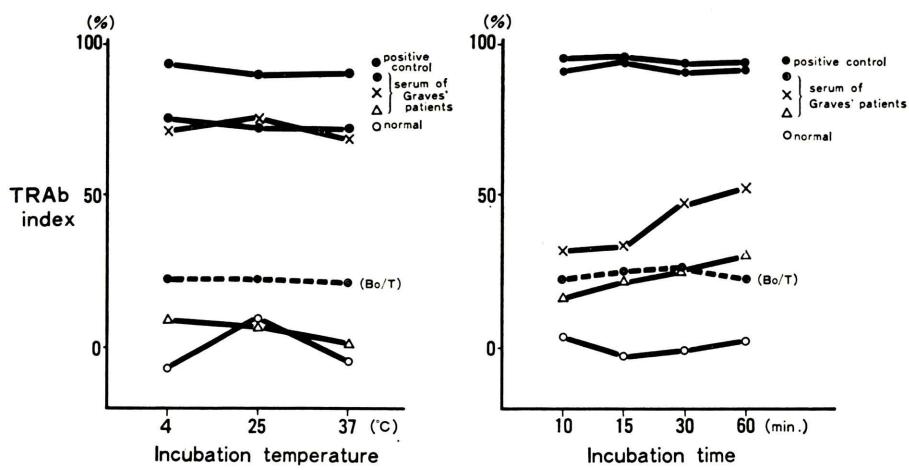


Fig. 2 Effects of temperature and time of 1st incubation on the TRAb index

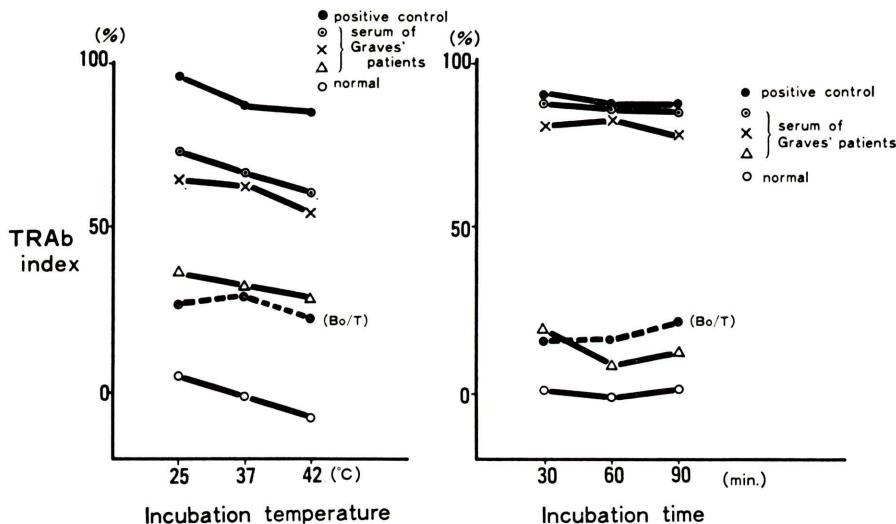


Fig. 3 Effects of temperature and time of 2nd incubation on the TRAb index.

B/Bo の変化はほとんどなかった (Fig. 5).

5) 再現性

TRAb 陽性コントロール血清、正常人血清およびパセドウ病患者血清の TRAb index について、同一測定内、測定間、日差および測定者間の再現性を検討した (Table 1 i)-iv)).

同一測定内の再現性では、10回の測定において、正常人血清の C. V. は 76.1% と高値を示したが、他の検体の C. V. は 3.2%~16.8% と良好であった。

異なるロットのキットを用いて 3 回測定した場合、正常人血清の C. V. は 122% と高値を示したが、他の検体の C. V. は 2.6%~26.6% と TRAb index が低いものほど大きくなかった。同一ロットのキットを用いた日差および測定者間の変動においても同様の結果が得られた。

6) 正常人および甲状腺疾患における TRAb index

正常人 60 例の TRAb index は、-11.2%~

+11.1%に分布し、平均値±S.D. は $-2.0 \pm 5.0\%$ であった (Fig. 6). 平均値 ± 2 S.D. は -12.0% から $+8.1\%$ となり、この結果から正常範囲をキットの指示のとおり10%以下として支障なく、10%をこえる TRAb index を示すものを TRAb 陽性とした。未治療バセドウ病52例中40例 (76.9%) で TRAb は陽性であった。また抗甲状腺剤で治療中のもの22例では10例 (45.5%) に、また治療後の50例では16例、32%にそれぞれ TRAb が陽性であった。同一症例について治療による TRAb

index の変化を4例について検討したところ、全例が治療とともに低下した (Fig. 7)。一方、亜急性甲状腺炎では16例中1例 (6.3%) のみが陽性であり、慢性甲状腺炎30例ではすべて TRAb は陰性であった。原発性甲状腺機能低下症では13例中4例、(30.7%) に TRAb が陽性であった。

7) バセドウ病の予後と T_3 抑制試験および TRAb 陽性率

TRAb の測定が、バセドウ病の予後判定に用いられる得るかどうかを検討するため、 T_3 抑制試験の結果と TRAb を比較した (Table 2)。治療後のバセドウ病24例では、 T_3 で抑制された12例中9例 (75.0%) で TRAb が陰性であったのに対して、抑制されなかった12例では8例 (67.0%) で TRAb が陽性であり、病勢判定の点では両法の結果はおおむね一致した。次に治療中止後6か月以上を経過観察した20例について、予後と T_3 抑制試験および TRAb を比較した (Table 3)。20例中再発を認めたのは7例であり、再発予測の点からは、 T_3 抑制試験が TRAb よりすぐれていた。また寛解が持続した13例では、 T_3 で抑制されたものは10例であったのに対して、TRAb 陰性が9例とほぼ同率を示した。

8) 原発性甲状腺機能低下症における TRAb TRAb が陽性を示した原発性甲状腺機能低下

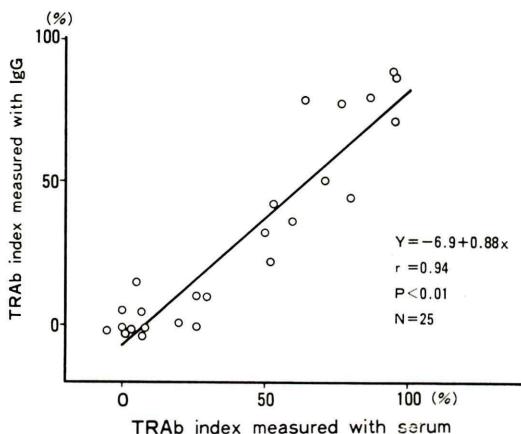


Fig. 4 Correlation of TRAb index measured with serum and IgG.

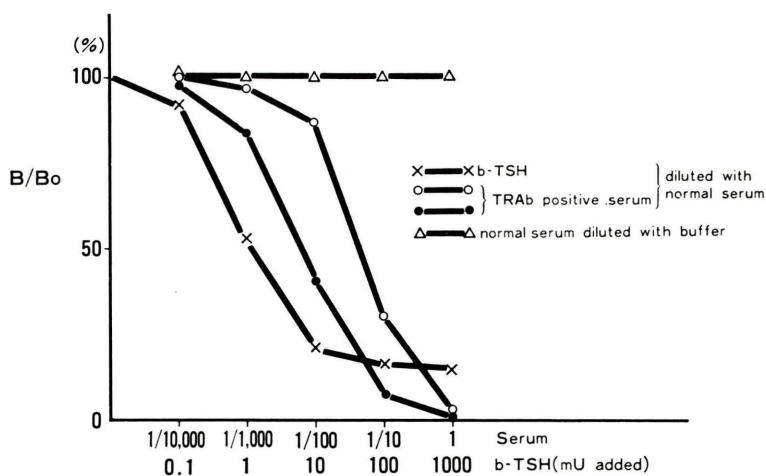


Fig. 5 Effects of unlabelled TSH, normal and TRAb positive sera on the binding of labelled TSH to TSH receptors.

Table 1 Reproducibility

i) Intra-assay variation

Sample No.	Mean (%)	S.D.	C.V. (%)	N
1	78.0	2.5	3.2	10
2	-4.6	3.5	76.1	10
3	22.1	3.0	13.6	10
4	30.7	5.2	16.9	10
5	45.0	2.8	6.2	10

ii) Inter-assay variation

Sample No.	Mean (%)	S.D.	C.V. (%)	N
1	88.8	2.3	2.6	3
2	2.0	2.5	125.0	3
3	40.0	10.6	26.5	3
4	69.0	10.5	15.1	3
5	85.9	5.2	6.2	3

iii) Variation of TRAb index measured by different technician

Sample No.	Mean (%)	S.D.	C.V. (%)	N
1	89.1	1.7	1.9	3
2	1.5	2.9	193.3	3
3	33.7	0.7	2.1	3
4	62.0	2.2	3.5	3
5	83.9	0.2	0.2	3

iv) Variation of TRAb index measured on different day

Sample No.	Mean (%)	S.D.	C.V. (%)	N
1	88.1	3.7	4.2	3
2	1.0	5.7	570.0	3
3	44.6	6.8	15.2	3
4	67.2	2.2	3.3	3
5	85.9	4.4	5.1	3

症4例の血清より IgG を抽出し、甲状腺細胞膜 TSH レセプターに対するこれらの IgG の作用を、AC 刺激活性を指標として検討したところいずれも甲状腺細胞膜 AC 活性を刺激せず、しかも b-TSH の AC 刺激作用を抑制した (Table 4)。

V. 考 案

TSH の RRA を用いて抗 TSH レセプター抗体を測定する場合、従来は主として甲状腺細胞膜分画が用いられ、未治療バセドウ病患者の 50%～88% に抗 TSH レセプター抗体が検出されている^{2,4,5)}。TRAb が 100% に検出できない理由の 1

つに測定感度の問題があるが、可溶化ブタ甲状腺 TSH レセプターを用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、b-TSH 換算で 5 μU/Tube と良好であった。また LH, FSH および hCG との交叉性もほとんど問題がないと思われた。

インキュベーション温度および時間の検討では、標識 TSH の特異的結合率には大きな差を認めなかつたが、TRAb index は、第1インキュベーション時間を延長させた場合と第2インキュベーション温度を上昇させた場合の変化が比較的大く、TRAb を本キットで測定する場合には、時間と温度をキットの指示どおりに行う必要があると思われた。

TRAb 陽性患者血清を正常人プール血清または緩衝液を用いて希釈しても良好な結果が得られ希釈による測定が可能であり、また正常人血清を緩衝液を用いて 10,000 倍に希釈しても B/B₀ はほとんど変化しなかった。これは従来の甲状腺細胞膜分画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¹⁰⁾ がほとんどないために血清を用いて測定した TRAb index と IgG を用いて測定したそれが良く相関するためと考えられた。

再現性の検討では、同一測定内および異なるロット間の C.V. は良好であった。また日差および測定者間の再現性も良好であった。正常人検体の C.V. は大きかったが、S.D. は小さく、再現性は良好と判定して支障ないと思われた。

正常人 60 例について測定した TRAb index は、-11.2%～+11.1% で、平均値 ± 2 S.D. は、-12.1%～+8.1% を示し、この結果はキット指示のごとく、10% 以下を正常範囲として良いと考えた。未治療バセドウ病患者では 76.9% に TRAb が陽性で従来の報告と一致した。また、陽性率は治療により低下し、同一例の TRAb index も治療により低下することが報告されているが^{5,11,12)}、われわれの検討でも同様の結果を示した。

T₃ 抑制試験は、抗甲状腺剤による治療を中止した後のバセドウ病患者の予後の判定に有用とさ

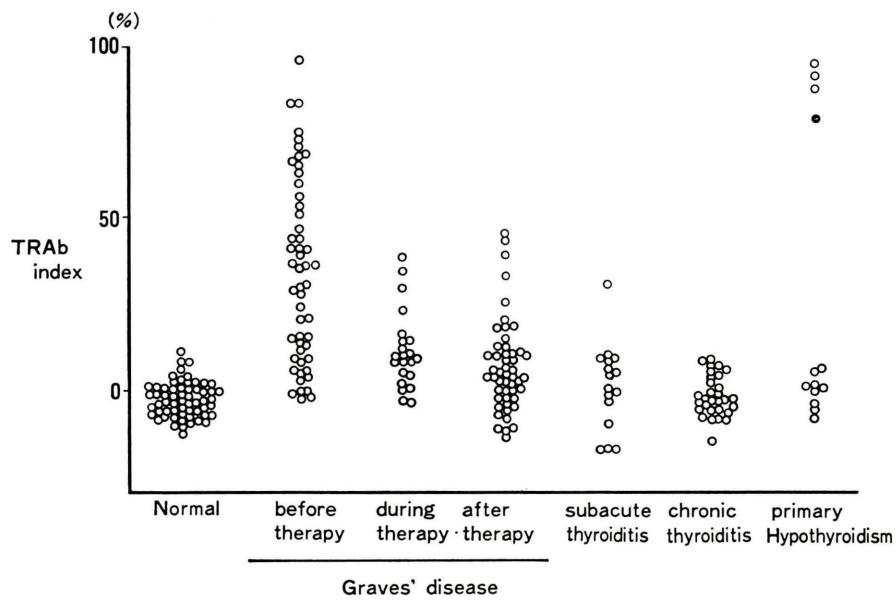


Fig. 6 TRAb index in patients with thyroid disease.

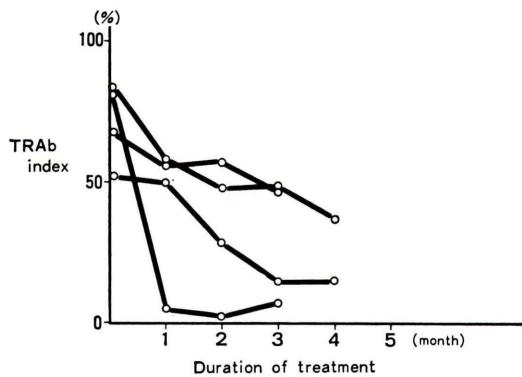


Fig. 7 Changes of TRAb index during antithyroid drug therapy.

Table 2 TRAb and T₃ suppression test in patients after antithyroid drug therapy

Case	T ₃ suppression test	
	Supp.	Not supp.
TRAb (+)	3	8
TRAb (-)	9	4

れている¹³⁾。本試験とTRAbの比較では、T₃非抑制例ではTRAb陽性が多く、T₃抑制例ではTRAb陰性が多かったという^{14~16)}。今回の検討

Table 3 Clinical course, TRAb and T₃ suppression test in patients after antithyroid drug therapy

Case	TRAb		T ₃ suppression test	
	(+)	(-)	Supp.	Not supp.
Remission	4	9	10	3
Relapse	4	3	2	5

Table 4 Effects of IgG of primary hypothyroid patients on the thyroid AC activity

	c-AMP generated for 30 min. (%)	
	TSH (-)	TSH (+)
Control	100.0	100.0
Case 1	85.4	29.3
Case 2	84.8	18.7
Case 3	104.6	35.1
Case 4	37.5	38.0

Each value indicates % value compared to control IgG.

でも、T₃非抑制例の67%でTRAb陽性でT₃抑制例の75%でTRAb陰性であった。したがって、バセドウ病の活動性とTRAbがかなり平行すると考えられた。

TRAbと予後との関係をみると、TRAb陰性

例に寛解が多く、陽性例に再発が多いとされている^{4,15)}。今回の検討では、TRAb 陰性例では、12 例中 9 例が寛解を示し、再発例でも 7 例中 4 例が TRAb 陽性であり、再発予測の上では、T₃ 抑制試験とほぼ同等の結果が期待できるものと思われた。

バセドウ病以外でも、亜急性甲状腺炎の 1 例と原発性甲状腺機能低下症の 4 例で TRAb が陽性であった。亜急性甲状腺炎の TRAb は甲状腺 AC 系を刺激しない¹⁷⁾とされ、その意義は現在のところ不明である。一方、慢性甲状腺炎の 10%～20% に TRAb が陽性であり、この TRAb は甲状腺 AC を刺激しなかったという^{16,18)}。報告されている TRAb 陽性慢性甲状腺炎は、原発性甲状腺機能低下症と診断し得る例がほとんどで、今回の検討でも原発性甲状腺機能低下症の 4 例で TRAb が陽性であった。原発性甲状腺機能低下症における TRAb は、Matsuura ら¹⁹⁾の報告以来注目され、本症における TRAb は TSH 作用を抑制することから、blocking type の抗レセプター抗体と考えられている。今回も全例の IgG が甲状腺細胞膜 AC に対する TSH 作用を抑制したことから、本症の発症になんらかの役割を演じている可能性が推察され、TRAb 陰性例と病因的に異なるものかどうかは、今後検討すべき点と考えられる。

以上、TRAb 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り、TRAb 測定により甲状腺疾患に関するなお一層の知見が得られると考えられる。

VI. 結 語

TRAK キットにより TRAb を測定して以下の成績を得た。

- 1) TRAK キットの測定感度および、再現性は良好であった。
- 2) 血清および IgG のいずれを用いても良好な結果が得られた。
- 3) 未治療バセドウ病における TRAb の陽性率は 76.9% で、抗甲状腺剤治療により陽性率は低

下した。TRAb と T₃ 抑制試験の結果とはおおむね一致した。また TRAb 陰性者に寛解例が、陽性者に再発例が多い傾向を認めた。

- 4) 原発性甲状腺機能低下症の 13 例中 4 例で TRAb が陽性であった。またこの 4 例の IgG は b-TSH の甲状腺刺激作用を抑制した。

キットを提供して下さいました日本トラベノール社に感謝します。

文 献

- 1) Adams DD, Purves HD: Abnormal responses in the assay of thyrotropin. Proc Univ Otago Med School 34: 11-12, 1956
- 2) Smith BR, Hall R: Thyroid-stimulating immunoglobulin in Graves' disease. Lancet 2: 427-430, 1974
- 3) Shewring G, Smith BR: An improved radioreceptor assay for TSH receptor antibodies. Clin Endocrinol 17: 409-417, 1982
- 4) O'Donell J, Trokoudes K, Silverberg J, et al: Thyrotropin displacement activity of serum immunoglobulins from patients with Graves' disease. J Clin Endocrinol Metab 46: 770-777, 1978
- 5) Teng CS, Yeung RTT: Changes in thyroid-stimulating antibody activity in Graves' disease treated with antithyroid drug and its relationship to relapse: a prospective study. J Clin Endocrinol Metab 50: 144-147, 1980
- 6) 海瀬和郎、桜田俊郎、海瀬信子、他：TSH Radio-receptor Assay キット (Smith) による TSH binding inhibitor immunoglobulin (TBII) の測定. 核医学 20: 1199-1206, 1983
- 7) 桜田俊郎、海瀬和郎、海瀬信子、他：甲状腺学、TBII と T₃ 抑制試験、第 1 版、下田新一、長瀬重信編、日本医事新報社、東京、1984, p. 125
- 8) Werner SC, Spooner M: A new and simple test for hyperthyroidism employing L-triiodothyronine and the twenty-four hour I-131 uptake method. Bull NY Acad Med 31: 137-145, 1955
- 9) 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: 341-354, 1976
- 10) Beall GN, Chopra IJ, Solomon DH, et al: Serum protein inhibition of thyrotropin binding to human thyroid tissue. J Clin Endocrinol Metab 47: 967-973, 1978
- 11) Fenazzi G, Hashizume K, Roudebush CP, et al: Changes in thyroid-stimulating immunoglobulins

during antithyroid therapy. *J Clin Endocrinol Metab* **48**: 572-576, 1979

12) McGregor AM, Petersen MM, McLachlan SM, et al: Carbimazole and the autoimmune response in Graves' disease. *N Engl J Med* **303**: 302-307, 1980

13) Cassidy CE: Thyroid suppression test as index of outcome of hyperthyroidism treated with anti-thyroid drugs. *Metabolism* **19**: 745-750, 1970

14) Kuzuya N, Chiu SC, Ikeda H, et al: Correlation between thyroid stimulators and 3,5,3'-triiodothyronine 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**: 706-711, 1979

15) 飯田泰啓, 小西淳二, 笠木寛治, 他: バセドウ病の予後に関する検討. *日内分泌誌* **58**: 796-806, 1982

16) 有川一美: 甲状腺疾患における抗TSH受容体抗体の意義に関する研究. *日内分泌誌* **59**: 131-147, 1983

17) Wall JR, Strakosch CR, Bandy P, et al: Nature of thyrotropin displacement activity in subacute thyroiditis. *J Clin Endocrinol Metab* **54**: 349-353, 1982

18) 遠藤啓吾: TSHのradioassayに関する研究, 第3編 橋本病におけるTSH結合阻害性免疫グロブリン(TBII)について. *日内分泌誌* **55**: 1275-1285, 1979

19) Matsuura N, Yamada Y, Nohara Y, et al: Familial neonatal transient hypothyroidism due to maternal TSH-binding inhibitor immunoglobulins. *N Engl J Med* **33**: 738-741, 1980