

《ノート》

TSH 受容体抗体 (TRAb) 測定キットの基礎的 ならびに臨床的検討

Fundamental and Clinical Studies on TRAb Kit

森 徹* 赤水 尚史* 石井 均* 横田 敏彦*
中村 浩淑*

Toru MORI, Takashi AKAMIZU, Hitoshi ISHII, Toshihiko YOKOTA
and Hirotoishi NAKAMURA

Second Division of Internal Medicine, Kyoto University School of Medicine, Kyoto

I. 緒 言

バセドウ病は、最近では TSH 受容体に対する自己抗体 (TRAb) による自己免疫疾患と考えられている¹⁻³⁾。ラジオアッセイを中心とするホルモン測定法の進歩により、甲状腺中毒症は適確に診断されるようになったが、血中ホルモン濃度が高いのみではバセドウ病とは言えず²⁾、また、バセドウ病の治療経過および寛解の判定には血中ホルモン濃度の測定は十分な指標とはならない。バセドウ病においては、その本質に直接的に関連する TRAb 測定の臨床的意義が大きいと考えられる。

著者らは、日本トラベノール社より TRAb 測定キット (R.S.R. 社製 Cardiff. U.K.) の提供をうけ、この基礎的ならびに臨床的検討を行った。

II. 対象ならびに方法

京大第二内科甲状腺外来通院中または入院中の診断確定した各種甲状腺疾患患者 393 例を対象として、凍結保存した血清を用いて TRAb を測定

* 京都大学医学部第二内科

受付：59年11月9日

最終稿受付：60年3月5日

別刷請求先：京都市左京区聖護院川原町 54 (☎ 606)

京都大学医学部附属病院第二内科

森 徹

した。健常人対照としては、非甲状腺疾患患者50例について検討した。

TRAb 測定法は治療計画書の指示⁴⁾に従った。アッセイごとに添付の陰性コントロールを用いて最大結合カウントと非特異的結合カウント (NSB) を測定し、被検血清の結合カウントからこの NSB を差し引いて個々の特異結合カウントを得、次式により TRAb% を算出した。

$$100 \times \left(1 - \frac{\text{被検血清の } ^{125}\text{I-TSH 特異結合カウント}}{\text{陰性コントロールの } ^{125}\text{I-TSH 最大特異結合カウント}} \right)$$

基礎的検討には、健常人血清および TRAb 既知血清を適宜混和し、低、中、高濃度血清プールを調整し、小分けして凍結保存したものを測定に供した。

III. 結 果

a. 基礎的検討成績

1) 再現性の検討

Figure 1 は、健常人、低、中、高血清および陽性コントロールによるアッセイ内およびロット間

Key words: Graves' disease, TSH receptor, TSH receptor antibodies, Blocking type receptor antibodies, Treatment of Graves' disease.

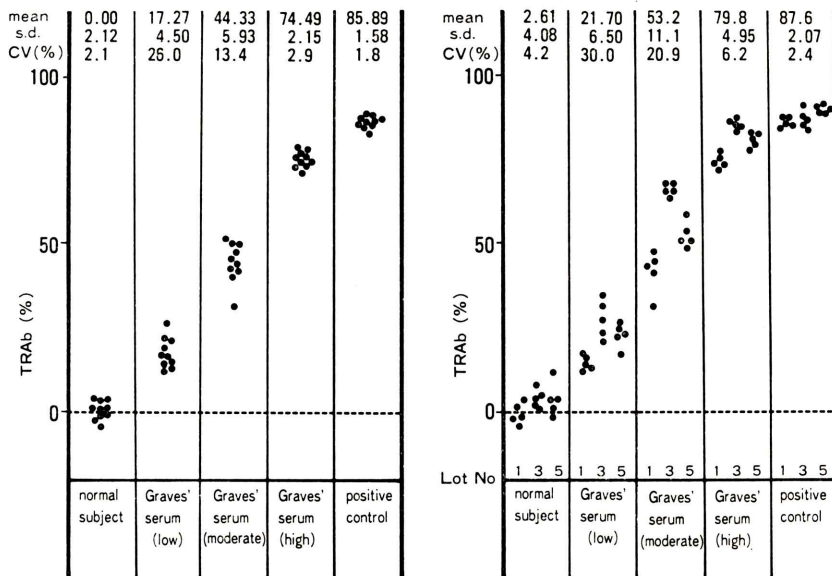


Fig. 1 Intra- and interassay variabilities of the TRAb kit.

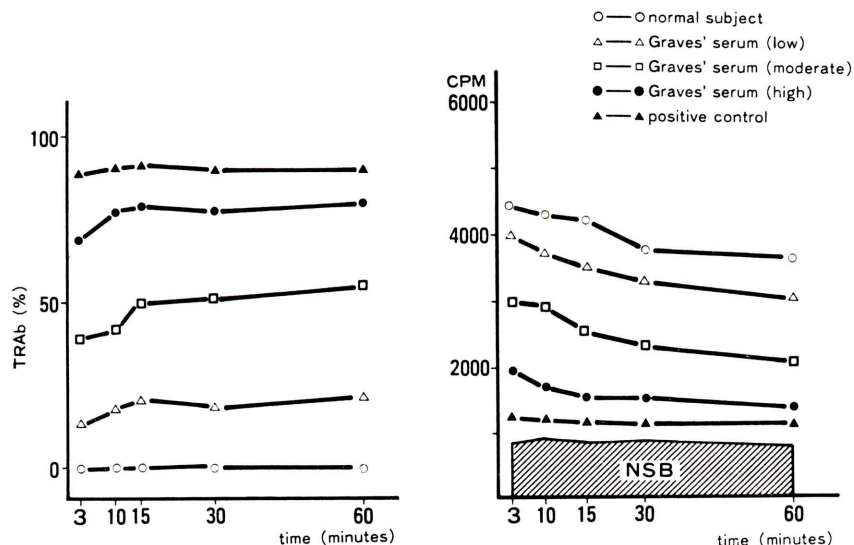


Fig. 2 Effects of the first incubation time on the TRAb assay.

測定成績の変動を示す。アッセイ内では5試料の10重測定成績に全く重なり合いを認めず、良好な分離を示した。ことに健常人および高濃度試料では良好な一致がみられたが、低および中濃度でのC.V.値は26.0および13.4%とやや高値を示した。K01, K03, K05の3ロット間の検討では、全

試料を通じてK03が高く、K01が低く、K05はその中間とロット間に測定値が若干変動した。試料ごとの分離はしかしなお良く保たれ、C.V.値は2.4から30.0%に分布した。

2) 第1インキュベーション条件の検討
本法では2段階インキュベーションが行われる。

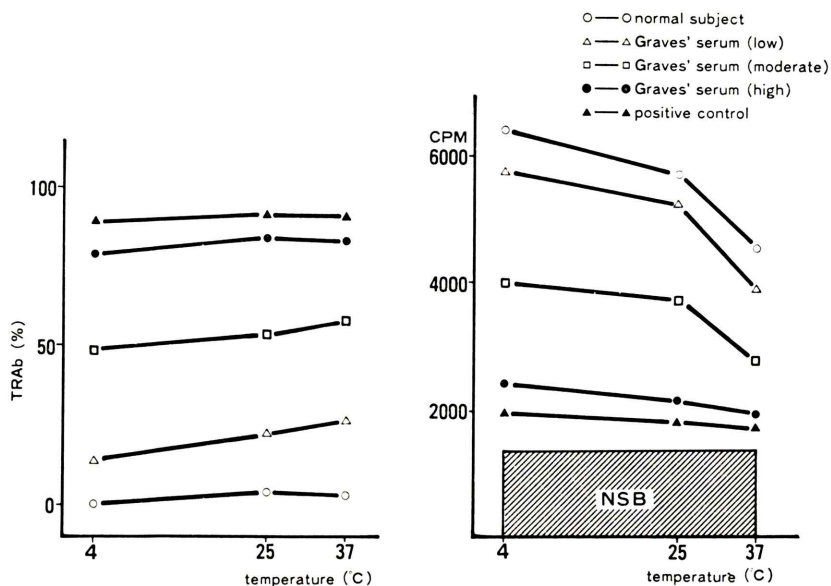


Fig. 3 Effects of the first incubation temperature on the TRAb assay.

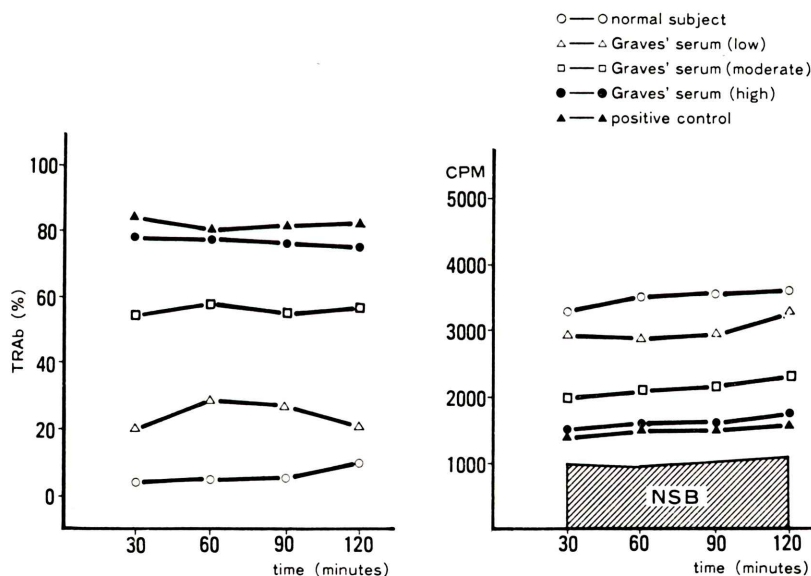


Fig. 4 Effects of the second incubation time on the TRAb assay.

第1反応では可溶性受容体と患者血清を室温でインキュベートし、次いで ^{125}I -TSHを添加して37°Cでインキュベートする。第1インキュベーションの条件をまず検討した。

Figure 2 に示すごとく、低および中濃度試料の

TRAb は時間が3~10分と短い場合に低値を示し、15分以降安定した。結合カウント数は時間とともに減少傾向を示し、規定の15分が好適と判断された。

温度については Fig. 3 に示すごとく、高温の

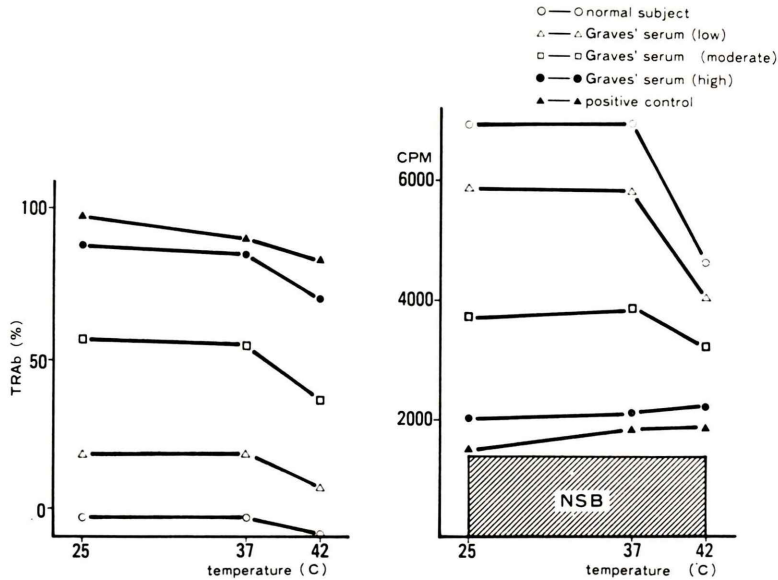


Fig. 5 Effects of the second incubation temperature on the TRAb assay.

方が TRAb の分離能に優れたが、一方、カウント数は 37°C で著減した。規定の 25°C (室温) が最適と考えられた。

3) 第 2 インキュベーション条件の検討

Figure 4 に示すごとく、30, 60, 90, 120 分の比較において、TRAb%には一定の傾向を認めなかったが、カウント数は時間とともに若干上昇した。ただし、NSB にも上昇傾向がみられ、規定の 60 分が好適と判断された。

Figure 5 に示すごとく、42°C の高温では TRAb, カウントともに下降した。25°C と 37°C には著差はなかったが、陽性コントロールと NSB の分離性から規定の 37°C が妥当と考えられた。

4) 陰性コントロールおよび健常人血清の検討

連続 20 回の TRAb 測定に際して、陰性コントロール存在下での ^{125}I -TSH のレセプターへの特異結合率 ((全結合カウント-NSB/トータルカウント)×100) は、12.9 から 27.8% と測定ごとに変動がみられ平均 21.77 ± 4.07 (s.d.) % であった。一方、レセプターに 1% ルブロールを代用して得た NSB は 5.1 から 12.8% 平均 8.94 ± 1.85 (s.d.) % を示した。

同一測定内で健常人血清 20 試料を使用した場

合には、結合率は 16.32 ± 0.68 (s.d.) %, NSB も 9.025 ± 0.70 (s.d.) % と異なった試料にもかかわらずきわめて良好な一致を示した。

以上の成績から測定法としては規定どおり施行して差支えないと結論され、以後の臨床的検討には第 1 反応室温 15 分、第 2 反応 37°C、60 分とし、PEG による分離を行った。

b. 臨床的検討成績

1) 正常範囲

健常人 50 例について TRAb を測定した。Fig. 6 に示すごとく、-8.1% から 13.5% の狭い範囲に分布し、平均 0.05 ± 4.71 (s.d.) %, 2 s.d. をとって -9.37 ~ 9.47% となり、正常範囲を 10% 以下と決定した。

2) 各種甲状腺疾患患者の測定成績

未治療バセドウ病 57 例 (全て活動性) は、おおむね高値域に分布し、10% 以下を示したものは 3 例 (5.3%) であった。陰性例のうち 1 例は抗 TSH 抗体例であり⁵⁾、これを除外すると 56 例中 54 例 (96.4%) が TRAb 陽性であった (平均 46.12 ± 22.90 (s.d.)%)。

バセドウ病再発例 25 例では、5 例が陰性で陽性率は 80.0%, 平均 35.25 ± 24.90 (s.d.) % であった。

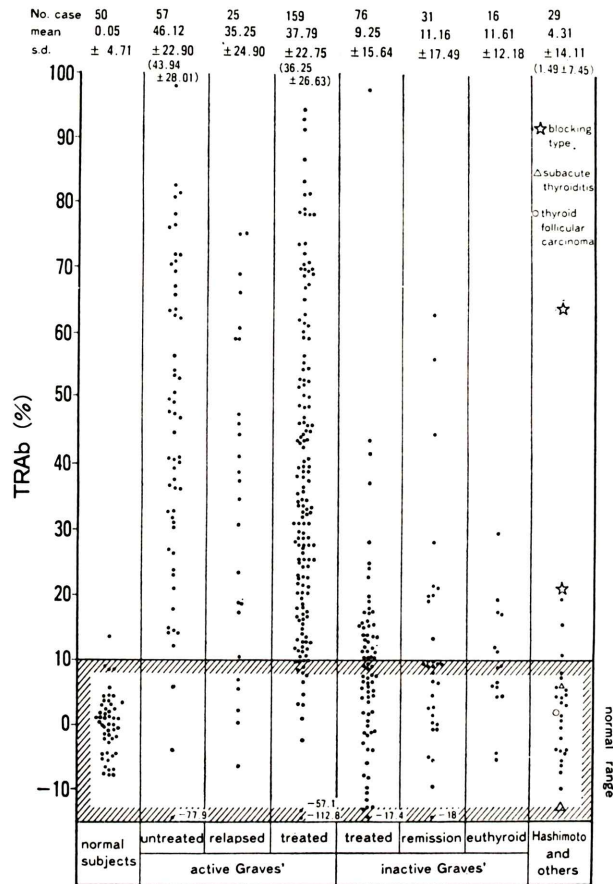


Fig. 6 Assay results of TRAb in normal subjects and patients with various thyroid disorders.

治療中でお活動性のバセドウ病 159 例では、143 例が陽性 (89.9%)。陰性例中 2 例の TSH 抗体例を除くと陽性率は 91.1%，平均 37.79 ± 22.75 (s.d.) % であった。

非活動性バセドウ病としては、抗甲状腺剤 1 日 2 錠以下の維持量で正常機能に保たれている 76 例では、34 例が 10% 以下で陽性率は 55.3%，平均 9.25 ± 15.64 (s.d.) % であった。1 例に 97.5% の異常高値例があったが、これは ^{131}I 療法 3 か月後の症例で、この後急速に機能低下に陥った。

3 か月間以上服薬を要さず寛解と判定された 31 例では、22 例が陰性で陽性率は 29.0% であった。20% を越す TRAb を示した 6 例のうち 3 例は ^{131}I 療法後、2 例は部分切除後であり、残る 1 例

は抗甲状腺剤投与中に急速に甲状腺腫の縮小と機能低下の持続をきたした症例で、検討によりこの TRAb は blocking type⁶⁾であることを認めている。

いわゆる euthyroid Graves' 16 例では、9 例が陰性で陽性率は 43.8%，平均 11.61 ± 12.18 (s.d.) % であった。陽性例は低活性のものが多いが、43.8% を示した例も含まれていた。

他の甲状腺疾患患者としては、blocking type TRAb による機能低下症⁶⁾ 1 例において経時的に 2 度の測定でともに陽性の値がみられたが、橋本病ないし原発性甲状腺機能低下症 24 例中 21 例に陰性。亜急性甲状腺炎 2 例および軽い中毒症状を呈した甲状腺濾胞腺癌の 1 例は陰性であった。

Table 1 Statistical comparisons of TRAb among normal subjects and patients with various thyroid disorders

		normal subjects	active Graves'			inactive Graves'			other diseases
			untreated	relapsed	treated	treated	remission	euthyroid	
normal subjects									n. s.
active Graves'	untreated		n. s.		—	—	—	—	—
	relapsed			—	—	—	—	—	—
	treated					—	—	—	—
inactive Graves'	treated					n. s.	n. s.	—	—
	remission						n. s.	—	—
	euthyroid							—	—
other diseases									

: p<0.01 — : not tested
 : p<0.05 n. s. : not significant

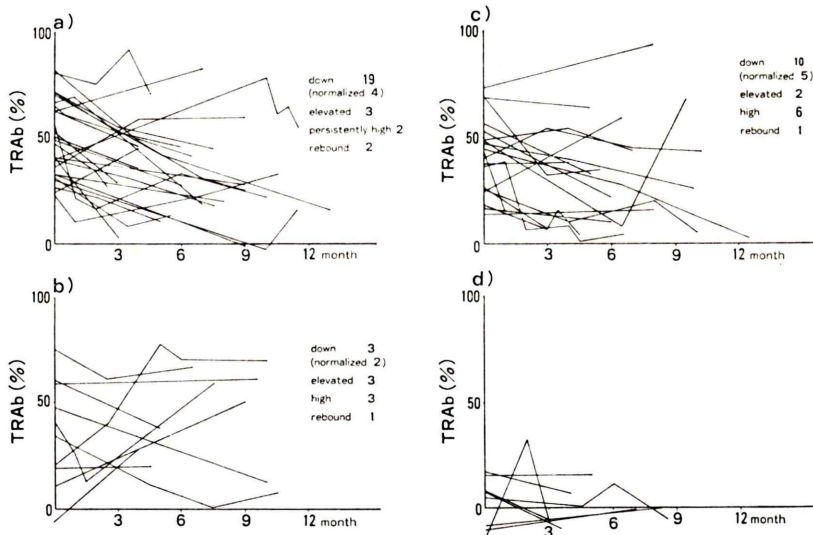


Fig. 7 Alterations of TRAb before and after antithyroid drug treatment in patients with Graves' disease.
 a) untreated active Graves'
 b) relapsed cases
 c) treated but still active Graves'
 d) treated and inactive Graves'

blocking type の例を除いた 27 例の平均は 1.49 ± 7.45 (s.d.)% であった。

Table 1 は各群の有意差検定結果を示す。健康

人群は他疾患群とは有意差なかったが、非活動型の各群を含めてバセドウ病の全群と有意差 (1% レベル) を示した。一方、未治療バセドウ病群は、

再発群とは有意差はなかったが、治療中の活動性群とは5%レベルで有意差を示した。さらに、治療中の活動性群と正常機能群の間には1%レベルで有意差がみられた。正常機能群と寛解群, euthyroid Graves' 群の間にはいずれも有意差はみられなかった。

3) バセドウ病患者における TRAb の経時的変動

Figure 7 a に示すごとく、未治療群では抗甲状腺剤療法後下降傾向が一般にみうけられ、6か月後には著減を示すものが26例中19例(73.1%)であった。さらに4例では陰性化がみられた。一方、2例は持続的に高値を示し、3例は治療開始後に上昇した。また、2例ではいったん下降後再上昇した。

Figure 7 b の再発群では、経過中下降を示したものは10例中3例(30.0%)と少なく、上昇または高値持続例が3例と多く、1例は再上昇した。未治療群に比して下降傾向に乏しかった。

治療中活動性群 (Fig. 7 c) 19例では、10例(52.6%)が下降し、うち6例に陰性化を認めた。一方、高値持続例も6例と高率であった。1例には再上昇がみられた。

治療中正常機能群 (Fig. 7 d) は、陰性ないし低値で持続したが、一部に一過性上昇もみられた。

寛解群および euthyroid Graves' 群の TRAb 陽性例では2か月以上の観察期間を通じ陽性範囲での変動がみられ、陰性例は陰性にて推移した。

IV. 考 察

TRAb の測定はラジオレセプターアッセイの応用であり、TSH 受容体の均一性安定性を保つことが困難のためルーチン化が遅れていた。このキットはブタ甲状腺細胞膜成分を可溶化して凍結乾燥したものをを用いるが、今回の検討成績にも明らかとなごとく、ロット間や保存期間などで若干の結合性の変動はみられるが、臨床応用上大きな支障はなく、アッセイ内での安定性に優れ、十分ルーチン使用に耐えるものと判断された。

レセプターは再溶解後の温度、時間により急速

に失活して行く。第1反応を室温15分で、第2反応を37°C、60分で行うことにより、結合率を保ち、分離能に優れるアッセイが可能であった。溶解後氷冷保存は良いアッセイのため不可欠の条件であると思われる。

本キットの臨床応用に際しては二つの優れた特徴がみられた。一つは正常範囲が狭いことであり、今一つは未治療バセドウ病の TRAb 検出率がきわめて高いことである。健康人50例の測定値は狭い範囲に分布し、これは高 γ グロブリン血症をしばしば伴う橋本病や原発性甲状腺機能低下症患者の分布と有意差を示さず、バセドウ病における TRAb 検出成績の高率が false positive によらないことをうかがわせる。

著者ら^{6,7)}は先に TRAb と未治療バセドウ病患者の甲状腺摂取率、組織学的濾胞上皮の増殖度および甲状腺腫の大きさに相関関係のあることを報告したが、TRAb がこのように高率に検出されることは診断上の意義の大きさとともに、TRAb の甲状腺刺激性による病像との関連上注目し値する所見である。バセドウ病における今一つの臨床的に重要な事項は寛解である。本シリーズでは抗甲状腺剤で寛解中の症例はほとんど全て TRAb 陰性であり、TRAb の消失が寛解のためにきわめて重要と考えられる。ただし、寛解例の中に陽性例があり、これらは¹³¹I または部分切除後の例および blocking type 例⁹⁾であったことから、バセドウ病寛解の一つの型として、甲状腺濾胞の減少によるものが考えられる。先に Mukhtar ら⁹⁾は、TRAb が部分切除例で陰性化率が高いと述べているが、反応する甲状腺が量的に少なければ TRAb 存在下でも臨床的寛解が得られうると考えるのが妥当であろう。この考えは euthyroid Graves' 群にみられる陽性例にも該当し、これらではおそらく甲状腺濾胞が質的にまたは量的に減少していることが想像される。一部には組織学的に橋本病の退行変性を確認することも少なくない。

治療経過および寛解の判定のうえからは TRAb の経時的変動の観察が有用である。McGregor ら⁹⁾は治療開始後6か月の時点で TRAb と HLA

を検索し、TRAb陽性またはHLA DR 3を伴うものでは他療法に変更すべきと述べている。本シリーズの検討でも未治療例の大半に抗甲状腺投与後著明なTRAbの下降が確認されたが、6か月の時点ではなお正常化を示すものは乏しかった。これは測定法の感度の改良によるものと思われるが、一方、本邦のバセドウ病の寛解率の低さとも無関係ではないと思われる。この成績と臨床的経験から著者らは治療1年後での陰性化を薬物療法の予後の指標として良いと考える。

バセドウ病再発例は難治例が多いが、今シリーズにおいて、再発例は再発時には未治療例よりやや低い分布を示した。しかし、治療後高値で持続するものや上昇を示すものの率が高く、TRAbの面からも難治性がうかがわれた。Aminoら¹⁰⁾は、再発例において甲状腺機能亢進がTRAbの出現に先行しうることを報告しているが、今シリーズの1例ではTRAbの上昇に遅れて機能亢進を示したものがあつた。TRAbが再発に原因のか、その結果かの決定にはなお検討を要する。しかし、今シリーズでも再発時からTRAbが上昇するものが少なくなつたことは、再発例は症状に敏感で早く医家を訪れるので、検査の時点ではなお症状が進展中である可能性、さらには血中にTRAbが出現する以前にすでに甲状腺内のリンパ球が刺激に十分なTRAbを産生しており、これが血中で測定されるのにズレがあることなども考えられよう。

TRAbの全てが甲状腺刺激性を有するのではなく、一部にはblocking type TRAbによる甲状腺機能低下症がみられることは周知のごとくである⁶⁾。TRAbの測定にはこの面でも有用である。なお、今シリーズ中のblocking type TRAbの1例では6か月後に著明なTRAbの減少を認め、甲状腺の機能回復もうかがわれた。TRAbによる機能低下症の自然寛解の可能性を示唆する興味深い知見と考える。

TRAb測定上の今一つの問題点は、まれではあるがバセドウ病活動期に抗TSH抗体が産生されることである⁵⁾。抗体が高親和性を示す場合には

PEGによる沈澱中の¹²⁵I活性が健常人血清や陰性コントロールによる最大結合カウントをはるかに上廻ることで容易に判断される。著者ら¹¹⁾は、TRAb測定に際し個々の試料ごとにNSBを測定したが、やはりバセドウ病活動期にNSB (TRAb測定上) 上昇例が20%くらいにみられ、これらのうちにはTSHやヨード化TSHによってその結合が阻害される抗体様の性状を呈するものが少なくなかつた。厳密にはTRAb測定時に個々のNSBを測定することが望ましいと考える。

V. 結 語

R.S.R.社製TRAbキットを検討し以下の結論を得た。

- 1) アッセイ内変動は小さく、若干のロット間変動はみられたが、臨床応用に支障ない。
- 2) 測定条件としては、規定の第1反応25°C、15分、第2反応37°C、60分が好適である。
- 3) 正常範囲は10%以下である。
- 4) 未治療バセドウ病でのTRAb検出率は94.7%と高率であつた。
- 5) 抗甲状腺剤療法によりTRAbは減少傾向が明らかであつた。
- 6) 抗甲状腺剤療法1年後の時点でのTRAb陰性化が治療効果の判定に有用であり、この時点での高値例は他療法への変更を考えるべきと考えられた。
- 7) 寛解の判定にはT₃抑制試験が必要であるが、TRAb陰性化例を対象とすることが、無用な被曝を避けるうえからも有用と考えられた。
- 8) ¹³¹Iまたは部分切除後の寛解例やeuthyroid Graves'にはTRAb陽性例が散見された。
- 9) blocking type TRAbの検出にも本キットは有用であつた。
- 10) より厳密なTRAb測定には個々の試料についてNSBの測定が必要と考えられた。

本キットは臨床応用上きわめて有用であり、バセドウ病の診断、治療経過の観察および寛解の判定に他では得られない有効な情報をもたらさうるものであり、一般ルーチン検査としての普及がき

わめて望ましいと考えられた。

ご指導, ご校閲を賜った井村裕夫教授, キットを提供下さった日本トラベノール社に感謝します。

文 献

- 1) 井村裕夫, 森 徹, 葛谷英嗣: レセプター抗体による疾患, 免疫科学第10巻免疫と病気II, 山村, 岸本, ガッド編, 南江堂, 1983, p. 131
- 2) 森 徹: パセドウ病診断のポイント. ドクターサロン **28**: 337, 1984
- 3) 森 徹: パセドウ病, 進む抗受容体抗体の研究. モダンメディスン **84**: 51, 1984
- 4) 日本トラベノール社. 臨床治験計画書 TRAK
- 5) Akamizu T, Ishii H, Mori T, et al: Abnormal thyrotropin-binding immunoglobulins in two patients with Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab* **59**: 240, 1984
- 6) 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
- 7) 赤水尚史, 尾藤早苗, 石原 隆, 他: TBI 測定キットの基礎的ならびに臨床的検討. ホルモンと臨床 **32**: 195, 1984
- 8) Mukhtar ED, Smith BR, Ryle GA, et al: Relation of thyroid-stimulating immunoglobulins to thyroid function and effects of surgery, radioiodine and antithyroid drugs. *Lancet* **1**: 713, 1975
- 9) McGregor AM, Smith BR, Hall R, et al: Prediction of relapse in hyperthyroid Graves' disease. *Lancet* **1**: 1101, 1980
- 10) Amino N, Mori H, Iwatani H, et al: Delayed increase of circulating thyrotropin-receptor antibodies at postpartum recurrence of hyperthyroidism in Graves' disease. *Proc 65th American Endocr Soc Meeting*, 1983, p. 87
- 11) Mori T, Akamizu T, Ishii H, et al: Incidence and properties of labeled TSH binding globulin (L TBG). *Proc 7th Internat' 1 Congress Endocrinol. Quebec*, 1984, p. 1087