

《ノート》

直接法による抗甲状腺抗体測定キットの基礎的、臨床的検討

—II. サイログロブリン抗体—

Basic and Clinical Studies on the Direct Assay Kit
for Serum Anti-Thyroid Autoantibody

—II. Thyroglobulin Antibody—

中嶋 良行* 梶田 芳弘* 長宗 輝彦** 石田 正夫*
藤田 洋一* 八谷 孝** 中川 雅夫** 越智 幸男***

Yoshiyuki NAKAJIMA*, Yoshihiro KAJITA*, Teruhiko NAGAMUNE**,
Masao ISHIDA*, Yoichi FUJITA*, Takashi HACHIYA**,
Masao NAKAGAWA** and Yukio OCHI***

*Department of Internal Medicine, Nantan General Hospital

**Second Department of Internal Medicine, Kyoto Prefectural University of Medicine

***Central Clinical Laboratory, Shiga University of Medical Science

I. はじめに

サイログロブリン (TG) は甲状腺で合成され、その分子中に約10%の糖成分を有する可溶性糖蛋白質で、分子量は約67万、沈降係数は19Sとされている。分子中にヨード化アミノ酸を含み、甲状腺ホルモンの合成、貯蔵および放出にきわめて重要な役割を果たしている。このTGに対する自己抗体は、Roittら¹⁾により橋本病患者の血清中に認められ、以後実験的甲状腺炎の発生に抗TG抗体の関与が報告され²⁾、本抗体は自己免疫性甲状腺疾患の代表的な自己抗体である。

抗TG抗体の測定法としては、寒天板内沈降反

応³⁾、ラジオイムノアッセイ⁴⁾、赤血球凝集反応 (TGHA)⁵⁾、蛍光抗体法⁶⁾、酵素免疫測定法⁷⁾等が開発されているが、日常臨床ではタンニン酸処理血球凝集反応を利用したTGHAキットが一般的に使用されているのが現状である。

今回われわれはRSR社で開発された標識TGを用いるTG抗体測定キットを治験する機会を得たので、その基礎的および臨床的検討ならびに従来からのTGHAキットと比較し、その有用性を検討した。

II. 方法および対象

1. 測定原理

ヒト甲状腺組織より抽出し、高度に精製した標識TGを用い、希釈患者血清と反応後プロテインA懸濁液を加え、遠心により標識抗原-患者抗体複合物を沈降せしめる。同時に抗体価既知の標準血清も測定し、得られた標準曲線より抗体価を求める。

Key words: Direct method, Thyroid, Thyroglobulin, Antibody.

* 南丹病院内科

** 京都府立医科大学第二内科

*** 滋賀医科大学検査部

受付：元年4月17日

最終稿受付：元年6月29日

別刷請求先：京都府船井郡八木町大字八木小字上野 25
(☎ 629-01)

南丹病院内科

梶田 芳弘

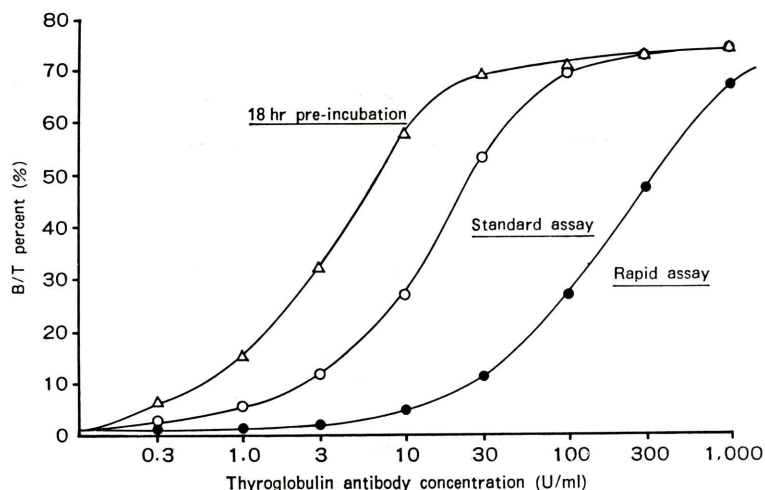


Fig. 1 Effect of incubation time on standard curve of direct thyroglobulin antibody assay kit.

2. 測定方法

操作はすべて室温にて行った。患者血清はキットに付属する緩衝液で20倍に希釈して用いた。測定法の概略は次のとおりである。

1) 標準血清(調整済みで希釈の必要はない)あるいは希釈患者血清 50 μ l をおのおのプラスチック試験管に入れる。

2) 標準法では 125 I-TG を 50 μ l ずつ加え振とう混和し、1 時間インキュベートする(第一インキュベーション)。振とう混和をせずインキュベート時間なしで次のステップに進む方法も行った(迅速法)。

3) プロテイン A 懸濁液 50 μ l を各試験管に加え、標準法では混和後 1 時間インキュベートする(第二インキュベーション)。迅速法はプロテイン A 懸濁液を加え混和後 30 分インキュベートする。

4) 希釈緩衝液 1 ml を各試験管に加え混和後 4°C, 30 分, 1,500 \times g で遠心する。

5) 各試験管の上清を吸引後、沈殿物の放射能を測定する。同時に全カウントの放射能も求める。

6) 各試験管の B/T% を求め、近似曲線により作成した標準曲線により患者血清の TG 抗体濃度を求める。

3. TG の影響

上述の標準法の測定系において 1,000 U/ml の標準血清および TG 抗体濃度高値の患者血清に種類の濃度の非標識の TG を同時に加え、測定値に与える影響を検討した。ヒト TG は既報⁸⁾のごとく精製した。

4. 他の甲状腺機能検査

マイクロゾーム抗体の測定は RSR 社の直接法⁸⁾で TGHA, MCHA は富士レビオ社のセロディア ATG, AMC を用いて測定した。

5. 対象

われわれの施設の甲状腺外来で診療を行っている Graves 病 33 例、橋本病 40 例、甲状腺癌 10 例、無痛性甲状腺炎 10 例、亜急性甲状腺炎 9 例を対象とした。正常成人は甲状腺腫を触知せず甲状腺機能正常で抗甲状腺抗体陰性の、われわれの施設の職員の善意血清 40 例(男性 20 例、女性 20 例)を対象とした。

III. 結 果

1. 測定方法の検討

血中 TG 抗体濃度測定に要する時間の検討を行った。なお、本キットで用いられた濃度単位(U/ml)は MRC の抗サイログロブリン抗体標準血清

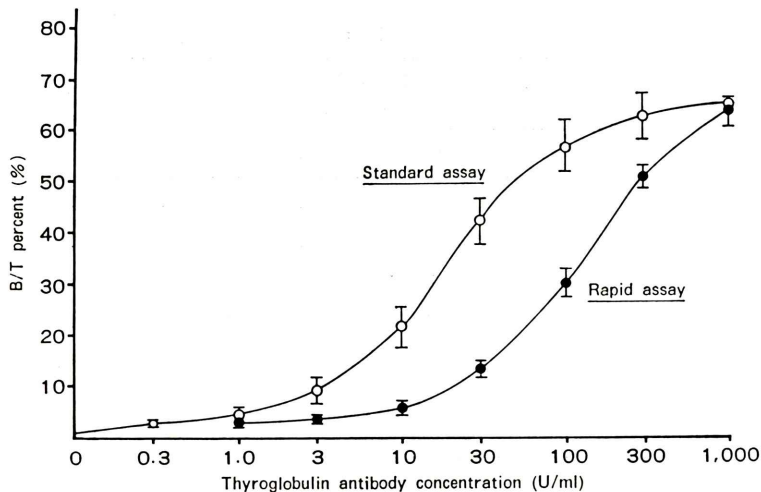


Fig. 2 Standard curve of direct thyroglobulin antibody assay kit.

Table 1 Intraassay and interassay reproducibility of direct thyroglobulin antibody assay

(1) Intraassay variation (n=10)

	Mean (U/ml)	SD	CV (%)
I	3.3	0.13	3.9
II	69.8	4.21	6.0
III	543.5	18.5	3.4

(2) Interassay variation (n=10)

	Mean (U/ml)	SD	CV (%)
I	3.6	0.31	8.6
II	52.0	1.64	3.2
III	532.0	16.6	3.1

から算出されたものである⁹⁾。Fig. 1のごとく標準曲線に及ぼすインキュベーション時間の影響をみた。標準法と迅速法さらに第一インキュベーション時間を18時間とする方法を検討した。0~30 U/mlの測定には第一インキュベーション時間が18時間とする方法が最適であり、100 U/mlまでの測定するには標準法が適当で、1,000 U/mlまでの測定には迅速法が適当であった。第一インキュベーション時間が長時間になるにしたがい低濃度域の感度の向上と中高濃度域の標準曲線の平行化が認められた。以上より0~30 U/mlは第一インキュベーション時間が18時間とする方法が望ましいが、実用性からはスクリーニング法として0~100 U/mlの範囲は標準

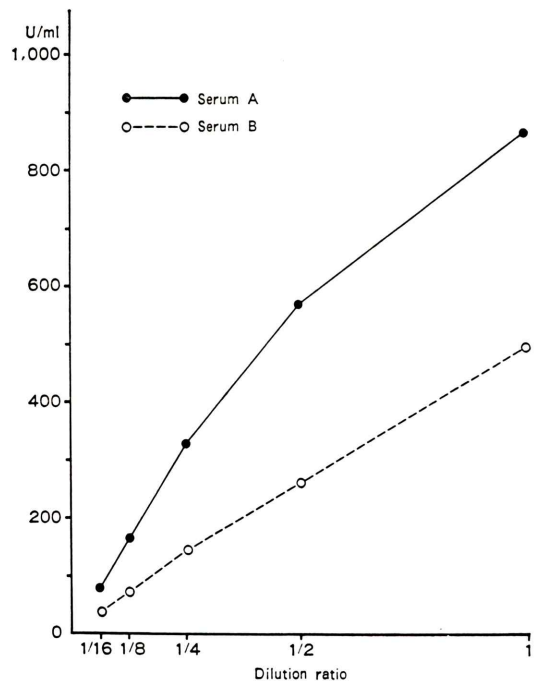
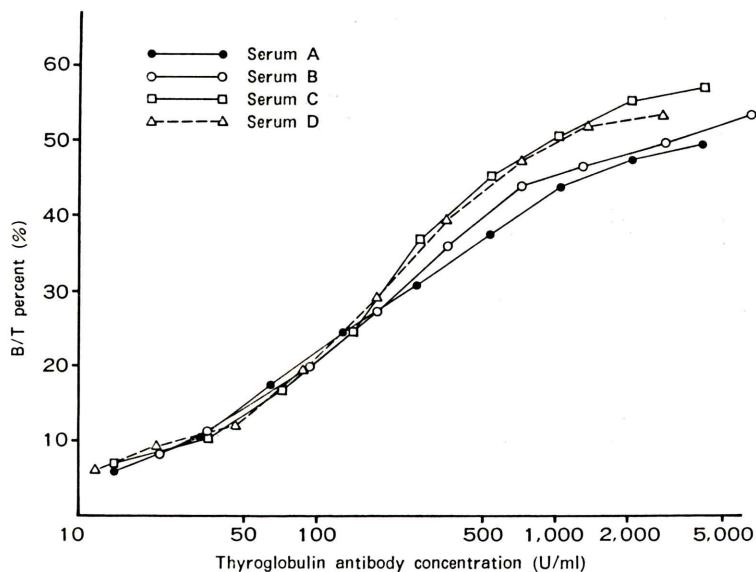


Fig. 3 Effect of dilution with buffer on the measurement of serum thyroglobulin antibody.

法、100~1,000 U/mlは迅速法を用いるのが妥当と考えられた。今回の検討では最初に標準法で測定した後、100 U/ml以上は迅速法で再測定を行

Table 2 Recovery of thyroglobulin antibody added to serum sample measured by direct thyroglobulin antibody assay kit

Original Added (U/ml)	Sample A (45.4 U/ml)		Sample B (121.2 U/ml)		Sample C (590.4 U/ml)		Mean recovery (%)
	expected	measured	expected	measured	expected	measured	
0	22.7	23.6	60.6	60.4	295.2	318.6	103.9
10	27.7	26.9	65.6	66.8	300.2	327.6	102.7
30	37.7	34.8	75.6	75.6	310.2	343.3	101.0
100	72.7	69.8	110.6	110.4	345.2	379.1	101.9
300	172.7	176.0	210.6	255.6	445.2	511.8	112.8
Mean recovery (%)	98.3		104.5		110.5		104.4

**Fig. 4** Dilution of sera containing high concentration of thyroglobulin antibody.

い実験成績とした。また基礎的検討において 100 U/ml 以上は迅速法にて測定した。

2. 血中 TG 抗体濃度測定の感度、精度の検討

異なる10ロットのキットで得られた標準曲線の mean±SD を Fig. 2 に示すが、標準法、迅速法ともに再現性は良好であった。表には示さないが、90~110 U/ml の範囲の10血清を標準法と迅速法にておのおの測定すると、迅速法が若干高値を示す傾向があるが、相関係数 0.899, $y=0.83x+25.2$ と

ほぼ近似の値を得た。濃度の異なる血清を同一ロット内 (10 回) および異なるロット (10 回) を用い測定を行った。変動係数 (CV) はおのおの 3.4~6.0%, 3.1~8.6% と良好な結果を得た (Table 1)。

血中 TG 抗体濃度の異なる 2 種類の血清をキットの緩衝液で希釈して得た希釈曲線は、零点に向かうほぼ直線となった (Fig. 3)。回収率も 98.3~110.5%, 平均回収率 104.4% と良好な結果を得た (Table 2)。

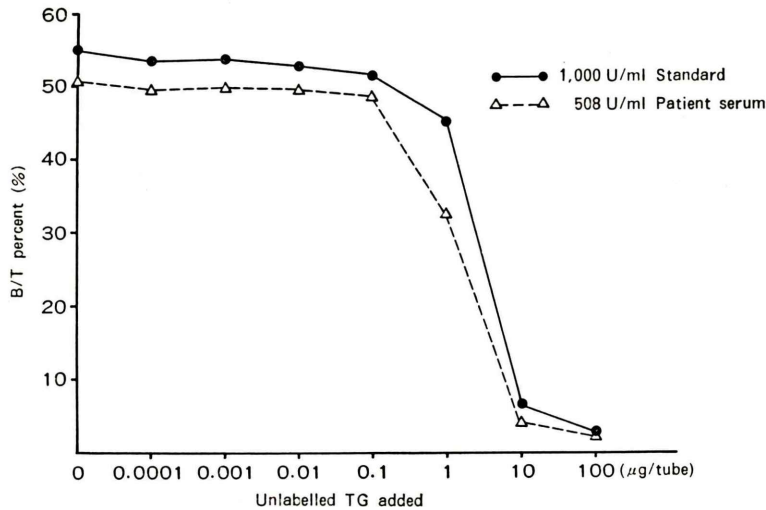


Fig. 5 Effect of unlabeled thyroglobulin on radioimmunoassay.

3. フック現象の検討

TG 抗体濃度の高い4血清を、緩衝液で倍数希釈後 TG 抗体濃度を測定した。高濃度域 (3,000 U/ml まで) でも結合率の低下は認められなかった。1,000 U/ml 以上の血清も適当な希釈後測定することが可能であった (Fig. 4)。一方、標準法ではフック現象が認められた。

4. TG の影響

Figure 5 に示すごとく、1,000 U/ml の標準血清および TG 抗体濃度高値の患者血清に標識の TG を加えると、1 μg で初めて結合%の抑制が認められた。本キットで TG 抗体の測定は20倍希釈血清を用いることから血中に存在する TG の影響は無視できるものと考えられた。

5. 正常成人および各種甲状腺疾患の血中 TG 抗体濃度

標準法での正常成人の測定では標準曲線の0濃度の結合%以下の値を取る例があり、平均値と標準偏差を求めるため、この場合は全て測定し得た最小検出感度の0.05として計算した。最小検出感度はキットの最低標準濃度の0.3 U/mlを0 U/mlの標準液で希釈して、0 U/mlの結合%との間に有意差を認める最小濃度より求めた。正常成人の血中 TG 抗体濃度は、 0.32 ± 0.29 U/ml (mean \pm

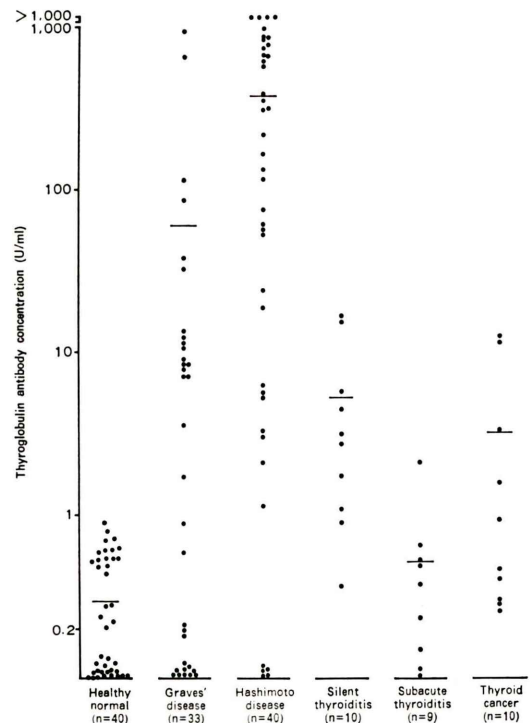


Fig. 6 Serum thyroglobulin antibody concentration in normal healthy subjects and patients with various thyroid diseases measured by direct assay kit.

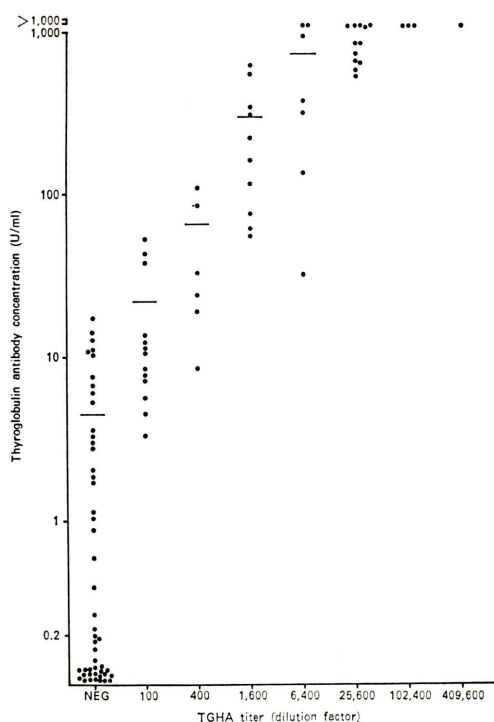


Fig. 7 Correlation between direct thyroglobulin antibody concentrations and TGHA titers.

SD) で、男性 0.19 ± 0.19 U/ml、女性 0.44 ± 0.31 U/ml で女性が少し高値を示した。全体としての正常範囲は $\text{mean} \pm 2 \text{SD}$ より求めた 0.90 U/ml 以下とした。Graves 病、橋本病では低値を示すものから高値を示すものまであり、橋本病では 1,000 U/ml 以上の症例が認められた。その他の甲状腺疾患では正常域のものから 10 U/ml 前後の値まで認められた (Fig. 6)。

6. TGHA との比較検討

甲状腺疾患で TGHA 陰性から 409,600 倍までの陽性患者の TG 抗体濃度を測定し比較検討した (Fig. 7)。各 TGHA 値とその TG 抗体濃度の平均値は正の相関関係にあったが、TGHA 6,400 倍ではスケールアウトする例も認められ、102,400 以上では全例スケールアウトした。また、TGHA 陰性でも直接法による本キットでの測定では、TG 抗体が検出される症例がかなり認められた。

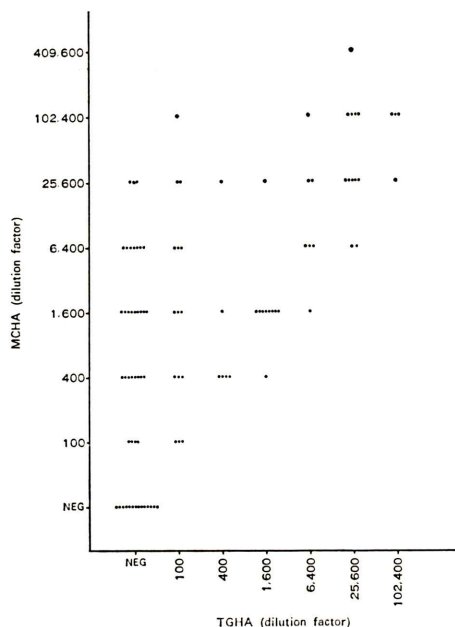


Fig. 8 Correlations between TGHA and MCHA titers.

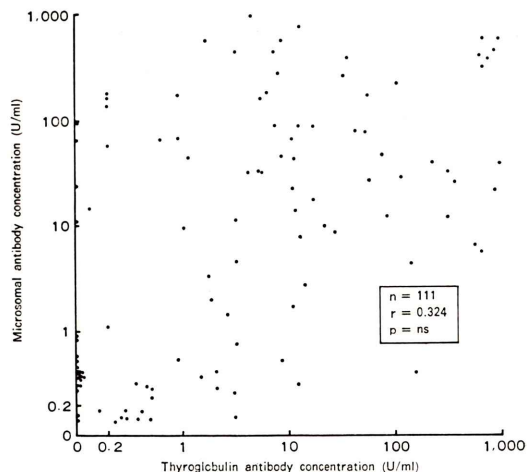


Fig. 9 Correlation between thyroglobulin and microsomal antibody concentrations measured by direct assay kit.

7. MCHA マイクロゾーム抗体 (直接法) との比較検討

TGHA と MCHA の比較を Fig. 8 に示すが、TGHA 陽性では全て MCHA 陽性であった。

TGHA 陰性あるいは低値でも MCHA が高値を示す症例が少なくなかった。しかし、逆に TGHA が高値で MCHA が低値を示す症例はほとんど認められなかった。直接法による TG 抗体とマイクロゾーム抗体との比較を Fig. 9 に示すが、両者ともスケールアウトする症例を除いた場合、相関係数 0.324 と低値で、有意な相関関係は得られなかった。

IV. 考 察

現在血中 TG 抗体濃度の測定は、赤血球凝集反応 (TGHA) を利用して間接的に測定されているが、本キットは ^{125}I 標識 TG と患者抗体との直接的反応を用い、濃度単位により得られる標準曲線より患者の血中 TG 抗体濃度を定量的に求めることが可能である⁹⁾。TGHA においては静置時間が短いと血球の落ち具合が悪く、陰性像のパターンが弱陽性凝集パターンと紛らわしい場合や、凝集像の判定に検者の主観が加わる問題がある¹⁰⁾。また測定時間に関しても、迅速法で約 1 時間、標準法で約 3 時間で終了し、再現性も良好で従来の TGHA に比し操作が簡便である。TGHA 陰性の血清でもかなりの症例に正常値以上の TG 抗体が検出された。このことは TGHA では感度面より測定されない微量の抗体存在とか、あるいは抗体が存在しても血中の TG と免疫複合体を形成し、TGHA では検出されない可能性も考えられるが、本キットは、このような症例でも TG 抗体検出可能な高感度を有している。さらに本キットの特徴はプロテイン A を用いる点である。免疫複合体の分離に PEG を用いる方法はすでに報告されているが¹¹⁾、この場合は非特異的結合が多くまた PEG 濃度の点で問題がある。TGHA 6,400 倍以上ではスケールアウトする症例も認められたが、フック現象も認められず希釈曲線も良好なことより、高濃度の血清も緩衝液で適当な希釈により値を求めることが可能である。本キットにて正常成人の正常値は 0.90 U/ml 以下であり、正常値は女性が若干高値を示した。TGHA と MCHA の比較については従来の報告どおりであった¹²⁾。このことは

MCHA のマイクロゾーム分画に TG が混入しているためと推定される。

今回 TG の影響を受けない直接法によるマイクロゾーム抗体との比較において、有意な相関関係が得られなかったことは、直接法によるマイクロゾーム抗体測定に、精製 ^{125}I 標識甲状腺ペルオキシダーゼが用いられているためと思われる。血中 TG 抗体が陽性で甲状腺腫もなく甲状腺機能が正常であっても、病理学的には甲状腺にリンパ球浸潤が認められる潜在性甲状腺炎の存在が報告されている¹³⁾。本キットは感度も良好で、このような潜在性自己免疫性甲状腺炎の診断に有用となる可能性があり、今後、組織像と血清の測定値との対比が必要であると思われる。

V. ま と め

直接法 TG 抗体濃度測定キットの基礎的および臨床的検討を行い次の結果を得た。

1) 本キットは短時間で測定でき、再現性、回収率は良好であった。

2) 正常成人の血中 TG 抗体濃度の $\text{mean} \pm \text{SD}$ は $0.32 \pm 0.29 \text{ U/ml}$ で 0.90 U/ml 以下が正常値と考えられた。

3) TGHA 高値血清ではスケールアウトすることもあるが、適当な希釈にて十分測定可能であった。

4) TGHA 陰性の血清でも、キットでは陽性になることがあり、感度は非常に良好であった。

5) 直接法により、マイクロゾーム抗体濃度との比較検討において、有意の相関関係は認められなかった。

稿を終えるに当たり、キットを提供くださいましたバクスター株式会社に深謝いたします。

文 献

- 1) Roitt IM, Doniach D, Campbell PN, et al: Auto-antibodies in Hashimoto's disease (Lymphadenoid goitre). *Lancet* 2: 820-821, 1956
- 2) Rose NR, Witebsky E: Studies on organ specificity. V. Changes in the thyroid glands of rabbits follow-

- ing active immunization with rabbit thyroid extracts. *J Immunol* **76**: 417-426, 1956
- 3) 樋渡恒憲, 宮地清光, 前野芳正, 他: 甲状腺細胞上清抗原を用いた二重免疫拡散法による甲状腺自己抗体の分析. *日本臨床免疫学会誌* **6**: 295-302, 1956
 - 4) Mori T, Kriss JP: Measurements by competitive binding radioassay of serum anti-microsomal and anti-thyroglobulin antibodies in Graves' disease and other thyroid disease. *J Clin Endocrinol Metab* **33**: 688-698, 1971
 - 5) Aoki N, Wakisaka G, Higashi T, et al: Clinical studies on thyroidal auto-antibodies. *Endocrinol Japon* **22**: 89-96, 1975
 - 6) Beutner EH: Fluorescent antibody technics as tools for the demonstration of human auto-antibodies to various constituents of the thyroid. In: *The thyroid* (ed by Hazard JB), Williams and Wilkins, Baltimore, 1964, p. 152
 - 7) Endo Y, Nakano J, Horinouchi K, et al: An enzyme immunoassay for the measurement of anti-thyroglobulin autoantibody in human serum. *Clin Chim Acta* **103**: 66-77, 1980
 - 8) 長宗輝彦, 梶田芳弘, 中嶋良行, 他: 直接法による抗甲状腺抗体測定キットの基礎的, 臨床検討——I. マイクロゾーム (ペルオキシダーゼ) 抗体——. *核医学* **26**: 1335-1342, 1989
 - 9) Smith BR: 私信
 - 10) 網野信行: 血中甲状腺抗体の検出法. *検査と技術* **8**: 1001-1006, 1980
 - 11) 三好正規, 平川秀三, 長谷川完, 他: Polyethylene Glycol (PEG) を用いた抗 thyroglobulin 抗体の検索. *日内分泌会誌* **53**: 1268-1278, 1977
 - 12) 桜美武彦, 栗原二郎, 加地隆彦, 他: サイロイドテストおよびマイクログロームテストによる甲状腺疾患に対する甲状腺抗体の測定と機能検査に関する検討. *日内分泌会誌* **50**: 704-710, 1974
 - 13) Yoshida H, Amino N, Yagawa K, et al: Association of serum antithyroid antibodies with lymphocytic infiltration of the thyroid gland: Studies of seventy autopsied cases. *J Clin Endocrinol Metab* **46**: 859-862, 1978