

《技術報告》

TRAb「デイド」キットを用いた甲状腺患者血中 TSH レセプター抗体価の測定

カリル アーメド* 富吉 勝美* 深沢 和浩** 井上登美夫*
村上 正己*** 小林 功**** 遠藤 啓吾*

要旨 バセドウ病は患者血中に存在する TSH レセプター抗体 (TRAb) により発症すると考えられている。TRAb 測定用キット TRAb「デイド」を用いて甲状腺疾患患者血中の TRAb 測定の基礎的、臨的検討を行った。本キットの測定原理は ^{125}I -標識 TSH の甲状腺レセプターへの結合阻害程度を検出するものである。アッセイの温度、時間は TRAb 値にはほとんど影響せず、測定の再現性も良好であった。またビリルビン、ヘモグロビン、乳ビも影響しなかった。

カットオフ値を 15% 以下とすると、55 例の健常人は全例陰性に、68 例の未治療バセドウ病患者は全例陽性であったが、治療後には陽性率が 22.4% に低下した。慢性甲状腺炎、亜急性甲状腺炎、慢性腎不全患者も TRAb はほとんど陰性であった。すでに市販されている TRAb「コスマック」により測定した TRAb ときわめてよく一致し、本キットによる血中 TRAb 値の測定は甲状腺疾患の診療に有用と考えられた。

(核医学 32: 695-701, 1995)

I. はじめに

バセドウ病の病因は古くから様々の考えが報告されてきたが、現在では患者血中の甲状腺刺激ホルモン (TSH) レセプターに対する抗体により甲状腺が刺激され発症すると考えられている¹⁻⁷。このバセドウ病患者の血中の TSH レセプター抗体は、TRAb (TSH receptor antibody)⁸⁾ あるいは TBII (TSH-binding inhibitor immunoglobulin) と呼ばれる²⁾。血中 TRAb は、通常 ^{125}I -TSH の甲状腺

receptor への結合阻害作用を指標として測定されるが、最近デイド社より新しく TRAb 測定用キット TRAb「デイド」が開発された。そこで本キットによる血中 TRAb 値測定の基礎的ならびに臨床的検討を行った。

II. 対象および方法

1. 対象 本院を受診した未治療バセドウ病患者 68 例、バセドウ病で抗甲状腺剤にて治療後に甲状腺機能正常となった患者 49 例、慢性甲状腺炎 10 例、亜急性甲状腺炎 3 例を対象とした。いずれも血中甲状腺ホルモン濃度、TSH 濃度、抗サイログロブリン抗体価、抗マイクロソーム抗体価および甲状腺 ^{123}I 摂取率の測定により診断された。さらに対照として、甲状腺機能正常の健常者 55 例および慢性腎不全で透析中の患者 29 例の合計 214 例について検討した。静脈血を採血後、血清分離し、血清をアッセイまで凍結保存

* 群馬大学医学部核医学科

** 多野総合病院

*** 群馬大学医学部第一内科

**** 同 臨床検査医学

受付：7年2月22日

最終稿受付：7年6月7日

別刷請求先：群馬県前橋市昭和町3-39-22 (〒371)

群馬大学医学部核医学科

カリル アーメド

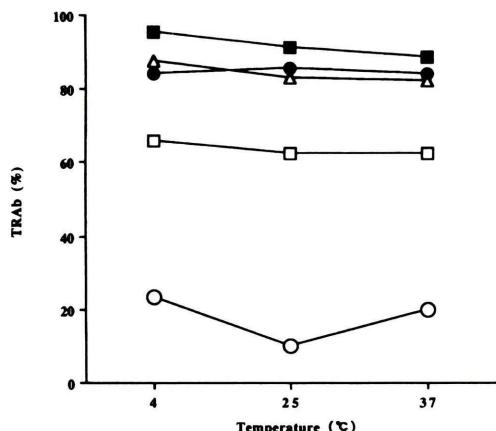


Fig. 1 Effect of temperature on TRAb measurement.

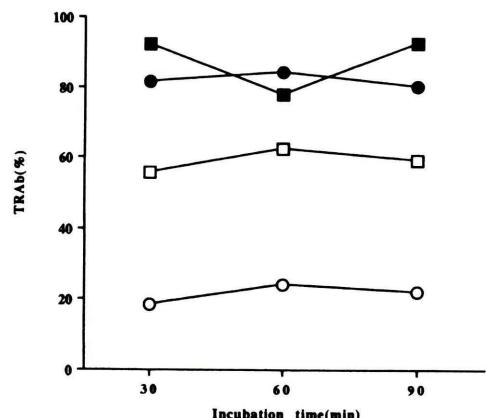


Fig. 2 Effect of incubation time on TRAb measurement.

Table 1 Reproducibility of TRAb measurement

Intraassay					Interassay				
Sample	n	Mean	S.D.	C.V.	Sample	n	Mean	S.D.	C.V.
A	8	65.7%	3.5	5.3%	A	10	87.7%	1.84	2.1%
B	8	47.4%	3.2	6.9%	B	10	46.8%	1.42	3.0%
C	8	32.2%	2.5	7.9%	C	10	20.1%	1.76	8.4%

*n=number of samples S.D.=standard deviation C.V.=coefficient of variation

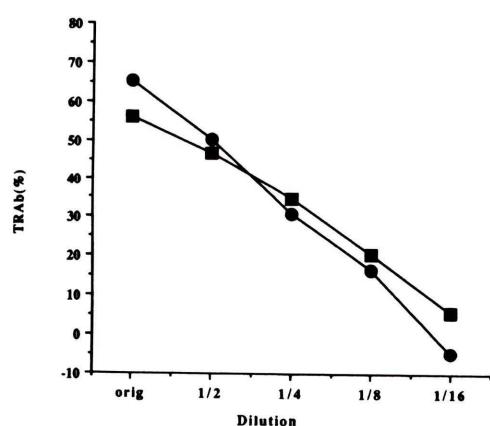


Fig. 3 Effect of dilution of serum on TRAb measurement.

した。

2. 方法 血中TRAbの測定はTRAb「デイド」キットおよび一部の検体はさらにTRAb「コスマック」キット(コスマック社, 東京)を用いて

行った。いずれも原則としてキット添付の書類の指示通りに測定した。

i) TRAbの測定方法

検体50μl(陰性コントロール, 陽性コントロールあるいは患者血清)とブタ甲状腺より得られたTSHレセプター液50μlを室温にて15分間インキュベートした。次いで¹²⁵I-標識TSH100μlを添加後37°Cにて60分間インキュベーションを行った。ポリエチレン glycolを含むB/F分離剤を加えた後, 4°Cにて遠心分離を行い, TSHレセプターを含む沈渣の¹²⁵I濃度を測定した。

TRAb値は、患者血清中での¹²⁵I-TSHの結合率をB, 陰性コントロール血清での¹²⁵I-TSHの結合率をB₀, 陰性コントロール血清と¹²⁵I-TSHのみを混和した場合(レセプターを含まない)を非特異的結合(NSB)とすると,

$$TRAb = \left(1 - \frac{B - NSB}{B_0 - NSB} \right) \times 100\%$$

で表示した。

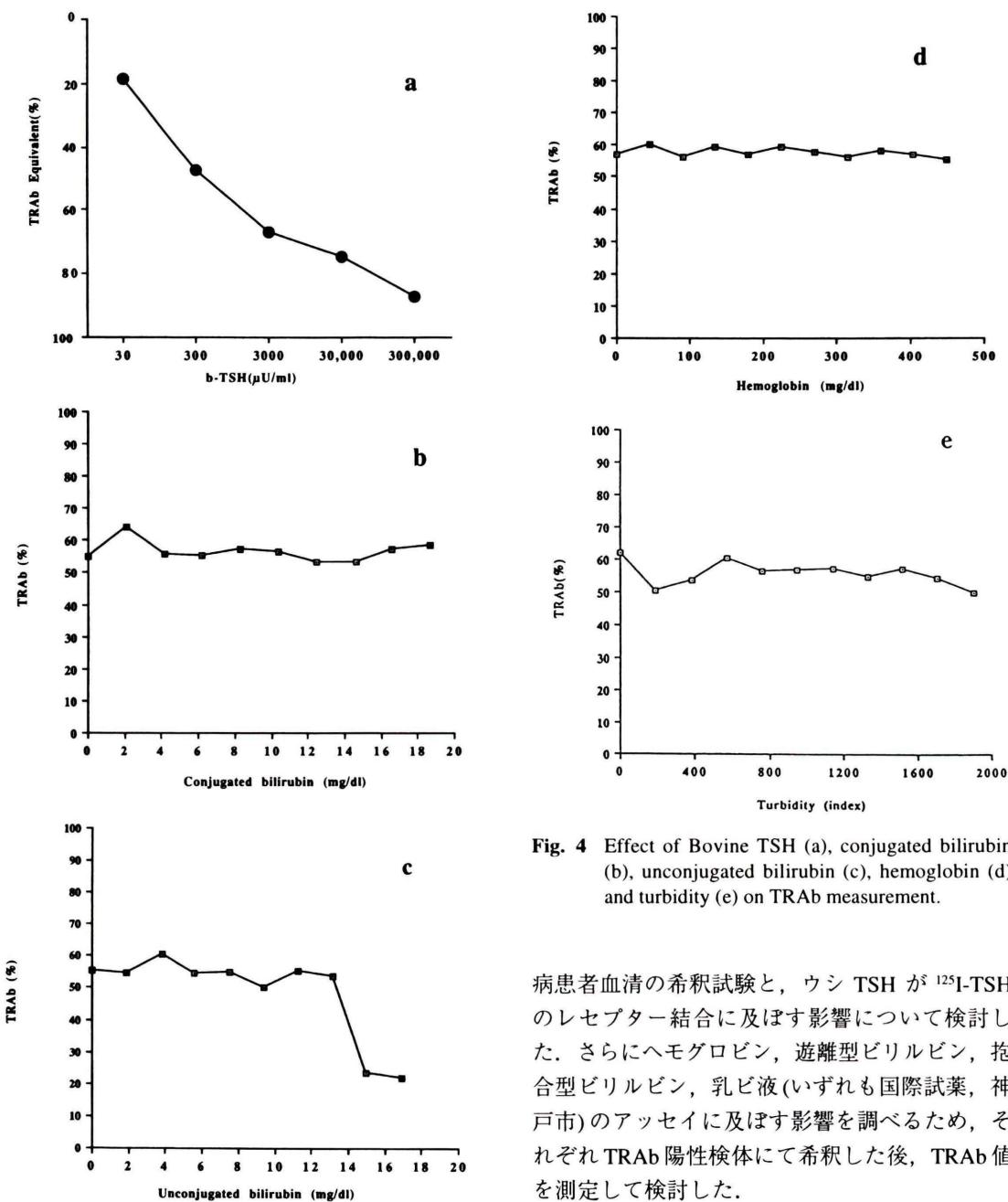


Fig. 4 Effect of Bovine TSH (a), conjugated bilirubin (b), unconjugated bilirubin (c), hemoglobin (d) and turbidity (e) on TRAb measurement.

病患者血清の希釈試験と、ウシTSHが ^{125}I -TSHのレセプター結合に及ぼす影響について検討した。さらにヘモグロビン、遊離型ビリルビン、抱合型ビリルビン、乳ビ液(いずれも国際試薬、神戸市)のアッセイに及ぼす影響を調べるために、それぞれTRAb陽性検体にて希釈した後、TRAb値を測定して検討した。

臨床的検討として健常人、慢性腎不全患者、各種甲状腺疾患患者より得られた血清のTRAb値を測定するとともに、本キットとTRAb「コスマック」キットにより測定されたTRAb値を比較した。

ii) 基礎的および臨床的検討

TRAb測定に及ぼす温度とインキュベーション時間の影響、測定値の再現性、高TRAbバセドウ

III. 結 果

TRAbの測定に及ぼすインキュベーション温度、時間の影響を検討したところ、TRAb値は4, 25, 37°Cではほとんど変わらなかった(Fig. 1)。また反応時間を30分、60分、90分で行ってもあまりTRAb値に変化が認められなかったため(Fig. 2)，以後のアッセイはすべてキット添付の指示書に従って、37°C、60分間のインキュベーションを行った。アッセイの再現性を見るため、種々のTRAb活性を有する3つの血清を用いて繰り返しTRAb値を測定したところ、アッセイ内再現性は、CV%にして5.3~7.9%(n=8)、アッセイ間再現性は2.1~8.4%(n=10)であった(Table 1)。

強いTRAb活性のバセドウ病患者血清を倍々希釈して測定したところ、ほぼ直線関係でTRAb値が低下し、良好な希釈曲線が得られた(Fig. 3)。アッセイ系にウシTSHを添加し、生理食塩水にて希釈したところ、300μU/ml以上のウシTSHは容量反応的に¹²⁵I-TSHのレセプターへの結合を阻害した。300mU/mlの高濃度TSHにより¹²⁵I-TSHのレセプター結合はほぼ完全に阻害された(Fig. 4a)。一方、抱合型遊離ビリルビンやヘモグロビン、乳ビ(Fig. 4b~e)は¹²⁵I-TSHのレセプターへ

の結合に影響を及ぼさなかった。ただ未抱合型ビリルビンを添加すると非常に高濃度の14mg/dl以上では、TRAbの陰性化が見られた(Fig. 4c)。

55例の健常人より得られた血中TRAb値は、-18.4%から12.9%に分布し、平均±2標準偏差は-15.4%から15.7%と計算されたので正常値を15%以下とした(Fig. 5)。68例の未治療バセドウ病患者63例は、17%から90%と、すべてTRAb陽性であった。しかし甲状腺機能が正常となった治療後の症例49例では、11例(22.4%)が陽性で、しかもTRAb値も低い値であった。未治療橋本病患者10例でもTRAb値は20%にのみ陽性で、未治療バセドウ病患者とは明らかに異なっていた。亜急性甲状腺炎(3例)、慢性腎不全(21例)でも弱陽性の1例を除いて全例陰性であった。抗甲状腺剤での治療経過をみた5例では、治療後徐々にTRAb値は低下した(Fig. 6)。5例中1例では抗甲状腺剤を減量したところ、低下していたTRAb値は再び急速に、上昇した。本例は同時に甲状腺機能亢進、癌の再燃をきたした。本キットとTRAb「コスマニック」により測定した67検体のTRAb値の間には良好な相関関係が認められ、ほぼ一致した値が得られた($y = 1.0x - 0.88$, $r = 0.95$, $n = 67$) (Fig. 7)。

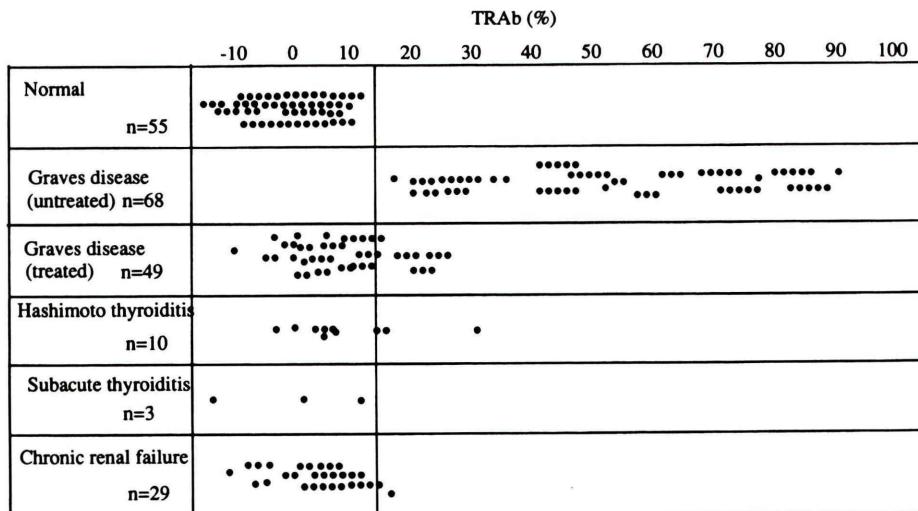


Fig. 5 TRAb measurement in various physiological and pathological conditions.

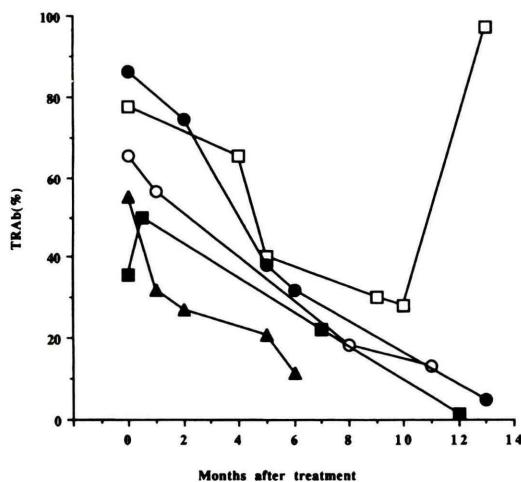


Fig. 6 Measurement of serum TRAb levels in five Graves' disease patients during antithyroid drug treatment.

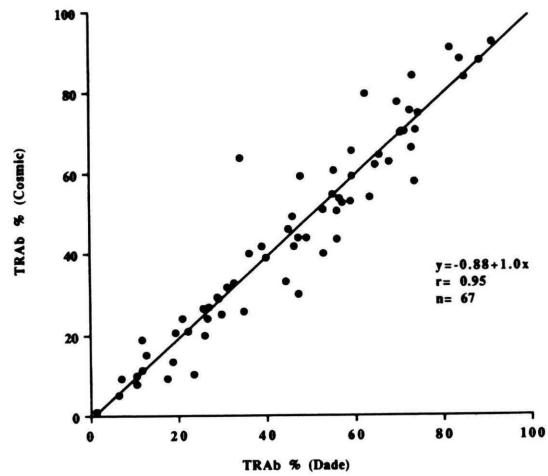


Fig. 7 Correlation of TRAb measured by TRAb Dade and TRAb Cosmic.

IV. 考 察

新しく開発されたTRAb「デイド」キットを用いて、血中TRAb測定の基礎的、臨床的検討を行い、ほぼ満足すべき結果が得られた。 ^{125}I -TSHとTSHレセプターの結合は温度、インキュベーション時間に依存するが、TRAb値は 4°C 、 25°C 、 37°C でも、またインキュベーション時間も30~90分間でほとんど同じであった。 ^{125}I -標識TSHのレセプターへの結合阻害は、バセドウ病患者、一部の橋本病患者血清のほか、高濃度TSHで認められたが、そのほかにはアッセイで問題となるような結合阻害物質は見当たらなかった。ただTSHの影響はウシ由来のTSHを用いての検討で、ヒトTSHについては検討していない。

測定値の再現性も良好で、55例の正常人では $-18.4\sim-12.9\%$ の間に分布し、平均 ± 2 標準偏差は -15.4% から 15.7% であるので、15%以下をカットオフ値としたところ、正常人ではいずれも15%のカットオフ値内であった。また慢性腎不全患者では、血中遊離甲状腺ホルモン濃度のデータの解釈が困難なことがあることが知られているが、TRAbは1例の弱陽性例を除いて、いずれも陰性であった。これに対し典型的な未治療バセ

ドウ病患者68例はいずれも血中TRAb陽性で、17~90%に幅広く分布した。抗甲状腺剤で治療後のバセドウ病患者は、TRAb陽性率が22.4%と低く、しかもTRAb値も未治療の症例と比較して明らかに低値であった^{7~9}。バセドウ病に対する抗甲状腺剤の治療に伴って血中のTRAb値が低下することが確かめられた。著者らの成績では4例が治療6~13か月後にはほぼ正常化した。しかし再燃した症例では、低値となっていたTRAb値も急速に高値となり、臨床症状とよく一致して変動することが明らかとなった。

臨床的には亜急性甲状腺炎もバセドウ病と同じように甲状腺機能亢進症状を呈する。両者の鑑別には ^{123}I あるいは $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ 甲状腺摂取率が有用であるが⁹、血中TRAb測定でも亜急性甲状腺炎と未治療バセドウ病が鑑別できることを示唆している。

本キットによる測定値はこれまで広く用いられてきたTRAbアッセイキット(コスマック社製)により得られたTRAb値とは、きわめてよく一致した。したがって2つのキットで測定したTRAb値は、よく似た臨床的有用性を示すものと思われる。甲状腺刺激物質には種族差があることが知られているが、2つのキットとも原理的に ^{125}I -標識

ウシTSHとブタ甲状腺より精製したTSHレセプターを用いたレセプターアッセイを用いて測定しており、一致したTRAb値が得られたものと考えられる。

バセドウ病患者における血中TRAb測定の臨床的有用性も古くから検討されており、抗甲状腺剤中止の指標として^{7,9}、あるいは新生児バセドウ病発症の予測にも有用である¹⁰。しかしいずれもTRAb活性がより強いほど、つまり¹²⁵I-標識TSHのレセプター結合阻害の程度が大きいほど、バセドウ病はより重症と考えられる。これまでのTRAb測定用キットはいずれも、¹²⁵I-TSHのレセプター結合阻害率で表示されており、今後TRAbの測定も、より精度の高い定量的な測定が望まれる。

文 献

- 1) Adams DD: Thyroid-stimulating autoantibodies. Vitamins and Hormones **38**: 119-203, 1980
- 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**: 734-739, 1978
- 3) Smith BR, Hall R: Thyroid-stimulating immunoglobulins in Graves' disease. Lancet **2**: 427-430, 1974
- 4) Beal GN, Chopra IJ, Solomon DH, Kruger SR: Serum protein inhibition of thyrotropin binding to human thyroid tissue. J Clin Endocrinol Metab **47**: 967-973, 1978
- 5) O'Donnell J, Trokoudes K, Silverberg J, Row VV, Volpe R: Thyrotropin displacement activity of serum immunoglobulins from patients with Graves' disease. J Clin Endocrinol Metab **46**: 770-777, 1978
- 6) Strakosch CR, Joyner D, Wall JR: Thyroid-stimulating antibodies in patients with autoimmune disorders. J Clin Endocrinol Metab **43**: 361-365, 1978
- 7) 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
- 8) Shewring G, Smith BR: An improved radioreceptor assay for TSH receptor antibodies. Clin Endocrinol **17**: 409-417, 1982
- 9) McGregor AM, Peterson MM, McChachlan SM, Rooke P, Smith BR, Hall R: Carbimazole and the autoimmune response in Graves' disease. N Engl J Med **303**: 302-307, 1980
- 10) Yagi H, Takeuchi M, Nagashima K, Konishi J, Endo K: Neonatal hyperthyroidism caused by TSH-binding inhibitor immunoglobulins (TBII). J Pediatr **103**: 591-593, 1983

Summary

Measurement of Serum TSH Receptor Antibodies in Thyroid Patients Using TRAb Dade Kits

Khalil AHMED*, Katsumi TOMIYOSHI*, Kazuhiro FUKAZAWA**, Tomio INOUE*, Masami MURAKAMI***, Isao KOBAYASHI**** and Keigo ENDO*

*Department of Nuclear Medicine, ***Department of Internal Medicine,

****Clinical Laboratory Medicine, Gunma University School of Medicine

**Tano General Hospital

TRAb Dade kit is a radioreceptor assay that detects autoantibodies in serum of patients with thyroid diseases which interfere with the binding of ^{125}I labeled TSH to its receptor. In this paper we examined the basic and clinical usefulness of newly developed TRAb assay kits. The intra and inter assay coefficients of variation were 7.9% and 8.4%, respectively. There was no significant effect of temperature and incubation time on TRAb values. The influence of conjugated, unconjugated bilirubin, hemoglobin and turbidity was not so significant on TRAb values. TRAb values in serum of 68 untreated Graves' disease were above the normal range, but most (78%) treated Graves' patients who became euthyroid after receiv-

ing antithyroid drug, showed the normal range. In patients with chronic renal failure TRAb values were also within the normal range. A significant correlation ($y = 1.0x - 0.88$, $r = 0.95$) was observed between this TRAb kit and TRAb Cosmic values in various thyroid conditions. This new assay for TRAb was simple, rapid and reproducible. The measurement of serum TRAb values was useful for the evaluation of physiological and pathological function and seemed to be helpful in the management of patients with thyroid disease.

Key words: TSH receptor antibodies, Radioreceptor assay, ^{125}I labeled TSH, Graves' disease.