

《ノート》

TSH の Radioreceptor assay キットを用いた TSH レセプター抗体 (TRAb) 測定の基礎的ならびに臨床的検討

Fundamental and Clinical Evaluation on Measurement of TSH Receptor Antibody (TRAb) by Radioreceptor Assay Kit

広岡 良文* 仁瓶 禮之*

Yoshifumi HIROOKA and Noriyuki NIHEI

Hamamatsu University School of Medicine, Hamamatsu, Japan

I. はじめに

バセドウ病は、甲状腺濾胞上皮細胞表面に存在する TSH レセプターに対する刺激性自己抗体により惹起されると考えられている¹⁾。

この TSH レセプター抗体 (TRAb) は、諸家により種々の方法で測定²⁾されているが、感度、再現性、安定性、手技などに問題があり、結果に一致がみられない^{3~5)}。

しかし近年、Smith ら⁶⁾により、諸施設で行っても共通の基盤で検討し得る TRAb 測定キットが開発された。今回、われわれはこのキットの基礎的ならびに臨床的検討を行い若干の知見を得たので報告する。

II. 対象および方法

1) 対象

健常人190例 (15~68歳の男性115例および19~66歳の女性75例)、バセドウ病266例 (うち未治療78例、治療中131例、治療後57例)、慢性甲状腺炎45例、亜急性甲状腺炎15例、単純性甲状腺腫6例、

下垂体疾患3例 (うち先端肥大症2例、シーハン症候群1例)、膠原病およびその類縁疾患35例 (うち慢性関節リウマチ18例、全身性エリテマトーデス9例、多発性筋炎2例、シエグレン症候群6例) およびバセドウ病の母親から生まれた新生児12例の総計572例を対象として血中 TRAb を測定した。

2) 方法

(1) 試薬 (①~⑦はキットのもの)

① 30% (w/v) ポリエチレングリコール (PEG) 溶液-1 M NaCl 溶液

② アッセイ緩衝液 (1 ml 当たり 1 mg の BSA を含む pH 7.5 の緩衝液, 10 mM トリス-塩酸, 5 mM NaCl 溶液より成る)

③ 1%ルブロール溶液

④ TSH レセプター (凍結乾燥粉末)

⑤ TSH (¹²⁵I) (凍結乾燥粉末)

⑥ TRAb 陰性コントロール血清

⑦ TRAb 陽性コントロール血清

⑧ ウシ TSH (bTSH) はアーマー社のチトロパール、ヒト黄体ホルモン (LH) および卵胞刺激ホルモン (FSH) は第1ラジオアイソトープ研究所、ヒト乳汁分泌ホルモン (PRL) はダイナボット社、ヒト成長ホルモン (GH) は栄研化学、ヒト副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) はミドリ十字のそれぞれ

* 浜松医科大学第三内科

受付: 59年11月9日

最終稿受付: 60年3月5日

別刷請求先: 浜松市半田町 3600 (☎ 431-31)

浜松医科大学第三内科

広岡 良文

Key words: TSH receptor antibody (TRAb), Radioreceptor assay, Graves' disease.

の標準品, またヒト IgG, およびヒト IgA はミドリ十字製, ヒト IgM はカッペル社製のクロマト精製標準品を用いた.

(2) 測定手技

測定操作を Fig. 1 に示した.

(3) 計算法

結果は標識 TSH 結合の阻害率によって示される.

$$100 \times \left(1 - \frac{\text{検体試料存在下における TSH (}^{125}\text{I) の特異結合率}}{\text{陰性コントロール試料存在下における TSH (}^{125}\text{I) の特異結合率}} \right)$$

(4) PEG による血清からの IgG の抽出

IgG の抽出は30および15% PEG 溶液を用いて行ったが, その手順は Fig. 2 に示したごとくである.

III. 結 果

1) 基礎的検討

(1) 第1インキュベーション時間および温度 (Fig. 3a, 3b)

健常人, 陰性コントロール, 陽性コントロール, 4例のバセドウ病患者血清および非特異的結合について第1反応を室温で, 10, 15, 30および60分間行った際の ^{125}I -TSH の特異的結合 (B/T%) の推移を検討したところ, いずれの時間でも B/T はほぼ同じ値を示したことから, 第1反応は15分とした. 次に, 第1反応時間を15分とし, 温度を4, 25および37°C とした際の B/T% の推移を検討した. 4°C と25°C ではいずれのサンプルでも同様の値を示したが, 37°C では, 非特異的結合, 陽性コントロールおよびバセドウ病患者の1例を除き, いずれも B/T% は低下を示した. したがって反応温度は室温 (25°C) とした.

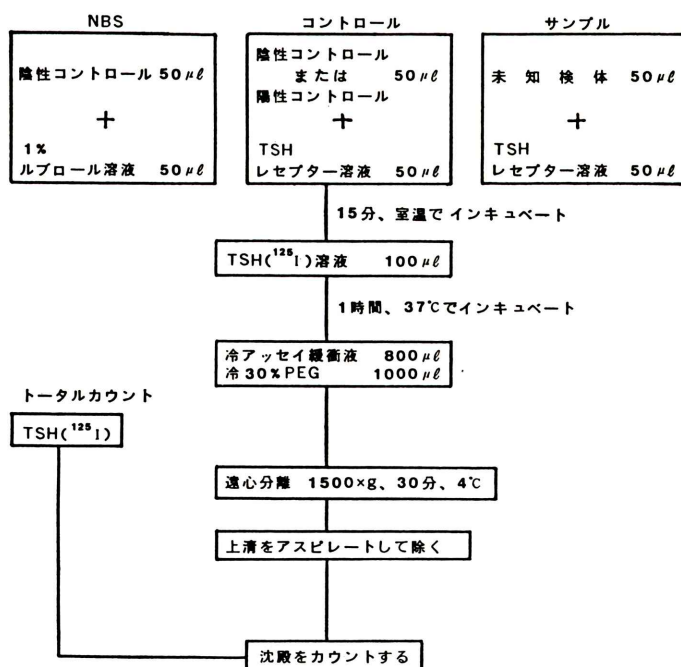


Fig. 1 Assay procedure.

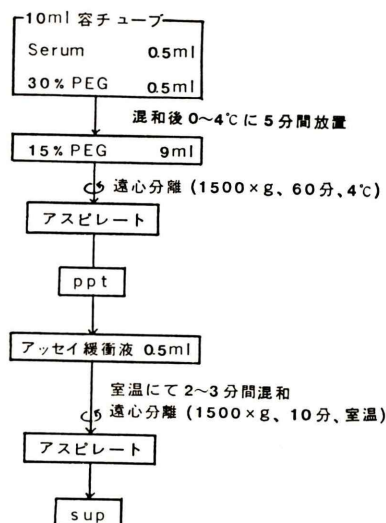


Fig. 2 Procedure of IgG extraction by PEG.

(2) 第2インキュベーション時間および温度 (Fig. 3c, 3d)

第2反応を 37°C で、30, 60, および 90 分間行った際の B/T% の推移を検討したが、いずれの時間でもほぼ同様の値を示した。したがって反応時間を 60 分とした。次に第2反応時間を 60 分とし、温度を 25, 37 および 42°C とした際の B/T% の推移を検討した。25°C と比べて 37°C では B/T% は上昇する傾向を示したが、42°C では非特異的結合、陽性コントロールおよびバセドウ病患者の 1 例を除き、いずれも B/T% は逆に低下を示した。

(3) 再現性

4 例のバセドウ病患者、陽性コントロールおよび健常人の各血清につき 10 重測定を行った同一アッセイ内の再現性は Table 1 に示すごとくきわめて良好であった。次に、異なる 3 名の測定者 (Y. H., S. K., M. F.) により同一キットを用いて同一サンプルにつき 5 重測定を行った際の再現性は Table 2 のごとく良好であった。また、同一キットを用いて、日をかえて、3 回 5 重測定した際の再現性は、Table 3 のごとく良好であった。一方、ロットの異なるキット (K06, K07, K08) で 5 重測定した際の再現性も、Table 4 のごとく比較的良好であった。

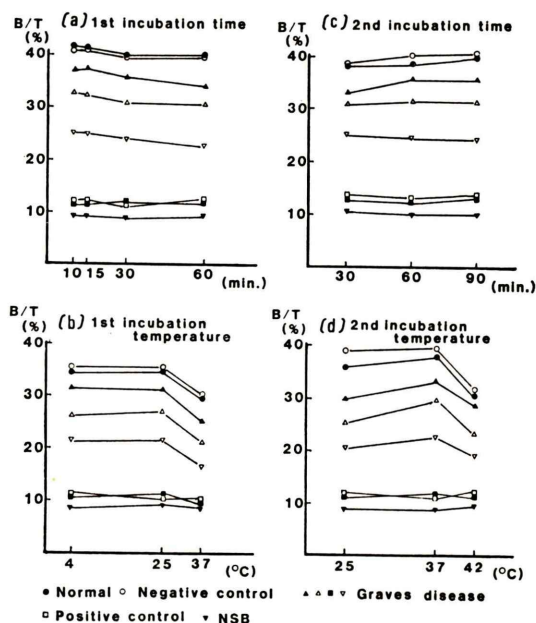
Fig. 3 Effects of incubation time and temperature on ^{125}I -bTSH specific binding to TSH receptor.

Table 1 Intraassay reproducibility (% inhibition of TSH binding)

No.	Patient's serum				PCS	NS
	A	B	C	D		
1	25.8	38.4	56.7	87.1	83.1	9.4
2	24.3	37.3	53.2	89.5	84.2	7.6
3	26.3	40.2	60.7	81.9	83.7	9.1
4	24.3	34.9	57.5	83.5	82.9	9.2
5	25.3	33.5	58.4	81.3	82.7	9.4
6	28.2	36.4	57.3	83.1	82.2	7.6
7	25.9	39.2	57.2	83.3	83.5	9.1
8	27.4	34.4	55.3	86.5	87.8	9.0
9	27.1	36.5	53.0	84.8	86.9	8.2
10	27.4	38.0	57.8	88.1	85.7	7.6
Mean	26.2	36.9	56.7	84.9	84.3	8.6
SD	1.33	2.16	2.34	2.76	1.90	0.78
CV	5.08	5.85	4.13	3.25	2.25	9.07

PCS: positive control serum

NS: normal serum

(4) 非特異的結合 (NSB)

本キットにおける NSB について検討した。陰性コントロール血清 20 検体をそれぞれ 2 重測定した際の標識 TSH の結合率は 9.3 ± 0.38 (M ±

Table 2 Reproducibility of the serum TRAb levels measured by three different persons
(% inhibition of TSH binding)

	Patient's serum												PCS			NS		
	A			B			C			D								
	Y.H.	S.K.	M.F.	Y.H.	S.K.	M.F.	Y.H.	S.K.	M.F.	Y.H.	S.K.	M.F.	Y.H.	S.K.	M.F.	Y.H.	S.K.	M.F.
Mean	27.4	30.0	23.0	37.6	39.5	44.6	59.5	61.5	60.3	92.7	91.1	94.1	90.7	90.9	91.3	10.4	10.0	9.1
SD	1.03	4.25	1.74	1.17	3.35	2.09	1.10	5.40	1.57	1.93	2.67	2.27	0.86	4.04	2.17	1.14	0.18	1.11
CV	3.80	14.2	7.57	3.11	8.48	4.69	1.85	8.78	2.60	2.08	2.93	2.41	0.95	4.44	2.38	11.0	1.80	12.2
Mean	26.8			40.6			60.4			92.6			91.0			9.80		
SD	3.54			3.62			1.01			1.50			0.30			0.67		
CV	13.2			8.92			1.67			1.67			0.33			6.84		

PCS: positive control serum, NS: normal serum

Table 3 Interassay reproducibility
(% inhibition of TSH binding)

	Patient's serum												PCS			NS		
	A			B			C			D								
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Mean	16.7	19.1	15.5	30.1	33.3	30.0	49.8	55.0	54.4	91.0	90.8	92.9	93.1	92.1	90.3	5.4	5.7	6.1
SD	3.51	1.65	1.94	4.26	2.10	1.23	3.35	2.79	3.23	2.59	0.86	3.12	2.15	1.11	0.21	0.61	0.80	0.61
CV	21.0	8.64	12.5	14.2	6.31	4.10	6.73	5.07	5.94	2.85	0.95	3.36	2.31	1.21	0.23	11.3	14.0	10.0
Mean	17.1			31.1			53.1			91.6			91.8			5.7		
SD	1.83			1.88			2.84			1.16			1.42			0.35		
CV	10.7			6.05			5.35			1.27			1.55			6.14		

PCS: positive control serum, NS: normal serum

Table 4 Reproducibility of the serum TRAb levels measured by three different kits
(% inhibition of TSH binding)

	Patient's serum												PCS			NS		
	A			B			C											
	K06	K07	K08	K06	K07	K08	K06	K07	K08	K06	K07	K08	K06	K07	K08	K06	K07	K08
Mean	20.9	19.1	25.2	34.8	33.3	34.4	92.7	90.8	87.2	91.9	92.1	85.6	7.3	5.7	8.0			
SD	1.40	1.66	0.93	1.85	2.10	1.98	1.26	0.87	1.76	0.76	1.11	1.72	1.28	0.80	0.64			
CV	6.70	8.69	3.69	5.32	6.31	5.76	1.36	0.96	2.02	0.83	1.21	2.01	17.5	14.0	8.0			
Mean	21.7			34.2			90.2			89.9			7.0					
SD	3.13			0.78			2.79			3.70			1.18					
CV	14.4			2.28			3.09			4.12			16.9					

PCS: positive control serum, NS: normal serum

SD)%を示し CV は 4.1% であった。また健常人 20 例では、標識 TSH の結合率は $8.4 \pm 0.54\%$ 、CV は 6.4% であった。

(5) 特異性

Figure 4 に示すように ^{125}I 標識 TSH は TSH レセプターに特異的に結合し、その結合は非標識

TSH の添加により用量依存的に阻害された。また TRAb 陽性血清を段階希釈したものは、TSH の阻害曲線と平行性を示した。一方、LH, FSH, HCG, PRL, GH, ACTH, IgG, IgA, IgM の標識 TSH の特異的結合に及ぼす影響は無視し得るものと考えられた。

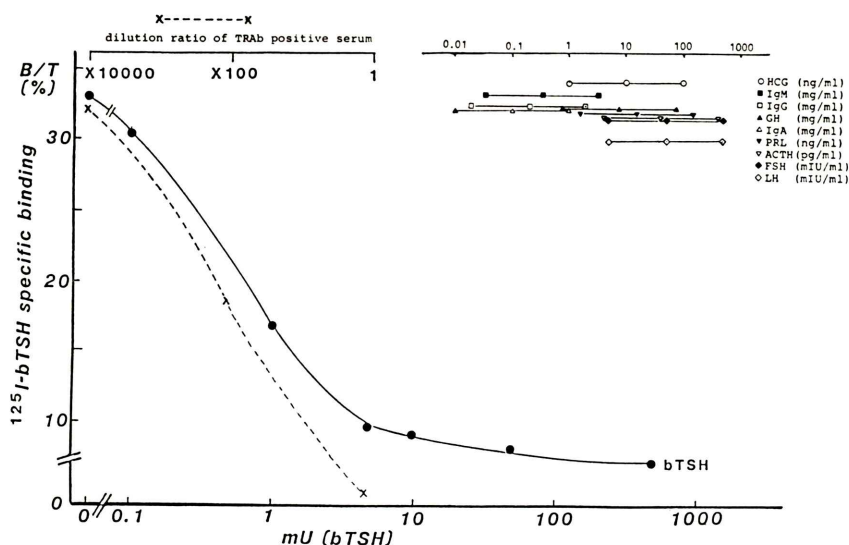


Fig. 4 Effect of unlabeled bTSH, diluted serum containing high level of TRAb, LH, FSH, HCG, PRL, GH, ACTH, IgG, IgA and IgM on ^{125}I -bTSH specific binding to TSH receptor.

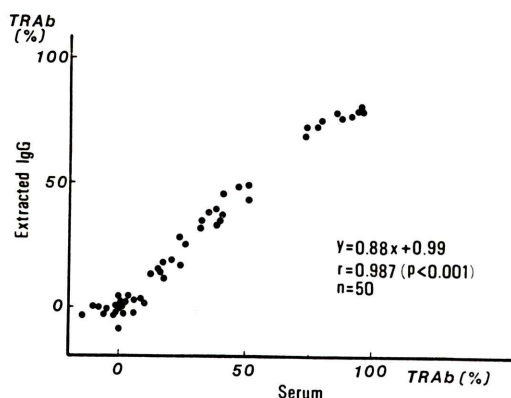


Fig. 5 Relationship of serum TRAb levels between extracted IgG and serum samples.

(6) 血清サンプルと IgG 抽出サンプルで測定した際の比較

健常人20例, バセドウ病患者30例の計50例を対象に, 血清サンプルと IgG 抽出サンプルで同時測定した TRAb 値の間には Fig. 5 に示すように $r=0.987$ ($p<0.001$) の高い相関性がみられた。

2) 臨床的検討

(1) 正常値

健常人 190 例を対象に測定した TRAb 値は

-0.29 ± 5.3 ($M \pm SD$)% を示し, 平均 ± 2 SD から算出した正常範囲は $-10.9 \sim +10.3\%$ であった。

(2) 各種疾患における TRAb 値

未治療バセドウ病患者 78 例の TRAb 値は $42.6 \pm 25.1\%$ を示し, Fig. 6 に示すごとく広い分布を示した。正常上限以上を示す陽性例は 78 例中 68 例 (87.2%) であった。治療中の患者 131 例では $27.5 \pm 19.5\%$ で, 陽性は 92 例 (70.2%) を示した。治療後症例 57 例では $-1.7 \pm 11.8\%$ で, 陽性は 5 例 (8.8%) のみであった。バセドウ病の母親から生まれた新生児 12 例は $6.3 \pm 18.7\%$ を示し, 陽性は 4 例 (33.3%) であった。一方, 慢性甲状腺炎 45 例では $2.1 \pm 13.7\%$ を示し, 陽性は 9 例 (20%) であった。しかし, 亜急性甲状腺炎 15 例では $-2.1 \pm 5.3\%$, 単純性甲状腺腫 6 例では $-2.8 \pm 3.9\%$, 下垂体疾患 3 例では $-1.5 \pm 1.4\%$ を示し全例陰性であった。さらに膠原病の中で, 慢性関節リウマチ 18 例は $6.3 \pm 16.4\%$ を示し陽性は 5 例 (27.8%) であった。全身性エリテマトーデス 9 例では $-3.5 \pm 10.4\%$ で陽性は 1 例 (13.5%) のみであった, また多発性筋炎 2 例, シエグレン症候群 6 例はいずれも陰性であった。

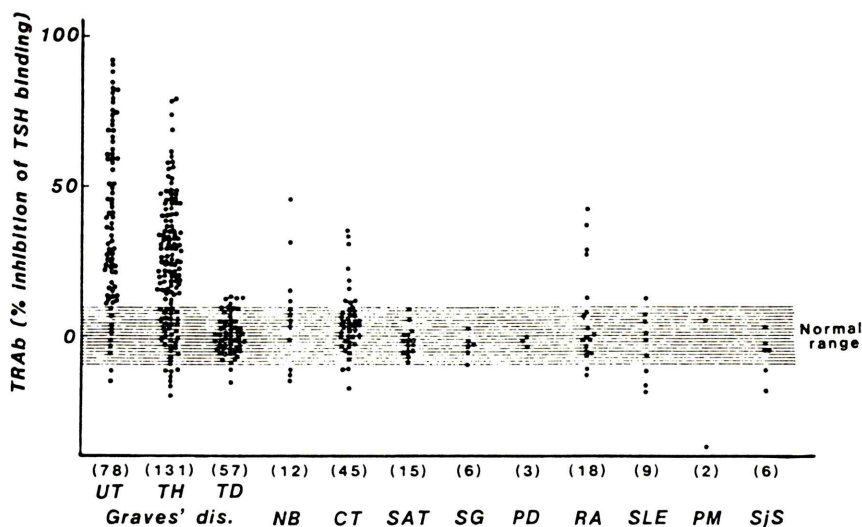


Fig. 6 Serum TRAb levels in various diseases. UT: untreated, TH: treating, TD: treated, NB: newborn, CT: chronic thyroiditis, SAT: subacute thyroiditis, SG: simple goiter, PD: pituitary disease, RA: rheumatoid arthritis, SLE: systemic lupus erythematosus, PM: polymyositis, SjS: Sjögren's syndrome. Normal range: calculated from $\text{Mean} \pm 2 \text{SD}$ in 190 normal subjects.

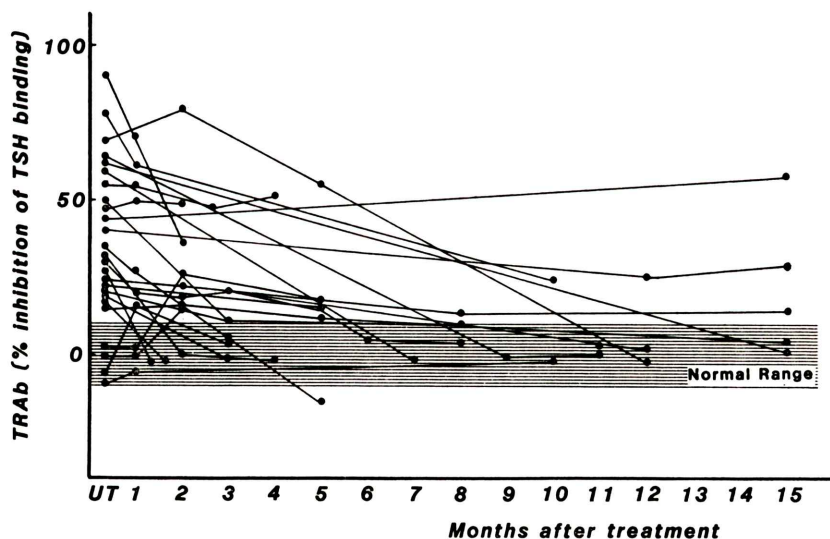


Fig. 7 Changes of serum TRAb levels before and during treatment with MMI. UT: untreated.

(3) パセドウ病の治療経過における TRAb 値の変動

未治療パセドウ病25例を対象として、抗甲状腺剤 MMI で治療した際の TRAb 値の変動を

Fig. 7 に示した。治療前25例中21例(84%)が TRAb 陽性を示したが、4例は陰性であった。治療中の変化をみると陽性例のうち高値のものは低値のものに比して陰性化するのに長期間を要す

る傾向を示すが、低値例のなかにも長期間陽性に留まる例もみられた。一方、治療前陰性例のうち1例は終始陰性であったが、他の3例は治療後1時期陽性化を示した。

IV. 考 察

TRAb はバセドウ病の病因や病態に密接に関連すると考えられている^{1,3,7-13)}ことから、バセドウ病患者の血中 TRAb 測定は臨床的に重要視されつつある。今回、Smith ら⁶⁾によって開発されたキットを用いて血中 TRAb を測定し、基礎的ならびに臨床的検討を行った。

第1反応時間の¹²⁵I-TSHの特異的結合に及ぼす影響を検討したが、10~60分の間では安定しておりキット指定の15分が適当と認められた。しかし第1反応で温度が37°Cの際には特異的結合の低下がみられた点は注意を要する。また第2反応時間は30~90分の間で安定しており、キット指定の60分は適当と認められたが、反応温度が42°Cの際には特異的結合の低下がみられたことから、本キットは高温にはやや不安定である点に操作上注意が必要と考えられた。TRAb 測定の再現性は同一アッセイ内、測定者間、日差間およびロット間のいずれにおいても良好な成績を示した。一般に Radioreceptor assay では NSB が critical な問題となるが、本キットにおける NSB は満足し得る結果であった。また LH, FSH, HCG, PRL, GH, ACTH, IgG, IgA, IgM の標識 TSH の特異的結合に及ぼす影響は無視し得るものであると認められたことから特異性は高いものであると考えられた。さらに従来¹⁾の方法では血清から IgG を抽出し測定に供していたが、抽出 IgG と血清で同時測定した TRAb 値の間に高い相関性が認められたことから、本キットは血清を直接用いて測定可能である。

健常人190例を対象に測定した TRAb 値の平均は-0.29%と0に近似し、標準偏差も5.3ときわめて小さく、平均±2 SD から算出した正常範囲は-10.9~+10.3%を示したことから、本キットを用いる際には+10%以上を陽性としてさしつ

かえないものと考えられた。

バセドウ病未治療例における TRAb 値の陽性率は必ずしも100%とならず87.2%にとどまった。この値は従来¹⁾の報告における陽性率と一致しているが未治療例でありながら TRAb が陰性の例は、他の測定法で検出され得る異常甲状腺刺激物質が存在するとも考えられるが、われわれは従来よりバセドウ病における TRAb 活性に血中免疫複合体(CIC)が抑制的に作用していることを認め報告している¹⁴⁾ことから、TRAb が陰性であるのはむしろ CIC による抑制の結果とも考えられる。

一方、治療後における TRAb 値の低下は、抗甲状腺剤療法^{4,7,12)}のみならず、手術療法⁷⁾においても報告されており、われわれの結果も同様で、MMI 治療により TRAb 値は大多数例で陰性化し、治療後症例57例中陽性は5例(8.8%)のみで、明らかな陽性率の低下が認められた。この TRAb 値の陰性化は抗甲状腺剤の抗体産生抑制効果によるものとも考えられるが、バセドウ病の病態の推移と密接な関係にあることが示唆される。

次に新生児バセドウ病は、TRAb の経胎盤性移行により惹起されると報告されている^{15,16)}が、TRAb 値が高値のバセドウ病の母親から生まれた新生児の TRAb 値も全例陽性を示し、TRAb の経胎盤性移行が確認された。

また慢性甲状腺炎45例中9例(20%)に TRAb が陽性であったが、この TRAb が Endo ら¹¹⁾の報告にみられる blocking antibody か否かは今後の検討を要する。

一方膠原病の一部症例で TRAb 陽性例がみられたが、これは単に臓器非特異性自己免疫疾患にしばしば認められる Polyclonal B cell activation に基づく抗体産生を反映するものと考えられるが詳細は今後の検討を要する。

V. 結 論

TSH の Radioreceptor assay キットを用いた TRAb 測定の基礎的ならびに臨床的検討を行った。

1) インキュベーション時間および温度の条件はキットの指定どおり行えば問題はないが、温度

がやや高温に傾くと特異的結合の低下を招く点に操作上の注意を要する。

2) 再現性および特異性は満足すべきものである。

3) IgG のみならず血清を直接用いて測定可能である。

4) 健常人190例の検討から、本キットを用いる際は+10%以上を陽性とし得る。

5) バセドウ病未治療例の陽性率は87.2%であったが、治療後例では8.8%に低下した。

6) TRAb の経胎盤性移行を確認した。

7) 慢性甲状腺炎および膠原病患者の1部症例で TRAb 陽性の例がみられたが詳細は今後の検討を要する。

以上、本キットは操作も簡便で再現性も良好で特異性も高く特にバセドウ病の病態および治療経過の観察において臨床的に有用と考えられる。

最後に、本キットを提供いただいた日本トラベノール株式会社に感謝の意を表します。

文 献

- 1) Smith BR, Hall R: Thyroid-stimulating immunoglobulins in Graves' disease. *Lancet* 2: 427-431, 1974
- 2) Adams DD: Thyroid-stimulating autoantibodies in Vitamins and Hormones, vol 38, Academic Press, Inc, 1980, p. 119
- 3) Sugeno A, Kidd A, Row VV, et al: Correlation between thyrotropin displacing activity and human thyroid stimulating activity by immunoglobulins from patients with Graves' disease and other thyroid disorders. *J Clin Endocrinol Metab* 48: 398-402, 1979
- 4) 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
- 5) Macchia E, Fenzi GF, Monzani F, et al: Comparison between thyroid stimulating and TSH-binding inhibiting immunoglobulins in Graves' disease. *Clin Endocrinol* 15: 175-182, 1981
- 6) Shewring G, Smith BR: An improved radioreceptor assay for TSH receptor antibodies. *Clin Endocrinol* 17: 409-417, 1982
- 7) Mukhtar ED, Smith BR, Pyle GA, et al: Relation of thyroid stimulating immunoglobulins to thyroid function and effects of surgery, radioiodine, and antithyroid drugs. *Lancet* 1: 713-715, 1975
- 8) Davies TF, Yeo PPB, Evered DC, et al: Value of thyroid stimulating antibody determinations in predicting shortterm thyrotoxic relapse in Graves' disease. *Lancet* 1: 1181-1182, 1977
- 9) Schleusener H, Kotulla H, Adkofer F, et al: Relationship between thyroid status and Graves' disease—specific immunoglobulins. *J Clin Endocrinol Metab* 47: 379-384, 1978
- 10) Strakosch CR, Joyner D, Wall JR: Thyroid stimulating antibodies in patients with subacute thyroiditis. *J Clin Endocrinol Metab* 46: 345-348, 1978
- 11) 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
- 12) O'Donnel J, Trokondes K, Silverberg J, et al: Thyrotrophin displacement activity of serum immunoglobulins from patients with Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab* 48: 381-387, 1978
- 13) Ozawa Y, Maciel RMB, Chopra IJ, et al: Relationships among immunoglobulin markers in Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab* 48: 381-387, 1979
- 14) 船内正憲: バセドウ病における流血中免疫複合体の研究. *日本内分泌学会雑誌* 59: 1912-1927, 1983
- 15) Yagi H, Takeuchi M, Nagashima K, et al: Neonatal transient thyrotoxicosis resulting from maternal TSH-binding inhibitor immunoglobulins. *J Pediatrics* 103: 591-593, 1983
- 16) Zakarija M, McKenzie JM: Pregnancy-associated changes in the thyroid-stimulating antibody of Graves' disease and the relationship to neonatal hyperthyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 57: 1036-1040, 1983