

《ノート》

血中 TRAb 測定法 (TRAK Kit) の基礎的ならびに臨床的検討

Basic and Clinical Evaluations of Serum TRAb Measurement

井上 健* 吉本 緑* 坂巻 隆男* 杉本 高士*
 長谷川 真* 栗屋 保男* 木村 肇* 鈴木 晟時*
 飯野 史郎*

Takeshi INOUE, Midori YOSHIMOTO, Takao SAKAMAKI,
 Takashi SUGIMOTO, Makoto HASEGAWA, Yasuo AWAYA,
 Hajime KIMURA, Seiji SUZUKI and Shiro IINO

*Division of Endocrinology and Metabolism, Department of Internal Medicine,
 Showa University Fujigaoka Hospital*

I. はじめに

異常甲状腺刺激物質に関する研究は Adams らの LATS に始まったが、その後多くの研究が重ねられ、現在ではこの刺激物質が IgG 分画に存在することが明らかになっている。さらに、この免疫グロブリンが甲状腺の細胞膜への TSH の結合を抑制することから、TSH 受容体に対する抗体 (TSH receptor antibody: TRAb) であると推論されるようになった。この抗体には測定方法などにより様々な名称がある。

今回、われわれは Smith ら¹⁾により改良が加えられた新しい血中 TRAb 測定法のキットを利用する機会を得、基礎的ならびに臨床的検討を行ったので報告する。

II. 対象と方法

対象は健康正常者 67 例 (男 34 例, 女 33 例), 未

治療バセドウ病患者 29 例 (男 4 例, 女 25 例), 抗甲状腺剤治療中で euthyroid 状態にあるバセドウ病患者 (治療群) 62 例 (男 18 例, 女 44 例), 抗甲状腺剤のみ治療にて寛解が 1 年以上続いている患者 (寛解群) 14 例 (男 5 例, 女 9 例), 橋本病患者 22 例 (男 1 例, 女 21 例, 治療中を含む), 亜急性甲状腺炎患者 4 例 (男 1 例, 女 3 例), 腺腫様甲状腺腫患者 3 例 (全例女) である。

TRAb 値の測定には、使用する検体を IgG から血清に変えた新しい Smith らの TRAb キット (TRAK, 日本トラベノール社) を用いた。測定方法は Fig. 1 に示すごとくで、被検血清と陰性および陽性コントロール 50 μ l に、それぞれ TSH レセプター溶液 50 μ l を加えたものと、nonspecific binding (NSB) として陰性コントロール 50 μ l に 1% ルブロール溶液 50 μ l を加えたものを攪拌混和し、室温で 15 分間インキュベーションする。その後、¹²⁵I でラベルした TSH 溶液 100 μ l を加えて混和後、37°C で 1 時間インキュベーションを行い、次に冷アッセイ緩衝液 800 μ l と冷 30% PEG 1,000 μ l を加え攪拌混和する。1,500 g, 4°C,

Key words: Radioreceptor assay, Serum TRAb, Thyroid, Abnormal stimulator.

* 昭和大学藤が丘病院内科内分泌代謝科

受付: 59 年 11 月 9 日

最終稿受付: 60 年 3 月 5 日

別刷請求先: 横浜市緑区藤が丘 1-30 (☎ 227)

昭和大学藤が丘病院内科内分泌代謝科

井 上 健

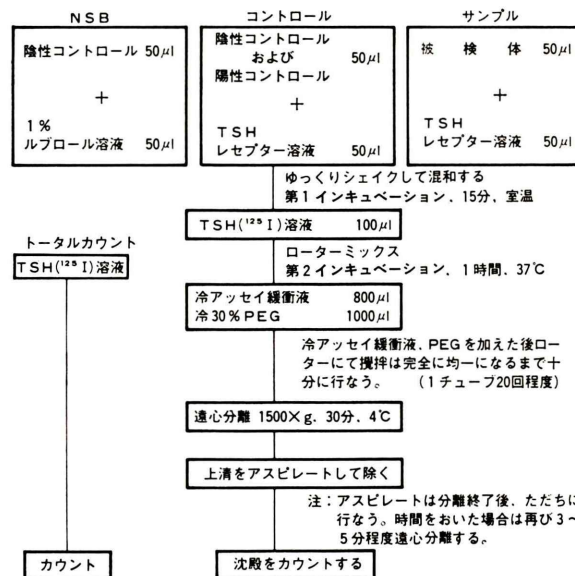


Fig. 1 Assay procedure for TRAb kit.

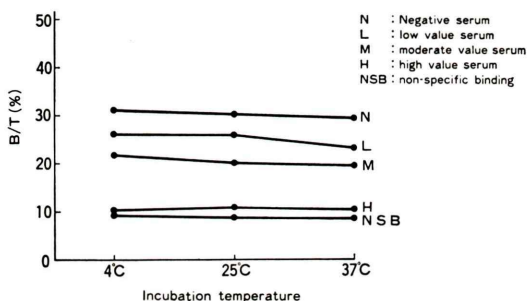
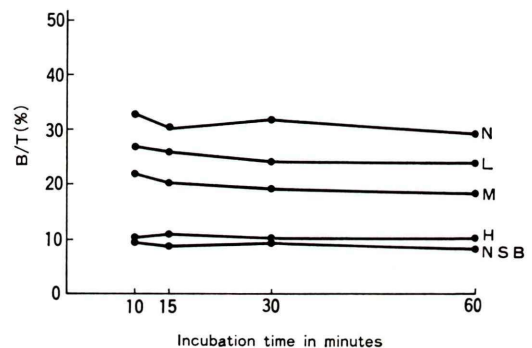


Fig. 2 Influence of first incubation temperature on B/T ratio in TRAb kit (first incubation time: 15 mins.).

Fig. 3 Influence of first incubation time on B/T ratio in TRAb kit (first incubation temp.: 25 $^{\circ}$ C).

30分遠心分離後、上清を吸引除去、 γ カウンターにて沈殿物をカウントする。TRAb値は下記の式により求められる標識TSH結合の阻害率によって示される。

標識TSH結合阻害率

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

レセプターは、ブタの甲状腺組織より細胞膜粗分画を作製し、可溶化剤として0.1%ルブロール

を用いている。TSHは、ウシの脳下垂体をホモゲナイズし、ゲルろ過クロマトグラフ法により分画精製してあり、 ^{125}I -TSHは、ウシ甲状腺刺激ホルモンをヨウ素125を用いてラベルしている。

なお、基礎的にはTRAb活性の異なる3種(低、中、高値)のプール血清とキット添付の陰性コントロールおよびNSBを用いた場合のインキュベーションの温度と時間の影響と、同じく3種のプール血清を用いた場合の測定内同時再現性および測定間再現性について検討した。

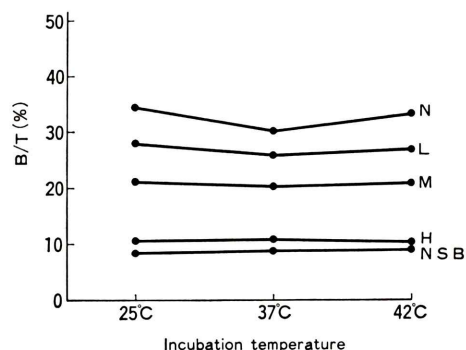


Fig. 4 Influence of second incubation temperature on B/T ratio in TRAb kit (second incubation time: 60 mins.).

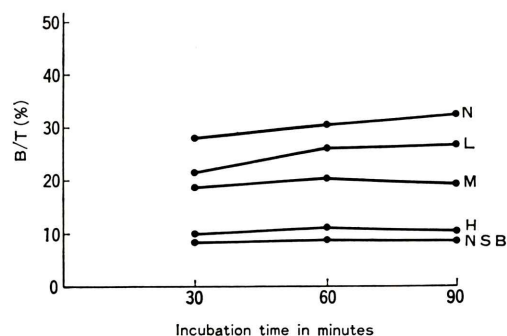


Fig. 5 Influence of second incubation time on B/T ratio in TRAb kit (second incubation temp.: 37°C).

Table 1 Within-run precision in TRAb kit

	Pooled serum L	Pooled serum M	Pooled serum H
1	22.8	53.3	91.1
2	26.4	51.2	95.5
3	25.6	44.7	92.7
4	24.0	50.0	90.2
5	26.8	55.7	95.5
6	32.5	50.0	89.8
7	24.4	56.9	92.3
8	24.8	43.5	89.0
9	24.8	54.5	93.1
10	32.1	45.9	97.2
Mean (%)	26.4	50.6	92.6
SD	3.3	4.7	2.7
CV (%)	12.5	9.3	2.9

Pooled serum L : low value
Pooled serum M: moderate value
Pooled serum H: high value

Table 2 Between-run precision in TRAb kit

	Pooled serum L	Pooled serum M	Pooled serum H
1	20.0	46.5	89.3
2	21.7	48.4	93.9
3	21.3	47.7	92.1
4	18.5	51.1	96.5
5	22.1	53.2	94.5
Mean (%)	20.7	49.4	93.3
SD	1.5	2.7	2.7
CV (%)	7.2	5.5	2.9

血清についても有意な変化は認められなかった (Fig. 2).

次に温度を 25°C で固定し、時間を 10分, 15分, 30分, 60分と変化させた場合, 10分で陰性コントロール, 低値血清および中等度血清の B/T 比が多少高くなるのが認められたが, 15分以降ではほぼ一定であった (Fig. 3).

次に, 第2 インキュベーションの検討の際には第1 インキュベーションの温度と時間を 25°C, 15分としたが, 第2 インキュベーションの時間を 60分で固定し, 温度を 25°C, 37°C, 42°C と変化させた場合, 37°C の際に陰性コントロールおよび低値血清の B/T 比が多少低くなるのが認められたが, その他の血清についてはほぼ不変であった (Fig. 4).

インキュベーション温度を 37°C で固定し, 時間を 30分, 60分, 90分と変化させた場合, 陰性血

III. 成 績

1. 基礎的検討

1) インキュベーション温度および時間の影響 (Figs. 2, 3, 4, 5)

まず, 第1 インキュベーションの検討の際には第2 インキュベーションの温度と時間を 37°C, 60分としたが, 第1 インキュベーションの時間を 15分で固定し, 温度を 4°C, 25°C, 37°C と変化させた場合の B/T 比 (Bound/Total, %) は, いずれの

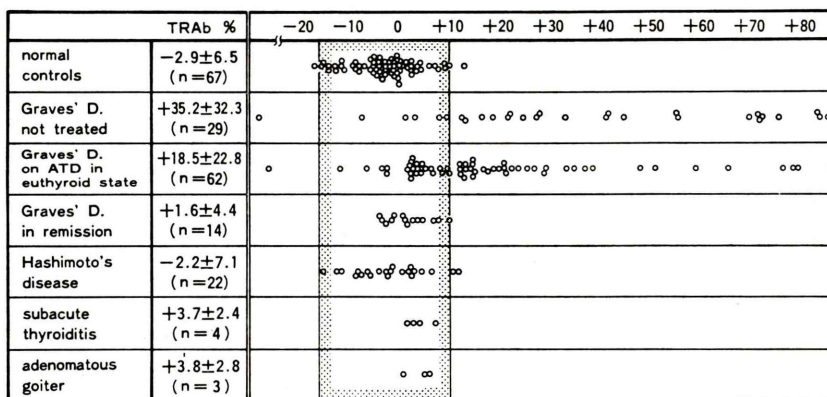


Fig. 6 TRAb values in normal controls and patients with various thyroid diseases.

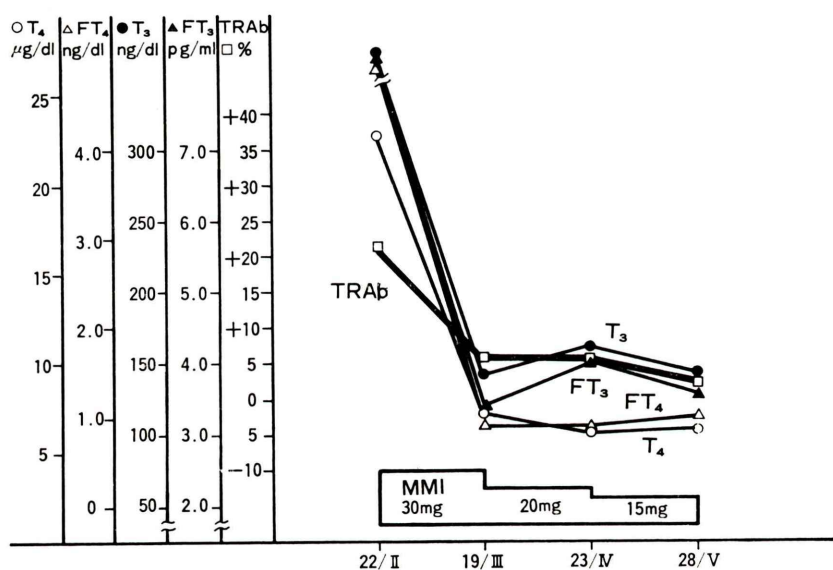


Fig. 7 T.A. 17 years old female Graves' disease.

清と低値血清とについて時間が長くなるにつれて、B/T比が高くなる傾向が認められたが、その他の血清については、ほぼ不変であった (Fig. 5).

2) 精度, 再現性

i) 測定内再現性 (Table 1)

TRAb が低, 中, 高値のプール血清を用いて, 同一キット内で10回測定を行った場合の変動係数 (C.V.) は, それぞれ 12.5%, 9.3% および 2.9% であった.

ii) 測定間再現性 (Table 2)

測定日とロット番号を変えて, 前述と同じプール血清を用いて, 5回の測定を行った場合の C.V. はそれぞれ 7.2%, 5.5% および 2.9% であった.

2. 臨床的検討

1) 健康正常者における TRAb 値 (Fig. 6)

健康正常者 67 例における TRAb 値の平均は $-2.9 \pm 6.5\%$ で, 男 34 例の平均は $-1.5 \pm 7.1\%$, 女 33 例の平均は $-4.4 \pm 5.6\%$ であり, 男女間に

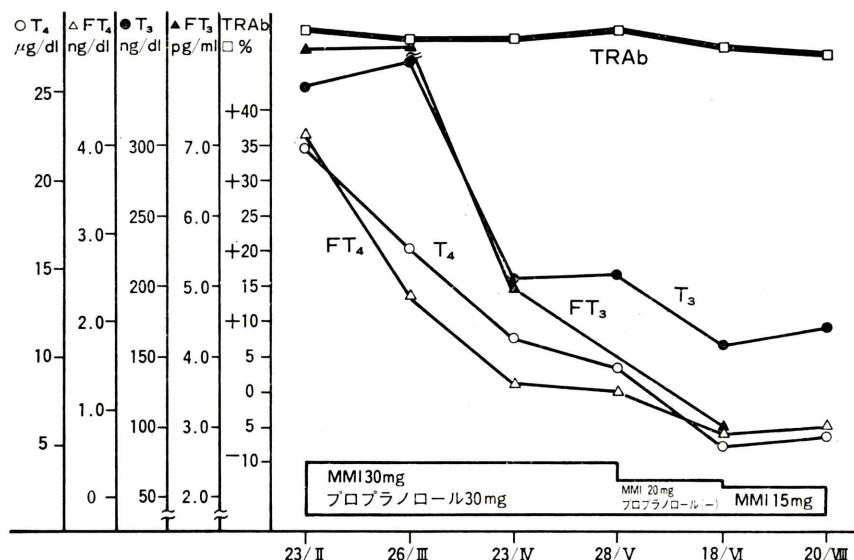


Fig. 8 M.S. 39 years old female Graves' disease.

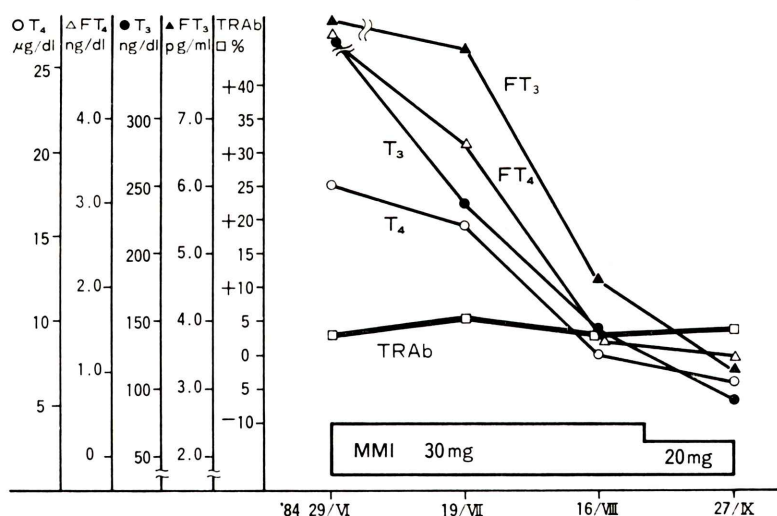


Fig. 9 T.Y. 45 years old female Graves' disease.

有意差は認められなかった。

平均値に 2 S.D. を加えた値は +10.1% であり、+10% 以下を陰性とした。

2) 甲状腺疾患患者における TRAb 値 (Fig. 6) 未治療バセドウ病患者の TRAb 値の平均は $+35.2 \pm 32.3\%$ であり、その実測範囲は $-49.2 \sim +84.0\%$ にあった。同患者 29 例中において TRAb

値は 6 例が 10% 以下で、その陽性率は 79.3% であった。治療群 62 例における TRAb 値の平均は $+18.5 \pm 22.8\%$ で、甲状腺機能が正常状態での陰性率は 41.9% であった。寛解群 14 例においては全例が TRAb 陰性であった。橋本病患者 22 例における TRAb 値の平均は $-2.2 \pm 7.1\%$ で、20 例において陰性であり、陽性を示したものは 2 例

(9.1%)で、その値は+10.5および+11.6%であった。亜急性甲状腺炎と腺腫様甲状腺腫患者は全例がTRAb陰性であった。

3) 抗甲状腺剤治療によるTRAb値の変動 (Figs. 7, 8, 9)

未治療バセドウ病患者を抗甲状腺剤で治療した場合のTRAb値の変動は、治療により血中 T_4 、 T_3 が減少するとともにTRAb値も並行して低下するもの、未治療時高値陽性であり、甲状腺ホルモン正常化後もなお高値を持続するもの、未治療時より陰性で、治療後も陰性を持続するものの3群に大別された。それぞれ代表例を図に示す。

IV. 考 察

1. 基礎的検討

基礎的検討においてはまず、第1インキュベーション時間が10分の際に、TRAb値が低値を示すような血清で、多少B/T比が高くなる傾向が認められたが、測定値への影響はほとんどないものと思われた。温度の影響はいずれの血清についても認められなかった。第2インキュベーションについては、TRAbが低値を示す血清で温度が37°Cの時、B/T比が低くなる傾向が認められ、時間については、時間が長くなるにつれてB/T比が高くなる傾向が認められた。しかし、これらの差違は、実際の測定値ではほとんど問題はないものと考えられた。これらの結果より、第1インキュベーションで温度は室温、時間は15分、第2インキュベーションで温度は37°C、時間は60分にすることは適切であると考えられた。

精度、再現性については、同一測定内での低値検体においてのみC.V.が12.5%と10%を越えた以外、測定内、測定間ともに10%以下できわめて良好であり、精度の点で優れた方法であると思われた。

2. 臨床的検討

健康正常者67例の平均は $-2.9 \pm 6.5\%$ 、平均値に2 S.D.を加えた値は+10.1%であり、1例を除いてすべて+9.9%以下であったことより、+10%以下を陰性とした。

未治療バセドウ病患者29例におけるTRAbの陽性率は79.3%であったが、これはShewring & Smith²⁾の約80%、加藤ら³⁾の79%と近似していたが、玉置ら⁴⁾の94%、赤水ら⁵⁾の91%に比べると低値であった。すなわち、本法の陽性率がほぼ80%以上であり、また、偽陽性率がきわめて低値であることから考えると、本法のバセドウ病診断上の意義はきわめて大きいと考えられた。

抗甲状腺剤治療により甲状腺機能が正常化した62例のバセドウ病患者において、TRAb値が10%以下を示したのは26例(41.9%)であり、なお陽性を示していたのは36例(58.1%)であったが、これらの結果は甲状腺機能が正常化しても、TRAb値がすべて陰性化するものではなく、甲状腺機能とTRAb値とは並行しない場合もあることを示唆するものと考えられる。加藤ら³⁾は血中 T_4 、 T_3 が正常化した3~6か月後に平均TRAb値は正常範囲に入ると述べている。

抗甲状腺剤の治療のみで1年以上寛解が続いている14例において、TRAb値が全例で10%以下と陰性であったことは興味深い。TRAb値が陰性である患者が必ず寛解するとは言えないが、寛解を示している患者においてTRAb値が陰性であることは、寛解の十分条件ではないが必要条件であるものと考えられる。

バセドウ病の治療経過を T_4 、 T_3 などと一緒にTRAbについてもその変動をみたところ、 T_4 、 T_3 などと並行した動きを示すものと、 T_4 、 T_3 などの動きとは無関係なものに分けられた。さらに、後者は異常高値が続くものと、当初より正常域を持続するものとに分けられた。これらを総合して見ると、TRAb値が未治療時に+60%を越えると甲状腺機能が改善しても低下し難く、40~50%以下の場合は治療と並行して低下する可能性が大きいものと考えられた。なお、当初よりTRAb値が正常域にあるような症例は抗甲状腺剤治療に比較的良好に反応するものと考えられた。

橋本病の一部でTRAb値が高値を示すものがあると報告されているが、われわれの症例ではほとんどの症例が陰性であり、陽性とした2例にお

ける TRAb 値は $+10.5\%$ 、 $+11.6\%$ と正常上界を僅かに越える値であった。

亜急性甲状腺炎、腺腫様甲状腺腫の症例の TRAb は、少数例ではあるが全例が陰性であり、バセドウ病とは明らかに鑑別できるものと考えられる。

以上バセドウ病以外の甲状腺疾患の TRAb の偽陽性率は 6.9% と低値であった。今回、われわれが集めたバセドウ病以外の甲状腺疾患は、症例数が少なく結論づけるのは早計であると考えられ、今後例数を重ね検討を要するものと思われた。

V. 総 括

われわれは、TRAb キットを用い血中 TRAb を測定し、基礎的ならびに臨床的検討を行い、次の結果を得た。

1) インキュベーション温度および時間を変化させた場合の測定値への影響は、ほとんど認められなかった。

2) 精度・再現性は測定内で C.V. $2.9\sim12.5\%$ 、測定間で $2.9\sim7.2\%$ といずれも良好であった。

3) 健康正常者67例の TRAb 値の平均は $-2.9\pm6.5\%$ で、平均値に 2 S.D. を加えて得た値は $+10.1\%$ であり、正常を $+10\%$ 以下とした。

4) 未治療バセドウ病患者の TRAb 値の平均は $+35.2\pm32.3\%$ で、陽性率は 79.3% であった。抗甲状腺剤治療で euthyroid 状態にある患者の TRAb 値の平均は $+18.5\pm22.8\%$ で、陰性率は

41.9% であり、また、1年以上寛解が続いている患者の平均は $+1.6\pm4.4\%$ で、全例が陰性であった。バセドウ病患者における TRAb は抗甲状腺剤治療により、甲状腺機能とほぼ並行して低下する場合、機能の改善と並行しない場合とが認められた。

5) 橋本病では $-2.2\pm7.1\%$ 、亜急性甲状腺炎と腺腫様甲状腺腫では全例が陰性であった。

6) 以上の成績より、本キットによる血中 TRAb 測定法は精度に優れ、これにより測定された TRAb 値はバセドウ病の診断と治療上きわめて有用な指標となり得るものと考えられた。

TRAb キットを提供していただいた日本トラベノール株式会社に謝意を表します。

文 献

- 1) Southgate K, et al: A receptor assay for the measurement of TSH receptor antibodies in unextracted serum. Clin Endocrinol **20**: 539-543, 1984
- 2) Shewring G, Smith BR: An improved radioreceptor assay for TSH receptor antibodies. Clin Endocrinol **17**: 409-417, 1982
- 3) 加藤輝夫, 他: TSH Displacing Activity (TDA) 測定の基礎的, 臨床的検討. ホと臨床 **32**: 789-792, 1984
- 4) 玉置治夫, 他: 血中 TSH レセプター抗体測定とその臨床的応用. 臨床病理 **32**: 637-640, 1984
- 5) 赤水尚史, 他: TBI 測定キットの基礎的ならびに臨床的検討. ホと臨床 **32**: 195-204, 1984