

《ノート》

Immunoradiometric Assay (IRMA) による抗サイロ グロブリン抗体測定の基礎的検討

Fundamental Study on Measurement of Antithyroglobulin Antibody by Immunoradiometric Assay (IRMA)

高田一太郎* 渡辺 和子* 金森 晃* 阿部 好文*
矢島 義忠*

Ichitaro TAKADA, Kazuko WATANABE, Akira KANAMORI,
Yoshifumi ABE and Yoshitada YAJIMA

Department of Medicine, Kitasato University School of Medicine

I. はじめに

抗サイログロブリン抗体の測定は、一般にはタンニン酸処理赤血球凝集反応による方法 (TGHA) で測定されているが、半定量法であるという制約がある。そのため定量的に測定ができ、多検体処理が可能でしかも高感度の radioimmunoassay (RIA)¹⁾ あるいは enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)²⁾ が開発されている。

著者らは Mariotti ら³⁾の方法に従い, immuno-radiometric assay (IRMA) を確立し, この系は自己免疫性甲状腺疾患における抗甲状腺抗体産生機構の解明に応用しうると考えられたので報告する。

II. 対 象

本院内分泌外来を受診した慢性甲状腺炎 34 例 (すべて女子, 年齢は 28~67 歳, 平均 47 歳) を対象とした。サイロイドテスト (TGHA) ならびにマイクロゾームテスト (MCHA) 陰性例では甲状腺針生検を行い組織学的に診断した。また血中サイ

ログロブリン値はすべて正常範囲 (<45 ng/ml) であった。

対照群は、北里ヘルス・サイエンス・センターの人間ドックで健常者と判定され、甲状腺腫をみとめず、家族歴に内分泌疾患がなく、血中 free T₄⁴⁾, free T₃⁵⁾ および TSH (RIA) が正常の女子 18 例 (年齢は 31 歳~65 歳, 平均 48 歳) であった。

III. 方 法

1. ヒトサイログロブリン (Tg) の精製

外科手術時に得られたパセドウ病甲状腺組織より, Ui ら⁶⁾の方法により 1.75 M (NH₄)₂ SO₄ による沈澱分画を DEAE-Cellulose Column Chromatography⁷⁾ にて精製, SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis あるいはゲル濾過法にて 19 Sであることを確かめた。

2. 抗 Tg 自己抗体 (anti-Tg Ab) の精製

先の Tg を CNBr で活性化した Sepharose 4B (Pharmacia 社製) に coupling し, TGHA 強陽性の慢性甲状腺炎患者血清 IgG から affinity chromatography⁸⁾ を行い, 0.01 M carbonate buffer, pH 10.4 にて溶出, anti-Tg Ab を精製した。

* 北里大学医学部内科学

受付: 59年11月20日

最終稿受付: 60年4月22日

別刷請求先: 神奈川県相模原市北里1-15-1 (☎228)

北里大学医学部内科学

高田 一 太 郎

Key words: Antithyroglobulin antibody. Immunoradiometric assay.

牛血清アルブミン (BSA) を標準とし, Lowry ら⁹⁾の方法により測定した蛋白量で anti-Tg Ab 量を表示した. anti-Tg Ab 測定の標準曲線作製には, この anti-Tg Ab を1%正常牛血清 (NBS) を加えた buffer で溶解して使用した.

3. anti-Tg Ab の immunoradiometric assay (IRMA)

1) 抗原の coating

予備実験にてポリスチレンチューブ (Assist 社製) に phosphate buffered saline, pH 7.6 (PBS) にて Tg 濃度を蛋白量として 3, 6, 12, 30, 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で 20°C, 24時間かけて coating を行い, TGHA 強陽性患者血清 100 μl を添加した. Hunter and Greenwood の方法により ^{125}I をラベルした羊抗ヒト IgG (^{125}I -anti-IgG Ab, NEN 社製, 比放射能 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$) のチューブへの結合率は総添加量のそれぞれ 4.1, 14.2, 23.8, 25.9, 24.1% と 12 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上ではかわらなかった. Tg 12 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で 2, 5, 24 時間かけて coating を行い, 同様に TGHA 強陽性患者血清 100 μl を添加, ^{125}I -anti-IgG Ab の結合率をみたところ, それぞれ 20.2, 24.0, 25.0% であった.

以上の検討から tube の coating は Tg 12 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で 20°C, 5 時間とし, この Tg 液を吸引除去後 1% BSA を含む PBS を加えさらに 20°C, 2 時間 incubate した. BSA を含む液を除去後, PBS で 1 回洗浄した.

2) アッセイ方法

予備実験で TGHA 強陽性患者血清 100 μl を tube 内で 20°C および 45°C で 5 時間 incubate し, ^{125}I -anti-IgG Ab を添加したところ, 総添加量のそれぞれ 18.1, 24.1% が結合した. 同血清を 45°C で 2 および 5 時間 incubate したところ, ^{125}I -anti-IgG Ab の結合率はそれぞれ 17.1, 20.2% であった. したがって 1st incubation は 45°C, 2 時間とした.

TGHA 強陽性患者血清および同血清を 1% NBS を含む PBS で 10, 10^2 , 10^3 , 10^4 倍に希釈しその 100 μl で 1st incubation を行い ^{125}I -anti-IgG Ab の結合率をみたところ, 患者血清では添加総

放射能の 15.8%, 各希釈倍数ではそれぞれ 16.0, 14.5, 4.3, 2.5% であった. 健常者血清および同様の希釈における ^{125}I -anti-IgG Ab の結合率はすべて 3% 以下であった. したがって血清は 10 倍に希釈してその 100 μl を使用し測定した.

^{125}I -anti-IgG Ab を 50% NBS を含む PBS に溶解し, 40,000~50,000 cpm を各 tube に添加, 20°C で 18 時間 incubate した (2nd incubation). 非結合放射能を吸引除去, 蒸留水で 5 回洗浄後, ガンマー・カウンターで結合放射能を計測した.

Tg を coat した tube に, 1st incubation で PBS のみ添加したものを blank tube とし, その結合カウントを差し引いて各 tube に結合した放射活性を, 添加した総放射能に対する割合で示した (% Bound of ^{125}I -anti-IgG Ab). アッセイはすべて triplicate で行った.

IV. 結 果

1. 吸収試験

TGHA 陰性血清ならびに 409,600 倍陽性血清にそれぞれ 1.5~150 μg の Tg を添加し 4°C で一晚 incubation した後, 遠心, その上清の Tg Ab を IRMA で測定した. TGHA 陰性血清の IRMA による ^{125}I -anti-IgG Ab の結合率は総放射能の 2.5% であり, 同血清と Tg 各量を incubation した後の上清の IRMA 結合率は, いずれも総放射能の 2.4% 以下であった. TGHA 409,600 倍陽性血清の IRMA 結合率は 29.2% であり, 同血清と Tg を incubation 後上清の IRMA 結合率を測定したところ Tg 7.5 μg で 3.2% と低値を示した (Fig. 1).

2. 標準曲線

5 回の IRMA による標準曲線を示す (Fig. 2). anti-Tg Ab の 15~1,500 ng/ml の範囲が測定された.

3. アッセイ内, アッセイ間変動

アッセイ内変動係数は anti-Tg Ab 33 ng/ml では 8.6%, 300 ng/ml では 6.7%, 850 ng/ml では 11% であった (Table 1a).

アッセイ間変動係数は anti-Tg Ab 33 ng/ml で 6.7%, 300 ng/ml で 8.6%, 850 ng/ml で 15.8% で

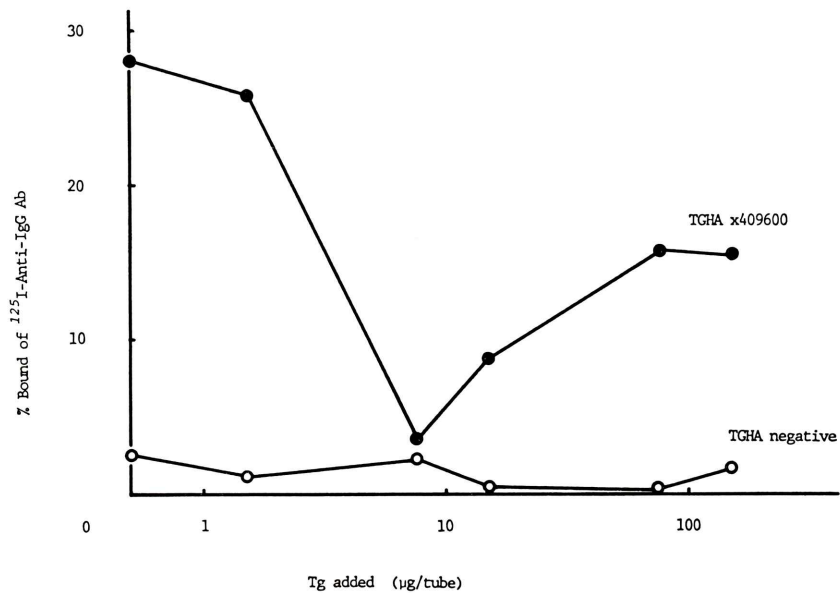


Fig. 1 Absorption test. TGHA positive serum (closed circle) and negative serum (open circle) were incubated with various amount of Tg. After centrifugation, supernatant was assayed for Tg-Ab by IRMA.

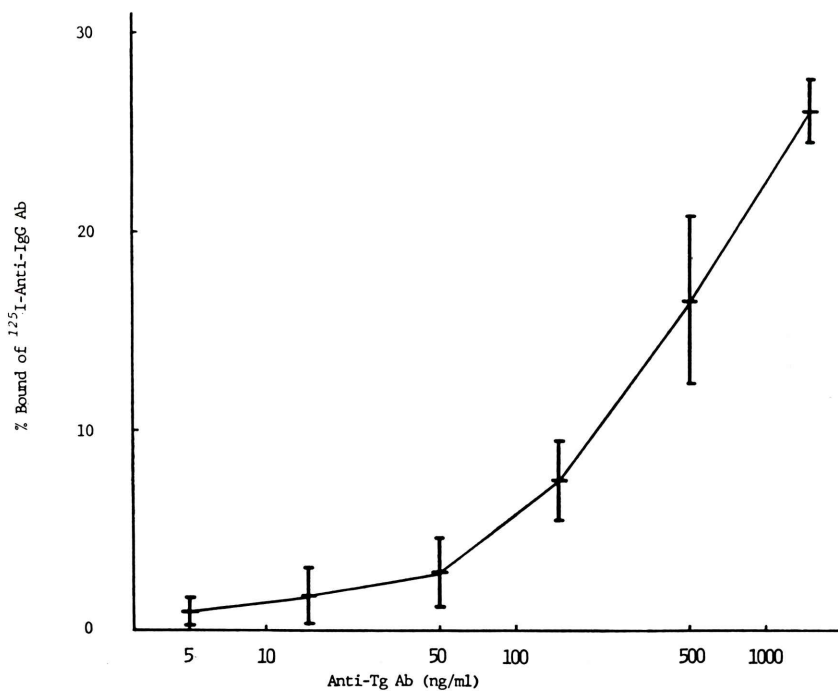


Fig. 2 Standard curve of IRMA for anti-Tg antibody (mean \pm SD of 5 assays).

Table 1 Intraassay variation (a) and interassay variation (b) of IRMA for anti-Tg antibody

(a) Intraassay		Anti-Tg Ab (ng/ml)					Mean±SD	CV (%)
Serum 1	36.0	35.5	30.0	29.0	32.0		32.5± 2.8	8.6
Serum 2	288	280	335	290	288		296 ±20	6.7
Serum 3	895	750	740	950	950		845 ±94	11.0

(b) Interassay		Anti-Tg Ab (ng/ml)					Mean±SD	CV (%)
Serum 1	36.0	32.0	37.5	34.0	38.5		35.6± 2.4	6.7
Serum 2	288	270	290	298	348		299 ±26	8.6
Serum 3	895	760	790	730	1100		855 ±135	15.8

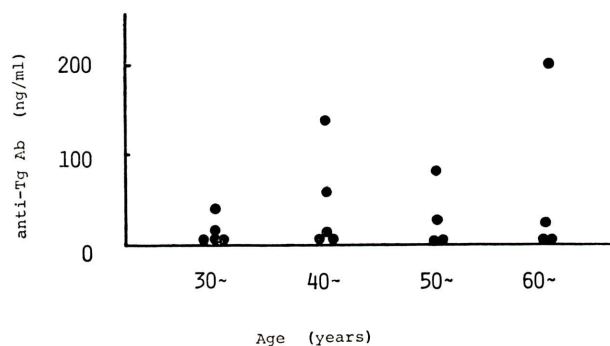


Fig. 3 Anti-Tg Ab levels in normal females by IRMA.

あった (Table 1b). anti-Tg Ab 1,000 ng/ml 以上ではアッセイ間変動係数は16%以上であった。

4. 健常者の IRMA による anti-Tg Ab の測定

健常者の anti-Tg Ab 価は、30歳代では 50 ng/ml 以下であったが、40歳以上では比較的高値を示すものがみとめられた。健常者では 200 ng/ml 以下であった (Fig. 3)。

5. IRMA による anti-Tg Ab と TGHA および MCHA との関係

慢性甲状腺炎ならびに健常者血清での結合カウント数を TGHA 1,600 倍の患者の結合カウントに対する比で表示した (IRMA binding ratio). IRMA binding ratio の正常値は、先の 18 例での検討による範囲とした。

横軸に TGHA の対数尺度をとり、縦軸に IRMA binding ratio をとると、両者は正の相関 ($r=0.87$, $p<0.005$) を示した。TGHA 100 倍以下の慢性甲状腺炎 18 例のうち 9 例では、IRMA で

陽性であった (Fig. 4a)。IRMA binding ratio と MCHA の間に相関をみとめなかった (Fig 4b)。

V. 考 察

自己免疫応答を惹起する要因として Roitt ら¹⁰⁾ は血中の自己抗原過剰を、Weigle¹¹⁾ は免疫応答調節機構の異常、自己抗原の修飾あるいはウイルス感染等による多クローン性 B 細胞の活性化をあげている。抗甲状腺抗体産生機序の解明は自己免疫性甲状腺疾患の病態および病因解明のために重要と考えられるがその詳細は未だ不明である。

一般に臨床でもちいられている TGHA は半定量法であるが、本 IRMA は定量的に血中抗体価が測定でき、しかも多検体を同時に処理できることが最大の特徴であると考えられる。TGHA 陽性血清と Tg の吸収試験ではほぼ対照血清のレベルまで上清の抗 Tg 抗体価が抑制された。また本法による抗 Tg 抗体価と TGHA が正の相関を示

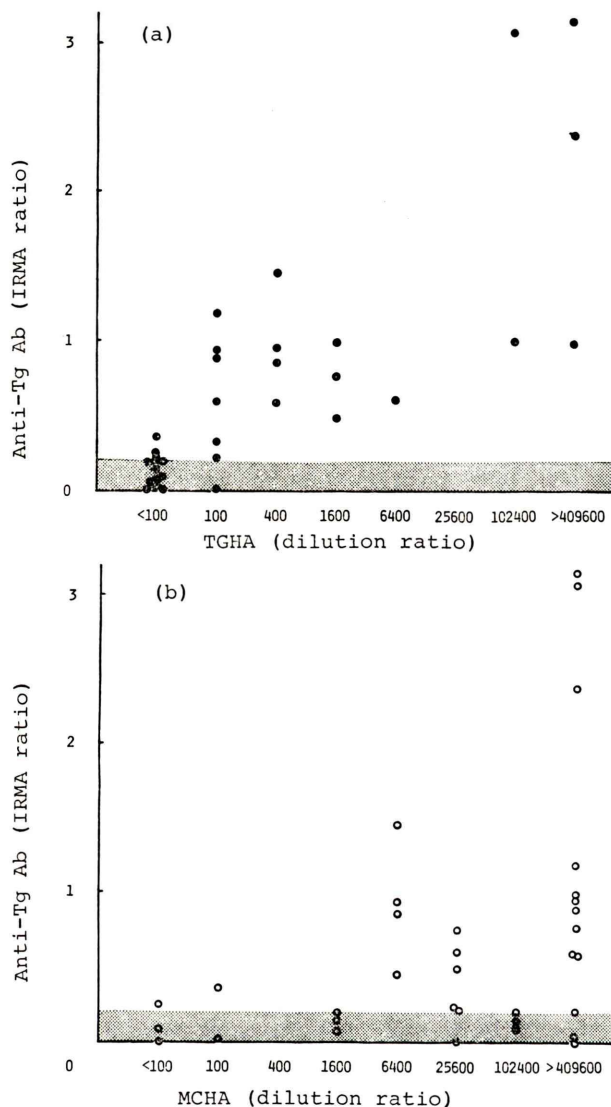


Fig. 4 Correlation between anti-Tg Ab by IRMA and TGHA (a) or MCHA (b).

したにもかかわらず MCHA とは相関を示さなかったことより、本アッセイは特異的に抗 Tg 抗体を測定しているものと考えられる。アッセイ間の変動が特に抗 Tg 抗体の高値の時、比較的高かったが、アッセイ内変動はほぼ満足できるものであった。標準曲線は 50~1,000 ng/ml ではほぼ直線を示したが、15 ng/ml まで測定可能であった。健常者の anti-Tg Ab 価が 200 ng/ml であったことより、測定感度は十分であると考えられた。

慢性甲状腺炎31例中 TGHA 400 倍以上の13例 (42%) はすべて IRMA で陽性であった。TGHA で100倍以下の18例中9例では IRMA で陽性であった。IRMA で 200 ng/ml 以上の陽性例は22例 (全体の71%) であった。しかし Wheatman ら¹²⁾ は、ELISA により自己免疫性甲状腺炎31例の全例に IgG class の抗 Tg 抗体を検出している。著者らも彼らと同様の方法で ELISA を行ってみたが、測定感度は IRMA とほぼ同程度であった。

著者らの測定した慢性甲状腺炎例は TGHA 陰性例が比較的多く、陽性率の相違は測定感度の違いによるものではなく測定対象の相違、あるいは正常値の設定方法の違いによるものと考えられる。

著者ら¹³⁾は先に、抗甲状腺抗体が自己免疫性甲状腺疾患患者のみならず、その近親者にも高頻度に見いだされることを報告した。本稿では少数例のみの検討ではあるが健常者でも抗 Tg 抗体陽性の存在することを示した。健常者での抗甲状腺抗体陽性の意義はさらに検討を要するものと考えられる。

VI. 結 語

immunoradiometric assay (IRMA) による抗 Tg 抗体測定の基礎的検討を行った。標準曲線は抗 Tg 抗体 50~1,000 ng/ml の範囲でほぼ直線を示した。抗 Tg 抗体高値の時のアッセイ間変動が比較的高かったが、アッセイ内変動は11%以下と良好であった。本法による抗 Tg 抗体価は TGHA と正の相関を示した。TGHA 陰性の慢性甲状腺炎18例中9例では本法で陽性であった。

本法は、血中抗体を定量的にしかも多検体を同時に測定することが可能で、自己免疫性甲状腺疾患における抗甲状腺抗体産生機序の解明に応用しうると考えられた。

ご協力頂きました 北里大学医学部 外科学、内田久則助教授、貴重なご助言を頂きました 同 臨床病理学、小出朝男講師（現、北里バイオケミカル・ラボラトリーズ 所長）に感謝します。

文 献

1) Delespierre G, Hubert C, Gausset Ph, et al: Radioimmunoassay for human antithyroglobulin anti-

bodies of different immunoglobulin classes. *Horm Metab Res* **8**: 50-54, 1976

- 2) Voller A, Bidwell DE, Burk CL: An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies to thyroglobulin. *Proc Soc Expl Biol Med* **163**: 402-405, 1980
- 3) Mariotti S, Pisani S, Russova A, et al: A new solid phase immunoradiometric assay for anti-thyroglobulin autoantibody. *J Endocrinol Invest* **5**: 227-233, 1982
- 4) 高田一太郎, 増戸 尚, 見坊 隆, 他: Free thyroxine の radioimmunoassay. *北里医学* **11**: 582-587, 1981
- 5) 高田一太郎, 阿部好文, 黒川秀彦, 他: Corning FT₃ RIA Kit による血中 free T₃ 測定の基礎的臨床的検討. *ホルモンと臨床* **31**: 1235-1239, 1983
- 6) Ui N, Tarutani O: Purification of hog thyroglobulin. *J Biochem* **50**: 508-518, 1961
- 7) Shulman S, Armenia JP: Studies on thyroid proteins I. The components of hog thyroid tissue and preparation of purified thyroglobulin by column chromatography. *J Biol Chem* **238**: 2723-2731, 1963
- 8) Salabe CGB, Andreoli M: Immunoreactive properties of anti-thyroglobulin autoantibodies isolated by affinity chromatography from human thyroiditis serum. *Clin Exp Immunol* **31**: 218-225, 1978
- 9) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**: 265-275, 1951
- 10) Roitt IM, De Carvalho LC: The immunological basis of autoimmune disease. In receptors, antibodies and disease. Chiba Foundation Symposium 90, Pitman, London, pp. 22-112, 1982
- 11) Weigle WO: Analysis of autoimmunity through experimental models of thyroiditis and allergic encephalitis. *Adv Immunol* **30**: 159-255, 1980
- 12) Wheatman AP: B cell function in autoimmune thyroid disease. MD Thesis, University of Newcastle-upon Tyne UK, p. 87, 1983
- 13) 見坊 隆, 高田一太郎, 増戸 尚, 他: 甲状腺疾患患者の血縁者の抗甲状腺抗体の頻度. *日内分泌会誌* **50**: 1058-1064, 1979