Studies on in vitro Binding of T_3 by the Sera in Various Thyroidal Diseases

Katsuhiko SHIOMI

Department of Medicine II, Kyoto Prefectural University of Medicine
(Director : Professor Susumu Marumoto)

It is well known that most of the thyroxine (T_4) and 3, 5, 3'-triiodothyronine (T_3) in blood are usually bound to specific proteins, Thyroxine Binding Protein (TBP). It is generally accepted that T_3 has greater biological effect and its disappearance half-life is more rapid than that of T_4 , which has been ascribed at least in part to its weaker binding to TBP.

Present study is to assess the effect of alterations of TBP in various thyroid disease on the binding of T_3 to serum protein in vitro employing various methods.

Material and Method

Various patient sera were used such as normal euthyroid subject, hyperthyroidism, pregnant with hyperthyroidism, pregnant and hypothyroidism. Also the patient sera of familiar TBG deficiency and of the Hashimoto's disease whose γ -globulin showed abnormal binding of T_3 in vitro were used.

Each serum was mixed in vitro with I^{131} - T_4 and I^{131} - T_3 to give a final concentration of 0.06 μ g/ml and 0.006 μ g/ml, respectively, and the mixtures were incubated at room temperature for 1 hr. and then subjected to electrophoresis. Electrophoresis on cellulose-acetate membrane was carried out at veronal buffer (pH 8.6 μ =0.06) and Tris-maleate buffer (pH 8.6 μ =0.05) for 1 hr. at constant mA (0.5 mA/cm). Paperelectrophoresis was also done in glycine acetate buffer (pH 9.0 μ =0.1) for 2 hr. at constant mA (0.5 mA/cm). At the end of electrophoresis, the strips were stained by Ponceau 3R TCA. Autoradiography was performed by exposing the strips to X-ray film for about 3 weeks. Actigraphy also was carried out to ascertain the RI peak. On the other hand, the strips were sectioned into each protein zones; i.e. TBPA, albumin, TBG, β -globulin and γ -globulin and then the distribution of radioactivity was calculated.

Immunoelectrophoresis were performed by slight modifications of Scheidegger's technique in phosphate buffer (pH 7.4 μ =0.05), using 1% buffered agar gel plate at a constant mA (2.5–3.0 mA/cm) for 2.5 hr. Precipitating arcs of protein became significant when diffusion was performed for 24 hr. with antiserum that had been added to central well, and then the agar gel plate was washed for 48 hr. with saline and water. Protein of the plate was stained and autoradiography was done as described above.

T_3 binding capacity of TBG & albumin, and T_4 binding capacity of γ -globulin region were measured according to the saturation method that is used generally to calculate maximal T_4 binding capacity of TBG.

Results

In the present study using paper-and cellulose-acetate electrophoresis and immuno-electrophoresis, the results were as follows;

1). T_3 was bound by both TBG and albumin, and T_3 binding capacity of TBG was 14 ± 2.1 ug/dl in normal subject, 5 ± 2.4 ug/dl in hyperthyroidism, 44 ± 7.2 ug/dl in pregnant and 45 ± 8.1 ug/dl in pregnant with hyperthyroidism; i.e. T_3 binding capacity of TBG was depend on the unsaturated TBG capacity of T_4 .

2). T_3 RSU value was proportionate to RI distribution of I^{131} - T_3 at albumin and inversely proportionate to that at TBG in cellulose-acetate electrophoresis. Also the converse of T_3 RSU value had a correlation ($r=0.79$) with unsaturated TGB capacity of T_4 .

From these results, it might be possible to postulate the maximal T_4 binding TBG capacity from T_3 RSU value and serum T_4 concentration.

3). Sera from a familiar partial TBG decreased patient attached not only T_4 but T_3 at TBG in vitro.

4). The patient serum with Hashimoto's disease having abnormal high binding of T_4 in the γ -globulin region had also high binding of T_3 in the γ -globulin region. The high binding in the γ -globulin region of T_3 or T_4 was remarkably decreased when the serum had been absorbed by human thyroglobulin before electrophoresis, or when the patient had been treated continuously with steroid hormone.

(See pp. 69~83)

諸種甲状腺疾患における T_3 と血清蛋白の in vitro での結合にかんする研究

京都府立医科大学第II内科学教室（主任 丸本 晋教授）

塩 見 勝 彦

（昭和46年2月18日受付）

血中に微量しか存在しない T_3 が T_4 より強力でしかも速効的な甲状腺ホルモン作用を有するため、 T_3 と血清蛋白との結合動態が重要視されてきた。familial TBG deficiency, γ -globulin 分画に T_4 が結合する橋本病をふくむ諸甲状腺疾患における T_3 の血中存在様式を in vitro にて cellulose-acetate 膜および paper-electrophoresis, radioimmuno-electrophoresis で検討した結果、 T_3 と血清蛋白との結合は、血清の TBP の変動と内因性 T_4 濃度によって左右されることを明らかにした。

I 緒 言

循環血中にある甲状腺ホルモンは大部分が血清のいわゆる TBP (Thyroxine Binding Protein), すなわち TBG (Thyroxine Binding Globulin), TBPA (Thyroxine Binding Prealbumin), および albumin と結合しているといわれている。そして血中の甲状腺ホルモンのほとんどを thyroxine (以下 T_4 と略す) が占め、3,5,3'-triiodothyronine (以下 T_3 と略す) がわずかに混在し、血中の T_3 量は T_4 量の3~5%程度にすぎないが^{1,2)}、 T_3 の甲状腺ホルモンとしての活性は T_4 より強力でしかも速効性である。このことは TBP との結合が T_4 より弱いので、末梢組織に転入されやすいためとも考えられている³⁻⁵⁾。 T_3 と血清との結合はその大部分が TBG に結合し、TBPA とは結合しないとされている⁶⁻¹²⁾。血中の微量に存在する T_3 と血清蛋白との結合動態については、 T_3 が T_4 より強いホルモン作用をもつので重要視されつつあるが、血清の T_3 結合蛋白の性質、in vivo での T_3 と血清蛋白との結合状態や、蛋白結合型 T_3 と遊離型 T_3 、および T_4 との関連など、なお未解決の点が多いのが現状である。

Tanaka & Starr⁷⁾, Mitchel ら⁹⁾は paperelectrophoresis で, Braverman ら¹³⁾は agar gel electrophoresis で T_3 が albumin にも結合するとしたが、pHにより左右されるとした報告があり^{8,14,15)}、最近では radioimmuno-electrophoresis を用いて TBG, albumin のほかに、 T_3 が lipoprotein と結合するとするものもある¹⁶⁾。甲状腺疾患における T_3 と血清蛋白との in vitro での結合に関してはすでに Mitchell ら⁹⁾, Braverman ら¹⁷⁾の報告があるが、この論文の研究では paperelectrophoresis, radioimmuno-electrophoresis のほかに cellulose-acetate electrophoresis を用いて in vitro で T_3 が TBG, albumin に結合することを確認し、familial TBG deficiency の一症例および γ -globulin 分画に多量の T_4 が結合する橋本病の一症例を含めた甲状腺疾患々々について、 T_3 と血清蛋白との結合状態を in vitro で検討した成績を報告する。

II 実験の材料と方法

(1) 実験対象

下記の諸疾患々々血清を用い、甲状腺機能正常のものを対照とした。

すなわち

- ① 甲状腺機能正常者： T_3 ¹³¹ Resin Sponge Uptake (以下 T_3 RSUと略す) 25~35%で T_4 値 1.5~4.5

のもの。

- ② 甲状腺機能亢進症： T_3 RSU 45～65%で T_7 値6.0～13.5のもの。
- ③ 妊婦(妊娠4～8カ月) T_3 RSU<25%で T_7 値1.5～4.5のもの。
- ④ 甲状腺機能亢進症で妊娠したもの： T_3 RSU 28%～38%で T_7 値4.5～9.5のもの。
- ⑤ 甲状腺機能低下症： T_3 RSU<20%で T_7 値0.42～1.2のもの。
- ⑥ familiar TBG deficiency の1家系(この家系はTBGの欠損ではなく、TBG減少である¹⁸⁾中の3例：各々のTBG最大結合能が4.5, 4.8, 5.7 μ g/dl, T_3 RSU 値が52.0, 64.0, 50.0%のもの。
- ⑦ T_4 が血清の γ -globulin 分画に多量に結合する橋本病患者¹⁹⁾： T_3 RSU<10%

(2) 実験材料

- 1) T_4 および T_3 ；l-thyroxine sodium salt, 3,5,3'-triiodothyronine sodium salt (半井化学)。
- 2) 放射性 T_4 および T_3 ； I^{131} - T_4 (T_4^{131}), I^{131} - T_3 (T_3^{131}) (Abbot Laboratories)
- 3) Cellulose-acetate 膜；Separax (富士写真フイルム社製), Oxoid (Oxoid Ltd. London), Selecta (Carl-Schleicher & Schüll), それぞれ20×70mmにて使用した。
- 4) Paper；東洋汙紙No. 51を20×100mmとして使用した。
- 5) 緩衝液；phosphate buffer (pH 7.4, μ =0.05), veronal buffer (pH 8.6, μ =0.06), tris-maleate buffer (pH 8.6, μ =0.05), glycine-acetate buffer (pH 9.0, μ =0.1)
- 6) 染色色素；Ponceau 3R (Chroma Gesellschaft Schmid & Co.)
- 7) Autoradiography 用フイルム；富士レントゲンフイルム Fx または Ax
- 8) 抗血清；抗ヒト血清ウサギ血清, 抗ヒト IgG ウサギ血清 (Hyland Laboratories)
- 9) ヒト Thyroglobulin (TG)；ヒト甲状腺ホモジネート(生食)を8,000gで遠沈した上清をリン酸緩衝液1.64～1.96Mで塩析精製したもの。

などを用いた。

(3) 実験方法

1) 血清への T_4^{131} および T_3^{131} 添加

血清に T_4^{131} (T_4 として0.06 μ g/ml血清)もしくは T_3^{131} (T_3 として0.006 μ g/ml)を添加し、室温に60分間おいたものを実験に供した。

2) Cellulose-acetate 膜および汙紙電気泳動

T_4^{131} または T_3^{131} 添加血清を cellulose-acetate 膜を用いた場合には veronal または tris-maleate buffer で定電流定電圧通電装置を用いて、膜巾1cmにつき0.5mA 15Vで1時間、汙紙の場合は glycine acetate buffer (pH9.0)で2時間泳動した。泳動後 Ponceau 3R TCA 溶液で1分間染色したのち3%氷酢酸で脱色した。室温で乾燥した cellulose-acetate 膜および汙紙はそれぞれ a) Autoradiography b) Actigraphy および c) 各分画を切り取り well-type scintillation counter で放射能活性(RA)を測定した。

3) TBP の T_4 または T_3 最大結合能の測定

T_4 の最大結合能の測定は T_4^{127} を血清に漸増添加する saturation method²⁰⁾にしたがつた。 T_3 の最大結合能の測定も T_4 の場合に準じ、 T_3^{127} を0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.0, 2.0, 3.0 μ g/mlの濃度に添加して測定した。

4) Radioimmuno-electrophoresis

Grabner ら²¹⁾および Scheidegger²²⁾の方法に準じて20×80mmまたは60×80mmのスライドガラスに約2mmの寒天層をつくり phosphate buffer (pH 7.4 μ =0.05)を用いて、定電流2.5～3mA/cmで150分間血清を泳動した。泳動後中央溝に抗血清またはTGを注入し室温に24時間放置し、沈降線が出現してから生理食塩水および蒸留水で48時間洗滌した。乾燥後X線フイルムに約3週間密着して autoradiography をおこなった。スライドガラス上の沈降線の染色には Ponceau 3R TCA 溶液を用いた。

5) TG による橋本病血清の吸収

精製したTGを蛋白量として25mg/ml(final concentration)の割合に添加し、4℃に24時間放置後、2,000

rpm 20分間遠沈した。その上清は Ouchterlony 法でTGとの間に沈降線はみとめられなかった。

Ⅲ 成 績

1) 泳動条件の検討

T_3^{131} 添加血清を電気泳動した場合、使用した cellulose-acetate 膜のうち Selecta は veronal, tris-maleate buffer を用いても膜への T_3^{131} のRAの吸着が強く、分離が不良で使用できなかった。Oxoid, Separax でも膜への T_3^{131} の吸着がみられたが、Separax のほうが Oxoid より吸着が少なく分離もよかつた。一方 T_4^{131} 添加血清を Separax を用いて veronal, tris-maleate buffer で電気泳動すると、膜への吸着はほとんどみられず分離は良好であつた。Separax を用いる場合、veronal, tris-maleate buffer では分離がよいが、glycine acetate および phosphate buffer では分離が悪かつた。

これらの予備実験から、以下の実験は Separax を用いて veronal buffer (時に tris-maleate buffer) を用いて電気泳動した。この場合にも原点へのRAの吸着があるため、conventional electrophoresis は用いず reverse-flow electrophoresis²³⁾をおこなつた。しかしこの場合でも原点が albumin 分画に一致する場合と、 $\alpha_1 \sim \alpha_2$ globulin 分画に一致する場合とでは Fig. 1. に示すように、 T_3^{131} の分布が異なつていた。すな

Fig. 1. Actigraphy and autoradiography of electrophoretic separation

Distribution of $L-T_3^{131}$ in the normal serum, Reverse-flow cellulose acetate electrophoresis in Veronal Buffer pH 8.6 $\mu=0.06$

Fig. 2. Actigraphy and autoradiography of electrophoretic separation

Distribution of $L-T_3^{131}$ in the serum, Reverse-flow cellulose acetate electrophoresis in Veronal Buffer pH 8.6 $\mu=0.06$

わち原点が albumin 分画に一致する場合には約50~70%のRAが、一方 $\alpha_1\sim\alpha_2$ globulin 分画に原点が一致する場合には40~55%のRAが albumin 分画にあつた。

以下の実験では条件を一定にするために、 $\alpha_1\sim\alpha_2$ globulin 分画に原点が一致するようにして、種々の甲状腺疾患における血清蛋白と T_3^{131} との結合状態を検討した。

2) 甲状腺疾患々々者血清蛋白の T_3 との結合態度

① 甲状腺機能正常者

対照として選んだ甲状腺機能正常者では、albumin 分画と TBG($\alpha_1\sim\alpha_2$ globulin) 分画への T_3^{131} の分布(%)は45:55であつた Fig. 2.

② 甲状腺機能亢進症

本症では TBG 分画のRAは25~40%で、60~75%が albumin 分画にみられた Fig. 2.

③ 妊婦(正常妊娠および甲状腺機能亢進と妊娠との合併).

正常妊婦では T_3^{131} のRAの分布は約75%がTBG分画にみられたが、一方妊婦が甲状腺機能亢進症患者である場合には、 T_3^{131} のTBG分画への結合は40~50%となり、甲状腺機能亢進症単独のときよりも増大する Fig. 3.

Fig. 3 Actigraphy and autoradiography of electrophoretic separation

Distribution of L- T_3^{131} in the serum, Reverse-flow cellulose acetate electrophoresis in Veronal Buffer pH 8.6 $\mu=0.06$

甲状腺疾患々々者血清に T_3^{131} を添加し、これを tris-maleate buffer で Separax 電気泳動をおこなつた後の autoradiography では、 T_4^{131} を血清に添加して同条件で泳動した場合と異なり、TBPA には T_3^{131} のRAはみとめられなかつた Fig. 4. なお TBG deficiency および橋本病患者血清の T_3 結合については後述する。

3) 甲状腺疾患々々者血清 TBG の T_3 最大結合能

TBG の T_3 最大結合能の測定 (saturation method) に準じて、TBG の T_3 最大結合能を測定すると、甲状腺機能亢進症では、 $5\pm 2.4 \mu\text{g/dl}$ 、正常人では $14\pm 2.1 \mu\text{g/dl}$ 、妊婦では $44\pm 7.2 \mu\text{g/dl}$ であつた。甲状腺機能亢進症患者が妊娠した場合では $45\pm 8.1 \mu\text{g/dl}$ であつた Fig. 5.

4) T_3 RSU 値と T_3 の血清蛋白結合状態との関係

106例の甲状腺疾患々々者で T_3 RSU 値と T_3^{131} の血清蛋白との結合状態を検討するために、 T_3^{131} 添加血清を veronal buffer で Separax 電気泳動し、TBG および albumin 分画の T_3^{131} のRAを%であらわすと、TBG 分画のRA(%)と T_3 RSU 値との間には -0.7 の(Fig. 6), albumin 分画のRA(%)との間には $+0.7$ (Fig. 7)の相関関係がみられた。

Fig. 4. Autoradiography of electrophoretic separation at reverse-flow cellulose-acetate electrophoresis in tris-maleate buffer pH 8.6 $\mu=0.05$

1-6; T_3^{131} added serum

7; T_4^{131} added serum

5) T_3 RSU 値と TBG capacity との関係

T_4 にくらべると T_3 の血清蛋白との結合が弱いことを利用して T_3 RSU 値を測定することが行なわれている。すなわち血中の内因性甲状腺ホルモン（大部分が T_4 ）の量によつて、甲状腺ホルモン結合蛋白（主にTBG）の結合予備能が左右されることを利用して、 T_3^{131} を用いて TBG の結合飽和率を測定する方法である。したがつて TBPA, albumin の影響を一定とすると；

X : TBG の甲状腺ホルモン結合予備能

k_1 : TBG の結合定数

R : resin sponge の甲状腺ホルモン結合能

k_2 : resin sponge の結合定数

とすれば、 T_3 RSU 値は次式のごとくになる。

Fig. 5. The relationship between the total concentration of T_3 bound to TBG and the concentration of total added T_3

Fig. 6. The relationship between T_3 RSU and distribution of T_3^{131} in TBG region at cellulose-acetate electrophoresis in veronal buffer pH 8.6 $\mu=0.06$

Fig. 7. The relationship between T_3 RSU and distribution of T_3^{131} in albumin region at cellulose-acetate electrophoresis in veronal buffer pH 8.6 $\mu=0.06$

$$T_3RSU (\%) = \frac{k_2R}{k_1X + k_2R} \times 100$$

$$\therefore \frac{1}{T_3RSU (\%)} = \left(\frac{k_1X}{k_2R} + 1 \right) \times \frac{1}{100}$$

$$\frac{100}{T_3RSU} = Y, \quad \frac{k_1}{k_2} = k \quad \text{とすると}$$

$$Y = K \frac{X}{R} + 1$$

$$\therefore X = \frac{R(Y-1)}{K}, \quad R = \frac{KX}{Y-1}$$

甲状腺疾患々々 40 名について, saturation method により求めた TBG の T_4 最大結合能から, 内因性 T_4 (テトラソルブー I^{125} キットで測定した) をひいた TBG の T_4 結合予備能 (unsaturated TBG capacity $\gamma\%$

$=X$) と $\frac{100}{T_3RSU}$ との間には $r=0.79$ の相関関係があり, またこの両者から $R=K (6.0 \pm 1.2)$

$\gamma\%$ がえられた Fig. 8. なお定数 K は一定のため Fig. 8 では省略した.

Fig. 8. Relation between T_3 RSU and unsaturated TBG capacity

6) TBG 減少症患者血清蛋白と T_3 との結合

Familiar TBG deficiency の 1 家系 (Fig. 9) 中の 5 名の TBG maximal T_4 binding capacity は $4.5 \sim 6.6 \mu\text{g/dl}$ と著減し, T_3 RSU 値は $50 \sim 64\%$ と異常高値を示した Table 1. Fig. 10, 11 は患者 (III-3) 血

Fig.9. Pedigree of the Family, with TBG Deficiency

Table 1. Thyroid function test of the family, with TBG deficiency

Subject	T ₃ Resin Uptake %	Maximal T ₄ -Binding Capacity		TRC	MCF
		TBG μg/100ml	TBPA		
I-1	28.6	15.3	222	0	0
2	28.9	20.5	177	0	0
II-1	17.7	33.6	193	0	
2	26.6	22.2	225	0	
3	50.4	6.6	170	0	0
4	29.0	21.6	178	0	0
5	54.9	6.6	189	0	0
6	39.0	16.8	165	0	0
7	42.5	14.4	225	0	0
10	35.4	23.0	176	0	0
III-1	27.4	21.1	156	0	0
2	37.6	17.9	184	0	0
3	52.0	4.5	158	10 ²	40
4	64.0	4.8	121	0	0
5	50.0	5.7	140	0	0
6	37.4	19.8	166	0	0
Normal Range	30±5	19.1+3.3	197.6±25.2		

清に T₄¹³¹ および T₃¹³¹ を添加したのちに電気泳動した Separax 膜の autoradiography であり, Fig. 12, 13 は autoradiography および actigraphy である。患者血清では正常人の場合と異なり T₄¹³¹ は TBPA と albumin に結合するが, TBG 分画にはほとんど RA はみとめられない。一方 T₃¹³¹ は albumin にのみ結合し, TBPA, TBG 分画にはほとんど RA を認めない (Fig. 4, 13)。

Fig. 10. Autoradiography of electrophoretic separation at cellulose-acetate electrophoresis in tris-maleate buffer (pH 8.6 $\mu=0.05$) using T_4^{131} added serum

Fig. 11. Autoradiography of electrophoretic separation

Fig. 12. Actigraphy and autoradiography of electrophoretic separation

患者血清に T_4^{131} または T_3^{131} を添加し, radioimmuno-electrophoresis をおこなったのちの autoradiography (Fig. 14, 15) では, T_4^{131} を添加した場合は, TBPA, albumin のほかに TBG 分画に一致して RA をみとめ, 一方 T_3^{131} を添加した場合には TBPA に RA をみとめないが, albumin のほかに TBG 分画にもわずかに RA がみとめられた。

Fig. 13. Actigraphy and autoradiography of electrophoretic separation

Distribution of L- T_3^{131} in the serum, Reverse-flow cellulose-acetate electrophoresis in Veronal Buffer pH 8.6 $\mu=0.06$

Fig. 14. T_4^{131} autoradiography of immunoelectrophoresis in phosphate buffer (pH 7.4 $\mu=0.05$) Fig. 15. T_3^{131} autoradiography of immunoelectrophoresis in phosphate buffer (pH 7.4 $\mu=0.05$)

1. immunoelectrophoretic pattern 2. autoradiography AHS : anti whole human serum

Table 2. Laboratory Data

Blood Erythrocyte	404×10^4	Thyroid I^{131} uptake 6hr	16%
Leucocyte	5500	24hr	39%
BSR	60	Conversion ratio 24hr	33%
Serum ASLO	50	Thyroid scintigram	nomal
RA	(+)	T_3^{131} Resin Uptake	10%
CRP	($\pm$)	T_3^{131} Red Cell Uptake	2%
GOT	39	TRC	10^7
GPT	15	TA test	>20
Al-ph	2.2	MCF	320
TTT	13.1	PBI	6.4%
ZnTT	28.6	Free Thyroxine	1.95m%
Cholesterol	184mg%	Maximal binding of thyroxine	
Total protein	8.0g%	TBPA	129.0%
Protogram Alb	42.9(%)	TBG	18.8%
α_1	4.6	Gamma-globulin	74.4%
α_2	8.9	BMR	+6%
β	10.5		
γ	33.1		

Table 3. Distribution of $L-T_4^{131}$ in the Serum of Patient

Fraction %	Prealbumin	Albumin	Globulin		
			$\alpha_1 + \alpha_2$	β	gamma
Buffer					
Glycine acetate*	15.3 (17.3)	22.0 (42.3)	35.2 (39.0)	0.2 (0.1)	27.3 (1.3)
Veronal		19.9 (62.5)	15.6 (34.5)	0.9 (1.0)	63.6 (2.0)
Tris-Maleate**	13.2 (26.0)	13.5 (40.1)	25.0 (33.4)	1.4 (0.2)	46.9 (0.3)

* : Conventional paper electrophoresis

** : Reverse-flow cellulose-acetate electrophoresis

() : Normal Serum

Table 4. Distribution of $L-T_3^{131}$ in the serum of patient

Fraction %	Albumin	Globulin		
		$\alpha_1 + \alpha_2$	β	gamma
Buffer				
Glycine acetate*	14.2 (42.0)	12.2 (52.6)	0.6 (2.7)	73.0 (2.7)
Veronal**	1.9 (83.4)	24.2 (16.5)	2.7 (0)	71.2 (0.1)
Tris-Maleate**	11.4 (8.5)	33.3 (90.5)	0.7 (0)	54.6 (1.0)

* : Conventional paper electrophoresis

** : Reverse flow cellulose-acetate electrophoresis

() : Normal serum

7) 血清の γ -globulin 分画に多量の甲状腺ホルモンが結合した橋本病患者¹⁹⁾ 血清蛋白の T_3 との結合状態 Table 2 はこの患者の検査成績で, T_4 最大結合能は TBPA ; $129\mu\text{g}/\text{dl}$, TBG ; $18.8\mu\text{g}/\text{dl}$, γ -globulin ; $74.4\mu\text{g}/\text{dl}$ (いずれも saturation method により測定した) であった. 種々の緩衝液を用いて T_4^{131} および T_3^{131} と血清蛋白との結合状態を検討すると, この γ -globulin 分画には T_4^{131} は平均45.9%, T_3^{131} は平均66.3 %のRAが結合した (Table 3, 4). Autoradiography および actigraphy で検討すると, T_4^{131} は TBG, TBPA, albumin 以外に γ -globulin 分画に (Fig. 16), T_3^{131} は TBG, albumin の他に T_4^{131} と同様に γ -globulin 分画に明らかなRAをみとめた (Fig. 4, 13). 本患者血清に T_3^{131} または T_4^{131} を添加し immunoelectrophoresis したのち autoradiography をおこなった (Fig. 17, 18). 中央溝が抗ヒト全血清の場合は T_4^{131} のRAは TBG, TBPA, albumin のほかに γ -globulin の沈降線に一致して, また T_3^{131} の場合は TBG, albu-

Fig. 16. Actigraphy and autoradiography of electrophoretic separation

Distribution of L- T_4^{131} in the serum, Conventional paper electrophoresis in Glycine-Acetate Buffer pH 9.0

Fig. 17. T_4^{131} autoradiography of immunoelectrophoresis in phosphate buffer (pH 7.4 $\mu=0.05$)

min のほかに, T_4^{131} の場合と同じく γ -globulin 分画に明らかな RA をみとめた. 中央溝が抗 IgG の場合は IgG の沈降線に一致して, さらに抗体溝に TG を用いた場合は巾のひろい沈降線に一致して T_3^{131} の RA をみとめた.

Fig. 18. T_3^{131} autoradiography of immunoelectrophoresis in phosphate buffer (pH 7.4 $\mu=0.05$)

1. immunoelectrophoretic pattern 2. autoradiography
AHS : anti whole human serum TG : thyroglobulin

Fig. 19. Change of T_3^{131} distribution by the addition of T_3^{127} or T_4^{127} in a Hashimoto serum

Veronal Buffer pH 8.6

Fig. 20. Effect of prednisolone on thyroid function in the patient

本患者血清に T_4^{127} または T_3^{127} を0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 μ g/ml添加して、 T_3^{131} のTBG, albumin および γ -globulin へのRAの分布の変動を Separax 電気泳動でしらべると、Fig. 19のごとく T_3^{127} , T_4^{127} を0.5 μ g/ml以上添加することにより、 γ -globulin への T_3^{131} のRAは著明に減少し、一方 albumin への分布は増加した。TBG の T_3^{131} の結合は添加 T_3^{127} , T_4^{127} が0.5 μ g/mlのときに最大で、 T_3^{127} , T_4^{127} を増量するにつれて減少した。このことからこの γ -globulin はTBG, albumin よりも T_3 結合力が強く、 T_3 最大結合能はTBG とほぼ同じであるが、albumin にくらべると最大結合能ははるかに低い。

本患者血清をTGで吸収した場合、抗TG抗体価、(TRC), 抗microsome 抗体価 (MCF) の低下がみられ、 T_4^{131} , T_3^{131} の γ -globulin への結合は著減した Table 5. また患者に steroid hormone (Predonin を30mgより投与し2週毎に5~10mg漸減) すると、 T_4^{131} , T_3^{131} の γ -globulin への結合は著減し、また TRC, MCF 値の低下がみられ、一方 T_3 RSU 値および T^7 値は上昇した Fig. 20.

Table 5. Decrease of thyroid hormone T_4^{131} or T_3^{131} binding at the gamma globulin region by absorption of the patient serum with human thyroglobulin prior to electrophoresis

Addition	Decreased Radioactivity (%)	
	L- T_4^{131}	L- T_3^{131}
Buffer		
Glycine acetate	91.8	86.2
Veronal	83.4	91.8
Tris-maleate	66.0	87.9
Phosphate	84.7	92.6

TRC- and MCF-Titer were decreased from 10^7 to 10^4 , and from 320 to 40 by absorption respectively.

IV 考 察

T_3 の生物学的活性は T_4 より数倍強力であるとされており^{3,4)}, その生理的意義が注目されてきた。一般に T_3 の生物学的活性が T_4 より強いのは T_3 と血清蛋白との結合が T_4 より弱いためと考えられている^{3-5,24,25}。例えば TBG がほとんどないニワトリでは T_4 と T_3 の生物学的活性に差がなく²⁶⁾, ヒトでの in vivo の実験では T_3^{131} と血清蛋白とは殆んど結合せず、 T_3^{131} の血中半減期は TBG の T_4 最大結合能の変動とは関係がないとした報告^{27,28)}がある。これは in vivo では T_3 は血清蛋白とほとんど結合しないためとも考えられるが、in vitro でおこなった筆者の実験では T_3 は TBG および albumin と結合した。しかし cellulose-acetate 膜への吸着は T_3^{131} のほうが T_4^{131} より大であり、Separax 以外の cellulose-acetate 膜では T_3^{131} の分離は非常に悪かった。これは血清蛋白への結合力と cellulose-acetate 膜への吸着力との競合の結果、 T_3 の血清蛋白

への結合が T_4 より弱いために吸着が多くなるものと考えられる。in vitro で Separax 電気泳動を用いた場合, paper-electrophoresis, radioimmuno-electrophoresis のときと同じく, T_3 は TBG および albumin と結合したが, TBPA との結合はみられなかった。一方 β -および γ -globulin との結合は特異な橋本病の一症例を除けば, 他の諸甲状腺疾患でも T_3 の結合はみとめられなかった。これらのことから TBG に結合する T_3 は (100-albumin 分画の T_3^{131} 結合) % で表わされた。したがって T_3 RSU 値と T_3^{131} の血清蛋白との結合状態との間には albumin 分画とは正の相関 ($r=0.7$), TBG 分画とは負の相関 ($r=0.7$) があつた。

甲状腺疾患で T_3 の TBG への結合を検討すると, 妊娠および甲状腺機能亢進症の妊婦, 正常人, 甲状腺機能亢進症, TBG deficiency の順に T_3 の結合は減少する。妊娠の場合には TBG の増加によって T_4 結合予備能 (unsaturated TBG capacity) が増加しているが, 一方甲状腺機能亢進症では内因性 T_4 の増加により T_4 結合予備能が減少する。すなわちこの結合予備能の増減によって, T_3 と TBG との結合も左右される。さらに T_3 RSU 値と unsaturated TBG capacity との間には $r=0.79$ の逆相関があつた。即ち T_3 RSU 値から maximal TBG capacity (unsaturated TBG capacity + 内因性 T_4) が容易に推定された。

TBG 減少症では Separax 電気泳動で TBG 分画に T_3^{131} の RA はほとんどみとめられないが, radio-immuno-electrophoresis では蛋白の沈降線に一致して RA がみられた。Separax 電気泳動で TBG 分画に T_3^{131} の RA がみられなかったのは, 添加した T_3^{127} 量は一定であることから, この患者の TBG は結合能が著減しており, その結合力が非常に弱いために泳動条件が異なると簡単に T_3 と TBG との結合が離れることが推定される。

TBG deficiency の場合, TBG 蛋白そのものの欠損または減少か, それとも TBG 蛋白は存在するが甲状腺ホルモン結合能力の欠陥によるものか否かは明らかでない^{29,30)}。本症例で radioimmuno-electrophoresis で T_4^{131} の場合と同じく T_3^{131} の RA が TBG にみとめられたことから, この TBG には T_4 だけでなく T_3 もある程度結合するものと考えられる。したがってこの TBG は蛋白自体の減少か, あるいは結合能の欠陥のために甲状腺ホルモン結合予備能は著減する。

甲状腺ホルモンは通常 TBG, TBPA, albumin と結合するが, γ -globulin と結合する場合が橋本病³¹⁾ や甲状腺癌³²⁾ および動物に作つた橋本病^{33,34)} で報告されている。Premachandra ら³¹⁾ は橋本病患者の血清の γ -globulin に T_4 が結合することを paper および gel electrophoresis で示し, この血清を TG で吸収することにより T_4 と γ -globulin との結合がなくなると報告した。ここに示した橋本病でも同様の結果であつた。この症例で T_3 と γ -globulin との結合について paper 及び cellulose acetate electrophoresis, radioimmuno-electrophoresis で検討した結果, T_4 だけでなく T_3 もこの γ -globulin に結合し, この T_3 と γ -globulin との結合は血清を TG で吸収することにより著減した。更にこの患者に steroid hormone を投与することにより TRC, MCF 値は低下し, T_3 , T_4 と γ -globulin との結合は著減した。これらのことから TG 抗体が産生される場合に TG に対する抗体と同時に T_4 や T_3 に対しても抗体が産生されたものと考えられ, 抗原抗体反応の結果この γ -globulin が T_4 と T_3 を強力に結合するために, TBG capacity は正常であるにも拘らず T_4 結合予備能は増大していると考えられる。

上に述べた特異な 2 症例では, 1 例は TBG そのものの減少もしくは結合能の欠陥のために T_3 RSU 値の著増を, また他の症例では γ -globulin の異常結合能のために T_3 RSU 値の著減がみられた。

これらの事実から T_3 の血清蛋白への結合動態は甲状腺ホルモン結合蛋白の変動と, 血清の内因性 T_4 濃度によって左右されるものと考えられる。すなわち T_3 の TBG への結合量は TBG の最大結合能から内因性に結合した T_4 の量を引いた量, すなわち TBG の unsaturated capacity に比例するものと考えられる。

V む す び

甲状腺疾患々者について T_3 の血清蛋白との結合状態を in vitro で cellulose-acetate 膜および paper-electrophoresis, radioimmuno-electrophoresis で検討して次の結果をえた。

- 1) T_3 は Separax 電気泳動でも TBG および albumin と結合するが, TBPA とは結合しなかった。

FBG の T_3 結合能は正常人, $14 \pm 2.1 \mu\text{g}/\text{dl}$, 甲状腺機能亢進症 $5 \pm 2.4 \mu\text{g}/\text{dl}$, 妊婦 $44 \pm 7.2 \mu\text{g}/\text{dl}$, 甲状腺機能亢進症の妊婦 $45 \pm 8.1 \mu\text{g}/\text{dl}$ であった。

2) T_3 RSU 値は Separax 電気泳動における albumin 分画の T_3^{131} の RA 量(%) に比例し, TBG 分画の RA 量(%) と反比例する。また T_3 RSU 値より TBG の T_4 最大結合能を推定することができる。

3) TBG 減少症の場合 T_3 は殆んどが albumin に結合するが, T_4 の場合と同様に TBG にも結合した。

4) γ -globulin 分画に T_4 が多量に結合する橋本病の一症例では, T_3 もこの γ -globulin 分画に結合した。この場合の γ -globulin と T_3 , T_4 の結合は, 患者血清を TG で吸収した場合や, 患者に steroid hormone を投与することにより著減したことから, 抗 TG 抗体との関係が推定された。

稿を終るに臨み, 御指導, 御校閲を賜った丸本 晋教授, 直接の御指導と御助言を賜った越智幸男講師, 八谷 孝先生, 阿部勢津子先生に深謝の意を表します。

文 献

- 1) Shimaoka, K. and B.M. Jasani : *Endocrinology*, 32 : 59, (1965).
- 2) Nauman, J.A., A. Alicja and S.C. Werner : *J. Clin. Invest.*, 46 : 1346, (1967).
- 3) Gross, J., R. Pitt-Rivers and W.R. Trotter : *Lancet*, 1 : 1044, (1952).
- 4) Lerman, J., : *J. Clin. Endocr.*, 13 : 1341, (1953).
- 5) Sterling, K., J.C. Lashof and E.B. Man : *J. Clin. Invest.*, 33 : 1031, (1954).
- 6) Robbins, J. and J.E. Rall : *Ibid*, 34 : 1331, (1955).
- 7) Tanaka, S. and P. Starr : *Acta Endocr.*, 31 : 161, (1959).
- 8) Myant, N.B. and C. Osorio : *J. Physiol.*, 157 : 529, (1961).
- 9) Mitchell, M.L., A.H. Bradford and S. Collins : *J. Clin. Endocr.*, 24 : 867, (1964).
- 10) Braverman, L.E. and S.H. Ingbar : *Endocrinology*, 76 : 547, (1965).
- 11) Ingbar, S.H., L.E. Braverman, N.A. Dawber and G.Y. Lee : *J. Clin. Invest.*, 44 : 1679, (1965).
- 12) Larson, F.C. and E.C. Albright : *Endocrinology*, 56 : 737, (1955).
- 13) Braverman, L.E. and S.H. Ingbar : *Ibid*, 76 : 547, (1965).
- 14) Osorio, C.D., J.M. Jartside and A.W. Goolden : *Clin. Sci.*, 21 : 355, (1961).
- 15) Sterling, K. and M. Tabachnik : *J. Biol. Chem.*, 236 : 2241, (1961).
- 16) 伊藤貴志男 ; 日内分誌, 46 : 559, (1970).
- 17) Braverman, L.E., A.E. Foster and S.H. Ingbar : *J. Clin. Invest.* 47 : 1349, (1968).
- 18) 塩見勝彦, 阿部勢津子, 八谷 孝, 越智幸男, 楠 智一 ; 日内分誌, 45 (An Extra) : 1452, (1970).
- 19) 塩見勝彦, 阿部勢津子, 八谷 孝, 越智幸男, 丸本 晋 ; 日内分誌, 45 : 397, (1969).
- 20) Oppenheimer, J.H., M. Martinez and G. Burnstein : *J. Lab & Clin. Med.*, 67 : 500, (1966).
- 21) Graber, P. and C.A. Williams : *Biochem. Biophys. Acta*, 10 : 193, (1953).
- 22) Scheidegger, J.J. : *Int. Arch. Allergy*, 7 : 103, (1955).
- 23) Elzinga, K.E., E.A. Carr, Jr. and W.H. Beierwaltes : *Am. J. Clin. Path.*, 36 : 125, (1961).
- 24) Robbins, J. and J.E. Rall : *Recent Progr. Hormone Res.*, 13 : 161, (1957).
- 25) Christensen, L.K. : *Acta Endocr.*, 33 : 293, (1960).
- 26) Schellabarger, C.J. and J.R. Tata : *Endocrinology*, 68 : 1056, (1961).
- 27) Zaninovich, A.A., H. Farach, C. Ezrin and R. Volpé : *J. Clin. Invest.*, 45 : 1290, (1966).
- 28) Zaninovich, A.A., R. Volpé and C. Ezrin : *J. Clin. Endocr.*, 29 : 1601, (1969).
- 29) Thorson, S.C., W.N. Tanxé and H.F. Taswell : *Ibid*, 26 : 181, (1966).
- 30) Marshall, J.S. and J. Pensky : *J. Clin. Invest.*, 48 : 508, (1969).
- 31) Premachandra, B.N. and H.T. Blumenthal : *J. Clin. Endocr.*, 27 : 931, (1967).
- 32) Robbins, J., J.E. Rall and R.W. Rawson : *Ibid*, 16 : 573, (1956).
- 33) Premachandra, B.N., A.K. Ray, Y. Hirata and H.T. Blumenthal : *Endocrinology*, 73 : 135, (1963).
- 34) Singh, K.D. and B.N. Premachandra : *Fed. Proc.*, 24 : 242, (1965). (Abstract)