甲状腺の自己免疫機序に関する臨床的研究

第1篇 甲状腺疾患の血中サイログロブリン濃度の測定に関する研究

京都大学医学部放射線科 (指導: 鳥塚莞爾教授)

池 窪 勝 治

Clinical Studies on Autoimmune Mechanisms of the Thyroid

Part I. Studies on Measurements of Serum Thyroglobulin Concentrations in Patients with Various Thyroid Diseases.

Katsuji IKEKUBO

Department of Radiology, Kyoto University School of Medicine, Kyoto, Japan.

(Director: Professor Kanji Torizuka)

The present report deals with the measurement of serum thyroglobulin (Tg) in various thyroid disorders by using radioimmunoassay (RIA). The results were as follows:

1) A specific and simple solid-state RIA for the measurement of Tg in human serum was used. This system was a direct RIA using plastic cups coated with crude anti-thyroglobulin antibodies (anti-Tg) and ^{125}I labeled purified anti-Tg. The purification of anti-Tg was performed by affinity chromatography using Tg-Sepharose, as an immunoabsorbent.

2) Affinity chromatography was carried out using a modification of the method of Cuatrecasas. The immunoabsorbent (Tg-Sepharose conjugate) was used in a column procedure for the isolation of anti-Tg from globulin fractions obtained from Hashimoto's sera. The elution was performed with 4M NaI or 0.17M Glycine-HCl with pH 2.3. The eluted materials contained a very small amount of Tg which was removed by Sephadex G-200 chromatography using the same elution buffer. The high purity of the anti-Tg obtained was demonstrated by the fact that almost all of the final product was bound with Tg by using Sephadex G-200 chromatography.

3) A direct RIA consisting of two incubation steps was applied for Tg measurement. During the first incubation, standard Tg or Tg in serum was bound to the antibody coated cup. After washing, equal amounts of radioactive purified anti-Tg were incubated with the bound Tg. The cups were then washed again, and counted separately. The radioactive counts thus obtained, increased with the amounts of Tg bound to the anti-Tg by the first incubation.

The sensitivity of the assay was 4 ng/ml. T_3 and T_4 did not cross-react against Tg, and did not interfere with the binding between Tg and ^{125}I -anti-Tg. A dilution curve was constructed using the serum of a patient with Graves' disease; the post-operative

serum contained a very high level of Tg. This curve paralleled the standard curve. By adding constant Tg to a normal serum or Graves' serum, Tg recovery was good. However, in regard to Hashimoto's serum, Tg recovery was unsatisfactory.

4) Serum Tg concentrations were measured in patients with various thyroid disorders. Tg was detectable in 60% of 25 normal subjects tested, with an average level of 26.5 ± 26.5 (mean $\pm$ SD) ng/ml. Serum concentrations in 23 simple goiter, 9 untreated Graves' disease, 27 treated Graves' disease, 10 Hashimoto's thyroiditis having undetectable anti-Tg, 13 adenoma and 8 thyroid cancer were measured as 37.9 ± 87.0 ng/ml, 324.3 ± 517.8 ng/ml, 71.0 ± 138.6 ng/ml, 172.5 ± 314.5 ng/ml, 126.0 ± 146.0 ng/ml and 15.0 ± 14.1 ng/ml, respectively. In two patients with subacute thyroiditis, one patient had 100 ng/ml and the other gave a value of 280 ng/ml.

In patients with Graves' disease, there was no correlation between Tg concentration and T_3 and T_4 . In two patients with Graves' disease undergoing partial thyroidectomy, serum Tg levels went up 16–30 μ g/ml after the surgery. A patient with thyroid cancer showed a serum Tg value of 350 ng/ml after total thyroidectomy.

5) High Tg levels were observed mostly in patients with low titers of anti-Tg. However, even with the existence of potent anti-Tg, Tg could be detected in some instances. It seemed that these Tg values represented free Tg concentration when used in the present direct RIA system.

I 緒 言

甲状腺からの流出抗原であるサイログロブリン (thyroglobulin, Tg) が甲状腺の自己免疫機序において、抗原としてどのように関与しているかは興味を持たれる。著者は甲状腺自己免疫機序の一端の解明のため各種甲状腺疾患の血中 Tg 濃度の測定を意図した。人の血中に Tg の存在することは、既に Lerman¹⁾ ら以来種々の方法で示唆されていたが^{2)–8)}、近年、Roitt⁹⁾、Torrigan¹⁰⁾、および Van Herle¹¹⁾ らによりラジオイムノアッセイ (radioimmunoassay, RIA) を用いての正常者および甲状腺疾患の血中 Tg 濃度の測定が報告されている。しかしながら、これらの RIA は 2 抗体法であり、したがって、患者血中に抗サイログロブリン抗体 (antithyroglobulin antibodies, anti-Tg) が存在する場合、標識 Tg は系内の添加抗体 (抗ヒト Tg 家兎血清) と同様に内因性 anti-Tg にも結合しうするため、第 2 抗体 (抗家兎 γ) 添加によって完全な沈澱を示さず、見かけ上は Tg 高値を示すことになる。したがって、2 抗体法で RIA を行なった報告では、すべて anti-Tg を有しない患者のみを対象としている^{10), 11)}。しかしながら自己免疫的甲状腺疾患である橋本病およびバセドウ病患者では大半が anti-Tg を有しており¹²⁾、Tg を抗原として考える上では、これら疾患時の Tg 濃度測定がより大きな意義があると考えられる。この目的のために著者は直接法による固相法 RIA を開発して、Tg の測定を試み、その臨床応用を行なうと共に、anti-Tg の存在下における Tg 濃度についても若干の知見を得た。また本 RIA 開発の途上、anti-Tg の精製の必要性を認め、Immunoabsorbent による高純度抗体の精製を行なった。以下、これらの成績について述べる。

II 測定原理

Tg 濃度の測定は plastic microtiter plate を用いた固相法 RIA によった。

原理はプラスチック表面に非特異的に結合せしめた抗体（固相）と Tg との抗原抗体反応にもとづくものである。著者はまず、抗体（固相に吸着）に対する標識 Tg と非標識 Tg の競合的結合反応を利用した Tg 測定（間接法）を試みたが、十分な感度が得られず、再現性も乏しかった。したがって第1段階として、まず、固相に吸着させた抗体と非標識（標準物質または被検血清）を結合させ、第2段階ではこれに標識した精製 anti-Tg を結合させて、Tg 量に相応した放射エネルギーを得ることにより Tg 量を測定する直接法 RIA を検討した。本法による測定のためには純度の高い anti-Tg の精製が必要であり、これを Immunoabsorbent を用いた affinity chromatography により行なった。

Ⅲ 実験材料

1) 抗原 (Tg) 精製

甲状腺組織を2倍等量の0.25M蔗糖でホモゲナイズし、順次、2,000rpm, 20分間, 8,000×g, 20分間, 更に4°C, 105,000×g, 60分間の超遠沈 (Spinco model, 日立55PA) にて甲状腺の可溶性蛋白を得た。この5ml (50~80mg/ml 蛋白濃度) を2.5×100cmのセファデックス G-200 カラム にて、0.02M, リン酸緩衝食塩液, PH7.6 で溶出し、その第1溶出分画を更に濃縮後、再クロマトグラフィし、再び超遠沈して精製 Tg を得た。精製蛋白は濾紙電気泳動法¹³⁾、および免疫電気泳動法¹⁴⁾ により inter-α の泳動度を示す単一成分であり、抗全ヒト血清とは反応せず、Tg に対する沈降抗体陽性の橋本病患者血清と反応した。

2) 抗体

Ouchterlony 法¹⁵⁾ により Tg と沈降抗体強陽性を示す橋本病患者血清およびこの IgG 分画を抗体として使用した。IgG 分画は血清の45%飽和硫酸沈澱分画を0.005M, リン酸緩衝液, PH7.8 を用い、DEAE セルロースカラムクロマトグラフィにより精製した。

3) 実験対象

正常人は京大病院勤務者の中から内分泌機能異常を認めない者を選び、各種甲状腺疾患患者は京大病院外来および入院患者で臨牀的、機能検査および甲状腺針生検などにより診断の確定したものを対象とした。

Ⅳ 実験方法

1) Immunoabsorbent による anti-Tg の精製

Cuatrecasas¹⁶⁾ に準じた。すなわち、先ず Table 1 に示す如く、CNBr-activated Sepharose 4B (Pharmacia) に Tg を加えて結合させた。基礎的検討として、¹²⁵I-Tg をトレーサーとして用い、その結合をみた結果、24時間、セファローズ 1ml につき 1.4~2.9mg の Tg の結合が得られた。したがって、セファローズ・ゲルの 1ml につき 3~4mg の Tg を使用した。次に Tg-セファローズ結合物をカラムに充てんし、緩衝液で洗滌して未結合の Tg を除去した。エタノールアミンによる処理後は溶出液と出発緩衝液で交互に2~3回洗滌した。

次に抗体として沈降抗体陽性血清のグロブリン分画 (45%飽和硫酸沈澱分画) をカラムにかけて出発緩衝液で非吸着蛋白が完全に溶出されるまで洗滌した。

特異抗体の溶出は0.17M, Glycine-HCl 緩衝液 (G-HCl), pH2.3 あるいは4M NaI を用いて行なった。溶離液は直ちに蒸留水で透析し、NaI を除去した。両者共、最終的には0.01M リン酸緩衝食塩液 (PBS), PH8.0 で透析し、生じた沈澱は遠沈により除去した。

G-HCl と NaI 処理による抗体価の変化をサイロイド・テストを用いて検討した。すなわち、数種の抗体含有患者血清に溶出液を1:5の比率で加えて、24時間、4°C に放置したが抗体価には何らの変化も認めなかった。

2) Tg 測定法

プラスチック製 microtiter plate U 型 (Cooke 社製, 米国) の各カップを抗体稀釈液で満たし2時間、室温に静置することで抗体はプラスチック表面に非特異的に吸着される (precoating)。内容を吸引除去後、

Table 1. Purification Procedures of anti-Tg by affinity chromatography

1. Formation of Tg-Sephadex conjugate
CNBr-activated Sephadex 4B+Tg (3-4mg/ml · sephadex)
dissolved in coupling buffer*
stirred 24 hrs. at 4°C
2. Preparation of Column
Tg-Sephadex conjugate was packed in a column (2×20cm)
Then, washed successively with
1) 10 volume of coupling buffer
2) 1M ethanolamine at PH 8.0 for 2 hrs.
3) 10 volume of elution buffer**
4) 10 volume of starting buffer***
3. Application on the Column
Applied 600-3,000 mg of globulin fractions of anti-Tg sera onto the column
Washed with starting buffer until unadsorbed protein was completely eluted
4. Elution
Eluted with elution buffer, and collected the first excluded protein peak
* 0.1M Carbonate-Bicarbonate buffer solution containing
0.5M NaCl, pH 8.0~pH 9.0
** 0.17M Glycine-HCl pH 2.3 or 4M NaI
*** 0.02M Phosphate buffer containing 0.5M NaCl, pH 8.0

PBS, PH 7.2 で洗滌し, 次いで各カップを牛血清アルブミン (BSA) 溶液で満たし, カップ表面に残存する空白結合部位を飽和させ (second coating), 10分後, 吸引除去する. これにインキュベーション・混合物 (0.25ml) として, 間接法では ^{125}I -Tgと標準 Tg または被検血清, 直接法では第1段階で標準 Tg または被検血清, 第2段階で ^{125}I -anti-Tg を入れ, 4°C でインキュベイトした. インキュベーション後は内容を吸引, 除去し, 水道水で洗滌後, 各カップを切り離してその放射エネルギーを測定した. 抗体稀釈液としては 0.02M 炭酸重炭酸緩衝液, PH 9.6, second coating およびインキュベーション・混合物の溶媒としては BSA の 2%PBS 溶液, PH 7.2 を用いた. 実験はすべて triplicate で行なった.

a) 間接法

アッセイ上, 至適な抗体稀釈度を求めるため種々の稀釈抗体で各カップを被覆後, ^{125}I -Tg の一定量 ($5 \times 10^4\text{cpm/cup}$) を加えて, 抗体稀釈曲線を得た. これに基づき, IgG の 3,000倍または血清の 16,000倍抗体稀釈液でカップを被覆し, インキュベーション・混合物として種々濃度の標準 Tg と一定量の ^{125}I -Tg ($5 \times 10^4\text{cpm}$) を用いて, 24時間, インキュベイトした.

b) 直接法

第1段階でのインキュベーション・混合物として, 2%BSA に各種濃度の標準 Tg あるいは被検血清 0.1ml を加えて 0.25ml とし, 24時間, インキュベーション後内容を除去し, 洗滌した. この段階では Tg はカップに吸着した抗体と結合し, 非結合物は洗滌により除去される. 第2段階としては, ^{125}I 標識精製 anti-Tg の一定量を加え, 再度, 24時間のインキュベーション後, 内容を除去, 水洗後に各カップの放射エネルギーを測定した. 基礎的検討としては, ①抗体稀釈度 ②インキュベーション時間 ③ ^{125}I -anti-Tg 量 ④高濃度 Tg 血清の稀釈曲線 ⑤各種血清の添加 Tg の回収率 ⑥標準 Tg および患者血清に対する anti-Tg の影響等につき検討した.

3) 標識

Tg および anti-Tg の標識は Hunter-Greenwood の方法に準じた。40~50 μg の Tg あるいは anti-Tg に 2 mci の ^{125}I (または ^{131}I) を用いて標識し、セファデックス G-50 カラムにて無機ヨードを分離し、比放射能 20~30 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ のものを得た。

4) 血中抗甲状腺自己抗体の検出

血清中の anti-Tg はサイロイド・テスト (富士臓器 K.K.) を用いて測定した。

V 実験成績

1) anti-Tg 精製の affinity chromatography

a) anti-Tg 溶出パターン

溶出液として 4M NaI と G-HCl を用いた場合、両者共にほぼ同様の溶出パターンを示した。Fig. 1 に 4M NaI のパターンを示す。また回収された精製抗体量は使用グロブリン量の 1.8% で、両溶出液間ではほとんど差が認められなかった。

Fig. 1. Elution pattern of anti-Tg from a Tg-Sepharose column.
The arrow indicates a start point of elution with 4M NaI.

^{125}I -Tg をトレーサーとして用いて検討した結果は溶離抗体中への Tg の混入は NaI では 1.26%, G-HCl では 0.46% で両者共に極めて微量であった。

b) 精製 anti-Tg の純度の検定

検定法の一つとして Cumulative binding technique を用いた。すなわち、精製 anti-Tg を ^{125}I (または ^{131}I) で標識し、これを高濃度 (0.1 mg/ml) の Tg (リン酸緩衝液, PH 6.4 を使用) で、あらかじめ被覆したプラスチック試験管中で、軽く振動しながらインキュベートし、30分後に内容物を同様に処理した 2 番目の試験管に移し、この過程を合計 10 回繰り返した。

Fig. 2 は各試験管に結合した放射エネルギーを加算して標識物の何%が Tg に結合しうるかを示したものである。成績は NaI と G-HCl 使用時に差異を認めず、おおむね 37~38% にとどまり、それ以上には上昇しなかった。更にこの精製蛋白を affinity chromatography により再クロマトグラフィーしたが改善を認めなかった。純度の低い原因としては Tg の混入、anti-Tg 以外のグロブリンの混入などが考えられ、溶出した抗体をそのまま 4M NaI を用いて更にセファデックス G-200 でクロマトグラフィーを行なった。Fig. 3 に示す如く、a, b の 2 相性を示した。a 分画は Tg に一致するピークであり、Tg の混入または Tg-anti-Tg 複合体の存在が考えられた。b 分画を用いて純度検定を試みたが若干の上昇を認めたに過ぎなかった。

Fig. 2. Cumulative binding curve of labeled anti-Tg or ^{125}I Human serum albumin against Tg and Bovine serum albumin.

したがって、異なった純度検定法として、b分画を標識した ^{125}I -anti-Tg と高濃度 Tg を 4°C 、48時間、インキュベート後、セファデックス G-200 でクロマトグラフィを行なった。その結果は Fig. 4 の A に示す如く、対照として Tg の代りに 1% BSA と ^{125}I -anti-Tg のインキュベート後にクロマトグラフィして得られたピーク B に比して明らかに早い大分子の溶出を認め、Tg-anti-Tg 複合体の形成がうかがわれた。したがってこの b 分画はかなり純度の高い anti-Tg と考え、以下これを用いて実験した。

2) Tg 測定法 (間接法)

a) 抗体希釈曲線

種々希釈抗体液にて各カップを被覆した後に ^{125}I -Tg の一定量 ($5 \times 10^4 \text{ cpm/cup}$) を加えての結合は Fig. 5 の如く、血清では、最高38%が結合し、8,000 倍希釈以上では、抗体の希釈とともにその結合%は減少した。

IgG (1.7 mg/ml) では、最高32%が結合し、1,000 倍希釈以上で抗体の希釈と共に、その結合%は減少した。したがってその50%結合を示す抗体希釈度を用いて、標準曲線を作成した。

b) 標準曲線

抗体として血清の16,000倍、および IgG の3,000 倍を用いて作成した標準曲線は Fig. 6 の如くである。抗体として IgG を用いた場合は感度が悪く、血清を用いた場合 3.1 ng/cup の感度であった。被

Fig. 3. Rechromatographic fractionation of the elute (purified anti-Tg by affinity chromatography) on Sephadex G-200 using 4 M NaI as elution buffer.

Fig. 4. Fractionation of ^{125}I -anti-Tg incubated with Tg(A) or BSA(B) by gel-filtration on Sephadex G-200.

Fig. 5. Antibody dilution curves.

Fig. 6. Standard curve for Tg radioimmunoassay (Indirect method).

Fig. 7. Standard curves for Tg radioimmunoassay obtained by various precoating antibody concentrations.

Table 2. Effect of incubation time on the binding of ^{125}I -anti-Tg

1) The first incubation time

Cups were precoated with 1:300 dilution of crude anti-Tg serum and the first incubations were performed for 16 and 24 hours under existence of various concentration of standard Tg. The second incubation with ^{125}I -Tg was kept constant for 24 hours.

	Added Tg Concentration (ng/assay)				
	0	1.5	25	100	1,000
16 hr (B/T) %	1.6	2.6	4.4	8.2	11.3
24 hr (B/T) %	1.5	2.8	6.4	10.2	12.5

2) The second incubation time

Similar as the above, but the first incubation was kept for 24 hours and the second incubation time was changed from 6 to 48 hours.

	Added Tg Concentration (ng/assay)			
	0	4.1	12.3	1,000
6 hr (B/T) %	0.8	2.2	3.4	8.8
12 hr (B/T) %	1.5	3.1	4.4	11.1
24 hr (B/T) %	1.9	4.4	6.4	13.2
48 hr (B/T) %	2.3	4.9	7.0	13.3

検血清 0.1 ml の使用により約 30 ng/ml の Tg 濃度が測定可能であるが、これは臨床応用上不十分であり、また本法は標識 Tg の易変性のため再現性も良好ではなかった。

3) Tg 測定法 (直接法)

a) precoating の抗体濃度 (Fig. 7)

300, 3,000, 15,000倍の各種稀釈血清を用いて、各種濃度の Tg 添加時の標準曲線を比較した。15,000倍, 3,000倍では十分な結合放射能量がみられず、300倍で十分な結合放射能量を認めた。更に、100倍稀釈血清を用いて検討したが、300倍稀釈血清と著差はなかった。

b) second coating

2%BSA, 6%BSA および10%正常ヒト血清で比較したが、アッセイ上特に差を認めなかった。したがって、以後2%BSA を用いた。

c) インキュベーション時間 (Table 2)

第2段階でのインキュベーション時間を24時間と一定にして、第1段階でのインキュベーション時間を16時間と24時間で比較した。Table 2 の 1) に示す如く、24時間のインキュベーションが感度、結合%の何れも高かった。次に第1段階でのインキュベーション時間を24時間とし、第2段階での ^{125}I -anti-Tg によるインキュベーション時間につき、6, 12, 24および48時間で検討した。Table 2 の 2) に示す如く、時間とともにバックグラウンドおよび結合放射能量は増加するが、24時間以後の増加は僅かであり、24時間が至適と考えられた。

d) ^{125}I -anti-Tg 量の検討 (Fig. 8)

^{125}I -anti-Tg 量として、 10×10^4 , 20×10^4 , および 30×10^4 cpm/cup を用いての標準曲線においては、 10×10^4 cpm/cup では十分な結合放射能量が得られず、標準曲線もやや不安定であった。 30×10^4 cpm/cup では結合放射能量は上昇するが、B/T%はむしろ低く、バックグラウンドも上昇し、低濃度の Tg 測定が困

Fig. 8. Effect of different counts of ^{125}I -anti-Tg on the standard curve for Tg.

Fig. 9. Standard curve for Tg (Direct method).

難である。20×10⁴cpm/cup では B/T% が高く、標準曲線も安定しており、至適と考えられた。

e) 標準曲線

上記の基礎的検討に基づき、300 倍稀釈血清を抗体として用い、2%BSA で second coating し、第1段階で種々濃度標準 Tg を24時間インキュベートし、第2段階では ¹²⁵I-anti-Tg の 20×10⁴cpm/cup を加えて、再び24時間インキュベートして、Fig.9 の標準曲線を得た。最少検出感度は 0.4 ng/cup であった。

f) 稀釈曲線

パセドウ病手術直後の症例の高濃度 Tg 血清の稀釈曲線は Fig.10 に示す如く、よく標準曲線に平行し、キャリア蛋白として2% BSA-PBS 液の使用が適当と考えられた。

g) 回収試験 (Table 3)

正常者およびパセドウ病患者血清 (サイロイド・テスト陰性) では添加 Tg はほぼ良好な回収成績を示した。一方、橋本病で沈降抗体陽性例では回収率が悪く、期待値より低値を示した。

h) 血中 Tg に対する anti-Tg の影響

anti-Tg 存在下における Tg 値の意義を検討するため、各種濃度の anti-Tg・IgG を標準 Tg あるいは

Fig.10. Comparison of effects of dilution of purified Tg and of high Tg serum.

Table 3. Recovery of standard Tg added in various human sera

	Added Tg concentration (ng/cup)						Mean	S. D.
	1.9	7.5	15	30	60	600		
Normal (Tg; 1.2 ng/cup)	83%	82%	83%	82%	91%	118%	89.8%	±14.2

	Added Tg concentration (ng/cup)						Mean	S. D.
	2.5	7.5	22	66	200	600		
Hshimoto's (Tg; <1.2 ng/cup)	100%	64%	80%	55%	49%	64%	68.7%	±18.6
Graves' (Tg; 37 ng/cup)	100%	100%	102%	104%	107%	145%	109.7%	±17.5

高 Tg 患者血清と 4°C, 48時間, インキュベートしたものについて, Tg のアツセイを行なった。

Fig.11 に添加 anti-Tg・IgG 量と測定された Tg 量を示す。サイロイド・テスト陰性の橋本病およびパセドウ病血清に少量の anti-Tg・IgG の添加では測定値に大きな変動はないが、あるレベルにおいて、一過性に高値に傾き、更に anti-Tg・IgG 量の増加により Tg 量は直線的の低下を示した。この傾向は標準 Tg においても同様に認められた。

i) トリヨードサイロニン (T₃) およびサイロキシニン (T₄) の交叉反応に関する検討

Tg のアツセイ系に標準 Tg の代わりに T₃(0.002~2 ng/cup), T₄(1.25~25 ng/cup) を加えた場合、¹²⁵I-anti-Tg の結合放射能の上昇は認められなかった。

また、標準 Tg(10, 100 ng/cup) に T₃(0.1~10 ng/cup) または T₄(4~100 ng/cup) を加えた場合、そ

例, 低値または正常範囲内にあって高値のものは認められなかった。

甲状腺腺腫: 13例の平均値は 126.0 ± 146.0 (S. D.) ng/ml であり, やや高値に分布した。

甲状腺癌: 8例の平均値は 15.0 ± 14.1 (S. D.) ng/ml であり, 低値を示した。

亜急性甲状腺炎: 2例において, それぞれ, 280 ng/ml および 100 ng/ml と高値を示した。

5) バセドウ病, 甲状腺癌の術後の血中 Tg 濃度の観察 (Fig. 13)

術後約1週間の血中 Tg 濃度の観察では, バセドウ病の2例で術直後16~30 μ g/ml の異常高値が速かに下降したが, 術後1週間以後はゆるやかに減少した。甲状腺癌の1例では術直後340 ng/ml の高値を示したが, それ以上には上昇せず, 以後も比較的高値が持続した。

6) Tg 濃度と anti-Tg の関係 (Fig. 14)

橋本病およびバセドウ病共 anti-Tg 価の高いものに Tg 濃度は低い傾向を示した ($r = -0.3$)。

サイロイド・テスト陰性例では橋本病, バセドウ病共に高値を示すものがあつたが, 低値のものも認めら

Fig. 13. Chronological changes in serum Tg level after partial thyroidectomy for Graves' disease.

Fig. 14. Relation between serum Tg concentrations and anti-Tg titers in Hashimoto's thyroiditis and Graves' disease.

れた。また、一方若干例に高抗体価を示しながらなお有意の Tg 濃度を示すものが認められた。

7) バセドウ病における Tg 濃度と甲状腺機能検査成績

Fig. 15 はバセドウ病の Tg 濃度と血中 T_3 および T_4 濃度との関係を示すが、一定の関係は認められなかった。

Fig. 15. Relation between serum Tg concentrations and serum thyroid hormone levels in Graves' disease.

VI 考 案

血清中の Tg 量の測定において、従来の 2 抗体法 RIA では被検血清中に anti-Tg が存在する場合、標識 Tg はこれと結合するため Tg の測定が不能となり、したがって anti-Tg 陽性患者の Tg 測定は行なわれていない。

著者は、anti-Tg 陽性患者の血中 Tg 濃度の測定を検討したものであり、以下、測定法、測定成績に分けて考案する。

1) 測定法について

まず間接法 RIA により Tg の測定を試みたが、最少検出濃度が 30 ng/ml で、感度が低く、また ^{125}I -Tg の易変性のため再現性が乏しかった。また、この系においても被検血清に anti-Tg を含む場合、従来の 2 抗体法におけると同様 ^{125}I -Tg と anti-Tg との結合がおり、Tg の測定が不能と考えられたので直接法による Tg の RIA を検討した。そのためには、まず、精製 anti-Tg を得ることが必要となり、近年、抗原および抗体の精製に広く応用されている Immunosorbent^{(18)~(21)}を用いて anti-Tg の精製を試みた。溶出抗体中には Tg の混入を認めたため、これを更に抗体溶離液を用いてセファデックス G-200 によるクロマトグラフィーを行なうことにより Tg を分離して、anti-Tg を精製した。

精製した anti-Tg の純度は、cumulative binding technique では満足する結果ではなかったが、 ^{125}I で

標識した精製 anti-Tg は大部分が Tg と結合することが確認でき、かなり純度の高い anti-Tg が得られたものと考えられた。anti-Tg の精製に関して、Metzger²²⁾ は γ -グロブリンと Tg の複合体を作り、酸により anti-Tg を解離して純度の高い anti-Tg を得ている。また、嶋崎²³⁾ や江藤・鈴木²⁴⁾ らは、Immunoabsorbent により anti-Tg の精製を試みているが、純度に関しては詳細な検討が行われていない。

得られたこの精製 anti-Tg を用いて、すでに確立された RIA 法¹²⁾ により anti-Tg の標準曲線を作成したが、Fig. 16 に示す如く、30 ng/cup の抗体の測定が可能であり、未精製の IgG を使用した場合に比較して、約10倍の感度の上昇が認められた。更に抗体の純度が上昇すれば、その純定量が可能と考えられる。

Fig. 16. Standard curve for anti-Tg.

Comparison of standard curve using purified anti-Tg(A) and IgG(B).

精製 anti-Tg を用いての直接法 RIA による Tg の測定法は簡便であり、感度に関しても、Roitt, Torrigiani^{10), 11)} らの 10 ng/ml に匹敵するものが得られた。この系では Tg の標識が不要であり、標識 anti-Tg ははるかに安定なため、再現性が良好である利点をも認めた。

直接法は、すでに、IgE^{25), 26)} およびオーストラリア抗原の RIA^{27), 28)} に用いられており、測定物質が少なくとも 2 個以上の免疫学的結合基を持つことが必須条件である。Tg に関して、カーブリニアの標準曲線を得たことは Tg が複数の抗体結合基を持つことを示唆し、Tg の結合基に関する従来の知見^{29), 30)} と一致する。この系の特異性に関しては、高 Tg 含有血清の稀釈曲線は標準曲線とよく平行し、anti-Tg により Tg が吸収されること、および T₃, T₄ との間の交叉反応の認められないこと、更には甲状腺手術直後では異常高値を示すことから Tg に特異なアッセイ系と考えられる。しかしながら、anti-Tg の存在下では Tg の回収率は不十分であり、正確な Tg の測定が望めず、更に今後の検索をまたねばならない。回収率の不十分な理由としては、血中に Tg と anti-Tg が共存しうることから、当然、Tg-anti-Tg 複合体の形成が考えられる。Roitt²⁹⁾ および Schulman³⁰⁾ らは橋本病血清に Tg を添加した場合の quantitative precipitin curve を示しているが、至適 Tg 量以外では複合体はいずれも減少する。したがって、anti-Tg を持つ血清では、遊離 Tg, anti-Tg およびその複合体が一定の平衡状態で共存しているものと考えられる。このような血清に Tg を添加すればその平衡状態に変化を来すことが想像され、添加 Tg が遊離 anti-Tg と結合し、回収の悪い結果を示したものと推定される。このことは多量の遊離 anti-Tg の存在下においても、

なお複数抗体結合基を有する Tg が存在しうることを示唆していると考えられる。overby²⁷⁾, 豊島²⁸⁾ もオーストラリア抗原および抗体の共存下で夫々が検出されることを認めている。

将来 Tg および anti-Tg の純定量が可能となれば血中抗原量, 抗体量および抗原抗体複合体の甲状腺自己免疫機序の関与を分子レベルで解明されると期待される。

2) 測定成績について

正常者25例中15例 (60%) に Tg が測定され, 90 ng/ml までに分布し, 平均 26.5 ng/ml であった。Torrighiani¹⁰⁾ は61%に認め, 10~150 ng/ml の分布, Van Herle¹¹⁾ は74%に測定され, 平均 5.1 ng/ml, 1.6~20.7 ng/ml の狭い範囲の分布の成績を報告している。Van Herle の成績の感度は良く, したがって検出率も高いと思われるが, 正常域の異なる理由は不明である。

甲状腺腺腫では高値を示すものがあり, Torrighiani¹⁰⁾ も non toxic colloid goiter では甲状腺腫の大きさと間に相関を認め, しばしば嚢胞を有することから血中への Tg の漏出がおこるためと述べている。亜急性甲状腺炎では, 2例共に高値を示したが, Torrighiani¹⁰⁾ は正常範囲, Van Herle¹¹⁾ は高値を報告している。本症では急性期では当然組織の炎症破壊のため Tg の漏出がおこり高値を示すものと思われる。

橋本病では Torrighiani¹⁰⁾ は16例の甲状腺抗体陰性例で1例の異常高値 (1200 ng/ml) を除き 10~175 ng/ml の値を示した。著者の成績でもサイロイド・テスト陰性では低値から高値の広い範囲に分布し, 異常高値を示すものもあり, 血中抗体の成立前に Tg の多量流出のあることを認めた。一方サイロイド・テスト陽性例においても低値ながら Tg が測定されたが, 沈降抗体陽性の2例では, いずれも認められなかった。

バセドウ病では一般に Tg は高値を示すものがあり, Torrighiani, Van Herle も高値と報告している^{10), 11)}。Tg はリンパ系を介して血中出现する^{31), 32), 33)} ことが知られており, TSH 刺激によって Tg は T_3 や T_4 と同様に反応を示し³⁴⁾, しかも正常者で T_3 による Tg 抑制が認められる事実¹¹⁾ がある。また Tg がホルモン産生に極めて効率のよい蛋白である点³⁵⁾ を考え合わせると両者の関係に興味を持たれる。Torrighiani は Tg 濃度と PBI 値の間に若干の関連性を認め, 治療後には Tg 濃度が低くなる傾向を示している¹⁰⁾。著者のバセドウ病の成績では Tg と T_3 , T_4 の間に明瞭な関係を認めず, また亜急性甲状腺炎, 甲状腺腺腫および橋本病で Tg 高値を示すものがあるが, Tg と甲状腺ホルモンの間には明らかな関係は認められなかった。

Ⅶ 総括並びに結論

plastic microtiter plate を用いた固相法 RIA による Tg の測定を試みた。間接法では十分な感度, 再現性がえられず, 直接法による RIA を検討し, 血中 Tg 濃度の測定を試みた。本測定には anti-Tg の精製が必要であり, これを Immunoabsorbent による affinity chromatography により精製した。成績は次の通りである。

1) affinity chromatography による anti-Tg の精製

Cuatrecasas に準じ, Tg-Sepharose 4B Immunoabsorbent を用いて anti-Tg を精製した。¹²⁵I 標識精製 anti-Tg は大部分が Tg と結合し, 純度の高いものと考えられた。

2) 直接法による Tg の RIA

標準曲線は Tg 量とともにカーブに上昇し, 4 ng/ml の Tg 濃度の測定が可能であった。 T_3 および T_4 とは交叉反応を示さず, 高濃度 Tg 血清の稀釈曲線は標準曲線とよく平行した。しかし, anti-Tg を有する血清に Tg を添加した場合の回収率は十分でなく, anti-Tg の存在下では Tg 量を正確には測定し得なかった。しかしながら, この系において anti-Tg を有する患者血清において Tg が測定され得たことから, この Tg 値は遊離 Tg 量を示すものと考えた。

3) 各種甲状腺疾患患者の Tg 濃度

正常者25例中15例 (60%) に測定され, 0~90 ng/ml に分布し, 平均値 26.5 ± 26.5 (S.D.) ng/ml, 単純性甲状腺腫23例の平均値 37.9 ± 87.0 (S.D.) ng/ml, 未治療バセドウ病9例の平均値 324.3 ± 517.8 (S.D.)

ng/ml, 治療バセドウ病27例の平均値 71.0 ± 138.6 (S.D.) ng/ml, サイロイド・テスト陰性の橋本病10例の平均値 172.5 ± 314.5 (S.D.) ng/ml, サイロイド・テスト陽性の橋本病26例の平均値 5.6 ± 10.3 (S.D.) ng/ml, 甲状腺腺腫13例の平均値 126.0 ± 146.0 (S.D.) ng/ml, 甲状腺癌8例の平均値 15.0 ± 14.1 (S.D.) ng/ml, であり, 亜急性甲状腺炎2例は夫々 280 ng/ml および 100 ng/ml, を示した. またバセドウ病2例の術後血中 Tg は $16 \sim 30 \mu\text{g/ml}$ の異常高値を示し, 甲状腺癌の1例では手術直後 340 ng/ml を示した.

Tg 濃度と anti-Tg との関係は, サイロイド・テスト陰性例では Tg 濃度は低値から高値にまで分布した. anti-Tg 高価のものに Tg 濃度は低い傾向を示し, 沈降抗体陽性では Tg は認められなかったが, anti-Tg 高値のものにも有意の Tg 量を示すものを認めた. またバセドウ病にて Tg 濃度と血中 T_3 および T_4 濃度との間には一定の関係は認められなかった.

終りにのぞみ終始御懇篤なる御指導と御校閲を頂いた恩師京大放射線科鳥塚莞爾教授に感謝の意を表します. また種々御助言を頂いた京大内科第2講座深瀬政市教授に深謝し, 直接御教示戴いた放射線科森徹講師および終始御協力下さった教室の甲状腺研究班の各位に感謝致します.

文 献

- 1) Lerman, J.: J. Clin. Invest., 19: 555, (1940).
- 2) Robbins, J.: J. Biol. Chem., 208: 377, (1954).
- 3) Robbins, J., M.L. Petermann and J.E. Rall: J. Biol. Chem., 208: 387, (1954).
- 4) Owen, C.A. and W.M. McConeahey: J. Clin. Endocr., 16: 1570, (1956).
- 5) Hjort, T.: Lancet, 1: 1262, (1961).
- 6) Hjort, T. and G.T. Pedersen: Lancet, 2: 259, (1962).
- 7) Assem, E.S.K.: Lancet, 1: 139, (1964).
- 8) Assem, E.S.K., W.R. Trotter and G. Belyavin: Immunology, 9: 21, (1965).
- 9) Roitt, I.M. and G. Torrigiani: Endocrinology, 81: 421, (1967).
- 10) Torrigiani, G., D. Doniach and I.M. Roitt: J. Clin. Endocr., 29: 305, (1969).
- 11) Van Herle, A.J., R.P. Uller, N.L. Matthews and J. Brown: J. Clin. Invest., 52: 1320, (1973).
- 12) Mori, T. and J.P. Kriss: J. Clin. Endocr., 33: 688, (1971).
- 13) Rosenblatt, M. and M. Goodman: Am. J. Clin. Path., 39: 462, (1963).
- 14) Sheidegger, J.J.: Int. Arch. Allergy. Appl. Immunol., 7: 103, (1955).
- 15) Ouchterlony, O.: Prog. Allergy, 5: 1, (1958).
- 16) Cuatrecasas, P., M. Wilchek and C.B. Anfinsen: Biochemistry, 6: 636, (1968).
- 17) Greenwood, F.C., W.M. Hunter and J.S. Glover: Biochem. J., 89: 114, (1963).
- 18) Wofsy, L. and B. Burr: J. Immunol., 103: 380, (1969).
- 19) Avrameas, S. and T. Ternynck: Immunochemistry, 6: 53, (1969).
- 20) Wilson, B.J., A. Malley, M.W. Cook and B.F. Mackler: J. Immunol., 106: 402, (1971).
- 21) Haase, A.T. and H. G. Pereira: J. Immunol., 108: 633, (1972).
- 22) Metzger, H. and H. Edelhoch: Nature, 193: 275, (1962).
- 23) Shimazaki, M., K. Hamba, C. Hiramane, N. Katsu, T. Mori and Y. Keno: Wakayama Medical Reports, 11: 59, (1966).
- 24) 江藤澄哉, 鈴木秀郎: ホルモンと臨床, 20: 62, (1972).
- 25) Ceska, M. and U. Lundkvist: IMM., 9: 1021, (1972).
- 26) Wide, L.: Radioimmunoassay Methods (Ed. by K.E. Kirkham and W.M. Hunter) p. 405, Livingstone, Edinburgh.
- 27) Overby, L.R. and C.M. Ling: 最新医学, 27: 1230, (1972).
- 28) 豊島 滋, 瀬戸瀧子, 稻垣真理子, 富岡 一: 小児科臨床, 24: 3044, (1971).
- 29) Roitt, I.M., P.N. Campbell and D. Doniach: Biochem. J., 69: 248, (1958).
- 30) Shulman, S. and E. Witebsky: J. Immun., 85: 559, (1960).
- 31) Daniel, P.M., M.M. Gale and O.E. Pratt: J. Physiol., 169: 330, (1963).
- 32) Daniel, P.M., O.E. Pratt, I.M. Roitt and G. Torrigiani: Immunology, 12: 489, (1967).
- 33) Daniel, P.M., O.E. Pratt, I.M. Roitt and G. Torrigiani: Quart. J. exp. Physiol., 52: 184, (1967).