正常ヒト甲状腺細胞を用いた
Thyroid Stimulating Immunoglobulin 測定法の
基礎的, 臨床的検討

名古屋大学第一内科

安 藤 通 泰, 山 内 一 征, 田 中 博 志
森 祐 一, 高 槻 健 介, 富 田 明 夫

名古屋大学環境医学研究所第二部門

山 本 昌 弘, 松 井 信 夫

Thyroid Stimulating Immunoglobulin Bioassay
Using Cultured Normal Human Thyroid Cells

**Michiyasu ANDO, Kazuyuki YAMAUCHI, Hiroshi TANAKA,
Yuichi MORI, Kensuke TAKATSUKI, Masahiro YAMAMOTO*,
Nobuo MATSUI* and Akio TOMITA**

First Department of Internal Medicine,
Nagoya University School of Medicine,
Nagoya, Japan

*Second Department of Research Institute of Environmental Medicine,
Nagoya University,
Nagoya, Japan

It is currently believed that the thyroid stimulating immunoglobulin (TSI) of Graves' disease is involved in the pathogenesis of hyperthyroidism through the stimulation of the adenylate cyclase-cyclic AMP system. To evaluate this mechanism, TSI in the serum of patients with Graves' disease was determined by its ability to generate cyclic AMP (cAMP) in monolayer cells prepared from a normal thyroid gland.

The thyroid tissue was digested with collagenase, and the liberated follicles were collected from the supernatant and cultured for 7 days. One gram of thyroid tissue yielded more than 1×10^7 monolayer cells which were stored in aliquots at -80°C . Cells ($1 \sim 2 \times 10^4/0.28\text{cm}^2$ microtiter well) were incubated for 4 hours in 0.2ml Hanks solution poor in NaCl, with various amounts of bovine TSH (bTSH) or 1.5 mg/ml Graves' serum IgG extracted by polyethylene glycol. cAMP accumulated in medium and cells was measured by RIA.

Total cAMP (both medium and cells) was about 4 times higher when NaCl was deleted from Hanks solution. Moreover, as more than 90% of the cAMP was released into the medi-

um, it was possible to omit the measurement of cellular cAMP, which requires extraction. The increase in medium cAMP concentration was dependent upon the number of cells, incubation time, and dose of bTSH. Time course and dose response curves in medium cAMP stimulated by IgG from 3 Graves' patients paralleled those of bTSH equivalent units. Accordingly, TSI activity could be expressed in bTSH equivalent units (bTSH μ Ueq). The assay could detect 1.0 or 3.3 μ U/ml of bTSH and was highly reproducible.

TSI activity in all of 16 IgGs from normal subjects was under 3.3 bTSH μ Ueq/ml, while it was greater than 3.3 bTSH μ Ueq/ml in IgGs from 33 of 37 (89%) untreated patients with Graves disease. Of the 13 patients followed for 2 to 7 months while on antithyroid drugs, 12 had greater than 3.3 bTSH μ Ueq/ml and, with the exception of one, all showed a decrease in their TSI activity. Moreover, 5 of 12 patients treated continuously for more than 1 year were TSI negative (<3.3 bTSH μ Ueq/ml), and except for one case, all had TSI values below 8 bTSH μ Ueq/ml (a value found in only 25% of untreated patients).

This *in vitro* bioassay for TSI is simple and sensitive. It detects the presence of TSI in virtually 90% of untreated patients with Graves' disease. TSI activity showed a clear decrease during the course of antithyroid drug therapy.

緒 言

1956年 Adams¹⁾らは、バセドウ病患者血中にモルモットの甲状腺を刺激する物質が存在することを報告した。その後この甲状腺刺激物質が、IgGに属する免疫グロブリンであり、ヒト甲状腺に対しても刺激作用を有するIgGが存在することが明らかになり、この分野の研究が飛躍的に発展した^{7) 13) 18)}。

又、一方、患者IgGが¹²⁵I-TSHの甲状腺細胞膜への結合を阻害することが明らかにされ^{9) 19)}、バセドウ病の病因として、甲状腺のTSH受容体に対する自己抗体の生成が、その本体であるとの考えが有力となってきた。

しかしバセドウ病患者血清のすべてに、甲状腺刺激活性やTSHに対する結合阻害活性が認められるわけではなく、また、それらの活性と臨床症状や甲状腺ホルモンレベルとは相関せず、さらに、これら両活性の間には必ずしも明らかな相関が得られていないなど、バセドウ病の病因としてのIgGの研究は、多くの解決すべき問題点を有している。

従来、甲状腺刺激作用を有するIgGの活性の測定は、甲状腺スライスを用いたコロイド小滴形成¹⁸⁾やcAMP産生増加^{13) 10)}を指標としたり、甲状腺細胞膜を用いたcAMP産生やアデニレートシクラーゼ活性¹⁴⁾を指標として行なわれてきたが、感度、再現性、簡便性など、いくつかの問題が残されている。

今回、我々は、Hinds⁴⁾、Kasagi⁵⁾らの方法に準じて、ヒト正常甲状腺組織から得られた単離細胞を用い、cAMP産生量を指標とし、感度、再現性にすぐれ、簡便なthyroid stimulating immunoglobulin 活性 (TSI 活性) の測定法を開発し、本法が臨床的に有用な測定法であることを明らかにした。

さらに、バセドウ病患者のTSH結合阻害性免疫グロブリン活性をTSHのradioreceptor assayを原理とするSmithのTSH Receptor Antibody (TRAb) キットを用いて測定し、TSIとの関連について検討し、バセドウ病の病因としてのIgGについて解析を試みた。

I 方 法

1) 甲状腺単離細胞の調製

甲状腺腫患者の手術時に、腺腫に付着して剔出された正常甲状腺組織約3gを、2ないし3mm角に細断し、Ca, Mgを含まぬリン酸緩衝生理食塩水(PBS 0.01M, pH7.4)で洗浄後、1mg/mlのコラゲナーゼ(Worthington CLS II)を含むDulbecco's Modified Eagle Medium (GIBCO: cat # 430-1600)(DMEM)にて、酵素処理を行なった。すなわち、強い振盪を加えながら、37℃の水槽中にて15分間インキュベート後1分静置し、上澄中の甲状腺濾胞を遠沈(500g 5分間)により集めた。この操作を7回繰り返し、得られた濾胞を260mlの培養フラスコ(Corning: cat #25110)を用い、10%胎仔血清を含むDMEM(以下培養液とする)中で培養した。7日間培養したmonolayer cellを、0.05% trypsin, 0.02% EDTAにて培養フラスコより剥離し単離細胞とした。この細胞を $1 \sim 2 \times 10^6$ cells/mlとなるよう10% dimethyl sulfoxideを含む培養液で調整し、凍結保存用バイアル(Nunc: cat # 366656)に1mlずつ分注し、4℃45分、-20℃2時間と段階的に冷却し、-80℃で凍結保存した。

単離細胞は甲状腺1gあたり1000万個以上を得ることができた。また、解凍した細胞は、ディッシュにまかれるとほとんどが着床し、トリパンブルーにより検定した細胞のviabilityは、90%以上であった。なお、凍結保存した細胞は、1週間から最長5ヵ月の間に解凍し、実験に供した。

以上の方法により、約3gの甲状腺組織より、1000検体以上のTSI活性の測定が可能となった。

2) IgGの分離

IgG分画は、polyethylene glycol (PEG)を用いて、McLachlan¹¹⁾, Shewring¹²⁾らの方法に準じて調製した。血清0.5mlを0.5mlの30% PEG水溶液(M.W. 4000)と混合した後、15% PEG 9mlを加え、4℃にて1500g 60分遠沈した。得られたペレットに、1%牛アルブミン(BSA)を含む50mM NaCl 10mM Tris HCl 0.5mlを加え攪拌し、不溶物を1500g 10分の遠沈で除去し、IgG分画を得た。この分画を0.15M NaClにて100倍に希釈し、吸光度計により、280nmの吸光度から蛋白濃度を求めた。本法により得られたIgGは、総蛋白の65%であり、アルブミンは、約20%であった。

3) TSI活性測定法

実験前日、凍結した甲状腺単離細胞を37℃で解凍後、96穴 microtiter well plate (0.28cm²) (Corning: cat # 25860)に1wellあたり $1 \sim 2 \times 10^4$ 個の細胞をseedし、1日培養したのち、実験に供した。

実験にはインキュベーションメジウムとして0.5mM 3-isobutyl-1-methyl xanthine, 20mM Hepes, 0.3% BSAを含むNaCl free Hanks液(5.4mM KCl, 1.3mM CaCl₂, 0.8mM MgSO₄ 7H₂O, 0.3mM Na₂HPO₄, 0.4mM KH₂PO₄, 0.1% glucose)を用いた。IgG検体は、1.5mg/mlの蛋白濃度になるようにインキュベーションメジウムで希釈した。標準ウシTSH (Armour Pharmaceutical Company)は、IgGの非特異的な影響を除外するために、1.5mg/mlの正常ヒトIgGを含むインキュベーションメジウムにより調整した。

実験は、まずwellから培養液を吸引除去し、各濃度の標準TSH及び検体を1wellあたり0.2ml添加し、37℃で4時間インキュベート後、産生されたメジウム中のcAMP量を測定した。基礎実験での細胞内のcAMP量の測定の際には、wellのメジウムを除去後、0.2mlの6%トリクロロ酢酸(TCA)を加え、30分放置した後、TCAに移行したcAMPを、ジエチルエーテルで抽出し、蒸発乾固させたのち、蒸留水0.2mlを加え、cAMP量の測定に供した。cAMPはヤマサRIAキットを

用いて測定した。IgG の TSI 活性値は TSH, 0, 10, 33, 100 $\mu\text{U}/\text{ml}$ による cAMP 産生量より作製した標準曲線から, TSH 力価に換算して表示した。

4) TRAb 活性測定法

Smith のキットを用いて測定した¹⁸⁾。

Fig. 1. Effect of NaCl concentration on the cAMP response to bTSH.

Normal human thyroid cells ($1 \sim 2 \times 10^4/0.28\text{cm}^2$ well) were incubated for 4 hours at 37°C in NaCl free Hanks solution to which different amount of NaCl were added. All media contained 0.5mM 3-isobutyl-1-methyl-xanthine, 0.3% bovine serum albumin, and 20mM Hepes. a: cAMP concentration in medium with different concentration of bTSH b: Total cAMP content (medium and cells) with 100 $\mu\text{U}/\text{ml}$ of bTSH. Vertical bars represent the standard error of a triplicate determination.

II 対 象

臨床症状及び各種甲状腺機能検査より診断した正常者16名, 未治療バセドウ病患者37名, 治療中のバセドウ病患者23名, 慢性甲状腺炎26名及び抗甲状腺剤で治療経過を観察した13例を対象とした。

III 結 果

1) 基礎的検討

① NaCl濃度のcAMP反応性に及ぼす影響

NaCl freeのHanks液にNaClを加えて種々のNaCl濃度のインキュベーションメジウムを調整し, TSHに対するcAMPの反応を4時間のインキュベーションで検討した。

メジウム中のcAMPは, TSH 0の場合は, どのNaCl濃度においても殆んど測定感度以下であった。TSH 10, 100 μ U/ml ではcAMPは用量反応的に増加したが, いずれもNaCl 4.38~17.5 mEq/lの間で頂値をとり35 mEq/l以上でNaCl濃度の上昇と共に減少した。(Fig. 1-a)

一方, 100 μ U/mlのTSHに対する細胞内cAMPの増加は, NaCl 0ではメジウム中に比し極めて少なく, 17.5 mEq/lまではほとんど変化なく, 70, 140 mEq/lと濃度の上昇につれて, 徐々に増加した。(Fig. 1-b)

細胞内とメジウム中のcAMPの比は, NaClの低濃度では, 約1:10であり, 140 mEq/lでは1.8:1と逆転した。またメジウムと細胞内のcAMP産生量を併せた総生産量は, 17.5 mEq/l以下の低濃度では, 140 mEq/lに比して約4倍の高値を示した。

以上の結果よりインキュベーションメジウムにはNaCl freeのHanks液を用い, 活性の指標には, メジウム中のcAMP量を用いた。

② TSH及びバセドウIgGに対するcAMP反応の経時的变化

TSHを含まないメジウムでインキュベートすると, メジウム中のcAMPは時間と共にわずかに増加するのみであった。TSH 10 μ U/ml では, メジウム中のcAMPは15分で有意に増加し, 6時間ではほぼプラトーに達した。TSH 100 μ U/mlの高濃度では, cAMPは2時間まで急激に増加し, 以後, 実験した8時間までゆるやかに増加した。(Fig. 2-a)

Fig. 2. Time course of cAMP response to bTSH. a: cAMP concentration in medium. b: cAMP content in cells. Vertical bars represent the standard error of a triplicate determination.

一方, 同時に測定した細胞内 cAMP の反応性は, TSH 0 の場合, 15 分でわずかに上昇傾向を示したが, 漸減し, 8 時間まで低値を持続した。TSH 10 及び $100 \mu\text{U/ml}$ では, 15 分後に頂値となり, 以後 2 時間まで漸減したのち, 8 時間まで同様の値を維持した。(Fig. 2-b)

また, メジウム中と細胞内の cAMP の濃度比は 0 分で $3.3:1$, 15 分では TSH 0 で $2.7:1$, TSH $10 \mu\text{U/ml}$ で $1.2:1$, TSH $100 \mu\text{U/ml}$ で $0.8:1$, 4 時間では, TSH 0 で $6.2:1$, TSH $10 \mu\text{U/ml}$ で $21:1$, TSH $100 \mu\text{U/ml}$ で $20:1$ であった。

次いで, 正常ヒト IgG (NIgG), 低い TSI 活性を有するバセドウ IgG (BIgG₁) と, 高い活性を有するバセドウ IgG (BIgG₂) を用いて, cAMP の経時的反応性を検討した。IgG 濃度は 1.5 mg/ml に調整した。NIgG に対するメジウム中の cAMP の経時的反応は, 2 時間まで漸微増し, 8 時間までその値を持続した。BIgG₁ では, 4 時間まで漸増し, 8 時間までほぼその値を持続した。(Fig. 3)

以上の結果より, TSI 活性測定は 4 時間のインキュベーションで行なった。

Fig. 3. Time course of cAMP accumulation in medium in response to IgG from a normal subject and two patients with Graves' disease. Vertical bars represent the standard error of triplicate determination.

③ 細胞数の cAMP 反応性に及ぼす影響

1 well あたり 1.25×10^4 , 2.5×10^4 , 5×10^4 個の細胞数に調整し, TSH 0, 10, $100 \mu\text{U/ml}$ に対するメジウム中の cAMP の反応性を検討した。TSH の各濃度において, cAMP 産生量は細胞数に比例して, 直線的に増加した。(Fig. 4)

以上の結果より, 同一甲状腺より調製した細胞で, 多くの検体を測定し, かつ産生された cAMP 量が cAMP 測定キットの最も鋭敏な測定範囲におさまることを考慮し, 以後の実験では $1 \sim 2 \times 10^4$ 個/well の細胞を用いた。

④ TSH の標準曲線及び正常ヒト IgG の影響

メジウム中の cAMP は, TSH 0 では $0.170 \pm 0.010 \text{ pmol/dish}$ であり, TSH $3.3 \mu\text{U/ml}$ では $0.640 \pm 0.040 \text{ pmol/dish}$ と有意の増加を示し, $100 \mu\text{U/ml}$ まで TSH 濃度の増加に従って, 用量反応性に増加した。本測定系における TSH の測定感度は $1.0 \sim 3.3 \mu\text{U/ml}$ であった。(Fig. 5)

Fig. 4. Relationship between number of cells and cAMP response to bTSH stimulation. Vertical bars represent the standard error of a triplicate determination.

Fig. 6. Effect of normal IgG on cAMP response to bTSH. Vertical bars represent the standard error of a triplicate determination.

Fig. 5. Standard curve for the TSI assay. Vertical bars represent the standard error of a triplicate determination.

Fig. 7. Dose-response curves of cAMP to bTSH and Graves' IgGs. cAMP response to increasing amount of bTSH and IgGs from 3 different patients with Graves' disease.

Fig. 8. TSI activities in IgGs from normal subjects, untreated and treated patients with Graves' disease, and patients with chronic thyroiditis. The TSI was expressed in terms of bTSH units equivalent. Each point represents the mean value from a duplicate determination.

Fig. 10. Changes of TRAb activity in IgG of patients with Graves' disease during the course of antithyroid drug therapy.

Fig. 9. Changes of TSI activity in IgG of patients with Graves' disease during the course of antithyroid drug therapy. The shadowed area indicates the normal range (negative TSI).

Fig. 11. Correlation between TSI and TRAb activity.

また、標準TSHに被検IgGと等量(1.5mg/ml)の正常ヒトIgGを添加すると、どのTSH濃度においてもcAMPの減少が見られ、標準曲線は、右側へ平行にshiftした。(Fig. 6)従って、TSIの測定に際しては添加するIgGの非特異的な影響を除外するために、標準TSHに、被検IgGと等量の正常ヒトIgGを添加することとした。

⑤ TSI活性陽性IgGの稀釈曲線

3名の異なるTSI活性を有するバセドウIgGを正常ヒトIgGで段階的に稀釈し、蛋白量として1.5mg/mlとなるように調整した。これら3名のIgGの稀釈曲線は、標準TSHに正常ヒトIgGを1.5mg/ml添加した標準曲線と、ほぼ平行した。(Fig. 7)このことは本法がバセドウIgGのTSI活性の測定法として有用であり、また、TSI活性をTSHに換算して表示することの妥当性を示すものと思われた。

⑥ 再現性

2名のバセドウIgGにおいて、cAMP産生量の変動係数は6.6%, 5.8% (n=5)と良好であった。インターアッセイでは、2名のバセドウIgGのTSH換算値でみると変動係数は各々24%, 21% (n=3)であった。

2) 臨床的検討

① バセドウ病患者のTSI活性

正常者16名のTSI活性の平均はTSH換算で、 $1.62 \pm 0.82 \mu\text{U/ml}$ であり、すべて $3.3 \mu\text{U/ml}$ 以下を示したため、 $3.3 \mu\text{U/ml}$ 以上をTSI活性陽性とした。未治療バセドウ病群では、37名中33名が陽性で、89%と高い陽性率を示したが、TSI活性値は3.5から $100 \mu\text{U/ml}$ 以上と広い範囲に分布した。治療後のバセドウ病のうち、治療期間3ヵ月以内の治療初期群では、11例すべてが陽性を示したが、1年以上治療を続けたEuthyroid群では、12例中6例が陽性であり、陽性のものも1例を除けば $8 \mu\text{U/ml}$ 以下とその活性は低値であった。また慢性甲状腺炎では26例中5例が、3.5から $9.5 \mu\text{U/ml}$ の範囲で、低値ながらTSI活性の陽性を示した。(Fig. 8)

② 未治療バセドウ病13例の治療に伴うTSI活性の推移 (Fig. 9)

症例はシリーズ毎に同時アッセイでTSI活性を測定した。症例⑬を除き、12例が未治療時には、TSI活性陽性を示した。陽性例は殆んど全例でTSI活性は治療と共に低下した。また、治療前TSI活性の高いもの程、その低下が大きかった。しかし、観察した2ないし7ヵ月の間では、TSI活性が陰性となったものは、症例⑩の1例のみであった。

③ 同一の症例におけるTRAb活性の推移

未治療時には、症例⑤を除きすべてTRAb活性陽性を示した。また、症例②③⑨⑪を除き、8例でTRAb活性は治療に伴い低下した(Fig. 10)が、全体としてTSIの低下の方が明瞭であった。個々の症例につき、そのTSI活性とTRAb活性を比較してみると、未治療時における両活性の間に相関はなく、また治療に伴う両活性の変動も一致しないものが多かった。

④ 未治療バセドウ病におけるTSI活性とTRAb活性の相関 (Fig. 11)

21例の未治療バセドウ病において、TSI活性とTRAb活性の相関をみたが、 $r=0.147$ と推計学的に有意の相関を認めなかった。

IV 考 案

従来、バセドウ病の患者血中に存在する甲状腺刺激活性のin vitroの測定には、甲状腺スライス

や甲状腺細胞膜を用いてcAMPの産生やアデニレートシクラーゼ活性を指標とする方法が広く利用されてきた。しかし、これらの方法は感度、再現性及び多数の検体測定には適していないなど、問題が多かった。

これらの点を改善するため、甲状腺の培養細胞を用いる方法が試みられるようになった。単離細胞を用いる場合でも、細胞収率の低さから、動物の甲状腺¹⁹⁾やヒトの甲状腺腺腫⁵⁾等を用いる方法が報告されている。しかし、動物の甲状腺を用いてTSI活性を測定することは、種属特異性があり、問題があるとの報告がある²⁰⁾¹⁹⁾。一方、ヒトの甲状腺を用いる場合でも、甲状腺腺腫及び分化癌は、正常とは異なったTSHに対する結合親和性を持ち、腫瘍個々の性格が異なっている可能性もあり³⁾、TSI活性の測定材料としては、問題がある。

これらの点を考慮し、我々はヒトの正常甲状腺組織を用いて、比活性が高くかつ細胞損傷が少ないコラゲナーゼにより、強い振盪下に15分毎の酵素処理を7回くりかえし、大量の甲状腺濾胞を得ることができた。甲状腺濾胞は7日間の培養中に、単離細胞となり培養フラスコに附着した。この方法は、蛋白分解酵素による処理のあとメッシュを用い、最初から単離細胞に分離する従来の方法に比して、細胞の損傷も少なくかつ収率も飛躍的に増加させることができた。さらに、得られた甲状腺細胞は凍結保存が可能であった。NaClがTSHの甲状腺への結合やアデニレートシクラーゼ活性刺激作用を阻害するとの成績が報告されている²¹⁾²⁰⁾。Kasagi⁵⁾らは甲状腺腺腫細胞を用いた甲状腺刺激活性の測定に際し、Hanks液からNaClを除くことで、その感度を上昇せしめた。本法では、NaCl free Hanks液を用い、TSHの測定感度はラジオイムノアッセイとほぼ等しい1または3.3 $\mu\text{U/ml}$ と著しく上昇し、TSH, TSIの生物学的測定法として極めて有用なものとなった。

IgGの抽出にはPEG法を用いたが、Shewring¹⁰⁾らの報告とほぼ同様、総蛋白の65%を占めるIgG分画を得ることができ、McLachlan¹¹⁾らも本法と同様の方法でIgGの95%を回収したとの報告と考え併せると、簡便で有用な方法と考えられた。

本測定系におけるTSI活性値が、患者血中のTSI活性を正しく反映しているか否かは重要な問題である。我々の測定系では、3名の異なったTSI活性を有するIgGを用いて、8時間までは、ほぼ同様の反応経過を認め、また、0.023 mg/mlから1.5 mg/mlまでのIgG濃度で、用量反応性を認め、かつ、TSHの用量反応曲線と平行関係が得られたことより、本法は患者血中のTSI活性を正しく反映しているものと考えられた。

以上、本法は多数の検体測定が可能で、簡便かつ、感度、再現性にすぐれたTSI活性測定法であると考えられた。

バセドウ病はTSIがその原因と考えられている。我々の測定法では、未治療バセドウ患者で、89%と高率にTSI活性を認め、抗甲状腺剤治療を1年以上続けた機能正常状態にあるバセドウ病患者では、58%にTSI活性を認め、活性の程度も低下した。また、抗甲状腺剤治療中のTSI活性を、経時的に測定すると、大部分の症例で治療と共に減少し、各症例ごとのTSI活性の変動をかなり正確にとらえることができた。

しかし未治療バセドウ病において、TSI活性を認めない症例が存在すること、また、臨床症状や、血中甲状腺ホルモン値と、TSI活性の力価が相関しないことは、TSIの測定によってもバセドウ病の病態の一側面を把握できるのみで、病態のすべてを説明しうるものでないことを示している。

今回、我々はTSI活性と共に、Smithのキットを用いて、TSH結合阻害性免疫グロブリン活性(TRAbs活性)も併せて測定した。未治療バセドウ病患者IgGにおいて、TSIとTRAbs活性とは相

関せず、また抗甲状腺剤治療による両者の変動も、明らかな類似性を示さなかった。ヒト甲状腺膜を用いたアデニレートシクラーゼ活性や、甲状腺スライスを用いcAMP増加を指標としたTSI活性と、TRAbとの間には、良好な正の相関を認めたとするもの^{12) 6)}、認めなかったとする報告^{8) 20)}があり、一定の結論は得られていない。

その原因として、用いられた甲状腺の種類、調整法、実験材料などの違いによるとも考えられるが、より本質的には、バセドウ病患者血中に存在するTSH受容体に対する多様な抗体の存在が関与しているものと考えられる。TRAb及びTSI活性は、ともに多様な抗体の作用発現のための重要な過程の一断面をあらわしているものであり、患者の病態を規定していると考えられる多様な抗体の生物学的作用の総和を明らかにする測定法の確立が望まれる。

結 語

バセドウ病の病態を明らかにするため、甲状腺腫手術時に得られた正常ヒト甲状腺細胞を用いるTSI活性の測定法について検討した。

本法は、従来法に比して単離細胞の収率が著しく増加し、かつ細胞を凍結保存して使用することができ、同一の細胞を用いて多数の検体を測定することが可能であった。また、インキュベーションメジウムにNaCl free Hanks液を用いることにより、メジウム中のcAMPを直接測定でき、かつTSHの測定感度は、1.0ないし3.3 μ U/mlと著しく上昇した。

未治療バセドウ病患者37名中33名に、TSI活性の陽性を認め、治療とともに、ほとんどの症例でTSI活性は低下した。

本法は、バセドウ病の病態を把握する上で臨床的に有用な測定法であると考えられた。

稿を終わるにあたり、御指導、御校閲を賜りました名古屋大学祖父江逸郎名誉教授、名古屋大学医学部第一内科齊藤英彦教授に深く感謝致します。

尚、本論文の要旨は、第56回日本内分泌学会総会において報告した。

文 献

- 1) Adams, D.D.: The presence of an abnormal thyroid-stimulating hormones in the serum of thyrotoxic patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 18: 699–712, 1958.
- 2) Amir, S.M., Carraway, Jr. T.F. and Kohn, L.D.: The binding of thyrotropin to isolated bovine thyroid plasma membranes. *J. Biol. Chem.*, 248: 4092–4100, 1973.
- 3) Clark, O.H., Gerend, P.L., Goretzki, P. and Nissenson, R.A.: Characterization of the thyrotropin receptor-adenylate cyclase system in neoplastic human thyroid tissue. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 57: 140–147, 1983.
- 4) Hinds, W.E., Takai, N., Rapoport, B., Filetti, S. and Clark, O.H.: Thyroid stimulating immunoglobulin bioassay using cultured human thyroid cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 52: 1204–1210, 1981.
- 5) Kasagi, K., Konishi, J., Iida, Y., Ikekubo, K., Mori, T., Kuma, K. and Torizuka, K.: A new in vitro assay for human thyroid stimulator using cultured thyroid cells: Effect of sodium chloride on adenosine 3' 5' monophosphate increase. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 54: 108–114, 1982.
- 6) Konishi, J., Endo, K. and Kasagi, K.: Thyroid stimulators and TSH-binding inhibitor immunoglobulins. In *Current Thyroid Problems in Southeast Asia and Oceania*. Hetzel, B.S., Wellby, M.L. and Hoschl, R. eds., 147–150, 1978.
- 7) Kriss, J.P., Pleshakov, V.

- and Chien, J.R.: Isolation and identification of the long acting thyroid stimulator and its relation to hyperthyroidism and circumscribed pretibial myxedema. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 24: 1005–1028, 1964.
- 8) Kuzuya, N., Chin, S.H., Ikeda, H., Ito, K. and Nagataki, S.: 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.
- 9) Manley, S.W., Bourke, J.R. and Hawker, R.W.: The thyrotropin receptor in guinea pig thyroid homogenate: interaction with the long-acting thyroid stimulator. *J. Endocrinol.*, 61: 437–445, 1974.
- 10) McKenzie, J.M. and Zakarija, M.: A reconsideration of a thyroid stimulating immunoglobulin as the cause of hyperthyroidism in Graves' disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 42: 778–781, 1976.
- 11) MaLachlan, S.M., Smith, B.R., Peterson, V.B., Davies, T.F. and Hall, R.: A system for studying thyroid-stimulating antibody production in vitro. *J. of Clinical and Laboratory immunology*, 1: 45–50, 1978.
- 12) Mukhtar, E.D., Smith, B.R., Pyle, G.A., Hall, R. and Vice, P.: Relation of thyroid-stimulating immunoglobulins to thyroid function and effects of surgery, radioiodine and antithyroid drugs. *Lancet*, 1: 713–715, 1975.
- 13) Onaya, T., Kotani, M., Yamada, T. and Ochi, Y.: New in vitro tests to detect the thyroid stimulator in sera from hyperthyroid patients by measuring colloid droplet formation and cAMP in human thyroid slices. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 36: 859–866, 1973.
- 14) Orgiazzi, J., Williams, D.E., Chopra, I.J. and Solomon, D.H.: Human thyroid adenyl cyclase-stimulating activity in immunoglobulin G of patients with Graves' disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 42: 341–354, 1976.
- 15) Poverly, P.M., Smith, B.R. and Hall, R.: Thyrotropin receptor binding, intracellular cyclic AMP levels, and iodine release in isolated thyroid cells. *F.E.B.S. Lett.*, 72: 251–255, 1976.
- 16) Rapoport, B., Takai, N. and Filetti, S.: Evidence for species specificity in the interaction between thyrotropin and thyroid-stimulating immunoglobulin and their receptor in thyroid tissue. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 54: 1059–1062, 1982.
- 17) Shewring, G. and Smith, B.R.: An improved radioreceptor assay for TSH receptor antibodies. *Clinical Endocrinol.*, 17: 409–417, 1982.
- 18) Shishiba, Y., Shimizu, T., Yoshimura, S. and Shizume, K.: Direct evidence for human thyroidal stimulation by LATS-protector. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 36: 517–521, 1973.
- 19) Smith, B.R. and Hall, R.: Thyroid-stimulating immunoglobulins in Graves' disease. *Lancet*, 2: 427–431, 1974.
- 20) Sugeno, A., Kidd, A., Row, V.V. and Volpe, R.: 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.
- 21) Yamamoto, M. and Rapoport, B.: Studies on the binding of radiolabeled thyrotropin to cultured human thyroid cells. *Endocrinol.*, 103: 2011–2019, 1978.
- 22) Zakarija, M. and McKenzie, J.M.: Zoological specificity of human thyroid-stimulating antibody. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 47: 249–254, 1978.

(受付日: 60. 1. 21)