甲状腺で機能性および非機能性結節が共存した患者の チログロブリンの性状

群馬大学医学部第二外科学教室¹⁾, 東京理科大学基礎工学部²⁾

石 北 敏 一¹⁾, 飯 野 祐 一¹⁾, 石 田 常 博¹⁾,
武 井 寛 幸¹⁾, 森 下 靖 雄¹⁾, 樽 谷 修²⁾

Characterization of Thyroglobulin in a Patient with Functioning and Non-Functioning Benign Thyroid Tumors

Toshikazu ISHIKITA¹⁾, Yuichi IINO¹⁾, Tunehiro ISHIDA¹⁾,
Hiroyuki TAKEI¹⁾, Yasuo MORISHITA¹⁾ and Osamu TARUTANI²⁾

1) The Second Department of Surgery, Gunma University School of Medicine,
Maebashi 371, Japan

2) Division of Biological Chemistry, Science University of Tokyo,
Noda 278, Japan

The chemical and immunological properties of thyroglobulin (Tg) in tissue obtained from a patient co-existed with two types of thyroid tumors, i.e., functioning and non-functioning, and were compared with the properties of Tg that was isolated from adjacent peripheral tissue.

In the present observations, the Tg content was markedly increased in the non-functioning thyroid tumor. On the other hand, the Tg content in the functioning tumor was at the normal level.

The iodine content of Tg was significantly lower in the non-functioning tumor than in peripheral tissues. Affinity with Lectins differed among Tg preparations, suggesting that the carbohydrate chain in the Tg was different in each nodule in a single individual.

Key words : Thyroglobulin, Functioning Thyroid Tumor, Non-Functioning Thyroid Tumor.

は じ め に

機能性および非機能性甲状腺腫瘍のそれぞれについて生化学的特徴, 特にチログロブリン (以下 Tg) の性状についてわれわれはすでに検討してきた¹⁾。その結果, Tg のヨウ素含量が非機能性腫瘍では周辺部が平均0.49%であるのに対し, 結節部は平均0.11%と顕著な減少を示した。これに対し, 機能性腫瘍では逆に周辺部 (平均0.16%) が低下し, 結節部 (平均0.30%) はそれよりも高いことが両タイプの腫瘍を区別する生化学的な特徴であることを示した。今回, 同一患者で両タイプの腫瘍を有する症例について検討する機会を得た。両タイプが共存する場合, 相互の関係がどのよう

になっているか、それぞれの腫瘍は本来の特徴を維持しているのかどうか等について、従来、殆ど報告が見られない。今回、一例ではあるが、とくにTgのヨウ素含量、レクチンとの親和性などについて解析をおこない、個々の場合の特徴と比較検討した。

症 例

患者：52才 女性

主訴：前頸部の腫大

現病歴：1987年6月、乳腺・甲状腺の集団検診にて、前頸部腫瘤を指摘される。近医受診し、甲状腺のaspiration cytologyを施行され、悪性所見を認めず、腺腫様甲状腺腫の診断にて経過観察となる。

1987年8月、動悸が出現するようになり他院受診し、検査の結果plummer病の診断にて当科紹介となる。

1988年2月、手術目的にて入院となる。

既往歴・家族歴：特記すべきことなし

甲状腺機能に関する初回検査値：

TSH (5.7以下)	: 0.01 μ U/ml	FT ₄ (0.81~2.13)	: 2.48ng/ml
T ₃ (0.79~1.95)	: 1.8ng/ml	Tg (30以下)	: 170ng/ml
T ₄ (5.6~12.0)	: 12.5 μ g/dl	MHA (-), TA (-)	

甲状腺シンチグラム所見：甲状腺右葉上部に集積が認められた (Fig.1)。

超音波検査所見：境界比較的明瞭で内部エコーはやや不均一な腫瘍が、右葉上部に一個、右葉・左葉下部に複数個認められた (Fig.2)。

以上の結果から、機能性結節と非機能性結節の合併例と診断し手術を施行した。

Fig. 1 Preoperative scintigraphy. (¹²⁵I Scintigraphy)
Hot nodule is observed in the right lobe.

手術：甲状腺右葉・峡部・左葉部分切除。

切除標本所見：腫瘍は右葉・峡部・左葉下部に複数認められ、淡褐色充実性、軟性であった (Fig. 3)。

病理所見：腺腫様甲状腺腫で、悪性像は認められなかった。光顕像では、結節性病変は大小様々な follicle からなり、被膜形成は乏しく、また周辺甲状腺組織への明らかな圧排所見は認められなかった (Fig. 4)。Fig. 5, 6は機能性結節部 (右葉上部の腫瘍) と非機能性結節部 (左葉下部の腫瘍) の

Fig. 2 Sonographic findings, clearly shaped masses of which internal echoes are heterogenous are noted in each lobes.

Fig. 3 Resected specimen.
Tumors are recognized in the right and left lobes.

電顕像である。機能性結節部の細胞は丈が高く、円柱状となり腺腔面にはマイクロビライが発達して見られる。細胞質内にはライソゾーム顆粒が多く認められ、粗面小胞体、ミトコンドリアの発達も良く、機能性を示唆している。また非機能性結節部は偏平ないし立方状の濾胞上皮が一層にコロイド腔を囲んで配列している。腺腔側のマイクロビライは短く小数散在性に認める。細胞内小器官の発達も一般に不良であり非機能性を示唆している。

尚、術後この患者の血中 Tg レベルは、正常範囲に戻り (14ng/ml), 経過良好である。

Fig. 4 A nodular region and the adjacent thyroid tissue (H.E.).

Fig. 5 Electron microscopic findings of the functioning nodule.

Fig. 6 Electron microscopic findings of the non-functioning nodule.

分 析 方 法

1. チログロブリンの精製

甲状腺腫瘍を中心に手術で摘出した組織を腫瘍部とそれに接した部分に分離し、後で組織学的に正常と確認したものを周辺部組織とした。甲状腺組織から Tg の精製は基本的には既に発表済みの方法で²⁾、スライスにしてイオン強度 0.1, pH 6.5 の磷酸緩衝液中で約 2 時間低温に浸し可溶性蛋白質を抽出した。この抽出液を 6% アガロース・ゲル (Bio Gel A-5m) カラム (2.5×100cm) で直接ゲル濾過をおこない Tg 分画を取り出した^{3,4)}。この方法で分離した Tg はゲル電気泳動的に均一であった。Tg 濃度は従来から簡便的に用いられている $E_{280nm}^{1\%} = 10$ として求めた²⁾。

2. 化学分析

Tg のヨウ素含量は Technicon autoanalyzer を用い亜砒酸および硫酸第二セリウムアンモニウムによる亜砒酸セリウム反応で測定した⁵⁾。

3. 赤血球凝集阻止試験

Tg の糖鎖構造に関する若干の知見を得るためレクチンとの親和性について検討した。すなわち Tg と各種レクチンを反応させ、レクチンの赤血球凝集能をどの程度 Tg が阻害するかをみる赤血球凝集阻止試験をおこなった。これは一定量のレクチンと倍々希釈をした Tg のシリーズを反応させ、約 2 時間室温で放置した後それぞれに一定量の赤血球を加え、凝集が起こる点の Tg の希釈度をもって、Tg のレクチンに対する親和性とした⁶⁾。

今回用いたレクチンは、糖鎖コア部分でマンノースの枝分かれ構造部分と親和性のある Con A (タチナタ豆凝集素)、複合型糖鎖の Gal (ガラクトース) → GlcNAc (グルコサミン) 結合部分を認識する RCA (ヒマ豆凝集素)、複合型糖鎖で GlcNAc → Man (マンノース) 構造を強く認識するといわれている PHA (インゲン豆凝集素)、およびコア部分の GlcNAc とくに混合型糖鎖に強い親和性のある WGA (小麦胚芽凝集素) など四種類を用いた。

結 果

1. 腫瘍部および周辺正常部組織の Tg 含量

従来の知見では良性非機能性および良性機能性のいずれも腫瘍部および周辺部とも組織単位重量当たりの Tg 含量は, 正常組織 (平均68mg/g 組織) に比べ, その60%から85%と若干の低下を示した¹⁾。これに対し本症例では Table 1 に示したごとく周辺部67mg/g, 機能性部 60mg/g, と Tg 含量は正常範囲にあった。これに対し, 非機能性部では従来の知見とは逆に, 116mg/g と Tg 含量がかなり高い値を示した。

2. Tg のヨウ素含量

一般に, 良性非機能性結節では腫瘍部 Tg のヨウ素含量は正常組織 Tg のそれに比べ1/3程度に低下し, 甲状腺ホルモンの形成能が減退する。逆に周辺部は正常組織より高いヨウ素含量を示す。これに対し, 良性機能性結節では, 腫瘍部のヨウ素含量は正常組織に比べ殆ど低下が認められず, 反対に周辺部 Tg でヨウ素含量が半減するのが特徴であった¹⁾。本症例の場合は周辺部が0.36%であるのに対し, 非機能性腫瘍部は0.14%と顕著な低下を示した。これに対し機能性腫瘍部では0.50%と従来の個々の場合と若干異なり正常組織 Tg (0.33%) よりも1.5倍も高い値を示した。(Table 1)。

3. 赤血球凝集阻止試験

Tg とレクチンの親和性を示す赤血球凝集反応における Tg の阻害効果の結果を Table 2 に示した。まず Con A では従来の知見にほぼ一致して, 本症例の各 Tg も Con A との親和性には顕著な差は見られない。これに対し RCA や WGA との反応では非機能性腫瘍 Tg が, また PHA には周辺部分の Tg に強い親和性が見られ, 同一患者でも組織部分の由来によって糖鎖構造の異なることが示唆される結果であった。

Table 1 Tg content in the tissue and iodine content in the Tg.

Thyroid tissue	Tg(mg)/Tissue(g)	I/Tg(%)
A.		
Adjacent periphery	67	0.36
Non-functioning tumor	116	0.14
Functioning tumor	60	0.50
B.		
Normal	68 ± 26 (4)	0.33 ± 0.14 (13)
Non-functioning tumor		
Tumor	42 ± 35 (11)	0.11 ± 0.11 (10)
Periphery	41 ± 16 (9)	0.49 ± 0.24 (14)
Functioning tumor		
Tumor	55 ± 12 (9)	0.30 ± 0.06 (9)
Periphery	58 ± 10 (7)	0.16 ± 0.07 (7)

A :Present case(patient) co-existed with two types of tumor.

B :Mean values from the patients with non-functioning or with functioning tumor. Numbers in parentheses represent numbers of patients. A part of data shown in Table 1B cited from previous report ¹⁾.

Table 2 Inhibitory action of human Tg on agglutination of erythrocyte-lectin system.

Inhibitor(Tg)	Relative inhibition titer			
	ConA	RCA	PHA	WGA
A.				
Adjacent periphery	2	1	1 2 8	2
Non-functioning tumor	1	8	6 4	1 6
Functioning tumor	4	1	8	2
B.				
Normal (K, M)	1 6	1 2 8	—	1 6
Non-functioning tumor (T, T)	1 6	3 2	—	1 2 8
Functioning tumor (N, K)	1 6	6 4	—	1 6
Carcinoma (S, H)	1 6	6 4	—	1 2 8

A :Patient shown in the present paper.

B ():Name of individual patient⁽⁶⁾.

— :not determined

考 察

甲状腺腫瘍は圧倒的に非機能性の場合が多く、機能性結節は比較的例数が少ない。我々は、両タイプをそれぞれ単独に持つ患者についての Tg および甲状腺ペルオキシダーゼ (TPO) 活性など生化学的性状について既に報告してきた^{7,8)}。今回は両タイプの結節を持つ同一患者の Tg について1例ではあるが機能性と非機能性腫瘍が共存する状況における Tg のヨウ素含量やレクチンとの親和性について検討ができた。

その結果、Tg 含量に関しては正常組織に比べ、周辺部や機能性結節では顕著な変化はみられなかったが、非機能性結節部分で116mg と高い値を示した。この値は単独の非機能性での結果 (42±35mg) より、極めて高いばかりでなく、健常人での含量 (68±26mg) よりも多い⁹⁾、これは Tg 含量が腫瘍の悪化とともに顕著な減少を示すという単独タイプ従来の知見と逆の結果であった。

次にヨウ素含量は非機能性結節部分で0.14%と低く、従来の知見と一致するが、機能性結節の部分は0.50%で正常組織 Tg に比べ顕著に高くなっているのが単独タイプの結果と異なる。さらに周辺部に関しては Tg 含量およびヨウ素含量のいずれもほぼ正常組織と同じ値を保持している点が、単独タイプの腫瘍周辺部の場合と異なっている。すなわち Tg 含量では機能性腫瘍の周辺部の特徴を、ヨウ素含量では非機能性腫瘍の周辺部の特徴を示している。

非機能性結節部分の Tg 含量が高い原因については目下のところ明らかにできないが、機能性単独のケースではあるが、今回の結果に似たような機序が報告されており、その中で機能性結節の産生する T₃, T₄が直接同一甲状腺の多くの部分を抑制する short loop negative feedback 機構が唱えられている^{9,10,11)}。今回の患者も血中 T₃, T₄レベルが若干高く、TSH レベルは極めて低いことから機能性結節および周辺から分泌される甲状腺ホルモンが paracrine 的に非機能性結節に作用して TSH に対する反応性を低下させ、Tg の酵素的加水分解能が落ち、その結果 Tg が結節に貯まってしまったのではないかと考えられる。この場合の Tg がヨウ素含量が低いことは、我々がすでに報

告している単独の場合に見られるように、非機能性腫瘍部では概して甲状腺ペルオキシダーゼ (TPO) 活性は高いが、ヨウ素の取り込み機構あるいは TPO 以外のヨウ素の有機化機構に欠陥があり、その結果として、Tg のヨウ素含量が低下しているものと考えられる¹⁷⁾。

Tg の糖鎖に関しては正常組織の Tg には典型的な高マンノース型糖鎖と複合型糖鎖を多数もっていることが知られている¹²⁾。さらに腫瘍 Tg になると両タイプの比に大きな変化が見られ、甲状腺癌、非機能性良性腫瘍、バセドウ病などでは高マンノース型が顕著に低下し、相対的に複合型が増加¹³⁾、腫瘍の悪性化によって異常糖鎖や巨大分子量の糖鎖構造のものが顕著に現れてくることは既に明らかにした¹⁴⁾¹⁵⁾。またこれらの変化が影響してレクチンとの親和性にも差が認められる⁶⁾。

今回の結果、非機能性 Tg は RCA や WGA と強い親和性があるのは、高マンノース型糖鎖よりも複合型および混合型糖鎖が多く、糖鎖末端を占めるシアル酸の顕著な減少 (RCA)、および正常組織 Tg ではほとんど見られない糖鎖コア部分へのグルコサミンの bi-secting な結合 (WGA)、あるいは複合型で多岐構造 (polyantennary) や混合型糖鎖 (WGA) があるものと思われ、非機能性腫瘍 Tg の特徴といわれる従来の知見に一致する⁶⁾¹³⁾¹⁴⁾。

次に機能性部 Tg とレクチンの反応を検討した知見は従来見られないが、今回の結果では Con A との親和性が若干高く、PHA とは弱い反応であることから癌 (非機能性) や良性腫瘍の Tg と異なり、複合型糖鎖よりも高マンノース型糖鎖の含量が高いことが示唆される。同様のことは、びまん性甲状腺腫の Tg で生じている¹²⁾。また正常組織 Tg に似て非高マンノース型糖鎖には異常糖鎖がほとんど含まれていないと考えられる (WGA)。

また周辺部 Tg は糖鎖のプロセッシングが進行し、高マンノース型から複合型糖鎖がかなり形成されているが (PHA)、異常糖鎖はほとんど無いようである (WGA)。この点では正常組織 Tg に類似すると考えられる。

結 論

甲状腺で機能性および非機能性結節が共存した症例を経験し、それぞれの腫瘍の組織 Tg について、ヨウ素含量、糖鎖構造などを生化学的に検討した。

1) 同一患者においても病巣組織の異なりによって Tg のヨウ素含量が異なり、周辺部が 0.36% であるのに対し、非機能性部では 0.14% と大きく減少しているが、単独の症例と異なり Tg 含量では逆に顕著な増大を示している。一方、機能性部分のヨウ素含量は 0.50% と周辺部よりもさらに高く、Tg 含量もほぼ正常範囲の値を示している。これは、単独の症例では周辺部 Tg のヨウ素含量が低下するのが特徴であることとは異なる結果であった。従ってこれらの結果から今回の患者の甲状腺全体としての機能及びヨード代謝は、それぞれ機能性あるいは非機能性単独の場合と異なり、機能性結節部分・非機能性結節部分・周辺部それぞれの相互関与のあることが示唆された。

2) レクチン類との反応性から機能性 Tg と非機能性 Tg はヨウ素含量だけでなく、糖鎖構造にも差が見られ、とくに非機能性部では従来単独の場合と一致して、腫瘍に特有な異常糖鎖が存在するものと思われた。機能性部と周辺部 Tg は正常組織 Tg に似た糖鎖組成で、異常糖鎖は含まないが、機能性部は糖鎖のプロセッシングがあまり進んでおらず、高マンノース型が多いと考えられる。

本論文の一部は、第 61 回日本内分泌学会甲状腺分科会において報告した。

文 献

- 1) 樽谷 修, 阿部展祐輝, 石田常博, 泉雄 勝, 高橋礼子, 斎藤公幸, 河野陽一, 桒山義雄, 吉村弘一, 細谷東一郎: 機能性結節性甲状腺腫の生化学的特徴. 日内分泌, 1988; 64: 390-401
- 2) Ui, N., Tarutani, O.: Purification of hog thyroglobulin. J. Biochem. 1961; 50: 508-518
- 3) Tarutani, O., Kondo, T., D.J. Smith, S. Shulman: Isolation and properties of thyroglobulin-related 4S protein in the soluble fraction of thyroid tissue. J. Biochem. 1978; 333-340
- 4) Tarutani, O., Kondo, T., D.J. Smith, S. Shulman: Subunit structure of 27-s thyroid iodoprotein. Endocrinol. Japon. 1978; 23: 305-311
- 5) Gross, W.G., Wood, L.K., McHargue, J.S.: Spectrophotometric determination of iodine. Anal. Chem. 1948; 20: 900-901
- 6) Tarutani, O., Ui, N.: Properties of thyroglobulin from normal thyroid and thyroid tumor on a concanavalin A Sepharose column. J. Biochem. 1985; 98: 851-857
- 7) Yoshimura, H., Ito, K., Tarutani, O., Hosoya, T.: Peroxidase activity and thyroglobulin iodination activity of thyroid in non-functioning thyroid tumors. Acta Endocrinol. 1988; 118: 147-153
- 8) 桒山義雄, 細谷東一郎, 樽谷 修, 伊藤国彦: バセドウ病甲状腺のペルオキシダーゼ活性—MMI, PTU, 無気ヨード投与による差異. 日内分泌, 1986; 62: 1-8
- 9) Takasu, N., Sato, S., Tukui, T., Yamada, T., Furihata, R., Makiuchi, M.: Inhibitory Action of Thyroid Hormone on the Activation of Adenyl Cyclase—Cyclic AMP System by Thyroid Stimulating Hormone in Human Thyroid Tissues from Euthyroid Subjects and Thyrotoxic Patients. J. Clin. End. Metab. 1974; 39: 772-778
- 10) Shishiba, Y., Takaishi, M., Miyachi, Y., Ozawa, Y.: Alteration of Thyroidal Responsiveness to TSH Under the Influence of Circulating Thyroid Hormone: Short Feed-Back Regulatory Effect. Endocrinol. Japon. 1975; 22: 367-371
- 11) 白水明代, 井上謙次郎, 岡村 建, 江頭芳樹, 尾前照雄, 久次武晴, 自見雅文: 機能性甲状腺結節 (Autonomous Functioning Thyroid Nodule) 及び周辺組織におけるヨード代謝. 日内分泌, 1978; 54: 866-875
- 12) Spiro, R.G.: The Carbohydrate Units of Thyroglobulin. J. Biol. Chem. 1965; 240: 1603-1610
- 13) Hotta, T., Ishihara, H., Tejima, S., Tarutani, O., Takahashi, N.: Comparative study of the oligosaccharides of human thyroglobulins obtained from normal subjects and patients with various diseases. J. Appl. Biochem. 1985; 7: 98-103
- 14) Yamamoto, K., Tsuji, T., Tarutani, O., Osawa, T.: Structural changes of carbohydrate chains of human thyroglobulin accompanying malignant transformations of thyroid glands. Eur. J. Biochem. 1984; 143: 133-144

- 15) Yamamoto, K., Tsuji, T., Tarutani, O., Osaw, T.: Phosphorylated high mannose-type and hybrid-type oligosaccharide chains of human thyroglobulin isolated from malignant thyroid tissue. *Biochem. Biophys. Acta* 1985; 838: 84-91

(受付日: '91.10.16)

(採択日: '92. 5.18)