免疫グロブリンの干渉により著しい高テストステロン血症 を呈した女性例

東京女子医科大学 RI 検査科¹⁾, 同 第二内科²⁾

鈴木 智 晴¹⁾, 出 村 黎 子¹⁾²⁾, 矢 島 里 江²⁾

小田桐 恵 美¹⁾²⁾, 出 村 博²⁾

Falsely Elevated Plasma Testosterone Levels Due to Immunoglobulin in a Young Woman without Virilization

Tomoharu SUZUKI¹⁾, Reiko DEMURA¹⁾²⁾, Rie YAJIMA²⁾

Emi ODAGIRI¹⁾²⁾, Hiroshi DEMURA²⁾

¹⁾Radioisotope Center, ²⁾Institute of Clinical Endocrinology, Tokyo Women's Medical College

A 26 year-old woman complained of amenorrhea lasting for 6 months showed markedly elevated total and free testosterone levels by radioimmunoassay. She lacked any signs of virilization, and gynecological and radiological examinations showed no abnormalities of the ovaries or adrenal glands. A high testosterone level persisted after the resumption of menstruation following several months of clomiphene citrate therapy, suggesting the presence of some factor interfering with the testosterone assay. Plasma total testosterone was measured using a total testosterone RIA kit (Nippon DPC) and was 2,130 ng/dl, while plasma free testosterone measured with a free testosterone kit (Nippon DPC) was >60 pg/ml. After ether extraction of plasma, the total testosterone level was 30.6 ng/dl, suggesting that some nonsteroidal water-soluble substance in her plasma was interfering with the assay. Binding tests employing the patient's plasma and the tracers used in the total testosterone kit revealed a high binding affinity after B/F separation by either PEG or Protein G, suggesting the presence of an IgG which crossreacted with these tracers. As the tracers have an iodinated histamine at C-19, the effects of histamine and testosterone itself on the binding affinity were studied, but no influence was demonstrated. Tracers used in estradiol, progesterone, aldosterone, cortisol, and DHEA-S kits as well as a different testosterone kit did not crossreact with the patient's plasma. Thus, the crossreaction between tracers in the testosterone kits and patient IgG was demonstrated to be specific to DPC kits. Furthermore, the difference in binding affinity between total and free testosterone suggested that the epitope may be close to C-19. The mechanism of production of this specific IgG, including whether it is an autoantibody or not remains unclear.

Keywords: immunoglobulin, testosterone, RIA, amenorrhea

はじめに

女性における高アンドロゲン血症は無月経, 多毛症, 男性型発毛, 音声の低音化や陰核肥大などの女性性徴の消失と男性化を引き起こす。今回, 我々は著しい高テストステロン血症を示しながらも男

性化徴候が認められなかった女性例を経験し、本症例の高テストステロン血症について内分泌学およびテストステロン測定上の問題の両面から検討したので報告する。

症 例

患 者：26歳，女性。

主 訴：無月経。

家族歴：父 直腸癌，母 気管支喘息。

既往歴：特記事項なし。

現病歴：生来健康，初経は11才で月経周期は規則的であった。1993年頃より徐々に皮下脂肪が薄くなり，軽度に骨ばった感じが出現した。1994年3月頃より無月経となったため5月受診。婦人科的に異常はなく，テストステロン 1,427 ng/dl と高値を認めたためアンドロゲン産生腫瘍を疑い，8月精査のため入院。

入院時現症：身体所見上多毛，音声の低音化，陰核肥大などの明らかな男性化徴候は認めなかった。入院時検査成績では，トータルテストステロン，フリーテストステロンがそれぞれ 2,130 ng/dl および 60 pg/ml 以上と男性の正常上限をもはるかに越える高値を示した以外は，各種ホルモン，内分泌負荷試験で明らかな異常は認められなかった（Table 1）。また，腹部 CT，MRI にても両側副腎，卵巣に異常所見を認めなかった。

臨床経過：クロミフェンで排卵を誘発できたため，その後外来で数回のクロミフェン治療を行い月経異常は改善された。しかし，テストステロンの高値は持続した（Fig. 1）。

Fig. 1 Changes of plasma total and free testosterone levels in the patient.

Table 1 Endocrinological findings on admission.

Basal level			
PRL	1.7	ng/ml	(<15)
LH	4.0	mIU/ml	(*1.5-12.7)
FSH	7.6	mIU/ml	(*3.2-10.2)
total-testosterone	2130	ng/dl	(10-60)
free-testosterone	>60	pg/ml	(<3)
estradiol	32.8	pg/ml	(*11-82)
progesterone	0.4	ng/ml	(* <1.7)
SHBG	27	nmol/L	(20-100)
cortisol	7.2	μg/dl	(4.5-24)
aldosterone	14.3	ng/dl	(2.2-15)
DHEA-S	314	μg/dl	(73-322)
17-OHP	0.60	μg/dl	(*0.2-2.8)
urinary 17-OHCS	4.50	mg/day	(1.6-8.8)
urinary 17-KS	10.2	mg/day	(2.4-11.3)

() : normal range, * : follicular phase

GnRH test				
	before	30	60	(min)
LH	5.6	22.2	32.7	(mIU/ml)
FSH	5.2	6.9	8.9	(mIU/ml)

GnRH 100 μg was administered intra venously.

ACTH test				
	before	30	60	(min)
cortisol	8.4	23.7	25.5	(μg/dl)
total-testosterone	1506	1466	1980	(ng/dl)

ACTH₁₋₂₄ 250 μg was administered intra venously.

Rapid dexamethasone suppression test			
	before	after	
cortisol	7.9	1.2	(μg/dl)
total-testosterone	2000	2270	(ng/dl)

0.5mg dexamethasone was administered orally the night before the test.

方 法

1. テストステロンの測定法

測定対照となった血漿テストステロン濃度の測定はトータルテストステロン DPC キット (Coat-A-Count Total Testosterone/日本 DPC コーポレーション/東京) によった。本キットは有機溶媒による抽出が不要な直接測定法で、インキュベーション時間は 37°C で 3 時間と短く、トレーサーに ¹²⁵I 標識テストステロン誘導体を用い、特異性の高い抗テストステロン—ウサギ抗体をチューブ固相した

one step 競合法 RIA である。

2. テストステロンの抽出

血漿 0.2 ml にエーテル 2 ml を加え15分間激しく振とうし、エーテル層を回収後蒸発固させ、これを RIA キットのテストステロン 0 濃度標準液 0.2 ml で溶解し、抽出前と同容量に調整した。

3. トレーサー結合試験

血漿 50 μ l にキットトレーサー溶液 1 ml を加え、室温あるいは 37°C で 3 時間インキュベーションし、25% PEG 溶液 1 ml (PEG 法) あるいはアガロース固定化 Protein G 懸濁液 0.5 ml (Protein G 法) を添加後遠心分離し、沈渣の放射線量を測定した。結合活性は総添加トレーサー量に対する沈渣の放射線量を%で表した。本試験にはトータルテストステロン DPC キット、フリーテストステロン DPC キット、2 抗体法テストステロン DPC キット、エストラジオール DPC キット、プロゲステロン DPC キット、アルドステロン DPC キット、コルチゾール DPC キットおよび DHEA-S DPC キットのトレーサーを使用した。

4. 結合置換試験

トレーサー結合試験の際に非標識体をインヒビターとして添加し、結合活性への影響を検討した。すなわち、血漿 50 μ l に非標識テストステロンあるいはヒスタミン溶液 (各 460 μ g/ml) 50 μ l とトータルテストステロンキットのトレーサー溶液 1 ml を添加後室温で 3 時間インキュベーションし、PEG 法で B/F 分離し、沈殿物の放射線量を測定した。

結 果

1. トータルテストステロンの希釈測定 (Fig. 2)

本症例の血漿トータルテストステロン値は原血漿ではスケールオーバーであったため、キット添付

Fig. 2 Standard curve for total testosterone RIA and dilution curve of the patient plasma.

の0濃度標準液で3, 10, 30および100倍希釈し測定した。標準曲線と比較して本症例の希釈曲線の傾きはなだらかで平行性が低かった。測定値は希釈するほど高値傾向であったため、希釈誤差、標準曲線の精度など考慮して10倍希釈の値を測定値とした。

2. エーテル抽出物中のテストステロン (Table 2)

本症例血漿中の夾雑物による測定系への影響を検討するため、エーテルで抽出後トータルテストステロンを測定し、値を比較した。正常男女の検体を用いたエーテル抽出によるテストステロンの回収率はそれぞれ91および97%であった。本症例では血漿の測定値 2,062.2 ng/dl に対し抽出液では 30.6 ng/dl と正常女性の範囲 (10~60 ng/dl) であったことから、本検体中の水溶性物質が影響していたことが明らかとなった。

3. トータルテストステロンキットのトレーサーと検体の結合活性 (Table 3)

37°C インキュベーションでトレーサー結合試験を行った結果、本症例の血漿とトータルテストステロンキットトレーサーとの結合活性は PEG 法, Protein G 法いずれの B/F 分離法でもそれぞれ総添加量の54.7および57.8%と対照の正常者血漿に比し著しく高く、症例血漿中の IgG と本トレーサーが結合することが明らかとなった。

4. 結合置換試験 (Table 4)

室温インキュベーションの条件で、対照の正常者血漿とトータルテストステロンキットトレーサーとの結合活性およびこれに対するテストステロン、ヒスタミン添加の影響は認められなかった。本症例の血漿とトレーサーの結合は室温インキュベーションでも認められた。この結合に対しテストステロン 460 μ g/ml およびヒスタミン 460 μ g/ml の添加は置換効果を示さず、抗テストステロン自己抗体あるいは抗ヒスタミン自己抗体活性は認められなかった。

Table 2 Total testosterone levels before and after extraction.

	plasma (ng/dl)	extract (ng/dl)
the patient	2062.2	30.6
control female	52.1	50.7
control male	664.4	603

Table 3 Tracer binding activity after B/F separation by PEG and Protein G methods.

	PEG method (B/T %)	Protein G method (B/T %)
the patient plasma	54.7	57.8
control	2.8	3.8

Table 4 Effects of testosterone and histamine on the binding activities of total testosterone kit tracer and the patient plasma.

	before (B/T %)	testosterone (B/T %)	histamine (B/T %)
the patient plasma	34.2	38.7	37.5
control	3.8	3.4	3.6

Table 5 Binding activities of various steroid kit tracer with the patient plasma.

	the patient plasma (B/T %)	control (B/T %)
Coat-A-Count Total Testosterone kit	34.2	3.8
Coat-A-Count Free Testosterone kit	18.5	3.6
Double Antibody Testosterone kit	5.4	5.4
Coat-A-Count Estradiol kit	3.9	4.6
Coat-A-Count Progesterone kit	2.7	2.8
Coat-A-Count Aldosterone kit	3.5	3.4
Coat-A-Count Cortisol kit	3.2	3.0
Coat-A-Count DHEA-SO ₄ kit	4.2	4.0

5. 各種キットトレーサーとの結合活性 (Table 5)

本症例の血漿と種々のステロイド測定キットのトレーサーとの結合活性を室温インキュベーション、PEG 法による B/F 分離の条件で検討した。使用したトレーサーの構造式を Fig. 3 に示した。本症例とフリーテストステロンキットトレーサーの結合は総添加量の18.5%で、同条件で測定したトータルテストステロントレーサーとの結合率34.2%に比べると弱いながらも対照の正常者血漿と比較して明らかな結合活性が認められた。一方、二抗体法テストステロン、エストラジオール、プロゲステロン、アルドステロン、コルチゾールおよび DHEA-S キットのトレーサーとの結合活性は認められなかった。

考 察

本症例は26歳女性で無月経を主訴とし、著しい高テストステロン血症を示しながら明らかな男性化徴候が見られず、アンドロゲン産生腫瘍と考えるには疑問のあった症例である。入院時の検査成績はトータルおよびフリーテストステロンがそれぞれ 2,130 ng/dl および 60 pg/ml 以上と、両検査値は共に男性の正常上限をもはるかに越える高値を示した以外、女性ホルモン、プロラクチン、ゴナドトロピン値や内分泌負荷試験でも明らかな異常は認められず、画像診断上も両側副腎、卵巣等に異常所見は認められなかった。さらに、月経異常が改善した後もテストステロンの高値は持続しているなどの臨床成績から、内分泌学的には高テストステロン血症ならびにこれと月経異常との関連は説明しがたいと思われた。そこで、テストステロン測定上の問題の可能性について検討した。

トータルテストステロン DPC キットによる測定系において、本症例血漿の希釈試験の結果はテストステロンの標準曲線と本症例血漿の希釈曲線との平行性が低く、本症例の測定系に対する親和性がテストステロンとは異なることを示している。本測定系は有機溶媒による抽出は必要ないが、本症例血漿中の夾雑物が測定系に影響している可能性を検討するためエーテルで抽出し測定した。本症例の血漿トータルテストステロン値は通常の測定では 2,062.2 ng/dl であったのに対し、抽出液では 30.6 ng/dl と女性の正常値の範囲であった。エーテル抽出によるテストステロンの回収率は90%以上であることから、本症例のテストステロン高値の原因は血漿中のステロイド類とは異なる水溶性の物質の影響であると考えられた。この水溶性物質として、抗テストステロン自己抗体の可能性が推測された。これまでに抗テストステロン自己抗体の症例は1例報告されているのみである¹⁾。この報告によ

れば、症例は25才の女性で初経以来月経は不整、その後無月経となり、高テストステロン血症を認めるも血中プロラクチン、ゴナドトロピン、女性ホルモン値は正常範囲であり男性化徴候を認めず、卵巣、副腎等に腫瘍を認めないなど、本症例との類似点が多い。本症例のテストステロンに対する自己抗体の可能性について検討する目的で、トータルテストステロン DPC キットのトレーサーと本症例血漿の結合試験を行った。その結果、高い結合活性が認められた。この結合活性は PEG 法、Protein G 法のいずれの B/F 分離法によっても認められることから、おそらく血中の IgG が本トレーサーと反応すると思われた。本トレーサーの構造は Fig. 3a の如くテストステロンの19位の炭素に側鎖としてヨウ化ヒスタミンがスペーサーを介し結合している。そこで、この抗体がテストステロンを認識するのか、側鎖部分を認識するのかを確認するため、非放射性テストステロンおよびヒスタミンで結合が置換されるかどうかを検討した。結合置換試験の結果、テストステロンおよびヒスタミンの大過剰量の添加によっても本症例血漿と本トレーサーとの結合は置換されなかった。以上の成績から、本抗体は少なくとも抗テストステロン自己抗体や抗ヒスタミン自己抗体ではなく、トータルテストステロン DPC キットのトレーサーに特異的な抗体と考えられた。さらに、本抗体と種々のステロイド測定キットのトレーサーとの結合活性を調べた結果、フリーテストステロン DPC キットのトレーサーとの結合が認められ、二抗体法テストステロン、エストラジオール、プロゲステロン、アルドステロン、コルチゾールおよび DHEA-S キットのトレーサーとは結合しなかった。これらの結果から、本症例のフリーテストステロン値が高値を示した原因も測定干渉によるものと思われた。さらに、本抗体はテストステロンや Fig. 3c に構造式を示したテストステロンの3位にヨウ化チロシンの側鎖が付いた二抗体法テストステロンキットのトレーサーと反応せず、Fig. 3a のテストステロンの19位の炭素にヨウ化ヒスタミンの側鎖が付いたトータルテストステロンキットのトレーサーとは強く、Fig. 3b に示した6位に OH 基が付いたフリーテストステロンキットのトレーサーとは弱く反応することから、本抗体の抗原認識エピトープはおそらくテストステロンの19位の炭素に付いたスペーサー部分からステロイド骨格の6位の炭素を含む部分にかけてと推測された。本症例が直接的にこれらのトレーサーに感作されたとは考えにくく、何らかの外因性あるいは内因性物質に対して生じた抗体がこれらのトレーサーと交叉反応するものと推測されるが、この抗体の産生機序は不明である。この抗体と月経異常との関連は不明であるが、月経異常はその後改善しており、直接的な関連はなかったと考えている。

近年、免疫アッセイ技術の進歩によって著しく測定感度、精度が向上し、臨床の有用性、信頼性が高まってきている。一方、以前から指摘され稀な現象と考えられてきた検体中の免疫グロブリンによる測定干渉の問題がしばしば認められるようになってきた。ホルモン自己抗体がホルモン測定に干渉することはよく知られており、当科においてもこれまでに数多く経験し報告している^{2)~4)}。一般に、ステロイドホルモンはペプチドホルモンとは異なり小分子化合物のため単独では免疫源にはならない。実験動物や家畜ではステロイドホルモンを大分子のハプテンとして感作することで抗体を産生させ、その抗体を RIA などに利用している。ヒトの場合、アジソン病や自己免疫性の卵巣炎、精巣炎などでステロイド産生部位である副腎や性腺組織に対する自己抗体が認められているが、これらの抗体はステロイド自体に対するものではない⁵⁾。パセドウ病患者で小分子化合物である甲状腺ホルモンに対し自己抗体を産生している例はあるが³⁾、ステロイドホルモンに対する自己抗体の報告はこれまでに先の抗テストステロン自己抗体の一症例のみである¹⁾。本症例は抗テストステロン自己抗体はなかったが、測定干渉の機序は同じであり極めて特異な症例と思われる。一方、ホルモン自己抗体以

Fig. 3 Chemical structures of various steroid kit tracers. a: Coat-A-Count Total Testosterone kit, b: Coat-A-Count Free Testosterone kit, c: Double Antibody Testosterone kit, d: Coat-A-Count Estradiol kit, e: Coat-A-Count Progesterone kit, f: Coat-A-Count Aldosterone kit, g: Coat-A-Count Cortisol kit, h: Coat-A-Count DHEA-SO₄ kit.

外に、マウスモノクローナル抗体を使用している測定系では human antimouse antibody (HAMA) のような異型抗体による測定干渉が近年問題となっている⁶⁾⁷⁾。さらに、我々は IgG 分子そのものが PTH-C 様免疫活性を有し偽高値を示した副甲状腺機能低下の一症例を報告している⁸⁾。これらの測

定干渉の問題は、検査データの信頼性を向上させるために常に留意されるべきである。

トータルテストステロン DPC キットは有機溶媒による抽出が不要で、トレーサーに ^{125}I 標識テストステロン誘導体を用い、チューブ固相抗体法による one step 競合法 RIA である。本キットはこれまでの ^3H テストステロンを用いた測定系に比べ極めて操作性が優れているが、検体を直接サンプリングすることから夾雑物による測定干渉を受けやすいことが予想される。本キットの臨床的有効性については良く知られており^{9)~12)}、広く世界的に使用され、本邦でもほとんどの施設で使用されている。そのため、本法によるテストステロン測定値が高値を示すものの男性化徴候を示さないなど、臨床症状との間に乖離がみられる場合、測定干渉による可能性を考慮し、有機溶媒抽出を検討するなど注意を配る必要があると思われた。

謝 辞

本研究に多大の御協力をいただいた日本 DPC コーポレーションに深謝致します。

尚、本論文の要旨は第69回日本内分泌学会学術総会（平成8年7月、大阪市）にて発表した。

文 献

- 1) 桑原 章, 苛原 稔, 鎌田正晴, 青野敏博, 奈賀 脩: 抗テストステロン自己抗体を有する無排卵症の一例. 日産婦誌, 1993; 45 supp.: 433.
- 2) 野村武則, 小田桐玲子, 明石弘子, 出村黎子, 出村 博: 日常検査のためのインスリン抗体測定法/インスリン抗体結合百分率測定法の基礎的検討および臨床的検討. 医学と薬学, 1983; 9: 235-242.
- 3) 山口伸之, 栗原重子, 小池幸子, 青山 昭, 日下部きよ子, 小田桐恵美, 出村黎子, 出村 博: T_3 自己抗体の検索法および物理化学的性状の解析. 臨床病理, 1987; 35: 571-576.
- 4) 出村黎子, 石渡尚子, 野村武則, 出村 博, 鎮目和夫, 奥野晃正, 真山和徳, 藤枝憲二: 血中 free ならびに total GH 濃度の測定/とくに GH 抗体陽性例における測定の意義について. ホルモンと臨床, 1988; 36: 591-600.
- 5) Bosze, P.: Antibodies against steroids. Human Reproduction, 1988; 3: 63-68.
- 6) 豊島宏二, 百溪尚子, 清水一雄, 齊藤一二三, 久岡俊彦, 吉村 弘, 石川直文, 伊藤国彦, 庄司 佑: マウス IgG 結合物質のため TSH がみかけ上高値を示したバセドウ病症例. 日内分泌会誌, 1993; 69: 1083-1091.
- 7) 橋本琢磨: イムノアッセイに干渉するイムノグロブリン. 臨床検査, 1996; 40: 80-82.
- 8) Kasono, K., Sato, K., Suzuki, T., Ohmura, E., Demura, R., Shizume, K., Tsushima, T., Demura, H.: Falusely elevated serum parathyroid hormone levels due to immunoglobulin G in a patient with idiopathic hypoparathyroidism. J. Clin. Endocrinol. Metab., 1991; 72: 217-222.
- 9) 石原静盛, 松井香都代, 森馬初子, 三島千穂, 本田 稔, 友延正弘, 金尾啓右, 伏見尚子, 笠島慶樹: 抗体固相法を用いたテストステロンのラジオイムノアッセイ. 医学と薬学, 1988; 20: 1111-1117.
- 10) 田中俊誠, 古田伊都子, 相原稔彦, 田中信一, 佐藤広文, 日下真純, 計良光昭, 林 正路, 藤本征一郎: 抗体固相法キット (DPC トータルテストステロンキット) による血中テストステロン濃度の測定, および使用テストステロン抗体の特異性に関する基礎的検討. ホルモンと臨床, 1989; 37: 961-964.
- 11) 田中俊誠, 桜田芳弘, 林 正路, 計良光昭, 立花理彦, 藤本征一郎: 各種ホルモンの新しい測定法による多嚢胞性卵巣症候群 (PCOD) の診断基準の設定について. ホルモンと臨床, 1990; 38: 459-463.
- 12) 田中俊誠, 日下真純, 古田伊都子, 林 正路, 岩城雅範, 佐藤光文, 田中信一, 藤本征一郎: トータルテストステロンおよびフリーテストステロンの正常月経周期内変動. ホルモンと臨床, 1990; 38: 1067-1071.

(受付日: '96, 10, 21)

(採択日: '96, 11, 25)