資 料

ラジオイムノアッセイ(Ⅱ)

——レセプタをめぐる諸問題——†

ラジオイムノアッセイ研究会

113 東京都文京区本駒込 2-28-45 日本アイソトープ協会内

Key Words: receptor, radioreceptor assay, radioimmunoassay

13. ニワトリ受精卵の 1, 25(OH)₂D₃ レセプタの特性清野佳紀, 山岡完次, 藪内百治
大阪大学 医学部小児科
市川雅常

ヤマサ醤油研究所

著者らは、ニワトリ受精卵の十二指腸 1, 25-(OH)₂-D₃ 受容体の特性を知る目的で、ニワトリ受精卵 (15, 18, 19, 20 日齢 (hatching)), ヒナ (1, 2 日齢), 成鶏 (118 日齢), D 欠乏ニワトリの十二指腸 1, 25-(OH)₂D₃ 受容体を Eismann らの方法に準じて抽出し, S 値, K_d 値, 受容体数および核内の飽和, あるいは不飽和の受容体数を求めた。さらに同材料で血中カルシウム, リン, 25 OHD, 24, 25(OH)₂D および 1, 25-(OH)₂D を測定し, 受容体との関係を検討した。

その結果, ①血中 Ca 濃度は胎生期では日齢がすすむにつれ上昇, 反対に P 濃度は低下していた。②血中 25OHD 値には変化が認められなかったが, 24, 25-(OH)₂D 値は, 胎生 20 日齢で上昇する傾向がみられた。1, 25-(OH)₂D 値は胎生 19, 20 日齢で 15 日齢に比して有意に上昇していた。③ニワトリ受精卵では, 十二指腸 1, 25-(OH)₂D₃ 受容体活性が 15 日齢から認められるが, その活性は受精卵が hatching するとき, すなわち 20 日齢で最も強いこと, さらにそのさい, 0.3 M KCl-phosphate buffer により抽出された 1, 25-(OH)₂D₃ 受容体 (細胞質内および核内 1, 25-(OH)₂D₃ 受容体) 数は非常に増加していること。④20 日齢の受精卵の核内の不飽和 1, 25-(OH)₂D₃ 受容体の比率が

増加しており, D 欠乏ニワトリにおける核内の不飽和 1, 25-(OH)₂D₃ 受容体の比率よりむしろ高いこと。⑤20 日齢の受精卵の核内の不飽和 1, 25-(OH)₂D₃ 受容体の比率が著しく高いにもかかわらず, 受精卵の血中 1, 25-(OH)₂D 濃度が最も高いこと。以上のことを発見したので報告する。

14. ラジオイムノアッセイ (RIA) によるブタ PHI 一次構造の確認とブタ組織内 PHI 免疫活性の検討

深田修司, 井口和明,
軒原清史, 矢内原千鶴子
静岡薬科大学 薬品分析化学
赤井裕輝, 矢内原 昇
国立生理学研究所

PHI (peptide histidine isoleucine) はブタ上部消化管より単離された 27 アミノ酸残基のポリペプチドであり, VIP やセクレチンと共通の部分構造を有している。その一次構造の解析において, 24 位の Glu 残基は Gln 残基である可能性も考えられた。本研究は PHI の構造を確認し, 組織内分布を検討することを目的とし, まず 2 種類の合成ブタ PHIC 末端フラグメント, [Glu²⁴]-PHI (20-27) および [Gln²⁴]-PHI (20-27) を用い, 免疫化学的に追求した結果, 24 位は Glu 残基であることを証明した。すなわち, [Glu²⁴]-PHI (20-27) および [Gln²⁴]-PHI (20-27) をそれぞれハプテン抗原とし, 家兎に免疫し, 抗 [Glu²⁴]-PHI (20-27) 血清 R8201 と抗 [Gln²⁴]-PHI (20-27) 血清 R8304 を得た。抗血清 R8201 は PHI (20-23) と 27 位の Ile アミドを主要抗原認識部位とし, 抗血清 R8304 は 24 位の Gln を特異的に認識した。これら両抗血清をそれぞれ用いる RIA 系において, R8201 RIA 系では天然ブタ PHI ならびに [Glu²⁴]-PHI (20-27), [Gln²⁴]-PHI (20-27)

† Topics on Receptor in Radioimmunoassay (Ⅱ).
Radioimmunoassay Research Society of Japan:
28-45, Honkomagome 2-chome, Bunkyo-ku, Tokyo
113.

は同等の用量反応曲線を示したが、一方、R8304 RIA系では天然ブタ PHI, $[Glu^{24}]$ -PHI(20-27)ともまったく交叉しないことが分かった。この知見は天然ブタ PHI の 24 位が Gln 残基ではなく、Glu 残基であることを示している。さらにブタ十二指腸組織内 PHI 様免疫活性を両 RIA 系により検討した結果、抗血清 R8201 を用いる系では組織抽出物は $[Glu^{24}]$ -PHI(20-27)に平行な希釈曲線を示したが、一方、抗血清 R8304 の系ではまったく反応を示さず、ブタ組織内においても PHI 様免疫活性成分は $[Glu^{24}]$ -PHI の構造をもつことが示唆された。以上の結果に基づき $[Glu^{24}]$ -PHI の全合成を液相法により行い、得られた合成 PHI は天然ブタ PHI に諸性質が一致し、さらに免疫化学的にも両者に差異がないことを証明した。ここにブタ PHI は $[Glu^{24}]$ -PHI であることが確認された。つぎに PHI 特異 RIA 系により、ブタ組織内 PHI 様免疫活性を検討し、消化管では結腸下部、中枢神経系では大脳皮質、海馬に高濃度であり、VIP (vasoactive intestinal peptide) の分布ときわめて類似していることを明らかにした。これらの結果は PHI と VIP は共通の前駆体から生成していることを示唆している。

15. 腫瘍細胞のトランスフェリンレセプターアッセイについて

漆崎洋一, 近藤 仁, 松本修二,
高後 裕, 新津洋司郎, 漆崎一朗
札幌医科大学 第四内科

近年トランスフェリンレセプター(以下、Tf-R と略)は、網赤血球や胎盤などの鉄需要のさかんな組織ばかりでなく、培養細胞株の表面にも豊富に存在することが報告され、細胞増殖との関係が注目されている。今回、 ^{125}I 標識トランスフェリン(Tf)を用いたラジオレセプターアッセイを行い、各種培養細胞株、各種ヒト白血病細胞および手術で得られたがん組織における Tf-R の分布につき検討を加えたので報告する。

15・1 方法

培養細胞株として、ヒト CML 由来 K562, APL 由来 HL 60, histiocytic lymphoma 由来 U937, 肝由来 chang liver cell, 肝がん由来 CHC-4, 大腸がん由来 M7609, 脾がん由来 HGC-25, 悪性黒色腫由来 HMV の 8 種類を用い、細胞表面への ^{125}I 標識 Tf の特異的結合から、scatchard plot 解析を行い、Tf-R 数および結合定数を算出した。ヒト乳がん、胃がん、大腸がん、肺がん組織は新鮮材料をただちに polytron blender で

homogenize し、1%トリトンで可溶化し、遠心後、上清と ^{125}I -Tf(10万 cpm) を 30 分間インキュベートした。ポリエチレングリコール(14%濃度)を用いレセプタートランスフェリン複合体として沈殿させ、%バウンド比を求めた。

15・2 結果

(1) 8 種類の培養細胞株に $0.3 \sim 6.0 \times 10^5$ 個/cell の Tf-R を認めた。細胞起源により Tf-R 数は異なった値を示したが、結合定数は $2 \times 10^8 M^{-1}$ 前後ではほぼ一定であった。(2) 白血病細胞では AML 症例で 5000 個, APL で 36000 個, CML blast crisis で 500~1100 個/cell の Tf-R を認め、正常人成熟赤血球や白血球(100 個以下)に比べ高値であった。(3) 手術材料のがん組織可溶分画への ^{125}I -Tf の結合能は、%バウンド比で 3.9~13.9%であり、対照の非がん組織(2%以下)に比べ有意の高値を示した。

15・3 結語

細胞の分裂・増殖著しい培養細胞株の表面には Tf-R が豊富に存在し、また生体内でも白血病細胞や各種がん組織中に広くその存在を確認し得た。この Tf-R アッセイは、腫瘍組織の分裂・増殖性と関連した 1 つの指標となり得ると考えられた。

16. ヒト乳がん細胞質中 ER (エストロジェンレセプター) 測定における Tamoxifen の影響

田川宗数, 田口早苗, 畠 啓視, 桜井兵一郎
三菱油化メディカルサイエンス

ヒト乳がん細胞質中の ER への E_2 の結合に対する tamoxifen の影響について検討した。

E_2 の 1000 倍濃度の tamoxifen 添加は E_2 の ER への結合を 40~50% 阻害した。この阻害の様式を解析するため以下の実験を試みた。

ER 濃度の異なる 3 検体について、tamoxifen を *in vitro* で細胞質画分中に添加し、ER 濃度の測定を scatchard plot により解析したところ、tamoxifen は E_2 の ER への結合親和性を弱める作用をもつことが明らかとなった。すなわち、いずれの検体も $1.5 \mu M$ tamoxifen 存在下で tamoxifen 非存在下におけるよりも、 E_2 の ER への結合親和性が 1 桁下がった。

このことから、tamoxifen 結合 ER と遊離 ER では E_2 の結合親和性が異なるものと考えた。そこで、tamoxifen と細胞質画分とのブレインキュベーション

ン,あるいは添加 tamoxifen 濃度を变化させるなどして,結合親和性の異なる2つのERの存在(scatchard plotにおける二相性)の検討を試みたが,そのような存在状態を見出すことはできなかった。一方, E_2 のERへの結合阻害は tamoxifen の対数濃度に対しシグモイド曲線を示した。しかも, tamoxifen は結合阻害の小さい低濃度では E_2 とERの結合親和性にたいした変化を起こさないが,大きな結合阻害を示すような高濃度では,その変曲点付近を境に結合親和性を1桁下げた。

以上の結果より, tamoxifen は低濃度と高濃度で結合部位が異なり,その作用も異なる可能性が考えられる。つまり,低濃度ではER上の E_2 結合部位に,高濃度では E_2 結合部位とは異なる部位に結合し, E_2 の結合親和性を下げるものと考えられる。Tamoxifen のERを介した抗 E_2 作用はこのようにER上の effector site に結合するか,ERとは異なる分子に結合し,その結果 E_2 のERへの結合親和性を下げることによってのではないかと考える。

17. ヒト乳がん細胞質中のER(エストロゲンレセプタ),PgR(プロゲステロンレセプタ)測定における判定基準

田川宗数, 伊藤昭夫, 伊東多紀子, 玉根敦子,
宮沢敏彦, 畠 啓視, 桜井兵一郎
三菱油化メディカルサイエンス

17.1 目的

本年6月末までに当社に依頼のあった約3000検体の乳がん組織中のERおよびPgRの結果をまとめたので,ERのアッセイを中心に判定基準およびER, PgRの陽性率を報告する。

17.2 方法

アッセイに用いるまで -80°C にて保存した乳がん組織から,脂肪組織,血液を取り除き,2mm角に切断し,TEGT緩衝液中でポリトロンPT-10にてホモジナイズ後,105000Gにて超遠心かけ,得られたcytosolを粗レセプタ分画として用いた。このcytosolに $^3\text{H}-E_2$ を $0.125\sim 2\text{ nM}$ に加え, 4°C で1晩反応させた。同時に $^3\text{H}-E_2$ に対して500倍量の非標識 E_2 を添加しnon-specific-boundを算出した。 B/F 分離にはDCC法を用い,scatchard plotよりレセプタの最大結合部位数, K_d 値およびR値を測定した。

17.3 結果

高い濃度のER値においてはR値は0.8以上を示したが,ER値が低濃度になるにつれR値は0.8以下となり,データの信頼性を欠くことになった。このようなことから,われわれはER(+)の判定基準を3 fmol/mgP以上でしかもR値が0.8以上であるとし,PgRについては10 fmol/mgP以上でR値が0.8以上を採用し,以下の陽性率を得た。

ER(+)	1938/3312 (58.5%)	
PgR(+)	476/1124 (42.3%)	
<hr/>		
	PgR(+)	PgR(-)
ER(+)	414/1124 (36.8%)	252/1124 (22.4%)
ER(-)	67/1124 (6.0%)	382/1124 (33.9%)

またER(+)検体では3~10 fmol/mgPの範囲,PgR(+)検体では10~20 fmol/mgPの範囲が最も高い比率を占め,それぞれ26.4%, 21.4%であった。

18. 受容体および非受容体物質への ^{125}I -甲状腺刺激ホルモン(TSH)結合特性とGraves病患者IgGの影響

飯高 誠, 石井 淳

埼玉医科大学 第四内科

ペプチドホルモンの中には,非受容体物質に対して,受容体類似の結合様式を示すものがあることが報告されている。受容体に対しては,TSHは $K_a=1.1\times 10^9\text{ M}^{-1}$ と高親和性を示すが,非受容体物質であるガラス試験管に対しても $K_a=1.8\times 10^9\text{ M}^{-1}$ と高い親和性を認め,非標識TSHにて用量反応的に結合阻害を受けた。非受容体物質へのTSHの結合は可溶化ブタ甲状腺細胞膜や,黄体化ホルモン(LH)-卵胞刺激ホルモン(FSH)にても,用量反応的に阻害されたが,インスリンでは高濃度にて阻害を認めなかった。Naによる結合阻害は,受容体同様濃度依存性で K_a 値は一定であった。Co-operativity factor (Tanford, 1970)は2.2と受容体存在下での値より低値で,TSHがNaによりnative stateからdenatured stateへ非常に小さなstabilizing free-energy differenceにて移行していることを示している。

Graves病患者IgGは,TSH結合阻害性抗体(TBII)として,受容体へのTSH結合を抑制する性質を持つものがあるが,非受容体物質へのTSH結合も用量反応的に抑制した。しかし,両者の抑制率には相関が認められなかった。Graves病患者IgGの少数例において,TBII活性と同時に,正常人IgGより高いTSH

結合活性を示し、非標識 TSH にて結合阻害を受ける性質を有する分画が認められた。また、TSH 結合活性が非常に高いため、通常の TBII アッセイでは-146 という異常低値を示し、非標識 TSH にて用量反応的に結合阻害を受ける IgG 分画も存在した。これらの TSH 結合活性の異同、およびその意義に関しては、さらに詳細な検討が必要である。

19. 下垂体、肝および脳における甲状腺ホルモン核レセプタの特異的変動とその生理的意義について

浜田 哲

天理よろづ相談所病院 内分泌内科

吉政康直, 中村浩淑, 井村裕夫

京都大学 第二内科

甲状腺ホルモンの核レセプタの総数、すなわち最大トリヨードサイロニン (T_3) 結合能は通常各臓器に一定の濃度を示す。最近、核レセプタが hormonal あるいは nutritional な因子によってある程度変動することが報告されたが、その変動様式は臓器によって相違がみられる。そこで諸臓器の核レセプタに対する甲状腺ホルモンおよび個体の発育・分化の影響について、われわれの成績および諸家の報告を比較した。

ラットの GH₁ 細胞の核レセプタは、その培養系に T_3 を添加すると、容量反応的に減少することから、 T_3 により down regulation を受けるといわれる。これに対して、 α -GPD 産生に關与するラット肝の核レセプタは、 T_3 によって早期に容量反応的に誘導され、これより遅れて α -GPD 活性の上昇、および核の総非ヒストンタンパク量の増加がみられる。したがって、肝の核レセプタは T_3 により upward regulation を受けると結論された。さらに、脳の核レセプタは甲状腺機能亢進症ラットでは肝と同様に増加するが、機能低下症ラットでは K_d が低下し、最大 T_3 結合能はかえって増加する。このような2様の調節を受けている理由は明らかではないが、脳の核レセプタには機能的に2種類あって、1つは真のレセプタであり、他はホルモンを集積する担体タンパクである可能性が考えられた。

核レセプタの変動の臓器差は、個体の発育・分化の過程においてもみられる。ラット肝の核レセプタは、生後に肝の成熟とともにしだいに増加し、約30日でプラトーに達する。これに対して脳の核レセプタは、大脳では2日目に、小脳では14日目に頂値に達し、以後漸減する。ウサギの肺の核レセプタは28日の胎児期に

頂値に達し、以後漸減するが、生後2〜3週にふたたびやや増加する。

このような核レセプタの変動は、各臓器の特有な機能および個々の発育・分化に關与すると推定される。

20. TSHのラジオレセプタアッセイ—標識TSHの遅延添加効果について—

玉置治夫, 網野信行, 岩谷良則,

渡辺幸彦, 宮井 潔

大阪大学 臨床検査診断学

熊原雄一

同大学 第四内科

限 寛二

限病院

TSH のラジオイムノアッセイでは、 ^{125}I -TSH を遅延添加した場合に非標識抗原と抗体との解離が不可逆的であるため、アッセイ感度が上昇することが知られている。一方、生きた甲状腺細胞の膜 TSH レセプタに TSH が結合すると、レセプタの clustering や internalization がおこり、結合した TSH が次第に安定化して解離しにくくなると考えられている。今回われわれは、より生理的な状態に近い培養ヒト甲状腺細胞を用いた TSH のラジオレセプタアッセイにおいて、標識 TSH の遅延添加効果を検討し、同時に Smith のキットによる純化レセプタを用いた系と比較した。

バセドウ病甲状腺よりコラゲナーゼ処理にて単離した細胞の、DNA 当たりの TSH 結合能は5日間の培養により3〜4倍に増加した。標識 TSH の遅延添加効果は、TSH 測定の場合には明らかに認められたが、バセドウ病 IgG でも同様の傾向がみられた。しかし第1インキュベーション時間が長くなると、どの検体を用いても標識 TSH の特異的結合カウントが減少した。Smith のキットによる純化レセプタを用いた場合には、標識 TSH の遅延添加効果は、TSH およびバセドウ病 IgG ともに認められなかった。そして細胞の場合と同様に、第1インキュベーション時間が長くなると、標識 TSH の結合能の低下が認められたが、それはトラジロールを添加しても不変であった。

21. TSH と甲状腺 刺激 イムノグロブリン (TSI) の相互作用—サイクリック AMP (cAMP) の反応性の検討—

福江 暁, 内村英正, 三橋知明, 久保田 憲,
葛谷信明, 池田 斉, 高久史磨
東京大学 第三内科

岡野 繁, 金地嘉夫
金地病院

あらかじめ, TSH に曝露された状態で培養された甲状腺細胞は, その後の TSH 刺激に対して異なる反応を示すが, TSH 受容体抗体と考えられているバセドウ病患者血中の甲状腺刺激イムノグロブリン(TSI)の刺激に対してはどうか, また TSI に曝露された状態で培養された甲状腺細胞が, その後の TSH 刺激, あるいは TSI 刺激に対しての反応はどうかという点は明らかでない。甲状腺細胞の TSH 受容体を介すると推測される両刺激物質の相互作用を明らかにするため, ヒト甲状腺細胞を使用して以下の実験を行った。

21.1 方法

バセドウ病患者の手術時に得られた甲状腺組織を, 細切後 collagenase およびトリプシン 0.2% 液で酵素処理して単離甲状腺細胞を作製し, 仔ウシ血清 10% 含有 Ham's F-12 液に, $1.5 \times 10^6/\text{ml}$ でサスペンドし, (A) TSH 10 mU/ml 付加, または (B) 未治療 バセドウ病患者 IgG 1 mg/ml 付加, あるいは (C) 非付加で単層培養し 4 日間維持した。これら A, B, C の 3 群の細胞に対し, 培養 4 日目に, TSH 100 mU/ml または未治療患者 IgG 10 mg/ml による刺激実験を行い, 細胞内 cAMP 量を RIA で測定した。

21.2 結果

(1) A 群では TSH 100 mU/ml 刺激に対する cAMP 反応は, C 群に比し有意に抑制され, その抑制率の平均は $34 \pm 7.1\%$ (mean $\pm$ S.D.) であり, 一方, IgG 10 mg/ml 刺激に対しては増加率 $855 \pm 216\%$ (mean $\pm$ S.D.) ($p < 0.001$) の増大反応を示した。(2) IgG 付加培養細胞すなわち B 群での TSH 刺激の結果は, C 群に比し有意 ($p < 0.001$) の増大反応が認められ, IgG 刺激に対しては甲状腺細胞由来の本人の IgG 刺激では, 他人 IgG よりも有意 ($p < 0.05$) の増大が認められた。

21.3 結論

(1) TSI と TSH の作用部位は異なっている可能性が

ある。(2) バセドウ病患者の TSI と甲状腺の間に特異的相互関係が存在する可能性がある。

22. 甲状腺機能低下症における TSH レセプタ抗体

小西淳二, 飯田泰啓, 御前 隆,
中島鉄夫, 遠藤啓吾, 鳥塚莞爾
京都大学 核医学科

甲状腺腫を有する橋本病および甲状腺腫のみられない原発性粘液水腫の患者各 43 例について TSH 結合阻害性抗体 (TBII) の測定を行うとともに, TSH による甲状腺細胞の cAMP 増加反応に対する患者 IgG の作用を検討した。

TBII は可溶化ヒト甲状腺膜分画を受容体とするラジオレセプタアッセイにより, protein A-sepharose カラムで精製した IgG 1 mg を用いて測定した。甲状腺刺激活性は培養ヒト甲状腺細胞の cAMP 増加を指標とする笠木らの方法により測定した。TSH による甲状腺刺激に対する IgG の作用は TSH 0.1 mU/ml とともに IgG 10 mg/ml を加えて検討した。

橋本病の 16%, 原発性粘液水腫の 21% に TBII が検出され, とくに後者の 12% には TSH の結合を 50% 以下に抑制する強い TBII が検出された (TBII 強陽性の粘液水腫患者の経験例はこれまでの 6 例と合わせ 11 例となった)。

原発性粘液水腫患者の強い TBII はいずれもこれまでの自験例と同じく, blocking type のレセプタ抗体と考えられる性状を示した。

TBII 陰性の粘液水腫患者においても 16 例中 9 例 (56%) に TSH 作用阻害活性が検出された。この活性をもつ IgG は用量反応性を示し, バセドウ病患者の IgG による甲状腺 cAMP 増加反応も阻害したが, プロスタグランディン E_1 による cAMP 増加は抑制しなかった。抗マイクロゾーム抗体陰性例でも 4 例にこの活性がみられた。推定発症年齢別に陽性率をみると 20 歳以後の成人発症例に有意に高率であった。

以上の成績より, 原発性粘液水腫患者には少なくとも 2 種類の TSH の作用を阻害するレセプタ関連抗体が存在することが示され, その病因に密接に関連していることが示唆された。

23. 持続性甲状腺刺激物質 (LATS) と TSH レセプタ抗体 (TRAb) との関係

越智幸男

滋賀医科大学 検査部

中島良行, 梶田芳弘, 石田正夫,

八谷 孝, 宮崎忠芳

京都府立医科大学 第二内科, 放射線科

Smith の TRAb 測定キットを用い, 各種甲状腺疾患の患者血清中の TRAb を検討した。Graves 病では LATS と TRAb との関係を検討した。LATS 陽性 Graves 病 50 例では, 治療前および治療中の全例が陽性であり, LATS 陰性 Graves 病 50 例の 64% が陽性であった。LATS 活性と TRAb 活性は有意の相関関係を示さなかった。橋本病では, サイログロブリン沈降抗体陰性の 1 例に TRAb 活性が陽性であった。甲状腺がん, 亜急性甲状腺炎では 1 例ずつ弱陽性を認めたが, ほとんどが陰性であった。

LATS 陽性の Graves 病患者について, 数年にわたる両活性の経時的変動を検討したが, LATS が強陽性を持続する症例では, TRAb 活性も陽性を持続し, LATS が強陽性で, その後陰性化した症例でも TRAb 活性は陽性を示しているものもあった。

また Graves 病患者 2 例の血中に ^{125}I -bTSH と特異的結合能を有する免疫グロブリンの存在を認めた。この血清および IgG は線量に依存して ^{125}I -bTSH と結合を認めた。この抗体はポリクローナルな IgG であり, 抗体活性は Fab 部分に存在した。患者血清と ^{125}I -bTSH との結合は, bTSH では抑制されたが h-TSH では抑制されなかった。Gel-filtration においても結合が認められ, void volume に一致して認められた。このような TSH 抗体の病因的意義は不明であるが, 本患者では甲状腺のみならず, 下垂体の異常も示唆され, 自己免疫疾患としての Graves 病の成因を考えるうえで興味深い症例と考えられた。

24. バセドウ病における TSH レセプタ抗体 (TRAb) と液性細胞性免疫との関係

広岡良文, 船内正憲, 福間尚文,
木佐森茂樹, 伊藤光泰, 仁瓶禮之
浜松医科大学 第三内科

われわれはバセドウ病 (GD) における TSH レセプタ抗体 (TRAb) と液性細胞性免疫との関係を検討した。正常者 15 例, GD 149 例, うち未治療 40 例, MMI による治療 109 例, 総計 164 例を対象とした。TRAb は

スミスのキットを用い測定し %inhibition of TSH binding で示した。-15~+15% を正常範囲とした。流血中免疫複合体 (CIC) は異なる 3 法のポリエチレングリコール (PEG), CIq および PA 法で同時測定した。リンパ球幼若化反応 (LBG) は PHA, PWM, Con-A を用い観察した。未治療 GD の TRAb は 86.4% が陽性で, 平均は甲状腺腫が I 度で 17.1, II 度で 26.9, III 度で 44.4, IV 度で 55.4% を示したが, PEG および PA の陽性率は II 度以下でそれぞれ 35.7%, 57.1% で III 度以上の 7.1%, 14.3% に比し有意に高かった。TRAb は FT_4 と正の相関 ($p < 0.01$) を示したが, CIq とサイロキシン (T_4) とは負の相関 ($p < 0.01$) を示した。TRAb と CIC との間に負の相関 ($p < 0.05$) を認めた。LBG は T 細胞マイトゲンの PHA では 38.1%, サプレッサ-T 細胞マイトゲンの Con A では 50.0% が正常以下の低値を示したが, B 細胞マイトゲンの PWM では 30.8% が正常以上の高値を示した。TRAb と PWM による LBG との間には正の相関 ($p < 0.01$) を見た。TRAb の平均は未治療例で 28.8, MMI 1 日 25 mg 以上投与例で 13.8, 15~20 mg の例で 1.1, 10 mg の例で -2.7, 5 mg 以下の例で -4.6% を示し, 維持量の減少に伴って有意に低下した。一方, CIq および PA の陽性率は MMI 10 mg 以下の例で有意の低下を示し, また PWM による LBG も維持量の減少に伴って低下したが, PHA および Con A による LBG では低値に留まった。

以上, バセドウ病では抗原非特異的な細胞性免疫異常を背景に TRAb が産生され, CIC は TRAb の甲状腺ホルモン分泌刺激作用および甲状腺腫増大作用に抑制的に働くこと, およびサプレッサ-T 細胞機能異常の持続は本症の基本的な免疫異常と考えられた。

25. TSH レセプタ抗体アッセイの臨床的意義—とくにバセドウ病治療経過におけるレセプタ抗体の変動について—

江本達志, 内藤毅嗣, 笠井貴久男, 下田新一
独協医科大学 内分泌内科

Smith のキットを用いてアッセイサンプルとして血清と γ -グロブリン分画とを用いた場合の TRAb 測定において, 両者の間には $r = 0.98$ ときわめて良好な相関が得られた。この Smith のキットを用いて, 各種甲状腺疾患における TRAb (TSH-レセプタ抗体) を測定した。

未治療バセドウ病では約 88% (56/63) に, 慢性甲状腺炎では約 17% (5/29) の TRAb 陽性率を認めたが,

亜急性甲状腺炎、甲状腺腫瘍（腺腫 および がん腫）、単純性甲状腺腫等の甲状腺疾患では陽性例は認められなかった。LATS 活性と TRAb の間には相関は認められなかった。抗甲状腺剤によるバセドウ病治療経過における TRAb 陽性率の検討では、88%（未治療）、83%（6 か月以内）、75%（1 年未満）、18%（2 年未満）、19%（3 年未満）、18%（3 年以上）と減少した。また、抗甲状腺剤による治療で、血中甲状腺ホルモンは早期に正常化するのに対し、TRAb の変化はそれより遅れて陰性化することが認められた。TRH テストに対する TSH レスポンスと TRAb との間には、 $\chi^2=23.7$, $p<0.005$ で有意の関係が存在することが認められた。

TRAb 陽性バセドウ病の cruder- γ グロブリン分画は、バセドウ病摘出甲状腺の crude membrane の adenylate cyclase 刺激活性が認められた。また、TSH-レセプタに対する blocking antibody をもつ慢性甲状腺炎の例では、患者 γ -グロブリンは TSH による adenylate cyclase の刺激を抑制することが認められた。

以上、TRAb は Smith のキットを用いた場合、未治療バセドウ病の88%に陽性を呈し、抗甲状腺剤治療に伴い次第に陰性化することが認められた。また、TRAb はバセドウ病のみならず、とくに甲状腺機能低下症を含む慢性甲状腺炎においても約20%に陽性例が認められ、blocking type のレセプタ抗体の検出にも役立つものと考えられた。

26. 甲状腺 TSH レセプタ抗体測定と比較

森田茂樹, 和泉元衛, 横山直方,
山下俊一, 田辺 徹, 平湯秀司,
久保一郎, 岡本純明, 長瀧重信
長崎大学 第一内科

26・1 目的

バセドウ病患者血中に存在する甲状腺 TSH 受容体抗体の検出法として、TSH 結合阻害反応をみる TSH binding inhibiting antibody (TBIAb)と、甲状腺刺激抗体、いわゆる甲状腺刺激抗体 (TSAb) の測定系が用いられてきた。今回われわれは TBIAb および TSAb 両測定系において用いる試料をヒト甲状腺とブタ甲状腺の両者で行い、その差異について比較検討した。

26・2 方法および結果

(I) TBIAb 測定系について：患者血清または IgG と、1%lubrol または0.5% トリトン X-100 で可溶性

した TSH 受容体を用いて TBIAb を測定した。①ウシ TSH に対する反応は、ブタ甲状腺を用いた方がヒト甲状腺を用いた場合よりも鋭敏であった。②未治療バセドウ病患者での TBIAb 陽性率は、ブタ甲状腺では90~95%であったが、ヒト甲状腺では30~65%であった。③可溶性に用いた 1% lubrol, 0.5% トリトン X-100 に差はなかった。④患者血清をそのまま使用しても十分測定可能であった。

(II) TSAb 測定系として human thyroid adenylate cyclase stimulating 測定法 (HTACS) と同様の方法を porcine thyroid でも行った (以下、porcine TACS と略)。①HTACS と porcine TACS 測定法に ATP 再生系として phosphoenolpyruvate と pyruvate kinase を用いた方が、creatine phosphate 系を用いた場合より cAMP の産生量および感度が良好であった。(2) HTACS と porcine TACS とでは、HTACS の方が cAMP の産生量および感度ともに良好であった。③未治療バセドウ病での HTACS の陽性率は56%であったが、porcine TACS では36%であった。④未治療バセドウ病患者での TBIAb と HTACS および porcine TACS に相関関係はみられなかった。

26・3 結語

ブタ甲状腺は、TBIAb 検出にはヒト甲状腺よりも有用であるが、adenylate cyclase 活性測定系では劣っていた。

27. TSH レセプタ抗体測定用キット(Smith)の基礎的検討

富樫和美, 工藤良子, 石神達三, 佐藤誠也
北里バイオケミカル・ラボラトリーズ
(ブリストル・マイヤーズ)

TSH レセプタ抗体測定用キット (Smith) に関する若干の基礎的検討を行ったので報告する。2種類の血清を用いて検討した同時再現性は C.V. 3.0, 3.7%($n=5$)であり、同様に検討した日差変動は C.V. 2.1, 3.3%($n=4$)であった。この結果より本測定系が良好な測定精度をもっていることが確認された。つぎにインキュベーション時間を5分から80分まで変化させ結合率(%)の変動をみたところ、陽性コントロール、正常血清は60分でプラトーに達したが陰性コントロールは60分で最大となるものの再度減少していく傾向を示した。したがって、インキュベーション時間管理は慎重に行うべきと思われた。さて最近、本キットは IgG 抽出法から直接法に測定法が変更されたが、血清を直

接用いるラジオレセプタアッセイでは、血清間でのタンパク濃度差による nonspecific binding (NSB) の変動が測定値に影響することが多い。そこで、種々の甲状腺疾患患者の血清44例を用いて2法のNSBを検討したところ、IgG抽出法で $10.9 \pm 1.9\%$ (mean $\pm$ S.D.)、直接法で $11.8 \pm 1.0\%$ と有意な差はみられず、直接測定が可能であると思われた。また、2法の抑制率の値には、(IgG抽出法) = $0.98 \times$ (直接法) - 2.00, $r = 0.939$, $n = 20$ という良好な相関関係が認められた。ところで、多くの血清のNSBは陰性コントロールのそれと同様の10.0から12.0%の間の値を示したが、まれに15.0から20.0%を示すものがみられた。このためTSHレセプタ抗体のより正確な評価には、キットマニュアルで指定されている陰性コントロールNSBを用いる抑制率算出法ではなく、個々の検体NSBを用いる抑制率算出法がより好ましいと考えられた。

28. TBII測定系におけるnon specific binding について

赤水尚史, 横田敏彦, 田中 清, 石井 均,
中村浩淑, 森 徹, 井村裕夫
京都大学 第二内科

石原 隆
神戸市立中央市民病院 内科
尾藤早苗, 戈木康彦, 池窪勝治
同病院 核医学科

Smithによって開発されたTBII測定キットにおけるNSBについて若干の興味ある知見を述べる。

2例のバセドウ病患者血清中に高親和性の抗TSH抗体を検出した。TBII測定においてこれらは ^{125}I -bTSHの70%ほどを結合し、この反応には受容体を要さなかった。また、非標識TSHによる置換・ゲルろ過・免疫電気泳動法を通じ、これらはTSHに特異性を有するIgG(K chain)であり、抗TSH抗体と結論された。この成績から個々のTBII測定にNSBの測定をルーチン的に行っており、正常人のNSBは約9%であるのに対し、バセドウ病患者では15%くらいまでのNSB上昇が時折みられた。NSBの補正がTBIIの臨床的意義を一層高めると考える。

このようなバセドウ病におけるNSB上昇について、ステロイドやplasmapheresisを行ったinfiltrative ophthalmopathy例のserious studyにおいて検討した。TBIIとNSBは、ステロイド投与とplasmapheresisによってほぼ平行に変化した。NSBと総タンパク、IgG、TBIIとの相関をみたところ、総タンパク、IgG

に対してよりもTBIIに対してより強い相関($r = 0.738$)を示し、endogenous IgG活性の影響が示唆された。抗TSH抗体のNSBへの関与が考えられたので高濃度bTSHを加えたが、結合阻害は見られなかった。

以上、TBIIアッセイにはNSBの影響が無視できず、ことにバセドウ病において著明であった。

29. 各種甲状腺疾患および重症筋無力症におけるTSH結合阻害性抗体(TBII)値

満間照典, 佐橋 功, 茶谷雅裕, 村上 研
愛知医科大学 第四内科

各種甲状腺疾患および重症筋力症(MG)を対象としてTBIIを測定し、これら疾患におけるTBII測定の病因的、病態生理学的意義について検討を加えた。

29.1 対象および方法

正常人15例、未治療甲状腺機能亢進症25例、甲状腺機能亢進症に抗甲状腺剤治療中で euthyroid state の73例、hyperthyroid state の23例、甲状腺機能亢進症にMG合併例5例、pretibialmyxedema 合併2例、眼突合併5例、甲状腺機能低下症15例、慢性甲状腺炎35例、亜急性甲状腺炎6例、結節性甲状腺腫5例、MG27例、MGに慢性甲状腺炎合併8例の計229例を対象として、TBIIをSmithのキットで測定した。

29.2 結果および考察

未治療甲状腺機能亢進症では80.4%にTBIIは陽性であった。甲状腺機能亢進症に抗甲状腺剤投与中でhyperthyroid state では56%, euthyroid state では38.7%が陽性であった。同一症例で抗甲状腺剤投与中のTBII値の変動を観察したところ、治療日数が進むに従って多くの症例で低下することが認められた。甲状腺機能亢進症にMG、眼突、pretibial myxedema 合併例でもTBIIは高率に陽性であった。甲状腺機能低下症や慢性甲状腺炎では少数例でTBIIは陽性であった。結節性甲状腺腫、亜急性甲状腺炎では全例陰性であった。MGでは27例中5例にTBIIは陽性であった。MGにおいてTBII陽性例はMGの病型でⅡ型、抗甲状腺抗体出現例に多い傾向が認められた。胸線摘出後例では認められなかった。

以上、TBIIは甲状腺機能亢進症で高率に認められ、治療により低下することが見られ、TBIIは甲状腺機能亢進症の病因に深く関与していることが示唆された。またMGにおいても少数例でTBII陽性であっ

たことは、MG における免疫異常と甲状腺疾患における免疫異常との間に何らかの関連があることを示唆したと思われる。