

甲状腺由来可溶性蛋白の測定による 甲状腺中毒症の鑑別について

岡山大学医学部第三内科学教室 (指導: 太田善介教授)

山 原 茂 裕

(平成 5 年 3 月 25 日受稿)

Key words: 甲状腺中毒症, 亜急性甲状腺炎, バセドウ病, モノクローナル抗体

緒 言

甲状腺中毒症にはバセドウ病に代表される甲状腺よりのホルモン産生分泌亢進すなわち甲状腺刺激によるものと、亜急性甲状腺炎などの炎症による甲状腺破壊にもとづく甲状腺よりの甲状腺ホルモンの漏出によるものがある。その鑑別は臨床症状および検査所見などより多くの症例で可能であるが、鑑別困難な病態として無痛性甲状腺炎によるものやバセドウ病に無痛性甲状腺炎が合併する症例も多く存在し、かかる症例での確定診断のためには甲状腺へのアイソトープ摂取率検査が必要である。しかしながらアイソトープを用いた検査は限られた施設でのみ可能であり、また妊娠、授乳中の患者では禁忌である。刺激性と破壊性との鑑別のために利用しうる検査として T3/T4 比 (1, 2) があるが必ずしも鑑別可能ではない。今回本研究では甲状腺中毒症に関し刺激性と破壊性の鑑別のため甲状腺に局在し破壊により漏出すると想定される物質の血中での測定を目的として、甲状腺ホモジュネート由来物質を免疫し甲状腺濾胞腔内の物質を認識するモノクローナル抗体を確立し、確立モノクローナル抗体を使用して患者血中の抗体認識物質を測定し甲状腺中毒症の鑑別について検討した。

方 法

1. 抗原の調整

手術時摘出バセドウ病甲状腺を使用し 0.25M sucrose 含有 Tris buffer (pH7.2) にてホモジ

ュネートを作製し 10 万 G 遠心上清を得た。さらにサイログロブリンの混入をできるだけさけるため作製した 10 万 G 遠心上清にて 45% 硫酸飽和液を調整しその 5 0 0 0 G 遠心上清を抗原とした。

2. モノクローナル抗体の作製

6 週齢の BALB/c マウスに 4 mg の抗原を PBS に溶解し等量の complete Freund's adjuvant と混合しエマルジョンを作成し背部皮下数箇所にて 1 週毎計 4 回免疫した。最終免疫 3 日後に免疫マウスを屠殺し脾細胞を調整、脾細胞浮遊液と 8-azaguanine 耐性 NS-1 ミエローマ細胞を混合し、50% PEG4000 (MERCK, Germany) にて細胞融合を行なった (3)。96 穴培養プレートに融合細胞を播種し、HAT (100 μM hypoxanthine, 400 nm aminopterin, 16 μM thymidine) 含有 10% Fetal Bovine Serum (AERMER, Australia) 含有 RPMI1640 (GIBCO, USA) 培地にて融合細胞を選択した。7~10 日培養後各ウェルの上清を採取し、免疫抗原、サイログロブリン、正常ヒト血清を抗原として ELISA にてスクリーニングした。陽性ウェルのうち免疫抗原と反応し、サイログロブリン、正常ヒト血清と反応を認めないものを選択し限界希釈法にてクローニングし目的のモノクローナル抗体を得た。大量の抗体を得るためプリスタン前処理 BALB/c マウスに確立モノクローナル抗体産生細胞をマウス腹腔内に接種し 3~4 週後腹水を回収しプロテイン-A アフィニティーカラム (MAPS Kit BIO-RAD, USA) にてモノクローナル抗体を精製した。

3. 蛍光抗体法

組織抗原切片としては手術摘出バセドウ病甲状腺凍結切片を使用した。cryostat (BRIGHT) にて $4\mu\text{m}$ の凍結切片を作製し風乾後、100%メタノールで30分間室温にて固定、培養上清を30分作用した後 PBS にて洗浄し、FITC 標識抗マウス IgG 山羊血清による蛍光抗体間接法により染色パターンを観察した (4)。

4. SDS-PAGE

Laemmli の方法 (5) に準じて、ゲル電気泳動にて抗原を分画泳動した。泳動資料を還元および非還元条件下に SDS を加え 100°C 3分間煮沸し可溶化し、15% polyacrylamide 分離用ゲル (0.375M Tris-HCl, pH8.8) にて泳動を行い、泳動後クマシールブルー染色にて検討した。

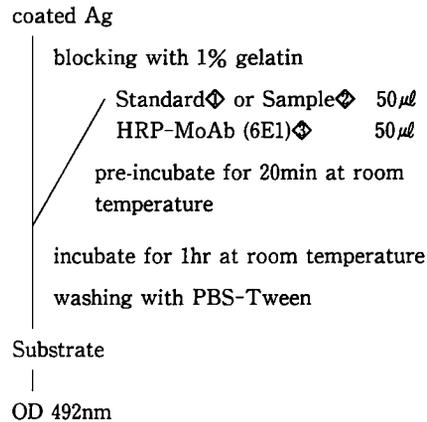
5. Western blotting

SDS-PAGE によって分離された抗原を、0.192M グリシンと20%メタノール含有0.025M トリス緩衝液 (pH8.3) 中でニトロセルロース膜に転写し、1%ゼラチン-PBS にてブロッキング後モノクローナル抗体を室温で1時間反応させた。次に PBS にて洗浄した後、horseradish peroxidase 標識抗マウス IgG 山羊血清を反応させ、PBS にて洗浄後、基質溶液 (4-methoxy-naphthol, Alorich, USA) を加えて発色させた。

6. モノクローナル抗体認識血中抗原量の測定 (inhibition assay)

アッセイの手順を Fig. 1 に示す。抗原溶液 ($10\mu\text{g}/\text{ml}$ in PBS) を調整し96穴 ELISA マイクロタイタープレート (Maxisorp, NUNC, Denmark) に、 $100\mu\text{l}$ ずつ 4°C にて一昼夜プレティングした。PBS にて3回洗浄後、室温にて60分間1%ゼラチンでブロッキングし PBS-Tween にて3回洗浄した。horseradish peroxidase 標識したモノクローナル抗体と患者血清とをあらかじめ20分間試験管内で反応させた後、マイクロタイタープレートに移した。室温で60分間反応させ PBS-Tween で3回洗浄した後、発色基質 (o-phenylenediamine, Wako, Japan) を加えて吸光度を492nm で EIA Reader (BIORAD, USA) にて測定した。測定結果は、standard として抗原の希釈列を作成し各希釈抗原での吸

Inhibition Assay Procedure



- ◇Standard : Ag diluted by buffer (0.5% BSA, 0.1% Tween20 in PBS)
- ◇Sample : serum diluted by buffer (×2.5)
- ◇HRP-MoAb : 過ヨウ素酸法にてペロキシダーゼ標識

Fig. 1 Inhibition assay procedure

光度から作成した標準曲線より濃度を U/ml で表示した。測定はすべて duplicate で行い、有意差検定は Student's t-test を用いた。

結 果

1. モノクローナル抗体

サイログロブリン、ヒト血清とは反応せず免疫抗原と反応する6種のモノクローナル抗体が得られた。確立したモノクローナル抗体のうち6E1, 4G2の2種の抗体についてさらに検討を加えた。

2. 蛍光抗体法 (Fig. 2)

バセドウ病甲状腺組織切片をメタノール固定した後モノクローナル抗体 (6E1) を反応させ、次に FITC 標識抗マウス IgG 山羊抗体を反応させたところ甲状腺濾胞腔内がほぼ均一に染色され、モノクローナル抗体認識抗原は濾胞腔内に局在していると考えられた。

3. SDS-PAGE (Fig. 3)

還元および非還元条件下のいずれの条件でも、免疫抗原は60kD 前後および14kD 付近に合計数本のバンドが検出された。

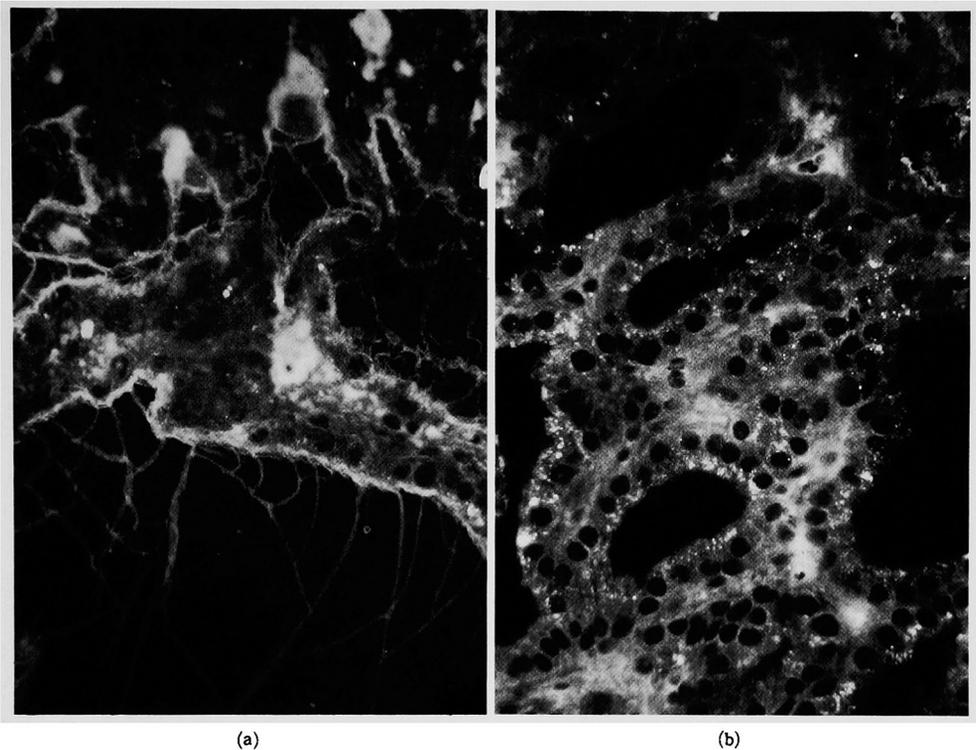


Fig. 2 Indirect immunofluorescence staining of thyroid tissue from Graves patients.
 (a) shows staining with monoclonal antibody (6E1), consisting of a bright uniform staining of the colloid.
 (b) shows no staining of the colloid spaces with PBS.

4. Western blotting (Fig. 4)

6E1, 4F2の2種類のモノクローナル抗体を使用した検討ではいずれの抗体でも14kD付近にバンドが検出された。

5. Inhibition assay (Fig. 5)

ELISAにて甲状腺疾患患者45例(バセドウ病31例, 亜急性甲状腺炎14例), 正常人10例の血清中の抗原量を測定した。正常人血清の平均抗原量は 27.4 ± 2.3 U/ml (mean \pm SD), 亜急性甲状腺炎患者14例では 10.9 ± 4.5 U/mlであり, 亜急性甲状腺炎患者血清では有意に認識抗原量は減少していた。バセドウ病患者では未治療で機能亢進状態のもの16例で 21.1 ± 5.1 U/ml, 血中甲状腺ホルモンが正常のもの15例で 20.0 ± 4.9 U/mlであり, 亜急性甲状腺炎患者でやはり低値であった。正常人とバセドウ病患者血清では機能亢進状態の有無にかかわらず有意差は認められなかった。

考 察

甲状腺中毒症は血中の甲状腺ホルモンの過剰による臨床病態であるが, その原因としては主にバセドウ病にもとづく甲状腺細胞の過剰刺激によるホルモン産生分泌の過剰によるものと, 炎症による甲状腺組織の破壊による血中へのホルモンの漏出によるものとに大別される。両者の鑑別は臨床治療上も重要であるが, 鑑別に関しては中毒症を惹起する病気の臨床症状からの断定, また血中物質の測定による鑑別に関しては刺激により甲状腺より甲状腺ホルモンとともに分泌されるものの同定, 破壊によりホルモンとともに漏出する物質の測定検討などが考慮される。臨床症状に関しては破壊性甲状腺中毒症である亜急性甲状腺炎では発熱, 甲状腺部位の疼痛, 血沈亢進, CRP 上昇などの炎症所見より

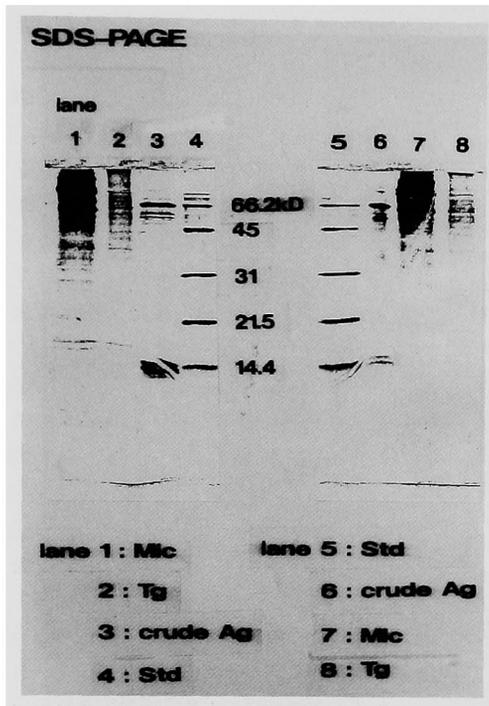


Fig. 3 SDS-PAGE analysis in reducing (lane 1-4) and non-reducing (lane 5-8) conditions.

Lane 1,7 shows microsome fraction (Mic), lane 2, 8 thyroglobulin (Tg), lane 3,6 crude antigen (crude Ag), lane 4, 5 mol wt markers (Std).

その診断は比較的容易である。しかし今ひとつの破壊性甲状腺中毒症である無痛性甲状腺炎は甲状腺局所の所見も乏しく、また血沈亢進、CRP陽性などの炎症所見に乏しく、バセドウ病との鑑別が困難な例が存在する。またバセドウ病患者での出産後の再発には、多くの例で無痛性甲状腺炎が関与していることが指摘されている。かかる症例では甲状腺中毒症が破壊性か刺激性であるかの最終的鑑別は放射性物質を使用した甲状腺への摂取率検査が必要となる。しかし放射性物質の使用が不可能な施設も多くまた妊娠、授乳中の患者への使用は禁忌である。

甲状腺刺激または破壊による甲状腺由来のホルモン以外の血中物質の検討に関してはサイログロブリンがある。サイログロブリンは甲状腺濾胞腔内に存在し隔絶抗原として考慮されてきた。しかし近年血中濃度に関して正常人血清中

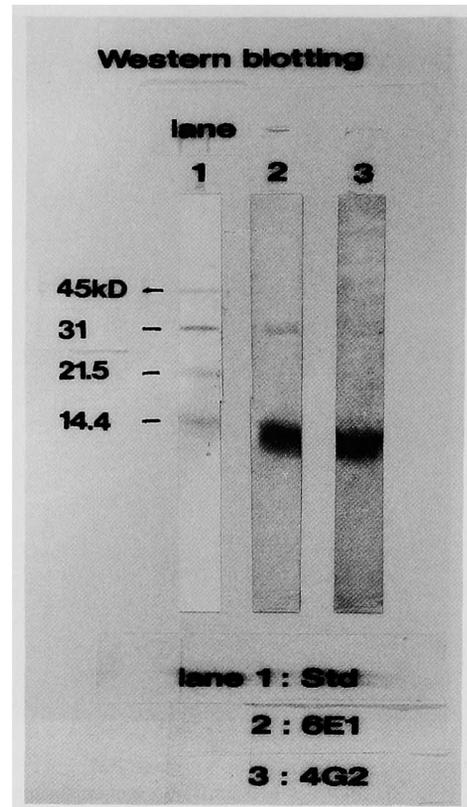


Fig. 4 Immunoblotting of the antigen.

After electrophoresis gels were subjected to immunoblotting with mouse monoclonal antibodies directed to the antigen (6E1, 4G2).

にも微量ながら存在し破壊性甲状腺中毒症では血中濃度は高値ではあるが、刺激性甲状腺中毒症であるバセドウ病においても甲状腺より過剰に分泌され、その濃度測定はバセドウ病の治療の指標とさえ考えられている(6, 7)。またその血中濃度は自己免疫性甲状腺疾患患者血中に高率に存在する抗サイログロブリン抗体により正しい濃度測定が困難であり中毒症の鑑別には利用しがたい。そのほか鑑別に利用しえる知見としてT3/T4比がある(1, 2)。刺激性甲状腺中毒症では破壊性に比し、末梢でのT4からT3へのconversionが正常人に比し促進しておりT3/T4比が高値であるとされている。しかし例外も多く確実な診断にはいまだ利用しがたい。その他鑑別に利用できる物質の測定

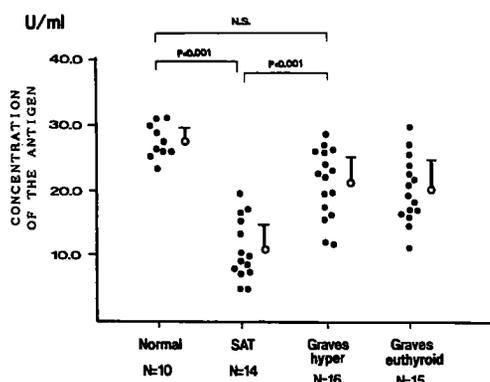


Fig. 5 Antigen in serum samples measured by binding inhibition assay, using ELISA, in 10 normal subjects, 14 patients with subacute thyroiditis (SAT), 31 with Graves' disease (16 hyperthyroid and 15 euthyroid state).

は現在報告がない。以上の事実にもつき今回甲状腺に局在する物質につき検討を加えた。甲状腺ホモジュネートの可溶性成分を使用し、サイログロブリンとは異なる分子量14万の濾胞腔内に局在する物質に対してモノクローナル抗体を作製しこれを利用して患者血中の濃度測定を試みた。確立モノクローナル抗体が認識する物質に関しては今回の検討では自己抗体の存在は認められなかった。したがって濃度測定に関してはサイログロブリン測定時のような自己抗体の影響の考慮は不要である。測定の結果、当初破壊による漏出のため血中濃度が高値となると推定していたのとは異なり、破壊性甲状腺中毒

症患者ではその濃度は正常人、バセドウ病患者に比し低下していた。この点については2つのことが考慮される。ひとつは測定物質が代謝回転の早い物質であり正常、バセドウ病では常に一定の血中への供給があるが、破壊性甲状腺中毒症では血中濃度測定の時点ではすでに甲状腺は破壊されており甲状腺よりの血中への供給が少ない。もうひとつは検索物質が炎症により甲状腺内で破壊され血中への供給がないことなどが考慮される。今後認識物質の詳細な性状、代謝についての検討が必要であるが、血中の抗原量を測定することが甲状腺中毒症の鑑別に有用となる可能性が示唆された。

結 論

1. サイログロブリンとは異なる、甲状腺濾胞腔内に存在する可溶性蛋白を認識するマウスモノクローナル抗体を作製した。

2. 抗原はバセドウ病甲状腺組織ホモジュネートの10万 G 遠心上清の45%硫酸飽和上清分で、Western blot で14kD 付近にバンドを検出した。

また蛍光抗体間接法による組織染色では甲状腺濾胞腔内が染色され、抗原は濾胞腔内に局在していると考えられた。

3. 甲状腺中毒症の鑑別の目的で、正常人、バセドウ病、亜急性甲状腺炎患者血清中の抗原量をマウスモノクローナル抗体を用いたELISAで測定したところ、亜急性甲状腺炎で有意に低値となり、破壊性と刺激性との鑑別に有用となる可能性が示唆された。

文 献

- 1) Amino N, Yabu Y, Miyai K, Fujie T, Azukizawa M, Onishi T and Kumehara Y : Differentiation of thyrotoxicosis induced by thyroid destruction from Graves' disease. *Lancet* (1978) **2**, 344-346.
- 2) Amino N, Yabu Y, Morimoto S, Kumehara Y, Mori H, Iwatani Y, Nishi K, Nakatani K and Miyai K : Serum ratio of triiodo-thyronine to thyroxine, and thyroxine-binding globulin and calcitonin concentration in Graves' disease and destruction-induced thyrotoxicosis. *J Clin Endocrinol & Metab* (1981) **53**, 113-116.
- 3) Koehler G and Milstein C : Continuous cultures of fused cells secreting antibody of pre-defined specificity. *Nature* (1975) **256**, 495-497.
- 4) Balfour BM, Doniach D, Roitt IM and Couchman KG : Fluorescent antibody studies in human

- thyroiditis : autoantibodies to an antigen of the thyroid colloid distinct from thyroglobulin. *Br J Exp Pathol* (1961) **42**, 307—316.
- 5) Laemmli UK : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* (1970) **227**, 680—685.
 - 6) Aizawa T, Ishihara M, Koizumi Y, Hashizume K, Takasu N, Yamada T, Kobayashi I, Watanabe T and Shimizu Z : Serum thyroglobulin concentration as an indicator for assessing thyroid stimulation in patients with Graves' disease during antithyroid drug therapy. *Am J Med* (1990) **89**, 175—180.
 - 7) Kawamura S, Kishino B, Tajima K, Mashita K and Tarui S : Serum thyroglobulin changes in patients with Graves' disease treated with long term antithyroid drug therapy. *J Clin Endocrinol & Metab* (1983) **56**, 507—512.

**Differential diagnosis of thyrotoxicosis using inhibition
assay of a protein present in thyroid follicular spaces**

Shigehiro YAMAHARA

Third Department of Internal Medicine,

Okayama University Medical School,

Okayama 700, Japan

(Director : Prof. Z. Ohta)

The difference between stimulative and destructive thyrotoxicosis is usually identified by thyroidal uptake of radioactive iodine, but uptake is not always available. At present, there is no reliable in vitro method of differential diagnosis of thyrotoxicosis. We conducted an investigation of an in vitro method of differential diagnosis of thyrotoxicosis by inhibition assay using monoclonal antibodies that recognized an antigen(14kD) differing from thyroglobulin and thyroid peroxidase. The antigen is the soluble material present in the thyroid follicular space, and is detected by immunofluorescent study. We measured the concentration of this antigen in the sera of patients with thyroid diseases by inhibition assay. In sera from patients with destructive thyrotoxicosis, the concentration of the antigen was lower than that in sera from normal subjects and from Graves' disease patients. There was no significant difference between normal subjects and Graves' disease patients. The data suggest that measurement of the antigen in sera from patients with thyroid disease can be useful for the differential diagnosis of thyrotoxicosis.