

抗サイログロブリン抗体および抗マイクロゾーム抗体 測定法の研究

加藤亮二¹⁾, 菅谷 昭²⁾, 飯田 太²⁾

Studies on measurement of Anti-Thyroglobulin and Anti-Microsomal Autoantibodies.

SERODIA AMC (PA-AMC) and SERODIA ATG (PA-ATG) with gelatin particle agglutination (PA) are most widely used for the determination of anti-thyroglobulin antibody (TgAb) and anti-microsomal antibody (McAb) in laboratory medicine.

However, the positive incidence of Hashimoto's disease in these measurements was 80% with PA-AMC and 30% with PA-ATG respectively.

We tried to define the causes of the difference produced between PA-ATG and PA-AMC by following experiments.

1. An Inhibition test in which Tg antigen was added to both PA-AMC and PA-ATG reagent system in order to identify positive incidence.
2. An enzyme immunoassay (EIA) in which purified Mc antigen (absolutely free from Tg) and purified Tg antigen were used in order to identify non-specific positive reactions.

Twenty-six percent of the false positive sera appeared in PA-AMC positive sera. However, no false positive sera were observed in PA-ATG positive sera.

These results suggested that Mc antigen in reagent could have been contaminated with Tg Antigen and also McAb could have a cross reactivity to Tg.

We concluded that Tg added PA-AMC system, Inhibition method, or Thyroid peroxidase (TPO) method were most suitable for the determination of serum McAb.

Key words : Thyroglobulin Autoantibody

Microsomal Autoantibody

Positive incidence of Autoantibodies

Tg inhibition test

Enzyme immunoassay

1) 信州大学医療技術短期大学部 : Ryoji Kato : School of Allied Medical Sciences, Shinshu University, Nagano, Japan.
2) 信州大学医学部第2外科 : Akira Sugeno, Futoshi Iida : The second Department of Surgery, School of medicine, Shinshu University, Nagano, Japan.

はじめに

甲状腺自己抗体はバセドウ病や橋本病に出現するため、これらの疾患の免疫学的な指標に用いられている。甲状腺自己抗体の実地臨床でよく測定されているものとして抗サイログロブリン抗体 (TgAb)、抗マイクロゾーム抗体 (McAb) および抗 TSH 受容体抗体 (TRAb)¹⁾などが知られ、前二者は主にタンニン酸処理血球凝集反応 (TGHA, MCHA)²⁻³⁾やゼラチン粒子凝集反応 (PA)⁴⁾が一般的に行われている。しかし、これらの方法における両疾患の抗体陽性率は TgAb でおよそ 30%、McAb で 80% 程度⁴⁾と云われる。そこで、TgAb 陽性率が McAb 陽性率に比べ低値を示す原因と McAb 測定における非特異反応について検討した。

方法および材料

1. 凝集反応による TgAb および McAb の測定

TgAb と McAb 測定はゼラチン粒子化した人工担体にヒト甲状腺組織から得られた Tg 抗原と Mc 抗原を結合させて作成したセロディア ATG (PA-ATG; 富士レビオ社)、セロディア AMC (PA-AMC; 富士レビオ社) を用い、すべてマイクロ法で行った。検体希釈はダイナテック社製のダイリユーターで行ない、プレートは 96 穴マイクロプレート U 型 (三光純薬社) を用いた。両者の操作法はキット備えつけの希釈用リン酸緩衝液をプレートの 2 穴目に 100 μ l、3 ~ 12 穴にそれぞれ 25 μ l 分注した後血清を 25 μ l 加えダイリユーターで希釈した。その後、TgAb 測定には Tg 感作ゼラチン粒子抗原、McAb 測定には Mc 感作ゼラチン粒子抗原をそれぞれ 3 ~ 12 穴目まで 25 μ l 加え、攪拌し 1 時間静置した。測定

結果値は 10×2^n で表現し、 10×2 以上を陽性とした。また、特異性の検討は予め患者血清 1 容と精製 Tg (10 mg/ml) 1 容を等量混合し、室温 1 時間放置した後反応に供した。(Tg インヒビションテスト)

2. Tg の精製法⁵⁾

特異性の検討に用いた Tg の精製はバセドウ病患者から手術時に得られた組織をホモジナイズし、超遠心 (105,000 g, 60 min) で分離した後、上清をウルトロゲル ACA34 によるゲルろ過法と DEAE-Sepharose イオン交換クロマトグラフィーで精製した。この Tg はディスク電気泳動法で単一のバンドを示し、Mc 抗原の混入は認められなかった。

3. Enzyme Immunoassay (EIA) による TgAb および McAb 測定⁶⁻⁷⁾

Tg-EIA 測定は上記の方法で精製した Tg を結合させた 96 穴プレート (Nunc 社) に血清または TgAb 標準液 (橋本病患者血清から精製したもの) を 100 μ l 加え、1 時間反応後洗浄し、さらに抗ヒト IgG 標識ペルオキシダーゼを 100 μ l 加え 1 時間反応させる固相サンドイッチ法で行った。McAb の EIA 測定も Tg-EIA 法と同様な原理で行い、甲状腺組織から超遠心により得た Mc 抗原を 0.5% TritonX で可溶化後、トリプシン処理、DEAE-Sepharose によるイオン交換クロマトグラフィーとゲルろ過法で分離し得た部分精製 Mc を固相化抗原として使用した。なお、この Mc 抗原中に含まれる Tg 量は TgAb 測定における固相化プレート作成時の濃度に比べ 0.1% 程度であった。標識 2 次抗体は抗ヒト IgG 標識ペルオキシダーゼを用いる方法で行なった。結果の判定は両者共に正常者 20 例を同時に測定して、その平均吸光度を 2 倍した値より大きい場合を陽性とした。

4. 測定対象

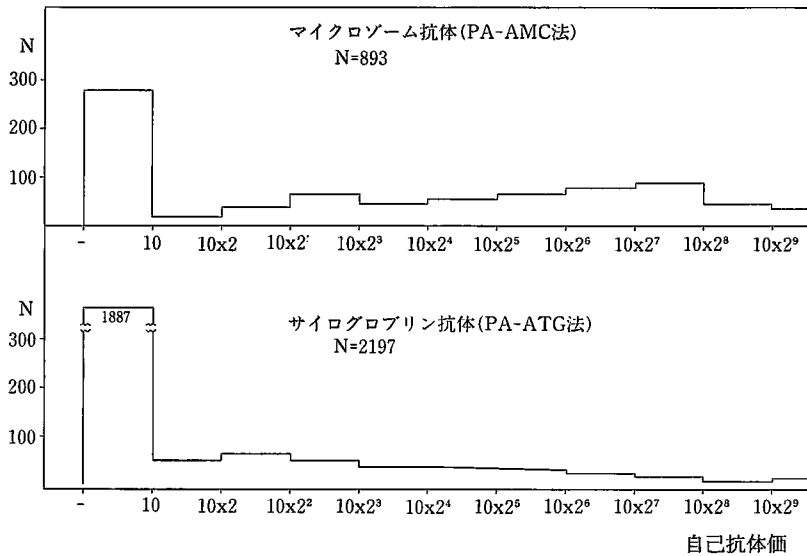


図1 甲状腺自己抗体価ヒストグラム

測定には野口病院受診の甲状腺疾患（橋本病，バセドウ病，甲状腺腫瘍，その他の甲状腺疾患）を用いた。自己抗体検出率測定用として平成2年4月中にオーダーされた約1ヶ月分の血清3,090例を用い，さらにこの中から無作為に296例(PA-ATG, PA-AMC共に陽性148例, PA-AMC単独陽性148例)を選び検討用として使用した。

結 果

1. PA-ATGとPA-AMC測定法の再現性
抗体価の異なる2濃度の血清(10×2², 10×2⁷)を用いてPA-ATG, PA-AMCの再現性を求めたところ両者のバラツキ(CV%)はそれぞれ18.4%, 15.7% (抗体価2倍程度差)であった。
2. 甲状腺自己抗体価のヒストグラム
McAb (N=893) 価およびTgAb (N=2197) 価を調べるためにそれぞれPA-ATGとPA-AMCを用いて測定し，その抗体価ヒストグラムを図1に示した。PA-ATGでは

表1 甲状腺疾患別自己抗体陽性率

病 名	PA-AMC 法		PA-ATG 法	
	件数	陽性率	件数	陽性率
橋本病	253/283	89.3%	78/280	28.2%
バセドウ病	328/399	82.2%	161/790	20.3%
腫 瘍	26/206	12.6%	59/1001	5.9%
亜急性甲状腺炎	0/5	0%	3/38	7.8%
その他	—	—	4/74	5.4%
計	607/893	67.9%	305/2183	13.9%

陽性：10X2以上

- 陰性例が圧倒的に多く，抗体価も比較的低い結果であった。これに対して，PA-AMCでは陽性例が多く抗体価も高い結果であった。
3. 甲状腺疾患別抗体価
自己抗体陽性率を疾患別に分類し，表1に示した。橋本病ではPA-ATG 28.2%，PA-AMC 89.3%，同様にバセドウ病では20.3%，82.2%と両疾患で共にPA-AMC陽性率が高い結果を認めた。甲状腺腫瘍やその他の疾患では抗体価および陽性率は低い結果であった。

表2 サイログロブリン抗原 (Tg) で吸収された検体数と割合

血清グループ		症例数	吸収された数	率
PA-AMC	陽性	148	50	33.7%
PA-ATG	陽性			
PA-AMC	陽性	148	27	18.3%
PA-ATG	陰性			
計		296	77	26.0%

4. PA-ATG および PA-AMC 特異性の検討

Tg に対する特異性を検討するために PA-ATG と PA-AMC が共に陽性を示す群 (A 群) および PA-AMC が単独に陽性を示す群 (B 群) の血清それぞれ148例に Tg を添加し Tg インヒビションテストを行った。なお、PA-ATG 単独陽性群は通常まれなために今回は測定しなかった。表2に結果を示すが、A 群の PA-ATG は Tg で全症例が吸収された。PA-AMC では148例中50例 (33.5%) が

Tg 添加で Tg 添加前抗体価に対して 2³倍以上の低下または陰性化した。一方 B 群では148例中27例 (18.3%) に低下または陰性化する血清が認められた。以上、PA-AMC では296例中77例 (26.0%) に Tg で吸収される症例が出現した。

5. Tg で吸収された症例の疾患別分類

Tg によって吸収された77例の症例を甲状腺疾患別に分類すると A 群では50例中34例 (68%) が橋本病、6例 (12%) がバセドウ病、7例 (14%) が腫瘍であった。B 群では27例中15例 (55.5%) がバセドウ病、9例 (33.3%) が橋本病であった。表3

6. PA-ATG と PA-AMC の相関

Tg で吸収された症例群と吸収されなかった症例群に分け、PA-ATG と PA-AMC でそれぞれ相関を求めると図2に示すように Tg で吸収された群の相関係数は $\gamma=0.88$,

Tg で吸収されなかった群の相関係数は $\gamma=0.39$ であった。

表3 サイログロブリン (Tg) で吸収された検体の疾患別分類

	PA-AMC+ PA-ATG+	PA-AMC+ PA-ATG-	計
橋本病	34	9	43
バセドウ病	6	15	21
腫瘍	7	2	9
亜急性甲状腺炎	0	1	1
その他	3	0	3
計	50	27	77

+ : 陽性 - : 陰性

表4 サイログロブリン (Tg) で吸収された検体の EIA 測定

血清グループ	症例数	McAb-EIA		TgAb-EIA	
		陽性	陰性	陽性	陰性
PA-AMC 陽性	50	18	32	50	0
PA-ATG 陽性		(36.0%)	(64.0%)	(100.0%)	(0%)
PA-AMC 陽性	27	8	19	18	9
PA-ATG 陰性		(29.6%)	(70.4%)	(66.7%)	(33.3%)
計	77	26	51	68	9
		(33.7%)	(66.3%)	(88.3%)	(11.7%)

(陽性率%)

7. EIA 測定による確認

PA 法において Tg インヒビションテストの結果、吸収された77例の血清を Mc-EIA で測定し比較したところ表4に示すように Tg 添加前では77例中51例 (66%) が EIA 陰性、26例が EIA 陽性であった。この中で EIA 陽性を示す26例に Tg を添加して測定すると23例は陰性、残りの3例は陽性であった。以上のことから PA 法における Tg インヒビションテストで吸収され、Mc-EIA で陰性を示す例は PA 法の McAb が

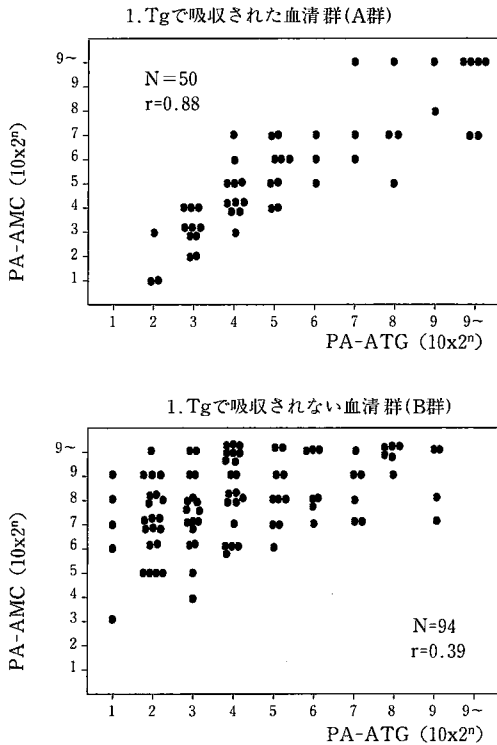


図2 PA-ATGとPA-AMCの相関

偽陽性で、残りの例は Tg 抗原と McAb の交差反応が考えられた。次に同様の例を Tg-EIA による TgAb 測定を行なうと PA-ATG と PA-AMC が共に陽性を示す群はすべて Tg-EIA で陽性、B 群の 27 例中 18 例 (66.6%) は TgAb 陽性、9 例は陰性であった。さらに Tg-EIA で陰性を示す 9 例の血清について Tg 抗原量を測定したところ 200~30,000 ng/ml と高値であった。

8. TgAb および McAb の最終陽性率

PA 法による Tg インヒビションテストと EIA 法の二法における TgAb および McAb の最終陽性率のまとめを表 5-a, b に示した。今

回測定した症例 (296 例) のなかで TgAb および McAb が共に陽性を示す群 (A 群) は 39.2%, McAb 単独陽性群 (B 群) は 42.9%, TgAb 単独陽性例は 17.2% であり、TgAb および McAb の最終陽性率は TgAb が 56.4%, McAb が 82.0% と特に TgAb の陽性率が向上した。

考 察

甲状腺疾患の機能診断にはホルモン測定が有効である。しかし、免疫学的側面から甲状腺疾患を見た場合、甲状腺自己抗体の変動は治療の効果と必ずしもパラレルに変動しないといわれ、自己抗体測定の有効性はおそらく診断時にあると考えられている。しかし、今回の検討結果や江藤らの報告⁴⁾に見られるように TgAb の陽性率はおよそ 30%, McAb 陽性率でも 80% 程度であり、一般的な測定法では両者の陽性率に乖離が生じ、また、TgAb における陽性率の低さなどから見て、現状の測定法は満足できない方法と云えよう。さらに、日常測定において良く見かける現象として McAb 単独陽性血清は多いが Tg 抗体単独陽性血清は非常にまれにしか認められないことも Tg の抗原性の強さから考え不可解なことであった。

今回の検討ではこれらのことを明らかにす

表 5-a McAb および TgAb の陽性の割合

N = 296

血清グループ	McAb 陽性 TgAb 陽性	McAb 陽性 TgAb 陰性	McAb 陰性 TgAb 陽性
陽性数 (陽性率%)	116 (39.2%)	127 (42.9%)	51 (17.2%)

表 5-b McAb および TgAb の最終陽性率

N = 296

自己抗体の種類	陽性数	陽性率 %
McAb	243	82.0%
TgAb	167	56.4%

る目的で① Tg 抗体単独陽性血清はまれであるか② Tg 抗体および Mc 抗体の陽性率ほどの程度あるか③ 現状の市販キット（特に McAb）における測定上の問題点はないか、などについて検討するために、現状において圧倒的に占有率の高い PA-ATG, PA-AMC を用いて検討を行った。

まず、本法（PA）の凝集反応における自己抗体陽性率はすでに述べた程度であり、特に TgAb は低い結果であった。この原因のひとつとして、測定感度の違いが考えられ今回の例においても PA 法陰性、EIA 法陽性が18例に認められた。また、免疫測定において、その測定原理により抗原抗体免疫複合体を形成している場合には陰性化することが多く見られる。今回の TgAb 測定の例においても PA 法と EIA 法が共に陰性を示した9例には Tg 抗原が200~30,000 ng と増加しており、抗体が存在していても抗原が多い場合には、見かけ上抗体が吸収される場合と免疫複合物による立体障害などが影響すると考えられている。これらの血清の検出率を上昇させるには良い方法はないが、Tg 抗原を測定する場合には Tg 自己抗体と反応性の異なる抗体を用いるか、また免疫複合体も同時に測定可能な系が望まれる。また、TgAb の測定においても感度の高い測定方法が望まれ、現在では RIA⁹⁾や EIA 法で測定を行うと凝集反応で陰性を示す血清の65%程度が陽性化⁹⁾すると云われおり、Mori¹⁰⁾らは RIA 法で TgAb 86%、McAb で95%程度陽性率が出現すると報告した。このように測定法を考慮すれば検出率の向上は可能と考えられ、現状の方法では感度や陽性率を犠牲とし、測定法の簡便性を重視した凝集法が多用されている。今後検査機器の自動化の開発と共に高感度法に推移していくと思われる。

次に現状法における測定上の問題点について検討した。PA-ATG および PA-AMC が陽性を示す血清を二群に分類し①両測定法が陽性群② PA-AMC 単独陽性群をそれぞれ無作為に選び、精製 Tg を加えて Tg 抗原に対する交差反応を検討した。PA-ATG 陽性血清のすべては Tg によって吸収され Tg との特異性が認められた。しかし、PA-AMC では296例中77例（26%）が Tg と反応し、McAb 陽性でありながら Tg 抗原と交差反応を認めた。この77例をさらに検討するために Tg で吸収されなかった血清群と分け、PA-ATG と PA-AMC の相関を求めたところ、吸収された77例における両者の抗体価は非常に類似しており ($r=0.88$)、TgAb と McAb は同一の抗体であることが推測された。これに対して、吸収されなかった抗体群の相関係数 ($r=0.38$) は低く別々の抗体であることが示唆された。さらに、この例を Tg を含まず特異性が高い高感度法による EIA 法で測定すると77例中51例は陰性化し、残りの26例は陽性を呈した。すなわち、PA-AMC で陽性を示す血清の中には TgAb の存在が認められ、使用している Mc 抗原と非特異反応が生じていると考えられた。また、この症例の中には例数は少ないものの Tg と反応する McAb が見られた。PA-AMC が非特異反応を起こしている原因のひとつとして Mc 感作抗原を作成する段階において精製法に問題があると考えられる。現状では超遠心 (105,000 g 60 min) による分離後、超音波による可溶化で抗原を得ている為に Tg 抗原の混入は避けられない。したがって、これらの作成方法の違いがメーカー差として生じていると考えられる。これを解決するには今後、Mc 抗原の性質が判明していく中で甲状腺ペルオキシダーゼ (h-TPO) の精製品を用いる方が望ましいと考

えられる。

次に、Tg 抗体単独陽性血清は従来法では検出できなかったが、今回の Tg インヒビションテストや EIA 法の検討により 17% 程度存在することが確認された。これらを総合して考えると、TgAb と McAb の陽性率は最終的にはほぼ同じような結果であることが推測される。さらに、今回の結果から興味ある事実も見いだされた。PA-ATG, PA-AMC の両者が陽性を示す血清を Tg で吸収を行うと PA-AMC の抗体価が Tg で吸収され陰性化する血清 (TgAb 単独陽性血清) は橋本病に多いことから、この疾患の診断に有効であると思われた。逆に、PA-AMC 単独陽性血清を Tg で吸収した場合、陰性化する症例はバセドウ病が多い結果であった。

結 語

現状の甲状腺自己抗体測定法における問題点について検討したところ以下の点が認められた。

1. 現状の McAb 測定法は Tg と 26% 程度の交叉反応が認められた。
2. 従来はまれな例であった TgAb 単独陽性例が 17% 程度認められた。
3. TgAb と McAb の抗体陽性率はほぼ同程度の結果であった。
4. TgAb, McAb が共に陽性を示す血清の中で Tg により吸収される場合は橋本病が多い結果であった。
5. McAb 単独陽性血清の中で Tg により吸収される場合はバセドウ病が多い結果であった。
6. 現状の PA-AMC による McAb 測定は Tg 抗原によるインヒビションテストが必要と思われた。

参 考 文 献

1. Smith, B. R. and Hall, R.: Thyroid-Stimulating Immunoglobulin in Graves' disease. *Lancet*. 2: 427-430, 1974.
2. Anderson, J. W. et al.: Diagnostic value of Thyroid antibodies. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 27: 937-944. 1967.
3. 加藤亮二 他: DDS を用いた新しい Thyroglobulin 感作血球の作成法. *臨床病理*. 26: 619-622. 1978.
4. 江藤澄哉: 甲状腺疾患. *Mebio*. 7: 106-110. 1990.
5. Shulman, S. and Armenia, J. P.: Studies on thyroid Proteins. *The Journal of Biological Chemistry*. 238: 2723-2731. 1963.
6. 大滝幸哉, 遠藤雄一: ヒト血清 Thyroglobulin および抗 Thyroglobulin 自己抗体の酵素免疫測定法の研究. *日本内分泌会誌*. 55: 1558-1569. 1979.
7. 加藤亮二: 抗甲状腺自己抗体測定法の問題点. *衛生検査特集号*. 38: 269. 1989.
8. 玉置治夫 他: 甲状腺マイクロゾーム抗体・サイログロブリン抗体の高感度ラジオイムノアッセイ. *ホルモンと臨床*. 38: 379-384. 1990.
9. 三好正規 他: Polyethylene Glycol (PEG) を用いた抗サイログロブリン抗体の検索. *日本内分泌会誌*. 53: 1268-1278. 1977.
10. Mori, T. and Kriss, J. P.: Measurements by Anti-Microsomal and Anti-Thyroglobulin Antibodies in Graves' disease and other Thyroid disorders. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 33: 688-698. 1971.

受付日: 1991年10月7日

受理日: 1991年11月21日