Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-04

Interaction between thyroid-stimulating immunoglobulins and thyrotropin receptors in fat cell membranes

岸原，道三

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
1980-04-09
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
乙0691
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2000691

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

〔48〕

氏名・（本籍）	岸原道三（きしはらみちぞう）（兵庫県）
学位の種類	医学博士
学位の番号	医博ろ第603号
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位授与の日付	昭和55年4月9日
学位論文題目	Interaction between Thyroid—Stimulating Immunoglobulins and Thyrotropin Receptors in Fat Cell Membranes 甲状腺刺激免疫グロブリンと脂肪細胞膜の甲状腺刺激ホルモン受容体に関する研究
審査委員	主査 教授 藤田拓男 教授 杉山武敏　教授 藤原美定

論文内容の要旨

緒言

グレーブス病患者血中には甲状腺細胞を刺激する免疫グロブリン（Thyroid stimulating immunoglobulins，TSIと略す）の存在が知られており，従来よりグレーブス病の病因の1つとして注目されている。近年，甲状腺細胞膜を甲状腺刺激ホルモン（TSH）受容体として用いた，TSHの radioreceptor assay（RRA）の開発により，TSIが甲状腺細胞膜へのTSH結合を特異的に阻害することが明らかになり，TSH受容体に対する自己抗体である可能性が示唆されている。一方，TSIはTSHと同様，甲状腺のみならず脂肪組織に対しても生物学的作用を有することが知られている。従って，TSIがTSH受容体に対する自己抗体であると仮定するならば，脂肪細胞膜を用いたTSHのRRAでも同様にTSIを検出できることが推定される。そこで著者らは，モルモット脂肪細胞膜を用いたTSHのRRAを確立し，脂肪細胞膜に対するグレーブス病患者血中免疫グロブリンの結合性（Fat cell binding immunoglobulins，FBIと略す）を検討した。さらに本法を用いてグレーブス病患者血中のFBIの測定を試み，ヒト甲状腺細胞膜を用いたTSHのRRAで測定したTSI活性と比較検討し，TSIの種ならびに臓器特異性の有無につき言及した。

実験方法

1) 脂肪および甲状腺細胞膜分画の作製法

断頭屠殺したモルモットから得た副睾丸周囲脂肪組織および手術時に得られたグレーブス病甲状腺

は，－70℃で凍結保存した。膜分画作製に際して融解後細切し，10倍量の10 mM Tris HCl pH 7.5緩衝液に入れ，ガラスホモゲナイザーにてホモゲナイズした。ガーゼでろ過後，4℃5分間，800×gで遠沈し上清を得た。これをさらに10,000×gで遠沈し，得たペレットを0.1%の牛血清アルブミンを含むTris HCl緩衝液（Tris HCl BSA）に溶解し，これを粗膜分画として測定に用いた。

2) TSHの標識と純化法

ヒトTSH（NIH-TSH-HS-4，NIAMDD，3.7 IU/mg）をlactoperoxidase法により〔^{125}I〕Na（R.C.C）で比活性50から120 μCi/μg位に標識し，さらにヒト甲状腺膜分画を用いたreceptor adsorption法により純化した。

3) 免疫グロブリンの作製法

最終濃度1.6Mの硫安塩析により得られたγグロブリン分画を用いた。

4) 脂肪および甲状腺細胞のTSH Binding Assay

両者の測定系にはTSHと受容体の特異結合を増加させる目的でプロプラノロールをそれぞれに添加して行った。すなわち脂肪（500mg湿重量）または甲状腺（100mg湿重量）粗膜分画に，精製標識TSH（7,000CPM），プロプラノロール1mM（最終濃度）を添加し，Tris HCl BSAの下で反応容量0.8 mlにて37℃，30分間のインキュベーションを行った。なお細胞膜結合ホルモン（B）と遊離ホルモン（F）の分離は20,000×g，15分間の遠沈によった。

5) FBIおよびTSI活性の測定

両活性は，前述した脂肪および甲状腺細胞のTSHのBinding Assay系にそれぞれ血清γグロブリン2mgを添加した場合の標識TSHのTSH受容体への結合率で示し，健常者群の平均結合率に対する百分率で表わした。なお両活性の測定は，未治療グレーブス病患者19例および健常者8例について行った。

成績および考案

1) モルモット脂肪およびヒト甲状腺を用いたTSHのRRAの標準曲線ならびにScatchard分析の比較検討

モルモット脂肪およびヒト甲状腺を用いたTSHのRRAにおいて，TSHの最小検出量は，前者がおよそ10 μU/tubeであるのに対し，後者は100μU/tubeとモルモット脂肪組織を用いたTSHのRRAの方が感度の点で若干優れていた。また両者の標準曲線をScatchard分析すると，両者ともaffinityの異なる2種類の結合部位が存在することが明らかになった。

high affinity binding siteのaffinity constantは，それぞれ$2.6\times10^{9}M^{-1}$，$3.7\times10^{8}M^{-1}$とモルモット脂肪組織の方が，ヒト甲状腺に比べTSHとのaffinityが明らかに強いことが示唆された。

2) モルモット脂肪組織を用いたTSHのRRAでのグレーブス病患者血中免疫グロブリンの影響

脂肪細胞を用いたTSHのRRA系に，グレーブス病患者γグロブリンの各量（0.3-3.0 mg/tube）を加えた場合の結合抑制を健常者の結果と比較すると，健常者に比し，グレーブス病患者では明らか

により強い結合抑制を認めた。しかもγグロブリンによる用量反応曲線をScatchard 分析すると健常者に比し，グレーブス病患者群ではほぼ直線関係が得られ，これらγグロブリンの脂肪細胞への結合部位が1種類であることが示唆された。また非標識ＴＳＨおよびグレーブス病患者γグロブリン添加による標識ＴＳＨの脂肪細胞への結合解離は，インキュベーション時間および温度に依存性で，解離曲線はきわめてよく類似していた。

3) グレーブス病患者におけるＦＢＩおよびＴＳＩ活性

未治療グレーブス病患者血中γグロブリンを，モルモット脂肪ならびにヒト甲状腺を受容体として用いた両Assay 系に添加し，同時測定を行った。グレーブス病患者群（ｎ＝ 19 ）におけるＦＢＩ活性は，60±5.6％（mean±SE）で健常者群（n=8）の100±2.1％に比べ有意（P＜0.001）に高値を示し，ＦＢＩ陽性率は約95％であった。一方，ＴＳＩ活性も前者が72±4.3％に対し，後者は100±1.7％とグレーブス病患者群で有意（Ｐ＜0.001）に高値を示し，TSI 場性率は約89％であった。しかもグレーブス病患者における両活性は，きわめて有意な正相関（ｒ＝0.80，ｎ＝ 19，Ｐ＜0.001）を示した。

以上の成績により，グレーブス病患者血中免疫グロブリンは，ヒト甲状腺細胞のみならず，種および標的臓器の異なるモルモット脂肪細胞にも特異的に結合する活性を有することが明らかになった。しかも両活性はきわめて有意な正相関を示すことより，ＴＳＩは種ならびに標的臓器に対して特異性を持たないＴＳＨ受容体そのものに対する自己抗体である可能性が強く示唆された。従って本研究は，グレーブス病の病因究明上，非常に有用である実験モデルの作製において，今后ＴＳＨ受容体の精製およびＴＳＨ受容体抗体の作製といった一連の過程を進める上で非常に重要な知見であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

従来内分泌疾患は内分泌腺の異常であり，ホルモンの分泌とその血中での濃度や存在様式などに主として注意が向けられて来たが，ホルモンの作用機序が解明されるにつれて，標的器官の細胞にあってホルモンがこれと特異的に結合することによってその作用が発揮される受容体がホルモンそのもの又は場合によってはそれ以上に重要なことが認められる様になり，ホルモン受容体の異常による疾患がいくつか認められている。

バセドウ病又は甲状腺機能亢進症はその一つであり，甲状腺を刺激する下垂体の甲状腺刺激ホルモンと異る物質が血中に証明され，これが甲状腺の下垂体甲状腺刺激ホルモン受容体に対する抗体グロブリンであり，バセドウ病はこの様な意味で自己免疫疾患の一つであることが定説となりつつある。

下垂体甲状腺刺激ホルモンの受容体は甲状線のみならず脂肪細胞にあることが知られており，本研究者は脂肪細胞のＴＳＨ受容体の性状を解明し，バセドウ病患者の血中にある甲状腺刺激免疫グロブリンとモルモット脂肪細胞のＴＳＨ受容体の相互作用を明らかにして，これによってバセドウ病の病態生理の解明に役立てることを目的として研究を行ったものである。

断頭屠殺したモルモットの副睾丸脂肪組織とバセドウ病患者の甲状腺組織を細切，トリス塩酸緩衝液でホモジナイズし1分間10,000回転で遠心して粗膜分画を得，精製した ^{125}I 標識TSHとの結合の非標識TSHによる阻害によりTSH結合能の検定を行った。モルモット脂肪組織のTSH結合能は温度及び時間依存性であり，バセドウ病患者血清の免疫グロブリン分画は正常血清よりも明らかに強く，^{125}I TSHとモルモット脂肪細胞膜との結合を阻害した。このようなバセドウ病患者血清中のモルモット脂肪細胞膜のTSH受容体と結合するグロブリン分画をFat Binding Immunoglobulin(FBI)と呼び，これと甲状腺細胞膜のTSH受容体と結合するグロブリン分画Thyroid Binding Immunoglobulin(TSI)との問いは有意の相関が見られた。しかも実際的には人甲状腺膜を用いる方法よりも，モルモット脂肪細胞膜を用いる方法の方がより感度が高いだけでなく，入手がより容易であり且つ再現性が高く，臨床的にバセドウ病患者の血清中の甲状腺刺激物質を検査する上によりすぐれた方法であると考えられる。

即ち，本研究は従来人血中の甲状腺刺激物質との関係が殆ど知られていなかった，モルモット脂肪細胞膜におけるTSH受容体を解析することによって，バセドウ病の病因として重要な甲状腺刺激免疫グロブリンの本態と作用について新しい知見を得た価値ある業績であると認める。よって本研究者は医学博士の学位を得る資格があると認める。