



Title	ヒト甲状腺刺激ホルモン β サブユニットの高特異的酵素免疫測定法の開発と臨床応用に関する研究
Author(s)	飯島, 康史
Citation	大阪大学, 1988, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/35992
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

【34】

氏名・(本籍)	飯 島 康 史
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	第 8 1 1 1 号
学位授与の日付	昭 和 63 年 3 月 25 日
学位授与の要件	医学研究科内科系専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	ヒト甲状腺刺激ホルモン β サブユニットの高特異的酵素免疫測定法の開発と臨床応用に関する研究
論文審査委員	(主査) 教 授 宮 井 潔 (副査) 教 授 熊 原 雄 一 教 授 谷 澤 修

論 文 内 容 の 要 旨

[目 的]

糖蛋白ホルモンである甲状腺刺激ホルモン (TSH) と、性腺刺激ホルモンは、 α と β の 2 つのサブユニットが非共有結合した heterodimer であり、 α サブユニットはすべてに共通で、 β サブユニットがそれぞれのホルモン特有の構造をもち生物学的活性の特異性を担うものとされている。さて、血中ヒト TSH (hTSH) の測定は、イムノアッセイにより可能となり各種甲状腺疾患の診断に利用されている。しかし、血中に存在する遊離型 hTSH- β サブユニット (hTSH- β) は、極微量である上に hTSH との交差反応が避け難く、信頼できる測定法がなかったため、その生理的病態の意義も不明な点が多かった。そこで本研究では hTSH- β に反応するモノクローナル抗体を用いて、hTSH とはほとんど交差反応がなく hTSH- β に特異的な酵素免疫測定法 (EIA) を開発し臨床応用を試みた。

[材料ならびに方法]

マウスモノクローナル抗 hTSH- β 抗体：hTSH あるいは hTSH- β でマウスを免疫し得られた 8 個のクローンをおのおの固相化し、 125 I-hTSH との結合およびこれに対する hTSH または各抗体の競合阻害効果から、それぞれの抗体の親和定数や特異性を検討した。固相化抗体：hTSH- β とのみ反応し hTSH とは反応しないモノクローナル抗体 (B1) を物理的にシリコン片に吸着させたものを用いた。酵素標識抗体：hTSH の β サブユニットを認識するモノクローナル抗体のうち親和性の最も高い抗体 (B10) β -D-galactosidase を dimaleimide 法にて結合させたものを用いた。測定操作：試験管に標準 hTSH- β (hTSH 非含有血清を含む) または血清試料 $100 \mu\text{l}$ 、 β -D-galactosidase 標識抗体 $50 \mu\text{l}$ 、リン酸緩衝液 $150 \mu\text{l}$ を加えた後、固相化抗体シリコン片を 1 個加え室温で 24 時間反応させた後、

シリコン片を2回洗浄しその酵素活性を4-methylumbelliferyl- β -D-galactosideを基質とした蛍光法で測定した。

[成績ならびに考察]

1. 検出感度：最小検出感度は0.04ng/tubeであり、血清中0.4ng/mlのhTSH- β の検出が可能であった。
2. 特異性：hTSH, hTSH- α サブユニット, ヒト胎盤性ゴナドトロピンとの交差反応は、それぞれ0.07%, <0.03%, <0.03%であった。また、hTSHとhTSH- β との混合液をSephadex G-100でゲルろ過し、分画中のhTSHおよびhTSH- β をそれぞれに特異的なE I Aで測定したところ、hTSH濃度がピークの分画においても本E I Aで反応しなかった。以上より本測定法はhTSH- β に特異的な方法であると考えられた。
3. 回収率：血清試料に標準hTSH- β を添加した際の回収率は79~100%であった。
4. 再現性：同一血清検体を測定した際の再現性を変動係数であらわすと、平均12.2% (測定内) および13.9% (測定間) であった。
5. 保存による影響：標準hTSH 500ng/mlを加えた血清検体を-20°Cにて1カ月間保存し、その検体中のhTSH- β を測定したところ、保存前後でhTSH- β 値に変動はなかった。このことより、保存血清中に検出されるhTSH- β がhTSHから解離したものではないことが示された。
6. 血清中hTSH- β 濃度：健常人22例、甲状腺機能亢進症16例、下垂体TSH産生腫瘍2例では、全例で感度以下、原発性甲状腺機能低下症では23例中8例で0.65~2.70ng/mlのhTSH- β が検出された。
7. TRH負荷試験：甲状腺機能低下症の患者5例にTRH500 μ gを静注したところ、全例でhTSH- β の上昇がみられた。
8. 血清中hTSH- β とhTSHとの関係：hTSH- β が検出された血清検体において、hTSH- β 値とhTSH値を比較したところ、両者の間には有意の相関関係がみられた。

[総括]

1. モノクローナル抗体を用いた酵素免疫測定法 (E I A) による血清中遊離型hTSH- β サブユニット測定法を開発した。
2. 本E I Aは、従来の測定法で問題となったhTSHとの交差反応がほとんどみられず、hTSH- β に特異性の高い方法であった。
3. 本E I Aは、感度、回収率、再現性も良好であり臨床検査法として適していると考えられた。
4. 原発性甲状腺機能低下症では、hTSH- β が検出されTRH負荷で増加した。

論文の審査結果の要旨

本研究は、ヒト甲状腺刺激ホルモン (hTSH) とその β サブユニット (hTSH- β) を免疫源として得たモノクローナル抗体を用いて抗原決定基地図を作製し、これに基づきhTSHとは交差せず極微量の

血中遊離型hTSH- β を特異的に測定できる酵素免疫測定法を開発し、臨床検査法としての基礎的条件を種々検討した結果、臨床応用を可能としたものである。

本法は、今後下垂体-甲状腺系の病態生理解明に有用であり、学位論文として価値あるものと認められる。