



Title	リコンビナントーヒト甲状腺刺激ホルモンの免疫学的・生物学的性質に関する研究
Author(s)	柏井, 卓
Citation	大阪大学, 1992, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/37981">https://hdl.handle.net/11094/37981</a>
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">＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"&gt;https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> >大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">&lt;/a&gt;</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

氏 名	かしわ い たく 柏 井 卓
博士の専攻分野の名称	博 士 ( 医 学 )
学位記番号	第 1 0 1 8 1 号
学位授与年月日	平成 4 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学研究科 内科系専攻
学位論文名	リコンビナントヒト甲状腺刺激ホルモンの免疫学的・生物学的性質に関する研究
論文審査委員	(主査) 教 授 宮 井 潔 (副査) 教 授 松 原 謙 一    教 授 荻 原 俊 男

## 論 文 内 容 の 要 旨

### (目 的)

甲状腺刺激ホルモン (TSH) は、脳下垂体から分泌され甲状腺機能を調節する重要なホルモンで、糖を含むペプチドから成る 2 個のサブユニット、 $\alpha$ 鎖と $\beta$ 鎖が非共有結合したヘテロダイマーである。近年、ヒト (h) TSH の $\alpha$ 鎖遺伝子 (ゴナドトロピンと共通) が Fiddes により、また、 $\beta$ 鎖は我々の研究室でクローニングされた。その結果、遺伝子組換え技術によってリコンビナント (r) h TSH を大量に生産することが可能となった。従来のヒト下垂体から精製された hTSH (pit- hTSH) は大量に入手できないため、測定用標準品や研究用試薬および、ヒトにおける負荷試験などでの使用が困難であったが、r- hTSH の利用によってその可能性がでて来た。しかし、このような応用を行うためには、その免疫学的、生物学的性質を十分に検討しなければならない。そこで本研究では、r- hTSH の免疫学的・生物学的活性について、pit- hTSH と比較検討した。

### (方 法)

精製 hTSH : r- hTSH は hTSH  $\beta$ 鎖および、絨毛性ゴナドトロピン $\alpha$ 鎖の cDNA を組み込んだプラスミドを、Chinese hamster ovary cell にトランスフェクトして発現させ、生成物を S-Sepharose, DEAE-Sepharose, Concanavalin-A Sepharose, TSK-G 2000 SW, Bio-Gel P-30 で精製した標品 (シオノギ社; r- hTSH-S) と Blue-Trisacryl M, Q-Sepharose, S-Sepharose で精製した標品 (Genzyme 社; r- hTSH-G) を用い、pit- hTSH としては、Calbiochem 社の hTSH (pit- hTSH-C) を規準として、UCB 社の hTSH (pit- hTSH-U) を対照として用いた。

保存条件 : 保存による影響をみるため pit- hTSH-C および、r- hTSH-G をリン酸緩衝液に溶解し、

担体タンパクとして牛血清アルブミン (BSA) を0.25%または1%になるように添加し、 $-80^{\circ}\text{C}$ に保存したものをコントロールとして、 $4^{\circ}\text{C}$ または $-20^{\circ}\text{C}$ の各温度について検討した。

エピトープ解析：pit- hTSH を抗原としてマウスで作成したモノクローナル抗体19種のうち pit- hTSH  $\alpha$ 鎖上の4種類のエピトープ ( $\alpha-1$ ,  $\alpha-2$ ,  $\alpha-3$ ,  $\alpha-5$ ) および、 $\beta$ 鎖上の3種類のエピトープ ( $\beta-1$ ,  $\beta-2$ ,  $\beta-3$ ) を認識する7種のモノクローナル抗体を吸着法で別々のシリコン片に固相化した。これと、 $^{125}\text{I}$  標識 pit- hTSH-C との結合に対する各 hTSH の競合抑制反応から、それぞれの用量反応曲線を作成し、その50%抑制を示す濃度を求め、各 hTSH の免疫活性を pit- hTSH-C を規準 (100%) として表した。

イムノアッセイ：4種類の市販 pit- hTSH イムノアッセイキット (第一ラジオアイソトープ研究所, ダイナボット, Celltech Diagnostics, Behring-werke 社) を用いて各 hTSH を段階希釈してその免疫活性を測定した。

バイオアッセイ：FRTL-5細胞を使用し産生されたサイクリック AMP をラジオイムノアッセイで測定した。

#### (結 果)

1. 保存条件：pit- hTSH-C も r- hTSH-G も BSA 0.25%,  $-20^{\circ}\text{C}$  での保存条件においてのみ免疫活性の低下 (30日で pit- hTSH-C が9.1 %, r- hTSH-G が7.1 %の低下) を認めた。
2. エピトープ解析：pit- hTSH の各エピトープの反応性は規準 (pit- hTSH-C) とほとんど差を認めなかった。r- hTSH については、 $\alpha-1$  エピトープでのみ反応性が pit- hTSH-C に比べ、r- hTSH-G で54.4%, r- hTSH-S で28.6%の低下を認めたが、その他のエピトープでは有意な差を認めなかった。
3. イムノアッセイ：r- hTSH は、両標品 (r- hTSH-G, r- hTSH-S) 共にその用量反応曲線 は規準と有意の差を認めなかった。
4. バイオアッセイ：r- hTSH は、両標品共に規準と有意の差を認めなかった。

#### (総 括)

エピトープ解析において認められた r- hTSH の  $\alpha-1$  エピトープでの反応性の低下は、 $-20^{\circ}\text{C}$  のサンプルの保存を避けて本実験を行ったので、保存による影響とは考えられず、また、2 標品に共通していることから、精製過程における変化ではなく、抗原構造そのものの差によると思われる、標準品として利用する際、あるいは生体投与時などに留意する必要がある。市販の hTSH のイムノアッセイキットでは、今回用いたものも含め、抗  $\beta$  鎖特異抗体を使用するものが多く、実際上は測定値に差異を生じる可能性は少ないと考えられ、また、FRTL-5細胞を用いたバイオアッセイによる測定でも r- hTSH は pit- hTSH と同様の生物活性を示した。以上の基礎検定の結果を勘案すれば、r- hTSH の in vitro, in vivo での利用が有望と考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

本論文は、遺伝子組換え技術によって生産されたリコンビナントヒト甲状腺刺激ホルモン (hTSH) について下垂由来の hTSH と比較して、その免疫学的・生物学的性質について詳細に調べたものである。

その結果、リコンビナント hTSH は下垂由来 hTSH と同様  $-20^{\circ}\text{C}$  保存で不安定なこと、7 種のモノクローナル抗体を用いて行ったエプトープ解析では、一部のエプトープでの反応性が異なるが、実用的なイムノアッセイでは差のないこと、さらに生物学的性質がよく一致することが明らかとなった。本研究はリコンビナント hTSH の測定用標準品としての使用や生体内投与への応用への基礎となるもので、学位論文として十分価値あるものと認められる。