

〔原著〕 バセドウ病における甲状腺刺激抗体の エピトープとその多様性の検討

— TSHレセプター/LH-CGレセプターキメラを用いた解析—

山 本 和 男*

(平成6年6月13日受付, 平成6年6月20日受理)

要 旨

バセドウ病の病因である血中 IgG 分画中の甲状腺刺激抗体 (TSAb) は甲状腺刺激ホルモン (TSH) レセプターに結合してその作用を発現するので, その作用機序を解明する第一段階として, TSAb の TSH レセプター上の結合部位とその多様性を検討した。田原らにより作成された wild type ヒト TSH レセプターおよび TSH レセプター機能 (TSH 結合能と TSH 刺激時の cAMP 産生能) を有する4種類のヒト TSH レセプター/ラット LH-CG レセプターキメラ (Mc1+2, Mc2, Mc2+4, Mc4) を Cos7 細胞に発現させ, TSH レセプター抗体活性が陽性 (血清中 TBII 活性60%以上) である57例のバセドウ病 IgG で各キメラレセプターを刺激した際の cAMP 産生量を測定し, 健常人プール IgG 存在下の cAMP 産生量に対する百分率として刺激抗体活性 (TSAb 活性) を算出した。その結果, wild type および TSH レセプター細胞外ドメインのセグメント4 (アミノ酸残基261-370) を相同な LH-CG レセプターのセグメントで置換したキメラ Mc4 では全例で TSAb 活性が陽性であり, セグメント4は TSAb のエピトープではないことが確認された。セグメント2 (アミノ酸残基90-165) を LH-CG レセプターに置換したキメラ Mc2 では57例中53例で TSAb 活性が消失した (Type I-TSAb)。したがって, 大多数のバセドウ病の TSAb は細胞外ドメインのセグメント2にあるエピトープを認識している可能性が高いと考えられた。一方, キメラ Mc2 で TSAb 活性を認めたのは57例中4例で, うち2例 (Type II-TSAb) の IgG はセグメント1+2 (アミノ酸残基21-165) を LH-CG レセプターに置換したキメラ Mc1+2 で TSAb 活性が完全に消失した。すなわち, これらの患者の TSAb は細胞外ドメインのセグメント1 (アミノ酸残基21-89) にあるエピトープを認識していると考えられた, 残りの2例 (Type III-TSAb) はキメラ Mc1+2 での TSAb 活性が wild type での TSAb 活性に比べて有意に低下していたが, 依然として陽性であった。したがって Type III の TSAb の認識するエピトープの一部はセグメント1にあるが, セグメント1, 2, 4以外のセグメント3 (アミノ酸残基166-260), セグメント5 (アミノ酸残基371-415), あるいは細胞膜貫通部位のいずれかにも重要なエピトープがあると考えられた。以上の結果よりバセドウ病の TSAb は患者により TSH レセプター上の異なるエピトープを認識しており, 多様性のあることが初めて明らかにされた。

Key words: バセドウ病, TSH レセプター, TSAb, キメラ, エピトープ

略語一覧: TSH: thyrotropin, TSAb: thyroid stimulating antibody, TBII: TSH bind-

* 千葉大学医学部内科学第二講座

* Kazuo YAMAMOTO: Study on Epitopes for Thyroid Stimulating Antibodies and Their Heterogeneity in Graves' Disease: Analysis Using TSH Receptor/LH-CG Receptor Chimeras

* 2nd Department of Internal Medicine, School of Medicine, Chiba University, Chiba 260
Received June. 13, 1994. Accepted June. 20, 1994.

ing inhibitory immunoglobulin, LH-CG : lutropin/chorionic gonadotropin, cAMP : cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate, cDNA : complementary DNA, IgG : immunoglobulin-G, TSAB : thyroid-stimulating blocking antibody

I. 緒 言

バセドウ病は自己免疫性甲状腺疾患で、瀰漫性の甲状腺腫、甲状腺機能亢進症、結合組織病変（眼球突出、限局性下腿粘液水腫等）などの特徴的兆候を呈する。本疾患の血中 IgG 分画には甲状腺濾胞上皮細胞膜上の TSH レセプターに対する自己抗体（TSH レセプター抗体）が存在し、TSH レセプターと結合して甲状腺濾胞上皮細胞内での cAMP 産生を促進し、過剰の甲状腺ホルモン合成や甲状腺細胞増殖がおこり、その結果、甲状腺機能亢進症や甲状腺腫が起これと考えられており、本症の原因として重視されている^{1,2)}。近年ヒト TSH レセプターの cDNA がクローニングされ³⁻⁵⁾バセドウ病の病態を分子レベルで解明することが可能となった。その結果、バセドウ病甲状腺刺激抗体（TSAb）の TSH レセプター上の結合部位についてエピトープライブラリー、合成ペプチド⁶⁻¹³⁾、mutagenesis などの方法で検討がなされてきた。エピトープライブラリーとは、TSH レセプター cDNA フラグメントでライブラリーを作り、TSH レセプター蛋白のフラグメントを融合蛋白として大腸菌に発現させ、甲状腺刺激抗体陽性血清でスクリーニングする方法である。抗体結合部位が一次構造上の連続したアミノ酸配列からなる場合その部位を含むクローンを得ることができ、thyroperoxydase (TPO) の結合部位もこの方法で同定された歴史があるが、TSH レセプターに関しては2施設で検討され陽性クローンは得られなかった^{14,15)}。また合成ペプチドによる方法とは、TSH レセプターの部分的アミノ酸配列に一致したペプチドを人工的に作成し、その活性を調べるものである。具体的にはペプチドを動物に免疫して得られた血清の TSAb 活性を測定する方法、あるいはバセドウ病 IgG の TSAb 活性のペプチドによる阻害度を調べる方法などが用いられ、TSH レセプター細胞外ドメインのN端寄り（29-57, 121-131）と中央領域（308-336, 352-366）を中心に TSAb の結合部位が検討されているが、報告により結果が異なり統一した見解は得られていない。エピトープライブラリーや合成ペプチドなど、アミノ酸の一次構造のみを問題としたこれらの方法ではエピトープが同定できないこと自体、やはり TSH レセプター抗体は連続したアミノ酸配列ではなく、不連続なアミノ酸配列すなわち立体構造を認識する可能性が高い

ことを強く示唆しているといえる。TSH レセプターの立体構造を保ちながら抗体の結合部位を検討する目的で、mutagenesis により変異 TSH レセプターを作り、その cDNA を哺乳動物細胞に発現させてその機能を調べる方法があり、大きなフラグメントの deletion やごく狭い範囲を対象とした site directed mutagenesis (non-homologous substitution)、あるいはキメラレセプターの作成（蛋白の一部を構造の類似したアミノ酸に置換する homologous substitution）などに大別される。今回の検討では TSAb のエピトープの検索にキメラレセプターを選んだ。その理由として（1）一般に長い蛋白フラグメントの deletion ないし non-homologous substitution では蛋白の立体構造を維持し難く、キメラではレセプター蛋白の一部を構造の類似した蛋白に置換するため前者にくらべて立体構造を維持しやすいと考えられている点、（2）キメラレセプターは置換するアミノ酸の範囲を site directed mutagenesis より広くとれる特徴をもつ点の2つがあげられる。バセドウ病患者の血清中にある抗体はおそらく多クローン性^{1,17-21)}であると考えられており、TSAb のエピトープも患者間により異なる可能性が十分に予想され、したがって多数検体での検討が不可欠である。しかも TSH レセプターの構造的特徴として長い細胞外ドメインをもつことが知られている。したがって始めから site directed mutagenesis により狭い範囲の mutation を行うよりも、置換する範囲を広くとれるキメラを用いて、細胞外ドメイン全体をスクリーニングしてエピトープの存在する部位を絞り込む必要がある。キメラレセプターによるこれまでの報告はいずれも TSH レセプターと LH-CG レセプターのキメラを用いた検討であり、永山らは TSH レセプターのN端側のドメイン ABC (21-260) が TSAb 活性に重要で、C端側のドメイン DE (261-418) は重要でなく²²⁾、一部の TSAb でN末端 (25-30) にエピトープがある²³⁾と報告し、田原らは TSAb はN端寄りのセグメント1+2 (21-165) に、TSH 結合阻害抗体 (TB-II) はセグメント1 (21-89) に重要なエピトープをもつが、両抗体のエピトープにはC端寄りのセグメント4 (261-370) は含まれないと述べている²⁴⁾。一方、site directed mutagenesis による方法で小杉らもアミノ酸30-76について検討し、TSAb のエピトープにおけるN端 (34-37, 42-45, 52-56) の重要性を指摘している¹⁶⁾。こ

れらは TSAb の重要なエピトープがN端側 (セグメント1; 21-89) にある点では一致するが, 田原らの報告では特にセグメント2 (90-165) の関与が無視できない点で他者の結果と異なり, この部位についてキメラレセプターを用いて重点的に検討した報告はない。また以上の報告はいずれも少数例のバセドウ病 IgG を用いた検討であった。そこで本研究では, 田原らが用いたキメラレセプター (Mc1+2, Mc4)²⁴⁾ に, 新たに Mc2, Mc2+4 を加え, TSH レセプター抗体活性が陽性 (TBII 活性60%以上) のバセドウ病57症例の IgG の各キメラレセプターに対する cAMP 産生反応から, 個々の患者の TSAb のエピトープとその多様性を調べ, エピトープの違いによる抗体のタイプ分けを試み, さらにバセドウ病の臨床所見 (甲状腺腫, 眼症, 下腿粘液水腫) と抗体のタイプとの関連を調べ, エピトープを明らかにすることの臨床的意義についても検討を加えてみた。

II. 対象, 材料と方法

対象

伊藤病院および千葉大学関連病院を受診したバセドウ病患者で, 市販のキットで測定された TSH レセプター抗体活性が陽性 (血清中 TBII 活性60%以上) で, wild type ヒト TSH レセプターを発現した Cos 7 細胞における TSAb 活性 (後述) が127%以上の57例をエピトープ検討の対象とした。TSAb 活性のコントロールには健常人20例のプール血清を用いた。57症例 [男性10例, 女性47例, 平均年齢 (mean±SD) 45±13歳] の全例に七条分類の二度以上の甲状腺腫を (表1 A), 21例 (37%) に NOSPECS 分類^{25,26)} class-2 以上の眼病変を (表1 B), 8例 (14%) に限局性下腿粘液水腫を認めた。

材料

1) ヒト TSH レセプター/ラット LH-CG レセプターキメラおよび wild-type ヒト TSH レセプター²⁴⁾。

本実験に用いた wild type と4種類のヒト TSH レセプター/ラット LH-CG レセプターキメラ (Mc1+2, Mc2, Mc2+4, Mc4) の細胞外ドメインの構造と機能を図1に示す。キメラレセプターは, ヒト TSH レセプターの細胞外ドメインを, 既存の制限酵素切断部位 (Pst I, Pst I, Aat II, Afl II, Sac I) でN端側より1から5までのセグメントに分け, その1から4までのセグメントを対応するラット LH-CG レセプター断片で置換 (斜線部分) したものである。キメラの命名法は置換したセグメントの番号に Mc の記号を付してあらわされている。その TSH レセプターとし

表1 A. 対象57例の甲状腺腫大度 (七条分類による)

性(人数)	度	0	I	I-II	II	II-III	III	IV	V
男 (10)		0	0	0	1	3	2	2	2
女 (47)		0	0	0	0	1	25	12	9
視診	頭部 正常位	(-)	(-)	(-)	(-)	(±)	(+)	(++)	(+++)
	頭部 後屈位	(-)	(-)	(±)	(+)	(+)	(+)	(++)	(+++)
触診		(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(++)	(+++)

B. 対象57例の眼症の重症度 (アメリカ甲状腺学会分類#による)

性(人数)	class#	0 (N)	1 (O)	2 (S)	3 (P)	4 (E)	5 (C)	6 (S)
男 (10)		4	1	2	0	2	1	0
女 (47)		20	11	5	2	5	4	0

(#) class 0: No signs or symptoms, class 1: Only signs, no symptoms (signs limited to the upper lid retraction and stare, with or without lid lag and proptosis), class 2: Soft tissue involvement (symptoms and signs), class 3: Proptosis, class 4: Extraocular muscle involvement, class 5: Corneal involvement, class 6: Sight loss (optic nerve involvement)^{25,27)},

ての機能は TSH 結合能と TSH 刺激による cAMP 産生能により評価され, 4種類のキメラレセプターのいずれにおいても TSH 結合能と TSH 刺激による cAMP 産生能が保たれていた。特に Mc1+2 と Mc2 は, Kd, EC₅₀ で, wild type とほぼ同等であったが, Mc2+4 と Mc4 は wild type に比し cAMP 産生能がやや低下していた。

2) 細胞培養および測定系に用いた材料

Cos7 細胞は American Type Culture Collection (Rockville, MD; CRL 1651) より, 試薬は DMEM (DULBECCO'S MODIFIED EAGLE MEDIUM), FBS (FETAL BOVINE SERUM), ANTIBIOTIC-ANTIMYCOTIC, L-GLUTAMINE, VERSENE: 1/5000, TRYPSINE, HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution), HEPES BUFFER SOLUTION を GIBCO (USA) より, ISOBUTYL METHYLXYTHANTIN を Aldrich (USA) より, 10DG カラム, DEAE Affi-

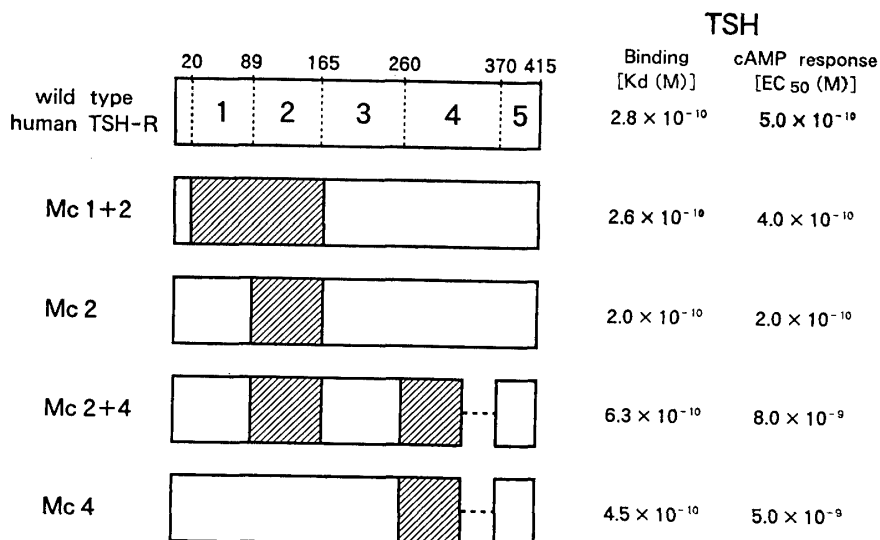


図 1 ヒト TSH レセプター/ラット LH-CG レセプターキメラ細胞外ドメインの構造と機能
図左側に上から順に wild type TSH レセプターと 4 種類のキメラレセプターの細胞外ドメインの構造を示す。wild type TSH レセプター細胞外ドメインを 5 個のセグメントに分け、N 端より 1 から 5 まで番号を付した。各レセプターの白抜きの部分が TSH レセプター、斜線部分が LH-CG レセプターのセグメントに相当する。wild type の上端の数字は、N 末端の Methionine を 1 として数えたアミノ酸残基の番号を意味する。TSH レセプターのセグメント 4 に対応する LH-CG レセプターのセグメントは TSH レセプターよりも短く、欠落部分が破線で表されている。図右側は各レセプターの TSH レセプターとしての機能²⁴⁾を TSH 結合能と cAMP 産生能で示したものである。

Gel Blue カラム、ガンマーグロブリン、蛋白定量用色素を Bio-Rad (USA) より、cAMP キット (YSI-7701) をヤマサより入手した。

方法

1) IgG の調整

①血清の脱塩処理；10DG カラムをサンプル用バッファー (0.02M K₂HPO₄, pH 8.0) 20ml で洗浄し、血清 3 ml を乗せ、3 ml 排液されたところでサンプル用バッファー 4 ml にて溶出し、脱塩された血清 4 ml を得る。

②精製と濃縮；DEAE Affi-Gel Blue カラムに再生用バッファー (1.5M sodium thiocyanate) 40ml を添加し、完全に排液後、洗浄用バッファー (0.02M K₂HPO₄, 1.4M NaCl, pH 8.0) 40ml を添加し、次いでサンプル用バッファー 30ml にてカラムを平衡化し、完全に流出した後に脱塩済み血清 4 ml を添加する。完全に排液されたらサンプル用バッファー 20ml を添加し、約 20ml の流出液を回収する。これをセントリプレッ 10 (Amicon, USA) を用いて 3000xg で遠心して 2 ml まで濃縮し、次にセントコリン 30 (Amicon, USA) を用いて 5000xg で遠心して 500μl に濃縮し、最後に HBSS を 1.5ml 添加して 500μl まで濃縮する操作を 3 回繰り返して濃縮を終了する。IgG の濃度は、ガンマーグロブリンの標準希釈系列 (62.5-500μg/ml) あるいは濃縮した

サンプル IgG を蒸留水で 100 倍希釈し、その 40μl と 20 % 蛋白定量用色素 2 ml とを混合し、分光光度計 (220 型, YF-F; 日立) にて吸光度 (波長: 595nm) を測定して算出した。

2) wild type TSH レセプターおよびキメラ TSH レセプターを用いた、パセドウ病 IgG の TSAb 活性の測定

①Cos7 細胞の継代と cDNA のトランスフェクション；800ml フラスコ (CORNING, USA) に complete DMEM (DMEM 中に 10% FBS, 25mM HEPES, 100 U/ml penicillin-G, 100U/ml streptomycin, 250ng/ml amphotericin-B を含む) 30ml をいれて Cos7 細胞を培養し、confluent になった時点でメディウムを吸引して VERSENE (6 ml) を添加する。その後室温で 10 分静置し、上清を捨て TRYPsin-VERSENE (3 ml) を加え、さらに室温で 2 分静置した後に 5 ml の complete-DMEM を加え、ピペッティングにて細胞を分散し、50ml チューブ (CORNING) に移して室温で 5 分間 (800rpm) 遠心する。細胞のペレットを DMEM にて resuspend し、室温で 5 分間 (800rpm) 再遠心し、更に同じ操作を 2 度繰り返して細胞を洗浄した後に DMEM で細胞密度が $3 \sim 5 \times 10^6$ /ml となるように resuspend し、この細胞浮遊液を 1 キュベットあたり 1 ml とり、wild type あるいはキメラレセプターの cDNA

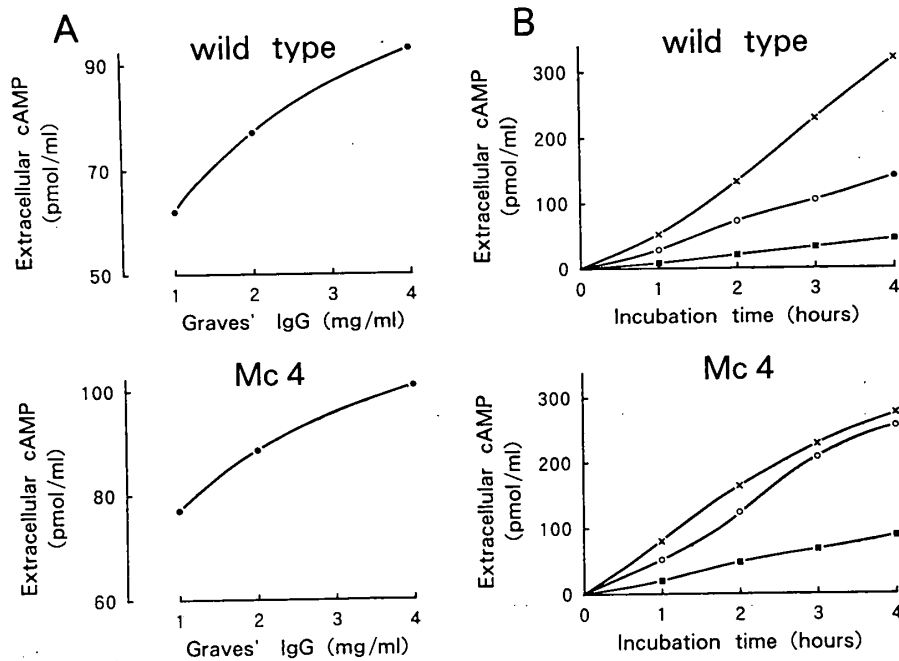


図2 A. バセドウ病 IgG 刺激による cAMP 産生の IgG 濃度依存性の検討
 図上段は wild type, 図下段は Mc4 を発現させた Cos7 細胞を 1, 2, 4 mg/ml の各濃度のバセドウ病 IgG で刺激した際の細胞外に放出された cAMP 産生量 (pmol/ml) を示している。
 B. TSH および IgG 刺激による cAMP 産生の時間依存性の検討
 図上段は wild type, 図下段は Mc4 を発現させた Cos7 細胞の IgG または TSH 刺激時の cAMP 産生量について, 刺激時間を 1, 2, 3, 4 時間と変化した際の値 (pmol/ml) を各刺激別に以下の記号であらわしている。[健常人 IgG (■), バセドウ病 IgG (○), TSH (×)]

20 μ g を混合し, cell-porator (BRL, USA) に 2 キュベットをセットし, 800 μ F, 280V で通電してトランスフェクションを終了する。その後ただちに complete DMEM を 1 キュベットあたり 12ml 添加, 混合し 24 穴プレート (COSTAR, USA) に撒いて (細胞浮遊液 1 ml/well) CO₂ インキュベーターで 37°C, 48 時間静置してレセプターを発現させ, IgG 刺激に用いた。

②IgG 刺激; レセプターを発現している Cos7 細胞を含む 24 穴プレートを氷上に静置して冷却してから各 well 毎にメディアを吸引し, IgG (4mg/ml) と IBMX (0.5mM) を混合した NaCl を含む通常の 20mM-HEPES HBSS buffer (pH 7.4) を 500 μ l 添加し, 37°C, 3 時間, CO₂ インキュベーター内に静置した後 4°C に移し, その上清をサンプルとして回収し, EDTA-4 Na (終濃度 5mM) を加えて cAMP アッセイまで凍結保存 (-20°C) した。

③cAMP アッセイ; ②の凍結サンプルを氷上で融解し, 各 100 μ l をアッセイチューブ (大塚) にとり 20mM-HEPES HBSS buffer (含 5mM-EDTA) にて 6~21 倍に希釈し, その 100 μ l にサクシニル化剤 100 μ l を添加し

て室温で 10 分間放置後, 氷冷したイミダゾール緩衝液を 800 μ l 添加して氷上に静置する。このサクシニル化された希釈サンプル 100 μ l と ¹²⁵I-cAMP 液 100 μ l (0.016 μ Ci/tube), 抗 cAMP 抗体 100 μ l とを混和し, 4°C にて 12~48 時間インキュベート後, 氷冷した B/F 分離剤 (活性炭原液の 2 倍希釈液) 500 μ l を混和し, 氷上で 30 分静置後, 3000rpm, 4°C で 5 分間遠心分離し, 上清 500 μ l を 栄研 2 号チューブにとり放射能を測定し cpm を求め, 下記の式 (*) により結合率 (B/T%) を計算し, 標準曲線 (片対数グラフの縦軸に結合率を, 横軸に cAMP 濃度をとって作成) から cAMP 濃度を読みとる。
 * [(標準値またはサンプルの cpm) - (ブランクの cpm の平均値)] / (総 cpm の平均値 - (ブランクの cpm の平均値)) $\times$ 100 (%)

④cAMP-RIA の信頼性; wild type を発現した Cos7 細胞をバセドウ病 IgG で刺激して得た同一検体 (希釈倍率 1~32 倍) の cAMP 濃度を 8 回繰り返し測定した際の CV (変動係数) は 9.2% 以内であり, wild type レセプターのトランスフェクションを 3 回独立して行い, 同一患者の IgG で刺激した際の TSAb 活性の CV は

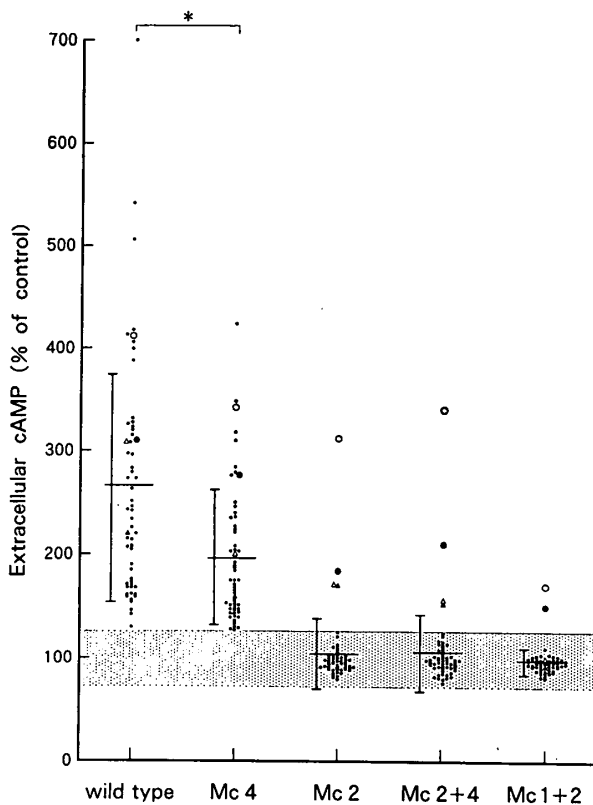


図3 バセドウ病患者57例の TSAb 活性
Cos7 細胞に発現させた wild type TSH レセプターおよび4種類のキメラレセプター (Mc 4, Mc 2, Mc 2+4, Mc 1+2) を用いて測定したバセドウ病患者57例の TSAb 活性を示す。各レセプターにおける健常人 IgG の TSAb 活性の平均値を対照として100%であらわし、その ± 2 SD の範囲(73-127%)を陰影で示しており、127%以上を TSAb 活性陽性とした。プロット群は各レセプターにおける個々のバセドウ病 IgG の TSAb 活性を表し、その横に TSAb 活性の mean $\pm$ SD を記した。また抗体のタイプ別に区別したプロット標示を用いた。[● Type I, Δ Type II (Case-1), $\blacktriangle$ Type II (Case-2), $\circ$ Type III (Case-3), $\bullet$ Type III (Case-4)], *: $p < 0.001$

14%以内であった。

⑤IgG 刺激条件の検討; a) IgG 濃度: 刺激に用いるバセドウ病 IgG の濃度を変えて cAMP 産生を検討した結果(図2A), wild type, Mc 4 とともに4 mg/ml まで IgG 濃度依存性の増加をみた。したがって至適 IgG 濃度は4 mg/ml とした。b) 刺激時間: IgG あるいは TSH の刺激時間と cAMP 産生との関係を調べた結果(図2B), wild type, Mc 4 とともに各刺激により3時間まではほぼ直線的に cAMP 産生が増加した。したがって刺激時間は3時間とした。

⑥TSAb活性; 各タイプのレセプターでの健常人 IgG による cAMP 産生量 (pmol/ml) をコントロールとし

て100%であらわし、トランスフェクション毎に TSAb 活性を次式 [TSAb 活性(%)=(個々のバセドウ病 IgG 刺激時 cAMP 濃度 $\div$ 健常人プール IgG 刺激時の cAMP 濃度) $\times 100$] により算出した。20例の健常人 IgG の cAMP 産生の SD (標準偏差) は wild type において最大(13.5%)であった。したがってレセプター各タイプでの健常人 IgG の cAMP 産生(100%)より2 SD 以上($\geq 127\%$)増加したものを TSAb 活性陽性とした。全ての測定は同一のサンプルを2本たて、かつ同条件で別々に3回繰り返して行い、その平均値をもって測定値とした。

〔統計処理〕wild type と Mc 4 の2群間の TSAb 活性の比較には、関連2群の差の検定と考え、paired-*t* test (パラメトリック法) を使用した。また個々の患者ごとの上記2群の TSAb 活性の関係は、単相関係数(ピアソンの相関係数)を用いて評価した。

III. 結 果

1) 甲状腺刺激抗体 (TSAb) のエピトープの検討
バセドウ病 TSAb のエピトープを調べるため、57例のバセドウ病 IgG の TSAb 活性を wild type ヒト TSH レセプターと4種類のヒト TSH レセプター/ラット LH-CG レセプターキメラを用いて測定した結果を図3に示す。TSAb 活性は左から順に wild type ; 154-376% (mean $\pm$ SD ; 265 $\pm$ 111), Mc 4 ; 133-262% (197 $\pm$ 64.5), Mc 2 ; 70.0-138% (104 $\pm$ 34.0), Mc 2+4 ; 68.2-144% (106 $\pm$ 37.8), Mc 1+2 ; 83.8-111% (97.2 $\pm$ 13.4) であった。すなわち wild type では全例 TSAb 活性が127%以上で陽性であったが、TSH レセプターのセグメント4 (アミノ酸残基261-370) を LH-CG レセプターに置換したキメラ Mc 4 でもやはり全例が TSAb 活性陽性であった。しかし Mc 4 と wild type の TSAb 活性を比較すると、Mc 4 では wild type に比較して TSAb 活性が有意に低下していた (paired-*t* test : $p < 0.001$)。以前の報告から²⁴⁾、TSH 刺激による cAMP 産生は Mc 4 において wild type に比して著しく低下しているので、Mc 4 での TSAb 活性の低下は Mc 4 自体の cAMP 産生の刺激伝達機構に異常があるためと考えられるが、セグメント4に TSAb のエピトープが存在する可能性も完全には否定できない。仮に Mc 4 における TSAb 活性の低下が wild type における TSAb 活性の大小と無関係に強く起これば、これはセグメント4にもエピトープの一部が存在する可能性があり、逆に wild type と Mc 4 での TSAb 活性の間に一定の関係があれば別の原因も考える必要がある。

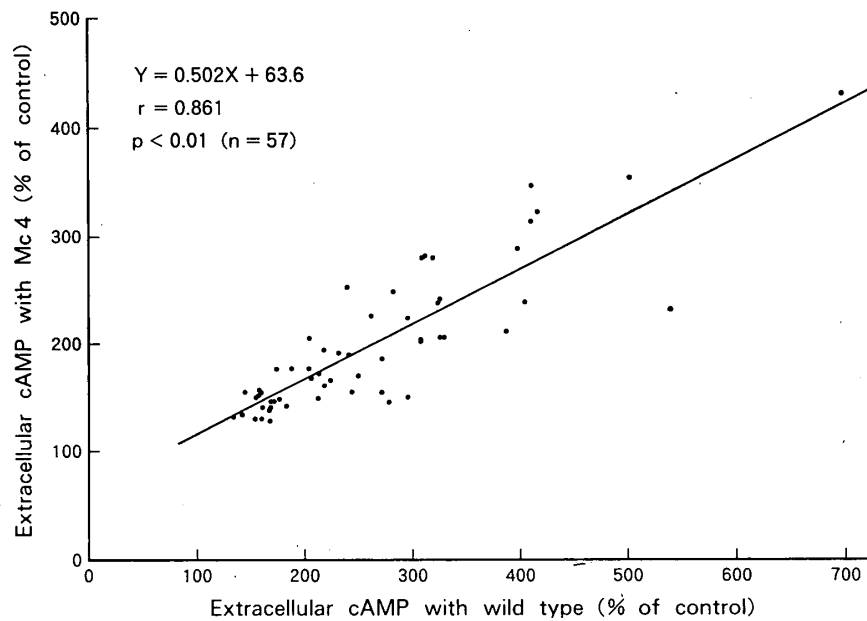


図 4 個々のバセドウ病 IgG の wild type と Mc4 における TSAb 活性の相関
 縦軸に Mc4 における TSAb 活性を、横軸に wild type における TSAb 活性をとり、57例の個々の IgG について wild type と Mc4 の TSAb 活性をプロットし、両者の相関を調べた。

そこで Mc4 の TSAb 活性低下の原因をさらに検討する目的で wild type と Mc4 の TSAb 活性の関係を調べたところ両者の間には強い正相関 ($r=0.86$, $p<0.01$) を認めた (図 4)。すなわち、個々の患者 IgG において、Mc4 での TSAb 活性は wild type における活性の約 70% で、ほぼ一定の割合で低下していることが判明した。このことは Mc4 での TSAb 活性の低下が cAMP 産生の刺激伝達機構の異常によることを示唆していると考えられた。セグメント 2 (アミノ酸残基 90-165) を LH-CG レセプターに置換したキメラ Mc2 では 57 例中 53 例で TSAb 活性が消失した。すなわち大多数 (53/57; 93%) の抗体 (Type I-TSAb) はセグメント 2 にあるエピトープを認識している可能性が高いと考えられた。一方、キメラ Mc2 で TSAb 活性を認めたのは 57 例中 4 例のみであった (case-1; 170%, case-2; 171%, case-3; 312%, case-4; 184%)。この 4 例のうち case-1, 2 はセグメント 1 と 2 (アミノ酸残基 21-165) を LH-CG レセプターに置換したキメラ Mc1+2 で TSAb 活性が完全に消失した (case-1; 93.2%, case-2; 97.3%)。すなわち case-1, 2 の抗体は、セグメント 2 を置換しても残存した TSAb 活性が、セグメント 1 と 2 を同時に置換した場合に陰性化したことより、セグメント 1 にあるエピトープを認識していると考えられた (Type II-TSAb)。一方、case-3, 4 はキメラ Mc1+2 においても TSAb 活性が陰性化しなかったが、それぞれ異なる程度に wild type に比し

有意に低下し、かつ両 case ともに Mc1+2 の活性が Mc2 よりも低値であった (wild type/Mc2/Mc1+2 での TSAb 活性: case-3; 414/312/169%, case-4; 311/184/150%)。したがって case-3, 4 ではセグメント 1, 2, 4 のいずれを置換したキメラにおいても TSAb 活性が消失せず、重要なエピトープはこれら以外の部分すなわちセグメント 3 (アミノ酸残基 166-260)、セグメント 5 (アミノ酸残基 371-415)、細胞膜貫通部位 (transmembrane domain) のどこかに存在すると考えられるが、Mc1+2 で Mc2 より TSAb 活性が低下することよりエピトープの一部にセグメント 1 も関与していると考えられた (Type III-TSAb)。すなわち TSAb のキメラレセプターに対する反応性は一様ではなく、バセドウ病 TSAb のエピトープは患者間で異なることが明らかになった。これら 3 つのタイプの抗体に対する各キメラレセプターの反応性の違いを表 2 にまとめている。

2) タイプ別 IgG の Mc2, Mc1+2 における TSAb 活性の IgG 濃度依存性の検討

今回用いた血清 IgG はモノクローナル IgG ではなく、各 IgG 間で刺激抗体の濃度が等しいとは言えない。したがって各キメラレセプターに対する反応性の違いが、単に IgG 中に含まれる刺激抗体の力価 (あるいは濃度) の差を反映したにすぎないのか、レセプターに対する各抗体の反応性の質的な差を反映しているのかを調べるため、上述の各タイプ別 IgG 毎に濃度を変化させ、

表 2 タイプ別バセドウ病 IgG の各キメラレセプターにおける TSAb 活性のサマリー

Receptor TSAb	wild type	Mc 4	Mc 2	Mc 2+4	Mc 1+2
Type I	+++	++	—	—	—
Type II	+++	++	+	+	—
Type III	+++	++	++	++	+

表中の記号はバセドウ病 IgG のタイプ別に, wild type における TSAb 活性を強陽性 (++) とした場合の各キメラにおける TSAb 活性を相対的に中等陽性 (++)、軽度陽性 (+)、陰性 (—) として表したものである。

wild type と Mc 2, Mc 1 + 2 に対する反応性を検討した (図 5)。その結果, Type I の刺激活性は wild type で濃度依存性増加を認め, Mc 2, Mc 1 + 2 には全く反応せず, Type II は wild type と Mc 2 で濃度依存性増加を認め, Mc 1 + 2 では全く反応を認めず, Type III は wild type, Mc 2, Mc 1 + 2 のいずれにも濃度依存性増加を認めた。すなわち IgG 濃度を変化させてもキメラレセプターに対する各抗体の反応のパターンは変化せず, 図 3 の結果と一致した。したがって上述の抗体のタイプ分けは, 刺激抗体のキメラレセプターに対する反応性の質的な違いを反映していると考えられた。なお, 各抗体に見られるこれらの cAMP 産生反応が, 実際に Cos7 細胞に発現させたレセプターを介するシグナルによるのか, 単に Cos7 細胞自体の TSH レセプターを介さない非特異的 cAMP 産生を見ているにすぎないのかを確認するため, 対照としてレセプター cDNA を組み込まない pSG5 ベクターを単独で Cos7 細胞に発現させ, 上記 3 タイプの抗体で刺激した際の TSAb 活性を調べたが (図 5 各段右端), いずれかのタイプの抗体も刺激活性は陰性であった。したがって, wild type と 4 種類のキメラレセプターに認める TSAb 活性は, トランスフェクションにより発現されたレセプターを介したシグナルによるものであると考えられた。

3) タイプ別 IgG と臨床的多様性の検討

バセドウ病はその臨床像に個人差を認める疾患として知られるが, その臨床的多様性をきたす原因の一つに患者がもつ抗体のエピトープの違いが関与する可能性があると考えられ, その検討に今回の結果を用いることができた。すなわち TSAb のタイプと臨床所見 (甲状腺腫, 眼症, 下腿粘液水腫) の合併率や重症度との関係を検討した (表 3)。その結果, 眼病変に関しては, Type

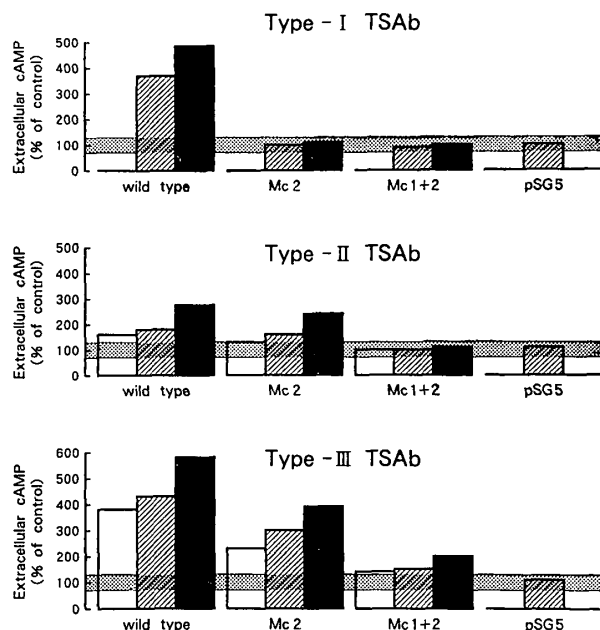


図 5 タイプ別 IgG の Mc 2, Mc 1 + 2 における反応性 (IgG 濃度依存性) の検討
バセドウ病 IgG のタイプ別に, IgG 濃度を 2, 4, 8 mg/ml と変化させ, wild type および Mc 2, Mc 1 + 2 における TSAb 活性を測定しその変化を観察した。上段の棒グラフは Type I, 中段は Type II, 下段は Type III の TSAb 活性を IgG 濃度により区別して表したものである [□ 2 (mg/ml), ▨ 4 (mg/ml), ■ 8 (mg/ml)]。健常人 IgG の TSAb 活性の平均値を対照として 100 % であらわし, 平均値 ± 2 SD の範囲 (73-127 %) が陰影で示されている。各段右端の棒グラフは pSG5 ベクターを単独でトランスフェクションした Cos7 細胞をバセドウ病 IgG (4 mg/ml) で刺激した際の TSAb 活性を示している。

I, II の両者に認められ, 特に Type II の 2 例はいずれも soft-tissue involvement を伴う眼病変 (アメリカ甲状腺学会のバセドウ病眼症分類^{25,26)} の class-2 以上) を合併していた。しかし Type III には眼症が見られなかった。甲状腺腫は全例に七條分類二度以上の腫大を認めたが, その程度と抗体のタイプとの間には特定の傾向は見いだせなかった。下腿粘液水腫については Type I に 7 例と Type II に 1 例の合併を見たが, Type III には認められなかった。Type III は N 端以外に重要なエピトープをもつ点で TSAb の中では特殊な症例とも考えられたが, 検討し得た範囲では陽性所見に特徴は見いだせなかった。また TSAb 活性, 性, 年齢と抗体の各タイプとの間にも特定の関連は認められなかった。

表 3 バセドウ病患者57症例の TSAb のタイプと臨床所見の重症度および出現頻度

性 (人数)	Type	甲状腺腫大度 (七条分類)						眼症 (アメリカ甲状腺学会分類)							下腿 粘液水腫
		0-I	II	II-III	III	IV	V	class 0	1	2	3	4	5	6	
男性 (10)	I	0	1	3	2	2	2	4	1	2	0	2	1	0	2
	II	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	III	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
女性 (47)	I	0	0	1	22	12	8	18	11	4	2	5	3	0	5
	II	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1
	III	0	0	0	2	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0

IV. 考 察

バセドウ病の臨床所見には、明らかに甲状腺刺激抗体 (TSAb) によるもの (甲状腺腫大, 頻脈, 発汗過多等) と, 現在まで病因が明確にされていないもの (眼球突出, 眼瞼浮腫, 下腿粘液水腫等) とがあり, かつこれらの程度や出現頻度にも個人差が存在することが知られている。本研究ではバセドウ病患者に認めるこの臨床的個人差すなわち多様性を来す原因の一つとして, 本症の病因とされる TSAb のエピトープの違いが関与している可能性を念頭におき, キメラレセプターを用いてそのエピトープを検討してきた。TSH レセプター抗体活性が高値 (TBII; 60%以上) でかつ wild type における TSAb 活性が陽性 (127%以上) の57例のバセドウ病 IgG について, 各キメラレセプターに対する cAMP 産生能 (TSAb 活性として評価) を検討した結果 (表2), TSH レセプターのセグメント1+2を置換したキメラ Mc1+2 では57例中55例 (96%) の TSAb 活性が陰性であり, セグメント4を LH-CG レセプターに置換したキメラ Mc4 では全例で TSAb 活性が陽性であった。すなわちN端側のセグメント1+2 (アミノ酸21-165) には大多数の TSAb のエピトープ (もしくはエピトープの構築に重要な役割を果たすと考えられる部位) が存在し, C端寄りのセグメント4 (アミノ酸261-370) は TSAb 活性の発現にあまり重要でないと考えられた。以上は結果的に田原らの報告²⁴⁾を多数の症例で再確認したかたちとなった。一方, 今回の検討では, 57例の TSAb が二種類のキメラ (Mc1+2, Mc2) に対する反応性の違いから以下に述べる3タイプに分けられることが新たに明らかとなった。すなわち, キメラ Mc1+2 において TSAb 活性が完全に消失し, セグメン

ト1+2が重要と考えられた上述の55例は, セグメント2 (アミノ酸90-165) を LH-CG レセプターに置換したキメラ Mc2 を用いることにより, Mc2 に全く反応しない大多数群 (Type I; 53例) と, Mc2 に反応する少数群 (Type II; 2例) とに分けられ, 他方キメラ Mc1+2 に対してもなお TSAb 活性が陽性 (Mc2 の TSAb 活性よりは有意に低下) となる点で前2者 (Type I, II) と明確に区別されるタイプの抗体 (Type III; 2例) も存在した。したがってバセドウ病 TSAb の認識するエピトープは一様ではなく, 個々の患者により異なること (多様性; heterogeneity) が判明した。これまでもバセドウ病 TSAb の多様性を論じた報告は散見される^{1,17-21)}が, 変異 TSH レセプターを用いて多数の症例で具体的に抗体間でのエピトープの違いを示してその多様性を論じたという意味では今回の報告は最初のものと言える。すなわち各抗体の予想される主要結合部位は, Type I ではセグメント2に, Type II ではセグメント1に存在すると考えられ, Type III ではその一部にセグメント1が関与するが, より重要なエピトープはセグメント3 (166-260), セグメント5 (371-415), あるいは細胞膜貫通部位のいずれかにあると考えられる (図6)。

TSH レセプター自己抗体のエピトープに関する主な研究は, 方法論的には以下の3種類に大別される。1) キメラレセプターを用いた検討では, 永山らが2種類の TSH レセプター自己抗体 (TSAb/TBII) と TSH の作用部位を検討し, TSAb のエピトープは TSH レセプターの細胞外ドメインのN端寄りのドメイン ABC (1-260) に存在し, C端寄りのドメイン DE (261-418) には存在しないことを示し²²⁾, また TSH の中心的作用部位は細胞外ドメインの中央部分 (171-260) に

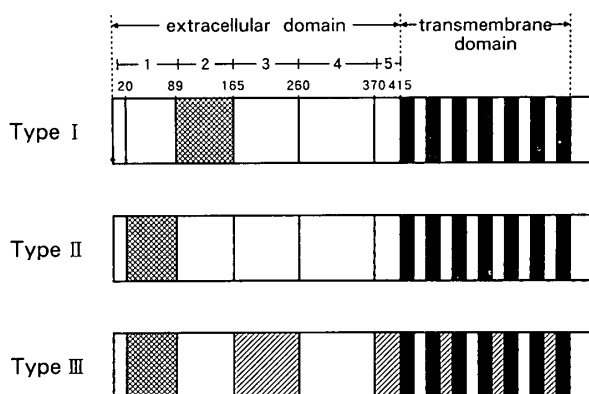


図 6 3 種類の TSAb の予想されるヒト TSH レセプター上の結合部位

図左端は刺激抗体のタイプ、右側はその TSH レセプター上の予想される結合部位を示す。

■：今回の結果からエピトープが存在すると考えられる部位

▨：エピトープの可能性が残る未検討部位 注) 図右側の黒塗り部分はレセプターが 7 回細胞膜を通過することを意味する。

あると報告した²⁷⁾。TSAb のエピトープに関しては後にドメイン ABC を細分割したキメラが作成され詳細に検討がなされたが、一部の TSAb で N 端 (25-30) に作用部位が存在する可能性が示されたに過ぎず、多くの TSAb に明らかなエピトープは見出されなかった²³⁾。同じくキメラを用いた田原らの検討では、TSAb は N 端寄りのセグメント 1 + 2 (21-165) に、TBII はセグメント 1 (21-89) に重要なエピトープをもつと考えられるが、両抗体のエピトープには C 端寄りのセグメント 4 (261-370) は含まれないと報告している²⁴⁾。2) site-directed mutagenesis による検討では、はじめに Wadsworth らが TSAb および TSH の作用部位として TSH レセプターの N 端 (38-45) が重要で、C 端寄り部分 (317-366) は重要でないと報告した²⁸⁾。しかし、後の検討でこの N 端 (38-45) が TSAb, TSH の結合部位というよりも、41 番目のシスチンが TSH レセプターの立体構造保持の上で重要らしいと訂正された²⁹⁾。小杉らは、TSH レセプターに特有のアミノ酸配列部位を中心に N 端 (20-107) と C 端 (287-410) のエピトープを検討し、N 端側の 3 箇所 (34-37, 42-45, 52-56) が TSAb のエピトープとして重要であると結論し¹⁰⁾、C 端側の検討した範囲 (アミノ酸 287-410) は TSAb 作用に関与しないとの結果であった³¹⁻³²⁾。3) TSH レセプターの合成ペプチドを用いた検討では、遠藤らが N 端 (29-57)⁶⁾ および細胞膜貫通部位の 3 個の細胞外ループ (E1 ; 478-497, E2 ; 561-580, E3 ; 649-652)⁷⁾ の合

成ペプチドを作成してその抗ペプチド家兔血清の TSAb 活性と TBII 活性を測定した結果、4 種類の抗体とも TBII 活性は陰性であったが、N 端 (29-57) と E2, E3 の抗体には TSAb 活性を認めた。すなわち N 端 (29-57), E2, E3 に TSAb のエピトープが存在する可能性があるが、TBII のエピトープはこの 4 部位に含まれない結果となった。大森らは同様に作成した 2 種類のペプチド (N2 ; 35-50, P1 ; 398-417) の抗ペプチド家兔血清の TBII 活性を調べ、TBII のエピトープは N2 (35-50) に存在し、P1 (398-417) には存在しないとの結果を示した¹²⁾。しかし、実験動物をペプチドで免疫して作成した抗体は、バセドウ病患者の血中に存在する自己抗体が認識するエピトープと同じエピトープを認識するという保証はなく、この方法で患者の TSAb のエピトープを検索するのは方法論的に限界があると考えられる。一方、ペプチドの添加による患者 IgG の TSAb 活性または TBII 活性の阻害度を検討した報告によれば、P-194 (123-131) はバセドウ病 IgG の TBII 活性のエピトープに関与し¹¹⁾、P-195 (353-363) は TBII 活性には関与しないが TSAb 活性に一部関与する可能性が示された⁸⁾。この他にバセドウ病 IgG と ¹²⁵I で標識したペプチドとの結合を観察し、N 端 (32-56) および C 端寄り (308-336, 352-336) が TSAb との結合に重要とした 2 報告^{9,13)}があるが、結合した IgG の性状が未確認という点に問題がある。上記の如く TSAb 活性発現に関わるレセプター各部位の重要度は実験方法によりまちまちであるが、今回の結果では、特に Type I は最多数を占めた抗体であり (57 例中 53 例 ; 93%)、バセドウ病 TSAb の多くはこのタイプに属するので、Type I の critical binding site であるセグメント 2 が重要であり、したがって我々はセグメント 2 (90-165) の中にほとんどのバセドウ病 IgG の TSAb 活性発現に不可欠の部位があると考えている。TSAb の結合部位に関するこれまでの報告の多くは前述のように主としてセグメント 1 の重要性を指摘しているのみである。セグメント 2 の部位に関するキメラレセプターを用いた検討では、永山らが N 端側の ABC ドメイン (21-260) を TSH/LH-CG レセプターキメラで細分割してその機能を調べたが明らかな結果が得られず²⁸⁾、田原らは少数の IgG でセグメント 1 と 2 の双方が関与する可能性を指摘している²⁴⁾。しかし、セグメント 2 相当部位を単独で置換したキメラで直接的にしかも多症例で検討した報告はなく、したがって今回新たに TSAb 活性の発現におけるセグメント 2 の意義をセグメント 1 と同様に重視して今後さらに詳細に検討すべきであることを強調したい。た

だし本検討ではセグメント1を単独で LH-CG レセプター断片に置換したキメラ (Mc1) は TSH レセプター機能がなく、セグメント1の機能を直接的には見ていない。したがって、セグメント1の意義に関する厳密な意味での言及は不可能であり、今回の結果はセグメント1のエピトープとしての重要性を否定するものではない。C端側のセグメント4 (261-370) については、キメラ Mc4 に全例 TSAb 活性を認めたことより TSAb のエピトープとしては重要ではないと考えられたが、同じキメラを用いた田原らの報告以外にも、小杉ら³¹⁾がアミノ酸299-301, 303-382, 387-395の deletion, non-homologous substitution は TSAb 活性に影響しないことを示し、Wadsworth ら²⁸⁾はアミノ酸317-366は TSH 結合, TSAb 活性, TSAB 活性を変化させずに deletion できることを報告し、永山らの報告²²⁻²³⁾もこれを支持している。すなわち mutagenesis によるいずれの検討も、セグメント4のエピトープとしての関与には否定的な結果となった。これに対し、合成ペプチドを用いた検討の中にはセグメント4の一部が TSAb 活性に関与するという報告があった。森らの報告⁸⁾は P-195 (333-343) とバセドウ病 IgG との pre-incubation により TSAb 活性が用量依存性に低下することを述べているが、その抑制は不完全であった。他の2報告^{9,13)}はいずれもペプチドとバセドウ病 IgG が結合したと述べているが、前述のごとく結合した IgG の性状が確認されていない。さらにこれらは方法論的にレセプターの立体構造への配慮がなされていないペプチドを用いた実験であるという点に、mutagenesis と異なる結果を生む原因があるのではないかと考えている。結果に述べたごとく、Mc4 における TSAb 活性の低下は、wild type と Mc4 の刺激活性の間に正相関を見たことより、少なくともセグメント4にエピトープがあるためではないと考えられた。その原因として二つの場合が想定できる。一つはセグメント4が cAMP 産生のシグナル伝達に関与している可能性である。TSH レセプターの立体構造は未だに明らかではなく、TSH レセプターを介する cAMP 産生シグナルの伝達機構に関する定説はない。しかし、TSH レセプター細胞外ドメインのN端とC端との間にはジスルフィド結合の存在が予想されており³⁴⁾、これがシグナルの伝達における両端の連絡をもたらしとも考えられる。したがって、仮に TSAb の結合部位がN端であるとした場合に、この両端が密接に連絡しあえる構造は、N端への抗体結合後の cAMP 産生シグナルが、C端を経由して7回の細胞膜貫通部位へ伝わるとの推察も可能ならしめる。細胞外ドメインのC端

側 (アミノ酸残基260-418) がシグナル伝達に重要とする報告^{33,35,36)}はさらにこれを支持している。もう一つは図1に示すごとくキメラ Mc4 では LH-CG レセプターで置換した断片そのものが TSH レセプターに比べてもともと短く、そのために Mc4 の立体構造は多少とも変化している可能性があり、その結果 cAMP 産生能が低下したと考える場合である。TSAb のエピトープを検索する過程で上述の如く抗体の多様性が明らかとなった。そこで、TSAb のエピトープを調べることの臨床的意義を確認する意味もふまえて、バセドウ病の臨床所見 (甲状腺腫、眼症、下腿粘液水腫) と抗体のタイプとの関連を調べ、本症にみる臨床像の個人差 (多様性) の原因について抗体の多様性という観点から検討を加えてみた (表3)。その結果、興味深いことに Type II の IgG は2例ともに soft-tissue involvement を併う眼病変を呈した。このことは眼病変発症にかかわるエピトープの一部が Type II の予想される主要結合部位 (セグメント1) に存在する可能性を示唆しているのかもしれない。しかし症例数が少ないので今後さらに症例を重ねて検討する必要がある。Type IIIはセグメント1以外にもセグメント3, 5, 細胞膜貫通部位のいずれかが関与する可能性が残される特殊な抗体と考えられるが、2例とも眼症が見られなかった点以外には、臨床的な特徴は見出せなかった。やはり症例を重ねての検討が不可欠である。限局性下腿粘液水腫は以前から眼症と並んで重症のバセドウ病に見られる比較的稀な所見であり、各症例について臨床徴候を検討してみた。その結果、今回認めた8例も全例に眼病変を合併し、さらに甲状腺腫大度に関して女性では6例中5例が巨大甲状腺を呈しており、やはり重症度との関与が示唆されたが、他の特徴は見いだせなかった。IgG のタイプとしては Type I と II の両者にみられたが、一定の傾向は認められなかった。以上本研究ではキメラレセプターを用いた方法で刺激抗体のエピトープを検索してきたが、TSH レセプターの立体構造が判明しない現時点においては、一つの方法で TSH レセプター抗体や TSH の結合部位を決定することは困難であり、複数の方法を組み合わせて各方法の欠点を補い合うしかない。キメラレセプターを用いる利点の第一は、同じ mutagenesis による方法の中でも、non-homologous substitution や deletion mutant を用いた場合に比べてレセプターの立体構造をより維持しやすいという点であり、第二は広い範囲のアミノ酸を置換できる点にある。欠点としてはキメラで置換しうるアミノ酸断片のサイズには限度があり、数アミノ酸以下のエピトープの細部の検討は困難であるという点がある。すなわ

ち、抗体の結合部位の決定にあたっては、はじめにキメラを用いてレセプター全体にわたりエピトープの存在部位をスクリーニングし、さらにその中でキメラで可能な範囲まで部位を狭く絞り込み、次いで point-mutation などを用いてより詳細に部位を限定するという手順が望ましいと考えられる。そしてその結果がキメラを用いて予想した部位と一致する場合に初めて確からしいエピトープを推定しうるものと思われる。

謝 辞

稿を終えるにあたり本研究遂行の御指導を賜りました恩師、千葉大学医学部第二内科学教室吉田 尚教授に深甚なる謝意を表します。また、直接御指導、御援助いただいた千葉大学医学部第二内科助教授田村 泰博士、千葉大学医学部第二内科平井愛山博士、田原和夫博士に心より感謝申し上げます。さらに多大な御援助を頂きました千葉大学医学部第二内科内分泌代謝研究室の諸先生方に深く感謝いたします。また、貴重な臨床検体を御提供下さった伊藤病院院長伊藤國彦先生、石川直文先生に感謝いたします。

なお本論文は学位審査論文である。

SUMMARY

In Graves' disease, thyroid stimulating antibodies (TSABs) bind to and stimulate thyrotropin receptor (TSHR), causing hypersecretion and goiter. To elucidate the mechanism of TSAB action, binding sites (epitopes) for TSAB on the human TSH receptor (TSHR) and their heterogeneity among fifty seven Graves' patients were studied by measuring IgG-stimulated cAMP production in Cos7 cells transfected with wild type TSHR or one of four TSHR/lutropin-chorionic gonadotropin (LH-CG) receptor chimeras which retained TSHR functions (high affinity TSH binding and cAMP response to TSH). All fifty seven cases showed positive TSAB activities with wild type TSHR and a chimera of Mc4, in which residues 261-370 of TSHR was replaced with the corresponding LH-CG receptor segment. This result confirmed that the residues 261-370 of TSHR is not important for TSAB activities. Fifty three within fifty seven cases completely lost TSAB activities with chimera Mc2, in which the residues 90-165 of the TSHR was replaced. This suggests the possibility that most Graves' IgGs may have an epitope on segment 2 (90-165). This group of Graves' IgG is named as Type I-TSAB. In only four cases, the chimera Mc2 was stimulated. It is suggested that residues 21-89 has a critical epitope for two out of these four

cases (Type II-TSAB) from the result that IgGs from these two cases lost TSAB activities completely with chimera Mc1+2, in which residues 21-165 was replaced. Two other cases (Type III-TSAB) showed decreased but positive TSAB activities with chimera Mc1+2. This indicates that segment 3 (residues 166-260) or segment 5 (residues 371-415), or the transmembrane domain contains an epitope in addition to an epitope on segment 1 (residues 21-89) for Type III-TSAB.

文 献

- 1) Kohn LD, Alvarez F, Marcocci A, Kohn AD, Corda D, Hoffmann WE, Tombaccini D, Valente WA, Luca M, Santisteban P and Grollman EF: Monoclonal antibody studies defining the origin and properties of autoantibodies in Graves' disease. *Ann NY Acad Sci* **475**: 157-173, 1986.
- 2) Smith BR, McLachlan SM, and Furmaniak J: Autoantibodies to the thyrotropin receptor. *Endocr Rev* **9**: 106-121, 1988.
- 3) Nagayama Y, Kaufman KD, Seto P and Rapoport B: Molecular cloning, sequence and functional expression of the cDNA for the human thyrotropin receptor. *Biochem Biophys Res Commun* **165**: 1184-1190, 1989.
- 4) Libert F, Lefort A, Gerard C, Parmentier M, Pellet J, Ludgate M, Dumont JE and Vassart G: Cloning, sequencing and expression of the human thyrotropin (TSH) receptor: evidence for binding of the autoantibodies. *Biochem Biophys Res Commun* **165**: 1250-1255, 1989.
- 5) Misrahi M, Loosdelt H, Atger M, Sar S, Guiochon-mantel A and Milgrom E: Cloning, sequencing and expression of human TSH receptor. *Biochem Biophys Res Commun* **166**: 394-403, 1990.
- 6) Endo T, Ikeda M and Onaya T: Thyroid stimulating activity of rabbit antibodies toward the human TSH receptor peptide. *Biochem Biophys Res Commun* **177**: 145-150, 1991.
- 7) Endo T, Ohmori M, Ikeda M and Onaya T: Rabbit antibody toward extracellular loops of the membrane spanning region of human thyrotropin receptor possess thyroid stimulating activities. *Biochem Biophys Res Commun* **181**: 1035-1041, 1991.
- 8) Mori T, Sugawa H, Piraphatdist T, Inoue D, Enomoto T and Imura H: A synthetic oligopeptide from human thyrotropin receptor sequence binds to Graves' immunoglobulin and inhibits thyroid stimulating antibody activity but lacks interactions with TSH.

- Biochem Biophys Res Commun 178: 165-172, 1991.
- 9) Murakami M and Mori M: Identification of immunogenic regions in human thyrotropin receptor for immunoglobulin G of patient with Graves' disease. Biochem Biophys Res Commun 171: 512-518, 1990.
- 10) Atassi MZ, Manshoury T and Sakata S: Localization and synthesis of hormone-binding regions of the human thyrotropin receptor. Proc Natl Acad Sci USA 88: 3613-3617, 1991.
- 11) Piraphatdist T, Sugawa H, Inoue D, Enomoto T, Mori T and Imura H: Possible binding site of thyrotropin binding inhibitor immunoglobulin (TBII) on thyrotropin (TSH) receptor, which is different from TSH binding site. Biochem Biophys Res Commun 172: 529-536, 1990.
- 12) Ohmori M, Endo T, Ikeda M and Onaya T: Role of N-terminal region of thyrotropin (TSH) receptor in signal transduction for TSH or thyroid stimulating antibody. Biochem Biophys Res Commun 178: 733-738, 1991.
- 13) Takai O, Desai RK, Seetharamaiah GS, Jones CA, Allway GP, Akamizu T, Kohn LD and Prabhakar BS: Prokaryotic expression of the thyrotropin receptor and identification of an immunogenic region of the protein using synthetic peptides. Biochem Biophys Res Commun 179: 319-326, 1991.
- 14) Nagayama Y and Rapoport B: The thyrotropin receptor 25 years after its discovery; new insight after its molecular cloning. Mol Endocrinol 6: 145-156, 1992.
- 15) Libert F, Ludgate M, Dinsart C and Vassart G: Thyroperoxidase but not the thyrotropin receptor, contains sequential epitopes recognized by autoantibodies in recombinant peptides expressed in the pUEX vector. J Clin Endocrinol Metab 73: 857-860, 1991.
- 16) Kosugi S, Ban T and Kohn LD: Identification of thyroid-stimulating antibody-specific interaction sites in the N-terminal region of the thyrotropin receptor. Mol Endocrinol 7: 114-130, 1993.
- 17) Zakarija M: The thyroid-stimulating antibody of Graves' disease: evidence for restricted heterogeneity. Hormone Res 13: 1-15, 1980.
- 18) McKenzie JM and Zakarija M: Clinical review 3, The clinical use of thyrotropin receptor antibody measurements. J Clin Endocrinol Metab 69: 1093-1096, 1989.
- 19) Vallente WA, Vitti P, Rotella CM, Vaughan MM, Aloj SM, Grollman EF, Ambesi-Ipiombato FS and Kohn LD: Antibodies that promote thyroid growth. A distinct population of thyroid stimulating autoantibodies. N Engl J Med 309: 1028-1034, 1983.
- 20) O'donnell J, Trokoudes K, Silverberg J, Row V and Volpe R: Thyrotropin displacement activity of serum immunoglobulins from patients with Graves' disease. J Clin Endocrinol Metab 46: 770-777, 1978.
- 21) 森 徹: TSH 受容体の構造と TSH および抗受容体抗体の作用部位: 医学のあゆみ 157: 36-40, 1991.
- 22) Nagayama Y, Wadsworth HL, Russo D, Chazenbalk GD and Rapoport B: Binding domains of stimulatory and inhibitory thyrotropin (TSH) receptor autoantibodies determined with chimeric TSH-lutropin/chorionic gonadotropin receptors. J Clin Invest 88: 336-340, 1991.
- 23) Nagayama Y and Rapoport B: Thyroid stimulating autoantibodies in different patients with autoimmune thyroid disease do not all recognize the same components of the human thyrotropin receptor: selective role of receptor amino acids Ser₂₅-Glu₃₀: J Clin Endocrinol Metab. 75: 1425-1430, 1992.
- 24) Tahara, K, Ban T, Minegisi T and Kohn LD: Immunoglobulins from Graves' disease patients interact with different sites on TSH receptor/LH-CG receptor chimeras than either TSH or immunoglobulins from idiopathic myxedema patients. Biochem Biophys Res Commun 179: 70-77, 1991.
- 25) Werner SC: Classification of the eye changes of Graves' disease. J Clin Endocrinol Metab 29: 982-984, 1969.
- 26) Werner SC: Modification of the classification of the eye changes of Graves' disease. J Clin Endocrinol Metab 44: 203-204, 1977.
- 27) Nagayama Y, Russo D, Chazenbalk GD, Wadsworth HL and Rapoport B: Extracellular domain chimeras of the TSH and LH/CG receptors reveal the mid-lesion (amino acids 171-260) to play a vital role in high affinity TSH binding. Biochem Biophys Res Commun 173: 1150-1156, 1990.
- 28) Wadsworth HL, Chazenbalk GD, Nagayama Y, Russo D and Rapoport B: An insertion in the thyrotropin receptor critical for high affinity hormone binding. Science 249: 1423-1425, 1990.
- 29) Wadsworth HL, Russo D, Nagayama Y, Chazenbalk GD and Rapoport B: Importance of cysteine 41 for the expression of the thyrotropin receptor. Mol Endocrinol 6:

394-398, 1992.

- 30) Kosugi S, Ban T, Akamizu T and Kohn LD: Identification of separate determinants on the thyrotropin receptor reactive with Graves' thyroid-stimulating antibodies and with thyroid-stimulating blocking antibodies in idiopathic myxedema: These determinants have non homologous sequence on gonadotropin receptors. *Mol Endocrinol* 6: 168-180, 1992.
- 31) Kosugi S, Ban T, Akamizu T and Kohn LD: Site-directed mutagenesis of a portion of the extracellular domain of the rat thyrotropin receptor important in autoimmune thyroid disease and nonhomologous with gonadotropin receptors: Relationship of functional and immunogenic domains. *J Biol Chem* 266: 19413-19418, 1991.
- 32) Kosugi S, Akamizu T, Takai O, Prabhakar B and Kohn LD: The extracellular domain of the TSH receptor has an immunogenic epitope reactive with Graves' IgG but unrelated to receptor function as well as determinants having different roles for high affinity TSH binding and the activity of thyroid-

stimulating autoantibodies. *Thyroid* 1: 321-330, 1991.

- 33) Nagayama Y and Rapoport B: Role of the carboxyl-terminal half of the extracellular domain of the human thyrotropin receptor in signal transduction. *Endocrinology* 131: 548-552, 1992.
- 34) 永山雄二, 長瀧重信: TSH 受容体遺伝子とバセドウ病の成因. *日内分泌会誌* 68: 584-591, 1992.
- 35) Nagayama Y, Russo D, Wadsworth HL, Chazenbalk GD and Rapoport B: Eleven amino acids (Lys-201 to Lys-211) and 9 amino acids (Gly-222 to Leu-230) in the human thyrotropin receptor are involved in ligand binding. *J Biol Chem* 266: 14926-14930, 1991.
- 36) Nagayama Y, Wadsworth HL, Chazenbalk GD, Russo D, Seto P and Rapoport B: Thyrotropin-luteinizing hormone / chorionic gonadotropin receptor extracellular domain chimeras as probes for thyrotropin receptor function. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 902-905, 1991.

Santen

The opening of better life

活動性RAに挑むDMARD

抗リウマチ剤 (制指) **リマチル®** (Rimatil® プシラミン100mg錠) (制指) **リマチル®50** (Rimatil®50 プシラミン50mg錠)

健保適用

- 1** リマチルは赤沈、腫脹などRAの活動性の指標を改善する効果が優れています。
- 2** リマチルは特に活動性RAの早期に より効果があります。
- 3** リマチルはRAでみられる免疫パラメーターの異常を改善します。

■効能・効果 慢性関節リウマチ

■用法・用量 本剤は消炎鎮痛剤などで十分な効果が得られない場合に使用すること。通常成人、1回プシラミンとして100mgを1日3回(300mg)食後に経口投与する。なお、患者の年齢、症状、忍容性、本剤に対する反応等に応じ、また、効果の得られた後には1日量100~300mgの範囲で投与する。1日最大用量は300mgとする。

■使用上の注意

一般的注意

- 1) 本剤の投与に際しては、慢性関節リウマチの治療法に十分精通し、患者の病態ならびに副作用の出現に注意しながら使用すること。
- 2) 本剤は消炎鎮痛剤等で十分な効果が得られない場合に使用すること。また、高齢者、手術直後の患者、骨髄機能の低下している患者、全身状態が悪化している患者には原則として投与を避けること。
- 3) 本剤の投与開始に先立ち、主な副作用、用法・用量等の留意点を患者に説明し、特に咽頭痛、発熱、紫斑等の症状がみられた場合には速やかに主治医に連絡するよう指示すること。
- 4) 本剤は遅効性であるので、本剤の効果が得られるまでは、従来より投与している消炎鎮痛剤等は継続して併用することが望ましい。ただし、本剤を6ヵ月間継続投与しても効果があらわれない場合には投与を中止すること。
- 5) 本剤投与前には必ず血液、腎機能、肝機能等の検査を実施すること。投与中は臨床症状を十分に観察するとともに、定期的に血液及び尿検査等の臨床検査を行うこと。

注意←本剤の「副作用」、「使用上の注意」等については、製品添付文書をご参照下さい。

S 参天製薬株式会社
〒533 大阪市東淀川区下新庄3-9-19
資料請求先 医薬情報課

92J⑦B5-2