

〔原著〕

正常ヒト血清チログロブリンの 物理化学的性状と抗原構造

斎藤 公幸*

(昭和63年11月12日受付, 昭和63年12月8日受理)

要 旨

血清チログロブリン (Tg) の物理化学的性状と抗原構造を明らかにする目的で, 健康人プール血漿より, イオン交換クロマトグラフィー, レクチン親和性クロマトグラフィー, ゲル濾過を順次行い, 血清 Tg を部分精製した。得られた血清 Tg 標品を再度, イオン交換クロマトグラフィー, およびゲル濾過を用いて分析したところ, 血清 Tg の物理化学的性状について, 次のような結果が得られた。すなわち, 血清 Tg の分子量は, 甲状腺組織由来の19S Tg と一致する660kd と推定された。また, 血清 Tg のヨウ素含量は, 不均一で, 少なくとも低ヨウ素含量と高ヨウ素含量の2つの分画が存在した。これらの結果から, 血清 Tg の物理化学的性状は, 組織 Tg と類似していると考えられた。

しかし, 一方, 自己抗体との結合能を ELISA で検討したところ, 自己抗体の血清 Tg に対する結合能は, 組織 Tg に対する結合能に比べ, 著しく低かった。さらに, ウェスタンブロット法による検討でも, ヘテロの抗体は, 660kd 領域の蛋白質と結合して, バンドを形成したが, 自己抗体は 全くバンドを形成しなかった。これらのことから, 自己抗体は, 血清 Tg よりも組織 Tg に親和性が高いと考えられた。すなわち, 物理化学的性状においては, 血清 Tg と組織 Tg の間にきわだった差が認められなかったが, 血清 Tg と組織 Tg の抗原構造には, 違いがあることが強く示唆された。

Key words: 血清チログロブリン, 抗原決定基, 自己免疫応答

略語一覧: BSA: Bovine serum albumin, Con A: Concanavalin A, ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay, HPLC: High performance liquid chromatography, IgG: Immunoglobulin G, PAGE: Polyacrylamide gel electrophoresis, PB: Phosphate buffer, PBS: Phosphate buffered saline, RIA: Radioimmunoassay, SDS: Sodium dodecyl sulfate, Tg: Thyroglobulin

I. 緒 言

臓器特異的自己免疫疾患の典型例として知られる慢性甲状腺炎の患者血清中には, 自己のチログロブリン (Tg) と結合する抗 Tg 抗体の存在が知られている¹⁾。Tg は, 甲状腺濾胞内に局在する蛋白質であり, この Tg を動物に免疫することにより, 動物の血清中に抗

Tg 抗体が出現するばかりでなく, ヒトの慢性甲状腺炎に極めて類似した組織像が得られること²⁾より, Tg は, 免疫系より隔絶された自己抗原として注目されてきた。最近になって, 甲状腺疾患患者のみならず, 健康人の血清中にも微量ながら Tg が存在していることが証明され, 当初考えられたように, Tg が隔絶抗原であるという仮説は, 成り立たなくなった。しかし, Tg を免疫す

* 千葉大学医学部小児科学講座

Kimiyuki SAITO: Physicochemical and Immunological Properties of Serum Thyroglobulin from Sera of Healthy Individuals.

Department of Pediatrics, School of Medicine, Chiba University.

Received November 12, 1988. Accepted December 8, 1988.

ることにより、種々の実験動物に甲状腺炎が引き起こせる¹⁾という事実は、自己免疫応答において Tg が自己抗原として働くことを強く示唆している。しかし、Tg がどのようにして自己の免疫系に抗原性を持ち得るのか、換言すると、Tg 分子のどのような抗原構造が Tg に対する自己免疫応答において認識されているのかは、全く判明していない。

一方、Tg 分子の構造という面から考えると、血清 Tg は、Tg 分子の合成、ヨウ素化の初期段階で循環血中に漏出したとする報告²⁾がある。この報告が正しいとすれば、甲状腺ホルモンを持たない血清 Tg 分子とホルモンを持った組織 Tg 分子との間には、構造の差があることが推測される。そこでもし、甲状腺組織に存在するヨウ素化された Tg 分子が循環血中に漏出すれば、甲状腺ホルモンの合成によって引き起こされた Tg 分子の構造変化が、免疫系にとって未知の抗原決定基として認識される可能性がある。すなわち、血清 Tg 分子にはなくて、組織 Tg 分子に固有の構造に注目して考えれば、その構造は、免疫応答系にとって隔絶された抗原構造であると考えられる。

そこで、本研究においては、自己抗原としての血清 Tg の物理化学的性状を明らかにし、自己抗体に対する結合能を組織 Tg と比較することにより、Tg 分子に対する自己免疫応答の機序を抗原構造から解析した。

II. 実験方法

1. 精製 Tg

組織 Tg としては、バセドウ病患者より摘出された甲状腺のホモジナイズを124,800×g で1時間遠心して得られた上清（サイトゾール）のプールより Ui と Tarutani の方法に従い、硫酸アンモニウムによる塩析³⁾、陰イオン交換クロマトグラフィー⁴⁾、およびゲル濾過を順次行って精製した。（サイトゾールは、千葉大学薬学部の細谷東一郎教授より分与された。）

2. 対象

千葉大学小児科にて外来管理中の、診断がすでに確定している慢性甲状腺炎患者で、抗 Tg 抗体が陽性である12例の血清を自己抗体として用いた。

3. 抗体

アルカリホスファターゼ標識モノクローナル抗ヒト IgG 抗体は、和光純薬（大阪）より購入した。アルカリホスファターゼ標識ウサギ抗ヒト免疫グロブリン抗体は、Cappel 社（West Chester, PA, USA）より、またアルカリホスファターゼ標識ヤギ抗マウス IgG 抗体（ヒト免疫グロブリンに非交差）とアルカリホスファ

ターゼ標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体は、Sigma 社（St. Louis, MO, USA）よりそれぞれ購入した。

マウスおよびウサギの抗ヒト Tg 血清は、組織 Tg を Freund's complete adjuvant と共に動物に免疫して作製した⁵⁾。抗ヒト Tg 抗体を含むウサギの血清からの抗体の精製は、Tg アフィニティークラムを用いて行い、さらに Yagi ら⁶⁾の方法に準じて、陰イオン交換体である Q-Sepharose fast flow（Pharmacia, Uppsala, Sweden）カラムを通過させて IgG 分画を得た。

4. 正常人血清 Tg の部分精製

20人の甲状腺疾患のない健康人のプール血漿よりイオン交換クロマトグラフィー、塩析、コンカナバリン A（Con A）アフィニティークロマトグラフィー、ゲル濾過を順次行い Tg 分画を濃縮した。

イオン交換クロマトグラフィーは、DEAE-Toyo pearl（東洋曹達）を充填した10×12.5cm のカラムを pH 6.5、イオン強度（ μ ）0.1に調整した phosphate buffer（PB）で平衡化し、約500ml の血漿を重層した。カラムに吸着した蛋白質は、この PB に塩化ナトリウムを加えてイオン強度を1.0とした緩衝液で溶出した。溶出された蛋白質溶液には、最終濃度が1.8M となるように硫酸アンモニウムを加えて沈殿する分画を回収した。沈殿は、次の精製段階の緩衝液に対して十分に透析して硫酸アンモニウムを除去した。

Con A アフィニティークロマトグラフィーは、Tarutani ら⁷⁾によってすでに甲状腺組織抽出液から Tg を精製する方法として確立された方法に従って行った。すなわち、1 mM の塩化カルシウム、1 mM の塩化マグネシウム、0.15M の塩化ナトリウムを含む20mM トリス塩酸緩衝液（pH 7.0）で平衡化した10ml の Con A-Sepharose 4B（Pharmacia）にイオン交換カラムにて濃縮した血清 Tg 試料を加えて、吸着分画を0.5M の methyl- α -D-glucoside（MeG）を含んだ同じ緩衝液で溶出した。

ゲル濾過は、6%アガロース（BioGel A-5m）カラム（2.5×95cm）で PB（pH6.5, μ =0.1）を移動相として、20ml/hr の流速でクロマトグラフィーを行い、1 ml ごとのフラクション中の Tg 量を Radioimmunoassay（RIA）で測定した。回収されたピークより得られた血清 Tg 標品は、280nm の波長における吸光度で測定した総蛋白量1 mg あたり、約18ng の Tg を含んでいた。

5. 酵素免疫測定法（enzyme-linked immunosorbent assay：ELISA）

自己抗体の組織 Tg、および血清 Tg に対する結合

能は、マイクロプレートを用いた ELISA により測定した。96穴平底ポリスチレンプレート (Nunc, Roskilde, Denmark) にリン酸緩衝食塩水 (phosphate buffered saline: PBS) で調整した100 μ g/ml の組織 Tg, あるいは、総蛋白量で200 μ g/ml の血清 Tg 試料を各穴100 μ l 加え、4 $^{\circ}$ C で一晩インキュベートし、プレートに吸着させた。抗原を取り除いたあと、PBS で調整した5%ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin: BSA) (Sigma) を各穴あたり200 μ l 加えて、室温で2時間インキュベートし、余剰の結合部位を被覆した。0.05%の Tween-20を含む PBS (PBS-Tween) で洗浄後、1%BSA を含む PBS-Tween で適度に希釈した血清を各穴100 μ l 加え、室温で2時間反応させた。さらに、PBS-Tween で洗浄したあと、アルカリホスファターゼで標識した抗ヒト IgG 抗体、あるいはアルカリホスファターゼで標識した抗ウサギ IgG 抗体を加え、室温で2時間反応させた。最後に、PBS-Tween で洗浄後、アルカリホスファターゼの基質である *p*-nitrophenyl phosphate を加え、加水分解によって生ずる *p*-nitrophenolate の量を405nm の波長における吸光度によって測定した。吸光度の測定は、マイクロプレートリーダーMPT-100 (コロナ電子, 茨城) によって行った。

6. 抗原サンドイッチ法 ELISA

ELISA の基本的操作は、前項に述べたとおりである。抗原サンドイッチ法では、96穴平底ポリスチレンプレート (Nunc) に、まず、10 μ g/ml の精製したウサギの抗ヒト Tg 抗体を100 μ l 加え、4 $^{\circ}$ C で一晩、吸着させ、余剰の結合部位を5%BSA を含む PBS を加えて被覆した。プレートを PBS-Tween で洗浄後、PBS で10mg/ml に希釈した血清 Tg, または1 μ g/ml の組織 Tg を100 μ l ずつ加えて室温で2時間反応させた。さらに、PBS-Tween で洗浄して結合し得なかった蛋白質を取り除いたのちに、1%BSA を含む PBS-Tween で希釈した血清を各穴100 μ l ずつ加えて室温で2時間インキュベートすることにより、プレート上のウサギの抗ヒト Tg 抗体に結合した血清 Tg, および組織 Tg に、自己抗体、あるいはヘテロの抗体を反応させた。血清 Tg に結合した自己抗体の検出は洗浄後、前項に示した ELISA の方法と同様にアルカリホスファターゼ標識したウサギ抗ヒト免疫グロブリン抗体を用いて行った。また、マウスの抗ヒト Tg 抗体は、アルカリホスファターゼ標識したヤギ抗マウス IgG 抗体を用いて検出した。

7. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis: SDS-PAGE)

SDS-PAGE は、Laemmli¹⁰⁾ の方法に多少の改良を加えて行った。部分精製した血清 Tg, または組織 Tg を4~20%の濃度勾配を作った厚さ1.5mm のポリアクリルアミドゲル (12 $\times$ 13.5cm) にのせ非還元条件下で、40mA の定電流を約1時間通電して泳動した。泳動後は、直ちにウエスタンブロットの操作に移った。

8. ウエスタンブロットティング

SDS-ポリアクリルアミドゲル中の蛋白質のニトロセルロース膜 (Bio-Rad) への転写は、Towbin ら¹¹⁾ の方法を多少改変して行った。すなわち、SDS-ポリアクリルアミドゲルをニトロセルロース膜に密着させて25mM トリス塩酸、192mM グリシン、20%メタノールを含む溶液に浸し、10V、2時間通電することにより、電気的に蛋白質をゲルからニトロセルロース膜上に転写した。蛋白質の転写されたニトロセルロース膜の余剰の活性部位は、3%BSA によって被覆し、PBS-Tween で洗浄後、自己抗体、またはウサギ抗ヒト Tg 抗体を室温で1時間反応させた。ニトロセルロース膜上の抗原と結合した抗体の検出は、ベクタステイン ABC Kit (Vector Lab., Burlingame, CA, USA) を用いて行った。すなわち、まずビオチンを結合した抗ヒト免疫グロブリン抗体を血清 Tg に結合した自己抗体に反応させた。さらに、ペルオキシダーゼを標識したアビジン-ビオチン複合体をビオチン化抗ヒト免疫グロブリン抗体に反応させ、ニトロセルロース膜上の抗原と結合した抗体を間接的にペルオキシダーゼで標識した。自己抗体、またはウサギ抗ヒト Tg 抗体の結合した抗原のバンドは、ペルオキシダーゼの基質である4-chloro-1-naphthol のメタノール溶液 (3mg/ml) 2ml と PBS 10ml および30% H_2O_2 5 μ l の混合液を加えて発色させた。

9. イオン交換クロマトグラフィー

部分精製した血清 Tg の物理化学的性状を解析するために血清 Tg 標品の再クロマトグラフィーを行った。イオン交換クロマトグラフィーは、Mono Q HR5/5カラム (Pharmacia) を装着した高速液体クロマトグラフィー (high performance liquid chromatography: HPLC) を用いて行った。血清 Tg 試料を25mM のトリス塩酸緩衝液 (pH8.3) で平衡化した Mono Q カラムに吸着させた。その後、同じトリス塩酸緩衝液に塩化ナトリウムを加えてイオン強度を1.0とした溶液と塩化ナトリウムを加えていない緩衝液とを組合わせてイオン強度に関する勾配を作製し、カラムに吸着した蛋白質を1ml/min の速度で溶出させた。溶出した蛋白質の濃度を280nm の波長における吸光度で測定し、1ml 毎に分画した試料中に含まれる血清 Tg を、RIA で測定

した。

10. ゲル濾過

血清 Tg の分子サイズをより正確に推定するために Superose 6 HR10/30 カラム (Pharmacia) を装着した HPLC を用いてゲル濾過を行った。溶出液には 10mM PB (pH7.6) を用いて 1 ml/min の流速でクロマトグラフィーを行った。前項と同様に、溶出液の蛋白濃度を吸光度で、Tg 濃度を RIA で測定した。

III. 結 果

1. 正常ヒト血清 Tg の物理化学的性状

① ゲル濾過

正常ヒト血清 Tg の分子サイズの測定を分子篩の原理を応用したゲル濾過を行って決定した。HPLC カラムより溶出した血清 Tg 試料の各分画中の Tg 量を RIA で測定したところ、Fig. 1 に示したように組織 Tg の 19S に相当する領域にやや幅の広い主たるピークが認められた。また、溶出の初期に別の小さいピークが認められた。

② イオン交換クロマトグラフィー

さらに、血清 Tg の陰イオン交換体に対する親和性を検討するために Mono Q カラムを用いてイオン交換クロマトグラフィーを行った。Fig. 2 に示したように、血

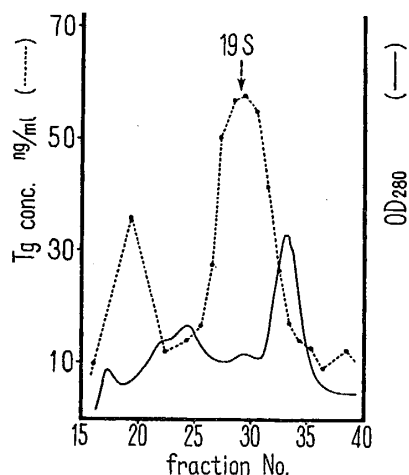


Fig. 1. 正常ヒト血清 Tg 標品の Superose 6 HR10/30 カラムによる HPLC。

クロマトグラフィーの条件は、実験方法の項に示した。

図の実線は、溶出された蛋白質の濃度を 280nm の波長における吸光度 (OD_{280}) で測定した結果を示し、破線は各分画中の Tg 濃度を組織 Tg を標準にして RIA で測定した結果を示す。

矢印は、組織 Tg を用いて別にクロマトグラフィーを行って決定した 19STg の溶出ピークを重ねて示した。

清 Tg は、イオン強度に関する勾配をつけた溶出条件下で比較的低イオン強度 ($\mu=0.3$ 付近) と高イオン強度 ($\mu=0.65$ 付近) に 2 つの溶出ピークを持つ広い分布の溶出形態をとった。

2. 血清 Tg と組織 Tg の抗原構造の比較

① 正常ヒト血清 Tg を用いたウエスタンブロット

血清 Tg 標品を非還元条件下の SDS-PAGE で展開後、ウサギ抗ヒト Tg 抗体と慢性甲状腺炎患者の自己抗体を用いてウエスタンブロットを行った。結果を Fig. 3 に示した。ウサギ抗ヒト Tg 抗体 (R) は、660kd 領域に最も濃いバンドを形成した。他に、300kd, 250kd 領域にも弱いバンドを形成した (右側カラム)。これに対して、自己抗体 (P) は、同じ希釈で対照として用いた組織 Tg にはよく反応したが、血清 Tg には全く結合せず、バンドを形成しなかった。

② ELISA による自己抗体の血清 Tg に対する結合能の検討

ウエスタンブロット法では、ニトロセルロース膜上に転写された血清 Tg と組織 Tg の抗原量の違いが考えられる。そこでさらに、この実験結果を確認するために ELISA によって血清 Tg に対する自己抗体の結合能を検討した。

200 μ g/ml に PBS で希釈した血清 Tg 標品をポリスチレンプレートに吸着させて ELISA を行った。Table 1 に示したようにウサギ抗ヒト Tg 抗体は、血清 Tg に対しては組織 Tg に対して示した結合能の約 50% の結合能を示した。これに対して、自己抗体の血清 Tg に

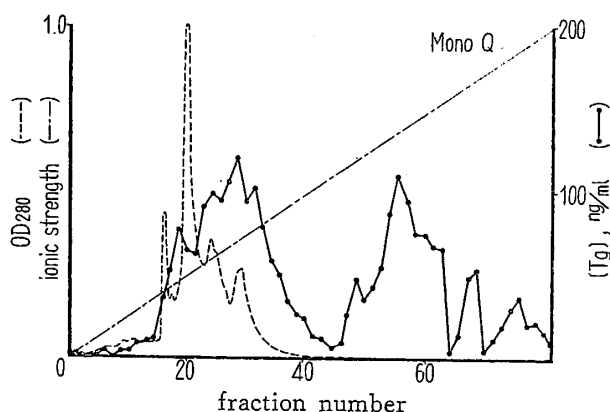


Fig. 2. 正常ヒト血清 Tg 標品の Mono Q HR5/5 カラムによる HPLC。

クロマトグラフィーの条件は、実験方法の項に示した。図の実線は、溶出された各分画中の Tg 濃度を RIA で測定した結果を示し、破線は、280 nm の波長で測定した吸光度 (OD_{280}) による蛋白濃度を示している。斜の破線は、溶出液のイオン強度を示している。

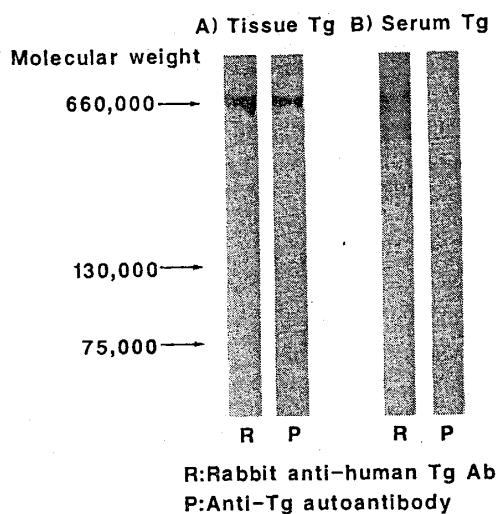


Fig. 3. 正常ヒト血清 Tg を抗原として用いたウエスタンブロット。

各レーンあたり、約100 μ g の蛋白量の血清 Tg 試料、あるいは3 μ g の組織 Tg を SDS-PAGE 後、ニトロセルロース膜上に転写した。

分子量マーカーには、組織 Tg と Bio-Rad 社の SDS-PAGE スタンダードを用い、転写後、アミドブラック B-10 で蛋白染色して同定した。

R は、ウサギ抗ヒト Tg 抗体により染色されたバンドを、P は、慢性甲状腺炎患者の血清自己抗体により染色されたバンドを示している。

対する結合能は、0.025と、組織 Tg との結合能に比べて微弱なものであった。しかし、この方法においても、血清 Tg 標品が完全に精製されていないため、血清 Tg を固相にする場合に混在する蛋白質の影響でプレート上に固定される抗原量が不均一になる可能性が残されている。そこで、プレートに固定される血清 Tg と組織 Tg の量的な差をなくす目的で抗原サンドイッチ法を用いた ELISA の系を確立して、改めて自己抗体と血清 Tg の結合能を組織 Tg と比較した。

③ 抗原サンドイッチ法 ELISA による自己抗体の血清 Tg に対する結合能の検討

A) ウサギ抗ヒト Tg 抗体の濃度が自己抗体、およびヘテロの抗体の結合におよぼす影響：抗原サンドイッチ法 ELISA において、はじめにプレートに固相化するウサギ抗ヒト Tg 抗体の濃度を0.1 μ g/ml から50 μ g/ml まで変化させることによりプレート上に固定される Tg 量を変化させて、自己抗体、およびヘテロの抗体の結合能を検討した。Fig. 4に示したように自己抗体の結合能も、ヘテロの抗体の結合能もウサギ抗ヒト Tg 抗体を1 μ g/ml 以上の濃度で用いた場合にプラトーに達した。

Table 1. 自己抗体の血清 Tg に対する結合能

抗 Tg 自己抗体	ウサギ抗ヒト Tg 抗体
P1 0.015	
P2 0.028	
P3 0.035	
P4 0.020	0.49
P5 0.026	
P6 0.026	
平均 $\pm$ SE	0.025 $\pm$ 0.007

血清 Tg 標品を 200 μ l/ml に希釈し、ポリスチレンプレートに固相化し、ELISA にて抗体の結合能を測定した。組織 Tg は、実験方法に示したように100 μ l/ml の濃度で使用した。

数値は、各抗体の組織 Tg に対する結合能を1とした時に血清 Tg に対する結合能の値を示した。

6人の患者由来の自己抗体と対照としてウサギの抗ヒト Tg 抗体を使用した。

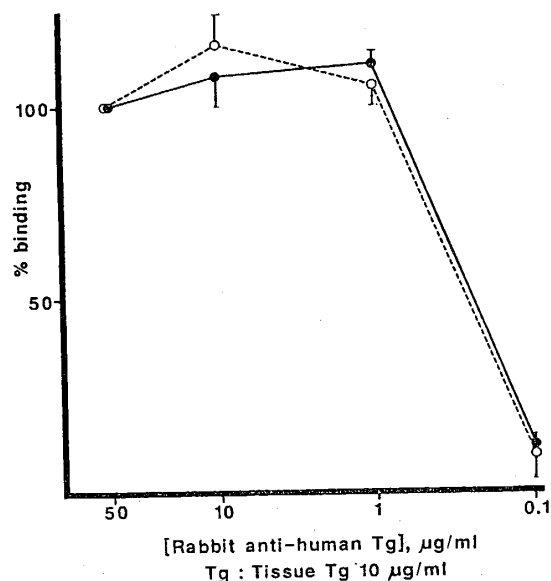


Fig. 4. 固相化するウサギ抗ヒト Tg 抗体の濃度を変化させた時の自己抗体およびヘテロの抗体の結合能の変化。

ウサギ抗ヒト Tg 抗体の濃度は、280nm の波長における吸光度によって測定した。ウサギ抗ヒト Tg 抗体によってプレートに固定する Tg は、組織 Tg を10 μ g/ml として用いた。自己抗体 (●) は、3名の慢性甲状腺炎患者の血清を、またヘテロの抗体 (○) は、Tg を免疫した3匹のマウスの血清を用いた。抗体の結合能 (平均 $\pm$ SE) は、ウサギ抗ヒト Tg 抗体を50 μ g/ml の濃度で用いた時の自己抗体、およびヘテロの抗体の結合能をそれぞれ100として%で示した。

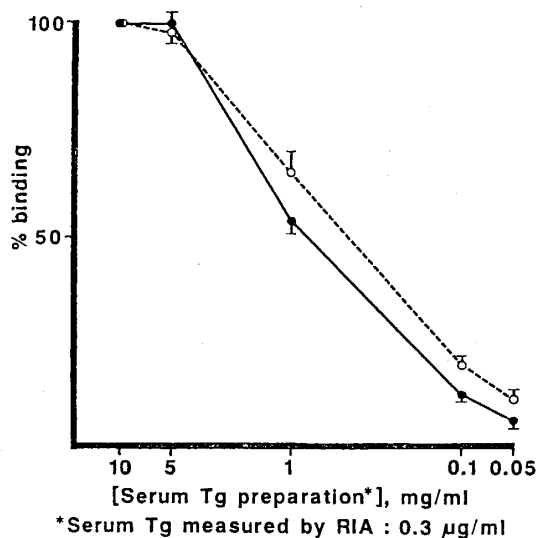


Fig. 5. 血清 Tg 試料の濃度を变化させた時の自己抗体およびヘテロの抗体の結合能の変化。

血清 Tg 試料の濃度は、280nm の波長における吸光度によって測定した。ウサギ抗ヒト Tg 抗体は、10 μ g/ml の濃度で用いた。自己抗体 (●) は、7 名の慢性甲状腺炎患者の血清を、またヘテロの抗体 (○) は、Tg を免疫した 9 匹のマウスの血清を用いた。抗体の結合能 (平均 $\pm$ SE) は、血清 Tg 試料を 10mg/ml の濃度で用いた時の自己抗体、およびヘテロの抗体の結合能をそれぞれ 100 として、それぞれの濃度における結合能を % で示した。

また、1 μ g/ml 以下では、いずれの抗体の結合能も急速に低下することが判明した。これより、はじめに固相化するウサギ抗ヒト Tg 抗体の濃度は、安定した結合が観察される 10 μ g/ml とした。

B) 血清 Tg 濃度が自己抗体およびヘテロの抗体の結合能におよぼす影響：血清 Tg 試料の蛋白濃度を 0.05 mg/ml から 10mg/ml まで変化させて、自己抗体およびヘテロの抗体の結合能の変化を検討した。Fig. 5 に示したように自己抗体の結合能も、ヘテロの抗体の結合能も血清 Tg 試料の濃度を 5 mg/ml 以上にして用いた場合に、いずれの抗体の結合もプラトーに達することが判明した。また、5 mg/ml 以下の濃度では、いずれの抗体の結合能も低下することから、血清 Tg 試料の濃度は、安定した結合能が観察される 10mg/ml とした。

C) 自己抗体とヘテロの抗体の血清 Tg および組織 Tg に対する結合能の比較：Table 2 に示したように、M1~M11 で示したマウス抗ヒト Tg 抗体の血清 Tg に対する結合能は、組織 Tg に対する結合能の 1.24 倍とほぼ同等であった。一方、同じ条件で、P1~P10 で示した自己抗体の血清 Tg に対する結合能は、組織 Tg に対

Table 2. 自己抗体の血清 Tg に対する結合能

A) マウス抗ヒト Tg 抗体		B) 自己抗体	
M1	1.23	P1	0.58
M2	1.46	P2	0.80
M3	0.99	P3	0.81
M4	1.12	P4	0.76
M5	1.02	P5	0.59
M6	1.37	P6	0.53
M7	1.38	P7	0.75
M8	1.89	P8	0.89
M9	1.05	P9	0.61
M10	1.20	P10	0.94
M11	0.93		
Mean $\pm$ SE	1.24 $\pm$ 0.08		0.73 $\pm$ 0.04

抗原サンドイッチ法 ELISA による 10 人の慢性甲状腺炎患者の自己抗体 (P1~P10) と血清 Tg の結合能を組織 Tg を対照として検討した。ヘテロの抗体としては、Tg を免疫したマウスの抗ヒト Tg 抗体 (M1~M11) を用いた。

数値は、各抗体の組織 Tg に対する結合能を 1 としたときの血清 Tg に対する結合能の値を比として示した。

自己抗体とヘテロの抗 Tg 抗体の血清 Tg と組織 Tg に対する結合能の比には、t 検定で有意差 ($p < 0.001$) を認めた。

する結合能の 0.73 倍とヘテロの抗体に比べて有意に低いものであった ($p < 0.001$)。

IV. 考 察

今回の研究においては、血清 Tg の物理化学的性状、および抗原構造を明らかにするために健康人血漿より、血清 Tg の精製を行った。

はじめに、血清 Tg の物理化学的性状について、イオン交換クロマトグラフィーにより血清 Tg のヨウ素含量について検討した。すでに、陰イオン交換クロマトグラフィーでは、組織 Tg による検討で、ヨウ素含量の低い Tg は、低イオン強度の溶媒で、またヨウ素含量の高い Tg は、高イオン強度の溶媒で溶出されることが知られている⁶⁾。このことから考えると、今回得られた血清 Tg は、ヨウ素含量に関して不均一で、低ヨウ素含量と高ヨウ素含量の少なくとも 2 つの分画が存在するものと考えられた。さらに、血清 Tg の分子サイズについて、ゲル濾過 (Fig. 1) およびウエスタンブロット (Fig. 3) によって検討した結果、そのどちらからも血清 Tg の分子量は、19S 組織 Tg に一致した 660 kd であると考えられた。これに対して、Schneider らは、密度勾配遠心法によって異なった 2 名の健康人血清

Tg について分析した結果、血清 Tg のヨウ素含量は、組織 Tg に比べ極めて低いことから、血清 Tg は、Tg 分子の合成からヨウ素化に至る過程のごく初期に Tg 分子がヨウ素化されずに、循環血中に漏出したものであると推測している⁴⁾。組織 Tg に関しては、個体間ではもちろんのこと、同じ甲状腺内においてもヨウ素含量について不均一であることが知られている¹²⁾。したがって、今回ここで用いた精製材料がプール血漿であったことから組織 Tg におけるこのような不均一性が血清 Tg に反映されたのかもしれない。今回の血清 Tg の精製段階においても、血清 Tg は、Con A に対して親和性を持っており、血清 Tg 分子にも組織 Tg 分子と類似の糖鎖構造が存在するものと考えられる。つまり、正常ヒト血清 Tg は、Tg 分子の成熟過程の特定の時点で、循環血液中に漏出するのではなく、あらゆる時点で血清中に漏出することも考えられる。

次に、血清 Tg の自己抗体との結合については、ウエスタンブロット法および直接法の ELISA では、ヘテロの抗体が結合し得た条件でも自己抗体の明らかな結合が観察されなかった。しかし、前述のようにこれらの方法においては抗原量の差をも含めて観察している可能性があるために、抗原サンドイッチ法 ELISA による検討を加えた。Fig. 4, 5より明かなように、この方法で一定の条件を選択すれば、プレート上に固定される Tg の量は、一定にすることが可能である。この条件下で、対照として用いたヘテロの抗体の血清 Tg と組織 Tg に対する結合能がそれぞれプラトーに達し、かつ、ほぼ一致していることを確かめ、自己抗体の血清 Tg に対する結合能を検討した。Table 2に示したようにこのような条件下でも自己抗体の血清 Tg に対する結合能は、ヘテロの抗体の結合能に比べて有意に低いものであった。抗原サンドイッチ法では初めにプレートに吸着させた抗体によって特定のエピトープが占拠され、特に認識するエピトープの限られた自己抗体との間で競合的阻害効果が強くでることは否定できない。しかしながら、ウエスタンブロットおよび直接法の ELISA においてヘテロの抗体が結合し得た量の Tg に自己抗体が結合しなかったことを併せて考えると、やはり自己抗体は、血清 Tg よりも組織 Tg に強い親和性を持つものと考えられる。すでに、私たちは、自己抗体によって認識される Tg の抗原構造は、Tg 分子の高次構造が主体となっていることを報告した¹³⁾。すなわち、自己免疫応答によって認識される抗原決定基の構造に関して血清 Tg と組織 Tg は、異なった高次構造をとっていることが強く示唆された。

今後、自己免疫応答によって認識される Tg の抗原決定基の構造が明らかにされることによって、慢性甲状腺炎の発症機序が解明されるばかりではなく、人為的な免疫応答の制御を通じて、こうした疾患の治療の可能性も開かれるものと考えられる。

V. 結 論

1) 今回の検討では、甲状腺組織の Tg と健康人血漿から精製した Tg の物理化学的性状には差が認められなかった。

2) 組織 Tg と血清 Tg の間には、物理化学的性状の差を認めなかったにもかかわらず、自己抗体は、組織 Tg に強い親和性を示したことから、組織 Tg と血清 Tg の間には自己抗体によって認識される Tg 抗原決定基の構造について違いがあると考えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました中島博徳教授に心より感謝申し上げます。また、御指導をいただきました河野陽一講師に深く謝意を表するとともに、技術的な御助言をいただきました群馬大学内分泌研究所の樽谷 修講師（現東京理科大学基礎工学部助教授）、千葉大学薬学部薬効安全性学講座の細谷東一郎教授、鈴木徳和博士、檜山義雄氏、内藤直和氏、群馬大学第二外科学教室の石北敏一先生、ならびに免疫生物研究所の竹内より子氏に感謝いたします。また、本研究を遂行する間、常に適切な御助言を下さいました当小児科学教室の佐々木 望非常勤講師はじめ、下条直樹博士、星岡 明先生、勝木利行先生、および教室員各位に感謝いたします。

なお、本論文は、学位審査論文である。

SUMMARY

In order to clarify the physicochemical properties and antigenic structure of serum thyroglobulin(Tg), serum Tg was partially purified from pooled human plasma of healthy individuals by sequential anion-exchange chromatography, concanavalin A affinity chromatography and gel filtration. Physicochemical properties of serum Tg were compared with those of Tg from thyroid tissues (tissue Tg) by the following methods: (a) in serum Tg preparations fractionated by gel filtration, serum Tg, measured on each fraction by radioimmunoassay, appeared in a single peak corresponding to 19S tissue Tg; (b) chromatographic diagram of serum Tg on Mono-Q column showed that serum Tg was eluted in wide-range ionic strengths, suggesting that serum Tg,

as well as tissue Tg, was heterogeneous in iodine contents. Based on these observations, the physicochemical properties of serum Tg may be similar to those of tissue Tg.

The use of ELISA revealed that mouse anti-human Tg antibodies bound equally well to serum Tg and tissue Tg. In contrast, the binding activities of anti-Tg autoantibodies from patients with chronic thyroiditis to serum Tg were much less than those to tissue Tg. In addition, Western-blotting experiments showed that the protein corresponding to 19S tissue Tg (660kd) was not stained by autoantibodies, whereas this protein band was stained by rabbit anti-human Tg antibodies. These data suggest that antigenic structures of serum Tg recognized by autoantibodies differ from those of tissue Tg.

文 献

- 1) Weetman AP and McGregor AM: Auto-immune thyroid disease: Developments in our understanding. *Endocr Rev* 5: 309-355, 1984.
- 2) Rose NR and Witebsky E: Studies on organ specificity V. Changes in the thyroid glands of rabbits following active immunization with rabbit thyroid extracts. *J Immunol* 76: 417-427, 1956.
- 3) Torrigiani G, Doniach D, and Roitt IM: Serum thyroglobulin levels in healthy subjects and in patients with thyroid disease. *J Clin Endocrinol Metab* 29: 305-314, 1969.
- 4) Schneider AB, Ikekubo K and Kuma K: Iodine contents of serum thyroglobulin in normal individuals and patients with thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 57: 1251-1256, 1983.
- 5) Ui N and Tarutani O: Purification of hog thyroglobulin. *J Biochem* 50: 508-518, 1961.
- 6) Ui N, Tarutani O, Kondo Y and Tamura H: Chromatographic fraction of hog thyroglobulin. *Nature* 191: 1199-1201, 1961.
- 7) Kohno Y, Tarutani O, Sakata S and Nakajima H: Monoclonal antibodies to thyroglobulin elucidate differences in protein structure of thyroglobulin in healthy individuals and those with papillary adenocarcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 61: 343-350, 1985.
- 8) Yagi Y, Maier P and Pressman D: Two different anti-insulin antibodies in guinea pig antisera. *J Immunol* 89: 442-451, 1962.
- 9) Tarutani O and Ui N: Properties of thyroglobulin from normal thyroid and thyroid tumor on a concanavalin A-Sepharose column. *J Biochem* 98: 851-857, 1985.
- 10) Laemmli UK: Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685, 1970.
- 11) Towbin H, Staehelin T and Gordon J: Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 4350-4354, 1979.
- 12) Ui N: Synthesis and chemistry of iodoproteins. In: *Handbook of Physiology*, Greer MA and Solom DH, ed., sect 7, vol 3, pp. 55-79, American Physiological Society, Washington DC, 1974.
- 13) Shimojo N, Saito K, Kohno Y, Sasaki N, Tarutani O and Nakajima H: Antigenic determinants on thyroglobulin: Comparison of the reactivities of different thyroglobulin preparations with serum antibodies and T cells of patients with chronic thyroiditis. *J Clin Endocrinol Metab* 66: 689-695, 1988.