

氏 名 (本籍) ^{たか}高 ^や屋 ^{きよし}潔

学 位 の 種 類 医 学 博 士

学 位 記 番 号 医 第 1 7 1 7 号

学 位 授 与 年 月 日 昭 和 6 0 年 9 月 1 1 日

学 位 授 与 の 要 件 学 位 規 則 第 5 条 第 2 項 該 当

最 終 学 歴 昭 和 5 1 年 3 月
東 北 大 学 医 学 部 医 学 科 卒 業

学 位 論 文 題 目 Flow cytometry による receptor-binding TSH
(Thyroid Stimulating Hormone) assay 法 の 研 究
— 各 種 ヒ ト 甲 状 腺 腫 瘍 に よ る 検 討

(主 査)

論 文 審 査 委 員 教 授 葛 西 森 夫 教 授 笹 野 伸 昭

教 授 吉 永 馨

論 文 内 容 要 旨

甲状腺の良性腫瘍や乳頭癌、濾胞癌では腫瘍細胞の膜表面にTSH receptor assay法やAdenylate cyclase 活性化法により receptor assay がなされてきた。今日Cell Biologyの分野で広く用いられている方法であるFlow cytometryを応用して、receptor siteに結合しているTSHをassayすることにより間接的にreceptorをassayする試みを行ない、今後の細胞表面形質の研究に有用であると考えられたので報告する。

材料はヒト甲状腺腫瘍を用いた。内訳は腺腫様甲状腺腫1例、乳頭癌5例、濾胞癌2例、髄様癌1例、悪性リンパ腫2例、未分化癌1例、Graves'氏病3例の計15例である。

細胞の処理は間接蛍光抗体法を用い、1次抗体はAnti-human TSH (Rabbit で作成)、2次抗体はFITC結合Anti-Rabbit IgG (Goat で作成)を使用した。こうして得られた蛍光を特異蛍光と呼ぶことにした。こうした処理によりreceptor siteに結合しているTSHに蛍光色素FITCが結合することになる。FITCが細胞の膜表面部に結合している事はレーザー蛍光顕微鏡による測定により確認できた。測定は昭和電工社製のCS-20 Flow cytometerを使用し、測定の内容は一定とした。蛍光色素FITCには蛋白と非特異的に結合する性質があるため、間接蛍光抗体法で処理した細胞の蛍光が特異的なものか否かが問題となる。そこで蛍光の特異性の検定を行なうために、濾胞癌及び腺腫様甲状腺腫の細胞を用いて蛍光の競合阻害実験を行なった。すなわち2次抗体の競合剤としてAnti-Rabbit IgGを2次抗体と一緒に加えて反応させた結果、蛍光の阻害が認められた。また1次抗体処理を省き2次抗体処理のみを行なった試料(以下Auto-fluorescenceと呼ぶ)を作り測定した結果、このAutofluorescenceと高濃度の競合剤による競合阻害実験結果が一致することを見出した。以上の結果よりAutofluorescenceをFITCの非特異的結合による蛍光の指標として用いることが可能となり、receptor-binding TSHに特異的な蛍光の有無はこのAutofluorescenceとの比較によって検討することが可能となった。乳頭癌5症例及び濾胞癌2症例の全例で有意な蛍光が認められ、receptor-binding TSHの存在すなわちTSH receptorの存在が示唆された。中でも気管浸潤のある乳頭癌症例や両側肺転移及び気管浸潤のある濾胞癌症例でもreceptorの存在が示唆されたのは興味深い。髄様癌症例ではごくわずかに有意な蛍光が認められた。甲状腺原発の悪性リンパ腫と小細胞癌は病理学的鑑別診断が非常に困難とされているが、悪性リンパ腫2例では有意な蛍光が全く認められなかったのに対して、小細胞癌症例では有意な蛍光を認めTSH receptorの存在が認められたことは両者の鑑別診断における本法の有用性を示唆するものとして興味深い。Graves'氏病の3例では、2例で有意な蛍光が認められたのに対して1例では全く認められなかった。こうした結果は本疾患の

病因と考えられている抗 TSH receptor 抗体の存在によるものとも考えることもできるが、更に詳細な検討が必要であろう。また Graves 氏病の濾胞細胞を予め TSH 10 mU/ml という高濃度下で incubation した後に前述の処理を行なった結果では、receptor に結合する TSH 量の増加が認められた。この結果の解釈については① TSH receptor に結合していた抗 receptor 抗体が高濃度 TSH 下での incubation により TSH と置換された。又は② no-binding の状態にあった receptor が高濃度 TSH 下での incubation により TSH binding 状態となった。以上の 2 つの可能性が考えられる。こうした実験結果も本法の特異性を示す事実と考えられる。また乳頭癌の 1 症例でも TSH 10 mU/ml の前処理により、receptor-binding TSH 量の増加が認められた。

Flow cytometry の特徴は細胞 1 個あたりの蛍光量を迅速かつ客観的に定量化できる点にあり、本法で測定した receptor-binding TSH 量について定量化する試みを行なった。一定細胞数について、特異蛍光の総蛍光量 / Autofluorescence の総蛍光量、という比を設定した。ここで Autofluorescence は膜表面部に非特異的に結合した FITC の細胞 1 個あたりの総蛍光量を表わしており、その細胞の表面積の 1 つの表現型と考えることができる。従ってこの比は同一の細胞に限れば、細胞の単位表面積あたりの receptor-binding TSH 量を表現している。と考えることができよう。一方異なる細胞についてこの比を比較するのは現段階では問題があり、更に詳細な検討を要すると考えられる。

以上本 assay 法の特徴を要約すると①操作が容易でかつ短時間で行なえる。② Flow cytometry は細胞 1 個ずつの測定のため、従来の方法では得られなかった細胞 1 個ずつが持っている TSH receptor に関する情報の解析が可能である。③従来の方法では測定できなかった in vivo で receptor site に結合している TSH 量を細胞単位で測定できる。

審 査 結 果 の 要 旨

本研究は各種ヒト甲状腺腫瘍細胞の膜表面にあるTSH receptor に結合しているTSHに、間接蛍光抗体法を用いて蛍光色素FITCを結合させ、Flow cytometry によるその蛍光量を測定する方法を開発したものである。本法によれば細胞各1個あたりの receptor-binding TSH量を測定するもので、従来の方法では得られなかった情報である。本法で得られた蛍光の特異性が問題となるが、この点については蛍光の競合阻害実験により特異性を証明し、また2次抗体処理のみを行なった試料の蛍光量がFITCの非特異的結合による蛍光量を反映することも競合阻害実験の結果より確認している。また乳頭癌細胞やGraves'氏病の濾胞細胞をTSHで incubation することにより receptor binding TSH量が増加することも認めている。従来病理学的鑑別診断が困難とされてきた甲状腺原発の悪性リンパ腫と甲状腺小細胞癌について、本法で receptor-binding TSH量が両者間に明確な差を認めたことは両疾患の鑑別診断上の有用性と考えられる。また本法により、receptor binding TSHを assay することで、間接的にTSH receptor を assay することも可能となる。

従来のTSH receptor assay では細胞をホモジュネートして膜分画を抽出して assay を行なっていたが、本法ではFlow cytometry の特徴でもある single cell 単位の測定を行なうもので、得られた結果は細胞1個ずつのデータの集積であり、この点も従来の方法とは大きく異なる点である。更に従来の方法ではRadioisotope を使用しているが、本法ではRadioisotope は全く使用せず操作が容易であり、しかも測定は細胞 200~1000個/秒といった迅速さで行なわれる。

本法は甲状腺腫瘍におけるTSH receptor assay や、TSH receptor に対する自己抗体が病因と考えられているGraves'氏病の研究等に有用な手法であるほかに、本研究の手法は他の細胞表面形質計測にも応用が可能であり、細胞研究に新しき面を拓いたものとして評価できる。よって学位授与に値するものと認める。