

正常ヒト甲状腺の免疫化学的解析

—特に thyroid albumin について—

川崎医科大学 解剖学教室

(指導: 池田 章教授)

川 野 亮

(昭和60年2月18日受付)

Immunochemical Analyses of Normal Human

Thyroid Gland

—Thyroid Albumin—

Ryo Kawano

Department of Anatomy, Kawasaki Medical School

(Accepted on February 18, 1985)

正常ヒト甲状腺中のヨード蛋白を、等電点分画と免疫化学的、免疫組織化学的、物理化学的手技を用いて分析した。その結果、次のような結論を得た。

1) 甲状腺中の albumin 様蛋白の等電点 (pI) 値は 4.80 から 5.21 であった。この値は serum albumin (SA) の 4.85 から 6.16 と比べ異なっていた。また甲状腺可溶性分画中の T_3 の等電点は albumin 様蛋白と一致した。

2) 免疫拡散実験の結果、 T_3 と albumin 様蛋白は結合しているという知見を得、いわゆる thyroid albumin (TA) と呼ばれているものであると判明した。

3) これら両 albumin のアミノ酸分析を行い、明らかな差を認めた。

4) free の T_3 の pI 値については、直接測定は困難なので RIA を用いて算出したところ、約 5.32 であり TA のそれとは異なっていた。

5) thyroglobulin (TG) は現在までいわれている pI 値約 4.5 より幅広い等電点値をとる事がわかった (pI 4.40 から 5.82)。

6) 免疫組織化学的分析では TA, T_3 , TG は甲状腺濾胞上皮に局限しており、コロイドには陰性であった。

The iodinated proteins in normal human thyroid tissue extracts were analyzed by immunochemical, immunohistochemical and physicochemical techniques after isoelectric focusing.

An albumin-like protein ranging in isoelectric point (pI) from 4.80 to 5.21 was found in the extracts. Its pI range was not compatible with that of serum albumin which ranges from pI 4.85 to 6.16. Amino-acid analysis revealed a

difference in the basic amino-acid composition between thyroid albumin and serum albumin. This albumin-like protein was shown to be combined with T_3 in an immunodiffusion study. Immunohistochemically, it was found in the thyroid follicular cells, but not in the colloid. These findings suggest that the albumin-like protein is the so-called thyroid albumin. It seems that low molecular weight hormones like T_3 can be detected when they combine with a protein molecule such as albumin. Thyroglobulin was isofocused in a wider pl region (4.40—5.82) than that previously reported which was located at approximately pl 4.5.

Based on these results, thyroid albumin consists of T_3 and an albumin-like protein which is immunochemically distinguishable from serum albumin and thyroglobulin.

Recently, DeGroot et al. suggested a collateral pathway of hormone metabolism through thyroid albumin in thyroid follicular cells. The present results support the existence of that pathway.

Key Words ① Thyroid albumin ② T_3 ③ Isoelectric focusing

I 緒 言

thyroid albumin (TA) はヨード化された albumin 様蛋白と考えられており、正常や病的状態のヒトあるいは動物の甲状腺から分離されている。この thyroglobulin (TG) と区別可能な TA は正常なヒトあるいは動物の甲状腺中可溶性ヨード蛋白の2~13%を占めるといわれているが、病的状態になると、この割合は増加するともいわれている。^{1)-4), 20)} 家族性の TG 合成障害に伴う甲状腺機能低下症の一部の症例では、甲状腺内に TG にかわってヨード蛋白として TA が検出され、血中にはある程度の甲状腺ホルモンが検出されるという報告がある。^{2), 5)-9), 21)} この事実は TA が甲状腺内でホルモンの代謝に何等かの重要な役割を果たしている事を考えさせる。

TA の性状に関しては、免疫化学的にも電気泳動や超遠心分離を用いても serum albumin (SA) との区別は困難とされている。^{1), 7), 10)-16)} しかし、一部の物理化学的性状やヨード化の過程は明らかにされておらず、SA 由来かどうかは議論の余地のあるところである。

免疫組織化学的分析により T_3 と TA が濾胞

上皮内に局限して認められ、濾胞内のコロイドには見られない事、また、免疫化学的分析結果より TA は free となった T_3 と albumin 様蛋白が結合したものであることはすでに報告した。¹⁷⁾ 今回の分析では正常ヒト甲状腺の TA を分離、その性状、SA との相違点を求める事を試みた。

II 材料および方法

実験の概要は **Figure 1** に示した。

1. 材 料

正常甲状腺組織は甲状腺腺腫症例の正常部、喉頭癌、上皮小体機能亢進症の各々1例、3例の非甲状腺疾患剖検例より得た。これらの症例は総て甲状腺機能が正常である事を確認した。

対照として正常ヒト血清を使用した。

2. 分 離

a. 試料の調整

得られた甲状腺が正常組織である事を確認するために切除された試料を実体顕微鏡下にて観察した。その試料 3g に倍量の生理的食塩水を加えハサミで細かく刻み、polytron homogenizer (PT-10ST) にてホモジナイズし (30

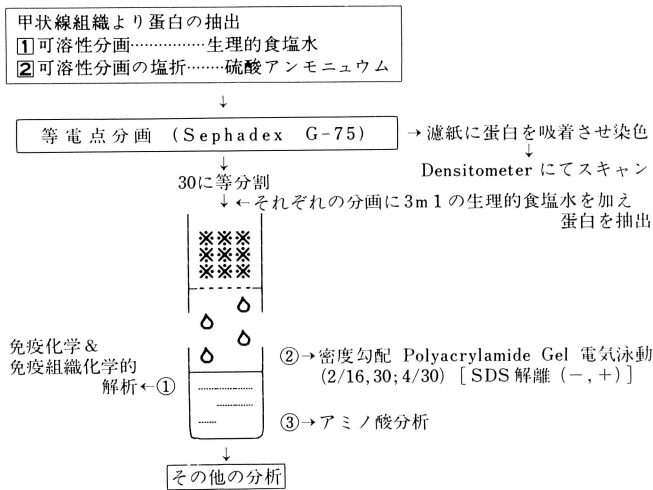


Fig. 1. THE PROCEDURE OF THE STUDY

sec.×3), 遠心分離後 (10,000 g. 20 min. 4°C), 上澄を等電点分画と免疫化学的分析に用いた (Fig. 1-①).

塩析による試料は 1.4 M と 1.8 M の硫酸アンモニウムを用いて調整した. 1.4 M 以下, 1.4 M から 1.8 M, 1.8 M 以上で生じたそれぞれの沈澱を透析し, 凍結乾燥した (Fig. 1-②).

b. 等電点分画

試料を refractometer にて 6% の蛋白濃度に調整し, flat-bed 等電点分画を 2.5 g の顆粒状の Sephadex G-75 superfine gel (Pharmacia) を用いて行った. 手技は LKB application note 198³⁰⁾ に示されたものに多少の改良を加えた. 試料を 3 ml, carrier Ampholine (pH 3.5—10, LKB) を 2.5 ml 使用し, 8 W 定電力 (1,500 volt maximum, 20 mA maximum, 2103 Power Suply, LKB) 10°C の条件で 16 時間泳動を行った.

泳動後, gel を pH にそって 30 に等分割し, それぞれより 3 ml 生理的食塩水で蛋白を抽出し, その蛋白の免疫化学的, 物理化学的分析を行った. 等電点分画の染色像は, gel の上に濾紙をのせ, それを 10% TCA にて固定し, メタノール: H₂O: 酢酸が 50: 50: 10 の溶液に溶解した 0.2% Coomassie brilliant blue R-250 を

用い染色した. また, 染色後の濾紙の写真撮影を行い, そのポジフィルムを densitometer を用いスキャンし, 客観的なデータを得た.

SA との比較のために正常ヒト血清を同様に 6% に調整し, 同様に等電点分画を行った.

TA と SA の分離は, 免疫化学的分析にもとづきそれらの含まれる分画を E-C Apparatus gel electrophoresis system (E-C 474, E-C Apparatus corp.) にて電気泳動後 (200 V, 80 mA, 2 hrs. 5% polyacrylamide gel) TA お

よび SA の正確な位置を確認し, それぞれを切り離し, Celluter elution recovery device (E-C Apparatus corp.) (100 V, 40 mA, 6 hrs.) を用いて行い, 48 時間蒸留水にて透析の後, 凍結乾燥し, 重量の測定を行った.

3. 分 析

a. 免疫化学的分析 (Fig. 1-①)

甲状腺可溶性分画を等電点分画したのち各分画より抽出した蛋白を抗原として, anti-total human thyroid rabbit serum (A. HT(T)), anti-T₃ rabbit serum (A. T₃) との免疫拡散実験を試みた. 反応は Tris-EDTA-bolic acid 緩衝液 (89 mM-Tris, 2.5 mM-EDTA, 89 mM-bolic acid) に溶解した 1.5% agar (Special Agar Noble, Difco) 5 cc をスライドグラス (3×12.5 cm) 上に水平に固め, 中央に幅 1 mm の溝を抗体のために作り, それより 4 mm 離して両方に 17 個ずつ計 34 個の直径 3 mm の穴をあけ抗原 7 μl を入れる方法により行った. なお, 上下両端の 4 個の穴には対照として正常ヒト甲状腺可溶性分画を配した.

甲状腺可溶性分画, およびその分画から活性炭 (Norit A, Sigma) により甲状腺ホルモンを除去した 2 種類の抗原と A. HT(T), anti-human albumin rabbit serum (A. HSA), anti-human serum rabbit serum (A. HS), A. T₃ の免疫

拡散実験を micro Ouchterlony 法を用いて上記と同様の agar で行った。4°C で12時間反応後、冷生理的食塩水で数回洗浄し、更に蒸溜水で洗浄し、写真撮影を行い、乾燥後、azocarmine G にて染色し、観察した。

b. 免疫組織化学的分析 (Fig. 1-①)

2 mm × 2 mm にトリミングした標本は、Buoin's fixing solution を用いて室温で2時間固定後、パラフィンに包埋し、5 μm の切片とした。脱パラフィン後、以下の酵素抗体法を用いて 19-S TG, TA, T₃ の染色を試みた。

- 1) A. TG, A. HSA, A. T₃ を phosphate saline buffer (PBS) を用いて適当な濃度に希釈し20分間反応 (moist chamber 内)
- 2) anti-rabbit IgG goat serum を PBS で5倍に希釈し20分間反応 (moist chamber 内)
- 3) anti-horseradish peroxidase rabbit serum (horseradish peroxidase (Sigma) を Freund's complete adjuvant (Difco Lab., Detroit, Mich.) と共に家兎に免疫し作成) を PBS で5倍に希釈し20分間反応 (moist chamber 内)
- 4) 0.1% bovine albumin を含む horseradish peroxidase (type II, Sigma, 0.5 mg/100 ml PBS) と20分間反応
- 5) 20 mg の 3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Nakarai Chemicals, LTD) を 0.05M Tris-HCl pH 7.6 100 ml に溶解し20分間反応
- 6) 上記の溶液に H₂O₂ を0.005% となるように加え、1~5分間反応

切片はそれぞれの過程が終るごとに PBS で15分間、3回洗浄した。すべての反応は室温で行った。

対照として、他臓器、すなわち肝臓、腎臓、筋肉にも同様の反応を行った。また、それぞれの抗血清を正常家兎血清、免疫前家兎血清、生理的食塩水、特異蛋白で吸着後の抗血清に置換する反応も行い、それぞれの抗原に対する抗体の特異性を確認した。

A. HT (T) はヒト甲状腺可溶性分画と

Freund's complete adjuvant を同量混合し家兎の皮下に免疫して作成した。A. TG は Bio-gel A-5 m column chromatography より得た 19S TG を用いて、同様にして得た。A. T₃ は川崎医科大学内分泌内科堀野正治教授の作成したものを使用した。A. HSA および A. HS は医学生物学研究所 (MBL) の製品を使用した。

c. 物理化学的分析 (Fig. 1-②, ③)

等電点分画後に抽出したそれぞれの分画中の蛋白の分子量測定のために、SDS 解離を行わない試料で行った試料について2~30%の密度勾配 polyacrylamide gel 電気泳動(2/30-PAA · PAGE) と、4~30%の密度勾配 polyacrylamide gel 電気泳動(4/30-PAA · SDS-PAGE) を行った。

分離した TA および SA は、6N HCl により窒素存在下で 110°C 22時間加水分解した後、アミノ酸自動分析機 (JLC-100, JOED) にてアミノ酸分析を行った。また、正確を期するため42時間加水分解を行った試料についても同様の分析を行った。

III 結 果

Figure 2 に正常ヒト甲状腺の可溶性分画を用いた時の典型的な flat-bed 等電点分画の染色像を示した。pH は fraction (fr.) 2から29, 等電点 (pI) 値にすると2.98から9.68までほぼ直線状の変化を示している (**Fig. 3**)。fr. 4から13, pI 4.28から5.82と fr. 19から21, pI 7.01から7.50に、正常ヒト甲状腺の可溶性分画中のほとんどの蛋白質が存在することがわかった。また、densitometer を用いて測定しても同様の結果を得た (**Fig. 3**)。

1. 分析結果

① TA

a. 免疫化学的分析

免疫拡散実験から等電点領域は pI 4.70 から5.21であった (**Fig. 4**)。

正常ヒト甲状腺の可溶性分画に含まれる TA と T₃ の関係は **Fig. 5** の micro Ouchterlony

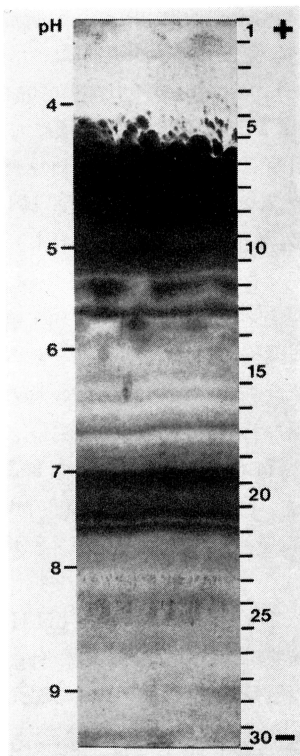


Fig. 2. THE PROFILE OF FLAT-BED ISOELECTRIC FOCUSING ON THE NORMAL HUMAN THYROID WATER SOLUBLE FRACTION

Carrier: Ampholine pH 3.5—10, LKB.

Gel: Sephadex G-75 Superfine, Pharmacia.

8W constant 10°C 16hrs.

法を用いた免疫拡散実験の結果からわかる。T₃を除去していない可溶性分画はA. HT(T)を除いて1本の共通の沈降線を形成していた。他の沈降線は甲状腺中のTGや幾つかの酵素によって形成されたものと考えられる。1本の共通する沈降線を形成するという事は、それぞれの抗体に対応する抗原は同一の拡散速度を有しており、この沈降線はalbuminに一致する。一方、T₃を除去した可溶性分画は各抗体とA. T₃を除いて共通の沈降線を形成しており、それはやはりalbuminに一致する。

b. 免疫組織化学的分析

TAは甲状腺濾胞上皮の胞体内の顆粒に一致して存在し、コロイドには認めらず、その分布はすべての細胞に陽性ではなく、一部の細胞にのみ陽性であった(**Fig. 6**)。

c. 物理化学的分析

2/30-PAA・PAGEではpl 4.88から5.21, fr. 8から10に分子量(MW) 6.7万のalbuminが存在し4/30-PAA・SDS-PAGEでも同様の範囲にMW 6.7万のalbuminを認め、免疫化学的分析結果と一致した(**Fig. 7**)。

22時間加水分解を行った試料のアミノ酸分析の結果は**Table 1**に示した。reference 1に示したのは現在一般的に正しいと考えられているSAのアミノ酸組成であり、今回のSAのアミノ酸分析結果とよく一致していた。この事は今回のTAのアミノ酸分析が正しい事を示している。TAとSAの分析結果を比較したところ、第一にTAはSAに比べてSER GLY ILEUの割合が多く、LYS ARG GLU VAL MET LEU PHEの割合は少ない、第二にTAはかなりの割合のORNIを含むが、SAには痕跡程度しか検出できない、第三にTAはTRY PEAとpeakのやや異なる未知の物質を2種含んでいることが判明した。また、42時間加水分解を行った試料のアミノ酸分析の結果もこれらと一致していた。

② SA

a. 免疫化学的分析

免疫拡散実験から等電点領域はpl 4.85から6.16であった(**Fig. 4**)。免疫拡散実験によるTAとSAの区別は成し得なかった。

b. 物理化学的解析

アミノ酸分析の結果はTAの項で述べた。

③ T₃

a. 免疫化学的分析

免疫拡散実験から等電点領域はpl 4.70から5.21であった(**Fig. 4**)。この結果はTAとのそれと一致する。T₃とTAの関係を示す結果はTAの項で述べた。

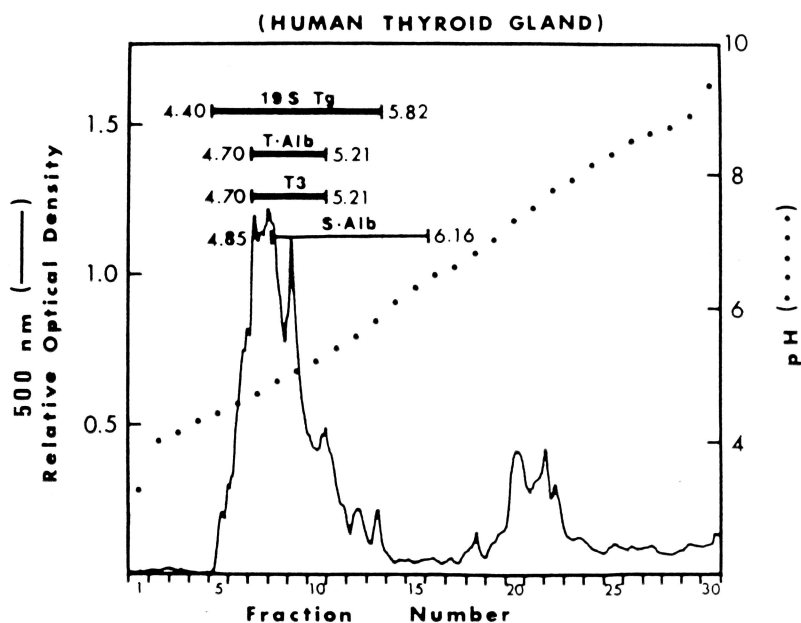


Fig. 3. THE DENSITOMETRIC SCANNING PROFILE OF FLAT-BED ISOELECTRIC FOCUSING

19S Tg: 19S thyroglobulin

T. Alb: thyroid albumin

T₃: triiodothyronine

S. Alb: serum albumin

The degree of optical density shows the concentration of each fraction. The solid lines indicate the pI range of each material based on the immunodiffusion studies.

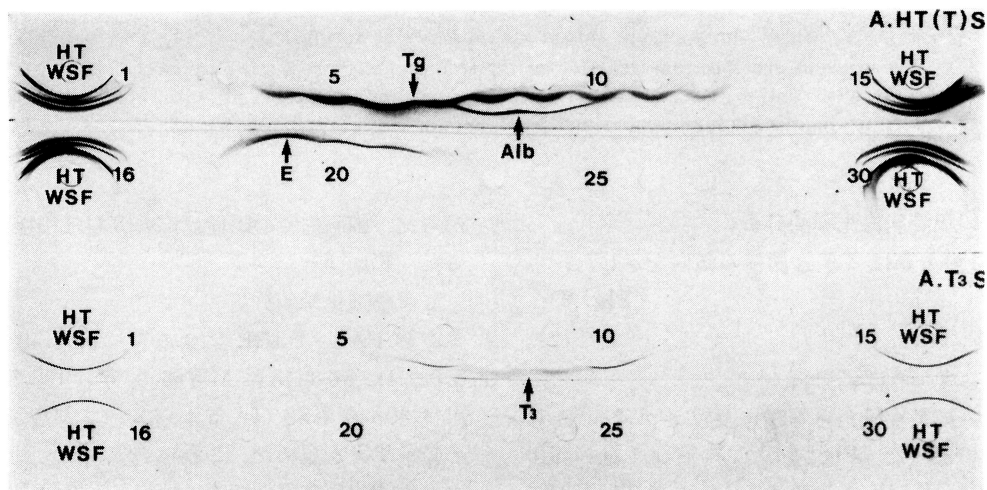


Fig. 4. THE IMMUNODIFFUSION STUDIES

HT WSF: human thyroid water soluble fraction

A. HT(T)S: anti-total human thyroid rabbit serum

A. T₃S: anti-triiodothyronine rabbit serum

Wells from No. 1 to 30: filled with extracted protein after isoelectric focusing

E: enzyme

19S thyroglobulin (Tg) is localized in the area of pI 4.2 (fr. 4) to 5.5 (fr. 12), thyroid albumin (Alb) in the area of pI 4.7 (fr. 7) to 5.2 (fr. 10) and the range of pI 7.0 (fr. 19) to 7.5 (fr. 21) is suggested an enzymatic (E) area. Triiodothyronine (T₃) is localized in the area of pI 4.7 (fr. 7) to 5.2 (fr. 10).

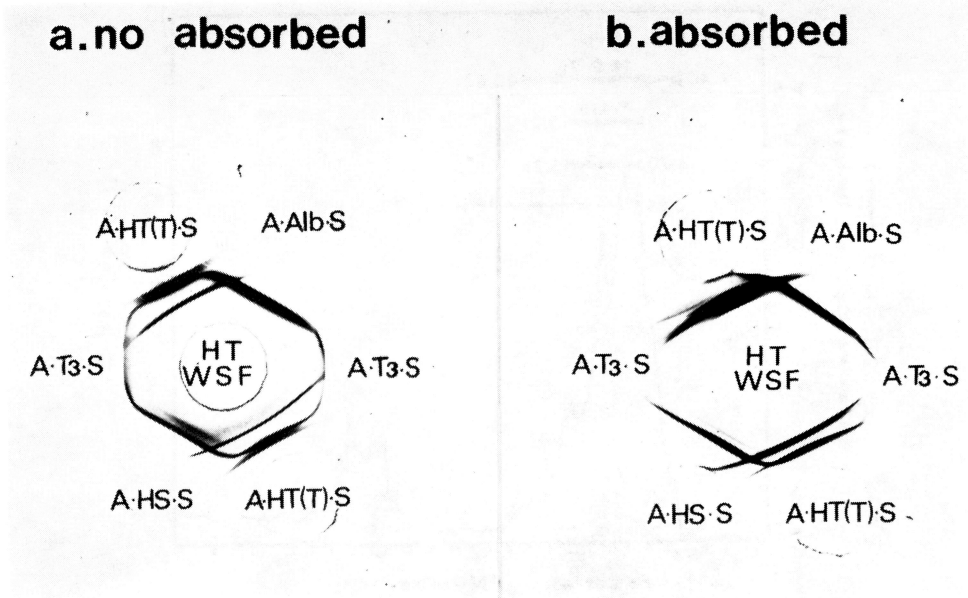


Fig. 5. MICRO AUCHTERLONY TESTS ON THE HUMAN NORMAL THYROID WATER SOLUBLE FRACTION (WSF)

a: WSF without charcoal absorption

b: WSF with charcoal absorption

HT WSF: human thyroid water soluble fraction

A. HT (T). S: anti-total human thyroid rabbit serum

A. T₃. S: anti-triiodothyronine rabbit serum

A. HS. S: anti-human serum rabbit serum

A. Alb. S: anti-human serum albumin rabbit serum

There is no precipitation reaction of T₃-free sample, prepared by charcoal absorption, with anti-T₃ serum, but a precipitation line is observed with anti-human serum albumin, human serum and total human thyroid rabbit serum.

b. 免疫組織化学的分析

T₃ の分布は TA と同様の傾向を示した。

(Fig. 6)

④ TG

a. 免疫化学的分析

免疫拡散実験から等電点領域は pl 4.40 から 5.82 であった (Fig. 4)。この値は、他の報告 (約 4.5)^{25)~27)} と比較するとかなり広い範囲である。なお、fr. 18 から 22 の沈降線については、抗体を liver powder で吸収することにより消失することから酵素である知見を得た。

b. 免疫組織化学的分析

ほとんどすべての甲状腺濾胞上皮内に顆粒状に陽性反応を認め、コロイドには反応を認めな

かった。細胞内での陽性反応の分布は一様であった (Fig. 6)。

c. 物理化学的分析

2/30-PAA・PAGE によると、pl 4.40 から 5.82, fr. 5 から 13 に MW 66.9 万の 19S TG, pl 4.40 から 4.88 (fr. 5 から 8) に MW 44 万の 12S TG を認めた。これら 12S, 19S TG は ヨウ素澱粉反応陽性であった。一方 4/30-PAA・SDS-PAGE によると 19S TG と同じ領域に 19S TG の subunit と考えられる MW 33 万の蛋白群を主に認め、免疫化学的分析結果と一致した (Fig. 7)。

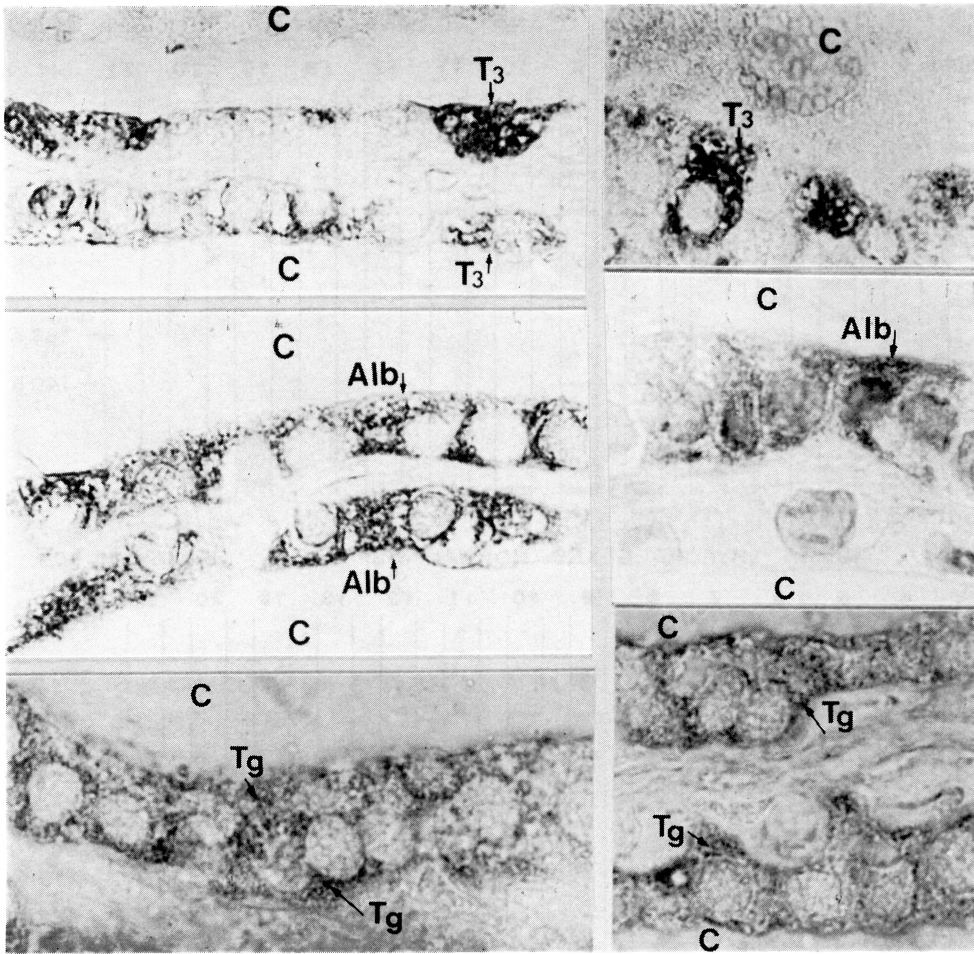


Fig. 6. THE IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDIES OF T₃, THYROID ALBUMIN AND THYROGLOBULIN IN NORMAL HUMAN THYROID GLAND (×1400)

C: colloid
 T₃: triiodothyronine
 Alb: thyroid albumin
 Tg: thyroglobulin

The positive grain reactions of thyroid albumin, T₃ and Tg are localized in the follicular cells, not in the colloid. Thyroid albumin and T₃ are found in not all cells but Tg is found in all. The patterns of distributions of thyroid albumin and T₃ are similar in each other.

IV 考 按

甲状腺内のTGを分析するにあたって、塩析を用いた方法が広く行われてきた。しかし、既に報告されているように、²⁸⁾ TGのpI値から考えると、この方法では甲状腺中の抗原の一部について分析した可能性が強い。そのため

TAの分析にあたっては可溶性分画を使用した。

TAは正常なヒト、^{11), 16)-18), 20)} 正常な動物¹⁸⁾の甲状腺だけでなく、先天性甲状腺腫をもつ動物¹⁾や病的ヒト甲状腺でも検出されるといわれている。その病的状態はほとんどすべての甲状腺疾患を含み、家族性、または散発性甲状腺

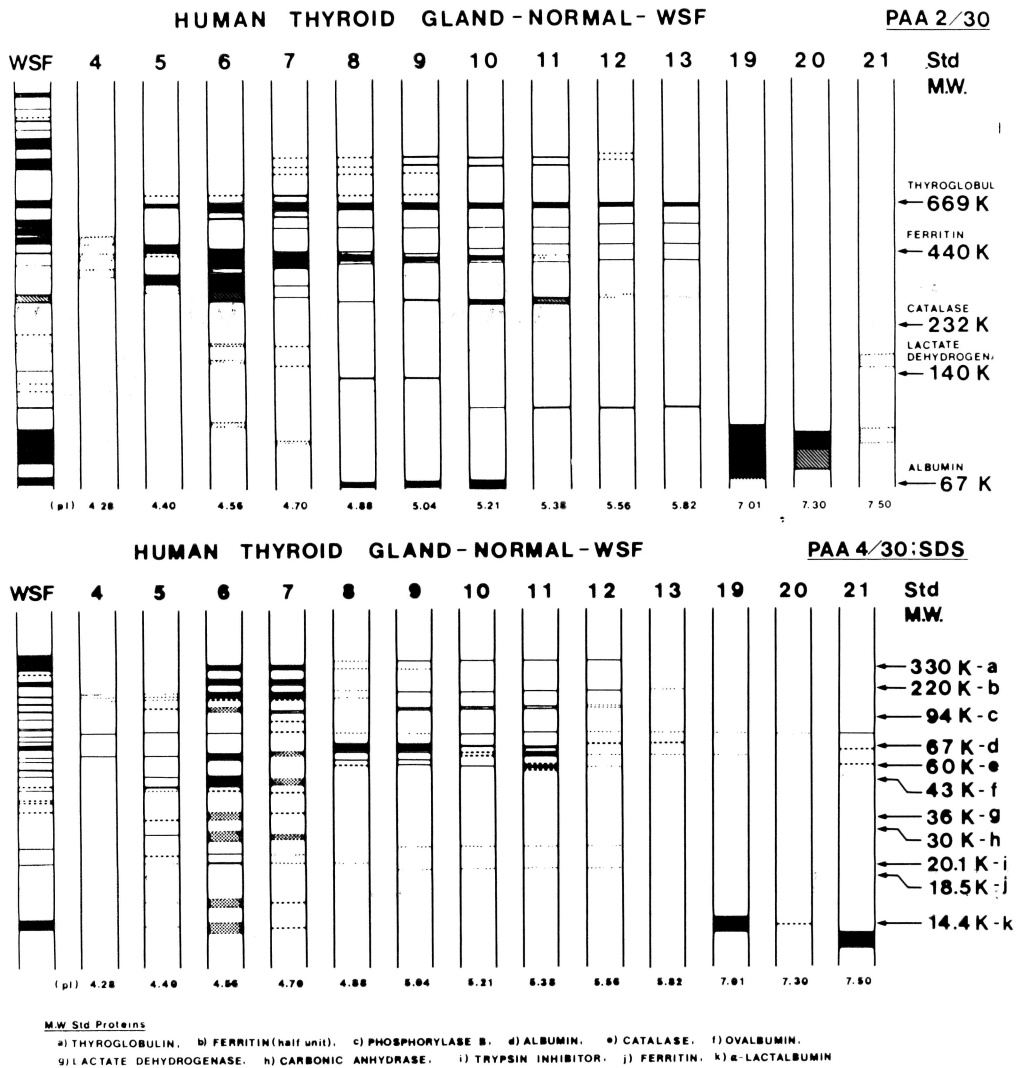


Fig. 7. POLYACRYLAMIDE GRADIENT GEL ELECTROPHORESIS
 Gel: A) 2/30-PAA·PAGE, B) 4/30-PAA·SDS-PAGE (Pharmacia)

- A) MW 669K 19S thyroglobulin is located in the area of pI 4.40 (fr. 5) to pI 5.82 (fr. 13), MW 440K 12S thyroglobulin in pI 4.40 (fr. 5) to pI 4.88 (fr. 8) and in the area of pI 4.88 (fr. 8) to pI 5.21 (fr. 10) MW 67K 4S albumin is located.
- B) MW 330K proteins which are concerned as the subunits of 19S thyroglobulin are mainly detected in the area of 19S thyroglobulin.

腫, 2), 5)-9), 13)-15), 19), 20) 甲状腺機能亢進症, 18) 癌, 19), 21) 慢性甲状腺炎, 10), 12), 18), 20) 濾胞腺腫, 18), 20) 腺腫様甲状腺腫²⁰⁾ などが報告されている. この TA も甲状腺内でのホルモン代謝に何等かの役割を果していると考えられているが, その

起原と性質については明らかでなく, 特に起原については, 不明とする考え, 10)-12), 19) 甲状腺由来とする考え, 2), 6), 16), 21), 22) SA 由来とする考え, 1), 7), 13)-15), 23) TG の前駆物質とする考え, 8), 9) TG の変性物とする考え¹⁹⁾ などが有り,

Table 1. (%of amino-acid residues)

	Serum Albumin		Thyroid Albumin	
	Ref. 1	this study	Ref. 2	this study
LYS	10.09	11.29	11.05	3.52
HIS	2.74	2.96	3.35	2.91
ARG	4.10	4.77	4.06	1.42
ASP	9.06	9.82	10.17	5.83
THR	4.79	5.24	5.32	4.86
SER	4.10	4.28	4.98	20.51
GLU	14.02	16.60	—	9.66
PRO	4.10	4.56	4.65	2.58
GLY	2.05	2.66	6.55	16.19
ALA	10.60	12.07	10.09	8.97
CYS	5.98	2.62	—	0.25
VAL	7.01	7.95	7.24	3.34
MET	1.03	1.03	0.22	0.33
ILEU	1.37	1.65	—	2.04
LEU	10.43	12.17	11.06	3.16
PHE	5.30	6.00	4.84	1.73
ORNI	—	—	—	12.36
TYR	3.08	3.04	2.87	*
PEA	—	—	—	**

THE AMINO-ACID ANALYSES OF THYROID ALBUMIN AND SERUM ALBUMIN

Ref. 1: Dayhoff, M. O. "Atlas of Protein Sequence and Structure", National Biochemical Foundation, Washington D. C., Vol. 5 Suppl. 2, 1976.

Ref. 2: Jonckheer, M. H., et al.: Thyroid albumin I. Isolation and characterization. J clin Endocrinol Metab 32; 7-17, 1971.

Equipment: amino-acid auto-analyzer, JLC-10D, JEOL.

*, **: unknown factors

Thyroid albumin is composed of amino-acids containing two unknown factors. The difference of amino-acid composition between thyroid albumin and serum albumin suggests that *the organ of their synthesis is different in each other.*

今なお議論の余地がある。

最初に豚の甲状腺にこの albumin 様蛋白を発見し、報告したのは Shulman ら²⁴⁾で、彼等は "thyralbumin" と命名した。一方、DeGroot ら³⁾は "thyroalbumin" と呼び、Jonckeer ら¹⁶⁾は甲状腺組織から抽出されたすべての albumin 様蛋白を "thyroid albu-

min" と呼んだ。しかしながら本論文ではこの蛋白がヨード化されているか否かを重視し、ヨード化されているものを "thyroid albumin" と呼び、ヨード化されていないものを "thyroalbumin" と呼ぶことにした。

上述したように、TA は正常および病的ヒト甲状腺に認められているが、甲状腺ホルモンとの関係については、放射性ヨードを用いた報告しかなく、直接両者の結合を示唆したものは無い、放射性ヨードを用いた報告によると、TA が含む甲状腺ホルモンはほとんどが MIT または DIT で、 T_3 ・ T_4 は少量であったとする報告が多い。^{2), 7), 8), 10), 13), 14), 18), 29)} また、良性甲状腺疾患の甲状腺組織培養による同様の実験を Thomas-Morvan ら⁹⁾が報告しているが、ほぼ同様の結果を得ている。今回、micro Ouchterlony 法を用いた免疫拡散実験により TA が thyroalbumin と T_3 の結合物である事を直接に証明することができた (Fig. 5)。等電点領域が一致する事もこれを支持する結果である。しかしこの結合力は、活性炭により容易に T_3 を除去できることからかなり微弱であると考えられる。

現在まで TA は濾紙 chromatography, 超遠心分離法, column を用いた方法などによって分離精製が試みられてきた。^{1), 2), 7), 8), 10), 12)-14), 16), 19), 20), 22)} しかし血清や間質液の多少の混入は避け得ない。今回の等電点分画によっても TA と SA の等電点領域が重複するため、精製は困難と考え、精製にこだわらず相対的比較に留めたため、免疫化学的な両者の相異点を見出すことができなかった。同様の報告も有るが、^{5), 7), 8), 10)-12), 14)-16)} 免疫化学的な両者の相異点を見出したという報告もある。^{5), 8)} また、沈降定数 (4S)^{2), 5), 7), 8), 10), 12), 15), 16), 18), 22)} や電気泳動における移動度^{5), 7), 8), 14)-16), 18), 22)} を比較した物理化学的分析においても、両者の間に差が無いと報告されている。しかし、両 albumin の pI 領域と、アミノ酸分析の結果に、明らかな差を認めた。現在まで TA の pI 値に関する報告は無く、今回の分析では TA が 4.70

から5.21に対し, SAのそれは4.85から6.16で重複した領域はあるものの, かなり異なっていた. アミノ酸の組成については, 結果の項で述べたように1) TAはSAに比べてSER GLY ILEUの割合が多く, LYS ARG GLU VAL MET LEU PHEの割合が少ない, 2) TAはかなりの割合のORNIを含むが, SAには痕跡程度しか検出できない, 3) TAはTYR PEAとpeakのやや異なる未知の物質を2種含んでいる, の三点の差を認めた. 3)のTYRについては, ヨードの結合によりpeakが移動した可能性もあるが, PEAについては全く不明である. アミノ酸分析はJonckheerら,¹⁶⁾ Furthら,¹³⁾ Lissitzkyら²⁾によってすでになされており, JonckheerらもTAとSAは異なったアミノ酸組成をし

ていると報告しているが, 3)のような結果については述べていない. Furthらによると, 我々の得た3)のような結果についての記述はなく, TAとSAのアミノ酸組成に差がなかったとしている. Jonckheerらと結果が異なるのは, 分離法の違いによると推測されるが, Furthらと異なる結果を得た原因については不明である. しかしJonckheerらはTAはSAに比べて2.62倍のGLYを含み, METは少量であると述べており, 前述した3)の結果を除けば, 我々とほぼ同様の結果を得ている. このアミノ酸分析の結果は, これら両者の由来が異なり, 互いに別の臓器で合成されたものである事を示

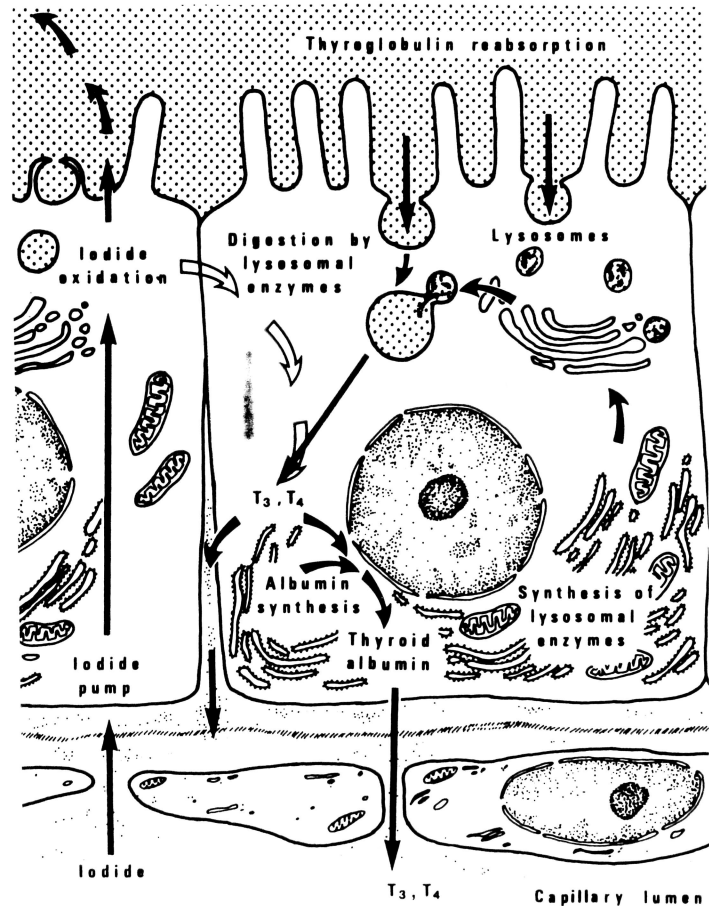


Fig. 8. SCHEME OF THE METABOLISM OF THYROID ALBUMIN AND THYROID HORMONES IN THE FOLLICULAR CELLS

唆しており, またJonckheerら, Lissitzkyらも同様の結論に達している. また, 免疫組織化学的分析ではTAは濾胞上皮細胞の胞体に局限しており, この結果とアミノ酸分析の結果を考え合わせると, TAは甲状腺濾胞上皮内で合成されている可能性が強い. Ottenら²¹⁾も組織培養を用いたin vivoでの実験により, 正常甲状腺から分離されるヨード化されたalbuminのうち, 少なくともその一部は甲状腺組織そのもので合成されると述べている.

Jonckheerら¹⁶⁾は, 蛍光抗体法を用いた組織学的分析で, TAを濾胞内のコロイド中に見出し, 正常甲状腺に含まれるalbumin様蛋白

のほとんどはヨード化されているからであると考へた。しかし提示された写真は不明瞭なため再検討の必要があり、TAが濾胞内のコロイド中に存在すれば、上皮が正常に機能している時、濾胞内のコロイドは再吸収され濾胞上皮の胞体内にもTAは存在するはずである。今回の酵素組織化学的分析で、TAは濾胞内のコロイド中には認められず、濾胞上皮の胞体にのみ認められた(Fig. 6)。著者がFigure 8に示したごとく、thyroalbuminは濾胞内には放出されず、再吸収されたTGが濾胞上皮のapical areaでlysosomal enzymeにより加水分解され、放出された甲状腺ホルモンと結合すると解釈できる。一方、このTAの甲状腺濾胞上皮内における存在意義は今なお不明である。しかし先天性TG合成障害の一部の症例において、甲状腺内にTAが検出され、TGが欠損しているにもかかわらず、血中にはある程度の甲状腺ホルモンが検出されるという報告がある。^{2), 5)-9), 20)}この事実はTAが甲状腺濾胞上皮内でヨードの有機化や輸送に何等かの役割を果している事を考えさせる。上述の症例でTAが濾胞内に放出されないと仮定すると、Figure 8に示すように濾胞上皮内でTAを介して甲状腺ホルモンが合成される可能性が考えられる。

今回の分析で、 T_3 は濾胞上皮の細胞質にのみ陽性で、コロイド中には陰性であった

(Fig. 6)。これはコロイド内の T_3 の存在を否定するものではなく、 T_3 はTGの巨大な分子に結合しており、 T_3 の免疫活性は覆い隠されていると考えられる。また、 T_3 のような低分子物質はalbuminのような蛋白と結合した状態でのみ組織に定着が可能であり、freeの状態での固定は困難であろう。

近年、DeGrootらが甲状腺内におけるこのようなTAを介するホルモン代謝の副側路の存在を示唆している。³⁾ 今回の分析結果はこの系の存在の可能性を支持するものと考えられ、今後この系の確立のために正常および病的甲状腺におけるTAの存在意義と役割を明らかにしたい。

本論文の内容の一部を予報としてActa Histochemica et Cytochemica Vol. 16, 559-563, 1983に掲載し、本論文の要旨は1984年7月、第7回International Congress of Endocrinology (Quebec city)³¹⁾にて発表した。

稿を終るにあたり直接御指導、校閲いただいた川崎医科大学解剖学教室池田章教授、御指導、校閲いただいた川崎医科大学内分泌外科妹尾亘明教授、原田種一助教授、同解剖学教室三島昇助手に謹んで深謝致します。また研究に御協力いただいた、同解剖学教室研究補助員阿賀育子、原田寿美子氏に感謝致します。最後に本研究に抗 T_3 抗体を御提供下さいました川崎医科大学内分泌内科堀野正治教授に厚く感謝致します。

文 献

- 1) Falconer, I. R., Roit, I. M., Seamark, R. F. and Torrigiani, G.: Studies of the congenitally goitrous sheep. *Biochem. J.* 117; 417-424, 1970
- 2) Lissitzky, S., Codaccioni, J. L., Bithmuth, J. and Depieds, R.: Congenital goiter with hypothyroidism and iodo-serum albumin replacing thyroglobulin. *J. clin. Endocrinol. Metab.* 27: 185-196, 1967
- 3) DeGroot, L. J. and Stanbury, J. B.: *The thyroid and its diseases*. 4th ed. New York, John Wiley. 1975, pp. 54-59
- 4) Netto, M. and Rosental, D.: Albumin concentration in normal and pathological human thyroid glands. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 15: 135-141, 1982
- 5) Wäger, G., Lamberg, B. A., Sivula, A., Saarinen, P. and Mäkinen, T.: Familial and sporadic thyroglobulin deficiency with goitre and hypothyroidism. *Ann. clin. Res.* 14: 37-45, 1982

- 6) Atakhanova, B. A., Turakvlov, Ya. Kh., Kadyrov, D. A., Mansurov, B. M. and Shetalova, M. V.: Protein biosynthesis and polyribosome thyroglobulin content in the thyroid cells in congenital goiter. *Probl. Endokrinol.* 27 : 8—11, 1981
- 7) Lissitzky, S., Bismuth, J., Jaquet, P., Castay, M., Michel-Béchet, M., Koutras, D. A., Pharmakiotis, A. D., Mochos, A., Psarras, A. and Malamos, B.: Congenital goiter with impaired thyroglobulin synthesis. *J. clin. Endocrinol. Metab.* 36 : 17—29, 1973
- 8) Desai, K. B., Mehta, M. N., Patel, M. C., Sharma, S. M., Ramanna, L. and Ganatra, R. D.: Familial goitre with absence of thyroglobulin and synthesis of thyroid hormones from thyroidal albumin. *J. Endocrinol.* 60 : 389—397, 1974
- 9) Thomas-Morvan, C., Nataf, B. M. and Tubiana, M.: Thyroid proteins and hormone synthesis in various benign thyroid diseases.: In vivo and organ culture studies. *Acta. Endocrinol.* 73 : 22—34, 1973
- 10) 森田陸司: 慢性甲状腺炎のヨード代謝に関する研究。第二編。慢性甲状腺炎患者の血中及び甲状腺組織内の albumin 様ヨード化蛋白に関する研究。日本内分泌学会雑誌 46 : 1097—1108, 1970
- 11) Černelc, M., Černelc, P., Vozelj, M. and Kostner, G: Isolation and immunological examination of the so-called thyralbumin (TA). *Allerg Immunol* 18 : 177—182, 1972
- 12) 桜美武彦: 慢性甲状腺炎の臨床免疫学的研究。第一編。甲状腺可溶性蛋白の分画及び分画蛋白の免疫化学的性状について。アレルギー 17 : 825—832, 1968
- 13) Furth, E. D., Agrowal, R. B. and Propp, R. P.: Secretion of iodoalbumin and iodoprealbumin by a congenital goiter containing thyroglobulin and the iodoalbumin. *J. clin. Endocrinol. Metab.* 31 : 60—69, 1970
- 14) Alexander, N. M. and Burrow, G. N.: Thyroxine biosynthesis in human goitrous cretinism. *J. clin. Endocrinol. Metab.* 30 : 308—315, 1970
- 15) Lissitzky, S., Bismuth, J., Codaccioni, J. L. and Cartouzou, G.: Congenital goiter with iodoalbumin replacing thyroglobulin and defect of deiodination of iodotyrosines. Serum origin of the thyroid iodalobumin. *J. clin. Endocrinol. Metab.* 28 : 1797—1806, 1968
- 16) Jonckheer, M. H. and Karcher, D. M.: Thyroid albumin. I. Isolation and characterization. *J. clin. Endocrinol. Metab.* 32 : 7 —17, 1971
- 17) Ikeda, A., Mishima, N., Kawano, R. and Harada, T.: T₃-binding albumin in human thyroid follicular cells. *Acta. Histochem. Cytochem.* 16 : 559—563, 1983
- 18) Robbins, J., Wolff, J. and Rall, J. E.: Iodoproteins in normal and abnormal human thyroid tissue and in normal sheep thyroid. *Endocrinology* 64 : 37—52, 1959
- 19) Kusakabe, T.: A goitrous subject with defective synthesis of diiodotyrosine due to thyroglobulin abnormalities. *J. clin. Endocrinol. Metab.* 37 : 317—325, 1973
- 20) DeGroot, L. J. and Carralho, E.: Studies on proteins of normal and diseased thyroid gland. *J. clin. Endocrinol. Metab.* 20 : 21—34, 1960
- 21) Otten, J., Jonckheer, M. and Dumont, J. E.: Thyroid albumin. II. In vitro synthesis of a thyroid albumin by normal human thyroid tissue. *J. clin. Endocrinol. Metab.* 32 : 18—26, 1971
- 22) Shulman, S., Mates, G. and Bronson, P.: Studies on thyroid proteins II. Purifications of human thyroid proteins by gel filtration and the isolation of 19S, 7S and 4S components. *Biochem. Biophys. Acta.* 147 : 208—221, 1967
- 23) Shimaoka, K. and Thompson, B. D.: Radioiodine Labeling of serum albumin in vivo. *Endocrinology* 76 : 570—577, 1965
- 24) Shulman, S., Rose, N. R. and Witebsky, E.: Thyralbumin—a new antigen from thyroid tissue. *Fed. Pro.* 16 : 443, 1957

- 25) Ui, N.: Isoelectric points and conformation of proteins. I. Effect of urea on the behavior of some proteins in isoelectric focusing. *Biochim. Biophys. Acta.* 229 : 567—581, 1971
- 26) Massi, G. and Crivelli, F.: Different behavior of 19S thyroglobulin extracted from normal thyroid, simple goitre and toxic goitre in polyacryl amide slab gel isoelectric focusing. *Acta. Endocrinol.* 89 : 296—302, 1978
- 27) Davoli, C., Grimaldi, S., Rusca, G., Andreoli, M. and Edelhoeh, H.: The isoelectric focusing of human thyroglobulin. *Biochim. Biophys. Acta.* 705 : 243—248, 1982
- 28) 三島 昇, 池田 章, 吉井 致, 宇川明德, 原田種一: 正常ヒト甲状腺可溶性蛋白の免疫化学的解析. *医学のあゆみ* 125 : 551—554, 1983
- 29) Thomas-Morvan, C.: Iodotyrosine content of human thyroid albumin. *Acta. Endocrinol.* 81 : 288—297, 1976
- 30) Winter, A., Permutter, H. and Davies, H.: Preparative flat-bed isoelectric focusing in a granulated gel with the LKB 2117 Multiphor. *LKB application note.* 198, 1975
- 31) Kawano, R., Mishima, N., Ikeda, A. and Harada, T.: Immunohistochemical study of iodinated proteins in the normal human thyroid gland. *Excerpta. Medica. International. Congress. Series.* 652 : 945, 1984