



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	母体由来のヒト抗マウス抗体（HAMA）による新生児の見かけ上の高TSH血症に関する研究
Author(s)	森山, 隆則; 矢野, 公一; 川崎, 芳正 他
Citation	北海道大学医療技術短期大学部紀要, 13, 1-7
Issue Date	2000-12
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/37653
Type	departmental bulletin paper
File Information	13_1-8.pdf



原 著

母体由来のヒト抗マウス抗体 (HAMA) による 新生児の見かけ上の高TSH血症に関する研究

森山 隆則¹⁾・矢野 公一²⁾・川崎 芳正³⁾・原田 正平⁴⁾
小林 清一¹⁾・松野 一彦¹⁾・中村 仁志夫¹⁾

Studies on false hyperthyrotropinemia caused by human anti-mouse antibody (HAMA) of maternal origin

Takanori Moriyama¹⁾, Koichi Yano²⁾, Yoshimasa Kawasaki³⁾, Shouhei Harada⁴⁾,
Seiichi Kobayashi¹⁾, Kazuhiko Matsuno¹⁾, Nishio Nakamura¹⁾

Abstract

Two cases of newborn infants with an unexplained elevation of serum TSH levels were found in a national mass-screening program for neonatal hypothyroidism (cretinism). Similar findings were obtained in sera from their mothers, who were clinically euthyroid.

The TSH activity in the sera from both infants and mothers corresponded to the peak of serum IgG in size-exclusion HPLC analysis. However, no anti-TSH autoantibody was detected in these sera. The TSH levels decreased when the sera were treated with protein A or immunoabsorbed with anti-human IgG serum. Furthermore, the high levels of serum TSH were abolished by using sheep, but not mouse, anti-human TSH antibody as a capture antibody. Our data demonstrate that placental transfer of maternal IgG class human anti-mouse antibody (HAMA) results in falsely elevated TSH levels in newborn sera in sandwich immunoassays using mouse anti-TSH monoclonal antibody.

略語: HAMA, human anti-mouse antibody; MAb, monoclonal antibody; TSH, thyrotropic hormone; HPLC, high-performance liquid chromatography; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; EIA, enzyme immunoassay; RIA, radio immunoassay; CLIA, chemiluminescence immunoassay; BSA, bovine serum albumin.

1) 北海道大学医療技術短期大学部衛生技術学科 (〒060-0812 札幌市北区北12条西5丁目)

2) 名寄市立病院小児科

3) バイエルメディカル株式会社学術部

4) 千歳市立総合病院小児科

1) Department of Laboratory Technology, College of Medical Technology, Hokkaido University

2) Department of Pediatrics, Nayoro City Hospital

3) Department of Scientific Affairs, Bayer Medical Co. Ltd.

4) Department of Pediatrics, Chitose General Hospital

要 旨

クレチン症マススクリーニングにおいて、矛盾する高TSH血症を示す新生児2名を検出した。これらの母親にも同様な病態が検出された。精査の結果、これらの母児の甲状腺に異常を示唆する所見はみられなかった。

ゲル濾過HPLCにより、母児の血清TSHは見かけ上、血清IgGに一致して溶出された。しかし、抗TSH自己抗体は陰性であった。母児の血清TSHは、protein A処理あるいは抗ヒトIgG血清による免疫吸収により減少した。また、捕捉抗体をヒツジ抗ヒトTSH抗体に変えた方法で測定すると、血清TSHは減少した。これらの結果により、母体より胎盤移行したIgG型HAMAがマウスモノクローナル抗体を用いたTSHサンドイッチ法へ干渉し偽陽性反応を生じたものと考えられた。

キーワード：ヒト抗マウス抗体(HAMA)・IgG・TSH・クレチン症マススクリーニング・見かけ上の高値

緒 言

近年、マウスモノクローナル抗体(MAb)を用いた各種免疫学的測定法において、ヒト血清中の異好抗体が原因とされる偽陽性反応が報告され問題視されている^{1,2)}。われわれも、非癌の女性患者に、IgM型ヒト抗マウス抗体(HAMA)が原因で、卵巣癌マーカーCA125が持続性に高値を示した症例を発見し報告している³⁾。

今回われわれは、クレチン症マススクリーニングにおいて、濾紙血のTSH測定において、異常高値を示すものの、クレチン症を示唆する身体所見を欠き、精査において甲状腺ホルモンが基準範囲を示す2例の新生児例を経験した。その原因を解析した結果、それらの患児の母親にも同様な矛盾する高TSH血症がみられ、母体由

来のIgG型HAMAが関与する見かけ上の高TSH血症を呈したことを明らかにしたので報告する。

対象と方法

1. 患者および血清

症例1⁴⁾は、生後14日目の紋別市の女児で、クレチン症マススクリーニングで濾紙血TSH(ELISA法)が $57.7 \mu\text{U/ml}$ (クレチン症基準値 $10 \mu\text{U/ml}$ 以上)と高値のため精査入院した。入院時に先天性甲状腺機能低下症を示唆する身体所見はみられなかった。EIA法による血清TSHは $100 \mu\text{U/ml}$ 以上と上昇しているが、 T_3 1.66 ng/ml 、 T_4 $10.11 \mu\text{g/dl}$ と基準範囲で、甲状腺エコーも正常であり、大腿骨遠位端骨核(左 $6 \times 4 \text{ mm}$ 右 $6.6 \times 3 \text{ mm}$)は出現していた。母親の検査成績では、同様に血清TSHは $100 \mu\text{U/ml}$ 以上であるにもかかわらず、甲状腺ホルモンはすべて基準範囲であった。

症例2⁵⁾は、千歳市の生後10日目の女児で、同様のスクリーニングで濾紙血TSH(ELISA法)が $33.4 \mu\text{U/ml}$ と高値であったため精査入院となった。しかし、クレチン症の臨床所見は無く、 FT_4 は 2.0 ng/dl であり基準範囲であったが、TSHは $40.3 \mu\text{U/ml}$ と高値であった。大腿骨遠位端骨核は5 mm程度で、甲状腺エコーでも正所性に正常大の甲状腺が描出された。母親の甲状腺機能検査では、血清TSHは $34.6 \mu\text{U/ml}$ 、 FT_4 は 1.25 ng/dl であり、同様な矛盾する高TSH血症が確認された。

症例1および2の各母児の血清を用い検討した。対照血清として、原発性甲状腺機能低下症の患者血清を用いた。これらの血清は、使用まで -70°C に分注保存した。

2. TSH測定法

クレチン症マススクリーニングで用いられたTSH測定法、および検討に用いた各種のTSH測定法の一次抗体および二次抗体について表1に要約する。

表 1. 各種TSH測定法の一次および二次抗体の種類

測定法	一次抗体	二次抗体
ELISA	抗TSH- α 鎖マウスMAb	抗TSH- β 鎖マウスMAb
EIA	抗TSH- α 鎖マウス・ヒトキメラMAb	抗TSH- α β 鎖マウス・ヒトキメラMAb
RIA	抗TSH- α 鎖マウスMAb	抗TSH- β 鎖マウスMAb
CLIA	ヒツジ抗TSHポリクローナル抗体	抗TSH- α β 鎖マウスMAb

表 2. 異なる測定原理による母児のTSH測定値

測定法	症例 1 - 患児	症例 1 - 母親	症例 2 - 患児	症例 2 - 母親
ELISA	ND	ND	40.3	ND
EIA	>100.0	>100.0	ND	46.5
RIA	>100.0	>100.0	ND	42.8
CLIA	1.1	3.3	29.0	8.7

ND, not determined TSH(μ U/ml)

3. TSHの分子量の検討

Superose 12 カラム(1.0×30cm,Pharmacia)を用いたゲル濾過HPLC (150mmol/l NaCl, 50 mmol/l リン酸緩衝液, pH 7.2)⁶⁾により, 血清TSHを分画した。血清アルブミン, IgGおよびIgMのピークは, ベーリングネフエロメターアナライザーを用い, 同社の各特異抗血清により同定した。溶出液のTSHのモニタリング(450nm)は, ELISA (Bayer Medical) により実施した。

4. protein A処理および免疫グロブリンの免疫吸収によるTSHの測定

3 倍稀釈血清を用い, パッチ法にて protein A処理³⁾を実施した。免疫吸収は³⁾, 血清 1 容に対し抗ヒトIgG, A, Mの各特異抗血清 (Dako) 5 容を混合し実施した。これらの処理の前後のTSHをEIAで測定した。

5. 正常マウス血清およびIgGによる吸収試験

正常 BALB / c マウス血清および IgG (Immunotech)と血清を等量混合あるいは 2 : 1 の割合で混合し37℃で1時間インキュベーションしさらに 4℃で1昼夜放置した。対照にBSAを加え同様に操作し, EIAでTSHを測定した。

6. ¹²⁵I-TSH結合率の検討

抗TSH自己抗体の存在を考慮し, 血清のTSH結合率を検討した⁷⁾。血清50 μ lに¹²⁵IウシTSHを添加し, 37℃で60分間反応後, 35%ポリエチレングリコール6000を200 μ l混合し, 沈殿物中の¹²⁵Iの放射能を測定し結合率を算出した。対照には, 正常者プール血清および抗TSH抗体陽性血清を用いた。

結 果

1. 測定原理の異なる方法によるTSH測定値

表 2 に原理の異なる 4 法 (表 1) による母児の入院時のTSH測定結果を示す。その結果, 症例 1 の患児は, 一次抗体および二次抗体がともにマウスMAbの測定系では, 原理の異なる方法においても高値であった。EIAではFc部分がヒトIgGの構造を持つMAbを用いた方法であるが, 同様な結果であった。

しかし, 一次抗体をヒツジポリクローナル抗体にかえたCLIAでは, 患児および母親はそれぞれ1.1および3.3 μ U/mlとともに基準範囲を示した。

症例 2 では, 母親のTSHはEIAおよびRIAとともに40.0 μ U/ml以上を示す 高値であったが, CLIAで10.0 μ U/ml 以下を示したことから症例 1 に準じた結果を示した。しかし患児のTSH

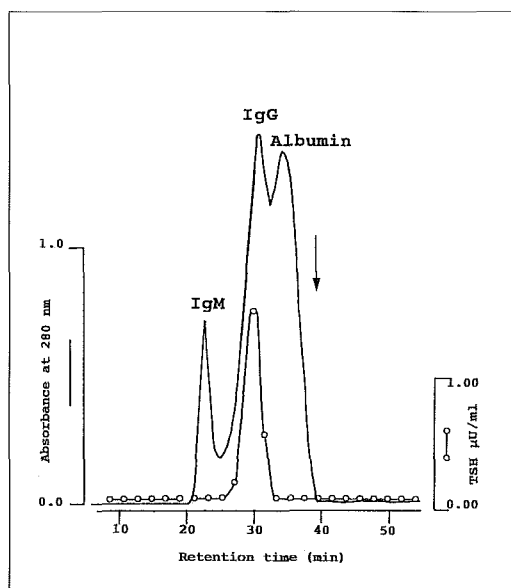


図1 症例1の患児血清TSHのSuperose12HPLC溶出パターン
患児血清の蛋白とTSH濃度は、吸光度280nm(—)およびELISA(O)によりそれぞれモニタリングされた。対照患者の正常TSHは、矢印に示す位置に溶出されたのに対し、患児血清TSHは見かけ上、正常TSHはほとんど見られず、IgGピークに一致した位置に溶出された。

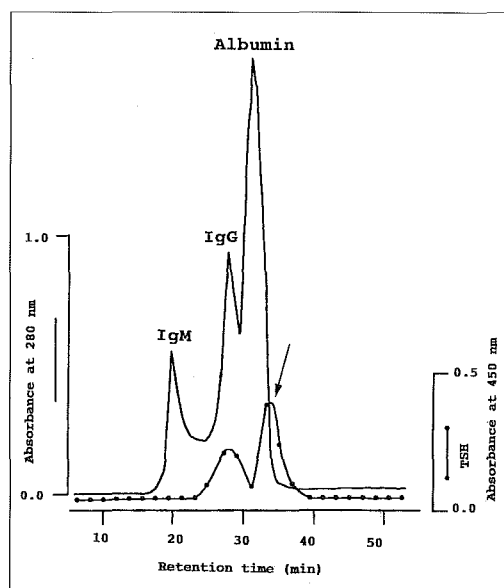


図2 症例2の患児血清TSHのSuperose 12 HPLC 溶出パターン
患児血清の蛋白とTSH濃度は、吸光度280 nm(—)および450nm(●)によりそれぞれモニタリングされた。対照患者の正常TSHは、矢印に示す位置に溶出されたのに対し、患児血清TSHは、正常TSHの位置およびIgGピークに一致した位置の2峰性に溶出された。

は、ELISAで40.3 μ U/ml であったがCLIAでは18.0 μ U/ml と低下を示したものの依然と高値であった。

2. 血清TSHのHPLC溶出パターン

図1および2に、それぞれ症例1および2の患児の血清TSHのゲル濾過HPLCパターンを示す。対照血清TSHは、分子量28,000であり、図中の矢印の位置に単峰性に溶出された。症例1では、血清TSHは見かけ上、遊離のTSHピークはみられず血清IgGピークに一致する単峰性のピークとして溶出された。これに対して、症例2の患児では、図2に示すように、正常分子量のピークに加えて、前者と同様にIgGのピークに一致した2峰性に溶出された。母親のデータは示さないが、それぞれの患児の溶出パターンと同様であった。

表3. protein A処理および免疫吸収前後の母親の血清TSH

処理方法	対照患者	症例1	症例2
BSA	65.30	>100.0	17.16
protein A	66.22	1.15	9.54
BSA	28.78	81.03	9.53
抗-IgG	28.09	0.28	7.17
抗-IgA	28.12	80.15	9.55
抗-IgM	28.08	81.08	9.52

(μ U/ml)

3. protein A処理および免疫グロブリンの免疫吸収によるTSHの測定

protein A 処理および免疫吸収による患児の血清TSHの測定値を表3に示す。対照の原発性甲状腺機能低下症の患者血清はいずれにおいてもTSHの測定値に変化はみられなかった。これに対して、症例1では、protein A処理 および抗IgG血清による免疫吸収によりTSHは著しく低値を示した。症例2では、前者ほどの感受

性はみられないものの、同様に低値傾向を示した。母親のデータは示さないが、患児の結果と同様であった。

4. ^{125}I -TSH結合率の測定

対照の正常プール血清と抗TSH抗体陽性血清の結合率は、それぞれ7.4%および69.3%であった。これに対して、症例1と2の母親の血清は、11.9%および13.2%であった。 ^{125}I -TSH結合率に基準範囲はないが、これらの値は正常血清の2倍以下であることから、抗TSH抗体は陰性と判定された。

5. 正常マウス血清およびIgGによる吸収試験

症例1および2の母親の血清を対象に検討したところ、データは示さないがマウス血清およびIgGの添加によりTSHの値に変化はみられなかった。

6. 患児の経過観察および血清TSHの変動

症例1の患児については、無治療による経過観察となり血清TSHの経時変化(EIA)を観察した。その結果、5ヶ月目より低下がみられ、8ヶ月目においてEIAで $20.9\mu\text{U/ml}$ およびRIAで $12.0\mu\text{U/ml}$ と明らかに低値となり10ヶ月目ではいずれも基準範囲を示した。

症例2は、1ヶ月目から3ヶ月目までの血清TSHはCLIAにおいても、 18.1 から $11.2\mu\text{U/ml}$ の範囲で変動を示しながら、軽度高値が持続した。このため、3ヶ月目でthyrotropin releasing hormone(TRH)試験を実施した。その結果、血清TSHの過剰反応が観察され軽症クレチン症と診断され、甲状腺ホルモン補充療法が実施された。治療の結果、9ヶ月目で血清TSH(CLIA) $1.2\mu\text{U/ml}$ およびFT $_4$ 1.70ng/ml と基準範囲を示した。

考 察

われわれは、当初からこれまでの経験³⁾より

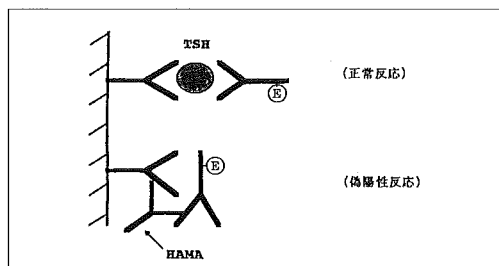


図3 推定されるIgG型HAMAのTSH測定系への干渉機序

正常な免疫反応では、固相に結合した一次抗体（マウスMAb）に血中のTSHが捕捉され、酵素標識抗体（マウスMAb）が反応し、TSH濃度に依存した酵素活性を示す。これに対して、マウスIgGで吸収されない本例のIgG型HAMAは、両マウスMAbのFab部分に結合し、あたかもTSHが存在するかのように偽陽性反応が遂行するものと推定される。

HAMAによる見かけ上の高値を推定した。ただし、新生児の血中にHAMAがみられると仮定した場合、経胎盤的に母体より移行するIgGクラス抗体以外に考えられない。そこで、母親の血清を併せて精査したところ、患児と同様な矛盾する高TSH血症が確認された。検討の結果、2組の母児の高TSH血症はIgG型HAMAが関与する図3に示す免疫学的な干渉による、見かけ上の高TSH血症と考えられた。

その根拠は、①一次抗体を非マウス抗体を用いた方法では基準範囲を示したこと、②HPLCのIgGピークに一致してTSHが溶出されたこと、③protein Aおよび抗IgG血清による免疫吸収により血清TSHが低値を示したこと、④抗TSH抗体は陰性であったことの4点である。

症例1の患児はクレチン症マスキングの基準値をはるかに上回る測定上限以上のTSH測定値を示したが、このような診断の結果、無治療による経過観察となった。その結果、血清TSHは8ヶ月目より明らかな低下傾向を示し、10ヶ月目では基準範囲を示した。このことは、母体由来のIgGの半減期を考慮すると矛盾しない。またHPLCにおいて、TSHは見かけ上IgGピークのみであり正常な遊離のTSHがほとんど

どみられなかったデータとも一致する。

症例2の患児は、母親の血清中にもIgG型HAMAが検出されたことから、クレチン症マスキングにおける高TSH血症は、前述の機序によるものと理解される。しかしprotein A処理および免疫吸収において、症例1ほどの感受性は示さなかった。この点はHPLCにおいて、患児血清中に正常TSHがIgGピークに一致する画分と同程度以上みられたデータと一致する。このHPLCの所見およびHAMAの影響を回避できると推定されるCLIAにおいても高TSH血症が持続したことから、TRH試験を施行することにより「軽症クレチン症」と診断された。すなわち症例2の患児は、母体由来のHAMAと軽症クレチン症との合併という稀な病態を呈していたと考察された³⁾。

ここに述べた2例のHAMAは、マウスの全血清およびIgG分画により吸収できなかった。もちろん、各測定キットにはこのようなマウスの血清蛋白が稀釈液中に含まれている。また、マウス・ヒトキメラ抗体を用いたEIAにおいても、見かけ上の高TSH血症がみられた。さらにはデータは示さなかったが、TSH以外のマウスMAbを用いた免疫学的方法において異常データはみられなかった。以上の点よりこれらのHAMAは図3に示すように抗TSHマウスMAbのFab部分の定常部の一部またはTSHを認識するイディオトープに反応するものと推定される^{1,3)}。この点については、イムノブロット法などにより今後さらに検討したい。

クレチン症マスキングにおいてこのような、異好抗体により母児に一過性の高TSH血症がみられたという事実は、ヨーロッパにおいてすでに報告されている⁸⁻¹⁰⁾。しかし、それらは、ウサギ抗ヒトTSH抗体を用いた方法であった。マウスMAbを用いた方法に改良されてからは、われわれの報告が初めてのものである。さらに相異点として、既報例では干渉因子はウサギ血清で中和され、母親にウサギとの接触

歴⁸⁾のみられた例もあったことである。ここに述べた母親らには、マウスとの接触歴はないばかりか、特記すべきエピソードは確認できなかった。母児にみられた一過性の高TSH血症以外にも、HAMAによる見かけ上の高TSH血症が報告されている¹²⁻¹⁵⁾。これらの中で、 T_3 、 T_4 は上昇したが、TSH抑制されないことからHAMAの存在が明らかになったバセドウ病の症例もあり注目される^{14, 15)}。

以上のことから、甲状腺ホルモンと矛盾する高TSH血症がみられた場合には、積極的に干渉因子HAMAを疑った解析をすべきであると考えられた。特にクレチン症は、早期発見、早期治療により知能および精神発達の遅延を阻止できる先天性疾患であることからTSHを測定するマスキングの使命は大きい。HAMAの存在は、すべての免疫学的測定法に対する警鐘であり、誤診やそれにもとづく過剰治療の防止のためにも重要である。今後、さらにHAMAの抗TSH MAbの認識部位を解析し、このような干渉を除外し得る測定方法の研究開発が望まれる。

謝 辞

本研究の一部は、平成11年度北海道大学医療技術短期大学部研究助成金により行われた。

引用文献

- 1) Klug T. L., Green P. J., Zurawki V.R. Jr., et al.: Confirmation of a false-positive result in CA125 immunoradiometric assay caused by human anti-idiotypic immunoglobulin. Clin Chem 34: 1071-1076, 1988.
- 2) Kricka L. J., Schmerfeld-Pruss D., Senior M., et al.: Interference by human anti-mouse antibody in two-site immunoassays. Clin Chem 36: 892-894, 1990.
- 3) 森山隆則, 上原聰, 鷲尾明子, 他.: ヒトIgM

- 型抗マウス抗体 (HAMA) による血清 CA-125測定における偽陽性反応の解析. 臨床検査 40: 607-610, 1996.
- 4) 矢野公一, 森山隆則, 蒔田芳男, 他.: 新生児マス・スクリーニングで発見された見かけ上の高TSH血症の母児例-母体の抗マウスIgG抗体 (HAMA) の関与-. ホと臨床 32: 105-110, 1998.
 - 5) 原田正平, 矢野公一, 山野公明, 他.: 母体血中に甲状腺刺激ホルモン(TSH)測定系に干渉する物質が存在した軽症クレチン症の1例. 日本マス・スクリーニング学会誌 9: 75-79, 1999.
 - 6) Moriyama T., Yamadera K., Takebe T. et al.: Purification of the pancreatic stone protein by high-performance liquid chromatography. J Chromatogr 493: 164-169, 1989.
 - 7) 矢野公一, 森山隆則, 川崎芳正, 他.: クレチン症マス・スクリーニングのPitfall-母体由来の抗TSH抗体による高TSH血症. ホルモンと臨床 47: 82-86, 1999.
 - 8) Larsson A, Hedenborg G. Carlström A.: Placental transfer of maternal anti-rabbit IgG causing falsely elevated TSH levels in neonates. Acta Paediatr Scand 70: 699-703, 1981.
 - 9) Gendrel D, Feinstein M.-C., Grenier J., et al.: Falsely elevated serum thyrotropin (TSH) in newborn infants: transfer from mothers to infants of a factor interfering in the TSH radioimmunoassay. J Clin Endocrinol Metab 52: 62-65, 1981.
 - 10) Czernichow P, Vandalem L. Hennen G.: Transient neonatal hyperthyrotropinemia: a factitious syndrome due to the presence of heterophilic antibodies in the plasma of infants and their mothers. J Clin Endocrinol Metab 53: 387-393, 1981.
 - 11) Leino A., Kaihola H.-L., Kleimola V., et al.: False pathological thyrotropin (TSH) level in mother and infant caused by interfering antibodies in the radioimmunoassay. Acta Paediatr Scand 74: 607-608, 1985.
 - 12) Zweig M. H., Csako G., Spero M.: Escape from Blockade of interfering heterophile antibodies in a two-site immuno-radiometric assay for thyrotropin. Clin Chem 34: 2589-2591, 1988.
 - 13) Kahn B. B., Weintraub B. D., Csako G., et al.: Factitious elevation of thyrotropin in a new ultrasensitive assay: implication for the use of monoclonal antibodies in sandwich immunoassay. J Clin Endocrinol Metab 66: 526-533, 1988.
 - 14) Iitaka M, Ishii J., Ishikawa N., et al.: A case of Graves disease with false hyper-thyrotropinemia who developed silent thyroiditis. Endocrinol Japon 38: 667-671, 1991.
 - 15) 久岡俊彦, 飯野史郎, 齋藤一二三, 他.: 遊離甲状腺ホルモン濃度とTSH濃度間に解離を認める病態に関する検査方法と臨床について. 日本内分泌学会誌 70: 563-572, 1994.