

バセドウ病の成因と TSH 受容体抗体

女屋 敏 正
山梨医科大第三内科

キーワード バセドウ病, TSH 受容体, TSH 受容体抗体, 甲状腺刺激抗体, 甲状腺刺激阻害抗体

はじめに

編集委員会のお許しを頂き、箱根での第11回富士ホルモカンファレンスの教育講演をまとめて本稿とさせていただきますことにした。代表的な甲状腺疾患であるバセドウ病と TSH 受容体抗体との関連はかなり以前から考えられて来たが、本稿ではここ数年間に私共の教室で得られたデータを中心に、バセドウ病の成因と TSH 受容体抗体に関する新しい考え方について話を進めてみることにする。何故甲状腺は腫れるのかと言う問題は、今も昔も甲状腺研究者にとっては大きなテーマであるが、現在では分子生物学の進歩により、「甲状腺が腫れるのは何故か」という問題が遺伝子のレベルで研究される様になった。TSH 受容体抗体の話に入る前にこの点について少し触れてみることにする。

1) 甲状腺腫大と関連する遺伝子

そもそも甲状腺は刺激されると腫大するのは言うまでもないが、甲状腺を TSH で刺激すると様々な甲状腺蛋白の遺伝子が発現される。甲状腺特異蛋白であるサイログロブリンやペルオキシターゼや TSH 受容体の遺伝子が TSH により影響を受けるのは当然と考えられるが、その他にどのような遺伝子が発現され得るかを検討した。我々のデータによると、抗甲状腺剤 (PTU) 投与ラットで甲状腺が腫大した状態で最も強く発現した遺伝子はフェリチン重鎖遺伝

子であることが判明した¹⁾。一方、甲状腺は腫瘍でも腫大するが、我々が樹立したラット甲状腺癌²⁾ではクロニン140³⁾リボソーム蛋白である PO 蛋白⁴⁾、ヒートショック蛋白である glucose-regulated protein 78⁵⁾などであることが判明した。今まで知られていなかったこれらの甲状腺蛋白は興味深いことに全て TSH 依存性であり、TSH 刺激によりそれらの遺伝子発現が増強された。このような甲状腺蛋白が如何にして、またどの様に oncogene や細胞増殖因子などとの関連で甲状腺腫大を起こすかは細胞の分化や癌化を考える上で、またこれらの蛋白が自己免疫甲状腺疾患の自己抗原になりうる可能性を考えると大変興味深い。繰り返すまでもなく、今や甲状腺疾患の成因について甲状腺蛋白遺伝子を調べる時代になったのである。特に TSH 受容体に関しては、数年前に Vassart ら⁶⁾によってクローニングされてからその構造と機能に関して多数の論文が発表された。当然のことであるが、TSH 受容体とバセドウ病との関連も分子レベルで研究される様になった。

2) 甲状腺刺激物質を求めて

ホルモンという言葉の語源はギリシャ語の hormao で“刺激する”と言う意味であるが、バセドウ病の成因に関連して甲状腺刺激物質の研究は今でも甲状腺研究者にとっては最も興味のあるテーマである。1956年 Adams と Purves が⁷⁾ LATS (long-acting thyroid stimulator) を発見して以来(表 1), LATS に関する論文もいやと言う程出たのであるが、LATS が IgG

表1. 甲状腺刺激物質の歴史
THYROID STIMULATORS

1956	Adams & Purves: Long-acting thyroid stimulator (LATS)
1969	Adam, et al.: LATS-protector (LATS-P)
1968	Onaya & Solomon: E prostaglandins
1971	Onaya, et al.: Human thyroid stimulator (HTS)
1974	Smith & Hall: Thyroid-stimulating immunoglobulin (TSI)
1976	Orgiazzi, et al.: Human thyroid adenyl cyclase stimulator (H-TACS)
1976	Onaya, et al.: Histamine H ₂ -receptor

であり甲状腺膜蛋白により中和されるという事実以外には余り大した新発見はなかったのである。この点で後に問題になったのは未治療のバセドウ病患者の実は10%位にしかLATSが陽性にならなかった点である。ところが1967年になって、またニュージーランドのAdamsらが⁸⁾殆どの未治療バセドウ病患者血中にLATS protectorが存在すると報告した。このprotectorというのはLATS活性の甲状腺膜による中和を阻害するIgGのことで、この物質がバセドウ病患者の甲状腺を刺激しているのではないかと言うものであった。しかし、その時点ではそれに関する直接的な証明はなかった。当時、私は米国に留学中でprostaglandin E compoundsが強力な甲状腺刺激物質であること⁹⁾を発見し興奮していた。Prostaglandinの様な生理的物質がひょっとしてバセドウ病の成因に関連しているのかと胸を躍らせていた。その後帰国して、何とかしてバセドウ病患者血中に甲状腺刺激物質を検出するよい方法はないものかと思案した挙句、ヒト甲状腺スライスを用いて患者血清によるコロイド小滴形成刺激を調べてみたのである。コロイド小滴形成と言うのはin vitroでTSH刺激を観察する非常に良い方法だったので、驚いたことに殆どの未治療バセドウ病患者血清またはIgGが陽性になったのである。ところがマウス甲状腺を用いると殆どの患者血清で陰性であり、またサイクリックAMPを測定する系でも同様であった。そこで未治療バセドウ病患者血中にはヒト甲状腺に特異的な甲状腺刺激IgGが存在することを確信し、Human Thyroid Stimulator (HTS)と命名して報告した¹⁰⁾。同じ頃、ShishibaらはLATS protectorが実際にコロイド小滴を刺激

するという実験的事実を報告した¹¹⁾。これら二つの日本人の論文は当時国際的にもかなりのimpactを与えたものと思われた。1974年になって、Smithら¹²⁾は¹²⁵I-TSHの甲状腺膜結合を利用したレセプターアッセイを開発したが、このキットを用いると未治療バセドウ病患者の殆どが陽性になるため、現在でもTSH receptor antibody (TRAb)又はTSH-binding inhibitor immunoglobulin (TBII)として臨床的に利用されている¹³⁾(図1)。当時、Doniachがthyroid-stimulating immunoglobulin (TSI)という言葉 を初めて使用したが、現在ではthyroid-stimulating antibody (TSAAb)という名称が一般的となった。即ち、甲状腺を刺激する抗体であり、その刺激効果はサイクリックAMP産生を見るものである¹⁴⁾。また橋本病やバセドウ病で認められる甲状腺刺激阻害抗体をthyroid stimulation-blocking antibody (TSBAb)と称している¹⁵⁾。著者が始めたサイクリックAMP産生による抗体の検出法は色々改良され、現在ではラット甲状腺細胞株であるFRTL-5を用いるのが一般的である¹⁶⁾。その他、甲状腺細胞を刺激してサイクリックAMP産生を起こす液性因子には活性アミンなどがあり、特にヒスタミンはH₂レセプターを介してバセドウ病甲状腺をin vitroでよく刺激する¹⁷⁾。しかしながら、結局のところ甲状腺刺激物質として強力なものはやはりTSHと一部のバセドウ病IgGということになる。話は少し戻るが、1979年に出版されたCecilのTextbook of Medicine、第15版の2121頁にこの様な記載がある¹⁸⁾。「様々な検出法により幾つかのthyroid stimulating immunoglobulinが見いだされている。その一つがOnayaらの“human thyroid stimulator”

TSH binding inhibitor immunoglobulin (TBII)

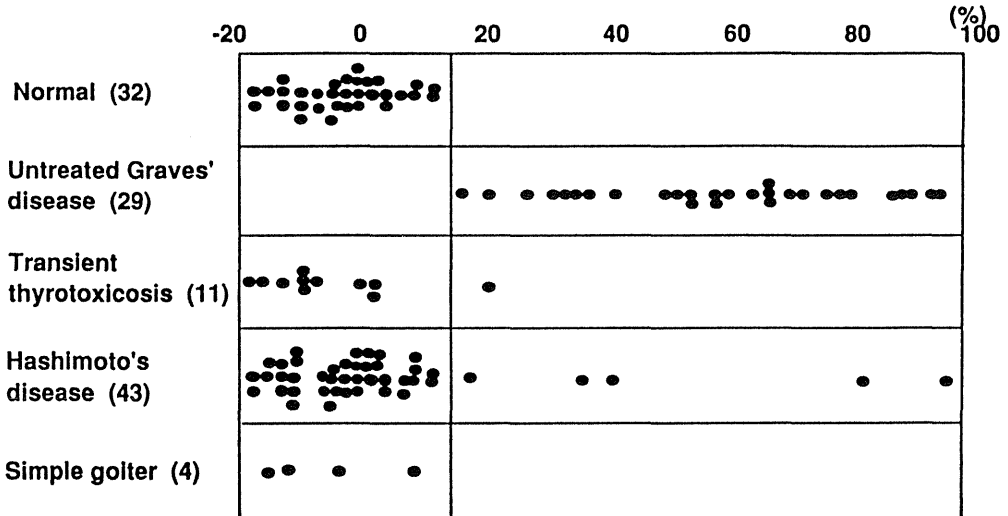


図1. 各種甲状腺疾患における TBII 活性。

(HTS)であり、もう一つが Adams の“LATS protector” (LATS-P)である。他のものはヒト甲状腺膜の TSH レセプターから TSH を displace させるかどうかで検出される。これらの IgG は恐らく様々な構造を有しおり、ヒトと動物では異なる親和性を持っているものと考えられる。これらの抗体が本当に TSH レセプ

ターの異常刺激に反応して生ずる抗体なのかどうか今後の大きな課題である。」と言う内容であるが、この課題こそ我々が目指すところであり、この点についてその実験結果を述べることにする。

3) バセドウ病 IgG の多様性

Cecil の Textbook of Medicine の筆者であっ

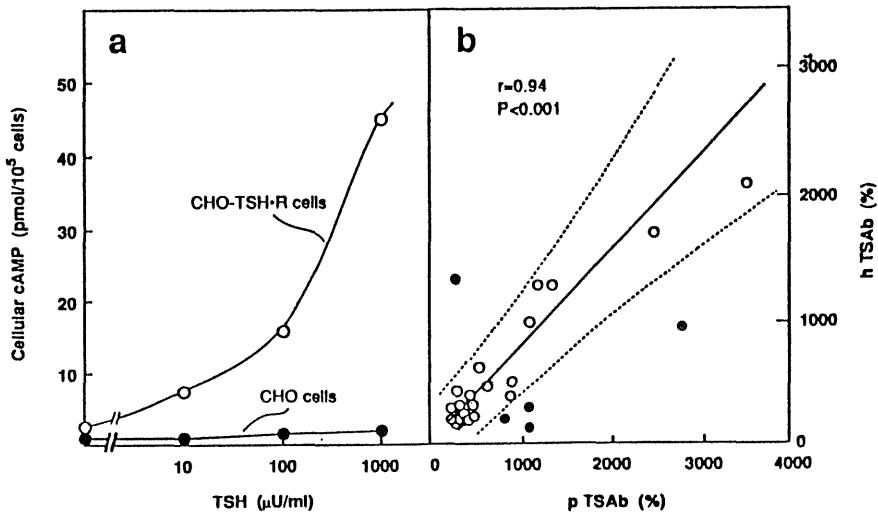


図2. ヒト TSH 受容体を移入した CHO 細胞とブタ甲状腺培養細胞における cAMP 産生反応の比較¹⁹⁾。

た DeGroot が既に指摘している様に、バセドウ病 IgG は非常に多様性に富むことが分かって来た。バセドウ病の成因との関連で TRAb の構造と機能は最も興味ある研究分野であることは言うまでもない。コロイド小滴形成やサイクリック AMP 産生を見ると、バセドウ病 IgG の刺激活性はヒトとマウスでは大きく異なることから human thyroid stimulator (HTS) と命名したことは既に述べた。Smith のキットによる TSH-binding inhibitor immunoglobulin (TBII) はブタ甲状腺膜を用いるため種特異性と言う点で同様な問題がある。サイクリック AMP 産生を見るアッセイ系でヒト TSH を Chinese hamster ovary (CHO) cell に transfect した細胞とブタ甲状腺培養細胞とを比較したのが図 2 である¹⁹⁾。やはり 2SD から外れるものが数例あり、つまりリコンビナントのヒト TSH 受容体を用いる事が可能になった今日、種特異性を考慮したアッセイ法を考案しなければならない。

4) 新しいタイプの TSH 受容体抗体
さて、ここで我々の教室で最近発見した興味

深い症例を提示する。これらの症例では、種特異性もさることながら、最も興味ある事実は TSAb が強陽性にも拘わらず或いは TSBAb が強陽性にもかかわらず TBII が共に陰性と言う点である。最初の症例は以前バセドウ病に罹患した経験があり、現在は甲状腺機能低下症になっているが、その臨床経過を図 3 に示す様に一貫して TBII が陰性にも拘わらず、TSAb は 3,000-4,000% と強陽性である。これとは逆に、TBII が陰性で blocking antibody が陽性という患者の臨床経過を図 4 に示す。この患者もバセドウ病の罹患歴があるが、現在は blocking antibody による甲状腺機能低下症と考えられる。即ち、キットによる TBII が陰性でも実際には生物活性を有する IgG が存在するのである²⁰⁾。この様な臨床的事実は後述の我々のデータを考える上で非常に興味ある現象である。

5) TSH 受容体ペプチドを用いて

TSH 受容体のクローニングと同時に多くの研究者は TSH 受容体の機能を知るために site-directed mutagenesis という方法に飛びついたのであるが²¹⁾、私どもは合成ペプチドを用い

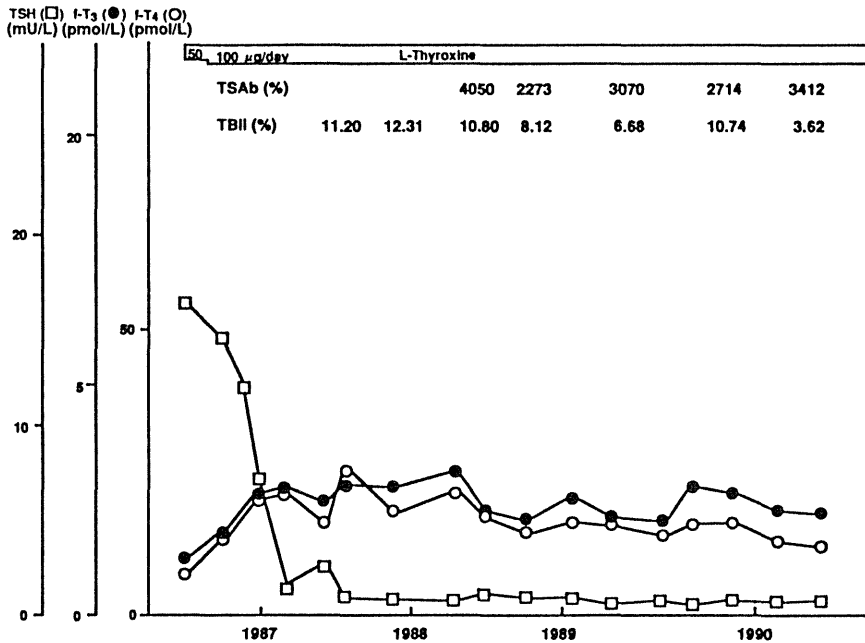


図 3. TSAb 強陽性, TBII 陰性症例の臨床経過。

経過表

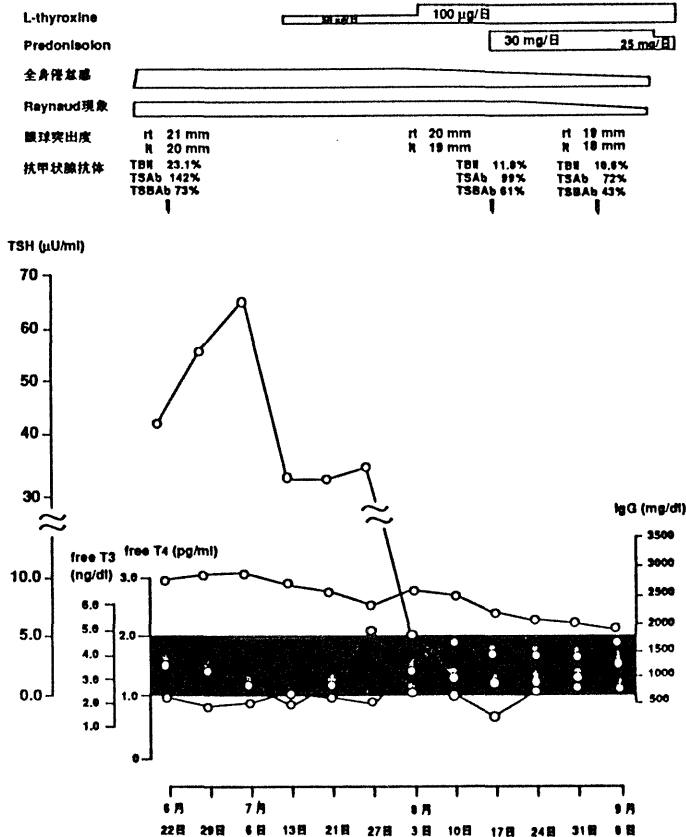
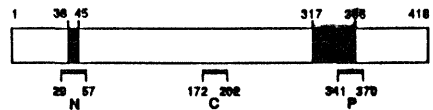


図4. TBII陰性でTSBAb強陽性の症例。

て研究を進めることにした。まず考えたのが TSH 受容体が本当に自己抗原でバセドウ病が発症するならば動物に TSH 受容体ペプチドを免疫すれば TSAb が人工的にできるのではないかというアイデアであった。当時は、まさかそんな夢の様な話が実現するとは思ってもしなかったのである。TSH 受容体には細胞外領域に2つの特異的な挿入部位があり、8アミノ酸と50アミノ酸のものであるが、これらの部位あるいは中間の部位のペプチドを合成し、最初はニワトリに、次にはラビットに、そしてラットにと言った具合に様々な動物に免疫した(図5)。この様に作成した抗体の或るものは TSAb をまた或るものは TSBAb を有していた

Schematic representation of the extracellular component of human TSH receptor and localization of the synthesized peptides



N: CECHQEEEDFR VTCKDIQRI PSLPPSTQTL
 C: FQGLCNETLTLKLYNNGFTSVQGYAFNGTKL
 P: SKFGDTHNNAHYVVFEEQEDERGFQGL

N peptide, C peptide and P peptide were synthesized by Automatic Peptide Synthesizer (Pharmacia, BioLynx).

図5. TSH 受容体の細胞外領域。合成ペプチドの位置を示す(N,C,P)。

表 2. ペプチド抗体の TSAb 活性
TSAb and TBII activities of rabbit antibodies toward C-peptide and P-peptide

	TSAb (%) ^(a)	TBII (%) ^(b)
Control	100±6 ^(c)	10.8 ^(d)
C peptide antibody (rabbit 3)	4127±152*	13.4
(rabbit 4)	2548±822*	15.1
P peptide antibody (rabbit 5)	359±17*	7.4
(rabbit 6)	3468±459**	12.4

(a) TSAb: thyroid stimulating antibody

TSAb activities of rabbit antibodies were measured using FRTL-5 cells.

(b) TBII: TSH-binding inhibitor immunoglobulin

(c) Mean±SEM of triplicate determinations

(d) Mean of duplicate determinations

* p<0.001 vs. control

** p<0.05

表 3. 細胞外ループペプチド抗体の TSAb 活性と TBII

	TSAb (%) ^(a)	TBII (%) ^(b)
control (n=3)	99±19 ^(a)	0 ^(d)
E1 peptide antibodies (rabbit 1)	305± 5.2*	0.43
(rabbit 2)	104± 3.9	12.7
E2 peptide antibodies (rabbit 3)	1153±50*	-0.43
(rabbit 4)	1083± 4.0*	-1.65
E3 peptide antibodies (rabbit 5)	956±57*	-1.21
(rabbit 6)	833±32*	3.2

E₁: 第1グループ, E₂: 第2グループ

E₃: 第3グループを示す。

のである。C 端のペプチドをニワトリに免疫した場合には TBII 陽性の TSAb が出来た²²⁾, 図5に示す様なペプチドをラビットに免疫したところ, 驚いたことに非常に強力な TSAb が産生された(表2)^{23,24)}。ここで特に意外だったのは LH レセプターと類似の C ペプチドによっても強力な TSAb が作成できた点である²⁴⁾。さらに驚いたことには細胞外ループペプチドによっても同様に TSAb ができたのである(表3)²⁵⁾。従って, このデータからは TSH 受容体の細胞外領域のどの部分でも抗 TSH 受容体抗体の自己抗原になり得ることが推測された。また逆にこの様な抗体がバセドウ

病を引き起こす TSAb ともなり得ると考えられた。実際にバセドウ病患者の血中にこれらペプチドを認識する抗体が存在するかどうか調べたのが図6である。ELISA 法で患者血中には各種ペプチドを認識する抗体が存在することが証明できた(図6)²⁶⁾。

一方, 細胞内領域のペプチドを用いた場合には生物活性を持つ抗体は産生されなかった。即ち, 細胞外領域のペプチド抗体のみが TSAb または TSAb になり得たのである。

6) バセドウ病の実験モデル

TSH 受容体が自己抗原としてバセドウ病を引き起こすという直接証明はまだなかった。当

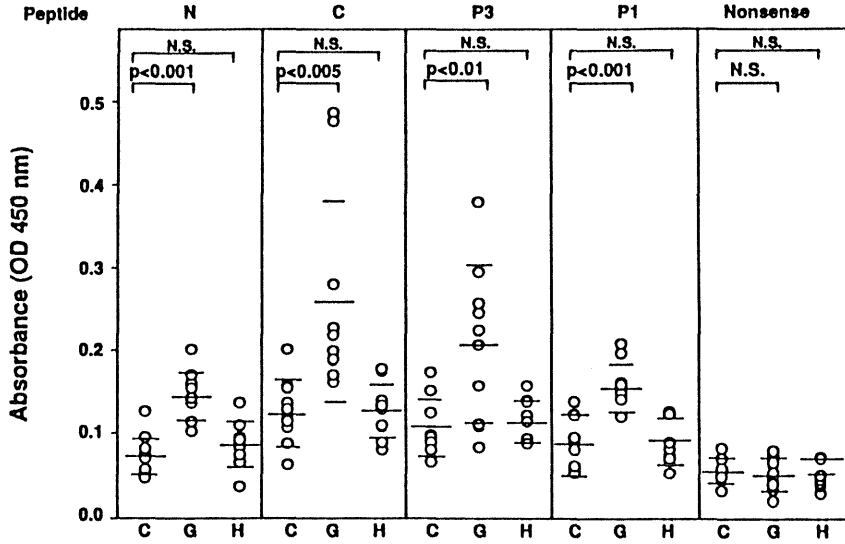
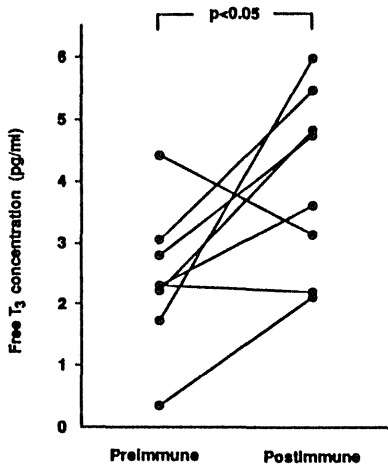


図6. バセドウ病患者血中には各種 TSH 受容体ペプチドを認識する抗体が存在することを示す。



Comparison of free T3 concentration between preimmune and postimmune sera from 8 rabbits.

図7. N ペプチド投与による血中フリー T₃ の上昇。

然の事ながら、TSAb を人工的に作る事に成功した訳であるから、次に我々の目指す目標はバセドウ病のモデル動物を作成する事である。そこでラビットに N ペプチド(N 端側)を2週毎に免疫して10週後に TSAb と血中甲状腺ホル

モンを測定した。TSAb は8匹中7匹に陽性で、図7に示す様に10週後には甲状腺ホルモンが上昇していたのである²⁷⁾。ところが、最初に示した症例の様に TBII は全く陰性であった。この事実を説明するための可能性としては、まずバセドウ病の自己抗体は、一般には TSH 受容体の3次構造を認識する抗体と考えられる。いずれにしても、勿論完全なものとは言えないまでもこの実験によりバセドウ病の実験モ

Western blot analysis of TSH receptor protein.

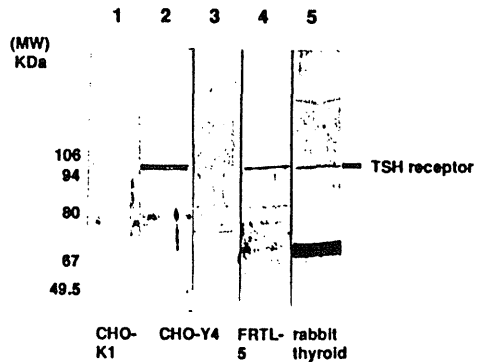


図8. Western blot による TSH 受容体の認識(104 kD)。

表 4. ラットにラット TSH 受容体ペプチドを免疫した場合
Thyroid functions in rats immunized with RAT-P

	TSABb %	TSBAb %	TBII %	¹²⁵ I uptake %	T ₃ ng/ml	T ₄ μg/ml
Control (n=8) mean±S.D.	100 ±19	0.0 ±32.9	0.0 ±7.4	14.2 ±2.7	0.47 ±0.06	4.39 ±0.49
RAT-P (n=8) mean±S.D.	102 ±30	14.4 ±15.4	7.7 * ±5.3	14.1 ±1.7	0.29 * ±0.19	3.91 ±0.60

*Statistically significant vs. control.

デルが出来たものと思われる。言い換えれば、バセドウ病が TSH 受容体を自己抗原とする自己免疫疾患である事実を或る程度実験的に証明出来たものと言える。

ここで実験的に重要な問題点はこれらの抗体が TSH 受容体を認識するかどうかである。これらの中には Western blot で TSH 受容体を特異的に認識するものがあり²⁷⁾、図 8 にそれを示すが、lane 2 には TSH 受容体を transfect した CHO 細胞、lane 4 には FRTL-5 細胞、lane 5 にはラビット甲状腺を示した。それぞれ 104 kD のところに TSH 受容体蛋白のバンドが見

られるが、バンドが認められない Lane 1 は TSH 受容体を transfect していない CHO 細胞で、lane 3 はペプチドで吸収したものである²⁸⁾。

7) 実験的甲状腺機能低下症

ヒト TSH 受容体細胞外領域の C 端側ペプチドをニワトリに免疫して blocking antibody が出来たことは既に述べた。今度はラット TSH 受容体 C 端側ペプチドをラットに免疫してみると、表 4 に示す様に、TSBAb (blocking antibody) は上昇傾向にあり、TBII は軽度ながら有意に上昇し、血中 T₃ は有意に減少した (Ohta, E et al, 未発表)。恐らく、TSBAb と

Model of TSHR which Approximates the N- and C-Terminal Portions of the TSHR Extracellular Domain (Kosugi et al.).

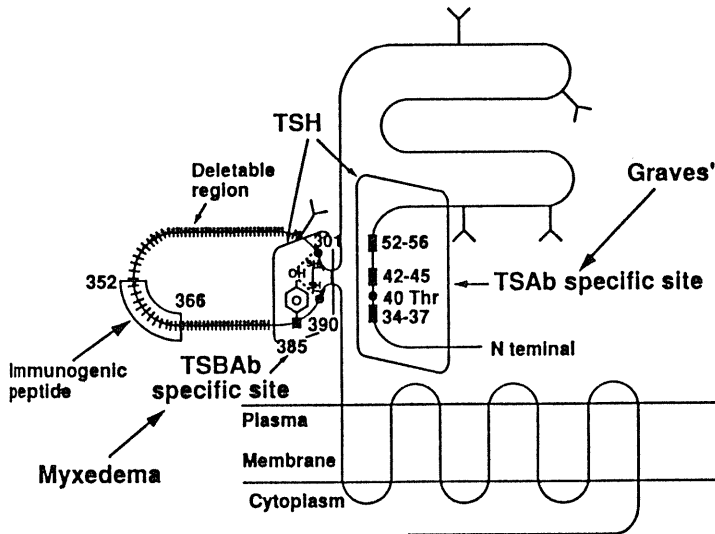


図 9. TSBAb のエピトープは C 端側に、TSAAb のエピトープは N 端側に推定している。

最も関係のありそうな TSH 受容体のエピトープはやはり C 端側が有力である。Site-directed mutagenesis を用いた研究で、NIH の Kohn のグループの Kosugi からも同様な結論を出している (図 9)²⁹⁾。

8) 非甲状腺組織の TSH 受容体

従来、バセドウ病眼球突出症の自己抗原として 64 kD 蛋白が知られていたが³⁰⁾、はっきりした結論が出ていなかった。ところが、最近ナポリの Fenzi らのグループがバセドウ病患者の眼窩組織に TSH 受容体 mRNA の存在を報告し³¹⁾、にわかに眼球突出症と TSH 受容体との関連が注目される様になった。一方、教室の遠

藤ら³²⁾はラット眼窩組織のみならず脂肪組織に TSH 受容体 mRNA を証明し、同時に TSH 受容体を蛋白レベルで世界で初めて証明した。さらに遠藤らはバセドウ病患者の眼窩組織と前脛骨部粘液水腫の皮下組織に TSH 受容体蛋白を証明したのである。この事実は今年の Cardiff で開かれたヨーロッパ甲状腺学会で既に報告したのであるが³³⁾、蛋白レベルでの証明は初めてということで話題になった。外眼筋が何故肥厚するのかなどサイトカインとの関連が問題にされているが³⁴⁾、いずれにしても眼窩の脂肪組織や前脛骨部粘液水腫の皮下脂肪組織に TSH 受容体が存在し、甲状腺刺激抗体に反応

The correlation between the potentiating effect of anti-Fc antibody and TSAb activities.

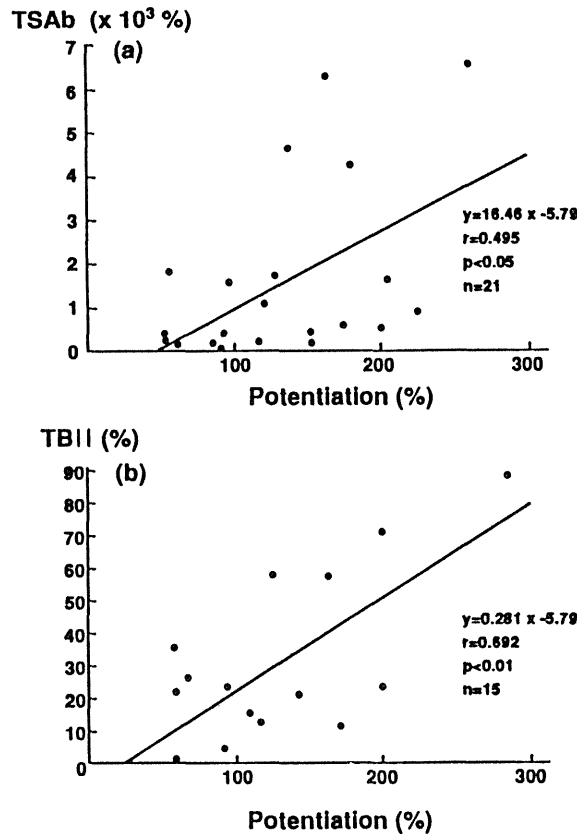


図10. 刺激増強活性と TSAb または TBII との相関³⁸⁾。

するとすれば理論的にも説明し易いのである。ここで前脛骨部粘液水腫を有するバセドウ病患者には LATS が殆どの場合存在する事実を考えればなおさらのことである。LATS の様な強力な甲状腺刺激抗体は脂肪組織の TSH 受容体さえも刺激する可能性は十分に考えられる。

9) 変異型 TSH 受容体

最近、ニューヨークの Davies らはヒト甲状腺に細胞外領域のみの短い TSH 受容体を見だし³⁵⁾、バセドウ病患者血中にはこの様な TSH 受容体を認識する抗体が存在すると報告した。長崎大学の永山らもこの様な TSH 受容体の存在を報告している³⁶⁾。一方、教室の遠藤らはラット脂肪組織に同様な変異型 TSH 受容体を発見している³⁷⁾、非常に興味深いことは脂肪組織には全長の TSH 受容体にしろ短い変異 TSH 受容体蛋白が存在する事実である。これらの事実はバセドウ病の成因にとって少なくとも2つの重要な可能性を示唆している。一つは変異型 TSH 受容体が自己免疫疾患としてのバセドウ病の自己抗原となる可能性であり、もう一つは脂肪組織の TSH 受容体がバセドウ病の自己抗原になる可能性である。この新しい仮説は現在では突拍子もないものの様であるが、近い将来間違いなく解明される興味ある課題である。

10) 甲状腺刺激増強抗体 (Thyroid-stimulation potentiating antibody: TSPA)

甲状腺刺激抗体 (TSAb) 活性を増強する抗体がバセドウ病疾患血中に存在するかも知れないが、まだそれを実証したデータはない。しかし、*in vitro* では抗 Fc と結合することにより TSAb 活性が増強されることが判明したのである³⁸⁾。また blocking antibody が抗 Fab により TSAb に変換されると言う報告もある³⁹⁾。図 10 に教室の斉藤らのデータを示したが、TSAb 活性と刺激増強活性とは非常に良い相関があり、この様な現象がバセドウ病患者で実際に起きているかどうか興味ある研究課題である。

おわりに

バセドウ病患者血中には、従来単純に考えられていた TSAb とは異なり、この様に実に様々な抗体が存在し、しかも複雑にバセドウ病患者の甲状腺機能に関与する可能性がある。また自己抗原も多様性に富むものと推測される。最後に、TSH 受容体の研究には現在ペプチドを用いる方法と site-directed mutagenesis を用いる方法とがあることは既に述べたが、本稿ではペプチドを用いた私共のデータを中心に話題を提供した。それぞれの方法にはそれなりの問題があり、ペプチドを用いる方法には患者血中の抗体が linear epitope を認識するかどうかといった問題⁴⁰⁾、また site-directed mutagenesis には変異 TSH 受容体が3次構造を変えることなく実際に非甲状腺細胞に発現されているかどうかなどである。恐らくこの様な問題の為に、様々な discrepancy が生じているものと考えられるが、多くのデータの積み重ねにより一步一步真理の方向にコンセンサスが得られつつあることは間違いない。

文 献

- 1) Isawa Y, Aida K, Ohta K, Onaya T. Molecular cloning of thyrotropin regulatable genes from rat thyroid gland. *Biochem Archiv* 1990; **6**: 115-127.
- 2) Endo T, Shimura H, Saito T, Onaya T. Cloning of malignantly transformed rat thyroid (FRTL) cells with thyrotropin receptor and their growth inhibition by cyclic AMP. *Endocrinology* 1990; **126**: 1492-1497.
- 3) Ohta K, Endo T, Kotani S, Onaya T. Isolation of a complementary deoxyribonucleic acid whose expression is markedly increased in malignantly transformed FRTL cells and neoplastic human thyroid tissues. *J Mol Endocrinol* 1994; (in press).
- 4) Ikeda M, Saito T, Endo T, Tsurugi K, Onaya T. Thyrotropin stimulates the expression of an acidic ribosomal protein, PO, mRNA in cultured rat thyroid (FRTL) cells. *Endocrinology* 1991; **128**: 2540-2547.
- 5) Endo T, Shimura H, Saito T, Ikeda M,

- Ohmori M, Onaya T. Thyrotropin stimulates glucose-regulated protein (GRP 78) gene expression in rat functional thyroid epithelial cells, FRTL. *Mol Endocrinol* 1991; **5**: 905-910.
- 6) Parmentier M, Libert F, Maenhaut C, Lefort A, Gerard C, Perret J, Van Sande J, Dumont JE, Vassart G. Molecular cloning of the thyrotropin receptor. *Science* 1989; **246**: 1620-1622.
- 7) Adams DD, Purves HD. Abnormal responses in the assay of thyrotropins. *Proc Univ Otago Sch Med* 1956; **34**: 11-12.
- 8) Adams DD, Kennedy TH. Occurrence in thyrotoxicosis of a gammaglobulin which protects LATS from neutralization by an extract of thyroid gland. *J Clin Endocrinol Metab* 1967; **27**: 173-177.
- 9) Onaya T, Solomon DH. Stimulation by prostaglandin E_1 of endocytosis and glucose oxidation in canine thyroid slices. *Endocrinology* 1970; **86**: 423-426.
- 10) Onaya T, Kotani M, Yamada T, Ochi Y. New in vitro tests to detect the thyroid stimulator in sera from hyperthyroid patients by measuring colloid droplet formation and cyclic AMP in human thyroid slices. *J Clin Endocrinol Metab* 1973; **36**: 859-866.
- 11) Shishiba Y, Shimizu T, Yoshimuyra S, Shizume K. Direct evidence for human thyroidal stimulation by LATS-protector. *J Clin Endocrinol Metab* 1973; **36**: 517-521.
- 12) Smith BR, Hall R. Thyroid-stimulating immunoglobulins in Graves' disease. *Lancet* 1974; **II**: 427-430.
- 13) 女屋敏正, 高沢賢次, 柴田圭一. TSH 受容体抗体の検出とその臨床的異議について。信州医誌 1983; **31**: 223-227.
- 14) Zakarija M, McKenzie JM. Clinical significance of assay of thyroid-stimulating antibody in Graves' disease. *Ann Intern Med* 1980; **93**: 28-32.
- 15) Endo K, Kasagi K, Konishi J, Ikekubo K, Okuno T, Takeda Y, Mori T, Torizuka K. Detection and properties of TSH-binding inhibitor immunoglobulins in patients with Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis. *J Clin Endocrinol Metab* 1978; **46**: 734-739.
- 16) Kasagi K, Konishi J, Iida Y, Tokuda Y, Arai K, Endo K, Torizuka K. A sensitive and practical assay for thyroid-stimulating antibodies using FRTL- thyroid cells. *Acta Endocrinol* 1987; **115**: 30-36.
- 17) Onaya T, Hashizume K, Sato A, Takazawa K, Akasu F, Endo W. Evidence for the existence of a histamine H_2 -receptor in the mouse thyroid. *Endocrinology* 1977; **100**: 61-66.
- 18) DeGroot LJ. Cecil textbook of medicine. In: Beeson PB, et al. eds., 15th Edition. Saunders WB Co., Philadelphia, 1979, p. 2121.
- 19) Endo T, Ohmori M, Ikeda M, Anzai E, Onaya T. Heterogeneous responses of recombinant human thyrotropin receptor to immunoglobulins from patients with Graves' disease. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; **186**: 1391-1396.
- 20) Ohta K, Kotani S, Ohmori M, Endo T, Onaya T. Two cases of hypothyroid Graves' disease with unique antibodies toward thyrotropin receptor (Submitted to *Clin Endocrinol*).
- 21) Nagayama Y, Rapoport B. The thyrotropin receptor 25 years after its discovery. New insight after its molecular cloning. *Mol Endocrinol* 1992; **6**: 145-156.
- 22) Ohmori M, Endo T, Onaya T. Development of chicken antibodies toward the human thyrotropin receptor peptides and their bioactivities. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; **174**: 399-403.
- 23) Endo T, Ohmori M, Ikeda M, Onaya T. Thyroid stimulating activity of rabbit antibodies toward the human thyrotropin receptor peptide. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; **177**: 145-150.
- 24) Endo T, Ohmori M, Ikeda M, Kotani S, Onaya T. Rabbit antibodies against two different extracellular domains of human thyrotropin receptor possess thyroid stimulating activities. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; **179**: 1548-1553.
- 25) Endo T, Ohmori M, Ikeda M, Onaya T. Rabbit antibodies toward extracellular loops of the membrane spanning region of human thyrotropin receptor possess thyroid stimulating activities. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; **181**: 1035-1041.
- 26) Ikeda M, Endo T, Ohmori M, Onaya T. Immunodetection of TSH receptor antibodies in sera of patients with autoimmune thyroid disease by ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). *Acta Endocrinol* 1993; **126**: 126-130.
- 27) Ohmori M, Endo T, Ikeda M, Onaya T. Immunization with human thyrotropin receptor peptide induces an increase in thyroid hormone in rabbits. *J Endocrinol* 1992; **135**: 479-484.
- 28) Endo T, Ikeda M, Ohmori M, Anzai E, Hara-

- guchi K, Onaya T. Single subunit structure of the human thyrotropin receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; **187**: 887–893.
- 29) Kosugi S, Ban T, Akamizu T, Kohn LD. Role of cysteine residues in the extracellular domain and exoplasmic loops of the transmembrane domain of the TSH receptor: Effect of mutation to serine on TSH receptor activity and response to thyroid stimulating autoantibodies. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; **189**: 1753–1762.
- 30) Hiromatsu Y, Sato M, Tanaka K, Shoji S, Norioka K, Chinami M, Fukazawa H. Significance of anti-eye muscle antibody in patients with thyroid-associated ophthalmopathy by quantitative Western blot. *Autoimmunity* 1992; **14**: 9–16.
- 31) Porcellini A, Feliciello A, Ciullo I, Bonavolonta G, Fenzi GF. Retroorbital tissues expresses TSH-receptor specific mRNA as detected by PCR. Preliminary studies. *J Endocrinol Invest* 1992; **15** (Suppl 2): 99: (Abstract).
- 32) Endo T, Ohno M, Kotani S, Gunji K, Onaya T. Thyrotropin receptor in non-thyroid tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; **190**: 774–779.
- 33) Endo T, Ohno M, Kotani S, Gunji K. Thyrotropin receptor in non-thyroid tissues. *J Endocrinol Invest* 1993; **16** (Suppl 2): 114: (Abstract).
- 34) Heufelder AE, Bahn RS. Elevated expression in situ of selectin and immunoglobulin superfamily type adhesion molecules in retroocular connective tissues from patients with Graves' ophthalmopathy. *Clin Exp Immunol* 1993; **91**: 381–389.
- 35) Graves PN, Tomer Y, Davies TF. Cloning and sequencing of a 1.3 kb variant of human thyrotropin receptor mRNA lacking the transmembrane domain. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; **187**: 1135–1143.
- 36) Takeshita A, Nagayama Y, Fujiyama K, Yokoyama N, Namba H, Yamashita S, Izumi M, Nagatani S. Molecular cloning and sequencing of an alternatively spliced form of the human thyrotropin receptor transcript. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; **188**: 1214–1219.
- 37) Endo T, Ohta K, Gunji K, Ohno M, Onaya T. Cloning and expression of a truncated form of thyrotropin receptor cDNA from rat adipose tissues (in preparation).
- 38) Saito T, Shimura H, Endo T, Onaya T. Enhancement of the activity of thyroid-stimulating antibodies by anti-human IgG antibodies in vitro. *Clin Endocrinol* 1989; **31**: 325–334.
- 39) Amino N, Watanabe Y, Tamaki H, Iwatani Y, Miyai K. In-vitro conversion of blocking type anti-TSH receptor antibody to the stimulating type by anti-human IgG antibodies. *Clin Endocrinol* 1987; **27**: 615–624.
- 40) Nagy EV, Burch HB, Mahoney K, Lukes YG, Morris III JC, Burman KD. Graves' IgG recognizes linear epitopes in the human thyrotropin receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; **188**: 28–33.