

行った。父、母、発端者、弟より白血球より DNA を抽出し、polymerase-chain-reaction (PCR)にて MR 遺伝子を増幅、direct-sequencing にて変異の有無について検討した。

In vitro でのレセプターの解析

MRcDNA を用いて site-direct mutagenesis 法にて変異レセプターを構築した。野生型ならびに変異型レセプターと glucocorticoid response element を有する CAT レポータープラスミドをそれぞれ COS 細胞に lipofectamine にて cotransfection しアルドステロンの存在下でレポーター活性を測定した。さらに変異レセプターの核内受容体の転写共役因子群(co-activator)との相互作用を mammalian-two-hybrid アッセイにて検討した。MR の DEF ドメインと GAL4 の DNA binding domain (GAL4DBD)の融合遺伝子を構築し、VP16 と各種 co-activator である SRC-1, TIF2, AIB1, p300 の融合遺伝子を持つプラスミド、CAT レポータープラスミドとともに COS 細胞に lipofectamine にて cotransfection しその活性化を検討した。

C 研究結果

MR 遺伝子の解析

発端者、その弟、母親の MR 遺伝子の第 8 エクソンのコドン 924 に CTC (Leu)から CCG(Pro)への変異(L924P)をそれぞれヘテロで認めた(図 1-2)。この変異の部分は MR の E 領域に存在した(図 1-1)。正常であった父親では変異を認めなかった。よってこの変異は常染色体優性遺伝形式であること

が示された。

In vitro でのレセプターの解析

図 2-1 に示すように野生型ではアルドステロン存在下で約 7 倍の転写活性の上昇を認めた。しかしながら変異レセプターではアルドステロン存在下でもアルドステロン非存在下に比べ転写の活性化は認められず(図 2-1)リガンド依存性の転写促進能を完全に喪失していると考えられた。さらに野生型のレセプターではアルドステロン依存的に co-activator である SRC-1, TIF2, AIB1, p300 との相互作用が認められ、レポーター活性が 2~5 倍に増加したが、変異レセプターではその相互作用は認められなかった(図 2-2)。

D 考案

今回常染色体優性遺伝形式の PHA1 の 1 家系において MR 遺伝子の第 8 エクソンに L924P の変異を認めた。この変異は発端者、その弟、母にそれぞれヘテロで認められたことから、常染色体優性の遺伝形式をとることが示された。現在までに同定されている MR 遺伝子の異常は図 1-2 に示すように、終止コドン、スプライシングの変異、フレームシフト変異であり、すべて MR 蛋白を発現させない変異であった。よって我々の同定した変異は第 1 例目のアミノ酸の置換を伴うものである。

この置換しているコドン 924 の Leu はアンドロゲン、エストロゲン、プロゲステロン、グルココルチコイドレセプターでそれぞれ保存されており、レセプターの機能に何らかの重要な役割を有するアミノ酸と

考えられる。そこで我々はこの変異が本症の原因であるか否かを検討するため、*in vitro* で変異レセプターを構築し、解析した。野性型のレセプターではレポーター活性をアルドステロンの依存的に増加させたが、変異レセプターではこの機能が喪失していた。さらにこのレセプターと *co-activator* との相互作用についても検討した。野性型ではリガンド依存性の相互作用が認められたが、変異レセプターではやはりその相互作用は認められなかった。これらの結果は変異レセプターは正常な機能を完全に喪失していることが示唆された。

この保存された *Leu* を *Arg* に変異させたマウスのエストロゲンレセプターでは変異レセプターが2量体形成をすることができないことが報告されている。よってこの *Leu* 残基がレセプターの2量体形成に必要であることが示唆される。従って我々の変異レセプターも2量体形成をすることができず、アルドステロンとの結合、核内への移行、それに引き続く *co-activator* との相互作用、DNA との結合が起こらないものと推測される。

今後この変異レセプターのアルドステロンとの結合、2量体形成、DNA との結合について検討していく予定である。

またさらなる PHA1 の症例を解析することにより、分子生物学的機序が解明されれば、ホルモン不応性のメカニズムの理解、アルドステロンの作用機序の理解に役立つ

と考えられる。また常染色体優性遺伝の PHA1 は乳児期以降治療を必要としなくなるが、その病態生理の解明、さらには早期診断、治療、遺伝相談にも役立つと考えられる。

E 結論

我々は常染色体優性遺伝を示す PHA1 の1家系を経験し、MR の遺伝子の第8エクソンの変異(L924P)を見い出した。*In vitro* の解析ではアルドステロン依存的な転写活性の促進が認められず、機能を完全に喪失していることを示した。常染色体優性遺伝の PHA1 で MR の遺伝子のミスセンス変異は世界で1例目でありアルドステロン不応のメカニズムを明らかにすることができた。

F 研究発表

1.田島敏広、北川浩史、立花克彦、安達昌功、諏訪誠三、加藤茂明、横谷進、阿部修司、藤枝憲二:ミネラルコルチコイドレセプター(MRL)遺伝子のミスセンス変異による偽性低アルドステロン症 (PHA-1)の一家系
第33回日本小児内分泌学会、1999年
2.安達昌功、立花克彦、朝倉由美、阿部修司、中江淳、田島敏広、藤枝憲二: γ ENaC 遺伝子異常によって引き起こされた全身型の偽性低アルドステロン I 型 (PHA1) の一例

第33回日本小児内分泌学会、1999年

図1-1 核内受容体スーパーファミリーの構造

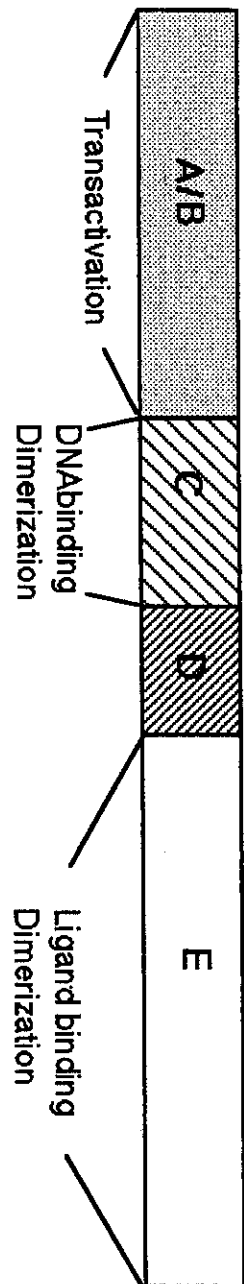


図1-2 MR遺伝子の構造とPHA1での変異

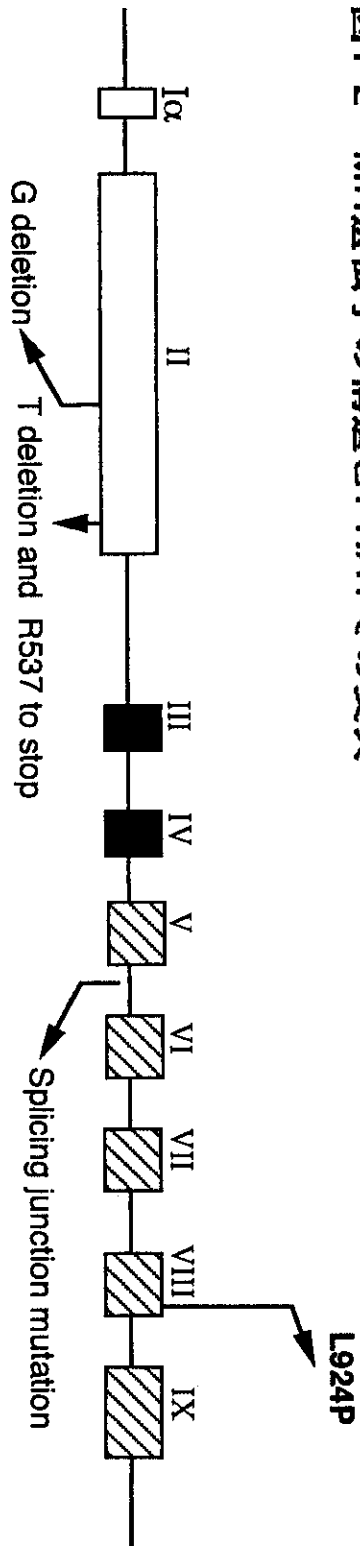


图 2-1

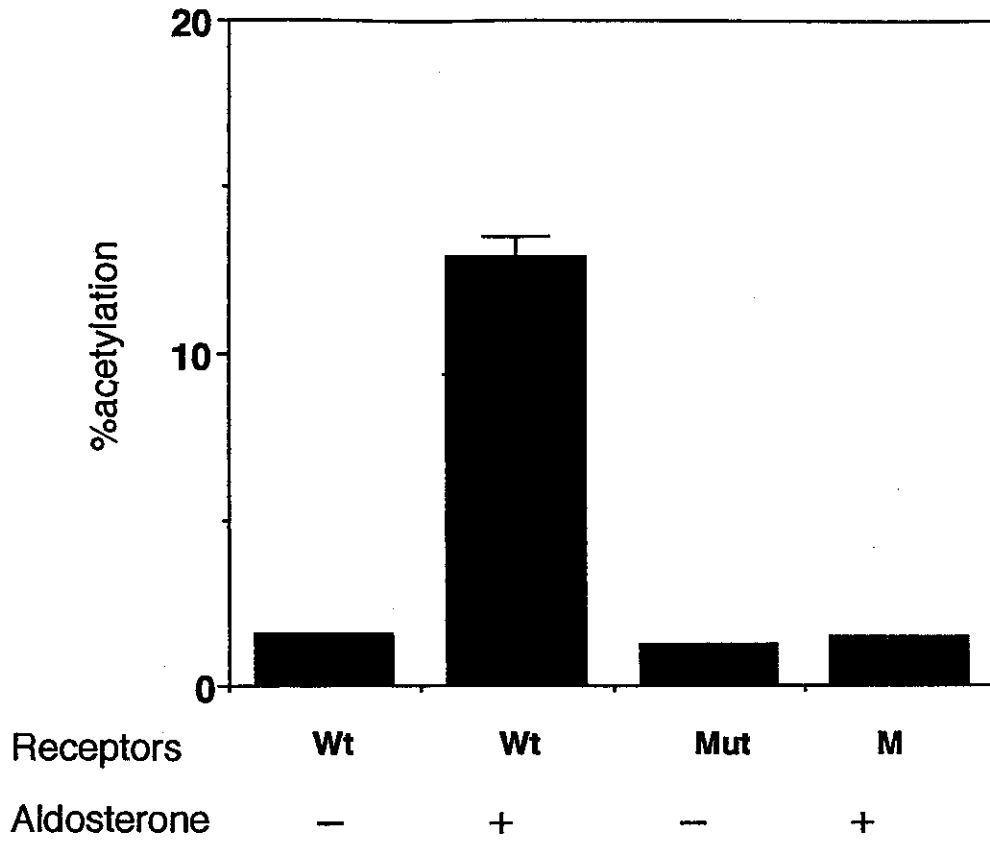
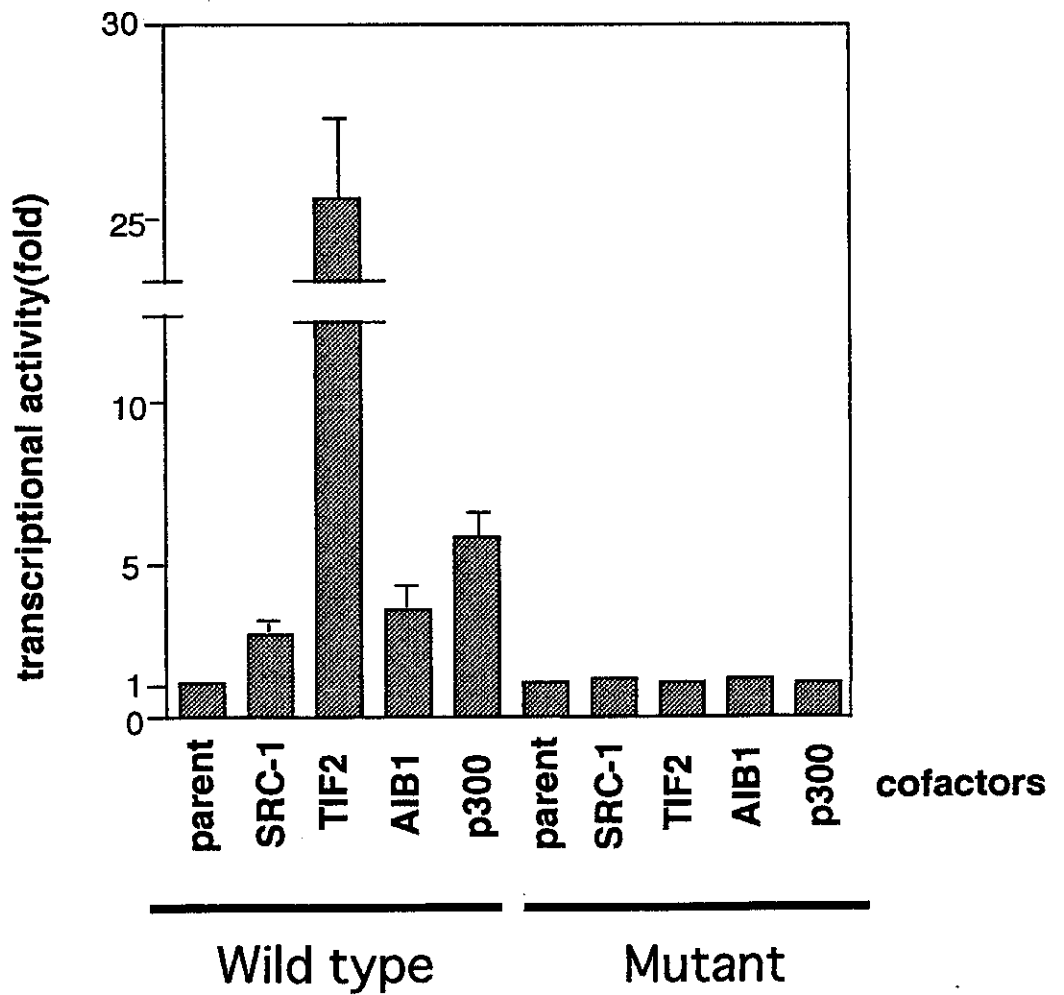


图 2-2



谷口 尚美、稲葉 聡、畠山 治彦、宮森 勇
福井医科大学 第三内科

研究要旨

特発性アルドステロン症 (IHA) は副腎球状層過形成によるアルドステロン過剰症であるが、その原因については未だ不明である。本研究では、IHA の発症機構を解明する目的で CYP11B1 遺伝子の発現調節領域である 5' -上流調節領域を解析した。その結果、IHA 患者 1 名に転写開始点より 463 塩基上流に C から T への新たなホモ変異を認めた。この変異は正常者 70 名には認められず遺伝子多型とは考えにくい。現在この変異による転写調節への機能影響については知られておらず、今後更に解析を進める予定である。

A. 研究目的

特発性アルドステロン症 (以下、IHA) は副腎球状層過形成によるアルドステロン過剰症であるが、その原因については未だ不明である。近年、アルドステロン合成酵素活性を亢進させる変異がアルドステロン合成酵素遺伝子 (以下、CYP11B2) において発生することが知られている。低レニン性本態性高血圧の動物モデルである Dahl - S ラットにおいて CYP11B2 遺伝子変異が高血圧発症の関与する可能性が報告されたことから、1995 年に Fardella らはそれに相当する変異を人工的にヒトの CYP11B2 遺伝子に作製し、その変異によるアルドステロン産生の変化を検討したれなかった。また、原発性アルドステロン症候群の一亜型であるグルココルチコイド反応性アルドステロン症患者においては CYP11B1 遺伝子と CYP11B2 遺伝子とのキメラ遺伝子がアルドステロン過剰分泌の原因として報告されている。我々は IHA 患者においてキメラ遺伝子の有無を検討しが関与している可能性を示唆する。そこで今回、我々は次に CYP11B2 遺伝子の 5' -上流調節領域の遺伝子異常について検討した。

B. 対象および研究方法

IHA と診断された患者 8 名の白血球から既知の方法で genomic DNA を抽出した。CYP11B2 遺伝子の 5' -上流調節領域において今までに報告されている T (-344) C 変異について、既報のプライマーを用いて PCR 法にて増幅し、制限酵素にて酵素消化した後、変異の割合を検討した。この変異以外に遺伝子異常が認められないか否かを検討するため CYP11B2 遺伝子の転写開始点の上流約 1000 塩基対について直接シークエンス法を用いて解析した。その結果認められた変異について polymorphism の可能性を除去するため正常者 70 名の白血球から既知の方法で genomic DNA を抽出し、PCR-RFLP 法を用いて検討した。今回検討した IHA 患者 8 名と正常者 70 名にはインフォームドコンセントを得て末血を採取し、遺伝子解析

を行う旨の同意を得て研究を行った。

C. 研究結果

T (-344) C 変異について、IHA 患者 8 名のうち genotype TT 型は 4 名、TC 型は 3 名、CC 型は 1 名であった。T アレル、C アレルの出現頻度は、以前に報告されている正常者の出現頻度と同等であった (図 1) CYP11B2 遺伝子の 5' -上流調節領域の遺伝子解析の結果、IHA 患者 1 名に転写開始点より 463 塩基上流に C から T へのホモ変異を認めた (図 2)。この C (-463) T ホモ変異は正常者 70 名には認められず、polymorphism とは考えにくかった (図 3)。

D. 考察

IHA におけるアルドステロン分泌過剰の原因は未だ不明である。アルドステロンは副腎球状層に局在するアルドステロン合成酵素 (P450aldo) により産生されるが、その活性亢進はコード遺伝子である CYP11B2 の gain of function 変異による可能性が想定される。これまでのアルドステロン産生副腎腺腫の DNA 解析ではこのような変異は見いだされていない。一方、IHA 患者における単球の CYP11B2 遺伝子発現が亢進しているとの結果は、IHA の発症に CYP11B2 遺伝子発現を調節する新たな因子の存在が関与している可能性を示唆する。実際に CYP11B2 転写開始点の上流約 1000 塩基対の遺伝子解析を行った結果、IHA 患者 1 名に C (-463) T ホモ変異が認められた。この部位は今までに報告されている転写因子の結合部位ではなく、新たな遺伝子異常と解される。C (-463) T が遺伝子多形である可能性を除外するため、健常人において同部位の遺伝子解析を実施したが、健常人においては変異が確認されなかった。このことは、アルドステロン遺伝子上流調節領域における変異が P450aldo の過剰産生している可能性を示すものと解される。今後この変異について CAT Assay を行い、もし酵素活性が亢進していればこれを調節している転写調節因子を同定していく予定である

E. 結論

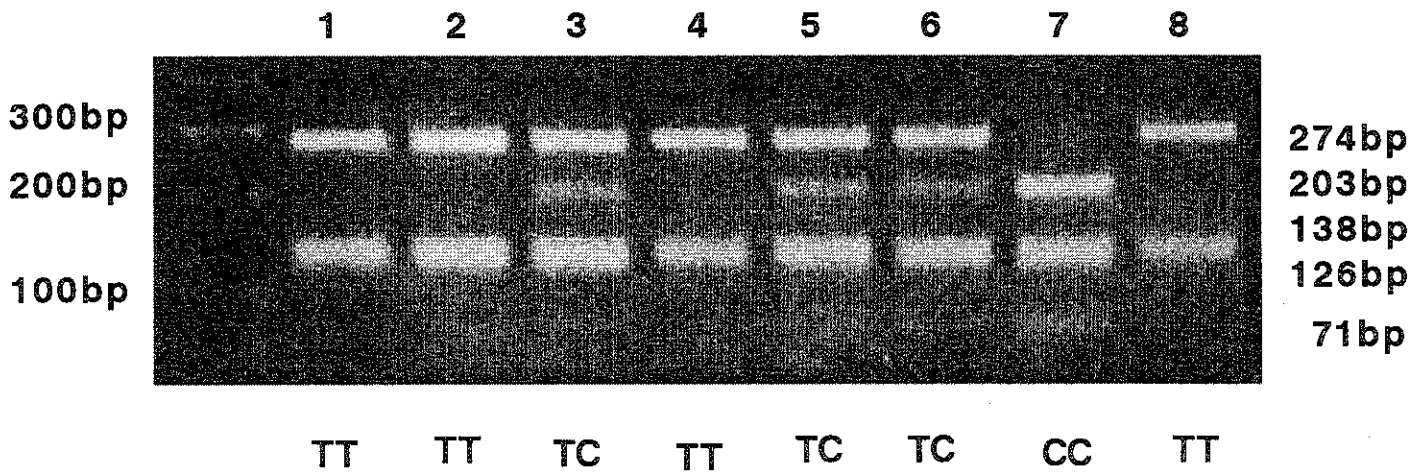
IHA 患者における単球ではアルドステロン合成酵素活性が増加している。今まで我々は IHA 患者について CYP11B2 遺伝子の Exon 3・4 の遺伝子解析や CYP11B1 遺伝子と CYP11B2 遺伝子とのキメラ遺伝子について検討してきたがアルドステロン過剰分泌の原因となるものは認められなかった。最近、人においてアンジオテンジンやカリウムが-72/-64 や-129/-144 を含む cis-element によって CYP11B2 遺伝子の転写調節を行っているとの報告がある。よって何らかの要因がアンジオテンジンに影響を与えている可能性がある。そこで我々は CYP11B2 遺伝子 5'-上流調節領域について検討した。その結果、IHA 患者 1 名に転写開始点より 463 塩基上流に C から T へのホモ変異を認めた。現在この変異による転写調節への影響については知られていない。この変異は正常者 70 名には認められず polymorphism とは考えにくい。今後さらにこの変異による CYP11B2 遺伝子の転写活性を検討し、IHA の病態解明を行っていく予定である。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takeda Y, Furukawa K, Inaba S, Miyamori I, Mabuchi H : Genetic analysis of aldosterone synthase in patients with idiopathic hyperaldosteronism. J Clin Endocrinol Metab 1999 May ; 84(5) : 1633-7
- 2) Hatakeyama H, Inaba S, Miyamori I : 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in cultured human vascular cells. Possible role in the development of hypertension. Hypertension 1999 May ; 33(5) : 1179-84
- 3) Miyamori I, Inaba S, Taniguchi N, Takeda Y. Idiopathic hyperaldosteronism : analysis of aldosterone synthase gene. Biomed & Pharmacology. (in press).

T (-344) C 変異

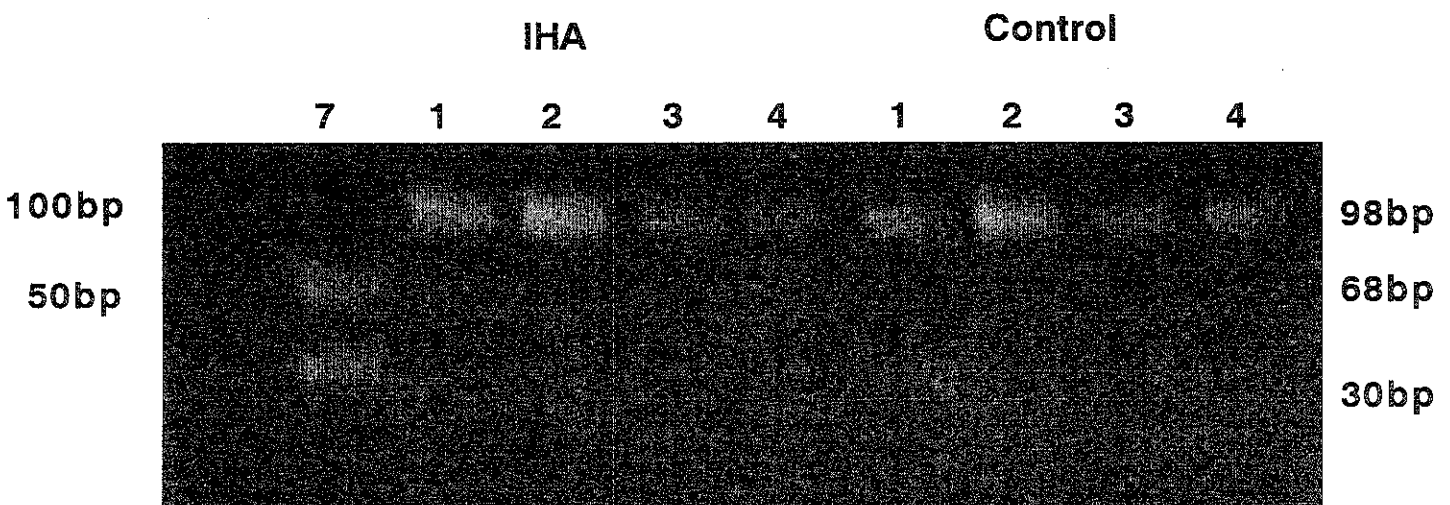


T allele : 39% (正常者 70%)

C allele : 61% (正常者 30%)

(図1)

PCR-RFLP



(図3)

CYP11B2 遺伝子 5' - 上流調節領域の

遺伝子解析結果

- 996 tatctgatga ttataaagtg cttgcattac ctctgaagct gtatagtgtt atatgaaggt
 - 936 ggagttggag agatgagttt taagcgata ttgcaaac tc tagggcaacc actaaagaag
 - 876 tgagaccag cctctagaaa aaaaaaaaa aaaggaaatt agctatcaag ccacgaaaaag
 - 816 aaatggagga accitaaacy catattacta actgagatac gtcactttg a aaaggctaca
 - 756 aacggtgtca ticcactat acaacatttt gaaaaagccc aaagcatggt gatgataaaa
 - 696 aagatcggag atgtcagga ctggggcagg agggatgagc aggcagagca caggtttct
 - 636 ttctctcttt ttaagacagt gaaatactic ctaggatcct gcaaggaggg atacaaaata
 - 576 catacatttg tcaaaacca cagcatgttg accaccagga ggagacccca tgtgactcca
 - 516 ggacctggt tgataacaac gtatcgagat tctcacaatg gaaccagtcg gctcctgtgg
 - 456 tggaggggtg acctgtgta gggcaggggg taactgtgaca tttctgcag tttttgatca
 - 396 attttgcatt gaactaaatc tgggtataa aaataaaatc taataaaaga atccaaggct
 - 336 ccctctcact tcaagataag ataaagtccc catccatttt actcctctca gccctggaga
 - 276 aaggagaggc caggtcccac caccitccac cagcatggac ccccagtcga gaccccacgc
 - 216 cttttctcag cactctcaga ccagcaggac ttgcagcaat ggggaattag gcaacctgact
 - 156 tctcttcat ctaccittgg ctggggccct cagccittgac cttegcctcg agagctcag
 - 96 gcaggtccag aggcagttc tcccatgacg tgataigtgtt ccagagcagg ttccctgggtg
 - 36 agataaaagg atttgggctg aacagggtgg agggagcatt ggaatg gcac tcaggggcaaa
 + 1 MetAlaLeu ArgAlaLys
 25 ggcagaggtg tgcgtggcag cgccccggct gtccccgcaa agggcacggg cactgggcaac
 Ala Glu Val CysVal Ala Ala Pro TrpLeuSerLeuGln ArgAla ArgAlaLeuGlyThr
 85 tagagccgct cggg
 ArgAla Ala Arg

————— AP-2 element

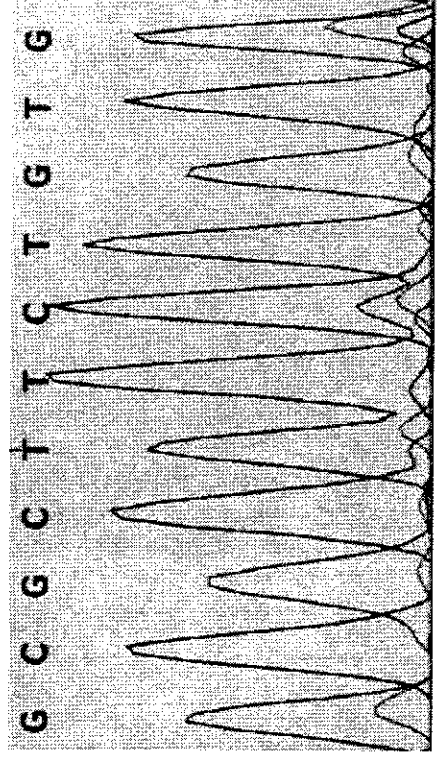
----- CAMP - responsive element

===== TATA box

Sequence analysis of CYP11B2 gene

-463

G C G C T C C T G T G



アルドステロンによる心筋の線維化と DHEA による抑制

向笠浩司、青木一孝、斉藤達也、関原久彦
横浜市立大学医学部第三内科

研究要旨

DHEA はヒトにおいては加齢とともに減少するというユニークなホルモンであるが、糖代謝改善、抗動脈硬化作用、抗腫瘍作用などが報告されており、成人病への効果が注目されている。今回我々は、心筋が加齢とともに線維化をおこすことへの DHEA の関与を検討し、さらに DHEA が心不全の新しい治療薬となる可能性を検討した。今回の検討では、DHEA 投与により、心筋のコラーゲンの発現が抑制され、さらに心筋の線維化も減少していた。これらのことより、DHEA は心筋の線維化を抑制し、心機能の低下を抑制する可能性が示唆された。

A. 研究目的

DHEA は加齢に従い、副腎からの分泌が減少するという特性を持っており、加齢に伴う心筋の線維化と DHEA の関連を探るうえでも重要と考えられる点が挙げられる。また、DHEA は、ヒトではもともと副腎から分泌されるアンドロゲンであり、すでに我々も報告しているが、インスリン感受性の改善作用 (*The Journal of Steroid Biochem. and Molecular Biology* 67 355-358, 1998, *Diabetes* 48 1579-1585, 1999) を有しており、心筋の線維化が、メカニズムに至るまで解明された場合、もともと生体内に存在するが故に、副作用のほとんどない、非常に安全性の高い心機能改善剤およびインスリン感受性改善剤として、とくに心合併症の多い糖尿病患者に対しては有用であり、また臨床応用可能であると考えられる。DHEA が心筋の線維化を抑制することが予想されるが、DHEA は内因性の副腎ホルモンであり、ヒトへの投与に対

する安全性が確立していることから、安全な薬剤で心筋の線維化を抑制し、心不全死を減少させようという点で、臨床的な意義は極めて大きいと考えられる。そこで我々は、線維化を抑制すると考えられる DHEA を実験動物に投与し、線維化における DHEA の作用点および DHEA 投与による心筋の線維化のメカニズムを検討し、今後の臨床応用の可能性を検討した。

B. 研究方法

Sprague-Dawley rat にアルドステロンを注入したポンプを皮下に埋め込み、高血圧を発症させ、心筋に対して負荷がかかる状態を作り出し、心筋の線維化を惹起した。この rat を用いて、食餌に混ぜた DHEA を投与し、3ヶ月後に rat より心臓を摘出し、コラーゲンを染色する Masson-Trichrome 染色を用いて、組織学的検討を行い、さらに心筋から mRNA を抽出し、心筋の主たるコラーゲンである typeI コラーゲン、

type III コラーゲンの発現を RT-PCR により検討する。

(倫理面への配慮)

動物愛護に関しては、飼育終了時に動物を屠殺するが、麻酔をかけ、動物に与える苦痛は最小限となっている。

C. 研究結果

RT-PCR にて、DHEA 投与により、心筋内コラーゲンの大部分をしめるコラーゲン type I と type III の発現が抑制されることが確認され、またコラーゲン線維を染色する Masson-Trichrome 染色による組織学的検討にても、DHEA 投与動物の心臓ではコントロール動物に比べ、線維化が抑制されていた。

D. 考察

DHEA 投与により、収縮期血圧に有意差はみられないにも関わらず、心筋のコラーゲンの mRNA の発現は減少しており、心筋の線維化が抑制されることが示された。線維化のメカニズムについてはいまだ不明であるが、培養線維芽細胞を用いて検討が可能と考えられる。DHEA は加齢に従い、副腎からの分泌が減少するという特性を持っており、加齢に伴う心筋の線維化と DHEA の関連を探るうえでも重要と考えられる点が挙げられる。また、DHEA は、ヒトではもともと副腎から分泌されるアンドロジェンであり、すでに我々も報告しているが、インスリン感受性の改善作用を有しており、心筋の線維化が、メカニズムに至るまで解明された場合、もともと生体内に存在するが故に、副作用のほとんどない、非常に安全性の高い心機能改善剤およびインスリン

感受性改善剤として、とくに心合併症の多い糖尿病患者に対しては有用であり、また臨床応用可能であると考えられる。DHEA が心筋の線維化を抑制することが予想されるが、DHEA は内因性の副腎ホルモンであり、ヒトへの投与に対する安全性が確立していることから、安全な薬剤で心筋の線維化を抑制し、心不全死を減少させようという点で、臨床的な意義は極めて大きいと考えられる。

E. 結論

ヒトにおいては、加齢に従って心筋の線維化が進み、心機能低下の原因となり、心不全へ陥りやすくなるという報告がある。近年、副腎ホルモンであるアルドステロンが、心筋の線維化に関与しており、アルドステロンの拮抗薬であるスピロラクトンが心筋の線維化を抑制するという報告が相次いでいる。また、最近、心不全患者にスピロラクトンを投与することにより、対照群に比較して心不全死が減少し、予後を改善させたとの報告がなされ、大きな反響をよんでいる。これらのことから、心筋の線維化を抑制することは、心不全の発症を減少させ、心不全の予後を改善させると考えられる。また、我々も今までの予備的検討で、ヒトにおいて加齢に従い低下する副腎アンドロジェンである dehydroepiandrosterone (DHEA) を Sprague-Dawley rat に投与すると、分子生物学的にも、組織学的にも心筋の線維化が抑制されるというデータを得ており、そのメカニズムの検討は充分意義あることと考えられる。心筋の線維化のメカニズムは機械的要因、代謝的要因から検討されている

が、いまだ不明な点が多く、本研究が心筋の線維化における DHEA の遺伝子調節の作用、メカニズム解明の糸口になると考えられる。

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

Koji Mukasa, Mizuki Kaneshiro, Kazutaka Aoki, Jun Okamura, Tatsuya Saito, Shinobu Satoh and Hisahiko Sekihara

Dehydroepiandrosterone(DHEA) ameliorates the insulin sensitivity in older rats. The Journal of Steroid Biochem. and Molecular Biology 67 355-358, 1998

Kazutaka Aoki, Tatsuya Saito, Shinobu Satoh, Koji Mukasa, Mizuki Kaneshiro, Satsuki Kawasaki, Atsushi Okamura and Hisahiko Sekihara, Dehydroepiandrosterone suppresses the elevated hepatic glucose-6-phosphatase and fructose-1,6-bisphosphate activities in C57bl/Ksj-db/db mice comparison with troglitazone. Diabetes 48 1579-1585, 1999

2. 学会発表

'99 アメリカ内分泌学会

Abstract # P-1-265

'99 日本内分泌学会

'99 日本心血管内分泌学会

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

原発性アルドステロン症(PA)における新しい局在診断法の開発に向けて
ACTH 連続負荷・アンギオテンシン・タイプ 1(AT1)受容体拮抗薬投与下副腎静脈サンプリング

伊藤 裕

京都大学大学院医学研究科臨床病態医科学

研究要旨

PA の全高血圧症における頻度に関し、10%内外と非常に高率であるとの報告が最近なされる様になり、注目を浴びている。その中には従来の局在診断法では容易に診断できないアルドステロン産生腺腫(APA)あるいは特発性アルドステロン症(IHA)が多数存在すると思われる。これらを確実に診断するための方法として、我々は、ACTH 連続負荷・AT1 受容体拮抗薬投与下副腎静脈サンプリングを開発し、局在診断が困難であった PA の症例においてその方法の有用性を確認した。

A. 研究目的

従来 PA の頻度は、全高血圧症の 1%以下と報告されており^{1~4}、頻度の高い疾患とは考えられていなかった。ところが、1994 年 Gordon ら⁵は血清 K 値が正常である高血圧患者 199 例中 17 例に PA が存在することを報告し、以後 PA は全高血圧患者の 10%前後という非常に高率に認められるとする報告が相次いでなされるようになった^{6~7}。

一方、PA の局在診断には、エコー、CT、MRI、シンチが一般的に用いられるが、これらは空間分解能に限界がある。特に、APA の中でもマイクロアデノーマや、IHA による PA の場合、これらの方法では診断が困難であり、最終的には副腎静脈サンプリングの結果が重要となる。しかし、副腎静脈サンプリングは、手技的に困難な場合もあり、また、その検査結果の解釈に関しても種々の報告があり、そのためこれまで PA の頻度を過小評価してきたと考えられ

る。

当研究班の第 1 期(昭和 47~51 年)・第 2 期(昭和 52~56 年)全国実態調査報告書では、PA における局在診断法において APA の陽性率は約 90%となっており、マイクロアデノーマや非機能性腫瘍の存在がこの陽性率を下げる原因と考えられる。IHA にいたっては陽性率が 23~55%と非常に低値であり、より正確な診断法の開発が必要と思われる。

今回我々はより精度の高い PA における局在診断法の確立を目指し、ACTH 連続負荷・AT1 受容体拮抗薬投与下における副腎静脈サンプリング法を開発し、局在診断が困難であった PA の症例においてその方法の有用性を検討した。

B 研究方法

[症例]

37 才、男性。H9 年近医にて高血圧を指

摘され、以後降圧薬を服用していた。H10年8月頃より血清Kの低下を指摘され(3.2mEq/L)、更にH11年7月に入り四肢脱力を自覚するようになった。近医での精査にて、血清K2.5mEq/L、血漿レニン活性(PRA)の低値(<0.1ng/ml/hr)、血漿アルドステロン濃度(PAC)の上昇(181pg/ml)、腹部CTにて左副腎に径5mmの腫瘤様陰影を認め、PAを疑われ、精査加療目的のため、同年8月当科紹介入院となった。身長:178cm、体重:93.8kg、BMI:29.6、血圧:座位142/98mmHg(66/min)、臥位144/102mmHg(72/min)、立位144/100mmHg(72/min)(ベシル酸アムロジピン5mg投与下)であり、他に特記すべき身体所見上の異常はなかった。

[方法]

症例において、一般検査、内分泌学的検査、CT、デキサメサゾン抑制下¹³¹I-アドステロールシンチ、日内変動、Rapid ACTH試験、カプトリル負荷試験、ラシックス立位負荷試験、通常の副腎静脈サンプリングに加え、Fig. 1に示すようにACTH連続負荷・AT1受容体拮抗薬投与下における副腎静脈サンプリングを施行した。

これらの結果を踏まえ、Informed consentを得た後、左副腎部分切除術を施行し、手術摘出標本の病理組織像やステロイド合成酵素の免疫組織化学的検索の他、術前後における諸検査の変化を検討した。

C 研究結果

一般検査所見は、脂肪肝に伴うと考えられる肝機能障害、高脂血症を認めた。血清Kは、16mEq/day投与下で3.3mEq/Lであり、

尿中K排泄は55.2mEq/dayと増加していた。内分泌学的検査所見は、PRA低値(<0.1ng/ml/h)、PAC高値(176pg/ml)、尿中アルドステロン高値(21.7 μ g/day)を認め、その他には異常を認めなかった。

CTでは、左副腎に径約5mmの造影効果のないlow densityの均一な腫瘤を認めた。右副腎には異常を認めなかった。

デキサメサゾン抑制下¹³¹I-アドステロールシンチは、全体的に取り込みが低く、明らかな左右差は認めなかった。

通常の副腎静脈サンプリングでは、右副腎静脈のA/C比は51.6~69.8であった。これに対し、左副腎静脈はA/C比15.3~19.0であり、このA/C比は下大静脈でのサンプリング値と同様であった(Fig.2)。この結果は、CT所見上の左副腎の腫瘤は非機能性腫瘍であり、右副腎にアルドステロン産生マイクロアデノーマが存在することを示唆するものであった。

そこで、我々は診断をより確実にするために、ACTHを連続投与して、恒常的にACTHによる負荷を加え、かつ、レニン・アンギオテンシン系を抑制するためにAT1受容体拮抗薬投与下で静脈サンプリングを施行した。右副腎静脈はA/C比49.4~56.5と前回同様であった。これに対し、左副腎静脈はA/C比33.0~35.7と、下大静脈のA/C比(12.1~17.7)と差を認め、左右の副腎静脈のA/C比はその差が小さくなる結果となった(Fig.3)。この所見から、この症例における副腎病変は両側性、つまりIHAまたは両側のアルドステロン産生マイクロアデノーマである可能性が考えられた。

このように診断に苦慮する症例であったため、我々は、当院泌尿器科・患者とも相

談の上、腫瘤を含めた形で左副腎を半切り、切除部の病理学的な検索と、術後のホルモン動態の変化をみて、今後の治療方針を決定することとした。

手術摘出標本の肉眼像では、CTで認められた腫瘤以外に、径1mm前後の結節性病変が多発していた。

病理組織診断やステロイド合成酵素の免疫組織化学的検索は東北大学大学院医学研究科病理学講座 笹野公伸先生に依頼した。病理組織所見としては、切除された副腎には結節か腺腫か鑑別が困難な病変が複数存在するものの、少なくとも1カ所は腫瘍と判断された。副腎皮質は著明な球状層のparadoxical hyperplasiaを呈していた⁸。ステロイド合成酵素の免疫組織化学的検索では、P450scc、3beta-HSD(hydroxysteroid dehydrogenase)、P450c21、P450c11、P450c17、DHEA-ST(dehydroepiandrosterone sulfotransferase)の6種類のsteroidogenic enzymesの発現を免疫組織化学的に検索した^{9,10}。マイクロアデノーマと判断した病変ではDHEA-STを除く他の酵素が発現し、結節においても同様の結果であった。球状層のparadoxical hyperplasiaの部位では3beta-HSDが発現しておらず、IHAを否定する所見であった。

Fig.4は手術前後を含めたこの症例における入院中経過であるが、当初塩化カリウムと塩酸マジピンにて血清K、血圧を調節し、その後、スピロラクトン投与のみにて血清K、血圧は正常化した。手術後は無投薬にて血清Kは正常範囲内であり、手術前後で尿中アルドステロンは21.7 μg/dayから11.8 μg/dayと減少した。

日内変動において、手術前後でPACは低下

しているものの、ACTHに対する依存性を依然認めた。

これらの所見より、この症例は両側多発性のアルドステロン産生マイクロアデノーマの可能性が高いと考えられた。

D 考察

今回我々は、従来の副腎静脈サンプリングの欠点を補う新しい局在診断法として、ACTH連続負荷・AT1受容体拮抗薬投与下副腎静脈サンプリングを開発した。今日までに副腎静脈サンプリング中にACTHを負荷する方法は、いくつか報告されている¹¹⁻¹³。その根拠としては、APAの場合、一般にアルドステロンの分泌におけるACTHへの反応性が増加しており、サンプリング中のストレス・時間経過によってACTHが変動した場合、サンプリングのデータが影響を受けることを避けるためとされている。しかし、ACTHの投与方法に限ってみても、bolusで静注するのみ、あるいは静注後連続負荷をするなど、報告により異なっており、今回我々が行った方法が最適なものかどうかは、今後の検討課題である。

また、今回の我々の方法では、レニン-アンジオテンシン系による影響を避けるため、AT1受容体拮抗薬投与も併せて行った。その根拠としては、一般にIHAの場合、アルドステロンの分泌がレニン-アンジオテンシン系による制御を受けており、サンプリング中の循環動態の変化によるレニン-アンジオテンシン系に対する影響がサンプリングのデータに反映される可能性があるためである。この方法はこれまで報告されておらず、我々が初めて行ったものである。そのため、AT1受容体拮抗薬投与の方法・

用量、あるいはその有用性を今後の症例で十分検討する必要があると思われる。

E 結論

今回我々は、PAにおける新しい局在診断法として、ACTH連続負荷・AT1受容体拮抗薬投与下副腎静脈サンプリングを開発した。PAが従来考えられていたよりはるかに頻度の高い疾患であるとする報告が散見されており、その意味でも、より有用な診断方法の確立が必要である。今回我々の開発した方法が従来の局在診断法に比べより有用性が高いかに関し、今後十分に検討していきたい。

参考文献

1. Berglund G et al: Prevalence of primary and secondary hypertension: studies in a random population sample. *Br Med J* 2:554-6,1976
2. Danielson M et al: The prevalence of secondary and curable hypertension. *Acta Med Scand* 209:451-5,1981
3. Sinclair AM et al: Secondary hypertension in a blood pressure clinic. *Arch Intern Med* 147:1289-93,1987
4. Anderson GH Jr et al: The effect of age on prevalence of secondary forms of hypertension in 4429 consecutively referred patients. *J Hypertens* 12:609-15,1994
5. Gordon RD et al: High incidence of primary aldosteronism in 199 patients referred with hypertension. *Clin Exp Metab* 46:552-60,1978

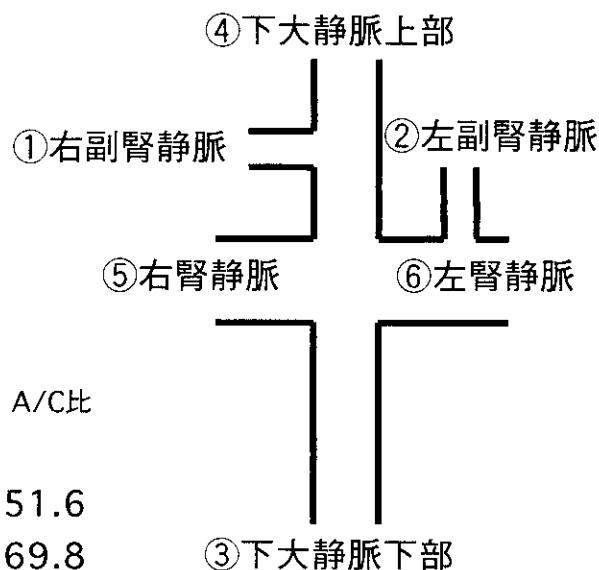
Pharmacol Physiol 21:315-8,1994

6. Abdelhamid S et al: Prevalence of adrenal and extra-adrenal Conn syndrome in hypertensive patients. *Arch Intern Med* 156:1190-5,1996
7. Lim PO et al: Potentially high prevalence of primary aldosteronism in a primary-care population. *Lancet* 353:40,1999
8. Matsuda A et al: Primary aldosteronism with bilateral multiple aldosterone-producing adrenal adenomas. *Intern Med* 35:970-5,1996
9. Sasano H et al: Immunolocalization of 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase in human adrenal cortex and its disorders. *Endocr Pathol* 1:94,1990
10. Sasano H et al: Immunohistochemical study of cytochrome P-45017 alpha in human adrenocortical disorders. *Hum Pathol* 20:113-7,1989
11. Young WF Jr. et al: Primary aldosteronism: adrenal venous sampling. *Surgery* 120:913-20,1996
12. Weinberger MH et al: Primary aldosteronism: diagnosis, localization, and treatment. *Ann Intern Med* 90:386-95,1979
13. Kem DC et al: Plasma aldosterone response to ACTH in primary aldosteronism and in patients with low renin hypertension. *J Clin Endocrinol*

Fig.1 ACTH連続負荷・アンギオテンシンII(AT1)受容体拮抗薬投与下副腎静脈サンプリング

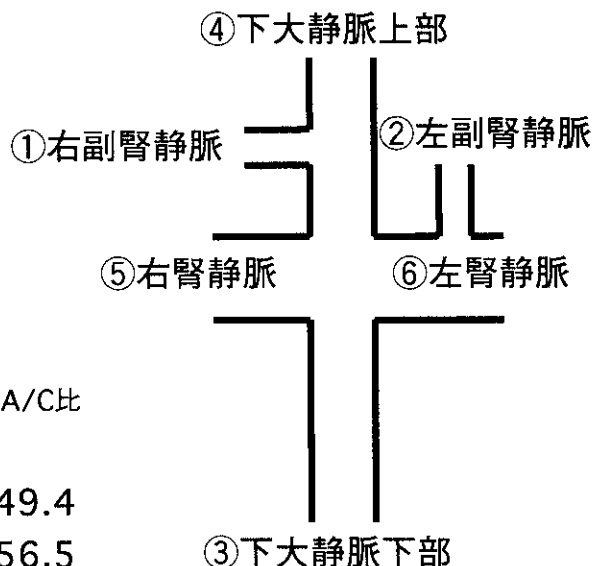
1. 検査前日午後9時にAT1受容体拮抗薬(カンデサルタン)8mgを内服。
2. 検査当日午前7時にAT1受容体拮抗薬(カンデサルタン)8mgを内服。
3. 血管造影室にて、合成ACTH(Tetracosactide)0.25mg(25u)をbolusで静注(午前9時)。
4. 引き続き、合成ACTH(Tetracosactide)0.25mgを生理食塩水100mlで溶解し、100ml/hで継続する。
5. 合成ACTH(Tetracosactide)持続静注開始15分後よりサンプリングを開始する。

Fig.2 副腎静脈サンプリング



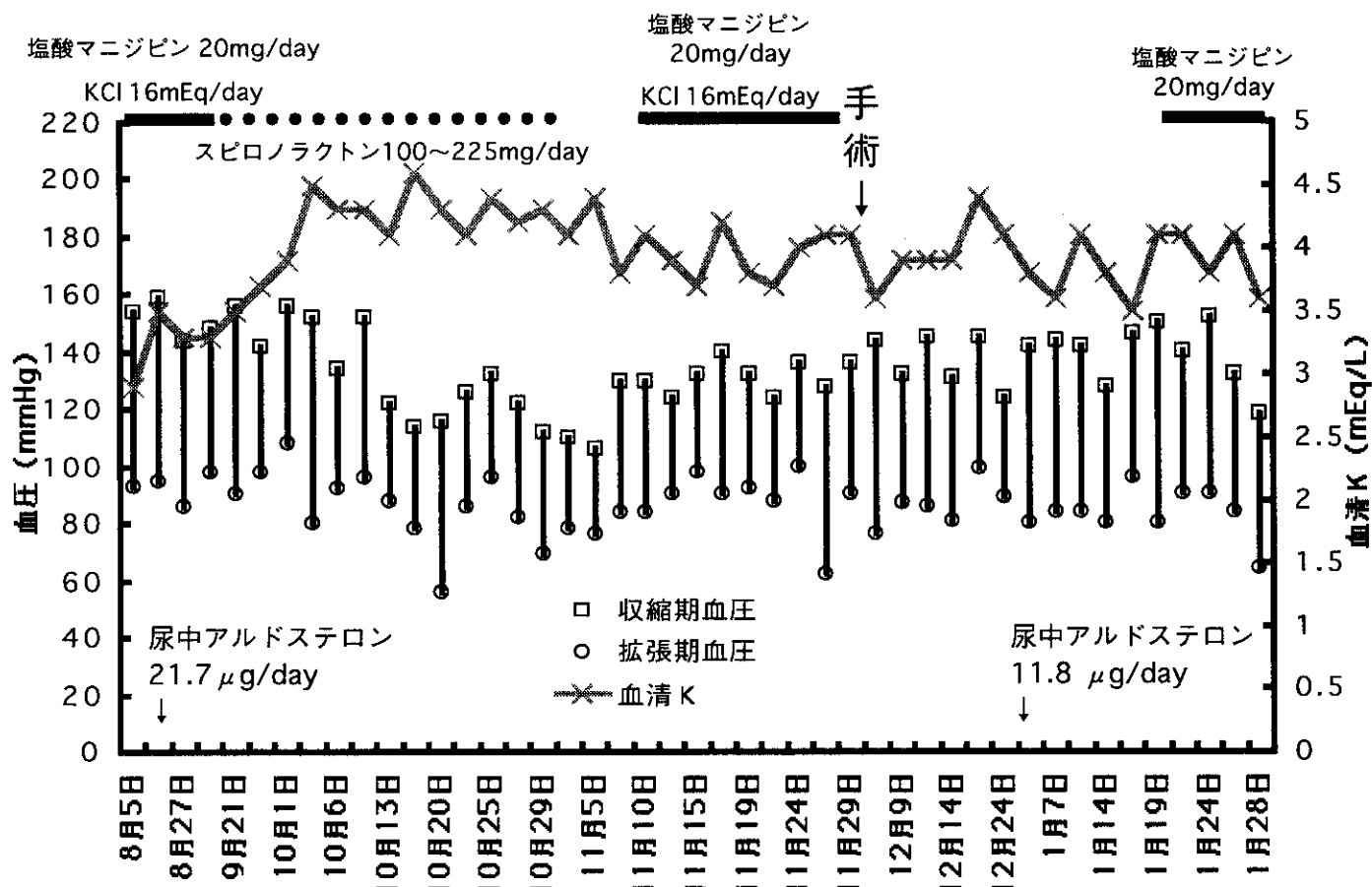
	アルドステロン(A) pg/ml	コルチゾール(C) μg/dl	A/C比
①右副腎静脈	71262	1381	51.6
	54599	782	69.8
②左副腎静脈	6586	432	15.3
	10235	539	19.0
③下大静脈下部	305	20.7	14.7
④下大静脈上部	237	19.6	12.1
⑤右腎静脈	270	17.1	15.8
⑥左腎静脈	246	16.7	14.7

Fig.3 ACTH連続負荷・
AT1拮抗薬投与下
副腎静脈サンプリング



	アルドステロン(A) pg/ml	コルチゾール(C) μg/dl	A/C比
①右副腎静脈	66295	1342	49.4
	84369	1494	56.5
②左副腎静脈	22454	629	35.7
	17218	522	33.0
③下大静脈下部	279	15.8	17.7
④下大静脈上部	237	19.6	12.1
⑤右腎静脈	433	17.1	15.8
⑥左腎静脈	404	16.7	14.7

Fig. 4 入院後経過



ACTH 負荷副腎静脈採血法による副腎疾患鑑別法の検討

西川哲男¹、大村昌夫¹、飯塚 孝¹、田之畑一則²、山口邦雄³

横浜労災病院内科¹、放射線科²、泌尿器科³

研究要旨

原発性アルドステロン症の診断法を検討する目的で、原発性アルドステロン症 29 例、本態性高血圧症(EHA)10 例を対象とし、フロセミド-立位試験、カプトプリル負荷試験、造影副腎 CT 像、¹³¹I-アドステロール副腎シンチグラム、ACTH 負荷副腎静脈採血法を比較検討した。この結果

1. 原発性アルドステロン症と本態性高血圧症は、フロセミド-立位試験とカプトプリル負荷試験の両者を施行することで鑑別可能と考えられた。
2. CT や ¹³¹I-アドステロール副腎シンチグラムでの原発性アルドステロン症鑑別診断率は 34%以下であった。
3. ACTH 負荷後のアルドステロンが 1400ng/dl 以上の場合、副腎からのアルドステロン過剰分泌が診断できる。

ことが判明した。

したがって、原発性アルドステロン症の診断では、内分泌検査でアルドステロン症を診断し、その後 ACTH 負荷副腎採血法でアルドステロン過剰分泌が片側性か両側性かを確認し治療をおこなう必要があると考えられた。

A. 研究目的

患者数 3000 万人と推計されている高血圧症は、動脈硬化性疾患の主な危険因子である。高血圧症は、その大部分が原因不明の生涯にわたっての治療が必要な本態性高血圧症である。一方、原因疾患の的確な診断治療により治癒の期待できる 2 次性高血圧症の存在も知られている。このうち、原発性アルドステロン症は、近年の報告で高血圧症の 5-10%を占める頻度の高い治癒可能な 2 次性高血圧症であるが、画像検査で検出不可能な小さなアルドステロン産生腺腫の存在が明かとなり、画像検査所見を診断根拠とし

て、原発性アルドステロン症の大部分を占めるアルドステロン産生腺腫と特発性アルドステロン症を鑑別する従来の診断方法に限界があることが判明してきた。

そこで今回我々は、副腎疾患のうち特に原発性アルドステロン症の各病型の内分泌検査所見、画像検査所見、ACTH 負荷副腎静脈採血法を比較検討し、原発性アルドステロン症診断における ACTH 負荷副腎静脈採血法の有用性を明らかにしたので報告する。

B. 研究方法

対象症例は、病理組織検査で診断が確定した原発性アルドステロン症 29 例-うちアルドステロン産生腺腫 (APA) 24 例、特発性アルドステロン症 (IHA) 2 例、片側性多発副腎微小結節によるアルドステロン症 (UMN) 3 例-とし、10 例の本態性高血圧症 (EHT) を対照とした。

各症例で、フロセミド-立位試験、カプトプリル負荷試験、造影副腎 CT 像、¹³¹I-アドステロール副腎シンチグラム、ACTH 負荷前と 30 分後に両側副腎静脈から採血を行いアルドステロン (PAC) とコルチゾール (PCC) を測定する ACTH 負荷副腎静脈採血法を行い、各々の結果と病理診断とを比較検討した。

C. 研究結果

内分泌学的検査成績

フロセミド-立位試験では、フロセミド-立位負荷後の血漿レニン活性 (PRA) は、EHT と比較し APA, IHA, UMN で 2.0 ng/ml/hr 以下と有意に低値を示した。しかし個々の症例では、EHT でも PRA が 2 ng/ml/hr 以下を示す例もあり、APA, IHA, UMN と重複した。原発性アルドステロン症の各病型、すなわち APA, IHA, UMN での比較では、PRA は APA, UMN, IHA の順で有意に低値であった。

カプトプリル負荷試験では、カプトプリル負荷 90 分後の PAC/PRA 比は、EHT と比較し原発性アルドステロン症では有意に高値を示したが、個々の症例で重複するものも認められた。また原発性アルドステロン症の各病型間でも重複例も認められた。

画像検査成績

表 1 に造影副腎 CT 像、¹³¹I-アドステロール副腎シンチグラムの所見と ACTH 負荷副腎静脈採血

法の結果に基づき手術を行った摘出副腎の病理検査所見を比較した。

アルドステロン産生腺腫の大きさは径 1mm から 30mm であった。

副腎 CT で、アルドステロン産生腺腫を発見できたのは径 7mm 以上の腺腫であり、それ以下の微小腺腫は CT では検出不能であり、また UMN の副腎結節も検出できなかった。すなわち原発性アルドステロン症での CT の正診率は 34% であった。さらに ¹³¹I-アドステロール副腎シンチグラムでは径 9mm 以下のアルドステロン産生腺腫は検出できず、原発性アルドステロン症全体での検出率は 23% であった。

また APA-5, 6, 15 の症例では、画像検査所見でアルドステロン症の原因となっている副腎と反対側に腫瘍像が検出された。

ACTH 負荷副腎静脈採血法

本態性高血圧症、および原発性アルドステロン症の原因となった病巣の存在する病側副腎静脈での ACTH 刺激前と 30 分後の PAC を検討したところ、ACTH 刺激前の副腎静脈 PAC は、原発性アルドステロン症の症例で本態性高血圧症と比較し統計学的に有意に高値を示したが、重複例も認められた。一方 ACTH 刺激後の PAC (図 1) は、本態性高血圧症全例で 1400ng/dl 以下であり、原発性アルドステロン症では 1400ng/dl 以上であった。また ACTH 負荷前の副腎静脈 PCC は 40ng/dl 以上であることが判明した。

D. 考案

以上の検討から、原発性アルドステロン症と本態性高血圧症は、フロセミド-立位試験とカプトプリル負荷試験の両者を施行することで、若干

の疑陽性例はあるものの、ほぼ鑑別可能と考えられた。

原発性アルドステロン症では、一側副腎からのアルドステロン過剰分泌が原因となり、外科的切除で治癒が期待できる APA, 片側副腎過形成による原発性アルドステロン症(UAH), UMN と、両側副腎からのアルドステロン過剰分泌が原因であり外科的治療では治癒せず薬物治療が選択される IHA, 原発性副腎過形成(PAH)を的確に鑑別することは、治療法の選択や治療予後を考える上で重要である。これらの鑑別は従来、CT や¹³¹I-アドステロール副腎シンチグラムを用いて行われているが、今回の検討で、腺腫の大きさが 6mm 以下のアルドステロン産生腺腫や径 2-3mm の副腎多発結節が原因となる UMN が原発性アルドステロン症の原因として多数存在するため、従来の CT や¹³¹I-アドステロール副腎シンチグラムではこれらの腺腫、結節が検出できず、このため画像検査の原発性アルドステロン症鑑別における診断率は 34%以下と不良であることが判明した。

そこで APA, UAH, UMN と IHA, PAH の鑑別には、アルドステロンの過剰分泌が一側性であるか、両側性であるかを確認する必要が考えられた。この方法として、従来から副腎静脈採血法が行われてはいたが、手技の煩雑さ、侵襲性のある検査であること、診断基準が示されていないことから、広く普及していなかった。そこで今回我々は副腎静脈採血法での原発性アルドステロン症の鑑別診断法を検討した。この結果 ACTH 負荷前のコルチゾールが 40 以上でカテーテルが正しく副腎静脈に挿入されていることが確認された場合、ACTH 負荷後のアルドステロンが 1400ng/dl

以上であれば、アルドステロンの過剰分泌が診断できることを証明した。

E. 結論

以上の検討結果より、低レニン性高アルドステロン血症をしめす高血圧症患者では、フロセミド-立位試験とカプトプリル負荷試験でアルドステロン症の診断を行い、その後 ACTH 負荷副腎採血法でアルドステロン過剰分泌が片側性か両側性かを確認し、片側副腎からのアルドステロン過剰分泌が確認された場合は、手術を、両側副腎からのアルドステロン過剰分泌が確認された場合は、抗アルドステロン剤などによる薬物療法を行うべきと考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kazushige Shimono, Kazuhiko Tsutsumi, Hiroshi Yaguchi, Masao Omura, Hironobu Sasano, Tsutsuo Nishikawa. 1999 Lipoprotein lipase promoting agent, NO-1886, modulates adrenal function: Species difference in effects of NO-1886 on steroidogenesis. Steroids 64: 453-459
2. 末松佐知子、矢口寛、大村昌夫、下野和之、堤一彦、笹野公伸、西川哲男 1999 HDL によるステロイド産生調節 ホルモンと臨床 99 秋季増刊号「ステロイドホルモン研究の進歩 1999」47:175-177
3. 西川哲男 1999 原発性アルドステロン症 今日の治療指針 1999 年版 p593