

Table 3. Differences in clinical parameters in dichotomized normal subjects (shorter CA)

Parameter	unit	Shorter CA repeat length ≤ 19 repeats	20 repeats ≤	P value
Urinary Na, K, Ald, E and F				
		<i>n</i> = 68	<i>n</i> = 106	
urinary Na	mEq/day/m ²	67.8 ± 3.2	78.1 ± 2.6	0.014
urinary K	mEq/day/m ²	21.6 ± 0.9	23.9 ± 0.8	0.067
urinary Na / K		3.25 ± 0.12	3.47 ± 0.09	n.s.
Ck	ml/min	6.84 ± 0.61	8.81 ± 0.50	0.014
urinary Ald	µg/day/m ²	3.74 ± 0.26	3.44 ± 0.21	n.s.
urinary E	µg/day/m ²	22.3 ± 1.4	25.6 ± 1.1	0.066
urinary F	µg/day/m ²	21.3 ± 2.0	28.3 ± 1.6	0.007
urinary E / F ratio		1.16 ± 0.05	1.06 ± 0.04	n.s.
Plasma E and F				
		<i>n</i> = 60	<i>n</i> = 145	
plasma E	µg/dl	2.42 ± 0.07	2.37 ± 0.05	n.s.
plasma F	µg/dl	9.53 ± 0.39	9.16 ± 0.25	n.s.
plasma E / F ratio		0.261 ± 0.011	0.281 ± 0.007	n.s.
Glucose homeostasis				
		<i>n</i> = 117	<i>n</i> = 230	
FPG	mg/dl	92.8 ± 0.64	92.8 ± 0.46	n.s.
FIRI	µU/ml	5.04 ± 0.22	5.42 ± 0.16	n.s.
HOMA-R	mg · µU/ml ²	1.17 ± 0.05	1.26 ± 0.04	n.s.
HOMA-β	%	63.3 ± 2.7	66.8 ± 2.0	n.s.

Above data were derived from normal subjects without medication. P values greater than 0.1 were presented as n.s. Data were presented as LSmeans ± SE, evaluated by a General Linear Models Procedure.

Dehydroepiandrosterone(DHEA)のアポトーシス抑制効果

高橋 宏和、中島 淳、関原 久彦
横浜市立大学 医学部 第三内科

研究要旨

近年わが国の生活様式は欧米型に変化しており、それに伴う生活習慣病の増加が懸念されている。食生活や運動量の変化は内分泌器官など内的環境にも影響しうる。内分泌器官の一つである副腎からはグルココルチコイド、ミネラルコルチコイド、副腎アンドロゲンが分泌される。DHEA(dehydroepiandrosterone)は、分泌量が思春期に増加してピークに達し加齢とともに減少する副腎アンドロゲンで、これまで抗糖尿病作用・抗動脈硬化作用・抗腫瘍作用など多くの報告がされている。

われわれはDHEAがマウス肝炎モデルにおいて抗炎症作用を発揮することを発見し、これよりDHEAがアポトーシスに抑制的に働いていると考えた。本研究では培養肝細胞、ヒト培養T細胞およびヒト抹消血リンパ球細胞を用い、DHEAのアポトーシス抑制作用を検討した。この作用は、肝組織・肝細胞だけでなく、ヒト培養T細胞・ヒト抹消血リンパ球細胞においても認められた。ヒト培養T細胞においては0hr incubationで有意差は認められなかったが48hrにて認められたことから、DHEAの作用は転写因子を介し間接的に起こっている可能性が示唆された。またヒト培養T細胞においてDHEAはアポトーシスに抑制的に働き、DHEASは作用しない結果となった。ヒト抹消血リンパ球においてはDHEA・DHEAS共にStaurosporineによるアポトーシスを抑制する傾向にあったが、有意差は認められず、さらなる研究が必要であると考えられた。

アポトーシスは亢進によって肝炎・膵炎やアルツハイマー病を、また抑制によって癌や自己免疫疾患を引き起こす。DHEAがアポトーシスに作用すれば、これらの疾患に応用でき、生活習慣病の予防や高齢者のQOLの改善などに対しても臨床的に用いる可能性がある。現在、DHEAはサプリメントとして米国では店頭で、日本でもインターネットを通じて容易に入手でき、詳細な機構の解明、とりわけ特異的結合部位の同定は今後急務となる。

A. 研究目的

DHEA(dehydroepiandrosterone)は、分泌量が思春期に増加してピークに達し加齢とともに減少する副腎アンドロゲンで、これまで抗糖尿病作用・抗動脈硬化作用・抗腫瘍作用など多くの報告がされている。

アポトーシスは亢進によって肝炎・膵炎やアルツハイマー病を、また抑制によって癌や自己免疫疾患を引き起こす。われわれはDHEAの抗炎症作用に注目し、マウス肝炎

モデルにおいてDHEAがTNF- α やiNOSなどの炎症性メディエーターの抑制を介して肝障害を減少させることを発見した。この作用においてDHEAがアポトーシスに抑制的に働いていることが考えられ、培養肝細胞(H4 II E)を用いてDHEAの直接的なアポトーシス抑制効果を、さらにDHEA対する特異的結合部位が存在するTリンパ球において、アポトーシス抑制作用をヒト培養T細胞(Jurkat cell)およびヒト末梢血リンパ球にて検討

した^{1,2)}。

B. 研究方法

15週齢の雄のBALB/CマウスにDHEAを0.4%の割合で含有させた餌を一週間摂食させConcanavalin A(Con A)静注(20mg/kg)によりアポトーシスを誘導後、肝組織を採取しTdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling(TUNEL法)、DNAラダー法を用いてアポトーシス細胞の検出を行った。

また、ラット培養肝細胞(H4 IIE)に対しDHEAを暴露し(10^{-6} M, 1hr)、TNF- α (5ng/ml, 6hr)及びactinomycin D(0.5g/ml, 6hr)によりアポトーシスを誘導し、TUNEL法及びDNAラダー法によってアポトーシスの検出を行った。

ヒト培養T細胞においてはDHEA・DHEAS(DHEA-sulfate)を暴露後(10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} M, 0hr/48hr, 37°C)、camptothecinにてアポトーシスを誘導し(6μ M, 4hr)、フローサイトメトリーにてアポトーシス細胞の検出・解析を行った。

さらに、健常者静脈血よりリンパ球を採取し、DHEA・DHEASを暴露後(10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} M, 24hr, 37°C)、Staurosporineにてアポトーシスを誘導し(1μ M, 150min)フローサイトメトリーにてアポトーシス細胞の検出・解析を行った。

C. 研究結果

Con A静注後のマウス肝細胞においては、TUNEL法及びDNAラダー法においてDHEA投与群でアポトーシス細胞数の顕著な減少が認められた(図1、2)。

TNF- α ・actinomycin D投与後のラット培養肝細胞においては、TUNEL法及びDNAラダー法においてDHEA投与群でアポトーシス細胞数の顕著な減少が認められた(図3、4)。

Camptothecin投与後のヒト培養T細胞に

おいては、DHEA 10^{-5} M・24hr incubationにて有意なアポトーシス抑制作用が認められた。ほかの濃度のDHEAおよびDHEAS、また0hr incubationにおいて有意差は認められなかったがDHEA投与群ではアポトーシスは抑制される傾向にあった(図5、6)。

Staurosporine投与後の健常人末梢血リンパ球においては、有意差は認められなかったがDHEA・DHEAS共にアポトーシスを抑制する傾向にあった。(図7)

D. 考察

DHEAのアポトーシス抑制作用について4つの自験例を紹介した。DHEAのアポトーシス抑制作用は、肝組織・肝細胞だけでなく、ヒト培養T細胞・ヒト末梢血リンパ球においても認められることが明らかとなった。またヒト培養T細胞においては0hr incubationで有意差は認められなかったが48hrにて認められたことから、DHEAの作用は転写因子を介し間接的に起こっている可能性が示唆された。

DHEAとその硫酸エステルであるDHEASの作用の相違についての報告が散見されるが、ヒト培養T細胞においてDHEAはアポトーシスに抑制的に働き、DHEASは作用しない結果となった³⁾。ヒト末梢血リンパ球においてはDHEA・DHEAS共にStaurosporineによるアポトーシスを抑制する傾向にあったが、有意差は認められず、さらなる研究が必要であると考えられた。

E. 結論

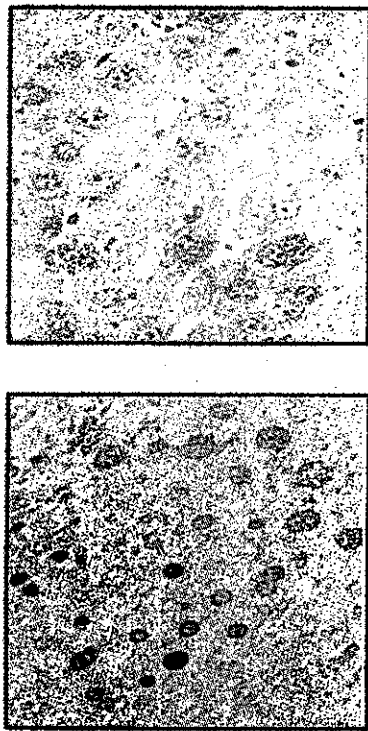
近年アポトーシスの機構が明らかになるにつれ、以前よりあった核の凝集やDNAの断片化など現象としてのアポトーシスに対してだけでなく、Fas/FasL・TNF- α ・caspase・MAPkinase(mitogen-activated protein kinase)などアポトーシスの誘導や実行に関わる諸因子に対してDHEAをはじめ

めホルモンのアポトーシスへの作用が報告されている⁴⁻⁶⁾。

DHEA・DHEA-Sは、おそらく直接的に特異的結合部位を介して作用するか、間接的に teststerone・estradiol に変換され作用しているだろうと考えられている。現在、DHEAはサプリメントとして米国では店頭で、日本でもインターネットを通じて容易に入手できる。今後、生活習慣病の予防や高齢者のQOLの改善など臨床的に用いるには、詳細な作用機構の解明、とりわけ特異的結合部位の同定が必要である。

参考文献

- 1) Meikle AW, et al.: J Steroid Biochem Mol Biol, 42: 293, 1992.
- 2) Okabe T, et al.: J Clin Endocrinol Metab, 80:2993, 1995.
- 3) Gil-ad I, et al.: Isr Med Assoc J, 3: 639, 2001.
- 4) Kolle S, et al.: Mol Reprod Dev, 61: 180, 2002.
- 5) Bailly-Maitre B, et al.: Cell Death Differ, 8: 279, 2001.
- 6) Fujita Y, et al.: Clin Exp Immunol, 128: 21, 2002.



control

+DHEA

図1 TUNEL法によるアポトーシスの検出
(マウス肝細胞)

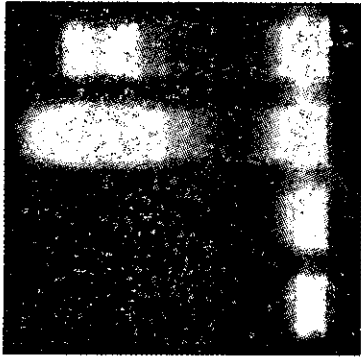


control



+DHEA

図3 TUNEL法によるアポトーシスの検出
(ラット培養肝細胞:H4 IIE)



control

+DHEA

図2 DNAラダー法によるアポトーシスの検出
(マウス肝細胞)



normal

+DHEA control

図4 DNAラダー法によるアポトーシスの検出
(ラット培養肝細胞:H4 IIE)

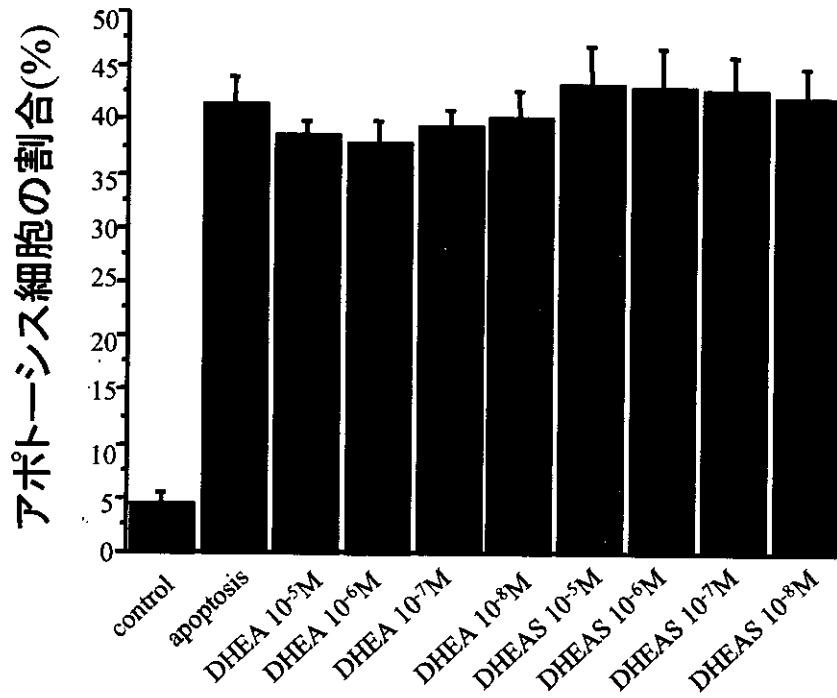


図5 DHEA・DHEASの濃度変化に対するアポトーシス細胞の割合 (Jurkat cell/ 0hr incubation)

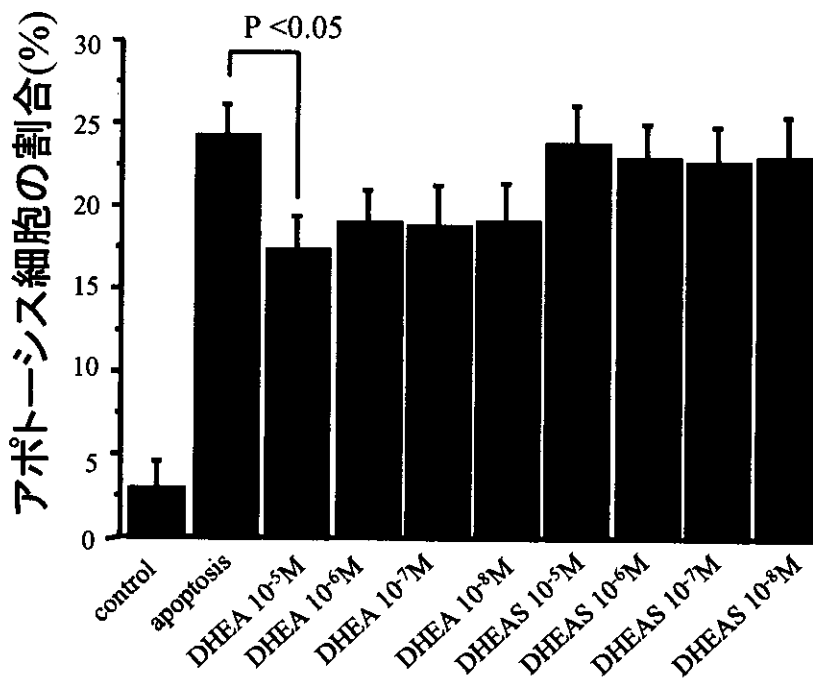


図6 DHEA・DHEASの濃度変化に対するアポトーシス細胞の割合 (Jurkat cell/48hr incubation)

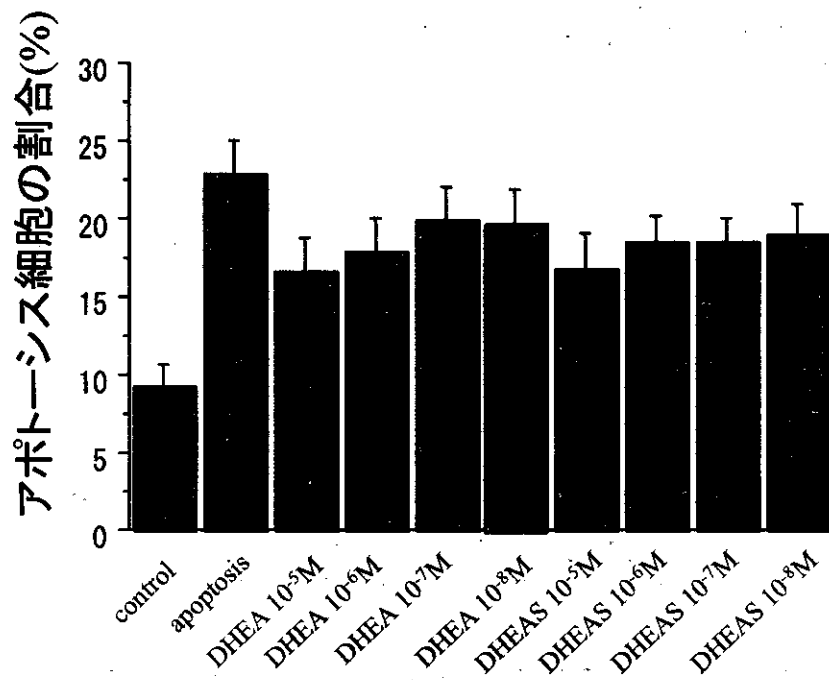


図7 DHEA・DHEASの濃度変化に対する
アポトーシス細胞の割合
(ヒト末梢血リンパ球/24hr incubation)

(4) 副腎腫瘍および副腎性高血圧

原発性アルドステロン症の新しいスクリーニング法の検討

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

我々は、これまで本研究班において、原発性アルドステロン症のより正確な局在診断法として、ACTH連続負荷・アンジオテンシン受容体拮抗薬投与下副腎静脈サンプリング法を開発し¹⁾、その有用性を検討してきた。今回、我々は、サンプリング法に比べ低侵襲の、アルドステロン産生腺腫と特発性アルドステロン症の鑑別を可能にするスクリーニング法の確立を目指し、各種負荷試験による検討を行った。その結果、rapid ACTH負荷試験においては、120分値の血漿アルドステロン濃度(PAC)、デキサメサゾン投与下アンジオテンシンⅡ(AⅡ)負荷試験では、AⅡ 1ng/kg/min 投与時のPACがその鑑別診断に有用であることが示唆された。

A. 研究目的

従来原発性アルドステロン症(PA)の頻度は、全高血圧症の1%以下と報告されており²⁻⁶⁾、頻度の高い疾患とは考えられていなかった。ところが、近年、PAは全高血圧患者の6.59~14.4%という非常に高率に認められるとの報告が相次ぎ⁷⁻¹¹⁾、本研究班においても、西川ら¹²⁾によって本邦における頻度は5.4%であると報告されている。

このようにPAが高血圧患者において高頻度に存在することから、すべての高血圧症例において、そのスクリーニング検査の施行が望まれる。我々は外来において、すべての高血圧患者に対し、安静臥位20分後の採血を行い、血漿レニン活性(PRA)、血漿アルドステロン濃度(PAC)からPAをスクリーニングしている。カットオフ値であるが、Gordonら⁷⁾はPAC(ng/dl)/PRA(ng/ml/hr)が30以上と報告しており、我々の施設では、PRA 1ng/ml/hr 以下かつPAC 100pg/ml 以上の場合、PAの疑いが強いと考えている。

スクリーニングによりPAが疑われた場合、PAの確定診断が必要になる。これに

は、原因疾患の鑑別(主にアルドステロン産生腺腫(APA)と特発性アルドステロン症(IHA)の鑑別)や、APAの場合は局在診断(腺腫(マイクロアデノーマを含む)の部位同定)が含まれる。我々は、本研究班においてPAのより正確な局在診断法として、ACTH連続負荷・アンジオテンシン受容体拮抗薬(ARB)投与下副腎静脈サンプリング法を開発し¹⁾、その有用性を検討し、報告してきた。今回我々は、サンプリング法に比べ低侵襲かつ簡便にAPAとIHAの鑑別を可能にするスクリーニング法の開発を目指し、平成13~14年に当科に入院したPAが疑われた症例において各種負荷試験を行い、検討を行った。

B. 研究方法

平成13~14年に当科に入院したPA症例あるいはPAが疑われた症例において以下の検討を行った。

1. rapid ACTH負荷試験

合成ACTH(コートロシン) $250\mu\text{g}$ bolus静脈投与による末梢血血漿アルドステロン濃度(PAC)、血漿コルチゾー

ル濃度の経時的変化。

2. デキサメサゾン (DEXA) 投与下アンジオテンシン II (A II) 負荷試験

内因性ACTHの影響を防ぐため、前日就寝前にDEXA 1mgを服用させる。翌朝9時からA IIを0.25ng/kg/minより投与開始し、以後15分ごとに倍量濃度とし、15分ごとの末梢血PAC、血圧を測定する。収縮期血圧が0分と比べ20mmHg以上上昇、あるいはA IIが2ng/kg/minとなった時点で終了とする。一部症例においては、試験当日の朝6時にアンジオテンシン受容体拮抗薬 (ARB) (Candesartan 12mg) を服用させる。

3. カプトプリル負荷試験

カプトプリル50mg服用後の末梢血PACおよびACTHの経時的変化。一部症例においては、試験施行前夜にDEXA 1mgを服用させる。

4. DEXA、ARB、および両者併用投与

同一症例において、無投薬、前日就寝前DEXA 1mg服用、当日朝6時Candesartan 12mg服用、およびその両者を服用、の計4回において朝9時 (安静臥位30分後) に静脈採血を行い、PACを測定する。

C. 研究結果

1. 症例

表1に平成13~14年にPAが疑われ、当科に入院し各種負荷試験の施行に同意を得た15症例を示す。APA 8例、IHA 4例であり、残りの3例はPAが否定された。AHA・IHA全ての症例において、低レニン・高アルドステロン血症を認め、尿中アルドステロン排泄量も8ug/day以上であった。PAを否定された症例のうち、S.M.は左副腎腫瘍の精査にて入院となった症例である。甘草を含

む漢方薬を自己判断にて内服していたため、外来時のデータは低レニン状態であるが、最終診断はCushing症候群であった。T.H.は外来にて低K血症、低レニン、高アルドステロン血症を認めた高血圧症例であるが、カプトプリル負荷、ラシックス立位負荷試験にて正常パターンであった。Y.K.は左腎上極の境界不明瞭な径5cmの腫瘍の精査にて当科入院となり、ラシックス立位負荷にてPRAの上昇が認められないため、副腎静脈サンプリングを施行しPAが否定された症例である。

2. rapid ACTH負荷試験

図1にrapid ACTH負荷試験の結果を示す。APA症例では、PACは60分後まで増加し続け、以後高値を保った。IHA症例・正常例においては、PACは負荷後30分でピークとなり、以後減少し、120分後には投与前の値近くにまで低下している例も認められた。コルチゾールに関してはすべての症例において高値を保っていた。

図2にrapid ACTH負荷試験における負荷前と負荷後120分のPACを、APA症例とIHA症例・正常例において比較したものを示す。APAでは負荷前に比べ負荷後120分値において、2倍近いPACの上昇を認めたが、IHA症例・正常例においては、30%程度の上昇であった。

3. DEXA投与下A II 負荷試験

すべての症例においてA II 2ng/kg/min投与時には収縮期血圧が投与前と比較し、20mmHg以上上昇した (図3)。APA症例においては、PACはA II 2ng/kg/min投与時においてもほとんど変化なく、APAにおけるアルドステロン分泌がレニン-アンジオテンシン (RA) 系に依存していないと考えられた。一方、

IHA症例・正常例においては、A II 2ng/kg/minまでの投与で、全ての症例においてPACは増加し、投与前の2倍程度まで増加している例も認められた。

図4にA II 負荷前および1ng/kg/min投与時のPACを、APA症例とIHA・正常例において比較したものを示す。APA症例ではPACに投与前後で変化がないのに比べ、IHA症例・正常例では、70%程度の上昇を認めた。

図5は、IHA症例・正常例での、ARBであるCandesartan 12mg前投与におけるDEXA投与下A II 負荷試験の結果である。ARB前投与により、A II 投与による血圧・PACの上昇は完全に抑制されており、12mgのCandesartanによりRA系をほぼ完全に抑制できると考えられた。

4. カプトプリル負荷試験

APA症例におけるカプトプリル負荷の結果をみると(図6)、全体的な傾向としてはPACに変化を認めない。しかし、中には減少している例があり、ACTHの変化をみると、スケールオーバーのため図には示していないが、投与前が90pg/mlであったものが、120分後には54pg/mlまで減少しており、ACTH濃度の変化に伴うPACの減少も考えられた。逆にPACに変化を認めない例においても、時間経過と共にACTHが増加している場合もあった。IHA症例・正常例においては、すべての例において時間経過と共にPACの低下を認めた。この結果は、A II 負荷試験で得られたAPA症例はRA系に非依存性であり、IHA症例はRA系に依存している結果と矛盾しないものであった。しかし、図のように負荷試験中にACTHが低下する例では、ACTHの日内変動によりPACの低下が認められる可能性も否定

できない。そこで、図7のように内因性ACTH分泌の影響を除外するために、我々はDEXA前投与下でのカプトプリル負荷試験を試みている。今回検討したAPA症例はDEXA非投与時においてもACTHの大きな変化が認められなかったことから、試験経過中PACに変化は認められなかった。DEXA投与により、APAのACTH依存性を反映して、PACが非投与時と比べると前値から低下しているが、非投与時同様、経過中PACに変化は認められなかった。

5. DEXAおよびARBによるACTH/RA系の抑制効果

図8は同一症例における、無投与、DEXA、ARB、およびその両者投与時のPACをグラフ化したものである。APA症例ではカプトプリル負荷試験の結果と同様にARB投与によってもPACに変化はほとんどないものの、DEXAにより約50%程度に抑制された。一方IHA・正常例ではARBによりPACは著明に抑制され、DEXAによってもAPA症例に比べその程度は弱いものの、一部抑制を受けた。

D. 考察

APAとIHAの一般検査による鑑別は容易ではない。18-OH-コルチコステロンが100ng/dl以上であればAPAの可能性が高く、50ng/dl未満であればIHAとする報告があるが¹³、例外も多く、また、一般的な検査でもない。そのため、一般にはCT、MRI、副腎シンチグラフィといった画像診断法が鑑別診断に用いられるが、これらは分解能に限界がある。特に、腫瘍径の小さいAPA(マイクロアデノーマ)では、径が3mm以下の場合も存在し、この場合thin sliceのCTでも診断は困難である。Gordonら¹¹⁾は病理学的にAPAと診断された111例中59例においてに

のみ3mm sliceのCTにて局在診断が可能であり、径1cm未満のAPAではCTでの検出率が1/4未満であったと報告している。このためPAの鑑別診断には最終的には副腎静脈サンプリングが必要となる。

しかし、副腎静脈サンプリングは侵襲的な検査であり、患者の負担も小さない。また、両側性APAとIHAの鑑別はサンプリングでは不可能である。我々は、外科的治療が可能なAPAと基本的には内科的治療を行うIHAを、簡便かつ容易に鑑別を可能にするスクリーニング法の開発を目指し、当科入院したPAが疑われた症例において施行した各種負荷試験から検討を行った。

APAとIHAの鑑別という点からrapid ACTH負荷試験をみると、図2のように、負荷前と負荷後120分のPACを比較することが有用であると思われた。すなわち、APA症例においてはそのACTH依存性の強さから、ACTH投与後にPACの過剰反応(前値の2倍程度)が認められたのに対し、IHA症例においては、正常例と同様の軽度な上昇(約30%)にとどまった。従来rapid ACTH負荷試験は投与後60分後まで採血を行う例が多いが、今回の検討から、120分値の有用性が示唆された。

A II負荷試験においても、図4のように、負荷前とA II 1ng/kg/min投与時のPACを比較することで、APAとIHAの鑑別が可能であると考えられた。すなわち、APA症例においては、RA系に対する依存性が少ないために、投与前後においてPACの変化が認められないのに対し、IHAにおいては、正常例と同様に約70%の増加を認めた。この増加は、ARB(Candesartan 12mg)前投与により抑制され、ARB投与によりRA系はほぼ完全に抑制されていたと考える。また、この試験は、DEXA前投与下に施行することで、内因性ACTHによるPACに対する影響を除外し検討が可能である。

しかし、A II負荷試験は、その昇圧作用のため、その施行においては慎重な対応が必要である。この点、同じRA系の反応性を検討する上でカプトプリル負荷試験の方が安全である。本試験においてもAPAとIHAの鑑別という点では、A II負荷試験と同様に考えることが可能である。しかしながら、図6のように、カプトプリル負荷後のPACは、すべてのIHA症例において正常例と比べ高値を示しているが、症例数が少ないため、正常例と比べてアルドステロン自律性分泌があるIHA症例においてカプトプリルによってどの程度PACが低下するのかはまだ明らかではない。また、上記のように、内因性ACTHのPACに対する影響は除外されるべきであり、DEXAの前投与によるカプトプリル負荷試験を、更に症例数を重ねて施行し、その有用性を検討する必要がある。

E. 結論

我々は、アルドステロン産生腺腫と特発性アルドステロン症の鑑別を可能にするスクリーニング法の確立を目指し、各種負荷試験による検討を行った。両者の鑑別診断には、rapid ACTH負荷試験においては、120分値のPAC、DEXA投与下A II負荷試験では、A II 1ng/kg/min投与時のPACが有用であることが示唆された。

参考文献

- 1) Yamahara K., et al: New diagnostic procedure for primary aldosteronism: adrenal venous sampling under adrenocorticotrophic hormone and angiotensin II receptor blocker - application to a case of bilateral multiple adrenal microadenomas. *Hypertens Res.*, 25: 145-52, 2002.
- 2) Fishman LM., et al: Incidence of primary aldosteronism uncomplicated essential hypertension. *JAMA* 205: 497-502, 1968.

3) Berglund G., et al: Prevalence of primary and secondary hypertension: studies in a random population sample. Br Med J., 2: 554-6, 1976.

4) Danielson M., et al: The prevalence of secondary and curable hypertension. Acta Med Scand, 209: 451-5, 1981.

5) Sinclair AM., et al: Secondary hypertension in a blood pressure clinic. Arch Intern Med., 147: 1289-93, 1987.

6) 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.

7) Gordon RD., et al: High incidence of primary aldosteronism in 199 patients referred with hypertension. Clin Exp Pharmacol Physiol, 21: 315-8, 1994.

8) Abdelhamid S et al: Prevalence of adrenal and extra-adrenal Conn syndrome in hypertensive patients. Arch Intern Med., 156: 1190-5, 1996.

9) Lim PO., et al: Potentially high prevalence of primary aldosteronism in a primary-care population. Lancet, 353: 40, 1999.

10) Fardella CE., et al: Primary hyperaldosteronism in essential hypertensives: prevalence, biochemical profile, and molecular biology. J Clin Endocrinol Metab, 85(5): 1863-7, 2000.

11) Gordon RD., et al: Primary aldosteronism: are we diagnosing and operating on too few patients? World J Surg, 25: 941-7, 2001.

12) Nishikawa T., et al: Clinical characteristics of primary aldosteronism: its prevalence and comparative studies on various causes of primary aldosteronism in Yokohama Rosai Hospital. Biomed Pharmacother 54, Suppl 1: 83s-5s, 2000.

13) Biglieri GT., et al: The significance of elevated levels of plasma 18-hydroxycorticosterone in patients with primary aldosteronism. J Clin Endocrinol Metab, 49: 87-91, 1979.

表1 症例

年齢	診断	腹部CT	PRA ng/ml/h	PAC pg/ml	尿中アルドステロン μg/day
T.F. ♂ 60	APA	右副腎腫瘍(径15mm)	0.3	334	10.6~11.9
H.H. ♂ 58	APA	右副腎腫瘍(径9×6mm)	0.1>	182	9.6~10.9
T.K. ♂ 44	APA	左副腎腫瘍(径10mm)	0.17	505	10.5~12.4
K.K. ♀ 68	APA	右副腎腫瘍(径5mm)	0.2	184	6.0~8.0
H.N. ♀ 61	APA	右副腎腫瘍(径10mm)	0.1>	255	9.2~10.0
H.H. ♀ 58	APA	異常認めず	0.24	140	7.5~10.4
K.Y. ♀ 58	APA	右副腎腫瘍(径10mm)	0.1>	220	5.3~8.2
K.Y. ♀ 33	APA	左副腎腫瘍(径5mm)	0.1>	306	25.8
T.H. ♂ 65	IHA	左副腎腫瘍(径2cm弱)の疑い	0.48	236	8.6~14.1
Y.H. ♂ 60	IHA	異常認めず	0.23	125	7.2~8.5
N.H. ♂ 48	IHA	左副腎腫瘍(径12mm)の疑い	0.27	175	14~17
H.M. ♀ 50	IHA	異常認めず	0.3	200	11.5~24.3
S.M. ♂ 72	Cushing症候群	左副腎腫瘍(径2cm弱)	0.1>	77	5.8~6.9
T.H. ♀ 64	本態性高血圧症、低K血症	施行せず	0.7	155	5.9~6.7
Y.K. ♀ 51	本態性高血圧症、腎血管筋脂肪腫	左腎上極に径5cmの腫瘍	0.1>	84	3.1~7.8

(PRA: 血漿レニン活性、PAC: 血漿アルドステロン濃度)

図1 ACTH負荷試験

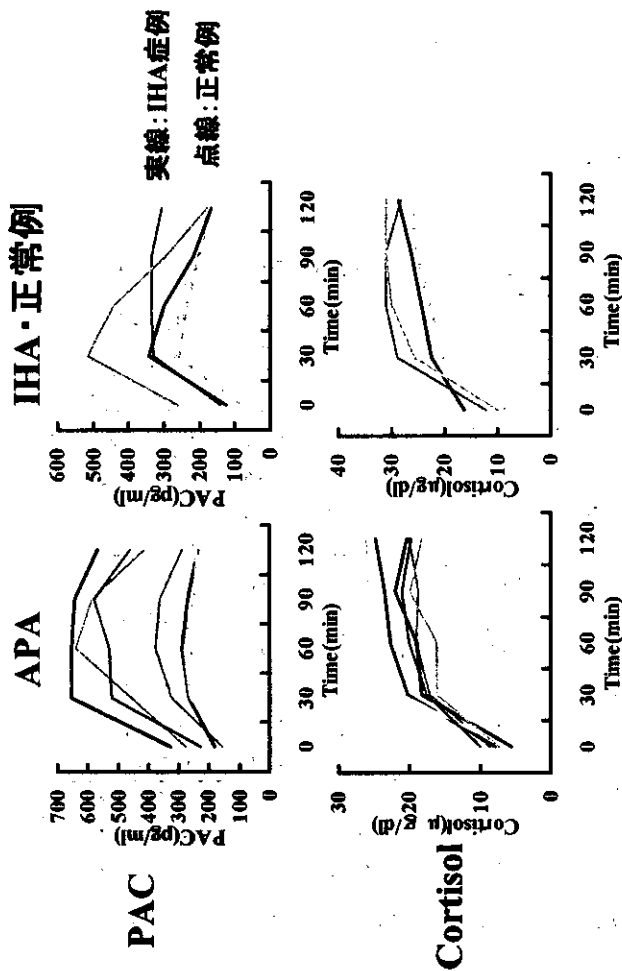


図2 ACTH負荷試験-負荷前と負荷後120分値の比較



図3 DEXA投与下AII負荷試験

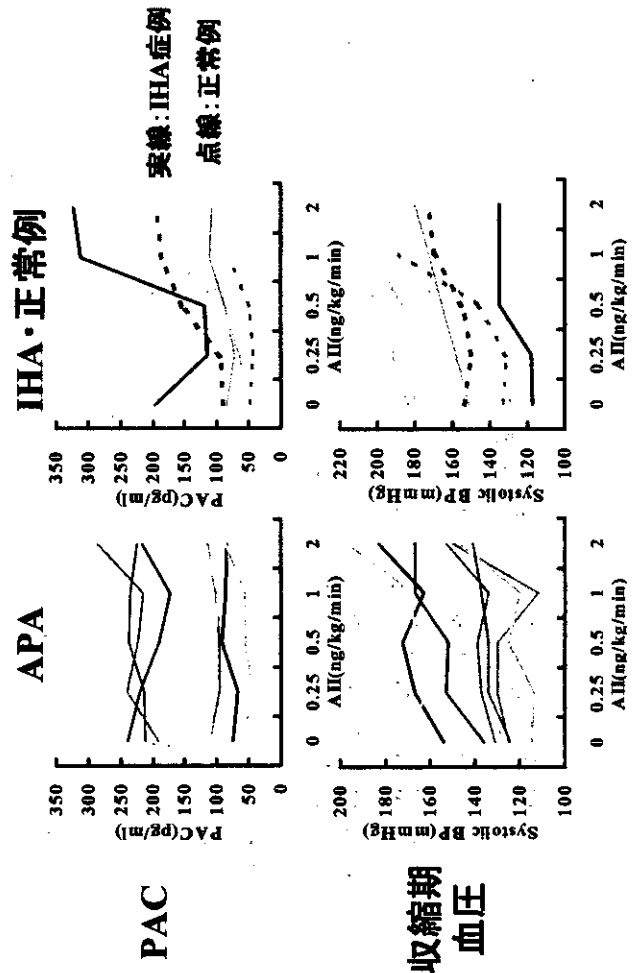


図4 DEXA投与下AII負荷試験-負荷前とAII 1ng/kg/min負荷の比較

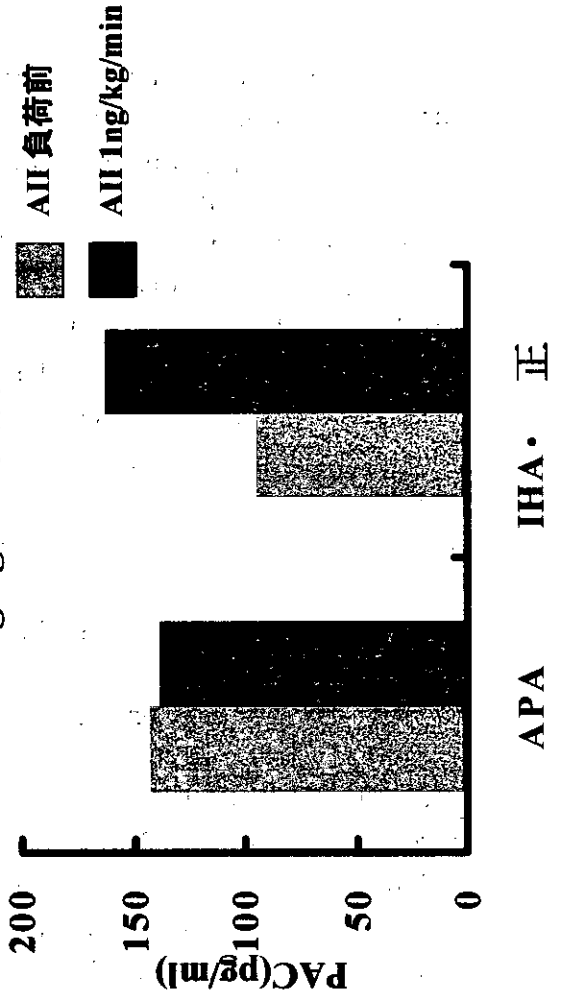


図5 DEXA・ARB投与下AII負荷試験-IHA・正常例

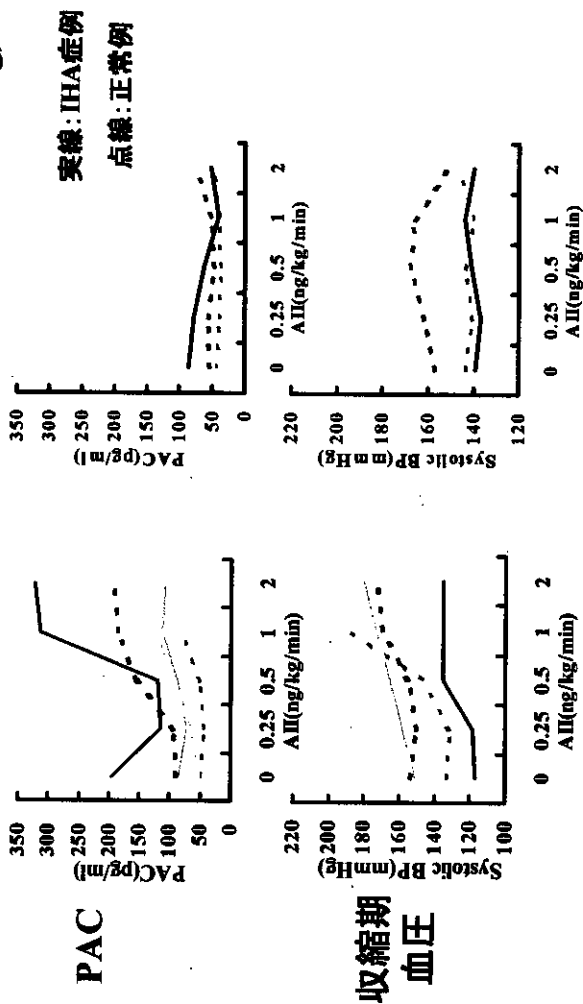


図7 DEXA投与下カプトプリル負荷試験

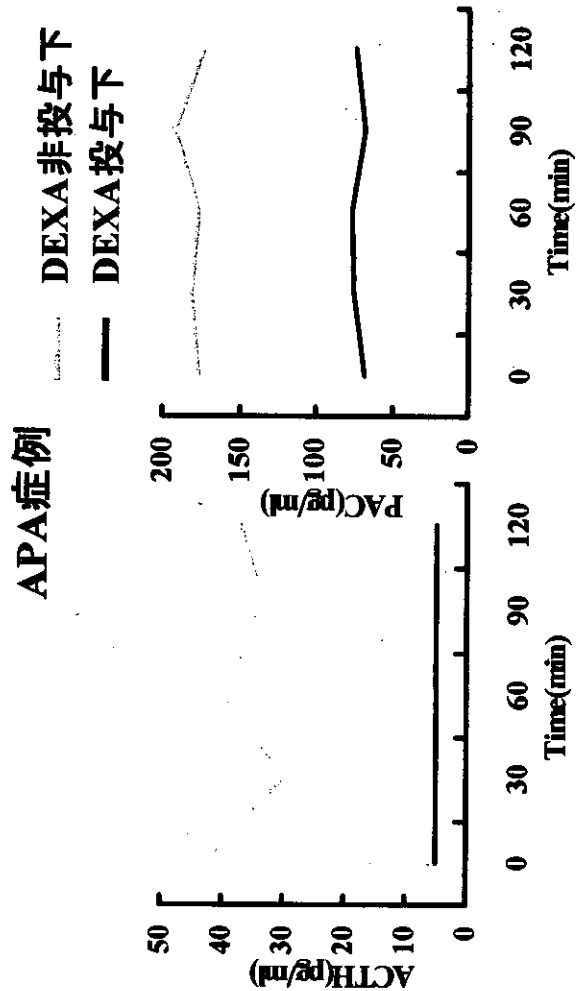


図6 カプトプリル負荷試験

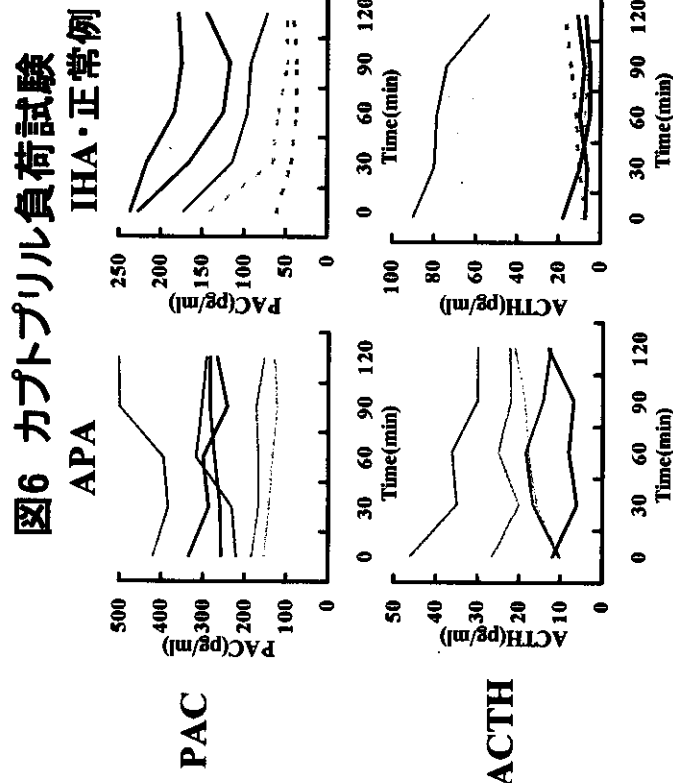
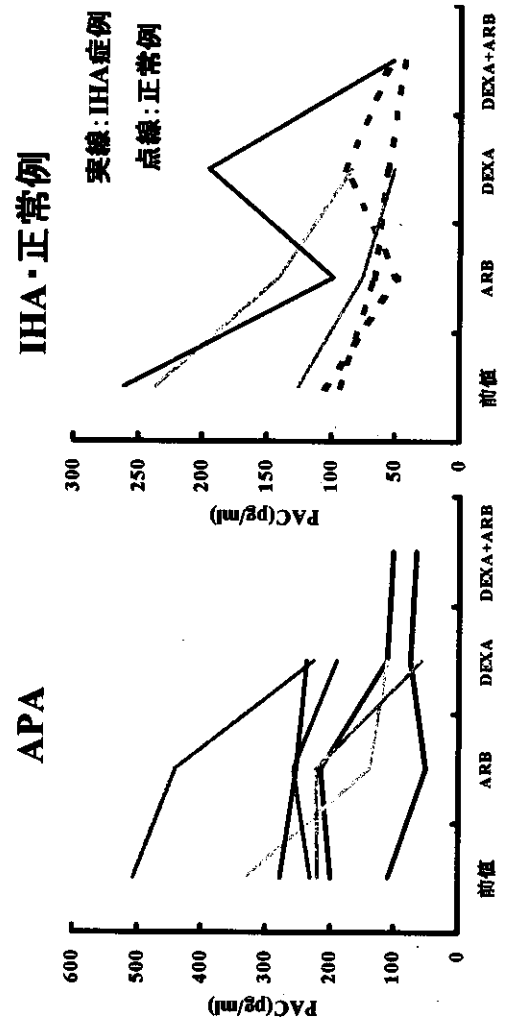


図8 DEXA/ARBによるACTH/RA系の抑制効果



副腎腫瘍に対する外科的治療

—内視鏡下副腎摘除術における到達法の選択—

辻畑 正雄、三宅 修、吉村 一宏、奥山 明彦
大阪大学大学院医学系研究科臓器制御医学 器官制御外科学(泌尿器科学)

研究要旨

内視鏡下副腎摘除術において副腎への内視鏡的アプローチの選択という観点から症例の検討を詳細に行った。76例中6例に合併症を認め、術中出血4例、術後出血1例、術後尿溢流1例であった。合併症と副腎への到達法の間係を検討すると、6例中3例は右側症例に対して後腹膜側方到達法で行っており、2例は左側症例に経腹膜前方到達法を行った症例であった。また、6例中2例が開腹手術に移行しており、いずれも右側症例に対する後腹膜側方到達法の症例であった。以上の結果およびそれぞれの到達法の長所、短所から考えて、右側症例には経腹膜前方到達法を、左側症例には後腹膜側方または経腹膜側方到達法の選択が良いと考える。

B. 研究方法

当科では1992年9月より2002年10月までに76例の内視鏡下副腎腫瘍摘出術を行っている。平均年齢48.2歳、男30例、女46例で、対象疾患は原発性アルドステロン47例(61.8%)、Cushing症候群7例(9.2%)、内分泌非活性腫瘍7例(9.2%)、褐色細胞腫6例(7.9%)、骨髄脂肪腫4例(5.3%)、神経節細胞腫2例(2.6%)、Cushing症候群+原発性アルドステロン1例(1.3%)、リンパ管腫1例(1.3%)、嚢腫1例(1.3%)であった。これらの全体の治療成績と副腎への内視鏡的アプローチの選択という観点からの検討を詳細に行った。

(倫理面での配慮)

術前に患者に対して十分なインフォームドコンセントを得て本術式を施行した。

C. 研究結果

手術は患側を上とする側臥位、全身麻酔下に経腹膜到達法ではまず中鎖骨線上に第1ポートを置き、そこにスコープを挿入

し、気腹後3本のポートを順次挿入する。後腹膜的到達法では後腋下線上にballoon付きtrocarを後腹膜腔に挿入し、操作腔の作成と後腹膜剥離を行う。そこにスコープを挿入し、中および前腋下線上に操作作用として3本のポートを挿入する。後腹膜的到達法および経腹膜的到達法の年度別症例数と治療成績を図1および表1に示す。

両者の比較では出血量が経腹膜的が301.4mlで、後腹膜的が127.9mlであり、後腹膜的到達法の方が少ない傾向を認めた。これ以外のパラメーターは両者で明らかに差を認めなかった。

さらに最初の症例から手術成績を比較すると、手術手技の熟練度の当初と最近では差があるため、データにばらつきが大きく、比較するのは困難であると考えられることから、最近の10症例での両者の治療成績を表2に示した。この検討においても出血量で後腹膜的到達法の方が有意に少なかった。

一方合併症と到達法の間係を表3に示し

た。術中出血4例、術後出血1例、術後腎盂からの尿溢流1例であった。

D. 考察

内視鏡下副腎摘除術において副腎への到達法には経腹膜的と後腹膜的があり、それぞれの長所、短所を表4に示した。さらに経腹膜的到達法に前方到達法と側方到達法があり、後腹膜的到達法に後腹膜側方到達法と後方到達法があり、それらの到達経路および長短所による比較を図2および表5に示した。経腹膜前方到達法は右副腎への到達が容易で、経腹膜側方到達法は副腎前面が大きく開放されるため、大きな腫瘍に適応があり、また左副腎への到達が容易である。後腹膜側方到達法は位置関係の把握が難しい欠点があるが、腹腔内手術既往のある症例には適応になる。

76例中6例に合併症を認めた。この6例の内訳は5例が術中または術後早期の出血で、4例に600~2400mlの輸血を行っている。出血例5例のうち1例は腎被膜周囲の動脈を損傷したことが原因で、3例は肝下面との癒着剥離が原因、残る1例は7時間を越える長時間手術が原因と考えられた。残る1例は腹腔鏡による広範な腎門部の剥離操作によると思われる腎盂からの尿溢流が術後に判明し、術後ダブルピグテールカテーテルを長期留置した。

これらの合併症を認めた6例の副腎への到達法を検討してみると、3例が右側症例に対して後腹膜側方到達法で手術を行っており、2例が左副腎に経腹膜前方到達法を行った症例であった。右副腎の場合には中心静脈は短く、肝下面との剥離において出血を認めるケースが多いにもかかわらず、操作腔が狭く、位置関係の把握が難しい後腹膜側方到達法を選択したためと考えられる。以上の結果およびそれぞれの到達法の長所、短所から考えて、右側症例には経腹

膜前方到達法を、左側症例には後腹膜側方または経腹膜側方到達法の選択が良いと考える。

E. 結論

当科では、基本的には右側症例では経腹膜前方到達法を、左側症例には後腹膜側方到達法あるいは経腹膜側方到達法を用いて手術を行う方針である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) O. Miyake, A. Okuyama: Surgical management of primary aldosteronism. *Biomed & Pharmacother* 2000, 54, Suppl 1, 25-31.
- 2) O. Miyake, K. Yoshimura, T. Yoshioka, M. Honda, K. Matsumiya, Y. Kokado, T. Miki, A. Okuyama: Operating time and complications in laparoscopic adrenalectomy. *Japanese Journal of Endourology and ESWL*, 1998, 11, 31-34.

2. 学会発表

- 1) 三宅 修、垣本健一、吉村一宏、辻畑正雄、高原史郎、奥山明彦：第14回日本内分泌外科学会総会、大阪、2002年。
- 2) 三宅 修、垣本健一、吉村一宏、辻畑正雄、松宮清美、高原史郎、奥山明彦：当科における腹腔鏡下、後腹膜腔鏡下副腎摘出術の治療成績。第15回日本Endourology ESWL学会、名古屋、2001年。
- 3) 吉村一宏、三宅 修、松宮清美、高原史郎、吉岡俊昭、三木恒治、奥山明彦：褐色細胞腫に対する腹腔鏡下副腎摘除術の経験、第10回日本内分泌外科学会、宇都宮、1998年。

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

ヒト副腎皮質癌細胞株 SW-13 における TGF- β type II receptor mRNA 発現低下

宮地幸隆、山本奈津子
東邦大学医学部第一内科

研究要旨

副腎皮質癌における TGF- β 情報伝達異常の関与を検討するため、ヒト副腎皮質腫瘍組織およびヒト副腎皮質癌細胞株 SW-13 を用い TGF- β 1、TGF- β I 型受容体 (TGF- β RI) および TGF- β II 型受容体 (TGF- β RII) mRNA の発現を解析した。副腎皮質腺腫では TGF- β 1、TGF- β RI および TGF- β RII mRNA 発現を認めたが、副腎皮質癌組織および SW-13 では TGF- β RII mRNA 発現が顕著に低下し、SW-13 は TGF- β 1 の細胞増殖抑制作用に抵抗性を示した。さらに SW-13 の TGF- β RII 強制発現系を作製し、TGF- β RII 発現回復による TGF- β 感受性の回復について検討をおこなった。TGF- β RII 強制発現系では TGF- β 1 の添加により細胞増殖は抑制され TGF- β 1 への感受性の回復を認めた。ヒト副腎皮質癌組織および SW-13 における TGF- β RII mRNA 発現低下は TGF- β 1 抵抗性に基づく副腎皮質癌発生に深く関与していることが示唆された。

A. 研究目的

副腎皮質癌は進行性で高度に転移し最も予後不良な悪性腫瘍のひとつであり、副腎皮質癌発生機序の解明が望まれている。現在までに副腎皮質癌発生の分子メカニズムとして p53 の点突然変異、IGF 2 の過剰発現や MEN1 の欠失などが報告されているが、他の因子の関与についても検討が必要とされている。

TGF- β は多くの正常および癌細胞の増殖を抑制する。細胞表面において TGF- β 1 が TGF- β II 型受容体 (TGF- β RII) と結合し TGF- β I 型受容体 (TGF- β RI) と TGF- β RII の両者がヘテロダイマーを形成することにより、下流の Smad をリン酸化してシグナルが伝達される。核内へと移行した Smad が遺伝子発現を調節することにより、細胞周期の G₁ 期から S 期への移行が阻害され TGF- β 1 の増殖抑制効果が示される。

TGF- β 情報伝達経路の異常により TGF- β の増殖抑制作用に抵抗性を獲得すると細胞

は自律性に増殖することから、TGF- β 抵抗性の獲得は細胞の癌化や癌の悪性化への進行の上で重要な過程であると考えられている。特に TGF- β RII は胃癌や大腸癌、乳癌、肝癌等の全身の様々な悪性腫瘍において、その遺伝子領域での欠失、点変異、転写抑制が報告され、TGF- β RII の異常は TGF- β 抵抗性に基づく癌化を来すものとして注目されている。我々の研究室では、ヒト内分泌腫瘍における TGF- β 情報伝達経路の異常と癌化との関連を研究しており、これまでに臨床摘出検体を用いてヒト甲状腺乳頭癌やヒト副腎皮質癌組織における TGF- β RII mRNA の発現低下を報告した。甲状腺悪性腫瘍での TGF- β RII 発現低下は数多く報告されているが、副腎皮質腫瘍における TGF- β 情報伝達経路の異常を研究した報告は少なく副腎皮質癌における TGF- β RII 発現低下の関与についてさらに検討する必要がある。

今回、副腎皮質癌と TGF- β 情報伝達経路

の関連について検討するため、ヒト副腎皮質腫瘍組織とヒト副腎皮質癌由来細胞株SW-13におけるTGF- β 1、TGF- β RIおよびTGF- β RII mRNAの発現解析を行なった。この結果、副腎皮質癌組織およびSW-13においてTGF- β RII mRNAの発現低下が認められ、SW-13はTGF- β の増殖抑制作用に抵抗性であることを示した。さらに、SW-13のTGF- β RII発現回復によるTGF- β 感受性の回復について、TGF- β RII強制発現系を作製して検討した。

B. 研究方法

1. 材料

ヒト副腎皮質癌、ヒトアルドステロン産生副腎皮質腺腫組織は患者の同意を得て手術時摘出された組織を用いた。ヒト副腎皮質癌細胞株SW-13はAmerican Type Culture Collectionより購入した。TGF- β 1、TGF- β RIおよびTGF- β RII mRNA発現の陽性対照としてヒト肝癌由来細胞株HepG2を使用した。ヒト血小板由来ヒトTGF- β 1(hTGF- β 1)はR&D Systemsより購入した。

2. 方法

a. 各副腎皮質組織および細胞株からのtotal RNAの抽出

TRIzol reagent(Life Technologies)を用い各副腎皮質組織、SW-13および対照のHepG2細胞よりtotal RNAを抽出した。10 μ gのtotal RNAを用いoligo(dT) primer(Life Technologies)と逆転写酵素Super ScriptTMII(Life Technologies)により逆転写反応を行ない相補的DNA(complementary DNA; cDNA)を作成した。

b. Reverse Transcription-PCR(RT-PCR) analysis

遺伝子特異的プライマーを用いてRT-PCR反応を行なった。鋳型DNAとし

て前述の逆転写反応によって得られたcDNAを用い、逆転写反応の対照として解糖系酵素であるglyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)遺伝子のプライマーを用いた。総PCR産物を1%アガロースゲルにて分離しエチジウムブロマイドによって染色後UV transilluminator(Toyobo)により可視化した。さらに、TGF- β RII mRNA発現を定量的に解析するためABI Sequence Detection System(Applied Biosystems)を用いReal Time RT-PCRを行なった。TGF- β RII mRNA発現量の指数は、逆転写反応の対照として用いたGAPDH mRNAの発現量に対する比(TGF- β RII mRNA/GAPDH mRNA)より算出した。

c. Western blot analysis

SW-13およびHepG2の細胞破碎液をヒトTGF- β RIIのC末端に対するウサギポリクローナル抗体(sc-220; Santa Cruz Biotechnology)を用いて免疫沈降した。10%SDS-PAGEで分離後、Hybond-P membrane(Amersham Pharmacia Biotech)にタンパクを転写した。同抗体を一次抗体とし、二次抗体液としてアルカリフォスファターゼの結合したロバ抗ウサギIgG抗体(Promega)を用いWestern blot analysisを行なった。

d. hTGF- β 1による増殖抑制効果

SW-13とHepG2を24ウェルプレートに1.5 \times 10⁴/ウェルの濃度で播種し、24時間後hTGF- β 1を0, 0.1, 1ng/mlの濃度で添加し培養を行なった。SW-13ではさらに高濃度のhTGF- β 1(10, 100ng/ml)を添加しその細胞増殖を観察した。7日後に各濃度における細胞数をヘモサイトメーターにより数え3ウェルの平均細胞数を得た。

e. TGF- β RII強制発現系の作製および

hTGF- β 1による増殖抑制効果

TGF- β RII遺伝子のタンパクコード領域を増幅し、CMV-IEエンハンサーおよびneomycine耐性遺伝子を有す発現ベクター、pCE-EGFPに挿入したpCE-T β ORIIプラスミドを作製した。SW-13に得られたpCE-T β RIIをトランスフェクションしTGF- β RII強制発現系のstable transfectantを得た。同様にコントロールとして、ベクターであるpCE-EGFPのstable transfectantを作製しSW-13-neoとした。得られたクローンのTGF- β RIIの発現を確認するためNorthernおよびWestern blot analysisを行なった。SW-13、SW-13-neo、SW-13のTGF- β RII強制発現系にTGF- β 1を添加して10日間培養しTGF- β 1感受性を検討した。

C. 研究結果

1. ヒト副腎皮質組織およびヒト副腎皮質癌細胞株SW-13でのTGF- β 1、TGF- β RIおよびTGF- β RII発現の検討

アルドステロン産生副腎皮質腺腫では陽性対照のHepG2と同様に530bp、1653bp、1743bpのバンドが検出されTGF- β 1、TGF- β RI、TGF- β RII mRNAの発現が認められた。一方、副腎皮質癌およびSW-13では、TGF- β 1、TGF- β RI mRNAの発現が認められるものの、TGF- β RII mRNAの発現は認められなかった(Fig. 1a)。さらに、副腎皮質癌およびSW-13におけるTGF- β RII mRNAの発現低下を、Real Time-PCR法により定量的に解析したところ、良性のアルドステロン産生副腎皮質腺腫に比し、TGF- β RII mRNAの発現が悪性の副腎皮質癌組織では約19%に低下し、SW-13では約0.6%と顕著に低下していた(Fig. 1b)。

SW-13におけるTGF- β RIIタンパク発

現を検討するため、抗ヒトTGF- β RII抗体を用いてWestern blot analysisを行なった。陽性対照のHepG2では約70kDaのTGF- β RIIタンパクを発現しているのに対し、SW-13ではバンドが認められず、mRNAのみならずTGF- β RIIタンパクの発現低下を認めた(Fig. 2)。

2. SW-13におけるhTGF- β 1感受性の検討

TGF- β 1への感受性を検討するため、SW-13およびHepG2にhTGF- β 1を添加してhTGF- β 1による増殖抑制効果の評価を行なった。縦軸にhTGF- β 1非添加群を1とした場合の相対数を示した。HepG2ではhTGF- β 1非添加群に対し、hTGF- β 1添加群では有意な細胞増殖抑制が観察された。一方、SW-13では0.1ng/mlから高濃度の100ng/mlのhTGF- β 1添加群においてもTGF- β 1非添加群との間に細胞増殖に有意差を認めず、hTGF- β 1の増殖抑制作用に抵抗性を示した(Fig. 3)。

3. TGF- β RII強制発現系の作製およびhTGF- β 1による増殖抑制効果の検討

SW-13のTGF- β RII発現回復によるTGF- β 感受性の回復について検討するため、TGF- β RII強制発現系のstable transfectantを作製した。同様にコントロールとしてベクターのstable transfectantを作製し、SW-13-neoとした。TGF- β RII強制発現系のstable transfectantであるSW-13-T β RII-BおよびDはTGF- β RII mRNAおよびタンパクを高発現していることを確認した(Fig. 4)。SW-13、SW-13-neo、SW-13-T β RII-BおよびDを用いてhTGF- β 1による増殖抑制効果を検討した。SW-13およびSW-13-neoは100ng/mlのTGF- β 1を添加しても増殖は抑制されずTGF- β の増殖抑制作用に対し抵抗性を示した。一方SW-13-T β RII-BおよびDでは