

められる。また、そのLIF過剰発現マウスの下  
垂体では、ACTH産生細胞の増加、ラトケ嚢胞  
の形成、GH、TSH、PRL分泌細胞の減少が認  
められた。このGH、TSH、PRL分泌細胞に対  
する影響はコルチコステロン過剰による可能  
性があるが、下垂体分化においてLIFはACTH  
産生細胞や、絨毛上皮系（ラトケンスト）細  
胞へ分化を誘導する因子として働き、GH産生  
細胞、TSH産生細胞分化には抑制的に働く可  
能性も考えられる。また、*in vitro*実験では、  
培養液にLIFを添加するとGH、PRL産生細胞  
であるGH3細胞ではGH分泌の抑制、細胞増殖  
がおこり、ACTH産生細胞であるAtT20細胞  
では細胞増殖の抑制、ACTH分泌の促進かお  
こることが観察されている。

今回のわれわれの実験では、LIF存在下で  
GH遺伝子の発現が増強した。このことはGH  
遺伝子の発現がLIFにより抑制されるという、  
下垂体特異的LIF発現マウスやGH3細胞にお  
ける成績と一見反対の結果に見える。しかし、  
下垂体特異的LIF発現マウスでは、GHプロモ  
ーターの制御下にLIFが発現するシステムを  
使用しており、GH発現細胞に分化後に存在す  
るLIFが、GH分泌を抑制することを示したも  
のであり、GH産生細胞の分化段階におけるLIF  
の作用は不明である。一方、GH3細胞で報告  
されたように、GH産生細胞の増殖には促進的  
に働く可能性もあり、これらの報告と今回の  
成績は必ずしも矛盾したものではないのかも  
しれない。

本研究で得られたGHを産生する細胞の性質は、  
正常下垂体のGH産生細胞と同一か不明である。  
GHRH受容体、GHRH反応性の存在、ソマトス  
タチン受容体やそれに対する反応性の保持、  
IGF-I作用の受容など今後さらに検討する必要  
がある。また、さらに分化条件を検討して、  
分化効率を上昇させる方法を確立する必要が

ある。このようなES細胞からの下垂体細胞へ  
の分化過程の解析を通して、正常下垂体の分  
化機構もいっそう明確になることが期待される。

## E. 結論

今回初めて、ES細胞からGHを産生する細胞  
に分化させることに成功した。種々の培養法  
と下垂体関連遺伝子の発現の関連について検  
討した結果、LIF存在下でセラチンコートディ  
ノシュに培養したとき、GH遺伝子の発現が増  
大することを見出した。ES細胞から分化した  
GH産生細胞の性格をさらに検討し、正常GH  
産生細胞の方向に分化させる手段を明らかに  
することは、下垂体の発生分化機構を解明す  
るうえで有効な手段になり得ると考える。

## F 健康危険情報

なし

## G 研究発表

### 1 論文発表

Cloning of a protein binding to the most proximal  
Pit-1 binding element of prolactin gene from  
human pituitary cDNA library

Fumoto M, Okimura Y, Sakagami Y, Iguchi G,  
Kishimoto M, Takahashi Y, Kaji H, Chihara K

Mol and cell Endocrinol 207 31-38, 2003

Mutant form of Pit-1 (R271W) does not act as a  
dominant inhibitor of Pit-1 action to activate the  
promoters of growth hormone and prolactin genes

Kishimoto M, Okimura Y, Fumoto M, Iguchi G,  
Iida K, Kaji H, Chihara K

Euro J Endocrinol 148 619-25, 2003

Diverse regulation of full-length and truncated  
growth hormone receptor expression in 3T3-L1

adipocytes

Iida K, Takahashi Y, Kaji H, Yoshioka S, Murata M, Iguchi G, Okimura Y, Chihara K  
Mol Cell Endocrinol 210 21-9, 2003

Lactogenic hormone responsive element reporter gene activation assay for human growth hormone  
Sakatani T, Kaji H, Takahashi Y, Iida K, Okimura Y, Chihara K  
Growth Horm IGF Res 13 275-81, 2003

Cloning and characterization of the 5'-flanking region of the human ghrelin gene  
Kishimoto M, Okimura Y, Iguchi G, kudo T, Takahashi Y, Kaji H, Chihara K  
Biochemical and Biophysical Research Communications 305 186-92, 2003

The role of circulating ghrelin in growth hormone (GH) secretion in freely-moving rats  
Okimura Y, Ukai K, Hosoda H, Murata M, Iguchi G, Iida K, Kaji H, Kojima M, Kangawa K, Chihara K  
Life Sci 72 2517-24, 2003

A study of carotid intima-media thickness in GH-deficient Japanese adults during onset among adults and children  
Murata M, Kaji H, Mizuno I, Sakurai T, Iida K, Okimura Y, Chihara K  
Euro J Endocrinol 148 333-338, 2003

Up-regulation of mitochondrial transcription factor1 mRNA levels by GH in VSMC  
Yoshioka s, Okimura Y, Takahashi Y, Iida K, Kaji H, Matsuo M, Chihara K  
Life Sci 74 2097-2109, 2004

## 2 学会発表

胚性幹細胞から下垂体細胞への分化誘導の試み

工藤工、井口元三、置村康彦、竹野亮子、高橋健太郎、高橋裕、加治秀介、千原和夫

第30回日本神経内分泌学会

日本内分泌学会雑誌 79巻2号 373ページ  
2003年

## H 知的財産権の出願・登録状況

なし

## ヒト大動脈血管内皮細胞の一酸化窒素産生に及ぼす 成長ホルモンの直接作用に関する研究

分担研究者 加 藤 譲 島根大学医学部附属病院長  
研究協力者 山 根 雄 幸 島根大学医学部内分泌代謝 血液腫瘍内科学 助手  
越 村 邦 夫 同上 講師  
村 上 宜 男 同上 助教授

**研究要旨** 成長ホルモン（GH）のヒト大動脈血管内皮細胞（HAEC）のNO産生に及ぼす直接的な作用についてin vitroで検討した。生理的濃度のGHはHAECの培養液NO<sub>2</sub>濃度を増加させた。IGFBP-1の同時投与はIGF-IによるNO産生を抑制したが、GHの作用には影響を与えなかった。GHはIGF-Iと同様に血管内皮細胞に直接的に作用してNO産生を増加させること、およひこの作用は局所に由来するIGF-Iを介しないことが示唆される。

### A 研究目的

欧米において、成長ホルモン（GH）欠損症患者では健常対象群に比較して心血管疾患による死亡率が高いことが報告されている。このことには、高脂血症や内臓肥満のほかに、血管進展性の低下が関与する可能性が示唆されている。GH欠損症患者では硝酸イオンとcyclic GMPの尿中排泄量が健常人の約2分の1に低下すると報告されている（文献1）。この減少は、血管内皮におけるNO産生とその作用の低下を反映すると考えられる。GH欠損症患者にGHを投与した場合には、硝酸イオンとcyclic GMPの尿中排泄量が健常人のレベルに増加するとともに、末梢血管抵抗の低下や心拍出量の増加など血行動態が改善することが示された（文献1）。

以上のように、GH欠損症患者では血管内皮細胞のNO産生が障害されることから、GHおよひIGF-Iが血管内皮細胞のNO産生に生理的役割を有することが示唆される。しかし、GHおよひIGF-Iの血管内皮細胞のNO産生促進作用の機序の詳細については明らかではない。IGF-Iが内皮細胞のNO産生を増加させることが知ら

れているか、GHがIGF-Iを介せずに直接的にNO産生を促進する可能性についてはなお明らかではない。Napoliら（文献2）は前腕動脈にGHを注入した場合には、急性に血管抵抗が低下するとともにNO遊離が増加すること、ならひに静脈血中のIGF-I濃度には変化が認められないと報告した。

今回は、生理的濃度のGHが血管内皮細胞のNO産生に及ぼす効果について明らかにすること、およひGHの血管内皮細胞のNO産生促進効果におけるIGF-Iの関与の有無についての知見を得ることを目的として、ヒト大動脈血管内皮細胞を用いてNO産生に及ぼすGHの直接的な作用についてin vitroで検討した。

### B. 研究方法

#### 1) 細胞培養

ヒト大動脈血管内皮細胞（HAEC）を、2% fetal calf serum、12 mg/ml bovine brain extract、1mg/l hydrocortisone、10  $\mu$ g/l human epidermal growth factor、50 mg/l gentamycin、50  $\mu$ g/l amphotericin Bを含むMCDB131培養液中で37°C、5% CO<sub>2</sub>-95% air下で培養した。第5-7継代の

HAECをpoly-L-lysineコートした24well-dishでsubconfluentに培養して実験に用いた。細胞をDulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)で洗浄後、DMEM中で30分間培養した。ヒトGH (10 pMないし1 nM)、IGF-I (133 nM)、抗ヒトGH血清 (100倍希釈)、IGFBP-1 (1 µg/ml)ならびにカルハミルコリン (10<sup>-5</sup>M)を添加したDMEM中で4時間反応させた。反応終了後、培養液を採取し遠心分離して上清をNO<sub>2</sub>、NO<sub>3</sub>濃度の測定に用いた。

## 2) Medium中NO<sub>2</sub>、NO<sub>3</sub>濃度の測定

培養液中のNO<sub>2</sub>、NO<sub>3</sub>濃度を既報の方法で測定した (文献3)。測定には、カトミウム還元カラム、Griess試薬との反応および吸光度計を接続したHPLC法を用いた。

## 3) GH結合実験

HAEC (10<sup>4</sup> cells/dish)を<sup>125</sup>I-GH (0.1 µCi/dish)を添加したKrebs-Ringer buffer (KRB)中で10°C、30ないし120分間反応させた。反応終了後、細胞を水冷したKRBで3回洗浄し、0.1 M NaOHを添加して細胞を溶解した。溶解液中の放射活性をカンマカウンターで測定した。10 nM非標識GH存在下での結合を非特異的結合とした。

## C 研究結果

結合実験においては、120分間の反応後に総結合は12.8 ± 0.9% (平均 ± 標準誤差)、非特異的結合は5.0 ± 0.7%であった。GHの特異的結合は約7.8%と考えられた。

本実験系では血清を添加しないため、遊離されたNOの大部分はNO<sub>2</sub>に変換された。培養液中のNO<sub>3</sub>濃度は測定感度以下であった。IGF-1添加はHAEC培養液中のNO<sub>2</sub>濃度を用量依存的に増加させた。133 nMのIGF-1はカルハミルコリンに匹敵する作用を示した。一方、

GHは2相性の作用を示した (図1)。最大反応は約2倍で、50 pM、すなわち11 ng/mlの生理的GH濃度で認められた (図1)。より高濃度においては、GHの刺激効果は減弱した。1 nMのGH存在下では、培養液中のNO<sub>2</sub>濃度は対象群とほぼ同程度であった。GHのNO産生増加作用は抗ヒトGH抗体の同時添加によって有意に抑制された。

GHのNO産生増加作用における内因性IGF-Iの関与について検討する目的で、培養液中にIGFBP-1を添加した。IGFBP-1の添加は基礎NO産生量に影響を与えなかったか、IGF-IのNO産生増加作用を抑制した (図2)。一方、GHによるNO産生はIGFBP-1の影響を受けなかった (図2)。

## D 考察

今回の研究において、生理的濃度のGHが血管内皮細胞のNO産生を増加させることが明らかとなった。最大反応は約2倍で、50ないし100 pMすなわち11ないし22 ng/mLのGH濃度において観察された。GH欠損症患者では、生体内のNO産生を反映する尿中硝酸イオン排泄量が約2分の1に減少しており、GHの補償治療によって健常人のレベルにまで増加することが知られている (文献1)。したがって、本研究でのインビトロにおける実験結果は、臨床的知見に類似したものであり、生体内におけるGHの生理的作用を反映したものであると考えられる。

GHがより高濃度 (0.5-1 nM) の場合には、GHの作用は減弱、消失した。この現象は、GHの作用機序によると想定される。すなわち、GHは1分子か2個のGH受容体と結合し、(1:2)の複合体を形成する。受容体の二量体化は、GH作用の発現に必須である。高濃度のGHの存在下では、GH受容体は(1:1)の複合体を形

成して飽和するため、むしろGHの作用は減弱する。

結合実験によってHAECが特異的なGH結合部位を有することが確認された。また、GHによるNO産生増加作用は抗GH抗体の添加によって抑制された。以上の成績から、HAECのNO産生に及ぼすGHの刺激作用がGHに特異的であることが示唆される。また、我々は既に、細胞内カルシウムイオンをキレートする処置を行った場合にはGH刺激によるHAECのNO産生が抑制されることを観察した。このことから、GHによるHAECのNO産生は誘導型NO合成酵素 (iNOS) ではなく、内皮型NOS (eNOS) によって触媒されることが考えられる。

血管進展性や血管内皮細胞機能の調節においてGH-IGF-I系が重要な役割を有することが知られている。しかし、その機序の詳細は明らかではない。GHの効果がGHそのものの直接的な作用を反映するものか、あるいは局所に由来するIGF-Iを介する間接的な作用によるものか、についてはなお明らかではない。下垂体を摘除した雌ラットにおいては、GHおよびIGF-Iは両者ともに大動脈のeNOS発現を増加させることが報告されている(文献4)。また、血管内皮細胞がIGF受容体を有すること、ならびに血管内皮細胞および血管平滑筋細胞がIGF-Iを産生することも報告されている。これらの成績は、局所に由来するIGF-IがGH刺激時のNO産生に関与する可能性を示唆するものである。Thumら(文献5)は培養したヒト血管内皮細胞株を用いて検討し、GH刺激時においてもIGF-I mRNAの発現を認めなかったと報告している。しかし、ウシ血管内皮細胞は培養液中のIGF-Iを取り込み、放出することが知られている(文献6)。したがって、局所由来のIGF-Iが作用するためには、必ずしも血管内皮細胞におけるIGF-I mRNAの発現や蛋白合成

を必要としない。今回の研究においては、局所由来のIGF-Iの作用を抑制することを目的として、培養液にIGFBP-1を添加した。IGFBP-1はIGF-IのNO産生刺激作用を抑制したか、一方、GHのNO産生刺激作用には影響を与えなかった。この成績から、GHのNO産生増加作用はGHによる直接的な作用であり、局所由来のIGF-Iが関与する可能性が低いことが示唆される。

今回の研究成果はGHおよびIGF-Iの両者が血管内皮細胞のNO産生に役割を有することを示すもので、GH分泌異常症における血管進展性の異常を考える上で臨床的に意義深い。すなわち、GH欠損症においてはGHおよびIGF-Iの両者が低下しており、血管内皮細胞のNO産生障害をきたす。一方、末端肥大症におけるGH過剰分泌状態ではGHおよびIGF-Iの両者が高値を示す。上述のように、高濃度のGHの存在下では生理的濃度のGHに比較してNO産生は低下するので、IGF-Iが高値であるにもかかわらず血管内皮細胞のNO産生障害が惹起される可能性が示唆される。

## E 結論

今回の研究において、HAECはヒトGHに対する特異的結合能を示した。IGF-IはHAEC培養液中のNO<sub>2</sub>濃度を用量依存的に増加させた。一方、GHは2相性の作用を示し、最大反応は50 pMで認められた。GHのNO産生促進作用は抗ヒトGH抗体によって抑制された。IGFBP-1は、IGF-IによるNO産生を抑制したか、GHの作用には影響を与えなかった。

以上の成績から、生理的濃度のGHは、IGF-Iと同様、HAECに直接的に作用してNO産生を増加させること、およびこの作用はGHによる直接的な効果あり、局所に由来するIGF-Iを介しないことが示唆される。

## G 研究発表

### 2 学会発表

山根雄幸、村上宜男、越村邦夫、西木正昭、  
加藤 譲 成長ホルモンのヒト大動脈血管内  
皮細胞一酸化窒素 (NO) 産生能に及ぼす促進  
作用について 第76回日本内分泌学会学術総会、  
2003年 横浜

### 参考文献

- 1 Boger RH, Skamira C, Bode- Boger SM, Brabant G, von zur Muhlen A Nitric oxide may mediate the hemodynamic effects of recombinant growth hormone in patients with acquired growth hormone deficiency A double-blind, placebo-controlled study J Clin Invest 98 2706-2713, 1996
- 2 Napoli R, Guardasole V, Angelini V, D' amico F, Zarra E, Matarazzo M, Saccà L Acute effects of growth hormone on vascular function in human subjects J Clin Endocrinol Metab 88 2817-2820, 2003
- 3 Tsumori M, Murakami Y, Koshimura K, Kato Y Thyrotropin-releasing hormone stimulates nitric oxide release from GH3 cells J Neuroendocrinol 11 451-456, 1999
- 4 Wickman A, Jonsdottir IH, Bergstrom G, Hedin L GH and IGF-I regulate the expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in cardiovascular tissues of hypophysectomized female rats Eur J Endocrinol 147 523-533, 2002
- 5 Thum T, Tsikas D, Frolich JC, Borlak J Growth hormone induces eNOS expression and nitric oxide release in a cultured human endothelial cell line FEBS Lett 555 567-571, 2003
- 6 Gajdusek CM, Luo Z, Mayberg MR Sequestration and secretion of insulin-like growth factor-I by bovine aortic endothelial cells J Cell Physiol 154 192-198, 1993

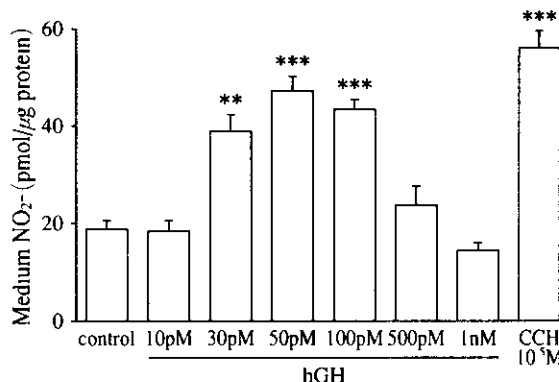


図1 ヒト大動脈血管内皮細胞 (HAEC) 培養液の NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 濃度に及ぼすヒト GH (hGH) およびカルバミルコリン (CCH) の効果

\*\* P<0.001 \*\*\* P<0.0001 vs 対象群を示す。

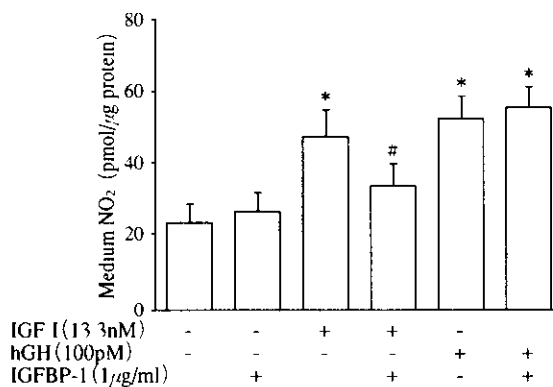


図2 HAEC培養液の NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 濃度に及ぼす IGF-1 hGH および IGFBP-1 の効果

\* P<0.01 vs 対象群 # P<0.05 vs IGF I 単独投与群を示す。

## 日本人の下垂体機能低下症患者を対象とした QOL尺度の開発(JAHQ)に関する研究

分担研究者	島 津 章	国立京都病院 臨床研究センター長
共同研究者	千 原 和 夫	王任研究者 神戸大学大学院医学研究科教授
	石 井 均	天理よろづ相談所病院内分泌内科長
	福 原 俊 一	京都大学大学院医学研究科教授
	田 中 敏 章	国立成育医療センター医長
	肥 塚 直 美	東京女子医科大学第二内科教授
	羽二生 邦 彦	羽二生クリニック院長
	沖 隆	浜松医科大学第二内科講師
	加 治 秀 介	兵庫県立看護大学教授
	鈴 鴨 よ し み	京都大学大学院医学研究科助手
	萱 間 真 美	東京大学大学院医学研究科助教授
	高 橋 奈 津 子	NPO法人健康医療評価研究機構

**研究要旨**・欧米において成人成長ホルモン分泌不全症を対象とした健康関連QOL尺度が開発され使用されているか、言語や文化的背景の相違から日本人にそのまま適用できるかどうか、疑問がある。アウトカム評価に使える、日本人に立脚した成人下垂体機能低下症に特異的なQOL尺度を独自に開発し、その妥当性の検証を目的とした。開発手順には、質的研究として下垂体機能低下症患者および専門医を対象に半構造的面接から特有な概念の抽出、整理を行い、概念モデル、下位尺度仮説、QOL質問項目プールを作成する。次に、パイロット研究として質的・量的検討、実施可能性に基づき項目を絞り込んだ後、多数の症例を対象に、信頼性と妥当性について計量心理学的評価を行い、治療前後の反応性を検証し、最終的なQOL尺度として完成させる。本年度は欧米で用いられている既存の疾患特異的QOL尺度について評価し問題点を指摘した。

### A. 研究目的

下垂体機能低下症患者の評価は、その症状や重症度といった臨床的な評価だけでなく、その症状を有することで患者が受ける日常生活における身体的、心理的あるいは社会的な影響を無視することは出来ない。このような観点から、近年、QOLを評価することの重要性が議論されるようになってきた。健康関連QOLは、疾患や治療が、患者の主観的健康感や、毎日行っている仕事、家事、社会活動にどの

ようなインパクトを与えているか、これを定量化したものと定義されている。患者のQOL評価に当たって感度の高い評価を行うには、下垂体機能低下の症状に特異的なQOL質問票を使用することか望ましい。しかし、本邦で下垂体機能低下症に関する標準化された疾患特異的QOL質問票は、存在していない。国際的に使用されている尺度は欧米と文化的、社会的背景が異なる我が国で、そのまま適用できるかどうか、疑問がある。本研究では、ア

ウトカム評価に使える、日本人に立脚した成人下垂体機能低下症に特異的なQOL尺度 (JAHQ Japanese Adult Hypopituitarism Questionnaire)を独自に開発し、その妥当性の検証を目的とした。

## B 研究方法

QOL尺度には、MOS-Short Form 36 (SF-36)で代表される包括的QOL尺度とそれぞれの疾患に特異的なQOL尺度がある。QOLの主要な構成要素には、身体機能、メンタルヘルス、社会生活機能、日常役割機能、満足度があげられ、QOL評価の質問項目を構築するには、QOLの概念モデルが重要となる。

QOL尺度を評価する基準には、主観特性を測定するため、1 設問の理解しやすさ、回答時間などの条件、2 再現性、内的整合性に代表される信頼性 (同じものを計っているか?)、3 基準関連性妥当性、構成概念因子妥当性、予測的妥当性などの妥当性 (測定したいものをすべてカバーしているか?)、4 スコアリングや標準値による標準化かできるか? 5 経時的変化に対する感度 (反応性) かとうか? 6 結果の解釈が可能か? などの項目がある。これまで欧米で開発されてきた既存の下垂体機能低下症や成人成長ホルモン分泌不全症の疾患特異的QOL尺度を、評価基準に照らして評価した。

(倫理面への配慮) 既に公表された成績を評価するため、特別な倫理面への配慮はない。

## C 研究結果

欧米で用いられている既存の疾患特異的QOLは4つの尺度が報告されている。

### 1 Growth Hormone Deficiency Questionnaire (GHDQ)

オーストラリアのCuneoら(1998)が報告した

尺度で、成人成長ホルモン分泌不全症の治療に際し、Nottingham Health Profile (NHP)に追加して活力、気分、睡眠に関する30項目を取り上げVisual Analog Scaleにより評価している。

### 2 Modified Impact Scale and Life Fulfilment Scale (Modified IS and LFS)

Wallymahmedら(1996)が報告した尺度で、既存のImpact Scale 8項目に2項目を追加、およびLife Fulfilment Scale 10項目の内2項目を入れ替えて作られた20項目を4段階で評価している。

### 3 The Quality of Life - Assessment of Growth Hormone Deficiency in Adults (QoL-AGHDA)

イギリスのHolmesら(1995)、McKennaら(1999)が報告した尺度で、主に精神機能面に關する25項目が選ばれ、はい、いいえの2者択一の質問項目である。日本語版が開発され、下垂体機能低下症患者のパイロット調査がおこなわれた。ファイザー株式会社から著作権を有している。

### 4 Questions on Life Satisfaction (QLS)

トイノのHerschbachら(2001)が報告した。全体をカバーするQLS-A、全般的健康度を評価するQLS-G、および下垂体機能低下に特異的なモジュールであるQLS-Hの3つから構成され、それぞれの項目の人生に対する重要度を加味した満足度で評価する形式である。当初16項目であったが、最終的に9項目に減しられ、5段階で評価している。イーライリリー株式会社が著作権を有している。

QOL尺度のうち、GHDQは成長ホルモン治療により有意に動かず、変化に対する感受性は低い。Modified IS and LFSは多数例を対象とした成績がない。QoL-AGHDA、QLS-Hは欧米で広く使用されており、ともに再現性、内部一貫性、成長ホルモン治療による反応性、包括的QOL尺度の併存妥当性がみられた。しかし、因子構造かはっきりせず、QoL-AGHDAは精神



面のみ、QLS-Hは精神面と身体面が扱われ、内容妥当性は不十分であった。概念妥当性、外部基準妥当性は両者ともに明らかでない。QLS-Hは国民標準値を基準とした標準化が可能であり、国別で比較できる長所がある。

#### D 考察

成人の下垂体機能低下症患者において、健常人と比較し、特に身体的、精神的活力や身体イメージに対する不満足、記憶障害など健康関連QOLの障害が報告されている。当初、包括的QOL尺度であるNHPやPsychological General Well-being Schedule (PGWS)、General Health Questionnaire (GHQ)、後にSF-36などの尺度により測定されている。包括的QOL尺度は健常人との比較が可能であるが、QOL障害と治療による改善は必ずしも全部の報告にみられたわけではない。成長ホルモン欠乏がQOLに及ぼす影響と成長ホルモン治療による効果を感度よく検出する目的で、疾患特異的QOL尺度が開発されたか、国際的に使用されている尺度が欧米と文化的、社会的背景が異なる日本において適用できるかは十分明らかではない。日本の成人成長ホルモン分泌不全症に対する成長ホルモン補充療法に関する臨床試験において、QOL項目の明確な変動は検出困難であった。そこで、日本人の国民性を考慮した疾患特異的QOL尺度を独自に開発し、科学的検証を行うことを計画した。

今回、下垂体機能低下症に関する関連文献を検索し、欧米で用いられている既存の疾患特異的QOLを尺度評価の基準から検討したところ、QoL-AGHDA、QLS-Hとともに、因子構造がはっきりせず、内容妥当性が不十分であった。概念妥当性、外部基準妥当性も明確でなかった。したがって、QOL測定内容を明確化した上で日本人に立脚した概念モデル 下

位尺度を作成することは大変意義深い。今後、開発手順には、質的研究として下垂体機能低下症患者および専門医を対象に半構造的面接から特有な概念の抽出、整理を行い、概念モデル、下位尺度仮説、QOL質問項目プールを作成する。次に、パイロット研究として質的量的検討、実施可能性に基づき項目を絞り込んだ後、多数の症例を対象に、信頼性と妥当性について計量心理学的評価を行い、治療前後の反応性を検証し、最終的なQOL尺度の完成を目指す必要がある。

#### E 結論

アウトカム評価に使える、日本人に立脚した成人下垂体機能低下症に特異的なQOL尺度を独自に開発し、その妥当性の検証を目的とした。本年度は欧米で用いられている既存の疾患特異的QOL尺度について、1 設問の理解しやすさ、回答時間などの条件、2 再現性、内的整合性に代表される信頼性、3 基準関連性妥当性、構成概念因子妥当性、予測的妥当性などの妥当性、4 スコアリングや標準値による標準化、5 経時変化に対する感度（反応性）、6 結果の解釈の面から評価した。QoL-AGHDA、QLS-Hともに再現性、内部一貫性、成長ホルモン治療による反応性、包括的QOL尺度の併存妥当性がみられたか、因子構造ははっきりせず、精神面が重要視され、内容妥当性、概念妥当性、外部基準妥当性が明らかでなかった。下垂体機能低下症に特有な概念を抽出・整理し、概念モデル、下位尺度仮説により質問項目を作成し、計量心理学的評価の上で特異的QOL尺度の完成を目指す必要がある。

#### 参考文献

- 1 Cuneo RC, et al J Clin Endocrinol Metab 83

107-116, 1998

2 Wallymahmed ME, et al Clin Endocrinol 44  
403-411, 1996

3 Holmes SJ, et al Endocrinol Metab 2 63-69,  
1995

4 McKenna SP, et al Qual Life Res 8 373-383,  
1999

5 Herschbach P, et al Eur J Endocrinol 145  
255-265, 2001

6 Blum WF, et al J Clin Endocrinol Metab 88  
4158-4167, 2003

## ACTH分泌過剰に対するtroglitasoneの効果 — in vitro及び実験的Cushing症候群モデルマウスを用いた検討—

分担研究者	橋本浩三	高知大学医学部内分泌代謝	腎臓内科学教授
研究協力者	浅羽宏一	高知大学医学部内分泌代謝	腎臓内科学
	岩崎泰正	名古屋大学医学部附属病院検査部	
	田口崇文	高知大学医学部内分泌代謝	腎臓内科学
	高尾俊弘	高知大学医学部内分泌代謝	腎臓内科学

**研究要旨**・troglitasoneのAtT20細胞におけるACTH過剰分泌に対する抑制効果に関して検討した。in vitro実験では、ラットPOMC遺伝子5'-プロモーター領域約0.7kbとluciferaseレポーターのfusion geneをAtT20細胞に導入したAtT20PL細胞を用いた。in vivo実験では、AtT20細胞をヌートマウスに移植した実験的Cushing症候群マウスを用いた。in vitroでは、troglitasone ( $3 \times 10^{-6}$  M) は、POMC遺伝子プロモーター活性及びACTH分泌を低下させたが、in vivoでは、troglitasone (150mg/kg) は、マウス血中ACTH濃度を逆に有意に増加させ、ACTH分泌抑制効果を示さなかった。これらin vitroとin vivoの実験結果の解離の原因は不明であるか、以上の結果よりtroglitasoneのCushing病に対する臨床応用は困難であると思われる。

### A 研究目的

Cushing病に対する治療の第一選択は外科的治療であるか、外科的治療によって根治出来ない場合があり、その場合は放射線療法、コルチゾール合成酵素阻害剤を用いた薬物療法、副腎摘出術が行われる。また、Cushing病は各種画像検査を行っても診断しえない場合もあり、第一選択である外科的治療が困難な場合がある。この様に治療が十分に行えない場合には高cortisol血症によって引き起こされる糖尿病、高血圧、高脂血症、骨粗鬆症などの合併症のために生命予後は不良となる。そこで、以前から下垂体腫瘍に直接作用し、ACTHを直接抑制する薬剤の臨床応用が望まれているか、ACTHを直接抑制する有効な治療薬は未だ存在しない。近年MelmedらのグループによりrosiglitazoneがAtT20細胞からのACTHの合成と分泌を抑制することが報告され<sup>(1)</sup>、Cushing病

の新たな治療薬となる可能性が注目されているか、投与量の点から臨床応用には問題が残されている。そこで今回、我々はtroglitasoneを用いてACTH過剰分泌に対するチアゾリジン誘導体の影響を検討した。

### B 研究方法

#### I in vitroの実験

マウス下垂体ACTH産生細胞株であるAtT-20細胞に、ラットPOMC遺伝子5'-promoter と luciferaseレポーター遺伝子とのfusion geneを安定性に導入したAtT-20PL細胞を用いた（共同研究者岩崎より提供）。細胞はフラスコ内にて10% fetal bovine serum(FBS)を含むDulbecco's modified Eagle's medium(DMEM) (25 mM グルコース)で37℃, 5% CO<sub>2</sub> インキュベーターにて4日間培養後、24 well plateへ移し、24時間後無血清培地へ変換し、以下の実験を行った。

POMC 遺伝子プロモーター活性はPromegaの luciferase assay kitを用いて評価し、ACTH濃度は三菱化学のACTH IRMAキットを用いて測定した。

実験1 POMC 遺伝子プロモーター活性に及ぼすtroglitazoneの効果を検討するため、troglitazone添加後24時間後のPOMC遺伝子プロモーター活性の容量依存的変化を評価した。

実験2  $3 \times 10^{-6}$ MのtroglitazoneによるPOMC 遺伝子プロモーター活性の経時的変化を評価した。

実験3  $10^{-5}$ M troglitazoneによるACTH分泌能を評価した。

## II in vivoの実験

雄のヌートマウスの皮下にAtT20細胞を移植し、Cushing症候群モデルマウスを作成した。移植後約2週間後肉眼的に腫瘍が確認され、その時点からtroglitazone 150mg/kgを経口的に投与した。2週間後に断頭屠殺し腫瘍重量と血中ACTH、corticosterone濃度を測定した。corticosteroneはICNのキットを用いて測定した。

## C 研究結果

### in vitroの実験

実験1 troglitazoneは $3 \times 10^{-6}$ M以上の濃度で容量依存性にPOMC遺伝子プロモーター活性を減弱させた(図1a)。

実験2 troglitazone( $3 \times 10^{-6}$ M)は添加3時間後より有意にPOMC遺伝子プロモーター活性を減弱させた(図1b)。

実験3 troglitazone( $10^{-5}$ M)により培養液中のACTH濃度は有意に減弱していた(図2)。troglitazone( $10^{-5}$ M)添加時の細胞生存率をMTT assayで検討したか、control群との間に有意の差を認めなかった(図省略)。したがって、POMC遺伝子プロモーター活性の減弱や、ACTH分泌の低下は、細胞障害によるものではないと考えられた。

ないと考えられた。

### in vivoの実験

実験的Cushing症候群モデルマウスを用いた検討では、troglitazone (150mg/kg、経口投与)を2週間投与後の腫瘍重量はcontrol群で平均0.18g、troglitazone投与群で平均0.32gであり、troglitazone投与群で重い傾向があったか、はらつきが大きく有意差を認めなかった(図3)。血中ACTH濃度は、control群で平均845 pg/ml、troglitazone投与群で平均1760 pg/mlでありtroglitazone投与群で有意に高値であった(図4)。血中corticosterone(B)濃度は、control群で平均1751 ng/ml、troglitazone投与群で平均1688 ng/mlであり両群間に有意差を認めなかった(図5)。

## D 考察

今回の我々の検討では、in vitroとin vivoの結果に解離が認められた。in vitroの実験は無血清の条件下であるか、in vivoの実験は100%血清状態と考えられる。そこで我々はin vitroとin vivoの結果の違いを検討する目的で、血清添加かtroglitazoneのPOMC遺伝子プロモーター活性に及ぼす影響について検討した。無血清培地と10% FBS添加培地で比較したところ、無血清培地群ではtroglitazoneはPOMC遺伝子プロモーター活性を減弱させたか、10% FBS添加群ではtroglitazoneによりPOMC遺伝子プロモーター活性はむしろ増加傾向であった(図省略)。このことから、血清に含まれている何らかの因子がtroglitazoneの効果を減弱させていた可能性が考えられる。このためin vitroでは得られたtroglitazoneのACTH分泌抑制効果か、in vivoでは見られなかった可能性が考えられた。

今回のin vitroの実験結果はMelmedらの報告と同様であったか、in vivoの実験結果は彼ら

の報告とは異なったものであった。彼らは rosiglitazoneの結果についてはin vitro及びin vivoの両者に関して詳細に報告しているか、troglitazoneの結果についてはin vivoの記載がなく、troglitazoneのin vivoにおける効果に関しては検討の余地があると思われ今回の検討を行った。今回はrosiglitazoneの入手が不可能であったので、両者のin vivoでの効果を直接比較することは出来なかった。

現在国内で臨床応用されているチアゾリジン誘導体はpioglitazoneであるか、pioglitazoneを用いたin vitroの検討では、同濃度のtroglitazoneと比較するとPOMC遺伝子プロモーター活性に及ぼす効果はpioglitazoneで弱かった(図省略)。同じチアゾリジン誘導体であっても、PPAR $\gamma$ に対する親和性の違いなどがあり、3者では効果が異なると考えられている。rosiglitazoneは、構造上他の2者と異なっており、PPAR $\gamma$ に対する親和性が強く、その薬理効果も強いと考えられている。このことから、今回の我々とMelmedらとの結果の違いをもたらし得た可能性となり得ると思われる。今回の我々の検討ではin vivoの実験においてMelmedらと同様に150mg/kgのtroglitazoneをマウスに投与した。この量は2剤の薬価からすると、troglitazoneはrosiglitazoneと同等の効果を示すには更に高濃度の投与が必要であった可能性がある。いずれにしても効果が得られる濃度はかなり高濃度(糖尿病で投与される量の1500倍)であるので、人への応用は困難であると思われた。

Melmedらは、rosiglitazoneの抗腫瘍効果としてアポトーシスを介した機序を報告している<sup>(2)</sup>。我々の検討ではtroglitazoneによってMTT assayによる評価では、細胞障害性は認められず、troglitazoneのACTH分泌抑制作用はアポトーシスを介さない機序の関与が示唆された。このtroglitazoneとrosiglitazoneの作用の違いは

PPAR $\gamma$ に対する親和性の違いの他に、PPAR $\gamma$ を介さない作用も関与している可能性があると思われる。

我々は以前に、AtT20細胞はNF $\kappa$ B活性が亢進しており、NF $\kappa$ B阻害剤を投与すると、POMC遺伝子プロモーター活性とACTH分泌が減少することを確認している(図省略)。また、最近、チアゾリジン誘導体に抗炎症効果が存在することが認められ、NF $\kappa$ Bの作用を阻害することにより、サイトカインの産生を抑制していると考えられている<sup>(3)</sup>。また、POMC遺伝子のプロモーター領域にはNF $\kappa$ B結合配列が2ヶ所確認されている。以上のことから、AtT20細胞のACTH分泌過剰にはNF $\kappa$ B活性の亢進が関与している可能性が考えられ、troglitazoneのアポトーシスを介さないACTH分泌抑制の機序のひとつとして、troglitazoneのNF $\kappa$ Bの阻害を介した作用の可能性も考えられた。

## E 結論

チアゾリジン誘導体はCushing病の治療薬としては適当ではないと思われた。

## F 参考文献

- (1) Anthony P Heaney et al, Functional PPAR $\gamma$  receptor is a novel therapeutic target for ACTH-secreting pituitary adenomas Nature Medicine 8 1281-1287, 2002
- (2) Anthony P Heaney et al, PPAR- $\gamma$  receptor ligands: novel therapy for pituitary adenoma JCI 111 1381-1388, 2003
- (3) Suzawa M et al, Cytokines suppress adipogenesis and PPAR- $\gamma$  functions through the TAK1/TAB1/NIK cascade Nat Cell Biol 5 224-230, 2003

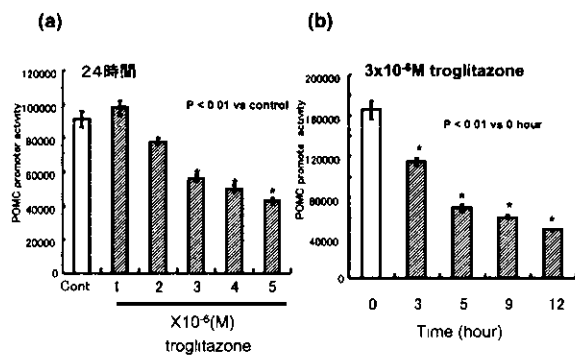


図1 POMC遺伝子プロモーター活性に及ぼすtroglitazoneの濃度依存的及び経時的影響。

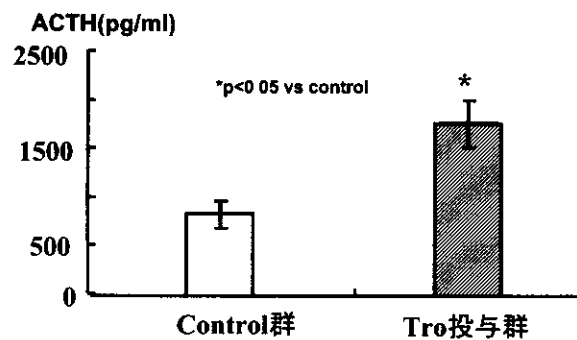


図4 Cushing症候群モデルマウスの血中ACTHに及ぼすtroglitazone (150mg/kg、経口投与)の影響。

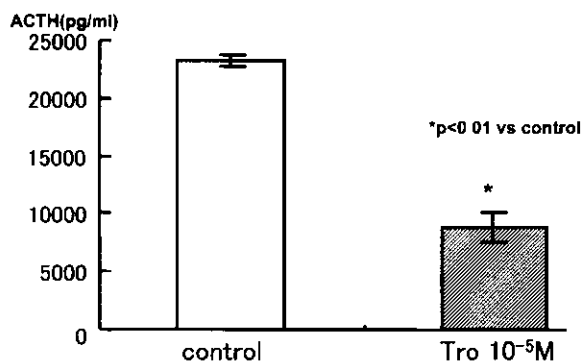


図2 AtT20細胞からのACTH分泌に及ぼすtroglitazoneの影響。

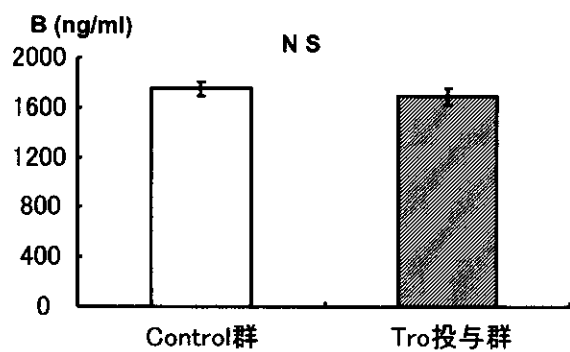


図5 Cushing症候群モデルマウスの血中corticosteroneに及ぼすtroglitazone (150mg/kg 経口投与)の影響。

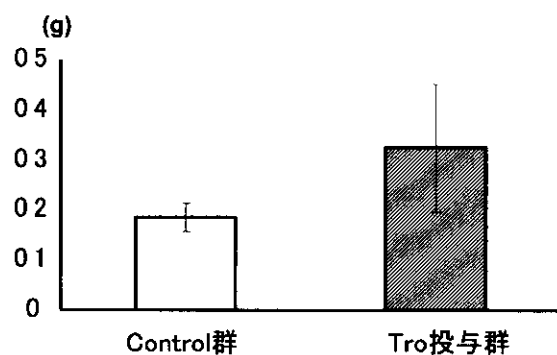


図3 Cushing症候群モデルマウスに於けるtroglitazone (150mg/kg、経口投与)の腫瘍重量に及ぼす効果。

## プロラクチンのMENINによる制御機構

分担研究者 森 昌 朋 群馬大学大学院病態制御内科教授  
研究協力者 山 田 正 信 群馬大学大学院病態制御内科講師

**研究要旨** 多発性内分泌腫瘍症 1 型の原因遺伝子MEN1は、610アミノ酸からなる蛋白MENINをコードする癌抑制遺伝子である。今回、MENINの変異による下垂体腫瘍発生機構を解明するため、MENINのプロラクチン遺伝子への転写制御機構を検討した。下垂体腫瘍細胞株GH4C1細胞を用い、MENINのプロラクチンプロモーター活性へ影響を検討したところ、野生型MENINはプロモーター活性を40%に抑制し、驚いたことにA176P、A242V変異体は、18%、20%と野生型より強い抑制効果を示した。さらに欠失変異体を作製し転写抑制効果を検討したところ、MENIN1-285、278-610はいずれも転写抑制効果を示し、MENIN1-108が最も強い抑制効果を示した。すなわち、MENINには2ヶ所以上の転写抑制ドメインが存在し、N端側の強力な転写抑制作用は通常はC端側により抑制されていることが判明した。以上の結果より、MENINの変異により転写抑制が強くなることか腫瘍発生機構に関与する可能性が示唆された。

### A 研究目的

多発性内分泌腫瘍症 1 型は、下垂体、副甲状腺、膵臓に多発的に腫瘍を形成する常染色体優性遺伝疾患であり、その原因遺伝子としてMEN1がクローニングされた。MEN1の遺伝子産物であるMENINは、JunD、Replication protein Aなどの蛋白質と結合し、その機能の一つとして遺伝子の転写に関与し、変異によりその機構が破綻し腫瘍を発生する癌抑制遺伝子と考えられている。本研究では、MENINの変異による下垂体腫瘍発生機構を解明するため、MENINのプロラクチン遺伝子への転写制御機構に焦点をあて検討した。

### B 研究方法

- 1) ラット下垂体腫瘍細胞株GH4C1細胞を用い、野生型MENINのSV40およびプロラクチンプロモーター活性への影響を検討した。
- 2) さらにプロラクチンプロモーターに焦点を絞り、JunDへの結合能を欠くA176P、A242V

変異体について、その転写抑制効果を検討した。

- 3) 欠失変異体MENIN1-285、278-610、1-138、1-108、A176P1-285、A242V1-285を作製し、MENINの転写抑制ドメインについて検討した。
- 4) Mammalian One-hybrid系を用いて、MENIN1-108が内因性の転写抑制化能を持つか検討した。
- 5) GFP-MENIN1-108を作製し核内移行を検討した。
- 6) NcoRなどの核内受容体コリプレノサーを共発現させ、MENINの転写抑制機構について検討した。

### C 研究結果

- 1) GH4C1細胞にて野生型MENINを強発現させ、SV40ならびにプロラクチンのプロモーター活性を検討したところ、SV40は約60%に抑制されるのに対して、プロラクチンプロモーターは約40%程度と、より強く抑制

された。

- 2) さらにプロラクチンプロモーターに注目してMENINの転写抑制効果について検討を行った。610個のアミノ酸からなるMENINには3つのJunD結合領域（アミノ酸1-40, 139-242, 323-428）が存在することか知られている。そこで、JunDへの結合能を欠く2つの変異体、176番目のアラニンがプロリンに置き換わったA176Pならびに242番目のアラニンがハリノに置き換わったA242Vについて、プロラクチンプロモーター活性を検討した。MENINによる転写抑制効果がJunDを介しているならば、これら2つの変異体において転写抑制が解除されるはずである。ところが驚いたことに、これらの変異体は、18%、20%といずれも野生型よりも強い転写抑制効果を示した。すなわちMENINに変異が起こることにより、gain of function様に働き、さらに転写抑制が強くなることか示唆された。
- 3) このMENINの転写抑制効果を解析するため、MENINをN端、C端側に分け検討した。欠失変異体MENIN1-285および278-610を作製し、プロラクチンプロモーター活性を検討したところ、それぞれ約20%、約35%といずれの変異体にも転写抑制効果か認められた。すなわちMENINには少なくとも2ヶ所以上の転写抑制トメインが存在し、その転写抑制効果はN端側の方がより強いことが判明した。そこでこのN端側のMENIN1-285に先ほどの変異を加えたA176P1-285、A242V1-285を作製したところ、有意ではないものの、より転写か抑制される傾向にあった。さらに、MENINのところに転写抑制トメインがあるのかを検討するため、N端側MENIN1-285のC端側から、より短い欠失変異体MENIN1-138、1-108を作製したところ、MENIN1-108が最も強い抑制効果を示し、プロラクチンプロ

モーター活性を約10%程度まで抑制した。したがって、野生型MENINにおいては、少なくともC端側か、N端側の転写抑制機構を押さえていることか示唆された。

- 4) さらにこのMENINのN端側に内因性の転写抑制化能があるかどうか検討するために、Mammalian One-hybrid 法にて、UAS-TKをレポーター遺伝子としてheterologous なプロモーター上での転写抑制化能を検討した。レポーターとの比を1/1、1/5と変えて検討したところ、それぞれ約60%、約40%と容量依存性に転写抑制化能を示し、MENINのN端側108アミノ酸には、転写抑制トメインがあることか判明した。
- 5) MENINのC端側には2つのNuclear localization signal（アミノ酸479-497, 588-608）が存在すると考えられている。今回、転写抑制トメインの存在か確認されたMENINのN端側108アミノ酸が核内に移行することを確認するため、GFPを融合したMENIN1-108をCV1細胞に発現させ、その細胞内局在について検討した。その結果、GFP-MENIN1-108は核内へ移行していることか確認された。
- 6) MENINの転写抑制機構についてさらに解析するために、核内受容体コリフレノサーNcoRを共発現させ、プロラクチンプロモーター活性について検討した。MENINがNcoRを介して転写を抑制しているのであれば、NcoRの添加によりその転写抑制作用は強調され、もし、共通の機構を介していれば、抑制作用は解除されるはずである。NcoR、そのsplicing variantであるNcoRI、さらにNcoR C端側の核内受容体とのinteraction domainのみにした変異体を作製し、MENIN1-108とともに強制発現させたところ、いずれもMENINによる転写抑制化能を解除



した。このことから、MENINの転写抑制作用は、NcoR C端側と共通の機構を介していることが予想される。

#### D 考察

多発性内分泌腫瘍症 (multiple endocrine neoplasia, MEN) 1型は、下垂体、副甲状腺、膵臓に多発的に腫瘍を形成する常染色体優性遺伝疾患である。下垂体病変は主に腺腫であり、prolactinomaが大半を占め、growth hormone産生腫瘍、非機能性腫瘍がこれに続く。

1997年にクローニングされたMEN1型の原因遺伝子 (MEN1) は11番染色体長腕上に位置し、約9 kb長で10個のエクソンを含み、610個のアミノ酸からなる蛋白 (MENIN) をコードしている癌抑制遺伝子である。MENIN 1型家系の遺伝子変異の検索では、現在まで200種以上の変異が報告されており、frame-shift、non-sense mutation、mis-sense mutationなど症例により様々である。これらの変異には特にhot spotはなくエクソン2からエクソン10にかけて広く存在する。また、こうした変異と臨床像との相関は未だ明らかになっていない。

MENINは主に核内に局在することか明らかとなり、現在はその機能解明の段階に入っている。これまでに、MENINがAPI complexであるJunDと核内で結合し、その転写活性を抑制していること、またMENINがDNAのintegrityの維持に関与していることなどが報告されており、変異によりその機構が破綻し腫瘍を発生すると考えられている。

本研究の結果、野生型MENINには、プロラクチンプロモーターの強い転写抑制作用があることが判明した。この転写抑制作用は、JunDとの結合能を欠く変異体において、より強くなることから、JunDを介するものではない。また、欠失変異体を用いた解析により、

MENINには少なくとも2カ所以上の転写抑制トメインが存在すること、さらに、N端側に最も強力な転写抑制作用があり、その作用は通常C端側により抑制されていることが判明した。以上のことから、MENINの変異により、一部の機能が失われ、転写抑制が強くなることか腫瘍発生機構に関与する可能性が示唆される。

一方、転写制御機構の解明が進んでいる核内受容体では、NcoRあるいはSMRTといったコリプレノサーが結合し、転写を抑制している。NcoRにはSin3Aを介して、あるいは直接にヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) が結合し、このHDAC活性によりヒストンが脱アセチル化されて、クロマチン構造が凝集し、転写が抑制されると考えられている。そこで、MENINとNcoRを共発現させたところ、MENINの転写抑制作用はNcoRによって拮抗された。このことから、両者が共通の機構を介している可能性が示唆される。

#### E 結論

MENINは、プロラクチンの転写に強い抑制作用を示し、変異MENINはより強い抑制作用を示した。MENINには2カ所以上の転写抑制トメインが存在し、N端側の強力な転写抑制作用は通常はC端側により抑制されている。従って、MENINの変異により転写抑制が強くなることか腫瘍発生機構に関与する可能性も示唆される。

#### F 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

1 論文発表

なし

2 学会発表

- 1) 山田正信, 岸美紀子, 橋田哲, 橋本貢士,  
門伝剛, 佐藤哲郎, 森昌朋 MENINの転写  
抑制機構 変異MENINはより強い転写抑制  
能を持つ 第76回日本内分泌学会学術総会,  
2003 5 9-11, 横浜
- 2) 山田正信, 沢沢信行, 橋本貢士, 門伝剛,  
佐藤哲郎, 森昌朋 フロラクチンによる  
MENINによる制御機構 第30回日本神経  
内分泌学会学術集会, 2003 9 11-13, 横浜

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## LH,FSHおよびPRLの各測定系間における 測定値の比較と問題点の検討

分担研究者	苛原 稔	徳島大学医学部発生発達医学講座女性医学分野教授
共同研究者	岩佐 武	徳島大学医学部発生発達医学講座女性医学分野
	松崎 利也	徳島大学医学部発生発達医学講座女性医学分野講師
	尾形 理江	徳島大学医学部発生発達医学講座女性医学分野
	田中 尚子	徳島大学医学部発生発達医学講座女性医学分野

**研究要旨**・現在国内ではLH、FSH、PRLの測定に関して複数の測定系が使用されており、測定値の比較が困難な場合がある。今回正常月経周期婦人、各種排卵障害患者などを対象とし現在本邦で汎用されているスパノク-S、アーキテクト、ケンタウルスの3種の測定系に関して測定値の比較、検討を行った。スパノク-S LHの測定値が低くなる変異LH症例は、スパノク-S LH/アーキテクト LH比 $<0.5$ の判定基準で明確に検出することか可能であった。この変異LH症例を除くと各測定系間のLH測定値の相関係数は $0.94\sim0.99$ と高く、測定値はアーキテクト LHはスパノク-S LHの $1.2$ 倍、ケンタウルス LHはスパノク-Sの $1.1$ 倍であった。FSHでも各測定系間の相関は $0.94\sim1.00$ と高く、測定値はアーキテクト FSHはスパノク-S FSHの $0.8$ 倍、ケンタウルス FSHはスパノク-S FSHの $0.85$ 倍であった。また多嚢胞性卵巣症候群(PCOS)を診断する上で重要なLH単独高値の判定基準は従来スパノク-SでのLH/FSHが $1.0$ 以上とされてきたが、スパノク-S LHの測定値が $20\text{mIU/ml}$ 以下であった $251$ 検体について、各症例について各測定系間のLH/FSH比の回帰直線を検討したところ、アーキテクトではスパノク-Sの $1.37$ 倍、ケンタウルスでは $1.25$ 倍となり、PCOSの診断に際し、LH単独高値の判定基準は、アーキテクトでは $1.4$ 以上、ケンタウルスでは $1.25$ 以上が妥当と考えられる。またスパノク-SではPCOSで、かつ変異LHを伴う症例の診断が困難となる点にも注意が必要である。PRLでは各測定系間の相関は $0.96\sim0.99$ と高かったが、測定値はアーキテクト PRLはスパノク-Sの $1.92$ 倍、ケンタウルス PRLはスパノク-S PRLの $1.64$ 倍と測定系による差が大きく、高PRL血症の診断にはスパノク-Sでは $15\text{ng/ml}$ 、アーキテクトでは $30\text{ng/ml}$ 、ケンタウルス PRLでは $24\text{ng/ml}$ が正常範囲の上限と考えられる。

### A 研究の目的

現在国内ではLH、FSH、PRLに関して複数の測定系が汎用されるようになっており、それぞれの標準品が同一でないために、測定系間の、測定値の比較が困難となってきた。今回正常月経周期婦人、各種排卵障害患者、閉経後婦人、及び妊婦検体を用いて本邦で比較

的汎用されているスパノク-S、アーキテクト、ケンタウルスの3種の測定系に関して測定値の比較を行い問題点の検討をした。

### B 研究の方法

1)対象 正常月経周期婦人 $36$ 例( $273$ 検体)、各種排卵障害患者 $45$ 例( $107$ 検体)、閉経後婦人 $11$

例(11検体)、妊婦28例(28検体)

2)測定方法、標準品(表1) I R M A (immunoradiometric assay)法のスパノク-S、CLIA(chemiluminescence immunoassay)法のアーキテクトおよびケンタウルスを用いて測定を行った。また標準品についてはLHの測定系ではアーキテクト LHとケンタウルス LH、FSHの測定系ではスパノク-S FSHとアーキテクト FSH、PRLの測定系ではアーキテクト PRLとケンタウルス PRLが同一の標準品を使用している。

3)検討項目 各測定系で検体中のLH、FSH、PRL濃度を測定し、各測定系間の相関を検討した。また、正常月経周期婦人のLH、FSH、PRLの基礎値、日内変動および月経周期内変動、妊婦における妊娠各時期の変動、各種排卵障害患者の基礎値、さらに変異LH症例の検討を行った。

## C 研究結果

1)変異LH症例の検出(図1) スパノク-S LHとアーキテクト LHの測定値の相関では、ほとんどの症例は実線で示す回帰直線付近に分布していた。しかし約1割の症例は破線で示す回帰直線付近に分布していた。これはスパノク-Sの測定値が実際より低い症例であり、従来から一般の人口の約1割に存在すると報告されている変異LH症例と考えられた<sup>13)</sup>。そこで各群のそれぞれの症例についてスパノク-S LHとアーキテクト LHとの測定値の比(スパノク-S LH/アーキテクト LH比)をとり、その分布を比較すると変異LHと考えられた45検体では0.27~0.44、その他の419検体は0.61~1.78に分布していた。このように両群の分布には全く重なりがなく、それぞれの分布の中間の0.5を用い、スパノク-S LH/アーキテクト LH比が0.5未満の症例を変異LH症例と定義した。実際

に図1の右の図(正常範囲に近い症例の相関図)に $y=2x$ (点線)、つまりスパノク-S LH/アーキテクト LH比が0.5となる直線を引いたところ、この直線の上下に2群を明瞭にわけることができた。

2)測定系間の測定値の相関(LH)(図2) 研究結果1)の定義で変異LHと判定した症例の多く、はスパノク-S LHとケンタウルス LHの相関図上でも検出が可能であったか、一部の症例では正常LHと明確に区別できないものが存在した。またアーキテクト LHとケンタウルス LHを比較した場合は、ケンタウルス LHで変異LH症例の測定値が若干低値となった。したがって、ケンタウルス LHは変異LHを完全には検出できていないと考えられる。なお、変異LH症例を除いた場合、各測定系間の相関係数は0.95~0.99と高く、回帰直線の傾きより、正常範囲に近い検体における測定値はアーキテクト LHではスパノク-S LHの1.2倍、ケンタウルス LHではスパノク-S LHの1.1倍であった。

3)測定系間の測定値の相関(FSH)(図3) 各測定系間の相関係数は0.94~1.0と高く、正常範囲に近い検体における測定値は、回帰直線の傾きより、アーキテクト FSHではスパノク-S FSHの0.82倍、ケンタウルス FSHではスパノク-S FSHの0.85倍であった。

4)各測定系間のLH/FSHの検討(図4) 多嚢胞性卵巣症候群の診断基準にあるLH分泌亢進の判定基準として従来スパノク-SではLH/FSH比>1が用いられてきた。アーキテクト、ケンタウルスではLHおよびFSHはそれぞれ、スパノク-Sの測定値と近い値ではあったか、LH/FSH比は回帰直線の傾きより、アーキテクトはスパノク-Sの1.25倍、ケンタウルスはスパノク-Sの1.37倍であった。

5)スパノク-S LH,FSHで変異中枢性第一度毎月