

図3 続発性副腎皮質機能低下症患者の血清Na値
(年齢別)

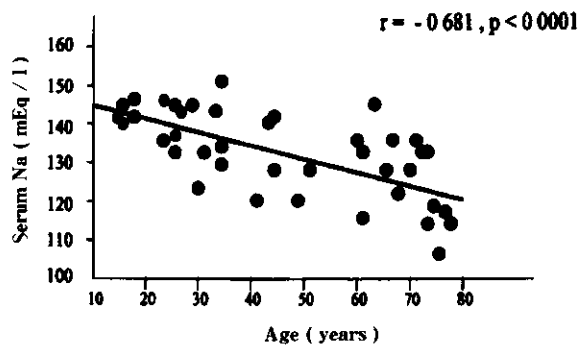
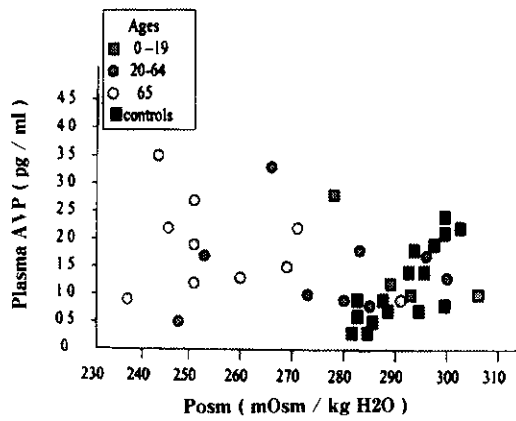


図4 続発性副腎皮質機能低下症患者における
血漿浸透圧と血漿AVP値の関係



細胞移植ないし骨格筋への遺伝子導入を用いた 中枢性尿崩症の遺伝子治療

分担研究者 岩崎 泰正 名古屋大学医学部付属病院検査部
吉田 昌則 名古屋大学医学部代謝病態内科学

研究要旨 我々は中枢性尿崩症尿崩症(CDI)を対象として、遺伝子治療によるホルモン補充療法の試みを行ってきた。一般にCDI患者の視床下部ハノプレニン(AVP)産生細胞は既に変成脱落しており、homologousな細胞におけるAVP遺伝子の発現は不可能である。我々は、CDIモデル動物であるBrattleboro rat において、AVP遺伝子を導入した内分泌細胞の皮下移植、non-viralな手法による骨格筋への直接AVP遺伝子導入の2種類の方法で、in vivoにおける抗利尿効果を解析した。また薬物誘導性ON/OFF Systemを用いた発現制御の可能性も検討した。その結果、(1)甲状腺C細胞株にAVP遺伝子を安定性に導入して、Brattleboro rat に皮下移植したところ、最大6ヶ月間尿量の正常化を認めた。また tetracyclineやglucocorticoid応答配列を有するプロモーターを用いたAVP遺伝子の発現調節が可能であった。(2)筋肉組織などの非内分泌細胞においても、AVP遺伝子が適切なフロセンゲを受けるように改変した発現システム(furin切断型ヘクター)ならびに直接遺伝子導入法を用いることにより、2-3週間程度の持続的なAVP発現、並びに抗利尿効果も認められた。今回開発したgene/cell therapyの手法は、AVPをはしめとする神経ペプチドホルモンの補充療法に応用可能と考える。

A 研究目的

CDIはAVPの分泌不全を原因とする疾患で、一日10Lにも及ぶ著しい多尿を特徴とする。現在の治療の主体は、テソモプレニンによる補充療法であるか、その生涯に亘る補充か必要であり、もし遺伝子治療により、長期間のペプチドホルモンの発現が可能となれば、このような従来の補充療法に代わる可能性も考えられる。

ヒトに対する臨床応用を考えた場合、CDIの患者では、AVP産生ニューロンはすでに高度に変性、脱落しており、AVP遺伝子を導入しても十分な発現は期待できない。そこで本来AVPを発現していないheterologousな組織に遺伝子を導入し、AVPを産生させる必要がある。そこで、我々は(1)AVP遺伝子を安定性に導入

した内分泌細胞の皮下移植、(2)主にその投与が簡便であるという利点から、non-viralな手法を用いた骨格筋への直接遺伝子導入、の2種類のstrategyを用いて、CDIモデル動物であるBrattleboro ratへの抗利尿効果を検討した。

B 研究方法

(1)ラット甲状腺C細胞由来CA77細胞に野生型ラットAVP遺伝子(AVP/WT)を安定性に組み込んだCA77VP細胞を樹立、Brattleboro rat へ皮下移植し、尿量、飲水量尿浸透圧などを測定した。(2)Glucocorticoid応答配列(GRE)を有するAVP発現ヘクター(GRE/AVP)を導入後dexamethason(Dex)を投与、或いはTet/OFF system(Tet repressor発現ヘクターとその応答配列を下流にAVP遺伝子を組み込んだヘクター)

を共発現させ、tetracycline(Tet)を添加し、薬物誘導下にAVPの発現調節が可能か否かを検討した。

(3) AVPは翻訳後適切なプロセッシングを受けて、生理活性を有する成熟AVPとなるか、非内分泌組織ではプロセッシング酵素が発現していないため、プロセッシングを受けることかできない。そこでubiquitousに発現するpeptidaseであるfurin²にて切断されるように改変したAVP発現ヘクター(F型)を、電気的穿孔法にてBrattleboro ratの下腿骨格筋内に遺伝し導入し、以後の尿量、飲水量、尿浸透圧などを測定した。尚、筋細胞においてより強力なpromoter活性を有するCAG promoter³を使用した。

C 研究結果

(1) CA77VP細胞は適切にプロセスされた正常サイズのAVPを効率に分泌することを確認した。Brattleboro ratに皮下移植すると、移植後著明に尿量が減少した。一部のラットでは移植後6ヶ月にわたりこの強力な抗利尿効果が持続した(Fig 1)。

(2) CA77細胞にGRE/AVPを遺伝子導入後、Dex処置を行った所、少量のDexにて、細胞培養液中のAVP分泌量は著明に増加した。また、Tet/OFFを導入後、Tet処置を行うと、その添加量に依存して、AVP分泌量が低下した(Fig 2)。

(3) fibroblast由来COS1細胞にAVP/WTを導入したところ、分泌AVPは大分子サイズの前駆体が主体であったが、F型を導入することで、適切にプロセスされ、分泌量自体も著明に増加した(Fig 3)。myoblast由来L6細胞にF型を安定性に導入したL6VP細胞をBrattleboro ratに皮下移植した所、尿量、飲水量は著明に改善、しかも腎におけるAVPの受容体(V2受容体)の選択的拮抗薬であるOPC31260⁴の使用により、一過性にこの抗利尿作用は阻害された(Fig 4)。電

氣的穿孔法によるF型の直接導入にて、3週間、尿量、飲水量の改善がみられた。導入後7日後の血漿AVP濃度は 3.03 ± 0.66 pg/ml(対象 0.06 ± 0.04 pg/ml)であり、ほぼ生理的に適切な範囲内と考えられた(Fig 5)。

D 考察

現在、遺伝子治療は、様々な疾患における有効な蛋白供給の手段として、重要な戦略の一つとなっている。尿崩症のような単一のペプチドホルモン欠損症では、目的ホルモンの持続的発現により、疾患の長期寛解も達成しうると考えられる。CDIの遺伝子治療としては、adenovirus vectorをBrattleboro rat視床下部視索上核に導入し、長期の抗利尿効果を得たという、Geddesらの報告がある⁵。しかし、Brattleboro ratはヒトのCDIと異なり、例外的にAVPニューロンが保存(むしろ肥大)しているため⁶、AVPの発現が可能であったか、AVPニューロンの変性脱落の著しい、ヒトCDI患者では、この手法を応用することはできない。また、ヘクターの中核投与も臨床応用という点からは難点がある。そこで我々は、投与の簡便性の点から、骨格筋でのAVPの発現を試みた。この場合の問題点は、AVPのプロセッシングに関与すると考えられる、prohormone convertase(PC)1/3ないしはPC2か、非内分泌細胞では発現していないため、筋組織からは適切にプロセスされたAVPが得られないという点である。この点を改善すべく、遍在性peptidaseであるfurinで切断されるよう改変したF型ヘクターを構築した。この結果、適切にプロセスされたAVPが分泌され、in vivoにおいて抗利尿効果を発揮させることに成功した。

今回我々は、遺伝子導入の手法として、安全性、簡便性などの点から、non-viralな手法によるgene deliveryを試みた。F型の筋注のみでは、

抗利尿効果を発揮できなかったため、電氣的穿孔法による遺伝子導入を試みた。この手法は筋注法に比へ、100倍以上の導入効率があると報告されている⁷。この結果、約3週間の尿量の有意な改善がみられた。血中AVP濃度も生理的範囲内であり、骨格筋においても、neuropeptideの発現が可能であることが確認された。一方、他の手法として、内分泌なしの神経細胞に、ex vivoでAVP遺伝子を安定性に組み込み、持続的にAVPを分泌する細胞を新たに構築し、移植することによって、多尿を改善することが可能であった。このようなcell therapyもまたホルモン欠損症に有効であることが確認された。

ホルモン欠損症の遺伝子治療でもう一つ重要な点は、目的ホルモンの発現または分泌レベルでの調節が可能かという点である。AVPも血漿浸透圧により、発現及び分泌の精緻な制御を受けている。Osmoregulationのメカニズムが未だ明らかではないため、今回我々は薬物制御システムを用いたAVP発現の制御を試みた。GlucocorticoidやtetracyclineによりAVP発現の制御が可能であることが示され、現在in vivoにおいて尿量の制御が可能か否かを検討中である。更に、選択的V2受容体拮抗薬OPC31260の投与により一過性にこの抗利尿効果が阻害された。OPCは経口投与も可能であり、その使用により、遺伝子治療中の抗利尿作用の制御、水中毒の予防が期待できる。

E 結論

今回の我々の検討により、CDIの治療に対し遺伝子治療が応用可能であることが示された。今回のstrategyはCDIのみならず、他のホルモン欠損症の遺伝子治療への道を開くものと考えられる。

【文献】

- 1 Blotner H 1958 Primary or idiopathic diabetes insipidus A system disease *Metabolism* 7 191-200
- 2 Nakayama K 1997 Furin a mammalian subtilisin/Kex2p-like endoprotease involved in processing of a wide variety of precursor proteins *Biochem J* 327 625-635
- 3 Niwa H, Yamamura K, Miyazaki J 1991 Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector *Gene* 108 193-199
- 4 Yamamura Y, Ogawa H, Yamashita H, Chihara T, Miyamoto H, Nakamura S, Onogawa T, Yamashita T, Hosokawa T, Mori T 1992 Characterization of a novel aquaretic agent, OPC-31260, as an orally effective, nonpeptide vasopressin V2 receptor antagonist *Br J Pharmacol* 105 787-791
- 5 Geddes BJ, Harding TC, Lightman SL, Uney JB 1997 Long-term gene therapy in the CNS reversal of hypothalamic diabetes insipidus in the Brattleboro rat by using an adenovirus expressing arginine vasopressin *Nat Med* 12 1402-1404
- 6 Valtin H 1967 Hereditary hypothalamic diabetes insipidus in rats (Brattleboro strain) A useful experimental model *Am J Med* 42 814-827
- 7 Aihara H, Miyazaki J 1998 Gene transfer into muscle by electroporation in vivo *Nat Biotechnol* 16 867-870

【Figure legends】

Fig 1 CA77細胞にAVP/WTを導入後、細胞培養液中のAVP分泌量、及びその分子サイズのゲル濾過解析。

Fig 2 CA77VP皮下移植後のBrattleboro ratの尿量・飲水量の推移。

Fig 3 CA77細胞にGRE/AVPを導入後、添加し

たDexの容量と、培養液中のAVP濃度。

Fig 4 CA77細胞に、Tetリフレノサー発現ヘクターと、その応答配列下流にAVP遺伝子を組み込んだヘクターを共発現、添加したTetの容量と培養液中のAVP濃度。

Fig 5 F型遺伝子のsequence。COS1細胞にF型を遺伝子導入、AVP分泌量と、その分子サイズのゲル濾過解析。

Fig 6 L6VP皮下移植後の尿量、飲水量の推移。移植4日後、6日後にOPC31260を腹腔内投与。

Fig 7 電氣的穿孔法にてF型遺伝子を導入後、Brattleboro ratの尿量、飲水量の推移。

Fig 8 電氣的穿孔法にてF型遺伝子導入後の局所AVP mRNA発現のRT-PCRによる確認、及びAVP免疫活性。

論文発表

M Yoshida, Y Iwasaki, A Asai, T Nigawara, Y Oiso Gene Therapy for Central Diabetes Insipidus Effective Antidiuresis by Muscle-Targeted Gene Transfer Endocrinology 145 261-268 2004

CA77におけるAVP発現量とプロセンク(ゲル濾過)

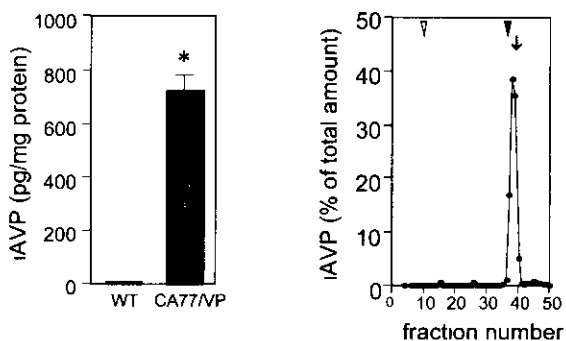


Fig 1

Brattleboro ratにおけるCA77VP細胞移植の抗利尿効果

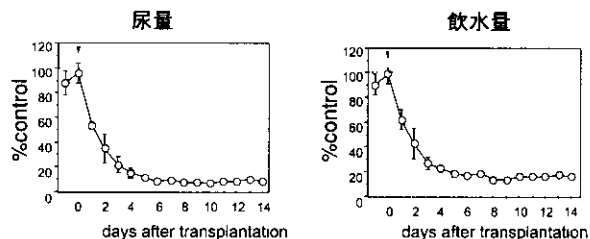


Fig 2

GlucocorticoidによるAVP発現調節

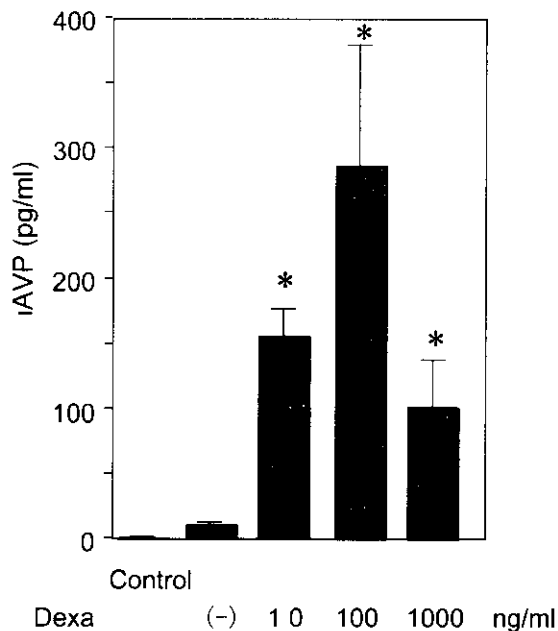
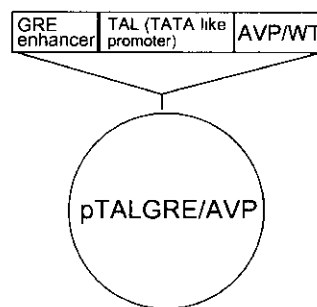


Fig 3

Tet / Off system による AVP 発現調節

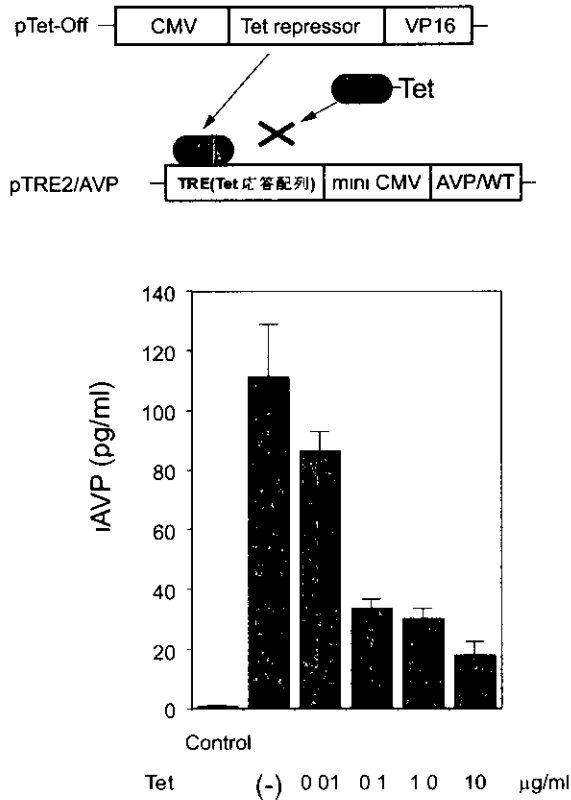
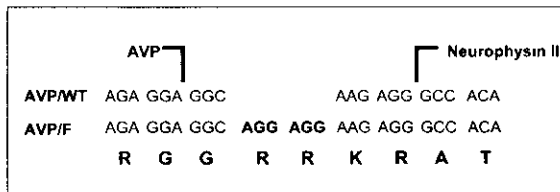


Fig 4

Furin 切断型 (AVP/F) 発現ヘクターの構造とそのプロセソク



COS1におけるプロセソク(ケル濾過を用いた検討)

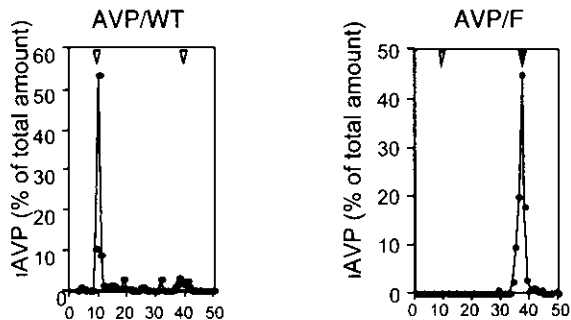


Fig 5

OPC31260 処置による *in vivo* における阻害作用

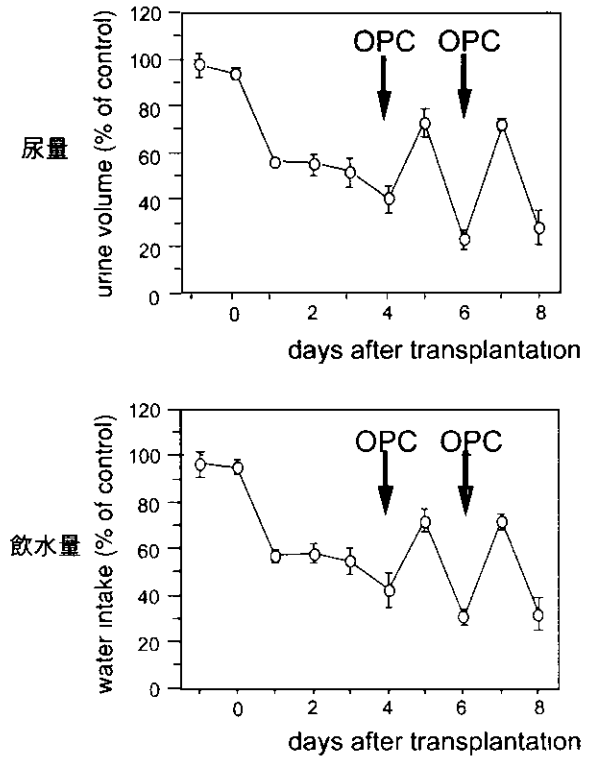


Fig 6

Brattleboro rat における筋組織への pCAGGS/AVP/F 直接遺伝子導入の抗利尿効果 (Electroporation 法)

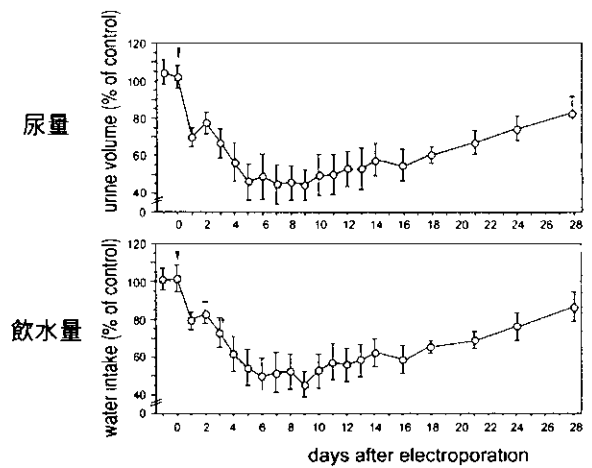
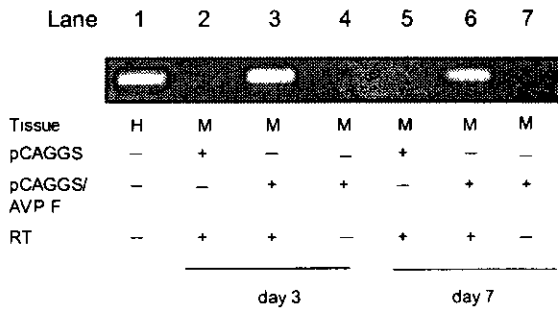


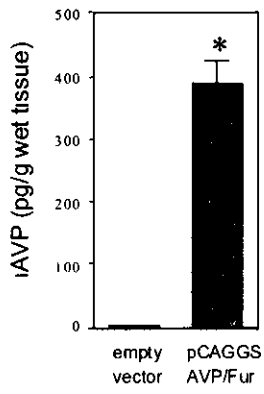
Fig 7

局所の AVP 遺伝子発現と血中AVP濃度

A



B



C

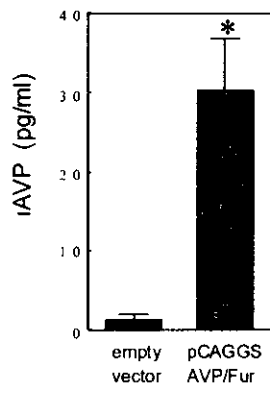


Fig 8

健常高齢者および軽症疾患罹患高齢者におけるGH分泌反応

| | | |
|-------|--------|---|
| 分担研究者 | 置村 康彦 | 神戸大学医学部保健学科 |
| | 工藤 工 | 神戸大学大学院医学系研究科応用分子医学講座 内分泌代謝 神経 血液腫瘍内科学教室 |
| | 竹野 亮子 | 同 |
| | 福岡 秀規 | 同 |
| | 高橋 健太郎 | 同 |
| | 吉岡 嗣朗 | 同 |
| | 高橋 路子 | 同 |
| | 麓 万里子 | 同 |
| | 井口 元三 | 同 |
| | 高橋 裕 | 同 |
| | 加治 秀介 | 兵庫県立看護大学 |
| | 佐藤 倫明 | 聖隷淡路病院 |
| | 喜多 哲也 | 千船病院 |
| | 千原 和夫 | 神戸大学大学院医学系研究科応用分子医学講座 内分泌代謝 神経 血液腫瘍内科学教室 |

研究要旨 GH分泌は加齢とともに低下するか、GH欠乏状態に陥る高齢者の割合は不明である。そこで、今回、60歳以上の健常高齢者、および軽症高血圧、糖尿病等で治療を受けているか他に大きな異常所見のない患者(軽症疾患罹患高齢者)に対してGH分泌刺激試験を行ない、GH反応を検討した。また、血中IGF-I値を測定し、GH分泌反応と比較した。61名(男性25名、女性36名)の被験者にアルキニンおよびL-トローハを投与したところ、GH反応の頂値が3ng/ml以下の低反応者は各々21%(13/61)、38%(21/55)であった。両試験ともに低反応であった者は16%(9/55)で、このうち2名の血中IGF-Iはともに77ng/mlと低値であった。GH分泌反応、血中IGF-I値から判断すると、一般高齢者のなかに、器質的疾患によるGH分泌不全症患者に匹敵するGH分泌不全者も存在する可能性があり、このようなGH分泌不全者が特有の臨床像を示すのか、今後明らかにする必要がある。

A 研究目的

成人GH分泌不全症では、血中脂質 内臓脂肪の増加や、骨塩量 筋力の低下が出現すること、さらにこれらの所見はGH投与によって改善することか明らかとなり、最近では、小児のGH分泌不全症と同様に、成人のGH分泌

不全症も治療すべきであると考えられている。

一方、GH分泌は加齢とともに低下するので、明らかな視床下部下垂体の器質的疾患が無いにもかかわらずGH分泌不全症に陥っている方々か高齢者の中に潜在する可能性も考えられる。そこで、今回、60歳以上の健常高齢者、お

よび軽症高血圧、糖尿病等で治療をうけているか他に大きな異常所見のない患者（軽症疾患罹患高齢者）に対してGH分泌刺激試験を行ない、GH反応を検討した。また、血中IGF-I値を測定し、GH分泌反応と比較した。また、この検査によって抽出されたGH分泌不全者か、特有の症状を検討する目的で、アンケート調査をおこなった。

B 研究方法

60歳以上の健常高齢者（34名、男性15名、女性19名）、および軽症高血圧、糖尿病、高脂血症等で治療をうけているか他に大きな異常所見のない患者（軽症疾患罹患高齢者27名、男性10名、女性17名）に対し本研究の目的を十分に説明し同意を得たうえで、GH分泌刺激試験を行なった。被験者は朝食をとらずに、異なった日の午前中に、アルキニン試験（アルキニンを30g、30分かけて静脈内投与）、およびL-トローパ試験（L-トローパ0.5mgを経口投与）をうけた。薬剤の投与前、投与後15、30、45、60、90、120分の時点を採血、血漿を分離、凍結保存した。その後、血漿GH値をIEMA(トローナー)で測定し、各被験者のGH分泌能を検討した。GH分泌刺激前に採取した血漿を使用してIGF-I値を測定した。

また、自覚症状を調べる目的で、調査用紙（別紙）を郵送、アンケート調査を行なった。質問は同世代の他の人に比べ、自分自身に次の症状かみられるかどうか問うものであった。質問は、同世代の他の人に比べ、（1）疲れやすいか？（2）スタミナの低下を感じる？（3）集中力の低下を感じるか？（4）他の人に比べ、気力が落ちていると感じるか？（5）自分自身が何ことをするにもおっくうであると感じるか？（6）皮膚が乾燥しているよう

に感じるか？（7）体毛が柔らかくなったと感じるか？（8）体に脂肪がついてきたと感じるか？（9）筋力が落ちてきたと感じるか？という9項目であり、Aあてはまらない、Bあてはまる、C非常によくあてはまる、の3段階にいずれに該当するか返答を依頼した。GH分泌不全群（アルギニン試験、およびL-トローパ試験において、ともにGH頂値が3 ng/ml以下）とGH分泌が保たれている群（アルキニン試験、L-トローパ試験の少なくとも1つにおいてGH頂値が3 ng/ml以上）で、症状の重症度を示す尺度であるA、B、Cの出現率に違いがあるか、マンホイットニーのU検定で比較した。

なお、本研究は神戸大学医学部附属病院医薬品及び医療用具の臨床研究審査委員会の許可を得て行なったものである。

C 研究結果

実際に本研究における被験者は62歳から91歳までの61名で、平均年齢は71歳であった。年齢分布は、62～69歳 27名（男性11名、女性16名）、70～79歳 27名（男性13名、女性14名）、80～89歳 6名（男性1名、女性5名）、90歳代1名（女性）であった。BMIは平均 23.4 ± 3.4 であった。

軽症疾患罹患高齢者（27名）が治療（生活習慣の改善指導をも含む）を受けている疾患は、高血圧（17名）、高脂血症（8名）、糖尿病（5名）、内分泌疾患（4名、すべて橋本病）、肝疾患（3名）、心疾患（3名、狭心症2名、不整脈1名）、骨粗鬆症（2名）、消化器疾患（1名、胃潰瘍）泌尿器系疾患（1名、前立腺肥大）、膠原病（1名、シェーグレン症候群）であった。

アルキニン試験（被験者数61名）において、平均血漿GH頂値は 81 ± 71 (mean \pm SD) ng/mlであり、3 ng/ml以下であったものは13名

(21%)であった。L-トローパ試験(被験者55名)において、平均血漿GH頂値は 59 ± 61 ng/mlであり、3 ng/ml以下であったものは21名(38%)であった。両試験を受けた55名中、血漿GH頂値が3 ng/ml以下であったものは9名(16%)であった。GH頂値が1.5 ng/ml以下をGH分泌不全とした場合には、アルギニン試験では4名(6.6%)、L-トローパ試験では12名(22%)がそれに該当した。Billerらが提唱するGH分泌不全の基準にしたかつて、GH頂値のカットオフ値を、アルギニン試験では1.4 ng/ml、L-トローパ試験では0.64 ng/mlとすると、それぞれ3名(4.9%)、5名(9.1%)が該当し、共に該当するものは2名(3.6%)であった。アルギニン試験におけるGH頂値と、L-トローパ試験におけるGH頂値の間には、相関係数0.49(危険率 $p < 0.05$)の有意な相関がみられた。

IGF-I値は 120.9 ± 32.4 ng/mlで、77 ng/ml以下のものは7名であった。この7名のGH頂値の平均は、アルギニン試験で11.9 ng/ml、L-トローパ試験で8.6 ng/mlであり、必ずしも低値ではなかった。アルギニン試験、およびL-トローパ試験ともに3 ng/ml以下であったものは、7名のうち2名のみであった。IGF-I値とアルギニン試験のGH頂値、L-トローパ試験におけるGH頂値の間には、それぞれ明確な相関はみられなかった。

アンケート調査(総回答数48(回収率79%))では、アルギニン試験、L-トローパ試験両者において、GH頂値が3 ng/ml以下であったGH分泌不全群(回答数7(回収率78%))と、少なくとも1つが3 ng/ml以上であったGH分泌良好群(回答数41(回収率79%))の間に、(3)集中力の低下を感じるか?(9)筋力が落ちてきたと感じるか?という質問に対するA,B,Cの返答出現率に相違がみられ、いずれもGH分泌不全群で、そのような自覚症状を感じる者が多

かった。

D 考察

間脳下垂体機能障害調査研究班によって作成された、成人GH分泌不全症の診断の手引きによれば、成人GH分泌不全症の診断は、GH分泌不全によると考えられる症状、所見の存在とGH分泌刺激試験におけるGH頂値の低値の2点から診断することになっている。GH分泌刺激試験として、インスリン低血糖刺激試験(ITT)、アルギニン試験、L-トローパ試験、グルカコン試験が用いられ、いずれか2つのGH分泌刺激試験において、刺激前および刺激後120分にわたり、30分ごとに測定した血清GHの頂値が5 ng/ml以下であることを判定基準の1つとしている。さらに、GH頂値が3 ng/ml以下である時、重症のGH分泌不全としている。

今回、61名の健常高齢者および軽症疾患罹患高齢者に対し、GH分泌刺激試験をおこなったところ、アルギニン試験およびL-トローパ試験に参加した55名のうち、両試験ともGH頂値が3 ng/ml以下であったものは9名(16%)で、予想以上に多いものであった。この結果を解釈するさいに、いくつか注意すべき事項がある。第一に、いずれのGH分泌刺激試験においてもGH頂値が3 ng/mlというカットオフ値が妥当なものであるかということである。これまで、海外では成人GH分泌不全のガイドラインが作成され、GH分泌不全の診断にはITTが望ましく、ITTにおけるGH頂値が3~5 ng/ml以下か1つの基準とされている⁽¹⁾。しかし、高齢者では、潜在性の虚血性心疾患を有する可能性があり、安易にITTを使用することは危険である。このため、本研究ではアルギニン試験、L-トローパ試験を使用した。Billerらは、成人GH分泌不全症診断に関して、各種GH分泌刺激試験の感度と特異性を比較し、ITTにお

けるGH頂値5 ng/mlに相当する区分は、アルキニン試験でGH頂値1.4 ng/ml、L-トローパ試験では0.64 ng/mlであると報告している⁽²⁾。この値に基づくと、該当者は少なくなり、アルキニン試験で3名(5.5%)、L-トローパ試験で5名(9.0%)、両者共に該当するものは2名(3.6%)となる。もう1つ考慮すべき点は、GH測定系である。ヒトGHの測定系として種々のキトが使用されており、その測定系間の差異はかなり大きい。本研究で使用した測定系はGH値を低値に測定する傾向にあるものであり、それが本研究の結果に影響している可能性がある。

アルキニン試験におけるGH頂値と、L-トローパ試験におけるGH頂値には、有意な生の相関が認められたが、それぞれのGH頂値と、IGF-I値の間には相関は認められなかった。IGF-I値は、GH分泌不全の適切な指標にはなりかたないことかすてに報告されているか⁽³⁾、本研究においてもそれと合致する成績であった。Billerらは、IGF-Iが77 ng/ml以下か成人GH分泌不全の1つの目安になると述べているか、本研究においてIGF-Iが77 ng/ml以下の群では、アルキニン試験、L-トローパ試験いずれにおいても、GH頂値は低値ではなく、むしろ全体の平均値より若干高めてあった。これは、IGF-I低値か原因で、GH分泌抑制が减弱している者が含まれていることを示唆する。一方、この7名のうち2名はアルキニン試験および、L-トローパ試験のいずれにおいても、GH頂値が3 ng/ml以下であり、この2名に関してはGH分泌不全か一義的なものである可能性が強い。

今回のおこなったアンケート調査では、GH頂値が3 ng/ml以下であった被験者はいずれもGH分泌不全による可能性のある何らかの自覚症状を訴えていた。なかでも、集中力の低下、筋力の低下を訴える者は、GH頂値が3 ng/ml以上の者と比へ有意に多かった。これを裏付け

る身体所見が存在するのか、および、それがGH分泌不全によると考えることが真に妥当であるのかという点は今後明らかにすべき重要な問題である。また、GH分泌刺激試験の判定基準を定める根拠を明確にするためにも、GH分泌不全によると想定される症状、身体所見の発現頻度と、GH分泌刺激試験におけるGH頂値の関連性を検討する必要がある。

E 結論

61名(男性25名、女性36名)の健常高齢者、軽症疾患高齢者にアルキニンおよびL-トローパを投与したところ、GH反応の頂値が3 ng/ml以下の低反応者は各々21%(13/61)、38%(21/55)であった。両試験ともに低反応であった者は16%(9/55)であった。GHのカットオフ値を、アルキニン試験では1.4 ng/ml、L-トローパ試験では0.64 ng/mlとすると、それぞれ3名(5.5%)、5名(9.0%)が該当し、共に該当するものは2名(3.6%)であった。GH分泌反応から判断すると、一般高齢者のなかに、器質的疾患によるGH分泌不全症患者に匹敵するGH分泌不全者が存在する可能性があり、このようなGH分泌不全者か特有の臨床像を示すのか、今後明らかにする必要がある。

参考文献

- (1) Consensus Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Adults with Growth Hormone Deficiency Summary Statement of the Growth Hormone Research Society Workshop on Adult Growth Hormone Deficiency
J Clin Endocrinol Metab 1998 83 379-381
- (2) Sensitivity and Specificity of Six Tests for the Diagnosis of Adult GH Deficiency
Beverly M K Biller, Mary H Samuels, Anthony Zagar, David M Cook, Baha M Arafah, Vivien

Bonert, Stavros Stavrou, David L Kleinberg, John J Chipman, and Mark L Hartman

J Clin Endocrinol Metab 2002 87 2067-2079

(3) Diagnostic reliability of a single IGF-I measurement in 237 adults with total anterior hypopituitarism and severe GH deficiency

Aimaretti G, Corneli G, Baldelli R, Di Somma C, Gasco V, Durante C, Ausiello L, Rovere S, Grottolì S, Tamburrano G, Ghigo E

Clin Endocrinol (Oxf) 2003 59 56-61

F 健康危険情報

なし

G 研究発表

1 論文発表

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

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

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

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

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

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

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 in press

H 知的財産権の出願・登録状況

なし

**V. 間脳下垂体機能異常症の
診断と治療の手引き
(2003)**

中枢性思春期早発症の診断の手引き(平成15年度改訂)

I 主症候

a) 男児の主症候

- 1) 9歳未満で精巣、陰茎、陰囊等の明らかな発育が起こる。
- 2) 10歳未満で陰毛発生をみる。
- 3) 11歳未満で腋毛、ひげの発生や声変わりをみる。

b) 女児の主症候

- 1) 7歳6ヶ月未満で乳房発育がおこる。
- 2) 8歳未満で陰毛発生、または小陰唇色素沈着等の外陰部早熟、あるいは腋毛発生がおこる。
- 3) 10歳6ヶ月未満で初経をみる。

II 副症候 発育途上で次の所見をみる(注1)。

- 1) 身長促進現象 身長が標準身長の2.0SD以上。または年間成長速度が2年以上にわたって標準値の1.5SD以上。
- 2) 骨成熟促進現象 骨年齢-暦年齢 \geq 2歳6ヶ月を満たす場合。
または暦年齢5歳未満は 骨年齢/暦年齢 \geq 1.6を満たす場合。
- 3) 骨年齢/身長年齢 \geq 1.5を満たす場合。

III 検査所見

下垂体性ゴナドトロピン分泌亢進と性ステロイドホルモン分泌亢進の両者が明らかに認められる(注2)。

IV 除外規定(注3)

副腎性アントロケン過剰分泌状態(未治療の先天性副腎皮質過形成(注4)、副腎腫瘍など)、性ステロイドホルモン分泌性の性腺腫瘍、McCune-Albright症候群、テストトキンコーンス、hCG産性腫瘍、性ステロイドホルモン(蛋白同化ステロイドを含む)や性腺刺激ホルモン(LHRH、hCG、hMGを含む)の長期投与中(注射、内服、外用(注5))、性ステロイドホルモン含有量の多い食品の大量長期摂取中などの全てを否定する。

[診断基準]

確実例

- 1) Iの2項目以上とIII、IVを満たすもの。
- 2) Iの1項目以上およびIIの1項目以上とIII、IVを満たすもの。

疑い例

Iの年齢基準を1歳高くした条件で、その確実例の基準に該当するもの。なお、疑い例のうち、主症状発現以前の身長が-1SD以下のものは、治療上は確実例と同等に扱うことかてきる。

[病型分類]

中枢性思春期早発症が診断されたら、脳の器質的疾患の有無を画像診断などで検査し、器質性、

特発性の病型分類をする。

- (注1) 発病初期には必ずしもこのような所見を認めるとは限らない。
- (注2) 各施設における思春期の正常値を基準として判定する。なお、基準値のない施設においては、下記の別表1に示す血清ゴナトトロピン基準値を参考にする。
- (注3) 除外規定に示すような状態や疾患か、現在は存在しないか過去に存在した場合には中枢性思春期早発症をきたしやすいので注意する。
- (注4) 先天性副腎皮質過形成の未治療例でも、年齢によっては中枢性思春期早発症をすでに併発している場合もある。
- (注5) 湿疹用軟膏や養毛剤等の化粧品にも性ステロイドホルモン含有のものがあるので注意する。

成長ホルモン分泌不全性低身長症の診断の手引き(平成15年度改訂)

I. 主症候

- 1 成長障害があること
通常は、身体のみならず骨格もとれていて、身長は標準身長(注1)の $-2.0SD$ 以下、あるいは身長が正常範囲であっても、成長速度が2年以上にわたって標準値(注2)の $-1.5SD$ 以下であること。
- 2 乳幼児で、低身長を認めない場合であっても、成長ホルモン分泌不全が原因と考えられる症候性低血糖がある場合。
- 3 頭蓋内器質性疾患(注3)や他の下垂体ホルモン分泌不全があるとき。

II. 検査所見

以下の分泌刺激試験(注4)で下記の値が認められること。(注5)

インスリン負荷、アルキニン負荷、L-DOPA負荷、クロニシン負荷、またはグルカゴン負荷試験において、原則として負荷前および負荷後120分間(グルカゴン負荷では180分間)にわたり、30分毎に測定した血清(漿)中成長ホルモン濃度の頂値が 10ng/ml 以下であること(注6)。ただし、リコンビナントヒト成長ホルモンを標準品としたときは、血清(漿)中成長ホルモン濃度の頂値が 6ng/ml 以下であること(注7)。

III 参考所見

- 1 あきらかな周産期障害がある。
- 2 24時間あるいは夜間入眠後3~4時間にわたって20分毎に測定した血清(漿)成長ホルモン濃度の平均値が正常値に比へ低値である。または、腎機能が正常の場合、2~3日間測定した24時間尿または夜間入眠から翌朝起床までの尿中成長ホルモン濃度が正常値に比へ低値である。
- 3 血清(漿)IGF-I値や血清IGFBP-3値が正常値に比へ低値である。
- 4 骨年齢(注8)が暦年齢の80%以下である。

[判定基準]

成長ホルモン分泌不全性低身長症

- 1 主症候がI-1を満たし、かつIIの2種類以上の分泌刺激試験において、検査所見を満たすもの。
- 2 主症候がI-2あるいは、I-1とI-3を満たし、IIの1種類の分泌刺激試験において検査所見を満たすもの。

成長ホルモン分泌不全性低身長症の疑い

- 1 主症候がI-1またはI-2を満たし、かつIIIの参考所見の4項目のうち3項目以上を満たすもの。
- 2 主症候がI-1を満たし、IIの1種類の分泌刺激試験において検査所見を満たし、かつIIIの参考所見のうち2項目を満たすもの。
- 3 主症候がI-1とI-3を満たし、かつIIIの参考所見のうち2項目以上を満たすもの。

[病型分類]

成長ホルモン分泌不全性低身長症は、分泌不全の程度により次のように分類する。

重症成長ホルモン分泌不全性低身長症

- 1 王症候がI-1を満たし、かつIIの2種以上の分泌刺激試験における頂値がすへて5ng/ml以下のもの(注6)。リコンビナント成長ホルモンか標準品の場合は、頂値がすへて3ng/ml以下のもの(注7)。
- 2 王症候がI-2または、I-1とI-3を満たし、かつIIの1種類の分泌刺激試験における頂値が5ng/ml以下のもの(注6)。リコンビナント成長ホルモンか標準品の場合は、頂値がすへて3ng/ml以下のもの(注7)。

中等症成長ホルモン分泌不全性低身長症

成長ホルモン分泌不全性低身長症の判定基準に適合するもので、うち「重症成長ホルモン分泌不全性低身長症」以外のもの。

注意事項

- (注1) 横断的資料に基づく日本人小児の性別 年齢別平均身長と標準偏差値を用いること。
 - (注2) 縦断的資料に基づく日本人小児の性別 年齢別標準成長率と標準偏差値を用いること。ただし、男児11歳以上、女児9歳以上では暦年齢を骨年齢に置き換えて判読すること。
 - (注3) 頭蓋部の照射治療歴、頭蓋内の器質的障害、あるいは画像検査の異常所見(下垂体低形成、細いか見えない下垂体柄、偽後葉)が認められ、それらにより視床下部-下垂体機能障害の合併が強く示唆された場合。
 - (注4) 正常者でも偽性低反応を示すことがあるので、確診のためには通常2種以上の分泌刺激試験を必要とする。但し、乳幼児で頻回の症候性低血糖発作のため、早急に成長ホルモン治療が必要と判断される場合等では、この限りでない。
 - (注5) 次のような状態においては、成長ホルモン分泌が低反応を示すことがあるので、注意すること。
 - ☆ 甲状腺機能低下症 甲状腺ホルモンによる適切な補充療法中に検査する。
 - ☆ 中枢性尿崩症 DDAVPによる治療中に検査する。
 - ☆ 成長ホルモン分泌に影響を与える薬物(副腎皮質ホルモンなど)投与中 可能な限り投薬を中止して検査する。
 - ☆ 慢性的精神抑圧状態(愛情遮断症候群など) 精神環境改善などの原因除去後に検査する。
 - ☆ 肥満 体重コントロール後に検査する。
 - (注6) 測定キットにより値が異なるので、成長科学協会のキット毎の補正式を用いて判定する。
 - (注7) リコンビナントヒト成長ホルモンを標準品としたときは、測定値を補正する必要はない。
 - (注8) Tanner-Whitehouse-2(TW2)に基づいた日本人標準骨年齢を用いるのか望ましいか、Greulich & Pyle法、TW2原法またはCASMAS (Computer Aided Skeletal Maturity Assessment System) 法でもよい。
- (附1) 診断名は、93年改訂前は下垂体性小人症。ICD-10では、下垂体性低身長または成長ホルモン欠損症となっている。
- (附2) 遺伝性成長ホルモン分泌不全症 (type IA, Ib, type IIなど) は、家族歴有り、早期からの著

明な低身長（ $-3SD$ 以下）、GRH負荷試験を含むGH分泌刺激試験で、GH値の著明な低反応、血中IGF-I、IGFBP-3値の著明な低値などを示す。遺伝子診断により確定診断される。

（附3）新生児 乳児早期には、分泌刺激試験の頂値が 10ng/ml を越えていても、成長ホルモン分泌不全を否定できない。

5-1-2. 成人GH分泌不全症の診断の手引き(平成15年度改訂)

I 主症候および既往歴

- 1 小児期発症では成長障害を伴う(注1)。
- 2 易疲労感、スタミナ低下、集中力低下、気力低下、うつ状態、性欲低下などの自覚症状を伴うことがある。
- 3 身体所見として皮膚の乾燥と菲薄化、体毛の柔軟化、体脂肪(内臓脂肪)の増加、ウェスト/ヒップ比の増加、除脂肪体重の低下、骨量の低下、筋力低下などがある。
- 4 頭蓋内器質性疾患(注2)の合併ないし既往歴、治療歴または周産期異常の既往がある。

II. 検査所見

- 1 GH分泌刺激試験(インスリン負荷、アルキニン負荷、L-DOPA負荷またはグルカゴン負荷試験)(注3)において、負荷前および負荷後120分間(グルカゴン負荷では180分間)にわたり、30分毎に測定した血清(漿)GHの頂値が5ng/ml以下である(注4、5)。ただし、リコンビナントGHを標準品とした場合は、血清(血漿)GH頂値が3ng/ml以下であること(注6)。
- 2 GHを含めて複数の下垂体ホルモンの分泌低下がある。

III. 参考所見

- 1 血清(漿)IGF-I値や血清IGFBP-3値が年齢および性を考慮した基準値に比へ低値である(注7)。
- 2 腎機能が正常な場合で、2~3日間測定した24時間尿または夜間入眠から翌朝起床までの尿中GH排泄量が正常値に比へ低値である。

[判定基準]

成人GH分泌不全症

- 1 Iの1あるいはIの2、3を満たし、かつIIの1で2種類以上のGH分泌刺激試験において基準を満たすもの。
- 2 Iの4とIIの2を満たし、IIの1で1種類のGH分泌刺激試験において基準を満たすもの。

成人GH分泌不全症の疑い

- 1 Iの1項目以上を満たし、かつIIIの1項目以上を満たすもの。

[病型分類]

重症成人GH分泌不全症

- 1 Iの1あるいはIの2、3を満たし、かつIIの1で2種類以上のGH分泌刺激試験における血清(漿)GHの頂値がすべて3ng/ml以下のもの。(注5)
- 2 Iの4とIIの2を満たし、IIの1で1種類のGH分泌刺激試験における血清(漿)GHの頂値が3ng/ml以下のもの。(注5)

ただし、リコンビナントGHを標準品とした場合は、血清(血漿)GH頂値が1.8ng/ml以下であること(注6)。

中等度成人GH分泌不全症

成人GH分泌不全症の判定基準に適合するもので、重症成人GH分泌不全症以外のもの。

注意事項

- 1 性腺機能低下症を合併している時や適切なGH補充療法後では成長障害を認めないことがある。
- 2 頭蓋内の器質的障害、頭蓋部の外傷歴、手術および照射治療歴、あるいは画像検査において視床下部-下垂体の異常所見が認められ、それらにより視床下部下垂体機能障害の合併が強く示唆された場合。
- 3 インスリン負荷試験をまず試みる。追加の検査としてアルギニン負荷、L-DOPA負荷あるいはグルカゴン負荷試験を行う。インスリン負荷試験が禁忌の場合には、アルキニン負荷、L-DOPA負荷あるいはグルカゴン負荷試験を行う。クロニン負荷とGHRH負荷試験は偽性低反応を示すことがあるので使用しない。
- 4 次のような状態においては、GH分泌刺激試験において低反応を示すことがあるので注意を必要とする。

甲状腺機能低下症 甲状腺ホルモンによる適切な補充療法中に検査する。

中枢性尿崩症 DDAVPによる治療中に検査する。

成長ホルモン分泌に影響を与える下記のような薬剤投与中 可能な限り投薬中止して検査する。

薬理量の糖質コルチコイド、 α -遮断薬、 β -刺激薬、抗トパミン作動薬、抗うつ薬、抗精神病薬、抗コリン作動薬、抗セロトニン作動薬、抗エストロゲン薬高齢者、肥満者、中枢神経疾患やうつ病に罹患した患者。

- 5 測定キットにより値が異なるので、成長科学協会のキット毎の補正式を用いて判定する。
- 6 リコニヒナントヒト成長ホルモンを標準品とした時は、測定値を補正する必要かない。
- 7 栄養障害、肝障害、コントロール不良な糖尿病、甲状腺機能低下症など他の原因による血中濃度の低下かありうる。

(附1) 下垂体性小人症、下垂体性低身長症またはGH分泌不全性低身長症と診断されてGH投与による治療歴が有るものでも、成人においてGH分泌刺激試験に正常な反応を示すことがあるので再度検査が必要である。

(附2) 成人においてGH単独欠損症を診断する場合には、2種類以上のGH分泌刺激試験において、基準を満たす必要がある。