

Sub (pre)-clinical Cushing病とsilent corticotroph adenomaの 全国調査結果

分担研究者	須田 俊 宏	弘前大学医学部第三内科
	橋本 浩 三	高知大学医学部内分泌代謝・腎臓内科
	平田 結喜緒	東京医科歯科大学体内分子制御学
	横山 徹 爾	国立保健医療科学院技術評価部
研究協力者	稲葉 洋	順天堂大学医学部衛生学
	玉腰 暁 子	名古屋大学医学部予防医学/医学推計・判断学
	崎原 哲	弘前大学医学部第三内科
	蔭山 和 則	同上
	二川原 健	同上

研究要旨: 前年度に計画された全国疫学調査が実施された。Sub (pre)-clinical Cushing病は50症例の報告のうち、除外項目の吟味により26症例を調査対象とした。男女比1:2.3と女性に多く、腫瘍はmicro/macroadenomaがほぼ同数であった。夜間の血中コルチゾールは14/15例で $2.5 \mu\text{g/dl}$ 以下に低下しなかった。CRH負荷に対し22/23例で、DDAVP負荷に対しては3/4例で、ACTHが前値から150%以上の上昇を示した。Silent corticotroph adenoma (45症例)は男女比1:2.8とやはり女性に多く、過半数(65.9%)が3 cm以上の大きな腫瘍を有していた。免疫染色ではGHや α -subunitなど複数のホルモンを産生する例(26例)がACTH単独陽性例(19例)より多数であった。今後更に解析を進め、これらの疾患概念および診断基準の確立をめざす。

A. 研究目的

平成15年度の本班会議において我々は、近年報告の見られている(1) ACTH産生下垂体腺腫を有するものの典型的なCushing病の症状を呈するには至らない状態(sub-またはpreclinical Cushing病)および(2) ACTHを合成するが分泌はしない腫瘍(silent corticotroph adenoma)の二病態について、その詳細把握と取扱いを確立するため全国疫学調査の必要性を提案した。これに沿って平成16年度には全国の医療施設に調査票が送付され、調査が行われた。本報告書ではそれらのデータと解析結果について述べる。

B. 研究方法

全国の大学病院および大規模病院に、1999年1月1日から2003年12月31日の間に調査対象(平成15年度本班会議報告書に記載)に該当した患者数を質問する趣旨の一次調査票が発送された。その他の一般病院にも、規模別に無作為に抽出された施設に同様の調査がなされた。回答のあった施設には更に二次調査票が送付され、対象患者のプロフィール、身体所見、一般検査所見、ホルモン基礎値、負荷試験データについての質問が行われ、回収された。(倫理面への配慮)

一次調査には個人情報が含まれないため、倫理面での大きな問題はないものと考えられた。

二次調査票には患者の臨床症状、検査成績等の個人情報が入り込まれるため、担当医のみがカルテ番号をリンクして個人を特定できる状態にして、個人情報の保護を図った。また本調査に参加する各施設においては倫理委員会や相当機関の承認を得ることとした。

C. 研究結果

1. 回答数 (表1)

計105症例の回答が得られた。Sub (pre)-clinical Cushing病 (以下Sub) として50症例、silent corticotroph adenoma (以下Silent) として45症例が報告された。10症例はデータの十分でない部分があり保留とされた。Subでは更に「特徴的身体所見」を有する症例、またACTHやコルチゾール基礎値の高値を呈する症例が除外され、最終的には26症例が解析の対象となった。

2. Sub (pre)-clinical Cushing病について

(1) 年齢、性 (図1)

症例は男性8名、女性18名、年齢35-80歳、平均58.8歳であった。60歳以上の女性に多い傾向が認められた。

(2) 腫瘍サイズ (図2)

1cm以下のmicroadenomaと、それ以上のmacroadenomaがほぼ同数 (12:11) であった。

(3) 血中ACTHおよびコルチゾール (図3)

血中ACTHは19-215 pg/mlに分布していた。60 pg/ml以内におさまるものは16/26例であった。血中コルチゾール朝の基礎値は9.1-23.8 μ g/dlで、21 μ g/dl以内におさまるものが23/26例であった。夜 (21-24時) の血中コルチゾールは2.3-17.6 μ g/dlであった。2.5 μ g/dlを超えるものが14/15例あった。

(4) 尿中遊離コルチゾール (UFC)、血中DHEAS (図4)

UFCは31.8-176.0 μ g/日に分布しており、100 μ g/日を超えるものが7/13例あった。血中DHEA-Sは49-4320 μ g/dlと幅広い分布を示したが、7/10例は1000 μ g/dl以下におさまった。

(5) デキサメサゾン (DEX) 抑制試験 (図5)

Overnight法でDEX 0.5 mg服用翌朝の血中コルチゾール (F) は3/5例で5 μ g/dl以下に抑制された。DEX 1 mg服用後では9/19例でFが3 μ g/dl以下、DEX 8 mg服用後では1/10例が1 μ g/dl以下となった。

(6) CRH試験 (図6)

22/23例でACTHは前値の150%以上に増加した。反応しなかった1例は腫瘍径1-2cmのmacroadenomaであった。

(7) DDAVP試験 (図7)

3/4例でACTHは前値の150%以上に増加した。反応しなかった1例は腫瘍径3cm以上のmacroadenomaであった。

3. Silent corticotroph adenomaについて

(1) 年齢、性 (図8)

症例は計45名で男性11名、女性31名、性別の記載がないものが3例あった。年齢は26-78歳まで分布しており、平均56.9歳であった。Sub同様中年以降の女性に多い傾向が認められた。

(2) 腫瘍サイズ (図9)

1cm以上のmacroadenomaが40/41症例とほとんどで、更に3cmを超えるものが27/41症例と目立った。

(3) 血中ホルモン (図9)

血中ACTHは5-107 pg/mlの間に広く分布しているが、最頻値は40-50 pg/mlの間であった。血中Fは1.6-24.2 μ g/dlの間で、最頻値は10-15 μ g/dlであった。

臨床的な先端巨大症に合併した例が3例 (microadenoma 1例、macroadenoma 2例)、高prolactin血症を伴った例が2例あった (

macroadenoma)。

(4) その他のホルモン産生 (図10)

切除標本の免疫組織化学的検討ではACTH単独陽性が19例あったが、 α -subunitにも陽性となる例が9例、GH陽性例が5例、GH+PRL陽性例が3例など、複数のホルモン産生が認められる例が計26例あり、ACTH単独陽性例を上回った。

D. 考察

Sub、Silentともに、中年以降の女性（前者では特に60歳以上の比較的高齢）に多く認められた。女性に多いことは顕性のCushing病と共通する事項であるが、年齢の分布が顕性のものより高い傾向にあった。これについては、ホルモン分泌が弱いために明らかな臨床症状が出現しにくく発見が遅れやすいことも部分的に寄与していると考えられる。Silentでmacroadenomaが多かったことについても、ホルモン過剰による臨床症状がなく腫瘍塊としてのmass effectが周囲に及んでから発見されやすいことが一因として推測される。

免疫組織化学的検討でSilentにplurihormonalな産生腫瘍が多かったことは、これらが分化度の高くない細胞集団から成っていたことを推測させる。分化度という点に更に言及すれば、Subにおいて種々の刺激試験、抑制試験に反応の不良だったものにmacroadenomaが多かったことも、腫瘍サイズが大きいものには分化度の高くないものが多いという顕性Cushing病で言われていることと共通する点があると考えられる。

Subの内分泌学的な診断の上で、CRH試験およびDEX抑制試験は重要な位置を占めるものと考えられる。顕性のCushing病においてはDEX 0.5 mg服用後の血中Fが $5 \mu\text{g/dl}$ 以上あればその疑いが持たれ、CRH試験で血中ACTHの1.5倍以上の増加、DEX 8 mg抑制試験で血中F

の1/2以下への抑制、MRIで下垂体腫瘍の証明、の三点が「確定診断的検査」と位置づけられている。また偽性Cushing病との鑑別にはDDAVP試験で血中ACTHの1.5倍以上の増加、深夜血中Fの高値 ($5 \mu\text{g/dl}$ 以上；「日内変動の消失」) が有用とされている。これらの検査がSubにも適用可能であるかどうかが目される。現在までのデータでは、SubにおいてCRH試験は前述のようにかなり感度のよい検査であることが示されている。DEX抑制試験については用いられたDEXのdoseにばらつきがあり、上述の0.5 mgおよび8 mgが採用された症例は必ずしも多くない。これらを適用することの妥当性を探るため、更に詳細な検討が必要と考えられる。また測定キット間の較差も勘案した血中F値の再検討が必要である。

E. 結論

SubおよびSilentに関する全国疫学調査の中間報告を行った。今後CRH試験やDEX抑制試験のカットオフ値、またDEXの用量を統一していくことを含めて、診断基準の検討を更に進めて行く。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Kageyama K, Hanada K, Suda T. Regulation of corticotropin-releasing factor receptor type 2beta mRNA by mitogen-activated protein kinases in aortic smooth muscle cells. Regul Pept 2005; 126: 223-31.
- (2) Suda T, Kageyama K, Sakihara S, Nigawara T. Physiological roles of urocortins, human homologues of fish urotensin I, and their receptors.

Peptides 2004; 25: 1689-701.

(3) Fukuda Y, Kageyama K, Nigawara T, Kasagi Y, Suda T. Effects of corticotropin-releasing hormone (CRH) on the synthesis and secretion of proopiomelanocortin-related peptides in the anterior pituitary: a study using CRH-deficient mice. *Neurosci Lett* 2004; 367: 201-4.

(4) Kageyama K, Takayasu S, Moriyama T, Sakihara S, Suda T. A case of pseudoaldosteronism, accompanied with hypocalcemia and exaggerated ACTH response. *Endocr J.* 2004; 51: 83-7.

2. 学会発表

(1) 須田俊宏

Pre (sub)-clinical Cushing病

第77回日本内分泌学会学術総会 クリニカルアワー

平成16年6月25日 京都市

(2) 蔭山和則

Neuroimmunomodulatorとしてのウロコルチンの作用機構

第77回日本内分泌学会学術総会 シンポジウム

平成16年6月26日 京都市

(3) 森山貴子、蔭山和則、二川原 健、花田小巻、岩崎泰正、須田俊宏

下垂体前葉細胞及びACTH産生下垂体腫瘍細胞AtT20でのCRF R1 mRNA発現調節機構の検討

第77回日本内分泌学会学術総会 平成16年6月24日 京都市

(4) 崎原 哲、須田俊宏

視床下部における11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11 β -HSD1)の発現と役割

第77回日本内分泌学会学術総会 平成16年6月24日 京都市

(5) 照井 健、蔭山和則、古川賢一、須田俊宏
ラット胸部大動脈におけるUcnとUcnII mRNAの発現

第77回日本内分泌学会学術総会 平成16年6月25日 京都市

(6) 川嶋祥子、崎原 哲、二川原 健、照井 健、須田俊宏、笹野公伸

副腎皮質腺腫の内部の一部にAIMAH様の病理所見を呈した原発性アルドステロン症の一例

第77回日本内分泌学会学術総会 平成16年6月25日 京都市

(7) 二川原 健、照井 健、向坂 彰、川嶋祥子、崎原 哲、須田俊宏

下垂体前様機能低下を伴った漏斗神経葉炎の四例

第77回日本内分泌学会学術総会 平成16年6月25日 京都市

(8) 高安 忍、岩崎泰正、吉田昌則、浅井真人、二川原 健、須田俊宏

転写因子Nurr1はAtT20 corticotroph cellにおいてサイトカインによるPOMC遺伝子転写を仲介する

第77回日本内分泌学会学術総会 平成16年6月25日 京都市

(9) 二川原 健、須田俊宏

Subclinical Cushing's disease

第31回日本神経内分泌学会 シンポジウム
平成16年10月9日 弘前市

(10) 森山貴子、蔭山和則、二川原 健、岩崎泰正、須田俊宏

ラット下垂体前葉細胞でのCRFによるCRF受容体タイプ1 mRNA down-regulationにおけるMAP kinase経路の関与とmRNA stabilityについての検討

第31回日本神経内分泌学会 平成16年10月9日 弘前市

- (11) 蔭山和則、二川原 健、花田小巻、照井 健、森山貴子、崎原 哲、須田俊宏

Urocortinによるinterleukin-6遺伝子の転写活性化作用に関する検討

第31回日本神経内分泌学会 平成16年10月9日 弘前市

- (12) 崎原 哲、須田俊宏

レプチン欠損状態の視床下部-下垂体-副腎皮質系の活性化における視床下部11β-HSD1の関与

第31回日本神経内分泌学会 平成16年10月10日 弘前市

- (13) 佐野真紀、平井裕一、奈須下 亮、川嶋詳子、須田俊宏

続発性副腎不全と思われた一例

第31回日本神経内分泌学会 平成16年10月10日 弘前市

- (14) 照井 健、川嶋詳子、須田俊宏、池田秀敏

ラトケ嚢胞を合併したACTH産生下垂体腺腫によるsubclinical Cushing diseaseの一例

第31回日本神経内分泌学会 平成16年10月10日 弘前市

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

総回答数 年齢	60症例 (男性18, 女性42) 12-80歳、平均52.4歳	
血中コルチゾール基礎値 >30 µg/dl 尿中コルチゾール >300 µg/day	6症例 3症例	除外
「特異的徴候」を 3項目以上有するもの	5症例	
2項目有するもの	4症例	図表には併記
1項目有するもの	5症例	
術後症例	4症例	
以上に該当しないものは 症例数 年齢	26 症例 (男性8, 女性18) 35-80歳、平均58.8歳	

表1 Sub (pre)-clinical Cushing症候群全国調査 回答数

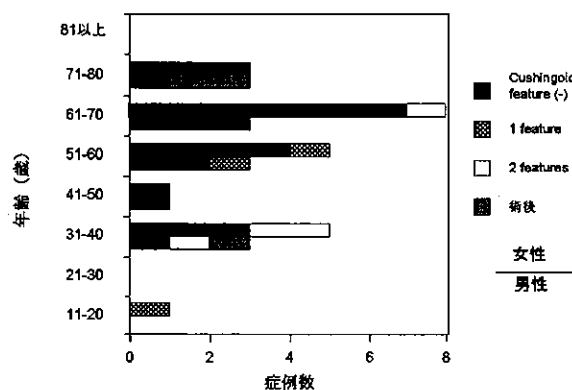


図1 Sub (pre)-clinical Cushing病 年齢・性別

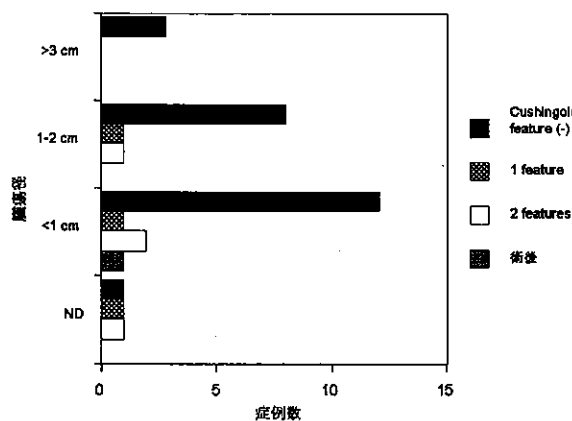


図2 MRIでの腫瘍径

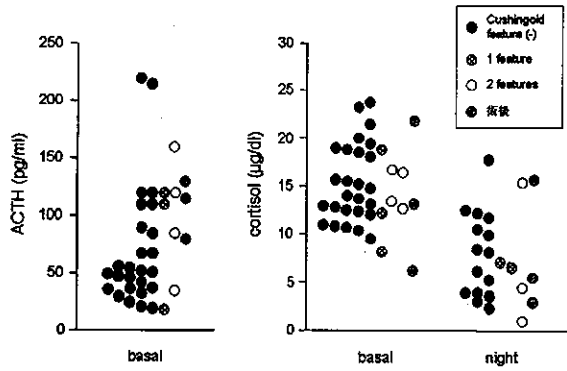


図3 Sub (pre)-clinical Cushing病 血中ACTH、コルチゾール値

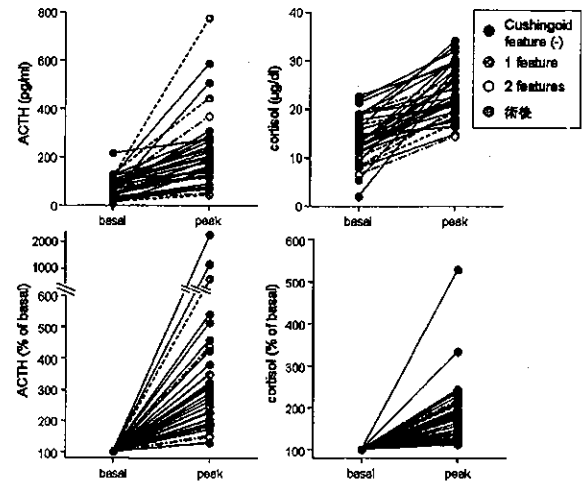


図6 Sub (pre)-clinical Cushing病 CRH試験

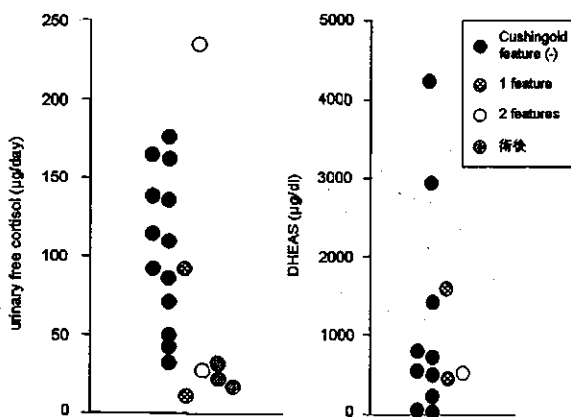


図4 Sub (pre)-clinical Cushing病 尿中遊離コルチゾール、血中DHEAS

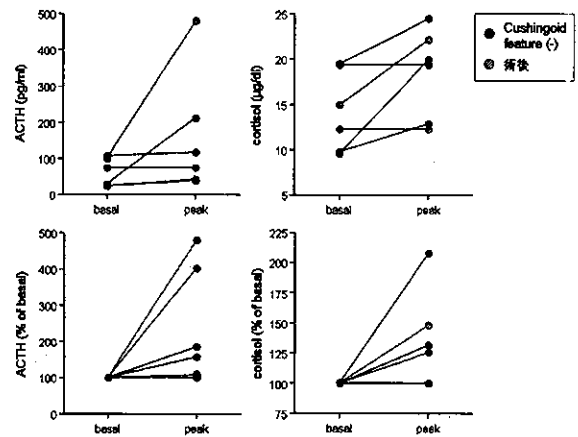


図7 Sub (pre)-clinical Cushing病 DDAVP試験

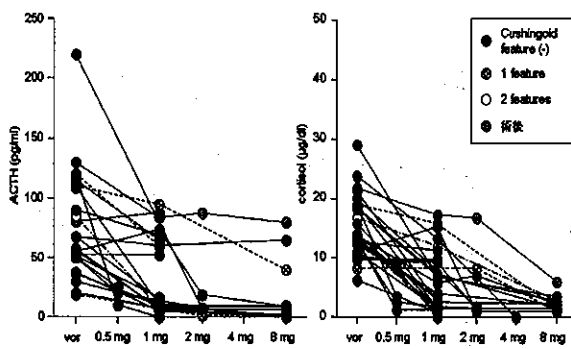


図5 Sub (pre)-clinical Cushing病 Dexamethasone抑制試験

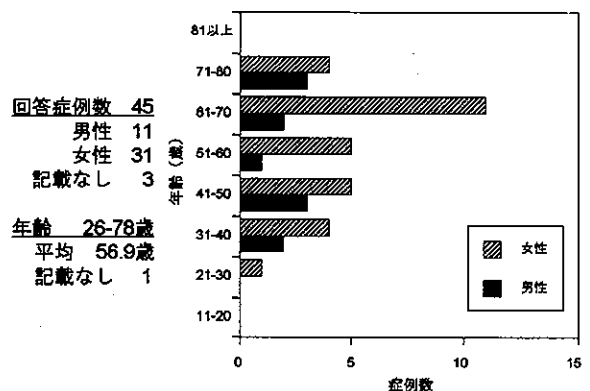


図8 Silent corticotroph adenoma全国調査 回答数、年齢、性別

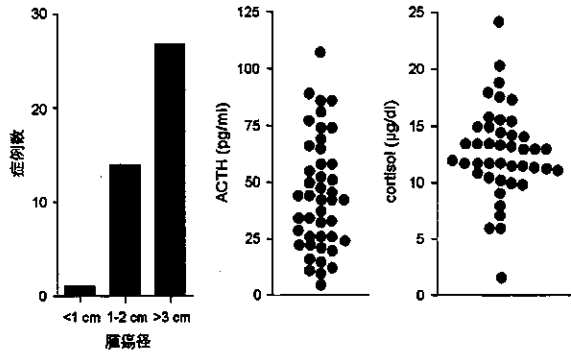


図9 Silent corticotroph adenoma 腫瘍径、血中ホルモン値

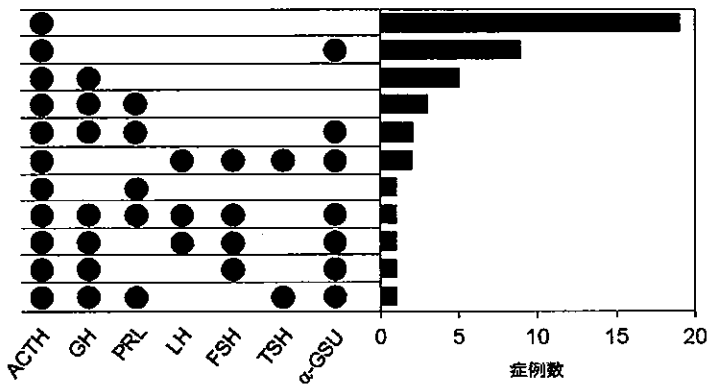


図10 Silent corticotroph adenoma 免疫組織化学

成長ホルモン（GH）分泌異常症におけるインスリン抵抗性と 血中アディポサイトカインに関する検討

分担研究者	肥塚直美	東京女子医科大学第二内科
研究協力者	福田いずみ	同
	盛田順子	同
	栗本真紀子	同
	村上祐子	同
	佐田晶	同
	大久保由美子	同
	高野加寿恵	同

研究要旨：GH分泌過剰症ではインスリン抵抗性を呈するが、一方、GH分泌不全症でもインスリン抵抗性を呈することが示されている。本研究ではこれら病態でのインスリン抵抗性を調節する因子としてのアディポネクチンとレジスチンの関与について検討した。成人GHD44例、先端巨大症49例、健常人57例を対象とし、血中アディポネクチン(A)、レジスチン(R)をELISAにて測定し、HOMA-R、BMIなどとの関連を解析した。GHD、先端巨大症のHOMA-Rは 2.5 ± 0.4 、 3.4 ± 0.6 であり両疾患ともインスリン抵抗性を認めた。血中A値は両疾患と健常人との差はなかったが、GHDで先端巨大症に比較し有意に低値であった。A値はGHDではHOMA-R、BMIと負の相関を示したが、先端巨大症ではHOMA-Rとの相関はみられず、BMIとのみ負の相関を認めた。血中R値はGHDにおいて、先端巨大症、健常人より有意に高値であったが、両疾患においてHOMA-R、BMIとの相関は認めなかった。GHDでは先端巨大症に比較し血中Aの減少とRの増加がみられ、これらアディポサイトカインがインスリン抵抗性に関与する一方、先端巨大症におけるインスリン抵抗性においては直接の関与は少ないことが示唆された。

A. 研究目的

成人GH分泌不全症（GHD）では内臓脂肪の蓄積によりインスリン抵抗性を惹起することが示唆され、一方GH分泌過剰症でもインスリン抵抗性をきたすことが知られている。本研究ではこれら病態でのインスリン抵抗性を調節する因子としてのアディポネクチンとレジスチンの関与について検討した。

B. 研究方法

健常人57例（男/女：30/27、24～77歳）、先

端巨大症49例（男/女：18/31、19～84歳）、成人GHD44例（男/女：20/24、20～76歳）を対象とし、血中アディポネクチンおよびレジスチン値をELISA法（それぞれ大塚製薬社製、BioVendor Lab, Brno, Czech Republic）にて測定し、インスリン抵抗性指数であるHOMA-RおよびBMIとの関係を検討した。

C. 研究成果

GHD、先端巨大症のBMIは各々 24 ± 3.1 （19～32）、 24 ± 3.7 （17～34） kg/m^2 であり健常人（

21±1.7, 18~24 kg/m²) に比べて高値を示したが、両疾患の間にはBMIの差は認められなかった。GHD, 先端巨大症のHOMA-Rは2.5±0.4, 3.4±0.6であり、健常人に(1.5±0.8) 比べ高値であり、両疾患ともインスリン抵抗性を認めた。

血中アディポネクチン値は成人GHD, 健常人, 先端巨大症で各々9.6, 11.4, 13.5 μg/mlであり、両疾患と健常人との間に差を認めなかったが、成人GHDでは先端巨大症に比較して有意に低値であった(P < 0.05)。血中アディポネクチン値はGHDではHOMA-R, BMIと負の相関(Rs= -0.41, P < 0.01; Rs= -0.64, P < 0.01)を示したが、先端巨大症ではHOMA-Rとの相関はみられず、BMIとのみ負の相関を認めた(Rs= -0.37, P < 0.05)。

血中レジスチン値は成人GHD, 健常人, 先端巨大症で各々6.5, 4.3, 3.7ng/mlであり、先端巨大症と健常人との間に差はなかったが、GHDでは両者に比較して有意に高値であった(P < 0.05)。GHDおよび先端巨大症において血中レジスチン値はHOMA-R, BMIとは相関を認めなかった。

インスリン抵抗性においては直接の関与は少ないことが示唆された。

F. 結論

成人GHDでは先端巨大症に比較し血中アディポネクチンの減少とレジスチンの増加がみられ、これらアディポサイトカインがインスリン抵抗性に関与することが示唆された。一方、先端巨大症におけるインスリン抵抗性においてはこれらのアディポサイトカインの直接の関与は少ないことが示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Fukuda I, Hizuka N, Ishikawa Y, Itoh E, Yasumoto K, Murakami Y, Sata A, Tsukada J, Kurimoto M, Okubo Y, Takano K: Serum adiponectin levels in adult growth hormone deficiency and acromegaly. Growth Horm IGF Res.14: 449-454, 2004.

2) 福田いずみ, 肥塚直美, 塚田順子, 栗本真紀子, 村上祐子, 小野昌美, 三木伸泰, 高野加寿恵: 過去5年間に当科で診療した先端巨大症82例における治療成績と合併症。日本内分泌学会誌 80 (Suppl): 82-83, 2004

3) 立木美香, 塚田順子, 齋藤洋, 福田いずみ, 肥塚直美, 川俣貴一, 久保長生, 掘智勝, 高野加寿恵: ブドウ糖負荷でGHが1 ng/ml以下に抑制されたIGF-I高値の先端巨大症の一例。日本内分泌学会誌 80 (Suppl): 116-117, 2004

2. 学会発表

1) 福田いずみ, 肥塚直美, 石川夕記子, 塚田順子, 栗本真紀子, 村上祐子, 佐田晶, 大久保由美子, 安本久美子, 高野加寿恵: 成長ホルモン(GH)分泌異常症におけるインスリン抵抗性と血中アディポネクチン値。第77回日本内分泌学会総会, 2004.

2) Sata A, Hizuka N, Ishikawa Y, Fukuda I, Murakami Y, Kurimoto M, Tsukada J, Yasumoto, K, Okubo Y, Takano K: Serum Resistin levels are unlikely to contribute to the insulin resistance in acromegaly. 86th Annual Meeting of the Endocrine Society, New Orleans, June, 2004.

3) Ishikawa Y, Hizuka N, Sata A, Fukuda I, Murakami Y, Kurimoto M, Tsukada J, Yasumoto, K, Okubo Y, Takano K: Serum resistin levels in patients with adult growth hormone deficiency. 12th International Congress of Endocrinology, Lisbon, 2004.

Silent corticotroph adenomaに関する内分泌学的検討

分担研究者 平田 結喜緒 東京医科歯科大学大学院分子内分泌内科学
(内分泌・代謝内科)

泉山 肇 東京医科歯科大学大学院分子内分泌内科学
(内分泌・代謝内科)

研究要旨: 35例のマクロアデノーマを呈した非機能性下垂体腫瘍を対象に、ACTHの免疫組織化学法によりsilent corticotroph adenoma (SCA)を検索した結果、高頻度にみられ(23%)、また内分泌学的検討から軽度のACTH・コルチゾール分泌異常がみられた。SCAで臨床症状が欠如する機序の一部に腫瘍でのACTHのプロセッシングに関わるproconvertase1/3の発現低下が関与するために、活性の弱い大分子ACTHが分泌されている可能性が示唆される。

A【研究目的】

Silent corticotroph adenoma(SCA)の成因ならびに病態生理は不明である。そこで非機能性下垂体腫瘍(NFT)におけるSCAの頻度ならびにその内分泌学的特徴を検討した。

B【研究方法】

頭部MRIにてマクロアデノーマを指摘されたNFT35例(男性 19、女性16)を対象とした。経蝶形骨洞手術で得た腫瘍組織のACTH免疫染色を行い、その陽性例に対しPOMC前駆体のプロセッシング酵素である prohormone convertase(PC)1/3の発現の有無と血中ACTHの存在様式を検討した。また、術前・後の内分泌学検査成績を検討した。更に最近のNFT9例については日内リズム、デキサメサゾン(DEX)少量(0.5mg)抑制試験(DEX)およびrapid ACTH試験を実施した。

C【研究結果】

35例中8例(男性2、女性6)がSCAで、すべてPC1/3様免疫活性は陰性であった。8例ともCushing徴候は欠如し、術前のACTH・コルチ

ゾールの基礎値は正常で、CRH刺激試験によるACTHは4例で過剰反応を示し、うち2例で術後過剰反応が消失した。一部のSCA患者血漿中のACTH様免疫活性はACTH(1-39)の溶出部位以外に大分子分画にも出現した。Prospectiveに解析できたNFT9例中の3例でSCAと診断した。この3例のSCAではACTH・コルチゾールの日内リズムはあるものの夜間時は軽度高値であった。またDEX(0.5mg)に対するACTH・コルチゾールの抑制は部分的に抵抗性を示した。しかし、副腎の反応性は正常であった。

D【考察】

従来、NFTは嫌色性腺腫でホルモン非分泌性と考えられてきた。しかし今回我々の研究からマクロアデノーマを指摘されたNFTで腫瘍組織中に免疫組織学的にACTHの存在を証明できたSCAの頻度は比較的多い(23%)ことが明らかとなった。SCAは臨床的にはCushing徴候を欠如しており、またACTH・コルチゾールの基礎分泌は正常であった。しかし今回の詳細な内分泌検査の結果、CRH刺激に対するACTHの反応亢進例が多かった(50%)。更にSCAでは

ACTH・コルチゾールの日内リズムは正常であるが、夜間時は軽度上昇していること、また少量(0.5mg)DEX刺激試験ではACTH・コルチゾールの抑制は部分的に抵抗性を示すことが明らかとなった。すなわちSCAでは軽度ではあるものの、視床下部・下垂体・副腎系の異常が存在するものといえる。

それでは何故SCAではCushing病のように典型的なCushing徴候が出現しないのであろうか。その機序として1)腫瘍組織でのACTH産生細胞数が少ないためACTH分泌亢進をきたし難い、2)腫瘍細胞でACTHが産生されていてもACTHの分泌過程に障害がある、3)腫瘍細胞でプロセシング障害があるためにACTH(1-39)が生成され難い、などが推定される。本研究の免疫組織化学的検索でSCAの腫瘍組織中にPOMCのプロセシングに関わるPC1/3の発現がみられないこと、及び一部SCAの血中ACTHのゲルろ過の成績でACTH(1-39)以外に大分子ACTHの存在が確認された。すなわちSCAの腫瘍ではPC1/3の発現低下のためにACTHへのプロセシングが障害される結果、活性の低い大分子ACTHが分泌されている可能性が示唆される。

E 【結論】

従来、NFTと考えられてきた下垂体腫瘍の中にSCAが比較的多く、また詳細な内分泌検査によって軽度のACTH・コルチゾールの分泌異常が存在することを明らかにした。SCAでは臨床的にCushing徴候を欠如する機序の一部に腫瘍でのACTHのプロセシング異常のために生物活性の低い大分子ACTHが分泌されている可能性が示唆された。

F 【健康危険情報】

なし

G 【研究発表】

1. 論文発表

1. Nishimori T., Inoue H., Hirata Y.: Involvement of the 3'-untranslated region of cyclooxygenase-2 gene in its post-transcriptional regulation through the glucocorticoid receptor. *Life Sci.* 74: 2505-2513,2004
2. Ozawa N., Shichiri M., Iwashina M., Fukai F., Yoshimoto Y., Hirata Y.: Laminar shear stress up-regulates inducible nitric oxide synthase in the endothelium. *Hypertens. Res.* 27: 93-99,2004
3. Yoshimoto T., Fukai N., Sato R., Sugiyama T., Ozawa N., Shichiri M., Hirata Y.: Anti-oxidant effect of adrenomedullin on angiotensin II-induced ROS generation in vascular smooth muscle cells. *Endocrinology* 45: 3331-3337,2004
4. Yoshimoto T., Matsushita M., Hirata Y.: Role of urotensin II in peripheral tissue as an autocrine/paracrine growth factor. *Peptides* 25: 1775-1781,2004
5. Ozawa N., Shichiri M., Fukai N., Yoshimoto T., Hirata Y.: Regulation of adrenomedullin gene transcription and degradation by the c-myc gene. *Endocrinology* 145: 4244-4250,2004
6. Sato R., Tsujino M., Nishida K., Otani Y., Minami T., Shichiri M., Hizuka N., Aiba M., Hirata Y.: High molecular weight form insulin-like growth factor II-producing mesenteric sarcoma causing hypoglycemia. *Intern.Med.* 43: 967-971, 2004
7. Sugiyama T., Yoshimoto T., Sato R., Fukai N., Ozawa N., Shichiri M., Hirata Y.: Endothelin-1 induces cyclooxygenase-2 expression and generation of reactive oxygen species in endothelial cell. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 43: S332-S335,2004

2. 学会発表

1. 第13回日本間脳下垂体腫瘍学会(2003.2)
Silent Corticotroph Adenomaに関する病理学

的ならびに内分泌学的解析

2. 第14回CRH・ACTH研究会(2003.3)

Silent corticotroph adenoma(SCA)の一例

3. 第102回日本内科学会講演会(2005.4発表予定)

Silent corticotroph adenoma(SCA)に関する内分泌・病理学的研究

4. 第78回日本内分泌学会学術総会(2005.7発表予定)

Subclinical Cushing病と考えられる2例：

Silent corticotroph adenoma(SCA)との異同

H【知的財産権の出願・登録状況】

なし

健常女児および低身長女児の思春期の成長

分担研究者 田中敏章 国立成育医療センター臨床検査部
研究協力者 今井敏子 東洋英和女学院小学部
堀川玲子 国立成育医療センター内分泌代謝科
内木康博 国立成育医療センター内分泌代謝科
勝又規行 国立成育医療センター研究所

研究要旨：いままで我が国には、健常女子の二次性徴の開始と思春期の成長を検討した多数例の報告はなかった。今回、それらのデータが得られたので、低身長女児の思春期の伸びと比較検討した。対象は、東京の私立女子校生で毎年身長・体重を測定し経過観察できた133名を対象とした。低身長女子は、国立小児病院・国立成育医療センター内分泌代謝科にて無治療で経過観察した28名。

健常女子の成人身長の平均は、 $159.3 \pm 5.5 \text{cm}$ ($0.28 \pm 1.14 \text{SD}$)と全国平均よりやや高かった。思春期開始から成人身長までの伸びは、 $20.8 \pm 4.7 \text{cm}$ であった。低身長女子の成人身長の平均は、 $146.1 \pm 4.4 \text{cm}$ ($-2.36 \pm 0.87 \text{SD}$)で、思春期の伸びは、 $17.9 \pm 4.0 \text{cm}$ であった。低身長女児の成人身長の正常化には、思春期開始時の身長が重要であった。

A. 研究目的

成人身長のうちで思春期の成長は約15%を占め、成人身長を予測するためには成長を思春期のとの関連で理解する必要がある。いままで我が国には、健常女子の二次性徴の開始と思春期の成長を検討した多数例の報告はなかった。今回、それらのデータが得られたので、思春期開始時に関与する臨床因子、思春期の伸びに関与する臨床因子につき解析し、また低身長女児の思春期の成長と比較検討した。

B. 研究方法

健常女児の対象は、東京の私立の女子校生で1977年4月から1979年3月までに生まれた小学校1年（6歳時）から高校3年（17歳時）まで経過観察できた133名を対象とした。4月の健診の時に身長・体重を測定し、小学校の健診はTanner段階判定の訓練を受けた同一の1名の養護教諭が、胸囲測定時に乳房の

Tanner段階をチェックした。Tanner 2度を思春期開始年齢とし、Tanner 1度が次の年にTanner 3度になったときは、中間の年齢を思春期開始年齢とした。種々の臨床因子のグループ別比較は、+1SDを越える群、±1SD以内、-1SDを下回る群の3群に分けて検討した。ピーク成長率（PHV：peak height velocity）年齢および身長を、成長率の一番高い学年、および前後の学年の成長率より比例配分により算出した。

低身長女児は、6歳時に-2SD以下の低身長があり、国立小児病院／国立成育医療センター内分泌代謝科で成人身長に達するまで経過観察された女児28名。内訳は特発性低身長13名、家族性低身長11名、胎内発育不全性低身長4名であった。

身長SDSの計算は、1990年度の標準値を用い、肥満度は村田らの方法を用いた。相関は、Pearsonの相関係数を用い、3群の比較には分散分析（one-way factorial ANOVA）および

Games-Howellの検定を用い、 $p < 0.05$ を有意とした。

蓄積データの解析に当たっては、責任者の了解を得、学年・組・番号および生年月日のみをコンピュータに入力し、プライバシーには十分配慮した。

C. 研究結果

1) 健常女児の思春期の成長

各学年毎の平均身長および ± 1 SDを、標準身長曲線の上にプロットした(図1)。6歳時の身長SDスコアの平均は -0.06 SDだが、17歳時は $+0.28$ SDと、標準身長よりやや大きい集団であった。

各個人の年間の成長率を算出し、最大成長率の年をピーク成長率年齢に合わせて、平均 ± 1 SD, 2 SDを図2に示した。PHV年齢は11.11歳、PHVは 8.23 ± 1.07 cm/年であった。

思春期開始時の臨床因子を表1に示した。

6歳時身長SDSで3群に分けたときのグループの、それぞれの平均身長と ± 1 SDを、標準身長曲線の上にプロットした(図3)。平均身長はほぼ並行に推移しており、標準偏差が大きくなるにつれて大きくなって17歳時で少し重なっているが、基本的には6歳時に身長が高い人は17歳時も高く、低い人は17歳時も低くなる傾向が顕著であった。これら3群の思春期開始年齢は、高い方からそれぞれ10.1歳、10.5歳、10.9歳と身長が高い方が、思春期開始が早い傾向にあった。

6歳から17歳までの身長SDSの変化と関連する臨床因子を検討した。6歳から17歳までの身長SDSの変化は、思春期開始時年齢($r=0.356, p<0.0001$)、身長($r=0.226, p<0.01$)と有意な正の相関が認められ、6歳時のBMI($r=-0.222, p<0.05$)、思春期開始時のBMI($r=-0.241, p<0.05$)と有意な負の相関が認めら

れた。

思春期開始別年齢で3群に分けたときのグループの、それぞれの平均身長を、標準曲線の上にプロットした(図4)。思春期開始年齢の平均は、早期思春期開始群(< -1 SD)、標準思春期開始群(± 1 SD以内)、遅発思春期開始群($> +1$ SD)それぞれ、 9.29 ± 0.28 歳、 10.45 ± 0.47 歳、 11.84 ± 0.37 歳であった。それぞれの群の成人身長の平均は、 159.2 cm、 159.2 cm、 159.1 cmと差がなかった。

思春期の伸び(思春期開始時より成人身長までの伸び)を、思春期開始時年齢に対してプロットした。思春期の伸びは、思春期開始時年齢にたいして有意な負の相関を示した(図5)($r=-0.685, p<0.0001$)。思春期の伸びの平均は、 20.8 ± 4.7 cmで、早期思春期開始群、標準思春期開始群、遅発思春期開始群に分けたときそれぞれ、 24.8 ± 3.0 cm、 21.3 ± 3.5 cm、 15.0 ± 5.5 cmであった。

6歳時から成人身長までの身長SDSの変化は、この集団が成人身長が1990年の17歳の身長より高いこともあって、 $+0.44$ SDと改善しており、図5に示すように思春期開始時の年齢と有意な負の相関を示した(図6)($r=0.356, p<0.0001$)。早期思春期開始群、標準思春期開始群、遅発思春期開始群の身長SDSの変化はそれぞれ、 -0.11 ± 0.58 SD、 0.50 ± 0.53 SD、 0.67 ± 0.69 SDで、早期思春期開始群が、他の2群よりも有意に小さかった。

6歳時の身長SDSが ± 0.5 SD以内の26名を抽出して、思春期開始年齢に対し思春期開始時身長、思春期の伸び、成人身長をプロットした(図7)。それぞれ思春期開始時年齢に対して強い有意な相関が認められ、思春期開始時身長は正の相関、思春期の伸びは負の相関であるが、思春期開始時身長の正の傾きが思春期の伸びの負の傾きより大きく、それらの

和である成人身長は正の傾きの相関となっている。

2) 低身長女兒と健常女兒の比較

健常女兒と低身長女兒の6歳時、思春期開始時および成人身長到達時の臨床因子の比較を、表2に示した。当然のことながら、低身長女兒は6歳時の身長、身長SDS、体重が有意に低く、BMIも有意に小さかった。思春期開始時は、低身長女兒は開始時年齢が健常女兒と比較して有意に遅いにもかかわらず、思春期開始時身長、身長SDS、体重およびBMIが有意に低かった。低身長女兒は成人身長も有意に低く終わったが、6歳時から成人身長到達時までの身長SDSの変化は有意差がなかった。低身長女兒のほうが有意に少なかったが、健常女兒の思春期開始時が遅いグループと比較すると、思春期開始時年齢には差がなく（低身長 N=28, 11.6±1.0歳：健常女兒思春期遅発群 N=22, 11.8±0.4歳）、思春期の伸びは有意に大きかった（ $p<0.05$, 17.9±3.7 cm vs 15.0±5.5 cm）。

成人身長と6歳時、思春期開始時の臨床因子との相関を検討すると、健常女兒では6歳時の身長SDS ($r=0.834$, $p<0.0001$) が、低身長女兒では思春期開始時の身長 ($r=0.728$, $p<0.0001$) が一番強い相関を示した。

3) 低身長女兒で成人身長が正常化した群と低身長に終わった群の比較

低身長女兒で、成人身長が-2SDを上回った9名と-2SD以下に終わった19名の臨床因子を表3に示した。6歳時の臨床因子には有意差がないが、成人身長が低身長に終わった群では、思春期開始時年齢が有意に若く、身長は有意に低かった。思春期の伸びは有意差がないため、思春期開始時の身長差がそのまま成人身長の差になっていた。身長SDSの変化も、成人身長が正常化した群の方が有意に

大きかった。

D. 考案

今回の健常女兒は、17歳時身長が1990年の標準女兒よりやや高いグループであったが、ピーク成長率の年齢と成長率は、1992年のSuwa¹⁾の縦断的な成長率の女子の平均11歳、8.3cmと非常に近い値を示しており、思春期の成熟としては、標準的な群と考えられる。

6歳時の身長SDSグループ別の平均身長は、ほぼ平行に17歳にまで達しており、6歳時の身長の程度は多くは成人の身長に移行することが示された。6歳時に-2SD以下だった健常女兒4名のうち、17歳時に正常化（-2SD以上）したのは1名だけだった。健常小児では、低身長小児も約60%が思春期遅発傾向を示して成人身長は正常化すると報告されているが²⁾、本研究の低身長健常女兒は思春期開始年齢が遅発のグループにはいなかったのが1名だけでその症例が成人身長が正常化し、他の3例は標準思春期開始群にはいるが、思春期開始身長が123.3~126.0cmと低かった。

身長SDSの改善のためには、思春期開始時年齢、思春期開始時身長が重要であることが、今回の解析で明らかになった。このことは、±0.5SD以内の健常女兒だけで思春期開始身長、思春期の伸び、成人身長をプロットしてみるとより明らかになる。思春期の伸びは思春期開始年齢に対して負の相関があり、思春期が遅くなればなるほど小さくなるが、思春期が遅くなることによって伸びる身長の方の傾きが思春期の伸びの傾きよりも大きいため、その和である成人身長は思春期開始年齢に対して正の相関を示し、思春期が遅いほうが成人身長が高くなる。この傾向は、低身長児、高身長児にもあてはまり³⁾、思春期が1年遅くなることにより、成人身長が1.5cm高くなる。

思春期の伸びは、思春期開始年齢と強く相関することにより、思春期の開始時で成人身長予測が可能である。しかし、より正確には骨年齢を検討することが必要で、骨年齢を用いたGrowth Potential法が、成長障害の臨床においては用いられている⁴⁾。

低身長女兒は、約3分の1しか成人身長が正常化せず、その大きな要因は思春期開始時身長が低いことが考えられる。これはすでに病院で経過観察されているデータでは⁵⁾、低身長主訴に病院を訪れるという選択がかかっていて家族性低身長や胎内発育不全性低身長の割合が多いとされているが、本研究においても、家族性低身長と胎内発育不全性低身長が15名含まれており、うち家族性低身長が11名中10名、胎内発育不全性低身長の4名中2名が成人身長が低身長に終わっている。特に家族性低身長は、特発性低身長に比べて、思春期開始時身長が有意に低かった(125.0±4.2cm vs 130.2±5.3cm, p<0.05)。

健常小児においては、6歳時の身長SDSが、低身長女兒では思春期開始時の身長が、成人身長に一番大きな影響を与えることがあきらかになった。

E. 結論

健常女兒の思春期の開始年齢の平均は10.5歳で、その時の平均身長は138.5cmであった。思春期開始から17歳までに平均20.8cmのび、平均身長159.3cmに達する。成人身長に一番影響を与える因子は、6歳時の身長SDSであった。

低身長女兒は健常小児より思春期の開始年齢は遅いがその時の平均身長は約7~8cm低く、思春期の伸びも健常小児より少ないため平均身長は146.1cm (-2.37SD)であった。低身長女兒では、成人身長に一番影響を与える因子は、思春期開始時の身長であった。

文献

- 1) Suwa S, Tachibana K, Maesaka M, et al. Longitudinal Standards for Height and Height Velocity for Japanese Children from Birth to Maturity. Clin Pediatr Endocrinol 1992;1:5-13.
- 2) 小松和男、岡村敏弘、高田五郎、宮下正弘、大野忠、田中敏章. 前思春期低身長児または最終身長低身長者の縦断的成長の解析. 第1編 秋田県健常小児における検討. 日本小児科学会雑誌 101:610-616,1997
- 3) Tanaka T. Puberty and growth in children. Growth Hormone Therapy in KIGS-10 Years' Experience. (eds. Ranke MB, Wilton P) Verlag, Heiderberg, pp81-92,1999
- 4) 佐藤真理、田中敏章、田苗綾子、日比逸郎. Growth potential 法による低身長小児における最終身長予測. 日本小児科学会雑誌 102:1271-1276,1998
- 5) 田中敏章、佐藤真理、石川美香、他. 前思春期低身長児または最終身長低身長者の縦断的解析 第2編 病院における経過観察の検討. 日本小児科学会雑誌 101:617-623,1997

表1. 思春期開始時の臨床指標

年齢(歳)	10.5 ± 0.84
身長(cm)	138.5 ± 6.6
身長SDS(SD)	-0.13 ± 1.00
体重(kg)	31.8 ± 4.8
BMI	16.5 ± 1.7

表 2. 健常女児と低身長女児の臨床因子の比較

	健常女児	低身長女児	有意差
6歳時			
身長 (cm)	115.3 ± 4.8	102.1 ± 2.3	p<0.0001
身長SD (SD)	-0.16 ± 0.97	-2.63 ± 0.42	p<0.0001
体重 (kg)	20.9 ± 2.7	15.2 ± 1.5	p<0.0001
BMI	16.0 ± 1.3	14.5 ± 1.2	p<0.0001
思春期開始時			
年齢 (歳)	10.5 ± 0.84	11.6 ± 1.0	p<0.0001
身長 (cm)	138.5 ± 6.6	128.1 ± 5.3	p<0.0001
身長SD (SD)	-0.13 ± 1.00	-2.85 ± 0.73	p<0.0001
体重 (kg)	31.8 ± 4.8	25.9 ± 4.1	p<0.0001
BMI	16.5 ± 1.7	15.7 ± 1.7	p<0.05
成人身長到達時			
身長 (cm)	159.3 ± 5.5	146.1 ± 4.4	p<0.0001
身長SD (SD)	0.28 ± 1.10	-2.37 ± 0.87	p<0.0001
身長SDSの変化 (SD)	0.43 ± 0.61	0.26 ± 0.78	NS
思春期の伸び (cm)	20.8 ± 4.7	17.9 ± 4.0	p<0.005

図 2. 健常女児の標準成長率曲線

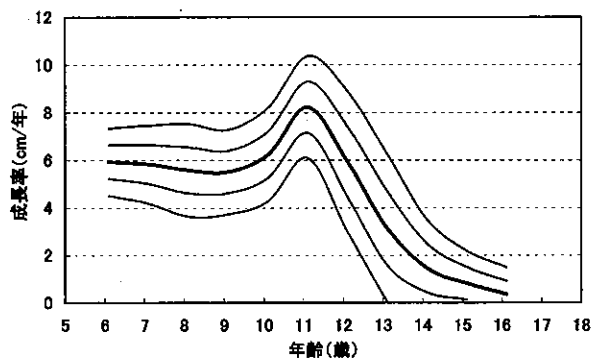


表 3. 低身長時のうち成人身長が正常化した群と低身長に終わった群の比較

	成人身長>2SD (9)	成人身長<2SD (19)	有意差
6歳時			
身長 (cm)	103.1 ± 1.2	101.6 ± 2.5	NS
身長SD (SD)	-2.42 ± 0.31	-2.73 ± 0.44	NS
体重 (kg)	15.5 ± 0.8	15 ± 1.7	NS
BMI	14.6 ± 0.9	14.5 ± 1.4	NS
思春期開始時			
年齢 (歳)	12.4 ± 0.7	11.2 ± 0.9	p<0.005
身長 (cm)	133.4 ± 2.7	125.7 ± 4.4	p<0.0001
身長SD (SD)	-2.89 ± 0.67	-2.83 ± 0.77	NS
体重 (kg)	28.6 ± 3.6	24.6 ± 3.7	p<0.05
BMI	16.0 ± 1.6	15.5 ± 0.4	NS
成人身長到達時			
身長 (cm)	151.5 ± 2.6	143.5 ± 2.0	p<0.0001
身長SD (SD)	-1.29 ± 0.51	-2.88 ± 0.41	p<0.0001
身長SDSの変化 (SD)	1.13 ± 0.63	-0.15 ± 0.42	p<0.0001
思春期の伸び (cm)	18.1 ± 2.4	17.8 ± 4.2	NS

図 3. 6歳時身長SDS別グループの17歳までの平均身長(±SD)

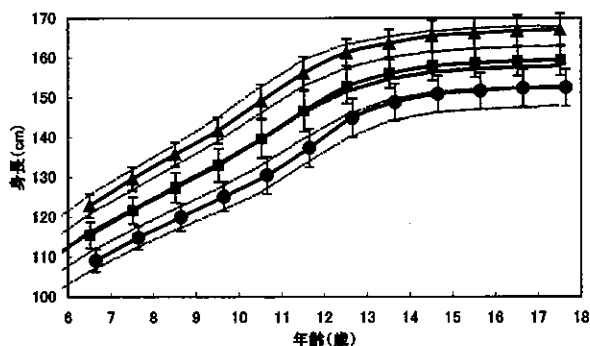


図 1. 健常女児の身長(平均±1SD)

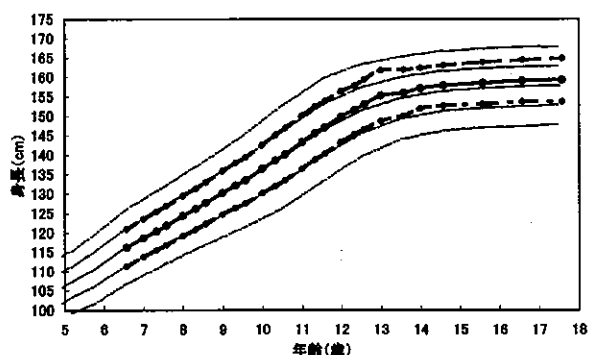


図 4. 思春期開始年齢別グループの平均身長

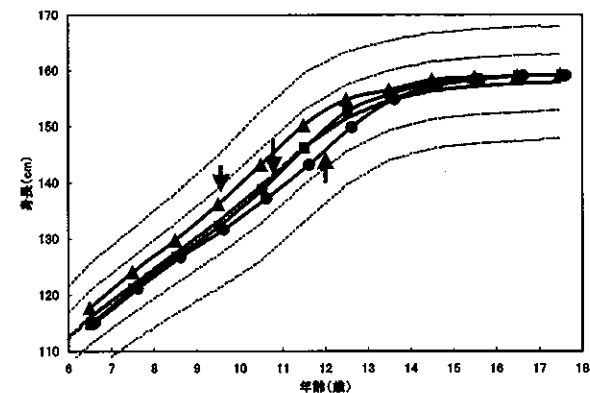


図5. 健常女児の思春期の伸び

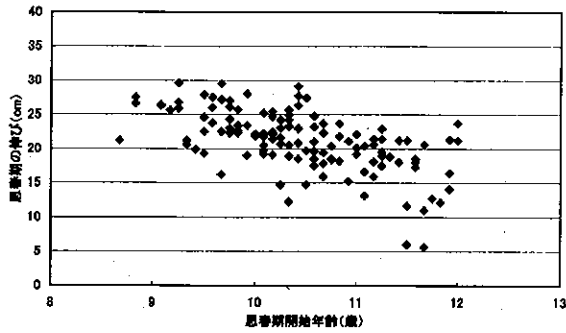


図6. 健常女児の6歳から17歳までの身長SDSの変化

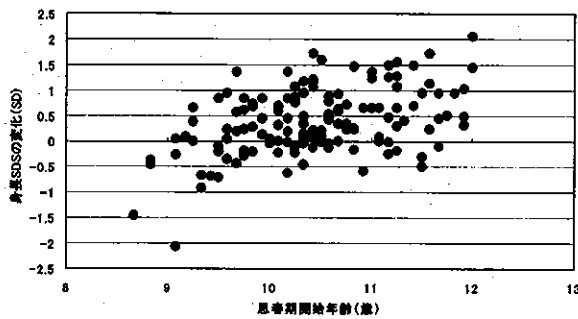
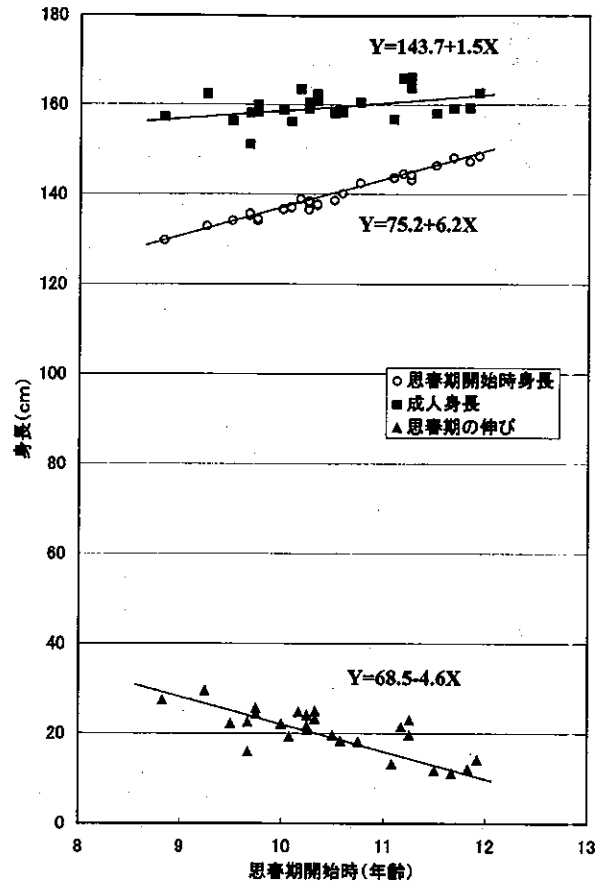


図7. 6歳時身長SDSが±0.5SD以内の健常女児の思春期開始時身長、思春期の伸びおよび成人身長



F. 研究発表

1. 論文発表

田中敏章. 女児の思春期早発症の診断における年齢基準. 日本生殖内分泌学会雑誌 8:67-69,2003

田中敏章. 日本人女児の思春期の成熟と成長. AUXOLOGY 10:7-9,2004

田中敏章、今井敏子. 乳房発育の年齢標準値—思春期早発症の診断基準のために— 小児保健研究 (印刷中)

Tanaka T, Niimi H, Matsuo N, Fujieda K, Tachibana K, Ohya K, Satoh M, Kugu K. Results of Long-Term Follow-Up after Treatment of Central Precocious Puberty with Leuporelin Acetate: Evaluation of Effectiveness of Treatment

and Recovery of Gonadal Function. The TAP-144-SR Japanese Study Group on Central Precocious Puberty. *J Clin Endocrinol Metab* (in press)

2. 学会発表

田中敏章、新美仁男、松尾宣武、藤枝憲二、立花克彦、大山建司. 中枢性思春期早発症に対するLHRHアナログ終了後の最終身長と性腺機能の回復. 第107回日本小児科学会学術集会, 4月9日~11日、岡山、2004

Tanaka T, Niimi H, Matsuo N, Fujieda K, Tachibana K, Ohyama K, Satoh M, Kugu K. Results of Long-Term Follow-Up after Central Precocious Puberty Treatment with Leuprorelin Acetate. The Endocrine Society's 86th Annual Meeting, June 16-19, New Orleans, 2004

田中敏章. 日本における中枢性思春期早発症の治療成績—成人身長と性腺機能の回復— 第18回小児成長障害研究会、10月30日、東京、2004

田中敏章、今井敏子. 健常女児の思春期の成長. 第15回AUXOLOGY(成長学)研究会、11月20日、仙台、2004

田中敏章、新美仁男、松尾宣武、藤枝憲二、立花克彦、大山建司、佐藤真理、久具宏司. 中枢性思春期早発症に対するLHRHアナログ終了後の性腺機能の回復. 第9回日本生殖内分泌学会、11月27日、大阪、2004

Prop-1 Tg マウスにおける下垂体腫瘍の解析と ヒト下垂体腺腫におけるProp-1の発現について

分担研究者 長村 義之 東海大学医学部教授

研究要旨: 本研究では、下垂体の初期分化に関わる転写因子であるProp-1の、ヒト下垂体腺腫における発現解析、およびProp-1 Tg マウスの下垂体の解析を行うことで、下垂体腺腫の発生・分化におけるProp-1の関与について考察した。ヒト下垂体腺腫では、ほとんどの症例においてProp-1 mRNAの発現は認められない、あるいは極めて低いレベルであった。しかし、一部のPRL産生性腺腫において著しく高くなっていた。一方、Prop-1 Tg マウスでは、1年以上飼育した雌動物の下垂体において、中・後葉に浸潤する結節性のPRLomaの形成が観察された。これらの結果より、Prop-1の異常発現は一部のPRLomaの形成・分化の一因であると考えられる。

A. 研究目的

Prop-1は、下垂体前葉ホルモン産生細胞の初期分化に関与する転写因子である。げっ歯類では、Prop-1は胎生期に一過性に発現し、出生後の発現は認められない。ヒトにおいても、胎生期に一時的に発現レベルが上昇するが、成人下垂体においてもProp-1 mRNAが検出されると言う報告もある。近年、FSH遺伝子の上流領域にProp-1 binding siteが存在していることが明らかとなったが、出生後のProp-1の役割に関して十分には解明されていない。

Prop-1は、下垂体前葉ホルモン産生細胞の分化初期において、GH産生細胞、PRL産生細胞、TSH産生細胞、およびLH/FSH産生細胞に共通の前駆細胞の分化を促す。更に、この前駆細胞は、Pit-1、GATA-2、SF-1などの転写因子の働きにより、それぞれのホルモン産生細胞へ分化する。

これまでの、我々のヒト下垂体腺腫における研究により、Prop-1 mRNAの発現は、ACTH産生腺腫 (ACTHoma)、GH産生腺腫 (GHoma)、PRL産生腺腫 (PRLoma) において高頻度に検出され、一方、ほとんどの非機能

性腺腫 (NFoma) およびTSH産生腺腫 (TSHoma) では検出されないことが明らかとなった。なかでも、下垂体の発生・分化過程におけるProp-1の働きを考えた場合、ACTHomaにおける結果は興味深いところである。

そこで、本研究では、ヒト下垂体腺腫におけるProp-1 mRNAの発現をより詳細に定量的に解析し、さらに、Prop-1 Tg mouseの解析を行うことによって、下垂体腺腫形成におけるProp-1の関与を考察した。

B. 研究方法

ヒト下垂体腺腫71症例 (GHoma22症例、PRLoma6例、ACTHoma3例、TSHoma1例、非機能性腺腫39例) について、Prop-1 mRNAの発現をリアルタイムRT-PCR法により、定量的に解析した。また、試料の一部を免疫組織化学に供した。これらの下垂体腺腫試料は、日本医科大学脳外科、寺本明教授との共同研究により採取、保存されたものである。また、これらの試料を実験に供する際には学内の倫理委員会に報告し、倫理面、および個人情報の取り扱いに十分に配慮して行った。