

vectorのルシフェラーゼ(Luc)遺伝子上流に組込んだプラスミドを作製した²⁾。これらのプラスミドをAQP-2遺伝子とともにInvitrogen社のLipofectamineを用いてIMCD₃細胞にトランスフェクションした。トランスフェクション後に低浸透圧培地(225mOsm/kg)に変更して48時間孵置した後、Luc活性を測定した。低浸透圧の培養液はNaCl無添加のDMEM(NaCl free)にNaClを添加し、225mOsm/kgとした。Luc活性測定前24時間の時点で5 μ M dibutyryl cyclic AMP(DBcAMP)を添加して、Luc活性を測定した。また一部の実験ではDBcAMP添加1時間前に1 μ M SB203580・1 μ M U0126・1 μ M SP600125にて前処置を行い、DBcAMP添加後のLuc活性を測定した。また、低浸透圧培地にUreaを添加した300mOsmの等張培地を作製して、48時間孵置した後にDBcAMP添加後のLuc活性を測定した。

C. 研究結果

- ①-6.1AQP2もしくは-1.1AQP2単独を発現させたIMCD₃細胞においては、低浸透圧培地孵置下でのLuc活性自体が1.7倍もしくは1.5倍と、対照群(300mOsm/kg)と比較して有意に増加していた(図1)。
- ②-6.1AQP2とAQP-2遺伝子を共発現させたIMCD₃細胞では、低浸透圧培地孵置下でのLuc活性は対照群と差がなかった(図1)。同様の所見は、-1.1AQP2とAQP-2遺伝子を共発現させたIMCD₃細胞においても認められた。
- ③-6.1AQP2とAQP-2遺伝子を共発現させたIMCD₃細胞において5 μ M Dibutyryl cAMPで24時間刺激すると、Luc活性は対照群で2.3倍に増加したが、低浸透圧培地では1.3倍とその増加は有意に抑制された(図1)。同様の所見は、-1.1AQP2とAQP-2遺伝子を共発現させたIMCD₃細胞においても認められた。

④-6.1AQP2とAQP-2遺伝子を共発現させたIMCD₃細胞において、低浸透圧培地に尿素を加えた等張培地下でも5 μ M Dibutyryl cAMP刺激によるLuc活性増加は有意に抑制された(図2)。同様の所見は、-1.1AQP2とAQP-2遺伝子を共発現させたIMCD₃細胞においても認められた。

⑤-6.1AQP2とAQP-2遺伝子を共発現させたIMCD₃細胞において、低浸透圧培地下での抑制作用は1 μ M SB203580・1 μ M U0126では解除されず、JNK阻害薬である1 μ M SP600125の前処置にて解除された(図3)。同様の所見は、-1.1AQP2とAQP-2遺伝子を共発現させたIMCD₃細胞においても認められた。

D. 考察

本研究では-6.1AQP2もしくは-1.1AQP2単独を発現させたIMCD₃細胞を低浸透圧孵置するだけでLuc活性が増加したが、-6.1AQP2もしくは-1.1AQP2とAQP-2遺伝子を共発現させたIMCD₃細胞においては低浸透圧培地孵置下でのLuc活性は対照群(300mOsm/kg)と差がなかった。一般的に、低浸透圧培地に細胞を孵置すると、細胞膜内外の浸透圧差に応じて細胞内に水が浸透して、細胞容積増加をきたすと想定される。しかし、培養IMCD₃細胞ではAQP-2が発現していないために低浸透圧下に置かれても細胞膜を介しての水移動が起こりにくい状況にあるのではないかと推測される。そして-6.1AQP2もしくは-1.1AQP2とAQP-2遺伝子をIMCD₃細胞に共発現させることで、生理的な尿細管細胞と同様な状態になると思われる。つまり、-6.1AQP2もしくは-1.1AQP2単独を発現させたIMCD₃細胞ではAQP-2を欠いており、本研究で見られた低浸透圧孵置下におけるLuc活性の基礎値増加は非生理学的な現象を捉えたものと考えられる。また、低浸透圧

培地に尿素を加えた等張培地を用いたところ、低浸透圧培地を用いた結果と同様な結果が得られていることから、細胞内外の浸透圧格差がAQP-2プロモーターのLuc活性には重大な影響を及ぼしていると推測される。

-6.1AQP2とAQP-2遺伝子を共発現させたIMCD₃細胞において、5 μ M Dibutyryl cAMPによる刺激24時間後には、Luc活性は対照群の2.3倍に増加したが、低浸透圧培地では1.3倍とその増加は有意に抑制された。同様の所見は、-1.1AQP2とAQP-2遺伝子を共発現させたIMCD₃細胞においても認められたことより、マウスAQP-2遺伝子-1.1kbまでの上流には低浸透圧によりcAMPによる転写活性が減弱する領域が存在することが示唆された。マウスAQP-2の5'上流域-570~-560bpには高浸透圧反応領域TonE⁵⁾が存在し、-6.1~-4.1kb内には私たちが報告したTonEとは異なる高浸透圧反応領域が存在している²⁾。-1.1kbと-6.1AQP2を用いて同じ所見が得られていることから、低浸透圧によりcAMPによる転写活性が減弱する反応は-570~-560bpに存在する高浸透圧反応領域TonEを介して生じている可能性がある。また、この減弱反応が1 μ M SP600125の前処置にて解除されたことより、低浸透圧の細胞内シグナルはJNKを介することが示唆された。

SIADHでは、低血漿浸透圧にもかかわらず血漿AVP値は持続的に高値をとる。AVP分泌過剰状態が慢性化すると、抗利尿作用は減弱し水利尿が部分的に回復することが知られており、AVP escape現象と呼ばれる。本研究では低浸透圧下ではcAMPによるAQP-2転写活性亢進が減弱しており、これはAVP escape現象を反映した所見である。

E. 結論

1. マウスAQP-2遺伝子-1.1kbまでの上流には、

低浸透圧によりcAMP刺激による転写活性が減弱する領域が存在し、これはJNKを介することが示唆される。

2. cAMPに対するAQP-2の転写活性の反応性低下が、in vivoでみられるAVP escape現象に反映することが想定される。

文献：

1. Fushimi K, Uchida S, Hara Y, Hirata Y, Marumo F, Sasaki S: Cloning and expression of apical membrane water channel of rat kidney collecting tubule. *Nature* 361: 549-522, 1993
2. Kasono K, Saito T, Saito T, Tamemoto H, Yanagidate C, Uchida S, Kawakami M, Sasaki S, Ishikawa S: Hypertonicity regulates the aquaporin-2 promoter independently of arginine vasopressin. *Nephrol Dial Transplant* 20: 509-515, 2005.
3. Gross PA, Kim JK, Anderson RJ: Mechanism of escape from desmopressin in the rat. *Circ Res* 53: 794-804, 1983.
4. Saito T, Higashiyama M, Nagasaka S, Sasaki S, Saito T, Ishikawa S: Role of aquaporin-2 gene expression in hyponatremic rats with chronic vasopressin-induced antidiuresis. *Kidney Int* 60: 1266-1276, 2001.
5. Storm R, Klusmann E, Geelhaar A, Rosenthal W, Maric K: Osmolality and solute composition are strong regulators of AQP-2 expression in renal epithelial cells. *Am J Physiol* 284: F189-F198, 2003.

図1. AQP-2過剰発現mIMCD3細胞における低浸透圧による-6.1AQP-2 promoter活性

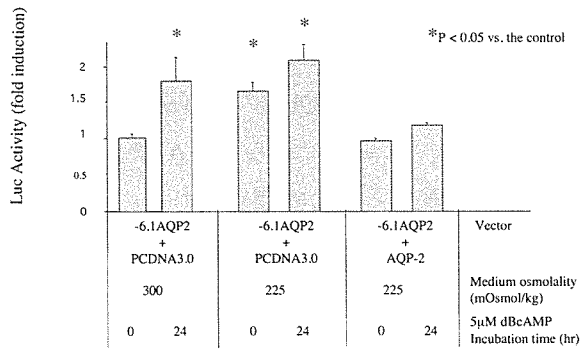


図2. -6.1AQP-2 promoter活性に及ぼす Iso-osmolality (not Isotonicity) 培地の影響

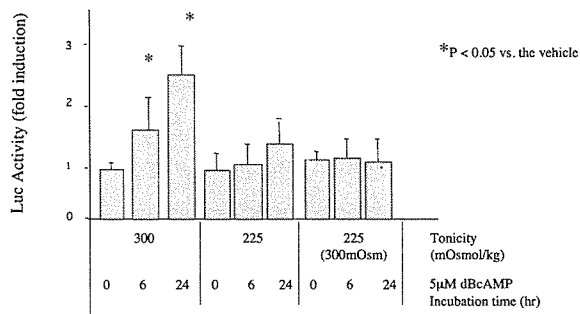
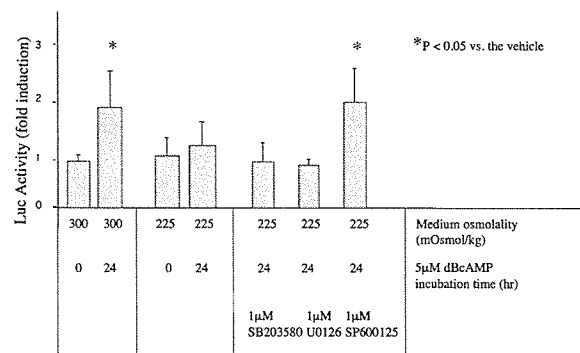


図3. 低浸透圧刺激による-6.1AQP-2 promoter活性に及ぼす各種阻害薬の影響



「多嚢胞性卵巣症候群の診断基準の問題点に関する検討」 に関する研究

分担研究者	苜原 稔	徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 女性医学分野 教授
研究協力者	松崎 利也	徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 女性医学分野 講師
	岩佐 武	徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 女性医学分野
	水口 雅博	徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 女性医学分野

研究要旨：多嚢胞性卵巣症候群(PCOS)はゴナドトロピン分泌異常、高アンドロゲン血症、インスリン抵抗性等を来す症候群である。日本婦人科学会のPCOS診断基準及び本研究班が2001年に作成した診断の手引きでは月経異常、LH高値、多嚢胞卵巣が必須項目とされている。最近、欧米での診断が見直され、日本でも診断基準の見直しが議論されている。今回、日本の診断基準の問題点を検討した。

全国の主な不妊治療施設650施設に対して、PCOSを含む排卵障害患者に関するアンケート調査を行い、94施設(回収率14.5%)から、2304症例について回答を得た。PCOS、PCOS疑診例のLH高値率はそれぞれ68.2%、37.7%であった。LHと各種男性ホルモンを同時に測定した症例のうち、LH高値率はPCOSで40~60%、PCOS疑診例で20~30%、LHまたはアンドロゲン(テストステロン、アンドロステンジオン、遊離テストステロン)高値率はPCOSで70-90%、PCOS疑診例で40~70%であった。

PCOS疑い症例の多くは、LH値が正常であるため診断に至っていないこと、このうちの52.8%で男性ホルモン(テストステロンまたはアンドロステンジオン)高値を認めることが判明した。LH高値と男性ホルモン高値を相補的に用いる診断基準を作成する必要があると考えられた。

A. 研究目的

多嚢胞性卵巣症候群(PCOS)は生殖年齢の女性の3~5%、月経異常の70%を占め、日常診療でも頻度の高い症候群である。本症候群ではLHの単独高値という特徴的なゴナドトロピン分泌異常を高率に合併する。日本産科婦人科学会が1993年に作成した診断基準(日産婦1993)(表1)、及び本研究班が2001年に作成した診断の手引き(表2)では、日本のPCOSで陽性率の高い月経異常、LH基礎分泌値高値、及び卵

巣の多嚢胞性所見の3項目が必須項目とされており、高アンドロゲン等の項目が参考所見として列挙されている[1-2]。一方、海外における主要な診断基準(NIH 1990, ESHRE/ASRM 2003)では病態の中心である高アンドロゲンが重視されている[3]。血中アンドロゲン濃度はPCOSのインスリン抵抗性と関連があり、高アンドロゲンを示す症例をPCOSと診断することは臨床的意義が大きい[4]。しかし、日本の診断基準では、高アンドロゲンを認めPCOSが強

く疑われる症例でも、LH値が正常であればPCOSと診断することができなかった。

今回、PCOS症例を含む排卵障害患者の血中ゴナドトロピン値および男性ホルモン値について調査を行い、日本の診断基準の問題点を検討した。

B. 研究方法

日本産科婦人科学会の生殖補助医療登録施設650施設(調査期間 平成18年5月～6月)に対して、PCOSを含む、排卵障害患者全般の臨床所見、血中ホルモン値等に関するアンケート調査を施行した。なお、血中ホルモンに関しては、卵胞発育や薬剤等による影響を防ぐため、卵胞発育の無い時期の測定値のみ採用し、ホルモン剤や排卵誘発剤を使用した時期の測定値は解析から除外した。LH高値の判定は、測定にスパック-Sを用いた場合では $LH \geq 7\text{mIU/ml}$ (正常女性の平均値+標準偏差 $\times 1$)、 $LH/FSH \geq 1$ とした[1]。他の測定系を用いた場合はスパック-Sとの相関式を用いてスパック-S LHの 7mIU/ml に相当する値を算出して用いた。またLH/FSHの判定は、スパック-S FSHの 7mIU/ml に相当を算出した上で、前述のLH換算値との比を用いた。

C. 研究結果

1. アンケート回収率および対象症例数

94施設(回収率14.5%)から、PCOS(1028例)、PCOS疑診例(771例)、その他(470例)を含む、合計2304症例(35例は診断のチェックがなく不適格)の回答を得た。

2. 患者背景

平均年齢、平均身長は3群間で差を認めなかった(表3)。平均BMI(体重(kg)/身長(m)²)、肥満率($BMI \geq 25$)はPCOSとPCOS疑診例がその他に比べて有意に高かった。高血圧、糖尿病、高脂血症の有病率は3群間で有意差を

認めなかったが、PCOS、PCOS疑診例においてわずかに高値であった。

3. 血中ホルモン値

血中LH、LH/FSH、及びテストステロン高値率はPCOS、PCOS疑診例がその他に比べて有意に高かった(表4)。LHと各種男性ホルモン(テストステロン、アンドロステジオン、遊離テストステロン)を同時に測定した症例において、LH基礎値の単独高値率はPCOSで40～60%、PCOS疑診例で20～30%であった。LHまたはアンドロゲン(テストステロン、アンドロステジオン、遊離テストステロン)の高値率はPCOSで70-90%、PCOS疑診例で40～70%であった(表5)。

D. 考察

PCOS患者ではゴナドトロピン分泌異常やインスリン抵抗性を認めることが多く、LHやインスリンが卵巣におけるアンドロゲン産生を促進し、月経異常やアンドロゲン過剰症状を引き起こすと考えられている。不妊PCOS患者の排卵誘発では卵巣過剰刺激症候群や多胎などの合併症が起こり易く、格別の注意が必要である。最近では、インスリン抵抗性改善薬の排卵誘発への応用や、レーザーを用いた腹腔鏡下卵巣多孔術など、PCOSに効果のある治療法が存在する[5-8]。また、PCOS患者では生活習慣病や子宮内膜癌の発症のリスクが高いことも指摘されている[9,10]。以上よりPCOSを診断することは、治療的、予防医学的観点から重要であると考えられる。現在、本邦では日産婦 1993の診断基準が広く用いられている。本診断基準は全国のアンケート調査の結果から、本邦のPCOSの特徴を考慮して作成された。その結果PCOSの診断が統一され、本邦におけるPCOSの共通理解と治療法の開発に大きな役割を果たしたと考えられる[1]。一方、本診断基

準に関するいくつかの問題点も指摘されてきた。特に海外で重視されている高アンドロゲンが必須項目に含まれていないこと、LH高値が単独で必須項目となっていることが重大な問題点とされている。高アンドロゲンはPCOSの病態の中心と考えられ、これを認める症例をPCOSと診断することは妥当である。さらに、血中アンドロゲン濃度が高い症例はインスリン抵抗性を認めることが多いことが報告されており[4]、アンドロゲン高値の症例をPCOSと診断することは臨床的にも重要と考えられる。しかし、現在の診断基準ではLH高値でなければPCOSと診断することができず、高アンドロゲンを有するにも関わらず、診断から漏れている症例が存在する可能性がある。今回、日本のPCOS患者の診断に適し、また海外の診断基準とも互換性があり国際的に評価され得る診断基準を作成することを目的として、PCOS患者を含む排卵障害患者全般のゴナドトロピン値とアンドロゲン値について検討した。PCOS、PCOS疑い症例ではその他の症例に比べてBMI、肥満率が高く、高血圧や糖尿病、高脂血症の合併率も高い傾向にあり、これらの症例は生活習慣病のリスクが高い群であると考えられた。特に、PCOS疑い症例はPCOS症例に比べて空腹時インスリン値(IRI)、HOMA指数($HOMA-R = FBS \times IRI \div 405$)が有意に高く、インスリン抵抗性が病態の中心となっていると考えられた。PCOS疑い症例ではLH、LH/FSHの異常高値率はそれぞれ37.7%、36.2%と低かった。これらの症例の90%以上が月経異常、多嚢胞性卵巣を有していたことから、PCOS疑い症例の多くはLH値が正常であるためにPCOSと診断できていないと考えられた。また、PCOS症例では一旦診断が確定しているにも関わらず、LH高値率は68.2%にとどまっておき、LH値の再現性の低さが確認された。

LHと男性ホルモンの測定値が揃っている症例の検討では、LH単独高値に比べて、LHまたは男性ホルモン高値とすると診断できる症例が増え、診断基準では、アンドロゲン高値症例の多くが診断から漏れていることが判明した。ただし、欧米に比べて、日本のPCOSでは高アンドロゲンを認める割合は低いので[1]、高アンドロゲンのみを単独項目として用いることは適切ではなく、十分条件として有用であると考えられる。現在作成中の日本産科婦人科学会の診断基準の改訂案では男性ホルモン高値とLH値を補完する形で用いることが検討されている(表6)。

E. 結論

現在の日本のPCOS診断基準では、ゴナドトロピン分泌異常を伴わないが、本来PCOSと診断すべき症例一部の症例が診断できないことが判明した。今後ゴナドトロピン値と男性ホルモン値の両者を考慮した診断基準が望ましいと考えられた。

参考文献

1. 杉本 治、青野敏博：本邦における多嚢胞性卵巣症候群の診断基準設定に関する小委員会(平成2年～平成4年度)検討結果報告。日産婦誌 45:1359-1367, 1993.
2. 加藤 譲：間脳下垂体機能異常症の診断と治療の手引き(2001)。厚生労働省厚生科学研究補助金特定疾患対策研究事業間脳下垂体機能障害に関する調査研究班 平成13年度総括研究事業報告書 :29-57, 2002.
3. The Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group: Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. Fertil Steril 81:19-25, 2004.

4. Adams JM, Taylor AE, Crowley EF, Hall JE: Insights into the pathophysiology of polycystic ovarian syndrome. J Clin Endocrinol Metab 84:165-169, 1997.

5. Nestler JE, Jakubowicz DJ, Evans WS, Pasquali R: Effects of metformin on spontaneous and clomiphene-induced ovulation in the polycystic ovary syndrome. N Engl J Med 25:1876-1880, 1998.

6. Moghetti P, Castello R, Negri C, Tosi F, Perrone F, Caputo M, Zanolin E, Muggeo M: Metformin effects on clinical features, endocrine and metabolic profiles, and insulin sensitivity in polycystic ovary syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled 6-month trial, followed by open, long-term clinical evaluation. J Clin Endocrinol Metab 85:139-146, 2000.

7. Kocak M, Caliskan E, Simsir C, Haberal A: Metformin therapy improves ovulatory rates, cervical scores, and pregnancy rates in clomiphene citrate-resistant women with polycystic ovary syndrome. Fertil Steril 77:101-106, 2002.

8. Farquhar C, Lilford RJ, Marjoribanks J, Vanderckhove P: Laparoscopic "drilling" by diathermy or laser for ovulation induction in anovulatory polycystic ovary syndrome (Cochrane Review). The Cochrane Library 4, 2003.

9. Dahlgren E, Friberg LG, Johanson S, Lindstrom B, Oden A, Samsioe G, Janson PO: Endometrial carcinoma; ovarian dysfunction-a risk factor in young women. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 41:143-150, 1991.

10. Ehrmann DA: Polycystic ovary syndrome. N Engl J Med 352:1223-1236, 2005.

表1 多嚢胞性卵巣症候群の診断基準 (日本産科婦人科学会)

I. 臨床症状	
①.	月経異常(無月経,稀発月経,無排卵周期症など)
2.	男性化(多毛,にきび,低音声,陰核肥大)
3.	肥満
4.	不妊
II. 内分泌検査所見	
①.	LHの基礎分泌値高値,FSHは正常範囲
2.	LHRH負荷試験に対し,LHは過剰反応,FSHはほぼ正常反応
3.	エストロン/エストラジオール比の高値
4.	血中テストステロン又は血中アンドロステンジオンの高値
III. 卵巣所見	
①.	超音波断層検査で多数の卵胞の嚢胞状変化が認められる
2.	内診又は超音波断層検査で卵巣の腫大が認められる
3.	開腹又は腹腔鏡で卵巣の白膜肥厚や表面隆起が認められる
4.	組織検査で内英膜細胞層の肥厚・増殖,及び間質細胞の増生が認められる

(注)以上の各項目のうち○印をつけた項目を必須項目として,それらのすべてを満たす場合を多嚢胞性卵巣症候群とする。その他の項目は参考項目として,必須項目のほか参考項目をすべて満たす場合は典型例とする。

表2 多嚢胞性卵巣症候群の診断の手引き (間脳下垂体機能異常症の診断と治療の手引き,2001)

I. 主症候	
1.	月経異常(無月経,稀発月経,無排卵周期症など)
2.	男性化(多毛,にきび,低音声,陰核肥大)
3.	肥満
II. 検査所見	
1.	LHの基礎分泌値高値かつFSHの基礎分泌値正常範囲
2.	LHRH負荷試験でLH過剰反応,FSHはほぼ正常反応
3.	エストロン/エストラジオール比の高値
4.	男性ホルモン高値
5.	卵巣の多発性嚢胞

[診断基準]

確実例 Ⅰの1を含む2項目以上を満たし,かつⅡの1と5を含む3項目以上を満たすもの。

疑い例 Ⅰの1項目以上を満たし,かつⅡの2項目以上を満たすもの。

表3 患者の背景

	PCOS 1028例	PCOS疑い 771例	その他 470例
平均年齢(歳) (平均±標準偏差)	28.1 ± 4.9	28.4 ± 5.3	28.4 ± 6.9
平均身長(cm) (平均±標準偏差)	158.0 ± 6.6	158.0 ± 5.4	157.9 ± 5.6
BMI(平均±標準偏差) 肥満例(BMI≥25)	23.1 ± 6.0 * 肥満例 25.9% (268/1028)	23.3 ± 6.1 * 肥満例 24.5% (189/771)	21.9 ± 5.8 肥満例 17.9% (84/470)
高血圧	無 89.2% (917/1028) 有 3.0% (31/1028) 不明 6.2% (64/1028)	無 86.8% (689/771) 有 3.5% (27/771) 不明 6.5% (50/771)	無 90.0% (423/470) 有 2.1% (10/470) 不明 6.0% (28/470)
糖尿病	無 88.7% (912/1028) 有 3.7% (38/1028) 不明 5.6% (58/1028)	無 81.2% (626/771) 有 3.4% (26/771) 不明 11.6% (90/771)	無 87.2% (410/470) 有 2.4% (12/470) 不明 8.3% (39/470)
高脂血症	無 78.4% (806/1028) 有 4.0% (41/1028) 不明 15.6% (160/1028)	無 65.8% (507/771) 有 3.6% (28/771) 不明 26.7% (206/771)	無 76.2% (358/470) 有 3.6% (17/470) 不明 18.3% (86/470)

*: P<0.01 vs. その他症例

表4 各種血中ホルモンの異常高値率(%)

	PCOS	PCOS疑い	その他
LH	68.2 * (546/801)	37.7 * (209/554)	25.0 (80/320)
LH/FSH比	74.6 * (592/794)	36.2 * (192/531)	17.5 (54/308)
PRL	3.9 (28/709)	4.5 (21/464)	6.7 (19/284)
テストステロン	14.3 * (105/734)	15.6 * (90/578)	6.3 (18/285)
遊離テストステロン	65.3 (94/144)	64.8 (70/108)	70.7 (29/41)
アンドロステンジオン	67.5 * (102/151)	53.2 (42/79)	34.3 (12/35)
DHEA	16.7 (3/18)	16.7 (1/6)	100.0 (2/2)
DHEA-S	13.1 (41/312)	11.2 (21/188)	11.9 (8/67)
エストロン	44.4 (12/27)	13.2 (5/38)	0 (0/1)
エストロン/エストラジオール比	100.0 (26/26)	61.1(22/36)	

*: P<0.01 vs. その他症例

表5 LHおよび男性ホルモンの関係

	PCOS	PCOS疑い	その他
LH、テストステロン、アンドロステンジオンの測定値がある症例	134例	69例	28例
LH高値	43.3*(58/134)	23.2(16/69)	21.4(6/28)
LHまたは男性ホルモン高値	80.6*(108/134)	63.8*(44/69)	39.3(11/28)
男性ホルモン高値(男性ホルモン高値はテストステロン、アンドロステンジオンの少なくとも1つ)	69.4*(93/134)	55.1*(38/69)	25.0(7/28)
LHとテストステロンの測定値がある症例	713例	488例	264例
LH高値	67.7*(483/713)	36.1*(176/488)	26.5(70/264)
LHまたはテストステロン高値	71.7*(511/713)	43.9*(214/488)	29.5(78/264)
テストステロン高値	14.3*(102/713)	12.7*(62/488)	5.7(15/264)
LHとアンドロステンジオンの測定値がある症例	145例	74例	34例
LH高値	44.3*(66/145)	23.0(17/74)	20.6(7/34)
LHまたはアンドロステンジオン高値	82.1*(119/145)	60.8(45/74)	44.1(15/34)
アンドロステンジオン高値	68.3(99/145)	51.4(38/74)	32.4(11/34)
LHと遊離テストステロンの測定値がある症例	123例	88例	38例
LH高値	62.6(77/123)	36.4(32/88)	34.2(13/38)
LHまたは遊離テストステロン高値	90.2(111/123)	76.1(67/88)	81.6(31/38)
遊離テストステロン高値	63.4(78/123)	61.4(54/88)	68.4(26/38)

*: P<0.01 vs. その他症例
*: P<0.05 vs. その他症例

表6 多嚢胞性卵巣症候群の新診断基準(案)
(日本産科婦人科学会 生殖・内分泌委員会,2007)

I. 月経異常
II. 多嚢胞性卵巣
III. 血中男性ホルモン高値 またはLH基礎値高値/FSH基礎値正常

注1) I~IIIの全てを満たす場合を多嚢胞性卵巣症候群とする。
 注2) 月経異常は、第一度無月経、稀発月経、無排卵周期症のいずれかとする。
 注3) 多嚢胞性卵巣は、超音波断層検査で両側卵巣に多嚢胞所見がみられ、少なくとも一方の卵巣で2-9mmの小卵胞が10個以上存在するものとする。
 注4) 内分泌検査は、排卵誘発薬や女性ホルモン薬を投与していない時期に、1cm以上の卵胞が存在しない事を確認の上で行う。また、月経または消退出血から10日までの時期は高LHの検出率が低い事に留意する。
 注5) 男性ホルモン高値は、テストステロン、遊離テストステロンまたはアンドロステンジオンのいずれかを用い、各測定系の正常範囲上限を超えるものとする。
 注6) LH高値の判定は、スパック-Sによる測定値はLH \geq 7mIU/ml(正常女性の平均値+1 \times 標準偏差)かつ LH \geq FSHとし、肥満例ではLH \geq FSHのみでも可とする。
 他の測定系による測定値は、スパック-Sとの相違を考慮して判定する。
 注7) クッシング症候群、副腎酵素異常、体重減少性無月経の回復期など、本症候群と類似の病態を示すものを除外する。

F. 健康危険情報

今回の研究結果内に、報告すべき健康危険情報は無かった。

G. 研究発表

論文発表

1. Iwasa T, Matsuzaki T, Tanaka N, Minakuchi M, Shimizu F, Ogata R, Kiyokawa M, Maegawaw M, Yasui T, Kuwahara A, Irahara M: Comparison and problems of measured values of LH, FSH, and PRL among measurement systems. Endocrine J 53:101-109, 2006.
2. Iwasa T, Matsuzaki T, Minakuchi M, Tanaka T, Shimizu F, Hirata Y, Kuwahara A, Yasui T, Maegawa M, Irahara M: Diagnostic performance of serum total testosterone for Japanese patients with polycystic ovary syndrome. Endocrine J (in Press).

学会発表

1. 岩佐 武、松崎利也、水口雅博、清水扶美、田中尚子、苛原 稔：多嚢胞性卵巣症候群診断における血中LH値の測定時期に関する検討。第59回日本産科婦人科学会中国四国合同地方部会総会ならびに学術講演会、平成18年10月7日～8日、松山
2. 水口雅博、松崎利也、岩佐 武、清水扶美、田中尚子、苛原 稔：PCOSの診断における血中テストステロン値の有用性の検討。第59回日本産科婦人科学会中国四国合同地方部会総会ならびに学術講演会、平成18年10月7日～8日、松山
3. 岩佐 武、松崎利也、水口雅博、田中尚子、苛原 稔：多嚢胞性卵巣症候群における血中LH値の測定時期に関する検討。第51回日本生殖医学会総会、学術講演会、平成18年11月8日～10日、大阪
4. 水口雅博、松崎利也、岩佐 武、田中尚子、苛原 稔：PCOSの血中テストステロン値の診断における有用性の検討。第51回日

本生殖医学会総会学術講演会、平成18年
11月8日～10日、大阪

5. 岩佐 武、松崎利也、水口雅博、清水扶美、
田中尚子、苛原 稔：多嚢胞性卵巣症候
群の診断におけるLH値の測定時期に関す
る検討. 第11回日本生殖内分泌学会、平
成18年11月25日、東京
6. 水口雅博、松崎利也、岩佐 武、田中尚子、
苛原 稔：多嚢胞性卵巣症候群の診断に
おける血中T値の有用性の検討. 第11回
日本生殖内分泌学会、平成18年11月25日、
東京

H. 知的財産権の出願、登録状況

無し

I. 特許取得

1. 特許取得 無し
2. 実用新案登録 無し
3. その他 無し

中枢神経系脱髄発症を回避するSIADH治療の確立に関する研究

分担研究者 大磯 ユタカ 名古屋大学糖尿病・内分泌内科学
村瀬 孝司 名古屋第一赤十字病院内分泌内科

研究要旨：SIADHの治療で最も重要なのは橋中心髄鞘崩壊 (CPM)などの中枢神経系脱髄病変を回避することであるが、その確実な発症予防法は存在しない。今回我々は、SIADHモデルを用いてCPMの予防的治療法を開発する目的で、発症機序におけるmicroglia (MG)の役割について検討した。雄SDラットにdDAVPと液体食を投与して低Na血症を誘導した後、高張食塩水で急速補正しCPMを惹起した。補正後の脳では脱髄病変部にTNF- α 、IFN- γ を発現するMGの著明な集積が認められた。補正時にHMG-CoA還元酵素阻害剤であるlovastatin (LVS)を投与すると、MGの集積とcytokineの発現が減弱し、脱髄病変の軽減がみられた。以上の結果、急速補正後、脱髄病変部に集積したMGが炎症性cytokineを産生して脱髄病変を助長し、LVSはMGの集積を抑制することでCPMの発症予防に有効であることが示された

A. 研究目的

従来、バズプレシン分泌過剰症 (SIADH) の治療は水制限などの対症療法が基本であったが、水制限が困難な場合も多く治療抵抗性の例も少なくなかった。最近になって国内外でOPC-31260, conivaptanといったバズプレシン受容体拮抗剤が相次いで認可され、治療体系の転機を迎えている。SIADHの治療で一番問題となるのは、低Na血症補正時の中枢神経系脱髄病変の発症である。通常、高張食塩水投与などにより血清Naを過剰に急速補正することで、脱髄病変が発症することから浸透圧性脱髄とよばれる。ヒトにおいては橋中心部に病変が生じることが多く、橋中心髄鞘崩壊 (CPM: Central pontine demyelination)と言われる。たとえばV2受容体拮抗剤による原因療法的治療を行っても、血清Na濃度の急激な上昇を生じる可能性は常に存在して脱髄病変の発症を回避することは困難である。さらに、補正速度が緩徐でもCPMを発症したという報告もあり、その確実な発症予防法は存在しない。我々は

従来、血清Na濃度の上昇速度にかかわらずCPMを確実に予防する方法を開発する目的でSIADHのラットモデルを用いて基礎的検討を行い、一酸化窒素 (NO) 合成酵素阻害剤やデキサメタゾンが、急速補正後の脳血液関門の破綻を防止することで、脱髄病変の発症予防に非常に有効であることを明らかにしてきた。しかし、NO合成酵素阻害剤には臨床薬剤が存在しないこともあり、現在まだ臨床応用の段階には至っていない。

ヒトのCPM病理組織および動物の浸透圧性脱髄モデルの脱髄病変部位ではmicrogliaの集積が報告されている。しかし、その脱髄病変発症機序における役割は未だ明らかではない。一方、CPMと同様にヒトの脱髄疾患である多発性硬化症の動物モデルでは、microgliaが炎症性cytokineを産生してoligodendrocyteを傷害し、脱髄病変の発症に関与するという報告がある。また、同モデルでは、HMG-CoA還元酵素阻害剤であるlovastatinがmicrogliaの浸潤を抑制して脱髄病変を軽減させることが報告されている。

本研究では、CPMの予防的治療法を開発することを目的とし、CPMの発症機序におけるmicrogliaの役割を明らかにするために、SIADHの動物モデルを用いて実験的に脱髄病変を惹起し、病変部位に集積したmicrogliaにおける炎症性cytokineやiNOSの発現を検討した。さらに、lovastatinの脱髄病変に対する発症予防効果について検討した。

B. 研究方法

雄SDラットにバゾプレシンのV2受容体アゴニストであるdDAVPを浸透圧ミニポンプを用いて持続注入し、dDAVP投与2日後から液体食を投与して低Na血症を誘導した。液体食を7日間連日投与したのち、補正群のラットには高張食塩水（1.0M NaCl, 1.5ml/100g 体重）を腹腔内投与して低Na血症を急速補正した。補正後の神経症状はスコア化して定量的に観察した。非補正群は液体食投与を続け、低Na血症を維持した。また、別の実験群では急速補正直前及び補正後連日、lovastatin（2 mg/kg 体重）を腹腔内注射した。

急速補正の1日から4日後に脳を摘出し、凍結切片を作成して組織学的検討を行った。髄鞘染色にはルクソールファストブルーとクレシルバイオレットを用いた。また、ミエリンのマーカーであるmyelin basic protein（BMP）抗体、活性型microgliaのマーカーであるED1抗体、炎症性cytokineであるIFN- γ 抗体、TNF- α 抗体とiNOS抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。

実験は名古屋大学の動物実験に関する指針を遵守して施行した。

C. 研究結果

急速補正後のラットは重篤な神経症状を呈し5日以内にほとんどが死亡した。非補正群の脳では脱髄病変が認められなかったのに対し、

補正4日後の脳では大脳皮質深部と中脳赤核部付近を中心に顕著な脱髄病変を認めた（図1）。脱髄病変部位では小型円形細胞の集積が多数認められた。免疫染色でこれらの細胞はED1陽性であり、活性型microgliaであることが確認された。Microgliaの集積は急速補正後1日目より始まり、補正3日後には著明な集積が認められた（図2）。非補正群ではmicrogliaの集積はみられなかった。

脱髄病変部位に集積した細胞では、二重染色でIFN- γ あるいはTNF- α とED-1の共発現がみられ、microgliaがIFN- γ およびTNF- α を産生していることが示された（図3A-F）。また、隣接切片における同様の細胞においてED1とiNOSの免疫染色がみられ、microgliaがiNOSを発現していることが示された（図3G, H）。

Lovastatin投与群ではlovastatin非投与群に比べ、補正後の神経症状(neuroscore：点数が低いほど重症)の明らかな軽減が認められ、特に投与1日と2日後では有意な差がみられた（図4）。脳組織における脱髄病変の程度もlovastatin投与群ではlovastatin非投与群に比べ著明に軽減していた。さらに、lovastatin投与群では脱髄病変部でのmicrogliaの集積とmicrogliaにおけるTNF- α の発現がともに顕著に減少していた。急速補正前後の血清Na濃度はlovastatin投与による有意な影響はなかった。

D. 研究考察

本研究では、CPMの予防法を開発する目的で、浸透圧性脱髄の実験動物モデルを用いて、脱髄病変の発症機序におけるmicrogliaの役割とlovastatinの脱髄発症予防効果について検討した。ED1抗体を用いた免疫染色により、低Na血症の急速補正により生じた脱髄病変部位に活性型microgliaが集積することが確認された。Microgliaの集積は補正1日後から認められた。

その時点ではまだ重篤な神経症状が出現する前であることから、microgliaの集積は脳組織の傷害から起こる二次的なものではないと考えられた。急速補正3日後には、さらに顕著なmicrogliaの集積が認められ、microgliaの集積は脱髄病変の進行と並行して起こることが示唆された。

二重染色の結果、脱髄病変部位に集積したmicrogliaはIFN- γ およびTNF- α といった炎症性cytokineを発現していることが示された。従来これらcytokineはmicrogliaにおいてiNOSの発現を誘導して大量のNOを産生させることが報告されている。過剰に産生されたNOは活性酸素と反応して非常に組織傷害性の高い物質であるperoxynitriteとなり細胞死を誘導することが知られている。実際に今回の研究でもmicrogliaにおけるiNOSの発現が認められた。以上のことより、脱髄病変部位に集積したmicrogliaは炎症性cytokineの産生を介してiNOSの発現を誘導し、過剰のNOを生成することで、oligodendrocyteの傷害を助長し脱髄病変を増悪させるという可能性が示唆された。

LovastatinはHMG-CoA還元酵素阻害剤であるが、近年その血清コレステロール低下作用以外にも抗炎症作用など多数の作用を有することが知られてきている。多発性硬化症の動物モデルであるラットの自己免疫性脳脊髄炎では、lovastatin投与によりmicrogliaの浸潤が減少し脱髄病変の発症が軽減することが報告されている。今回の研究で、CPMの動物モデルである浸透圧性脱髄においてもlovastatin投与により、急速補正後の神経症状と脱髄病変の軽減が認められた。また、lovastatin投与群では、脱髄病変部位へのmicrogliaの集積とmicrogliaにおけるTNF- α の発現の著明な減少がみられた。以上の結果より、lovastatinは浸透圧性脱髄発症予防作用を有することが示され、その作用機序

として、lovastatinは急速補正後のmicrogliaの浸潤とcytokineの産生を抑制することで、脱髄病変を軽減している可能性が示唆された。また、lovastatin投与により脱髄病変部位へのmicrogliaの集積が減少することで脱髄病変が軽減したことは、microgliaが脱髄病変を増悪させるという我々の説を裏付けるものと考えられた。

Lovastatin投与群では補正後早期の神経症状は軽減していたが、3日後以降には非投与群と同程度の神経症状を呈した。従って、lovastatin投与だけでは急速補正後の脱髄病変の発症を完全に予防するには不十分であり、脱髄病変の発症にはmicrogliaによるcytokineの産生以外の要因も関与することが示唆された。浸透圧性脱髄の発症機序の詳細は未だ不明だが、血漿浸透圧の急激な上昇により血液脳関門が破綻することが重要と想定されている。血液脳関門が破綻すると、cytokineや補体など細胞傷害性血漿成分の脳内流入、あるいは高浸透圧ストレスによりoligodendrocyteが傷害されると考えられる。このように、浸透圧性脱髄の発症機序には多数の因子が関与すると推察されるため、lovastatinの投与によりmicrogliaの浸潤を防止するだけでは脱髄病変の発症を完全に予防することは困難であるが、軽減には有効であると考えられた。

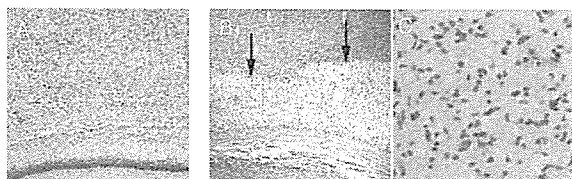
Lovastatinは日本では未承認であるが、欧米では高脂血症薬として広く用いられており、一般的な投与量は10-80 mg/日とされている。今回の研究でラットに用いられた2 mg/kg/日をヒトに換算すると体重50 kgのヒトで100 mg/日となり、臨床投与量と比較して大目ではあるが著明な差があるわけではなく、臨床的な投与量でも脱髄発症予防に有効である可能性がある。Lovastatinは一般的に副作用も少ない安全な薬剤であり、今後CPM発症予防薬として実際の臨床応用が期待される。また前述のご

とくlovastatinは日本では未承認なため、日本で承認されている他のHMG-CoA還元酵素阻害剤が同様の脱髄発症予防作用を有するかどうか検討する必要があると考えられた。

E. 結論

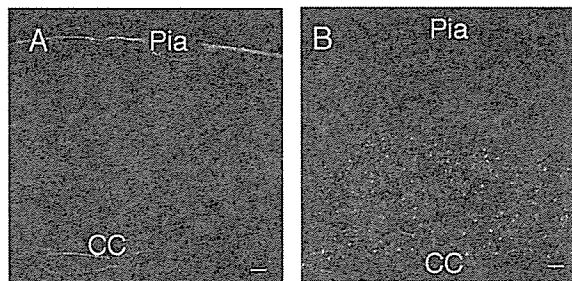
CPMの発症機序において、脱髄病変部位に集積したmicrogliaが炎症性cytokineやNOを産生してoligodendrocyteの傷害を助長し、脱髄病変の増悪に関与することが推察された。さらに、lovastatinが、microgliaの集積と炎症性cytokineの産生を阻害することで、CPMの発症予防に有効である可能性が示唆された。

図1. 急速補正後の脱髄病変 (大脳皮質)



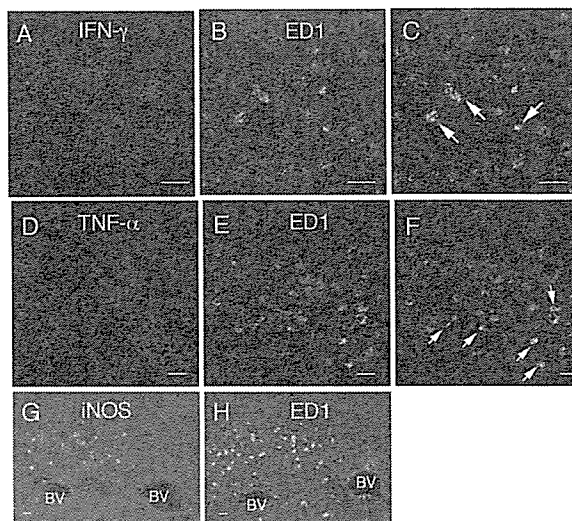
A: 非補正群 B: 補正4日後 (矢印は脱髄病変を示す)
C: Bの強拡大

図2. 急速補正後のmicrogliaの集積 (大脳皮質)



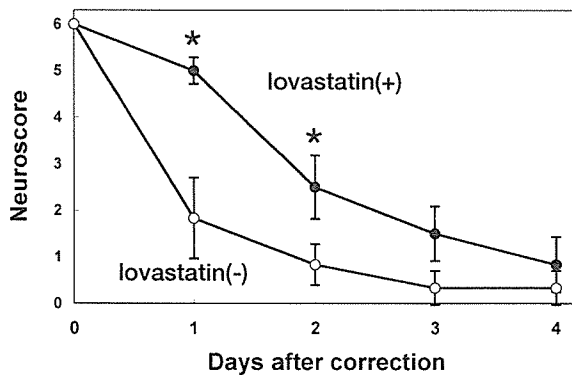
ED1免疫染色
A: 非補正群 B: 補正3日後 (Pia 軟膜, CC 脳梁)

図3. Microgliaにおけるcytokineの発現



C: IFN- γ とED1の二重染色 F: TNF- α とED1の二重染色 (矢印は共発現の細胞を示す) G,H: 隣接切片

図4. 急速補正後の神経症状に及ぼすlovastatinの影響



下垂体腫瘍形質転換遺伝子（PTTG）による 腫瘍形成機構の解明に関する研究

分担研究者 長村 義之 東海大学医学部 基盤診療学系病理診断学教授

研究要旨：本研究ではヒト下垂体腺腫（51例）におけるPTTG発現とホルモン、血管形成因子との関連性を解析し、下垂体腫瘍形成および機能分化へのPTTGの関与について検討を行った。免疫組織化学および定量的RT-PCR法にて、下垂体腺腫におけるPTTG、血管形成因子（VEGF）の発現解析を行った。また、下垂体由来の腫瘍（ACTH）細胞株であるAtT-20を用いて、PTTGの細胞内局在を免疫電顕法により検討した。正常下垂体に比較してヒト下垂体腺腫では、PTTGの発現が有意に高いことが判明した。更に、GHomaでは腺腫中のPTTG発現とVEGF発現、血管数との間に有意な相関関係が認められ、PTTGが血管新生を誘導し腫瘍の進展を促進することが示唆された。一方、免疫電顕法による観察によりマウス下垂体培養細胞AtT-20ではPTTGはゴルジ装置および分泌顆粒内に局在することが判明した。下垂体腫瘍中のPTTGが分泌蛋白としてパラクライン・オートクライン的に機能する可能性が強く示唆された。

A. 研究目的

下垂体腫瘍形質転換遺伝子（Pituitary Tumor Transforming Gene, PTTG）は、ラット下垂体腺腫由来の細胞株GH4から単離された細胞周期制御因子である（Pei L & Melmed S, Mol Endocrinol ;1997）。これまでの研究により、PTTGが細胞の形質転換（Pei & Melmed, Mol Endocrinol ;1997）、細胞の増殖促進（Boelaert K et al., FASEB J ;2003）、血管新生促進（McCabe CJ et al., J Clin Endocrinol Metab.; 2002）など様々な機能を有することが判ってきている。乳癌や大腸癌における高発現も報告されており（Solbach C et al., Breast; 2004、Heaney AP et al., 2000）、腫瘍形成過程において、PTTGが何らかの重要な役割を担っているものと考えられている。最近、Melmedらは α -subunit（ α SU）のプロモーターを用いPTTGトランスジェニックマウス（PTTG Tg）の作成を行い、PTTG TgではLH、TSH、GHを産生する下垂体腺腫が形成されることを明らかにした（Abbud RA et

al., Mol Endocrinol ;2005）。本研究では、ヒト下垂体腺腫形成の分子機構を追求することを目的とし、ヒト下垂体腺腫（51例）におけるPTTG発現とホルモン、血管形成因子との関連性を解析し、下垂体腫瘍形成および機能分化へのPTTGの関与について検討を行った。更に下垂体培養細胞におけるPTTGの細胞内局在部位を免疫電顕法により検討しPTTGが分泌蛋白として機能することを示唆する結果を得た。

B. 研究方法

ヒト下垂体腺腫51症例（GH産生腺腫：GHoma 29例、PRL産生腺腫：PRLoma 12例、FSH産生腺腫：FSHoma 3例、ゴナドトロピン産生腺腫Gn-oma 34例、TSH産生腺腫：TSHoma 3例、null cell 腺腫：NCA 16例）について、PTTG、細胞増殖因子（Ki-67）および血管形成因子（VEGF）の発現解析を免疫組織化学法およびリアルタイムRT-PCR法により定量的に解析した。これら下垂体腺腫試料は、

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。これら試料を実験に供する際には、学内の論理委員会に報告し、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。

定法に従い、試料よりtotal RNAを抽出後、Oligo dTプライマーを用いて逆転写を行い、cDNAサンプルを作成した。cDNAサンプルはSYBR Green法によるリアルタイムRT-PCR解析を行い、pttg及び血管新生関連遺伝子であるvegfの発現量を定量した。内部標準としてはgapdhを用いた。また、試料の一部を10%ホルマリン固定し、パラフィン法埋して切片を作製した。切片は脱パラフィン後、human PTTG (Zymed Laboratories)、human Ki-67 (MIB-1, Dako Cytomation)、human cleaved caspase-3 (Cell Signaling Technology)、CD-34 (Novocastra Laboratories)に対する抗体染色を行った。更に、ヒト下垂体腫瘍において、PTTGが細胞質に染色されたことから、PTTGが高発現しているマウス下垂体由来の腫瘍 (ACTH) 細胞株であるAtT-20を用いて、腫瘍細胞でのPTTGの局在について免疫電顕法およびImmuno-blotting法より検討した。

C. 研究結果

免疫組織化学によるヒト下垂体腺腫のPTTG発現については、視野中細胞1000個あたりのPTTG陽性細胞数をカウントし、全細胞に占める陽性細胞の比率を算出した。PTTGの発現は、GHomaで $39.6 \pm 4.9\%$ 、NCAで $38.9 \pm 7.1\%$ となり、正常下垂体 $6.0 \pm 2.2\%$ と比較し、有意に高値を示した。その他の腫瘍においても、Gn-oma $31.4 \pm 4.9\%$ 、PRLoma $25.8 \pm 10.9\%$ 、ACTHoma $30.3 \pm 15.9\%$ 、FSHoma 35.0% となり、有意差は認められなかったものの、正常と比較し高値を示す傾向が認められた。リアルタイム

RT-PCRによるpttg発現解析では、免疫組織化学の結果と同様の傾向を示し、正常下垂体に比較してヒト下垂体腺腫 (NCA: 35.1 ± 22.7 -fold、ACTHoma: 26.29 ± 21.9 -fold、Gn-oma: 26.3 ± 24.2 -fold、FSHoma: 23.34 -fold、PRLoma: 17.9 ± 10.0 -fold、GHoma: 8.2 -fold) で、pttgの発現が高値を示す傾向認められた。また、免疫組織化学による観察によりPTTGがゴルジ野に局在することが光顕レベルで明らかになった。Cleaved caspase-3の免疫組織化学によるアポトーシスの検討では、陽性細胞数が、正常下垂体および下垂体腫瘍で非常に少なく、有意な差は認められなかった。Ki-67の免疫組織化学による細胞増殖の検討では、Gn-omaの陽性細胞率が $0.68 \pm 0.08\%$ となり、正常下垂体 $0.23 \pm 0.04\%$ およびGHoma $0.29 \pm 0.05\%$ と比較し有意に高値を示した。PTTGと血管新生の関連を調べるため、PTTG発現が高値を示したGHomaのvegf発現の検討をリアルタイムRT-PCR法を用いて検討した。更に腫瘍部位の血管分布をCD34の免疫組織化学により検討を行った。その結果GHomaで、腺腫中のPTTG発現とVEGF発現、血管数との間に有意な相関関係が認められた。一方、免疫電顕法による観察により下垂体培養細胞AtT-20ではPTTGはゴルジ装置および分泌顆粒内に局在することが判明した。また、培養上清を用いたImmuno-blotting法によりPTTGが培養上清中に検出された。

D. 考察

正常下垂体に比較してヒト下垂体腺腫では、PTTGの発現が有意に高いことが判明した。また、更に、GHomaでは腺腫中のPTTG発現とVEGF発現、血管数との間に有意な相関関係が認められ、PTTGが血管新生を誘導し腫瘍の進展を促進することが示唆された。免疫組織化学に

よる観察によりPTTGがゴルジ野に局在することが光顕レベルで明らかとなり、腫瘍中のPTTG局在について免疫電顕法による詳細な観察を、下垂体培養細胞AtT-20を用いておこなった。その結果PTTGはゴルジ装置および分泌顆粒内に局在することが判明し、更に、Immuno-blotting法によりPTTGが培養上清中に検出されたことから、PTTGが分泌蛋白としてパラクライン・オートクライン的に機能する可能性が強く示唆された。以上のことから、PTTGが下垂体腫瘍形成における重要因子であることは明らかであるが、PTTGが胎児期の下垂体形成時に高発現することが腫瘍形成に必須であるのか、あるいは発生分化が終了（生後、個体成熟後）した後においてもPTTGの発現誘導が腫瘍形成を誘発しうるのか、が焦点となっている。多様なヒト下垂体腺腫の発生機序は全く不明であるが、成熟後の個体にPTTGの発現誘導を行うことで腫瘍形成が可能であれば、ヒトの下垂体腺腫の発生機序の分子機構解明に大きな進展がもたらされるものと考えられる。現在、PTTGの腫瘍発生における役割を精査する目的で、任意の時期にターゲット分子の発現誘導が可能であるエクジソン（Ecdysone）システムを用いたPTTGのconditional transgenic mouseの作製を試みており、ベクター系の作成と培養細胞（L β T2細胞）での発現系が確立されたところである。殆どのヒト下垂体腺腫は成年以降に起こる細胞増殖因子（or癌抑制遺伝子）などの遺伝子の発現異常（変異）により誘発されることが考えられるが、本研究の「発生後、経時的にPTTGの発現誘導を行うことにより下垂体腫瘍を誘発する試み」は、実際のヒトの下垂体腺腫形成の分子機構を追求する際の重要な拠点となるものと考えられる。

E. 結論

下垂体では、PTTGが血管新生を誘導し腫瘍の進展を促進することが示唆された。一方、下垂体培養細胞AtT-20ではPTTGはゴルジ装置および分泌顆粒内に局在することが判明し、下垂体腫瘍中のPTTGが分泌蛋白としてパラクライン・オートクライン的に機能する可能性が強く示唆された。今回の検討から、PTTGが下垂体腫瘍形成における重要因子であることが明らかとなったが、今後、エクジソン（Ecdysone）システムを用いたPTTGのconditional transgenic mouseを用いて、個体発生後、経時的にPTTGの発現誘導を行い、PTTGを介した下垂体腫瘍形成過程の分子機構の解明を試みる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Minematsu T, Suzuki M, Sanno N, Takekoshi S, Teramoto A, Osamura RY.

PTTG overexpression is correlated with angiogenesis in human pituitary adenomas.

Endocr Pathol. 2006; 17(2):143-53.

Minematsu T, Egashira N, Kajiya H, Takei M, Takekoshi S, Itoh Y, Tsukamoto H, Itoh J, Sanno N, Teramoto A, Osamura RY

PTTG is a secretory protein in human pituitary adenomas and in mouse pituitary tumor cell lines.

Endocr Pathol. In press

2. 学会発表

T Minematsu, M Yamazaki, S Takekoshi, S Miyai, N Sanno, A Teramoto, RY Osamura

“ Study on the Expression of Pituitary Tumor-Transforming Gene (PTTG) in Human Pituitary Adenomas by Real Time RT-PCR and Immunohistochemistry”

United States and Canadian Academy of Pathology
(USCAP) 2005 Annual Meeting, San Antonio,
Texas

日本人成人の血中インスリン様成長因子-1 濃度の基準範囲設定に関する研究

分担研究者	島津 章	独立行政法人国立病院機構京都医療センター 臨床研究センター
研究協力者	千原和夫	神戸大学大学院医学系研究科 内分泌代謝・神経・血液腫瘍科
	肥塚直美	東京女子医科大学第二内科
	寺本 明	日本医科大学脳神経外科
	田中敏章	国立成育医療センター臨床検査部
	巽 圭太	大阪大学大学院医学系研究科臨床検査診断学
	立花克彦	日本ケミカルリサーチ
	勝又規行	国立成育医療センター研究所
	横谷 進	虎の門病院小児科
	藤枝憲二	旭川医科大学小児科

研究要旨：インスリン様成長因子-1 (IGF-1)は成長ホルモン(GH)依存性の成長因子であり、その血中濃度の測定はGH分泌異常症の診断と治療に有用である。1996年に日本人健常成人男性469例、女性255例を対象として年齢別性別IGF-1基準値を設定した。しかし一部の年代で例数が少ないため信頼区間の幅が大きく再設定が必要と考えられた。今回、20歳から69歳まで各年代5歳刻みの男性50例、女性50例、および18-19歳、70歳以上において男性25例、女性25例を集め総数1118例を対象にIGF-1濃度をIGF-1 IRMA「第一」キットを用いて測定した。血中IGF-1濃度は正規分布しないため、Box-Cox変換を使い現量値曲線のセントイル値をもとめるLMS法を使用して、3次スプライン関数による平滑化から基準範囲を求めた。

平均IGF-1濃度は、20歳の男女でそれぞれ243ng/ml, 259ng/mlであり、年齢と共に減少し70歳の男女ではそれぞれ124ng/ml, 101ng/mlであった。35歳以上において男性の方が女性より高値であった。以上、多数例の日本人成人を対象としてIGF-1濃度の基準範囲を性別に分けて再設定し、各年齢毎のSDスコア（Zスコア）表現を可能とした。

A. 研究目的

インスリン様成長因子-1 (IGF-1)は成長ホルモン(GH)依存性の成長因子であり、その血中濃度の測定はGH分泌不全症および先端巨大症の診断と治療に欠くことが出来ない。また個体の栄養状態を反映することから栄養の指標としても用いられている。IGF-1濃度は年齢により大きく変動し、思春期において最も高濃

度であり加齢によりGH分泌の低下とともに減少する。最近の研究では血中IGF-1濃度と認知機能との関連も報告されている。1996年に著者らは日本人健常成人男性469例、女性255例を対象として年齢別性別IGF-1基準値を10歳刻みではじめて設定し、報告した¹⁾。しかし一部の年代で例数が少ないため信頼区間の幅が大きく再設定が必要と考えられた。今回、さら

に多数例を対象として血中IGF-1濃度の基準範囲の再設定を試みた。

B. 研究方法

対象：日本人健常成人として、20歳から69歳まで各年代5歳刻みで男性50例、女性50例、および18-19歳、70歳以上の年齢で男性25例、女性25例を対象とした。除外基準として、1)BMIが17以下または30以上の者、2)来院時の採血にて、ALTが施設基準値の3倍以上、またはクレアチニンが2mg/dl以上、または空腹時血糖が116mg/dl以上の者、3)来院日の4週間以内に急性疾患に罹患した者、4)下垂体性疾患、甲状腺疾患を有する者、5)巨人症、末端肥大症、小人症等の疾患を有する者、6)糖尿病、肝疾患(特に肝硬変)、腎疾患、心疾患などの重篤な疾患を有する者、7)妊産婦及び授乳中の者、8)その他、試験責任医師または試験分担医師が不適当と判断した者、を取り上げた。被験者の募集、組み入れなどに関し株式会社総合臨床薬理研究所に試験実施を依頼した。

方法：被験者は来院時間直前の食事の摂取は禁止とし、最後の食事から検査終了までは水以外の飲み物の摂取を禁止した。医療機関へ来院後、問診、身長、体重、ウエスト周囲径を測定し、静脈血採血を行った。空腹時血糖値、ALT(GPT)、総コレステロール、クレアチニンを測定した。IGF-1の測定は、IGF-1(ソマトメジンC)IRMA「第一」(製造販売元：株式会社エスアールエル、株式会社テイエビー販売)により行った。IGF結合蛋白との再結合を阻止する試薬を含む希釈液で検体処理し無抽出によるIRMA法に基づいたビーズ固相法を利用し、総IGF-1濃度を測定する方法²⁾である。測定の変動係数CVは約5-8%であった。

統計処理：血中IGF-1濃度の測定値分布の検索にべき乗変換を用いた。性別年齢別の血中

IGF-1濃度の基準範囲は、Box-Cox変換を使い現量値曲線のセンタイル値をもとめるLMS法³⁾を使用して、3次スプライン関数により平滑化して求めた⁴⁾。LはBox-Cox変換係数 λ (歪度)を、Mは中央値(median)を、Sは変動係数(coefficient of variation)を表している。

(倫理面への配慮)

本臨床試験に関し、国立病院機構京都医療センターおよび株式会社総合臨床薬理研究所の倫理審査委員会および試験実施医療機関の治験審査委員会において試験実施計画書が審議され、試験実施が承認された。

C. 研究結果

被験者の総数は男性557例、女性563例の1120例であったが、血清クレアチニン値が1.8mg/dlであった1例と血清ALT値が100IU/Lを超えた1例を除外し、1118例を対象とした。年齢・性の区別をしない全例の血中IGF-1濃度の分布は、図1に示すように正規分布せず、変換原点を24.077、べき乗を0.222としたBox-Cox変換により正規化が可能であった。

成長曲線など年齢により変化する現量値曲線のセンタイル値を求める方法であるLMS法を利用して性別年齢別の基準範囲を求めた。最初に $\pm 2.81SD$ の範囲から外れる例を極端な離れ値として除外した。この結果、男性1例、女性7例が除外され、最終的な解析対象は男性554例、女性556例の合計1110例となった。表1に解析対象の年齢および性別分布と平均BMIを示した。また図2には解析対象における血中IGF-1濃度の年齢別分布を示した。

20歳から70歳までの男女別基準範囲および各年齢におけるL,M,S値を表2a、表2bに示した。平均IGF-1濃度は20歳の男女でそれぞれ243ng/ml、259ng/mlであり、女性で高値であった。IGF-1濃度は年齢と共に減少し70歳の男女では

それぞれ124ng/ml, 101ng/mlとなった。35歳以上では男性の方が女性より高値であった。18歳から80歳まで男女別年齢における血中IGF-1濃度の+2SD, +SD, median, -SD, -2SDに相当する平滑化曲線を図3に示した。

D. 考察

今回、多数例の日本人の健常成人を対象として血中IGF-1濃度を測定し、年齢別・性別の基準範囲を設定した。10年前に設定した年齢別・性別基準範囲では、一部の年齢層で健常対象者の例数が少なく、かつ10歳刻みで統計処理したため、各年代で段差が生じ、結果の解釈に不都合であった。今回、解析に用いたLMS法³⁾は、成長曲線などの現量値曲線のセンチル値を求める場合に使用され、年齢ごとの測定値の分布が一律に正規化できない場合にその威力を発揮する。各年齢において設定されたL,M,Sの値を用いて、SDスコア(Zスコア)が下記の式に従い計算可能である。

$$Z = \left[\frac{(\text{測定値}/M)^L - 1}{L \times S} \right]$$

年齢により変動するIGF-1の基準値の設定には、年齢関数を用いる方法⁵⁾も報告されている。この場合小児期を含めた全年齢のデータが必要となる。ドイツにおける多施設共同研究で自動測定機によるNichols Advantageを用いたIGF-1基準範囲を設定した成績⁵⁾との比較では、平均値はほぼ同様であるが基準範囲は狭かった。日本人健常者で10年前に設定した基準値¹⁾と比較しても、今回の平均値は女性例でほとんど変化ないが、男性例では若干高値であった。基準範囲は比較的狭く、-2SD値が100ng/mlを下回るのは、男女とも35歳以上であった。成人領域におけるGH分泌不全症の診断補助により有用である可能性がある。

今回の健常対象者は関東都市部の住民であるが、BMIの分布から推察すると全国調査と差異がみられなかった。近畿圏の健診センターにおける血中IGF-1濃度の検討結果(古賀ら)との比較ではほぼ一致した結果が得られた。したがって、今回設定した基準範囲を日本人成人の基準値として大きな問題はないと考えられる。

本研究は、医師主導型臨床研究としてファイザー株式会社からの研究助成、厚生労働省難治性疾患克服研究事業間脳下垂体機能障害に関する調査研究班および財団法人成長科学協会成長ホルモン・関連因子検討専門委員会の支援を得て実施された。

参考文献

- 1) 島津 章, 藤枝憲二, 羽二生邦彦, 他: IRMAキットを用いたIGF- I , IGF- II , IGFBP-3測定の臨床的検討, 第1報 成人期における検討, ホルモンと臨床, 44: 1129-1138, 1996
- 2) 高須重人, 土屋ますみ, 森 一峰, 他: 血中IGF-1およびIGF- II の無抽出IRMA系の開発と基礎検討. ホルモンと臨床 44(4): 383-391, 1996
- 3) Cole TJ, Green PJ: Smoothing reference centile curves: The LMS method and penalized likelihood. Stat Med 11: 1305-1319, 1992
- 4) Cole TJ, Pan H: A program calculating age-related reference centiles using the LMS method. lmsChartMaker Pro version 2.3. Medical Research Council, UK. 25 September 2006
- 5) Brabant G, von zur Muhlen A, Wuster C, et al.: Serum insulin-like growth factor 1 reference values for an automated chemiluminescence immunoassay system: results from a multicenter study. Hormone Research 60: 53-60, 2003