

る可能性が得られ、有望なLINHの診断マーカーの候補と考えられた。今後の本班を中心とした検体の収集を行いさらに精度を深めたマーカーとして評価した上で臨床展開する。

#### ・下垂体疾患の診断標準化に向けたホルモン基準値の設定

クッシング病/サブクリニカルクッシング病の診断において基本となるデキサメサゾン0.5mg抑制試験はスクリーニングの検査として必須であり、またサブクリニカルクッシング病診断の際は、測定誤差を考慮して慎重に判断する必要がある。

#### ・バゾプレシン(AVP)

家族性中枢性尿崩症の発症機構において小胞体ストレス下のバゾプレシンmRNAはその安定性が低下することにより発現が低下することが病態の進行機序として重要であることが示された。

さらに下垂体柄を圧排するラトケ嚢胞では、視床下部障害型の内分泌異常をきたし、下垂体機能低下症、中枢性尿崩症を示す特異例が認められる。

#### ・成長ホルモン(GH)

成人GHDでは肥満、脂質代謝異常とともに肝機能障害を高頻度に合併し、この肝機能障害はNAFLD・NASHと考えられ、GH治療により改善することを認めた。

また、術後GHD症例における代謝異常やQOLについては長期にわたって綿密な観察が必要であることが示された。

さらにTwo-photon extracellular polar tracer法は開口分泌をintactな細胞で直接観察できる手法であり、GH産生細胞をはじめとする内分泌細胞およびその腺腫において開口分泌と分泌調節機構、病理像、臨床像について基礎的な解析を可能とするためその意義は大きいと考えられる。

一方、GH産生腫瘍の約40%にgsp変異を認め、gsp変異を伴う症例ではオクトレオチドによるMLL/p27<sup>Kip1</sup>経路の活性化に抵抗性を示したことは、今後先端巨大症の薬物治療の効果予測と薬物選択に関し応用可能である。

またプロレニン受容体がV-ATPaseの機能を介し、GH分泌とGH系疾患の病態形成に関与する可能性が示された。

#### ・ACTH

ob/obマウスにおける肥満・過食の形成における糖質コルチコイド上昇の、また過食形成に視床下部AgRPの関与が示唆された成績は、今後Cushing病の耐糖能異常管理をより有効とするための基礎的成績となる。

またACTH依存性Cushing症候群として発見され、病理学的にcorticotroph hyperplasiaを呈する稀な症例の病因検索を種々の画像検査およびCRH免疫染色により行ったが、CRH過剰産生を示す所見を認めず今後corticotroph hyperplasiaの病態解明が必要である。

#### ・プロラクチン

マクロプロラクチン血症では無症状の症例が多数あるため、今後症例を積極的に集積し日本における診断・治療指針を早期に定める必要がある。

一方、非浸潤性PRLomaの場合は薬物療法のコントロール率と同様の手術成績が得られたことから、長期薬物治療と手術療法の適応を明らかに定義していく必要がある。

#### ・ゴナドトロピン

中枢性第2度無月経でも、頻回の通院が困難な症例には、体重等を考慮の上、rFSHの自己注射を検討すべきと考えられる。

また腫瘍化に伴うLHβ発現低下にはDNAのメチル化が重要な役割を話していることが

強く示唆された。

#### ・下垂体機能低下症

日本発でその概念が初めて報告された抗PIT-1抗体の存在する後天性下垂体機能低下症を抗PIT-1抗体症候群と命名した上で、その病態解析と治療法について今後症例を加え検討を進める。

また、甲状腺領域に放射線治療を受けた患者の30%にsubclinical hypothyroidism (SH: TSH高値、FT3正常、FT4正常)を呈することが示された。

#### ・長期予後関連調査

間脳下垂体疾患患者510名に対して患者背景、治療、合併症および生活状況に関して解

析した結果、患者に対する生活の質を含めた最善の治療の選択決定には全国規模の長期にわたる症例の蓄積が必要と考えられた。

#### ・その他の成果

SIADHの標準治療法の設定に向けた検討として前年度から継続研究している橋中心髄鞘崩壊回避を目的としたミノサイクリンの有効性についての治験を今年度も実施中であり、また未承認薬の臨床導入のため当研究班が推進してきた中枢性尿崩症治療薬であるデスモプレシン経口薬の開発治験を2011年1月から開始した。さらに研究成果の社会還元のための公開セミナーを2010年12月に開催した。

## IV. 分担研究報告書

## プロテオミクスによるリンパ球性漏斗下垂体後葉炎の 診断マーカー開発 第2報

研究代表者	大磯ユタカ	名古屋大学大学院医学系研究科糖尿病・内分泌内科学
研究協力者	岩間信太郎	名古屋大学大学院医学系研究科糖尿病・内分泌内科学
	梶村 益久	名古屋大学大学院医学系研究科糖尿病・内分泌内科学
	清田 篤志	名古屋大学大学院医学系研究科糖尿病・内分泌内科学
	鈴木 陽之	名古屋大学大学院医学系研究科糖尿病・内分泌内科学
	有馬 寛	名古屋大学大学院医学系研究科糖尿病・内分泌内科学

**研究要旨:** リンパ球性漏斗下垂体後葉炎(LINH)は中枢性尿崩症を呈する自己免疫疾患と考えられているが診断マーカーは確立されていない。これまで我々はLINHに特異的な自己抗原の同定に向け、患者血清を用いた免疫沈降により得られる自己抗原をプロテオミクスで網羅的に解析する方法(免疫沈降-ショットガン LC-MS/MS法)を開発し昨年の本会で報告した。

今回の研究では3例のLINH患者血清と健常人の血清を用いて本法で解析を進め、LINH患者特異的な自己抗原候補が複数見出された。その中に自己抗原候補として6種類の分泌顆粒関連蛋白が認められたため、それらの6種類の自己抗原候補蛋白をサブクローニングし、リコンビナント蛋白を作成した。これらのリコンビナント蛋白と患者血清との反応をウェスタンブロット(WB)で再検証した結果、76kDの蛋白において患者血清との反応が確認された。この成績をもとに非侵襲的診断マーカーの開発と病因自己抗原の解明を進めている。

### A. 研究目的

リンパ球性漏斗下垂体後葉炎(LINH)は中枢性尿崩症(DI)を呈する自己免疫疾患と考えられているが診断マーカーは確立されていない。これまで我々はLINHに特異的な自己抗原の同定に向け、患者血清を用いた免疫沈降により得られる自己抗原をプロテオミクスで網羅的に解析する方法(免疫沈降-ショットガン LC-MS/MS法)を開発し<sup>1)2)</sup>、平成21年度の本会で報告した<sup>3)</sup>。また、我々は本研究班の横断的研究として、「ADH分泌異常症(尿崩症)を呈するリンパ球性漏斗下垂体炎の診断マーカーの開発に向けた患者検体の収集」を開始している<sup>4)</sup>。

本法は患者血清と下垂体後葉抽出蛋白を用いて免疫沈降を施行することで患者血清中に存在する自己抗体と反応する自己抗原を抽出し、高精度質量分析装置(LTQ Orbitrap XL<sup>®</sup>)でその自己抗原を網羅的に同定するものである。3例のLINH患者血清と健常人の血清を用いて本法で解析した結果、LINH患者特異的な自己抗原候補が複数見出された(図1)。その後の検討で、その中には自己抗原候補として興味深い6つの分泌顆粒関連蛋白が認められたため、それらの6つの自己抗原候補蛋白をサブクローニングし、リコンビナント蛋白を作成した。これらのリコンビナント蛋白と患者血清との反応をウェスタンブロット

(WB)で再検証した結果、76kDの蛋白において患者血清との反応が確認された。今回の研究の目的は、非侵襲的診断マーカーの開発及び病因自己抗原の解明に向け、本蛋白に対する自己抗体の有無をより多くの検体で検証し、LINHにおける疾患特異性を評価することである。

## B. 研究方法

- 1) 76kDの自己抗原候補蛋白の全長cDNAを発現ベクター(pcDNA3.1D/V5-His-TOPO®)にサブクローニングした。
- 2) Lipofectamine 2000®を用いて発現ベクターを哺乳類細胞株(HEK293FT)にトランスフェクションし、リコンビナント蛋白を合成した。
- 3) 合成したリコンビナント蛋白と一次抗体として患者血清(1:50)を用いてWBを行い、76kDの自己抗原候補蛋白に対する血清中の自己抗体の有無を検討した。
- 4) 検討に用いた血清は図2の通りである。
- 5) 下垂体後葉、及び視床下部視索上核(SON)のバゾプレシン(AVP)ニューロンにおける本蛋白の発現を免疫組織化学(IHC)で検討した。

## C. 研究結果

- 1) WBで検討した結果(図3)、LINH患者7例中6例(6/7)で本蛋白に対する自己抗体が認められた。一方、対照者で本自己抗体が認められたのは健常人で1/9、リンパ球性下垂体前葉炎(LAH)0/3、腫瘍などに伴うDI 1/10例であった(図4)。検討した全例において、本自己抗体は感度85.7%・特異度90.9%であり、臨床的にLINHとの鑑別に苦慮する腫瘍性病変に伴うDIの症例で特異度90%であった。

- 2) IHCの結果、下垂体後葉及び視床下部SONのAVPニューロンにおいて、本蛋白の発現が認められた(図5)。

## D. 考察

LINHにおいて、76kDの蛋白に対する自己抗体は疾患特異度・感度がともに優れていた。特に、LINHは臨床において腫瘍性病変に伴うDIとの鑑別に苦慮するが、その腫瘍性病変に伴うDI患者との鑑別においても特異度90%であり(図4)、優れた診断マーカーとなる可能性が期待される。

また、下垂体後葉、及び視床下部SONのAVPニューロンにおいて、本蛋白の発現が認められることを初めて明らかにした。すなわち、LINHの病変部位で本蛋白の発現が認められたことから、本蛋白のLINHの病態への関与の可能性、または同部位の炎症によって本自己抗体が二次的に生じた可能性が示唆された。診断マーカーとしての有用性のみならず、LINHの病態への関与の可能性については、今後の重要な検討課題である。

今後も本研究班を中心に引き続き症例の集積を進め、本自己抗原・自己抗体の臨床的な有用性と病態における意義をさらに解明していきたいと考えている。

## E. 結語

我々が開発した免疫沈降-ショットガンLC-MS/MS法により同定された76kD蛋白に対する自己抗体は、LINHにおいて疾患特異度・感度がともに優れている可能性が得られ、有望なLINHの診断マーカー候補と考えられた。

## F. 文献

- 1) 岩間信太郎, 梶村益久, 加藤琢哉, 鈴木

陽之, 榎本篤, 有馬寛, 大磯ユタカ: 日本内分泌学会雑誌85巻2号: 569, 2009.

- 2) Iwama S, Sugimura Y, Kato T, Suzuki H, Enomoto A, Arima H, and Oiso Y. Endocr J. 57 (Suppl.2): S507, 2010.
- 3) 梶村益久, 岩間信太郎, 鈴木陽之, 有馬寛, 大磯ユタカ: 厚生労働省科学研究費補助金 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 平成

21年度総括・分担研究報告書 主任研究者: 大磯ユタカ, 22-26, 2010.

- 4) 大磯ユタカ: ADH分泌異常症(尿崩症)を呈するリンパ球性漏斗下垂体後葉炎の診断マーカーの開発に向けた患者検体の収集, 厚生労働省科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業 平成21年度総括・分担研究報告書 研究代表者: 大磯ユタカ, 1-15, 2010.

図1. 免疫沈降-ショットガン LC-MS/MS法により得られた自己抗原候補蛋白数  
質量分析装置で同定された蛋白のうち、LINH患者に特異的に認められた蛋白数を示す。( )は分泌顆粒関連蛋白の数。

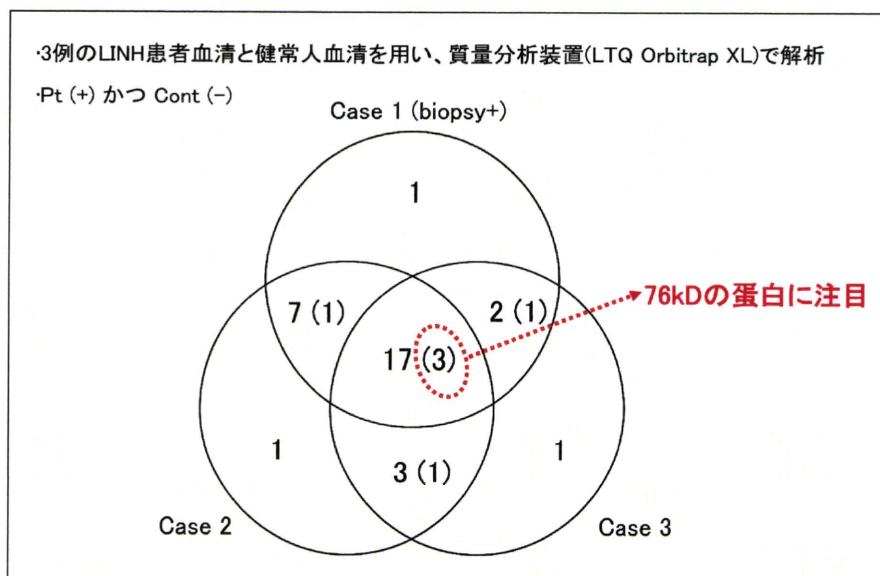


図2. 血清サンプル一覧

LINH	7例
LAH	3例
Disease control	10例
胚細胞性腫瘍+DI	3例
鞍上部松果体腫瘍術後+DI	1例
視床下部腫瘍術後+DI	1例
ラトケ嚢胞+DI	1例
頭蓋咽頭腫+DI	2例
Glioma術後+DI	1例
サルコイドーシス+DI	1例
Healthy control	9例

図3. 患者血清と76kD蛋白を用いたWB

LINH患者において76kDの蛋白に対する反応が認められた。一方、二次性DIや健常人ではその反応は認められなかった。

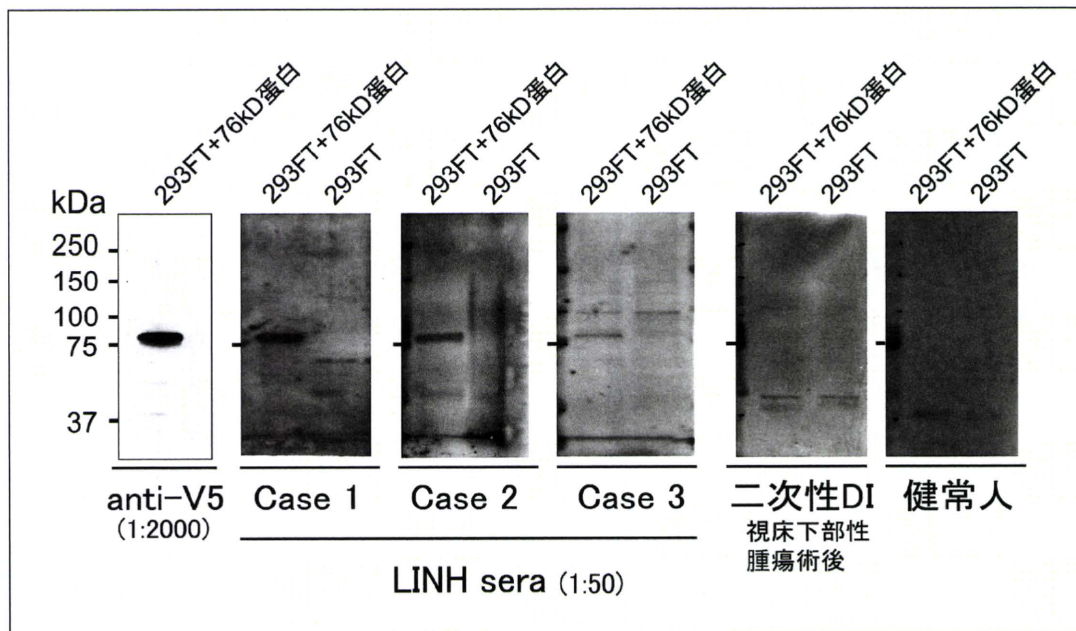
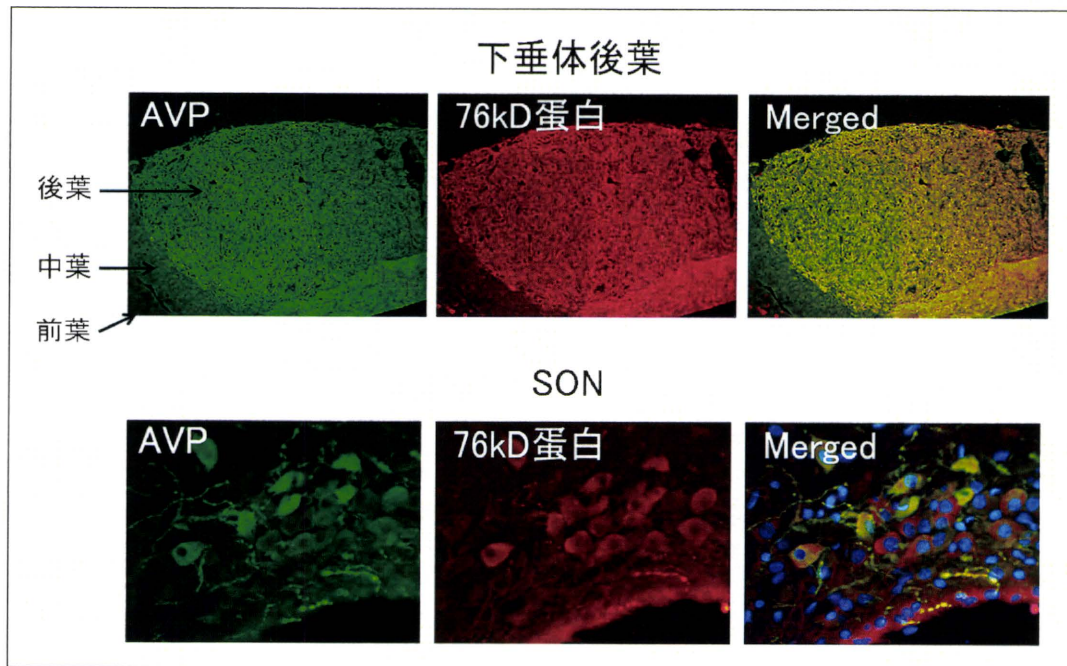


図4. WBで検討した76kD蛋白に対する自己抗体陽性率のまとめ

6/7; 7例中6例で自己抗体陽性を示す。

LINH.....7例	<b>6/7</b>	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;"> <b>全例</b>  <b>感度 85.7% (6/7)</b>  <b>特異度 90.9% (20/22)</b> </div>
LAH.....3例	<b>0/3</b>	
Disease control.....10例	<b>1/10</b>	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;"> <b>腫瘍性病変+DIとの鑑別</b>  <b>特異度 90% (9/10)</b> </div>
胚細胞性腫瘍+DI 3例 <b>1/3</b> 鞍上部松果体腫瘍術後+DI 1例 <b>0/1</b> 視床下部腫瘍術後+DI 1例 <b>0/1</b> ラトケ嚢胞+DI 1例 <b>0/1</b> 頭蓋咽頭腫+DI 2例 <b>0/2</b> Glioma術後+DI 1例 <b>0/1</b> サルコイドーシス+DI 1例 <b>0/1</b>		
Healthy control...9例	<b>1/9</b>	

図5. ラット下垂体後葉及び視床下部視索上核 (SON) における76kD 蛋白の発現  
下垂体後葉及び視床下部室傍核 (SON) のAVPニューロンにおいて76kDの蛋白の発現が認められた。



## 家族性中枢性尿崩症の発症機序の解明および治療法の確立

研究分担者 有馬 寛 名古屋大学医学部附属病院糖尿病・内分泌内科

**研究要旨:**家族性中枢性尿崩症(FNDI)は生後数ヶ月から数年で緩徐進行性に尿崩症が発症する常染色体優性遺伝性疾患である。本研究ではバゾプレシンのキャリアプロテインであるニューロフィジンの点突然変異の一つであるCys98stopを導入したノックインマウス(FNDIマウス)を用い、バゾプレシン遺伝子発現調節の検討を行った。電子顕微鏡を用いた検討により3ヶ月齢のFNDIマウスにおいて視床下部視索上核のニューロンの小胞体内腔に凝集体の蓄積が確認された。FNDIマウスでは野生型マウスと比較してバゾプレシンmRNA発現が基礎状態、刺激下のいずれにおいても有意に低下していたが、転写活性を示すバゾプレシンheteronuclear(hn)RNAの発現は野生型マウスと比較して有意な差を認めなかった。以上より小胞体ストレス下においてバゾプレシンmRNAはその安定性が低下することにより発現が低下することが示唆された。

### A. 研究目的

バゾプレシンは視床下部視索上核もしくは室傍核で産生される抗利尿ホルモンで、血漿浸透圧の上昇や循環血漿量の減少により産生および分泌が刺激される。バゾプレシンは水バランスにおいて重要な役割を担っており、その欠乏により多尿を特徴とする尿崩症を呈する。その中で家族性中枢性尿崩症(FNDI)は常染色体優性遺伝の稀な疾患で生後数カ月から数年で進行性に多尿を呈するようになる。多尿が進行する機序は未だ明らかにされていないが、我々が作成したバゾプレシンのキャリアプロテインであるニューロフィジンの点突然変異の一つであるCys98stopを導入したノックインマウス(FNDIマウス)では、尿崩症の進展とともに視床下部バゾプレシンニューロンの小胞体内腔に凝集体が蓄積する特徴を有し、小胞体ストレスがバゾプレシンニューロンの機能障害や細胞死に深く関与していると考えられる。本研究では小胞体ストレスがどのようなシグナル伝達を介してFNDIの病態形成に関与しているかを明らか

にする目的で、FNDIマウスにおけるバゾプレシン遺伝子発現調節を検討した。

### B. 研究方法

実験は3ヶ月齢FNDIマウスおよび野生型マウスの雄を用いた。

#### 《電子顕微鏡》

マウスを4%パラフォルムアルデヒドで固定後に100 $\mu$ mの切片を作成、2% osmium tetroxideで固定しエポンに包埋した後に超薄切片をウルトラミクロトームおよびダイヤモンドナイフで作成した。

#### 《基礎状態》

自由飲水下のFNDIマウスおよび野生型マウスを断頭屠殺して脳を取り出した。

#### 《急性浸透圧刺激》

急性浸透圧刺激後のバゾプレシン遺伝子発現を検討する目的で900 mOsm/kgの高張食塩水を腹腔内に体重の2%投与、コントロール群には290 mOsm/kgの生理食塩水を体重の2%を腹腔内投与した。腹腔内投与30分後にマウスを断頭屠殺して脳を取り出した。

## 《慢性脱水》

慢性脱水後のバゾプレシン遺伝子発現を検討する目的で48時間飲水を禁じた後にマウスを断頭屠殺して脳を取り出した。

### 《in situ hybridization》

クライオスタットを用いて視床下部視索上核を含む厚さ14 $\mu$ mの切片を作成した。mRNAの検出にはバゾプレシンおよびオキシトシン遺伝子の3' UTRに相補的なRNAプローブを、転写の第一産物であるheteronuclear (hn) RNAの検出にはバゾプレシン遺伝子のintron 1に相補的なRNAプローブを35Sにより標識して用いた。遺伝子発現はフィルム上のシグナルをImage Jソフトを用いて定量した。また視床下部視索上核における遺伝子発現の局在をより詳細に検討する目的で一部のスライドはKodak NTB2 エマルジョンに浸して現像した。

なおノックインマウスを用いた実験に関しては名古屋大学医学部組換えDNA実験安全委員会において承認を受けており、マウスの飼育および実験は各種実験動物の取り扱いに関して厳しい基準を満たした名古屋大学の実験動物施設にて行った。実験に際しては名古屋大学の動物実験指針を遵守するとともに、ノックインマウスを扱う時は遮蔽版を設置し、マウスの逃亡を防止した。

## C. 研究結果

### 《電子顕微鏡》

FNDIマウスの視床下部視索上核の切片では凝集体を有する細胞が認められたが(図1A)、野生型マウスではこのような細胞は認めなかった。凝集体はリボゾームに特徴的な構造物を有する膜に囲まれていたことから粗面小胞体内腔に存在することが確認された(図1B)。

### 《バゾプレシンhnRNAの発現》

エマルジョンに浸した後に現像したスライドの検討においてhnRNAが核の上に発現していることを認め、作成したバゾプレシンintron 1に相補的なprobeが転写の第一産物を認識していることを確認された(図2)。なおsense probeを用いたin situ hybridizationでは有意なシグナルを認めなかった。

### 《基礎状態》

基礎状態のバゾプレシンmRNAは野生型マウスと比較してFNDIマウスにおいて有意に低下していた(図3A)。一方、オキシトシンmRNAの発現は野生型マウスとFNDIマウスにおいて有意な差を認めなかった(図3B)。基礎状態のバゾプレシンhnRNAは野生型マウスとFNDIマウスにおいて有意な差を認めなかった。

### 《急性浸透圧刺激》

生理食塩水投与後および高張食塩水投与後のバゾプレシンmRNAは野生型マウスと比較してFNDIマウスにおいて有意に低下していた。高張食塩水投与はいずれのマウスにおいても生理食塩水投与と比較してバゾプレシンmRNAの発現に有意な影響を及ぼさなかった。一方、生理食塩水投与後のバゾプレシンhnRNAは野生型マウスとFNDIマウスにおいて有意な差を認めなかった(図4)。高張食塩水投与後のバゾプレシンhnRNAは生理食塩水投与後と比較していずれのマウスにおいても有意に増加し、その絶対値は野生型マウスとFNDIマウスの間で有意な差を認めなかった(図4)。

### 《慢性脱水》

慢性脱水はいずれのマウスにおいてもバゾプレシンmRNAの発現を有意に増加させたが、その絶対値はFNDIマウスにおいて野生型マウスより有意に低くかった。一方、バゾ

プレシンhnRNAは慢性脱水によりいずれのマウスにおいても有意に増加し、その絶対値は野生型マウスとFNDIマウスの間で有意な差を認めなかった。

#### D. 考察

今回の検討ではまず電子顕微鏡を用いて3ヶ月齢のFNDIマウスの視床下部視索上核のニューロンの粗面小胞体内腔に凝集体が蓄積していることを確認した。FNDIマウスは多尿を示すことから野生型マウスより脱水状態にあると考えられるが、FNDIマウスでは野生型マウスと比較するとバゾプレシンmRNAが基礎状態において有意に低下していた。さらに慢性脱水下ではmRNAの発現がFNDIマウスおよび野生型マウスのいずれにおいても有意に増加したが、その発現レベルはFNDIマウスにおいて有意に低値であった。一方で転写の第一産物であり転写活性の指標であるバゾプレシンhnRNAは基礎状態、急性浸透圧刺激下および慢性脱水後のいずれの場合においてもFNDIマウスと野生型マウスで有意な差を認めなかった。以上の結果からFNDIマウスの視床下部視索上核バゾプレシンニューロンにおいてバゾプレシンmRNAの発現が基礎状態および刺激下のいずれにおいても野生型マウスと比較して低下していることが明らかになるとともに、バゾプレシンmRNAの発現低下が遺伝子転写活性の低下ではなくmRNAの安定性に起因することが示唆された。同じく視床下部視索上核に発現するオキシトシンmRNAがFNDIマウスと野生型マウスとの間で発現レベルに有意な差を認めなかったことから、こうしたmRNAの変化はバゾプレシンニューロンが小胞体ストレスにさらされていることに起因している可能性が示唆された。

抗利尿ホルモンであるバゾプレシンは水バランスにおいて重要な役割を果たしており、わずかな水バランスの変化に対しても分泌およびその遺伝子転写活性(hnRNA)が変化することが知られている。一方バゾプレシンmRNAは比較的安定しており、有意な増加を検出するためには慢性脱水のような長時間の強い刺激が必要である。今回の検討においてもバゾプレシンmRNAは急性浸透圧刺激に対しては有意な変化を示さず、慢性脱水においてのみ有意な変化を示した。このように安定したバゾプレシンmRNAの発現がFNDIマウスにおいて低下していることはバゾプレシンの合成低下に繋がり、FNDIにおけるバゾプレシン分泌低下の一因とも考えられるが、その一方でバゾプレシンmRNAの発現低下は変異蛋白の合成の低下にも繋がる。

FNDIマウスでは視床下部視索上核のニューロンに凝集体の蓄積を認め、電子顕微鏡を用いた検討からこの凝集体はリボソームを有した小胞体膜に囲まれていることから粗面小胞体内腔に蓄積していることが確認された。小胞体ストレス下ではunfolded protein response (UPR) と呼ばれる反応が生じることが広く知られている。UPRにはinositol requiring enzyme 1 (IRE1)、activating transcriptional factor 6 (ATF6) およびPKR-like ER kinase (PERK) の3つの主調節器がある。このうちIRE1はX-box binding protein 1をスプライスし、ATF6とともに小胞体内シャペロンや小胞体内の変性蛋白を除去する機序に関与する蛋白の発現を増加させる。一方、PERKはeukaryotic translation initiation factor 2  $\alpha$  (eIF2 $\alpha$ ) のリン酸化を介して蛋白翻訳を抑制し、小胞体内での作業負荷を軽減する。今回我々が見出したFNDIマウスにおけるmRNAの低下はPERK-eIF2 $\alpha$ を介した系

と同様にバゾプレシンニューロンにおける小胞体の作業負荷の軽減に繋がると考えられる。小胞体ストレスは糖尿病や神経変性疾患などの種々の疾患においてその病態形成に深く関与していることが最近の研究で明らかとなってきた。今後はどのような機序でバゾプレシンmRNAの低下が生じているかを解明することが必要であり、こうした解析を通じて新たなUPRを明らかにすることが期待される。また小胞体ストレスを軽減することによりFNDIにおける多尿の発症、進展を抑制する可能性も考えられる。

## E. 結論

FNDIモデルマウスにおいてバゾプレシンmRNAの発現低下は転写活性の低下ではなくmRNAの安定性の低下に起因することが示唆された。こうした変化は小胞体ストレスにさらされているバゾプレシンニューロンにおける小胞体作業負荷に繋がる可能性が考えられる。

## F. 健康危険情報

該当なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Arima H, Oiso Y. 2010 Mechanisms underlying progressive polyuria in familiar neurohypophysial diabetes insipidus. *J Neuroendocrinol* 22 (7): 754-757
- 2) Hiroi M, Morishita Y, Hayashi M, Ozaki N,

Sugimura Y, Nagasaki H, Shiota A Oiso Y, Arima H. 2010 Activation of vasopressin neurons leads to phenotype progression in a mouse model for familial neurohypophysial diabetes insipidus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 298 (2):R486-93.

- 3) 有馬寛, 大磯ユタカ. 尿崩症, 今日の診療指針(第6版) p1159-1160, 2010年, (株)医学書院

### 2. 学会発表

- 1) 森下啓明, 有馬寛, 廣井麻依子, 林正幸, 尾崎信暁, 梶村益久, 長崎弘, 大磯ユタカ. 家族性中枢性尿崩症におけるバゾプレシンmRNA発現調節機序—モデルマウスを用いた検討. 第20回バゾプレシン研究会(2010年1月9日, 東京).
- 2) Morishita H, Arima H, Hiroi M, Hayashi M, Oiso Y. Suppression vasopressin synthesis delayed phenotype progression in a mouse model for familial diabetes insipidus. 14th International Congress of Endocrinology (2010, March 26-30, Kyoto)
- 3) Morishita Y, Arima H, Oiso Y. Posttranscriptional regulation of vasopressin mRNA in a mouse model for familial neurohypophysial diabetes insipidus. The 7th International Congress NEUROENDOCRINOLOGY (2010, July 11-15, Rouen France)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし。

図1. FNDI マウスに認められる粗面小胞体内腔の凝集体

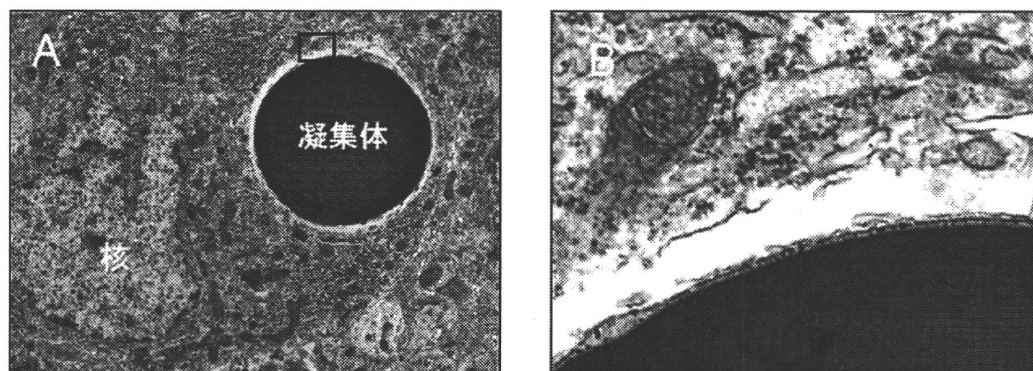


図2. バゾプレシン hnRNA の発現

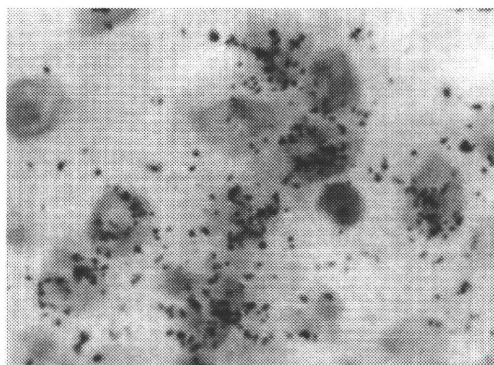


図3. FNDI および野生型マウスにおけるバゾプレシンとオキシトシン mRNA の発現

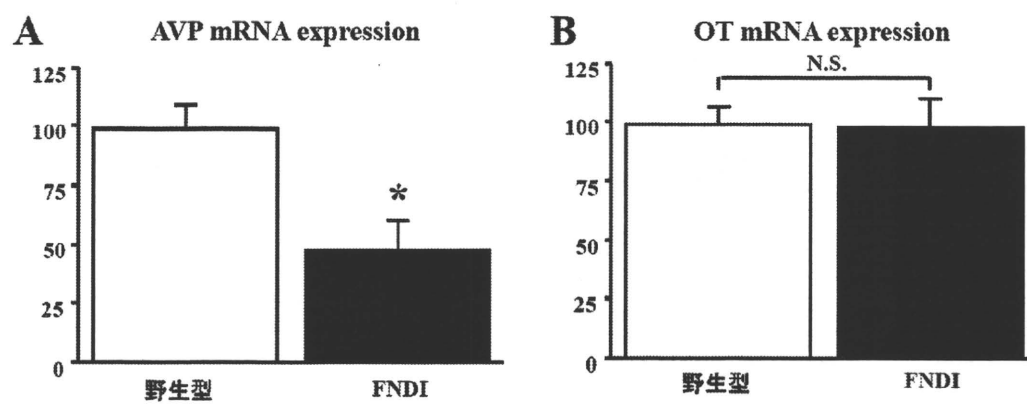
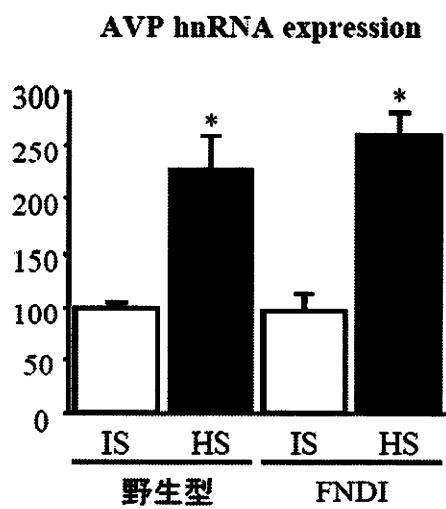


図4. 浸透圧刺激によるバゾプレシンhnRNAの発現



## 嚢胞の占拠部位により特異な下垂体前葉障害、 尿崩症を呈したラトケ嚢胞の解析

研究分担者 石川 三衛 自治医科大学附属さいたま医療センター内分泌代謝科  
研究協力者 浅野 智子 自治医科大学附属さいたま医療センター内分泌代謝科  
佐々木正美 自治医科大学附属さいたま医療センター内分泌代謝科

**研究要旨:**中枢性尿崩症を呈したラトケ嚢胞4例を解析した。症例1-3は56-69歳女性。いずれの症例も多飲・多尿が出現し中枢性尿崩症と診断された。MRI画像上でトルコ鞍内、トルコ鞍内から鞍上部にかけて径10-16mmの嚢胞性腫瘤が見られラトケ嚢胞と診断された。画像上T1強調像では後葉高信号は消失しており、また下垂体前葉機能は正常であった。うち1例で手術を施行し病理学的にラトケ嚢胞と確認した。症例4は特異な下垂体機能障害を呈した68歳女性。数年前から食欲不振、体重減少がみられ67歳時多尿・口渇が出現、尿崩症と診断されDDAVPが開始となっていた。全身状態不良、頭痛のため当院入院となった。画像上下垂体柄から後葉にかけて腫大し同部位に辺縁明瞭に周囲が造影される腫瘤が見られた。T1強調像で後葉高信号は消失していた。下垂体機能では、視床下部障害パターンの下垂体機能低下症を呈した。3ヵ月後のMRIでは下垂体柄と後葉の腫脹が軽減した。画像から下垂体柄に主座をおくラトケ嚢胞の炎症か出血による一時的な症状の悪化と考えられた。下垂体柄を圧排するラトケ嚢胞では、視床下部障害型の内分泌異常をきたし、下垂体機能低下症、中枢性尿崩症を示す特異例が認められる。

### A. 研究目的

ラトケ嚢胞は無症候性で経過することが多く、近年MRIの発達により発見される機会が増えている。通常のラトケ嚢胞は鞍内に限局、鞍内から鞍上部にかけて伸展する形で存在することが多く、下垂体柄を首座に置く形や鞍上部に限局するものは珍しい。

症候性のラトケ嚢胞では頭痛、視野障害や内分泌学的異常をきたすことが多く、内分泌学的異常では単独ホルモン欠損症や汎下垂体機能低下症、中枢性尿崩症、高PRL血症が知られる<sup>1)2)</sup>。

最近私たちはラトケ嚢胞の主座が下垂体柄部であり、視床下部障害パターンの下垂体機能低下症、高PRL血症、尿崩症を呈した珍

しい症例を経験したので、過去に経験した3例のラトケ嚢胞と比較し解析した。

### B. 研究方法

今回経験したラトケ嚢胞の症例と2003年～2007年に当センターで中枢性尿崩症を呈しラトケ嚢胞と診断された3例を症状、画像所見、内分泌異常を比較し解析した。

画像所見は下垂体MRIを施行し、内分泌機能に関してはAVP分泌能評価のため5%高張食塩水負荷試験(0.05ml/Kg/min, 2時間)を施行し尿量、尿浸透圧、血漿浸透圧、血清Na、血漿AVP値を測定した。下垂体前葉機能の評価は基礎値と4者負荷試験(CRH, GRH, TRH, LH-RH)の結果で判断した。

### C. 研究結果

症例1は56歳女性。2年前、偶発的に下垂体腫瘍を指摘された。今回頭痛・嘔吐が出現、その直後から多飲・多尿が出現し検査の結果、中枢性尿崩症と診断。MRI画像上トルコ鞍内から鞍上部にかけて径16mmのT1強調像で低信号、T2強調像で高信号、造影されない嚢胞性腫瘍がみられ、下垂体柄は後方に圧排されていた。手術を施行し病理学的にラトケ嚢胞と診断された。

症例2は69歳女性。多尿・口渇・多飲が出現し、中枢性尿崩症と診断された。画像上トルコ鞍内にT1強調像で低信号、T2強調像で低信号、造影されない径10mmの嚢胞性腫瘍が見られ下垂体柄は前方に変位していた。画像上ラトケ嚢胞と診断された。

症例3は56歳女性。多尿・口渇・多飲が出現し中枢性尿崩症と診断された。画像上トルコ鞍から鞍上部にかけて径11mmのT1強調像で高信号、T2強調像で低信号の造影されない嚢胞性腫瘍が見られ下垂体柄は前上方に圧排されていた。画像上ラトケ嚢胞と診断された。いずれの症例も視野障害は存在せず、画像上T1強調像では後葉高信号は消失し、下垂体前葉機能は正常であった。

症例4は68歳女性。61歳時より食欲不振、体重減少がみられていた。65歳時筋力低下、67歳時口渇・多飲が出現、近医で中枢性尿崩症と診断されDDAVPが開始となった。68歳時全身状態不良、頭痛のため緊急入院となった。入院時身体所見は身長152cm、体重48Kg(症状出現時より18Kgの減少)、BMI20.9、体毛脱落がみられ、全身の筋力はMMT4/5に低下していた。血液一般検査は明らかな異常所見は見られなかった。

画像所見ではMRI上、下垂体柄から後葉にかけて腫大しT1強調像で等信号、T2強調

像で高信号、辺縁明瞭に周囲が造影される径13mmの嚢胞性腫瘍が認められた。T1強調像で後葉高信号は消失していた。下垂体前葉機能では、基礎値でTSH以外のホルモンは低下し、高PRL血症が見られた。下垂体ホルモンは4者負荷試験には正常反応(図1)、インスリン低血糖やクロミフェンを用いた視床下部を介する刺激試験には無反応であった(図2)。以上から視床下部障害パターンの下垂体機能低下症と中枢性尿崩症と診断しホルモン補充療法を行った。3ヶ月後のMRIでは下垂体柄と後葉の腫脹が消失し、T1強調像で高信号、T2強調像で低信号の下垂体柄に主座をおく径11mmのラトケ嚢胞が明らかとなった。入院時の画像所見はラトケ嚢胞の出血か炎症による一時的な変化と考えられた。

### D. 考察

経験した4例はすべて女性であり、ラトケ嚢胞が女性に多いことに矛盾しなかった。また年齢は56-69(62.2±7.2)歳であった。診断の契機となった症状は尿崩症が3例、頭痛が1例であり、診断時の症状は頭痛が2例、尿崩症が4例、副腎不全症状が1例でみられた。嚢胞の部位は鞍内部に限局したものが1例、鞍内から鞍上部にかけて進展したものが2例、1例は今回経験した鞍上部に首座を置くものであった。下垂体柄は症例1、3では嚢胞により圧排され、症例2では軽度の変位、症例4は腫脹していたが変位はなかった。MRI T1強調像での所見は症例1、2で低信号、症例3で高信号、症例4は等信号(数ヵ月後高信号)であった。内分泌学的所見は症例1-3は中枢性尿崩症のみ呈し、下垂体前葉機能は保たれていた。一般に内分泌異常を持つラトケ嚢胞の原因は明らかではないが、汎下垂体機能低下症に関してはラトケ嚢胞によ

る下垂体前葉の物理的な圧迫や炎症の波及により起こるとされる。尿崩症に関しては下垂体後葉の物理的圧迫や炎症の波及により起こり[5]、高PRL血症に関しては下垂体柄の圧迫症例で起こることが多く、術後に改善する症例が多いといわれる<sup>3)</sup>。またMRI所見ではT1強調像で高信号のものは嚢胞内に高濃度の蛋白を含み、汎下垂体機能低下症との関係が指摘されている<sup>4)</sup>。

症例1-3の中には下垂体柄部の圧排を認めた症例、T1強調像で嚢胞が高信号の症例もあったが画像所見と内分泌異常との関連はみられなかった。

症例4は特異な内分泌異常を示した。一般的なラトケ嚢胞の汎下垂体機能障害例では、視床下部ホルモン刺激には反応しないが、当症例では4者負荷試験に反応した。しかしインスリン低血糖やクロミフェン試験など視床下部の刺激に対して下垂体前葉ホルモンが全く反応しない視床下部障害型の下垂体機能低下症を呈した。また画像所見から下垂体前葉は保たれており物理的圧迫の所見は見られなかったことも合わせると、下垂体機能障害は下垂体前葉自体の障害ではなく下垂体柄に存在する嚢胞により視床下部ホルモンの門脈内輸送が途絶した可能性が高いと考えられた。高PRL血症は以前の報告で下垂体柄の圧迫でみられることが多いが、当症例では下垂体柄の外部からの圧迫ではなく下垂体柄に腫瘤が存在し下垂体柄のPIFの下降途絶によるものと考えられた。尿崩症に関しては後葉自体にも嚢胞が存在することから物理的な圧迫や炎症の波及のどちらも考慮することができたが、下垂体機能障害、高PRL血症の合併も考慮すると下垂体柄の障害によりAVP産生ニューロン自体の障害が考えられた。

また画像所見上は、頭痛が出現し入院し

た際下垂体柄の腫脹、下垂体柄はT1強調像で等信号、T2強調像で高信号、その周囲が造影されていた。その後、下垂体柄の腫脹は軽快しT1強調像で高信号、T2強調像で低信号の造影されない嚢胞性腫瘤が明らかとなった。これらの変化から、経過として下垂体柄部のラトケ嚢胞は以前より存在し、視床下部ホルモンの門脈内輸送が障害される程度に腫大して副腎不全症状が出現、その後増大や周囲への炎症の波及により1年前から尿崩症も伴うようになったと推測される。また入院時は頭痛が存在していたことからラトケ嚢胞の出血か炎症により一時的に症状が悪化し、今回の診断に至ったと考えられた。

## E. 結論

下垂体柄を圧排するラトケ嚢胞では、視床下部障害型の内分泌異常をきたし、下垂体機能低下症、中枢性尿崩症を示す特異例が認められる。

## 文 献

- 1) Raper D M S, Michael Beser (2009) Clinical features, management and recurrence of symptomatic Rathles cyst. J Clin Neurosci 16:385-389
- 2) Ross DA, Norman David, Wilson CB (1992) Radiographic characteristic and results of surgical management of Rathkes cysts in 43 patients. Neurosurgery 30:173-179
- 3) Aho CJ, Liu C, Zelman V, et al. (2005) Surgical outcomes in 118 patients with Rathke cleft cysts. J Neurosurg 102:189-193
- 4) 西岡 宏, 伊澤仁之, 池田幸穂, 生天目浩昭, 深見真二郎, 原岡 襄(2008) ラトケ嚢胞に伴う下垂体前葉機能障害の長期治療成績, 日本間脳下垂体腫瘍学会

5) 高橋 潤, (2004) 汎下垂体機能低下症を伴ったラトケ囊胞の周囲下垂体組織に

CRH challenge test

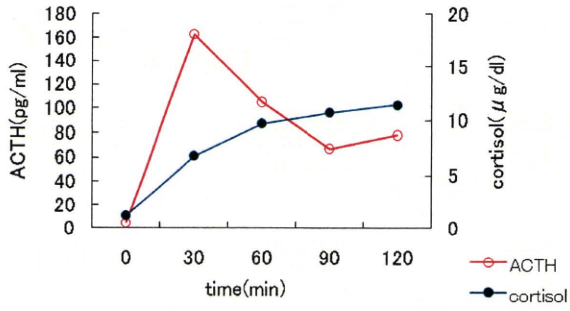


図 1 (a)

LH-RH challenge test

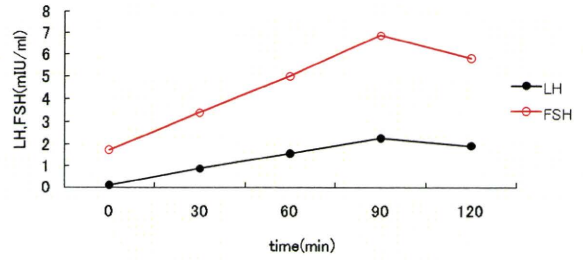


図 1 (b)

Insulin-induced hypoglycemia test

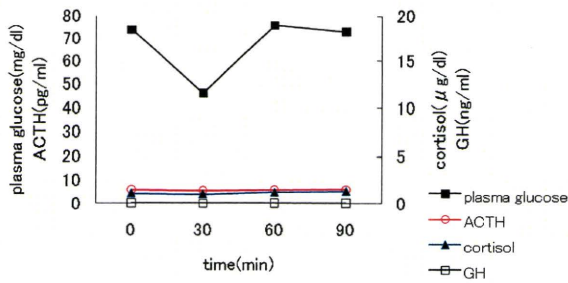


図 2 (a)

Clomiphene test

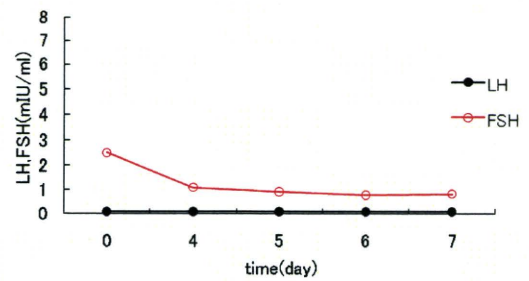


図 2 (b)

## コルチゾール測定値標準化と測定誤差を考慮した Dex抑制試験によるクッシング病診断の検討

研究分担者	須田 俊宏	弘前大学大学院医学研究科内分泌代謝内科学
研究協力者	崎原 哲	弘前大学大学院医学研究科内分泌代謝内科学
	照井 健	弘前大学大学院医学研究科内分泌代謝内科学
	二川 原健	弘前大学大学院医学研究科内分泌代謝内科学
	蔭山 和則	弘前大学大学院医学研究科内分泌代謝内科学
	沖 隆	浜松医科大学第二内科
	桑 克彦	産業技術総合研究所

**研究要旨:** Non-RIAで測定された低濃度域血清コルチゾール値は信頼性が低く、クッシング病診断の弊害となっている。各測定キットの校正を行うことで、測定値ばらつきの改善を目指した。

コルチゾールの高純度標準品を利用して作成した検量線で低濃度のコルチゾール検体を測定し、血清標準物質とした。これを用いて従来使用されていた7つのコルチゾール測定キットの校正を行ったところ、各キット間のばらつきが $CV \leq 10\%$ に改善した(校正前は約15%)。

この測定精度だと、Dex抑制試験のカットオフ値である1.8、3および $5\mu\text{g}/\text{d}$ 付近のばらつき( $\pm 2SD$ )は、それぞれ $\pm 0.36$ 、 $\pm 0.6$ 、 $\pm 1.0\mu\text{g}/\text{dl}$ となる。この幅を考慮し当科で施行したDex抑制試験の結果を再検討したところ、CDの診断には影響なかったが、subCDの診断能力がやや低下した。subCD診断の際は、測定誤差を考慮して慎重に判断する必要がある。

### A. 研究目的

従来、血清コルチゾール濃度の測定には主としてradioimmunoassay (RIA) が用いられてきた。しかし、RIAは迅速性・操作性に難があり、かつ放射性物質を用いることから、近年ではその使用が敬遠され、代りにnon-RIAが汎用されつつある。しかし現時点では種々のnon-RIAによる測定値は標準化されていないため、特に低濃度域での結果において、測定キット間のばらつきが大きく、臨床ではしばしば混乱が生じている。

Cushing病(CD)/sub-clinical Cushing病(subCD)の診断には、深夜、あるいはDex

抑制下におけるコルチゾール値が重要であるが、これらは低濃度領域での正確な測定が必要とされる。そのため、この領域でのnon-RIAによる測定値の信頼性と互換性の確保が急務となっている。

Non-RIAによる測定値の標準化を目的に、我々は①低濃度域の測定に対応した血清標準物質を作成し、②これを用いて、本邦の主な検査施設で血清コルチゾール測定用に採用されている7つの測定キット(ここでは日常検査法と呼ぶ)について各企業で測定値の校正を行っていただき、③その後、実際の低濃度域の検体を用いて校正効果の確認を行った。

## B. 研究結果

### i) 低濃度域 血清標準コルチゾールの作成と 日常検査法 (non-RIA) の校正

現在汎用されているコルチゾール測定キットは、主としてEU標準物質・計測研究所の血清標準物質を基準にキャリブレーションが行われている。この標準物質の認証値は約10 $\mu$ g/dlと30 $\mu$ g/dlと中～高濃度であり、CD/subCDの診断の際に問題となる低濃度域では信頼性は高くない。そこでまず、高純度標準物質のコルチゾール、NMIJ CRM 6007aを用い、同位体希釈質量分析法 (IDMS) により、低濃度域のキャリブレーションに利用できる血清標準物質の設定を行った。

高純度のヒドロコルチゾンNMIJ CRM 6007aは、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) と分取カラムにより精製された。これを用いて検量線を書き、以下のサンプルの濃度測定を行った。

血清標準コルチゾールを作成するために、まず20人の健常人血清を混合し、これを中濃度試料 (15 $\mu$ g/dl程度) とした。次にこの一部を活性炭処理して低濃度試料を作成した。この中濃度および低濃度の試料二つを適宜混合し4段階濃度の試料とし、さらに中濃度試料に高純度コルチゾールを添加した高濃度試料も加え、全部で5段階の濃度の標準試料を作成した。

前述の検量線を用い、これら5段階濃度の試料を同位体希釈質量分析法 (GC/MSとLC/MS/MS) で測定し、正確な値を付け、これを血清コルチゾールの標準物質とした。この血清コルチゾール標準物質を利用し、7種類の日常検査法 (non-RIA) の校正を行い、さらに、校正について信頼性を確保するため技能試験も行った。技能試験には、健常者から深夜採血により採取した低濃度域を示す血清コルチ

ゾール検体を用いた。LC/MS/MSで測定した値を基準として、校正済の7つの日常検査法による測定値がどの程度のばらつきに収まるのか検討した。

### ii) 血清コルチゾール低濃度域の測定誤差 を考慮した、Dex抑制試験によるCD/ subCDの診断感度特異度。

各々の日常検査法による測定値のばらつきがCV $\leq$ 10%に抑えることができた場合、Dex抑制試験のカットオフ値である1.8 (欧米のDex 1mg抑制試験によるCushing症候群のスクリーニング基準)、3あるいは5 $\mu$ d (それぞれ本邦のDex 0.5mg抑制試験によるSubCD、CDのスクリーニング基準) 付近のばらつきは、標準偏差が0.18、0.3、0.5となり、 $\pm 2SD$ の幅では $\pm 0.36$ 、 $\pm 0.6$ 、 $\pm 1.0\mu$ g/dとなる。この測定誤差を考慮し、当科で最近4年間に施行したDex抑制試験がどの程度の診断感度・特異度を示すか再検討した。対象は当科入院中の患者で、110例にDex 0.5mg抑制試験を施行した (Dex 1mg抑制試験は102例)。そのうちCDは12例、SubCDは12例、CD/subCD以外は86例 (Dex 1mg抑制試験は78例) だった。CD/subCDの診断は当研究班がH21年度に改訂した診断の手引きに従った。

## C. D. 研究結果および考察

暫定的に5段階のコルチゾール濃度に振り分けた血清中の、正確なコルチゾール濃度は、GC/MS/MSおよびLC/MS/MSで決定された。結果はそれぞれ低濃度のものから、1.99、4.67、9.44、19.3 $\mu$ g/dlだった。これらの検体が低濃度域の血清コルチゾール標準物質となり、現在日常検査で使用される各測定キットの校正に利用された。校正による測定