

ことを示唆する所見が認められた(図2)、Rph3aがAVP分泌に関与することを示唆する所見が得られた。Rph3aはRab3aに結合するeffectorとして同定され、vesicleのExocytosisに関与する膜蛋白SNAREの一つであるSNAP25と結合と関与し分泌を調整する可能性が考えられる。我々は活性化したRab3aとSNAP25が結合する所見を得ており、図3に示すような機構でRph3aがAVP分泌に関与する機序が想定される。我々はRph3aの関与を検討するためにRph3aのsiRNAによるノックダウンを行い(図3)、KCl刺激を行うとコントロールであるscramble siRNA導入群ではAVP分泌が亢進するが、Rph3a siRNAのノックダウン群ではAVP分泌が抑制され(図3)、Rph3aがAVP分泌に関与することが示された。

#### D. 考察

抗Rph3a抗体はLINH患者において感度91.7%、またコントロール全135例において特異度86.6%であった。また、临床上重要な鑑別疾患である脳腫瘍に伴う中枢性尿崩症を呈する患者においては特異度92.3%であり、非常に優れた有効な診断マーカーであると考えられた。また、リンパ球性下垂体炎のなかでも、前葉炎では陽性例がないことから、抗Rph3a抗体は漏斗下垂体後葉炎に特異的である可能性が示唆された。我々の本発明を国際特許出願することができたので、特許取得を目指すとともに、世界初のリンパ球性下垂体炎の診断検査薬として実用化に向けてさらに開発をすすめたい。

また、我々は、Rph3a抗原がLINHの病因・病態に関与する可能性、およびRph3aのAVP分泌への関与を示唆する結果を見出した。

#### E. 結論

我々は、LINHの新規病因自己抗原候補76kD蛋白を同定し報告してきたが、76kD蛋白はRph3aであり、血中抗Rph3a抗体はLINHに特異性が高く、非常に優れた有効な診断マーカーであると考えられた。ELISAを構築し、LINHの診断検査薬としての実用化を目指す。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 文献

- 1) 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22年度総括・分担研究報告書 141-146, 2012
- 2) リンパ球性漏斗下垂体後葉炎の診断マーカーとしての抗76kD蛋白抗体の有用性の検証と、ES-AVP細胞培養系を用いた76kD蛋白のAVP分泌への関与の解析. 研究代表者：大磯ユタカ，研究分担者：島津 章，高橋 裕，研究協力者：清田篤志，梶村益久，岩間信太郎，福岡一貴，高木博史，長崎 弘，有馬 寛

#### H. 健康危険情報

特になし

#### I. 研究発表

1. 論文発表  
該当なし
2. 学会発表  
《国際学会》

- 1) Atsushi Kiyota, Yoshihisa Sugimura, Hiroshi Takagi, Kazuki Fukuoka, Hiroshi Nagasaki, Yutaka Oiso. Expression of Ras related

proteins in ES cell-derived AVP secreting cells. 15th International and 14th European Congress of Endocrinology. Florence, May 5-9

- 2) Yoshihisa Sugimura, Shintaro Iwama, Atsushi Kiyota, Hiroshi Takagi, Seiji Takeuchi, Hisakazu Izumida, Takuya Kato, Atsushi Enomoto, Yutaka Oiso. Identification of a novel autoantigen and a diagnostic marker of autoimmune hypophysitis. 11th International Congress of Neuroimmunology. Boston, November 5,

《国内学会》

- 1) 梶村益久. リンパ球性漏斗下垂体後葉炎. 日本内分泌学会雑誌 88巻1号:163, 2012.
- 2) 清田篤志, 梶村益久, 岩間信太郎, 鈴木陽之, 高木博史, 福岡一貴, 西岡朋生, 榎本 篤, 有馬 寛, 大磯ユタカ. プロテオーム解析によるACTH単独欠損症とリンパ球性下垂体前葉炎の自己抗原の検索. 日本内分泌学会雑誌 88巻1号:103, 2012.
- 3) 梶村益久. リンパ球性漏斗下垂体後葉炎の疾患マーカー. 日本内分泌学会雑誌 88巻2号:603, 2012.
- 4) Yoshihisa Sugimura, Shintaro Iwama, Atsushi Kiyota, Hiroshi Takagi, Takuya Kato, Atsushi Enomoto, Yutaka Oiso. Identification of a novel autoantigen and a diagnostic marker in lymphocytic infundibuloneurohypophysitis (LINH). Neuroscience 2012, 109
- 5) 梶村益久. リンパ球性漏斗下垂体後葉炎のバイオマーカー及びその用途. 中部地区医療・バイオ系シーズ発表会, 12月4日, 名古屋

- 6) 梶村益久. リンパ球性下垂体炎の診断マーカーの発見. 厚生労働省科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業 2012年度公開セミナー 間脳下垂体疾患の病態と診断・治療に関する最新の研究成果, 名古屋, 12月7日

3. 和文雑誌・総説

- 1) 梶村益久, 大磯ユタカ  
リンパ球性漏斗下垂体後葉炎  
下垂体疾患診療マニュアル 頁:243-244  
内分泌シリーズ 診断と治療社 2012年4月
- 2) 梶村益久, 大磯ユタカ  
リンパ球性下垂体炎の自己抗体  
下垂体疾患診療マニュアル 頁:256  
内分泌シリーズ 診断と治療社 2012年4月

4. 新聞掲載

- 1) 脳の難病「下垂体後葉炎」血液検査で簡単判別. 中日新聞 2012年4月19日

J. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

- ・発明案件「リンパ球性漏斗下垂体後葉炎のバイオマーカー及びその用途」2011年特許出願
- ・2012年8月, 独立行政法人科学技術振興機構(JST)が国際特許出願(PCT出願)の支援の対象と決定
- ・2012年11月, 名古屋大学知的財産部より発明の名称「リンパ球性漏斗下垂体後葉炎のバイオマーカー及びその用途」国際特許出願[出願番号 PCT/JP2012/079776]

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

図1. 抗Rph3a抗体の陽性率

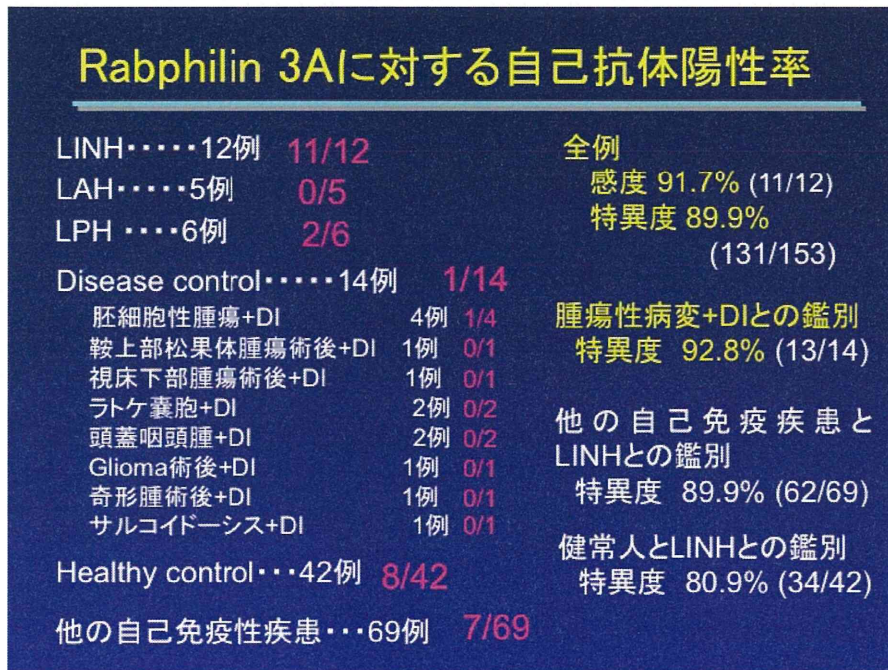


図2. ES-AVP細胞におけるRph3a抗体とCopeptinの免疫染色(KCl刺激前後)

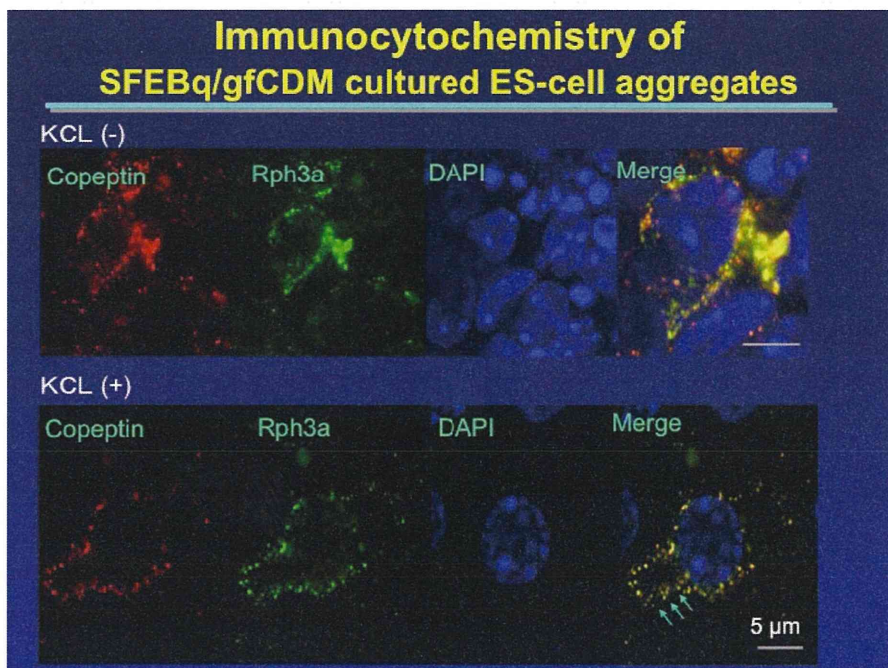
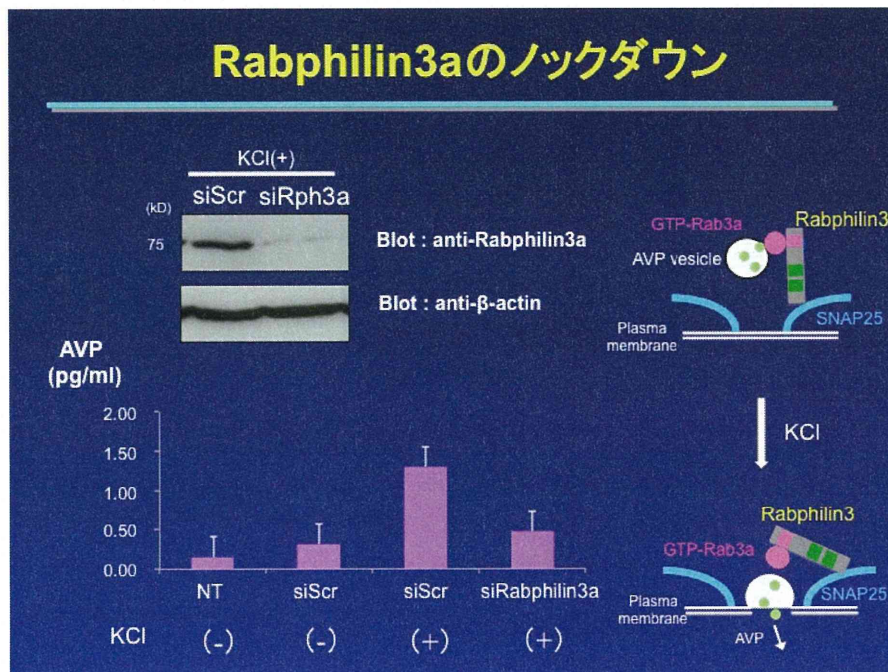


図3. ES-AVP細胞におけるRph3aノックダウンの効果



## 原発性・続発性副腎機能不全症患者におけるグルココルチコイド補充指標としてのCGMの有用性に関する検討

研究分担者	柳瀬 敏彦	福岡大学医学部内分泌・糖尿病内科学
研究協力者	高田 彩子	福岡大学医学部内分泌・糖尿病内科学
	福田 高士	福岡大学医学部内分泌・糖尿病内科学
	野見山 崇	福岡大学医学部内分泌・糖尿病内科学
	明比 祐子	福岡大学医学部内分泌・糖尿病内科学

**研究要旨：**糖質コルチコイド (GC) の至適補充量の設定には血中コルチゾール値の頻回測定が望ましいが、実際には困難である。本研究ではGCの糖代謝への影響に着目し、至適GC補充量設定のためのCGM (24時間血糖モニタリング) の有用性について検討した。当科入院の原発性・続発性副腎機能低下症の患者を対象にヒドロコルチゾン (HC) の補充量は15～30 mg/日とし、種々の分割投与下にCGMを装着した。血糖120 mg/dl以上を高血糖、70 mg/dl以下を低血糖とし、該当する一日あたりの時間(分)を算出した。また一日の平均血糖 (PG) (mean ± SD)、底値、頂値を比較検討した。MENIIによる両側副腎摘出例では、一日を通して高血糖時間帯は認めなかったが、HC 30 mg/日の補充下では深夜0時から朝方まで低血糖の持続が明らかになり、眠前のDex追加により夜間低血糖時間の短縮が得られた。両側副腎摘出例の場合、GCのみならずカテコールアミンの分泌欠如も、血糖値に影響している可能性がある。一方、続発性症例では、低血糖を呈する時間はほぼ健常人と同様であり、高血糖時間がHC補充量に依存する傾向を認めた。また3分割より2分割投与の方が、より生理的な血糖変動が得られると考えられた。副腎不全症患者における至適GC補充量の決定に際し、CGMが有力なツールとなる可能性が示唆された。

### A. 研究目的

副腎不全患者におけるグルココルチコイド (GC) 補充療法では、通常ヒドロコルチゾン (HC) が用いられ、一日あたり10～30 mgを2～3回の分割で投与されているが個人差があり、過剰投与によるQOLの低下<sup>1)</sup>、骨塩量の低下<sup>2)</sup>、体組成や脂質代謝への悪影響<sup>3)</sup>も報告されている。補充に際しては生理的コルチゾールの日内変動を可能な限り再現することが望ましいが、本邦での治療ガイドラインはなく、至適補充量、補充回数と分割比率などは日常診療の中で経験的に決定されて

いるのが現状である。血中のコルチゾール値をモニターするのがもっともいい指標となるが、一日4～5回の経時的な採血が必要であり、外来での測定は困難である。また近年、唾液中のコルチゾール測定が可能となり、外来患者でも夜間の測定が可能だが、唾液コルチゾール値はHC服用1～2時間後に急激に上昇し、血中濃度の変動幅から逸脱するため、細やかな補充量の決定には適さない。GCと糖代謝との関係では、GC過剰投与によりインスリン抵抗性が惹起され、高インスリン血症を伴う血糖上昇反応が起こり、逆に

欠乏状態では低血糖が危惧される。本研究ではGCの糖代謝への影響に着目し、至適なGC補充量、GCの種類および分割法の決定に際し、CGM(24時間血糖モニタリング)の有用性について検討した。

## B. 研究方法

対象は、2011年4月1日より2012年4月30日までの間、福岡大学病院内分泌・糖尿病内科に入院した原発性・続発性副腎機能低下症患者とした。糖尿病または甲状腺機能亢進症を合併した患者は除外した(境界型糖尿病は可)。

### (1) HCの補充量と分割法

HCの補充量は15～30 mg/日とし、原則として分割法を以下の表1のように変更し、CGMを24時間装着した。原発性の場合、続発性より必要投与量が多いため、症例によっては15 mg/日と20 mg/日は省略可とした。続発性の場合、15 mg～30 mg/日の各補充量でCGMを装着した。朝のHCの服用のタイミングは食前または食後いずれでも可であるが、症例に応じて統一し、昼と夕は食後に服用とした。半減期の短いHCのみの補充により、夜間～早朝に低血糖がみられた場合は、夕または眠前にHCより半減期の長いデキサメタゾン(Dex)を投与し、相当量を朝または昼のHCの分より減量した(一日あたりの補充量をHC換算で同じにする)。

### (2) CGMの解析方法

血糖120 mg/dl以上を高血糖、70 mg/dl以下を低血糖とし、それぞれに該当する時間帯を示し、一日あたりの時間(分)を算出した(健常者の場合、71～120 mg/dlを呈する時間が一日のうち91%を占めるという報告<sup>4)</sup>をも

とに決定)。また一日の平均血糖(PG)(mean ± SD)、PG底値、PG頂値を比較検討した。

### (3) 血中コルチゾール、血糖、インスリン値の測定

CGM装着中、朝食前(7時)、11時半、17時半、23時に採血し、コルチゾール、血糖、インスリン値を測定した。

## C. 研究結果

代表的2症例の概要とそのCGMデータを以下に示す。

症例1:50才、女性。MEN 2型の診断で加療中。2001年3月に副甲状腺過形成の診断で副甲状腺全摘出術施行。同年7月、甲状腺髄様癌の診断で甲状腺全摘出術、11月に左褐色細胞腫の診断で左副腎摘出術を施行した。2011年4月、右褐色細胞腫の診断で右副腎を摘出し、術当日よりGCの補充療法を開始した。術後、HCの補充量を漸減し、30 mg/日まで減量した時点でCGMを施行した結果、0時から朝の7時までの間の425分間、血糖が70 mg/dl以下を呈していることが判明した(図1)。そこで、眠前にDex 0.25 mgを加え、HC換算でほぼ相当量としてHC 10 mgを朝と昼の補充量から減量した。その結果、血糖70 mg/dl以下の時間は335分に短縮された(図2)。

症例2:64才、男性。2002年、頭蓋咽頭腫に対して開頭手術を施行後、汎下垂体機能低下を認め、HCおよびサイロキシンの補充を開始された。HC補充量は15 mg/日(朝10 mg、夕5 mg)。2011年、38.1°Cの発熱を認め、HCの内服量を増量。図3は昼にHC 10 mgを補充した場合(上段)と、しなかった場合(下段)の比較であるが、昼のHC補充により昼食後、夕食後の血糖の上昇傾向を認めた

(図3の円)。症例2の各HC補充量におけるCGMの結果を表3に示した。いずれの補充法も血糖70 mg/dl以下を呈することはなかった。またHCの一日総投与量が少ないほど、高血糖時間の短縮を認めた。表3の①と②、③と④の比較より、HCの昼の10 mgないし5 mgを中止することにより、血糖120 mg/dl以上を呈する時間が短縮されることが示唆された。

#### D. 考察

健常者における検討では、9～65才の74名に対して3～7日間、CGMを装着した結果、71～120 mg/dLを呈する時間が91%を占め、60 mg/dL以下または140 mg/dL以上はそれぞれ0.2% (2.8 min)、0.4% (5.7 min)、一日血糖のSDは13.7 mg/dlであったと報告されている<sup>4)</sup>。今回は血糖70 mg/dl以下または120 mg/dl以上を呈する時間帯をそれぞれ低血糖時間、高血糖時間とし、両側副腎摘出例と下垂体性副腎皮質機能低下症の症例において、HCの補充量、分割法による違いを検討した。両側副腎摘出例では、一日を通して高血糖時間帯は認めなかったが、HC 30 mg/日の補充下では深夜0時から朝方まで低血糖が持続していることが明らかになり、眠前にDexを追加し、朝、昼のHC量を減量するプロトコールに変更後、夜間の低血糖時間の短縮が得られた。しかしながら、夜中3時以降の低血糖は依然としてみられた。両側副腎摘出例の場合、GCのみならず髄質からのカテコールアミンの分泌欠如も、血糖値に影響している可能性があり、今後、アジソン病との比較検討が必要と考えられる。一方、下垂体性副腎皮質機能低下症では、低血糖を呈する時間はほぼ健常人と同様であり、高血糖時間がHC補充量に依存する傾向を認めた。また、

コルチゾールの生理的血中濃度の実現のために、朝、夕の2分割投与より朝、昼、夕の3分割投与を推奨する報告<sup>5)</sup>があるが、今回、一日の血糖の推移からみると、昼のHCの補充により、昼食後、夕食後の血糖の上昇を認め、3分割より2分割投与の方が、より生理的な血糖変動が得られると考えられた。

#### E. 結論

副腎不全症患者における至適GC補充量の決定に際し、CGMが有力なツールとなる可能性が示唆された。

#### F. 参考文献

- 1) Bleicken B, et al. Influence of hydrocortisone dosage scheme on health-related quality of life in patients with adrenal insufficiency. Clin Endocrinol. 72: 297-304, 2010
- 2) Løvås K, et al. Glucocorticoid replacement therapy and pharmacogenetics in Addison's disease: effects on bone. Eur J Endocrinol. 160: 993-1002, 2009
- 3) Filipsson, H. et al. The impact of glucocorticoid replacement regimens on metabolic outcome and comorbidity in hypopituitary patients. J Clin Endocrinol Metab. 91:3954-3961, 2006
- 4) Juvenile Diabetes Research Foundation Continuous Glucose Monitoring Study Group, et al. Variation of interstitial glucose measurements assessed by continuous glucose monitors in healthy, nondiabetic individuals. Diabetes Care. 33:1297-1299, 2010
- 5) Mah PM, et al. Weight-related dosing, timing and monitoring hydrocortisone replacement

therapy in patients with adrenal insufficiency. Clin Endocrinol 61: 367-375, 2004

## G. 健康危険情報

特になし

## H. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Tachibana S, Sato S, Yokoi T, Nagaishi R, Akehi Y, Yanase T, Yamashita H. : Severe hypocalcemia complicated by postsurgical hypoparathyroidism and hungry bone syndrome in a patient with primary hyperparathyroidism, Graves' disease, and acromegaly. Intern Med.51 (14): 1869-73, 2012
- 2) 濱之上暢也, 永石綾子, 竹之下博正, 野見山崇, 明比祐子, 乗富智明, 林 博之, 鍋島一樹, 池満陽美子, 野々熊真也, 桑原康雄, 榊 裕佳, 的場ゆか, 小河 淳, 柳瀬敏彦: 局在診断に FDG-PET/CT が有用であった異所性 ACTH 産生膵神経内分泌腫瘍の一例. 臨床と研究 89: 1417-1422, 2012
- 3) 後藤敏孝, 高田 徹, 佐藤栄一, 田村和夫, 柳瀬敏彦: クリプトコッカス、サイトメガロウイルス及びニューモシスチスの重複感染下でコルチゾール拮抗薬投与後に急性呼吸窮迫症候群を呈したと推定される Cushing 症候群 1 例. 感染症学雑誌 87 (1): 39-43, 2013
- 4) 柳瀬敏彦: 成人 GHD であっても GH 補充療法を避けるべき患者 成人 GHD における Pitfall 3: 1-2, 2012

- 5) 高柳涼一, 河手久弥, 柳瀬敏彦: 内分泌疾患: 診断と治療の進歩: 副腎疾患の取り扱いと問題点 副腎偶発腫とサブクリニカルクッシング症候群. 日本内科学会雑誌 101: 941-948, 2012

### 2. 学会発表

- 1) 明比祐子, 柳瀬敏彦: クリニカルアワー 8 コルチゾール代謝・産生の軽度異常時の対処「軽症副腎不全の診断と治療」第 85 回日本内分泌学会学術総会 2012.4.20 (名古屋)
- 2) Yanase T : Symposium 6: Subclinical adrenal diseases Diagnosis and treatment of subclinical Cushing syndrome (SCS) International Congress of Endocrinology May 5-9, 2012 (Florence, Italy)
- 3) Akehi Y, Fukuda T, Nagasako H, Terawaki Y, Takada A, Nagaiashi R, Takenoshita H, Nomiyama T, Yanase T: Utility of CGM for the determination of optimal glucocorticoid replacement method in patients with adrenal insufficiency International Congress of Endocrinology May 5-9, 2012 (Florence, Italy)
- 4) 柳瀬敏彦: 特別講演「ステロイドホルモン産生異常症に関する幾つかの話題」第 13 回日本内分泌学会近畿支部学術集会 2012.10.20 (大阪)
- 5) Yanase T : Symposium Androgen and metabolic syndrome 15th International Congress on Hormonal Steroids and Hormones and Cancer Nov 17<sup>th</sup> 2012 (Kanazawa)



表1. HC (商品名コートリル) 補充量と分割法

30 mg/日	(3分割)	朝 15 : 昼 5 : 夕 10 朝 15 : 昼 10 : 夕 5
	(2分割)	朝 20 : 昼 0 : 夕 10
30 mg/日は上記のうちから1~2つを選択 (医療者選択)		
20 mg/日	(2分割)	朝 15 : 昼 0 : 夕 5
	(3分割)	朝 10 : 昼 5 : 夕 5
15 mg/日	(2分割)	朝 10 : 昼 0 : 夕 5

表2. 症例1のCGMによる平均血糖値、血糖底値、血糖頂値、および血糖70 mg/dl以下を呈する時間

HC 分割補充量 (Dex 含む) mg	平均 PG (mg/dl)	PG 底値 (mg/dl)	PG 頂値 (mg/dl)	PG 70 以下の時間 (min)
HC 朝 20 + 夕 10	88 ± 19	60	119	425
HC 朝 15 + 夕 5 + Dex 眠前 0.25	85 ± 17	57	121	335

症例1のCGMの結果を表2にまとめた。

表3. 症例2のCGMによる平均血糖値、血糖底値、血糖頂値、および血糖70 mg/dl以下または120 mg/dl以上を呈する時間

HC 補充量 (mg) 朝・昼・夕 (総量)	平均 PG (mg/dl)	PG 底値 (mg/dl)	PG 頂値 (mg/dl)	PG <70 (min)	PG >120 (min)
① 15, 10, 5 (30)	102 ± 10	83	133	0	85
② 15, 0, 5 (20)	97 ± 10	77	133	0	75
③ 10, 5, 5 (20)	99 ± 11	75	124	0	55
④ 10, 0, 5 (15)	99 ± 9	75	122	0	35

症例2の各HC補充量におけるCGMの結果を表3に示

図1. 朝 HC 20 mg + 夕 HC 10 mg 補充時の CGM

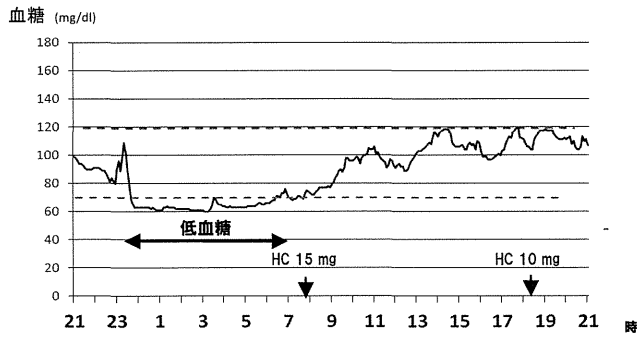


図2. 朝 HC 15 mg + 夕 HC 5 mg + 寝る前 Dex 0.25 mg 補充時の CGM

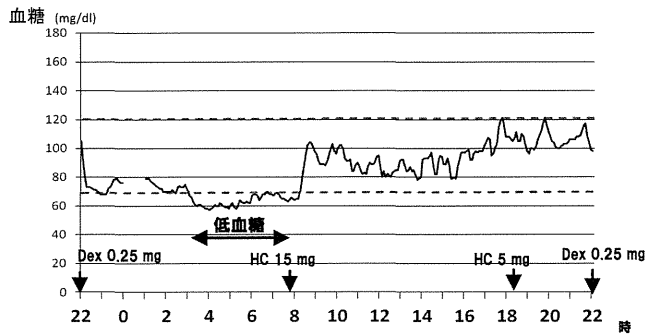
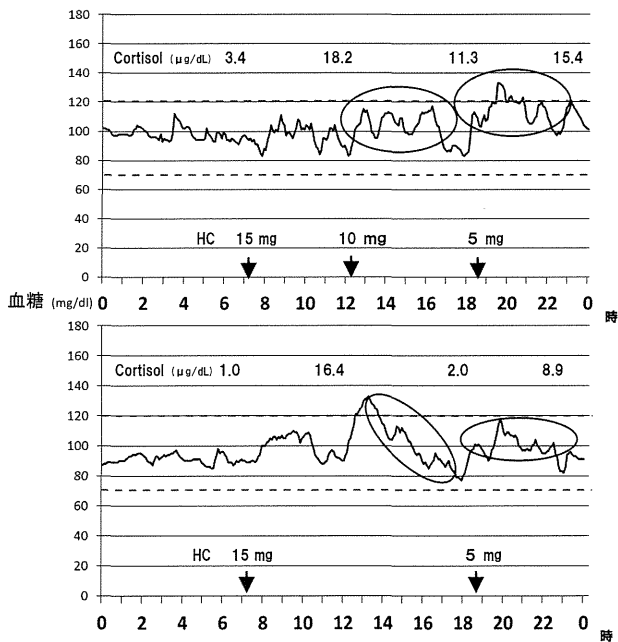


図3. 上段：朝 HC 15 mg + 昼 HC 10 mg + 夕 HC 5 mg  
下段：朝 HC 15 mg + 夕 HC 5 mg 補充時の CGM



## 超高感度測定法を用いた異所性ACTH産生症候群(EAS)の簡易診断法の開発と臨床応用に関する研究

研究分担者 片上 秀喜 帝京大学ちば総合医療センター内科臨床研究部

**研究要旨:** EASではプロオピオメラノコルチン(POMC)の種々の大分子ACTH(bACTH,  $\geq 10$ kDa)やpro $\gamma$ 3-MSH(pMSH,  $\geq 15$ kDa)が増加する。bACTHあるいはpMSHに対する特異的な高感度測定法を開発し、EAS診断の臨床的有用性を検討した。対照10名、クッシング病CD15名、EAS7名。ACTH(4.5kDa)に特異的なACTH-II EIA, bACTHとACTHを共に検出する新規のACTH-II EIA, pMSH構成ペプチドである $\gamma$ 1-MSH RIAと $\gamma$ 3-MSH RIAをそれぞれ開発した。活動期EASの血中 $\gamma$ 1-MSH,  $\gamma$ 3-MSH, ACTH-IIの各濃度はいずれも高値を示した。血中POMC分子型は $\gamma$ 1-MSHならびに $\gamma$ 3-MSH活性はいずれも $\geq 15$ kDaの大分子型のみ、ACTH-Iでは4.5kDaに一致する部位に、ACTH-IIでは4.5kDaと $\geq 10$ kDaの部位に多峰性に活性を示した。bACTHやpMSHに対する高感度測定法はEASの診断に有用である。

### A. 研究目的

異所性ACTH産生症候群(EAS)はCushing症候群のうち、5-10%前後を占める<sup>1)</sup>。EASの特徴として、①病巣の微小性、②クッシング病(CD, 微小ACTH産生腺腫)との病態類似性、③臨床徴候の周期性・間欠性を示す<sup>2)</sup>。さらに両者の鑑別診断手技としての下錐体静脈洞サンプリング(IPSS)あるいは海綿静脈洞サンプリングは手技上の煩雑さ、合併症や解剖学的問題のため、必ずしも、CDの病巣の局在診断に至るわけではない<sup>1)</sup>。これらの問題点のため、画像診断の進歩した今日でも、CDとEASとの鑑別診断と治療に難渋することが少なくない<sup>2)</sup>。

一方、EASではプロオピオメラノコルチン(POMC)産生・分泌の量的増加に加えて、翻訳後修飾の質的偏倚により、種々の大分子ACTH(bACTH)や大分子MSH(pro $\gamma$ 3-MSH, pMSH)が産生され(図1)、両者の簡易鑑別診断に有用であることが示されている<sup>3)</sup>。

しかし、本邦ではこれらPOMC関連タン

パクのN端側ペプチドに対する高感度の測定系が欠如している。本研究ではPOMC関連タンパクのN端側ペプチド、bACTHあるいはpMSH、に対する超高感度あるいは高感度測定法を開発し、EAS診断における臨床的有用性を検討した。

### B. 研究方法

健常者CNT 10名、micro ACTHomaによるCD15名、とEAS7名。より、診療行為として、それぞれ、検査あるいは手術同意書を取得した。診断はいずれも病理組織もしくはIPSSに基づいた。

ヒト $\gamma$ 1-MSHに対する高感度RIAを新規に開発し、pMSHを中心に、POMC関連タンパクのN端側ペプチドを認識する既報の $\gamma$ 3-MSH RIA<sup>4)</sup>、ACTH1-39をほぼ選択的に認識するACTH ICT-EIA I(LDV: 1.0fg/tube)<sup>5)</sup>、種々の大分子ACTH前駆体(bACTH)とACTH 1-39を等しく認識するICT-EIA II(LDV: 1.0fg/tube)<sup>6)</sup>を用いて、

CNT、CDならびにEASの血中POMC関連タンパクのN端側ペプチド濃度を測定した。典型的なEAS症例の血中のPOMC関連タンパク分子型を検討する目的で、サイズ排除HPLCを用いて、分画中の各POMC関連タンパクを測定した。いずれの測定法も、血漿中のペプチド・ホルモンを非抽出・直接的に測定した。血中 $\gamma$ 1-MSHと $\gamma$ 3-MSH活性はともに、塩酸添加新鮮EDTA-2Na血漿(1/5量の1N HCL添加)を用いた(塩酸非添加のEDTA-2Na血漿は凍結融解により、高値を示すため、結果は示さず)。

一部のEASでは組織抽出液中中のPOMC関連ペプチドならびにPOMC遺伝子発現量、PC1/3遺伝子発現量を定量的RT-PCR(TP960, Takara, Ohts)を用いて検討した。サイズ排除HPLCカラムは東ソー TSK G2000SW, 1x58cmを用いた<sup>6)</sup>。同カラムのMW-Maker Proteins (Oriental Yeast Co., Ltd, Osaka)として142kDa, 90kDa, 67kDa, 32kDa, 12.4kDa, ACTH1-39(4.5kDa)とSS28(3.1kDa)を用いた。

### C. 研究結果

新規の高感度 $\gamma$ 1-MSH RIAの感度と特異性を既報の $\gamma$ 3-MSH RIA<sup>4)</sup>と比較した(図2)。次に、図3に示すように、典型的なEASにおける塩酸添加新鮮血漿中のPOMC関連ペプチドのサイズ排除HPLC解析ではACTH ICT-EIA Iではほぼ4.5kDaに一致する部位に、ACTH ICT-EIA IIでは10-100kDaの部位に多峰性に、それぞれ、活性が認められた。 $\gamma$ 1-MSH RIAでは100kDa以上の大分子POMC関連タンパクを認識し、より小分子の16kDa前後のbig ACTHやACTH1-39は認識しなかった。そして、 $\gamma$ 3-MSH RIAの測定では、既報の如く<sup>4,6)</sup>、今回もEAS血中の大

分子POMC関連タンパク、pro- $\gamma$ -MSHのみを認識した。

さらに、図5に示すように、活動期EAS(血中コチゾル $\geq 30\mu\text{g/dl}$ , N=7)の血中ACTH濃度は、ACTH ICT-EIA I: 82~245pg/mL, ICT-EIA II: 240~1,540pg/mL、をそれぞれ示した。さらに、図6に示すように、塩酸添加新鮮血漿中の $\gamma$ 1-MSH濃度: 276~2197pg/mL、 $\gamma$ 3-MSH濃度: 108~1146pg/mLを示した。そして、図7に示すように、 $\gamma$ 1-MSHあるいは $\gamma$ 3-MSH/ACTH-Iモル比は0.5以上、ACTH ICT-EIA I/ACTH ICT-EIA II比は2.0以上を示した。非活動期EASではいずれも0.5以下を示した(図示せず)。

一方、CD(微小ACTH産生腺腫)では活動性を反映して、血中ACTH ICT-EIA I濃度: 74~248pg/mL, ACTH ICT-EIA II濃度: 85~308pg/mLを示した(図5)。 $\gamma$ 1-MSHと $\gamma$ 3-MSH血中濃度はいずれも測定感度前後以下を示した(図6)。その結果、活動期にも関わらず、血中の $\gamma$ 1-MSHあるいは $\gamma$ 3-MSH/ACTH ICT-EIA IあるいはACTH ICT-EIA IIのモル比は0.5以下を示した(図7)。

EASの摘出腫瘍中には既報と同様に、種々の大分子型のPOMC関連ペプチドを検出した<sup>4,6)</sup>(図示せず)。POMCとPC1遺伝子の $\beta$ -actin遺伝子発現量はCDのそれらに比較して、それぞれ、減少を示す傾向を示したが、有意差を認めなかった(M-W U test)。しかし、対照としての、非機能性下垂体腺腫(NF)に比較して100倍以上のPOMC遺伝子発現量を示した。

### D. 考察

今回新たに開発した $\gamma$ 1-MSH RIAは既報の $\gamma$ 3-MSH RIAと同様に、大分子型のN端側POMC関連ペプチドのみを検出した。EAS

では腫瘍組織からのPOMCタンパクの産生・分泌の量的増加に加えて、翻訳後修飾の糖鎖附加やプロセッシングの質的偏倚により、種々の大分子型のN端側POMC関連ペプチド、たとえば大分子ACTHや大分子MSHが産生され、末梢血に放出される。これら $\gamma$ 3-MSHを含む血中のN端側POMC関連ペプチドは病的な糖鎖附加をうけているため、 $\gamma$ 1-MSH RIAならびに $\gamma$ 3-MSH RIA、いずれの測定法も、よく検出することができる。

一方、既報のACTH ICT-EIA IIはこれらの大分子型POMC関連ペプチド以外に、正常型のACTH 1-39も認識する。その結果、健常者においてもストレス時など、ACTH産生細胞が活性化され、大分子型のPOMC関連ペプチドが増加する状態では、ACTH濃度とその標的ホルモンであるコルチゾール濃度が乖離する。そのため、大分子型POMC関連ペプチドの存在を疑う場合は、ACTH ICT-EIA IでのACTH測定値とACTH ICT-EIA IIでのそれとの乖離を確認し、さらに、サイズ排除HPLCなどの解析が必要である。

そして、EASの活動期にはIPSSあるいは海綿静脈洞サンプリングによる中枢血中と末梢血中のACTH同時測定はCDとの確定診断有用である。ただ、検査手技の煩雑さや合併症などのため、頻回の検査や、周期性を示す場合の寛解期には診断有用性に欠ける。

## E. 結語

これらの血中big ACTH/pro- $\gamma$ MSHに対する測定法は簡便で、非侵襲的であるため、CDとEASとの鑑別診断に有用である。

## F. 文献

1) Newell-Price J, Bertagna X, Grossmann AB, Nieman LK. Cushing's syndrome. *Lancet*

2006; 367: 1605-1617.

- 2) 片上秀喜. 周期性クッシング症候群. 平田結喜緒, 成瀬光栄 編, クッシング症候群診療マニュアル, 東京: 診断と治療社, 2011: 122-125.
- 3) Pritchard LE and White A: Neuropeptide processing and its impact on melanocortin pathways. *Endocrinology* 2007; 148: 4201-4207.
- 4) 片上秀喜, 奈須和幸, 松野 彰, 山田正三, 橋田誠一. big ACTH測定系の開発と臨床応用(1): ヒト $\gamma$ 3-MSH RIAの開発. *ACTH RELATED PEPTIDES* 2009; 19: 27-30.
- 5) 片上秀喜, 橋田誠一, 奈須和幸, 松野 彰. ヒトACTH 1-39に対する新規超高感度測定法の開発と臨床応用. *ACTH RELATED PEPTIDES* 2008; 20: 40-43.
- 6) 片上秀喜, 奈須和幸, 鎌田陽子, 松野 彰, 橋田誠一. ヒト肺小細胞がん株(DMS-79)におけるPOMCならびにソマトスタチン(SRIF)の遺伝子発現と産生に関する検討:  $\gamma$ 3-MSHと大分子ACTHの解析. *ACTH RELATED PEPTIDES* 2011; 22: 49-51.

## G. 健康危険情報

特になし

## H. 刊行物一覧(2012年度分)

### 1. 雑誌

- 1) 片上秀喜. 「視床下部一下垂体疾患診断のアプローチ. 下垂体前葉」特集 内分泌疾患—診断と治療の進歩—. *日本内科学会誌* 101: 913-923, 2012
- 2) 片上秀喜, 奈須和幸, 橋田誠一, 宮村信博, 松野 彰, 肥塚直美, 山田正三. クッシング病と異所性ACTH産生症候群との鑑

別診断：big ACTHとpro $\gamma$ MSHに対する超高感度・高感度測定法の開発と臨床応用. 日本内分泌学会雑誌 88: 49-51, 2012.

3) 小田桐恵美, 桑 克彦, 片上秀喜, 武田京子, 竹岡啓子, 日高 洋, 家入蒼生夫, 池田 斉, 亀子光明. イムノアッセイ検査全国コントロールサーベイ30年間の軌跡. 臨床病理 60: 932-954, 2012.

4) Numata S, Umehara A, Katakami H, Inoue S, Hashida S. Development of a novel and ultrasensitive enzyme immunoassay for human insulin autoantibodies. *Clinical Biochemistry* 45: 1086-1091, 2012.

## 2. 書籍

1) 片上秀喜. 下垂体機能低下症. 門脇 孝, 下村伊一郎 編. 「代謝・内分泌疾患診療最新ガイドライン」. 総合医学社, 東京, 2012, pp187-193.

2) 片上秀喜. GHRH. 平田結喜緒, 山田正三, 成瀬光栄 編. 「下垂体疾患マニユア

ル」. 診断と治療社, 東京, 2012, pp24-25.

3) 片上秀喜. ソマトスタチン. 平田結喜緒, 山田正三, 成瀬光栄 編. 「下垂体疾患マニユアル」. 診断と治療社, 東京, 2012, pp30-33.

4) 片上秀喜. ACTH単独欠損症. 平田結喜緒, 山田正三, 成瀬光栄 編. 「下垂体疾患マニユアル」. 診断と治療社, 東京, 2012, pp152-156.

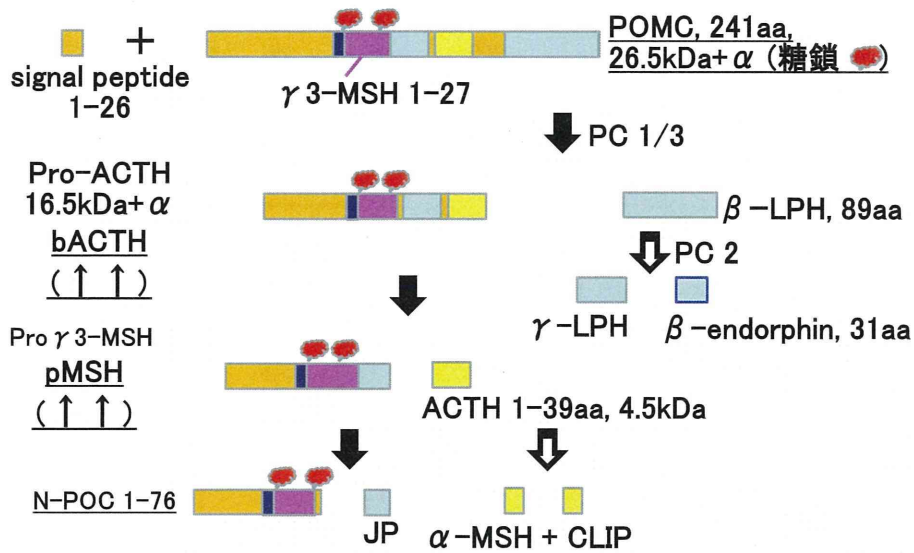
5) 片上秀喜. 自己免疫性(リンパ球性)下垂体前葉炎. 平田結喜緒, 山田正三, 成瀬光栄 編. 「下垂体疾患マニユアル」. 診断と治療社, 東京, 2012, pp177-181.

6) 片上秀喜. リンパ球性下垂体炎. 成瀬光栄, 平田結喜緒, 島津 章 編. 「内分泌代謝専門医ガイドブック」改訂第3版. 診断と治療社, 東京, pp113-118.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

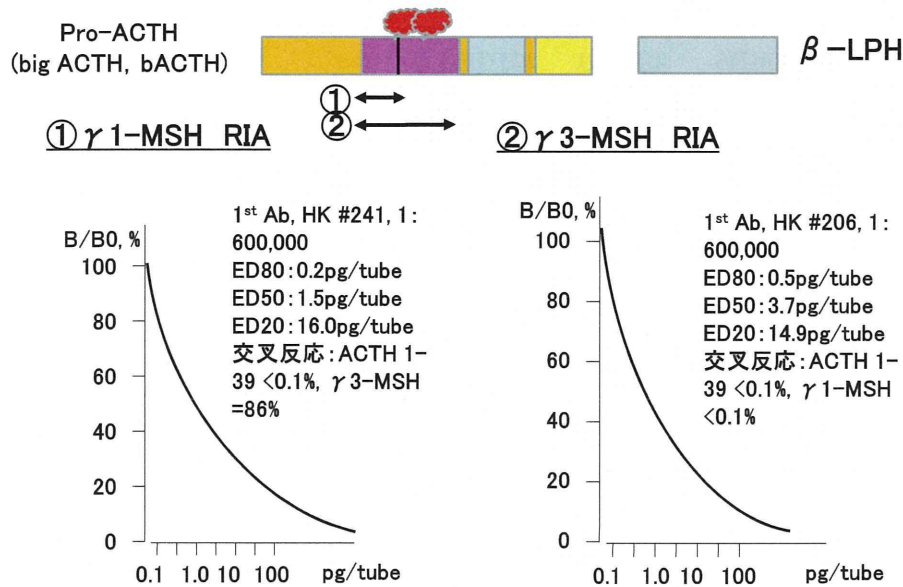
無し

図1. 異所性ACTH産生腫におけるPOMCタンパクのプロセッシング



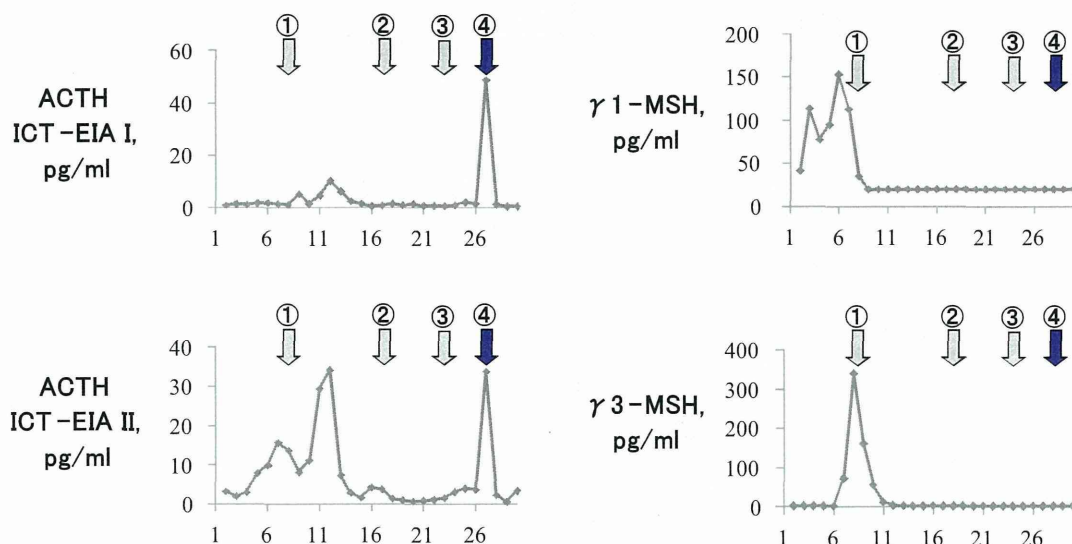
pro ACTH (bACTH)、pro  $\gamma$  3-MSH (pMSH)濃度の上昇(↑↑)。POMC:プロオピオメラノコルチン(241アミノ酸残基、26.5kDa)、 $\beta$ -LPH:ベータリポトロピン(89アミノ酸残基)、ACTH1-39:副腎皮質刺激ホルモン(39アミノ酸残基)、N-POC1-76(POMC N端側ペプチド、76アミノ酸残基)。POMC、bACTH、pMSH、N-POC分子は種々の糖鎖附加(雲状記号)をうけ、いずれも大分子量を示す。

図2. 高感度ヒト $\gamma$  1-MSH 1-11ならびにヒト $\gamma$  3-MSH 1-27のRIA



1/5量の1N塩酸無添加では、凍結融解により、血漿濃度が上昇するため、塩酸添加あるいは新鮮血漿を用いる必要がある。

図3. 異所性ACTH産生症候群を示した甲状腺髄様癌症例の血中ACTH,  $\gamma$ 1-MSH、 $\gamma$ 3-MSH濃度



分子量マーカー:①142kDa, lactate dehydrogenase、②32kDa, Myokinase,28kDa, POMCに相当、③12.4kDa, chyoochromeC, 16kDaのbig ACTHに相当、④ACTH 1-39。EASでは翻訳後の種々の糖鎖附加をうけるため、POMC各フラグメントの推定分子量より大分子量を示す。

図4. 異所性ACTH産生症候群を示した甲状腺髄様癌症例の血中ACTH,  $\gamma$ 1-MSH、 $\gamma$ 3-MSH濃度

各測定法の種類 感度 (fg/tube)*と ◎epitope認識部位	$\gamma$ 1-MSH RIA 150fg* ◎ $\gamma$ 3-MSHと その前駆体	$\gamma$ 3-MSH RIA 100fg* ◎ $\gamma$ 3-MSHと その前駆体	ICT-EIA I 1fg* ◎N端:1-24 ◎C端:18-39	ICT-EIA II 1fg* ◎N端:1-16 ◎C端:18-39
POMC, 241aa  $\gamma$ 1-MSH $\gamma$ 3-MSH 1-11 1-27	○	○	△	○
Pro-ACTH  ACTH 1-39	○	○	△	○
N-POMC, 76aa (pro $\gamma$ -MSH)  ACTH 1-39aa	○	○	×	×
ACTH 1-39aa 	×	×	○	○

POMC関連タンパク・ペプチドに対する各測定法の特徴。交叉率の程度:○:100%、△:33%–50%、×:<50%。



図5. クッシング病 (CD, 微小ACTH産生腺腫) と異所性ACTH産生腫瘍 (EAS) におけるACTH濃度

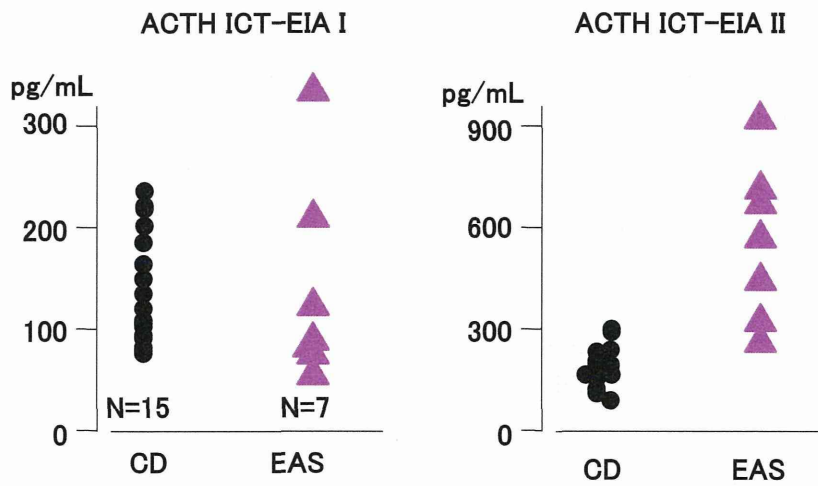
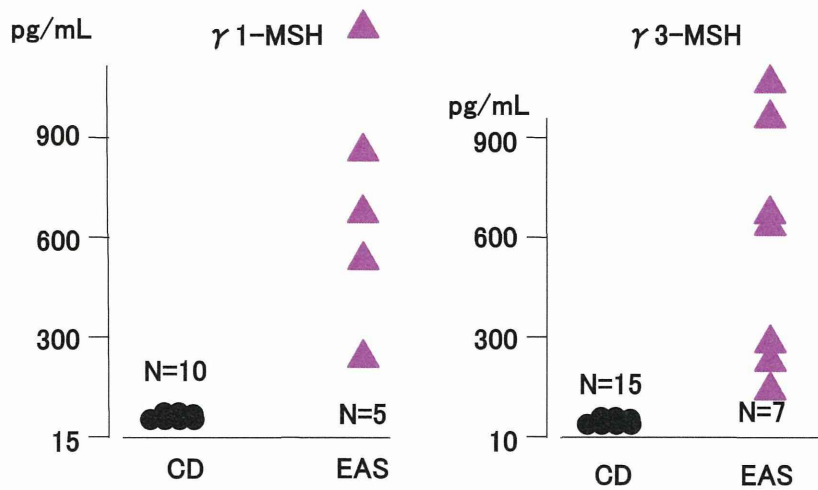
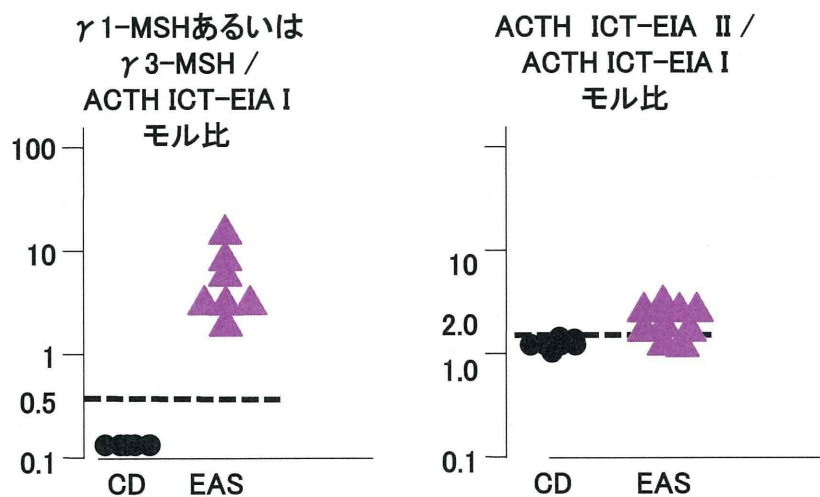


図6. クッシング病 (CD, 微小ACTH産生腺腫) と異所性ACTH産生腫瘍 (EAS) の末梢血中  $\gamma$  1-MSH と  $\gamma$  3-MSH の濃度



健常者あるいはCD (マイクロACTH産生腺腫) ではいずれも測定感度以下を示す。

図7. クッシング病 (CD, 微小ACTH産生腺腫) と異所性ACTH産生症候群 (EAS) における血中  $\gamma$  1-MSH あるいは  $\gamma$  3-MSH/ACTH ICT-EIA I モル比ならびに ACTH ICT-EIA II/ACTH ICT-EIA I 比



EASでは  $\gamma$  3-MSH/ACTH I モル比が0.5以上を示す。一方、ACTH II/ACTH I モル比は重なりがあり、有用性は低い。

## Cushing病におけるドパミンアゴニスト・ソマトスタチンアナログの効果について

研究分担者 沖 隆 浜松医科大学第二内科  
研究協力者 飯野 和美 浜松医科大学第二内科

**研究要旨：**Cushing病患者の治療選択の第一は、手術療法と考えられる。しかし、3～4割の例で寛解に至らず。薬物療法や放射線療法の追加を要する。今回、Cushing病患者において薬物療法の候補となり得るソマトスタチンアナログ(オクトレオチド)とドパミンアゴニスト(ブロモクリプチン)の単回投与試験を行い、その効果について検討した。いずれの薬剤も約40%の例において、血中ACTHあるいはコルチゾールが前値の50%以下に低下した。これらの結果から、術後寛解に至らなかったCushing病患者においてソマトスタチンアナログやドパミンアゴニストの追加治療を積極的に考慮して良いものと考えられた。

### A. 研究目的

Cushing病の治療は、手術療法(経蝶形骨洞的下垂体腺腫摘出術)が第一選択である。しかし、手術療法によって寛解に至らなかった例においては、薬物療法や放射線療法が考慮される。薬物療法として主にドパミンアゴニストや様とスタチンアナログが試みられているが、その効果については限定的と考えられている。今回、Cushing病患者において、術前にドパミンアゴニストのブロモクリプチンおよびソマトスタチンアナログのオクトレオチドの単回投与試験を行った。また、手術による摘出組織においてD2受容体(D2DR)の免疫染色を行った。

### B. 研究方法

Cushing病患者19例(男性4例・女性15例、14～70歳)の摘出下垂体腺腫組織を用い、D2DRの免疫染色(Santa Cruz社)を行った。内14例については、術前にブロモクリプチン2.5 mg内服あるいはオクトレオチド100 µg皮下注後12時間まで経時的に採血し、

血中ACTHとコルチゾールを測定した。

### C. 研究結果

#### 1) D2DR

検討した19例中10例でD2DR免疫染色陽性であった。(図1)D2DR陽性例の血中ACTHとコルチゾールはそれぞれ(143.2 ± 95.7 pg/mLと31.1 ± 13.5 µg/dL)でありD2DR陰性例の(119.0 ± 48.3と28.5 ± 9.0 µg/dL)と差を認めなかった。また、マクロアデノーマをD2DR陽性10例中4例に、D2DR陰性例9例中3例に認め、両者間に差を認めなかった。

#### 2) ブロモクリプチン試験

ブロモクリプチン内服後、血中ACTHあるいはコルチゾールいずれかが前値の50%以下に低下した例を42.9%に認めた。(図2)また、ACTHあるいはコルチゾール前値の75%までの低下を有効とすると、64.3%の例に効果を認めた。ブロモクリプチン試験を施行できた14例の内7例で摘出下垂体腺腫内

にD2DRを認めたが、その内6例でブロモクリプチン内服後ホルモン値の低下を認めた。

### 3) オクトレオチド試験

オクトレオチド皮下注後、血中ACTHあるいはコルチゾールいずれかが前値の50%以下に低下した例を38.5%に認めた。(図3) また、ACTHあるいはコルチゾール前値の75%までの低下を有効とすると、77%の例に効果を認めた。

## D. 考察

現在、Cushing病の薬物治療に関しては、ステロイド合成阻害薬である、メチラポンやトリロスタンが高コルチゾール血症の是正に用いられている。しかし、ACTHを直接抑制する薬剤としてのソマトスタチンアナログやドパミンアゴニストの効果につい

ては確立していない。今回、SSTR2のリガンドであるオクトレオチド、D2DRのリガンドであるブロモクリプチンの単回投与の効果について検討した。いずれも著効する例が存在するものの、多くの例で効果が見られるわけではないと考えられてきた。しかし、我々の検討では、いずれの薬剤も約40%の例で短期効果が認められた。今後、長期効果についての検討が必要であるが、下垂体手術後寛解に至らなかった例での治療選択肢として積極的に考慮して良いと考えられた。

## E. 結論

ソマトスタチンアナログやドパミンアゴニストは、術後寛解に至らなかったCushing病の治療選択肢として有効な薬剤の可能性が示唆された。

図1. PACTH産生腺腫におけるD2DR免疫染色

