

テモゾロミドを使用し、一時的に腫瘍縮小効果が得られたが、最終的に肝転移を来して死亡した。現時点では、放射線治療や薬物療法を組み合わせ対応していくしかないと思われるが、今後新たな分子標的薬の開発が期待される。

## ii) 成長ホルモン (GH) 関連：

a) 今回、術後1か月以内の早期に測定したGH底値を欧米における新基準に切り下げると現行の基準と比較し治癒率は低下した。一方、血中IGF-Iは、術直後は十分には下がりきらず、12週間目で安定化するが、GTTの成績は術後1週間目から12週間目の期間で明らかな変化をきたさなかったとの報告もみられる。現在のところ我が国では術後のGTTの施行時期に関する具体的な指針はないが、GTTの判定時期が治癒率に影響を及ぼす可能性はあると考えられる。実際には術後1か月でのGH底値が0.4~1ng/mlであっても以降のIGF-Iは基準値内で推移し、臨床的に明らかな再燃徴候なく経過観察されている症例が少なからず認められた。一方、少数例でGH底値が<0.4ng/mlであるにもかかわらずIGF-Iが術後12か月を経過しても基準値を上回っていた。b) 2年間の成長総量は平均6cmで、標準的な成長量から概算すると6cm以上の損失があると予測され、現在のガイドラインの条件により治療開始が遅れる可能性が示された。2年間以上成長率-1.5SD以下が持続の基準は、2点に分けて再検討が必要と考える。1点目は「2年以上」の問題であり、今回半数以上の症例で2年目にさらに成長率が低下していたことから、少なくとも重症GHDにおいては、2年間の観察期間は短縮すべきであると考えられる。2点目の-1.5SD以上という値

については設定の基準が明確ではない。今後、よりエビデンスに基づいた妥当なガイドラインを策定するために、成長ホルモン治療の対象とならなかった症例での成長率調査を行い、比較検討する必要があると思われる。c) 今回の検討において、GHRTが肝機能、線維化マーカーを改善することを明らかにし、GHRTの有用性が明らかになった。AGHDにおけるNASHの発症機序として、①GHによる内臓脂肪減少作用による間接的な効果、②IGF-Iによるインスリン抵抗性改善、③IGF-Iによる肝細胞における酸化ストレス低下およびミトコンドリア機能改善、④IGF-Iによる星細胞の細胞老化誘導と活性の低下作用など複数の機序によると考えられた。IGF-Iによる線維化改善を目指したNASHに対する治療応用はその予後を改善する可能性がある。また、これまで機序が不明であった絶食、低栄養時のGH抵抗性機序について今回初めて明らかにし、絶食時にはサーチュインのひとつであるSIRT1が活性化されGHシグナルに重要なSTAT5を脱アセチル化しSTAT5のGH受容体への結合能を低下させて、GHシグナルを抑制する。このことは低栄養時への適応現象としてSIRT1が、GH-IGF-I系においても重要な役割を果たしていることを示している。

## iii) 抗利尿ホルモン (AVP) 分泌異常症：

a) 今回の研究においてfollow-up期間に半数の中枢性尿崩症患者が135 mEq/l未満の低ナトリウム血症を経験し、臨床的により問題となりうる130 mEq/l未満の低ナトリウム血症を経験している患者も30%以上いることが明らかとなった。これはDDAVP製剤(スプレーおよび点鼻液)による治療の限界を示している。DDAVPの口

腔内崩壊錠はスプレーや点鼻液よりもその抗利尿効果が安定している可能性があり、今後は口腔内崩壊錠の使用により少しでも中枢性尿崩症の水バランスが改善されることを期待したい。本研究において渴感障害を伴う患者では容易に血清ナトリウム濃度が150 mEq/l以上となり、しばしば脱水状態に陥ることが明らかとなった。また、渴感障害を伴う患者では感染症による入院歴を有する患者の割合が渴感正常群よりも有意に高く、重症感染症に罹患しやすいことも示された。さらに渴感障害群では渴感正常群よりも生命予後が悪いことも本研究で明らかになり、渴感障害を伴った中枢性尿崩症患者の水管理、特にシックデイにおける水管理の重要性が示された。b) 本研究では心不全におけるAVP分泌亢進の機序は未解明であるが、恐らく心拍出量の低下が圧受容器を調節する有効循環血液量の減少を招く結果、圧受容器を介する抑制性の求心性制御が解除されて、AVPの分泌亢進を惹起することが考えられる。AVP依存性に水利尿不全が助長されて、循環血液量の増加とこれに伴う希釈性低Na血症が招来される悪循環を形成することが示唆される。急性心筋梗塞で入院72時間以内に低Na血症を認めた症例は29例に達した。長期予後調査では低Na血症群で心不全への進展が明らかに増加しているが、このような変化は発症72時間の血漿AVP値に由来することが明らかとなった。本研究でAVP分泌亢進の機序は明らかでないが慢性心不全と同様心機能の低下が圧受容器を介する求心性AVP分泌抑制系を解除することが推察される。

iv) 下垂体腫瘍ほか：

a) 甲状腺ホルモン受容体(TR)αのアン

チセンスに由来する核内受容体Rev-erbαの発現に概日リズムがあり、標的遺伝子の発現調節を行い、その機構に転写共役因子のコリプレッサーであるNCoRが関与することが明らかとなった。NCoRは甲状腺ホルモンにより正の制御を受ける遺伝子群において、TRと結合して標的遺伝子発現を抑制するが、TSHβ遺伝子発現においてもその関与が注目されている。NCoRを標的とするshRNAの導入により、TSHβ遺伝子発現はNCoRにより抑制されていることが判明し、さらにNCoRとRev-erbαはTSHβ遺伝子上の同じ領域にリクルートされることが判明した。この部位は既知のTR結合部位である、TSHβ遺伝子上-1.8kbならびに+18bpとは異なっていた。NCoRはHDAC3と結合し、ヒストンを脱アセチル化させることが知られている。今回の研究ではTSHβ遺伝子におけるH3アセチル化の状態をクロマチン免疫沈降法で解析しNCoRがTSHβ遺伝子上においてヒストン脱アセチル化により抑制状態に働くことが示唆された。また、Rev-erbαアゴニストであるSR9011投与は濃度依存的にTSHβ遺伝子発現を抑制することが判明した。以上より、Rev-erbαはNCoRを介し、TSHβ遺伝子発現制御へ関与していることが示唆され、特にTSHβ遺伝子発現の概日リズムに重要な役割をしていると考えられた。b) 現在、ソマトスタチンアナログ治療がTSHの産生下垂体腫瘍に適用されているのは英国および仏国で、いずれもランレオチドのSRもしくはLP製剤である。我が国では、TSH産生腫瘍に関する薬物療法のまとまった報告は非常に少ない。山田らは、手術を行なったTSH産生下垂体腫瘍90例のうち、LARを含めたオクトレオチ

ドの術前投与は44例と報告している。1週間から2ヶ月間の投与期間で34例において甲状腺機能は正常化し、前後で腫瘍サイズを検討できた38例中22例で縮小を認め、良好な成績であった。今回、1例は術前の投与、1例は薬物治療継続であり、両例とも甲状腺機能は全て正常化し、軽度の腫瘍縮小効果がみられ、既報に合致する結果であった。TSH産生腫瘍に対する薬物療法の目的は、腫瘍コントロールと甲状腺機能の正常化である。手術前の症例では、周期における甲状腺中毒クリーゼを回避する必要があり、こうした面からもソマトスタチンアナログ徐放製剤の使用が我が国でも適用拡大されることが期待される。

v) ゴナドトロピン分泌異常症ほか：

a) IL-6はFSHによるLH-R mRNA転写活性の上昇を増強することが示された。こうした結果からIL-6はFSHと相乗的にLH-Rプロモーター活性を上昇させ、mRNA安定性には寄与していないことが分かった。またFSHはIL-6R $\alpha$  mRNAの発現を増強するが、IL-6添加により相乗的に発現増強を認め、FSHはIL-6系のautoregulationを介してLH-R発現を増強することが示唆された。IL-6のFSH誘導性のLH-R発現増強に関するシグナル伝達系を検索し、JAK/STAT系が発現増強に寄与するシグナル伝達であることが示された。またFSH及びIL-6同時添加によりERK及びSTAT3のいずれもリン酸化を起しており、シグナル阻害剤の選択性も確認した。IL-6は様々な細胞で産生され、免疫や炎症反応において生化学的役割を果たすサイトカインとして知られている。JAK/STAT3シグナルがLH-R発現を増強するメカニズムは、JAK/STAT3が単独でLH-R

発現させるのではなく、何らかのPKA下流シグナルに影響を与えることでLH-R mRNA転写活性を上昇させるメカニズムが考えられた。b) 長期間E2を投与することにより多ホルモン産生性の下垂体腫瘍性結節を生じるモデル動物をはじめて作出することに成功した。今回作出した多ホルモン産生性の腫瘍性結節部では、同一細胞内において同時に3種類のホルモンの産生を示す特徴的な病変であった。また、PRLと $\alpha$ SUのように異なる細胞系譜の細胞で産生されるホルモンが、しかも同一の細胞で発現しているという特徴を有しており、下垂体ホルモンの発現の初期の制御を司るProp-1などの転写因子の発現変化が推察される。レーザーマイクロダイセクションによる解析によりPRL、TSH、 $\alpha$ SUのmRNAの発現が顕著に高いことが確認され、多ホルモン産生誘導は転写レベルであることが判明した。また、結節部では正常組織と比較しても上記4種類のホルモンの発現が高くPTTGの関与が疑われた。また多能性維持に関与するとされるSOX2の発現が多ホルモン産生性結節部位では顕著に低下していることが判明した。これはSOX2が下垂体ホルモン産生を正に制御する因子であることを示唆する重要な知見であると考えられた。

3) 長期予後研究：

間脳下垂体疾患の予後を前向きに長期間追跡する研究は、わが国では初めてである。登録開始から7年間で459例が登録された。登録後1～4年目の追跡データが登録された5疾患の一部の症例で縦断的な分析を試みたところ、「健康上の理由で日常生活に影響のある者の割合」(日常生活動作への影響、外出

への影響、仕事・家事・学業への影響)と「主観的健康観」の改善傾向が確認された。疾患別でも、下垂体機能低下症、AVP分泌低下症で、日常生活への影響、主観的健康観ともに改善傾向があった。今後、このような分析を治療法別に行うことにより、治療法とADLや症候等の改善との関係が明らかになることが期待される。

## E. 結論

### 1) 重点研究課題：

a) 自己免疫性下垂体炎の病因解析と新規疾患分類の確立：抗PIT-1抗体症候群、IgG4関連下垂体炎など自己免疫性下垂体炎には様々な病態があり、さらなる症例の集積と基礎的研究によってより病態が明らかになると考えられる。

b) Cushing病に対する新規薬物療法および診断法の開発：Cushing病の診断は、現時点ではgold standardといえるレベルに達した機能検査はなく、複数の検査の組み合わせから総合的に診断する必要があるため鑑別診断、確定診断の感度と特異性の高い方法論を早急に確立する必要がある。治療法に関しては、腺腫自体に作用する分子標的療法、合併症の防止を目的とした代謝阻害剤の開発と臨床応用が今回の研究を基盤に展開可能と考えられる。

c) 機能性下垂体腺腫の腫瘍発生原因と腫瘍増殖に関与する因子の解析：GH産生下垂体腺腫を正常下垂体組織と比較すると、多くの遺伝子にメチル化の異常が認められ、これまでの解析では明らかでなかった腫瘍による特性が明らかになった。GH産生腺腫の網羅的メチローム解析には、*gsp*変異有無の情報が必要であり、その有無により遺伝子によっては腫瘍でのメチル化の変化の意義が異

なってくるということが考えられた。ゲノムワイドのエピゲノム解析から、新たな体細胞変異が想定され、今後の解析の筋道が明らかになった。

### 2) 個別研究：

#### i) Cushing病ほか：

a) HX630はCushing病の新規治療薬になり得る可能性が示唆された。b) 新規のACTH/ICT-EIAは超高感度で特異性が高く、種々の病因に基づくACTH分泌不全症の診断に有用である。c) ACTH産生下垂体腺腫において、M群は増殖能が高く治療が困難であることが再認識された。一方m群においても腺腫が発見できない症例が依然として存在し、さらなる診断技術の向上が期待される。

#### ii) 成長ホルモン(GH)関連：

a) 先端巨大症術後の治療効果判定をさらに精度の高いものとするためには、術後のGTTの判定時期およびGH底値とIGF-I値の判定基準での乖離例の治療管理上の位置づけに関して今後検討する必要があると考えられた。b) 治療開始までの身長SDの損失は平均2SDであり、現在のガイドラインの条件により治療開始が遅れる可能性が示唆された。c) 成人GH分泌不全症に伴うNAFLD/NASHに対するGH補充療法が長期的にも有効であること、IGF-Iが一般のNASH治療においても有用である可能性、IGF-Iによる肝臓星細胞に対する作用機序、肝臓におけるGH抵抗性の新たな機序の解明とともに、GHの標的臓器としての肝臓の重要性が明らかになった。

#### iii) 抗利尿ホルモン(AVP)分泌異常症：

a) 中枢性尿崩症患者における水バランスの管理は現行のDDAVPによる治療では

十分とは言いがたく、低ナトリウム血症が高頻度で生じている現状が明らかとなった。また、渇感が障害されている患者ではしばしば高ナトリウム血症を呈し、重症感染症に罹患しやすく、さらには生命予後が不良であることが示された。渇感障害を伴った中枢性尿崩症患者では特にシックデイにおける水管理が重要である。b) 心疾患の予後にはAVP分泌過剰を伴う体液調節の異常が深く関わることが考えられる。

iv) 下垂体腫瘍ほか：

a) NCoR を介した  $Rer-erb\alpha$  は下垂体 TSH  $\beta$  遺伝子を制御しており、その概日周期発現に重要な役割をしている。b) TSH 産生腫瘍において、ソマトスタチンアナログ徐放製剤は、甲状腺機能および腫瘍サイズのコントロールをもたらす有効な治療法の一つである。我が国でも TSH 産生腫瘍への適用拡大が期待される。

v) ゴナドトロピン分泌異常症ほか：

a) PCOS では LH 基礎値が高値であることが知られており、PCOS では LH が IL-6 の影響で増加した LH 受容体を介して、高アンドロゲン血症を引き起こす可能性が考えられた。また、高濃度の IL-6 存在下では顆粒膜細胞での LH 受容体が適切なタイミングより早く発現して、FSH のシグナルを抑制し、十分な卵胞発育が阻害され、排卵障害をきたすという機構が考えられた。これらの結果から IL-6 などのシグナル伝達系を修飾することで排卵の制御が可能になれば、現在最も多胎発生の危険性の高い PCOS の排卵誘発に画期的な方法を提供する可能性があり生殖・周産期医療に貢献することが考えられる。b) 長期エストロゲン投与により多ホルモン産生結節を生じる腺腫モデル動物が再現性をもって作出

されることが判明した。多ホルモン産生結節の形成に SOX2 が関与することが示唆された。本モデル動物は多ホルモン産生ヒト下垂体腺腫の病態解析のための有用なツールとなると考えられる。

3) 長期予後研究：

間脳下垂体疾患データベースへの症例登録と追跡を継続して、追跡データがある程度蓄積した段階で、逐次、縦断的・横断的に解析予定である。長期間の追跡により、治療法や周囲の支援体制等に関する貴重な情報が得られることが期待される。

4) 今期の研究成果：

今期3年間の全研究期間における代表的研究の目標のうち、特に臨床展開が進展した課題は重点研究ではリンパ球性下垂体炎診断マーカーとなる責任病変蛋白が確定し、これを臨床診断に展開応用する基盤を構築した点であり、国際特許出願手続の着手、キット化を前提としたPMDA薬事戦略の相談などを行った。さらに世界に先駆けわが国から発信した成果としては、抗PIT-1抗体症候群という新規下垂体疾患を当班の研究により発見した点である。また個別研究ではIGF-1基準値の全年齢をカバーする平滑化曲線の作成を新生児から18歳の健常小児と健常成人のIGF-1値を設定し、トランジション年齢でも使用可能な診断用基礎情報として提供できた。また、超高感度測定法を用いた異所性ACTH産生症候群の簡易診断法を構築しACTH関連病態の診断精度を飛躍的に上昇させた。また、国際連携研究としては米国Johns Hopkins大学などとの合同研究を進め、検体の相互解析などを進めた。社会連携活動では、患者会との連携を特に重視し、セ

ミナーの開催、患者会での啓発、医薬品あるいは診断用試薬の開発にあたっての協力などが円滑に行われた。その結果、DDAVPの口腔内溶解錠がわが国で初めて承認を得るなどの成果を得た。今後特に力点を置くべきものとしては、特にCushing病の治療薬の開発であり、基礎的解析は着実に進展したが、これを臨床に展開するためにはマンパワー、研究経費、産学協同などの諸点から効果的で実効的な方法論を駆使し研究を進める必要があるものと考え。創薬に向けた研究を進展させるためには他の機関、他の組織との連携を強める必要もあり今後その実現を目指す。さらに、臨床現場等への研究成果の活用例としては、当研究班では「診療と治療の手引き」という形でガイドラインを作成、提供している。当班研究班が発信しているガイドライン

は18編におよび、その改訂、充実化を毎年順次行い、当研究班のホームページと内分泌学会ホームページに掲載し、臨床的に頻用され診療の手助けとなることはもちろん、難病対策としての厚労行政へも寄与しているものとする。

#### **F. 健康危険情報**

特記すべきものなし

#### **G. 知的財産の出願・登録状況**

##### **1. 特許取得：**

該当なし

##### **2. 実用新案登録：**

該当なし

##### **3. その他：**

該当なし

## IV. 分担研究報告書

## ACTH依存性Cushing症候群における CRH・dDAVP・GHRP-2負荷試験の評価

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  
蔭山 和則 弘前大学大学院医学研究科内分泌代謝内科学

**研究要旨：**Cushing病患者の診断は、少量デキサメタゾン抑制試験によるスクリーニングとともに、デスマプレシン(dDAVP)試験によって偽性Cushing症候群との鑑別をCRH試験によって異所性ACTH症候群との鑑別を行う。これら機能検査について、感度や特異度などを検討した。また、ACTH促進作用のあるGHRP-2についても検討した。CRH試験、dDAVP試験、GHRP-2試験のCushing病患者におけるそれぞれの感度は、58.8%、31.3%、78.6%であった。特異度いずれも低かった。これらの成績から、各試験の施行方法や投与量など、更に検討が必要と考えられた。

### A. 研究目的

Cushing病患者の診断は、少量デキサメタゾン抑制試験によるスクリーニングとともに、デスマプレシン(dDAVP)試験によって偽性Cushing症候群との鑑別をCRH試験によって異所性ACTH症候群との鑑別を行う。これら機能検査に加えて画像診断を行うことによって最終診断にいたる。これまで、推奨されてきたこれまでの方法を再評価するとともに、新しいACTH促進薬であるGHRP-2がACTH依存性Cushing症候群の鑑別に有用であるか否か検討した。

### B. 研究方法

Cushing病あるいはサブクリニカルCushing病患者17例(CD/SCD：男性4例・女性13例)および異所性ACTH産生症候群(EAS)あるいは下錐体静脈洞サンプリングにおいてもACTH産生部位の特定できない患者4例(EAS/occult：男性1例・女性3例)を対象に下記の検査を施行した。早朝空腹時に30分安静臥床後、CRH試験(100 $\mu$ g静注)、

dDAVP試験(4 $\mu$ g静注)、GHRP-2試験(100 $\mu$ g静注)を行った。各試験直前、15、30、60、90、120分後に採血を行い、ACTHおよびコルチゾールを測定した。ACTHの1.5倍以上の反応を持って、陽性所見とした。

### C. 研究結果

#### 1) CRH試験

CD/SCD 17例中10例(58.8%)で陽性反応を認め、EAS/occult 4例中全例(100%)で陽性反応を認めた。

#### 2) dDAVP試験

CD/SCD 16例中5例(31.3%)で陽性反応を認め、EAS/occult 4例中2例(50%)で陽性反応を認めた。

#### 3) GHRP-2試験

CD/SCD 14例中11例(78.6%)で陽性反応を認め、EAS/occult 2例中2例(100%)で陽性反応を認めた。



#### D. 考察

現在、ACTH依存性Cushing症候群の鑑別診断を行うプロセスとして、dDAVP試験とCRH試験が採用されている。dDAVP試験は、正常者や偽性Cushing症候群との鑑別に優れ、スクリーニング感度も良いとされてきた。しかし、今回の検討では極めて感度が不良であった。この原因としていくつかの原因が考えられる。用いられているdDAVPが本邦で入手可能な4 µg製剤であり、海外で用いられる10 µgと容量で異なる。1例のCD患者で、容量を10 µgへ増量した結果、ACTH増加反応を認めた。また、現在施行している早朝空腹時は、午後に比べて反応性が弱いと考えられるため、施行する時間を変更してみることも、改善法として考えられる。CRH試験に

ついても、CDにおける陽性率は必ずしも高くない。1例の確実なEAS例(気管支カルチノイド)においても、明らかなACTH増加反応を認めたことから、CRH試験を用いた診断には細心の注意が必要である。GHRP-2は、EAS症例を含めてACTH増加反応を示す例が多く、正常者でもACTH増加反応を認めることから、ACTH依存性Cushing症候群の鑑別に用いることは困難と考えられた。

#### E. 結論

CRH試験、dDAVP試験、GHRP-2試験はいずれも単独でCushing病診断に十分な感度・特異度を認めなかった。施行法や各薬剤の投与量など更に検討が必要であった。

表1. 各種試験におけるACTH陽性率

|         | CRH | dDAVP | GHRP-2 |                            |
|---------|-----|-------|--------|----------------------------|
| case 1  |     |       |        |                            |
| case 2  |     |       |        |                            |
| case 3  |     |       |        |                            |
| case 4  |     |       |        |                            |
| case 5  |     |       |        |                            |
| case 6  |     |       |        |                            |
| case 7  |     |       |        |                            |
| case 8  |     |       |        |                            |
| case 9  |     |       |        |                            |
| case 10 |     |       |        |                            |
| case 11 |     |       |        |                            |
| case 12 |     |       |        | ← EAS(Bronchial Carcinoid) |
| case 13 |     |       |        |                            |
| case 14 |     |       |        | ← occult EAS               |
| case 15 |     |       |        |                            |
| case 16 |     |       |        |                            |
| case 17 |     |       |        |                            |
| case 18 |     |       |        |                            |
| case 19 |     |       |        |                            |
| case 20 |     |       |        | ← occult EAS               |
| case 21 |     |       |        | ← occult EAS               |

|                  |
|------------------|
| response         |
| no response      |
| not administered |

## ヒトACTH1-39に対する新規超高感度測定法(ACTH/ICT-EIA)の開発と臨床応用：一次性あるいは二次性のACTH分泌不全症(ACTHF)の鑑別診断に関する研究

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:**【背景】一次性ACTH分泌不全症(1-ACTHF)であるACTH単独欠損症(IAD)のみならず、視床下部・下垂体腫瘍の副腎不全(HPF)や副腎皮質腺腫によるCushing syndrome(CS)などの二次性ACTH分泌不全症(2-ACTHF)の血中濃度を知ることが困難であった。【目的】ヒトACTH1-39に対する新規超高感度測定法(ACTH/ICT-EIA)を開発し、1-ACTHFならびに2-ACTHFにおける血中ACTHの分泌動態を明らかにする。【対象ならびに方法】IAD・下垂体炎慢性期(AH)、HPF、CS、IC、活動期Cushing Disease(CD)の血中ACTH濃度を新規に開発したACTH/ICT-EIA(最少検出感度：1.0fg/tube)を用いて測定した。【成績】血中ACTH基礎値：すべての検体で測定可能で、IAD/AH 0.6-1.2pg/mL < CS/AD/DEX << PHP 4.2-10.6pg/mL << CD 48.3-800.0pg/mL。【結論】本ACTH/ICT-EIAにより、ACTHFの鑑別診断が可能となった。

### A. 研究目的

従前のACTH測定法はいずれも測定感度が不十分で、一次性ACTH分泌不全症(1-ACTHF)であるACTH単独欠損症(IAD)のみならず、視床下部・下垂体腫瘍の副腎不全(HPF)、副腎皮質腺腫によるCushing syndrome(CS)あるいは外因性ステロイド(PSLなど)投与下(DEX)などの二次性ACTH分泌不全症(2-ACTHF)の血中濃度を知ることが困難であった。本研究ではヒトACTH1-39に対する新規超高感度測定法(ACTH/ICT-EIA)を新たに開発し、1-ACTHFならびに2-ACTHFにおける血中ACTHの分泌動態を明らかにする。

### B. 研究方法

対照はすべて正常副腎機能を示す健常者(CNT)41例(男性M 8例, 女性F33例), IAD 9例(M7, F2), 神経後葉原発の胚細胞

腫を含む下垂体腫瘍術後の副腎不全(HP)14例(M9, F5), subclinical CSを含む内因性ステロイド過剰症(CS)9例(M2, F7), 原発性アルドステロン症あるいはサブクリニカルCSの別診断でデキサメサゾン1mg内服投与後の症例(DEX)9例(M2, F7), ACバイパス術などで対外循環時のメチルプレドニン1g投与(MPL)6例(M6)の前, 1, 2, 4, 6, 12, 24, 48時間経過観察中の最低値, そして, 活動期クッシング病(CD)15例(F15). 一部の症例にはCRH負荷試験を行った。

つぎに、既報の測定原理に基づき、2種類の抗体、HK202(自家作製家兎血清, 抗ヒトACTH1-24:補足抗体)ならびにMCACT02(ヤマサ醤油, 抗ヒトACTH18-39:標識抗体)を用いて、免疫複合体転移EIA(ICT-EIA)を開発した(図1)。

そして、本ICT-EIAの特性をさらに明らかにするため、内分泌病理学的に診断の確定し

た異所性ACTH産生症候群(EAS)の血漿を酸性化処理(1/5vol 1N HCL)後に、サイズ排除HPLC(東ソー BioAssist G2SWxl PEEK 2連結, 0.05%TFA in 50mM KCl溶液, 流速0.5mL/min)で分画採取し、本ACTH1-39のICT-EIA Iならびにbig ACTHなどの大分子POMC関連タンパク質を等しく検出するACTH/ICT-EIA II(測定感度1.0fg/tube)を用いて比較検討した。

### C. 研究結果

本測定法ACTH/ICT-EIA I(以下 ACTH/ICT-EIA)の感度は1.0pg/tube(CV値12%)で、測定内誤差と測定間後差はそれぞれ4.8%と5.5%を示した。従来法のIRMA(三菱油化)ならびにECLIA(Roche)と比較し、それぞれのx1000倍ならびにx100倍の感度を示した(図2)。さらに、本ICT-EIAはヒトACTH1-24, ヒトACTH18-39, ラットACTH1-39やラット下垂体抽出液とは有意の交差反応を示さず、ヒトACTH1-39に高い特異性を示した。

つぎに、図3に示すように、本ICT-EIAではPOMC関連タンパク質の翻訳後修飾により、大分子ACTHなどが産生される異所性ACTH産生症候群(EAS)の血漿のサイズ排除HPLC(東ソー BioAssist G2SWxl PEEK 2連結, 0.05%TFA in 50mM KCl溶液, 流速0.5mL/min)では、本ACTH1-39のICT-EIA(図3中はACTH 1-39 ICT-EIA Iと表記, 測定感度1.0fg/tube)はACTH1-39をよく認識した。一方、big ACTHなどの大分子POMC関連タンパク質をよく検出するACTH/ICT-EIA II(図3中はACTH 1-39 ICT-EIA IIと表記, 測定感度1.0fg/tube)では大分子分画に主要な活性を認めた。

そして、ACTH分泌不全症をきたした症例

の血中ACTH基礎値はすべての検体において測定可能で、CNT(M $\pm$ SE: 8.9 $\pm$ 0.6 pg/mL) IAD(0.8 $\pm$ 0.1 pg/mL), CS(1.8 $\pm$ 0.5 pg/mL), DEX1mg(1.7 $\pm$ 0.2 pg/mL), MPL(3.4 $\pm$ 0.7 pg/mL), PHP(6.5 $\pm$ 1.1 pg/mL), CD(102.1 $\pm$ 19.1 pg/mL)を示した(図4)。うち、IAD, CS, DEXとMPL群で、分散分析(Fisher)を行ったところ、IADの基礎値が最も低値を示した(p<0.05)。

さらに、各種の疾患で、ACTHFをきたした症例にヒトCRH(100ug, iv)を投与したところ、CNTでは30-60分に頂値34-154pg/mLを示す良好なACTHの増加反応を示した。一方、IADでは増加反応が著しく低下し、胚細胞腫治療後(GCT)や視床下部・下垂体腫瘍術後(HP)の2-ACTHFでは減弱した増加反応を示した(図5)。また、心臓外科手術にさいして術前にMPL 1gを単回投与し、前後で血中ACTH濃度を測定したところ、抑制されたACTH値を感度よく測定できた(図6)。

### D. 考察

ヒトACTH 1-39に対する本ICT-EIAは既存の他のACTH1-39のいずれの測定法よりも、高感度で(LDV 1.0fg/tube)、2アミノ酸残基の差異を有するラットACTHを認識しなかったことより、感度・特異度ともに優れた測定法である。

つぎに、POMC分子は翻訳後に種々の糖附加とPC1/3ならびにPC2酵素による修飾をうける。EASではPC1/3の活性が低下し、その新鮮血漿中には、種々の糖附加うけた非processあるいは低processの大POMC分子が存在する。事実、今回のEAS血漿中のサイズ排除HPLCの各分画中には大分子側(100Kda, 67Kda, 12.4Kda)にも、本ACTH

ICT-EIAでも免疫活性が認められた。本ICT-EIA測定では4.5KdaのACTH1-39を主として認識し、一部に15-20KdaのPOMC関連分子を認識することが明らかとなった。

そして、従前の測定法では測定不可能であったIADの基礎値のみならず、長期のグルココルチコド過剰症、外因性グルココルチコド過剰症や、短期のグルココルチコド過剰であるDEX負荷試験やMPL投与後のACTH底値を明らかにした。うち、血中ACTHの基礎値あるいは底値の比較ではIAD < CS ≒ DEX < MPL < HPの順であった。本ICT-EIAの測定感度は0.1pg/mLで、いずれのIADにおいても基礎値やCRH負荷後の頂値(多くは基礎値の<120%)も測定できた。今後、IADにDEX1mgを補償した場合、抑制反応が生ずるか否か、興味のあるところである。

以上の成績より、1)本ICT-EIAは従前のいずれのACTH1-39測定よりも高感度で、かつ、ACTH1-39に高い特異性を有する。2)IADと下垂体炎にともなうACTHF-1は他の病因にもとづくACTHF-2に比較し、ACTH分泌不全の程度が強く、血中ACTHの基礎値の測定により、鑑別が可能である、と結論づけられる。

## E. 結語

新規のACTH/ICT-EIAは超高感度で特異性が高く、種々の病因に基づくACTHFの診断に有用である。

図表の説明：スライド中に記載

## F. 健康危険情報

なし

## G. 刊行物一覧

### 1. 雑誌

1) 福原紀章, 井下尚子, 片上秀喜, 堀口健太郎, 鈴木尚宜, 竹下 章, 藤井丈士, 西岡 宏, 竹内靖博, 山田正三. 異所性 silent ACTH産生下垂体腺腫の1例. 日本内分泌学会雑誌 第22回臨床内分泌Update Proceeding. 日本内分泌学会雑誌89:増8-10, 2013.

### 2. 書籍

1) 片上秀喜. 先端巨大症・下垂体性巨人症. 矢崎義雄 他 編「内科学」第10版. 朝倉書店, 東京, 2013, pp 1567-1571.

2) 片上秀喜. 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. 研究代表者: 大磯ユタカ. 厚生労働科学研究費補助金 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24年度 統括・分担研究報告書. pp47-54, 2013.

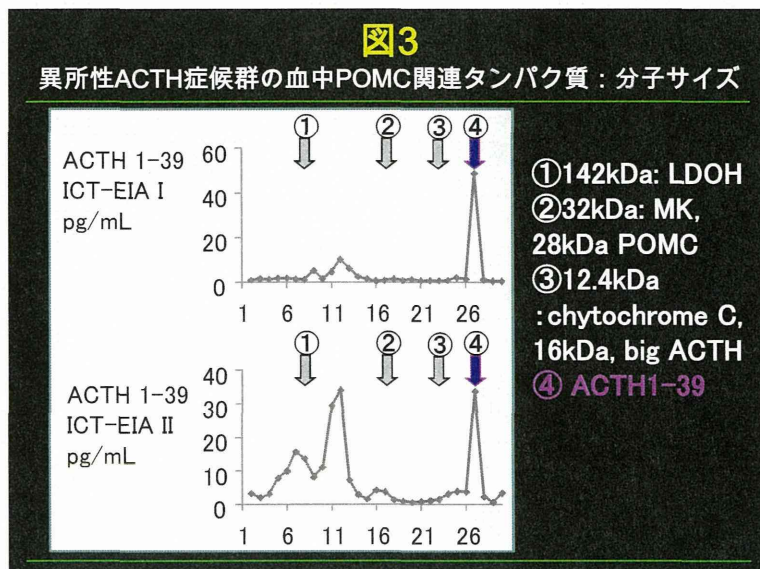
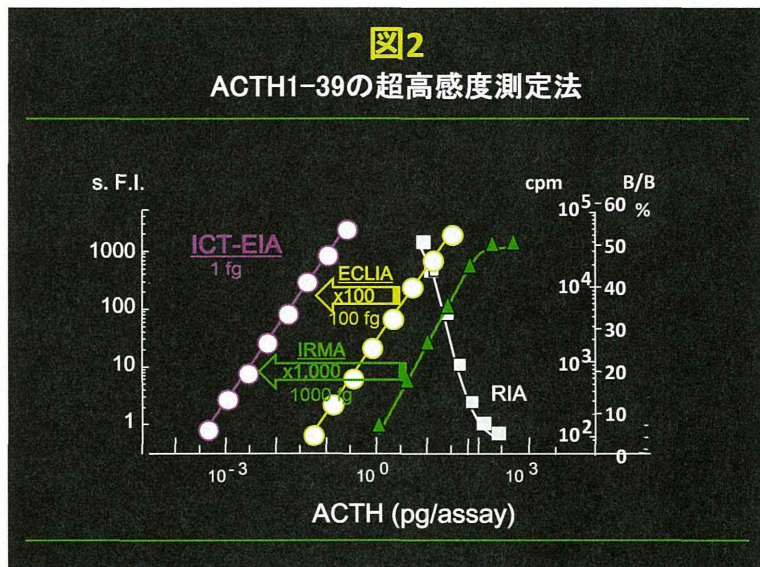
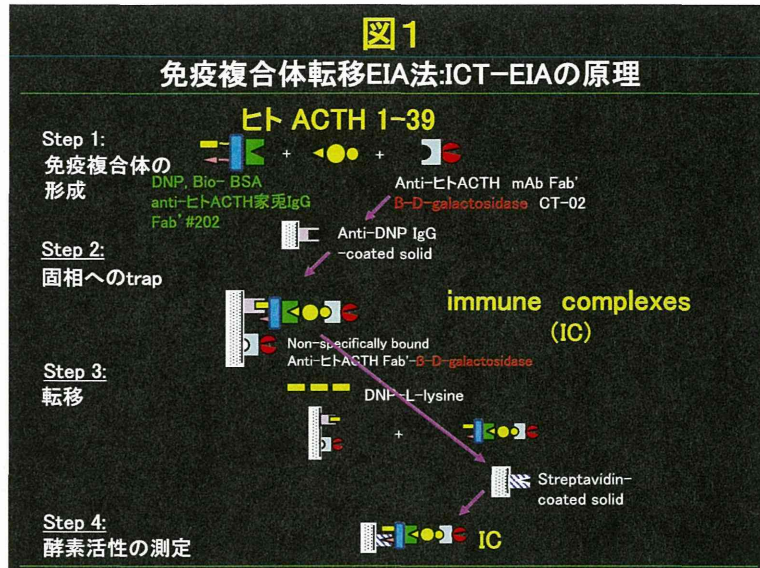
3) 菅原 明, 沖 隆, 片上秀喜, 岩崎泰正. Gushing病に対する新規薬物療法の開発. 重点研究課題報告書. 研究代表者: 大磯ユタカ. 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業 「間脳下垂体機能障害に関する調査研究」. 平成24年度 統括・分担研究報告書. pp181-182, 2013.

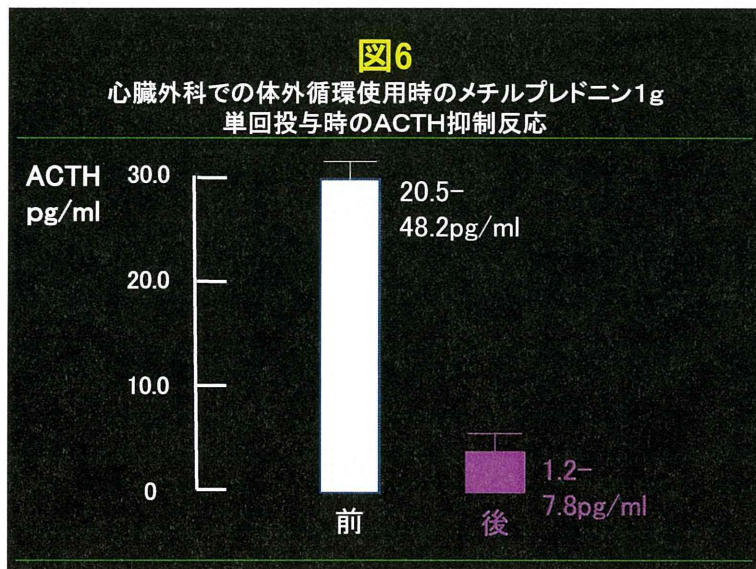
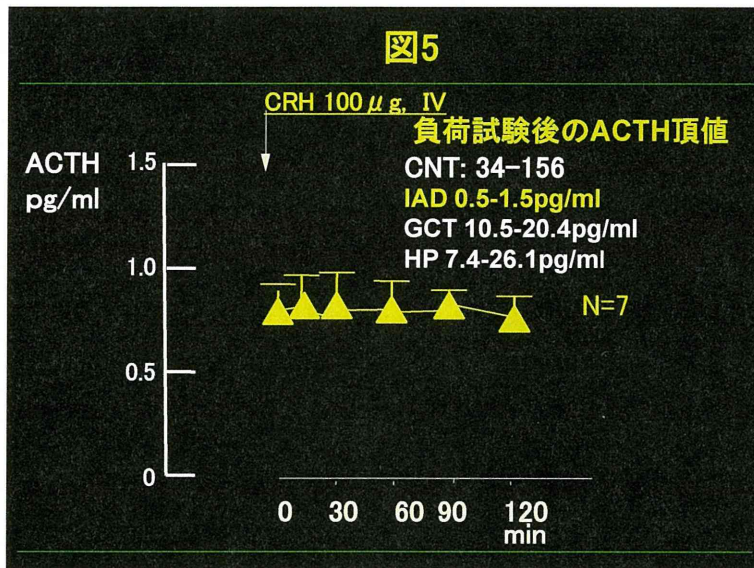
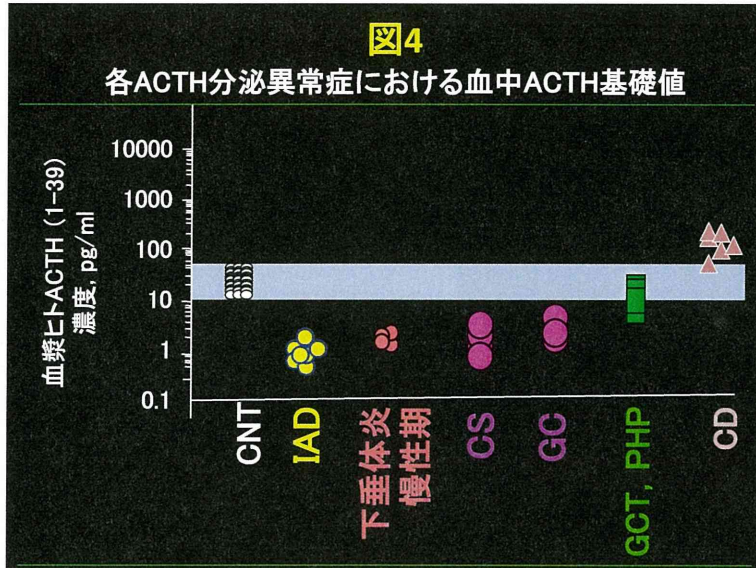
### 3. 学会発表

1) 片上秀喜, 橋田誠一, 宮村信博, 肥塚直美, 山田正三. 内分泌代謝領域における超高感度測定法の開発と臨床応用(その9) 異所性ACTH産生症候群(EAS)の診断. 日本内科学会雑誌 102巻: 増218, 2013.

2) 片上 秀喜, 奈須 和幸, 異所性GHRH産生腫瘍 コンソーシアム. 神経内分泌腫瘍(NET)におけるGHRHとソマトスタチン(SRIF): 先端巨大症(Ac)を呈した異所性

- GHRH産生腫瘍(eGHRH)での検討. 日本内分泌学会雑誌89巻1号:232, 2013.
- 3) 米川 忠人, 山口 秀樹, 土持 若葉, 片上 秀喜, 山田 正三, 中里 雅光. 診断が容易でない下垂体部の真菌感染症の2例. 日本内分泌学会雑誌89巻1号:230, 2013.
  - 4) 宮下 健悟, 高橋 千恵, 西垣 五月, 水野 裕介, 内木 康博, 堀川 玲子, 片上 秀喜. 診断に苦慮したHCG産生縦隔腫瘍による思春期早発症の男児例. 日本内分泌学会雑誌89巻1号:290, 2013.
  - 5) 田所 梨枝, 橋詰 真衣, 村井 謙允, 赤岡 利香, 杉澤 千穂, 遠藤 慶, 飯坂 徹, 齊木 亮, 佐藤 尚太郎, 高橋 育克, 大塚 史子, 片上 秀喜, 谷山 松雄. GHRH産生膵内分泌癌を伴った異所性ACTH産生症候群の一例. 日本内分泌学会雑誌89巻1号:347, 2013.
  - 6) 片上 秀喜, 奈須 和幸, 伴 良行, 緑川 早苗. 異所性GHRH産生腫瘍コンソーシアム. 神経内分泌腫瘍(NET)におけるクロモグラニンA(CgA), GH分泌促進ホルモン(GHRH)とソマトスタチン(SRIF)の産生・分泌の比較. 日本内分泌学会雑誌89巻2号:809, 2013.
  - 7) 廣畑 倫生, 片上 秀喜, 岩上 貴幸, 山田 創, 西堂 創, 宮本 信哉, 保谷 克巳, 村上 峰子, 石井 雄道, 寺本 明, 松野 彰. 周術期管理に難渋した再発GH産生下垂体腺腫の1例. 日本内分泌学会雑誌89巻2号:805, 2013.
  - 8) 嘉納 麻耶, 瀬尾 千颯, 山城 健二, 東條 克能, 片上 秀喜. 経過中に組織像が変化した前立腺癌を原発巣とする異所性ACTH症候群の1例. 日本内分泌学会雑誌89巻2号:811, 2013.
  - 9) 周東 佑樹, 杉原 仁, 小林 俊介, 高野 綾子, 長峯 朋子, 仲村 優子, 武市 奈緒美, 高谷 磨紀代, 竹光 秀司, 真山 大輔, 長尾 元嗣, 石崎 晃, 原田 太郎, 稲垣 恭子, 片上 秀喜, 及川 眞一. 日本内分泌学会雑誌89巻2号:811, 2013.
  - 10) Katakami H, Hashida S, Miyamura N, Matsuno A, Hizuka N, Yamada S. Novel and highly sensitive EIAs for the differential diagnosis (DDx) between Cushing's disease (CD) and ectopic ACTH syndrome (EAS). Hottopics 4, Abst & Prog 13th International Pituitary Congress: 30, 2013.
- H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)  
無し





## サブクリニカルクッシング症候群における0.5mg デキサメサゾン抑制試験導入の試み

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 田邊真紀人 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：**副腎性Subclinical Cushing症候群診断に下垂体性と同じ0.5mgデキサメサゾン抑制試験(DST)が適応できるか検討した。福大病院および九大病院にて0.5mg/1mgDSTの両者を施行した102例のうちSCD(疑い例含む)4例を除く98例を検討、98例中SCSは8例、Cushing症候群(CS)は1例であり残りの89例は正常例とした。0.5mg/1mgDSTの血中コルチゾール(F)値をプロットすると1mgDSTのF 3.0 $\mu$ g/dlは0.5mgDSTで4.0 $\mu$ g/dl(98例全例)、6.3 $\mu$ g/dl(正常89例)に相当した。正常89例中、10例で0.5mgDSTでF $\geq$ 4.0 $\mu$ g/dl、6例でF $\geq$ 6.3 $\mu$ g/dlとなった。SCSないしCSと診断された9例中0.5mgDSTでF $\geq$ 6.3 $\mu$ g/dlは5例のみでF $\geq$ 4.0 $\mu$ g/dlは全例満たした。したがって見逃しを防ぐためには0.5mgDSTのF $\geq$ 4.0 $\mu$ g/dlが妥当であるが正常例の1割強でもこの値をとり、診断には他所見の考慮も必要と考えられた。

### A. 研究目的

本邦で副腎性Subclinical Cushing症候群(SCS)の診断には1mgデキサメサゾン抑制試験(DST)が、Subclinical Cushing病(SCD)の診断には0.5mgDSTが用いられ、両者においてDST後の血中コルチゾール(F)値 $\geq$ 3.0 $\mu$ g/dlを陽性と判定する。SCSやSCDは肥満、糖尿病、高血圧、脂質異常症といった生活習慣病に潜在する可能性があり手術によりこれらの病態の改善が期待できる。実際、我が国における2003-2007年のSCSの全国集計例の成績(厚生労働省研究補助金難治性疾患克服研究事業「副腎ホルモン産生異常に関する調査研究」平成22年度総括・分担研究報告書)によれば、395例中273例(69%)で手術が行われ、高血圧、糖尿病、耐糖能異常、肥満の各項目の悪化が認められたのは1-4%のみで、約60-80%は改善、もしくは不変と報告されている。

しかし非常に頻度の高いこれらの病態の中でSCSやSCDのスクリーニングを行う際、副腎や下垂体病変の存在は必ずしも明らかではなく、0.5mgDSTと1mgDSTのどちらを行うべきか迷うことがある。2型糖尿病例においてSCSないしSCDのスクリーニングを試みた13の研究のレビュー(Krarup T. et. al. Diabetes Metab Res Rev 28: 219-227, 2012)によると、2型糖尿病例の0~9.4%にSCSないしSCDが認められている。その頻度に幅がある理由として、各研究において選択される検査の内容(DST、深夜唾液中コルチゾール値、尿中遊離コルチゾール)、検査値のカットオフ、コルチゾール測定のアッセイ系の違いが指摘されている。このように、生活習慣病の中からSCSやSCDをスクリーニングするにあたり、診断基準の設定は重要な問題となる。

今回我々は、両疾患スクリーニングにおけ



るデキサメタゾン投与量の統一に向けた試みとして、副腎性SCS診断に0.5mgDSTが適応できるか検討した。

## B. 研究方法

福岡大学病院内分泌・糖尿病内科および九州大学病院内分泌代謝・糖尿病内科に入院し0.5mg/1mgDSTの両者を同時期に施行した102例のうち、0.5mg/1mgの反応に差があると予想されるSCD(疑い例含む)4例を除く98例について後方視的に検討した。なお、診断基準としてSCDは本研究班の「サブクリニカルクッシング病の診断と治療の手引き(平成21年度改訂)」を用い、SCSは副腎ホルモン産生異常に関する調査研究班の診断基準(平成8年)を用いた。98例中SCSは8例、Cushing症候群(CS)は1例でそれ以外の89例を正常例とした。63例は副腎腫瘍の精査、26例は生活習慣病例のスクリーニングとしてDSTを実施している。

### (倫理面への配慮)

本研究は、福岡大学病院、九州大学病院の臨床研究審査委員会の承認を得て行った。

## C. 研究結果

0.5mg/1mgDSTにおける血中F値をプロットし回帰式を求めた。98例全例を解析したところ $y=0.95x+1.17$ ( $R^2=0.77$ )の相関(なお、ここでxは1mgDSTにおける血中F値、yは0.5mgDSTにおける血中F値。以下同様)が得られた。したがって1mgDSTのF 3.0 $\mu$ g/dlは0.5mgDSTで4.0 $\mu$ g/dlに相当した(図1)。いっぽう、正常例89例における同様の解析では $y=1.95x+0.43$ ( $R^2=0.34$ )の相関が得られ、1mgDSTのF 3.0 $\mu$ g/dlは0.5mgDSTで6.3 $\mu$ g/dlに相当した(図2)。

次に、このようにして得られた2つの値を実際のSCSスクリーニングに応用した場合の妥当性を検討した。0.5mgDSTのF 6.3 $\mu$ gをカットオフとした場合、0.5mgDST F<6.3 $\mu$ g/dlの87例中1mgDST F $\geq$ 3.0 $\mu$ g/dlとなる両者の乖離は5例(6%)に認められた。また、現行診断基準で最終的にSCSないしCSと診断された9例においても0.5mgDST F $\geq$ 6.3 $\mu$ g/dlとなるのは5例(56%)にとどまった。0.5mgDSTのF 4.0 $\mu$ g/dlをカットオフとした場合、0.5mgDST F<4.0 $\mu$ g/dlの79例中1mgDST F $\geq$ 3.0 $\mu$ g/dlとなる両者の乖離は0例(0%)であった。また、現行診断基準で最終的にSCSないしCSと診断された9例において0.5mgDST F $\geq$ 4.0 $\mu$ g/dlとなるのは9例(100%)であった。いっぽう正常89例中、0.5mgDST F $\geq$ 4.0 $\mu$ g/dlとなるのは10例(11%)であった。

## D. 考察

同一症例において同時期に、同一の入院期間中に0.5mgDSTと1mgDSTの両者を実施し、得られた負荷後血中F値の相関を調べた。その結果、SCSないしCSを含む全例で解析した場合と含まない正常例のみで解析した場合で相関の直線に差異が生じた。具体的には、1mgDSTの血中F 3.0 $\mu$ g/dlに相当する0.5mgDSTの血中F値は前者では4.0 $\mu$ g/dl、後者では6.3 $\mu$ g/dlとなった。正常例のみの解析で0.5mgDSTのF値が高めに出た理由としては、1mgDSTでは十分Fが抑制されるものの、0.5mgDSTでは十分抑制されない症例(図2において、○で囲んだ部分)の影響を強く受けた可能性が考えられる。本研究でこれらの症例は一様に正常例として扱ったが、0.5mgDSTで抑制されていない点ではSCDを完全に否定することはできず(実際これら

の症例では下垂体のMRIやその他の負荷試験、深夜血中F値等、SCDを否定するための検査が必ずしも実施されていない)、この点は本研究の限界として挙げられる。

そこで今回得られた2つの0.5mgDSTのF値を用いて、現行診断基準においてSCSがどのように診断されるかを検討した。その結果、0.5mgDSTのF 6.3 $\mu$ g/dlをスクリーニングのカットオフとした場合、SCSないしCSと診断された9例のうち4例はスクリーニング陰性すなわち見逃されることが分かった。したがってこの値はスクリーニング陰性例に相当数のSCSが紛れ込む(見逃す)おそれがありスクリーニングのカットオフ値としては不相当と考えられた。一方、0.5mgDSTのF 4.0 $\mu$ g/dlをカットオフとした場合、スクリーニング陰性となる79例は全例1mgDSTでも陰性と判定されていた。またSCSないしCSと診断された9例は全例0.5mgDSTによるスクリーニング陽性と判定されており、見逃されていなかった。したがってスクリーニング陰性例ではSCSはきちんと除外され、SCS確定例では全例陽性となるためスクリーニングのカットオフ値としては有用と考えられた。

スクリーニングのカットオフ値を甘く(今回の場合、DSTのF値を低く)設定すると見逃しは少なくなるが疑い例としてさらなる精査に回る例が増加することが予想される。0.5mgDSTのF 4.0 $\mu$ g/dlをカットオフ値とした場合、正常例の89例中10例(11%)はスクリーニング陽性と判定される。したがって正常例の1割強は0.5mgDST F $\geq$ 4.0 $\mu$ g/dlとなるためSCS確定診断には血中ACTH値、深夜血中F値などその他の所見も考慮すべきと考えられた。

## E. 結論

0.5mg/1mgDSTの血中F値の相関を求めると1mgDSTのF 3.0 $\mu$ g/dlは0.5mgDSTで4.0 $\mu$ g/dl(98例全例)、6.3 $\mu$ g/dl(正常89例)に相当した。0.5mgDSTのF 6.3 $\mu$ g/dlをスクリーニングのカットオフとした場合、スクリーニング陰性例に相当数のSCSが紛れ込む(見逃す)おそれがありスクリーニングのカットオフ値としては不相当と考えられた。一方、0.5mgDSTのF 4.0 $\mu$ g/dlをカットオフとした場合、スクリーニング陰性例は全例1mgDSTでも陰性と判定され、またSCSないしCSと確定診断された例は全例0.5mgDSTによるスクリーニング陽性と判定されており、見逃されていなかった。したがってスクリーニング陰性例ではSCSはきちんと除外され、SCS確定例では全例陽性となるためスクリーニングのカットオフ値としては有用と考えられた。一方、この値では正常例の1割強はスクリーニング陽性と判定される。したがってSCS確定診断には血中ACTH値、深夜血中F値などその他の所見も考慮すべきと考えられた。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Sakamoto R, Matsubara E, Nomura M, Wang L, Kawahara Y, Yanase T, Nawata H, Takayanagi R.: Roles for corticotropin-releasing factor receptor type 1 in energy homeostasis in mice. *Metabolism*. 2014 in press
- 2) Akehi Y, Kawate H, Murase K, Nagaishi R, Nomiyama T, Nomura M, Takayanagi R,

Yanase T: Proposed diagnostic criteria for subclinical Cushing's syndrome associated with adrenal incidentaloma Endocrine J 60 (7): 903-912, 2013

- 3) 明比祐子、継 仁、辰元亜希、吉田亮子、二村 聡、重川誠二、鍋島一樹、井上亨、小野順子、柳瀬敏彦：Corticotroph hyperplasia を示した高齢Cushing症候群の一例臨床と研究. 90(1): 103-106, 2013
- 4) 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Cushing症候群の1例. 感染症学雑誌 87(1): 39-43, 2013
- 5) 柳瀬敏彦、福田高士、高田彩子、野見山崇、明比祐子：原発性・続発性副腎機能

不全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(第23回日本間脳下垂体学会proceeding). 日本内分泌学会雑誌 89: 35-37, 2013

2. 学会発表  
該当なし

H. 健康危険情報  
特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得  
特になし
2. 実用新案登録  
特になし
3. その他  
特になし

図1. 全例(98例)における1mg/0.5mgDSTの相関

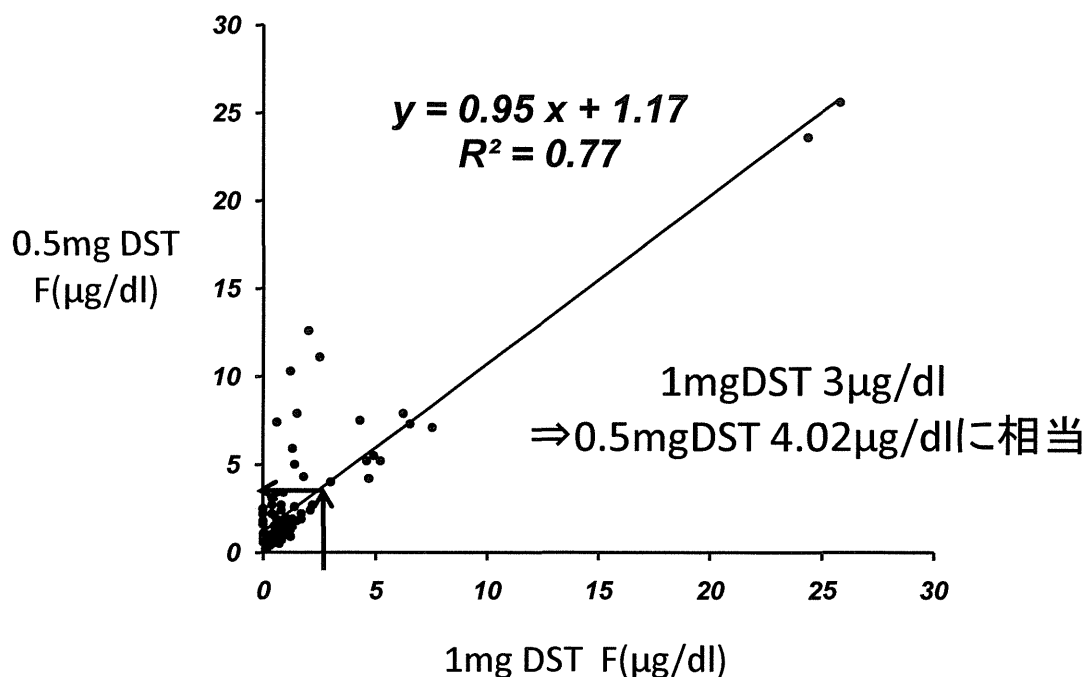


図2. 正常例(89例)における1mg/0.5mgDSTの相関

