

# corticotropin-releasing hormone (CRH) と proopiomelanocortin (POMC) 関連ペプチドに対する超高感度・高感度ホルモン測定法からみえてくるもの： ACTH 単独欠損症と異所性 ACTH 症候群

帝京大学ちば総合医療センター内科臨床研究部<sup>1)</sup>，甲南加古川病院内科<sup>2)</sup>

片上 秀喜<sup>1)2)</sup>

本稿は第 27 回 間脳・下垂体・副腎系研究会での教育講演に，big ACTH (POMC ならびに proACTH) に対する新規超高感度測定法の開発と臨床応用を追記したものである。下記の構成で述べる。

1. はじめに：視床下部・下垂体・副腎皮質系 (HPA) 疾患の特徴と超高感度ホルモン測定法の必要性
2. ACTH(1-39)に対する超高感度測定法の開発と臨床応用
  21. 自験例 1：若年発症の ACTH 単独欠損症
  22. ACTH 単独欠損症の疫学研究
  23. ACTH 超高感度測定法の開発
    231. 本測定法の特徴
    232. ECLIA 法との相関
    233. ACTH 分泌不全症の診断
3. big ACTH に対する高感度・超高感度測定法の開発と臨床応用
  31. 自験例 2：10 年後に診断できた異所性 ACTH 症候群 (EAS)
  32. EAS における POMC 翻訳後修飾の偏倚
  33.  $\gamma$ 1-MSH と  $\gamma$ 3-MSH の高感度測定法と臨床応用
  34. big ACTH に対する新規超高感度 EIA の開発と臨床応用
  35. ACTH 依存性 Cushing syndrome の診断 algorithm
4. corticotropin releasing hormone (CRH) の超高感度測定法の開発
  41. 異所性 CRH 産生腫瘍の診断は正しいか？
  42. CRH 超高感度測定法の開発と EAS における CRH 産生腫瘍の再評価
  43. CRH 超高感度測定法を用いたヒト視床下部機能の推定と CD における CRH 分泌過剰の検出
5. おわりに：超高感度測定法からみえてくるもの

## 1. はじめに，視床下部・下垂体・副腎皮質系 (HPA) 疾患の特徴と超高感度測定法の必要性

内分泌系は神経系や免疫系とならび，生体の恒常性を保つ役割を担っている。血中の微量の生理活性物質 (ホルモン) を介して，標的内分泌腺の機能を調節する<sup>1) 2)</sup>。

古典的な視床下部・下垂体や膵臓・性腺などの内分泌腺で同定されたホルモンはその概念が拡大し，臓器間や組織間の情報伝達のみならず，細胞間情報伝達物質として，より大きく把握され，臓器をこえた作用機序への理解が進んだ。その結果，神経系では神経内分泌物質としての AVP のみならず，orexin や ghrelin などのペプチドが睡眠・覚醒や食欲摂取に関与することが明らかにされた。同様に，各種の炎症性サイトカインが免疫系でも，さらに，ANP や BNP が循環器系でも同定され，それぞれ，生体の恒常性に大きく関与している (図 1)。

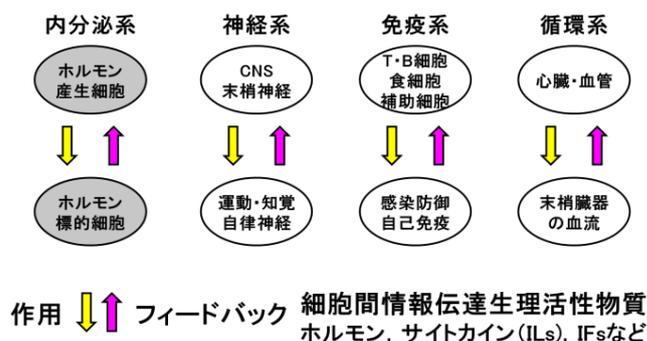


図1. 生体の恒常性

うち，視床下部-下垂体は内分泌調節機構の中心を占める (図 2)<sup>2)</sup>。視床下部の神経核で合成された視床下部ホルモン，たとえば CRH，は下垂体門脈血中に放出され，瞬時に，その特異的受容体を介して，下垂体前葉ホルモン，ACTH，分泌を調節する。

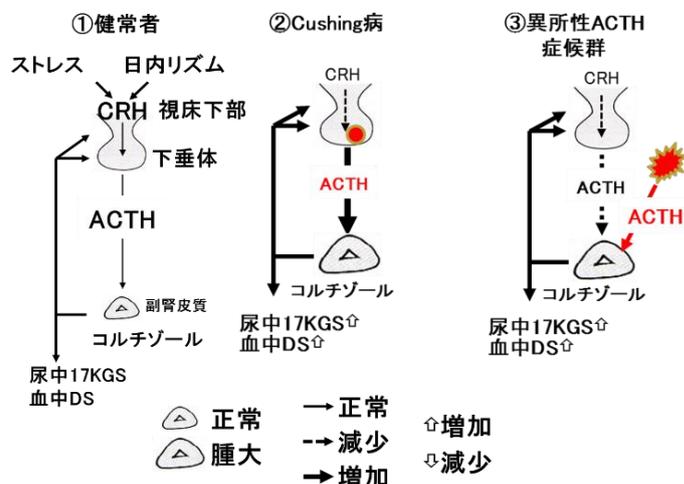


図2. 視床下部・下垂体・副腎皮質 (HPA) 系

下垂体前葉では5種類の細胞から6種類のホルモンが合成され、視床下部からの刺激に反応して末梢血中に放出され、その標的内分泌腺、例えば、副腎皮質からのホルモン、コルチゾール、分泌を促進する。さらに、各ホルモンは血流を介して全身の組織に分布し、特異的受容体を介して、各細胞の固有機能を調節する。逆に、血中の標的ホルモン、コルチゾール、が視床下部 CRH 産生細胞や下垂体の ACTH 産生細胞に作用し、ホルモン作用の恒常性を保つ（フィードバック調節機構）(図2, ①健康者)。

視床下部-下垂体疾患では病変が視床下部-下垂体にまたがるが多く、下垂体機能のみならず、視床下部機能(自律神経機能)と視野・視力が同時に障害されることが少なくない。さらに、下垂体ホルモンの標的内分泌腺からのホルモン分泌も障害され、続発性の機能低下症を来す。一方、機能亢進症はホルモン分泌細胞の腫瘍化にともない、多くの場合は単一下垂体ホルモンの過剰症の症状と、ときに腫瘍による物理的圧迫による他の下垂体前葉機能低下症と頭痛や視野・視力異常などの神経症状を来しやすい<sup>3,4)</sup>。

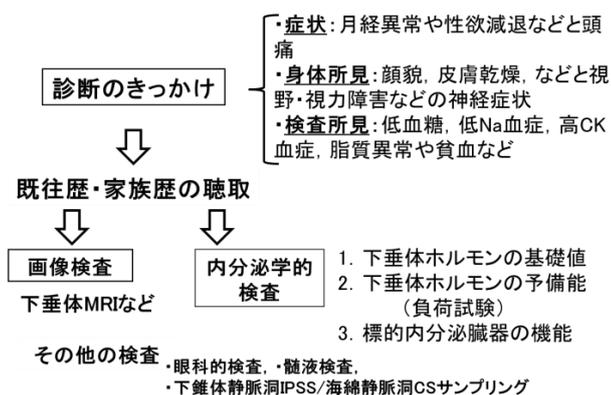


図3. 視床下部下垂体疾患の診断プロセス

そして、これら視床下部-下垂体疾患は稀である。例えば、先端巨大症や下垂体性巨人症は人口100万人あたり有病率は85.9人、新規の年間発症率は5.3人と少ない。これら疾患の稀少性は日常診療では見落とされがちで、診断と治療の遅れにつながりやすい。

したがって、以上の特徴を念頭に置いて非特異的臨床徴候、たとえば、頭痛、視野・視力の異常、副腎不全による低Na血症や低血糖などの症状や陰萎などの観察から、視床下部・下垂体疾患の存在を疑うことになる<sup>4)</sup>。

つぎに、臨床徴候から診断に進む際、血中ホルモン濃度を測定することが必須となる。血中ホルモンのうちには、比較的安定したレベルを示すものもあるが、多くは間挿的(episodic)な分泌のため脈動的に変動し、一日の時間による変動(日内リズム)もあることがあって、測定の間と測定結果の判定には注意が必要である<sup>3)</sup>。

多くのホルモンやペプチドの血中濃度はpM

( $10^{-12}$ , 分子量 1,000 のペプチド 1mg が小学校のプール三個分, 約 1,000t に溶解した濃度) レベルで (図

ペプチドの濃度 e.g. 分子量1,000 1.0mg

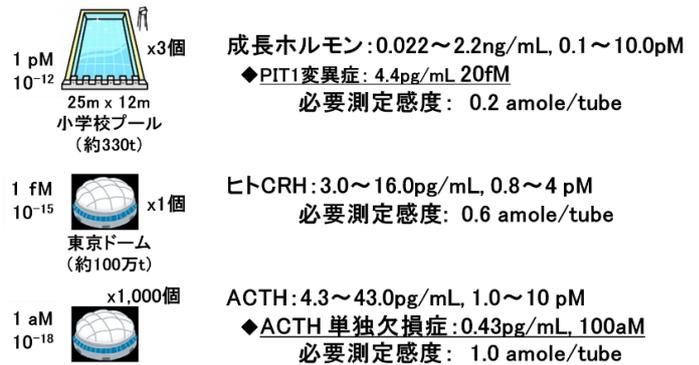


図4. 超高感度測定法の必要性

4), その基礎値や機能喪失型の分泌異常症, 例えば, PROP1 変異症やPIT1 変異症における GH 値は 20~200fM ( $1\text{fM}, 10^{-15}$  は東京ドーム一個分, 約 100 万 t, に上記ペプチド 1mg が溶解した濃度) である。さらに, ACTH 単独欠損症の ACTH 基礎値は 100aM ( $1\text{aM}, 10^{-18}$  は東京ドーム千個分に上記のペプチド 1mg が溶解した濃度) で, 既存のいずれの高感度測定法をもってしても, 測定できない。そこで, これら既存の測定法に比較して, 200~1,000 倍以上の超高感度測定法が必要となる<sup>5)</sup>。

われわれは若年発症の ACTH 単独欠損症と<sup>6)</sup>, 診断に難渋した EAS<sup>7)</sup> を経験した。その診断と病態解明のため, それぞれ, ACTH, pro  $\gamma$ -MSH ( $\gamma 1$ -MSH,  $\gamma 3$ -MSH) と big ACTH に対する超高感度測定法を開発し, それらの臨床応用を行った経緯を述べる。

2. ACTH(1-39)に対する超高感度測定の開発と臨床応用

21. 自験例1:若年発症のACTH単独欠損症(IAD)<sup>6)</sup>

診断に難渋した若年発症の IAD を経験した (表1)。前診療科ではミトコンドリア脳筋症として, 筋

16歳、女性、高校1年生

【主訴】食欲低下、学業不振、全身倦怠感

【現病歴】11歳(小学校5年生、1992年12月)、全身倦怠感、筋力低下、学業成績不振(上位1/5から下位1/5)。精神発達遅滞とミトコンドリア筋症? 筋生検:異常なし。

14歳(中学2年生、1995年8月)、ACTH単独欠損症のDx。コートリルの内服により、症状は消失した。

【既往歴・家族歴】在胎34週、出生体重1,200g。呼吸障害。顎頭7ヶ月、発語18ヶ月、処女歩行19ヶ月。その後 catch up。初経12歳、整

表1. 自験例1:若年発症ACTH単独欠損症

生検まで受けたが診断に至らなかった。頻発する低血糖発作より、副腎不全を疑い、内分泌学的に血中 ACTH とコルチゾールの選択的分泌不全を証明し(表2), 診断した。本例の下垂体は経年的に徐々に萎縮した(図5)。成人発症の IAD によく見られる下垂体萎縮の始まりと考え

られた。

ACTH, pg/ml (LDV 5.0pg/mL)	GH, ng/ml
CRH: 5.2→5.6	GHRH: 0.3→6.47(17.1)
ITT: 5.0→6.9	ITT: 0.3→1.33(4.53)
コーチゾル, μg/dl	アルギニン1.38→3.82(6/36)
CRH: <1.0→<1.0	PRL, ng/ml
ITT: <1.0→<1.0	TRH: 51.7→124.0
迅速ACTHテスト	TSH, μU/ml
<1.0→<1.0	TRH: 7.86 →32.81
連続ACTHテスト	(T <sub>3</sub> : 2.61 →3.54ng/ml)
<1.0→7.4	LH, mIU/ml
U-17OHCS	LHRH: 11.33 →42.39
1.2→6.6mg/日	FSH, mIU/ml
日内変動(08, 14, 20)	LHRH: 8.05 → 17.32
<0.2, 0.2, <0.2	

表2. 自験例1: 内分泌負荷試験成績

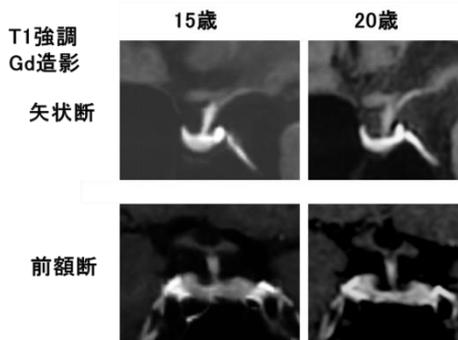


図5. 自験例1: 下垂体の経年変化

その後、若年発症の IAD 自験例を増やし、成人発症の IAD との異同を明らかにした (表3)<sup>8)</sup>。

IAD 24症例の検査値	全体 (n=24)	中高年 (n=20)	若年 (n=4)
・ACTH, pg/ml	<5.0	<5.0	<5.0
・F, μg/dl	<1.0	<1.0	<1.0
・empty sella (CT/MRI)	6/16例	4/13例	2/3例
・PRL, ng/ml (コートルル+チラーゼンS補償後)	6.8-68.7 (2.7-13.5)	6.8-68.7 (4.2-13.5)	11.7-51.7 (2.7-9.4)
・TSH, μIU/ml (コートルル+チラーゼンS補償後)	1.6-21.2 (1.1-4.0)	1.6-21.2 (1.1-4.0)	7.5-16.0 (1.2-3.5)
・抗下垂体抗体 (AtT <sub>20</sub> -GH <sub>3</sub> 細胞膜, 細胞質抗体)陽性例	5/21例	5/17例	0/4例
・甲状腺自己抗体	8/21例	7/18例	1/3例
・抗核抗体	0/10例	0/8例	0/2例

表3. ACTH 単独欠損症24例のまとめ

## 22. ACTH 単独欠損症の疫学研究<sup>8)</sup>

疫学調査に必要な3要素、すなわち、①地理的均質性 (他の地域と交流が少ない)、②人口動態の把握

	人口100万人	ACTH単独欠損症	先端巨大症・下垂体性巨人症
	発症率	0.9人	5.3人
	有病率	19.1人	85.9人

図6. ACTH単独欠損症の疫学

握 (人口流動が少なく、正確な県勢調査や国勢調査)、③一定の診断基準と紹介率 (医学生と研修医を教育し、厚労省研究班の IAD 診断基準に基づき、県下の主要病院からのほとんどすべての IAD を一カ所に集約し、責任者のもとで診断を確定) を満たす、宮崎県で行った (図6)。

同時におこなった先端巨大症・下垂体性巨人症の疫学調査と比較し、IAD の有病率ならびに発症率は、それぞれ、その約 1/5 と判明した。

## 23. ACTH 超高感度測定法の開発

高感度の免疫学的測定法には抗原認識部位の異なる2種類の抗体を用いる。それら抗体は親和性と特異性がともに優れている必要がある。一般には捕捉抗体に親和性の高いポリクローナル抗体を、標識抗体には特異性の高いモノクローナル抗体を用いることが多い。本 ACTH 超高感度測定法にも、捕捉抗体として N 端部 ACTH

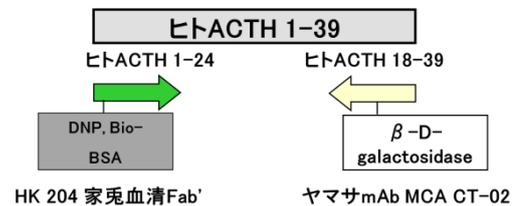


図7. HITACTH の免疫複合体転移法 (ICT-EIA) の開発

1-24 にたいする家兎自家血清 (HK204) を、標識抗体として C 端部 18-39 に対するマウスモノクローナル抗体 (ヤマサ, CT-02) を用いた (図7)<sup>9)</sup>。

## 23.1. 本測定法の特徴 (図8)<sup>10)11)</sup>

従来のサンドイッチ EIA 法は十分量の抗体をチューブ内壁、ビーズ、ゲルなどに付着させた固相化抗体①に、異なった濃度の抗原 (標準液または検体) を加えて抗体に結合させる。次いで十分量の標識抗体を加えて、同一分子内の別の抗原決定基にサンドイッチ状に抗原を挟んで結合させる。

しかし、反応液中に多量に存在する酵素標識抗体が抗体不溶化固相①に非特異的に吸着して、バックグラウンドを上昇させるため、高感度とはならない (図8, 左①, サンドイッチ EIA)。

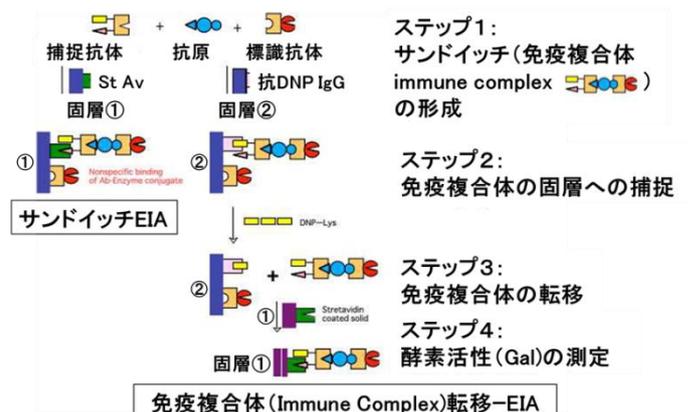


図8. 免疫複合体転移法 (ICT-EIA) と従来法の比較

非特異吸着を除去しなければ高感度とはならない。

そこで、ステップ1では、標識抗体を含むサンドイッチ（免疫複合体 immune complex）を形成させ、ステップ2では、この免疫複合体を固層②で補足する。ステップ3では、本測定法の特徴でもあるが、この免疫複合体を、さらに、別の固相①に移し替えることにより（transfer）、標識抗体の固相への非特異吸着を少なくし、Noiseを大幅に減少させる（低Noise）。ステップ4では、酵素活性のより強いβ-D-galactosidase（高Signal）を用いて酵素反応をより長時間行い、S/N比を飛躍的に増大させる（図8、右）。

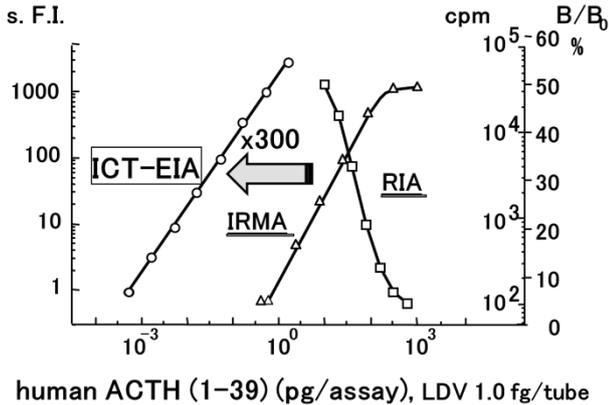


図9. ACTH 1-39の超高感度測定法

その結果、図9に示すように、ヒトACTH 1-39のICT-EIAの感度は1.0fg/tube（10% CV）となり、RIAに比較して1,000倍、IRMA法あるいはECLIA法に比較して約300倍の高感度測定が可能となった。超高感度法では血漿量はごく微量（5~10μL）を用いるため、血漿中の非特異的な干渉物質の影響を受けにくくなる（図9）<sup>10</sup>。

### 232. 既存のECLIA法との相関

そこで、既存のECLIA法(Roche)との相関を2~105pg/mL、N=94検体、で検討したところ両者の相関係数は0.92と概ね良好であった（図10）。しかし、5pg/mL

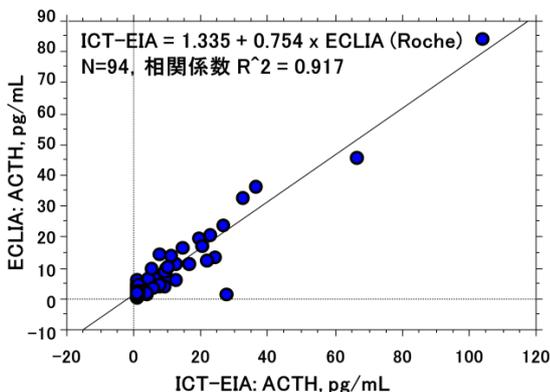


図10. ICT-EIAとECLIAの相関1: ACTHすべての測定値

以下の検体（N=65）においては、ECLIA法ではその測定下限値、2.0pg/mLに近づくにつれて、相関係数は0.35と低下した（図11）。

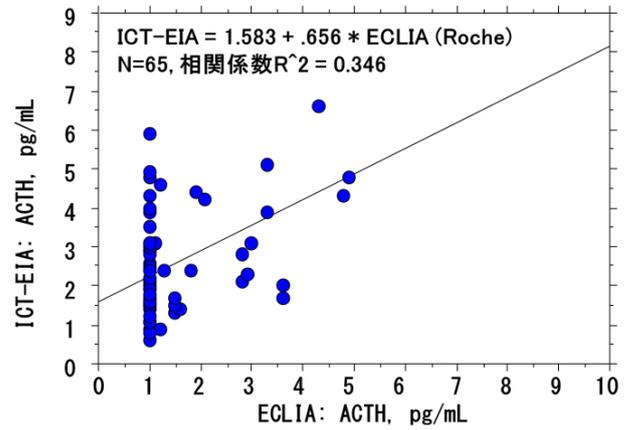


図11. ICT-EIAとECLIAの相関2: ACTH<5.0pg/mL

したがって、ECLIA法によるACTH測定値が信頼性を示す値は5pg/mL以上であるといえる。一般に、測定限界値に近づくにつれて、血漿中の非特異的な干渉物質の影響を受けやすくなるためである。そして、ACTH測定キット間の国際標準化がのぞまれる<sup>12)</sup>。

### 233. ACTH分泌不全症の診断

次に、本ACTH ICT-EIAを用いて、IADなどの各種のACTH分泌不全症の血中ACTH基礎値を測定したところ、図12に示すように、対照者（CNT）の血中ACTH濃度は6.0~45.0pg/mLであった。一方、IADや慢性期のリンパ球性下垂体前葉炎にともなうACTH分泌不全症では0.6~1.8pg/mLと低値であったが、すべての検体で測定感度（0.03~0.1pg/mL）以上を示した。

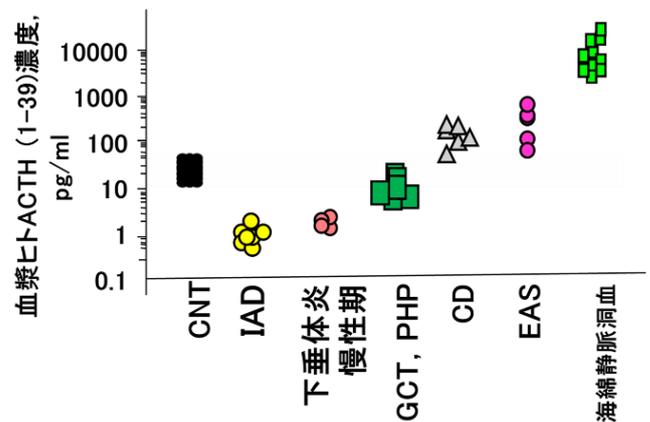


図12. 各ACTH分泌異常症における血中ACTH基礎値

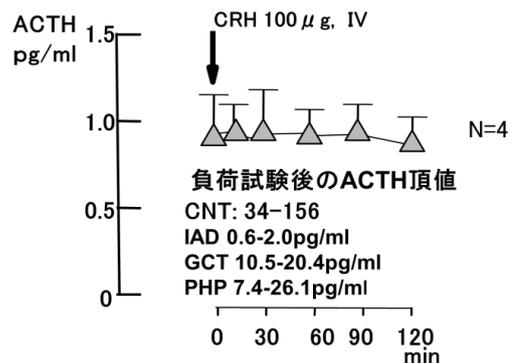


図13. IADにおけるCRH負荷試験成績

そして、胚細胞腫 (GCT) や下垂体腫瘍などなどによる下垂体機能低下症 (PHP) では 3.0~11.0pg/mL と、一部、健常者の下限値との重なりを示した。

Cushing 病 (CD) や EAS では高値を、海綿静脈洞血は著明な高値を示した (図 12)<sup>13)</sup>。さらに、IAD では ACTH 分泌予備能も著明に低下した (図 13)。

したがって、これら IAD と ACTH 分泌不全を示す慢性期の下垂体前葉炎では、ACTH 基礎値のみならず分泌予備能も、いずれも共に、著明に低下しており、他の下垂体性あるいは視床下部性の ACTH 分泌不全とは大きく異なる。その結果、ACTH の基礎値のみで、疾患の類推が可能である。ただ、ネフローゼ症候群などの腎疾患や慢性関節リュウマチなどの自己免疫疾患により、合成ステロイドを長期間服用している症例の一部では IAD に見られるほど高度の ACTH 抑制を示すことがある (投稿準備中)。

### 3. big ACTH に対する高感度・超高感度測定の開発と臨床応用

#### 31. 自験例 2: 10 年後に診断できた異所性 ACTH 症候群 (EAS)

EAS は Cushing 症候群 (CS) の約 10% 前後を占める。病因として気管支カルチノイド (25-40%) や肺の小細胞癌 (3-27%) が多い。しかし、原病巣が微小で周期性を示す症例では長期間の経過観察にもかかわらず、その診断に苦慮することが少なくない。

われわれは高血圧症の治療中に、クッシング

【症例】56 歳、女性、3 児の母  
【主訴】クッシング様顔貌と体型

【現病歴】  
1987 年 (50 歳) 高血圧

1994 年 (56 歳) クッシング様顔貌と体型、全身性の軽度の色素沈着。下腿浮腫、全身倦怠感。低 K 血症、血中 ACTH 150 pg/ml, F 47.8 μg/dl。MRI: 下垂体腫瘍陰影 (-)  
症状は自然に軽快 (約 6 ヶ月周期)。  
同年 10 月、四肢脱力、K 2.2 mEq/L。  
同年 12 月、ミトタン開始

【既往歴】1994 年、甲状腺右葉切除術 (乳頭癌)。【家族歴】特記事項なし

表 4. 自験例 2: 気管支カルチノイドによる EAS  
身長 151.0 cm, 体重 58.5 kg (BMI 25.6)

中心性肥満、意識清明、血圧 186/104 mmHg  
脈拍 72/分 整

〈皮膚〉色素沈着  
〈頭・頭部〉満月様顔貌 Buffalo hump  
前頭部に手術痕  
〈胸部〉収縮期駆出性心雑音 (Levine II / VI)  
正常肺胞音  
〈腹部〉平坦・軟 肝・腎・脾 触知せず  
〈四肢〉圧痕性浮腫  
〈神経学的所見〉四肢筋力低下

表 5. 自験例 2: EAS の初回入院時身体所見

様顔貌と体型、低 K<sup>+</sup>血症をきたし、ACTH 依存性 CS と診断した 56 歳の女性を経験した (表 4, 表 5, 表 6)。

ACTH	515 pg/ml	TSH	0.40 μU/ml
cortisol (F)	60 μg/dl	free T <sub>3</sub>	2.25 pg/ml
DHEA-S	547 ng/ml	free T <sub>4</sub>	0.78 ng/dl
urinary free F	1443 μg/gCr	Tg	≤5 ng/ml
17-OHCS	28.8 mg/gCr	prolactin	16.9 "
17-KS	13.1 "	LH	25.3 mIU/ml
PRA	<0.15 ng/ml/h	FSH	46.2 "
PAC	54.2 pg/ml	estradiol	13.0 pg/ml
serotonin	0.02 μg/dl	progesterone	3.0 ng/ml
血中 5-HIAA	40 ng/ml	GH	0.92 ng/ml
尿中 5-HIAA	11.4 mg/gCr	IGF-I	160 "
		calcitonin	36 pg/ml
		gastrin	95.2 "

\* cortisol の日内変動は消失。

表 6. 自験例 2: EAS の初回入院時ホルモン基礎値

頭部 MRI 検査では下垂体に腫瘍陰影を認めず、また、約 6 ヶ月周期で、臨床症状の消退を繰り返した。多数回の全身 CT や下垂体 MRI 検査に加え、複数回の IPSS や CSS をおこなったが、病巣不明の ACTH 依存性 CS と診断し、ステロイド合成阻害薬を投与しながら、現病巣の検索を進めた。

当初、下垂体静脈洞サンプリング (IPSS) や海綿静脈洞サンプリング (CSS) も一定した結果が得られず、CRH 負荷試験でも血中 ACTH/F の弱反応を示したことから、CD と EAS との鑑別が困難であった。血中 F 値が 30 μg/dl を常時示すようになり、再発性肺炎を合併した。1998 年 (61 歳)、両側副腎摘除 (ADX, 左右 18g, diffuse cortical hyperplasia) (図 14) を行い、コートリル® (10-20mg/日) 内服補充療法を開始した。再発性肺炎は軽快した。

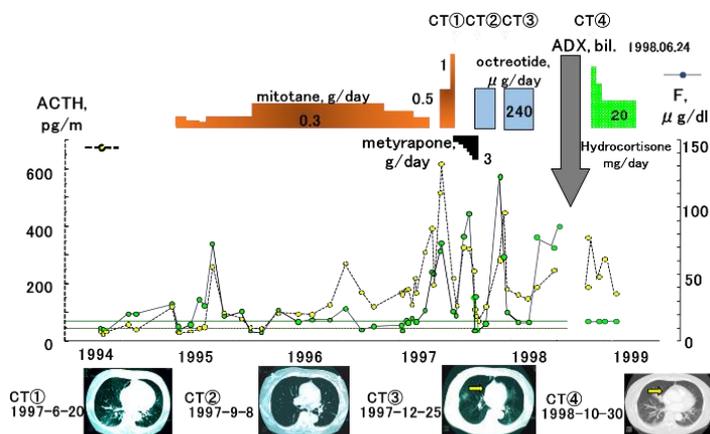


図 14. 自験例 2: EAS における両側副腎全摘 (ADX)

2003 年より、爪床など、全身色素沈着が生じ、血中 ACTH (355-1465pg/ml) と proGRP 高値が持続したため、EAS を強く疑い原病巣の精査を進めた。2 回の FDG-PET は陰性であったが、Met-PET で、肺右中葉 S5 の腫瘍陰影 (胸部 CT 検査、14x10mm 大) に一致して異常集積を示したため、2004 年 1 月胸腔鏡下手術 (VATS) により腫瘍摘除を行なった (図 15, 左)。

術後すみやかに色素沈着は改善し、血中 proGRP, ACTH の基礎値ならびに Dex 抑制性は正常化した。手術時の摘除肺組織 (単一充実性腫瘍)、周辺の肺組織と肺門リンパ節の肉眼・触診所見ならびに病理組織

所見より, tumorlet 型気管支 carcinoid と診断した (図 15、中央). 肺腫瘍の摘除術後, 速やかに色素沈着は改善し, 血中 proGRP, ACTH の基礎値ならびにデキサメタゾン (DEX) による抑制性は正常化した. 本例は診療を開始してから 10 年の経過を得て, EAS の責任病巣を同定し, 腫瘍の摘除により, 完全寛解した (図 15、右).

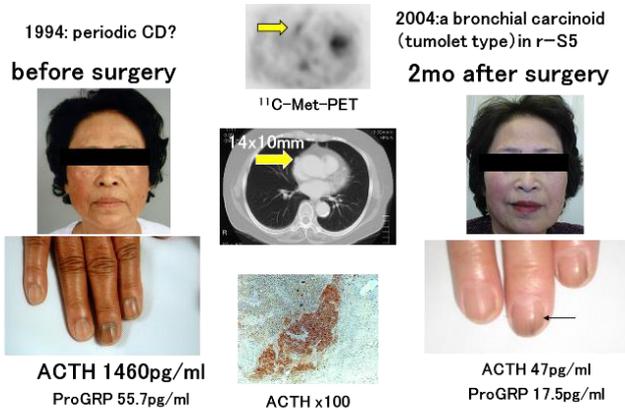


図 15. 自験例 2: 気管支カルチノイドの摘出前後

このように, EAS には診断が困難な症例が少なからず存在する. CD と EAS の病態を図 2②, 図 2③と図 16 に示す. 多くの EAS は CRH に反応せず, 8mg デキサメタゾンで抑制されない. しかし, 気管支カルチノイドなどでは CD と類似の反応性を示すことがあり, 必ずし

	CD	EAS
血中 ACTH	正常上限~軽度上昇	著増 ↑↑
血中 F	増加 ↑	増加~著増 ↑
尿中 F	増加	著増 ↑↑
デキサメタゾン抑制試験	少量抑制あり 大量抑制あり	抑制なし
CRH 負荷試験	過剰反応	反応なし
dDAVP 負荷試験	過剰反応	不定
IPSS/CSS	C/P 比 > 2	CP 比 ≒ 1

図 16. Cushing 病 (CD) と EAS の病態

も, 鑑別診断は容易ではない. そして, 両者の鑑別の gold standard である下錐体静脈洞サンプリング

- 微小性:**
  - 腫瘍が小さく, 診断困難な場所にある (12.5% は死後も局在診断できず)
- 病態類似性:**
  - CRH や AVPI に反応することがある
  - 大量デキサメタゾンで抑制されることがある
- 周期性あるいは間歇性:**
  - 下錐体静脈洞採血法 (IPSS) あるいは海綿静脈洞採血法 (CSS): ときに不成功.

表 7. EAS の診断が困難な理由

(IPSS) や海綿静脈洞サンプリング (CSS) は, ともに, 高い習熟度が必要で, かつ, 活動期に施行する必要がある.

したがって, 画像診断法が進歩した今日においても, 表 7 に示すような理由で, 診断に難渋する EAS 症例が少なくない.

### 32. EAS における POMC 翻訳後修飾の偏倚

他方, POMC の遺伝子が同定され, その翻訳修

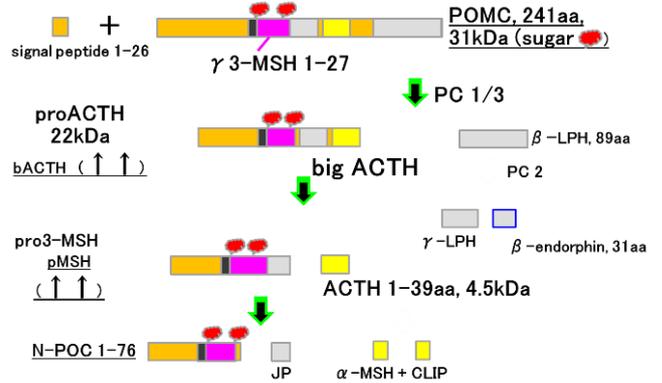


図 17. EAS における POMC タンパク翻訳後修飾の質的偏倚

飾には組織や腫瘍特異性があることが判明した (図 17). 正常下垂体 ACTH 細胞や CD の下垂体腺腫細胞内では POMC は特異的なセリンプロテアーゼである prohormone convertase 1/3 (PC1/3) 酵素の作用により, 速やかに, ACTH1-39 分子が生成される. 一方, EAS 腫瘍組織や一部の巨大 ACTH 産生腫瘍では, 本酵素作用が低下し (POMC タンパク翻訳後修飾の質的偏倚), POMC 分子そのもの (31kDa) や, proACTH (22kDa) (big ACTH) や N-POC の血中濃度が高値を示す<sup>14)</sup>.

### 33. $\gamma$ 1-MSH・ $\gamma$ 3-MSH の高感度測定法と臨床応用

これら POMC, proACTH や N-POC 分子は  $\gamma$ 1-MSH や  $\gamma$ 3-MSH 配列を含むため, 血中や  $\gamma$ 1-MSH や  $\gamma$ 3-MSH を測定することにより, pro  $\gamma$ -MSH として, EAS の血中に増加するものと期待される. そこで,  $\gamma$ 1-MSH ならびに  $\gamma$ 3-MSH に対する高感度 RIA を開発した (図 18)<sup>15)</sup>.

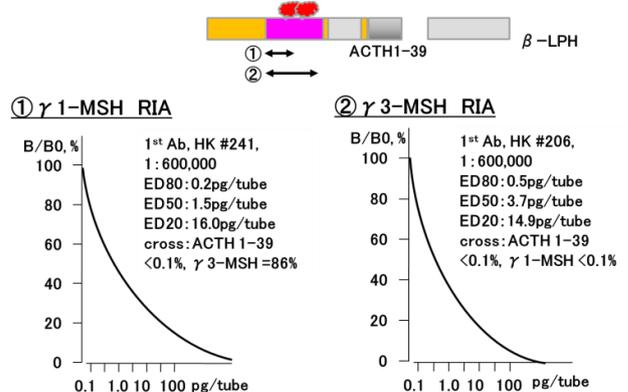


図 18. 高感度 RIA for  $\gamma$ 1-MSH or  $\gamma$ 3-MSH

EAS の血中濃度を測定すると, 大分子分画のみに,  $\gamma$ 1-MSH と  $\gamma$ 3-MSH 活性 (pro  $\gamma$ -MSH) が認められる (図 19)

16). そして、これら pro  $\gamma$ -MSH 濃度は CD と CNT では低値を、EAS では高値をそれぞれしめす (図 20). 一部の EAS では CD おけるそれらの濃度に重複が見られるが、 $\gamma$

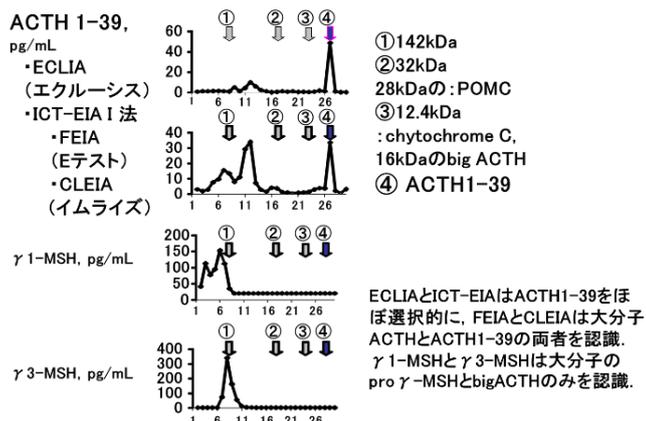


図19. EAS典型例における血中POMCの分子多型

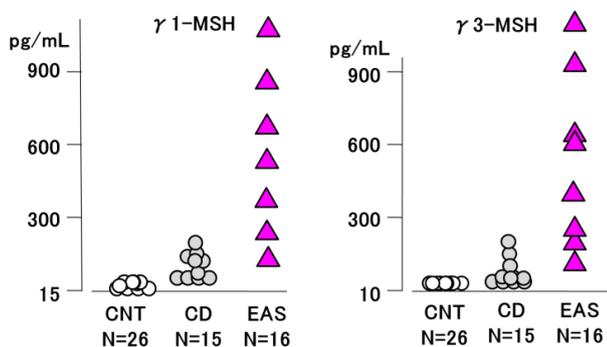


図20.  $\gamma$ 1-MSHあるいは $\gamma$ 3-MSHの血漿中濃度

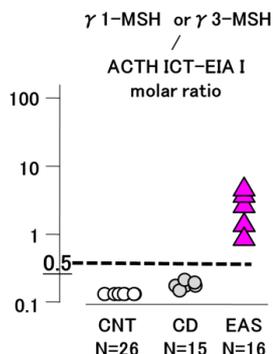


図21. 血漿中 $\gamma$ 3-MSH/ACTH1-39モル比

3-MSH/ACTH1-39 モル比を算出すると、EAS ではすべて 0.5 以上を示した (図 21) <sup>17)</sup>.

ただ、これら pro  $\gamma$ -MSH 測定法はいずれも RIA であること、凍結融解により測定値が大きく変動するため新鮮凍結血漿を用いる必要があること、などの問題点がある。

#### 34. big ACTH に対する新規の超高感度 EIA の開発

英国 Manchester の White A らは big ACTH を認識する IRMA を開発し、big ACTH が EAS と macro ACTHoma (MRI で容易に診断) で高値を示すことから、IPSS あるいは CS に代わる簡易診断法であると報告している <sup>18) 19)</sup>. ただ、健常者でも big ACTH 血中モル濃度は ACTH1-39 モル濃度と同程度あるいはそれ以上に高値を示

すこと、また、彼らのグループ以外からは追認されておらず、有用性は必ずしも明らかではなかった。

そこで、われわれは  $\gamma$ 1-MSH と  $\gamma$ 3-MSH に対する RIA の発展として、補足抗体を抗  $\gamma$ 1-MSH 家兔自家血清 (HK242, 図 22 ①), 標識抗体を抗 ACTH18-39 モノクローナル抗体 (ヤマサ, CT-02, 図 22 ②) を組み合わせ、超高感度測定法を開発した. POMC の標準品は未だないため、DMS79 培養細胞上清を用いて、サイズ排除型 HPLC 分取法をおこなった. うち、31kDa 分画中の  $\gamma$ 1-MSH 濃度を測定し、POMC/ $\gamma$ 1-MSH モル比より、POMC の濃度に換算し、同分画を POMC の標準品として用いた. 従前の IRMA を用いた big ACTH 測定法では CNT における血中 big ACTH 濃度が十分明らかではなかったが、われわれの超高感度測定法の開発により、すべての CNT 検体でその基礎値のみならず、DEX 抑制試験の底値も測定できた (投稿準備中).

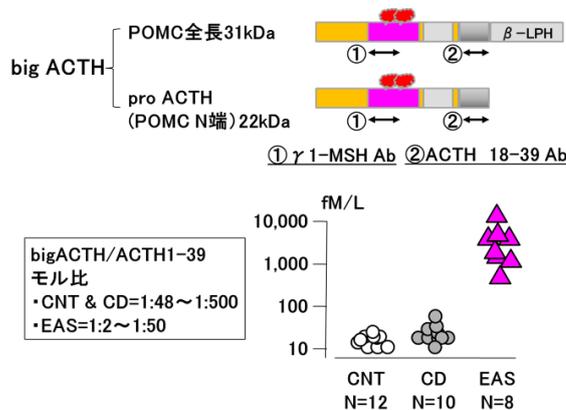


図22. ACTH前駆体(proACTH+POMC)に対するICT-EIA

その結果、CNT の big ACTH 濃度は 10~30fm, ACTH 1-39 濃度は 1~10pM, CD はそれぞれ 20~50fm, 8~40pM を示し、ACTH1-39 濃度の約 1/50~1/500 であった. 一方、EAS ではそれぞれ 100~18,000fm と 15~46pM と、big ACTH 濃度が高値を示した. そして、血中 ACTH1-39 に対する big ACTH モル比は EAS では 1/2~1/50 を示した.

したがって、血中 big ACTH 濃度の高値と big ACTH /ACTH1-39 モル比の上昇は、 $\gamma$ 1-MSH や  $\gamma$ 3-MSH による pro  $\gamma$ -MSH の測定と同様に、EAS の簡易診断に有用である。

#### 35. ACTH 依存性 Cushing syndrome の診断 algorithm (図 23)

EAS と CD の鑑別診断 algorithm のうち、下垂体に腫瘍陰影 (径>6mm) がない場合、IPSS あるいは CSS は必須となっている. しかし、技術的難易度や検査侵襲度が高く、どの施設でも安全に行えるものではない. さらに、周期性 CS 示す場合、頻回に行えるものではない. したがって、本 big ACTH 測定法は、すべての CD あるいは EAS の初診時をふくむ活動期①②に採血し、必要時に測定すれば、IPSS/CSS の代替検査となり、かつ、

EASの補助診断法となり得る。そして、自験例2からの反省ではあるが、本法を用いて早期にEASと診断していれば、病巣にたいする局在診断の力点を下垂体から気管支などへと移し、早期治療できた可能性が大である。

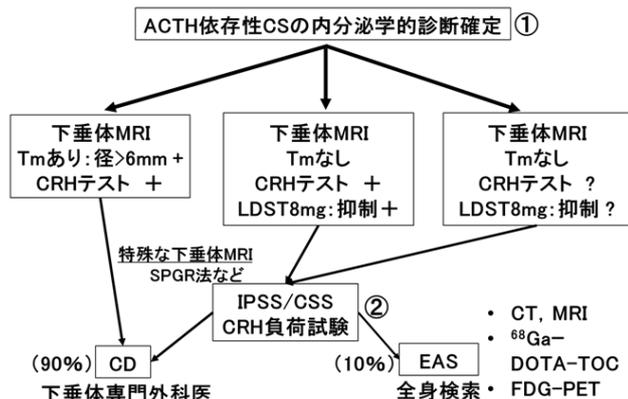


図23. EASとCDの鑑別診断のalgorithm. ①, ②の活動期にbig ACTH測定用検体を保存

#### 4. corticotropin releasing hormone (CRH)の超高感度測定法の開発

##### 41. 異所性CRH産生腫瘍の診断は正しいか?

上述のEASにおいて、血中ACTHが高値で、画像診断で明らかな腫瘍が存在するものの、腫瘍組織のACTH免疫組織化学染色(免染, IHC)では陰性の症例が散見される。そして、これらの症例の腫瘍組織でCRH免染が弱陽性を示した場合、異所性CRH産生腫瘍によるEASと診断されている。一部の症例では、血中CRH濃度が高値を示し、腫瘍摘除後には血中ACTHのみならず、血中CRHも低下し、EASも軽快したとされている<sup>20)</sup>。

われわれは多くのEAS症例において、血中big ACTH (pro  $\gamma$  MSH)が高値を示し、ACTHモノクローナル抗体を用いた腫瘍組織の免染は陰性を示す症例を少なからず経験した。異所性CRH産生腫瘍を疑い、腫瘍組織でのCRHに対する免染あるいは定量的CRH遺伝子発現解析(qRT-PCR)を行ったところ、いずれも、それぞれ陰性あるいは対照組織と同程度であることが判明した。そこで、既報のCRH産生腫瘍とされる報告<sup>20)</sup>などを検討したところ、表10に示す問題点が明らかとなった。

##### 従来のCRH産生腫瘍: 明らかなEAS症例

1. 血中CRH測定に誤差の大きい抽出法を用いる
2. 感度と特異性の劣るRIA法で血中CRH濃度を測定
3. ACTHとCRH免疫組織化学の問題点
31. ACTH IHC: 陰性. 抗体はbig ACTHを認識しない抗体のみで判定.
32. CRH IHC: 陽性. 中和試験あるいはpositive controlでの検討欠如.

表10. 異所性CRH産生腫瘍の診断における問題点

##### 42. CRH 超高感度測定法の開発

免疫複合体転移法によるCRH超高感度測定法を

開発した。妊娠月数が進むにつれて、血中CRH濃度は漸増し、臨月では1,000pg/mLにも達する(図25)<sup>21)</sup>。その後、捕捉抗体を自家作製(HK245)することにより(図24, RIA), さらに、高感度となった(LDV 3fg/tube, CV 10%) (図24, ICT-EIA)。

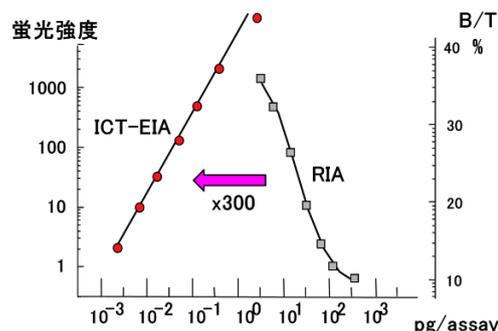


図24. のヒトCRH標準曲線の比較. 免疫複合体転移EIA (ICT-EIA) vs. RIA

##### 血中CRH, pg/mL

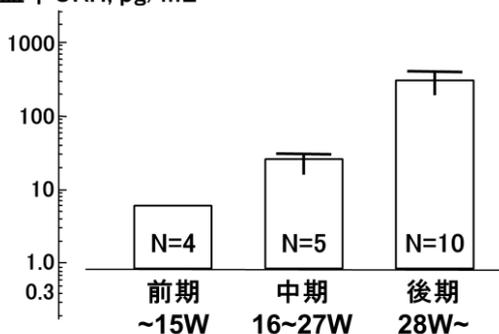


図25. 妊娠月数における血中CRH濃度

##### 43. 超高感度CRH測定法と異所性EAS

そこで、自験EASの14例において、血中・組織中のCRH含量、遺伝子発現量(qRT-PCT)とCRH免疫組織化学を行ったところ、いずれの症例においても、血中ならびに腫瘍組織にはCNTのそれらと比較して、有意なCRH発現量の上昇はなかった(表11)。

##### 1. EAS 14症例: mcAbのIHCでACTH: 陽性12例, 陰性2例

- ACTH/F 高値
- $\gamma$ 3-MSH 高値
- $\gamma$ 3-MSH/ACTHモル比> 0.5

2. CRH濃度: すべて, 基準値 3.0~16.0pg/mL
3. CRH mRNA発現 qRT-PCR: 1/100以下 vs. POMC mRNA, 健常膵組織の1/10以下
4. CRH免疫染色: 陰性, 視床下部正中隆起部は陽性
5. CRH含量: 健常膵組織抽出の含量以下

表11. EASにおける血中・組織中のCRH遺伝子とタンパク質の発現

留意すべき点はヒトのCRHは血中ではCRH結合蛋白(CRHBP)と結合し、中和されることである。事実、妊娠中は血中CRHは異常高値を示すものの、血中CRHは

CRHBP と結びつき、ACTH とコルチゾールは概ね基準値内から軽度の増加を示す。

したがって、endocrine 機構により、EAS を生ずると考えられる CRH 産生腫瘍では、GHRH 産生腫瘍（血中 GHRH は遊離）<sup>22</sup>とは異なり、慢性的な高 CRH 血症を呈しても、EAS をきたすことは無いものと推測される。ただし、今回の成績は paracrine 機構による下垂体 ACTH 産生細胞の直接的な刺激や、他の神経ペプチドと同じく、腫瘍細胞での CRH 産生能を否定するものではない。

**44. CRH 超高感度測定法を用いたヒト視床下部機能の推定と CD における CRH 分泌過剰の検討**

次に、本 CRH 超高感度測定法の臨床応用の一つとして、ヒト視床下部ホルモンがより高濃度に存在すると考えられる経蝶形骨洞の下垂体腺腫摘除術 (TSS) の術中術野血 (PS) や、さらに、無麻酔下で採血された海綿静脈洞血 (CS) や下錐体静脈洞血 (IPS) の CRH, GHRH とソマトスタチン (SRIF あるいは SST) 濃度を、末梢血 (Pe) のそれらとを同時に測定し、CD, 先端巨大症、非機能性下垂体腺腫における視床下部機能を評価した<sup>23</sup>。実験動物では無麻酔下での下垂体門脈血が採取可能である。門脈血中の CRH 濃度は Pe 中濃度に比較して、高値で、インスリン低血糖刺激に反応し、高値を示す<sup>24</sup>。一方、ヒトでは下垂体門脈血の採取は困難である。より末梢の下垂体灌流血は全身麻酔下での蝶形骨洞の下垂体腺腫摘除術中の PS として、さらにその末梢の CS や IPS は微小下垂体腺腫の局在診断時に中枢血 (Cn) として、それぞれ、無麻酔下の採取が可能である。

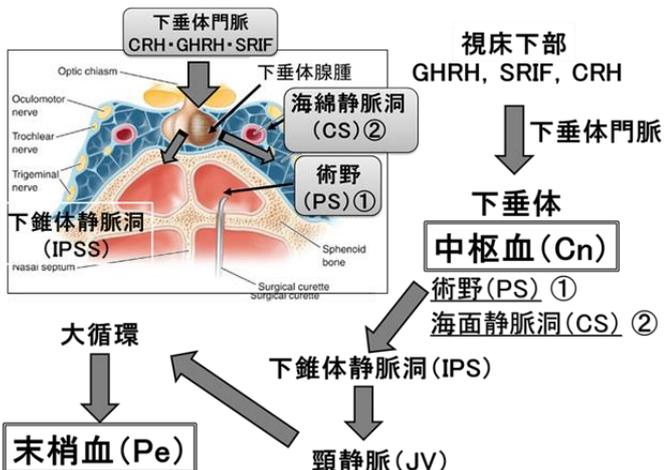


図26. ヒト視床下部ホルモンの測定部位

しかし、図27に示すように、下垂体腺腫摘除術中に得られた下垂体ホルモン濃度は CD をはじめとして、先端巨大症あるいは非機能下垂体腺腫を問わず、いずれの下垂体ホルモンの Cn 中濃度は Pe 濃度の数十倍～数千倍の高濃度を示したにもかかわらず、CRH, GHRH と SRIF 濃度は、いずれも、Cn と Pe 濃度には有意差を認めなかった。さらに、無麻酔下で得られた CS 血での検討でも同様であった<sup>23</sup>。

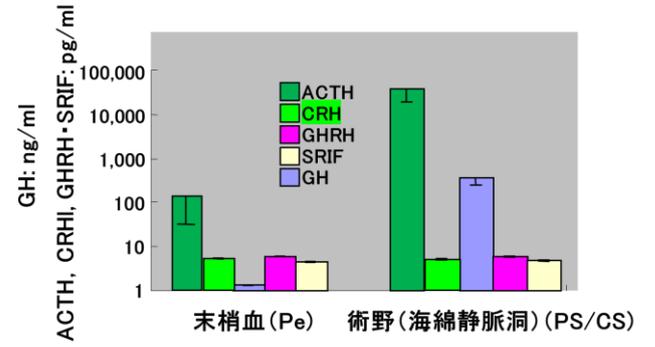


図27. ヒト CD においては Pe と CS, IPS や PS 血中の視床下部ホルモン CRH, GHRH, SRIF 濃度較差はない。

以上の成績より、ヒトで比較的容易に採取可能な PS, CS あるいは IPS では、大量の Pe の混入によって視床下部ホルモンも希釈され、Cn と Pe の濃度格差を示さないことが明らかになった。

したがって、ヒトでは Pe はもちろん、PS, CS, IPS, いずれの採取血を用いても、視床下部ホルモン測定による視床下部機能を類推・評価することはできないことを示している。さらに、CD の成因として、視床下部からの CRH 過剰説 (CD 発症の視床下部仮説) は可能性が低いものと考えられる。

**5. おわりに (まとめ) : 超高感度測定法からみえてくるもの**

以上、自験症例から出発して、HPA 系の主軸をなす二つのペプチド、CRH と POMC 関連ペプチド、に対する超高感度・高感度測定法の開発とそれらの臨床応用を述べた。その結果、表 12 に示すように、ACTH 分泌不全症の鑑別診断や EAS の鑑別診断 algorithm において、pro  $\gamma$ -MSH の高感度測定法 ( $\gamma$ 1-MSH や  $\gamma$ 3-MSH 測定) や big ACTH の超高感度測定法が IPSS や CSS の補助・補完検査として有用であることが明らかになった。そして CRH に対する超高感度測定法により、異所性 CRH 産生腫瘍を診断するうえでの問題点と、ヒト視床下部機能を類推する困難さが明らかとなった。

- ACTH の基礎値より、病因 (ACTH 単独欠損症など) を明らかにできる。
- big ACTH あるいは pro  $\gamma$ -MSH の測定法は EAS の簡易補助診断法として、IPSS や CS の代用となりうる。ACTH 依存性 CS の診断 algorithm (図 23)
- 異所性 CRH 産生腫瘍診断は注意が必要である。
- ヒト視床下部機能は術野血や海綿静脈洞血中のホルモン測定でも推測不能。

表12. ホルモンの超感度測定法から見えてくるもの

## 謝 辞

ICT-EIA の測定原理を開発した、故 石川榮治 先生（宮崎医科大学）と共同研究者の橋田誠一 先生（徳島文理大学）に深謝いたします。そして、貴重な症例を紹介いただいた全国各地の内分泌・代謝科の先生方に御礼申し上げます。

## 文 献

- 1) 井村裕夫：生命のメッセンジャーに魅せられた人びと。羊土社、東京、1992
- 2) 井村裕夫：内分泌・代謝病学（第4版）。医学書院、1997
- 3) 井村裕夫：内分泌疾患の診断をめぐって。特集：内分泌疾患：症候・検査値から診断へ。日内学会誌 87:983-985, 1998
- 4) 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—。日本内科学会雑誌 101:913-923, 2012
- 5) 片上秀喜, 他：ホルモン測定法の変遷。日本内科学会雑誌, 創立100周年記念号 内科-100年のあゆみ(内分泌, 代謝)。日本内科学会雑誌 91:1110-1116, 2002
- 6) 片上秀喜, 他：若年発症 ACTH 単独欠損症の 5 症例。ACTH RELATED PEPTIDES 13:203-212, 2002
- 7) 片上秀喜, 他：約10年の経過をたどり診断しえた肺 tumorlet 型カルチノイドにもとづく周期性異所性 ACTH 産生症候群の 1 例。内分泌病理学最近の進歩 2005, 2006。ホルモンと臨床 55(増)：219-227, 2007
- 8) 片上秀喜, 他：ACTH 単独欠損症 (IAD) の疫学研究：人口 100 万人あたりの発症頻度と臨床像。日内学会誌 84:123-125, 2008
- 9) 片上秀喜, 他：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 20:40-43, 2010
- 10) 石川榮治：超高感度酵素免疫測定法。学会出版センター、1993
- 11) Hashida S, et al: Development of an ultra-sensitive enzyme immunoassay for insulin and its application to the evaluation of diabetic risk by analysis of morning urine. Eltrayb A (ed) Trends in immunolabelled and related techniques. InTech, Croatia, pp83-100, 2012
- 12) Giraldo FP, et al: Assessment of ACTH assay variability: a multicenter study. Eur J Endocrinol 164:505-512, 2011
- 13) 片上秀喜, 他：ヒト ACTH1-39 に対する新規超高感度測定法の臨床応用 (2)：ステロイド過剰による ACTH 抑制反応。ACTH RELATED PEPTIDES 21:36-37, 2010
- 14) Bicknell AB: The tissue-specific processing of pro-opiomelanocortin. J Neuroendocrinol 20:692-699, 2008
- 15) 片上秀喜, 他：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 19:27-30, 2008
- 16) 片上秀喜:ACTH. 三橋知明 編：臨床検査ガイド 2015 年改訂版。pp357-369, 2015
- 17) 片上秀喜, 他：Silent ACTHoma あるいは macro ACTHoma の機能的診断法：ヒト  $\gamma$ 3-MSH 高感度 RIA と ACTH1-39 超高感度測定法の開発と臨床応用。日本内分泌学会雑誌 85：増 89-90, 2009
- 18) Crosby SR, et al: Direct measurement of the precursors of

- adrenocorticotropin in human plasma by two-site immunoradiometric assay. J Clin Endocrinol Metab. 67:1272-1277, 1988
- 19) Page-Wilson G, et al: Clinical utility of plasma POMC and AgRP measurements in the differential diagnosis of ACTH-dependent Cushing's syndrome. J Clin Endocrinol Metab. 99:E1838-E1845, 2014
- 20) Karageorgiadis AS, et al: Ectopic adrenocorticotrophic hormone and corticotropin-releasing hormone co-secreting tumors in children and adolescents causing Cushing syndrome: A diagnostic dilemma and how to solve it. J Clin Endocrinol Metab. 2015 Jan; 100(1): 141-148, 2015
- 21) Katakami H, et al: Immunoreactive corticotropin-releasing hormone (CRH) in plasma and hypothalamic incubation media as assessed by a novel and highly sensitive immune complex transfer EIA. Clin Pediatr Endocrinol 11:S93-S97, 2002
- 22) 片上秀喜：成長ホルモン放出ホルモン (GHRH)。広範囲 血液, 尿化学検査, 免疫学的検査 (第七版) —その数値をどう読むか—。日本臨床, pp193-199, 2010
- 23) 片上秀喜, 他：下垂体腺腫摘除手術の術野血あるいは海綿静脈洞サンプリング血中の視床下部ホルモン測定によるヒト視床下部機能の評価。日本内分泌学会雑誌 92:S14-S16, 2016
- 24) Caraty A et al: Insulin-induced hypoglycemia stimulates corticotropin-releasing factor and arginine vasopressin secretion into hypophysial portal blood of conscious, unrestrained rams. J Clin Invest 85:1716-21, 1990