

最終講義

ホルモン測定 of 進歩と共に
— 症例から教えられた臨床内分泌学 —

東京女子医科大学中央検査部臨床検査科

オダギリ エミ
小田桐恵美

(受理 平成24年6月6日)

Lecture

Progress in Development of Methods in Hormone Measurement

Emi ODAGIRI

Central Clinical Laboratories, Department of Clinical Laboratory, Tokyo Women's Medical University

Normal human pregnancy is associated with maternal adrenocortical hyperfunction that apparently is secondary to increased adrenocorticotrophic hormone (ACTH) secretion. Since concentration of maternal plasma ACTH and cortisol increase progressively during pregnancy, plasma cortisol and urinary excretion of free cortisol are relatively resistant to glucocorticoid negative feedback suppression.

We encountered a patient with Cushing's syndrome whose clinical symptoms aggravated during pregnancy. Placental ACTH and corticotropin releasing hormone (CRH) are said to be involved in adrenocortical hyperfunction during gestation.

In the past 30 years, control surveys for various hormones have been carried out every year by the Japanese Radioisotope Association. In spite of the advances in immunoassay, a control survey has revealed large inter-assay variation.

In 1995, Nawata et al established the diagnostic criteria for subclinical Cushing's syndrome. We believe that the differences among cortisol kits may be problematic after dexamethasone tests for the diagnosis of subclinical Cushing's syndrome. The standardization of measurement for many hormones, including cortisol, has yet to be established. Further investigative studies are necessary for the standardization of hormone assays.

Key Words: Cushing's syndrome, cortisol, placental ACTH, control survey, standardization

はじめに

私は昭和46年に東京女子医科大学（東京女子医大）を卒業後、小坂樹徳先生が主催する小坂内科に入局した。当時の小坂内科は糖尿病専門内科というより総合内科的な要素が強く、多くの分野にわたる様々な患者さんが入院していた。小坂先生は医局の教育体制を充実させるために東京大学（東大）から血液学、呼吸器学、神経学など専門の異なる多くの先生方を非常勤講師として招いてくださった。講師の先生方は症例の相談にのるだけでなく、しばしば

講義をしてくださった。講師の多くの先生方は、その後の日本医学界の各分野の指導者になられた方ばかりだったので、いずれの講義も本当に素晴らしいものであった。当時、考えられる最高の医局員教育の環境を提供してくださった。

2年後小坂先生は突然、東大第三内科の主任教授として風のように去っていかれ、後任の鎮目和夫先生から新しく着任する出村博先生、黎子先生の指導を受けるようにといわれた。私が出村先生達から、ホルモン測定 of 指導を受けた年は Berson, Yalow

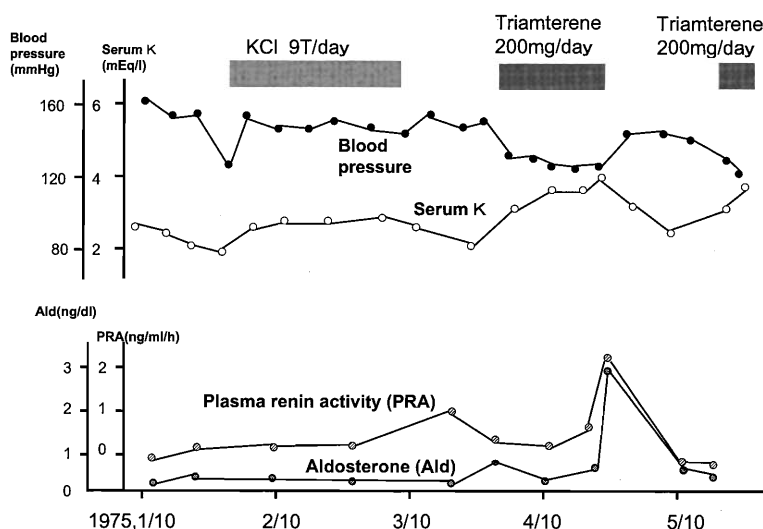


Fig. 1 Clinical course of Liddle's syndrome

が immunoreactive insulin (IRI) の radioimmunoassay (RIA) を確立してから 15 年ほど経過していた。しかし、ほとんどのホルモン測定キットはなく、測定法の確立には各自がホルモン標準品を求め、ウサギで抗体を作成し、 ^{131}I 、 ^{125}I でホルモンを標識して、測定系を組み立てることがあたりまえの時代だった。大学院 3 年目の私は、それこそ出村先生達から手取り、足取りホルモン測定の一から教えていただいた。採血からホルモンの測定結果が得られるまで約 1 週間かかった時代からスタートした私は、まさか就職中に測定時間 10 分、採血から、約 1 時間でホルモンデータが返信されるという時代が来ようとは夢にも思っていなかった。

当時、私は病棟で研修し、出村研究室では主に血中、尿中遊離コルチゾール測定の臨床応用というテーマで研究をしていた。その頃、出会った 2 人の印象的な患者さんから、臨床内分泌学の醍醐味を教えていただき、今でも深く感謝している。

1. 印象的な 2 例の症例と臨床研究

1 例目の患者は低 K 血症と高血圧を主訴に入院した 15 歳の女兒であった。患者は 1 歳から年数回四肢脱力発作を繰り返し、13 歳で高血圧、低 K 血症を指摘され、精査の結果、原発性アルドステロン症として、右副腎を摘出されるも、高血圧、低 K 血症は是正されず当院に精査入院した。入院時血圧は 154/108mmHg と高く、KCl 9 錠服用下でも血清 K 値は 2.8mEq/l と低く、尿中 K 排泄は増加していた。血漿レニン活性とアルドステロン値は極めて低く、日本で 2 例目のリドル症候群だった。当時リドル症候群の原因は不明だったが、Liddle 先生が 1963 年に記

載した第 1 例目の症例報告¹⁾は素晴らしいものであった。Liddle 先生は患者の異常な Na 保持傾向と尿中 K 排泄の増加から、腎尿細管における Na/K の transport に何らかの異常があることを推測し、さらに治療法としてはミネラルコルチコイド受容体の阻害剤であるスピロノラクトンではなく抗アルドステロン作用以外に腎尿細管に作用し Na 排泄を促し K 排泄を抑制するトリウムテレンが効果があることを推測し、治療法を確立した。私もこの患者にトリウムテレンを使用し、劇的に高血圧と低 K 血症が改善した時は非常に感動した (Fig. 1)。現在でこそリドル症候群の原因は腎遠位尿細管上皮細胞のアミロライド感受性ナトリウムチャネルの遺伝子異常とされているが、1960 年代に既に病変の部位を想定し、治療も行った Liddle 先生から、原因不明な疾患に対して、臨床内分泌学はこのようなアプローチをするのかと目からうろこの思いであった。その後留学先のナシュビルで Liddle 先生にお目にかかり症例のリプリント²⁾をお渡しできたことは望外の喜びであった。

もう 1 例は妊娠によってクッシング症候群が増悪した患者³⁾で、その後の私のテーマとなった胎盤性副腎皮質刺激ホルモン (adrenocorticotrophic hormone: ACTH)⁴⁾ならびにクッシング症候群の妊娠時の増悪因子の研究^{5,6)}への糸口を開いてくれた。

症例は 28 歳女性、2 年前の 1 回目の妊娠時に徐々に血圧が上昇し、コントロール不良となったために妊娠 3 ヶ月にて人工妊娠中絶。2 回目の妊娠後徐々に血圧上昇、満月様顔貌、全身倦怠感、ざ瘡の多発などからクッシング症候群が疑われ当院へ精査入院

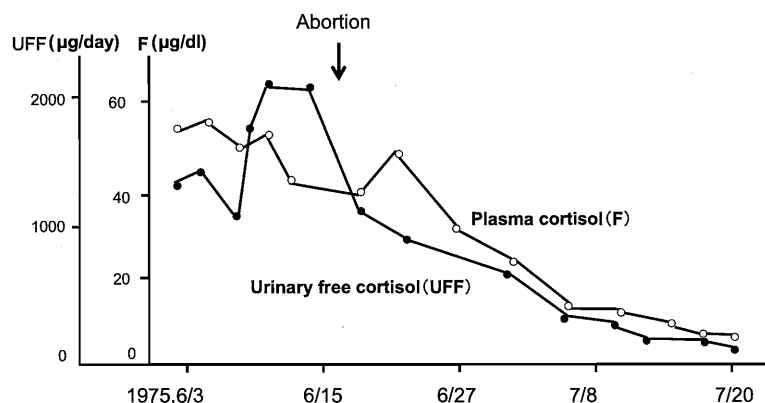


Fig. 2 Changes of plasma and urinary cortisol before and after artificial abortion in patient with Cushing's syndrome

した。血圧は170/110mmHgと高く、血中コルチゾールは60.3µg/dlと高値であったがACTHは17 pg/mlと低値ながら測定はできた。血中コルチゾールはデキサメタゾン1, 8, 16mgのいずれにても抑制されず副腎CTにて左副腎腫瘍を認めたことから副腎腺腫によるクッシング症候群と診断した。妊娠の経過とともに血圧を含む臨床症状はさらに悪化したため、妊娠22週にて人工妊娠中絶をしたところ、クッシング症候群の臨床症状は徐々に改善した。Fig. 2には血中、尿中遊離コルチゾールの人工妊娠中絶前後の変化を示したが、妊娠中絶後、3週間ほどの間に徐々に低下していった。患者さんは2度の妊娠によりクッシング徴候が増悪し、妊娠中絶により臨床症状が改善したことから、妊娠はクッシング症候群を増悪させる病態であると考えられた。症例は著明なクッシング症候群であるにも関わらず、ACTHが低濃度ながら測定でき、患者から採取された胎盤よりACTHが測定されたことから、クッシング症候群増悪因子の一つとして考えられる胎盤性ACTHについて検討するためにバンダービルト大学のLiddle先生の教室のOrth先生のもとに留学した。

Fig. 3に胎盤抽出液のゲル濾過のデータを示すが胎盤はACTH, lipotropic hormone (LPH), β -endorphin (β -END)のホルモン活性を示し、大部分のホルモン活性は分子量の大きいACTH, LPH, β -ENDのcommon precursorに存在すると考えられた⁴⁾。

その後、我々の内科からSalk Instituteのギルマン博士のもとに留学した芝崎保先生が、胎盤内に副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン(corticotropin releasing hormone: CRH)の存在⁷⁾も確認したことから、胎盤はACTHと共にCRHも産生する臓器と考えられ帰国後、産婦人科の安達知子先生と共同で妊

娠に伴う視床下部-下垂体-副腎系の変化について様々検討した。

正常妊婦では妊娠経過と共にACTHは基準値内であるが徐々に増加する⁶⁾。また血中コルチゾールも妊娠経過と共に徐々に増加し、妊娠末期には50~60 µg/dlとほぼクッシング症候群レベルに達した。妊娠時には様々なホルモン結合蛋白が増加するが、血中コルチゾールの増加はエストロゲン上昇に伴うコルチゾール結合グロブリン(corticosteroid binding globulin: CBG)の増加のためと考えられた。妊娠時には甲状腺結合蛋白である甲状腺ホルモン結合蛋白(thyroxine binding globulin: TBG)も増加し、血中のトータルの甲状腺ホルモンは上昇するが、フリーの甲状腺ホルモンは低下する。しかしコルチゾールは甲状腺ホルモンと異なり、活性ホルモンの指標である尿中遊離コルチゾールは低下せず、むしろ増加し妊娠経過を通して、ほぼクッシング症候群レベルで推移する。妊娠経過に伴いコルチゾールのデキサメタゾンによる抑制性を見ると、妊娠経過に伴い抑制は徐々に不良となった(Fig. 4)。このことから、妊娠はまさにクッシング病状態であると考えられる。さらに分娩前後のACTH, コルチゾールの変化を見ると分娩時にはACTH, コルチゾール共に著明に増加し分娩後は低下する⁵⁾。この時のCRHの変化をみた、McLeanら⁸⁾の報告によると、妊娠経過と共にCRH-binding protein (BP)は徐々に増加するものの、分娩前30日ごろからCRH-BPは急速に低下し、それと相反するように生物活性を持ったCRHは急激に上昇し分娩時にpeakに達するとしている。これをまとめたものがFig. 5であるが、正常妊婦は自身と胎盤と、胎児の3カ所にACTH/CRHの産生部位を抱えることになる。妊娠時には大量のエストロゲ

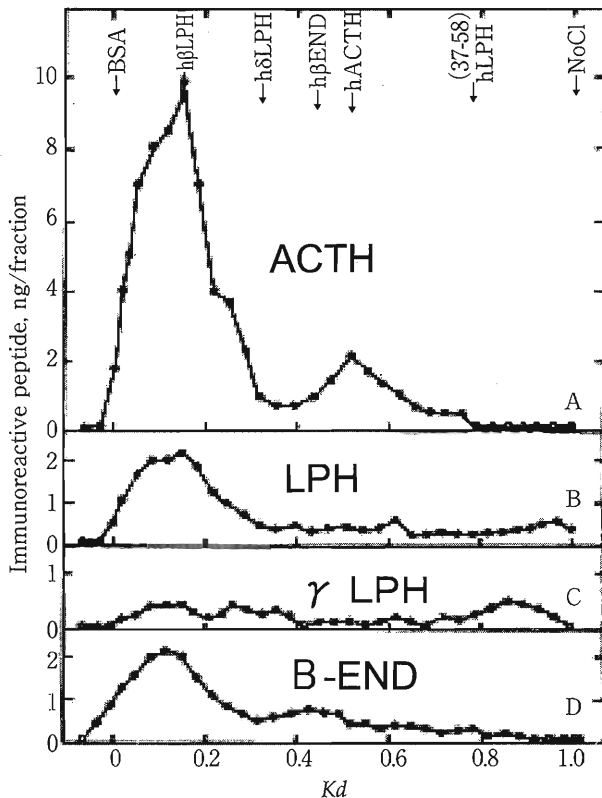


Fig. 3 Presence of placental ACTH and POMC⁴⁾
Sephadex G-50 Fine gel exclusion chromatography of a water extract of placenta. Concentrations of immunoreactive ACTH (A), human LPH (B), human γ LPH (C), and human β END (D) were determined in alternate fractions.

ンにより CBG が増加するために血中のコルチゾールは上昇するが、ACTH、CRH は抑制されずにむしろクッシング病状態にまで分泌能は高まってゆく。これに胎盤性 ACTH、CRH の関与が考えられる。分娩時には CRH-BP が低下することにより生物活性を持った CRH が上昇しさらに母体の ACTH、コルチゾールは上昇する。このように妊娠母体は従来考えられていた以上に、大きな視床下部-下垂体-副腎系の変化が起こっていることが示された。我々の症例のようにクッシング症候群がある上に妊娠を合併すると母体での視床下部-下垂体-副腎系の変化がさらに大きくなり、コルチゾール値は著明に上昇し、クッシング徴候は悪化し、母体のみならず胎児が危険状態にさらされることになる。残念ながら、我々の症例は胎児を救命できなかったが、その後副腎腫瘍摘出によりクッシング症候群は改善し、数年後には無事妊娠出産に至った。

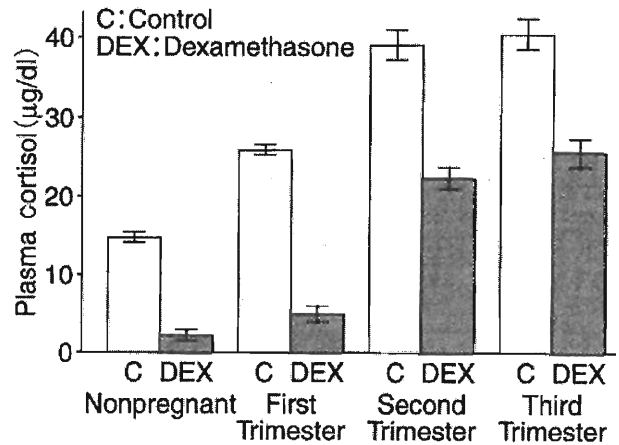


Fig. 4 Changes of cortisol levels before and after dexamethasone suppression during gestation⁶⁾

2. ホルモン測定の進歩とイムノアッセイコントロールサーベイ、その課題

私はアメリカから帰国後、ラジオアッセイ科に移り出村黎子先生指導のもと、技師さん達と共に種々のホルモンや腫瘍マーカーの臨床研究を行った。当時は RIA 全盛の時代で多くのキットの開発がなされた。また、東京女子医大の内分泌センターは日本で唯一の内分泌専門のセンターとして全国から患者が来院されたので、ホルモンの測定においても多くの臨床検討を共同して行うことができた。その1つ1つを紹介することはできないが、ここ10年ほどイムノアッセイコントロールサーベイに関わってきたので、2008年、第30回をもって止むなく終了したサーベイデータを振り返ることがホルモン測定の30年間の歩みをみることに繋がると思う。

イムノアッセイコントロールサーベイは日本アイソトープ協会、インビトロ委員会が主催したもので、1978年から開始された。Fig. 6にはサーベイを行ったホルモン項目の年次推移を示しているが、第1回は IRI, TSH, T3, T4 の4項目でスタートした。peak時はホルモン26項目のサーベイを行ったが、このサーベイではホルモン項目以外に腫瘍マーカーを含む14項目が検討され、総数40項目のサーベイを行った。現在、最大の3,000施設が参加している日本医師会主催のコントロールサーベイではホルモンは FT4, TSH のわずか2項目のみであることから、イムノアッセイコントロールサーベイは日本におけるホルモン測定の現状を反映していたことになる。サーベイが中止された原因はホルモン測定の急速な non-RI 化にある。第6回までのサーベイには non-RI キットは1つもなかったが、第10回ごろから年

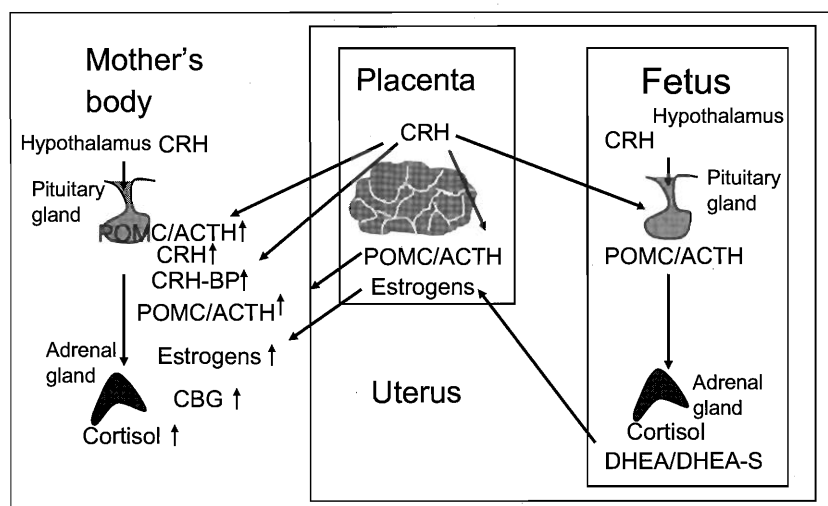


Fig. 5 Relationship among CRH (corticotropin releasing hormone), POMC (pro-opiomelanocortin) and steroid hormones in maternal-feto-placental unit

ACTH: adrenocorticotrophic hormone

CBG: corticosteroid binding globulin

DHEA: dehydroepiandrosterone

DHEAS: dehydroepiandrosterone sulfate

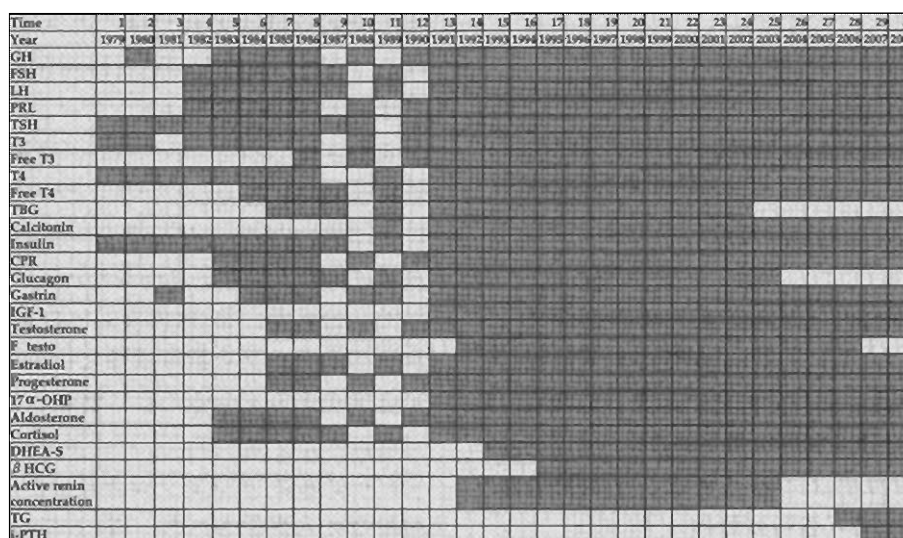


Fig. 6 Changes of analytes for hormones in the past 30 years of control survey

を追うごとに増加し、第30回では90%を超えるまでに became. このためアイソトープの適正使用を指導する目的で設立された日本アイソトープ協会が主催することが困難となった. Fig. 7にはステロイドホルモンのキット内の変動を示したが、継時的には徐々に収束してきていたが、問題はキット間の変動の大きさである (Fig. 8). キット間変動はE2は50%を超える大きな変動を示しほとんど収束の傾向はみられなかった. むしろ最も良好な coefficient variation (CV) を示していたのはコルチゾールで10%

前後を推移していた. このようにサーベイではキット内の変動は比較的小さいもののキット間の変動が大きいことはいずれのホルモンでも見られた.

当時サブクリニカルクッシング症候群で判定基準からずれる症例が多く認められることが問題になっていた. 当時はプレクリニカルクッシング症候群という名称で診断基準が提示されていた. 副腎偶発腫があり、クッシング徴候を示さないが、ある程度のコルチゾールの自律分泌を示す一連の症候群をサブクリニカルクッシング症候群と診断する. 診断のた

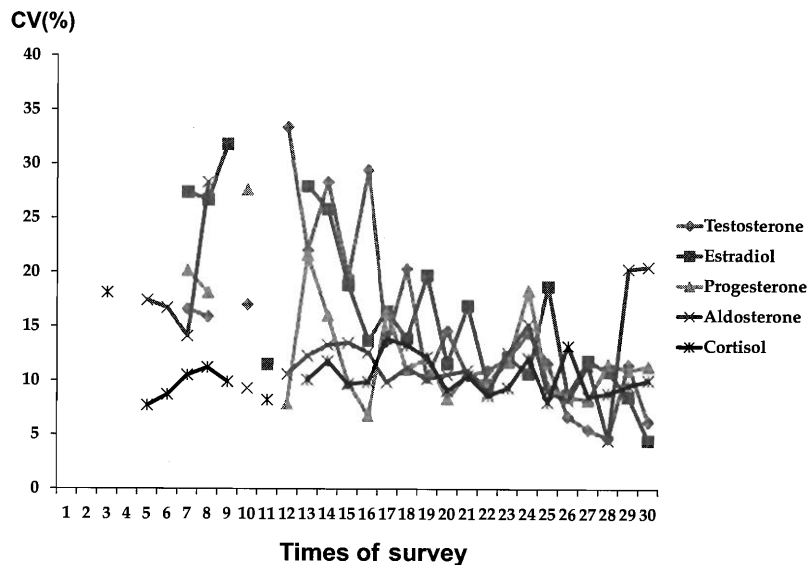


Fig. 7 Intra-assay variations of steroid hormones in sample 1

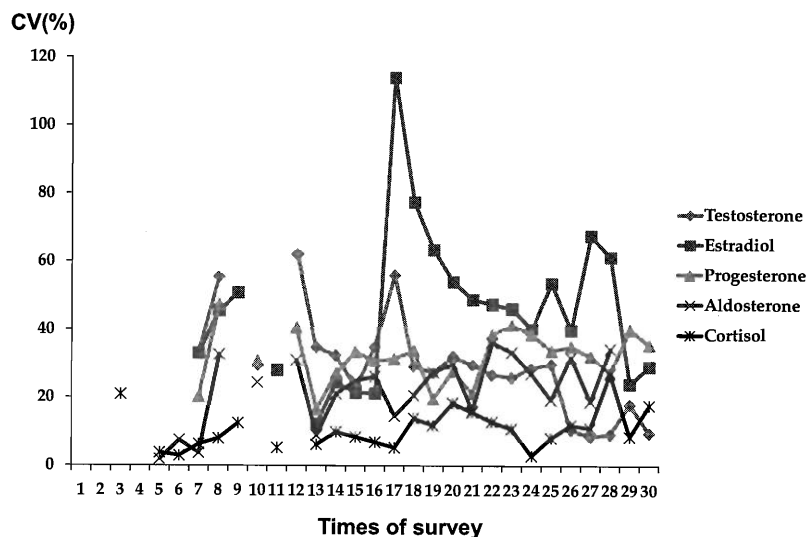


Fig. 8 Inter-assay variations of steroid hormones in sample 1

めにはデキサメタゾン抑制試験が必要でコルチゾール値がデキサ 1mg で $3\mu\text{g}/\text{dl}$, 8mg で $1\mu\text{g}/\text{dl}$ 以上を示すことが必須項目とされている。そこでサブクリニカルクッシング症候群でのデキサメタゾン後のコルチゾールを異なったキットで測定してみた⁹⁾。Fig. 9 に示すようにデキサメタゾン 1mg では症例 4, 5 においてアマレックスキットではいずれも $3\mu\text{g}/\text{dl}$ 以上を示したが、他のキットでは $3\mu\text{g}/\text{dl}$ 以上、以下と分かれ、使用したキットによりデータが異なることがわかった。デキサメタゾン 8mg においても症例 4 では乖離例がみられた。このことは用いたキットによってサブクリニカルクッシング症候群の診断が左右されることを示している。その後、国立病院機構、京都医療センターの成瀬光栄先生達と症例を増

やして検討したところ、さらに多くの乖離例がみられた¹⁰⁾。乖離例はデキサメタゾン 8mg において顕著となった。このような乖離例がみられることは、コントロールサーベイからは当然予測されていた結果であった。現在、サブクリニカルクッシング症候群の診断基準の見直しが続いている。その後筑波大学の桑や、産業総合研究所の高津らと低濃度領域のコルチゾールの実試料系での標準品を選定し、日本臨床検査標準協議会 (JCTLM) という国際機関に登録した^{11)~15)}。いま日本で使用されているコルチゾールキットはこの標準品にトレーサビリティを取ることが推奨されているが、コントロールサーベイ自体が消滅してしまったので、コルチゾールの値が収束しているか否かが確認できないことは残念の極みである。

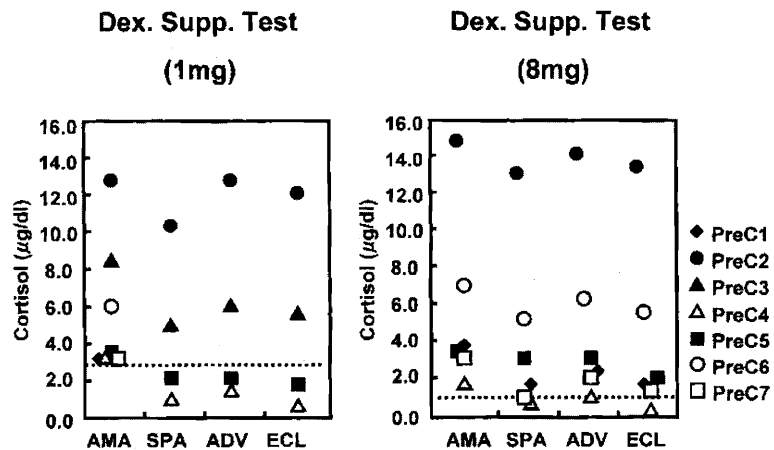


Fig. 9 Plasma cortisol after 1 and 8 mg of dexamethasone suppression tests in patients with primary aldosteronism and uncertain diagnosis of preclinical Cushing's syndrome⁹⁾

3. イムノアッセイの現状と今後の展望

長年ホルモンのイムノアッセイに関わってきたものとして、イムノアッセイの現状と今後の展望を述べる。

イムノアッセイを構成する要素として標準品、抗体、測定法の3つがあげられる。

①標準品であるが、多くの測定項目では準拠標準品が決まっていないので各社が独自に標準品を選定している現状から、トレーサビリティの確認がほとんどなされていない。準拠標準品の選定が困難な項目もあるが、ステロイドホルモンや甲状腺ホルモンは分子量が小さく純品もある。このような項目では公的に認識された施設や団体が責任をもって標準品を選定し、血清ベースでの標準物質を作成し、国際機関に登録することが可能である。その後、各社がこの標準物質にトレーサビリティを確認することが望まれる。我々の低濃度領域のコルチゾールの標準品もそのような手続きを踏みJCTLMに登録した。

②次に抗体であるが、抗体はキットごとに異なりモノクローナル抗体や、ポリクローナル抗体が多種多様使用されている。これらの抗体量にも限界があり、今後特異性の高い高力価の抗体を大量に作る技術の開発が望まれる。

③最後に測定法であるが、測定法はnon-RIが大半を占める時代となり、測定器が大型化したため、会社の利益拮抗も激化し標準化することはほとんど不可能な現状がある。

この中で特に標準品にこだわるのは標準品だけが唯一標準化が可能だからである。

しかしながら、イムノアッセイは抗原抗体反応を利用した測定法であり、測定系で抗体と反応する物

質はすべて同一物質とみなしてしまうために、単一の物質を測定しているという保証はない。イムノアッセイは標準品を標準化するだけでは解決されない測定法であることを深く理解する必要がある。

謝 辞

ここ数年間はボールルームダンシング部の全く社交ダンスができない顧問として、クラブの学生さんと時に語らい、時に励まし、楽しい時を過ごすことができたことは私の望外の喜びであった。

私は本稿で提示した症例だけでなく、多くの症例からたくさんのことを学び、医師の本当の教師は患者であると思っている。

長い間お世話になった先輩、後輩、同僚に深く感謝すると共に東京女子医大の益々の発展を心より祈念している。

(2012. 3. 3, 於弥生記念講堂)

文 献

- 1) Liddle GW, Bledsoe T, Coppage WS: A familial renal disorder simulating primary aldosteronism but with negligible aldosterone secretion. *Trans Assoc Am Physicians* **76**: 199-213, 1963
- 2) 小田桐恵美, 出村 博, 出村黎子ほか: Pseudoaldosteronism (Liddle 症候群) の一例. *内科* **37**: 890-894, 1976
- 3) 小田桐恵美, 出村 博, 出村黎子ほか: 妊娠によるCushing 症候群の増悪因子の検討. *日内会誌* **70**: 87-94, 1981
- 4) Odagiri E, Sherrell BJ, Mount CD et al: Human placental immunoreactive corticotropin, lipotropin, and β -endorphin: Evidence for a common precursor. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 2027-2031, 1979
- 5) 小田桐恵美, 安達知子, 代田真理子ほか: 妊娠および分娩時の母体血中 ACTH, Immunoreactive- β -endorphin および Cortisol の変動. *日産婦会誌* **34**: 920-928, 1982

- 6) **Odagiri E, Ishiwatari N, Abe Y et al:** Hypercortisolism and the resistance to dexamethasone suppression during gestation. *Endocrinol Jpn* **35**: 685-690, 1988
- 7) **Shibasaki T, Odagiri E, Shizume K et al:** Corticotropin-releasing factor-like activity in human placental extracts. *J Clin Endocrinol Metab* **55**: 384-386, 1982
- 8) **McLean M, Bisits A, Davies J et al:** A placental clock controlling the length of human pregnancy. *Nat Med* **1**: 460-463, 1995
- 9) **Odagiri E, Naruse M, Terasaki K et al:** The diagnostic standard of preclinical Cushing's syndrome: evaluation of the dexamethasone suppression test using various cortisol kits. *Endocr J* **51**: 295-302, 2004
- 10) **小田桐恵美, 成瀬光栄, 田辺晶代ほか:** 内分泌疾患の検査診断の進歩 コルチゾール測定とその問題点 プレクリニカルクッシング症候群の診断基準をめぐる問題点. *臨病理* **55**: 549-554, 2007
- 11) **Kawaguchi M, Takatsu A:** Development of candidate reference measurement procedure for the analysis of cortisol in human serum samples by isotope dilution-gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Sci* **25**: 989-992, 2009
- 12) **桑 克彦, 高津章子, 谷 涉ほか:** コルチゾール測定用血清標準物質の設定と測定性能. *ACTH RELATED PEPTIDES* **20**: 3-11, 2009
- 13) **高津章子:** 血清コルチゾール測定用標準物質. *臨化* **39**: 311-312, 2010
- 14) **高津章子, 川口 研, 桑 克彦ほか:** コルチゾール分析用血清標準物質による低濃度域の校正効果と技能試験. *ACTH RELATED PEPTIDES* **21**: 47-57, 2010
- 15) **川口 研, 桑 克彦, 高津章子ほか:** コルチゾール測定の標準化と低濃度域の技能試験結果. *ACTH RELATED PEPTIDES* **22**: 2-8, 2012



ラジオアッセイ科の皆さんと



ボールルームダンシング部の皆さんと