クッシング病患者における脳脊髄液中Corticotropin-Releasing Factor 濃度およびその日内変動

名古屋大学脳神経外科

横江 敏雄, 桑山 明夫, 市原 薫
山本 直人, 景山 直樹

Corticotropin-Releasing Factor Concentrations
in Cerebrospinal Fluid and its Diurnal Rhythm
in Patients with Cushing's Disease

**Toshio YOKOE, Akio KUWAYAMA, Kaoru ICHIHARA,
Naoto YAMAMOTO and Naoki KAGEYAMA**

Department of Neurosurgery,
Nagoya University School of Medicine,
Nagoya, Japan

Since Vale et al isolated and sequenced a 41 amino acid peptide with corticotropin-releasing factor (CRF) activity from ovine hypothalamus, intensive works have been done about its physiological activity and intracerebral distribution. However, little has been done yet about CRF metabolism in human cerebrospinal fluid (CSF).

Using a specific ovine CRF radioimmunoassay (RIA), we measured the levels of CRF in CSF from 16 patients with Cushing's disease (group I), 8 patients with Acromegaly (group II), 5 patients with Prolactinoma (group III) and 10 patients without endocrine abnormalities (group IV). Moreover diurnal changes of CRF in CSF from 2 patients with Acromegaly and 2 patients with Cushing's disease were examined.

Dilution curves of CRF in CSF were parallel to that of synthetic ovine CRF standard. The intraassay coefficient of variation was 9.2% and the interassay coefficient of variation 12.6%.

The concentrations of CRF in CSF of groups I, II, III and IV were 38.83 ± 9.02 pg/ml (mean $\pm$ SD), 44.24 ± 4.71 , 47.62 ± 8.05 and 49.45 ± 12.86 , respectively.

Group I was significantly lower than group IV ($p < 0.05$). On the other hand, group II or III was not significantly different from group IV. A diurnal rhythm of CRF in CSF was observed in 2 patients with Acromegaly.

However, there was almost no change in the 2 patients with Cushing's disease.

In considering rich amount of CRF in hypothalamus and CRF-positive fibers surrounding the third ventricle, CRF content in CSF seems to reflect mainly its metabolic

activity in hypothalamus. Therefore, our results suggest that hypothalamic CRF metabolism in Cushing's disease is suppressed with the elimination of its diurnal activity by secondary hypercortisolism due to autonomic ACTH-hypersecretion from pituitary adenoma.

緒 言

近年, Vale ら¹⁸⁾により corticotropin-releasing factor (CRF) がヒツジ視床下部より分離され、41個のアミノ酸からなる構造式が同定された。

そしてこのヒツジ CRF はヒト下垂体からの ACTH 分泌能を持つことが in vivo, in vitro において証明された^{7) 14)}。

その後、このヒツジ CRF 抗血清を用いた酵素抗体法により視床下部室傍核から、正中隆起に至る CRF 陽性線維が報告され^{1) 11) 12)}、更にはヒト第三脳室を取り囲む CRF 陽性線維が例証¹⁰⁾された結果、ヒト脳脊髄液 (Cerebrospinal fluid: CSF) 中における CRF の存在が示唆されるに至った。

しかしながら、ヒト脳脊髄液中の CRF 分泌動態に関する報告は少ない^{15) 17)}。

そこで今回我々は内分泌学的正常例、クッシング病症例および他の下垂体疾患症例の脳脊髄液中 CRF 濃度を測定するとともに、クッシング病症例、末端肥大症症例における脳脊髄液中の CRF 日内変動を検討し、若干の知見を得たので報告する。

対象および方法

1 対 象

クッシング病患者16例 (男子3例, 女子13例, 年齢15歳-47歳, 平均30.3歳), 末端肥大症患者8例 (男子4例, 女子4例, 年齢31歳-64歳, 平均43.5歳) およびプロラクチノーマ患者5例 (男子1例, 女子4例, 年齢27歳-33歳, 平均29.8歳) とし、朝9時に腰椎穿刺により脳脊髄液を各2 ml 採取した。また内分泌学的に正常と認められた症例 (以下正常症例と略す) の10例 (虫垂炎手術時に脳脊髄液を各2 ml 採取) を対照とした。

さらにクッシング病患者2例 (20歳女子, 29歳女子), コントロールとして末端肥大症患者 (48歳男子, 40歳女子) に対して手術前日より挿入した lumbar catheter より約4時間毎脳脊髄液を2 ml ずつ採取し、脳脊髄液中 CRF 日内変動につき検索するとともに同時刻に血中 ACTH・コルチゾールを測定しその相関などについても検討を加えた。脳脊髄液採取による合併症・副作用等はほとんど認められなかった。

なお、上述した、クッシング病症例、末端肥大症症例およびプロラクチノーマ症例は全例とも、その後の経蝶形骨洞手術により下垂体腺腫を確認摘出し、病理組織学的検索によって腺腫の証明がなされた。

2, 方 法

まず採取した脳脊髄液を、抗ヒツジ CRF 家兔血清 (須田博士から提供)¹⁵⁾ を使用したイムノアフイニティーカラム^{8) 15)} にかけたのちに radioimmunoassay (RIA) により CRF 濃度測定をおこなった。なお回収率は平均89%であった。

上述した抗血清は ACTH, β -endorphin, arg-8-vasopressin, lysine-8-vasopressin, angiotensin I, renin substrate などとの交叉反応を認めず、またその抗原認識部位はヒツジ CRF の N 末端から中央部であった (Fig. 1)。

Fig. 1. Standard curve and crossreactivity of O-CRF antiserum.

Fig. 2. CRF concentrations in CSF from patients with pituitary disorders.

^{125}I -N-Tyr-ovine CRF はクロラミン T 法により作製し Sephadex G-50 にて精製した。また 0.1% HSA, 0.1% Triton X-100 を含む 0.1M リン酸 buffer (PH 7.4) を反応液とし 2 抗体法にて分離した。以上により CRF-RIA 系を確立し、脳脊髄液中 CRF を測定した。この測定系の最小測定感度は 3 pg/tube であり、intraassay, interassay の変動係数はそれぞれ 9.2%, 12.6% であった。

また血中 ACTH, 血中コルチゾールは各々 CIS キット, 栄研キットによる RIA にて測定した。

なお、有意差の検定には分散分析法 (analysis of variance) を用いた。

結 果

脳脊髄液中 CRF 濃度はクッシング病症例群 ($n=16$): 38.83 ± 9.02 (mean $\pm$ SD), 末端肥大症症例群 ($n=8$): 44.24 ± 4.71 , プロラクチノーマ症例群 ($n=5$): 47.62 ± 8.05 , さらに正常症例群 ($n=10$): 49.45 ± 12.86 pg/ml であった (Fig. 2)。

クッシング病症例群では正常症例群に比し有意 ($p < 0.05$) に脳脊髄液中 CRF 濃度の低下を認めた。

なお、正常症例群・末端肥大症症例群間, さらに、正常症例群・プロラクチノーマ症例群間には有意の差を認めなかった。

Fig. 3. Diurnal rhythm of CRF in CSF, plasma ACTH and cortisol in a patient with Acromegaly.

Fig. 4. Diurnal rhythm of CRF in CSF, plasma ACTH and cortisol in a patient with Acromegaly.

また脳脊髄液中CRF日内変動の結果は、対照とした末端肥大症患者2例をFig.3, Fig.4にクッシング病患者2例をFig.5, Fig.6に示した。

Fig. 3に示す末端肥大症症例(48歳男子)においては脳脊髄液中CRF濃度の頂値(61.0pg/ml)をa.m. 4:00に認めた。

この頂値は最低値(a.m. 12:00, 30.6pg/ml)の1.99倍であった。また血中ACTH, コルチゾールの頂値は、それぞれa.m. 4:00(87.0pg/ml), a.m. 0:00(36.1μg/dl)に認められた。

Fig. 4の末端肥大症症例(40歳女子)では、脳脊髄液中濃度の頂値(58.9pg/ml)をa.m. 4:00に認め最低値(a.m. 12:00, 30.8pg/ml)の1.91倍であった。なお血中ACTH, コルチゾールはa.m. 8:00にそれぞれ、51.2pg/ml, 35.5μg/dlと頂値を示した。

一方、Fig. 5に示すクッシング病症例(20歳女子)においては血中ACTH, コルチゾールとも日内変動がほとんど認められず、脳脊髄液中CRFに関しても同様の結果が得られた。

Fig. 5. Diurnal rhythm of CRF in CSF, plasma ACTH and cortisol in a patient with Cushing's disease.

Fig. 6. Diurnal rhythm of CRF in CSF, plasma ACTH and cortisol in a patient with Cushing's disease.

Fig. 6 のクッシング病症例 (29歳女子) においても測定時間は a.m. 8:00 から p.m. 8:00 までではあるがほとんど変動を示さなかった。

なお、脳脊髄液中 CRF の稀釈曲線はヒツジ CRF の標準曲線に平行であった。

考 案

ヒツジ CRF 抗血清を用いた酵素抗体法によってヒト第三脳室を取り囲む CRF 陽性線維が認められたという事実¹⁰⁾ から脳脊髄液における CRF の存在が示唆された。

一方、視床下部以外の組織中においても CRF が存在しているという報告^{2) 4) 11)} も認められる。

以上により視床下部以外の組織からの CRF という要素を考慮しなければならないものの各組織中の含有量の差などから、脳脊髄液中 CRF は視床下部性 CRF をかなり反映しているものと思われる。

また CRF の日内変動に関しては、ラット視床下部抽出物を用いた bioassay による報告^{3) 5) 6) 13) 16)}や最近では RIA による報告⁹⁾がなされているにすぎない。

これらの事実をふまえ、今回我々は脳脊髄液中の CRF の存在とクッシング病事例、他の下垂体疾患事例および正常事例における比較、さらにはクッシング病事例での脳脊髄液中 CRF 日内変動をヒツジ CRF 抗血清を用いた RIA 系により検討した。

その結果、脳脊髄液中 CRF は、クッシング病事例群において正常事例群と比較し有意 ($p < 0.05$) の低下を示した。

一方、末端肥大症事例群およびプロラクチノーマ事例群では正常事例群と有意の変動を認めなかった。

また脳脊髄液中 CRF 日内変動に関しては、対照とした末端肥大症事例では、血中 ACTH コルチゾールの日内変動とはほぼ平行もしくはやや先行するという結果を得た。

一方クッシング病事例においては、血中 ACTH、コルチゾールの日内変動の消失とともに、脳脊髄液中 CRF もその日内変動が消失しているという結果がみとめられた。

以上によりクッシング病事例においては、恐らく ACTH 産生下垂体腺腫からの自律的 ACTH 分泌に基づく高コルチゾール血症によるネガティブフィードバック機構のため、視床下部における CRF 産生分泌が抑制され、その日内変動も消失しているという可能性が示唆された。

結 語

ヒツジ CRF 抗血清を用いた RIA 系によりヒト脳脊髄液中 CRF の存在が証明されクッシング病事例群では正常事例群に比し有意 ($p < 0.05$) の低下をみた。

さらにクッシング病事例では末端肥大症事例と異なり脳脊髄液中 CRF 日内変動が消失していた。

これらの事実より、クッシング病事例においては、その ACTH 産生下垂体腺腫からの自律的 ACTH 分泌に基づく高コルチゾール血症により視床下部における CRF 分泌が抑制され、その日内変動も消失しているという可能性が示唆された。

ヒツジ CRF 抗血清を提供していただいた東京女子医科大学第 2 内科 須田俊宏講師、鎮目と夫教授に深謝致します。

なお、本論文の要旨は第 57 回日本内分泌学会総会にて発表した。

文 献

- 1) Bloom F.E., Battenberg E.L.F., Rivier J. and Vale W.: Corticotropin-releasing factor (CRF); immunoreactive neurons and fibers in rat hypothalamus, *Regulatory Peptides*, 4: 43–48, 1982.
- 2) Côté J., Lefèvre G., Labrie F. and Barden N.: Distribution of corticotropin-releasing factor in ovine brain determined by radioimmunoassay, *Regulatory Peptides* 5: 189–195, 1983.
- 3) David-Nelson M.A. and Brodich A.: Evidence for a diurnal rhythm of corticotropin-releasing factor (CRF) in the hypothalamus, *Endocrinology* 85: 861–866, 1969.
- 4) Fischman A.J. and Moldow R.L.: Extrahypothalamic distribution of CRF-like immunoreactivity in the rat brain, *Peptides* 3: 149–153, 1982.
- 5) Hiroshige T., Sakakura M. and Itoh S.: Diurnal variation of corticotropin-releasing activity in the rat hypothalamus, *Endocr jap* 16: 465–469, 1969.

- 6) Hiroshige T. and Wada-Okada S.: Diurnal changes of hypothalamic content of corticotropin-releasing activity in female rats at various stages of the estrous cycle, *Neuroendocrinology* 12: 316–319, 1973.
- 7) Labrie F., Veilleux R., Lefevre G., Coy D.H., Sueriras-Diaz J. and Schally A.V.: Corticotropin-releasing factor stimulates accumulation of adenosine 3', 5'-monophosphate in rat pituitary corticotrophs, *Science* 216: 1007–1008, 1982.
- 8) Mains R.E. and Eipper B.A.: Biosynthesis of adrenocorticotrophic hormone in mouse pituitary tumor cells, *J Biol Chem* 251: 4115–4120, 1976.
- 9) Moldow R.L. and Fischman A.J.: Physiological changes in rat hypothalamic CRF; circadian, stress and steroid suppression, *Peptides* 3: 837–840, 1982.
- 10) Mouri T., Suda T., Takei Y., Takasue M., Yoshinaga K., Ando N. and Sasano N.: Immunocytochemical identification of CRF in human hypothalamus, *Tohoku J Exp Med* in press.
- 11) Olschowka J.A., O'Donohue T.L., Mueller G.P. and Jacobowitz D.M.: Hypothalamic and extrahypothalamic distribution of CRF-like immunoreactive neurons in the rat brain, *Neuroendocrinology* 35: 305–308, 1982.
- 12) Paull W.K., Schöler J., Arimura A., Meyers C.A., Chang J.K., Chang D. and Shimizu M.: Immunocytochemical, localization of CRF in the ovine hypothalamus, *Peptides* 3: 183–191, 1982.
- 13) Retiene K. and Schulz F.: Circadian rhythmicity of hypothalamic CRH and its central nervous regulation, *Horm Metab Res* 2: 221–224, 1970.
- 14) Rivier C., Brownstein M., Spiess J., Rivier J. and Vale W.: In vivo corticotropin-releasing factor-induced secretion of adrenocorticotropin, β -endorphin, and corticosterone, *Endocrinology* 110: 272–278, 1982.
- 15) Suda T., Tozawa F., Mouri T., Demura H. and Shizume K.: Presence of immunoreactive corticotropin-releasing factor in human cerebrospinal fluid, *J Clin Endocrinol Metab* 57: 225–226, 1983.
- 16) Takebe K., Sakakura M., Horiuchi Y. and Mashimo K.: Persistence of diurnal periodicity of CRF activity in adrenalectomized and hypophysectomized rats, *Endocr jap* 18: 451–455, 1971.
- 17) Tomori N., Suda T., Tozawa F., Demura H., Shizume K. and Mouri T.: Immunoreactive corticotropin-releasing factor concentrations in cerebrospinal fluid from patients with hypothalamic-pituitary-adrenal disorders, *J Clin Endocrinol Metab* 57: 1305–1307, 1983.
- 18) Vale W., Spiess J., Rivier C. and Rivier J.: Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and β -endorphin, *Science* 213: 1394–1397, 1981.

(受付日: 59. 2. 10)