第60回日本内分泌学会総会 会長講演

内分泌学と核医学

福井医科大学

鳥 塚 莞 爾

President Lecture at the 60th Congress of Japan Endocrine Society:
The Role of Nuclear Medicine in Endocrinology**Kanji TORIZUKA**

Fukui Medical School

Radioisotopes have been widely used in both in vitro and in vivo studies of endocrine organs. In this lecture, results of our recent in vitro studies on calcium regulating hormones, thyroid-stimulating hormone, and gastro-intestinal hormones are reviewed.

1) Clinical evaluation of measurement of calcium regulating hormones such as PTH, calcitonin and vitamin D metabolites was demonstrated. Furthermore, problems of those assays were also discussed. Especially, simpler methods which measure intact PTH or vitamin D metabolites are to be developed. PTH-like factor, which should play the major role in hypercalcemia of malignancy, was assayed biologically. After determination of amino-acid sequence of this protein, clinical measurement should reveal mechanism of hypercalcemia of malignancy.

2) Studies on TSH-receptor antibodies by using radioreceptor assay. TSH-binding inhibitor immunoglobulins (TBII) were detected not only in 93% of untreated patients with Graves' disease, but also in 21% of patients with primary myxedema. In contrast to the thyroid-stimulating nature of TBII in Graves' patients, TBII in hypothyroid patients were disclosed to be blocking in their nature. Clinical and laboratory findings supported pathogenetic role of the blocking antibodies in the latter condition.

3) Mutual regulation between CCK and muscarinic receptors on dispersed pancreatic acini. CCK and carbachol in their higher concentrations regulated muscarinic receptor and CCK receptor, respectively. The mode of regulation of both receptors was disappearance of their high affinity binding site. TPA, an activator of protein kinase C, modulated both receptors in the same manner as CCK or carbachol. These effects of CCK and carbachol on receptors were well compatible to the restriction of carbachol or CCK induced amylase secretion by CCK or carbachol.

These in vitro studies, in association with the results of in vivo studies, contribute to the developments of nuclear endocrinology.

1. はじめに

放射性同位元素 (radioisotope, RI) の医学利用は、甲状腺および血液領域の研究に始まり、核医学は内分泌学と、もっとも古くから、関わっている。中でも1959年、Berson, Yalow¹⁾により開発された radioimmunoassay (RIA) は各種ホルモンの血中濃度の測定を可能とし、内分泌学に画期的な進歩をもたらした。一方、RI の *in vivo* 投与による核医学イメージングの内分泌学への応用も、甲状腺にはじまり、副腎皮質、副甲状腺、更に副腎髄質へと進展している。イメージングの進歩については、本学会のワークショップで²⁾現状のまとめが予定されている。そこで、本講演では、*in vitro* 核医学の内分泌学への応用として、京大核医学科の協同研究者により行なわれたカルシウム調節ホルモン、甲状腺刺激ホルモン、消化管ホルモンに関する研究成績について述べる。

2. カルシウム調節ホルモンの測定

カルシウム調節ホルモンには、副甲状腺ホルモン (PTH)、カルチトニン (および関連ペプチド)、ビタミン D 代謝物、およびホルモンとは未だ云えないが悪性腫瘍における高カルシウム血症誘導因子の原因物質と考えられる PTH 様物質があり、RIA, competitive protein binding assay (CPBA), radioreceptor assay (RRA), immunoradiometric assay (IRMA) により測定が行なわれている。

PTH の測定においては、C fragment を測定する C 端 assay は PTH のルーチンの assay に広く用いられており、90% の原発性副甲状腺機能亢進症を鑑別し得るが、腎不全では高値を示し、腎機能低下時には副甲状腺機能の評価に使用し得ない³⁾。その欠点をおぎなうために開発された intact assay は、N 端に特異的な抗体をつけた agarose にて、N 部分をもつ PTH ペプチドのみを抽出し、測定するものである。この intact assay により、腎不全患者における副甲状腺機能の評価が可能となった。すなわち、本法による腎不全患者での低 Ca 刺激に対する副甲状腺の反応を検討した成績において、低 Ca に対して PTH の上昇が認められた。また、ROS17/2細胞の cyclic AMP の上昇能を指標とする *in vitro* bioassay の検討を行ったが、特異性と感度に問題が認められた。今後、更に簡便な IRMA などによる intact PTH assay の開発が望まれる。

ビタミン D 代謝物の測定に関しては、25-OH-D、24, 25-(OH)₂-D に対しては牛胎児血清などのビタミン D 結合蛋白を結合蛋白として CPBA を行い、1, 25-(OH)₂-D に対しては、ニワトリの腸管サイトゾルの Vitamine D receptor を結合 receptor として RRA により測定された⁴⁾。本法による年齢別にみた健康人の 1, 25-(OH)₂-D の測定値において、1 才以降では15才前後に高値を示すが、その他は比較的一定値を示し、各種疾患においては、図1に示す如く、腎不全、甲状腺機能亢進症、原発性胆肝汁性硬変症などでは低値を示し、妊娠時、原発性副甲状腺機能亢進症において高値を示した。

近年、悪性腫瘍における高カルシウム血症の誘導物質として PTH 様物質が注目されている。本物質は扁平上皮癌などより分泌され、全身の骨吸収を促進し、しかも PTH 受容体に結合するものと考えられている⁵⁾。図2は高カルシウム血症をもたした卵巣癌の抽出物のゲルクロマトグラフィによる分画区分の生物活性を検討した成績を示す。分子量の約13,000の処に、骨芽細胞の cyclic AMP を上昇させ、しかも *is vitro* にて骨吸収能を示す物質を認めた⁶⁾。本物質の骨芽細胞における cyclic AMP 上昇能は、PTH antagonist である 3-34PTH にて dose-dependent に抑制され、本物質が PTH receptor に結合する物質であると考えられた。すなわち、本物質は悪性腫瘍より分泌され、PTH 受容体に結合し、高カルシウム血症をもたすと云う点で、きわめて興味深い因子であり、今後、その精製と同定、簡便な assay の開発が望まれる。

図 1. 各種疾患における血中1,25-(OH)₂-D 分布

図 2. 高カルシウム血症をもたした卵巣癌の抽出物のゲルクロマトグラフィによる分画区分の生物活性分布

3. RRA による TSH receptor 抗体の検出とその病因的意義

バセドウ病患者の血中には、30年前より LATS と呼ばれる異常な甲状腺刺激物質の存在することが知られて来た。近年、このような患者の IgG が TSH と全く同様に、標識 TSH の receptor への結合を阻害することが見出され⁷⁾、異常甲状腺刺激物質が TSH receptor 抗体であることが明らかにされて来た。このような TSH の receptor の結合を阻害する抗体は、今日、TSH-binding inhibitor immunoglobulins (TBII) と呼ばれている⁸⁾。

図3. 各種甲状腺疾患における血中 TBII 活性の分布

図3は各種甲状腺疾患の TBII を値を示すが、未治療バセドウ病の93%が陽性であり、抗甲状腺剤治療により、TBII 活性は低下し、寛解時にはほとんど陰性化する。一方、再発時には全例陽性となり、病勢をよく反映した変動を示す。しかしながら、TBII はバセドウ病に特異的ではなく、1978年、私共が報告した最初の症例以来⁸⁾、いわゆる原発性粘液水腫の患者のうち、約20%に強い TBII 活性がみられた⁹⁾。

図4. ラットの FRTL-5 細胞株を用いて測定した各種甲状腺疾患の血中甲状腺刺激抗体活性 (TSAb) の分布

そこで、私共に、このような receptor 抗体のもつ生物活性を簡便かつ高感度に測定する in vitro bioassay を開発して、抗体の性状の分析を行なった。当初はブタ甲状腺培養細胞を用いたが¹⁰⁾、最近ラットのFRTL-5細胞株を用い、培養上清へのcyclic AMPの放出を指標とする甲状腺刺激抗体 (TSAb) の測定系を開発した¹¹⁾。本 assay はきわめて高感度を示し、ウシ TSH $1\mu\text{U}/\text{ml}$ で3.5倍の cyclic AMP 値の上昇が得られた。図4は、本方法での TSAb の検出成績を示す。未治療バセドウ病では50例全例で陽性であるほか、再発例、euthyroid Graves 病でも、いずれも全例に TSAb が検出された。橋本病における陽性例は TSH が $30\mu\text{U}/\text{ml}$ 以上のものであり、抗 TSH 抗体による吸収操作で消失したことより、TSH の混入による刺激活性であり、TSAb でないことが判明した。その他の疾患では単純性甲状腺腫および癌の各1例で弱陽性例を認めたのみで、極めてバセドウ病に特異的であることが認められた。

図5に示す如く、未治療のバセドウ病患者において、TBII と TSAb 活性との間には有意の正相関が認められ、バセドウ病患者の TBII が刺激抗体であることが裏づけられた。一方、原発性粘液水腫患者の強い TBII 活性を有する IgG には、全く、甲状腺刺激活性が認められなかった。これら機能低下症患者の IgG は、それ自身、甲状腺刺激活性を持たないのみならず、TSH と共に加えると、TSH による cyclic AMP 増加反応の抑制が認められた^{8,12)}。LATS 陽性のバセドウ病患者 IgG による cyclic AMP 増加反応も同様に患者 IgG の添加により抑制されるが、prostaglandin E_1 による cyclic AMP 増加は抑制されないことより、この抑制作用は TSH 受容体を介する刺激に特異的であることが認められた⁸⁾。

図5. 未治療バセドウ病 (●) および原発性粘液水腫 (★) 患者の血中 TBII 活性とブタ甲状腺培養細胞を用いて測定した TSAb 活性との関係

原発性甲状腺機能低下症における TBII 活性と TSH の作用を阻害する程度との間には、有意の正相関が見られ、これらが TSH receptor に対する blocking 抗体であることが裏付けられた。このような blocking type の TSH receptor 抗体をもつ母親から生まれた新生児には、一過性の甲状腺機能低下症がみられ、TBII の消失と共に甲状腺機能が正常化し、甲状腺ホルモン剤の投与が不必要となることが明らかにされた¹³⁾。この所見は、バセドウ病の母親より生まれた児にみられる新生児バセドウ病と全く逆の現象であり、この抗体の病因的意義を強く支持している。

これまでに報告された TBII が 50% 以上の強陽性の甲状腺機能低下症 29 例の臨床所見をまとめてみると、男女比は 1 : 7、発症年齢は 15~49 才、1 例を除いて甲状腺腫をふれない、著しく低い甲状腺摂取率、高度な原発性甲状腺機能低下、抗マイクロゾーム抗体陽性、上述した如く、新生児に一過性甲状腺機能低下症のみられることなどの臨床的特徴が見られる¹⁴⁾。

バセドウ病患者においても、¹³¹I 治療後などに blocking 抗体の出現が報告されている。私共は、最近、抗甲状腺剤による治療後に機能低下症に陥ったバセドウ病患者の受容体抗体を検討した処、機能低下症の発症の時期に一致して、当初の刺激抗体が、強い blocking 抗体への変化を認めた¹⁵⁾。このような症例の存在は、刺激抗体および blocking 抗体それぞれのバセドウ病および機能低下症における病因的役割を強く支持するものであり、また、両者の混在した病態の存在を示すものである。

以上の成績により、刺激抗体によるバセドウ病と blocking 抗体による機能低下症は TSH 受容体抗体に起因すると考えられる一連の受容体異常症の両端に位置するものと理解され、両者は共に橋本病と密接な関係にある自己免疫性甲状腺疾患と位置づけることが出来るものと考えられる。

図 6. CCK および carbachol のアミラーゼ分泌の用量反応曲線と高濃度 carbachol および CCK の影響

4. 膵腺房細胞における CCK 受容体とムスカリン様受容体、その相互分泌調節と受容体調節

ラットやモルモットなどの小動物の膵外分泌細胞には、消化管ホルモンである cholecystokinin (CCK) や、神経伝達物質である acetylcholine のムスカリン様受容体が存在し、これらを介する刺激は、膵外分泌酵素分泌の主要な制御因子として知られている¹⁶⁾。これらの受容体のアゴニストで

ある CCK と carbamylcholine (carbachol) の分泌作用には類似の点が多く、共に ^{++}Ca 依存性の作用機構を持つことが知られているばかりでなく、分泌刺激の用量反応曲線が特徴的な二相性を呈する点でも類似性が認められる。図 6 に示す如く、この二相性の用量反応曲線は、濃度の上昇と共に分泌が増加する第一相と、分泌が頂値に達した後、更に濃度を上昇させると分泌がかえって減少する第二相とから成り、各々の第二相を形成する高濃度が共存することによって、他方の第一相を形成する低濃度による分泌が抑制される現象が以前より特有の相互分泌調節として知られて来た。両者の構造上の相違や、両受容体の拮抗剤が他方の分泌現象に影響を与えないことなどから、従来、この分泌相互調節は受容体以後の細胞内機構の部分で起るものと考えられて来た。しかしながら、本研究で私共が明らかにするように、実際には、こうした分泌の相互調節は各々受容体の部位で起っているものであり、脳腸ホルモンである CCK と神経伝達物質である acetylcholine の間に、このような相互の受容体調節機構の存在することは極めて興味深い。先ず、CCK 受容体は ^{125}I -Bolton・Hunter reagent を用いて標識された ^{125}I -BH-CCK8 をトレーサーとして解析され、この受容体が二つの異なる親和定数を持つ結合部位からなることが図 7 から明らかである。carbachol の高濃度が存在することにより ^{125}I -BH-CCK8 単独の結合は抑制され、この条件下での非標識 CCK8 による結合阻害曲線では、対照に見られるような低濃度部分での有意の結合阻害が消失している。この結果から明らかなように Scatchard 解析では、この場合 CCK 受容体の高親和性結合部の消失が認められる。この様な carbachol の影響は atropine 存在下では認められず、また、atropine 自体は CCK の受容体結合に何ら影響を与えない。更に ^{++}Ca -ionophore もまた CCK の受容体結合に影響を与えない。

図 7. 膵腺房受容体に対する CCK の結合と高濃度 carbachol の影響

これらの成績は、高濃度 carbachol が、細胞内 ^{++}Ca イオン変動自体以外の細胞内機構の活性化を介して CCK 受容体の高親和性結合部を消失させ、これによって低濃度 CCK による分泌刺激を抑制していることを示唆するものである。次に acetylcholine のムスカリン様受容体は、同受容体拮抗剤である N-methyl-scopolamine の ^3H 標識体 (^3H -NMS) を用いて解析され、carbachol はこの ^3H -NMS の結合を用量依存的に阻害する。この阻害曲線の解析からは、ムスカリン様受容体に対し carbachol は二つの異なる親和定数で結合することがわかる。これに対して NMS はこの二つの結合部位に対して等しい親和性を持つ結果、見かけ上単一の親和定数でその結合部位が表現される。このことは実験成績の解析上、少し重要な問題を含んでおり、もし仮に CCK のムスカリン様受容体への影響が carbachol の CCK 受容体へのそれと同様、その高親和性結合部の消失（または低親和性への変換）の形で起ったとしても、 ^3H -NMS 単独の結合は殆んど変化しないことを示している。事実、比較的最近の論文でも ^3H -NMS の結合量が変化しない事実によって CCK は膵腺房のムスカリン様受容体に影響を与えないとされている¹⁷⁾しかし、高濃度 CCK 存在下に carbachol による ^3H -NMS 結合阻害曲線を検討すると、図 8 に示す如く、対照と比較して低濃度 carbachol の結合阻害能は抑制され阻害曲線はより急峻となる。この結合阻害曲線の解析からは carbachol の二つの結合部位の内、高親和性結合部位の消失が明らかに認められる。即ち、CCK の高濃度による、低濃度 carbachol の分泌能の抑制もまた、ムスカリン様受容体の親和性の変化の結果であることが示唆される。

図 8. 膵腺房受容体に対する carbachol の結合と高濃度 CCK の影響

このようなムスカリン様受容体の変化もまた ^{++}Ca ionophore では再現されず、 ^{++}Ca 依存性細胞機構の transmembranous signal transduction として重要視されている P-I 代謝回転関連の図式にあてはめて言えば IP_3 産生とそれによる細胞内 ^{++}Ca 貯蔵からの ^{++}Ca の遊離そのものはこれらの相互受容体調節には直接関係しないと考えられる。一方 P-I 代謝回転関連のもう一つの細胞内機構

である protein kinase C の活性化物質として知られるフォルホールエステル (TPA) は図 9 に示す如く, CCK 及ムスカリン様受容体に対し, 各々 carbachol 及び CCK と同様, 高親和性結合部位の消失による結合抑制をもたす。CCK や carbachol が膵腺房において P-I 代謝回転を起すことはよく知られており, より直接的にはこれらが protein kinase C の活性化につながるジアシルグリセロールの産生を惹起することも最近では明らかにされている¹⁸⁾。

このジアシルグリセロール産生の用量反応曲線が同じ膵腺房からの酵素分泌刺激のそれとくらべて右方に偏位し CCK や carbachol の分泌刺激の用量反応曲線の第二相に近い部分に位置すること、また, TPA による成績に加えて, これらの受容体調節の機構として protein kinase C が有力な候補の一つであることを示している。

図 9. 膵腺房受容体に対する CCK および carbachol の結合と TPA の影響

5. むすび

カルシウム調節ホルモンの測定, RRA による TSH 受容体抗体の検索と, その病因的意義および膵外分泌細胞の受容体調節について, 私共の教室における成績を中心に述べた。

in vitro 核医学は, ホルモンなどの生物学的活性の測定を可能としており, 今後, in vitro 核医学の成果が機能画像としての in vivo 核医学に還元され, また, in vivo 核医学の成果が in vitro 核医学に還元されて, 内分泌核医学が発展するものと考えられる。

謝辞

この会長講演は, 下記の右々のご協力によるものであり, ここに記して, 厚く御礼を申し上げます。

京都大学核医学科

小西淳二, 安達秀樹, 遠藤啓吾, 山本逸雄, 笠木寛治, 野口正人, 飯田泰啓, 滋野長平, 青木 純, 青木悦雄, 大西秀一, 佐藤俊介, 本田豊彦, 新井圭輔, 勝島慎二, 北村暢康, 徳田康孝, 塩見一樹, 曾根照喜

文 献

- 1) Berson, R.S. and Yalow, R.S.: Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. *Nature*, 184: 1648, 1959.
- 2) 第60回日本内分泌学会学術総会抄録集: ワークショップVII「画像診断」, 日内分泌誌, 63: 4, 326-331.
- 3) 山本逸雄, 高坂唯子, 阿曾沼和代, 北村暢康, 青木 純, 鳥塚莞爾: Mid-Region 副甲状腺ホルモン測定用キット (PTH-MM RIA Kit) の使用経験 現代医薬, 17: 1976-1979, 1985.
- 4) 土光茂治, 森田陸司, 福永仁夫, 山本逸雄, 山本厚江, 山田和代, 滋野長平, 鳥塚莞爾: 血中 Vitamin D 誘導体の測定に関する研究, 日内分泌学誌, 57: 1223-1238, 1981.
- 5) Stewart, A.F., Insogna, K. L., Goltzman, D. and Broadus, A.E.: Identification of adenylate cyclase-stimulating activity and cytochemical glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in extracts of tumours from patients with humoral hypercalcemia of malignancy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 80: 1454-1462, 1983.
- 6) Shigeno, C., Yamamoto, I., Dokoh, S., Hino, M., Aoki, J., Morita, R. and Torizuka, K.: Co-purification of bone resorbing activity and adenylate cyclase stimulating activity from human tumours associated with the humoral hypercalcemia of malignancy. *Acta Endocrinol.*, 114: 18-26, 1987.
- 7) Smith, B.R. and Hall, R.: Thyroid-stimulating immunoglobulins in Graves' disease. *Lancet*, 2: 427-431, 1974.
- 8) Endo, K., Kasagi, K., Konishi, J., Ikekubo, K., Okuno, T., Takeda, Y., Mori, T. and Torizuka, K.: Detection and properties of TSH-binding inhibitor immunoglobulins in patients with Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 46: 734-739, 1978.
- 9) Konishi, J., Iida, Y., Kasagi, K., Misaki, T., Nakashima, T., Endo, K., Mori, T., Shinpo, S., Nohara, Y., Matsuura, N. and Torizuka, K.: Primary myxedema with thyrotrophin-binding inhibitor immunoglobulins. Clinical and laboratory findings in 15 patients. *Ann. Int. Med.*, 103: 26-31, 1985.
- 10) Kasagi, K., Konishi, J., Arai, K., Misaki, T., Iida, Y., Endo, K. and Torizuka, K.: A sensitive and practical assay for thyroid-stimulating antibodies using crude immunoglobulin fractions precipitated with polyethylene glycol. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 62: 855-862, 1986.
- 11) Kasagi, K., Konishi, J., Iida, Y., Tokuda, Y., Arai, K., Endo, K. and Torizuka, K.: A sensitive and practical assay for thyroid-stimulating antibodies using FRTL-5 thyroid cells. *Acta Endocrinol.*, 115: 30-36, 1987.
- 12) Konishi, J., Iida, Y., Endo, K., Misaki, T., Nohara, Y., Matsuura, N., Mori, T. and Torizuka, K.: Inhibition of thyrotropin-induced adenosine 3', 5'-monophosphate increase by immunoglobulins from patients with primary myxedema. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 57: 544-549, 1983.
- 13) Matsuura, N., Yamada, Y., Nohara, Y., Konishi, J., Kasagi, K., Endo, K., Kojima, H. and Wataya, K.: Familial neonatal transient hypothyroidism due to maternal TSH-binding inhibitor immunoglobulins. *N. Engl. J. Med.*, 303: 738-741, 1980.
- 14) Konishi, J.: Role of thyrotropin-receptor antibodies in primary hypothyroidism. In *Recent Progress in Thyroidology*, Apichati, V., Wannee, N., Eastman, C., Nagataki, S. (eds.), Crystal House Press, Bangkok, 1987, p.10-19.
- 15) Kasagi, K., Iida, Y., Konishi, J., Misaki, T., Arai, K., Endo, K., Torizuka, K. and Kuma, K.: Paired determination of thyroid-stimulating and TSH-binding inhibitory activities in patients with Graves' disease during antithyroid

- drug treatment. *Acta Endocrinol.*, 111: 474–480, 1986.
- 16) Gardner, J.D. and Jensen, R.T.: Regulation of Pancreatic Enzyme Secretion In Vitro. *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. 2: 831–871, L.R. Johnson (ed.), Raven Press.
- 17) Dehayé, J.P., Winand, J., Poloczek, P. and Christophe, J.: Characterization of muscarinic cholinergic receptors on rat pancreatic acini by n - 3 H-methylscopolamin binding. *J. Biol. Chem.*, 259: 294–300, 1984.
- 18) Pandol, S.J. and Schoeffield, M.S.: 1, 2-Diacylglycerol, protein kinase C, and pancreatic enzyme secretion. *J. Biol. Chem.*, 261: 4438–4444, 1986.