

イソスリン様成長因子Ⅱ（IGF-Ⅱ）およびその結合蛋白の生理的役割と疾患における変動

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 竹谷, 良平 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8433

インスリン様成長因子Ⅱ (IGF-Ⅱ) およびその結合蛋白の 生理的役割と疾患における変動

金沢大学医学部小児科学講座 (主任: 谷口 昂教授)

竹 谷 良 平

(平成5年2月2日受付)

インスリン様成長因子Ⅱ (insulin-like growth factor Ⅱ, IGF-Ⅱ) は胎児期における個体の成長や分化に関与する可能性が示唆されているが、ヒトにおける生理的ならびに臨床的意義については未だ十分に解明されていない。その意義を明らかにするため、今回 IGF-Ⅱ の測定系を確立し、小児期を中心に各種体液中の IGF-Ⅱ 濃度ならびにインスリン様成長因子結合蛋白 (insulin-like growth factor binding protein, IGFBP) を測定し、さらに子宮内発育不全児およびモデルラットにおける IGF-Ⅱ の動態について検討した。臍帯血中の IGF-Ⅱ は在胎週数および生下時体重と有意に相関し胎児胎盤系との関連が示唆された。また妊娠末期に増加した母親血中 IGF-Ⅱ は分娩後数日で速やかに正常化し胎児胎盤系と母体血中 IGF-Ⅱ との関連が窺われた。年齢的推移では生後数日で増加し、思春期に増加傾向を示すほかは乳児期より成人まで有意な変化はみられなかった。血中 IGF-Ⅱ の存在様式はウエスタンブロッティング上 7.5kilo-dalton (kD) が主体でわずかに 15kD の高分子量 IGF-Ⅱ がみられた。各種病態下における検討では成長ホルモン (growth hormone, GH) 欠損児の IGF-Ⅱ 値は低値で GH 治療により明らかに増加し、IGF-Ⅰ の変化と有意の正相関を示した。肝不全、潰瘍性大腸炎、インスリン依存型糖尿病症例では急性期に低下し、病態の改善とともに正常化した。以上の所見より IGF-Ⅱ は IGF-Ⅰ 同様に GH 依存性で、主に肝臓で産生され、栄養状態に左右されて変化することが示唆された。腎不全では有意に増加し、ウエスタンブロッティング上 15/12kD の高分子量の増加が顕著であり、腎クリアランス低下との関連が想定された。尿中 IGF-Ⅱ は小児期を通じて年齢の変動はなく、各種腎炎疾患の尿中 IGF-Ⅱ は正常対照と差はなかった。また尿尿や蛋白尿の程度とも関連しないことより、腎炎の臨床的指標とはならなかった。尿中 IGFBP は糸球体疾患で IGFBP-3 や BP-2 が、尿細管障害では IGFBP-1 が多く排泄されており、臨床的マーカーとなり得る可能性が示された。髄液中 IGF-Ⅱ は小児期を通じて変動はみられず、脳炎、脳腫瘍の一部の症例で増加がみられたが一定の傾向はなかった。髄液中の IGFBP がは BP-1, BP-2 が主体で、中枢神経系の炎症で増加した。特に BP-2 は IGF-Ⅰ に比して IGF-Ⅱ への親和性が強く、中枢神経系局所における IGF-Ⅱ の生物活性を制御する可能性が想定された。ついで子宮内発育不全 (intrauterine growth retardation, IUGR) についてヒト、ラットで検討した。在胎30週以降の不当軽量 (small for dates, SFD) 児の臍帯血中 IGF-Ⅱ は相当体重 (appropriate for dates, AFD) 児に比して有意に低値であり、また血中 IGFBP は SFD 児において BP-1 が増加し、BP-3 は減少した。母体の絶食やデキサメサゾン投与による IUGR ラットでは脳や肝臓など組織の IGF-Ⅱ 含有量は減少し、またヒトと同様に血中 IGFBP は BP-1 が増加し BP-3 が減少した。脳、肝臓、胎盤などの組織 IGF-Ⅱ 受容体の結合容量は IUGR ラットにおいて有意に増加した。以上の成績より、IGF-Ⅱ は胎生期における個体や臓器の成長、発達に関与し、IGFBP や IGF-Ⅱ 受容体の変化が局所における IGF-Ⅱ の生物活性発現を修飾するものと推察された。

Key words insulin-like growth factor (IGF), IGF-binding protein (IGFBP), IGF receptor, intrauterine growth retardation (IUGR)

インスリン様成長因子 (insulin-like growth factor, IGF) には IGF-Ⅰ と IGF-Ⅱ の 2 種類あることが知られている¹⁾。IGF-Ⅱ は 67 個のアミノ酸よりなり、分子量は 7.5kilo-dalton (kD) の酸性のポリペプチドで IGF-Ⅰ と 60% の類似性をもつ²⁾。近年実験動物の各種組織において IGF-Ⅱ の m-RNA や特異的受容体の発現が確認されていてその生理的役割が注目されている³⁾。IGF-Ⅰ は成長ホルモン (growth hormone, GH) 依存性が強く、軟骨成長作用が優位でその生理的、臨床的意義について

は多くの報告がなされている⁴⁾。一方 IGF-Ⅱ は動物実験において胎生期成長/分化に関与している可能性が指摘されているが⁵⁾、ヒトにおける臨床的検討はほとんどされていない。また、IGF は血中、尿および脳脊髄液など各種体液中で特異的な IGF 結合蛋白 (IGF binding protein, IGFBP) と結合して存在している。現在 IGFBP は BP-1 から BP-6 までの 6 種類が同定されており、各種体液中においてそれぞれ特徴的な存在様式を呈している。さらにこれらの IGFBP は IGF の生理的活性を制

Abbreviations: AFD, appropriate for dates; BP, binding protein; BW, body weight; Cr, creatinine; CRF, chronic renal failure; CSF, cerebrospinal fluid; GH, growth hormone; GHND, growth hormone neurosecretory dysfunction; IGFBP, insulin-like growth factor binding protein; IGF, insulin-like growth factor; IDDM,

御することが知られている⁹⁻¹¹⁾。また、それぞれの IGFBP は IGF-I/IGF-II に対する親和性が異なっている。従って、IGF-II の生理的役割を検討するにあたりこの IGFBP の動態を同時に解析することが重要である。しかし、IGF-II と IGFBP の生理的あるいは臨床的意義については未だ十分には解明されていない。本研究は IGF-II の測定系を確立するとともに小児期の生理的ならびに病的状況下における血液、髄液および尿中 IGF-II、IGFBP について検討した。また、妊娠ラットを用い、絶食又はデキサメサゾン投与により子宮内発育不全 (intrauterine growth retardation, IUGR) モデルを作製し、胎児成長における IGF-II、IGF-II 受容体そして IGFBP の動態、役割について検討した。

対象および方法

1. 対象

1. 血清、髄液および尿

在胎20~40週の臍帯血143例、正常コントロールとして血清104例(年齢1カ月~40歳、男性60名女性44名)、髄液35例(年齢1カ月~14歳、男性21名女性14名)、尿30例(年齢1カ月~40歳、男性18名女性12名)の対照群を設定し、金沢大学付属病院小児科および関連施設に通院または入院していた下垂体性小人症33名、成長ホルモン分泌調節神経機構異常症 (growth hormone neurosecretory dysfunction, GHND) 4名、シルバー症候群4名、体質性低身長27名、ターナー症候群5名、思春期早発症5名、IUGR 4名、腎不全6名、肝不全2名、インスリン依存性糖尿病 (insulin-dependent diabetes mellitus, IDDM) 14名、白血病8名(急性リンパ性白血病7名、急性骨髄性白血病1名)、固形腫瘍8名(ウイルス腫瘍3名、神経芽細胞腫2名、悪性リンパ腫2名、横紋筋肉腫1名)、潰瘍性大腸炎1名の血清を、髄腔内化学療法を施行した白血病患者12名、髄膜白血病1名、髄芽細胞腫1名、先天性トキソプラズマ症2名、ウイルス性脳炎4名、ライ症候群1名、ギランバレー症候群1名の髄液を、急性糸球体腎炎20名、慢性糸球体腎炎8名、IgA 腎症25名、膜性増殖性糸球体腎炎 (membranoproliferative glomerulonephritis, MPGN) 5名、紫斑病性腎炎5名、ループスエリテマトーデス2名の尿を対象とした。

2. IUGR ラット

妊娠第14日目のウイスター系雌ラットを用い、以下3群のプロトコールに従って IUGR ラットを作製した。

1) 妊娠第15日目より母親ラットを5日間絶食とし妊娠20日目に胎児を摘出した。

2) 妊娠第16日目より母親ラットに対してデキサメサゾン (デカドロン[®]) を0.4mg 4日間腹腔内注射を施行し、妊娠第20日目に胎児を摘出した。

3) 1) に対しては絶食とせず、2) に対しては生理食塩水を腹腔内投与した母親ラットの胎児を正常対照群として作製した。この操作により作製した IUGR ラットより採血し、併せて胎盤、脳、および肝臓を摘出した。血液は血清分離後測定までの間-20℃で保存し、胎盤、腎は以下に述べる方法でそれぞれ実験に使用した。

II. 方法

1. ペプチド

IGF-I、IGF-II は遺伝子工学により作製されたヒト IGF-I (recombinant human IGF-I, rhIGF-I) (藤沢薬品、東京より提供) およびヒト IGF-II (rhIGF-II) (Amersham 社、Amersham, 英国) を、またヒトインスリン (和光純薬工業、大阪) を用い標準曲線、交叉性試験に使用した。

2. IGF-II の曲線

各種体液、組織中の IGF-II 定量にあたりあらかじめ以下のごとく抽出操作を施行した。

1) 血清および尿

血清は Daughaday ら¹²⁾の方法に従って酸-エタノール抽出した後ラジオイムノアッセイ (radioimmunoassay, RIA) 緩衝液 (50mM 磷酸緩衝液, 0.1% NaCl, 0.1% エチレンジアミン四酢酸, 0.1% NaN₃, 0.02% 硫酸プロタミン, 0.05% Tween-20, pH 7.5) にて希釈し検体とした。尿はウサギ免疫グロブリン (SIGMA 社, St. Louis, 米国) を最終濃度として 10mg/ml となるように添加した後、酸-エタノール抽出し更に凍結乾燥した後 RIA 緩衝液で溶解して検体とした。

2) 髄液

髄液は酸性条件下ゲル濾過法により抽出した。すなわち髄液 0.5ml に対して 30μl の酢酸を添加して酸性にし、ゲル濾過カラム (スーパーローズ HR10/30 カラム 1.0×30cm, Pharmacia 社, Uppsala, スウェーデン) にかけて。酸性移動相 (1M 酢酸, 150mM NaCl, 0.02% NaN₃) で 0.5ml/分にて溶出 (FPLC システム, Pharmacia 社) し ¹²⁵I-IGF-II に相当する分画を凍結乾燥した後 RIA 緩衝液に溶解して検体とした。

3) 組織からの抽出法

組織中 IGF-II は Lee らの方法¹³⁾に従ってギ酸アセトン法を用いて抽出した。すなわち組織に4倍量の 3.3M ギ酸/0.5% Tween20 を加え均質化し、40,000×g で10分間遠心した。この上清 150μl を90℃30分間加熱した後、アセトン 350μl を加え、15分間3,000×g で遠心した。上清を乾固し RIA 緩衝液で溶解して検体とした。

3. IGF-II RIA

IGF-II RIA は Lee らの方法¹³⁾に従って施行した。RIA 緩衝液にて適当に希釈した IGF-II 標品 (Amersham 社) あるいは被検検体 100μl に抗 IGF-II 抗体 (天野薬品, 名古屋) 100μl を 500pg/tube となるように添加し、4℃24時間放置した。ついで ¹²⁵I-IGF-II (Amersham 社) 50μl (~10,000cpm/tube) を添加し更に4℃24時間放置した。0.1%ゼラチン加 RIA 緩衝液にて200倍に希釈した正常マウス血清 (Cappel 社, West Chester, 米国) 200μl および10%ポリエチレングリコール/0.005%フェノールレッド加 RIA 緩衝液にて400倍希釈した抗マウス免疫グロブリン G (immunoglobulin G, IgG) (Cappel 社) 1ml を添加して20℃2時間静置し、30分の遠心後沈査の放射活性を測定した。各検体の IGF-II 値は IGF-II 標品で作製した標準曲線から算出した。

4. 血中 IGF-II の存在様式

血清を酸エタノール抽出し凍結乾燥した後、原血清に対し5

insulin-dependent diabetes mellitus; Ig, immunoglobulin; IUGR, intrauterine growth retardation; kD, kilo-dalton; MPGN, membranoproliferative glomerulonephritis; RIA, radioimmuno assay; SDS, sodium dodecyl sulfate; SFD, small for dates; SM-C, somatomedin-C

倍希釈となるように 50mM 磷酸緩衝液に溶解して検体とした。被検検体あるいは IGF-II 標品 80 μ l に処理液 (125mM トリス, 2%ドデシル硫酸ナトリウム, 50%グリセリン) 20 μ l を加えた後 2分間煮沸した。その 20 μ l を16%ポリアクリルアミド細孔ゲルを用い, 40mA, 1時間で電気泳動を行った。泳動終了後, 分離したペプチドをエレクトロブロット装置 (ホライズブロット[®] ATTO 社, 東京) を用い, ニトロセルロース膜 (Hybond-ECL, Amersham 社) に 200mA, 1時間で転写した。転写されたニトロセルロース膜を 5%スキムミルク加磷酸緩衝液にてブロッキングし, 一次抗体 (抗 IGF-II 抗体, 天野薬品) を添加し 4 $^{\circ}$ C 16時間放置した, 次いで二次抗体 (\times 2000 ペルオキシダーゼ標識抗マウス Ig, Amersham 社) を添加し化学発光を利用したウエスタンブロット検出システム[®] (Amersham 社) を用い X線フィルム (Hyper film-ECL[®] Amersham 社) に露光しオートラジオグラフィーを施行した。分子量は 6種類の蛋白から成る分子量マーカー (Bio-Rad, Richmond, 米国) の泳動パターンから算出した。

5. 各種体液 IGF-II BP の存在様式

血清は10倍希釈し, 髄液は生体溶液試料濃縮剤 (ATTO 社) で 5倍濃縮し検体とした。尿は磷酸緩衝液に対して24時間透析した後, 凍結乾燥し 50mM 磷酸緩衝液 pH7.4に原尿の20倍濃縮となるように溶解し検体とした。各検体 20 μ l を10%ポリアクリルアミド細孔ゲルを用い電気泳動を行った後, Hossenlopp らの方法¹⁴⁾に従い, ウエスタンリガンドブロット法を施行し検討した。ニトロセルロース膜に転写した後, 1% (v/v) トリトン-X加 150mM NaCl 0.1Mトリス pH7.4で30分間洗浄することにより内因性の IGF-II を取り除き, 5%スキムミルク加磷酸緩衝液にてブロッキングした。¹²⁵I-IGF-II (\sim 0.5 μ Ci) を添加し 4 $^{\circ}$ C 20時間放置した後, バイオイメージアナライザー BA100 (富士写真フィルム, 神奈川) を用いて各分画の定量を行った。一部の検体では X線フィルム (Hyper film-ECL[®] Amersham 社) にカセット内で -20 $^{\circ}$ C, 2時間密着露光することによって, オートラジオグラフィーを行った。また, 分子量は先述した分子量マーカーの泳動パターンから算出した。

6. ラット各臓器の IGF-II 受容体の定量

母親ラットから摘出した胎盤, 胎児ラットから摘出した脳, 肝臓について 10 μ m の凍結切片を作製し, Lesniak らの方法¹⁵⁾

に従って施行した。すなわち作製した切片を 4 $^{\circ}$ C の 50mM 磷酸緩衝液で10分間, 2回洗浄し, ¹²⁵I-IGF-II (\sim 0.02 μ Ci) を添加し室温にて6時間静置した後, 再び 4 $^{\circ}$ C の 50mM 磷酸緩衝液で1分間, 5回洗浄した。各臓器の IGF 受容体はバイオイメージアナライザー-BA100 で定量, 解析した。

7. 尿中クレアチニンの測定

市販のクレアチニン測定キット (クレアチニン-テスト, ワコー[®] 和光純薬工業) を用いて尿中クレアチニンを測定した。

8. 尿蛋白, 尿潜血の定性

尿蛋白, 尿潜血の定性には尿検査試験紙 (エームス尿検査試験紙[®], マイルス三共株式会社, 東京) を用いた。

9. 統計学的処理

得られた数値は平均 \pm 標準偏差で示した。2群間の平均値の差の検定には Student-t. 検定を, 他群間の平均値の差の検定には一元配置分散分析法後 Scheffe または Duncan の多重比較法を用いた。危険率 5%以下を統計学的に有意差ありと判定した。

成 績

I. 本 IGF-II 測定法による IGF-II の標準曲線とその反応特異性

ラジオイムノアッセイによる IGF-II の標準曲線は抗 IGF-II 抗体の添加量により大きく左右された。すなわち 10ng/tube 添加時には特異的結合は約45%得られたが1/2最大結合能は 5 \sim 6ng/ml と低感度であった。一方 0.5ng/tube 時には特異的結合は約25%であったが1/2最大結合能は 0.7 \sim 0.8ng/ml と高感度であった。従って以下の実験では一次抗体は 0.5ng/tube とした。図1に IGF-II の標準曲線ならびに IGF-I, インスリンとの交叉性を示す。IGF-I とは約 2 \sim 3%に交叉し, インスリンとの交叉性はみられなかった。

II. 血中 IGF-II の検討

1. 生理的変動

1) 血中 IGF-II の年齢別推移

図2に各年齢毎に IGF-II の正常値を示した。臍帯血では平均 351.6 \pm 52.9ng/ml, 0 \sim 1歳 445.9 \pm 103.9ng/ml, 1 \sim 5歳 472.8 \pm 133.3ng/ml, 5 \sim 10歳 565.2 \pm 132.0ng/ml, 10 \sim 15歳 691.1 \pm 109.2ng/ml, 成人 544.9 \pm 134.1ng/ml であり, 臍帯血では成人対照に比較して有意に低値であり, また思春期に一

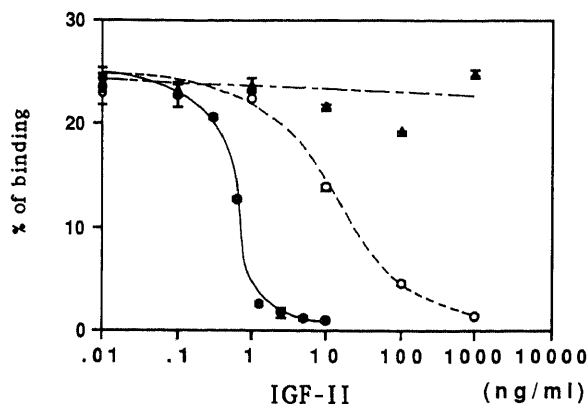


Fig. 1. The standard curve of radioimmunoassay for IGF-II and the cross-reactivity to insulin and IGF-I. Vertical bars indicate mean \pm SD. ●, IGF-II; ○, IGF-I; ▲, Insulin.

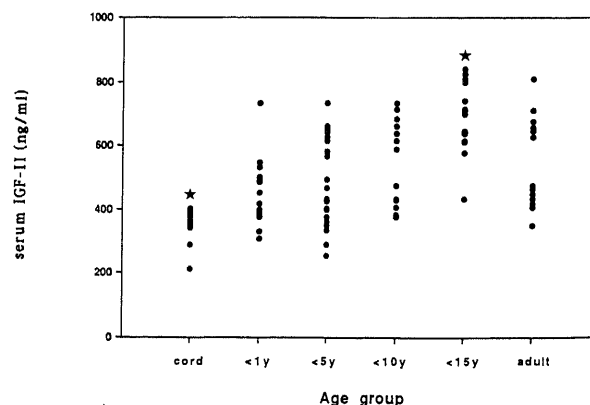


Fig. 2. Human serum IGF-II levels in each age group. ★, $p < 0.05$ vs adult.

致して有意に高値であった。

2) 分娩前後の母体ならびに胎児血中 IGF-II の検討

母体血中 IGF-II は分娩後 4 日で速やかな減少を認めた (図 3-a) のに対して胎児血中 IGF-II は上昇傾向を認めた (図 3-b)。

3) ヒト臍帯血中の IGF-II の検討

臍帯血中 IGF-II は在胎週数ならびに生下時体重いずれとも有意に正相関した (図 4a, b)。

4) SFD 児と AFD 児の臍帯血中 IGF-II の比較

各週数において不当軽量 (small for dates infant, SFD) 児と相当体重 (appropriate for dates infant, AFD) 児に別けてヒト臍帯血中 IGF-II を検討したところ SFD 児, AFD 児それぞれ <30週で 229.2±9.9ng/ml, 215.3±15.3ng/ml, <35週で 207.4±23.8ng/ml, 222.5±19.4ng/ml, <40週で 235.2±25.5ng/ml, 264.0±31.2ng/ml と30週以上で IGF-II は AFD 児で有意に高値であった (図 5)。

5) ヒト臍帯血中 IGF-BP の検討

表 1 に SFD 児と AFD 児の各週数別の IGF-BP の変化を示した。<40週で有意に SFD 児で IGF-BP の BP-1 は増加し, BP-3 は減少を認めた。他の週数では同様の変化がみられた。しかし BP-2, BP-4 に関しては SFD 児と AFD 児間の明らかな差はみられなかった。

2. 各疾患群による IGF-II の変動

1) 血中 IGF-II 値

図 6 に各疾患群における血清中の IGF-II 値を示した。GH 欠損患者では GH 未治療群の血清 IGF-II は有意に低く, GH 治療群では正常対照と比較して有意な差は認められなかった。GHND, シルバー症候群, 体質性低身長, ターナー症候群, IUGR 症例においてはパラツキが大きく一定の傾向はみられなかった。思春期早発症, CRF 症例では有意に高値, 一方 IDDM 症例では有意に低値であった。白血病, 固形腫瘍では正常または一部症例高値を示した。また肝不全症例では症例数は

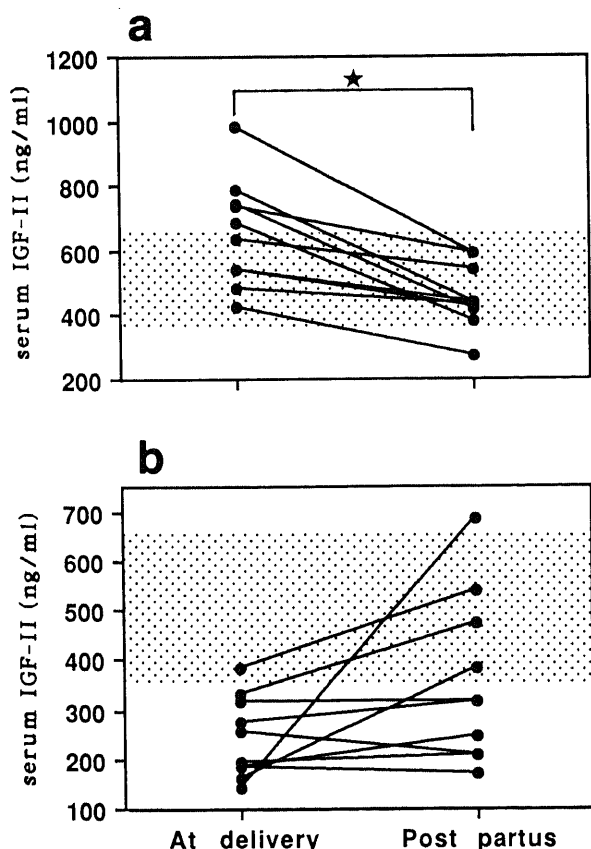


Fig. 3. Serum IGF-II in pregnant mothers (a) and infants (b). (a) Changes in serum IGF-II in pregnant mothers at delivery and four days later. The shaded area indicates the mean±SD of serum IGF-II levels in control subjects. ★, p<0.05. (b) Changes in serum IGF-II in cord blood and infants on 6 post natal days. The shaded area indicates the mean±SD of serum IGF-II levels in control subjects.

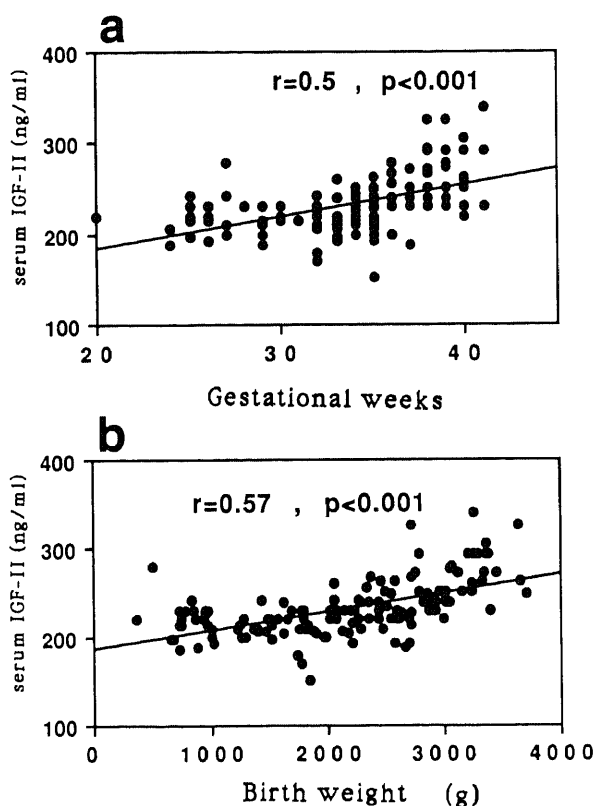


Fig. 4. The correlation between human cord blood IGF-II levels and gestational weeks (a)/birth weights (b).

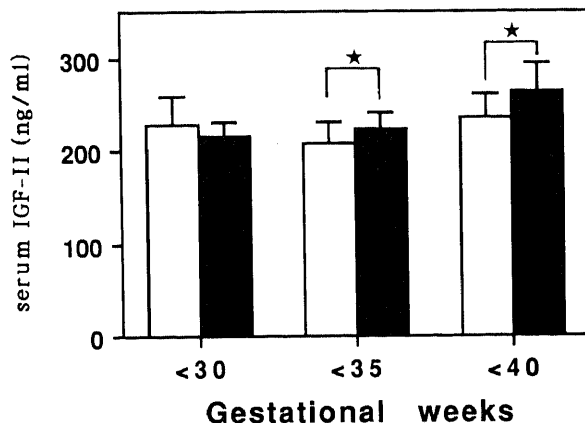


Fig. 5. Comparison of cord IGF-II in small for date infant (SFD) with those in appropriate for date infant (AFD) during gestational stage. Each value was presented as mean±SD. □, SFD; ■, AFD. ★, p<0.05.

Table 1. Comparison of serum IGFBP pattern between SFD and AFD as a function of gestational weeks

G. W.	IGFBP Type	SFD	AFD	p-value
<30W	BP-1	107.5±136.1	55.7±39.6	n. s.
	BP-2	246.0±329.9	286.3±194.4	n. s.
	BP-3	69.8±42.7	99.0±12.8	n. s.
	BP-4	10.0±9.0	12.3±3.2	n. s.
<35W	BP-1	36.5±25.2	29.0±2.0	n. s.
	BP-2	283.9±191.5	244.0±41.2	n. s.
	BP-3	61.9±37.1	93.7±13.7	n. s.
	BP-4	12.3±5.4	15.3±2.1	n. s.
<40W	BP-1	58.7±14.3	38.9±2.9	p<0.05
	BP-2	343.8±96.7	308.8±30.7	n. s.
	BP-3	101.3±38.1	162.2±15.9	p<0.03
	BP-4	35.4±11.4	41.6±8.0	n. s.

(AU/mm²)

Each value is presented as mean±SD.

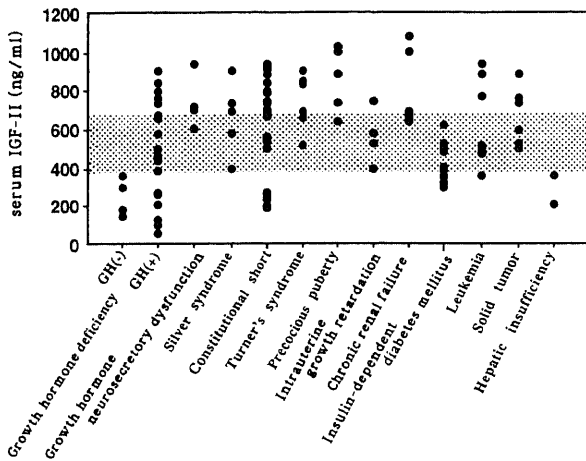


Fig. 6. Serum IGF-II values in the patients with various disorders in children. The shaded area indicates the mean±SD of serum IGF-II levels in normal control subjects. GH (-), growth hormone untreated; GH (+), growth hormone treated.

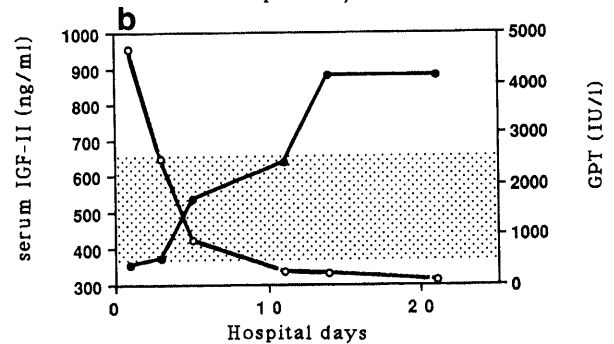
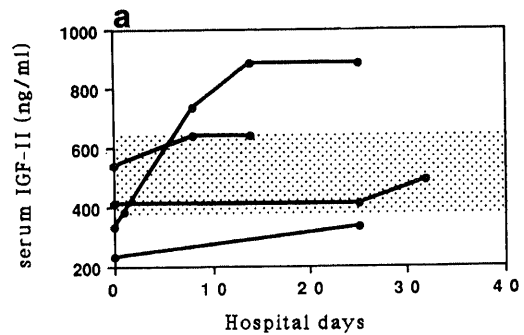


Fig. 8. IGF-II and glutamic pyruvic transaminase (GPT) levels in the patients of insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) (a) and drug induced hepatic insufficiency (b). (a) Changes in serum IGF-II in four cases with IDDM during insulin therapy. The shaded area indicates the mean±SD of serum IGF-II levels in control subjects. (b) Changes in plasma IGF-II and GPT in a patient with drug induced hepatic insufficiency during hospital course. The shaded area indicates the mean±SD of serum IGF-II levels in control subjects. ●, IGF-II; ○, GPT.

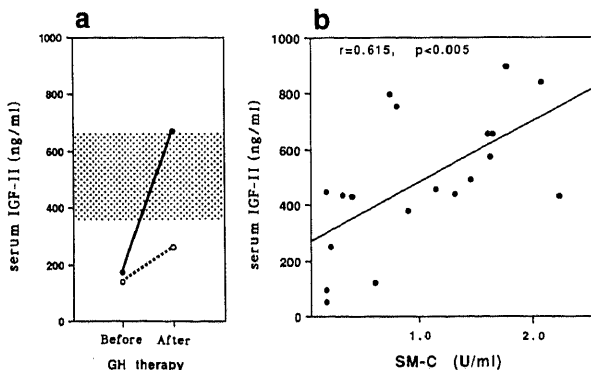


Fig. 7. IGF-II levels in patients of GH deficiency. (a) Changes in serum IGF-II levels in two patients with GH deficiency before and 6 months after GH therapy. The shaded area indicates the mean±SD of serum IGF-II levels in control subjects. (b) Correlation between serum SM-C and IGF-II in GH deficient children.

少ないが明らかに低値であった。

次いで個々の症例について経時的に検討した。GH 欠損患者で GH 治療前後に測定した 2 症例はいずれも治療後 IGF-II の回復傾向がみられた (図 7-a)。GH 欠損患者 (GH 治療, 未治療とも含む) において直接法にて測定した SM-C と IGF-II とは有意に正相関した (図 7-b)。なお図には記載しなかったが GH 結合タンパクの著減したラロン型と思われる小人症例では IGF-II = 100ng/ml と明らかに低値で, GH 4 U/日連続 5 日間筋注によるソマトメジン産生試験後においても 147ng/ml と正常化しなかった。IDDM の IGF-II は低下していたが HbA_{1c} との間には有意の相関はみられなかった。ただ IDDM 初発時より経時的に検討した 4 症例ではいずれも入院後血糖コントロールの改善とともに IGF-II は回復傾向を示した (図 8-a)。

薬剤性の肝不全 1 症例の経時的検討では病態の改善とともに IGF-II も暫時増加した (図 8-b)。潰瘍性大腸炎の 3 歳男児例では高カロリー輸液による栄養改善/体重増加とともに IGF-II は回復傾向を示した (図 9)。ウイルス腫瘍の一症例で腫瘍摘出前後の経時的検討では腫瘍摘出前で 480ng/ml, 摘出後 15 日目で 440ng/ml と IGF-II の変動はほとんどなかった。

2) 血中 IGF-II の存在様式

図 10 に示すように血中 IGF-II はウエスタンブロッティング上,

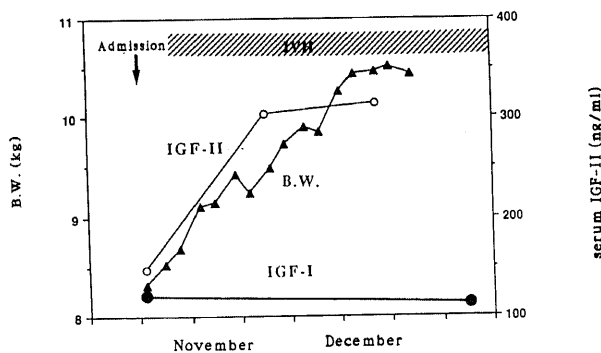


Fig. 9. Changes in serum IGF-I, IGF-II and body weight (B.W.) in a patient with ulcerative colitis during intravenous hyperalimentation (IVH). ●, IGF-I; ○, IGF-II; ▲, B.W..

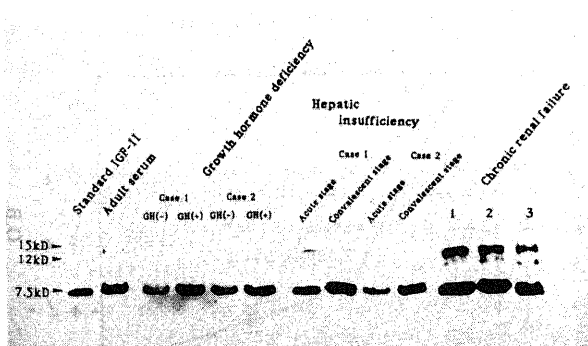


Fig. 10. Western blot analysis of serum IGF-II in adult control and patients with growth hormone deficiency (GH deficiency), hepatic insufficiency and chronic renal failure (CRF). Changes in serum IGF-II patterns in patients with GH deficiency with (+) or without (-) GH therapy and hepatic insufficiency in an acute stage or a convalescent stage is indicated. The right three lanes are three cases with CRF.

分子量 7.5kD, 15kD の 2 つのバンドとして抗 IGF-II 抗体存在下に特異的に検出された。コントロールでは分子量 7.5kD の IGF-II が主体で, 12kD や 15kD の高分子量の IGF-II はわずかに認めるのみであった。GH 欠損患者では GH 治療により, また肝不全患者は病態の改善とともに分子量 7.5kD の IGF-II が増加した。一方, 腎不全患者の IGF-II は増加していたが 7.5kD に加え 12kD, 15kD の高分子量の IGF-II が顕著に増加していた。

III. 髄液中 IGF-II および IGFBP の検討

1. 髄液中 IGF-II の年齢別推移

図 11 に各年齢毎の髄液中 IGF-II の正常値を示した。0 ~ 1 歳 14.0 ± 1.9ng/ml, 1 ~ 5 歳 19.0 ± 7.2ng/ml, 5 ~ 10 歳 15.7 ± 3.9ng/ml, 10 ~ 15 歳 18.7 ± 4.0ng/ml と各年齢において有意な差は認めなかった。

2. 各種疾患における変動

図 12 に各疾患群における IGF-II 値を示した。髄芽細胞腫, 先天性トキソプラズマ症, ウイルス性脳炎, ギランバレー症候群の一部の症例で髄液中 IGF-II 値の上昇みられた。

3. 髄液中 IGFBP

髄液中 IGFBP はウエスタンブロッティング法により主に

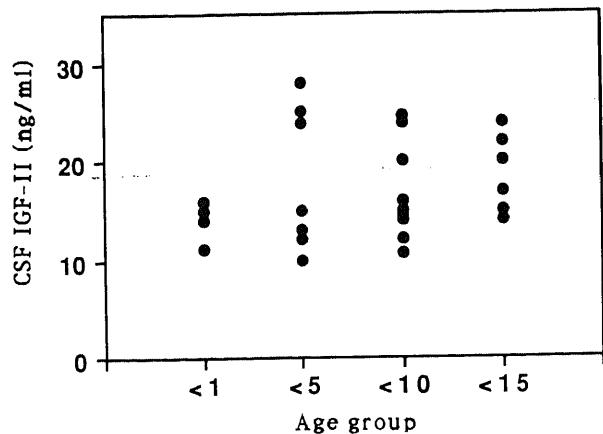


Fig. 11. Human cerebrospinal fluid (CSF) IGF-II levels in each age group.

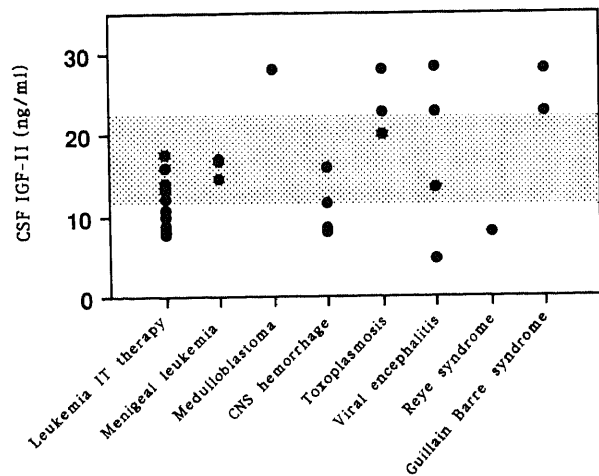


Fig. 12. CSF IGF-II in patients with various CNS disorders. The shaded area indicates the mean ± SD of CSF IGF-II in normal control subjects.

34kd, 31kd, 24kd の蛋白として出現した。これらはそれぞれ BP-2, BP-1, BP-4 に相当する。また成人とは異なるが, 15歳以下では年齢による変動はみられなかった。髄液中 IGFBP の内, 特に BP-2 と BP-1 は IGF-1 に比較して IGF-II とより高い親和性を示した (図 13-a)。髄芽細胞腫, 中枢神経系の炎症疾患や出血, 先天性トキソプラズマ症で髄液中 BP-2 と BP-1 は量的に増加した。BP-3 は対照の髄液中ではみられなかった上記疾患の中には増加したのもあった。BP-4 については明ら

かな変化はみられなかった。悪性リンパ腫症例の中中枢神経系再発時の経時的検討では11月29日, 髄液中細胞数220/3, 蛋白 29mg/dl, 12月4日, 細胞数20/3, 蛋白 159mg/dl, 12月11日, 細胞数10/3, 蛋白 82mg/dl と髄液中蛋白に比例して髄液中 IGFBP は全体として量的に増加し, 髄腔内への化学療法により髄液中蛋白, 髄液中 IGFBP 共減少していった (図 13-b)。しかし, 髄液中 IGF-II 値は経過中 14.6~17.2ng/ml と明らかな変動はみられなかった。

Ⅳ. 尿中 IGF-II および IGFBP の検討

1. 尿中 IGF-II の年齢別推移

図14に各年齢毎に尿中 IGF-II の正常値を示した。0~1歳 $9.2 \pm 3.1 \text{ ng/mg} \cdot \text{Cr}$, 1~5歳 $7.3 \pm 0.6 \text{ ng/mg} \cdot \text{Cr}$, 5~10歳 $7.0 \pm 2.5 \text{ ng/mg} \cdot \text{Cr}$, 10~15歳 $8.2 \pm 4.4 \text{ ng/mg} \cdot \text{Cr}$, 成人 $4.6 \pm 4.4 \text{ ng/mg} \cdot \text{Cr}$ と成人を除き小児期を通して年齢による変動はみられなかった。

2. 各疾患群における尿中 IGF-II の変動

図15に各疾患群における尿中 IGF-II を示した。急性糸球体腎炎症例の一部で尿中 IGF-II の高い症例を認めたが, 各腎炎疾患において一定の傾向は認めなかった。急性糸球体腎炎症一

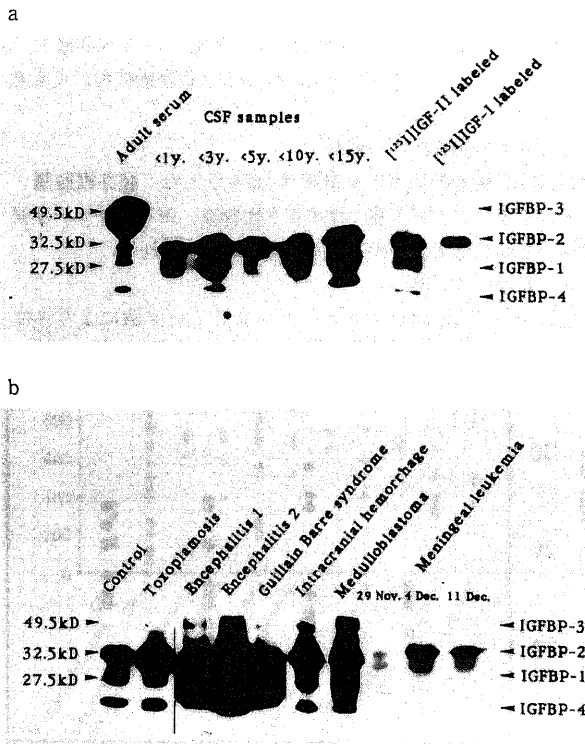


Fig. 13. Human serum IGFBP and CSF IGFBP. (a) Western blot analysis of adult serum IGF binding protein (IGFBP) and CSF IGFBP in each age group. The right two lanes are CSF IGFBP labeled with ^{125}I -IGF-II and ^{125}I -IGF-I. (b) Western ligand blot analysis of CSF IGFBP in control and patients with various CNS diseases. The right three lanes are serial changes of CSF IGFBP in the course of meningeal leukemia therapy.

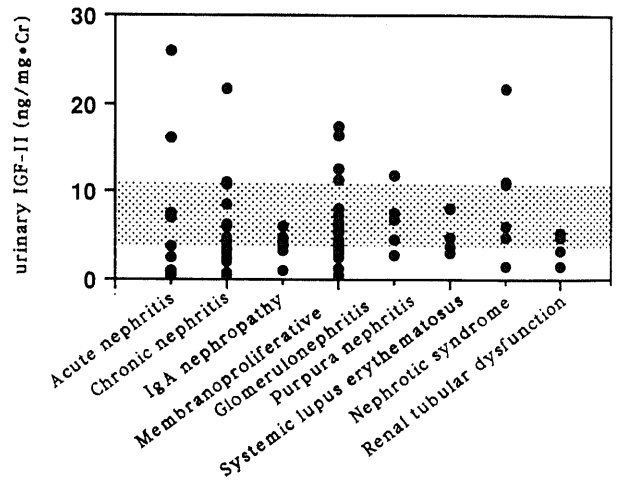


Fig. 15. Urinary IGF-II levels in the patients with various renal disorders. The shaded area indicates the mean \pm SD of urinary IGF-II in normal control subjects.

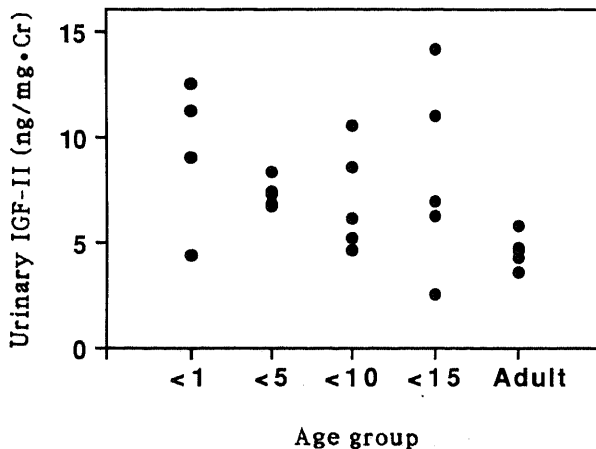


Fig. 14. Urinary IGF-II levels in each age group.

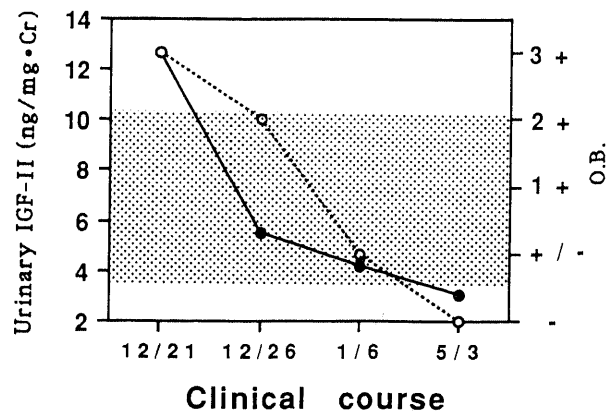


Fig. 16. Serial changes of urinary IGF-II and urinary occult blood (O.B.) in a patient with acute nephritis by therapy. The shaded area indicates the mean \pm SD of urinary IGF-II in normal control subjects. ●, IGF-II; ○, O.B.

例の経時的検討では初発時高かった尿中 IGF-II は尿潜血の改善とともに正常化した (図16)。また、腎炎疾患群において尿中 IGF-II と尿蛋白 (図 17-a) および尿潜血 (図 17-b) の程度との関連はみられなかった。

3. 尿中 IGFBP の検討

図18にコントロール, 糸球体疾患および尿細管障害の尿中

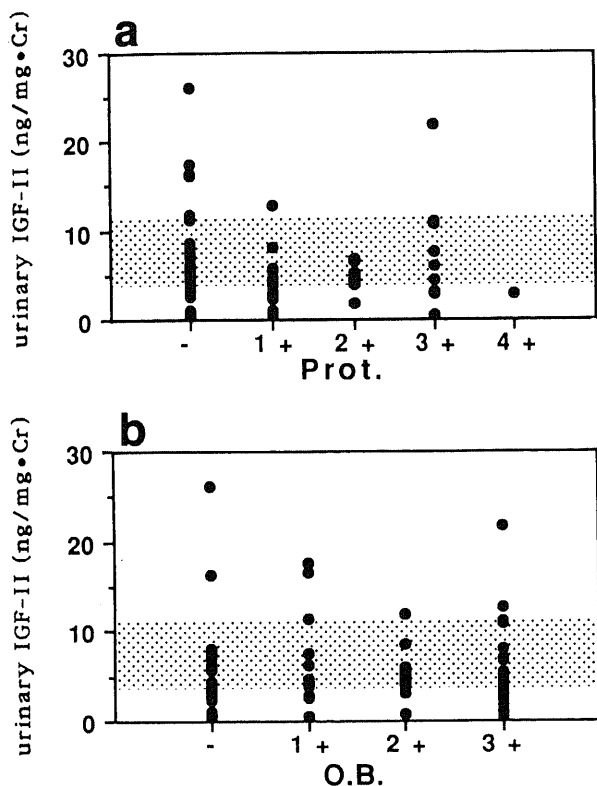


Fig. 17. The correlation between urinary IGF-II and urinary protein (Prot.) (a) or urinary occult blood (O.B.) (b). The shaded area indicates the normal ranges of urinary IGF-II.

IGFBP の存在様式を示した。糸球体疾患で BP-2, BP-3 が増加し, 尿細管障害では BP-1 の増加がみられた。

V. IGFBP における組織内 IGF-II 含量, IGF-II 受容体の変化

1. デキサメサゾン処置例

表2に母親にデキサメサゾンを処置した場合の IUGR ラットにおける, 体重, 各臓器の重量, IGF-II 含有量, IGF-II 受容体, IGFBP の変化を示した。コントロール群と比較してデキサメサゾン処置で体重と脳, 肝臓の重量は有意に低くなったが胎盤重量には有意な差はみられなかった。各臓器の IGF-II 含有量については脳で有意に低値になったが, 肝臓と胎盤では有意な差はみられなかった。血中 IGFBP では BP-1 が増加したが BP-3, BP-4 に変化はみられなかった。また各臓器の IGF-II 受容体については胎盤で有意な増加したが, 脳と肝臓では有意な差はみられなかった。

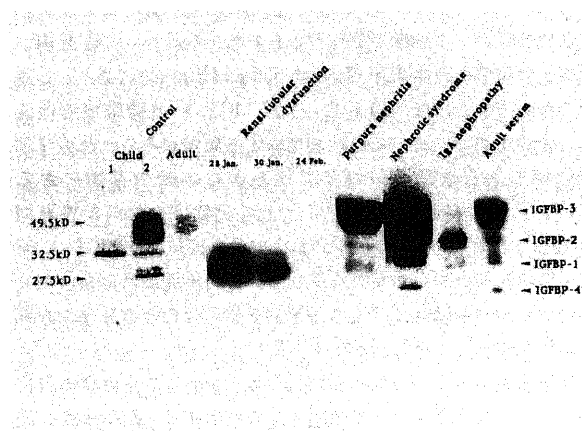


Fig. 18. Western blot analysis of urinary IGFBP i control and patients with renal tubular dysfunction, purpura nephritis, nephrotic syndrome and IgA nephropathy.

Table 2. Body weight, organ weight, tissue IGF-II content, IGF-II receptors and serum IGFBP levels in dexamethasone induced IUGR rats

		Experimental group		
		Dexamethasone	Control	p-value
Body weight(g)		3.19±0.31	5.30±0.31	p<0.001
Organ weight (g)	Brain	0.19±0.01	0.26±0.02	p<0.05
	Liver	0.09±0.02	0.22±0.07	p<0.008
	Placenta	0.24±0.03	0.25±0.06	n. s.
IGF-II content (ng/g·tissue)	Brain	5.9±1.5	10.2±2.3	p<0.015
	Liver	47.0±7.7	52.0±10.2	n. s.
	Placenta	48.8±13.0	64.0±16.0	n. s.
IGF-II receptor (AU/mm²)	Brain	2.42±0.46	1.71±0.58	n. s.
	Liver	10.41±2.79	6.33±1.66	n. s.
	Placenta	10.13±2.77	5.61±0.40	p<0.05
serum IGFBP (AU/mm²)	BP-1	38.51±7.28	22.23±9.81	p<0.02
	BP-3	1.49±0.21	2.08±1.14	n. s.
	BP-4	1.87±0.35	2.59±1.45	n. s.

Each value is presented as mean±SD.

2. 絶食例

表3に母親に絶食を施行した場合のIUGRラットにおいて、体重、各臓器の重量、IGF-II含有量、IGF-II受容体、IGFBPの変化を示した。絶食した場合、コントロール群と比較して体重と脳、肝臓、胎盤の重量が有意に低下した。各臓器のIGF-II含有量については脳、肝臓で有意に低値となったが胎盤では有意な差はみられなかった。血中IGFBPではBP-1が有意に増加しBP-3が減少したがBP-4に変化はみられなかった。また各臓器のIGF-II受容体については脳、胎盤で有意に増加したが、肝臓では差はみられなかった。

考 察

今回開発したIGF-II値測定系では、抗IGF-II抗体の添加量を500pg/tubeに減らし、また一次抗体を加えた24時間後に¹²⁵I-IGF-IIを加えることによって感度、特異性とも良好な測定系を確立することができた。本測定系はIGF-Iと約2~3%交叉したが、IGF-Iの正常値が300~400ng/ml前後であり、一方IGF-IIは400~800ng/mlであることを考慮すると実際の検体でIGF-Iの影響は僅かであると考えられた。本法を用いた成人対照群の血中IGF-II値は536±146ng/mlであり、これまでの報告例とほぼ一致していた¹⁶⁾。IGF-IIは臍帯血では低く、また思春期において僅かに増加する傾向がみられた他は年齢による大きな変動はなく、明らかな年齢依存性のあるIGF-I¹⁷⁾¹⁸⁾とは対照的であった。ただ症例数は少ないが思春期早発症でIGF-IIの上昇がみられており、IGF-IIがIGF-I同様に性ホルモンによる制御を受けている可能性が考えられた。この点については今後個々の思春期早発症例や治療経過や、思春期例を検討して更に明らかにしたい。

臍帯血中のIGF-IIは、在胎週数/生下時体重とも有意に正相関した。これまでラットでは胎児期に血中IGF-IIは高値を示し、生後減少していくため胎児における主要な成長因子はIGF-IIであると考えられている¹⁹⁾。また胎生期組織の成長や分

化に関与している可能性が指摘されている。しかしヒトでは胎児発育とIGF-Iとの関連があるといわれているが¹⁹⁾²⁰⁾、IGF-IIについては関連があるとする報告、ないとする報告両者があり一定しない^{20)~22)}。今回の検討ではIGF-IIが胎児発育調節の役割を持つという報告を支持するものであった。また、妊婦では分娩後速やかに血中IGF-II値は低下し、これまでの報告と一致した²⁰⁾。妊娠中のIGF-IIの増加は胎盤由来のヒト胎盤ラクトゲンの刺激によるといわれている²⁰⁾。一方、児では血中IGF-IIは生後速やかに上昇する傾向があった。試験管内実験ではIGF-IIはヒト胎盤の成長に関与するといわれているが²⁰⁾²³⁾²⁴⁾、生体内において胎児/胎盤系でのIGF-IIの産生、機能的役割については、今後解明されるべき課題である。

これまで胎児成長に重要と考えられている多くのホルモンやIGFを含む成長因子がヒト胎盤で作られていることは知られている。母親のIGFは血液胎盤関門を通ることはできず、胎児IGFは胎盤胎児部で合成されており、特に胎児の成長にはこの胎盤由来のIGFが重要な役割を担う可能性が示されている²⁰⁾²⁴⁾²⁵⁾。今回の検討でヒトSFD児とAFD児のIGF-II値については30週以上の週数で出生した児ではAFD児で有意に高値であり、胎児胎盤系で合成されるIGF-IIは胎児発育を左右する因子の一つと考えられた。また血中IGFBPはBP-3が低下し、BP-1が上昇する傾向がみられた。BP-3はIGF-Iに依存性が大きく、栄養状態に大きく左右され、またBP-1は血糖コントロールや糖代謝に速やかに対応して変動することが知られている。これらのIGFBPはいずれもIGFの生物活性を促進的もしくは抑制的に制御するといわれており⁹⁾、ヒトIGFBPの機序についてはIGF/IGFBP系が関与すると考えられた。

母親ラットにデキサメサゾンを経口投与または絶食を施行することによって、IUGRラット作成が可能であった。しかしいずれも胎盤のIGF-II含有量はコントロールと有意な差はなく、ラットのIUGRと胎盤由来のIGF-II自身の直接的関連は見出せなかった。胎盤のIGF-II mRNAが妊娠初期や末期に比

Table 3. Body weight, organ weight, tissue IGF-II content, IGF-II receptors and serum IGFBP levels in fasting induced IUGR rats

		Experimental group		p-value
		Fast	Control	
Body weight(g)		1.81±0.18	2.58±0.20	p<0.001
Organ weight (g)	Brain	0.14±0.01	0.16±0.01	p<0.05
	Liver	0.09±0.02	0.17±0.01	p<0.001
	Placenta	0.34±0.02	0.51±0.06	p<0.001
IGF-II content (ng/g·tissue)	Brain	6.5±0.5	8.0±0.9	p<0.01
	Liver	53.5±12.4	79.6±16.9	p<0.01
	Placenta	47.0±16.0	55.6±5.6	n. s.
IGF-II receptor (AU/mm ²)	Brain	1.76±0.29	1.28±0.42	p<0.03
	Liver	8.36±1.14	5.11±1.30	n. s.
	Placenta	7.64±0.19	2.02±0.08	p<0.001
serum IGFBP (AU/mm ²)	BP-1	45.83±9.87	31.67±3.09	p<0.02
	BP-3	1.25±0.23	2.05±0.48	p<0.01
	BP-4	2.91±0.30	3.57±0.79	n. s.

Each value is presented as mean±SD.

較して妊娠中期により多く発現する²⁵⁾ことから、今回妊娠末期に各手技を行ったことは胎盤発育、胎盤での IGF-II 合成をみるには、不適当であったかもしれない。一方、脳や肝臓などの一部臓器では組織重量の低下にともない、組織 IGF-II 含有量も有意に低下し、各臓器の発育に対し、IGF-II の関与が示唆された。

IGFBP についてはヒト IGFBP と同様に BP-1 の増加、BP-3 の減少が見られた。

ラット胎盤の IGF-II 受容体は IUGR 群で有意に増加した。IGF-I の場合は、局所のペプチド含量とその特異的受容体結合容量とは鏡像的な関係にあり、IGF-I がそれ自体の受容体数を減少することが知られている²⁶⁾。IGF-II 受容体についても、IGFBP の変動に伴う IGF-II の生理的活性の変化が、IGF-II 受容体を増加させている可能性がある。また子宮動脈を結紮して作製した IUGR ラットでは胎盤の IGF-II 受容体 mRNA が増加しており、IGF 受容体自体が IGF-II の turn over を促進させているという可能性も報告されている²⁷⁾。今回の IUGR ラットでみられた IGF-II 受容体の増加が二次的な変化なのか、あるいは病態の発症に一次的意味を有するかは、今後解明されるべき課題である。以上から胎児発育に関しては胎盤の発育、胎盤で合成される IGF-II、IGFBP、IGF 受容体の相互関係を考慮する必要があると考えられた。

IGF-II は IGF-I とは対照的に GH 依存性は比較的乏しいとされている^{10,28)}。しかし今回の検討では GH 欠損患者の IGF-II は低く、GH 治療により回復傾向がみられており Asakawa らの報告¹⁶⁾と同様であった。更に GH 受容体の動態を反映する GH 結合蛋白が減少することによって、組織 GH 受容体が量的に減少し、結果として GH 不応性となっている小人症例でも IGF-II は明らかに低く、GH 投与によっても IGF-II の上昇はみられなかった。以上の所見より、IGF-II が GH 受容体をも含めた GH の生物活性発現により制御されている可能性が示唆された²⁹⁾。実際 GH 欠損患者において IGF-II とソマトメジン C (somatomedin-C, SM-C) とが有意に正相関したこともこれを支持している。

潰瘍性大腸炎症例で高カロリー輸液による体重の増加、栄養状態の改善につれ血中 IGF-II は増加した。ラットにおいては短期間の絶食のような栄養状態の影響は少なく血中 IGF-II 濃度に変化はみられず³⁰⁾、ヒトにおいては神経性食欲不振症のような低栄養児で IGF-I 値同様血中 IGF-II も低下し、栄養状態の改善にともない正常化する^{16,31)}。今回の検討で血中 IGF-II は炎症性腸疾患にみられるような、長期間の栄養状態の評価の指標となりうるかもしれない。

腎不全症例の血中 IGF-II は有意に増加していたが、この所見はこれまででも多くの報告者によって指摘されている³²⁾。ウェスタンブロッティング法を用いた血中 IGF-II の存在様式では対照群では認められなかった分子量 15/12kD の高分子量 IGF-II の増加が明らかであった。高分子量の IGF-II は IGF-II の前駆体であるプロ IGF-II から最終的に 7.5kD の IGF-II になる過程での産物と考えられており³³⁾、直接的なインスリン様作用により低血糖を引き起こしたり、GH 分泌を抑制する作用を持つ。高分子量の IGF-II は IGF-II 産生腫瘍症例の血中でもその存在が報告されており、腫瘍中で産生され低血糖の原因になるといわれている^{33,34)}。同様に腎不全患者血清中でもプロ IGF-II の増加が特異的 RIA で確認されている³⁵⁾、この

プロ IGF-II 値の増加が高分子量 IGF-II 産生を増加させたのか、腎機能が極度に障害されクリアランスが低下したため高分子量 IGF-II が排泄がされず結果として増加したのかは不明である。今後の課題である。

一般に、IGF-I は多量投与により、ラットでもヒトにおいても血糖降下作用を示す。IGF-II も IGF-I と同様にインスリン作用を示すが IGF 様作用はインスリンに比して弱いものである^{10,36)}。糖尿病と IGF-II の関連について報告は少ないが、IDDM では正常、インスリン非依存性糖尿病 (non-insulin dependent diabetes mellitus, NIDDM) では低値を示すとの報告がある³⁷⁾。しかし今回の検討では IDDM 患者では IGF-II は減少し、また同一症例の検討でも血糖の改善にともない IGF-II は回復した。IGF-II はインスリン分泌/血糖コントロールによっても左右されるかもしれない。

末梢血中に存在する IGF-I 値の90%以上が肝臓由来と考えられている¹⁰⁾。肝不全患者の血中 IGF-II は明らかに低値で、病態の改善にともない IGF-II は暫時増加したことから IGF-I 同様に IGF-II もまた肝臓は主要な産生臓器であると考えられた。

髄液検体は酸性条件下ゲル濾過法によって IGF-II を IGFBP より分離させた後、本測定系にて測定可能であった。髄液中 IGF-II 濃度は $16.7 \pm 4.9 \text{ ng/ml}$ で年齢による変動はみられなかった。この値は Haselbacher らの報告値 ($30.6 \pm 9.5 \text{ ng/ml}$)³⁸⁾ に比較してやや低値であったが、IGF-II 抽出法や測定系の違いによるものかもしれない。これまで、髄液中 IGF-II/IGF-I の比率 (13.3) は血中 IGF-II/IGF-I の比率 (5.4) に比べてより高いと報告されており³⁹⁾、このことは髄液中 IGF-II が中枢神経系で局所的に産生されていることを示唆している。実際 IGF-II はヒト脳抽出液に存在し³⁹⁾、IGF-II mRNA はラットの中枢神経系あらゆる場所で発現しており、特に星状神経膠細胞や脈絡膜叢などで多く認められている^{9,40,41)}。今回の検討では髄液中 IGF-II は中枢神経系の炎症性疾患や腫瘍の一部の症例で上昇していた。これまで、試験管内実験で IGF-II は神経突起の形成を刺激することによって交感神経節細胞など中枢神経系の発達に関与しているといわれている⁴²⁾。一方、成人中枢神経系の髄液中 IGF-II の生理的、病理学的意義に明らかにされていないが、ヒト髄液中 IGF-II は脊髄腫瘍などの脊髄髄膜を刺激する疾患において上昇するという報告がある⁴³⁾。今回の検討では小児期中枢神経系の炎症や腫瘍などの一部で髄液中 IGF-II は上昇したが、一定の関連はみられなかった。今後、中枢神経系奇形などの新生児症例についてさらに検討を重ねたい。

髄液中 IGFBP には BP-1, BP-2, BP-4 がみられた。中でも BP-2 が主体で以前から知られているように⁹⁾ この蛋白は IGF-I よりも IGF-II により強い親和性を示した。髄液中 IGFBP のパターンは年齢間において有意差はみられず、各種中枢神経系炎症疾患では IGFBP の全般的な上昇がみられ、一部では BP-3 の出現もみられた。また、一例ではあるが悪性リンパ腫の中枢神経系への再発時に髄液中 IGF-II には変動なく、一方髄液中 BP-2 の増加がみられた。正常例の髄液中 IGFBP は BP-2 が主体であることを考え併せると BP-2 の変動が中枢神経系における IGF-II の生物活性発現を制御する可能性が考えられる。実験動物では中枢神経系において IGFBP の制御因子として、年齢や IGF 自体の関与が示されている。今回の結果から、ヒト中枢神経系においても実験動物と同様に IGF-II/

IGFBP 産生に対する調節機構が存在することが示唆された。ヒト中枢神経系における IGF-II の役割を解明するには、IGF-II/IGFBP の相互関係を考慮する必要があると考えられた。

尿検体は γ -globulin を添加し酸-エタノール抽出した後、本測定系にて測定が可能であった。尿中 IGF-II 濃度は 7.3 ± 2.9 ng/mg·Cr で、成人を除き小児期を通して、年齢による変動はみられなかった。腎臓では IGF-II mRNA は腎血管系に集中して存在し、IGF-II は発達に関与しているという⁴⁰⁾。これまで IGF-I が腎炎の指標になりうるという報告がある⁴¹⁾。今回の検討では急性糸球体腎炎症例の一部で尿中 IGF-II の高い症例を認めだが、他の腎炎、ネフローゼ症候群、糸球体疾患、尿管障害症例はバラツキが大きく一定の傾向はみられなかった。また腎炎症例についての尿中 IGF-II と尿潜血および尿蛋白との関連はみられなかったため、尿中 IGF-II は腎炎の尿中指標とはならなかった。

以上を総合すると、体液中の IGF-II は個体の成長、発育、栄養などの一般状態をよく反映するが、特定疾患の臨床的マーカーとしての役割は、検索した範囲では有用性が少ないと考えられた。

結 論

IGF-II の測定を確立するとともに生理的ならびに小児期各種病的状況下における血液、髄液および尿中 IGF-II、IGFBP の存在様式を検討し、また子宮内発育不全児およびモデルラットにおける IGF-II、IGFBP、IGF 受容体の動態につき検討し、以下の結論を得た。

1. 今回の IGF-II 測定系では IGF-II 抗体の添加量を 500pg/tube に減らし、また ¹²⁵I-IGF-II を一次抗体を加えた24時間後に加えることによって感度、特異性とも良好な測定系を確立することができた。
2. 臍帯血の IGF-II は在胎週数/生下時体重と有意に正相関し、ヒトにおいて胎児発育と IGF-II との関連が示唆された。また満期産児では生後6日目には生下時よりさらに増加したが、以後思春期に増加するほかは成人まで IGF-II に有意な変化はみられなかった。
3. 妊娠末期に増加した IGF-II は分娩後数日で速やかに正常化し胎児胎盤系と母体血中 IGF-II との関連を考えた。
4. 在胎30週以降では SFD の臍帯血中 IGF-II は AFD 児に比して有意に低値であった。血中 IGF-II は SFD 児において BP-1 が増加し、BP-3 は減少した。
5. IUGR ラットでは組織の IGF-II 含有量は減少し、ヒトと同様に血中 IGF-II は BP-1 が増加し BP-3 が減少した。また組織 IGF-II 受容体の結合容量は IUGR ラットにおいて有意に増加していた。IGF-II は胎児期個体/臓器の成長/発育に関与し、IGFBP や IGF-II 受容体の変化が局所における IGF-II の生物活性発現を修飾するものと推察した。
6. GH 欠損児の IGF-II 値は低値で GH 治療により明らかに増加し、SM-C とは有意に正相関した。また GH 不応性の小児症例では IGF-II は低く、GH 投与にも反応しなかった。以上より IGF-II は IGF-I と同様に GH 受容体を含む GH の生物活性発現に一部依存するものと考えた。
7. 肝不全、潰瘍性大腸炎、IDDM 症例では急性期に血中 IGF-II 値は低値で、病態の改善とともに正常化した。以上の

所見は、IGF-II は IGF-I と同様に GH 依存性で、主に肝臓で産生され、栄養状態に左右されることを示唆した。

8. 腎不全では IGF-II は有意に増加していたが、ウエスタンブロットティング上 15/12kD の高分子量 IGF-II の増加が顕著であり、腎クリアランス低下との関連を想定した。

9. 尿中 IGF-II は小児期を通じて、年齢の変動はみられなかった。各種腎炎疾患の尿中 IGF-II はコントロールと差異はなく、糸球体腎症機転の指標とはならなかった。ウエスタン解析上糸球体疾患では BP-3 が、尿管障害では BP-1 が尿中に多く排泄されており、臨床的なマーカーとなりうる可能性を示した。

10. 髄液中 IGF-II は小児期を通じて、年齢の変動はみられなかった。脳炎、脳腫瘍の一部の症例で増加がみられたが、一定の関連は得られなかった。髄液中の IGFBP は BP-1、-2 が主体で、BP-2 は IGF-II への親和性が強かった。中枢神経系の炎症では増加した。

謝 辞

稿を終えるに臨み、ご指導と御校閲を賜りました恩師谷口 昂教授の心より深甚なる謝意を表します。また、終始直接のご指導を頂きました佐藤 保助教授、五十嵐 登助手をはじめとする小児科内分泌グループ並びに教室員の諸先生方に深謝いたします。研究遂行にあたり貴重な検体を提供していただきました石川県立中央病院産婦人科干場 勉先生に厚く御礼申し上げます。

本論文の一部は第95回日本小児科学会学術集会(1992年、松山)、第26回日本小児内分泌学会(1992年、金沢)で発表した。

文 献

- 1) Daughaday, W. H.: Divergence in binding sites, in vitro action, and secretory regulation of the somatomedin peptides, IGF-I and IGF-II. Proc. Soc. Biol. Med., 170, 257-263 (1982).
- 2) Rinderknecht, E. & Humbel, R. E.: Amino-terminal sequences of two polypeptides from human serum with nonsuppressible insulin-like and cell-growth promoting activities: Evidence for structural homology with insulin B chain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73, 4379-4381 (1976).
- 3) Rinderknecht, E. & Humbel, R. E.: Primary structure of human insulin-like growth factor-II. FEBS Lett., 89, 283-286 (1978).
- 4) Daughaday, W. H. & Rotwein, P.: Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations. Endocr. Rev., 10, 68-91 (1989).
- 5) Sklar, M. M., Thomas, C. L., Municchi, G., Roberts, C. T., Leroith, D., Kiess, W. & Nissley, P.: Developmental expression of rat insulin-like growth factor-II/mannose 6-phosphate receptor messenger ribonucleic acid. Endocrinology, 130, 3438-3491 (1992).
- 6) Schoenle, E., Zapf, J., Humbel, E. R. & Froesch, E. R.: Insulin-like growth factor-I stimulates growth in hyposectomized rats. Nature, 296, 252-253 (1982).
- 7) Hall, K., Takano, K., Fryklund, L. & Sievertsson, T.: Somatomedins. Adv. Metab. Metab. Disord., 8, 19-46 (1975).

- 8) Lin, L., Greenberg, S., Russel, S. M. & Nicoll, C. S.: Effects of insulin-like growth factors I and II on growth and differentiation of transplanted rat embryos and fetal tissues. *Endocrinology*, 124, 3077-3082 (1989).
- 9) Clemmons, D. R.: Insulin-like growth factor binding proteins. *Trends Endocrinol. Metab.*, 1, 412-417 (1990).
- 10) 肥塚直美, 高野加寿恵: IGF. 成長ホルモンとその関連ペプチド (鎮目和夫編著), 第1版, 120-169頁, 朝倉書店, 東京, 1992.
- 11) Binkert, C., Lndwehr, J., Mary, J. L., Schwander, J. & Heinrich, G.: Cloning, sequence analysis and expression of a cDNA encoding a novel insulin-like growth factor binding protein (IGF-2). *EMBO J.*, 8, 2497-2502 (1989).
- 12) Daughaday, W. H., Mariz, I. K. & Blethen, S. L.: Inhibition of access of bound somatomedin to membrane receptor and immunobinding sites: A comparison of radioreceptor and radioimmunoassay of somatomedin in native and acid-ethanol extracted serum. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 51, 781-788 (1980).
- 13) Lee, E. H., Bowsher, R. R., Apathy, J. M., Smith, M. C. & Henry, D. P.: Measurement of insulin-like growth factor-II in physiological fluids and tissues. II. extraction and quantification in rat tissues. *Endocrinology*, 128, 815-822 (1991).
- 14) Hossenlopp, P., Seurin, D., Segovia-Quinson, B., Hardouin, S. & Binoux, M.: Analysis of serum insulin-like growth factor binding proteins using western blotting: Use of the method for titration of the binding proteins and competitive binding studies. *Anal. Biochem.*, 154, 138-143 (1986).
- 15) Lesniak, M. A., Bassas, L., Roth, J. & Hill, J. M.: Autoradiographic localization of insulin-like growth factor I receptors in rat brain and chick embryo. *Methods Enzymol.*, 198, 26-35 (1991).
- 16) Asakawa, K., Hizuke, N., Takano, K., Fukuda, I., Sukegawa, I., Demura, H. & Shizume, K.: Radioimmunoassay for insulin-like growth factor II (IGF-II). *Endocrinol. Jpn.*, 37, 607-614 (1990).
- 17) Furlanetto, R. W., Underwood, L. E., Van Wyk, J. J. & D'Ercole, A. J.: Estimation of somatomedin-levels in normal and patients with pituitary disease by radioimmunoassay. *J. Clin. Invest.*, 60, 648-657 (1977).
- 18) Zapf, J., Waters, H. & Froesh, E. R.: Radiomunological determination of insulin-like growth factors I and II in normal subjects and in patients with growth disorders and extrapancreatic tumor hypoglycemia. *J. Clin. Invest.*, 68, 1321-1330 (1981).
- 19) Wang, H. S. & Chard, T.: The role of insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-binding protein-1 in the control of human fetal growth. *J. Endocrinol.*, 132, 11-19 (1992).
- 20) Wilson, D. M., Bennett, A., Adamson, G. D., Nagashima, R. J., Lin, F., Denatale, M. L., Hinz, R. L. & Rosenfeld, M.L.: Somatomedins in pregnancy: A cross-sectional study of insulin-like growth factors I and II and somatomedin peptide content in normal human pregnancies. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 55, 858-861 (1982).
- 21) Lassarre, C., Harduin, S., Daffos, F., Forestier, F., Frankenn, F. & Binoux, M.: Serum insulin-like growth factors and insulin-like growth factor binding proteins in the human fetus. Relationships with growth in normal subjects and in subjects with intrauterine growth retardation. *Pediatr. Res.*, 29, 219-225 (1991).
- 22) 船越 徹, 上田康夫, 小林秋雄, 森川 肇, 望月真人: Insulin-like growth factor-II の母児血中レベルと児発育との関連. *日内分泌会誌*, 66, 688-699 (1990).
- 23) Shen, S. J., Wang, C. Y., Nelson, Jansen, M. & Ilan, J.: Expression of insulin-like growth factor II in human placentas from normal and diabetic pregnancies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 9179-9182 (1986).
- 24) Zhou, J. & Bondy, C.: Insulin-like growth factor-II and its binding proteins in placental development. *Endocrinology*, 131, 1230-1240 (1992).
- 25) Shen, S. J., Wang, C. Y., Nelson, K. K., Jansen, M. & Ilan, J.: Expression of insulin-like growth factor II in human placentas from normal and diabetic pregnancies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 9179-9182 (1986).
- 26) Hizuka, N., Takano, K., Tanaka, I., Honda, N., Tsushima, T. & Shizume, K.: Characterization of insulin-like growth factor I receptor on human erythrocytes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 61, 1066-1070 (1985).
- 27) Price, W. A., Rong, L., Stiles, A. D. & Dercole, A. J.: Changes in IGF-I and -II, IGF binding protein, and IGF receptor transcript abundance after uterine artery ligation. *Pediatr. Res.*, 32, 291-295 (1992).
- 28) Hinz, R. L. & Liu, F.: A radioimmunoassay for insulin like growth factor II specific for the C-peptide region. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 54, 442-446 (1982).
- 29) 五十嵐登, 佐藤 保: 成長ホルモン結合蛋白の著減していた16歳男児の小人症例に関する検討. *日内分泌会誌*, 67, 1219-1229 (1991).
- 30) Davenport, M. L., Svoboda, M. E., Koerber, K. L., Van Wyk, J. J., Clemmons, D. R. & Underwood, L. E.: Serum concentration of insulin-like growth factor II and not changed by short term fasting and refeeding. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 67, 1231-1236 (1988).
- 31) Sliman, A. T., Hassan, A. E. H. I., Areff, M. K., Hinz, R. L., Rosenfeld, R. G. & Rogol, A. D.: Serum insulin-like growth factors I and II concentrations and growth hormone and insulin responses to arginine infusion in children with protein-energy malnutrition before and after nutritional rehabilitation. *Pediatr. Res.*, 20, 1122-1130 (1986).
- 32) Powell, D. R., Rosenfeld, R. G., Baker, B. K., Liu, F. & Hinz, R. L.: Serum somatomedin levels in adults with chronic renal failure: The importance of measuring insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-II in acid-chromatographed uremic serum. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 63, 1186-1192 (1986).

- 33) Daughaday, W. H.: Editorial: The possible autocrine/paracrine and endocrine roles of insulin-like growth factors of human tumors. *Endocrinology*, **127**, 1-4 (1990).
- 34) 福田いずみ: IGF-II 産生腫瘍中の IGF-II の性質に関する研究. *東女医大誌*, **61**, 288-299 (1991).
- 35) Powell, D. R., Lee, P. D. K., Chang, D., Liu, F. & Hinz, R. L.: Antiserum development for the E peptide region of insulin-like growth factor IA prohormone recognizes a serum protein by both immunoblot and radioimmunoassay. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **65**, 868-875 (1987).
- 36) Skottner, A., Clark, R. G., Robinson, I. C. A. F. & Fryklund, L.: Recombinant human insulin-like growth factor: testing the somatomedin hypothesis in hypophysectomized rats. *J. Endocrinol.*, **112**, 123-132 (1987).
- 37) Merimee, T. J., Zapf, J. & Froesch, E. R.: Insulin-like growth factors. *N. Eng. J. Med.*, **309**, 527-530 (1983).
- 38) Haselbacher, G. & Humbel, R.: Evidence for two species of insulin-like growth factor-II (IGF-II and "big" IGF-II) in human spinal fluid. *Endocrinology*, **110**, 1822-1824 (1982).
- 39) Backstrom, M., Hall, K. & Sara, V.: Somatomedin levels in cerebrospinal fluid from adults with pituitary disorders. *Acta Endocrinol.*, **107**, 171-178 (1984).
- 40) Lamson, G., Pham, H., Oh, Y., Orant, I., Schwander, J. & Rosenfeld, R. G.: Expression of the BRL-3A insulin-like growth factor binding protein (rBP-30) in the rat central nervous system. *Endocrinology*, **123**, 1100-1102 (1989).
- 41) Olson, J. A., Shierick, K. T., Oglivie, S., Buhi, W. C. & Raizada, M. K.: Developmental expression of rat insulin-like growth factor binding protein-2 by astrocytic glial cells in culture. *Endocrinology*, **129**, 1066-1074 (1991).
- 42) Mill, J. F., Chao, M. V. & Ishii, D. N.: Insulin, insulin-like growth factor effects on tubulin mRNA levels and neurite formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 7126-7130 (1985).
- 43) 浅川久美子, 肥塚直美, 高野加寿恵, 鈴木香苗, 出村博, 鎮目和夫, 安本幸正, 松村耕三: 脳脊髄液及び脳腫瘍中の IGFs について. *日内分泌会誌*, **67**, 371 (1991).
- 44) Chin, E. & Bondy, C.: Insulin-like growth factor system gene expression in the human kidney. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **75**, 962-968 (1992).
- 45) Hizuka, N., Takano, K. & Tanaka, I.: Demonstration of insulin-like growth factor I in human urine. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **54**, 1309-1312 (1987).

Physiological and Pathological Changes of Insulin-Like Growth Factor-II and its Binding Proteins in Infancy and Childhood Ryohei Takeya, Department of Pediatrics, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-J. *Juzen Med Soc.*, **102**, 214-227 (1993)

Key Words insulin-like growth factor (IGF), IGF-binding protein, IGF receptor, intrauterine growth retardation (IUGR)

Abstract

Using a newly-developed insulin-like growth factor II (IGF-II) radioimmunoassay, I examined clinically IGF-II levels and its specific binding proteins (IGFBP), and also studied IGF-II systems in rat models of intrauterine growth retardation (IUGR) by maternal fasting or dexamethasone treatment. Cord blood IGF-II levels, were significantly correlated with gestational weeks and birth weights. During childhood, there were no apparent changes in serum IGF-II values. Serum IGF-II levels were elevated in late pregnancy and returned to the normal level within a few days after delivery, indicating the relationship between maternal IGF-II and fetoplacental unit. Cord blood IGF-II levels of small for date (SFD) infants were significantly lower than those of age-matched appropriate for date (AFD) infants, suggesting the involvement of IGF-II in IUGR. In SFD infants, Western ligand analysis showed an increment of serum IGFBP-1 and a reduction of BP-3 in comparison with those in AFD infants. In IUGR rats, tissue IGF-II contents were decreased and a similar serum IGFBP pattern to SFD infants was observed. The binding capacity of tissue IGF-II receptor was higher than those of control rats. These results suggested that IGF-II systems play a crucial role in fetal growth. In patients with growth hormone (GH) deficiency, hepatic dysfunction, ulcerative colitis and insulin-dependent diabetes mellitus, serum IGF-II levels were decreased in the active stage of the diseases and normalized in the convalescent stage. These results suggested that serum IGF-II levels were influenced by several factors, such as GH, hepatic reserve, nutritional state and glycemic control. In chronic renal failure, there was a significant increment of serum IGF-II levels, and the higher molecular forms of IGF-II (12 and 15kD) were definitely detected on Western analysis, which was probably due to an impairment of renal clearance. Urinary IGF-II levels were not influenced by age, and in nephritic and nephrotic syndrome, urinary IGF-II values were not significantly different from those of control subjects and also not affected by the degree of urinary occult blood or protein contents. On Western ligand analysis of urinary IGFBP, BP-2 and BP-3 were increased in the cases of glomerulopathy, whereas BP-1 was increased

in renal tubular dysfunction. Although urinary IGF-Ⅱ alone can not be a clinical indicator in nephritic/nephrotic disease, urinary IGFBP patterns may be a useful marker in the diagnosis of renal impairment. CSF IGF-Ⅱ levels were also not influenced by age and increased in some cases of encephalitis. CSF IGFBP mainly consisted of IGFBP-1 and BP-2; BP-2 showed a higher affinity for IGF-Ⅱ than IGF-Ⅰ, and increased generally in a number of CNS diseases. These IGFBP dynamics may be important in understanding the local bioavailability of IGF-Ⅱ in CNS.