

成長ホルモンの血漿-赤血球間アミノ酸転送に及ぼす影響

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8876

成長ホルモンの血漿-赤血球間アミノ酸 転送に及ぼす影響

金沢大学医学部小児科教室 (主任: 谷口 昂教授)

内 瀉 安 子

(昭和55年11月26日受付)

ヒト成長ホルモン (hGH) はその名称よりうかがわれるように個体の成長発育に不可欠のホルモンであるが、特定の標的器官をもたず、その生理作用は多くの組織、代謝経路に関与している。その主な作用として①骨、軟骨、筋、結合織の発達を促す形態学的作用、②蛋白質、DNA合成、アミノ酸同化の促進作用、③脂肪酸酸化、脂肪分解の促進作用、④インスリンのAntagonistとしての糖代謝への効果、⑤Ca、Pの再吸収、Na、K出納における蓄積促進作用があり、その影響は多岐にわたっている。しかし個々の生物学的作用の促進がいかなる機序によっておこるかについてはいまだ不明の点が多い。従来のhGHの生物学的活性に関する実験は下垂体摘出動物についての成績が多く、hGH単独の欠乏状態とは見なし難い欠点がある。ヒトにおけるhGHの欠損状態として下垂体性小人症が知られているが、近年、hGH製剤の入手が可能となり、その治療経験から下垂体性小人症に対するhGHの有効性は確立している。そこで下垂体性小人症児を対象として、hGH効果をアミノ酸転送の面から検討した。

生体内のアミノ酸転送は血漿遊離アミノ酸 (Plasma amino acid, PAA) と組織間の問題として考えられてきたが、近年、両者の間に赤血球が介在して、アミノ酸の受け渡しに積極的役割を果していることが知られてきた^{1)~4)}。さらにそれを支持する証拠として、hGHがヒト赤血球膜と特異的に結合して膜の構造を変化させる事実も報告されている⁵⁾。またhGHのアミノ酸とりこみへの促進効果は、発現までの一定時間を要し⁶⁾、二相性で初期には促進効果がみられるが、その後不応期のくることも知られている^{7)~10)}。この二相性効果の生理的理由もまだ不明である。これらのhGHとアミノ酸をめぐる生理学的、臨床的知見の展開と問題点にもとづいて、今回以下の3点に関する検討を試みた。

1) hGH欠損症と、正常児のPAAの組織移行程度

の差とhGH投与によるPAA転送の短期および長期の変化 (実験I)。

2) 赤血球内外におけるアミノ酸転送に及ぼすhGHのin vivo (実験II) およびin vitro (実験III) での検討。

3) 生体膜アミノ酸転送に直接関与するr-グルタミル回路に及ぼすhGHの効果、赤血球膜r-グルタミル転移酵素 (GGTP) 活性の変動から検討した (実験IV)。

対象と方法

[実験I] hGHのPAA変動に及ぼす影響:

外因性に投与された高濃度のhGHによる直接的効果ではなく、出来るだけ生理的条件下に近い状態でのPAAの変動を検討する目的で、PAAの組織内移行を刺激する方法としてグルコース経口負荷を選んだ。対

Table 1

診 断 基 準
I. 主要症状
1. 平均身長 -3.0σ 以下 (10才未満では -2.5σ 以下)
2. 10才以下で3年間の身長増加が12cm以下
3. 骨年齢が歴年齢の75%以下
II. 検査所見
2つ以上の成長ホルモン刺激試験でいずれもその反応値が5.0ng/ml以下
III. 除外規定
成長率や成長ホルモンの反応値に影響を及ぼす他の疾患や薬物投与がないこと
確: Iの1つ以上及びII, IIIを満たすもの
疑: Iの1つ以上及びIIIの事項を満たすもの

Effects of Human Growth Hormone on Amino Acid transport Between Plasma and Humane Erythrocytes. **Yasuko Uchigata**, Department of Pediatrics, (Director: Prof. N. Taniguchi) School of Medicine, Kanazawa University.

象は厚生省視床下部下垂体機能障害研究班の診断基準(表1)を満足する下垂体性小人症17例(4-19才)で、これをhGH治療の期間により3つのグループに分けた。I群は治療前で9例、II群は治療開始1-2ヶ月後で9例(ただしI群と同一対象)、III群は治療開始1-3年を経過した長期治療群8例である。正常対照群として発作間歇期の喘息患児で薬剤投与のないもの5例を設定した。hGH(Crescormone, Kabi)は0.3-0.5 I.U./kgの量で週2回に分けて筋肉注射されている。これらの症例に少なくとも食後4時間以上の空腹時間において、2g/kgのグルコースを経口負荷して負荷前と負荷2時間にヘパリン採血した。負荷2時間にPAAは最も減少するといわれる^{11,12)}。PAA減少率は負荷前値に対する負荷2時間値の%で表わした。なお予備試験の成績から塩基性アミノ酸はグルコース負荷前後の変動が少ないので省略し、中酸性PAAのみ日立アミノ酸自動分析機(KLA-3B)で測定した¹³⁾。hGHの直接の影響をさけるため、この負荷試験は最後のhGH筋注より1-4日を経て行なった。またhGHの直接作用をチェックする目的でこの検体のGH濃度を測定した。血漿GH濃度はダイナボット社のキット(2抗体法)によった。

〔実験II〕赤血球膜内外のアミノ酸濃度に及ぼすhGHの影響(in vivo):

4-14才の下垂体性小人症児(診断基準は前述)10例を対象とした。うち4人は未治療で他6人はhGH0.25-0.3 I.U./kgを週2回に分けて2筋肉注射しつつづけており、開始後2-3ヶ月経っているものから2年経過しているものを含む。未治療4人のうち2人は治療前と治療後2ヶ月の2回検査を行なった。予備実験の成績よりhGH投与後の赤血球内アミノ酸(amino acid in red cell, RAA)の変化は2時間でpeakを示したので、hGH投与前、4 I.U.のhGH筋注後1時間、2時間にヘパリン採血した。血漿GH濃度は前値 2.0 ± 2.2 ng/ml、2時間後 15.7 ± 4.8 ng/mlに上昇した。最後のhGH筋注と、この試験の日まで3-4日のあいだをおいた。生理的状态下での赤血球内外のアミノ酸変動を知るため、コントロールとして5人の正常児にhGH筋注をしないで、1時間おきに3回ヘパリン採血した。

ヘパリンは直ちに遠心して血漿分離し、Buffy coatを除き、赤血球をKrebs-Ringer-Bicarbonate(KRB) buffer (glucose 2ng/ml含)で2回洗浄した。1%ピクリン酸5mlに赤血球ペレット1ml入れて溶血させ除蛋白した。遠心後、上清を陰イオン交換樹脂カラム(Bio-Rad AG2-X8)に通して最後に

0.002N HCl数mlでカラムを洗浄した。溶出した液の中酸性RAA濃度は日立アミノ酸自動分析機(KLA-3B)で測定した。血漿も同様の処理をしてRAAを測定した。赤血球、血漿のそれぞれのアミノ酸分布状態の変化はRAAとPAAの比(Distribution ratio, R/P)で表現した。

〔実験III〕in vitroにおける³H-leucineの赤血球内外移行に対するhGHの効果:

hGH投与前の赤血球を下垂体性小人症児4例(治療開始1-4年)と正常対象3例から得た。ヘパリン採血した血液は直ちに遠心分離してbuffy coatを除きKRB bufferで3回洗浄して、KRB-bufferで赤血球浮遊液を作った(Ht20-30%)。赤血球浮遊液1mlにhGH100ngとhGH freeの系列を作り、すべてのtubeに0.075 μ Ci/tubeの³H-leucineを入れ、5分、10分、30分、37℃でincubateした。incubate後、n-ブチルフタレート1mlを加え2000回転2分間遠心し、上清と血球層に分離した。上清の0.1mlとKRB 0.9mlをカウント用ミニバイアル内でPCSシンチレーター2.0mlと混合しゲル状態でAloca LSL 671液体シンチレーションカウンターを用いて2分カウントを行った。このカウント数をmediumの³H-leucine量とした。血球層には水2mlとperchloric acid(14%)1mlを加え、溶血、除蛋白した後、3000回転10分の遠心をして上清1mlを赤血球内³H-leucine量として同様のシンチレーションカウントを行なった。Htで補正したpacked red cell (PRC) 1ml当たりのカウント数を³H-leucine $X10^3$ cpm/ml-PRCとし、また赤血球浮遊液1ml中のmedium内³H-leucineカウント数に対する赤血球内³H-leucineカウント数をdistribution ratioとした。尚³H-leucine量は後述の実験条件の検討成績から通常0.075 μ Ci/tube, influxのincubation timeは5分とした。また分離操作中、n-ブチルフタレートへの³H-leucineの移行はみられなかった。赤血球からのeffluxは³H-leucine 0.075 μ Ci/tubeを加え37℃30分incubateした後、n-ブチルフタレートにてmedium層を分離除去し、³H-leucine freeのKRB bufferを1ml/tube入れ、再度60分間37℃でincubateした。0分は新しいKRB buffer 1ml入れた時間を示し、通常60分のincubation timeでeffluxを測定した。hGHその他のホルモンはKRB bufferに添加した。cell/mediumはmedium 1ml中³H-leucine cpmに対する血球内³H-leucine cpm/mlを意味する。

〔実験IV〕赤血球膜GGTP活性に及ぼす投与の影響: 実験IIで得られた検体(赤血球)から赤血球膜分画

を分離した。赤血球を KRB buffer で 3 回洗浄し、上層の赤血球を含めて buffy coat はできる限りとり除いた。白血球混入は $1/10^5$ RBC 以下の比率であった。この比率では赤血球膜の GGTP 活性に影響を与えなかった。遠心後の赤血球ペレットは等量の 10mM Tris-HCl buffer (pH8.5 80mM MgCl₂ 含) に浮遊し、15 秒間 Sonification して溶血させた¹⁴⁾。その後この溶血液を 4℃ 20 分間 17,000g で遠心して膜成分を得た。この膜成分を同じ Tris-HCl buffer で 3 回 (洗浄液の色が透明になる迄) 洗浄遠心をくりかえし、10mM EDTA を含む 0.1M Tris-HCl buffer (pH8.5) の 1% sodium deoxycholate 溶液で膜溶解した。最後蛋白濃度はほぼ 10 mg/ml にそろえた。この膜溶解液を使い、Orlowski & Meister¹⁵⁾ 法により、1 時間 incubate して膜 GGTP 活性を測定した。尚ヘモグロビンを膜蛋白から完全に除去することができなかったため、それぞれの検体につきヘモグロビン補正のための blank をおいた。本法の再現性は測定内変動係数、 $2.0 \pm 1.7\%$ 、測定間変動係数、 $7.9 \pm 5.4\%$ であった。蛋白量の測定は Lowry 法¹⁶⁾ による。赤血球膜 GGTP のコントロール用検体は正常児 40 人より

得た。尚、赤血球の成熟状態をみるために膜 GOT も測定した (Karmen 法¹⁷⁾)。また 1 例の下垂体性小人症児につき hGH 治療経過 3 ヶ月間の尿中 GGTP 活性の推移を検討した。hGH 注射前の 1 回尿について Orlowski 変法により GGTP 活性を測定し、creatinine 1 mg 当たりの活性として表わした。尿 creatinine は Jaffe 法による。

以上の実験 I-IV の統計処理は Student's t-test F-test による。

成 績

〔実験 I〕

1. 空腹時 PAA の濃度 (図 1)

図 1 に I-III および対照群の中酸性 PAA の平均 ± SD 値を示した。threonine (Thr), serine (Ser), proline (Pro), glycine (Gly), alanine (Ala), valine (Val), methionine (Met), tyrosine (Tyr) は各群、対照群の間に有意差はみられなかった。一方 aspartate (Asp), glutamate (Glu), isoleucine (Ileu), leucine (Leu), phenylalanine (Phe) は I 群で有意に対照群より低下していた。hGH 治療によりしだいに正常化してくるが、Asp だけは長期治療群 (III 群) でも対照群に比し低下していた。

2. hGH 治療中の PAA 減少の変動 (図 2)

図 2 は個人別 PAA 減少率の平均 ± SD 値と各群全体としてのアミノ酸減少率の平均 ± SD 値を示す。群別の減少率は、I 群 $68 \pm 16\%$ II 群 $91 \pm 26\%$ 、III 群 $57 \pm 17\%$ 、対照群で $86 \pm 16\%$ であった。I 群は対

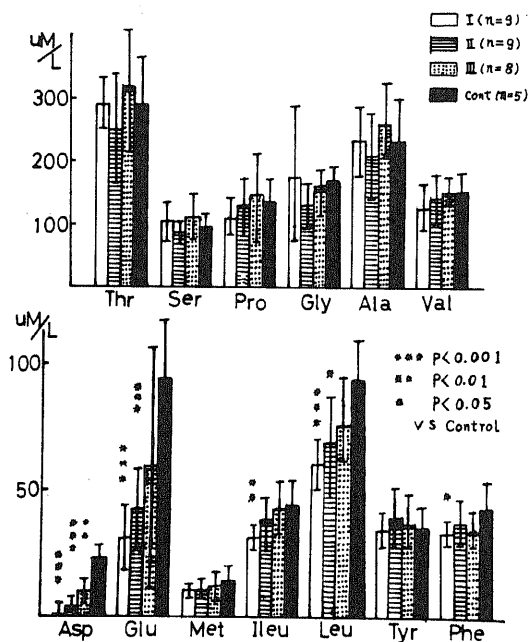


Fig. 1. Fasting plasma amino acid (PAA) concentration of group I, II, III and controls. Asp, Glu, Ileu and Phe levels are significantly reduced in untreated patients and are gradually increased during hGH therapy. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs. controls.

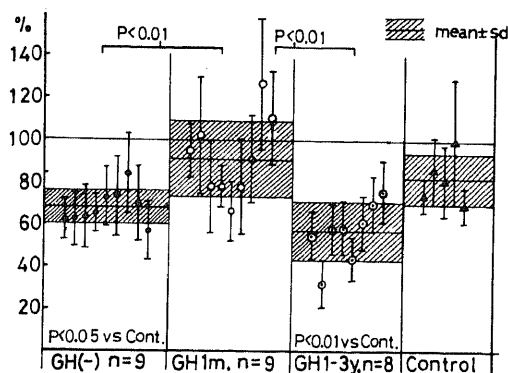


Fig. 2. Changes in PAA ratio during hGH treatment. Vertical bars show mean ± SD values of individual patients, and the shaded area indicate that of overall PAA ratio in each group. Significant difference is noted between group I, II and III, I and control and III and control.

照群より有意に低い($p < 0.05$).しかしこの減少率は治療初期であるII群で対照群に近づき長期治療群のIII群でまた減少してしまう(I vs. II, $p < 0.01$, II vs. III, $p < 0.01$).アミノ酸転送に対するhGHの影響

は治療期間によりかなり変動することがわかる。個々のアミノ酸別の減少率を図3に示した。斜線の範囲は正常対照群の平均±SD値であるが、I群はこの範囲の下限に位置しているが、II群で上限に位置し

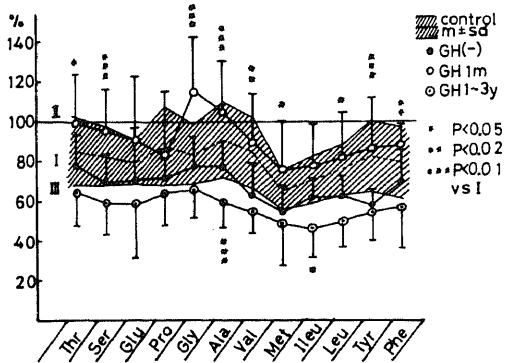


Fig. 3. Changes in PAA ratio of individual amino acid. Solid circle; group I, open circle; group II, double circle; group III, and shaded area; mean±SD values of controls. Significant changes are found with the duration of hGH therapy. * $P < 0.05$, ** $P < 0.02$, *** $P < 0.01$ vs. group I.

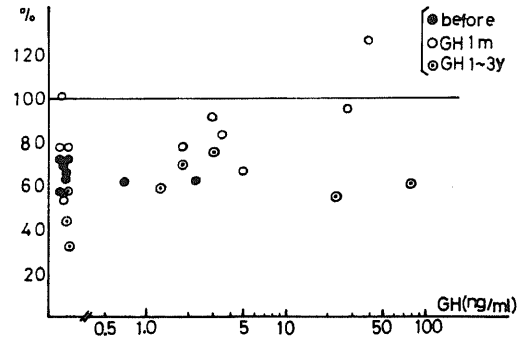


Fig. 4. Relation between plasma GH concentration and PAA ratio. No significant correlation is noted.

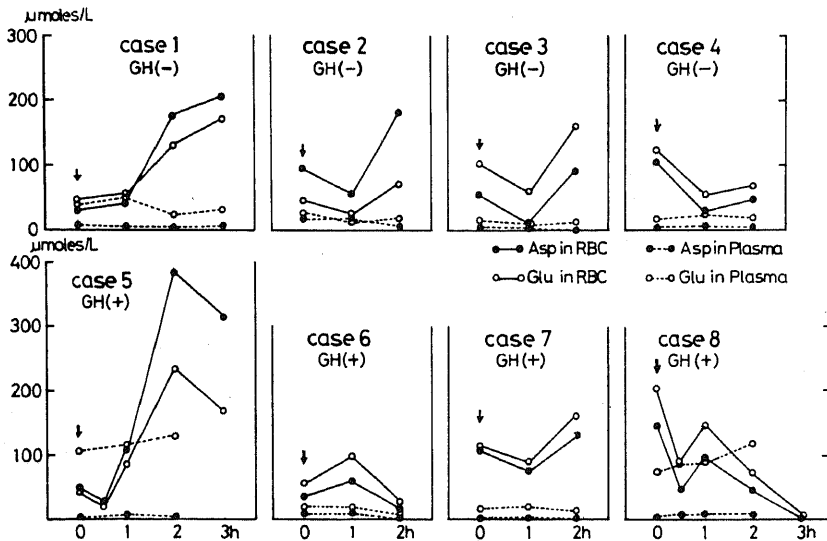


Fig. 5: Changes in concentration of aspartate (solid circle) and glutamate (open circle) in red cells (solid line) and in plasma (broken line) after hGH administration. Upper panels; untreated patients, lower panels; GH-treated patients. Note marked intracellular fluctuation in contrast to relatively stable serum levels and consistent parallelism between two AAs.

Ⅲ群でこの下限よりさらに低下している。治療開始とともに上限に移り長期治療になるとまた開始前よりさらに低下するという二相性を示している。Thr, Ser, Gly, Ala, Val, Met, Leu, Tyr, Phe は I 群よりⅡ群で有意に上昇し, Ⅲ群では Ala, Ileu のみ有意に I 群より低い。つまり hGH 治療により PAA 転送には二相性の変化がみられ, 治療前には減少率が大きく治療開始とともに減少率が小さくなり (正常対照域に入り), 長期治療になるとまたこの差が大きくなる。個々のアミノ酸では Thr, Ser, Gly, Ala などの glucogenic AA, Val, Leu などの branched chain AA, および Try, Phe などの aromatic AA の変動が目立った。

3. 血漿 GH と PAA 減少率の関係 (図 4)

上記の PAA 減少率に血中 GH が直接的影響を及ぼしているか否かを知るために, 平均アミノ酸減少率と症例別 GH 濃度の相関を見たが, 有意の相関関係はみられなかった。hGH は直接には PAA 転送には関与しないことを示唆している。

4. PAA 減少率と身長伸び率の関係

成長率 cm/M と平均アミノ酸減少率の間には統計的に有意の相関は得られなかった。ただ PAA 減少率が

小さい時は身長伸びはよく, PAA 減少率が大きい時は伸びが悪い傾向はみられた。

〔実験Ⅱ〕

1. 赤血球と血漿中のアミノ酸濃度への hGH の影響

個々のアミノ酸の PAA, RAA 濃度は図 1 の SD 値でもわかるようにばらつきが大きい (表 2)。そこで RAA/PAA (R/P 比) で表示してみると 3 つのグループに大別された。R/P 比が大きい (≥ 1) Asp, Glu を A 群, R/P 比がほぼ 1 に近い Thr, Ser, Pro, Gly, Ala を B 群, R/P 比が 1 より小さい Cystine (Cys), Met, Val, Ileu, Leu, Tyr, Phe を C 群とした。治療群と未治療の RAA 間には有意差はみられなかった (A, B 群) が, C 群の Val 以外のアミノ酸は hGH 治療群で有意に低下していた ($p < 0.05 - 0.001$)。

2. A 群の変化 (図 5)

Asp, Glu は hGH 投与後, hGH 治療, 未治療にかかわらず著明な変動を示した。これは対照群 (hGH 投与なし) でも同様の変動がみられた (データ省略)。この変動は生理的な変動であって, hGH 作用とは関係しないものであろう。しかし, Asp と Glu の変動には平行関係がみられた。

3. B, C 群の R/P 比の変化 (図 6)

B, C 群の R/P 比の合計を $\Sigma R/P$ を表わし図 6 にその平均 \pm SD 値を示した。下垂体性小人症の未治療群は hGH 筋注にあまり反応していない。未治療群の前値, 1 時間値, 2 時間値とも対照群とくらべて有意に低い ($p < 0.01$)。一方治療群の $\Sigma R/P$ は未治療群のレベルより上昇し, 2 時間値は対照群のレベルに達している。そして時間とともに $\Sigma R/P$ の変動巾も対照の域に増大した。これは hGH 治療によりアミノ酸出納が大きくなるためと考えられる。

4. 個々のアミノ酸 R/P 比の変動 (図 7)

未治療群の R/P 比は対照群 R/P 比に比して Val, Met 以外すべて低い ($p < 0.01 - 0.001$)。逆に Met だけは対照群に比して有意に高い ($p < 0.001$)。hGH 負荷後, 未治療の R/P 比の変動はやはり小さく, 治療群の R/P 比は変動巾が大きくなり, 2 時間値で正常化した (Thr, Ser, Gly, Ala)。しかし C 群のアミノ酸の R/P 比は前値が低く, hGH 負荷により更に低下した。

〔実験Ⅲ〕

1. 3H -leucine の容量反応と influx, efflux の時間経過 (図 8, 9)

図 8 は $0.075\mu Ci/tube, 0.15\mu Ci/tube, 0.3\mu Ci/tube$ の 3 系列を作り 15 分 $37^\circ C$ incubate した容量反応

Table 2. AMINO ACIDS in RBC

Amino acid	untreated (n=4×3)	GH-treated (n=8×3)	control (n=5×3)
Asp	100±69	105±102	124±127
Glu	125±92	112±57	136±52
Thr	331±48	318±128	300±138
Ser	159±23	160±43	149±60
Pro	134±41	112±49	110±23
Gly	285±90	291±75	284±46
Ala	252±60	219±60	251±73
Cys	10±7**	3±4	10±3
Val	56±22	40±15	46±12
Met	8±4***	3±3	6±6
Ileu	17±9*	10±4###	25±9
Leu	30±16**	15±7###	50±23
Tyr	36±10*	27±8###	48±12
Phe	15±7**	8±6###	21±7

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. GH-treated.
$p < 0.001$ vs. control.

関係である。0.3 μ Ci/tube までとりこみが濃度に直線関係を示したので、以後 0.075 μ Ci/tube で実験した。図9に influx と efflux の時間経過を示したが、5分間 incubate 後どちらもほぼ平衡状態に達した。以後、influx には5分 incubate を、efflux には60分 incubate を行なった。以上より leucine の赤血球膜透過性は非常にすみやかであることがわかる。

2. 正常赤血球に対する hGH の in vitro の効果

表3は正常赤血球を用い、hGH を preincubate した場合と efflux study にのみ hGH を使用した場合の³H-leucine cpm/ml -PRC を対比した結果である。hGH は preincubate しても、また efflux にも影響はなかった。

3. 治療電の下垂体性小人症赤血球と、正常赤血球の比較 (図10.11)

図10は influx の結果を示した。hGH - free medium 中では、下垂体性小人症赤血球の³H -

leucine とりこみは cpm/ml - PRC, distribution ratio 共正常赤血球にくらべ低下している。しかし、hGH medium 中では両者間には差はない。図11は efflux の結果である。赤血球による相違も、hGH の影響もみられなかった。以上アミノ酸のとりこみに関してのみ、両者に差がみられた。

4. hGH 以外の因子による可能性の検討 (表4)

hGH, insulin, glucagon, hydrocortisone, epinephrine, T₃ で同様の取込みを検討したがそれぞれの間に有意差はみられなかった。また Ca²⁺, glucose 2 mg/ml 含む medium で同様の efflux を検討したが、いずれも有意な相違点はみあたらなかった。

以上まとめると hGH 治療中の下垂体性小人症赤血球の変化は hGH の直接効果ではなく、in vivo でアミノ酸転送に関与する metabolic な変化を介していることが想定される。

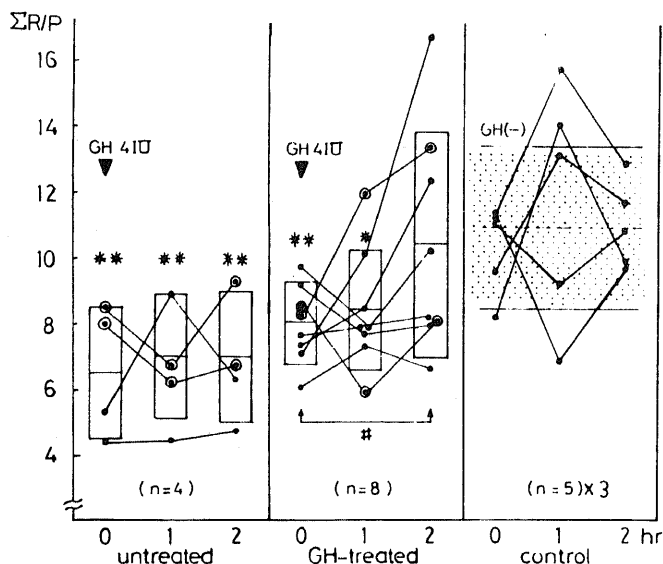


Fig. 6. Changes in the integrated value of R/P ratio group B and C AAs before and after GH loading. Controls are not administered hGH. Open column and shaded area indicate mean \pm SD. Double circle; patients examined in the early stage of the therapy. In untreated patients, R/P values are decreased and effect of hGH is not apparent. HGH-treated patients show rise in R/P to the control level at 2 hr after hGH injection. * $P < 0.02$, ** $P < 0.01$ vs. control. # $P < 0.025$ (difference in variance)

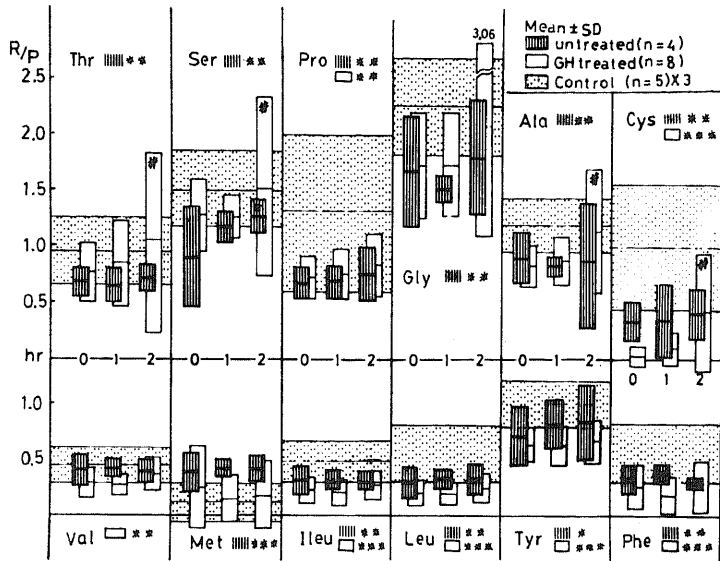


Fig. 7. Mean±SD values of R/P ratio of individual AA in untreated (hatched column), hGH-treated (open column) and control subjects (shaded area). R/P of all AAs except Met are low in untreated patients, while hGH-treated group, those of group II AAs are enhanced at 2 hr. But group III AAs remains to be depressed. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs. control. #P<0.025 (difference in variance between 0 and 2 hr).

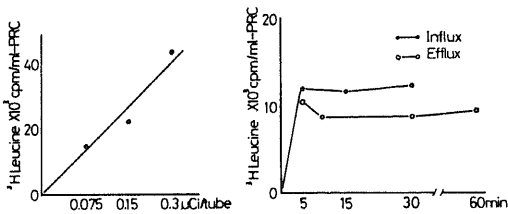


Fig. 8. Influx of ³H-leucine across red cell membrane as a function of the dose added to tube; 0.075, 0.15, and 0.3μCi per tube. A linear correlation is noted.

Fig. 9. Time course of the influx of ³H-leucine across red cell membrane (solid circle) and that of the efflux (open circle). The equilibrations are attained at 5 min of incubation. The efflux was studied after 30 min of incubation with medium containing 0.075μCi of ³H-leucine, which was changed to RI-free one at 0 time.

〔実験IV〕

1. 赤血球膜のGGTP活性(図12)

コントロール赤血球膜 GGTP 活性は 29.7 ± 10.0μM/h/g - protein に分布し、未治療群は 12.0 ± 5.4μM/h/g - protein と有意に低い (p < 0.001)。治療開始 1 - 2 ヶ月後には 71.8 ± 6.2μM/h/g - protein と有意の上昇をみた。しかし長期治療群ではコントロール域に低下する変動を示した。

この膜 GGTP 活性と赤血球内外アミノ酸転送の関係を検討するために、膜 GGTP 活性と ΣR/P の相関関係を検討した(図13)。回帰係数には差があるがコントロール群では r = 0.613 (p < 0.02)、治療群では r = 0.767 (p < 0.001) の正の相関が得られた。この GGTP 活性の上昇が、赤血球膜に対する hGH の直接効果なのか、あるいは赤血球産生を刺激して幼若赤血球が増加するための間接的影響なのかをみるために、赤血球の年齢を反映するといわれる膜 GOT¹⁰⁾ 活性との関係を検討した(図14)。しかし両者の間に相関は

Effects of hGH on ^3H -leucine transport in normal erythrocytes

Condition of Incubation		No.	$\times 10^3$ cpm/ ml PRC 0'	$\times 10^3$ cpm/ ml PRC 60'	Cell/Medium
Preincubation with 100ng/ml GH 60'	GH in medium (100ng/ml) 60'				
-	-	(4)	6.84 ± 0.44		3.57 ± 0.15
-	-	(4)		3.46 ± 0.37	1.68 ± 0.11
-	+	(4)		3.14 ± 0.35	1.61 ± 0.16
+	-	(4)		3.10 ± 0.60	1.75 ± 0.23
+	+	(4)		3.45 ± 0.55	1.84 ± 0.31

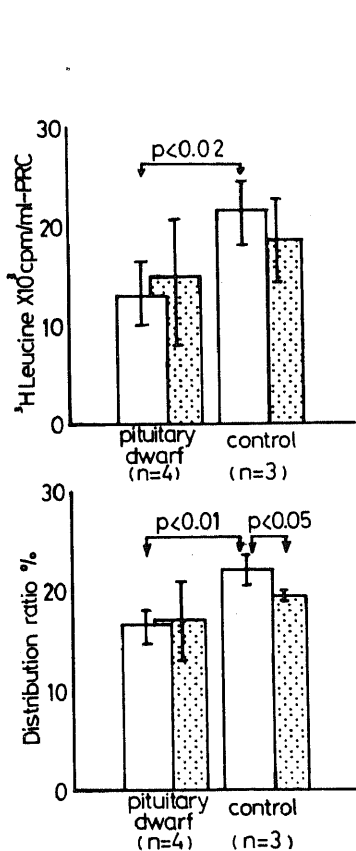


Fig. 10. Comparison of ^3H -leucine uptake in red cells between pituitary dwarfs and normal controls. Open column; hGH-free medium, shaded column; 100ng/ml hGH containing medium, ^3H -leucine uptake and distribution ratio are significantly decreased in red cells of pituitary dwarfs in hGH-free medium.

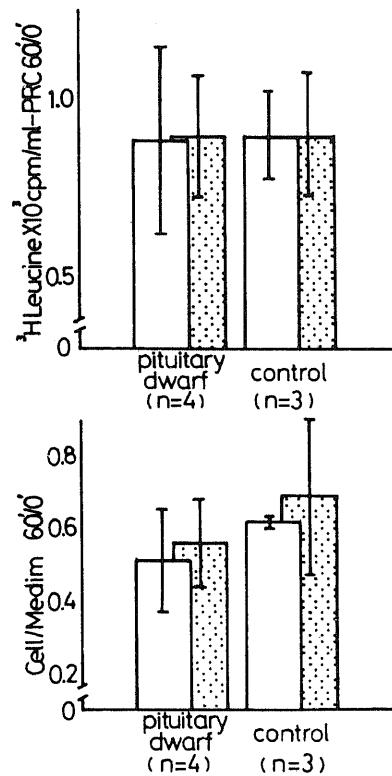


Fig. 11. Comparison of ^3H -leucine efflux from red cells between pituitary dwarfs and normal controls. Because the initial ^3H -leucine uptake is different in each sample, the value is expressed as the ratio of cpm at 60 min to that of 0 min. Open column; hGH-free medium, shaded column; 100ng/ml hGH containing medium. Neither intracellular count of ^3H -leucine nor distribution ratio is different between pituitary dwarfs and controls.

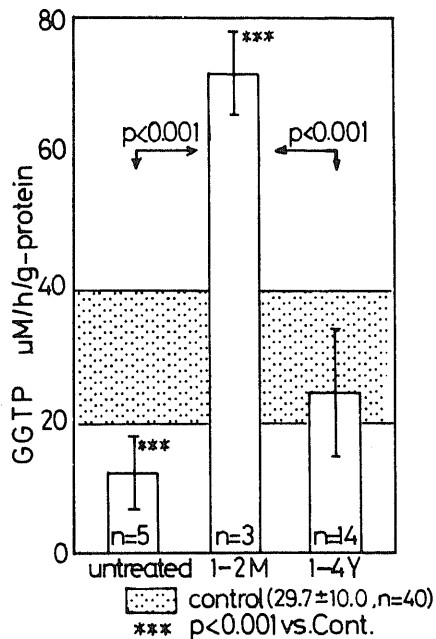


Fig. 12. GGTP activities in red cell membrane during the course of hGH therapy. Shaded area indicate mean±SD of 40 normal controls. Untreated patients show lower activities than controls, whereas a remarkable increase is observed in the early stage of the therapy, followed by a decrease into the normal level after the prolonged treatment.

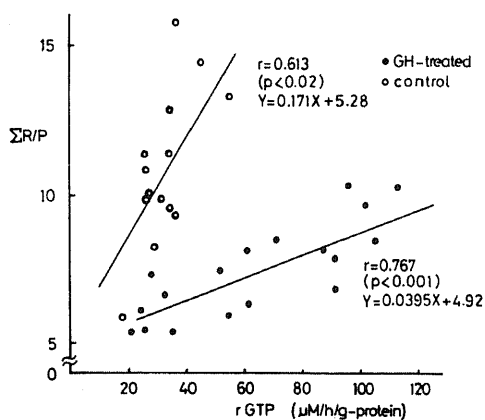


Fig. 13. Correlation between GGTP activity and integrated R/P values of group B and C AAs. Significant correlation is noted in hGH-treated patients (solid circle) and in controls (open circle) although the regression equation is considerably different.

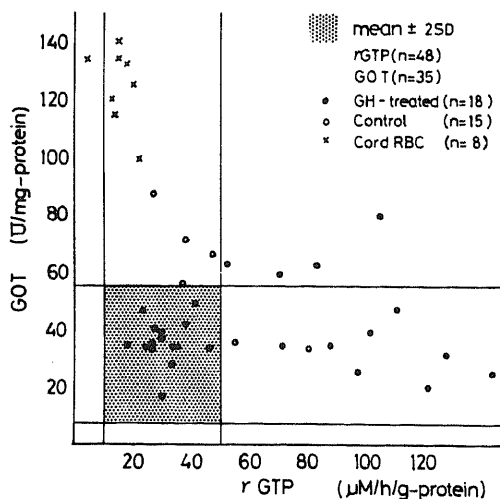


Fig. 14. Correlation between GGTP and GOT activities in the red cell membrane. Shaded area indicate mean±2 SD of normal GGTP (n=48) and GOT (n=35) values. There is no significant correlation.

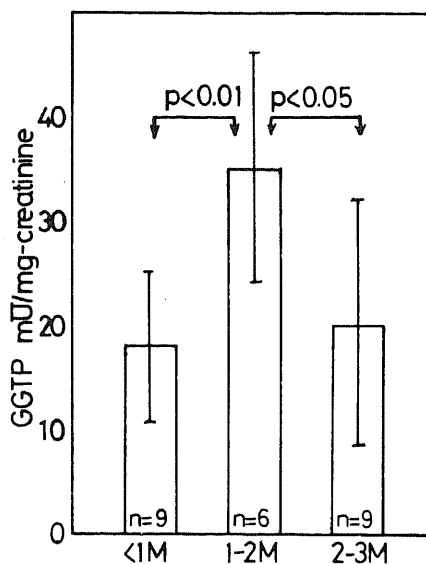


Fig. 15. Serial estimations of urinary GGTP activities during hGH treatment in one patient with pituitary dwarfism. Before the therapy, it was 16.3mU/mg-creatinine. Significant increase in urinary GGTP is also observed during 1-2 months of the therapy.

認められず、GGTP 活性の上昇は hGH の膜に対する直接的効果と推定される。

2. 尿中 GGTP 活性 (図 15)

赤血球膜 GGTP 活性は hGH により促進効果をうけることが示されたが、他の生体膜における GGTP 活性をみるため、尿中 GGTP 活性を検討した。尿中 GGTP は尿細管細胞の GGTP 活性を反映するとみられるが、治療初期 1-2 ヶ月で有意の上昇がみられ、3 ヶ月以降再び前値に減少した。この二相性の変動は赤血球膜 GGTP のそれとよく類似していた。

考 察

下垂体性小人症患児の PAA 濃度については Zachmann¹⁹⁾, Stahnke²⁰⁾ の報告があり、両者共、未治療時には低く、hGH 治療により正常化すると述べている。今回の成績も同様の結果であった。この成績は hGH である期間治療した患者についてのものであるが、より短時の hGH 投与後、たとえば数時間後の急性効果では PAA は前値より減少すると報告されている²¹⁾。この際、尿中アミノ酸排泄は増加しないので、血中の減少は細胞内への転送によるものと解釈される²⁰⁾。従って hGH の PAA に対する影響は直接的急性効果と持続的効果を区別して考える必要がある。一方グルコース負荷により PAA が減少することは既に検討されており¹¹⁾⁽²²⁾、この現象は内因性インスリン分泌によるといわれている¹¹⁾⁽²³⁾。事実 Pozefsky²⁴⁾ は直接インスリンを静注して PAA の減少を観察している。この機序として、インスリンは筋細胞へのアミノ酸とりこみを増大させるのか、あるいは筋細胞からのアミノ酸放出を抑制するのか、二つの可能性が考えられるが、後者の機序が主に推測されている。この刺激法を利用して PAA 転送に関する hGH の効果を検討したが、hGH 欠損下でのグルコース負荷による PAA の減少率は対照群より顕著であった。一般に下垂体性小人症では内因性インスリン分泌が低下しているが²⁵⁾⁽²⁶⁾、逆にインスリンに対する組織の感受性は亢進している²⁷⁾⁽²⁸⁾。未治療群の PAA 減少率が大きいことはインスリン感受性が高いことを反映するものであろう。hGH 投与により PAA 減少率が正常化するのには hGH の抗インスリン作用からうなづける結果であるが、長期治療群 (Ⅲ群) の減少率増大はインスリン過敏性からは説明が困難である。そこで hGH がアミノ酸転送に及ぼす効果を細胞膜の面から検討した。

赤血球はその材料入手の容易さから生体膜の研究に利用価値が高いが、近年血漿と組織間のアミノ酸転送に赤血球がアミノ酸担体の役割を果しているとする報

告が多い¹⁴⁾。またヒト赤血球と hGH が特異的に結合しその膜構造に変化をきたすという証拠もあげられている⁹⁾。しかし従来の in vitro の実験では標識アミノ酸の赤血球内とりこみが非常に低い²⁹⁾ことから、生体内でのアミノ酸転送に関する赤血球の役割は疑問視される面もあった。この両者の矛盾を説明する仮設として、生体内ではアミノ酸転送を促すホルモンの介在が想定される³⁰⁾。最近血漿 GH 濃度とラット横隔膜のアミノ酸とりこみには経時的相関関係がみられるといわれ⁶⁾、実際に hGH が赤血球膜の性状を変化させるならば、hGH が赤血球のアミノ酸透過性に重要な影響を及ぼしている可能性がある。この点を実験Ⅱ、Ⅲで検討した。

実験Ⅱの結果から、既に Elwyn¹⁾ が犬について観察している様に、赤血球内アミノ酸濃度は同一個体内で生理的に刻々と変動しており、無処置の対照群の R/P 比は大きい変動巾を示した (図 2)。これに対して未治療の下垂体性小人症の赤血球の R/P 比は有意に低く、かつ変動巾が小さかった。さらに hGH を投与してもその後 2 時間の R/P の変化はみられなかった。即ち hGH 欠損下の赤血球は正常児のそれに比してアミノ酸の出納が少ないと考えられる。一方 hGH 補償療法を行なうと、hGH 投与に反応性の回復がみられ投与 2 時間後の R/P 比は正常変動域に上昇した。この変化は特に glucogenic AA で顕著であった。hGH が赤血球のアミノ酸転送にどのような機序で影響を与えるのか未だ明らかではないが、少なくとも R/P の濃度比で分けたアミノ酸の A, B, C の各群の影響は異なっていた。Winter と Christensen²⁹⁾ は赤血球膜におけるアミノ酸転送は apolar side chain の大きさと立体構造に左右されると述べている。Young³¹⁾ は in vitro における標識アミノ酸の成績から、Val, Leu, Met, Tyr, Phe は赤血球膜透過性が高く、Asp, Glu は最も赤血球内に入りやすく、Pro, Ala, Gly, Cys はその中間に位置すると述べているが、今回の成績も方法は異なるがよく合致する結果であった。

実験Ⅱで hGH が赤血球膜アミノ酸転送に影響を与えることは明らかとなったが、その効果は hGH の膜に対する直接的な作用なのか否かを in vitro で検討した (実験Ⅲ)。標識アミノ酸としてとりこみ率の高い leucine を使用した。正常赤血球に対する in vitro の hGH 添加は影響を示さなかった。一方治療中の患者赤血球では Leu の influx が有意に低下しており、efflux 相には差がみとめられなかった。この結果は in vivo での Leu の R/P 比が正常より低いことと矛盾しないが、hGH の赤血球膜に対する直接的な作用に対

Table 4. Effects of other agents on ^3H -leucine transport (normal erythrocytes)

Exp. I	content.	$\times 10^3$ cpm/ml PRC 60'/0'		Cell/Medium 60'/0'	
			n		n
hGH	(100ng/ml)	0.48 \pm 0.20	(4)	0.43 \pm 0.14	(4)
Insulin	(100 μ U/ml)	0.54 \pm 0.16	(4)	0.43 \pm 0.10	(4)
Glucagon	(1 μ g/ml)	0.64 \pm 0.04	(4)	0.46 \pm 0.10	(4)
Hydrocortisone	(200ng/ml)	0.59 \pm 0.13	(4)	0.46 \pm 0.14	(4)
Epinephrine	(100ng/ml)	0.69 \pm 0.11	(4)	0.42 \pm 0.09	(4)
T3	(2ng/ml)	0.60 \pm 0.08	(4)	0.46 \pm 0.08	(4)
Control		0.60 \pm 0.11	(4)	0.46 \pm 0.10	(4)
Exp. II					
Control (Ca+)		0.59 \pm 0.09	(4)	0.50 \pm 0.09	(4)
Ca-free		0.55 \pm 0.13	(4)	0.47 \pm 0.13	(4)
Ca+glucose		0.59 \pm 0.09	(4)	0.49 \pm 0.11	(4)

しては否定的な成績である。おそらく生体内では何らかの代謝的過程を介してアミノ酸転送に影響するものと推定される。

一般に GH は組織へのアミノ酸とりこみに関して二相性の効果を発現するといわれている⁷⁾⁻¹⁰⁾。投与初期 2-3 時間に急性促進効果が作動し、4-5 時間は続くという。この間に筋肉へのアミノ酸とりこみが増大し、この過程は蛋白合成阻害剤により抑制されることから carrier protein の合成が関与するとみられている⁷⁾。一旦、促進効果が発現するとその後 1-2 日間は再刺激に対して不応期であるという³²⁾⁻³⁴⁾。この hGH のアミノ酸転送に関する二相性効果は細胞一般に対する普遍的な現象であるという³²⁾。実験 II で観察された C 群アミノ酸の R/P 比が治療後さらに低下する現象はこの hGH の二相性効果を反映しているものかもしれない。

一般に細胞膜アミノ酸輸送機序は carrier protein に仲介された能動輸送によっておこなわれるとされ³⁵⁾、上述の hGH の促進効果も carrier protein の合成が推定される。GH の効果発現に time lag がある⁶⁾こと、促進効果が in vitro の GH 添加では認められないこともこれを支持する。現在この蛋白の化学的実体は明らかではないが、最近、細胞膜のアミノ酸転送は r-グルタミン回路を介することが、Meister 一派により提唱された³⁶⁾。GGTP は膜に結合した酵素で細胞

内へのアミノ酸とりこみに直接関与するが、ヒト赤血球にこの酵素が存在するか否かについては相反する見解が報告されている¹⁵⁾⁽³⁷⁾⁽³⁸⁾。測定された活性は白血球の混入とする見方もあるが、今回白血球を充分除去した赤血球膜分画に、GGTP 活性が存在することを見いだした。未治療の患者赤血球で有意に低く、hGH 補償療法により明らかな活性の上昇をみ、この活性とアミノ酸全体の R/P 比を統計した $\Sigma\text{R}/\text{P}$ の値とは正の相関が認められた。さらに 1 例の患者で経時的に観察した尿中 GGTP 活性も赤血球膜の活性の推移に平行した変動を示した。以上の成績は赤血球膜のアミノ酸転送に膜 GGTP が関与していることを示唆すると同時に、hGH がその活性化を介してアミノ酸とりこみに影響しているものと考えられる。しかし正常以上の活性上昇にもかかわらず、正常赤血球と患者赤血球の相関の帰帰直線に差がみられる(図 14)ことは赤血球膜のアミノ酸転送が GGTP 活性のみに左右されているものではないことを示唆している。おそらく carrier protein の合成、膜の性状の変化等の metabolic な変化がさらに関与するものと推定される。

最後に PAA 減少率や GGTP 活性の推移にみられた二相性変化と近年注目されている GH 受容体の関連性につき考察する。GH 受容体が血中 GH 濃度により down regulation をうけることは既に認められている³⁹⁾。hGH 治療をうけている患者の血中 GH の変動は

生理的リズムとは全く異なっており、週2回の筋注により2-3日間は生理的濃度をこえるGHに持続的に影響をうけている。このような環境の下ではGH受容体の側にも当然変化がおこることが推測され、長期に及ぶ治療経験上、GHの成長促進効果が年を追って減弱する事実⁴⁰⁾⁻⁴²⁾も受容体の変化を想定させる。今回観察された二相性変化もGH受容体の変化に関連している可能性があるが、この問題は今後の検討に残されている。

結 論

hGHのアミノ酸転送に及ぼす影響を下垂体性小人症および正常小児を対象に、血漿および赤血球アミノ酸濃度の変動と赤血球膜GGTP活性より検討した。

1) GH欠損下の血漿アミノ酸濃度は正常児より低く、hGH治療により正常化する。

2) グルコース負荷による血漿アミノ酸減少率は未治療時大きく、治療初期に正常化し、以後再び増大する。

3) 赤血球/血漿アミノ酸濃度比(R/P)は、GH欠損下で低く生理的変動が少ない。hGH治療によりglucogenic AAのR/Pは正常域に上昇し変動巾も増大するが、転送の速いアミノ酸のR/P比は治療後も低値に止る。

4) hGHの赤血球アミノ酸濃度に対する影響はhGHの膜に対する直接的効果とは考え難い。

5) 赤血球膜GGTP活性は治療前低く、治療早期に著明に上昇し、以後正常化する。

6) 以上の成績より赤血球内アミノ酸は生理的に顕著な変化を示し、hGHはそのとりこみを促進する。促進効果の一部は赤血球膜GGTP活性を介しているものと考えられる。

稿を終るに臨み、御指導と御校閲を賜りました谷口昂教授に深謝いたします。また終始御指導、御助言いただきました佐藤保助教授に心から感謝の意を表します。そして御協力いただきました教室の諸先生方に感謝いたします。

尚、本論文の要旨は、第81回日本小児科学会(1978)と第53回日本内分泌学会総会(1980)において発表した。

文 献

- 1) Elwyn, D. H. : Distribution of amino acids between plasma and red blood cells in the dog. *Fed. Proc.*, **25**, 854-861 (1966)
- 2) Elwyn, D. H., Launder, W. J., Parikh, H. C. & Wise, E. M. Jr. : Roles of plasma and

erythrocytes in interorgan transport of amino acids in dogs. *Am. J. Physiol.*, **222**, 1333-1342 (1972)

3) Aoki, T. T., Brennan, M. F., Muller W. A., Moore, F. D. & Cahill, G. F. Jr. : Effect of insulin on muscle glutamate uptake. *J. Clin. Invest.*, **51**, 2889-2894 (1972)

4) Felig, P., Wahren, J., Raf, L. : Evidence of inter-organ amino acid transport by blood in humans. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**, 1775-1779 (1973)

5) Sonenberg, M. : Interaction of human growth hormone and human erythrocyte membranes studied by intrinsic fluorescence. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **68**, 1051-1055 (1971)

6) Isaksson, O., Nutting, D. F., Kostyo, J. L. & Reagan, C. R. : Hourly variations in plasma concentrations of growth hormone and insulin and in amino acid uptake and incorporation into protein in diaphragm muscle of the rat. *Endocrinology*, **102**, 1420-1428 (1978)

7) Kostyo, J. L. : Rapid effects of growth hormone on amino acid transport and protein synthesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **148**, 389-407 (1968)

8) Hjalmarson, Å. : Sensitivity of the rat diaphragm to growth hormone. III. biphasic action of growth hormone in vitro on amino acid and pentose uptake. *Acta endocr. Suppl.*, **166**, 1-16 (1968)

9) Nutting, D. F. : Ontogeny of sensitivity to growth hormone in rat diaphragm muscle. *Endocrinology*, **98**, 1273-1283 (1976)

10) Nutting, D. F. & Coats, L. J. : Hormonal alteration of the sensitivity of amino acid transport to growth hormone in muscle of young rats. *Proc. Soc. exp. Biol.*, **156**, 446-451 (1977)

11) Zinneman, H. H., Nuttall, F. Q. & Goetz, F. C. : Effect of endogenous insulin on human amino acid metabolism. *Diabetes*, **15**, 5-8 (1966)

12) Swendseid, M. E., Tuttle, S. G., Drennick, E. J. & Joven, C. B. : Plasma amino acid response to glucose administration in various nutritive states. *Amer. J. clin. Nutr.*, **20**, 243-249 (1967)

13) Spackman, D. H., Stein, W. H. & Moore, S. :

- Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. *Analyt. Chem.*, **30**, 1190-1206 (1958)
- 14) **Srivastava, S. Awasthi, Y. C., Miller, S. P., Yoshida, A. & Beutler, E.** : Studies on γ -glutamyl transpeptidase in human and rabbit erythrocytes. *Blood*, **47**, 645-650 (1976)
- 15) **Orlowski, M. & Meister, A.** : γ -glutamyl-p-nitroanilide; A new convenient substrate for determination and study of L- and D- γ -glutamyltrans peptidase activities. *Biochim. Biophys. Acta*, **73**, 676-679 (1963)
- 16) **Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J.** : Protein measurements with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951)
- 17) **LaDue, J. S., Wroblewski, F. & Karmen, A.** : Serum glutamic oxaloacetic transaminase activity in human acute transmural myocardial infarction. *Science*, **120**, 497-499 (1954)
- 18) **Rapoport, S. M., Renthal, S., Schewe, T., Shultze, M. & Miller, M.** : The metabolism of the reticulocyte, p93-141, In Yoshikawa, H. & Rapoport, S. M. (ed), Cellular and molecular biology of erythrocytes, University of Tokyo Press, Japan, 1974
- 19) **Zachmann, M.** : Influence of human growth hormone (hGH) on Plasma and urine amino acid concentrations in hypopituitary dwarfs. *Acta endocr.*, **62**, 513-520 (1969)
- 20) **Stahnke, N., Pletter, C. & Blunck, W.** : Effects of growth hormone on protein metabolism. *Acta Paediat. Scand.*, **66**, 153-159 (1977)
- 21) **Zachmann, M., Prader, A., Ferrandez, A. & Illig, R.** : Evaluation of growth hormone deficiency by metabolic tests. p421-428, In Pecile, A. & Muller, E. E. (ed), Growth and growth hormone, Excerpta med. Amsterdam, (1972)
- 22) **Munro, H. N. & Thomson, W. S. T.** : Influence of glucose on amino acid metabolism. *Metabolism*, **2**, 354-361 (1953)
- 23) **Felig, P. & Wahren, J.** : Influence of endogenous insulin secretion on splanchnic glucose and amino acid metabolism in man. *J. clin. Invest.*, **50**, 1702-1711 (1971)
- 24) **Pozefsky, T., Felig, P., Tobin, J. D., Soelder, T. S. & Cahill, G. F. Jr.** : Amino Acid Balance across Tissues of the Forearm in Postabsorptive Man. Effects of Insulin at Two Dose Levels. *J. clin. Invest.*, **48**, 2273-2282 (1969)
- 25) **Frohman, L. A., MacGillivray, M. H. & Acedo, T. Jr.** : Acute Effects of Human Growth Hormone on Insulin Secretion and Glucose Utilization in Normal and Growth Hormone Deficient Subjects. *J. Clin. Endocr.*, **27**, 561-567 (1967)
- 26) **Merimee, T. J., Rabinowitz, D., Rimoin, D. L. & McKusick, V. A.** : Isolated human growth hormone deficiency. III. Insulin secretion in sexual ateliotic dwarfism. *Metabolism*, **17**, 1005-1011 (1968)
- 27) **Gold, H., Spector, S., Samaan, N. A. & Pearson, O. H.** : Effect of growth hormone on carbohydrate metabolism in hypopituitary dwarfs. *Metabolism*, **17**, 74-83 (1968)
- 28) **Costin, G., Kogut, M. D. & Frasier, S. D.** : Effect of low-dose human growth hormone on carbohydrate metabolism in children with hypopituitarism. *J. Pediat.*, **80**, 796-803 (1972)
- 29) **Winter, C. G. & Christensen, H. N.** : Migration of amino acids across the membrane of the human erythrocyte. *J. Biol. Chem.*, **239**, 872-878 (1964)
- 30) **Noall, M. W., Riggs, T. R., Walker, L. M. & Christensen, H. N.** : Endocrine control of amino acid transfer. *Science*, **126**, 1002-1005 (1957)
- 31) **Young, J. G. & Ellory, J. C.** : Red cell amino acid transport. p301-325, In Ellory, J. C. & Lew, V. L. (ed), Membrane transport in red cells. Academic Press, London, New York, San Francisco. 1977
- 32) **Albertson - Wikland, K. & Isaksson, O.** : Time course of the effect of growth hormone in vitro on amino acid and monosaccharide transport and on protein synthesis in diaphragm of young normal rats. *Endocrinology*, **102**, 1445-1451 (1978)
- 33) **Albertsson - Wikland, K., Eden, S. & Isaksson, O.** : Analysis of early responses to growth hormone on amino acid transport and protein synthesis in diaphragm of young

normal rats. *Endocrinology*, **106**, 291 - 297 (1980)

34) **Albertsson - Wikland, K., Eden, S. Ahrén, K. & Isaksson, O.** : Analysis of refractoriness to the effects of growth hormone on amino acid transport and protein synthesis in diaphragm of young normal rats. *Endocrinology*, **106**, 298 - 305 (1980)

35) 川崎 尚 : アミノ酸の細胞膜透過性とその調節, 代謝 **13**, 751 - 758 (1976)

36) **Meister, A.**: On the enzymology of amino acid transport. *Science*, **180**, 33 - 39 (1973)

37) **Jackson, R. C.**: Studies in the enzymology of glutathione metabolism in human erythrocytes. *Biochem. J.*, **111**, 309 - 315 (1969)

38) **Azzopardi, O. & Jayle, M F.**; Activité r - glutamyltransferase dans la membrane du globe rouge humain. *Biochim. Biophys. Acta*, **389**, 339 - 344 (1975)

39) **Kahn, M. C. R., Megyesi, K., Bar, R. S.,**

Eastman, R. & Flier, L. S.: Receptors for peptide hormones. *Ann. inter. Med.*, **86**, 205 - 217 (1977)

40) **Tanner, J. M., Whitehouse, R. H. & Vince, F. P.**: Effect of human growth hormone treatment for 1 to 7 years on growth of 100 children, with growth hormone deficiency, low birthweight, inherited smallness, Turner's syndrome, and other complaints. *Archiv. Dis. Child.*, **46**, 745 - 779 (1971)

41) **Rudman, D., Kutner, M. H., Goldsmith, M. A. & Blackston, R. D.**: Predicting the response of growth hormone - deficient children to long term treatment with human growth hormone. *J. Clin. Endocr. Metab.*, **48**, 472 - 477 (1979)

42) **Soyka, L. F., Bode, H. H., Crawford, J. D. & Flynn, F. J.**: Effectiveness of long - term human growth hormone therapy for short stature in children with growth hormone deficiency. *J. Clin. Endocr.*, **30**, 1 - 14 (1970)

Effects of Human Growth Hormone on Amino Acid Transport between Plasma and Erythrocytes Yasuko Uchigata, Department of Pediatrics, (Director: Prof. N. Taniguchi) School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920, Japan. *J. Juzen Med. Soc.*, **89**, 837-851 (1980).

Abstract Effects of human growth hormone (hGH) on amino acid (AA) transport between plasma and erythrocytes were studied in patients with pituitary dwarfism before and during the hGH therapy in comparison with normal children. Plasma amino acid (PAA) transport into tissues induced by glucose administration (study 1), changes in AA transport across red cell membrane in vivo (study 2), and in vitro (study 3), and effects of hGH on gamma-glutamyl-transpeptidase (GGTP) activity in red cell membranes (study 4) were examined.

The results were as follows;

Study 1: Fasting levels of PAA before treatment were significantly low, but gradually rose during the course of the therapy. Effect of hGH on PAA decrease induced by glucose was biphasic; elevated in the early stage and depressed later.

Study 2: On the basis of AA concentration ratio in red cell to plasma (R/P), AAs were divided into three groups (group A; $R/P \gg 1$, B; $R/P \approx 1$ and C; $R/P < 1$). Group A (aspartate and glutamate) showed great intracellular fluctuation independently of hGH. R/P of group B (threonine, serine, glycine and alanine) was reduced before hGH therapy, which restored the normal shift after hGH administration. In contrast, R/P of group C (cystine, valine, methionine, isoleucine, leucine, tyrosine and phenylalanine) was low before therapy and further depressed by hGH treatment.

Study 3: In vitro ^3H -leucine uptake into normal erythrocytes was not affected by hGH, whereas that in hGH-treated patients was significantly decreased. HGH added in vitro did not influence the change. Efflux of ^3H -leucine from red cells was not different between patients and controls.

Study 4: GGTP activities in red cell membrane were reduced in untreated patients, which rose prominently in the early stage of hGH therapy, decreasing to the normal level in the course of the therapy. Urinary GGTP in a patient showed similar fluctuation during hGH treatment. Between GGTP activity and integrated value of R/P ratios, a linear correlation was noted ($p < 0.001$).

These results indicate that physiologically a dynamic equilibrium exists between AAs in red cells and those in plasma, the transport system of which appears to be different in each group of AAs. HGH seems to exert promoting effects on amino acid transport, in part via activation of GGTP in the early stage of administration. The mechanism of the late effect of hGH on the membrane transport of AAs remains to be elucidated in future.