

原 著

Radioimmunoassay によるヒト血中総 IGF-I の測定

東京女子医科大学 ラジオアッセイ検査科

イシワタリ	ナオコ	ザオ	ユウ	デムラ	レイコ	ジビキ	カズコ
石渡	尚子・肇	字 ¹⁾	・出村	黎子	・地曳	和子	
サノ	トモヒデア	サノ	ノリコ	オダギリ	エミ	デムラ	ヒロシ
佐野	智英 ²⁾	・佐野	典子 ²⁾	・小田桐恵美	・出村	博	

(受付 昭和63年2月1日)

Measurements of Total IGF (Insulin-like Growth Factor)-I
in Human Plasma by Radioimmunoassay

Naoko ISHIWATARI, Yu ZHAO¹⁾, Reiko DEMURA, Kazuko JIBIKI,
Tomohide SANO²⁾, Noriko SANO²⁾, Emi ODAGIRI
and Hiroshi DEMURA

Radioassay Center, Tokyo Women's Medical College

1) Trainee of Japan International Corporation Agency

2) Nishiyamado Hospital

Measurements of plasma total insulin-like growth factor-I (IGF-I) were performed in various clinical disorders with radioimmunoassay (RIA) using biosynthetic IGF-I for standard, labelling and antigen to raise antibody. RIA was satisfactory enough as to sensitivity, precision, and specificity for measuring IGF-I in 100 μ l plasma or serum after extracting with acid-ethanol. Recovery of extraction was 96.7%. Plasma total IGF-I levels in normal subjects were age-related. They were low in early childhood, but increased to a peak level during puberty and reached to normal adult levels of 232~557 ng/ml. They decreased gradually after 60th. Normal short children with heights within -1.5 SD of mean showed low normal to subnormal levels but patients with pituitary dwarfism showed significantly low levels compared with age-matched controls. Patients with acromegaly has significantly high levels, but they were normal in prolactinoma and low in Cushing's syndrome. Patients with liver or renal diseases had low levels in a parallel fashion with their dysfunction. Plasma total IGF-I showed a significant correlation with somatomedin C levels measured by Nichols RIA kit.

Measurements of plasma total IGF-I by RIA were useful to tell GH secretory reserve and influences of endocrine or metabolic factors for a production of IGF-I.

はじめに

ヒトの血中には2種類のインスリン様成長因子 IGF-I, IGF-II が存在し, IGF-I とソマトメジン C は同一物質であり, IGF-II と MSA (multiplication stimulating activity) は類似した構造を持つことが知られている¹⁾²⁾. IGF-I は分子量7649の成

長ホルモン (GH) 関連ペプチドで, 主に肝で産生され, 成長促進作用, インスリン様作用などを有し, 血中では95%以上が分子量40K, 150K の2種類の蛋白と結合して存在する^{3)~5)}. 現在市販のソマトメジン C の RIA キットは遊離型と一部の蛋白結合ソマトメジン C を測定するものであり, 正

1) 国際協力事業団研修生

2) 西山堂病院

常人のプール血清1ml中の活性を1Unitとしている。

今回我々は遺伝子工学により作製された合成IGF-Iを用いて、血中総IGF-Iを測定するRIA系を確立し、基礎的、臨床的検討を行ったのでその結果を報告する。

方法および対象

1. 材料

標準品およびヨード化用には、藤沢薬品より提供を受けた合成IGF-I Lot B1516Ysを、抗血清は同社 Lot B01066Sを用いた。

2. 方法

¹²⁵IによるIGF-Iの標識はクロラミンT法にて行った。¹²⁵I-IGF-Iの比活性は67%であった。抽出および測定法を図1に示した。抽出は古川らの方法によった⁶⁾。B/F分離にはポリエチレングリコール6000(PEG)を用いた。ソマトメジンC, hGH, コルチゾール, プロラクチンの測定は、各々<NicholsソマトメジンC>, <hGH栄研>, <Amersham amerlex cortisol>, <NIAMDプロラクチン>キットを用いた。

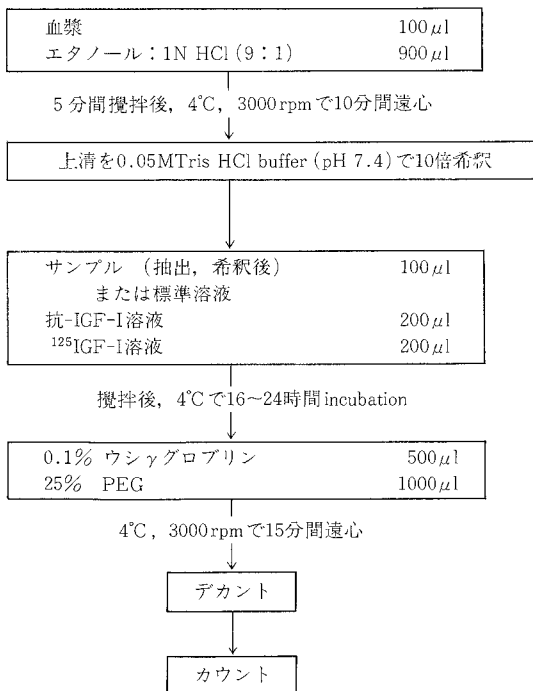


図1 測定法

3. 対象

1) 小児

身長が標準±1.5SD以内の正常小児281例(男子156例, 女子125例), 身長-2.5~-1.5SDで各種GH分泌刺激試験で5ng/ml以上に反応した正常低身長71例(男子42例, 女子27例), および身長が標準-2.5SD以下, 骨年齢が13歳以下で, 且つ暦年例の80%以下と遅れを認め, 種々のGH分泌刺激試験に無反応だった下垂体性小人症18例を対象とした。

2) 成人

21~85歳の正常成人79例(男子38例, 女子41例), 末端肥大症38例(未治療23例, 手術後17例, プロモクリプチン治療中9例), プロラクチノーマ19例(未治療13例, プロモクリプチン治療中6例), 下垂体腺腫, 視床下部腫瘍手術後の下垂体機能低下症22例, 甲状腺機能亢進症8例, 甲状腺機能低下症10例, クッシング症候群13例(下垂体腺腫6例, 副腎腺腫7例), 糖尿病13例, 慢性肝炎14例, 急性肝炎20例, 肝硬変12例, 肝癌5例, 慢性腎不全35例を対象とした。また慢性腎不全の透析前後9例のIGF-Iを測定した。

結果

1. 基礎的検討

1) 標準曲線(図2)

各標準溶液を5重測定して得られた標準曲線の測定範囲は, 0.434~55.6ng/mlであった。各点の

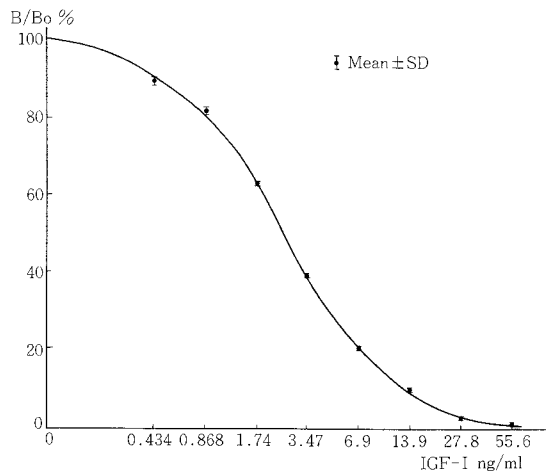


図2 標準曲線

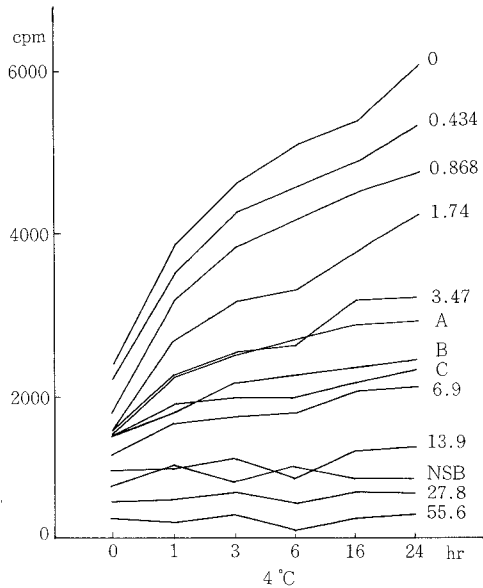


図3 第1反応時間

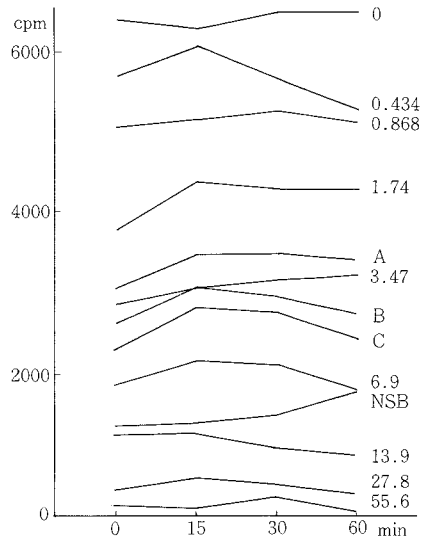


図4 第2反応時間

表1 抽出率

	添加量 ng/ml	計算値 ng/ml	実測値 ng/ml	抽出率 %
A	31.3	182.4	151.1	97.9
	62.5	213.6	178.6	101.7
	125.0	276.1	217.3	94.4
	250.0	401.1	260.7	105.9
	500.0	651.1	424.6	81.7
				96.3±9.22
B	31.3	265.0	233.7	101.4
	62.5	296.2	268.8	99.2
	125.0	358.7	293.9	94.1
	250.0	493.7	337.7	98.7
	500.0	733.7	487.4	78.7
				94.4±9.18
C	31.3	476.0	444.8	105.0
	62.5	507.3	499.7	104.0
	125.0	569.8	527.8	97.9
	250.0	694.8	558.1	104.7
	500.0	944.8	727.6	85.8
				99.5±8.18

平均CVは7.9±9.0%，測定感度は0.434ng/mlであった。

2) 反応時間 (図3, 4)

反応温度4°C，第2反応時間(γグロブリン，PEG添加後の反応時間)30分で第1反応時間を0～24時間と変化させた。24時間でも低濃度域のbound%が上昇したが，サンプルの実測値は安定していたため，反応時間は16～24時間とした。次に反応温度4°C，第1反応時間18時間で第2反応時間を0～60分に変化させた。いずれの反応時間でもbound%に差はなかったため，γグロブリン，PEG添加後すぐに遠心分離を行った。

3) 抽出率 (表1)

3種類の血漿に種々の濃度のIGF-Iを加えて得られた抽出率は平均94.4～99.5%であった。

4) 回収率 (表2)

3種類の血漿の種々の濃度のIGF-Iを加えて得られた回収率は平均95.6～96.3%であった。

5) 精度 (表3)

3種類の血漿の測定内再現性，測定間再現性のCV%は各々2.6～4.9%，6.7～14.0%であった。

6) 希釈試験 (図5)

酸エタノール抽出後のサンプルを緩衝液で10～200倍に希釈したところ，全例でほぼ原点を通る直線が得られた。

表2 回収率

	添加量 ng/ml	計算値 ng/ml	実測値 ng/ml	回収率 %
A			142.4	
	21.7	164.1	164.7	100.4
	43.4	185.8	187.8	101.1
	86.8	229.2	234.7	102.4
	174.0	316.4	329.1	104.0
	347.0	489.4	490.1	100.1
	690.0	832.4	765.4	92.0
	1390.0	1532.4	1264.6	82.6
2780.0	2922.4	2574.4	88.1	
				96.3±7.78
B			270.1	
	21.7	291.8	283.0	97.0
	43.4	313.5	297.5	94.5
	86.8	356.9	343.1	96.1
	174.0	444.1	442.5	99.6
	347.0	617.1	607.4	98.4
	690.0	960.1	943.9	98.3
	1390.0	1660.1	1575.3	94.9
2780.0	3050.1	2625.1	86.1	
				95.6±4.23
C			511.5	
	21.7	533.2	515.5	96.7
	43.4	554.9	550.7	99.2
	86.8	598.3	563.1	94.1
	174.0	685.5	636.1	92.8
	347.0	858.5	837.5	97.6
	690.0	1201.5	1132.6	94.3
	1390.0	1901.5	2064.0	108.5
2780.0	3291.5	2691.9	81.8	
				95.6±7.43

表3 測定精度

	Intraassay			Interassay		
	A ng/ml	B ng/ml	C ng/ml	A ng/ml	B ng/ml	C ng/ml
N	10	10	10	10	10	10
Mean	302.2	467.4	889.5	290.2	476.8	975.2
SD	14.9	12.2	30.6	19.5	36.2	136.5
CV %	4.9	2.6	3.4	6.7	7.6	14.0

7) 交叉試験 (図6)

C-ペプチドとは0.42%の交叉を示したが、GH、インスリン、プロインスリン、LH、FSHとは交叉しなかった。

8) 採血条件

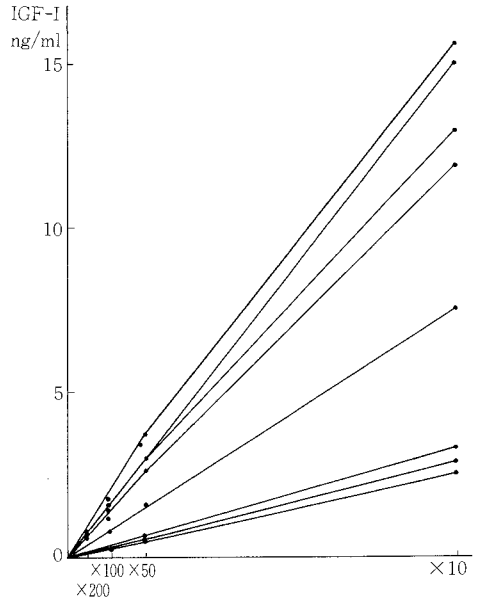


図5 希釈試験

50検体について採血条件による測定値の差を検討した。ヘパリン加血漿、EDTA加血漿、血清の mean±SD は各々487.0±265.8, 487.3±283.6, 512.9±332.7ng/ml で3者に有意の差はなかった。

9) Nichols ソマトメジン C キットとの相関(図7)

102検体において、本法と Nichols ソマトメジン C キットとは、 $r=0.843$, $Y=254.6X+165.9$ と有意の相関を示した。

2. 臨床的検討

1) 正常者基礎値 (図8)

小児の血中 IGF-I は乳幼児期は低値であったが、年齢と共に上昇し、思春期に相当する10~15歳でピークとなり、以後次第に下降し、10代の終わりにほぼ正常成人値となった。

成人では、20~30代の血中 IGF-I 値は性差はなく20代、30代の平均は397.8±85.1, 384.9±74.8 ng/ml で年齢の影響はなかったため、20~30代の52例の平均±2SD にあたる232.0~556.8ng/ml を成人の正常値とした。

60歳以上の老人では60代265.5±85.4, 70代228.4±96.3, 80代166.7±84.7ng/ml と、加齢に

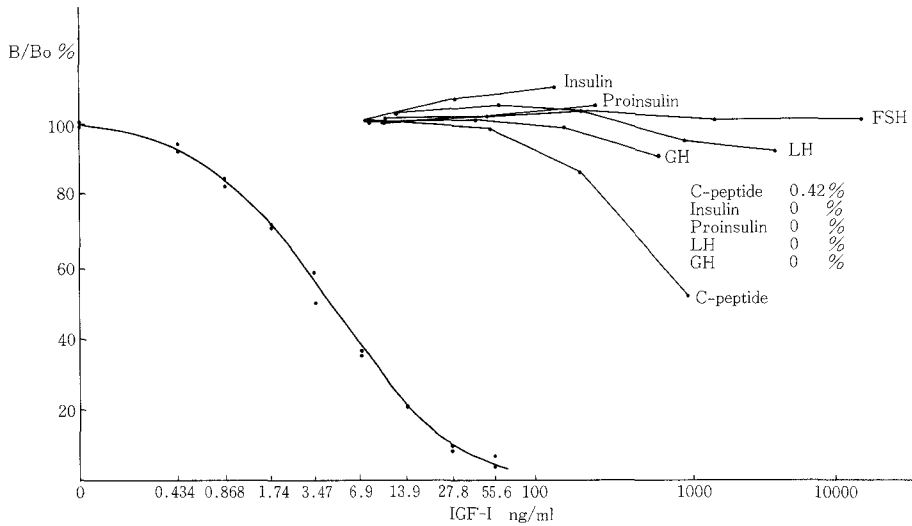


図6 交叉試験

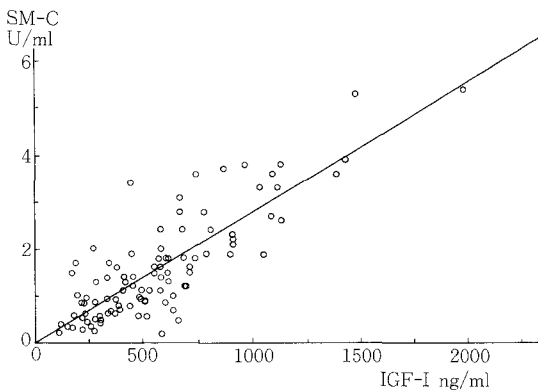


図7 本法と Nichols SM-C キットとの相関

伴い明らかに低下した。

2) 低身長 (図9)

4~17歳の正常低身長の年齢別 IGF-I 値は、8歳以下ではほとんど変化は認められないが、9歳以降次第に上昇し、正常小児と比べて低値ながらも類似したカーブを描いた。

3) 下垂体性小人症 (図10)

4~18歳の未治療下垂体性小人症では、年齢に関係なく低値で、 $\text{mean} \pm \text{SD}$ は $162.0 \pm 92.2 \text{ ng/ml}$ であった。

4) 成人各種疾患

図11に成人各種疾患の IGF-I 値および $\text{mean} \pm$

SD を示した。未治療末端肥大症は1例を除く全例で 862.9 ng/ml 以上の著明な高値を示し、術後では約半数が正常域に低下した。プロモクリプチン治療例では、血中 GH 値は治療前に比し有意に低下していたが、IGF-I は未治療群と有意の差はなかった。また未治療、手術後とも IGF-I と GH の相関は認められなかった(図12)。未治療プロラクチノーマでは、肝機能の低下を伴っていた2例が $81.4, 63.7 \text{ ng/ml}$ と著しい低値を示した。他はほぼ正常範囲に分布し、プロモクリプチン治療によって血中プロラクチン値が低下しても IGF-I に変化はなかった。クッシング症候群では血中コルチゾールと IGF-I には相関は認めなかったが、コルチゾールの高い例では IGF-I が低値となる傾向があった(図13)。

糖尿病の IGF-I は正常下限あるいは正常下界以下の例を多く認めたが正常者と有意の差はなかった。

肝疾患では、肝炎、肝硬変、肝癌の順に低く、肝炎では半数以上が正常範囲に分布していたのに対し、肝硬変では2例のみ、肝癌では全例が著明な低値であった。

慢性腎不全では、 $66.0 \sim 570.0 \text{ ng/ml}$ と広範囲に分布した。透析前後の IGF-I は、6例が透析後軽度上昇したが、個人差が大きく一定の傾向は

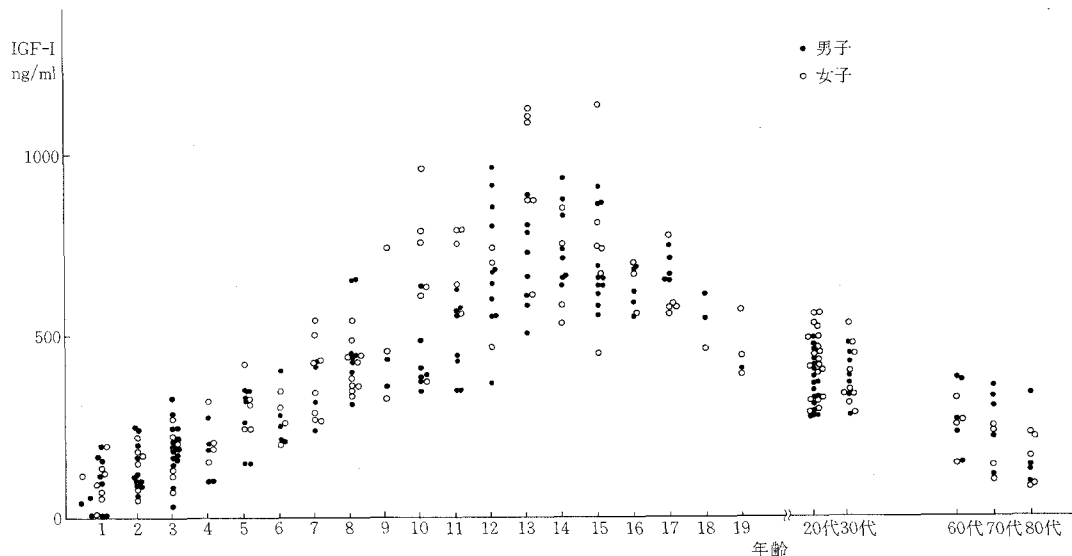


図8 正常者の血中 IGF-I 値

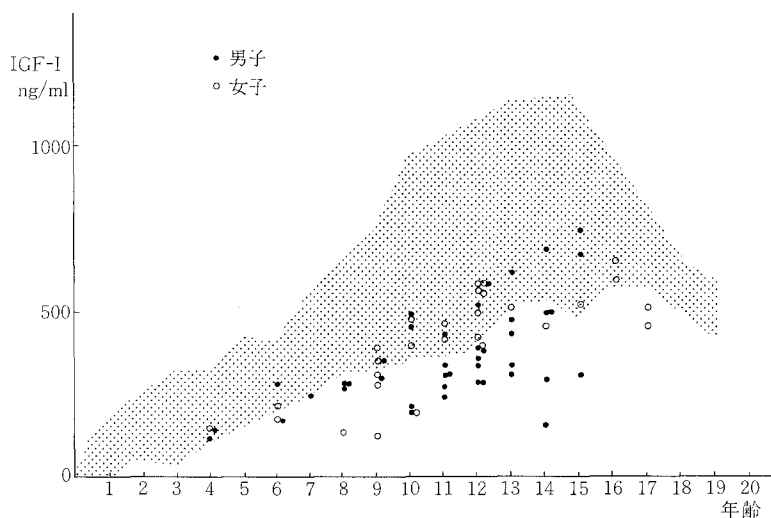


図9 正常低身長者の血中 IGF-I 値

なかった (図14)。

考 察

今回我々は遺伝子工学により作製された合成 IGF-I を用い、血中総 IGF-I を重量単位で表示する RIA 系の検討を行った。基礎的検討の結果、抽出率、精度、再現性、希釈試験はほぼ満足すべき結果で Nichols キットによる直接法と、本法との相関も良好であった。ソマトメジン C の測定については検体の条件に関して種々の報告がある

が^{7)~9)}、本法ではヘパリン加血漿、EDTA 加血漿、血清でほとんど差がなく安定した測定値が得られ、総 IGF-I 測定の有用性が示唆された。

臨床的検討の結果、正常小児の IGF-I は、乳児期は低く、年齢と共に上昇、10~15歳でピークとなり、以後次第に下降し成人域に達し、他の報告と同様明らかな年齢変化を認めた⁵⁾⁹⁾。乳児期に低値を示す理由として、胎児には胎児性ソマトメジンが高濃度に存在し、出生後次第に低下、2歳頃

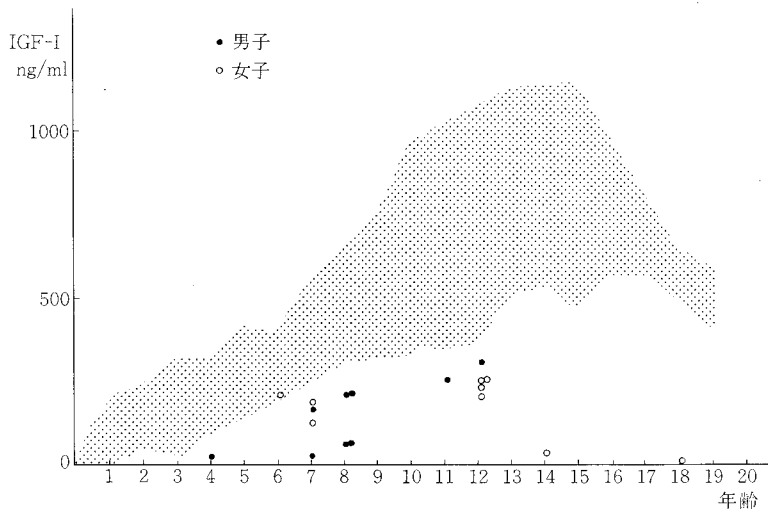
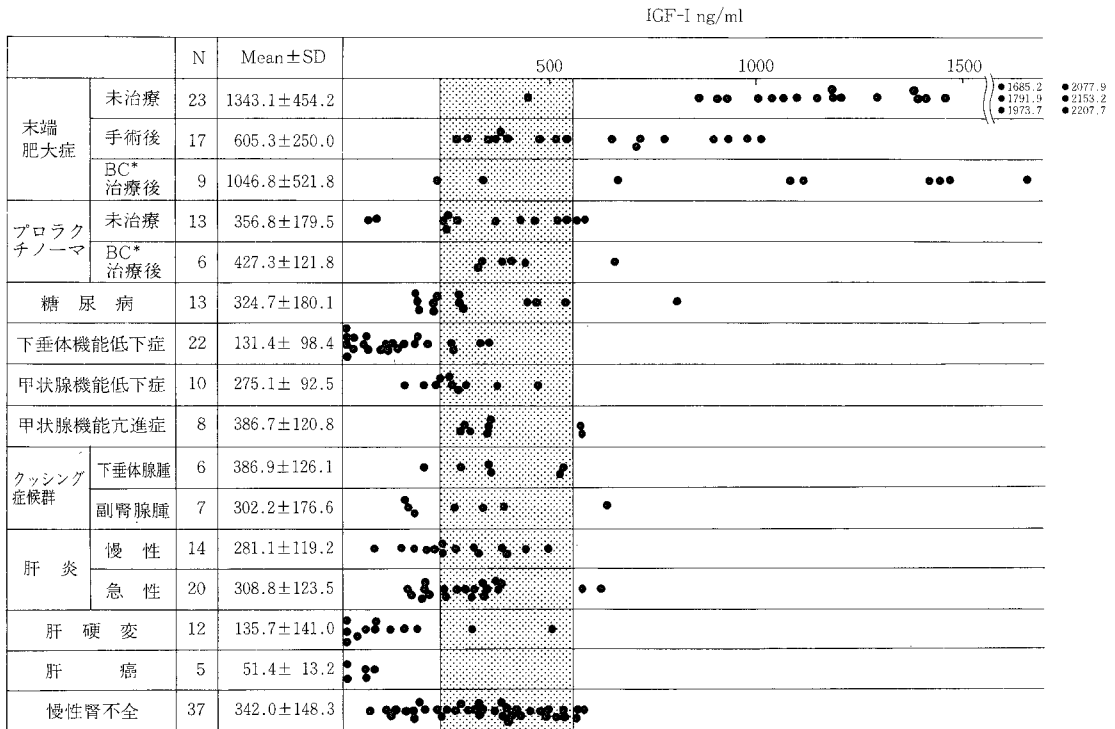


図10 下垂体性小人症の血中 IGF-I 値



BC*: プロモクリプアチン

図11 各種疾患における血中 IGF-I 値 (成人)

までに成人型ソマトメジンに置き変わるという報告¹⁰⁾, 成人の IGF-I の血中存在様式が150K 結合主体であるのに対し, 胎児は40K 主体で, 妊娠中期以降徐々に150K へ移行するとの報告¹¹⁾, 乳児期の

尿中 IGF-I 値は, 他の年齢での値より高く, そのほとんどが40K と結合した状態で排泄されるという報告があげられる¹²⁾. 正常小児では思春期にかけて血中 IGF-I が増加するが, 下垂体性小人症

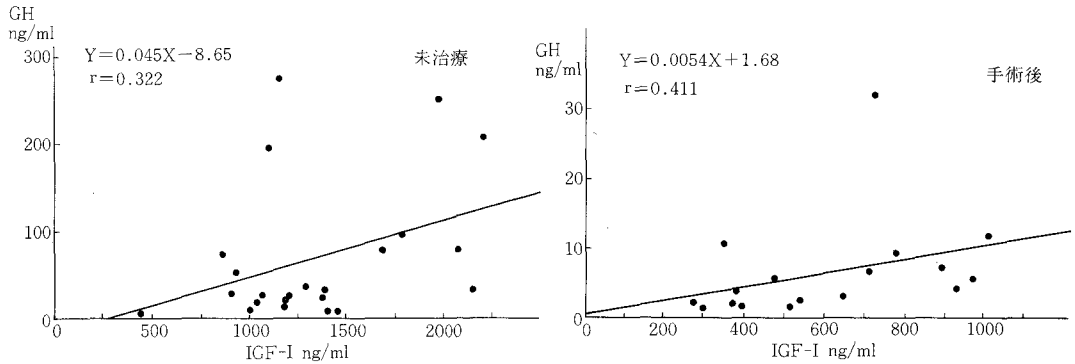


図12 末端肥大症における血中 IGF-I と GH の相関

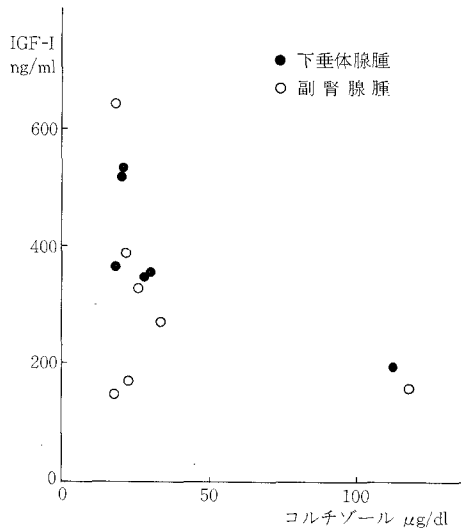


図13 クッシング症候群における血中コレチゾールと血中総 IGF-I の相関

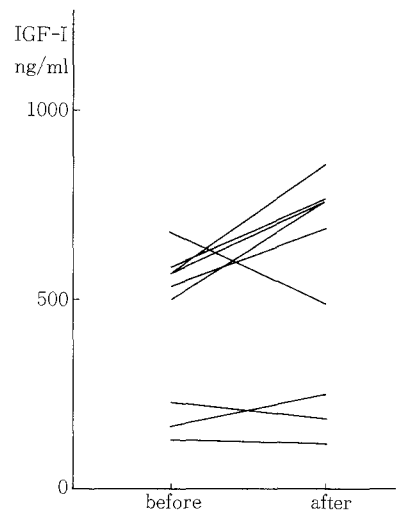


図14 透析前後の血中 IGF-I の変化 (CRF)

は一様に低く、正常低身長者は低値ながらも年齢に応じた変化を示した。したがって正常低身長者の中には部分的な GH 欠損症や GH neurosecretory dysfunction も含まれると考えられ、これらの症例で刺激試験に対する GH 分泌能は保たれているにもかかわらず、身長増加が不十分であることの一因と考えられた。これらの症例の血中 GH 基礎値は正常者とほとんど差を認めなかった。血中 GH は、IRMA や EIA を用いた高感度 GH 測定法によっても、正常者、正常低身長、下垂体性小人症を区別することはできず、これらを鑑別するには、24時間の血中 GH 値の頻回測定や高

感度 EIA による尿中 GH の測定が必要とされている。これに対し IGF-I は血中では比較的安定で、任意に採血した基礎値は一日分泌量を良く反映すると思われる。我々の成績でも低身長者の約30%が正常者とオーバーラップしたが、下垂体性小人症は正常者とは明らかな差を認め、GH 欠乏症の診断および GH 分泌能の指標として、簡便且つ有用であると思われた。

成人の IGF-I 値は、他の報告¹³⁾¹⁴⁾と比べ、 $394.4 \pm 81.2 \text{ ng/ml}$ とやや高めであったが、これは抗体の特異性、標準品、B-F 分離法の差によるものと考えられた。高年齢では成人に比べて有意に低値で、老年期にかけて徐々に低下するという

成績が得られた。成人の内分泌疾患では、末端肥大症で著明に高値で、手術によって低下はするものの、約半数はなお高値を示し、プロモクリプチン治療例では未治療群と有意の差はなかった。本症では、外科的、内科的治療によって血中GHは低下しても、わずかなGH過剰が存続すれば十分にIGF-I産生刺激になる可能性を示唆していた。他の内分泌疾患では高値を示す例は少ないのに対し、下垂体機能低下症、甲状腺機能低下症、クッシング症候群などでは低値を示す例が多く、GH以外の種々のホルモンの欠乏や過剰は、IGF-I産生に抑制的な影響を与えると思われた。

糖尿病のIGF-Iは広範囲な分布を示した。インスリンはIGF-I産生に促進的に作用するためインスリンが相対的に欠乏している糖尿病ではIGF-Iは低値を示すという報告や⁵⁾¹⁵⁾、35Kの結合蛋白がインスリンと逆相関を示すためIGF-Iは高値となるという報告など¹⁶⁾、様々な成績があり、これまでのところ一定した見解は得られていない。

肝疾患では、肝炎、肝硬変、肝癌と肝機能の低下に応じてIGF-Iも低下し、肝機能が結合蛋白のみならずIGF-I産生に与える影響が明らかであった。

慢性腎不全のIGF-I値は大半が正常範囲に分布し、透析によっても変化はなかった。これは、血中においてIGF-Iは結合蛋白と結合して存在するため、透析の影響を受けにくいと考えられた。血中総IGF-I値は直接測定による値と比べ、種々の刺激による変動や病態を顕著にはとらえられないが、妊娠を除くほとんどの疾患で直接法とよく一致すると報告されており¹⁷⁾、直接法で問題とされる検体の条件による影響も総IGF-I測定では認められず、安定した測定値が得られることは大きな利点と考えられた。

まとめ

遺伝子工学により作製された合成IGF-Iを用い血中総IGF-Iを測定するRIA系の検討を行った。基礎的検討の結果、抽出率、回収率、精度、再現性、希釈試験などはほぼ満足できるもので、従来法のソマトメジンCキットとよく相関し、採

血条件の影響もなく安定な測定値が得られた。

臨床的検討の結果、正常者のIGF-Iは乳児期は低く、年齢と共に上昇、10~15歳でピークに達した後は下降し、成人レベルに至り、以後老年期にかけて徐々に低下した。正常低身長者も類似の変化を示したが、正常者より低値を示す例が多く、下垂体性小人症では極めて低値で、ほとんど正常小児と区別することができ、GH分泌能を評価する有用な指標と思われた。末端肥大症では著明な高値を、下垂体機能低下症、肝疾患、特に肝硬変、肝癌では著しい低値を示す例が多く、治療前後の変化などからこれらの疾患の病態との関連性が示唆された。

本研究は国際協力事業団研修生の研修の一環として行った。なお本研究の一部は厚生省特定疾患間脳下垂体機能障害調査研究班(班長:清水直容)の研究費によった。また、IGF-I、抗IGF-I血清を提供くださった藤沢薬品工業に深謝致します。

文 献

- 1) Van Wyk JJ, Svoboda ME, Underwood LE: Evidence from radioligand assays that somatomedin-C and insulin-like growth factor-I are similar to each other and different from other somatomedins. *J Clin Endocrinol Metab* 50: 206-208, 1980
- 2) Marquardt H, Todaro GJ: Purification and primary structure of a polypeptide with multiplication-stimulating activity from rat liver cell cultures. *J Biol Chem* 256: 6859-6863, 1981
- 3) Phillips LS, Vassilopoulou-Sellin R: Somatomedins. *N Engl J Med* 302: 371-380, 1980
- 4) Furlanetto RW: The somatomedin-C binding protein: Evidence for a heterologous subunit structure. *J Clin Endocrinol Metab* 51: 12-19, 1980
- 5) 対馬敏夫: IGFの生理的意義。ホルモンと臨床 34: 265-273, 1986
- 6) 古川敏仁: 血中総ソマトメジン-C測定系の確立。SRL宝函 9: 44-47, 1985
- 7) 真山和徳, 張 弘昌, 牛久英雄ほか: Radioimmunoassay (RIA)法による血中Somatomedin-Cの測定。ホルモンと臨床 32: 567-571, 1984
- 8) Daughaday WH, Mariz IK, Blethen SL: 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

- 9) 諏訪城三, 古川敏仁, 徳弘悦郎ほか: 正常小児における血中ソマトメジンC値. *ホルモンと臨床* 35 : 273-277, 1987
- 10) Sara VR, Hall K, Rodeck CH et al: Human embryonic somatomedin. *Proc Natl Acad Sci USA* 78 : 3175-3179, 1981
- 11) 山崎敦子, 森川 肇, 上田康夫ほか: 児の発育とIGF-I/SM-Cの血中存在様式. *日内分泌会誌* 63 : 1035, 1987
- 12) 横谷 進, 諏訪城三, 前坂機江ほか: 下垂体性小人症及び他の原因による成長障害における尿中IGF-I/SM-Cの測定. 第1回小児成長障害研究会, p9, 1987
- 13) Zapf J, Walter H, Froesch ER: Radioimmunological 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
- 14) Bennett A, Wilson DM, Liv F et al: Levels of insulin-like growth factors I and II in human cord blood. *J Clin Endocrinol Metab* 57 : 609-612, 1983
- 15) Yde H: The growth hormone dependent sulfation factor in serum from patients with various type of diabetes. *Acta Med Scand* 186 : 293-297, 1969
- 16) Guilherme P: Studies on somatomedin binding protein. *J Endocrinol Invest* 10(Suppl 4) : 15, 1987
- 17) 石塚竜哉, 中川光二, 小原孝雄ほか: Radioimmunoassayによる血漿総Somatomedin-Cと直接Somatomedin-Cの比較. *ホルモンと臨床* 35 : 731-735, 1987