Radioreceptor assayによる体液中 ヒト Epidermal Growth Factor (Urogastrone)の検討

東邦大学医学部第一内科

(指導: 入江 実教授)

中 村 公 一

東京大学医学部第三内科

今 井 康 雄, 松 崎 宸

Human Epidermal Growth Factor/Urogastrone
in Human Fluids Detected by Radioreceptor Assay

Kimiichi NAKAMURA

The First Department of Internal Medicine,

Toho University School of Medicine,

Tokyo, Japan

(Director: Professor Minoru Irie)

Yasuo IMAI and Fukashi MATUZAKI

The Third Department of Internal Medicine,

Faculty of Medicine,

University of Tokyo,

Tokyo, Japan

Epidermal growth factor (EGF)/urogastrone is a polypeptide hormone that stimulates growth of a variety of tissues and inhibits gastric acid secretion. Although it was originally isolated from male mouse submaxillary glands, EGF/urogastrone has recently been isolated from human urine.

We detected EGF-like activity in human urine, milk and saliva by radioreceptor assay using the male mouse hepatic microsomal fraction as a receptor preparation and mouse EGF as reference standard. On Sephadex G-50 gel chromatography, major EGF-like activity (RRA-EGF) in human urine, milk and saliva was eluted near the portion where standard mouse EGF was eluted ($K_{av}=0.5$, $MW \cong 6000$). Isoelectric focusing revealed that isoelectric point of major RRA-EGF was 4.45 with minor heterogeneity.

Twenty-four hour urinary excretion of RRA-EGF in adult males and females with normal renal function was 88.8 ± 4.0 and 65.2 ± 7.9 (mean $\pm$ SE) μg /total volume or 141 ± 7.2 and 96.5 ng/mg of creatinine, respectively. There was no apparent diurnal rhythm in urinary RRA-EGF excretion. A series of 24 h urine collection over 5 days from adults showed relatively small variations. Urinary levels of EGF per mg creatinine in normal chil-

dren were significantly higher than those in normal males or females. There was a reverse correlation between serum creatinine levels and urinary EGF levels per creatinine. The concentration of RRA-EGF in human milk collected 7 days after starting breast feeding was 81 ± 11 ng/ml. The salivary RRA-EGF concentration was 6.5 ± 1.0 and 6.9 ± 0.3 in normal adult males and females, respectively.

緒 言

Epidermal growth factor (EGF) は雄マウス顎下腺から抽出された53個のアミノ酸残基からなる分子量6045, 等電点 PH4.6の酸性ポリペプチドである。EGFは上皮細胞のみならず, 線維芽細胞等種々の細胞の増殖刺激効果をもち, 種々の組織の増殖分化に重要な役割をもつと考えられる¹⁾。

マウス由来のEGF (mEGF) はヒトの細胞にも作用があることから, ヒトのEGFの存在が推測されたが, 1975年, ヒト尿中からヒトEGFが精製された²⁾。一方ヒト尿から胃酸分泌抑制物質, β -ウロガストロンが精製された³⁾。その一次構造はmEGFと極めて類似していた。更にウロガストロンは胃酸分泌抑制作用のみならずmEGFと同様に, 細胞増殖刺激作用をもち, またmEGFも胃酸分泌抑制作用をもつことが明らかにされた³⁾。従って現在ヒトEGFと β -ウロガストロンは同一のものでないかと考えられている。しかしながらこのように広汎な作用を有するヒトEGFの分泌動態, 生理的意義については尚多くの不明な点が残されている。

EGFの特徴としてその作用の種特異性の少ない点があげられる。事実, mEGFはヒト線維芽細胞にウロガストロン (ヒトEGF) と同じ親和性で結合することが知られている⁴⁾。従って我々はヒトEGFの検出には, mEGFを標準にした既報 Radioreceptor assay (RRA)⁵⁾が有用であると考え, 人の体液中, 特に尿, 乳汁, 唾液中の検出測定, 及び物理化学的特性について検討した。

材 料 と 方 法

1) mEGF: mEGFは雄マウス顎下腺より Savageらの方法により抽出精製した⁶⁾。生物活性は眼瞼開裂法により確認した⁷⁾。

2) ヨード化: mEGFのヨード化はクロラミンT法により行なった⁸⁾。比活性は200-250 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ であった。

3) Radioreceptor assay (RRA): RRAは既報の方法によった⁸⁾。簡単に述べると, Receptorとしては, 雄マウス肝臓マイクロゾーム分画を蛋白量として400 μg 用いた。 ^{125}I -EGF (20,000-25,000) 標準EGF, またはサンプル0.1mlを加え, 計0.5mlの0.1%BSAと10mM MgCl_2 を含む50mM Tris-HCl緩衝液 (PH7.4) 中にて22°Cで120分インキュベイトした。その後2mlの氷冷緩衝液を加えて反応を止め, receptorに結合した ^{125}I -EGFを, 2,000 $\times$ gにて30分遠沈し, 沈渣を γ カウンターにて測定した。最小検出量はtubeあたり100pgであった。

4) ゲル濾過: ゲル濾過はセファデックス G-50 (Fine) を用い, 1.5 $\times$ 62-71cmのカラムにつめPBSにて平衡化, 溶出を行なった。サンプルとしては, 尿は4°Cにて蒸留水に対して透析後, 限外濾過器 (アミコン, UM-2 フィルター) により10倍に濃縮し, その1mlをカラムにかけた。唾液は4°Cにて20,000 $\times$ g, 20分遠沈後上清を同様に濃縮し, その1mlをカラムにかけた。母乳は

4℃ 20,000×gにて遠沈，細胞成分，脂肪層を除いた液1 ml をカラムにかけた。各溶出フラクションは1.5 ml であった。

5) 等電点分画：体液中EGFの等電点は，LKB社の装置を用い平板ゲル法によって定めた。アンフォラインは2% (v/v) pH 3.5–5.5を用い，8ワットにて4℃で14時間泳動を行なった。各サンプルは，20,000×gにて遠沈，1%グリシンに対し透析後，尿は80 ml，唾液は80 ml，母乳は10 mlを用いた。泳動終了後，平板ゲルを30のスライスに分け，各スライスを蒸留水にて溶出し各溶出液中のEGF含量をRRAにて測定した。各スライスのpHは溶出後4℃にて測定した。

6) 対象サンプル：成人一日尿は年齢26歳–64歳までの腎機能正常の男子76名，女子68名より集めた。また男子11名及び女子4名について日内変動を調べ，更に男子6名，女子6名については連続5日間蓄尿し，日差変動を調べた。正常小児（0–12歳）の午前中の随意尿につき尿中mgクレアチニンあたりの尿中EGFを測定した。腎機能障害者の尿は血中クレアチニンが2–25 mg/dl の患者，15名より集めた。母乳は正常分娩した産婦から授乳開始後7日目に集めた。検体は，20,000×g 4℃にて遠沈し，その脂肪層を含まない部分を集め測定した。唾液は正常男子5例，女子5例より自然流出した唾液を集め，4℃，20,000×gにて遠沈後上清を使用した。

7) 統計：有意差検定はStudent's t 検定によった。

Fig. 1. Competitive binding curves generated by human body fluids in EGF radioreceptor assay. The curves for urine, milk and saliva parallel to that of mouse EGF standard.

結 果

1) 体液の稀釈曲線

Radioreceptor assay系(RRA)へ体液(尿，乳，唾液)を種々の濃度を加えて得られた稀釈曲線は，いずれもマウスEGFを用いた標準曲線に良好な平行性を示した。以後の測定は，全てこの平行性を示す範囲内で行なった (Fig. 1)。

2) 体液中EGFの分子量，等電点

各体液中にRRAで検出されたEGF様活性がどのような分子量，等電点をもつかを検討した。尿中EGFはSephadex G-50のゲル濾過では，活性の大部分はマーカーとして用いた¹²⁵I-mEGF(分

子量約6100)の近傍(Kav0.5)に溶出された。少量の活性がVoid Volume(分子量3万以上)に認められた。等電点分画ではpH4.45及び4.6の二峰性を示した。(Fig. 2 a) 乳汁中EGFはこの条件下では、Void VolumeにはEGFは検出されず、大部分の活性はKav0.5の位置に溶出された。等電点はpH4.45が主であった(Fig. 2b)。唾液中EGFもゲル濾過上mEGFとほぼ同じ部位(Kav0.5)に溶出された。等電点はpH4.45と4.6の二峰性を示した(Fig. 2c)。

3) 尿中EGFの測定

a) 成人一日尿中EGF排泄量

腎機能正常な成人男子76名女子68名を対象として一日尿中EGF量を測定すると、男子は 88.8 ± 4.0 (平均値 $\pm$ 標準誤差) μg , 女子は $65.2 \pm 7.5 \mu\text{g}$ で有意差を認めた。(p<0.05)(Fig. 3 a) 尿中mgクレアチニンで標準化すると男子は $141 \pm 7 \text{ ng/mg}$ クレアチニン, 女子は $96.5 \pm 5 \text{ ng/mg}$ クレアチニンでやはり有意の性差を認めた。(p<0.05)(Fig. 3 b)

Fig. 2. Sephadex G-50 (fine) gel chromatography (upper column) and isoelectric focusing (lower column) of human urine (a), milk (b) and saliva (c).

Vo, void volume (blue dextran). Vt, total volume (Na^{125}I).

Fig. 3. Twenty-four urinary excretion of RRA-EGF in adult males and females. a) Total RRA-EGF excretion for 24h. The mean values are significantly different. (p<0.01) b) The same data standardized by creatinine levels in urine. The mean values are also significantly different. (p<0.01)

Fig. 4. RRA-EGF concentrations (ng/mg creatinine) in sequential time of day. Urine samples were collected from 15 adults with normal renal function. M, meals

Fig. 5. Amounts of 24h urinary excretion of RRA-EGF over 5 days. Urine samples were collected from 12 adults with normal renal function.

b) 尿中 EGF の日内変動

腎機能正常な成人15名を対象として7時、10時、13時、16時、17時、24時に採尿しmgクレアチニンあたりのEGFを測定した。15例中3例 (Fig. 4 A.B.C.) 除き、大きな変動はなく、全体としては一定の傾向をもった変動は認められなかった。

c) 尿中 EGF の日差変動

腎機能正常な成人12名を対象として5日間連続して24時間尿を測定したところ大きな日差変動は認められなかった (Fig. 5)。

Fig. 6. Urinary excretion of RRA-EGF (ng/mg creatinine) in children and adults.

Fig. 7. Correlation between serum creatinine (mg/dl) and RRA-EGF in 24h urine (ng/mg creatinine).

d) 小児における尿中 EGF 排泄量

116名の正常小児について検討した。尿中 mg クレアチニンあたりの EGF は 0 - 1 歳未満 (n=20) 206 ± 26 (平均値 $\pm$ 標準誤差) ng, 1 - 4 歳未満 (n=22) 294 ± 25 ng, 4 - 8 歳未満 (n=47) 203 ± 16 ng, 8 - 12 歳未満 (n=27) 200 ± 36 ng であった。(Fig. 6) 成人男, 女に比べ小児の全ての年齢層にわたって, 有意に高値を示した。(p<0.05) また, 1 - 4 歳未満の年齢層は他の年齢層に比べて有意に高かった (p<0.05)。

e) 腎機能障害者の尿中 EGF 排泄量と血清中クレアチニンとの相関

血清クレアチニン値の上昇につれて, 尿中 mg クレアチニンあたりの EGF は, 高度の逆相関にて減少した ($r = -0.97$, $p < 0.01$)。(Fig. 7)

4) 母乳中 EFG についての検討

採乳開始後 7 日目の乳中 EGF は 81 ± 11 ng/ml (平均値 $\pm$ 標準誤差) であった。

5) 唾液中 EGF

自然流出した唾液中 EGF は成人男子 (5 名) $6.5 \pm 1.0 \text{ ng}$ (平均値 $\pm$ 標準誤差), 女子 (5 名) では $6.9 \pm 0.3 \text{ ng}$ で, 有意差は認められなかった。

考 案

現在のところ, ヒト EGF の入手は困難であるが, 本実験に用いた Radioreceptor assay (RRA) では種特異性が少ないため, 容易に入手可能なマウス EGF を標準に用いられること, 及び Receptor の作製も容易であることが利点としてあげられる。一方不利な点として, RIA に比し感度が落ちる点と非特異的な阻害活性 (塩濃度, pH, 蛋白分解酵素等) に充分考慮する必要がある。そのため RRA で検出された EGF 活性の物理化学的性質を検討し, 従来の報告と比較した。ヒト EGF/ウロガストロンは分子量約 6000 であるが, ヒト体液中の RRA-EGF は Sephadex G-50 のゲル濾過では標準マウス EGF の近傍に溶出された。尿では Void volume に小さな活性を認めたがこれは大分子 EGF⁹⁾ に相当するものと考えられる。我々の用いた条件下では乳汁, 唾液中にはこの大分子型は認められなかった。

ヒト EGF/ウロガストロンの等電点については, ヒト EGF は精製者により電気泳動上マウス EGF とは異なると報告されているが, その等電点については詳細は不明である²⁾³⁾。pH 3.5-9.5 の広範囲の等電点分画を用いた, 平田らの報告によればヒト EGF の等電点は, 4.8, また尿中大分子型 EGF のそれは 3.9 と報告されている⁹⁾。また髄液中の EGF は等電点 4.5 と 4.3 の二種が報告されている¹⁰⁾。我々の狭い範囲 (pH 3.5-5.0) の等電点分画では主要な活性は 4.45 に認められ, 尿と唾液では更に 4.6 に小さな活性が認められた。尿からウロガストロンを精製した Gregory 等は β と γ の二種のウロガストロンを認め, γ は β の C 末端のアミノ酸残基がはずれたものとしている³⁾。等電点 4.6 の部分が γ -ウロガストロンに相当するかは不明であるが, microheterogeneity は末端のアミノ酸がはずれて生ずる可能性はあり得ると考えられる。以上から RRA で検出された体液中 EGF は従来報告されてきたヒト EGF の報告にはほぼ一致していることから, 他の非特異的結合阻害によるものではないと考えられる。

次にヒト体液中の RRA-EGF 量を従来の報告と比較検討する。一日尿中ヒト EGF 量は抗人 EGF 抗体を用いた RIA では男 63 ± 3 (平均値 $\pm$ 標準誤差 $n=34$) μg , 女 $52 \pm 3.5 \mu\text{g}$ ($n=21$) で性差なく 1 mg クレアチニンあたりでは男 $29.7 \pm 1.1 \text{ ng}$, 女 $39.8 \pm 1.0 \text{ ng}$ で有意に女性の方が高い¹¹⁾。Starkley らの抗マウス EGF 抗体を用いた Heterologous RIA の報告では, 男 $97.8 \pm 10.7 \mu\text{g}$ ($n=15$), 女 $72 \pm 4.5 \mu\text{g}$ ($n=16$) と男の方が有意に高く 1 mg クレアチニンあたりではそれぞれ 51.7, 57 ng と有意差はない¹²⁾。体重で標準化した Gregory らの尿中ウロガストロンの値は男 $602 \pm 41 \text{ ng/kg}$ ($n=39$) 女 $782 \pm 44 \text{ ng/kg}$ ($n=33$) と女性の方が有意に高い¹³⁾。我々の RRA-EGF の一日尿中量は男 $88.8 \pm 4.0 \mu\text{g}$ ($n=76$), 女 $65.2 \pm 7.9 \mu\text{g}$ ($n=68$) と男性の方が有意に高く, クレアチニンあたりでも有意の性差を認めた。我々の値は Starkey らの報告に近いが, 各報告者間と我々の値の違いは, 第一に方法による違いから来ていることが考えられる。ヒト尿中ウロガストロンを RRA と RIA で比較した Nexø らによれば, RIA が RRA に比し高値を示した¹⁴⁾。この原因として彼らは彼らの用いた抗体が β -ウロガストロンよりも γ -ウロガストロンにより高い親和性にて反応し, 一方 Receptor は両者共均等の親和性で反応することをあげている。また尿中の大分子型の EGF は, RRA に比し RIA の方が高く反応するということが報告されており⁹⁾, このような尿中 EGF の Heterogeneity によ

りRIAとRRAでは差がでてくることが考えられる。またRIAによるクレアチニンあたりのEGFは加齢による減少傾向があるとされている¹⁵⁾。我々の調べた対象の男女の年齢層は、24歳-64歳で各々の年齢分布は、ほぼ同じであるが、他の報告との性差についての違いは対象数、年齢層の違いもその原因となっていると考えられる。

尿中EGFは、食事や睡眠により余り影響を受けないとされている¹¹⁾。我々の15例についての検討でも3例を除いて大きな変動を認めなかった。変動を示した3例中2例は消化性潰瘍で1例は骨折の患者であった。マウスでは血中レベルは α -adrenergicな刺激で上昇することが知られている¹⁶⁾。また攻撃的行動をとったマウスの血中EGF濃度は100倍以上に上昇するとされている¹⁷⁾。ヒトEGFがこのような刺激に反応するかは不明であるが、外傷や潰瘍によるストレスが尿中EGFの変動因子になっている可能性はあると思われる。

小児期の尿中EGFについては、年齢に相関して一日尿中のEGFは増加するとされている¹²⁾。我々は随意尿を用いてクレアチニンで標準化して成人と比較したところ成人に比し、有意に高い傾向を認めた。これは成長期に有意にEGFの血中レベルが高まるためなのかは今後の検討を要する。

尿中EGFは尿中クレアチニンに強く相関するとされている¹¹⁾¹²⁾¹⁹⁾。我々は腎不全の患者にて検討した結果、血中クレアチニンの上昇につれ尿中クレアチニンあたりのEGF排泄量は減少し、従来の報告を裏づける結果を得た。腎不全時に尿中排泄が減少し、血中レベルの変化が予測されるが、我々のRRA系では血中濃度は非特異的と思われる現象のため測定が困難であり今後の検討を要する。

母乳中EGFについてはStarkeyらによれば約80ng/mlとされているが、乳汁採取時期は明らかではない¹²⁾。我々は授乳開始後7日目の乳汁を検討したところ、 81 ± 11 ng/mlという結果を得た。ヒト乳汁中には細胞増殖刺激効果があり²⁰⁾、この活性の大部分はヒトEGF抗体により抑制されることからヒトEGFによるものであるとされている²¹⁾。このように生物学的活性のあるEGFが新生児には経口的に投与されるのであるが、これが新生児の各臓器の発育にどのように関係しているかは興味深い。また乳汁中にこのような高濃度のEGFがどのように分泌されてくるかは不明である。

ヒト唾液中EGFは同じくStarkeyらによると5-17ng/mlとされている¹²⁾。我々の自然流出した唾液を測定した結果では男女とも平均6-7ng/mlで性差を認めなかった。人顎下腺中には蛍光抗体法²²⁾、及び抽出¹⁸⁾により少量のEGFの存在が認められるが、唾液中EGFが顎下腺で全て合成、分泌されているかは不明である。また唾液中に分泌されたEGFが消化管で再吸収されるのか、胃酸分泌調節にどのように関係するのかは興味深い。

結 語

1) 人体液(尿、乳汁、唾液)中のEGFをRadioreceptor assay (RRA)により検出した。主要な活性は、分子量6000付近、等電点4.45に認められた。

2) 尿中RRA-EGFは、男子が女子よりも高値を示した。また小児のクレアチニンあたりの尿中EGFは、成人のそれよりも高値を示した。

3) 乳汁、唾液中にもRRA-EGF活性が認められた。

文 献

- 1) Carpenter, G. and Cohen, S.: Epidermal growth factor. *Ann. Rev. Biochem.*, 48: 193-216, 1979.
- 2) Cohen, S. and Carpenter, G.: Human epidermal growth factor:

- isolation and chemical and biological properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, 72: 1317–1321, 1975.
- 3) Gregory, H.: Isolation and structure of urogastrone and its relationship to epidermal growth factor. *Nature (London)*, 257: 325–327, 1975.
- 4) Hollenberg, M.D. and Gregory, H.: Human urogastrone and mouse epidermal growth factor share a common site in cultured human fibroblasts. *Life Sci.*, 20: 267–274, 1976.
- 5) Imai, Y., Tsushima, T., Sasaki, N. and Masuzaki, F.: Radioreceptor assay for epidermal growth factor, 275–287. Ed. by Shizume, K. and Takano, K., *Growth and Growth Factors*, University of Tokyo Press, Tokyo, 1980.
- 6) Savage, C.R.Jr. and Cohen, S.: Epidermal growth factor and a new derivative: rapid isolation procedures and biological and chemical characterization. *J. Biol. Chem.*, 247: 7609–7611, 1972.
- 7) Cohen, S.: Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *J. Biol. Chem.*, 237: 1552–1562, 1962.
- 8) Hunter, W.H. and Greenwood, F.C.: Preparation of iodine I labeled growth hormone of high specific activity. *Nature (London)*, 194: 495–496, 1962.
- 9) Hirata, Y. and Orth, D.N.: Epidermal growth factor (urogastrone) in human fluids: size heterogeneity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 48: 673–679, 1979.
- 10) Hirata, Y., Uchihashi, M., Nakajima, H., Fujita, T. and Matsukura, S.: Presence of human epidermal growth factor in human cerebrospinal fluid. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 55: 1174–1177, 1982.
- 11) Dailey, G.E., Kraus, J.W. and Orth, D.N.: Homologous radioimmunoassay for human epidermal growth factor (urogastrone). *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 46: 929–936, 1978.
- 12) Starkey, R.H. and Orth, D.N.: Radioimmunoassay of human epidermal growth factor (urogastrone). *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 45: 1144–1153, 1977.
- 13) Gregory, H., Holmes, J.E. and Willshire, I.R.: Urogastrone levels in the urine of normal adult humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 45: 668–672, 1977.
- 14) Nexø, E., Lambeg, S.I. and Hollenberg, M.D.: Comparison of a receptor binding assay with a radioimmunoassay for measuring human epidermal growth factor – urogastrone in urine. *Scan. J. Clin. Lab. Invest.*, 41: 577–582, 1981.
- 15) Uchihashi, M., Hirata, Y., Fujita, T. and Matsukura, S.: Age-related decrease of urinary excretion of human epidermal growth factor (hEGF). *Life Sci.*, 31: 679–683, 1982.
- 16) Bynny, R.L., Orth, D.N. and Cohen, S.: Epidermal growth factor: effects of androgens and adrenergic agents. *Endocrinology*, 95: 776–782, 1974.
- 17) Nexø, E., Hollenberg, M.D. and Bing, J.: Aggressive behaviour in mice provokes a marked increase in both plasma epidermal growth factor and renin. *Acta Physiol. Scand.*, 111: 367–371, 1982.
- 18) Hirata, Y. and Orth, D.N.: Epidermal growth factor (urogastrone) in human tissues. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 48: 667–672, 1979.
- 19) Hirata, Y., Moore, G.W., Bertagna, C. and Orth, D.N.: Plasma concentrations of immunoreactive human epidermal growth factor (urogastrone) in man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 51: 440–444, 1980.
- 20) Klagsbrun, M.: Human milk stimulates DNA synthesis and cellular proliferation in cultured fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 75: 5057–5061, 1978.
- 21) Carpenter, G.: Epidermal growth factor is a major growth-promoting agent in human

milk. Science, 210: 198—199, 1980.

22) Elder, J.B., Williams, G., Lacey, E. and

Gregory, H.: Cellular localization of human urogastrone/epidermal growth factor. Nature (London), 271: 466—467, 1978.

(受付日: 57. 4. 1)