

胎児発育における epidermal growth factor(EGF) の  
生理的意義に関する研究

地 井 良 政

## 研究目的ならびにその背景

胎児の発育は、あらかじめ遺伝子に組み込まれたプログラムに従って細胞の増殖・分化、臓器の機能発達が一定の方向に進んで行く。特に妊娠中期以降における急速な胎児発育、胎児臓器の機能発達に際しては、何らかの内分泌学的な変化が関与していることは十分考えられる。一方、科学技術の進歩に伴い多くの細胞が試験管内での培養が可能となり、この様な培養系の研究から細胞の増殖分化を制御する物質として細胞成長因子の存在が明らかとなってきた。この様な細胞成長因子が胎児発育に深く関与しているであろうことは想像に難くなく、胎児臓器の機能発達の仕組みを理解する上で多大の興味の持たれるところである。

一方、子宮内胎児発育遅延 (intrauterine growth retardation, IUGR) は肉体的あるいは精神的な発達障害をもたらす危険があり、産科領域における大きな問題の一つである<sup>(1)</sup>。この IUGR の中で *asymmetrical type* は脳重量が軀幹に比し比較的保持されている *type* で、胎盤機能不全がその原因と考えられている<sup>(1,2)</sup>。この様な病態が何等かの細胞成長因子の欠乏によるものであるとすれば、その細胞成長因子を同定することは臨床的に重要な意味を持つことになる。

現在、胎児発育、胎児臓器の機能発達に関与している可能性のある成長因子には種々のものがある。Epidermal growth factor (EGF) は、これら細胞成長因子の一つで、ヒトにおいては、血漿<sup>(3)</sup>、尿<sup>(4)</sup>、羊水、唾液、乳汁<sup>(5)</sup>など様々な体液中に存在することが知られている。一方、マウスでは EGF は 53 個のアミノ酸からなる分子量 6045 のポリペプチドであり、顎下腺中に大量に含まれており<sup>(6)</sup>、やはり血漿、尿<sup>(7)</sup>、羊水<sup>(8)</sup>といった体液中にも存在することが知られている。EGF の作用を媒介する EGF レセプターは、子宮<sup>(9)</sup>、胎盤、胎

児臓器<sup>(10)</sup>を含めた様々な細胞に存在し、*in vitro* においては、細胞の増殖分化の仕組みすなわち細胞内での情報伝達機構が解明されつつある<sup>(11)</sup>。しかしながら、*in vivo* における EGF の生理作用に関しては未だ十分に明らかにはされていない。ヒトにおいては、妊娠経過とともに血漿中<sup>(12)</sup>、尿中<sup>(13)</sup>の EGF 濃度が上昇し、IUGR の母体ではこれらの濃度がいずれも低下していることが報告されている<sup>(12,13)</sup>。マウスにおいては、妊娠経過とともに顎下腺中および血漿中の EGF 濃度が上昇すること<sup>(7)</sup>、また妊娠前に両側顎下腺切除を行うと有意に流産の発生率が上昇すること<sup>(14)</sup>が報告されている。

本研究では、妊娠マウスを用いて、妊娠中期に両側顎下腺切除を行い、母獣の EGF 欠乏状態が作製されることを確認した。この妊娠中期両側顎下腺切除による EGF 欠乏マウスにおける胎仔発育への影響を検討すると同時に、EGF の補充を行い、EGF の欠乏が胎児発育に及ぼす影響を検討した。さらにこの実験モデルにおいて発症した子宮内胎児発育遅延において、そのメカニズムを糖代謝機能を指標として検討した。

## 研究方法

### 【マウス母獣の手術及び胎仔重量の測定】

8 週から10 週齢の C3H/HeN 処女マウスを同種の成熟雄マウスと交配させ、連日早朝に腔栓の有無を確認し、腔栓確認日を day 1 とした。妊娠マウスはそれぞれ個別にケージ内にて、恒温 (25 °C)、一定の明暗条件 (7 時 ~ 19 時照明) で飼育し、飼料ならびに水は自由に摂取させた。Day 13 の 7 時より 9 時の間にエーテル麻酔下に sham 手術または両側顎下腺切除術 (Sx) を施行した。Sham 手術は頸部皮膚に小切開を加え両側顎下腺を露出させ再び収納することにより行なった。同時に alzet ミニ浸透圧ポンプ (model 1007D, Alza, Palo Alto, CA) を背部皮下に埋め込み、PBS あるいはマウス EGF (receptor grade, 以下 mEGF, Collaborative Research, Waltham, MA) を 0.5  $\mu$ l/h の一定速度で持続投与した。術後のマウスは直ちに麻酔より回復し、摂食、飲水行動、体重増加には特に異常は認められなかった。Day 19 の 16 時より 20 時までの間に妊娠マウスを頸椎脱臼後開腹し、血液サンプルを腹部静脈よりヘパリン加採血し、2000 G, 10 min, 4 °C にて遠心後血漿成分を得た。子宮摘出後胎仔及び胎盤を摘出し、胎仔については生死を確認し、同時に奇形の有無をチェックした。個々の胎仔、胎盤の重量を測定後、胎仔はマイクロシリンジを用いて心穿刺にてヘパリン加採血し、母獣血と同様に遠心し血漿成分を得た。これら血漿サンプルは測定まで -80 °C にて凍結保存した。その後胎仔臓器として脳、肝臓、消化管を摘出しその重量を測定した。

Sham 手術マウスには、PBS をミニ浸透圧ポンプを用いて投与した。Sx マウスには、PBS または mEGF (1  $\mu$ g/day) を同様にミニ浸透圧ポンプを用いて投与した。

### 【血漿中 EGF 濃度測定】

非妊マウス, day 13 並びに day 19 の妊娠マウス, 及び上に述べた種々の条件のマウス (day 19) の血漿中 EGF 濃度は, mEGF をスタンダードとして, Amersham 社の mouse EGF RIA kit を用いて測定した。この測定法の測定限界は 0.1 ng/ml であり, 同一アッセイ内, アッセイ間の測定値のばらつきはそれぞれ 7.5%, 10.3% であった。

#### 【血漿中及び胎仔臓器中グルコース濃度測定】

Sham 手術 + PBS 投与マウス群 (以下 C 群), Sx 手術 + PBS 投与マウス (以下 Sx 群), Sx 手術 + mEGF 投与マウス (以下 R 群) の 3 群において, day 19 に母獣並びに胎仔血漿中, 胎仔脳, 肝臓のホモゲネート中のグルコース濃度を蛍光法を用いて測定した。ホモゲネートは, 摘出した胎仔臓器を十分生理食塩水にて洗浄した後, 10 倍量の生理食塩水を加えて Potter-Elvehjem タイプのホモジナイザーにて氷冷上 2 分間ホモゲネーションして得, 測定まで  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。グルコースの蛍光測定法は, Lowry の方法によった<sup>(15)</sup>。具体的には, 100 mM Tris-HCl (pH8.0), 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 300  $\mu\text{M}$  ATP (Boehlinger Mannheim GmbH, Mannheim, Germany), 30  $\mu\text{M}$  NADP (同), 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  hexokinase (同), 0.2 U/ml G6PD (同) の組成よりなる反応液 1 ml に血漿あるいはホモゲネート 1  $\mu\text{l}$  を加えて反応させ, 発生する蛍光を 10 mM NADPH (同) をスタンダードとして蛍光光度計 (Ratio fluorometer-2, Farrand Optical, New York, NY) にて測定した。また, ホモゲネートの蛋白含量の測定についても, Lowry の方法によった<sup>(16)</sup>。

#### 【 $^3\text{H}$ -2-deoxy-D-glucose 及び $^{14}\text{C}$ -aminoisobutylic acid の胎盤通過性の検討】

上に述べた 3 群において, day 19 にネブタールを 0.2 ml 皮下注射し麻酔した。10 分後に開腹し大静脈を確認後, 27 ゲージ注射針付きマイクロシリンジにて非代謝性グルコースである  $^3\text{H}$ -2-deoxy-D-glucose (以下  $^3\text{H}$ -2-DG, 1  $\mu\text{Ci}/0.1$  ml, Du Pont, Wil-

mington, DE) 並びに非代謝性アミノ酸である  $^{14}\text{C}$ -aminoisobutylic acid (以下  $^{14}\text{C}$ -AIB,  $1\ \mu\text{Ci}/0.1\ \text{ml}$ , Du Pont, Wilmington, DE) の混合溶液を下大静脈より静脈内に投与した。注射針はそのまま留置して、刺入部よりの血液の流出を防いだ。投与 5 分後に別の 27 ゲージ注射針付きマイクロシリンジにて母獣血 0.1 ml を採取した。採取した全血は、Aquasol II (Du Pont, Wilmington, DE) 5 ml および 30% 過酸化水素水 0.3 ml を添加し振盪、溶解脱色した。その後子宮を摘出し、胎仔および胎盤をそれぞれ摘出した。胎仔、胎盤はそれぞれ 1 匹ずつ PBS 1 ml を加えてポリトロンホモゲナイザーにてホモゲネートした。得られたホモゲネートは、Aquasol II を胎仔は 15 ml, 胎盤は 12 ml, それぞれ加え、さらに 30% 過酸化水素水をそれぞれ 1 ml 加え、同様に振盪、溶解脱色した。その後直ちに液体シンチレーションカウンター (Aloka 液体シンチレーションシステム LSC-903) にて各サンプルの放射能活性を測定した。

#### 【EGF の胎盤通過性の検討】

Day 13 及び day 19 の妊娠マウスにおいて、mEGF (5  $\mu\text{g}$ ) を母獣皮下投与し、投与前、15分、30分、60分、90分、120分後に母獣血、胎仔、胎盤を摘出した。母獣血はヘパリン加採血後、2,000 G, 10 min, 4 °C にて遠心し血漿成分を得た。胎仔及び胎盤については母獣 1 匹毎にまとめて重量の 2 倍量の PBS を加えた後ホモゲネートを作製した。得られたホモゲネートを 10,000 G, 75 min, 4 °C にて遠心後、上清を採取した。これらサンプル中の EGF 濃度を Amersham 社の mouse EGF RIA kit にて測定した。

#### 【統計的処理】

実験結果の統計的処理にあたっては、Apple 製 Macintosh Quadra 800 上にて、統計プログラムとして Stat View II または Excel ver. 4.0 を使用し、Kruskal-Wallis 検定を行なった。

## 実験結果

### 【マウス血漿中 EGF 濃度の変化】

Amersham 社の mouse EGF RIA kit における standard curve は図 1 のとおりで、このアッセイにおける  $^{125}\text{I}$ -mEGF の Trace binding ( $B_0$ ) は 65.4% であった。

8 週から 10 週齢の非妊マウス ( $n=10$ ) の血漿中 EGF 濃度は、 $0.13 \pm 0.04$  ng/ml であった (図 2)。妊娠マウスでは、day 13 ( $n=10$ ) には  $0.44 \pm 0.21$  ng/ml, day 19 ( $n=10$ ) には  $0.62 \pm 0.28$  ng/ml と妊娠経過とともに有意に増加していた。先に述べた 3 群では、day 19 には C 群 ( $n=10$ ) は  $0.67 \pm 0.23$  ng/ml であるのに対し、Sx 群 ( $n=15$ ) は全例測定感度以下であった (図 3)。また R 群 ( $n=10$ ) では  $0.23 \pm 0.04$  ng/ml であり一定の EGF 濃度の回復が認められた。

### 【EGF の生存胎仔率に及ぼす影響】

Day 19 における胎仔数及び生存胎仔率は、C 群ではそれぞれ  $7.5 \pm 1.7$  匹, 95% であった (図 4, 図 5)。Sx 群では、胎仔数 ( $7.2 \pm 1.7$  匹) に差はないものの、生存胎仔率は 80% に有意に低下した。R 群では、胎仔数 ( $7.6 \pm 1.4$  匹) には有意差がなく、さらに生存胎仔率は 95% まで有意に回復した。

### 【EGF 欠乏の胎仔胎盤発育に及ぼす影響】

Day 19 における平均胎仔重量は、C 群の  $1.22 \pm 0.08$  g に比し Sx 群では  $1.10 \pm 0.06$  g と有意に減少した (図 6)。R 群では  $1.18 \pm 0.10$  g と Sx 群より有意に増加し、C 群と同じレベルまで回復した。

Day 19 における胎仔肝臓及び腸管の平均重量は、いずれも Sx 群 ( $70.4 \pm 11.2$  mg,  $36.2 \pm 3.5$  mg) では C 群 ( $81.2 \pm 11.0$  mg,  $42.0 \pm 3.5$  mg) に比し有意に減少してお

り、逆に R 群 ( $80.0 \pm 12.7$  mg,  $41.3 \pm 4.6$  mg) では改善された (図 7)。また、それぞれの臓器の胎仔体重に占める比率は各群間で有意差を認めずほぼ一定であり、胎仔肝臓及び腸管の重量は胎仔体重と symmetrical に推移していることが明らかとなった (図 8)。しかしながら、胎仔脳重量は C 群 ( $82.9 \pm 5.6$  mg) と Sx 群 ( $80.8 \pm 3.6$  mg) との間に有意差を認めず、従って胎仔体重に占める脳重量の比率が Sx 群 ( $7.5 \pm 0.4\%$ ) では C 群 ( $6.7 \pm 0.3\%$ ) に比し有意に増加していた。また R 群 ( $6.8 \pm 0.2\%$ ) では C 群と同じレベルまで回復していた。以上の結果より、EGF 欠乏による胎仔発育遅延においては、臓器間に発育障害の程度に asymmetry が存在することが明らかとなった。

胎盤重量には各群間で有意な差を認めなかった (図 9)。

#### 【EGF の血漿中グルコース濃度に及ぼす影響】

母獣血漿中グルコース濃度には 3 群間で有意差を認めなかったが、胎仔血漿中グルコース濃度は、C 群 ( $86.0 \pm 13.0$  mg/dl) に比し Sx 群 ( $63.0 \pm 11.8$  mg/dl) では有意に減少し、R 群 ( $81.3 \pm 15.3$  mg/dl) では C 群と同じレベルまで回復した (図 10)。

#### 【EGF の胎仔臓器中グルコース濃度に及ぼす影響】

胎仔脳、肝臓のいずれにおいても、臓器内グルコース含量は、Sx 群 ( $0.31 \pm 0.09$ ,  $0.91 \pm 0.27$  nM/mg protein) では C 群 ( $0.44 \pm 0.16$ ,  $1.22 \pm 0.31$  nM/mg protein) より低値を示し、R 群 ( $0.40 \pm 0.09$ ,  $1.19 \pm 0.24$  nM/mg protein) では Sx 群より増加していた (図 11)。

#### 【EGF の胎盤でのグルコースおよびアミノ酸輸送能に及ぼす影響】

Day 19 における、非代謝性グルコースである  $^3\text{H}$ -2DG 及び非代謝性アミノ酸である  $^{14}\text{C}$ -AIB の母獣同時投与による検討では、まず  $^3\text{H}$ -2DG は、C 群、Sx 群、R 群の 3 群間で、母獣血中並びに胎盤ホモゲネート中の放射能活性に有意差を認めなかった (図 12)。



しかしながら、胎仔ホモゲネートでは、C 群 ( $5.17 \pm 1.25$  %dpm) に比し Sx 群 ( $2.94 \pm 1.02$  %dpm) で有意に放射能活性が減少した。この胎仔ホモゲネート中放射能活性は、R 群 ( $5.17 \pm 1.79$  %dpm) では C 群と同じレベルまで回復した。

次に  $^{14}\text{C}$ -AIB については、母獣血、胎盤ホモゲネート、胎仔ホモゲネートのいずれにおいても、3 群間でその放射能活性に有意差を認めなかった (図 13)。

#### 【EGF の胎盤通過性の検討】

mEGF を day 13 の母獣に投与したところ、母獣血漿中の EGF 濃度は、投与後 15 分にピークを示し、その後は漸減して投与後 120 分には投与前値に復した (図 14)。胎盤ホモゲネートにおいては、同様に投与後 15 分でピークを示し、その後の EGF 濃度の減少は母獣血漿に比較して緩徐であった。一方胎仔ホモゲネートでは、測定期間中有意な EGF 濃度の上昇を認めなかった。Day 19 においても EGF 濃度の推移は day 13 と全く同様であり、胎仔ホモゲネートにおいては投与後 120 分に至るまで有意な EGF 濃度の上昇を認めなかった。

## 考案

本実験では、マウスにおいて血漿中 EGF 濃度は妊娠経過とともに増加し、両側顎下腺切除により測定感度以下に低下した。マウス血漿中 EGF の産生源については、当初顎下腺ではないと報告されたが<sup>(17)</sup>、その後の一連の報告<sup>(7,14,18,19)</sup>では、血漿中 EGF 濃度が顎下腺切除により低下することから、やはり顎下腺がその主要な産生源であると考えられる様になった。今回の実験においても、両側顎下腺切除により血漿中 EGF 濃度が低下し、マウスにおいては顎下腺が血漿中 EGF の産生源であることが示唆された。一方、胎児の発育は妊娠中期以降に急速に進行することが知られており、この時期における発育障害が子宮内胎児発育遅延の原因であるとされている<sup>(1,2)</sup>。従って、妊娠中の胎児発育における EGF の作用は妊娠中期に両側顎下腺切除を行うことにより検討できると考えられた。また、両側顎下腺切除マウスに EGF を持続投与したところ、血漿中 EGF 濃度はある程度の回復が認められた。マウスにおいては血漿中 EGF 濃度が日内変動を示し、深夜にピークを持ち日中は測定感度以下になることが知られている<sup>(7)</sup>。本実験でのマウスの採血は血漿中 EGF 濃度が高値となりつつある夕方に行なっており、その結果 C 群では  $0.67 \pm 0.23$  ng/ml と R 群に比し有意に高値となったものと考えられた。

本実験では、妊娠中の両側顎下腺切除により、生存胎仔率の減少すなわち子宮内胎仔死亡 (intrauterine fetal death, IUFD) の増加が認められた。この IUFD に至った胎仔はいずれも体重が生存胎仔よりも小さく、IUGR によるものと考えられた。一方、顎下腺切除マウスに EGF を持続的に補充することにより、IUFD の減少及び IUGR の防止が可能であった。これらの実験結果より、マウスにおいては、EGF が正常な胎児発育において生理学的に重要な働きを持っていることが示唆された。

IUGR には大きく分けて 2 つのタイプが存在し、hypoplastic type と malnutrition type とがある<sup>(1,2,21)</sup>。前者は先天奇形や胎内感染などの妊娠初期からの異常によるもので、細胞数が少なく、頭部も躯幹も同様に発育が障害されるために symmetrical type ともいわれる。一方後者は、妊娠後半の何らかの異常によるものと考えられており、細胞数より細胞の大きさに減少傾向が強く、頭部の発育が比較的保持され、肝臓、消化管といった躯幹臓器の重量が減少するために asymmetrical type ともいわれている<sup>(1,2, 20, 21)</sup>。この後者のタイプは、前者に比べて出生後に低血糖を示すことが圧倒的に多く<sup>(22,23)</sup>、その原因として胎児へのグルコース供給の低下、すなわち胎盤の機能低下が考えられてきた<sup>(24)</sup>。本実験系では、Sx 群では肝臓、消化管の重量は胎仔体重と同様に C 群に比し有意な減少を示したにもかかわらず、脳重量には各群間で有意な差を認めなかった。さらに、各臓器の体重に占める比率を検討すると、肝臓、消化管では 3 群間に有意な差を認めなかったにもかかわらず、脳では C 群に比し Sx 群で脳/体重比が有意に増加していた。このことから、本動物モデルでは、EGF 欠乏が asymmetrical type IUGR 及び IUFD をもたらしたものと考えられた。

そこで EGF の作用点を検討する目的で、mEGF を母獣に投与し EGF の胎盤通過性を検討した。mEGF を母獣に皮下投与したところ、観察期間中胎仔ホモゲネート中の EGF 濃度は有意な変化を認めなかった。これより、母獣の EGF は胎盤の通過性がない、あるいは通過してもごくわずかであろうと考えられた。他家の報告<sup>(25)</sup>でも、マウスでは intact な形での EGF の移行は認められないとされており、今回の実験結果を支持するものである。これらのことより、母獣 EGF の作用点が胎仔である可能性は低いと推測された。

EGF の作用点が胎盤であるとする、EGF は胎盤のどのような機能に関与しているのが問題となる。すなわち、EGF 欠乏が胎盤そのものの発育を障害しているために IUGR

が惹起されるのか、あるいは胎盤での母獣から胎仔への物質輸送を障害しているのか、を明らかとする必要がある。本実験では、3 群間で胎盤重量に有意な差は認めず、EGF 欠乏が胎盤そのものの発育を障害している可能性は否定的であった。

そこで次に、EGF 欠乏による胎盤での物質輸送能への影響について検討した。胎児においては自らのグルコース産生能は成人の 10 ~ 30% に過ぎず、胎盤を介して母体から供給されるグルコースが主要なエネルギー源となっている<sup>(26)</sup>。臨床的にも、IUGR 胎児においては、出生後の低血糖がしばしば問題となり、特に *asymmetrical type* のものではその程度が大きいとされている<sup>(22,23)</sup>。また、アミノ酸は胎盤での濃度勾配に逆らって胎児への能動輸送がされており、やはり胎児の蛋白合成並びに発育にとって重要であることが知られている<sup>(26)</sup>。一方、脂肪は胎児血漿中の遊離脂肪酸濃度は母体の 6 分の 1 以下であり、胎児の代謝においてはさほど重要な役割を果たしていないと考えられている<sup>(26)</sup>。このため本研究では、胎盤におけるグルコース及びアミノ酸の輸送能に及ぼす EGF の影響を本動物モデルを用いて検討した。

何れも非代謝性物質である <sup>3</sup>H-2DG と <sup>14</sup>C-AIB を母獣に同時投与したところ、胎仔移行率は <sup>14</sup>C-AIB では 3 群間で有意な差は認められなかったものの、<sup>3</sup>H-2DG は C 群に比し Sx 群で有意に胎仔移行率は低下した。この傾向は R 群では改善された。以上の実験結果より、本動物モデルにおける IUGR の病因として、胎盤におけるグルコース輸送能の低下が強く示唆された。

さらに、この観察結果を確認するために、胎仔におけるグルコース含量を検討した。まず血漿中グルコースについては、母獣血漿中グルコースには 3 群間で有意差を認めないにもかかわらず、胎仔血漿中グルコースにおいては、C 群、Sx 群の順に有意に減少していることが確認され、R 群では逆に C 群と同じレベルまで回復した。さらに、胎仔臓器

ホモゲネート中のグルコース濃度を比較検討したところ、IUGR 胎仔においては、臓器重量の減少している肝臓ばかりでなく、重量の比較的保持されている脳においてもグルコース含量が減少していることが明らかとなった。Asymmetrical IUGR における脳のグルコース含量の変化については報告がなく、本実験系における EGF 欠乏による IUGR で、脳のグルコース含量が低下している意義は明らかではなく、今後の検討課題である。

以上述べた実験結果より、この EGF 欠乏による IUGR では、母獣から胎仔へのグルコース供給が低下している可能性が示唆された。グルコースの輸送に際して重要な役割を果たす GLUT には、現在少なくとも 5 種類 (GLUT1-5) のクローンが同定され、それぞれのタイプ毎に組織分布が異なっている<sup>(27)</sup>。ラットでは、胎盤には GLUT1, GLUT3 の 2 種類が発現しており、前者は主に胎盤そのものの発育に関与し、後者は胎児へのグルコース輸送に関与するとされている<sup>(28)</sup>。現在、本実験系において、胎盤での GLUT1, GLUT3 の発現を *in situ hybridization* の手法を用いて検討しているが、各群間で GLUT1 の発現には差を認めず、一方 GLUT3 については、Sx 群ではその発現が C 群に比し有意に減少しており、R 群では回復を認めている<sup>(29)</sup>。本実験系においては、母獣の EGF 欠乏による IUGR では、胎盤重量には差を認めることなく、母獣から胎仔へのグルコース輸送の障害が認められたが、その病因として GLUT3 の発現の減少が関与していることが示唆される。

## まとめ

以上本研究から、マウス母獣の妊娠中期以降における EGF 欠乏は、IUGR 並びに IUFD を惹起することを明らかとした。また、この IUGR は脳重量が比較的保持される asymmetrical type であることが明らかとなり、さらにその病因として胎盤でのグルコース輸送能の低下が示唆された。このことは、従来その病態が不明であったヒトの子宮内胎児発育遅延の病態解明並びに治療への手掛かりとなるものと考えられる。

## 謝辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲頂きました東京大学医学部産科婦人科学教室教授  
武谷雄二先生、順天堂大学医学部産科婦人科学教室教授 桑原慶紀先生、並びに東京大学  
医学部産科婦人科学教室助教授 堤治先生に深謝いたします。

## 参考文献

1. **Cunningham, F.G., P.C. McDonald, N.F. Gant, K.J. Leveno, and L.C. Gilstrap III.** Williams Obstetrics. East Norwalk, CT, Appleton and Lange. 1993, 875-882.
2. **Gruenewald, P.** Growth of the human fetus: normal growth and its variations. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 94: 1112-1119, 1966.
3. **Hirata, Y., G.W. Moore, C. Bertagna, and D.N. Orth.** Plasma concentrations of immunoreactive human epidermal growth factor (urogastrone) in man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 50: 440-444, 1980.
4. **Gregory, H., J.E. Holmes and I.R. Willshire.** Urogastrone levels in the urine of normal adult humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 45: 668-682, 1977.
5. **Hirata, Y. and D.N. Orth.** Epidermal growth factor (urogastrone) in human fluids: size heterogeneity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 48: 673-679, 1979.
6. **Cohen, S., and C.R. Savage.** Recent studies on the chemistry and biology of epidermal growth factor. *Recent Prog. Horm. Res.* 30: 551-574, 1974.
7. **Kurachi, H., and T. Oka.** Changes in epidermal growth factor concentrations of submandibular gland, plasma and urine of normal and sialoadenectomized female mice during various reproductive stages. *J. Endocrinol.* 106: 197-202, 1985.
8. **Weaver, L.T., P.A. Gonnella, E.J. Israel, and W.A. Walker.** Uptake and transport of epidermal growth factor by the small intestinal epithelium of the fetal rat. *Gastroenterology.* 98: 828-837, 1990.
9. **Mukku, V.R., and G.M. Stancel.** Regulation of epidermal growth factor receptor by estrogen. *J. Biol. Chem.* 260: 9820-9824, 1985.
10. **Adamson, E.D., M.J. Deller, and J.B. Warshaw.** Functional EGF receptors are present on mouse embryo tissues. *Nature* 291: 656-659, 1981.
11. **Hollenberg, M.D.** Epidermal growth factor-urogastrone, a polypeptide acquiring hormonal status. *Vitam. Horm.* 37: 69-110, 1979.

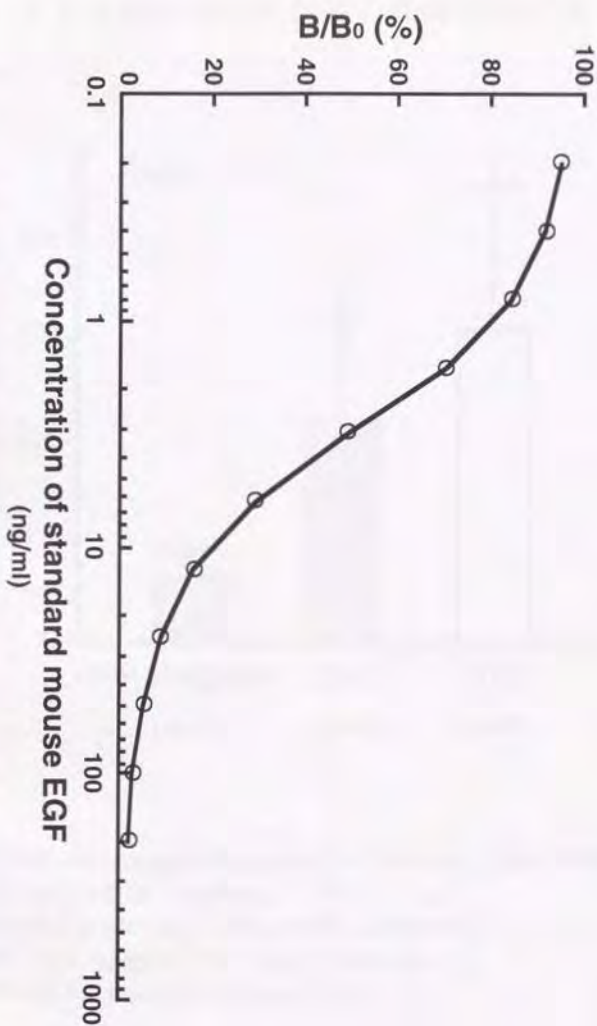


12. **Shigeta, K., Y. Hiramatsu, K. Eguchi, and K. Sekiba.** Urinary and plasma epidermal growth factor levels are decreased in neonates with intrauterine growth retardation and in their mothers. *Biol. Neonate.* 62:76-82, 1992.
13. **Hofmann, G.E., C.V. Rao, M.J. Brown, L.F. Murray, G.S. Schultz and T.A. Siddiqi.** Epidermal growth factor in urine of nonpregnant women and pregnant women throughout pregnancy and at delivery. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 66: 119-123, 1988.
14. **Tsutsumi, O., and T. Oka.** Epidermal growth factor deficiency during pregnancy causes abortion in mice. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 156: 241-244, 1987.
15. **Lowry, O.H., J.V. Passonneau.** A flexible system of enzymatic analysis. *Orland, FL, Academic Press.* 1972, 174-175.
16. **Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.W. Farr, and R.J. Randall.** Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275, 1951.
17. **Barka, T.** Biologically active polypeptide in submandibular glands. *J. Histochem. Cytochem.* 28: 836-859, 1980.
18. **Tsutsumi, O., H. Kurachi, and T. Oka.** A physiological role of epidermal growth factor in male reproductive function. *Science.* 233 : 975-977, 1986.
19. **Tsutsumi, O., A. Tsutsumi, and T. Oka.** Epidermal growth factor-like, corneal wound healing substance in mouse tears. *J. Clin. Invest.* 81: 1067-1071, 1988.
20. **Spellacy, W.N.** Intrauterine growth retardation. In: **Eden, R.D., and F.H. Boehm.** Assessment and care of the fetus. East Norwalk, CT, Appleton and Lange. 1990, 643-649.
21. **Crane, J.P., and M.M. Kopta.** Comparative newborn anthropometric data in symmetric versus asymmetric intrauterine growth retardation. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 138: 518-522, 1980.
22. **Goldsmith, J.P.** Neonatal morbidity. In: **Eden, R.D., and F.H. Boehm.** Assessment and care of the fetus. East Norwalk, CT, Appleton and Lange. 1990,

643-649.

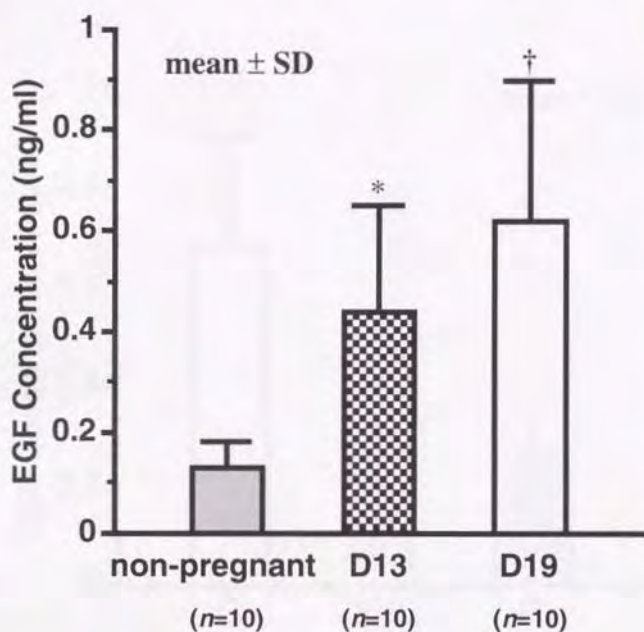
23. **Creasy, R.K., and R. Resnik.** Maternal-fetal medicine: principles and practice. Philadelphia, PA, W. B. Saunders, 1989, 1162-1167.
24. **Economides, D.L., and K.H. Nicolaides.** Blood glucose and oxygen tension levels in small-for-gestational-age fetuses. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 160: 385-389, 1989.
25. **DiAugustine, R.P., M.J. Rosch, D.E. Lannon, M.P. Walker, and R.M. Pratt.** Evaluation of murine placental degradation and transfer of [<sup>125</sup>I]iodo-epidermal growth factor. *Endocrinology* 120: 1190-1200, 1987.
26. **Girard, J.R.** Metabolic fuels of the fetus. *Isr. J. Med.* 11:591-600, 1975.
27. **Bell, G.I., T. Kayano, J.B. Buse, C.F. Burant, J. Takeda, D. Lin, H. Fukumoto, and S. Seino.** Molecular biology of mammalian glucose transporters. *Diabetes Care* 13:198-208, 1990.
28. **Zhou, J., and C.A. Bondy.** Placental glucose transporter gene expression and metabolism in the rat. *J. Clin. Invest.* 91:845-852, 1993.
29. **Kamei, Y., O. Tsutsumi, A. Yamakawa, Y. Oka, Y. Taketani, and J. Imaki.** Involvement of placental glucose transporters in the intrauterine growth retardation induced by maternal epidermal growth factor deficiency. *submitted.*

図 1 マウス血漿中EGF濃度の測定における standard curve



Amersham 社の mouse EGF RIA kit を用いて、mouse EGF (receptor grade, Collaborative Research, Waltham, MA) を標準として standard curve を作製した。本アッセイにおける  $^{125}\text{I}$ -mEGF の Trace binding (B<sub>0</sub>) は 65.4% であった。各濃度における測定は triplicate にて行なった。

図2 マウス血漿中EGF濃度の妊娠経過に伴う変化



EGF濃度は Amersham社の mouse EGF RIA kit を用いて測定した。

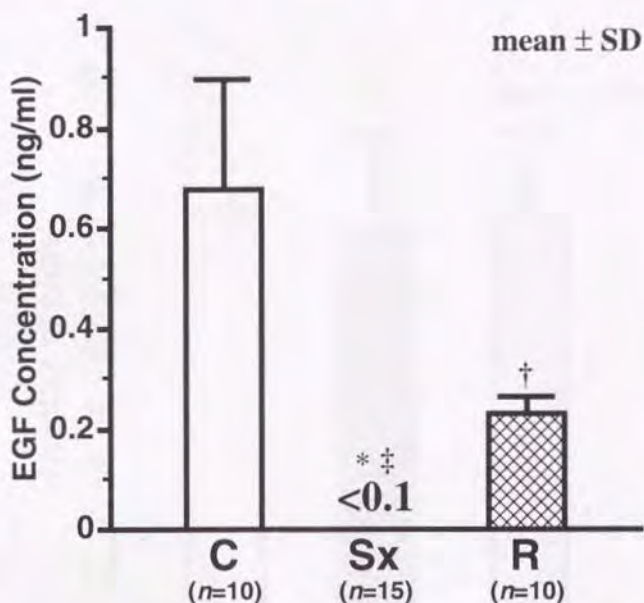
各サンプルの測定は triplicate にて行なった。

D13, day13 of pregnancy; D19, day 19 of pregnancy

\*  $p < 0.05$  when compared with non-pregnant mice

†  $p < 0.05$  when compared with mice of D13

図3 種々の条件下のマウス母獣のday19における血漿中EGF濃度の比較



EGF濃度は Amersham社の mouse EGF RIA kit を用いて測定した。各サンプルにおける測定は triplicate にて行なった。

C, sham手術 + phosphate buffered saline 投与群

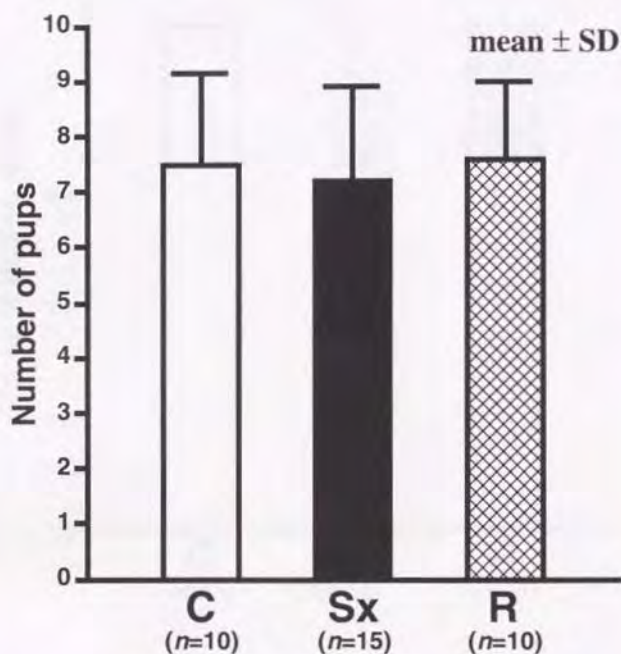
Sx, 両側顎下腺切除手術 + phosphate buffered saline 投与群

R, 両側顎下腺切除手術 + mouse EGF 投与群

\*  $p < 0.001$ , †  $p < 0.02$  when compared with group C

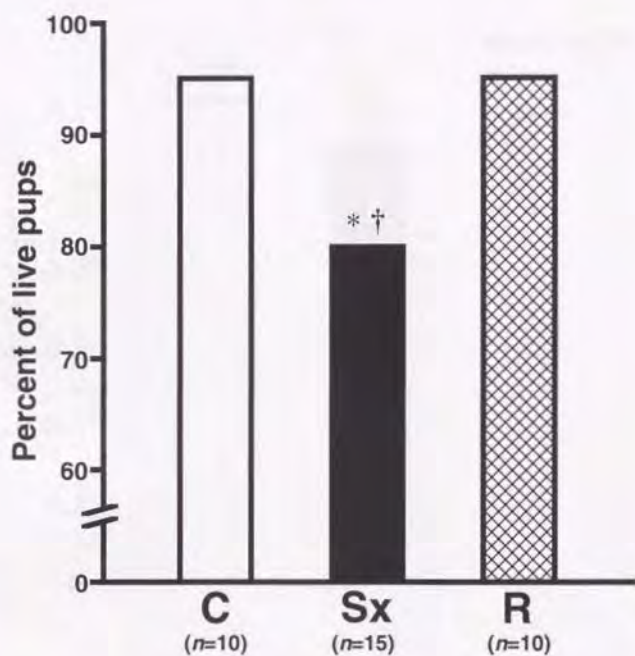
‡  $p < 0.001$  when compared with group R

図4 種々の条件下のマウス母獣のday19における胎仔数の比較



- C, sham手術 + phosphate buffered saline 投与群  
Sx, 両側顎下腺切除手術 + phosphate buffered saline 投与群  
R, 両側顎下腺切除手術 + mouse EGF 投与群

図5 種々の条件下のマウス母獣のday19における胎仔生存率の比較



C, sham手術 + phosphate buffered saline 投与群

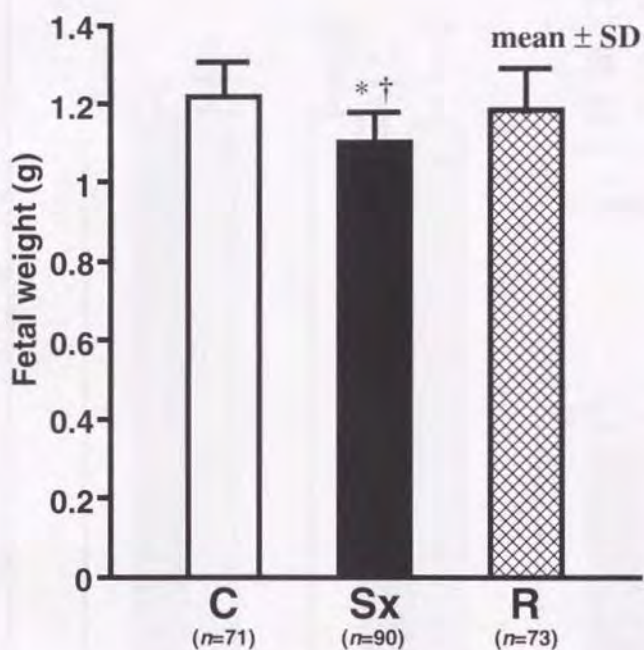
Sx, 両側顎下腺切除手術 + phosphate buffered saline 投与群

R, 両側顎下腺切除手術 + mouse EGF 投与群

\*  $p < 0.05$  when compared with group C

†  $p < 0.05$  when compared with group R

図6 種々の条件下のマウス母獣のday19における胎仔重量の比較



C, sham手術 + phosphate buffered saline 投与群

Sx, 両側顎下腺切除手術 + phosphate buffered saline 投与群

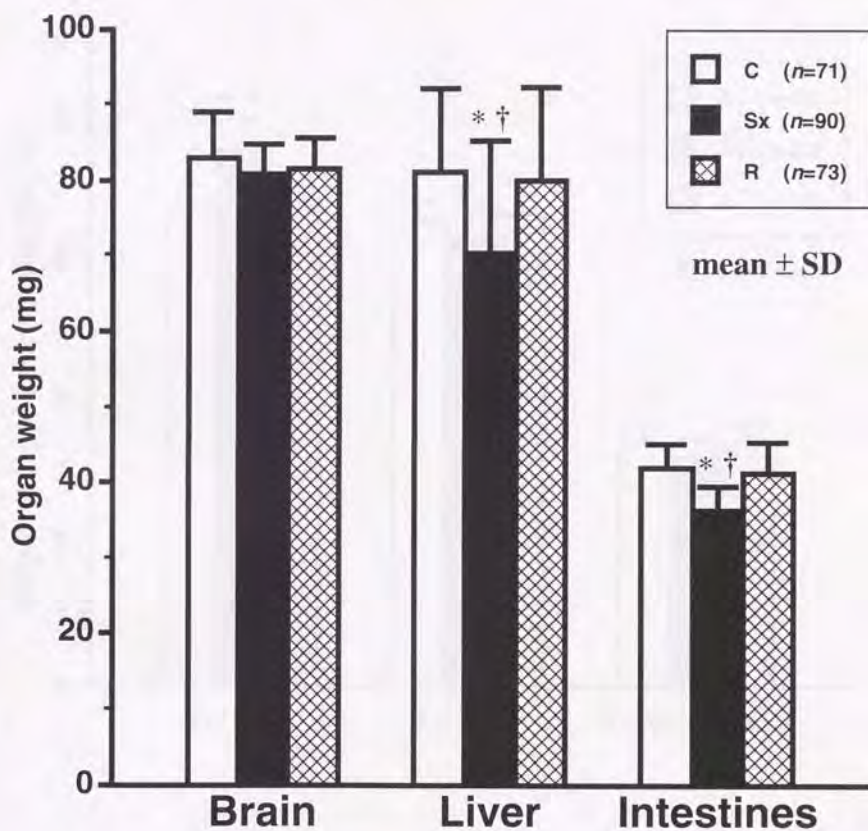
R, 両側顎下腺切除手術 + mouse EGF 投与群

\*  $p < 0.05$  when compared with group C

†  $p < 0.05$  when compared with group R



図7 種々の条件下のマウス母獣のday19における胎仔臓器重量の比較



C, sham手術 + phosphate buffered saline 投与群

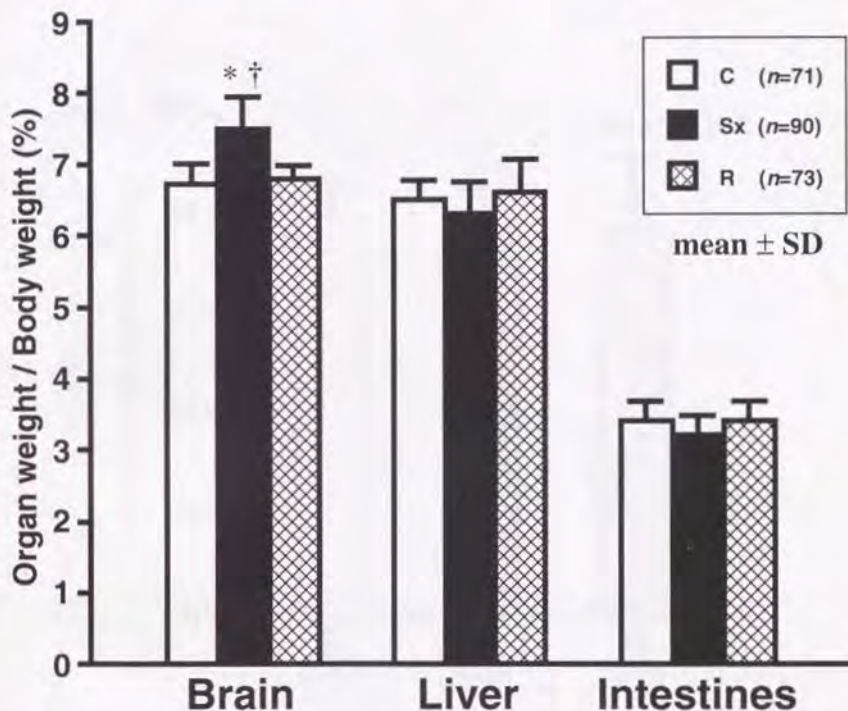
Sx, 両側顎下腺切除手術 + phosphate buffered saline 投与群

R, 両側顎下腺切除手術 + mouse EGF 投与群

\*  $p < 0.05$  when compared with group C

†  $p < 0.05$  when compared with group R

図8 種々の条件下のマウス母獣のday19における胎仔臓器重量/胎仔体重比の比較



C, sham手術 + phosphate buffered saline 投与群

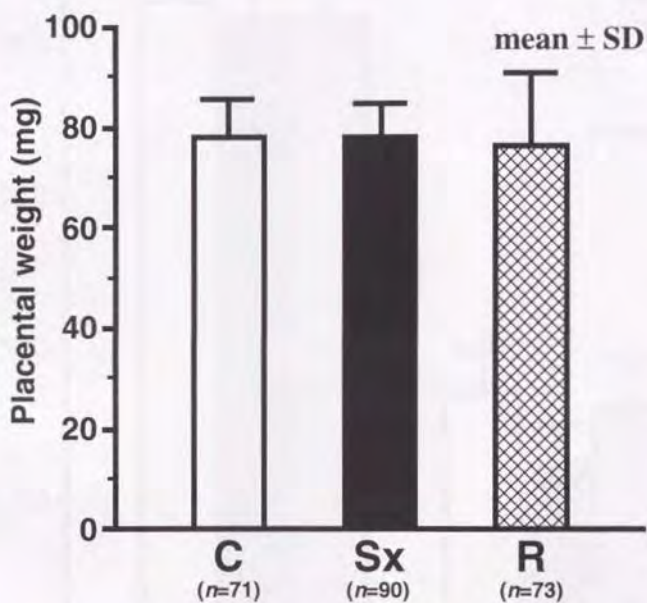
Sx, 両側顎下腺切除手術 + phosphate buffered saline 投与群

R, 両側顎下腺切除手術 + mouse EGF 投与群

\*  $p < 0.05$  when compared with group C

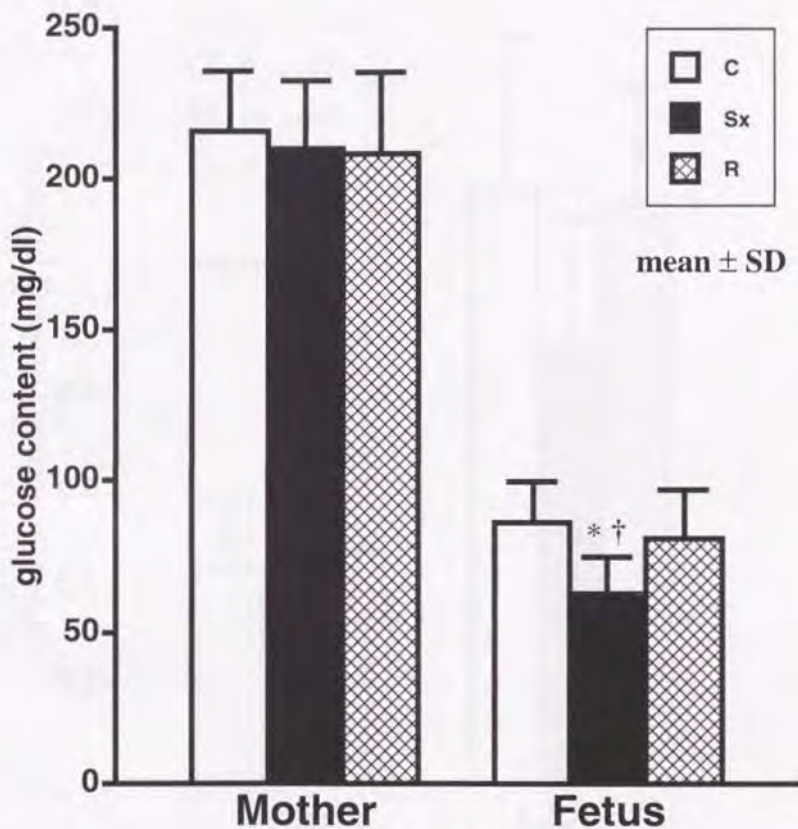
†  $p < 0.05$  when compared with group R

図9 種々の条件下のマウス母獣のday19における胎盤重量の比較



- C, sham手術 + phosphate buffered saline 投与群  
Sx, 両側顎下腺切除手術 + phosphate buffered saline 投与群  
R, 両側顎下腺切除手術 + mouse EGF 投与群

図10 母獸EGF欠乏による子宮内胎仔発育遅延における  
血漿中グルコース濃度の比較



グルコース濃度はLowryの蛍光測定法により測定した。

C, sham手術 + phosphate buffered saline 投与群

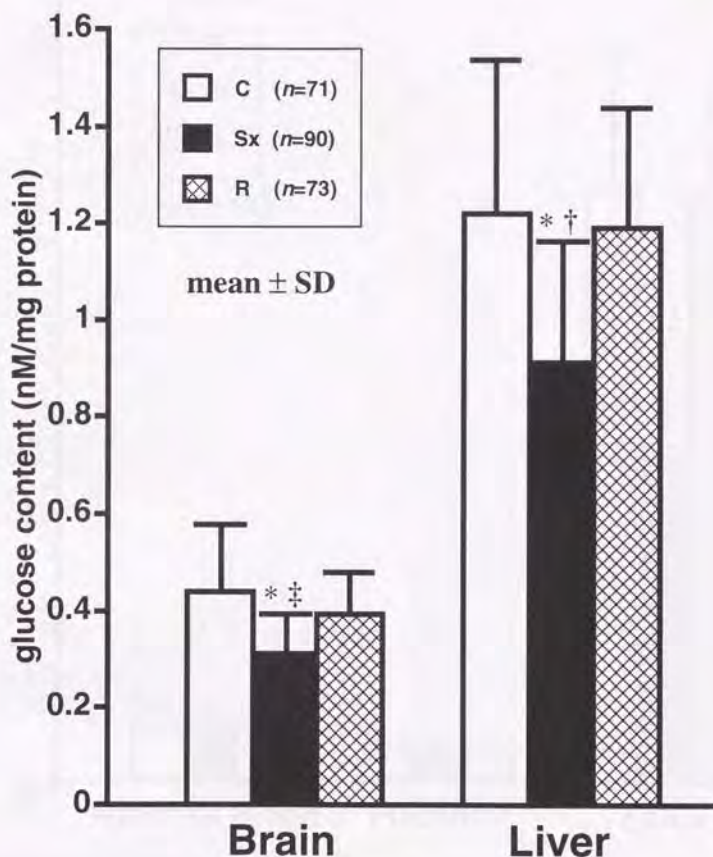
Sx, 両側顎下腺切除手術 + phosphate buffered saline 投与群

R, 両側顎下腺切除手術 + mouse EGF 投与群

\*  $p < 0.03$  when compared with group C

†  $p < 0.04$  when compared with group R

図11 母獸EGF欠乏による子宮内胎仔発育遅延における臓器内グルコース濃度の比較



グルコース濃度は、臓器に10倍量の生理食塩水を加えてホモゲネートを作製した後、Lowryの蛍光測定法により測定した。

C, sham手術 + phosphate buffered saline 投与群

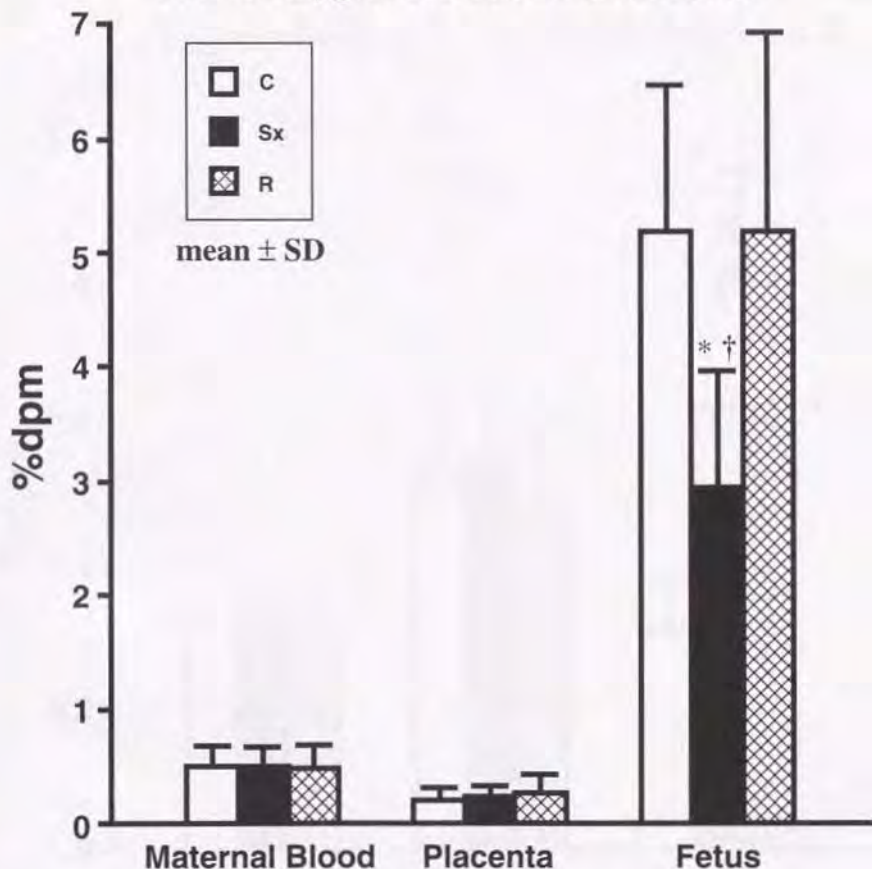
Sx, 両側顎下腺切除手術 + phosphate buffered saline 投与群

R, 両側顎下腺切除手術 + mouse EGF 投与群

\*  $p < 0.03$  when compared with group C

†  $p < 0.03$ , ‡  $p < 0.05$  when compared with group R

図 12 母獸EGF欠乏による子宮内胎仔發育遅延における<sup>3</sup>H-2-deoxyglucoseの胎盤通過性の比較



Day 19 の母獸下大靜脈より <sup>3</sup>H-2-deoxyglucose (1  $\mu$ Ci / 0.1 ml) を靜注し、5 分後に母獸血、胎盤及び胎仔を採取した。母獸血は 0.1 ml を、胎盤、胎仔は各個体毎にホモゲネートを作製し、溶解脱色後液体シンチレーションカウンターにて放射能活性を測定した。各測定値は母獸投与量に対する比率で示した。

C, sham手術 + phosphate buffered saline 投与群

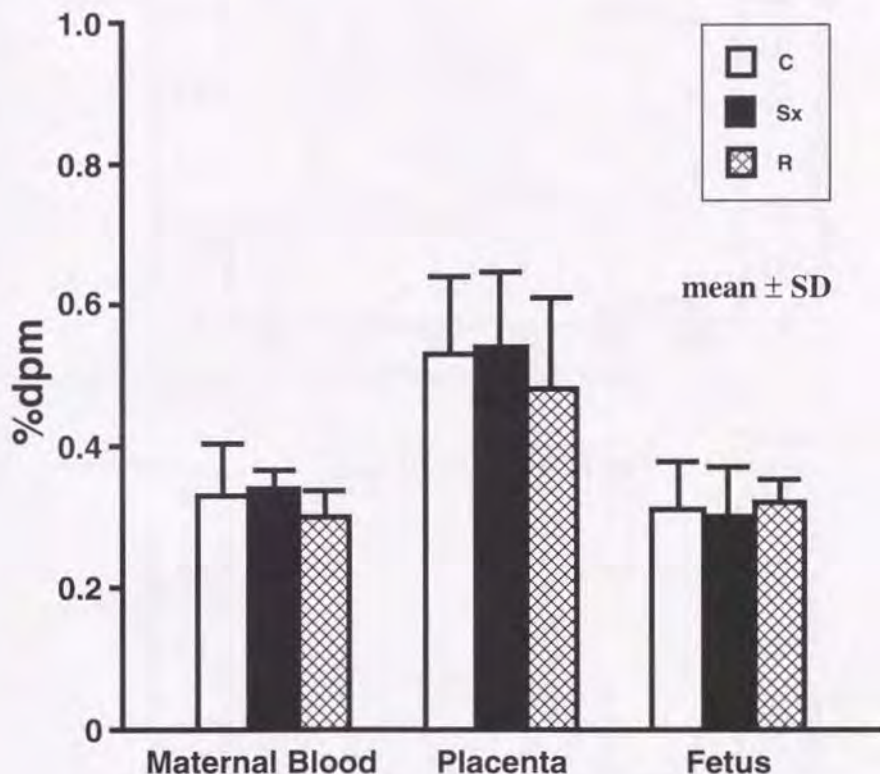
Sx, 両側顎下腺切除手術 + phosphate buffered saline 投与群

R, 両側顎下腺切除手術 + mouse EGF 投与群

\*  $p < 0.01$  when compared with group C

†  $p < 0.02$  when compared with group R

図 13 母獸EGF欠乏による子宮内胎仔發育遅延における $^{14}\text{C}$ -aminoisobutylic acidの胎盤通過性の比較



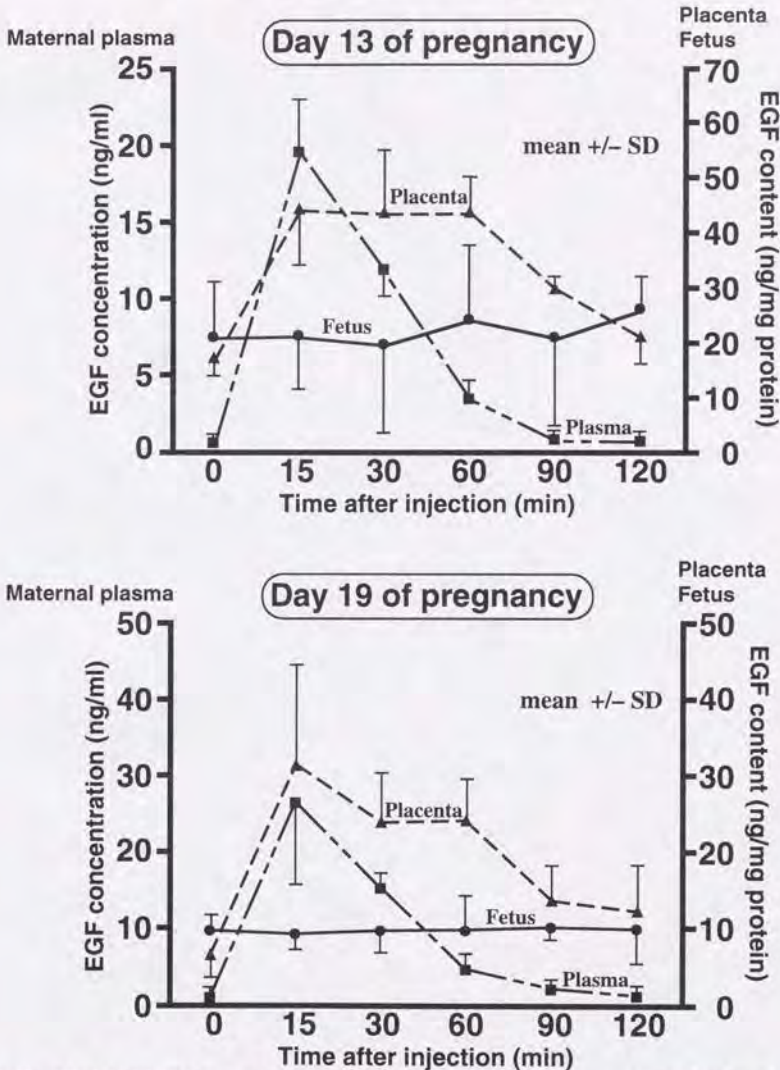
Day 19の母獸下大静脈より $^{14}\text{C}$ -aminoisobutylic acid ( $1\ \mu\text{Ci}/0.1\ \text{ml}$ )を静注し、5分後に母獸血、胎盤及び胎仔を採取した。母獸血は $0.1\ \text{ml}$ を、胎盤、胎仔は各個体毎にホモゲネートを作製し、溶解脱色後液体シンチレーションカウンターにて放射能活性を測定した。各測定値は母獸投与量に対する比率で示した。

C, sham手術 + phosphate buffered saline 投与群

Sx, 両側顎下腺切除手術 + phosphate buffered saline 投与群

R, 両側顎下腺切除手術 + mouse EGF 投与群

図 14 マウスEGF母獣投与後の母獣血漿,胎盤並びに胎仔におけるEGF濃度の変化



母獣血漿は下大静脈よりヘパリン加採血後 2,000 G, 10 min, 4°C にて遠心後採取した。胎仔, 胎盤については母獣1匹毎にまとめて2倍量のPBSを加えた後ホモゲネートを作製し, 10,000 G, 75 min, 4°C にて遠心後上清を採取した。EGF濃度の測定には Amersham 社の mouse EGF RIA kit を用いた。各測定値のサンプル数は全てn=4である。



