

原 著

糖尿病母体から出生した児の臍帯血中インスリン様 成長因子結合蛋白に関する研究

東京女子医科大学 第三内科学教室 (主任: 大森安恵教授)

テツ オウ
哲 翁 た ま き

(受付 平成4年10月26日)

Profiles of Insulin-Like Growth Factor Binding Proteins in Umbilical Cord Blood of Diabetic Mothers

Tamaki TETSUOH

Department of Medicine III (Director: Prof. Yasue OMORI)
Tokyo Women's Medical College

It has been suggested that insulin-like growth factors (IGFs) may play a role in normal fetal growth and also cause of macrosomia born to diabetic mothers. IGFs are found in blood complexed to specific binding proteins (IGFBPs) that modulate IGF availability to their receptors.

In the present study, we have examined the profiles of IGFBPs in cord sera by Western ligand blot analysis, and investigated the relationship between the IGFBPs and the birth weight. Fetal cord sera were obtained from newborns of 63 diabetic and 35 normal mothers at delivery.

Fetal cord sera revealed four IGFBPs with mol wts of 41/38, 34, 30, 24 kd, identified as IGFBP-3, -2, -1, -4, respectively. In appropriate for dates (AFD) infants, serum IGFBP-2 increased and IGFBP-3 decreased in comparison with those in normal adults. In heavy for dates (HFD) infants born to both normal and diabetic mothers, serum IGFBP-2 values significantly decreased in comparison with those for AFD infants ($69 \pm 24\%$ vs. $93 \pm 13\%$, $95 \pm 22\%$ vs. $112 \pm 47\%$, respectively). The amount of cord serum IGFBP-2 from both normal and diabetic mothers inversely correlated with birth weight. In addition, birth weight of newborns of diabetic mothers correlated with IGF-I, II, IGFBP-3 and C-peptide immunoreactivity (CPR).

We demonstrated that serum IGFBP-2 decreased and IGF-I increased at the birth weight of neonates increased in both of groups and that IGFBP-3 and IGF-II correlated with birth weight in diabetic group. These data indicate that changes of serum IGFBP profiles might influence the fetal growth.

緒 言

糖尿病母体から巨大児が多く出生することはよく知られた事実である。以前より、巨大児出生の主要要因として母体の高血糖に基づく児の高インスリン血症があげられている¹⁾。しかし、母体の血糖コントロールが良好であっても巨大児が出生することがあり、母体の高脂血症²⁾や血中アミノ酸の組成の変化³⁾、インスリン様成長因子 (insulin-

like growth factor : IGF) の関与も考えられている。

健常母体および糖尿病母体から出生した児の体重と臍帯血中 IGF-I が正の相関を示すこと^{4)~6)}、更に糖尿病母体より出生した児の IGF-II が健常母体より出生した児の IGF-II に比べ高値を示す⁷⁾ことは既に報告されている。しかし IGF-I が低値でも巨大児の出生することがある⁸⁾。

IGFsは血中では大部分これに特異的な結合蛋白(IGF binding protein: IGFBP)と結合して存在しており、現在このIGFBPには、IGFBP-1~6の6種類が存在することが知られている⁸⁾⁹⁾。IGFBPsは単にIGFのreservoirとしての役割だけでなく、IGFの作用を調節していると考えられている。そこで巨大児の成因として、IGFBPの関与も示唆されるが、糖尿病母体から出生する児の体重とIGFBPとの関係について未だ報告はない。

糖尿病母体から出生した児の体重とIGFBPとの関係について検討を行ったので報告する。

対象と方法

1. 対象

妊娠37~41週に糖尿病妊婦より出生した63児(糖尿病群)および健常妊婦より出生した35児(健常対照群)を対象とした。

糖尿病群は、当センター妊娠外来で管理した糖尿病妊婦63名より1987~1991年の5年間に出生した63児である。この糖尿病妊婦の内訳はNIDDM 43例、IDDM 20例であり、罹病期間は妊娠時発見例は0年として0~24年(5.9±5.8年:平均±SD)、分娩時年齢は19~40歳(28.9±4.2歳)であった。児体重は仁志田の曲線¹⁰⁾に基づき、-1.5SD以下

をlight-for-dates (LFD), ±1.5SD以内をappropriate-for-dates (AFD), +1.5SD以上をheavy-for-dates (HFD)に分類した。63児の児体重の分布は2,200~4,815g(3,507±685g)であり(図1)、LFD 4児、AFD 28児、HFD 31児であった。

一方、健常対照群は、1991年に出生した糖尿病群と略同年齢の健常妊婦35名(21~35歳; 29.4±1.1歳)より出生した35児とし、児体重は2,113~4,078g(3,310±504g)に分布しており(図1)、AFD 27児、HFD 8児であった。

2. 方法

糖尿病群および対照群の臍帯血中IGFBPs, IGF-I, IGF-II, インスリン(IRI), C-ペプチド(CPR)を測定した。臍帯血は分娩時に採取し、遠心分離後、血清を測定まで-20℃で保存した。

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(rhIGF-I; 藤沢薬品工業より提供)およびヒトIGF-II(rhIGF-II; Eli-Lilly社より提供)を使用した。IGF-I, IGF-IIのヨード化はクロロミンT法で行い、¹²⁵I-IGF-I, ¹²⁵I-IGF-IIのspecific activityは各々5.2~7.4×10¹², 4.4~7.4×10¹² Bq/gであった。

2) 血中IGFBPの測定

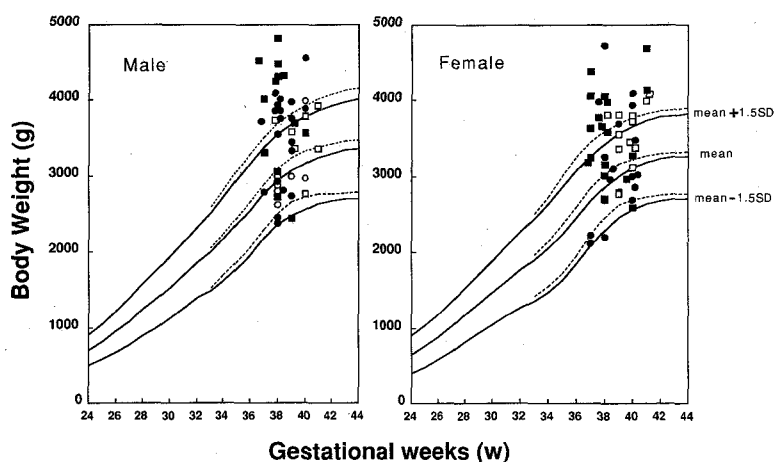


図1 児の体重分布

健常群初産婦(○), 経産婦(□), 糖尿病群初産婦(●), 経産婦(■)から生まれた児の体重をそれぞれ分娩週数に応じて日本人の胎児発育曲線(初産:—, 経産:-----)上に示す。

血中 IGFBP は Western ligand blot 法¹¹⁾で測定した。すなわち血清 $2\mu\text{l}$ を非還元下で 12% SDS polyacrylamide gel にて電気泳動し、その後蛋白をニトロセルロース膜に転写した。この膜を 0.1% Tween 20, 3% Nonidet-P40 にて洗浄し、IGFBP から内因性の IGF を解離させた。その後、 ^{125}I -IGF-I, -II (各 $1 \times 10^6 \text{cpm}$) を 4°C , 48時間 incubate し、膜を洗浄後、autoradiogram を作製した。この radiogram での IGFBP-1, -2, -3, -4 をデンストメーター (BIO-RAD 社 Model 1650 II) で測定した。各 IGFBP は管理血清 (健康妊婦より出生した AFD 児血清) の各 IGFBP 値を 100% として算出した。

3) IGF-I, IGF-II, CPR, IRI の radioimmuno assay (RIA)

血中 IGF は酸エタノール法で抽出し¹²⁾, RIA にて測定した。IGF-I および IGF-II の RIA はそれぞれ Miyakawa ら¹³⁾, Asakawa ら¹⁴⁾の測定法に準じて行った。すなわち、IGF-I の RIA は家兎に免疫して作製した抗 IGF-I 抗体を用いて二抗体法で行った。本測定系での測定内、測定間変動はそれぞれ 5.4%, 9.7% であり、成人血清 IGF-I の正常範囲は $88 \sim 240 \text{ng/ml}$ である。また本 RIA は IGF-I に特異的であり、IGF-II, インスリンとの交差は認められない。一方、IGF-II の RIA は抗 IGF-II モノクロナール抗体 (天野製薬) を用いて二抗体法にて行った。本測定系での測定内、測定間変動はそれぞれ 6.3%, 9.3% であり、成人血清 IGF-II の正常範囲 $374 \sim 804 \text{ng/ml}$ である。本 RIA では IGF-I と 1% の交差を示すが、インスリンとの交差は認められない。RIA 用緩衝液としては 0.03M リン酸緩衝液, pH7.5 (0.02% アジ化ナトリウム, 0.02% 硫酸プロタミン, 0.01M EDTA, 0.25% bovine serum albumin (BSA) を含む) を用いた。

IRI, CPR はインスリン抗体と内因性プロインスリンおよび中間体 (proinsulin-like component) との結合物の影響を考慮し free CPR, free IRI を RIA にて測定した¹⁵⁾。即ち血清 0.2ml に 25% polyethylene glycol (PEG) を加え抽出した上清を、それぞれ市販のキット (AB ビーズインシュリン [栄研], C-ペプチド [第一] III) を用いて 2 抗体

法で行った。

4) 母体血 hemoglobin A₁ (HbA₁) の測定

糖尿病妊婦の血中 HbA₁ は妊娠外来受診時 1 か月に 1 回採血したものを、高速液体クロマトグラフィー法 (京都第一科学 HA8120) にて測定し、児体重と母体糖尿病コントロールとの関係を検討した。

5) 統計

統計処理は、t 検定, Mann-Whitney 検定および Spearman の相関係数 (r_s) 有意差検定を用い、 $p < 0.05$ を統計的に有意とした。

結 果

1. 臍帯血中 IGFBPs の検討

臍帯血中 IGFBP を Western ligand blot で検討すると、4 つの IGFBPs (41kD/38kD: IGFBP-3, 34kD: IGFBP-2, 30kD: IGFBP-1, 24kD: IGFBP-4) が認められた (図 2)。成人血清と比較して、臍帯血中においては IGFBP-2 の増加と、IGFBP-3 の減少を認めた。

以下、各 IGFBP と児体重との関係について検討した。

1) IGFBP-2 と児体重

健康対照群で AFD の臍帯血中 IGFBP-2 値の平均 \pm SD は $93 \pm 13\%$ (range 61~135%), HFD では $69 \pm 24\%$ (28~101%) であり、HFD 群で有

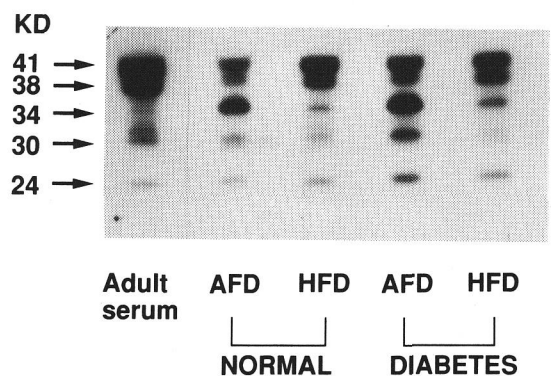


図 2 健康成人血清, 健康群 AFD, HFD, 糖尿病群 AFD, HFD の臍帯血中 IGFBP の Western ligand blot

健康成人血清では IGFBP-3 が大部分を占めるが、臍帯血中では IGFBP-2 の増加と IGFBP-3 の減少を認めた。

意の低値を認めた(図3)。糖尿病群においてIGFBP-2値の平均±SDは、LFDでは112±47%(range 55~163%), AFDでは95±22%(38~133%), HFDでは71±22%(27~134%)であり、LFD, AFDに比べてHFDでは有意に低値(AFD vs HFD: $p < 0.005$, LFD vs HFD: $p < 0.05$)を示した(図3)。

健常対照群および糖尿病群において、血中IGFBP-2は児体重と負の相関を認めた(図4)。

すなわちこれらの成績は健常群と糖尿病群とも児体重の増加に伴い、血中IGFBP-2の減少を認めた。糖尿病群と健常群の間ではIGFBP-2値は有意差を認めなかった。

2) IGFBP3と児体重

臍帯血中IGFBP-3を児体重別に検討した。健常対照群AFDのIGFBP-3値の平均±SDは125±29%(range 57~180%), HFDでは157±57%(117~285%)であり、HFDでやや高い傾向を認めたが、有意差は認めなかった(図5)。また血中IGFBP-3と児体重との間に相関を認めなかった。

一方、糖尿病群の血中IGFBP-3値の平均±SDは、LFDでは75±52%(range 16~120%), AFDでは131±30%(77~238%), HFDでは136±21%(96~186%)であり、AFD, HFD間では有意差は認めなかったが、LFDと比較するとAFD, HFDとも有意な差を認めた(図5)。更に糖尿病群では

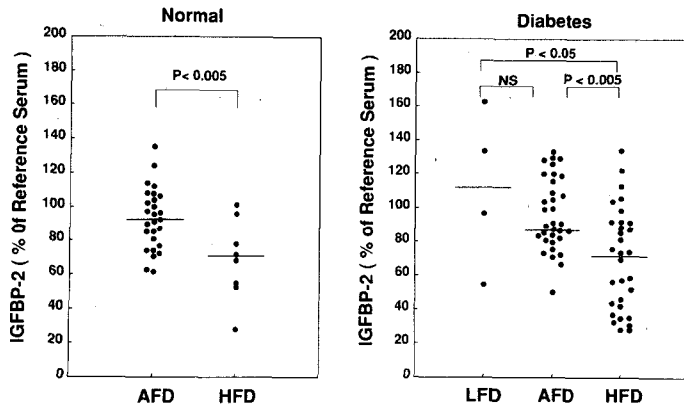


図3 健常群, 糖尿病群における臍帯血中IGFBP-2の児体重別の比較
健常群, 糖尿病群ともHFDにおいて臍帯血中IGFBP-2は有意に減少していた。
NS: not significant

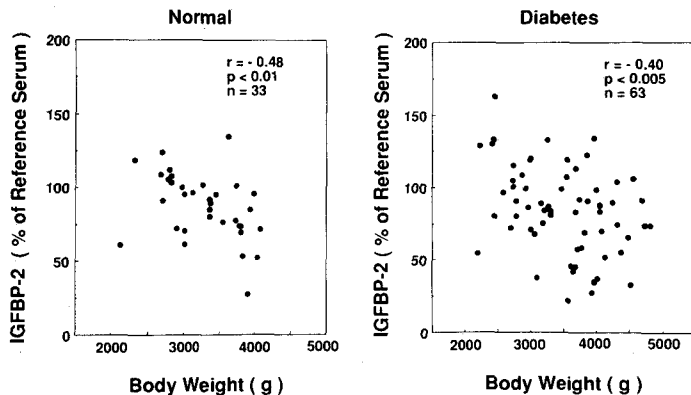


図4 健常群および糖尿病群より出生した児の臍帯血中IGFBP-2と児体重との相関
健常群, 糖尿病群とも児体重と臍帯血中IGFBP-2の間に負の相関を認めた。

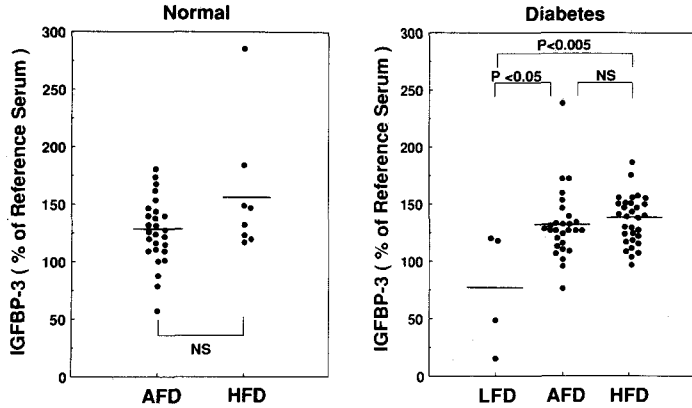


図5 健常群, 糖尿病群における臍帯血中 IGFBP-3 の児体重別の比較
健常群, 糖尿病群とも HFD において有意に臍帯血中 IGFBP-3 の増加を認めた。

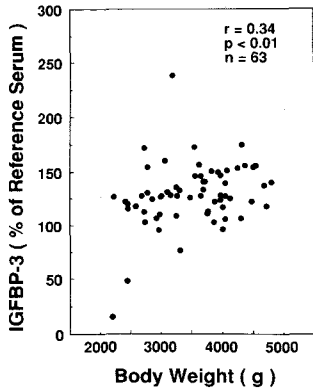


図6 糖尿病群における臍帯血中 IGFBP-3 と児体重の相関
糖尿病群において児体重と臍帯血中 IGFBP-3 の間に弱い正の相関を認めた。

血中 IGFBP-3 と児体重の間に弱いながら正の相関を認めた (図 6)。

なお, 血中 IGFBP-3 値は, 糖尿病群と健常群との間に有意差を認めなかった。

3) IGFBP-1, -4 と児体重

血中 IGFBP-1 と IGFBP-4 は共に児体重と明らかな相関は認めなかった。

2. 臍帯血中 IGF-I, -II と児体重

臍帯血中 IGF-I, IGF-II と児体重との関係を検討した(表 1)。健常対照群においては, 臍帯血中 IGF-I 値の平均 ± SD は 31 ± 12 ng/ml (range 22 ~ 57 ng/ml) であり, 児体重との間に正の相関を認

表 1 健常群, 糖尿病群における臍帯血中 IGF-I, -II, IRI, CPR と児体重との相関

	Normal			Diabetes		
	r _s	p	(n)	r _s	p	(n)
IGF-I	0.48	p < 0.01	(32)	0.61	p < 0.005	(61)
IGF-II	0.29	NS	(32)	0.49	p < 0.005	(61)
IRI	0.17	NS	(33)	0.29	p < 0.05	(60)
CPR	0.30	NS	(33)	0.41	p < 0.005	(61)

NS: not significant.

めた。一方, 糖尿病群でも臍帯血中 IGF-I 値の平均 ± SD は 41 ± 20 ng/ml (22 ~ 100 ng/ml) と同様に児体重との間に正の相関を認めた。更に健常群では IGF-II 値の平均 ± SD は 176 ± 26 ng/ml (115 ~ 228 ng/ml), 糖尿病群では 190 ± 40 ng/ml (135 ~ 426 ng/ml) であり, 糖尿病群においては IGF-II と児体重との間に正の相関を認めた。また, IGF-I と IGF-II の間には健常群, 糖尿病群とも正の相関を認めた。

すなわち, IGF-I は両群において児体重と正の相関を示し, IGF-II は糖尿病群においては, 児体重と正の相関を認めた。IGF-II を健常群, 糖尿病群それぞれ児体重別に検討したところ, HFD 群において糖尿病群が有意に高値を示した (179 ± 16 vs 198 ± 24 ng/ml, p < 0.05)。

3. 臍帯血中 IRI, CPR と児体重

臍帯血中 IRI, CPR と児体重との関係を検討した(表 1)。糖尿病群においては臍帯血中 CPR (平

均±SD 2.8±2.8ng/ml), IRI (平均±SD 23.2±31.5 μ U/ml)ともそれぞれ児体重とは弱い相関を認めたが, 健常群ではCPR (平均±SD 1.3±0.7 ng/ml), IRI (平均±SD 10.1±11 μ U/ml)とも児体重とは相関を認めなかった。

表2 糖尿病母体の血糖コントロールと児体重

症例	HbA _{1c} (%)	分娩週数 (週)	児体重 (g)	症例	HbA _{1c} (%)	分娩週数 (週)	児体重 (g)
1	9.5	39	2,440	33	—	38	2,410
2	9.5	40	2,590	34	10.2	40	2,360
3	12.0	37	3,245	35	8.9	40	3,000
4	9.7	38	2,455	36	8.7	39	3,298
5	9.5	39	2,735	37	8.5	38	2,726
6	10.0	38	3,005	38	9.7	39	3,700
7	8.5	38	2,965	39	8.3	40	3,560
8	7.8	40	2,985	40	8.5	39	2,455
9	7.1	38	2,720	41	9.4	38	2,690
10	9.7	37	3,305	42	9.9	40	3,476
11	9.2	37	3,180	43	9.3	37	2,226
12	8.2	38	2,930	44	8.5	38	3,250
13	8.3	40	3,270	45	8.5	38	3,550
14	—	38	3,098	46	9.0	38	2,780
15	8.9	38	3,065	47	9.4	38	3,154
16	—	37	2,785	48	9.8	39	3,700
17	9.6	38	3,655	49	9.0	39	3,978
18	9.2	37	3,625	50	7.9	40	4,560
19	9.0	37	4,056	51	8.6	38	4,815
20	9.6	39	3,760	52	9.0	38	3,868
21	7.9	40	3,884	53	10.2	38	4,320
22	11.0	40	4,695	54	9.6	38	3,655
23	7.9	37	4,378	55	9.8	37	4,020
24	10.2	38	4,058	56	—	38	3,980
25	11.8	38	4,255	57	8.9	41	4,135
26	8.4	38	3,775	58	9.6	38	3,824
27	8.9	38	4,732	59	9.9	38	4,090
28	10.0	37	4,520	60	8.1	38	3,935
29	8.4	38	4,330	61	10.2	38	4,488
30	9.2	38	3,978	62	11.5	37	3,718
31	8.6	38	4,014	63	—	40	4,055
32	8.5	38	2,200				

4. 母体血糖コントロールと児体重

糖尿病群の妊娠全期にわたっての平均 HbA_{1c} 値は, 7.1~12% (平均±SD 9.2±1.0) であり, 母体の血糖コントロールと児体重の間に相関を認めなかった(全例の HbA_{1c}, 分娩週数, 出生時体重を表2に示す)。

考 察

今回著者は糖尿病母体から出生した児の臍帯血中の IGF および IGF の作用を調節していると考えられている IGFBP について検討した。

糖尿病母体より出生した児の臍帯血中 IGF-I, IGF-II とも児体重と相関し, IGF-I, -II が巨大児出生に関与しているであろうという従来の報告^{4)~6)}を支持する成績を得た。IGF はインスリン様作用, 細胞の増殖促進作用, 細胞の分化誘導作用をもち, 血中では大部分, これに特異的な結合蛋白 (IGFBP) と結合して存在していることが明らかにされている⁸⁾⁹⁾。臍帯血中の IGFBP は糖尿病群, 健常群とも健常成人でのパターンと異なっていた。すなわち, 健常成人血中では IGFBP-3 が大部分を占めるが, 臍帯血中では成人に比べ IGFBP-2 の増加と IGFBP-3 の減少を認めた。臍帯血では全 IGF-I 値は成人に比し低値であるが, 全 IGF-I に占める遊離型 IGF-I の割合が多いと報告されている¹⁶⁾。この臍帯血中の質的量的な IGFBP の変化が IGF-I を IGFBP から遊離させ, 遊離型 IGF の増加に関与している可能性が考えられる。

本研究において糖尿病母体および健常母体より出生した児の体重の増加に伴い, 血中 IGFBP-2 は減少していることを明らかにした。この成績は胎児発育に IGFBP-2 が抑制的に作用することを示唆するものであると考えられた。最近, 癌組織において IGFBP-2 が増加しており, これが癌の局所での増殖の抑制に関与しているのではないかと注目されている¹⁷⁾。このように IGFBP-2 自身が IGF の作用を抑制し, 成長を抑制しているとも考えられる。

一方, 糖尿病母体より出生した児において, 体重の増加に伴い血中 IGFBP-3 は増加した。最近, IGFBP-3 は in vivo において細胞増殖に対し, 増殖抑制作用と増殖促進作用の二面性を有すること

が明らかにされている¹⁸⁾。増殖抑制作用はIGFBP-3が遊離型 IGF-I を中和することにより生じ、細胞増殖促進作用は細胞表面に結合した IGFBP-3 の関与が考えられている。In vivo において、我々の成績ならびに子宮内胎児発育遅延において IGFBP-3 の減少を認めた報告¹⁹⁾²⁰⁾を考え合わせると、IGFBP-3 は細胞増殖に促進的に作用し、更に胎児の発育に促進的に作用している可能性が示唆された。

また、低栄養状態でIGFBP-2は増加し²¹⁾、IGFBP-3が減少することが知られている²²⁾。児体重の増加に伴い、血中IGFBP2が減少し、血中IGFBP-3が増加したが、これらの変化が児の栄養状態を反映している可能性も否定できない。

IGFBP-1がIGF-Iの作用をmodulateして胎児の子宮内発育に影響を及ぼすことが報告されているが²³⁾、我々はIGFBP-1と児体重との関係を認めなかった。また、IGFBP-4についても児の成長との関係を認めることはできなかった。

従来より、糖尿病母体からの巨大児出生の成因に高インスリン血症が挙げられているが²⁴⁾、本研究においても臍帯血中CPR、IRIは児体重と正の相関を認めた。

以上の成績は、IGFBPの変動、特にIGFBP-2の変動がIGFのbioavailabilityを変化させ、児の発育に関与している可能性が考えられた。すなわち、糖尿病母体から出生する巨大児の成因にIGFBPが関与している可能性が示唆された。

結 語

糖尿病母体から出生する巨大児の成因としてのIGFの関与を明らかにするため、児の臍帯血中のIGFおよびIGFの作用を調節しているIGFBPについて検討した。

1. 健常群および糖尿病群において、臍帯血中IGFBPをWestern ligand blot法で検討し、4つのIGFBPs (IGFBP-1, -2, -3, -4)を認めた。

2. 健常成人血清と比較して、健常群、糖尿病群ともに臍帯血中IGFBP-2は増加し、IGFBP-3は減少していた。

3. 健常群、糖尿病群とも児体重の増加に伴い臍帯血中IGFBP-2は減少した。

4. 糖尿病群においては、児体重の増加に伴いIGFBP-3は増加する傾向を示した。

5. 健常群、糖尿病群とも児体重の増加に伴いIGF-Iの増加が認められ、更に、糖尿病群においては、児体重の増加に伴いIGF-IIの増加も認められた。

これらの成績はIGFBPの変動、特にIGFBP-2の変動がIGFのbioavailabilityを変化させ、児の発育に関与している可能性が考えられた。すなわち、糖尿病母体から出生する巨大児の成因にIGFBPが関与している可能性が示唆された。

稿を終えるにあたり、ご指導、ご校閲を賜りました大森安恵教授に深く感謝申し上げますと共に、ご指導頂きました肥塚直美助教授、高野加寿恵助教授、佐中真由実講師、清水明実博士、嶺井里美学士に心より感謝申し上げます。また正常臍帯血をご提供くださいました大森茂先生(聖母病院産婦人科)に心よりお礼申し上げます。

文 献

- 1) Pedersen J: The Pregnant Diabetic and Her Newborn. Problems and Management. p128, The Williams & Wilkins, Copenhagen (1967)
- 2) Szabo AJ, Szabo O: Placental free fatty-acid transfer and fetal adipose tissue development. Lancet ii: 498-499, 1974
- 3) Potter JM, Green A, Cullen DR et al: Amino acid profiles in early diabetic and non diabetic pregnancy. Diabetes Res Clin Pract 23: 123-126, 1986
- 4) Gluckmann PD, Johnson-Barrett JJ, Butler BW et al: Studies of insulin-like growth factor-I and -II by specific radioligand assays in umbilical cord blood. Clin Endocrinol (Oxf) 19: 405-413, 1983
- 5) Bennet A, Darrel M, Wison DM et al: Levels of insulin-like growth factors I and II in human cord blood. J Clin Endocrinol Metab 57: 609-612, 1983
- 6) Omori Y, Minei S, Shimizu M et al: Insulin-like growth factor-I and CPR levels in the umbilical cord blood of newborns from diabetic mothers. 東女医大誌 55: 971-978, 1985
- 7) Hall K, Hansson U, Lundin G et al: Serum levels of Somatomedins and Somatomedin binding protein in pregnant woman with type I or gestational diabetes and their infants. J Clin

- Endocrinol Metab 63 : 1300-1306, 1986
- 8) **Shimasaki S, Ling N**: Identification and molecular characterization of insulin-like growth factor binding proteins (IGFBP-1,-2,-3,-4,-5 and -6). *Prog Growth Factor Res* 3 : 243-246, 1991
 - 9) 肥塚直美 : II. IGF : 疾患における血中濃度と血中存在形態「成長ホルモンとその関連ペプチド」(鎮目和夫編)pp149-169, 朝倉書店, 東京(1992)
 - 10) 仁志田博司, 坂上正道, 倉智敬一ほか : 日本人の胎児発育曲線(出生時体格基準曲線). *日新生児会誌* 20 : 90-97, 1984
 - 11) **Hossenlopp P, Seurin D, Segovia-Quinson B et al**: 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 site. *Anal Biochem* 154 : 138-143, 1986
 - 12) **Daughaday WH, Mariz IK, Blethen SL et al**: Inhibition of access of bound Somatomedin to membrane receptor and immunobinding sites: A comparison of radio receptor and radio-immunoassay of Somatomedin in native and acid-ethanol-extracted serum. *J Clin Endocrinol Metab* 51 : 781-788, 1980
 - 13) **Miyakawa M, Hizuka N, Takano K et al**: Radioimmunoassay for insulin-like growth factor I using biosynthetic IGF-I. *Endocrinol Jpn* 33 : 795-801, 1986
 - 14) **Asakawa K, Hizuka N, Takano K et al**: Radioimmunoassay for insulin-like growth factor II. *Endocrinol Jpn* 37 : 607-614, 1990
 - 15) 明石弘子, 小田桐玲子, 野村武則ほか : C-ペプチドリアシオノギキットを用いた Free CPR 測定 (PEG 法)について. *医学と薬学* 19 : 1217-1222, 1988
 - 16) **Hizuka N, Takano K, Asakawa K et al**: Measurement of free form of insulin-like growth factor I in human plasma. *Growth Regulation* 1 : 51-55, 1991
 - 17) **Reeve JG, Schwander NM, Bleehen M**: IGFBP-2: An important regulator of IGF action in human tumors 2nd International Workshop on Insulin-Like Growth Factor Binding Proteins, p35, 1992
 - 18) **Mellow JSMD, Baxter RC**: Growth hormone-dependent insulin-like growth factor (IGF) binding protein both inhibits and potentiates IGF-stimulated DNA synthesis in human skin fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 156 : 199-204, 1988
 - 19) **Lassarre C, Hardouin S, Daffos F et al**: 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 intra-uterine growth retardation. *Pediatr Res* 29 : 219-225, 1991
 - 20) **Crystal RA, Giudice LC**: Insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) profiles in human fetal cord sera : ontogeny during gestation and differences in newborns with intra-uterine growth retardation (IUGR) and large for gestational age (LGA) newborns. *Modern Concepts of Insulin-Like Growth Factors* (Spencer EM ed) pp395-408, Elsevier, New York (1991)
 - 21) **Clemmons DR, Synder DK, Busby WH**: Variable controlling the secretion of insulin-like growth factor binding protein-2 in normal human subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 73 : 727-733, 1991
 - 22) **Blum WF, Ranke BR**: Plasma IGFBP-3 levels as clinical indicators. *Modern Concepts of Insulin-Like Growth Factors* (Spencer EM ed) p381, Elsevier, New York (1991)
 - 23) **Wang HS, Lim J, English J et al**: The concentration of insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-binding protein-1 in human umbilical cord serum at delivery : relation to fetal weight. *J Endocrinol* 129 : 459-464, 1990