

-43- Microfine silica (Quso G-32) による
標識 glucagon の精製法について

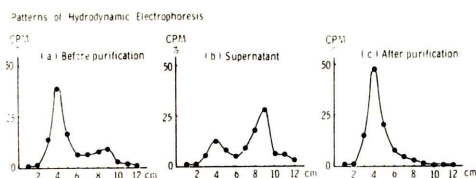
札医大 一内

○伊東義智, 小笠原徹也, 鬼原 彰

目的: 各種病態時における啞 glucagon の変動に関する知見は急速に積み重ねられているが, glucagon の RIA はキット化され一般に利用されていない。これには標識 glucagon 作製の問題がまだ十分に解決されていない点も大きいと考えられる。われわれも自家標識 glucagon を用いて RIA を実施しているが, damaged glucagon の比率が毎回必ずしも一定せず, その純度を高める必要性を認めている。そこでこの点に関して microfine silica を用いた再精製法を検討した結果, 極めて純度の高い標識 glucagon を得ることが出来た。

方法: Chloramin-T 法により標識した glucagon を Sephadex G-10 カラムで精製した分画に 0.2 M glycine buffer pH 8.8 を加え, 次いで Quso G-32 を添加, 十分に混和した後, 4°C, 2000×G で遠沈して上清はすてる。さらに同 buffer を加えて洗浄し, 上清はすてる。次いで ethanol-HCl を加えて標識 glucagon を抽出した。なお hydrodynamic flow electrophoresis は Whatmann 3MM 濾紙を用い, Veronal buffer pH 8.6 で約 1 時間泳動した。成績: Quso G-32 による再精製条件に関する検討では, まず添加時の温度は室温と氷冷でほぼ差異を認めず, 吸着時間も 1~30 分の間でその吸着率は変化しない。Quso G-32 の添加量では, その増加と共に吸着率は上昇した。蛋白濃度はその吸着率に最も影響し, 添加する血漿の最終濃度を増すにつれて吸着率は次第に減少し, 無血漿では 80% 以上を示した。Quso G-32 からの標識 glucagon の抽出には ethanol-HCl を用いたが, これにより 80~90% の intact glucagon が抽出された。図(a)は再精製前, (b)は Quso G-32 を加えて遠沈後の上清, (c)は再精製後の hydrodynamic flow の pattern を示したが, damaged glucagon は吸着されずに上清に残り, 再精製後には数%以内に限られた。

結論: 以上より damaged glucagon は Quso G-32 に吸着されることが極めて少なく, これによって標識 glucagon の純度を著しく高めることが可能で RIA 上十分に応用が出来た。



-44- 25-Hydroxycholecalciferol の測定
法及びその血中レベルについて

京大 放

○土光茂治, 森田陸司, 福永仁夫,
山本逸雄, 鳥塚莞爾

人にてけるカルシウム代謝は, ビタミン D₃ (V. D₃) を始め, PTH, カルチトニン, 成長ホルモン等, 種々のホルモンにより複雑な調節機構が営まれて居り, 近年急速にカルシウム代謝の解明がなされつつあるがまだ未知の分野を数多く残している。V. D₃ の最終活性代謝産物として知られている。1-25 Dihydroxycholecalciferol (1-25 (OH)₂ D₃) は先ず V. D₃ が肝で 25 位の水酸化がなされ, 次いで腎で 1 位の水酸化がなされると言われているが血中 1-25 (OH)₂ D₃ の一般的測定方法は未だ開発されて居らずその中間代謝産物である 25-Hydroxycholecalciferol (25 OH D₃) の血中レベルを知る事はカルシウム代謝の解析に 1 つの手掛りを与えるものと考えられる。1972 年 Belsey らが Competitive Protein Binding Assay (C. P. B. A) による血中 25-OH D₃ の測定法を公にして以来最近世界各地でその報告が散見される。今回我々は, C. P. B. A. により血中 25-OH D₃ の測定に成功したのでその測定方法を述べると共に, 正常者及びカルシウム代謝異常を来すと思われる各種疾患患者中の血中 25 OH D₃ を測定し若干の知見を得たので合わせて報告する。

測定方法

V. D₃ 及びカルシウム欠乏食で 4 週間以上飼育したラット血清を 2000 倍に稀釈し V. D₃ の Binding Protein (B. P.) として使用した。先ず被検血清 0.25 ml にエタノール 1.0 ml を加え, 血清中の 25 OH D₃ の抽出をし, その 0.1 ml をとり, これに [³H] 25 OH D₃ (26 · 27 位に ³H のラベルをした 25 OH D₃ で New England Nuclear 社に購入したもの) を 0.05 ml (約 2 ng) 混和し, B. P. 1.0 ml を加え incubate する。次いで Dextran-charcoal 溶液 (Dextran T70 0.05%, Norit A Charcoal 0.5%) にて Free の [³H] · 25 OH D₃ を吸着し, 上清 1.0 ml の Radio-activity を液体シンチレーションカウンターで測定し, Standard Curve から血中 25 OH D₃ 値を得た。

結果

B. P. の稀釈曲線は 2000 倍で約 30% の結合が得られた。標準曲線は Maximum Binding 271% (S. D. = 28%, n = 10) であり血中 25 OH D₃ 測定範囲は約 1.0 ~ 9.0 ng/ml であった。Dilution test は共に良好な結果を得た。亦 V. D₃, 1 · OH · D₃, 1 · 25 (OH)₂ D₃ との交叉反応を見たが生理的濃度範囲内では 25 OH D₃ との交叉反応は見られなかった。正常者血清中 25-OH D₃ 値は 8~18 ng/ml で 11.6 ± 2.5 (mean ± S. D., n = 21) であった。慢性腎不全では低値の傾向は見られなかった。