

《原 著》

Microfine silica (Quso G-32) による標識 glucagon の精製

伊東 義智* 小笠原徹也* 鬼原 彰* 大原 弘通*

はじめに

各種病態時の膵 glucagon の変動に関する知見は、本邦でもここ数年来、その radioimmunoassay (RIA) の普及と共に急速に積み重ねられている。しかし、glucagon の RIA 法はまだキット化され一般に利用される段階には到っていない。これは標識 glucagon の作製に関する問題と特異抗体の問題が十分に解決されていないためと考えられる。前者については chloramin T 標識のさいに生ずる免疫活性の低下¹⁾があり、後者についても膵特異抗体と消化管 glucagon (G.L.I.) との交叉性²⁾、本抗体と反応する膵外性 glucagon の存在³⁾、あるいは ¹²⁵I-glucagon と本抗体の反応に干渉する血中因子⁴⁾等の多くの問題点をかかえている。著者らも chloramin T による自家標識 glucagon を用いてその RIA を実施しているが⁵⁾、得られた標識 glucagon 中に含まれるいわゆる damaged glucagon の比率が毎回必ずしも一定せず、その精製度を高める必要性を認めている。そこでこの点に関して、Holohan ら⁶⁾の microfine silica (Quso G-32) を用いた標識 glucagon の精製法につき、2, 3 の検討を加えた。

実験方法

1. ¹²⁵I-標識 glucagon の作製

Hunter ら⁷⁾の chloramin T 法によった。すな

* 札幌医科大学内科学第1講座

受付：51年7月7日

最終稿受付：51年9月28日

別刷請求先：札幌市中央区南1条西16丁目(☎060)

札幌医科大学内科学第1講座

鬼原 彰

わち、結晶 glucagon (Eli Lilly 社) 5 μ g (10 μ l, 0.02 N HCl) に標識用 Na ¹²⁵I 1 mCi (Amersham 社, 50 μ l, 0.5 M phosphate buffer pH 7.5) を加え、直ちに chloramin T 20 μ g (20 μ l, 0.1 M phosphate buffer pH 7.5) を添加して反応開始、15~20秒後 sodium metabisulfite 60 μ g (50 μ l, 0.1 M phosphate buffer pH 7.5) で反応をとめ、次いで1%ヒト albumin 100 μ l を加えて標識を終了した。この反応液を sephadex G-10 (1 \times 25 cm) column で、0.2 M glycine buffer pH 8.8 を用いて eluate し、1 ml ずつ分画、最初の放射能ピークを用いた。比放射能は 80~160 mCi/mg を示した。

2. Microfine silica (Dainabot 社) による標識 glucagon の再精製

sephadex G-10 で精製した ¹²⁵I-glucagon 分画 1 ml に 0.2 M glycine buffer pH 8.8 を 3 ml 加え、次いで Quso G-32 20 mg を添加、十分に混和した後、4 $^{\circ}$ C, 2,000 \times G で 15 分間遠沈して上清はすてる。さらに同 buffer 2 ml を加えて洗浄し、同様に上清をすてる。次いで ethanol-0.5 N HCl (3:1) 2 ml を加えて ¹²⁵I-glucagon を抽出した。

3. hydrodynamic flow electrophoresis

Berson ら⁸⁾に従い、Whatman 3 MM 濾紙を用い、Veronal buffer pH 8.6 ($\mu=0.075$) で約1時間泳動した。

実験成績

1. chloramin T 添加量と damaged glucagon (Fig. 1)

chloramin T をそれぞれ 10, 20 および 40 μ g 添加し、20 秒間反応させた。sephadex G-10 column

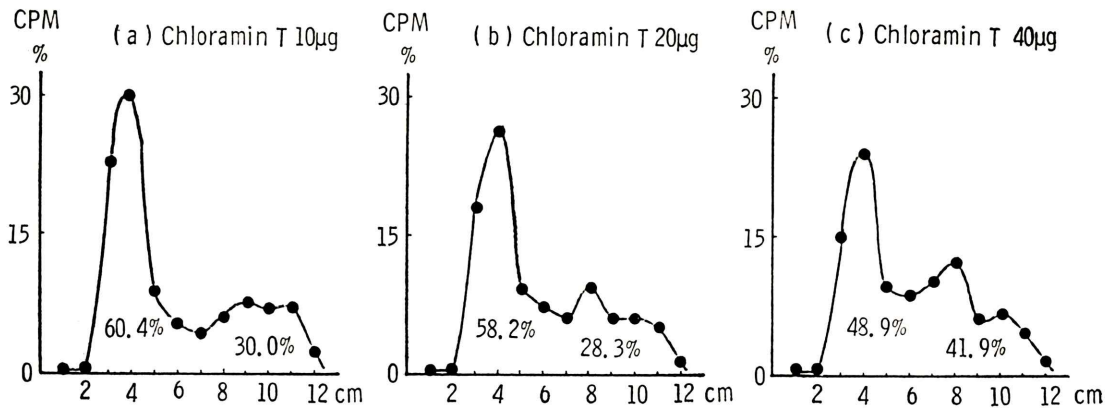


Fig. 1 Patterns of hydrodynamic electrophoresis: effects of chloramin T concentration

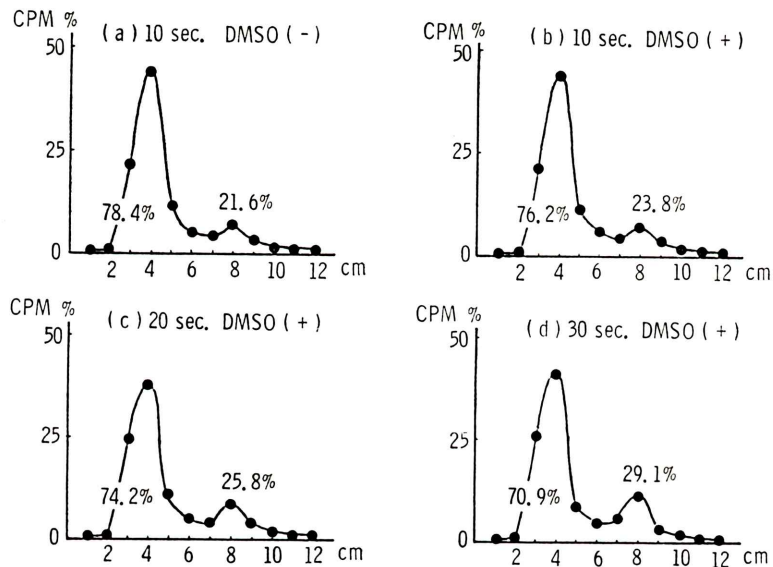


Fig. 2 Patterns of hydrodynamic electrophoresis: effects of reacting time with chloramin T and addition of dimethyl sulfoxide (DMSO)

で精製後, hydrodynamic flow でその damaged glucagon の含有率をみると, chloramin T 10 μ g と 20 μ g では 30.0% および 28.3% と差異を認めないが, 40 μ g では 41.9% に増加した。

2. chloramin T 反応時間および dimethyl sulfoxide (DMSO) 添加と damaged glucagon (Fig. 2, 3)

あらかじめ DMSO 10 μ l を加えた結晶 glucagon

を用い, chloramin T 添加量を一定 (20 μ g) とし, 反応時間を 10, 20 および 30 秒とした。この場合 damaged glucagon の含有率はそれぞれ 23.8, 25.8 および 29.1% としだいに増加した。また DMSO 無添加で 10 秒間反応させた場合には 21.6% と DMSO 添加 10 秒との間に差異を認めなかった。

Fig. 3 にこれら 4 種類の 125 I-glucagon を用いて作製した標準曲線を示したが, DMSO 添加で必

ずしも良好な標準曲線は得られなかった。なお臍特異抗体としては 30 K (Unger) を用いた。

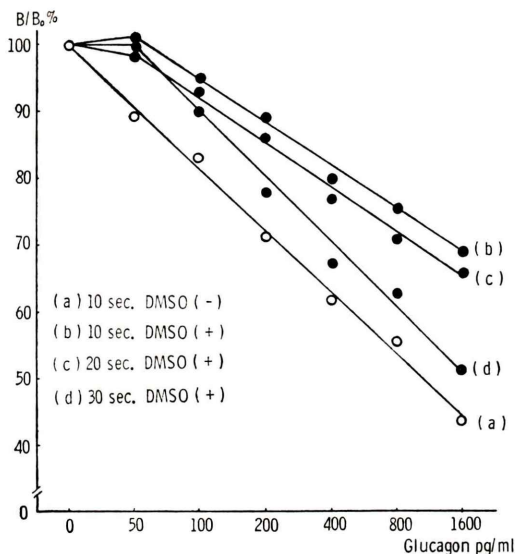


Fig. 3 Standard curve for glucagon immunoassay

3. Quso G-32 による再精製 (Fig. 4, 5)

前述のごとく, sephadex G-10 で精製した場合には, かなりの比率で damaged glucagon を含有しているので Quso G-32 による再精製を試みた。

Fig. 4 (a) は再精製前, (b) は Quso G-32 を加えて遠沈後の上清, (c) は ethanol-HCl で抽出し

た ^{125}I -glucagon の hydrodynamic flow の pattern を示したものであるが, damaged glucagon は Quso G-32 に吸着されずに上清に残り, 再精製後の標識 glucagon 中には数%以内に限られた。

再精製前後の ^{125}I -glucagon を用いて作製した標準曲線を Fig. 5 に示したが, 再精製操作により精製前と比較して高感度の方に平行移動している。なおこの実験に用いた ^{125}I -glucagon の比放射能は 83.3 mCi/mg である。

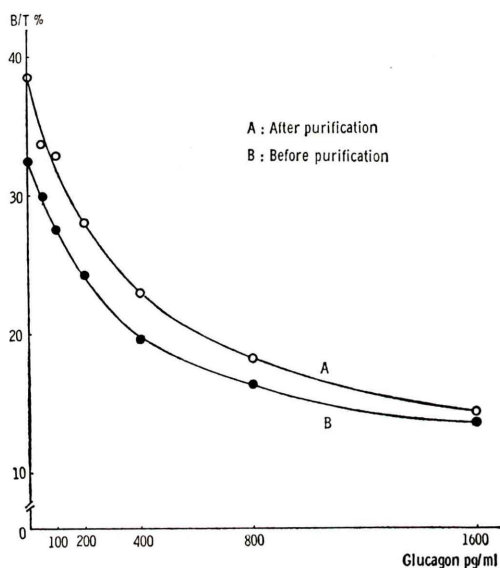


Fig. 5 Standard curve for glucagon immunoassay before and after purification by Quso G-32

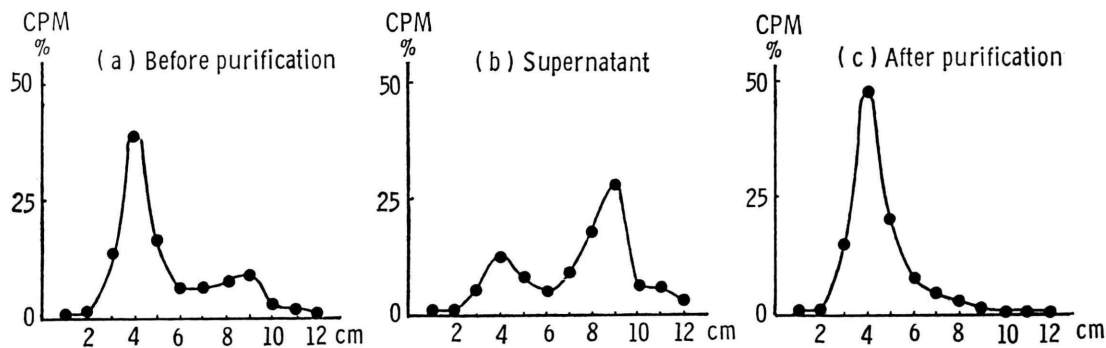


Fig. 4 Patterns of hydrodynamic electrophoresis: before and after purification by Quso G-32

4. Quso G-32 による再精製条件に関する 2, 3 の検討

まず Quso G-32 添加時の温度条件をみると、室温と氷冷ではほぼ変化せず、吸着時間に関しても 1~30 分の間でその吸着率に差異を認めなかった。Quso G-32 の添加量については、5, 10 および 20 mg でみると、添加量の増加と共に吸着率は上昇した。

次いで Quso G-32 に対する吸着率には蛋白濃度が強い影響を与えることから、添加する plasma の最終濃度を増すにつれて吸着率はしだいに減少した。plasma を含まない場合の吸着率は 80% 以上を示した。

Quso G-32 からの ^{125}I -glucagon の抽出には ethanol-HCl を用いたが、これにより 80~90% の ^{125}I -glucagon が抽出され、このさい HCl 濃度が 0.05~1.0 N の範囲内では抽出率は変化せず、ethanol と HCl の容量比を、3:1, 2:1, 1:1 および 1:2 と変化させても差異を認めなかった。以上の成績から、再精製は低温下で行い、Quso G-32 の添加量は 20 mg とし、その抽出には ethanol-0.5 N HCl (3:1) を用いた。この方法での最終回収率は約 50% であった。

考 按

chloramin T 添加量とその反応時間は、比放射能と damaged hormone の比率に強い影響を及ぼす。今回の成績でも、chloramin T の添加量と反応時間の増加に比例して damaged glucagon の占める割合が増加している。この点に関して、Jørgensen ら⁹⁾、桜井ら¹⁰⁾も標識 glucagon の作製には chloramin T 添加量と反応時間をそれぞれ 20 μg および 10~15 秒として行っている。しかしそれらを一定としても毎回の標識における damaged glucagon の比率は必ずしも同一ではなく、この点からも標識 glucagon の精製法の改善の必要性が認められた。

そこで Holohan ら⁹⁾の microfine silica を用いた精製法を応用し、2, 3 の検討を加えた結果、再精製後の damaged glucagon の割合は数% 以内と

なり、RIA 上十分使用に耐え得ることが明らかとなった。

一般的には、hormone のガラス容器への吸着防止と damaged hormone が血漿蛋白に吸着される性質を利用して、標識 hormone の精製には血漿添加が行われるが¹¹⁻¹³⁾、Rosselin ら¹³⁾も指摘しているように、Quso G-32 への hormone の吸着は蛋白と競合することから、damaged hormone の吸着除去を目的として血漿等を加えると Quso G-32 への標識 hormone の吸着率が極端に減少する。事実今回の成績でも、血漿添加の濃度に応じて、標識 glucagon の Quso G-32 への吸着が阻害された。そのため血漿を用いると再精製後の最終回収率は 10% 前後に低下した。しかし Quso G-32 への吸着の態度は hormone の種類によって異なると言われていることから¹⁴⁾、蛋白を含まない 0.2 M glycine buffer (pH 8.8) のみを使用したところ、血漿を加えた場合に比べてその hydrodynamic flow の pattern は変らない結果を得た。しかもこの場合の最終回収率は約 50% を示し、この点からも血漿無添加の方が有利であった。

また再精製操作中に免疫活性の変化も予想されたので、再精製前後の ^{125}I -glucagon による標準曲線を比較したが、再精製後の標準曲線はむしろ、B/T 比の増加がみられた。

以上の成績より Quso G-32 を用いた ^{125}I -glucagon の再精製は十分に応用価値があると考えられる。

ところで最近まではいわゆる damaged hormone の含有率が標識 hormone の精製度ないし良否を示す指標として重要視される傾向が強かったが、damaged glucagon の比率と免疫活性とは必ずしも並行しないとも言われ¹⁾、われわれもそのような場合を経験している。この点に対し Stagg ら¹⁵⁾は、gastrin 標識のさいに、chloramin T による免疫活性の低下を dimethyl sulfoxide (DMSO) を添加することにより防ぐことが出来たとし、glucagon 標識についても、島ら¹⁾は同様の成績を発表している。これは chloramin T による C 末端部分の methionine 酸化を防ぐと言われることから、わ

れわれもその点を再吟味したところでは、確かに DMSO 添加の有無と damaged glucagon の比率とは関連性を認めなかったが、免疫活性の点でも、DMSO 添加による利点は認め得なかった。

結 論

microfine silica (Quso G-32) を用いて標識 glucagon の再精製を検討した結果、Quso G-32 は標識 glucagon をよく吸着する反面、damaged glucagon を吸着することが極めて少く、これによって標識 glucagon の純度を著しく高めることが可能となり、標識 glucagon の精製法として十分応用価値があると考えられた。

本論文の要旨は第16回日本核医学会総会（昭和51年11月）で発表した。

文 献

- 1) Shima K, Sawazaki N, Tanaka R, et al: Effect of an exposure to chloramin-T on the immunoreactivity of glucagon. *Endocrinology* **96**: 1254-1260, 1975.
- 2) Matsuyama T and Foà PP: Plasma glucose, insulin, pancreatic and enteroglucagon levels in normal and depancreatized dogs. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **147**: 97-102, 1974
- 3) Munoz L, Blázquez E and Unger R: Gastric α -cell function in normal and diabetic dogs. *Diabetes* **24**, suppl **2**: 411, 1975
- 4) Weir GC, Turner RC and Martin DB: Glucagon radioimmunoassay using antiserum 30K: interference by plasma. *Horm. Metab. Res.* **5**: 241-244, 1973
- 5) 伊東義智, 菊地 晃, 稲辺靖仁郎他: Polyethylene-glycol を用いた peptide hormone の radioimmunoassay に関する研究. 第2報—Glucagon について臨床病理. **23**: 811-814, 1975
- 6) Holohan KN, Murphy RF, Buchanan KD, et al: Enzymic iodination of polypeptide hormones for radioimmunoassay. *Clin. Chim. Acta* **45**: 153-157, 1973
- 7) Hunter WM and Greenwood FC: Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity. *Nature* **194**: 495-496, 1962
- 8) Berson SA, Yalow RS, Bauman A, et al: Insulin- I^{131} metabolism in human subjects: demonstration of insulin binding globulin in the circulation of insulin treated subjects. *J. Clin. Invest* **35**: 170-190, 1956
- 9) Jørgensen KH and Larsen UD: Purification of I^{125} -glucagon by anion exchange chromatography. *Horm. Metab. Res.* **4**: 223-224, 1972
- 10) 桜井英雄, 倉八博之, 井村裕夫: 藤グルカゴンのラジオイムノアッセイによる測定. *Diabetes Journal* **1**: 172-174, 1973
- 11) Yalow RS and Berson SA: Purification of I^{131} -parathyroid hormone with microfine granules of precipitated silica. *Nature* **212**, 357-358, 1966
- 12) Yalow RS and Berson SA: Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J. Clin. Invest* **39**: 1157-1175, 1960
- 13) Rosselin G, Assan R, Yalow RS, et al: Separation of antibody-bound and unbound peptide hormones labelled with iodine-131 by talcum powder and precipitated silica. *Nature* **212**: 355-357, 1966
- 14) Boden G and Chey WY: Preparation and specificity of antiserum to synthetic secretin and its use in a radioimmunoassay. *Endocrinology* **92**: 1617-1624, 1973
- 15) Stagg BH Temperley JM and Rochman H: Iodination and the biological activity of gastrin. *Nature* **228**: 58-59, 1970

Summary

Purification of ^{125}I -Glucagon by Microfine Silica (Quso G-32)

Yoshinori ITO, Tetsuya OGASAWARA, Akira KIHARA and Hiromichi OHARA

First Department of Internal Medicine, Sapporo Medical College

The ^{125}I -glucagon labelled with chloramin T method was found to contain the damaged hormone which bound to plasma protein non specifically and migrated with the protein by the hydrodynamic flow electrophoresis.

A portion of ^{125}I -glucagon purified on sephadex G-10 column was mixed with 20 mg of Quso G-32 in 3 ml of 0.2 M glycine buffer solution (pH 8.8).

The mixture was centrifuged and the precipitate was washed with 2 ml of the same buffer solution and suspended in 2 ml of ethanol-0.5 N HCl (3:1, v/v). ^{125}I -glucagon was eluated in the solution and confirmed to be chromatoelectrophoretically pure.

The purified ^{125}I -glucagon reacted with a glucagon antibody (30K) satisfactorily.