

## 《原 著》

## Glucagon の Radioimmunoassay における基礎的検討

村 田 和 平\*

**要旨：**グルカゴンの免疫学的測定法において基礎的検討を行い、新しい測定系を確立した。

結合型、遊離型グルカゴンの分離において PEG 法は talc 法、2 抗体法、dextran coated charcoal 法の 3 方法に比し操作が容易であり、しかも精度が優れた。結合率は PEG の最終濃度が 10.0%~12.5% (w/w) で最高であった。

まず検体と抗体を 4°C で 48 時間前に温浴させ、その後標識グルカゴンを添加しさらに 70 時間行う 2 段法の導入により標準曲線の低濃度域における勾配が高まり、感度および精度が向上した。

以上の成績から確立した 2 段法および PEG 法を用いた測定系の最小検出感度は 16 pg/ml、再現性は Intraassay の変動係数 1.9%~5.4%、Interassay では 6.3%~11.3%、平均回収率は 96.7%、稀釈曲線では 2~8 倍稀釈で直線性を示した。この測定系は感度、信頼性が高く、臨床上の診断に有用と考えられた。

## I. はじめに

グルカゴンの測定は最近膵グルカゴンに特異的に結合する抗体 (Unger らの 30K) が容易に入手できるようになり、各機関で種々の方法で測定されるようになった<sup>1)~4)</sup>。標識グルカゴンの比放射能を高めると抗原性の変化をきたすため放射活性は低く、またその測定系における血漿グルカゴン値の基礎値は低く、精度 (precision) は充分でないことが多い。このため一般に検体として 0.2 ml の血漿量が用いられている。著者は preincubation を行った後、標識グルカゴンを加える 2 段法により満足する精度および感度 (sensitivity) を得、その結果検体量は 0.1 ml で充分測定可能となった。

結合型 (B: bound) と遊離型 (F: free) グルカゴン分離法に関して種々の方法がなされている。Unger ら<sup>5)</sup>は dextran coated charcoal (DCC) 法を行っているが、DCC 法は厳密な温度および時

間管理を必要とする欠点がある。最近では、各種のホルモンの radioimmunoassay (RIA) における B・F 分離法の中でこの欠点の少ないと思われる polyethylene glycol (PEG) 法が応用されつつある<sup>2),3)</sup>。その他、2 抗体法、talc 法を含め 4 方法の B・F 分離法を比較し、さらに PEG 法については詳細に検討した。

これら種々の検討成績より温浴を 2 段法で行い、B・F 分離に PEG を用いる RIA の測定系を確立したので報告する。

## II. 試薬および方法

## A. 試 薬

1) 0.2 M glycine buffer (GB): 牛血清アルブミン (BSA: bovine serum albumin, Armor fraction V) を 0.5%, 正常羊血清 (NSS: normal sheep serum, Miles Laboratories) を 1% の濃度になるように加え、1N NaOH で pH の補正を行い 0.2 M glycine buffer, pH 8.7 を作製した。

2) 0.04 M phosphate buffered saline (PBS): 0.5 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> と 0.5 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> とで調整した pH 7.4 の液を用い、0.85% NaCl, 0.01% sodium merthiolate, 0.5% BSA, 1% NSS を含む 0.04 M PBS を作製した。

\* 三重大学医学部産科婦人科学教室  
(主任 杉山陽一教授)

受付: 53 年 1 月 6 日

最終稿受付: 53 年 3 月 9 日

別刷請求先: 三重県津市江戸橋 2 丁目 174 番地 (☎514)

三重大学医学部産科婦人科学教室

村 田 和 平

3) PEG: Polyethylene glycol # 6,000 (半井化学) を用い蒸留水で 25% (w/w) とした。

4) Aprotinine: 生食に溶解した Trasylol または Antagosan (10,000u/ml) を使用した。

5) EDTA-Aprotinine 液: Na<sub>2</sub>-EDTA を Aprotinine で溶解し 12 mg/ml の濃度にした。

6) グルカゴン抗体: Unger 研究所の 30 K を使用, PBS で 100 倍に希釈し小分して保存, 測定時さらに PBS で 20 倍に希釈した。

7) 標識グルカゴン: Behring werke AG 製 (比放射能 92~168  $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ ) を GB で 125 pg/ml の濃度に溶解し, 入荷後 10 日以内に使用した。

8) 標準グルカゴン: Lilly 社の豚結晶グルカゴンを用い GB で 4 ng/ml の濃度に溶解し小分して  $-20^{\circ}\text{C}$  で保存した。測定時には GB で倍数希釈した。

9) Pool serum: 生化学検査用血清 1 ml につき EDTA-Aprotinine 液 0.1 ml 加えた。この serum の  $\gamma$ -globulin 濃度は 11.2 mg/ml であった。

## B. 検 体

血液 1 ml あたり EDTA-Aprotinine 液を 0.1 ml 入れた氷冷試験管に採血し, 混和後再び氷水中に保管し 3 時間以内に  $4^{\circ}\text{C}$  で血漿分離を行った。血漿は測定まで  $-20^{\circ}\text{C}$  にてガラス試験管で保存した。

## C. 測定方法

採血後より放射活性の測定まですべての操作は氷水中もしくは  $4^{\circ}\text{C}$  で行い, Fig. 1 のごとく標準グルカゴンまたは血漿 0.1 ml に Aprotinine 0.05 ml, 抗血清 (1:2,000) 0.05 ml, GB 0.2 ml を加え, まず 48 時間 preincubation する。なお各群の検体については非特異的結合を求めるため, 抗体を含まない PBS 含有の blank の試験管を作る。Preincubation 後, 標識グルカゴンを 0.1 ml 加え, さらに 70 時間温浴を行う。B・F 分離では標準物質には pool serum を, 血漿試料には GB をそれぞれ 0.1 ml 加え, 各試験管の血清量を等しくする。次に 25% PEG 0.6 ml を添加して vortex mixer で攪拌する。その後 20 時間放置して冷却遠心を 2,000 g で 20 時間行い上清を吸引除去した。1 試験管の総

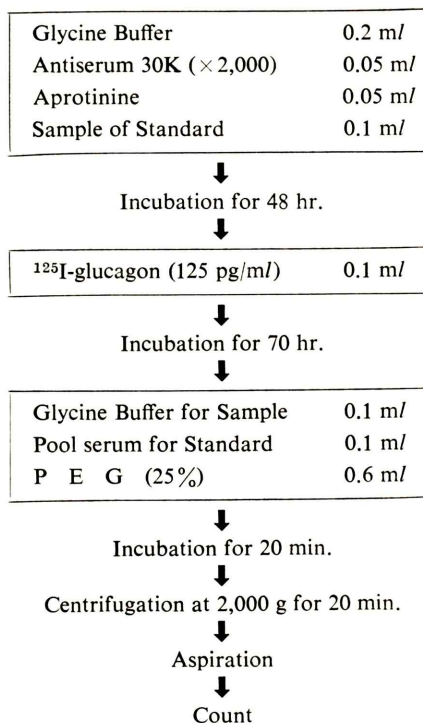


Fig. 1 The assay procedure of glucagon

放射能 (T) は 1,150~2,100 pCi で 8 分間計測した。なお試験管は栄研チューブを用いた。

## D. 検討項目

検討項目 1) より 6) までは上記測定系の組成で, preincubation をなくした。なお温浴は 96 時間行った。

1) 抗体の希釈率: 抗体の結合能をみるため最終希釈率 (final dilution)  $2.5 \times 10^3 \sim 1.28 \times 10^6$  に希釈した抗体に標識グルカゴン 12.5 pg を加えた。以下に述べる標準曲線の式より真の結合率を測定した。

2) 温浴時間: 標識グルカゴン (12.5 pg) と抗体との結合を 4 時間後より 96 時間後まで調べた。抗体は 2,500 倍に希釈し, その 0.05 ml (最終希釈率 25,000) 倍を用いた。

3) 結合型および遊離型グルカゴンの分離における 4 方法の比較: 2 抗体法を除いた 3 方法は B・F 分離時に各試験管の血清量を等しくした。PEG 法は上記測定系の方法によった。Talc 法は桜井<sup>6)</sup>



ら<sup>6)</sup>の方法に準じ10%の人血清を含む 0.05 M barbital buffer, イオン強度 0.05, pH 8.6 を 2 ml ずつ入れ, 次に talc 1 錠 (50 mg, ダイナボット社) を投入, 10分間放置した後, 2,000 g で 20分間冷却遠心を行い, 沈渣の放射能より遊離型を計測した. 結合型は総放射能との差より求めた. 2 抗体法は第一アイソトープ研究所製第 2 抗体を用い, 正常家兎血清および第 2 抗体を PBS でそれぞれ 50 倍, 10 倍に稀釈し 0.1 ml ずつ加え, さらに 24 時間放置した. 冷却遠心は 2,000 g で 20 分間行い結合型を計測した. DCC 法は 0.5% charcoal (Norti A) および 0.25% dextran 70 (Xeran) を含む GB を調製し, 各試験管に 0.6 ml 加え攪拌後 45 分間放置した. その後 2,000 g で 20 分間冷却遠心を行ない, talc 法と同様にして結合型を求めた.

4) PEG 濃度: 10% (w/w) から 35% の PEG を assay volume と等量の 0.6 ml 添加し結合型の変動を求めた.

5) B・F 分離における  $\gamma$ -globulin 添加量: まず血清を 0.19  $\mu$ l/tube-200  $\mu$ l/tube 添加した. なお 100  $\mu$ l/tube 未満の血清添加群では血清を GB で稀釈し, それを 100  $\mu$ l 加えた. 次に, bovine  $\gamma$ -globulin (Cohn fraction II, Sigma) を GB で 0.02 mg/ml ~ 160 mg/ml の濃度に溶解し, 0.1 ml 加えて検討した.

6) PEG 添加攪拌後の遠心分離までの放置時間: 氷水中に 0~60 分放置した場合の結合型の変動を調べた.

7) Preincubation: まず抗体と標準物質もしくは血漿試料を 4 時間から 72 時間前より反応させ, その後標識グルカゴンを添加し温浴を 70 時間行い, 標準曲線, 血漿グルカゴン値について調べた.

8) 標準曲線の精度 (precision), 感度 (sensitivity), 勾配 (slope): Triplicate で 9 回測定した結果より求めた. 標準曲線の作製は, 総放射活性 (T), 各濃度の結合型放射活性 (B), 緩衝液試料における blank の放射活性 (N) を求め,  $(B-N)/(T-N) \times 100$  を片対数グラフに plot した. Interassay の精度は  $S.D. = \sqrt{[1/(k-1) \times (\sum \bar{x}_i - \bar{x})^2]}$  より求めた. ここで  $k$ =assay の回数,  $\bar{x}_i$ =assay 毎の各濃度で

の平均真結合率,  $\bar{x}$ =総測定での平均真結合率を示す. Intraassay の精度は

$$S.D. = \sqrt{[1/(n-k) \times \sum \sum (\bar{x}_{ij} - \bar{x}_i)^2]}$$

より求めた. ここで  $n$ =各濃度での総測定本数,  $k$ =assay の回数,  $x_{ij}$ =各試験管の真結合率,  $x_i$ =assay 毎の平均真結合率を示す<sup>7),8)</sup>. 感度は隣あった各濃度のグルカゴン添加間において 95% の信頼度で有意に区別できる結合率を  $t \sqrt{[(S_1^2 + S_2^2)/2]}$  より求め, 標準曲線の低濃度側より読みグルカゴン量で表わした<sup>9),10)</sup>. ここで  $t=1.96$ ,  $S_1$ ,  $S_2$  は各濃度での精度を示す. 勾配は assay 毎の隣あったグルカゴン濃度間における真結合率の差より求め, この平均値および標準偏差 (S.D.) を示した.

9) 血漿試料の精度, 稀釈曲線, 回収率: 血漿中のグルカゴン値は血漿試料の結合型放射活性 (Bp) および blank の放射活性 (Np) より真の結合率  $(Bp - Np)/(T - N) \times 100$  を求め, 標準曲線より読みとった. Intraassay の精度は安静時の 1 症例, 動作時の 2 症例, アルギニン負荷時の 1 症例について 10~12 本測定した. Interassay の精度は安静時, 動作時, アルギニン負荷時の 3 症例について duplicate で 6~9 回の測定を行った. 両精度とも変動係数 (C.V.) で表わした. 稀釈曲線は安静時とアルギニン負荷時血漿を GB で 2, 4, 8 倍に稀釈して求めた. 回収率については GB で溶解した標準グルカゴン 31.3 pg/ml ~ 500 pg/ml を 0.1 ml 添加した. なお非添加群と組成を等しくするため回収率用試験管には GB は 0.1 ml とした.

### III. 成 績

1) 抗体との結合能: 抗体を倍数稀釈して標識グルカゴンとの結合を調べたのが Fig. 2 である. 最終稀釈率  $2.5 \times 10^3$  で結合率  $[B/T \times 100]$  は 74.6%, 真の結合率  $[(B-N)/(T-N) \times 100]$  は 69.6% であった. 真の結合率が 50% となる稀釈率は約  $2.2 \times 10^4$  であり, 測定系では稀釈率  $2 \times 10^4$  を用いた.

2) 温浴時間: Fig. 3 は温浴時間を 0, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96 時間と種々に変化させて, B・F 分離を行った際の結合率の変動を示す. 緩衝液, 血

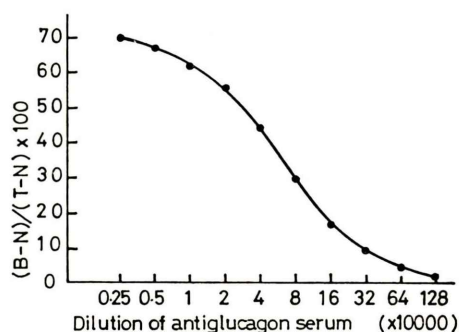


Fig. 2 Percent  $^{125}\text{I}$ -glucagon precipitated as a function of antilucagon dilution.

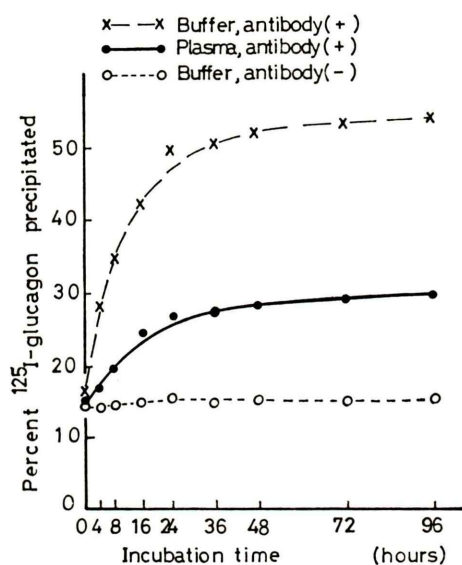


Fig. 3 Percent  $^{125}\text{I}$ -glucagon precipitated as a function of incubation time

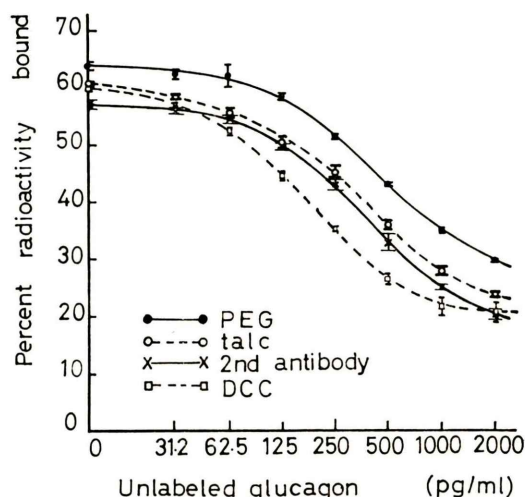


Fig. 4 A comparison of the standard curves obtained from various method of B. F. separation. Each point represents the mean  $\pm$  S.D. of triplicate determination.

漿試料とも4時間ですでに上昇し、48時間以後はほぼ plateau に達す。Blank 値は15% 前後で96時間までは変動はなかった。

3) 4方法のB・F分離: Fig. 4のごとく、グルカゴン0濃度での結合率はPEG法が64%で4方法のうちで一番高く、2抗体法は57%と低かった。0濃度から2,000 pg/ml 濃度までの結合率の低下率はPEG法34.0%, talc法36.9%, 2抗体法37.1%, DCC法38.5%であった。DCC法が一番下降が大きく、60 pg/ml の濃度から高い勾配がみられる。

Table 1 Specific and nonspecific percent bound of buffer and plasma samples

Sample	Antiserum	Bound-free separation method			
		PEG	Talc	2-antibody	DCC
Buffer	(+)	64.0 $\pm$ 0.69	60.8 $\pm$ 0.25	57.3 $\pm$ 0.97	59.8 $\pm$ 0.20
	(-)	24.5 $\pm$ 0.75	17.0 $\pm$ 0.21	15.4 $\pm$ 0.60	14.5 $\pm$ 0.21
Plasma K	(+)	51.5 $\pm$ 0.38	49.1 $\pm$ 1.99	43.5 $\pm$ 1.01	50.2 $\pm$ 0.75
	(-)	20.6 $\pm$ 0.44	18.4 $\pm$ 1.86	9.5 $\pm$ 0.70	16.7 $\pm$ 1.31
Plasma L	(+)	52.3 $\pm$ 1.04	50.4 $\pm$ 0.64	45.9 $\pm$ 1.31	52.4 $\pm$ 0.44
	(-)	18.9 $\pm$ 1.04	17.2 $\pm$ 0.80	9.8 $\pm$ 0.40	16.0 $\pm$ 0.68
Plasma M	(+)	56.1 $\pm$ 0.81	54.9 $\pm$ 1.15	50.6 $\pm$ 0.70	54.5 $\pm$ 2.30
	(-)	21.0 $\pm$ 0.36	17.2 $\pm$ 0.81	10.4 $\pm$ 0.51	16.3 $\pm$ 1.21

Each point represents the mean  $\pm$  S. D. of triplicate



**Table 2** Glucagon value of plasma obtained by four bound-free separation method

Sample	B/F separation method			
	PEG	Talc	2-AB	DCC
Plasma K	165	170	135	98
Plasma L	130	140	103	76
Plasma M	90	70	50	62

Each value was tested in triplicate and represents pg/ml.

**Table 3** Variance of each bound-free separation method

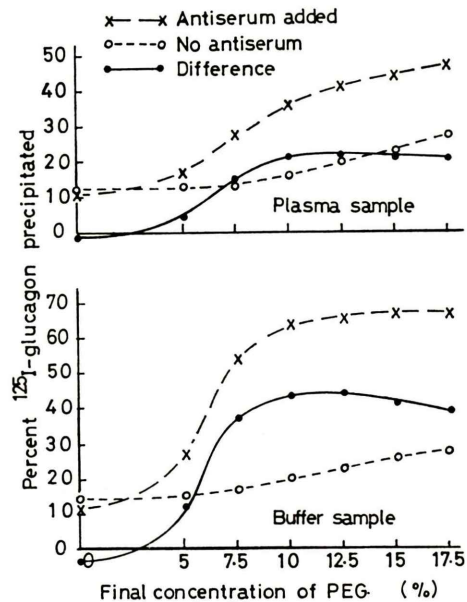
Sample	B/F separation method			
	PEG	Talc	2-AB	DCC
Standard (f=20)	0.934	1.028	0.815	0.719
Plasma (f=12)	0.548	1.736*	0.432	2.072**

Significantly difference from PEG at the level of

\* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$

3種類の血漿をそれぞれの4方法により測定した結果をTable 1に示す。結合率は3種類の血漿ともPEG法が高くDCC法が低かった。これはグルカゴン0濃度の結合率と平行関係にある。それぞれのB・F分離法で得たグルカゴン値をTable 2に示す。PEG, talc, 2抗体法では比較的高値を示すが、DCC法では低値であった。4方法でのtriplicate内のばらつきを比較するため級内変動 $1/(n-k) \times \sum \sum (x_{ij} - \bar{x}_i)^2$ を求めた<sup>7)</sup>。ここで $n$ =総測定本数、 $k$ =triplicateでの測定組数、 $x_{ij}$ =各試験管の結合率、 $\bar{x}_i$ =triplicateの平均結合率を示す。Table 3のごとく標準物質ではいずれの方法においても有意差はなかったが、血漿試料では2抗体法、PEG法が小さく、talc法、DCC法が大きかった。

4) PEG濃度：B・F分離におけるPEGの最適濃度を求めるため、PEGの最終濃度0%, 5.0%, 7.5%, 10.0%, 12.5%, 15.0%, 17.5%について調べたのがFig. 5である。PEGが存在しなくとも約10%~14%の放射活性が沈渣に認められ緩衝液、血漿試料とも抗体の非添加群が添加群より高い。これはグルカゴンの試験管壁への吸着によると思われる。緩衝液試料での抗体添加群の放射活性は、

**Fig. 5** Percent  $^{125}\text{I}$ -glucagon precipitated as a function of final concentration of PEG.

PEGの最終濃度が5%より増加し10%以上でplateauに達する。また血漿試料では5%から濃度とともに徐々に増加した。抗体非添加群では緩衝液、血漿試料ともPEGの濃度とともに徐々に上昇した。抗体添加群と非添加群の差により示される真の結合率は、緩衝液試料では10%~12.5%が最高であり、血漿試料では10%以上でplateauであった。

5)  $\gamma$ -globulin添加量：PEG法では抗体である $\gamma$ -globulinと結合した標識グルカゴンを沈澱させるため、 $\gamma$ -globulin濃度が問題になる。緩衝液試料においてpool serumを0.09  $\mu\text{l}/\text{tube}$ ~200  $\mu\text{l}/\text{tube}$ 添加したときの結合率がFig. 6である。結合率は12.5  $\mu\text{l}/\text{tube}$ で急激に上昇する。抗体非添加群では50  $\mu\text{l}/\text{tube}$ 以上でわずかに上昇した。Fig. 7は緩衝液試料に0.02 mg/ml~160 mg/mlの $\gamma$ -globulinを0.1 ml添加した場合である。Pool serumの場合と同様の変化を示し、結合率は抗体添加群では1.25 mg/ml、非添加群では40 mg/mlより上昇した。Fig. 8は血漿試料に $\gamma$ -globulinを添加した場合であるが、 $\gamma$ -globulinの影響は少ない。

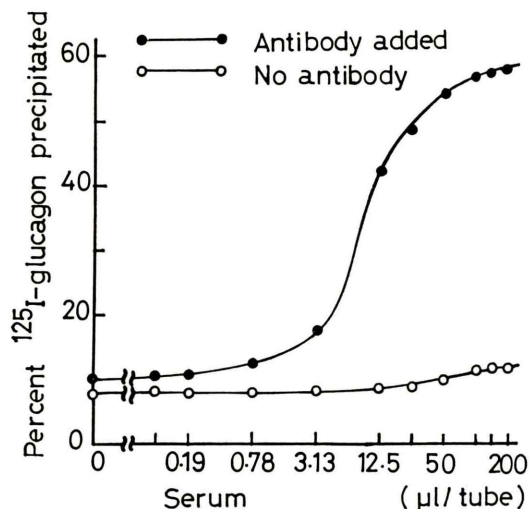


Fig. 6 Effect of plasma concentration upon  $^{125}\text{I}$ -glucagon precipitation for buffer sample.

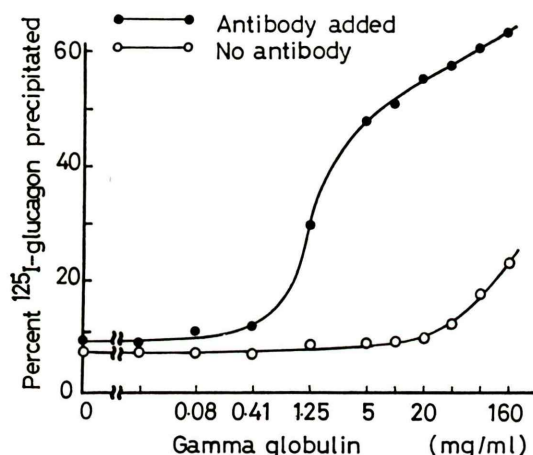


Fig. 7 Effect of gamma globulin concentration upon  $^{125}\text{I}$ -glucagon precipitation for buffer sample

以上のことより, B・F 分離時各試験管の血清含有量を 0.1 ml にすれば充分である。

6) PEG 添加攪拌後の遠心分離までの放置時間: Table 4 のごとく, 攪拌直後に PEG との結合は完成され, 60分までは時間による結合率の変化はみられなかった。

7) Preincubation: Fig. 3 に示したごとく, 抗原抗体反応は約48時間で plateau に達するため温浴を70時間とし, preincubation を 0, 8, 24, 48, 72

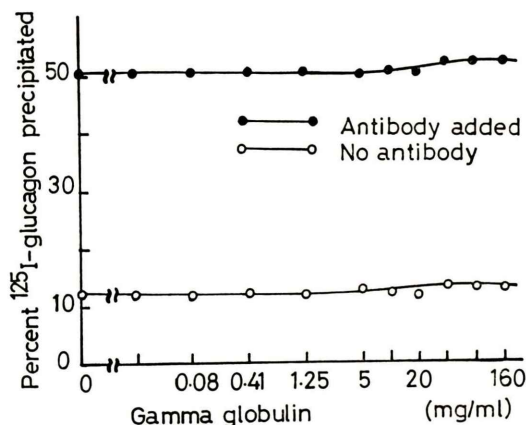


Fig. 8 Effect of gamma globulin concentration upon  $^{125}\text{I}$ -glucagon precipitation for plasma sample.

Table 4 Effect of time interval between addition of PEG and centrifugation upon  $^{125}\text{I}$ -glucagon precipitation

Time (min.)	Buffer sample	
	Antiserum (-)	Antiserum (+)
0	21.1 $\pm$ 0.59	65.9 $\pm$ 0.98
5	21.6 $\pm$ 0.98	65.8 $\pm$ 1.73
15	21.5 $\pm$ 2.00	65.4 $\pm$ 0.21
30	22.4 $\pm$ 0.68	65.4 $\pm$ 0.84
45	21.8 $\pm$ 0.86	65.4 $\pm$ 0.74
60	21.8 $\pm$ 0.75	64.7 $\pm$ 0.67

Precipitation of  $^{125}\text{I}$ -glucagon by PEG is expressed in % of total radioactivity. Each value represents the mean $\pm$ S.D. of triplicate.

時間行い標準曲線におよぼす影響を調べたのが Fig. 9 である。グルカゴン 0 濃度における結合率は preincubation に関係なく一定で 52.3% であった。125 pg/ml の濃度での結合率は 0 時間 45.2%, 4 時間 44.8%, 8 時間 43.4%, 24 時間 42.0%, 48 時間 41.7%, 72 時間 38.5% であった。

500 pg/ml の濃度では各群間の差が一層大きく, それぞれ, 30.6%, 26.0%, 23.2%, 21.6%, 18.4%, 16.0% であった。Fig. 9 より基礎値 100 pg/ml 前後のグルカゴンを測定するには preincubation を 48 時間ないし 72 時間行うのが好ましい。Table 5 はアルギニン負荷よりえた同一血漿を duplicate で各 preincubation 時間により測定した結果であ

る。いずれの時間においても大きな差はなかった。

以上の結果から Fig. 1 の方法により測定を行った。

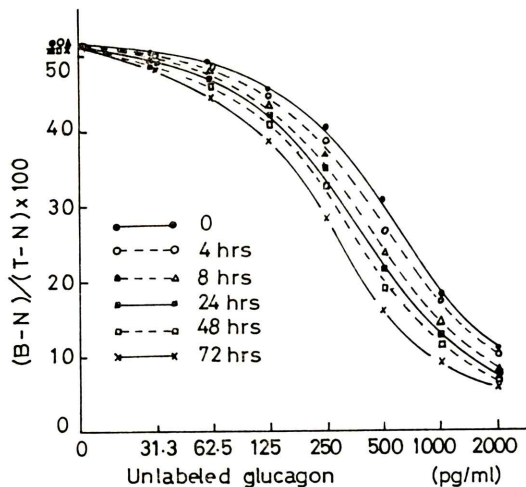


Fig. 9 Effect of first incubation time upon standard curve.

Table 5 Preincubation time and plasma glucagon value

	Preincubation time					
	0 hr	4 hr	8 hr	24 hr	48 hr	72 hr
Value	940	880	860	960	840	840
	820	780	820	900	740	700

Sample was collected from arginine test and measured in duplicate.

8) 標準曲線: Fig. 10 に triplicate で 9 回測定した真の結合率の平均値および標準偏差を示した。Table 6 は各濃度における真の結合率の平均、標準偏差、精度、各濃度間の勾配およびその標準偏差、感度を示す。各濃度における intraassay の精度は S.D. 0.51%~0.97%, interassay では 1.1%~2.1%であった。勾配は 125 pg/ml~250 pg/ml で特に高い。250 pg/ml 以下での感度は 20 pg/ml 以下であり、最小検出感度は 16 pg/ml であった。

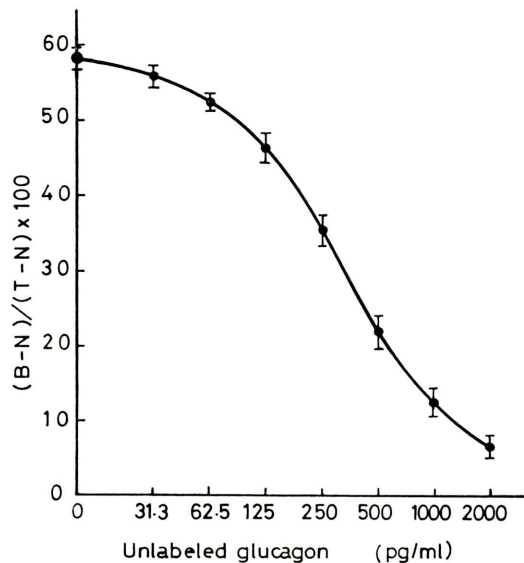


Fig. 10 Glucagon immunoassay standard curve. Each point represents the mean  $\pm$  S.D. of 9 different assays.

Table 6 Slope, precision and sensitivity of standard curve

Amount of glucagon added (pg)	Percent $^{125}\text{I}$ -glucagon bound (mean $\pm$ S.D.)	Precision percent (S.D.)	Slope percent (mean $\pm$ S.D.)	Sensitivity over given range (pg)
0	58.0 $\pm$ 1.4	0.75	2.7 $\pm$ 0.9	16
31.3	55.3 $\pm$ 1.5	0.97	2.3 $\pm$ 0.6	18
62.5	53.0 $\pm$ 1.2	0.81	6.1 $\pm$ 1.4	17
125	46.9 $\pm$ 1.8	0.87	11.1 $\pm$ 1.2	18
250	35.8 $\pm$ 1.9	0.79	14.1 $\pm$ 1.4	25
500	21.7 $\pm$ 2.1	0.82	9.4 $\pm$ 1.0	40
1000	12.3 $\pm$ 1.9	0.55	5.6 $\pm$ 1.0	115
2000	6.7 $\pm$ 1.2	0.51		

Nine curves were obtained in triplicate. The precision is an expression of replicate analysis within each assay, whereas the standard deviations of the slopes and mean percentages bound express the variations from assay to assay at each level of glucagon. The sensitivity of the system is expressed as the least amount of glucagon which is significantly different from zero or represented by the lower standard over each range of glucagon.



9) 血漿グルカゴン値: Table 7 は intraassay の精度である. 試料 A は安静時, B, C は動作時, D はアルギニン負荷時であり, C.V. は 1.9%~5.4% であった. Table 8 は interassay の精度である. 試料 E は安静時, F は動作時, G はアルギニン負荷時である. C.V. は 6.3%~11.3% であった. 稀釈曲線は Fig. 11 のごとく直線性を示した. 回収試験では 31.3 pg/ml, 62.5 pg/ml, 125 pg/ml, 250 pg/ml, 500 pg/ml を添加して測定した. Table 9 はその結果を示す. 添加濃度が高まるほど回収率は上昇し, 100% を越す場合もあった. 平均回収率は 96.7% であった.

Table 7 Precision in intraassay

	Number of determinations	Mean±S.D. (pg/ml)	C.V. (%)
Sample A	10	105.7±5.7	5.4
Sample B	12	173.8±6.2	3.6
Sample C	12	228.7±13.2	5.8
Sample D	12	455.0±8.7	1.9

Table 8 Precision in interassay

	Run	Replicate	Mean±S.D. (pg/ml)	C.V. (%)
Sample E	9	2	151.0±13.0	8.6
Sample F	6	2	221.9±14.0	6.3
Sample G	9	2	687.8±77.6	11.3

#### IV. 考 案

一般にグルカゴン測定において抗体の稀釈は, グルカゴン 0 濃度における結合率が 30%~50% と

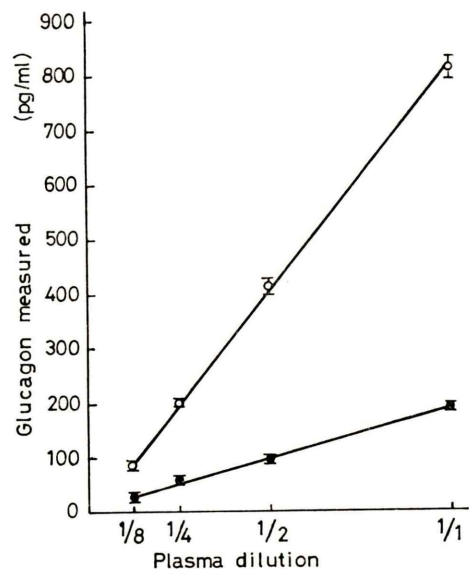


Fig. 11 Effect of dilution on apparent glucagon concentration in plasma. Each point represents the mean±S.D. of triplicate determination

なるような稀釈率が用いられる. 本測定系では広範囲の濃度における感度を高めるために, 抗体の稀釈率を低くし, 最終稀釈率  $2.0 \times 10^4$  を用いた. 9 回測定での緩衝液試料 ( $B_0$ ) の平均真結合率は 58.0% であった.

抗原抗体反応での結合型グルカゴンは温浴後時間とともに増加し 48 時間以降は plateau に達するため, 測定系では温浴を 70 時間行った.

B・F 分離法では 2 抗体法は精度がよいが, さらに約 24 時間の温浴が必要であり, またヒトの血

Table 9 Recovery of unlabeled glucagon added to plasma

Added glucagon (pg/ml)	Sample H		Sample I		Sample J		Mean recovery (%)
	value (pg/ml)	recovery (%)	value (pg/ml)	recovery (%)	value (pg/ml)	recovery (%)	
0	103	—	173	—	191	—	—
31.3	130	85.0	199	83.1	219	89.9	86.0
62.5	155	83.2	228	88.5	252	97.1	89.6
125.0	220	93.6	298	100.2	315	99.2	97.7
250.0	352	99.6	444	108.3	454	105.1	104.3
500.0	657	110.7	737	112.8	660	93.8	105.8
Mean recovery (%)		97.0		98.6		94.4	96.7

Each point was tested in triplicate.



清蛋白と第2抗体との非特異的結合がみられるとの報告がある<sup>2)</sup>。Talc 法は遊離型を吸着させる現象を利用したもので、遠心分離により明瞭な沈澱物ができ、上清の除去が容易である。標準曲線では低濃度域において下降度が強い利点があるが、triplicate内でのばらつきが大きく精度が落ちた。DCC 法は温度および時間の影響が大であることが知られている。したがって DCC 添加後遠心分離までの時間を厳格に一定にしなければならない欠点がある。著者の検討では標準曲線の低濃度域において感度はよいが、血漿グルカゴン値は他の方法に較べ低値を示し、血漿試料では試験管間のばらつきが大きかった。PEG 法は遠心分離までの時間の影響がなく、抗体と直ちに結合しその結合は安定であった。また結合率も高く、試験管間のばらつきも少ない。これらの点から PEG 法はすぐれた B・F 分離法といえよう。

PEG 濃度は他のホルモンの RIA においても 12.5% が用いられるが<sup>2), 3)</sup>、本測定系での真の結合率は PEG の最終濃度 10.0%~12.5% で最高であり 12.5% を用いた。

Fig. 7 に示したように、PEG により結合型を沈澱させるには  $\gamma$ -globulin の存在が必要であり、1.25 mg/ml より急激に上昇し、10 mg/ml 以上では10倍の濃度になっても真の結合率は誤差範囲しか変化しない。Pool serum の場合にもほぼ同様の変化を示し 100  $\mu$ l/tube で充分である。血漿試料では  $\gamma$ -globulin の添加の有無にかかわらず、結合型の沈澱が充分みられる。したがって本測定系では各試験管とも等しい濃度となるように、標準物質に pool serum を血漿試料には GB を加えた。

RIA の感度を高める方法として、1) 温浴時間の延長、2) 抗体の希釈、3) 抗原と抗体の濃度比、4) 2 段法が一般に知られている<sup>11)</sup>。温浴48時間以降において結合率は軽度しか上昇せず (Fig. 3)、感度を高めえてもわずかであろう。抗体の希釈は全般に結合率が下がるため、結果として標準曲線における結合率の低下率が小さくなり、感度はわずかししか高まらず良策でない。標識ホルモンは市販の 92  $\mu$ Ci/ $\mu$ g~168  $\mu$ Ci/ $\mu$ g を使ったが、比放射能

を高めると抗原性の変化をきたすため、この程度に止めるのがよいといわれる。標識グルカゴンは一般に 10 pg/tube~20 pg/tube 用いられるが、これ以上に希釈すると試験管壁への吸着率が高くなり、また放射活性の測定時間が問題になる。これらの観点から 2 段法を用いることにより、標準曲線では臨床上血漿グルカゴンの分布する 62.5 pg/ml~1,000 pg/ml の範囲で高い勾配がえられ、満足できる感度、精度の測定系が確立できた。最小検出感度は 16 pg/ml であり、その結果、検体血漿量は 0.1 ml で充分であった。

## V. 結 語

グルカゴンの免疫学的測定法において種々の検討を加え 2 段法の測定系を確立した。

1) 抗原抗体反応は 4°C において48時間以降ほぼ plateau であった。

2) B・F 分離では 4 方法とも滑らかな標準曲線を描くが、PEG 法は操作が容易で、しかも精度も満足できた。

3) PEG 法での真の結合率は PEG の最終濃度 10.0%~12.5% で最高であった。 $\gamma$ -globulin 量は 0.1 ml/tube の血清で充分であった。

4) Preincubationにより標準曲線の低濃度域において勾配が高くなり、感度が高まった。

5) 本測定系は最小検出感度 16 pg/ml で感度、精度、回収率、希釈試験など充分満足できた。

6) 血漿検体量は 0.1 ml で充分であった。

終わりに臨みご指導、御校閲を賜った恩師杉山陽一教授に深甚なる謝意を表します。

また本研究に種々の御助言を賜った本学放射線科中川毅助教授、京都大学第2内科桜井英雄博士、本学附属医院中央放射線部信田憲行技官に深謝します。

なお本論文の要旨は昭和52年12月10日松阪市で開催された日本核医学会第22回東海、第31回北陸合同地方会にて発表した。

## 文 献

- 1) 桜井英雄：グルカゴンの分泌動態に関する研究，第一編。グルカゴンのラジオイムノアッセイの基礎的検討。内科宝函 23: 247-256, 1976

- 2) 大根田昭, 石井正二: ポリエチレングリコール法によるグルカゴンの Radioimmunoassay. 糖尿病 17: 23-27, 1974
- 3) 伊藤義智, 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
- 4) 池田 匡: グルカゴンの測定法および臨床的意義. 臨床病理 23: 856-859, 1975
- 5) Unger RH: Radioimmunoassay of glucagon. Manufacture's instruction for antiserum, 30 K.
- 6) 桜井英雄, 倉八博之, 井村裕夫: 豚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
- 7) 大村 平, 今田直孝: 推測統計の FORTRAN 1 版 オーム社, 東京, 185, 1972
- 8) 赤木弘昭, 末沢慶昭, 関木 寔: Competitive radioassay の基礎的諸問題, データ処置, 最新医学 30: 571-580, 1975
- 9) Hazzard WR, Crockford PM, Buchanon KD, et al: A double antibody immunoassay for glucagon. Diabetes 17: 179-186, 1968
- 10) Midgley AR, Niswender GD and Rebar RW: Principles for the assessment of the reliability of radioimmunoassay methods (precision, accuracy, sensitivity and specificity) Acta Endocrinol. 63 Suppl. 142: 163-184, 1969
- 11) 宮本 力, 大河原賢一, 三宅 有: 体液中の IgE 測定, 第1報. 唾液, 尿, 臍帯血清中 IgE の測定法について. アレルギー 24: 733-739, 1975

## Summary

### Fundamental Research on Glucagon Radioimmunoassay

Kazuhira MURATA

*Department of Obstetrics and Gynecology, Mie University, School of Medicine, Tsu, Japan  
(Director: Professor Youichi Sugiyama)*

Various factors and techniques concerning the glucagon radioimmunoassay were extensively studied and a new assay system was devised.

The antigen-antibody reaction reached a plateau of maximal binding after 48 hours of incubation at 4°C. The uses of PEG, talc, double antibody and dextran coated charcoal to separate free and bound glucagon were compared. Although each method was possible to measure the plasma glucagon, PEG method was most convenient and satisfactory in precision in both standard and plasma samples. Time interval between addition of PEG and centrifugation showed no detectable effect. The net percent of immunoprecipitation was maximum at the PEG concentration of 10.0%—12.5%. By means of preincubation of samples with antiserum for 48 hours before addition of <sup>125</sup>I-glucagon, the slope of standard curve was sharpened at lower levels of glucagon. As the result, the sensitivity and precision were improved.

The established radioimmunoassay procedure is as follows. The mixture of standard solution or unknown sample, 0.1 ml; antiserum diluted (1/2,000) in phosphate buffered saline or buffer

alone, 0.05 ml; aprotinine, 0.05 ml; and glycine buffer, 0.2 ml was preincubated for 48 hours. Following 0.1 ml of <sup>125</sup>I-glucagon (125 pg/ml) was added and the mixture was incubated for 70 hours. It was necessary to adjust protein content to the same level in all tubes before precipitation of the glucagon-antibody complex. Polyethylene glycol # 6,000 (final dilution 12.5%) was dispensed into all tubes. Then the tubes were centrifuged and the supernatant was aspirated.

Sensitivity of this assay was 16 pg/ml over the range of 0–31.3 pg/ml, and 25 pg/ml over the range of 250 pg/ml–500 pg/ml. Precision for intraassay was 1.9%–5.4% (C.V.), and for interassay 6.3%–11.3%. Recovery of exogenous glucagon added to plasma was satisfactory. Measurement of glucagon was possible in such low level as 1/8 of basal levels.

This assay system, utilizing 2 stage incubation technique and PEG for separation of bound from free fraction, is very sensitive and reliable and considered very useful for clinical study.

**Key word:** Radioimmunoassay, Glucagon, Bound-free separation, Preincubation.