

《ノート》

ラジオイムノアッセイによるグルカゴン測定条件の検討

Fundamental Studies of Radioimmunoassay for Glucagon

奥村 一忠* 杉山 理** 小沢 高将*** 谷口清昭****
 角田 信三*****

Kazutada OKUMURA*, Satoru SUGIYAMA**, Takayuki OZAWA***,
 Kiyoaki TANIGUCHI**** and Shinzo KAKUTA*****

*Medical Technological School, Faculty of Medicine, University of Nagoya

**Department of Biomedical Chemistry, Faculty of Medicine, University of Nagoya

***Department of Biomedical Chemistry, Professor and Director of Medical Division
 of Isotope Center of Nagoya University, Tsuruma-cho, Showa-ku, Nagoya 466

****Chu-nichi Hospital, Chief of Clinical Laboratory

*****Chu-nichi Hospital, President, 3-6 Marunouchi, Naka-ku Nagoya 460

はじめに

グルカゴンは、Unger ら¹⁾により比較的早くからラジオイムノアッセイ(RIA)で測定されていたが、他のタンパク性ホルモンに比し、特異性の高い抗体が得にくくこと、分解酵素により破壊されやすいこと²⁾、得られた抗体が膵グルカゴンのみならず消化管由来のグルカゴンと交叉反応する^{3, 4, 5)}などのため、さらにはグルカゴンはインスリンに較べてその生理的、病理的な意義が不明確であったため測定そのものが普及しなかった。しかし、ここ数年来 Unger らの努力により特異性の高い膵グルカゴン抗体(30K)が入手可能となり、また、彼らのデキストランチャコール(DCC)に

よる結合型グルカゴンと遊離型のそれを分離する方法⁶⁾の確立により多数検体処理も可能となり、今後種々の負荷試験法(糖、アルギニンなど^{7~9)})とともに膵グルカゴンの糖、アミノ酸、脂肪酸代謝への影響および代謝異常に關する疾患の研究が発展すると考えられる。

現在 Unger らにより推奨されている測定法は、比較的低分子量のホルモンの分離に有利とされている¹⁰⁾、デキストランチャコール法(DCC 法)を用いている。しかし、DCC 法は、その精度および検体量の面で批判もあり¹¹⁾、今日タルク法¹²⁾、ポリエチレングリコール法(PEG 法)などが種々検討されてきている^{13~16)}。一方、DCC 法は簡便なほか、低濃度での感度が優れている¹⁶⁾面も有している。今回、われわれは DCC 法によるグルカゴン測定の基礎的な条件について検討を加え、若干の知見を得たので報告する。

試薬および方法

A. 試 薬

1) 希釀液: glycine(和光純薬工業、特級)7.5 g

Key words: Glucagon, Radioimmunoassay, Dextran coated charcoal

* 名古屋大学医学部附属臨床検査技師学校講師
 ** 名古屋大学医学部生化学教室

*** 名古屋大学教授兼名古屋大学総合アイソトープセンター医学部分館長

**** 中日病院臨床検査科長

***** 中日病院院長

受付: 54年2月27日

最終稿受付: 54年4月27日

別刷請求先: 名古屋市昭和区鶴舞町(番466)

名古屋大学医学部生化学教室

小沢 高将

Table 1 Flow sheet of Unger's method

	Total (T)	Control of Standard (C)	Standard (St)	Sample (S)	Control of Sample (Cs)
¹²⁵ I-Glucagon (30 pg/ml)	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml
Aprotinine (10,000 U/ml)	—	0.1	0.1	0.1	0.1
Sample or Standard soln.	—	—	0.2	0.2	0.2
Diluent	—	0.6	—	—	0.4
Antiserum	—	—	0.4	0.4	—
↓ Mixing ↓ Incubation for 96 hr. at 4°C					
NSS	—	0.2 ml	0.2 ml	—	—
DCC	—	0.5	0.5	0.5	0.5
↓ Mixing ↓ Incubation for 45 min. at 4°C ↓ Centrifugation 2500 rpm 10 min ↓ Aspiration of Supernate Count					

を水 450 ml に溶解し、ヒトアルブミン試薬(国際試薬、30% 試薬用)を 0.5%，正常ヒツジ血清(日本バイオテスト)を 1% となるよう添加し、2 N-NaOH で pH を 8.8 に補正し全量を 500 ml とした。

2) Aprotinine: Antagasan (10,000 U/ml, 5 ml ヘキスト社)

3) グルカゴン抗体: 30 K (Unger研究所, pool 3, pool 4) を希釈液により 100 倍(pool 3)あるいは 500 倍(pool 4)にし、-20°C に保存、使用時さらに最終濃度 2 万倍(pool 3)あるいは 25 万倍(pool 4)とした。

4) 標識グルカゴン(¹²⁵I-Glucagon): ヘキスト社製(0.54 μCi/5 ng～0.81 μCi/5 ng)を蒸留水 2 ml で希釈し、小分けして-20°C に凍結保存、使用時 30 pg/ml に希釈液で再希釈して使用、入荷後 3 週間以内に用いた。

5) 標準グルカゴン: リリー社製、ウシブタグルカゴンを用い 0.02 N-HCl で 0.4 mg/ml の原標準液を作り、さらに希釈液で 10 μg/ml とし、小分けして凍結保存、使用時さらに 1 ng/ml～16 pg/ml に希釈して使用した。

6) 0.2M Glycine buffer: glycine 7.5 g を水 450 ml に溶解し、2 N-NaOH にて pH 8.8 とし、水に

て全量 500 ml とした。

7) デキストランチャコール(DCC): 0.2 M Glycine buffer で 1% となるよう Norit A(和光純薬工業)を入れ混和し、別に 0.5% デキストラン T-70、あるいは T-40(生化学工業)を含有した 0.2 M Glycine buffer を作り、両者を等量ずつ使用前に 15 分間よく混和して用いた。

8) ポリエチレン glycole 6,000(PEG)(和光純薬工業)

B. 検体

採血後直ちに、全血 2 ml をあらかじめ 4°C に冷却し、Na₂-EDTA 3.0 mg, Aprotinine 1,000 U を入れておいたガラス試験管に注入混和、冷所保存して 2 時間以内に 4°C, 2,500 rpm, 10 分遠心し、得られた血漿を検体とし、-20°C に保存した。

C. 測定方法

Unger らの方法(標準法と仮称する)に従った^{6, 17)}。前もって氷中で冷却したポリエチレンチューブに Table 1 のごとく ¹²⁵I-Glucagon 15 pg/tube, Aprotinine 1,000 U/tube を入れ、標準用(St)に標準液(0, 16, 31, 63, 125, 250, 500, 1,000 pg/ml)を 0.2 ml 検体用(S)および検体コントロール用(Cs)に検体 0.2 ml を入れ、抗体を St, S ～ pool 3 は最終濃度 2 万倍、pool 4 は最終濃度 25 万倍

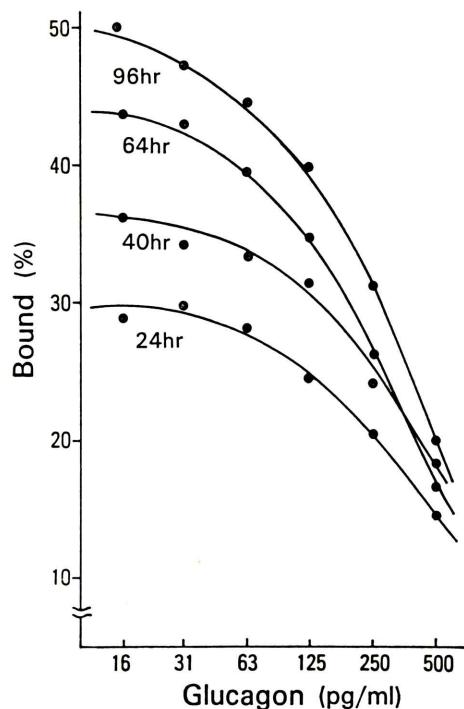


Fig. 1-a Effect of incubation time on standard curve.

となるよう 0.4 ml 加えた。非特異的結合を求めるため標準用コントロール (C) および Cs には希釈液を 0.6 ml , 0.4 ml それぞれ添加した。Vortex mixer で混和した後 4°C で 96 時間 incubation した。St, C に標準ヒツジ血清 0.2 ml を入れ混合し, DCC 0.5 ml を Total 用 (T) を除く全 tube に入れ混和した。次に, 4°C , 45 分間放置したのち, 4°C , $2,500 \text{ rpm}$ で 15 分間遠心し, 上清を吸引除去, 沈渣および T を Auto-Logic(ダイナボット社製) でそれぞれ 5 分間カウントした。バックグラウンドを差し引いたカウント数から次式により, それぞれ, 非特異的結合率 = $\frac{T-C}{T} \times 100$, 検体結合率 = $\frac{Cs-S}{Cs} \times 100$, 標準結合率 = $\frac{C-St}{C} \times 100$ を算出した。そして, 片対数グラフ用紙に濃度を対数軸とし標準結合率をプロットし, その検量線により検体濃度を読みとった。

なお T, C, 各濃度 St は 3 重測定, S, Cs は 2 重測定した。また, 以下の検討のため測定法の一部を変更して行なった。

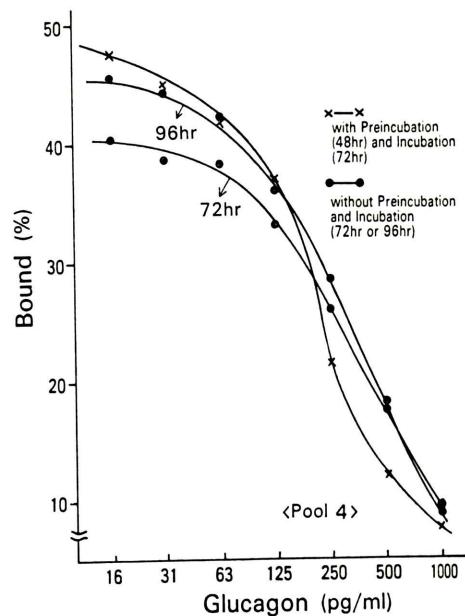


Fig. 1-b Effects of incubation time and preincubation on standard curve.

結 果

1) Incubation 時間, preincubation による標準曲線, 非特異的結合の変化: incubation 時間を 24, 40, 64, 96 時間とした場合の標準曲線を Fig. 1-a に示した。長時間 incubation するにしたがい, 結合率は上昇し傾きも大となった。非特異的結合はいずれの場合も $10.3 \sim 13.0\%$ 内であった。Fig. 1-b は pool 4 抗体を用い 72, 96 時間での標準法と, はじめに検体と抗体を加えて 48 時間 preincubation を行なったあとで, ^{125}I -Glucagon を全チューブに 0.5 ml 加えて混合し, さらに 72 時間 incubation を行なった場合の標準曲線を示した。preincubation を行なったものは $100 \sim 400 \text{ pg/ml}$ 域での感度の上昇がみられた。

2) 希釈液, DCC 調製用 glycine buffer の pH の変動による標準曲線, 非特異的結合への影響: pH を 7.5, 8.5, 9.0, 9.5 にして行なった結果が Fig. 2 である。pH 7.5~8.5 はほぼ同一のカーブを示すのに対して, pH 9.0, 9.5 は明らかな結合

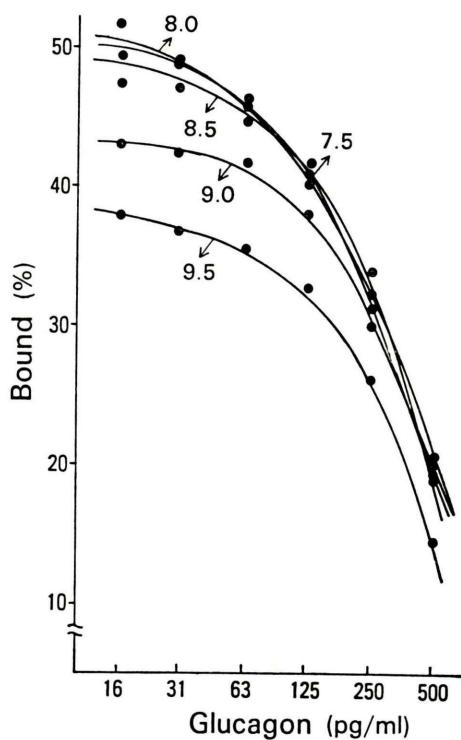
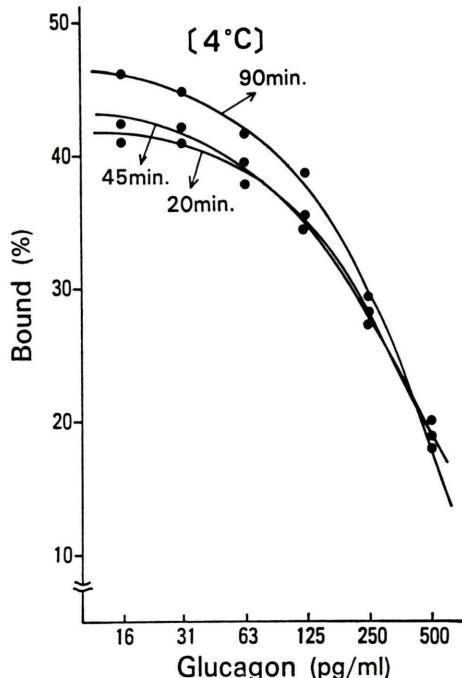


Fig. 2 Effect of pH on standard curve.



率の低下を示した。非特異的結合と pH の相関には一定の傾向は見られず、いずれの pH でも 11.8 ~17.5% にあった。

3) DCC 添加後の incubation の温度および時間の標準曲線への影響: Fig. 3-a, b に 4°C, 29°C それぞれ 20 分, 45 分, 90 分 incubation した結果をあらわした。4°C では incubation 時間が長いと若干結合率が上昇したが、20 分, 45 分ではほとんど変化がなかった。しかし、29°C では時間の延長とともに明らかな結合率の低下がみられた。29°C, 20 分 incubation した後の結合率は、4°C, 45 分のものとほぼ一致した結果となった。

4) デキストランの分子量による標準曲線の変化について: 平均分子量 4 万の T-40, 7 万の T-70 を用いた結果を Fig. 4 にあらわした。標準曲線はほとんど差がなかった。

5) 正常ヒツジ血清添加および希釈正常ヒツジ血清添加による影響: 正常ヒツジ血清を添加しない場合、Fig. 5 のごとく全体に低い結合率となっ

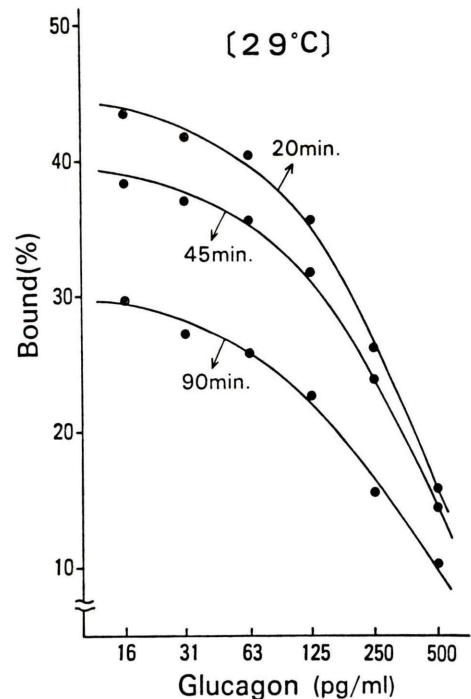


Fig. 3-a, b Effects of temperature and staying time on standard curve.

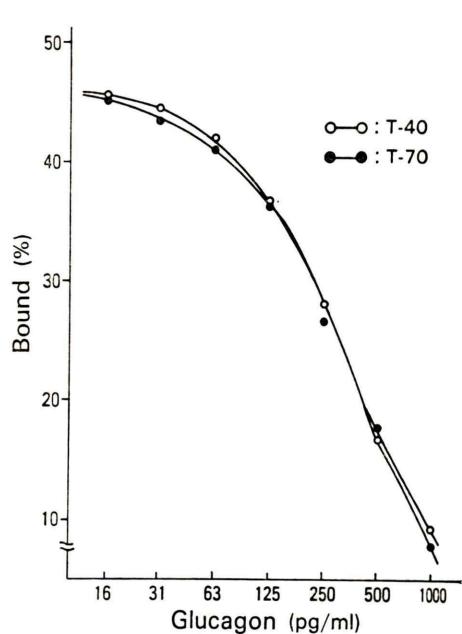


Fig. 4 Effect of molecular weight of dextran on standard curve.

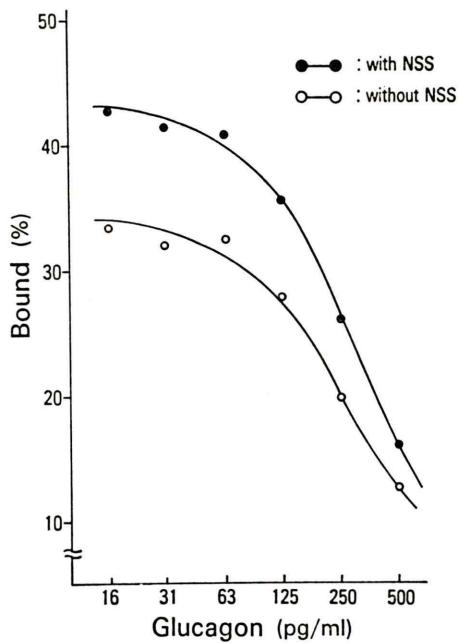


Fig. 5 Effect of addition of normal sheep serum (NSS) on standard curve.

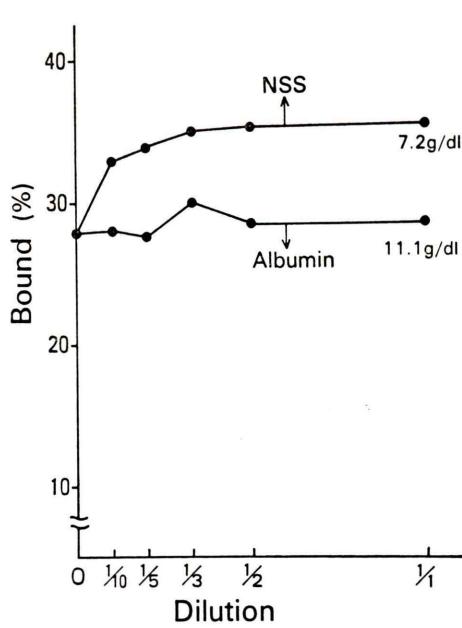


Fig. 6 Effect of dilution of normal sheep serum and human serum albumin.

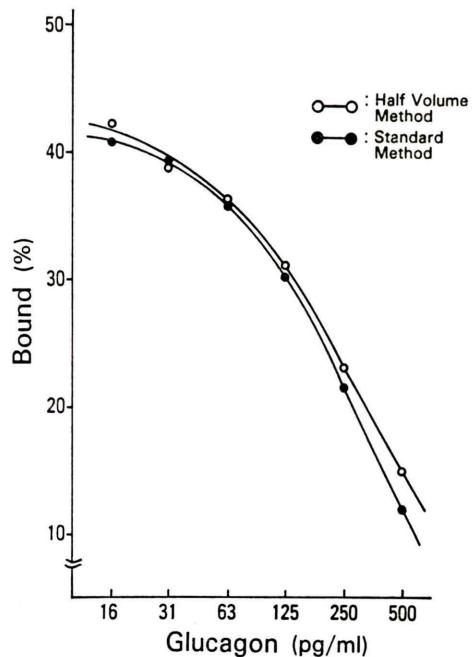


Fig. 7 Comparison of standard method and half volume method.

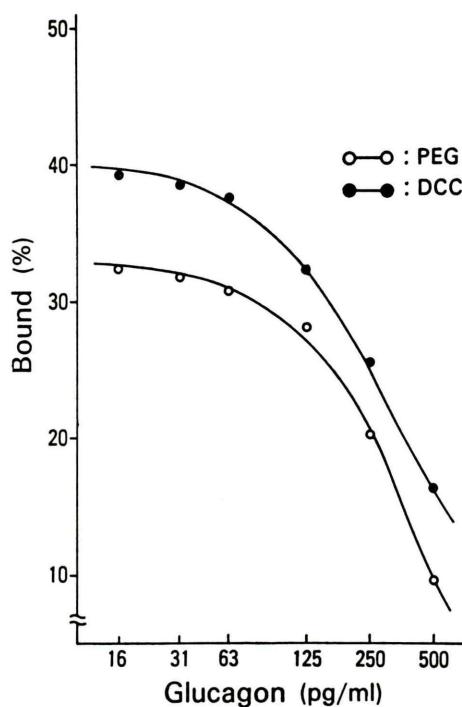


Fig. 8 Comparison of PEG and DCC separation method.

た。どの程度の正常ヒツジ血清が必要かグルカゴン 125 pg/ml の標準液を用い、正常ヒツジ血清を希釈液で 2 倍、3 倍、5 倍、10 倍に希釈し、検討したもののが Fig. 6 である。3 倍希釈までは結合率は変化しなかった。同一条件下で、ヒト血清アルブミンを添加した場合は、その濃度にかかわらず効果が認められなかった。

6) 標準法とその半量法による検体測定値の再現性について：Fig. 7 にそれぞれの標準曲線を示した。半量法でも標準法と同じような標準曲線が得られた。2 つの検体 (S_1 , S_2) を 9 重測定したところ S_1 は標準法で平均値 216 pg/ml, S_2 は 43 pg/ml, 半量法ではそれぞれ 274, 95 と、半量法では測定値が高くてた。また標準法での再現性の変動係数は 14.1% (S_1), 16.8% (S_2) であったのに対し、半量法ではそれぞれ 28.9, 30.3% と悪くなつた。

7) DCC, PEG 分離法による標準曲線および

検体の再現性：標準法の正常ヒツジ血清添加までを 2 系列作り、1 系列は DCC 法で他の系列は 4 °C に冷却した 35% PEG を 0.8 ml (最終 PEG 濃度 12.7%) 注入混和し、4 °C で 30 分放置後、4 °C, 2,500 rpm, 15 分遠心し上清を吸引除去し、沈渣をカウントした。DCC 法は前記算出法で PEG 法は標準結合率 = $\frac{St-C}{T-C} \times 100$ 、検体結合率 = $\frac{S-Cs}{T-Cs} \times 100$ で算出し、Fig. 8 にあらわした。DCC 法に較べ PEG 法は傾きの小さいカーブで全体に低い結合率にとどまり、低濃度域での感度は DCC 法がやや勝った。しかし、それぞれの方法による同一検体の 9 重測定の結果での値の再現性の変動係数は DCC 法で 14.1%, PEG 法では 4.0% と PEG 法が勝った。

8) 標準法による正常範囲：健康と考えられる 12 名の成人男性の早朝空腹時値は 130 ± 82 pg/ml (平均値土標準偏差) であった。

考 案

グルカゴンの結合型、遊離型の分離法としては、クロマト法、タルク法、二抗体法、PEG 法、DCC 法など多種あるが、安価で操作が簡便でルーチンのための多数検体を処理するには PEG 法、および DCC 法がすぐれている。ここ数年来この 2 法につき検討されているが、標識量の問題、一定の抗体を得にくいため、標準的な方法が確立されていなかった。Unger らによる 30K 抗体は高価ではあるが容易に入手でき、しかも、脾グルカゴンに対する特異性も高いとされ、近年急速にこの方法が普及してきた。わが国では、取り扱い、精度の面から PEG 法を推す報告^{13,14,16)}が多いが、Unger ら^{6,17)}は DCC 法を推奨している。今回われわれは、DCC 法についての基礎的条件について検討した。一般に incubation 時間は 72~96 時間とされ、また、preincubation を行なつた方が精度が上昇するという報告¹⁶⁾がある。われわれの結果では、incubation は長時間ほど低濃度域での感度が大となり、また、preincubation を行なつた方がさらに優れた結果が得られた (Fig. 1-a, b)。

pH は各研究者により緩衝液の組成が異なったり、pH が異なっている^{5,6)}ので、pH 変化の影響を検討した結果、標準法では pH 8.8 としているが、pH 7.5~8.5 の中性に近い域で結合率が高く、pH 9.0 を越えると結合率は低下した (Fig. 2)。ただし、今回は反応系と吸着系の pH を同時変化せしめたので、いずれの系の pH の変化が大きな影響を有するかはさらに検討が必要である。

従来から DCC 法は低分子のものの分離法として良い¹⁰⁾と言われているが、温度および時間の影響が大きいため、再現性に問題があるのではないかとされてきた。そこで、DCC 添加後 2 つの温度で、3 種の放置時間で検討した結果、明らかに 29°C では結合率は、時間とともに低下しており、結合体の破壊が起こっていると考えられる。しかし、4°C ではむしろ、長時間の方が結合率がやや上昇した。DCC 添加後の incubation は低温下で行なう必要があるが、その時間は標準法の半分でもよいと考えられた (Fig. 3-a, b)。

一般には添加するデキストランは T-70 が用いられているが、より低分子の T-40 の添加でも同様の効果が認められ、添加するデキストランの分子量の影響は認められなかった (Fig. 4)。

PEG 法でも共沈のために一定量の血清の添加が標準液用には必要¹³⁾とされるが、DCC 法でもこの血清濃度が問題とされているので、正常ヒツジ血清の添加効果をみた。添加しない場合は明らかに結合率が落ちる (Fig. 5)。しかし、正常ヒツジ血清の添加効果はその 3 倍希釈液でも認められた (Fig. 6)。この場合ヒト血清アルブミンを用いたところ、結合率の上昇に全く効果がなく、結合率の上昇にはアルブミン以外のタンパクが関与していると考えられる (Fig. 6)。

抗体が高価であるため、半量法を検討した。同様の標準曲線が得られたが (Fig. 7)，測定値の再現性が悪くなり、半量法で行なうのは難しいと考えられる。

DCC 法が PEG 法に較べ、再現性に問題があるのは、DCC そのものが懸濁液であること、沈渣がくずれ易いこと、ポリエチレンチューブにチ

ヤコールの付着が起り、特に検体が入るとそれが著しいなどの要因が考えられる。しかし、DCC 法は比較的低濃度での感度が優れており (Fig. 8)，この点が DCC 法の長所といえる。

健常人の血漿グルカゴン値は報告者、方法によって異なっているが、われわれと同じように抗体として 30K、分離法として DCC 法を用いた Gerich ら¹⁸⁾の報告 ($142 \pm 7 \text{ pg/ml}$ ；平均値士標準誤差) と、われわれの値はよく一致した。

ま と め

DCC 法によるグルカゴンの測定の基礎的条件の検討を行なった。

- 1) incubation 時間を長くするほど低濃度域での感度は上昇した。また、はじめに検体と抗体を preincubation し、次に ^{125}I -Glucagon を加え incubation すると、さらに感度が上昇した。
- 2) pH は 7.5~8.5 の中性域近くで高い結合率が得られた。
- 3) DCC 添加後の incubation 温度の結合率への影響は大であったが、低温度 (4°C) で incubation した場合は、incubation 時間の影響は小さかった。
- 4) デキストランの分子量による結合率の変化は認められなかった。
- 5) 標準用には正常ヒツジ血清の添加が必要であった。
- 6) DCC 法は PEG 法に較べ、低濃度での感度は優れていたが、再現性では劣った。
- 7) 本法による健常人の血漿グルカゴン値は、 $130 \pm 80 \text{ pg/ml}$ (平均値士標準偏差) であった。

文 献

- 1) Unger RH, Eisentraut AM, McCall MS et al: Glucagon antibodies and an immunoassay for glucagon. *J Clin Invest* **40**: 1280, 1961
- 2) Eisentraut AM, Whissen N and Unger RH: Incubation damage in the radioimmunoassay for human plasma glucagon and its prevention with "Trasylol". *Amer J Med Sci* **255**: 137, 1968
- 3) 鎮目和夫, 熊原雄一編: 新版ラジオイムノアッセイ. 朝倉書店, 1977, p. 239

- 4) 松山辰男, 田中亮一: 脾グルカゴンと脾外グルカゴン. 最新医学 **31**: 937, 1976
- 5) 吉田隆司, 豊島博行, 野中共平: 血漿脾グルカゴン測定とその問題点. 最新医学 **30**: 754, 1975
- 6) Aguilar-Parada E, Eisentraut AM and Unger RH: Effects of starvation on plasma pancreatic glucagon in normal man. *Diabetes* **18**: 717, 1969
- 7) 大根田昭, 小林 節, 二瓶次郎: インスリン, グルカゴン. 総合臨床 **27**: 2322, 1978
- 8) Aguilar-Parada E, Eisentraut AM and Unger RH: Pancreatic glucagon secretion in normal and diabetic subjects. *Amer J Med Sci* **257**: 415, 1969
- 9) Unger RH: Alpha- and beta-cell interrelationships in health and disease. *Metabolism* **23**: 581, 1974
- 10) 大西利夫, 宮井 潔: B. F. 分離法—最近の動向. 最新医学 **30**: 564, 1975
- 11) 鬼原 彰, 石橋文利, 伊藤義智, 他: Dextran-coated-charcoal 法による血中 glucagon の測定について. 臨床病理 **22**: 796, 1974
- 12) 桜井英雄: グルカゴンの分泌動態に関する研究 第1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, 1976
- 13) 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, 1974
- 14) 伊藤義智, 菊地晃, 稲辺靖二郎, 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, 1975
- 15) Henquin JC, Malvaux P and Lambert AE: Glucagon immunoassay using polyethylene glycol to precipitate antibody-bound hormone. *Diabetologia* **10**: 61, 1974
- 16) 村田和平: glucagon の radioimmunoassay における基礎的検討. 核医学 **15**: 959, 1978
- 17) Unger RH: Radioimmunoassay of glucagon. Unger 研究室資料
- 18) Gerich JE, Langlois M, Noacco CI et al: Lack of glucagon response to hypoglycemia in diabetes; Evidence an intrinsic pancreatic alpha cell defect. *Science* **182**: 171, 1973