

《ノート》

Glucagon radioimmunoassay kit (Dainabot) の基礎的, 臨床的検討

Glucagon Radioimmunoassay by Using Anti-Pancreatic Glucagon 19-29
Sera: Evaluation of a New Commercial Kit (Dainabot)

勝田 隆子* 石原 睦夫* 原田 義道* 山脇美登里**
上山 勝美***

Takako KATSUTA*, Mutsuo ISHIHARA*, Yoshimichi HARADA*,
Midori YAMAWAKI** and Katsumi UHEYAMA***

*Department of Internal Medicine, Tottori University School of Medicine

**Department of Internal Medicine, Tottori Red Cross Hospital

***Radioimmunoassay Laboratory, Tottori Red Cross Hospital

I. はじめに

1923年, Kimball と Murlin¹⁾ によって膵エキスの血糖上昇物質として報告された glucagon は, 1955年 Staub ら²⁾ および1956年 Bromer ら³⁾ により, それぞれ結晶化され化学構造が決定されたが, 一方, 1964年 Makman ら Sutherland⁴⁾ により, 食道を除く消化管にグルカゴン様物質が存在する事が示され, 現在ではそれぞれ膵 glucagon および gut glucagon として区別されている. ヒト末梢血中の膵 glucagon だけを特異的に測定する方法は, 1959年 Unger ら⁵⁾ が radioimmunoassay (RIA) を導入することによって進展したが, 本邦においても 1971年大根田ら⁶⁾ を始めとして諸家により続々と報告され⁷⁻¹⁷⁾, 一次性糖尿病, 二次性糖尿病等における膵 glucagon 分泌動態は, 漸時明らかにされつつある. しかし, これらは依然として極く限られた研究室においてのみ可能であり, 日常

の臨床で応用するためには, 十分管理された, 信頼度の高い測定キットの提供が望まれる.

今回著者らは, ダイナボット RI 研究所より抗膵 glucagon¹⁹⁻²⁹ 特異抗体 (OAL-123²⁰⁾) を用いた RIA による血中膵 glucagon 測定キットの提供をうけ, 若干の検討を行ない, 本邦文献⁶⁻¹⁷⁾ との比較検討を加え報告する.

II. 測定方法

1. キットの内容

本キット (100 検体用) の内容は ¹²⁵I-glucagon¹⁹⁻²⁹ 溶液 (¹²⁵I-glucagon と benzamidine を含む borate buffer, 比放射能 180~240 mCi/mg, 総放射線量 1 μ Ci 以下) 10.5 ml, 標準 glucagon 血清 (0, 50, 100, 200, 400, 800, および 1,600 pg/ml) 各 0.5 ml, 抗ブタ/ウシ膵 glucagon¹⁹⁻²⁹ 家兎血清溶液 (OAL-123²⁰⁾, 最終濃度約15万倍) 31ml, 抗家兎 γ -globulin ヤギ血清溶液 (第二抗体) 31 ml よりなる.

2. 測定操作

a) 各試験管 (ガラス製, 直径14 mm×高さ104 mm) に標準血清又は被検血清をそれぞれ 0.1 ml ずつ入れる.

Key words: glucagon, radioimmunoassay

* 鳥取大学医学部第三内科

** 鳥取赤十字病院内科

*** 鳥取赤十字病院ラジオイムノアッセイ検査室

受付: 55年6月24日

最終稿受付: 55年10月6日

別刷請求先: 鳥取県米子市西町 36-1 (☎683)

鳥取大学医学部第三内科

石原 睦夫

b) 全試験管に抗膵 glucagon 抗体溶液を 0.3 ml/ ずつ加え、軽く混じ、4°C で孵置する (pre-incubation).

c) 全試験管に ^{125}I -glucagon 溶液を 0.1 ml/ ずつ入れ、軽く攪拌後、4°C で孵置する (first incubation).

d) 全試験管に第二抗体溶液を 0.3 ml/ ずつ加え、軽く振とうし、4°C で一昼夜孵置する (second incubation).

e) 全試験管を 3,000 rpm で 30 分間遠沈し、傾斜法で、抗体と結合した ^{125}I -glucagon を、遊離型 ^{125}I -glucagon と分離する.

f) ウェル型 γ -シンチレーションカウンターで、各試験管の放射線量 (B) を測定する.

g) 標準血清の B/T% より標準曲線を作成し、検体の B/T% より glucagon 濃度 (IRG) を求める.

3. その他

血中 insulin (IRI) は二抗体法による RIA キット (Dainabot), 血糖は autoanalyzer 法, 血中 GOT, GPT は UV 法によりそれぞれ測定した. Trasylol 5,000 U/ml はバイエル社より, 10% L-アルギニン溶液は森下製薬よりそれぞれ提供された.

有意差検定は、スチューデントの t-テストを用いた.

III. 対 象

臨床症状、所見および一般検査で特記すべき異常を認めない健常成人 (年齢 11~72 歳) 86 例 (男 47 例, 女 39 例), 人間ドックで発見された 48~55 歳の一次性成人型糖尿病 22 例 (男 17 例, 女 5 例), 血液生化学的検査、腹腔鏡、肝生検等で診断された急性肝炎 10 例 (男 6 例, 女 4 例), 慢性肝炎 21 例 (男 13 例, 女 8 例), アルコール性肝炎 10 例 (男のみ), 肝硬変症 7 例 (男のみ), 閉塞性黄疸 2 例 (女のみ), 慢性膵炎 3 例 (男 1 例, 女 2 例), 膵全摘術後 2 例 (男のみ), インスリンノーマ 2 例 (男のみ), 各種内分泌機能検査で診断した末端肥大症 10 例 (男 8 例, 女 2 例), 特発性下垂体性こびと症 12 例 (男 9 例, 女 3 例), クッシング氏病および SLE のため数年間 betamethasone 5 mg/日以上を服用中のグルコ

ルチコイド過剰症 7 例 (男 3 例, 女 4 例), 原発性甲状腺機能低下症 3 例 (女のみ), 計 197 例を対象とした.

IV. 結 果

1. 孵置時間

First incubation を 1~5 日とした時の標準曲線を比較した (Fig. 1). $B_0\%$ は 1 日 21%, 2 日 28%, 3 日 30%, 4 日 27%, 5 日 28% であり, 3 日の標準曲線は他に比べ, glucagon 濃度 100 pg/ml 以下の検量線が急峻であり, 以後は first incubation を 3 日ないし 4 日とした.

この際, さらに ^{125}I -glucagon 溶液の添加時期をそれぞれ同時, 3, 24 および 48 時間後とした時の標準曲線を比較した (Fig. 2). Glucagon 濃度 100 pg/ml 以下での検量線の傾きは, 3 時間後添加のときが最も急峻であり, pre-incubation は 3 時間とした. Second incubation は, 経験上一昼夜とした.

2. 標準曲線

標準曲線は glucagon 濃度 50 pg/ml から 1,600 pg/ml の間で軽度の sigmoid curve を描き (Fig. 3)

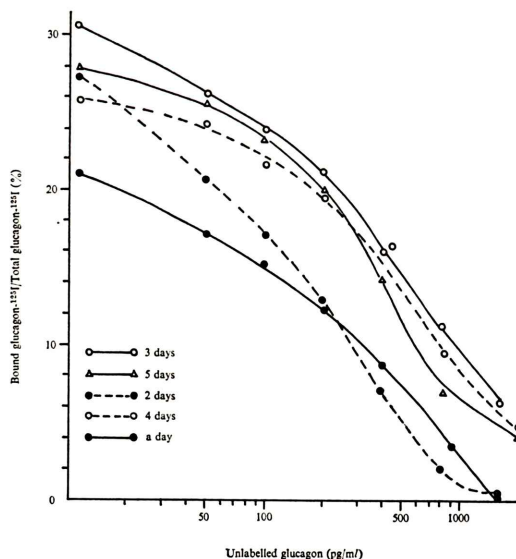


Fig. 1 Effect of first incubation times on standard curves. (Incubation temperature 4°C, second incubation time a day)

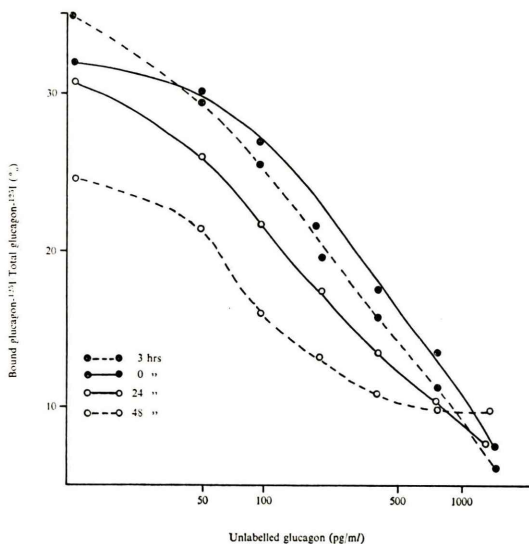


Fig. 2 Effect of delayed addition of ^{125}I -glucagon on standard curves. (First incubation for 3 days, second incubation for a day, incubation temperature 4°C)

0 pg/ml 点と 50 pg/ml 点, および 50 pg/ml 点と 100 pg/ml 点での B% にそれぞれ有意差 ($p < 0.05$) を認めた。

3. 稀釈曲線

IRG がそれぞれ 390, 895, および 1,120 pg/ml と高値を示したアルギニン (0.5 g/kg) 負荷数の糖尿病患者血清を glucagon free 血清で倍数稀釈し, assay 系に添加して求めた稀釈曲線は, 50 pg/ml から 1,600 pg/ml の間で, 標準曲線と比較的に良く平行した (Fig. 3)。

4. 再現性

内一 assay 内で平均 IRG が, 70, 168 および 335 pg/ml の血清を 4 本ずつ測定した時の変動係数は, それぞれ 6, 8 および 4%, 平均 $6.0 \pm 1.6\%$ であった (Table 1)。

異なった assay 間で, 平均 IRG が 200, 270 および 500 pg/ml の血清を 8 回繰り返して測定した時の変動係数はそれぞれ 7, 6 および 10%, 平均 $7.7 \pm 1.7\%$ であった (Table 1)。

5. 回収率

IRG 84 pg/ml の健常成人血漿に 62.5, 125, 250,

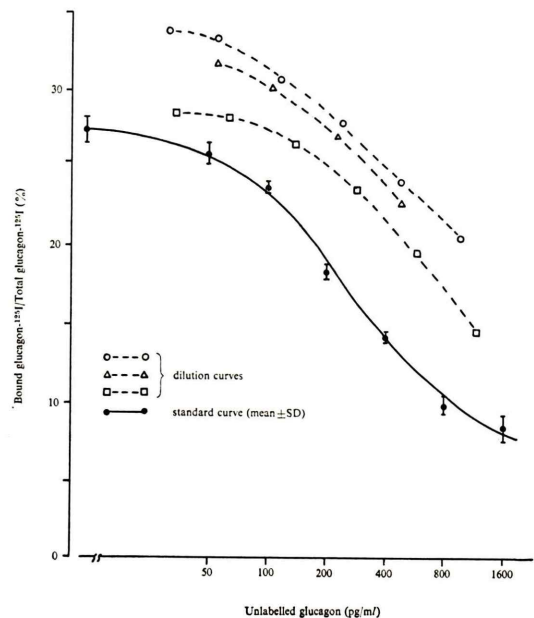


Fig. 3 Representative standard curve and dilution curves.

Table 1 Reproducibility (*mean \pm SD of duplicate determination).

Sample	IRG pg/ml	% C.V.
Within assay (N=4)		
A	70 \pm 4	6
B	168 \pm 14	8
C	335 \pm 13	4
Between assay (N=8)		
D	200 \pm 14	7
E	270 \pm 16	6
F	500 \pm 50	10

500 および 1,000 pg/ml の glucagon を添加したものを検体として, それぞれ 3 本ずつ本 assay 系で測定し, 求めた回収率はそれぞれ $57 \pm 20\%$, $122 \pm 34\%$, $93 \pm 19\%$, $112 \pm 14\%$ および $124 \pm 7\%$, 平均 $110 \pm 27\%$ であった。

6. ポリ試験管による測定値との比較

試験管にガラス製 (直径 14 mm \times 高さ 104 mm) あるいはポリエチレン製 (日本無線社, 直径 14 mm \times 高さ 83 mm) を使用した場合の標準曲線を比較した (Fig. 4)。2 つの標準曲線は平行せず,

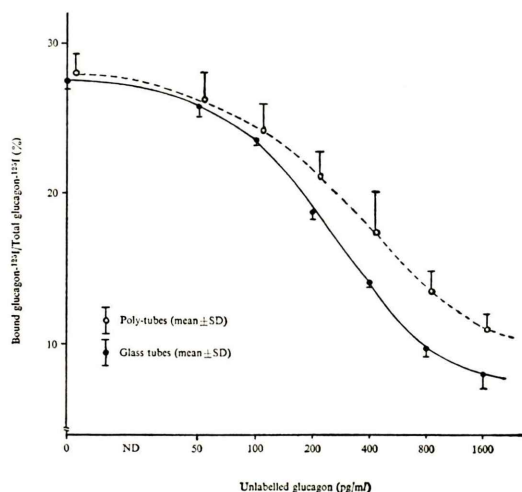


Fig. 4 Comparison of the standard curve obtained from using poly-tubes and glass-tubes.

glucagon 濃度が100 pg/ml 以上のとき明らかに解離した。ガラス試験管を使用している本 assay 系での測定値 (y) が 65~920 pg/ml であった血漿22本を、ポリ試験管を用いて再度測定し (x), 両者を比較したとき、回帰直線は $y=0.68x+22$, 相関係数+0.97 であり, ポリ試験管を用いた測定値は本アッセイ系での測定値より約30%高値であった。

7. 採血条件

採血後血漿分離迄の条件を 37°C, 室温 (22°C) および氷水中 (0°C) とし, それぞれ Trasylol (500 U/ml) を添加した時と, 添加しなかった時との測定値について検討した (Fig. 5). 採血後血液を37°C に保ち Trasylol を添加しなかった時, IRG は漸減し, 採血後直ちに血漿分離し測定した値に比べ, 2時間で約30%低下した。Trasylol を添加し, 室温あるいは氷水中に保てば採血後血漿分離までの時間が6時間以内であれば, 測定値に変化を認めなかった。

本研究では, 採血後直ちに Trasylol を加え, 氷水中に保ち3時間以内に血漿分離し, deep freezer 内で凍結保存し, 3カ月以内に室温で解かし測定することにした。

8. 測定値

健常成人86例での空腹時 IRG は 25~122 (62±

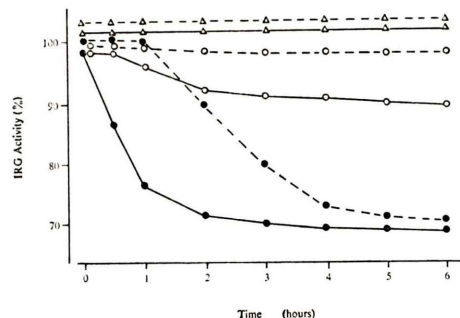


Fig. 5 Change of IRG Activity in human plasma with or without peptidase inhibitor (Trasylol) at different temperature. (●: 37°C, ○: room temperature, △: 0°C, —: without Trasylol, ---: with Trasylol)

35) pg/ml で, 性差, 加齢による差を認めなかった。健常成人男子ボランティア2例において, 安静臥床絶食状態で午前8時より午後2時迄, 30分毎に採血し測定した IRG は, 有意の変化を示さず, 変動係数は5% および11%であった。

健常成人 (11~72歳) 86例の空腹時 IRG は 62 ± 35 pg/ml であった。

人間ドックのため受診した17例 (48~55歳) に50gブドウ糖負荷を施行し, 血糖曲線が正常型を呈した3例の IRG は, 空腹時 96 ± 2 pg/ml で, 60分及び90分に有意な低下傾向を示した。境界型9例及び糖尿病型5例の空腹時 IRG は, それぞれ 104 ± 6 及び 111 ± 15 pg/ml で, ブドウ糖負荷後有意な低下傾向を認めず, 後者ではむしろ上昇する傾向を認めた (Table 2)。

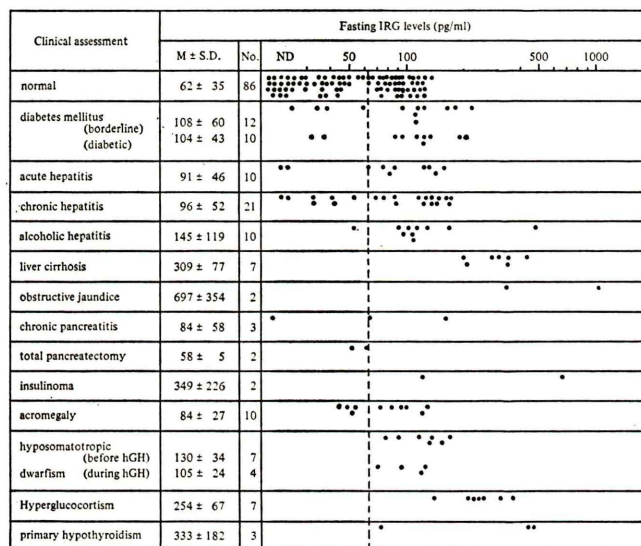
健常成人3例にアルギニン (0.5 g/kg) を30分間で点滴静注し, IRG を測定した。前, 30, 60, 90 および120分にそれぞれ 70 ± 35 , 351 ± 41 , 99 ± 12 , 100 ± 36 および 85 ± 42 pg/ml を得た。

この他の空腹時 IRG (Fig. 6) は, 急性肝炎10例で ND (12.5 として計算) ~160 (92 ± 46) pg/ml, 慢性肝炎21例で ND~75 (96 ± 52) pg/ml, アルコール性肝炎10例で 54~172 (145 ± 119) pg/ml, 肝硬変症7例で 207~355 (309 ± 77) pg/ml, 慢性膵炎3例で ND~163 (84 ± 58) pg/ml, 閉塞性黄疸2例で343および1054 (697 ± 354) pg/ml, 膵全摘術後2例で53および56 (58 ± 5) pg/ml, インスリンノーマ

Table 2 Plasma IRG, IRI levels following oral administration of 50 g glucose in 17 adults with BS response of normal, borderline and diabetic pattern.

Time	(minutes)	0	30	60	90
BS (mg/dl)	N*	96 ± 2†	128 ± 8	117 ± 10	80 ± 12
	B**	104 ± 6	158 ± 21	171 ± 23	125 ± 18
	D***	111 ± 15	180 ± 16	199 ± 25	179 ± 34
IRI (μU/ml)	N*	10 ± 4	19 ± 14	13 ± 7	11 ± 6
	B**	11 ± 3	25 ± 14	32 ± 16	26 ± 11
	D***	9 ± 4	16 ± 6	21 ± 8	17 ± 8
IRG (pg/ml)	N*	87 ± 7	84 ± 8	77 ± 7	74 ± 2
	B**	101 ± 51	99 ± 54	93 ± 46	95 ± 49
	D***	119 ± 51	128 ± 39	123 ± 44	117 ± 46

N*: Normal pattern (N=3), B**: borderline pattern (N=9), D***: diabetic pattern (N=5). †: mean ± S.D.

**Fig. 6** Fasting IRG levels.

2例は 123 および 675 (349 ± 226) pg/ml, 末端肥大症10例で 50~129 (84 ± 27) pg/ml, 特発性下垂体性こびと症未治療 7例で 78~174 (130 ± 34) pg/ml, hGH 治療中 4例で 71~127 (105 ± 24) pg/ml, グルココルチコイド過剰症 7例で 148~371 (254 ± 67) pg/ml, 甲状腺機能低下症 3例で 75~468 (333 ± 182) pg/ml であった。

V. 考 察

膵 glucagon の RIA において, 最大の問題点は, 使用する抗血清の特異性であり, 膵 glucagon の

みに特異的な抗血清は稀にしか得られない。本キットの抗血清 (OAL-123) は, トリプシン処理で作られたブタ/ウシ膵 glucagon¹⁹⁻²⁹ と牛血清アルブミンの結合物で家兔を免疫して得られた抗血清で, 食道並びに胃前庭部, 十二指腸, 小腸, 大腸等の各抽出物とほとんど反応せず, 膵, 胃底部および胃体部の各抽出物と反応し, 従来より供給されてきた特異抗体 30 K⁵⁾ に匹敵する特異性を有する抗血清である²⁰⁾。

Glucagon RIAでの first incubation time は, 4°C で 48~96 時間とするものが多く⁷⁻⁹⁾, また pre-

incubation を行った方が、低濃度域での精度が上昇することが指摘されているが^{9,10}、著者らはfirst incubation 3乃至4日間 (Fig. 1), pre-incubation 3時間 (Fig. 2) とした時、最も良い結果を得た。この際の標準曲線は 50 pg/ml から 1,600 pg/ml の間で軽度の sigmoid curve を描き、容量反応的に変化し、高濃度 glucagon 血清の稀釈曲線も、この間で標準曲線と比較的に良く平行した (Fig. 3)。従って本キットは、ヒト血漿 0.1 ml を直接用いて血漿中 glucagon 濃度を測定可能であり、最小検出感度は 50 pg/ml と推定された。これは伊東ら⁸⁾の 25 pg/ml、桜井ら¹¹⁾の 20 pg/ml、村田ら⁹⁾の 16 pg/ml、Sanke ら¹²⁾の 15 pg/ml、吉田ら⁷⁾の 5 pg/ml より高く、今後改良の必要性がある。各施設で報告されている RIA 系の再現性 (変動係数) は同一 assay 内で伊東ら⁸⁾ 5% 以下、村田ら⁹⁾ 1.9~5.4%、奥村ら¹⁰⁾ 4 および 14.1%、著者ら 10~19%、異なった assay 間では伊東ら⁸⁾ 7.1~21.1%、村田ら⁹⁾ 6.3~11.3%、著者ら 6~10%、回収率は桜井ら¹¹⁾ 83~121%、村田ら⁹⁾ 86~106%、Shima ら¹³⁾ 46~89%、著者ら 57~122% であり、ほぼ満足しうると考える。

著者らは、ガラス製試験管を用いたが、ポリ試験管を用いた時の測定値はこれより有意の高値であり、本アッセイ系では使用する器具による影響も無視できない (Fig. 4)。

Eisentraut ら¹⁸⁾は、標識 glucagon による incubation damage は、Trasylol 500 U/ml の添加によってほぼ完全に克服されると報告している。著者らは血液を氷水中に保つことで、採血後6時間迄は glucagon の分解をほぼ完全に阻止しうる結果を得たが (Fig. 5)、血漿保存中や解凍時の分解を防止するために、Trasylol の添加は必要であると考えた。

健康成人における空腹時血中 IRG 値は、用いた assay 系によって多少異なり、著者らは ND~127 (62±35) pg/ml で、伊東ら⁸⁾ 77±29 pg/ml、桜井ら¹¹⁾ 67±10 pg/ml、森田ら¹⁴⁾ 53±20 pg/ml とほぼ一致し、奥村ら¹⁰⁾ 132±82 pg/ml に比べ低値、吉田ら⁷⁾ 12~96 (37±23) pg/ml、Weir ら¹⁹⁾ 25~60

(43±12.3) pg/ml に比べ高値であった。又、著者らは健康成人2例について、安静臥床絶食状態で午前8時より午後2時まで30分毎に採血し測定した IRG に有意の変化を認めず、アルギニン負荷で増加し、ブドウ糖負荷で低下する傾向を認めた。

本研究では、ドックで発見された一次性成人型糖尿病で、既に空腹時 IRG が軽度高値であり、ブドウ糖負荷後、正常者では IRG は前値に比べ低下するのに対し、本症では低下せず、むしろ逆に増加する傾向を認めた (Table 2)。こうした IRG 分泌調節機序の異常は、既に諸家により報告されており^{8,12,15,16)}、本症の増悪に働いている可能性が指摘されている。Sanke ら¹²⁾、Matsuyama ら¹⁷⁾ は、これが gut glucagon であることを示唆している。

二次性糖尿病の発生機序は非常に heterogenous であるが、一次性糖尿病と内様に、IRG の異常がみられる。

慢性膵炎での空腹時 IRG は、森田ら¹⁴⁾ 103±28 pg/ml、著者ら ND~163 (84±58) pg/ml とほぼ正常であるが、ブドウ糖負荷後膵性糖尿病では IRI 反応が低下し、IRG は健康人と内様に低下するが、耐糖低下が同程度な一次性成人型糖尿病では、IRI 反応は健康人と同程度に分泌され、IRG 分泌はむしろ増加する点で異なる事が示されている¹⁴⁾。

肝硬変症では糖代謝障害が認められ、insulin 治療にも抵抗する事は周知の通りであるが、本症における空腹時 IRG 値は、森田ら¹⁴⁾ 224±38 pg/ml、小笠原ら²¹⁾ 240±186 pg/ml、Sherwin ら²²⁾ 243±41 pg/ml、著者ら 309±77 pg/ml といずれも高値が報告されている。本症での高 glucagon 血症はアンモニア耐性の低下や²²⁾門脈一大循環副行路の存在と相関すること²³⁾から、代謝低下による可能性が指摘されているほか、glucagon 分泌が正常の2~3倍に増加²³⁾していることより、高グルカゴン血症をきたしている可能性についても報告されている。

グルココルチコイド過剰症における空腹時 IRG 値は、清野ら²⁴⁾ 153±28 pg/ml、Wise ら²⁵⁾ 169±28 pg/ml、著者ら 254±67 pg/ml といずれも高値

であり, その原因として Wise らは, 蛋白異化亢進の結果生じた高アミノ酸血症による可能性を指摘している²⁵⁾.

下垂体性こびと症の空腹時 IRG は, 清野ら²⁶⁾ 175 ± 21 pg/ml, 著者ら 119 ± 44 pg/ml といずれも高値で, ブドウ糖負荷後に増加すること²⁶⁾が報告されているが, 本研究では hGH 治療中にもブドウ糖負荷試験を行ったところ, IRG 分泌が正常に近づいており, hGH 欠損に起因する可能性が示唆された.

成長ホルモン過剰症における空腹時 IRG は, 清野ら²⁶⁾ 181 ± 38 pg/ml, 著者ら 84 ± 27 pg/ml と正常乃至高値であり, ブドウ糖負荷ではむしろ上昇する傾向も報告され²⁶⁾, 過剰な成長ホルモンの持続刺激により膵 glucagon や gut glucagon 分泌能に変化が生じている可能性も考えられるが, 尙お明らかではなく, 今後追究すべき課題である.

VI. ま と め

抗ブタ/ウシ膵 glucagon¹⁹⁻²⁹ 家兎血清 (OAL-123) を先いる glucagon RIA キット (Dainabot) について検討し, 次の結果を得た.

1. 本測定法ではガラス試験管(直径 14 mm, 高さ 104 mm)を用い, 標準血清又は被検血漿 0.3 ml を入れ, 抗膵 glucagon 抗体¹⁹⁻²⁹ (最終稀釈 15 万倍) を混じ, 最終液量は 0.25% BSA と 0.01M benzamidine を含む borate buffer (pH 8.6) で 0.8 ml に調整し, 4°C で 3 時間 pre-incubation 後, ¹²⁵I-glucagon (200 mCi/mg) 溶液 0.1 ml を加え, さらに 4°C で 3 日間 incubation し, 抗家兎 γ -globuline 山羊血清溶液 0.3 ml を添加し, 傾斜法で B・F 分離した.

2. 最小検出量は 50 pg/ml であり, 50 pg/ml から 1,600 pg/ml の濃度まで良好な容量反応曲線が得られた. 同一 assay 内での変動係数は $6.0 \pm 1.6\%$ (M \pm SD), 異なった assay 間では $7.7 \pm 1.7\%$, 回収率は $110 \pm 27\%$ であった.

3. 本アッセイ系は種々の病的状態における IRG 分泌動態を検討可能であり, 臨床上有用と考えた.

稿を終えるにあたり, ご協力いただいた周防内科医院 (院長 周防俊成先生) に深謝致します. 本稿要旨の一部は, 日本臨床病理学会第25回中国四国地方会総会および第53回日本内分泌学会総会において発表した.

文 献

- 1) Kimball CP, Murlin JRV: Aqueous extracts of pancreas. *J Biol Chem* **58**: 337-346, 1923
- 2) Staub A, Sinn LG, Behrens OK: Purification and crystallization of glucagon. *J Biol Chem* **214**: 619-632, 1955
- 3) Bromer WW, Sinn LG, Staub A, et al: The amino acid sequence of glucagon. *J Am Chem Soc* **78**: 3858-3860, 1956
- 4) Makman MH, Sutherland EW: Use of liver adenyl cyclase for assay of glucagon in human gastrointestinal tract and pancreas. *Endocrinology* **75**: 127-134, 1964
- 5) Unger RH, Eisentraut AM, McCall MS, et al: Glucagon antibodies and their use for immunoassay for glucagon. *Pro Soc Exp Biol Med* **102**: 621-623, 1959
- 6) Ohneda A, Yamagata S: Evidence for the presence of inhibitor and some trials for its prevention in radioimmunoassay of plasma glucagon by two-antibody system. *Tohoku J Exp Med* **103**: 257-268, 1971
- 7) 吉田隆司, 豊島博行, 野中共平, 他: 血漿膵グルカゴン測定における Correction factor の導入. *糖尿病* **18**: 156-163, 1975
- 8) 伊東義智, 鬼原 彰: 血漿膵グルカゴンの Radioimmunoassay の基礎的検討と, 糖尿病ならびに肝障害に関連する臨床的, 実験的研究. *札幌医誌* **46**: 200-213, 1977
- 9) 村田和平: Glucagon の Radioimmunoassay における基礎的検討. *核医学* **15**: 959-968, 1978
- 10) 奥村一忠, 杉山 理, 小沢高将, 他: 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. *核医学* **16**: 969-976, 1979
- 11) 桜井英雄, 倉八博之, 井村裕夫: 膵グルカゴンのラジオイムノアッセイによる測定. *Diabetes J* **1**: 40-42, 1973
- 12) Sanke T, Kondo M, Nanjo K, et al: Plasma pancreatic glucagon response to oral glucose load in diabetic patient. *Wakayama Med Rep* **19**: 161-168, 1976
- 13) Shima K, Foa PP: A double antibody assay for glucagon. *Clin Chim Acta* **22**: 511-520, 1968
- 14) 森田宣人, 早川浩之, 河合昂三, 他: 各種疾患における血漿グルカゴン動態. *Radioisotopes* **27**: 183-187, 1978
- 15) 後藤康生, 清野 裕, 田港朝彦, 他: 一次性糖尿病

ならびに内分泌疾患における治療経過中の膵グルカゴン反応の推移. 糖尿病 19: 277-284, 1976

- 16) Seino Y, Goto Y, Kurahachi H, et al: Alteration of plasma glucagon response to arginine after treatment in patients with Diabetes Mellitus, Cushing's Syndrome and Hypothyroidism. *Horm Metab Res* 9: 28-32, 1977
- 17) Matsuyama T, Hoffman WH, Dunbar JC, et al: Glucose, insulin, pancreatic glucagon and glucagon-like immunoreactive materials in the plasma of normal and diabetic children. Effect of the initial insulin treatment. *Horm Metab Res* 7: 452-456, 1975
- 18) Eisentraut AM, Whissen N, and Unger RH: Incubation damage in the radioimmunoassay for human plasma glucagon and its prevention with "Trasylol". *Am J Med Sci*: 137-142, 1968
- 19) Weir GC, Turner RC, Martin DB: Glucagon radioimmunoassay using antiserum 30K Interference by plasma. *Horm Metab Res* 5: 241-244, 1973
- 20) Yanaihara N, Nishino T, Kodaira T, Imagawa K, Nishida T, Mihara S and Yanaihara C: International Congress Series Proinsulin, insulin, C-peptide 468 Baba S Kaneko T Yanaihara N. eds. *Excerpta medica*, Amsterdam-Oxford, North-Holland, 1979, p. 426-431
- 21) 小笠原徹也, 鬼原 彰: 肝疾患における膵内分泌機能, とくに α 細胞機能に関する研究. 日本消化器病学会雑誌 75: 664-673, 1978
- 22) Sherwin R, Joshi P, Hendler R, et al: Hyperglucagon in Laennes's cirrhosis. *N Engl J Med* 290: 239-242, 1974
- 23) Sherwin RS, Fisher M, Besoff J, et al: Hyperglucagonemia in cirrhosis. Altered secretion and sensitivity to glucagon. *Gastroenterology* 74: 1224-1228, 1978
- 24) 清野 裕, 田港朝彦, 後藤康生, 他: 各種内分泌疾患, 肝疾患, 肥満症におけるアルギニン負荷時の膵グルカゴンならびにインスリン反応. 糖尿病 18: 121-127, 1975
- 25) Wise JK, Hendler R, Felling P: Influence of Glucocorticoids on glucagon secretion and plasma amino acid concentration in man. *J Clin Invest* 52: 2774-2787, 1973
- 26) 清野 裕, 田港朝彦, 後藤康生, 他: 末端肥大症, 成長ホルモン単独欠損症におけるグルカゴン分泌動態. 糖尿病 20: 76-81, 1977