

《ノート》

グルカゴンキット「第一」の使用経験

Fundamental and Clinical Studies of "Glucagon KIT [Daiichi]"

安達 秀樹* 高坂 唯子* 野口 正人* 吉井 正雄*

鳥塚 莞爾* 川瀬 満雄**

Hideki ADACHI, Tadako KOUSAKA, Masato NOGUCHI, Masao YOSHII,
Kanji TORIZUKA and Mitsuo KAWASE

*Department of Radiology and Nuclear Medicine, Faculty of Medicine, Kyoto University

**Department of Internal Medicine, Fukui Red Cross Hospital

I. 緒 言

グルカゴンの Radioimmunoassay は、同様に胰ラ氏島に存在し糖代謝に関わるホルモンであるインスリンの Radioimmunoassay と異なって、抗体作製の困難さに加えて腸管に広く分布するグルカゴン様活性物質が免疫活性においても交叉反応を示すことや、グルカゴン自体の不安定性など、多くの問題点を指摘されてきた。胰グルカゴンに対する特異性の高い抗体の作製と、それによる Radioimmunoassay については、1968~1971 年頃に Unger ら 2, 3 の研究者によって報告され^{1,2,3)}、今日我国での胰グルカゴン測定には Unger らによつて作製された抗体が汎用されていることは周知のこととおりである。

今回、我々は第一ラジオアイソトープ研究所によつて完成されたグルカゴン測定キットを使用する機会を得たので、その検討成績を報告する。

1. 測定原理と測定方法

1) 測定原理

* 京都大学医学部放射線核医学科

** 福井赤十字病院内科

受付：55年4月18日

最終稿受付：55年6月17日

別刷請求先：京都市左京区聖護院川原町 54 (番号 103)

京都大学医学部附属病院 放射線核医学科
安達秀樹

今回検討したキットの測定原理は通常の放射免疫測定法のそれに基づくものである。B と F の分離は 2 抗体法を基礎に、沈澱安定剤を使用して第 2 反応が短時間で終了する様に工夫されている。グルカゴンは比較的不安定であるので血液試料の採取にあたっては トラジロール (100 KIU/ml), EDTA・2Na (1 mg/ml) を併用し、1 回の測定分ずつに分注して -20°C で保存する。

2) キットの構成

本キットの構成は以下の如くである。

- i) RIA 用緩衝液 (凍結品) 20 ml
6 倍希釈で使用
- ii) ¹²⁵I-グルカゴン (凍結乾燥品)
RIA 用緩衝液 10 ml で溶解
- iii) 標準グルカゴン溶液 (凍結品)
4000 pg/ml 溶液 2 ml
RIA 用緩衝液にて倍々希釈
- iv) グルカゴン抗血清 (凍結乾燥品)
RIA 用緩衝液 10 ml で溶解
- v) 抗家兎 γ -グロブリン山羊血清 (凍結乾燥品)
RIA 用緩衝液 10 ml で溶解
- vi) グルカゴン RIA 用沈澱安定剤 (デキストラン 6.5% 溶液…凍結品)
解凍し 4°C で使用

Key words: Glucagon, Radioimmunoassay, Unger 30 K, 50 g OGTT

標準グルカゴン溶液は(iii)の4000 pg/ml 溶液をRIA用緩衝液で倍々希釈して、それぞれ4000, 2000, 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.3, 15.6 pg/ml 溶液各1mlを調整する。

3) 測定方法

- i) グルカゴン標準液又は被検血漿0.2mlを1対の試験管にとる。
- ii) 試験管に0.4mlのRIA用緩衝液を加える。
- iii) 各試験管に¹²⁵I-グルカゴン溶液0.1mlを加える。(別に総放射能測定用試験管3本にも同溶液0.1mlを加える)。
- iv) 各試験管にグルカゴン抗血清溶液0.1mlを加え、充分に振盪する。
- v) 4°Cにて48時間放置する。
- vi) 各試験管に抗家兎γ-グロブリン山羊血清0.1mlを加え充分に振盪する。
- vii) 更に各試験管に沈殿安定剤0.4mlを加え振盪した後、4°C, 30分間放置する。
- viii) 各試験管を4°C, 2000Gで30分間遠心分離する。
- ix) 上清を吸引除去した後、各試験管の放射能をウエル型シンチレーションカウンターで測定する。

II. 検討の方法

1) 基礎的検討

標準曲線の再現性、測定値の再現性、回収率、希釈試験、B/F 分離法について検討した。

2) 臨床的検討

正常人及び糖尿病患者における経口50g糖負荷試験及びアルギニン負荷試験時の血漿サンプルを対象とした。

又、本キットで測定される血中グルカゴン値の脾特異性を検討するためにUngerらの30K抗体による測定値との比較を行うと共に脾全摘患者2例におけるアルギニン負荷試験時の測定値についても検討した。30KはHoechst社より入手した30K Lot 7を用いた。抗体の最終希釈は20万倍とした。本キットの抗グルカゴン抗体は、第2抗体での沈殿を充分におこす様に2.5% (v/v) の正常

家兎血清を含む溶液で希釈されているので、30Kの希釈にも2.5% (v/v) の正常家兎血清を含むRIA用緩衝液を用い、これを本キット測定法(iv)の本キット抗体の代りに用いた。

以下の文中及び表中の数値は特記したもの以外は全て、平均±標準誤差で記載した。

III. 結 果

1) 基礎的検討

標準曲線の再現性

標準曲線は、グルカゴン濃度15.6~4000 pg/mlの間でsigmoid curveを示し、13回の測定における各グルカゴン濃度のB/Bo値の変動係数はいずれも10%以下で良好な再現性が得られた(Fig. 1)。

Bo/T%は41.56±0.26であった。グルカゴン濃度15.6 pg/mlにおいて、B/Bo値で7.9±0.40%の結合抑制が認められ、この抑制はp<0.01で有意であった。

測定値の再現性

グルカゴン濃度の異なる血漿について同一キット内及び異なるキット間の測定値の平均値、標準偏差、変動係数をTable 1に示す。

同一キット内での3種類の血漿サンプルのそれぞれ12回の測定値の変動係数は4.0~7.4%，異なる

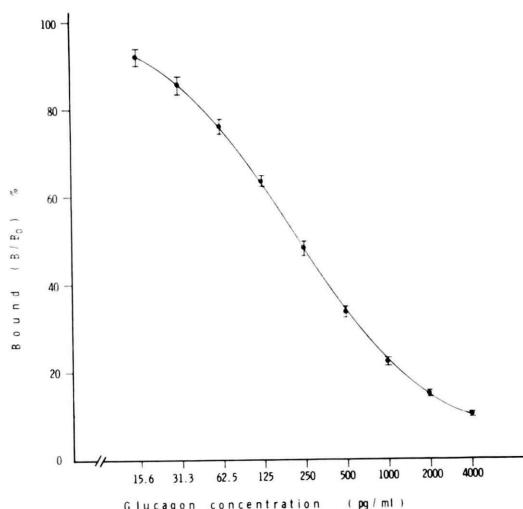


Fig. 1 Reproducibility of standard curve.

Table 1 Reproducibility of the measured values

(a) Intra-assay variability

Serum	No.												Mean	S.D.	C.V. (%)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
1	49	46	50	50	50	59	54	54	51	45	53	53	51.2	3.8	7.4
2	203	198	193	208	187	186	211	206	195	201	202	205	199.6	8.0	4.0
3	388	391	351	409	388	403	373	373	356	346	349	333	372.0	24.0	6.5

(b) Inter-assay variability

Serum	No.						Mean	S.D.	C.V. (%)
	1	2	3	4	5	6			
1	67	52	59	69	63	68	63.0	6.5	10.4
2	204	213	203	232	190	207	208.2	13.9	6.7
3	446	399	403	462	437	484	438.5	33.2	7.6

Table 2 Recovery tests

	Glucagon values obtained (% recovery)		
	Glucagon added (pg/ml)		
	125	500	2000
1) 34 pg/ml	Measured	165	601
	Recovered	131	567
	Recovery (%)	(104.8)	(113.4)
2) 98 pg/ml	Measured	246	700
	Recovered	148	602
	Recovery (%)	(118.4)	(120.4)
% mean recovery 111.0%			

るキット間での3種類の血漿サンプルのそれぞれ6回の測定値の変動係数は6.7~10.4%であった。

回収率

グルカゴン濃度既知の2種類の血漿サンプルに、標準液から3濃度のグルカゴンを加え測定し回収率を求めた(Table 2)。平均回収率は $111.0 \pm 2.0\%$ であった。

希釈試験

グルカゴン高値を示した3種類の血漿について、RIA用緩衝液を用いて倍数希釈して得られた希釈曲線は、標準曲線に対して良好な平行性を示した(Fig. 2)。

B/F 分離法について

本キットでは沈殿安定剤を用いて第2反応を30分で終了させているが、従来よく用いられた第2抗体のみによる反応を 4°C 、24時間行ってそのま

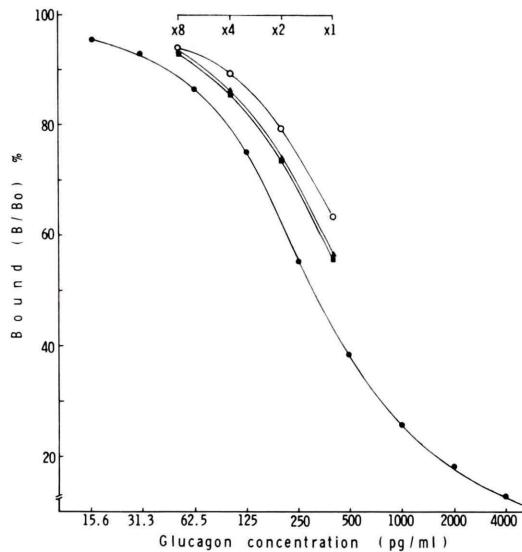


Fig. 2 Dilution curves.

ま遠心分離した場合との比較検討の結果を(Fig. 3)に示す。標準曲線は両者共にほぼ同一であり、それぞれの方法によって分離された同一血漿サンプルの測定値もほぼ一致した。

2) 臨床的検討

経口50g糖負荷試験

正常耐糖能を示した22例の血中グルカゴンの経時変動を、前値を100%として表すとFig. 4の如くになる。これら22例の負荷前血中グルカゴン値は $79.7 \pm 7.2 \text{ pg/ml}$ であった。経時変動は負荷後60分で前値の $77.1 \pm 3.3\%$ と最低値をとり、以後漸増して180分では負荷前値に復した。これに対して、糖尿病型血糖曲線を示した17例の負荷前血中グルカゴン値は $90.4 \pm 9.8 \text{ pg/ml}$ であった。この17例中6例においては血中グルカゴン値は、糖負荷によって減少せず、むしろ増加する傾向が見られた(Fig. 5)。他の11例では、糖負荷によって血中グルカゴンは減少し、負荷後90分を最低値とする変動パターンを示した。糖負荷後に血中グルカゴンが上昇する群ではRIA法で測定した血中インスリンの30分値と基礎値の差(ΔIRI)と血糖30分値と基礎値の差(ΔBS)の比率 $\Delta IRI/\Delta BS$ (30分)値は0.12~0.62の間にあったが、血中グルカゴンが減少する群では、同値が0.1以下のものが

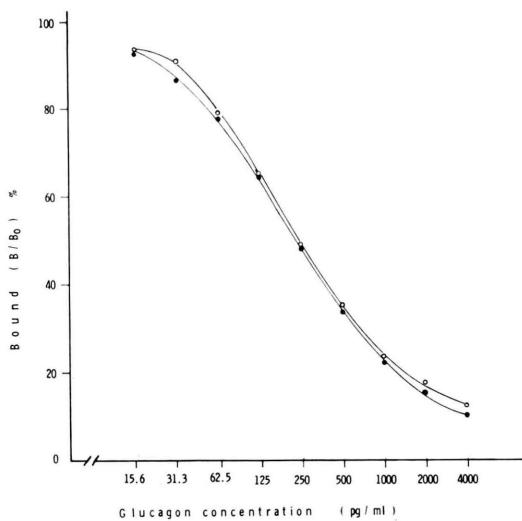


Fig. 3 Effect of the change of B/F separation method on the measured values.

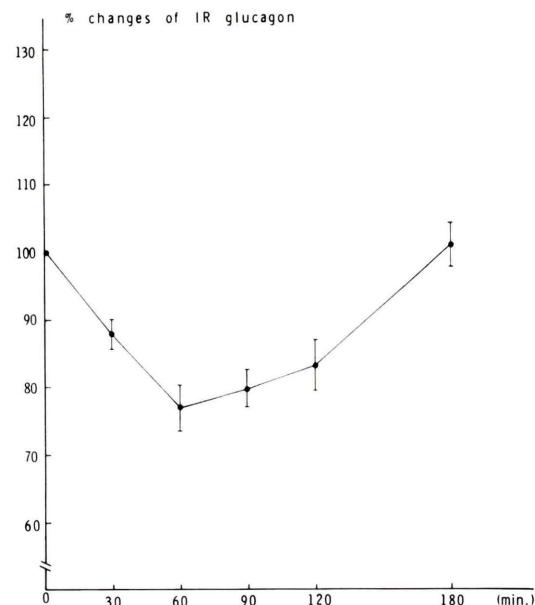


Fig. 4 Changes of serum glucagon level in normal subjects after 50 g OGTT.

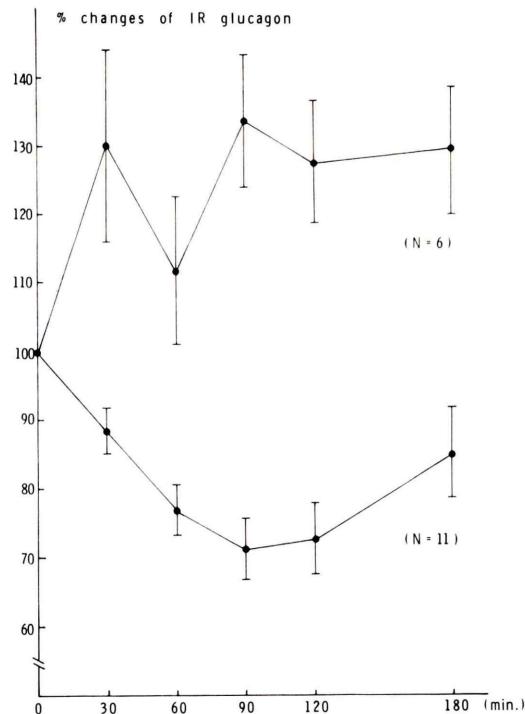


Fig. 5 Changes of serum glucagon level in diabetics after 50 g OGTT.

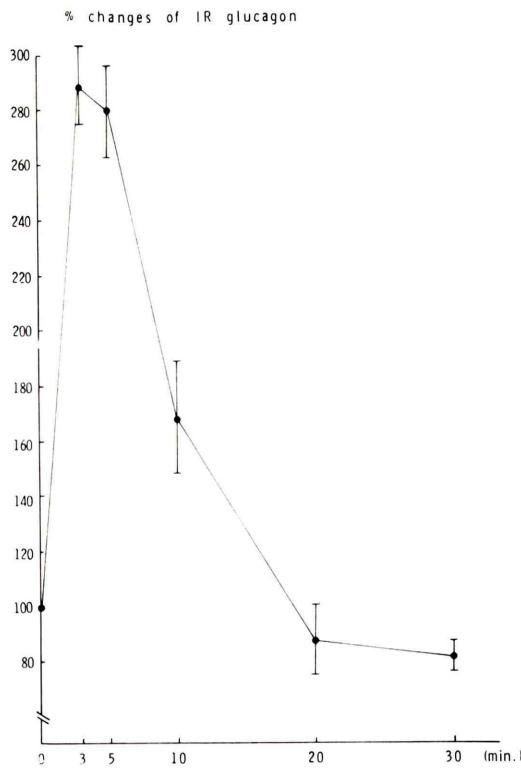


Fig. 6 Changes of serum glucagon level in normal subjects after venous administration of Arginine.

多くみられた。

アルギニン負荷試験

4 g のアルギニンを正常人 4 名を静脈内投与した場合の血中グルカゴンの変動を Fig. 6 に示す。静注終了後 3 分で前値の $289.1 \pm 38.8\%$ と頂値をとり以後漸減して 20 分後には前値を下まわった。

これに対して脾全摘患者においては同様のアルギニン負荷試験によって血中グルカゴン値は全く上昇せず、基礎値も正常者に比べて明らかな低値を示した。

30 K による測定値との比較

30 K 抗体 Lot 7 (Hoechst) を最終希釈 20 万倍で本キット抗体に代えて用いることによって、本キット抗体と同等の $Bo/T\% (49.66 \pm 3.36\%)$ が得られ、その標準曲線の最小検出感度も 15.6 pg/ml で本キット抗体と同等であった。48例の血漿サンプルの両抗体系による測定値を Fig. 8 に示す。縦軸

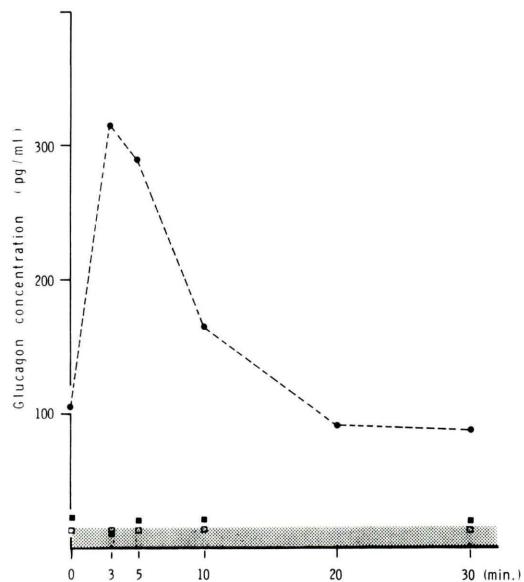


Fig. 7 Changes of serum glucagon level in totally pancreatectomized patients after venous administration of Arginine.

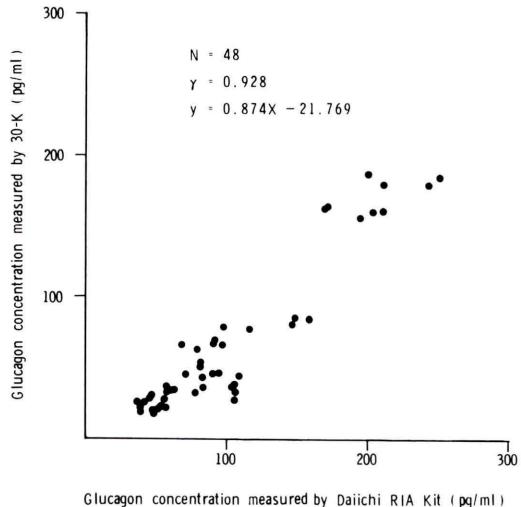


Fig. 8 Comparison of the measured values between Glucagon Kit Daiichi and 30 K Antibody.

の 30 K による測定値は本キットによる測定値よりも低い傾向がみられた。両測定系による測定値間の相関係数は $r=0.928$ で良好な相関が得られた。

又、血中グルカゴン低値 (20 pg/ml 以下) 血漿

に本キットの標準グルカゴンを加えて本キット内測定値 345~1314 pg/ml の値が得られた16検体の 30 K 抗体による測定値との相関は $r=0.976$, $Y=0.939X-49.1$ であった。

IV. 考 案

Unger らによって膵グルカゴンに対する特異性の高い抗体が作製されて以来、様々な糖代謝異常における血中グルカゴンの変動について数多くの報告がされてきた。緒言にも述べた様に、今日我国におけるグルカゴンの RIA には Unger らの 30 K 抗体が汎用されているのであるが、多くの施設ではトレーサーグルカゴンも購入しなければならない等、やや繁雑な点が多かった。本キットに用いられた ^{125}I -グルカゴンは、Bo/T 値・標準曲線の良好な再現性や非特異的結合の低さなどからみると、RIA のトレーサーとして充分に優れたものであると考えられ、これを用いて得られる標準曲線の最小検出感度 15.6 pg/ml は臨床上よく行われる糖負荷試験の際の血中グルカゴンの下降を充分に追跡できるもので、満足すべき最小検出感度と考えられる。

同一検体の測定値の再現性は、本キットに添付された注意の如くにトラジロール、EDTA を用いて採血し、 -20°C に保存する限りにおいては良好であった。しかしながら、グルカゴンと多くの構造類似性をもつセクレチンでは凍結乾燥粉末の状態で -20°C 保存しても、一年後にはその免疫活性が低下することが報告されており⁴⁾、余り長期間の保存は望ましくないと思われる。標準グルカゴンを加えた場合の回収率は良好で、本測定系は膵グルカゴンを充分に測定し得ると考えられる。

本キットでは第2反応に沈澱安定剤が用いられているが、この方法で B/F 分離を行った場合と、二抗体法のみによって B/F 分離を行った場合の成績を比較すると、得られる標準曲線は殆んど同一で、同一サンプルの測定値にも有意の変化は認められなかった。従って本キットの方法で沈澱安定剤を用いて第2反応を30分に短縮しても、充分信頼性のある測定値が得られるものと考えられる。

次に本キットの RIA 用緩衝液で高値血漿を倍数希釈して得られる希釈曲線は標準曲線とよく平行し、本キットで測定された測定値は膵グルカゴンと同一の免疫活性を表現していると考えられた。

臨床的検討は、糖負荷試験を中心に行った。正常者では 50 g 経口負荷によって、60 分値を最低値とする血中グルカゴンの有意の低下が認められたのに対して、糖尿病群ではその約 1/3 に血中グルカゴンの上昇を認めた。残りの 2/3 の糖尿病群では血中グルカゴンは糖負荷によって低下したが、その最低値は 90 分でみられ 180 分後にも正常者と異なって負荷前値に復さない傾向が認められた。

上述の二群の糖尿病例の内、グルカゴン上昇型の患者の $\Delta\text{IRI}/\Delta\text{BS}$ (30分) 値は 0.12~0.62 であったのに対し、グルカゴン低下型の患者の中には同値が 0.1 以下のものが多くみられた。この血中グルカゴン上昇反応は従来から言われた糖尿病患者における糖負荷時の血中グルカゴンの paradoxical response に相当するものと考えられ糖尿病状態における糖調節ホルモンの複雑な関与の一端を表現しているものと考えられる。これらの成績は、糖尿病の様々な状態に関する膵グルカゴンの変化を、本キット測定値がよく反映していることを示すものと考えられた。

本キット 测定値と、膵グルカゴン特異抗体とされる 30 K 抗体による測定値の間には良好な相關係数が得られたが、30 K 抗体を使用した場合の測定値は、本キットによる測定値に比べ殆んどの例で低値を示した。しかしながらグルカゴン低値血漿に、本キットの標準膵グルカゴンを添加して測定した場合にも 30 K による測定値は本キットによる測定値よりも低値となった。この二つの場合の相関式から得られた相関係数は、両測定値が良好な相関関係にあることを示している。従って本キット系におけるグルカゴン測定値の高値は、本キット抗体及び 30 K 抗体とトレーサーグルカゴンの結合に対する血漿の非特異的結合抑制が本キット抗体に対してより強く働いた結果と考えられ、30 K 抗体で測定されない特異的グルカゴン様免疫活性を本抗体が測定した結果ではない

と思われる。このことは膵全摘患者におけるアルギニン負荷試験時の血中グルカゴン値を本キットにて測定した場合の測定値が殆んど測定感度以下であり、正常者にみられる様な有意の上昇を示さないことによっても裏付けられる。以上の成績からすると、本キットによって測定された血中グルカゴン値は、少くとも臨床的によく用いられる糖負荷試験やアルギニン負荷試験時の血漿サンプルについては、従来汎用されてきた 30 K 抗体によるグルカゴン値と極めて近いものが得られていると考えられる。

V. 結 論

グルカゴンキット「第一」によるグルカゴンの Radioimmunoassay について基礎的及び臨床的検討を行った。

- (1) 本キットの ^{125}I -グルカゴンは充分に精製されており、Bo/T 値、標準曲線は良好な再現性を示した。
- (2) 本キットによる測定値の再現性・回収率・

希釈試験はいずれも満足すべき値を示し、Radioimmunoassay の基礎的必要条件を充分満たすものと考えられた。

(3) 本キットによって測定された血中グルカゴン値は様々な糖尿病の病態をよく反映するものと考えられた。

(4) 本キットによる血中グルカゴン値は 30 K 抗体によるグルカゴン値と良好な相関を示した。

文 献

- 1) Aguilar-Parada E, Eisentraut AM and Unger RH: Pancreatic secretion in normal and diabetic subjects. Amer J Med Sci 257: 415, 1969
- 2) Samols E, Tyler JM and Mialhe P: Suppression of pancreatic glucagon release by the hypoglycemic sulphonylureas. Lancet 1: 174, 1969
- 3) Heding LG: Radioimmunological determination of pancreatic and gut glucagon in plasma, Diabetologia 7: 10, 1971
- 4) Boden G, Dinoso VP and Owen OE: Immunological potency and stability of native and synthetic secretins. Gastroenterol 67: 1119, 1974