グルカゴン分解活性について

山形大学医学部第3内科学教室

(主任: 佐々木英夫教授)

若 杉 和 義

Glucagon Degrading Activity

Kazuyoshi WAKASUGI

The Third Department of Internal Medicine,

Yamagata University School of Medicine,

Yamagata 990-23, Japan

(Director: Prof. Hideo Sasaki)

To evaluate the effect of glucagon degrading activity (GDA) on radioimmunoassay (RIA) of glucagon, I measured GDAs in plasma, serum, lysed red blood cells (RBC), and suspension of mononuclear cells and granulocytes. Serum levels of GDA in patients with various diseases were also examined.

1. Serum GDA values in normal subjects (control) measured by TCA precipitation method were $4.6 \pm 2.2\%$ (mean $\pm$ S.D.). GDA values in plasma treated with citrate and those in serum treated with aprotinin were not different from those in nontreated serum. GDAs in plasma treated either with EDTA and aprotinin or with EDTA alone were significantly lower than those in control serum, but the values in plasma treated with heparin were markedly higher than those in control serum.

2. GDAs in RBC lysate and suspension of mononuclear cells and granulocytes remained low up to the concentration of 23×10^4 RBC/ μ l and 5000 mononuclear cells or granulocytes/ μ l, respectively. GDAs in RBC lysate and mononuclear cells were markedly suppressed by the treatment with EDTA, whereas GDAs in granulocytes were inhibited by the treatment with aprotinin.

3. Markedly high values of GDA were obtained in serum of patients with pancreas diseases, liver diseases, renal diseases and hyperthyroidism. However, in four patients these elevated levels were restored to normal value after recovery from these disorders. The elevated GDA values in serum were suppressed to normal value by the addition of EDTA and aprotinin.

4. On Bio-Gel P-6 column chromatography, 125 I-glucagon incubated with patient serum containing high GDA values revealed several peaks eluted after 125 I-glucagon.

5. In healthy subjects, immunoreactive glucagon (IRG) levels in nontreated serum were not different from those in plasma treated either with EDTA and aprotinin or with heparin.

6. In patients showing high serum GDA levels, serum GDA levels were not significantly related to IRG levels in plasma treated with EDTA and aprotinin.

These results indicate that a series of treatment of blood samples before assay: addition of EDTA and aprotinin to the blood samples, immediate separation of plasma from blood cells, and storage at 4°C is recommended to avoid breakdown of glucagon by GDAs.

緒 言

Radioimmunoassay (RIA) の発展により次々と微量ホルモンの測定が可能となってきた。血中ホルモンの RIA では安定した値を示すものが多いが、一方では測定値がばらつき不安定さが指摘されているホルモンも少なくない。殊にグルカゴンは、protease により分解されやすく、他のペプチドホルモンより不安定であることが臨床上大きな問題であり、これを防ぐ工夫が色々となされてきた。これまで分解活性を防ぐため採血するにあたっては金属イオン protease inhibitor である ethylene-diamine tetraacetic acid 2Na 塩 (EDTA) のほか、serine protease inhibitor である aprotinin⁷⁾ または、benzamidine⁸⁾などが単独または併用で用いられ、採血後もただちに 4°C で血漿を分離し、測定まで -20°C で保存することなどが重要とされてきた。

グルカゴン分解活性 (Glucagon degrading activity, GDA) は従来肝¹⁾、腎⁶⁾、筋⁵⁾に存在することが知られており、そのためこれらの臓器はグルカゴンを分解する主要臓器と考えられてきた。最近、膵外グルカゴンとして注目されていた唾液腺グルカゴン²⁾⁴⁾¹²⁾が、実はグルカゴンを抽出する際に混入する GDA によることが判明した¹⁶⁾¹⁷⁾。即ち、GDA が RIA に際して標識グルカゴンを分解し、抗体と結合しない count を増す結果、グルカゴンの測定値が見かけ上大きくなることが確認された。血中 GDA に関しても、その本体はまだ明らかでないが RIA に対する影響が大きい点で注目されている。

例えば、四塩化炭素肝障害ラットで見られる高グルカゴン血症は、従来行われている EDTA と aprotinin 処理のみでは GDA を抑制しきれないことがあきらかとなった¹⁸⁾。これらの成績は、各種の疾患で見られる高グルカゴン血症が真実の値を示すのか、障害臓器より遊出した血液中の GDA による見かけ上の値なのか、改めて疑問を投げ掛けるものである。

本研究では、ヒト血漿グルカゴン測定値を再評価するためヒト血液成分中の GDA、各種疾患における血清 GDA、および GDA のグルカゴン RIA に及ぼす影響について検討した。

対象及び方法

1. 対象

11人の健常人 (男7人, 女4人, 25.9±3.2才) より、早朝空腹時に採血した。

採血後、無処置に、あるいは直ちに3.8%クエン酸ナトリウムを0.1ml/ml、塩酸ヘパリン10単位/ml、EDTA 2Na 1mg/ml、または aprotinin 500KIU/mlを混和後、氷冷して、2000×g、5分間遠心し、4°Cで血清または血漿を分離後、-20°Cで保存した。

昭和60年5月より昭和61年8月まで、当科受診の肝疾患10例 (急性肝炎1, 慢性肝炎4, 肝硬変5), 膵疾患7例 (急性膵炎1, 慢性膵炎6), 慢性腎不全4例, 慢性関節リウマチ5例, 特発性血小板減少性紫斑病5例, バセドウ病9例, 糖尿病15例, その他4例 (多発性筋炎1, 扁桃周囲膿瘍1, 悪性リンパ腫1, 不明熱1) の患者計59例 (男19例, 女40例, 52.9±13.4才) より同様に採血

し、保存した。

2. 標識グルカゴンの作成

Hunter と Greenwood の方法⁹⁾に準じて作成した。即ち、グルカゴン (0.4mg/ml, 0.01N NaOH) 溶液25 μ l, 99%dimethylsulfoxide 5 μ l, Na ¹²⁵I (100 μ Ci/ μ l, Amersham) 5 μ l を混和後, 0.4% クロラミン T を 5 μ l 加えて標識を行い, 10秒後0.24%Na₂S₂O₅を加え反応を停止させた。標識グルカゴンの精製は, Jørgensen の方法¹¹⁾にもとづき QAE-Sephadex A-25 (1.0 $\times$ 28cm)カラムで, 0.08M Tris, 0.02N HCl, 0.08M NaCl, 1.0%HSA, 50KIU/ml aprotinin, pH8.5で溶出し行った。得られた標識グルカゴンの比放射能は, $1.4 \times 10^2 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ であった。

3. GDA の測定法

Ansorge らの¹⁾方法に準じた。即ち, 0.5ml 0.12M glycine buffer, 1.5% BSA, pH7.4中に溶解した標識グルカゴンと0.2ml血清を加え, 48時間後, 10%Trichloroacetic acid (TCA) を等量加え, 攪拌後2,000 $\times$ g, 15分間遠心し, 上清と沈渣に分離したのち, それぞれを γ カウンターで放射能を測定した。上清に含まれる放射能を標識グルカゴンの分解産物とし, GDA₁を(1)の式で求めた。次に ¹²⁵I-グルカゴン TCA soluble fraction (t) を求めたところ, 6.1%であったので, t を差し引いた後の GDA₂を(2)の式で求め, GDA とした。

$$\text{GDA}_1 (\%) = \frac{\text{上清のカウント (cpm)}}{\text{上清+沈澱のカウント (cpm)}} \times 100 \cdots \cdots (1)$$

$$\text{GDA}_2 (\%) = \frac{1}{1-t} \times \text{GDA}_1 - \frac{t}{1-t} \times 100 \cdots \cdots (2)$$

(t=0.061)

血清の代りに約4,000単位のトリプシン (Sigma) を加えたところ10分間の incubation で GDA は89.9%であった。加える標識グルカゴンは $1.2 \sim 19.2 \times 10^4 \text{cpm}$ の間でほぼ一定であった。直接等量の10%TCA を加えると緩衝液中及び血清中の蛋白による共沈現象を生じ, 沈澱に含まれる放射能が増加し, GDA が実際の値よりも低値となるので, 希釈したところ, 5倍希釈以上で一定の値となった。従って本研究では約 $5 \times 10^4 \text{cpm}$ の標識グルカゴンをを用い, 4 $^{\circ}\text{C}$, 48時間 incubate 後, 0.1mlをとり, 0.4mlの生理食塩水で希釈したのち, 0.5mlの10%TCA を加え分離することとした。標準グルカゴンと buffer のみを 4 $^{\circ}\text{C}$, 48時間 incubation した場合, GDA は $2.1 \pm 1.3\%$ であった。

4. 血球分離

赤血球の分離:

クエン酸を加えて採血し, 2,000 $\times$ g, 5分間遠心分離を行い, 血漿及び白血球を吸引後, 赤血球を10倍量の生理食塩水で3回洗浄して用いた。

単核球と顆粒球の分離:

ヘパリンを加えて採血後, 6.4%Ficoll (Pharmacia) 10%Hypaque (Pharmacia) に重層し, 400 $\times$ g 温室30分遠心し, 中間層より単核球を, 沈渣より顆粒球を分離した³⁾。メランジュールで計測後, 赤血球は蒸留水で溶血させ, 単核球と顆粒球は生理食塩水に浮遊させ使用した。

5. グルカゴンのRIA

第一ラジオアイソトープ社製のキットを用いグルカゴン (immunoreactive glucagon: IRG) を測定した。本キットで用いる OAL-123は膵グルカゴン特異抗体で, グルカゴン分子の C 末端21~29位アミノ酸を主に認識する¹⁰⁾。また本キットで用いる Buffer は, 0.12M glycine, 1.5% BSA, 60

mM 塩酸 benzamidine, 27mM EDTA 2Na, pH8.7である。

6. ゲルろ過

Bio-Gel P-6 (Bio-Rad) カラム (1×100cm) を用い, elution buffer (0.2% glycine, 0.1% BSA, pH3.7) で溶離し, 0.8mlずつ集め, 放射能を Aloka (ARC-351) γ カウンターで測定した。得られた結果は平均±標準偏差で表わし, 統計学的検討は, Student の t 検定で行った。

結 果

1. 健常人の血清 GDA

健常人11人から無処置で得られた血清 GDA は $4.6 \pm 2.2\%$ であった。

温度の GDA に及ぼす影響をみるため健常人 5 名より無処置で血清を得て, incubation 温度を 4°C, 20°C, 37°Cにして測定したところ, GDA はそれぞれ $2.4 \pm 0.5\%$, $13.5 \pm 2.9\%$, $41.5 \pm 2.2\%$ となり, 温度依存性を示した。

incubation buffer の pH が GDA に及ぼす影響をみるため pH 4～10の間で検討したところ, 健常人では低値のためか, pH 4 から pH 9 まで変化なく ($6.9 \pm 1.8\%$), pH10でのみ $3.6 \pm 1.0\%$ であった。

通常, 血漿採血には, ヘパリン, クエン酸, EDTA が用いられる。これらの採血条件及びグルカゴン RIA で用いられる EDTA+aprotinin 採血の GDA に及ぼす影響を検討した (表 1)。無処置血清 ($6.2 \pm 3.4\%$) に比べ, EDTA 採血 (2.2 ± 1.4 , $p < 0.05$) 及び EDTA+aprotinin 採血 (1.0 ± 0.2 , $p < 0.01$) で GDA の低下がみられ, 一方ヘパリン採血では, $75.6 \pm 7.2\%$ と著しい GDA の増加がみられた ($p < 0.001$)。クエン酸採血と aprotinin 採血では, 無処置血清の場合と比べ GDA に差はなかった。

Table 1. The effects of heparin, citrate, EDTA, aprotinin, or EDTA plus aprotinin on GDA.
(5 normal subjects, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ VS serum)

materials	GDA(%) (mean $\pm$ SD)
serum	6.2 $\pm$ 3.4
plasma treated with heparin	75.6 $\pm$ 7.2 ***
plasma treated with citrate	4.4 $\pm$ 0.6
plasma treated with EDTA	2.2 $\pm$ 1.4 *
serum treated with aprotinin	3.5 $\pm$ 0.9
plasma treated with EDTA and aprotinin	1.0 $\pm$ 0.2 **

2. 溶血赤血球の GDA

採血に際して, また採血後の血漿分離に際して, 赤血球の溶血及び血球成分の混入の可能性があるるのでその影響について検討した。

健常人より採取した洗浄赤血球を $360 \times 10^4/\mu\text{l}$ となるように蒸留水を加えて溶血させ, 以後生理食塩水で希釈して得られた溶血赤血球を各0.2mlとり, GDA を検討した (図 1)。

GDA は生理食塩水のみでは $3.9 \pm 0.4\%$ であり、 $1.4 \times 10^4/\mu\text{l}$ 溶血赤血球では $6.5 \pm 0.5\%$ と有意に増加し ($p < 0.05$)、 $90 \times 10^4/\mu\text{l}$ 溶血赤血球で最高 $79.9 \pm 1.3\%$ に達した。血漿または血清 GDA を最も抑制した EDTA と aprotinin をそれぞれ溶血液に 1 mg/ml , 500 KIU/ml 添加すると、GDA は $5.6 \times 10^4/\mu\text{l}$ 溶血赤血球まで抑制された。溶血赤血球の GDA に対する抑制効果は EDTA 単独でも EDTA+aprotinin と同程度にみられたが、aprotinin 単独ではみられなかった。

3. 白血球の GDA

健康人より採取し、単離した単核球と顆粒球をそれぞれ生理食塩水に $1 \times 10^4/\mu\text{l}$ 浮遊させ、漸次希釈した浮遊液を作成して、各濃度浮遊液 0.2 ml の GDA を検討した。

単核球浮遊液では $1,300/\mu\text{l}$ の濃度で有意 ($q < 0.05$) な GDA の増加を示し、 $1 \times 10^4/\mu\text{l}$ で GDA は $25.1 \pm 4.2\%$ に達した (図 2)。EDTA と aprotinin を添加すると単核球の GDA を $2,500/\mu\text{l}$ の濃度まで抑制した。単核球 GDA 抑制効果は EDTA 単独で EDTA+aprotinin と同程度にみられたが、aprotinin 単独ではみられなかった。

Fig. 1. Effects of EDTA, aprotinin or EDTA plus aprotinin on GDA in RBC lysate of varying concentrations.

(5 normal subjects, ●: RBC lysate, ○: RBC lysate with EDTA, ■: RBC lysate with aprotinin, □: RBC lysate with EDTA plus aprotinin)

Fig. 2. Effects of EDTA, aprotinin or EDTA plus aprotinin on GDA in a suspension of mononuclear cells of varying concentrations.

(3 normal subjects, ●: nontreated mononuclear cells suspension, ○: mononuclear cells suspension treated with EDTA, ■: mononuclear cells suspension treated with aprotinin, □: mononuclear cells suspension treated with EDTA plus aprotinin)

顆粒球浮遊液では $1,300/\mu\text{l}$ の添加で有意 ($p<0.05$) な GDA の増加を生じ, $1 \times 10^4/\mu\text{l}$ の添加で $29.7 \pm 10.7\%$ となった (図 3)。EDTA と aprotinin を添加すると $2,500/\mu\text{l}$ まで顆粒球による GDA の増加を抑制した。溶血赤血球や単核球の場合と異なり, 顆粒球 GDA に対する抑制効果は aprotinin 単独で EDTA+aprotinin と同程度にみられたが, EDTA 単独ではみられなかった。

4. 各種疾患における血清 GDA

昭和60年5月より昭和61年8月までの山形大学第3内科受診患者より無作為に59名を抽出して, 無処置血清を採取し, GDA を測定した (図 4)。肝疾患, 脾疾患, 慢性腎不全, パセドウ病, 多発性筋炎, 扁桃周囲膿瘍, 悪性リンパ腫の患者の一部に GDA 高値 (GDA25%以上) の例がみられた。慢性関節リウマチと糖尿病の患者の中に軽度高値 (GDA15~25%) の例がみられ, 特発性血小板減少性紫斑病では GDA 高値の例はみられなかった。GDA 高値の例を検討したところ, 肝疾患では GOT, GPT が, 脾疾患では GOT, GPT またはアミラーゼが高値を示す傾向がみられ, 慢性腎不全

Fig. 3. Effects of EDTA, aprotinin or EDTA plus aprotinin on GDA in a suspension of granulocytes of varying concentrations. (3 normal subjects, ●: nontreated granulocytes suspension, ○: granulocytes suspension treated with EDTA, ■: granulocytes suspension treated with aprotinin, □: granulocytes suspension treated with EDTA plus aprotinin)

Fig. 4. Serum GDAs levels in patients with various diseases and normal subjects.

では全身衰弱の著しい例でみられた。多発性筋炎及び扁頭周囲膿瘍では著しく赤沈, CRP の亢進した例で GDA 高値であった。パセドウ病および悪性リンパ腫では, 臨床検査成績と GDA に特異な相関はみられなかった。

5. ゲルろ過による ^{125}I -グルカゴンの GDA による分解の解析

血清 GDA27.3%であった悪性リンパ腫 (59才・女) の無処置血清または EDTA+aprotinin 血漿と標識グルカゴンを GDA 測定と同様に 4°C , 48時間 incubate した後, Bio-Gel P-6 カラム ($1 \times 100\text{cm}$) でゲルろ過した。EDTA+aprotinin 血漿の場合では, 大部分の放射活性はグルカゴンの位置に鋭いピークとなって溶出されたが (図 5, B) 無処置血清の場合ではグルカゴンの位置につづく幅広いピークと, ^{125}I とは別にその直前の小分子量域のピークとなって溶出された (図 5, A)。無処置血清 GDA83.1%の多発性筋炎 (71才, 男) の例では, 大部分が ^{125}I 直前の小分子量域に溶出された (図 6, A)。同じ血清に EDTA と aprotinin を加えた場合は ^{125}I -グルカゴンの位置に鋭い peak として溶出された (図 6, B)。

Fig. 5. Bio-Gel P-6 gel filtration profiles of ^{125}I -Glucagon incubated with serum obtained from the patient with malignant lymphoma.

(A) nontreated serum

(B) plasma treated with EDTA plus aprotinin

Fig. 6. Bio-Gel P-6 gel filtration profiles of ¹²⁵I-Glucagon incubated with serum obtained from the patient with polymyositis.

(A) nontreated serum

(B) plasma treated with EDTA plus aprotinin

健常人のヘパリン添加血漿において、GDA 高値となったので、標識グルカゴンと4°C、48時間incubate 後、同様にゲルろ過を試みた。¹²⁵I-グルカゴンの GDA による分解様式を見ると、¹²⁵I-グルカゴンより遅れた位置に主に3つのピークとなって溶出されたが、¹²⁵I 直前のピークは認められなかった(図7, A)。ヘパリンに、27mM EDTA と60mM benzamidine を添加して採血した場合には、¹²⁵I-グルカゴンの所にのみピークが現われ、GDA は抑制されることが明らかとなった。(図7, B)

6. 原疾患治療と無処置血清 GDA の変動

GDA 高値を呈した4例で治療前後の無処置血清 GDA を比較した。多発性筋炎では赤沈値、CRP の正常化とともに、慢性膀胱炎では肝機能およびアミラーゼ値の正常化とともに、バセドウ病では甲状腺機能の改善とともに、扁桃周囲膿瘍では炎症の改善とともに、いずれも血清 GDA は低下した(図8)。

Fig. 7. Bio-Gel P-6 gel filtration profiles of ^{125}I -Glucagon incubated with plasma obtained from a normal subjects.

(A) plasma with heparin

(B) plasma with heparin, benzamidine and EDTA

Fig. 8. Serum GDA levels before and after treatment in various diseases.

●: polymyositis

○: chronic pancreatitis

■: Basedow's disease

□: peritonissillar abscess

7. 採血時における, EDTA, aprotinin 添加の GDA に及ぼす影響

血清 GDA15%以上を示した 7 例 (多発性筋炎, 慢性膵炎, バセドウ病, 慢性肝炎, 急性肝炎, 悪性リンパ腫, 慢性関節リウマチ各 1 例) について EDTA+aprotinin 採血を行い, GDA を比較したところ, EDTA+aprotinin 採血で得た血漿 GDA はすべてが10%以下となった (図 9)。

8. 各種採血法における IRG

表 1 と同じ健常人 5 名より各種採血法で得た血清または血漿について RIA でグルカゴンを測定した (表 2)。IRG はいずれの採血法においても有意な差を示さなかった。

各種疾患で血清 GDA が15%以上であった例 8 例 (多発性筋炎, バセドウ病, 慢性肝炎, 扁桃周囲膿瘍, 悪性リンパ腫, 慢性関節リウマチ各 1 例, 糖尿病 2 例) で, EDTA+aprotinin 採血を行い IRG を測定した (図10)。しかしながら, 無処置血清 GDA と IRG の間の相関は明らかでなかった。

Fig. 9. Relationship between GDA levels in plasma treated with EDTA plus aprotinin and those in nontreated serum.

Table 2. Effects of heparin, citrate, EDTA, aprotinin or EDTA plus aprotinin on IRG levels in plasma or serum.
(5 normal subject)

materials	IRG (pg/ml) (mean $\pm$ SD)
serum	62.9 $\pm$ 10.4
plasma treated with heparin	52.4 $\pm$ 14.2
plasma treated with citrate	56.8 $\pm$ 9.3
plasma treated with EDTA	55.2 $\pm$ 11.6
serum treated with aprotinin	57.6 $\pm$ 13.7
plasma treated with EDTA and aprotinin	47.4 $\pm$ 15.4

Fig. 10. Relationship between plasma IRG levels and serum GDA levels.

考 案

血中グルカゴンの動態を知る上で、IRGの size heterogeneity とグルカゴンの不安定性が障害となっている、著者らは¹⁵⁾、前者につき慢性腎不全例や胃全摘例で検討し、報告したが、本研究では後者について検討した。

表1で見られる如く健常人血清 GDA は、 $6.2 \pm 3.4\%$ であったが、EDTA+aprotinin 血漿では更に低値 ($1.0 \pm 0.2\%$) となり、Eisentraut らの成績⁷⁾と同様の結果を得た。一方、健常人のヘパリン血漿で GDA が著しく高値となることはこれまで報告がない。GDA は多種類のペプチド分解酵素活性の積算と思われる。その中にはヘパリンにより活性化する酵素活性も含まれるものと思われる。

溶血及び血球の混入の GDA に及ぼす効果についての報告としては、溶血赤血球の GDA が EDTA で抑制されること¹³⁾、単核球の GDA は EDTA では約 $\frac{1}{2}$ にしか抑制されず、thiol protease inhibitor である n-ethylmaleimide や p-hydroxymercuribenzoate で抑制されるという報告¹⁴⁾があるが、顆粒球についてはみあたらない。本研究において初めて顆粒球に GDA が存在し、赤血球や単核球の場合とは異なり、aprotinin で約 $\frac{1}{2}$ に抑制されることが明らかとなった。一方、これまでの報告¹³⁾と異なり、本研究では EDTA の溶血赤血球 GDA に対する抑制が不十分であった点は採血時に用いた EDTA 濃度の差によると思われる。単核球の GDA も EDTA により約 $\frac{1}{2}$ に抑制され、これまでの報告と同様の結果を得た。溶血赤血球、単核球、顆粒球は血清または血漿中にそれぞれ $1.4 \times 10^4/\mu\text{l}$, $1,300/\mu\text{l}$, $1,300/\mu\text{l}$ 以上混入すると GDA は増加することが明らかとなったが、このような高濃度で各成分が血漿に混入する可能性は日常臨床上考えにくい。EDTA+aprotinin 血漿の場合たとえ多くの血球混入があってもその影響は充分に防止されることから、血球の混入が GDA に影響を及ぼすことはほとんどないと思われる。

各種疾患患者血清 GDA を測定したところ、肝疾患、脾疾患、慢性腎不全、パセドウ病、多発性筋炎、扁桃周囲膿瘍、悪性リンパ腫の症例の一部で血清 GDA が高値を示す例が認められた。これらの例では、臨床検査成績からみて、これまでグルカゴン分解酵素活性が報告されている肝¹⁾筋⁵⁾及び脾に障害が推定される例であり、これら障害臓器より遊出した酵素が GDA を高めたものと考えられる。パセドウ病では全身の代謝が亢進している為にこれら各臓器からの遊出酵素が総量として増加しているためとも考えられる。慢性腎不全においても、血液中の酵素の腎による排泄あるいは分解が遅延し、各臓器からの酵素が血液中に増加するため、GDA を高めたものと考えられる。扁桃周囲膿瘍の1例で血清 GDA が高値であった。通常強度の炎症があると plasmin 等本来血中に存在する酵素群が活性化されることが知られているので、この場合も同様の機序により高値を示したのと考えられる。このことは GDA の中には本来血中に存在し、何らかの刺激で活性化されうる酵素も含まれている可能性を示唆する。また健康人のヘパリン血漿で GDA が増加したことも、この可能性を支持する所見と思われる。

Tsubouchi ら¹⁸⁾は四塩化炭素肝障害ラット血中 GDA は、EDTA+aprotinin では抑制されず、thiol 系の protease inhibitor が必要であると報告しているが、本研究で検討した各種疾患患者の例でみられた高値の血清 GDA は、全て EDTA+aprotinin 採血で抑制された。この相違の原因は不明であるが、細胞傷害度の差や種属差などに依るものと考えられる。

グルカゴンは N 末端より、10番目と13番目のチロジンが¹²⁵I により標識される。27.3%および83.1%の GDA を示した患者血清と¹²⁵I 標識グルカゴンを incubate してゲルろ過すると¹²⁵I とは別にその直前に単一の放射能ピークを生じた。これらの例では、GDA が単に¹²⁵I を遊離させるのではなく、グルカゴン分子を少なくとも標識された10または13番目の Tyrosine をもつ小分子にまで分解することを示している。事実、グルカゴン分子中の¹⁷Arg-¹⁸Arg の部分も分解を受けやすいことがよく知られている。また GDA27.3%例では、グルカゴンに続く幅広い低分子量域に放射能がみられたことにより、5% TCA で沈澱する標識グルカゴンが全て intact ではないことが示され、5% TCA 法で表わす GDA は実際に分解されたグルカゴンより低値を示している可能性がある。

健康人で検討した結果において、採血法により GDA に大きな差がみられたが、それぞれの採血法で得られた血中 IRG には差がみられなかった。これはグルカゴン RIA の buffer には高濃度の benzamidine と EDTA が含まれていることと、採血後ただちに分離したためによると思われる。また GDA は¹²⁵I 標識グルカゴンに対しては非標識グルカゴンよりも強く作用することも報告されている⁷⁾。本研究では血清 GDA 高値を示した症例について、血清 GDA と EDTA+aprotinin 血漿の IRG 値との間に関連があるのかどうか検討したが例数も少なく明確な結果は得られなかった。

本研究の結果を総合して判断すると、採血直後よりの GDA による endogenous なグルカゴンの分解を防ぐために、EDTA+aprotinin 採血を行い、4℃で保存し、可及的速やかに血漿分離し、-20℃で保存して行う現行のグルカゴン RIA においては血漿 GDA が IRG に影響を及ぼすことは少ないと考えられる。

結 語

- 1) 健康人では、TCA 法で測定される血清 GDA は $4.6 \pm 2.2\%$ であったが、採血時の EDTA+aprotinin 添加では低値を示し、ヘパリン添加では高値を示した。
- 2) 高濃度の溶血赤血球、単核球、顆粒球は GDA を上昇させたが、前2者の GDA は EDTA で抑制され、顆粒球の GDA は aprotinin で抑制された。

3) 肝疾患, 脾疾患, 慢性腎不全, バセドウ病, 多発性筋炎, 悪性リンパ腫, 扁桃周囲膿瘍の症例で, 血清 GDA 高値の例が存在した。これら血清 GDA 高値例は, 採血時の EDTA+aprotinin 添加で低値となった。また, 経過を見た 4 疾患においては, 原疾患の改善とともに GDA は低値となった。

4) GDA 高値を示した血清は ^{125}I 標識グルカゴンを著しく分解することがゲルろ過で確認された。

5) 健常人では通常の RIA において, 無処置血清, EDTA+aprotinin 血漿, ヘパリン血漿の IRG 値に差がみられなかった。

6) 血清 GDA が高値であった各症例で, 血清 GDA と EDTA+aprotinin 血漿 IRG 値の間の相関は明らかでなかった。

以上の結果より採血直後よりの GDA による endogenous なグルカゴンの分解を防ぐため, EDTA+aprotinin 採血を行い, 4°C で保存し, 速やかに血漿分離する現行のグルカゴン RIA においては, ヒトでは, 若干の血球の混入や, 血清 GDA の増加している症例があっても IRG に影響を及ぼすことは少ないと考えられた。

稿を終えるに臨み, 御指導と御高閲を賜りました佐々木英夫教授に深謝致します。研究に対し種々の御指導を頂きました第 2 生化学教室石川喜一教授に感謝致します。また, 直接御指導頂きました山谷恵一講師, ならびに第 3 内科の諸先生に感謝致します。

なお, 本論文の要旨の一部は, 第 60 回日本内分泌学会総会 (昭和 61 年 5 月, 仙台), 第 61 回日本内分泌学会総会 (昭和 62 年 6 月, 京都) にて報告した。

文 献

- 1) Ansorge S., Bohley P., Kirschke H., Langner J. and Hanson H.: Metabolism of insulin and glucagon; Breakdown of radioiodinated insulin and glucagon in rat liver cell fraction. *Eur. J. Biochem.*, 19, 283–288, 1971.
- 2) Baldissera F.G.A., Poulsen K. and Holst J.J.: Mouse salivary glands secrete a glucagon-degrading enzyme not glucagon. *Endocrinology*, 117, 84–87, 1985.
- 3) Boyum A.: Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 21 (Suppl 97), 77–89, 1968.
- 4) Castillo A.P. and Blazquez E.: Evidence of glucagon biosynthesis involving protein intermediates in rat salivary glands. *Diabetologia*, 27, 472–477, 1984.
- 5) Duckworth W.C. and Kitabchi A.E.: Insulin and glucagon degradation by the same enzyme. *Diabetes*, 23, 536–543, 1974.
- 6) Duckworth W.C.: Insulin and glucagon binding and degradation by kidney; Subcellular distribution under different assay condition. *Biochem. Biophys. Acta*, 437, 518–530, 1976.
- 7) Eisentraut A.M., Whissen N. and Unger R.H.: Incubation damage in the radioimmunoassay for human plasma glucagon and its prevention with “Trasylol”. *Amer. J. Med. Sci.*, 235, 137–142, 1968.
- 8) Ensink J.W., Shepard C., Dudl R.J. and Williams R.H.: Use of benzamidine as a proteolytic inhibitor in the radioimmunoassay of glucagon in plasma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 35, 463–467, 1972.
- 9) Hunter W.M. and Greenwood F.C.: Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity.

- Nature, 194, 495–496, 1962.
- 10) Imagawa K., Nishino T., Shin S., Uehata S., Hashimura E., Yanaihara C. and Yanaihara N.: Production of pancreatic glucagon sera with a C-terminal fragment of pancreatic glucagon. *Endocrinol. Japon.*, 26, 123–131, 1979.
- 11) Jørgensen K.H. and Laren U.D.: Purification of ^{125}I -glucagon by anion exchange chromatography. *Horm. Metab. Res.*, 4, 223–224, 1972.
- 12) Lawrence A.M., Tan S., Hojvat S., Kirsteins L. and Mitton J.: Salivary gland glucagon in man and animals. *Metabolism*, 25 (Suppl 1), 1405–1408, 1976.
- 13) 宮崎博臣, 坪内博仁, 合田栄一, 高橋耕三, 中山宏幸, 弘野修一, 大工原恭, 橋本修治: 赤血球 glucagon 分解活性の性質. *Peptide Hormones in Pancreas 6* (赤沼安夫編), Biomedical Research Foundation, 東京, pp 265–271, 1986.
- 14) Neal G.W., Solomon S.S., Shankar T.P. and Duckworth W.C.: Glucagon degradation by human mononuclear cells. *Diabetologia*, 25, 404–410, 1983.
- 15) 小川 淳, 須田克幸, 若杉和義, 山谷恵一, 佐々木英夫, 星川 匡, 亀山仁一, 塚本 長: 血中グルカゴン測定値の評価—存在様式への配慮—, *ホルモンと臨床*, 34, 81–88, 1986.
- 16) Tahara A., Shima K., Hirota M., Ikegami H., Tanaka A. and Kumahara Y.: Salivary gland glucagon is a fictitious substance due to tracer-degrading activity resistant to protease inhibitors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 113, 340–347, 1983.
- 17) Tominaga M., Yamatani K., Marubashi S., Kaneda H., Manaka H., Kamimura T., Katagiri T. and Sasaki H.: ^{125}I -glucagon-degrading activity in acid-saline extracts of rat salivary gland. *Diabetologia*, 27, 392–396, 1984.
- 18) Tsubouchi H., Miyazaki H., Gohda E., Nakamura H., Daikuhara Y. and Hashimoto S.: Activity for glucagon degradation in big plasma glucagon fractions and whole plasma from normal and carbon tetrachloride-treated rats. *Biomedical Res.* 6 (Suppl), 25–32, 1985. (受付日: '88. 6. 27)