



Title	グルカゴンC端フラグメント抗体の作成とその応用に関する研究
Author(s)	西野, 友善
Citation	大阪大学, 1987, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/35653
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名・(本籍)	にし 西	の 野	とも 友	よし 善
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	7826	号	
学位授与の日付	昭和62年7月9日			
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当			
学位論文題目	グルカゴンC端フラグメント抗体の作成とその応用に関する研究			
論文審査委員	(主査) 教授	熊原 雄一		
	(副査) 教授	垂井清一郎	教授	宮井 潔

論文内容の要旨

〔目 的〕

膵グルカゴン(以下G)の生体内存在意義解明にとって、radioimmunoassay(以下RIA)によるGの血中動態の検索,あるいは受動免疫による生体反応の検討などは極めて有用な手法である。これら,いずれの場合も膵G特異抗体を用いることが必須であるが、Gで動物を免疫した場合、この抗体作成に成功するチャンスは稀有で、従って膵G特異抗体は極めて貴重なものであった。

我々はG-C端フラグメント19-29をハプテン抗原として殆ど100%の確立で膵G特異抗体を得る方法を開発した。本研究では、このようなregion specific glucagon 19-29抗体が体液中の膵G測定に実用され得るか否かを検討するとともに、本抗体を用いて受動免疫によるmetaboliteの変動を測定し、膵Gの生理的役割の一端を明らかにしようとした。

〔方 法〕

抗原の作製及び免疫法：ハプテン抗原としたG19-29はGのトリプシン分解物より精製し、glutaraldehydeにてBSAに結合したものを24羽の家兎の皮下に注射し免疫した。特異性の検討に供したGフラグメント1-12, 1-17, 13-17, 19-29はGのトリプシン消化物より、G14-22, 23-25, 26-29はGのキモトリプシン分解物より各々調整した。des Asn²⁸・Thr²⁹・Homoser²⁷-G(以下G1-27)はGのCNBr分解により得た。イヌ小腸粘膜抽出物をゲル濾過し、そのpeak I(分子量、約8000)をglucagon like immunoreactivity(以下GLI)として用いた。抗体の対照として膵G特異抗体30K(Hoechst), GLIと交差反応をする非特異抗体GA10(自家製)を用いた。

RIA：得られたG19-29抗体の内、力価・感度が優れているOAL123を用いてRIA系を確立し

た。標識抗原はモノヨード¹²⁵I-Gを用い、B・F分離はデキストラン炭末法で行った。

受動免疫：24時間絶食ウィスター系ラットを対象に、ネンブータル麻酔下、右心房にカテーテルを置き、それより抗体の投与、採血を行った。対照群には正常家兎血清を投与した。G投与（200ng/kg）、L-アルギニン静注（0.5g/kg）、インスリン低血糖（0.5U/kg）等における高G血症時の血糖及びC-peptide immunoreactivity（以下CPR）レベルの変化を検索した。抗体は免疫家兎由来の結合G（896ng/ml）を除去したものをを用いた。その結合定数及び結合能は $2.6 \times 10^{10} \text{M}^{-1}$ 、147nMであった。血中free Gの測定は、Holstの方法に準じて前処理し、前述のRIA系により行った。

[成 績]

(1) G19-29抗体の特異性

得られたG19-29抗体は非特異抗体GA10に比較して、GLIとの交差反応率は $0.70 \pm 0.49\%$ と低く、いずれの抗体も膵Gと特異的に反応した。これらの交差率は30Kの場合（0.64%）と同程度であった。OAL123の種々のG-フラグメントに対する反応性を検討した結果、本抗体はG19-29と強く反応し、G1-27とも軽微な反応性を示したが、N端部、中央部のいずれのフラグメントとも反応しなかった。

(2) RIA系による血漿G測定

本RIA系の最小検出限界は4pg/tubeで、日内及び日差再現性は、それぞれ4.8~8.1%、7.1~10.7%と良好であった。血漿検体を用いた添加回収率は97.6~98.8%であった。本系にて測定した健常人早朝空腹時血漿glucagon immunoreactivity（以下GI）濃度は $87.9 \pm 23.8 \text{pg/ml}$ （n=30）と30Kによる測定値 $86.2 \pm 26.3 \text{pg/ml}$ に極めて近似した。健常人に施行したアルギニン負荷試験、50g OGTT時の血漿GI反応も30K値との間に差がなかった。同様の傾向はイヌにおいて行った種々の刺激物質に対する末梢及び門脈血漿GI値及び変動パターンにおいても認められた。イヌ血漿のゲル濾過分析を行った結果、分子量3500の主ピークの他に少なくとも2つのより高分子のGI分画が認められた。

(3) 受動免疫による効果

抗体投与により、24時間絶食ラットの血中free G値は検出限界以下となったが、血糖レベルは変化しなかった。ただCPRは有意に低下した。G200ng/kgによる血中CPR及び血糖の上昇は抗体投与により有意に抑制された。アルギニン、インスリン低血糖時に上昇する血中free Gは抗体投与により、いずれも著明に低下した。しかし、血糖レベルは両負荷試験とも対照群のそれと差がなかった。血中CPRはいずれの抗体投与群も低値であった。

[総 括]

(1) G19-29フラグメントをハプテン抗原として家兎を免疫した結果、得られた抗体はGLIとの交差性が僅少で、いずれも膵G特異抗体であった。

(2) G19-29抗体を用いたRIA系によるGI値、反応パターン及びGI分子形態等は広く用いられている膵G特異抗体30K系のそれらに近似した。

(3) G19-29抗体をラットに投与し、内因性Gを中和した際、対照群に比較して有意なCPR分泌抑制がみられたが、血糖値には差がなかった。

論文の審査結果の要旨

本研究は、グルカゴンC端フラグメントをハプテン抗原として動物を免疫する事により、従来得る事が極めて困難であった膵グルカゴン特異抗体をほぼ100%の確率で得る方法を明らかにしたものである。さらに、そのような抗体を用いるラジオイムノアッセイにより、血中グルカゴンの特異測定が可能である事を実証するとともに、受動免疫の手法により膵グルカゴンの生体内存在意義の一端を明らかにした。これらの成績はグルカゴン研究を大きく飛躍させるものであり、その学術的意義大である。以上の事より医学博士の学位を授与するに値すると考えられる。