

グルカゴンELISA測定キットの性能評価

75(4) | 417-424, 2018

菊池唯史^{*1}・北村忠弘^{*2}・難波光義^{*3}Tadashi Kikuchi^{*1}, Tadahiro Kitamura^{*2}, Mitsuyoshi Namba^{*3}

要 旨

前駆体プログルカゴンがプロテアーゼによる限定分解を受けることで、グルカゴンとアミノ酸配列を共有するいくつかのグルカゴン関連ペプチドが生じる。それゆえ、グルカゴン配列を認識する抗体を用いた免疫測定法はグルカゴン関連ペプチドと交差反応する可能性がある。近年開発されたグルカゴンのN末端およびC末端の両断端認識抗体を用いたサンドイッチELISA法は、片側断端認識抗体のみを用いた従来のRIA法と比較して、理論的に交差反応性が低減すると考えられている。そこで、グルカゴンおよびその関連ペプチドを合成し、サンドイッチELISA法キットおよびRIA法キットのグルカゴン関連ペプチドとの交差反応性を調べたところ、サンドイッチELISA法では5種類のグルカゴン関連ペプチドに対する交差反応率は1%未満または4.6~6.5%と低く、C末端断端認識抗体のみを用いたRIA法と比べて交差反応性が大きく改善していることが示された。さらに、添加回収率は96.7~103%と良好で、検体の希釈直線性も認められたことから、サンドイッチELISA法は現在市販されているキットの中では、より正確にグルカゴンを測定できる検査法と考えられた。

はじめに

グルカゴンは膵島 α 細胞において、その前駆体プログルカゴンからプロホルモン転換酵素などのプロテアーゼの作用を受けて生成する29アミノ酸残基からなるペプチドホルモンで、インスリンとともに血糖調節において重要な役割

を担っている。プログルカゴンは腸管細胞にも発現し、プロテアーゼの働きにより、glicentin 1-69(1-69)やoxyntomodulin(Oxm)といったペプチド断片を生じることが知られ、腸管グルカゴンと呼ばれている¹⁾。また、グルカゴンはさらにプロテアーゼによる分解を受けて、glucagon 3-29(G3-29)やmini-glucagon(G19-29)など

Performance Evaluation of Glucagon ELISA Kit

*1 株式会社コスミックコーポレーション 学術課 Cosmic Corporation, Medical Affairs Section

*2 群馬大学生体調節研究所 代謝シグナル研究展開センター

Gunma University, Institute for Molecular and Cellular Regulation

*3 兵庫医科大学病院 Hyogo College of Medicine

Key words : グルカゴン, 酵素標識免疫測定 (ELISA) 法, 交差反応性

のグルカゴン部分断片が生じることがある。腸管グルカゴンおよびグルカゴン部分断片はグルカゴンとアミノ酸配列を共有することから、グルカゴン関連ペプチドと呼ばれる。グルカゴン関連ペプチドのうち、グルカゴンと同じC末端配列をもつ glicentin 1-61 (1-61), G 3-29やG 19-29は、C末端認識抗体のみを用いるRIA法では高い交差反応性が認められることから、両末端を認識する免疫測定法の必要性が提唱された²⁾。Mercodia社が開発したグルカゴンの両末端それぞれに対する2種類の特異的モノクローナル抗体を用いたサンドイッチELISA測定キットは市販の免疫測定キットの中では最も正確に測定できると評価された³⁾。また、最近筆者らは高精度にグルカゴンを定量解析できるLC-MS/MSを用いた測定結果との比較を行い、サンドイッチELISAはLC-MS/MSとおおむね良好な相関性を有することを明らかにした⁴⁾。一方、グルカゴンはセリンプロテアーゼ^{5)~7)}、チオールプロテアーゼ⁷⁾⁸⁾、エンドペプチダーゼ⁹⁾などにより分解されることが示唆されており、血中グルカゴン濃度の測定を不正確にさせる原因として、交差反応性の問題に加えてプロテアーゼによる分解も挙げられる。これまでに筆者らは、Mercodia社サンドイッチELISAキットの基礎的および臨床的な検討¹⁰⁾¹¹⁾、およびグルカゴンの検体安定性¹²⁾について報告してきた。本研究では、より詳細な交差反応性試験とともに、添加回収率、測定範囲試験などの性能試験を実施したので報告する。

I. 試験方法

1. グルカゴンおよびグルカゴン関連ペプチドの合成

株式会社ベックスに依頼して、以下に示すアミノ酸配列からなるペプチドを合成し、HPLC精製により純度95%以上の標品を得た。得られたペプチドは、終濃度1mMとなるようにジメチルスルフォキシドに溶解後、使用するまで-80℃にて凍結保存した。使用に際しては、各

種キットに添付された希釈用緩衝液を用いて1μMから1pMまで7段階の10倍希釈系列を作製した。

Glucagon :

HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNT

Glicentin 1-61 (1-61) :

RSLQDTEEKSRFSASQADPLSDPDQMNE
DKRHSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNT

Glucagon 3-29 (G3-29) :

QGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNT

Mini-glucagon (G19-29) :

AQDFVQWLMNT

Oxyntomodulin (Oxm) :

HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMN
TKRNRNNIA

Glicentin 1-69 (1-69) :

RSLQDTEEKSRFSASQADPLSDPDQMNE
DKRHSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNTKRNRNNIA

2. 血漿検体の作製

医療法人社団三思会東邦病院の倫理審査委員会の承認を経て、3名の健常者から、アプロチニン入りEDTA採血管(ニプロ:以下、アプロチニン採血管)またはプロテアーゼインヒビターカクテル入りのBD™ P800採血管(バクトン・ディッキンソン:以下、P800採血管)を用いて採血し、すみやかに、4℃で20分間3,000rpmの条件で遠心分離して、上清を血漿として採取した。これら血漿検体は使用まで-80℃で凍結保存した。

特定機能病院兵庫医科大学病院の倫理審査委員会の承認を行って行った、2型糖尿病患者1名に対する75g経口ブドウ糖負荷試験の検体で、負荷後にP800採血管を用いて採取した血漿をグルカゴン高値検体の希釈試験に供し、高値グルカゴン測定の信頼性を評価した。

市販の健常者EDTA血漿(ケー・エー・シー)をP800採血管に入れることで、採血管内に含まれるプロテアーゼインヒビターカクテル粉末をEDTA血漿に溶解した。ここに、既知濃度

のブタグルカゴン標準品 (NIBSC 69/194) を添加して、グルカゴン添加血漿検体を作製した。

3. Glucagon ELISA キットの基礎的な性能評価

市販の健常者プール血漿 (グルカゴン値 8.0 pg/mL) にブタグルカゴン標準品を添加して 24.8 pg/mL と 99.6 pg/mL のグルカゴン添加血漿検体を作製した。これら 3 種類の検体にさらに既知濃度のグルカゴン標準品を添加し、Merco-dia 社製のコスミックコーポレーションが販売する Glucagon ELISA キット (以下、Glucagon ELISA) で測定することにより添加回収率を求めた。Glucagon ELISA の測定は、キット添付の取扱説明書の方法に従った。

つづいて、標準溶液 5 (445.8 pg/mL) および 3 種類のグルカゴン高値検体を標準溶液 0 (0 pg/mL) で 2 倍希釈系列を作製した。また、標準溶液 1 (4.6 pg/mL) を標準溶液 0 (0 pg/mL) で希釈して 3.5 pg/mL, 1.7 pg/mL を作製して Glucagon ELISA で測定して、それぞれの測定結果から測定範囲、希釈直線性および最小検出感度を調べた。

健常者 3 名の血漿 (グルカゴン濃度 30 ~ 52 pg/mL) を 3 カ月または 6 カ月間 -20℃ 以下で凍結保存した後、Glucagon ELISA で測定して凍結保存安定性を調べた。凍結保存開始日のグルカゴン値を 100% としたとき、凍結保存後のグルカゴン値を変化率として表した。

4. 交差反応性試験

Glucagon ELISA に加えて、セティ社 RIA と ミリポア社 RIA の 3 種類のグルカゴン測定キットを用いて、1 μM から 1 pM までのグルカゴンおよびグルカゴン関連ペプチドを添加して、グルカゴン濃度を定量した。Glucagon ELISA および 2 つの RIA 法キットはそれらの取扱説明書に記載の方法に従って測定した。この結果をもとに、各ペプチドについて測定値の変化の大きい濃度域を同定し、この濃度域において 2 倍の希釈系列を作製して、再度グルカゴン濃度を定量した。ただし、10 nM (グルカゴン定量上限付近である 100 pM の 100 倍の濃度) 以上に

においてグルカゴン測定値が認められなかったペプチドは交差反応が弱いと判断して追加の試験を行わず、交差反応率を 1% 未満とした。各キットの標準溶液の最大濃度の半分値を与える各ペプチド濃度を添加濃度に対する測定値のスロープの直線回帰式から計算により求め、それを EC50 とした。グルカゴンの EC50 を各ペプチドの EC50 で除し、100 を乗じた数を交差反応性%とした。

5. 統計解析

凍結保存検体のグルカゴン変化率について、等分散を仮定しない t 検定によって確率変数 P を解析し、 $p < 0.05$ を有意とした。

II. 結 果

1. 添加回収率

血中グルカゴンは臍内分泌腫瘍症例において高値となることが知られているが、このような臨床検体を測定キットの性能評価に使用することは容易でないため、グルカゴン標準品を健常者血漿に添加して評価用検体を作製することとした。まず、添加したグルカゴン標準品を正確に測定できるか調べるため、Glucagon ELISA でのグルカゴン添加回収試験を実施した。8.0, 24.8 または 99.6 pg/mL のグルカゴンが含まれる検体に、1 mL あたり 170 pg のグルカゴン標準品を添加して Glucagon ELISA で測定したところ、添加回収率は 96.7 ~ 103% だった (表 1)。

2. 測定範囲と希釈直線性、凍結保存安定性

Glucagon ELISA に添付されている最大濃度の標準溶液 (グルカゴン 450 pg/mL 付近) を標準溶液 0 (0 pg/mL) で 2 倍希釈系列を作製して Glucagon ELISA で測定したところ、3 pg/mL 付近から 450 pg/mL 付近にかけて、相関係数 $r = 0.997$ の良好な直線性がみられた (図 1A)。また標準溶液の最小濃度 4.6 pg/mL を標準溶液 0 で希釈して最小検出感度を調べたところ、3.5 pg/mL の吸光度の平均値 - 2SD は 0.041 であり、標準溶液 0 (0 pg/mL) の平均値 + 2SD の 0.035 (破線) よりも大きく、3.5 pg/mL を 0

表1 Glucagon ELISA の添加回収試験

項目	検体1	検体2	検体3
グルカゴン値 (pg/mL)	8.0	24.8	99.6
添加量 (pg/mL)	170.0	170.0	170.0
理論値 (pg/mL)	178.0	194.8	269.6
測定値 (pg/mL)	177.3	200.6	260.7
添加回収率 (%)	99.6	103.0	96.7

3種類のヒト血漿に170pg/mLのグルカゴン標準品を添加して、Glucagon ELISAにて測定した。理論値に対する測定値の百分率を添加回収率(%)とした。

pg/mLと測り分けられたが、1.7pg/mLの平均値-2SDは0.033であり0.035を下回ったため、3.5pg/mLを最小検出感度とした(図1B)。以上のことから、Glucagon ELISAの有効な測定範囲を3.5~400pg/mL(1~114pM)とした。

つづいて、2型糖尿病患者に対するブドウ糖負荷後にグルカゴン血中濃度が上昇した血漿検体を用いて希釈直線性を調べたところ、希釈により直線性をもってグルカゴン測定値が減少することを確認した(図1C)。

血中グルカゴンのプロテアーゼ分解を抑制するために、検体採取時にプロテアーゼ阻害剤が添加されるが、検体を1日以上保存する際には凍結が必要である¹²⁾。さらに長期間の凍結保存での安定性について調べたところ、P800採血管あるいはアプロチニン入り採血管で採取した血漿検体はともに、凍結保存日数に依存してグルカゴン値が減少し、特にP800採血管では3カ月と6カ月間凍結保存した検体は、保存開始時と比較して統計的な有意差($p < 0.05$)をもってグルカゴン値は低下した(図1D)。

3. グルカゴン関連ペプチドの交差反応性

図2Aに示すグルカゴン関連ペプチドをセティ社RIAキット(測定下限値4.7pM)で測定したところ(図2B)、1-69とOxmは10nMまで添加しても反応はみられず、グルカゴンと共通のC末端を有するG19-29は9.8pM以上で、G3-29は7.8pM以上で、1-61は3.9pM以上で交差反応を認めた。これらグルカゴン関連ペプチドの交

差反応率はそれぞれ、11.1%、72.2%、91.9%であった。

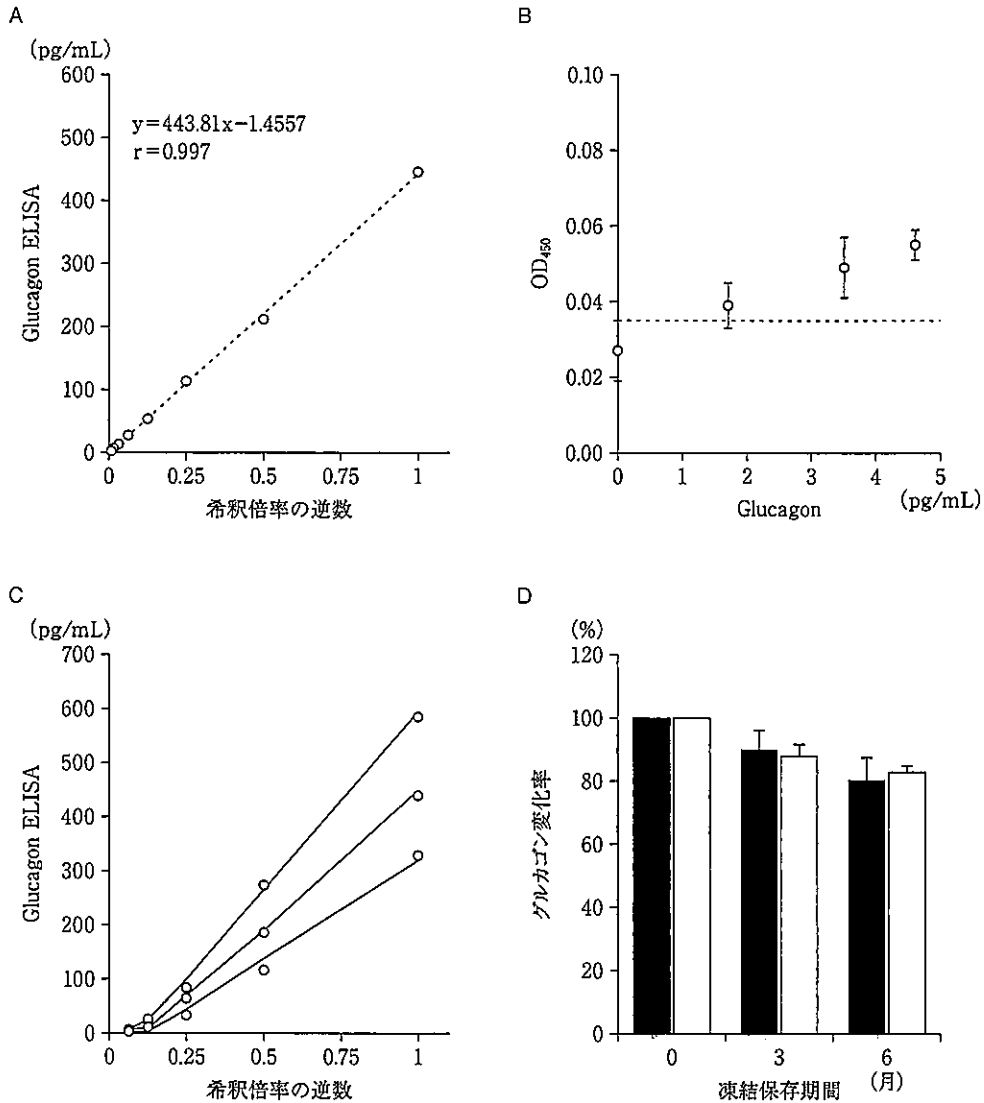
つづいて、ミリボア社RIAキット(測定下限値7.2pM)では(図2C)、1-69とOxmは10nMを添加すると弱い交差反応を認めたものの、交差反応率は1%未満であった。G19-29と1-61は7.8pM以上で交差反応を認め、交差反応率は100%以上であった。G3-29は15.6pM以上で交差反応を認め、交差反応率は34.7%だった。

Glucagon ELISA(測定下限値1pM)では、G19-29については10nMまで交差反応はみられなかった。1-69は78pM以上で、G3-29は156pM以上で、1-61とOxmは31.3pM以上で交差反応が生じ、交差反応率はそれぞれ、4.7%、4.6%、6.3%、6.5%だった(図2D)。

III. 考 察

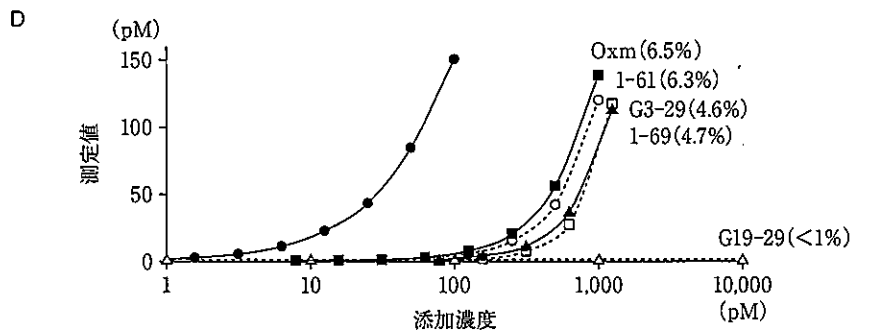
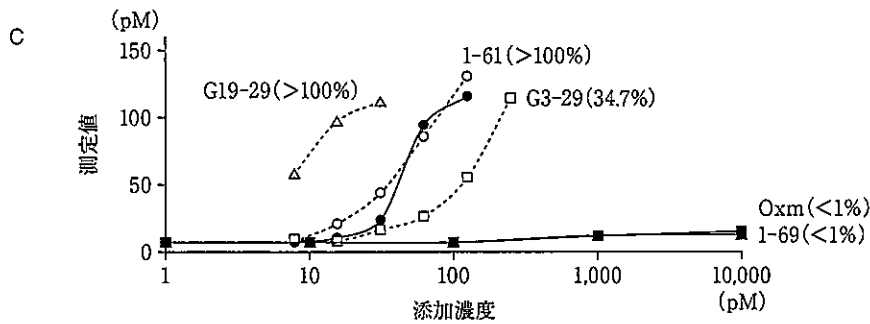
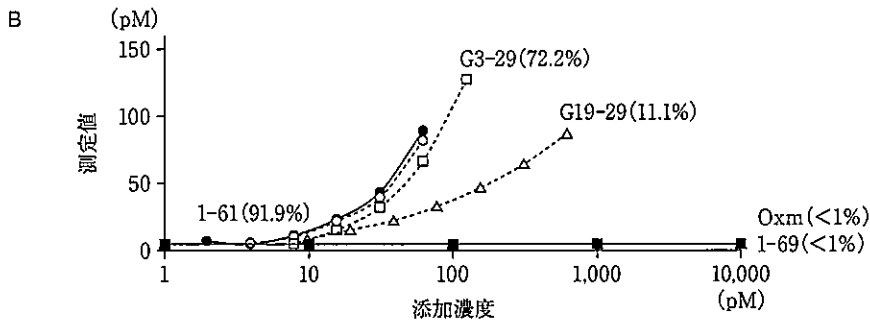
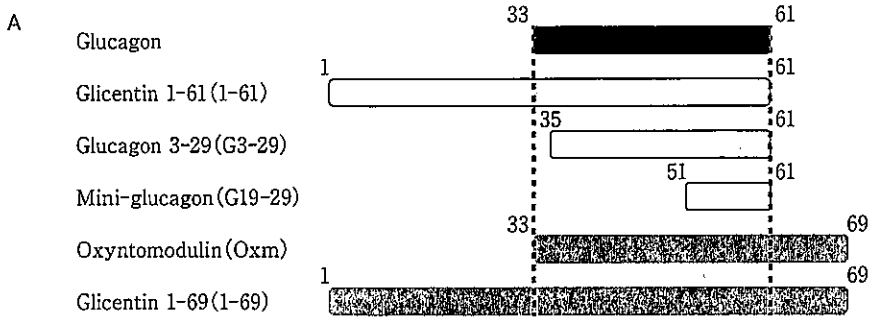
これまでの競合法RIAを用いた血中グルカゴン濃度の測定は、検体の採取や保存における不安定性、およびグルカゴン関連ペプチドとの交差反応性に課題があり、測定結果の解釈には注意が必要とされてきた。最近開発されたサンドイッチELISAがこれらの懸念を払拭できるかどうかを検証する目的で、本研究を計画した。

グルカゴンは分解を受けやすいために、プロテアーゼ阻害剤を添加した採血管で採血する必要があり、アプロチニン採血管やP800採血



- A. Glucagon ELISA キットに添付の最大濃度の標準溶液から希釈系列を作製してグルカゴンを測定した。3重測定の平均値を希釈倍率の逆数を横軸としてプロットし、直線回帰式および相関係数を求めた。
- B. Glucagon ELISA キットに添付の最小濃度の標準溶液から希釈系列を作製してグルカゴンを測定した。3重測定のデータを平均値±2SD で表した。
- C. ブドウ糖を経口摂取後の2型糖尿病患者より採取した血漿3種類から希釈系列を作製してグルカゴンを測定した。
- D. 健常者3名からアプロチニン採血管（黒塗りカラム）またはP800採血管（白抜きカラム）を用いて採血して得られた血漿（グルカゴン濃度 30-52 pg/mL）を図中に示す期間-20℃以下で凍結保存後、グルカゴンを測定した。グルカゴンの測定値は、保管開始時のグルカゴン測定値を100%として、グルカゴン変化率として、平均値±SD で表した。

図1 Glucagon ELISA の測定範囲 (A), 最小検出感度 (B), 希釈直線性 (C), 凍結保存安定性 (D)



グルカゴンおよびグルカゴン関連ペプチドのアミノ酸配列をプログルカゴンのアミノ酸配列番号で表記した (A)。合成したグルカゴンおよびグルカゴン関連ペプチドの希釈系列を、セティ社 RIA キット (B)、ミリオパ社 RIA キット (C)、あるいは Glucagon ELISA キット (D) で測定した。グルカゴンの測定値を黒塗りの丸印でプロットした。そのほかのペプチドは図中に記したとおり、1-61:○、G 3-29:□、G 19-29:△、Oxm:■、1-69:▲でプロットした。() には各測定キットでの交差反応率を記載した。

図2 グルカゴン関連ペプチドの交差反応性

管が推奨される。P800 採血管で採取したグルカゴンの室温での半減期は約 2 日¹³⁾、冷蔵でも 13 日程度であり、検体を冷凍で保管する必要がある¹²⁾。本研究において長期間の凍結保存安定性を調べたところ、プロテアーゼ阻害剤を添加しているにも関わらずグルカゴン値が減少しており、長期間の冷凍保存にも注意が必要と考えられた。

製造元である Mercodia 社の資料によれば、Mercodia Glucagon ELISA キットの 1-69 および Oxm に対する交差反応性は 0.8% および 4.4% だが、最近の Matsuo らの報告では、それらの交差反応性は 17.3% および 10.2% とされた¹⁰⁾。そこで、本研究での交差反応性を再評価したところ、4.7% および 6.5% と Mercodia 社の結果よりも高い数値が得られた。これらの 3 つの検討は同様の方法で行っているにもかかわらず、結果に違いが認められることから、実施者の技量の違いに起因する可能性も考えられた。

一方、グルカゴンと C 末構造が重複している G19-29, G3-29, 1-61 はセティヤミリポアなどの RIA 法に比べ、Glucagon ELISA は明らかに交差反応性が低かった。従って、製造元およびわれわれの試験結果から、Glucagon ELISA はグルカゴン関連ペプチドに対する交差反応性が依然として 5% 程度認められるものの、現行の免疫測定キットの中では最も正確な検査方法と考えられた。

健常者ボランティアの血中 Oxm 濃度を LC-MS/MS 法によって測定すると 1-2 pM であり、ミールテストにより 60 分から 120 分の間におよそ 8 pM まで上昇すると報告されている¹⁴⁾。同時にグルカゴンの血中濃度は 8 pM からテストミールにより 25 pM まで上昇しており、Oxm : グルカゴン比がおよそ 1 : 4 であることを考えると、約 5% という Oxm の交差反応率が大きな影響を及ぼすとは考えにくい。しかしながら、Oxm 以外のグルカゴン関連ペプチドの血中濃度を LC-MS/MS によって正確に解析した報告は乏しく、それゆえ、疾患の病態や投薬の種類によってはグルカゴン関連ペプチドの血中

濃度が大きく上昇する可能性を現時点で否定できない。病態や投薬に関連したグルカゴンおよびその関連ペプチドの体内動態を研究するうえで、LC-MS/MS を用いた解析や、交差反応性をさらに改善した免疫測定法が必要になる可能性がある。

最近では、インクレチン製剤の臨床研究において Mercodia 社キットを用いてグルカゴン測定の結果が再評価されたという報告があった¹⁵⁾。このように、グルカゴン研究の成果がサンドイッチ ELISA 法で追試され、そこから得られる新たな知見によって、グルカゴン研究がさらに進展することを期待したい。

利益相反

菊池唯史 (試験実施費用の負担)

文 献

- 1) Bataille D, Dalle S : The forgotten members of the glucagon family. *Diabetes Res Clin Pract* 106 (1) : 1-10, 2014.
- 2) Holst JJ, Christensen M, Lund A et al : Regulation of glucagon secretion by incretins. *Diabetes Obes Metab* 13 (Suppl 1) : 89-94, 2011.
- 3) Wewer Albrechtsen NJ, Hartmann B, Veedfald S et al : Hyperglucagonaemia analysed by glucagon sandwich ELISA : nonspecific interference or truly elevated levels? *Diabetologia* 57 (9) : 1919-1926, 2014.
- 4) Miyachi A, Kobayashi M, Mieno E et al : Accurate analytical method for human plasma glucagon levels using liquid chromatography-high resolution mass spectrometry : comparison with commercially available immunoassays. *Anal Bioanal Chem* 409 (25) : 5911-5918, 2017.
- 5) Eisentraut AM, Whissen N, Unger, RH : Incubation damage in the radioimmunoassay for human plasma glucagon and its prevention with "Trasylol". *Am J Med Sci* 255 : 137-142, 1968.
- 6) Mirsky IA, Perisutti G, Davis NC : The destruction of glucagon, adrenocorticotropin and somatotropin by human blood plasma. *J Clin Invest* 38 (1) : 14-20, 1959.
- 7) Tsubouchi H, Miyazaki H, Gohda E et al : Degradation of [¹²⁵I]iodoglucagon by normal rat plasma

- in radioimmunoassay mixture containing aprotinin and its prevention by p-chloromercuriphenyl sulfonate and leupeptin. *Endocrinology* 119 (3) : 1137-1145, 1986.
- 8) Authier F, Mort JS, Bell AW et al : Proteolysis of glucagon within hepatic endosomes by membrane-associated cathepsins B and D. *J Biol Chem* 270 (26) : 15798-15807, 1995.
- 9) Trebbien R, Klarskov L, Olesen M et al : Neutral endopeptidase 24.11 is important for the degradation of both endogenous and exogenous glucagon in anesthetized pigs. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287 (3) : E431-438, 2004.
- 10) Matsuo T, Miyagawa J, Kusunoki Y et al : Postabsorptive hyperglucagonemia in patients with type 2 diabetes mellitus analyzed with a novel enzyme-linked immunosorbent assay. *J Diabetes Investig* 7 (3) : 324-331, 2016.
- 11) 稲垣貫之, 串田 祥, 松尾俊宏 他 : ELISA 法による特異的グルカゴン測定キットの基礎的検討. *医学と薬学* 72 (3) : 491-497, 2015.
- 12) 菊池唯史, 北村忠弘, 難波光義 : アプロチニン入り採血管でのグルカゴン保存安定性. *臨床検査* 61 (7) : 878-883, 2017.
- 13) Yi J, Warunek D, Craft D : Degradation and Stabilization of Peptide Hormones in Human Blood Specimens. *PLoS One* 10 (7) : e0134427, 2015.
- 14) Lee AY, Chappell DL, Bak, MJ et al : Multiplexed Quantification of Proglucagon-Derived Peptides by Immunoaffinity Enrichment and Tandem Mass Spectrometry after a Meal Tolerance Test. *Clin Chem* 62 (1) : 227-235, 2016.
- 15) Kramer CK, Zinman B, Choi H et al : Impact of the Glucagon Assay When Assessing the Effect of Chronic Liraglutide Therapy on Glucagon Secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 102 (8) : 2729-2733, 2017.

* * *