

<原 著>

Phadebas® Insulin Test (Solid Phase Radioimmunoassay) の 使 用 経 験*

稻 田 満 夫 岡 部 純 一 風 間 善 雄
高 山 英 世 春 名 桃 江 高 橋 浩

は じ め に

Radioimmunoassay による血中ホルモンの測定には二抗体法^{1), 2)} が広く用いられているが、更に操作を簡便化し、測定所要時間を短縮して、日常検査法として利用しやすくしようとする努力がなされて来た。最近非常に簡便な抗原抗体複合物の分離法として固相法 (Solid Phase Radioimmunoassay)^{3), 4)} が注目されている。著者らは第一ラジオアイソトープ研究所より血中 Insulin 測定法に固相法を用いた Phadebas® Insulin Test (Pharmacia 社製) の提供をうけたので、本稿ではその若干の使用経験について述べる。

Phadebas® Insulin Test の原理 (図1)

本法では insulin 抗体を予め化学反応により sephadex に結合させてある。従って insulin 抗体はすでに大きな分子となっているため、それと血中 insulin 及び標準 insulin と反応させると、結合型 insulin は容易に遊離型 insulin と分離する事が出来る。これを模式的に示すと図1のごとくである。

Fig. 1 Principle of Solid phase radioimmunoassay



Kit の構成

1 kit は 100 検体測定用で、その構成は下記の通りで

天理よろず相談所病院内分泌内科

臨床病理部

受付: 1971年9月

別刷請求先: 奈良県天理市三島町 200

天理よろず相談所病院内方泌尿内科
稻 田 満 夫 (〒 632)

ある。

(a) Sephadex-anti-insulin complex

Buffer, sodium carboxymethyl cellulose (CMC) および Tween 20 と共にこの complex が真空凍結乾燥してある。

(b) Insulin 標準品

標準 insulin が buffer および CMC と共に真空凍結乾燥してある。

(c) ^{125}I 標識 insulin

本品も buffer および CMC と共に真空凍結乾燥したもので、その比放射能は 350 nCi/ng であった。

(d) 0.05 M-phosphate buffer, pH 7.4

200 ml の蒸留水で溶解する事により簡単に調整出来る。

測 定 操 作 法⁵⁾

(a) 標準 insulin 溶液または血清 0.1ml を試験管にとる。試験管はガラスの遠沈管または Res-O-Mat T₄ test で用いられる試験管が使用された。

(b) ^{125}I 標識 insulin 溶液 0.1ml を各試験管に加える。

(c) Sephadex-anti-insulin complex 溶液 1 ml を各試験管に攪拌しながら加える。

(d) 各試験管を室温で振盪する。ガラス遠沈管が用いられた時は、Taiyo Incubator M-I が振盪器として使用され、その振盪速度は130回/分であった。また Res-O-Mat T₄ test 用試験管が使用された時は専用の Rotator が用いられた。

(e) 4,000rpm で 1 分間遠心分離し、上清を除く。

(f) 生理食塩水 2 ml を加え、再遠沈し、上清を除く。

(g) 操作 (f) の洗滌操作を更に 2 回くり返す。

(h) Well 型 scintillation counter にて各試験管の放

射能を各2分間測定する。

(i) Zero sample に対する標準 insulin または血漿の計数率比 (B/B_0) を計算する。

(ii) 片対数グラフ用紙を用い, insulin 濃度を log 側に, 標準 insulin の計数率比を lin 側にプロットして, 標準曲線を作成する。

(iii) 標準曲線より各血清の insulin 濃度をよみとる。

実験成績

(1) 試験管の silicon coating の有無の影響

本法の操作法で試験管の silicon coating が必要とされている。しかし日常検査として用いる場合, 試験管を silicon coating する事は必ずしも容易でない。そこで先ず試験管の silicon coating の有無による, insulin 測定値に及ぼす影響について検討した。この場合 siliconize されたものと, されない試験管について同一試料を同時に測定し, その測定法は室温で24時間振盪し, 洗滌操作は

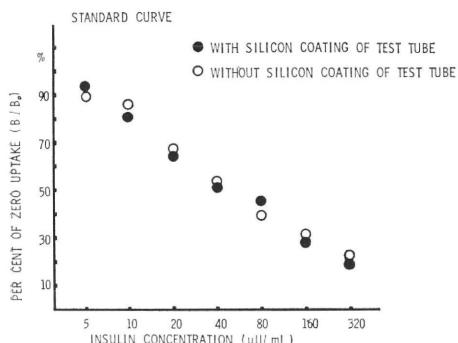


Fig. 2

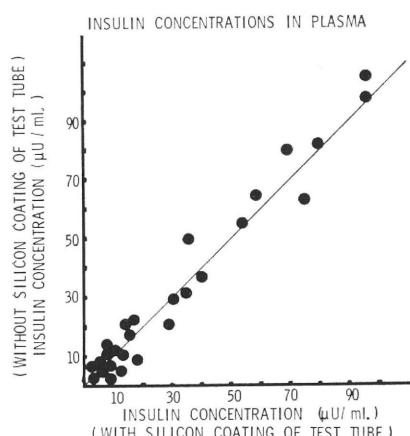


Fig. 3

3回行なった。先ず標準曲線を比較したが両者間に特に差はみられない(図2)。次に血漿中 insulin 値を比較したが、図3に示すように silicon coating の有無に拘らず insulin 値はほぼ一致していた。これ等の成績より試験管の silicon coating は特に必要ないものと考えられ、以下の実験は siliconize されない試験管を用いて行なわれた。

(2) 洗滌の洗滌回数の検討

Sephadex-anti-insulin complex の遠沈後、それを洗滌する回数について検討した。図4は lot 番号 765001, 765002 および 765003 の kit について、室温で24時間振盪後洗滌を2回洗滌した場合と、その後更に1回洗滌し合計3回洗滌した場合の標準曲線を比較したものである。図は各 insulin 濃度で、3つの kit で日を変えて各

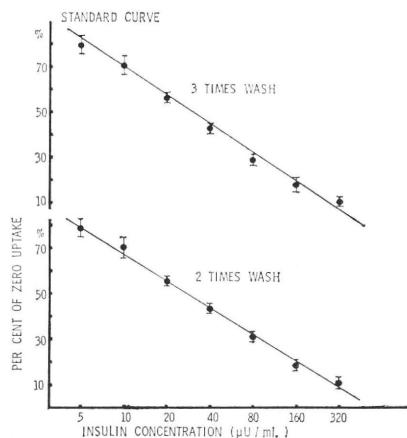


Fig. 4

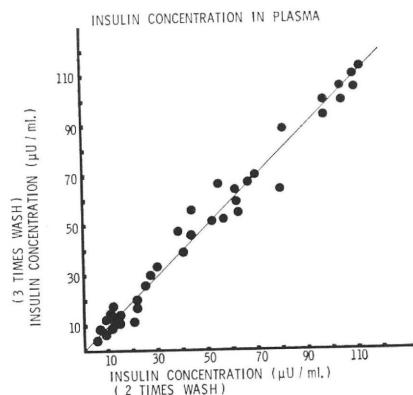


Fig. 5

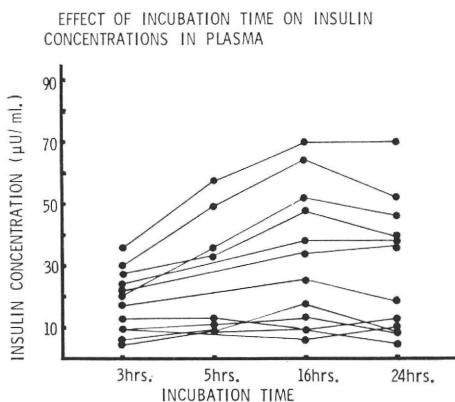


Fig. 6

2回計6回測定された計数率比の平均およびその標準偏差を示し、また、直線式は Hawlett-Packard 社製9100 A計算機にて最小二乗法より求められた。各 insulin 濃度での計数率比のバラツキは少なく、lot による差は少なく、また、その再現性も良い事を示す。次に2回洗滌と3回洗滌で標準曲線の減衰率は各々 -0.0586 ($Y = 950.4 e^{-0.0586x}$) および -0.0565 ($Y = 832.0 e^{-0.0565x}$) で両者は良く平行している。更に図5は同一血漿中 insulin 濃度を2回洗滌で測定した場合と、3回洗滌で測定した場合で比較したものであるが、両者間に特に差はない。従って本法における沈殿の洗滌回数は2回で充分と考えられ、以下の実験はすべて洗滌回数は2回で行なわれた。

(3) 振盪時間の検討

図6は血漿中 insulin 値に振盪時間の及ぼす影響について検討したものである。即ち同一血漿を室温にて3、5、16および24時間振盪後測定された insulin 濃度を示す。Insulin 濃度 $20\mu\text{U}/\text{ml}$ 以下では振盪時間による血漿中 insulin 濃度測定値の差は特にみられない。一方 insulin 濃度 $20\mu\text{U}/\text{ml}$ 以上では振盪時間3時間より16時間までの間で測定値は上昇し、振盪時間16時間と24時間では血漿中 insulin 測定値に著明な変化はみられない。この成績は本法では室温で振盪時間は16時間以上を必要とする事を示すものである。

(4) Zero sampleにおける結合型 insulin の radioactivity / total radioactivity (B₀/T) に対する振盪時間および温度の影響 (図7)

本法では沈殿の radioactivity が低くその測定には慎重を要する。従ってその radioactivity を最も高くする条件を検討する必要がある。そこで zero sample において反

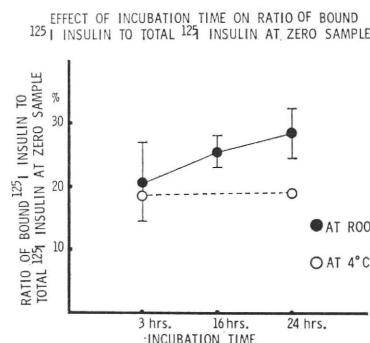


Fig. 7

応系の全 radioactivity に対する、沈殿物の radioactivity (結合型 insulin の radioactivity) の比 (B₀/T) を室温で3時間、16時間および24時間振盪して測定し、比較すると各々 $20.7 \pm 6.2\%$ 、 $25.5 \pm 2.4\%$ および $28.3 \pm 3.9\%$ であった (図7)。これを 4°C で振盪した場合でみると、3時間振盪で 19.1% 、24時間振盪でそれは 19.0% であった (図7)。かくして、室温で24時間振盪した場合その B₀/T は平均ほぼ30%で、これが現在得られた最も高い値であった。

以上の成績を小括すれば、本法を用いて血漿中 insulin 濃度を測定する場合、試験管は siliconize する必要はなく、反応は室温で24時間振盪して行なわせるのが最も良く、また沈殿の洗滌は2回で充分であった。

(5) 再現性

前述のごとく、標準曲線の再現性は良好であった。そこで同一血漿中 insulin 濃度を5回測定しそのバラツキ

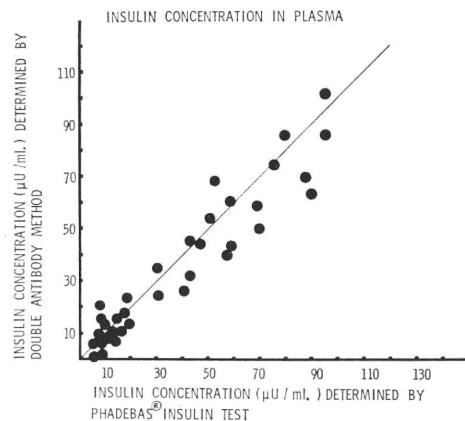


Fig. 8

をみると、15.0, 11.2, 15.5, 18.5 および $13.0\mu\text{U}/\text{ml}$ (平均 $14.6 \pm 2.8\mu\text{U}/\text{ml}$) であった。次に高濃度の insulin 値を有する血漿を各々 2 回測定した成績を示すと、(31 と $57\mu\text{U}/\text{ml}$), (70 と $78\mu\text{U}/\text{ml}$) および (80 と $78\mu\text{U}/\text{ml}$) でバラツキは少ない様に考えられた。

(6) 本法による血漿中 insulin 濃度と二抗体法による血漿中 insulin 濃度の比較。

図 8 は同一血漿について、ダイナボット社製 kit により、二抗体法で測定された血漿中 insulin 濃度と本法によるそれを比較したものである。両者はよく一致し、両者間に有意差はみられなかった。

考 按

血漿中 insulin 濃度の測定に関しては、現在各種の kit が発売され、insulin の radioimmunoassay⁶⁾ は日常検査として広く行なわれている。その大部分は二抗体法^{1,2)} が用いられているが、日常検査としては radioimmunoassay の高感度と高精度をそのまま生かしながら、より簡便で、測定所要時間が短縮され、より経済的な方法の開発が望まれている。かくして solid phase に抗体を結合させ、結合型ホルモンと遊離型ホルモンの分離を簡単に行なおうとする試みが Wide³⁾ らまた Catt⁴⁾ らにより行なわれ、最近この Solid phase radioimmunoassay が注目されるに至った。

Phadebas[®] Insulin Test は solid phase として sephadex が用いられている。その sephadex-anti-insulin complex、標準 insulin および ^{125}I 標識 insulin はいずれも真空凍結乾燥され、添付の buffer で溶解する事により直ちに使用され、安定で、使用法の非常に簡単な kit になっている。この kit で実際操作上、特に問題になるのは、沈澱即ち結合型 insulin の radioactivity が低値で、その測定は慎重を要する点であろう。この点に関しては自動型 well type scintillation counter で一試料に長時間測定し、測定誤差を少なくする事が考えられるが、自動型 well type scintillation counter は高価で現在それ程普及しておらず、また測定に時間をかける事は日常検査として不利である。そこで本法における ^{125}I 標識 insulin の比放射能は $350\mu\text{Ci}/\text{ng}$ と高値であるから ^{125}I 標識 insulin を指定された量より多く加えるか、または sephadex-anti-insulin complex を指定された量より多く加える等により沈澱の radioactivity を高め得る事が

考えられる。しかしながら、これ等の方法も ^{125}I 標識 insulin または sephadex-anti-insulin complex を大量に必要とする点で必ずしも日常検査として有利でない。そこで著者らは、反応温度と反応時間を変えて沈澱の radioactivity を高める事を検討した。反応温度は 4°C より室温がよく、また反応時間は 24 時間で B_0/T が平均ほぼ 30% で最も高い値を示した。反応は室温で行なわれるため、反応時間は 24 時間が限度と考えられた。この条件で著者らが使用しているメトロ社製 well type scintillation counter で沈澱中の radioactivity は最高ほぼ 3,000 cpm (zero sample)、最低ほぼ 500 cpm (insulin 濃度 $320\mu\text{U}/\text{ml}$) であった。従って実際に insulin 濃度の測定は、 $100\mu\text{U}/\text{ml}$ 以内で行なわれ、1 試料 2 分間で radioactivity が測定された。Solid phase radioimmunoassay の特徴は結合型と遊離型の分離法の簡便化と共に反応時間の短縮にある。現在二抗体法では 40 時間の反応時間が必要であるが、この点本法のそれは 24 時間で、かなり短縮されている。しかし日常検査として用いる場合、検査員の 1 日のスケジュールの点より 16 時間 (一夜) の反応時間がより有利であり、この点 B_0/T を更に高める努力が必要であろう。

次に本法を用いての insulin 濃度の再現性であるが、標準曲線では異った lot でも余り差はなく、再現性も良好であった。また同一血漿を 5 回にわたって測定した成績でも、そのバラツキは少なく、この点は従来の二抗体法と甲乙をつけがたい。

以上、著者らは本法を用いて血漿中 insulin 濃度を、反応温度は室温、反応時間は 24 時間、また沈澱の洗滌回数は 2 回として測定したが、その測定値と、同一血漿を二抗体法で測定した値とは、ほぼ一致していた。かくして Phadebas[®] Insulin Test は、反応温度は室温でよく、また反応時間が短縮された点、従来の二抗体法に比べ有利で、本法は insulin 濃度の測定に日常検査法として十分使用し得るものと考えられた。

むすび

Solid phase radioimmunoassay による血漿中 insulin 値の測定法として、Phadebas[®] Insulin Test が発売されているが、その若干の使用経験について述べた。

Phadebas[®] Insulin Test を提供された第一ラジオアイソトープ研究所に深謝します。

文 献

- 1) Morgan, C. R. and Lazarow, A. *Diabeies* **12**, 115, 1963
- 2) Hales, C. N. and Randle, P. J. *Biochem.* **88**, 137, 1963
- 3) Wide, L. and Porath, J. *Biochem. Biophys. Acta.* **130**, 257, 1966
- 4) Catt, K., Niall, H. D. and Tregear, G. W. *J. Lab. Clin. Med.* **70**, 820, 1967
- 5) Pharmacia 社製 Insulin Assay Kit 使用説明書 (第一 RI 研究所)
- 6) Yalow, R. S. and Berson, S. A. *Nature* **184**, 1648, 1959

Determinations of insulin concentrations in plasma by solid phase radioimmunoassay (Phadebas® Insulin Test).

Mitsuo Inada, Junichi Okabe, Yoshio Kazama, Hideo Takayama,
Momoe Haruna and Hiroshi Takahashi.

*Endocrine Section, Department of Internal Medicine, and
Department of Clinical Pathology, Tenri Hospital, Tenri, Nara.*

1) Determinations were made of insulin concentrations in plasma by Phadebas® insulin test. In this new solid phase method of radioimmunoassay for insulin, insulin antibodies were covalently coupled to Sephadex as the solid phase support, and insulin bound to Sephadex anti-insulin complex was easily precipitated to separate from free insulin.

2) After incubation of plasma or insulin standard with ^{125}I -insulin and with Sephadex anti-insulin complex, bound insulin was precipitated by centrifugation, and was washed with 0.9% saline solution. ^{125}I activities of washed precipitates were assayed by well type scintillation counter. The ratios of ^{125}I activities of precipitates in standard and plasma sample to that in sample without addition of insulin standard (zero sample) were calculated to construct the standard curves and to determine the insulin concentrations in plasma.

3) The effect of incubation time on insulin concentration in plasma was investigate from comparison of insulin concentrations determined after 3, 5, 16

and 24 hours incubation at room temperature.

Insulin concentrations in plasma were clearly elevated with prolongation of incubation time for 3 to 16 hours and it was reached at plateau in incubation of over 16 hours. The results indicated that incubation time of over 16 hours was necessary to obtain accurate insulin concentrations in plasma.

4) The ratios of activity of bound ^{125}I -insulin to total ^{125}I activity at zero sample were $20.7 \pm 6.2\%$, $25.5 \pm 2.4\%$, and $28.3 \pm 3.9\%$ in incubation time of 3, 16 and 24 hours, respectively, at room temperature. The highest ratio was obtained at incubation time of 24 hours, indicating this condition was most suitable to determine insulin concentrations in plasma by the test.

5) Striking correlation was evident in the plots of insulin concentrations in plasma by Phadebas® insulin test and those by double antibody method. The findings represent Phadebas® insulin test was useful to determine the insulin concentrations in plasma as routine test.

* * * * *