

《ノート》

インスリン PEG キットの使用経験

Radioimmunoassay Kit Using Polyethyleneglycol to Separate Free and Antibody-bound Insulin

鬼原 彰* 菊池 晃* 野尻 義男* 細川 英明*

Akira KIHARA, Akira KIKUCHI, Yoshio NOJIRI and Hideaki HOSOKAWA

First Department of Internal Medicine, Sapporo Medical College

はじめに

RIA の進歩・普及はめざましいものがあるが、最近では臨床検査上の点からも迅速・簡便な方法が追求されるようになってきている。

インスリン (Ins) の RIA キットも種々のものが市販されており、いずれを使用してもほぼ安定した結果が得られている。今回著者らは F/B 分離に polyethyleneglycol (PEG) を用いたインスリン測定キットを試用する機会を得たので若干の検討を行なった。

測定方法

1. 第1反応について

キット記載の方法を述べると、標準 Ins (ブタ) 溶液あるいは被検血清 0.1 ml に Ins 抗体 (抗ブタ Ins モルモット血清) および ^{125}I -Ins (ブタ) をおのおの 0.1 ml 加えて室温 (15~30°C) で3時間反応させる。なおこれらの各試薬はいずれも 0.1M borate buffer (0.5% BSA を含む) pH 8.6 に溶解してある。

2. 第2反応について

第1反応終了後25% PEG 溶液 1.0 ml を加えて

十分に混和する。次いで室温で 3,000 r.p.m., 15分間遠沈し decantation にて上清をすてる。沈渣の放射能を γ -counter で測定する。なおあらかじめ第1反応中に2~3本の全放射能を測定しておく。

測定成績

1. 第1反応時間の検討

第1反応時間の検討を行なったところ Fig. 1 に示す如く、反応曲線は9~24時間ではほぼプラトーとなった。したがって第1反応時間は16時間とした。

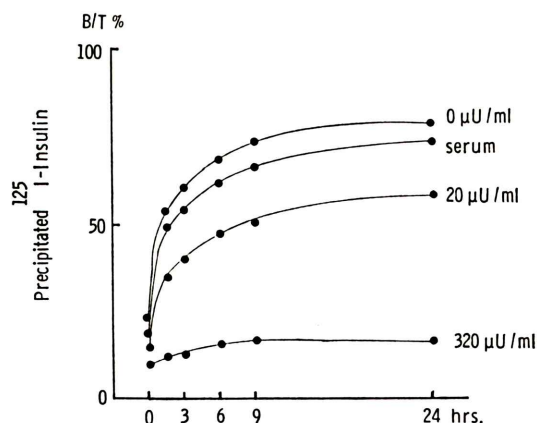


Fig. 1 Effect of Incubation Time on ^{125}I -Insulin Precipitation

Key words: insulin, radioimmunoassay, polyethyleneglycol

* 札幌医科大学第1内科

受付: 52年11月7日

最終稿受付: 53年2月3日

別刷請求先: 札幌市中央区南1条西16丁目 (〒060)

札幌医科大学第1内科

鬼原 彰

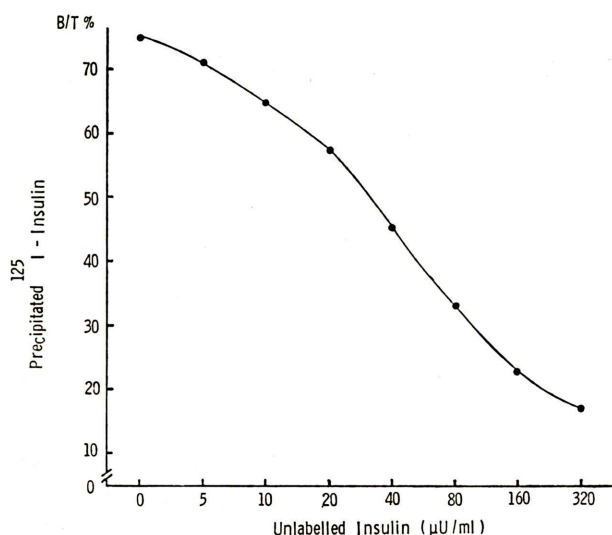


Fig. 2 Standard Curve for Insulin Immunoassay

2. 標準曲線について

Fig. 2 に本法による標準曲線の1つを示したが、毎回安定した標準曲線が得られた。

3. 再現性について

Table 1 に示す如く、同一測定系内の再現性は3.2~5.5% (C.V.) を示し、測定系間のそれは4.4~11.6%を示した。

4. 回収率について

2種類の血清試料を用いて回収率を調べたが、Table 2 に示す如く、80.0~103.0%を示した。

5. 本法と2抗体法による測定値の比較

42種類の血清試料を用いて両法による測定値を比較した。Fig. 3 に示す如く、両法の相関係数は $r=0.98$ ($p<0.001$) を示し極めて高い相関性を示した。しかし PEG 法は2抗体法に比べて全般的にやや低値を示した。

6. 非特異結合の検討

本法は γ -globulin (γ -G) を carrier protein として抗体結合 Ins の沈澱を生ぜしめるものであることから、血清試料中の γ -G 濃度は当然その測定値に影響を与えることが考えられる。そこで標準 Ins 溶液あるいは血清試料 0.1 ml と ^{125}I -Ins 0.1 ml を0および20時間反応させて非特異結合の検

Table 1 Reproducibility of the Assay when applied to Serum

(a) Intraassays			
Sample	No.	$\mu\text{U/ml}$ ($M \pm SD$)	C.V. (%)
Serum A	6	26.16 ± 1.32	5.0
B	6	58.50 ± 2.58	4.4
C	6	28.83 ± 1.60	5.5
D	6	85.66 ± 3.66	4.3
E	6	41.83 ± 1.32	3.2
(b) Interassays			
Sample	No.	$\mu\text{U/ml}$ ($M \pm SD$)	C.V. (%)
Serum F	3	14.33 ± 1.15	8.0
G	3	45.00 ± 2.00	4.4
H	3	94.33 ± 5.68	6.0
I	3	13.33 ± 1.52	11.4
J	3	21.66 ± 2.51	11.6

Table 2 Recovery of unlabelled Insulin added to Serum

Serum A ($\mu\text{U/ml}$)			Serum B ($\mu\text{U/ml}$)		
expected	measured	%	expected	measured	%
165	170	103.0	189	161	85.2
88	88	100.0	112	103	92.0
49	44	89.8	73	70	95.9
30	25	83.3	54	50	92.6
20	17	85.0	44	45	102.3
15	12	80.0	39	40	102.6
—	10	—	—	34	—

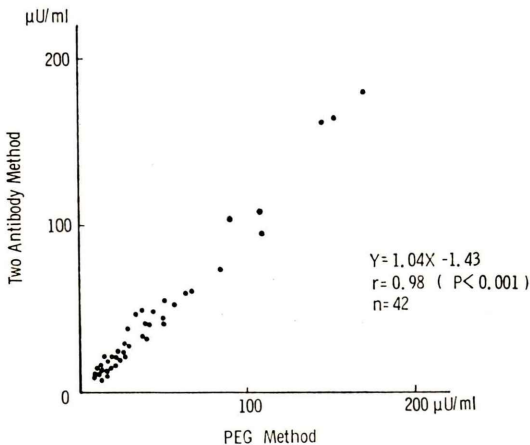


Fig. 3 Comparison of Insulin Levels in Sera between PEG Method and Two Antibody Method.

Table 3 Changes of Non-specific Binding of ^{125}I -Insulin during the First Incubation in Normal Sera

	Sample	0 hrs. (B/T %)	20 hrs. (B/T %)
1.	10 $\mu\text{U/ml}$	5.0	6.4
2.	80 $\mu\text{U/ml}$	5.1	6.4
3.	160 $\mu\text{U/ml}$	5.6	6.7
4.	Serum A	4.3	4.5
5.	B	7.3	7.7
6.	C	5.0	4.9
7.	D	4.6	4.7
8.	E	5.1	5.0
9.	F	4.7	5.7
10.	G	3.3	3.7
11.	H	4.1	4.4
12.	I	5.3	5.0
13.	J	6.0	5.4
		5.03 ± 0.96	5.42 ± 1.11

討を行なった。

まず3種類の標準 Ins 溶液および10種類の正常対照血清について調べたが、反応時間が0の場合には Table 3 に示す如く、あらかじめ bovine γ -G 20 mg/ml が添加されている標準 Ins 溶液では 5.0~5.6% とほとんど一定の結合率を示したが、血清試料ではそれらの間にかんがりの変動が認められた。しかし第1反応時間を20時間としても非特異結合の増加は極めて軽微であった。

次に正常対照血清と高 γ -G 血症を示した肝疾

Table 4 Changes of Non-specific Binding of ^{125}I -Insulin in Sera from Patients with Liver Diseases and Diabetes Mellitus and in Normal Sera

	Normal Subject (B/T %)	Liver Disease with Hyper γ -globulinemia (B/T %)	Diabetes Mellitus treated with Insulin (B/T %)
1.	6.4	1. 8.3	1. 18.6
2.	6.3	2. 7.7	2. 91.5
3.	6.7	3. 7.5	3. 9.9
4.	6.6	4. 7.0	
5.	6.8	5. 7.4	
6.	6.3	6. 8.7	
7.	7.2	7. 7.4	
8.	5.8	8. 9.5	
9.	5.9	9. 7.9	
10.	5.9	10. 9.5	
	6.39 ± 0.44	8.09 ± 0.88	

患および Ins 治療糖尿病血清について20時間反応後の非特異結合を比較した。Table 4 に示す如く、正常対照群の非特異結合は $6.39 \pm 0.44\%$ を示したが、肝疾患群では $8.09 \pm 0.88\%$ と軽度の上昇を示し、Ins 治療糖尿病のうち2名はそれぞれ18.6および91.5% と高値を示したが、1名は軽度の上昇にとどまった。

考 案

インスリンのRIAは、いずれの方法を利用しても安定した成績が得られる^{1),2)}が、最近では迅速・簡便なものがしだいに普及している。F/B分離にPEGを用いた方法も各種のRIAに応用されている。InsのRIAに本法を用いた場合の簡便性・経済性・迅速性等の利点についてはすでに報告³⁾したが、今回本法を用いたIns測定キットを入手したので、2,3の検討を加えた。

まず第1反応時間は3時間程度の短時間でも測定は可能であるが、安定した成績を得るためには9~24時間が適当と考えられた。PEG添加および遠沈操作は今回は室温で実施したが、さきにも発表³⁾したように低温下で行なうとより安定した成績が得られることから、できるだけ低温で実施することが望ましいと考えられた。

標準曲線, 再現性, 回収率はRIAとしてほぼ満足すべき成績と考えられ, 2抗体法による測定値との相関性についても極めて良好な結果が得られ, この点も前回の成績と一致している.

PEGによる抗体結合Insの沈殿には, 前述の如くcarrier proteinとしての γ -Gの共存⁴⁾が必要である. したがって血清試料中の γ -G濃度の差が抗体結合Insの沈殿に大きい影響を与えることは明らかであり, 本法の実施上最も問題となる点である. そこで本キットについてその非特異結合を検討した結果, 第1反応時間が0および20時間の間にはほとんど変化を認めなかったが, 高 γ -G血症を示す肝疾患群では正常対照群に比べて非特異結合の増加が認められた. このことは測定値が真の値よりも低値に算出される可能性のあることを示している. この点については1次性糖尿病で高 γ -G血症を示すことはまれであるから問題となることは少ないとも言えるが, 肝疾患をはじめとして高 γ -G血症を示す病態では十分に考慮に入れておくことが必要であろう. 著者らは稀釈プール血清を第1反応終了後に標準曲線および検体用試験管に加えることによってこの点を補正している.

本法はIns治療患者の血中遊離Insの定量法にも応用⁵⁾されているが, その原理からも明らかのように, 血中Ins抗体の有無を簡単に知る方法としても有用である. 今回は3名のIns治療糖尿病につき無処理血清を用いて非特異結合の変化を調査したが, 2名は明らかに高値を示し, 特に症例2は著明な結合率増加を示したことから, 外因性

Insに対する抗体の存在が強く示唆された.

結 論

PEGを用いたIns測定キットにつき検討した. その結果, 第1反応時間を16時間とすることにより再現性および回収率ともほぼ満足できる成績が得られ, 2抗体法とも極めて高い相関性を示した. またその非特異結合の態度によってIns抗体の有無を簡単に調べることもできる点から, 簡易に, かつ安定したIns測定キットとして臨床応用の価値が大きいと考えられた.

本論文の要旨は第2回核医学北海道地方会(昭和52年10)月で発表した.

なお, 本測定キットの提供をいただいたダイナボットRI研究所に深謝の意を表したい.

文 献

- 1) 鬼原 彰, 白石正勝, 伊東義智, 他: Sephadex anti-insulin complex による血中インスリンの測定. 基礎と臨床 6: 1549-1554, 1972
- 2) 青木紘一, 細川英明, 鬼原彰, 他: デキストラン・チャコールを用いたインスリン測定キット(CIS)の使用経験 Medical Postgraduates 14: 485-488, 1976
- 3) 鬼原 彰, 菊池 晃, 八重樫田鶴子, 他: Polyethyleneglycolを用いた peptide hormone の radioimmunoassay に関する研究, 第1報 Insulinについて. 臨床病理 23: 449-452, 1975
- 4) Desbuquois B and Aurbach GD: Use of polyethyleneglycol to separate free and antibody-bound peptide hormones in radioimmunoassays. J Clin Endocrinol Metab 33: 732-738, 1971
- 5) 中川昌一, 中山秀隆, 佐々木嵩, 他: インスリン治療患者の血中遊離インスリン定量法, PEG 抽出法. 糖尿病 15: 403-408, 1972