

《ノート》

Solid phase Radioimmunoassay による血中インスリンの測定**—抗体 bead 法に関する基礎的ならびに臨床的評価—****Fundamental and Clinical Evaluation of Antibody-coated Bead Method for Insulin Radioimmunoassay**

福地 稔 木戸 亮 森田 俊孝 永井 清保

Minoru FUKUCHI, Akira KIDO, Toshitaka MORITA and Kiyoyasu NAGAI

Devision of Nuclear Medicine, RI Center, Hyogo College of Medicine

I. はじめに

インスリンは、Berson and Yalow¹⁾により開発された radioimmunoassay (以下 RIA と略す) によって最初に測定されたホルモンである。RIA によりインスリンが測定可能となって、日常臨床上胰β細胞機能を知ることが容易となった。

インスリンの RIA を、その B., F. 分離法からみると、濾紙電気泳動法¹⁾、二抗体法^{2,3)}、塩析法⁴⁾、エタノール沈殿法⁵⁾、PEG 法⁶⁾、DCC 法⁷⁾、レジン法⁸⁾、などに区別できる。RIA が広く臨床的に活用されるにつれ、より迅速により正確に測定結果を得ることができる測定法へと関心が向かれるようになった。インスリン RIA においても、B., F. 分離に必要な一連の操作や機器を必要としない固相法が注目を集め、近年、Sephadex 法⁹⁾や抗体 tube 法¹⁰⁾などが開発されるようになった。

今回われわれは、新しくインスリン測定法として開発された固相法、すなわち、Plastic bead に抗インスリン抗体を coating した抗体 bead 法について、測定法としての基礎的検討を行うと共に、

兵庫医科大学病院・RI センター診療部

受付：56年5月18日

最終稿受付：56年10月7日

別刷請求先：西宮市武庫川町1-1 (番号 663)

兵庫医科大学病院 RI センター診療部

福地 稔

その臨床的評価を行ったので、その成績につき報告する。

II. 方法および対象

Insulin RIA KIT II (ダイナボット RI 研究所製) の有用性の検討を行ったが、実際の測定は Table 1 に示す手順で行った。

1) 基礎的検討**(1) 標準曲線**

異なる 8 回の測定で得られた標準曲線を平均土標準偏差で表わし、片対数グラフにプロットし、その安定性と再現性を検討した。

(2) 特異性の検討

特異性をみる目的で、本測定系に C-ペプタイド (第一ラジオアイソトープ研究所製) およびグルカゴン (ダイナボット RI 研究所製) を添加し、標準インスリンとの比較を行った。

(3) Intraassay および Interassay

インスリン濃度の異なる A, B, C, 3 種類の血清試料を用い、同一測定内 ($n=8$) における再現性を、また同じく D, E, F, 3 種類の血清試料を用い異なる 8 回の測定間の再現性をそれぞれ検討した。

(4) 回収率

血清試料にインスリン濃度の異なる 7 種類の標

Key words: Insulin, Radioimmunoassay, Antibody-coated bead, Evaluation

Table 1 Assay procedure for insulin radioimmunoassay with antibody-coated bead

- 1) Standards or samples..... 0.1 ml
- 2) I-125-Insulin solution 0.3 ml
- 3) Anti-insulin antibody coated bead 1 piece
Mixed, and incubate for 20 hours
↓ at 25°C.
- 4) Distilled water 1.0 ml
- 5) Aspirate the incubation medium
- 6) Count the radioactivity of bead
- 7) Calculate the assay results

準インスリンを添加した際の回収率についても検討した。

(5) 希釈試験

血中インスリン濃度の比較的高い2種の血清試料を用い、1:1, 1:2, 1:4, 1:8, および1:16と段階的に希釈した際の希釈曲線を標準曲線と比較検討した。

(6) インキュベーション温度および時間

インキュベーション温度およびインキュベーション時間が測定系に与える影響を検討する目的で、以下の検討を行った。すなわち、インキュベーション温度を4°C, 37°C, 25°C および室温とかえ、それぞれ20時間インキュベーションした際の標準曲線を比較検討した。また、インキュベーション時間を、6時間、20時間、および24時間とかえた際のそれぞれの標準曲線についても比較検討した。

2) 臨床的検討

健常人3名および糖尿病患者29例に対し、50g OGTT を施行し、負荷前ならびに負荷後30分、60分、90分、120分、180分に採血し、本測定法で IRI を測定するとともに autoanalyzer によりそれぞれの試料の血糖値を測定した。

インスリノーマ1例について、その早朝空腹時のIRIを本測定法で測定した。

一方、本測定法で得られる測定値の評価を目的にして、78検体について同時に Insulin RIA Kit (ダイナボット RI 研究所製) でも測定し、両測定値を比較した。

III. 成績

1) 基礎的検討

(1) 標準曲線

異なる8回の測定で得られた標準曲線を Fig. 1 に示したが、急峻で再現性の良好な標準曲線が得られた。

(2) 特異性の検討

本測定系の特異性をみる目的で、本測定系に C-ペプタイド、およびグルカゴンを添加した際の標準曲線を、インスリンのそれと比較した (Fig. 2)。すなわち、C-ペプタイドおよびグルカゴンを添加しても、検討範囲内ではインスリン測定系に対し抑制効果を認めなかった。

(3) Intraassay および Interassay

インスリン濃度の異なるA, B, C, 3種類の血清試料を用い、同一測定内 ($n=8$) における再現性を、また異なるD, E, F, 3種類の血清試料を用い、異なる8回の測定における再現性をそれぞれ検討し、その成績を Table 2 で一括した。同一測定内における再現性は、C.V. が血清 A で 8.0%, B で 1.9%, C で 3.5% であった。また異なる測定間の C.V. は、血清 D で 8.5%, E で 13.3%, F で 6.7%

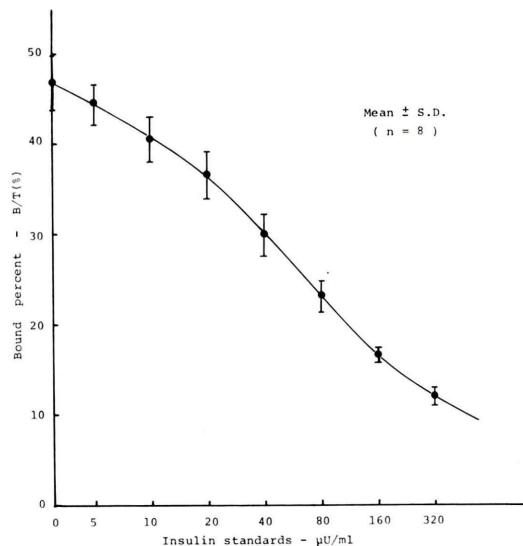


Fig. 1 Standard curve of Insulin RIA Kit II.

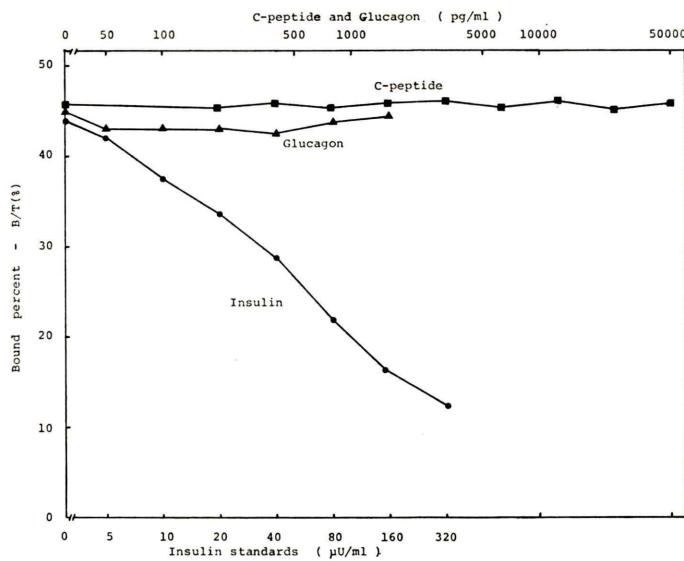


Fig. 2 Influences of C-peptide and glucagon on Insulin RIA KIT II.

Table 2 Intraassay and interassay reproducibility of Insulin RIA KIT II

1) Intraassay reproducibility

	Assay results — μU/ml								C.V. (%)		
	1	2	3	4	5	6	7	8			
Serum A	3.4	3.3	3.6	4.1	3.3	4.0	3.8	3.5	3.63	0.29	8.0
Serum B	24.9	24.5	25.3	25.0	24.6	24.7	24.8	26.1	24.98	0.48	1.9
Serum C	140.4	123.1	132.5	136.2	134.8	135.7	133.3	135.9	140.40	17.30	3.5

2) Interassay reproducibility

	Assay results — μU/ml								C.V. (%)		
	1	2	3	4	5	6	7	8			
Serum D	3.6	3.5	3.7	3.3	3.3	3.8	4.0	3.0	3.53	0.30	8.5
Serum E	27.4	35.1	27.9	31.7	25.3	28.6	30.4	38.5	30.61	4.09	13.3
Serum F	157.4	160.7	166.0	138.6	140.8	155.2	160.7	140.4	152.48	10.15	6.7

の成績が得られた。

(4) 回収率試験

血清試料にインスリン濃度の異なる 7 種類の標準インスリンを添加し、回収率を検討した成績を Table 3 に示した。回収率は 88.0~107.0% の範囲を示し、平均 97.6% であった。

(5) 希釈試験

血中インスリン濃度の比較的高値を示す 2 種類の血清試料を、それぞれ、1:1, 1:2, 1:4, 1:8,

および 1:16 と段階的に希釈した際の希釈曲線を標準曲線と比較した成績を Fig. 3 に示した。いずれの希釈曲線も標準曲線との間に良好な平行性が認められた。

(6) インキュベーション温度と時間の検討

インキュベーション時間を 20 時間と一定にし、インキュベーション温度を 4°C, 25°C, 37°C および室温に設定した際の標準曲線を Fig. 4 に示した。4°C および 37°C のインキュベーションでは B %

Table 3 Recovery of insulin added to serum sample measured by Insulin RIA KIT II

Serum IRI value (μ U)	Added insulin value (μ U)	Assay result (μ U)	Recovery	
			(μ U)	(%)
8.4	2.5	10.6	2.2	88.0
	5.0	13.2	4.8	96.0
	10.0	17.2	8.8	88.0
	20.0	27.8	19.4	97.0
	40.0	49.2	40.8	102.0
	80.0	94.2	85.8	107.0
	160.0	176.8	168.4	105.0
			Mean	97.6

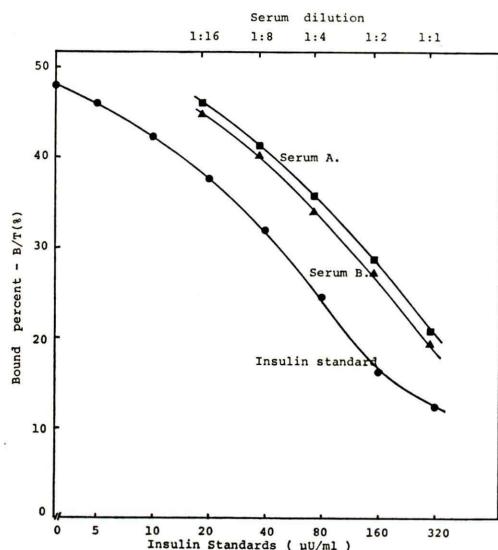


Fig. 3 Dilution test of serum IRI measured by Insulin RIA Kit II.

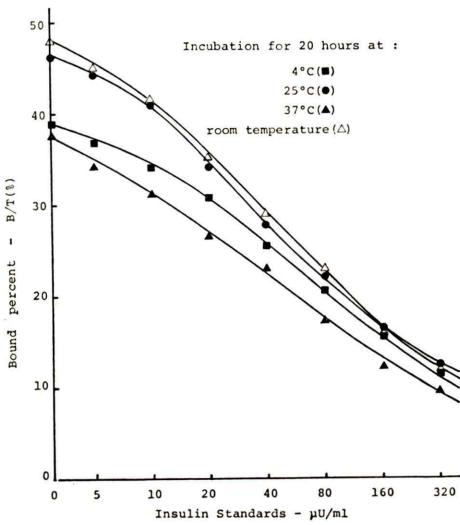


Fig. 4 Effect of incubation temperature on standard curve of Insulin RIA Kit II.

の低下が認められ、良好な標準曲線が得られなかった。これに対し、室温と25°Cではいずれも良好な標準曲線が得られ、両者の間にはとくに差異を認めなかった。

一方、インキュベーション温度を25°Cと一定にして、インキュベーション時間を6時間、20時間、および24時間と変えた際の標準曲線をFig. 5に示した。6時間のインキュベーションではB%の低下が著しく、良好な標準曲線が得られなかつた。これに対し、20時間のインキュベーションでは、いずれも良好な標準曲線が得られた。

2) 臨床的検討

健常人3名の50gOGTTの成績をFig. 6に示した。血糖値は30分値を極大とするいわゆる正常型を示し、これに伴いIRI値は60分値を極大とする反応が認められ、本測定法がOGTTとの併用により臍β細胞機能を知る検査法として応用可能であることを示す成績が得られた。

糖尿病患者29例に対し50gOGTTを施行し、得られたそれぞれの測定値を、空腹時血糖値とともに149mg/dl以下を示すgroup A, 150~199mg/dlの範囲を示すgroup B, 200mg/dl以上を示す、

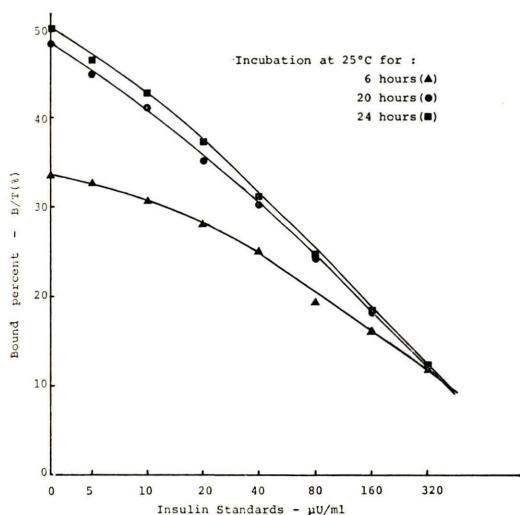


Fig. 5 Effect of incubation time on standard curve of Insulin RIA Kit II.

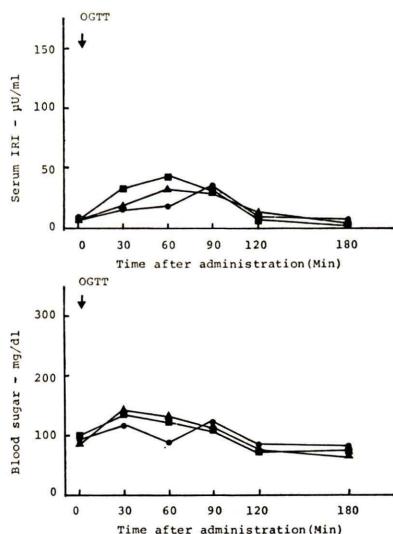


Fig. 6 IRI and blood sugar responses to oral administration of 50 g glucose in normal subjects.

group C, およびインスリン治療中の group D, の 4 群に分け、それぞれの値の平均土標準偏差を求め、Fig. 7 に一括した。Group A では OGTT に対する IRI の反応は認められたが、group B ではその反応は悪くかつ遅延する成績が得られ、group C ではほとんど IRI の反応が認められなか

った。一方、インスリン治療中の患者では、前値すでに高値を示し、OGTT 中、常に高値を示した。

手術によりインスリンノーマが確認された 1 例の術前の絶食時血清試料を用い、その IRI 濃度を測定したところ、 $49.7 \mu\text{U}/\text{ml}$ と高値を示した。

一方、本測定法の測定値の評価を目的として、78 検体について本測定法とインシュリン・リアキット法による IRI 値の比較を行った (Fig. 8)。両者の間には相関係数 $r=+0.973$ 、回帰直線 $y=0.793x+8.323$ との成績が得られた。

IV. 考 案

インスリンはラジオイムノアッセイにより、最初に測定されたホルモンである¹⁾。以来、膵 β 細胞機能をみる手段として広く臨床的に活用されるようになった^{1~8)}。現在、臨床的には多くの測定法が提供されているが、より迅速、より簡便に測定結果を得ることができるキットへの関心が向けられているといえる^{9,10)}。その結果、B., F. 分離に必要な一連の操作や機器を必要としない固相法が注目を集めようになつた。今回、われわれが検討した測定法は、plastic bead に抗インスリン抗体をあらかじめ coat した、いわゆる抗体 bead 法である。抗体 bead 法の利点は、測定手順がほぼ抗体チューブ法と同様である上に、測定終了後の廃棄物の取り扱いが容易であることであろう。しかし、一般的に固相法の問題点として、均一に抗体が固体に coat されているか否かがあげられる。つまり、それぞれが同一の割合の抗原-抗体反応となり得るかどうかである。これに関しては、今回のわれわれの検討では、アッセイ間のばらつきはむしろ他の測定法に比べて少なく、安定した成績が得られた。これらの成績から、本測定法は bead に抗体を一定量 coat することに技術的に成功したキットといえる。さらに本測定法の長所として、B., F. 分離に際し bead のみを残して他の反応液をほぼ完全に除去することが容易である点をあげることが出来る。

本測定法に関する基礎的検討として、標準曲線、

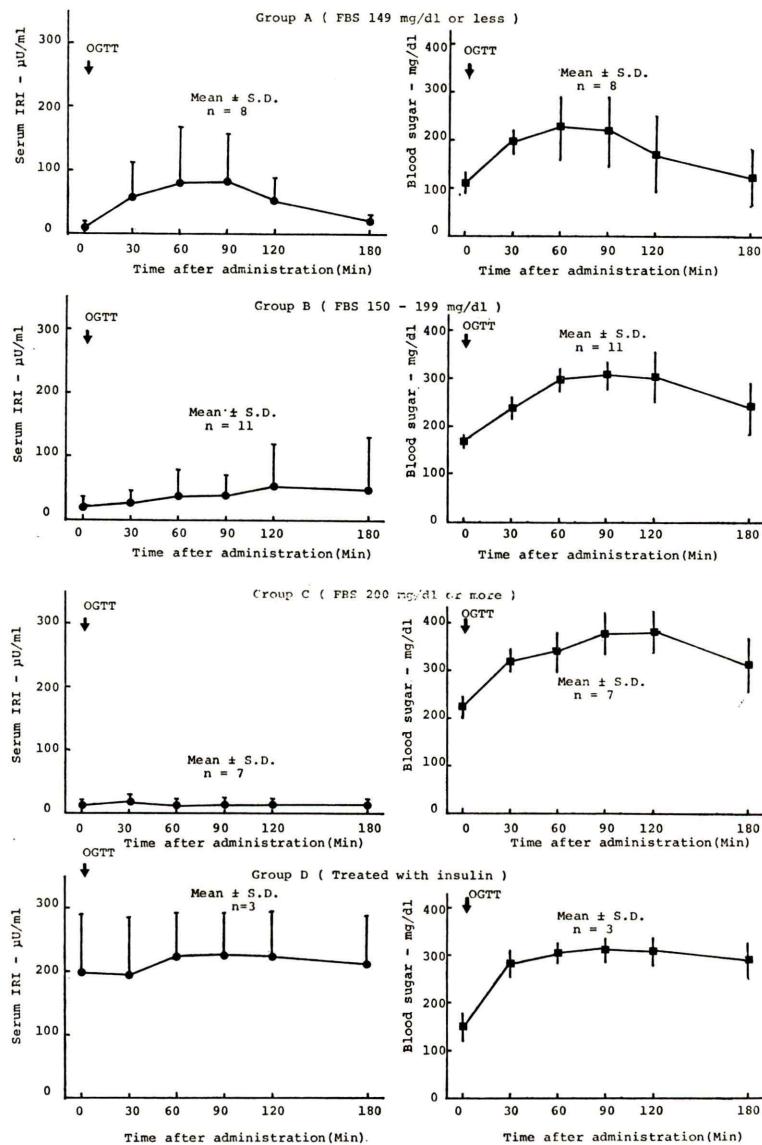


Fig. 7 IRI and blood sugar responses to oral administration of 50 g glucose in patients with diabetes mellitus.

特異性、希釈試験、回収率など測定法に要求される諸条件について検討したが、いずれも満足できる成績が得られた。

測定条件としては、インキュベーション時間は20時間と24時間では差は認め得なかった。したがってより早く測定結果が得られる点を考えると20

時間のインキュベーションを採用することが望ましいと思われる。インキュベーション温度については、25°Cと室温との間に差を認めなかつたが、室温の季節的変動等を考慮すると25°Cの恒温槽を使用する方が望ましいであろう。

臨床応用の成績では、それぞれの胰 β 細胞機能

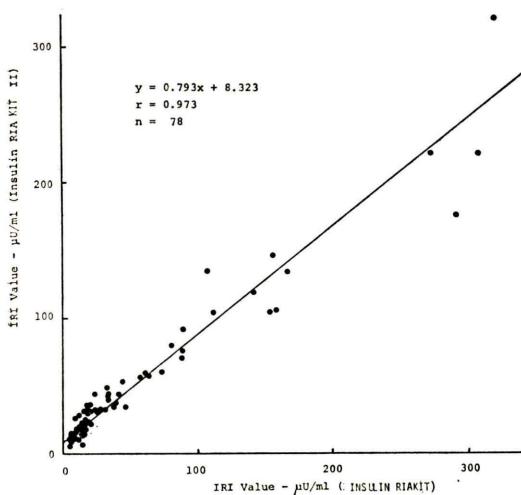


Fig. 8 Correlation between assay results of Insulin RIA Kit and those of Insulin RIA Kit II.

をよく反映した成績が得られ、本測定法が OGTT などとの併用で臨床的にも有用であることが確かめられた。ただしインスリン治療中の患者は当然のことながら血中 IRI 値は高く、内因的胰 β 細胞機能を評価し得ない。一方、1 例ではあったがインスリンノーマの患者の血中 IRI の測定を本測定法で行い、高値であることが確認できた。これらの臨床的検討成績から、本測定法は IRI の測定法として臨床的にも有用といえる。問題は、すでに臨床的に活用されている他の測定法キットと測定値が一致するかどうかにあるといえる。これに関し、Insulin RIA Kit を用い検討したわれわれの成績では、 $r=+0.973$ と良好な相関関係が得られたが、その際の回帰直線は $y=0.793x+8.323$ であった。これは、本測定法と現在使用されているキットとの間に、得られる測定値に差のあることを示しているが、その理由については明確ではない。しかし、われわれが比較に用いた Insulin RIA Kit は、その開発が比較的早かったため、標準インスリンの値を、WHO の標準品を基に決定されたものではないという事情がある。これに対し、今回検討に用いた新しい Insulin RIA Kit II は、その標準インスリンの値を WHO の標準品を基に決定されている。これらの事情を考えると、

この両キットにおける標準インスリンの値の設定の差が、両者の測定値の差となっているものと推測される。

V. 結 語

抗体 bead 法によるインスリン・ラジオイムノアッセイ (Insulin RIA KIT II) につき、基礎的な観察に臨床的検討を行い以下の結論を得た。

- 1) 本測定法は、標準曲線、希釈試験、同一測定内および異なる測定間の再現性、特異性、回収率などの基礎的検討成績から、測定法に要求される諸条件を満足している。
- 2) インキュベーション温度 25°C、インキュベーション時間20時間で最も良好な成績が得られる。
- 3) 臨床応用では、糖尿病患者の胰 β 細胞機能の評価やインスリノーマの診断に本測定法は有用であった。
- 4) 他の測定法との測定値の比較をインシュリン・リアキットを用い検討したが、良好な相関関係が認められた。
- 5) 本測定法は、B. F., 分離に必要な特別な機器も必要とせず、また測定終了後の廃棄物の取扱いが容易である。

稿を終るにあたり Insulin RIA Kit II の提供を頂いたダイナボット RI 研究所に謝意を表します。

文 献

- 1) Yalow RS, Berson SA: Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J Clin Invest* **39**: 1157-1175, 1960
- 2) Morgan CR, Lazarow A: Immunoassay of insulin using a two-antibody system. *Proc Soc Exper Biol Med* **110**: 29-32, 1962
- 3) Hales CN, Randle PJ: Immunoassay of insulin with insulin-antibody precipitate. *Biochem J* **88**: 137-146, 1963
- 4) Grodsky GM, Forsham PH: An immunochemical assay of total extractable insulin in man. *J Clin Invest* **39**: 1070-1079, 1960
- 5) Mukulu DR, Vichick D, Wright PT et al: Insulin immunoassay by baek-titration using alcohol precipitation of insulin-antibody complex. *Diabetes* **18**: 660-669, 1969

- 6) Desbuquois B, Aurbach GD: Use of polyethylene glycol to separate free and antibody-bound peptide hormones in radioimmunoassay. *J Clin Endocr* **33**: 732-738, 1971
- 7) Harbert V, Lau KS, Gottlieb CW et al: Coated charcoal immunoassay of insulin. *J Clin Endocr* **25**: 1375-1384, 1965
- 8) Malani F, Ditschuneit H, Bartelt KM, et al: Uber die radioimmunologische Bestimmung von Insulin im Blut. *Klinisch Wochenschrift* **43**: 1000-1007, 1965
- 9) Wide L, Porath J: Radioimmunoassay of proteins with the use of sephadex-coupled antibodies. *Biochem Biophys Acta* **130**: 257-262, 1966
- 10) Ceska M, Grossmuller F, Lundkvist U: Solid-phase radioimmunoassay of insulin. *Acta Endocr* **64**: 111-125, 1970