

《ノート》

## ポリエチレングリコール (PEG) 法による 血中インスリン測定について

—PEG 沈降法とセルロースアセテート膜電気泳動法によるインスリン抗体の検索—

Serum Insulin Radioimmunoassay Using Polyethylene Glycol (PEG) Method

—Detection of Insulin Antibody by PEG Precipitation and  
Cellulose Acetate Membrane Electrophoresis—

野上 修二\*    鈴木 謙三\*    中敷領勝士\*    石塚 仁平\*  
茅沼 浩\*    小笠原 幹\*    近藤 隆\*    福士 政広\*  
内川 澄\*

Shuji NOGAMI\*, Kenzo SUZUKI\*, Katsushi NAKASHIKIRYO\*,  
Nihei ISHIZUKA\*, Hiroshi KAYANUMA\*, Miki OGASAWARA\*,  
Takashi KONDO\*, Masahiro FUKUSHI\*, and Toru UCHIKAWA\*\*

\*Department of Radiology, \*\*Department of Internal Medicine, Tokyo Metropolitan Komagome Hospital

### I. はじめに

ラジオイムノアッセイ (RIA) による血中インスリン測定値が異常値を示し、インスリン抗体の存在が疑われる検体に遭遇することが少なくない。検体中に抗体が存在する場合、標識インスリンが試薬として添加したインスリン抗体のみならず検体中の抗体とも結合し、ポリエチレングリコール (PEG) 法では、抗体とともに沈降して沈渣に集まるので、測定値は 0 またはそれ以下の異常低値となる。二抗体法では、試薬由来の抗体は沈降するが、検体由来のものは上清にとどまり、沈渣の放射能が減少するので、測定値は異常高値を示すことになる。インスリン抗体のほとんどの場合が、

過去あるいは現在のインスリン治療に由来するが、われわれは、PEG 法で異常低値をとるにもかかわらず二抗体法では異常高値を示さず、インスリン治療歴も否定される症例を経験し、PEG 法による測定値の異常が検体中のインスリン抗体によるものか、あるいは測定法上の問題によるものかについて検討し、インスリン抗体の存在によるものであることを確認したので、PEG 法の有用性と併せて報告する。

### II. 方 法

1) 検体: 昭和55年1月より11月までの11か月間に、PEG 法による血中インスリン測定を行った症例は780例で、測定値が0以下となった症例は18例であった。今回、このうちの13例について検討し、これらを異常群とした。インスリン治療歴のあるものは11例、患者が否定したものは2例

\* 東京都立駒込病院放射線科

\*\* 同 内科

受付: 57年5月8日

最終稿受付: 57年9月20日

別刷請求先: 文京区本駒込 3-18-22 (☎ 113)

東京都立駒込病院内科 内川 澄

**Key words:** polyethylene glycol (PEG) method, insulin radioimmunoassay, insulin antibody.

であった。これに対して、インスリン治療歴のない症例より無作為に17例をとり、これらを対照群とした。

2) インスリン RIA: PEG 法による市販キット(科研製薬社, PEG 法キットと略す)と、二抗体法による市販キット(ダイナボット社, 二抗体法キットと略す)を用いた。

3) インスリン結合率の測定: 検体血清 100  $\mu$ l に 0.04 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) 100  $\mu$ l,  $^{125}$ I-ウシインスリン液 100  $\mu$ l (いずれも PEG 法キットで使用のもの) を添加し, 4°C で約 20 時間反応させた後, 20% PEG-0.5%  $\gamma$ -グロブリン (4:1) 混液 1 ml を加えて混和し, 4°C で 3,000 rpm, 15 分間遠心分離し, 沈渣の放射能を計測した。インスリン結合率は添加した総放射能に対する沈渣の放射能の比 (B/T %) で求めた。インスリン結合率に対する血清蛋白濃度の影響をみる実験では, ウシアルブミン, ヒト  $\alpha$ -グロブリン (Sigma Chemical 社), ヒト  $\gamma$ -グロブリン (ICN Pharmaceuticals 社) を 0.04 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) で種々の濃度溶液に調製し検体とした。また, 非標識インスリンの影響をみる実験では, PEG 法キットの標準品であるヒトインスリンを同じ緩衝液で 0~約 10 mU/ml に調製して使用した。

4) セルロースアセテート膜(セ・ア膜)電気泳動法: 検体血清 100  $\mu$ l に  $^{125}$ I-ウシインスリン液 100  $\mu$ l (約 5  $\mu$ U), 0.04 M リン酸緩衝液またはヒトインスリン液 (約 10 mU/ml) 100  $\mu$ l を加え, 4°C で約 20 時間反応させたものを検体として泳動した。セ・ア膜は Sepharose III (Gelman Science 社) を用い, 陰極側より 3.5 cm の位置に検体数  $\mu$ l を塗布して, バルビタール緩衝液 (pH 8.6, イオン強度 0.06) で約 1 時間, 1 mA/cm の定電流で泳動した。0.4% ポンソー 3R 液で染色, 次いで 3% 酢酸液で脱色して蛋白の分画を確認した。さらに, 原線より陰極側 0.3 cm, 陽極側 6.0 cm を 0.3 cm ずつの切片とし, ポリスチレン管に入れて放射能計測を行った。

5) B/F 分離法の交叉実験: PEG 法キットの標識インスリン, 抗体および緩衝液に対して二抗

体法による B/F 分離法<sup>1)</sup>を用い, 二抗体法キットの標識インスリン, 抗体および緩衝液に対して PEG 法による B/F 分離法を用い, 通常の方法と合せて 4 通りの組み合わせについて, それぞれ測定を行った。二抗体法キットの場合, 反応液量が 800  $\mu$ l であるため, PEG 濃度を 27.7%,  $\gamma$ -グロブリン濃度を 0.7% として, 同一最終濃度で B/F 分離が行われるようにした。

### III. 成績

1) PEG 法と二抗体法の比較: 異常群 (13 症例, 69 検体) においては, PEG 法キットで全部が 0 以下の測定値となったが, 二抗体法キットでは Fig. 1 に示す結果となった。二抗体法による症例 1~5 の反応パターンは, 非インスリン依存性糖尿病, 肥満, 肝硬変などでもみられるものであり, 直ちにインスリン抗体の存在を疑う結果ではなかった。症例 6~13 は明らかに異常高値を示し, インスリン抗体の存在が疑われた。すなわち, 症例 1~5 の検体中のインスリン抗体の有無について, PEG

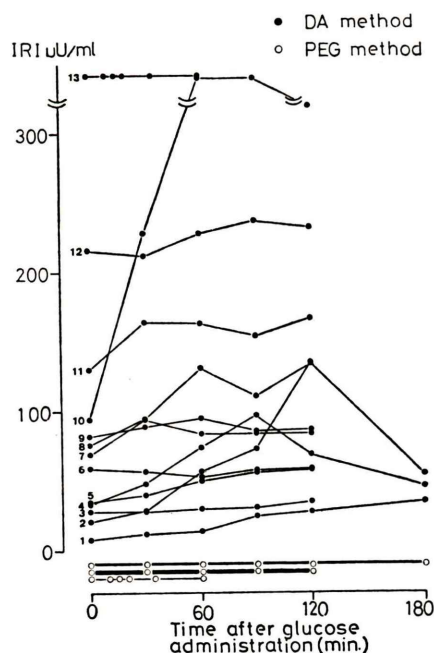


Fig. 1 Changes in IRI during oral glucose tolerance test determined by both PEG and double antibody (DA) methods.

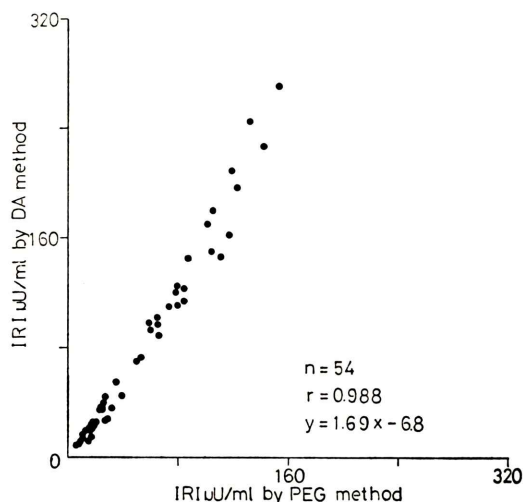


Fig. 2 Correlation between IRI values by PEG method and those by double antibody (DA) method.

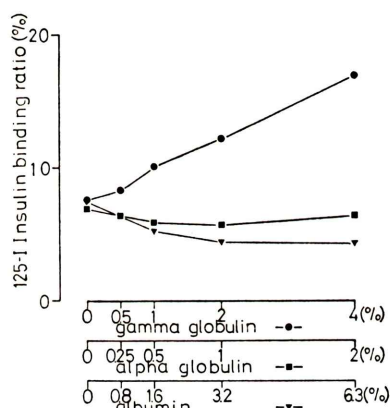


Fig. 3 Effect of gamma globulin, alpha globulin and albumin on insulin binding ratio.

法と二抗体法で解離する結果が得られた。症例 2, 3, 5 ではインスリン治療歴があり, 症例 1, 4 ではなかった。

対照群 (17 症例, 54 検体) においては, PEG 法キットと二抗体法キットの測定値の間に, 相関係数  $r=0.988$  ときわめて高い相関が認められた (Fig. 2)。ただし, PEG 法キットでは二抗体法キットに比し低値となる傾向がみられた。

2) インスリン結合率に対する血清蛋白濃度の影響: 0~6.3% のアルブミン液, 0~2% の  $\alpha$ -グ

Table 1 Results of insulin binding ratio in control and abnormal groups

Control group		Abnormal group	
1	7.7	1	78.9
2	8.4	2	77.3
3	7.1	3	51.5
4	7.3	4	70.5
5	7.4	5	35.4
6	6.4	6	62.0
7	6.7	7	55.1
8	6.7	8	81.0
9	6.4	9	56.3
10	7.0	10	69.8
11	6.6	11	71.7
12	6.5	12	77.6
13	7.1	13	75.2
14	6.5		
15	6.3		
16	7.5		
17	7.0		
Mean $\pm$ SD		7.0 $\pm$ 0.56	

ロブリン液, 0~4% の  $\gamma$ -グロブリン液の影響を検討した結果, アルブミン,  $\alpha$ -グロブリンでは, 濃度を増加してもインスリン結合率に対する影響はみられなかった。これに対して,  $\gamma$ -グロブリンでは, 正常血清濃度の約 2 倍に相当する 4% 溶液で, インスリン結合率は約 17% に増加した (Fig. 3)。

3) 患者血清のインスリン結合率: 異常群では, 35.4~81.0%, 平均 66.3% と著しい高値となった。一方, 対照群では, 6.3~8.4%, 平均 7.0% であった (Table 1)。

4) インスリン結合率に対するヒトインスリンの影響: 症例 4 の血清 100  $\mu$ l に 0~約 10 mU/ml のヒトインスリン液 100  $\mu$ l,  $^{125}$ I-ウシインスリン液 100  $\mu$ l を添加し, インスリン結合率を測定したところ, ヒトインスリンの添加量が増加するにしたがいインスリン結合率が低下し (Fig. 4), ヒトインスリンが競合する特異的結合であることが認められた。

5) セ・ア膜電気泳動による検討: 対照群では, アルブミンと  $\alpha_1$ -グロブリン分画の間に単一の放射能ピークがみられた。これに対して, 異常群症例 4 では, 以上のピークに加えて,  $\gamma$ -グロブリン分



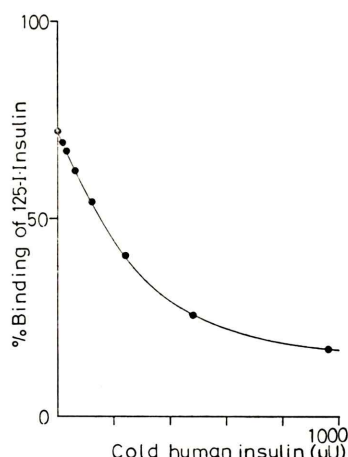


Fig. 4 Effect of added cold human insulin on insulin binding ratio. (abnormal group, case No. 4)

画により大きな放射能ピークが認められた。血清の代わりにキットのインスリン抗体を用いた場合も、 $\gamma$ -グロブリン分画に放射能ピークが認められた。さらに、あらかじめ約 1mU の過量のヒトインスリンを添加し泳動させたところ、 $\gamma$ -グロブリン分画にみられた放射能ピークは、対照群にみられる位置に移動した (Fig. 5a).

$^{125}\text{I}$ -ウシインスリン液に代えて、 $^{125}\text{I}$ -ブタインスリン液 (二抗体法キットで使用するもの) を用いても同様の結果となった。ただし、 $^{125}\text{I}$ -ウシインスリンを用いた場合に比して、 $\gamma$ -グロブリン分画にみられる放射能ピークが低い結果となった (Fig. 5b).

異常群の他の症例についても、症例 4 と同様に、過量のヒトインスリンの添加により、放射能ピークが  $\gamma$ -グロブリン分画からアルブミンと  $\alpha_1$ -グロブリンの中間に移動する結果が得られた。これは抗体と結合していた標識インスリンが、過量の非標識インスリンと競合して遊離することを反映したものと考えられた。

6) B/F 分離法の交叉実験: 方法の項で述べた 4 通りの方法につき、それぞれの標準曲線を作成したが、B/F 分離法を交叉させても原法の場合とほぼ同様な標準曲線が得られた。また、同一血清につき IRI を測定したが、PEG 法と二抗体法に

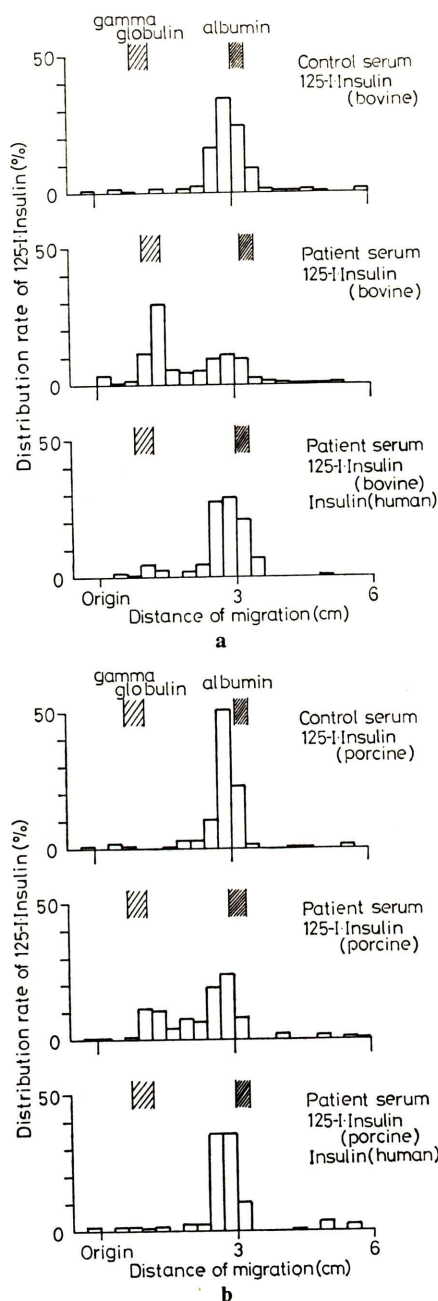


Fig. 5 Displacement of  $^{125}\text{I}$ -insulin peak by addition of human insulin. (abnormal group, case No. 4)  
(a)  $^{125}\text{I}$ -bovine insulin was used.  
(b)  $^{125}\text{I}$ -porcine insulin was used.

よる測定値間に、極めて良好な相関がみられた。これらの結果より、B/F 分離法を交叉させても原法

**Table 2** Bound ratio (B/T%) in cross experiments of bound-free separating method. (abnormal group, case No. 4)

Exp.	Reagents		Sample	B/F Separation		Difference (PEG-DA)
	125-I Ins <sup>1)</sup>	AB <sup>4)</sup>		PEG	DA <sup>6)</sup>	
i	peg <sup>2)</sup>	peg	Std <sup>5)</sup>	48	48	
	da <sup>3)</sup>	da		59	57	
ii	peg	—	Patient serum	57.1		
	da	—		(32.3)*	0.3	
iii	peg	peg	Patient serum	63.4	28.5	34.9
	da	da		50.2	38.7	11.5

<sup>1)</sup> insulin iodinated with <sup>125</sup>I <sup>2)</sup> reagent in PEG kit <sup>3)</sup> reagent in Double Antibody kit  
<sup>4)</sup> antibody <sup>5)</sup> 0μU/ml of standard solution <sup>6)</sup> double antibody \* value in case of  
addition of extra buffer

よと変わらない結果の得られることを確認した後、以下3つの場合について測定を行った (Table 2)。

(i) 標準液にインスリン抗体試薬を加えて測定する場合。いずれのキットにおいても、B/F 分離法による差はみられなかった。濃度 0 μU/ml の結合率 (Bo %) を表に示した。

(ii) 検体にインスリン抗体試薬を加えないで測定する場合 (インスリン結合率の測定)。別の機会に採血した異常群症例 4 を検体とした。PEG 法では、PEG 法キットで 57.1%，二抗体法キットで 20.1% とキットにより大きな差異が認められた (前者は Bo % を越え、後者は Bo % より明らかに小さかった)。PEG 法キットについて、反応液量を二抗体法キットと同一 (800 μl) にして測定を行った結果、インスリン結合率が 32.3% に低下したことから、両キット間のインスリン結合率に差が認められた理由として、反応液量の多少による希釈の効果の差が考えられたが、標識インスリンの比放射能の差、あるいは種差 (PEG 法キットではウシインスリンを、二抗体法キットではブタインスリンを用いている) も可能性として考えられた。

(iii) 検体にインスリン抗体試薬を加えて測定する場合 (IRI の測定)。PEG 法では、試薬に用いたインスリン抗体と検体中のインスリン抗体の両者に結合した標識インスリンの割合が結合率 (B/T %) であり、二抗体法では、試薬に用いたイン

スリン抗体に結合した標識インスリンの割合のみが B/T % に相当することから、両法の差により、検体中のインスリン抗体に結合した標識インスリンの割合を知ることができる。PEG 法キットの場合、検体中の抗体による標識インスリンの結合率 (34.9%) が、試薬抗体による結合率 (28.5%) よりも若干大きかったのに対し、二抗体法キットの場合は、検体中の抗体による結合率 (11.5%) が試薬抗体による結合率 (38.7%) よりも著しく小さかった。すなわち、PEG 法を用いた原法では検体中のインスリン抗体の影響を受けたが、二抗体法を用いた原法ではその影響が軽度にとどまっと考えられた。

#### IV. 考 察

PEG は、Desbuquois ら<sup>2)</sup> により RIA における B/F 分離に利用される様になった。彼らは、水-PEG 2 相系の分配において、抗体と結合したペプチドホルモンは、PEG により溶液から排除されて沈降し、遊離のものは上清の PEG 相に残って両者が極めて良好に分離されること、PEG が室温でも蛋白の変性を起こさず、B/F 分離時にもペプチドホルモン-抗体結合の解離を起さないことを指摘している。また、中川ら<sup>3)</sup> は、インスリン抗体を含有する血清の遊離インスリン定量法において、B/F 分離に炭末、タルクによる吸着法、二抗体法、塩析法などを試みたが満足すべき結果

が得られず、PEG法の優れていることを報告している。

抗体結合インスリンを完全に沈降させるためには、一定濃度以上のPEGに加えて、ヒト血清が $\gamma$ -グロブリンの添加を要するが、 $\gamma$ -グロブリンが過剰となると、遊離インスリンも $\gamma$ -グロブリンに伴ってわずかながらも沈降することが指摘されている。われわれも、 $\gamma$ -グロブリンと共にアルブミン、 $\alpha$ -グロブリンについて、PEG法によるインスリン結合率測定に及ぼす影響を検討し、 $\gamma$ -グロブリンのみが濃度増加に伴ってインスリン結合率を非特異的に増加させることを認めた。菊池ら<sup>4)</sup>も、高 $\gamma$ -グロブリン血症を示した肝疾患患者で、この様な非特異的結合が有意に上昇することを報告している。しかしながら、血清 $\gamma$ -グロブリン濃度が正常の約2倍に相当する4g/dlに程度が達しても、このためにインスリン結合率が、われわれの測定条件下で、非特異的に20%以上に増加することはない、異常群でみられたインスリン結合率高値が、この原因によるものでないことは明らかである。また、異常群に高 $\gamma$ -グロブリン血症を合併した症例はなかった。

インスリン結合率の測定は、インスリン結合物質の有無を確認する簡便な方法であり、それが $\gamma$ -グロブリン分画に含まれる場合は、PEG法により異常値が得られる。しかし、測定値にはB/F分離の技術的な不完全さ、標識インスリンの試験管への吸着などによる非特異的結合率(NSB)も含まれており、インスリン結合物質の含まれていない検体でも数~10%程度の値となる。したがって、インスリンに対する特異的結合率をみる為には、過量の非標識インスリンを加えて、インスリン結合率が低下することを確認することが必要である。この点について、PEG法およびセ・ア膜電気泳動法を用いて検討した結果、非標識インスリンを加えることにより、競合的なインスリン結合率の低下、あるいは放射能ピークの $\gamma$ -グロブリン分画からの移動がみられた。

以上の成績から、異常群の血清には、インスリン治療の有無にかかわらず、インスリンと特異的

に結合し、高分子で $\gamma$ -グロブリン分画に属することからインスリン抗体が存在し、これが原因でPEG法による血中インスリン測定値が0以下の異常値を示したと考えられる。

二抗体法による測定値が著しい異常高値をとらず、インスリン抗体の存在を直ちに示唆しない検体があった点については、B/F分離法の交叉実験から、B/F分離法の相違ではなく、反応液量の差による希釈の効果、検体中のインスリン抗体と試薬として用いたインスリン抗体の力価、親和力の相対差が原因であり、標識インスリンの相違による可能性も残された。測定条件、検体によっては、検体からの抗体混入による影響が軽度にとどまり、測定値に著しい異常をきたさず、検体中のインスリン抗体の存在を見逃す場合のあることは注意を要すると考えられた。

インスリン抗体は、インスリン治療によりほとんどの症例に発生し、その一部でインスリン抵抗性の状態をもたらす。また、インスリン治療のない場合でも低血糖発作を引き起こして、インスリン自己免疫症候群の原因となる。今回、検討した異常群のうち2例(症例1と4)では、インスリン治療歴が確認されないことから、低血糖発作はなかったが、インスリン自己抗体の可能性が考えられた。インスリン抗体と標識インスリンの種差によりインスリン結合率に差があり、異常群症例4でも、標識ウシインスリンとの結合率がブタの場合よりも高値であった。この場合、比放射能の差による可能性もあり、種差によることはできないが、仮に種差が原因であったとしても、Goldmanら<sup>5)</sup>は、治療によるインスリン抗体とインスリン自己抗体とで、ヒト、ウシ、ブタインスリンに対する親和性には一定の差はみられず、この点からの両者の鑑別はできないと報告しており、異常群症例1、4のインスリン自己抗体の存在を否定するものではない。

平田<sup>6)</sup>は、インスリン自己抗体を有しながら低血糖を生じない多数の症例も広く含めてインスリン自己免疫症候群とする見解に対して、低血糖を発生する場合に限って自己免疫症候群と呼ぶべき



であろうと定義し、インスリン自己免疫症候群の本邦例は約10年間に50人の頻度であるが、一方、低血糖を起こさないインスリン自己抗体保有者については、甲状腺機能亢進症でチアマゾール使用者以外に、健康者や他疾患罹患患者にも偶然に認めることが少なくないと述べている。その頻度について数字としては示されていないが、抗体力価が高く、低血糖を起こすインスリン自己免疫症候群を氷山の一角として、抗体力価が低く、低血糖を起こさないインスリン自己抗体保有者が多数潜在すると想定され、インスリン自己免疫症候群の病態を明らかにするに当っては、単なるインスリン自己抗体保有者も含めた全体を対象にして検討することが必要であろう。

われわれの症例1は85歳女子、症例4は51歳男子で、いずれも肥満を伴った非インスリン依存性糖尿病であり、前者は胆石症、後者は高血圧症を合併していたが、両者とも、他の免疫異常の合併はなく、甲状腺機能も正常で、チアマゾール服用もなかった。

## V. ま と め

PEG 法を用いた血中インスリン測定において、780 例中18例で測定値が0以下の異常を示し、そのうち、13例について検討した結果、全例がインスリン抗体の存在によるものであった。

また、インスリン結合率に対する血清蛋白の影響につき検討した結果、 $\gamma$ -グロブリンのみが濃度増加に伴ってインスリン結合率に有意の影響を与

えた。しかし、インスリン結合率が著しい高値をとる場合は、インスリン抗体の存在が強く示唆されることを示した。

PEG 法による血中インスリン測定は、検体ブランク値がインスリン結合率を示すことから、インスリン抗体の有無を同時に、かつ鋭敏に検出できるという大きな利点があり、抗体によるインスリン抵抗性、あるいはインスリン自己免疫症候群などの病態の把握に最も有用な方法と考えられる。

本論文の要旨は、第21回日本核医学会総会(札幌, 1981)において発表した。

## 文 献

- 1) Hales CN, Randle PJ: Immunoassay of insulin with insulin-antibody precipitate. *J Biochem* 88: 137-146, 1963
- 2) Desbuquois B, Aurbach GD: Use of polyethylene glycol to separate free and antibody-bound peptide hormone in radioimmunoassay. *J Clin Endocrinol Metab* 33: 732-738 1971
- 3) 中川昌一, 中山秀雄, 佐々木嵩, 他: インスリン治療患者の血中インスリン定量法, PEG 抽出法. *糖尿病* 15: 403-408, 1971
- 4) 菊池 晃, 石川善朗, 多田信和, 他: PEG を用いたイムノアッセイキット(科研)による血中インスリンの測定. *ホと臨* 27: 557-559, 1979
- 5) Goldman J, Baldwin D, Rubinstein AH, et al: Characterization of circulating insulin and pro-insulinbinding antibodies in autoimmune hypoglycemia. *J Clin Invest* 63: 1050-1059, 1979
- 6) 平田幸正: インスリン自己免疫症候群. *日本臨床* 40: 387-391, 1982