

《ノート》

# IRMA による血中インシュリン測定法 インシュリン・リアビーズ II に関する基礎的検討

## Fundamental Evaluation of IRMA for Serum Insulin

樽岡 陽子\* 仲谷 聡子\* 福地 稔\*

Youko TARUOKA, Satoko NAKATANI and Minoru FUKUCHI

Department of Nuclear Medicine, Hyogo College of Medicine, Nishinomiya

### I. はじめに

インシュリンは、膵臓のβ細胞から分泌されるホルモンで、糖の利用を促進する働きを有し、糖質、脂質、蛋白質などの代謝調節に重要な役割を果たしている。インシュリンは、Berson and Yalow<sup>1)</sup>により、最初に radioimmunoassay (RIA) で測定されたホルモンだが、その後、B、F. 分離法の異なる数多くの測定キットが開発され<sup>1-11)</sup>、臨床的に利用されてきた。近年、モノクローナル抗体 (MoAb) 作製技術の進歩に伴い、インシュリンに関しても、その MoAb の作製が容易となり、その RIA への応用に関心が向けられてきた。今回、著者らはヒトインシュリンマウス MoAb のうち、B 鎖の C 端 (24-30) に比較的特異性を有する抗体と、B 鎖の N 端および A 鎖の 70 位前後に特異性を有する抗体の 2 つを用いた two-sites immunoradiometric assay (IRMA) によるインシュリン測定法 (インシュリン・リアビーズ II) につき基礎的検討を行ったのでその成績を報告する。

### II. 方法および対象

検討には、ダイナボット株式会社の好意により提供を受けたインシュリン・リアビーズ II キットを用い、実際の測定は Fig. 1 に示す手順で行った。

#### 1. 最小検出感度

標準インシュリン溶液の最低濃度 (3.0 μU/ml) を、キット添付の標準インシュリン 0 濃度溶液で 0.38 μU/ml まで段階的に希釈しておのおの 6 重測定を行いカウント数 (cpm) の平均±標準偏差 (mean±S.D.) を求め、標準インシュリン 0 濃度溶液との間で mean±2 S.D. 間の有意差検定をおのおの行い求めた。また、標準インシュリン 0 濃度溶液との重複の有無を指標とする評価も行った。

#### 2. インキュベーション条件

インキュベーション時間と温度が本測定法の標準曲線におよぼす影響につき、以下の方法で検討した。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 1, 2, 2.5, 4 時間と変えた際の標準曲線と、インキュベーション時間を 2.5 時間と一定にして、インキュベーション温度を 4°C, 25°C, 37°C と変えた際の標準曲線につきおのおの比較検討した。

\* 兵庫医科大学病院核医学診療部

受付：3年9月24日

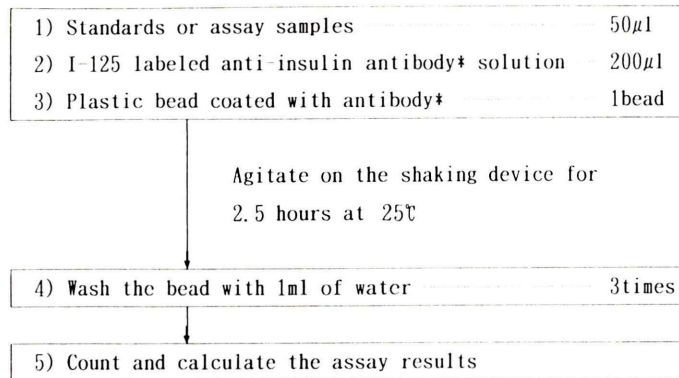
最終稿受付：3年11月25日

別刷請求先：西宮市武庫川町 1-1 (☎ 663)

兵庫医科大学病院核医学診療部

樽岡陽子

**Key words:** Insulin, Immunoradiometric assay, Monoclonal antibody, Insulin・RIABEAD II.



(\*) : monoclonal antibody

Fig. 1 Procedure of IRMA for serum insulin.

### 3. 精度再現性

血中インシュリン濃度の異なる 3 種類の血清試料を用い、同一測定内 (n=6)、および異なる 6 回の測定間の再現性を C.V. で評価した。

### 4. 希釈試験

血中インシュリン濃度の異なる 3 種類の血清試料を用い、標準インシュリン 0 濃度溶液で 1:1 から 1:32 まで倍々希釈を行い測定評価した。

### 5. 回収試験

血中インシュリン濃度の異なる 3 種類の血清試料に、おのおの濃度の異なる 4 種類の標準インシュリンを添加して回収率を求めた。

### 6. 採血条件

健常人 9 名を対象に、同時に普通採血、ヘパリン採血、EDTA-2Na 採血を行い、血中インシュリン濃度をおのおの本測定法で測定比較した。

### 7. RIA との測定値の比較

本測定で得られた測定値の評価を目的に 117 検体について同時に RIA であるインシュリン・リアビーズ (ダイナボット株式会社製) でも血中インシュリン濃度を測定し、両測定値を比較した。なお、これら 117 検体中には、抗インシュリン自己抗体を有する 18 検体が含まれる。

## III. 成績

### 1. 最小検出感度

本測定法の代表的標準曲線を Fig. 2 に示す。標準インシュリン濃度溶液 3 $\mu$ U/ml から 300 $\mu$ U/ml まで直線性を示す良好な標準曲線が得られた。最小検出感度は、有意差検定法で、標準インシュリン 0 濃度溶液と 0.38 $\mu$ U/ml との間で結合カウントに有意差 ( $p < 0.01$ ) を認めた。また、Mean  $\pm$  2 S.D. との重複で見たとこ標準インシュリン 0 濃度溶液と 0.75 $\mu$ U/ml との間で重複は見られなかった (Fig. 2)。

### 2. インキュベーション条件

インキュベーション温度を 25 $^{\circ}$ C と一定にして、インキュベーション時間を変えて反応させたところ、Fig. 3(A) で示すごとく、2 時間以上のインキュベーションではほぼ同様の良好な標準曲線が得られた。また、インキュベーション時間を 2.5 時間と一定にして、インキュベーション温度を変えて反応させたところ、Fig. 3(B) で示すごとく 25 $^{\circ}$ C で最もカウント数が高い標準曲線が得られた。

### 3. 精度再現性

Table 1 に示すごとく、再現性の C.V. は同一測定内 (n=6) が血清 A で 3.6%、血清 B で 0.7%、血清 C で 1.7%、また異なる 6 回の測定間が血清 D で 3.4%、血清 E で 2.4%、血清 F で 1.4% で

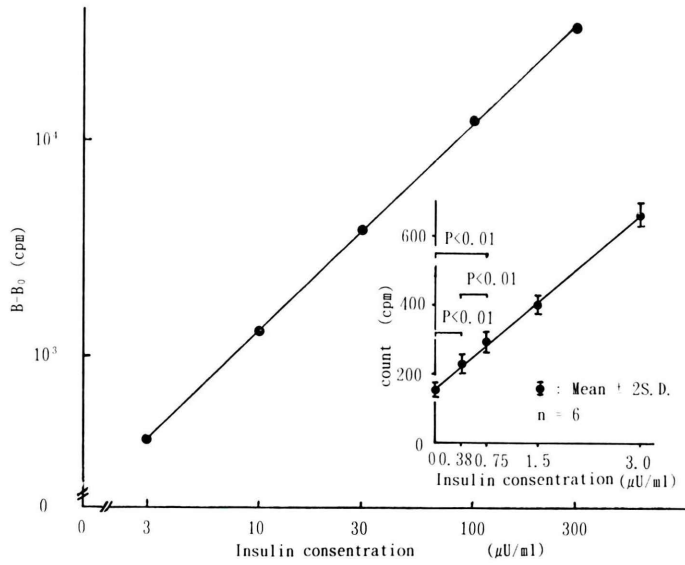


Fig. 2 Standard curve of IRMA for serum insulin.

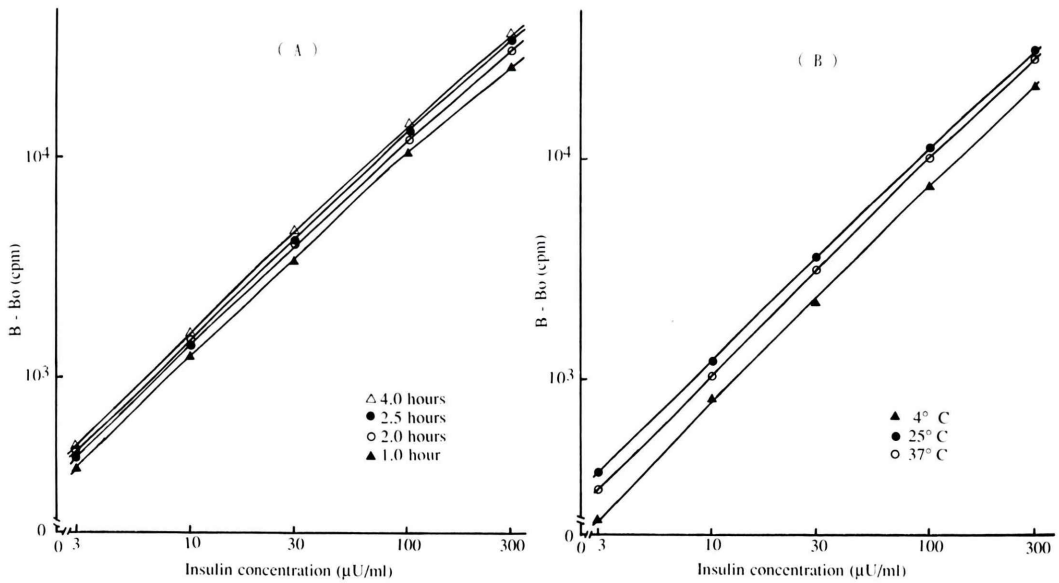


Fig. 3 Effect of incubation time and temperature on standard curve of IRMA for serum insulin.

あった。

#### 4. 希釈試験

希釈試験の結果を Fig. 4 に示す。いずれも 0 点に集束する直線が得られた。

#### 5. 回収試験

回収試験の結果を Table 2 に示す。平均回収率はおのおの血清 A で 100.5%、血清 B で 96.8%、血清 C で 102.9% であった。

**Table 1** Intraassay and interassay reproducibility of IRMA for serum insulin

##### (1) Intraassay reproducibility

Samples	n	Mean ( $\mu\text{U/ml}$ )	S.D. ( $\mu\text{U/ml}$ )	C.V. (%)
Serum A	6	3.5	0.13	3.6
Serum B	6	50.4	0.34	0.7
Serum C	6	186.2	3.16	1.7

##### (2) Interassay reproducibility

Samples	n	Mean ( $\mu\text{U/ml}$ )	S.D. ( $\mu\text{U/ml}$ )	C.V. (%)
Serum D	6	11.6	0.40	3.4
Serum E	6	74.0	1.80	2.4
Serum F	6	143.2	2.07	1.4

#### 6. 採血条件

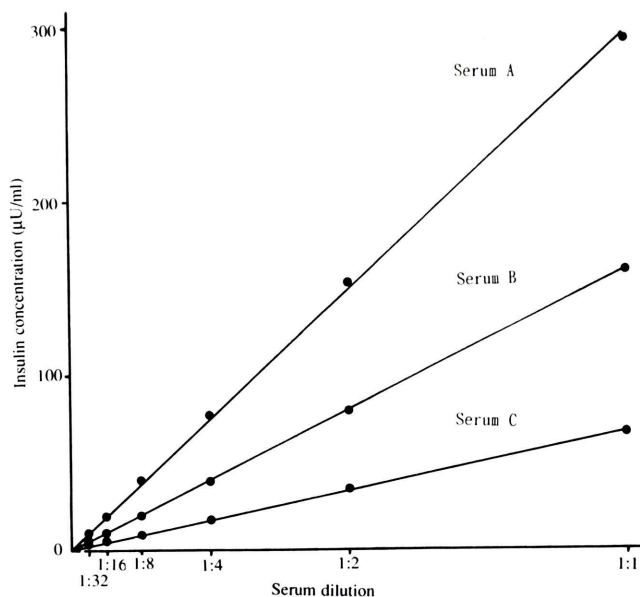
健常人 9 名における血中インシュリン値は、普通採血で  $6.2 \pm 2.3 \mu\text{U/ml}$ 、ヘパリン採血で  $6.6 \pm 3.0 \mu\text{U/ml}$ 、EDTA-2Na 採血で  $6.9 \pm 3.1 \mu\text{U/ml}$  で、有意差検定上差異は認められなかった。

#### 7. RIA との測定値の比較

本測定法で血中インシュリン濃度を測定した 117 検体について、同時に RIA により血中インシュリン濃度を測定し、得られた測定値を比較した (Fig. 5)。その結果、両者の間には相関係数  $r = +0.890$ 、回帰直線  $y = 0.65x + 7.46$  と有意の相関関係が得られた。そこで、血中抗インシュリン自己抗体を有する 18 検体を除いて、同様の検討 ( $n = 99$ ) を行ったところ、両者の間には相関係数  $r = +0.976$ 、回帰直線  $y = 0.92x - 1.99$  ときわめて良好な相関関係が認められた。

## IV. 考 察

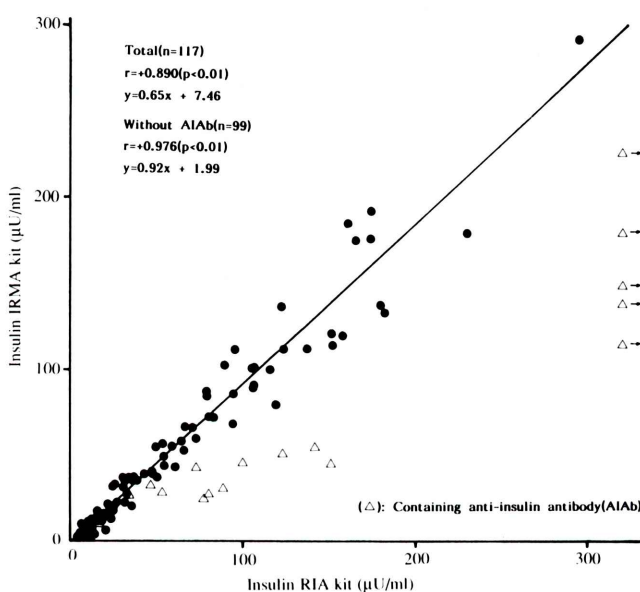
インシュリンは RIA で最初に測定されたホルモンとして種々改良を加えつつ広く臨床的に活用されてきた<sup>1~11)</sup>。近年、MoAb 作製技術の進歩により、インビトロ核医学においても RIA に代わ



**Fig. 4** Dilution test of serum insulin measured by IRMA.

**Table 2** Recovery test of standard insulin added to serum samples measured by IRMA for serum insulin

		Added insulin ( $\mu\text{U}/\text{ml}$ )					Mean recovery (%)	
		0	1.5	5	15	50		150
Serum A	Measured ( $\mu\text{U}/\text{ml}$ )	7.6	9.3	12.7	22.3	54.1	151.7	100.5
	Recoverd ( $\mu\text{U}/\text{ml}$ )		1.7	5.1	14.7	46.5	144.1	
	Recovery (%)		113.3	102.0	98.0	93.0	96.1	
Serum B	Measured ( $\mu\text{U}/\text{ml}$ )	34.3	35.7	39.1	49.4	82.7	180.2	96.8
	Recoverd ( $\mu\text{U}/\text{ml}$ )		1.4	4.8	15.1	48.4	145.9	
	Recovery (%)		93.3	96.0	100.7	96.8	97.3	
Serum C	Measured ( $\mu\text{U}/\text{ml}$ )	63.0	64.7	68.0	78.5	113.2	209.4	102.9
	Recoverd ( $\mu\text{U}/\text{ml}$ )		1.7	5.0	15.5	50.2	146.4	
	Recovery (%)		113.3	100.0	103.3	100.4	97.6	

**Fig. 5** Correlation between assay results of IRMA kit and those of RIA kit for serum insulin.

って IRMA が主流となった。インシュリンについても、MoAb の作製が可能となり、1960 年に初めて RIA で測定されたインシュリンも、IRMA の時代を迎えることとなった。今回、著者らが検討したインシュリン・リアビーズ II は、B 鎖の N 端および A 鎖の 70 位前後に比較的特異性を有する抗ヒトインシュリンマウス MoAb をビーズに固相化し、B 鎖の C 端 (24-30) に比較的特異性を有するヨウ化ヒトインシュリン MoAb ( $^{125}\text{I}$ ) を

追跡子とする IRMA 法である。測定法に関する基礎的検討として、標準曲線、精度再現性、希釈試験、回収試験について検討したが、従来の RIA に比べ、いずれも満足できる結果が得られた。従来の RIA によるインシュリン測定では、プロインシュリンとの交差が 27.4% あることが知られていた。本測定法については、われわれは検討できなかったが、ダイナボット株式会社の検討データによると、プロインシュリン  $10^7 \mu\text{U}/\text{ml}$  の添加

実験でも交差は認められないことから、従来のRIAに比べ、特異性についても一段と優れた測定法だと言える。また、本測定法は、標準溶液または測定試料と<sup>125</sup>I標識抗体と抗体固相化ビーズを加え2時間半のインキュベーション後、洗浄操作3回で測定を終えることができ、RIAによるインシュリン・リアビーズが16~24時間のインキュベーションであったのに比べきわめて簡便である。最小検出濃度も有意差検定法で0.38  $\mu\text{U/ml}$ ,  $\text{mean} \pm 2 \text{ S.D.}$  で重複でみても0.75  $\mu\text{U/ml}$  まで測定が可能であり、RIAであるインシュリン・リアビーズが3.0  $\mu\text{U/ml}$  であったのに比べ一段と感度の良い測定法である。また、測定範囲がRIAでは320  $\mu\text{U/ml}$  までであったのに対し、本測定法では300  $\mu\text{U/ml}$  までとなっている。今回のわれわれの検討した189検体中測定値が300  $\mu\text{U/ml}$  以上を示したのは僅かに1検体(0.53%)であったことから、320  $\mu\text{U/ml}$  が、RIAの標準曲線において精度上問題となる濃度であることを考え合わせると、日常臨床検査上、特に問題はないと考えられた。インキュベーション条件も、室温に相当する25°C、2時間半のインキュベーションで十分満足できる結果が得られた。また、採血条件に関する検討から、本法は普通採血、ヘパリン採血、EDTA-2Na採血のいずれでも測定値に差異のないことが確かめられた。データは示さなかったが、臨床的検討として、健常人、IDDM、NIDDMを対象に75 g OGTTを施行し、経時的に血中インシュリン濃度を測定しおのおの反応曲線を比較したところ、おのおの病態を反映した成績が得られ、本法が75 g OGTTとの併用で膵 $\beta$ 細胞機能の評価に有用であることも確かめられた。現在、臨床的に活用されているRIAとの測定値の比較では、両者の間に良好な相関関係が認められたが、抗インシュリン自己抗体を有する検体では、本測定法で低値となる結果であった。したがってインシュリン自己免疫症候群などでの応用に際し、その点の留意が必要と考えられた。抗インシュリン自己抗体を有する検体は、従来RIAでは高値を示すことが知られていたが、われわれが今回検討

した18検体のうち5検体は320  $\mu\text{U/ml}$  以上となり、測定値が算出できなかった。一部例外もあったが、これら検体の抗インシュリン自己抗体価はいずれも25%以上と高く、このような検体では、IRMAとの比較に際し、測定値の得られた検体群との間で集団として解離が見られた(Fig. 5)。

## V. 結 語

IRMA法による血中インシュリン測定法につき、基礎的ならびに臨床的検討を行い、以下の結論を得た。

- (1) 本測定法の最小検出感度は、有意差検定法で0.38  $\mu\text{U/ml}$ ,  $\text{mean} \pm 2 \text{ S.D.}$  との重複でも0.75  $\mu\text{U/ml}$  であった。
- (2) 本測定法のインキュベーション条件は、25°C、2時間半で良好な標準曲線が得られた。
- (3) 本測定法で得られた血中インシュリン値は、従来のRIAと良好な相関が得られたが、抗インシュリン自己抗体を有する検体では、本測定法での測定値は低値であった。

稿を終えるにあたりインシュリン・リアピースIIの提供を受けたダイナボット株式会社に謝意を表す。

## 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, Vickick D, Wright PT, et al: Insulin immunoassay by back-titration using alcohol precipitation of insulin-antibody complexes. *Diabetes* **18**: 660-669, 1969
- 6) Desbuquois B, Aurback 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, Lan 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
- 11) 福地 稔, 木戸 亮, 森田俊孝, 他: Solid phase radioimmunoassay による血中インシュリンの測定——抗体 bead 法に関する基礎的ならびに臨床的評価——. *核医学* **19**: 281-288, 1982