

《ノート》

C-peptide の Radioimmunoassay

—— 塩基性アミノ酸部分を含まない合成ヒト
C-peptide による方法に関する検討と評価 ——

Fundamental and Clinical Evaluation of C-Peptide Radioimmunoassay Kit

福地 稔* 木谷 仁昭* 永井 清保*

Minoru FUKUCHI*, Hiroaki KITANI* and Kiyoyasu NAGAI*

*Division of Nuclear Medicine, RI Center, Hyogo College of Medicine

1. はじめに

1967 年 Steiner ら¹⁾により, インスリンの前駆物質であるプロインスリンが発見された. プロインスリンは, 膵β細胞内で, インスリン部分, 塩基性アミノ酸部分, さらに C-peptide の3つの部分に分解され分泌されることが知られている²⁻⁴⁾.

現在, 膵β細胞機能を臨床的に検査する方法として, radioimmunoassay (以下 RIA と略す) による血中インスリン (IRI) の測定が広く普及している. ところが, IRI の測定は, インスリン治療中の患者や, 血中に抗インスリン抗体の存在する患者などの検査で問題があった⁵⁻⁸⁾. C-peptide とインスリンとの間には, 免疫学的に交叉性がないことが明らかにされており⁹⁾, RIA を用いることにより, 両者を完全に区別して測定することが可能である. したがって, インスリン治療中の患者や, 血中に抗インスリン抗体の存在する患者を含め, すべての症例の膵β細胞機能検査が, C-peptide を指標にすることにより容易に施行できる.

C-peptide の RIA に関しては, 当初, 抽出ヒト C-peptide を用いた方法が種々検討されてきたが^{9,10)}, 一般化するまでにいたらなかった. 近年, ヒト C-peptide の合成が可能となり¹¹⁾, これを用いた RIA が確立され¹²⁾, 臨床的に利用されている¹³⁾.

現在, わが国で入手可能な C-peptide RIA Kit は, 材料として N および C 端に各々 2 個ある塩基性アミノ酸部分, つまり Arg・Arg と Lys・Arg を含む構造となっている.

最近, あらたにこれら塩基性アミノ酸部分を含まないヒト C-peptide の合成を行い, これを用いた新しい RIA system がわが国で開発され, 注目されている. 今回, われわれは, この新しい C-peptide RIA system につき, 基礎的および臨床的検討を行うと共に, 従来の方法との比較などを行う機会をえたので, その成績につき報告する.

2. 方法および材料

今回, 検討に用いた RIA Kit は, 塩野義製薬 (株) より提供をうけ, 実際の測定操作は, Table 1 に示すごとく手順で行った. また, IRI の測定には PEG 法による RIA 法により, また血糖値の測定は, Auto-analyser 法によった.

Key words: Evaluation, Radioimmunoassay, C-peptide.

* 兵庫医科大学病院 RI センター診療部

受付: 55 年 3 月 17 日

最終稿受付: 55 年 5 月 14 日

別刷請求先: 大阪市北区茶屋町 2-32 (☎ 530)

シオノギ製薬株式会社梅田分室検査薬品部
長谷川 煥

Table 1 Assay procedure for C-Peptide radioimmunoassay Kit

1. Buffer	0.5 ml
2. Standard C-Peptide or Sample	0.1 ml
3. Anti-C-peptide antiserum	0.1 ml
4. Radioiodinated C-peptide	0.1 ml
↓ Mixed and stand for 20-24 hrs at room temperature (15-25°C).	
5. Second antibody	0.1 ml
↓ Mixed and stand for 1 hrs at room temperature.	
6. Centrifuge at 1,500 g for 5 min.	
7. Aspirate of supernatant	
8. Added saline to the assay tube	2.0 ml
9. Centrifuge at 1,500 g for 5 min.	
10. Aspirate of supernatant.	
11. Count and calculate of assay results.	

1) 基礎的検討**(1) 標準曲線に関する検討**

異なる10回の測定でえられた標準曲線を、 $\text{mean} \pm \text{S.D.}$ で表示し、その安定性と再現性を検討した。

(2) 特異性に関する検討

本測定系の抗体の特異性をみる目的で、塩基性アミノ酸部分を含むヒト合成 C-peptide (第一ラジオアイソトープ研究所)、塩基性アミノ酸部分を含まない合成ヒト C-peptide (シオノギ)、グルカゴン(ダイナボット RI 研究所)、およびトリプシン(ミドリ十字)を用い、本測定系に対する抑制の有無、およびその程度を検討した。

(3) 回収率に関する検討

濃度の異なる2種類の血清試料に、濃度の異なる4種類の C-peptide を添加した際の回収率につき各々検討した。

(4) 再現性に関する検討

濃度の異なる各々4種類の血清試料を用い、同一測定内(n=6)、および5回の異なる測定間における再現性を検討した。

(5) 希釈試験に関する検討

比較的血中 C-peptide 濃度が高値を示す2種類の血清試料を、1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 と希釈し、希釈試験を行った。

(6) インキュベーション時間に関する検討**a. First incubation 時間に関する検討**

First incubation を、8, 22, および 46 時間とかけた際の各々の標準曲線と、血清試料の B% および測定値を基に比較検討した。尚, second incubation は1時間とした。

b. Second incubation 時間に関する検討

Second incubation を、15, 60, および 180 分とかけた際の各々の標準曲線と、血清試料の B% および測定値を基に比較検討した。尚, first incubation は20時間とした。また second incubation が、原法では60分と比較的短いため、rotator を用い攪拌した場合と、静置した場合との差異の有無につき、各々の標準曲線を基に比較検討した。

2) 他の測定法との比較**(1) 標準 C-peptide の比較**

本測定法における標準曲線および標準 C-peptide の評価を目的として、他の測定法(第一ラジオアイソトープ研究所製)の標準 C-peptide を本測定系に、また逆に本測定法の標準 C-peptide を第一ラジオアイソトープ研究所製の測定系に各々添加し、比較を試みた。

(2) 測定値の比較

血清試料 66 検体を用い、本測定法と他の測定法(第一ラジオアイソトープ研究所製)とで同時に血中 C-peptide 濃度を測定し、両測定値を比較した。

3) 本測定法の臨床応用

対象には、昭和 54 年 8 月から昭和 55 年 1 月までの間に、兵庫医科大学病院 RI センター 診療部に 50 g ブドウ糖経口負荷試験 (50 g OGTT) による血中 IRI または C-peptide の測定依頼のあった症例から、任意に選ばれた 34 例をあてた。これらの症例の内訳は、糖尿病患者 27 例、尿糖を伴う他疾患患者 7 例であった。さらに、糖尿病患者 27 例を治療法別にみると、食餌療法群 9 例、経口糖尿病剤投与群 8 例、インスリン治療群 10 例であったが、インスリン治療群 10 例のうち 3 例は、PEG 法による IRI 測定で血中に抗インスリン抗体の存在が確かめられた症例であった。さらに対照として、健常人 6 名をあて、同様の検討を行っ

た。

すなわち、これら総ての症例に 50 g OGTT を施行し、インスリン治療群を除く症例では、血中 C-peptide, IRI, および血糖値を、またインスリン治療群では血中 C-peptide と血糖値を測定し比較した。

3. 成 績

1) 基礎的検討

(1) 標準曲線に関する検討

異なる 10 回の測定でえられた標準曲線を、 $\text{mean} \pm \text{S.D.}$ で Fig. 1 で示した。すなわち、 B/B_0 % でみると C-peptide で 0.195 ng の平均は 95.0 ± 1.5 で、有意の抑制が認められ、本測定法の感度がきわめてすぐれていることが確かめられた。また、0.39 から 25 ng の間で良好な直線性が認められた。各濃度における C.V. をみると、0.195 ng で 1.5%, 0.39 ng で 2.6%, 0.78 ng で 2.8%, 1.56 ng で 4.1%, 3.12 ng で 4.2%, 6.25 ng で 3.4%, 12.5 ng で 5.9%, 25 ng で 11.8%, また 50 ng で 19.8% であった。

(2) 特異性に関する検討

本測定法の特異性を検討する目的で、C-peptide, インスリン, グルカゴン, およびトリプシンを用

い、本測定系における抑制効果の有無を検討した結果を Fig. 2 で示した。すなわち、グルカゴン、インスリン、トリプシンとは、検討範囲内ではほとんど影響を認めなかった。これに対し C-peptide は、第一ラジオアイソトープ研究所製も、シオノギ(株)製も、いずれも同様に用量反応性に抑制効果が認められ、本測定法が C-peptide に特異的であることが確かめられた。

(3) 回収率に関する検討

C-peptide 濃度の異なる A, B, 2 種類の血清試料に、3.1, 6.3, 12.5, および 25 ng と濃度の異なる 4 種類の C-peptide を添加した際の回収率を各々求め Table 2 で一括した。血清 A での回収率の平均は 107.5%, 血清 B での回収率の平均は 109.5% といずれも良好な結果がえられた。

(4) 再現性に関する検討

C-peptide 濃度の異なる A, B, C, D, 4 種類の血清試料を用い、同一測定内における再現性と、同じく C-peptide 濃度の異なる E, F, G, H, 4 種類の血清試料を用い、異なる 5 回の測定における再現性を各々検討し、その結果を Table 3 に一括した。同一測定内での再現性は C.V. が 6.4 から 11.7% の範囲を示し、一方、異なる測定間の再現性は、C.V. が 6.7 から 9.8% の範囲を示すことが

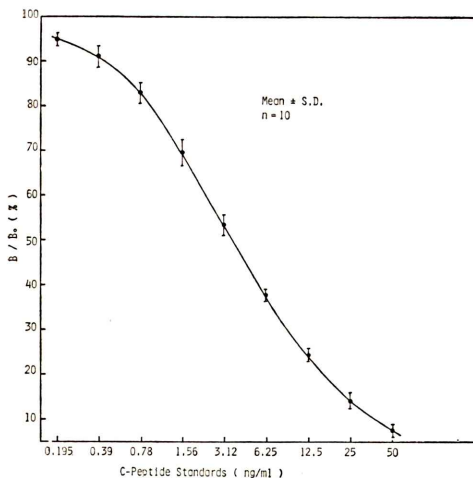


Fig. 1 Standard curves of C-peptide radioimmunoassay kit.

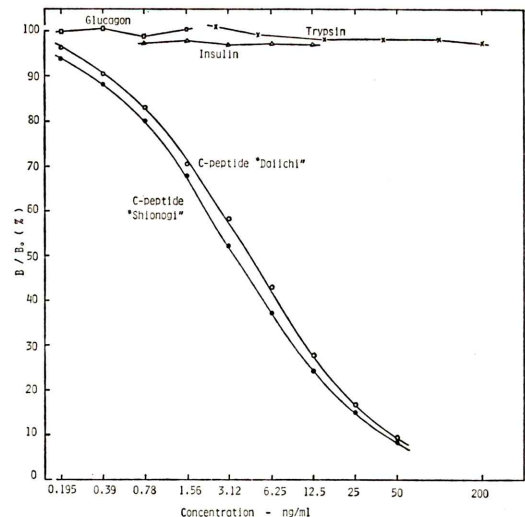


Fig. 2 Specificity of C-peptide radioimmunoassay kit.

Table 2 Recovery of c-peptide added to serum samples on c-peptide radioimmunoassay kit

Serum value (ng)	Added C-peptide (ng)	Assay result (ng)	Calculated value (ng)	Recovery (%)
A. 3.8	3.1	7.5	6.9	119
	6.3	11.0	10.1	114
	12.5	16.0	16.3	98
	25.0	28.5	28.8	99
Mean				107.5
B. 1.6	3.1	5.6	4.7	129
	6.3	7.9	7.9	100
	12.5	14.5	14.1	104
	25.0	28.0	26.6	105
Mean				109.5

Table 3 Intraassay and interassay reproducibility of c-peptide radioimmunoassay kit

1) Intraassay reproducibility

No. of assay	Assay results—ng/ml								C.V. (%)
	1	2	3	4	5	6	Mean	S.D.	
Sample A.	0.36	0.37	0.34	0.27	0.28	0.34	0.33	0.04	11.7
Sample B.	4.3	5.2	4.3	4.5	4.4	4.3	4.5	0.32	7.1
Sample C.	10.7	12.0	11.0	9.3	9.8	10.3	10.5	0.87	8.2
Sample D.	22.5	21.5	20.0	18.5	20.5	19.5	20.4	1.30	6.4

2) Interassay reproducibility

No. of assay	Assay results—ng/ml							C.V. (%)
	1	2	3	4	5	Mean	S.D.	
Sample E.	0.60	0.61	0.65	0.55	0.52	0.59	0.05	7.8
Sample F.	4.2	4.5	4.3	5.2	4.1	4.5	0.39	8.8
Sample G.	4.6	5.9	5.4	6.2	5.6	5.5	0.54	9.8
Sample H.	10.5	8.8	9.4	10.5	9.7	9.8	0.66	6.7

確かめられた。

(5) 希釈試験に関する検討

C-peptide 濃度の異なる2種類の血清試料を用い、1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, と希釈して測定した際の測定値を検討したところ、いずれも0点を通る直線がえられた (Fig. 3)。

(6) インキュベーション時間に関する検討

a. First incubation 時間に関する検討

First incubation 時間を、8, 22, および 46 時間とかえた際の標準曲線と、血清試料の B/B₀% および測定結果につき、比較検討した。標準曲線に

ついては、Fig. 4 で示したごとく、いずれも良好な平行性が確かめられた。細部についてみると、8時間のインキュベーションだと 0.195 ng での B/B₀% は 99% と C-peptide 濃度が 0 との間に有意の差を認めえなかった。これに対し、22時間のインキュベーションだと 95.7% と有意の抑制が認められ、46時間のインキュベーションとの間にも有意の差異を認められなかった。また血清試料についての検討では、B/B₀% も、これを基に算出された測定結果も有意の差を認めなかった。

b. Second incubation 時間に関する検討

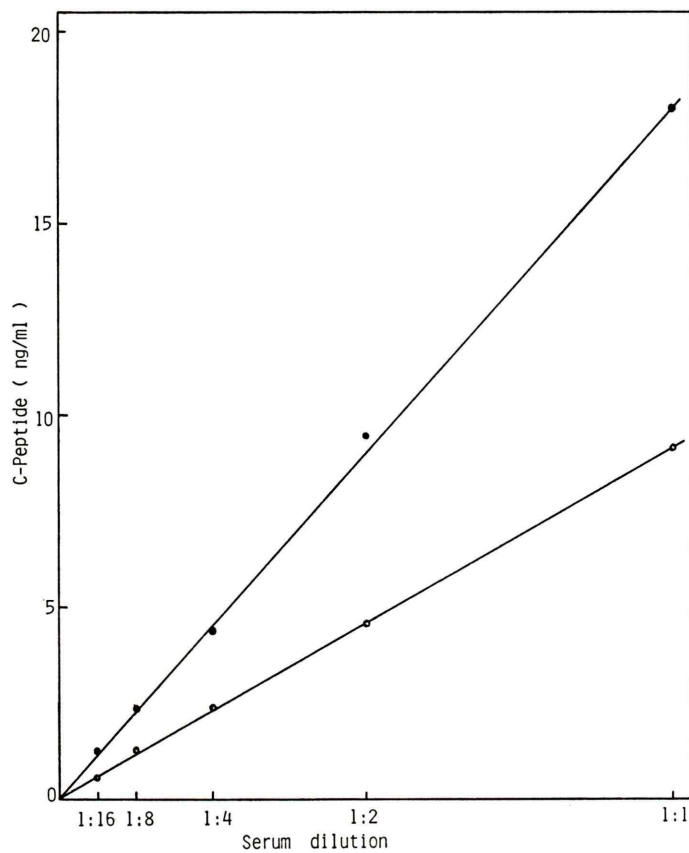


Fig. 3 Dilution test of serum C-peptide on C-peptide radioimmunoassay kit.

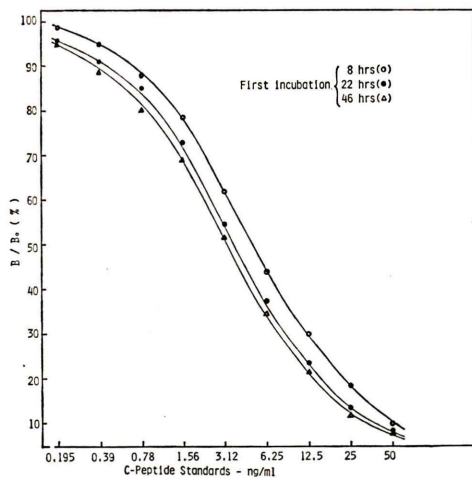


Fig. 4 Effect of first incubation times on C-peptide radioimmunoassay kit.

Second incubation 時間を, 15, 60, および 180 分とかえた際の標準曲線と, 血清試料の $B/B_0\%$ および測定結果につき, 比較検討した. 標準曲線については Fig. 5 で示したごとく, いずれも良好な平行性が確かめられた. 細部についてみると, 低濃度領域では, インキュベーション時間が長くなる程 $B/B_0\%$ が低下する傾向が認められたが, 感度についてみると 15 分インキュベーションの場合を除き有意の差異を認めなかった. また血清試料についての検討では $B/B_0\%$ も, これを基に算出した測定結果も, 有意の差を認めなかった. また, second incubation の際, 静置した場合と, rotator で攪拌した場合との比較も行ったが, Fig. 6 に示したごとく, 両者の間には有意の差を認めなかった.

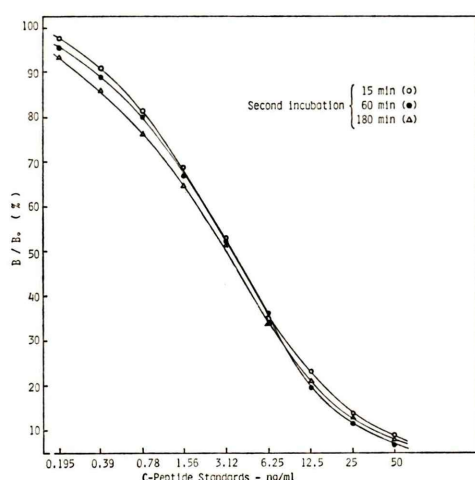


Fig. 5 Effect of second incubation times on C-peptide radioimmunoassay kit.

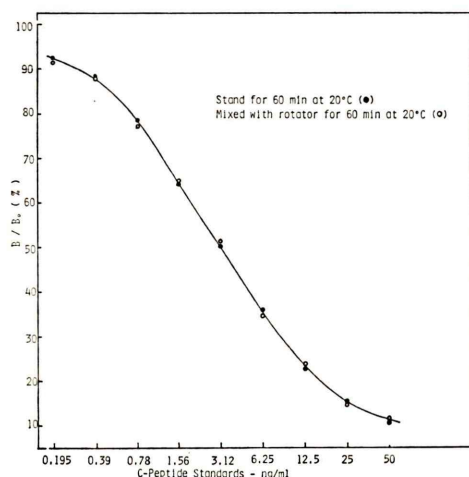


Fig. 6 Effect of mixed with rotator on second incubation of C-peptide radioimmunoassay kit.

2) 他の測定法との比較

(1) 標準 C-peptide の比較

本測定系に2種類の標準 C-peptide を添加した際の標準曲線を Fig. 2 に、また、他の測定法に同様に2種類の標準 C-peptide を添加した際の標準曲線を Fig. 7 で示した。すなわち、両標準 C-peptide による標準曲線は良好な平行性を示すことが確かめられた。細部についてみると、 $B/B_0\%$ はいずれの測定系でも塩基性アミノ酸部分を含ま

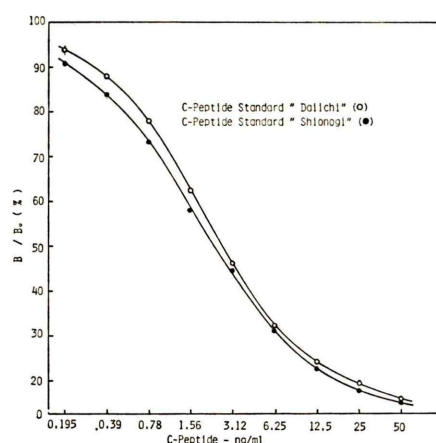


Fig. 7 Effect of C-peptide standards of "Shionogi" on C-peptide radioimmunoassay kit "Daiichi".

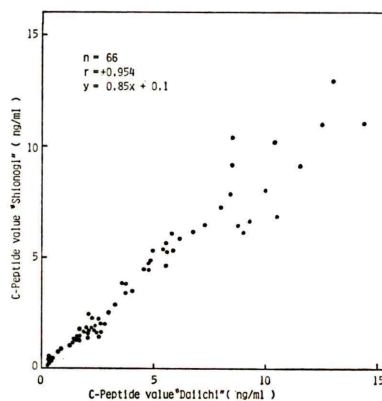


Fig. 8 Correlation of assay results between C-peptide radioimmunoassay kit Shionogi and C-peptide radioimmunoassay kit Daiichi.

ない合成ヒト C-peptide で低い結果であった。

(2) 測定値の比較

本測定法と他の測定法とで66例の血清試料を同時測定し、両者の比較を行った結果を、Fig. 8 で示した。両者は相関係数 $r = +0.954$, $y = 0.85x + 0.1$ と良好な相関がえられた。

(3) 本測定法の臨床応用

健常人6例に対し、早朝空腹時に50g OGTT を施行し、負荷前、および負荷後30分、60分、90分、120分、および180分と採血し、血中 C-peptide, IRI, および血糖値を測定した成績を、Fig. 9

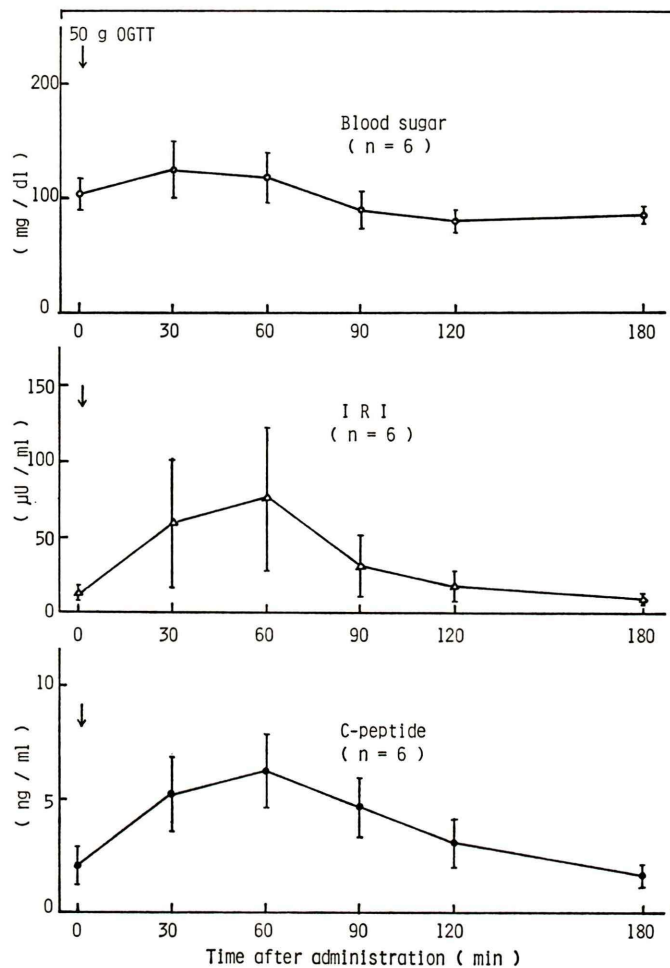


Fig. 9 Blood sugar, IRI and C-peptide responses to oral administration of 50 g glucose in normal subjects (Mean \pm S.D.).

で一括した。C-peptide は IRI と類似の変動を示すことが確かめられ、50 g OGTT による血中 C-peptide の測定が、膵 β 細胞機能を知る手段として有用であることが確かめられた。一方、同様の方法による臨床応用の成績を Fig. 10., 11 で示したが、C-peptide は IRI と類似の動態を示し、各々の症例の膵 β 細胞機能を反映した成績がえられた。特に PEG 法による血中 IRI の測定で、血中抗インスリン抗体の存在を明らかにしえた 3 例中 2 例で、C-peptide の過大反応が認められ (Fig. 11) かかる症例における膵 β 細胞機能を知る手段とし

て有用であることが確かめられた。

4. 考 察

膵 β 細胞機能を知る必要のある症例は、臨床的にはきわめて多い。膵 β 細胞機能を知る手段としては、現在、主に OGTT による血中 IRI の測定が広く普及し、臨床的にも有用であることがすでに確かめられている。しかし、現在インスリン治療中の患者や、血中に抗インスリン抗体の存在する患者などの検査では、測定値に影響するため応用が不可能であった。ところが臨床的には、これ

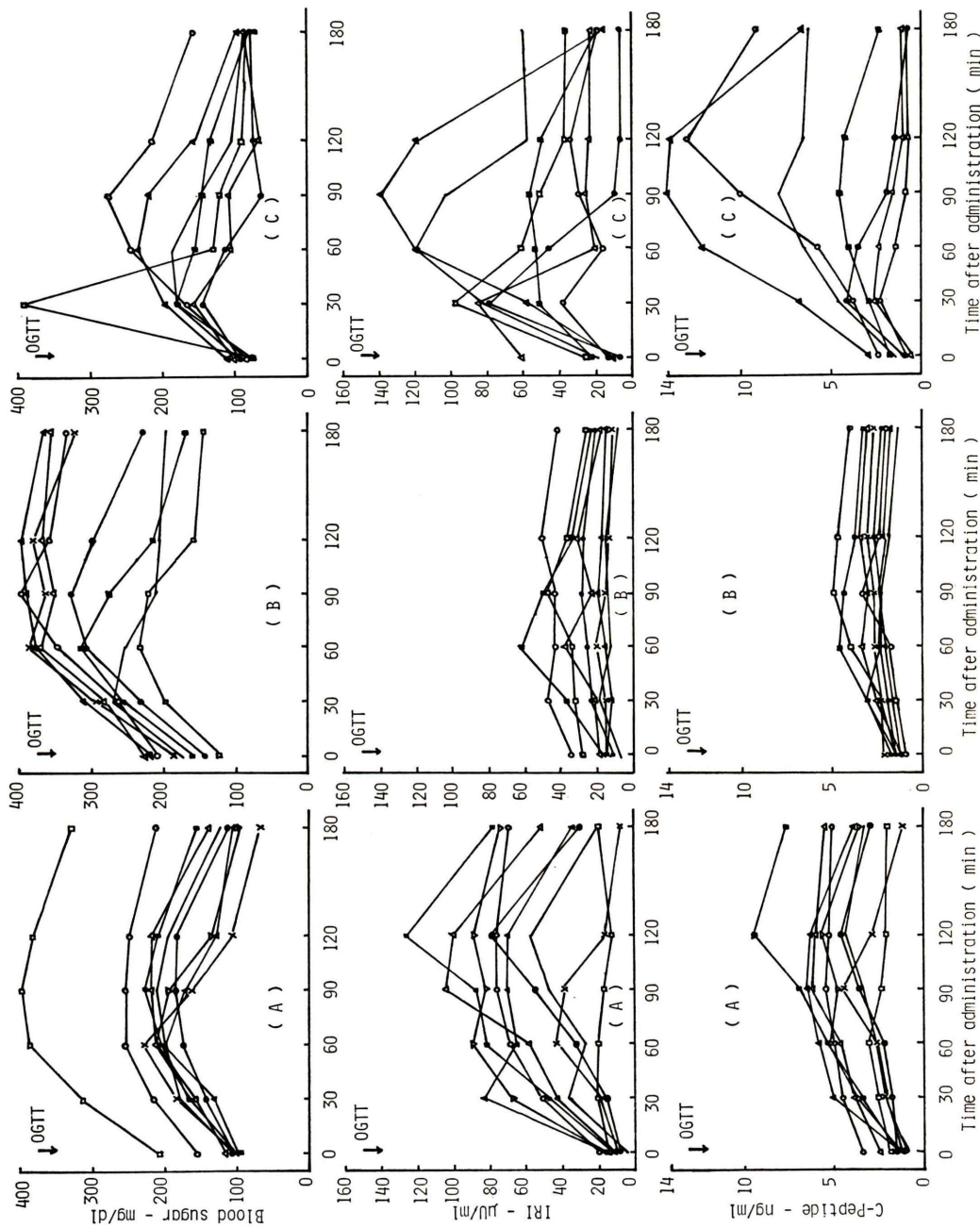


Fig. 10 Blood sugar, IRI and C-peptide responses to oral administration of 50 g glucose in diabetic patients treated with diet therapy (A), treated with oral agents (B) and other diseases with glycosuria without treated for glycosuria (C).

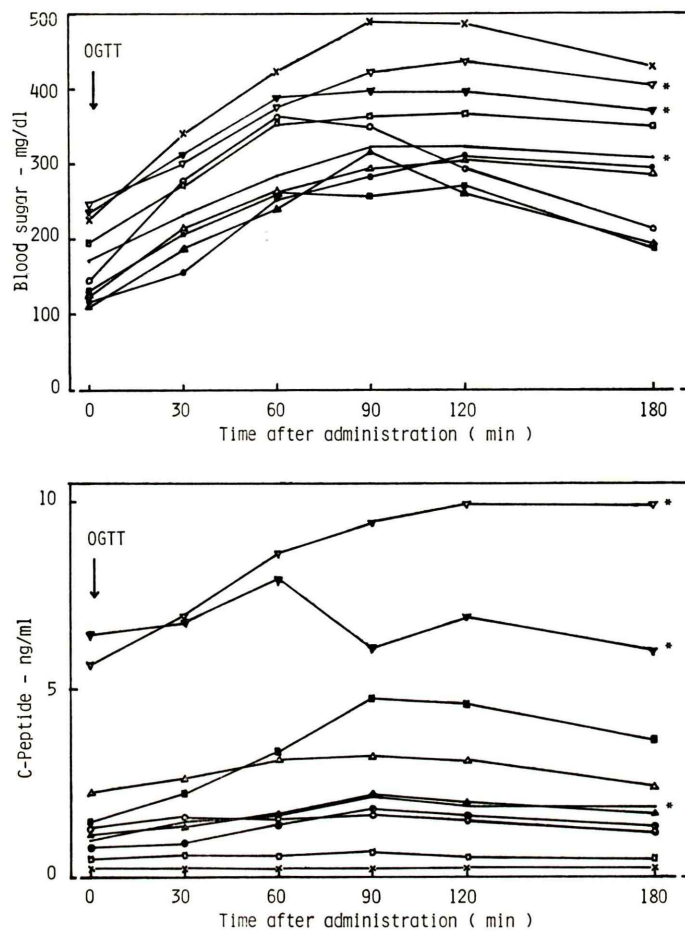


Fig. 11 Blood sugar and IRI responses to oral administration of 50 g glucose in diabetic patients treated with insulin. (*patients with anti-insulin antibody in the serum).

ら症例の膵β細胞機能は、しばしば問題となるため、かかる症例の膵β細胞機能を検する方法の確立が望まれていた。一方、プロインスリンの構造が明らかになるにつれ¹⁴⁾、血中へのインスリン分泌に際し、プロインスリンからインスリン部分とC-peptide部分と塩基性アミノ酸部分の3つに分解され、血中に放出されることが知られるようになった²⁻⁴⁾。このことは、C-peptideがインスリンと同様の分泌動態を示し¹⁵⁾、しかも免疫学的にインスリンと交叉性がないことから、C-peptideを用いた新しい膵β細胞機能検査が注目されるようになった。1974年 Kaneko ら^{12,13)}により、合成C-

peptideを用いたRIAが確立され、現在広く普及している。われわれも、すでに現在市販されている測定法の臨床応用とその意義につき、報告してきた¹⁶⁻¹⁹⁾。現在、市販されている測定法はすぐれたKitであることが確かめられているが、材料として塩基性アミノ酸部分を含むヒト合成C-peptideを用いたものであった。ところが、C-peptideとは、厳密にはインスリン部分と塩基性アミノ酸部分を除いた部分を意味している。最近、純粋にC-peptide部分を合成し、これを用いたRIAが確立されたのを契機に、現在市販されている測定法との間の特異性や、臨床応用上の差異の有無

に関心が集まってきた。われわれは、今回、この新しい測定 Kit に関する基礎的検討を行うとともに、これら2種類の Kit の比較などを行う機会をえた。われわれの検討成績では、本法は標準曲線、特異性、回収率、再現性、希釈試験などの基礎的諸条件を、いずれも満足するものであることが確かめられた。特に注目されたのは、現在市販されている測定法との比較であったが、両者の標準曲線は Fig. 2 および Fig. 7 で示したごとく、良好な平行性を示すことが、いずれの測定系でも確認できた。同一血清を用い、同時に両測定系で測定比較した成績では、両者は $r=0.954$ と良好な相関関係がえられた。これらの成績から C-peptide RIA は、その材料として塩基性アミノ酸部分を含むものを用いても、あるいは含まないものを用いても、実際の臨床応用上は差異がないと考えられる。しかし、今回われわれが検討した Kit は、I-125-C-peptide を青色、抗 C-peptide を黄色と着色がなされているため、測定操作上便利であり、さらに、測定に必要な時間が、現在市販されている測定法が4日であるのに対し、本 Kit は2日でよいなどの特徴をそなえている。一方、実際の臨床応用では34例の糖尿病患者を中心に検討したが、いずれもよく各々の臨床病態を反映した成績がえられた。特に、PEG 法による IRI の RIA で血中に抗インスリン抗体の存在が認められた症例においても、OGTT で C-peptide の反応が確かめられたことは、本法の臨床的有用性を示唆する成績といえる。

最後に、C-peptide radioimmunoassay Kit “Shionogi” の提供をうけた塩野義製薬株式会社に謝意を表します。

文 献

- Steiner DF and Oyer PE: The biosynthesis of insulin and probable precursor of insulin by a human islet cell adenoma. *Proc Nat Acad Sci* **57**: 473-480, 1967
- Rubenstein AH, Clark JL, Melani F et al: Secretion of proinsulin C-peptide by pancreatic B cells and its circulation in blood. *Nature*, **224**: 697-699, 1969
- Melani F, Rubenstein AH, Oyer PE et al: Identification of proinsulin and C-peptide in human serum by a specific immunoassay. *Proc Nat Acad Sci* **67**: 148-155, 1970
- Horwitz DL, Starr JI, Mako ME et al: Proinsulin, insulin, and C-peptide concentrations in human portal and peripheral blood. *J Clin Invest*, **55**: 1278-1283, 1975
- Berson SA and Yalow RS: Species-specificity of human anti-beef, pork insulin serum. *J Clin Invest*, **38**: 2107-2025, 1959
- Grodsky GM: Production of autoantibodies to insulin in man and rabbits. *Diabetes*, **14**: 396-403, 1965
- Heding LG: Determination of free and antibody-bound insulin in insulin treated diabetic patients. *Horm Metab Res* **1**: 145-146, 1969
- 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
- Rubenstein AH, Welbourn WP, Mako M, et al: Comparative immunology of bovine, porcine and human proinsulins and C-peptide. *Diabetes*, **19**: 546-553, 1970
- Block MB, Mako ME, Steiner DF, et al: Circulating C-peptide immunoreactivity. Studies in normals and diabetic patients. *Diabetes*, **21**: 1013-1026, 1972
- Yanaihara N, Hashimoto T, Yanaihara C, et al: Synthesis of human connecting peptide derivatives and their immunological properties. *Biochem Biophys Res Comm*, **59**: 1124-1130, 1974
- Kaneko T, Oka H, Munemura M, et al: Radioimmunoassay of human proinsulin C-peptide using synthetic human connecting peptide. *Endocrinol Jap* **21**: 141-145, 1974
- 兼子俊男: C-ペプチドの測定とその臨床的意義, 代謝, **10**: 1288-1295, 1973
- Chance RE, Ellis RM and Bromer WW: Porcine proinsulin: Characterization and amino acid sequence. *Science* **161**: 165-167, 1968
- Kemmler W, Peterson JD and Steiner DF: Studies on the conversion of proinsulin to insulin. 1. Conversion in vitro with trypsin and carboxypeptidase B. *J Biol Chem* **246**: 6786-6790, 1971
- 木戸 亮, 松岡 徹, 福地 稔, 他: 糖尿病患者における C-peptide 分泌動態に関する研究, 日本内分泌学会雑誌 **51**: 483 (Suppl), 1975
- 南本正篤, 尾上公一, 仲座良造, 他: C-peptide の radioimmunoassay に関する検討, 核医学 **12**: 593 (Suppl.), 1975
- 福地 稔, 木戸 亮, 永井清保, 他: 糖尿病患者における C-peptide 分泌動態——抗 Insulin 抗体含有血清における CPR——, 日本内分泌学会雑誌 **52**: 429 (Suppl), 1976
- 木戸 亮, 福地 稔, 永井清保, 他: 血中 C-peptide を指標とする膵β細胞機能検査法の臨床応用, 兵庫医科大学医学会雑誌 **1**: 117-123, 1976