

《ノート》

Insulin-like growth factor-I (IGF-I) radioimmunoassay (RIA)の検討

The Evaluation of RIA for Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I)

勢川 真理* 宮地 幸隆* 長尾 紀子* 宮下 洋*
庄司 亨* 入江 實*

Mari SEGAWA*, Yukitaka MIYACHI*, Noriko NAGAO*,
You MIYASHITA*, Toru SHOJI* and Minoru IRIE*

*First Department of Internal Medicine, Toho University School of Medicine

I. はじめに

IGF-I は growth hormone (GH) 分泌異常者の診断や治療効果の評価に有用であり¹⁻³⁾, RIA キットを用いて測定されている. IGF-I は血中では遊離型および蛋白結合型として存在しているが⁴⁻⁷⁾, 現在用いられている RIA キットは抽出なしの血漿で測定 (直接法) することから, 結合蛋白による影響を避けられず, その測定値の信頼性に疑問がもたれてきた^{4,8-12)}.

最近, 血清の酸エタノール処理で血中 IGF-I を全て遊離型とする抽出法を用いた測定キット (Chiba Corning 社製) が開発された. 今回われわれはこの RIA キットの基礎的検討, 臨床的検討およびこれまでの直接法による測定値との比較を行い, 臨床上的有用性の検討を行ったので報告する.

II. 対象および方法

1. 測定方法

- a) 血清あるいは血漿からの IGF-I 抽出法
(Fig. 1(a))

サンプル血清あるいは血漿 100 μ l に塩酸・エタノール・精製水よりなる前処理液 400 μ l を加え, 30 分間覚拌し 1,500g で遠心分離後, その上清 100 μ l にリン酸 1 カリウム・リン酸 2 ナトリウム・アジ化ナトリウム・精製水からなる中和液 600 μ l を加え, 混和後その一部を IGF-I の RIA に用いた.

b) IGF-I の RIA (Fig. 1(b))

抗 IGF-I モノクローナル抗体を固相化したポリスチレンチューブに 0, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 20.0, 50.0 ng/ml の標準 IGF-I 100 μ l, もしくは血清あるいは血漿の抽出液 100 μ l を入れる. さらに ¹²⁵I 標識 IGF-I を 500 μ l (約 30,000 cpm) 加え, 4°C でオーバーナイトインキュベーション後反応液を吸引する. 次に Tween 20・精製水よりなる洗浄液を 3 ml 加え吸引, 2 分間静置後再度吸引し, チューブに残存した放射活性をガンマカウンターにて測定した. 測定は全て二重測定を行った.

2. 基礎的検討

IGF-I の RIA の基礎的検討としてインキュベーション条件 (時間, 温度), 標準曲線, 再現性, 添加回収試験, 希釈試験, 特異性, 安定性について検討した.

3. 臨床的検討

明らかな内分泌疾患のない男性 46 名 (年齢 1~

* 東邦大学医学部附属大森病院内科学第一講座

受付: 2 年 4 月 27 日

最終稿受付: 2 年 7 月 12 日

別刷請求先: 東京都大田区大森西 6-11-1 (☎ 143)

東邦大学医学部附属大森病院第一内科

勢川 真理

Key words: IGF-I, RIA, serum, extraction method.

(a) Method for extraction

Serum or Plasma	100 $\mu\ell$
Pre-treatment solution ^{*1}	400 $\mu\ell$

Mix at room temperature for 30 min.

Centrifuge for 10 min. at 1500 g

Supernatant	100 $\mu\ell$
Neutralisation solution ^{*2}	600 $\mu\ell$

*1 HCl + C₂H₅OH + water

*2 KH₂PO₄ + Na₂HPO₄ · 12H₂O + azide + water

(b) Assay procedure

Extracted Sample or Standard	100 $\mu\ell$
in IGF-I Ab coated tube.	
¹²⁵ I-IGF-I	500 $\mu\ell$

Mix and incubate at 4°C overnight

Aspirate

Wash with 3 ml washing solution^{*3}

Leave for 2 min.

Aspirate

Count

*3 Tween 20 + water

Fig. 1 Extraction procedure of serum or plasma (a) and RIA procedure for IGF-I (b).

63歳, 平均 15.4歳), 女性35名(年齢 1~69歳, 平均 21.6歳) および下垂体性小人症3名(年齢 7~16歳, 平均 10.7歳), 下垂体機能低下症3名(年齢 40~76歳, 平均 66.0歳), 末端肥大症11名(28~88歳, 平均 55.5歳) その他甲状腺機能異常症など15名(年齢 19~64歳, 平均 38.8歳) について本法で IGF-I 値を求めた. またその一部で, Nichols 社製 RIA キット(直接法)での測定値との相関を比較検討した.

III. 成績

1. 基礎的検討

a) インキュベーション条件

インキュベーション温度を 4°C, 室温, 37°C とし, おのおのインキュベーション時間を 1, 5, 16 時間と変化させた場合の標準曲線を比較検討した (Fig. 2(a), (b), (c)). 4°C, 室温ではおのおの 16 時間で良好な標準曲線が得られたが, 37°C では各時間とも 4°C, 室温に比し結合能が低かった. 4°C 16時間で最も結合能の高い良好な標準曲線が得られたことから, 以後インキュベーションは 4°C 16時間で行った. この条件下で, IGF-I が 0.5 ng/ml 存在下の B/B₀ は 90% 以下となり, 感

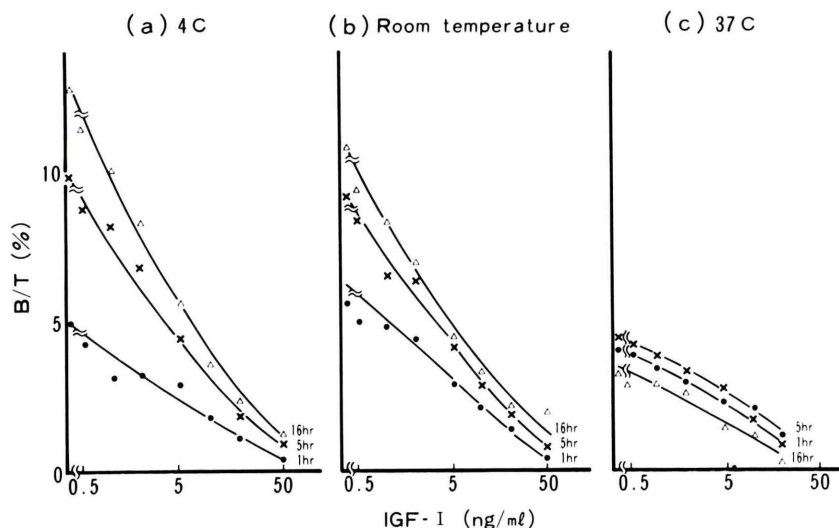


Fig. 2 Effect of incubation temperature and time on standard curve of IGF-I RIA.

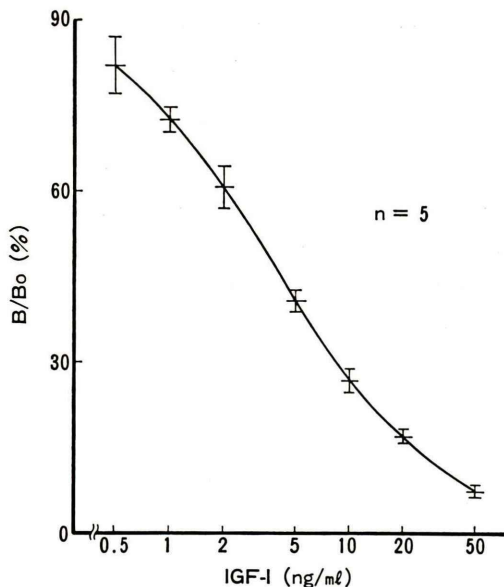


Fig. 3 Standard curve of IGF-I RIA.

度は少なくとも 0.5 ng/ml で 0.5~50 ng/ml まで良好な容量反応性を示した (Fig. 3).

b) 再現性

再現性は、測定内誤差 (Table 1(a)) と測定間誤差 (Table 1(b)) を 3 つの異なる IGF-I 濃度血清で検討した. おおの 1 回に 10 本ずつ測定した測定内誤差は, CV で 5.1~11.1%, 二重測定した 5 回の測定間誤差は CV で 8.8~17.3% あった. IGF-I が高濃度の血清での測定間誤差で CV がやや高めであるが, その他では満足できる結果を得た.

c) 添加回収試験

3 つの異なる IGF-I 濃度血清 (1.54, 5.72, 15.1 ng/ml) におおの 5 濃度 (0, 1.0, 2.0, 5.0, 20.0 ng/ml) の標準溶液を等量添加しおおの 3 重測定を行い添加回収率を求めた (Table 2). なお, 抽出誤差を無くするため, 標準溶液はサンプルの前処

Table 1 Intraassay (a) and interassay (b) reproducibility of IGF-I RIA

(a) Intraassay

Sample	Mean (ng/ml)	SD (ng/ml)	CV (%)
I	179.1	9.2	5.1
II	144.9	9.9	6.9
III	305.3	33.9	11.1

(n=10)

(b) Interassay

Sample	Mean (ng/ml)	SD (ng/ml)	CV (%)
I	114.4	10.1	8.8
II	171.5	19.7	11.5
III	639.9	111.0	17.3

(n=5)

Table 2 Recovery of IGF-I

Serum IGF-I conc. Added IGF-I conc.	1.54 ng/ml		5.72 ng/ml		15.1 ng/ml	
	(ng/ml)	(%)	(ng/ml)	(%)	(ng/ml)	(%)
0 ng/ml	1.54	—	5.72	—	15.1	—
1.0 ng/ml	2.41	87	6.58	86	16.2	110
2.0 ng/ml	3.64	105	7.61	95	17.6	125
5.0 ng/ml	6.17	93	11.2	110	20.4	106
20.0 ng/ml	22.3	104	27.6	109	31.2	81
Mean±SD	97±9		100±12		106±18	

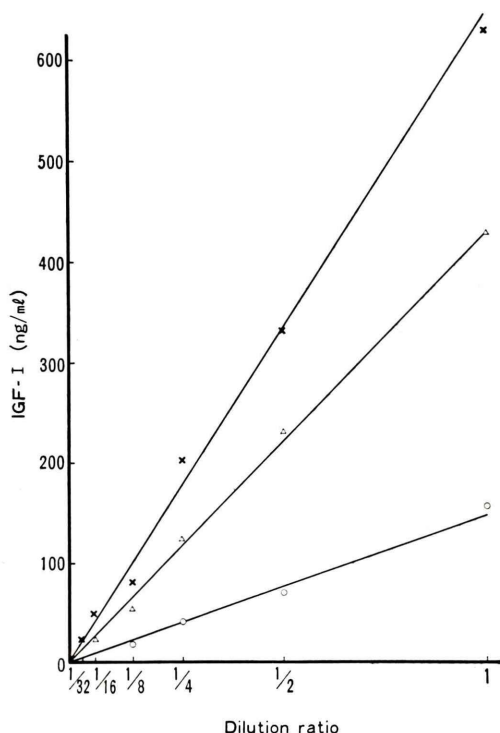


Fig. 4 Serum dilution curves in IGF-I RIA.

理を行った後に添加した。添加量に対する平均回収率は 97~106% と良好であった。

d) 希釈試験

IGF-I 濃度が 155.8, 428.8, 630.0 ng/ml の血清について, おおのリン酸 1 カリウム・リン酸 2 ナトリウム・アジ化ナトリウム・塩酸を含む 0 濃度液で 2, 4, 8, 16, 32 倍希釈までの検討を行ったところ希釈曲線はいずれも原点に収束する良好な直線性を示した (Fig. 4).

e) 特異性

human IGF-II, epidermal growth factor (EGF), GH, multiplication-stimulating activity (MSA), insulin との交叉性について検討したところ, IGF-II との間に 0.11% の交叉性が認められたがその他との交叉性はほとんど認められず, 特異性が高かった (Fig. 5).

f) 安定性

初めに IGF-I 低濃度 (A) および高濃度 (B) 血清で, 凍結血清融解後測定までの時間経過の測定値に対する影響を検討した (Table 3(a)). 融解後, おおの 0, 1, 4, 6 日後に測定した IGF-I 値の CV は, 4°C で 6.8%, 12.0%, 室温で 7.6%, 2.5% であった。次に同じ血清を用いて, 血清凍結融解の

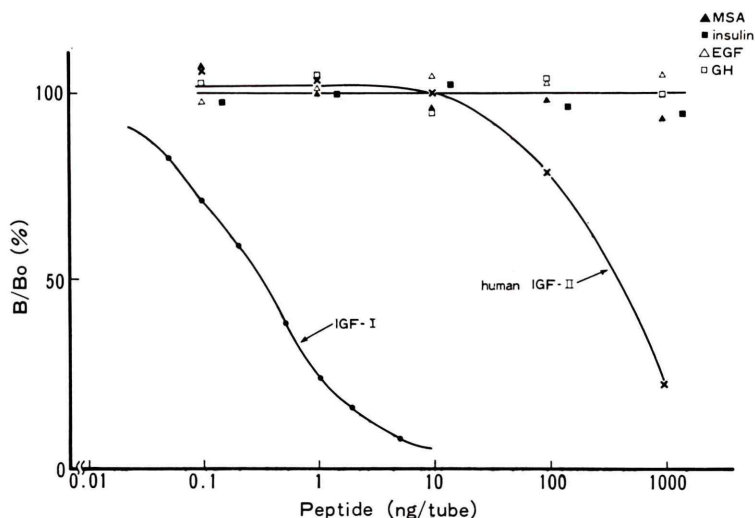


Fig. 5 Specificity of IGF-I RIA.

Table 3 Stability of serum IGF-I at different temperature (4°C, room temperature) and time (a) and after repeated freezing and thawing (b)(a). Temperature and Time
4°C

	Day				Mean (ng/ml)	SD (ng/ml)	CV (%)
	0	1	4	6			
Sample A	179	160	156	156	163	11	6.8
Sample B	315	286	258	240	275	33	12.0

Room temperature

	Day				Mean (ng/ml)	SD (ng/ml)	CV (%)
	0	1	4	6			
Sample A	179	161	167	191	175	13	7.6
Sample B	315	317	301	305	310	8	2.5

(b). Freezing and Thawing

	Times			Mean (ng/ml)	SD (ng/ml)	CV (%)
	1	3	5			
Sample A	168	160	147	158	11	6.7
Sample B	357	246	282	227	83	36.7

Table 4 Serum IGF-I concentrations in normal subjects with different age

Age group (years)	Mean (ng/ml)	SD (ng/ml)	No.
0-2	101.9	42.3	5
3-5	238.9	148.5	6
6-8	205.8	154.5	13
9-11	297.6	193.1	10
12-14	444.1	255.1	12
15-17	544.3	122.0	6
18-20	392.0	194.5	3
21-30	365.0	115.8	14
31-70	277.4	114.9	12

繰り返しの測定値に対する影響について検討した (Table 3(b)). 凍結融解をおおの 1, 3, 5 回繰り返した後に測定した場合の CV は 6.7%, 36.7% であった. IGF-I が高濃度の血清では凍結融解の

繰り返しは測定値に変動が見られるので避けたほうが良いと思われた.

2. 臨床的検討

本法で測定した明らかな内分泌疾患を持たない成人28名 (年齢 20~69 歳, 平均 34.9 歳) の IGF-I 値は 337.4 ± 126.1 (M \pm SD) ng/ml であった. これに比し, 下垂体性小人症 3 名および下垂体機能低下症 3 名では 83.7 ± 54.0 ng/ml と低値を示し, 末端肥大症 11 名では $1,039.8 \pm 283.5$ ng/ml と高値を示した (Fig. 6). また, 明らかな内分泌疾患を持たない 0~69 歳の症例の加齢による IGF-I 値の変化を Table 4 に示す. 血中 IGF-I 値は 9~11 歳頃より増加し 15~17 歳でピークを示し, 20 歳以後は加齢とともにやや減少する傾向が見られた.

IGF-I の Nichols 社製キット (直接法) と今回われわれが用いた抽出法での測定値の関係は, Fig.

7(a) に示すように $r=0.73$ ($p<0.001$) であったが、とくに抽出法での IGF-I 値が 200 ng/ml 以下を示したのに関してみると、Fig. 7(b) に示すように $r=0.29$ ($p=0.19$) と悪かった。

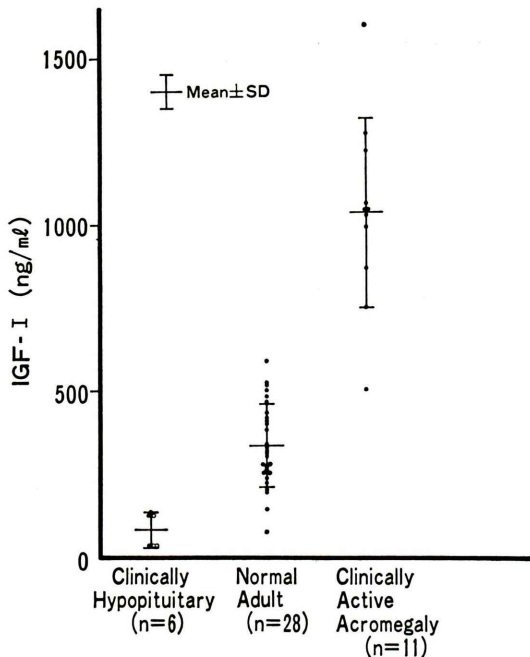


Fig. 6 Serum IGF-I concentrations in 6 patients with hypopituitarism (• : hypopituitarism, ○ : pituitary dwarfism), 28 normal adults and 11 patients with active acromegaly.

IV. 考 察

本邦で現在一般に用いられている IGF-I の RIA は直接法と呼ばれ、Fulranetto らによる nonequilibrium 法¹³⁾ に基づいた方法であり、遊離型 IGF-I と一部の蛋白結合型 IGF-I が測定されるが、IGF-I と結合蛋白の結合が不安定であるため採血方法や保存条件による測定値の変動が指摘されており、結合蛋白による影響を避けるため種々の血清処理方法が報告されてきた^{4,10,11,13,15)}。またこれまでの単位表示は、正常成人プール血清を 1 unit とした unit 表示であるが、諸外国ではすでに重量表示が導入されており、IGF-I 合成が可能となった現在わが国でも重量表示をとるべきであると考えられる。

これに対し今回われわれが検討した抽出法による IGF-I の RIA は、直接法による測定値を不安定にしてきた結合蛋白を除去し、全て遊離型にして総 IGF-I を測定する方法である。この方法は Daughaday らの酸エタノール法¹⁰⁾ に準じた抽出法であるが、中和後一週間の静置を必要とせず操作方法も簡便である。

今回の検討で、その感度は少なくとも 0.5 ng/ml であることから、必要とする血清あるいは血漿は $100 \mu\text{l}$ と少量で測定可能であった。また交叉性も

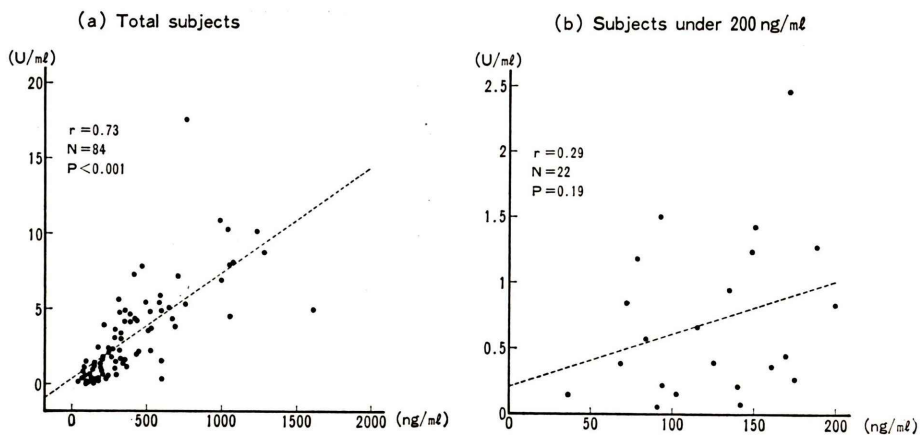


Fig. 7 Comparison of values for serum IGF-I as obtained from direct RIA (ordinate) and from extracted RIA (abscissa) (a): Total subjects, (b): Subjects under 200 ng/ml .

IGF-II との間に 0.11% 認められた以外, 他の成長因子, insulin などとは認められず特異性も高かった。また再現性は, IGF-I 高濃度血清で測定間誤差の CV が 17.3% とやや高いが他は満足できるものであった。

本法による下垂体性小人症および下垂体機能低下症の IGF-I 値はいずれも正常下限以下を示し, また末端肥大症の IGF-I 値はいずれも正常上限以上を示したことから, 本測定法の臨床的有用性も確認された。

同一検体の直接法と抽出法による測定値の比較では, IGF-I 値が低値でとくにその相関関係は悪かった。抽出法による測定値がより安定していることから信頼性は高いと考えられ, 今後 IGF-I の測定は抽出法を用いて行われると思われるが, さらに生物活性のある遊離型 IGF-I のみを測定する方法について検討していく必要があると考えられる。

V. ま と め

抽出法を用いた IGF-I 測定 RIA キットの基礎的, 臨床的検討を行いその有用性が明らかとなった。今後この測定法が利用されていくことが期待される。

謝辞: 稿を終えるに当たり, 下垂体性小人症の検体を御提供下さいました国立小児医療センター田中敏章先生に深謝致します。

文 献

- Clemmons DR, Van Wyk JJ, Ridgway EC, et al: Evaluation of acromegaly by radioimmunoassay of somatomedin-C. *N Engl J Med* **301**: 1138-1142, 1979
- Rudman D, Moffitt SD, Fernhoff PM, et al: The relation between growth velocity and serum somatomedin C concentration. *J Clin Endocrinol Metab* **52**: 622-627, 1981
- Rieu M, Girard F, Bricaire H, et al: The importance of insulin-like growth factor (Somatomedin) measurements in the diagnosis and surveillance of acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab* **55**: 147-153, 1982
- Daughaday WH, Kapadia M, Mariz I: Serum somatomedin binding proteins: Physiologic significance and interference in radioligand assay. *J Lab Clin Med* **109**: 355-363, 1987
- Furlanetto RW: The somatomedin C binding protein: Evidence for a heterologous subunit structure. *J Clin Endocrinol Metab* **51**: 12-19, 1980
- Hintz RL, Liu F: Demonstration of specific plasma protein binding sites for somatomedin. *J Clin Endocrinol Metab* **45**: 988-995, 1977
- Zapf J, Waldvogel M, Froesch ER: Binding of nonsuppressible insulinlike activity to human serum. *Arch Biochem Biophys* **168**: 638-645, 1975
- Chatelain PG, Van Wyk JJ, Copeland KC, et al: Effect of in vitro action of serum proteases or exposure to acid on measurable immunoreactive somatomedin-C in serum. *J Clin Endocrinol Metab* **56**: 376-383, 1982
- Clemmons DR, Underwood LE, Chatelain PG, et al: Liberation of immunoreactive somatomedin-C from its binding proteins by proteolytic enzymes and heparin. *J Clin Endocrinol Metab* **56**: 384-389, 1983
- Daughaday WH, Mariz IK, Blethen SL: Inhibition of access of bound somatomedin to membrane receptor and immunobinding sites: a comparison of radioreceptor and radioimmunoassay of somatomedin in native and acid-ethanol-extracted serum. *J Clin Endocrinol Metab* **51**: 781-788, 1980
- Zapf J, Walter H, Froesch ER: Radioimmunological determination of insulinlike growth factors I and II in normal subjects and in patients with growth disorders and extrapancreatic tumor hypoglycemia. *J Clin Invest* **68**: 1321-1330, 1981
- Bhaumick B, Bala RM: Radioimmunoassay of basic somatomedin in human plasma and serum: Effects of incubation time and temperature, and of anticoagulants. *Clin Invest Med* **1**: 57-61, 1982
- Furlanetto RW, Underwood LE, Van Wyk JJ, et al: Estimation of somatomedin-C levels in normals and patients with pituitary disease by radioimmunoassay. *J Clin Invest* **60**: 648-657, 1977
- Bala RM, Bhaumick B: Radioimmunoassay of a basic somatomedin: Comparison of various assay techniques and somatomedin levels in various sera. *J Clin Endocrinol Metab* **49**: 770-777, 1979
- Underwood LE, D'Ercole AJ, Copeland KC, et al: Development of a heterologous radioimmunoassay for somatomedin C in sheep blood. *J Endocrinol* **93**: 31-39, 1982