技術報告

ビーズ固相法による血清インスリン測定キット の基礎的および臨床的検討†

山口育子, 船越顕博*, 馬場裕子, 小宮妙子, 一矢有一**, 松浦啓一**

九州大学医学部付属病院放射線部, *同大学医学部第3内科, **同大学医学部放射線科

812 福岡市東区馬出 3-1-1

1983年7月16日 受理

Key Words: insulin, radioimmunoassay, solid phase method

1. はじめに

インスリンのラジオイムノアッセイ (RIA) は, Berson と Yalow¹⁾ によって確立され, 今までに種々のキットが開発されている。その B/F 分離には, 二抗体法^{2), 3)}, 固相法^{4), 5)} などが用いられており, いずれの方法でも安定した結果が得られているが, 最近では迅速性, 簡便性が要求されてきている。今回, 私たちは, ビーズ固相法を用いたインスリン・リアビーズ (ダイナボットラジオアイソトープ研究所製) の基礎的, 臨床的検討を行った。

2. 測定方法

本キットはインスリン抗体処理ビーズを用いた固相法で, 従来のリアキットと異なり WHO 標準品に準拠したヒトインスリン標準液を用いている。本キットは, ①インスリン抗体ビーズ (抗ブタインスリン), ②ヨウ化インスリン (¹²⁵I) 液30mL, ③インスリン標準液 (0, 5, 10, 20, 40, 80, 160, 320 μ U/mL) よりなる。

本キットによる測定手順は, Fig. 1 の通りである。

Fig. 1 Procedure for measurement of IRI (immunoreactive insulin).

3. 結果

本キットに関する基礎的な検討項目として, ①再現性, ②回収試験, ③希釈試験, ④インキュベーション条件, ⑤交差試験について検討し, 健常者7名による75g 経口糖負荷テスト (OGTT) によるインスリン値を測定した。また現在使用されているインスリンリアキット (二抗体法) 測定値との比較を各種疾患について行った。

3.1 再現性

5種類の血清を6回測定し intraassay variance を, 3種類の血清を3回測定し interassay variance を検討した (Table 1)。C.V. 値は, intraassay variance では, 2.7~7.2%, interassay variance では, 7.4~7.9%と再現性は良好であった。

† Basic and Clinical Evaluation of Radioimmunoassay Kit for Serum Insulin by Bead Solid Phase Method. Ikuko YAMAGUCHI, Akihiro FUNAKOSHI, Hiroko BABA, Taeko KOMIYA, Yuichi ICHIYA and Keiichi MATSUURA: Department of Radiology, Kyushu University Hospital, Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka-shi 812.

Table 1 Reproducibility

A) Intraassay variance

Sample	N	Mean ($\mu\text{U/ml}$)	S.D. ($\mu\text{U/ml}$)	C.V. (%)
No. 1	6	10.1	0.7	6.9
No. 2	6	33.4	2.4	7.2
No. 3	6	71.0	1.9	2.7
No. 4	6	84.0	5.8	6.9
No. 5	6	190.3	8.8	4.6

B) Interassay variance

Sample	N	Mean ($\mu\text{U/ml}$)	S.D. ($\mu\text{U/ml}$)	C.V. (%)
No. 6	3	9.4	0.7	7.4
No. 7	3	37.1	2.8	7.5
No. 8	3	79.7	6.3	7.9

Table 2 Recovery test

Sample	Added ($\mu\text{U/ml}$)	Measured ($\mu\text{U/ml}$)	Recovery (%)
No. 9		12.4	
	0	10.0	80.6
	10	18.4	82.1
	40	45.6	87.0
	80	90.4	97.8
	160	162.2	94.1
	320	329.4	99.1
No.10		40.6	
	0	37.2	91.6
	10	40.6	80.2
	40	72.6	90.1
	80	115.2	95.5
	160	191.8	95.6
	320	355.6	98.6
No.11		164.4	
	0	184.8	112.4
	10	183.0	104.9
	40	213.6	104.5
	80	252.6	103.4
	160	316.0	97.4
	320	437.8	90.4

3・2 回収試験

3種類の血清を用いて、0, 10, 40, 80, 160, 320 $\mu\text{U/ml}$ の標準溶液を添加し回収試験を行った (Table

Fig. 2 Dilution test.

Fig. 3 Effect of temperature and time on the reaction of the standard curve.

2)。回収率は、90.1~102.2%と良好であった。

3・3 希釈試験

希釈試験は、3種類の血清を用いて生理食塩水で16倍まで倍々希釈を行った (Fig. 2)。いずれの希釈曲線も良好な直線性を示した。

3・4 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を4°C, 25°C, 37°Cとし、異なる温度下における標準曲線および3種類の血清の測定値について検討した (Fig. 3)。4°Cの場合、結合率はやや低かったが、得られた測定値はいずれの温度でもほぼ同一であった。

つぎにインキュベーション時間を4時間、24時間、48時間と変えた場合の標準曲線および3種類の血清の測定値に対する影響について検討した。Fig. 3のごとく4時間の場合は、結合率の低下を示し、標準曲線の勾配は緩やかであった。24時間、48時間の標準曲線

Fig. 4 Cross reactivity of insulin antiserum.

は、両者とも平行した急峻な勾配の曲線が得られた。得られた測定値は4時間ではやや高値の傾向を示した。

3.5 交差試験

Fig. 4に、本キットを用いた標準曲線を示しているが、本測定系に他の消化管ホルモン(ガストリン、グルカゴン、セルレイン、somatostatin, pancreatic polypeptide, C-ペプチド、セクレチン)を加えても交差反応性は認められなかった。またブタ、ウシインスリンとは良好な交差性を示した。

3.6 健常者における糖負荷時インスリン値

肥満のない健常者7名(男4名, 女3名)に75g OGTT 経口負荷を行った(Fig. 5)。血中インスリンの前値は、 $11.4 \pm 3.5 \mu\text{U/ml}$ (mean $\pm$ S.E.)で、負荷後30分でピーク($56.4 \pm 35.5 \mu\text{U/ml}$)に達し、以後漸減した。血糖値は負荷前は、 $86 \pm 12.1 \text{ mg/dl}$ (mean $\pm$ S.E.)で、負荷後30分でピークを示し($125 \pm 22.6 \text{ mg/dl}$)以後漸減した。

Fig. 5 75 g OGTT in healthy controls.

Fig. 6 Correlation between IRI values determined with double antibody method and solid phase method.

3.7 本キットとインスリンリアキットの比較

各種疾患患者血清400検体を本キットとインスリンリアキット(二抗体法, ダイナボット社製)とで測定し両者を比較した(Fig. 6)。回帰直線は、 $y = 0.59x + 3.7$ と本キットの方が低値を示したが、相関係数は、 $r = 0.97$ ($p < 0.001$)ときわめて良好であった。

4. 考 察

インスリン測定の普及により、多量のサンプルを簡便かつ正確に測定する方法への要望は強い。本キットは、 B/F 分離に遠心操作が不要であり、かなり簡便化されている。基礎的な検討では、再現性、回収率、希釈試験とも良好な結果であった。本キットの抗体の交差反応性でも、他のほとんどの消化管ホルモンとは交差反応を示さず、ヒトインスリンとは標準曲線と一致したカーブを示し、ウシ、ブタインスリンとは良好な交差性を示した。インスリンリアキット(二抗体法)との比較では、その相関は $r = 0.97$ と良好であったが、本キットは標準溶液をWHO標準品に準拠させているためインスリンリアキットに比べ、 $y = 0.59x + 3.7$ と低値になっている。この点国内でのデータを比較する場合は考慮する必要がある。

臨床的検討でも、75gブドウ糖経口投与における健常成人のIRI濃度は、従来の報告^{6,7)}とよく一致し、本キットは今後十分に臨床に使用できると思われる。

5. ま と め

ビーズを用いたインスリン、リアビーズ(固相法)の基礎的、臨床的検討を行い以下の結果を得た。

(1) 再現性, 回収試験, 希釈試験, 交差試験はいずれも良好な結果であった。

(2) 本キットとインスリンリアキット(二抗体法)との比較では, 本キットは WHO の標準品に準拠しているため, $y=0.59x+3.7$ と本キットの方が低値を示したが, 相関係数は, $r=0.97$ と良好であった。

本キットは, 遠心分離を必要とせず, 操作も簡便で日常検査に有用であると考えられた。

最後に, 本キットの提供を受けたダイナボットラジオアイソトープ研究所に感謝致します。

文 献

- 1) R.S. Yalow and S.A. Berson: *Nature*, **184**, 1948 (1959)
- 2) 馬場茂明: 臨床病理, **19**, 326 (1971)
- 3) 安沢竜徳: ホと臨, **18**, 673 (1970)
- 4) 稲田満夫: 核医学, **8**, 305 (1971)
- 5) 中川昌一: *Radioisotopes*, **21**, 97 (1972)
- 6) 兼子俊男: 代謝, **10**, 1288 (1973)
- 7) 井村裕夫: ホと臨, **24**, 9 (1976)