

酵素抗体法(ELISA)による実験小動物の血漿インスリン値の 微量定量法について

誌名	日本獣医畜産大学研究報告 = The bulletin of the Nippon Veterinary and Zootechnical College
ISSN	03738361
著者	新井, 敏郎 菅原, 盛幸 大木, 与志雄
巻/号	32号
掲載ページ	p. 48-51
発行年月	1983年12月

酵素抗体法 (ELISA) による実験小動物の血漿 インスリン値の微量定量法について

新井敏郎・菅原盛幸・大木与志雄

日本獣医畜産大学 獣医生理化学教室

Micro Method of Measurement of Plasma Insulin Levels by ELISA in Experimental Small Animals

Toshiro ARAI, Moriyuki SUGAWARA and Yoshio OKI

Department of Physiological Chemistry,
Nippon Veterinary and Zootechnical College

近年, Radioimmunoassay (RIA) に代わって酵素を免疫反応に用いる Enzymeimmunoassay (EIA) が開発され, 今日多くの物質の定量や検出に利用されている。1972年に, インスリンは, 初めて ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) により測定され⁵⁾, その後種々の改良が加えられてきている^{2,3,4,7)}。

今回, 我々はインスリンの微量定量法を確立するために, 抗インスリン抗体の担体としてマイクロプレートを用いる ELISA 二抗体サンドイッチ法に改良を加え, ハタネズミおよびマウスにおける血漿インスリン値について測定を行った。

実験材料および方法

1. 酵素抗体法 (ELISA)

(1) 測定原理: 本法は, 抗インスリン抗体を吸着させたマイクロプレートを用いた二抗体サンドイッチ法である。Fig. 1 に示したように, マイクロプレートに吸着させた抗インスリン抗体とインスリンを反応させ, 抗原抗体反応を起こさせる。この抗インスリン抗体-インスリン複合体に, 更に酵素標識抗インスリン抗体を反応させ, 抗インスリン抗体-インスリン-酵素標識抗インスリン抗体の複合体を形成させる。そしてこの複合体の酵素活性を測定することにより, 間接的にインスリン量を測定する。

(2) 試薬

①抗インスリン抗体液: 抗インスリンモルモット抗体 (Miles Laboratories Ltd.) 力価 0.85 mU/ μ l を精製

水で 2000 倍に希釈したもの。

②標準インスリン溶液: プタインスリン (0, 10, 20, 40, 80, 160, 320 μ U/ml)。

③緩衝液: リン酸二水素ナトリウム 144 mg, リン酸水素ナトリウム 1,100 mg, 塩化ナトリウム 352 mg, ウン血清アルブミン 170 mg を精製水 40 ml に溶解したもの。

④酵素標識抗体液: 抗プタインスリンモルモット抗体に β -D-ガラクトンダーゼを標識したもの (三井製薬・カイノス)。

⑤酵素基質: o-ニトロフェニル- β -D-ガラクトシド 20 mg を精製水 20 ml に溶解したもの。

⑥洗浄液: リン酸二水素ナトリウム 425 mg, リン酸水素ナトリウム 1,530 mg, ウン血清アルブミン 700 mg を精製水 700 ml に溶解したもの。

⑦反応停止液: 炭酸ナトリウム 2.0 g を精製水 200 ml に溶解したもの。

(3) 測定機器・用具

①MICROELISA MINIREADER (DYNATECH)

②冷蔵室 (4°C)

③恒温室 (37°C)

④マイクロプレート DYNATECH IMMULON (DYNATECH)

⑤オートピペット 10~200 μ l (ユッペンドルフ)

(4) 操作法

①抗インスリン抗体のマイクロプレートへの吸着: 抗インスリンモルモット抗体液 200 μ l をマイクロプレ

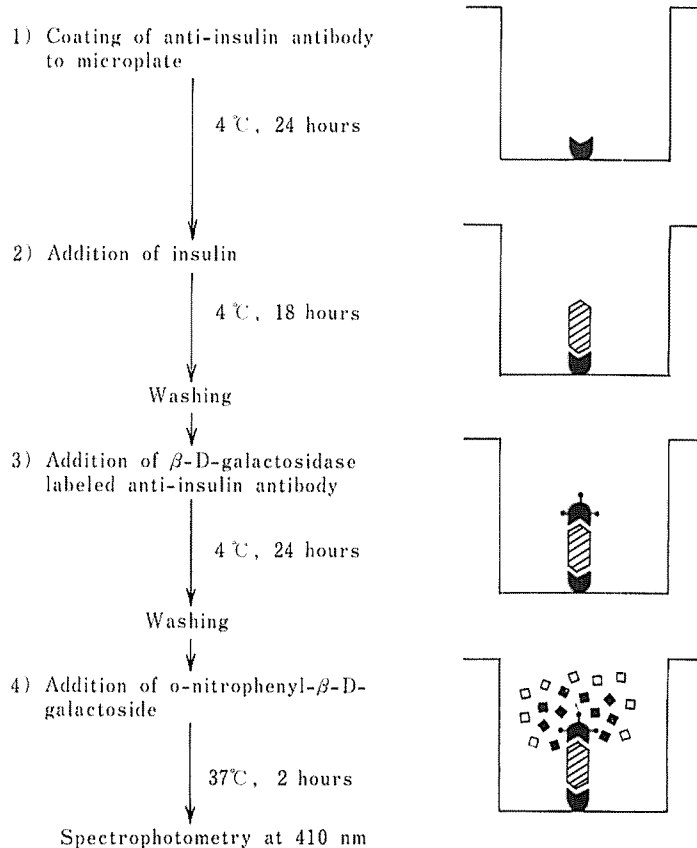


Fig. 1. Principal of insulin enzyme immunoassay (ELISA).

ートの各 well に入れ、4°C、24 時間以上静置して吸着させた後、反応液を吸引除去し、測定に用いた。

②被検液および標準インスリン溶液の添加: 被検液および標準インスリン溶液をオートピペットで 20 μ l 採取し、抗インスリン抗体を吸着させたマイクロプレートの各 well に入れ、これに緩衝液 100 μ l を加えてよく混和し、4°C、18 時間静置した。

③酵素標識抗体の添加: 各 well 内の反応液を吸引除去後、洗浄液 200 μ l を各 well に入れて、約 30 秒間軽く振とうした後、再び吸引除去した。そして、各 well に酵素標識抗体液 30 μ l をオートピペットで入れ、4°C、24 時間静置した。

④酵素基質の添加: 各 well 内の反応液を吸引除去後、③と同様の洗浄操作を 2 度行った。そして、各 well に酵素基質液 50 μ l をオートピペットで入れ、37°C、2 時間静置した。また同時に、抗インスリン抗体未吸着の well に酵素基質液を 50 μ l 入れて試薬ブランク

対照とした。

⑤吸光度の測定: 各 well に、反応停止液を 200 μ l 入れ、酵素反応を停止させた後、1 時間以内に試薬ブランクを対照として MICROELISA MINIREADER により、410 nm で吸光度を測定した。

2. ハタネズミおよびマウスの血漿インスリン値の測定

①動物: 研究室内で飼育している草食性ハタネズミ (*Microtus arvalis* Pallas) と C57BL/6J 系マウスをそれぞれ 8 頭ずつ用いた。

②血漿インスリン値の測定: 飽食時頸部切断法によって採取した血液を、3500 r.p.m.、10 分間遠心分離した血漿中のインスリン値を上述の ELISA 法により測定した。

実験結果

1. ELISA によるインスリン標準曲線の検討

上述の ELISA 法により、5 枚 (No. 1~No. 5) のマイ

Table 1. Values of optical density of standard insulin solution by ELISA in different microplates coated with anti-insulin antibody.

Plate no.	1	2	3	4	5	Mean \pm S. D.
Standard insulin	Optical density					
0 μ U/ml	0.09	0.08	0.08	0.08	0.08	0.082 \pm 0.004
10	0.10	0.09	0.10	0.09	0.10	0.096 \pm 0.005
20	0.11	0.12	0.14	0.12	0.22	0.122 \pm 0.011
40	0.14	0.14	0.18	0.15	0.16	0.154 \pm 0.017
80	0.23	0.20	0.24	0.19	0.22	0.216 \pm 0.021
160	0.34	0.29	0.32	0.32	0.34	0.322 \pm 0.020
320	0.45	0.46	0.46	0.49	0.53	0.478 \pm 0.033

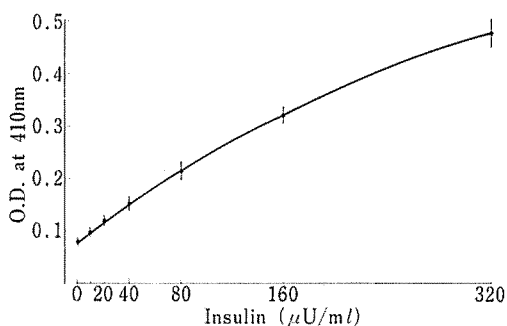


Fig. 2. Insulin standard curve by ELISA in different microplates coated with anti-insulin antibody.

クロプレートを用い、それぞれのプレートごとに各種濃度の標準インスリン溶液の吸光度を測定した (Table 1)。これらの平均値から作製した標準曲線は Fig. 2 に示したとおりである。それぞれのプレート間におけるインスリン溶液の吸光度のバラツキは、濃度が高くなるにつれて少しずつ大きくなる傾向がみられたが、そのバラツキは 10% 以下であり、かなり均一な値が得られた。

2. ハタネズミおよびマウスにおける血漿インスリン値の測定

草食性ハタネズミ (*Microtus arvalis Pallas*) と C57

Table 2. Plasma insulin levels in *Microtus arvalis Pallas* and C57BL/6J mice by micro ELISA.

Animal	No. of animals	Plasma insulin (μ U/ml)
Microtus	8	21.5 \pm 6.7
C57BL	8	19.9 \pm 7.0

BL/6J 系マウス (各 8 頭) の血漿インスリン値を上述の ELISA 法により測定した結果、ハタネズミの血漿インスリン値は平均 21.5 \pm 6.7 μ U/ml で、マウスのそれは平均 19.9 \pm 7.0 μ U/ml であった。

考 察

抗インスリン抗体の担体として、マイクロプレートを用いた本 ELISA 法においては、インスリン定量のための被検血漿量はわずか 20 μ l で十分であり、また試薬量も他の EIA 法に較べて極めて微量で、測定が可能であることが明らかになった。そして感度および再現性も十分に高かった。また、本法は操作が簡便であり、一枚のプレートで 90 検体以上の測定が同時に可能であるという利点がある。反面、検体量が 20 μ l と極めて微量であるため、反応を十分に行わせるためには、低温でかつ長時間の静置が望ましく、迅速性にやや欠けることが難点であった。この点については今後、反応温度条件ならびに時間など改良を加える必要があると思われる。

本 ELISA 法により、ハタネズミの血漿インスリン値が初めて明らかとなったが、比較のためにマウスの血漿インスリン値を測定したところ、RIA 法や他の EIA 法によって従来測定された値とほぼ同じ値が得られた^{1,6)}。そして検体量は、血漿が 20 μ l という微量で十分であることから、ハタネズミやマウスのような小動物において、同一個体から数度にわたってサンプリングが可能であると思われる。それ故、グルコースや低級脂肪酸投与などに対するインスリン分泌の反応性についても、本 ELISA 法を応用して、小動物における測定解析が可能であることが示唆された。

要 約

抗インスリン抗体を吸着させたマイクロプレートと、

β -D-ガラクトンダーゼ標識抗インスリン抗体を用いた ELISA 二抗体サンドイッチ法を応用して、標準ならびに血漿インスリン値を測定した。その結果、本法では、検体量が $20 \mu\text{l}$ という微量で測定が可能であり、感度、再現性も十分に高いということが明らかになった。さらに、本法では操作が簡便であり、一度に多数の検体の測定が可能であった。

本法を用いて、ハタネズミと C 57 BL/6 J 系マウスの血漿インスリン値を測定したところ、それぞれ $21.5 \pm 6.7 \mu\text{U/ml}$ ($n=8$) および $19.9 \pm 7.0 \mu\text{U/ml}$ ($n=8$) であった。

文 献

- 1) 新井敏郎・大木与志雄 (1983) 草食性ハタネズミにおける食餌性糖尿病の誘発とその発生機序。栄養生理研究会報, **27**, 13-26.
- 2) ISHIKAWA, E. (1973) Enzyme immunoassay of insulin by fluorimetry of the insulin-glucoamylase complex. *J. Biochem.*, **73**, 1319-1321.
- 3) KATO, K., HAMAGUCHI, Y., FUKUI, H., and ISHIKAWA, E. (1975) Enzyme-linked immunoassay I. Novel method for synthesis of the insulin- β -D-galactosidase conjugate and its applicability for insulin assay. *J. Biochem.*, **78**, 235-237.
- 4) KITAGAWA, T. and AIKAWA, T. (1976) Enzyme coupled immunoassay of insulin using a novel coupling reagent. *J. Biochem.*, **79**, 233-236.
- 5) MIEDAMA, K., BOELHOUWER, J. and OTTEN, J. W. (1972) Determinations of proteins and hormo-

nes in serum by immunoassay using antigen-enzyme conjugates. *Clin. Chim. Acta.*, **40**, 187-192.

- 6) STANFFACHER, W., LAMBERT, A. E., VECCHIO, D. and RENOLD, A. E. (1967) Measurements of insulin activities in pancreas and serum of mice with spontaneous ("obese" and "New Zealand obese") and induced (gold thioglucose) obesity and hyperglycemia, with considerations on the pathogenesis of the spontaneous syndrome. *Diabetologia*, **3**, 230-237.
- 7) YOSHIDA, M., TANIGUCHI, H., KAWAGUCHI, A., KOBAYASHI, T., MURAKAMI, K., SEKI, M., TSUTOU, A., TAMAGAWA, M., MINODA, H. and BABA, S. (1979) Evaluation of a commercial enzyme immunoassay for insulin in human serum, and its clinical application. *Clin. Chem.*, **25**, 35-38.

SUMMARY

We applied an ELISA sandwich method, using the microplate coated with anti-insulin antibody and β -D-galactosidase labeled anti-insulin antibody, to determine the insulin levels. In this method, we were able to measure plasma insulin with a very small amount of sample ($20 \mu\text{l}$), and the sensitivity and reproducibility were comparably excellent. The operation of this method was very easy and we could measure over 90 samples at the same time.

In the measurements of the plasma insulin levels of *Microtus arvalis Pallas* and C 57 BL/6 J mice with this method, the former was $21.5 \pm 6.7 \mu\text{U/ml}$ ($n=8$), and the latter was $19.9 \pm 7.0 \mu\text{U/ml}$ ($n=8$).