

# 牛の血中インスリン測定のための臨床検査用ラジオイムノアッセイ測定キットの利用とその問題点について

誌名	畜産試験場研究報告 = Bulletin of the National Institute of Animal Industry
ISSN	0077488X
著者	小林, 剛 大森, 昭一郎
巻/号	39号
掲載ページ	p. 7-12
発行年月	1982年10月

## 牛の血中インスリン測定のための臨床検査用ラジオイムノアッセイ測定キットの利用とその問題点について

小林 剛・大森昭一朗\*

### 要 約

3種類の臨床検査用ラジオイムノアッセイキット(RIAキット)を用いて、牛の血漿インスリン濃度を測定する際に生じてくる問題について検討した。

1) 使用したRIAキットでは、二抗体法<逆二抗体法<セファデックス固相法の順に、牛の血漿インスリン濃度の測定値が高くなる傾向がみられた。しかし、各RIAキットによる牛の血漿インスリン濃度の測定値の再現性、測定誤差はほぼ同一であった。

2) 牛標準インスリン濃度の測定値を、RIAキットに付属標準品としてついている豚標準インスリン濃度の測定値と比較すると、約12%高い値を示したが、統計的な有意差は認められなかった。

3) 24時間放置により調製した血清のインスリン値は、ヘパリン添加により直ちに調製した血漿での値に比べ明らかに低かった。

4) インスリン濃度は、採血時に添加するヘパリンの量の相違によっては影響されなかった。

5) 子牛の血漿インスリン濃度の測定値は、牛乳給与後ならびに個体によって、変動が観察されたが、それらの差は統計的に有意ではなかった。

### 緒 言

ペプチドホルモンであるインスリンの測定には、アイソトープ標識ホルモンと抗原抗体反応を組み合わせたラジオイムノアッセイ法が、広く使われている。人のインスリン濃度を測定する場合には、臨床面からの必要性が大きいので、数種類の臨床検査用ラジオイムノアッセイキット(以下、RIAキット)が市販されており、それを利用する手技や変法も多数報告されている<sup>1-3)</sup>。しかし、牛などのインスリン測定の場合には、そのようなキットも開発されていないので、測定試薬を自作するか、あるいは、臨床検査用RIAキットを利用して測定するしか方

法がない現状である。

反芻動物では、低級脂肪酸を多く利用するなどの代謝上の特性があるので、その調節に關与するインスリンの動態について多くの研究が報告されている<sup>4,5)</sup>。牛の血中インスリン濃度の測定に臨床検査用RIAキットを使用することができれば、この方面の研究の発展に役立つと考えられる。しかし、その適用については、十分な検討がなされていない。また、牛の血漿インスリン測定に際しては、ヘパリン添加によって影響を受けることが報告されているので<sup>6)</sup>、この点についても検討が必要である。

本報告では、牛の血漿インスリンの測定に、臨床検査用RIAキットを使用し、キットに付属している豚、人標準インスリンを基準として用いた場合の測定値と、同じキットを用いて牛標準インスリンの測定値を求めて比較検討し、これらの市販キットを用いて牛のインスリンを測定する際の問題点について考察した。さらに、インスリン測定値に及ぼす血液の前処理の影響などについても検討したので報告する。

### 実験材料および方法

#### 1. 使用した臨床検査用 RIA キットの種類

牛血漿インスリン濃度測定のために二抗体法<sup>7)</sup>、逆二抗体法<sup>8)</sup>、セファデックス固相法<sup>9-11)</sup>の3種類の臨床検査用RIAキットを使用した。二抗体法(ダイナポット社製)は、反応系に抗インスリン血清に対する抗体(第二抗体)を加えて、インスリン-抗体結合物を不溶性の沈殿とし、遠心分離することによって、抗原抗体結合物と遊離のインスリンとを分離する方法である。逆二抗体法(ラジオケミカルセンター製)は第一抗体と第二抗体を先に結合させておき、この結合物とインスリンを反応させたのち、抗体結合インスリンと遊離インスリンをマイクロフィルターで濾過分離する方法である。セファデックス固相法(ファルマシア社製)は、基本的に二抗体法に準ずるものであるが、第二抗体の代りにセファデック

昭和57年1月6日受付

\*現 草地試験場家畜部

スを用いる方法である。

## 2. 牛標準インスリンの調製

標準曲線を求めるために、次のような牛標準インスリン液を調製し、測定値の校正に使用した。牛の結晶インスリン 25.0IU/mg (清水製薬製) を正確に秤量し、0.5%牛アルブミン加0.1M磷酸緩衝液 (pH7.4) で10mlに希釈し、凍結保存しておき、使用時に融解後充分混和してマイクロビペットで0~400 $\mu$ U/mlの倍数希釈液を調製した。

## 3. 総放射能ならびに沈渣の放射能計測

分析方法は、それぞれのRIAキットに指定されている操作手順に従った。総放射能および沈渣の放射能は、ニュークリア・シカゴ社製 (4218型) ウェルタイプシンチレーションカウンターで計測し、各キットの算出方法にもとずきB/B<sub>0</sub>% (抗体結合<sup>125</sup>I-インスリン) を求めた。

## 4. 測定の反覆誤差

測定の反覆誤差を調べるために、各キットごとに、血清および血液にヘパリンナトリウムを加えた場合について、検体の同一測定系でのバラツキを調べた。

## 5. 被検血液とその処理方法

被検血液は、ホルスタイン種成雌 (乾乳牛) からは飼料給与後に採取し、また生後3カ月まで、牛乳、市販人工乳および乾草で飼育したホルスタイン種雄子牛からは、飼料給与前、および牛乳給与後に随時、頸静脈から採取し、それぞれ、血清、ヘパリン添加血漿として処理した。

血清分離は次の2つの方法によった。短時間処理では、成雌牛および子牛から採取した血液を31°Cの恒温器内に30分間放置し、血清を分離した。また、長時間処理では、子牛から採取した血液を31°Cの恒温器内に一昼夜放置することにより血清を分離した。分離した血清は測定するまで-20°Cに凍結保存した。

血漿分離、および処理方法は次のように行なった。使用したヘパリンナトリウムは、一万単位 (Lot. No. TMC 2859) あるいは10万単位 (Lot. No. DWG 2138, ともに和光純薬製) のものである。採血する試験管に、ヘパリンナトリウム濃度が血液1mlあたり0.05, 0.5, 1.0および3.0mgになるようにヘパリン溶液を採り、60°Cの定温乾燥器内で乾固した。各試験管に約6mlの血液をとり、アイスボックス内に保存しておき、可及的速やかに、3,000 rpmにて20分間遠沈処理により血漿を分離し、測定まで-20°Cで凍結保存した。また、市販の真空採血管 (ヘパリンナトリウム添加採血管, サイズ10ml, テルモジャパン社製) も使用した。

## 実験結果ならびに考察

1. 牛標準インスリンを用いた場合の測定値について  
豚、牛あるいは人などのほ乳動物のインスリンの一次構造は、21個のアミノ酸残基から成るA鎖と、30個のアミノ酸残基から成るB鎖と呼ばれる2本のポリペプチド鎖から成り、それらは互いに2個の分子間ジスルフィド (-S-S-) 結合によって結合されている。一般に、ほ乳動物および鳥類のインスリンのアミノ酸配列は互いに類似してはいるが、A鎖の8, 9および10位とB鎖の30位においては、アミノ酸残基の置換が見られる。豚インスリンにおいて、人のそれと異なるアミノ酸残基はB<sub>30</sub>のみであり、豚ではAla残基で、人ではThr残基である。牛インスリンではB<sub>30</sub>はAlaであり、さらにA<sub>8</sub>とA<sub>10</sub>はそれぞれ、AlaとValであるのに対し、人では、それぞれThr, Ileであり3個のアミノ酸残基に相違がみられる。生物活性の発現に関与するアミノ酸残基は置換されず保持されていると考えられているが、一部の置換でも免疫

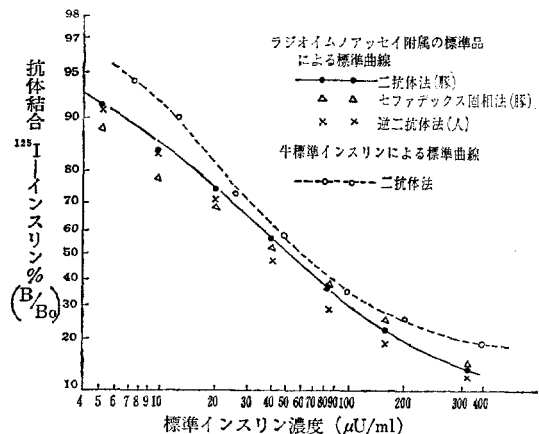


図1. 牛標準インスリンおよびラジオイムノアッセイ (RIA) キット付属のインスリン標準品を用いた場合の標準曲線

表1 二抗体法により牛標準インスリンと豚標準インスリンを用いた場合の牛血漿インスリン値 ( $\mu$ U/ml)

試料採取時刻	例数	牛標準インスリン	豚標準インスリン
(成雌牛)			
飼料給与前	16	16.3 $\pm$ 4.6	14.7 $\pm$ 4.1
(子牛)			
牛乳給与前	6	15.4 $\pm$ 1.8	14.0 $\pm$ 1.5
牛乳給与60分後	6	31.3 $\pm$ 15.7	28.1 $\pm$ 15.7
牛乳給与180分後	6	28.2 $\pm$ 11.4	25.9 $\pm$ 11.3

a) 平均値 $\pm$ 標準偏差

活性には大きい影響を与えることもありうる。したがって、インスリンの構造が明らかにされているほ乳動物より得られた抗血清で他の動物の体液中のインスリンを検討するとき、RIAについての抗血清の特異性、感度の検討、標準抗原の純度、あるいは反応条件等により免疫活性が影響されることを考慮しなければならない。このため牛標準インスリンを用いた場合、インスリン測定値にどの程度の差異を生ずるか検討した。

RIAキットに、付属しているインスリン標準品と牛標準インスリンについて、標準インスリン濃度と抗体結合<sup>125</sup>I-インスリン% (B/B<sub>0</sub>) の関係を標準曲線として図1に示した。二抗体法、セファデックス固相法ではキット付属標準インスリンとして豚のインスリンが、逆二抗体法では人のインスリンが使用されている。図1より、これらの場合には、牛標準インスリンを使用した時よりも高い計数比(抗体結合<sup>125</sup>I-インスリン% B/B<sub>0</sub>)となることがわかり、したがって測定値としてはやや低い値を示す結果となった。

牛血漿インスリン濃度を、牛および豚標準インスリンを用い、二抗体法によって測定した結果は表1に示すとおりである。飼料給与前の成雌牛の結果は、豚標準インスリン使用で14.7μU/ml、牛標準インスリン使用で16.3μU/mlとなり、後者は豚標準インスリンを用いた場合に比べて約12%高い値を示した。また、子牛の血漿インスリン値の牛乳給与ともなう変化を、給与前、給与後1hr、3hrについて、豚標準インスリンと牛標準インスリンを用いて測定し比較すると、豚標準インスリン使用の方が、いずれも約10%低い値を示した。しかし、これらの数値間には、統計的な有意差は認められなかった。試薬調製に使用した動物種、標準インスリンの種類は不明なので、これらの現象がインスリンの種差によるものか、あるいは他の原因によるものかは不明である。

牛の血漿インスリン値の測定に市販RIAキットを用いる場合にはすでにのべたようないくつかの要因が関与すると考えられるので牛の標準インスリンを使用する測定値の補正が必要となってくる。一方、補正できない場合

表2 各法における牛血漿インスリン値の測定(三重測定)

試料	採取時刻	牛番号	二抗体法	逆二抗体法	セファデックス固相法
		分	μU/ml		
血清 (31°C, 30分間 放置後分離)	0	(1)	13.4 ± 0.2 <sup>a)</sup> (1.4)	17.5 ± 0.1 (0.6)	31.8 ± 3.0 (9.4)
		(2)	10.2 ± 1.3 (12.7)	17.8 ± 0.4 (2.2) <sup>b)</sup>	23.8 ± 1.6 (6.7)
		(3)	7.1 ± 0.3 (4.2)	14.1 ± 0.5 (3.4)	29.5 ± 1.8 (6.1)
	60	(1)	56.5 ± 2.6 (4.6)	112.3 ± 0.5 (0.4)	90.0 ± 9.0 (10.0)
		(2)	22.8 ± 0.7 (3.0)	34.9 ± 1.6 (4.5)	53.3 ± 1.4 (2.6)
		(3)	14.8 ± 1.2 (8.1)	20.5 ± 1.4 (6.2)	39.3 ± 3.1 (7.8)
	90	(1)	53.3 ± 1.6 (3.0)	94.9 ± 3.2 (3.3)	90.8 ± 6.2 (6.8)
		(2)	39.3 ± 3.0 (7.6)	60.8 ± 4.2 (6.9)	73.5 ± 3.2 (4.3)
		(3)	20.1 ± 0.2 (0.9)	28.7 ± 1.4 (4.8)	51.5 ± 4.5 (8.7)
b)			(5.0 ± 3.7)	(3.5 ± 2.3)	(6.9 ± 2.4)
血漿 (ヘパリン添加量 1.00mg/ml)	0	(1)	11.3 ± 1.0 (8.8)	16.0 ± 0.8 (5.0)	24.6 ± 1.0 (4.0)
		(2)	8.0 ± 0.4 (5.0)	16.8 ± 0.8 (5.9)	22.5 ± 2.6 (11.5)
		(3)	7.5 ± 0.6 (8.0)	13.2 ± 0.4 (3.0)	24.6 ± 2.7 (9.7)
	60	(1)	57.8 ± 5.6 (9.6)	77.6 ± 2.4 (3.0)	101.3 ± 5.3 (5.2)
		(2)	25.1 ± 1.7 (6.7)	34.4 ± 4.4 (12.7)	48.3 ± 3.0 (6.2)
		(3)	14.7 ± 1.3 (8.8)	20.2 ± 0.4 (1.9)	35.5 ± 1.3 (3.6)
	90	(1)	66.7 ± 1.4 (2.7)	67.7 ± 9.2 (13.5)	93.8 ± 7.6 (8.1)
		(2)	32.3 ± 2.4 (7.4)	46.1 ± 1.2 (2.6)	56.0 ± 1.7 (3.0)
		(3)	24.3 ± 0.5 (2.0)	34.4 ± 0.8 (2.3)	45.3 ± 2.5 (5.5)
b)			(6.5 ± 2.7)	(5.5 ± 4.4)	(5.6 ± 2.6)

a) 平均値 ± 標準偏差

b) 変動係数

には、牛標準インスリンで測定した結果と比較して観察値はやや低い値を示す傾向となるのでこの点に留意しなければならないであろう。

2. 測定法の違いによるインスリン値の差とそれらの誤差について

3種類のRIAキットを使用し、各キットごとに、同一試料を三重測定した結果を表2に示した。測定法の違いによってインスリン値に大きな相違が観察された。血清試料に関する三重測定時の変動係数は、二抗体法で平均5.0%、逆二抗体法で3.5%、セファデックス固相法で6.9%となり、いずれの場合にも、同一試料を2~3回測定することによって比較的良好な測定精度が得られることがわかった。血漿についても、血清とほぼ同様の結果がえられた。

3. 血液の処理方法の影響

インスリン濃度の測定にあたり、血液の処理方法が測

表3 牛血漿インスリン値に及ぼすヘパリン添加の影響

ヘパリン 添加量	二抗体法	逆二抗体法
mg/ml	$\mu\text{U/ml}$	$\mu\text{U/ml}$
0	21.0 $\pm$ 3.9 <sup>a)</sup>	29.0 $\pm$ 8.2 <sup>*b)</sup>
0.05	22.4 $\pm$ 4.1	26.6 $\pm$ 6.4
0.10	21.7 $\pm$ 4.1	28.0 $\pm$ 7.1 <sup>*</sup>
0.50	20.3 $\pm$ 3.8	28.0 $\pm$ 6.2 <sup>*</sup>
1.00	21.7 $\pm$ 3.6	29.3 $\pm$ 6.7 <sup>*</sup>
3.00	23.4 $\pm$ 5.0	29.3 $\pm$ 6.8 <sup>*</sup>

注) 試料は、乾乳牛3頭から飼料給与3時間後に採血

a) 平均値±標準偏差

b) 測定法による差 \*  $P < 0.05$

定値にどの程度の影響を及ぼすものであるかを検討した。血漿調製時に添加したヘパリンナトリウムの濃度が、血中インスリン値に及ぼす影響は、二抗体法、および逆二抗体法を用いて測定し、その結果を表3に示した。表3より、血漿調製時のヘパリンナトリウムの添加量は、同一測定内では、インスリン値にほとんど影響しないことが明らかである。次に血清の処理方法を変えてヘパリン添加血漿のインスリン濃度と対比し検討した。その結果を表2および表4に示した。表2に示した実験では、血清は31℃に30分間放置後分離したが、血清と血漿の測定値の間には統計的な有意差は認められなかった。表4に示した実験では、血液を31℃に、24時間放置後分離して血清としたが、この血清はヘパリンナトリウム添加血漿に比べて明らかに低い値を示しており、測定法および処理条件による差異が認められた。このような長時間処理を行なうと血中のインスリンが分解、あるいは変性して低下するものと推察される。したがって、血清の分離は採血後できるだけ速やかに実施し、しかも温和な条件で行なう必要がある。また、市販の真空採血管を使用した場合には、インスリン値はヘパリンナトリウム添加血漿 (1.0mg/ml) と同様な傾向を示していた。

血中のインスリン値は、試料を採取した個体による変動が大きく、さらに子牛では哺乳後の変動が大きいことが本研究を通して明らかであった (表2, 表4)。これは、概して反芻動物の血中インスリン値の変動は大きいという従来の知見<sup>1)</sup>と一致している。今後、これらの傾向を明確にするためには、十分な例数を集めて比較検討する必要があると考えられる。

表4 長時間放置後分離の血清とヘパリン添加血漿が牛血中インスリン値に及ぼす影響

試料	測定法	測定法		
		(I) 二抗体法	(II) 逆二抗体法	(III) セファデックス固相法
血清	分	$\mu\text{U/ml}$		
	0	12.6 $\pm$ 2.5 <sup>a)</sup>	10.8 $\pm$ 1.4 <sup>e)</sup>	10.9 $\pm$ 1.4 <sup>e)</sup>
	60	14.3 $\pm$ 3.7	18.0 $\pm$ 6.8 <sup>b),e)</sup>	9.2 $\pm$ 1.2 <sup>d),e)</sup>
	90	13.3 $\pm$ 2.1 <sup>e)</sup>	9.6 $\pm$ 2.6 <sup>b),e)</sup>	8.5 $\pm$ 1.8 <sup>d),e)</sup>
血漿	0	15.6 $\pm$ 5.2	26.8 $\pm$ 8.2 <sup>b)</sup>	36.8 $\pm$ 12.0 <sup>d)</sup>
ヘパリン添加量 (1.00mg/ml)	60	40.8 $\pm$ 21.7	68.4 $\pm$ 30.6	27.2 $\pm$ 9.9 <sup>c),e)</sup>
	90	39.3 $\pm$ 17.3	63.2 $\pm$ 31.2	28.1 $\pm$ 10.2

注) 血液は、供試子牛4頭の牛乳給与前、牛乳給与60, 90分後に採血

a) 平均値±標準偏差

b) 測定法による差  $P < 0.05$  (I) < (II)<sup>b)</sup> (II) < (III)<sup>e)</sup> (I) < (III)<sup>d)</sup>

c) 処理条件による差  $P < 0.05$ <sup>e)</sup>

3つの方法による牛血漿インスリンの測定値を比較すると、二抗体法の場合は測定値が低く、逆二抗体法、セファデックス固相法では高く出る傾向が観察され、とくに子牛では牛乳給与後の血漿インスリン濃度の高くなる時期にその差が大きくなる傾向が認められた。この相違がどのような機構によるものかは不明であるが、RIAキットのロット番号の違いも関係しているのかも知れない。

しかし、使用した3種類のRIAキットで、ほ乳などによるインスリンの増加の傾向が共通して観察されているので、これらの変動を追跡するためには臨床検査用キットを十分利用しうるものと考えられる。

終りに、本稿の作製に御尽力をいただいた板橋久雄生理第4研究室長、および牛の結晶インスリンを恵みいただいた清水製薬株式会社に厚く感謝の意を表する。

## 引用文献

- 1) YALOW, R. S. and S. A. BERSON.: Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J. Clin. Invest.*, **39**, 1157~1175, 1960
- 2) 中川昌一：インシュリン—その数値をどう読むか—, 日本臨牀, **31**, 増刊号, 415—426, 1973
- 3) 熊原雄一・垂井清一郎編：血中ホルモン—測定法, 意義, 臨床, 第2版, 358—377, 医学書院, 1977
- 4) MANNS, J. G. and J. M. BODA.: Insulin release by acetate, propionate, butyrate and glucose in lambs and adult sheep. *Amer. J. Physiol.*, **212**, 747~755, 1967
- 5) TRENKLE, A.: Radioimmunoassay of plasma hormones; Review of plasma insulin in ruminants. *J. Dairy Sci.*, **55**, 1200~1211, 1972
- 6) Von, K. SCHALLER, J. HARMMEYER und V. PARTALE: Einfluß von Heparin auf den radioimmunologischen Insulinnachweis, *Dtsch. Tierärztl. Wschr.*, **83**, 436~438, 1976
- 7) MORGAN, C. R. and A. LAZALOW.: Immunoassay of insulin with two antibody system. Plasma insulin levels of normal, subdiabetic and diabetic rat. *Diabetes*, **12**: 115—126, 1963
- 8) HALES, C. N. and P. J. RANDLE: Immunoassay of insulin with insulin—antibody precipitate. *Biochem. J.*, **88**, 137—146, 1963
- 9) ミドリ十字 (CEA-IRE-SORIN): Insulin radioimmunoassay kit. The kit based on the double antibody method, 1972
- 10) WIDE, L. and J. PROATH.: Immunoassay of proteins with the use of Sephadex-coupled antibodies, *Biochem. Biophys. Acta.*, **130**, 257, 1966
- 11) 中川昌一・佐々木嵩・堀内淑彦：Sephadex 結合抗体による insulin radioimmunoassay 法の検討, *RADIOISOTOPES*, **21**, 72, 1972

## Use of Commercial Human Insulin Radioimmunoassay Kits for the Estimation of Bovine Blood Insulin Levels

Takeru KOBAYASHI and Shoichiro OMORI

### Summary

In the case of bovine insulin estimation by three kinds of commercial human insulin radioimmunoassay kits, variations and repeatabilities of methods were examined.

1. Higher values of bovine plasma insulin were obtained by contra-double antibody and sephadex-bound antibody methods than by double antibody method, though there was no difference in variation of values among three methods.

2. Application of bovine crystalline insulin for standard of calibration showed 12% higher values than those obtained by the commercial kits.

3. Bovine serum insulin values fluctuated by conditions of blood samples treatment. The insulin values dropped clearly by over night incubation of blood sample.

4. Bovine plasma insulin values were not affected by the amounts of heparin added to blood in the range of 0.05 mg to 3 mg per ml.