

化学発光法によるインシュリンの酵素免疫測定法

青柳重夫[®], 久住美代子, 松行 昭*, 前田昌子, 辻 章夫**

(1986 年 11 月 17 日受理)

ルミノール-フェリシアン化カリウム化学発光系による過酸化水素の定量を、化学・生物発光測定用に開発された“Luminometer UPD-8000”を使って検討し、従来の吸光光度法との比較を行った結果、検出感度は 1 pmol/tube (吸光光度法: 1 nmol/tube), 測定範囲は $1 \times 10^{-8} \sim 1 \times 10^{-3}$ M (吸光光度法: $1 \times 10^{-5} \sim 1 \times 10^{-3}$ M) であった。又、サンドイッチ法の感度を左右する酵素標識抗体の固相への非特異的吸着の低減化を検討し、モルモット血清の添加が有効であることを見いだした。これらの結果を基に、インシュリン酵素免疫測定法を実施したところ、測定範囲 5~320 μ U/ml, 日内再現性及び日差再現性はそれぞれ 8.8~9.0, 6.7~10.8%, RIA 相関は $Y=1.21X-3.60$, $r=0.95$ ($n=50$) であった。

1 緒 言

1959 年, Yalow らにより開発されたラジオイムノアッセイ (RIA) は、現在、多数のホルモンなどの微量分析法として、種々の内分泌疾患の診断に応用されている。しかし、RIA は放射性物質を標識物とするため、使用、貯蔵、廃棄の面で大きな問題を有している。このような欠点を持たない酵素を標識として用いる酵素免疫測定法 (EIA) が、Engvall ら²⁾により初めて報告されたのは RIA の出現からほぼ 10 年後の 1971 年であるが、以後多くの研究が続けられ現在では臨床検査の現場にも徐々に普及しつつある。この酵素活性の最終検出には、主に吸光光度法、蛍光法が適用されているが、最近、感度、定量範囲、分析時間などの点でこれらの方法より優れている化学・生物発光を用いた分析法が盛んになってきた³⁾⁴⁾。

著者らは先に化学・生物発光の高感度測定装置 (Luminometer UPD-8000) を開発し、化学・生物発光の有用性を明確にすべく検討を行ってきているが、本報では種々の臨床化学分析の最終段階で用いられている過酸化水素測定、及びモルモット血清添加による酵素標識抗体の非特異的吸着低減の知見を基礎とした、化学発光法によるインシュリンの EIA について報告する。

2 実 験

2.1 装 置

化学発光の測定は、明電舎製 Luminometer UPD-8000, 吸光光度測定は、島津製ダブルビーム分光光度計 UV-200 を使用した。

2.2 試 薬

モルモット抗ウシインシュリン血清は Miles 製, β -D-グルコースオキシダーゼ (GOD) 104 U/mg (grade II) は東洋紡製, 二官能性の架橋剤である *N*-サクシニミジル 4-(*N*-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレートはジーベンケミカル製を使用した。ルミノール及びチオール基導入試薬である *s*-アセチルメルカプト無水コハク酸は Sigma 製, 過酸化水素は三菱瓦斯化学製, 標準ブタインシュリンは栄研化学製, その他の試薬はすべて市販特級品を使用した。

セファデックス G-25, セファクリル S-300 は, Pharmacia Fine Chemicals 製, ポリスチレンボール (ϕ 6.5 mm) はイチコ製, タンパク質濃縮装置のコロジオンバッグは Sartorius 製を使用した。

2.3 酵素標識抗体の調製

GOD へのマレイミド基導入は, GOD: *N*-サクシニミジル 4-(*N*-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート=1:50 のモル比で反応させセファデックス G-25 カラム (1 $\times$ 30 cm) で脱塩し, 素通り画分をコロジオンバッグで氷冷濃縮した。導入されたマレイミド基の定量は, 4,4'-ジチオジピリジンを用いた逆滴定法

* (株)明電舎開発本部: 141 東京都品川区大崎 2-1-17

** 昭和大学薬学部: 142 東京都品川区旗の台 1-5-8

によった⁵⁾。一方, 抗インシュリン IgG へのチオール基導入は, IgG:s-アセチルメルカプト 無水コハク酸=1:200 のモル比で反応させ, 脱塩後, 濃縮した⁵⁾。チオール基の定量は, 4,4'-ジチオジピリジンを用いた。GOD と抗インシュリン IgG は 1:1 のモル比で, 30°C で 1 時間反応し, 引き続き 4°C で一晩反応することにより酵素標識抗体を調製した。酵素標識抗体の精製はセファクリル S-300 カラム (1×85 cm) により行った⁵⁾。

2.4 抗体吸着固相の調製

0.1~0.3 mg/ml の抗ウシインシュリン IgG を含む 0.1 M ホウ酸塩緩衝液 (pH 8.5) 中に, ポリスチレンボールを浸し, 4°C で一晩静置した。次いで, A 液 {0.1% ウシ血清アルブミン, 0.1% アジ化ナトリウム, 10 mM EDTA を含む 0.1 M ホウ酸塩緩衝液 (pH 8.5)} で洗浄後, 同液中で冷蔵保存した。

2.5 過酸化水素測定

過酸化水素は, 化学発光法と吸光光度法で測定した。30% 過酸化水素水をヨウ素滴定法で検定後, 各濃度の過酸化水素を調製した。

(1) 化学発光法: 過酸化水素溶液 0.1 ml, 2×10^{-7} M ルミノール溶液 {0.2 M 炭酸塩緩衝液 (pH 9.8)} 0.5 ml, 6×10^{-3} M フェリシアン化カリウム水溶液 0.5 ml を順次加え, 15 秒後から 30 秒間の発光量を測定した。

(2) 吸光光度法: 3-メチル-2-ベンゾチアゾリノンヒドラゾンとジメチルアニリンの過酸化水素による酸化縮合生成物であるインダミン色素を 590 nm で測定した。

2.6 インシュリン EIA

抗インシュリン IgG 吸着固相を 1 個試験管に入れ, インシュリン標準液, 又は被検血清 0.1 ml と, A 液 0.2 ml を加え, 室温で 6 時間静置した。反応した固相は再蒸留水で 3 回洗浄後, B 液 (C 液 [0.1% ウシ血清アルブミン, 0.1 M 塩化ナトリウム, 0.1% アジ化ナトリウムを含む 0.1 M リン酸塩緩衝液 (pH 6.5)]: 正常モット血清=5:1 の体積比の混合液) で 100 倍希釈した GOD 標識抗インシュリン IgG 0.1 ml と B 液 0.2 ml を加え, 室温で一晩静置した。固相を再蒸留水で 3 回洗浄後, 別の試験管に移し, この試験管に 0.5 M グルコース溶液 {0.01 M 酢酸塩緩衝液 (pH 5.1)} を 0.3 ml 加え, 37°C で 2 時間反応後, 氷冷して反応を停止させ, 生成した過酸化水素を化学発光法によって測

定した⁶⁾。

3 結果と考察

3.1 過酸化水素測定

種々の臨床化学分析の最終段階を過酸化水素とする系は非常に多く見られ, 主として吸光光度法が検出法として用いられてきた。化学発光法は吸光光度法より感度的に優れていることが知られており, ビス (2,4,6-トリクロロフェニル) オキサレート-8-アニリノナフタレン-1-スルホン酸系, イソルミノール-マイクロペルオキシダーゼ系などを用いた測定法が報告されている³⁾。著者らは水系でかつ触媒も安価な, ルミノール-フェリシアン化カリウム系について検討した。

Fig. 1 に化学発光法と吸光光度法の過酸化水素測定結果を示した。感度は各々 1 pmol/tube, 1 nmol/tube, 測定範囲は $1 \times 10^{-8} \sim 1 \times 10^{-3}$ M, $1 \times 10^{-5} \sim 1 \times 10^{-3}$ M と, 化学発光法が吸光光度法より感度, 測定範囲共数段優れていることを示している。4 水準の相対標準偏差は 1×10^{-7} M で 6.3%, 1×10^{-6} M で 4.6%, 1×10^{-5} M で 4.2%, 1×10^{-4} M で 3.3% と良好な結果が得られた。

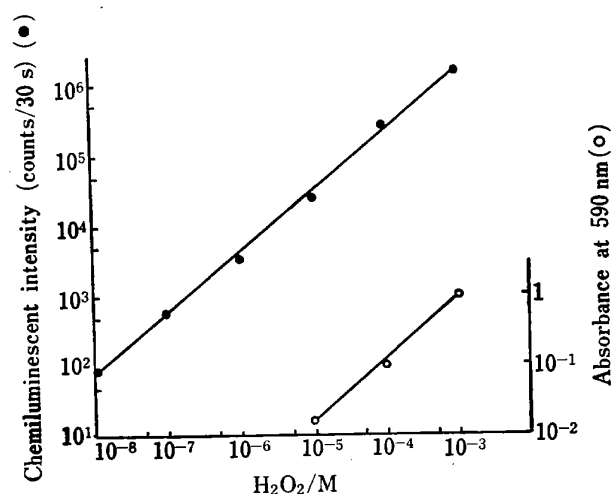


Fig. 1 Calibration curves of hydrogen peroxide by chemiluminescent and colorimetric methods. The chemiluminescent intensity and absorbance were calculated by subtracting the corresponding blank value.

3.2 酵素標識抗体の非特異的吸着低減化の検討

サンドイッチ法の感度を左右する主要因の一つは酵素標識抗体の固相への非特異的吸着である⁷⁾。酵素標識抗体の固相への非特異的吸着の起こる要因としては, 標識に用いた酵素の種類, 抗体の F_c 部位, 酵素標識法及び標識抗体の重合などが考えられている⁷⁾。

著者らは、緩衝液のみでは非特異的吸着が高いため、種々のタンパク質又は各種動物の血清を添加し、非特異的吸着の低減化を検討した。その結果、Table 1 に示すように、モルモット血清が種々のタンパク質又は他の血清と比較して最も有効であることを見いだした。

Table 1 Effects of the addition of various proteins on nonspecific binding

Buffer	Nonspecific binding ^{††} , %
I D buffer alone [†]	0.863
II I+0.1% bovine serum albumin (C buffer)	0.435
III I+0.1% gelatin	0.982
IV I+0.1% egg albumin	0.367
V II+1/5 volume of guinea pig serum (B buffer)	0.022
VI II+1/5 volume of goat serum	0.235
VII II+1/5 volume of rabbit serum	0.071
VIII II+1/5 volume of horse serum	0.112

[†] 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.5) containing 0.1 M NaCl and 0.1% NaN₃; ^{††} Guinea pig IgG coated polystyrene ball (P.B.) was incubated overnight in 0.3 ml of respective buffer solution containing guinea pig IgG-GOD (600-fold dilution) at room temperature. Then the GOD activity remained on the P.B. was measured and the percentage of nonspecific binding was calculated as GOD activity (P.B.)/total GOD activity in buffer solution.

次に Table 2 に C 液とモルモット血清の混合比を検討した結果を示す。この結果より、モルモット血清の比率が大きいと非特異的吸着が著しく小さいことが判明した。今回は、コスト面を考慮して、C 液：モルモット血清=5：1 の体積比の混合液を標識抗体の希釈及び第 2 反応の緩衝液として選択した。モルモット血清のどの成分が非特異的吸着に関与しているか、又、モルモット血清添加が今回の条件（標識酵素 GOD、抗体由来動物モ

ルモット）以外でも有効であるか否かは検討中である。

3.3 インシュリン EIA

酵素標識抗体調製：GOD へのマレイミド基導入と、IgG へのチオール基導入数を検討した結果、マレイミド基が 2~5 個/1 分子、チオール基が 2~4 個/1 分子導入されたとき収率良く GOD 標識 IgG が得られた。今回は、マレイミド基が 5 個、チオール基が 2.7 個の条件で行った。

インシュリン標準曲線：栄研化学製インシュリン標準液を用いた場合と空腹時の低インシュリン血清を添加した場合の標準曲線を Fig. 2 に示す。測定範囲は 5~320 μ U/ml、検出感度は 0.5 μ U/tube であった。両標準曲線の差は、血清中の内因性インシュリン及び何らかの発光増強物質の影響と思われる。又、希釈試験の結果はインシュリン遊離血清、C 液のいずれで希釈しても原点を通る良好な結果を得た。

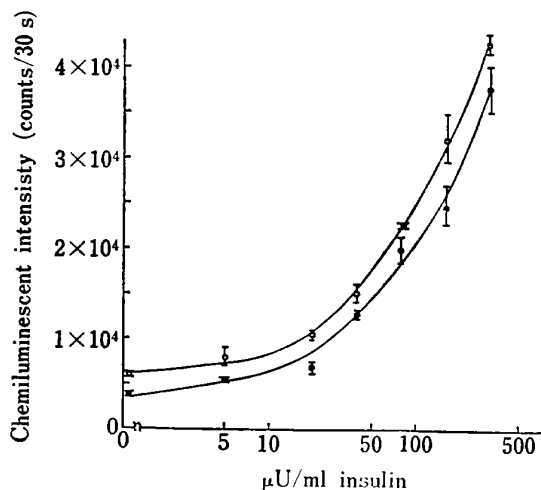


Fig. 2 Calibration curves of insulin by the chemiluminescent enzyme immunoassay (EIA)

○ : addition of serum, ● : buffer

精度：Table 3 に日内再現性、日差再現性を示した。インシュリン濃度の異なる 2 種類の血清についての相対標準偏差は、日内 8.8%, 9.0% ($n=10$), 日差 6.7%。

Table 2 Effects of the concentration of guinea pig serum on nonspecific binding

B buffer : Normal guinea (v/v) pig serum	Nonspecific binding, %
1 : 0	0.367
20 : 1	0.038
15 : 1	0.022
10 : 1	0.023
5 : 1	0.016
3 : 1	0.011
2 : 1	0.006
1 : 1	0.008
0 : 1	0.005

Table 3 Within-day and between-day variations

Assay	Sample	Number of determination	Insulin level μ U/ml	R.S.D., %
Within-day	1	10	50 $\pm$ 4.0	8.8
	2	10	180 $\pm$ 16.0	9.0
Between-day	3	5	45 $\pm$ 3.0	6.7
	4	5	190 $\pm$ 20.5	10.8

10.8% ($n=5$) が得られた。

回収試験: 15, 16.7 $\mu\text{U/ml}$ のインシュリンを含む血清に 40, 160 $\mu\text{U/ml}$ のインシュリンをそれぞれ添加したとき, 102%, 98.4% ($n=7$) と良好な結果が得られた。

RIA 法との相関: Fig. 3 に昭和大学医学部付属病院中央臨床検査部より提供された血清試料 (RIA 測定データは, 塩野義製薬製ファデセフィンシュリンリアによる) について RIA との相関を検討した結果を示した。回帰直線 $Y(\text{EIA}) = 1.21X(\text{RIA}) - 3.60$, 相関係数 $r = 0.95$ ($n=50$) と良好な結果が得られた。

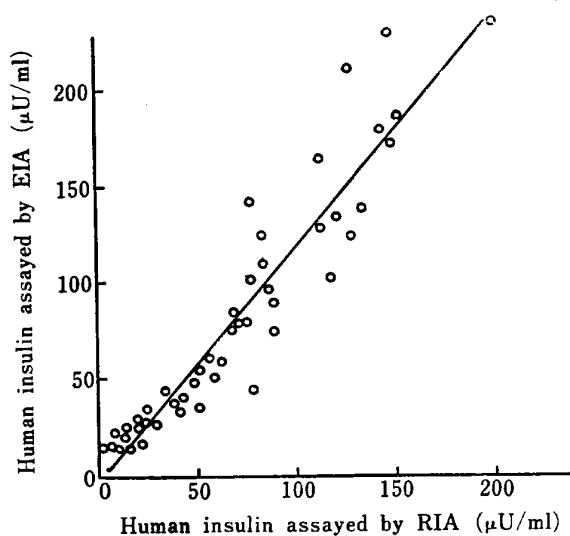


Fig. 3 Correlation between serum insulin levels obtained by the chemiluminescent EIA and radioimmunoassay (RIA)

$$Y = 1.21X - 3.60, r = 0.95, n = 50$$

以上より, ルミノール-フェリシアン化カリウムの化学発光反応による過酸化水素定量は吸光光度法より測定範囲は二けた拡大し, 検出感度は三けた向上させることができた。又, サンドイッチ法の感度を左右する主要因の一つである標識抗体の固相への非特異的吸着がモット血清添加により低減可能であることが分かった。これらの結果に基づき, 高感度インシュリン酵素免疫測定法を開発することができた。

終わりに, 本研究を行うに当たり, 東京大学医学部第3内科大沢伸昭助教授に多大の御指導を頂いたことを記して, 深く感謝の意を表します。

(1985年4月, 日本薬学会
第105年会にて一部発表)

文 献

- 1) R. S. Yalow, S. A. Berson: *Nature*, **184**, 1648 (1959).
- 2) E. Engvall, P. Perlmann: *Immunochemistry*, **6**, 871 (1971).
- 3) K. Van Dyke: "Bioluminescence and Chemiluminescence Applications", (1985), (CRC Press, Boca Raton).
- 4) L. J. Krica, P. E. Stanley, G. H. G. Thrope, T. P. Whitehead: "Analytical Applications of Bioluminescence and Chemiluminescence", (1984), (Academic Press, New York).
- 5) E. Ishikawa, M. Imagawa, S. Hashida, Y. Yoshitake, Y. Hamaguchi, T. Ueno: *J. Immunoassay*, **4**, 209 (1983).
- 6) H. Arakawa, M. Maeda, A. Tsuji: *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 3036 (1982).
- 7) 石川栄治, 河合 忠, 宮井 潔: "酵素免疫測定法 第2版", p. 53 (1982), (医学書院).

☆

Chemiluminescent enzyme immunoassay for insulin. Shigeo AOYAGI, Miyoko KUSUMI, Akira MATSUYUKI*, Masako MAEDA and Akio TSUJI** (*Meidensha Electric Mfg., Co., Ltd., Research and Development Operations, 2-1-17, Osaki, Shinagawa-ku, Tokyo 141; **School of Pharmaceutical Sciences, Showa University, 1-5-8, Hatanodai, Shinagawa-ku, Tokyo 142)

The determination of hydrogen peroxide was performed by chemiluminescent and colorimetric methods. The light emitted from chemiluminescent reaction was measured with a Luminometer UPD-8000 (Meidensha Electric Mfg., Co., Ltd.). The detection limit was 1 pmol/tube in chemiluminescent method and 1 nmol/tube in colorimetric method. The calibration curves were obtained in the range from 1×10^{-8} to 1×10^{-3} M by chemiluminescent method and from 1×10^{-5} to 1×10^{-3} M by colorimetric method. In order to reduce nonspecific binding which reduces the sensitivity of sandwich enzyme immunoassay (EIA), the effect of addition of various proteins was studied. Guinea pig serum was found to be the most effective one. Based on these experimental results, chemiluminescent EIA for insulin using β -D-glucose oxidase (GOD) as label enzyme was established. The anti insulin IgG-GOD was prepared by Ishikawa's method. The detection limit of this chemiluminescent EIA for insulin was 0.5 $\mu\text{U/tube}$ and the regression line was $Y(\text{EIA}) = 1.21X(\text{RIA}) - 3.60$ (the correlation coefficient $r = 0.95$).

(Received November 17, 1986)

Keyword phrases

chemiluminescent enzyme immunoassay for insulin; glucose oxidase; reduction of nonspecific binding; addition of normal guinea pig serum; determination of hydrogen peroxide.