

なるほど!! ELISA

インスリン測定

目次

I. インスリンと関連物質	ページ
1. インスリンってどんなホルモン？	3
2. 各種動物インスリンの力価はどのくらい？	4
3. 関連物質	4-5
II. レビス[®] インスリン測定キットシリーズ及び関連物質測定キットについて	
1. レビス [®] インスリン測定キットはどのように設計されているの？	5-6
2. レビスインスリン及び関連物質測定キットにはどのようなものがあるか？	7-8
※キット選択のポイント	8-9
3. 関連物質：レビス [®] プロインスリン-マウス/ラット	10-11
4. 関連物質：レビス [®] C-ペプチド-マウス/レビス [®] C-ペプチド-ラット	11
III. 測定試料の取り扱いについて	
1. 測定試料の採取について	12-13
2. 抗凝固剤について	13
3. インスリンの安定性と分解酵素阻害剤	13-14
4. 溶血の影響	14
5. 麻酔、ストレスの影響	14-17

なるほど!! ELISA : インスリン測定

I. インスリンと関連物質

1. インスリンってどんなホルモン?

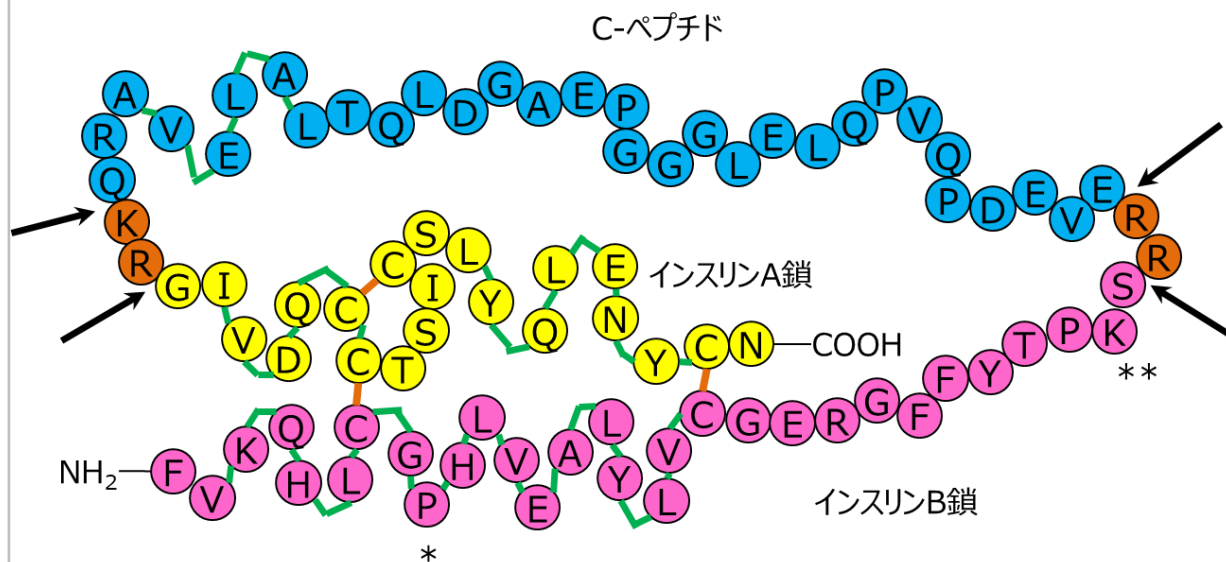
インスリンは膵臓のランゲルハンス島（膵島）の B 細胞から分泌されるホルモンで、分子量は約 5800、等電点 5.4 付近の蛋白質です。

A6-A11、A7-B7、A20-B19 で S-S 結合を形成し、酸性、或いは Zn の存在しない中性水溶液では 2 量体を形成しますが、中性で Zn 存在下では Zn 2 個を含む 6 量体を形成します。

肝、筋肉、脂肪組織が主要な標的組織ですが、それぞれに次のような作用を示します。

肝	グリコーゲン合成促進、蛋白合成促進、脂肪酸合成促進 糖利用の促進、糖新生抑制
筋肉	糖、アミノ酸、K の細胞膜透過性増大、グリコーゲン合成促進 蛋白合成促進、蛋白分解抑制
脂肪組織	グルコースの細胞膜透過性増大、脂肪酸合成促進

ラットプロインスリン I からインスリン I とC-ペプチドの生成



緑色の線をつないだ部分は α -helix構造が推定される部分
 朱色はSS結合，インスリン II では * = S, ** = M
 矢印は活性化における切断部位を示す

インスリンは細胞内で 1 本鎖のプロインスリンの形で合成された後、S-S 結合が形成され、酵素分解による活性化がおこって C-ペプチドとインスリンが分離します。

2. 各種動物インスリンの力価はどのくらい？

インスリンの力価を示す単位(Unit)は元来バイオアッセイで決められたもので、例えば 1 ウサギ単位は体重 2 kg の 24 時間絶食ウサギの血糖値を 5 時間以内に半減する量とされていました。これは大体 3 IU に相当します。ほかにもバイオアッセイ法はいくつもありますが、バイオアッセイで決めるには個体差が大きく精度係数(λ)は 0.15 程度なので正確にはできません。

インスリンはラットとマウスでは同じアミノ酸配列を持つ二つの分子量 (タイプIとタイプII) からなります。しかし、ラットとマウスではタイプ I とタイプ II の構成比が異なっていますので、免疫測定においてはそれぞれの動物由来のインスリン標準品を使うことが望ましいのです。

インスリンはヒトでは治療目的に使用されますので、特に生理作用をはっきりさせておく必要があります。インスリンの精製度が十分でなかった時代は重量で扱うのは危険でした。そこで、国際標準品を作って基準とすることになっていきます。

インスリンの WHO 第 4 次国際標準品(1958)はウシインスリン 52 %とブタインスリン 48 %の混合物で、力価は 24 IU/mg (0.04167 mg/IU) と定められていました。その後、インスリンの精製度が進み、WHO はヒトインスリンの 1st International Standard, 1986 として 26 IU/mg (0.038 mg/IU) の精製品を提供しています。同時にウシインスリンについて 1st International Standard, 1986、25.7 IU/mg、ブタインスリン 1st International Standard, 1986、26 IU/mg を提供するようになりました。これらは 1 アンプルあたり約 50 mg 入っています。それ以前にはヒトインスリンのイムノアッセイ用標準品 1st International Reference Preparation, 1974 があります。これは 1 アンプルあたり 3 IU とされています。前述のようにヒトの場合は、治療用に用いられますので、それに合わせてヒトの臨床検査での測定値も IU で表現する方が便利なのかもしれませんが、動物では重量で扱った方がよいでしょう。

各種動物の分子当りの生物学的活性が等しいかどうかわかりません。確かにブタやウシのインスリンはヒトとほとんど同じ効力を持っているようです。

HOMA-IR を計算するなど、どうしても換算が必要であれば、目安として 1 mg を 26 IU と考えて行えばよいでしょう。

3. 関連物質

プロインスリン	プロインスリンはインスリンの前駆体です。膵島 B 細胞内でアミノ酸 86 個からなる分子量約 9,400 の 1 本鎖の形で合成された後、分泌顆粒に移行する過程で S-S 結合が形成され、さらにゴルジ装置で酵素分解によりインスリンと C-ペプチドになります。分泌顆粒には、分解し残りのプロインスリンも 10 %程度存在し、顆粒が分泌される際に共に血中に放出されます。プロインスリンの生理活性はインスリンの 5-10 %であると言われております。 プロインスリンは II 型糖尿病では空腹時やグルコース負荷時、共に血中プロインスリンレベルは健常者に比べて高く、インスリンに対する割合も増加し、空腹時血糖値が高い場合や肥満の際にはこの傾向は顕著となります。高血糖による持続的なインスリンの分泌が未成熟分泌顆粒まで放出される可能性が考えられます。またインスリノーマでは高プロインスリン血症が歴然と現れます。家族性高プロインスリン血症では遺伝的にプロインスリンからインスリンへの転換酵素の異常やプロインスリン遺伝子の異常により転換酵素の作用を受けないプロインスリンが作られるなどが原因で、分泌顆粒中の IRI の大半をプロインスリンが占めます。甲状腺機能高進の場合も、甲状腺ホルモン過多による糖新生に伴う血糖上昇がインスリン産生放出を促進し分解し残りのプロインスリン放出も多くなります。
C-ペプチド	インスリンは細胞内で 1 本鎖のプロインスリンの形で合成された後、S-S 結合が形成され、酵素

分解による活性化がおこって C-ペプチドとインスリンが分離します。
インスリン部分のアミノ酸配列はマウス、ラット共通ですが、C-ペプチドの部分は多少違います。
マウス C-ペプチド 1 はアミノ酸 29 個、2 は 31 個の単鎖ペプチドです。
C-ペプチドはプロインスリンから分離したあと、インスリンとともに分泌されます。
C-ペプチドは長い間、インスリン合成の過程において A 鎖と B 鎖が正しい形で折りたたまれ、正しい組み合わせの S-S 結合ができるようにする作用のほかには生理作用は特に無いと考えられていましたが、近年の研究の積み重ねにより様々な生理作用のあることが明らかになって来ました。まず C-ペプチドは 10^{-9} M 程度で内皮細胞、腎尿細管細胞や繊維芽細胞の表面の恐らく Gタンパクにカップルした受容体に結合し、カルシウムイオン依存性の細胞内シグナルを活性化すること、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ を活性化し、内皮細胞の NO 合成を促進すること、受容体との結合には立体的特異性があり、インスリン、プロインスリン、IGF-1、-2、NPY との交差性がないことが示されています。また C-ペプチドを欠いている I 型糖尿病患者に C-ペプチドを投与することにより、骨格筋と皮膚の血流が増強され、腎糸球体の hyperfiltration を低下させ、尿中へのアルブミンの排泄を抑制し、神経機能を改善するが健常人には作用が現われないことが示されています。このことから I 型糖尿病患者にはインスリンのみでなく C-ペプチドの同時投与が合併症の阻止に有用であることが示唆されます。
C-ペプチドの C 末端部のペプタペプチド(27-31)が受容体との結合に重要で、この部分の欠如した Des(27-31)C-ペプチドはその作用を失うとされています。このペプタペプチドは C-ペプチドと受容体との結合を完全に replace することができ、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ を活性化します。Des(27-31) C-ペプチドの存在量は新生仔ラットでは C-ペプチドの約 37 %、成熟ラットでは 8.5 %を占めるという報告があります。
C-ペプチドの血中における寿命はインスリンよりも数倍長いという特徴を持ちます。そこで、C-ペプチドの血中レベル測定は臨床的にはインスリン合成、分泌機能を観察するのに用いられます。また尿中に多量に排泄され、血中のレベルとよく相関することから、尿を検体として測定することも出来ます。
また、インビトロで培養されたランゲルハンス島（膵島）からのインスリン分泌の指標として C-ペプチド測定は有用です。なぜなら、培養液にはインスリンが添加されることが多いので、培養後培養液中のインスリンを測定すると、分泌されたインスリンと添加されたインスリンの区別がつかなくなってしまい、培養開始時の量を差し引かなければなりません。その場合、分泌されたインスリン量が少ないと測定誤差の影響が大きくなり正確な判定が出来なくなります。この時、C-ペプチドを測定してやれば、インスリンと等モルで分泌されますから、分泌されたインスリンを正確に判定できるというわけです。
弊社で使用する測定系は C-ペプチド 1,2 の共通部分を認識しますので、トータルの C-ペプチドが測定されます。

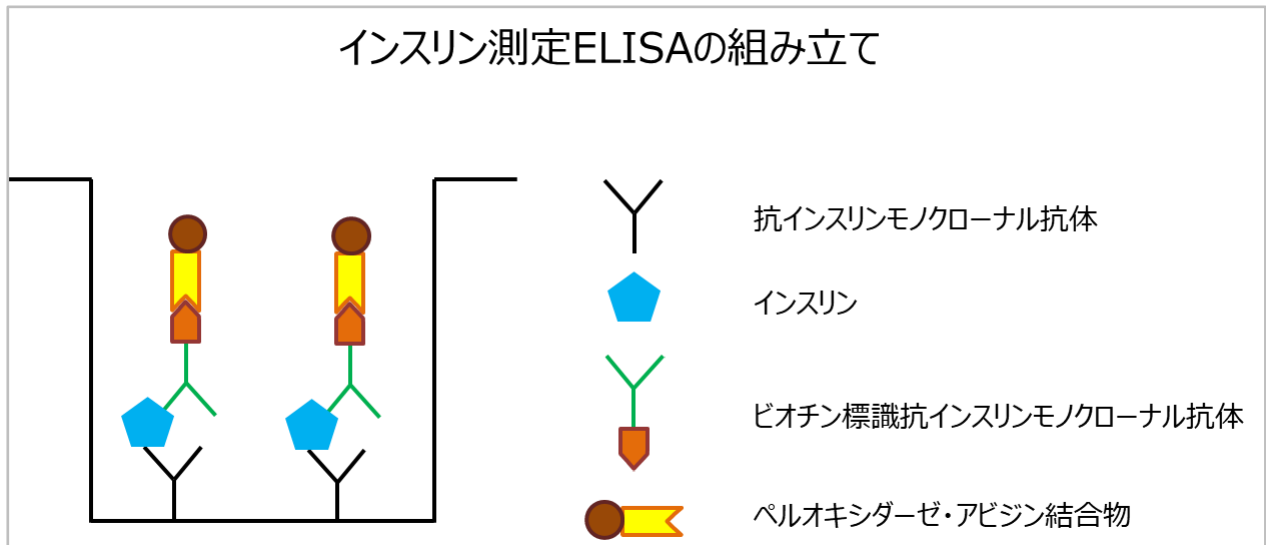
II. レビス[®] インスリン測定キットシリーズ及び関連物質測定キットについて

1. レビス[®] インスリン測定キットはどのように設計されているの？

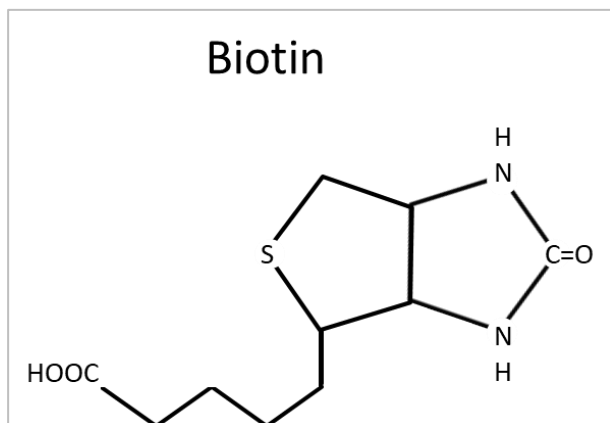
96 ウェルプレートに抗インスリンモノクローナル抗体を固相化しておき、検体中のインスリンをこれに結合させた後、インスリンの別な部位を認識するビオチン標識抗インスリンモノクローナル抗体を反応させます。洗浄後、ペルオキシダーゼ

– アビジン結合物を加えてビオチンにアビジンを結合させます。洗浄後、色原性基質を加えて発色させることによりインスリンを測定します。

実際にはビオチン標識抗インスリン抗体とインスリンの結合、及び固相化抗体との結合反応を同時に行っております。C-ペプチドも同様な設計です。



註) Biotin と Avidin について



Biotin	どの細胞にも存在する一種の成長因子で、ビタミン B 複合体のひとつです。ビタミン H とも呼ばれます。炭酸固定やカルボキシル基転移反応に関与する酵素の補酵素として作用するので Coenzyme R(R)ともいいます。脂肪酸、糖代謝に関与し、欠乏すると皮膚炎を起こします。肝、腎、脾、イースト、ミルクに多く存在します。
Avidin	生の卵白から単離された塩基性糖タンパク質。鳥類、両生類の卵管で作られます。4 個の本質的に同じアミノ酸 128 個からなる単鎖 (N 端アラニン、C 端グルタミン酸) のサブユニットで形成され、分子量は約 68000。熱処理や放射線照射で破壊されます。

Avidin はビオチンと結合し、ビオチンを不活性化します。それぞれのサブユニットは 1 個のビオチンを結合できます。解離定数 $K_d = 10^{-15}$ M (抗体よりも強い結合能と言える)。

大量の生卵白をラットや鶏に与えると、ビオチン不足に陥り、皮膚炎や成長抑制を起こします。この作用はビオチン投与で抑制できます。このようなビオチンとアビジンの特異的結合性をアッセイシステムに利用しています。

2. レビスインスリン及び関連物質測定キットにはどのようなものがあるか？

～対象動物種、特異性、測定感度、関連物質（プロインスリン、C-ペプチド）などからの分類～
弊社のインスリン測定キットにはいくつかの種類があります。

対象動物からの分類

ラット用	一般的測定キット（Tタイプ） 高感度測定キット（U-Eタイプ） 高濃度測定キット（Hタイプ） 特異的測定キット（Sタイプ） Ready to Use キット（RTUタイプ）
マウス用	一般的測定キット（Tタイプ） 特異的測定キット（Sタイプ） 高感度測定キット（Uタイプ） 高濃度測定キット（Hタイプ） Ready to Use キット（RTUタイプ）
イヌ用	一般的測定キット（Tタイプ）
ブタ用	一般的測定キット（Tタイプ）
サル用	一般的測定キット（Tタイプ）

この他に、ウサギ、ハムスター、ウシのインスリン測定用に標準品を提供しています。これらの標準品をラット用の T タイプキットと組み合わせて使用することで、それぞれの動物の試料の測定が可能となります。

特異性からの分類

通常インスリン測定キット Sタイプを除く全てのタイプ	このキットはインスリンとプロインスリンの双方に対して交差性を示します。血液中には通常プロセッシングされた真のインスリンのほかに少量のプロインスリンが放出されております。プロインスリンの放出量は通常インスリンと並行しますので、血液中のインスリンの変動を測定するにはこちらのキットで通常は十分です。
インスリン特異的測定キット Sタイプ	プロインスリンとの交差性が非常に低い（5%以下）ので、實際上インスリンのみを特異的に測定することができるキットです。プロインスリンが異常に高くなるような状況の中でインスリンを測定できるという長所があります。プロインスリンのみの変動にインスリン測定値が影響されず、通常キットでの測定値の差を考慮することでプロインスリンの放出量を推定できます。

測定感度からの分類

一般的測定感度キット Tタイプ、RTUタイプ	通常取り扱われる動物での血中インスリン測定に適しているキットです。動物種を問わず、Tタイプでは 0.156～10 ng/mL（イヌとブタでは 0.188～12 ng/mL）、RTUタイプでは 0.1～12 ng/mL で標準曲線が描けます。
---------------------------	--

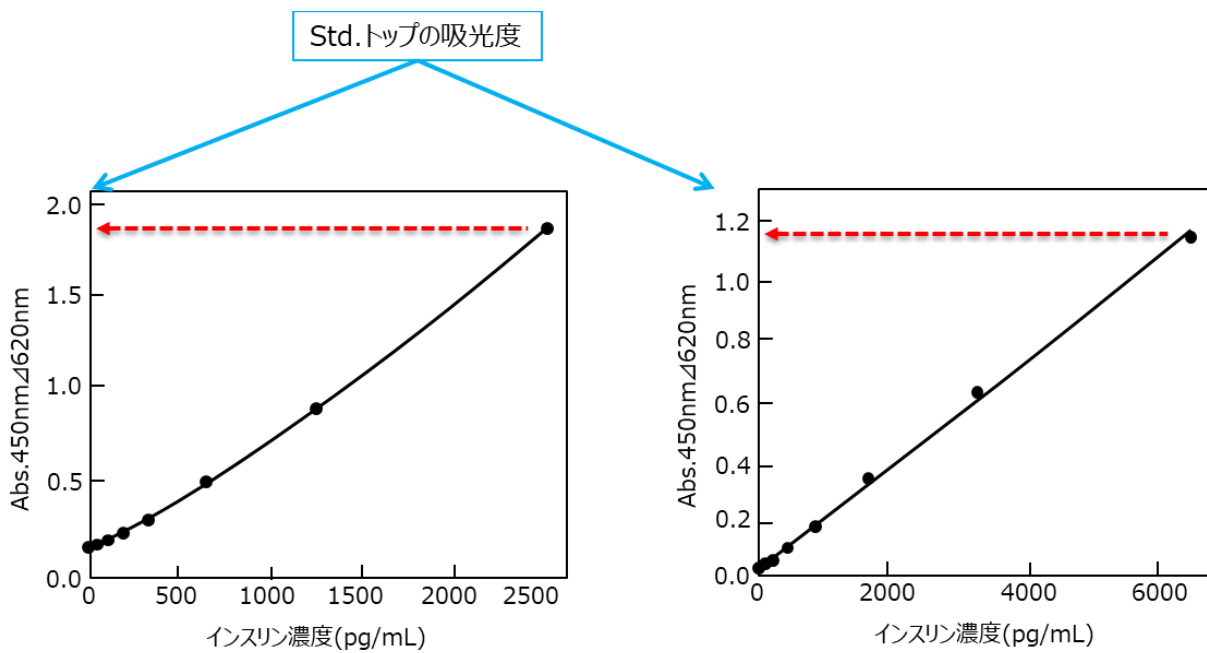
<p>高感度測定キット Uタイプ、U-Eタイプ</p>	<p>ラットとマウスについて、特にUタイプ（U-Eタイプ）という高感度測定キットをご提供致しています。こちらのタイプは、絶食時の動物血清について精度の良い測定ができるように改良したものです。その測定範囲はラット、マウスでは 39～2500 pg/mL となっています。</p>
<p>高濃度測定キット Hタイプ</p>	<p>モデルマウスや膵島細胞の培養液など、高濃度にインスリンが含まれている試料のために 0.5～100 ng/mL の測定が可能になっています。</p>

利便性の追求から

<p>Ready to Use キット RTU タイプ</p>	<p>測定キットとは言え、使用に当たって標準液やビオチン結合抗体、ペルオキシダーゼ-アビジン結合物などを希釈するのは結構手間がかかり、また間違いの原因ともなります。希釈標準液の調製はその操作自身に誤差、変動の要因を必然的に包含しています。</p> <p>RTU タイプは、洗浄液の他はすべての試薬が希釈済みで、そのままウェルに加えればよいようになっています。手間と時間を節約し、正確度と精度が向上させたキットです。また測定範囲もこれまでの T タイプと比べて拡張されています。</p>
-------------------------------------	--

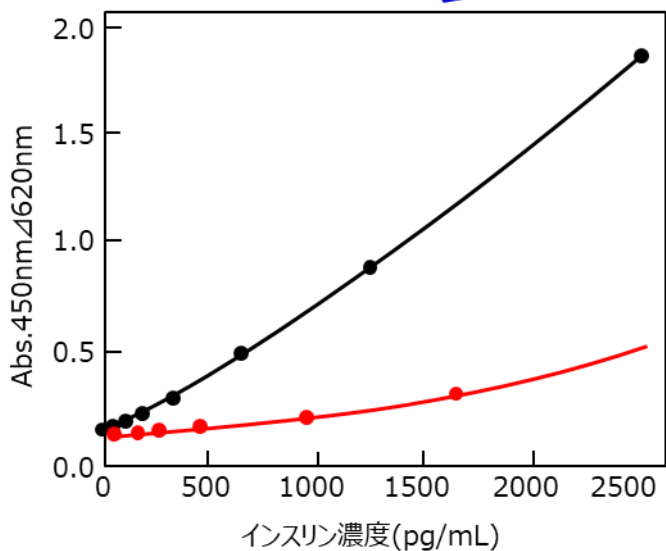
※キット選択のポイント

各メーカーの標準曲線を比較してみると、標準品の最高濃度の吸光度に差がみられる場合があります。これにより検量線の傾きが変わってきます。これは何に影響があるでしょうか。検量線の傾きは感度に影響します。この場合の感度は、吸光度の変化に対する濃度の変化を示します。

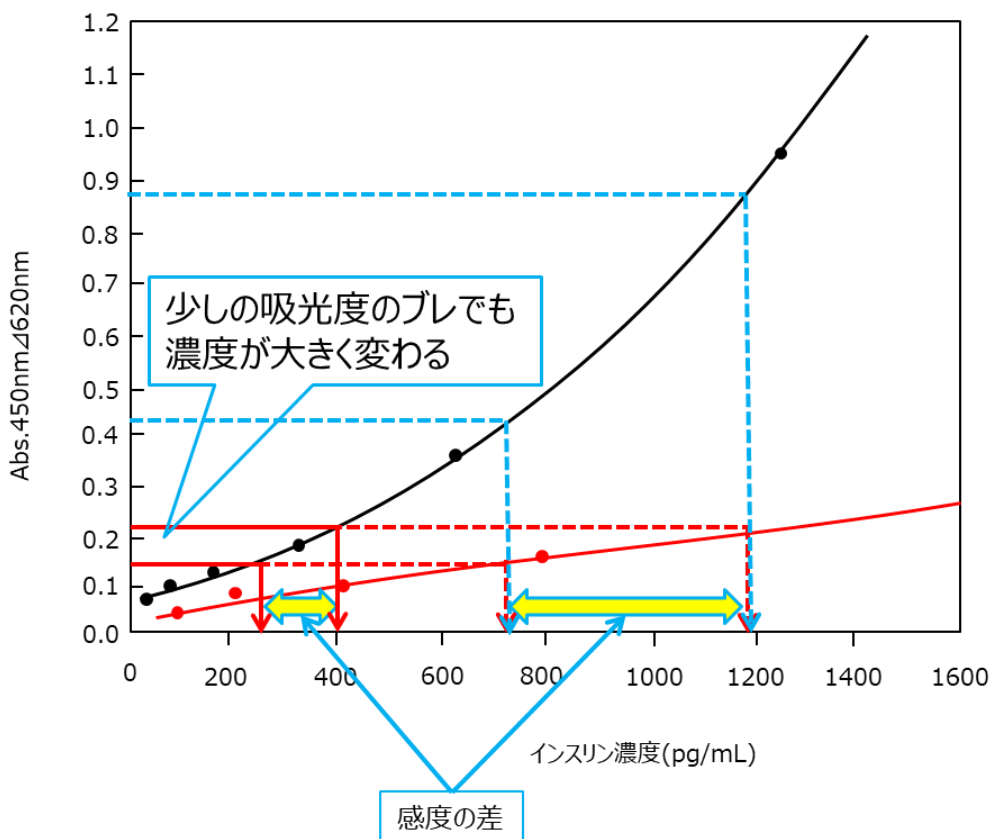


左側は当社のレビス® インスリン-マウス(U タイプ)の検量線例です。仮に右側のような検量線と低濃度領域を比較してみますと、

絶食時やSTZ投与後に
測定したい範囲！



もしも？吸光度がバラツいたら？



測定値のバラツキが大きくなる

3. 関連物質：レビス® プロインスリン-マウス/ラット

インスリンと密接な関連のあるプロインスリン測定キットのマウス用とラット用を提供しております。このキットはインスリンとは交差せず、高感度でプロインスリンのみを測定することができます。

プロインスリンはゴルジ装置から分泌顆粒に移行する過程でインスリンと C-ペプチドとなりますが、この際、分泌顆粒には、分解し残りのプロインスリンも少量存在し、顆粒が分泌される際に共に血中に放出されます。プロインスリンの生理活性はインスリンの 5-10 % であると言われています。

血中のインスリンや C-ペプチドを測定しようとする、一般的にはこのプロインスリンも測定してしまうことになります。立体的形状を無視して考えれば、プロインスリンは、インスリン及び C-ペプチドの全てのアミノ酸配列を包含しているためです。そこで、血中のインスリンを免疫学的測定法で定量した際は、IRI(immuno-reactive insulin)と呼んでインスリンそのものと区別しています。従って IRI 値にはインスリン値のほか抗体と反応したプロインスリン値も含まれることになります。

ポイント：IRIとは？

IRIに含まれるプロインスリンの量

ヒトのデータからインスリンとプロインスリンの割合をざっと計算してみましょう。

プロインスリンの分子量は約 9400、インスリンは 5800（分子量の比は 1 : 0.62 となります）

インスリン 1 mg = 24 IU として計算してみましょう。

プロインスリンの正常値（空腹時）は 3.3~10.1 pmol/L(Hampton,1988) という報告がありますので、1 pmol/L は重量に直すと 9400 pg/L=9.4 pg/mL ですので、正常値は 31~95 pg/mL、平均値は 63 pg/mL これを分子量の比からインスリンに換算すれば 39 pg/mL

インスリン(IRI)の正常値(空腹時)は 8~11 μ IU/mL=333~458 pg/mL、平均値を 396 pg/mL とすれば、この測定値にプロインスリンが含まれているとすれば約 10 % となります。

インスリンに対するプロインスリンの割合は変動するのか？

ヒトでの臨床研究報告によれば、血中プロインスリンの量はいろいろな場合に増加を示すと言われています。

II 型糖尿病(DM2、NIDDM)	空腹時やグルコース負荷時、共に血中プロインスリンレベルは健常者に比べて高く、インスリンに対する割合も増加しています。空腹時血糖値が高い場合や肥満の際にはこの傾向は顕著となります。高血糖による持続的なインスリンの分泌が未成熟分泌顆粒まで放出される可能性が考えられます。
I 型糖尿病(DM1、IDDM)	未治療患者の場合にはインスリン合成不全のために血中プロインスリン値は低下していますが、多くの患者はインスリン治療に伴う抗体の形成があって、血中プロインスリンレベルが高くなります。即ち抗体がプロインスリンと結合することで代謝が遅れるためであると考えられています。インスリン治療前でも抗体が存在することがあり未治療患者でも高値を示すことがあります。
肥満	II 型糖尿病の場合と同様、インスリンの放出過多による生合成-分泌プロセスのアクセラレーションが未成熟顆粒の放出をもたらしているのであろうと考えられます。
インスリノーマ	インスリンや C-ペプチドの上昇よりも高プロインスリン血症が歴然と現れるのでインスリノーマの診断に有用とされています。

家族性高プロインスリン血症	遺伝的にプロインスリンからインスリンへの転換酵素の異常やプロインスリン遺伝子の異常により転換酵素の作用を受けないプロインスリンが作られるなどが原因で、分泌顆粒中の IRI の大半をプロインスリンが占めます。
甲状腺機能高進	甲状腺ホルモン過多による糖新生に伴う血糖上昇がインスリン産生放出を促進し分解し残りのプロインスリン放出も多くなります。

以上非常に特殊な場合もありますが、多くの場合プロインスリンのインスリンに対する割合は、インスリン生合成過程の状況を反映している可能性があります。

4. 関連物質：レビス® C-ペプチド-マウス/レビス® C-ペプチド-ラット

インスリンと密接な関連のある C-ペプチドの測定キットのマウス用とラット用を提供しています。

インスリン部分のアミノ酸配列はマウス、ラット共通ですが、C-ペプチドの部分は多少違います。C-ペプチドはプロインスリンから分離したあと、インスリンとともに分泌されます。C-ペプチドは長い間生理作用がなく、インスリン生合成の過程において A 鎖と B 鎖が正しい形で折りたたまれ、正しい組み合わせの S-S 結合ができるようにする作用のほかには生理作用は特に無いと考えられていましたが、近年の研究の積み重ねにより様々な生理作用のあることが明らかになってきました。まず C-ペプチドは 10^{-9} M 程度で内皮細胞、腎尿細管細胞や繊維芽細胞の表面の恐らく G タンパクにカップルした受容体に結合し、カルシウムイオン依存性の細胞内シグナルを活性化すること、Na⁺-K⁺-ATPase を活性化し、内皮細胞の NO 合成を促進すること、受容体との結合には立体的特異性があり、インスリン、プロインスリン、IGF-1、-2、NPY との交差性がないことが示されています。また C-ペプチドを欠いている I 型糖尿病患者に C-ペプチドを投与することにより、骨格筋と皮膚の血流が増強され、腎糸球体の hyperfiltration を低下させ、尿中へのアルブミンの排泄を抑制し、神経機能を改善するが健常人には作用が現われないことが示されています。このことは I 型糖尿病患者にはインスリンのみでなく C-ペプチドの同時投与が合併症の阻止に有用であることが示唆されます。

C-ペプチドの C 末端部のペンタペプチド(27-31)が受容体との結合に重要で、この部分の欠如した des(27-31) C-ペプチドはその作用を失うとされています。このペンタペプチドは C-ペプチドと受容体との結合を完全に replace ことができ、Na⁺-K⁺-ATPase を活性化します。Des(27-31) C-ペプチドの存在量は新生児ラットでは C-ペプチドの約 37 %、成熟ラットでは 8.5 %を占めるという報告があります。C-ペプチドの血中における寿命がインスリンよりも数倍長いという特徴を持ちます。そこで、C-ペプチドの血中レベル測定は臨床的にはインスリン合成、分泌機能を観察するのに用いられます。また尿中に多量に排泄され、血中のレベルとよく相関することから、尿を試料として測定することもできます。

また、*in vitro* で培養されたランゲルハンス島（膵島）からのインスリン分泌の指標として C-ペプチド測定は有用です。なぜなら、培養液にはインスリンが添加されることが多いので、培養後培養中のインスリンを測定すると、分泌されたインスリンと添加されたインスリンの区別がつかなくなってしまう、培養開始時の量を差し引かなければなりません。その場合、分泌されたインスリン量が少ないと測定誤差の影響が大きくなり正確な判定ができなくなります。この時、C-ペプチドを測定すれば、インスリンと等モルで分泌されますから、分泌されたインスリンを正確に判定できるというわけです。

当社のキットは C-ペプチド 1、2 の共通部分を認識しますので、トータルの C-ペプチドが測定されます。

Ⅲ. 測定試料の取り扱いについて

1. 測定試料の採取について

血清／血漿中のインスリン

マウスからの採血について

全採血

頸静脈または頸動脈採血

麻酔したマウスを背位に保ち、頸部をアルコール綿で払拭し、鎖骨上部の皮膚を切り取り、皮下組織を左右に分けて行くと鎖骨の上部、気管の左右に頸静脈が見えます。またその深部に神経と並行して走る頸動脈が見えます。動脈または静脈、または双方をピンセットですくい上げ、鉗で切断してあふれ出てくる血液を試験管に受けるか注射筒で吸引します。

股静脈または股動脈採血

麻酔したマウスを背位に保ち、鼠径部の皮膚を切開すると股静脈と股動脈が目視できます。切開部位の皮膚を袋状にして動・静脈を切断すると血液が袋状のところに溜まるので、それを注射筒で吸い取ります。

心臓採血

深麻酔したマウスを背位に保ち、胸部を切開した後、注射針（できれば静脈針）をつけた注射筒で心臓から採血します。慣れれば切開なしで心臓採血できます。

部分採血

必要とする血液量が少量である場合にはヘマトクリット管が役に立ちます。ヘパリンで前処理しておくことも多く行われます。

尾静脈または尾動脈採血

静脈注射の要領で尾静脈に注射針を刺し、すぐに抜いてもれ出てくる血液をヘマトクリット管で吸い取ります。
尾動脈からの採血には、尾部をアルコール綿で拭き、はさみで先端部を切断し、滴下してくる血液を試験管で受けます。その後、指で圧迫しながら熱したスパーテルを当てて止血します。

ラットからの連続採血法

ラットを麻酔し、プラスチックチューブを頸静脈に挿入（直接には挿入せず、頸静脈が筋肉の下に潜り込むあたりで筋肉層を通して挿入）して心房まで到達させ、チューブを固定し、チューブを首の後ろから体外に出して栓をしておきます。翌日以降実験を行います。採血に際してはその出口に長いチューブを接続し、スイベルでラットの動きに合わせて上下させるようにし、必要量の血液をハミルトンシリンジを使って抜き取ります。

細胞中のインスリン

細胞を適量の酸・エタノール溶液（7.5 mL の塩酸と 370 mL の 95 %エタノールの混合液）でホモゲナイズ、4 °C で数時間放置してください。放置後、遠心分離し、得られた上清を 6 M のアンモニアで中和にします。再度遠心分離して、上清を測定サンプルとしてください。インスリン濃度により適宜キット付属の緩衝液で希釈してください。

参考文献

- Kenny, A, J., J. Clin. Endocrinol. Metab., 15, 1089-1105, 1955

Ethanol 75 % (v/v), 12 N HCl 1.5 % (v/v), sonication

- Mirsky, I. A. et al. J. Clin. Invest., 42, 1869-1872, 1963

Kenny の方法を使用.

- Steiner, D. F. et al. J. Biol. Chem. 246, 1365-1374, 1971

95 % EtOH:conc.HCl = 450:9

- Garcia, S. D. et al. J. Clin. Invest., 57, 230-243, 1976

Ethanol 92 %, containing NaCl, adjusted to pH 4 with conc.HCl

2. 抗凝固剤について

血漿を得るための抗凝固剤の使用について

必ずしも血漿でなくても血清のまま測定できますが、血漿にしたい場合には最終濃度としてヘパリン 10 μ g/mL (=1.2 U/mL) ~ 100 μ g/mL、EDTA-2Na=1~1.5 mg/mL (EDTA-2K=1.1-1.7 mg/mL)、もしくはクエン酸 Na=0.8~1.0 % になるように採血してください。

抗凝固剤を加えることにより、測定に対して多少の影響がでることがあります。

当社でそれらの影響について検討した結果を下に示しますので参考にしてください。

抗凝固剤の影響 (インスリン ELISA キットに共通)				
サンプル	抗凝固剤	理論値 (ng/mL)	実験値 (ng/mL)	回収率 (%)
1	ヘパリン	0.523	0.508	97.1
	10 μ g/mL	2.001	2.041	102
2	EDTA・2K	0.725	0.718	99.1
	1 mg/mL	2.348	2.252	95.9
3	クエン酸 Na	0.662	0.633	95.7
	0.8 %	2.161	1.995	92.3

インスリン測定系ではほとんど影響はないと考えても良いと思われます。

いずれにしても、抗凝固剤の使用に関しては、すべての測定試料に同じ処理を行うことが肝心です。絶対値に多少の影響があっても、処理が同じなら相対的測定値は変わらないからです。

抗凝固剤として NaF の入っている採血管は好ましくありません。洗浄したあとでも多少残っているフッ素イオンが酵素活性を抑制する結果、低値になる可能性があります。ヘパリンを使用して血漿を採取し冷凍保存して、使用時融解した場合、必ずフィブリンのもやもやとしたものが生じます。そのまま試料を採取するとピペットチップの先端に引っかかり正確な液量が取れない原因になります。融解後はヴォルテックス攪拌してから遠沈するとフィブリンが塊となりますので、細い針金や注射針の先をカギ状に曲げたもので引っ掛け吊り上げて除去してください。

3. インスリンの安定性と分解酵素阻害剤

血液中でのインスリンの安定性

血液中にはインスリナーゼやその他の蛋白質分解酵素が含まれています。そこで採血した血清・血漿はできるだけ速やかに測定してください。検体によっては室温で保存することによりインスリン濃度が低下します。検体は数時間の保存であれば 4 $^{\circ}$ C で、それ以上の場合 -35 $^{\circ}$ C 以下で冷凍 (長期保存には -80 $^{\circ}$ C) することが望ましいのです。

試料中のインスリンの分解が心配な方に

例えば試料採取後直ちに測定できず、冷蔵庫などに保管する場合はインスリン分解酵素阻害剤として、アプロチンを最終濃度 100~500 KIU/mL となるように加えてください。

アプロチニンの別単位、TIU は、1 TIU = ほぼ 900 KIU です。

(KIU: Kallikrein inhibitor unit, TIU: Trypsin inhibitor unit)

4. 溶血の影響

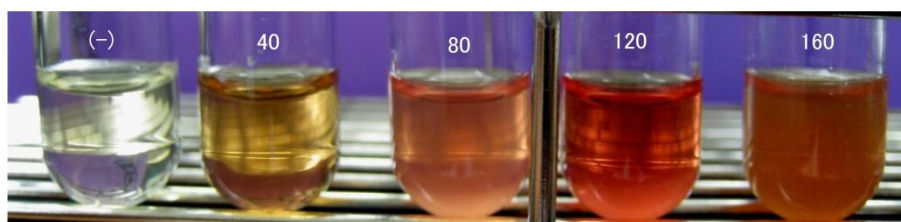
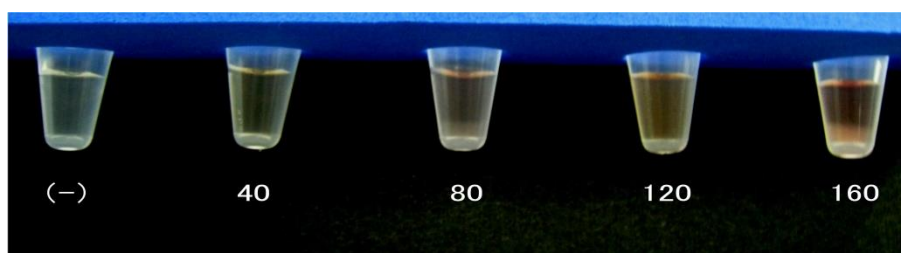
n=5 で実施、表中上段はインスリン測定値、下段は溶血のないときを 100 %とした相対値です。

サンプル	ヘモグロビン濃度 (mg/dL)			
	0	10	20	40
1	0.521	0.533	0.500	0.456
	100%	102%	96.0%	87.5%
2	1.04	0.998	0.989	0.925
	100%	96%	95.1%	88.9%
3	3.56	3.35	3.39	2.56
	100%	94.1%	95.2%	71.9%

上記のようにヘモグロビン濃度が 40 mg/dL 程度の溶血では測定値は低めに出ます。

採血には十分ご注意ください。特にマウスの場合採血に際して溶血しやすいので要注意です！

溶血度(mg/dL)と血清の色の目安です。



5. 麻酔、ストレスの影響

インスリンと絶食、麻酔

絶食	○低下する。 Ketamine の項参照
エーテル	○ <i>in vitro</i> の実験でエーテルは膵臓片でのグルコース依存性インスリン分泌を濃度依存的に阻害した。(1)
Pentobarbital	○Pentobarbital sodium は給餌、絶食ラットで急性の高血糖を起こさなかった。(2) ○Pentobarbital は血漿中のグルコースレベルを変化させなかったが、インスリン濃度を増大させた(0.59 ng/mL→2.13 ng/mL)。(3)
Thiopental	○イヌを thiopentone の infusion 下に静脈耐糖試験をすると insulinogenic index が

sodium	増大する。高血糖がインスリン分泌を促進していると思われる。(4)
Ketamine	<p>○給餌、および絶食 SD ラットにおける ketamine (100 mg/kg) および xylazine(10 mg/kg)の同時投与による麻酔。(2)</p> <p>給餌ラットでは投与によって急性の高血糖(178.4±8.0 mg/dL)を 20 分以内に惹起した。その際、インスリンレベルの低下を伴った。</p> <p>急性高血糖は yohimbine(1-4 mg/kg)の投与で dose-dependent に抑制された。従って K+X の効果はα2-adrenergic receptor を刺激することにより糖代謝関連のホルモンを変化させていると考えられる。</p> <p>Ketamine 単独では高血糖は起こさなかった。</p> <p>絶食ラットでは K+X 同時投与でも急性高血糖は起こさなかった。これらの事実は、糖尿病やグルコース、糖制御ホルモンレベルが実験結果を左右するようなモデルでは、麻酔薬の選択や動物の給餌、絶食の状態を考慮すべきであることを示している。</p>
Isoflurane	<p>○給餌ラットに対する Isoflurane 麻酔は急性の高血糖を 20 分以内に起こしたが、絶食ラットでは起こさなかった。(2)</p> <p>○Japanese white rabbit で、静脈内糖耐性試験(IVGTT)を行う際、glucose 0.6 g/kg i.v.投与の 30 分前に isoflurane 麻酔(1.0 minimum alveolar concentration)を行うと、insulinogenic index {GTT におけるインスリン濃度(\cdotU/mL)増大/血糖値(mg/dL)の増大}を阻害した Isoflurane はインスリンの分泌とグルコース utilization を阻害する。(5)</p> <p>○Isoflurane 2 %は単離されたランゲルハンス島において、glucose 20 mmol/L により起こされるインスリン分泌を basal non-stimulated レベルにまで低下させた。Glyceraldehyde と phorbol ester を用いてのインスリン分泌増大も抑制した。つまり抑制作用は glyceraldehyde や phorbol ester よりも先で起きていることが示唆される。(6)</p> <p>○Isoflurane はイヌで急速な広範な代謝への影響を与えた。10 分の麻酔で血漿中の遊離脂肪酸とパルミチン酸の代謝が有意に減少し、グルコースの産生が増加し、3.5 時間の麻酔では末梢のグルコース利用が低下した。即ち、末梢でのインスリン抵抗性の増大、脂肪分解の減少を惹起し、麻酔の継続に比例してタンパク質合成の低下とアミノ酸の酸化の割合を増大させた。(7)</p> <p>○ヒトでの isoflurane 麻酔下に行った静脈内耐糖試験(IVGTT)では insulinogenic index, acute insulin response 及び glucose disappearance rate が非麻酔の場合と比べて低下した。(8)</p> <p>○Isoflurane は給餌ラットで hyperglycemia を惹起したが、インスリン濃度には影響しなかった。Isoflurane による高血糖は glibenclamide(non-specific K(ATP) channel inhibitor)によって阻止された。グルコース依存性インスリン分泌が障害されている可能性がある。(3)</p>
Halothane	<p>○<i>in vitro</i> の実験で halothane は膵臓片でのグルコース依存性インスリン分泌を濃度依存的に阻害した。(9)</p> <p>○<i>in vitro</i> の実験で halothane は単離された膵島でのグルコース依存性インスリン分泌を濃度依存的に阻害した。この作用は glucose oxidation の阻害によるものではない。(10)</p> <p>○ウマ(pony)を halothane で 2 時間麻酔(手術なし)。同じ固体の異なる日麻酔なし</p>

での採血と比較。(11)

Halothane 麻酔により血漿中のグルコース、lactate、cortisol、ACTH レベルは上昇。インスリンレベルは低下した。18 ヶ月後に同じ実験を繰り返したが結果は同様であった。Halothane による麻酔はウマで実質的にストレス反応を惹き起こしている。

○絶食授乳中ラットに於いて、乳腺と肝臓の pyruvate dehydrogenase 活性は、絶食のみのラットではインスリン投与によって乳腺中での酵素活性が増加したが肝臓では増加しなかった。このインスリン作用は halothane 麻酔で大きく阻害された。(12)

○Halothane 麻酔は 24 時間ラットでグルコースの代謝率を 20 %減少させた。これは睡眠中の場合と類似している。従って、これは halothane に特異的な作用とは言えない。血漿中のインスリン濃度はグルコースの代謝率に逆比例していた。(13)

○ラットに死には至らない火傷(scald injury)を与え、70 分後に halothane 麻酔を行った。麻酔しないラットと比較した。麻酔の導入した直後及び麻酔の最中、halothane は急速の血糖値を上昇させ、30 分後にはコントロールレベルに下がった。インスリン濃度も上昇した。2 時間麻酔を続けるとグルコースの産生と利用を低下させ、血漿中のインスリンレベルは増加させ、肝臓でのグリコーゲン量を減少させた。(4)

○イヌを halothane 麻酔下に静脈耐糖試験をすると insulinogenic index が有意に低下。(14)

1. Inhibition by ether of glucose-stimulated insulin secretion in isolated pieces of rat pancreas. Gingelich RL, Paradise RR, Wright PH. Anesthesiology 51: 34-35, 1979
2. Acute hyperglycemia induced by ketamine/xylazine anesthesia in rats: Mechanism and implication for preclinical models. Saha JK, Xia J, Grondin JM., et al. Exp Biol Med (Maywood) 230: 777-784, 2005
3. Anesthesia's effects on plasma glucose and insulin and cardiac hexokinase at similar hemodynamics and without major surgical stress in fed rats. Zuurbier CJ, Keijzers PJ, Koeman A.. et al. Anesth Analg. 106:135-142, 2008
4. Effects of halothane on glucose metabolism after injury in the rat. Heath DF, Frayn KN, Rose JG. Br J Anaesth. 50: 899-904, 1978
5. Mechanism of impaired glucose tolerance and insulin secretion during isoflurane anesthesia. Tanaka K, Kawano T, Tomino T., et al. Anesthesiology 111: 1044-1051, 2009
6. Isoflurane inhibits insulin secretion from isolated rat pancreatic islets of Langerhans. Desborough JP, Jones PM, Persaud SJ., et al. Br J Anesth 71: 873-876
7. Isoflurane and whole body leucine, glucose, and fatty acid metabolism in dog. Horber FF, Krayner S, Cryer P., et al. Anesthesiology 73: 82-92, 1990
8. Insulin secretion and glucose utilization are impaired under general anesthesia with

sevoflurane as well as isoflurane in a concentration-independent manner.

Tanaka T, Nabatame H, Tanifuji Y.

J Anesth. 19: 277-281, 2005

9. Inhibition by halothane of glucose-stimulated insulin secretion in isolated pieces of rat pancreas.

Gingelich RL, Paradise RR, Wright PH.

Anesthesiology 40: 449-452, 1974

10. Effects of halothane on glucose-stimulated insulin secretion and glucose oxidation in isolated rat pancreatic islets.

Gingelich RL, Wright PH, Paradise RR.

Anesthesiology 53: 219-222, 1980

11. Equine stress response to anaesthesia.

Taylor PM.

Br J Anaesth. 63: 702-709

12. Halothane anaesthesia can block insulin stimulation of pyruvate dehydrogenase activity in mammary glands of 24-hour starved lactating rats.

Hutchinson CE, Coore HG.

Br J Anaesth. 52: 573-576, 1980

13. Rate of glucose utilization and gluconeogenesis in rats in the basal state induced by halothane anaesthesia.

Heath DF, Frayn KN, Rose JG

Biochem J 162:643-651, 1977

14. Intravenous glucose tolerance test during anaesthesia in dogs: insulin response and glucose clearance.

Ishihara H, Kallus FT, Giesecke AH Jr.

Can Anaesth Soc J 28: 381-386, 1981

参考資料

若林克己著 ELISA A to Z 増補改訂第5版

若林克己著 シバヤギ学術情報 インスリンと関連物質のレビス測定キット

若林克己著 シバヤギ学術情報 Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) 概説

若林克己著 シバヤギ学術情報 Glucagon 概説

【糖尿病・肥満関連分野】

和光コード	シバヤギコード	品名	標準曲線範囲	希望納入価格(円)
634-01481	AKRIN-011T	レビス® インスリン-マウス T	0.156~10 ng/mL	48,000
639-23911	AKRIN-011RU	レビス® インスリン-マウス(RTU)	100~12,000 pg/mL	55,000
630-10371	AKRIN-011H	レビス® インスリン-マウス(Hタイプ)	0.5~100 ng/mL	48,000
633-03411	AKRIN-031	レビス® インスリン-マウス(Uタイプ)	39~2,500 pg/mL	62,000
636-07281	AKRIN-011S	レビス® インスリン-マウス(Sタイプ)	78~5,000 pg/mL	62,000
637-01471	AKRIN-010T	レビス® インスリン-ラット T	0.156~10 ng/mL	45,000
636-24141	AKRIN-010RU	レビス® インスリン-ラット(RTU)	100~12,000 pg/mL	52,000
633-10621	AKRIN-010H	レビス® インスリン-ラット(Hタイプ)	0.5~100 ng/mL	45,000
636-05581	AKRIN-130	レビス® インスリン-ラット(U-Eタイプ)	39~2,500 pg/mL	62,000
637-07191	AKRIN-010S	レビス® インスリン-ラット(Sタイプ)	0.1~10 ng/mL	62,000
634-13071	AKMAN-011	レビス® 高分子アディポネクチン-マウス/ラット	3.13~200 ng/mL	68,000
636-23041	AKMPI-111	レビス® プロインスリン-マウス/ラット	1.47~94.3 pg/mL	62,000
637-10381	AKRLP-011	レビス® レプチン-マウス	20.6~5,000 pg/mL	68,000
631-07231	AKRCP-031	レビス® C-ペプチド マウス(Uタイプ)	46.9~3,000 pg/mL	65,000
639-07271	AKRCP-030	レビス® C-ペプチド ラット(Uタイプ)	46.9~3,000 pg/mL	65,000
299-75501	-	GLP-1 ELISA キットワコー, 高感度品	0.94~30 pM	75,000
293-79301	-	活性型 GLP-1 ELISA キットワコー 発光系	0.123~30.0 pM	82,000
633-15121	AKMGP-011	レビス® GLP-1(Active)	0.47~15 pM	70,000
292-80001	-	グルカゴン ELISA キットワコー(サンドイッチ法)	2.2~143.6 pmol/L	95,000
291-73501	-	マウス/ラット PYY ELISA キットワコー	0.15~12.5 ng/mL	83,000

【関連製品】

和光コード	シバヤギコード	品名	標準曲線範囲	希望納入価格(円)
634-04301	AKRAL-121	レビス® アルブミン-マウス	50~1,000 ng/mL	55,000
638-31931	AKRAL-221	レビス® アルブミン-マウス (2プレートタイプ)	50~1,000 ng/mL	90,000
631-04311	AKRAL-120	レビス® アルブミン-ラット	50~1,000 ng/mL	55,000
631-31921	AKRAL-220	レビス® アルブミン-ラット (2プレートタイプ)	50~1,000 ng/mL	90,000
635-25831	AKRAL-022S	レビス® 尿中アルブミン-サル (Sタイプ)	2.5~202.5 µg/mL	56,000
638-25561	AKRAL-021S	レビス® 尿中アルブミン-マウス (Sタイプ)	6.17~500 µg/mL	54,000
634-25301	AKRAL-020S	レビス® 尿中アルブミン-ラット (Sタイプ)	6.17~500 µg/mL	54,000

富士フイルムワコーシバヤギ株式会社