

THE RADIOCHEMICAL CENTRE IMMUNOASSAY FOR INSULIN
A MODIFICATION

Radiochemical Centre のインスリンの免疫学的測定法 - 変法

THOMAS T. AOKI, M.D.

SUSAN K. AOKI, M.D.



ATOMIC BOMB CASUALTY COMMISSION

国立予防衛生研究所 - 原爆傷害調査委員会

JAPANESE NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH OF THE MINISTRY OF HEALTH AND WELFARE

TECHNICAL REPORT SERIES

業 績 報 告 書 集

The ABCC Technical Reports provide the official bilingual statements required to meet the needs of Japanese and American staff members, consultants, advisory councils, and affiliated government and private organizations. The Technical Report Series is in no way intended to supplant regular journal publication.

ABCC業績報告書は、ABCCの日本人および米人専門職員、顧問、評議会、政府ならびに民間の関係諸団体の要求に応じるための日英両語による記録である。業績報告書集は決して通例の誌上発表に代るものではない。

THE RADIOCHEMICAL CENTRE IMMUNOASSAY FOR INSULIN
A MODIFICATION

Radiochemical Centre のインスリンの免疫学的測定法 - 変法

THOMAS T. AOKI, M.D.†

SUSAN K. AOKI, M.D.

Department of Medicine

臨床部

Approved 承認 30 May 1968



ATOMIC BOMB CASUALTY COMMISSION
HIROSHIMA AND NAGASAKI, JAPAN

A Cooperative Research Agency of
U.S.A. NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES · NATIONAL RESEARCH COUNCIL
and
JAPANESE NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH OF THE MINISTRY OF HEALTH AND WELFARE

with funds provided by
U.S.A. ATOMIC ENERGY COMMISSION
JAPANESE NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH
U.S.A. PUBLIC HEALTH SERVICE

原 爆 傷 害 調 査 委 員 会

広島および長崎

米国学士院 - 学術会議と厚生省国立予防衛生研究所
との日米共同調査研究機関

米国原子力委員会, 厚生省国立予防衛生研究所および米国公衆衛生局の研究費による

† Surgeon, US Public Health Service, The National Center for Radiological Health, Population Studies Program, assigned to ABCC
米国公衆衛生局放射線保健センター人口調査計画部門所属医師で ABCC へ派遣

CONTENTS

目次

Introduction	緒言	1
Materials and Methods	材料および方法	2
The Technique	技法	3
Results	成績	4
Discussion	考察	4
Summary	要約	6
References	参考文献	6
Figure 1. Standard curve			
図	標準曲線	5
2. Standard curve prepared one week after the curve in Figure 1.			
	図1の曲線の1週間後に作成した標準曲線	5

ACKNOWLEDGMENT

感謝のことば

We wish to thank Dr. Benedict R. Harris for his strong support and encouragement and Mr. Fumiharu Sugino for preparing the heat-killed bacteria.

著者らは Dr. Benedict R. Harris の強力な援助と激励に対し、また杉野文治氏が熱で殺した細菌を準備して下さったことに対して感謝を述べたい。

A paper based on this report was submitted to Nature.

本報告に基づく論文は Nature へ提出した。

THE RADIOCHEMICAL CENTRE IMMUNOASSAY FOR INSULIN A MODIFICATION

Radiochemical Centre のインスリンの免疫学的測定法 — 変法

INTRODUCTION

The circulating insulin level in man has received considerable attention from investigators of carbohydrate metabolism. In the past, however, the tedious bioassay of insulin, utilizing rat diaphragms and rat epididymal fatpads, was the only technique available, and its use was necessarily restricted to research laboratories. Further, it is now known that the bioassay technique measured insulin-like activity rather than insulin activity.¹

With the appearance of fast, reliable, accurate, and in vitro radioimmunoassays for insulin²⁻⁴ a powerful tool became available that could readily be used in epidemiological investigations.

At present, there are three main radioimmunoassay techniques available for the determination of insulin levels. All three methods involve the reaction of radioactive insulin and unlabeled insulin with anti-insulin antibody. The procedures differ primarily in the method of separation of the free and bound insulin. The method of Yalow and Berson³ utilizes paper chromatography, whereas the methods of Hales and Randle,⁴ and Morgan and Lazarow⁵ use a second antibody to precipitate the bound insulin — anti-insulin complex leaving the free insulin in the supernatant. Further, in the latter two methods, final separation of the insulin — anti-insulin complex from free insulin is accomplished by filtration and by centrifugation, respectively.

Recently, a kit has become available from the Radiochemical Centre (RCC), Amersham, England which contains carefully prepared iodinated insulin-I¹²⁵ and the two antibodies required in the Hales and Randle Method (Data Sheet 5616). With this kit, patterned after the Hales and Randle Method C, it is now possible to perform the radioimmunoassay of insulin with a minimum of equipment, materials, and personnel. However, the relatively great expense of the paper filters (400/kit, 12c/filter) and bovine plasma albumin powder (\$23.04/50 g) could constitute an economic obstacle to the performance of this test.

緒言

人間における血中インスリン値は、炭水化物代謝の研究の注目の的になっている。しかしながら、ラットの横隔膜および副睾丸脂肪組織を利用するめんどろなインスリンの生物学的測定法が唯一の技法であったので、必然的にその利用は実験研究室に限られた。さらに、生物学的測定法ではインスリン活性よりもむしろインスリン様活性を測定していることが最近判明した。¹

迅速で、信頼できる、正確な試験管内のインスリンの放射性免疫学的測定法が開発されて、²⁻⁴ 疫学的調査に容易に利用できる強力な技法が用いられるようになった。

現在、インスリン値の測定に利用できる3つの主要な放射性免疫学的測定法がある。それらはいずれも放射性インスリンおよびラベルしていないインスリンと抗インスリン抗体との反応によるものである。これらの方法では、主として遊離インスリンおよび抗体と結合したインスリンの分離の方法が異なる。Yalow・Berson法³はろ紙クロマトグラフィーを利用するが、Hales・Randle法⁴およびMorgan・Lazarow法⁵では、抗体と結合したインスリン—抗インスリン複合体を沈殿させるために第2の抗体を使用し、ラベルしないインスリンが上澄み液に残る。なお、後者の2つの方法では、インスリン—抗インスリン複合体とラベルしないインスリンの最終的分離はそれぞれろ過と遠心分離によって行なわれる。

最近、Hales・Randle法(資料表5616)に必要で入念に調製された沃化インスリン I¹²⁵ および2つの抗体のはいったキットを Radiochemical Centre (RCC) (英国 Amersham 市)で求めることができるようになった。したがって、Hales・Randle C法をもとに作られたこのキットで、最小限の装置と資材と人員でインスリンの放射性免疫学的測定を実施することが可能となった。しかしながらろ紙(1キット400枚で1枚12セント)および牛血漿アルブミン末(50g当たり\$23.04)にかなり多くの経費を必要とするので、この検査を実施するのに経済的障害となり得る。

Presented here is a modification of the RCC technique which we believe to offer economies in both money and time and provides good accuracy.

MATERIALS AND METHODS

Apparatus Syringes To facilitate the handling of a large number of samples, separate Hamilton PB-600-10 repeating dispensers (Hamilton Company, Inc., P.O. Box 307, Whittier, California, USA) were used in conjunction with 5 cc Hamilton Microliter gas-tight syringes (Catalog No. 1005-N) and permitted the dispensing of approximately 48 0.1 cc aliquots of either iodinated insulin-I¹²⁵ or insulin binding reagent without refilling. The accuracy of this dispenser was approximately $\pm 2\%$.

Heat-killed Bacteria Dispenser A Sasaki Minipette (Catalog No. 1620-C, with 5 cc syringe; Kayagaki Rika Kogyo Kabushiki Gaisha, 1690 14-ban, 3-chome, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo, Japan) was utilized to deliver 2 cc aliquots of the heat-killed bacteria to each test tube at the rate of approximately 40 aliquots/minute with good accuracy ($\pm 0.8\%$).

Test Tubes 75 × 12 mm test tubes were used.

Centrifuge A Model 2 International centrifuge was modified so that the temperature within the centrifuge during prolonged operation was maintained at approximately 10-12 C by a cold air and ice water circulation system. Model 250 International multiple trunnion carriers, each capable of holding 8 tubes, were used. Since the rotor (head) used held 16 multiple trunnion carriers, a total of 128 tubes could be spun at one time.

Preparation of Insulin Standards Pure crystallized pork insulin was obtained (Novo Therapeutisk Laboratorium A/S Insulin Department Lot No. S23267, biological potency 23.7 [21.6-25.9 I.U./mg]) courtesy of Kodama Shoji Gaisha. The first stock solution (200 μ g/ml), second stock solution (2 μ g/ml) and working standards were prepared in accordance with the technique outlined in the RCC brochure.

Insulin Binding Reagent (IBR) This double-antibody reagent ("Wellcome" Brand) is provided in the RCC Kit. It was stored and diluted in the manner recommended by the RCC brochure.

Preparation of Working Solution of Iodinated Insulin-I¹²⁵ The working solution of iodinated insulin-I¹²⁵ was prepared as recommended by the RCC data sheet. Excess working solution of iodinated insulin-I¹²⁵ was stored in the refrigerator at 4 C for not more than 1 week.

本論文では、良好な精度が得られ、しかも経費と時間が節約できると思われる RCC 法の変法について述べる。

材料および方法

器具 注射器 多数の標本の取り扱いを容易にするため、別々のハミルトン PB-600-10 連続分注器 (米国カリフォルニア州 Whittier P.O. Box 307, Hamilton Company) を耐ガス構造のハミルトン・マイクロリットル 5 cc 注射器 (カタログ #1005-N) と組み合わせて使用した。これにより途中で補充することなしに沃化インスリン I¹²⁵ またはインスリン結合試薬のいずれかを 0.1 cc の微量標本約 48 本に分注することができた。この分注装置の精度は約 $\pm 2\%$ であった。

加熱殺菌した菌液の分注装置 佐々木ミニペット (カタログ番号 1620-C, 5 cc 注射器つき, 東京都文京区本郷 3 丁目 14 番 1690, 萱垣理工工業株式会社) を使用して、熱で殺した細菌の標本 2 cc を約 1 分間に 40 標本の割合で各試験管に入れた。精度は良好 ($\pm 0.8\%$) であった。

試験管 75 × 12 mm 試験管を使用した。

遠心機 インターナショナル 2 型遠心機を改造し、冷たい空気と氷で冷した水それぞれを循環させることによって、長時間の連続回転でも機内の温度を約 10-12 C に維持できた。それぞれ 8 本の試験管を保持できる 250 型インターナショナル多筒耳キャリアーを利用した。使用した rotor (頭部) は 16 の多筒耳キャリアーを保持するので、合計 128 の試験管を一度に回すことができた。

インスリン標準液の調製 児玉商事会社の好意により純粋結晶豚インスリン (Novo Therapeutisk Laboratorium A/S Insulin Department Lot No. S 23267, 生物学的効力 23.7 [21.6-25.9 I.U./mg]) を入手した。第 1 保存液 (200 μ g/ml), 第 2 保存液 (2 μ g/ml) ならびに使用標準液は RCC 資料 (資料表 5616 号) に記した技法に従って調製した。

インスリン結合試薬 (IBR) (Wellcome 製) この 2 つの抗体試薬は RCC キットに含まれている。RCC キットに指示された方法 (資料表 5616 号) で保管し希釈した。

沃化インスリン I¹²⁵ 使用溶液の調製 沃化インスリン I¹²⁵ 使用溶液を RCC 資料表の指示どおりに調製した。余分の沃化インスリン I¹²⁵ 溶液を 1 週間を限度として冷蔵庫に 4 C で保管した。

Buffers A phosphate buffer (Buffer A) containing thiomersalate (0.6 millimolar) and bovine plasma albumin (0.1%) and isotonic buffer (Buffer B) were prepared in accordance with the RCC data sheet. Buffer C was not used in this procedure.

Preparation of Heat-killed Bacteria Method A Two 5 liter bottles, each containing 1.5 liters of enriched nutrient broth media* were heavily inoculated with a nonpathogenic *E. Coli*. The bottles were first agitated for 12 hours at room temperature and then incubated at 37 C for 10-12 hours. The heavy growth of bacteria obtained was killed by heating in a water bath at 70 C for 20 minutes and then centrifuged (2000 rpm for 5 minutes). The resulting pellet (approximately 12-14 cc) was resuspended in cold Buffer A (4 C), mixed, and again centrifuged. The second supernatant was discarded and the washed pellet was finally resuspended in 520 cc of Buffer A (for 128 tubes). Just prior to dispensing, the suspension was again thoroughly mixed.

Method B Preparation of bacteria was identical to Method A. However, approximately 2.6 cc of the washed pellet was resuspended in 260 cc of cold Buffer A (for 128 tubes). A Coulter counter with an aperture of 100 microns and set at maximum gain was used to check the final concentration of bacteria (1:1000 dilution, 50,000-60,000/mm³). Just prior to dispensing, the suspension was again thoroughly mixed.

THE TECHNIQUE

To test tubes containing 0.1 cc of standard insulin solutions (or serum), 0.1 cc of IBR is added. Each tube is thoroughly mixed using a vortex mixer and refrigerated for 6 hours (2-4 C). One-tenth cc of the working solution of the iodinated insulin-I¹²⁵ is then added. The tubes are again mixed and incubated at 2-4 C for 18 hours.

The multiple trunnion carriers are chilled overnight prior to use. Upon completion of the second incubation, the tubes are wedged in the chilled carriers with small pieces of soft plastic foam. Two cc of the suspension of heat-killed bacteria (prepared as described in Method A) are added to each sample. The tubes are then spun for 35 minutes at 1500 rpm at 10-12 C. The carriers are removed from the centrifuge. The tubes are not removed from the carriers; instead, each carrier is inverted over a 1000 cc beaker and all 8 supernatants are poured off simultaneously. The drops remaining on the inner lips

緩衝剤 RCC資料表に従って thiomersalate (0.6 ミリモル) ならびに牛血漿アルブミン (0.1%) を含む燐酸塩緩衝剤 (緩衝剤 A) および等浸透緩衝剤 (緩衝剤 B) を調製した。この要領では緩衝剤 C は利用しなかった。

加熱殺菌した菌液の調製 A方式—1.5 ℓ の栄養強化培養肉汁基*をいれた 5 ℓ びん 2 本に非病原性大腸菌を大量に接種した。まず室温でびんに 12 時間振動を与えてから、10-12 時間 37 C で培養した。大量に増殖した細菌は、20 分間 70 C に加温して殺し、遠心分離機にかけた (毎分 2000 回転、5 分間)。その結果得られた小顆粒状の塊 (約 12-14 cc) を、冷たい緩衝剤 A (4 C) の中で再懸濁し、混和して再び遠心分離機にかけた。2 回目の上澄み液を棄てて洗浄した小顆粒を最後に緩衝剤 A 520 cc (試験管 128 本分) に再懸濁した。分注する直前に再びこの懸濁液を十分に混和した。

B方式—細菌の調製は A 方式と同じである。しかし、洗浄した小顆粒の約 2.6 cc を冷たい緩衝剤 A 260 cc (試験管 128 本分) に再懸濁した。細菌の最終濃度 (1:1000 の希釈、50,000-60,000/mm³) を調べるため Coulter Counter の絞り孔を 100 ミクロンにし最大利得にセットして使用した。分注を行なう直前に、再び懸濁液を十分に混和した。

技 法

標準インスリン溶液 (または血清) 0.1 cc を入れた試験管にインスリン結合試薬 0.1 cc を添加する。渦巻きミキサーを使用して内容物を十分混和した後、2-4 C で 6 時間冷蔵する。沃化 I¹²⁵ インスリン使用溶液 0.1 cc を添加する。再びこれらの試験管の内容物を混和し、2-4 C で 18 時間冷蔵する。

使用前夜に多筒耳キャリアーを冷却する。第 2 冷蔵完了後に試験管を柔らかいプラスチック製発泡材の小片といっしょに冷却したキャリアーに押し込む。熱で殺した細菌の懸濁液 (A 方式の記載どおりに調製したもの) 2 cc をそれぞれの標本に添加する。それから 10-12 C、毎分 1500 回転で 35 分間回転させる。キャリアーを遠心機から取りはずし、試験管はキャリアーから取り出さず、それぞれのキャリアーを 1000 cc のピーカーの上にさかさにし 8 本分の上澄み液を全部同時に注ぐ。試験管の内側のふ

* 20 g nutrient broth, 4 g dextrose, 5 g NaCl, 2.5 g disodium phosphate, per liter.

1ℓ 当たり栄養肉汁 20 g, ブドウ糖 4 g, 塩化ナトリウム 5 g, リン酸二ナトリウム 2.5 g.

of the test tubes are removed by suction while the tubes are still inverted. Thoroughly mixed heat-killed bacteria are again added to each tube. The tubes are again spun for 35 minutes at 1500 rpm at 10-12°C. The supernatants are again discarded and the tubes are then counted in a well-type crystal scintillation counter.

An alternative procedure utilizes the diluted bacterial suspension described in Method B. Two cc aliquots of this suspension are added to each tube prior to the first centrifugation step. The tubes are then centrifuged. The supernatants are poured off and 2 cc aliquots of Buffer A are added to each tube. The tubes are then mixed and re-centrifuged. After the second supernatant is poured off, the tubes are counted.

The standard curve is prepared by plotting counts per minute minus background against $\mu\text{u/ml}$ of insulin and the serum unknowns are read off the standard curve.

RESULTS

As can be seen from Figures 1 and 2, a virtually straight line can be drawn between 50 and 500 microunits of insulin. Each insulin dilution was performed in triplicate, and the vertical lines at each point on the curve represent plus or minus one standard deviation. The different curves were obtained from the same kit and were determined at one week intervals. The heat-killed bacteria used to obtain these curves were prepared as described in Method A; however, comparable standard curves were obtained using bacteria prepared as described in Method B and the alternative technique.

A small amount of radioactivity is brought down by the heat-killed bacteria. However, by using the very fast and accurate Sasaki Minipette it is possible to insure that the same amount of bacteria is added in each tube.

DISCUSSION

The high cost of the filters and bovine plasma albumin powder and the rather significant amount of time and handling required in the filtration step of the RCC procedure greatly detract from an otherwise attractive and excellent kit. With the modification of the RCC procedure proposed, the expensive filtration step (\$66/kit for bovine plasma albumin powder and Millipore filter papers) is replaced by a centrifugation step (\$2/kit for bovine plasma albumin powder and bacterial media in Method A, less than \$1/kit in Method B).

ちに残っているしずくは試験管をさかさにしたまま吸引によって取りさる。熱で殺した細菌の完全に混和したものを再びそれぞれの試験管に添加する。試験管を再び10-12°C毎分1500回転で35分間回転する。上澄み液を再び棄ててから、well-type crystal scintillation counterで測定する。

他の方法としてはB方式に述べた希釈細菌懸濁液を利用する。最初の遠心分離の過程以前に、この懸濁液2ccをそれぞれの試験管に添加し、試験管を遠心分離機にかける。上澄み液を棄てて、緩衝液A 2ccをそれぞれの試験管に添加する。それから試験管の内容を混和し遠心分離機にかける。第2の上澄み液を流してから、試験管の計測を行なう。

インスリンの $\mu\text{u/ml}$ に対応して毎分の計測数からバックグラウンドを引いた値をプロットして標準曲線を作成し、未知の血清における値をこの曲線から読みとる。

成績

図1および2からわかるように、インスリン50から500マイクロユニットの間はほとんど直線で結べる。各インスリン希釈液について3回測定を行ない、曲線上のそれぞれの点における垂直線は標準偏差 ± 1 を表わす。同一のキットから異なった曲線が得られたが、これらは、1週間の間隔を置いて測定して求められたものである。これらの曲線を得るため使用した熱で殺した細菌は、A方式に記述した方法で調製された。またB方式および他の技法として記述した方法に従って調製した細菌を使用して、同様な標準曲線を得た。

熱で殺した細菌によって放射エネルギーは少し下がる。しかし、非常に迅速で正確な佐々木ミニベット方式の活用により、各試験管に等量の細菌を添加することができる。

考案

RCC法はフィルターや牛血漿アルブミン末が高価なことや、ろ過の過程にかなり時間と手数がかかることを除けば、魅力のある優れたキットである。提案したRCC法の変法では、遠心分離の過程(A法では牛血漿アルブミン末および細菌培養基の価格、1キット当たり\$2、B法はもっと安く1キット当たり\$1)が経費のかかるろ過の過程(牛血漿アルブミン末およびMilliporeフィルターペーパーの代価1キット当たり\$66)に取って代わる。

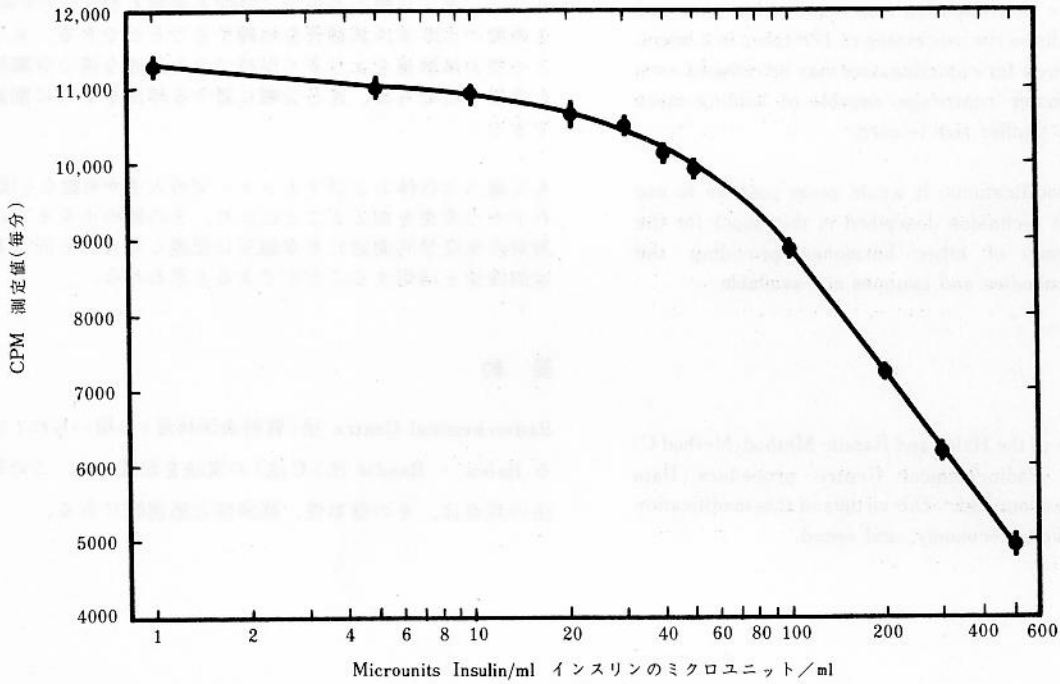


Figure 1 Standard curve. The heat-killed bacterial suspension used was prepared as described in Method A. Vertical lines represent ± 1 standard deviation.

図1 標準曲線。熱で殺した細菌懸濁液はA法に記述したとおりに調製した。垂直線は標準偏差 ± 1 を表わす。

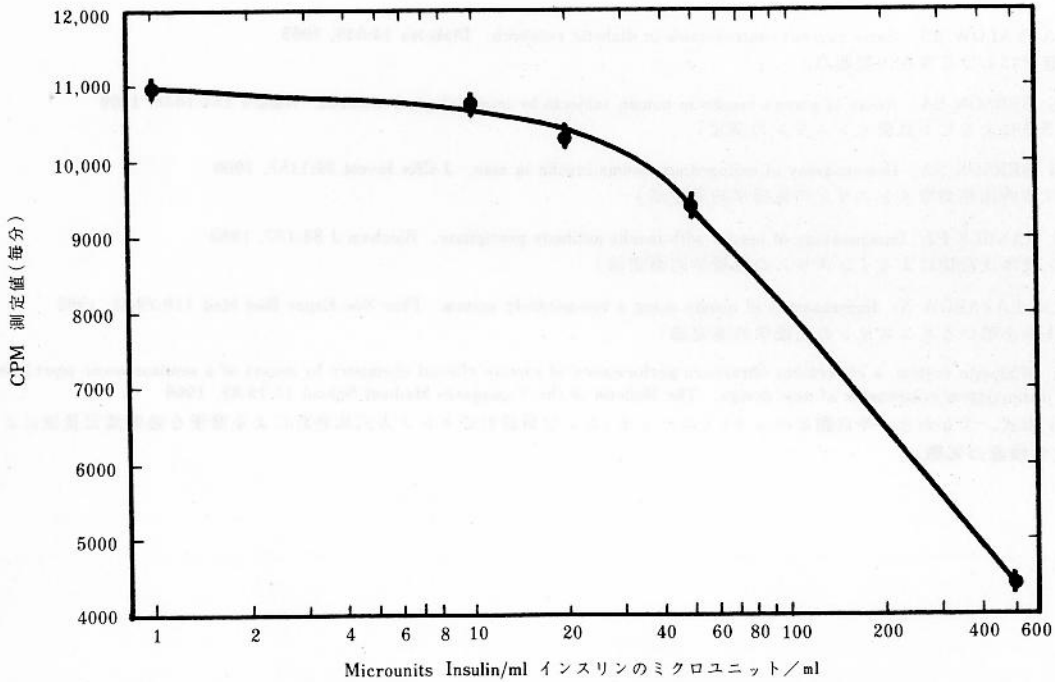


Figure 2 Standard curve. The heat-killed bacterial suspension was prepared as described in Method A. Vertical lines represent ± 1 standard deviation. This curve was prepared one week after the curve in Figure 1.

図2 標準曲線。熱で殺した細菌懸濁液はA法に記述したとおりに調製した。垂直線は標準偏差 ± 1 を表わす。
この曲線は図1の曲線の1週間後に作成した。

In addition, the centrifugation step requires less time and handling and allows the processing of 128 tubes in 2 hours. The time required for centrifugation may be reduced even further if a faster centrifuge capable of holding more test tubes of a smaller size is used.

With minor modifications, it would seem possible to use the same basic technique described in this paper for the radioimmunoassay of other hormones providing the appropriate antibodies and isotopes are available.

SUMMARY

A modification of the Hales and Randle Method (Method C) used in the Radiochemical Centre procedure (Data Sheet 5616) is described. The virtues of this modification lie in its simplicity, economy, and speed.

その上、遠心分離の過程では時間も手数も少なく済み、2時間で128本の試験管を処理することができる。もっと小型の試験管をより多く保持できる迅速な遠心分離機を使用したならば、遠心分離に要する時間をさらに削減できる。

もし適当な抗体およびアイソトープの入手が可能ならば、わずかな変更を加えることにより、その他のホルモンの放射性免疫学的測定にも本論文に記述したのと同じ基本的技法を活用することができると思われる。

要 約

Radiochemical Centre 法(資料表5616号)に用いられている Hales · Randle 法(C法)の変法を記述した。この変法の利点は、その簡易性、経済性と迅速性にある。

REFERENCES

参考文献

1. BERSON SA, YALOW RS: Some current controversies in diabetic research. *Diabetes* 14:549, 1965
(糖尿病の研究における現在の問題点)
2. YALOW RS, BERSON SA: Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. *Nature* 184:1648, 1959
(免疫学的方法によるヒト血漿インスリンの測定)
3. YALOW RS, BERSON SA: Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J Clin Invest* 39:1157, 1960
(人間における内因性血漿インスリンの免疫学的測定法)
4. HALES CN, RANDLE PJ: Immunoassay of insulin with insulin-antibody precipitate. *Biochem J* 88:137, 1963
(インスリン抗体沈殿物によるインスリンの免疫学的測定法)
5. MORGAN CR, LAZAROW A: Immunoassay of insulin using a two-antibody system. *Proc Soc Exper Biol Med* 110:29-32, 1962
(2つの抗体系を用いるインスリンの免疫学的測定法)
6. SASAKI M: Minipette system, a convenient ultramicro performance of routine clinical chemistry by means of a semiautomatic pipet (minipette) and a drain-system colorimeter of new design. *The Bulletin of the Yamaguchi Medical School* 13:19-33, 1966
(ミニベット方式、すなわち、半自動ピペット(ミニベット)および新設計のドレン方式比色計による簡便な超微量定量法による通常臨床化学検査の実施)