

生物学に関する実験例 — 生化学/医療に関する実験例

ラジオアッセイ法によるホルモン測定

[目的]

本実習では、放射免疫測定 (Radioimmunoassay, RIA) 法による血中インスリンとイムノラジオメトリックアッセイ (免疫放射測定 Immunoradiometric assay, IRMA) 法による血清中のレニンを定量を通して、今日用いられている種々のインビトロ検査法の原理並びに両者の違い等を理解する。

[理論]

ラジオアッセイとは、放射性同位元素で標識した抗原や抗体、又は生理活性物質等を用いて、これらが関与する特異的結合反応を行い、その結合結果から得られる放射能を測定することで物質の定量を行なう方法である。代表的なものとして、ラジオイムノアッセイ (放射免疫測定 Radioimmunoassay, RIA) 法とイムノラジオメトリックアッセイ (免疫放射測定 Immunoradiometric assay, IRMA) 法がある。

RIA 法は抗原—抗体反応をその測定原理とすることから、抗原、抗体および標識抗原による競合反応を利用する。これらの競合反応の結果、抗体と反応しなかった標識抗原 (F) または標識抗原—抗体結合体 (B) のうちいずれかの放射能を測定することにより、非標識抗原 (測定対象物であるインスリン) の定量が行える。

IRMA 法は抗原中の異なる 2 か所にそれぞれ結合する 2 種の抗体が用い、そのうち一方はポリスチレン (固相) などのビーズやチューブに固定、他方は ^{125}I などの放射性同位元素で標識されている。両抗体とも抗原の異なる箇所にも抗原抗体反応でそれぞれ結合し、「固相结合抗体—抗原—標識抗体」複合体が作られる。測定試料中の抗原量が増えるに伴い標識抗体、及び固相の放射エネルギーも増加することから、既知の標準抗原を用いて作製した標準曲線から抗原の定量を行なうことができる。なお、2 つの抗体で抗原をはさむことからサンドイッチ法とも呼ばれる。

1) RIA 法による血中インスリン量の測定

[準備]

実験器具	: マイクロピペット (100 μ L, 100 μ M)	各 1 本
	チップ	必要数
	試験管	必要数
	試験管立て	1 式
	アスピレータ	1 台
	ミキサー	1 台
実験機器	: 遠心分離器	1 台
	ガンマカウンタ	1 台

試薬の調製 (シアノリアインスリン) :

ヨウ化インスリン (^{125}I) 溶液

ヨウ化インスリン (^{125}I) 溶液をそのまま用いる (黄色)。

インスリン抗血清溶液

インスリン抗血清溶液をそのまま用いる (青色)。

第二抗体懸濁液

第二抗体懸濁液試薬を十分混和して用いる。

標準インスリン溶液

標準インスリン溶液 (0, 3, 30, 100, および 240 μ U) をそのまま用いる。

[操作]

(1) 標準インスリン溶液の添加 ;

0、3、10、100 および 240 μ U/mL の標準インスリン溶液を 0.1 mL ずつ標準曲線用試験管 (No 3~No 14) に入れる。

(2) 未知検体の添加 ;

未知検体用試験管 (No 15~) に未知検体 (血清) を 0.1 mL 入れる。

(3) ヨウ化インスリン (^{125}I) 溶液 (黄色) の添加 ;

No 1 および 2 を含む全ての試験管にヨウ化インスリン (^{125}I) 溶液を 0.1 mL ずつ加える。ただし、No 1 および 2 の総放射能測定用試験管はヨウ化インスリン (^{125}I) 溶液後、直ちに栓をして放射能測定時まで静置する。

(4) インスリン抗血清溶液 (青色) の添加 ;

No 3 以降の全ての試験管にインスリン抗血清溶液を 0.1 mL ずつ加え、十分混和する。

- (5) 第 1 インキュベーション；
20～30℃で 2 時間静置する。
- (6) 第二抗体懸濁液の添加；
第二抗体懸濁液を No 3 以降の全ての試験管に 1 mL ずつ加え、十分混和する。
- (7) 第 2 インキュベーション；
20～30℃で 30 分間静置する。
- (8) 遠心分離；
室温、2000 x g で 10 分間遠心分離する。
- (9) 上清の除去；
No 1 および 2 の試験管を除き、全ての試験管の上清をアスピレーション又はデカンテーションにより除去する。
- (10) 放射能の測定；
全ての試験管の放射能をガンマカウンタで測定する。
- (11) 標準曲線の作成；
 - ・標準インスリン 0 μ U/mL (No 3 および 4) から得られた平均放射能を B_0 とした場合の各試験管の $B/B_0(\%)$ を求める。
 - ・片対数グラフ用紙の横軸 (対数目盛) にインスリン濃度を、縦軸に $B/B_0(\%)$ 値をとり、上で求めた各標準インスリン溶液の $B/B_0(\%)$ をプロットし、標準曲線を作成する (図 1 参照)。
 - ・未知検体の $B/B_0(\%)$ を標準曲線に対応させ、検体中のインスリン濃度を求める。

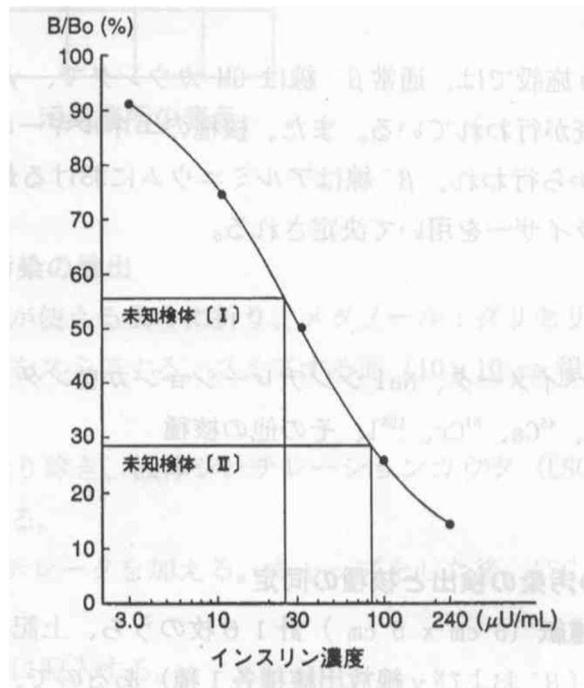


図1 RIA法でのインスリンの標準曲線

[データ処理]

- (1) 次式により各標準インスリン溶液の B/B_0 (%) を求める。

$$B/B_0 (\%) = \frac{\text{各標準インスリン溶液のカウント数 (B)}}{\text{(0 } \mu\text{U/mL)の標準インスリン溶液の平均カウント数 (B}_0\text{)}} \times 100$$

- (2) 片対数グラフ用紙の横軸（対数目盛）にインスリン濃度を取り、縦軸に B/B_0 (%) をとり、(1) で得た各標準インスリン溶液の B/B_0 (%) をプロットして標準曲線を作成する。
- (3) 未知検体についても同様に、次式により B/B_0 (%) を求める。
- (4) 未知検体の B/B_0 (%) を標準曲線に外挿し、検体のインスリン濃度を求める。

[考察への手引き]

- (1) 得られたインスリン値を正常値と比較し考察する。
- (2) Radioimmunoassay (RIA) と Immunoradiometric assay (IRMA) との相違点について考える。
- (3) 測定値に影響する因子にはどのようなものがあるかを考察する。

2) IRMA 法による血中レニン量の測定

[準備]

実験器具	: マイクロピペット (100 μ L, 200 μ L, 1000 μ L)	各 1 本
	チップ	必要数
	チューブ	必要数
	試験管立て	1 式
	アスピレーター	1 台
実験機器	: 恒温震盪器	1 台
	ガンマ・カウンタ	1 台

試薬の調製 (レニン IRMA) :

- (1) 各試薬は使用前に温室に戻し、泡立えないように混和し、液を均一にしてから用いる。
- (2) 検体は二重測定 (duplicate) するので、各濃度、各検体について試験管 2 本ずつを準備する。

[操作]

- (1) チューブに①～⑯番号を記入する。なお、①～⑩は標準曲線作成用、⑪～⑭は未知検体用、⑮及び⑯は Total coun 測定用とする。
- (2) ①及び②には 0 pg/mL の標準レニン溶液を 200 μ L ずつ秤取する。以下③及び④に 5 pg/mL の標準レニン溶液と、順次、⑨及び⑩までのチューブに各標準レニン溶液を 2 本ずつ、200 μ L 秤取する。
- (3) ⑪～⑭に未知検体 1 と 2 を 2 本ずつ、200 μ L 秤取する。
- (4) 全てのチューブにヨウ化レニン (125 I) を 100 μ L ずつ加える。
- (5) ①～⑭にレニン抗体ビーズを 1 個ずつ加える。
- (6) ①～⑭のチューブにキャップをつけ、恒温震盪器 (200～240 rpm) で室温で 3 時間インキュベートする。
- (7) ①～⑭のチューブの反応液を吸引除去、洗浄液 (精製水) 2 mL を入れ、チューブ内壁とビーズを洗浄し、洗浄液を吸引除去する。この操作を、さらに 2 回繰り返す。
- (8) 全ての放射能 (cpm) を、 γ カウンタを用いて測定 (1 分間) する。
- (9) 各標準レニン溶液の平均計数率 (B cpm) から 0 pg/mL の平均計数率 (B0 cpm) を差し引き、Total count の平均計数率 (T) に対する比を計算する (表 1～3)。

$$\text{計数率比 (\%)} = \{(B - B0)/T\} \times 100$$

- (10) 両対数グラフ用紙を用いて、レニン濃度 (pg/mL) を横軸に。各標準レニン溶液の計数率比 (%) を縦軸にとり標準曲線を作成する (図 1)。この標準曲線を用いて、未知検体の計数率比からレニン濃度を読み取る。

<操作手順プロトコール>

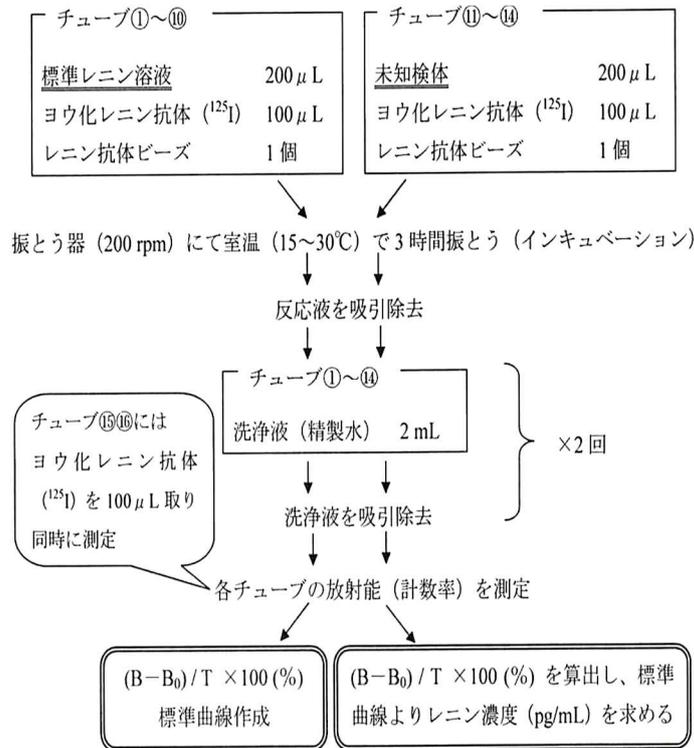


表1. 計算例

試験管 No.	検体	カウント数 (cpm)	カウント数 平均 (cpm)	B-B ₀ (cpm)	(B-B ₀)/T (%)	レニン濃度 (pg/mL)
01	Total Count (T)	127,345	127,669			
02		127,994				
03	標準試薬A (0 pg/mL) (B)	60	54			0
04		48				
05	標準試薬B (5 pg/mL)	580		526	0.41	5
06		547		493	0.38	
07	標準試薬C (20 pg/mL)	1,809		1,755	1.37	20
08		1,836		1,782	1.39	
09	標準試薬D (100 pg/mL)	8,689		8,635	6.76	100
10		8,919		8,865	6.94	
11	標準試薬E (500 pg/mL)	36,857		36,803	28.82	500
12		37,081		37,027	29.00	
13	コントロール 試薬I	5,628		5,574	4.36	63.7
14		5,612		5,558	4.35	63.5
15	コントロール 試薬H	23,647		23,593	18.47	287.2
16		23,754		23,700	18.56	288.7
17	被検血清	1,173		1,119	0.87	12.3
18		1,102		1,048	0.82	11.5
19	被検血漿	12,176		12,122	9.49	139.5
20		12,636		12,582	9.85	145.0

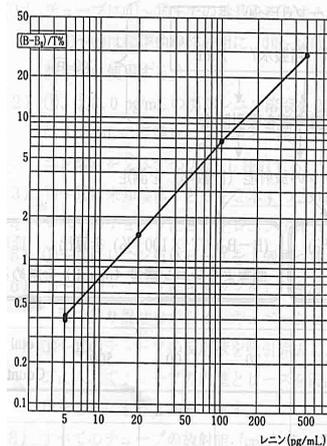


図1 レニン標準曲線

(表1 計算例をもとに作成した例)

- *参考正常値 ; 随時 : 3.2~36.3 (pg/mL)
 臥位 : 2.5~21.4 (pg/mL)
 立位 : 3.6~63.7 (pg/mL)

<結果のまとめ>

表2 標準曲線データ

レニン濃度 (pg/mL)	0	5	20	100	500	Total Count
計数率 (cpm)						
平均計数率 (B ; cpm)	(= B ₀)					(= T)
B-B ₀ (cpm)						
計数率比 (%)						

* 計数率比 (%) = (B-B₀) / T × 100

表3 未知検体データ

	未知検体 1	未知検体 2
計数率 (cpm)		
平均計数率 (cpm)		
B-B ₀ (cpm)		
計数率比 (%)		

[考察への手引き]

- (1) IRMA 法と RIA 法との相違点をまとめる。
- (2) レニンについて生理作用や疾患との関係を調べて記述する。
- (3) 参考正常値から、未知検体はどのような患者かを推定する。