

ラット C-ペプチドのエンザイムノアッセイ測定法の確立

Enzyme immunoassay for rat C-peptide

李 玲* 押田 芳治** 羅 偉 權***
中 尾 千登世* B-L. JOHANSSON**** J. WAHREN****
矢内原 昇*** 佐藤 祐造**

Ling LI*, Yoshiharu OSHIDA**, Weiquan LUO***
Titose NAKAO*, B-L. JOHANSSON****, J. WAHREN****
Noboru YANAIHARA***, Yuzo SATO**

Our previous studies suggest that C-peptide augments glucose utilization in diabetic rats. However, a reliable assay for rat C-peptide has not been available. In the present study, a sensitive and specific enzyme immunoassay for rat C-peptide has been developed. Effects of rat, pig, goat and fetal bovine sera on the standard curve were studied, and did not produced significant displacement. Rat C-peptide standard concentration ranged from 0.024-100 ng/ml. The intra-assay coefficient of variation (CV) was $3.9 \pm 2.2\%$ (less than 8%). The fasting and postprandial plasma C-peptide level in normal rat were 6.89 ng/ml and 13.28 ng/ml, respectively. Rat plasma C-peptide levels following oral glucose tolerance test in normal rats were consistent with expected patterns.

In conclusion, we have developed and validated a rat C-peptide enzyme immunoassay that is sensitive and simple for rat C-peptide in plasma. This assay provides a reliable tool for studies of diabetes using rat models.

はじめに

インスリンは膵 B 細胞でプレプロインスリンからプロインスリンを経て作られる。プロインスリンの分子構造中インスリン A 鎖と B 鎖を連結している部分が C-ペプチド (connecting peptide) と呼ばれている。プロインスリンは膵 B 細胞内で、等モルのインスリンと C-ペプチドに分解され、血中に放出される。これまで、C-peptide に生物学的活性は有さないと考えられてきたが、最近、インスリン依存型糖尿病 (IDDM) 患者に C-ペプチドをインスリン治療に

併用することで、マイクロアルブミン尿の減少や、血中 HbA_{1c} の低下、尿管細胞の Na⁺ - K⁺ ATPase 活性の改善などがみられたと報告されている¹⁻⁴⁾。

インスリンのアミノ酸配列は哺乳動物間では若干の差異を認められるが、類似性が高い。それに比して、C-ペプチドは動物種により、アミノ酸配列が大きく異なる。ヒト C-ペプチド測定系は確立されているが、ラット C-ペプチド測定系が確立されていないのが現状である。今回、われわれは酵素イムノアッセイ (ELA) 法にて、ラット C-ペプチド測定系の開発を試

* 名古屋大学大学院医学研究科社会医学系健康増進科学第一専攻

** 名古屋大学総合保健体育科学センター

*** 矢内原研究所

**** Department of Clinical Physiology, Karolinska Hospital, Stockholm

* Division of Health Promotion Science I, Graduate School of Medicine, Nagoya University

** Research Center of Health, Physical Fitness and Sports, Nagoya University

*** Yanaihara Institute Incorporation, Research and Development

**** Department of Clinical Physiology, Karolinska Hospital, Stockholm

みた。

対象および方法

1. 測定方法

まず、モルモット抗ウサギ IgG (second antibody) をプレートに固相化した (Fig. 1 の 1)。次に、この second antibody を固相化したプレートに、標準ラット C-ペプチド I または検体とビオチンで標識したラット C-ペプチド I 及びウサギ抗ラット C-ペプチド I 抗体 (first antibody) を加えて、競合反応をさせた (Fig. 1 の 2)。競合反応をさせたプレートに西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) で標識したストレプトアビジン (SA, ビオチンと非常に高い親和性を持つ糖蛋白質である) を入れて反応させた (Fig. 1 の 3)。最後に、OPD (o-phenylenediamine dihydrochloride) を含有している基質液を加えて、HRP 酵素反応を行い、この反応産物の吸光度をマイクロプレート用の吸光度測定器 (BIO-RAO 社製、Model 459) により 490nm の波長で読み取った (Fig. 1 の 4)。標準液または検体中のラット C-ペプチドの濃度が高いほど弱い酵素活性 (吸光度) を示した。標準液の吸光度をプロットして、標準曲線 (検量線) を作成し、検体の吸光度を検量線と対比させ、検体中ラット C-ペプチド濃度を算出した。なお、ラット C-ペプチド I 標準品とビオチン標識したラット C-ペプチド I およびウサギ抗ラット C-ペプチド I 抗体 (first antibody) は矢内原研究所にて合成及び精製した。モルモット抗ウサギ IgG (second antibody) は Organon Teknika 社より購入した。西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) で標識したストレプトアビジン (SA-HRP) は CALBIO CHEM 社より購入した。

2. 各試薬の調整

1) 基礎緩衝液

Dublecco's PBS (-) 9.6g と BSA 1.0g を蒸留水 1000ml に溶解した。

2) Second antibody 溶液

NaHCO₃ 8.4g と NaN₃ 0.5g を蒸留水 1000ml に溶解した。この溶液で Second 抗体

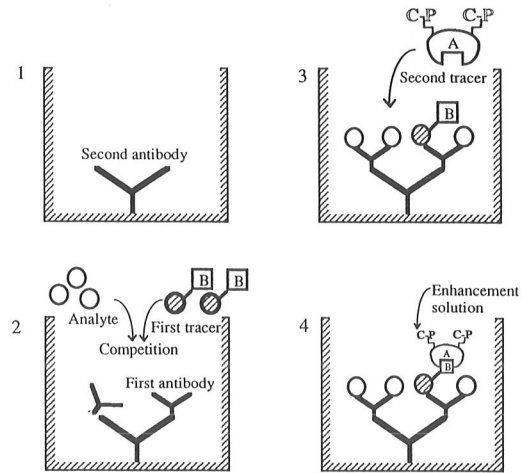


Fig. 1 The procedure for measuring rat C-peptide
 1: Anti-rabbit r-globulin (second antibody) is immobilized in a microtiter well.
 2: Biotinylated rat C-peptide (first tracer) and analyte are added to the well, where they react competitively with anti-C-peptide (first antibody). The first antibody is captured by the second antibody immobilized in the microtiter well.
 3: A fluorescent product is generated on the solidphase by adding streptavidin labeled HRP (second tracer).
 4: Enhancement solution is added, and the fluorescent complex, (second antibody)-(first antibody)-(first tracer)-(second tracer) is quantified by fluorometer. A and B mean avidin and biotin, respectively.

を 200 倍希釈した。

3) ブロッキング溶液

基礎緩衝液 1) をブロッキング溶液とした。

4) 洗浄液

0.9% NaCl と 0.05% Tween を蒸留水に溶解した。

5) first 緩衝液

1) 上記 1) 液に 5% Goat 血清を入れた。

6) ラット C-ペプチド I 標準抗原溶液 (用時調製)

ラット C-ペプチド I を上記 1) 液で 100 ng/ml, 25 ng/ml, 6.25 ng/ml, 1.56 ng/ml

0.39 ng/ml, 0.097 ng/ml, 0.024 ng/ml, 0

ラット C- ペプチドのエンザイムノアッセイ測定法

ng/ml (ゼロブランク) 各標準抗原溶液を調製した。

7) ビオチン標識したラット C- ペプチド I 溶液 (用時調製)

上記 1) 液で 60,000 倍希釈する。

8) first 抗体溶液

上記 1) 液で first antibody を 2000 倍希釈する。

9) HRP 標識ストレプトアビジン (SA-HRP) (用時調製)

上記 1) で 150,000 倍希釈する。

10) 基質溶液

酵素反応基質溶液 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (23.89g)

とクエン酸・ H_2O (7.0g)、過酸化水素 (0.5ml) を蒸留水 1000ml に溶解した) 11ml に対して、OPD 10mg を加えて溶解した。

11) 反応停止液

蒸留水 170ml に濃硫酸 (10ml) を加え、反応停止液とした。

3. 経口グルコース負荷試験 (OGTT)

Wistar 雄性ラット 8 週令 (体重 250 ~ 280g) に既報のごとく⁵⁾、頸動脈と頸静脈にカテーテルを挿入した。手術一週間後、無拘束下で、2g/kg のグルコースを経口投与し、糖負荷試験を行った。糖負荷前及び負荷後 30 分、60 分、120 分に頸静脈カテーテルより 0.7ml ずつ採血し、血糖、インスリン、C- ペプチドを測定用に供した。血糖値は電極法にて、インスリンは RIA 法にて各々測定した。また、C- ペプチドは前述した手順で、(Fig. 2) 測定した。

成 績

1. 標準曲線

標準曲線の 1 例を Fig. 3 に示したが、TriPLICATE によって求められた標準曲線における各点の C. V. (変動係数) は 1.1% ~ 7.8% で、平均 $3.9 \pm 2.2\%$ (Mean \pm SD) と小さく、精度の良好な標準曲線が得られた。この標準曲線より検出可能なラット C- ペプチドの最小検出量は

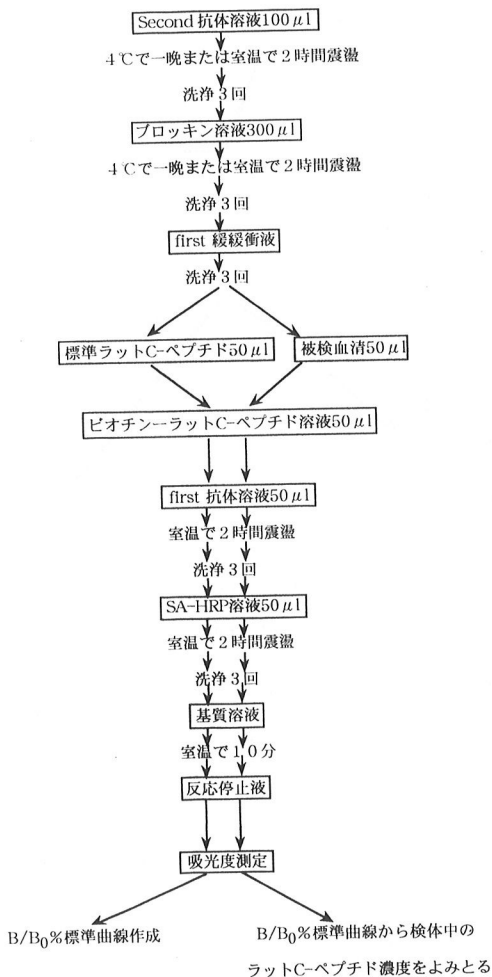


Fig. 2 Operation for rat C-peptide measurement.

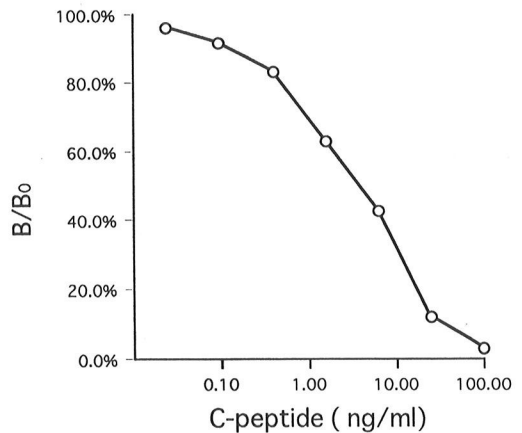


Fig. 3 Standard curve of rat C-peptide assay.

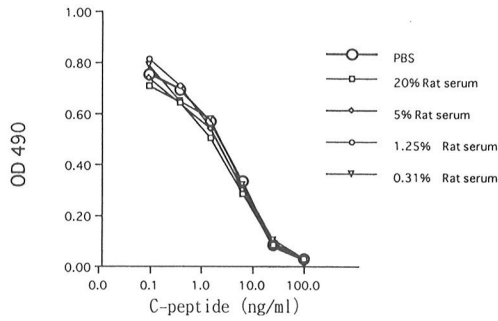


Fig. 4 Effects of rat sera on the standard curve.

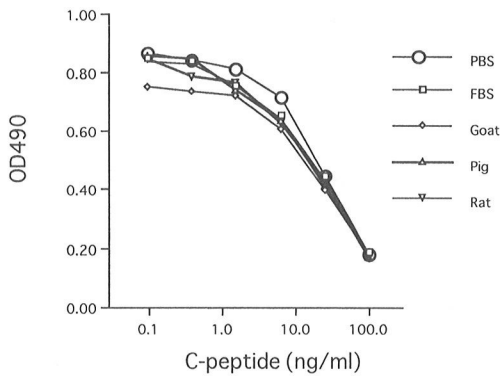


Fig. 5 Effects of rat, pig, goat and fetal bovine sera (FBS) on the standard curve.

0.024ng/mlであった。

2. ラット血清の標準曲線への影響について

標準ラットC-ペプチドIを希釈するに用いられる基礎緩衝液1)の中に、それぞれ20%、5%、1.25%、0.31%のラット血清を添加して、ラット血清による標準曲線への影響を検討したが、Fig. 4に示したごとく、ラット血清による影響が認められなかった。

3. ヤギ、ウシ、ブタ血清の標準曲線への影響について

標準ラットC-ペプチドIを希釈するに用いられる基礎緩衝液1)の中に、それぞれ5%のヤギ、ウシ、ブタ血清を加えたが、標準曲線は影響されなかった(Fig. 5)。

4. 糖負荷試験前後の血中C-ペプチド濃度

糖負荷試験前後の血糖、血中インスリンおよ

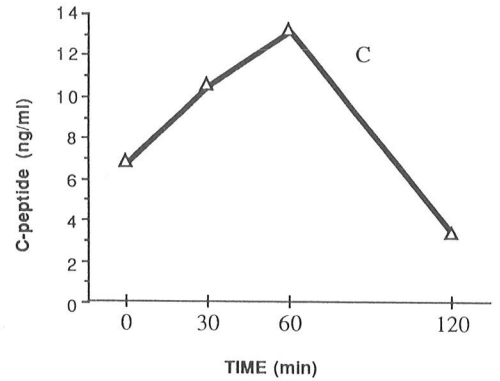
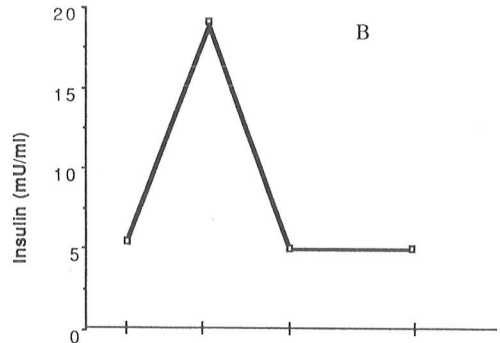
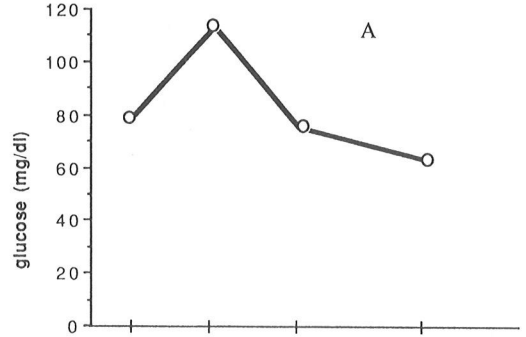


Fig. 6 Changes in plasma glucose (A), plasma insulin (B), and plasma C-peptide (C) levels during oral glucose tolerance test (OGTT) in normal rats.

びC-ペプチドの変動をFig. 6のに示した。インスリン血中濃度のピークは糖負荷後30分後であったのに対して、C-ペプチド血中濃度のピークは糖負荷後60分後であった。

考 察

これまで、C-peptide は内分泌代謝学上生物学的活性を有さず、IDDM など内因性インスリン分泌能の指標として利用されてきたにすぎなかった。しかしながら、最近 IDDM 患者に C-peptide を投与し、短期的にはマイクロアルブミン尿の消失や腎機能の改善効果が、長期的には、グリコヘモグロビン A_{1c} の低下がそれぞれ報告され、その有効性が注目されている¹⁻³⁾。また、我々すでに糖尿病ラットにヒト C-ペプチドを投与し、血中濃度が生理的レベルの 10 倍以上に達した際に、インスリン抵抗性が改善された成績を報告した⁶⁾。さらに、最近糖尿病ラットを用いて、C-ペプチドがインスリン感受性を増大させる成績を認めた⁷⁾。しかしながら、ラット C-ペプチド測定系は確立されていないのが現状である。インスリンのアミノ酸配列には動物種による差は少ないが、C-ペプチドは動物種により異なっており⁸⁾、ヒト C-ペプチド測定系ではラット C-ペプチドは感知されない。

ラットの C-ペプチドには二種類の C-ペプチド I と C-ペプチド II があるが、その構造上の相違は 8 番と 15 番アミノ酸残基に認められたにすぎず⁹⁾、C-ペプチド I に対する抗体は C-ペプチド I と C-ペプチド II に対し、ほぼ 100% 反応することが報告されている¹⁰⁾。そこで今回は C-ペプチド I に対する抗体を用い、検討を行った。ラット、ヤギ、ウシ、ブタ血清は標準曲線に影響をおよぼさず、標準曲線の B/B₀% は標準 C-ペプチド 0.024 ~ 25ng/ml 範囲で極めて良好な感度を示した。

本測定系を用い、グルコース負荷試験後の C-ペプチド変動を検討したところ、C-ペプチドのピークはインスリンの負荷後 30 分のピークに比して、60 分と明らかに遅延していた。この成績は Jones らが最近 RIA 法で報告した結果と同一であった¹⁰⁾。したがって、今回開発した測定系はラット C-ペプチドの測定に極めて有用であると思われる。なお、インスリンと C-ペプチドのピーク出現時間の差は両者の代

謝過程の相違に由来するものと考えられる¹¹⁾。

結 語

今回、検討したラット C-ペプチドの EIA 測定系はラット C-ペプチド測定に極めて有用であると考えられる。

参 考 文 献

- 1) Johansson, B-L., Sjöberg, S. and Wahren, J. The influence of human C-peptide on renal function and glucose utilization in Type 1 (insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia* 35: 121-128. 1992.
- 2) Johansson, B-L., Linde, B. and Wahren, J. Effects of C-peptide on blood flow, capillary diffusion capacity and glucose utilization in exercising forearm of Type 1 (insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia* 35: 1151-1158. 1992.
- 3) Johansson, B-L., Kernell, A., Sjöberg, S. and Wahren, J. Influence of combined C-peptide and insulin administration on renal function and metabolic control in diabetes Type 1. *J Clin Endocrinol & Metab* 77: 976-981. 1993.
- 4) Ohtomo, Y., Aperia, A., Sahlgren, B., Johansson, B-L., and Wahren, J. C-peptide stimulates rat renal tubular Na⁺, K⁺-ATPase activity in insulin synergism with neuropeptide Y. *Diabetologia* 39: 199-205. 1996.
- 5) 李玲、押田芳治、加古真実、島戸真司、大崎暢子、佐藤祐造。覚醒時と麻酔下におけるインスリン感受性の比較検討。総合保健体育科学 19 (1): 67-70. 1996.
- 6) Wu, W., Oshida, Y., W-P. Y., Li, L., Ohsawa, J., Sato, J., Iwao, S., B-L. Johansson, Wahren, J. and Sato, Y. Effect of C-peptide administration on Whole body glucose utilization in STZ-induced diabetic rats. *Acta Physiol Scand* 157: 253-258. 1996.
- 7) Sato, Y., Oshida, Y., Li, L., Sato, J., Johansson, B-L., and Wahren, J. Effect of rat C-peptide on in vivo insulin action in diabetic rats. *Diabetologia*. 39: A181. 1996.
- 8) Linde, S., Nielsen, JH., Hansen, B., and Welinder, BS. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic analyses of insulin in isolated rat and mouse islets. *J Chromatog* 462: 243-249. 1989.
- 9) Yanaihara, N., Yanaihara, C., Sakagami, M., Sakura, N., Hashimoto, T., Nishida, T. Syntheses of C-peptides and human proinsulin. *Diabetis* 27 (Suppl): 149-160. 1978.

- 10) Akpan, J-O., Weide, L-G., and Gingerich, R-L. A specific and sensitive radioimmunoassay for rat C-peptide. *International Journal of Pancreatology*. 13 (2): 87-95. 1993.
- 11) 松田文子 血中 C-ペプチド 日本臨床 48 卷 (1990 年増刊号) 糖尿病 (上巻) 284-292. 1990.

(1996 年 12 月 9 日受付)