

溶血のインスリンリセプターアッセイに対する影響

川崎医科大学 内分泌内科

(指導：堀野正治教授)

米 田 正 也

(昭和61年2月28日受付)

Influence of Hemolysis on the Insulin Receptor Assay of Human Erythrocytes

Masaya Yoneda

Division of Endocrinology, Department of Medicine

Kawasaki Medical School

(Accepted on February 28, 1986)

赤血球のインスリンリセプターアッセイは、糖尿病患者のインスリンのリセプターの臨床研究に広く用いられてきた。今回、インキュベーション中の部分的な溶血によるリセプターアッセイへの影響を検討した。その結果、hemolysisは、赤血球の細胞内腔の radioactivity を増加させ、細胞壁に結合した radioactivity を減少させた。このことはインキュベーションの条件によっては、必ずしも赤血球の total としての radioactivity を増加させるとはかぎらなかった。10°Cでは、hemolysateの有無は赤血球全体の radioactivity に影響をおよぼさなかった。このことは、hemolysate (+) のグループでは、細胞内腔の radioactivity の増加が細胞膜の radioactivity の減少を補っており、見かけ上 hemolysate (-) のグループの radioactivity と差がみられなかった。37°Cでは、hemolysate (+) グループは細胞内腔の radioactivity の増加が著明で、total としても hemolysate (-) グループに比して著しく大であった。

以上より、たとえ10°Cのインキュベーション条件下でも、インスリンリセプターアッセイの研究を行う時は、溶血の厳密な管理が重要である。

The human erythrocyte receptor assay has been widely used in clinical studies of diabetes patients. I studied the effects of partial hemolysis during incubation on the receptor assay. The results showed that hemolysis increases radioactivity in intracellular space and decreases cell-wall bound radioactivity. It did not always markedly change total cell-associated radioactivity. At 10°C, both hemolysate (+) and (-) groups appear to have almost the same radioactivity of erythrocytes. In the hemolysate (+) group, increasing of intracellular space radioactivity balanced the loss of cell-wall bound, and the total radioactivity was nearly equal to that of the hemolysate (-) group. At 37°C, the intracellular space radioactivity of the hemolysate (+) group was far larger than the loss of cell-wall bound radioactivity so that the total was exceedingly high.

It is suggested that hemolysis should be avoided even at incubation temperature of 10°C studies concerning to the insulin receptor assay.

Key Words ① Insulin receptor assay ② Hemolysis

はじめに

Gambhir ら^{1),2)} が 1977 年にヒト赤血球についてインスリンリセプターアッセイを報告して以来、赤血球は最も簡単な材料として、糖尿病患者のインスリンリセプターやインスリンの生物学的活性に関する臨床的研究に広く用いられてきた。赤血球の場合インキュベーションの条件は、非生理的な 15°C が用いられることが多い。そして、より生理的温度に近い 30°C、もしくは 37°C では、インスリンの赤血球への結合の経時変化が、他の細胞と全く異なったパターンを示すことが報告されている。^{3)~5)} また、赤血球はインスリンの internalization の有無に関しても異論が多く、リセプターアッセイにも注意すべき点が多いものと考えられる。

今回、インスリンリセプターアッセイのインキュベーション中に、しばしばおきる hemolysis のインスリンリセプターアッセイにおける影響について、若干の検討を行った。

材料および方法

Biosynthetic human insulin (Lot No. 46L-295) は、Lilly 社より提供を受けた (Indianapolis, Indiana, U. S. A.). ¹²⁵I-insulin は、クロロミン T 法を用いて標識し、Sephadex G 50 と G 200 を用いて、ゲル濾過後実験に用いた。⁶⁾

血液サンプルは標準体重の ±10% 以内の正常者について、早朝空腹時に採血して直ちに実験に用いた。

(1) 赤血球浮遊液；赤血球は Gambhir らの方法を用いて分離した。^{1),2)} Buffer には、pH 8.0 の Buffer G (50 mM HEPES, 50 mM Tris, 10 mM MgCl₂, 2 mM EDTA, 10 mM dextrose, 10 mM CaCl₂, 50 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.1% BSA) を用いた。赤血球数の計測は、ZBi 型のコールターカウンターを用いた。

(2) hemolysate；上記の赤血球浮遊液を超音波で溶血させた後、20,000 × g で 60 分、4°C の条件下で遠心し、上清を以下の実験に用いた。

(3) 赤血球とインスリンのインキュベーション；全ての赤血球のインスリンリセプターアッセイは、以下の方法で行った。1,000 μl の赤血球浮遊液 (4.6 × 10⁹ cells/ml；Buffer G) は、50 μl の ¹²⁵I-insulin (500 pg；specific activity 100~200 Ci/g) および 100 μl の hemolysate (hemoglobin 濃度 7.0 g/dl) もしくは等量の Buffer G をタイヨーパーソナル water bath を用いてインキュベーションした。振幅は 30 mm で、振動数は 60/min のレシプロ振とうの条件で行った。インキュベーション後に、このうち 300 μl をあらかじめ氷冷した Buffer G 3 ml と 500 μl の dibutyl phthalate の入ったプラスチックチューブに移し、4°C 1,900 × g で 10 分遠心し、Buffer G と dibutyl phthalate の層をピペットで吸引し、赤血球の放射能を測定した。なお、インキュベーションを除いた全ての操作は、4°C の cold room で行った。

実験 1；2 つの異なった温度と hemolysate の有無による赤血球結合放射能の time course の検討。4 つの条件下でインキュベーションを行った。

A；hemolysate を加えず、10°C でインキュベーション。

B；hemolysate を加え、10°C でインキュベーション。

C；hemolysate を加えず、37°C でインキュベーション。

D；hemolysate を加え、37°C でインキュベーション。

各々のグループで 1, 2, 3 および 5 時間のインキュベーションを行った。

実験 2；赤血球に結合した radioactivity の

うち膜に結合したものと、細胞膜内腔のものを区別するため、実験1のAからDの4グループの5時間のサンプルにつき ghost を作り、以下の方法で細胞内腔の radioactivity を計算した。

赤血球細胞内腔の radioactivity = 赤血球全体の radioactivity (a) - ghost に結合している radioactivity (b)

赤血球の ghost は、低張溶血法を用いて作成した。⁷⁾ それぞれのインキュベーション後、赤血球浮遊液の 300 μ l (46 \times 10⁹ cells/ml) を、あらかじめ氷冷した 6 倍量の、20 OsM pH 7.6 の Tris buffer に加え、Voltex ミキサーを用いて 5 分間攪拌した。

Hemolysate は、4°C 2,000 g で 30 分遠心し、上清をとり除いた。以上の操作は、4°C の cold room で行った。

(4) ¹²⁵I-insulin の degradation;

a; ¹²⁵I-insulin と赤血球浮遊液を、37°C で 3 時間インキュベーションした。

b; ¹²⁵I-insulin と赤血球浮遊液を、37°C で 3 時間 hemolysate とともにインキュベーションした。

c; ¹²⁵I-insulin と赤血球浮遊液を、15°C で 3 時間 hemolysate とともにインキュベーションした。

以上の a, b, c, の 3 つの条件の実験のうちに、4°C 1,900 \times g で遠心後上清 50 μ l を標準ポリアクリルアミドゲル電気泳動し,⁸⁾ -80°C でコダック AR film を用いて、autoradiography を行った。

結 果

実験1; 2 つの異なる温度と hemolysate の有無による赤血球結合放射能の time course の検討。

37°C のインキュベーションでは、hemolysate を加えたグループの赤血球に結合した ¹²⁵I-insulin の radioactivity は、1 時間で 24.8 \pm 2.0 % (mean \pm SD) まで上昇した。その後やや低

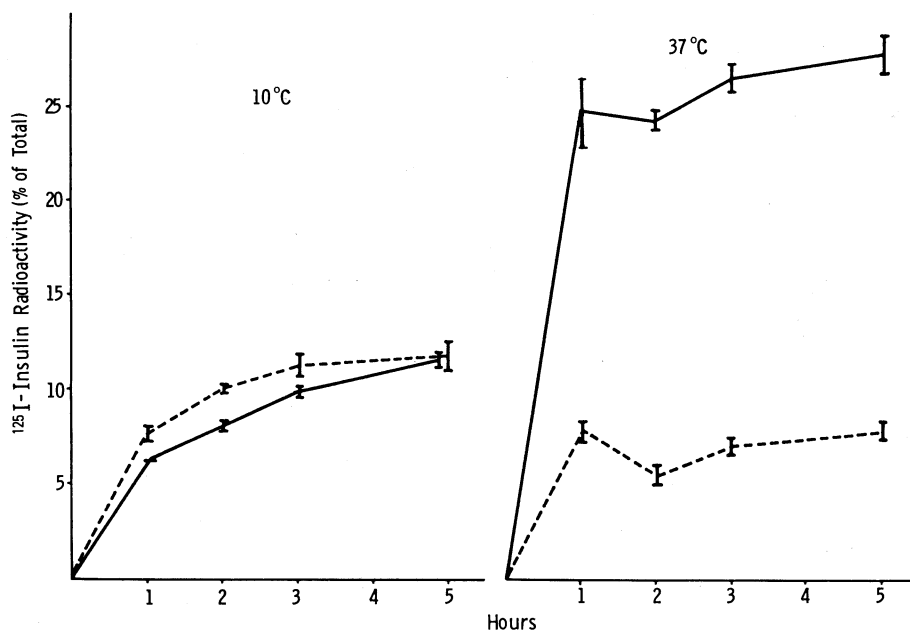


Fig. 1. Effects of hemolysate on cell-associated radioactivity of ¹²⁵I-insulin at two different temperatures.

Time course studies of cell-associated radioactivity of erythrocytes at 10°C and 37°C were shown.

Solid Line; Hemolysate (+)

Broken Line; Hemolysate (-)

下傾向を示し、再びゆっくり上昇し、5時間後には、 $27.9 \pm 1.1\%$ を示した。これに比し、hemolysateを加えなかったCグループでは、赤血球に結合した ^{125}I -insulinのradioactivityは、1時間後 $7.9 \pm 0.6\%$ で、2時間めにはやはり軽度低下を示し($5.5 \pm 0.8\%$)、その後再び上昇し、5時間後には、 $7.9 \pm 0.8\%$ となった。10°Cでは、hemolysateを入れなかったグループと、入れたグループでは、赤血球に結合した ^{125}I -insulinのradioactivityは同様の増加傾向を示した。

実験2；赤血球に結合したradioactivityの分布。

37°Cでhemolysateとインキュベーションしたグループでは、 ^{125}I -insulinのradioactivityは平均2.9%が細胞膜に結合しているのみで、27.4%は、細胞内に存在していた(Fig. 2-D)。しかしながら、hemolysateを加えなかったグループでは、全体のradioactivityの半分の3.9%が膜に結合しており、細胞腔内のもは3.9%にすぎなかった(Fig. 2-C)。

10°Cのインキュベーションでは、hemolysateを加えなかったグループでは、 ^{125}I -insulinのradioactivityの12.5%が膜に分布しており、細胞腔内のradioactivityは、ほとんど0を示した(Fig. 2-A)。これに比してhemolysateを加えたグループでは、 ^{125}I -insulinのradioactivityの5.4%が膜に分布しており、6.2%が細胞腔内にあった(Fig. 2-B)。

実験3； ^{125}I -insulinのdegradation.

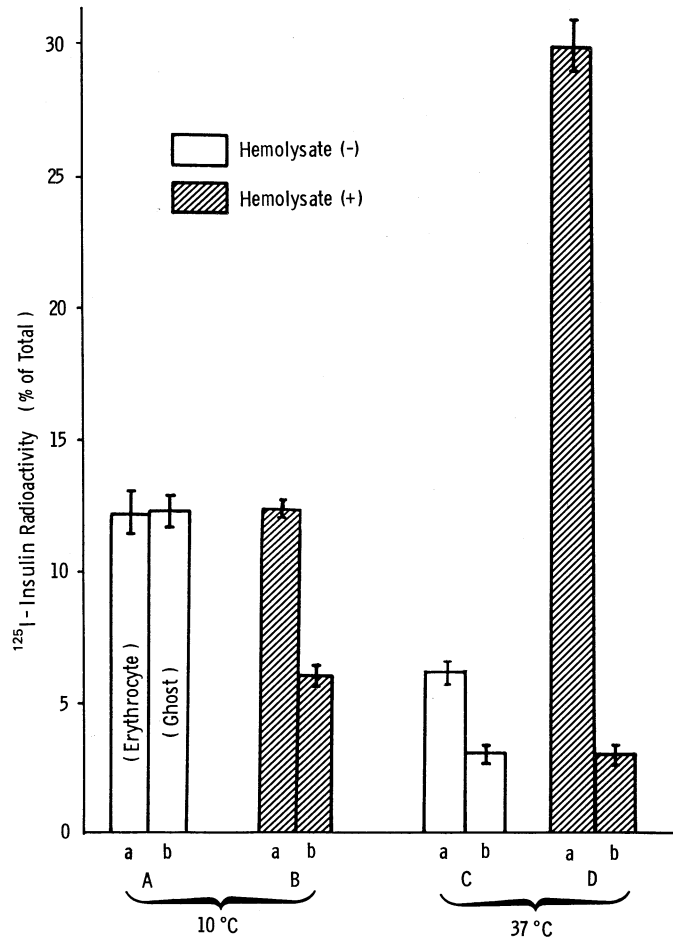


Fig. 2. Erythrocyte and its ghost associated radioactivity.

A-a; Erythrocyte associated radioactivity, Without hemolysate

A-b; Erythrocyte ghost associated radioactivity, Without hemolysate

B-a; Erythrocyte associated radioactivity, With hemolysate

B-b; Erythrocyte ghost associated radioactivity, With hemolysate

C-a; Erythrocyte associated radioactivity, Without hemolysate

C-b; Erythrocyte ghost associated radioactivity, Without hemolysate

D-a; Erythrocyte associated radioactivity, With hemolysate

D-b; Erythrocyte ghost associated radioactivity, With hemolysate

^{125}I -insulinと赤血球浮遊液を37°Cで3時間インキュベーションすると、hemolysate存在下では、Buffer G中の ^{125}I -insulinは、ほとんど完全に分解されていた(Fig. 3-b)。一方、hemolysateを加えなかった場合、37°C 3時

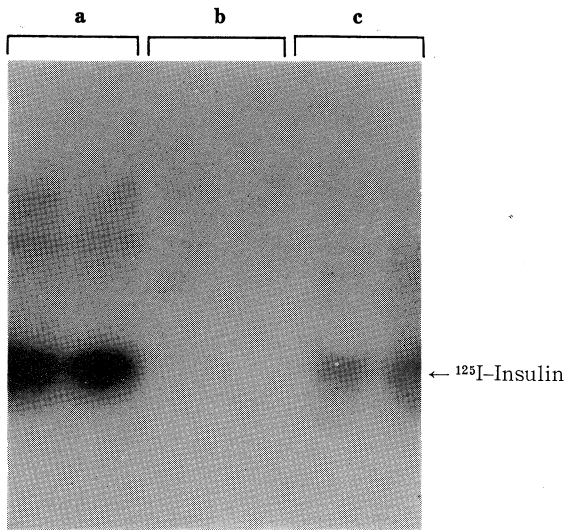


Fig. 3. Autoradiogram showing the degradation of ^{125}I -insulin.

- a; Without hemolysate, 37°C
 b; With hemolysate, 37°C
 c; With hemolysate, 15°C

間のインキュベーションでも、 ^{125}I -insulin はほとんど分解を受けないことがわかった (**Fig. 3-a**). 15°C の条件でも、hemolysate の存在下では、 ^{125}I -insulin は前二者の中間程度の分解を受けた (**Fig. 3-c**).

考 案

実験1の結果より、 37°C の生理的なインキュベーション条件においても、hemolysate が存在しない場合は、赤血球への ^{125}I -insulin の結合は、著明な上昇を示さなかった。一方、hemolysate を加えてインキュベーションしたものでは、1時間以内に著明な ^{125}I -insulin の radioactivity の上昇が観察された。これに比して、 10°C でインキュベーションしたものは、hemolysate の有無にかかわらず、赤血球に結合した radioactivity は大差を示さなかった。

インキュベーションに、非生理的な 10°C や 15°C などの低い温度条件を使う場合には、hemolysis のインスリンと赤血球の結合におよぼす影響は、無視できるように考えられる。しかし、実験2の結果からみると、 10°C のイン

キュベーションでは、total としての赤血球に結合した ^{125}I -insulin の radioactivity (みかけ上の結合)は類似しているにもかかわらず、その分布においては、著明な差が認められた。すなわち、hemolysate を加えたグループでは、 10°C では、全体の半分以上の radioactivity が、 37°C では、ほとんどの radioactivity が膜に結合していないので、赤血球の total としての radioactivity は、リセプターの数や、その親和性を表していないものと考えられる。

一方、Kolb, H. J. と Standl, E. は、⁹⁾ high sensitive な insulin protease を、ヒト赤血球 hemolysate より精製したと報告しているが、本実験3でも、 ^{125}I -insulin は 37°C , hemolysate の存在下でほぼ完全に分解されることを確認した。さらに、 15°C でも高度の分解を受けている。つまり、一般的に最も良く使われる 15°C のインキュベーション条件下においても、hemolysis があれば ^{125}I -insulin は分解を受けることを示している。 ^{125}I -insulin の分解物が、赤血球内に入ると仮定すれば、この結果は実験2の結果とよく一致すると思われる。また、 10°C のインキュベーションで hemolysate のないものでは、細胞内の radioactivity が全くなく、 ^{125}I -insulin のリセプターによる internalization は、起こっていないことを示している。一方、hemolysate を加えたものでは、1/2以上が細胞内腔に存在するが、これは、hemolysate で degradation を受けた ^{125}I -insulin の radioactivity のある部分が、インスリンリセプターの internalization を介さず、細胞内に入ったものと考えられる。 37°C の条件においても、hemolysate を加えたグループでの細胞内腔の radioactivity の上昇は、大部分上記と同様の機序によると思われる。また、 37°C で hemolysate を加えなかったグループでは、 ^{125}I -insulin の radioactivity の 3.7% が細胞内腔に入っている。しかし、この3.7%の radioactivity は、hemolysate を加えたグループの 1/7 であり、微量の溶血が起こったことによる可能性も

考えられる(別の実験によるデータでは, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の微量の濃度の hemolysate でも, インスリンリセプターアッセイに影響を与えた).
以上, 赤血球のインスリンリセプターアッセ

イが日常検査化されつつある現在, 溶血に対する厳密な監視が必要であり, それが不十分であれば, 測定結果の信頼性に影響をうけるものと考えられる.

文 献

- 1) Gambhir, K. K., Archer, J. A. and Carter, L.: Insulin radioreceptor assay for human erythrocytes. *Clin. Chem.* 23: 1590—1595, 1977
- 2) Gambhir, K. K., Archer, J. A. and Bradley, C. J.: Characteristics of human erythrocyte insulin receptor. *Diabetes* 27: 701—708, 1978
- 3) Gambhir, K. K., Nerurkar, S. G. and Archer, J. A.: Post-receptor transport and degradation of insulin in human erythrocytes. *Clin. Res.* 30: 392A, 1982
- 4) Gambhir, K. K., Nerurkar, S. G. and Das, P. D.: Insulin binding and degradation by human erythrocyte at physiological temperature. *Endocrinology* 109: 1787—1789, 1981
- 5) Nerurkar, S. G. and Gambhir, K. K.: Insulin degradation by human erythrocyte lysates. *Clin. Chem.* 27: 607—609, 1981
- 6) Horino, M., Machlin, L. J., Hertelendy, F. and Kipnis, D. M.: Effect of short-chain fatty acid on plasma insulin in ruminant and nonruminant species. *Endocrinology* 83: 118—128, 1968
- 7) Hanahan, J. D. and Ekholm, E. J.: The preparation of red cell ghosts (membranes). *Methods Enzymol.* 31: 168—172, 1974
- 8) 長 裕子: 電気泳動のすべて, 月刊 Medical Technology 編. 東京, 医歯薬出版. 1980, pp. 54—58
- 9) Kolb, H. J. and Standl, E.: Purification to homogeneity of insulin degrading enzyme from human erythrocyte. *Hoppe-Seyler's Z Physiol. Chem.* 361: 1029—1039, 1980