

《ノート》

Trypsin Radioimmunoassay Kit の基礎的および臨床的検討

Fundamental and Clinical Evaluation of Trypsin Radioimmunoassay Kit

野口 正人* 中島 言子* 安達 秀樹** 吉井 正雄**
 光野 重根** 鈴木 敏*** 鳥塚 莞爾*

Masato NOGUCHI*, Kotoko NAKAJIMA*, Hideki ADACHI**, Masao YOSHII**,
 Shigene KONO**, Takashi SUZUKI*** and Kanji TORIZUKA*

*Department of Nuclear Medicine, **Radiology and ***First Division of Surgery,
 Kyoto University School of Medicine, Kyoto

I. はじめに

血中トリプシンの測定は従来酵素学的方法で試みられていたが、血中に同時に存在するトリプシン・インヒビター (α_1 -antitrypsin, α_2 -macroglobulin, inter- α -trypsin) のために、その正確な測定は困難であった。また従来から、膵疾患の診断に利用されているアミラーゼの測定は臓器特異性に欠ける¹⁾ という問題点を有している。したがって測定操作が簡便で臓器特異性を有するトリプシンの radioimmunoassay (RIA) の開発は臨床的に重要な意味を持っている。

RIA によるトリプシン血中濃度の測定は、1971年 Temler ら²⁾ が最初に行なって以来、数多くの報告がみられる³⁻⁶⁾。近年その測定に RIA キットが使用されるようになり、その臨床的応用が検討されている。

今回著者らは Trypsin Radioimmunoassay Kit (CIS-Sorin; ミドリ十字社) を使用する機会を得て、

その基礎的検討、臨床的検討を行なったのでその成績および知見を報告する。

II. 方法および対象

本キットの特徴は、1) 測定に要する時間が短いこと、2) 結合型トリプシン (B) と遊離型トリプシン (F) の分離にポリエチレングリコールを用いていることである。

測定方法はキットに添付された使用説明書に従ったが、その概略は次の如くである (Fig. 1)。

(1) 被検血清または標準トリプシン液 0.1 ml ¹²⁵I 標識トリプシン 0.1 ml, 抗トリプシン血清 0.1 ml を試験管内で混合し、室温で1時間インキュベートする。

(2) 氷浴中で冷却した 20% ポリエチレングリコールを 1 ml 添加し、攪拌した後15分間放置する。

(3) 試験管を室温で 3000 rpm, 10分間遠沈して B/F 分離を行なう。

(4) 上清液 (F) を吸引除去し、沈殿 (B) を autogamma counter で計測する。

(5) 各測定値から background を引き、0 standard に対する標準トリプシン系 (B) の割合より標準検量線を作成して、その曲線から被検血清のトリプシン値を読み取る。

Key words: radioimmunoassay, Trypsin, Trypsinogen, pancreatic disease, renal failure.

* 京都大学医学部核医学科

** 同 放射線科

*** 同 第一外科

受付: 56年10月23日

最終稿受付: 57年1月8日

別刷請求先: 京都市左京区聖護院川原町 54 (☎ 606)

京都大学医学部核医学科

野口 正 人

測定はすべて duplicate で行ない、検体はすべて血清分離後測定まで -20°C に保存した。

血清アミラーゼの測定はヨード・デンブンプン比色法を用いた日立オートアナライザー(日立726)で行なった。

対象は、健常人58名(18~70歳)、手術にて確認し得た膵癌10名および慢性膵炎6名、急性膵炎4名、内視鏡的逆行性膵管造影(ERPG)実施患者7名、そして腹部症状のない人工透析患者23名、溶血性貧血7名、鉄欠乏性貧血39名、Banti 症候群6名、肝疾患70名、糖尿病8名、計238名である。

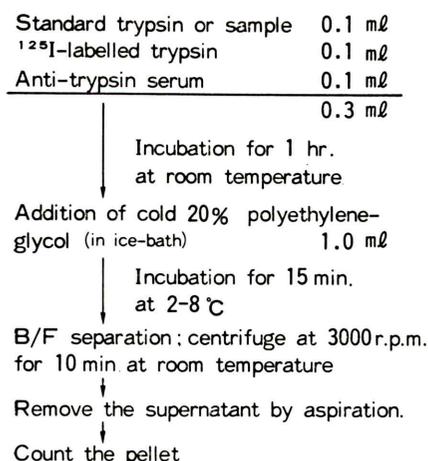
以下、文中の測定値は特記したもの以外すべて平均値±標準偏差で記載した。

III. 成績

1. Trypsin Radioimmunoassay Kit の基礎的検討

a) 標準曲線

Fig. 2 に B/F 分離後の沈殿をそのまま計測した場合と、洗浄操作を加えて計測した場合のおおの標準曲線とおおの方法で測定した4検体の測定値を示した。Total count に対する結合率は洗浄した場合低くなるが、両標準曲線はほぼ



$$\text{B}/\text{Bo} (\%) = \frac{\text{Average of Std. or Sample (cpm)}}{\text{Average of O standard (cpm)}} \times 100$$

Fig. 1 Radioimmunoassay procedure of trypsin.

平行した。また4検体の読取値は両者で同様の値を示した。この測定系の最小測定感度は 5 ng/ml であった。なおこの結果から、以下の検討は Fig. 1 に示したように B/F 分離後沈殿を洗浄せずに行った。

b) Incubation time

室温での Incubation time を 15, 30, 60, 90 分間とした場合のおおの標準曲線を Fig. 3 に示した。30分以上の Incubation で標準曲線は安定し、60分でこの抗原抗体反応は飽和に達した。なお4検体をおおの Incubation time で測定した値は、30分以上の Incubation による標準曲線とほぼ同様の値を示した。

c) 再現性

同一キットにおける intra-assay は4種類の検体を用いて10回測定した。Table 1 に示したように、C. V. は $8.4\sim 12.3\%$ であった。一方、測定

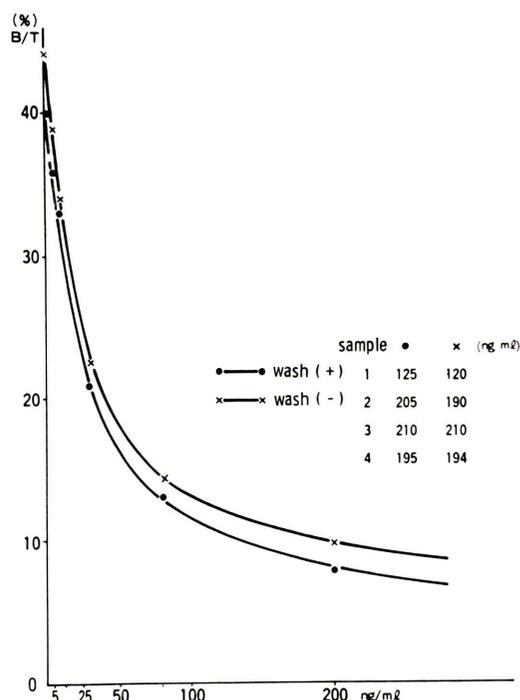


Fig. 2 Standard curve and effect of washing of pellet. Numbers of inset indicate measured values of samples by each standard curve with washing or without washing.

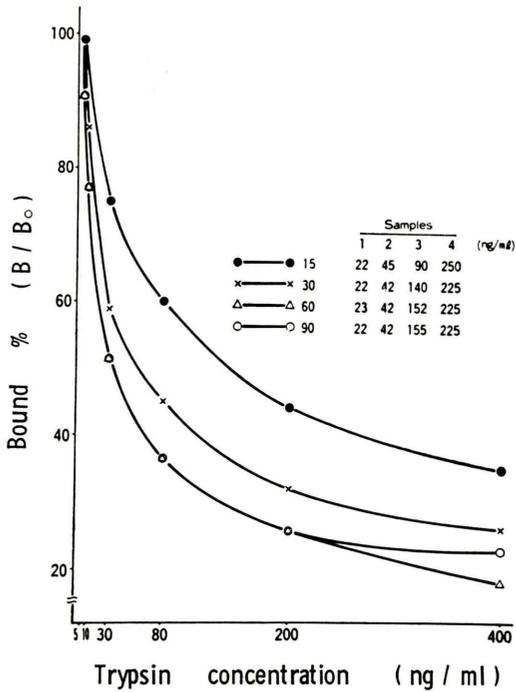


Fig. 3 Effect of incubation time on standard curve. Numbers of inset indicate measured values of samples by each standard curve of various incubation times.

Table 1 Reproducibility of measured values.

	n	\bar{X}	SD	(%) C.V.
Intra assay	10	46.5	4.6	9.8
	10	138.5	13.9	10.0
	10	188.0	15.8	8.4
	10	326.0	40.1	12.3
Inter assay	6	22.8	1.9	8.2
	6	42.2	3.6	8.5
	6	103.7	9.4	9.1
	6	173.3	14.8	12.0
	6	237.5	34.5	14.6

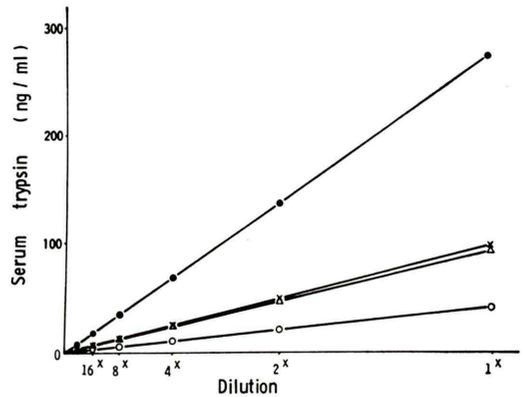


Fig. 4 Dilution test.

Table 2 Recovery of trypsin added to serum.

Added standard trypsin (ng/ml)	Sample A		Sample B	
	measured value (ng/ml)	recovery (%)	measured value (ng/ml)	recovery (%)
0	10	-	18	-
15	27	108	36	109
40	55	110	59	102
100	117	106	125	106
200	180	86	270	124
mean ± S.D.		103 ± 11	110 ± 10	

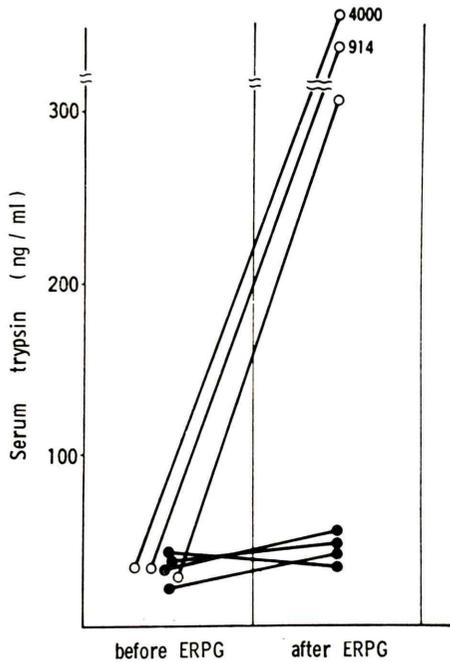


Fig. 7 Change of serum trypsin after ERPG.
 ○ patient injected contrast medium to acinous space by ERPG.
 ● patient injected contrast medium to secondary branch of pancreatic duct by ERPG.

2. Trypsin Radioimmunoassay Kit の臨床的検討

a) 健常対照群の空腹時トリプシン値

膵・肝・腎疾患および糖尿病などの既応歴のない、健康と思われる58名(18~70歳)の空腹時トリプシン値は 32.9 ± 8.1 ng/ml であった。男女差はなかった。

b) 血清トリプシン高値を示した疾患について

Fig. 6 に各種疾患患者の空腹時または検査後のトリプシン値を示した。急性膵炎4名、腺房造影された ERPG 後の患者3名および人工透析患者24名のトリプシン値は、健常群の平均値 ± 2 S.D. を正常範囲とした場合、全例高値であった。急性膵炎および ERPG 後の平均値は 914 ng/ml であり、人工透析患者の平均値 200 ng/ml に比しより高値であった。膵癌10名のトリプシン平均値は 77 ± 60 ng/ml で、膵癌の60%が高値であった。

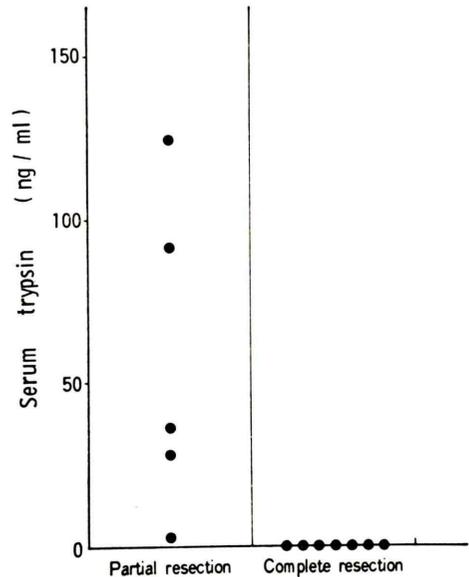


Fig. 8 Serum trypsin concentrations after pancreatectomy.

また溶血性貧血7名のうち6名(86%)がトリプシン高値であったが、その値は 71 ± 21 ng/ml で、急性膵炎に比しはるかに低い値であった。

ERPG を実施した患者の検査前後のトリプシン値を Fig. 7 に示したが、腺房造影されるとトリプシン値は著明に上昇した。しかし主膵管および2次膵管までの造影では検査直後の値は変動しなかった。

c) 血清トリプシン低値を示した疾患について
 慢性膵炎6名のうち5名にトリプシンの低値が認められ、その平均値は 11 ± 7 ng/ml であった。鉄欠性貧血39名のトリプシン値は 18 ± 6.9 ng/ml であったが、41%が低値を示した。Banti 症候群は全例トリプシンが低値であり、その平均値は 6.2 ± 3.5 ng/ml であった (Fig. 6)。

d) 膵全摘後の血清トリプシン値

膵癌患者の空腹時トリプシン値は前述した如く 77 ± 60 ng/ml であり、高値から低値まで広く分布した。しかし手術により完全に膵が摘出された7名では、Fig. 8 に示したようにトリプシン濃度は全例において測定感度以下となった。なお、部

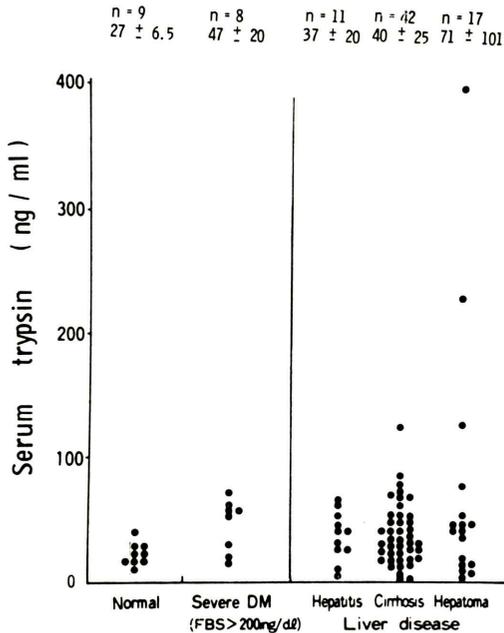


Fig. 9 Serum trypsin concentrations in normal subjects, severe diabetes mellitus examined by 50 g-OGTT and liver diseases. Numbers of inset indicate Mean \pm S.D. of each group.

分腓摘出術を受けた患者のトリプシン濃度は測定可能であった。

e) 肝疾患, 糖尿病の血清トリプシン値 (Fig. 9)

肝炎・肝硬変・肝癌患者計70名のトリプシン値は一定の傾向を示さず, 正常範囲 (51%) から軽度高値 (30%) であった。

50 g-OGTTを行なった健常人9名および空腹時血糖が 200 mg/dl をこえる重症糖尿病患者8名の空腹時トリプシン値はおおの 27.1 \pm 6.5, 47.0 \pm 19.5 ng/ml であった。各群の糖負荷後のトリプシン値はともに有意の変動を示さなかった。

f) 慢性膵炎患者の PS 試験時の血清トリプシン値について

慢性膵炎が疑われる2名の患者に pancreozyminsecretin (PS) 負荷試験を行ない, パンクレオザイミン注射後10分, セクレチン注射後10, 20, 40, 60分に採血し, 血清トリプシン値を測定した。負荷後の値は前値に比し有意に変動しなかった。

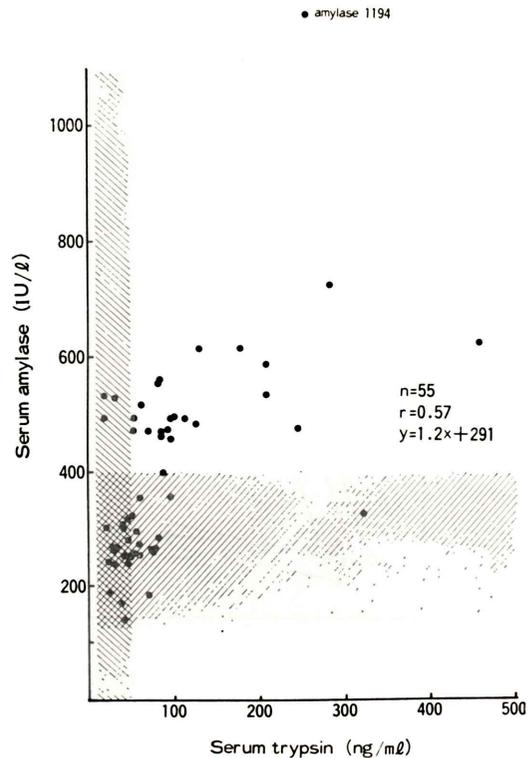


Fig. 10 Correlation between serum trypsin and amylase. Shaded areas indicate normal ranges of each assay.

g) 血清トリプシン値と血清アミラーゼ値の相関について

Fig. 10 に同一検体から測定し得たトリプシン値およびアミラーゼ値を示した。両者間には $r = 0.57$ の弱い正相関がみられた ($p < 0.01$)。Fig. 10 の斜線領域はおおのこの正常範囲を示す。55例中トリプシン正常, アミラーゼ高値を示した3例は耳下腺炎2例, 手術時肉眼的に膵が正常であった大腸癌1例であった。一方トリプシン高値, アミラーゼ正常を示した例は13例で, 確定診断されている例(9例)の中では, 腎機能障害(5例)が多かった。

IV. 考案

Trypsin Radioimmunoassay Kit の特徴は操作

が簡便で、短時間で測定が可能なことである。本キットの基礎的検討で、著者らは B/F 分離後の沈殿の洗浄が不要であること、また Incubation time は 60 分で十分であることを示したが、この方法で行なうと約 3 時間で血清トリプシンの測定が完了すると思われる。

本キットの標準曲線は 5~200 ng/ml の範囲で鋭敏であり、低濃度検体の測定値の再現性は C. V. が 10% 以下であり、また回収試験、希釈試験も十分に満足できる結果であった。高濃度検体の測定値の再現性は C. V. が 10% をこえ唯一の難点を示したが、これは Fig. 3 の標準曲線を見ると明らかなく、200~400 ng/ml の範囲の標準曲線は緩徐な傾きで測定手技による誤差が影響するためと思われた。しかしこの欠点は、200~400 ng/ml の値が本キットの正常値をはるかにこえる範囲であるため異常値の確認に困難なく、本キットの希釈試験が良好なので検体を希釈再検することにより十分に解消し得ると考えられた。

RIA によるトリプシン測定の特異性については Geokas ら⁶⁾ が詳細に報告し、従来の酵素学的測定法でトリプシン・インヒビターとして問題になった α_2 -macroglobulin が ¹²⁵I 標識トリプシンと結合し、この結合体はほとんど免疫活性を示さないことを指摘している。したがって、RIA に用いられる ¹²⁵I 標識トリプシンはヒト血清中の α_2 -macroglobulin と結合しないように不活化されるか、または本キットのようにあらかじめトリプシンをウシ血清と混和し免疫活性を有する trypsin- α_1 -antitrypsin としておく必要がある。また RIA ではトリプシノーゲンの交叉反応が 98% あるとされ⁶⁾、RIA により測定されるものにはトリプシンのみならずトリプシノーゲンも含まれている。

本キットは種々の蛋白分解酵素と交叉反応を示さないことが知られており⁷⁾、また著者らは臍全摘患者でトリプシン値が測定感度以下になること、および耳下腺炎患者等でアミラーゼが高値になるがトリプシン値は正常であることを示した。これらの事実は、本キットが臍に特異的なトリプシ

ン・トリプシノーゲンを測定していることを示している。

本キットによる健常人空腹時トリプシン値は 32.9 ± 8.1 ng/ml であった。これは Geokas⁶⁾、Borgström⁴⁾ ら、および本キットを使用した岩木⁷⁾、今村⁸⁾ らの報告と近似している。トリプシンの RIA による測定値についてはその他に Temler³⁾、Elias⁵⁾ らの報告やそれらの RIA 系に準じた RIA-gnost trypsin kit を使用した報告があるが、その健常人空腹時トリプシン値は著者らの結果より約 10 倍高値である。この相違は先に述べた ¹²⁵I 標識トリプシンの不活化および標準トリプシンの純度が異なるためと考えられている⁶⁾。したがって、トリプシン値の判定には測定に用いた RIA 法を知っておくことが肝要である。

血清トリプシンの測定が臨床的に急性膵炎の診断に有用であるとの報告はすでに多くあり、著者らの成績も同様であった。また ERPG を行なった患者の検討から、トリプシンの異常変動は非常に鋭敏であると思われた。

他の膵疾患では、慢性膵炎でトリプシン値が低く、諸家の報告^{5,8,11,12)} と同様の傾向を示した。膵癌は 60% にトリプシンの高値が認められたが、摘出臍に広範な慢性炎症を合併していた例ではトリプシンが低値であり、一定の傾向を示さなかった。膵癌におけるトリプシン値は随伴する膵炎の状態を反映しているものと思われた。以上の成績は本キットが膵疾患のスクリーニングに有用であることを示している。

著者らは膵疾患に対するトリプシン測定の有用性を検討するため各種疾患患者のトリプシン値を測定したが、その結果、膵疾患との鑑別に注意を要する疾患がいくつか存在することが明らかとなった。Fig. 6 に示した如く、人工透析患者は急性膵炎と同程度の高トリプシン値を示し、また BUN, creatinine が異常高値を示さない腎機能低下患者でもトリプシンが軽度高値となるので、トリプシン高値の場合は腎機能低下の有無に関する検討が必要である。腎不全における高トリプシン値に関してはいくつかの報告^{5,9,10)} がみられ、

Lake-Bakaar ら¹⁰⁾ はアミラーゼを同時測定しトリプシン/アミラーゼ比をみると、その値が腎不全で高いことを指摘している。すなわち腎機能低下ではアミラーゼに比しトリプシンが高値となる。これはトリプシン、アミラーゼの腎におけるクリアランスの相違によると考えられる。また、血液疾患のトリプシン値は溶血性貧血で高値が多く(86%)、鉄欠乏性貧血および鉄欠乏性貧血と同様の血液学的パターンを示す Banti 症候群で低値(おのおの41%, 100%)であった。貧血患者のトリプシン値が疾患特有の病態を反映しているのか、あるいはこれら患者血清が測定系に非特異的に影響しているのかは詳細不明である。しかし、患者血清、フェリチンは本アッセイ系に影響せず(成績省略)、疾患特有のパターンと思われた。これら疾患と膵疾患との鑑別が臨床問題になることは少ないと思われるが、トリプシンが低値で慢性膵炎を疑う場合には、同時に鉄欠乏性貧血の有無についての検討が必要である。

肝疾患、糖尿病ではトリプシン値に特有の傾向がなかった。従来重症糖尿病、特にインスリン依存性患者でトリプシン値の低下が報告されている¹³⁻¹⁵⁾が、著者らの検討では空腹時血糖値200 mg/dl 以上の重症糖尿病患者8名のトリプシン値はいずれも低値を示さなかった。重症糖尿病におけるトリプシン低値の報告は Elias ら⁵⁾ の RIA 系に準じた測定系によるものであり、著者らと同じキットを使用した糖尿病のトリプシン値の報告^{8,16)} は著者らの成績と同様の傾向を示している。この相違はトリプシンの正常値と同様に、測定に用いた RIA 系によるものと考えられる。

V. 結 論

1. 本キットは再現性、精度とも良好で、RIAの基礎的必要条件をみたす簡便な測定系である。
2. 血清トリプシン値は急性膵炎で全例著明な高値を示した。また慢性膵炎で低値を示す傾向にあった。膵癌では6例(60%)が高値、1例が低値を示した。
3. 本キットは膵に特異的なトリプシンを反映

するものであり、膵疾患のスクリーニングとして臨床的有用性を持つと考えられた。

4. 血清トリプシン値の測定結果の判定について腎機能低下および貧血患者の場合は、膵疾患との鑑別に若干の考慮が必要である。

最後に trypsin 測定用キットを御提供下さいました(株)ミドリ十字に感謝致します。

文 献

- 1) Janowitz HD, Dreiling DA: The plasma amylase. *Am J Med* 27: 924-935, 1959
- 2) Temler RS, Felber JP: Radioimmunoassay of the exocrine pancreas (Trypsin, Chymotrypsin, Chymotrypsinogen). *Biochim Biophys Acta* 236: 78-83, 1971
- 3) Temler RS, Felber JP: Radioimmunoassay of human plasma trypsin. *Biochim Biophys Acta* 445: 720-728, 1976
- 4) Borgstöm A, Ohlsson K: Radioimmunological determination and characterization of cathodal trypsin-like immunoreactivity in normal human plasma. *Scand J Clin Lab Invest* 36: 809-814, 1976
- 5) Elias E, Redskam M, Wood T: Diagnostic importance of changes in circulating concentrations of immunoreactive trypsin. *Lancet* 2: 66-68, 1977
- 6) Geokas MC, Largman C, Brodrick JW, et al: Determination of human pancreatic cationic trypsinogen in serum by radioimmunoassay. *Am J Physiol* 236: E77-E83, 1979
- 7) 岩木研次郎, 北原健志, 小川道雄, 他: Trypsin radioimmunoassay kit の基礎的ならびに臨床的検討. *Biomedical J* 4: 777-783, 1980
- 8) 今村浩一郎, 木村寿成, 松本雅裕, 他: Radioimmunoassay 法による血清 trypsin の臨床的研究. *日消病誌*, 78: 238-245, 1981
- 9) Lake-Bakaar G, McKavanagh B, Gatus B, et al: The relative values of serum immuno-reactive trypsin concentration and total amylase activity in the diagnosis of mumps, chronic renal failure and pancreatic disease. *Scand J Gastroent* 15: 97-101, 1980
- 10) Koop H, Rumpf KW, Lankish PG, et al: Plasma-immunoreactive trypsin in chronic renal failure. *Digestion* 20: 334-335, 1980
- 11) Adrian TE, Besterman HS, Mallinson CN, et al: Plasma trypsin in chronic pancreatitis and pancreatic adenocarcinoma. *Clin Chim Acta* 97: 205-212, 1979
- 12) Koop H, Lankish PG, Stöckmann F, et al: Trypsin

- radioimmunoassay in the diagnosis of chronic pancreatitis. *Digestion* **20**: 151-156, 1980
- 13) Dandona P, Elias E, Beckett AG: Serum trypsin concentration in diabetes mellitus. *Br Med J* **2**: 1125, 1978
- 14) Adrian TE, Barnes AJ, Bloom SR: Hypotrypsinemia in diabetes mellitus. *Clin Chim Acta* **97**: 213-216, 1979
- 15) 吉田俊秀, 北川良裕, 大住高子, 他: RIA-gnost® Trypsin Kit の基礎的検討とその臨床応用について. *ホルモンと臨床* **28**: 95-99, 1980
- 16) 石原静盛, 金尾啓右, 本田稔, 他: トリプシン・I-125・キット (CIS) の基礎的および臨床的検討. *基礎と臨床* **15**: 3339-3344, 1981