

《ノート》

膵分泌性トリプシン・インヒビター (PSTI) の RIA に 関する基礎的ならびに臨床的検討 (その 1)

Basic and Clinical Studies on Radioimmunoassay of Pancreatic Secretory Trypsin Inhibitor (PSTI)

則武 昌之* 芳賀 博光* 桂田 光彦* 鬼原 彰**

Masayuki NORITAKE*, Hiromitsu HAGA*, Mitsuhiro KATSURADA*
and Akira KIHARA**

*Internal Medicine, Sapporo District Hospital of Ground Self Defence Force

**Internal Medicine, School of Allied Health Professions, Sapporo Medical College

I. はじめに

最近のラジオイムノアッセイ (RIA) の進歩により膵疾患の診断に特異性の高いトリプシンやエラスターゼなどの測定法が普及しつつある。一方膵蛋白分解酵素インヒビターに関しては α_1 -アンチトリプシン (α_1 -AT) や α_2 -マクログロブリン (α_2 -MG) が血中でその役割を果たしていることが知られている。Pancreatic secretory trypsin inhibitor (PSTI) は 56 個のアミノ酸よりなる分子量 6242 の物質で、膵酵素とともに膵液中に分泌され、キモトリプシンやカリクレインを阻害せずトリプシンのみを阻害する Kazal 型インヒビターである¹⁾。その血中測定は Eddeland ら²⁾ および北原ら³⁾ が RIA 法を開発して以来 PSTI の基礎的ならびに臨床応用に関する報告⁴⁻¹³⁾ がこれまでにかなり認められる。

今回著者らも PSTI-RIA キット (シオノギ 0931-S) を試用する機会を得、その基礎的検討とともに

に、とくにカラムクロマトグラフィーおよび濾紙電気泳動法により ^{125}I -標識 PSTI の純度検定を行った。また臨床検討としてはアルコール多飲者における変化を検討するため慢性アルコール症患者を対象に血中 PSTI の測定を行ったのでその成績を報告する。

II. 対象および方法

使用した PSTI 測定用キットは 2 抗体法によるもので指定の操作手順は Table 1 に示した。なお γ カウンターは LKB-WALLAC 8000 オートウェルカウンターを用い、標準曲線からの PSTI 濃度算出は LOG-3 次回帰曲線を用いてディスクトップコンピューター (Cannon SX-350) で行った。

臨床検討としてはアルコールを常習的に多飲して精神科に入院した慢性アルコール症患者で、明らかな膵炎の症状および膵石を認めない症例 40 名 (男 39, 女 1, 年齢 16~70 歳, 平均 46.9 歳, 飲酒期間 3~39 年, 平均 22.9 年) を選んだ。また日常的飲酒にとどまる健常者 40 名 (男 45, 女 1, 年齢 18~51 歳, 平均 35.8 歳) を対照群とした。

* 陸上自衛隊札幌地区病院内科

** 札幌医科大学衛生短期大学部内科

受付: 60 年 3 月 11 日

最終稿受付: 60 年 4 月 26 日

別刷請求先: 札幌市中央区南 3 条西 17 丁目 (☎ 060)

札幌医大衛生短期大学部内科

鬼原 彰

Key words: PSTI, Radioimmunoassay, Gelchromatography, Paperelectrophoresis, Chronic alcoholic.

Table 1 Assay procedure of PSTI RIA

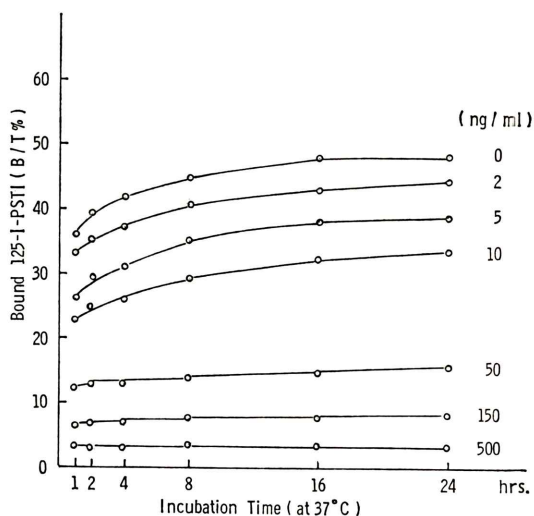
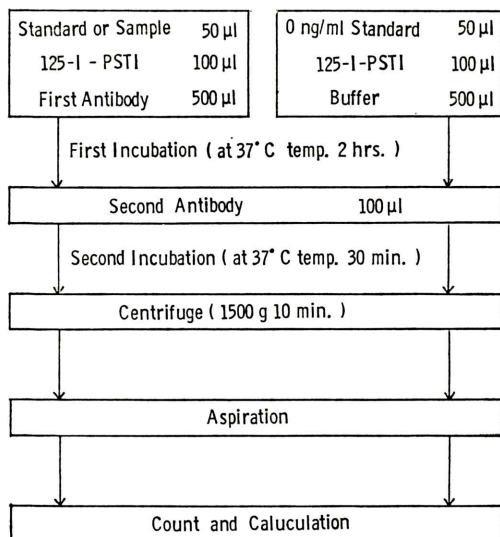


Fig. 1 Influence of first incubation time.

III. 成 績

1. 基礎的検討

1) 第1反応時間

第2反応時間を30分とし第1反応時間を37°Cで30分～24時間まで変化させた際の各濃度におけるB/T(%)をFig. 1に示したが、反応は16時間ではほぼ平衡に達した。

2) 第2反応時間

第1反応時間を16時間とし第2反応時間を37°Cで30分～240分まで変化させた時の各濃度におけるB/T(%)をFig. 2に示したが、反応時間は30分で十分と考えられた。

3) 標準曲線

前述の結果から第1反応を16時間、第2反応を30分で実施した代表的な標準曲線をFig. 3に示す。標準濃度2～150 ng/mlの範囲において良好な曲線が得られた。

4) 再現性

測定系内および測定系間の再現性をいずれも3種類の血清試料を用いて検討した。Table 2に示すように、測定系内では2.9～6.5%(C.V.), 測定系間では8.5～9.7%(C.V.)の再現性を示した。

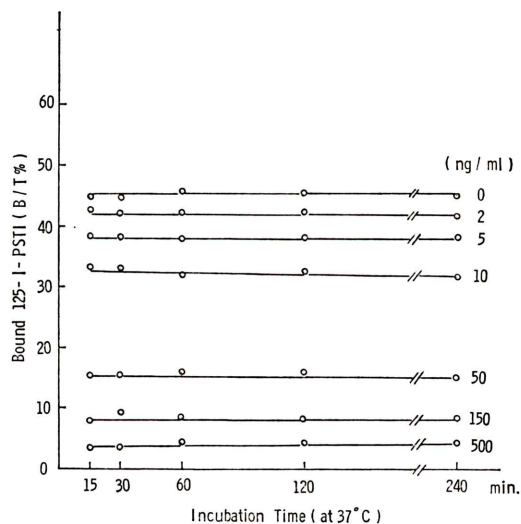


Fig. 2 Influence of second incubation time.

5) 回収率

2種類の血清試料について回収率を求めた。Table 3に示すようにそれぞれの血清において、105.3%および97.5%の平均回収率が得られた。

6) 希釈試験

3種類の血清試料を生理食塩水で2～8倍まで希釈して測定を行った。Fig. 4に示すように各濃度とも良好な直線性が得られた。

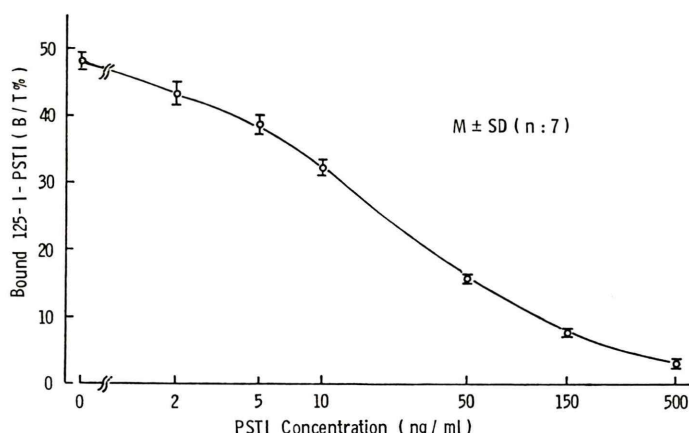


Fig. 3 Standard curve for PSTI RIA.

 7) ^{125}I -標識 PSTI の検定

(a) ゲル濾過法

^{125}I -標識 PSTI の純度を検定するために、セファデックス G-50 カラム (1×50 cm) に 1% ヒトアルブミン 2 ml をあらかじめ通し、 ^{125}I -標識 PSTI 1 ml を添加した後、0.01 M リン酸緩衝液 (pH=7.4) を溶出液として 1 ml ずつ分画した。その結果は Fig. 5 に示すように 3 つの放射能ピークがみられその割合はおおの 5.4%, 86.3%, 8.3% であった。

(b) 電気泳動法

Whatman 3 MM 濾紙 (3×30 cm) をあらかじめバルビタール緩衝液 (pH=8.6, $\mu=0.075$) に浸した後、泳動槽に水平にはりつけ、 ^{125}I -標識 PSTI 0.1 ml とヒト血清 0.1 ml にブロムフェノールブルー

(BPB) を指標として加えた試料を濾紙面の原点にのせ定電圧 500 V、定電流 10 mA で 4°C にて約 1 時間泳動した。終了後濾紙を乾燥させ、1 cm 間

Table 2 Intra- and Interassay variations

A) Intraassay			
Sample	No.	PSTI ng/ml (M \pm SD)	C.V. (%)
Serum A	10	9.64 \pm 0.63	6.5
Serum B	10	30.74 \pm 1.20	3.9
Serum C	10	63.75 \pm 1.82	2.9
B) Interassay			
Sample	No.	PSTI ng/ml (M \pm SD)	C.V. (%)
Serum D	4	6.97 \pm 0.67	8.5
Serum E	4	19.63 \pm 1.90	9.7
Serum F	4	62.82 \pm 5.32	9.6

Table 3 Recovery test

Added PSTI (ng/ml)	Serum G		Serum H	
	Measured (ng/ml)	Recovery (%)	Measured (ng/ml)	Recovery (%)
0	4.70	—	3.68	—
1	5.95	125.0	4.07	90.0
2.5	7.47	110.8	5.98	92.0
5	9.51	96.2	8.61	98.6
25	28.91	96.8	29.31	102.5
75	81.99	103.1	80.81	102.8
250	253.70	99.6	251.34	99.1
mean		105.3		97.5

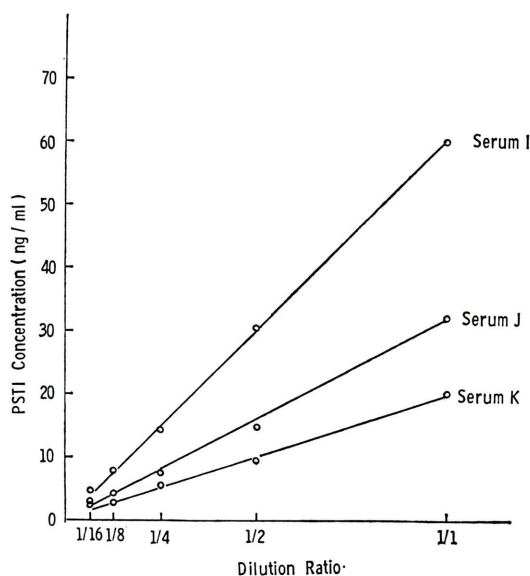


Fig. 4 Dilution test.

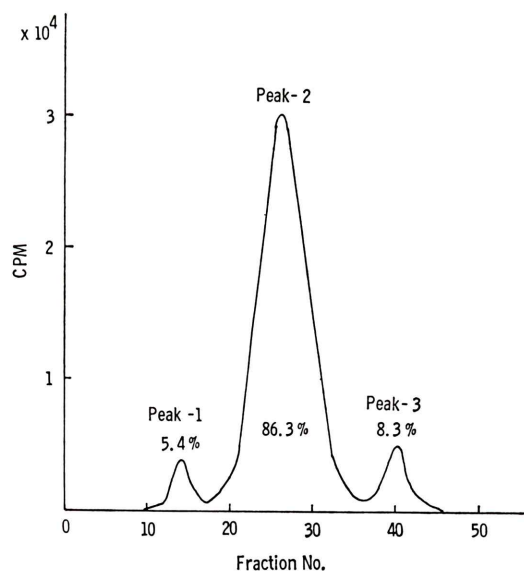


Fig. 5 Column chromatography of 125-I-PSTI with sephadex G-50.

隔に切りおのおのを試験管に入れ放射能を測定した。

その結果は Fig. 6 に示すように 2 つのピークがみられ、添加放射能の 7.5% がヒト血清蛋白とともに移動した。

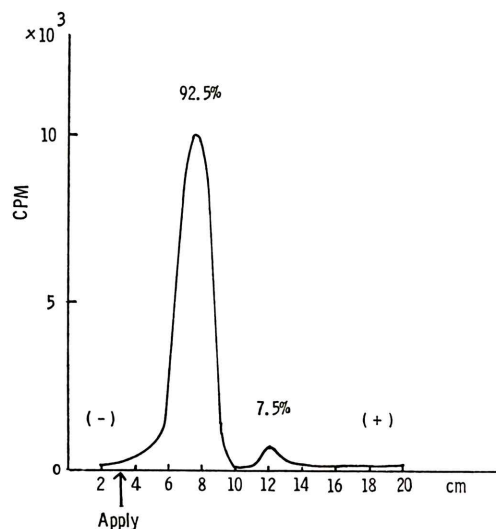


Fig. 6 Paperelectrophoresis of 125-I-PSTI with Whatman 3 MM paper.

Table 4 Serum PSTI levels in patients with chronic alcohol intake and in normal controls

Subjects	No.	PSTI (ng/ml) (M±SE)
Normal control	46	10.4±0.3
Patient with chronic alcohol intake	40	15.8±1.4*

vs. normal control *p<0.001

2. 臨床的検討

健常人および慢性アルコール症患者の本キットによる血中 PSTI 値は Table 4 に示すように対照群 46 名では 10.4 ± 0.3 (M±SE) ng/ml を示し、一方慢性アルコール症 40 名では 15.8 ± 1.4 (M±SE) ng/ml を示し、対照群と比べて有意の上昇を認めた。なお各症例の実測値は Fig. 7 に示すごとくであるが、慢性アルコール症では 40 名中 19 名 (47.5%) に健常者の Mean+2 SD (14.6 ng/ml) 以上の高値を認めた。

IV. 考 察

現在血中 PSTI の測定にはシオノギ製薬株式会社製 RIA・キット (0931-S) が用いられ、これまでもその基礎ならびに臨床検討の成績⁴⁻¹³⁾が発表されている。今回著者らも同キットについて基

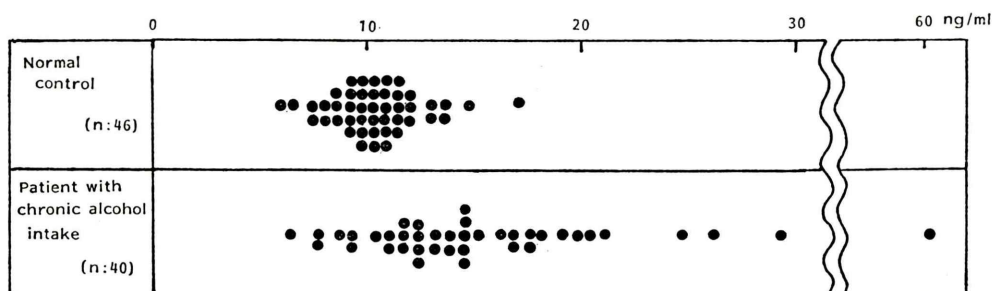


Fig. 7 Serum PSTI levels in patients with chronic alcohol intake and in normal controls.

礎的検討を行うとともに、とくにカラムクロマトグラフィーおよび濾紙電気泳動法を用いて ^{125}I -標識 PSTI の純度検定を試みた。

まず反応時間はキット指定では第 1 反応は 2 時間、第 2 反応は 30 分となっているが、前者については反応系が完全に平衡に達するまでには少なくとも 16 時間以上を要すると考えられた。したがって以下の実験はすべて 16 時間で行った。しかし 2 時間の反応でもほぼ同程度の傾きの標準曲線が得られることから迅速な測定を要する場合には 2 時間でも可能と考えられる。また第 2 反応時間は 30 分で反応系は十分に平衡に達した。このようにして作製した標準曲線は標準 PSTI 濃度 2~150 ng/ml の範囲において良好な曲線が得られた。また本キットの再現性については測定系内で 2.9~6.5% (C.V.), 測定系間では 8.5~9.7% (C.V.) であり RIA 法としてはほぼ満足すべき結果を示した。回収率についても 105.3% および 97.5% と良好な成績が得られた。さらに希釈試験では高、中および低濃度のいずれの領域においてもほぼ原点を通る直線が得られた。

さて今回の検討においてはとくに ^{125}I -標識 PSTI の純度検定を試みた。セファデックス G-50 を用いたゲル濾過では 3 つのピーク部分が認められたが、第 1 のピークは重合分子と考えられその割合は 5.4% であった。第 2 のピークは 86.3% を占め PSTI そのものと思われた。また第 3 のピークは 8.3% で PSTI のフラグメントあるいは遊離 ^{125}I と考えられた。一方濾紙電気泳動法では ^{125}I -標識 PSTI の放射活性は原点に近い部位に 92.5% がと

どまり、7.5% がヒト血清とともに移動した。これも Damaged fraction の存在を示すものと考えられた。このように ^{125}I -標識 PSTI の純度検定の結果、カラムクロマトグラフィーにおいては第 1 および第 3 のピークを合わせ 13.7% に、電気泳動では 7.5% にそれぞれ不均一性が認められたが、RIA 実施上とくに問題となるほどではないと考えられる。なお今回は本測定系に対する各種膵酵素および蛋白分解酵素インヒビター (アプロチニン) などの交叉性は検討し得なかったが、石原ら⁴⁾ および松田ら⁵⁾ によると交叉性は認めなかったとしている。

血中 PSTI の測定意義に関しては膵疾患、とくに急性膵炎や慢性膵炎増悪期⁶⁾ に上昇し、壊死性膵炎⁷⁾ では著明な上昇を認めると報告されている。またこのほか各種の悪性腫瘍^{5,8-10)}、腎不全¹¹⁾ あるいは加齢¹³⁾ における上昇も知られている。アルコールは膵炎発症の最も重要な因子であり、アルコール多飲者においては血中トリプシン¹⁴⁾ やエラスターゼ-1¹⁵⁾ の上昇も報告されている。そこで今回の研究では慢性アルコール症患者を対象に血中 PSTI の変動を観察した。その結果本症の血中 PSTI 値は対照群と比べて有意の上昇を示し、異常出現頻度もほぼ半数に達した。これはアルコール多飲者では血中トリプシンやエラスターゼ-1 の上昇に加えて、血中 PSTI も同時に上昇することを示すものである。健常人の血中 PSTI 値については報告者により差異があるが、今回の著者の症例 (平均年齢 35.8 歳) では 10.3 ± 0.3 (M \pm SE) ng/ml を示した。一方慢性アルコール症患者の平

均年齢は46.9歳と約10歳の開きがある。したがって前述のように慢性アルコール症における血中 PSTI 上昇には加齢に伴う因子も考慮に入れることが必要と思われる。しかし中野ら¹³⁾によれば30歳代と40歳代との間には差異は少ないとしていることから、年齢要因を考慮しても慢性アルコール症の血中 PSTI は上昇していると考えられる。

PSTI が血中に増加する機序については現時点では不明であるが、PSTI は本来膵腺房細胞より分泌され、膵管内で特異的にトリプシン活性を阻害するとされていることから、それがアルコール多飲者の血中に上昇する事実は、アルコールによるトリプシン上昇に生体が何らかの機序で対応している可能性を示唆している。

V. 結 論

1. 基礎検討

- 1) 第1反応時間は16時間が適当と考えられた。
- 2) 再現性、回収率および希釈試験においてはRIA法としてはほぼ満足しうる結果を示した。
- 3) カラムクロマトグラフィーおよび濾紙電気泳動を用いた¹²⁵I-標識 PSTI の検定ではRIA法として十分用い得る結果が得られた。

2. 臨床検討

慢性アルコール症の血中 PSTI は有意に上昇し、アルコールによる膵障害との関連性が推測された。

本論文の要旨は第9回日本核医学会北海道地方会(昭和59年7月札幌市)で発表した。

なお、PSTI測定用キットの提供をいただいた塩野義製薬株式会社、PSTIにつき種々ご教示をいただいた大阪大学医学部第二外科小川道雄講師および本研究にご協力いただいた札幌医大RIセンターの諸氏に謝意を表します。

文 献

- 1) Kazal LA, Spicer DS, Brahinsky RA: Isolation of a crystalline trypsin inhibitor-anticoagulant protein from pancreas. *J Am Chem Soc* **70**: 3034-3040, 1948
- 2) Eddeland A, Ohlsson K: A radioimmunoassay for measurement of human pancreatic secretory trypsin inhibitor in different body fluids. *Hoppe-Seyler's Z, Physiol Chem* **359**: 671-675, 1978
- 3) Kitahara T, Takatsuka Y, Fujimoto K, et al: Radioimmunoassay for human pancreatic secretory trypsin inhibitor: measurement of serum pancreatic secretory trypsin inhibitor in normal subjects and subjects with pancreatic diseases. *Clin Chem Acta* **103**: 135-143, 1980
- 4) 石原静盛, 八木悦子, 辻岡設子, 他: Radioimmunoassay 法(二抗体法)による血清 Pancreatic secretory trypsin inhibitor (PSTI) 測定の基礎的ならびに臨床的検討. *ホルモンと臨床* **31**: 1039-1046, 1983
- 5) 松田和彦, 小川道雄, 宮内啓輔, 他: Pancreatic secretory trypsin inhibitor (PSTI) RIA kit (0931-S) の基礎的検討および血中 PSTI 測定の臨床的意義. *ホルモンと臨床* **32**: 387-391, 1984
- 6) 北原健志, 小川道雄, 松田和彦, 他: 膵分泌性トリプシン・インヒビターに関する研究(III)——急性膵炎における血中膵分泌性トリプシン・インヒビター測定(RIA法)の診断的意義——. *胆と膵* **3**: 383-388, 1982
- 7) Ogawa M, Kitahara T, Fujimoto K, et al: Serum pancreatic secretory trypsin inhibitor in acute pancreatitis. *Lancet* **2**: 205, 1980
- 8) 藤井 恭, 福地 稔: Pancreatic secretory trypsin inhibitor (PSTI) の Radioimmunoassay に関する検討. *医学と薬学* **11**: 163-172, 1984
- 9) 田中龍彦, 大橋 修, 山本正博, 他: 血清膵分泌性トリプシン・インヒビター (PSTI) 測定の基礎的ならびに臨床的検討. *基礎と臨床* **18**: 265-271, 1984
- 10) 辻野大二郎, 千田麗子, 斉藤尚枝, 他: Pancreatic secretory trypsin inhibitor (PSTI) 測定用 RIA kit (塩野義) の検討. *核医学* **21**: 875-881, 1984
- 11) 竹田昌弘, 岩近千津子, 出村 博, 他: Pancreatic secretory trypsin inhibitor のラジオイムノアッセイ——PSTI RIA キットの基礎的ならびに臨床的検討——. *医学と薬学* **11**: 1101-1108, 1984
- 12) 片岡慶正, 加嶋 敬, 衣笠勝彦, 他: 血清膵分泌性 trypsin inhibitor (PSTI) 測定の臨床的意義. *日消誌* **81**: 1607-1616, 1984
- 13) 中野逸郎, 船越頭博, 牧 俊夫, 他: Radioimmunoassay 法による血清 pancreatic secretory trypsin inhibitor (PSTI) 測定の臨床的検討. *ホルモンと臨床* **32**: 255-260, 1984
- 14) 鬼原 彰, 野尻義男, 谷内 昭, 他: アルコールと膵内外分泌機能——(2)慢性アルコール症の血中 immunoreactive trypsin の変動——. *アルコール研究と薬物依存* **18**: 99-103, 1983
- 15) Hayakawa T, Noda A, Kondo T: Changes in serum pancreatic enzymes during 2 months' abstinence in asymptomatic chronic alcoholics. *Am J Gastroenterol* **77**: 625-629, 1982