

《使用経験》

ガストリンリアキットの基礎的ならびに臨床的検討

笠 木 寛 治* 稲 田 満 夫*

1. はじめに

ガストリンは GEP (Gastro-Entero-Pancreatic) Endocrine System に属する重要なホルモンである。それは主として胃前庭部および十二指腸粘膜に存在し、胃液分泌刺激作用、胃運動亢進作用を持つと言われている^{1)~5)}。

以前より Zollinger Ellison 症候群の診断および胃十二指腸潰瘍等の病態生理の解明の手掛りとしてこのホルモンの測定が期待されていた。近年血中微量ホルモンの測定法として免疫学的測定法(ラジオイムノアッセイ・RIA)が開発され、血中ガストリンも本法により測定可能となった。

著者らはダイナボット社よりガストリン測定用キットを入手し、使用する機会を得たので、その基礎的ならびに臨床的検討を行った成績を報告する。

2. 測定方法

ガストリンリアキットは ^{125}I 標識ガストリン、抗ガストリン家兔血清、ガストリン標準品(SHG, 800 pg/ml), 標準曲線用調整液, チャコール・デキストラン液, 0.02 M バルビタール緩衝液 PH 8.0 (0.2%卵アルブミン含有) から成り、その使用法の概略は次の通りである。

緩衝液 0.2ml に検体または標準ガストリン溶液 0.1ml を加える。ただし標準系には、緩衝液 0.1

ml の他に標準曲線用調整液 0.1ml を加える。それに ^{125}I 標識ガストリン 0.1ml と抗ガストリン家兔血清を 0.1ml 加え、 4°C 24時間または 37°C 1.5 時間インキュベートする。

結合型と遊離型を分離するために、インキュベーション後チャコール・デキストラン溶液 1ml を加え、攪拌後 4°C 15 分間放置、その後 4°C にて 3000 r.p.m. 15 分間遠沈する。

上清液の放射能を B, ^{125}I 標識ガストリン 0.1ml の放射能 T として B/T (%) を求める。まず標準系の B/T (%) を縦軸に、既知量のガストリン濃度を横軸にプロットして、標準曲線を作成する。

次に被検血清の B/T (%) を求め、標準曲線より被検血清のガストリン値が得られる。

標準試料および検体はすべて duplicate に検査を行った。

放射能の測定は東芝製自動ウェル型シンチレーションカウンタを用い、すべての試料を 5 分間測定した。

検体はすべて血漿または血清分離後、測定時まで -20°C に凍結保存した。

3. 成績

(1) 基礎的検討

a) 標準曲線と希釈テスト

図 1 は、 37°C 1.5 時間と 4°C 24 時間の 2 通りのインキュベーション法による標準曲線と、その希釈テストの結果である。ガストリン濃度が 10 pg/ml の B/T (%) は約 55%, ガストリン濃度が 400 pg/ml のそれは約 19% で、良好な標準曲線が得られた。

* 天理よろず相談所病院 内分泌内科

受付: 49年12月4日

別刷請求先: 奈良県天理市三島町200 (〒632)

天理よろず相談所病院 内分泌内科

笠 木 寛 治

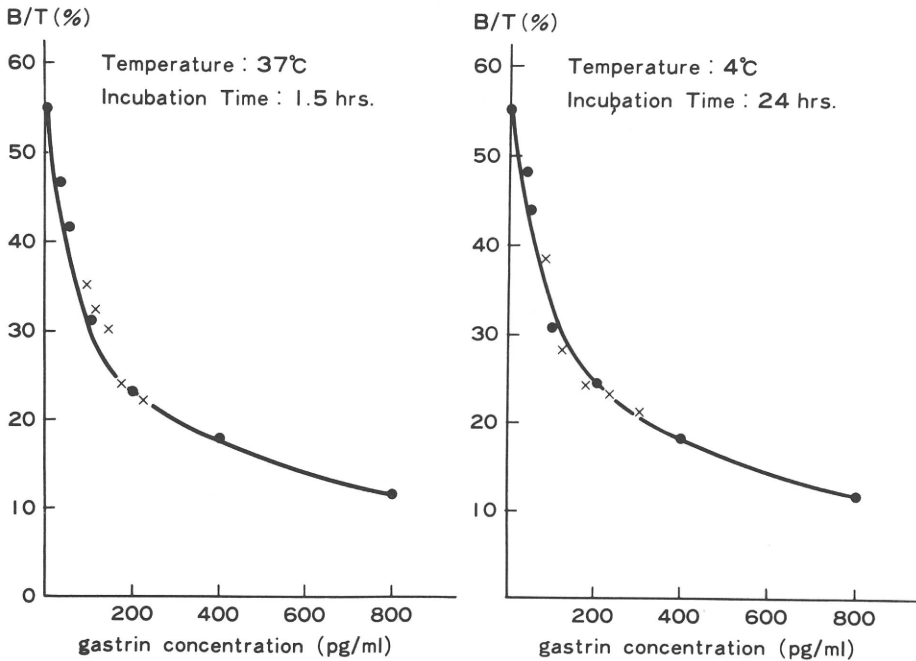


図 1 標準曲線と希釈試験

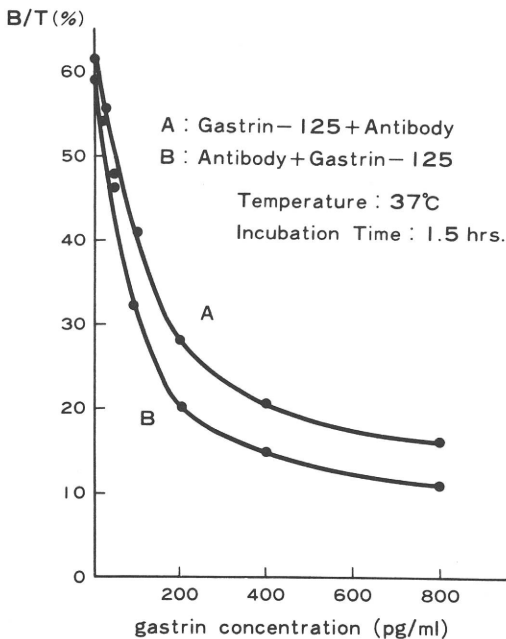


図 2 ^{125}I ガストリンとガストリン抗体の添加順序の相違による標準曲線の比較

またその再現性を見ると、各濃度での B/T(%) の変動係数は 8.7%~15.2% の範囲で、ほぼ良好な成績が得られた。

また図 1 の×印は、高ガストリン濃度の腎不全患者血清を種々に倍数希釈して、その B/T(%) を示すが、それは標準曲線とほぼ平行に変動した。

b) インキュベーション時間の影響

4°C にてインキュベーション時間の影響を見た。標準ガストリン溶液の各濃度における B/T (%) は、24 時間、48 時間および 72 時間のインキュベーション時間で有意の変化なく、24 時間にてすでに平衡に達していると考えられた。

また同時に測定した検体も、各インキュベーション時間でガストリン値に有意の変化は認められなかった。

c) 添加順序の影響

インキュベーションが短時間の場合には、アイソトープ、抗体の添加順序の影響が大きいとされている⁶⁾。

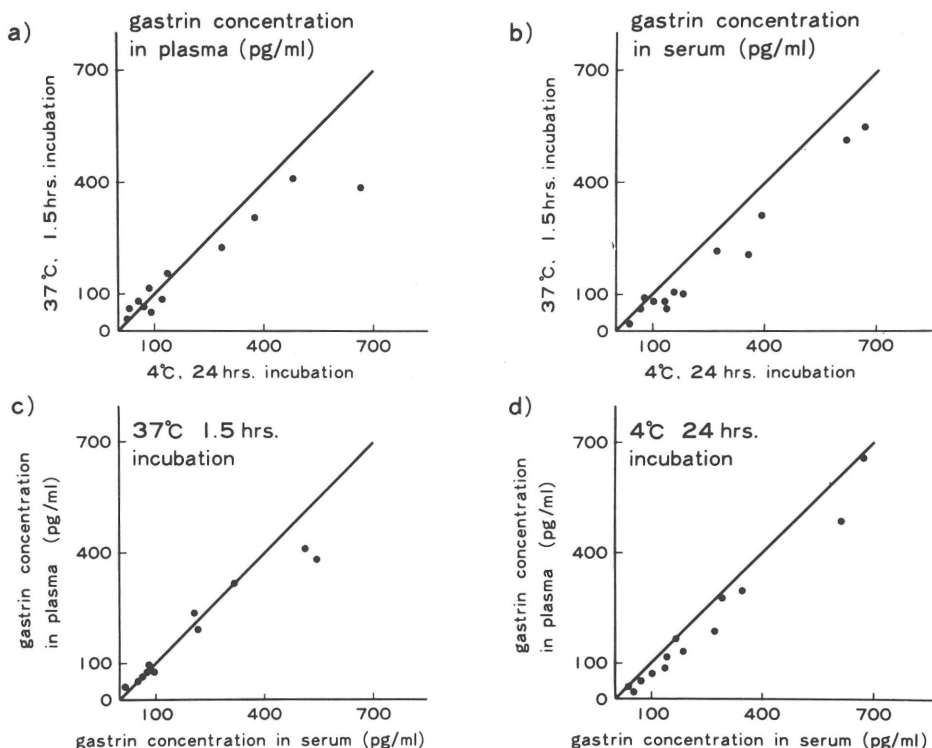


図3 37°C 1.5時間インキュベーション法と4°C 24時間インキュベーション法によるガストリン値の相違及び血漿と血清によるガストリン値の相違

図2は、37°C 1.5時間インキュベーション法で、アイソトープと抗体の順序を換えた場合の影響を見たものである。曲線Aは原法通り先にアイソトープを入れた場合、曲線Bは逆に先に抗体を入れて一定時間インキュベートした後、アイソトープを入れた場合である。図2のように、Bは200pg/ml まではAに比べて感度は良いが、Aの場合には広い範囲に測定可能であり、原法通りの添加順序が実用的と考えられた。

d) 4°C 24時間インキュベーション法と37°C 1.5時間インキュベーション法によるガストリン値の比較
4°C 24時間インキュベーションと37°C 1.5時間インキュベーションによって得られた測定値を比較した〔図3, a(b)〕。血漿中ガストリン値は両者はほぼ一致したが、血清中ガストリンは4°C 24時間法では高く測定された。

e) 血漿中ガストリン値と血清中ガストリン値の比較
図3, c) のように、37°C 1.5時間インキュベ

ーション法では、本法の測定可能域 400pg/ml 以下で両者はほぼ一致した。一方4°C 24時間法では、図3, d) に示すように血清中ガストリン値が血漿中のガストリン値よりも高く測定された。

f) 回収率試験

4°C 24時間法および37°C 1.5時間法で、各々血漿および血清を用いた場合の回収率試験を試みた。図4, a) d) のように、血清で4°C 24時間法の平均回収率は102.5 (±8.6) %と最良であった。他の方法の平均回収率を見ると、血清および血漿で37°C 1.5時間法の平均回収率はそれぞれ82.2 (±8.3) %, 87.1 (±3.3) %で、血清の4°C 24時間法のそれに比し有意に低下した(両者共 $p < 0.05$)。また血漿の4°C 24時間法の平均回収率は83.0 (±16.6) %で、血清の4°C 24時間法のそれに比し有意差はなかったが、低下する傾向を認めた。

g) 測定値の再現性

ガストリン濃度 25pg/ml より750pg/ml の間で

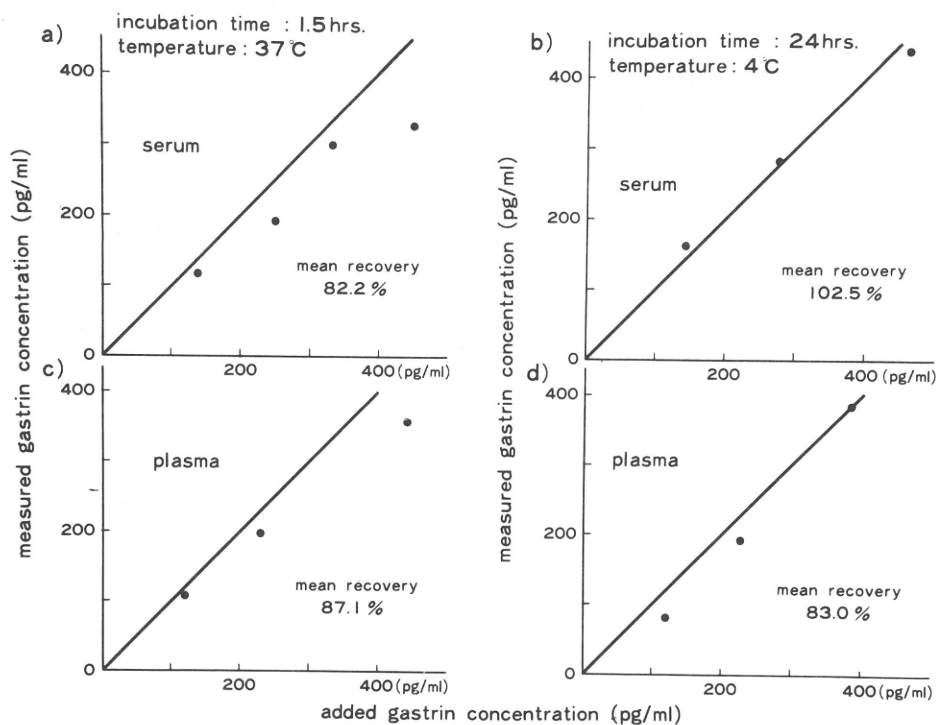


図4 回収率試験

種々のガストリン濃度を示す20例の日差変動をみるために、同一試料を日を変えて二回測定したが、その測定値間に t 検定により有意差は認められなかった ($0.7 < p[|0.173| \geq t_0] < 0.8$)。

また2例の4重測定の結果は、表1のように変動係数は5.6%, 5.5%で、多重測定の変動は少なかった。

h) 凍結融解の影響

腎不全で高ガストリン値を示す患者の血清または血漿と、正常ガストリン値の患者のそれらについて3回凍結融解を繰り返して測定値の変動をみた。凍結融解を繰り返す事によって測定値が低下する傾向がみられたので、凍結融解は繰り返さないのが望ましく思われた。

i) 本キットのガストリン特異性

反応の特異性を見るために、CCK-PZ, Tetragastrin, Pentagastrin, Caeruleinについて交叉反応の有無を調べた。

図5のようにPentagastrin, Caerulein と若干の

表1 多重測定による測定値の変動

Gastrin Concentration (pg/ml)				M±SD (pg/ml)	CV(%)
95	88	91	83	89±5	5.6%
355	370	392	347	366±20	5.5%

交叉反応が認められた。しかしSHG100pgの抑制効果に匹敵する Caerulein および Pentagastrin の量を図から求めると、それぞれ 2000pg, 4400pgであった。SHGの抑制能を100%とすると、Caerulein および Pentagastrin ではそれぞれ5%および2.3%相当と計算され、抑制効果はあっても影響は極めて少ないと考えられた。

またCCK-PZ, Tetragastrinとは、いずれもガストリン測定範囲内では全く交叉反応が認められなかった。

(2) 臨床的検討

a) 健常者及び各種疾患患者の血清中ガストリン値
糖尿病, 高血圧症患者に 50gr-OGTTを行い、

経時的なガストリン値の変動を見ると、一定の傾向はなかったが、Glucose 摂取後ガストリン値の変動が見られた。従って採血は早朝空腹時が適当と考えた。

図6は早朝空腹時の血清で、4°C 24時間インキュベーションによる健常者および各種疾患患者のガストリン値を示す。健常者8例の平均は $97 \pm 24 \text{ pg/ml}$ であった。5例の糖尿病患者では、その血清中ガストリン値は 42 pg/ml より 580 pg/ml の広い範囲に分布した。胃十二指腸潰瘍7例中1例は 315 pg/ml でやや高値を示したが、他の6例はほぼ正常範囲内であった ($\text{Mean} \pm \text{SD} = 157 \pm 83 \text{ pg/ml}$)。2例の胃癌患者では 150 pg/ml 、 380 pg/ml とやや高値を示した。次に腎不全患者6例の血清中ガストリン値は、1例が 93 pg/ml と正常範囲内にあった以外他はすべて 300 pg/ml 以上と高値を示し、最高は 895 pg/ml であった。

b) 尿毒症患者の血液透析前後における血清ガストリン値の変動

腎不全患者にてガストリン値が高値を示したので、著者らは血液透析を必要とする尿毒症患者において、透析前後のガストリン値の差異を比較検討してみた。図7に示すように透析前後において若干の変動を示したが、有意差なく ($0.5 < P\{|0.671| \geq t_0\} < 0.6$)、透析によりガストリン値が下降する傾向は認められなかった。

4. 考 按

ガストリンは1905年 Edkinsら⁷⁾によって存在が推測された。1964年 Gregory and Tracyら³⁾によって化学構造が決定され合成が可能になった。その後1968年 McGuigan⁸⁾、1970年 Berson and Yalowら⁹⁾によるガストリンのRIAの成功以来、わが国でもガストリンのRIAに関する多くの報告が見られる^{10)~16)}。

今回著者らが使用したダイナボット社製のガストリン測定用キットでは、ガストリン0濃度におけるB/T (%) は約55%で、ガストリン濃度400

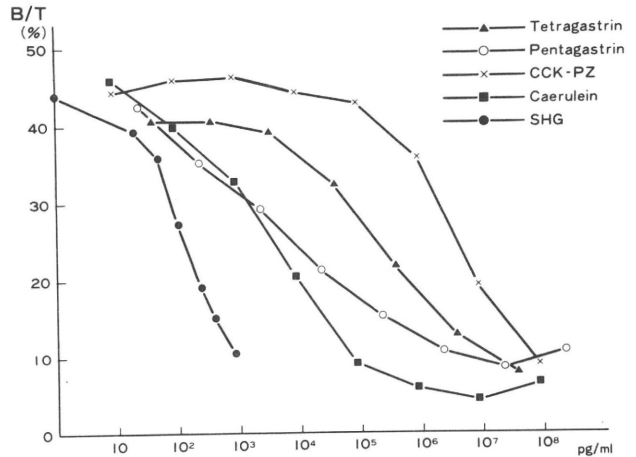


図5 ガストリン抗体と類似消化管ホルモンとの交叉反応性

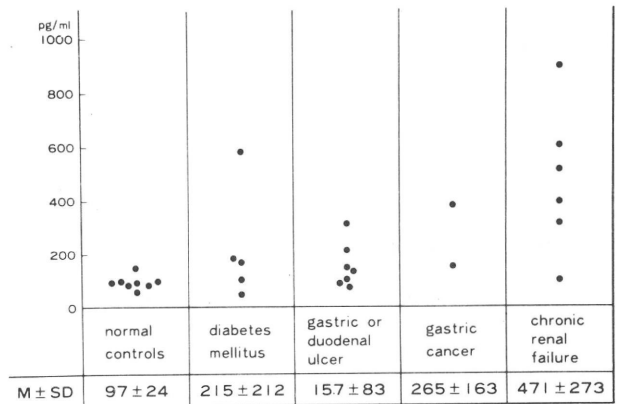


図6 各種疾患の早朝空腹時血清ガストリン値

pg/ml まで良好な標準曲線が得られた。また希釈テストの成績より本法による測定値は内因性ガストリンをよく反映しているものと考えられた。

インキュベーションには4°C 24時間と37°C 1.5時間の2方法があり、それぞれの方法で血清と血漿の値を比較した。血漿を用いて上記2方法でインキュベートした場合、および血清で37°C 1.5時間インキュベーション法では、同一試料のガストリン値はほぼ一致した。しかし血清を用い4°C 24時間インキュベートした場合には、ガストリン値は前者らに比べて常に高値であった。そこでそれ

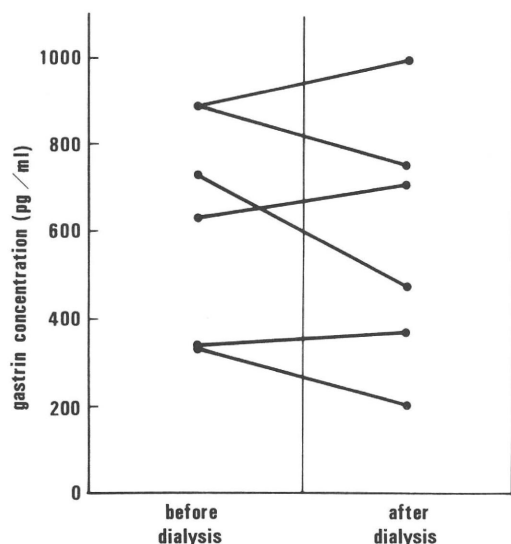


図7 尿毒症患者における血液透析前後の血清ガストリン値の変動

それぞれの条件で回収率試験を行った所、血清の4°C 24時間インキュベーションでは平均回収率 102.5%で最良であり、他はほぼ80~90%で低下を認めた。従来、血清中に免疫反応抑制物質が存在し¹⁷⁾、また free の charcoal に対する吸着を妨げる非特異的因子が存在するとも報じられている¹⁸⁾。本法において血清と血漿または温度の差による回収率の違いも、以上の現象と何らかの関係を有するかも知れないが、今後の検索に待ちたい。以上の成績より今回は、試料は血清を用い、インキュベーションは4°C24時間法を用いた。

次に標準曲線の再現性は比較的良好で、測定値の多重測定時の変動、日差変動も少なかった。

さらに他の類似消化管ホルモンとの交叉反応性を調べると、Pentagastrin, Caerulein と若干の交叉反応性を認めた。しかし Pentagastrin は合成ガストリンであり、また Caerulein はオーストラリア産のカエルの皮膚より抽出され、爬虫類にはあるが人間には存在しないと言われている¹⁹⁾。従って本法においてこれらのホルモンの影響は無視しうる。以上の成績より本キットは臨床検査法として充分使用しうるものと考えられた。

次に臨床的検討では、50gr-OGTT に対する反応を見ると、Glucose 投与後ガストリン値の変動が見られ、また蛋白食投与後、血中ガストリン値が上昇すると言われている^{12), 20), 21)}。従って採血は早朝空腹時と一定でなければならない。

本法での健常者の正常値は 97 ± 24 pg/ml で、Mc Guigan ら²²⁾の 48 ± 42 pg/ml, Yalows ら⁹⁾の75 pg/ml 以下、Hanski ら²³⁾の 113 ± 11 pg/ml, 井村ら¹⁰⁾の 53.7 ± 35.1 pg/ml, 松尾ら¹¹⁾の40~140 pg/ml, 三好ら¹²⁾の 91 ± 5.3 pg/ml という報告にほぼ一致する結果が得られた。

胃十二指腸潰瘍に関しては、従来報告者によって、高値のもの、低値のもの、健常者と有意の差のないものと様々である¹²⁾。著者らが測定した7例の胃十二指腸潰瘍のガストリン値のうち、1例が315 pg/ml と高値を示した以外他はほぼ正常範囲内であった。症例数も少なく、今後胃癌、萎縮性胃炎を含めて、症例数を重ね検討していく予定である。

糖尿病に関しては、従来より報告されているように¹³⁾、低値のものから高値のものまで広い範囲に分布し、一定の傾向はなかった。

腎不全で血中ガストリン値は増加するといわれ¹³⁾、著者らの成績でも腎不全の6例中1例を除いて他は全部高値を示した。腎不全患者におけるガストリン値高値の原因として、まず Gastrin Clearance の低下すなわち BUN, NPN のように腎よりの排泄低下のために上昇していると考えられる。そこで尿毒症患者にて、血液透析前後での血清ガストリン値を比較したが、特に透析後にガストリン値が低下する傾向は認められなかった。ガストリンの分子量は約2000で、透析膜を濾過しうると考えられるので、原因を Gastrin Clearance の低下に求めがたい。また矢花ら¹³⁾は、腎疾患では血中ガストリン濃度の上昇と共に尿中ガストリン排泄量も増加すると報告し、これも本疾患における血中ガストリン濃度の上昇は腎の排泄低下に基因しない事を示すものである。一方 Newton and Jaffe²⁴⁾は、ガストリンは主に腎皮質にて代謝され異化されると述べており、これが腎不全患者の高ガスト

リン血症と何らかの関係があるように思われる。

5. ま と め

ダイナボット社のガストリンリアキットを用い、ガストリンのラジオイムノアッセイの基礎的臨床的検討を行った。本キットでは、測定値の再現性は良く、また希釈試験にて本法による測定値が内因性ガストリンを反映していると考えられた。4°C 24 時間インキュベーションで血清を用いた場合、回収率が最も良好であった。また交叉反応性より本キットのガストリン特異性は充分証明された。以上の成績より、本キットは臨床検査として血中ガストリン測定に利用できるものと考えられた。健康人および若干の各種疾患患者に早朝空腹時の血清ガストリン値を測定し、若干の考察を加えた。

終りに春名桃江、田辺恵三子両氏の御協力に深謝し、またキットを提供されたダイナボット研究所に謝意を表します。

本論文の要旨は、第7回近畿核医学研究会で報告した。

文 献

- 1) 松尾 裕：消化管ホルモンの現状と将来の展望。日本臨床 32 : 8, 1974
- 2) 松尾 裕他：Gastrinの分泌調節機構。日本臨床 29 : 1734, 1971
- 3) Gregory RA & Tracy HJ : The constitution and properties of two gastrins extracted from hog antral mucosa. Gut 5 : 103, 1964
- 4) ダイナボット社、ガストリンリアキット使用説明書
- 5) 柚木一雄他：胃十二指腸潰瘍の発生と Secretin, Gastrin 分泌異常。日本臨床 32 : 32, 1974
- 6) 久保田治代他：Radioimmunoassay における抗原抗体の添加順序——Digoxin の測定について。医学のあゆみ 78 : 26, 1971
- 7) Edkins JS : The chemical mechanism of gastrin secretion. J Physiol 34 : 133, 1906
- 8) McGuigan JE : Immunochemical studies with synthetic human. gastrin. Gastroenterology 54 : 1005, 1968
- 9) Yalow RS & Berson SA : Radioimmunoassay of gastrin. Gastroenterology 58 : 1, 1970
- 10) 井村寿男他：ガストリンキット (CIS-GASK) による血清ガストリンの基礎的並びに臨床的検討。Medical Postgraduates 12 : 20, 1974
- 11) 松尾 裕、石井喜代子：ガストリンリアキットによる血中ガストリン測定。ホルモンと臨床 22 : 1087, 1974
- 12) 三好秋馬：消化器疾患における Gastrin の動態。日本臨床 32 : 17, 1974
- 13) 矢花 剛他：Gastrin の Radioimmunoassay に関する基礎的検討と血清、尿および胃液内 Gastrin に関する臨床的研究。日本消化器病学会雑誌 69 : 244, 1972
- 14) 松尾裕他：ガストリン、最新医学26 : 1091, 1971
- 15) 本木達也他：ガストリンのRadioimmunoassay の検討。核医学 10 : 373, 1973
- 16) 大倉久直他：テトラガストリン抗血清によるガストリンのラジオイムノアッセイ。医学のあゆみ 76 : 492, 1971
- 17) 入江 実：Radioimmunoassay, 4 版, 朝倉書店, 東京, 1972, p.71
- 18) 対馬敏夫：Radioimmunoassay, 4 版, 朝倉書店, 東京, 1972, p.146
- 19) 松尾 裕、斉藤敏夫、内藤聖二：消化管ホルモンの知識。1 版, 中外医学社, 東京, 1974, p.116
- 20) Korman MG, Soveny C & Hanski J. : Gastrin studies in gastric ulcer, Gut 13 : 166, 1972
- 21) 谷昌尚他：胃液分泌におけるガストリンの意義に関する最近の知見——肉エキス負荷試験を中心に。医学のあゆみ 91 : 143, 1974
- 22) McGuigan JE & Trudeau WL : Immunochemical measurement of elevated levels of gastrin in the serum of patients with pancreatic tumors of the Zollinger Ellsion variety. N Eng J Med 278 : 1308, 1968
- 23) Hanski J & Cain MD : Radioimmunoassay of gastrin in human serum. Lancet 2 : 1388, 1969
- 24) Newton WT & Jaffe BM : The fate of intravenously administered radiolabeled gastrine. Surgery 69 : 34, 1971