

《ノート》

セクレチン測定用キットによる血清セクレチンの Radioimmunoassay

Measurement of Serum Secretin by Secretin Radioimmunoassay Kit

高原 淑子* 佐々木由三* 与那原良夫*

Yoshiko TAKAHARA*, Yoshizo SASAKI* and Yoshio YONAHARA*

*The 2nd Tokyo National Hospital, 2-5-1 Higashigaoka, Meguro-ku, Tokyo 152, Japan

はじめに

セクレチンは消化管ホルモンの中で最初に発見され(1902年), その生理学的作用も詳細に検討されて消化管ホルモン研究の緒となったものであるが, その化学構造の決定はガストリンよりもはるかに遅れ, ようやく, 1967年に至り, Mutt & Jarpes¹⁾により明らかにされたものである。

すなわち, Jarpes & Mutt は1953年からセクレチンの分離精製を試み, 1961年に単一なセクレチンを得るに至った²⁾。次いで, アミノ酸分析により11種のアミノ酸27個からなるポリペプチドであることが報告され, Edman 分析により N-端から His.-Ser.-Asp. の配列が決定されたが, 抽出物が微量なため構造決定までには至らず, ようやく, 1957年に至って Mutt & Jarpes¹⁾ は Trypsin, Thrombin 分析を利用して構造を決定し, さらに, Bodanszky らの合成研究の協力を得て27個のペプチドを合成し得るに至ったものである。

セクレチンは十二指腸粘膜から分泌され, 膵外分泌, とくに水, 重炭酸の分泌促進作用ガストリンならびに胃塩酸分泌機能の抑制作用などの生理的作用が知られている。

セクレチンの radioimmunoassay による測定については, 1968年 Young ら³⁾によって初めて定量

され, さらに, 1973年 Boden & chey⁴⁾によって測定法が確立された。以来, セクレチンの定量は多くの研究者によって行なわれてきたが, 安定性のある標準セクレチンが得られ難いこともあって測定は困難をきわめた。1976年 Yanaihara ら⁵⁾はヨウ化セクレチンとして, 彼らが合成に成功した Na-tyrosyl セクレチン, [Tyrosine¹] セクレチンを用いたセクレチンの radioimmunoassay 法を確立したことから, セクレチンの測定は格段の進歩を示すようになった。

われわれは昭和52年来末, 第一ラジオアイソトープ研究所で開発された [Tyrosine¹] セクレチンを用いたキットを使用する機会を得たので, 2, 3の基礎的検討を行なった。

対象ならびに方法

対象症例は国立東京第二病院の入院および外来患者 181 例で, その内訳は正常者68例, 胃癌, 胃潰瘍それぞれ9例, 十二指腸潰瘍3例, 肝臓および肝硬変18例, 胆石症14例, 膵炎3例, 腸閉塞2例, 悪性腫瘍(非消化器)25例, 糖尿病6例, 甲状腺機能亢進症13例および甲状腺機能低下症11例である。

試料はいずれも早期空腹時の血清を用い, 採取後 -20°C で凍結保存した。

セクレチンの radioimmunoassay はキットの指示書に従った操作法を用いて行なった。

Key words: Gastrointestinal hormone, Secretin, Radioimmunoassay, Secretin value

* 国立東京第二病院

受付: 53年9月26日

最終稿受付: 53年12月5日

別刷請求先: 東京都目黒区東が丘2丁目5-1 (〒152)

国立東京第二病院 高原 淑子

キットの内容

1) セクレチン抗血清 (合成ブタセクレチンを家兎に感作して作製した抗血清)

2) 標準セクレチン (合成ブタセクレチン 6.4 mg 含有)

3) ヨウ化セクレチン ($^{125}\text{I}\cdot[\text{Tyr.}^1]$ セクレチンを約 2 μCi 含む)

4) 家兎 γ -グロブリン抗血清—第2抗体—(家兎 γ -グロブリンを山羊に感作して作製した抗血清)

5) 標準セクレチン用希釈剤

6) Tween #80 溶液 (約 5 ml)

測定操作法は標準セクレチン, または被検血清 200 μl に緩衝液で希釈したセクレチン抗血清 1 ml を加え, 4°C で 4 日間インキュベートした後, ヨウ化セクレチン (^{125}I) 溶液 100 μl を加えて 4°C でインキュベートし, 次に家兎 γ -グロブリン抗血清 (第2抗体) 100 μl を加えてさらに 4°C で 1 日間, 延べ 6 日間インキュベートする. 次に, 冷却遠心器で 2,000 $\times g$ で 30 分間遠沈し, アスピレーターを用いて上清を吸引除去する.

ウェル型シンチレーションカウンターで放射活性を測定して自然計数率を差し引き, B/Bo% を算出して標準曲線を作製し, 被検血清のセクレチン濃度を読みとる.

成績

1. 標準曲線

本法での標準曲線をインキュベーション温度に変化を与えつつ行なったものと併せて示したのが Fig. 1 である. すなわち, 指示書どおりに行なった 4°C のインキュベーションにおける標準曲線は, 50 pg/ml から 100 pg/ml までは緩徐に, またそれ以上の濃度では 1,600 pg/ml に至るまで比較的急峻に下降する曲線を示した. また, 20°C の恒温槽でインキュベートした際には B/Bo% は低値を示したものの, ほぼ前者と平行しつつ経過した. また, ラジオイムノアッセイの本質からみても, 実際の操作上からみてもあり得ないことではあるが, 凍結氷解という急激な温度変化を途中で与えつつ

操作を行なった際の標準曲線は, 50 pg/ml から 3,200 pg/ml に至るまで緩徐な曲線を描き, かつ, その測定値にもかなりのバラツキを示した.

また, ロット番号の異なった 8 キットおよび有効期限切れのキットにおける標準曲線は Fig. 2 に示すように逆 S 字型の曲線を示した. ただ有効期

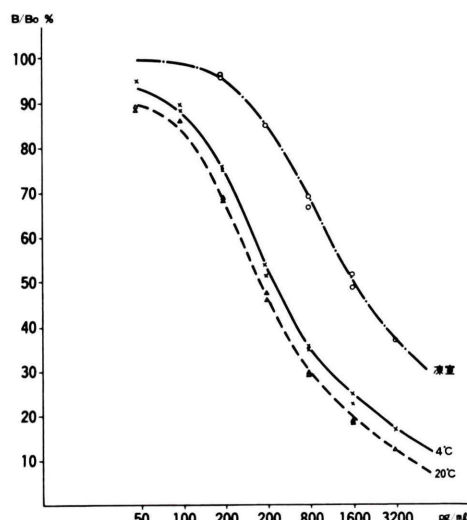


Fig. 1 温度による変化

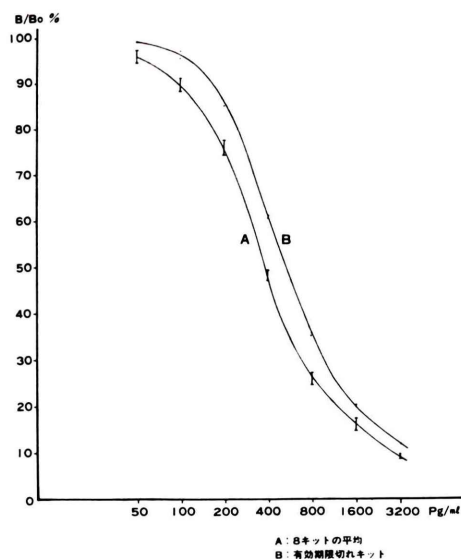


Fig. 2 異なったロットにおける標準曲線

Table 1 各ロットにおける標準曲線作成時の濃度%の変動

ロット No. 濃度 pg/ml	1	2	3	4	5	6	7	8	平均±S.D. (%)
50	95.0%	94.5	94.3	97.5	97.6	95.6	96.5	96.5	95.93±1.28
100	89.2%	87.3	88.7	89.9	92.0	88.2	90.4	90.5	89.52±1.48
200	75.7%	75.2	76.2	74.2	75.3	74.9	78.5	77.5	75.93±1.42
400	49.2%	49.9	49.3	48.4	47.1	46.8	48.3	48.6	48.45±1.06
800	25.3%	24.5	25.1	28.1	26.6	24.7	24.9	26.6	25.73±1.25
1,600	15.5%	15.6	15.4	18.7	18.2	15.4	14.8	16.4	16.25±1.43
3,200	9.1%	9.3	9.3	10.6	9.3	9.7	9.4	9.3	9.53±0.46

限切れのキットにおける標準曲線は 100 pg/ml 以下のみならず全般的に緩徐な下降を示す傾向にあった。

8 キットにおける標準曲線作成時の濃度%の変動を Table 1 に示した。キット間でわずかな変動は見られたものの、一般に標準偏差は少なく、きわめて良好であった。

2. 回収率

濃度既知のセクレチンを含む血清 3 試料に一定量の標準セクレチンを添加した際の回収率は Table 2 に示したごとくである。すなわち、濃度既知試料 34, 52, 73 pg/ml の血清にそれぞれ 50, 100, 200, 400 pg/ml を添加した際の各試料の平均回収率はそれぞれ、 $111.7 \pm 6.07\%$ 、 $112.5 \pm 8.43\%$ 、 $101.8 \pm 4.76\%$ とほぼ満足すべき成績を得た。

また、希釈試験は Table 3 に示したように、実測値 1,606 pg/ml の試料について 2, 4, 8 倍に希釈

して行なったが、それぞれ 811, 398, 196 pg/ml とほぼ満足すべき測定値を得た。なお Fig. 3 には、その際の理論値と測定値との関係を%であらわしたもので、いずれも良好な成績を示した。

3. 再現性

本法の再現性を見るために、同一キット内でのバラツキについて検討した。すなわち血清 3 試料を用いて同一キット内で同一血清を試験管 5 本で測定した際の成績は Table 4 に示すごとくで、変動係数 (CV) はそれぞれ 2.13%, 1.08%, 3.30% と良好な成績を示した。

4. 臨床例の測定値について (Table 5)

本キットを用いて測定した正常者 68 例の空腹時セクレチン値は 67~239 pg/ml の間に分布し、平均 130.6 ± 38.0 pg/ml であった。

Table 3 希釈試験

	×1 pg/ml	×2 pg/ml	×4 pg/ml	×8 pg/ml
実 測 値	1.606	811	398	196
理 論 値		803	401.5	200.7

Table 2 回 収 率

既知試料値 pg/ml	添加量 pg/ml	回収量 pg/ml	回収率 (%)	平均回収率 (%±S.D.)
サンプルA	50	98	117	111.7 ±6.07
	100	144	107	
	200	273	117	
	400	460	106	
サンプルB	50	117	115	112.5 ±8.43
	100	180	118	
	200	295	117	
	400	453	100	
サンプルC	50	134	109	101.8 ±4.76
	100	174	100	
	200	271	99.3	
	400	469	99.2	

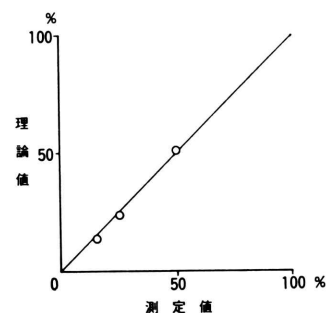


Fig. 3

Table 4 再現性

No.	サンプルA	サンプルB	サンプルC
1	98 pg/ml	132 pg/ml	116 pg/ml
3	94	130	122
3	94	132	119
4	98	132	122
5	95	129	113
m±S.D.	95.8±2.05	131.0±1.41	118.4±3.91
C.V.	2.13%	1.08%	3.30%

Table 5 各種疾患におけるセクレチン値

	例数	範囲 (pg/ml)	m±S.D. (pg/ml)
正 常	68	67-239	130.6±38.0
胃 癌	9	62-220	144.5±48.1
胃潰瘍	9	92-258	161.2±51.9
十二指腸潰瘍	3	89-189	147.3±52.0
肝炎及び肝硬変	18	56-195	126.4±46.3
胆石症	14	56-235	133.3±42.8
膵 炎	3	97-127	116.7±17.0
腸閉塞	2	116-146	131.0±21.2
悪性腫瘍(非消化器)	25	54-595	162.1±116.5
糖尿病	6	62-218	115.7±54.2
甲状腺機能亢進症	13	66-225	127.3±52.5
甲状腺機能低下症	11	70-170	103.8±33.4

胃癌9例では62~220 pg/ml, 平均144.5±48.1 pg/mlで, 正常者よりやや高い値を示した。また, 胃潰瘍9例では92~258 pg/ml, 平均161.2±51.9 pg/mlと高値を示したが, 十二指腸潰瘍3例では

89~189 pg/ml, 平均147.3±52.0 pg/mlとこれより低い値を示した。肝炎および肝硬変18例では56~195 pg/ml, 平均126.4±46.3 pg/ml, 胆石症14例では56~235 pg/ml, 平均133.3±42.8 pg/ml, 膵炎3例では97~127 pg/ml, 平均116.7±17.0 pg/ml, 腸閉塞2例では116~146 pg/ml, 平均131.0±21.2 pg/ml, 悪性腫瘍(非消化器)25例では54~595 pg/ml, 平均162.1±116.5 pg/ml, 糖尿病6例では62~218 pg/ml, 平均115.7±54.2 pg/ml, 甲状腺機能亢進症13例では66~225 pg/ml, 平均127.3 pg/ml, 平均127.3±52.5 pg/ml, 甲状腺機能低下症11例では70~170 pg/ml, 平均103.8±33.4 pg/mlであった。

5. 糖負荷試験時における血中セクレチン濃度の時間的変動

胃十二指腸透視検査で異常を認めなかった正常例, 糖尿病症例および肝炎症例の50g経口糖負荷試験時の血中セクレチン値の変動を血糖値, インシュリン値, C-ペプチド値, HGH値およびガストリン値などと併せて検索した。

a. 正常例 (Fig. 4)

血糖曲線は正常型を示し, かつ, C-ペプチド, インシュリン値も糖負荷後1~2時間で高値を示した後下降した。この間のHGH値は当然のことながら, わずかに緩やかな減少を示すにとどまっ

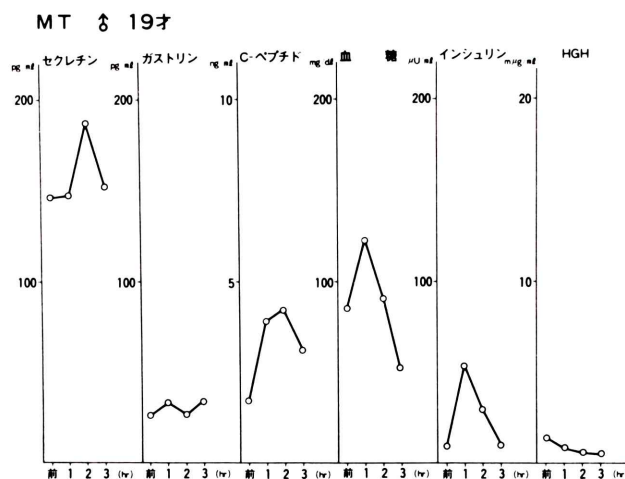


Fig. 4 正 常 例

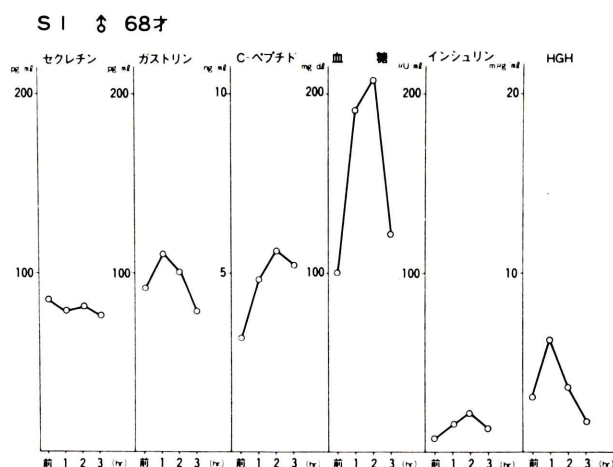


Fig. 5 糖尿病症例

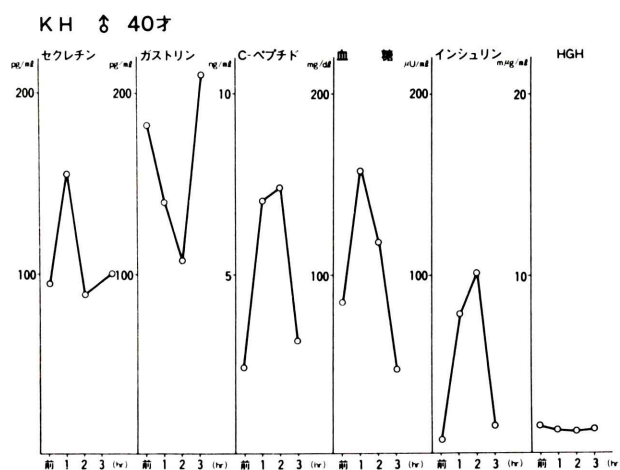


Fig. 6 肝炎症例

た。

血中セクレチン値は、糖負荷後2時間目に高値を示した後旧値にもどる傾向を示したが、この間、ガストリン値はほとんど変動を示さなかった。

b. 糖尿病症例 (Fig. 5)

過去にインシュリン治療歴を有し、現在1820 cal. の食餌制限のみで十分コントロールにされている糖尿病症例である。

空腹時血糖値は正常を示したが、50 g ブドウ糖経口負荷による血糖曲線では明らかな糖尿病型を

示した。

C-ペプチドおよびインシュリン値の空腹時レベルは正常者のそれとの間に差はないが、両者とも peak はいずれも60分より遅れ、いわゆる *delayed response* を示した。しかし、本症例は食餌療法によるコントロールが十分であるため、C-ペプチドの態度はインシュリンの低値に比して正常に近い反応を示していることがわらう。

本症例のセクレチン値の推移は糖負荷によってほとんど変動せず、一方、ガストリン60分は値

を頂点とした変動を示した。

c. 肝炎症例 (Fig. 6)

鼻出血およびこれに対して行われた血管結紮術に際して行なった輸血による血清肝炎例で、GOT、GPT は高値を示す。

50 g ブドウ糖経口負荷による血糖曲線は正常型を示し、また、C-ペプチドおよびインシュリンの空腹時レベルは正常域にあったが、負荷による反応性増加は著しく、これに反して HGH は低値を維持するにとどまった。

セクレチン値は糖負荷により早期に著明な増加を示した後旧値に復し、また、ガストリン値は空腹時には高値を示していたが、糖負荷により急速な減少を示した後、再び、空腹時を上回る高値を示した。

考 案

セクレチンは消化管ホルモンの中で最も早く発見され、膵外分泌量の増加作用や、ガストリンならびに胃塩酸分泌機能の抑制作用などが知られているが、セクレチンの radioimmunoassay による測定は、標識ホルモンを作製するために必要な Tyrosine が存在せず、安定性のあるヨウ化セクレチンを得るのが困難であつたため、不可能であつた。

1976年 Yanaihara ら⁵⁾ はブタセクレチン、[Tyrosine¹] セクレチンの合成に成功し、これに伴ってこれらを用いた radioimmunoassay 法を確立したことから、セクレチンの測定は飛躍的な進歩を示すに至った。

われわれは第一ラジオアイソトープ研究所より提供を受けた [Tyrosine¹] セクレチンを用いたキットについて、2, 3 の検討を試みたのであるが、得られた標準曲線の B/Bo% は標準セクレチン 50 pg/ml から 100 pg/ml までは緩徐に、またそれ以上の濃度では 1,600 pg/ml に至るまで比較的急峻に下降する良好な感度を示した。この点は清野ら⁶⁾、宮下ら⁷⁾ の報告と同様であつた。ただ、全過程を 20°C 恒温状態で行なった際の B/Bo% は低値を示したものの、50 pg/ml~800 pg/ml の間

で指示書に従った 4°C 操作の際の標準曲線と平行する曲線を得たことは、少なくともこの温度範囲内で恒温状態を保ち得るならば、測定し得る可能性を示唆するものといえよう。

回収試験の結果はほぼ満足すべきものであつた。ただ、今回の実験に使用した既知試料値が 34, 52, 73 pg/ml と比較的 low 濃度試料に偏したきらいがあり、より高度の試料についての検討もまた必要であろう。また添加量の多少による回収率の傾向に一定のものは見られなかった。

希釈試験は実測値 1,606 pg/ml を示した試料を、それぞれ 2, 4, 8 倍に希釈して行なった結果、理論値に近似した良好な再現性を示した。

同一キット内で同一血清を試験管 5 本で測定した際の変動係数は 2.13%, 1.08%, 3.30% を示し、本キットにより得られるセクレチンの再現性はきわめて良好であつた。

以上の検討成績から、本キットは臨床上的セクレチン測定に有用であると思われる。

われわれの測定した正常者の空腹時セクレチン値は、67~239 pg/ml の間に分布し、平均 130.6 ± 38.0 pg/ml であつた。この値は清野ら⁶⁾ の 50~217 pg/ml、宮下ら⁷⁾ の 50~230 pg/ml、平均 140 ± 50 pg/ml とくらべて多少の差異はあるものの、ほぼ同様であつた。

また、例数はまだ少ないのであるが、測定し得た胃癌、胃潰瘍、十二指腸潰瘍および非消化器悪性腫瘍などの症例では、正常者より平均値の上で高い傾向を示し、とくに胃潰瘍および非消化器悪性腫瘍にその傾向を強く認めた。肝炎および肝硬変、胆石症、腸閉塞、甲状腺機能亢進症例などはほぼ正常に近く、また、膵炎、糖尿病、甲状腺機能低下症などの症例ではいずれも低値を示す傾向にあつたが、いずれも今後症例を重ねて検討を加える必要があろう。

糖経口負荷試験時における血中セクレチン濃度の推移については、セクレチンの有する生理学的作用の多様性を考慮して、ガストリン、C-ペプチド、血糖インシュリン、HGH を同時に測定して興味ある知見を得たがこの点に関してもさらに症

例を重ねて検討する必要がある。

おわりに

われわれは [Thyrosine¹] セクレチンキットについて 2, 3 の検討を加えた結果, 本キットは感度, 精度ならびにセクレチン値の再現性も良好で, 臨床的に十分利用し得るものと考えられる。

本論文の要旨は第 9 回日本核医学会関東甲信越地方会で報告した。

文 献

- 1) Mutt V and Jorpes E: Biochem Biophys Research Commun **26**: 392, 1967
- 2) Jorpes E and Mutt V: Acta chem Scand **15**, 1790 1961
- 3) Young J et al: Nucl Med **9**: 641, 1968
- 4) Boden G et al: Endocrinology **92**: 1617, 1973
- 5) Yanaihara N et al: Endocrinol Jap **23**: 87, 1976
- 6) 清野裕他: ホルモンと臨床 **25**: 1147, 1977
- 7) 宮下洋他: ホルモンと臨床 **26**: 485, 1978