

《ノート》

Trypsin の Radioimmunoassay とその臨床応用

Radioimmunoassay of Trypsin and it's Clinical Application

鬼原 彰* 野尻 義男* 石川 善朗* 多田 信和*
 細川 英明* 谷内 昭*

Akira KIHARA*, Yoshio NOJIRI*, Yoshiaki ISHIKAWA*, Nobukazu TADA*,
 Hideaki HOSOKAWA* and Akira YAUCHI*

*First Department of Internal Medicine, Sapporo Medical College (Director: Prof. Takeo WADA)

I. はじめに

今日血中膵酵素の測定は酵素活性を指標とする amylase 測定がルーチン化されているが、血中 trypsin や lipase の測定はその段階に至っていない。しかし、trypsin は他の酵素とは異なり、膵でのみ産生されることから、その測定は膵疾患診断の上からも特異性が高いと考えられる。

最近 radioimmunoassay (RIA) による血中 trypsin の測定法が開発され、特に膵病変の診断に有用との報告¹⁾がみられるが、今回われわれも2抗体法を用いた trypsin 測定キット (Behringwerke Radiochemistry Laboratory: Hoechst Japan 株式会社) を試用する機会を得たので、本キットの臨床応用上の有用性を追究する目的で、2, 3の基礎的な検討を加えると共に、pancreozymin 刺激後の変化、endoscopic retrograde pancreatography (ERPG) 時の変化、および腹部手術の影響などについて血中 trypsin の測定を試みた成績を報告する。

II. 測定方法

1) 第1反応について キット記載の方法を述べると、標準 trypsin (以下 IRT) あるいは被検血清 0.1 ml に抗 IRT 家兔血清 (第1抗体) 0.2 ml および ¹²⁵I-IRT 0.2 ml を加えて室温で24時間反応させる。

2) 第2反応について 第1反応終了後、抗家兔沈降抗体 (第2抗体) 0.1 ml を加え、同様に室温で3時間反応させる。次いで4°Cで3,000 rpm 30分間遠沈し、decantation にて上清をすてる。沈渣の放射能をγ-counter で1分間測定する。なお、あらかじめ全放射能測定用試験管を1本用意しておくことが望ましいが、測定値の計算は B/T% あるいは B/B₀% のいずれでも良い。

III. 測定成績

1. RIA に関する検討

1) 第1および第2反応時間について 3種類の標準 IRT 溶液と control 血清を用いて検討した。Fig. 1 に示すように、第1反応時間は16および24時間に比べて48および72時間の方が B/T% はやや高値を示したが、16ないし24時間の反応時間でも十分と考えられた。一方第2反応時間は1~6

* 札幌医科大学第1内科 (主任: 和田武雄教授)

受付: 54年12月19日

最終稿受付: 55年3月21日

別刷請求先: 札幌市中央区南1条西16丁目 (☎060)

札幌医科大学内科学教室第1講座

鬼原 彰

Key words: Trypsin, Radioimmunoassay

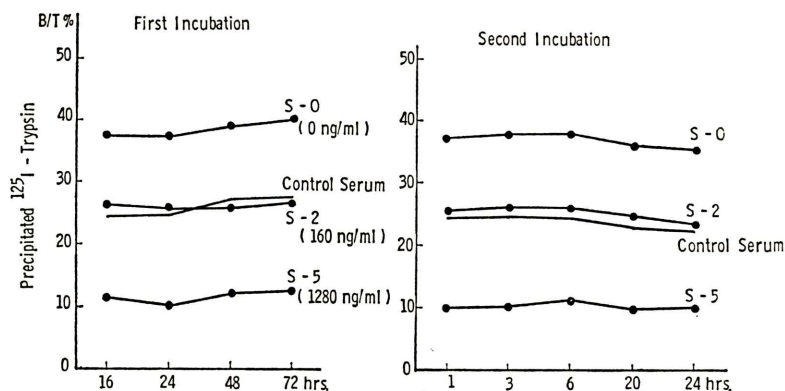


Fig. 1 Effects of First and Second Incubation Time on ^{125}I -Trypsin Precipitation

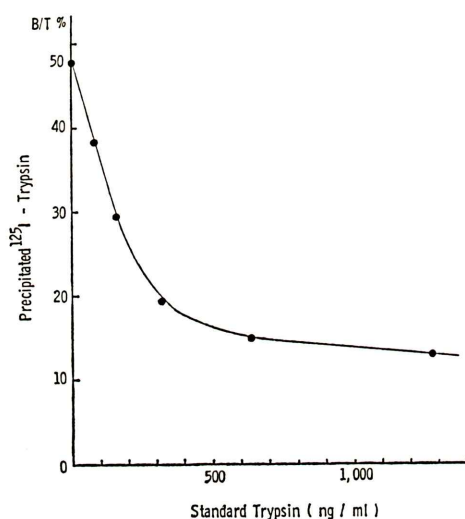


Fig. 2 Standard Curve for Trypsin Immunoassay

時間でほぼ plateau になり、20および24時間では逆に B/T% はやや低下を示した。

2) 標準曲線について Fig. 2 に本キットによる標準曲線の一つを示したが、毎回安定した標準曲線が得られた。

3) 再現性について 5種類の血清試料につき検討した。Table 1 に示すように、同一測定系内の再現性は 1.9~11.8 (平均 6.8) % (CV) を示し、測定系間のそれは 8.1~15.8 (平均 10.4) % を示した。

4) 回収率について 2種類の血清試料を用い

Table 1 Reproducibilities of the Trypsin Radioimmunoassay

a. Intraassay

Sample	No	IRT ng/ml (M \pm SD)	CV (%)
A	5	168 \pm 3	1.9
B	5	194 \pm 14	7.0
C	5	478 \pm 25	5.3
D	5	836 \pm 66	7.9
E	5	978 \pm 115	11.8

b. Interassay

Sample	No	IRT ng/ml (M \pm SD)	CV (%)
A	5	151 \pm 24	15.8
B	5	164 \pm 14	8.7
C	5	172 \pm 18	10.5
D	5	197 \pm 16	8.1
E	5	213 \pm 19	8.9

て回収率を調べたが、Table 2 に示すように、添加 IRT が 300 ng/ml 以下の時は 96.5~115.0 (平均 105.9) % の範囲内を示した。しかし、550 ng/ml においてはいずれの血清も高い回収率を示した。

5) 稀釈試験について 2種類の血清試料を用い、原血清を 2~16倍に稀釈して測定を行なったが、いずれにもきわめて良好な直線性が得られた。

6) 血清の凍結融解の影響 IRT 測定に与える

Table 2 Recovery of Unlabelled Trypsin Added to Serum

added trypsin	Serum A (ng/ml)			Serum B (ng/ml)		
	expected	measured	%	expected	measured	%
0	—	223	—	—	245	—
75	296	306	103.4	320	333	104.1
150	373	398	106.7	395	381	96.5
300	523	575	109.9	545	627	115.0
550	773	1180	152.6	795	1045	131.4
ng/ml						

Table 3 Effects of Freezing and Thawing of Serum on Immunoreactive Trypsin

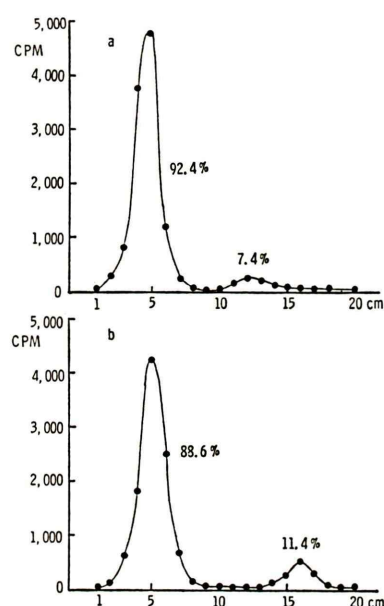
Serum	IRT (ng/ml)		
	Before	After	% Decrease
A	978	700	71.6
B	21	12	57.1
C	478	382	79.9
D	836	575	68.8
E	168	140	83.3
F	194	153	78.9
M±SE	446±159	327±111	73.3±3.9

血清試料の凍結融解の影響を調べるため、6種類の血清試料を5回にわたり急速凍結・融解をくり返し、無処置血清と比較した。Table 3に示すように無処置血清では平均446 ng/mlに比べて凍結融解後は平均327 ng/mlを示し、これを減少率で見ると凍結融解により平均73.3%に低下した。

7) ^{125}I -標識 IRT の検定 RIA における原則の一つは、標識操作によって生ずる damaged fraction が少なく、かつ免疫活性の良好な標識抗原の作製であることから、本キットの ^{125}I -IRT につき、Whatman 3MM 濾紙を用いた paper electrophoresis および sephadex G-100 を用いた gel-filtration によりその検定を行なった。

Fig. 3-a はキット入手直後の電気泳動パターンを示すが、放射活性の92.4%は原点にとどまり、わずかに7.4%が添加血清と共に移動した。また、Fig. 3-b はキット入手後1か月間凍結保存した ^{125}I -IRT を用いたパターンである。damaged fraction は11.4%とやや増加を示した。

次にそれぞれを sephadex G-100 用いて gel-

Fig. 3 Paper Electrophoresis of ^{125}I -Trypsin

filtration を行なった成績を Fig. 4-a および 4-b に示した。いずれも ^{125}I -IRT は分子量の異なる3つの放射活性部分より成ることを示している。

2. 血中 IRT の測定成績

1) 正常対照群の空腹時 IRT 値および pancreozymin 刺激後の変化 膵・肝疾患および糖尿病などの既往症のない健康対照22名（男16，女6，年齢24～46歳，平均33.4歳）の空腹時血中 IRT 値は $186 \pm 7 \text{ ng/ml}$ (M±SE) を示した。また，この中10名に対して pancreozymin 1 U/kg (Boots 社) を静注し，前，10および20分目に採血して外分泌刺激時の血中 IRT の変化を調べた。しかし，Ta-

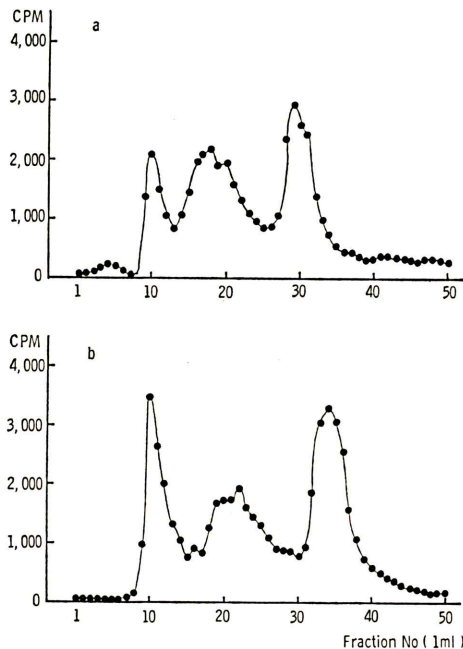


Fig. 4 Gel-filtration of ^{125}I -Trypsin with Sephadex G-100.

ble 4 に示すように、健康対照例では少なくとも 20 分目までは特にみるべき変化を示さなかった。

2) ERPG 後の血中 IRT の変化 種々の疾患 24 名に ERPG (endoscopic retrograde pancreatography) を施行し、その前後における血中 IRT の変化を観察した。

Table 5-a に示すように、血中 IRT は ERPG 施行前は平均 278 ng/ml を示したが、施行直後には平均 871 ng/ml と著明な上昇を認めた。同時に測定した血中 amylase 活性は施行前の平均 303 IU/l に対し、施行後は平均 397 IU/l と軽度の上昇を示したに過ぎなかった。

以上の変化は、個々の症例における%増加率としてみると、Table 5-b に示すように、amylase では前値を 100% とするとその増加率は平均 136% を示したが、IRT では平均 367% を示して amylase に比べてその上昇率はきわめて大きかった。さらに、これを増加率ごとに区分すると、IRT では、amylase に比べて増加率 301% 以上を示したものが 8 名認められた。

Table 4 Changes of Serum Immunoreactive Trypsin after Intravenous Pancreozymin Administration in Normal Controls

Subjects	age	sex	IRT (ng/ml)		
			0	10	20 (min)
1	46	F	163	166	154
2	24	F	215	224	225
3	32	M	190	181	179
4	40	M	215	208	213
5	37	M	178	178	186
6	21	M	184	182	186
7	39	M	173	188	195
8	39	M	206	220	227
9	26	M	220	207	203
10	42	F	132	156	147
M \pm SE			188 \pm 9	191 \pm 7	192 \pm 9

Table 5 Changes of Serum Immunoreactive Trypsin and Amylase Activity after ERPG in Subjects with Various Disorders (M \pm SE)

No	IRT (ng/ml)		Amylase (IU/l)	
	Before	After	Before	After
a.				
Subjects	24	278 \pm	871 \pm	303 \pm
examined		42	149	32
b.				
% Increase		367 \pm 79		136 \pm 9
100-200 %		No. 10		No. 22
201-300 %		6		2
301-400 %		3		0
401-500 %		1		0
501- %		4		0

3) 腹部手術中の血中 IRT の変化 腹部外科手術が血中 IRT 値に与える影響をみるために、胆石症手術 3 名を含む 7 名の術前、術中および術後に採血して血中 IRT を測定した。Table 6 に示すように、術前に比べて術中および術後では比較的軽微な血中 IRT の上昇が認められた。中でも脾に直接侵襲が加えられた症例 3 および 6 では他の例に比較して血中 IRT の上昇率が大きかった。

IV. 考 案

今日、脾疾患の診断には主として血中および尿

Table 6 Effects of Surgical Treatment on Serum Immunoreactive Trypsin in Subjects with Digestive Disorders

Subjects	age	sex	Surgical Treatments	IRT (ng/ml)		
				Before	During	After
Patient 1	44	F	Cholecystectomy (Cholelithiasis)	196	189	200
2	55	M	Cholecystectomy (Cholelithiasis)	144	179	144
3	26	F	Pancreas tail resection and Splenectomy (Insuloma)	73	248	216
4	59	F	Cholecystoduodenostomy (Pancreas Ca)	57	58	61
5	40	M	Cholecystectomy (Cholelithiasis)	302	547	406
6	39	M	Pancreas head resection and Splenectomy (Chronic Pancreatitis)	267	524	500
7	70	F	Choledochostomy and Cholecystectomy (Choledochostenosis)	168	240	160
M±SE				172±35	283±69	241±59

中 amylase 活性の測定が行なわれているが、必ずしも膵に特異的でないことは周知のとおりである。これに比べて trypsin は臓器特異性が高く、かつ膵炎の発症機構とも直接関連した酵素であるだけに、その血中濃度を知る臨床的意義は大きい。しかし、本酵素活性の測定にあたっては、 α_1 -antitrypsin を主とした血中活性阻害物質の存在や、trypsin 以外の蛋白分解酵素が反応系に強い影響を与えることから、その活性測定値自体が膵疾患の診断などに有用であるかどうかについては、必ずしも一定の見解が得られていない。

一方、その RIA は、酵素蛋白量自体を測定することから trypsin に特異的であり、かつ抗 trypsin 抗体の結合部位が α_1 -antitrypsin や α_2 -macroglobulin などの trypsin-inhibitor と競合性を示さない限り、血中 trypsin の測定法としてはきわめて有用と言える。しかしこの点に関してはその前駆物質である trypsinogen との間に交叉反応性が認められ、また α_1 -antitrypsin の影響はうけないが、 α_2 -macroglobulin とは抗体結合部位で軽度ながら競合性が認められるとの報告¹⁾があり、なお問題が残されている。

RIA 法実施の上で最も重要なことは前述のごとく、いわゆる damaged fraction の少ない、かつ免疫活性の良好な標識抗原の作製にある。この点を検討するために、本キットの ^{125}I -IRT につき paper electrophoresis および gel-filtration を行

なった。前者ではキット入手後1か月を経ても damaged fraction の存在は 11.4% 程度と比較的少なかったが、後者の検討によると、本標識 IRT には分子量の異なる 3 つの放射活性部分が認められ、その不均一性については今後の検討が必要と思われる。

次には抗体特異性の問題がある。これに関してはヒト trypsin の入手が困難であることより、今回の研究では検討しなかったが、早川ら²⁾はイヌ血清および膵液とは交叉反応を認めず、ヒト十二指腸液により標準曲線と平行した抑制曲線が得られたことから本抗体はヒト trypsin に特異性が、高いとしている。しかし、本抗体の特異性についても今後検討の余地がある。

なお、本キットの信頼性については、その再現性、回収率、稀釈試験とも RIA 法としてはほぼ満足できるものであり、また第 1 および第 2 反応時間もキット記載の方法で十分と考えられた。血清試料の保存に関しては、測定系間のばらつき（約 10 週間で -20°C 保存）や急速凍結融解実験の結果をみても大体安定した成績が得られる。

血中 IRT 測定の臨床上の意義については、膵炎を中心とする膵疾患^{1,2)}、肝疾患³⁾ および糖尿病⁴⁾ についての研究発表がみられる。

今回われわれが測定した健康対照群の空腹時 IRT は平均 186 ng/ml を示し、pancreozymin 刺

激後20分目までは全く変化を示さなかった。しかし、pancreozymin 刺激後30分目には正常人でも血中 IRT の上昇を認めたとの報告²⁾もあることから、この点についてはさらに検討を要する。

次に ERPG 時の血中 IRT 動態と amylase 活性の変化を平行して調べたが、ERPG 後の上昇率は amylase に比べて著明であり、RIA 法による血中 IRT 測定の方が amylase 活性の測定に比べて明らかに鋭敏といえる。

さらに、腹部手術時の血中 IRT の変化を観察したが、脾に直接侵襲が加えられた2名を除いては、IRT の上昇は軽度であった。

V. 結 論

2 抗体法による血中 trypsin 測定キットについて、2, 3 の検討を加えて次の結果を得た。

1) 本キットの再現性、回収率および稀釈試験では RIA 法としてはほぼ満足できる成績が得られた。

2) さらに ^{125}I -trypsin の検定では damaged fraction の存在は少なかったが、gel-filtration の上では不均一性が認められた。

3) 臨床的に pancreozymin 刺激前後、ERPG 施行前後および腹部手術時の変化をみた。また、

ERPG 施行時の血中 IRT と血清 amylase 活性の変化とを比較したが、血中 trypsin の測定は amylase 活性測定に比べて明らかに鋭敏な成績を示した。

以上より、本測定キットを用いた血中 trypsin の測定は臨床応用上の意義が大きいものと考えられた。

本論文の要旨は、第3回北海道膵臓研究会(昭和54年10月)において発表した。

なお、本測定キットの提供をいただいた Hoechst Japan 株式会社ならびにご協力をいただいた本学第1外科水間公一博士に謝意を表します。

文 献

- 1) Elias E, Redshaw M, Wood T: Diagnostic importance of immunoreactive trypsin. *Lancet* **2**: 66-68, 1977
- 2) 早川哲夫, 近藤孝晴, 山崎嘉弘, 他: 膵疾患における血清トリプシンの診断的意義. *日消誌* **76**: 1513-1521, 1979
- 3) 神坂和明, 都留正展, 稲垣徹也, 他: 肝障害における血清トリプシン値について. *肝臓* **20**: 1034-1039, 1979
- 4) Dandona P, Elias E, Beckett AG: Serum trypsin concentration in diabetes mellitus. *Brit Med J* **2**: 1125, 1978