

《ノート》

Pancreatic Secretory Trypsin Inhibitor (PSTI) 測定用 RIA・Kit (塩野義) の検討

Evaluation of Pancreatic Secretory Trypsin Inhibitor RIA Kit

辻野大二郎* 千田 麗子* 斉藤 尚枝* 近藤 義任*
綾部 晃久* 矢崎 俊二* 木田 博和* 染谷 一彦*
佐々木康人**

Daijiro TSUJINO*, Reiko CHIDA*, Hisae SAITO*, Yoshitoh KONDO*,
Teruhisa AYABE*, Shunji YASAKI*, Hirokazu KIDA*, Kazuhiko SOMEYA*
and Yasuhito SASAKI**

*The Third Department of Internal Medicine, St. Marianna University School of Medicine

**Department of Radiology, Toho University School of Medicine

I. はじめに

膵臓には2種類のトリプシンインヒビターが存在する。塩基性膵トリプシンインヒビター (Basic pancreatic trypsin inhibitor, BPTI Kunitz 型インヒビター) と膵分泌性トリプシンインヒビター (Pancreatic secretory trypsin inhibitor, PSTI, Kazal 型インヒビター) である¹⁾。BPTI はヒトには存在しないが、ウシ肺臓より得られたもの (Trasylol®) が急性膵炎、ショック、熱傷などの治療に利用されている。PSTI はヒトをはじめとする哺乳動物の膵液中に分泌され、膵管内のトリプシン活性に對抗している。ヒト PSTI は 54 個のアミノ酸から成り、分子量は 6,242 である²⁾。

PSTI の RIA による測定は 1978 年 Eddeland ら³⁾、1979 年小川ら⁴⁾ により報告された。血中に

は微量の PSTI が存在し、その濃度は急性膵炎、慢性膵炎増悪期に著増し、重症度や臨床経過をよく反映する。また、血中アミラーゼに比し長期間高値を持続すると報告されている¹⁾。

今回、われわれは PSTI RIA キット (0931-S・塩野義製薬株式会社製) を使用する機会を得たので、その基礎的検討と各種疾患での血中 PSTI 濃度測定の結果について報告する。

II. 方法と対象

本キットは B/F の分離に 2 抗体法を用いている。標準 PSTI はヒト膵液より分離したものであり、抗 PSTI 抗体もヒト PSTI を抗原として家兎を免疫して得られたものである。実際の測定は Fig. 1 に示すように、各濃度の標準 PSTI 溶液または検体 50 μ l に ¹²⁵I-PSTI 溶液 100 μ l、抗 PSTI 抗体 (第 1 抗体) 溶液 500 μ l を加え 37°C で 2 時間インキュベートする。さらに polyacrylamid gel にヤギ抗家兎 IgG 抗体を結合した第 2 抗体溶液 100 μ l を加え 37°C で 30 分インキュベートする。

Key words: Pancreatic secretory trypsin inhibitor, Radioimmunoassay, Pancreatitis.

* 聖マリアンナ医科大学第三内科

** 東邦大学医学部放射線科

受付: 58年11月26日

最終稿受付: 59年4月3日

別刷請求先: 川崎市宮前区菅生2095 (☎ 213)

聖マリアンナ医科大学第三内科

辻野 大二郎

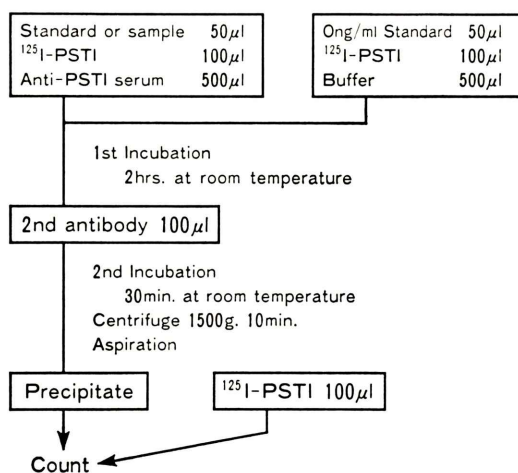


Fig. 1 Assay procedure.

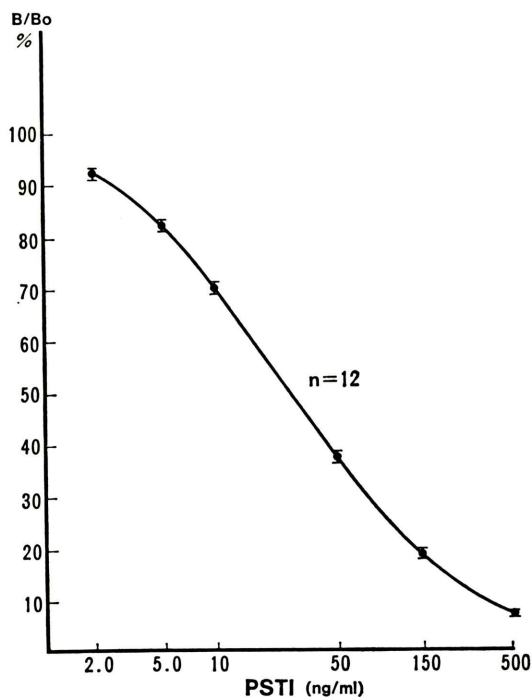


Fig. 2 Standard curve.

反応終了後、室温で 1,500 g, 10 分間遠心分離し、上清を吸引除去したのち沈渣の放射能をオートウェルシンチレーションカウンターで測定する。測定はすべて duplicate で行った。片対数グラフ用紙を用いて標準 PSTI 濃度 (ng/ml) を横軸, log

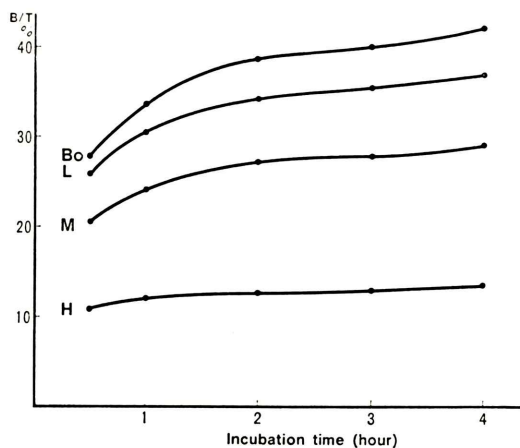


Fig. 3 Effect of incubation time on the 1st reaction.

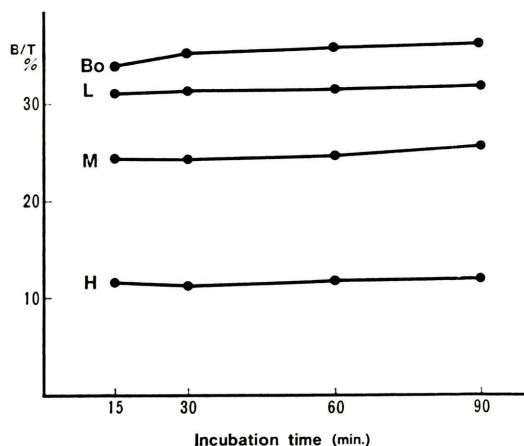


Fig. 4 Effect of incubation time on the 2nd reaction.

側に, B/Bo% を縦軸にとり標準曲線を描き, これを用いて検体中 PSTI 濃度を求めた。

今回検討の対象としたのは正常対照 71 例 (男 35, 女 36), 良性疾病患者 183 例, 癌患者 251 例である。良性疾病のうちわけは急性肝炎 15 例, 慢性肝炎 13 例, 胃潰瘍 23 例, 肺炎 17 例, 急性肝炎 15 例, 慢性肝炎 25 例, 肝硬変 29 例, 胆石症 19 例およびその他の疾患 27 例である。癌は食道癌 11 例, 胃癌 78 例, 大腸癌 37 例, 肝細胞癌 34 例, 膵癌 30 例, 肺癌 25 例, 乳癌 17 例, および胆道癌 19 例である。

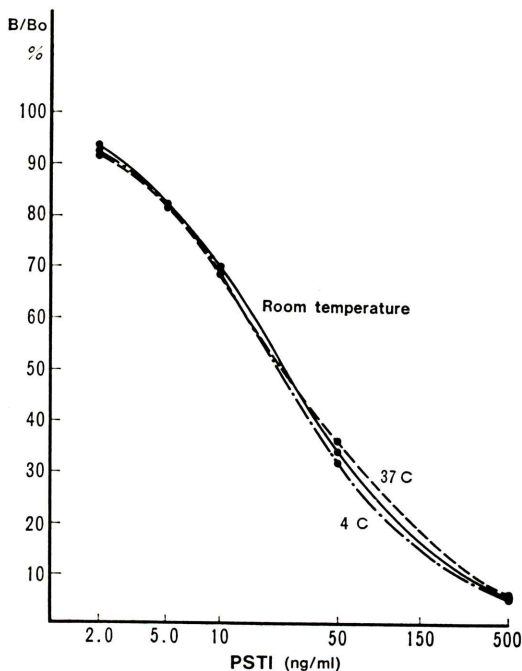


Fig. 5 Effect of incubation temperature on standard curve.

III. 結 果

1. 基礎的検討

(1) 標準曲線 (Fig. 2)

12回の測定で得られた標準曲線の各標準濃度における B/Bo % の平均値 ± 1 標準偏差 ($\bar{m} \pm 1$ S.D.) を Fig. 2 に示した。標準液の濃度範囲は 2.0~500 ng/ml である。各標準溶液における 12 回測定の変動係数 (C.V.) は 1.3~8.9% と良好であり、毎回安定した標準曲線が得られた。

(2) インキュベーション時間 (Figs. 3,4)

実測値 2.8, 10.1, 59.3 ng/ml の 3 種類のコントロール検体を用いて第 1 および第 2 反応におけるインキュベーション時間の影響を検討した。

第 1 反応時間の検討では第 2 反応の条件を 37°C, 30 分とし、第 1 反応時間を 30 分から 4 時間まで 5 段階に変化させ検討した。Fig. 3 に示すように B/T および Bo/T% はキットの指示時間である 2 時間前後ではまだごく緩徐な上昇傾向を示し

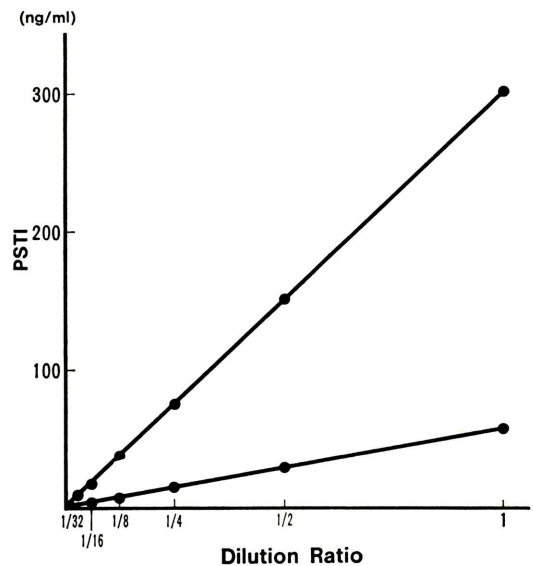


Fig. 6 Dilution test.

たが時間による差はわずかであった。

第 2 反応時間の検討では、第 1 反応の条件を 37°C, 2 時間とし、第 2 反応時間を 15~90 分まで 4 段階に変化させ検討したが、Fig. 4 に示すように結合率の変化はほとんどみられなかった。

(3) インキュベーション温度 (Fig. 5)

第 1 および第 2 反応におけるインキュベーション温度を 4°C, 室温, 37°C の条件で測定を行った時のおのおのの標準曲線を Fig. 5 に示す。高濃度域での結合率は 37°C, 室温, 4°C の順に大きかったがその差はごくわずかであった。

(4) 希釈試験 (Fig. 6)

PSTI 濃度 58.0 ng/ml の膵癌症例と 303.0 ng/ml の急性膵炎症例の検体を用い、キットに添付されている 0 ng/ml 標準 PSTI 溶液で倍々希釈し測定した。測定結果は理論値を示す直線とよく一致した値が得られた。

(5) 回収試験 (Table 1)

1 例の正常対照血漿に 2.5~250 ng/ml の濃度の標準 PSTI を加えて測定した結果より得た回収率は 98.0~109%, 平均 101% と良好であった。

(6) 測定系内再現性と最低測定感度 (Table 2)

測定の Within assay error と最低感度をみるため 9 種類の検体をおのおの duplicate で 10 回測定した。2.0 ng/ml 以下の濃度の測定は 2.0 ng/ml の標準 PSTI 溶液を 0 ng/ml の PSTI 溶液で希釈し、

1.0, 0.5, 0.25 ng/ml の標準溶液を調製し、測定した。検体濃度 2.02~59.3 ng/ml の範囲では C.V. 1.6~8.4% と良好な結果であった。検体濃度 1.89, 1.63, 0.90 ng/ml ではおのおの C.V. 15.0, 19.1,

Table 1 Recovery test

Added (A) (ng/ml)	Measured (B) (ng/ml)	Recovery (%) $\frac{B-A}{A} \times 100$
0	6.88 (*)	—
2.5	9.33	98.0
5.0	11.9	100
25	32.3	102
75	88.8	109
250	253	98.4

$\bar{m}=101$

Table 2 Within assay error

\bar{m} (ng/ml)	1 S.D. (ng/ml)	C.V. (%)
59.3	1.74	2.9
10.1	0.16	1.6
3.60	0.30	8.3
2.75	0.23	8.4
2.31	0.14	6.1
2.02	0.14	6.9
1.89	0.28	15.0
1.63	0.31	19.1
0.90	0.21	23.1

(n=10)

Table 3 Between assay error

\bar{m} (ng/ml)	1 S.D. (ng/ml)	C.V. (%)	n
2.54	0.13	5.0	10
10.0	0.60	6.0	12
61.1	3.28	5.4	11

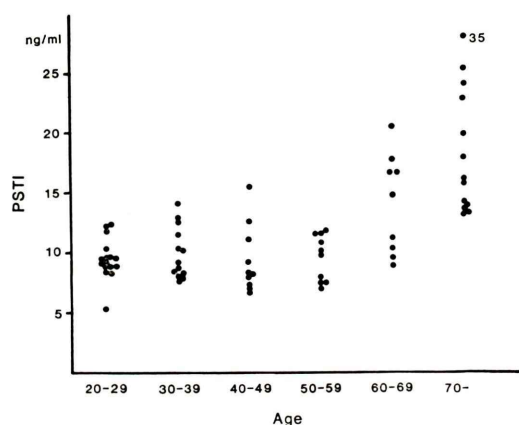


Fig. 7 Effect of age on plasma PSTI levels in normal subjects.

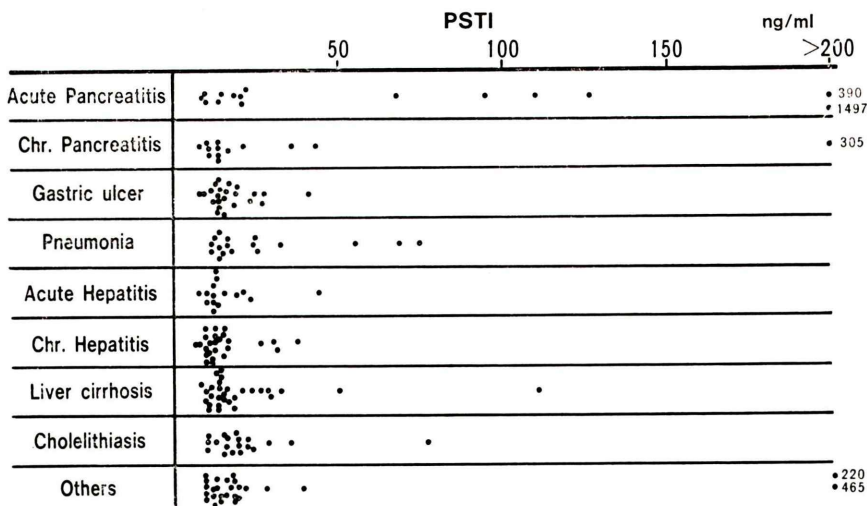


Fig. 8 Plasma PSTI levels in benign diseases.

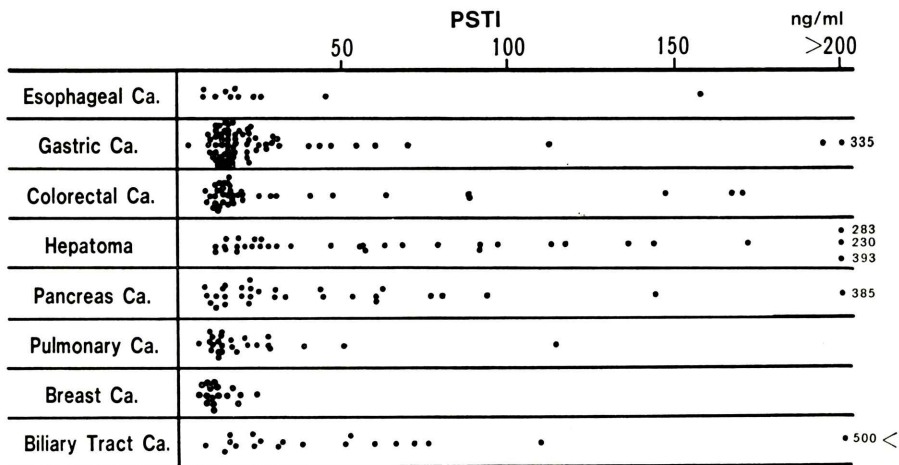


Fig. 9 Plasma PSTI levels in various carcinomas.

23.1%と変動は増大した。この結果より、信頼にたる最低測定感度は 2.0 ng/ml 程度と考えられる。

(7) 測定系間再現性 (Table 3)

Lot No. 830150 と No. 830216 のキットを用い、低、中、高濃度の 3 種の検体をおのおの測定した。測定値は No. 830150 では低濃度で 2.50 ± 0.08 ng/ml ($n=4$)、中濃度で 10.2 ± 0.25 ng/ml ($n=6$)、高濃度で 59.0 ± 3.14 ng/ml ($n=5$) であり、同様に No. 830216 では 2.57 ± 0.15 ng/ml ($n=6$)、 9.77 ± 0.77 ng/ml ($n=6$)、 63.0 ± 2.2 ng/ml ($n=6$) と Lot 間で測定値の有意の差 ($p < 0.01$) はなかった。

同じ 3 種類の検体をおのおの二重測定で 10, 12, 11 回測定 (異なる 3 Lot のキットを含む) して得た Between assay error は平均濃度 2.54 ng/ml で C.V. 5.0%, 10.0 ng/ml で 6.0%, 61.1 ng/ml で 5.4% と良好な結果であった。

(8) 血漿と血清の比較

検体として血漿または血清を用いた場合の測定値の差を比較検討するため正常対照 29 名より同時に採血して得た血清と EDTA 加採血による血漿を同時に測定した。血清 10.2 ± 1.65 ng/ml ($\bar{m} \pm 1$ S.D.), 血漿 9.70 ± 1.73 ng/ml であり、両者には有意の差はみられなかった ($p < 0.01$)。

(9) 検体の凍結融解による影響

検体の凍結融解をくり返すことによる測定値へ

の影響をみるため、PSTI 値 10.3 ng/ml の検体を用いて凍結融解を 0~12 回くり返し測定した。測定値は凍結融解の回数増加に伴う一定の増減傾向は示さず C.V. 7.2% であった。

2. 臨床的検討

(1) 正常対照群の PSTI 値 (Fig. 7)

正常対照 71 例 (男 35, 女 36, 年齢 20~89 歳, 平均 47.8 歳) の血漿中 PSTI 値を測定した。正常対照全体では 12.0 ± 5.0 ng/ml であり、男性 11.3 ± 3.6 ng/ml, 女性 12.6 ± 6.1 ng/ml と性差はなかった。20~50 歳台 ($n=49$) までの PSTI 値に年齢差はみられず 9.7 ± 2.1 ng/ml であった。これに比し、60 歳台 ($n=9$) では 14.2 ± 4.2 ng/ml, 70 歳以上 ($n=13$) では 18.9 ± 6.5 ng/ml とおのおの 5%, 1% の危険率で有意に高値を示した。

(2) 血漿 PSTI 値の日内変動

正常対照 3 例で 8:00 a.m. から 5:00 p.m. にかけて食事前後を含み 5~6 回採血し、PSTI 値を測定した。それぞれの日内変動は 2.2, 4.5, 5.4% (C.V.) で測定内変動の範囲であり、かつ時間による一定の増減傾向はみられなかった。

(3) 各種疾患の PSTI 値 (Figs. 8, 9)

各種良性疾患 183 例 (18~89 歳, 平均 61.1 歳) の疾患別血漿 PSTI 値を Fig. 8 に示す。また、各種癌患者 251 例 (36~89 歳, 平均 69.4 歳) の

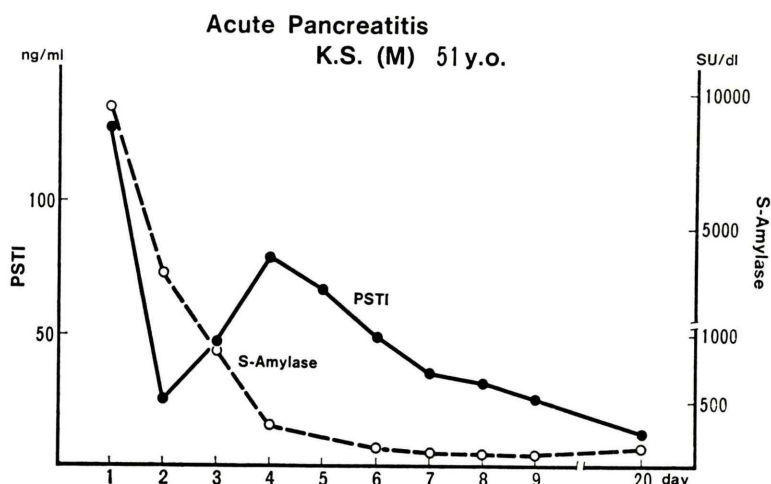


Fig. 10 Changes of plasma PSTI levels and serum amylase activities in a case of acute pancreatitis.

PSTI 値を Fig. 9 に示す。対象患者には高齢者が多いことを考慮し、PSTI 正常上限値のカット・オフ値を 30.0 ng/ml として検討した。

良性疾患の血漿 PSTI 上昇症例は急性膵炎 15 例中 6 例 (40.0%)、慢性膵炎 13 例中 3 例 (23.1%)、胃潰瘍 23 例中 1 例 (4.3%)、肺炎 17 例中 4 例 (23.5%)、急性肝炎 15 例中 1 例 (6.7%)、慢性肝炎 25 例中 2 例 (8.0%)、肝硬変 29 例中 3 例 (10.3%)、胆石症 19 例中 2 例 (10.5%) およびその他の疾患 27 例中 3 例 (11.1%)、PSTI 値 220 および 465 ng/ml の症例は慢性腎不全患者) であり、全体では 183 例中 25 例 (13.7%) であった。

各種癌患者の PSTI 上昇率をみると、食道癌 11 例中 2 例 (18.2%)、胃癌 78 例中 13 例 (16.7%)、大腸癌 37 例中 8 例 (21.6%)、肝細胞癌 34 例中 20 例 (58.8%)、膵癌 30 例中 14 例 (46.7%)、肺癌 25 例中 2 例 (8.0%)、乳癌 17 例中 0 (0%)、胆道癌 19 例中 10 例 (52.6%) であり、癌全体で 251 例中 69 例 (27.5%) であった。

Figure 10 に急性膵炎で発症当日より血漿中 PSTI 値と血清アミラーゼの経過を追えた症例を示す。アミラーゼは第 1 病日より第 4 病日にかけて臨床症状がまだ不良にもかかわらず急激に正常化した、PSTI 値は第 1 および第 4 病日をピーク

とする 2 相性の変動を示したが、その後臨床症状の改善ともよく一致して、第 20 病日にかけて徐々に低下した。

IV. 考 察

血中に存在する PSTI の測定には免疫学的測定法が必要である。1978 年 Eddeland⁵⁾ らは single radial immunodiffusion 法を報告したが、感度が血中 PSTI 測定には不十分であった。その後 Eddeland ら³⁾、小川ら⁴⁾ により RIA 法が報告された。今回検討した PSTI 測定用 RIA キットはヒト膵液より得た PSTI を抗原とした 2 抗体法 RIA キットである。

インキュベーション時間の検討結果では第 1 反応ではキットの指示時間である 2 時間以後も結合率 (B/T%) はまだわずかに上昇傾向にあるが、時間による結合率の変化はわずかであり、検体ごとの測定操作時間のわずかな差が測定値に与える影響はほとんど無視しようと考えられる。臨床的にはできるだけ短時間に測定を終了することが望ましいので 4 時間以降の検討は実施しなかった。第 2 反応では時間による結合率の変化はほとんどなく、インキュベーション時間はキット指示の 30 分で十分であった。本キットによる PSTI 測定に

要する時間は4時間以内と短かく、急性膵炎などの急性腹症での利用に対応できるものと思われる。

Within assay error は2.02~59.3 ng/ml の範囲で C.V. 1.6~6.9%。Between assay error は2.54~61.1 ng/ml の範囲で C.V. 5.0~6.0 % であり良い精度、再現性を示した。また希釈試験、回収試験の結果も良好であった。

検体の血漿、血清による差はなく、1検体だけでの検討であるが、凍結融解のくり返しによる測定値の変化もみられなかった。また正常対照では、食事を含めた採血時間による測定値の変動もみられなかった。

以上のように本キットによる血中 PSTI 濃度測定の基礎的検討の結果は日常臨床検査法として満足すべきものであった。

正常対照 71 例の血漿中 PSTI 値は 12.0 ± 5.0 ng/ml であり、正常上限値を $\bar{x} + 2 \text{ S.D.}$ とすると 22.0 ng/ml となる。しかし 60 歳以上では 60 歳以下に比し有意に高値を示したことが、対象者が比較的高齢者が多いことを考慮すると血漿中 PSTI 値の正常上限値は臨床的には 30.0 ng/ml 程度が適当と考えられる。高齢者で PSTI 値が高値を示す理由は明らかでない。血中 PSTI の排泄には腎が重要な役割をしていると考えられる⁹⁾。われわれの検討でも腎不全の2例で著明な高値を示した。正常対照でも加齢に伴う軽度の腎機能の低下が血中 PSTI 値上昇の原因の一つであるのかもしれない。

血中 PSTI 値は各種の膵疾患で上昇し、その重症度や臨床経過を良く反映する¹⁾といわれる。血中 PSTI はトリプシンやエラスターゼ 1 などの膵酵素と異なり、他の蛋白とは結合せず free の状態で存在する。このため RIA により全量の測定が可能であり、より正確に膵病変を評価しうると考えられる¹⁾。今回の検討でも急性膵炎の 40% で血漿中 PSTI の上昇がみられた。また経過を追って PSTI を測定できた急性膵炎症例では発症当日には著明な高値をとったが、第2病日には一度下降し、再度上昇を示した。この原因は不明である

が急性膵炎発症初期では採血時期により PSTI 値はかなり変動する可能性はある。しかしその後の PSTI 値の経過は急速に低下してしまうアミラーゼと比べ、臨床経過によく一致した動きを示した。

癌患者では肝細胞癌、膵癌、胆道癌を中心とした各種癌で血中 PSTI 値が上昇する症例がみられた。これらの症例では必ずしも膵への転移浸潤はみられていない。これらの症例での血中 PSTI 値上昇の原因は判然としないが PSTI と免疫学的に同一の物質がヒトの各臓器にも存在するとの報告⁷⁾もあり興味もたれる。なお臨床症例についての詳細な検討は別に報告する。

V. おわりに

2 抗体法による PSTI 測定用キット (0931-S) を検討した結果、精度、再現性は良好であり、日常検査法として満足すべき結果を得た。また血中 PSTI 値測定は各種膵疾患、癌などで新しい臨床情報をもたらすと考えられる。

文 献

- 1) 小川道雄：膵臓のトリプシン・インヒビター。胆と膵 3: 847-856, 1982
- 2) Green LJ, Pubols MH, Bartelt DC: Human Pancreatic Secretory Trypsin Inhibitor. Meth Enzymol 45: 813-825, 1976
- 3) 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
- 4) 北原健志, 高塚雄一, 藤本憲一, 他：膵疾患における血中膵分泌性トリプシン・インヒビター測定の意義。臨床化学シンポジウム 19: 35-40, 1978
- 5) Eddeland A, Ohlsson K: Purification and immunochemical quantitation of human pancreatic secretory trypsin inhibitor. Scand J Clin Lab Invest 38: 261-267, 1978
- 6) 北原健志, 高塚雄一, 藤本憲一, 他：膵分泌性トリプシン・インヒビターに関する研究。(II) ラジオイムノアッセイによる膵分泌性トリプシン・インヒビター測定の基礎的およびその血中存在様式。胆と膵 2: 231-238, 1981
- 7) Matsuda K, Ogawa M, Murata A, et al: Elevation of serum immunoreactive pancreatic secretory trypsin inhibitor contents in various malignant disease. Res Commun Chem Pathol Pharmacol 40: 301-305, 1983