

《ノート》

血中 immunoreactive trypsin 測定値に及ぼす要因について

—Behringwerke および Cis-Sorin kit の比較検討—

Comparative Evaluation of Two Commercial Kits for Immunoreactive Trypsin

早川 哲夫* 野田 愛司* 近藤 孝晴* 村瀬 敏之*
 浜野 博次* 柴田 時宗* 杉本 吉行* 小川 裕*

Tetsuo HAYAKAWA, Aiji NODA, Takaharu KONDO, Toshiyuki MURASE,
 Hirotsugu HAMMANO, Tokimune SHIBATA, Yoshiyuki SUGIMOTO
 and Yutaka Ogawa

Second Department of Internal Medicine, School of Medicine, Nagoya University

I. はじめに

膵疾患診断における血中膵酵素測定の意味は各種診断法の発達した現在も高く、特に、膵障害のスクリーニングに重要である。血中のトリプシンは膵特異性が高い。しかし、血中に共存する類似活性物質や活性阻害物質のため酵素活性測定は困難である。そのため、免疫活性を測定する radioimmunoassay 法が開発され、膵疾患診断に対する意義も認められている¹⁻⁹⁾。

現在までに報告された血中トリプシンの正常値は radioimmunoassay 系により異なる。Temler ら¹⁾, Elias ら²⁾ による正常値は他の測定系³⁻⁵⁾ による正常値に比し約10倍高い。測定系による正常値の差の原因を明らかにするため、Temler ら¹⁾, Elias ら²⁾ の報告とほぼ同様な正常値を示す Behringwerke の RIA-gnost Trypsin kit と Malvano ら³⁾, Borgström ら⁴⁾, Geokas ら⁵⁾ の報告と同様な正常値を示す Cis-Sorin の Trypsin Radioimmunoassay

kit を用いて血中トリプシンの免疫活性を測定し比較した。

II. 方法、材料および対象

1. 血清トリプシンの測定方法

Behringwerke の RIA-gnost Trypsin kit (ヘキストジャパン提供、以下 BW kit とする) および CIS-Sorin の Trypsin Radioimmunoassay kit (ミドリ十字提供、以下 CS kit とする) を用い、immunoreactive trypsin (IRT) を測定した。測定操作は、kit 添付の操作法によった。

2. 標識トリプシンの活性阻害剤添加による影響

¹²⁵I 標識トリプシンに対するトリプシン阻害剤の影響を検討するため、リン酸緩衝化生理食塩水 (NaH₂PO₄・2H₂O 1.0 g, NaHPO₄ 7.3 g, NaCl 9.3g, EDTA・2Na 1.7 g, ウシアルブミン 10 g を加え蒸留水にて全量 1,000 ml, pH 7.4 にした。以下 PBS とする), 1 M 塩酸 benzamidine PBS 溶液, Aprotinin 10,000 KIU/ml (trasylol, Bayer) 各 0.3 ml を ¹²⁵I トリプシン液 2.7 ml に加えて、これを標識トリプシンとして用いて、それぞれの標準曲線を作成し、比較した。

Key words: Immunoreactive trypsin, Trypsin standard, Trypsin inhibitor, Behringwerke kit, Cis-Sorin kit.

* 名古屋大学医学部第二内科

受付: 59年6月4日

最終稿受付: 59年8月3日

別刷請求先: 名古屋市昭和区鶴舞町 65 (☎ 466)

名古屋大学医学部第二内科

早川 哲夫

3. 標準トリプシンの比較

標準トリプシンの純度の違いによる測定値への影響をみるために、標準血清 2, アルコール依存症 13 例の断酒直後から 2 か月間の血清 46 検体を、測定系は変えず標準トリプシンのみを相互に交換して測定値を読んだ。すなわち、BW kit で CS kit の標準トリプシンと血清を測定し、測定値は CS kit の標準トリプシンで作成した標準曲線で読んだ。同様に、CS kit の測定値を BW kit の標準トリプシンで作成した標準曲線で読んだ。なお、測定値がそれぞれの測定系で高値あるいは低値となりすぎた値は相関を求める時には除外した。

両 kit による測定値の相関をみるために、それぞれの kit による上記 48 検体の測定値を比較した。

4. 血中トリプシン阻害物質の影響

血中の α_1 antitrypsin (α_1 AT) および α_2 macroglobulin (α_2 M) の両 kit の IRT 測定値に対する影響をみるために、 α_1 AT および α_2 M の濃度を血漿蛋白定量用免疫拡散板, M パルチゲン (ヘキストジャパン提供) で測定し比較した。検体は上記 46 検体の中から 30 検体を選んだ。

5. 推計学的検討

相関および回帰直線は最小二乗法を用い、相関係数の有意水準は 5% 以下とした。

III. 成 績

1. 標識トリプシンに活性阻害剤を添加した場合の標準曲線に対する影響 (Fig. 1 a, b)

BW kit (Fig. 1a) および CS kit (Fig. 1b) とともに benzamidine 1 M 液, trasylool 10,000 KIU 液の添加では PBS 緩衝液 (対照) の添加と標準曲線にはほとんど差がなかった。

2. 標準トリプシンの差による測定値の影響 (Fig. 2 a, b)

BW kit に CS kit の標準品を用いて標準曲線を描いた測定値 (y) は BW kit そのままの測定値 (x) と、 $y = 0.36x - 23.9$ ($r = 0.99$, $p < 0.01$) の有意な相関関係があった (Fig. 2a)。一方、CS kit と BW kit の標準品で標準曲線を描いた測定値 (y) は CS kit そのままの測定値 (x) と、 $y = 13.0x - 57$ ($r = 0.99$,

$p < 0.01$) の有意な相関を認めた (Fig. 2b)。

両 kit 本来の標準品を用いて測定した場合も BW kit の測定値 (x) と CS kit の測定値 (y) は良く相関したが、前者は後者の 10 倍以上の高値を示

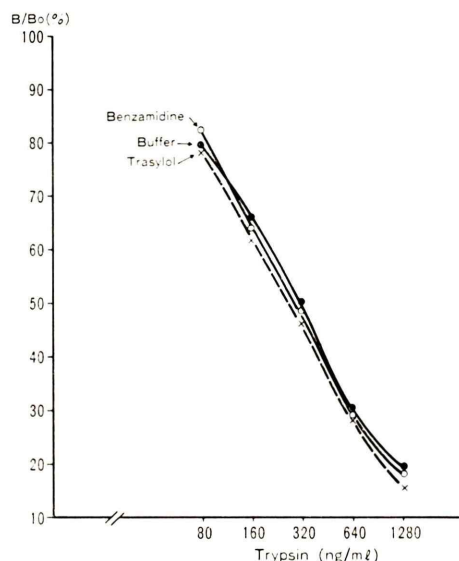
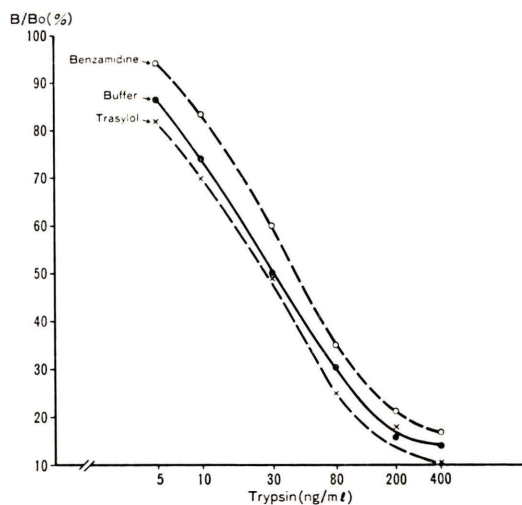


Fig. 1 Comparison of trypsin standard curves with and without addition of a trypsin inhibitor to 125 I trypsin.

1a: measured by Behringwerke's RIA-gnost trypsin (BW) kit.



1b: by CIS-Sorin's trypsin radioimmunoassay (CS) kit.

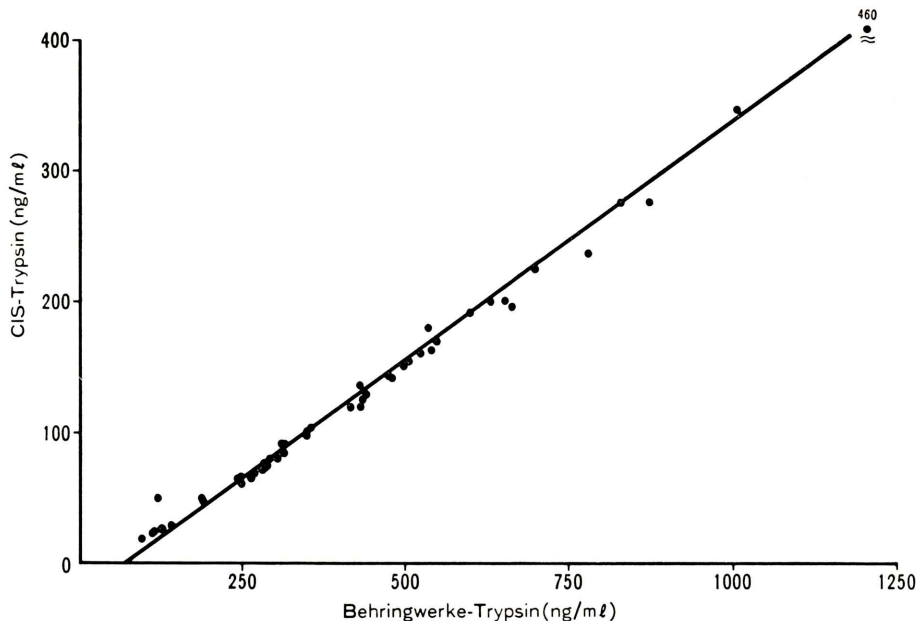
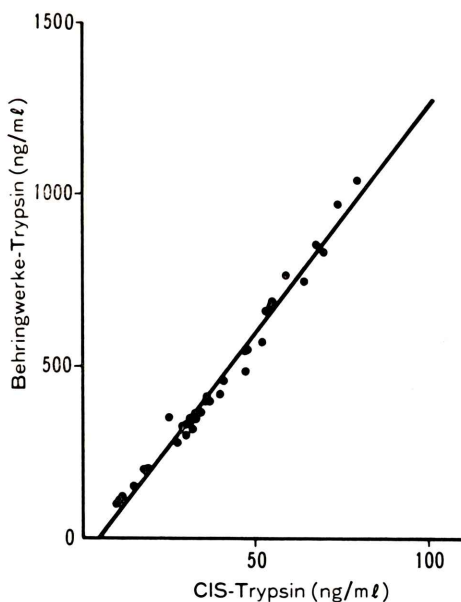


Fig. 2 Correlation between serum immunoreactive (IRT) values read by its own standard by another kit.

2a: IRT was measured using BW kit and read by BW standards (x) and by CS standards (y). $y=0.36x-23.9$, $r=0.99$, $p<0.01$, $n=48$



2b: IRT was measured using CS kit and read by CS standards (x) and by BW standards (y). $y=13.0x-57$, $r=0.99$, $p<0.01$, $n=36$

した ($y=0.14x-2.9$, $r=0.89$, $p<0.01$, Fig. 3).

3. 血中 α_1 AT 濃度の IRT 測定値に対する影響 (Fig. 4 a, b)

BW kit による IRT 測定値 (y, Fig. 4a), CS kit による IRT 測定値 (y, Fig. 4b) いずれも同一検体中の α_1 AT 濃度 (x) と相関しなかった。

4. 血中 α_1 M 濃度の IRT 測定値に対する影響 (Fig. 5 a, b)

血中 IRT の測定値 (y) は BW kit, CS kit いずれでも同一検体中の α_2 M 濃度 (x) とは相関を認めなかった。

IV. 考 察

現在までに報告されている血中 IRT の正常値は Temler ら¹⁾, Elias ら²⁾ とその他の報告^{3~5)} では前者が約10倍高い。この差は欧米のみでなく、日本の報告^{6~8)} でも同様である。その原因としては、①標識トリプシンの性状、特にそのトリプシン活性の阻害の有無や阻害方法の相異、②標準ト

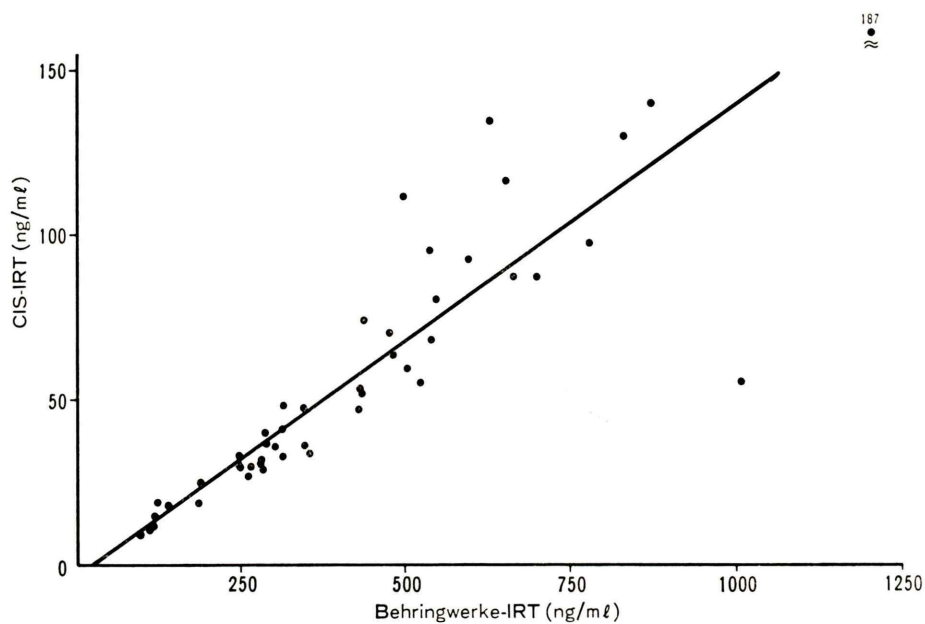


Fig. 3 Correlation of serum IRT values assayed by BW kit (x) and by CS kit (y).
 $y=0.14x-2.9$, $r=0.89$, $p<0.01$, $n=48$

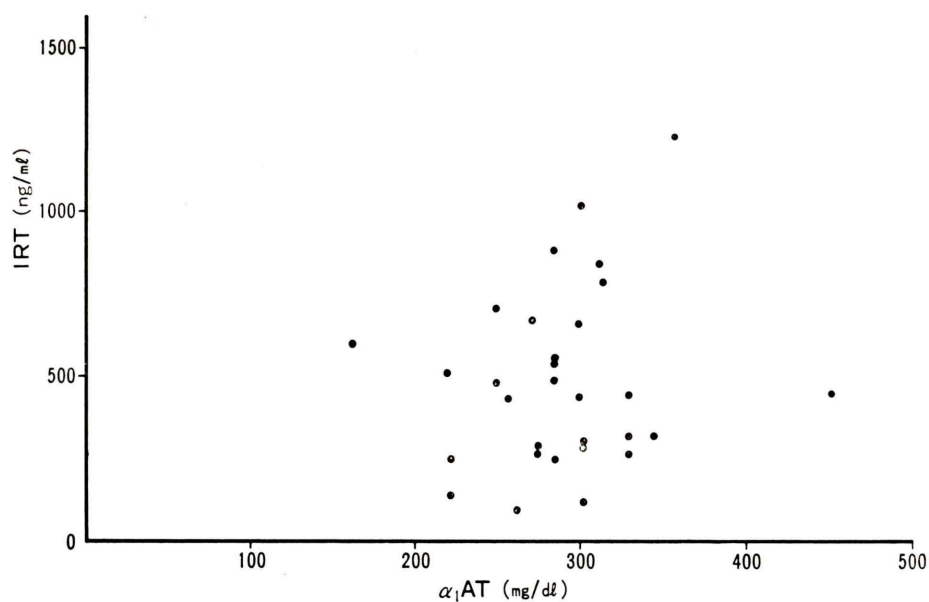
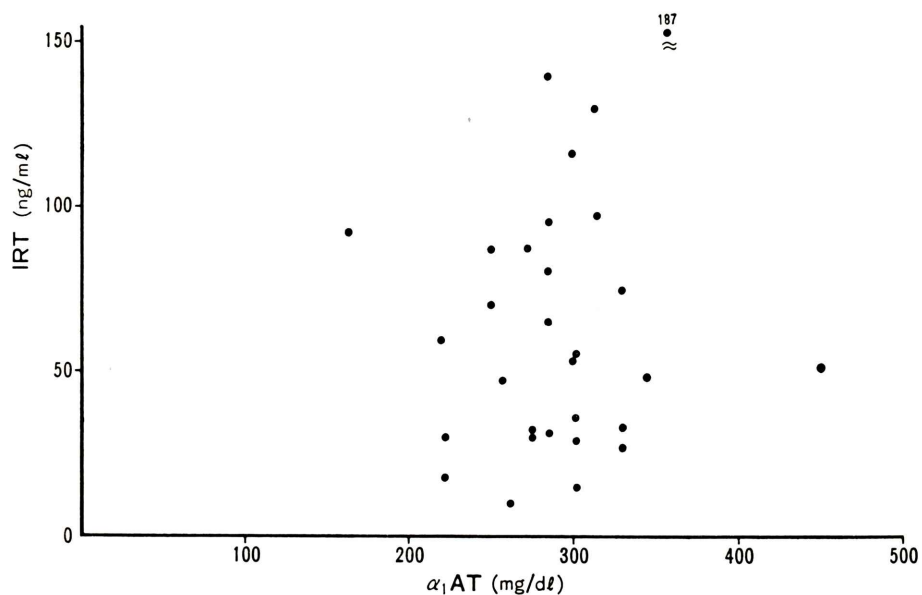


Fig. 4 Correlation of serum IRT (y) and α_1 antitrypsin (x).
 4a: IRT was determined by BW kit. $r=0.15$ not significant, $n=30$



4b: IRT was measured by CS kit. $r=0.13$ not significant, $n=30$

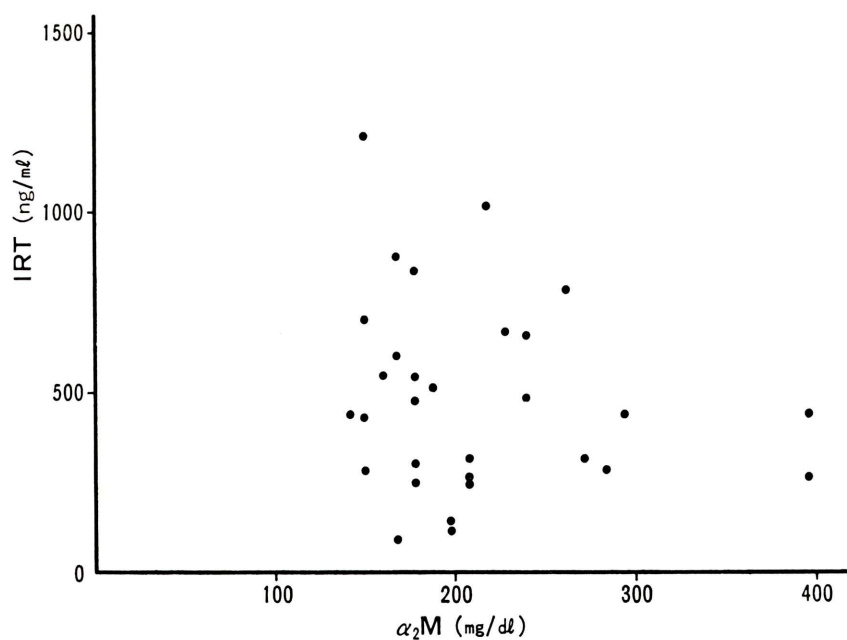
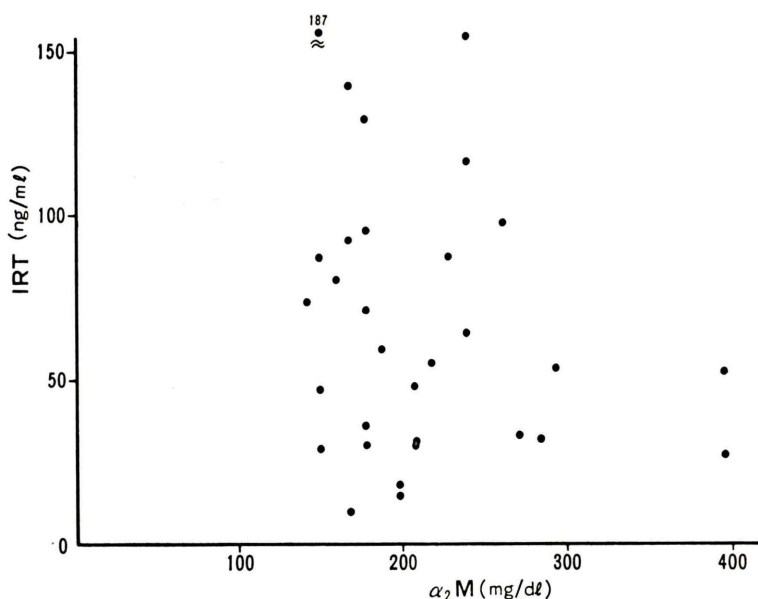


Fig. 5 Correlation of serum IRT (y) and α_2 macroglobulin (x).

5a: IRT by BW kit. $r=0.17$ not significant, $n=30$



5b: IRT by CS kit. $r=0.25$ not significant, $n=30$

リプシンの相異, 特に純度の違い, ③血中トリプシンの存在様式の影響, 特に α_2 M や α_1 AT と結合したトリプシンと遊離トリプシンやトリプシノーゲンに対する抗トリプシン抗体の反応性の違い, ④抗トリプシン抗体の特異性の相異などが考えられる。

1. 標識トリプシンについて

標識トリプシンの酵素活性が不活化されていないと, 標識トリプシン自体が分解されたり, 被検血清中の α_1 AT や α_2 M などと結合し, 抗トリプシン血清との反応性が変わり, 測定値が実際より高くでる可能性がある。したがって, 標識トリプシンは何らかの方法で酵素活性を不活化する必要がある。

Temler ら¹⁾, Elias ら²⁾ はヒトの活性トリプシンを標識に用いた。Temler らは抗トリプシン血液溶液にウシ血清 2% を加えた液 0.1 ml に標準トリプシン液あるいは被検血清 0.1 ml を加えた後, 125 I trypsin を加えているので, 125 I trypsin はウシ血清中の α_1 AT で不活化されると推定される。Elias ら²⁾ の方法は, Adrian ら⁹⁾ が報告した

ように, aprotinin₂ で 125 I trypsin の活性を不活化している。

Malvano ら³⁾ もヒト活性トリプシンを 125 I で標識し, その後ウシ血清を加えてから Sephadex G-200 でゲル濾過し, 放射活性の第 2 峰を標識トリプシンとして用いた。これは α_1 AT と結合した 125 I trypsin 分画と考えられる。

Borgström ら⁴⁾ は DFP (di-iso-propyl fluorophosphate) で不活化したトリプシンを標識に用いた。Geokas ら⁵⁾ は TLCK (tosyl-L-lysine chloromethyl ketone) で不活化したトリプシンを標識した。

以上のように, α_1 AT, aprotinin, DFP, TLCK などと結合した 125 I trypsin はトリプシン, トリプシノーゲン, α_1 AT-trypsin とほぼ同様な免疫活性を示し^{3~5,10)}, 被験血清の IRT 測定値もほぼ同様な値を示した¹⁰⁾。

今回の検討でも BW kit, CS kit の標識トリプシンは aprotinin, benzamidine 添加による免疫活性の変化はほとんど認められなかった。BW kit では aprotinin, CS kit ではウシ血清中の α_1 AT が

^{125}I trypsin と結合していると考えられ、両 kit による測定値の相異は標識トリプシンが原因とは考え難い。

2. 標準トリプシン (ST とする) について

Elias らは ST 用には半精製トリプシンを用いた²⁾。この酵素活性は精製品の 30% であった²⁾。Malvano らは CS kit の ST 用トリプシンは BW kit の ST に比し約 10 倍、Figarella のトリプシンの 4 倍免疫活性が高いという³⁾。Recchia ら¹¹⁾ も BW kit の ST は CS kit の ST に比し免疫活性が約 10 倍低く、そのため前者の測定値は約 10 倍高いことを報告している。

両 kit の ST を相互に測定した今回の結果も、BW kit の ST は CS kit の ST に比し約 10 倍免疫活性が低く、そのために測定値は約 10 倍高くなっていた。Elias ら²⁾ の ST と精製品の酵素活性の比較では 10 倍の IRT 測定値は説明しがたいが、彼らの精製品の純度が Figarella のトリプシン程度と考えれば ST の純度の差で、両 kit の測定値の差は説明できる。

3. 血中 $\alpha_1\text{AT}$, $\alpha_2\text{M}$ の IRT 測定値に対する影響

血中には活性型トリプシンと結合しその酵素活性を阻害する物質が含まれている。 ^{125}I trypsin の酵素活性が不活化されていないとこれが血中の $\alpha_1\text{AT}$, inter- α -antitrypsin, $\alpha_2\text{M}$ と結合する。前 2 者との結合トリプシンの免疫活性はトリプシンの約 80% であるが、 $\alpha_2\text{M}$ との結合トリプシンはほとんど免疫活性を示さない⁵⁾。 ^{125}I trypsin の不活化が不十分であると $\alpha_1\text{AT}$ や $\alpha_2\text{M}$ と結合し、特に $\alpha_2\text{M}$ -trypsin は免疫活性がほとんどないので IRT 測定値への影響が大きい。しかし、BW kit, CS kit の標識トリプシンは aprotinin, $\alpha_1\text{AT}$ でそれぞれ不活化されているので、血中の $\alpha_1\text{AT}$ や $\alpha_2\text{M}$ の影響されなかった。すでに報告したように⁷⁾、被検血清に $\alpha_1\text{AT}$ を添加しても IRT 測定値はほとんど影響されなかった。また、慢性膵炎の血中の $\alpha_1\text{AT}$, $\alpha_2\text{M}$ も IRT と相関がなかった。Adrian ら⁹⁾ も被検血清に $\alpha_1\text{AT}$, $\alpha_2\text{M}$, inter- α -antitrypsin, aprotinin を過剰に加えても IRT 測定値は変わら

なかったと報告している。

4. 抗トリプシン抗体の特異性

抗血清の特異性には明らかな相異はないと考えられている。

以上のように、BW kit と CS kit の正常値の差の最大の要因は両 kit に用いられている標準トリプシンの力価の差によると推定される。 ^{125}I trypsin の不活化は両 kit とも十分にされており、血中の $\alpha_1\text{AT}$ や $\alpha_2\text{M}$ などの阻害物質が IRT の測定値には影響しないと考えられる。

今回、トリプシンで認めたような kit 間の測定値の変動はインスリン、その他でも報告がある。インスリン測定用の kit では共通のインスリン標準品を用いることにより、kit 間の変動が有意に減少した¹²⁾。共通の標準品を採用することが、測定値の差を少なくするために重要であろう。

V. 結 論

血清トリプシンの正常値は報告者、測定系により 2 大別される。正常値が 200 ng/ml に近い測定系の代表として Behringwerke の RIA-gnost trypsin kit を、20 ng/ml に近い測定系の代表として Cis-Sorin の Trypsin Radioimmunoassay kit を選び、標識トリプシンに対する阻害剤の影響、標準トリプシンの力価の比較、血中の α_1 antitrypsin, α_2 macroglobulin 濃度のトリプシン測定値に対する影響などを検討した。その結果、両測定系の測定値の差異は標準品の力価の差によるため、標識トリプシンの不活化処理の差によるものでないことが判明した。

文 献

- 1) Temler RS, Felber IP: Radioimmunoassay of human plasma trypsin. *Biochim Biophys Acta* **445**: 720-728, 1976
- 2) Elias E, Redshaw M, Wood T: Diagnostic importance of changes in circulating concentrations of immunoreactive trypsin. *Lancet* **ii**: 66-68, 1977
- 3) Malvano R, Marchisio M, Massaglia A, et al: Radioimmunoassay of trypsin-like substance in human serum. *Scand J Gastroenterol* **15** (Suppl (2)): 3-10, 1980

- 4) Borgström A, Ohlsson K: Radioimmunological determination and characterization of cathodal trypsin-like immunoactivity in normal human serum. *Scand J Clin Lab Invest* **36**: 809-814, 1976
- 5) Geokas MC, Largman C, Brodrick JW, et al: Determination of human pancreatic cationic trypsinogen in serum by radioimmunoassay. *Am J Physiol* **236**: E77-83, 1979
- 6) 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. *日消会誌* **76**: 1513-1521, 1979
- 7) 早川哲夫, 野田愛司, 近藤孝晴: トリプシン——測定とその臨床的意義——. *胆と膵* **2**: 1131-1136, 1981
- 8) 岩本研次郎, 北原健志, 小川道雄, 他: Trypsin radioimmunoassay kit (CIS-Sorin) の基礎的ならびに臨床的検討. *Biochemical J* **4**: 777-783, 1980
- 9) Adrian TE, Basterman HS, Mallinson CN, et al: Plasma trypsin in chronic pancreatitis and pancreatic adenocarcinoma. *Clin Chim Acta* **97**: 205-212, 1979
- 10) 岩本研次郎, 小川道雄, 北原健志, 他: Trypsin の免疫活性および RIA による血中 trypsin 測定値に対する酵素活性阻害物質の影響. *胆と膵* **3**: 265-271, 1982
- 11) Recchia S, Masoero G, Andriulli A, et al: Trypsin radioimmunoassay (RIA): comparative evaluation of two commercial kits. *Danish Medical Bulletin* **26** (Suppl 1): 10, 1979
- 12) Shishiba Y, Takino H, Takagi A, et al: The large "Kit-to-Kit" variation in insulin radioimmunoassay is mainly due to difference in standard concentration. *Clin Chem* **28**: 2443-2444, 1982