



Title	腓エラスターゼの分離精製とラジオイムノアッセイによる血中腓エラスターゼ量測定法の確立
Author(s)	藤本, 憲一
Citation	大阪大学, 1982, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/33569
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名 ・ (本 籍)	藤 本 憲 一
学 位 の 種 類	医 学 博 士
学 位 記 番 号	第 5 7 1 6 号
学位授与の日付	昭和 57 年 4 月 27 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当
学 位 論 文 題 目	膵エラスターゼの分離精製とラジオイムノアッセイによる血中膵エラスターゼ量測定法の確立
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 神 前 五 郎 (副査) 教 授 田 川 邦 夫 教 授 和 田 博

論 文 内 容 の 要 旨

〔目 的〕

ヒトの膵組織や膵液中にはエラスターゼ 1 (E-1) およびエラスターゼ 2 (E-2) の 2 種類のエラスターゼが存在する。エラスターゼの生理的意義は不明であるが、急性膵炎ことに急性出血性膵炎、壊死性膵炎において血管壁の弾性線維の破壊に関与するとされている。血中のエラスターゼ量を酵素学的に測定することは、血中に阻害物質が存在するため不可能である。

本研究の目的はヒト膵液から「のこくず」を用いた新しい方法でエラスターゼを分離精製して、その性質を明らかにするとともに、血中エラスターゼ測定のためのラジオイムノアッセイ系を確立して、その診断的意義を明らかにすることにある。

〔方法ならびに成績〕

1) 膵エラスターゼの精製

膵頭十二指腸切除術後の外膵液瘻より採取した膵液を原材料とした。リグニンがエラスターゼ活性を阻害することを見出したので、リグニンを多く含むのこくずカラムにより精製を行った。のこくずは主としてアメリカスギより成り、減圧下に水洗の後、酸およびアルカリで処理し 1 M 食塩水で洗浄したものをを用いた。酵素活性の測定は、エラスチンを基質として酵素を作用させ、可溶化した peptide にフルオレスカミンを加えて発する蛍光を測定した。また合成基質 succinyltrialanine p-nitroanilide (Suc(Ala)₃ pNA) を用いて遊離する p-nitroaniline を吸光度 410 nm で測定した。

膵液をトリス塩酸緩衝液 (pH 7.6) に対して透析し、同じ緩衝液で平衡化したのこくずカラムに負荷した。エラスターゼ活性はカラム非吸着画分と 0.5 M NaCl で溶出されるカラム吸着画分に分

た。前者がE-1を、後者がE-2を含んでいた。カラム吸着画分を Sephadex G-75 によってゲル濾過して得られたE-2は、電気泳動的に単一成分であった。E-1を含むカラム非吸着画分は、更に DEAE- Cellulose カラムクロマトグラフィ, Biogel A 0.5 m によるゲル濾過で精製し単一成分として得た。E-1, E-2の分子量はそれぞれ30,000, 25,000 であった。

2) 膵エラスターゼの性質

基質特異性ではE-2のエラスチン分解力はE-1の約6倍であった。一方合成基質Suc(Ala)₃pNA に対してはE-1がE-2の約8倍の分解力を示した。

E-1, E-2をEDTAに対して透析するとその活性は低下したが、Ca⁺⁺, Mg⁺⁺の添加で活性は回復した。

3) 血中膵エラスターゼ2のラジオイムノアッセイによる測定

家兔を免疫して抗E-2血清を作成した。

E-2を正常および膵炎血清と混じてその血中存在様式を検討したところ、E-2は血中の蛋白分解酵素の阻害物質である α_2 -macroglobulin(α_2 M), α_1 -antitrypsin (α_1 AT)と結合して存在したので、E-2を精製した α_2 Mおよび α_1 ATと結合させ、それぞれの免疫活性を検討した。 α_2 M-E-2 complex は全く抗原性を失っていたが、 α_1 AT-E-2 complex は部分的に交叉反応性を示した。

血清中E-2測定に際して標識抗原が、血中 α_2 M, α_1 ATと結合しないようにactive site を phenylmethanesulfonylfluoride (PMS)でblock してラジオイムノアッセイ系を確立した。

ラジオイムノアッセイによる正常血清中のE-2量は 294 ± 82 ng/mlであった。急性膵炎では血清E-2は全例高値を示した。しかし急性出血性膵炎では $1,282.7 \pm 925.5$ ng/ml, 急性浮腫性膵炎では $1,010.0 \pm 663.5$ ng/mlであり、両者に有意の差は認められなかった。

〔総括〕

1. 膵液からのこくずカラムを用いて膵エラスターゼ(E-1, E-2)を分離精製した。
2. E-1, E-2は分子量, 基質特異性で異った性質を有した。
3. α_2 Mと結合したE-2は抗原性を失ったが、 α_1 ATと結合したE-2は抗原性を部分的に保有していた。
4. PMSでactive site をblockしたE-2を標識抗原としてラジオイムノアッセイ系を確立した。血中 immunoreactive E-2の正常値は 294 ± 82 ng/mlであった。
5. 急性膵炎患者での血清中の immunoreactive E-2はその発症初期から高値を示し、診断に有用であった。しかしその血中レベルからは急性出血性膵炎, 急性浮腫性膵炎の鑑別は困難であった。

論文の審査結果の要旨

本論文はヒト膵液から「のこくず」を用いた新しい方法で膵エラスターゼ1及び2を分離精製し、その酵素化学的, 蛋白化学的性質を明らかにしたものである。またエラスチン分解能の高いエラスター

ーゼ 2 の血中存在様式を検討し、血中濃度測定のためのラジオイムノアッセイ系を確立した。血中 immunoreactive エラスターゼ 2 は急性膵炎で著明に上昇したが、その血中濃度からは急性出血性膵炎、急性浮腫性膵炎の鑑別は困難であるという結論に到達した。本研究はヒト膵エラスターゼの精製ならびにその性質に関して新しい知見を加えたもので、急性膵炎の病態解明に利用し得、価値あるものと考えられる。