



Title	血中trypsinとchymotrypsinの免疫学的測定に関する基礎的ならびに臨床的検討
Author(s)	岩木, 研次郎
Citation	大阪大学, 1983, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/33716
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、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）	岩 木 研 次 郎
学 位 の 種 類	医 学 博 士
学 位 記 番 号	第 6 1 3 9 号
学位授与の日付	昭 和 58 年 6 月 29 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	血中 trypsin と chymotrypsin の免疫学的測定に関する基礎的なら びに臨床的検討
論 文 審 査 委 員	（主査） 教 授 川 島 康 生
	（副査） 教 授 坂 本 幸 哉 教 授 和 田 博

論 文 内 容 の 要 旨

（目 的）

血中では蛋白分解酵素は proenzyme として存在するか、あるいは protease inhibitor と結合して存在するため、酵素活性を示さない。従ってこれを測定するためには免疫学的測定法に頼らざるを得ない。

さて radioimmunoassay (RIA) の標識抗原としては高度に精製された酵素が必要であり、通常は affinity chromatography を用いて活性型の蛋白分解酵素が精製されている。ところが、標識抗原が活性型であるため、この RIA 系で血中の酵素量を測定すると、標識抗原が血中の protease inhibitor と結合し、一部その阻害をうける。しかしこの結合が蛋白分解酵素を測定するための RIA の精度や測定値にどのように影響するか、ほとんど知られていない。

本研究ではまず trypsin をモデルとして、血中の trypsin を RIA で測定する場合に標識抗原の活性阻害物質が trypsin の免疫活性にどのような影響をおよぼすか、見かけ上の測定値がどのように変化するかを明らかにする。ついで標識抗原として酵素活性を阻害した trypsin および chymotrypsin を用い RIA 系を確立してその基礎的検討を行い、あわせて各種疾患における血中 trypsin および chymotrypsin 測定の診断的意義を検討する。

（方法ならびに成績）

1) trypsin の免疫活性に対する酵素活性阻害物質の影響

ヒト腭液より Ohlsson の方法に準じて精製した trypsin を chloramine T 法によって標識した。得られた標識 trypsin を 6 分し、その一つを対照として活性阻害を行わず、残りについてその活性基を① aprotinin, ② phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), ③ N-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone

(TLCK), ④ α_1 -antitrypsin (α_1 AT), ⑤bovine serumで阻害した。これらを正常血清に混じて, ヒト血中の α_2 -macroglobulinおよび α_1 ATと結合しないことにより, 活性基が阻害されていることを証明した。

活性型 125 I-trypsinおよび①～⑤の不活性型 125 I-trypsinを標識抗原とし, 家兎にて作成した抗血清を 10^4 倍希釈したものをを用いてRIA系を確立した。

正常血清20検体の各RIA系による測定値の検討では, 標識抗原として不活性型の 125 I-trypsinを用いたRIA系では測定値は①26.1 ng/ml, ②28.2 ng/ml, ③26.4 ng/ml, ④32.9 ng/ml, ⑤36.4 ng/mlであるのに対し, 活性型 125 I-trypsinを用いたRIA系では202 ng/mlと高値であった。

標識抗原が不活性型のRIA系では不活性型trypsinの回収率は約100%であった。これに反して標識抗原が活性型のRIA系では回収率は398～556%と高値であった。

一方aprotininで不活化したtrypsinのRIA系で見た交叉免疫活性は活性型trypsinを100%とすると, これを不活性化すると①～④は93.7%～74.5%, ⑤は54.5%と低下した。また標識抗原として活性型 125 I-trypsinを用いたRIA系のBo/Tを50%とした場合, 不活性型 125 I-trypsinのRIA系のBo/Tは46.2～37.4%であった。しかし測定内および測定間変動の検討では不活性型のRIA系に比し, 活性型のRIA系のCV値は大きかった。以上より血中trypsin測定のためのRIA系では標識抗原の酵素活性を不活性化しておかないと, RIAで測定した血中濃度が血中に存在する酵素量を反映しえないことが明らかとなった。

2) trypsin および chymotrypsin の RIA 系の確立とその基礎的検討

前述の aprotinin- 125 I-trypsin を標識抗原として trypsin の RIA 系を確立した。またヒト腭液より Ohlsson の方法に準じて精製した chymotrypsin の酵素活性を PMSF で阻害し, これを Bolton & Hunter の方法で標識した。抗血清は家兎により作成し, 5×10^3 倍希釈のものを使用し, RIA 系を確立した。両 RIA 系とも得られた標準曲線は良好な用量反応相関を示し, ヒト血清, ヒト腭液希釈曲線ともよく平行した。

特異性の検討では, いずれの RIA 系とも他の腭酵素や動物血清と交叉性を示さなかった。確立した RIA 系の精度および再現性ともに良好であった。これらの RIA 系で trypsin は 6.3～400 ng/ml, chymotrypsin は 6.3～5000 ng/ml の範囲で血中濃度の測定が可能であった。

3) 各種疾患患者における血中 immunoreactive trypsin (IRT) 量と immunoreactive chymotrypsin (IRCT) 量の変動

IRT の血中正常値は 27.0 ± 7.3 ng/ml ($n=64$) であり, IRCT では 37.5 ± 19.6 ng/ml ($n=23$) であった。急性膵炎では IRT は 435 ± 566 ng/ml ($n=35$), IRCT は 449 ± 605 ng/ml ($n=20$) と高値を示した。正常人および各種疾患における IRT と IRCT には有意の正の相関 ($r=0.78, n=91, P<0.01$) がみられたが, 測定値が高値の症例では, 両者の値に解離がみられた。

(総括)

1) ヒト腭液より精製した trypsin を用いてその免疫活性に対する酵素活性阻害物質の影響を検討した。活性型の酵素を標識抗原とした RIA 系では不活性型を用いた RIA 系に比べて測定値は見かけ上高値とな

った。このことは回収実験の結果により裏づけられた。

2) 不活性型の標識酵素は活性型のものに比べてその免疫活性はやや低下したが、RIA系の精度はむしろ良好となった。

3) aprotininで活性を阻害した trypsin, および PMSFで活性を阻害した chymotrypsin を標識抗原としてRIA系を確立した。血中正常値は IRT が $27.0 \pm 7.3 \text{ ng/ml}$, IRCT が $37.5 \pm 19.6 \text{ ng/ml}$ であった。急性膵炎では IRT が $435 \pm 566 \text{ ng/ml}$, IRCT が $449 \pm 605 \text{ ng/ml}$ であった。正常人および各種疾患患者の血中IRTおよびIRCTには有意の正の相関がみられた。

論文の審査結果の要旨

本研究は、先ず血中の蛋白分解酵素を免疫学的に測定する際に標識抗原の酵素活性を阻害しておくことがどの様に重要であるかを検討した。そして実際に aprotinin を活性阻害物質とした trypsin のRIA系および PMSF を活性阻害物質とした chymotrypsin のRIA系を確立し、その基礎的検討と各種疾患における変動を検討したものである。膵酵素の免疫学的測定を臨床に応用するために意義ある研究であると考ええる。