The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

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

【38】

氏名・（本籍）	岩木研次郎（いわき けんじろう）
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 6139 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

ヒト膵液より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①aprotinin，②phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF)，③N−tosyl−L−lysine chloromethyl ketone

(TLCK), ④α_1-antitrypsin (α_1AT), 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_1AT 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① 26.1 ng／mℓ, ② 28.2 ng／mℓ, ③ 26.4 ng／mℓ, ④ 32.9 ng／mℓ, ⑤ 36.4 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。またヒト膵液より 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, ヒト膵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 系とも他の膵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±566ng／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) ヒト膵液より精製した 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 ± 7.3 ng／mℓ，IRCTが 37.5 ± 19.6ng／mℓ であった。急性膵炎ではIRT が 435 ± 566 ng／mℓ，IRCT が 449 ±605 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る。