



抗ヒト腓アミラーゼモノクローナル抗体の作製と enzyme immunoassayによる血清腓型アミラーゼ値測定

藤澤, 貴史

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1991-05-08

(Date of Publication)

2014-01-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙1546

(JaLCD0I)

<https://doi.org/10.11501/3085913>

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2001546>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



抗ヒト腓アミラーゼモノクローナル抗体の作製と enzyme
immunoassay による血清腓型アミラーゼ値測定

神戸大学医学部第二内科（指導：春日雅人教授）

藤 澤 貴 史

神戸大学医学部紀要 第51巻 第2号 別刷

平成 2 年 6 月

抗ヒト膵アミラーゼモノクローナル抗体の作製と enzyme immunoassay による血清膵型アミラーゼ値測定

神戸大学医学部第二内科 (指導: 春日雅人教授)

藤 澤 貴 史

(平成2年6月28日 受付)

要 旨

抗ヒト膵型アミラーゼ (P-amylase) モノクローナル抗体はヒト P-amylase に対して極めて特異的に結合し、P-amylase の主分画だけでなくすべての亜分画に結合した。本モノクローナル抗体を用いた enzyme immunoassay (EIA) 法で求めた P-amylase の免疫活性と電気泳動法で求めた P-amylase の酵素活性は、高い相関性を示した。EIA 法による健康成人247名の血清 P-amylase 値は、 92.1 ± 24.3 ng/ml (mean \pm SD) であった。血清 P-amylase 値は急性膵炎患者では全例高値を示したのに対し、石灰化膵炎患者では有意に低値であった。非膵疾患では慢性腎不全で血清 P-amylase 値は高値を示し、インスリン依存性糖尿病では低値を示した。本 EIA 法は急性膵炎の診断や膵外分泌機能低下の判定に有用であった。

緒 言

体液中の α -アミラーゼは電気泳動法における分子荷電の違い^(1,2)やアミラーゼインヒビターに対する親和性の違い^(3,4)から、膵由来 (膵型, P-amylase) と非膵由来 (唾液腺型, S-amylase) の2種類のアミラーゼに分別測定される。電気泳動法ではアミラーゼアイソザイムの亜分画まで分離でき、病態に関する多くの情報が得られるが⁽⁵⁾、操作が煩雑で結果を得るのに数時間を要する点などから、臨床検査としては一般に用いられていない。一方、アミラーゼインヒビターを用いる方法は簡便で短時間 (約1時間) で P-amylase と S-amylase の活性比 (P/S 比) を算出できるが、現在用いられている小麦由来のアミラーゼインヒビターは S-amylase のみに特異的なものではなく、P-amylase に対してもその活性を約20%抑制す

ることから、正確性に欠ける⁽⁴⁾。

P-amylase と S-amylase では、アミノ酸配列や基質親和性は類似しているが、分子荷電および小麦インヒビターに対する親和性だけでなく、分子量、等電点、carbohydrate 含有量、peptide map⁽⁶⁾や transglycosylation 活性⁽⁷⁾などが異なることから、P-amylase と S-amylase を識別できる抗原決定基が存在すると推測される。近年モノクローナル抗体作製方法が開発され、アミラーゼに対するモノクローナル抗体も作製されるようになった⁽⁸⁻¹⁰⁾。本研究ではヒト P-amylase に特異的に結合するモノクローナル抗体 (以下 P-抗体) を作製し、この P-抗体を用いて P-amylase 値測定用 EIA 法を開発したのでその有用性を検討した。

対象と方法

1. 対象

年齢20-59歳 (平均年齢35.6歳) の健康成人計247名 (男102名, 女145名) と急性膵炎症例14例および日本膵臓学会慢性膵炎診断基準に基づく慢性膵炎確診症例53例 (石灰化症例23例, 非石灰化症例30例)、膵全摘症例3例、膵癌症例9例、慢性腎不全症例126例 (透析症例79例, 非透析症例47例)、糖尿病性腎症を有しない糖尿病症例168例 (インスリン非依存性糖尿病症例151例, インスリン依存性糖尿病症例17例) の早朝空腹時血清を試料とした。

2. 方法

1) ヒト P-amylase モノクローナル抗体 (P-抗体) の作製

ヒト P-amylase は Matsuura らの方法に準じてヒト膵液より精製した⁽¹¹⁾。精製 P-amylase と等量の Freund complete adjuvant を混合し、雌性 BALB/c マウスに14日ごとに6回免疫した。免疫マウスの

key words : enzyme immunoassay, モノクローナル抗体, 膵型アミラーゼアイソザイム, 電気泳動法, 膵炎

脾を摘出し、マウスの feeder 細胞として脾リンパ細胞を用い、融合相手にミエローマ細胞 (BALB/c マウス腫瘍組織由来 P 3-Ag 8-U 1 株) を選択した。個々の細胞を 35% polyethylene glycol (PEG) 存在下に hypoxanthine-aminopritene-thimidine (HAT) 培地にて培養し、融合細胞を作製した。この融合細胞のうち抗ヒト P-amylase モノクローナル抗体 (P-抗体) を産生するマウスハイブリドーマ細胞株を選択し、enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA) 法により抗体産生が確認された細胞株のクローニングを行なった^(12,13)すなわちこの細胞株を雌性 BALB/c マウスの腹腔内に注射し、マウスに大量の P-抗体を産生させ、腹水からプロテインAカラムを用いて P-抗体を精製した⁽¹⁴⁾。得られた抗体の反応性を検討した結果、P-amylase に対し強い結合能を有するが S-amylase とはほとんど交叉反応しない抗体 (3B7) をマイクロプレートに固相化し、P-amylase との結合能も強いが S-amylase との交叉反応も認められた抗体 (7F8) を標識抗体とした EIA 系を確立した。

2) ヒト P-amylase 値の測定

マウス由来の P-抗体を固相化したマイクロプレートを 1 回洗浄後、各ウェルに 0.1% 牛血清アルブミン (BSA) 含有リン酸緩衝液 200 μ l, P-amylase 標準液 (0-1,000 ng/ml) または未知検体 20 μ l を加えた。プレートを振盪混和し、37°C で 1 時間反応させた。次に反応液を吸引除去し、洗浄液で 5 回洗浄後、オルトフェニルジアミン含有緩衝液に過酸化水素水を加えた基質液 100 μ l を加え、4 N 硫酸 50 μ l で反応を停止させた。吸光度は三光純薬 Sjeia オートリーダー E R-8000 を用いて波長 492 nm で測定した。検体中の P-amylase 値は、10-1,000 ng/ml の標準 P-amylase から描かれる標準曲線から求めた。測定はすべて二重測定とし、その平均値を測定値とした。測定範囲を越える検体はリン酸緩衝液にて希釈後、測定した。

総アミラーゼ活性は Phadebas amylase test (アミラーゼテスト A ; 塩野義製薬) を用いて測定し、Somogyi units (SU) /100ml で示した⁽¹⁵⁾。

アミラーゼアイソザイムは、すでに報告した薄層ポリアクリルアミドゲルを支持媒体とする電気泳動法により分離し、ヨード澱粉反応を利用してアイソザイム活性を検出後、densitometry により各アイソザイムの P/S 比を算出し、P-amylase 活性を間接的に求めた。その上、アミラーゼアイソザイムを印画紙に直接焼き付け、陰極側の活性帯から陽極側の活性帯へと順次 Amylase-1, Amylase-2, …のごとく命名した⁽²⁾。この方法では、Amylase-1, 2, 4, 6 は P-am-

ylase, Amylase-3, 5, 7 は S-amylase である。

トリプシン値は、EIA kit (コダザイムトリプシン M-EIA ; 小玉製薬) を用いて one step sandwich method による EIA 法にて測定した⁽¹⁶⁾。Pancreatic secretory trypsin inhibitor (PSTI) は、radioimmunoassay kit (PSTI テスト ; 塩野義製薬) を用いて、二抗体法で測定した⁽¹⁷⁾。

3. 統計処理

得られた結果は平均値 \pm 標準誤差 (mean \pm SE) で示し、統計学的処理は、Student's t test を用いて行ない、 $P < 0.05$ を有意とした。

結 果

1. 抗ヒト P-amylase モノクローナル抗体 (P-抗体) の特性

ラット、マウス、モルモットおよびイヌの血清アミラーゼを P-抗体を用いて測定した。これらの試料のアミラーゼ酵素活性はラット 2,830, マウス 2,450, モルモット 2,310 およびイヌ 910 SU/100ml であったが、本法での測定値はすべて 0 ng/ml として得られた。60,000 SU/100ml の高値を示す実験的急性膵炎ラットの血清も本法で P-amylase の免疫活性を検出することができなかった。またヒト精製 S-amylase 希釈液 (850 SU/100ml) は、本法では 5.0 ng/ml と測定され、本測定に用いた P-抗体は、S-amylase とほとんど交叉反応しなかった (Fig. 1)。

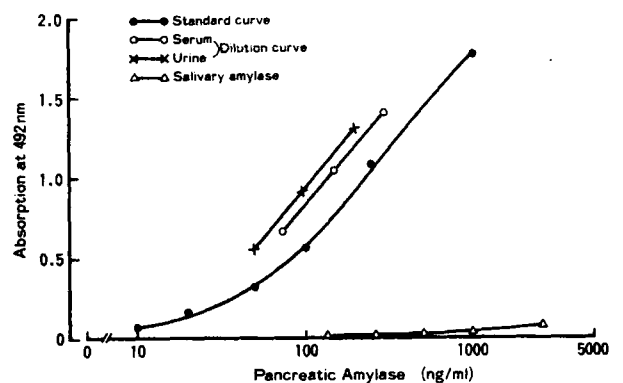


Fig. 1 P-amylase standard curve (●-●), dilution curves of serum (○-○) and urine (×-×) from a patient with acute pancreatitis, and cross-reactivity of anti-human P-amylase monoclonal antibody with S-amylase (△-△). The data are presented in semi-log plot.

アミラーゼ酵素活性が 300.5 SU/100ml, 免疫活性が

370 ng/ml になるように希釈したヒト精製 P-amylase を種々の濃度の P-抗体 (0 - 200 μg protein/ml) と 37°C で 1 時間反応させた後、酵素活性と免疫活性を測定した。P-抗体添加により P-amylase の免疫活性は濃度依存性に低下し、P-抗体 200 μg protein/ml 添加で P-amylase 免疫活性は 4.2 ng/ml になったが、酵素活性は P-抗体添加後もごく軽度の低下しか示さなかった (Fig. 2)。

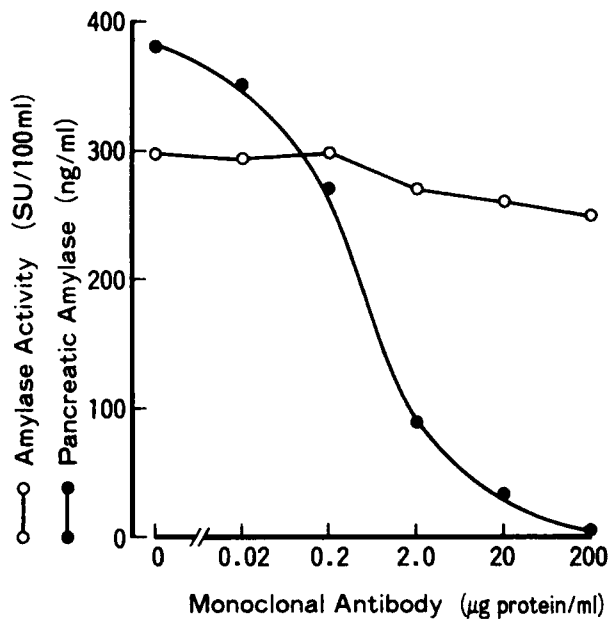


Fig. 2 Change of total amylase activity determined by Phadebas amylase test (○-○) and P-amylase levels determined by EIA (●-●) after incubation with various concentrations of anti-human P-amylase monoclonal antibody at 37°C for 60 min.

ヒト尿を 56°C で保存すると、アミラーゼ酵素活性の低下に平行して、P-amylase 免疫活性も低下した (Fig. 3)。試料を室温で長期間保存した場合にもアミラーゼ酵素活性に平行して免疫活性も低下した。

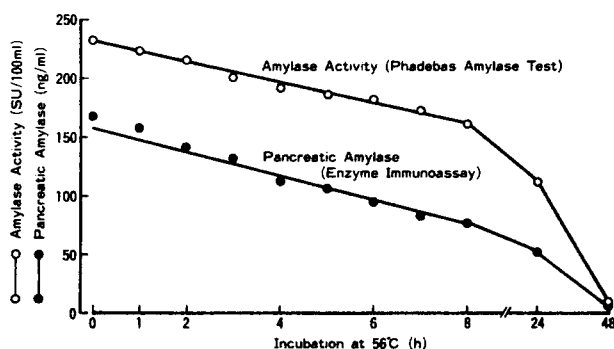


Fig. 3 Effect of storage at 56°C on immunologic and enzymatic activities in urine. Human urine was incubated at 56°C for 48 hours. After various periods of incubation, immuno- (●-●) and enzymatic activities (○-○) were determined by EIA and Phadebas amylase test, respectively

急性膵炎患者の血清を保存すると、post-secretory modification により電気泳動上 P-amylase の亜分画が検出されるようになるが⁽⁵⁾、アミラーゼ酵素活性に変化がなければ、P-amylase 免疫活性も変化しなかった (Fig. 4)。

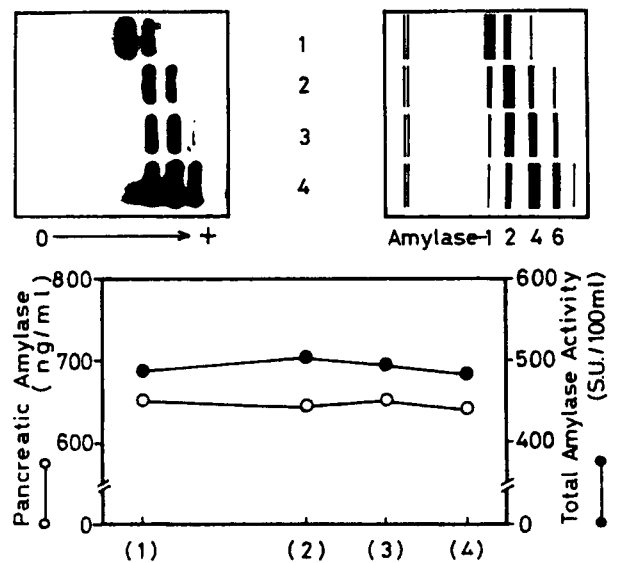


Fig. 4 Effect of storage at 56°C on immunologic and enzymatic activities of amylase in serum from a patient with acute pancreatitis. Serum was incubated at 37°C up to 4 days. Electrophoretic analysis was performed (upper panel), and immunologic (○-○) and enzymatic activities (●-●) (lower panel) were determined after various periods of incubation. Incubation period: 1 = without preincubation, 2 = 2 days, 3 = 3 days, 4 = 4 days.

2. EIA 法による血清 P-amylase 値測定の有用性

(1) 本 EIA 法の基礎的検討

本 EIA 法の標準曲線は Fig. 1 に示すごとく、P-amylase 値 10 - 1000 ng/ml の範囲で良好な用量反応相関を示した。各標準濃度の P-amylase 値測定内変動係数は 3.2 - 8.1% (n=10) と良好で、毎回安定した標準曲線が得られた。

0.1% BSA 含有リン酸緩衝液で段階希釈した急性膵炎患者の血清および尿の希釈曲線は共に標準曲線と平行であった (Fig. 1)。P-amylase 値が低・中・

高濃度の3種の血清検体をそれぞれ10回測定した際の測定内変動係数は4.9-5.9%, 測定間変動係数は7.5-9.4%と良好な再現性が得られた (Table 1)。

Table 1 Reproducibility of serum pancreatic amylase by enzyme immunoassay

	Within-assay			Between-assay		
	1	2	3	1	2	3
Determinations	10	10	10	10	10	10
Mean (ng/ml)	33.1	54.1	703.3	38.2	59.5	728.8
S. D.	1.8	3.2	34.5	3.6	5.5	54.7
C. V. (%)	5.4	5.9	4.9	9.4	9.2	7.5

(2) 電気泳動法と EIA 法の相関性

種々の血清50検体, 尿20検体を用いて, EIA 法で求めた P-amylase の免疫活性 (Y) および電気泳動法で求めた P-amylase の酵素活性 (X) は有意な正

の相関関係を示し, 回帰曲線は, 血清では $Y = 1.34X + 12.38$, $r = 0.966$, 尿では $Y = 1.42X + 5.45$, $r = 0.957$ であった (Fig. 5)。

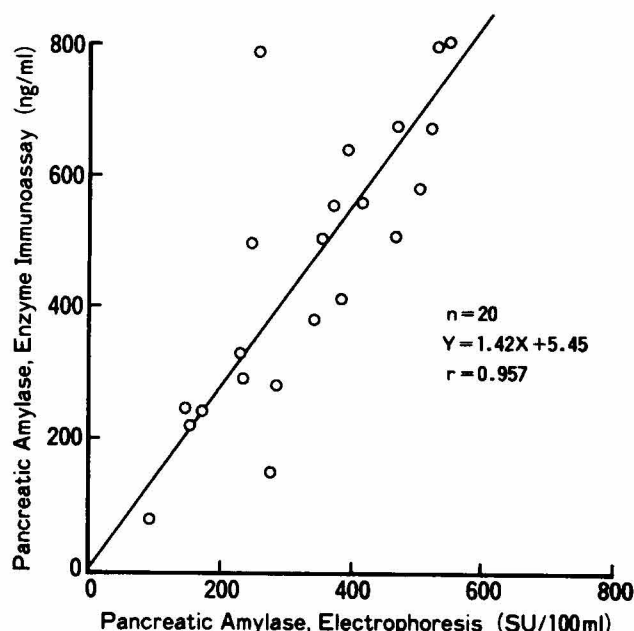
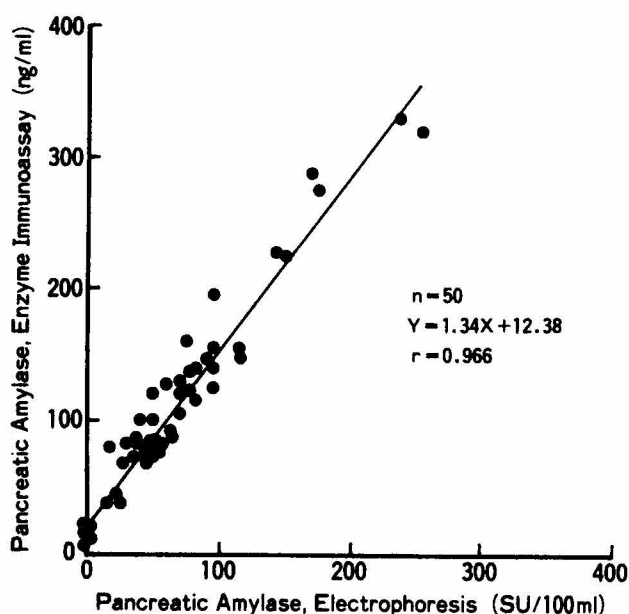


Fig. 5 Correlation between P-amylase activity obtained by the electrophoretic (X) and P-amylase level obtained by enzyme immunoassay method (Y) in sera (left) and urine (right).

(3) 健常成人における血清 P-amylase 値

健常成人247名の血清 P-amylase 値は正規分布し, その平均値は, 92.1 ± 24.3 ng/ml (mean \pm SD)

で, mean \pm 2SD を正常値とすると血清 P-amylase 値の正常範囲は43.5-140.7 ng/ml となった (Table 2)。

Table 2 Serum pancreatic amylase level in normal subjects.

Sex	Number	Age (years old)	Pancreatic amylase level (ng/ml)
Male	102	31.5 \pm 5.5	92.7 \pm 31.5
Female	145	32.2 \pm 9.3	91.7 \pm 19.2
Total	247	32.0 \pm 8.7	92.1 \pm 24.3

Results shown are mean \pm SD.

3. 種々の疾患における血清 P-amylase 値

(1) 膵疾患

急性膵炎症例では、血清 P-amylase 値は全例著明

な高値を示し、その平均値は 2486.3 ± 628.4 ng/ml (760-7306 ng/ml) であった (Fig. 6)。

慢性膵炎確診症例の P-amylase 値は 91.2 ± 16.0

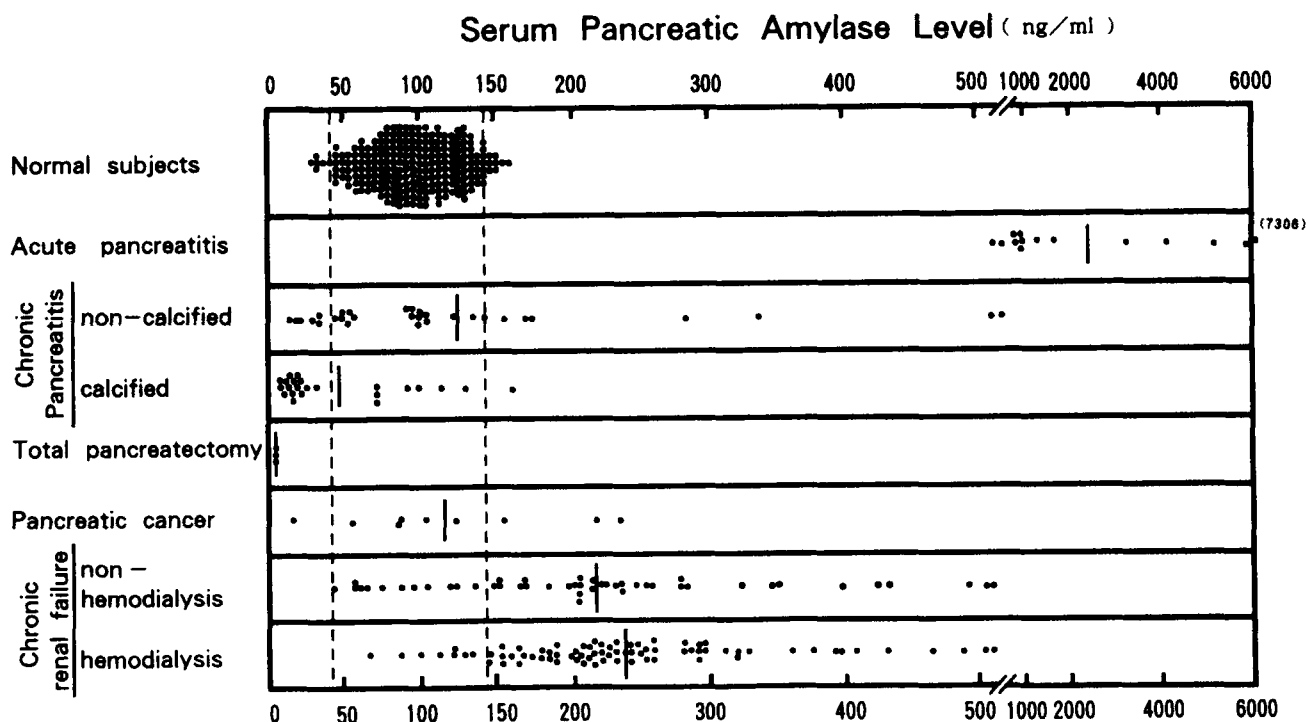


Fig. 6 Serum P-amylase levels determined by EIA in patients with pancreatic diseases and chronic renal failure.

ng/ml で健常成人と有意差がなかったが、慢性膵炎症例を石灰化群と非石灰化群に分けると、前者の血清 P-amylase 値は 42.9 ± 9.5 ng/ml、後者では 128.3 ± 25.4 ng/ml で、石灰化群の血清 P-amylase 値は、非石灰化群並びに健常成人に比べ有意に低値であった (Fig. 6)。慢性石灰化膵炎症例の65.2% (15/23) は正常範囲下限 (43.5 ng/ml) 以下の低値を示したが、慢性非石灰化膵炎症例で正常下限以下の低値を示したのは23.3% (7/30) のみで、23.3% (7/30) は逆に正常上限 (140.7 ng/ml) 以上の高値を示した。慢性膵炎53症例において血清 P-amylase 値とトリプシン値は有意な正相関を有していた ($Y=0.73X-3.7$, $r=0.89$)。

膵全摘を施行された3症例の血清 P-amylase 値は全例本 EIA 法の測定感度 (10 ng/ml) 以下の低値を示した (Fig. 6)。

膵癌症例の血清 P-amylase 値は 118.3 ± 24.8 ng/ml で健常人に比べ有意に高値を示した (Fig. 6)。

(2) 非膵疾患

慢性腎不全症例126例の血清 P-amylase 値は 230.5 ± 9.4 ng/ml と健常成人に比べ有意に高値であった。

透析症例の血清 P-amylase 値は 239.4 ± 8.7 ng/ml ($n=79$)、非透析症例の血清 P-amylase 値は 213.9 ± 18.8 ng/ml ($n=47$) と、それぞれ健常成人の2倍以上と有意な高値を示したが、透析の有無による血清 P-amylase 値の有意な変化は認めなかった (Fig. 6)。

腎症を有しない糖尿病症例168例の血清 P-amylase 値は 81.2 ± 2.7 ng/ml で、健常成人に比べ有意に低下していた。インスリン依存性糖尿病症例 (IDDM) に限ると血清 P-amylase 値は 69.4 ± 7.9 ng/ml ($n=17$) で、健常成人およびインスリン非依存性糖尿病症例 (NIDDM; 82.5 ± 2.9 ng/ml, $n=151$) に比べ、有意に低値であった。インスリン治療中の糖尿病症例の血清 P-amylase 値は 70.1 ± 4.8 ng/ml ($n=37$) で、食事療法 (84.6 ± 3.5 ng/ml, $n=66$) や経口血糖降下剤による治療 (81.1 ± 4.8 ng/ml, $n=65$) を受けている糖尿病症例に比べ、有意に低値であった。糖尿病症例を血糖コントロール状態で分類すると、 $FBS \geq 180$ mg/100ml あるいは $HbA_{1c} \geq 7.0\%$ の群の血清 P-amylase 値はそれぞれ 72.8 ± 5.6 ng/ml, 75.3 ± 5.6 ng/ml で、 $FBS < 180$ mg/100ml あるいは

HbA_{1c} < 7.0%の群 (それぞれ87.5±5.0 ng/ml, 92.6±4.7 ng/ml) に比べ有意に低値であった (Table 3)。糖尿病症例168例の血清 P-amylase 値は血清ト

リプシン値と有意な正相関を示した (Y=0.53X+19.1, r=0.73)。

Table 3 Serum pancreatic amylase level in patients with diabetes mellitus

	Number of patients	Serum pancreatic amylase level (ng/ml)
Normal subjects	247	92.1±1.5
Diabetes mellitus (total)	168	81.2±2.7
Type:		
insulin dependent (IDDM)	17	69.4±7.9*
non-insulin dependent (NIDDM)	151	82.5±2.9
Treatment:		
diet	66	84.6±3.5
oral hypoglycemic agent	65	81.1±4.8
insulin	37	70.1±4.8*
Duration:		
< 5 years	41	91.8±5.6
≥ 5 years	127	79.4±2.9*
Condition:		
a) Fasting blood glucose		
< 180 mg/100ml	104	87.5±5.0
≥ 180 mg/100ml	64	72.8±5.6*
b) HbA _{1c}		
< 7.0%	62	92.6±4.7
≥ 7.0%	106	75.3±5.6*

Data shown are mean ± SE.

*Significant difference versus normal subjects : P<0.05.

考 察

EIA 法は精度ならびに感度が優れ、操作が簡単で検体量も少なく短時間で結果が得られることから、すでに各種ホルモンや腫瘍マーカーなどの測定に利用されている。膵疾患の分野でもトリプシン⁽⁸⁾とリパーゼ⁽⁹⁾の EIA 法が開発されており、共に膵特異性が高く急性膵炎や慢性膵炎の診断、経過観察などに利用されている。本研究では、P-抗体の特性とヒト体液中の P-amylase 値の免疫学的測定法として P-amylase EIA 法の臨床検査としての有用性を検討した。

P-抗体は、ヒト以外の哺乳動物のアミラーゼに対しては全く交叉反応を示さなかったし、またヒト S-amylase に対してもほとんど交叉反応を認めなかったことから、本法で用いた P-抗体は、ヒト P-amylase に対して極めて特異性の高い抗体であると言える。

P-抗体と P-amylase を反応させると、免疫活性は減少したが、酵素活性は P-抗体添加後も有意な変

化を認めなかったことから、P-抗体は P-amylase の酵素活性部位以外の部位に結合すると推測される。しかしながら試料の P-amylase 免疫活性はアミラーゼ酵素活性と一致して低下したことから、EIA 法でも P-amylase を正確に測定するには検体保存に注意し、検体を長時間室温に放置したり、凍結融解を繰り返したりしてはならない。

体液中の α-アミラーゼは post-secretory modification を受け、一つのアイソザイムから陽極側へ易動度の早いアイソザイムが作られていく^(5,10)が、出現する亜分画の程度には関係なく、アミラーゼの酵素活性が一定であれば P-amylase の免疫活性も一定であったことから、P-抗体は P-amylase の主分画だけでなくすべての亜分画と結合すると言える。従って post-secretory modification を受け、電気泳動上のアイソザイムパターンからは P-amylase か S-amylase かを判定できない検体においても、P-amylase を正確に測定できると言える。

Mifflin ら⁽⁸⁾, Gerber ら⁽⁹⁾, Hiroishi ら⁽¹⁰⁾は、

それぞれ抗ヒト S-amylase モノクローナル抗体を用いた P-amylase 測定法を報告している。これは S-amylase に特異的に結合するモノクローナル抗体を用いてまず検体中の S-amylase を吸着除去し、その残存する酵素活性を測定することにより P-amylase の酵素活性を求める P-amylase 活性間接測定法である。いずれも電気泳動法やインヒビター法と高い相関性を有することが示されているが、S-amylase との結合性に問題が残されている。一方、本研究で用いた P-抗体は、ヒト P-amylase に対する特異的なモノクローナル抗体であり、検体中の P-amylase を直接測定することができ、P-amylase に対する感度も良好で、操作も比較的簡単であった。しかも電気泳動法で求めた血清ならびに尿中の P-amylase 酵素活性と EIA 法で求めた免疫活性は高い相関性を有しており、EIA の正確性が確かめられた。

本 EIA 法における測定内ならびに測定間変動係数はともに10%以下であり、再現性は良好であった。血清および尿の希釈曲線は、標準曲線と平行であり、高濃度検体の希釈測定にも十分対応できることが確かめられた。その上、P-抗体はヒト S-amylase に対してほとんど交叉反応を示さなかったし、逆に P-amylase の主分画だけでなくすべての P-amylase の亜分画とも結合し、電気泳動法では判定困難な P-amylase も測定できた。従って本法を用いると、種々の原因で発生する唾液腺型高アミラーゼ血症でも^(19, 21)、S-amylase の影響を受けることなく正確に P-amylase を測定でき、高アミラーゼ血症が膵疾患によるものか否かを診断できる。

急性膵炎では、血清 P-amylase 値は全例著明な高値を示した。急性膵炎発症後、P-amylase は早期に著明な上昇（正常上限の15-22倍）を示した後、急速に低下し、5-6日後には正常域に復することから⁽²²⁾、急性膵炎における血清 P-amylase 値測定は膵炎発症後比較的早期にのみ、診断的有用性があると考えられる。一方、電気泳動法では、アミラーゼ活性が正常化した後も膵炎発作後10日以内ならば、特有のアイソザイムパターンで急性膵炎と診断できることから^(1, 23)、急性膵炎発症後5日以降では血清 P-amylase 値の測定だけでなく電気泳動法によるアミラーゼアイソザイムの分別測定も併用する必要がある。

慢性非石灰化膵炎の血清 P-amylase 値は、正常人の血清 P-amylase 値に比べ有意差は認められなかったが、血清 P-amylase 値が正常範囲以下の低値あるいは正常範囲以上の高値を示す異常症例が46.7%あり、既に報告されている血清トリプシン値の異常率⁽¹⁶⁾とほぼ同じであった。一方慢性石灰化膵炎では65.2%の症

例で血清 P-amylase 値は異常低値を示し、その平均値も非石灰化膵炎に比べ有意に低かった。このような今回の観察結果は、慢性石灰化膵炎をはじめ、高度膵外分泌障害患者や膵性糖尿病患者で血清 P-amylase 活性やトリプシン値が著明な低値を示すことを明らかにした過去の報告^(16, 24)と一致している。

腎不全でも血清アミラーゼ活性が高値で、しかもそのアミラーゼアイソザイムパターンは正常であることが知られている⁽²⁷⁾。今回の検討でも透析の有無にかかわらず、70%以上の症例が P-amylase 値の異常高値を示しており、血清 P-amylase 値を膵疾患の診断に用いる際には腎機能に留意する必要がある。

糖尿病症例の血清 P-amylase 値は、IDDM、インスリン治療群および血糖コントロール不良群ではそれぞれ NIDDM、非インスリン治療群およびコントロール良好群に比べ有意に低値であった。糖尿病症例では40-73%に、IDDMに限ると73-80%と高頻度に膵外分泌機能低下が合併していることが報告されている^(28, 29)。しかも罹病期間が長い症例や、コントロール不良な症例、あるいは重症の網膜症を有し、インスリン治療を必要とする糖尿病症例では膵外分泌機能低下が著しいことが示されている⁽²⁹⁾。今回の EIA 法を用いた血清 P-amylase 値測定結果もこれら既報の結果を支持するものであった。

従来用いられているインヒビター法では P-amylase 低値の診断が困難であるし、電気泳動法で P-amylase 低値を診断するには熟練を要し、判定までに従来よりさらに長時間反応させる必要がある。これに対しヒト P-amylase に特異的に反応する P-抗体を用いた本 EIA 法は、簡便かつ比較的短時間に、しかも正確に P-amylase 値を測定することが出来ることから、今後高アミラーゼ血症の鑑別診断のみならず、膵外分泌機能の指標検査として臨床上有用であると考えられた。

結 語

抗ヒト P-amylase モノクローナル抗体の特性およびこのモノクローナル抗体を用いたヒト体液中 P-amylase 値測定 EIA 法の有用性を検討した。

抗ヒト P-amylase モノクローナル抗体はヒト P-amylase に極めて特異性が高く、本モノクローナル抗体を用いたヒト体液中 P-amylase 値測定 EIA 法は簡便で正確に体液中 P-amylase 値を直接測定でき、急性膵炎の診断や膵外分泌機能の指標として臨床的にも有用な方法である。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導と御校閲を賜りました馬場茂明名誉教授ならびに春日雅人教授に深甚なる謝意を表します。本研究に際し直接の御助言、御教示をいただきました大槻眞博士ならびに岡林克典博士に厚く御礼申し上げます。また本実験を行うにあたり、御協

力をいただいた神戸大学医学部第2内科膵疾患研究グループの諸先生方に深謝いたします。

なお本論文の要旨は第39回電気泳動学会総会（札幌、1988）及び第30回消化器病学会大会（鹿児島、1988）において発表した。

文 献

- 1) Benjamin DR, Kenny MA: Clinical value of amylase isoenzyme determination. *Am J Clin Pathol* 62 : 752-758, 1974.
- 2) Otsuki M, Saeki S, Yuu H, et al: Electrophoretic pattern of amylase isoenzymes in serum and urine of normal persons. *Clin Chem* 22 : 439-444, 1976.
- 3) O'Donnell MD, McGeeney KF : Purification and properties of an α -amylase determination from wheat. *Biochim Biophys Acta* 422 : 159-169, 1976.
- 4) O'Donnell MD, FitzGerald O, McGeeney KF: Differential serum amylase determination by use of an inhibitor and design of a routine procedure. *Clin Chem* 23 : 560-566, 1977.
- 5) 大槻 眞, 佐伯 進, 尤 芳才, 他 : Amylase isoenzyme の臨床的研究. *日消誌* 72 : 1282-1290, 1975.
- 6) Stiefel DJ, Keller PJ: Preparation and some properties of human pancreatic amylase including a comparison with human parotid amylase. *Biochim Biophys Acta* 302 : 345-361, 1973.
- 7) Omichi K, Ikenaka T: Difference in transglycosylation between human pancreatic and salivary α -amylases. *J Biochem* 94 : 1797-1802, 1983.
- 8) Mifflin TE, Benjamin DC, Bruns DE: Rapid quantitative, specific measurement of pancreatic amylase in serum with use of a monoclonal antibody. *Clin Chem* 31 : 1283-1288, 1985.
- 9) Gerber M, Naujoks K, Lenz H, et al: A monoclonal antibody that specially inhibits human salivary α -amylase. *Clin Chem* 33 : 1158-1162, 1987.
- 10) Hiroshi S, Matsuyama S, Kurooka S, et al: Differential assay of salivary and pancreatic α -amylase in serum and urine, with use of monoclonal antibody to human salivary amylase immobilized on bacterial cell wall. *Clin Chem* 33 : 1235-1236, 1987.
- 11) Matsuura K, Ogawa M, Kosaki G, et al: Proteochemical, immunological and enzymatic properties of two amylase component from human pancreatic juice. *Clin Biochem* 16 : 224-228, 1983.
- 12) Kohler G, Milstein C: Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. *Eur J Immunol* 6 : 511-519, 1976.
- 13) Hales A: A procedure for the fusion of cells in suspension by means of polyethylene glycol. *Somatic Cell Genet* 3 : 227-230, 1977.
- 14) Tiselius A, Hjerten Levin O: Protein chromatography on calcium phosphate columns. *Arch Biochem Biophys* 65 : 132-155, 1956.
- 15) Ceska M, Birath K, Brown B: A new and rapid method for the clinical determination of α -amylase activities in human serum and urine. *Clin Chim Acta* 26 : 437-444, 1969.
- 16) 小川 裕, 早川哲夫, 近藤孝晴, 他 : 血清トリプシンの EIA による測定とその診断的意義. *日消誌* 84 : 74-83, 1987.
- 17) Otsuki M, Oka T, Suehiro I, et al: Serum pancreatic secretory trypsin inhibitor in pancreatic disease. *Clin Chim Acta* 142 : 231-240, 1984.
- 18) 早川哲夫, 野田愛司, 近藤孝晴, 他 : Enzyme immunoassay (EIA) による血清膵リパーゼ測定法とその臨床的意義. *日消誌* 82 : 2809-2815, 1985.
- 19) Otsuki M, Yuu H, Maeda M, et al: Amylase in the lung. *Cancer* 39 : 1656-1663, 1977.
- 20) Otsuki M, Maeda M, Yuu H, et al: The nature and origin of hyperamylasemia following open-heart surgery with extracorporeal circulation. *Clin Chim Acta* 77 : 349-357, 1977.
- 21) Maeda M, Otsuki M, Baba S, et al: Serum amylase isoenzyme pattern after pancreatectomy. *Lancet* 2 : 325-326, 1978.
- 22) 藤澤貴史, 大槻 眞, 神田 勤, 他 : Enzyme immunoassay による血清膵型アミラーゼ測定の基礎的検討ならびにその臨床応用. *膵臓* 4 : 15-21, 1989.
- 23) Otsuki M, Yuu H, Maeda M, et al: Relation of electrophoretic pattern of amylase isoenzymes to severity of pancreatic diseases. *Clin Chim Acta* 79 : 1-6, 1977.
- 24) Suehiro I, Otsuki M, Ohki A, et al: Amylase inhibitor from wheat: Its action and clinical application. *Gastroenterol Jap* 19 : 313-319, 1984.
- 25) 大槻 眞, 佐伯 進, 尤 芳才, 他 : 尿中アミラーゼアイソザイム pattern による慢性膵炎の診断.

医学のあゆみ 91 : 719-720, 1974.

- 26) Otsuki M, Maeda M, Yuu H, et al: Clinical evaluation of the pancreatitis-like isoamylase pattern in normal persons. Clin Chim Acta 89 : 159-164, 1978.
- 27) 岡野邦泰, 大槻 眞, 前田光雄, 他 : 腎不全患者における血清アミラーゼ活性, アミラーゼ・クレアチニンクリアランス比およびアミラーゼアイソザイムの検討. 日消誌 75 : 1825-1831, 1978.
- 28) Chey WY, Shay H, Shuman CR: External pancreatic secretion in diabetes mellitus. Ann Int Med 59 : 812-821, 1963.
- 29) Frier BM, Saunders JIIB, Wormsley KG, et al: Exocrine pancreatic function in juvenile-onset diabetes mellitus. Gut 17 : 685-691, 1976.

Characteristics of a monoclonal antibody for human pancreatic amylase
and clinical evaluation of the enzyme immunoassay for human
pancreatic amylase in serum and urine

Takashi FUJISAWA

The Second Department of Internal Medicine, Kobe University School of Medicine
(Director : Prof: Masato Kasuga)

ABSTRACT

The usefulness of the determination of pancreatic amylase (P-amylase) level in serum and urine was investigated by enzyme immunoassay (EIA) using a monoclonal antibody against human P-amylase.

The monoclonal antibody used in this study was highly specific for human P-amylase and cross reacted negligibly with human salivary amylase (S-amylase). This monoclonal antibody bound to both the major and minor P-type isoenzymes that appeared due to post-secretory modification, indicating that all of P-amylase can be measured by EIA using this monoclonal antibody.

The results obtained by EIA method correlated well with those obtained by electrophoretic method. Serum P-amylase levels in 247 normal subjects were 92.1 ± 24.3 ng/ml (mean \pm SD). Serum P-amylase levels were greatly elevated in all patients with acute pancreatitis. On the other hand, serum P-amylase levels in patients with chronic calcified pancreatitis were significantly low compared with those in patients with chronic non-calcified pancreatitis. Serum P-amylase levels in patients with chronic renal failure were significantly elevated compared with those in normal subjects and serum P-amylase levels in patients with insulin-dependent diabetes mellitus were significantly low. The EIA method described herein is useful for the direct and accurate determination of human P-amylase in serum and urine, indicating that EIA is helpful for diagnosing pancreatic exocrine insufficiency as well as acute pancreatitis.