

十二指腸液中 colipase の分泌動態と その臨床的意義について

古 川 善 也

広島大学医学部内科学第一講座 (主任: 梶山梧朗教授)

受付 平成1年1月10日

受理 平成1年3月4日

人工基質 2,3-dimercaptopropan-1-ol tributyrate を用いた, 十二指腸液中 colipase 測定系を確立した。この測定系を用いて caerulein-secretin test (C-S test) における十二指腸液中 colipase の分泌動態, 膵機能および膵形態と colipase 分泌の関係について検討するとともに, 慢性膵炎および膵癌症例における colipase 分泌を検討した。さらにバター負荷試験と colipase 分泌量の関係についても検討した。

① 本測定系は簡便かつ短時間で多数検体の同時測定が可能であり, titrimetric 法と良好な相関関係を認めた。また十二指腸液中の胆汁の影響を受けず, 十二指腸液の希釈曲線も良好な直線性を認め, 精度も満足できるものであった。

② 健常者における C-S test 時 colipase 分泌は, caerulein 刺激後に最大となり, secretin では持続刺激にもかかわらず減少し, 本試験における colipase 分泌刺激は主に caerulein の作用であると考えられた。また, C-S test 時の colipase 分泌量はほぼ対数正規分布を示した。

③ 膵外分泌機能障害が進行するのに従い, colipase 濃度の低下がみられ, 特に caerulein 刺激後では低下が著明であった。

また, 正常所見群に比べ高度膵外分泌障害群である確診所見群においては, colipase, lipase, amylase 分泌量とも有意の低下を示した。一方, 軽度障害群である異常所見群では, colipase および lipase 分泌量が有意の低下を示し, 異常所見群の colipase 分泌量は正常所見群の65.7%, lipase 分泌量は72.8%, amylase 分泌量は88.5%であり, 軽度膵外分泌機能障害の診断に C-S test 時の十二指腸液中 colipase 測定は有用と考えられた。

④ 内視鏡的逆行性膵管造影所見において膵管形態異常が高度となるのに従い, colipase 濃度の低下を認めた。これは特に caerulein 刺激後において著明であった。

また, 高度膵管形態異常群である MOP or ADP 群は, 膵管形態正常群である Normal-ERP 群に比し, colipase, lipase, amylase 分泌量とも有意の低下を示した。一方軽度膵管形態異常群である MIP 群では Normal-ERP 群との有意差は認めなかったものの, amylase 分泌量が Normal-ERP 群の102.6%と過分泌の傾向を示したのに対し, colipase 分泌量では77.1%, lipase 分泌量では72.2%と低下傾向を示し, colipase による軽度膵管形態異常群診断の可能性が示唆された。

⑤ 慢性膵炎 I 群では, colipase, lipase, amylase 分泌量とも正常群に比べ有意の低下を認めた。一方慢性膵炎 II 群では正常群に比べ colipase 分泌量は60.6%, lipase 分泌量は68.7%, amylase 分泌量は100.4%であり, colipase 分泌量のみが有意の低下を認め, 軽度または早期慢性膵炎の診断に十二指腸液中 colipase 測定は有用と考えられた。

⑥ 膵癌症例における C-S test 時十二指腸液中 colipase 分泌は, 健常者に比べ lipase, amylase と同様に低下する傾向を認めた。

⑦ バター負荷試験異常群では, colipase 分泌量は正常群に比べ著明に低下していた。また co-

lipase 分泌量は lipase 分泌量と同様, バター負荷試験正常群と異常群でオーバーラップを認めなかった。さらに colipase 分泌量は, lipase 分泌量よりバター負荷試験と良好な相関を示し, 十二指腸液中 colipase は脂肪の消化の指標となることが示唆された。

以上より C-S test 時十二指腸液中の colipase 測定は, 膵疾患, 特に早期または軽度慢性膵炎や脂肪の消化障害の診断・病態解明に有用であると考えられた。

Key words : Colipase, Caerulein-secretin test, Chronic pancreatitis, Pancreatic cancer, Maldigestion of fat

現在十二指腸内挿管を手段とする膵外分泌機能検査法 (duodenal intubation test: DIT) のなかでも特に, pancreozymin-secretin test (P-S test)⁸⁾ および caerulein-secretin test (C-S test)^{1), 20, 25)} は膵外分泌機能検査法として最も重要な位置を占め, 慢性膵炎の診断には欠かす事の出来ない検査法として定着している。

従来 DIT の判定因子としては, 最高重炭酸塩濃度 (Max. BC)・液量・膵酵素分泌量特に amylase 分泌量が用いられてきた。各種膵酵素のなかで amylase が測定されてきた理由は, 活性が安定で測定も簡便なため⁴⁰⁾ であるが, 近年膵外分泌障害の診断精度の向上や病態生理の把握を目的として, 新しい生化学的因子の研究が行われてきた^{21, 26, 27, 36, 49)}。その結果 lipase は amylase に比べ活性は不安定であるものの, 膵外分泌障害の早期より分泌低下傾向がみられることが明らかとなった⁴⁰⁾。

一方, 膵 lipase が主に働く小腸内の様な高濃度の胆汁酸塩存在下で作用が発現するためには, 分子量約 1 万の polypeptide cofactor である colipase が必要である^{3, 12, 43)}。colipase の主作用は高濃度の胆汁酸塩で阻害された膵 lipase 活性を回復させること^{3, 6, 7)} であり, このため colipase の欠損は, maldigestion・malabsorption の原因となる^{16, 18)} ことが知られている。しかし colipase の膵よりの分泌様式や病態生理に関する知見は極めて少ない。これまで colipase 測定法としては titrimetric 法^{7, 12, 14, 23, 24)}, turbidimetric 法²⁴⁾ や radioimmunoassay 法 (RIA 法)^{33, 34)} が報告されているが, 操作が複雑であったり, 測定に長時間を要したり, 多数検体を同時測定できない等多数の問題点を有している。

そこで今回著者は, 人工基質 2, 3-dimercaptopropan-1-ol tributyrate (BALB) を用いた lipase 測定法 (BALB-DTNB 法)³¹⁾ の簡便性に注目し, BALB を用いた多数検体の同時測定が可能かつ簡便で短時間で測定できる colipase 測定系を確立し, C-S test 時の colipase 分泌動態, 膵機能および膵形態と colipase 分泌の関係について検討した。さらに

慢性膵炎および膵癌症例における colipase 分泌を検討すると同時に, 脂肪消化吸収試験の一種であるバター負荷試験と colipase 分泌量の関係についても検討したのでその概要を報告する。

材料と方法

[I] 十二指腸液中 colipase 測定系の確立

(1) 試薬

porcine colipase は Boehringer Mannheim 社, 5, 5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB), tri-n-butyrin は半井化学, taurodeoxycholic acid, sodium salt (TDC), bovine serum albumin, egg albumin, bovine chymotrypsinogen, bovine ribonuclease は Sigma 社, Sephadex G-25 medium, DEAE-Sephadex A-50, Sephadex G-100 は Pharmacia 社, caerulein (Ceosunin[®]) は協和発酵工業, secretin (Secrepan[®]) はエーザイより購入し, BALB は黒岡繁博士 (大日本製薬) より提供をうけた。

(2) 精製ヒト膵 lipase (lipase low in colipase activity) および colipase sample の作製

精製ヒト膵 lipase は, Erlanson らの方法¹²⁾ により作製した。まず膵頭部癌のため膵頭十二指腸切除術を施行された症例の surgical fistula より採取したヒト純粋膵液を, 0.01 M phosphate buffer, pH 6.2 (PB) にて平衡とした Sephadex G-25 medium column (2.5×45 cm) に添加後, PB を用いて溶出し 5 ml ずつ分画採取し lipase 活性を測定した。lipase 活性を示す分画を, PB で平衡とした DEAE-Sephadex A-50 column (2.5×45 cm) に添加後, PB にて溶出し 4.5 ml ずつ分画採取した。各分画の lipase 活性を測定後, 高い lipase 活性を示した分画を集めて凍結乾燥し, colipase 測定時まで -40°C で保存した。

colipase sample は, Borgström らの方法⁷⁾ に基づき, C-S test にて得られたヒト十二指腸液を water bath にて 75°C, 10分間加熱し, lipase 活性を全く消失させたものを colipase sample として用いた。なお colipase sample は測定時まで -40°C で凍結保存し

た。

(3) colipase 測定原理

TDC により抑制された精製膵 lipase は、加えられた colipase 量に比例して活性化される⁴²⁾。活性化された膵 lipase は BALB を加水分解し、2,3-dimercaptopropan-1-ol (BAL) と butyric acid を生ずる。遊離された BAL は -SH 基定量試薬である DTNB と反応し、5-thio, 2-nitrobenzoate (TNB) anion を生じる。これを 412 nm で比色定量し³¹⁾、porcine colipase を用いて作成した dose-response curve より colipase 量を算定する。

(4) colipase 測定法 (Table 1)

test 用試験管 (T) と blank 用試験管 (B) に各々 0.3 mM DTNB-14 mM TDC-0.1 M Tris-HCl (pH 8.5) 1 ml および standard 用の porcine colipase 又は未知濃度の colipase sample 50 μ l を加える。さらに (T) には、1,000 BALB-U に調整した精製ヒト膵 lipase 50 μ l を加え、(T) (B) とともに 30°C で 5 分間予熱する。予熱後 (T) (B) に Branson Sonifier model 200 を用い出力 20%、45 秒間 sonicate して emulsion とした 20 mM BALB 100 μ l を加え、よく混和して反応を開始する。30°C、30 分間暗所で incubate し、(T) (B) に acetone 2 ml を加え反応を停止する。生成された TNB anion を、純水を対照として島津ダブルビーム分光光度計 UV140 を用い、光路 1 cm のキューベットで 412 nm での吸光度を測定する。(T)-(B) の吸光度差を求め、porcine colipase を用いて作成した

dose-response curve より colipase 量の半定量を行った。

なお測定はすべて 2 回の重複測定を行い、測定値は平均値で表示した。

(5) colipase 測定系の基礎的検討

まず本測定系における TDC 濃度と精製ヒト膵 lipase 活性の関係を検討するため、colipase free の状態で TDC 濃度を変化させ lipase 活性を測定した。次に本測定系の至適 pH を求めた。BALB 濃度の本測定系に与える影響は、BALB 濃度を 10 mM、20 mM、30 mM と変化させ、各々の条件下で porcine colipase 濃度の dose-response curve を作成することで検討した。反応時間は porcine colipase 存在下で、反応時間と lipase 活性化の関係を調べることで検討した。本測定系に最も適した膵 lipase 濃度は、精製ヒト膵 lipase 濃度を 3,000 BALB-U、1,000 BALB-U、150 BALB-U と変化させ、各々の条件下で porcine colipase の dose-response curve を作成し検討した。また反応停止後の安定性は、日中の通常室内光下での変化を経時的に観察することで検討した。

(6) 十二指腸液中 colipase の測定

① 十二指腸液 colipase sample 測定の検討

C-S test 時に得られた十二指腸液を 75°C で 10 分間加熱処理し、200 倍から 1,000 倍まで希釈したものの colipase 活性を測定し希釈曲線を求めた。また胆汁の影響を検討するために、まず 3 例の手術時に得られた胆嚢胆汁を、75°C で 10 分間加熱処理したものの co-

Table 1. A colorimetric method using BALB as substrate for the determination of colipase.

Procedure of Colipase Assay			
Test (T)		Blank (B)	
Standard porcine colipase	50 μ l	Standard porcine colipase	50 μ l
or unknown sample		or unknown sample	
Human pancreatic lipase (1,000 BALB-U)	50 μ l	14 mM TDC-0.3 mM DTNB-	1 ml
14 mM TDC-0.3 mM DTNB-	1 ml	0.1 M Tris- HCl (pH 8.5)	
0.1 M Tris- HCl (pH 8.5)			
		preincubation at 30°C for 5 min	
preincubation at 30°C for 5 min			
		20 mM BALB	100 μ l
20 mM BALB	100 μ l		
		incubation at 30°C for 30 min	
incubation at 30°C for 30 min			
		Acetone	2 ml
Acetone	2 ml	Human pancreatic lipase (1,000 BALB-U)	50 μ l

read at 412 nm (T-B)

lipase 活性を測定した。次に100倍希釈した加熱胆嚢胆汁で porcine colipase 300 ng/ml となるように調整した試料の colipase 活性を測定し、回収率を求めた。十二指腸液中 colipase の安定性は、C-S test にて得られた5種類の十二指腸液を 0°C および 30°C で240分間保存し、colipase 活性を経時的に測定することで検討した。また十二指腸液を加熱して作製した colipase sample の安定性は、3例の colipase sample を -40°C で凍結保存し、1週間毎に1カ月間経時的に測定することにより検討した。

② colipase sample のゲル濾過法

十二指腸液 colipase sample を、150 mM NaCl を含む 0.02 M Tris-HCl buffer (pH 8.0) で平衡とした Sephadex G-100 column (1.0×116 cm) に添加した。溶出は同一 buffer にて行い、1.5 ml ずつ fraction collector で分画採取し、得られた溶出液の colipase 活性を測定した。なお標準分子量マーカーは、Erlanson ら¹²⁾ に準じ bovine serum albumin, egg albumin, bovine chymotrypsinogen, bovine ribonuclease を用いた。

③ titrimetric 法との相関

C-S test にて得られた十二指腸液21例の colipase 活性を、本測定法と titrimetric 法にて求め、両測定系の相関を検討した。titrimetric 法は Borgström らの方法⁷⁾ に準じ、4 mM TDC-150 mM NaCl-1 mM CaCl₂-2 mM Tris-HCl (pH 7.0) 溶液 7.5 ml に tributyrin 250 μl を加え、sonicator にて emulsion としたものを基質として用い、10,000 BALB-U の精製ヒト膵 lipase 100 μl および colipase sample を 100 μl 加え反応を開始した。colipase により活性化された lipase が基質から遊離させる fatty acid を、TOA pH stat model HSM-10A を用いて 0.05 N NaOH で滴定することにより colipase 活性を求めた。なお titrimetric 法による colipase 活性は μmoles butyric acid/min·ml で表した。

④ Intraassay variance および Interassay variance

colipase 高値 (平均 285.6 ng/ml) および低値 (平均 55.3 ng/ml) の検体を同一 assay 内で10回測定して intraassay variance を求め、また colipase 中等値 (平均 190.6 ng/ml) および低値 (平均 80.0 ng/ml) の検体を5回の異なった assay にて測定し inter-assay variance を算出した。

【II】健康者における C-S test 時十二指腸液中 colipase 分泌動態

対象は血中 amylase 値, amylase isozyme pattern

および肝機能検査において異常を認めず、かつ腹部超音波検査で膵臓、肝臓、胆道系に著変がないことが確認された22歳から77歳まで平均年齢51.2歳の男性17例、女性18例計35例である。

C-S test は早期空腹時に fluoroscope 下でクリニーバルーンゾンデ42B型を挿入し、十二指腸球部および水平脚でバルーンをふくらませることにより十二指腸下行脚に固定した。つぎに被験者を安静仰臥位とし、30 mmHg の陰圧で胃液および十二指腸液の持続吸引を行った。約30分間十二指腸液を吸引除去後、caerulein 50 ng/kg を5分間で静注を行い、引きつづいて secretin をシリンジポンプを用いて 1.2 U/kg/hr で60分間持続静注し、10分毎に十二指腸液を氷冷下で分画採取した。各分画毎に液量、重炭酸塩濃度、膵酵素系 (amylase, lipase, colipase) を測定し、amylase, lipase, colipase の分泌パターンを比較検討した。また35例中5例には、caerulein の静注に引きつづき secretin の代わりに saline を20分間持続静注し、caerulein 静注後の colipase 分泌に対する secretin の影響を検討した。

さらに caerulein 静注後の colipase 総分泌量を体重 (kg) で除した値を求め、生データおよび対数化されたデータより歪度 (skewness), 尖度 (kurtosis) を計算し colipase 分泌量の分布を検討し、日本消化器病学会の慢性膵炎臨床診断基準⁴⁰⁾ に準じ、C-S test における十二指腸液中 colipase 分泌量の正常値設定 (mean+2S.D.~mean-S.D.) を行った。

なお重炭酸塩は Natelson 法, amylase は blue starch 法, lipase は BALB-DTNB 法で測定した。

【III】十二指腸液中 colipase 測定の臨床的意義

(1) 慢性膵炎診断に対する十二指腸液中 colipase 測定の意義

① 膵外分泌機能と colipase 分泌の関係

対象は広島大学医学部第一内科において、臨床症状および血中膵酵素 (amylase, lipase, または elastase I) 値より慢性膵炎が疑われ、C-S test が施行された15歳より77歳まで平均年齢51.6歳の男性47例、女性43例の計90症例である。

膵外分泌機能と colipase 分泌の関係を検討するために、C-S test を従来の判定因子である Max. BC, 液量, amylase 分泌量を用い、日本消化器病学会の慢性膵炎臨床診断基準⁴⁰⁾ に準じ C-S test 正常所見群 (56症例), Max. BC 単独低下または液量と amylase 分泌量低下を示す異常所見群 (15症例), Max. BC を含む2または3因子低下を示す確認所見群 (19症例) の3群に分類し、各群における colipase 分泌パター

ンを検討した。さらに colipase 分泌量を Max. BC, 液量, lipase 分泌量および amylase 分泌量と比較検討した。

② 膵管造影所見と colipase 分泌の関係

内視鏡的逆行性膵管造影 (ERP) で慢性膵炎または正常膵管像を示し、かつ C-S test を施行した29歳より77歳まで平均年齢52.7歳の男性22例、女性11例の計33症例を対象とした。

対象症例を日本消化器病学会の慢性膵炎臨床診断基準⁴⁰⁾ に準じ、ERP 所見にて正常群 (Normal-ERP 群: 12症例)、軽度膵炎群 (MIP 群: 7症例)、中等度膵炎または高度膵炎群 (MOP or ADP 群: 14症例) の3群に分類し、各群における colipase 分泌パターンを検討した。さらに各群における colipase 分泌量を Max. BC, 液量, lipase 分泌量および amylase 分泌量と比較検討した。

③ 慢性膵炎診断と colipase 分泌量の意義

対象は広島大学医学部第一内科において、慢性膵炎を疑い臨床経過を6カ月以上観察し得た80症例である。年齢は19歳より77歳まで平均52.0歳、男性42例、女性38例であった。

対象症例全例に C-S test および腹部正面単純X線写真を、33症例に ERP を施行し、日本消化器病学会の慢性膵炎臨床診断基準⁴⁰⁾ に準じて、正常群 (46症例)、慢性膵炎 I 群 (21症例)、慢性膵炎 II 群 (13症例) の3群に分類した。慢性膵炎の成因別ではアルコール性6例 (I 群5例, II 群1例)、胆石性3例 (I 群1例, II 群2例)、成因不明を含むその他が25例 (I 群15例, II 群10例) であった。colipase 分泌量を各群間で比較するとともに、Max. BC, 液量, lipase 分泌量および amylase 分泌量と比較検討した。

(2) 膵癌診断における十二指腸液中 colipase 測定の意義

対象は組織学的に膵癌と確定診断され、かつ C-S test が施行された、44歳より69歳までの平均年齢60.2歳、男性4例、女性2例の計6症例である。膵癌の主占拠部位は膵頭部2例、膵体部4例であった。

膵癌診断に対する十二指腸液中 colipase の有用性は、膵癌症例の colipase 分泌と健常者の colipase 分泌とを比較するとともに、amylase 分泌および lipase 分泌と比較することにより検討した。

(3) バター負荷試験と十二指腸液中 colipase 分泌量の関係

脂肪の消化吸収と十二指腸液中 colipase の関係を、バター負荷試験と C-S test 時十二指腸液中 colipase 分泌量の関係を調べることで検討した。

対象は、膵疾患以外の消化器疾患のないことが確認され、かつ空腹時血中総コレステロールおよび中性脂肪が正常であった24症例である。年齢は19歳より77歳まで平均48.4歳、男性15例、女性9例であった。

対象にバター負荷試験と C-S test を同時期 (1カ月以内) に施行した。バター負荷試験は中尾の方法³⁹⁾ に準じ、バター 0.5 g/kg を含む試験食を投与し血中に出現する chylomicron をレーザーネフロメーターで経時的 (前, 30分, 60分, 120分, 180分, 300分) に測定した。脂肪の消化吸収の指標として Integrated Δ light scattering intensity (Int. Δ LSI) を求めバター負荷試験正常群 (Int. Δ LSI 44.2 以上)、異常群 (Int. Δ LSI 44.2 未満) に分類し、各群における C-S test 時十二指腸液中 colipase, lipase, amy-

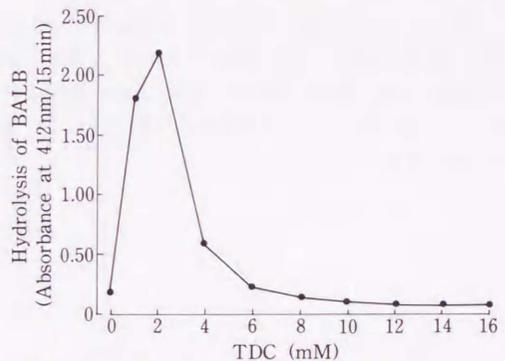


Fig. 1. Effect of TDC concentration on the activity of human pancreatic lipase in the absence of colipase.

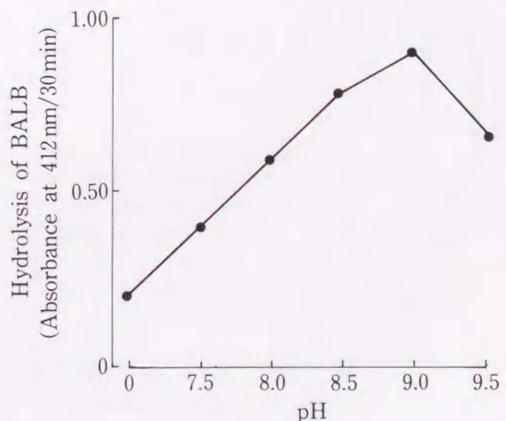


Fig. 2. Effect of pH on the hydrolysis of BALB by pancreatic lipase in the presence of 150 ng/ml colipase.

lase 分泌量の対比を行うとともに, Int. Δ LSI と C-S test 時十二指腸液中 colipase, lipase 分泌量との相関関係の検討を行った。

[IV] 統計

各マーカーおよび Int. Δ LSI はいずれも mean \pm S.E. で示し, 各群間の差は, Mann-Whitney's U test または Wilcoxon test を用い検討した。回帰直線は最小2乗法にて求めた。相関関係の検討は, 十二指腸液中 colipase 測定系の確立では, Pearson の積率相関係数 (r) を用い, 臨床的検討では, Kendall の順位相関係数 (τ) を用い行った。

結 果

[I] 十二指腸液中 colipase 測定系の確立

(1) colipase 測定系の基礎的検討

① TDC 濃度の検討 (Fig. 1)

colipase free の状態での精製ヒト膵 lipase 活性は, TDC 濃度の増加とともに漸増し 2 mM で最高となり, 以後 TDC 濃度の増加とともに lipase 活性は抑制され, 10 mM 以上では最高活性時の1/10以下となり抑制率はほぼ一定化した。

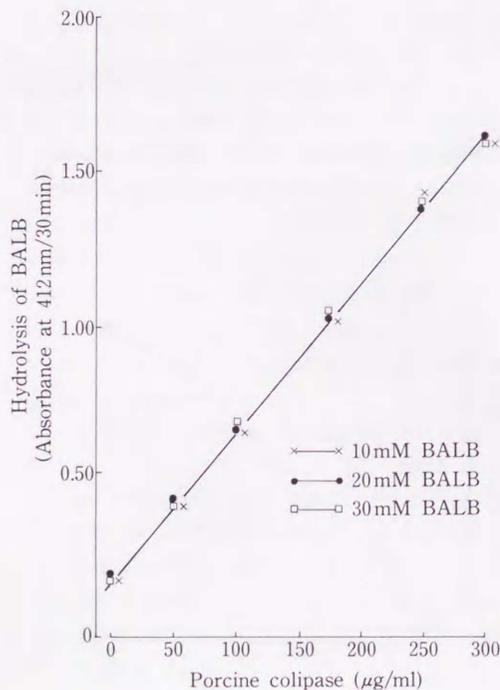


Fig. 3. Effect of BALB concentration on the rate of its hydrolysis by pancreatic lipase as related to colipase concentration.

② pH の検討 (Fig. 2)

本測定系の膵 lipase 活性は porcine colipase 150 ng/ml 存在下で, pH 7.0 から pH 9.0 まで漸増し pH 9.0 で最高となり, それ以上では lipase 活性は低下した。

③ BALB 濃度の検討 (Fig. 3)

本測定系の基質である BALB の濃度を10から 30 mM まで変化させ, porcine colipase の dose-response curve を作成すると, いずれもほぼ同様の直

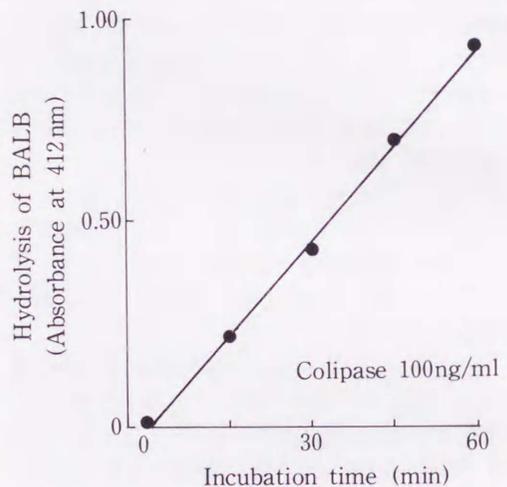


Fig. 4. Relation between incubation time and hydrolysis of BALB.

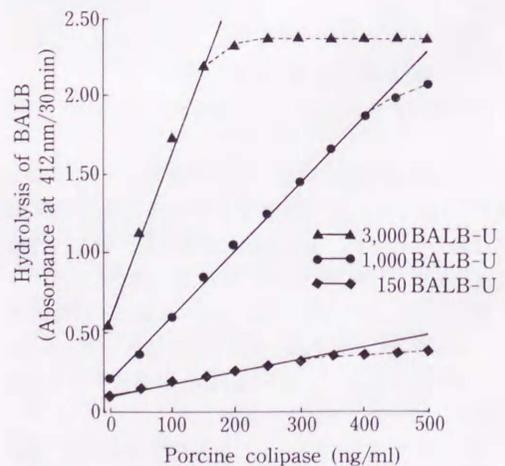


Fig. 5. Effect of pancreatic lipase concentration on the rate of hydrolysis of BALB with pancreatic lipase as related to colipase concentration.

線となった。

④ 反応時間の検討 (Fig. 4)

porcine colipase 100 ng/ml 存在下で、本測定系は少なくとも反応開始より1時間までは、BALB 水解と反応時間の間に直線関係を認めた。

⑤ 精製ヒト膵 lipase 濃度の dose-response curve に与える影響の検討 (Fig. 5)

本測定系に最も適した精製ヒト膵 lipase 濃度を決めるために、3種類の膵 lipase 濃度で porcine colipase の dose-response curve を作成した。まず精製膵 lipase 濃度が 3,000 BALB-U では、porcine colipase 0 から 150 ng/ml の間で、412 nm における吸光度と直線関係 ($Y=0.0121X+0.528$, $r=0.999$) を認めたが、200 ng/ml 以上では吸光度は約2.3で一定化した。次に精製ヒト膵 lipase 濃度が 1,000 BALB-U では、porcine colipase 0 から 400 ng/ml まで BALB の水解と良好な直線関係 ($Y=0.00435X+0.174$, $r=0.997$) を認めた。また porcine colipase 400 ng/ml での吸光度は約1.9であった。一方精製ヒト膵 lipase 濃度が 150 BALB-U の場合には、porcine colipase が 0 から 200 ng/ml の間でのみ、BALB 水解と直線性 ($r=0.993$) を認めた。また porcine colipase 200 ng/ml での吸光度は約0.27であった。

⑥ 反応停止後の安定性 (Fig. 6)

acetone 2 ml にて反応停止後、日中の通常室内光下で経時的に測定した吸光度は、時間とともに緩徐に上昇していくが、反応停止60分後では反応停止時に比べ4.3%の上昇を認めたのみであった。

(2) 十二指腸液中 colipase の測定

① 十二指腸液 colipase sample の希釈曲線 (Fig.

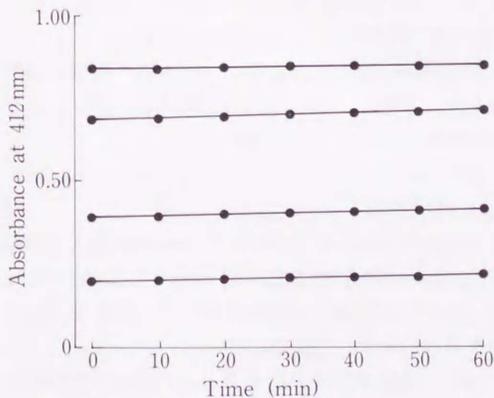


Fig. 6. Stability of developed color by colorimetric method using BALB at room temperature.

7)

加熱処理した十二指腸液の希釈曲線は、少なくとも吸光度1.7以下においては BALB の水解と良好な直線性 ($r=0.998$) を示した。

② 胆汁の影響

加熱処理した胆嚢胆汁には colipase 活性は全く認めなかった。また、加熱した胆嚢胆汁を porcine colipase 300 ng/ml に添加したときの回収率は97.1%を示した。

③ 十二指腸液中 colipase の安定性および colipase sample の安定性 (Fig. 8)

5例の十二指腸液を 0°C または 30°C で240分まで保存したときの colipase 活性は、前値に比べ 0°C では活性の低下は認めず安定していたが、30°C で保存したときの colipase 活性は徐々に低下していき、180

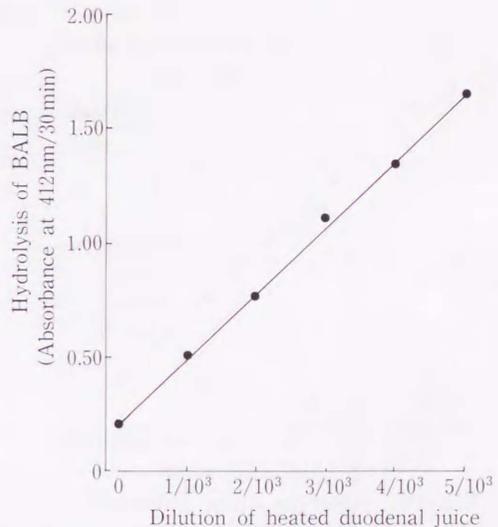


Fig. 7. Dilution curve of heated duodenal juice.

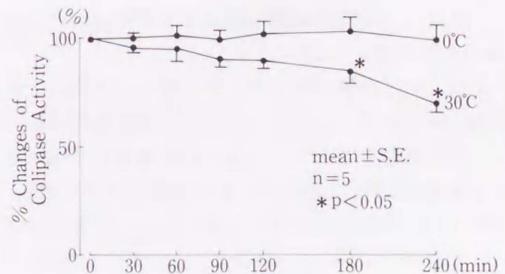


Fig. 8. Stability of colipase activity in the duodenal juice at 0°C and 30°C.

*($p < 0.05$) compared to the value at 0 time.

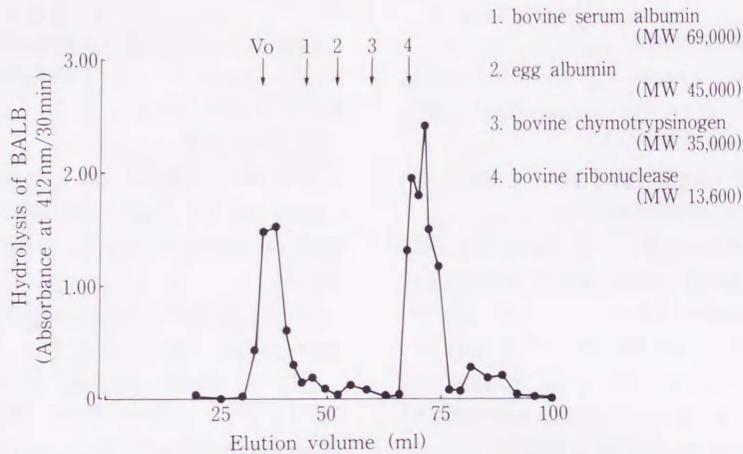


Fig. 9. Gel filtration profiles of heated duodenal juice on Sephadex G-100.

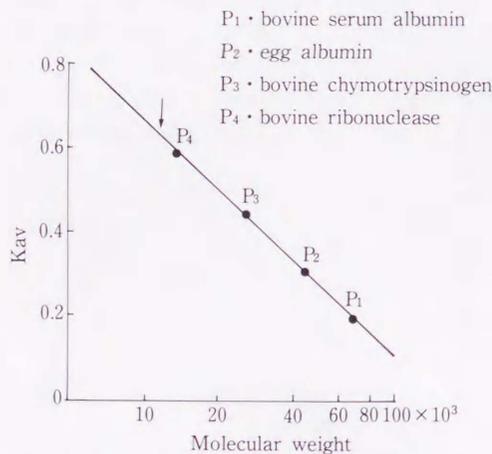


Fig. 10. Molecular weight determination of colipase activity by the gel filtration technique. The arrow indicates the K_{av} value observed for colipase.

分で84.4%, 240分では69.3%であり前値に比べ有意 ($p < 0.05$) の低下を認めた。

また、十二指腸液を加熱して作製した3例の colipase sample を -40°C で凍結保存し、1週間毎に1カ月間測定した時の colipase 活性は前値に比し1週で $99.3 \pm 8.8\%$, 2週で $97.3 \pm 7.8\%$, 3週で $107.5 \pm 15.1\%$, 1カ月後でも $96.4 \pm 14.4\%$ を示し安定していた。

④ colipase sample のゲル濾過パターン (Fig. 9, 10)

十二指腸液 colipase sample のゲル濾過パターン

Table 2. Assay variability for colipase.

	Mean (ng/ml)	S.D. (ng/ml)	C.V. (%)
Intraassay Variance (n=10)	285.6	10.0	3.5
Interassay Variance (n=5)	190.6	25.5	13.4
	80.0	10.9	13.7

C.V.: coefficient of variation

は、2峰性の colipase 活性 peak を示した。第一の small peak は void volume に認められ、第二の main peak は Fig. 10 で示される様に colipase の分子量である11,000の分画^{12,35} に認められた。

⑤ titrimetric 法との相関 (Fig. 11)

titrimetric 法と本測定系における同一検体21例の colipase 活性は、相関係数 $r = 0.889$ ($p < 0.01$) と良好な相関を認めた。

⑥ Intraassay variance および Interassay variance (Table 2)

本測定系における intraassay variance の C.V. 値は colipase 高値で3.5%, 低値で5.8%と良好であった。また interassay variance の C.V. 値は、colipase 中等値で13.4%, 低値で13.7%であった。

【II】 健常者における C-S test 時十二指腸液中 colipase 分泌動態

(1) 健常者における十二指腸液中 colipase, lipase, amylase 分泌パターン (Fig. 12)

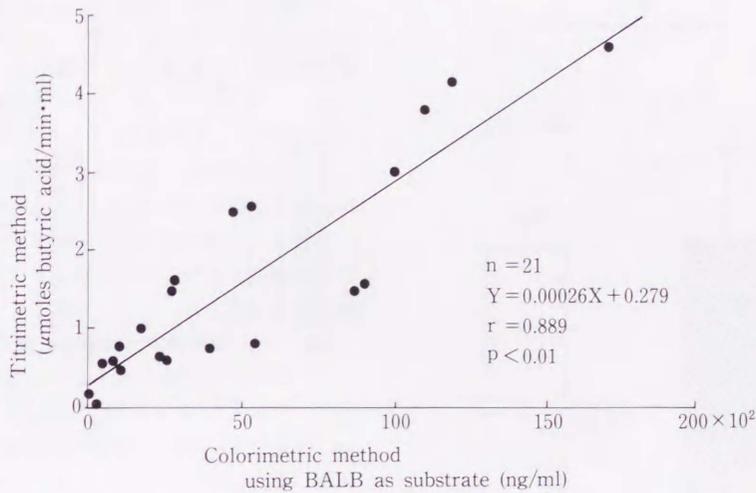


Fig. 11. Correlation of colipase activities determined by the titrimetric method and colorimetric method using BALB as substrate.

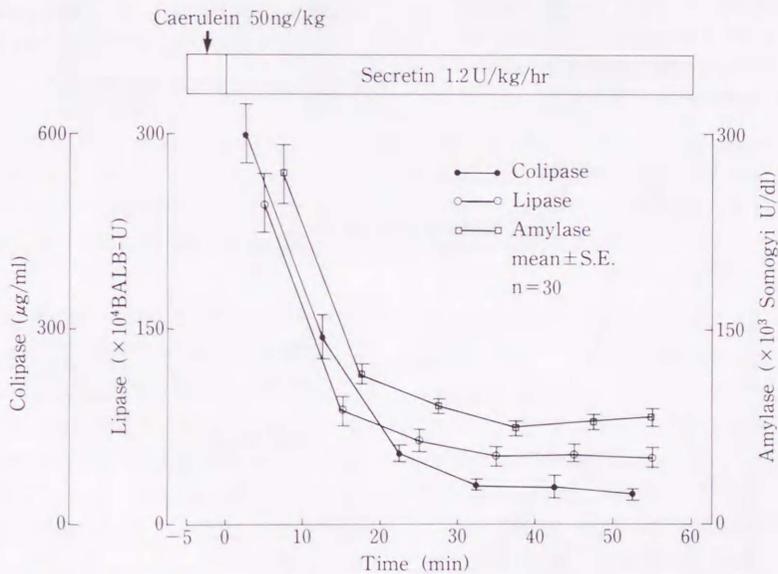


Fig. 12. Secretory pattern of colipase, lipase and amylase during caerulein-secretin test in healthy subjects.

健常者における C-S test 時の colipase 分泌パターンは、amylase, lipase とほぼ同様であり、caerulein 静注直後の10分分画で最高濃度の $599.7 \pm 48.2 \mu\text{g/ml}$ を示し、以後 secretin の持続静注にもかかわらず漸減し、20分分画では $288.6 \pm 33.6 \mu\text{g/ml}$ 、30分分画では $109.1 \pm 13.1 \mu\text{g/ml}$ となり、40から60分分画では 58.4 ± 9.2 , 56.8 ± 18.4 , $44.9 \pm 8.0 \mu\text{g/ml}$ とほぼ一定の低値を示した。

(2) caerulein 静注後の colipase 分泌におよぼす secretin の影響 (Fig. 13)

caerulein 静注後 secretin を静注した6例と生食を静注した5例における caerulein 静注開始時より25分間の colipase 分泌量は、secretin 静注群では $262.3 \pm 93.7 \times 10^2 \mu\text{g}$ 、生食静注群では $257.1 \pm 24.3 \times 10^2 \mu\text{g}$ であり両群に差異を認めなかった。

(3) C-S test における colipase 分泌量の分布

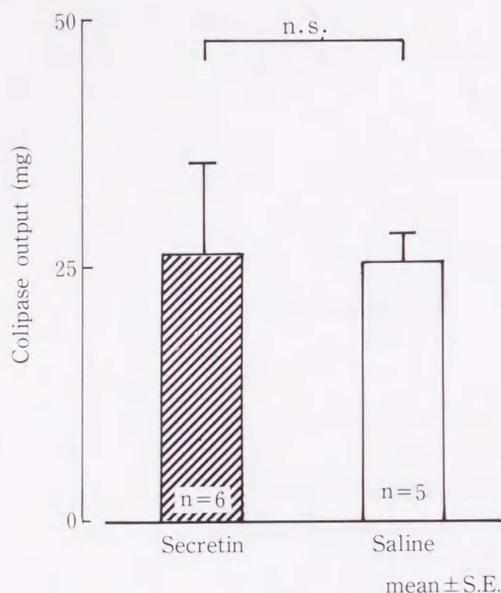


Fig. 13. Colipase output in healthy subjects for 25 min after caerulein (50 ng/kg) administration with constant infusion of secretin (1.2 U/kg/hr) or saline.

colipase 分泌量の skewness, kurtosis を, 測定値とその対数化された値と比較した。skewness は測定値では0.36, 対数値では-0.17であった。また kurtosis はそれぞれ-1.33, -1.10であり, いずれのメーカーも生データより対数化された値の方が, 正規分布を示す skewness 0, kurtosis 0 に近似しており, colipase 分泌量は対数正規分布をとるものと考えられた。これより C-S test 時十二指腸液中 colipase 分泌量の正常値は, 対数変換した値より求め, 16.68~4.05 $\mu\text{g}/\text{kg}$ と設定した。

【Ⅲ】 十二指腸液中 colipase 測定の臨床的意義

(1) 慢性膵炎診断に対する十二指腸液中 colipase 測定の意義

① 膵外分泌障害と colipase 分泌パターンとの関係 (Fig. 14)

C-S test 正常所見群における caerulein 静注後の10分分画より60分分画までの各分画の colipase 濃度は, 各々 557.5 ± 40.0 , 267.0 ± 24.0 , 126.0 ± 11.0 , 76.8 ± 9.1 , 64.6 ± 11.1 , $52.7 \pm 6.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ であった。一方異常所見群では各々 382.2 ± 60.2 , 232.6 ± 27.5 , 106.2 ± 17.2 , 66.9 ± 15.0 , 36.0 ± 8.5 , $31.9 \pm 6.8 \mu\text{g}/\text{ml}$

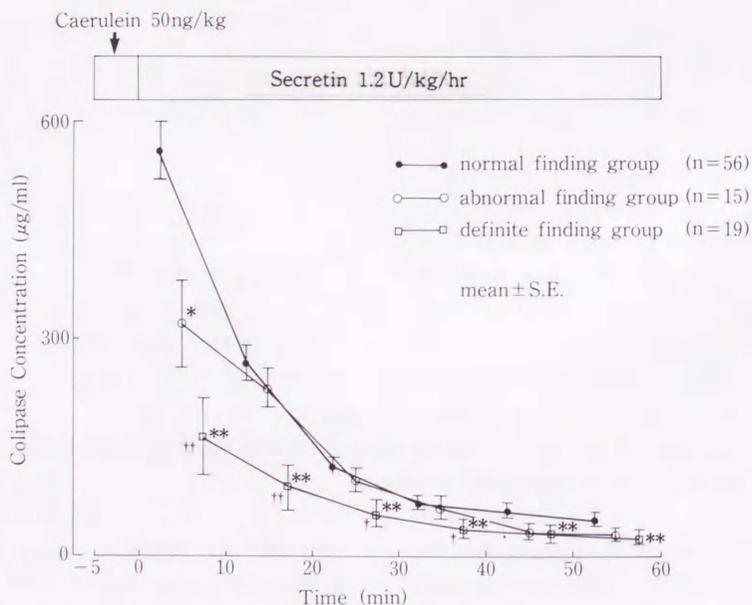


Fig. 14. Secretory pattern of colipase during caerulein-secretin test by different degrees of pancreatic exocrine dysfunction. (normal exocrine function: normal finding group, mild pancreatic insufficiency: abnormal finding group, severe pancreatic insufficiency: definite finding group)
 **($p < 0.01$), *($p < 0.05$) compared with normal finding group.
 ††($p < 0.01$), †($p < 0.05$) compared with abnormal finding group.

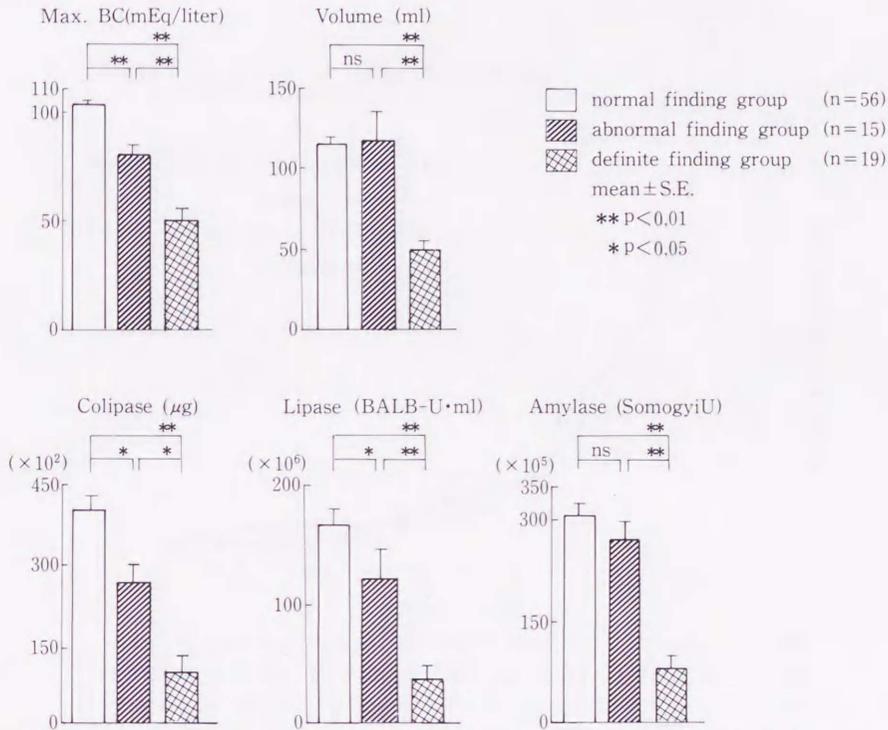


Fig. 15. Max. bicarbonate concentration (Max. BC), volume, colipase output, lipase output and amylase output during caerulein-secretin test by different degrees of pancreatic exocrine dysfunction. (normal exocrine function: normal finding group, mild pancreatic insufficiency: abnormal finding group, severe pancreatic insufficiency: definite finding group)

であり、正常所見群に比べ全体的に colipase 濃度は低下する傾向が見られ、特に caerulein 静注直後の10分分画に見られる colipase 濃度は有意 ($p < 0.05$) に低下した。確診所見群における各分画の colipase 濃度は、各々 166.9 ± 53.1 , 98.0 ± 30.4 , 59.8 ± 18.0 , 39.1 ± 12.2 , 33.1 ± 11.1 , $27.9 \pm 9.3 \mu\text{g/ml}$ であり、正常所見群に比べ全分画で有意 ($p < 0.01$) の低下を認め、また異常所見群に比べ caerulein 静注直後より40分分画まで有意 (10, 20分分画では $p < 0.01$, 30, 40分分画では $p < 0.05$) の低下を認めた。

② 膵外分泌障害と colipase 分泌量の関係 (Fig. 15)

C-S test 正常所見群における Max. BC, 液量, colipase, lipase, amylase 分泌量はそれぞれ 103.3 ± 1.3 mEq/liter, 115.3 ± 4.7 ml, $398.3 \pm 24.5 \times 10^2 \mu\text{g}$, $163.9 \pm 12.3 \times 10^6$ BALB-U·ml, $299.4 \pm 18.1 \times 10^5$ Somogyi U であった。一方確診所見群では各々 50.3 ± 5.3 mEq/liter, 56.7 ± 9.6 ml, $96.4 \pm 28.7 \times 10^2 \mu\text{g}$, $35.6 \pm 11.6 \times 10^6$ BALB-U·ml, $79.0 \pm 19.7 \times 10^5$ Somogyi U で

あり各マーカーとも正常所見群に比べ有意 ($p < 0.01$) の低下を示した。特に膵酵素系は正常所見群に比べ colipase で24.2%, lipase で21.7%, amylase では26.4%と低い値を示した。また異常所見群の Max. BC は 80.1 ± 4.2 mEq/liter であり、正常所見群の77.6%で有意 ($p < 0.01$) の低下を示したが、液量は 118.1 ± 18.0 ml で102.4%とむしろ過分泌の傾向を示した。酵素系間の比較では、colipase では $261.8 \pm 35.9 \times 10^2 \mu\text{g}$ であり正常所見群の65.7%で、lipase では $119.4 \pm 23.7 \times 10^6$ BALB-U·ml であり72.8%でいずれも有意の ($p < 0.05$) 低下を認めたのに対し、amylase は $265.0 \pm 25.0 \times 10^5$ Somogyi U であり正常所見群に比し88.5%と低下傾向を示しただけであった。

③ 膵管造影所見と colipase 分泌パターン (Fig. 16)

Normal-ERP 群の C-S test 時十二指腸液中 colipase 濃度は、caerulein 静注後の10分分画よりそれぞれ 427.0 ± 75.4 , 191.7 ± 34.1 , 83.4 ± 16.8 , 62.3 ± 15.6 , 37.0 ± 7.0 , $36.8 \pm 8.7 \mu\text{g/ml}$ であった。一方

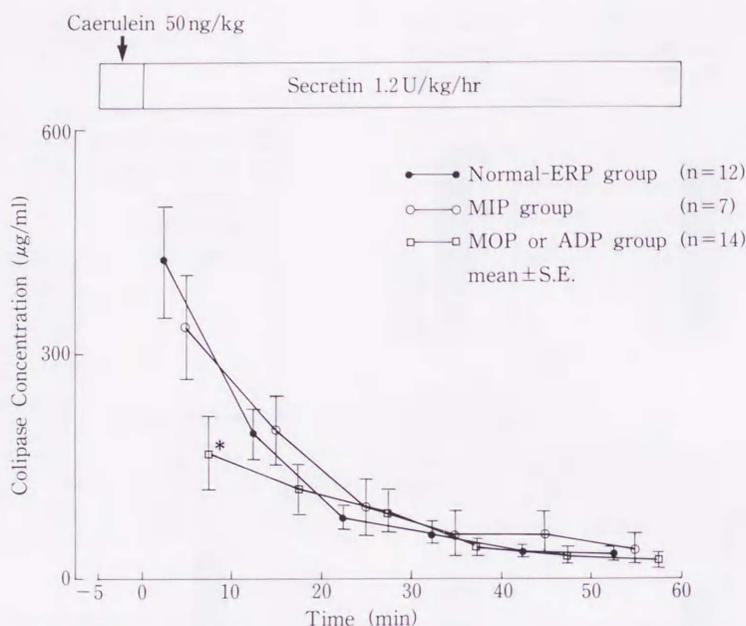


Fig. 16. Secretory pattern of colipase during caerulein-secretin test by different degrees of pancreatic morphological change. (normal: Normal-ERP group, minimal pancreatitis: MIP group, moderate or advanced pancreatitis: MOP or ADP group)

*($p < 0.05$) compared with Normal-ERP group.

MIP 群では, caerulein 静注直後の10分分画では $337.8 \pm 70.8 \mu\text{g/ml}$ と低下傾向を示したが, 以後 200.3 ± 47.1 , 97.4 ± 36.6 , 60.9 ± 29.7 , 61.9 ± 27.4 , $42.5 \pm 21.0 \mu\text{g/ml}$ でありいずれの分画でも有意の低下を認めなかった。

MOP or ADP 群ではそれぞれ 170.0 ± 48.8 , 121.1 ± 34.2 , 90.8 ± 26.6 , 47.0 ± 12.6 , 33.3 ± 10.4 , $26.0 \pm 7.4 \mu\text{g/ml}$ であり, Normal-ERP 群に比べ全体的に低下傾向を認め, 特に10分分画では Normal-ERP 群の 39.8%で, 有意 ($p < 0.05$) の低下を認めたが, 他の分画では有意差を認めなかった。また MOP or ADP 群は MIP 群に比しても全体的に低下する傾向が認められたが, いずれの分画でも有意差を認めなかった。

④ 膵管造影所見と colipase 分泌量の関係 (Fig. 17)

Normal-ERP 群における Max. BC は $97.5 \pm 3.4 \text{ mEq/liter}$, 液量は $129.4 \pm 14.2 \text{ ml}$, colipase 分泌量は $330.8 \pm 43.7 \times 10^2 \mu\text{g}$, lipase 分泌量は $142.0 \pm 19.1 \times 10^6 \text{ BALB-U}\cdot\text{ml}$, amylase 分泌量は $276.1 \pm 25.8 \times 10^5 \text{ Somogyi U}$ であった。一方 MIP 群ではそれぞれ $86.9 \pm 5.6 \text{ mEq/liter}$, $147.0 \pm 33.2 \text{ ml}$, $260.5 \pm 35.0 \times$

$10^2 \mu\text{g}$, $102.5 \pm 11.1 \times 10^6 \text{ BALB-U}\cdot\text{ml}$, $283.4 \pm 25.1 \times 10^5 \text{ Somogyi U}$ であり, MIP 群では Normal-ERP 群に比しいずれのマーカーも統計学的に有意の変化を認めなかった。また Max. BC, colipase 分泌量, lipase 分泌量はそれぞれ Normal-ERP 群の 89.1%, 77.1%, 72.2%と Normal-ERP 群より MIP 群では低下していたが, 液量は 113.6%, amylase 分泌量は 102.6%とむしろ過分泌の傾向を示した。MOP or ADP 群では Max. BC は $56.2 \pm 9.0 \text{ mEq/liter}$, 液量は $62.4 \pm 7.9 \text{ ml}$, colipase 分泌量は $142.5 \pm 41.4 \times 10^2 \mu\text{g}$, lipase 分泌量は $52.1 \pm 18.0 \times 10^6 \text{ BALB-U}\cdot\text{ml}$, amylase 分泌量は $111.1 \pm 33.2 \times 10^5 \text{ Somogyi U}$ であり, Normal-ERP 群に比し Max. BC と液量ではそれぞれ 57.6%, 48.2%で有意 ($p < 0.01$) の低下を, colipase, lipase, amylase 分泌量ではそれぞれ 44.1%, 36.7%, 40.3%で有意 ($p < 0.05$) の低下を認めた。また, MOP or ADP 群では MIP 群に比し液量, amylase 分泌量では有意 ($p < 0.05$) の低下を認めたが, Max. BC, colipase および lipase 分泌量では有意差を認めなかった。

⑤ 慢性膵炎診断と colipase 分泌量の関係 (Fig.

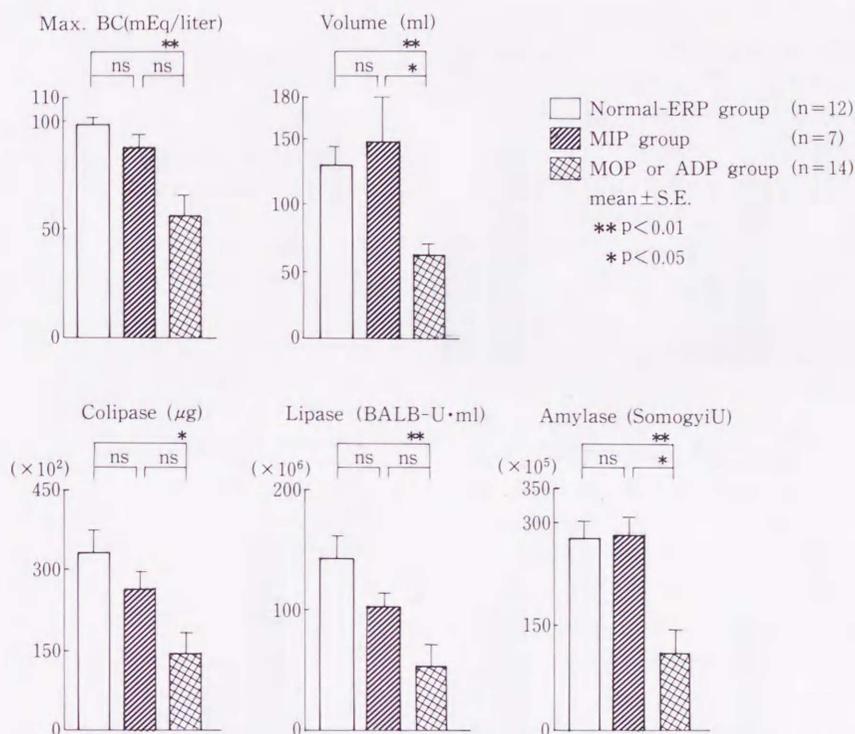


Fig. 17. Max. bicarbonate concentration (Max. BC), volume, colipase output, lipase output and amylase output during caerulein-secretin test by different degrees of pancreatic morphological change. (normal: Normal-ERP group, minimal pancreatitis: MIP group, moderate or advanced pancreatitis: MOP or ADP group)

18)

正常群における各マーカーの値は、Max. BC で 104.1 ± 1.5 mEq/liter、液量で 115.4 ± 5.3 ml、colipase 分泌量で $415.3 \pm 35.4 \times 10^2 \mu\text{g}$ 、lipase 分泌量で $172.1 \pm 14.1 \times 10^6$ BALB-U·ml、amylase 分泌量で $296.3 \pm 21.6 \times 10^5$ Somogyi U であった。また慢性膵炎 I 群ではそれぞれ 61.0 ± 6.6 mEq/liter、 74.5 ± 10.1 ml、 $173.8 \pm 35.4 \times 10^2 \mu\text{g}$ 、 $67.6 \pm 17.2 \times 10^6$ BALB-U·ml、 $132.3 \pm 27.4 \times 10^5$ Somogyi U であり、慢性膵炎 I 群の Max. BC、液量、colipase、lipase および amylase 分泌量の平均はそれぞれ正常群の 58.6%、64.6%、41.8%、39.3%、44.6% であり、いずれも有意 ($p < 0.01$) の低下を認めた。一方慢性膵炎 II 群では Max. BC は 82.7 ± 4.0 mEq/liter、液量は 132.0 ± 19.2 ml、colipase 分泌量は $251.8 \pm 320.1 \times 10^2 \mu\text{g}$ 、lipase 分泌量は $118.3 \pm 23.0 \times 10^6$ BALB-U·ml、amylase 分泌量は $299.7 \pm 23.3 \times 10^5$ Somogyi U であり、正常群に比し Max. BC が 79.5% で有意 ($p < 0.01$) の、colipase 分泌量も 60.6% で有意 ($p < 0.05$) の低下を認め

たが、液量、amylase 分泌量はそれぞれ 114.4%、100.4% でむしろ過分泌の傾向を示し、lipase 分泌量も 68.7% で低下傾向を認めただけであった。また慢性膵炎 I 群では慢性膵炎 II 群に比べ、Max. BC、液量、lipase および amylase 分泌量で有意の低下を認めたが、colipase 分泌量では有意差を認めなかった。

(2) 膵癌診断における十二指腸液中 colipase 測定の意義 (Fig. 19)

膵癌症例における colipase 分泌パターンは、caerulein 静注直後の 10 分分画で $202.6 \pm 101.3 \mu\text{g/ml}$ と最高値を示し、以後 152.4 ± 74.9 、 62.5 ± 23.3 、 33.2 ± 14.4 、 34.5 ± 15.1 、 $23.4 \pm 11.6 \mu\text{g/ml}$ と漸減した。また健康者と比べると、いずれの分画でも低下する傾向を認めた。しかし amylase および lipase 分泌パターンもほぼ同様の低下傾向がみられ、膵癌に特異的な colipase 分泌パターンは認めなかった。また colipase 分泌量は $123.1 \pm 72.4 \times 10^2 \mu\text{g}$ であり、lipase 分泌量の $50.6 \pm 22.7 \times 10^6$ BALB-U·ml および amylase 分泌量の $126.5 \pm 42.1 \times 10^5$ Somogyi U と同

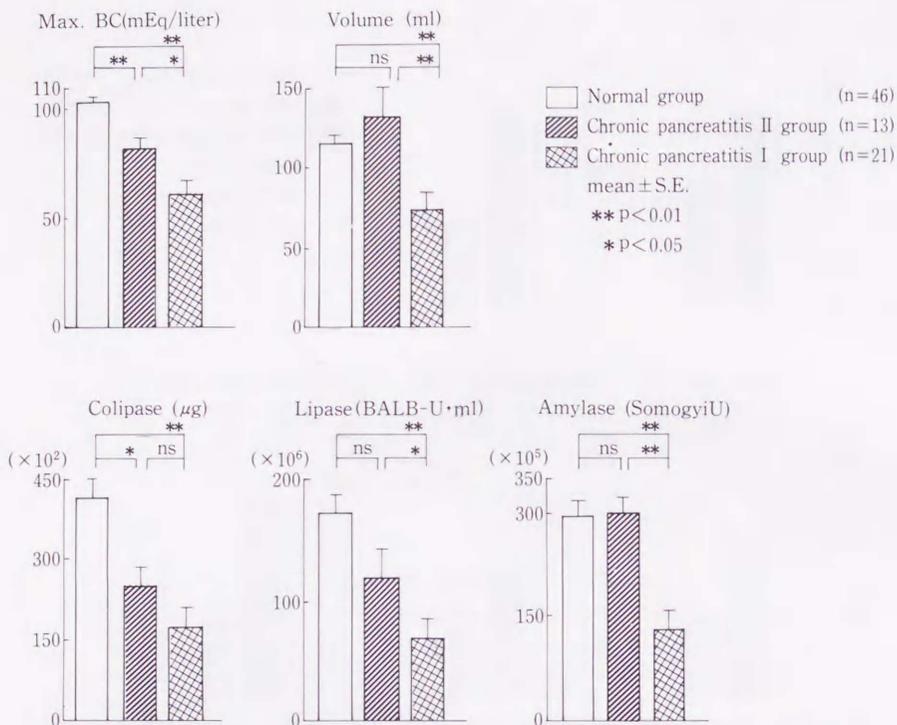


Fig. 18. Max. bicarbonate concentration (Max. BC), volume, colipase output, lipase output and amylase output during caerulein-secretin test in normal subjects and patients with chronic pancreatitis. (mild or early-stage chronic pancreatitis: Chronic pancreatitis II group, advanced chronic pancreatitis: Chronic pancreatitis I group)

様、健常者に比べ明らかな低下を示した。

(3) 脂肪消化吸収と十二指腸液中 colipase 分泌量の関係

① バター負荷試験正常群と異常群における C-S test 時十二指腸液中 colipase, lipase, amylase 分泌量の対比 (Fig. 20)

バター負荷試験正常群における C-S test 時十二指腸液中 colipase 分泌量は $374.0 \pm 57.9 \times 10^2 \mu\text{g}$ であり、lipase 分泌量は $121.7 \pm 19.9 \times 10^6 \text{ BALB-U} \cdot \text{ml}$ 、amylase 分泌量は $323.3 \pm 52.8 \times 10^5 \text{ Somogyi U}$ であった。一方バター負荷試験異常群では、colipase 分泌量は $1.82 \pm 0.64 \times 10^2 \mu\text{g}$ 、lipase 分泌量は $0.66 \pm 0.31 \times 10^6 \text{ BALB-U} \cdot \text{ml}$ 、amylase 分泌量は $7.49 \pm 0.30 \times 10^5 \text{ Somogyi U}$ であり、いずれの酵素系も著明に低下していた。また脂肪の消化に直接関与していない amylase 分泌量では Int. ΔLSI 正常群と異常群の間に一部オーバーラップがみられたが、colipase 分泌量では lipase 分泌量と同様オーバーラップを認めな

った。

② Int. ΔLSI と十二指腸液中 lipase, colipase 分泌量の相関関係 (Fig. 21)

Int. ΔLSI と C-S test 時十二指腸液中 lipase 分泌量の相関関係は、Kendall の順位相関係数 (r) が 0.376 と低いながらも有意の相関を認めた。一方 Int. ΔLSI と colipase 分泌量の関係も、順位相関係数 (r) が 0.420 で有意の相関関係を認めた。

考 案

1963年 Baskys ら³¹ は、ブタ豚 lipase の精製過程で、腭抽出物の DEAE-cellulose column chromatography を行うことにより、胆汁酸塩存在下で lipase 活性が失われるが、加熱処理した腭抽出物を加えることにより lipase 活性が回復することを発見した。1969年, Morgan ら³⁷ はゲル濾過により lipase と cofactor を分離した。1971年, Maylié ら³⁵ はこの cofactor を colipase と命名し、colipase の分子量は10,000が

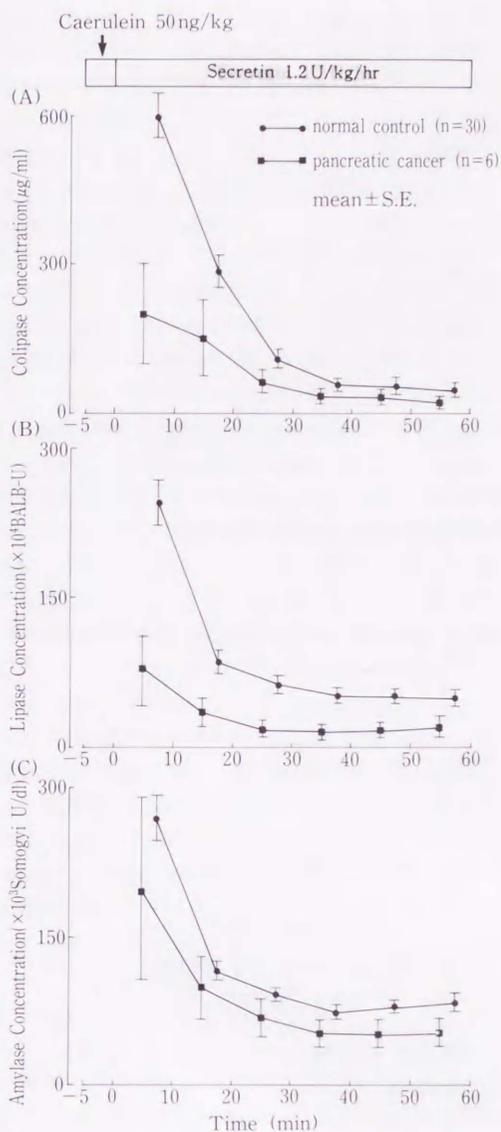


Fig. 19. Secretory pattern of colipase (A), lipase (B) and amylase (C) during caerulein-secretin test in healthy subjects and patients with pancreatic cancer.

ら 12,000 daltons であると報告した。1972年には、Erlanson ら¹²⁾により porcine colipase が純化され、以後ヒトを含む各種動物より colipase が純化されてきた^{13, 23, 34, 45, 46)}。

それらの colipase はいずれも90から110のアミノ酸残基よりなり、5つの disulfide bridge を持ち、ほとんど carbohydrate を持たないといった特徴を有していた⁶⁾。さらに colipase の主作用は、CMC 以上の高

濃度の胆汁酸塩で阻害された膵 lipase 活性を回復させること^{3, 4, 34, 38)}であることが明らかとなった。この colipase の作用機序は以下のように考えられている。すなわち、膵 lipase 活性は水と油層の界面で作用するため、水溶性の lipase が基質であるトリグリセライドの消化吸収を効率よく行うためには、胆汁酸塩によるエマルジョン化が必要である⁵⁾。しかし生体内の腸管で認められる様な CMC レベル以上の高濃度胆汁酸塩存在下では、胆汁酸塩により lipase と基質が物理的に分離される^{6, 9)}ため lipase 活性は阻害されるが、このとき colipase は胆汁酸塩の存在下で lipase を基質につなぎ止めることにより lipase の活性を発現させる⁴⁾と考えられている。また、colipase には lipase および胆汁中リポ蛋白と結合することにより、十二指腸液中の蛋白分解酵素で lipase が分解されるのを防ぐ作用もある³²⁾ことが報告されている。このため小腸内での膵 lipase の作用発現には、適当量の colipase が必要であり、膵より分泌される colipase は脂肪の消化に欠かせない存在であるにもかかわらず、簡便で多数検体の同時測定が可能な測定法の確立は行われていないため、colipase の膵よりの分泌様式や、病態生理に関する知見は少なく、また DIT の指標としての colipase の意義は検討されていない。そこで TDC により抑制された精製膵 lipase が、加えられた colipase 量に比例して活性化される⁴³⁾こと、および人工基質 BALB を用いた lipase 測定法(BALB-DTNB 法)³¹⁾の簡便性に着目し、新しい colipase 測定系の確立を行い、その臨床応用を行った。

まず colipase 測定系の基礎検討では、BALB を基質とした場合、精製ヒト膵 lipase 活性は TDC 濃度が 10 mM 以上では、ほぼ同様に抑制されるため、本測定系の TDC 濃度は 14 mM とした。colipase 測定系の pH について Borgström ら³⁾は、胆汁酸により抑制された膵 lipase が colipase により再活性化される時の至適 pH は 6.0~7.0 になると報告しているが、今回の検討では、Vandermeers ら⁴⁸⁾と同様 pH 8.0~9.0 に至適 pH を認めたため、本測定系の pH は 8.5 とした。基質である BALB の濃度は、10 mM~30 mM まで測定値に変化を認めなかったことより 20 mM と設定した。反応時間は、standard 用の porcine colipase 100 ng/ml 存在下で、1時間まで BALB の水解と反応時間の間に比例関係を認めたことより 30分とした。精製ヒト膵 lipase 濃度の検討では、まず精製ヒト膵 lipase 濃度を 3,000 BALB-U とした場合、porcine colipase 濃度と吸光度 (BALB 水解)との間に直線関係を認めたのは、porcine co-

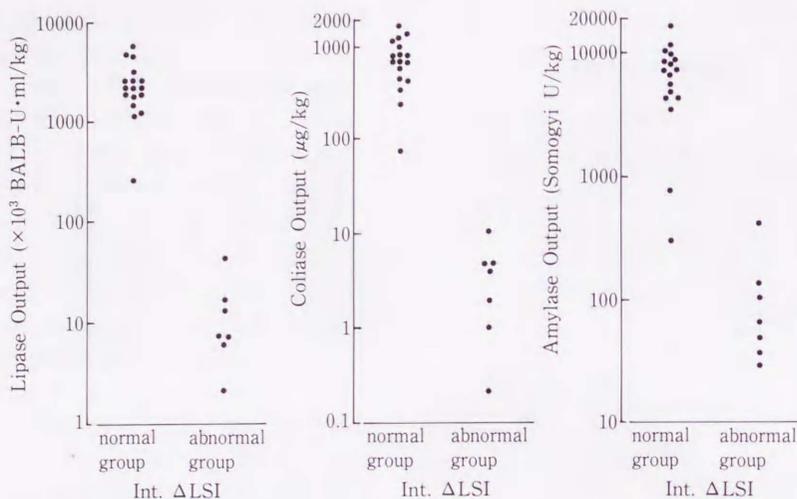


Fig. 20. Lipase output, colipase output and amylase output in normal and abnormal butter tolerance test group.

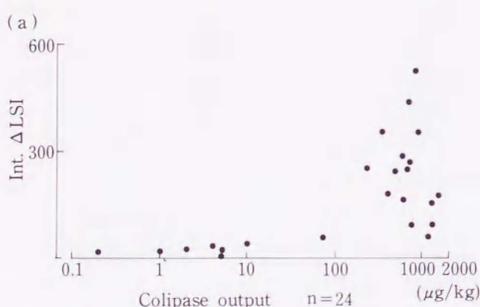


Fig. 21(A). Correlation between integrated Δ light scattering intensity (Int. Δ LSI) and colipase output during caerulein-secretin test. Kendall correlation coefficient (τ)=0.420 ($p < 0.05$).

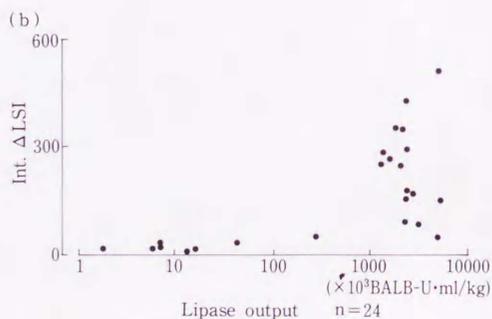


Fig. 21(B). Correlation between integrated Δ light scattering intensity (Int. Δ LSI) and lipase output during caerulein-secretin test. Kendall correlation coefficient (τ)=0.376 ($p < 0.05$).

lipase 濃度が 0~150 ng/ml の狭い範囲のみであり、porcine colipase 濃度が 200 ng/ml 以上では DTNB 消費のため吸光度は一定となった。次に精製ヒト膵 lipase 濃度を 1,000 BALB-U としたときには、porcine colipase 濃度が 0~400 ng/ml の間で BALB 水解と良好な直線関係を認めた。さらに porcine colipase 1 ng/ml での吸光度の変化率は 0.0045 であり、十分判別可能であった。一方精製ヒト膵 lipase 濃度が 150 BALB-U の場合は、porcine colipase 濃度が 0~200 ng/ml の間で BALB 水解と直線関係を認めたものの、相関係数の低下を認めた。そこで本測定系の精製ヒト膵 lipase 濃度は、porcine colipase 測定範

囲が 0~400 ng/ml と広範囲で、測定感度も porcine colipase 1 ng/ml が十分識別可能な 1,000 BALB-U とした。さらに、本測定系は少なくとも反応停止後 60 分までは安定していた。

十二指腸液中 colipase 測定の検討では、十二指腸液を加熱して作製した colipase sample の希釈曲線は良好な直線性を示し、胆汁には colipase 活性がなく、さらに試料中の胆汁の影響を受けないことが確認された。colipase は、trypsin により分解され活性が失われる³²ことが知られているため、C-S test で得られた十二指腸液中の colipase の安定性を検討したが、0°C で保存したときは十二指腸液採取後 240 分までは

安定していた。しかし、30°C で保存したときには120分で colipase 活性は前値に比べ90%以下と著明に低下し、C-S test 時の十二指腸液の採取は水中で行う必要性を認めた。このため C-S test 時の十二指腸液採取は必ず水中で行った。また、十二指腸液を75°C 10分間加熱して作製した colipase sample は、-40°C で保存すれば少なくとも1カ月間は安定しており、十二指腸液中 lipase^{26, 49)} や chymotrypsin³⁶⁾ が数日間の保存しかできないのに対し、長期保存も可能であり臨床应用到有利であった。加熱十二指腸液のゲル濾過では、二峰性の活性 peak が認められたが、第一の Vo に認められた small peak は加熱処理により lipase 等の蛋白と結合した colipase⁴¹⁾ を測定しているものと考えられ、活性の main peak が colipase の分子量と一致する分子量11,000の分画^{12, 35)} に認められたことより、colipase を測定していることが確認された。本測定系は、現在最も一般的な colipase 測定法と考えられる titrimetric 法⁷⁾ と相関係数 $r=0.889$ の良好な相関関係を認め、また精度も良好であった。現在までに報告されている colipase 測定系は、titrimetric 法^{7, 12, 14, 23, 24)}、turbidimetric 法²⁴⁾ および RIA 法^{33, 44)} があるが、本測定系は colipase の定量測定が可能であり、また titrimetric 法、turbidimetric 法が同時測定が困難なのに比べ standard porcine colipase の測定も含め約100検体の同時測定が可能であり、RIA 法に比べ全測定時間が1時間程度の短時間で完了し、特殊な設備も不要などの点で優れており、臨床応用も十分可能であり有用と考えられた。

そこで、まず本測定系を用いて健常者における C-S test 時 colipase 分泌動態を検討した。健常者における colipase 分泌パターンは、lipase, amylase と同様 caerulein 静注直後の10分分画にピークを認め、以後は secretin 1.2 U/kg/hr の持続静注にもかかわらず漸減した。これは、加賀谷ら²⁵⁾ の amylase での報告と一致しており、amylase, lipase とほぼ同様の分泌パターンを示すことが明らかとなった。また、Gaskin ら¹⁴⁾ は pancreozymin と secretin をそれぞれ 0.125 U/kg/min で同時に持続静注したとき、十二指腸液中 colipase 濃度は20から40分分画でピークとなる増加反応を示すと報告しているが、pancreozymin と secretin のいずれが主な分泌刺激であるかの検討はなされていない。そこで caerulein 静注後、secretin 1.2 U/kg/hr を持続静注した群と生食を持続静注した群で、caerulein 静注開始より25分間の colipase 分泌量を比較検討したが、この両群間にほとんど差を認めず、1.2 U/kg/hr の secretin が明らか

な colipase 分泌作用を示さなかったことより、本試験における colipase 分泌刺激は主に caerulein の作用であると考えられた。

新しい生化学マーカーを検討するとき、特に正常値を設定するとき、そのマーカーの分布を調べることは必要なこと²⁸⁾ であるが、現在まで colipase 分泌量の分布を調べた報告および C-S test 時の colipase 分泌量の正常値を設定した報告はない。そこで今回著者は健常者より得られた C-S test 時 colipase 分泌量の分布を検討し、colipase 分泌量の正常値を設定した。現在までのところ確実な正規変換の方法は確立されておらず、簡便性より正規分布、または対数正規分布を仮定することが多い²⁸⁾ が、十二指腸液中 amylase 分泌量については対数正規分布に近い分布を示す²⁹⁾ ことが報告されている。今回、健常者における colipase 分泌量の skewness, kurtosis を計算した結果より、cofactor である colipase も単なる正規分布より対数正規分布に近い分布を示すことが明らかとなった。このため C-S test 時十二指腸液中 colipase 分泌量の正常値は、対数変換を行ったうえで設定した。

慢性膵炎は膵炎としての臨床症状が軽快した後も膵に機能的な障害を残しているため、膵外分泌に確実な機能障害があることが慢性膵炎の診断基準の大きな柱の一つ⁴⁰⁾ である。Gaskin ら^{14, 15)} は、膵性脂肪便症例の lipase, colipase 分泌量を検討し、膵性脂肪便症例の一部では colipase 分泌量の低下が脂肪便の原因となっていることを示した。これより、C-S test 時 colipase の測定が早期の膵外分泌障害を検出する可能性のある新たな指標となることが示唆されたため、膵機能障害度別の colipase 分泌を検討した。

まず colipase 分泌濃度パターンの検討では、膵機能軽度障害群と考えられる C-S test 異常所見群における colipase 分泌パターンは正常所見群とほぼ同様であり、caerulein 静注直後に最高濃度を認めたが、正常所見群に比べ全体的に低下する傾向を認めた。特に colipase の主な分泌刺激と考えられる caerulein 静注直後の10分分画では、有意な低下を認めた。一方膵機能高度障害群と考えられる確認所見群では、caerulein にほとんど反応せず、正常所見群に比べ全分画で有意の低下を認めた。しかし、異常所見群に比べると secretin を持続静注しているにもかかわらず、50分および60分分画で有意の低下を認めておらず、colipase を DIT の指標とするには、caerulein の投与が必要であると考えられた。

膵外分泌障害度と各マーカーの関係では、確認所見群では正常所見群に比べ Max. BC, 液量, colipase 分

泌量, lipase 分泌量, amylase 分泌量の各マーカーは有意の低下を認めたと, 異常所見群では液量, amylase 分泌量は有意の低下を認めず, Max. BC, colipase 分泌量, lipase 分泌量のみが有意の低下を認めた。特に colipase は正常所見群の65.7%と, lipase の72.8%や amylase の88.5%よりも低下する傾向が認められ, 軽度のまたは早期の膵外分泌機能障害診断に有用と考えられた。

近年, 慢性膵炎時における膵の形態変化が明らかとなっており, 日本消化器病学会の慢性膵炎臨床診断基準⁴⁰⁾でも膵画像が慢性膵炎の診断の手技として取り上げられ, 膵形態と機能の関連は興味のもたれるところである。そこで, 膵形態の検査法として最も信頼のおける ERP と, C-S test 時十二指腸液中 colipase の対比検討を行った。十二指腸液中 colipase 濃度のパターンは, 軽度膵管形態異常と考えられる MIP 群では caerulein 刺激直後の10分分画で低下する傾向を示したが, それ以後の分画では Normal-ERP 群とほぼ同様であった。高度膵管形態異常群と考えられる MOP or ADP 群では, 全体的に colipase 濃度は低下する傾向があり, caerulein 刺激直後の10分分画では caerulein 刺激にほぼ反応を示さず Normal-ERP 群に比べ有意の低下を示した。これは, 膵機能障害度別の colipase 分泌パターンと同様であり, 膵形態異常が高度になるのに従い, 分泌される colipase 濃度が低下するものと思われた。

ERP と各マーカーの関係は, Jensen ら²²⁾が報告しているのと同様に, 膵管形態異常が強くなるのに従い各マーカーも低下を示し, Normal-ERP 群に比べ MOP or ADP 群ではすべてのマーカーが有意の低下を示した。一方 MOP or ADP 群は MIP 群に比べ液量と amylase 分泌量のみが有意の低下を示したが, これは MIP 群の液量および amylase 分泌量が Normal-ERP 群に比べ過分泌の傾向を示したのに対し, Max. BC, colipase および lipase 分泌量では低下傾向を示したためであり, colipase は軽度膵管形態異常群よりすでに低下傾向を認めたことより, colipase の早期または軽度膵管形態異常群診断の可能性が示唆された。

以上の膵機能と形態を加味した総合的な慢性膵炎診断に対する colipase を含む各マーカーの検討を行ったところ, 高度の慢性膵炎と考えられる慢性膵炎 I 群では, 正常群に比べ各マーカーとも有意の低下を示した。しかし, 軽度または早期の慢性膵炎と考えられる慢性膵炎 II 群では, 正常群に比べ Max. BC と colipase 分泌量のみが有意の低下を認めたのみであり, lipase 分泌量は低下傾向を示したが, 液量, amylase

分泌量はむしろ過分泌の傾向を示した。以上より C-S test において十二指腸液中 colipase は軽度または早期慢性膵炎ですでに低下を示し, 軽度または早期慢性膵炎の診断に十二指腸液中の colipase 測定は有用であると考えられた。

従来, 膵酵素の分泌動態については parallel 説^{17,26)}と non-parallel 説^{10,36,49)}があったが, 日本消化器病学会の慢性膵炎の臨床診断基準⁴⁰⁾では, lipase や elastase は amylase に比し慢性膵炎早期から低下する傾向があるとされている。今回著者が得た結果でも, 慢性膵炎においては colipase, lipase, amylase の順に低下することが示唆され, 膵酵素は non-parallel に分泌されると考えられた。

膵癌症例では高度の膵外分泌障害を示すことが多い²⁷⁾といわれている。今回の colipase の検討でも lipase, amylase と同様, 膵癌症例では健常者と比べ明らかな分泌低下が認められた。しかし, 河合²⁷⁾が P-S test において ribonuclease や amylase で報告しているのと同様, C-S test における十二指腸液中 colipase も膵癌特有の分泌パターンは認めず, 十二指腸液中 colipase 測定は膵癌診断には補助的な意義しかないものと思われた。

厚生省慢性膵炎調査研究班の慢性膵炎の臨床経過と治療方針⁴²⁾によると, 慢性膵炎の臨床経過は発症後腹痛を中心とした症状は見られるものの代謝および消化吸収障害の見られない代償期があり, その後移行期を経て消化吸収障害の見られる非代償期となる。また, 第2回慢性膵炎全国集計⁴⁷⁾の慢性膵炎の死亡原因によると, 栄養障害による死亡は他病死, 術後合併症について第3位であり, 慢性膵炎の治療, 管理には膵外分泌低下による消化吸収障害を知ることが必要不可欠である。colipase は脂肪の消化に直接的に関与が考えられているため, 慢性膵炎で最も問題となる脂肪の消化吸収障害との関係が注目されている^{7,14,15,19)}。今回著者も簡便な脂肪消化吸収試験であるバター負荷試験と C-S test 時十二指腸液中の colipase との対比を行った。

DiMagno ら¹¹⁾は膵性脂肪便症例では DIT の lipase 分泌量が顕著に低下していると報告しているが, バター負荷試験と C-S test を同時期に施行した症例においてもバター負荷試験異常群の各膵酵素は正常群に比べ著明な低値を認めた。また Gaskin ら¹⁴⁾は便中脂肪正常群と異常群で colipase, lipase 分泌量のオーバーラップはみられなかったが, trypsin 分泌量では一部オーバーラップがみられたと報告している。今回著者の得た結果でも colipase, lipase 分泌量

はバター負荷試験正常群と異常群でオーバーラップを認めなかったが、*amylase* では一部オーバーラップが認められた。これは *amylase* が脂肪の消化に直接の関与はないのに対し、*colipase*, *lipase* は直接的に関与しているためと考えられた。さらに *colipase* 分泌量とバター負荷試験の相関関係の検討で、相関係数は 0.420 と低いながらも有意であり、さらに *lipase* 分泌量とバター負荷試験の相関係数 ($r=0.376$) よりも良好であり、C-S test 時十二指腸液中 *colipase* は、膵外分泌機能の面より脂肪の消化を検討する場合、有用な指標となりうることが示唆された。

なお本論文の要旨は第22回日本臨床代謝学会総会、第16回日本膵臓病研究会大会、第27回日本消化器病学会秋期大会、第73回日本消化器病学会総会において発表した。

謝 辞

稿を終わるにあたり、御指導・御校閲を賜りました広島大学第一内科・梶山梧桐郎教授に深甚の謝意を表すとともに、直接御指導・御協力をいただきました藤田肅博士および膵臓病研究室の諸先生に深謝致します。また本論文の統計処理を御協力いただきました広島大学原爆放射能医学研究所生物統計部門の務中昌己教授、平岡政隆先生に厚く感謝致します。

参 考 文 献

1. Agosti, A., Biasioli, S. and Bertaccini, G. 1970. Action of caerulein on pancreatic secretion in man. *Pharmac. Resea. Comm.* 2: 125-133.
2. Baskys, B., Klein, E. and Lever, W. F. 1963. Lipases of blood and tissues. III. Purification and properties of pancreatic lipase. *Arch. Biochem. Biophys.* 102:201-209.
3. Borgström, B. and Erlanson, C. 1971. Pancreatic juice co-lipase: Physiological importance. *Biochim. Biophys. Acta* 242:509-513.
4. Borgström, B. and Erlanson, C. 1973. Pancreatic lipase and co-lipase: Interactions and effects of bile salts and other detergents. *Eur. J. Biochem.* 37:60-68.
5. Borgström, B. and Erlanson, C. 1978. Interactions of serum albumin and other proteins with porcine pancreatic lipase. *Gastroenterology* 75:382-386.
6. Borgström, B. and Erlanson-Albertsson, C. and Wieloch, T. 1979. Pancreatic colipase: chemistry and physiology. *J. Lipid Res.* 20:805-816.
7. Borgström, B. and Hildebrand, H. 1975. Lipase and co-lipase activities of human small intestinal contents after liquid test meal. *Scand. J. Gastroent.* 10:585-591.
8. Burton, P., Evans, D. G., Harper, A. A., Howat, H. T., Oleesky, S., Scott, J. E. and Varley, H. 1960. A test of pancreatic function in man based on the analysis of duodenal contents after administration of secretin and pancreozymin. *Gut* 1:111-124.
9. Chapus, C., Sari, H., Sémériva, M. and Desnuelle, P. 1975. Role of colipase in the interfacial adsorption of pancreatic lipase at hydrophilic interfaces. *FEBS Lett.* 58:155-158.
10. Dagorn, J. C., Sahel, J. and Sarles, H. 1977. Nonparallel secretion of enzymes in human duodenal juice and pure pancreatic juice collected by endoscopic retrograde catheterization of the papilla. *Gastroenterology* 73:42-45.
11. DiMagno, E. P., Go, V. L. W. and Summerskill, W. H. J. 1973. Relations between pancreatic enzyme outputs and malabsorption in severe pancreatic insufficiency. *N. Eng. J. Med.* 288:813-815.
12. Erlanson, C. and Borgström, B. 1972. Purification and further characterization of co-lipase from porcine pancreas. *Biochim. Biophys. Acta* 271:400-412.
13. Erlanson, C., Fernlund, P. and Borgström, B. 1973. Purification and characterization of two proteins with co-lipase activity from porcine pancreas. *Biochim. Biophys. Acta* 310: 437-445.
14. Gaskin, K. J., Durie, P. R., Hill, R. E., Lee, L. M. and Forstner, G. G. 1982. Co-lipase and maximally activated pancreatic lipase in normal subjects and patients with steatorrhea. *J. Clin. Invest.* 69:427-434.
15. Gaskin, K. J., Durie, P. R., Lee, L., Hill, R. and Forstner, G. G. 1984. Colipase and lipase secretion in childhood-onset pancreatic insufficiency. *Gastroenterology* 86:1-7.
16. Ghishan, F. K., Moran, J. R., Durie, P. R. and Greene, H. L. 1984. Isolated congenital lipase-colipase deficiency. *Gastroenterology* 86:1580-1582.
17. Goldberg, D. M. and Wormsley, K. G. 1970. The interrelationships of pancreatic enzymes in human duodenal aspirate. *Gut* 11: 859-866.
18. Hildebrand, H., Borgström, B., Békassy, A., Erlanson-Albertsson, C. and Helin, I. 1982. Isolated co-lipase deficiency in two

- brothers. *Gut* 23:243-246.
19. Hill, R. E., Durie, P. R., Gaskin, K. J., Davidson, G. P. and Forstner, G. G. 1982. Steatorrhea and pancreatic insufficiency in Shwachman syndrome. *Gastroenterology* 83: 22-27.
 20. 石井兼央, 中村耕三 1974. セルレイン, セクレチンを用いる膵外分泌機能試験の臨床的研究 (共同研究の総括). *日本臨床* 32: 2983-2989.
 21. 石田修三 1982. 膵液中 c-AMP の測定ならびに診断的意義に関する研究. *広島大学医学雑誌* 30: 103-120.
 22. Jensen, A. R., Matzen, P., Malchow-Møller, A., Christoffersen, I. and The Copenhagen Pancreatitis Study Group. 1984. Pattern of pain, duct morphology, and pancreatic function in chronic pancreatitis. A comparative study. *Scand. J. Gastroent.* 19: 334-338.
 23. Julien, R., Rathelot, J., Canioni, P., Sarda, L., Gregoire, J. and Rochat, H. 1978. Horse pancreatic colipase: isolation by a detergent method and amino terminal sequence of the polypeptide chain. *Biochimie* 60:103-107.
 24. Junge, W. and Leybold, K. 1982. Detection of colipase in serum and urine of pancreatitis patients. *Clin. Chim. Acta* 123: 293-302.
 25. 加賀谷寿孝, 大山公三, 建部高明, 斉藤達也, 滝山義之, 小竹好裕, 小池台介 1982. Caerulein Secretin 試験における膵過分泌. *胆と膵* 3: 1427-1432.
 26. 加嶋 敬, 衣笠勝彦, 中条 忍, 稲田安昭, 瀧野辰郎, 細田四郎, 馬場忠雄 1979. 合成基質 BALB を用いた十二指腸液中膵 LIPASE の測定法の検討及びその臨床応用. *京府医大誌* 88: 1251-1258.
 27. 河合公三 1983. 膵疾患患者における膵液 Ribonuclease に関する研究—第2編: Pancreozymin-secretin 試験時の十二指腸液中の ribonuclease, amylase 活性および immunoreactive trypsin の分泌動態について—. *日消誌* 80: 994-1000.
 28. 川西昌弘 1986. 腫瘍マーカーを用いた膵癌診断の方法に関する研究—多変量解析による検討—. *広島大学医学雑誌* 34: 289-306.
 29. 小泉 勝, 三浦守正, 菅野 孝, 後藤由夫 1982. 十二指腸液採取法における膵過分泌. *胆と膵* 3: 1419-1425.
 30. 近藤孝晴, 早川哲夫, 野田愛司 1982. 慢性膵炎臨床診断基準—細則試案. 膵機能—疑診—. *胆と膵* 3: 1151-1157.
 31. Kurooka, S., Okamoto, S. and Hashimoto, M. 1977. A novel and simple colorimetric assay for human serum lipase. *J. Biochem.* 81:361-369.
 32. Lairon, D., Nalbone, G., Lafont, H., Domingo, N. and Hauton, J. C. 1978. Protective effect of biliary lipids on rat pancreatic lipase and colipase. *Lipids* 13:211-216.
 33. Leger, C., Alessandri, J. M., Kann, G., Charles, M., Corring, T. and Flanzly, J. 1982. Binding between immobilized anti-colipase purified antibodies and colipase. Radioimmunoassay of colipase from pig plasma and pancreatic juice. *Biochim. Biophys. Acta* 713:208-221.
 34. Maylié, M. F., Charles, M., Astier, M. and Desnuelle, P. 1973. On porcine pancreatic colipase: large scale purification and some properties. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 52: 291-297.
 35. Maylié, M. F., Charles, M., Gache, C. and Desnuelle, P. 1971. Isolation and partial identification of a pancreatic colipase. *Biochim. Biophys. Acta* 229:286-289.
 36. 水野理文, 早川哲夫, 野田愛司, 近藤孝晴, 榊原啓, 片田直幸 1982. 十二指腸液中 Chymotrypsin 活性の測定とその臨床的意義. *日消誌* 79: 858-863.
 37. Morgan, R. G. H., Barrowman, J. and Borgström, B. 1969. The effect of sodium taurodesoxycholate and pH on the gel filtration behaviour of rat pancreatic protein and lipases. *Biochim. Biophys. Acta* 175:65-75.
 38. Morgan, R. G. H. and Hoffman, N. E. 1971. The interaction of lipase, lipase cofactor and bile salts in triglyceride hydrolysis. *Biochim. Biophys. Acta* 248:143-148.
 39. 中尾精治 1983. ネフェロメーターによるカイロマイクロンの測定とその脂肪吸収試験への応用. *広島大学医学雑誌* 31: 535-552.
 40. 日本消化器病学会慢性膵炎検討会 (編) 1983. 慢性膵炎の臨床診断基準. 医学図書出版, 東京.
 41. Roberts, J., Stella, V. J. and Decedue, C. J. 1985. A colorimetric assay of pancreatic lipase: rapid detection of lipase and colipase separated by gel filtration. *Lipids* 20:42-45.
 42. 佐藤寿男 (編) 1980. 厚生省特定疾患慢性膵炎調査研究班昭和54年度研究業績集.
 43. Sternby, B. and Borgström, B. 1979. Purification and characterization of human pancreatic colipase. *Biochim. Biophys. Acta* 572: 235-243.
 44. Sternby, B. and Åkerström, B. 1984. Immunoreactive pancreatic colipase, lipase, and phospholipase A₂ in human plasma and urine

- from healthy individuals. *Biochim. Biophys. Acta* 789:164-169.
45. **Sternby, B., Engström, Å., Hellman, U., Vihert, A. M., Sternby, N. H. and Borgström, B.** 1984. The primary sequence of human pancreatic colipase. *Biochim. Biophys. Acta* 784:75-80.
46. **Sternby, B., Larsson, A. and Borgström, B.** 1983. Evolutionary studies on pancreatic colipase. *Biochim. Biophys. Acta* 750:340-345.
47. 竹内 正 (編) 1986. 厚生省特定疾患難治性膵疾患調査研究班昭和60年度研究報告書.
48. **Vandermeers, A., Vandermeers-Piret, M. C., Rathé, J. and Christophe, J.** 1974. On human pancreatic triacylglycerol lipase: isolation and some properties. *Biochim. Biophys. Acta* 370:257-268.
49. 山崎嘉弘, 早川哲夫, 野田愛司, 青木 勲, 近藤孝晴, 伊藤和人, 飯沼幸雄, 成瀬 達 1980. 十二指腸液中リパーゼ活性とその臨床的意義. *日消誌* 77:82-87.

Studies on the Secretory Pattern of Colipase in the Duodenal Juice and its Clinical Significance

Yoshinari FURUKAWA

The First Department of Internal Medicine, Hiroshima University School of Medicine
(Director: Prof. Goro KAJIYAMA)

A method was established for measuring colipase concentration in duodenal juice using 2,3-dimercaptopropan-1-ol tributyrates, an artificial substrate, and the secretory pattern of colipase in caerulein-secretin test and its clinical significance were studied. The following results were obtained.

(1) This method permitted easy and simultaneous determinations for a large number of samples within a short time.

(2) Colipase secretion in healthy subjects remarkably increased by stimulation with caerulein, but did not manifest any significant reaction to stimulation with secretin. Colipase output showed an almost logarithmic normal distribution.

(3) Colipase concentration decreased with progression of pancreatic exocrine dysfunction or morphological abnormality of the pancreatic duct. The output of colipase, lipase and amylase in the group with mild chronic pancreatitis was found to be 60.6%, 68.7% and 100.4% of those in the normal group, respectively.

(4) Colipase secretion in patients with pancreatic cancer showed a tendency to decrease, compared to healthy subjects.

(5) The colipase output in the group with abnormal butter tolerance test decreased markedly when compared with that in the normal group.

The foregoing results suggest that determination of colipase in duodenal juice is useful in the diagnosis and pathogenetic elucidation of pancreatic disease, especially mild chronic pancreatitis, and maldigestion of fat.