

## 顆粒球エラスターゼの測定とその問題点

自治医科大学大宮医療センター

総合医学 I 講座教授  
検査部

櫻林郁之介  
金 禎暁

はじめに

顆粒プロテアーゼの一つである顆粒エラスターゼ (EC3.4.21.37)は, Baugh & Travis によって分離・精製された<sup>1)</sup>。循環血液中に存在する顆粒エラスターゼは, 血中のプロテアーゼインヒビターと結合した状態で不活性化されている。このインヒビターは,  $\alpha_1$ -antitrypsin ( $\alpha_1$ -AT, MW:55000)と $\alpha_2$ -macroglobulin ( $\alpha_2$ -MG, MW:725000)であり, インヒビター1分子に, それぞれ1分子と2分子のエラスターゼが結合する<sup>2)</sup>。また血中における顆粒球エラスターゼは, 90%が $\alpha_1$ -ATと, 10%が $\alpha_2$ -MGと結合している<sup>2)</sup>。

顆粒球は, エラスターゼを多量に含み, 食細胞の刺激を受けると, これを放出する。また死亡あるいは損傷顆粒球からも放出される。すなわち, 顆粒球エラスターゼを定量的に測定することは, 急性炎症などの疾病の大きさや, 治療効果に対する情報を与えると考えられる。

### 1. 測定原理と方法

#### a. 酵素活性測定法

エラスターゼの低い基質特異性を利用して多くの基質を用いた分析法が開発されている。エラスターゼのもつ elastinolytic activity を測定するためのエラスチンや Congo-red エラスチンを基質とする方法もあるが, esterolytic activity を測定するための Suc-(Ala)<sub>3</sub>-pNA(succinyl-alanyl-alanyl-alanine-p-nitroanilide)などを基質とした方法<sup>3)</sup>が一般的である。しかしながら, 血中においては, このような合成基質を分解する別の酵素が存在し, 胆道系疾患で上昇するといわれている。また腫瘍エラスターゼは血中ではすべて $\alpha_1$ -ATと結合し不活性化型となっているが, 腫瘍エラスターゼ2のうち $\alpha_2$ -MGと結合しているものは, esterolytic activity を残しており, このような基質を水解する。したがって, 本測定法においては顆粒球エラスターゼに対する特異性は低い。

なお, 合成基質を用いて顆粒球中に存在するエラスターゼ活性の測定も試みられている。

#### b. 酵素免疫測定法

2つの方法があるが, その測定原理は図1に示してある。

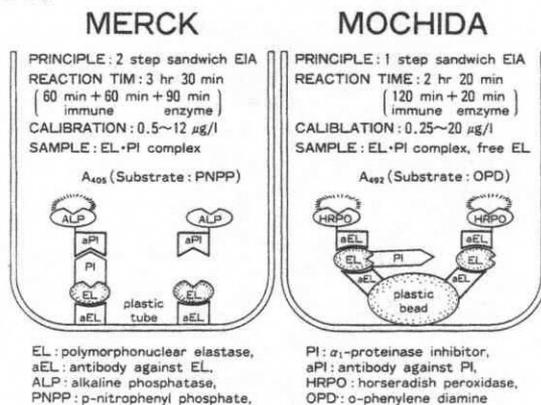


図1 2つの酵素免疫測定法の測定原理

#### ① Merck法

この測定法は, 血中において $\alpha_1$ -ATと結合した顆粒球エラスターゼの免疫活性をサンドイッチ法を利用して測定する方法である<sup>4)</sup>。すなわち顆粒球エラスターゼに対する抗体を固定化した試験管に検体を加えると, 個相抗体と結合する。次にアルカリホスファターゼ (ALP)を標識した $\alpha_1$ -ATに対する抗体を加えると, 固相抗体と結合している $\alpha_1$ -ATと結合し, ALPの酵素活性から, 検体中の顆粒球エラスターゼの蛋白量を得る。

#### ② Mochida法

Merck法が顆粒球エラスターゼに対する抗体と $\alpha$ -ATに対する抗体を用いて2ステップサンドイッチ法で測定するのに対して, 本法はエラスターゼに対する二種のモノクロナル抗体を用いて行う1ステップサンドイッチ法で, 標識したHRPOD (ペルオキシダーゼ)の酵素活性から複合体の量を知る。しかし, 本法はその測定原理から遊離のエラスターゼも測定することが可能である。

### 2. 顆粒球エラスターゼの正常値

健康診断を行い, 内科的および臨床検査で異常を認めない各年代における男女218人の顆粒球エラスターゼ値

は表1, 図2, に示すとおりであり<sup>5, 8)</sup>, 性差あるいは年齢差も認められない。また血中の顆粒球エラスターゼ活性値<sup>6, 7)</sup>も表1に示した。

表1 顆粒球エラスターゼの正常値  
酵素免疫測定法による顆粒球エラスターゼ値<sup>5)</sup>  
( $\mu\text{g/l}$ )(n=218)

性	男性		女性		全体	
	平均	SD	平均	SD	平均	SD
年齢						
10~19	108.5	37.7	71.6	22.2	89.6	36.0
20~29	88.9	25.0	97.3	31.3	93.6	28.7
30~39	85.7	32.1	89.1	39.5	87.3	35.4
40~49	106.8	42.1	108.6	46.2	107.7	43.6
50~59	84.8	21.5	89.2	25.8	86.9	23.4
60~69	95.3	52.5	105.7	27.5	97.2	49.0
合計	94.8	36.4	91.8	35.0	92.9	36.1

酵素活性法による顆粒球エラスターゼ活性

$15.83 \pm 5.29 \text{ mU/dl}$  (n=15)<sup>8)</sup>

$0.062 \pm 0.012 \Delta\text{OD}_{550}/\text{時}$  (n=26)<sup>7)</sup>

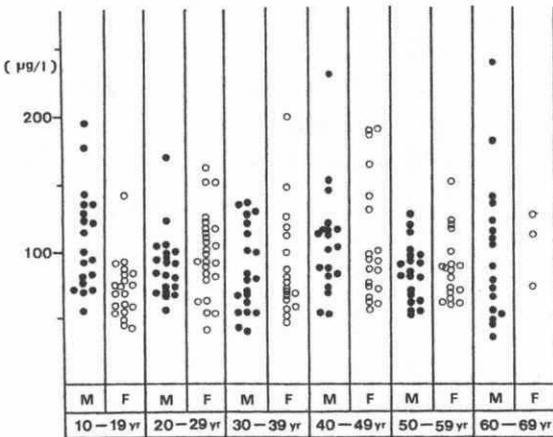


図2 健康人における血中顆粒球エラスターゼ値の分布

3. 測定結果ならびに測定の問題点

a. 血漿か血清か

血清と血漿を同一例で比較すると、たしかに血清の方が高い値を示すが、かならずしも決まった比率で高い値を示さない。これは血液が凝固する際に白血球が巻き込まれ、白血球中のエラスターゼがランダムに放出されるためと思われる。したがって、顆粒球エラスターゼを測定する場合は血漿を用いるべきである。

b. 測定精度

EIA法 (Merk社) での日内変動および日差再現性共に良好な結果を得ることができた<sup>8)</sup>。しかし、測定精度に関してはベテランと新人での差は歴然とし

ており、新人のデータはかなりばらつくことが示されている。検査がいつでも、誰がやっても、いつも同じ精度が得られるものとの条件をクリアしなければよい検査法とはいえないとすれば、改善の余地があるといえる。

EIA法 (持田) でも同時再現性は良好な結果を得ている (CV 4.0~5.8%)。

c. 特異性

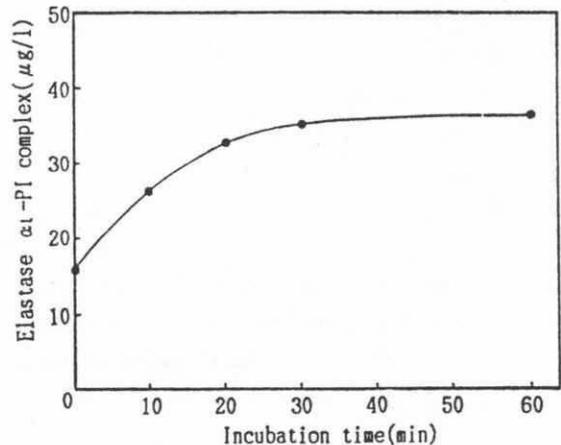
添加回収試験では両法共に良好な結果を得た (83.0~105.8%)。また、糜エラスターゼIとの交叉反応性も、糜エラスターゼIを添加して測定したが影響はみられず<sup>8)</sup>, 顆粒球エラスターゼに対する特異性は高いといつてよいであろう。

d. 顆粒球からのエラスターゼの遊出

顆粒球からのエラスターゼがどのような経過で起こるかをみるために、in vitroの実験系を組んで行った<sup>9)</sup>。まず、正常ヒト末梢血から常法どおり顆粒球を分取し、フェノールを除去した培養液にサスペンドし、ただちに一定 ( $10^5 \sim 10^6$ ) の細胞数ずつ小試験管に分注した後、あらかじめエラスターゼ- $\alpha_1$ -PI complexを除去した血清を加えて37°C, 5%CO<sub>2</sub>の条件下で培養した。一定時間培養した後、直ちに遠心にて細胞を除いた培養上清中の顆粒球エラスターゼ- $\alpha_1$ PI complexをエラスターゼとしてEIA法にて測定した。

その結果は図3に示してあるように、顆粒球からのエラスターゼの遊出はごく速い時期から起こり、約30分で平衡に達することがわかった。また、ちなみに培養上清中のエラスターゼの活性を人工基質法にて測定したが、遊出の早期から活性が失われるため正しい値を得ることができなかった。

図3 ヒト顆粒球からのエラスターゼの放出の時間的経緯



In vitro の実験とはいえこの結果から、生体内での局所における顆粒球からのエラスターゼを含むプロテアーゼの遊出はかなり早期から起こることが推定された。

#### 4. 臨床的有用性はあるのか

顆粒球エラスターゼをインヒビターとの複合体として測定するのは、いわば不用になった“ぬけがら”をみているようなもので、臨床的にあまり意味がないのではないかと意見がある。確かに、多くの症例で他の炎症マーカーとの間に相関が見られないが、個々の例で経時的に追跡すると白血球数、CRPとよく平行して変動することからみると、それらの検査の方が簡便で臨床的には便利な面が多い。

しかし、血中では顆粒球エラスターゼは遊離状態ではほとんど存在しないこと、人工透析中では白血球の変動とは必ずしも平行しないこと、体外循環などの大きな負荷が生体にかかった場合呼吸指数(RI)と顆粒球エラスターゼとの間には正の相関があること<sup>10)</sup>や、敗血症では他の炎症マーカーとは相関しないこと、などの事実を考えると、単に炎症マーカーとして各症例での経過をみるというよりは、特殊な病態における状態の把握などに有用性が高いと思われる。

例えばこれと同じことがその他の検査法でも立派に日常診療で使用されている。慢性関節リウマチやIgA腎症などの疾患において、血中の免疫複合体は直接病態に関わっているとは思えないが、診断的価値はあること、等がまさにそれである。このように考えると、これからも顆粒球エラスターゼを測定する意義は消えないのではないだろうか。

#### おわりに

以上、顆粒球エラスターゼ測定とその問題点ならびに臨床的意義についてその概要をのべた。

#### 文 献

- 1) Baugh R, Travis J: Human leukocyte granule elastase: Rapid isolation and characterization. *Biochemistry* 15:836, 1976
- 2) Ohlsson K: Interaction of granulocyte neutral proteases with,  $\alpha_2$ -antitrypsin,  $\alpha_2$ -macroglobulin and  $\alpha_1$ -antichymotrypsin. In: *Neutral proteases of human polymorphonuclear leukocytes* (Havemann K, Janoff AP eds.). Baltimore - Munich: Urban&Schwarzenberg, 1978. P 167
- 3) Taylor, J.C., Crawford, I.P: Purification and

preliminary characterization of human leukocyte elastase *Arch. Biochem. Biophys.* 169:91, 1975

- 4) Neumann S, et al: Enzyme-linked immunoassay for human granulocyte elastase in complex with  $\alpha_1$ -Proteinase inhibitor. In: *Proteases* (Horl H, Heidl H eds.). New York Plenum Press, 1984. p379
- 5) Sakurabayashi, I et al: Clinical evaluation on a new assay method for elastase in granulocyte. In: *Proceedings of Elastase Symposium WASP* (Lang, H ed) GIT Verlag, West Germany, 1985
- 6) 稲毛康司, 他: 川崎病急性期における elastase 活性に関する研究. *日小会誌* 87:2202, 1983
- 7) 工藤幹彦, 他: 糖尿病患者の多核白血球および血清エラスターゼ様活性. *糖尿病* 26:1057, 1983
- 8) 櫻林郁之介, 伊藤弘美: 顆粒球エラスターゼ. *日本臨床* 47(臨増): 967, 1989
- 9) 櫻林郁之介, 島貫公義, 他: 顆粒球エラスターゼ. *臨床病理* 38:267, 1990
- 10) Shimanuki K, et al: Perioperative fluctuation in plasma levels of granulocyte elastase and  $\alpha_1$ -antitrypsin: The influence of the severity of surgical intervention and their effect on the respiratory index. *Jpn J Surg* 19:410, 1989