

胃液ペプシン活性測定法の基礎的検討

—特に胃液保存法と少量化 Anson 変法について—

川崎医科大学 附属川崎病院 内科
山本 俊, 塚本 真言
篠原 昭博, 坂本 武司
同 中央検査科
江木 聖子

(昭和55年8月20日受付)

Determination of Pepsin in Human Gastric Juice

with Special References to Modified Anson's
Method and the Storage Effect for
Pepsin Activity

Shyun Yamamoto, Makoto Tsukamoto
Akihiro Shinohara and Takeshi Sakamoto
Department of Internal Medicine, Kawasaki Hospital,
Kawasaki Medical School

Seiko Egi
Department of Clinical Laboratory, Kawasaki
Hospital, Kawasaki Medical School

(Accepted on August 20, 1980)

ヘモグロビンを基質としたペプシン活性測定法 (Anson 法) の改変法を確立し, その方法を用いて胃液の保存方法によるペプシン活性の経時的変動を検討した。

この改変法は基質および検体が少量で測定することができ, 再現性も良好である。また本法による測定値と日本消化器病学会胃液測定法検討委員会の方法による測定値とは良好な相関を示した。 ($y=1.024x-0.002$, $r=0.966$, $p<0.001$)

pH 1.0 の胃液は 4°C に保存すると 14 日後には活性が 20 % 減少し, -60°C に保存すると 4 日で完全に失活した。しかしながら 0.1 M acetate buffer, pH 5.3 で透析した胃液は 14 日後には 4°C に保存すると 5 %, -60°C でも 25 % の失活しかみられなかった。このように透析後胃液を 4°C で保存するのが最もペプシン活性の減少が少なかった。

A modified method for the estimation of pepsin using hemoglobin as a substrate was established, and the effect of storage on pepsin activity in the human gastric juice was examined.

This method requires a small amount of substrate and sample, and shows good reproducibility. The peptic activities determined by this method were completely correlated to those determined by the method of Committee for the

Determination of Gastric Secretion Test in the Japanese Society of Gastroenterology ($y=1.024x-0.002$, $r=0.966$, $p<0.001$).

The pepsin activity of centrifuged gastric juice (pH 1.0) was reduced by 20% of initial activity in 14 days storage at 4°C, and was completely destroyed in 4 days storage at -60°C. Nevertheless in the best condition of the dialysed gastric juice against 0.1 M acetate buffer, pH 5.3, pepsin activity was reduced by only 5% of initial activity 14 days storage at 4°C, and 25% in 14 days storage at -60°C.

緒 言

胃液検査は消化管 X線検査, 内視鏡検査の発達した現在では診断的な価値に対する期待は少なくなった。しかしながら胃液検査が慢性胃炎を中心とする胃粘膜萎縮, あるいは消化性潰瘍に関する病態生理を検討するうえに必要な欠くべからざる検査であることに変わりはない¹⁾。胃液検査のうちペプシン活性の測定は酸の測定ほど一般的に行なわれていないのが現状である。この原因としては酸度測定に比しペプシン活性測定の意義の検討が不充分であることその他に, その測定法の繁雑さや胃液の保存が難しく早期に測定を完了する必要があることなどがあげられる。本研究の目的は日本消化器病学会胃液測定法検討委員会の方法²⁾による測定値と対比できる方法で, できるだけ少量の検体および試薬で測定できるペプシン活性測定法を確立すること, および胃液ペプシン活性を保たせたままできるだけ長期保存する方法を探究することにある。

方 法

胃液は当科へ入院した消化性潰瘍患者の胃液検査によって得られたものの一部を用いた。胃液検査は日本消化器病学会胃液測定法検討委員会の方法³⁾により行なった。即ち基礎分泌 30分およびテトラガストリン 4 μ g/kg の刺激後 120分間を 10分毎に分画採取した。採取胃液は直ちに 4°C に保存し, 保存方法の検討以外の基礎的検討の場合は採取後 4日以内にペプシン活性を測定した。ペプシン活性の測定は胃液測定法委員会の方法²⁾ (以下 original method と略す) を改変し, 胃液や基質溶液および発色

液などをすべて 1/2 容に少量化した方法 (以下 standard method と略す) を用いた。

Table 1 に standard method を示した。

Table 1. Standard method の実施方法

I 試料調整

(1) ヘモグロビン溶液 (基質)

ヘモグロビン原液として Sigma 社の bovine type II hemoglobin を蒸留水に 2.5% の割合で溶し, 遠沈後の上清液を 4°C に保存する (1 週間以内に使用すること)。

実験当日に原液 4 容に対し 0.3 N HCl 1 容を加えて基質溶液とする。

(2) ヒト胃液 (酵素)

0.04 N HCl を用いて 50 倍に稀釈する。

II 実験操作

(1) 消 化

基質溶液 1 ml および稀釈胃液 0.25 ml を 37°C にて混合し, よく振とうしながら 10 分間消化を行なう。10 分後 5% trichloroacetic acid (T. C. A.) 2.5 ml を加えよく混和し, 消化を停止した後 30 分以上室温に放置する。その後東洋濾紙 No. 7 を用いて濾過し, その濾液 0.5 ml に 0.5 M Na₂CO₃ 2.5 ml を加えアルカリ化したのち phenol reagent (第一化学) 0.25 ml を加え, 60 分以上室温で発色させ, 波長 640 nm で測定する。ただし吸光度 0.50 以上のときは消化時間を 5 分として再検する。

(2) コントロール

コントロールはヒト稀釈胃液 0.25 ml に 5% T. C. A. 2.5 ml を加えよく混和したのち基質溶液 1 ml を加えて振とうし, 室温に放置する。以後の操作は消化実験の場合と同じ。

III 計 算

胃液の消化活性は胃液 1 ml 当りのヘモグロビン消化により生成するチロジン様物質を L-チロジン量に換算して表現する。検量線は L-チロジンを 0.2 N HCl で稀釈して作製する。

胃液 1 ml 当りの蛋白分解酵素活性 = [(消化実験の吸光度に相当する検量線の読み) - (コントロールの吸光度に相当する検量線の読み)] \times 75 μ g/ml gastric juice / min incubation.

1) original method と少量化変法の比較方法

胃潰瘍患者 2 名および十二指腸潰瘍患者 1 名より得た刺激後分画採取胃液 30 検体をそれぞれ original method, standard method および original method のすべての反応液を 1/5 容に縮小した方法 (以下 1/5 volumes method と略す) で測定した。

2) 基質濃度, 反応時間, および胃液希釈度に対する検討方法

基質濃度の検討は十二指腸潰瘍患者の胃液を用いて行なった。基質濃度を 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 および 3% と変化させ standard method にて測定した。反応時間の検討は十二指腸潰瘍患者の刺激後 20 分分画 (A), 基礎分泌分画 (B), および胃潰瘍患者の刺激後 20 分分画 (C) の胃液を用いた。反応時間を 2, 5, 10, 15, 20, 25 および 30 分として standard method で測定した。胃液希釈度の検討は十二指腸潰瘍患者の刺激後 20 分分画 (D), 胃潰瘍患者の刺激後 30 分分画 (E), および 40 分分画 (F) の胃液を用いた。胃液はそれぞれ 0.04 N HCl を用いて 10, 20, 50, 100, 150, 200 倍に希釈したうえで standard method で活性を測定した。

3) 胃液の保存方法に対する検討方法

十二指腸潰瘍患者の刺激後 20 分分画の胃液を用いて検討した。①採取胃液を遠沈 (3,000 rpm 5 分) した胃液 (pH 1.0), ②これを 0.04 N HCl で 5 倍に希釈した胃液 (pH 1.0), ③遠沈後胃液に 1 M sodium acetate buffer, pH 5.3 で 5 倍に希

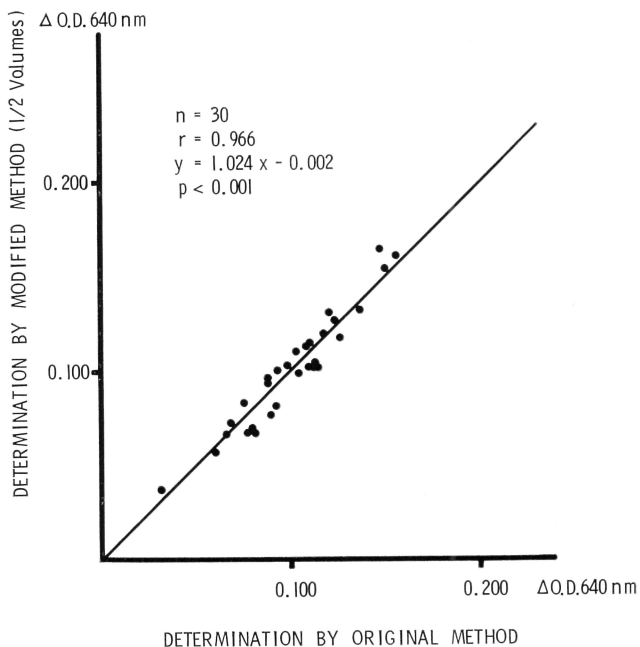


Fig. 1. Correlation between peptic activities determined by original method and by modified method. (1/2 Volumes)

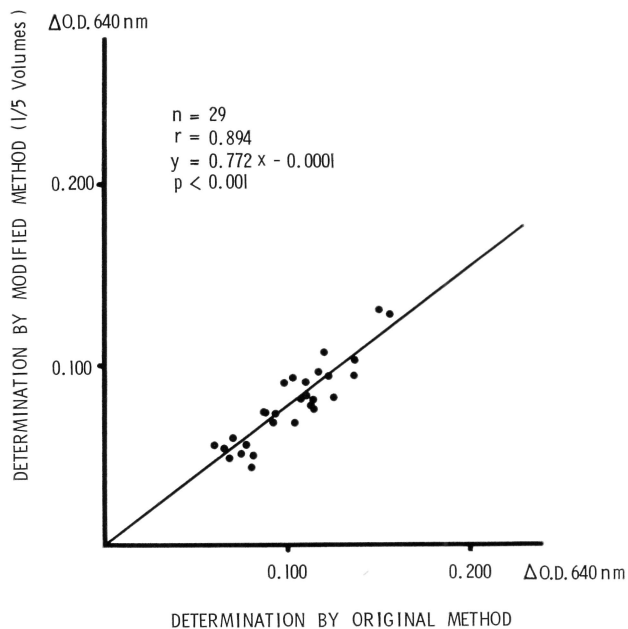


Fig. 2. Correlation between peptic activities determined by original method and by modified method. (1/5 Volumes)

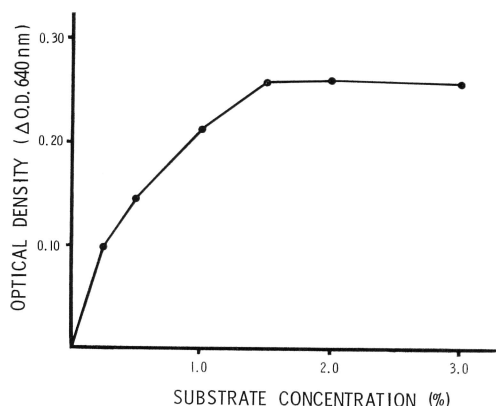


Fig. 3. Pepsin activity and substrate concentration.

積した胃液 (pH 5.0), および ④遠沈後胃液を 4°C にて 0.1M sodium acetate buffer, pH 5.3 に対して 20 時間透析した胃液, の 4 種の検体をそれぞれ 20°C, 4°C および -60°C に保存し, 14 日間の活性の変動を standard method で測定した.

結 果

1) 測定系少量化に対する検討成績

Original method と standard method による測定値の相関を吸光度で比較すると Fig. 1 のとおりであり, $y=1.024x-0.002$, $r=0.966$ と良好な相関を認めた. 誤差の平均は 2.4% であった. Original method とさらに少量化した 1/5 volumes method とを同様に比較したものが Fig. 2 である. $y=0.772x-0.0001$, $r=0.894$ と良好な相関を認めたが 1/5 volumes method による測定値は original method による測定値よりも平均 23% 程度低値を示した.

2) 基質濃度, 反応時間および胃液の希釈度に対する検討成績

基質濃度と反応速度の関係を Fig. 3 に示した. Standard me-

thod で用いる基質濃度は 2.0% であるが, それよりも低い基質濃度 1.5% ですでに初速度の条件を満たした. 反応時間と加水分解能の関係を Fig. 4 に示した. ペプシン活性の低い胃液 (B, C) の場合は 30 分まではほぼ直線的に水解が進んだ. 活性の高い胃液 (A) を用いた場合は O. D. 0.50 を境にして水解速度が低下した. 胃液の希釈の測定値に対する影響は Fig. 5 に示した. D, E, F のいずれの胃液を用いても 20~100 倍希釈ではほぼ一定の値をとるが, 希釈倍

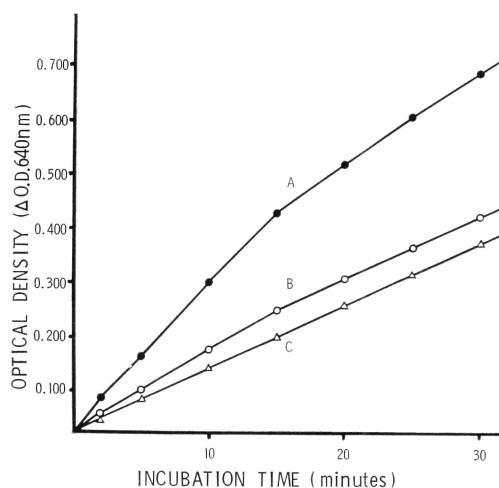


Fig. 4. Pepsin activity and incubation time. Gastric juice A, B: 20 min and basal fractions of a duodenal ulcer patient. C: 20 min fraction of a gastric ulcer patient.

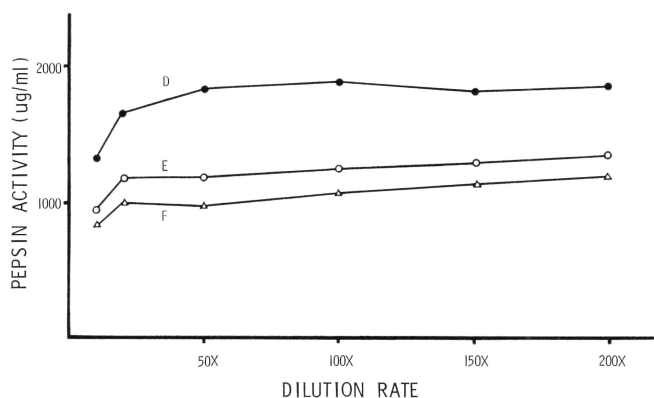


Fig. 5. Effect of dilution of gastric juice on peptic activity. Gastric juice D: 20 min fraction of a duodenal ulcer patient. E, F: 30 and 40 min fractions of a gastric ulcer patient.

数がそれよりも高くなると活性測定値が軽度の上昇を示す傾向がみられた。

3) 胃液の保存法に対する検討成績

Fig. 6~9 に 4 種類に調整した胃液をそれぞれ 3 つの温度条件で保存した場合のペプシン活性の経時変動を採取直後の胃液ペプシン活性を 100% として示した。遠沈後胃液 (Fig. 6)

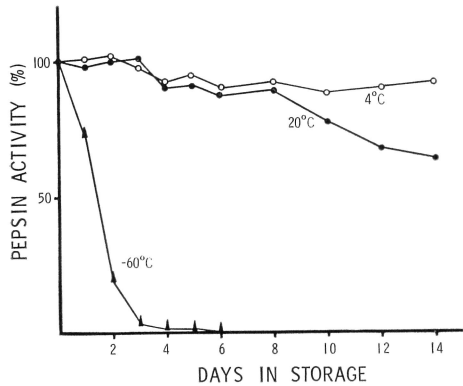


Fig. 6. Pepsin activity and days in storage of centrifuged gastric juice. (pH 1.0)

と 0.04 N HCl で希釈した胃液 (Fig. 7) (いずれも pH 1.0) の場合は同様のパターンでペプシン活性の減少がみられた。即ち -60°C 保存では急速な活性の低下がみられ、3 日目にはほぼ活性は失われた。 20°C 保存では 7 日目に約 10~20% の活性の低下がみられ、14 日目には 35~45% の活性が失われた。 4°C 保存では

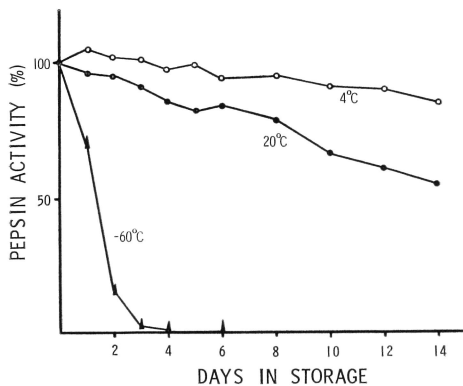


Fig. 7. Pepsin activity and days in storage of diluted gastric juice by 0.04 N HCl. (pH 1.0)

最も活性の低下は少なく、5 日目まではほぼ活性が保たれたが、その後は低下傾向を示し、14 日目では 10~15% の失活を示した。

比較的 pH の高い胃液、即ち 1 M sodium acetate buffer, pH 5.3 を加えた胃液 (pH 5.0, Fig. 8) および 0.1 M sodium acetate buffer, pH 5.3 に対して透析した胃液 (pH 5.3, Fig. 9) の場合のペプシン活性の低下はいずれも比較的少なかった。 Fig. 8 に示したように 1 M acetate buffer で希釈した胃液 (pH 5.0) のペプシン活性の経時変動をみると、 20°C と 4°C 保存の場合はほとんど活性の低下がみられず 14 日目でも約 95% の活性を有した。しかし 1~4 日目に活性が 100% を越えて高値をとる

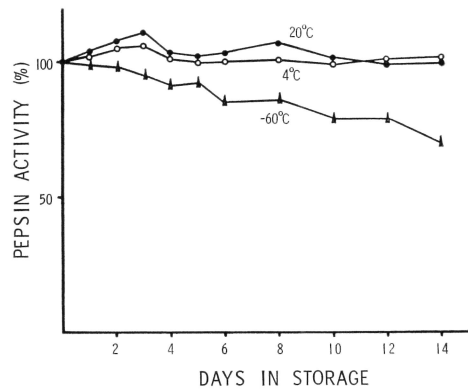


Fig. 8. Pepsin activity and days in storage of diluted gastric juice by 1.0 M acetate buffer pH 5.3. (pH 5.0)

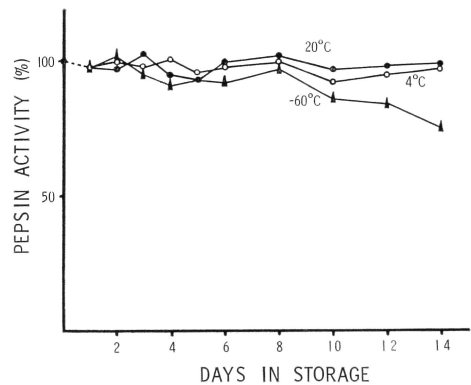


Fig. 9. Pepsin activity and days in storage of dialysed gastric juice against 0.1 M acetate buffer, pH 5.3. (pH 5.3)

傾向がみられた。-60°C 保存の場合は低い pH の胃液の場合と異なって活性の低下は少なかったが、14 日目には 40% の低下を示した。

Fig. 9 に示したように透析直後のペプシン活性の低下は 3% であった。この胃液を -60°C で保存してもペプシン活性の急速な失活はみられなかったが 14 日では約 30% の失活を認めた。20°C および 4°C 保存では 14 日までほぼ活性が保たれた。

考 案

胃液分泌の三大成分である塩酸、ペプシンおよび粘液については特に消化性潰瘍の発生要因の一つとして古くから注目されて来た^{4),5)}。このうち酸分泌については詳細な検討がなされて来たが、ペプシン分泌は多くの場合酸分泌と平行するために従来より酸分泌の補助的な成績としてあつかわれて来た⁶⁾。しかしながら近年胃粘膜萎縮に際してペプシン分泌は酸分泌ほどには低下しないこと^{7),8)}、あるいはペプシンの多様性の研究⁹⁾が進められた結果血中 group I pepsinogen (Samloff⁹⁾) が高値を示す十二指腸潰瘍に遺伝関係が成立すること¹⁰⁾などが明らかとなった。さらに消化管ホルモンの研究が進むにつれてこれらのホルモンのターゲットとしてのペプシン分泌は酸と異なる態度を示す場合がある¹¹⁾ことが注目されて来た。これらの事実より消化管疾患特に消化性潰瘍や胃粘膜萎縮に関する病態を検討するうえで胃液ペプシンを測定する意義は大きいと思われる。

ペプシン活性測定法はヘモグロビンにペプシンを作用させ基質ヘモグロビンの加水分解により遊離したチロジンを測定する Anson の方法¹²⁾を基礎とした方法が一般に用いられている。その他の方法としては基質蛋白にペプシンを作用させ加水分解を受けなかった蛋白を測定する方法として Orange G 比色法 (岡島¹³⁾)、Remazolbrilliant Blue 比色法 (Rinderknecht¹⁴⁾) および凝乳法 (Lee¹⁵⁾) などがある。また基質蛋白から遊離したカルボキシル基あるいはアミノ基を測定する方法としては Casein-

Formol 法 (Northlop¹⁶⁾) などがある。その他にも RISA 法 (Absolon¹⁷⁾)、radial diffusion assay (Samloff¹⁸⁾) および radioactive assay (Piper¹⁹⁾) などがあるが再現性、簡便さなどより胃液中のペプシン活性測定には Anson 法¹²⁾が最も一般的である。

本邦の諸施設で採用されているペプシン活性測定法は日本消化器病学会胃液測定法検討委員会による方法¹⁾であるが、これは Anson 法¹²⁾を改変したものである。今回我々は基本的にはこの方法に従って少量化を試みた。基質及び試量を極端に少量にすると実測値に変動を来たしてしまう (**Fig. 2**)。しかしながら standard method による測定値は original method による測定値と同じであった (**Fig. 1**)。この方法の基質濃度と反応時間の検討から standard method の基質濃度で十分な初速度が得られ (**Fig. 3**)、10 分の反応時間で吸光度が 0.50 未満であれば正確な測定値が得られることが明らかとなった。ペプシン活性が非常に高い胃液を用いた場合は胃液の希釈度を増すか、あるいは反応時間を短縮せざるを得ない。胃液の希釈度を増すとペプシン活性は高値をとる傾向がある (**Fig. 5**) ため委員会の方法でも示しているように反応時間を短縮するほうが正確である。

胃液中のペプシンは強酸性下にあるためその保存は難しいとされており、胃液測定法検討委員会も 4 日以内に測定するよう指示している¹⁾。本論文では pH が比較的高い (pH 5.0 付近) 状態で保存すればペプシン活性を失わずにかなり長期に保存することができることを示した (**Figs. 8, 9**)。この場合 4°C 保存が最も安定しており、なおかつ透析をして塩濃度を低下させることによりペプシン活性を一層安定させることができた (**Fig. 9**)。-60°C 保存の場合には特に低い pH においてペプシン活性の急速な失活がみられた (**Figs. 5, 6**)。この原因としては凍結の際により高い塩濃度あるいは酸度が生ずる可能性があり、この時にペプシン活性が失われる可能性が考えられる。一方 20°C 保存の場合には保存後 1~4 日目にペプシン活性の上昇を認めたが、この現象は胃液中のペプシン活

性阻害物質²⁰⁾の不活化によって生ずる可能性も考えられ、今後の検討が必要である。

従来ペプシンと総称されて来た胃液中の酸性プロテアーゼには少なくとも胃底腺主細胞由来²¹⁾の group I pepsins (Samloff⁹⁾)と、おそらくは mucous neck cell²¹⁾ や幽門腺細胞²²⁾ 由来の group II pepsins (Samloff⁹⁾) が存在する。また胃液の電気泳動により非ペプシンであるプロテアーゼとして slow moving protease (SMP: Samloff²³⁾) も存在することが明らかとなった。本論文に示した standard method でも、あるいは original method でも pH 1.5

あたりの条件における protease 活性を測定している²⁴⁾。この pH 1.5 付近では group II pepsin や非ペプシンの SMP も十分な活性を持っており^{9), 25)} また他の protease 活性が存在する可能性も否定できない²⁵⁾。この意味からすると本論文で示した standard method を含めて Anson 法¹²⁾ に基づくペプシン測定法は pH 1.5 付近で活性をもつ全ての protease fraction の活性を測定していることになる。したがっていわゆるペプシンの測定値が検討される時、このことが十分認識された上で論じられる必要がある。

文 献

- 1) Baron, J. H.: The clinical use of gastric function tests. *Scand. J. Gastroent.* 6: 9—46, 1970
- 2) 胃液測定法検討委員会: ヒト胃液ペプシン活性測定法に関する報告. *日消誌* 71: 206, 1974
- 3) 胃液測定法検討委員会: 胃液測定法検討委員会報告. *日消誌* 70: 1016, 1973
- 4) Davenport, H. W.: The gastric mucosal barrier. *Digestion* 5: 162—165, 1972
- 5) Sun, D. C. H.: Etiology and pathology of peptic ulcer. *In Gastroenterology*, Vol. 1, ed. by Bockus, H. L. 3rd ed. Philadelphia, London, Toronto, WB Saunders. 1974, pp. 579—610
- 6) 和田武雄, 佐藤勝己, 工藤雅之, 山田悟朗, 藤田伊久雄, 大友 晋: 胃・十二指腸潰瘍と胃液. *最新医学* 21: 422—432, 1966
- 7) 石森 章, 桜田弘之, 荒川弘道, 井上修一, 山形 淳, 狩野 敦, 橋本 仁, 根本勝也, 竹内哲夫: 慢性胃炎における胃分泌能と胃粘膜組織像. *最新医学* 23: 2043—2053, 1968
- 8) Yamamoto, S.: Studies on acid protease fractions and gastric mucosal atrophy. 2. Relationship of acid proteases in gastric juice separately determined by alkali treatment and gastric mucosal atrophy. *Gastroenterol. Jpn.* 15: No. 5, 1980 (掲載予定)
- 9) Samloff, I. M.: Pepsinogens, pepsins, and pepsin inhibitors. *Gastroenterology* 60: 586—604, 1971
- 10) Rotter, J. I., Peterson, G., Samloff, I. M., McConnell, R. B., Ellis, A., Spence, M. A. and Rimoin, D. L.: Genetic heterogeneity of hyperpepsinogenemic-I and normopepsinogenemic-I duodenal ulcer disease. *Ann. intern. Med.* 91: 372—377, 1979
- 11) Brook, A. M., Isenberg, J. and Grossman, M. I.: The effect of secretin, glucagon, and duodenal acidification on pepsin secretion in man. *Gastroenterology* 57: 159—162, 1969
- 12) Anson, M. L. and Mirsky, A. E.: The estimation of pepsin with hemoglobin. *J. gen. Physiol.* 16: 59—63, 1932
- 13) 岡島 喬: 胃液分泌に関する知見補遺, 第一報 胃液のペプシン定量に対する色素 Orange-G の応用に就て. *内科宝函* 4: 616—621, 1957
- 14) Rinderknecht, H., Geokas, M. C., Silverman, P. and Haverback, B. J.: A new ultrasensitive method for the determination of proteolytic activity. *Clin. chim. Acta* 21: 197—203, 1968
- 15) Lee, D. and Ryle, A. P.: Pepsinogen D. A fourth proteolytic zymogen from pig gastric mucosa. *Biochem. J.* 104: 735—741, 1967
- 16) Northrop, J. H.: Pepsin activity units and methods for determining peptic activity. *J. gen. Physiol.* 16: 41—58, 1932

- 17) Absolon, K. B.: The use of albumin ^{131}I (RIHSA) for proteolytic activity determination. *Surg. Forum* 5 : 543—548, 1975
- 18) Samloff, I. M. and Kleinma, M. S.: A radial diffusion assay for pepsinogen and pepsin. *Gastroenterology* 56 : 30—34, 1969
- 19) Piper, D. W.: The estimation of peptic activity in gastric juice using radioiodinated serum albumin as substrate. *Gastroenterology* 38 : 616—621, 1960
- 20) Baillie, A. J. and Anderson, W.: Macroanionic inhibition of peptic activity by high and low molecular weight macroanions. *Nature (London)* 218 : 770—771, 1968
- 21) Rubin, W., Ross, L. L., Sleisenger, M. H. and Jeffries, G. H.: The normal human gastric epithelia, a fine structural study. *Lab. Invest.* 19 : 598—626, 1968
- 22) Yasuda, K., Suzuki, T. and Takano, K.: Localization of pepsin in the stomach, revealed by fluorescent antibody technique. *Okajimas Folia anat. Jpn.* 42 : 355—367, 1966
- 23) Samloff, I. M.: Slow moving protease and the seven pepsinogens. Electrophoretic demonstration of the existence of eight proteolytic fractions in human gastric mucosa. *Gastroenterology* 57 : 659—669, 1969
- 24) 村上健二, 宮岡孝平: ペプシンおよびペプシノーゲン分泌. 川井啓市 編: 胃その形態と機能, 第1版. 東京, 医学書院 1975, pp. 94—112
- 25) Yamamoto, S.: Studies on acid protease fractions and gastric mucosal atrophy. 1. A modified simple method for separate determination of alkali labile pepsin in gastric juice by alkali treatment or by using a synthetic substrate. *Gastroenterol. Jpn.* 15 : No. 5, 1980 (掲載予定)