

氏名	割谷孝貴
生年月日	
本籍	石川県
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	博乙第245号
学位授与の日付	平成14年3月22日
学位授与の要件	論文博士(学位規則第4条第2項)
学位授与の題目	Development of assay systems for canine pancreatic diseases using anti-trypsin monoclonal antibodies (イヌトリプシンに対するモノクローナル抗体を用いたイヌ膵疾患診断系の開発)
論文審査委員(主査)	大熊 勝治(薬学部・教授)
論文審査委員(副査)	正宗 行人(薬学部・教授) 二階堂 修(薬学部・教授) 米田 幸雄(自然科学研究科・教授) 山田 隆紹(麻布大学・獣医学部教授)

## 学位論文要旨

Cationic trypsin (CT) and anionic trypsin (AT) were purified from canine pancreas and their structures were determined mostly from the results of SDS-PAGE in reduced and non-reduced conditions. Thirty monoclonal antibodies (mAb) to canine CT were obtained by the cell fusion (hybridoma) technique. Each mAb showed different reaction to CT, AT and CT- $\alpha_1$  protease inhibitor complex (CT- $\alpha_1$ PI), probably because of different epitopes.

Three assay systems for canine pancreatic diseases (ELISA, EPI (exocrine pancreatic insufficiency) diagnosis kit, and pancreatitis diagnosis kit) were developed using these mAbs. ELISA showed measurable range of trypsin like immunoreactivity (TLI) substance from 1 to 100 ng/ml and showed high performance of intra-assay, inter-assay, recovery, and correlation to RIA. The mAbs detected canine CT and canine CT- $\alpha_1$ PI, but recognized little the canine CT- $\alpha_2$  macroglobulin complex, AT, porcine trypsin nor bovine trypsin. The EPI diagnosis kit detected not only all the "EPI-positive" dogs but also "EPI-negative" dogs with other diseases. The pancreatitis diagnosis kit detected only 3 dogs with high TLI values out of 15 "pancreatitis" dogs, but also detected "non-pancreatitis" dogs with high TLI values, suggesting that such "non-pancreatitis" dogs were actually "pancreatitis."

We suggest that the clinical application of these mAb assay systems to

pancreatitis and other diseases will provide us useful informations.

## 1. はじめに

トリプシンは膵臓で産生される臓器特異性と基質特異性の高い酵素であり、その変動は膵臓の状態、例えば膵疾患を示唆するなど注目されている。イヌトリプシンにはその等電点の異なる 2 種類のサブタイプであるカチオニック型 (CT) とアニオニック型 (AT) があり、その遺伝子配列とアミノ酸配列とが明らかとなっている。またトリプシノーゲンの N 末 7 アミノ酸残基が切断されて活性型のトリプシンになるが、トリプシンとトリプシノーゲンはほぼ同等の免疫反応性を持つので、獣医学領域ではそれら全てを網羅した形で Trypsin like Immunoreactivity (TLI ; トリプシン様免疫反応物質) と呼んでいる。さらにイヌ、ネコ、ヒト等では急性膵炎、膵癌、腎不全では血中 TLI が上昇していること、一方、膵外分泌機能不全症 (EPI)、慢性膵炎における血中 TLI は低い値を示していることが報告されている。このように各疾患で変動が大きい TLI の体内動態を明らかにするべく、イヌトリプシンに対するモノクローナル抗体 (mAb) の反応性を検討し、立体構造や抗原性及びプロテアーゼインヒビターとの相互作用について新たな知見を得たので報告する。また臨床現場で TLI を測定可能にするための ELISA 及びイムノクロマトグラフィー法による簡易キットを開発し、その臨床的有用性を確認したので報告する。

## 2. イヌカチオニックトリプシンに対するモノクローナル抗体の作製とその性状解析

イヌ膵臓より硫酸ホモジネート、硫酸アンモニウム塩析、ゲルクロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーによる精製を行い、CT 17mg と AT 20mg とを得た。この精製過程で CT の比活性は 118.1 倍、AT は 32.3 倍に上昇した。この精製イヌ CT を BALB/C マウスに免疫し、合計 30 株の抗イヌ CT mAb 産生ハイブリドーマを樹立することができた (Table.1)

この 30 種類の mAb のうち 22 種類が CT のみ認識し、8 種類が CT と AT の両方を認識した。また mAb のサブクラスは L 鎖は全て  $\kappa$  鎖であり、H 鎖は 29 種類が  $IgG_1$  であり、 $IgG_{2a}$  と  $IgM$  が 1 種類ずつであった。

また各精製過程のサンプルを用いて 15%ゲルによる SDS-PAGE を行った。その結果、精製過程毎に精製度が上昇しており、CT と AT の分子量は 28 kDa、29.5 kDa と計算された (Fig.1A)。さらに mAb 009-303 を用いたウエスタンブロッティング (WB) では、硫酸アンモニウム塩析後サンプルでは若干バンドが薄いのが、各精製過程で 28 kDa 付近のバンドが検出された (Fig.1B)。

Table.1 The evaluation of mAb activities against canine cationic and anionic trypsin by ELISA<sup>a</sup>

Cell names	Subtype	Reaction to Cationic Trypsin	Reaction to Anionic Trypsin
004-301	$IgG_1, \kappa$ chain	4+	3+
004-312	$IgG_1, \kappa$ chain	4+	3+
004-203	$IgG_1, \kappa$ chain	4+	-
004-214	$IgG_1, \kappa$ chain	4+	-
005-201	$IgG_1, \kappa$ chain	4+	-
005-202	$IgG_1, \kappa$ chain	4+	±
005-203	$IgG_1, \kappa$ chain	4+	+
005-204	$IgG_1, \kappa$ chain	3+	±
005-205	$IgG_1, \kappa$ chain	4+	+
005-206	$IgG_1, \kappa$ chain	3+	-
005-208	$IgG_1, \kappa$ chain	4+	-
007-202	$IgG_1, \kappa$ chain	3+	-
007-203	$IgG_1, \kappa$ chain	3+	-
007-205	$IgG_1, \kappa$ chain	3+	-
007-206	$IgM, \kappa$ chain	3+	3+
007-207	$IgG_1, \kappa$ chain	3+	-
007-209	$IgG_1, \kappa$ chain	3+	-
008-202	$IgG_1, \kappa$ chain	3+	-
008-204	$IgG_1, \kappa$ chain	3+	-
008-205	$IgG_1, \kappa$ chain	3+	-
008-206	$IgG_1, \kappa$ chain	3+	-
008-207	$IgG_1, \kappa$ chain	3+	-
009-201	$IgG_1, \kappa$ chain	4+	-
009-202	$IgG_1, \kappa$ chain	4+	-
009-303	$IgG_1, \kappa$ chain	5+	-
009-204	$IgG_1, \kappa$ chain	4+	-
009-205	$IgG_1, \kappa$ chain	3+	-
009-206	$IgG_{2a}, \kappa$ chain	3+	-
009-207	$IgG_1, \kappa$ chain	3+	-
009-209	$IgG_1, \kappa$ chain	3+	±

<sup>a</sup>Here; - : 0-0.1, ± : 0.1-0.2, + : 0.2-0.4, 2+ : 0.4-0.6, 3+ : 0.6-0.8, 4+ : 0.8-1.0, 5+ : >1.0

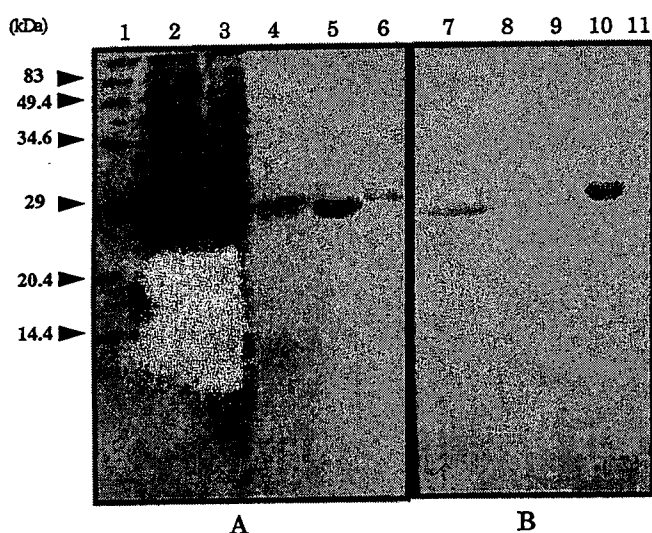


Fig.1 A: SDS-PAGE of each canine trypsin during purification stages. Each sample was subjected to a 15% SDS-PAGE under reduced condition and stained with CBB R-250. B: Immunoblot analysis of anti-canine cationic trypsin monoclonal antibody 009-303. The arrows indicate the molecular weight (kDa) corresponding to the bands of standard. Lane 1, Molecular weight standards; Lane 2 & 7, Homogenate sample; Lane 3 & 8, After salting-out sample; Lane 4 & 9, After gel filtrate sample; Lane 5 & 10, Cationic trypsin; Lane 6 & 11, Anionic trypsin

さらに2種類のmAbによるサンドイッチ法で測定系を開発すべく、mAb 009-303とmAb 008-207とを用いて、CTをサンドイッチできる組み合わせを検討した。するとmAb 009-303と異なるエピトープを認識するmAbが4種類、mAb 008-207と異なるエピトープを認識するmAbが15種類、mAb 009-303とmAb 008-207の両者と異なるエピトープを認識するmAbが

Table.2 モノクローナル抗体の組み合わせ検討結果

008-207とサンドイッチ可能なmAb	009-303とサンドイッチ可能なmAb	008-207及び009-303とサンドイッチ可能なmAb
009-303	008-207	004-301
009-206	004-203	004-312
009-207	004-214	008-205
009-201	007-207	009-204
009-202		009-205
008-204		
008-206		
007-205		
007-309		
005-201		
005-206		
005-208		

5種類あった (Table.2)。このことから立体障害を考慮したエピトープは最低3領域存在することが示唆された。さらにイヌカチオニクトリプシノーゲンのアミノ酸配列をN末から15残基単位で5残基ずつずらしたペプチドを抗原としたELISAより、mAbのエピトープを検索した。するとmAb 009-206と009-207は両方共アミノ酸番号66~80 (-SEGGEQFINAAKIIR-)を認識した。

さらにヒト由来 $\alpha_1$ プロテアーゼインヒビター ( $\alpha_1$ PI)、CT及びATを用いてSDS-PAGEとmAbによるWBを行った。還元条件でのSDS-PAGEではCTとATの分子量は28 kDaと29.5 kDaとになるが (Fig.2A)、非還元条件ではCTが29.7と31.3 kDa、ATが28.7、29.7及び31.1 kDaに分離した。 $\alpha_1$ PIの分子量は63.8~74.7 kDaであったが、CT- $\alpha_1$ PI複合体では、59.6、71.6~91.9及び91.9 kDaに、AT- $\alpha_1$ PI複合体では61.6、67.1及び78.2~91.9 kDaに分離した (Fig.2A)。さらにエピトープが同定されているmAb 009-206、CTとATの両方に反応するmAb 004-301及びmAb 009-206とはエピトープが異なるmAb 008-207の3種類を用いたWBを実施した (Fig.2 B)。するとmAb 009-206はATと $\alpha_1$ PIには反応せず、CTの29.7、31.3及び28.7 kDaに反応し、またCTを $\alpha_1$ PIに反応させたサンプルでは71.6~91.9、91.9 kDa、29.7及び31.3 kDaに反応し、59.6 kDaには反応しなかった (Fig.2 B)。一方、mAb 004-312はATとも交差反応し、ATの29.7と31.1

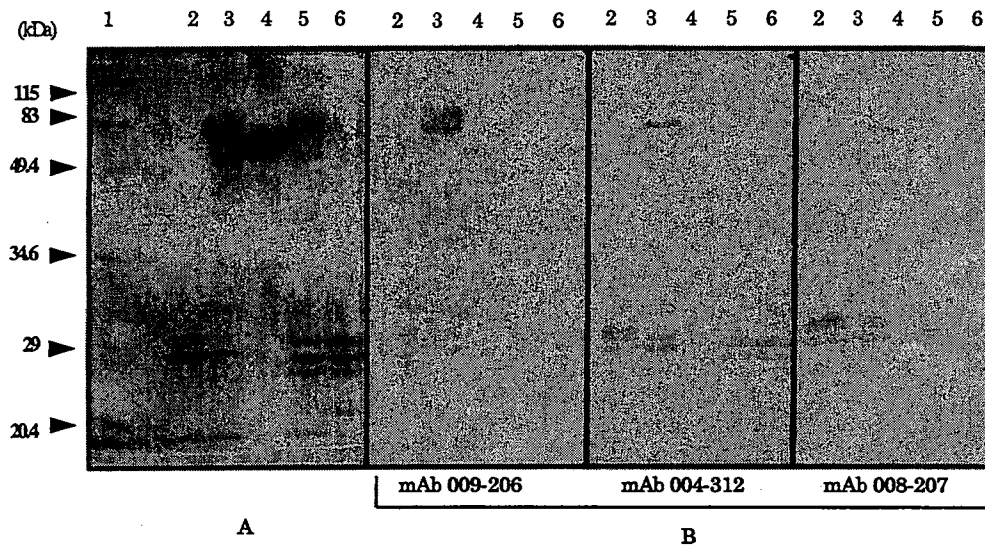


Fig.2 A. SDS-PAGE of trypsin,  $\alpha_1$  protease inhibitor and their complex. Each sample was subjected to 12% SDS-PAGE under non-reduced condition and stained with CBB R-250. B: Immunoblot analysis of anti-canine cationic trypsin monoclonal antibodies 009-206, 004-312 and 008-207. The arrows indicate the molecular weight (kDa) corresponding to standard. Lane 1, Molecular weight standards; Lane 2, Cationic trypsin; Lane 3, Cationic trypsin -  $\alpha_1$  protease inhibitor complex; Lane 4,  $\alpha_1$  protease inhibitor; Lane 5, Anionic trypsin- $\alpha_1$  protease inhibitor complex; Lane 6, Anionic trypsin.

kDa に反応したが、28.7 kDa には反応しなかった。さらに CT を  $\alpha_1$ PI に反応させたサンプルでは mAb 009-206 と同様に CT の 29.7 と 31.3 kDa に反応したが、CT- $\alpha_1$ PI 複合体では 91.9 kDa にのみ反応した。しかし AT- $\alpha_1$ PI 複合体には反応しなかった。また mAb 008-207 は CT 及び CT- $\alpha_1$ PI 複合体に対し、mAb 004-312 と全く同様の反応性を示した。

今までの成績より mAb 009-303 が CT- $\alpha_1$ PI 複合体の低分子側のバンドに反応するので、CT のアミノ酸番号 66~80 が CT- $\alpha_1$ PI 複合体に残るように一部の構造が分解されていると考えられた。この予想から切断可能なアミノ酸はアルギニンのアミノ酸番号 80、83、107 及び 157 とリジンのアミノ酸番号 97、115、147、178、208、210、216 及び 219 の C 末側であり、切断されないアミノ酸はアルギニンのアミノ酸番号 53 と 57 及びリジンのアミノ酸番号 51 と 77 の C 末側であり、この部分は  $\alpha_1$ PI で保護されていると考えられた。切断可能なアミノ酸をまとめると、アミノ酸番号 96~125、159~188 及び 223~240 の領域が mAb のエピトープ候補として考えられた (Fig 3)。さらにこの 3 領域での CT と AT のアミノ酸配列を比較し、mAb 004-312 が認識している配列はホモロジーの高いアミノ酸番号 90~105 付近と考えられた。従って AT ではこの配列部分が  $\alpha_1$ PI で保護されていると予想された。

### 3. モノクローナル抗体を用いたイヌトリプシンの定量測定系開発

MAB を用いた ELISA は最高検出感度が 0.5 ng/mL、定量測定範囲が 1~100 ng/mL であった (Fig.4)。また正常犬 6 血清測定 (n=6) の測定内間差の CV 値は 1.8~6.1%、測定間間差の CV 値は 5.1~9.8%であった。さらに正常犬 2 血清による TLI の添加回収試験は 103±9%と 102±6%で

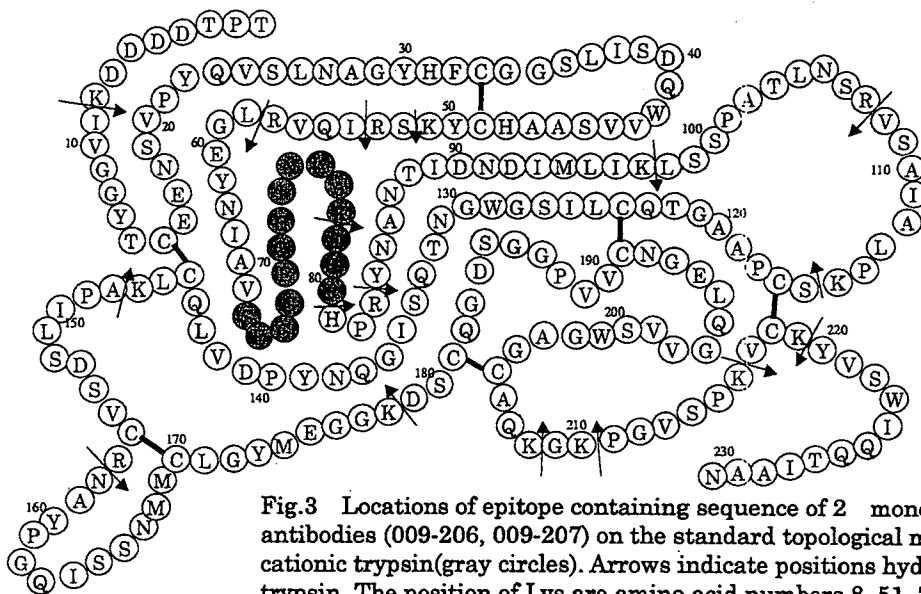


Fig.3 Locations of epitope containing sequence of 2 monoclonal antibodies (009-206, 009-207) on the standard topological model of canine cationic trypsin(gray circles). Arrows indicate positions hydrolyzed by trypsin. The position of Lys are amino acid numbers 8, 51, 77, 97, 115, 147, 178, 208, 210, 216 and 219. The positions of Arg are amino acid numbers 53, 57, 80, 83, 107 and 157. The one-letter amino acid codes are indicated.

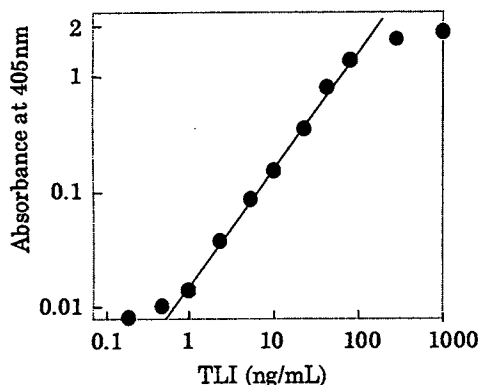


Fig.4 The standard curve for canine TLI by a one-step sandwich ELISA. Purified DFP inactivated canine cationic trypsin (TLI) was quantitated using a combination of two mAbs; mAb 008-207 for the solid phase and Fab' of mAb 009-303 for conjugation with horseradish peroxidase of the second antibody.

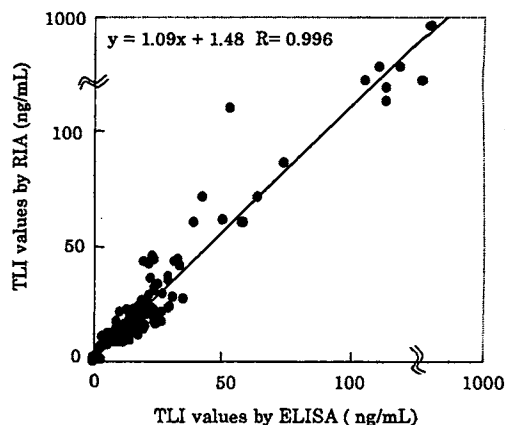


Fig.5 Correlation of values for canine TLI between ELISA and RIA. Results were obtained from 154 canine serum samples. The coefficient of correlation was 0.996.

あった。一方、今までの標準測定法である RIA と ELISA を用いた 154 検体の TLI 測定値を各々プロットしたところ、相関式が  $y=1.09x+1.48$  で相関係数が 0.996 であった (Fig.5)。

さらに得られた mAb がイヌ CT 以外のトリプシン又は CT-プロテアーゼインヒビター複合体を認識するかどうかを ELISA で検討した。するとウシトリプシンとブタトリプシンは全く測定できず、CT- $\alpha_2$  マクログロブリン複合体とイヌ AT は通常の測定範囲では測定できないので、非常に特異性が高かった。またイヌ CT- $\alpha_1$ PI 複合体はイヌ CT に対して、約 70%の回収率であった (Fig.6)。

以上の成績より感度、特異性、再現性及び RIA との相関性も良いので、ELISA を臨床応用できる測定系と判断した。また ELISA の TLI 値とは CT と CT- $\alpha_1$ PI 複合体の合計の値であった。

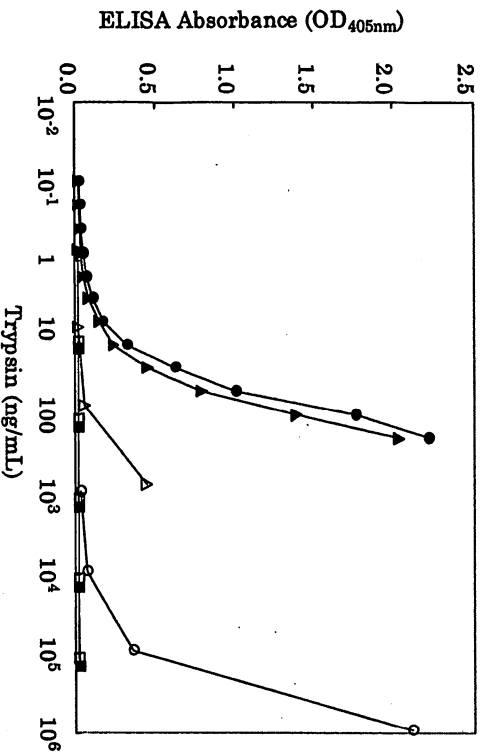


Fig.6 Cross-reactivity of monoclonal antibodies on ELISA with trypsin complex, canine cationic, canine anionic, bovine and porcine trypsin. The x-axis represents trypsin concentrations determined by the protein assay kit for sample of trypsin and trypsin complexes. ●, canine cationic trypsin; ○, canine anionic trypsin; ▲, canine cationic trypsin complexed with  $\alpha_1$  protease inhibitor; △, canine cationic trypsin complexed with  $\alpha_2$  macroglobulin; ■, bovine trypsin; □, porcine trypsin.

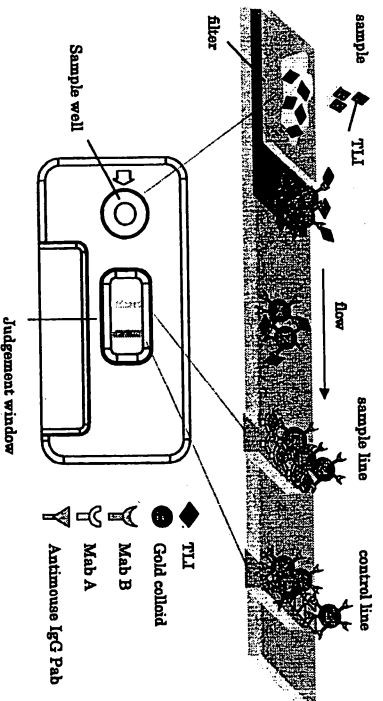


Fig.7 Scheme of EPI diagnosis kit

#### 4. 腓外分泌機能不全症定性測定系の開発

動物病院内で簡便に TLI を測定し、EPI を診断できるイムノクロマトグラフィー法による EPI 診断キットを開発した (Fig.7)。検体中に TLI が存在するとサンプルラインとコントロールラインの 2 本線が確認でき陽性と判定し、検体中に TLI が存在しないとコントロールラインのみが確認でき陰性と判定した。

EPI 診断キットの臨床上の有用性を確認するために正常犬血清 65 例、腓炎を疑うイヌ 16 例、EPI を疑うイヌ 11 例、小腸疾患を疑うイヌ 24 例及びその他の疾患を疑うイヌ 40 例の合計 156 症例を用いて、臨床診断と腓炎診断キットの判定について検討した (Fig.8)。その結果、正常犬では全てが陽性と判定でき、EPI は全て陰性と判定できたので感度は 100%であった。一方、腓炎を疑う 16 例のうち 2 例で TLI 値が低く陰性と判定でき、6 例で TLI 値が非常に高値 (50ng/mL 以上) であった。また小腸疾患を疑う 24 例中 1 例が陰性であり、4 例で TLI 値が高値であった。さらにその他の疾患を疑う 40 例のうち 1 例が陰性と判定でき、2 例で TLI が高値であった。このように EPI 診断キットは EPI 以外の疾患を疑っている症例からも EPI を検出できることが示唆された。さらに腓炎を疑う症例で TLI 値が比較的高値であり、TLI が腓炎マーカーとなりうる可能性が考えられた。

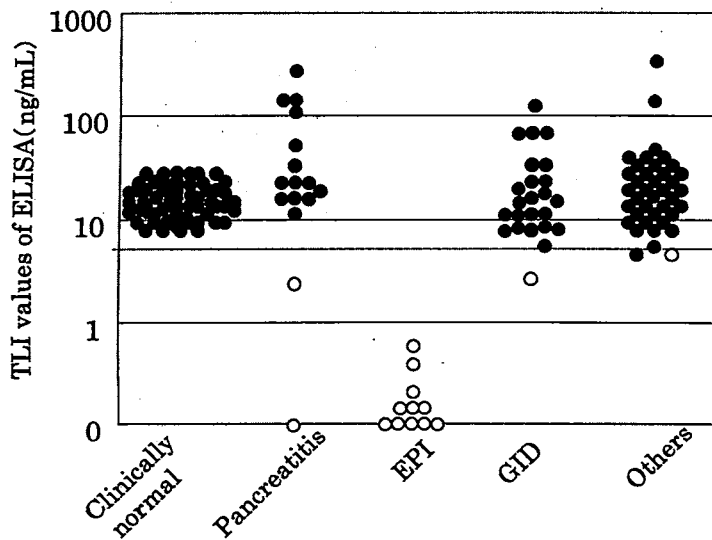


Fig.8 Serum TLI values obtained by the ELISA method from 65 clinically normal, 16 pancreatitis, 11 exocrine pancreatic insufficiency (EPI), 24 gastrointestinal disease (GID) and 40 other disease having dogs. The dashed line indicates 5 ng/mL of serum TLI as the cut off value determining a diagnosis of EPI. Negative (O) and positive (●) results from the EPI diagnosis kit were from the same samples.

### 5. 膵炎診断用半定量測定系の確立

動物病院内で簡便に TLI を測定し、膵炎を診断できるイムノクロマトグラフィー法による膵炎診断キットを開発した (Fig.9)。検体中の TLI 値が 75 ng/mL 以上であるとラインの濃さがサンプルコントロールラインよりもサンプルラインが濃くなり陽性と判定され、TLI 値が 25~75 ng/mL の場合はサンプルラインとコントロールラインの濃さは同等となり弱陽性と判定され、TLI 値が 25 ng/mL 以下であるとサンプルラインよりもコントロールラインが濃くなり陰性と判定できた。

膵炎診断キットの臨床上の有用性を確認するべく、正常犬 65 検体、膵炎を疑うイヌ 15 例、EPI を疑うイヌ 9 例、小腸疾患を疑うイヌ 19 例、肝炎を疑うイヌ 9 例及びその他の疾患を疑うイヌ 31 例の合計 148 症例を用いて臨床診断と膵炎診断キットの判定について検討した (Fig.10)。その結果、正常犬では 65 例中 57 例が陰性、8 例が弱陽性と判定でき、膵炎を疑う 15 例のうち 8 例が陰性、4 例が弱陽性、3 例が陽性と判定できた。また炎症性疾患の肝炎を疑う 9 例のうち 8 例が陰性、1 例が陽性であった。一方、消化器系疾患の EPI を疑う 9 例は陰性と判定され、小腸疾患を疑う 19 例のうち 14 例が陰性、4 例が弱陽性、1 例が陽性と判定できた。さらにその他の疾患を疑う 31 例中、21 例が陰性、7 例が弱陽性、3 例が陽性であった。このように膵炎診断キットが陽性であれば

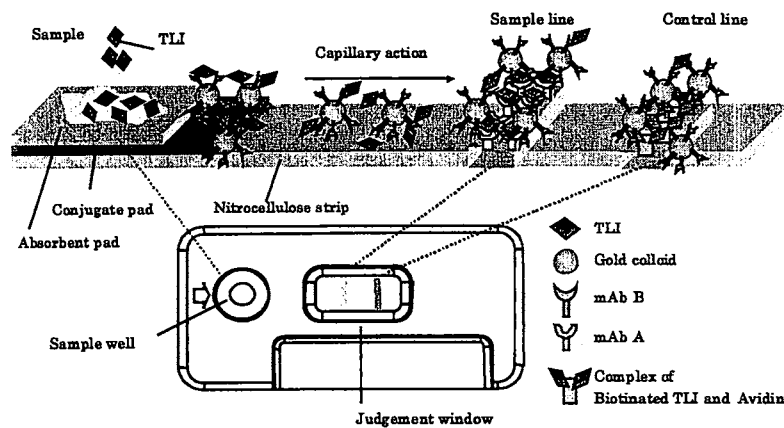


Fig.9 Scheme of pancreatitis diagnosis kit

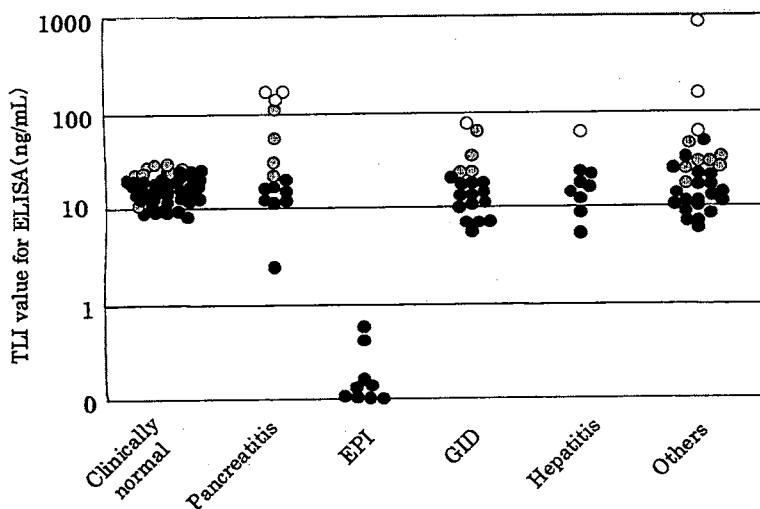


Fig.10 Serum TLI values obtained by the ELISA method from 65 clinically normal, 15 pancreatitis, 9 exocrine pancreatic insufficiency (EPI), 19 gastrointestinal disease (GID), 9 hepatitis and 31 others disease having dogs. Negative (●), plus-minus (◐) and positive (○) results from the pancreatitis diagnosis kit are from the same samples are also plotted.

TLI 値が高値のため膵炎を積極的に疑うことができ、弱陽性であっても約 20%の症例で膵炎を起こしている可能性を示唆できたので、その有用性を明らかにすることができた。

## 6. まとめ

MAB が認識している立体障害を考慮した CT のエピトープは 3 領域存在することが予想され、そのうち 1 ヶ所の抗原性が高いと考えられた。また同定できた 2 種類の mAb は同じ配列を認識しており、その部分は hydrophilic であり、helix 構造を有する抗原性の高い部分であった。

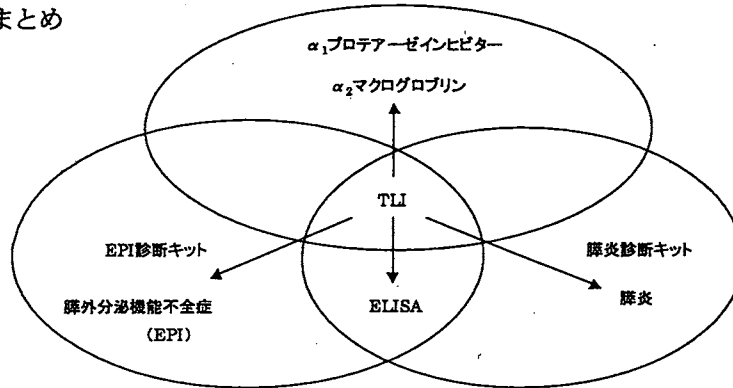
またイヌ CT と AT と共に最低 3 種類の構造異性体が存在する可能性を示唆された。しかし単に熱力学的に安定な構造が 3 種類あるのか、そのほかの原因で異性体が存在するのかは不明であった。WB で異なるエピトープを認識していると考えられた mAb を CT- $\alpha_1$ PI 複合体に反応させると認識できるバンドに差が出たので、CT- $\alpha_1$ PI 複合体形成後にエピトープ部分の脱落もしくは構造変化が起こっている可能性を示唆され、またエピトープと考えられる領域は 3~4 領域存在した。さらに CT- $\alpha_1$ PI 複合体及び AT- $\alpha_1$ PI 複合体への mAb の反応性が異なるので、 $\alpha_1$ PI への CT と AT の結合様式が異なる可能性を示唆された。

一方、臨床症例を用いた診断キットの有用性の検討では、EPI 診断キットの EPI の検出率は 100% であった。さらに EPI 以外の疾患を疑う症例からも EPI を検出できたので、消化器系疾患のスクリーニング試験として使えると考えている。また膵炎診断キットを使用すると、膵炎のみならず他の疾患を疑っていても、その中に潜んでいる膵炎を検出することができた。臨床では単一の疾患だけということは少なく、いくつかの疾患を併発している場合が多い。特に膵炎は予後不良の場合が多いので、簡便に膵炎を検出できるのは非常に有用であると考えられる。しかし膵炎で発症から数日で TLI が正常値に戻る場合があることを問題点の一つとしてとらえられている。

以上の成績から、トリプシンやトリプシン-インヒビター複合体の構造に関する知見や測定系の臨床応用について多くの情報を得ることができた (Fig.11)。今後の獣医療の発展に期待したい。



Fig.11 まとめ



1. イヌカチオニックトリプシンに対するモノクローナル抗体を開発し、一部エピトープを同定できた。
2. モノクローナル抗体を用いて、トリプシン及びトリプシン-プロテアーゼインヒビターの立体構造に関する知見を得ることができた。
3. ELISAが再現性、特異性、RIAとの相関が良いことを確認した。
4. 膵外分泌機能不全症診断キットを開発し、臨床的な有用性を確認できた。
5. 膵炎診断キットを開発し、臨床的な有用性を確認できた。

## 学位論文審査結果の要旨

論文発表後、当日審査委員間で慎重審議した。トリプシンは膵臓で産生される高特異性のタンパク質加水分解酵素であり、その変動は膵臓の状態を反映しており、疾患面からも注目される。活性型のトリプシンは酵素的に不活性なトリプシノーゲンのN末端の7アミノ酸残基が切断されて生じるが、両者はほぼ同等の免疫反応性を持つので、TLI (Trypsin-like Immunoreactivity: トリプシン様免疫反応物質) と呼ばれている。

本論文提出者は、イヌの膵臓より分子量 28kDa のカチオニック・トリプシン (CT) と、分子量 29.5kDa のアニオニック・トリプシン (AT) とを精製し、これらよりイヌ・トリプシンに対するモノクローナル抗体 (mAb) を 30 種類調製した。この内、22 種は CT のみを認識し、8 種類は CT と AT を共に認識することを、ELISA と Western blotting で確認するとともに、これら mAb のエピトープ解析並びに CT- $\alpha_1$ プロテアーゼ阻害剤 ( $\alpha_1$ PI) 複合体等に対する反応性から、mAb の結合様式を示唆した。更に、これらの mAb を用いて、動物病院内で高感度・等特異的且つ簡便に TLI を測定し、膵外分泌機能不全症 (EPI) 等を診断出来る EPI 診断キット、及び膵炎診断キットとを開発 (ともに ELISA による) し、それらの有用性を明らかにした。

本論文提出者の得た以上の結果は、ペットとして近年重要な地位を占めるイヌの膵疾患を診断する上で貴重な知見を提出するものであり、充分博士 (薬学) に値する。