

HPLC 法を用いた血清蛋白成分中の癌関連分画検討

西 出 良 一

富山医科薬科大学外科学第 1 教室

はじめに

私どもは、癌患者の糖蛋白分画中の fucose 値を、非癌疾患患者および正常人とともに分析検討し、癌患者におけるその測定値の上昇が診断、病期の進行程度、予後の評価、さらに治療効果等の判定上、有用なパラメーターになることを認め発表してきた^{1,2)}。今回の研究の目的は、高速液体クロマトグラフィー (high performance liquid chromatography, 以下 HPLC) 等による蛋白分析技術を駆使して、上記の物質中より癌関連分画を解析するとともに、その分画を採取し、その分画の特質を明らかにすると同時に、本研究の臨床応用を可能にすることにあり、各方面よりの検討を試みた。

対象および方法

A) HPLC 法による血清等の蛋白分析

I. 血清蛋白の分析

対象は悪性腫瘍患者105名 (悪性腫瘍群), 良性腫瘍患者20名, 心臓血管疾患患者28名 (以上非悪性腫瘍群), 健常者40名, あわせて193名である。悪性腫瘍群の内訳は, 肺癌73例, 胃癌15例, 乳癌 8 例, 他 9 例である。

実験方法は, 日立製の高速液体クロマトグラフィー, 波長可変 UV モニター, プロセッサーを使用し, カラムは解析至適分子量が2000~数万である TSK-gelG200sw を, 溶離液は 0.2M 磷酸緩衝液 (pH6.9) + 0.2M NaCl を用いて, 流速 0.7ml/min, 検出は UV254nm とし, 血清 5 μ l を注入した。そこで保持時間 (retention time: 以下 RT) 30分から50分までの分画を採り, 各測定値を次式を用いて換算し統計学的検討を行った。

$$RT_x/RT_{30-50} \times 100 \\ (RT_{30-50}; RT_{30} \text{ から } RT_{50} \text{ までの総和})$$

群間の平均値の差の検定は, 分散分析後, Student t-test を行った。また, 肺癌患者47例に対し CEA, TPA を, またそれらのうち30例に対しては PHA, ConA を同時に測定している。

II. 肺癌患者の気管支洗浄液中蛋白の分析

肺癌患者で片側にのみ病変を認めた10例を対象とした。気管支鏡検査による観察確認終了後に, 腫瘍が占拠する肺葉気管支, および対側気管支にそれぞれ生食水約 20ml を注入洗浄した後, 吸引回収したものを検体に供した。患側と対側との間で, 血清と同様に統計学的検討を行った。

B) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法

HPLC 測定により癌患者において有意に上昇した RT34 分画をさらに HPLC にて分抽を重ねた後, 凍結乾燥し, 蒸留水で再溶解して血清中濃度の約50倍としたものを試料とした。泳動は, 15% SDS-ポリアクリルアミドゲル(ゲルサイズ16 \times 16, 厚さ1.0 mm)を作製し, 試料 10 μ l を測定に用い, 25mA で 4 時間通電した。Merril ら³⁾の方法にしたがって銀染色を行い, 530nm と 660nm との 2 波長法により測定した。

結 果

A) HPLC 法

1. 血清蛋白の分析

各分画の分画比を検討したところ, RT34 分画に於て, 悪性腫瘍群で 8.23 ± 4.75 , 良性腫瘍患者で 2.14 ± 2.18 , 心臓血管疾患患者で 2.68 ± 2.31 , 健常者で 2.50 ± 1.36 と, 悪性腫瘍群で有意($p < 0.001$)に高値を示した。なお, 非悪性腫瘍群における良性腫瘍患者, 心臓血管疾患患者, および健常者との間に有意差は認められなかった。cut off 値6.0を設定し, 6.0以上を陽性とする, 非悪性腫瘍群および健常者での陽性率は 3.4%, 悪性腫瘍群での陽性率は70.4

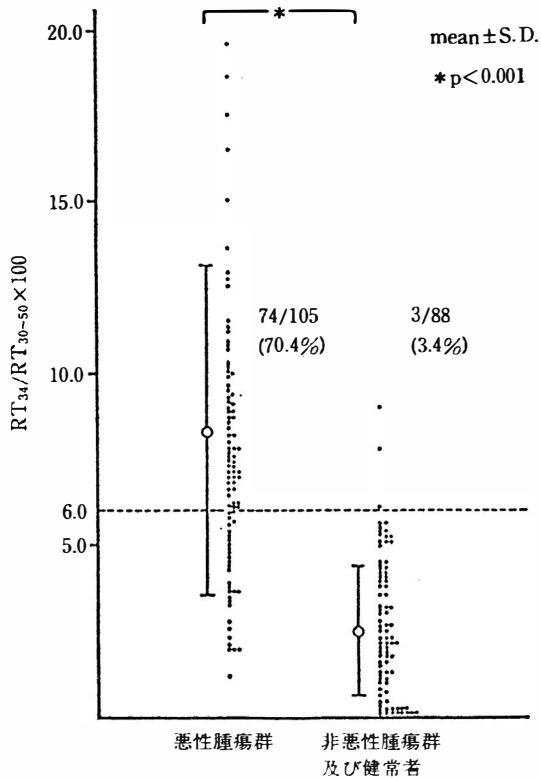


図1 悪性腫瘍群・非悪性腫瘍群のRT34分画比及び陽性率 (cut off 値: 6.0)

%となる(図1)。それらのうち、肺癌患者についてRT34分画の陽性率および分画比の値を病期別、組織型別にみると、病期の進行にともなって陽性率は上昇し、また分画比は有意差をもって上昇した。組織型別にみると扁平上皮癌、腺癌、小細胞癌の順に陽性率および分画比が高い値を示したが、それらの間に有意差は認められなかった(表1)。分子量が既知の5種類の精製標準蛋白を既掲の条件でHPLCにかけたときのRTより相関式が求められ、私どもの注目しているRT34分画の分子量を推算すると、この分画は分子量が6,000から8,000の間の物質からなっていることがわかった。

さらに悪性腫瘍患者について、それらのRT34分画比が①6以下、②6~10、③10以上の3群に分け、CEA, TPA, PHA, ConAの値を検討した。CEA, TPAの検討では、3群間において有意差は認められなかったが、PHAのSI値では①群が363.5±165.1、②群が131.9±68.5、③群が92.2±70.2の値を示し、①群に比べて②・③群が有意に低値を示し

表1 肺癌の病期別・組織別陽性率及びRT34分画比

	陽性率	RT34分画比	
stage I	9/20 (45%)	6.17±3.00	* ** ***
stage II	3/6 (50%)	6.28±2.76	
stage III	16/20 (65%)	7.84±4.64	
stage IV	21/27 (77%)	10.44±5.67	
腺癌	20/33 (60%)	8.45±2.80	
扁平上皮癌	16/22 (72%)	10.06±5.54	
小細胞癌	2/4 (50%)	8.05±0.24	

* p<0.1
** p<0.1
*** p<0.01

た(p<0.01)。ConAにしても同様の結果を得た(図2)。

II. 肺癌患者の気管支洗浄液中蛋白の分析

患側気管支と対側気管支のそれぞれとから採取した洗浄液について、血清と同様に比較検討したところ、患側気管支から採取した洗浄液のRT34分画比は6.53±4.81、対側気管支から採取したものは2.28±2.85と、患側において有意に高値を示した(p<0.05)。

B) SDS-ポリアクリルアミド電気泳動法

上記のRT34分画抽出精製し、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動法にて分析した後、銀染色を行うと、分子量1万以下の領域に銀染色により染色されるバンドが認められた。

考 察

癌患者の血清蛋白分画は、健常人の蛋白分画と異なることが注目され、Snyderら⁴⁾は、癌患者において、hemopexin, α₁ acid glycoprotein, α₁ anti-trypsinの増量を報告した。同様に、Macbeth⁵⁾, Harvey⁶⁾が、上記蛋白を含め、急性相蛋白と総称される血清糖蛋白の数種が担癌症例において上昇することを報告している。当教室においても、龍村ら²⁾が糖蛋白分画中のfucoseが担癌生体において有意

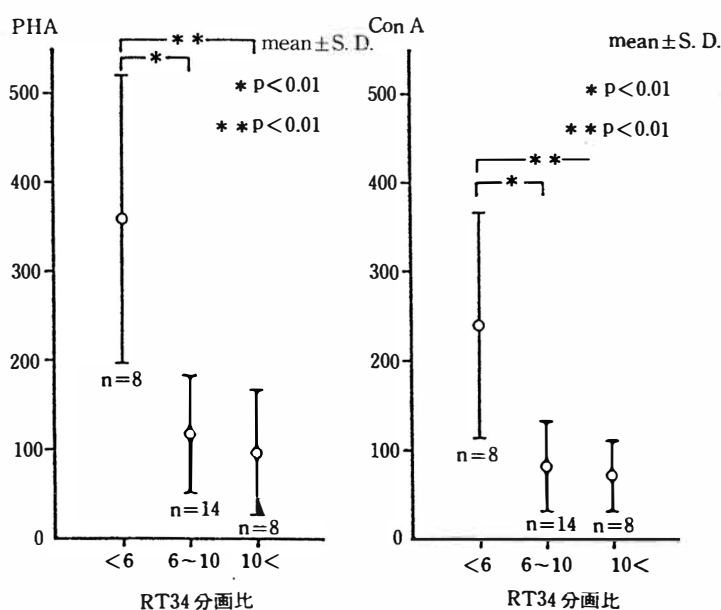


図2 RT34分画比別のPHA, Con Aの比較

に上昇することを他に先駆けて報告している。この一連の研究の継続として、さらに村上⁷⁾は癌、及び非癌者の血清蛋白分画をHPLC法(カラム TSK-gelG3000sw)をもちいて測定し、担癌患者血清中の分子量1万前後と推定される分画に興味深い結果をえた。そこで今回、TSKgelG3000swカラムよりも至適分子量が低く、村上の注目した分画のレベルに適したTSKgelG2000swカラムを用いてさらに検討した。

今回の検討では、癌患者血清中のRT34分の分画が有意に上昇し、しかも癌の進行にともなって上昇することを知り得た。また、cut off値を設定することにより、その陽性率が癌患者で有意に高いことを示した。ゆえにこのRT34分画が癌血清診断上有用なパラメーターになり得ると考えた。また、吸光度及び銀染色により高分子ポリペプチド、ないし蛋白質と考えられる本分画の分子量は6000~8000と推算された。

銀染色法は、従来より繁用されているクーマシーブリリアントブルー染色法の50~100倍の感度を有する染色法であるが、SDS-PAGEによりRT34分画は血清では捉えられず、RT34分画の抽出物でようやくバンドとして捉えることができた。これはHPLC法の検出能の優秀性を裏付けている。

ところで癌患者血清における血清蛋白の変動の機序として、松本⁸⁾は、癌細胞から放出されるhepatocyte stimulating factorにより、肝細胞における急性相蛋白の産生が増加した結果であろうと報告している。しかし、癌細胞からある種の蛋白が産生されている可能性を示す報告もある⁹⁾。実際、細胞膜糖蛋白、および糖脂質の性状は、細胞の癌化や発生・分化に伴って変化するといわれるが^{10,11)}、一般に癌化に際して、細胞膜糖蛋白の糖含量の増加、N-グリコシド型糖鎖の分岐の増大、およびO-グリコシド型糖蛋白の出現が知られている¹²⁾。

一方、最近では血清のみならず、諸他の体液、例えば肺癌患者の場合、その気管支洗浄液なども生化学的診断に利用されている。Iglehartら¹³⁾は、気管支洗浄

液中のimmunoglobulin Aが、肺癌において有意に上昇することを指摘し、肺癌の診断に有用であると報告している。また、洗浄液中のCEAに関する報告もあり¹⁴⁻¹⁶⁾、藤井らは、洗浄液中CEAの高値は肺癌組織の局所産生CEAを反映したものであり、その測定が末梢型肺癌の鑑別診断に有用であると報告している。私どもが行った気管支洗浄液中のRT34分画の検討では、患側気管支においてRT34分画比が高値を示し、このRT34分画が腫瘍細胞、もしくはその周辺より産生されている可能性が示唆された。しかしこの場合、検体の採取方法、つまり洗浄液の量、洗浄気管支の選択、患者の呼吸状態による洗浄範囲の適否、気管支内腔への腫瘍の進展の程度といった問題もあり、今後さらに検討究明すべき課題も残されている。

さらに近年、担癌患者の血清蛋白組成の変化と癌に対する免疫機構との関連も注目されてきている。従来、癌患者の血清が免疫抑制活性を示すことは知られており、こうした免疫抑制の因子として癌患者血清中に増量する或種の蛋白が考えられている。それについてCooperbandら¹⁷⁾は α -globulin中より免疫抑制因子を抽出し、immunoregulatory α -globulin (IRA)と名付け、また、宮地¹⁸⁾は担癌生体においてPHAによるリンパ球幼若化能を測定し、 α_1

acid glycoprotein, α_1 antitrypsin との間に逆相関があることを立証している。私どもの検討でも RT34 分画の上昇にともなって、PHA・ConA の細胞性免疫の指標が低下することが示され、RT34 分画が免疫抑制に関与している可能性が示唆され、この分画は急性相蛋白に類縁の性質をもつ物質であろうと考えている。しかし、このような免疫機作に関与する物質としては、RT34 分画のような低分子量のものはまだ報告されておらず、私どもが得た新しい知見の一つである。

総 括

HPLC (カラム TSKgelG2000sw) で、retention time 34 分に得られた低分子量物質(推定分子量6000~8000)は、現在までに腫瘍マーカーとして見いだされている CEA や AFP, および急性相反応蛋白と総称される血清糖蛋白とはかなり異なる新しい血清中の蛋白分画として注目すべきものと考えられる。さらに、RT34 分画は、腫瘍免疫機作にも関わりを持つ癌関連物質であることが推測され、HPLC 法によるその測定は癌血清診断上パラメーターとして有用であることが示された。今後さらに研究を継続し、この低分子量の蛋白分画の本質を明らかにしていきたい。

文 献

- 1) Lambana S. : Clinical value of protein-blood fucose in patients with carcinoma and other diseases. *Gann* **67** : 379-388, 1976.
- 2) Tatsumura T., Sato H., Komori Y., and Yamamoto K. et al. : Clinical significance of fucose level in glycoprotein fraction of serum in patients with malignant tumors. *Cancer Res.* **37** : 4101-4103, 1977.
- 3) Merrill C. R., Goldman D. and Sedman S. A. et al. : Ultrasensitive stain for protein in polyacrylamide gels show regional variation in cerebrospinal fluid proteins. *Science* **211** : 1437-1438, 1981.
- 4) Synder S. and Ashwell G. : Quantitation of specific serum glycoproteins in malignancy. *Clin. Chem. Acta.* **34** : 449-455, 1971.
- 5) Macbeth R. A. L. and Bekesi J. G. : Plasma glycoproteins in various disease states including carcinoma. *Cancer Res.* **22** : 1170-1176, 1962.
- 6) Harvey H. A., Lipton, A. and White D. et al. : Glycoproteins and human cancer. *Cancer* **47** : 324-327, 1981.
- 7) 村上 新, 龍村俊樹, 清水岑雄ほか: 担癌生体における血清蛋白分画の異同に関する研究——高速液体クロマトグラフィー(high performance liquid chromatography) を用いたヒト血清蛋白の分析とその意義——. *金大十全医誌* **96** : 575-586, 1987.
- 8) 松本雅彦, 勝沼恒彦: インターロイキン I と肝細胞刺戟因子 (HSF). *日本臨床* **45** : 1032-1039, 1987.
- 9) 吉村真一, 上山義人, 秦 順一ほか: 担癌マウス血清中に検出される人血清蛋白成分. *日癌会36回総会記* **848** : 1977.
- 10) Tatsumura T., Ariga T. and Alan C. Sartorelli et al. : Changes in glycosphingolipids accompanying the differentiation of human squamous SQCC/Y1 cells. *Cancer Res.* **48** : 2121-2124, 1988.
- 11) Hakomori S. : Glycosphingolipids in cellular interaction, differentiation and oncogenesis. *Ann. Rev. Biochem.* **50** : 733-764, 1981.
- 12) 小島清秀: がん細胞の膜生化学. *日本臨床* **43** : 794-798, 1985.
- 13) Iglehart J. D., Warzynski M. J. S. and Monteraro R. C. et al. : Function of the secretory immune system in bronchogenic carcinoma. Immunoglobulin A levels in respiratory secretions. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **82** : 63-69, 1981.
- 14) Lemarie C., Lavandier M., and Renoux M. and Renoux G. : Carcinoembryonic antigen in bronchoalveolar lavage fluid. *N. Engl. J. Med.* **303** : 586, 1980.
- 15) 白木るい子, 木下美登里, 和顔房代ほか: 肺癌

血清蛋白成分中の癌関連分画検討

- 患者における気管支肺胞洗浄液中 CEA 値の検討. 日胸疾会誌 **20**: 398-402, 1982.
- 16) 藤井昌史, 木浦勝行, 亀井治人ほか: 末梢型肺癌における気管支肺胞洗浄液中 CEA, SCC, NSE の検討. 日胸会誌 **27**: 452-455, 1989.
- 17) Cooperband S. R., Badger A. M. and Davis R.C. et al. : The effect of immunoregulatory alpha globulin (IRA) upon lymphocytes in vitro. *J. Immunol.* **109**: 154-163, 1972.
- 18) 宮地洋二: 癌手術適応決定のための免疫学的指標に関する研究. 名市大医誌 **28**: 554-584, 1977.