

原 著

高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による癌患者血清および肺癌気管支洗浄液中蛋白分画に関する臨床的研究

西出 良一*, 龍村 俊樹**, 村上 新*, 小山 信二*
富山医科薬科大学外科学第1教室*, 附属病院救急部**

HPLC quantitation of cancer specific serum fraction in malignancies and in bronchoalveolar lavage fluid of lung cancer patients

Ryoichi NISHIDE*, Toshiki TATSUMURA**, Arata MURAKAMI*, Shinji KOYAMA*

First Department of Surgery,* Faculty of Medicine, Emergency Department of University Hospital**;
Toyama Medical and Pharmaceutical University, Toyama 930-01, Japan

Key words : high performance liquid chromatography, tumor marker, lung cancer, bronchoalveolar lavage fluid, glycoprotein

要 旨

悪性腫瘍105例(肺癌73, 胃癌15, 乳癌8, ほか9), 良性腫瘍20例, 心血管疾患等28例, および健常者40例の計193例の血清を HPLC (カラム TSKgelG2000sw) を用いて分析し, retention time 34分において特徴ある低分子量物質(分子量6,000~8,000)を得た。本物質は従来腫瘍マーカーとして見出されている CEA や AFP, および急性相蛋白と総称されている血清糖蛋白とは異なる新しい物質であって, 悪性腫瘍群では, 他群, および健常者に較べて有意($p < 0.001$)に高値を示した。悪性腫瘍群での陽性率は70.4%で, とくに肺癌患者についてみた場合, 従来報告されている他の如何なる腫瘍マーカーよりも高い鑑別能を示した。これは肺癌患者の患側気管支洗浄液の HPLC 測定によっても有意性($p < 0.05$)が裏付けられた。さらに RT34 分画上昇例では PHA, Con A 等の細胞性免疫能の指標が低下していることも示され, RT34 分画は腫瘍免疫機作にも関わりをもつ癌関連物質であることが推測された。

はじめに

私どもは, さきに血中の糖蛋白分画中の fucose 値を癌, 非癌疾患患者, 及び正常人について分析検討し, その測定値の上昇が癌の診断, 病期の進行程度, さらに予後の評価, ならび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報告し

た^{1,2)}。

今回, 最近の発達した蛋白分析技術である高速液体クロマトグラフィー (high performance liquid chromatography : 以下 HPLC) を用いて, 癌患者血清蛋白分画を分析し, 癌関連分画を見いだすとともに, その分画の臨床応用を可能にすることを目的として検討を試みた。

対 象

1. 血清蛋白の分析

対象は、富山医科薬科大学第一外科において1981年5月から1989年10月の入院患者中、低栄養、肝障害、腎障害、重度炎症を認めなかった悪性腫瘍患者105例、良性腫瘍患者20例(肺8例、甲状腺5例、乳腺3例、大腸2例、肝臓1例、耳下腺1例)、心臓血管疾患患者28例(心臓弁膜疾患5例、虚血性心疾患2例、大動脈瘤11例、閉塞性動脈硬化症8例、閉塞性血栓性血管炎2例)、および対照として健康な成人40名(健常者)を選んだ(表1)。

2. 気管支洗浄液中の蛋白の分析

上記のうち、肺癌患者で片側にのみ病変を認め、検体を採取し得た10例(平均年齢61.6歳、男性7例、女性3例)を対象に行った。病期別には stage I 4例、stage II, stage III, stage IV 各2例で、組織型別では腺癌5例、扁平上皮癌3例、小細胞癌1例、腺扁平上皮癌1例であった。

方 法

1. 血清蛋白の分析

1) 採血は早朝空腹時に肘静脈より抗凝固剤を加えることなく行い、3,000回転15分間遠心後、血清を分離し、フィルター(孔径0.45 μ m)で濾過した。なお、保存を要する場合には-40°Cで凍結し、解凍後速やかに分析に供した。

血清は、低分子量物質の分離能が良く、その至適分子量が $2 \times 10^3 \sim 1 \times 10^5$ とされている TSKgelG-2000SW(7.5mm \times 600mm)(TOSO, 東京)分析用カラムを用いて、HPLC(655A-11 高速液体クロマトグラフ, 655A-21 型波長可変型 UV モニター, 655-61 プロセッサー A)(日立製作所, 東京)にて解析を行った。溶離液としては、0.2M リン酸緩衝液(pH6.9) + 0.2M NaCl を用い、流速は0.7ml/min に設定し、血清の注入量は7 μ l とし、UV モニターによる検出波長を254nm に設定して、チャートスピード5nm/min として吸光度測定を行い、プロセッサーに内蔵された積分器により、分画面積値を算出した。

TSKgelG2000SW カラムで分析したクロマトグラムは、低分子量分画に注目して行ったので、保持時

表1 HPLC 法(TSKgelG2000SW)による血清蛋白分析を行なった対象

	件数	年齢(歳, 平均)	男:女
悪性腫瘍	105	22-82(63.3)	67:38
肺 癌	73	22-82(63.6)	50:23
胃 癌	15	41-76(61.9)	11:4
乳 癌	8	52-75(61.6)	0:8
食道癌	4	58-69(65.3)	4:0
大腸癌	3	61-72(68.4)	2:1
甲状腺癌	2	50-74(62.0)	0:2
良性腫瘍	20	19-66(45.6)	12:8
心臓血管疾患	28	23-79(62.0)	20:8
健常者	40	19-62(46.8)	20:20
計	193	19-82(57.9)	119:74

間(retention time: 以下 RT) 30分から50分までの分画を統計学的検討の対象として、その測定値を次式を用いて換算し検討を行った。

$$RT_x/RT_{30-50} \times 100(\%) \quad (RT_x: RT_x \text{ 分の分画面積, } RT_{30-50}: RT_{30 \text{ から } RT_{50} \text{ 分までの分画面積の総和)})$$

群間の平均値の差の検定は、分散分析後、t 検定を行い、危険率(p)が0.05未満を有意とした。

2) 注目する分画の分子量を推測するため、分子量が既知の精製標準蛋白の RT の測定を HPLC 法にて同様に行った。用いた標準蛋白は、 γ -globulin (分子量160,000), bovine serum albumin(67,000), ovalbumin (43,000), β -lactoglobulin (36,000), myoglobin (17,000) である。

2. 気管支洗浄液中の蛋白の分析

肺癌患者の気管支鏡検査の観察終了後に、腫瘍が占拠する肺葉気管支(患側)、および対側肺の肺葉気管支(対側)へ、生食水20mlを活入洗浄した後、吸引回収したものを、1,000回転5分間遠心し、上清を分離した。その1mlを取り、Freeze Dryer Modulyo EF-4(エドワード, イギリス)にて凍結乾燥し

た後、蒸留水 200 μ l で溶解し、フィルター(孔径0.45 nm)で濾過し、そのうちの7 μ l を HPLC 法で同様に測定した。患側と対側のそれぞれより得られた気管支洗浄液中の各分画値について、血清の場合と同様にして統計学的検討を行った。なお、これらの症例については、いずれも血清蛋白分画の測定を併施して、気管支洗浄液の測定値との関係を検討した。

3. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法

癌患者血清中の HPLC 法で有意に上昇した分画 (RT34 分画) を抽出し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (以下 SDS-PAGE) を行った。

ULTRACENT-30 (TOSO, 東京) にて、分子量 3 万以上の物質を排除した血清 10ml を凍結乾燥し、蒸留水 200 μ l で溶解したものを、フィルター (孔径 0.45nm) で濾過し、そのうちの 20 μ l を同じ条件で HPLC に注入し、Fraction Collector FRAC-100 (Pharmacia, スウェーデン) にて RT34 分画の溶出した部分を抽出し、この操作を 50 回繰り返して、その抽出液を凍結乾燥した後、蒸留水 1ml で溶解して試料とした。15% SDS-ポリアクリルアミドゲル (ゲルサイズ 16 \times 16, 厚さ 1.0mm) を作製し、試料 10 μ l を測定に用い、Protean II 165-1802 (BIO-RAD, アメリカ) を用いて、25mA で 4 時間通電し泳動を行った。また、サイズ排除を行っていない全血清、および精製標準蛋白を同時に泳動した。ここで用いた標準蛋白は、bovine serum albumin (分子量 67,000), ovalbumin (43,000), chymotrypsinogen A (25,000), ribonuclease A (13,700) である。泳動後、Merril らの方法³⁾にしたがって銀染色を行い、Dual wavelength TLC Scanner CS930, Data Recorder DR-2(島津製作所, 東京)を用いて 530nm と 660nm との 2 波長法により吸光度の測定を行った。

結 果

1. 血清蛋白の分析

1) TSKgelG2000SW を用いて血清を分析したところ、図 1 の様な分画パターンを示した。検討の結果 RT30~50 分の間にみられた分画中、RT34 分の分画 (以下 RT34 分画) は、悪性腫瘍で 8.23 \pm 4.75%, 良性腫瘍で 2.14 \pm 2.18%, 心血管疾患で 2.68 \pm 2.31%, 健常者で 2.50 \pm 1.36% の分画比で、悪性腫

瘍のみが有意 ($p < 0.001$) に高値を示し (表 2), 他の分画においては、有意差は認めなかった。また RT-34 分画比は、各悪性腫瘍の間に有意差は認められなかった。

健常者について、年齢別・性別にみた RT34 分画比の検討においては、いずれも有意差は認められなかった (表 3)。

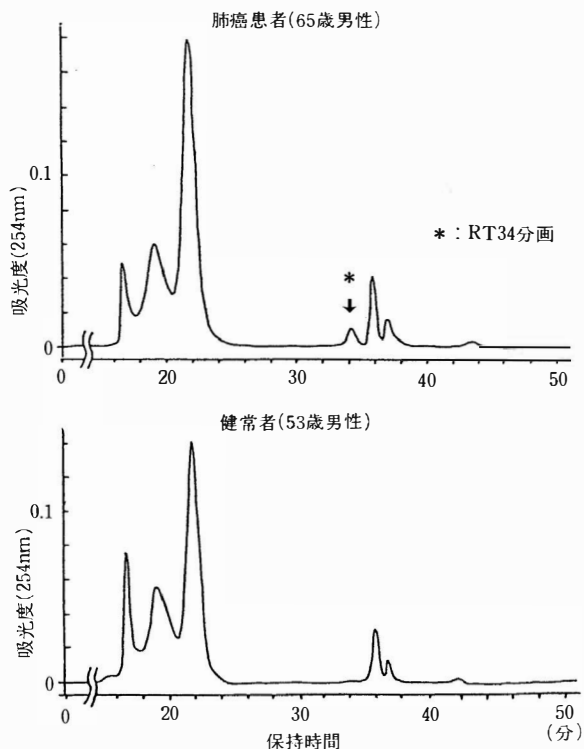


図1. HPLC(TSKgelG2000SW)による血清蛋白分画測定例

表2. 血清 RT34 分画比

	例数	RT34 分画比 (%)	
悪性腫瘍	105	8.23 \pm 4.75	* * *
肺 癌	73	8.22 \pm 4.92	
胃 癌	15	7.08 \pm 2.80	
乳 癌	8	7.06 \pm 2.18	
食道癌	4	11.37 \pm 5.10	
大腸癌	3	11.80 \pm 5.45	
甲状腺癌	2	10.26 \pm 2.37	
良性腫瘍	20	2.14 \pm 2.18]
心血管疾患	28	2.68 \pm 2.31	
健 常 者	40	2.50 \pm 1.36	

* $p < 0.001$

表3. 健常者における性別, 年齢別の血清 RT34 分画比

	例数	RT34 分画比 (%)
男性	20	2.57 ± 1.54
女性	20	2.44 ± 1.30
19-30才	13	2.31 ± 1.39
31才-50才	14	2.64 ± 1.21
51才以上	13	2.15 ± 1.39
計	40	2.50 ± 1.37

本検査における cut off 値を健常者の値の mean + 2SD より, 6.0% に設定し, 6.0% 以上を陽性とする。悪性腫瘍での陽性率は 70.5% を示すのに対して, 良性腫瘍では 10.0%, 心血管疾患では 3.6%, 健常者では 0% となり, 本分画は癌血清診断上, 有用であることが示された (図 2)。なお悪性腫瘍以外で陽性となった 3 例は, 肝血管腫, 甲状腺腺腫, 腹部大動脈瘤であった。

さらに肺癌 73 例の病期別の RT34 分画比は, stage

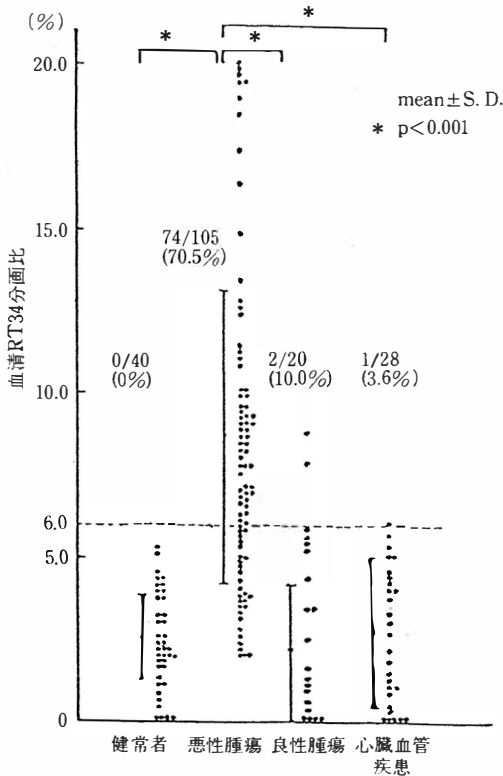


図2. 各疾患における血清 RT34 分画比と陽性率 (cut off 値: 6.0)

I が $6.17 \pm 3.00\%$, stage II が $6.28 \pm 2.76\%$, stage III が $7.84 \pm 4.64\%$, stage IV が $10.44 \pm 5.67\%$ と, 病期の進行にともなって上昇することを認めた (図 3)。また, 陽性率も, stage I は 45.0%, stage II は 50.0%, stage III は 65.0%, stage IV は 77.8% と病期の進行にともなって上昇がみられた。

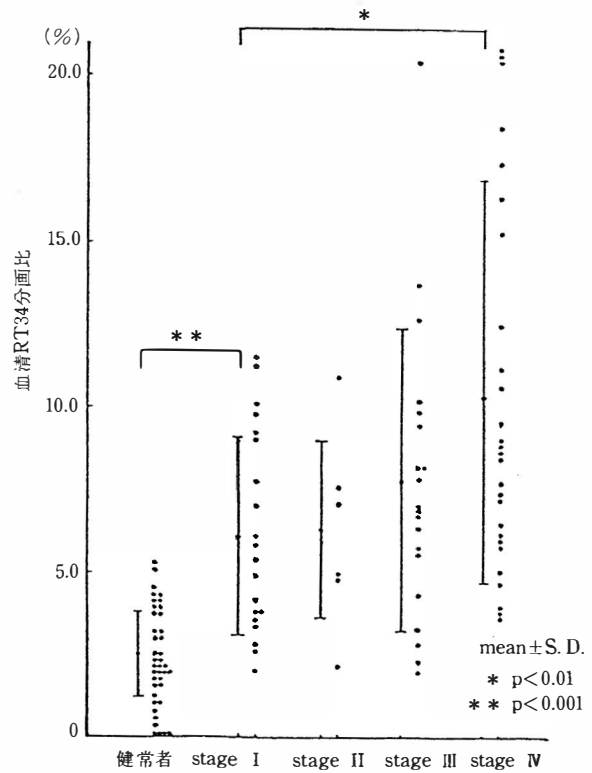


図3. 肺癌における病期別の血清 RT34 の分画比

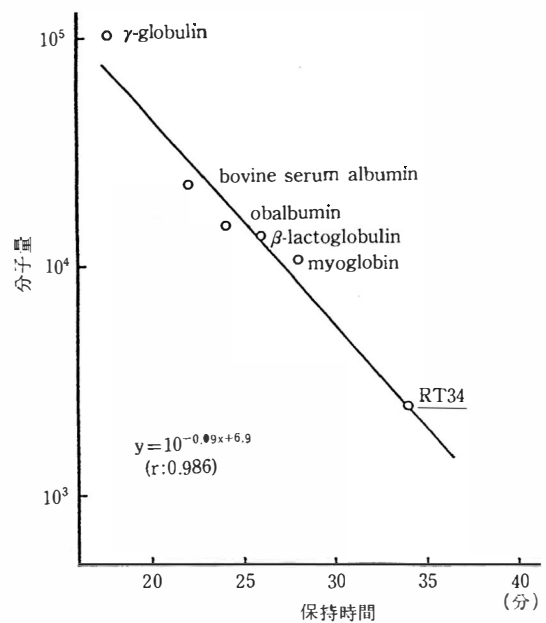


図4. 血清 RT34 分画の分子量の推定

組織型別にみると、扁平上皮癌、腺癌、小細胞癌、腺扁平上皮癌、大細胞癌の順に高い値を示したが、有意差は認められなかった(表4)。

2) TSKgelG2000SW を用いた分子量既知の5種類の精製標準蛋白の保持時間の測定により、RT34分画の分子量の推定を行った。片対数グラフでそれら標準蛋白の分子量をY軸、保持時間をX軸にとって相関を見ると、一次相関を示すことが明かにされ(図4)、分子量(y)と保持時間(x)とは

$$y = 10^{-0.09x+6.9}$$

の相関式で表わされる(相関係数 = r: 0.986)。そこ

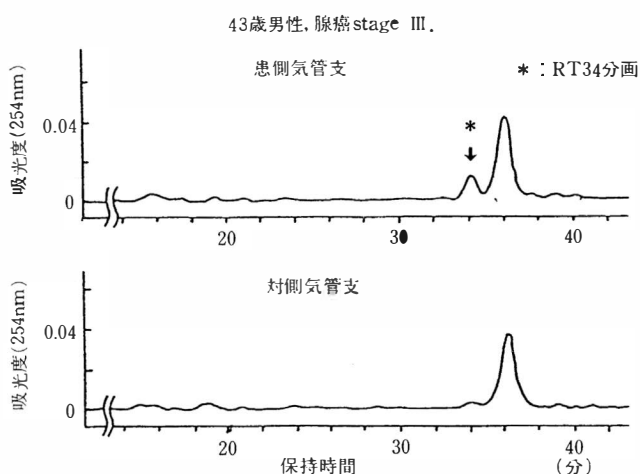


図5. HPLC(TSKgelG2000SWによる肺癌患者の気管支洗浄液中の蛋白分画測定例

表4. 肺癌の病期別、組織型別陽性率および血清 RT34 分画比

	陽性率(%)	RT34分画比(%)
stage I	9/20(45.0)	6.17±3.00
stage II	3/6(50.0)	6.28±2.76
stage III	13/20(65.0)	7.84±4.64
stage IV	21/27(77.8)	10.44±5.67
腺癌	20/33(60.6)	8.45±2.80
扁平上皮癌	16/22(72.7)	10.06±5.54
小細胞癌	2/4(50.0)	8.05±0.24
腺扁平上皮癌	2/4(50.0)	6.82±1.65
大細胞癌	2/3(66.7)	6.05±1.85

*

* p<0.01

で $x = 34.0$ により分子量を推定すると、この RT34 分画は分子量が 6,900 の物質から成ることが判明した。

2. 気管支洗浄液中の蛋白分画

気管支洗浄液の HPLC 泳動パターンは、血清のものとは幾分異なり、RT において 30 分未満では、ほとんど分画を指摘できなかった。しかし、RT34 分以上においては、血清パターンと類似しており(図5)、患側気管支と対側気管支とのそれぞれ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。RT34 分画比は、患側気管支から採取したものは $6.53 \pm 4.81\%$ 、対側気管支から採取したものは $2.28 \pm 2.05\%$ と、患側において有意 ($p < 0.05$) に高値を示した。

さらに患側と対側の気管支洗浄液 RT34 分画比と血清 RT34 分画比との相関関係を検討した結果、患側の RT34 分画比において相関係数 0.74 で有意 ($p < 0.05$) の相関を示した(図6)。

3. SDS-ポリアクリルアミド電気泳動法

血清より HPLC で分離し抽出した RT34 分画を SDS-PAGE で泳動した後、銀染色を行ったところ、図のように分子量 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(図7)。

考 察

癌患者の血清蛋白分画は、健常者の蛋白分画と異なることが注目され、Snyder⁴⁾は、癌患者において、hemopexin, α_1 -acid glycoprotein, ceruloplasmin, α_1 -antitrypsin の増量を報告した。さらに、癌患者のスクリーニング、予後推定に血清糖蛋白値の測定が有用であるとしている報告も多い^{5,6)}。当教室においても、Tatsumura ら^{1,2)}が糖蛋白分画中の fucose 値が担癌生体において有意に上昇することを他に先駆けて報告している。さらに村上ら⁷⁾は、癌及び非癌者の血清蛋白分画を HPLC 法(カラム TSKgelG3000SW を用いて測定し、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。そこで今回は、TSKgelG3000SW カラムよりも至適分子量が低く、注目する分画の分子量レベルに適した、TSKgelG2000SW カラムを用いてさらに検討を行った。

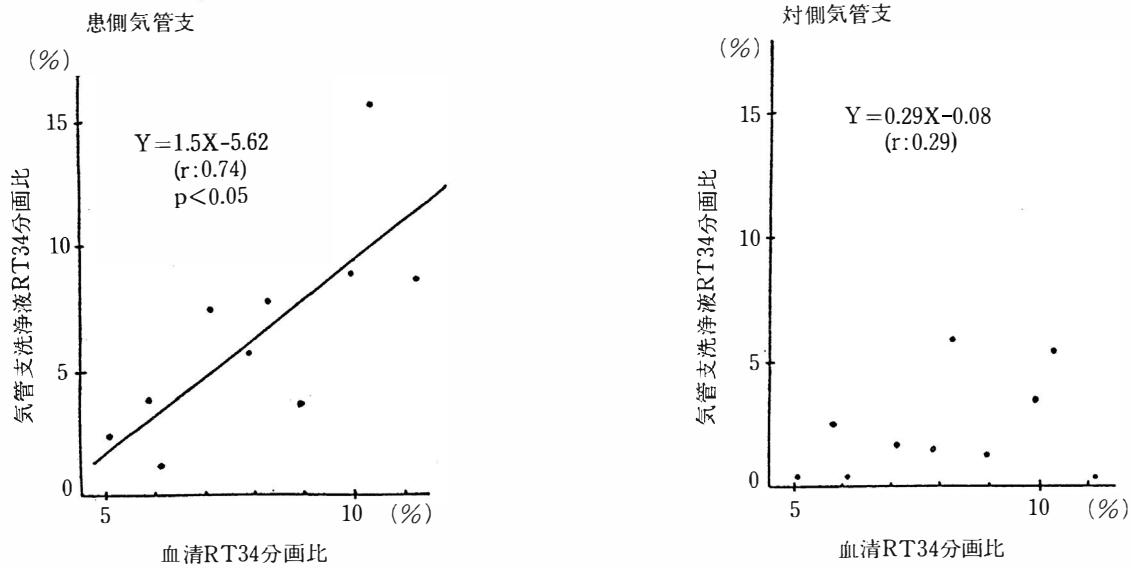


図6. 肺癌患者における血清 RT34 分画比と気管支洗浄液 RT34 分画比との相関

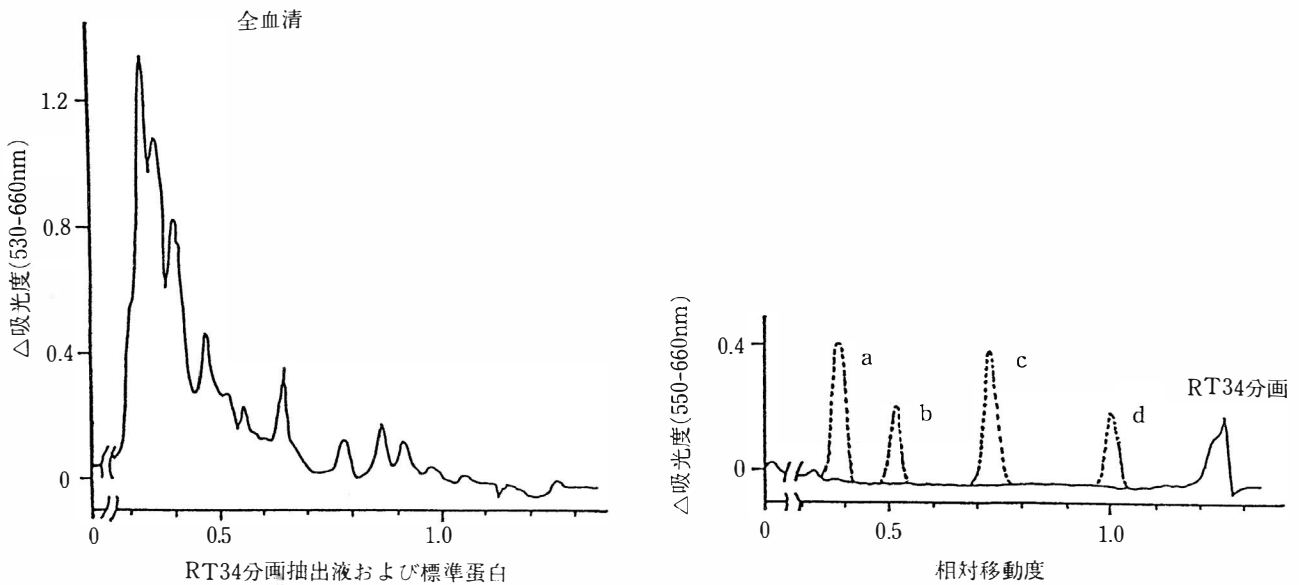


図7. SDS-ポリアクリルアミド電気泳動法(銀染色)による全血清, RT34 分画の抽出液, および標準蛋白の分画パターン
 a: bovine serum albumin (分子量67,000), b: ovalbumin (43,000),
 c: chymotrypsinogen A (25,000), d: ribonuclease A (13,700).

癌患者血清における血清蛋白の変動の機序としては、①癌細胞由来の刺激により、主として肝での蛋白の産生が促進され血中へ流出する、②癌細胞の増殖によるその産生蛋白が血中へ流出する、③腫瘍組織の崩壊、④腫瘍発育に伴う周囲結合組織成分の破壊などがあげられている。現在のところ、①の説を支持するものが多い。しかし、実際、細胞膜糖蛋

白、および糖脂質の性状は細胞の癌化に伴って変化することが知られており^{8,9)}、また、細胞培養の発達とともに、癌細胞から種々の蛋白が産生されていることが明らかになってきた。腫瘍細胞の産生する諸物質の中から、ペプチド性で細胞の増殖促進に働く因子として種々の transforming growth factor (TGF) が分離されている。TGF は正常線維芽細胞

に腫瘍細胞の増殖特性を発現させる活性を持ち、腫瘍細胞自身の増殖に関与している可能性も持っている。TGF が、担癌ヌードマウスおよび癌患者の尿中に特異的に排出されることから、腫瘍マーカーとなりうる可能性もあるとされ¹⁰⁾、またその分子量は、約 6,000 のものから 55,000 のものまで報告されている。TGF をはじめいくつかの growth factor が、今回我々が測定の対象とした分子量範囲内に含まれており、RT34 分画との関連が興味深いところである。

一方、最近では血清のみならず、他の体液、例えば肺癌患者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¹¹⁾ 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、藤井ら¹²⁾ は、肺癌患者の気管支洗浄液中の 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。我々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、さらに患側気管支洗浄液の RT34 分画比が血清 RT34 分画比と相関を示した。したがって、RT34 分画が腫瘍細胞、もしくはその周辺から産生あるいは流出している可能性が示唆された。しかし、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、今後なお検討究明すべき課題も残されている。

さらに、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。癌患者血清中に増量する或種の蛋白が免疫抑制の因子として考えられており、この面からも血清蛋白測定の意義は大きい。Cooperband ら¹³⁾ 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¹⁴⁾ は担癌生体において、PHA によるリンパ球幼若化能と PHA 皮内反応とを測定し、それらと α_1 -acid glycoprotein, α_1 -antitrypsin との間に逆相関があることを立証し、IRA に類似の免疫抑制能を血清蛋白が有していると報告している。

今回の成績では、悪性腫瘍患者血清中の RT34 分

画比が良性腫瘍、心臓血管疾患、および健常者に比べて有意 ($p < 0.001$) に上昇することを認め、また各悪性腫瘍の間に有意差の無いことから、RT34 分画は非臓器特異的癌関連物質であることが推測された。さらに cut off 値を設定することにより、その陽性率が悪性腫瘍で明らかに高いことが示され、肺癌における検討でも癌の進行にともなう RT34 分画比および陽性率の上昇が認められ、HPLC による RT34 分画測定が癌血清診断において有用なパラメーターとなることが示された。

RT34 分画の分子量は 6,900 と推測されるが、これは過去報告されている腫瘍マーカーや糖蛋白に比べてかなり低分子量であり、我々の得た新しい知見と考えている。今後さらに研究を継続し、growth factor や免疫機構などの問題を含め、RT34 分画の化学的、生物学的性質についてその詳細を明らかにしてゆきたい。

結 語

1. 血清蛋白分画を HPLC 法にて分析検討した結果、血清 RT34 分画は悪性腫瘍において、良性腫瘍、心臓血管疾患、および健常者に比べて、有意に高値を示した。また、陽性率も悪性腫瘍において高値を示し、RT34 分画は癌血清診断上、有用であることが示された。
2. 肺癌について検討したところ、病期の進行にともなう血清 RT34 分画比の上昇と陽性率の上昇が認められた。組織型による差は認められなかった。
3. 肺癌患者の患側気管支と対側気管支とのそれぞれから採取した洗浄液の RT34 分画比を比較したところ、患側において有意に高値を示し、さらに患側の洗浄液 RT34 分画比は、その血清 RT34 分画比の上昇と相関を示し、RT34 分画は腫瘍細胞、あるいはその周辺から産生あるいは流出している可能性が示唆された。
4. HPLC および SDS-PAGE による精製標準蛋白との比較測定の結果、RT34 分画は分子量 6,900 の高分子ポリペプチドと推定された。

稿を終るにあたって、血清等の採取に協力下さった教室各主治医、並びに測定に多大の労を賜った大西治美、国谷佳子、伊藤博子の各技師に感謝するとともに、ご助言、ご指導を賜った矢野三郎、渡辺明治両教授に深謝する。

文 献

- 1) Lambana S. : Clinical value of protein-bound fucose in patients with carcinoma and other diseases. *Gann* **67** : 379-388, 1976.
- 2) Tatsumura T., Sato H., Komori Y., Yamamoto K., Fukatani G. and Kuno S. : 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., Sedman S. A. and Ebert M. H. : Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins. *Science* **211** : 1437-1438, 1981.
- 4) Snyder S. and Ashwell G. : Quantitation of specific serum glycoproteins in malignancy. *Clin. Chem. Acta* **34** : 449-455, 1971.
- 5) Grindulis K. A., Forster P. J. G., Hubball S. and McConkey B. : Can acute phase reactants distinguish benign and malignant disease of the upper gut? *Clin. Oncol.* **7** : 345-350, 1981.
- 6) 森田耕一郎, 小田達郎, 毛利 平 : 肺癌患者における血清糖蛋白値. *肺癌* **24** : 721-726, 1984.
- 7) 村上 新, 龍村俊樹, 清水岑雄, 森田直賢 : 担癌生体における血清蛋白分画の異同に関する研究—高性能液体クロマトグラフィー (high performance liquid chromatography) を用いた, ヒト血清蛋白の分折とその臨床的意義— *金大十全医誌* **96** : 575-586, 1987.
- 8) Tatsumura T., Ariga T., Yu R. K. and Sartorelli A. C. : Changes in glycosphingolipids accompanying the differentiation of human squamous SQCC/Y1 cells. *Cancer Res.* **48** : 2121-2124, 1988.
- 9) 古川 清, 寺山 宏 : 細胞膜の複合蛋白の構造と生物学機能. *日本臨床* **43** : 681-686, 1985.
- 10) 平井玲子, 山岡和子 : TGF (腫瘍化増殖因子). *細織培養* **13** : 150-155, 1987.
- 11) Iglehart J. D., Warzynski M. J. S., Montelaro R. C., Bolognesi D. P., Sabiston D. C. and Wolfe, W. G. : Function of the secretory immune system in bronchogenic carcinoma. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **82** : 63-69, 1981.
- 12) 藤井昌史, 木浦勝行, 亀井治人, 畝川芳彦 : 末梢肺癌における気管支肺胞洗浄液中 CEA, SCC, NSE の検討. *日胸疾会誌* **27** : 452-455, 1989.
- 13) Cooperband S. R., Badger A. M., Davis R. C., Schmid K. and Mannick J. A. : The effect of immunoregulatory α globulin (IRA) upon lymphocytes in vitro. *J. Immunol.* **109** : 154-163, 1972.
- 14) 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.