

新しい酵素法によるポリアミン測定について

第6報：血中総ポリアミン定量法の基礎的検討および
尿路性器癌患者における臨床的検討

県立岐阜病院泌尿器科（部長：酒井俊助）

小出卓也・酒井俊助

彦根市立病院泌尿器科（部長：嶋津良一）

嶋津良一

長浜赤十字病院泌尿器科（部長：鄭漢彬）

鄭漢彬

岐阜薬科大学生化学教室（主任：沢田英夫教授）

原明・沢田英夫

DETECTION OF POLYAMINES BY AN ENZYMATIC ASSAY
(6) FUNDAMENTAL AND CLINICAL STUDIES OF A SIMPLE ENZYMATIC
METHOD FOR DETERMINING TOTAL POLYAMINES IN BLOOD

Takuya KOIDE and Shunsuke SAKAI

*From the Department of Urology, Gifu Prefectural Gifu Hospital
(Chief: Dr. S. Sakai)*

Ryoichi SHIMAZU

*From the Department of Urology, Hikone Municipal Hospital
(Chief: Dr. R. Shimazu)*

Kanhin TEI

*From the Department of Urology, Nagahama Red Cross Hospital
(Chief: Dr. K. Tei)*

Akira HARA and Hideo SAWADA

*From the Department of Biochemistry, Gifu Pharmaceutical University
(Director: Prof. H. Sawada)*

A simple enzymatic method for determining total polyamines in human blood was established. Polyamines in trichloroacetic acid extract from 1 ml of blood were isolated on an anion-exchange column and measured spectrophotometrically by the end point assay using polyamine oxidase and putrescine oxidase. The recovery was as high as 98.4% and within-run precision (coefficient of variance: 1.82%), and the values obtained by this method were in fair agreement with those obtained by high performance liquid chromatography and the enzymatic differential assay methods previously reported. The polyamine levels were not changed when the blood was stored at -20°C .

Blood polyamine levels were measured in 108 patients with genitourinary cancers, 29 patients with benign prostatic hypertrophy, 18 patients with benign urological diseases and 25 normal subjects. Although polyamines were not significantly elevated in the low stage of cancer, elevation was observed at a high stage of malignancy. These results indicate that the determination of total polyamines may be useful to determine biochemically the malignancy of cancers.

Key words: Total polyamines in blood, A new enzymatic method

緒 言

核酸、蛋白合成と密接な関係を持つポリアミンは近年腫瘍マーカーとして注目されており、尿・血液など各種体液中で測定され、臨床的に検討されている¹⁾。われわれは、第1報²⁾～第5報³⁻⁶⁾において、基質特異性の異なる2種類のアミン酸化酵素を用いて、血中および尿中ポリアミンを簡便に分別定量する方法を検討し、有用であるという結論を得ている。今回その分別定量法をさらに簡便に変法させ、ポリアミンを diamine・spermidine・spermine といった分画単位でなく、一括した総ポリアミンとして測定する方法について基礎的検討を加え、未治療の尿路器癌患者における血中総ポリアミンを測定し、その臨床的意義を検討した。

測定原理および方法

A: 測定原理 (Fig. 1)

本法は、spermine・spermidine に対して基質特異性を持つポリアミンオキシダーゼと、diamine・spermidine に対して基質特異性を持つプレトシオンオキシダーゼの2種のアミン酸化酵素を用いてポリアミンを酸化し、この反応により生成される H_2O_2 を比色定量することにより、血中の総ポリアミン量を測定するものである。

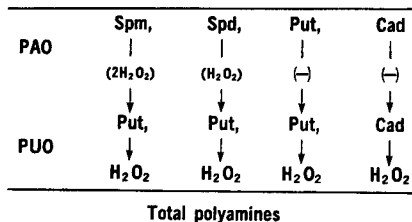


Fig. 1. Principle.

B: 測定方法 (Fig. 2)

1) 血中ポリアミンの抽出と分離

共栓付試験管に、採血時にヘパリン加した全血1 ml に10%トリクロロ酢酸1 ml を加え、試験管ミキサーにて2分間かく拌後、3,000 r.p.m. で10分間遠心分離した。遠心分離上清1 ml に0.5 M Bis-tris 溶液0.5 ml を加え中和し、この混合液を Amberlite CG-50 カラム (4×7 mm) に添加し、精製水0.5 ml にて洗浄後、吸着したポリアミンを0.5 N HCl 0.5 ml で溶出し測定用試料とした。

2) Polyamine 定量

発色液 I: 0.5 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) 10 ml に、ポリアミン酸化酵素 (PAO) 1.5 U, 4 A

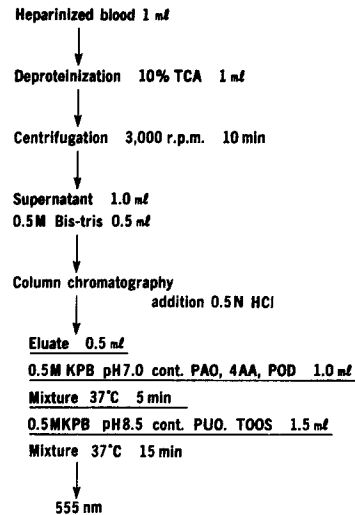


Fig. 2. Method for determination of total polyamines.

ミノアンチピリン (4AA) 1.0 mg, ペルオキシダーゼ (POD) 0.2 mg を用時溶解した。

発色液 II: 0.5 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 8.5) 15 ml に、プレトシオン酸化酵素 (PUO) および TOOS (sodium N-ethyl-N (2-hydroxy-3-sulfopropyl)-m-toluidine) 4.5 mg を用時溶解した。

反応: 測定用試料 0.5 ml に発色液 I を 1.0 ml 加え 37°C で5分間混和させた。続いて、発色液 II を 1.5 ml 加え 37°C で15分間反応させ、生成した H_2O_2 から POD によって形成されるキノン色素を 555 nm で測定した。盲検として水 0.5 ml を用いて同様に操作した。本法における血中総ポリアミン量はプレトシオンを標準ポリアミンとして求めた係数 360 を盲検試験との吸光度差に乗ずることによって算出した。

対 象

対象は主として岐阜県立岐阜病院に入院し組織学的に悪性腫瘍と診断された治療前の 108 症例である。癌の深達度は UICC 分類に従った。その内訳は、腎細胞癌18例、腎盂尿管腫瘍9例、膀胱腫瘍45例、前立腺癌26例、睾丸腫瘍10例である。なお、良性腫瘍ではあるが組織学的に前立腺肥大症と診断された29例についても検討を加えた。

一方、対照群は明らかな炎症性病変を伴わない泌尿器科的良性疾患18例および健康人25例とした。泌尿器科的良性疾患の内訳は、尿路結石症13例、遊走腎3例、神経因性膀胱2例である。

検体はヘパリン加採血後 4°C にて冷所保存し、原則として約12時間後に測定した。

成 績

1) 添加回収試験および検量線

標準液を用いた血中ポリアミンの添加回収試験の結果を Fig. 3 に示す。回収率は98.4%と良好な成績が得られた。検量線は良好な直線性が得られた。

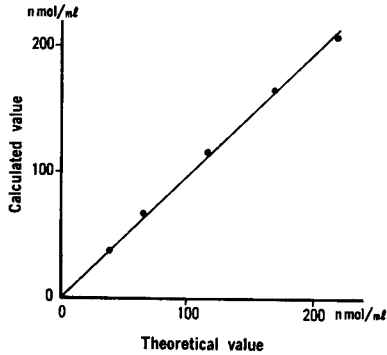


Fig. 3. Recovery of polyamine in blood.

2) 同時再現性試験

同時測定を10回全操作にわたって行なった結果、変動係数は1.82%と良好な成績が得られた。

3) HPLC との比較試験

本法と同様に調製したカラム溶出液を試料として、Table 1 に示した HPLC の条件にて測定し本法と比較した。対象は泌尿器科的疾患を有する26症例であり、両者の測定結果は Fig. 4 に示すとおりで、 $r=0.9729$, $y=0.9868x+0.7572$ という良好な相関関係が得られた。

Table 1. Conditions of HPLC.

Apparatus	: LC-6A (Shimadzu)
Column	: ISC-05/S-0504 4mmφ×5.0cm (Shimadzu)
Mobile phase	: 0.17M trisodium citrate 3.0M sodium chloride
OPT reagent	: 0.15M sodium tetraborate 0.5 g/l o-phthalaldehyde 0.5 g/l Brij 35 0.1% 2-mercaptoethanol 1.0% sodium hydroxide
Temperature	: column 70°C
Flow rate	: mobile phase 0.7 ml/min OPT reagent 1.0 ml/min
Reaction coil	: Teflon tube 0.5mmφ×300cm
Detector	: EP-210 (Japan Spectroscopic Co.) Ex=345nm Em=450nm
Integrator	: SIC 7000B (System Instruments Co.)

4) 凍結保存試験

大量検体を処理する場合、凍結保存が可能か否かは大きなポイントとなる。泌尿器科的疾患を有する15症例について、採血後 4°C にて冷所保存し約12時間後

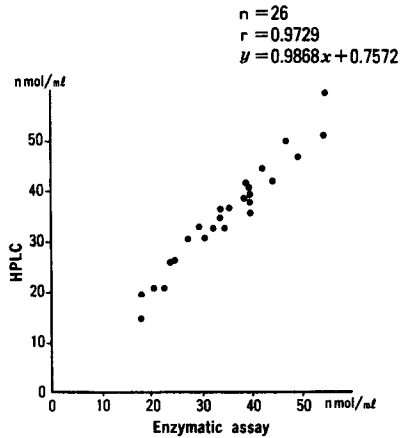


Fig. 4. Correlation between Enzymatic and HPLC assay in blood.

に測定した値と、-20°C にて72時間凍結保存後測定した値とを比較した。その結果を Fig. 5 に示すが、 $r=0.9672$, $y=0.9897x-1.6621$ と良好な相関関係が得られた。

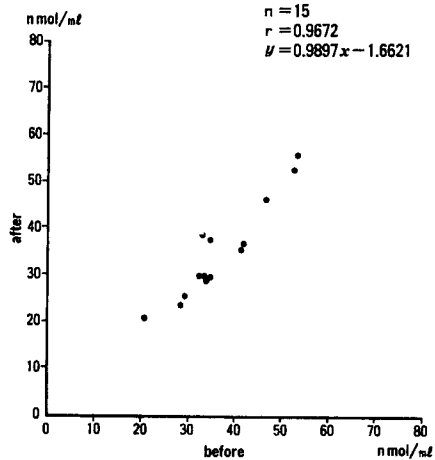


Fig. 5. Effect of freezing.

5) 分別定量法との比較

第4報で報告した分別定量法を用いて測定した diamine・spermidine・spermine の和としての総ポリアミン量と、本法で測定した総ポリアミン量とを比較した。Fig. 6 に示すとおり、 $r=0.9762$, $y=1.1304x-7.1070$ と良好な相関関係が得られた。

以上1)から5)より、本法は臨床応用が可能と考えられた。

6) 臨床的検討

血液のポリアミンは95%以上が血球成分中に含まれていると報告されている⁷⁾。われわれは第5報で示し

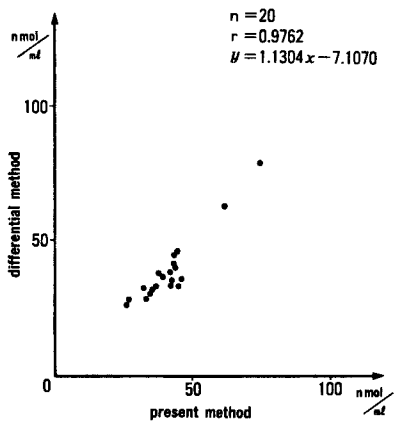


Fig. 6. Correlation between present method and differential method.

たとおり⁶⁾, 腫瘍マーカーとしての特異性を強めるために, 血球 1 ml あたりの nmol として測定値を求めた。

結果を Table 2 に示す。

健常人 25 例の平均は 38.97 ± 4.95 nmol/ml であった。前立腺肥大症 29 例のそれは 33.90 ± 7.40 nmol/ml であり, 泌尿器科的良性疾患群 18 例のそれは 38.98 ± 4.49 nmol/ml であった。

腎細胞癌 18 例の平均は 50.65 ± 21.62 nmol/ml であり, 健常人群に比し $P < 0.05$ で有意の差を認めた。深達度別に検討すると, low stage 群 9 例の平均は 45.08 ± 10.56 nmol/ml であり, high stage 群 9 例のそれは 56.22 ± 26.49 nmol/ml であった。low stage 群は健常人群に比し $P < 0.05$ で, high stage 群は

Table 2. Polyamine level of blood in urological disease. (Corrected by Ht. value)

	n	Mean \pm SD (nmol/ml)	Positive rate (%)
Normal	25	38.97 ± 4.95	0
Renal cell Ca.	18	50.65 ± 21.62	33.3
Renal pelvic & ureteral Ca.	9	42.19 ± 6.77	22.2
Bladder Ca.	45	48.18 ± 27.50	24.4
Prostatic Ca.	26	48.88 ± 24.85	34.6
Testicular Ca.	10	43.38 ± 13.69	20.0
BPH	29	33.90 ± 7.40	6.9
Urological benign disease	18	38.98 ± 4.49	0

$P < 0.01$ で有意の差を示した。

腎盂尿管腫瘍 9 例の平均は 42.19 ± 6.77 nmol/ml であり, 健常人群に比し有意の差は認めなかった。

膀胱腫瘍 45 例の平均は 48.18 ± 27.50 nmol/ml であり, 健常人群に比し有意の差を認めなかった。深達度別に検討すると, low stage 群 32 例の平均は 39.82 ± 8.53 nmol/ml であり, high stage 群 13 例のそれは 68.75 ± 44.04 nmol/ml であった。low stage 群は健常人群に比し有意の差を示さなかったが, high stage 群では $P < 0.01$ で有意の差を示した。

前立腺癌 26 例の平均は 48.88 ± 24.85 nmol/ml であり, 健常人群に比し有意の差を認めなかった。深達度別に検討すると, low stage 群 7 例の平均は $35.10 \pm$

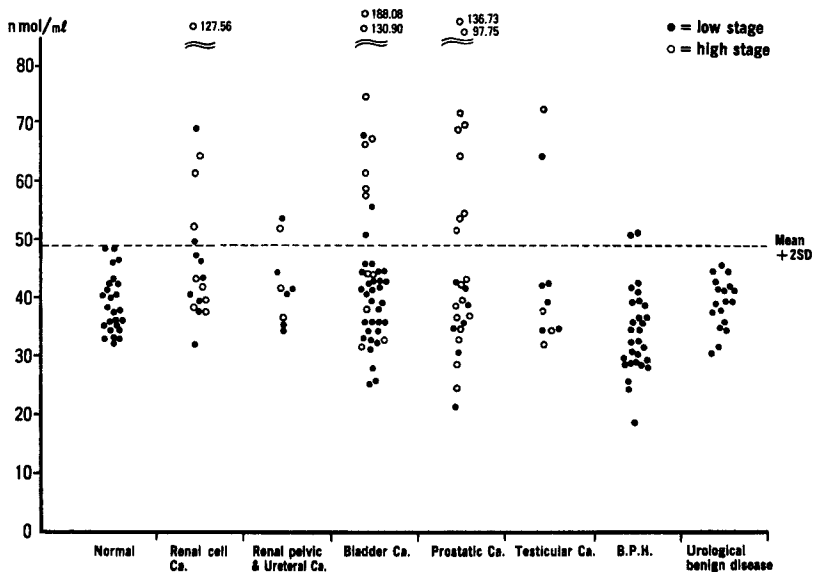


Fig. 7. Polyamine level of blood in urological disease.

7.30 nmol/ml であり, high stage 群のそれは 53.96 \pm 27.18 nmol/ml であった. low stage 群は健常人群に比し有意の差を示さなかったが, high stage 群は $P < 0.01$ で有意の差を認めた.

辜丸腫瘍 10 例の平均は 43.38 \pm 13.69 nmol/ml であり, 健常人群に比し有意の差を認めなかった.

健常人群 25 例の平均は 38.97 \pm 4.95 nmol/ml (mean \pm SD) である. mean + 2SD = 48.87 nmol/ml を越えるものを有意の高値として検討すると健常人群では 48.87 nmol/ml を越えるものは認められなかった. 泌尿器科的良性疾患群では 48.87 nmol/ml を越えるものは認められなかったが, 前立腺肥大症では 29 例中 2 例 6.9% の陽性率を示した. 腎細胞癌では 18 例中 6 例 33.3% の陽性率であり, 深達度別に検討すると low stage 群では 9 例中 2 例 22.2%, high stage 群では 9 例中 4 例 44.4% の陽性率であった. 腎盂尿管腫瘍では 9 例中 2 例 22.2% の陽性率であった. 膀胱腫瘍は 45 例中 11 例 24.4% の陽性率であった. 深達度別に検討すると low stage 群では 32 例中 3 例 9.4%, high stage 群では 13 例中 8 例 61.5% の陽性率であった. 前立腺癌は 26 例中 9 例 34.6% の陽性率であった. 深達度別に検討すると, low stage 群で 48.87 nmol/ml を越えるものは認められなかったが, high stage 群では 19 例中 9 例 47.4% の陽性率であった. 辜丸腫瘍は 10 例中 2 例 20.0% の陽性率であった. 悪性腫瘍群全体では 108 例中 30 例 27.8% の陽性率を示し, 深達度別に検討すると, low stage 群では 60 例中 7 例 11.7%, high stage 群では 48 例中 23 例 47.9% の陽性率を示した.

考 察

生体内アミンであるポリアミンは, 細胞の増殖と密接な関係を持ち, 各種の悪性疾患患者の血液・尿で増加することが知られている^{8,9}. われわれは第 5 報⁹で尿路器癌患者の血液中のポリアミンについて分別定量し, 臨床的に検討を加えた. しかし, 血中ポリアミンの分別定量法では検体としてヘパリン加血液が 5 ml と多量に必要であるという難点がある. また, 大量の検体を処理する場合に凍結保存が可能であるか否かは大きなポイントとなるが, われわれが分別定量法で検討した結果では, diamine, spermidine, spermine のそれぞれについて, 採血後 4°C にて冷所保存し約 12 時間後に測定した値と, -20°C にて 72 時間凍結保存後測定した値とを比較検討したところ良好な相関は得られなかった. 本法において血中総ポリアミン量は成績の 4) に示したとおり良好な相関が得られた. 分別定量法でも, diamine, spermidine, spermine

の和としての総ポリアミン量は凍結の前後で比較的良好な相関が得られたことから, 凍結はポリアミンの各成分構成にのみ影響を与え, 総量としてはあまり変動が無いものと思われた. しかし, 凍結とそれに続く解凍といった操作が血液中のポリアミン分画に与える影響に関しては, 解凍時の溶血の関与が推測される程度でよくわかっていない. 今回, 凍結保存が可能で, 検体の必要量が 1 ml と分別定量法の 5 分の 1 で済み, 実験操作もはるかに簡易な本法で測定される総ポリアミン量が臨床的に十分な意義を持つならばその利用価値は大きいと考え, 未治療の尿路器癌患者 108 例について検討を加えた. 健常人群の mean + 2SD を越えたものを陽性値として悪性疾患群別に検討したところ, いずれも 20.0~34.6% と特に高値を示す疾患はなく, 尿路器癌に関しては特定の癌のマーカーになりづらいと思われた.

ポリアミンの早期癌診断における意義に関しては否定的な意見が多い¹⁰. 今回も, 悪性疾患群全体の low stage 群 60 例中 7 例の 11.7% しか陽性を示さなかった. 分別定量法においてわれわれは, 血中のポリアミン分画のいずれか 1 つ以上の分画が陽性を示す場合の陽性率が早期癌の症例でも 30% 以上と高いことを認め, 癌の早期診断における可能性を予測したが, 本法は分別定量法と比較すると有用性は低いものと思われた.

癌の深達度との関係について検討してみると, いずれの悪性疾患群でも low stage 群より high stage 群の方が陽性率が高く, さらに悪性疾患群全体では, high stage 群で 47.9% と高値を示した. 血中のポリアミン値が癌の進行と相関し上昇するという報告は高見ら¹¹をはじめとしてよく見られており, Russell らは抗癌剤や放射線による治療効果の判定に有用であると述べている¹². 今後, 本法は測定・保存の簡便さから, 癌の進行度, 再発の check, 化学療法などの治療効果の指標として汎用が期待される.

結 語

1) 第 4 報において報告した新しい簡便な酵素法による血中ポリアミン分別定量法を変法し, 血中総ポリアミンの定量を行ない, その基礎的検討を加えた.

2) 添加回収試験の結果は回収率が 98.4% と良好で, 同時再現性試験も変動係数が 1.82% と良好な成績が得られた. HPLC との比較試験および分別定量法との比較試験ではともに良い相関関係が得られた. 検体の凍結保存も可能という結果も得られた.

3) 以上より本法は臨床応用可能と考えられ, 未治

療の尿路性器癌患者108例について検討を加えた。

4) 健常人25例の平均は 38.97 ± 4.95 nmol/ml であり, $\text{mean} + 2\text{SD} = 48.87$ nmol/ml を越えるものを有意の高値として検討した。

5) 尿路性器癌の早期症例では11.7%の陽性率しか示さなかった。

6) いずれの悪性疾患群でも low stage 群より high stage 群の方が陽性率が高く, さらに悪性疾患群全体の high stage 群で47.9%と高値を示すことから, 癌の進行度, 化学療法などの治療効果の指標として本法の有用性が示唆された。

最後に酵素を供与していただいた天野製薬に深謝いたします。

なお, 本論文の要旨は第74回日本泌尿器科学会総会において発表した。

文 献

- 1) Russell DH, Levy CC, Schimpff SC and Hawk IA: Urinary polyamines in cancer patients. *Cancer Res* 31: 1555~1558, 1971
- 2) 酒井俊助・伊藤康久・小出卓也・鄭 漢彬・原明・沢田英夫: 新しい酵素法によるポリアミン測定について, 第1報, 本法における尿中ポリアミン分別定量の基礎的検討. *泌尿紀要* 32: 327~336, 1986
- 3) 酒井俊助・伊藤康久・小出卓也・鄭 漢彬・原明・沢田英夫: 新しい酵素法によるポリアミン測定について, 第2報, 本法と他の尿中ポリアミン測定法の比較検討. *泌尿紀要* 32: 337~341, 1986
- 4) 酒井俊助・伊藤康久・小出卓也・鄭 漢彬・原明・沢田英夫: 新しい酵素法によるポリアミン測定について, 第3報, 尿路性器癌患者における尿中ポリアミン分別定量. *泌尿紀要* 32: 343~350, 1986
- 5) 小出卓也・酒井俊助・武田明久・土井達朗・鄭漢彬・原 明・沢田英夫: 新しい酵素法によるポリアミン測定について, 第4報, 本法における血中ポリアミン分別定量の基礎的検討. *泌尿紀要* 32: 913~917, 1986
- 6) 小出卓也・酒井俊助・篠田育男・説田 修・鄭漢彬・原 明・沢田英夫: 新しい酵素法によるポリアミン測定について, 第5報, 尿路性器癌患者における血中ポリアミン分別定量. *泌尿紀要* 32: 919~928, 1986
- 7) Saeiki Y, Uehara N and Shirakawa Sa: Sensitive fluorimetric method for the determination of putrescine, spermidine and spermine by high performance liquid chromatography and its application to human blood. *J Chromatogr* 145: 221~229, 1978
- 8) 遠藤康夫・東海林紀美・三田村圭二・鈴木 宏・織田敏次・島津久明・赤池由子・飯島啓二郎: 血中ポリアミン定量による癌診断の試み. *医学のあゆみ* 98: 485~488, 1976
- 9) 早瀬良二・米沢 優・平松祐司・江口勝人・関場香: 婦人科悪性腫瘍における赤血球, 尿中ポリアミン測定の臨床的意義. *産婦誌* 33: 107~116, 1981
- 10) 湯浅 誠・前林浩次・香川 征: 泌尿器科領域におけるポリアミン, 第1報, 尿路腫瘍における全血中ポリアミン. *日泌尿会誌* 73: 868~874, 1982
- 11) 高見 博: 外科領域における癌患者赤血球中ポリアミン. *臨床病理* 59: 151~156, 1984
- 12) Russell DH, Looney WB, Kovacs CJ, Hopkins HA, Dattilo JW and Morris HP: Changes in serum putrescine and spermidine levels following local radiation to hepatoma 3924A of the rat. *Cancer Res* 36: 420~423, 1976

(1986年12月15日迅速掲載受付)