

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

県立岐阜病院泌尿器科（部長：酒井俊助）

小 出 卓 也

酒 井 俊 助

岐阜市民病院泌尿器科（部長：土井達朗）

武 田 明 久

土 井 達 朗

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 A NEW ENZYMATIC
DIFFERENTIAL ASSAY(4) FUNDAMENTAL STUDY ON A NEW ENZYMATIC DIFFERENTIAL
ASSAY OF BLOOD

Takuya KOIDE and Shunsuke SAKAI

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

Akihisa TAKEDA and Tatsuo DOI

*From the Department of Urology, Gifu City Hospital**(Chief: Dr. T. Doi)*

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 College of Pharmacy**(Director: Prof. S. Sawada)*

The enzymatic method for isolation and determination of urinary polyamines was modified to measure the polyamines in the blood. High recovery rates of polyamine in blood by enzymatic hydrolyzation were obtained, namely, $101.9 \pm 4.4\%$ for diamine, $96.0 \pm 5.4\%$ for spermidine and $104.1 \pm 3.3\%$ for spermine. Furthermore excellent linearity was demonstrated. Within-run precision of polyamine in blood was excellent, namely, in C.V., 1.15% for Reaction 1, 2.11% for Reaction 2 and 2.79% for Reaction 3.

This method was compared with high pressure liquid chromatography (HPLC), and a close

correlation was demonstrated for all the fractions: diamine $r=0.8824$, $y=1.367x+0.0417$ ($n=15$); spermidine $r=0.9878$, $y=0.806x+5.218$ ($n=15$); spermine $r=0.9764$, $y=1.068x-0.9195$ ($n=15$).

Key words: Polyamines in blood, A new enzymatic method

緒 言

ポリアミンは生物界に広く存在する生体アミンで、核酸やタンパク質の合成や安定化、あるいは細胞の増殖や機能的分化において重要な役割を担っていることが知られている。また、1971年 Russell らが癌患者における尿中ポリアミンの増加を報告して以来、新しい腫瘍のマーカーとして注目を浴び、その臨床応用について種々の検討がなされている^{1,2)}。

血液中のポリアミンの測定については、高速液体クロマトグラフ法 (HPLC) を用いた高感度蛍光定量法³⁾、ダンシル化薄層クロマトグラフ法を用いた蛍光定量法⁴⁾、アミノ酸分析法⁵⁾などが報告されている。しかし、精度の点では優れているものの、特別な機器や測定に時間を要すると臨床応用には問題があった。われわれは尿路性器癌患者における尿中ポリアミンを、基質特異性の異なる2種類のアミン酸化酵素を用いて簡便に分別定量する方法を臨床的に検討してきた⁶⁻⁸⁾。今回、この酵素法を変法して、血中ポリアミンの分別定量に応用し、添加回収試験、同時再現性試験、HPLC との比較試験などの基礎的検討を加えたので報告する。

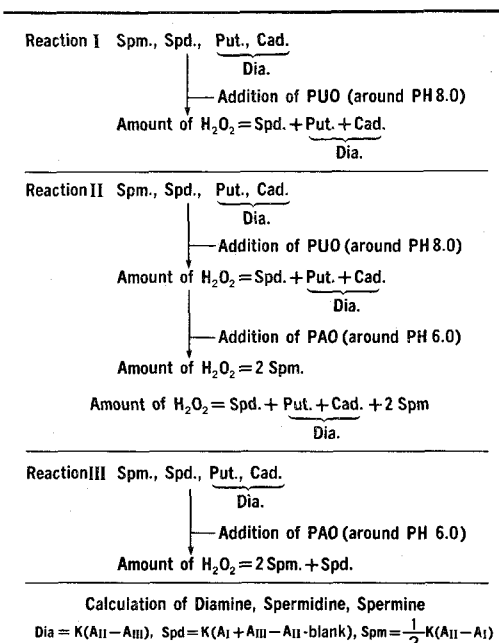


Fig. 1. Method for differential determination of diamine, spermidine and spermine

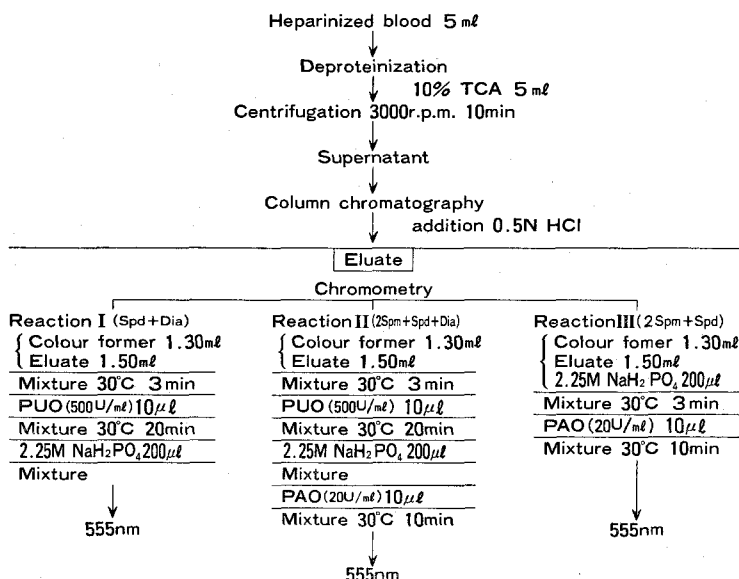


Fig. 2. Polyamine differentiation method in blood

測定方法

A：測定原理 (Fig. 1)

第1報⁶⁾にて詳説したので省略する。

B：測定方法 (Fig. 2)

1) 酵素加水分解法とカラムクロマトグラフ

共栓付試験管に、採血時にヘパリン加した全血 5 ml 及び蛋白除去剤 (10% トリクロロ酢酸) 5 ml を加え、3 分間激しくかく拌した。3,000 r.p.m. にて10分間遠心分離後、上清 5 ml を集め、0.5 M Bis-tris 溶液 3 ml を加えて混合した。この中和混合液をカラムに通し、精製水 5 ml にて洗浄後、0.5 N HCl 3 ml で溶出した。カラムは 0.8×1.1 cm の陰イオン交換樹脂を含むものを使用した。

2) Diamine, spermidine 及び spermine の分別定量

発色液：0.2 M ホウ酸ナトリウムーリン酸緩衝液 (pH 7.3) 130 ml に、4-アミノアンチピリン 10 mg 及び TOOS (N-ethyl-N (2-hydroxy-3-sulfopropyl) N toluidine sodium salt) 45 mg を用時溶解した。

酵素液：ポリアミン酸化酵素 (PAO) 20 U/ml, プトレッシン酸化酵素 (PUO) 500 U/ml を用いた。

中和剤：2.25 M リン酸ナトリウム溶液

反応：0.5 M NaOH にて中和されたカラム溶出液 1.5 ml に、発色液 1.3 ml を加え反応Ⅰ・Ⅱ・Ⅲを行なった。反応Ⅰは 30°C にて3分間 preincubation 後、PUO 500 U/ml 10 μ l を加え、30°C で20分間反応させた。中和剤 200 μ l 添加後、555 nm における吸光度 (A_I) を測定した。反応Ⅱ 30°C にて3分間 preincubation 後、PUO 500 U/ml 10 μ l を加え、30°C で20分間反応させた。中和剤 200 μ l を添加後、PAO 20 U/ml 10 μ l を加え、30°C で10分間反応し、555 nm における吸光度 (A_I) を測定した。反応Ⅲは中和剤 10 μ l を添加し、3分間 preincubation 後、20 U/ml 10 μ l を加え、30°C 10分間反応後、555 nm における吸光度 (A_{II}) を測定した。

下記の計算式にて血中の各ポリアミン量を求めた。

$$\text{diamine} = 240 \times (A_{555 \text{ II}} - A_{555 \text{ I}})$$

$$\text{spermidine} = 240 \times (A_{555 \text{ I}} + A_{555 \text{ II}} - A_{555 \text{ I}} - \text{blank})$$

$$\text{spermine} = 120 \times (A_{555 \text{ I}} - A_{555 \text{ I}})$$

Blank は反応Ⅰでカラム溶出液 1.5 ml の代りに蒸留水 1.5 ml を使用したものを用いた。検体はヘパリン加採血後冷所保存し、原則として約12時間後に測定した。

3) 高速液体クロマトグラフ法 (HPLC)

酵素法と同様に調製したカラム溶出液を試料として

Table 1. Conditions of HPLC

Apparatus	: LC-6A (Shimadzu)
Column	: ISC-05/S-0504 4mm ϕ ×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 0.5mm ϕ ×300cm
Detector	: EP-210 (Japan Spectroscopic Co.) Ex=345nm Em=450nm
Integrator	: SIC 7000B (System Instruments Co.)

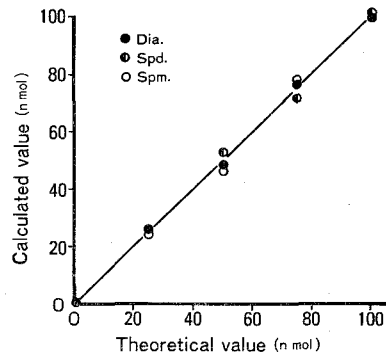


Fig. 3. Recovery of polyamine in blood

Table 1 に示した HPLC の条件にて測定した。

成 績

1) 添加回収試験及び検量線

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。diamine の回収率は $101.9 \pm 4.4\%$, spermidine のそれは $96.0 \pm 5.4\%$, spermine のそれは $104.1 \pm 3.3\%$ であり、いずれも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。

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、変動係数は反応Ⅰが1.15%, 反応Ⅱが2.11%, 反応Ⅲが2.79%と良好な成績が得られた。

3) HPLC との比較試験

本法と HPLC との比較試験における対象は泌尿器科的疾患を有する15症例である。

両者の測定結果を diamine, spermidine, spermine の別に Fig. 4 に示す。diamine における両者の間には、 $r=0.8824$, $y=1.367x+0.0417$, $n=15$, sper-

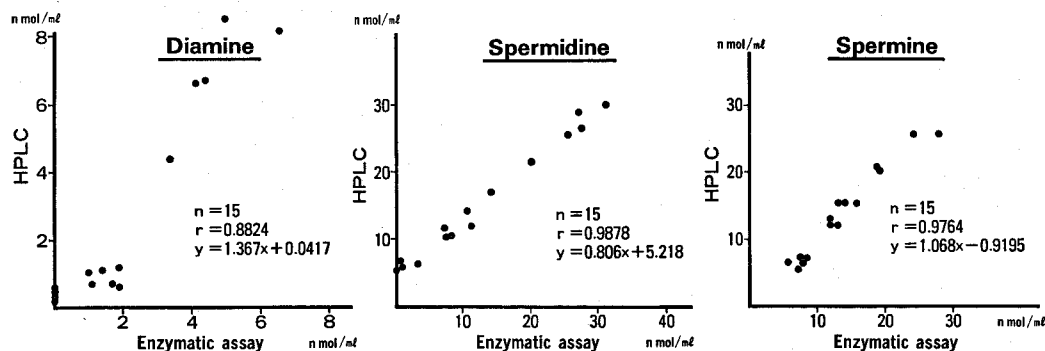


Fig. 4. Correlation between Enzymatic and HPLC assay in blood

midine における両者の間には, $r=0.9878$, $y=0.806x+5.218$, $n=15$, spermine における両者の間には, $r=0.9764$, $y=1.068x-0.9195$, $n=15$ の関係があった. diamine, spermidine, spermine のいずれも, 本法と HPLC との間には良好な相関関係が得られる.

考 察

腫瘍マーカーとして近年注目されているポリアミンは, 尿, 血液, 脳脊髄液⁹⁾, 胃液¹⁰⁾ などにおいて様々な測定が行なわれ, 臨床的に検討されている. 現在まで, 体液中のポリアミンの中で最も幅広く測定され臨床的役割を検討されてきたものは尿中ポリアミンであった. 泌尿器科領域をはじめ各種の癌患者において diamine, spermidine, spermine のうちいずれかあるいはすべての上昇が報告されている. しかし, 尿中ポリアミンが日内変動を認めることは周知のことであり, 尿定量検査ではその物質の排泄量に日内変動を認める場合には, 24時間蓄尿が原則とされる. 24時間蓄尿は入院患者では容易に採取できるが, 外来患者ではなかなか困難である. 24時間蓄尿の代りに尿中クレアチニン補正することにより随意尿での代用が可能である¹¹⁾という報告もあるが, 第1報でわれわれが検討したとおり厳密に言えば24時間蓄尿が好ましい. 腫瘍マーカーとしての汎用性などを考えた場合, 外来患者で随時測定でき, かつ患者の負担が少なく, 集団健診などへの応用も可能であるという点で血中ポリアミンの測定は非常に有用と思われ, われわれは血中ポリアミンについて検討を加えた.

現在まで, 血液中のポリアミンの分布に関しては, Cohen ら¹²⁾, Sacki ら¹³⁾ により, 95%以上が血球成分中に含まれており, その中でも赤血球内に spermidine の90%, spermine の80%が含まれると報告されている. そのため赤血球内ポリアミンについての臨

床的検討は, 前林ら¹⁴⁾ 早瀬ら¹⁵⁾ により行なわれている. しかし, 白血球内にも相当量のポリアミンが含まれているとの Cooper ら¹⁶⁾ の報告もあり, 赤血球内ポリアミンのみで血中ポリアミンを代表させるのは危険であると思われる.

本法は, 血中ポリアミンを赤血球・白血球といった分画単位でなく total として測定でき, HPLC などの従来法と比較して簡便であり, 臨床的応用の可能性が大きいと思われ, 今回その基礎的検討を行なった.

本法における血中ポリアミンの添加回収試験は, diamine, spermidine, spermine のいずれも良好な回収率を示した. 日常考えられるレベルまで直線性が得られ, 同時再現性も良好で, 臨床的に充分応用可能と思われた.

現在まで, 血中ポリアミンを測定する方法として最も有力かつ正確であるとされていた HPLC と本法との比較検討を行ない, diamine, spermidine, spermine のいずれも良好な相関関係が得られた.

以上より, 添加回収試験, 同時再現性試験, HPLC との比較試験はいずれも良好な成績を示した. 従来法と比較し, 測定に要する時間が大幅に短縮でき, 高度な機器が不要で全操作が一般の検査室レベルで可能で, 大量検体の同時処理が容易であるといった特徴をもつ本法は, 臨床的に非常に有用であると思われた.

結 語

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

2)添加回収試験の結果は, diamine $101.9 \pm 4.4\%$, spermidine $96.0 \pm 5.4\%$, spermine $104.1 \pm 3.3\%$ であり, いずれも良好な成績を示した.

3)同時再現性試験の結果は, 変動係数が反応 1 =

1. 15%, 反応Ⅱ=2. 11%, 反応Ⅲ=2. 79%と良好な成績が得られた。

4) HPLC との比較試験では, diamine, spermidine, spermine のいずれも良好な相関関係が得られた。

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35回中部連合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) Russell DH, Durie BG and Salmon SE : Polyamines as predictors of success and failure in cancer chemotherapy. *Lancet* **ii** : 797~799, 1975
- 3) 植原典美・佐伯行一・白川 茂・堂前尚親・内野治人：癌患者における赤血球ポリアミン量の検討。医学のあゆみ **107** : 23~25, 1978
- 4) 井上秀夫・竹田義朗・大工原恭：ポリアミン。生化学実験講座11—アミノ酸代謝と生体アミン(下) : 951~994, 1976
- 5) Takami H, Romsdahl MW and Nishioka K : Polyamines in bloodcells as a cancer marker. *Lancet* **ii**: 912, 1979
- 6) 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
- 7) 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
- 8) 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
- 9) Marton LJ, Heby O, Levin VA, Lubich W P, Crafts DC and Wilson CB: The relationship of polyamines in cerebrospinal fluid to the presence of central nervous system tumors. *Cancer Res* **36**: 973~977, 1976
- 10) 淵田則次・川瀬昌宏・山中勝馬・山中功二・山中純三・竹内英郎：胃液中ポリアミンの測定と臨床的意義。臨床病理 **59** : 176~184, 1984
- 11) 柳下次雄・川原昌巳・澤村良勝・松島 正・安藤弘：泌尿生殖器癌とポリアミン。臨床病理 **59** : 82~88, 1984
- 12) Cohen LF, Lundgren DW and Farrell PM: Distribution of spermidine and spermine in blood from cystic fibrosis patients and control subjects. *Blood* **48**: 469~475, 1976
- 13) Saeki R, Uehara N and Shirakawa S : Sensitive fluorimetric method for the determination of putrescine, spermidine and spermine by high-performance liquid chromatography and its application to human blood. *Journal of Chromatography* **145**: 221~229, 1978
- 14) 前林浩次・河野 明・香川 征：泌尿器科腫瘍患者の赤血球内ポリアミン。西日泌尿 **45** : 276~280, 1983
- 15) 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。日産婦誌 **33** : 107~116, 1981
- 16) Cooper KD, Shukla JB and Rennert DM : Polyamine compartmentalization in various human disease states. *Clin Chem Acta* **82** : 1~7, 1978

(1986年3月6日迅速掲載受付)