

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

岐阜県立岐阜病院泌尿器科（部長：酒井俊助）

酒井 俊助・伊藤 康久・小出 卓也

長浜赤十字病院泌尿器科（部長：鄭 漢彬）

鄭 漢 彬

岐阜薬科大学学生化学教室（主任：沢田英夫教授）

原 明・沢 田 英 夫

DETECTION OF THE URINARY POLYAMINE BY
A NEW ENZYMATIC DIFFERENTIAL ASSAY

(II) COMPARISON WITH CONVENTIONAL METHOD

Shunsuke SAKAI, Yasuhisa ITO and Takuya KOIDE

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

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. H. Sawada)*

A new method of determining urinary polyamine concentration was compared with other techniques, namely, high pressure liquid chromatography (HPLC) and a polyamine test-enzyme kit.

The values obtained by the new method, HPLC, and polyamine test-enzyme kit correlated well for all the fractions: diamine, spermidine and spermine. The correlation between the new method and the polyamine test-enzyme kit gave $r=0.9702$, $y=1.1359x+5.1266$ ($n=48$).

Key words: Urinary polyamine, A new enzymatic method

緒 言

生体内アミンの1つであるポリアミンは細胞の構成成分として広く生物界に存在し、生体内における代謝、生理作用についての研究がすすむにつれ、核酸や蛋白代謝に深く関与していることが知られるようになった。細胞増殖の活発な癌組織ではポリアミンの合成・蓄積が亢進し、組織内濃度が増加しているという報

告がみられる¹⁾。そのため、癌疾患では健常人に比し尿中ポリアミンが高値を示すなど癌の有力な腫瘍マーカーとして注目を集めている。ポリアミンは、前立腺癌に対する PAP や肝癌に対する AFP と異なり特殊な癌に対してでなく、種々の癌に対して腫瘍マーカーとなりうる点からも期待される。しかし、電気泳動法・高速液体クロマトグラフィー法やアミノ酸分析法などの従来法はいずれも手技が複雑であり、一般臨床検

査としては限界があった。

第1報²⁾にて報告した新しい酵素法は尿中ポリアミンのアセチル抱合体を acylpolyamine amidohydrolase にて遊離ポリアミンとして、基質特異性の異なる2種類のアミン酸化酵素にて簡便に分別定量でき、一般臨床検査レベルにての測定が可能である。

第1報にて新しい酵素法による基礎的検討を加えたので、今回は他の尿中ポリアミン測定法である高速液体クロマトグラフィ法やポリアミンテストエンザイムとの比較検討を行った。

研究方法および対象

尿中ポリアミン測定の比較検討は第1報にて報告した本法と高速液体クロマトグラフィ法およびポリアミンテストエンザイムである。本法の測定法は第1報にて報告したので詳細は省略するが、acylpolyamine amidohydrolase による酵素加水分解にて尿中ポリアミンのアセチル抱合体を遊離型ポリアミンとし、Diamine, Spermidine, に対して基質特異性を示すブトレッシン酸化酵素 (PUO と略) と Spermidine, Spermine に対して基質特異性を示すポリアミン酸化酵素 (PAO と略) の2種類のアミン酸化酵素にて反応させ、生成される過酸化水素を比色定量することにより Diamine, Spermidine および Spermine を分別定量する。

高速液体クロマトグラフィの測定法は尿 5 ml に 0.2 M tricine 緩衝液 (pH 7.5) 5 ml を加え、30℃にて3分間 preincubation 後、acylpolyamine amidohydrolase (1.000 U/ml) 0.1 ml を加え、30℃, 1時間酵素加水分解した。加水分解処理尿全量をカラム (0.5×1.8 cm の陰イオン交換樹脂を含む) に添加し、精製水 4 ml で洗浄後、0.5 N HCL 3 ml にて溶出した。その溶出液 10 μ l を試料として、Table 1 に示した高速液体クロマトグラフィ法の条件にて測定した。

ポリアミンテストエンザイムによる測定法も前報²⁾にて報告したので詳細は省略するが、acylpolyamine amidohydrolase による酵素加水分解にて尿中ポリアミンのアセチル抱合体を遊離型とし、ブトレッシン酸化酵素にて反応させ生成される過酸化水素を比色定量することにより Diamine と Spermidine の総量を求める。

本法と高速液体クロマトグラフィ法における対象は泌尿器科的良疾患患者 3 例、腎細胞癌患者 2 例、膀胱腫瘍患者 3 例および前立腺癌患者 2 例である。

本法とポリアミンテストエンザイムにおける対象

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.)

は健常人15例、泌尿器科的良疾患患者 4 例、腎細胞癌患者 6 例、腎盂尿管腫瘍患者 4 例、膀胱腫瘍患者 10 例および前立腺癌患者 9 例である。

なお、いずれの検体も24時間蓄尿の一部を測定日まで -20℃にて保存し測定に用いた。

成 績

a) 本法と高速液体クロマトグラフィ法の比較

両者における測定結果を Diamine, Spermidine, Spermine およびそれらのポリアミン総量別に Fig. 1 に示す。

Diamine における両者の間には $r=0.9577$, $y=1.17x-0.71$, $n=10$, Spermidine における両者の間には $r=0.9648$, $y=1.23x-0.78$, $n=10$, Spermine における両者の間には $r=0.9210$, $y=0.98x+0.03$, $n=10$ およびそれらのポリアミン総量における両者の間には $r=0.9863$, $y=1.24x-2.81$, $n=10$ の結果であった。

Diamine, Spermidine, Spermine およびそれらのポリアミン総量のいずれも本法と高速液体クロマトグラフィ法との間には良好な相関関係が認められた。

b) 本法とポリアミンテストエンザイムの比較

ポリアミンテストエンザイムにて測定される尿中ポリアミンは Diamine と Spermidine のみの総量であることより、本法では Diamine と Spermidine の和を求めて両者を比較検討した。両者における測定結果を Fig. 2 に示した。

健常人 15 例における両者の間には $r=0.9443$, $y=1.20x-0.37$, $n=15$, 泌尿器科的良疾患群 4 例における両者の間には $r=0.9416$, $y=1.03x-0.21$, $n=4$ といずれも良好な相関関係が認められた。泌尿器科領域の癌疾患別に同様の検討を加える

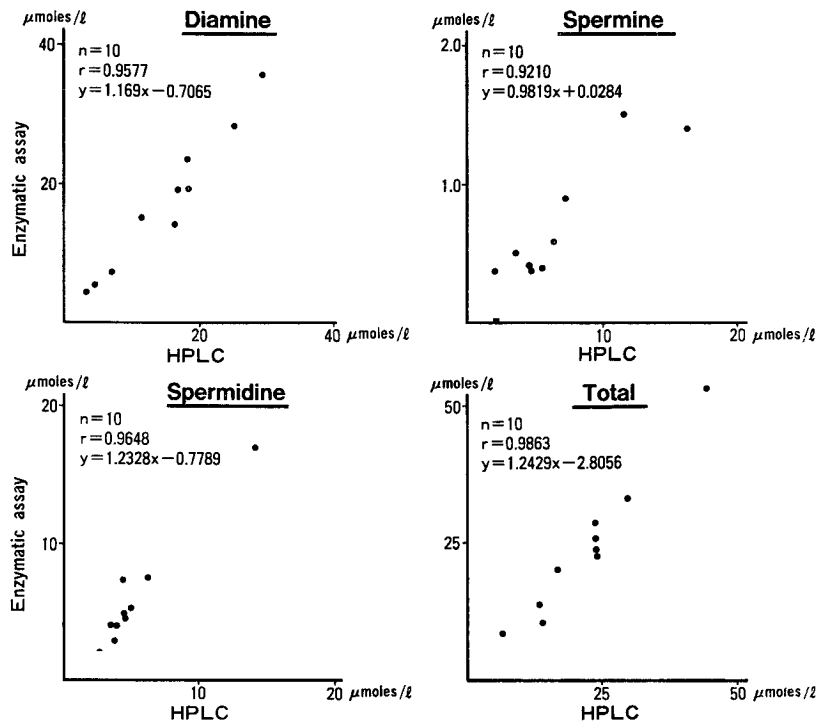


Fig. 1

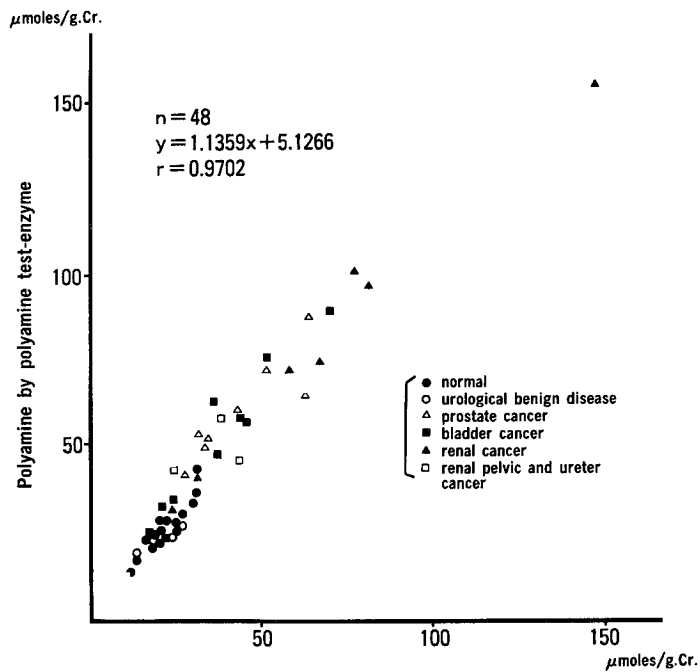


Fig. 2. Spermidine and Diamine by enzymatic assay

と、腎細胞癌6例における両者の間には $r=0.9692$, $y=0.99x+15.03$, $n=6$, 腎盂尿管腫瘍4例における両者の間には $r=0.7867$, $y=0.85x+16.59$, $n=4$, 膀胱腫瘍10例における両者の間には $r=0.9632$, $y=1.31x+2.26$, $n=10$ および前立腺癌9例における両者の間には $r=0.9074$, $y=1.03x+14.13$, $n=9$ であり、腎盂尿管腫瘍以外いずれも良好な相関関係が認められた。健康人、泌尿器科的良性疾患群および癌疾患を含めた両者の間には $r=0.9702$, $y=1.14x+5.13$, $n=48$ と良好な相関関係が認められた。

本法における健康人15例の Diamine と Spermidine の和の平均は $22.37 \pm 6.18 \mu\text{moles/g. Cr.}$, 泌尿器科的良性疾患群のそれは $20.55 \pm 5.14 \mu\text{moles/g. Cr.}$ であるのに対し、ポリアミンテストエンザイムにおける健康人および泌尿器科的良性疾患群のそれは $26.56 \pm 7.88 \mu\text{moles/g. Cr.}$ および $23.78 \pm 3.65 \mu\text{moles/g. Cr.}$ であり、いずれもポリアミンテストエンザイムの方が高値を示した。さらに、個々の症例を検討してもポリアミンテストエンザイムの方がいずれの症例も高値を示した。

癌疾患別に同様の検討を加えると、本法における腎細胞癌6例の平均は $76.84 \pm 38.13 \mu\text{moles/g. Cr.}$, 腎盂尿管腫瘍4例のそれは $31.67 \pm 10.89 \mu\text{moles/g. Cr.}$, 膀胱腫瘍10例のそれは $36.87 \pm 16.35 \mu\text{moles/g. Cr.}$ および前立腺癌9例のそれは $41.83 \pm 14.84 \mu\text{moles/g. Cr.}$ であるのに対し、ポリアミンテストエンザイムにおける腎細胞癌の平均は $90.83 \pm 38.03 \mu\text{moles/g. Cr.}$, 腎盂尿管腫瘍のそれは $43.57 \pm 11.79 \mu\text{moles/g. Cr.}$, 膀胱腫瘍のそれは $50.69 \pm 22.30 \mu\text{moles/g. Cr.}$ および前立腺癌のそれは $57.22 \pm 16.85 \mu\text{moles/g. Cr.}$ といずれの癌疾患においてポリアミンテストエンザイムの方が高値を示した。さらに、個々の症例を検討してもやはりポリアミンテストエンザイムの方がいずれの症例も高値を示した。

考 察

Russell らは濾紙電気泳動法を用いて癌疾患患者の尿中ポリアミンを測定し、健康人に比し癌患者の尿中ポリアミンが高値を示すことを報告した²⁾。尿中にはポリアミン排泄が多いためか、あまり鋭敏な方法でない濾紙電気泳動法でも測定が可能であった。その後、高速液体クロマトグラフィ法をはじめとした鋭敏な方法が開発され、尿中ポリアミンの腫瘍マーカーとしての意義が高まった。しかし、高速液体クロマトグラフィ法やガスクロマトグラフィ法は鋭敏な方法ではある

が、操作が複雑であり、特殊な器具を要し一般検査室レベルでは困難であった。さらに、尿中に排泄されるポリアミンはアセチル抱合体がほとんどのために加水分解にて遊離型ポリアミンとして測定する必要がある。従来は高温で長時間の条件を有する塩酸加水分解が用いられ、非常に複雑で危険であった。そのため、鋭敏でかつ簡便な方法が望まれ、ポリアミンに対する抗体を用いて測定するRIA法が開発されて⁴⁾きているが、抗体の特異性に問題があり現段階では鋭敏な方法とは考えにくい。

最近 久保田らにより塩酸加水分解のかわりに acylpolyamine amidohydrolase による温和な条件下で尿中アセチル抱合体を酵素加水分解し、プトレッシン酸化酵素を用いて尿中ポリアミンを測定するポリアミンテストエンザイムが開発され⁵⁾、簡便にかつ多量に検体を処理できるようになった。しかし、ポリアミンテストエンザイムは尿中におけるポリアミンの Diamine と Spermidine のみの総量を求めるものであり、ポリアミンにおける Diamine, Spermidine, Spermine の各分別を定量することができない。

本法は尿中アセチル抱合体を acylpolyamine amidohydrolase による酵素加水分解にて遊離型とし、基質特異性の異なる2種類のアミン酸化酵素を用いることにより Diamine, Spermidine, Spermine の各分別定量を簡便かつ多量に検体を処理できるようになり、一般検査室レベルにでも測定可能となった。さらに、本法は尿中におけるポリアミンばかりでなく、血液中や組織中のポリアミンの分別定量も可能である。

本法における基礎的検討は第1報にて報告したので、今回は他の尿中ポリアミン測定と比較検討した。その結果、本法と高速液体クロマトグラフィ法との比較検討では、Diamine, Spermidine, Spermine およびそれらの総量における両者の間には、いずれも良好な相関関係を認め臨床応用には十分測定可能と考えられた。

ポリアミンテストエンザイムと本法の比較検討において、両者の間には $r=0.972$, $y=1.14x+5.13$, $n=48$ と良好な相関関係を得たが、測定法が異なるためかいずれの症例もポリアミンテストエンザイムの方が高値を示した。

ポリアミンテストエンザイムは高速液体クロマトグラフィ法などの従来法に比し、①測定に要する時間を大幅に短縮できる。②測定が比色計など一般機器のみで実施でき、全操作が一般の検査室で行える。③操作に全く危険を伴わない。④大量検体の同日処理が容易である。などの特長が指摘されている⁶⁾が、本法も

手技的にほとんど大差なく尿中のポリアミンの分別定量が可能であり、さらに大きく飛躍するものと考えられる。

結 語

1) 第1報にて新しい酵素法による尿中ポリアミン測定の基礎的検討を加えた。

2) 本法と高速液体クロマトグラフィ法およびポリアミンテストエンザイムとの比較検討を加えた。

3) 本法と高速クロマトグラフィ法の比較検討において、Diamine, Spermidine, Spermine およびそれらのポリアミン総量における両者の間には、いずれも良好な相関関係が得られた。

4) 本法とポリアミンテストエンザイムの比較検討において、両者の間には $r=0.9702$, $y=1.14x+5.13$, $n=48$ と良好な相関関係を認めた。

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49回東部連合総会および第73回日本泌尿器科学会総会において発表した。

文 献

- 1) Scalabrino G and Ferioli ME : Polyamines in mammalian tumors. *Advance in Cancer Res. Part II*, Academic Press 20~56, 1982
- 2) 酒井俊助・小出卓也・伊藤康久・鄭 漢彬・出口 隆・松田聖二・加藤直樹・坂 義人・西浦常雄：ポリアミンテストエンザイムによる尿路性器癌患者における尿中ポリアミンについて。泌尿紀要 投稿中
- 3) Russell DH : Increased polyamine concentrations in the urine of human cancer patients. *Nature* 233: 144~145, 1971
- 4) Bartos D: Direct determination of polyamines in human serum by radioimmunoassay. *Cancer Res* 35: 2056~2058, 1975
- 5) 久保田俊一郎・岡田昌人・今堀和友・大沢伸昭・腫瘍マーカーとしての尿中ポリアミンの新しい簡便、迅速測定法。医学のあゆみ 124: 22~24, 1983
- 6) 亀岡秀昭・真重文子・亀井幸子・大久保昭行・山中 学：酵素法によるポリアミン測定キットの基礎検討。臨床検査 28: 215~218, 1984

(1985年11月9日迅速掲載受付)