

1. 肝臓における腫瘍マーカー

2) 肝細胞癌に特異的に出現する

 γ -GTP isoenzyme (novel γ -GTP)*

澤武 紀雄**・中源 雅俊**・尾崎 監治**

若林 時夫**・登谷 大修**

米島 学**・服部 信**

はじめに

哺乳動物の肝における γ -GTP は胎生期に高く、生後著しく低下する。¹⁾ 一方、肝細胞癌の発癌において、前癌性変化として注目されている過形成結節においてすでに強い γ -GTP 活性が現われ、癌化が進行するに従い、活性が増加することが知られている。²⁻⁷⁾ このように肝細胞癌では α -fetoprotein (AFP) と同様に癌胎児性蛋白としての性格を有する γ -GTP が産生され、これが血中に分泌されることが示唆されている。⁸⁾ 著者らはこのような点に注目した研究より、肝細胞癌患者血清に特異的に出現する γ -GTP isoenzyme (novel γ -GTP) の存在することを報告してきた。⁹⁻¹⁵⁾ ここでは、本 isoenzyme の臨床的意義とその性格について、これまでにえられた成績について言及する。

血清 γ -GTP isoenzyme の分画と特異活性帯

γ -GTP isoenzyme の分離には各種の支持体を用いた様々な方法があるが、肝細胞癌に特異的に出現する γ -GTP isoenzyme を検出するには polyacrylamide を支持体に用いる方法で行う必要がある。Disc 電気泳動法でも一応可能であるが、わずかの heterogeneity を区別せねばならず、それには密度勾配を形成した polyacrylamide gradient gel slab を用いねばならない。著者ら^{10,11)} の検出法の詳細は別に報告しているので省略するが、この方法によれば血清 γ -GTP は Fig. 1 に示すように 13 の活性帯に分画可能である。このうち ceruloplasmin 領域に泳動される第 II 分画、第 II と第 III 分画の

間で、第 III よりに検出される第 II' 分画、および第 I 分画のごく陰極よりに検出される第 I' 分画が肝細胞癌に特異的な活性帯である。著者らは、これらを前述したごとく hepatoma specific novel γ -GTP と呼称している。第 I' 分画はしばしば第 I 分画が幅広くあたかもテーリングを起こしたようにみえる場合が少なくない。このような場合には、第 I 分画が Con A に親和性があり、一方、第 I' 分画が非親和性である性質を利用し、Con A

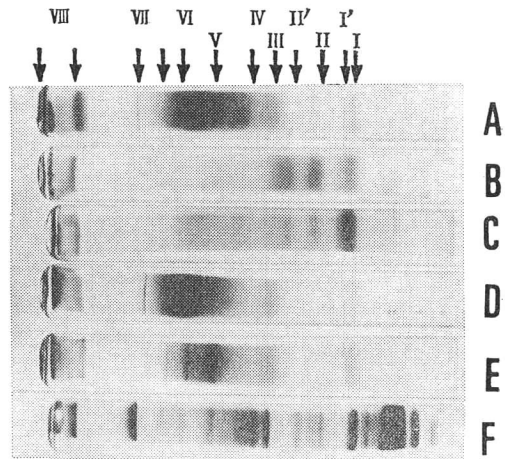


Fig. 1. A ; γ -GTP isoenzymogram of serum from alcoholic liver injury, B and C ; from hepatocellular carcinoma, D ; from obstructive jaundice due to choledocholithiasis, E ; from metastatic liver cancer, F ; normal serum protein with amidoblack.

* Clinical and experimental studies on novel γ -GTP isoenzyme which is found specifically in sera of hepatocellular carcinoma.

** Norio Sawabu, Masatoshi Nakagen, Kenji Ozaki, Tokio Wakabayashi, Daishu Toya, Manabu Yone-shima, Nobu Hattori, 金沢大学医学部第1内科学教室.

Table 1. Incidence of novel γ -GTP isoenzyme.

| Diseases | Patients | Patients with specific band | | |
|----------------------------|----------|-----------------------------|-----|----|
| | | II | II' | I' |
| Hepatocellular carcinoma | 200 | 97 | 93 | 95 |
| Cholangioma | 8 | 0 | 0 | 0 |
| Metastatic cancer of liver | 52 | 3 | 3 | 0 |
| Liver cirrhosis | 57 | 1 | 1 | 1 |
| Chronic hepatitis | 43 | 0 | 0 | 1 |
| Alcoholic liver injury | 36 | 1 | 2 | 2 |
| Subacute hepatitis | 6 | 0 | 0 | 0 |
| Acute hepatitis | 8 | 0 | 0 | 0 |
| Intrahepatic cholestasis | 16 | 0 | 0 | 0 |
| Carcinoma of biliary tract | 16 | 0 | 0 | 0 |
| Cholelithiasis | 26 | 0 | 0 | 0 |
| Carcinoma of pancreas | 11 | 0 | 0 | 0 |
| Total | 479 | 102 | 99 | 99 |

Table 2. Incidence and combination of specific bands in sera of various hepatobiliary diseases.

| Combination of bands | Number of patients with specific bands | | | | |
|----------------------------|----------------------------------------|---------------------------------|----------------------|------------------------|-----------------------------|
| | Hepatocellular carcinoma (200) | Metastatic cancer of liver (52) | Liver cirrhosis (57) | Chronic hepatitis (43) | Alcoholic liver injury (36) |
| II + II' + I' | 79 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| II + II' | 8 | 2 | 1 | 0 | 0 |
| II + I' | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| II' + I' | 4 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| II | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| II' | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| I' | 6 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Total of positive patients | 109 | 3 | 1 | 1 | 2 |

Number in parenthesis indicates total patients of each group.

添加後の血清を再泳動することによって分別が可能である。第II分画は肝細胞癌200例中97例(49%)に検出される。肝細胞癌以外では転移性肝癌の52例中2例、肝硬変57例中1例、アルコール性肝障害の36例中1例と出現頻度は低いながら、第II分画の陽性例を認めている。また、第II'および第I'分画の肝細胞癌における陽性率はそれぞれ47%、48%であり、他の疾患においても、Table 1に示すように、稀ながら陽性例がみられる。これらの活性帯のうち、少なくとも1つの活性帯が認められる場合を陽性とするれば、肝細胞癌以外では転移性肝癌

3例、肝硬変1例、慢性肝炎1例、アルコール性肝障害2例に陽性で、その出現率は279例中7例、約3%になる。ただし、肝細胞癌以外の症例は血清総 γ -GTP活性が100 mU/ml以上の高 γ -GTP血症例のみについて検討した成績であり、このような点を考慮すると肝細胞癌以外での novel γ -GTP 出現率はさらに低いといえよう。ところで、AFPは当初肝細胞癌と胎児癌に特異的とされていたが、RIA法による鋭敏な測定法の導入により特異性が問題になっている。この際AFPの400~500 ng/ml以上を陽性とするれば肝細胞癌に対する特異性

は高くなるが、それでも肝硬変や消化器癌の転移性肝癌で5%前後に陽性になる。このような事実があっても、AFPの腫瘍マーカーとしての臨床的価値は揺るぎないものである。Novel γ -GTPも肝細胞癌以外の疾患において若干の陽性例もみられるが、AFPと同様に肝細胞癌に特異的な腫瘍マーカーと考えてよからう。

Novel γ -GTP の出現と臨床的事項との関係

特異活性帯であるII, II', I'分画のうち、少なくとも1つの活性帯が出現する場合を陽性とすれば、肝細胞癌200例中109例(55%)の陽性率がえられる。さらに手技の安定した最近の100例に限ると、その陽性率は63%に達する。次に、これら活性帯の出現する組合せをみると、Table 2に示すごとく、II, II', I'がともに出現する場合は陽性例109例中79例(72%)を占め、他の組合せはさまざまで、いずれも頻度は低い。

Novel γ -GTPの出現は、血清総 γ -GTP活性値が高いものほど、より高率であることはいうまでもないが、血清総 γ -GTP活性値が80~90 mU/mlでも novel γ -GTPの陽性例がある(Fig. 2)。Novel γ -GTPが陰性で、

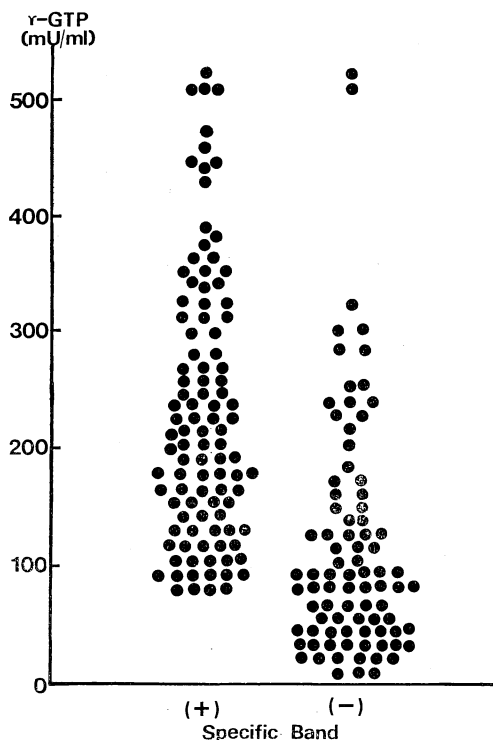


Fig. 2. Correlation with positivity of novel γ -GTP isoenzyme and serum activity of γ -GTP.

γ -GTP活性の著明に高い場合には閉塞性黄疸や肝硬変の急性増悪など、他の γ -GTPの上昇をきたすような病態を合併している場合が多い。このような病態を合併せずに γ -GTP活性の高い肝細胞癌では、殆んどの場合、novel γ -GTPが出現しているようである。肝細胞癌患者血清で γ -GTP活性が100 mU/ml以上に限ると、novel γ -GTPの陽性率は71%に達する。同じいわゆる ductal enzymeである alkaline phosphatase 活性値には novel γ -GTPの有無で明らかな差異は認められていない。

血清AFP値との関連をみると、Fig. 3に示すごとく、一般にAFP高値群で novel γ -GTPの陽性率がより高率である。しかし、AFPの肝細胞癌に対する特異性が低くなる400 ng/ml以下でも、76例中29例(38%)に陽性例が認められる。このように、AFP低値例、ときにはAFP陰性例(AFP non-producing hepatoma)の診断においても novel γ -GTPが有用である点で、本 isoenzymeの臨床的重要性があるといえる。

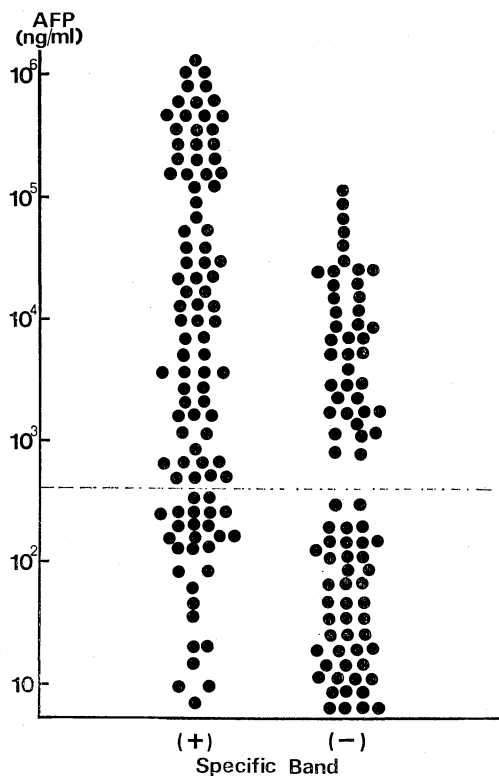


Fig. 3. Correlation with positivity of novel γ -GTP isoenzyme and serum levels of AFP. The dotted line indicates AFP levels of 400 ng/ml.

Table 3 は日本肝癌研究会で提案されている肝シンチグラムにより進行度を分類して, novel γ -GTP の出現率を検討したものである. Table 3 に示すごとく, 進行度に従い novel γ -GTP の陽性率が高くなるという関係はなく, 肝シンチグラムで欠損像のみられない stage I においても53%と, 全体の陽性率と変わらない, 高い出現率がえられている. このような傾向は AFP においても従来からいわれていることであるが, 本 isoenzyme においても, 個々の症例毎にそれを産生する性格がかなり違っているため, そのような性格の強いものは早い時期から本 isoenzyme を産生し, 一方, そうでないものはかなり進行してもほとんど産生しないのであろう. しかし, 個々の症例でみると, 腫瘍の増大とともに novel γ -GTP の産生も増加し, 血中への出現率も高くなると推測される. 事実, 著者らは癌の進展とともに本 isoenzyme が出現してくる症例を経験している. また, 術前本 isoenzyme が陽性であったが, 切除後消失した肝細胞癌を3例に経験しており, トレースマーカーとしても有用であると考えている. さらに, いわゆる細小肝癌9例中2例にも本 isoenzyme の陽性例を経験しており, 早期癌の診断法としても期待されるであろう.

Table 3. Incidence of novel γ -GTP and stage of hepatoma.

| | Stage classified by liver scanning | | | |
|----------------|------------------------------------|----|-----|----|
| | I | II | III | IV |
| Total cases | 17 | 50 | 82 | 7 |
| Positive cases | 9 | 26 | 48 | 3 |
| Incidence (%) | 53 | 52 | 59 | 43 |

肝細胞癌組織より精製した γ -GTP の性格

Novel γ -GTP の性格を解明するために肝細胞癌組織より Orłowski ら¹⁶⁾ に準じて精製した γ -GTP について言及する. 血清中に novel γ -GTP 陽性の剖検肝細胞癌組織を 80 mM MgCl₂ 溶液でホモジェネートを作り, その40,000 g, 30分間遠心後の沈渣を Triton X と DOC を含有する 0.1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) で可溶化し, 27,000 g, 30分遠心後の上清に acetone を加え, 生ずる沈殿よりエムulsionを作る. さらに, 凍結融解, 57°C熱処理, 硫酸分画を行った後, bromelain 処理してえられたものを組織抽出液とし, 次いで Ultrogel ACA-34 によるゲル濾過, DEAE-Sephacel によるイオン交換クロマトグラフィーを行って, 部分精製している. 正常ヒト肝の γ -GTP 活性は非常に低く, 精製が困難なの

で, 正常ヒト腎より同様な方法でえた γ -GTP と比較検討した成績について述べる.

Table 4 に示すごとく, 基質に対する Km 値, 至適 pH, Na⁺, K⁺, Ca⁺⁺, Mg⁺⁺, Zn⁺⁺, などの金属イオンや EDTA による影響, 耐熱性, さらには各種アミノ酸のアクセプターとしての反応などの物理化学的性質には, 肝癌 γ -GTP と腎 γ -GTP の間には明らかな差異はみられない. 一方, Ultrogel ACA-34 を用いたゲル濾過による分子量の推定値は, 肝癌 γ -GTP は92,000であるのに対し, 腎 γ -GTP は約81,000である.

Table 4. Comparison of physicochemical properties of γ -GTP from hepatocellular carcinoma (HCC) with those from normal kidney.

| | HCC | Kidney |
|-------------------------------------------|--------|--------|
| Km for γ -glutamyl-p-nitro-anilide | 1.44mM | 1.15mM |
| pH optimum | 7.9 | 7.9 |
| Molecular weight | 92,000 | 81,000 |
| Heat stability | (+) | (+) |
| Isoelectric point | 4.4 | 4.4 |
| Effect of cations (mol) | (%) | (%) |
| none | 100 | 100 |
| Mg ⁺⁺ 10 ⁻² | 103 | 106 |
| Ca ⁺⁺ 10 ⁻² | 117 | 116 |
| K ⁺ 10 ⁻¹ | 109 | 107 |
| Na ⁺ 10 ⁻² | 119 | 106 |
| Zn ⁺⁺ 10 ⁻² | 37 | 40 |
| EDTA 10 ⁻² | 79 | 90 |

血清 γ -GTP の場合と同じ方法で電気泳動すると, 腎 γ -GTP はIIに近似した部位に, 肝癌 γ -GTP はIIおよびI'の部位にやや幅広く泳動される. Con A 親和性についてみると, 症例毎にその値が多少違うが, 肝癌 γ -GTP は80~90%が Con A 吸着分画に溶出されるのに対し, 腎 γ -GTP では Con A 非吸着分画が80%余りを占め, 肝癌 γ -GTP の場合とは著しく異なっている. さらに, neuraminidase 処理後に Con A の親和性をみると, 肝癌の場合には処理前後で吸着, 非吸着分画の割合に明らかな差は認められないのに対し, 腎 γ -GTP では neuraminidase 処理により, 大部分が Con A 吸着分画に溶出されるようになる. Fig. 4 は肝癌と腎 γ -GTP を Con A 吸着と非吸着分画に分けて電気泳動したものである. 肝癌の Con A 吸着分画はIの部位に泳動されるのに対し, Con A 非吸着分画はそのやや陰極よりのI'の部位に泳動され, 両者は泳動上明かに区別される. 一方, 腎 γ -GTP においては Con A 吸着, 非吸着分画の

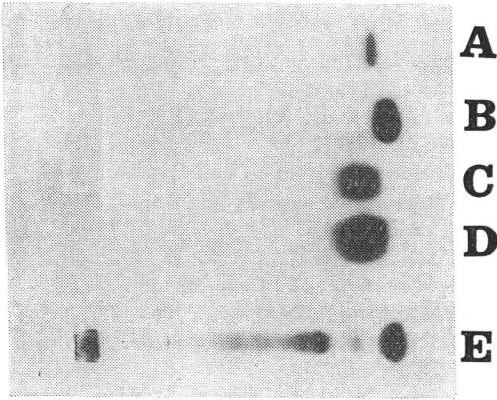


Fig. 4. γ -GTP isoenzymogram.

A and B; Con A-unbound and bound fractions of γ -GTP purified from hepatocellular carcinoma, C and D; Con A-unbound and bound fractions of γ -GTP purified from normal kidney, E; serum of hepatocellular carcinoma.

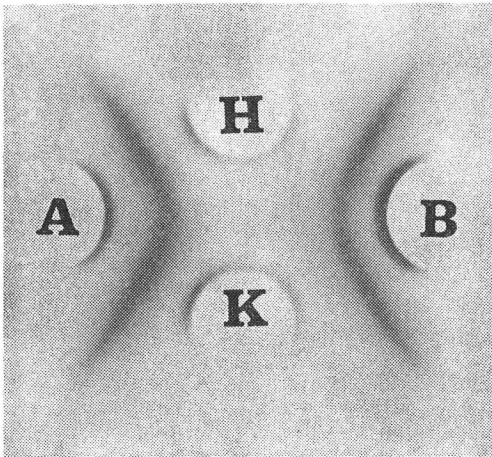


Fig. 5. Double immunodiffusion in agarose gel stained with γ -GTP activity.

Purified preparations of γ -GTP from hepatocellular carcinoma (H) and kidney (K). Antisera against the γ -GTP purified from hepatocellular carcinoma (A) and from kidney (B).

両者間に泳動上の差異は明らかではない。さらに、neuraminidase 処理により泳動度を検討すると、肝癌の場合には Con A 吸着、非吸着分画は供により陰極側へ移動し、泳動位置はほぼ等しくなる。しかし、腎 γ -GTP には neuraminidase 処理前後で泳動度には明らかな移動は認められない、ampholite を用いた等電点分画についてみると、腎の pI は 4.4 で、neuraminidase 処理に

より、pI は 5.3 になる。一方、肝癌 γ -GTP は pI 4.0 とより酸性側にあるが、neuraminidase 処理後は pI 5.25 と腎 γ -GTP とあまり変わらない値を示すようになる。

次に両者の部分精製したものを、抗ヒト正常全血清を結合させた Sepharose 4B による免疫吸着を利用して、夾雑蛋白を除いた後、家兎に免疫して、えられた抗血清により、免疫学的検討を行っている。肝癌 γ -GTP、腎 γ -GTP はともに抗肝癌 γ -GTP ウサギ抗血清、あるいは抗正常腎 γ -GTP ウサギ抗血清でほぼ同じように中和され、Fig. 5 に示すように、Ouchterlony 法でもこれらは互に隔合する 1 本の沈降線を形成する。さらに、novel γ -GTP 陽性患者血清に抗正常腎 γ -GTP ウサギ抗血清を加えて、反応させた後に γ -GTP isoenzyme を行うと、他の非特異的な活性帯ばかりでなく、II, II', I' の novel γ -GTP も消失し、抗原・抗体の複合化して、原点より残ったと考えられる活性帯だけになる。

以上のように、肝癌と正常腎 γ -GTP の間には酵素学的性格には明らかな差異はみられない。また、免疫学的にも両者には強い共通抗原性が認められ、さらに血清 γ -GTP isoenzyme の各活性帯に対しても、特異、非特異を問わずに共通な抗原性を有することが示唆されている。このように、novel γ -GTP は同じ活性を有する酵素であるが、異なった遺伝子にコードされる 1 次構造の違った蛋白よりなる酵素という、古典的な意味でのアイソザイムの定義には一致しないという成績がえられている。今日、このような定義に一致しない、synzyme, allozyme などもアイソザイムとして扱い、広義に解釈されている現状にあり、novel γ -GTP もこの範疇に入るものであろう。

近年、主として膜糖蛋白についてであるが、癌において糖蛋白の糖鎖構造に形成不全の生ずることが注目されている。¹⁷⁾ 上述したように、著者らの成績においても、肝癌 γ -GTP と正常腎 γ -GTP には抗原性の違いはみられず、Con A や neuraminidase に対する感受性、易動度や等電点において、かなりの相違がみられている。このような点より、肝細胞癌における novel γ -GTP も糖鎖の形成不全により生じた糖鎖構造の違いを反映したアイソザイムであるとも推察できる。しかし、novel γ -GTP である II, II', I' の各分画のどのような糖鎖構造が癌に特異的なのか、あるいはお互にどのような関連になっているかは、未だ多くの解明せねばならぬ問題があり、さらに各方面からの研究が必要であらう。

ま と め

肝細胞癌に特異的に出現する novel γ -GTP につい

て、現在までにえられている著者らの臨床的、基礎的な成績について述べた。Novel γ -GTP の本体に関しては未だ不明な部分も多いが、臨床的には特異性の高い腫瘍マーカーであることは明白で、肝細胞癌の血清生化学的診断法として重要な地位を占めるものと期待される。

謝辞：本研究は、厚生省がん研究助成金による研究、腫瘍マーカーによるがん診断の開発に関する研究（班長 服部 信）、がんの集学的治療の研究（班長 末舛恵一）、文部省がん特別研究、癌胎児性蛋白質の生化学的・臨床的研究（班長 平井秀松）の研究費で行われた。記して深く謝意を表わす。

文 献

- 1) Albert, Z. and Rzuclidlo, Z. et al. : Acta histochem., **37** : **34**, 1970.
- 2) Kalengayi, M. M. R. et al. : J. Natl. Cancer Inst., **55** : 579, 1975.
- 3) Fiala, S. et al. : J. Natl. Cancer Inst., **51** : 151, 1973.
- 4) Cameron, R., et al. : Cancer Res., **38** : 823, 1978.
- 5) Sells, M. A. et al. : Brit. J. Cancer, **40** : 274, 1979.
- 6) Jalanko, H. and Ruoslahti, E. : Cancer Res., **39** : 3495, 1979.
- 7) Kitagawa, T. et al. : Gann, **71** : 536, 1980.
- 8) Taniguchi, N. et al. : Biochim. Biophys. Acta, **391** : 265, 1975.
- 9) 澤武紀雄他：医学のあゆみ, **98**, 670, 1976.
- 10) Sawabu, N. et al. : Gann, **69** : 601, 1978.
- 11) 澤武紀雄他：医学のあゆみ, **106** : 288, 1978.
- 12) 澤武紀雄他：癌と化学療法, **6** (Suppl 3) : 459, 1979.
- 13) Sawabu, N. et al. : Ann. Acad. Med., **9** : 206, 1980.
- 14) 澤武紀雄他, 日本臨牀, **38** : 4606, 1980.
- 15) Sawabu, N. et al. : Cancer (in press).
- 16) Orłowski, M. and Meister, A. : J. Biol. Chem., **240** : 338, 1965.
- 17) 高崎誠一, 木幡 陽：代謝, **16** : 1725, 1979.