腎細胞癌における胎盤性ロイシンアミノペプチダーゼ (P-LAP)の意義

岐阜大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 西浦常雄教授)

栗山 学 篠田 育男 山本 直樹

竹内 敏視 高橋 義人 西浦 常雄

福井医科大学泌尿器科学教室 (主任: 河田幸道教授)

岡 野 学 河 田 幸 道

CLINICAL EVALUATION OF SERUM PLACENTAL LEUCINE AMINOPEPTIDASE (P-LAP) ACTIVITY IN RENAL CELL CARCINOMA

Manabu Kuriyama, Ikuo Shinoda, Naoki Yamamoto, Toshimi Takeuchi,

Yoshito Takahashi and Tnuneo Nishiura

Department of Urology, Gifu University School of Medicine

(Director; Prof. T. Nishiura, M.D.)

Manabu Okano and Yukimichi Kawada

Department of Urology, Fukui Medical College

(Director; Prof. Y. Kawada, M.D.)

Serum placental leucine aminopeptidase (P-LAP) activities were measured using leucyl-*p*-nitroanilide as a substrate and coexisting other LAP activities were blocked with 2mM of L-methionine and evaluated clinically as a tumor marker of renal cell carcinoma. From the mean $\pm$ 2S.D. in normal male subjects, 22~67G-R unit was decided as normal range in male cases. Based upon Mizutani's report, 20~49G-R unit was similarly regarded to be normal range of females. A total of 243 sera from various urological diseases including 47 of renal cell carcinoma were examined for serum P-LAP values. Positive rates in major diseases were as follows; 3% (4/135) of normal males, 50% (15/30) of male and 18% (3/17) of female renal cell carcinoma, 14% (6/44) of male and 11% (1/9) of female uroepithelial tumor, and 5% (1/20) of male and 38% (3/8) of female chronic renal failure. By students' *t* test, a group of renal cell carcinoma showed statistical high serum P-LAP values in male cases ($p < 0.05$). Serum P-LAP values in 14 patients with renal cell carcinoma changed in parallel to clinical courses. However, serum P-LAP and LAP activities showed a strong correlation ($r = 0.799$). These results suggest that determination of serum P-LAP activities may be useful for detection and follow-up of renal cell carcinoma, especially in male cases. Moreover, development of an immunological assay for specific determination of P-LAP must be necessary for avoiding cross reaction with other aminopeptidases and this assay system will clarify the significance of P-LAP as a tumor marker of renal cell carcinoma (Supported in part by Grant-in-aid from Ministry of Education, Japan).

要旨: 腎細胞癌における胎盤性ロイシンアミノペプチダーゼ (placental leucine aminopeptidase, P-LAP)の腫瘍マーカーとしての意義を臨床的に検討した。血清 P-LAP 値の測定は、leucyl-*p*-nitroanilide を基質とする酵素法で行ない、共存する他の LAP 活性を、L-methionine で阻害した。135例の健常男性例の血清 P-LAP 値は、24.6~74.7G-R unit に分布し、この群の平均 $\pm$ 2S.D. 値から、22~67G-R unit を男性例の正常値とみなした。一方、非妊娠女性例の正常値は、水谷らの報告に基づいて、20~49G-R unit とした。各種尿路疾患243例の陽性率は腎細胞癌; 男性50% (15/30), 女性18% (3/17), 尿路上皮腫瘍; 男性14% (6/53), 女性11% (1/9), 前立腺癌; 18% (6/33), 良性腎疾患; 男性5% (1/20), 女性0% (0/1), 慢性腎不全; 男性5% (1/20), 女性38% (3/8) が主なものであった。血清 P-LAP 値の推移は、

14例の腎細胞癌患者の臨床経過と、よく一致していた。以上のように、血清 P-LAP 値の測定は、特に男性症例において、腎細胞癌の診断と経過観察に有力な生化学マーカーとなりうる可能性を示唆していたが、酵素法による測定では、血清 LAP 値との相関も高く ($r=0.799$, 腎細胞癌群), 交叉反応は避けられなかった。より感度上昇を得るためにも、免疫学的測定手技の開発が望まれた。

はじめに

腎細胞癌の診断、再発の発見は、現在のところ、腎盂造影、超音波検査、CT、血管造影などの画像診断技術に負うところが多く、生化学のマーカーに乏しいのが現状である¹⁾²⁾。以前から用いられてきた、血沈、 α_2 グロブリン分画、CRP などは、いずれも nonspecific であり、炎症の併存によって修飾されやすいものでもあった。適切な化学療法、放射線療法について一定の見解の得られていない本疾患では、早期診断と適切なフォローアップのみが、治癒切除の施行と生存率向上の唯一の方法であり、この意味でも、高い感度と特異性を有する「腫瘍マーカー」の確立が望まれるところである。

本論文では、胎盤組織だけでなく腎腫瘍組織にも見出されている³⁾胎盤性ロイシンアミノペプチダーゼ (placental leucine aminopeptidase, P-LAP) の、腎細胞癌における意義を臨床的に検討した。

方法および対象

血清 P-LAP 値の測定は、酵素法で行なった。即ち、L-leucyl-*p*-diethylanilide を合成基質とし、生成された *p*-diethylaminoanilide に、1-nephtol-2-sulfonic acid にて酸化縮合させ、生じた青色色素を 650nm の吸光度で測定した(図 1)。この基質では、共存する他の LAP 活性も測定しているため、2mM の L-methionine を共存させてブロックした。測定単位は、Goldbarg-Rutenburg unit (G-R unit) と表示し、G-R unit $\times 0.2425 = \text{IU/l}$ の関係が成立する。

P-LAP 値を測定した検体は、378血清(男性343, 女

性35)であった。疾患別内訳は、健康成人男性135例、腎細胞癌47例(男性30, 女性17)、尿路上皮腫瘍53例(男性44, 女性9)、前立腺癌33例、他の男性泌尿器癌25例、前立腺肥大症25例、良性腎疾患21例(男性20, 女性1)、血液透析療法施行中の慢性腎不全28例(男性20, 女性8)、前立腺炎または副睾丸炎9例、男性例の転移性腎腫瘍2例であった。血清は、当科および関連病院から得られ、使用まで -70°C にて保存された。また、採血時、全ての患者は治療前の状態であった。

血清 P-LAP 値の正常値については、男性例は今回の検討で決定し、女性例では水谷らの報告⁴⁾に基づいて、平均 $\pm 2\text{S.D.}$ 値から、20~49G-R unit とした。

結 果

まず、135例の健康成人男性の血清 P-LAP 値を測定し、年齢別分布および正常値の決定を行なった。各10歳毎の血清 P-LAP 値の分布は、表 1 のようになり、24.6から74.7G-R unit に分布していたが、年齢群間に

表 1 Serum P-LAP values in normal male subjects by Age

Age	# of examined	Serum P-LAP (G-R unit)			
		Range	mean $\pm$ S.D.	$\geq 67^{\text{a}}$ (%)	$\geq 77^{\text{b}}$ (%)
≤ 19	3	52.4-67.7	54.13 $\pm$ 12.79	1 (33)	0
20-29	52	24.6-68.0	42.75 $\pm$ 9.87	1 (2)	0
30-39	44	29.1-74.7	45.46 $\pm$ 11.57	2 (5)	0
40-49	11	33.0-65.6	46.53 $\pm$ 11.96	0	0
≥ 50	25	27.6-66.0	42.54 $\pm$ 11.05	0	0
Total	135	24.6-74.7	44.16 $\pm$ 10.93	4 (3.0)	0

a) 67 G-R unit : mean + 2 S.D. of normal male subject.
b) 77 G-R unit : mean + 3 S.D. of normal male subject.

図 1 測定原理

図2 Distribution of serum P-LAP values in normal males

差は認めなかった(図2). この群の平均±標準偏差(S.D.)値は、44.16±10.93G-R unit となり、平均±2S.D. 値が66.12、+3S.D. 値が76.95G-R unit となった。67 G-R unit 以上を示した例は、10歳代、20歳代の各1例および30歳代の2例であり、全体の3.0%であった。また、77G-R unit 以上の例は認めなかった。

次いで、378例の各種疾患の血清 P-LAP 値の一覧を表2に示した。男性例の正常上限値を、前述のように67G-R unit とすると、健常群の3%、腎細胞癌群の50% (15/30)、尿路上皮腫瘍の14% (6/44)、前立腺癌の18% (6/33)、睪丸腫瘍をはじめとする他の泌尿器癌

の4% (1/25) が、陽性となった。また、良性疾患では、良性腎疾患、慢性腎不全のおおの5% (ともに1/20)、前立腺炎/副睪丸炎の11% (1/9) が陽性を示したが、25例の前立腺肥大症、2例の転移性腎腫瘍では陽性例は認めなかった。一方、女性例では、腎細胞癌17例中3例 (18%)、尿路上皮腫瘍の9例中1例 (11%)、慢性腎不全患者8例中3例 (38%) が、陽性の49G-R unit を越し、水腎症の1例では、31.8G-R unit と正常であった。極端な高値例は、慢性腎不全群の2例に観察された。Students' t test による有意差検定では、男性例において、腎細胞癌群は、尿路上皮腫瘍、前立腺癌群に対して5%、その他のグループに対しては1%未満の危険率で、有意に高値の P-LAP レベルを示した(図3)。しかし、女性例では、腎細胞癌群は、尿路上皮腫瘍群に対して有意差なく、逆に慢性腎不全群が、この2群に対して5%未満の危険率で有意に高値であった(図4)。

一方、P-LAP 値と、日常検査で LAP 値として測定されている arylamidase (AA) 値との相関を検討した(図5)。同時測定を行なわれていた腎細胞癌群16例の相関係数(r)は、0.799、その他の疾患を含む22例でも r=0.669 と高い相関性を示していた。

最後に、14例の腎細胞癌患者の臨床経過と血清 P-LAP 値の変動を検討した。血清 P-LAP 値は、根治手術後、時期的なズレは認められるものの、正常値内へ収束する傾向を示し、腫瘍の残存する症例では、異常

表2 Serum P-LAP values in various diseases

Group	# of examined	Serum P-LAP (G-R unit)							
		Male				Female			
		# of cases	Range	mean±S.D.	≥67 ^{a)} (%)	# of cases	Range	mean±S.D.	≥49 ^{b)} (%)
Normal controls	135	135	24.6-74.7	44.16±10.93	4(3)				
Renal cell carcinoma	47	30	29.7-192.0	73.62±36.92	15(50)	17	18.0-61.0	38.76±14.46	3(18)
Uroepithelial tumor ^{c)}	53	44	17.4-221.7	49.66±41.43	6(14)	9	25.2-58.5	38.44±10.15	1(11)
Prostate cancer	33	33	26.2-191.9	54.61±32.14	6(18)				
Other urological tumor ^{d)}	25	25	18.5-69.9	38.67±13.78	1(4)				
Benign renal disease ^{e)}	21	20	28.4-128.7	48.74±21.11	1(5)	1	31.8	31.8	0
Chronic renal failure	28	20	30.0-79.0	40.40±12.06	1(5)	8	33.1-157.5	64.21±42.61	3(38)
BPH	25	25	24.6-60.7	41.36±11.04	0				
Prostatitis/epididymitis	9	9	23.8-70.2	48.73±13.53	1(11)				
Metastatic renal tumor ^{f)}	2	2	45.1-58.0	51.55	0				

a) b) : 67 and 49 G-R unit were upper normal limits in normal males and females, respectively, determined by mean+2S.D. of serum P-LAP values in normal controls.
c) consist of 15 of renal pelvic tumor (M:F=11:4), 8 of ureteral tumor (6:2) and 30 of bladder tumor (27:3).
d) consist of 20 of testicular tumor, 4 of penile cancer and 1 of scrotal tumor.
e) consist of 7 of renal cyst (M:F=7:0), 8 of renal stone (8:0) and 6 of hydronephrosis due to ureteral stone (5:1).
f) tumors came from bone and lung.

図3 Distribution of serum P-LAP values in male patients

Two broken lines indicate normal range of serum P-LAP values in males (22-67 G-R unit).

図4 Distribution of serum P-LAP values in female patients

Two broken lines indicated normal range of serum P-LAP values in females (20-49 G-R unit).

図5 Comparison between serum P-LAP and so-called LAP values

値内での変動か、正常値から高値への変動を示していた(図6)。こうした傾向は、いわゆるLAP値での解析では、明らかでなかった(図7)。

考 察

腫瘍産生物質、または腫瘍存在時生体が反応性増加を示す物質が、血液をはじめとする体液中に出現し、生化学的に測定することができ、悪性腫瘍の診断と経過観察の目的で用いられている腫瘍マーカーは、感度と特異性が高ければ、単に「癌の存在」のみだけでなく、その癌の生物学的悪性度をあわせて評価しうる点で、画像診断技術と同様に、悪性腫瘍患者の監理に欠くことのできない手段の1つと行うことができよう。事実、泌尿器科領域においても、睾丸腫瘍における α

図 6

図 7

fetoprotein, HCG- β subunit は、癌細胞産生物質として、また、前立腺癌の prostatic acid phosphatase (PAP) や prostate tissue-specific antigens (PA, γ -Sm など) は、組織特異抗原として、有用なマーカーとし

ての評価を受けている。

しかし、腎細胞癌においては、こうした特異的マーカーは乏しく、血沈、 α_2 グロブリン、CRP などの acute phase reactant が多用されている²⁾⁵⁾に過ぎず、いずれの物質を用いても、かなり多くの鑑別診断を行なつてのち本疾患に到達できるのにすぎず、また、retrospective にはともかくも、早期診断の手技にはなりえなかった。さらに、basic fetoprotein (BFP), tissue peptide antigen (TPA), immunosuppressive acid protein (IAP) の評価を行なつた神田らの報告⁶⁾でも、BFP の陽性率は30%と低感度であり、TPA についても同様結果であった。IAP については、高感度であったが特異性に乏しいとのものであった。また、この3つのマーカーのいずれかが高値であっても、他臓器悪性腫瘍との鑑別診断を要することは論を待たない。さらに、最近では、鈴木ら⁷⁾によって、血清 fibrinogen 値と腎細胞癌の病期、prostaglandin F 値と細胞分比度との相関があること、おのおののマーカーで40%前後の陽性率を示すとの報告もある。しかし、腎細胞癌の現時点での唯一の根治手段は、早期発見・根治手術であり、インターフェロンを初めとする化学療法、放射線療法も一定の確立された方法は、未報告であり、この意味においても、specific なマーカーの確立が待たれる点でもあった。

placental leucine aminopeptidase (P-LAP) は、妊婦の胎盤機能の指標として広く用いられている⁸⁾⁹⁾が、村井ら¹⁰⁾によれば、妊婦血清のみならず、悪性腫瘍患者血清中にも高値例が散見されるようになり、本酵素の腫瘍マーカーとしての意義が注目されている。本論文は、この P-LAP の腎細胞癌における臨床的意義につ

表 3

	LA (LAP)	LNA (AA)	CAP
加水分解	leucine amide leucyl-glycine Aminoacyl-peptide + H ₂ O → amino acid + peptide ⌢ _(E)	leucyl- β -naphthylamide leucyl-p-nitroanilide Aminoacyl-peptide + H ₂ O → amino acid + oligopeptide ⌢ _(E)	l-cystine-bis-naphthylamide leucyl-p-nitroanilide leucyl- β -naphthylamide Cystyl-peptide + H ₂ O → amino acid + peptide ⌢ _(E)
系 統 名	α -aminoacyl-peptide hydrolase (cytosol) (EC 3, 4, 11, 1.)	α -aminoacyl-peptide hydrolase (microsomal) (EC 3, 4, 11, 2)	α -aminoacyl-peptide hydrolase (EC 3, 4, 11, 3)
別 名	leucine aminopeptidase (LAP)	arylamidase (AA)	oxytocinase
慣 用 名	aminopeptidase	aminopeptidase	l-cystine aminopeptidase cystil aminopeptidase placental LAP
局 在	肝可溶分画	ミクロソーム(膜結合性)	ミクロソーム(膜結合性)
至適 pH	8.0-9.0	7.0-8.0	7.0-8.8
電気泳動	β	α_1	α_2
特 徴			耐熱性 L-methionine に耐性

いて検討した preliminary な報告である。周知のように, aminopeptidase は, ペプチドをアミノ基末端から加水分解する酵素の総称であり, 各酵素間の基質特異性が乏しいのが特徴である。表 3 は, 各種文献³⁾¹¹⁾¹²⁾からまとめた aminopeptidase の特徴の一覧であり, P-LAP は, cystine aminopeptidase (CAP) (EC 3, 4, 11, 3) と同一の酵素とみなされている。今回の検討で基質として用いた L-leucyl-p-diethylamino-anilide も, P-LAP のみならず arylamidase (AA) によって, よく加水分解されるため, 2mM の L-methionine の共存によって, AA 活性を阻害させ, P-LAP 活性のみを測定したものである。

血清 P-LAP 値の正常値は, 今回の 135 例の健常男性例の検討では, 24.6~74.7 G-R unit に分布しており, 平均+2S.D. 値より, 67 G-R unit 未満とした。村井らの報告¹⁰⁾では, 514 例の男女例での測定で 3~15 mU/ml (12.4~61.9 G-R unit) に分布しており, はば一致した成績であった。男性例の陽性率は, 腎癌 50%, 前立腺癌 18%, 尿路上皮腫瘍 14% が主であり, P-LAP の腎細胞癌検出の感度 50% は, さほどでもなかったが, 特異性 (94%, 162/178) は優れた結果であった。また, Students' t test でも, 少なくとも 5% の危険率で, 腎細胞癌群は, 血清 P-LAP 値が高値を示すことが証明された。一方, 女性例での陽性率 (≥ 49 G-R unit) は, 腎細胞癌 18%, 尿路上皮腫瘍 11%, 血液透析中の慢性腎不全 38% と, 腎不全患者の血清 P-LAP 値が, 有意に高値であった。検討症例数が多くないため, この原因は推測できないが, 後述するように, P-LAP 値と AA 値間の相関性が高く, 食餌療法・ヘパリン使用など, 腎不全患者においては, いずれか高値を示しているが興味深い点であった。さらに, 14 例と多くない症例で, 測定ポイントも 2, 3 カ所にすぎないが, 経時的測定の結果, 臨床経過とよく一致した成績が得られた。これは, いわゆる LAP 値での解析では得られない現象であった。いずれにしても, この結果から, 本酵素は, 男性例では, 少なくとも尿路疾患において高い特異性と, 中等度の感度を示す腫瘍マーカーとなりうる可能性を示唆していた。

日常, 臨床検査で測定されている“LAP”活性は, 大部分 AA 活性であり¹¹⁾, 今回測定された P-LAP 値との相関をみると, $r=0.669$ と高度であった。これは, 日和田ら¹³⁾が述べているように, 20mM L-methionine 添加でも, AA 活性は完全に失活せず, 一方で P-LAP 活性もある程度阻害されるためと考えられた。このた

め, 本測定系では, P-LAP の大部分+AA の一部を合わせ断定していることになり, 非妊婦の担癌状態の患者では, P-LAP の体液内放出が大量でないため, 問題となりうるものと考えられた。この観点から, P-LAP に特異的な合成基質が望みにくい現状では, 免疫学的測定法の開発が焦眉であり, 開発された方法を用いることによって, P-LAP の腎細胞癌における腫瘍マーカーとしての意義がより明確になるものと思われた。

結 語

腎細胞癌における腫瘍マーカーとしての胎盤性ロイシンアミノペプチダーゼ (P-LAP) の意義を臨床的に検討した。測定は, 酵素法で行ない, 合計 243 例の尿路疾患で解析した。男性 67, 女性 49 G-R unit の正常上限値を越す陽性率は, 腎細胞癌 (男 50%, 女 18%), 尿路上皮腫瘍 (男 14%, 女 11%), 前立腺癌 18%, 良性腎疾患 (男 5%, 女 0%), 慢性腎不全 (男 5%, 女 38%) であった。男性例では, 本酵素を用いた腎細胞癌の生化学的診断上の感度は 50%, 特異性 94% であった。また, 14 例の腎細胞癌患者の臨床経過を血清 P-LAP 値の変動もよく一致していた。しかし, 他の aminopeptidase との交叉反応はさけられず, 免疫学的測定法の開発が必須であろうと思われた。

稿を終るにあたり, 血清の採取など御協力いただきました関連病院の諸先生に深謝いたします。なお, 本研究の一部は, 文部省科研費 (No. 60480355) によって行なわれたことを付記します。

本論文の要旨は, 第 24 回日本癌治療学会総会 (1986 年, 松江) において発表した。

文 献

- 1) Warren, B. and Perlmann, P.: Bladder and renal tumor markers. Human Cancer Markers, p. 303, Human Press, Clifton, 1982.
- 2) 上田豊史: 腫瘍マーカーに関する研究の現況と展望—腎細胞癌—. 西日泌尿, 45, 235—240, 1983.
- 3) 尾形 稔, 杉田 収: ロイシンアミノペプチダーゼ (LAP). 酵素の検査診断学, p. 115, 宇宙堂八木書店, 東京, 1984.
- 4) 日本ケミファ (株): P-LAP テスト添付文書.
- 5) 里見佳昭: 腎癌の予後に関する臨床的研究—とくに生体側の因子を中心に—. 日泌尿会誌, 64, 195—216, 1973.
- 6) 神田裕三, 石井 勝, 田利清信, 佐竹一郎: 腎癌における腫瘍マーカーの有用性について. 臨泌, 39, 579—583, 1985.
- 7) 鈴木明彦, 増田宏明, 大田原佳久, 鈴木和雄, 田島淳, 阿曾佳郎: 腎癌と血中腫瘍マーカー. 日泌尿会誌, 77, 87—91, 1986.

- 8) 水谷栄彦：母体情報としての血清酵素—Placental leucine aminopeptidase (P-LAP)を中心に。臨婦産, 35, 661—666, 1981.
- 9) 秋山治幸, 水谷栄彦, 成田 収, 友田 豊, 佐伯明彦：妊娠時における血中placental leucine aninopeptidase (P-LAP)の動態。日産婦会誌, 36, 2605—2612, 1984.
- 10) 村井哲夫, 及川 淳：シスチンアミノペプチダーゼ(CAP)の臨床的意義, 臨床病理, 28, 1020—1024, 1980.
- 11) 菅野剛史：ロイシンアミノペプチダーゼ。臨床病理, 特43, 102—111, 1981.
- 12) 熊坂一成, 関口光夫：シスチンアミノペプチダーゼ。臨床病理, 特55, 156—166, 1983.
- 13) 日和田邦男, 国府達郎：Cystine aminopeptidase (CAP)の生化学。産科と婦人科, 48, 971—976, 1981.

(1986年12月25日受理)