癌転移に伴う α_2 macroglobulin 欠乏症に関する研究

狩野 有作・大谷 英樹・小 柴 健*

Jpn. J. Clin. Immun., 20 (1) : 30~43, 1997.Studies on α_2 macroglobulin deficiency in association with cancer metastasis

Yuhsaku Kanoh, Hideki Ohtani and Ken Koshiba

Kitasato University School of Medicine Department of Clinicalpathology

【Summary】

We found 5 cases of prostatic carcinoma with metastasis with α_2 macroglobulin (α_2 M) concentration below approximately 40 mg/dl in serum. All these patients had bone metastasis, and none of them had DIC. We found no other cases with such a low concentration of α_2 M.

Their α_2 M level increased to normal level after treatment with transurethral resection of prostate or hormon agents, and the level was correlated with the clinical symptom. During the clinical course, their α_2 M level was negatively correlated with prostate-specific antigen (PSA) and prostatic acid phosphatase (PAP). All these results suggest that α_2 M concentration in serum reflects the severity of prostatic carcinoma with metastasis and that α_2 M deficiency is an indicator of metastasis.

The acute phase proteins of CRP and serum amyloid A did not increase in spite of the presence of metastasis in these patients with extremely low α_2 M level (<20 mg/dl), suggesting that α_2 M is involved in the metabolism of these acute phase proteins.

On immunohistochemical studies, their specimens of prostatic carcinoma gave positive stain for PSA and urokinase-type plasminogen activator (u-PA). Both PSA and u-PA formed a complex with α_2 M in vitro. The α_2 M deficiency in these patients might be due to the complex formation between α_2 M and these prostate-originated proteases and to the rapid disappearance of the complex.

Key words : α_2 macroglobulin,
prostatic carcinoma with metastasis,
prostate-specific antigen,
urokinase-type plasminogen activator

【概 要】

血清 α_2 macroglobulin (α_2 M) 濃度が約 40 mg/dl 以下の著減を示す 5 症例が見い出され、それらは全て骨転移を伴う前立腺癌であり、DIC の合併は認めなかった。

臨床経過において α_2 M 値は、経尿導の前立腺切除術および抗男性ホルモン療法により基準範囲内に復し、臨床像に伴って変動した。また、前立腺特異抗原 (PSA) および前立腺酸性フォスファターゼ (PAP) 値とほぼ逆相関の経日的変動を示した。これらより、血清 α_2 M 濃度は癌転移を伴う前立腺癌の病勢を反映し、血中 α_2 M の著減は癌転移の指標の 1 つとして有用であると考えられた。

癌転移の存在にもかかわらず α_2 M が約 20 mg/dl 以下では、CRP および SAA は陰性ないしは異常高値を示さず、それらの変動に α_2 M が関与することが示唆された。

免疫組織学的検索では、前立腺癌組織に PSA およびウロキナーゼ (u-PA) が多量に認められた。一方、PSA および u-PA などの protease は α_2 M と complex を形成した。したがって、 α_2 M 欠乏症は前立腺癌組織から血中へ多量に放出される PSA および u-PA などの protease と α_2 M の complex の形成に伴う異化の亢進によると考えられた。

I. 緒 言

生体では血液凝固、線溶現象および炎症反応などの過程で多数の蛋白分解酵素 (protease) が関与しているが、それらの作用は阻害因子である蛋白分解酵素阻害蛋白 (protease-inhibitor) によって制御され平衡を保っている。 α_2 M は、主要の protease-inhibitor としての役割¹⁾を担っているが、その他に免疫抑制作用^{2,3)}や Interleukin-6 (IL-6) の carrier protein としての機能⁴⁾なども知られている。

一方、 α_2 M は癌細胞が放出する protease の作用を阻害し、癌の浸潤ならびに転移を抑制する機序も考えられている⁵⁾。

今回、著者らは癌転移例において α_2 M が著減する 5 症例を見い出し、 α_2 M 欠乏症の臨床病理学的特徴、ならびに癌病変由来の血中 protease と α_2 M の関係について検討したので報告する。

II. 対象ならびに方法

1. 対 象

対象は北里大学病院で血中 α_2 M の著減を認めた 5 症例を選んだ。対照として、転移のない前立腺癌 29 例を用いた。

2. 方 法

1) 免疫電気泳動法：血中 α_2 M の有無は抗ヒト全血清 (富士レビオ) および抗 α_2 M 血清 (Dako 社) を用い免疫電気泳動 (Immunoelectrophoresis ;

IEP) によった。

2) 測定法： α_2 M, α_1 -antitrypsin (α_1 AT), α_1 -acid glycoprotein (α_1 AG), α_1 -antichymotrypsin (α_1 ACT), Ceruloplasmin (Cer), Haptoglobin (Hp), C3 および C4 の測定は、Laser Nephelometry (Behring-nephelometer-analyzer) を用いた。CRP は Latex immunoassay (LPIA-300) で、SAA は latex agglutination nephelometric immunoassay⁶⁾ (LX-M, 栄研化学・AIC 社), ならびに SAA 専用試薬 (LX 試薬栄研 SAA) を用いて測定した。IL-6 の測定は化学発光 EIA⁷⁾ によった。PSA および PAP は EIA (AIA-600) により、 γ -seminoprotein (γ -sm) は EIA (γ -sm 中外) を用いて測定した。

3) 免疫組織学的方法：前立腺組織の 10% ホルマリン固定パラフィン包埋切片を使用し、抗体として Anti-human rabbit prostate specific antigen (Dako 社; 3000 倍), Anti-human rabbit prostatic acid phosphatase (Dako 社; 3000 倍), Anti-human rabbit urokinase (コスモバイオ社 TechnoClone; 100 倍), Anti-human rabbit tissue plasminogen activator (Cappel 社; 100 倍) を用い、LSAB 法にて免疫染色を行った。すなわち、10% ホルマリン固定パラフィン包埋切片 (3 μ m) を脱パラフィンし水洗後、0.3% 過酸化水素加メタノールに 20 分間浸し内因性ペルオキシダーゼを阻止し、水洗後 phosphate buffer saline (PBS 0.01 M pH 7.4) に浸し、それぞれ希釈した一次抗体を 4°C over night 後反応させた。

PBS 洗浄後, 200 倍希釈したビオチン化二次抗体 (Anti rabbit IgG (Vector 社)) を 20 分間反応させ PBS 洗浄をする。100 倍希釈した Streptavidin biotinylated orseradish peroxidase complex (Amersham 社) を室温で 30 分間反応させ PBS 洗浄し, 最後に DAB で発色させメチル緑溶液で核染色を行った。免疫染色の評価方法は, 異型のない正常腺管と比較して強く染色された場合を (+) とし, 染色の程度は染色条件などの影響を受けるため設定しなかった。なお, 抗体吸収試験は抗 u-PA 血清 (Techno-Clone) に精製 u-PA (MW: 33,000 & 54,000; BiopurAG 社) を混和し, 4°C over night 後 37°C 60 min incubation させたものを上記と同様方法で使用した。

4) 免疫化学的解析: α_2 M と PSA の結合性については, α_2 M (ProtogenAG 社) と PSA (Chemicon 社) (mol 比 1:1) を混和後 37°C 20 min incubation させ, 5~15% SDS-PAGE 後 Western blotting し抗 PSA 血清 (Dako 社) で反応させた。 α_2 M と u-PA の結合性は, α_2 M と u-PA (mol 比 1:1) を混和後 37°C 60 min incubation し, 5~15% SDS-PAGE 後 Western blotting し抗 u-PA 血清で反応させた。 α_2 M と IL-6 の結合性は, α_2 M と recombinant IL-6 (rhIL-6) (UBI) (mol 比 1:1) を混和後 37°C 20 min incubation し, SDS-PAGE 後 Western blotting し抗 IL-6 血清 (Genzyme) で反応させた。 α_2 M と rhIL-6 を反応させたもの, ならびに α_2 M 欠乏症 (α_2 M 13 mg/dl) 患者血清に rhIL-6 を反応させたものは, HPLC システム (カラム TSK-3000 SWXL (東ソー)) により 20 mM リン酸緩衝液 (PH 7.4) を流速 1 ml/min で 0.5 ml ずつ分画し, 各分画について IL-6 を測定した。

III. α_2 M 欠乏症 5 症例の概要

症例 1 (O.T.): 69 歳, 男性

確定診断: 前立腺癌 (stage D₂)

主 訴: 左頸部腫瘍

既往歴: 10 年前に胃癌 (分類不明) のため胃亜全摘および十二指腸の全摘。

家族歴: 特記すべきことなし。

現病歴: 1993 年 8 月左頸部腫瘍に気づき近医外科を受診し, 同年 10 月 12 日精査治療目的にて当院耳鼻科に入院した。頸部腫瘍摘出術を施行し, リンパ節への転移性腫瘍 (腺房細胞腫瘍) と診断された。前立

腺腫瘍マーカーが著明な上昇を示し泌尿器科にて経直腸的前立腺生検が行われ adenocarcinoma が認められた。骨核医学検査で第 10 および 11 胸椎などに RI の異常集積があり (Fig. 6) 骨転移を伴う前立腺癌と診断された。治療は抗男性ホルモン療法が著効し, その後外来治療にて骨核医学検査上骨転移像の消失および前立腺腫瘍マーカーの正常化を呈している。

症例 2 (Y.K.): 74 歳, 男性

確定診断: 前立腺癌 (stage D₂)

主 訴: 腰痛, 便秘および体重減少

既往歴および家族歴: 特記すべきことなし。

現病歴: 1992 年 7 月頃より腰痛および便秘傾向を認めるようになり, 2 カ月で約 12 kg の体重減少が生じたため, 同年 10 月 20 日北里大学東病院消化器内科を受診。重篤な便秘, 高度の貧血ならびに超音波検査で両側胸水貯留および右水腎症を認め翌日入院。大腸鏡による下部消化管精査では悪性病変は認めなかったが, 直腸診で前立腺の軽度腫大および前立腺腫瘍マーカーの著明な上昇を認めた。11 月 5 日当院泌尿器科へ転科し, 経直腸的前立腺生検により adenocarcinoma と診断された。骨核医学検査で頭蓋骨部に RI が異常集積を示し, 骨転移を伴う前立腺癌と診断された。抗男性ホルモンによる治療により, 腰痛および便秘は消失した。以後悪化傾向をきたし, 3 回の入院で化学療法および放射線療法が施行されたが 1993 年 8 月 31 日に死亡した。

症例 3 (Y.T.): 80 歳, 男性

確定診断: 前立腺癌 (stage D₂), 悪性リンパ腫 (large cell type, stage IV)

主 訴: 頻尿および排尿困難

既往歴: 約 30 年前より心房細動。

家族歴: 特記すべきことなし。

現病歴: 1992 年 7 月頃より頻尿および排尿困難を訴え, 8 月 13 日北里大学東病院消化器内科を受診。超音波検査で膀胱および前立腺の腫瘍が疑われ当院泌尿器科へ転科した。同年 9 月 25 日経尿導的前立腺切除術および前立腺生検が施行され adenocarcinoma と診断された。骨核医学検査で右第 2 肋骨および第 8 肋骨起始部などへの RI の異常集積によりびまん性の骨転移像が認められ, 骨転移を伴う前立腺癌と診断された。抗男性ホルモンによる治療により, 排尿障害は消失した。11 月下旬より左腋窩リンパ節腫脹が出現し, 生検で悪性リンパ腫 (large cell type, stage IV) と診断された。放射線治療を受けたが, 1993 年 3 月

上旬より前胸部、背部および左側腹部に悪性リンパ腫の皮膚転移が認められ、転移部の放射線治療が行われた。その後全身状態の改善は認められなかったが、本人の希望により近医へ転院となった。

症例 4 (S.Y.): 56 歳, 男性

確定診断: 前立腺癌 (stage D₂)

主 訴: 腰痛

既往歴および家族歴: 特記すべきことなし。

現 病 歴: 1985 年 2 月頃より腰痛を訴え、6 月から近医整形外科で鎮痛剤にて経過観察がされた。その後、腰部 X-P 上異常を指摘され、9 月 30 日当院泌尿器科を受診した。前立腺腫瘍マーカーは著明に上昇し、経直腸的前立腺生検により adenocarcinoma が認められた。骨核医学検査で頭蓋骨および全脊椎などへの RI の異常集積によりびまん性の骨転移像が認められ、骨転移を伴う前立腺癌と診断された。経尿導的前立腺切除術および抗男性ホルモン療法が行われ、腰痛は軽減した。以降は改善、増悪を繰り返し、3 回の入院で化学療法および放射線療法が施行されたが 1995 年 9 月 10 日死亡した。

症例 5 (O.S.): 67 歳, 男性

確定診断: 前立腺癌 (stage D₂)

主 訴: 夜間尿および腹部腫瘤

既 往 歴: 9 年前より糖尿病。

家 族 歴: 特記すべきことなし。

現 病 歴: 1976 年 1 月頃より夜間尿 (1~2 回/日) を訴え、1977 年 1 月頃から右下腹部腫瘤を自覚するようになり 5 月 18 日精査目的にて当院内科へ入院。顕微鏡的血尿および経静脈的腎盂造影で膀胱の左右への圧排像を認め、5 月 30 日泌尿器科へ転科となった。経直腸的前立腺生検により adenocarcinoma が認められ、骨核医学検査で右恥骨および左第 4 肋骨に RI の異常集積があり、骨転移を伴う前立腺癌と診断された。抗男性ホルモン療法により排尿回数は減少した。以降は改善、増悪を繰り返し 2 回の入院で経尿導的前立腺切除術、化学療法および放射線療法が施行されたが 1981 年 6 月 13 日に死亡した。

Control-

-Anti-WHS

O.T.-

-Anti- α_2 M

Control-

-Anti-WHS

Y.K.-

-Anti- α_2 M

Control-

-Anti-WHS

Y.T.-

-Anti- α_2 M

Fig. 1 Immunoelectrophoretic pattern of α_2 macroglobulin (α_2 M) deficiency sera, with antiserum to whole human serum (Anti-WHS) and antiserum to α_2 M

Table 1 Haematological findings of the five patients

	Normal ranges	O.T.	Y.K.	Y.T.	S.Y.	O.S.
WBC	4,000~9,000(/mm ³)	3,700	4,000	6,000	2,900	4,900
Neut	43~71 (%)	53.8	57	62.6	51.5	67
Eosino	2~6 (%)	2.9	2.3	3.7	1.8	2
Lymph	30~41 (%)	30.7	38.4	24.8	35.4	24
Mono	3~6 (%)	11.4	1.7	6.8	10.6	6
Baso	0~1 (%)	1.6	0.6	0.8	0.7	1
RBC	420~560x10 ⁴ (/mm ³)	399x10 ⁴	229x10 ⁴	350x10 ⁴	273x10 ⁴	490x10 ⁴
Hb	12.5~17.0 (g/dl)	13.6	7.2	10.3	8.5	15.3
Ht	39~50 (%)	39.6	21.9	30.6	24.5	45
MCV	85~95 (fL)	99.2	95.8	87.5	89.9	93
MCH	30~34 (PG)	34.0	31.6	29.4	31.4	30
MCHC	32~36 (%)	34.2	32.4	33.6	34.9	33
PLT	15~35x10 ⁴ (/μl)	21.3x10 ⁴	27.3x10 ⁴	19.8x10 ⁴	19.6x10 ⁴	19x10 ⁴
PPT		10.7/11.0	12.5/12.0	NT	11.1/10.5	NT
PTT		40.0/39.2	31.5/37.5	NT	36.4/37.6	NT
FIG	170~377 (mg/dl)	NT	312	NT	334.6	NT
ESR	5~10 (mm)	52	121	42	95	65
α ₂ AP	45~70 (μg/ml)	22.2	29.6	25	40.6	NT
t-PA	<10 (ng/ml)	9.8	4.9	<1.5	9.8	NT
t-PA-PAI	<17 (ng/ml)	19.2	7.4	8.8	19.2	NT

NT : not tested

IV. 結 果

1. IEP

血中 α₂M 濃度が 18 mg/dl 以下の 4 症例では、抗ヒト全血清および抗 α₂M 血清に対して α₂M の沈降線は全く検出されなかった。42 mg/dl を示した 1 症例 (Y.K.) では α₂M の沈降線は著減を示した (Fig. 1)。

2. 血液学的所見

血液学的所見を Table 1 に示す。白血球分類で 5 例中 3 例が単球の軽度増加を示した。正球性正色素性貧血が 5 例中 3 例で認められた。血小板数は全例が正常範囲で、赤沈は全例で亢進した。tissue-plasminogen activator (t-PA) は検査し得た 4 例全例が正常範囲を示したが、tissue-plasminogen activator-plasminogen activator inhibitor (t-PA-PAI) は 4 例中 2 例で軽度増加した。PPT および PTT は測定し得た 3 例全てが正常範囲であった。α₂anti plasmin (α₂AP) は検査し得た 4 例全例で軽度～中等度に低下した。

3. 生化学的所見

生化学的所見を Table 2 に示す。蛋白分画では α₁ 分画は全例で増加し、α₂ 分画は 5 例中 2 例で増加を示した。ALP は 5 例中 3 例で、LDH は 5 例中 1 例で増加した。血清 Fe は 5 例中 1 例で軽度減少した。

4. 免疫学的所見

免疫学的所見を Table 3 に示す。5 症例の α₂M の範囲は <6~42 mg/dl で、転移のない前立腺癌 (29 例, 範囲 90~570 mg/dl, 中央値 225 mg/dl) に比べ異常低値を示し、両者の間には有意差 (p<0.01) が認められた。CRP 以外の急性相反応性蛋白は正常ないしは増加を認めた。すなわち、α₁AT は検査し得た 4 例中 2 例、α₁AG は 4 例中 1 例、α₁ACT は全例で増加した。Cer は 4 例中 3 例、Hp は 4 例中 2 例、C3 は 4 例中 1 例、C4 は 4 例中 2 例が増加を示した。SAA は 4 例中 3 例が正常範囲で、1 例で増加した。CRP は 5 例中 4 例が正常範囲であったが、α₂M 42 mg/dl を示した 1 例は増加し、この症例では SAA の増加もみられた。IL-6 は測定し得た 4 例全てが基準範囲であった。

Table 2 Biochemical findings of the five patients

	Normal ranges	O.T.	Y.K.	Y.T.	S.Y.	O.S.
TP	6.5~8.1 (g/dl)	7.8	6.2	6.9	6.4	7.0
A/G	1.5~2.4 (%)	1.4	1.1	1.4	2.3	1.8
Alb	60.9~70.9(%)	58.1	52.2	58.9	69.8	63.6
α_1	1.8~2.9 (%)	3.6	7.6	3.4	3.6	3.1
α_2	4.9~8.3 (%)	8.7	13.9	8.3	6.2	8.1
β	7.7~12.1(%)	10.4	7.8	9.0	9.4	11.3
γ	10.5~19.9(%)	19.2	18.5	20.4	11.0	13.7
T.Bil	0.2~1.0 (mg/dl)	0.7	0.4	0.6	0.5	0.4
GOT	10~35 (IU/L)	24	13	17	101	13 (Unit)
GPT	5~40 (IU/L)	19	4	2	171	13(Unit)
ALP	73~248 (IU/L)	322	1726	148	873	8(Unit)
S.Che	0.63~1.23(Δ PH)	1.13	0.27	0.53	0.8	1.0
γ -GTP	6~60 (IU/L)	34	12	14	59	NT
LDH	260~480 (IU/L)	356	369	280	564	213 (Unit)
T.Cho	125~240 (mg/dl)	273	149	138	192	171
BUN	5~19 (mg/dl)	15	19	14	26	20
Cr	0.5~1.3 (mg/dl)	0.8	0.8	1.1	0.8	1.1
Na	135~146 (meq/l)	141	137	135	133	143
K	3.4~4.8 (meq/l)	5.0	4.6	4.7	3.8	4.1
Cl	98~108 (meq/l)	101	103	100	100	NT
Ca	8.3~10.3(meq/l)	9.5	7.2	8.6	9.2	NT
Fe	60~180 (meq/l)	114	65	69	58	120

Table 3 Immunological findings of the five patients

	Normal ranges	O.T.	Y.K.	Y.T.	S.Y.	O.S.
α_2 M (by IEP)		(-)	weak(+)	(-)	(-)	(-)
α_2 M	100~250 (mg/dl)	18	42	13	<6	10
CRP	<300 (μ g/dl)	170	1724	129	246	(-)
SAA	<8 (μ g/ml)	5.3	860	2.6	5.3	NT
IL-6	<10 (ng/ml)	5.4	2.7	1.7	0.7	NT
α_1 AT	150~240 (mg/dl)	317	40.3	265	211	NT
α_1 AG	34~110 (mg/dl)	176	64	99	73	NT
α_1 ACT	24~30 (mg/dl)	40.5	34.8	37.5	32.4	NT
Cerulo	16~31 (mg/dl)	41.5	90.1	32	28.5	NT
Hp	80~330 (mg/dl)	263	457	252	613	NT
C3	50~105 (mg/dl)	99	117	73	78	NT
C4	14~44 (mg/dl)	43	63	26	46	NT
Immunoglobulin						
IgG	960~1960(mg/dl)	1890	1480	1650	935	1000
IgA	120~450 (mg/dl)	412	247	477	195	170
IgM	70~360 (mg/dl)	210	189	130	75	130

Table 4 Prostate tumor marker levels of the five patients

	Normal ranges	O.T.	Y.K.	Y.T.	S.Y.	O.S.
PSA	0.1~5.4 (ng/ml)	1530	5580	6970	7810	NT
γ -sm	<4 (ng/ml)	696	302	456	2590	NT
PAP	0.2~1 (ng/ml)	550	585	89	326	NT

Fig. 2 Clinical course of the patient (Y.K.)
Shaded area represents the normal range of α_2 M

5. 前立腺腫瘍マーカー

PSA, γ -sm および PAP は測定し得た 4 例全例で著明な増加を示し、治療により臨床像の改善に伴い減少し、 α_2 M 値とは逆相関を示した (Table 4)。

6. 臨床経過

臨床経過における血清 α_2 M, CRP および前立腺腫瘍マーカー (PSA, PAP) の変動を Fig. 2 (Y.K.) および 3 (Y.T.) に示す。

Y.K. では抗男性ホルモンによる治療の開始後、臨床像の改善とともに PSA および PAP は減少したが、約 50 病日から臨床像の悪化に伴い再び増加傾向を示

した。 α_2 M は PSA および PAP の変化とほぼ逆相関を示し、約 200 病日に PSA が約 5,000 ng/ml 以上に急激に増加すると、逆に α_2 M は 50 mg/dl 以下に減少した。その後 PSA は減少し、逆に α_2 M は増加し基準範囲に復した。一方、CRP は治療開始後より約 30 日間 300 μ g/dl 以下の陰性を示したが、PSA および PAP が再び増加した約 50 病日から陽性化を示し、以降は PSA および PAP とほぼ平行した変動を示した。

Y.T. では前立腺腫瘍マーカーの著明な増加時に、 α_2 M の著減 (13 mg/dl) および CRP 陰性を示した。経尿導的前立腺切除術および抗男性ホルモンによる治

< Y. T. , 80yrs >

Casodex® (ICI 176334)	50mg/day
Zoladex® (goserelin acetate)	3.6mg
Estracyt® (estramustine phosphate sodium)	420mg/day
Endoxan® (cyclophosphamide)	300mg
Oncovin® (vincristine sulfate)	3mg

Fig. 3 Clinical course of the patient (Y.T.)
Shaded area represents the normal range of α_2 M

療開始後、臨床像の改善とともに PSA および PAP は減少した。一方、 α_2 M は異常低値から基準範囲に復し、CRP は陰性から陽性化を呈した。

7. 病理組織所見

検索し得た 4 症例中 3 例は中分化型腺癌で、異型な核をもつ腫瘍細胞が環状ないしは篩状に増生を示した。他の 1 例は低分化型腺癌で、核の大小不同が目立ちクロマチンは粗造であった。腺管構造の形成は乏しくシート状の増生がみられ、一部の腫瘍細胞では好酸性の核小体が 1~2 ケ認められた。

8. 免疫組織学的所見

免疫組織学的検討では、PSA および PAP は検索し得た 3 例全例において前立腺肥大症に比べ前立腺癌の細胞質に強く発現し (Fig. 4)、中分化型に比べ低分化型で強い傾向を示した。

u-PA は、3 例全例で前立腺肥大症に比べ前立腺癌の細胞質に強い発現分布を示し、分化度による相違は認められなかったが、細胞質の他に、核、線維芽細胞および血管内皮細胞などでも陽性を呈した。抗体吸収試験では前立腺癌細胞での発現は明らかに減少し、他の細胞での発現も軽度低下を示した (Fig. 5)。

tissue-plasminogen activator (t-PA) は 3 例全て

で陰性であった。

Fig. 4 PSA positive cells in adenocarcinoma of the prostate ($\times 200$)

9. 骨核医学検査所見

$^{99m}\text{Tc-MDP}$ を用いた骨核医学検査所見について、O.T. は左肩甲骨頸部、第 10, 11 胸骨、左第 7 肋骨に RI の異常集積があり骨転移が考えられた (Fig. 6)。治療後には転移像は消失した。Y.K. は頭蓋骨部に小さな RI の異常集積が認められ、転移巣が考えられた。Y.T. は右第 2 肋骨、第 8 肋骨起始部、左肩甲骨、右仙腸関節、第 7 頸椎右横突起付近に RI の異常集積が認められ、骨転移が考えられた。S.Y. は頭蓋、全脊椎、肋骨、寛骨臼に RI の異常集積を認め、骨転移が考えられた。O.S. は右恥骨、左第 4 肋骨に RI の異常集積がみられ、骨転移が考えられた。

10. $\alpha_2\text{M}$ の結合性に関する免疫化学的解析

$\alpha_2\text{M}$ と PSA の結合性について調べると、Western blotting では分子量 700~800 KDa 領域に $\alpha_2\text{M-PSA}$ complex を、分子量約 30 KDa 領域に Free の PSA の band が検出された (Fig. 7-a)。

$\alpha_2\text{M}$ と u-PA の結合性については、分子量 700~800 KDa 領域に $\alpha_2\text{M-u-PA}$ complex を、分子量 100~200 KDa 領域には $\alpha_2\text{M}$ の分解物と u-PA の結合物と考えられる band が、分子量約 30 および 50 KDa 領域に Free の u-PA の band が認められた (Fig. 7-

Fig. 5 u-PA positive cells in adenocarcinoma of the prostate ($\times 200$)

Left : before absorption with anti-human rabbit urokinase

Right : after absorption with anti-human rabbit urokinase

Fig. 6 Skeletal scintigraphy of the patient (O.T.) before treatment

b).

α_2 M と IL-6 の結合性については、分子量約 700 KDa 領域に α_2 M-IL-6 complex を、分子量 100~200 KDa 領域には α_2 M の分解物と IL-6 の結合物と考えられる band が認められた (Fig. 7-c).

HPLC では α_2 M と rhIL-6 を反応させたものは、670 KDa 以上と 60~40 KDa および 15~3.5 KDa の 3 分画に分れた。また、 α_2 M 欠乏症患者血清に rhIL-6 を反応させたものでは、70~40 KDa に 1 つの大きな分画として認められた。

V. 考 察

α_2 M は分子量 720,000 の糖蛋白で、血中に最も多い protease-inhibitor として約 100~300 mg/dl の濃度で存在するが、髄液や胸腹水などの体液では微量の存在にすぎない⁸⁻¹¹⁾。 α_2 M は単球-マクロファージ系の細胞などで産生され、血中のほとんどの

protease と結合して α_2 M-protease complex を形成し、 α_2 M レセプターを有するマクロファージおよび線維芽細胞に取り込まれ異化されると考えられている¹²⁾。

α_2 M の生物学的作用としては、protease-inhibitor の機能¹⁾をはじめ、免疫抑制作用^{2,3)}、IL-6 に結合し運搬する作用⁴⁾などが明らかにされている。

血中 α_2 M は各種病態で増加を示すことが多いが、減少する病態は少ない^{3,13)}。 α_2 M の低下する病態は良性疾患では DIC、慢性関節リウマチ、急性膵炎および術後などでみられる。DIC では形成された α_2 M-plasmin complex が血中から消失されるために、しばしば α_2 M が低下すると考えられている。一方、悪性疾患では、骨髄腫、リンパ肉腫、白血病などの造血系腫瘍、進行癌および前立腺癌などで低下がみられる¹⁴⁾。現在までのところ、良性疾患で血清 α_2 M が 40 mg/dl 以下を示すことはほとんどなく、血清 α_2 M 濃度 40 mg/dl 以下は悪性腫瘍を示唆する所見といえよう。

今回、 α_2 M が著明に低下し、癌転移を示した 5 症例について臨床病理学的特徴を検討した。

血液学的所見において α_2 AP は全例で軽度~中等度低下を示したが、その機序としては前立腺組織から放出される u-PA の作用により plasminogen が plasmin となり、 α_2 AP-plasmin complex が血中から消失するためと考えられた。他方、t-PA および血小板数は全例が正常範囲を示し、ESR は全例で亢進したが、PPT および PTT も検査し得た 3 例では正常であった。このような所見より、5 症例において DIC などの線溶系の亢進はないと考えられた。軽度から中等度の正球性正色素性貧血が 3 例に認められ、血清 Fe は 1 例で軽度低下を示すのみで慢性消耗性疾患による貧血も考えられた。

生化学的所見では、蛋白分画の α_1 分画は全例で増加を示し、これは α_1 AT や α_1 ACT などの急性相反応蛋白の上昇を反映したものと考えられた。 α_2 分画が増加を示したのは 2 例のみで、Hp の増加と α_2 M の著明な低下による影響が考えられた。ALP 異常高値は 3 例に、LDH 高値は 1 例に認められ、それらは癌転移の結果と考えられた。

免疫学的所見では、急性相反応蛋白の α_1 -AG および C3 は 4 例中 1 例の増加であったが、 α_1 AT、 α_1 ACT、Cer、Hp および C4 は半数から全例で増加を示し、これらは癌転移の病態を反映したものと考えら

Fig. 7 Western blotting of SDS-PAGE (5~15%), stained with antiserum to PSA, u-PA and IL-6, respectively

れた。一方、CRP および SAA は血清 α_2 M 値が 42 mg/dl を示した 1 例においてのみ増加したが、血清 α_2 M 値 18 mg/dl 以下の 4 症例では癌転移があるにもかかわらず正常範囲または陰性を示し、 α_1 AT, α_1 ACT および Cer などとは異なる変動が認められた。

以上のように急性相反応蛋白の変動は、それぞれ異なった産生機序や異化のために多少異なった経時的変動を示し、とくに CRP と SAA は主に IL-6 の影響を受け^{15,16)}、その他の急性相反応蛋白は、IL-1, IL-6, TNF などの炎症性サイトカインが肝細胞に作用して産生される^{17,18)}と考えられた。

免疫化学的解析の結果、Western blotting により α_2 M は IL-6 と complex を形成し、IL-6 の carrier protein としての機能があることが認められた。HPLC では、 α_2 M と rhIL-6 を反応させたものは α_2 M との complex, IL-6 の重合¹⁹⁾および遊離 IL-6 の分画に分かれた。 α_2 M 欠乏症患者血清に rhIL-6 を反応させたものでは、 α_2 M 以外の血清蛋白成分との complex と考えられる分画が認められた。以上のことから、血中 α_2 M の著減で CRP および SAA が上昇

しない機序として、血中の遊離 IL-6 活性は不安定で protease による分解および処理を受けやすく⁴⁾、IL-6 作用が低下し肝臓での CRP および SAA の生合成が低下すると考えられた。

また、臨床的にも α_2 M が 13 mg/dl を示した例では、治療開始後臨床像の改善に伴って α_2 M は基準範囲に復し、また CRP は陰性から陽性化を呈した。他方、 α_2 M が 42 mg/dl を示した例では、CRP は全経過中で PSA および PAP とほぼ平行して変動し、癌の病勢を良く反映していた。以上のことから、 α_2 M のほとんど欠損する状態 (約 20 mg/dl 以下) では CRP および SAA の産生が低下することが示唆された。

前立腺腫瘍マーカーは全例で著明に増加し、臨床経過において PSA および PAP は血清 α_2 M 濃度と逆相関の変動を示した。今回の検討でも、従来の報告^{20~22)}と同様に α_2 M は PSA と complex を形成しやすく、complex が血中から速やかに消失することが証明されており¹²⁾、血中 PSA の著増は血清 α_2 M 濃度の低下に影響することが示唆された。また、血清

α_2 M 濃度は癌転移を伴う前立腺癌で転移のない前立腺癌に比し著明に減少した。以上より、血清 α_2 M 濃度の低下は癌転移を伴う前立腺癌の病勢を良く反映し、その測定は経過観察に有用な指標になると考えられた。

骨核医学検査では全例で骨転移を示す RI の異常集積を認め、骨転移をきたしやすい前立腺癌^{23,24)}に典型的な転移像を示した。O.T. では抗男性ホルモン療法が著効し、治療より骨転移像の消失を認めた。

免疫組織学的検索については、前立腺癌組織では PSA は分化度に関係なく発現するとされる^{25,26)}が、低分化型で発現率が減少するという報告もある^{27,28)}。また、PAP は分化度とは無関係の発現であったとされる^{29,30)}。今回の検討では、前立腺癌組織で PSA および PAP はほぼ同様の発現分布を示し、中分化型より低分化型で強い発現傾向を示したが、分化度の相違と関係あるかは、さらに多数例の検討が必要である。

一方、u-PA は前立腺の腺上皮細胞などに存在し³¹⁾、前立腺肥大症に比べ前立腺癌組織で増加することが観察されている^{31,32)}が、著者らの成績でも u-PA は前立腺肥大症に比べ骨転移を伴う前立腺癌の癌組織で強い発現分布を示し、癌細胞において u-PA の産生が亢進していることが考えられた。また、前立腺癌で原発部位より浸潤転移巣で u-PA の発現が増加することが観察されており^{33,34)}、限局する前立腺癌に比べ骨転移を伴う前立腺癌で、その血中濃度も有意に上昇することが指摘されている^{35,36)}。今回の検討でも、 α_2 M は PSA と同様に u-PA とともに complex を形成しやすく³⁷⁾、その complex が血中から消失する機序も考えられる。つまり、PSA と同様に u-PA も血清 α_2 M 濃度の低下に影響する因子と考えられた。一方、t-PA は前立腺では内腺組織に存在し³⁸⁾、前癌状態の前立腺組織では発現しなかったという報告がある³⁹⁾が、今回の検討では前立腺癌組織でも発現は認められなかった。ただ、固定組織による影響は否定できない。

転移を随伴する前立腺癌における α_2 M 欠乏症の機序に関しては、PCR を用いた α_2 M 遺伝子の解析および SDS 電気泳動を用いて検討した結果、 α_2 M 欠乏症

は産生の低下というよりも異化の亢進で生じることが示唆された¹³⁾。さらに、今回の検討から癌組織が放出する PSA、u-PA などの protease は α_2 M と結合し、その complex は網内系に取り込まれ消費され α_2 M 欠乏症が生ずると考えられた。

なお、 α_2 M の欠乏状態では血中に大量に増量した protease が上皮細胞、血管内皮細胞などの細胞基底膜や結合組織の構成蛋白質を局所的に分解するため、癌細胞の転移能が上昇し癌の遠隔転移が生じやすいと考えられた。したがって、血中 α_2 M の著明な減少は癌細胞の転移を知るための指標の 1 つとして有用であると考えられた。

VI. 結 語

1. 血清 α_2 M 濃度が約 40 mg/dl 以下を示す α_2 M 欠乏症 5 例は、すべて癌転移を伴う前立腺癌であった。

2. 血清 α_2 M 濃度は臨床経過において血中 PSA および PAP 値と逆相関を示し、PSA および u-PA などの protease は α_2 M と complex を形成した。

3. 前立腺癌組織の免疫組織学的検索において PSA、PAP および u-PA が多量に認められた。

4. α_2 M 欠乏症の成因として、前立腺癌組織から放出される protease と α_2 M の complex の形成による異化の亢進が考えられた。

5. CRP および SAA は、血清 α_2 M 濃度約 20 mg/dl 以下の欠乏状態で陰性ないしは異常高値を示さず、他の acute phase proteins とは異なり α_2 M 濃度に影響されることがわかった。

6. 血清 α_2 M 濃度は癌転移を伴う前立腺癌の病勢を反映し、血中 α_2 M の著減は癌転移の 1 つの指標として有用と考えられた。

(稿を終えるにあたり、本研究のために御協力いただいた北里大学医学部泌尿器科学額川晋講師、同医学部病理学三枝信講師、同医学部臨床病理学西川隆講師ならびに同医学部生物化学系市川恵子主任研究技術員の諸氏に深謝致します。)

文 献

- 1) Barrett, A.J., Starkey, P.M.: The interaction of α_2 macroglobulin with proteases. *Biochem. J.*, 133: 709~724, 1973.
- 2) Urushizaki, I., Ishitani, K., Nagai, T., et al.: Immunosuppressive factors in serum of patients with gastric carcinoma. *GANN*,

- 68 : 413~421, 1977.
- 3) Ohtani, H., Saito, M., Koshiba, K. : Alpha-2-macroglobulin deficiency in patients with advanced prostate cancer. *Oncology*, 42 : 341~344, 1985.
- 4) Matsuda, T., Hirano, T., Nagasawa, S., Kishimoto, T. : Identification of α_2 macroglobulin as a carrier protein for IL-6. *J. Immunol.*, 142 : 148~152, 1989.
- 5) Hall, W.S., Humphries, E.J., Gonias, L.S. : Inhibition of cell surface receptor-bound plasmin by α_2 -aniplasmin and α_2 -macroglobulin. *J. Biol. Chem.*, 266(19) : 12329~12336, 1991.
- 6) Yamada, T., et al. : A rabbit method for measuring serum amyloid A protein by latex agglutination nephelometric immunoassay. *Ann. Clin. Biochem.*, 30 : 72~76, 1993.
- 7) Ida, N., Sakurai, S., Hosaka, T., Hosoi, K., et al. : Matsuura, Y., Kohase, M. : An enzyme-linked immunosorbent assay for the measurement of human interleukin-6. *J. Immunol. Meth.*, 133 : 279~284, 1990.
- 8) 狩野有作・大谷英樹・他4名 : Blood-cerebrospinal fluid barrier (BCB) の障害における微量蛋白成分の動態について. *生物物理化学*, 40 : 199~206, 1996.
- 9) Kanoh, Y., Ohtani, H. : Levels of interleukin-6, CRP and α_2 macroglobulin in cerebrospinal fluid (CSF) and serum as indicator of blood-CSF barrier damage. *J. Clin. Pathol.*, (in submission).
- 10) Asseo, P.P., Tracopoulos, G.D. : Orsomucoid, α_2 -macroglobulin and immunoglobulins in serum and pleural effusions. *Am. J. Clin. Pathol.*, 76 : 431~441, 1981.
- 11) Buo, L., Karlsrud, T.S., Johansen, H.T., et al. : The contact system in human malignant and benign ascites. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 53 : 117~124, 1993.
- 12) Kaplan, J., Nielson, M.L. : Analysis of macrophage surface receptors. *J. Biol. Chem.*, 254 : 7323~7328, 1978.
- 13) 狩野有作・大谷英樹 : α_2 マクログロブリン欠乏症. *生物物理化学*, 38 : 391~396, 1994.
- 14) 大谷英樹・小出朝男 : 悪性腫瘍における血清糖蛋白の変動—とくに α_2 マクログロブリンについて—. *北里医学*, 10 : 30~34, 1980.
- 15) Depraetere, S., Willems, J., Joniau, M. : Stimulation of CRP secretion in HepG 2 cell : Cooperative effect of dexamethasone and interleukin 6. *Agents and Actions*, 34 : 369~375, 1991.
- 16) Smith, J.W., McDonald, T.L. : Production of serum amyloid A and C-reactive protein by HepG 2 cells stimulated with combinations of cytokines or monocyte conditioned media : the effect of prednisolone. *Clin. exp. Immunol.*, 90 : 293~299, 1992.
- 17) Baumann, H., Richards, C., Gaudie, J. : Interaction among hepatocyte-stimulating factors, interleukin-1, and glucocorticoids for regulation of acute phase plasma proteins in human hepatoma (HepG 2) cells. *J. Immunol.*, 139 : 4122~4128, 1987.
- 18) Mackiewicz, A., Speroff, T., Kushner, I., et al. : Effects of cytokine combinations on acute phase protein production in two human hepatoma cell lines. *J. Immunol.*, 146 : 3032~3037, 1991.
- 19) May, T.L., Santhanam, U., Sehgal, B.P. : On the multimeric nature of natural human Interleukin-6. *J. Bio. Chem.*, 266(15) : 9950~9955, 1991.
- 20) Lilja, H., Christensson, A., Dahlen, U., et al. : Prostate-specific antigen in serum occurs predominantly in complex with α_1 -antichymotrypsin. *Clin. Chem.*, 37/9 : 1618~1625, 1991.
- 21) Zhou, A.M., Tewari, P.C., Bluestein, B.I., et al. : Multiple Forms of Prostate-Specific Antigen in Serum : Differences in Immunorecognition by Monoclonal and Polyclonal Assays. *Clin. Chem.*, 39/12 : 2483~2491, 1993.
- 22) Espana, F., Cuenca, S.J., Estelles, A., et al. : Quantitative immunoassay for complexes of prostate-specific antigen with α_2 -macroglobulin. *Clin. Chem.*, 42(4) : 545~550, 1996.
- 23) Merrick, M.V., Ding, C.L., Chisholm, G.D., et

- al. : Prognostic significance of alkaline and acid phosphatase and skeletal scintigraphy in carcinoma of the prostate. *Brit. J. Urol.*, 57 : 715~720, 1985.
- 24) Urwin, G.H., Percival, R.C., Harris, S., et al. : Generalised increase in bone resorption in carcinoma of the prostate. *Brit. J. Urol.*, 57 : 721~723, 1985.
- 25) Ghazizadeh, M., Kagawa, S., Maebayashi, K., et al. : Prostatic origin of metastases : Immunoperoxidase localization of prostatic-specific antigen. *Urol. Int.*, 39 : 9~12, 1984.
- 26) Ito, H., Yamaguchi, K., Sumiya, H., et al. : Histochemical study of R 1881-binding protein, prostatic acid phosphatase, prostate specific antigen and γ -seminoprotein on prostatic cancer. *Eur. Urol.*, 12 : 49~53, 1986.
- 27) Stain, B.S., Vangore, S., Peterson, R.O. : Immunoperoxidase localization of prostatic antigens. Comparison of primary and metastatic sites. *Urology*, 24 : 146~152, 1984.
- 28) Epstein, J.I., Eggleston, J.C. : Immunohistochemical localization of prostate-specific acid phosphatase and prostate-specific antigen in A 2 adenocarcinoma of the prostate : Prognostic implications. *Hum. Pathol.*, 15 : 853 ~859, 1984.
- 29) Nadi, M., Tabei, S.Z., Castro, A., et al. : Prostate-specific antigen : An immunohistologic marker for prostatic neoplasms. *Cancer*, 48 : 1229~1232, 1981.
- 30) Jobsis, A.C., De Vries, G.P., et al. : The immunohistochemical detection of prostatic acid phosphatase : Its possibilities and limitations in tumor histochemistry. *Histochem. J.*, 13 : 961~973, 1981.
- 31) Camiolo, S.M., Markus, G., Englander, L.S., et al. : Plasminogen Activator Content and Secretion in Explants of Neoplastic and Benign Human Prostate Tissues. *Cancer Res.*, 44 : 311~318, 1984.
- 32) Dano, K., Andreasen, P.A., Grondahl-Hansen, J., et al. : Plasminogen activators, tissue degradation, and cancer. *Adv. Cancer Res.*, 44 : 139~239, 1985.
- 33) Gaylis, F.D., Keer, H.N., Wilson, M.J. et al. : Plasminogen activators in human prostate cancer cell lines and tumors : correlation with the aggressive phenotype. *The J. Urol.*, 142 : 193~198, 1989.
- 34) Festuccia, C., Vincentini, C., Di Pasquale, A. B., et al. : Plasminogen activator activities in short-term tissue cultures of benign prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma. *Oncology Res.*, 7 : 131~138, 1995.
- 35) Kirchheimer, J.C., Pfluger, H., Ritschl, p., et al. : Plasminogen activator activity in bone metastases of prostatic carcinomas as compared to primary tumors. *Inv. Metast.*, 5 : 344~348, 1985.
- 36) Hienert, G., Kirchheimer, J.C., Pfluger, H., et al. : Urokinase-type Plasminogen activator as a marker for the formation of distant metastases in prostatic carcinomas. *The J. Urol.*, 140 : 1466~1469, 1988.
- 37) Waller, E.K., Schleuning, W.D., Reich, E. : Complexformation and inhibition of urokinase by blood plasma proteins. *Biochem. j.*, 215 : 123~131, 1983.
- 38) Reese, J.H., McNeal, J.E., Redwine, E.A., et al. : Tissue type plasminogen activator as a marker for functional zones within the human prostate gland. *Prostate*, 12 : 47~53, 1988.
- 39) McNeal, J.E., Alray, J., Leav, I. et al. : Immunohistochemical evidence for impaired cell differentiation in the premalignant phase of prostate carcinogenesis. : *Am. J. Clin. Pathol.*, 90(1) : 23~32, 1987.