<短 報>

肝癌組織中に特異な α -L-fucosidase 活性 —ポリアクリルアミドゲル等電点電気泳動による検討—

井手口清治*

緒言: α -L-fucosidase (α -L-fucoside-fucohydrolase, EC3.2.1.51: AFU) は複合糖質の fucose を解離する exoglycosidase である。著者は血清 AFU 活性が肝細胞癌のマーカーとして有用な可能性を報告し, Sephadex G-200 による検討で肝癌部に非癌部には認められない活性が存在する事を示唆した¹⁾。今回この肝癌部および非癌部における活性をポリアクリルアミドゲル (PAG) 等電点電気泳動を用いて比較し, 興味ある知見を得たので報告する。

対象と方法: 肝硬変合併肝細胞癌 2 例で死後 6 時間以内に剖検により得た癌部および非癌部組織について検討した。肝組織の処理は Kleintop ら²⁾の方法に従った。湿重量 1~2g を 3 倍量の 0.01M citric acid-sodium citrate buffer pH5.0 の中で POLYTRON® (KAINEMATIC) を用いてホモジネートする。次に 40,000×g, 40分間遠沈しその上清を採取する。残った沈澱物は再度 2 倍量の同 buffer 内で攪拌し, 40,000×g, 40分間遠沈を繰り返す。これらの上清を minicon B-15® (Amicon) を用いて 5 倍に濃縮後泳動に用いた。この濃縮液中の組織 AFU 活性は既報に従い測定した¹⁾。PAG 等電点電気泳動は, 岸ら³⁾の方法に従った。ゲルは, アクリルアミド (半井) 18.4g, ビスアクリルアミド (半井) 0.6g を蒸留水で 100ml とした I 液 7ml と, 蔗糖 (半井) 20g, グリセリン (和光) 10ml を蒸留水で 100ml とした II 液 11.5ml, さらに Ampholine® (LKB) pH5-7 1.2ml, pH3.5-10 0.2ml, 5%過硫酸アンモニウム (和光) 0.3ml, TEMED (和光) 0.2ml を加え, 混合, 脱気後, 一夜重合して作成した。このようにして作成したゲルはおよそ 5.8%T, 3%C となる。電極液は陽極に 0.02M H_3PO_4 , 陰極に 0.5M NaOH を用い, 両電極の間隔は 10cm とした。試料は 10 μ l を陽極より 1.0cm の部位に添加した。泳動は 400V, 1.5W~1,000V, 3.0W で 23~24時間行った。なお, こ

れらの操作はすべて 0~4℃にて行った。活性染色には, 4-methylumbelliferyl- α -L-fucoside (SIGMA) を用いた。これを 0.2mg/ml の割合で 0.1M citric acid-phosphate buffer pH4.8 に溶解する。この中にセルロースアセテート膜 (Sartorius) を浸し, この膜を泳動後のゲルに密着させ, 37℃, 10分間放置後, アンモニアガスに曝し, 365nm の長波長紫外線下で観察した。

結果: Fig. 1 に泳動像を示す。各例左側に非癌部検体, 右側に癌部検体を泳動した。非癌部組織では, 2 例とも共通して陽極よりに約 6 本のバンドに AFU 活性が分離された。これに対して癌部組織では, 非癌部と同じ 6 本のバンド以外に, 陰極よりのバンド I と II との間に新たな 1 本のバンドの出現 (arrow) が認められ, 計 7 本のバンドに分離された。pI MARKER PROTEIN KIT (ORIENTAL YEAST) による検討では, これらのバンドは pI 4.9~8.3 の間で, 酸性領域よりに形成されていた。なお各組織の AFU 活性値は case 1 の非癌部 252nmol/mg/hr, 癌部 275nmol/mg/hr, case

Fig. 1 The electrophoretic pattern of α -L-fucosidase from liver tumors and non cancer livers by PAG isoelectric focusing.

* 川崎医科大学内科学教室消化器 I 部門

<受付日1989年7月27日>

2の非癌部302nmol/mg/hr, 癌部210nmol/mg/hrであった。

考察：肝細胞癌では血清 AFU 活性の有意な上昇が認められ、その測定が肝細胞癌の診断や動態の把握に有用であると報告されている^{1,4,5)}。一方、等電点電気泳動による肝組織中 AFU 活性については、6～7個の活性の存在が報告されている^{6,7)}。しかし、肝癌組織と非癌部肝組織につきその活性を比較した報告はみられない。今回、癌部と非癌部の AFU 活性値には一定の傾向はみられなかったが、PAG 等電点電気泳動による検討では、非癌部組織では約6本のバンドにその活性が分離されたのに対して、癌部組織においては非癌部に認められた6本のバンドのほかに新たな1本のバンドを加え、計7本のバンドにその活性が分離された。この新たな活性は、陰極側よりのバンド I とバンド II との間でよりバンド II に近い位置に認められており、やや中性領域に近い活性と考えられた。著者は既に肝癌部と非癌部での AFU 活性につき Sephadex G-200 を用いた分子ふるいによる検討で、非癌部組織の AFU 活性は二つのピークに分離されたのに対し、肝癌組織ではさらに低分子よりに第三のピークを認め、癌に特

異な活性の存在する可能性を示唆している¹⁾。今回の PAG 等電点電気泳動の結果からは肝細胞癌に特有と思われる AFU 活性を示すバンドを検出し得た。このバンドが Sephadex ゲル濾過により得られた第三のピークと一致するという証明は未だなしえていないが、非癌部には認められない癌に特有と思われる AFU 活性が肝癌組織から検出されたことは、肝細胞癌における血清 AFU 活性の高値を説明しうる一つの根拠になりうると考えられた。

索引用語：肝細胞癌, α -L-fucosidase 活性, PAG 等電点電気泳動

文 献：1) 井手口清治：肝臓 30：323—334, 1989
2) Kleintop LDL, et al：JNCI 76：649—652, 1986
3) 岸紘一郎，他：科学警察研究所報告法科学編 38：84—86, 1985 4) Deugnier Y, et al：Hepatology 4：889—892, 1984 5) 山本佳司，他：第22回日本肝臓学会西部会講演抄録集：61, 1987(抄) 6) Alhadeff JA, et al：Practical Enzymology of the Sphingolipidosis, Edited by RH Glew, SP Peters. Alan R Liss, Inc, New York, 1977, p247—281 7) Turner BM, et al：Am J Hum Genet 27：651—661, 1975

Tumor specific α -L-fucosidase in liver cancer —Analysis by PAG isoelectric focusing—

Seiji IDEGUCHI*

* Division of Gastroenterology I, Department of Medicine, Kawasaki Medical School (Kurashiki)