原 著

Glutathione S-transferase- π (GST- π) による 口腔扁平上皮癌の診断に関する研究

小 林 裕

東京医科歯科大学歯学部第一口腔外科学教室 (主任・指導：天笠光雄教授)

(1998 年 12 月 10 日 受付)

A Study on Diagnosis of Oral Squamous Cell Carcinoma (Oral SCC) by Glutathione S-transferase- π (GST- π)

Yutaka Kobayashi

The First Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Faculty of Dentistry, Tokyo Medical and Dental University
(Chief and Director : Prof. Teruo Amagasa)

The purpose of this study was to estimate the usefulness of plasma GST- π in diagnosis of oral SCC and to confirm the expression and localization of GST- π in human oral SCC. Plasma GST- π levels of 109 untreated oral SCC cases, 47 recurrent oral SCC cases and 36 healthy controls were measured by the sandwich enzyme-immunoassay (EIA) system. Human oral SCC and human oral SCC cell lines (HSC-3, HSC-4) were examined immunohistochemically and by the immunoelectron microscopic technique. The results were as follows :

1. The cut off level was 30.0 ng/ml (mean+2S.D.). There was a statistically significant difference between the mean plasma GST- π levels in oral SCC (both untreated and recurrent cases) and controls ($p < 0.001$).
2. The positive rate of GST- π was 63.3% in untreated cases and 68.1% in recurrent cases.
3. There was no significant correlation between plasma GST- π levels and each clinical factor.
4. The positive rates of plasma GST- π were compared with those of serum SCC antigen in oral SCC. Plasma GST- π was 62.9%, while serum SCC antigen 22.2%.
5. From immunohistochemical observation, GST- π positive staining was evident in the cytoplasm and nucleus of oral SCC.
6. By immunoelectron microscopy, GST- π was confirmed to be in the mitochondria and the interchromatinic regions of the nucleus.

I. 緒 言

近年、腫瘍マーカーに関連する研究が行われるようになり、悪性腫瘍の診断に有効との報告がある¹⁻⁴⁾。

Glutathione S-transferase- π (GST- π) は、解毒機構に関連した多機能酵素群の Glutathione S-transferase の一種であり⁵⁻⁷⁾、肺癌^{8,9)}や消化器癌^{10,11)}において腫瘍マーカーとしての有用性が示唆されてきている。また、ラット肝前癌病変¹²⁾や口腔の前癌病変¹³⁻¹⁵⁾において免疫組織化学的に GST- π が発現するとの報告がある。

本研究では、抗 GST- π モノクローナル抗体を用い口腔扁平上皮癌患者の血漿 GST- π 値を測定し、臨床的要因、病理組織学的要因との関連を明らかにすることを目

的としている。なお、血漿 GST- π 値と口腔癌の治療成績との関連についても検討した。さらに、GST- π の有用性を明らかにすべく、これまで口腔領域でも使用されている腫瘍マーカー SCC 抗原値との比較も行った。また、ヒト扁平上皮癌組織および当科で樹立した口腔扁平上皮癌由来の培養細胞株 HSC-3, HSC-4¹⁶⁾を用い GST- π の細胞内の発現ならびにその局在について、免疫組織化学的、免疫電顕的にも検討を試みた。

II. 対象症例、実験材料および方法

1. 対象症例

1990 年 10 月から 1996 年 6 月までに東京医科歯科大学歯学部附属病院第一口腔外科を受診し、病理組織学的

表 1 対象症例

症例\性別	男性	女性	計
扁平上皮癌患者			
未治療例	69	40	109
再発例	28	19	47
健常者	20	16	36
計	117	75	192

表 2 年齢分布

年 齢	症例数 (%)
50 歳未満	20 (18.3)
50～59 歳	29 (26.6)
60～69 歳	34 (31.2)
70 歳以上	26 (23.9)
計	109 (100.0)

表 3 扁平上皮癌未治療例の TNM 分類 (UICC 1987)

N \ T	T 1	T 2	T 3	T 4	計 (%)
N 0	23	41	10	8	82 (75.2)
N 1	0	7	2	4	13 (11.9)
N 2					
a	0	2	2	0	4 (3.7)
b	0	3	1	5	9 (8.3)
c	0	0	1	0	1 (0.9)
N 3	0	0	0	0	0 (0.0)
計	23	53	16	17	109
(%)	(21.1)	(48.6)	(14.7)	(15.6)	(100.0)

に扁平上皮癌と診断された 156 症例を対象とした。なお肝機能値 (GOT>37, GPT>35) に異常のみられた症例については除外した。対象患者のうち未治療例は 109 例, 再発例は 47 例であった。コントロールは 18～77 歳の健康成人 36 名とした。

扁平上皮癌未治療例 109 例の性別は男性 69 例, 女性 40 例, 再発例 47 例では男性 28 例, 女性 19 例であった。コントロール 36 例では男性 20 例, 女性 16 例であった (表 1)。

対象患者の年齢は, 25 歳から 87 歳で, 50 歳未満が 20 例 (18.3%), 50 歳台 29 例 (26.6%), 60 歳台 34 例 (31.2%), 70 歳以上 26 例 (23.9%) であった (表 2)。

1987 年度 UICC の TNM 分類による T 分類では, T 1; 23 例 (21.1%), T 2; 53 例 (48.6%), T 3; 16 例 (14.7%), T 4; 17 例 (15.6%), また N 分類では, N 0; 82 例 (75.2%), N 1; 13 例 (11.9%), N 2 a; 4 例 (3.7%), N 2 b; 9 例 (8.3%), N 2 c; 1 例 (0.9%) で, M 分類では全例 M 0 であった (表 3)。病期分類については, Stage I; 23 例 (21.1%), Stage II; 41 例 (37.6%), Stage III; 18 例 (16.5%), Stage IV; 27 例 (24.8%) であった (表 4)。

表 4 扁平上皮癌未治療例の病期分類

Stage	症例数 (%)
I	23 (21.1)
II	41 (37.6)
III	18 (16.5)
IV	27 (24.8)
計	109 (100.0)

2. 培養細胞

GST- π の局在を検討するためにヒト口腔扁平上皮癌細胞株 HSC-3, HSC-4¹⁶⁾を用いた。これらの細胞は 5 % Fetal Calf Serum (FCS, Gibco) を含む Dulbecco's modified Eagle's Medium (日水製薬) を培地とし, 5 % CO₂, 37℃ 条件下にて継代培養した。再現性を確保するため, 本実験において継代は 6 週以内とした。

3. 方法および試料の作製法

1) 血漿 GST- π 測定

測定方法は, ヘパリンナトリウム加試験管 (テルモ, 5 ml) を用いて対象患者ならびコントロールの末梢血を採取した後, 3 時間以内に 3,000 rpm, 10 分間遠心分離

し、1 ステップサンドイッチによる EIA 法 (TDI-64, 帝人社, 東京, 抗 GST- π モノクローナル抗体)³⁾にて測定した。すなわち, GST- π の 4, 16, 40, 120 ng/ml の標準溶液をそれぞれ 40 μ l ずつ試験管に採取し基準液とした。対象症例の血漿も 40 μ l ずつ試験管に採取した。両者を測定用緩衝液で 6 倍稀釈し, 抗 GST- π モノクローナル抗体を 200 μ l 加え振とうする。次いで, 固定抗体ビーズを 1 個ずつ各試験管に加え, 37℃ の恒温槽にて 90 分間反応させる。免疫反応終了後, 各試験管反応液を吸引除去し, 生理食塩水にて 3 回洗浄する。発色液を 400 μ l ずつそれぞれの試験管に加え, 37℃ の恒温槽にて 30 分間発色反応させる。反応終了後, 2 N H₂SO₄ を 1 ml ずつ加え十分に攪拌する。その後, 波長 450 nm で吸光度を測定し, 血漿 GST- π 値を定量した。なお, 本研究で使用した GST- π は, Guthenberg らの方法¹⁷⁾に従ってヒト胎盤から精製したもので, 抗 GST- π モノクローナル抗体は BALB/C マウスの腹水より作製されている¹⁸⁾。血清 SCC 抗原値の測定は, SRL 社に依頼し測定した。

2) 光顕的観察

培養細胞は, 無処理のスライドガラス上で培養し, Dulbecco's Phosphate Buffered-Saline (PBS, pH 7.5) で洗浄後, PLP (Periodate-Lysine-Paraformaldehyde) 固定を 4℃ で 4 時間行い, ヘマトキシリン-エオジン (H-E) 染色を行い観察した。ヒトから得られた癌組織は, 採取後 PLP 固定液にて 4℃ で 6~10 時間固定した。次いで, OCT コンパウンド (Miles 社) に包埋し, ドライアイス・アセトンで凍結させ, -80℃ のディープフリーザ内に保存した。薄切は -20℃ 以下でクリオスタット (Leitz 社 CM 1900) にて行った。切片の厚さは 4~6 μ m とした。

GST- π の免疫組織化学的観察では, 培養細胞, ヒト癌組織とも PLP 固定後, 0.01 M PBS にて 3 回洗浄し, 0.03% H₂O₂/メタノールを室温 30 分間処理させることで内因性ペルオキシダーゼを除去し, 再び 0.01 M PBS にて洗浄後, 非特異的吸着を阻止するために正常ウマ血清を室温 20 分間処理し, 一次抗体 (抗 GST- π モノクローナル抗体¹⁹⁾, マウス IgG, 稀釈率 1/500) を湿箱内で 4℃ 一晩作用させた。0.01 M PBS にて洗浄し, 二次抗体としてビオチン化抗マウス IgG (VECTASTAIN) を 30 分間湿箱内で作用させ, 0.01 M PBS で洗浄し, ABC 溶液 (VECTASTAIN) を室温で 60 分間湿箱内において作用させた。次いで, DAB 反応 (0.01% H₂O₂, 0.02% 3,3'-diaminobenzidine • 4 HCL, Tris 緩衝液 pH 7.4) により発色させた。いずれも陰性コントロールとして一次抗体の代わりに PBS を用いた。

3) 電顕的観察

培養細胞を 30 mm プラスチックシャーレ内で培養し

2.5% グルタルアルデヒドで 2 時間固定し, PBS にて洗浄後, 1% 四酸化オスミウムで 2 時間後固定した。次いでアルコール系列にて脱水, Epon 812 にて包埋し, Ultracut-C (ライヘルトユンク社) にて超薄切した後, 酢酸ウラン, クエン酸鉛の二重染色を行い, 透過電子顕微鏡 (日立 600 型) にて観察した。

免疫電顕的観察では Post-embedding 法によって行った。すなわち, 上記の電顕的観察と同様に 2.5% グルタルアルデヒドで固定後, 1% 四酸化オスミウムで後固定し, 脱水, 包埋, 超薄切片を作成した。免疫染色は寺田らの方法²⁰⁾に準じ, PBS をセルロースアセテート 0.20 μ m のフィルターにて濾過して用いた (以後, 抗体や試薬の稀釈にはこれを用いる)。超薄切片をニッケルメッシュに乗せ, 0.5% の過酸化水素にて脱エボン 5 分間行う。その後, 極力メッシュの汚染を避けるため, マイクロチューブ (アシスト社) のなかにメッシュを沈めて, PBS による洗浄を 5 分間, 3 回十分に行う。次いで, 正常ヤギ血清 (60 倍稀釈) で 2 時間前処置を行い, 再度 PBS にて 5 分間, 3 回洗浄する。一次抗体として抗 GST- π モノクローナル抗体を 500 倍稀釈したものをマイクロチューブ内に入れ, そのなかにメッシュを沈める。陰性コントロールとしては, 一次抗体の代わりに PBS を用いた。おのおの 4℃ にて一晩作用させ, 同様にマイクロチューブ内で 5 分間, 3 回洗浄した。PBS にて, 100 倍に稀釈された金コロイド標識 (コロイド粒子 10 nm, イーレム社, イタリア) をマイクロチューブ内で 30 分反応させ, 0.20 μ m のフィルターにて濾過した蒸留水を用いて, 5 分間マイクロチューブ内にて洗浄した (3 回繰り返す)。その後, 酢酸ウランにて 10 分間染色し, 水洗後電顕観察に供した。

4. 統計処理

本研究の GST- π 測定値に関わる統計処理は Kruskal Wallis 検定法を用いて行った。

III. 結 果

1. 血漿 GST- π 値と陽性率

1) cut off 値

コントロール 36 例の血漿 GST- π 測定値は平均値 17.6 ng/ml, 標準偏差 6.2 ng/ml であった。このことより cut off 値 (コントロールの平均値 + 2 S.D.) は 30.0 ng/ml とした (表 5)。

2) 口腔扁平上皮癌患者

口腔扁平上皮癌患者未治療例の血漿 GST- π 値の平均値と標準偏差は, 39.8 ± 22.6 ng/ml, 再発例では 45.1 ± 24.9 ng/ml であり, 未治療例および再発例の血漿 GST- π 値は, 健常者に対して有意に高かった (p < 0.001)。陽性率は, 未治療例では 109 例中 69 例 (63.3%), 再発例

表5 血漿 GST- π 値と陽性率

症例 \ GST- π	平均値 $\pm$ 標準偏差 (ng/ml)	範 囲	陽性率 (%)
扁平上皮癌			
未治療例	39.8 $\pm$ 22.6*	7.4~114	69/109 (63.3)
再発例	45.1 $\pm$ 24.9*	8.1~112	32/ 47 (68.1)
コントロール	17.6 $\pm$ 6.2	6.8~ 29.1	0/ 36 (0.0)

cut off 値=30.0 ng/ml (コントロールの mean+2 S.D.)

*未治療例, 再発例はそれぞれコントロールに対して有意な差が認められた (p<0.001)。

図1 血漿 GST- π 値の比較

点線は cut off 値 (30.0 ng/ml) を示す。

*未治療例, 再発例はそれぞれコントロールに対して有意な差が認められた (p<0.001)。

47 例中 32 例 (68.1%) であった (表 5, 図 1)。

3) 臨床的要因

a. 原発部位

腫瘍の原発部位別の血漿 GST- π の平均値を比較したところ, 陽性率は口底, 中咽頭で高く, 舌, 下顎では低かったが, 有意差はみられなかった (表 6)。

b. 病期分類

病期分類別の血漿 GST- π の平均値と標準偏差は, Stage I では 37.3 $\pm$ 21.1 ng/ml, Stage II ; 37.9 $\pm$ 23.2 ng/ml, Stage III ; 38.3 $\pm$ 17.5 ng/ml, Stage IV ; 45.8 $\pm$ 25.7 ng/ml となった。各群間に有意差はみられなかったが, Stage が上がるにつれて血漿 GST- π の平均値は高くなる傾向が認められた。また, 陽性率では Stage I が 56.5%, Stage II が 61.0%, Stage III が 61.1%, Stage IV が 74.1% であり, 血漿 GST- π 値と同様に Stage が上がるにつれて陽性率も上昇した (表 7, 図 2)。

c. 再発部位別分類

再発例の部位による血漿 GST- π の平均値の比較については, 再発部位によって以下のごとく分類し検討した。

すなわち, 原発巣再発群, 頸部再発群, 原発巣および頸部再発群の 3 群に分類した。各群の GST- π の平均値を比較すると, 原発巣および頸部再発群 (59.2 $\pm$ 30.3 ng/ml) が最も高く, 次いで原発巣再発群 (51.8 $\pm$ 23.7 ng/ml), 頸部再発群 (36.6 $\pm$ 21.5 ng/ml) の順であったが, 有意差はみられなかった。陽性率は原発巣および頸部再発群が 100%, 局所再発群が 75.8%, 頸部再発群が 54.2% の順であった (表 8, 図 3)。

4) 病理組織学的要因

早期浸潤癌²¹⁾と診断された 12 例を除いた 97 例を病理組織学的に WHO の分化度で分類すると, Grade I ; 50 例 (51.6%), Grade II ; 39 例 (40.2%), Grade III ; 8 例 (8.2%) であった。Grade I の血漿 GST- π 値 (平均値+標準偏差) は 38.5 $\pm$ 24.0 ng/ml, Grade II は 42.0 $\pm$ 22.9 ng/ml, Grade III は 39.3 $\pm$ 12.9 ng/ml であり, 明らかな差はなかった。なお, 陽性率については Grade 間に差はみられなかった (表 9, 図 4)。

5) GST- π 値別の治療成績

扁平上皮癌患者の治療前の血漿 GST- π 値を 0 から 30 ng/ml 未満を A 群, 30 以上 60 ng/ml 未満を B 群, 60 ng/ml 以上を C 群に分類した。各群の血漿 GST- π 値別 5 年累積生存率 (Kaplan-Meier 法) は, A 群では 67.0%, B 群では 63.0%, C 群では 59.0% であり, 血漿 GST- π の値が上昇すると生存率が低下する傾向が認められた (図 5)。

2. 血漿 GST- π と血清 SCC 抗原の陽性率の比較

血漿 GST- π と血清 SCC 抗原の陽性率をみると, 両者ともに検査できた癌未治療例および再発例は 81 例で, 血漿 GST- π 単独の陽性率は 62.9%, 血清 SCC 抗原単独の陽性率は 22.2% であり, 両者を合わせた陽性率は 65.4% であった。なお, それぞれの内訳をみると血漿 GST- π および血清 SCC 抗原両者が陽性は 81 例中 16 例 19.7% で, 血漿 GST- π が陽性で血清 SCC 抗原が陰性は 81 例中 35 例 43.2%, 血漿 GST- π が陰性で血清 SCC 抗原が陽性は 81 例中 2 例 2.5%, 血漿 GST- π および血清 SCC 抗原, 両者とも陰性は 81 例中 28 例 34.6% であった (表 10)。

表 6 未治療例の腫瘍部位別の血漿 GST- π 値と陽性率

部位 (例数) \ GST- π	平均値 $\pm$ 標準偏差 (ng/ml)	陽性率 (%)
舌 (52)	38.8 $\pm$ 23.3	57.7
下顎 (21)	34.8 $\pm$ 22.6	52.4
上顎 (14)	47.9 $\pm$ 23.9	78.6
口底 (10)	37.7 $\pm$ 14.4	80.0
頬粘膜 (6)	48.3 $\pm$ 30.4	66.7
中咽頭 (6)	41.2 $\pm$ 15.2	83.3
計 (109)	39.8 $\pm$ 22.6	63.3

各群間に有意差は認められなかった

表 7 扁平上皮癌未治療例の病期分類の血漿 GST- π 値と陽性率

Stage (例数) \ GST- π	平均値 $\pm$ 標準偏差 (ng/ml)	範 囲	陽性率 (%)
I (23)	37.3 $\pm$ 21.1	8.1~ 77	56.5
II (41)	37.9 $\pm$ 23.2	7.4~112	61.0
III (18)	38.3 $\pm$ 17.5	14 ~ 70	61.1
IV (27)	45.8 $\pm$ 25.7	11 ~114	74.1
計 (109)	39.8 $\pm$ 22.6	7.4~114	63.3

各群間に有意差は認められなかった

表 8 再発症例の処置法別の血漿 GST- π 値と陽性率 (%)

経過 (例数) \ GST- π	平均値 $\pm$ 標準偏差 (ng/ml)	範 囲	陽性率 (%)
原発巣再発 (16)	51.8 $\pm$ 23.7	22 ~106	75.8
頸部再発 (24)	36.6 $\pm$ 21.5	8.1~ 84	54.2
原発巣+頸部再発 (7)	59.2 $\pm$ 30.3	30 ~112	100.0
計 (47)	45.1 $\pm$ 24.9	8.1~112	68.1

各群間に有意差は認められなかった

図 2 病期分類別血漿 GST- π 値の比較
点線は cut off 値 (30.0 ng/ml) を示す。 図 3 再発部位別血漿 GST- π 値の比較
点線は cut off 値 (30.0 ng/ml) を示す。

表9 扁平上皮癌未治療例の分化度別分類 (WHO) の血漿 GST- π 値と陽性率

分化度 (例数) \ GST- π	平均値 $\pm$ 標準偏差 (ng/ml)	陽性率 (%)
grade I (50)	38.5 $\pm$ 24.0	62.0
grade II (39)	42.0 $\pm$ 22.9	69.2
grade III (8)	39.3 $\pm$ 12.9	62.5

各群間に有意差は認められなかった

図4 WHOの分化度別血漿 GST- π 値の比較
点線は cut off 値 (30.0 ng/ml) を示す。表10 血漿 GST- π と血清 SCC 抗原の組み合わせ診断率

		SCC		計 (%)
		(+)	(-)	
GST- π	(+)	16 (19.7)	35 (43.2)	51 (62.9)
	(-)	2 (2.5)	28 (34.6)	30 (37.1)
計 (%)		18 (22.2)	63 (77.8)	81 (100.0)

図5 血漿 GST- π 値別の治療成績
A群(55例): 血漿 GST- π 値が 0 ~ 30 ng/ml 未満
B群(71例): 血漿 GST- π 値が 30 ~ 60 ng/ml 未満
C群(30例): 血漿 GST- π 値が 60 ng/ml 以上3. 腫瘍組織および腫瘍細胞における GST- π の発現ならびに局在

1) 光顕所見

a. H-E 染色

HSC-3 はコロニーを形成し増殖しており, その細胞形態は多角形のものが多く, 大きさは大小不同であった。

核は楕円形を呈しており, クロマチンは濃染し, 細胞質は比較的均一に染色されていた。細胞間架橋を認め, 細胞間はやや疎であり, 核, 細胞質比は比較的小であった。HSC-4 も同様にコロニーを形成し増殖しており, 細胞形態は多角形のものが多く, その大きさは大小不同であった。核は楕円形または類円形であり, 核小体が数個散見

図 6 培養細胞の光顕像(×340)
A : HSC-3, B : HSC-4

図 8 培養細胞における GST- π の発現 (×340)
A : HSC-3, B : HSC-4
核および細胞質に染色を認めるも、細胞により染色の程度の差が認められた。

図 7 ヒト口腔扁平上皮癌細胞の光顕像(×100)

図 9 ヒト口腔扁平上皮癌組織における GST- π の発現 (×340)
核および細胞質に染色を認める。

され、細胞質には小空胞を多数認めた。細胞間架橋は若干認められ、細胞間は密であり、核、細胞質比は比較的大であった(図 6 A, B)。ヒト癌組織においては大きな胞巣を形成するものが多く、高～中分化型扁平上皮癌であった。腫瘍間質は比較的少なく、腫瘍は連続的に浸潤増殖し、周囲には高度のリンパ球、形質細胞浸潤が認められた(図 7)。

b. 免疫染色

HE 染色で認められた HSC-3 細胞株および HSC-4 細胞株の両者において、ほぼすべての細胞に GST- π 抗体による陽性像を認め、核および細胞質は全体に染色されていた。染色性は個々の細胞において程度の差が認められた(図 8 A, B)。ヒト癌組織においては、培養細胞

図10 培養細胞 (HSC-3) 電顕像

図12 培養細胞免疫電顕像

細胞質においてミトコンドリア内に GST- π の局在がみられる (矢印)。

と同様にほぼすべての細胞に陽性像を認めたが、細胞により濃度差がみられた。(図9)。

2) 電顕所見

a. 電子染色

培養細胞 (HSC-3, HSC-4) の核は類円形または不整形を示し、クロマチンは分散しており、核小体は1ないし2個認められた。細胞質は細胞内小器官に富み、ミトコンドリア、粗面小胞体は比較的多く認められ、微絨毛は発達していた (図10)。

b. 免疫染色

GST- π の免疫反応は培養細胞 (HSC-3, HSC-4) の核においてはクロマチンと思われる部分に一致し出現しており (図11)、細胞質においてはミトコンドリア内に出現していた (図12 A, B)。

IV. 考 察

口腔領域における悪性腫瘍は、解剖学的理由から腫瘍の発見は比較的容易とされるが、正確な診断は必ずしも容易でない。近年、口腔癌においても拡大手術後、大型皮弁を使用する機会が増加したため、再発を早期に診断

図11 培養細胞 (HSC-3) 免疫電顕像
核内のクロマチンと思われる部分に一致して GST- π の局在がみられる (矢印)。

することが困難となってきた²²⁾。また、頸部リンパ節転移についてはCT、エコー検査などを用いても診断が困難な場合もある²³⁾。このため、腫瘍の早期診断、頸部リンパ節転移や遠隔転移の診断および術後の再発を早期に正確に判明できるものが望まれてきた。

Glutathione S-transferase (GST) は、1961年にBoothら²⁴⁾が報告して以来、種々の臓器に分布が認められており^{25,26)}、その機能としては、酵素タンパク質としての機能 (解毒酵素としての作用など) と結合タンパク質としての機能 (結合して運搬、排泄作用など) があるといわれている⁵⁻⁷⁾。GSTは、alpha, mu, pi, thetaのアイソザイムに分類されており²⁷⁾、今回われわれが使用したGST- π は、ヒト胎盤から分離されたヒト胎盤型GSTのうちで、piクラスに属する。このGST- π は、肺癌、胃癌、大腸癌、各種消化器癌、口腔癌などにおいて出現が認められている^{3,8-11,13-15,18,19,25,26,28)}。近年、RadioimmunoassayによるGST- π の血清診断が可能となり^{18,29,30)}、血中GST- π を測定することで悪性腫瘍を診断しうる可能性が示唆されている^{3,9-11,18,28,30)}。これまでのわれわれの研究では口腔癌患者における血漿GST- π の測定値は、血清GST- π の測定値に比較し陽性率が高く、測定値のばらつきも少ない結果であったことから、血漿GST- π 値のほうが血清GST- π 値よりも有用であると判断された²⁸⁾。そのため本研究では、口腔扁平上皮癌症例における血漿GST- π 測定の有用性について詳細に検討した。

血漿GST- π のcut off値と陽性率については、コント

ロールの平均値+2 S.D.の値を cut off 値としたが、コントロールでは 1 例も陽性例はなく、合理的な cut off 値と判断された。

血漿 GST- π 値と臨床的要因との関連について扁平上皮癌症例における原発部位、病期分類、再発症例の再発部位などにより血漿 GST- π 値を比較した。癌症例の陽性率は、未治療例で 63.3%，再発例で 68.1%であり、これまでの他の腫瘍マーカーの陽性率に比べかなり高く、診断的価値が高いものと判断された。原発部位別の血漿 GST- π 値については、明らかな差はみられなかった。病期分類においては Stage が増すことにより血漿 GST- π 値が増加する傾向があった。また再発例の血漿 GST- π 値については原発巣および頸部再発の群が最も高く、次いで原発巣再発群、頸部再発群の順であった。これらのことから血漿 GST- π 値の上昇の因子としては腫瘍の大きさや進行度あるいは腫瘍の増殖能などが考えられる。平田らは Stage が大きくなると血漿 GST- π 値が上昇し、腫瘍体積との関係について報告している³⁾。本研究においても統計的な差はみられなかったが同様の傾向はみられている。

血漿 GST- π 値と病理組織学的要因との関連について、WHO の分化度別の血漿 GST- π 値を比較したところ、分化度別には明らかな差は認められなかった。しかし、病理組織学的に早期浸潤癌²¹⁾と診断された表在性の癌の血漿 GST- π 値は 38.0 ± 22.4 ng/ml で、陽性率も 50% (6 例/12 例) と高い検出率であり、進行癌の陽性率よりは低い早期癌の診断にも有用といえよう。

血漿 GST- π 値と治療成績との関連に関する報告はこれまでにない。本研究結果からは有意差は認められなかったが、血漿 GST- π 値が高くなるに従ってわずかではあるが、治療成績が劣る結果であり、血漿 GST- π 値と治療成績との関連が推察された。

血清 SCC 抗原は腫瘍マーカーとして日常臨床で繁用されてきたが、血清 SCC 抗原の陽性率はあまり高いとはいえないようである^{1~3,28,31,32)}。本研究において、GST- π と血清 SCC 抗原を同時に検索できたものでは、血漿 GST- π の陽性率 62.9%，血清 SCC 抗原の陽性率は 22.2%で、血漿 GST- π は血清 SCC 抗原よりはるかに有用であると考えられた。また、両者組み合わせの陽性率は 65.4%であり GST- π 単独よりも 2.5%のみの陽性率の上昇ではあるが、臨床においては両者による経過観察が实际的であり、より有用であろう。特に再発例において、血漿 GST- π 値は上昇しておりその有用性は高いと判断された。頸部転移例では、原発巣再発例に比べ陽性率が低いことから、他の画像診断などを併用することが望ましいと考えられる。さらに、腫瘍切除後には GST- π 値は正常域に入ることが確認されており²⁸⁾、また抗癌剤

などにより腫瘍の縮小とともに GST- π 値の低下が認められる^{3,11,30,33)}ことから治療効果のパラメーターとしても有用といえよう。以上より、血漿 GST- π 値を測定することは、口腔扁平上皮癌の診断や再発、転移の早期発見、早期治療に役立つもので、临床上非常に有用であると考えられた。

GST- π の細胞内の発現については、榮本⁸⁾はヒト肺扁平上皮癌において、Campbell ら²⁶⁾は子宮頸部扁平上皮癌において、細胞質と核が染色されると報告している。また、口腔扁平上皮癌においては、Odajima らは細胞質に均一に染色され癌の分化度とその染色パターンとに関連はなかったと述べている¹³⁾。一方、Chen ら¹⁴⁾や Zhang ら¹⁵⁾は細胞質および核に染色されると述べている。今回われわれは、当科で樹立したヒト口腔扁平上皮癌の培養細胞を使用し、免疫組織化学的に GST- π の発現を検索した。それぞれの細胞の性状は HSC-3 では低転移型、HSC-4 では非転移型であり、組織分化度においては HSC-3 は高分化型で HSC-4 は低分化型を示している^{17,34)}。それぞれ腫瘍の性格の違いで染色される部位、染色の度合などを調べたが、HSC-3、HSC-4 とも細胞質および核に GST- π が発現し、その染色の度合も細胞質、特に核周囲の細胞内器官に相当する部位に強く観察されたものもあった。免疫組織化学的には細胞の性状の違いがあっても、GST- π 発現の差は認められなかった。この培養細胞における結果は口腔扁平上皮癌の腫瘍分化度別の血漿 GST- π 値に差がないことと一致するものであった。一方、GST- π の細胞内の局在についてはこれまで詳細な検索はみられていない。本研究では免疫電子顕微鏡的に観察したところ、核内ではクロマチンに相当する部位に、細胞質内ではミトコンドリアに局在が認められた。ヒト口腔扁平上皮癌の GST- π の局在を免疫電子顕微鏡的に観察した報告は本研究報告以外には認められていない。ヒト口腔扁平上皮癌以外では、ラットの肝細胞における Bennett らの免疫電子顕微鏡的研究報告がみられるのみである。それによれば GST ファミリーの GST 3-3 および GST 4-4 の局在を核内のクロマチンに相当する部位に認め、DNA 結合非ヒストンタンパク質中に存在すると報告している³⁵⁾。一方、本間らは細胞質の GST- π が経時的に核内に移行することを報告している³⁶⁾。本研究においてもヒト口腔扁平上皮癌の GST- π はクロマチン相当部に染色されることより、Bennett らの報告と同様に DNA 結合非ヒストンタンパク質中に存在する可能性が示唆された。細胞質内の局在について、Senjo らはラット肝細胞のミトコンドリアに GST アイソザイムの存在を認めたと報告している³⁷⁾。その働きとしてヘムの輸送に関与しているとのことであった。本研究ではミトコンドリア内の電子密度の高い所に金コロイ

ドの染色がみられたことから、金属イオンの存在する所に GST- π が存在する可能性が示唆され、GST- π もヘムの輸送に関与しているという報告と矛盾のない結果であった。

以上、癌細胞の核および細胞質内に GST- π が確認されたが、GST- π がどのようにして血中に放出されるかこれまで明らかでない。Kura らはヒト消化器癌の細胞株を使用し細胞を培養すると、その培養液中に GST- π の濃度が増加することを確認した。それにより細胞内タンパク質が細胞から放出されるメカニズムについては、1) 細胞が破壊されてタンパク質が放出される、2) リボゾームにおいて合成されたタンパク質はシグナルペプチドと小胞体腔で合体しゴルジ装置に移動し分泌される、3) そのほかの未知のメカニズムによって細胞質から細胞外へ放出されることを挙げており、1) については細胞が破壊されても GST- π 濃度は上がらなかった。2) についても GST- π のシグナルペプチドは認められない。以上より、いまだ知られていないメカニズムによって細胞質外に放出されるのではないかと推測されている³⁸⁾。今後はそのメカニズムを解明することが必要と考えられた。

V. 結 論

本研究は、抗 GST- π モノクローナル抗体を用い口腔扁平上皮癌症例およびコントロールの血漿 GST- π を測定し、血清 SCC 抗原値とも比較し、腫瘍マーカーとしての有用性について検討した。さらに、口腔扁平上皮癌培養細胞およびヒト癌組織を用い、免疫組織学化学的、免疫電顕的に GST- π の発現と局在を検索した。

1. コントロールの血漿 GST- π 値 (平均値 ± 2 S. D.) から cut off 値 30.0 ng/ml を設定した。
2. 口腔癌患者の血漿 GST- π 値は再発例が最も高く、次いで癌未治療例であり、陽性率はのおの 68.1%, 63.3% であった。
3. 癌未治療例の GST- π 陽性率は腫瘍の原発部位、病理組織学的分化度では差は明らかでなく、病期が進むにつれ、高値を示した。血漿 GST- π 値が上昇すると治療成績は劣る傾向であったが、有意差はなかった。
4. 再発例では原発巣および頸部再発群の血漿 GST- π 値が最も高値を示し、次いで原発巣再発群、頸部再発群であった。
5. 口腔癌患者の血漿 GST- π と血清 SCC 抗原との陽性率の比較では血漿 GST- π のほうが明らかに高値を示し、有用性が高いことが明らかになった。
6. ヒト口腔扁平上皮癌細胞および培養細胞における GST- π の局在について免疫組織学化学的に検討し

たところ、核および細胞質に発現が認められた。さらに、同細胞株を使用し免疫電顕的に観察したところ、核内ではクロマチン相当部位に、細胞内ではミトコンドリア内に局在が認められた。

以上より、口腔扁平上皮癌において GST- π は細胞内に発現し、なんらかの機序で細胞外または血中に分泌され、その血漿 GST- π を測定することは、口腔扁平上皮癌の診断、経過観察時の再発の有無を早期に診断できる可能性が示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり終始ご指導、ご検閲を賜りました東京医科歯科大学歯学部口腔外科学第一講座 天笠光雄教授に心より御礼申し上げます。ご検閲を賜った口腔病理学教室 高木実教授に厚く御礼申し上げます。さらにご指導、ご協力を頂いた東京医科歯科大学医学部法医学教室 故寺田充彦 助教授、本学中央電子顕微鏡室 市野瀬市津子博士に心より感謝の意を表します。また本研究にご援助、ご協力いただいた本学口腔外科学第一講座の諸先生方に深く感謝いたします。なお本研究の一部は第 45 回日本口腔科学会総会 (1991 年 5 月, 京都), 第 29 回日本癌治療学会総会 (1991 年 10 月, 大阪), 第 47 回日本口腔科学会総会 (1993 年 5 月, 弘前) にて発表した。

文 献

- 1) Nagumo, K., Okada, N., Takagi, M., Yamamoto, H., Amagasa, T. and Fujibayashi, T.: Squamous cell carcinoma antigen in oral squamous cell carcinomas. Bull. Tokyo Med. Dent. Univ. 37 : 27-34, 1990.
- 2) 松友豊伸, 中村誠司, 篠原正徳, 原田 猛, 竹之下康治, 辻 龍雄, 篠崎文彦, 岡 増一郎: 口腔扁平上皮癌における SCC 抗原および CEA の臨床的意義. 日口外誌 39 : 207-214, 1993.
- 3) Hirata, S., Odajima, T., Kohama, G., Ishigaki, S. and Nittsu, Y.: Significance of glutathione S-transferase- π as a tumor marker in patients with oral cancer. Cancer 70 : 2381-2387, 1992.
- 4) Doweck, I., Barak, M., Greenberg, E., Uri, N., Kellner, J., Lurie, M. and Gruener, N.: Cyfra 21-1 A new potential tumor marker for squamous cell carcinoma of head and neck. Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg. 121 : 177-181, 1995.
- 5) Jakoby, W. B.: The glutathione S-transferases: A group of multifunctional detoxification proteins. Adv. Enzymol. 46 : 383-414, 1978.
- 6) Neil, K.: Physiological significance of glutathione S-transferases. Am. J. Physiol. 232 : G 439-G 444, 1980.
- 7) 土田成紀, 佐藤清美: グルタチオン S-トランスフェラーゼアイソザイム. 蛋白質 核酸 酵素 33 : 1564-1573, 1988.
- 8) 榮本弘行: ヒト肺癌における Glutathione S-transferase π form の発現に関する免疫組織化学的研究. 奈医誌 40 : 657-668, 1989.
- 9) Hida, T., Kuwabara, M., Ariyoshi, Y., Takahashi, T., Sugiura, T., Hosoda, K., Niitsu, Y. and Ueda, R.: Serum Glutathione S-transferase- π level as a tumor

- marker for non-small cell lung cancer. Potential predictive value in chemotherapeutic response. *Cancer* 73 : 1377-1382, 1994.
- 10) Tsuchida, S., Sekine, Y., Shineha, R., Nishihira, T. and Sato, K. : Elevation of the placental glutathione S-transferase form (GST- π) in tumor tissues and the levels in sera of patients with cancer. *Cancer Res.* 49 : 5225-5229, 1989.
 - 11) Niitsu, Y., Takahashi, Y., Saito, T., Hirata, Y., Arisato, N., Maruyama, H., Kohgo, Y. and Listowsky, I. : Serum glutathione-S-transferase- π as a tumor marker for gastrointestinal malignancies. *Cancer* 63 : 317-323, 1989.
 - 12) Sato, K., Kitahara, A., Satoh, K., Ishikawa, T., Tatematsu, M. and Ito, N. : The placental form of glutathione S-transferase as a new marker protein for preneoplasia in rat chemical hepatocarcinogenesis. *Gann* 75 : 199-202, 1984.
 - 13) Odajima, T., Hirata, S., Yokoi, T., Tsutsumida, R., Noguchi, M., Miyakawa, A., Kyogoku, J., Hiratsuka, H., Kohama, G., Arisato, N., Ishigaki, S. and Niitsu, Y. : Glutathione-S-transferase- π activity in benign and malignant human oral epithelial lesions. *Tumor Res.* 24 : 49-56, 1989.
 - 14) Chen, Y. K. and Lin, L. M. : Immunohistochemical demonstration of epithelial glutathione S-transferase isoenzymes in normal, benign, premalignant and malignant human oral mucosa. *J. Oral Pathol. Med.* 24 : 316-321, 1995.
 - 15) Zhang, L., Xiao, Y. and Priddy, R. : Increase in placental glutathione S-transferase in human oral epithelial dysplastic lesions and squamous cell carcinomas. *J. Oral Pathol. Med.* 23 : 75-79, 1994.
 - 16) 百瀬文雄, 平田章二, 新井田俊雄, 田中信幸, 塩田重利 : 3つの口腔扁平上皮癌由来細胞の性状について. *口科誌* 35 : 485-496, 1986.
 - 17) Guthenberg, C., Åkerfeldt, K. and Mannervik, B. : Purification of glutathione S-transferase from human placenta. *Acta Chem. Scand. B* 33 : 595-596, 1979.
 - 18) Takahashi, Y., Hirata, Y., Saito, T., Yamashina, T., Arisato, N., Watanabe, N., Kohgo, Y., Niitsu, Y., Suzuki, E. and Hosoda, K. : Enzyme immunoassay for human serum glutathione S-transferase π using monoclonal and polyclonal antibodies. *Cancer J.* 2 : 225-229, 1989.
 - 19) Hosoda, K., Okada, M., Hirata, Y., Saito, T., Arisato, N., Ishigaki, S. and Niitsu, Y. : Determination of antigenic epitopes recognized by four monoclonal antibodies to glutathione S-transferase π (GST- π). *Hybridoma* 9 : 133-142, 1990.
 - 20) 寺田充彦, 三浦圭子, 中村恭一 : 金コロイドを用いた失敗の少ない post-embedding 免疫電顕法. *病理と臨床* 13 : 1049-1050, 1995.
 - 21) 天笠光雄, 横尾恵美子, 結城勝彦, 岩城 博, 立花忠夫, 藤井英治, 塩田重利 : 口腔粘膜早期浸潤癌の臨床的研究. *口外誌* 26 : 1497-1507, 1980.
 - 22) Besteiro, J. M., Aki, F. E., Ferreira, M. C., Medina, L. R. and Cernea, C. : Free flap reconstruction of tumors involving the cranial base. *Microsurgery* 15 : 9-13, 1994.
 - 23) 石井純一, 天笠光雄, 篠塚恵造, 塩田重利, 立花忠夫 : 口腔癌頸部転移リンパ節の超音波および CT による診断. *日癌治療会誌* 25 : 2526-2532, 1990.
 - 24) Booth, J., Boyland, E. and Sims, P. : An enzyme from rat liver catalysing conjugations with glutathione. *Biochem. J.* 79 : 516-524, 1961.
 - 25) Kantor, R. R. S., Giardina, S. L., Bartolazzi, A., Townsend, A. J., Myers, C. E., Cowan, K. H., Longo, D. L. and Natali, P. G. : Monoclonal antibodies to glutathione S-transferase π Immunohistochemical analysis of human tissues and cancers. *Int. J. Cancer* 47 : 193-201, 1991.
 - 26) Cambell, J. A. H., Corrigall, A. V., Guy, A. and Kirsch, R. E. : Immunohistologic localization of alpha, mu, and pi class glutathione S-transferases in human tissues. *Cancer* 67 : 1608-1613, 1991.
 - 27) Mannervik, B., Awasthi, Y. C., Board, P. G., Hayes, J. D., Ilio, C. D., Ketterer, B., Listowsky, I., Morgenstern, R., Muramatsu, M., Pearson, W. R., Pickett, C. B., Sato, K., Widersten, M. and Wolf, C. R. : Nomenclature for human glutathione transferases. *Biochem. J.* 282 : 305-306, 1992.
 - 28) Kobayashi, Y., Amagasa, T., Fujii, E. and Yamashiro, M. : Evaluation of plasma glutathione S-transferase- π (GST- π) as a tumor marker for oral squamous cell carcinoma. *Int. J. Clin. Oncol.* 1 : 44-50, 1996.
 - 29) 佐藤鉄典 : ヒト血清 Cationic Glutathione S-transferase の Radioimmunoassay 法とその肝疾患における臨床応用に関する研究. *札幌医誌* 53 : 157-170, 1984.
 - 30) 平田康二 : Glutathione S-transferase (GST)- π の Immunoradiometric Assay (IRMA) 法の開発とその消化器悪性腫瘍血清診断への応用. *札幌医誌* 57 : 277-290, 1988.
 - 31) 井田順子, 又賀 泉, 加藤譲治 : 口腔癌患者における腫瘍マーカーの臨床的研究 —免疫組織化学的所見を加えて—. *口外誌* 39 : 1276-1287, 1993.
 - 32) Molina, R., Torres, M. D., Moragas, M., Perez-Villa, J., Filella, X., Jo, J., Farrus, B., Gimenez, N., Traserra, J. and Ballesta, A. M. : Prognostic significance of SCC antigen in the serum of patients with head and neck cancer. *Tumour Biology* 17 : 81-89, 1996.
 - 33) 高橋康雄, 新津洋司郎 : GST- π . *癌と化学療法* 21 : 945-951, 1994.
 - 34) Momose, F., Araida, T., Negishi, A., Ichijo, H., Shioda, S. and Sasaki, S. : Variant sublines with different metastatic potentials selected in nude mice from human oral squamous cell carcinomas. *J. Oral Pathol. Med.* 18 : 391-395, 1989.
 - 35) Bennett, C. F., Spector, D. L. and Yeoman, L. C. : Nonhistone protein BA is a glutathione S-transferase localized to interchromatinic regions of the cell nucleus. *J. Cell Biol.* 102 : 600-609, 1986.
 - 36) 本間久登, 新津洋司郎, 漆崎一朗 : グルタチオン S-トランスフェラーゼとステロイドホルモン. *蛋白質 核酸 酵素* 33 : 1574-1581, 1988.
 - 37) Senjo, M., Ishibashi, T. and Imai, Y. : Purification and characterization of cytosolic liver protein facilitating heme transport into apocytochrome b5 from mitochondria. *J. Biol. Chem.* 260 : 9191-9196, 1985.
 - 38) Kura, T., Takahashi, Y., Takayama, T., Ban, N., Saito, T., Kuga, T. and Niitsu, Y. : Glutathione S-transferase- π is secreted as a monomer into human plasma by platelets and tumor cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1292 : 317-323, 1996.