原 著

悪性腫瘍患者における血清 ribonuclease 活性の診断学的意義

九州大学医学部第二内科

赤木 公博[◇] 村井宏一郎 辻 博
志方 建 尾前 照雄
東筑病院 山中 正義

SERUM RIBONUCLEASE ACTIVITY IN THE DIAGNOSIS OF MALIGNANT NEOPLASM

Kimihiro AKAGI, MD, Koichiro MURAI, MD, Hiroshi TSUJI, MD,
Tatsuru SHIKATA, MD and Teruo OMAE, MD

The Second Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Kyushu University
Masayoshi YAMANAKA, MD
Tochiku Hospital

概要 酵母RNAを基質として悪性腫瘍患者の血清RNase活性 (mean±SD) を測定した。1) アルカリ性RNase活性は肺癌 19.8 ± 6.5 , その他の癌 33.2 ± 16.4 , 悪性リンパ腫 24.2 ± 6.1 , 白血病 40.2 ± 20.6 , 腎不全 87.7 ± 31.3 単位で健常者 15.5 ± 2.3 に比し明らかに高値を示したが, 肺癌で特に高い傾向はみられなかった。これらの増加した酵素活性は癌および腎不全患者でクレアチニン値と有意の正の相関を示した ($P < 0.05$)。また癌患者では5種類のアルカリ性RNaseのすべての分画に増加がみられたが, 健常者と基本的には同一パターンを示した。2) 酸性RNase活性は健常者 9.9 ± 2.3 , 肺癌 13.6 ± 7.6 , その他の癌 18.7 ± 7.8 , 悪性リンパ腫 16.2 ± 5.3 , 白血病 87.6 ± 88.9 , 腎不全 53.7 ± 22.2 単位であつた。次にRNase活性の酸/アルカリ比 (mean±SD) をとると, 骨髄性白血病では 2.00 ± 0.73 と健常者 0.65 ± 0.11 に比し有意の高値が認められた ($P < 0.001$)。しかし悪性リンパ腫, 肺癌およびその他の癌患者では健常者とこの比に差異はみられなかった。以上の結果より, 血清アルカリ性RNase活性の上昇は疾患特異性に乏しいため肺癌およびその他の癌の診断, さらにその進展を知る上で必ずしも有用なmarkerとはなり得ないと考えられた。癌患者における上昇機序の一つとして血中酵素の尿中への排泄障害が示唆された。また本酵素は血清GOTや, LDH活性と相関を示さないことから, 組織破壊による逸脱酵素ではないと考えられた。一方, 酸性RNase活性は, 骨髄性白血病で特異的に増加するため, 血清RNase活性の酸/アルカリ比をとることは本症の診断に極めて有用であると考えられた。

はじめに

血清アルカリ性ribonuclease (RNase) 活性は尿毒症, 癌, 白血病等で増加することが知られており^{1)~13)}, その上昇機序には不明な点が多いが, 尿中への排泄障害^{1)~3)10)}, 異化作用の亢進^{12)~15)}, その他

諸説⁶⁾¹⁶⁾が報告されている。

しかし, 本酵素の臨床的有用性についてはまだ一致した評価がなされていないのが現状である。その理由としては, 本酵素の由来臓器が不明であること, 疾患特異性に乏しいこと, さらに血清RNaseの性質が充分検討されていなかったこと等が上げられよう。

[昭和56年7月6日受稿]

我々は先にヒト血清RNaseを二つに大別し(酸性およびアルカリ性RNase), 前者は1分画¹⁷⁾, 後者は少なくとも5分画¹⁸⁾のそれぞれ異なつた性質を有する酵素より成ることを報告している。

今回は悪性腫瘍患者において, これらの血清酸性およびアルカリ性RNase活性の変動を観察し, その臨床的意義について検討したので報告する。

対象および方法

検索対象: 九州大学医学部附属病院内科に入院し, 血管造影または組織学的に診断された肺癌6例, およびその他の癌(肝細胞癌4例, 胃癌3例, 肺癌3例, その他2例)計12例, リンパ節生検にて診断された悪性リンパ腫10例, 末梢血および骨髓像の異常より診断された骨髄性白血病14例および血清クレアチニン値が3.0以上を示す腎不全症9例である(Table 1)。対照として, 九州大学職員およびその家族28例から採血した。採血は早朝空腹時に肘静脈より行なつた。

臨床生化学検査: 血清glutamic oxaloacetic transferase (GOT), lactic dehydrogenase (LDH), alkaline phosphatase (alk-P-ase), total protein (T prot), blood urea nitrogen (BUN), creatinine (Creat) は九州大学附属病院中央検査室でtechnicon auto-analyzerを用いて測定した。

材料: 酵母RNAはSigma社, ホスホセルロースはBrown社の市販品を購入した。

酵素活性の測定: 血清酸性およびアルカリ性RNase活性の測定はAnfinsenらの方法を改良し, すでに報告した方法¹⁷⁾¹⁸⁾により測定した。

血清RNaseの分離: 患者血清1mlを20時間, 10mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH 6.7) 1 lに透析した。血清RNaseの分離はホスホセルロース・カラムを用いて行なつた。なお操作はすべて

4~10℃で行なつた。

ホスホセルロース・カラムは1.2×10cmを用い, 10mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH 6.7)で十分に平衡させたのち試料をかけ, 50mlの同一緩衝液でカラムを洗つた。溶出は10mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH 6.7)で0.2~0.9Mの直線の食塩濃度勾配を使用した。140mlを用い流速約15ml/hで溶出させた。試験管1本あたり2mlずつ分割採取し, そのおのおのについて酸性およびアルカリ性RNase活性を測定した。RNaseの測定は酸およびアルカリ性RNase測定用の基質0.8mlに検体0.2mlを加え, 37℃で2時間反応させ, 0.5%酢酸ウラニルを含む3%過塩素酸0.2mlを加えて反応を停止させた。氷冷中に10分間放置したのち, 2,000×gで10分間遠沈し, その全上清をとり, 脱イオン水2mlを加えてよく混和し, 分光光度計((日立139))を用いて, 波長260nmにおける酸可溶性分画の吸光を測定した。本酵素反応は, 上記条件で酸素量および反応時間に比例して260nmにおける吸光が1.5までRNAを直接的に水解する。従つて, それ以上の活性を示す場合には, 上記の反応時間を短縮して測定した。

なおホスホセルロース・カラム溶出後の各検体は種々の濃度の食塩を含んでいる。食塩は50mMの濃度までRNase活性を直接的に活性化し, それ以上の濃度ではプラトーに達する。従つて食塩を含んだ検体の活性測定には反応溶液に十分量の食塩(175mM)を加え, 酵素反応に対する食塩の影響を一定にしてRNase活性を測定した。

結 果

対象とした患者の血清酵素, 血清蛋白およびBUN, Creat 値の平均値(±SD)をTable 1に示した。

Table 1. Clinical laboratory data of patients with malignant disease.

Disease	No. of case	Age	WBC (x 10 ³)	GOT (mU/ml)	LDH (mU/ml)	ALP (mU/ml)	T. prot. (g/100ml)	BUN (mg/100ml)	Creat. (mg/100ml)
Pancreatic cancer	(6)	60 ± 5*	7.6 ± 1.8	118 ± 44	199 ± 43	263 ± 41	6.6 ± 0.5	13.0 ± 1.1	0.6 ± 0.1
Other cancers	(12)	54 ± 5	6.0 ± 0.9	114 ± 35	379 ± 78	320 ± 81	7.0 ± 0.3	16.0 ± 3.5	0.8 ± 0.1
Malignant lymphoma	(10)	48 ± 7	48.7 ± 29.9	47 ± 12	406 ± 75	189 ± 28	6.8 ± 0.4	18.1 ± 2.5	0.9 ± 0.2
Myelogenous leukemia	(14)	41 ± 4	135.2 ± 37.2	47 ± 9	700 ± 114	135 ± 29	6.9 ± 0.2	17.0 ± 4.0	0.8 ± 0.1
Renal failure	(9)	50 ± 5	9.9 ± 2.1	92 ± 53	249 ± 55	151 ± 32	6.2 ± 0.4	56.1 ± 6.8	5.0 ± 0.8

* mean ± SE

血清酸性およびアルカリ性RNase活性 (Fig 1): 上記疾患患者で血清RNase活性を測定した。酸性RNase活性は各種疾患で明らかに増加し、特に白血病および腎不全症で著しい上昇がみられた。一方、アルカリ性RNase活性も悪性腫瘍で高値を示す例がみられた。他の癌と同様に膵癌でも活性値が増加した症例および正常値を示す例がみられた。

血清RNase活性値の酸/アルカリ比 (Fig 2): 測定された血清RNase活性は健常者を含め癌および腎不全患者ではアルカリ性RNase活性優位であるが、骨髄性白血病では酸性RNase活性の優位が観察された。そこでRNase活性値の酸/アルカリ比をとると健常者、癌、悪性リンパ腫および腎不全症ではその平均値は0.68以下であつた。これに比し、骨髄性白血病では $2.00 \pm 0.73 (\pm SD)$ と有意の高値がみられた ($P < 0.0001$)。膵癌の1例にこの比が1.00以上を示す例を認めたが、その比は1.50以下で、しかも酸性RNase活性は30単位以下であつたことより、骨髄性白血病とはその活性値および酸/アルカリ比から明らかに鑑別可能であつた。つまり、酸性RNase活性が高値を示し、酸/アルカリ比が1.00以上を示す場合には骨髄性白血病と診断され得ると思われた。血清酸性

RNase活性の高値がみられた腎不全症では、他の疾患同様その比は $0.66 \pm 0.06 (\pm SD)$ と低値を示した。

血液生化学検査値と血清RNase活性との相関 (Table 2): 白血病では酸性RNase活性、その他の癌ではアルカリ性RNase活性値と血液生化学検査値との相関をおのおの検討した。白血球数の増加が認められた悪性リンパ腫および骨髄性白血病でみると、前者でアルカリ性RNase活性とに正の相関がみられたが、骨髄性白血病では酸性RNase活性との間に相関は認められなかつた。

血清LDH活性は各種疾患患者で増加がみられたが、血清RNase活性との間には全く相関がみられなかつた。また、GOTの上昇とは膵癌の他はすべて相関はみられなかつた。alk-P-ase値は各種疾患で高値がみられたが、腎不全症とのみ正の相関を認めた。腎不全症では二次性の副甲状腺機能亢進症があり¹⁹⁾、骨変化が存在するため骨性alk-P-aseの上昇がみられる。その高値が腎不全症の重症度を示しているためと思われた。

次にT prot値の異常低下傾向がみられた膵癌および腎不全症において血清RNase活性との間に相関は認められなかつた。一方、腎不全症でみられたcreat値の異常と酵素活性との間には正の

Fig 1. Serum RNase activities in normals and patients with malignant disease and renal failure. Mean is indicated by horizontal line. o, acid RNase activity; ●, alkaline RNase activity.

Table 2. Relationship between serum RNase activity and laboratory data of patients with malignant disease.

Disease	No. of case	WBC	LDH	GOT	Alk-P-ase	T.prot.	Creat.
Pancreatic cancer	(6)	ns*	ns	$p < 0.02$	ns	ns	ns
Other cancers	(12)	ns	ns	ns	ns	ns	$p < 0.05$
Malignant lymphoma	(10)	$p < 0.02$	ns	ns	ns	ns	ns
Myelogenous leukemia	(14)	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Renal failure	(9)	ns	ns	ns	$p < 0.01$	ns	$p < 0.05$

*ns; not significant.

Fig 2. The acid/alkaline ratios of RNase activities in normals and patients with malignant disease and renal failure. shadowed area is 2 SD of normal mean.

相関が認められた ($P < 0.05$). また 4 例に creat 値の異常を認めた膵癌以外の癌患者においても creat 値との間に有意の相関がみられた ($P <$

0.05).

血清 RNase 活性の高値を呈する疾患における RNase 分画の変化 (Fig 3): ホスホセルロース・カラムを用いて血清 RNase を分離すると、酸性 RNase 1 分画、アルカリ性 RNase 5 分画に分離される。この各分画の変化を血清 RNase 活性の高値を示す疾患で検討し、胃癌患者血清 RNase 溶出パターンを Fig 3 に示した。アルカリ性 RNase が優位を占める膵癌、その他の癌および悪性リンパ腫では健常者の RNase 分画との間に本質的な差異は認められなかった。しかし、骨髄性白血病では酸性 RNase の著明な増加が、腎不全ではアルカリ性 RNase の I, II, III 分画の著しい増加が観察された。

考 案

血清 RNase 活性が癌患者で有意に増加するという多くの報告がみられ^{1)~10)}、悪性腫瘍の診断お

Fig 3. Separation of serum RNase of normal (a) and gastric cancer (b) on phosphocellulose chromatography. o, RNase activity at pH 6.5; ●, RNase activity at pH 8.5; —, linear gradient of NaCl.

よび進展を知る有用なmarkerの一つとなり得る可能性が示唆されている⁵⁾⁶⁾¹⁰⁾。Reddiら⁶⁾はpoly(c)を基質として血清RNase活性を測定し、肺癌患者で本酵素活性が特異的に高値を示し、その血液生化学的検査法として有用であると報告している。ところが最近、Kottelら⁷⁾は癌の進展とは関係なく採血された患者68%で本酵素活性の増加をみたが、その上昇は各種の癌でも観察され、肺癌に特異的ではないと報告している。Peterson⁸⁾も肺癌患者で本酵素活性を再検討したところ、肺癌では慢性肺炎および胆のう炎などの他の疾患と酵素活性に差異がみられなかつたことから、本酵素は肺癌に特異的ではないと結論している。この様に、血清RNase活性の増加は癌患者で非特異的なため、現在その診断学的意味はないものと考えられている⁷⁾⁸⁾。

従来測定されているこれらのRNaseは酵母RNAを基質として用いた場合、至適pHをアルカリ側に有する酵素(アルカリ性RNase)である¹⁷⁾。我々は先に本酵素はホスホセルロース・カラムを用いて分離したところ、それぞれ性質の異なる五つの酵素からなることを報告している¹⁷⁾。さらに、ヒト血液中にはこれらのアルカリ性RNaseの他に酸性RNaseが1分画存在することを認めている¹⁸⁾。この研究では癌患者において、これらの酸性およびアルカリ性酵素がどの様に変動するかを観察し、血清RNaseの悪性腫瘍における診断学的有用性およびその上昇機序について検討を加えた。その結果、血清アルカリ性RNase活性は癌患者で明らかに異常を呈するが、正常値を示す例も認められた。またホスホセルロースによる血清RNaseの分画法でも、5種類のアルカリ性RNaseに基本的には健常者との間で違いは認められなかつた。さらに、癌に特異的なRNase分画をも認めることは出来なかつた。この様に、血清アルカリ性RNase活性は肺癌およびその他の癌でその活性、あるいは分画に違いはみられず非特異的に変動しているものと考えられた。一方、ヒト血清中の酸性RNase活性は骨髄性白血病で著明に増加し、さらにその増加はホスホセルロースを使つた分離

法でも確認された²⁰⁾。次に血清RNase活性の酸/アルカリ比をとると、骨髄性白血病では 2.00 ± 0.73 (平均値 $\pm$ SD)と健常者 0.65 ± 0.11 に比し著明な高値がみられた($P < 0.001$)。また白血病以外の腎不全症や、癌患者でも血清酸性RNase活性の明らかな高値がみられたが、その酸/アルカリ比は腎不全 0.62 ± 0.10 、悪性リンパ腫 0.68 ± 0.15 、肺癌 0.69 ± 0.33 、その他の癌 0.59 ± 0.16 と健常者と同様低値を示した。その比が1.0以上を示す例は骨髄性白血病では14例中全例(100%)であるのに比し、腎不全では9例中に1例もみられず(0%)、悪性腫瘍では28例中1例(3.6%)のみであつた。さらに癌および腎不全の血清RNaseのホスホセルロース・カラムの溶出パターンをみても(Fig 3)、酸性RNase活性の増加は認められなかつた。つまり、癌または腎不全患者で観察された酸性RNase活性の高値は増加したアルカリ性RNaseの酸性例での活性を測定していたものと考えられた。

悪性腫瘍患者で増加する血清アルカリ性RNaseの上昇機序に関しては不明な点が多いが、尿中への排泄障害、蛋白の異化作用の亢進、その他諸説が推測されている^{1-3)6)12)~16)}。血清RNaseと同時に測定された臨床検査値との相関をみると、血清クレアチニン値との間で正の相関が認められた($P < 0.05$)。つまり、悪性腫瘍患者の血清アルカリ性RNase活性の変動に、酵素の尿中への排泄障害が一因となつている可能性が示唆された。またAlbaneseら¹³⁾は古典的な方法によつて測定された窒素バランスと血清RNase活性が、蛋白同化ホルモンおよび異化ホルモン投与例で負の相関を示すことを報告している。つまり、蛋白の異化作用が亢進した場合に血清アルカリ性RNase活性は上昇すると述べている。この研究では、患者の蛋白代謝異常を反映する一つの因子として、総蛋白量を指標にして血清RNaseとの関係をみたが明らかな相関は認められなかつた。しかし一般に癌患者で食欲不振、体重減少などの変化が存在する場合には、血清RNaseの上昇機序にこの因子が関与していることは考えられる。

さらに、悪性腫瘍患者においては癌およびその

周辺組織の破壊により、血中に酵素が遊出している可能性が考えられる⁴⁾¹⁰⁾。しかし、本研究では血清アルカリ性RNase活性とLDH値とは有意の相関を示さないことから、本酵素は組織破壊による逸脱酵素ではないと考えられた。一方、骨髓性白血病で変動する血清酸性RNaseはその基質特異性が同じであることから病的白血球由来であることを先に報告している²⁰⁾。

結 論

以上、血清RNase活性を酸およびアルカリ性RNaseに分けて測定し、その診断学的有用性および上昇機序について検討した結果、アルカリ性RNaseは悪性疾患では非特異的に変動するためその診断および進展を知る上で必ずしも有用なmarkerとはなり得ないと思われた。また癌患者でみられる酵素活性の上昇機序の一つとして、血中酵素の尿中への排泄障害が関与していることが示唆された。一方、酸性RNase活性は骨髓性白血病で特異的に増加するため、その活性の酸/アルカリ比は本症の診断に極めて有用であると考えられた。

文 献

- 1) Houch JC and Berman LB: Serum rinbonuclease activity. J Appl Physiol 12: 473, 1958.
- 2) Rabinovitch M, et al: Plasma ribonuclease activity in human uremia. J Lab Clin Med 53: 563, 1959.
- 3) Connolly JR, et al: Ribonuclease in normal and uremic human blood. Brit J Exp Pathol 43: 402, 1952.
- 4) Zytko J and Cantero A: Serum ribonuclease in patients with malignant disease. Canad Med Ass J 86: 482, 1962.
- 5) Chretien PB, et al: Serum ribonuclease in cancer: relation to tumor histology. Cancer 31: 175, 1973.
- 6) Reddi KK: Elevated serum ribonuclease in patients with pancreatic cancer. Proc Natl Acad Sci 73: 2308, 1976.
- 7) Kottl RH, et al: Serum ribonuclease activity in cancer patients. Brit J Cancer 38: 280, 1978.
- 8) Peterson LM: Serum RNase in the diagnosis of pancreatic carcinoma. Proc Natl Acad Sci 76: 7630, 1979.
- 9) Ressler N, et al: Investigation of ribonuclease isozymes by a electrophoretic ultra-violet method. Nature 210: 695, 1966.
- 10) Fink K, et al: Serum ribonuclease in multiple myeloma. Amer J Med 50: 450, 1971.
- 11) Levy AL and Rottino A: Effect of disease state on the ribonuclease concentration of body fluids. Clin chem 6: 43, 1960.
- 12) El-Sewedx SW, et al: The activity of serum ribonuclease in protein-energy malnutrition. Trans R Soc Trop Med Hyg 72: 529, 1978.
- 13) Albanese AA, et al: Nutrition and metabolic effects of serum newer steroid. IV. Serum ribonuclease. NY State J Med 19: 1595, 1972.
- 14) Sigulem DM, et al: Plasma and urine ribonuclease as a measure of nutritional status in children. Amer J Clin Nutr 26: 792, 1973.
- 15) Shenkin A, et al: An assessment of the clinical usefulness of plasma ribonuclease assays. Clin Chem Acta 72: 223, 1976.
- 16) Reddi KK: Nature and possible origin of human serum ribonuclease. Biochem Biophys Res commun 67: 110, 1975.
- 17) Akagi K, et al: Purification and properties of ribonucleases in human serum and leukocytes. Cancer Res 38: 2163, 1978.
- 18) Akagi K, et al: Purification and properties of alkaline ribonuclease from human serum. Biochim Biophys Acta 442: 368, 1976.
- 19) Garner A and Bell J: Quantitative observation on mineralized and unmineralized bone in chronic renal azotemia and intestinal malabsorption syndrome. J Path Bact 991: 545, 1966.
- 20) Akagi K, et al: Serum acid ribonuclease in myelogenous leukemia. Cancer Res 38: 2168, 1978.