四肢骨軟部腫瘍における血中ヒアルロン酸の意義

久留米大学整形外科

小 宮 節 郎・松 浦 豪
井 上 明 生

Serum Hyaluronate in Musculoskeletal Tumors

by

Setsuro Komiya, Tsuyoshi Matsu-ura and Akio Inoue

Department of Orthopaedic Surgery,
Kurume University School of Medicine

Using a sandwich-binding protein assay, serum levels of hyaluronate were measured in 125 patients with musculoskeletal tumors. There was a significant correlation between serum hyaluronate and malignancy and pulmonary metastasis. It is suggested that hyaluronate levels reflect the aggressiveness of the tumors.

Key words : hyaluronic acid (血中ヒアルロン酸値), extraskeletal tumors (骨軟部腫瘍), pulmonary metastasis (肺転移)

方 法

は じ め に

ヒアルロン酸 (hyaluronic acid : HA) は結合組織中に広く分布する身体の重要な構成成分であり、四肢においても関節軟骨、関節液、骨などに広くみられる。ヒアルロン酸はリンパ経路を通して血行に入り、最終的には肝臓で代謝される。従ってヒアルロン酸の排泄が傷害される肝臓疾患では血中ヒアルロン酸が上昇することが考えられ、実際、肝硬変ではスクリーニングテストとさえなっている⁹⁾。そのほか、中皮腫の胸水¹⁴⁾、慢性関節リウマチ等でもその意義が報告されており¹³⁾、また炎症性疾患でも値が上昇するとされている。一方、四肢の骨軟部腫瘍は結合組織の破壊をきたし、また諸々の治療により炎症や肝疾患を誘発することもある。また肺に転移するとヒアルロン酸が豊富な肺組織を破壊することになる。従って、悪性骨軟部腫瘍患者の血中ヒアルロン酸値は上昇していることが予測される。本研究の目的は血中ヒアルロン酸値が悪性骨軟部腫瘍のマーカーになり得るかどうかを検討するものである。

骨軟部腫瘍患者 125 例を対象とした。内訳は良性 58 例、悪性 67 例 (肺転移患者 43 例) である。なお前記のごとくヒアルロン酸は肝臓疾患、RA、炎症性疾患で上昇するため予めこれらは除外した。

研究プロトコールとして血清ヒアルロン酸のほか、肝機能として GOT, GPT, LDH, AIP, γ GPT, ChE, TTT, ZTT を、腎機能として BUN, Cr を、炎症マーカーとして CRP, ESR, WBC を測定して血清ヒアルロン酸値との関連を検討した。測定方法は共同演者の松浦らが開発したサンドイッチ結合蛋白測定方法に依った¹¹⁾。これは ELISA 法とは抗体を使用しない点が異なる。ヒアルロン酸結合蛋白 (HABP) を吸着させた固相 (ポリスチレンビーズ) で血中ヒアルロン酸をトラップし、次にビオチン化 HABP でサンドイッチ後、西洋ワサビペーパーオキシダーゼ (POD) 標識アビジンを結合させて POD 活性により HA 濃度を測定する方法である。

実際は HABP をコートしたマイクロウェルに 50 μ l の検体血清と 0.3 ml の緩衝液を入れ温室で 2 時間

放置した。洗浄液で3回洗浄し、0.4 ml のビオチン化 HABP 液を加え温室で1時間放置した。さらに 50 μ l の POD 標識アビジン液を加え温室で1時間放置した。洗浄液で4回洗浄後 0.5 ml の基質液を加え室温暗所に1時間放置した。これに 3 N 硫酸 2 ml を加えて反応を停止させ、492 nm の吸光度を測定した。本法の最小検出濃度は 10 ng/ml であり、再現性の CV 値は

3.0~8.4% であった。

結 果

悪性例では約 60, 良性例では約 20 ng/ml であり、両者間に明らかな有意差を認めた ($P=0.0001$) (図 1)。

肺転移例と非肺転移例の比較では前者が約 65, 後者が約 25 ng/ml で有意な差が認められた ($P=0.0001$) (図 2)。

血清 AIP 値はヒアルロン酸値と有意な正の相関関係がみられた ($P=0.0023$) (図 3)。コリンエステラーゼ (ChE) とは負の相関関係がみられた ($P=0.0169$) (図 4)。BUN とは正の相関関係がみられた ($P=0.0116$)。CRP 値とヒアルロン酸値は相関する傾向にあった ($P=0.0675$)。血沈とも有意な相関 ($P=0.0085$) を認めた。年齢と比較検討してみると明らかな正の相関関係 ($P=0.0001$) を認めた。

考 察

ヒアルロン酸は細胞外に存在する酸性ムコ多糖体で、その構造は D-glucuronic acid と N-acetyl glucosamine が交互に繰り返して連鎖状に連なっている。軟骨をはじめ結合組織中ではヒアルロン酸を中心にプロテオグリカンのコア蛋白(この一部が HABP)が枝状に結合し、さらにこのコア蛋白にコンドロイチン硫酸やケラタン硫酸が結合して樹枝状の構造をとっている。ヒアルロン酸は線維芽細胞でつくられて血中に入り^{5),6),7)}、最終的には肝類洞の内皮細胞で消化される⁸⁾。従って肝臓の線維化がおこると血中ヒアルロン酸の不活化が起こらず高値を示すことになる⁹⁾。in vitro の実験で滑膜細胞からのヒアルロン酸の産生はプロスタグランジン E にて増強され¹⁾、ステロイド剤や抗炎症剤で抑制されることが示されている¹⁵⁾。従って RA ではその産生が著明に増加し、松浦ら¹¹⁾は血清ヒアルロン酸値が RA の活動性をしめすマーカーとなり得る点や、朝のこわばりともつよく関連するのではないかと報告している。悪性腫瘍とヒアルロン酸の関係を述べた論文は少ない。そのなかで癌細胞の可溶性分画からヒアルロニダーゼが証明され、しかも癌の浸潤度との相関性がみられたとの報告がある⁴⁾。またヒアルロン酸はリンパ球の細胞性免疫力を低下させ²⁾、マウスへの腫瘍移植率を高めるとされている¹⁰⁾。さらにヒアルロン酸は培養癌細胞の凝集をたかめるともいわれている¹²⁾。このような点から悪性骨軟部腫瘍

図 1 悪性例と良性例の血清ヒアルロン酸値。悪性例では有意に高値を示した。

図 2 肺転移例と非肺転移例での血清ヒアルロン酸値。肺転移例では有意に高値を示した。

図 3 血清アルカリフォスファターゼと血清ヒアルロン酸値の関係。有意な正の相関関係がみられた。

図4 コリンエステラーゼ値と血清ヒアルロン酸値の関係。有意な負の相関関係がみられた。

患者血清ではヒアルロン酸値が上昇していることが予測された。肺転移例で上昇がみられたのはヒアルロン酸に富む肺細胞組織に浸潤・増殖する過程で腫瘍細胞からヒアルロニダーゼが分泌された結果なのかもしれない。今後血清中のヒアルロニダーゼとヒアルロン酸の相関を検討すべきであると思われる。

結 語

1) 骨軟部腫瘍患者 125 例の血清ヒアルロン酸を測定した。

2) 血清ヒアルロン酸値は腫瘍の悪性、肺転移との相関がみられた。

3) 血清ヒアルロン酸値は腫瘍の浸潤度を示すマーカーになり得るのではないかと考えられた。

参 考 文 献

- 1) Castor, C. W.: Connective tissue activation. VII. Evidence supporting a role for prostaglandins and cyclic nucleotides. *J. Lab. Clin. Med.* 85 : 392-404, 1975.
- 2) Darzynkiewicz, Z. and Balazs, E. A.: Effect of connective tissue intercellular matrix on lymphocyte stimulation. *Exp. Cell Res.* 66 : 113-123, 1971.
- 3) Eriksson, S., Fraser J. R. E., Laurent T. C., et al.: Endothelial cells are a site of uptake and degeneration

tion of hyaluronic acid in the liver. *Exp. Cell Res.*, 144 : 223-228, 1983.

- 4) Fiszler-Szafars, B. and Szafars, D.: Lysosomal hyaluronidase activity in normal rat liver and in chemically induced hepatomas. *Cancer Res.*, 33 : 1104-1108, 1973.
- 5) Fraser, J. R. E., Laurent, T. C., Pertoft H. et al.: Plasma clearance, tissue distribution and metabolism of hyaluronic acid injected intravenously in the rabbit. *Biochem. J.*, 200 : 415-424, 1981.
- 6) Fraser, J. R. E., Laurent T. C., Engstrom-Laurent, A., et al.: Elimination of hyaluronic acid from the blood stream in the human. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 11 : 17-25, 1984.
- 7) Fraser, J. R. E., Appelgren, L-E, and Laurent T. C.: Tissue uptake of circulating hyaluronic acid. A whole body autoradiographic study. *Cell Tissue Res.*, 233 : 285-293, 1983.
- 8) Frebourg, T., Delpech, B., Bercoff, E., et al.: Serum hyaluronate in liver diseases : Study by enzymeimmunoassay. *Hepatology*, 6 : 392-395, 1986.
- 9) Galambos J. T. and Shapira, R.: Natural history of alcoholic hepatitis. IV. Glycosaminoglycuronans and collagen in the hepatic connective tissue. *J. Clin. Invest.*, 52 : 2952-2962, 1973.
- 10) Lippman, M.: in *Epithelium-mesenchyme interaction*, ed. by Fleischmajer, R. and Billingham, R. E., pp208-229, Williams & Wilkins, Baltimore, 1968.
- 11) 松浦豪, ほか: 慢性関節リウマチにおける血中ヒアルロン酸濃度の検討, 関節外科, 10 : 29-36, 1991.
- 12) Pessac, B. and Defendi, V.: Cell aggregation : Role of acid mucopolysaccharides. *Science*, 175 : 898-900, 1972.
- 13) Sundblad, L.: Glycosaminoglycans and glycoproteins in synovial fluid. In *The amino sugars*, ed. by Balazs, E. A. and Jenaloz, R. W. New York Academic Press, 109 : 229-250, 1965.
- 14) Suzuki, Y.: Pathology of human malignant mesothelioma. *Semin. Oncol.*, 8 : 268-282, 1980.
- 15) Yaron, M., Yaron, I., Wiletzki, C., et al.: Interrelationship between stimulation of prostaglandin E and hyaluronate production by poly(I) poly(C) and interferon in synovial fibroblast culture. *Arthritis Rheum.*, 21 : 694-698, 1978.