脳腫瘍嚢胞液中の遊離およびアセチル化ポリアミン

山崎 弘道・塚原 隆司・中村 正・松崎 茂*・卯木 次郎**

Free and Acetylated Polyamines in Cyst Fluids of Brain Tumors

Hiromichi YAMAZAKI, Takashi TSUKAHARA, Masaru NAKAMURA,
Shigeru MATSUZAKI* and Jiro UKI**

*Department of Neurosurgery, Gunma University, Maebashi; *Department of Physiology, Institute of Endocrinology, Gunma University, Maebashi; **Neurosurgery Clinic, Saitama Cancer Center, Saitama*

Abstract

Increased levels of polyamines in rapidly growing tissues have been demonstrated, and recently rather high concentrations of conjugated polyamines such as N¹-acetylspermidine have been found in certain malignant tumors. The purpose of this study is to analyze concentrations of free and conjugated polyamines in cyst fluids of brain tumors.

Materials used were cyst fluids obtained in brain tumor surgery: 25 specimens were from cysts of benign brain tumors (acoustic neurinoma, 8 cases; craniopharyngioma, 7 cases; hemangioblastoma, 6 cases; meningioma, 2 cases; pituitary adenoma, 2 cases) and 17 specimens from malignant brain tumors (malignant astrocytoma, 2 cases; glioblastoma, 15 cases). After deproteinization of cyst fluids with 6N perchloric acid, polyamine levels were measured with the use of high-performance liquid chromatography (HPLC) using cation-exchange resin before and after acid hydrolysis. Polyamines separated in various fractions by HPLC were further analyzed before and after acid hydrolysis.

The cyst fluids contained putrescine, spermidine, N¹-acetylspermidine, and several other minor peaks. The levels of N¹-acetylspermidine were much higher in cyst fluids of malignant brain tumors than in benign brain tumors. Higher concentrations of putrescine were also demonstrated in cyst fluids of malignant brain tumors. The increase in spermidine contents after acid hydrolysis was more than that which was derived from N¹-acetylspermidine alone. In fact, some fractions other than the N¹-acetylspermidine fractions yielded putrescine and/or spermidine upon acid hydrolysis. These data suggest that not only N¹-acetylspermidine but also other polyamine conjugates are present in cyst fluids of brain tumors. Presumably N¹-acetylspermidine and other conjugated forms are preferentially released into cyst fluids from malignant tumor tissues.

The present study shows that not only putrescine but also N¹-acetylspermidine in cyst fluids are promising markers of brain tumors.

Key words: polyamine, brain neoplasms, cyst fluid, tumor marker, liquid chromatography

I はじめに

ポリアミンとはアミノ基を複数持つ高塩基性の低分子物

質の総称であり、哺乳類では spermidine, spermine やその前駆物質である putrescine が良く知られている³⁾。これらのポリアミンは増殖の盛んな組織に高濃度に見い出され、

群馬大学脳神経外科 *群馬大学内分泌研究所生理学 **埼玉県立がんセンター脳神経外科

Address reprint requests to: H. Yamazaki, M.D., Department of Neurosurgery, Yamanashi Prefectural Central Hospital, 1-1-1 Fujimi, Kofu 400.

受稿 1985年4月4日 受理 1985年9月2日

1971年, Russell²²⁾ が癌患者では尿中のポリアミンが著しく増加していることを報告して以来, ポリアミンと悪性腫瘍との関連が注目され, 診断や治療経過の観察に応用すべく研究がなされてきた^{10,23-25)}. 最近ではアセチルポリアミンのような抱合型ポリアミンのほうが遊離型ポリアミンよりも癌と密接に関連していることも報告されている^{1,28)}. 脳腫瘍においても腫瘍組織, 脳脊髄液などのポリアミン測定とその意義が検討され, Marton らは小脳髄芽腫の再発や髄膜播種の経過観察に有用であると報告している^{5,11-14)}.

通常, 脳脊髄液のような体液中のポリアミンは微量のため, その測定に際し濃縮や酸分解などが必要であり, 操作が煩雑で, しかも誤差が生じやすかった¹¹⁾. 我々は操作が容易で, 微量のポリアミンでも高感度に測定可能な高速液体クロマトグラフィー(以下 HPLC)を開発し, すでに報告した^{17,18)}.

今までに脳腫瘍細胞液中のポリアミンを分析した報告はなく, 今回, HPLC にて脳腫瘍細胞液中の抱合型および遊離型ポリアミンを測定し, 興味ある所見を得たので, その意義を検討した.

II 対象および方法

対象は手術時採取した脳腫瘍細胞液42例で, 内訳は良性脳腫瘍25例(頭蓋咽頭腫7例, 聴神経鞘腫8例, 血管芽腫6例, 髄膜腫2例, 下垂体腺腫2例), 悪性脳腫瘍17例(悪性星状神経膠腫2例, 多形性膠芽腫15例)であった. 血液の混入した例は除き, 遠心して細胞を除いた上清を分析まで -80°C にて凍結保存した.

ポリアミン分析は, すでに報告した方法で行った^{17,18)}. 原則的に酸分解を行わないので, 遊離型のみならず抱合型ポリアミンも測定できる.

前処理: 検体 $450\ \mu\text{l}$ に6N 過塩素酸 $50\ \mu\text{l}$ を加え混和, 20分間放置したのち遠心分離(3,000 rpm, 15分)して検体の除蛋白を行い, 得られた上清を HPLC 分析に用いた. 上清に等量の first buffer (Table 1)を加え, Milipore filter (Millex HA, $0.45\ \mu\text{m}$)にて濾過後, 測定した. 操作はすべて 4°C にて行った.

Table 1 Composition and condition of eluting buffers

	K citrate	Final pH	KCl	n-Propanol	Time (min)
First buffer	0.35 N	5.55	0.5 M	2%	10
Second buffer	0.35 N	5.63	2.1 M	2%	20
Third buffer	0.35 N	5.73	2.4 M	2%	10

K citrate indicates potassium citrate.

ポリアミン測定: 協和精密のアミノ酸分析計を本体とし, 陽イオン交換樹脂62210FKの短カラム($4.6\times 80\ \text{mm}$)を用い, Table 1のような3種の buffer でアミノ酸やポリアミンを溶出した. Buffer 用のポンプは脈流がごく少ない KHP-010 を用いた. カラムからの溶出液を o-phthalaldehyde で postlabel し, 日本分光の FP110 蛍光分析計を用い, activation 338 nm, emission 455 nm で蛍光測定を行った. 1 検体測定時間は50分, 検体量は通常 $50\ \mu\text{l}$, 測定限界濃度はいずれのポリアミンもほぼ $1\ \text{pmol}$ であった.

酸分解: ポリアミンは遊離型としてのみ存在するのではないので, 塩酸による加水分解も行った. これによりアセチル体などの抱合型はすべて遊離型となり, 総ポリアミンとして測定される. 今回, 特に良性脳腫瘍7例, 悪性脳腫瘍5例については酸分解を加え, 総ポリアミンとして酸分解前後の変化を比較した. 酸分解は除蛋白した上清に等量の10N 塩酸を加え, 16~24時間, 110°C に保って行った.

ポリアミンの同定: Arginine, 1,3-diaminopropane, putrescine, norspermidine, cadaverine, spermine などの標準物質 $100\ \text{pmol}$ を溶出し, その retention time を比較して同定した. 特に N^1 -acetylspermidine は相当するピークを fraction collector にて集め, 酸分解してピークの消失とともに spermidine に相当するピークの出現を確認した. また, Prussak and Russell の方法²¹⁾により N^1 -acetylspermidine と N^8 -acetylspermidine の区別を確かめた.

統計学的検討は Student's *t* 検定を行った.

III 結 果

標準物質の溶出パターンは Fig. 1 のごとくで, arginine, diaminopropane, putrescine, norspermidine, cadaverine, spermine が明瞭に分離され, retention time はそれぞれ10.05, 18.90, 20.43, 24.73, 25.86, 37.27 であった. 脳腫瘍細胞液の典型的な溶出パターンを示すと Fig. 2 のようになるが, N^1 -acetylspermidine, putrescine, spermidine が明瞭に分離されていることが判る. N^8 -acetylspermidine も本装置で測定可能で N^1 -acetylspermidine の直前に溶出されるが, 脳腫瘍細胞液中には検出されなかった. Spermine も体液中にはほとんど検出されなかった.

脳腫瘍細胞液中の N^1 -acetylspermidine, putrescine, spermidine, spermine の濃度をまとめると Table 2 のごとくなり, N^1 -acetylspermidine は良性腫瘍で低値, 悪性腫瘍で有意に高値を示した($p<0.001$, Fig. 3). Putrescine も悪性腫瘍で高値を示した($p<0.01$)が, spermidine に差はなかった. Spermine は痕跡程度しか検出されなかった. 良性腫瘍の組織型の間におけるポリアミン分布の差はなかった.

Fig. 1 Elution profile of a standard mixture of amino acids and polyamines. The amount of each polyamine was 100 pmoles. Arg indicates arginine; DAP, 1,3-diaminopropane; PUT, putrescine; Norspd, norspermidine; Cad, cadaverine; SPM, spermine.

Fig. 2 Typical separation of polyamines in cyst fluids from a malignant brain tumor. Arrowhead indicates N¹-acetylspermidine. X1, X2, and X3 are unknown peaks. Arg indicates arginine; N¹-Aspd, N¹-acetylspermidine; PUT, putrescine; SPD, spermidine; SPM, spermine.

Table 2 Free polyamines in cyst fluids of brain tumors

	N¹-acetyl-spermidine (nmol/ml)	Putrescine (nmol/ml)	Spermidine (nmol/ml)	Spermine (nmol/ml)
Benign tumors (n=25)	0.14±0.04	0.73±0.15	1.21±0.18	0.12±0.04
Malignant tumors (n=17)	2.43±0.63**	2.23±0.66*	1.24±0.26	0.20±0.08

Values are expressed by mean±SE. Statistically significant when compared with benign tumor: *p<0.01, **p<0.001.

酸分解後では Fig. 4 に示すように、putrescine, spermidine が増加し、酸分解前には認められなかった spermine が出現した。また、N¹-acetylspermidine, X1, X3 は消失ないし著明に減少したが、X2 はまったく変化しなかった。X1, X3 はアセチル体またはペプチドと予想されたが、同定することができず、X2 はポリアミン代謝産物と思われたが、hypusine や isoptureanine とは一致しなかった。N¹-acetylspermidine, putrescine, spermidine の酸分解前後の変化を Fig. 5 に示す。酸分解後、spermidine は増

Fig. 3 N¹-acetylspermidine levels in cyst fluids of brain tumors. Note the significantly high levels of N¹-acetylspermidine in cyst fluids of malignant brain tumors.

加するが、その増加量は N¹-acetylspermidine に由来する量よりも多く、特に悪性腫瘍でその傾向が強かった。Putrescine の増加は良性腫瘍、悪性腫瘍ともに著明ではなかった。遊離型の spermidine は良性、悪性腫瘍で差はなかったが、酸分解後の総 spermidine は悪性腫瘍で高値であった。

IV 考 察

脳脊髄液など体液中のポリアミンは濃度が低く^{2,14)}、多

Fig. 4 Changes in polyamine elution profile after hydrolysis of cyst fluid from a malignant brain tumor. Upward arrows indicate the polyamine which increased after hydrolysis. Downward arrows indicate polyamines and/or peptides which decreased after hydrolysis. Note the disappearance of N¹-acetylspermidine and the appearance of spermine. X1, X2, and X3 are unknown peaks. N¹-Aspd indicates N¹-acetylspermidine; PUT, putrescine; SPD, spermidine; SPM, spermine.

くは抱合型として存在しているので、従来、測定に際し濃縮や酸分解などの抽出操作を要し、内部標準物質添加による回収率の算定など、操作が煩雑で、結果を得るまでに長時間を要した^{14,27)}。これに対し、今回我々が開発した陽イオン交換樹脂を使用した HPLC では、高感度 spectrofluorometer、直径 7 μ m の陽イオン交換樹脂の選択、脈流の少ない高性能ポンプなどの採用により測定感度を著しく高めることができた^{17,18,30)}。すなわち、検体を過塩素酸で除蛋白しただけの上清を直接 HPLC 分析でき、微量のポリアミンでも短時間で特異的に測定できるようになった。また、酸分解を必要としないので、putrescine, spermidine, spermine のような遊離型ポリアミンだけでなく N¹-acetylspermidine のような抱合型ポリアミンも測定できる利点があり、しかも必要に応じて除蛋白した検体を酸分解して比較することも可能である。

従来、癌のマーカーとしてポリアミンを測定する場合は、ほとんどが塩酸による加水分解処理をしてから測定されてきたが、1978年、Adbel-Monem and Ohno¹⁾が癌患者

Fig. 5 Polyamine levels in cyst fluids from brain tumors before (open columns) and after (hatched columns) hydrolysis. Note the greatly increased level of spermidine after hydrolysis of cyst fluids of malignant tumors. Vertical lines represent mean $\pm$ SE. N¹-Aspd indicates N¹-acetylspermidine; PUT, putrescine; SPD, spermidine.

では尿中 N¹-acetylspermidine が増加し、N¹-/N⁸-acetylspermidine の比が著しく大きくなると報告して以来、アセチルポリアミンが腫瘍マーカーとして注目されはじめた²⁸⁾。しかし、脳腫瘍や脳脊髄液での分析はほとんどが塩酸による加水分解の方法であり、アセチルポリアミン^{9,19)}の報告は少ない^{4-6,8,16,26,29,31)}。

脳腫瘍嚢胞液には変性、壊死に陥った腫瘍細胞やその破壊産物、腫瘍細胞からの分泌物、漏出した血清成分などが含まれると考えられ、種々の蛋白質、電解質、酵素などの生化学的分析では明らかに腫瘍組織、血清成分、脳脊髄液などとその構成成分を異にしている³²⁾。しかし、嚢胞液は腫瘍細胞に接していることから腫瘍細胞のポリアミン濃度を反映すると考えられ、脳脊髄液に接した腫瘍や髄膜播種のモデルとみなすことができる⁷⁾。現在までに脳腫瘍嚢胞液中のポリアミンを分析した報告はない。

脳腫瘍嚢胞液中の N¹-acetylspermidine は、良性腫瘍では低値で悪性腫瘍では有意に高値を示した。大腸癌では良性腺腫や対照粘膜に比べ組織中の N¹-acetylspermidine が特異的に増加しており³⁰⁾、癌組織では N¹-acetylspermidine の合成が高まっていると考えられる¹⁵⁾。組織中のポリアミンは拡散²⁰⁾や荷電の関係ですべてが体液中に放出される訳ではなく、アセチルポリアミンのような抱合型ポリアミンは塩基性が減少して体液中に拡散しやすくなる。癌患者の尿中でも N¹-acetylspermidine の放出が高まっており¹⁾、悪性脳腫瘍組織においても同様に N¹-acetylspermidine の合成が高まり、嚢胞液中に放出されると推測される。Putrescine は astrocytoma では組織学的悪性度を反映するとされ⁶⁾、脳腫瘍嚢胞液中でも悪性腫瘍で高値であった。

総ポリアミンとしての spermidine, spermine は腫瘍組織中には多く含まれているが、通常、遊離型は荷電の関係で体液中に存在しにくい。このため、spermidine は囊胞液中でも高濃度で検出されるが良性、悪性腫瘍で有意の差はなかった。一方、spermine がほとんど検出されなかったのは組織中の spermine が高塩基性で体液中に存在しにくいためと考えられる。

酸分解前後の比較では、悪性脳腫瘍囊胞液中の spermidine の増加は良性腫瘍に比べ著しく、N¹-acetylspermidine に由来する量より多く、他の抱合型 spermidine に由来すると考えられる。Putrescine も酸分解後増加しており、これも抱合型 putrescine の存在を示すものであるが、putrescine の場合は抱合型の割合は少ない。事実、N-acetylputrescine はほとんど検出されなかった。また、spermine は酸分解前では検出されないが、酸分解後出現する例もあり、体液中には抱合型 spermine の存在も推定される。このように悪性腫瘍で抱合型ポリアミンが多くなることは、悪性腫瘍におけるポリアミン代謝が正常組織と異なっていることを示すと推測される¹⁵⁾。

脳脊髄液中のポリアミンは、増殖性の腫瘍細胞だけでなく非腫瘍性病変によっても影響される⁵⁾。したがって、前述のごとく悪性腫瘍組織においてポリアミン代謝が変化し、N¹-acetylspermidine のような抱合型ポリアミンが増加していることは、腫瘍性病変とポリアミン代謝の変化が少ないと考えられる非腫瘍性病変を区別できる可能性も示している。現在、脳腫瘍組織および脳脊髄液のポリアミンを検討中である。

以上、新しく開発した HPLC を使用し、脳腫瘍囊胞液を分析した結果とその意義について検討した。

V ま と め

1. 陽イオン交換樹脂を使用した高速液体クロマトグラフィーにて脳腫瘍囊胞液中の遊離および総ポリアミンを測定した。
2. Putrescine, spermidine, N¹-acetylspermidine はすべての検体で検出されたが、spermine は酸分解後一部の検体で検出されるのみであった。
3. 悪性腫瘍では N¹-acetylspermidine, putrescine が有意に高値であり、特に N¹-acetylspermidine は新しい腫瘍マーカーとして期待できる。
4. 遊離型 spermidine は良性、悪性腫瘍で差はなかったが、総 spermidine は悪性腫瘍で高値を示した。
5. 脳脊髄液中の非腫瘍性病変によるポリアミンの変化と腫瘍性病変による変化をアセチルポリアミンにより区別できる可能性がある。

本研究は昭和59年度文部省科学研究費補助金奨励研究 A の助成を受けて行われた。

本研究の要旨は、第43回日本脳神経外科学会総会(1984年10月、千葉)および第1回日本ポリアミン研究会(1985年1月、横浜)において発表した。

文 献

- 1) Abdel-Monem MM, Ohno K: Polyamine metabolism III: Urinary acetyl polyamines in human cancer. *J Pharm Sci* 67: 1671-1673, 1978
- 2) Albright AL, Marton LJ, Lubich WP, Reigel DH: CSF polyamines in childhood. *Arch Neurol* 40: 237-240, 1983
- 3) Bachrach U: *Function of the Naturally Occurring Polyamines*. New York, Academic, 1973, pp 1-211
- 4) Fulton DS, Levin VA, Lubich WP, Wilson CB, Marton LJ: Cerebrospinal fluid polyamines in patients with glioblastoma multiforme and anaplastic astrocytoma. *Cancer Res* 40: 3293-3296, 1980
- 5) Fulton DS, Levin VA, Wilson CB, Marton LJ: Clinical correlation of cerebrospinal fluid polyamine levels, in Wood J (ed): *Neurobiology of Cerebrospinal Fluid* 2. New York, Plenum, 1983, pp 441-452
- 6) Harik ST, Sutton CH: Putrescine as a biochemical marker of malignant brain tumors. *Cancer Res* 39: 5010-5015, 1979
- 7) Heby O, Andersson G: Tumor cell death: The probable cause of increased polyamine levels in physiological fluids. *Acta Pathol Microbiol Scand [A]* 86: 17-20, 1978
- 8) Heby O, Marton LJ, Wilson CB, Martinez HM: Polyamine metabolism in rat brain tumor cell line: Its relationship to the growth rate. *J Cell Physiol* 86: 511-522, 1975
- 9) Heideman RL, Fickling KB, Walker LJ: Free and total putrescine in cerebrospinal fluid quantified by reversed-phase liquid chromatography. *Clin Chem* 30: 1243-1245, 1984
- 10) Jänne J, Pösö H, Raina A: Polyamines in rapid growth and cancer. *Biochim Biophys Acta* 473: 241-293, 1978
- 11) Marton LJ: Polyamines and brain tumor: Relationship to patient monitoring and therapy, in *Advances in Polyamine Research*, vol 3. New York, Raven, 1981, pp 425-430
- 12) Marton LJ, Edwards MS, Levin VA, Lubich WP, Wilson CB: Predictive value of cerebrospinal fluid polyamines in medulloblastoma. *Cancer Res* 39: 993-997, 1979
- 13) Marton LJ, Edwards MS, Levin VA, Lubich WP, Wilson CB: CSF polyamines: A new and important means of monitoring patients with medulloblastoma. *Cancer* 47: 757-760, 1981
- 14) Marton LJ, Heby O, Levin VA, Lubich WP, Craft DC, Wilson CB: The relationship of polyamines in cerebrospinal fluid to the presence of central nervous system tumors. *Cancer Res* 36: 973-977, 1976
- 15) 松崎 茂, 竹之下誠一: 組織中のポリアミンおよびその誘導体の測定とその意義. *臨病理* 59: 167-175, 1984
- 16) McAnulty PA, Yusuf HKM, Dickerson JWT, Hey EN,

- Waterlow JC: Polyamines of the human brain during normal fetal and postnatal growth and during postnatal malnutrition. *J Neurochem* 28: 1305-1310, 1977
- 17) 小川徹男, 遠藤敬一, 泉雄 勝, 松崎 茂, 浜名康栄: アミノ酸自動分析計による尿中ポリアミン測定の改良法. 北関東医 31: 211-216, 1981
 - 18) 小川徹男, 鈴木英雄, 遠藤敬一, 泉雄 勝, 松崎 茂, 鈴木光雄, 浜名康栄: 体液および組織中のポリアミンの高速液体クロマトグラフィーによる微量測定. 北関東医 33: 237-245, 1983
 - 19) Ortiz JG, Giacobini E, Schmidt-Glenewinkel T: Acetylation of polyamines in mouse brain: Subcellular and regional distribution. *J Neurosci Res* 9: 193-201, 1983
 - 20) Pierangeli E, Levin VA, Seidenfeld J, Marton LJ: Putrescine diffusion in cat brain and capillary permeability in rat brain: Relation to CSF putrescine levels in brain tumor patients. *Eur J Cancer* 17: 143-147, 1981
 - 21) Prussak CE, Russell DH: Single-step high-performance liquid chromatographic method for the analysis of acetylated polyamines. *J Chromatogr* 229: 47-56, 1982
 - 22) Russell DH: Increased polyamine concentrations in the urine of human cancer. *Nature New Biology* 233: 144-145, 1971
 - 23) Russell DH, Duric BGM: *Polyamines as Biochemical Markers of Normal and Malignant Growth*. New York, Raven, 1978, pp 1-172
 - 24) Scalabrino G, Ferioli ME: Polyamines in mammalian tumor II. *Adv Cancer Res* 36: 1-102, 1982
 - 25) Scalabrino G, Modena D, Ferioli ME, Puerari M, Luccarelli G: Degrees of malignancy in human primary central nervous system tumors: Ornithine decarboxylase levels as better indicators than adenosylmethionine decarboxylase levels. *JNCI* 68: 751-754, 1982
 - 26) Seidenfeld J, Marton LJ: Biochemical markers of central nervous system tumors measured in cerebrospinal fluid and their potential use in diagnosis and patient management: A review. *J Natl Cancer Inst* 63: 919-931, 1979
 - 27) Seiler N: Assay procedures for polyamine in urine, serum, and cerebrospinal fluid. *Clin Chem* 23: 1519-1526, 1977
 - 28) Seiler N, Graham A, Bartholeyns J: Enhanced urinary excretion of N¹-acetylspermidine and presence of tumors. *Cancer Res* 41: 1572-1573, 1981
 - 29) Shaw GG: The polyamines in the central nervous system. *Biochem Pharmacol* 28: 1-6, 1979
 - 30) Takenoshita S, Matsuzaki S, Nakano G, Kimura H, Hoshi H, Shoda H, Nakamura T: Selective elevation of the N¹-acetylspermidine level in human colorectal adenocarcinoma. *Cancer Res* 44: 845-847, 1984
 - 31) Terabayashi T: Blood levels of polyamines in patients with brain tumor: Special reference to relationship between blood levels of polyamines and histological finding, extension as well as treatment of tumor. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 16 [Part I]: 43-50, 1976
 - 32) Wolleman M: *Biochemistry of Brain Tumors*. London, Macmillans, 1974, pp 1-158

[別刷請求先: 〒400 甲府市富士見1-1-1, 山梨県立中央病院脳神経外科, 山崎弘道]