〔シンポジウム：レクチンの臨床応用〕

 γ -グルタミルトランスペプチダーゼ (GGT)

アイソザイムのアフィニティー電気泳動

吉川智加男*・下條信雄*・中 恵一*・奥田 清*・大川二郎**

はじめに

γ -グルタミルトランスペプチダーゼ (以下 GGT) アイソザイムは濾紙をはじめとして、セルロースアセテート膜、アガロース、ポリアクリルアミド等種々の支持体により分画され検討されてきたが、明らかに疾患特異性を示す分画は少なくそのなかで最も疾患特異性があり臨床的意義の明らかなものは肝癌特異的 GGT アイソザイムである。これは児島ら¹⁾が hepatoma-related γ GTP 澤武ら²⁾が novel γ GTP とそれぞれ呼称しているものでいずれも 4~30% ポリアクリルアミドゲルで分画された。また藤沢ら³⁾も 7.5% ポリアクリルアミドディスクゲルで α グロブリン領域の活性帯が肝癌特異的な分画であり hepatoma-specific γ GTP と呼んで報告している。しかしいずれの方法も手技が煩雑で泳動時間も長く多くの検体をこなすルーチン検査としては不適當である。われわれはセルロースアセテート膜 (以下セア膜) を支持体に用い、さらに新しい酵素基質を利用し、高感度で短時間に肝癌由来の分画を検出できるアイソザイム分析を開発し行っている。従来のセア膜でのアイソザイム像は多様性が強くまた特異染色の感度も低いため肝癌特異的分画を検出するには困難であった。多様性の主な原因は高比重リポ蛋白を主体とした血清リポ蛋白との結合にある⁴⁾。この影響をとり除くためセア膜に界面活性剤として Triton X-100 を 1% 添加し泳動することにより、リポ蛋白と GGT は完全に解離することができ均一なアイソザイム像を得、さらにコンカナバリン A (ConA) レクチンを添加することにより ConA に親和性のない肝癌に特異的な分画を明らかにすることができ

た⁵⁾。以下にわれわれが行った界面活性剤添加セア膜電気泳動法、さらに ConA 添加によるレクチンアフィニティーセア膜電気泳動法について説明する。

材料と方法

1. 材料

検体は肝動脈造影、肝生検、剖検等にて診断された肝癌 102 例および組織学的に肝硬変、慢性肝炎と診断され、各種画像診断にて肝癌を否定した 40 例の血清を用い、正常対象として健診で来院した健康人のうちアルコール摂取歴のないものを選んだ。また剖検および肝切除時に得た肝癌組織についても泳動を行った。さらに切除不能肝癌に対する治療として行った肝動脈塞栓術後に経時的に採血した血清検体についても検討した。

2. 方法

1) セア膜電気泳動は泳動装置としてヘレナ社製を使用し、支持体に TITAN III ISO-VIS、泳動緩衝液にトリス-バルビタール緩衝液を用いた (0.07 M tris-amino-metane, 0.07 M sodium barbital, 0.02 M barbital, pH 8.6, イオン強度 0.09)。泳動緩衝液に 1% になるよう Triton X-100 を添加し、この液中で泳動膜を平衡化させ、試料塗布後 1 mA/cm で約 70 分間泳動した。サンプルは GGT の総活性に応じて血清を 0.6~1.5 μ l 塗布した。

2) 染色基質として γ -グルタミル-3, 5-ジプロモ-4-ヒドロキシアニリド (γ -Glu-DBHA) を用いた GGT 測定キット (協和メデックス社製) を利用した。本法は下記の原理のごとく GGT の作用により遊離した DBHA がモノフェノールモノオキシゲナーゼにより EMSE と

Affinity electrophoresis for γ -glutamyltranspeptidase (GGT) isoenzyme on cellulose acetate membrane.

* Chikao Yoshikawa, Nobuo Simojo, Keiichi Naka, Kiyoshi Okuda; 大阪市立大学医学部臨床検査医学

** Jiro Ohkawa; 兵庫県立成人病センター検査部

Correspondence address: Chikao Yoshikawa, Department of Laboratory Medicine, Osaka City University Medical School, 1-5-7, Asahimachi, Abeno-ku, Osaka 545, Japan.

酸化縮合し緑色色素を生じる方法で、反応はすべて酵素法のため one-step で行うことができ拡散が少なく鮮明な像が得られる。

Reaction Principle

DBHA, dibromhydroxyanilide

EMSE, N-ethyl-N-(3-methylphenyl)-N-succinylethylenediamine

MPO, monophenol monooxygenase

電気泳動終了後、あらかじめ GGT の基質液に浸しておいた新しい TITAN 膜もしくはもう 1 枚別のセア膜を泳動の終了した TITAN 膜に気泡が入らないよう上からかぶせてサンドイッチ状にし、1~2 時間 37℃ で加温発色終了後、ドライヤーで完全に乾燥させる。

3) ConA 添加セア膜泳動は上記 1% Triton X-100 添加緩衝液に ConA (sigma, type IV) をさらに添加した液でセア膜の平衡化を行い同様の条件で泳動を行う。ConA は少量ずつ徐々に増加して泳動を行った結果、5 g/l 濃度にて高活性検体でも十分な分離が得られた。

またセア膜のリボ蛋白染色は Oil red O, 蛋白染色はボンソー 3R を使用した。

4) 対照として 4~30% グラジエントポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) を児島¹⁾、澤武²⁾らの方法で行い基質には γ -L-Glutamyl- α -naphthylamide, lithium salt (和光純薬) および Fast Garnet GBC (Sigma) を用いた。

5) ゲルろ過クロマトグラフィーとして高速蛋白液体クロマトグラフィー (FPLC, Pharmacia) を用い、TSK G 3000 SW カラム (東洋ソーダ) 0.75×60 cm を担体とした。

6) 血清 GGT 活性は L- γ -glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilide を基質とするベーリンガー・マンハイム山之内製のキットを使用して日立 736 自動分析装置にて測定し、60IU/l 以下を正常値とした。血清 α -フェトプロテイン (AFP) は LPIA-300 (三菱化成工業) を用いたテックス近赤外比濁法にて測定し、20 ng/ml 以下を正常値とした。

7) 剖検もしくは肝切除時に得られた肝癌組織および

同一患者での硬変肝部組織の GGT アイソザイムは、すでに報告されている方法^{6,7)}に従ってホモジナイズし、Triton X-100 にて可溶化して、超遠心にて分画し、その上清を検体とした。

結 果

1) 本法での Triton X-100 添加セア膜泳動で GGT アイソザイムは (Fig. 1), 五つの分画に分離され、陽極側より post-albumin 位 (GGT 1), α 位 (GGT 2), pre β 位 (GGT 3), β 位 (GGT 4), post β 位 (GGT 5) となる。健康人では主に GGT 2, GGT 3, GGT 4 の三つの分画が認められる。肝癌では GGT 1 が認められる場合があり、GGT 2 分画も強く認められる場合が多い。本法でのリボ蛋白染色は、陰極側に遅れてほぼ 1 本のバンドとして γ 位に認められ GGT アイソザイムとは完全に解離されて泳動される。

2) 肝癌患者血清を PAGE にて泳動し、肝癌特異的分画である澤武らの呼称している I', II, II' 分画の認められた検体を FPLC にてゲルろ過し、各分画を分取濃縮してセア膜に添加、泳動した結果、I' は GGT 2 に泳動され、II, II' 分画は GGT 1 に泳動された。また肝炎、肝硬変等の検体で I 分画を分取して泳動すると I' と同様に GGT 2 に泳動され、 α 位の GGT 2 分画は I, I' の両成分が混在することが判明した。

3) ConA 添加セア膜泳動では (Fig. 2), ConA に親和性のある分画は陰極側へ引っ張られた形となる。ConA に親和性のない分画は ConA の添加にもかかわらず陽極側へ移動する。もとの post-Alb に移動した分画を GGT 1', α 位に移動した分画を GGT 2' とした

Fig. 1. Cellulose acetate electrophoresis with Triton X-100 and specific staining for protein, lipoprotein, and GGT.

(-)

(+)

Fig. 2. Serum GGT from healthy subjects and patient with liver diseases and tissue homogenate GGT zymogram with ConA affinity electrophoresis.

が、ConA に親和性のない GGT 2' 分画が澤武らの I' に相当し、この分画が肝癌に最も特異性の高い分画であり、われわれはこの分画を Hepatoma-associated GGT (HA-GGT) と呼称している。また肝癌組織の上清分画のアイソザイム像では、肝癌組織では ConA に親和性

Table 1. Diagnostic sensitivity and specificity of HA-GGT and AFP for hepatocellular carcinoma.

	HA-GGT		AFP	
	Positive	Negative	Positive	Negative
Patients				
with HCC	59 TP	43 FN	70 TP	32 FN
Patients				
w/o HCC	7 FP	33 TN	17 FP	23 TN
	Sensitivity=58%		Sensitivity=69%	
	Specificity=83%		Specificity=58%	

TP, true positive; FN, false negative; FP, false positive; TN, true negative.
Sensitivity=100 TP/(TP+FN)
Specificity=100 TN/(TN+FP)

のない分画を α 位に認めたが同一患者の硬変肝部組織にはほとんど認めなかった。

4) 肝癌 102 例、対照として肝硬変 20 例、慢性肝炎 20 例において AFP と HA-GGT を同時に測定した結果 (Fig. 3), 肝癌 102 例中 HA-GGT は 59 例に認められ、うち GGT 60IU/L 以下では 48 例中 19 例が、60IU/L 以上では 54 例中 40 例が HA-GGT 陽性であった。AFP 値でみると、AFP 20 ng/ml 以上の 70 例中 49 例に HA-GGT を認め、AFP 20 ng/ml 以下の陰性例においても 32 例中 10 例が HA-GGT 陽性であった。また AFP 10,000 ng/ml 以上の肝癌患者では全例が陽性で

Fig. 3. Correlation of the detection of HA-GGT with AFP measurement.

Fig. 4. Serum GGT zymogram of a patient with hepatocellular carcinoma after transcatheter arterial embolization.

あった。以上より Table 1 のごとく HA-GGT の感度は 58%, 特異性は 83% であり, AFP は感度が 69%, 特異性は 58% であった。

5) 肝動脈塞栓術後の経時的なアイソザイム分画像では (Fig. 4), 澤武らの PAGE 法で術後経時的に I' 分画の増加を認めたが, II, II' 分画には変化を認めなかった。ConA 添加セア膜泳動においても, I' に相当する GGT 2' の増加を認めたが, II, II' に相当する GGT 1' は増加を認めなかった。

考 察

GGT アイソザイムは種々の方法で分離されているが, いずれも多様性を示し, 臓器特異性に乏しいといわれてきた。1976 年 Köttgen⁶⁾ らは ConA セファロースクロマトグラフィーを用いてラット肝組織を分画し, ラット肝癌由来の GGT は胎性肝由来の GGT としての性質を有しており, シアル酸量の違いにより ConA アフィニティークロマトグラフィーで肝癌 GGT を分離できることを報告した。またヒト肝癌 GGT と肝 GGT とは酵素学的, 免疫学的に同じ性質を有し, 糖鎖部分の違いから ConA 吸着率が低いことが報告されている⁷⁾。そこでわれわれは武田ら⁸⁾ の報告を応用し, 肝癌由来 GGT を特異的に分離する方法として ConA をセア膜に添加しそれを相対的固相としてアフィニティークロマトグラフィー電気泳動を行う方法を開発した。本法ではセア膜に 1% Triton X-100 を添加することによりリポ蛋白を完全に解離させ脂質の影響を除くと同時に, ConA を 5 g/l と十分量添加することにより ConA に親和性の低い肝癌由来分画 (HA-GGT と呼称) をセア膜上で明瞭に分離

することが可能となった。またこのアイソザイムは肝癌組織の上清分画に認めることから HA-GGT が肝癌に最も特異的な分画と考えられた。

臨床的には肝癌 102 例中 59 例に HA-GGT が陽性であり, 陽性率は 58% であった。一方, 同時に測定した AFP は 70 例が 20 ng/ml 以上であり, 陽性率は 70% と高いが, 肝硬変でも 20 例中 9 例, 慢性肝炎でも 20 例中 8 例が 20 ng/ml 以上であり良性疾患でも異常値を示すことが多い。この点 HA-GGT は良性疾患では 40 例中 7 例のみに陽性で偽陽性が低いという特徴をもつ。また AFP が 20 ng/ml 以下の AFP 陰性肝癌でも 32 例中 10 例が HA-GGT 陽性であり AFP 陰性例にも有効であった。HA-GGT と AFP の診断感度と特異性を比較すると HA-GGT は感度が 58% と低い特異性は 83% と高く, 逆に AFP は感度は高いが特異性は低い。このため両者を併用することにより肝硬変や慢性肝炎などの肝癌発生のハイリスク・グループにおける診断に有用と考えられる。

近年, 切除不能肝癌における最も効果的な治療の一つとして肝動脈塞栓術 (transcatheter arterial embolization: TAE) が施行されている。われわれは TAE 後の血清酵素変化を測定することにより TAE の効果判定に有用であり, その際血中に出現する酵素は主として肝癌組織由来であることを報告した⁹⁾。そのなかで TAE 後 GOT, GPT, GLDH 等の逸脱酵素は一過性に著しく上昇するが, GGT, ALP, LAP 等はほとんど変化しないことを報告している。今回 TAE 後の HA-GGT を分画すると Fig. 4 のごとく澤武らの方法で行った PAGE では I' 分画の増加を認めたものの II, II' 分

画は変化を認めなかった。われわれの行った ConA 添加アフィニティーセア膜泳動でも I' に相当する GGT 2' の増加を認めたが II, II' に相当する GGT 1' は変化を示さなかった。TAE 後に ConA に親和性のない GGT 2' 分画の増加が認められ、TAE 後の血中酵素変化が主として肝癌組織由来であることを考え合わせると、肝癌組織には I' に相当する GGT 2' 分画のみが存在すると考えられる。そして GGT 1' 分画は肝癌以外の疾患もしくは機序によって出現するのではないかと考えられた。

近年、山下ら¹⁰⁾により肝癌 GGT の糖鎖構造が詳しく調べられ、その結果正常肝とは異なり bisecting GlcNAc の構造をもつことが明らかとなった。また谷口ら¹¹⁾は肝癌組織から GGT の糖鎖部分のみを取り出してそのモノクローナル抗体を作製し、種々の疾患で測定した結果その抗体に反応する GGT は肝癌に多く検出されたと報告している。このような肝癌由来の糖鎖変化を認識するモノクローナル抗体が開発されれば酵素活性をもたない GGT が血中に存在している場合でも診断が可能となって電気泳動法に代わる肝癌の早期診断への

有用な手段の一つになるものと考えられる。

文 献

- 1) Kojima, J. et al.: Clin. Chim. Acta, **106**: 165, 1980.
- 2) Sawabu, N. et al.: Cancer, **51**: 327, 1983.
- 3) Fujisawa, K. et al.: Carcino-Embr. Prot., **1**: 421, 1979.
- 4) Huseby, N.E.: Clin. Chim. Acta, **124**: 103, 1982.
- 5) Yoshikawa, C. et al.: Clin. Chim. Acta, **185**: 317, 1989.
- 6) Köttgen, E. et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun., **72**: 61, 1976.
- 7) Yamamoto, H. et al.: Clin. Chim. Acta, **111**: 229, 1981.
- 8) 武田和久: 生物物理化学, **28**: 349, 1984.
- 9) Yoshikawa, C. et al.: Clin. Biochem., **20**: 435, 1987.
- 10) Yamashita, K. et al.: Cancer Res., **43**: 5059, 1983.
- 11) Taniguchi, N. et al.: J. Natl. Cancer Inst., **75**: 841, 1985.