日消外会誌　23（12）：2709～2715，1990年

原　著

食道癌における腫瘍マーカーとしての尿中ポリアミンの有用性に関する検討

久留米大学第1外科
力武　浩　山名　秀明　藤田　博正
白水　玄山　南　泰三　掛川　暉夫

胸部食道扁平上皮癌55例を対象とし，酵素法にて尿中ポリアミンの測定を行い，その有用性について検討した．さらに，増殖期細胞の核抗原に対するモノクローナル抗体Ki-67の陽性細胞率とともに癌細胞核DNA量の測定を行い，増殖能および悪性度と尿中ポリアミンとの関係についても検討を加えた．尿中ポリアミンの陽性率は，38.3%とcarcinoembryonic antigen（CEA），squamous cell carcinoma related antigen（SCC）と比較し若干高値でありCEA，SCCとのcombination assayにより診断率は54.5%と向上し，特に再発時には83.3%と高値を示した．尿中ポリアミンは，組織学的深達度の増大とともに平均値および陽性率が増加したがKi-67陽性細胞率との間には特に相関を認めなかった．また，DNA ploidyではaneuploid症例がdiploidより尿中ポリアミンは術後のfollow upにおいて有用なモニタリングマーカーとなることが示唆された．

Key words: tumor marker, urinary polyamine levels, DNA index of esophageal cancer, monoclonal antibody Ki-67

緒　言

最近では，腫瘍マーカーとして種々のものが発見され，診断・治療に広く応用されているが，いまだ食道癌に特異性の高いものはない．食道癌の腫瘍マーカーとしてsquamous cell carcinoma related antigen（SCC），carcinoembryonic antigen（CEA），tissue polypeptide antigen（TPA），血清Caなどが使用されているが，食道扁平上皮癌では陽性率も低く，その使用範囲は限定されることが多い．

一方，尿中ポリアミンは，臓器特異性はないが，種々の癌腫において高値を示すことが判明し，注目されるようになってきた．ポリアミンの作用機序としては，核酸の生合成を促進し，細胞増殖と密接に関連していることが知られている．それゆえ，予後不良で，悪性度の高い腫瘍といえる食道癌の腫瘍マーカーとしても応用可能か否かについて検討する必要があるものと考えた．今回，尿中ポリアミンとともに従来より用いられているSCC CEA，血清Caの各腫瘍マーカーについても測定を行い，尿中ポリアミンの腫瘍マーカーとしての臨床的意義を検討してみた．さらに，悪性度の指標として測定してきた癌細胞核DNA量とともに，細胞動態の指標としてのモノクローナル抗体Ki-67[1]を用いて癌腫の増殖期細胞率についても測定を行い，増殖活性の高い腫瘍で高値を示すと考えられるポリアミンとの関係について，尿中ポリアミン量を測定することにより検討を加えた．

研究対象と方法

1．対象

1986年1月より1987年12月までに当科に入院し，切除術を施行した（腺癌を除く）原発性胸部食道癌55例を対象とした．内訳は，男性48例，女性7例で，平均年齢は62歳（45～83歳）であった．食道癌取扱い規約[2]に基づいた組織型は，高分化型扁平上皮癌（高分化型）13例，中分化型扁平上皮癌（中分化型）32例，低分化型扁平上皮癌（低分化型）9例，未分化癌1例であり，組織学的進行度は，stage 0が7例，stage I，2例，stage II，2例；stage III，20例；stage IVの24例であった．

2．研究方法

1）尿中ポリアミンの測定

＜1990年9月12日受理＞別刷請求先：力武　浩
〒830　久留米市旭町67　久留米大学医学部第1外科

尿中ポリアミン値には，日差変動や日内変動が認められるが，田中[3]は早朝尿，随意尿，蓄尿のポリアミン値の検討により，これらの値には有意差は認めなかったと報告しており，入院時には早朝尿を，外来での follow up 時には随意尿を試料として用いた．

測定は，迅速測定キット（ポリアミンテストーエンザイム：徳山曹達製造，シノテスト販売）を用い，60 MCMOL/G.CR を cut off 値とし，これ以上の値を異常値と判定した．

2）他の腫瘍マーカーの測定

SCC と CEA は静脈血採取後に血清分離し，RIA キットを用いて測定した．また，同時に血清 Ca 値の測定も併用して行った．

正常値範囲の設定は SCC は3.1μg/l 未満，CEA は 2.5ng/ml 以下，血清 Ca は8.5～10.5mg/dl とした．

3）癌細胞核 DNA 量の測定

癌の悪性度と尿中ポリアミンとの関係をみるために，flow cytometry を用いて癌細胞核 DNA 量の解析を行い，南[4]，入江[5]が既に報告した方法により DNA index（DI 値）を算出した．

4）Ki-67陽性細胞率の測定

ヒトの増殖期細胞の核抗原に対するモノクローナル抗体 Ki-67を用い，間接酵素抗体法（ABC 法）で染色した．腫瘍細胞の核内が顆粒状に褐色に染色されたもののみを陽性細胞と判定し，腫瘍細胞1,000個当りの陽性細胞率を算出した．

成　績

1．組織学的進行度と各種腫瘍マーカー

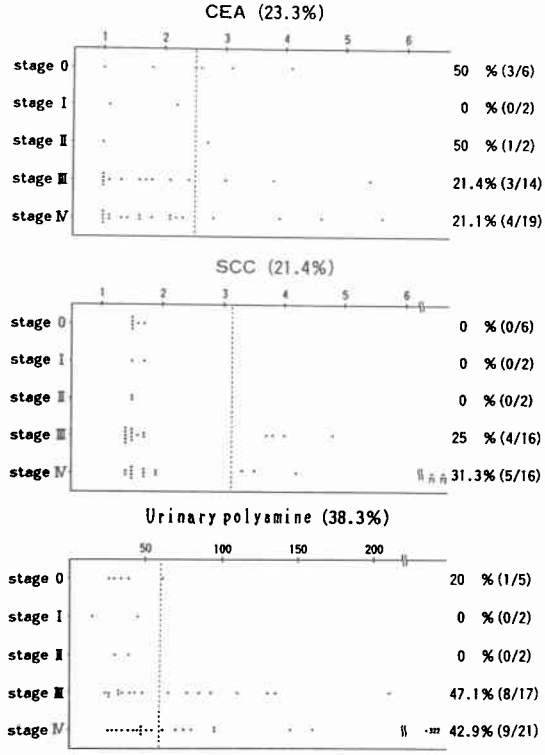
1）組織学的進行度と CEA

43症例における CEA の陽性率は23.3%であった．組織学的進行度別の CEA 値とその陽性率は次のとおりである．stage 0, 2.52±1.06(n=6)；stage I, 1.65±0.78 (n=2)；stage II, 1.85±1.20 (n=2)；stage III 2.01±0.29 (n=14)；stage IV, 2.08±1.31 (n=19) であり，陽性率はそれぞれ50% (3/6)，0%，0%，21.4% (3/14)，21.1% (4/19) であった（**Fig. 1**）．

2）組織学的進行度と SCC

42症例における SCC の陽性率は21.4%であった．組織学的進行度別の SCC 値とその陽性率をみると，stage 0, 1.55±0.08(n=6)；stage I, 1.60±0.14(n=2)；stage II, 1.5(n=2)；stage III, 2.14±1.20(n=16)；stage IV, 7.37±17.65 (n=16) であり，陽性率は stage 0からIIは0%，stage III が25%(4/16)，stage IV が31.3% (5/16) であった（**Fig. 1**）．

Fig. 1　The relationship between tumor marker and histological stages



3）組織学的進行度と尿中ポリアミン

47症例における尿中ポリアミンの陽性率は38.3%であり，CEA，SCC と比較し，若干高値を示したが有意なものではなかった．組織学的進行度別の尿中ポリアミン値とその陽性率は，stage 0, 37.1±14.5MCMOL/G.CR (n=5)；stage I, 29.1±19.4 (n=2)；stage II, 34.6±5.5 (n=2)；stage III, 68.3±51.7 (n=17)；stage IV, 82.0±69.0 (n=21) であり，陽性率はそれぞれ20% (1/5)，0%，0%，47.1% (8/17)，42.9% (9/21) であった（**Fig. 1**）．

2．各種腫瘍マーカーの combination assay

CEA と SCC の combination assay では，陽性率は29.1%(16/55)であったが，尿中ポリアミンと SCC では45.5%(25/55)，尿中ポリアミンと CEA では49.1% (27/55)，尿中ポリアミン，CEA および SCC の三者では54.5% (30/55) と最も高値を示した（**Table 1**）．

3．組織学的深達度（a 因子）と尿中ポリアミン

a 因子別に尿中ポリアミン値とその陽性率についてみると，a0では34.7±13.2MCMOL/G.CR (n=12)，陽性率は8.3% (1/12) であったが，a1～a2では81.5±

Table 1 The positive rate of tumor marker and combination assay

Urinary polyamine	CEA	SCC	CEA SCC	Urinary polyamine SCC	Urinary polyamine CEA	Urinary polyamine CEA SCC
38.3% (18/47)	21.4% (9/42)	23.3% (10/43)	29.1% (16/55)	45.5% (25/55)	49.1% (27/55)	54.5% (30/55)

Table 2 The relationship between the depth of the cancer and urinary polyamine

Depth of cancer	Urinary polyamine levels		Positive rate
a_0 (n=12)	34.7 ± 13.2	※	8.3% (1/12)
a_1～a_2 (n=23)	81.5 ± 71.5	※※	43.5% (10/23)
a_3 (n=9)	83.8 ± 43.3		77.8% (7/9)

※ $p<0.05$
※※ $p<0.01$

Table 3 The relationship between lymph node metastasis and urinary polyamine

n factor	Urinary polyamine level	Positive rate
n_0 (n=18)	67.2 ± 55.0	38.9% (7/18)
n_1～n_2 (n=13)	44.0 ± 19.6	30.8% (4/13)
n_3～n_4 (n=11)	101.9 ± 84.7	54.6% (6/11)

71.5(n=23)，陽性率は43.5%となり有意差($p<0.05$)を認めた．a3は83.3±43.3 (n=9) と a0と比較し有意($p<0.01$)な高値を示した．また，陽性率は77.8%(7/9) であった (**Table 2**).

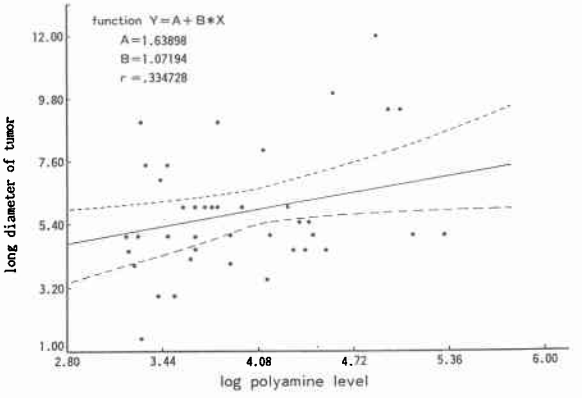
4. リンパ節転移（n 因子）と尿中ポリアミン

n 因子別に尿中ポリアミン値とその陽性率をみると，n0は67.2±55.0MCMOL/G.CR (n=18)，陽性率は38.9% (7/18)，n1～n2は44.0±19.6 (n=13)，陽性率は30.8% (4/13)，n3では101.9±84.7 (n=11)，54.6% (6/11) であった (**Table 3**)．各群間には有意差は認められなかったが，n3～n4が平均値，陽性率とも最も高値であった．

Table 4 The relationship between histologic type and urinary polyamine

Histologic type	Urinary polyamine level	Positive rate
well (n=9)	61.4 ± 34.5	55.6% (5/9)
mode (n=25)	78.7 ± 72.0	40.0% (10/25)
poor (n=8)	59.7 ± 36.2	37.5% (3/8)
undiff (n=1)	24.7	0 % (0/1)

Fig. 2 The relationship between long diameter of tumor and urinary polyamine level



5. 組織学的分化度と尿中ポリアミン

組織学的分化度別に尿中ポリアミン値とその陽性率をみると，高分化型の陽性率が最も高値を示したが，各群間に有意差は認められなかった (**Table 4**).

6. 腫瘍長径と尿中ポリアミン

腫瘍の大きさ（腫瘍長径）と尿中ポリアミン値との関係をみると，両者間に一定の相関はみられなかった (**Fig. 2**).

7. 組織学的進行度と血清 Ca

血清 Ca 値の異常高値を認めたのは5.3% (2/38) であり，stage III の 1 例と stage IV の 1 例であった．組織学的進行度別の血清 Ca 値は，stage 0, 9.5±0.3mg/dl(n=5)；stage I, 9.2±1.4(n=2)；stage II, 10.0±1.1 (n=2)；stage III, 9.1±0.5 (n=10)；stage IV, 9.4±0.5 (n=19) で stage による血清 Ca 値の差異は認められなかった (**Fig. 3**).

8. DNA index (DI) 値と尿中ポリアミン

Fig. 3 The relationship between histological stage and serum calcium level

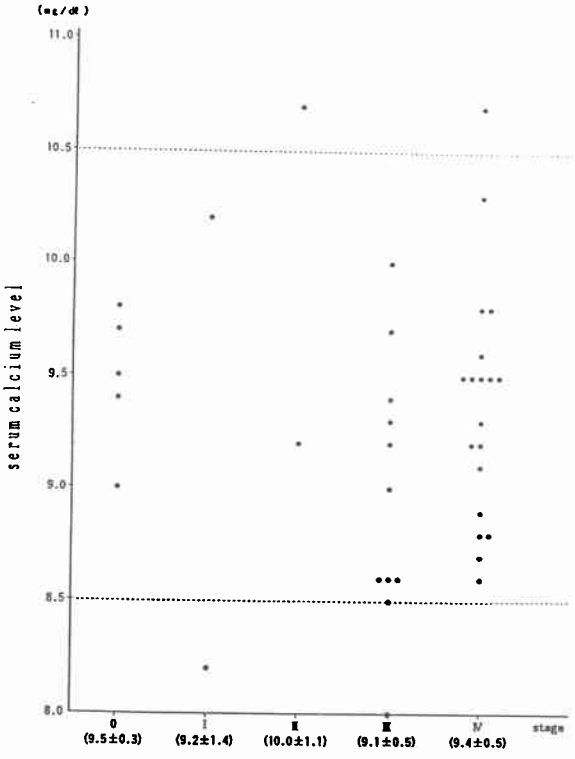


Fig. 5 The relationship between the rate of cells positive to Ki-67 and urinary polymine level. The square area represents the positive cases of both Ki-67 and urinary polyamine levels.

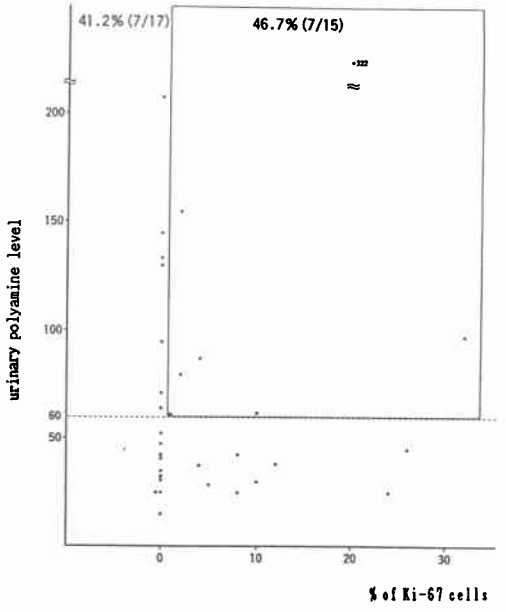


Fig. 4 The relationship between DNA index and urinary polyamine level

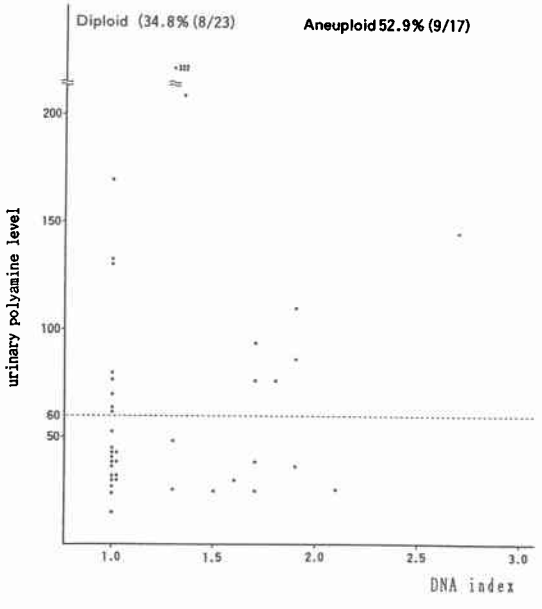
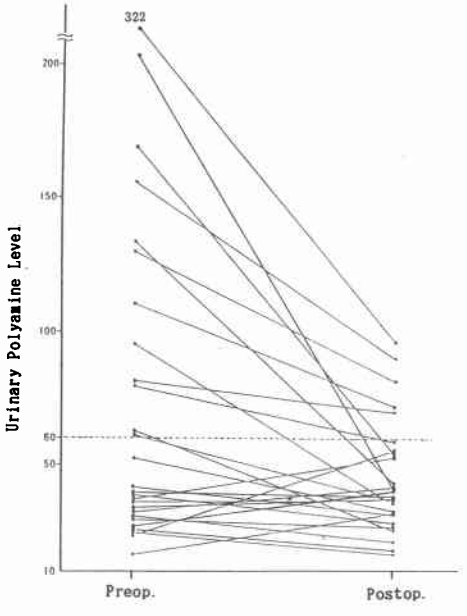


Fig. 6 The movement of urinary polymine levels in the non-recurrent cases



DI値と尿中ポリアミン値の関係をみるとDI値が1.0であるDNA diploid癌腫の陽性率は34.8%(8/23)であったが，DI値が1.1以外の値を示すDNA aneuploidの癌腫では52.9%（9/17）であった（**Fig. 4**）．なおDI値と尿中ポリアミン値との間には一定の相関関係は認められなかった．

9．Ki-67陽性細胞率と尿中ポリアミン

増殖期の細胞を認識するモノクローナル抗体Ki-67により陽性細胞を認めた症例は32例中15例（46.9%）であった．その15例中，尿中ポリアミンが陽性であったものは7例（46.7%）であった．Ki-67陰性の17例では尿中ポリアミンの陽性率は41.2%であり，両者間には有意差を認めなかった（**Fig. 5**）．

10．非再発症例における尿中ポリアミンの変動

再発を認めない28例において術前，術後における尿中ポリアミン値の変動をみると，28例中21例（75%）が術後に下降しており，術前値と比較し有意差（$p<0.01$）を認めた．また，術前に陽性であった12例中7例（58.3%）が術後には陰性化していた．

11．再発症例における各種腫瘍マーカーの変動

再発が確認された12例において術前，術後約1か月，再発時の3時点における各種腫瘍マーカーの変動をみると，尿中ポリアミンでは再発時に上昇を示す例が12例中7例に認められ，CEAでは9例中6例，SCCでは7例中4例に認められた（**Fig. 7**）．

Table 5 The positive rate of tumor markers and combination assay at the time of recurrence

Urinary polyamine	CEA	SCC	CEA SCC	Urinary Polyamine SCC	Urinary polyamine CEA	Urinary polyamine CEA SCC
58.3% (7/12)	77.8% (7/9)	40.0% (4/10)	63.6% (7/11)	58.3% (7/12)	83.3% (10/12)	83.3% (10/12)

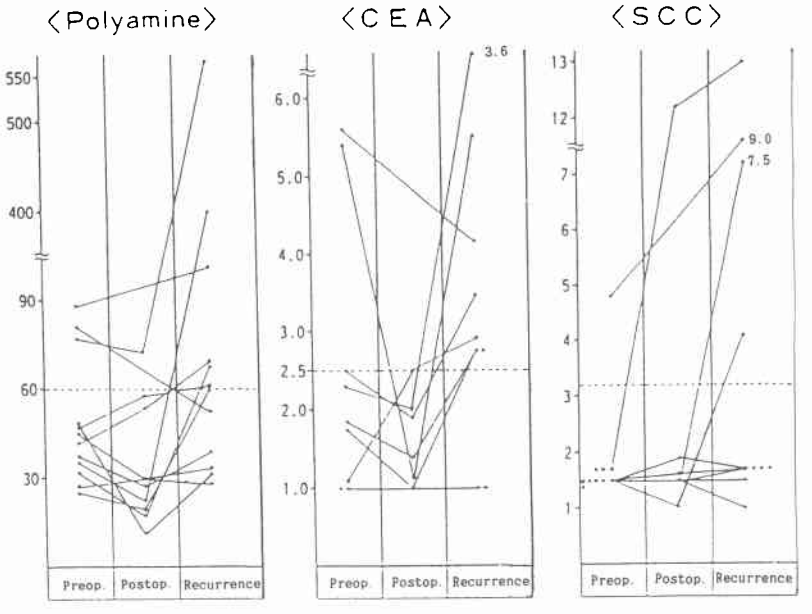
12．再発時の腫瘍マーカーの陽性率とcombination assay

再発時の陽性率は，単独では尿中ポリアミンは58.3%（7/12），CEAが77.8%（7/9），SCCが40.0%（4/10）であり，CEAが最も高値であったが，尿中ポリアミンとのcombination assayにより陽性率は83.3%（10/12）と高値を示した（**Table 5**）．

考　察

Russel[6]が癌患者において尿中ポリアミンが増加することを報告して以来，腫瘍マーカーとしてポリアミンの意義が各臓器において検討されてきた[7)~9)]．しかし，食道癌における尿中ポリアミンの検討は十分になされてなく，いまだ臨床的意義は明らかではない．食道癌は，たとえ小さな癌腫であってもリンパ節転移を認めたり，治癒手術施行例においても術後に早期再発を認めることもあり，いわゆる悪性度の高い癌腫と考えられる．このように転移や再発を起こしやすい癌腫

Fig. 7 The movement of tumor markers in the recurrent cases



は細胞の増殖活性も高いことが示唆される．そこで，蛋白合成や核酸合成の盛んな組織で高濃度なポリアミンとの関係を知るために，簡便な酵素法[10]により尿中ポリアミンを測定し，食道癌における腫瘍マーカーとしての臨床的意義について検討した．

食道癌患者における尿中ポリアミンの陽性率は，従来のCEAやSCCに比べて若干の高値を示した．また，CEAやSCCは尿中ポリアミンとのcombination assayによりその陽性率は著明に増加した．血清Ca値は，ほかの消化器癌と比較し，食道癌において異常高値を示すとする報告[11]がみられるが，今回の著者の検討では陽性率も低く，通常の腫瘍マーカーとして使用する意義は見出せなかった．

組織学的進行度別の尿中ポリアミンの陽性率は，進行癌において高値であり，早期癌における腫瘍マーカーとしては期待できないようである．また，進行癌において陽性率が増加したことより，病理組織学的予後規定因子との関係をみると，組織学的深達度の増大とともに尿中ポリアミン値は増加し，陽性率も増加する結果を得た．n因子に関しては，n（＋）群がn（－）群より尿中ポリアミン値が高値であった報告[7]もみられるが，今回の食道癌による検討ではn3が平均値，陽性率が最も高値（有意差は認めなかったが）を示したという結果を得たにすぎなかった．腫瘍容積と尿中ポリアミン値とは相関する報告[3][7]もみられるが，食道癌では腫瘍長径との間に相関は認められなかった．しかしa因子，n因子の結果より，進行度が増すにつれて，尿中ポリアミン値も増加していくものと考えられ，実験腫瘍などにより経時的な検討も必要と考える．しかし，進行癌においても低値を示す症例があり，腫瘍の増殖曲線との関係が示唆され，対数増殖期において高値を示す可能性が考えられた．このことを明確にするため，著者らは，late G1，S，G2，M期の増殖期にある細胞を認識するモノクローナル抗体としてのKi-67を用いて腫瘍の増殖期細胞の頻度と尿中ポリアミンとの関係を検討してみた．組織中のポリアミン含量は，G1期に増加してS期に最大に達するとされており，Ki-67陽性細胞率と尿中ポリアミン値とは相関することが予想されたが，今回の検討では両者間に相関関係を認めなかった．また，組織型別にみても増殖の盛んな低分化型よりも分化型の癌腫の方が陽性率が高値であった．この結果は，組織中のポリアミンを尿中ポリアミンとして測定する方法にも問題があるものと思われる．Russellら[12][13]は，化学療法や放射線療法などの治療後の腫瘍細胞の壊死により尿中ポリアミン量が増加することを報告している．また，悪性腫瘍以外にも炎症，感染症，熱傷，膠原病などでも高値を示し，ポリアミンには今なお不明な点が多くある．

一方，著者らが，食道癌の悪性度指標の一つとして測定してきた癌細胞核DNA量と尿中ポリアミン値との関係についても検討を加えてみた．その結果，DNA aneuploid症例がdiploid症より尿中ポリアミン陽性率が高値であった．このことは，尿中ポリアミン陽性率が進行癌において高値であったためか，もしくは，aneuploidがdiploidより細胞増殖が激しいことが示唆された．

術後の経過と尿中ポリアミン値を検討すると，術後は癌腫が除去されるために術前より低値となるが，再発が確認された時点ではポリアミン値の上昇が認められた．CEAにおいても同様の傾向を認めたが，SCCにおいてはこの傾向は顕著ではなかった．このように，尿中ポリアミンは，食道癌術後のfollow upにおいて有用なモニタリングマーカーになり得るものと考えられた．また，再発時のcombination assayでは，術前と同様に尿中ポリアミン，CEA，SCCの陽性率が最も高値を示した．

以上，尿中ポリアミンの測定は，食道癌のモニタリングマーカーとして有用と考えられた．しかし，その使用範囲は限られており，今後さらに食道癌に特異性の高いマーカーを開発し，比較的早期の癌腫に対しても使用できるように努力する所存である．

本論文の要旨は，第33回日本消化器外科学会総会（1989年2月）にて発表した．

文　献

1）Gerdes J, Lemke H, Baisch H et al：Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. J Immunol 133：1710—1715, 1984
2）食道疾患研究会編：臨床・病理．食道癌取扱い規約，第7版，金原出版，東京，1989
3）田中眞紀：乳癌における尿中Polyamine測定の臨床的意義．日臨外医会誌　49：1852—1859, 1988
4）南　泰三：Flow cytometryによる食道癌DNA histogramの検討．久留米医会誌　50：339—356, 1987
5）入江　均：食道癌の細胞核DNA量による悪性度と担癌宿主の免疫応答に関する研究．日消外会誌　22：1161—1171, 1989
6）Russell DH：Increased polyamine concentra-

tions in the urine of human cancer patients. Nature N Biol 233：144—145, 1971
7) 角田明良：固型癌における尿中 Polyamine の臨床的検討．日外会誌 88：816—825, 1987
8) 早瀬良二, 米沢 優, 平松祐司ほか：婦人科悪性腫瘍における赤血球．尿中ポリアミン測定の臨床的意義．日産婦会誌 33：107—116, 1981
9) 久保田俊一郎：その他の腫瘍マーカー①ポリアミン．医のあゆみ 137：393—395, 1986
10) Kubota S, Okada M, Imahori K et al: A new simple enzymatic assay method for urinary polymines in humans. Cancer Res 43：2363—2367, 1983
11) Monno S, Nagata A, Furuta S: Hypercalcemia of cancer in the digestive tract. J Clin Gastroenterol 9：78—82, 1987
12) Russell DH, Gullino PM, Marton LJ et al: Polyamine depletion of the MTW9 mammary tumor and subsequent elevation of spermidine in the sera of tumor-bearing rats as a biochemical marker of tumor regression. Cancer Res 34：2378—2381, 1974
13) Russell DH, Looney WB, Kovacs CJ et al: Changes in serum putrescine and spermidine levels following local radiation to hepatoma 3924A of the rat. Cancer Res 36：420—423, 1976

Clinical Value of Urinary Polyamine Levels in Esophageal Cancers

Hiroshi Rikitake, Hideaki Yamana, Hiromasa Fujita, Genzan Shirozu, Taizo Minami and Teruo Kakegawa
First Department of Surgery, Kurume University School of Medicine

Urinary polyamine levels in 55 patients with thoracic esophageal cancer were measured by enzymic assay in order to investigate their usefulness. Moreover, in order to investigate the relationship between proliferative ability (and malignancy) and urinary polyamine levels, the rate of detection of a nuclear antigen in prolifelating cells by the monoclonal antibody Ki-67 and the nuclear DNA content were measured. The rate of positive urinary polyamine levels was 38.9%, slightly higher than that of carcinoembryonic antigen (CEA) or squamous cell carcinoma relted antigen (SCC). The diagnostic rate improved to 54.5%, and to 83.3% at the time of recurrence because of combination assay with CEA and SCC. The positive rate and the mean polyamine level increased in proportion to the depth of the cancer, while a correlation with the rate of cells positive to Ki-67 was not found. Concerning the DNA ploidy pattern, the rate of positive urinary polyamine in cases of DNA aneuploidy was higher than that in cases of DNA diploidy. These results suggested that urinary polyamine levels could become a useful monitoring marker in postoperative follow-up.

Reprint requests: Hiroshi Rikitake First Department of Surgery, Kurume University School of Medicine
67 Asahi-machi, Kurume, 830 JAPAN