

各種肝疾患における Type III Procollagen N-Peptide の臨床的意義

川崎医科大学 消化器内科

(主任: 平野 寛教授)

古 城 研 二

(昭和61年 8月30日受付)

Clinical Significance of Type III Procollagen N-Peptide in Various Liver Diseases

Kenji Kojoh

Division of Gastroenterology, Department of Medicine
Kawasaki Medical School

(Accepted on August 30, 1986)

血中 III 型プロコラーゲン N 末端ペプチド (P III P) を各種肝疾患 221 例について測定した。正常人の P III P 値は 10 ng/ml 以下で、慢性肝炎や肝硬変では有意の増加がみられた。肝癌では 19.0 ± 10.89 ng/ml と従来の報告より低かったが transcatheter arterial embolization (TAE) 後には 1.7 倍に増加した。さらに蛍光抗体法による肝癌組織内の P III P の局在を検討し、TAE 後に増加することを示した。これらの事実は肝癌が強いコラーゲン増生能を示唆すると考えられた。

Serum concentrations of type III procollagen N-peptide (P III P) were examined in 221 cases of various liver diseases. Serum P III P concentration was less than 10 ng/ml in healthy controls and elevated significantly in liver cirrhosis as well as in chronic hepatitis. The mean value of P III P for primary liver cancer was 19.0 ± 10.89 ng/ml, which was relatively lower than has been reported. Serum P III P levels were elevated to as high as 1.7 fold after transcatheter arterial embolization (TAE) in liver cancer. In addition, intracellular localization of P III P by the immunofluorescent method revealed a significant increase in liver cancer after TAE. These data suggest that primary liver cancer has a high rate of collagen synthesis.

Key Words ① Type III procollagen N-peptide ② Fibrosis ③ Liver cancer ④ TAE ⑤ Intracellular localization

はじめに

コラーゲン分子はその生成細胞内でプロコラーゲンとして合成され、プロコラーゲンは細胞外へ分泌されプロコラーゲンペプチダーゼに

より N 末端および C 末端ペプチドが特異的に切断されコラーゲンに変換する。最近、Rohde ら¹⁾によって radioimmunoassay 法による III 型プロコラーゲン N 末端ペプチド (以下、P III P と略す) の測定法が開発され、肝疾患の診断

における臨床的有用性が報告されている。³⁾⁻¹⁵⁾ 今日、コラーゲンにはI型からV型の5種類が知られているが、肝疾患ではI・III・IV・V型コラーゲンの増量がみられると言われており、¹³⁾ このうちIV・V型は血管等の基底膜に分布しており、I・III型コラーゲンが門脈域および肝小葉内に分布している。I型は肝以外の組織にも大量に含まれているため、肝疾患特異性に乏しい。²⁾ これに対し、III型コラーゲンは肝に特異性が高いことが知られている。今回、著者は各種肝疾患における血中P III P値を測定し、肝疾患の病態とP III P値の変動との関係を検討した。また、P III Pの肝組織内局在について蛍光抗体間接法により検索したので、その結果を報告する。

対象および方法

対象は健常者40例、急性肝炎(AH)10例、慢性非活動性肝炎(CIH)55例、慢性活動性肝炎(CAH)27例、肝硬変(LC)61例、原発性肝癌(PLCa)31例、転移性肝癌(MLCa)26例、脂肪肝(FL)11例の計261例である。急性肝炎は臨床経過により、慢性肝炎および脂肪肝は肝生検により、肝硬変は腹腔鏡検査および肝生検で診断し、一部は生化学検査等により診断した。肝癌は血管造影と剖検により確診した。血中P III P値の測定はRohdeら¹⁾の方法に従ってヘキスト社のRIAキットを用いた。P III Pの肝組織内局在は間接蛍光抗体法により検討した。すなわち、剖検あるいは生検により採取した肝組織の一部をホルマリン固定後、パラフィン切片を0.25%トリプシン37°C・60分にて処理し、一次抗体はantibovine P III P rabbit antiserum 100~1000倍希釈液を、二次抗体はFITC labeled swine anti-rabbit IgG抗体を使用した。

結 果

1. 各種肝疾患における血中P III P値

Table 1 に示すように健常者の血中P III P値は 8.01 ± 1.03 ng/ml (M \pm SD)で、10 ng/ml以下を正常値とした。肝疾患では急性肝炎

Table 1. Serum P III P in various liver diseases.

	n	M \pm SD
Controls	40	8.1 \pm 1.03
AH	10	26.8 \pm 9.50***
CIH	55	12.8 \pm 5.05**
CAH	27	18.3 \pm 7.78***
LC	61	17.9 \pm 8.09***
PL Ca	31	19.0 \pm 10.89***
ML Ca	26	23.8 \pm 12.10***
FL	11	15.2 \pm 9.54*

***: P<0.001 **: P<0.01 *: P<0.05

で 26.8 ± 9.50 ng/mlと有意に高値を示した。慢性肝炎のうち慢性非活動性肝炎では 12.5 ± 5.05 ng/mlに対し、慢性活動性肝炎では 18.3 ± 7.78 ng/mlと、慢性非活動性肝炎よりやや高値であった。一方、肝硬変61例の平均は 17.9 ± 8.09 ng/mlで、慢性活動性肝炎とほとんど差がみられなかった。肝癌では原発性肝癌31例の平均値は 19.0 ± 10.89 ng/mlと肝硬変よりやや高値であったが、両者の間に有意差はみられなかった。また、転移性肝癌26例においては平均 23.8 ± 12.10 ng/mlと原発性肝癌よりやや高値を示した。脂肪肝11例では平均 15.2 ± 9.54 ng/mlとわずかながら正常値よりも高値を示した。Figure 1はこれらのP III P値の分布を示したものである。P III P値が40 ng/ml以上の高値を示したのは急性肝炎、肝硬変および肝癌の一部に過ぎなかった。

2. P III P値と他の肝機能検査値との相関

慢性肝炎82例および肝硬変61例の計143例について血中P III P値と他の肝機能検査値

Table 2. Correlation between serum P III P and other liver function tests.

	n	r	p
G P T	148	0.21	<0.05
G O T	148	0.27	<0.001
ChE	148	-0.22	<0.01
Albumin	148	-0.25	<0.01
γ -globulin	63	0.17	n. s.
I C G	27	0.07	n. s.

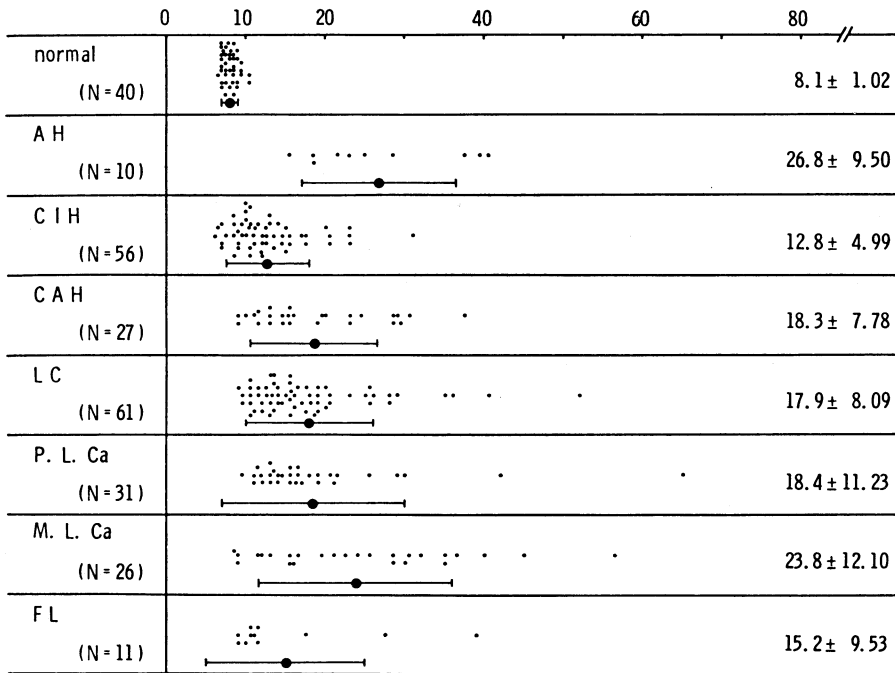


Fig. 1. Distribution of P III P of various liver diseases.

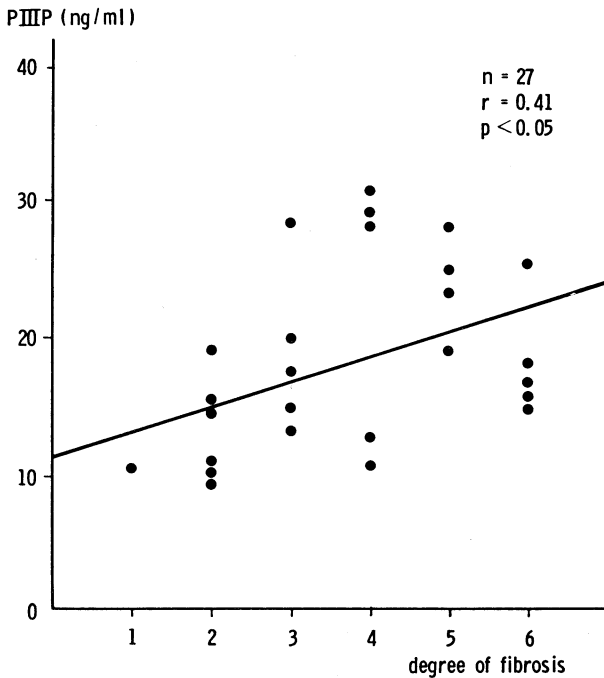


Fig. 2. Correlation between serum P III P and degree of liver fibrosis.

との相関を検討した (Table 2).

P III P は GOT および GPT と有意に正の相関を示し, cholinesterase, albumin とは負の相関を示した. しかしながら, γ -globulin および ICG とは有意の相関はみられなかった.

3. 肝線維化と血中 P III P 値

慢性肝炎および肝硬変 27 例の肝組織像でみられた肝の線維化の程度と血中 P III P 値との相関を検討した. 線維化の程度を grade 1~6 に分けた. grade 1 は門脈域に線維化の認められないもの, grade 2 は門脈域に軽度の線維化を示すもの, grade 3 は門脈域の中等度の線維化が認められるもの, grade 4 はさらに隣接門脈の線維結合 (P-P 結合) の存在のみられるもの, grade 5 はさらに門脈-中心静脈間に線維性結合 (P-C 結合) が存在するもの, grade 6 は再生結節が認められるものとした. Figure 2 に示すよう

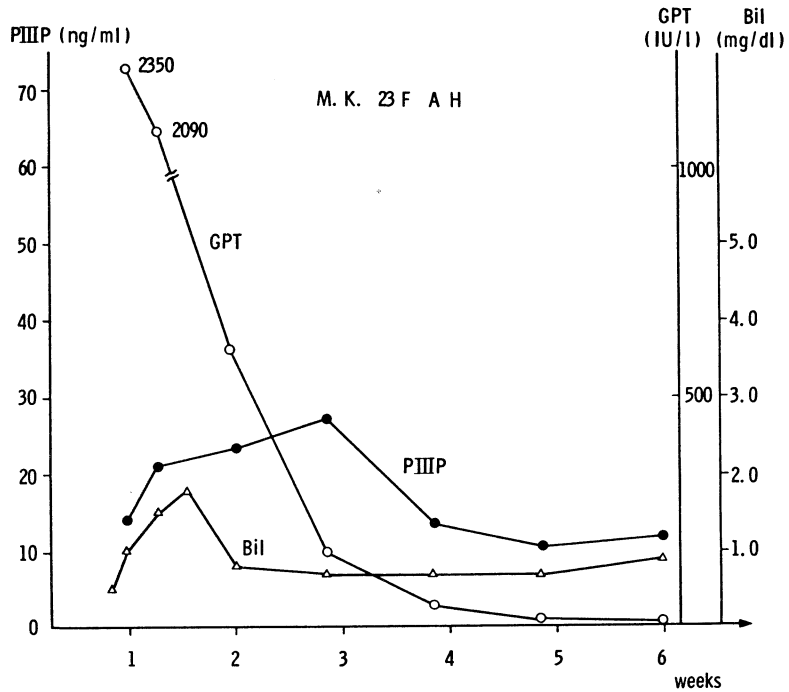


Fig. 3. Serial changes of serum P III P in acute hepatitis.

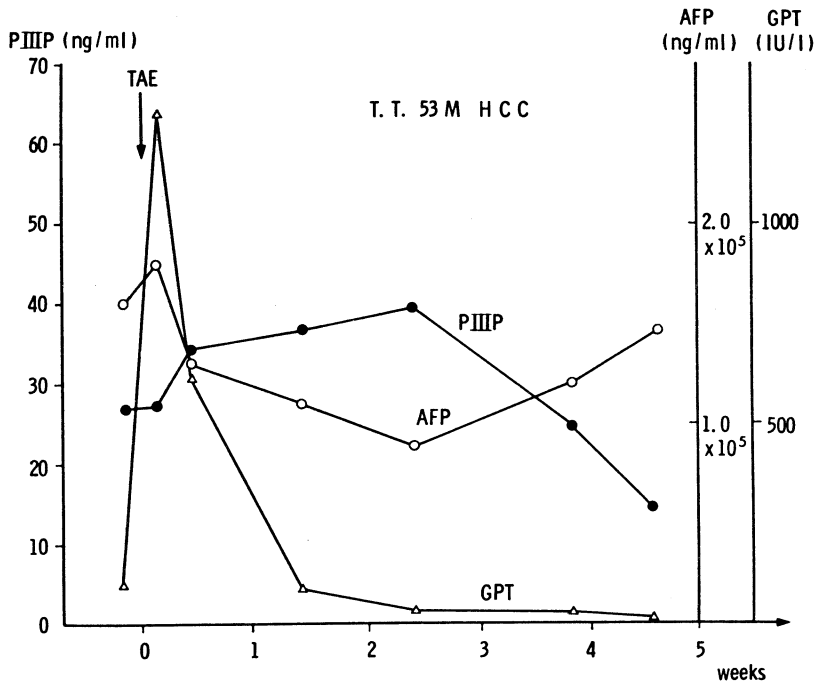


Fig. 4. Serial changes of serum P III P after TAE in liver cancer.

に、P III P 値は肝線維化の程度と比例して高値を示す傾向があり、 $r=0.41$ ($p<0.05$) の有意の相関を示した。

4. 各種肝疾患における血中 P III P 値の経時的変動

Figure 3 は 23 歳女性の急性 A 型肝炎の経過における P III P 値の経時的変動を示したものである。P III P 値は発病極期には比較的低値にとどまっていたが、3 週後にはピークに達し、その後漸減する経過をたどった。transaminase のピークとはほぼ 2 週のずれがみられた。図には示していないが、慢性肝炎や肝硬変においてはほとんど変動がみられなかった。Figure 4 は 53 歳男性の原発性肝癌における経カテーテル肝動脈塞栓療法 transcatheter arterial embolization (TAE) 後の P III P 値の変動を示したものである。TAE 直後には GPT の急激な上昇がみられ、2 週後には正常値にかえった。また、AFP 値も TAE 後漸減した。これに対し、P III P 値は TAE 翌日にはほとんど変化を示さず、3 日目より徐々に増加し始め、2 週後にピークに達し以後減少した。上記 2 例

に示したように、急性肝炎および肝癌 TAE 後はいずれも transaminase のピークから約 2 週間遅れて P III P の高値がみられた。

5. TAE 後における血中 P III P 値の経時的変動

TAE 施行例 10 例について TAE 後 P III P 値を経時的に測定した (Fig. 5)。TAE 前値の平均は 19.5 ± 5.9 ng/ml であった。TAE 翌日は 18.7 ± 6.0 ng/ml と変動はなかったが、TAE 3 日目 23.8 ± 9.1 ng/ml と増加がみられ、1 週後には 28.8 ± 9.0 ng/ml、さらに 2 週後には 33.6 ± 9.6 ng/ml となり、前値の約 1.7 倍と有意の ($p<0.01$) 増加を示した。その後、P III P 値はゆるやかに低下を示した。これらのうち、2 週を過ぎても P III P 値が低下せず、4 週目以降も低下のみられなかった 2 例は肝不全にて死亡した。他の 8 例は経時的に低下してはほぼ前値に復する経過をたどり、肝機能も安定化がみられた。

6. P III P の肝組織内局在

P III P の肝組織内局在を免疫組織化学的に

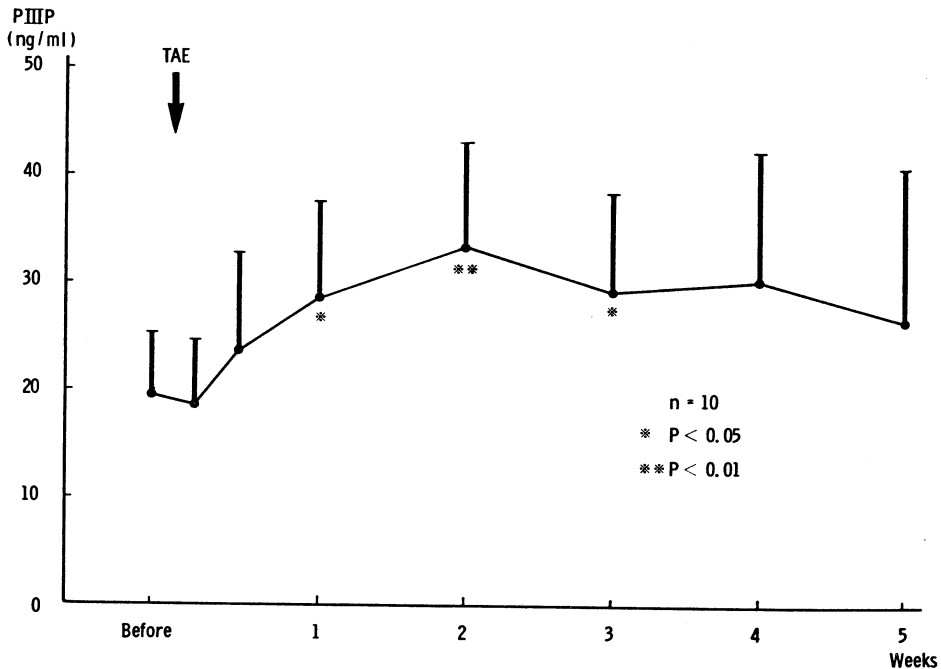


Fig. 5. Serial changes of serum P III P after TAE in ten cases of liver cancer.

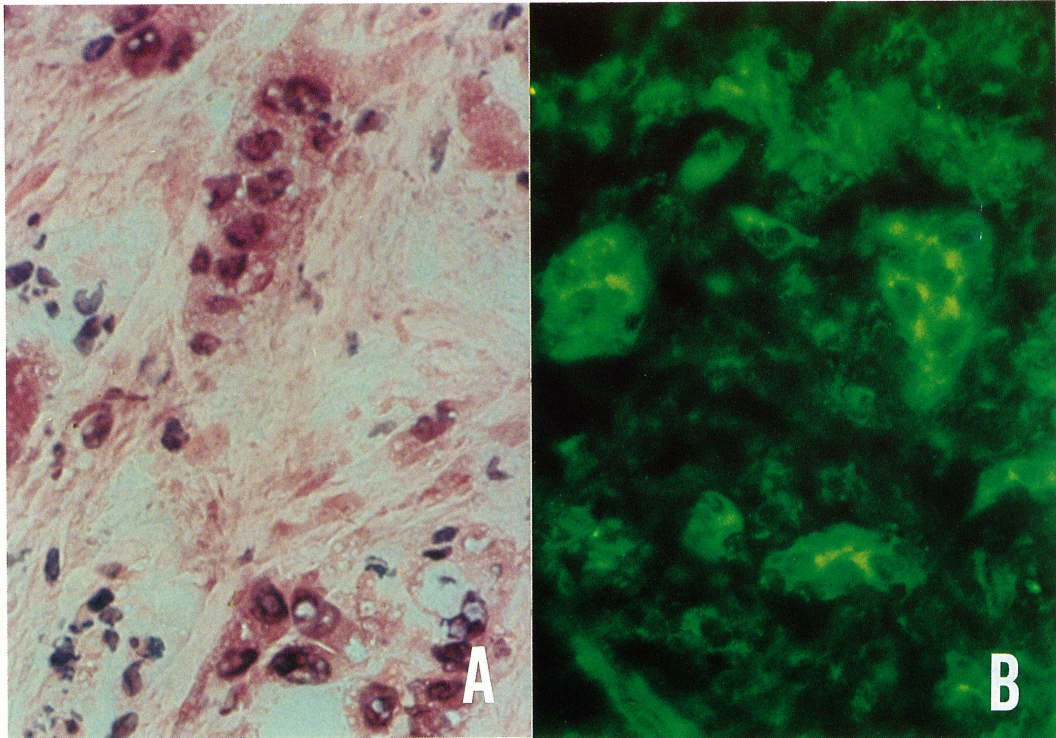


Fig. 6. Intracellular localization of P III P in liver cancer.
A. HE stain, $\times 400$ B. indirect immunofluorescence, $\times 400$

蛍光抗体間接法にて検討した。Figure 6にTAE後3週目に死亡した原発性肝癌例の剖検肝組織のH-E像(Fig. 6A)と蛍光抗体間接法によるP III P染色所見(Fig. 6B)を示す。TAEにより完全に壊死に陥った部分ではP III Pは染色されなかったが、残存肝癌細胞の胞体は強く染色された。一方、非癌部においては、グリソン鞘の周辺の線維化の部分にも蛍光がみられたが、肝細胞自体は陰性であった。

考 察

コラーゲン生成細胞で合成されたプロコラーゲンは、細胞外に分泌されたのちにN末端およびC末端がプロコラーゲンペプチダーゼにより切断されてコラーゲン分子に変換される。この際、プロコラーゲンNペプチダーゼによりはずされるN末端ペプチド(P III P)は循環血中に移行すると考えられている。したがって、血中のP III P値を測定することにより、III型コラ

ーゲン生成の状態を知ることができる。Rohdeら¹⁾によりradioimmunoassay法が開発されて以来、血中のP III Pの濃度を簡単に測定できるようになり、各種肝疾患における血中P III P値測定の臨床的意義について幾つかの検討がなされてきた。^{3)~15)}

健常者の血中P III P値は、著者の検討結果では平均 8.1 ± 1.03 ng/mlで、他の報告も6.6~9.9 ng/mlである^{4)~6)}ことから、おおむね10 ng/ml以下であると考えられる。肝疾患においては急性肝炎>転移性肝癌>原発性肝癌>慢性活動性肝炎>肝硬変>脂肪肝>慢性非活動性肝炎の順に高値を示した。これらのうち、原発性肝癌については、著者の31例の平均値は 19.0 ± 10.89 ng/mlであったが、五十嵐ら¹⁰⁾は肝硬変で30 ng/ml以上に上昇した時には肝癌発生を示唆するとし、また、川上ら⁶⁾は原発性肝癌では平均 40.4 ± 43.1 ng/mlと高値であることを報告しており、これらの成績からP III Pを

肝癌の腫瘍マーカーとする考え方も提唱されている。^{6),10)-12)} 著者の原発性および転移性を含めた肝癌例では 40 ng/ml を越える症例は 57 例中 4 例 (7%) に過ぎず、他の報告^{6),10)-12)} に比較して低値であった。この理由については不明であるが、ひとつは肝癌の時期の差によるものかも知れない。しかも、肝硬変と原発性肝癌の血中 P III P 値の分布についても、一部の極端な高値例を除けば比較的重なり合っており、^{11),12)} P III P 値のみでは肝硬変と肝癌の鑑別は必ずしも容易でないと思われる。

P III P 値と他の肝機能検査値との相関では、GOT, cholinesterase, albumin と比較的良い相関を示した。丸山ら⁴⁾ も albumin とは相関があると報告しており、中島ら¹²⁾ はコリールグリンと相関があったとしている。一方、ICG や γ -globulin に関しては著者は有意の相関を認めなかった。このように P III P 値と他の肝機能検査との相関については個々の肝機能検査により異なっており、P III P の上昇機序は必ずしも単純なものではないことが窺われた。しかしながら、肝線維化の程度と P III P 値との関連についての幾つかの報告^{9),4),6)} ではいずれもおおむね良好な相関がみられている。この点はわれわれの成績でも同様で、肝線維化の程度と血中 P III P 値の間にはある程度の相関が認められる。

次に各種肝疾患における経時的変動を検討した結果、急性肝炎では transaminase の極期より約 2 週遅れて P III P 値はピークを示し、以後改善に従って徐々に下降する経過を示した。この点は中島ら¹²⁾ も報告しており、肝細胞壊死後の組織修復と関連することが示唆された。

今回、著者は特に肝癌の TAE 例について術後の P III P 値の変動を詳細に検討したが、急性肝炎と同じように TAE 直後の組織破壊に伴うと思われる transaminase の極期より 2 ないし 3 週後に P III P 値はピークに達し、以後に漸減した。浮田ら¹⁴⁾ は TAE を施行した 10 例について TAE 後 1~5 日の間 P III P 値の低下を認めて、その後上昇し 7~12 日目に前値に

復し、その後は上昇を続けたと報告している。著者は TAE 施行の前日と施行後 1・3・7 日目、その後は 1 週ごとに 5 週目まで詳細に血中 P III P 値の変動を検討した。その結果、TAE 後 1 日目にやや低下し、3 日目から 2 週間にかけては漸増し、2 週目にピークを示した後徐々に前値に復する経過をとった。すでにわれわれ¹⁶⁾ は TAE 施行後の肝癌組織の経時的变化を検討し、TAE 後 1 日目以内では肝癌細胞は壊死を示し、結合織の増加は認めなかったが、TAE 後 10 日以降の例で種々の程度の線維化が認められ、幼若な結合織の増加が生じることを組織学的に確認して報告した。このような病理学的所見と TAE 後の P III P 値の変動とを併せて考察すれば、TAE 後 3 日目を以降に P III P 値が増加するという変化は TAE による肝癌組織の壊死の組織修復機転としての結合織の増加を反映しているものと考えられる。

上述の血中 P III P 値の測定は肝細胞障害および肝線維化の診断にある程度有用と思われるが、丸山ら¹⁵⁾ の指摘したように幾つかの問題点がある。そのひとつは線維合成が盛んな時は P III P 値が増加するが線維化が完成した時点では必ずしも上昇はみられず、したがって、血中 P III P の増加は蓄積された線維の量を反映するのではなく、肝硬変における線維形成の程度を診断する上では不適當と考えられることである。また、アルコール性肝疾患患者で禁酒後に P III P 値の上昇がみられるという事実は、禁酒により活性化されたコラーゲン分解酵素により P III P が分解され血中に逸脱してきたものであると推測されている。すなわち、P III P の上昇がコラーゲン合成の程度のみならず分解の程度にも影響される場合のあることが考慮される必要がある。さらに腎からの排泄障害も関連する可能性がある。このように、P III P 値の変動にはいろいろな要因が関係していることが考えられるが、今回著者の得た TAE 後の血中 P III P 値の経時的変動は比較的特異な変化と考えられ、TAE 後の壊死修復過程での線維化さらに TAE 後の予後判定の指標として興味ある所見であり、今後十分検討される価値があ

ると考えられる。

次に、肝組織内の P III P の局在について免疫組織化学的に検討した結果、肝癌細胞内に強い染色陽性細胞を多数認めた。しかしながら、周辺の硬変肝実質細胞の胞体は陰性であった。P III P の肝組織内局在については船木ら¹⁷⁾、近藤ら¹⁸⁾ および 榊原¹⁹⁾ により試みられているが、肝癌組織においては健常部より染色性に乏しいという報告¹⁸⁾ と肝癌および肝硬変においていずれも染色陽性であったという報告¹⁷⁾ があり、一定していない。榊原は肝硬変肝 19例について検討した結果、正常肝の細胞成分は陰性であり、肝硬変では肝細胞、類洞細胞および偽小葉間の線維性隔壁が染色され、肝癌では癌細胞の胞体が強く染色されたと報告している。今回、著者は TAE 後の残存肝癌細胞に強い染色性を示すことを免疫組織化学的に証明し得たが、このことは残存肝癌細胞が III 型コラーゲン産生能を持っていることを示唆する所見と考えられ、血中の P III P 値が TAE 後 2~3 週後に上昇がみられることを支持する根拠を与えるものであるかもしれない。今後さらに TAE 後の種々の時期における肝組織内の P III P の局在ならびに形態との関連を解明し、TAE 後の血中 P III P 値の変動の意義についてさらに検討する予定である。

結 論

各種肝疾患 221 例につき血中 P III P 値の測定を行い、また肝癌の TAE 前後における血中 P III P 値の変動を検討するとともに肝癌組織内の P III P の局在につき免疫組織化学的検討を行い、次の結果を得た。

1. 血中 P III P 値は健常者では 10 ng/ml 以下で肝疾患では急性肝炎>肝癌>慢性活動性肝炎>肝硬変>慢性非活動性肝炎の順に高値であった。
2. 従来、肝癌では血中 P III P 値が高値を示すと言われているが、40 ng/ml 以上は 57 例中 4 例に過ぎなかった。
3. TAE 後血中 P III P 値は 2 週目にピークに達し前値の約 1.7 倍となり、その後徐々に低下した。
4. 血中 P III P 値の増加は肝細胞障害後の修復機転と関連があると思われた。
5. 肝癌組織においては P III P が癌細胞の胞体に強く染色された。

本論文の要旨は第43回日本消化器病学会中国四国地方会（昭和60年6月8日、広島）および第20回日本肝臓学会西部会（昭和60年11月21日、大阪）にて発表した。御校閲頂いた平野寛教授および本研究に直接ご指導頂いた山本晋一郎助教授に深謝する。

文 献

- 1) Rohde, H., Vergus, L., Hahn, E., Kalbfleisch, H., Bruguera, M. and Timpl, R.: Radioimmunoassay for type III procollagen peptide and its application to human liver diseases. *Eur. J. clin. Invest.* 9: 451-459, 1979
- 2) Taubman, M. B., Kammerman, S. and Goldberg, B.: Radioimmunoassay of procollagen in serum of patients with Paget's disease of bone. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 152: 284-287, 1976
- 3) 中野 博, 河崎恒久, 宮村正美, 福田善弘, 井村裕夫: N末端III型プロコラーゲンペプチドの血中値の年齢別変動と肝線維化との対比. *肝臓* 24: 1230-1233, 1984
- 4) 丸山勝也, 岡崎 勲, 小林利次, 奥野府夫, 亀谷麒与隆, 高木 敏, 織田正也, 石井裕正, 土屋雅春: 血清 type III procollagen aminopeptide の測定による肝線維化診断の試み. *肝臓* 25: 24-31, 1984
- 5) 五十嵐省吾, 旗原照昌, 船木直也: 慢性肝疾患とくに慢性肝炎と肝硬変症における type III procollagen N-peptide の測定の意義. *肝臓* 25: 731-735, 1984
- 6) 川上広育, 中西敏夫, 末盛彰一, 渡辺恭行, 松浦寿二郎, 吉川正哉, 川本広夫, 池本吉博, 竹崎英一, 佐々木正博, 折免滋雄, 相光 汐美: 各種肝疾患における血清 type III procollagen peptide (PC-III NP) の臨床的検討とくに原発性胆汁性肝硬変及び肝細胞癌を中心として一. *肝臓* 26: 33-40, 1985

- 7) Niemelä, O., Risteli, L., Sotawemi, E. A. and Risteli, J.: Aminoterminal propeptide of type III procollagen in serum in alcoholic liver disease. *Gastroenterology* 85: 254—259, 1983
- 8) Colombo, M., Annoni, G., Donato, M. F., Conte, D., Martines, D., Zaramella, M. G., Bianchi, P. A., Piperno, A. and Tibibelli, C.: Serum type III procollagen peptide in alcoholic liver disease and idiopathic hemochromatosis: its relationship to hepatic fibrosis, activity of the disease and iron overload. *Hepatology* 5: 475—479, 1985
- 9) Trivedi, P., Cheezeman, P., Portmann, B., Hegarty, J. and Howat, A. P.: Variation in serum type III procollagen peptide with age in healthy subjects and its comparative value in the assessment of disease activity in children and adults with chronic active hepatitis. *Eur. J. clin. Invest.* 15: 69—74, 1985
- 10) 五十嵐省吾, 旗原照昌, 船木直也: 各種肝疾患患者血清中の type III procollagen N-peptide の動態, とくに肝癌患者における測定の意義. *肝臓* 24: 975—980, 1983
- 11) 山内真義, 中山 一, 福沢圭子, 中島尚登, 高原 仁, 中原正雄, 川瀬治通, 渡部幸夫, 木村和夫, 北原敏久, 小倉和雄, 藤沢 洌, 亀田治男: 肝癌における血清 type III procollagen peptide の臨床的意義. *癌の臨* 30: 785—790, 1984
- 12) 中島公雄, 金山正明: 各種肝疾患患者における血中 procollagen-type III-peptide 値. *肝胆膵* 10: 319—324, 1985
- 13) 山田貞子, 周防武昭, 平山千里: 肝疾患における血清プロコラーゲン III ペプチドとヒプロプロテイン. *生物物理化学* 28: 29, 1984
- 14) 浮田 実, 伊藤俊雄, 白井裕子, 服部修三, 北代正大, 水谷繁樹, 喜田恵治, 田中良治, 糸島達也, 長島秀夫: 肝細胞癌における血清プロコラーゲン type III N 末ペプチドと TAE 療法後の変動. *肝臓 (抄)* 26: 1256, 1985
- 15) 丸山勝也, 永井 忠, 笹生光男, 永田茂之, 重田洋介, 岡崎 勲: 血清タイプ III プロコラーゲンアミノペプチドの測定法とその臨床的意義. *メヂヤサークル* 30: 555—570, 1985
- 16) 山本晋一郎, 福嶋啓祐, 日野一成, 大海庸世, 大元謙治, 古城研二, 平野 寛: 原発性肝癌の肝動脈塞栓術による組織学的変化について. *肝臓* 25: 235—240, 1984
- 17) 船木直也, 旗原照昌, 五十嵐省吾, 榑原耕子: 肝細胞癌における type III コラーゲンの産生—PAP 法を用いた免疫細胞化学的証明—*肝臓 (抄)* 26 (Suppl.): 62, 1985
- 18) 近藤英明, 小出典男, 小野良策, 小川 晃, 荒木康之, 田辺高由, 治徳通博, 長島秀夫: モノクローナル抗体を用いた III 型プロコラーゲン N 末ペプチドの組織分布と抗原特異性の検討. *日消誌* 82: 2464, 1985
- 19) 榑原耕子: 肝線維化と肝細胞. 第一回肝疾患治療研究会抄録, 第一製薬編, 東京, ライフサイエンス社. 1985, pp. 11—18