

## 卵巣癌における血清マンガン, スーパーオキシドジスムターゼ (Mn-SOD) 測定の臨床的意義

旭川医科大学産婦人科  
石川 睦男 林 博章 齊藤 聡史 清水 哲也  
国立札幌病院産婦人科  
山下 幸紀 齊藤 康子 兼元 敏隆  
札幌厚生病院産婦人科  
土門 洋哉  
斗南病院産婦人科  
神谷 博文  
東京大学医学部第1内科  
遠藤 康夫  
大阪大学医学部生化学  
谷口 直之

### Clinical Significance of Manganese Superoxide Dismutase in Ovarian Carcinoma

Mutsuo ISHIKAWA, Hiroaki HAYASHI, Satoshi SAITOH  
and Tetsuya SHIMIZU

*Department of Obstetrics and Gynecology, Asahikawa Medical College, Asahikawa*

Kohki YAMASHITA, Yasuko SAITOH  
and Toshitaka KANEMOTO

*Department of Obstetrics and Gynecology, National Sapporo Hospital, Sapporo*

Hiroka DOMON

*Department of Obstetrics and Gynecology, Sapporo Kohsei Hospital, Sapporo*

Hirofumi KAMIYA

*Department of Obstetrics and Gynecology, Tonan Hospital, Sapporo*

Yasuo ENDOH

*First Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, University of Tokyo, Tokyo*

Naoyuki TANIGUCHI

*Department of Biochemistry, Osaka University Medical School, Osaka*

**概要** 活性酸素の scavenger である superoxide dismutase (SOD) や活性酸素自体と悪性腫瘍との関連が注目を集めているが, その詳細は不明であった。今回, Manganese SOD (Mn-SOD) のモノクローン抗体を作成し, ELISA 法による血清値の測定を行い, 卵巣癌診断における腫瘍マーカーとしての有用性を検討した。健常婦人の Mn-SOD の平均値は  $88.8 \pm 20.8 \text{ ng/ml}$  であるため, cut off 値  $\text{mean} + 2\text{SD}$  の  $130 \text{ ng/ml}$  を用いた。健常婦人 207 例においては, 0.9% の陽性率であった。各種疾患における Mn-SOD を測定したところ, 婦人科悪性腫瘍において子宮頸癌 22.5% (9/40), 子宮体癌 20.0% (8/40) の陽性率を示した。一方, 良性の婦人科疾患においては, 子宮筋腫 10.6% (5/47) であった。子宮内膜症は 11.9% (7/62) であり, 同時測定の子宮内膜症の CA-125 の陽性率 ( $> 35 \text{ U/ml}$ ) は 48.3% (22/45) であった。

卵巣癌全体の Mn-SOD の陽性率は59.7% (37/62) であり、一方、良性卵巣腫瘍は17.9% (7/39) であつた。さらに、Mn-SOD 値は卵巣癌臨床進行期に並行し、病態とも一致していた。以上、Mn-SOD の卵巣癌、特に上皮性悪性卵巣腫瘍の腫瘍マーカーとしての意義を明らかにした。

**Synopsis** A monoclonal antibody to manganese superoxide dismutase (Mn-SOD) was measured in patients with epithelial ovarian carcinomas. An enzyme-linked immunosorbent assay has been developed to detect serum Mn-SOD. With this assay, only 0.9% of the 207 healthy females tested had more than 130ng per milliliter of serum Mn-SOD. In contrast, 37 of 62 patients (59.7%) with epithelial ovarian carcinomas showed high levels of Mn-SOD. The serum Mn-SOD increased according to the clinical stage and declined to reflect the effects of therapy. Compared with CA-125, Mn-SOD showed a less frequent false positive rate (10%) in benign gynecological diseases. The determination of Mn-SOD levels proved to be a clinically useful marker for monitoring the response to treatment and to early detection of the recurrence of epithelial ovarian carcinomas.

**Key words:** Manganese superoxide dismutase (Mn-SOD) • ELISA • Tumor marker • Ovarian carcinoma

## 緒 言

フリーラジカルや活性酸素が癌化および老化に密接な関連性があると従来から考えられてきたが、その分子機構はまだ不明確である。フリーラジカルは不対電子をもつ分子や原子で、一般に不安定で反応性に富んでいる。一方、活性酸素は基底状態にある酸素分子( $^3\text{O}_2$ )以外の活性に富む酸素類の総称で、その主なものはスーパーオキシド( $\text{O}_2^-$ )、ヒドロキシルラジカル(OH)などである。この活性酸素および付随して生成される脂質過酸化物などによる細胞障害、更に DNA 障害による 8-ヒドロキシグアニンの生成などが発癌過程に関与していると報告されてきている。更に、活性酸素が癌化の機構にプロモーター作用を有しているという考え方もある<sup>5)6)</sup>。この活性酸素の消去系のうち、 $\text{O}_2^-$ を消去するものがスーパーオキシドジスムターゼ (superoxide dismutase; SOD) で哺乳類では 3 種類知られており、Cu, Zn-SOD は細胞質に、Manganese SOD (Mn-SOD) はミトコンドリアに、extracellular SOD は細胞外に存在している<sup>8)11)13)17)</sup>。我々は、ヒト Mn-SOD の大量精製法を確立し、結晶化に成功した<sup>9)</sup>。これを用いてモノクローン抗体を作成したところそのエピトープは、末端近傍のペプチドに存在した。このモノクローン抗体を用いた ELISA 法<sup>10)</sup>や免疫組織化学により、卵巣癌に Mn-SOD の発現の著しいことを初めて報告した<sup>17)</sup>。この Mn-SOD 蛋白は血清に出現し、卵巣癌の特異的なマーカーとなることが考えられる。本研究では、卵巣癌における Mn-SOD の発現に関し、ELISA 法によつて本酵

素の血清レベルを卵巣癌ならびに各種婦人科疾患において測定し、その臨床的意義につき検討した。

## 対象ならびに方法

### 1. 対象

健常対象群は男性195名、女性207名、計402名である。今回対象とした卵巣癌以外の各種婦人科疾患の内訳は下記のごとくである。良性卵巣腫瘍39例、子宮筋腫47例、子宮内膜症62例、子宮頸癌40例、子宮体癌40例である。悪性卵巣腫瘍は、上皮性の卵巣癌62例、非上皮性悪性卵巣腫瘍 6 例と、5例の low malignant potential である。各種疾患の検体は、手術前 1 週間以内に採血し、血清に分離後 $-30^\circ\text{C}$ に保存し使用した。

### 2. 方法

Mn-SOD の測定には、ヒト肝臓の Mn-SOD 蛋白に対するモノクローン抗体による ELISA を原理とする Mn-SOD 測定キット (宇部興産社製) を用いた。この ELISA 法の測定感度は2~200ng/ml であり、特異性は高く、ほかの蛋白には交叉性を示さず、Cu, Zn-SOD にもほとんど交叉性を示さなかつた。再現性に関しては、対照血清について 6 回行い、その C.V. は 3% であつた。

## 成 績

### 1. 健常人の Mn-SOD 値

健常者の男性194名、女性207名の年齢別の Mn-SOD 値を表 1 に示す。男性全体の平均値100 ng/ml (mean $\pm$ 2SD, 50~149ng/ml)、女性全体は89ng/ml (mean $\pm$ 2SD, 47~130ng/ml) であつた。したがつて、女性の正常上限値を130ng/ml とした。

表1 Mn-SOD mean values in controls by age and sex

Age	Sex	No.	Mn-SOD Values (ng/ml)	
			Mean	Mean ± 2SD
~19	M	40	91	55~127
	F	40	86	53~118
20~29	M	40	103	62~143
	F	40	83	48~118
30~39	M	40	102	54~151
	F	22	82	43~121
40~49	M	40	107	54~160
	F	40	98	56~140
50~59	M	29	96	36~155
	F	40	97	53~142
60~69	M	2	57	—
	F	8	81	55~106
70~79	M	3	88	—
	F	17	82	30~133
male		194	100	50~149
female		207	89	47~130
total		401	94	47~141

表2 Positive rate of serum Mn-SOD in gynecologic diseases

	Mn-SOD (>130ng/ml)
Benign ovarian tumor	7/39 (17.9%)
Uterine myoma	5/47 (10.6%)
Endometriosis	8/62 (12.9%)
Endometriosis	1/19 (5.3%)
Endometriosis+myoma	2/6 (33.3%)
adenomyosis	3/21 (14.3%)
adenomyosis+myoma	2/16 (12.5%)
Uterine cervical ca.	9/40 (22.5%)
Endometrial ca.	8/40 (20.0%)

## 2. 各種婦人科疾患における Mn-SOD 値(表2)

骨盤内良性腫瘍の子宮筋腫は47例中5例(10.6%)、良性の卵巣腫瘍は39例中7例(17.9%)であった。CA-125の陽性率の高い子宮内膜症に関しては、62例中8例(12.9%)の陽性率であった。その内訳は、外性子宮内膜症のみでは、19例中1例しか陽性が認められなかったが、子宮筋腫合併では、6例中2例、腺筋症のみでは21例中3例、腺筋症と筋腫の合併では16例中2例が陽性であった。この際に同時測定可能であった子宮内膜症の

表3 Positive rate of serum Mn-SOD in ovarian malignancies

	Mn-SOD (>130ng/ml)
Epithelial carcinoma	
: total	37/62 (59.7%)
: preoperative	25/41 (61.0%)
Low malignant potential	0/5 (0%)
Non-epithelial carcinoma	0/6 (0%)

表4 Positive rate of serum Mn-SOD in ovarian carcinoma with histology

	Mn-SOD (>130ng/ml)
serous ca.	20/31 (64.5%)
mucinous ca.	2/9 (22.2%)
endometrioid ca.	8/11 (72.7%)
clear cell ca.	6/10 (60.0%)
others	1/1 (100.0%)
total	37/62 (59.7%)

CA-125の陽性率は45例中22例(48.9%)であった。一方、Mn-SODの婦人科悪性腫瘍の陽性率をみると、子宮頸癌40例中9例(22.5%)、子宮体癌40例中8例(20.0%)であった。

## 3. 悪性卵巣腫瘍における Mn-SOD の意義

悪性卵巣腫瘍の Mn-SOD 値が130ng/ml以上の陽性率をみると、非上皮性悪性卵巣腫瘍、low malignant potentialは、各々6例、5例中1例の陽性も認めなかった。一方、上皮性の卵巣癌においては、62例中37例(59.7%)を示した(表3)。その中で、手術前値のみを集計すると、41例中25例(61.0%)の陽性率であった。さらに、卵巣癌の組織型別分類でみると漿液性嚢胞腺癌の症例数が多く、31例中20例(64.5%)の陽性率であった。その他、類内膜癌及び類中腎癌が各々11例中8例(72.7%)、10例中6例(60.0%)の陽性率であった。しかし、ムチン性嚢胞腺癌の陽性率は9例中2例と低かった(表4)。図1に、漿液性嚢胞腺癌、FIGOの臨床進行期IIBの症例を代表例として示す。cytoreduction surgeryとchemotherapyにより、CA-125値に並行してMn-SOD値が減少した。Second look operationにおいては、明らかな腫瘍の残存は確認されなかった。治療開始後、2年

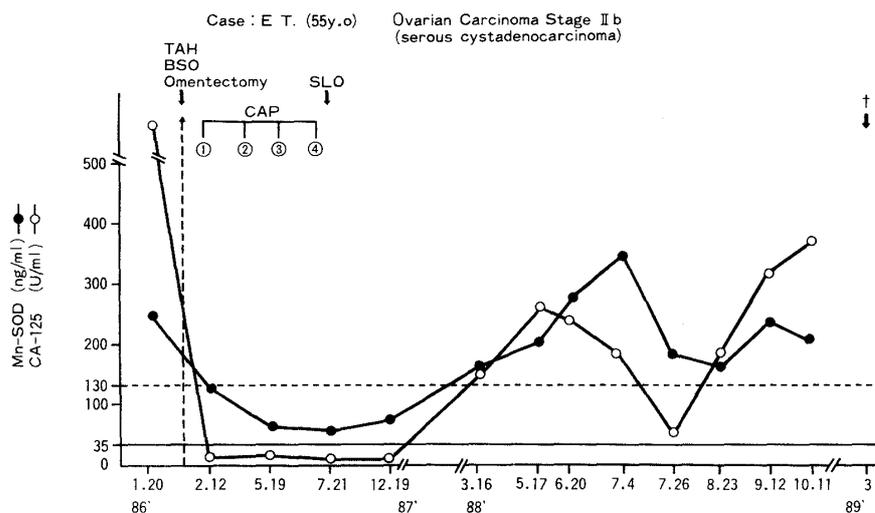


図 1

表5 Correlation between Mn-SOD and CA-125 in ovarian carcinoma

	Mn-SOD>130ng/ml	Mn-SOD<130ng/ml
CA-125>35U/ml	31	13
CA-125<35U/ml	6	12

2カ月でCA-125, Mn-SODの再上昇が認められ、この際のCTで骨盤内に小さな腫瘍の再発と腹水の貯留を認めた。この症例は、治療開始後3年2カ月で死亡しているが、CA-125と極めて近似した推移をMn-SODは示した。次に、卵巣癌において、腫瘍マーカーとして卵巣癌で最も利用されているCA-125との比較を試みた。Mn-SODのcut off値を130ng/ml, CA-125のcut off値を35U/mlとすると、両測定法とも陽性例が62例中31例、両測定法とも陰性例が12例あった。しかし、Mn-SODがcut off値以下で、CA-125が陽性の例が13例あった。逆に、CA-125が陰性でMn-SODが陽性の例が6例あった。このような症例において、CA-125に代り、Mn-SODはマーカーになりうると思われる(表5)。図2に上皮卵巣癌の術前値のみを臨床進行期で示す。漿液性嚢胞腺癌は症例数は多いが、早期進行期癌は少なく、またムチン性嚢胞腺癌も、早期進行期に陽性率は高くない。一方、類内膜癌のI期は3例中2例(67.0%)の陽性率を示し、類中腎癌のI期も5例中2例(40.0%)の陽性率

を示した。Mn-SODはこれらの組織型に陽性率が高いのが特徴と思われるが、さらに症例数を増やして検討したい。

### 考 案

一般にSOD活性が幼若組織より加齢組織に減少するとされている。Markuland et al.は、31種の異なるヒトのdiploidならびに癌のcell linesと15種の正常の組織における各種SOD活性を比較した。一般にCu, Zn-SOD活性は悪性細胞でやや低下するが、Mn-SODの含量はこれらのcell lineでは、Cu, Zn-SODに比べて多くない。しかし、一つのcell line, 中皮腫のみMn-SODが著明に豊富であることの報告だけが悪性腫瘍とMn-SODの関連を示すものである<sup>2)</sup>。さらに、婦人科悪性腫瘍におけるMn-SODの意義については、卵巣癌に発現し、血清中にも出現し、上皮卵巣癌のマーカーとなる可能性を示唆した我々の報告のみである<sup>1)</sup>。本研究において、207名の健常婦人のMn-SODの平均値は、89ng/mlであり、mean+2SDのcut off値130ng/mlを超える陽性率は良性卵巣腫瘍17.9%、子宮筋腫10.6%と10%台であり、CA-125の陽性率の高い子宮内膜症に関しても12.9%であった。また、婦人科悪性腫瘍においても、子宮頸癌22.5%、子宮体癌20.0%であるのに対し、卵巣癌において59.7%と高い陽性率を示した。上皮性の卵巣癌においては、Bast et al.により開発されたCA-125のcut off値を35U/ml以上

Histology	stage	Mn-SOD (ng/ml)				Positive rate >130ng/ml
		100	130	200	300	
serous ca.	I	○				0/1 (0%)
	II			●		1/1 (100%)
	III	○ ○	○ ○	●	● ● ● ●	6/12 (50%)
	IV			●	● ● ● ● ●	5/5 (100%)
mucinous ca.	I	○	○			0/3 (0%)
	II					
	III			●		1/1 (100%)
	IV		○			0/1 (0%)
endometrioid ca.	I	○		● ●		2/3 (67%)
	II		○	●		1/2 (50%)
	III			●	●	3/3 (100%)
	IV				●	1/1 (100%)
clear cell ca.	I	○ ○ ○		●		2/5 (40%)
	II					
	III				●	2/2 (100%)
	IV					

図2 Histology and status of the patient's tumor correlated to the Mn-SOD in the patient's serum.

とすると75.0~92.5%の範囲の陽性率の卵巣癌診断法としての感受性が報告されている<sup>2)~4)</sup>。しかし、子宮内膜症において70%台の陽性率を示し、卵巣癌診断法として特異性は低いという欠点を有する<sup>5)14)</sup>。今回、Mn-SODとCA-125の同時測定可能であった卵巣癌34例と子宮筋腫、良性卵巣腫瘍、子宮内膜症の婦人科良性腫瘍90例、計124例における卵巣癌診断精度を検討した(表6)。その結果、Mn-SODはCA-125に比し感受性は低いが特異性が高いため、卵巣癌の診断効率もCA-125、71.8%に比しMn-SODは79.8%と高くなり、Mn-SODの卵巣癌診断における有用性が示唆された。また、卵巣癌患者におけるMn-SODの血清値は病態の進行に伴い臨床的に有用であった。すなわち、効果的治療によりMn-SOD値が低下し、また癌病巣の消失を反映した。Mn-SOD値が治療により低下

表6 Evaluation of Mn-SOD and CA-125 in 34 patients with ovarian cancer and 90 patients with benign pelvic masses

	Mn-SOD	CA-125
sensitivity	58.8% (20/34)	82.4% (28/34)
specificity	87.8 (79/90)	67.8 (61/90)
false positive rate	12.2 (11/90)	32.2 (29/90)
false negative rate	41.2 (14/34)	17.6 (6/34)
diagnostic value*	79.8 (99/124)	71.8 (89/124)

\*true positive+true negative  
total patients with/without disease

し、再発で増加することにより、本酵素の測定は、卵巣癌治療の臨床的なモニターになることが期待される<sup>7)</sup>。

さて、卵巣癌において血清中に増加出現する機構について考察する。まず、Mn-SODのモノク

ローン抗体を用いた間接酵素抗体法にて、Mn-SODの局在を検討した。正常の卵巣においてMn-SODの抗体の染色性は認められず、非上皮性悪性卵巣腫瘍においても結合は認められなかつた。一方、卵巣癌においては、大部分の検体において明らかな染色性を示し、卵巣癌におけるMn-SODの局在が確認された。しかし、子宮頸癌や子宮体癌などの他の婦人科悪性腫瘍においては明らかな染色性は認められなかつた<sup>7)</sup>。

また、卵巣癌の細胞株Kuramochiをin vitroで培養し、培養液中にTNFを添加し、Mn-SODの発現を細胞内の蛋白レベルで検討した。TNFの1~1,000ng/mlの範囲の濃度で24時間培養した後、超音波で細胞を破壊し、ELISA法にてMn-SODの定量を行った。その結果、Kuramochi細胞においては、TNFは容量依存的に、Mn-SODの細胞内の増加を認めた(未発表成績)。しかし、Cu, Zn-SOD量の変化は認められなかつた。また、TNFに耐性のある細胞では、既にTNF未処理で十分発現されており誘導はみられなかつた。Mn-SODの発現はIL-1やTNFを分泌する癌組織やマクロファージの活性化に産生するO<sub>2</sub><sup>-</sup>の産生に適応的に発現するためと考えられる<sup>18)19)</sup>。以上、卵巣癌診断におけるMn-SODの血液測定の腫瘍マーカーとしての意義を明らかにした。さらに、Mn-SODの卵巣癌における発現機構について若干の検討を試みた。

最後に研究に御協力いただいた宇部興産研究開発本部、川口哲男、宇田泰三、鬼沢三郎、佐藤勇夫、大阪大学生化学教室、鈴木敬一郎の諸氏に感謝する。

なお、本論文の要旨は第42回日本産科婦人科学会学術講演会(東京)、第49回日本癌学会総会(札幌)で発表した。

#### 文 献

1. 石川睦男, 柳沼裕二, 林 博章, 清水哲也, 山下幸紀, 遠藤康夫, 谷口直之: 卵巣腫瘍におけるマンガン, スーパーオキシドディスムターゼ(Mn-SOD)の意義. 日産婦誌, 42: 363, 1990.
2. Bast, R.C., Feeney, M., Lazarus, H., Nadler, L.M., Colvin, R.B. and Knapp, R.C.: Reactivity of a monoclonal antibody with human ovarian carcinoma. J. Clin. Invest., 68: 1331, 1981.
3. Bast, R.C., Klug, T.L., John, E.S., Jenison, E., Niloff, J.M., Lazarus, H., Berkowitz, R.S.,

Leavitt, T., Gliffiths, T., Parker, L., Zurawski, V.R. and Knapp, R.C.: A radioimmunoassay using a monoclonal antibody to monitor the course of epithelial cancer. N. Engl. J. Med., 309: 883, 1983.

4. Canney, P.A., Moore, M., Wilkinson, P.M. and James, R.D.: Ovarian cancer antigen CA 125: A prospective clinical assessment of its role as a tumor marker. Br. J. Cancer, 50: 765, 1984.
5. Di-Xia, C., Schwartz, P.E., Xingno, L. and Zhna, Y.: Evaluation of CA 125 levels in differentiating malignant from benign tumors in patients with pelvic masses. Obstet. Gynecol., 72: 23, 1988.
6. Iizuka, S., Taniguchi, N. and Makita, A.: Enzyme-linked immunosorbent assay for human manganese-containing superoxide dismutase and its content in lung cancer. J. Natl. Cancer Inst., 72: 1043, 1984.
7. Ishikawa, M., Yaginuma, Y., Hayashi, H., Shimizu, T., Endo, Y. and Taniguchi, N.: Reactivity of a monoclonal antibody to Manganese superoxide dismutase with human ovarian carcinoma. Cancer Res., 50: 2538, 1990.
8. Karlsson, K. and Marklund, S.L.: Extracellular superoxide dismutase in the vascular system of mammals. Biochem. J., 255: 223, 1988.
9. Kawaguchi, T., Noji, S., Uda, T., Nakashima, Y., Yahagi, A., Kawai, Y., Takagi, H., Toyama, M. and Taniguchi, N.: A monoclonal antibody against COOH-terminal peptide of human liver manganese superoxide dismutase. J. Biol. Chem., 264: 5762, 1989.
10. Kawaguchi, T., Suzuki, K., Matsuda, Y., Nishimura, T., Uda, T., Ono, M., Sekiya, C., Ishikawa, M., Iino, S., Endo, Y. and Taniguchi, N.: Serum-manganese-superoxide: Normal values and increased levels in patients with acute myocardial infarction and several malignant diseases determined by an enzyme-linked immunosorbent assay using a monoclonal antibody. J. Immunological Method, 127: 249, 1990.
11. Marklund, S.L.: Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 79: 7634, 1982.
12. Marklund, S.L., Westman, N.G., Lundgren, E. and Roos, G.: Copper- and Zinc-containing superoxide dismutase, manganese-containing superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in normal and neoplastic

- human cell lines and normal human tissues. *Cancer Res.*, 42: 1955, 1982.
13. *McCord, J.M. and Fridovich, I.*: Superoxide dismutase—An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.*, 244: 6049, 1969.
  14. *Niloff, J.M., Knapp, R.C., Schaetzel, E., Reynolds, C. and Bast, R.C. Jr.*: CA 125 antigen levels in obstetric and gynecologic patients. *Obstet. Gynecol.*, 64: 703, 1984.
  15. *Oberley, L.W. and Buettner, G.R.*: Role of superoxide dismutase in cancer: A review. *Cancer Res.*, 39: 1141, 1979.
  16. *Weisinger, R.A. and Fridovich, I.*: Mitochondrial superoxide dismutase: Site of synthesis and intramitochondrial localization. *J. Biol. Chem.*, 248: 4793, 1973.
  17. *Weisinger, R.A. and Fridovich, I.*: Superoxide dismutase: Organelle specificity. *J. Biol. Chem.*, 248: 3582, 1973.
  18. *Wong, G.H.W., Elwell, J.H., Oberley, L.W. and Goeddel, D.V.*: Manganese superoxide dismutase is essential for cellular resistance to cytotoxicity of tumor necrosis factor. *Cell*, 58: 923, 1989.
  19. *Wong, G.H.W. and Goeddel, D.V.*: Induction of manganese superoxide dismutase by tumor necrosis factor: Possible protective mechanism. *Science*, 242: 941, 1988.

(No. 6941 平3・1・12受付)