

泌尿器系疾患における尿中、血漿中および組織中 Epidermal growth factor 量の検討

長崎大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 斉藤 泰教授)

宮 崎 伸 一 郎

CLINICAL STUDY OF THE EPIDERMAL GROWTH FACTOR CONTENTS IN URINE, PLASMA AND TISSUE FROM THE PATIENTS WITH UROLOGICAL DISEASES

Shinichiro Miyazaki

From the Department of Urology, Nagasaki University School of Medicine

Contents of epidermal growth factor (EGF) in urine, plasma and tissues in urological diseases were estimated by enzyme immunoassay using beads bound to the anti-EGF antibody, and the clinical significance of the presence of EGF in the disease state was examined. There was no difference in EGF level between healthy male and female subjects ($n=22$), and the level showed a tendency to decrease with age ($p<0.05$). The subjects were 19 cases of prostatic cancer, 7 of renal cancer, and 12 of urinary bladder cancer. The difference in EGF level between the healthy subjects and patients was not significant, and the levels were shown to be lower in 8 cases of renal insufficiency (including patients on hemodialysis:HD)($p<0.01$). Plasma EGF levels in the 30 healthy subjects revealed no significant differences related to sex or age. Plasma EGF levels were lower in 42 cases of renal insufficiency (before and after HD), and in 7 cases of renal cancer ($p<0.01$); they were significantly lower in 15 cases of prostatic cancer ($p<0.05$). In tissues including tumor sites, EGF levels were higher particularly in the prostatic gland tissue (hypertrophy and cancer regions). Thus, urinary and plasma EGF levels in urological diseases may be useful parameters of renal function, but its relationship with malignant diseases is still unknown. The EGF level should be explored in relation with the EGF receptor.

(Acta Urol. Jpn. 38: 919-924, 1992)

Key words: Epidermal growth factor (EGF), Urological disease, Urine, Plasma, Tissue

緒 言

上皮成長因子 (Epidermal Growth Factor: 以下、EGF と略す) は、1962年 Cohen によって雄マウス顎下腺から発見された¹⁾ 53個のアミノ酸残基からなる分子量6,045のペプチド蛋白であり、その後、1975年、Cheon, Gregory らは、ヒト EGF を尿中より精製し、すでに単離されていた胃酸分泌抑制作用を示す物質 β -urogastrone と同一のものと考えられている^{2,3)}。

EGF は、細胞の増殖、分化に重要な役割りを果たしていると考えられているが、生体における生理作用や各種疾患における病態生理学的役割についてはなお明らかでなく、臨床的にも、悪性腫瘍を含む一部の疾患での尿中や血中での EGF 量の変動があることが報告されているに過ぎない^{4,5)}。

泌尿器科領域においては、EGF が腎尿細管細胞の増殖を強力に促進し⁶⁻⁸⁾、一側腎摘出後の代償性腎過形成に関与している可能性があること⁹⁾、腎移植後の移植腎由来の尿中 EGF 量の検討¹⁰⁾、膀胱癌の尿中 EGF が健常者に比べ変化していること、前立腺組織中に EGF 様物質が存在し、前立腺組織の増殖制御に関与している可能性があること¹¹⁾などが報告されているにすぎない。

今回われわれは、健常者および泌尿器系疾患に対して尿中、血漿中および組織中 EGF を測定し臨床的意義について検討したので若干の文献的考察を加え報告する。

対象および方法

1. 対象

尿中 EGF は、健常者をコントロールとし、男性14

名, 女性 8 名, 年齢分布は 20~65 歳 (平均 34 歳) の 22 例, 泌尿器疾患群として前立腺癌 19 例, 腎癌 8 例, 膀胱腫瘍 12 例, 血液透析を含む慢性腎不全 8 例, クッシング症候群 4 例, 水腎症 4 例, 尿道腫瘍 3 例, 尿道狭窄 1 例の 59 例を対象として検討した。

血漿中 EGF は, 健常者をコントロールとし, 男性 6 名, 女性 24 名, 年齢分布は 19~67 歳 (平均 40 歳) の 30 例, 泌尿器疾患群として血液透析前後を含む慢性腎不全 42 例, 前立腺癌 15 例, 腎癌 7 例, 前立腺肥大症 2 例, クッシング症候群 2 例の 68 例を対象として検討した。

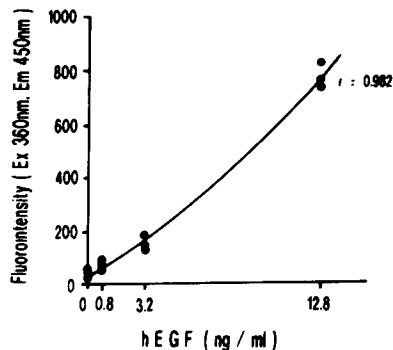
組織中 EGF は, 同一検体の腫瘍部および正常組織部を含め, 腎組織 (腎細胞癌・正常部) 2 症例, 膀胱組織 (移行上皮癌・正常部, 平滑筋腫) 2 症例, 前立腺組織 (腺癌, 肥大症) 11 症例, 副腎組織 (褐色細胞腫, クッシング症候群) 4 症例, 肝臓組織 (転移性肝癌・正常部) 1 症例, 精巣組織 (セミノーマ) 1 症例について検討した。

2. 方法

試料 (検体) は, 血漿については血中の EGF を測定する場合, 血清を用いると, 凝集した血小板の分泌顆粒由来の大量の EGF が混入し, 正しい病態に応じた EGF を測定するうえで不都合となる点を考慮し, EDTA 採血によりえられた血漿から, さらに血小板を除き (10,000 g にて遠心), その上清成分 (platelet poor plasma) を用いて検討した。また, 尿は 24 時間蓄尿を用いたが, 全例血液の混入は認めなかった。

組織については, 各組織の湿重量 1 g を 0.1 M 酢酸, pH 3.0 にてポリトロンホモジナイザーでホモジナイズし, 測定時, 0.1 M 水酸化ナトリウムで中和し, EIA buffer にて希釈後, 測定した。

EGF 測定の方法は, ウサギを免疫してえられた抗ヒト EGF ポリクローナル抗体 (湧永製薬) を固相したポリスチレンビーズ (積水化学, $\phi \frac{1}{4}$ inch) をポリスチレンチューブ (12.5×77mm) に入れ, そのチューブ内に検体または標準 EGF を加え室温 4 時間反応後洗浄し, その後, β -galactosidase でラベルした抗ヒト EGF F (ab')₂ フラグメントを反応させた。60 分後に基質液 (0.15 mM 4-methyl umbelliferyl- β -D-galactoside, 0.01 M Sodium phosphate, 0.15 M NaCl, 1 mM MgCl₂, 0.5% BSA, pH 7.2) を加えて発色させ, 蛍光強度を蛍光分光光度計 (日本分光, FP-777, Ex 360 nm, Em 450 nm) を用いて測定した (高感度サンドイッチ enzyme immunoassay 法: EIA)^{12,13)}。この方法は, EGF に対する抗体が試料中の



Assay was carried out as described in materials and methods.

Fig. 1. Dose-Response Curve for hEGF enzyme immunoassay.

EGF に選択的に反応するという抗原抗体反応の特異性に基づく反応を応用した測定法であり, radioimmunoassay (RIA) 法における被爆に対する安全対策や試料の安定性が悪い点を考慮し¹⁴⁾, EIA 法にて検討した。

結 果

まず, われわれの確立した EIA 法で EGF の dose-response curve を作成した。Fig. 1 に示すように, この EIA 法では, 0~12.8 ng/ml の範囲ではほぼ直線となり, EGF の測定は, この範囲で可能と思われた。以後, 尿, 血液および組織サンプルの EGF 測定は, この直線部分にくるように EIA buffer で適宜希釈して行った。

尿中 EGF については, 尿中 EGF 濃度が尿中クレアチニン濃度とよく相関することより^{15,16)}, クレアチニン濃度で補正 (ng/mg・Cr) して検討した。Table 1 のように健常者の平均値は 56.1 ng/mg・Cr で, 男女に有意差なく, 年齢とともに低下傾向をみた ($P<0.05$)。

疾患別平均尿中 EGF 濃度は (Fig. 2), 前立腺癌 25.4 ng/mg・Cr, 腎癌 27.2 ng/mg・Cr, 膀胱腫瘍 19.9 ng/mg・Cr, 血液透析を含む慢性腎不全 5.87 ng/mg・Cr, クッシング症候群 14.1 ng/mg・Cr, 水腎症 39.8 ng/mg・Cr, 尿道腫瘍 26.0 ng/mg・Cr で, 悪性疾患などについては, 健常者との有意差を認めなかったが, 慢性腎不全においては低下していた ($P<0.01$)。

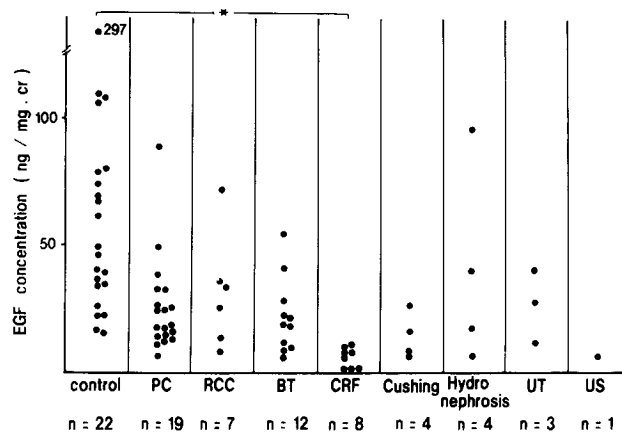
つぎに血漿中 EGF 濃度は, Table 2 のように健常者の平均値は, 0.424 ng/ml 男女間で有意差なく, 年齢でも差を認めなかった。

一方、疾患別平均血漿 EGF 濃度は (Fig. 3), 血液透析前後を含む慢性腎不全 0.175 ng/ml, 前立腺癌 0.136 ng/ml, 腎癌 0.089 ng/ml, 前立腺肥大症 0.064 ng/ml, クッシング症候群 0.327 ng/ml で、慢性腎不全および腎癌で $P<0.01$, 前立腺癌で $P<0.05$ の有意差をもって低下していた。前立腺肥大症患者については、非常に低値を示したものの、今回の検討では 2 例しかなく、その意義は不明であった。さらに、腎癌症例で、腫瘍摘除前後の血漿中 EGF を測定してみると、血液透析患者、単腎者および高齢者の症例では EGF レベルは術後改善しないものの、残腎機能のよ

Table 1. Concentration in normal human urinary EGF.

Age (yr)	Urinary EGF (ng/mg. Cr)	
	Male	Female
20~29 (n=12)	65.8±38.7	86.6±108
30~39 (n=2)	31.1±6.86	—
40~49 (n=4)	53.7±18.0	—
50~ (n=4)	15.7±0.42	6.80±0.14

Values are the means±SD. * $p<0.05$



* $p<0.01$

PC: prostatic cancer RCC: renal cell carcinoma BT: bladder tumor CRF: chronic renal failure UT: urethral tumor US: urethral stenosis

Fig. 2. Urinary EGF concentrations in various urological diseases

い 3 例は術後 EGF レベルが回復した (Fig. 4).

最後に、組織中 EGF の測定では (Fig. 5), 各症例数が少ないため、正常組織の採取が困難なため、有意差検定はできなかったが、前立腺組織で高値を示し、前立腺癌で 10.5 ng/g・wet weight, 前立腺肥大症で平均 12.0 ng/g・wet weight の組織中濃度であった。

また、同一検体の腫瘍部および正常組織部を比較してみると、腎臓、肝臓は正常部で、膀胱は腫瘍部で高値を認めた。

考 察

尿中 EGF 濃度については、老化にともない、EGF の合成、分泌は低下することが報告されている¹⁷⁾。今回のわれわれの検討でも同様で、加齢とともに尿中 EGF は減少する傾向にあることから、尿中 EGF 濃度の疾患群との比較には、年齢を一致させた対照群

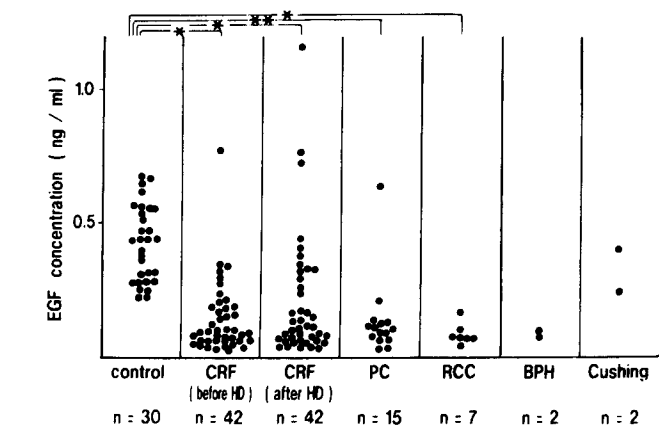
Table 2. Concentrations in normal human plasma EGF.

Age (yr)	Plasma EGF (ng/ml)	
	Male	Female
~19 (n=2)	0.479	0.437
20~29 (n=6)	0.286	0.474±0.143
30~39 (n=6)	0.578±0.142	0.390±0.119
40~49 (n=3)	—	0.352±0.099
50~ (n=13)	0.291±0.075	0.435±0.162

Values are the means±SD

との比較検討が必要と考える。

一方、慢性腎不全においては、有意に尿中 EGF 量は低下しており、end stage の腎においては、EGF の産生細胞である遠位尿管まで障害を受けている可能性が示唆され、腎機能の指標として有用であると考え



* $P < 0.01$ ** $P < 0.05$

CRF: chronic renal failure HD: hemodialysis PC: prostatic cancer RCC: renal cell carcinoma BPH: benign prostatic hypertrophy

Fig. 3. Plasma EGF concentrations in various urological diseases.

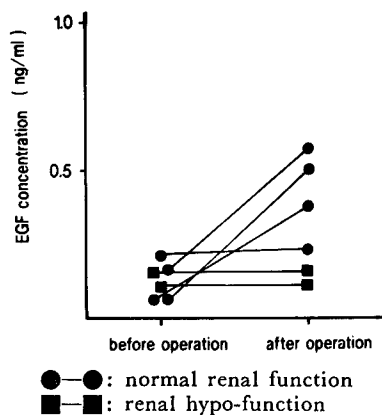


Fig. 4. Plasma EGF concentrations in patients with renal cancer before and after nephrectomy.

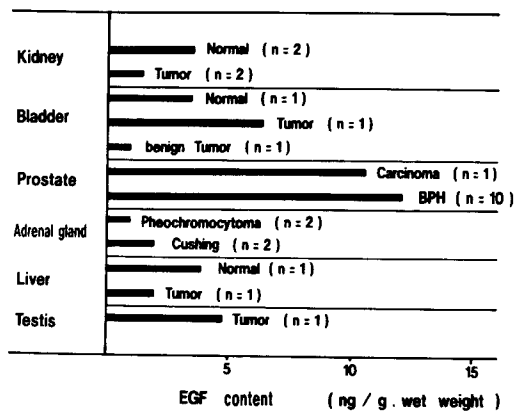


Fig. 5. Human tissue EGF contents.

えられた。

泌尿器系の悪性疾患との関連性については、EGFは移行上皮癌細胞を増殖させることより、尿路系の腫瘍発生の重要な一因子と考えられており¹⁸⁾、また各種の悪性腫瘍患者において、尿中 EGF 排泄が増加している症例がある⁹⁾ という報告もあることから、腫瘍マーカーとしての有用性を検討したが、今回の結果では有意な EGF 量の変化は認められず、腫瘍マーカーとして利用できる可能性は少ないと考えられた。

血漿中 EGF 濃度については、透析を含む慢性腎不全で低下傾向をみることで尿中 EGF の場合と同様に腎機能に関連した EGF の合成が低下しているものと考えられる。

腎癌および前立腺癌においては、有意に血漿中 EGF が低下していたが、これは腫瘍細胞における EGF の消費の亢進 (EGF receptor との結合) による見かけ上の低下による可能性が考えられる。

前立腺癌においては、EGF receptor に対するモノクローナル抗体で免疫組織化学的染色を行い、悪性度が高いほど EGF receptor の発現頻度が高いと報告されており¹⁹⁾、前立腺組織中の EGF 量は多いにもかかわらず (Fig. 5)、前立腺癌15症例では、血漿中 EGF 値が低いことから、receptor との結合が起きていることが考えられる。1例血漿中 EGF 値が高い症例は、全身骨転移が著明であり、tumor の volume や骨破壊にも左右され、EGF の消費に比し、産生の方が亢進しているのかもしれない。また、腎癌

については、正常腎と腎細胞癌との EGF receptor を比較した報告があり、癌細胞の EGF receptor 量が有意に高かったと述べられている²⁰⁾。われわれの症例でも、血漿中 EGF 値はすべて低値で、Fig. 4 のように腎機能に問題なく、腫瘍転移の所見がない症例において、腫瘍摘除後、血漿中 EGF 値が正常域に向って回復しており、尿中 EGF 値は正常者との間で差のないことから、EGF の産生の減少は本疾患で考えにくく、血漿中 EGF が血液を介して腫瘍増殖に消費されている可能性がある。また、膀胱癌において、悪性度の高い浸潤性の強い癌には、EGF receptor が過剰に発現しているという報告もあるものの²¹⁻²³⁾、今回の検討では尿中 EGF は低値傾向ではあるが有意差はなく、尿中 EGF は絶対量が多く、消費されてもその変化に影響が出にくいのかも知れない。

今後、EGF ならびに EGF receptor の発現と癌細胞増殖との関係について、さらに検討がなされる必要があると考えられる。

結 語

泌尿器系疾患における尿中、組織中および血漿中の EGF 濃度を EIA 法で測定して、以下の結果をえた。

1. 健常者の尿中 EGF 濃度は、男女に有意差なく、年齢とともに低下傾向を見た ($P<0.05$)。
2. 疾患別の尿中 EGF 濃度は、前立腺癌、腎癌、膀胱癌では有意差なく、腎不全 (HD を含む) で低下をみた ($P<0.01$)。
3. 腫瘍部を含む組織中 EGF 濃度は、前立腺組織 (肥大症、癌) にて高値をみた。
4. 健常者の血漿中 EGF 濃度は、男女に有意差なく、年齢にても差をみなかった。
5. 疾患別の血漿中 EGF 濃度は、腎不全 (HD)・腎癌 ($P<0.01$)、前立腺癌 ($P<0.05$) で低下をみた。
6. 腎癌の血漿中 EGF 値はすべて低値で、腫瘍摘除前後で比較してみると、残腎機能のよい症例では、術後、EGF レベルが回復した。

稿を終えるに当たり、御指導ならびに御校閲を賜りました斉藤 泰教授に厚く感謝の意を表します。また、研究にあたり直接の御指導を頂きました金武 洋助教授、神田 滋先生、野俣浩一郎先生、南 祐三先生および下釜多久美氏に謝いたします。

なお本論文の要旨は、第43回日本泌尿器科学会西日本総会にて発表した。

文 献

- 1) Cohen S: Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the newborn animal. *J Biol Chem* **237**: 1555-1562, 1962
- 2) Cohen S and Carpenter G: Human epidermal growth factor: Isolation and chemical and biological properties. *Proc Natl Acad Sci USA* **72**: 1317-1321, 1975
- 3) Gregory H: Isolation and structure of urogastrone and its relationship to epidermal growth factor. *Nature* **257**: 325-327, 1975
- 4) Hirata Y・ヒト EGF の動態とその意義. *Folia Endocrinol Jpn* **59**: 1930-1934, 1983
- 5) Uchihashi M, Hirata Y, et al.: Urinary excretion of human epidermal growth factor (hEGF) in patients with malignant tumors. *Horm Metab Res* **15**: 261-262, 1983
- 6) Norman J, Badie-Dezfooly B, et al.: EGF-induced mitogenesis in proximal tubular cells: Potentiation by angiotensin II. *Am J Physiol* **253**: 299-309, 1987
- 7) Rosenberg MR and Micholopoulos G: Kidney proximal tubular cells isolated by collagenase perfusion grow in defined media in the absence of growth factor. *J Cell Physiol* **131**: 107-113, 1987
- 8) Kanda S, Nomata K, et al.: Growth regulation of the renal cortical tubular cells by epidermal growth factor, insulin-like growth factor-I, acidic and basic fibroblast growth factor, and transforming growth factor- β in serum free culture. *Cell Biol Int Rep* **13**: 687-699, 1989
- 9) Kanda S, Nomata K, et al.: Transient increase in renal epidermal growth factor content after unilateral nephrectomy in the mouse. *Acta Endocrinol* **124**: 188-193, 1991
- 10) Kvist N and Nexø E: Epidermal growth factor in urine after kidney transplantation in humans. *Urol Res* **17**: 255-258, 1989
- 11) Nishi N, Matsuo Y, et al.: Partial purification of a major type of rat prostatic growth factor: characterization as an epidermal growth factor-related mitogen. *Prostate* **13**: 209-220, 1988
- 12) Ito K, Furukawa S, et al.: enzyme immunoassay 法によるマウス上皮細胞増殖因子 (epidermal growth factor) の測定. *医学のあゆみ* **125**: 1137-1139, 1983
- 13) Hayashi T, Hashimoto K, et al.: A sensitive enzyme immunoassay for human epidermal growth factor. Determination of hEGF in human serum and urine and pharmacokinetics in mouse. *J Pharmacobio dyn* **12**: 410-415, 1989
- 14) Okada T, Katada T, et al.: Function and application of epidermal growth factor. *フレグランス ジャーナル* **82**: 42-47, 1987

- 15) Dailey GE, Kraus JW and Orth DN: Homologous radioimmunoassay for human epidermal growth factor (Urogastrone). *J Clin Endocrinol Metab* **46**: 929-936, 1978
- 16) Hirata Y, Moore GW, et al.: Plasma concentrations of immunoreactive human epidermal growth factor (Urogastrone) in man. *J Clin Endocrinol Metab* **50**: 440-444, 1980
- 17) Uchihashi M, Hirata Y, et al.: AGE-related decrease of urinary excretion of human epidermal growth factor (hEGF). *Life Sci* **31**: 679-683, 1982
- 18) Messing EM, Hanson P, et al.: Epidermal growth factor-interactions with normal and malignant urothelium: in vivo and in situ studies. *J Urol* **138**: 1329-1335, 1987
- 19) Fowler JE Jr, Lau JLT, et al.: Epidermal growth factor and prostatic carcinoma: An immunohistochemical study. *J Urol* **139**: 857-861, 1988
- 20) Lau JLT, Fowler JE, et al.: Epidermal growth factor in the normal and neoplastic kidney and bladder. *J Urol* **139**: 170-175, 1988
- 21) Kristensen JK, Lose G, et al.: Epidermal growth factor in urine from patients with urinary bladder tumors. *Eur Urol* **14**: 313-314, 1988
- 22) Messing EM: Clinical implications of the expression of epidermal growth factor receptors in human transitional cell carcinoma. *Cancer Res* **50**: 2530-2537, 1990
- 23) Neal DE, et al.: Epidermal-growth-factor receptors in human bladder cancer: comparison of invasive and superficial tumors. *Lancet* **16**: 366-368, 1985

(Received on February 28, 1992)
(Accepted on April 22, 1992)

(迅速掲載)

Editorial comment

泌尿器系疾患における尿、血漿および組織の EGF 量の検討を行い、この研究面での有用な示唆を与えている。

著者らの確立した EIA 法で EGF の測定を行い、

1) 尿中 EGF 濃度は年齢とともに低下傾向にあるため、尿中 EGF 測定にあたっては年齢を一致させた比較検討が必要である。

2) 腎不全患者で尿中 EGF が低値を示したことより、腎機能の指標として有用である。

3) 尿中 EGF 排泄が各種悪性腫瘍患者において増加するという報告があるが、否定的である。

4) 残腎機能に問題のない腎癌患者は血漿 EGF が術後回復する。しかし、尿中 EGF は正常と差がないことより血漿 EGF が腎腫瘍増殖に消費されている可能性がある等が述べられている。

ただ年齢とともに低下傾向とあるが、20歳～49歳までは10歳毎に検討しているものの、あとは50歳以上の群と一括しており、50歳台、60歳台、70歳台等、高齢者における検討も興味をもたれるところである。事実、石倉ら（泌尿紀要 **37**: 1229-1234, 1991）は50～80歳台までの検討でもしだいに低下傾向にあることをRIA法で報告している。また血漿 EGF は腎癌、前立腺癌が有意に低い、良性疾患である前立腺肥大症も少数例ながら低い。これらの点に関し、正常人を含めた症例の集積とともに EGF レセプターとの関係等、今後の研究に期待したい。

徳島大学医学部泌尿器科学教室

香川 征