

尿中 tissue polypeptide antigen (TPA) に 関する臨床的研究

測定上の問題点の検討とその改良

和歌山県立医科大学泌尿器科学教室 (主任 : 大川順正教授)

吉田 全範, 森本 鎮義, 上門 康成, 安川 修

青枝 秀男, 吉田 利彦, 戎野 庄一, 大川 順正

CLINICAL STUDIES ON URINARY TISSUE POLYPEPTIDE ANTIGEN (TPA) : PROBLEMS AND IMPROVEMENT IN DETERMINATION

Masanori YOSHIDA, Shigeyoshi MORIMOTO, Yasunari UEKADO,

Shu YASUKAWA, Hideo AOSHI, Toshihiko YOSHIDA,

Shouichi EBISUNO and Tadashi OHKAWA

From the Department of Urology, Wakayama Medical College

The reliability of measurement of urinary TPA using a Prolifigen TPA kit (Sangtec, Sweden) was investigated, and an improved method for stabilizing TPA was tested. Samples were filtrated with a cellulose nitrate membrane filter to remove impurities as a possible cause of a high false positive rate which has been a problem in urinary TPA measurement. Serum TPA and Tween 40-treated urinary TPA was not adsorbed by the filter, whereas TPA in the non-treated urine showed a marked affinity to the filter. This shows the instability of TPA in the original urine, and the impropriety of filtration as a measure of purification of urine samples.

The dilution test of urine and the standard TPA, and the recovery test of the standard TPA added to 6 different urine samples showed reasonable results only when the samples were treated with Tween 40; otherwise the values were lower than expected.

Thirty-four spot urine samples were tested to examine the change in TPA value during the storage for 24 hours. TPA values decreased when urine was stored at room temperature, but this change was prevented by treatment of urine with Tween 40.

(Acta Urol. Jpn. 35: 217-223, 1989)

Key words: TPA, Urine, RIA

緒 言

Tissue polypeptide antigen (以下 TPA と略す) は, 臨床各科領域において腫瘍マーカーとしての意義が認められてきており, 多くの臨床応用の成績が報告されている。泌尿器科領域においては, 特に尿中 TPA の意義についての検討が進められており, 本邦でもいくつかの報告がなされている。しかしながら, 本測定においては, その正常範囲が報告者間で一定せず, かつ各種疾患における陽性率にも差がみられている。このことは, 尿自体のもつ多様性のもとより, その不安定性が, 現在の測定値に不正確さを与えている

ものとの危惧を感じさせるところである。

そこで著者は, 現在血清 TPA と同様の方法で行われている尿中 TPA 測定の問題点について検討したところ, 従来の方法では尿中 TPA が正しく測定されない可能性があること, および非イオン性界面活性剤 Tween 40 (ポリオキシエチレン ソルビタンモノパルミテート) を用いた尿の前処理により, これらの測定値の安定化が得られるとの結果を得たので, ここにその検討経過を記載する。

方 法

TPA の測定には Sangtec 社製 Prolifigen RIA-

TPA キットを使用し、Aloka 製 CD-751 シンチレーションカウンタで測定した。

尿は、泌尿器科外来および入院患者の随時尿あるいは24時間蓄尿の一部を用い、3,000回転、15分の遠沈後その上清を採取し、測定に供した。この際、膿尿、血尿の有無は考慮せず、不純物除去の目的で、硝酸セルロース膜フィルター（東洋濾紙製、pore size 1.0 μm ）を用いて、上清を濾過したものと濾過しないものについて TPA 測定を行った。

他方、界面活性剤 Tween 40（半井化学薬品製）による処理を行ったものについて、同様の方法で TPA 測定を行った。Tween 40 処理は、4% Tween 40 水溶液と検体を等量混合する事により行った。この際、比較のために、血清および標準 TPA にも同様の処理を行い測定した。有意差検定は paired t-test を用いて行った。

結 果

1) フィルター処理による効果

不純物除去の目的で、25例の尿をフィルターで濾過したところ、濾過前 TPA 値は 335.0 ± 216.2 U/l (Mean $\pm$ SD) であったが、濾過後には 153.0 ± 168.8 U/l となり、濾過による著明な測定値の低下がみられ、これはすべての検体においてその傾向がみられた (Fig. 1a)。他方、15例の血清に同じフィルターによ

る操作を加えたところ、濾過による測定値の変化は認められなかった (Fig. 1b)。

また、キット添付の希釈液で溶解した標準 TPA を濾過したところ、濾過による測定値の低下は全く認められなかった (Fig. 2a)。そこで、キット添付希釈液に含まれる界面活性剤 Tween 40 を用いて、20例の24時間尿を処理したところ、濾過による測定値の低下はみられなくなった (Fig. 2b)。

2) Tween 40 処理による検討

68例の随時尿を用いて Tween 40 処理による測定値の変化を検討したところ、尿ではほぼ全例に、Tween 40 処理による測定値の増加が認められ、非処理群では 180.7 ± 249.6 U/l であったのに対し、処理群では 232.2 ± 296.1 U/l ($p < 0.01$) と、有意の差がみられた (Fig. 3a)。一方、20例の血清についても検討を加えたが、Tween 40 処理による測定値の変化は認めなかった (Fig. 3b)。

また、尿における Tween 40 処理時間と尿中 TPA 測定値の関係をみたところ、6例中5例に Tween 40 水溶液と混合後2時間以内でほぼ安定した値になる傾向が認められた (Fig. 4)。

次に、尿の Tween 40 処理によって得られた測定値の信頼性について、希釈試験および添加回収試験により検討を行った。まず TPA の希釈試験の結果、Tween 40 水溶液で溶解、希釈した場合には希釈によ

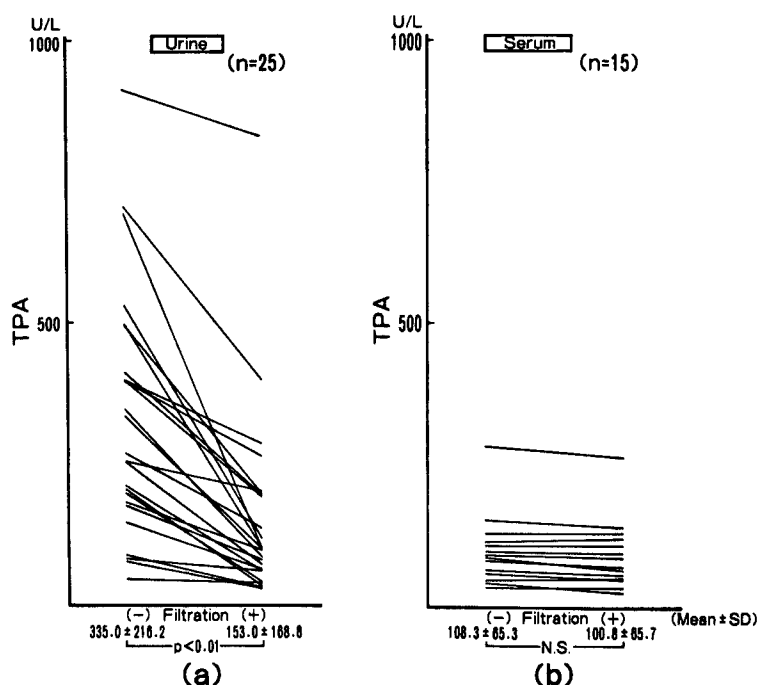


Fig. 1. The effect of filtration on TPA in urine and serum

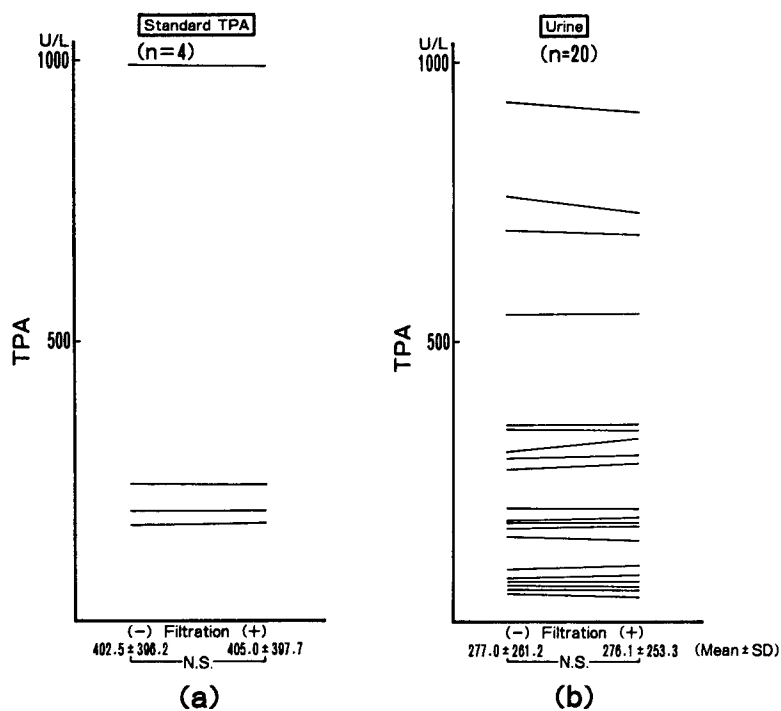


Fig. 2. The effect of filtration on urinary TPA and the standard TPA after treatment with Tween 40

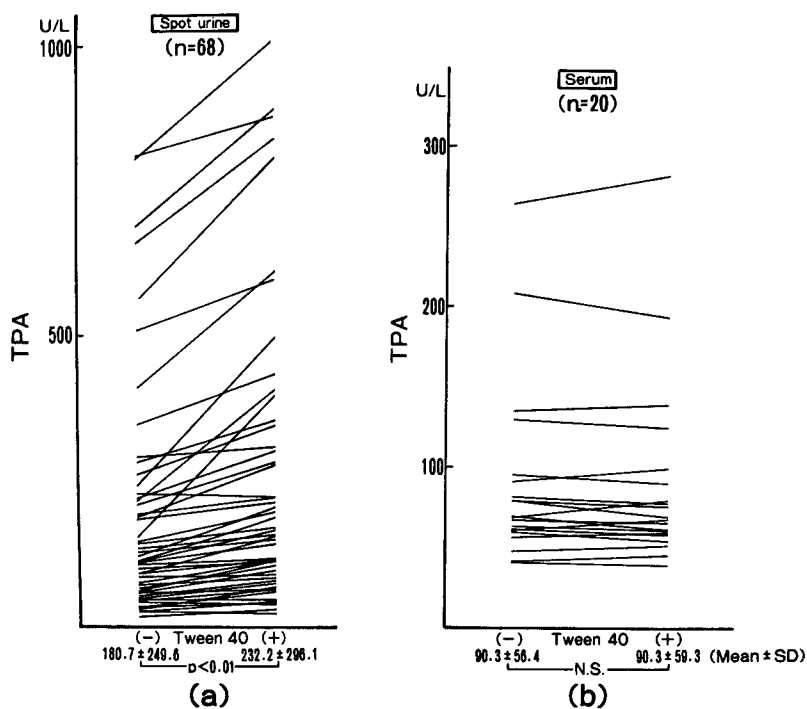


Fig. 3. Changes of TPA value in urine and serum after treatment with Tween 40

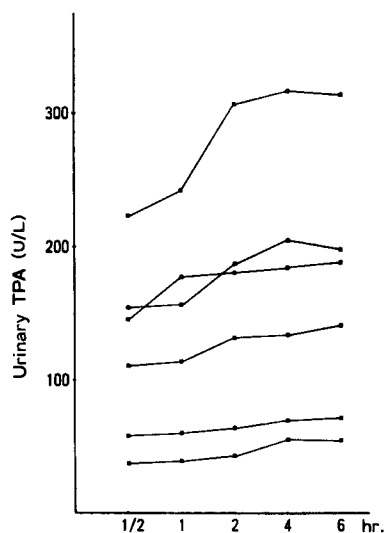


Fig. 4. Relationship between TPA value and the time of Tween 40 treatment in 6 different urine specimens

る予測値に近い値を示したが、生理食塩水で溶解希釈した場合には、予測値を大きく下回った。しかしながら、希釈途中で Tween 40 処理を追加した場合には予測値への回復がみられた (Fig. 5)。

次に、高 TPA 値を示していた尿を、低 TPA 値を示した他の尿で希釈したところ、Tween 40 処理群は、非処理群に対し高値を呈し、希釈曲線は予測値に近いものとなった (Fig. 6)。

6 例の尿に、既知量の標準 TPA を添加し、その添加回収率の検討を行った。同一検体を Tween 40 非処理群および処理群に分け、TPA 測定および回収率計算を行った。なお、標準 TPA はいずれも Tween 40 を含まないものを用い、添加は 200 U/l および 300 U/l の水溶液を等量の尿と混合することにより行った。その結果、Tween 40 非処理群では平均 52.2% の回収率であったのに対し、Tween 40 処理群では

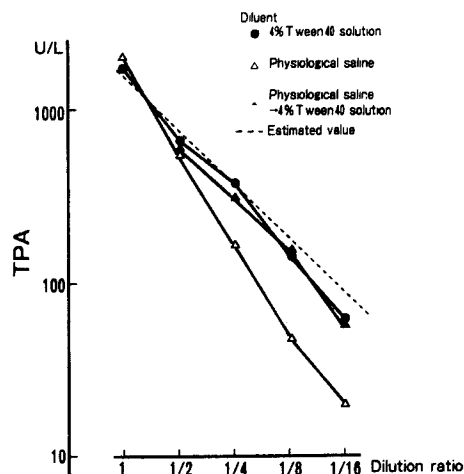


Fig. 5. Dilution test of the standard TPA

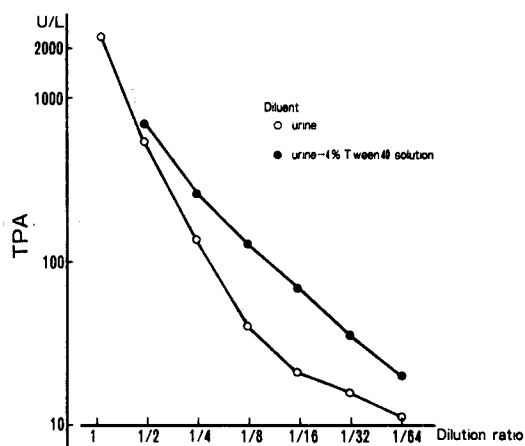


Fig. 6. Dilution test of urine which showed a high TPA value

101.6%と極めて良好な回収率が得られた (Table 1)。

3) 尿保存に関する検討

尿の保存中に生じる、TPA 測定値の変化と Tween 40 の効果について 34 例の随時尿を用いて検討した。

Table 1. Results of recovery tests of the standard TPA using 6 different urine specimens

No.	Added U/L	Tween 40 (-)			Tween 40 (+)		
		Urinary U/L	Measured U/L	Recovery rate %	Urinary U/L	Measured U/L	Recovery rate %
1	200.0	30.9	78.5	63.0	57.8	127.4	98.1
2	200.0	33.9	72.5	55.7	53.2	130.5	103.9
3	200.0	306.5	198.5	45.2	377.5	295.4	106.6
4	300.0	31.7	95.0	52.7	56.2	165.2	91.4
5	300.0	55.1	100.6	48.7	76.5	197.5	106.2
6	300.0	61.5	102.5	47.8	91.9	200.7	103.2
		Mean $\pm$ SD : 52.2 $\pm$ 6.4			101.8 $\pm$ 5.8		

P < 0.01

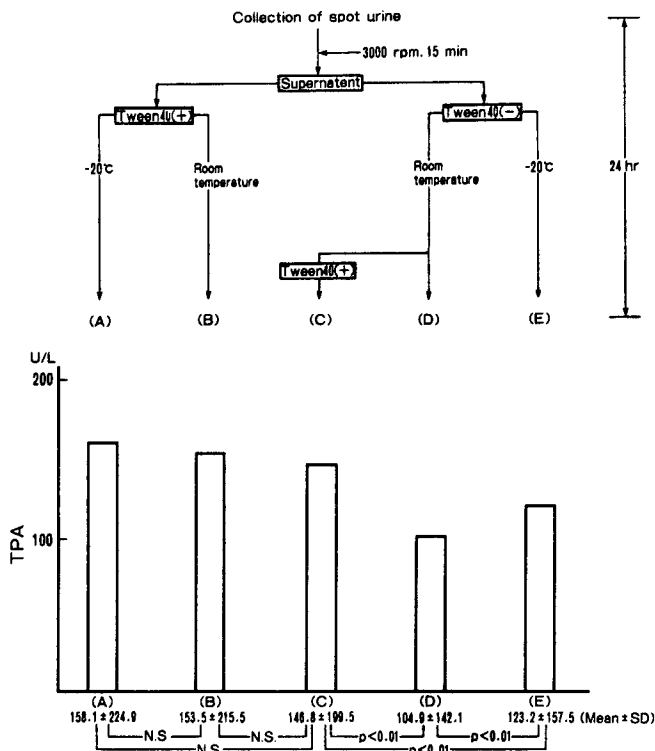


Fig. 7. The influence of resorption of urine on TPA values and the effect of treatment with Tween 40

すなわち Fig. 7 に示すごとく尿を遠沈し, その上清を Tween 40 処理群と非処理群に分け, さらに各群を室温, あるいは -20°C で 24 時間保存する 2 群に分類した. また, Tween 40 非処理群で室温保存したものについては, 測定直前に Tween 40 処理をしたものとし, 各群の測定値を比較した. その結果, Tween 40 処理を行った群では, 24 時間凍結保存群 (A) で 158.1 ± 224.9 U/l. 室温保存群 (B) で 153.5 ± 215.5 U/l と両群間に差を認めなかった. 他方, Tween 40 非処理群では, 凍結保存群 (E) において 123.2 ± 157.5 U/l で有意の低値を示し, さらに室温保存群 (D) では 104.9 ± 142.1 U/l となり, 凍結保存群 (E) に比してもさらに有意の低下を示した.

しかしながら, Tween 40 非処理のまま 24 時間室温放置した D 群に対し, 測定直前 Tween 40 処理を施行したところ, 146.8 ± 199.5 U/l となり, あらかじめ Tween 40 処理を行っていた群にほぼ近い測定値を示した.

考 察

Tissue polypeptide antigen は腫瘍細胞から検出

された蛋白で, 1957 年に Bjorklund ら¹⁻³⁾によって報告された. 現在これには 3 種類のサブユニットが知られており, その分子量はそれぞれ 43,000, 30,000, 17,000 と報告されているが⁴⁾, 通常はこれらが互いに凝集し合って大きな分子を形成しているものとされている^{5,6)}. TPA 測定には, 以前は赤血球凝集反応が用いられていたが⁷⁾, 現在では PIA キットを用いた簡便な方法が用いられ, その基礎的^{6,8-11)}, および臨床的⁹⁻¹⁶⁾検討が成されつつある. しかしながら, TPA 測定における基礎的検討の多くは血清 TPA に関するものであり⁹⁻¹²⁾, 尿中 TPA に関するものはほとんどみられないのが現状である. 尿中 TPA の正常値についてみても, 坂上ら¹³⁾は 125 U/l, Kumar ら¹⁴⁾は 85 U/l, 辻橋ら¹⁵⁾は 430 U/l, 藤氷ら¹⁶⁾は 244 U/l と報告者間で差がみられる. このような差を生じる原因として, 1) 現在の測定キットは, 本来血清 TPA 測定用に開発されたものであり, 尿を検体として用いた時の安定性には問題が残されていること, 2) 尿自体の不安定性および多様性に基づく測定値の変動, 3) 検体の採取あるいは保存の条件の相違などが考えられる.

測定キット自体に関しては, 血清を用いた諸報告で十分な信頼性が既に示されており^{6,11)}, 鳥住らの尿を

用いた実験⁹⁾でもアッセイ間、キット間での測定値変動は僅かであり、臨床応用に十分耐えうる可能性が示されている。しかしながら、長田ら¹⁰⁾によれば、血清、腹水、あるいは羊水などを用いた希釈試験の結果、検体の種類の相違により、その希釈曲線は標準TPAのそれとの平行性に差がみられると報告されており、種々の検体を一様に扱うことには問題があると思われる。さらに、尿自体の性状が測定値にいかなる影響を与えるかについてはほとんど検討されていないのが現状であるため、著者は尿中TPA測定の安定性を検討すべく尿特有の問題点を探ってみた。

感染尿や血尿において偽陽性が生じ易く、それが尿中の不純物によって引き起こされるのではないかと考え、不純物を除去する目的で、遠沈後の尿上清を硝酸セルロース膜フィルターで濾過した。その結果、TPA測定値の安定性は増加したものの、全般的に著明な低下が認められるという結果が得られた。硝酸セルロース膜フィルターはある種の蛋白質を吸着するため、その性質を利用して蛋白質や核酸の分離、精製に用いられている¹¹⁾が、尿TPAはこのフィルターに吸着されることが考えられた。事実、著者はこの確認のためにフィルターの細片を尿に混入させ、攪拌したところ、そのTPA値の著明な低下を認めている。他方、血清TPAおよび界面活性剤Tween 40を含むキット添付希釈液で溶解した標準TPAは、フィルターへの吸着がみられなかった。このことから、尿中において、TPAは他の物質に極めて吸着され易いこと、さらに、尿中でのTPA分子は他の物質を吸着することにより、測定に何らかの影響を与えているとの考え方が示唆された。

血清にはすでに界面活性作用が存在するとされ¹²⁾、これがTPAの易吸着性を抑えていると考えられる。著者が行った血清での検討でも、尿にTween 40処理を行った時にみられたTPA測定値の増加は血清においてはみられなかった。このことから、尿での測定を血清と同一の方法で行うことに問題があると考えられた。

さらに、Tween 40処理を行った場合の標準TPAの希釈試験、および尿への添加回収試験の結果は、抗原抗体反応開始前に尿のTween 40処理が行われなければ、正しい測定値が得られない可能性を示唆している。血清TPAは希釈試験においてほぼ良好な直線性を示すことが知られている^{6,11)}が、これについても長田ら¹⁰⁾は、血清よりもさらに羊水の方が検体間における希釈特性のばらつきが少ないことから、RIAに対するなんらかの妨害因子の存在が考えられるとして

いる。とくに、血清や羊水中には多量のリン脂質が存在する^{18,19)}ことから、溶媒中の界面活性作用の強弱がTPA測定値に大きな影響を与えているのではないかと考えられる。

尿中TPA測定が臨床応用されるにあたって大きな問題となることの一つに、測定までの尿の保存条件が考えられる。尿中TPA測定は、最近になって随時尿を用いた報告¹⁵⁾が散見されるが、一般には24時間尿を用いて行われてきており、著者もこれまでに24時間尿を用いた成績を報告してきた¹⁶⁾。しかしながらこれまでの報告では、各々の測定値でかなりの変動がみられ、臨床応用における信頼性に不安がもたれてきた。そこで今回、24時間蓄尿の影響を検討したところ、TPA測定値は、室温での蓄尿中にかなり低下することが明らかにされた。そして、その変化は尿にあらかじめTween 40を加えておくことにより防止でき、また、無処理であっても測定直前にTween 40による処理を行うことで正確な測定値を示しえることが明らかとなった。

結 語

1) 尿中TPAは血清TPAと異なり、血清TPAと同じ従来の測定法では、正しい値を示さないと思われた。

2) 尿中TPA測定値が一定しない理由を検討した結果、血清との界面活性作用の差に起因するものであることが推察された。

3) 尿に、界面活性剤であるTween 40処理を加えることにより、安定した測定結果が得られた。

4) Tween 40を加えることにより、蓄尿中に生じるTPA測定値の低下を防止することができ、臨床応用における信頼性を確立することができた。

なお、本研究の一部は、文部省科学研究費60480362号の助成を受けて行われた。

文 献

- 1) Björklund B and Björklund V: Antigenicity of pooled human malignant and normal tissues by cyto-immunological technique: presence of an insoluble, heat-labile tumor antigen. *Int Arch Allergy* 10: 153-184, 1957
- 2) Björklund B, Lundblad G and Björklund V: Antigenicity of pooled human malignant and normal tissues by cytoimmunological technique: II. Nature of tumor antigen. *Int Arch Allergy* 12: 241-261, 1958
- 3) Björklund B, Björklund V and Hedlof I: Antigenicity of pooled human malignant

- and normal tissues by cytoimmunological technique: III. Distribution of tumor antigen. *J Natl Cancer Inst* **26**: 533-545, 1961
- 4) Luning B, Wiklund B, Redelius P and Björklund B: Biochemical properties of tissue polypeptide antigen. *Biochim Biophys Acta* **624**: 90-101, 1980
 - 5) Ochi Y, Ura V, Hamazu M, Ishida M and Nakajima Y: Immunological study of tissue polypeptide antigen (TPA)-demonstration of keratin-like sites and blood group antigen-like sites on TPA molecules. *Clini Chim Acta* **151**: 157-167, 1985
 - 6) 遠藤啓吾, 阪原晴海, 中島言子, 中島鉄夫, 太田仁八, 鳥塚莞爾: Prolifigen RIA キットによる血中 Tissue polypeptide antigen (TPA) 濃度の測定: 第1編, 基礎的検討. *核医学* **21**: 75-81, 1984
 - 7) Menendez-Botet CJ, Oettgen HF, Pinsky CM and Schwartz MK: A preliminary evaluation of tissue polypeptide antigen in serum or urine (of both) of patients with cancer or benign neoplasms. *Clin Chem* **24**: 868-872, 1978
 - 8) 鳥住和民, 山田龍作, 戎野庄一, 藤永卓治: ラジオイムノアッセイによる尿中 TPA の測定. *Radioisotopes* **33**: 150-153, 1984
 - 9) 真坂美智子, 吉見輝: TPA (tissue polypeptide antigen) の基礎的, 臨床的検討—TPA の腫瘍マーカーとしての可能性. *Radioisotopes* **32**: 633-636, 1983
 - 10) 長田篤雄, 田中豊秋, 山羽義貴, 伊藤 進: Tissue polypeptide antigen (TPA) の radioimmunoassay kit の基礎的検討と臨床的意義について. *核医学* **21**: 177-190, 1984
 - 11) 西川彰治, 末広美津子, 石村順治, 福地 稔: Tissue polypeptide antigen (TPA) のラジオイムノアッセイに関する基礎的検討ならびに臨床的検討. *核医学* **21**: 91-100, 1984
 - 12) 風間泰蔵, 片山展昌: 泌尿器科領域における血清および尿中 Tissue polypeptide antigen (TPA) の検討. *泌尿紀要* **31**: 2113-2118, 1985
 - 13) 坂上善成, 片寄巧一, 一条貞敏: 膀胱腫瘍患者における血中 Tissue polypeptide antigen (TPA) 値の検討. *西日泌尿* **48**: 445-449, 1986
 - 14) Kumar A, Costello CB, Glashan RW and Björklund B: The clinical significance of tissue polypeptide antigen (TPA) in the urine of bladder cancer patients. *Brit J Urol* **53**: 578-581, 1981
 - 15) 辻橋宏典, 松浦 健, 秋山隆弘, 栗田 孝, 井口正典, 宮本 力: 尿路腫瘍関連抗原に関する検討. 1. 尿路悪性腫瘍における血清・尿 TPA (tissue polypeptide antigen). *日泌尿会誌* **77**: 243-250, 1986
 - 16) 藤永卓治, 北村慎治, 吉田全範: 膀胱癌患者における尿中 tissue polypeptide antigen (TPA) の検討. *日泌尿会誌* **75**: 959-966, 1984
 - 17) Gillespie D and Spiegelman S: A quantitative assay for DNA-RNA hybrids with DNA immobilized on a membrane. *J Mol Biol* **12**: 829-842, 1965
 - 18) 岡庭 弘: 血漿脂質. 臨床脂質化学, 1版, pp 316-329, 医学書院, 東京, 1972年
 - 19) Dennis EF and Bernard ES: Measurement of amniotic fluid surfactant. *Clin Chem* **27**: 1629-1640, 1980

(1988年3月7日受付)