

膀胱癌における尿テロメラーゼ活性 簡易測定法の有用性

岩渕 郁哉¹, 盛 和行¹, 山本 勇人¹, 畠山 真吾¹
米山 高弘¹, 橋本 安弘¹, 古家 琢也¹, 神村 典孝¹
鈴木 唯司², 大山 力¹

¹弘前大学大学院医学研究科泌尿器科学講座, ²鷹揚郷腎研究所青森病院

SIGNIFICANCE OF A SIMPLE ASSAY OF URINE TELOMERASE ACTIVITY FOR THE DETECTION OF BLADDER CANCER

Ikuya IWABUCHI¹, Kazuyuki MORI¹, Hayato YAMAMOTO¹, Shingo HATAKEYAMA¹,
Takahiro YONEYAMA¹, Yasuhiro HASHIMOTO¹, Takuya KOIE¹, Noritaka KAMIMURA¹,
Tadashi SUZUKI² and Chikara OHYAMA¹

¹The Department of Urology, Hirosaki University Graduate School of Medicine

²The Aomori Hospital, Oyokyo Kidney Research Institute

We developed a simple urine telomerase activity assay by a modification of the TeloTAGGG telomerase polymerase chain reaction (PCR) enzyme-linked immunosorbent assay kit. We conjugated digoxigenin (DIG) with the CX primer of omitting hybridization of PCR products and DIG-labeled probe. The sensitivity and specificity of bladder cancer diagnosis on 100 patients with bladder cancer and 25 healthy volunteers using the simple urine telomerase activity measurement were 81% and 92%, respectively. The positive rate for bladder cancer by the present assay system was affected by neither tumor grade nor invasiveness. The diagnostic potential of the present method is superior to the conventional urine telomerase assay kit and urine nuclear matrix protein-22 (NMP22). The present method is simple, and can be used for mass screening of bladder cancer.

(Hinyokika Kiyo 56 : 551-557, 2010)

Key words : Urine telomerase, Bladder cancer

緒 言

膀胱癌の診断は一般的に膀胱鏡検査と尿細胞診によって行われている¹⁾。膀胱鏡検査は侵襲があるため尿細胞診が汎用されているが感度が低く、特に高-中分化度の膀胱癌の検出能力には問題がある¹⁾。さらに、観察者の主観が介入するという問題点もある。一方、膀胱鏡検査は患者にとっても負担が大きいので、不必要な膀胱鏡検査を回避し非侵襲的で客観的な方法で膀胱癌を診断しようとする試みが数多くなされている。膀胱癌の尿中マーカー探索の試みも活発に行われており、日本では bladder tumor antigens (BTA), nuclear matrix protein-22 (NMP22) などが保険適応となっている。BTA は基底膜断片複合体であり、膀胱癌患者の尿中に出現する^{2,3)}。尿中 BTA 測定キットは、ラテックス凝集反応でこれを検出する簡便かつ安価な検査法であるが、low grade, low stage の腫瘍では検出率が低く、偽陽性も多い^{2,3)}。NMP22 は、核マトリクスタンパク質を免疫原として作製された2種類のモノクローナル抗体302-22と302-18によって認識される核タンパク質であり⁴⁾、核内の nuclear mitotic

apparatus associated protein (NuMA タンパク) が細胞死に伴い可溶型となり、培養液中や体液中に分泌したものである⁵⁾。尿中 NMP22 濃度は尿路上皮癌で上昇し、測定キットによる膀胱癌に対する感受性は48%~90.9%⁶⁻⁸⁾であるが、血尿、尿路結石、尿路感染症を有する症例での偽陽性率が高いという問題を有している⁹⁾。

ヒト癌細胞の約90%に発現するテロメラーゼは、膀胱癌においても有用な腫瘍マーカーである。ヒトの染色体末端には TTAGGG のテロメア反復配列が存在し、テロメラーゼはこのテロメアを付加、伸長する逆転写酵素の一種である¹⁰⁾。ほとんどの正常ヒト体細胞にはその活性は認められないが、多くのヒト癌組織に存在し、細胞の不死化、癌化に関連していると考えられている¹¹⁻¹³⁾。膀胱癌組織においても、高率にその活性が認められるため^{14,15)}、1990年代後半から、尿中剥離細胞のテロメラーゼ活性を指標とした尿路上皮癌診断の検討が行われるようになってきた。1994年に Kim ら¹⁶⁾によって TRAP (telomeric repeat amplification protocol) 法が開発され、それ以前の方法では検出困難だった微量のテロメラーゼ活性を検出できる

ようになった。しかし、電気泳動を用いた測定法ではラダーの伸長とバンドの濃淡により検出するため定量性を欠く。その後、多くの改良が重ねられ、現在では定量性に優れた測定キットが市販されている。TeloTAGGG テロメラーゼ PCR ELISA キット (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) は digoxigenin (DIG) で標識したテロメア反復配列に相補的なプローブと、polymerase chain reaction (PCR) で増幅したテロメア反復配列との間でハイブリダイゼーションを行い、テロメラーゼ活性に由来した発色を enzyme linked immuosorbent assay (ELISA) 法で検出することにより大量サンプルの半定量的な測定を可能とした。市販キットとして広く使用されている。さらに、Cheng ら¹⁷⁾は DIG で標識した CX プライマーを用いて PCR 反応を行うことでハイブリダイゼーションのステップを省略し、増幅産物を直接測定する簡易法により糞便のテロメラーゼ活性を測定する方法を考案し、大腸癌診断における有用性を報告した。

われわれは Cheng ら¹⁷⁾の測定原理を基本に市販の Telomerase PCR ELISA キットを利用して簡便で正確なテロメラーゼ活性測定法を考案した。今回は、膀胱癌細胞株を用いた TeloTAGGG テロメラーゼ PCR ELISA キットと TRAP 簡易法のテロメラーゼ活性測定能力の比較、さらに膀胱癌の診断能力について簡易測定法と NMP22 を比較検討したので報告する。

対象と方法

テロメラーゼ活性簡易測定法の対象とした膀胱癌 100 症例の概要を Table 1 に示した。おのおのの症例に十分なインフォームドコンセントを行い承諾を得た。

これらのうち、膀胱癌 31 例、泌尿器良性疾病 6 例、健常者 19 例を無作為に抽出して尿中 NMP22 濃度を測

定した。この膀胱癌 31 例の概要も Table 1 に示したが、テロメラーゼ活性簡易測定法の対象症例の年齢、男女比、tumor grade、T カテゴリーに有意な差を認めなかった。

膀胱癌細胞株として、ヒト膀胱癌細胞株 T24¹⁸⁾ および J82¹⁹⁾ を用いた。10~10⁵ 個の細胞を 10 ml の健常者尿および PBS (-) に浮遊させ、37°C で 3 時間インキュベーションした後遠心分離し細胞を沈殿、洗浄、急速凍結し、-80°C で保存した。

尿中剥離細胞は、自然排尿による 50 ml の尿から回収した。採取した尿を 4°C、2,000 rpm で 5 分間遠心分離し細胞を沈殿、急速凍結し、-80°C で保存した。

細胞ペレットを TRAP lysis buffer で懸濁し、4°C、14,000 rpm にて 20 分間遠心分離した。上清 (細胞抽出液) 150 μ l をテロメラーゼ抽出液として急速凍結し、-80°C で保存した。凍結保存する前にタンパク質濃度を Bradford 法²⁰⁾で測定した。

テロメラーゼ活性測定は、市販 TRAP 測定キットの TeloTAGGG テロメラーゼ PCR ELISA キット (Roche Applies Science, Mannheim, Germany) を用いた。タンパク質 6 μ g 相当の細胞抽出液を用いてキットの使用説明書にしたがって操作した。

テロメラーゼ活性簡易測定法は、Cheng らの方法¹⁷⁾の原理を参考にして、TeloTAGGG テロメラーゼ PCR ELISA キットを利用して考案した。市販キットおよび簡易測定法の概略を Fig. 1 に示した。

DIG 標識 CX プライマーを用いて、市販 TRAP 測定キットのハイブリダイゼーションのステップを省いた。0.1 μ g の 5' 末端 DIG 標識 CX プライマーを PCR チューブに入れ、その上層に WAX 片を入れ 70°C で 5 分間反応した後、室温で放置し WAX バリアーを作製した。次に、この PCR チューブの WAX バリアーの上に、細胞抽出液および TRAP lysis buffer, 50 μ M dNTPs, 2U Taq DNA polymerase, ビオチンで標識した 0.1 μ g の TS プライマーを加え全量を 50 μ l とし、25°C で 30 分間テロメラーゼ反応を行った後、94°C で 5 分間加熱しテロメラーゼを失活させた。その後、94°C 30 秒、50°C 30 秒、72°C 90 秒にて PCR を 30 サイクル行い、続いて 72°C で 10 分間反応させた。

PCR 産物を TBST [10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20] にて希釈し、96 穴マイクロタイタープレートの各穴に 100 μ l ずつ移し、37°C で 30 分間反応させた。反応液を取り除き、200 μ l の TBST で室温、300 rpm で 5 分間ずつ 5 回洗浄し、20,000 倍希釈 anti-DIG-POD 液を加え、室温で 30 分間反応させた。反応液を完全に取り除き、TBST で洗浄後、100 μ l の BM Blue POD substrate を加え、室温で 10 分間反応させた。次に、100 μ l の 5% H₂SO₄ を加えて反応を停止し、吸光度を測定した。

Table 1. Demographic data on the patients with bladder cancer

		Simple telomerase assay 100 cases	NMP22 31 cases
Mean age (range)		70.9 (43-89)	72.3 (49-88)
Sex	male	80	24
	female	20	7
Grade	1	20	7
	2	43	17
Grade	3	32	6
	unclear	5	1
T category	is	7	2
	a	16	7
	1	42	15
	T2 $\leq$	24	4
	unclear	11	3

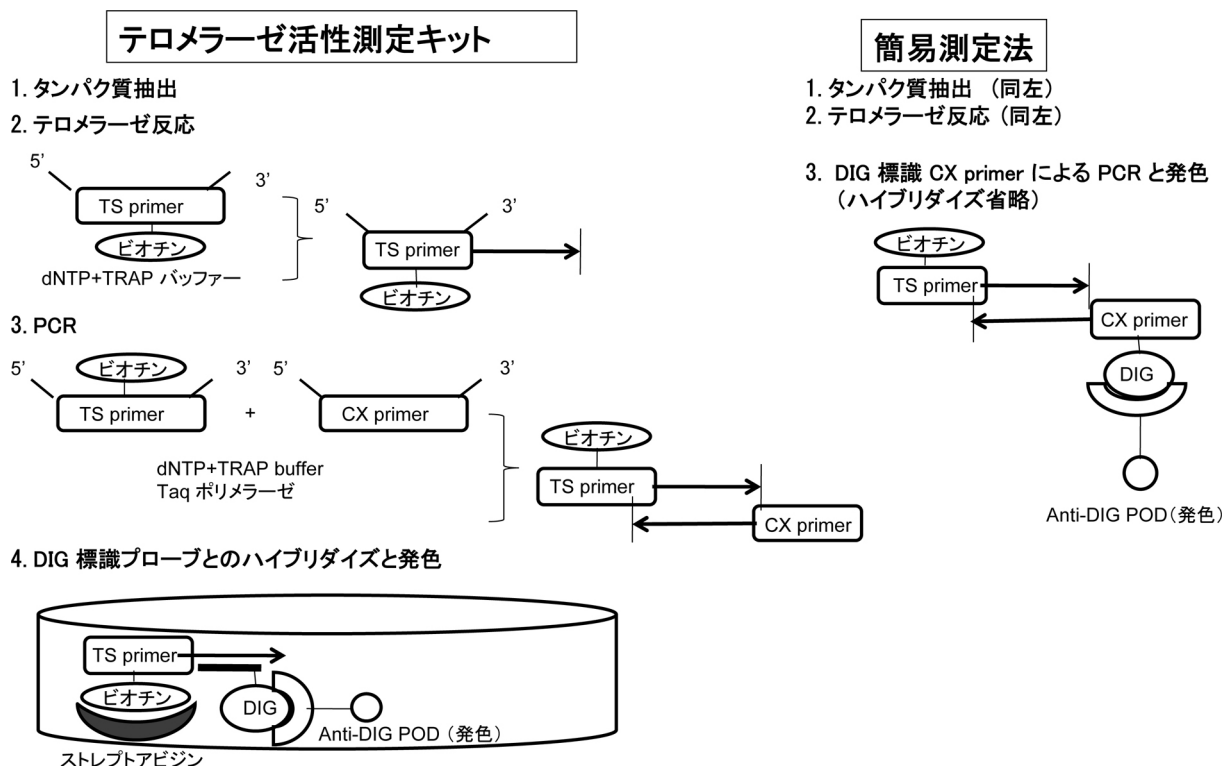


Fig. 1. Difference in telomerase activity assay system between TeloTAGGG telomerase PCR ELISA kit and the modified simple method. We conjugated digoxigenin (DIG) to the CX primer of polymerase chain reaction (PCR), omitting hybridization of PCR products and DIG-labeled probe.

尿中 NMP22 測定キットでは, 肉眼的血尿, 経尿道的操作後 5 日以内または膀胱炎で高値を示すことがあるため, 使用説明書に従いこれらを除いた症例で尿中 NMP22 濃度を測定した. 尿中 NMP22 濃度測定にはコニカ Matritech UNMP22 テストキット (コニカミノルタエムジー(株), 東京) を用いてキットの使用説明書にしたがって操作した.

統計学的解析は, Mann-Whitney の U 検定および Fisher's exact probability test を用い, 危険率 5 % 未満を有意とした.

結 果

市販 TRAP キット (TeloTAGGG テロメラーゼ PCR ELISA キット) によるテロメラーゼ活性測定では, 膀胱癌 10 例, 泌尿器良性疾患例は 5 例を無作為に抽出し, 健常者 25 例を加えてテロメラーゼ活性を測定した. 各群のテロメラーゼ活性は, 膀胱癌 (0.093 ± 0.073 : mean $\pm$ SD), 良性疾患 (0.038 ± 0.004), 健常者 (0.047 ± 0.022) の間に有意差を認めなかった. また, 健常者のテロメラーゼ活性値の mean + 2SD (0.091) をカットオフ値とすると, 膀胱癌の陽性率は 40.0%であった.

次に, ヒト膀胱癌細胞を PBS (-) およびヒト尿に浮遊させ, 市販 TRAP キットおよび簡易法によるテロメラーゼ活性値の検出限界を検討した. 簡易法では

T24, J82 とともに PBS (-), 尿中浮遊において 10 個から検出可能であった (Fig. 2). 両測定法によるテロメラーゼ活性値の相関係数は T24 で 0.896, J82 で 0.836 と良好な相関関係を認めた (data not shown).

簡易法の膀胱癌診断能力を検討するため, 膀胱癌 100 例, 泌尿器良性疾患 26 例, 健常者 25 例について簡易法にてテロメラーゼ活性値を測定した. それぞれの値は, 0.286 ± 0.248 (mean $\pm$ SD), 0.069 ± 0.043 , 0.062 ± 0.023 であった. 膀胱癌は良性疾患に比して有意に高い活性値を示した (Fig. 3). また, 健常者テロメラーゼ活性値の mean + 2SD (0.108) をカットオフ値とすると, 膀胱癌および良性疾患の陽性率はそれぞれ 81.0, 15.4%であった.

膀胱癌 100 例のうち組織学的異型度・深達度の判明した症例のテロメラーゼ活性値を, その組織学的異型度・深達度によって比較した. G1, G2, G3 のテロメラーゼ活性はそれぞれ 0.266 ± 0.260 , 0.311 ± 0.280 , 0.282 ± 0.213 であり, 異型度による有意差は認めなかった (Fig. 4). その陽性率はそれぞれ 75.0, 81.0, 83.3%であった. Tis, Ta, T1, T2 以上のテロメラーゼ活性はそれぞれ 0.285 ± 0.253 , 0.296 ± 0.314 , 0.259 ± 0.234 , 0.304 ± 0.189 であり, 深達度による有意差は認めなかった (Fig. 5). また, その陽性率はそれぞれ 100, 81.3, 71.4, 95.8%であった.

一方, 尿中 NMP22 濃度では, 健常者の尿中 NMP22

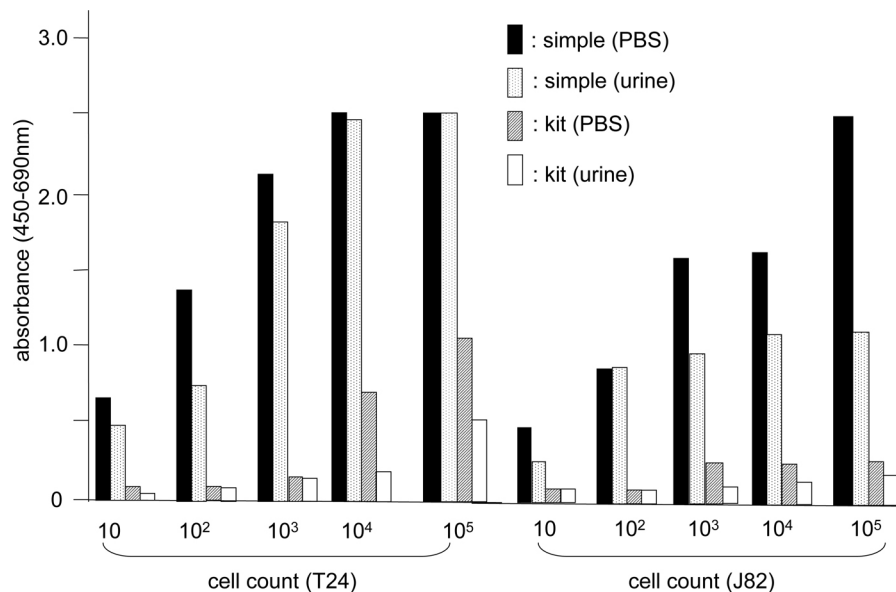


Fig. 2. Sensitivity of telomerase activity assay in bladder cancer cell line.

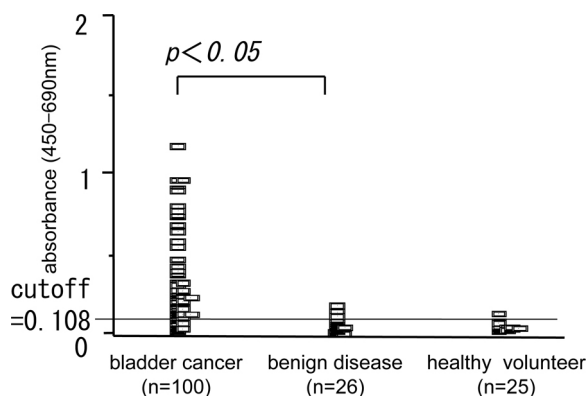


Fig. 3. Telomerase activity measured by the simple method. Horizontal bar represents cutoff value. The telomerase activity was significantly higher in patients with bladder cancer than in those with benign urological disease or healthy volunteers.

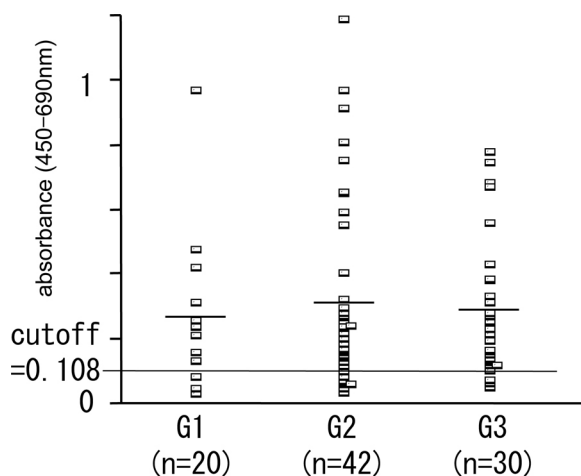


Fig. 4. Telomerase activity measured by the simple method categorized by tumor grade. There is no significant difference in telomerase activity among various tumor grades. Horizontal bars represent mean values.

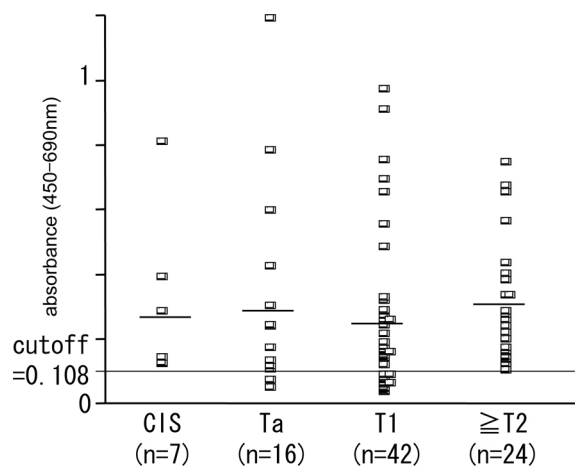


Fig. 5. Telomerase activity measured by the simple method categorized by clinical stage. There is no significant difference in telomerase activity among various stages. Horizontal bars represent mean values.

濃度の mean + 2SD である 11.34 U/ml 以上を陽性とする、陽性率は膀胱癌で54.8%, 良性疾患で33.3%であった。

市販 TRAP キットによるアッセイでは膀胱癌の陽性率が40.0%と、簡易法に比して明らかに低値であった。そこで、簡易法によるテロメラーゼ活性と尿中 NMP22濃度の膀胱癌の診断能力を比較した。Table 2に両者の感度と特異度の比較を示した。特異度は双方とも十分に高かったが、テロメラーゼ活性簡易測定法は尿中 NMP 濃度に比して感度が高かった。Table 3に両者の陽性率の比較を示した。尿中 NMP22 濃度よりもテロメラーゼ活性のほうが、膀胱癌のすべての異型度、深達度において高い陽性率を示し、特に G3 および T2 以上で統計学的に有意差を認めた。

Table 2. Sensitivity and specificity of urine NMP22 and urine telomerase simple assay in bladder cancer diagnosis

	Sensitivity (%)	Specificity (%)
NMP22	54.8	94.7
Simple telomerase assay	81	92

Table 3. Positive rate of urine NMP22 and urine telomerase simple assay for benign urological disease and bladder cancer

	Positive rate (%)		
	NMP22	Simple telomerase assay	
Benign urologic disease	33	15.4	
Bladder cancer	54.8	81	
G1	57.1	75	
G2	58.8	81	
G3	33.3	83.3	p<0.05
Tis	50	100	
Ta	71.4	81.3	
T1	46.7	71.4	
T2≤	50	95.8	p<0.05

考 察

今回の検討で用いた TeloTAGGG テロメラーゼ PCR ELISA キット (以下, 市販 TRAP キット) は現在最も多用されているキットの 1 つであるが, 今回の検討では膀胱癌検出率は 40% と低いものだった. Cheng ら¹⁷⁾ は DIG で標識した CX プライマーを用いて PCR 反応を行うことでハイブリダイゼーションのステップを省略し, 増幅産物を直接測定する簡易法により糞便のテロメラーゼ活性を測定する方法を考案した. そこでわれわれは, この方法を尿中剥離細胞のテロメラーゼ活性測定に応用することを考え, 市販 TRAP キットの CX プライマーを DIG で標識してテロメラーゼ活性測定簡易法を考案した.

膀胱癌細胞株を用いたテロメラーゼ活性値の検討では, 簡易法でも市販 TRAP キット法と同様に細胞数の増加とともに高い活性値を示し, 良好な相関関係を認めた. 簡易法は市販 TRAP キット法に比して高い活性値を示し, 細胞数 10 個からでも検出可能であった. Kavalier ら²¹⁾ は, 電気泳動による測定で細胞数 50 個で検出可能と報告しているが, 簡易法は電気泳動による測定以上の感度と考えられた. ハイブリダイゼーションのステップを省略したことで感度が改善したものと考えられた.

簡易法での測定条件を検討した結果, 細胞抽出液のタンパク質量 0.6 μ g で PCR 産物の希釈率 1/1,000 が最良の条件であったため (data not shown), この条件を採用した. 簡易法は膀胱癌の診断における感度

81.0%, 特異度 92.0% と十分に高いものであった. 健康者の陽性率は 2/25 (8%) と低く, 良性疾患の陽性率は 4/26 (15.4%) と, これまでの電気泳動による報告の 1~36%^{9,21-24)} と比べても遜色はない.

TeloTAGGG テロメラーゼ PCR ELISA キットは市販のテロメラーゼ活性測定キットの中でも最も多用されているものの 1 つである. しかし, パイロットスタディとして行った検討では, 膀胱癌の陽性率は 40% であった. 明らかに低い陽性率であったので, 簡易測定法と尿中 NMP22 濃度測定法との比較検討を行った. 尿テロメラーゼ簡易測定法は組織学的異型度, 深達度別に比較検討すると, その活性値には有意な差は認めず, low grade, low stage の腫瘍でも良好な検出率を示した. これは, テロメラーゼ活性が他の腫瘍マーカーより有用な点とするこれまでの報告に矛盾しない^{14,23-25)}.

一方, 尿中 NMP22 濃度は本邦でも 1999 年 7 月に保険適用となった. その膀胱癌の陽性率は 48~90.9%⁶⁻⁹⁾ と報告されている. しかし, 血尿や尿路感染症の影響を受けやすいため, Sharma ら²⁶⁾ は除外条件を設定することの有用性を報告している. 本研究では, 使用した測定キットの仕様書にしたがって, 偽陽性となりうる肉眼的血尿, 経尿道的操作後 5 日以内, 膀胱炎を除外して測定したが, 膀胱癌, 良性疾患の陽性率はそれぞれ 54.8, 33.3% であった. 膀胱癌での陽性率はすべての grade および深達度においてテロメラーゼ活性簡易測定法が高かった. 特に G3 および T2 以上の筋層浸潤癌で有意に陽性率が高かった. このことは簡易測定法が高リスク膀胱癌の検出に優れていることを示唆する. また, 尿中 NMP22 濃度は泌尿器良性疾患の陽性率が 33.3% と高いが, 簡易測定法では 15.4% であった. したがって, テロメラーゼ活性簡易測定法は血尿や尿路感染の影響を受けにくいアッセイ系であると考えられた.

テロメラーゼには human telomerase reverse transcriptase (hTERT) や human telomerase RNA component (hTR) などのサブユニットが存在する. 最近, これらのサブユニットの mRNA を定量 PCR によって測定する方法が開発され²⁷⁾, 膀胱癌の診断において感度 55~96%, 特異度 72~96% と比較的高い診断能力を有すると報告されている. しかし, mRNA の抽出を要するため, 手技が煩雑でサンプルの取扱いや保存には厳重な注意を必要とする. したがって, 日常診療で大量のサンプルを処理するには若干不利な要素を持つ. 尿中の膀胱癌細胞を検出する方法としては, BTA, NMP22 のほか, fluorescence *in situ* hybridization (FISH) の高い感度 (約 80%) と特異度 (90~100%) も報告されているが²⁸⁾, 費用の点で問題がある. この点, 今回報告したテロメラーゼ簡易測定法は, 従来

の測定キット法と比較しても、測定に要する時間は約6時間と短く、1検体当たりの費用も約500円以下と安価なうえ（data not shown）高い診断効率を有する。手技が簡便であり、特殊な機器も必要としないため、大量スクリーニングにも用いることが可能と考えられる。

結 語

TeloTAGGG テロメラーゼ PCR ELISA キットを改良した簡易測定法は、膀胱癌に対して異型度、深達度に影響されず高い感受性と特異性を示すテロメラーゼ活性測定法と考えられた。従来のテロメラーゼ活性測定法および尿中 NMP22 濃度と比較しても膀胱癌診断能力は高かった。手技が簡便であり大量スクリーニングに用いる測定法として有用であると思われる。

文 献

- Badalament RA, Hemansen DK, Kimmel M, et al.: The sensitivity of bladder wash flowcytometry, bladder wash cytology, and voided cytology in the detection of bladder carcinoma. *Cancer* **60**: 142-147, 1987
- Sarosdy MF, Devere WRW, Soloway MS, et al.: Results of a multicenter trial using the BTA test to monitor for and diagnose recurrent bladder cancer. *J Urol* **154**: 374-384, 1995
- D'Hallewin M and Baert L: Initial evaluation of the bladder tumor antigen test in superficial bladder cancer. *J Urol* **155**: 475-476, 1996
- Susan KK, Joseph VB, Gregory T, et al.: Utilization of nuclear matrix proteins for cancer diagnosis. *Crit Rev Eukar Gene Exp* **3**: 189-241, 1996
- Getzeberg RH, Konety BR, Oeler TA, et al.: Bladder cancer associated nuclear matrix proteins. *Cancer Res* **56**: 1690-1694, 1996
- Wiener HG, Haitel A, Pycha A, et al.: Can urine bound diagnosis tests replace cystoscopy in the management of bladder cancer? *J Urol* **159**: 1876-1880, 1998
- Serretta V, Lo PD, Vasile P, et al.: Urinary NMP22 for the detection of transitional cell carcinoma of the bladder: experience on 137 patients. *Urology* **52**: 793-796, 1998
- Miyanaga N, Akaza H, Tsukamoto T, et al.: Urinary nuclear matrix protein22 as a new marker for the screening of urothelial cancer in patients with microscopic hematuria. *Int J Urol* **6**: 173-177, 1999
- Landman J, Chang Y, Kavalier E, et al.: Sensitivity and specificity of NMP22, telomerase, and BTA in the detection of human bladder cancer. *Urology* **52**: 398-402, 1998
- Ishikawa F: Telomerase crisis, the driving force in cancer cell evolution. *Biochem Biophys Res Commun* **230**: 1-6, 1997
- Wright WE, Piatyzek MA, Rainey WE, et al.: Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev Genet* **18**: 173-179, 1996
- Harley CB and Villeponteau B: Telomeres and telomerase in aging and cancer. *Curr Opin Genet Dev* **5**: 249-255, 1995
- Shay JW and Bacchetti S: A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer* **33**: 787-791, 1997
- Lin Y, Miyamoto H, Fujinami K, et al.: Telomerase activity in human bladder cancer. *Clin Cancer Res* **2**: 929-932, 1996
- Kinoshita H, Ogawa O, Kakehi Y, et al.: Detection of telomerase activity in exfoliated cells in urine from patients with bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* **89**: 724-730, 1997
- Kim NW, Piatyzek MA, Prowse KR, et al.: Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* **266**: 2011-2015, 1994
- Cheng AJ, Tang R, Wang JY, et al.: Polymerase chain reaction-based enzyme immunoassay for quantitation of telomerase activity: application to colorectal cancers. *Jpn J Cancer Res* **90**: 280-285, 1999
- Bubenik J, Baresova M, Viklicky V, et al.: Established cell line of urinary bladder carcinoma (T24) containing tumor-specific antigen. *Int J Cancer* **11**: 765-773, 1973
- O'Toole C, Price ZH, Ohnuki Y, et al.: Ultrastructure, karyology and immunology of a cell line originated from a human transitional-cell carcinoma. *Br J cancer* **38**: 64-76, 1978
- Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254, 1976
- Kavalier E, Landman J, Chang Y, et al.: Detecting human bladder carcinoma cells in voided urine samples by assaying for the presence of telomerase activity. *Cancer* **82**: 708-714, 1998
- Ramakusmar S, Bhuiyan J, Besse AJ, et al.: Comparison of screening methods in the detection of bladder cancer. *J Urol* **161**: 388-394, 1999
- Droller MJ, Kavalier E, Landman J, et al.: Urinary telomerase and its possible role as a marker for bladder cancer. *Keio J Med* **47**: 135-141, 1998
- Yoshida K, Sugino T, Tahara H, et al.: Telomerase activity in bladder carcinoma and its implication for noninvasive diagnosis by detection of exfoliated cancer cells in urine. *Cancer* **79**: 362-369, 1997
- Muller M, Heine B, Heicappell R, et al.: Telomerase activity in bladder cancer, bladder washings and in urine. *Int J Oncol* **9**: 1169-1173, 1996
- Sharma S, Zippe CG, Pandrangi L, et al.: Exclusion criteria enhance the specificity and positive predictive value of NMP22 and BTA STAT. *J Urol* **162**: 53-57, 1999
- Eissa S, Swellam M, Ali-Labib R, et al.: Detection of

- telomerase in urine by 3 methods: evaluation of diagnostic accuracy for bladder cancer. *J Urol* **178**: 1068-1072, 2007
- 28) Bravaccini S, Casadio V, Amadori D, et al.: The current role of telomerase in the diagnosis of bladder cancer. *Indian J Urol* **25**: 40-46, 2009
- (Received on January 18, 2010)
(Accepted on June 1, 2010)