

《技術報告》

血中 Tissue Polypeptide Antigen (TPA) 測定法としての BEKI TPS IRMA に関する基礎的ならびに臨床的検討

濱政 明宏* 河中 正裕* 木谷 仁昭* 福地 稔*

要旨 TPA 測定法としての BEKI TPS IRMA キットにつき、基礎的ならびに臨床的検討を行った。本法は測定範囲も 0 U/L から 2,500 U/L まで広範囲の測定が可能であった。測定手順は 1-Step 法で、2 時間の反応操作で測定結果が得られた。インキュベーション条件、回収試験、再現性等の基礎的検討成績も十分満足できた。ただし、希釈試験では TPA 同様原点に集束する直線は得られなかった。本法のカットオフ値は 71 U/L で、偽陽性率は健常人で 5.2%、良性疾患で 32.4% と現在活用されている TPA 測定法とほぼ同等であった。悪性疾患での陽性率は原発性肝細胞癌 80.8%、胆管癌 60.0% と高率であったが、悪性疾患全体では 34.5% と比較的低率であった。測定感度以上の測定値が得られた 101 例での TPS と TPA の比較では、両者は相関係数 $r=0.835$, $y=0.82x-0.91$ と良好な相関が得られた。また、治療効果の評価では本法はきわめて有用であった。

(核医学 31: 995-1003, 1994)

I. はじめに

Tissue polypeptide antigen (以下 TPA と略) は、1957 年 Björklund ら^{1,2)}により抽出精製され、化学的同定がなされた^{3,4)}。これを契機に TPA に関する知見が明らかにされ⁵⁾、腫瘍マーカーとして比較的早くから注目されてきた。わが国でもすでにラジオアッセイによる TPA の測定が普及し、ポリクローナル抗体を用いた 2-Step 法による IRMA が広く臨床的に活用されている。

最近、新たに TPA 測定法としてポリクローナル抗体とモノクローナル抗体を用いた、1-Step 法による TPA の IRMA が提供可能となった。そこでわれわれはこの BEKI TPS IRMA キットについて、TPA 測定法としての基礎的ならびに臨床的検討を行った。

II. 対象および方法

検討には BEKI TPS IRMA キットを用い、実際の測定手順は Fig. 1 に示すごとく行った。

1. 基礎的検討

1) 標準曲線と最小検出濃度

本法の標準曲線を評価するとともに、本法の最小検出濃度の検討を、キット添付の標準 TPS 最小濃度溶液 60 U/L を、キット添付の標準 TPS 0 U/L 濃度溶液で 50, 40, 30, 20, 10 U/L と希釈して測定 ($n=5$) し、測定結果の平均 ± 2 標準偏差 (mean ± 2 S.D.) を求め、0 U/L ($n=5$) との間の有意差検定 (Student's t test) および Mean ± 2 S.D. 間の重複の有無を指標に行った。

2) インキュベーション条件

インキュベーション条件の検討を、インキュベーション温度を 25°C と一定にして、インキュベーション時間を 1, 2, 3, および 6 時間と変えた際の標準曲線の比較と、逆にインキュベーション時間を 2 時間と一定にして、インキュベーション温度を 4°C, 25°C, 37°C と変えた際の標準曲線をおのおの比較した。

* 兵庫医科大学核医学科

受付：6 年 3 月 14 日

最終稿受付：6 年 5 月 16 日

別刷請求先：西宮市武庫川町 1-1 (〒 663)

兵庫医科大学核医学科

福地 稔

3) 回収試験

TPS 濃度の異なる 3 種類の血清試料 A (60 U/L), B (114 U/L), C (393 U/L) に、濃度の異なる 4 種類の標準 TPS (23, 75, 313, 1,225 U/L) を添加した際の回収率を検討した。

4) 再現性

再現性の検討を、TPS 濃度の異なる 3 種類の血清試料を用い、同一測定内 ($n=5$)、および異なる 5 回の測定間の再現性を評価した。

5) 希釈試験

TPS 濃度の異なる 3 種類の血清試料 A (1,454 U/L), B (551 U/L), C (285 U/L) を用い、キット添付の TPS 0 U/L 標準溶液で 1 : 1, 1 : 2, 1 : 4, 1 : 8, 1 : 16, 1 : 32 とおのおの段階的に希釈して測定し、得られた測定値を基に評価した。

2. 臨床的検討

1) 健常人

健常人 77 名を対象に血中 TPS 値を本法で測定した。これら 77 名の内訳は男性 37 名、女性 40 名で、年齢分布は 21 歳から 48 歳（平均 28.5 歳）であった。なお、本法におけるカットオフ値は健常人 77 名における測定結果を基に 95% の健常人 (73 名) が含まれる範囲を指標として決定した。

2) 良性疾患

良性疾患患者 74 例を対象に血中 TPS 値を本法で測定した。これら良性疾患の内訳は急性肝炎 6 例、慢性肝炎 12 例、肝硬変 10 例、急性肺炎 6 例、

胃潰瘍 9 例、急性膵炎 4 例、慢性膵炎 18 例、潰瘍性大腸炎 6 例および慢性胃炎 3 例であった。

3) 悪性疾患

診断が確定した悪性疾患 232 例を対象に血中 TPS 値を本法で測定した。これら悪性疾患の内訳は原発性肝細胞癌 26 例、胆管癌 15 例、乳癌 23 例、大腸直腸癌 38 例、肺癌 55 例、卵巣癌 13 例、膀胱癌 13 例、膀胱癌 18 例および胃癌 31 例であった。

4) 治療前後の TPS 値

治療前後の血中 TPS 値の評価を目的に悪性疾患 27 例を対象に手術前後の血中 TPS 値を本法で測定した。内訳は術前に血中 TPS 値がカットオフ値以上を示した 10 例、カットオフ値以下測定感度以上を示した 7 例、測定感度以下を示した 10 例であった。また、肺癌 1 例、乳癌 1 例の計 2 例では臨床経過中の血中 TPS 値を本法で測定するとともに、同時に血中 TPA 値も合わせ測定し、得られた測定値を比較評価した。

5) TPA 値との比較

TPS 値と TPA 値との測定値の比較を、血中 TPS 値を測定した 200 検体を用い、同時に血中 TPA 値を測定し、得られた測定値を評価した。また、そのうち、両測定法で感度以上の測定値が得られた 101 検体については、両測定値間の相関係数を求め評価した。なお、血中 TPA の測定はプロリフィゲン TPA キット“第一” II (第一ラジオアイソトープ研究所製) を用いた。

III. 結 果

1. 基礎的検討

1) 標準曲線と最小検出濃度

本法の代表的標準曲線を Fig. 2 に示す。標準 TPS 濃度 0 U/L から 2,500 U/L まで直線性を示す良好な標準曲線が得られた。本法の最小検出濃度は Fig. 2 に示すごとく 0 U/L と 10 U/L との間で有意差検定上有意差があったが、Mean \pm 2 S.D. の重複では 0 U/L と 20 U/L との間で初めて重複が認められなかった。この成績を基に本法の最小検出濃度を 20 U/L とした。

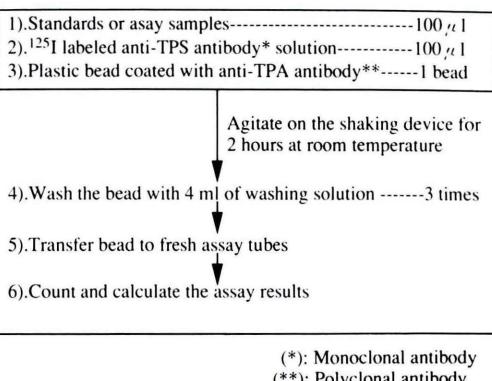


Fig. 1 Assay procedure of BEKI TPS IRMA kit.

2) インキュベーション条件

インキュベーション条件に関する検討成績を Fig. 3 に示す。インキュベーション時間は時間を長くするほどカウント数 (cpm) も高くなる成績であったが、2 時間以上では大きな差ではなく、早く測定結果を得るために 2 時間のインキュベーションで十分であると考えられた。一方、インキュ

ベーション温度は 25°C で最も高いカウント数 (cpm) が得られたことから、25°C でのインキュベーションで十分であると考えられた。

3) 回収試験

回収試験の成績を Table 1 に示す。おのおのの平均回収率は血清 A で 84.4%，血清 B で 101.1%，血清 C で 88.1% で、全体における平均回収率は 91.2% であった。

4) 再現性

再現性に関する検討結果を Table 2 に示す。同一測定内における再現性は C.V. (%) で評価すると、4.2% から 5.9% の範囲を示し、また、異なる 5 回の測定間の再現性の C.V. (%) は 8.0% から 9.1% の範囲を示した。

5) 希釈試験

希釈試験の成績を Fig. 4 に示す。図でも明らかなごとく、特に血中 TPS 濃度が高値の血清では原点に収束する直線性は得られなかった。

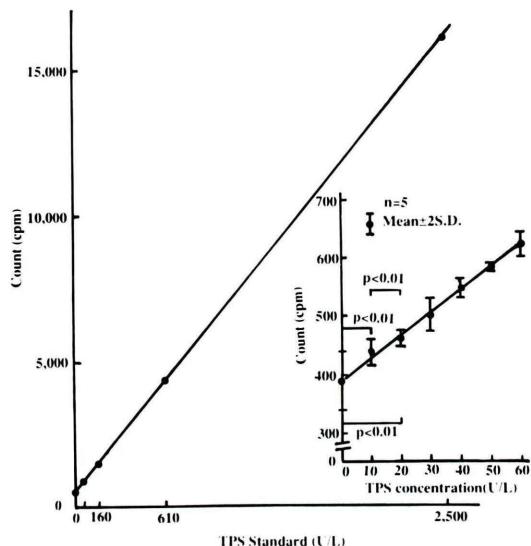


Fig. 2 Standard curve of BEKI TPS IRMA kit.

健常人 77 名における血中 TPS 値の測定結果を

Fig. 5 に示す。71 名 (92.2%) は測定感度以下を示し、残る 6 名 (7.8%) は 46 U/L から 108 U/L の

範囲に分布した。この結果を基に 95% (73 名) の

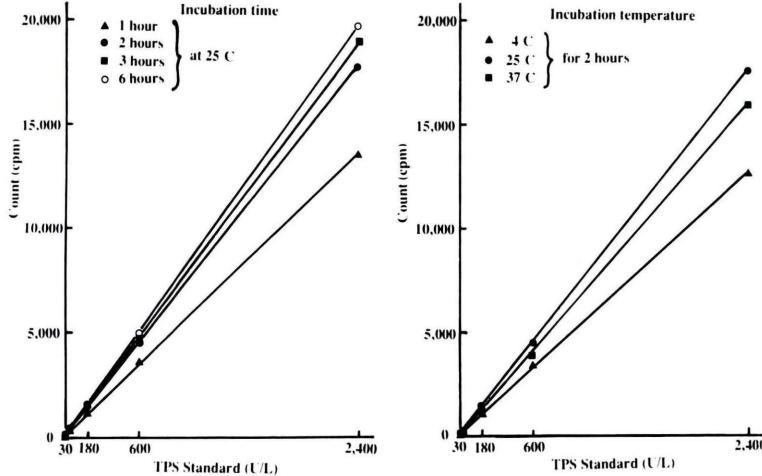


Fig. 3 Effect of incubation time and temperature on standard curve of BEKI TPS IRMA kit.

Table 1 Recovery test of TPS added to serum samples measured by BEKI TPS IRMA kit

		Added TPS (U/L)					Mean recovery (%)
		0	23	75	313	1,225	
Serum A	Measured (U/L)	60	82	123	320	978	
	Recovered (U/L)		22	63	260	918	
	Recovery (%)		95.6	84.0	83.1	74.9	84.4
Serum B	Measured (U/L)	114	138	189	427	1,339	
	Recovered (U/L)		24	75	313	1,225	
	Recovery (%)		104.3	100.0	100.0	100.0	101.1
Serum C	Measured (U/L)	393	418	470	640	1,262	
	Recovered (U/L)		25	77	247	869	
	Recovery (%)		100.0	102.7	78.9	70.0	88.1

Mean total recovery = 91.2%

Table 2 Intraassay and interassay reproducibility of BEKI TPS IRMA kit

(1) Intraassay reproducibility

Sample	n	Mean (U/L)	S.D. (U/L)	C.V. (%)
A	5	225	11.8	5.3
B	5	481	28.3	5.9
C	5	1,146	48.6	4.2

(2) Interassay reproducibility

Sample	n	Mean (U/L)	S.D. (U/L)	C.V. (%)
A	5	256	21.6	8.4
B	5	552	50.5	9.1
C	5	1,028	81.9	8.0

健常人が含まれる範囲を求めたところ 71 U/L 以下と算出された。したがって本法のカットオフ値は 71 U/L と決定し、この値を基に評価すると健常人の 4 名 (5.2%) が偽陽性を示した。

2) 良性疾患

良性疾患患者 74 例における血中 TPS 値の測定結果を Fig. 5 に示す。74 例中 40 例 (54.1%) が測定感度以下を示し、残り 34 例 (45.9%) は 28 U/L から 1,168 U/L の範囲を示し、うち、24 例 (32.4%) が偽陽性であった。この偽陽性率を疾患別で見ると、慢性肝炎で 58.3% と最も高く、次いで急性肝炎と肝硬変が 50.0%，肺炎 33.3%，胃潰瘍と慢性膵炎が 22.2%，潰瘍性大腸炎 16.7%，急性膵炎と慢性胃炎はいずれも 0% であった。

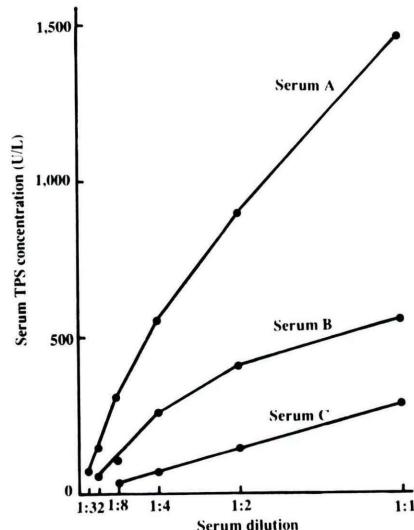


Fig. 4 Dilution curves of serum TPA measured by BEKI TPS IRMA kit.

3) 悪性疾患

悪性疾患患者 232 例の血中 TPS 値の測定結果を Fig. 6 に示す。232 例中 111 例 (47.8%) が測定感度以下を示し、残る 121 例 (52.2%) が 22 U/L から 2,166 U/L の範囲を示した。悪性疾患患者における陽性率は 232 例中 80 例 (34.5%) であった。これを疾患別で見ると、図のごとく原発性肝細胞癌で 80.8% と最も高く、次いで胆管癌 60.0%，乳癌 34.8%，大腸直腸癌 34.2%，肺癌 32.7%，卵巣

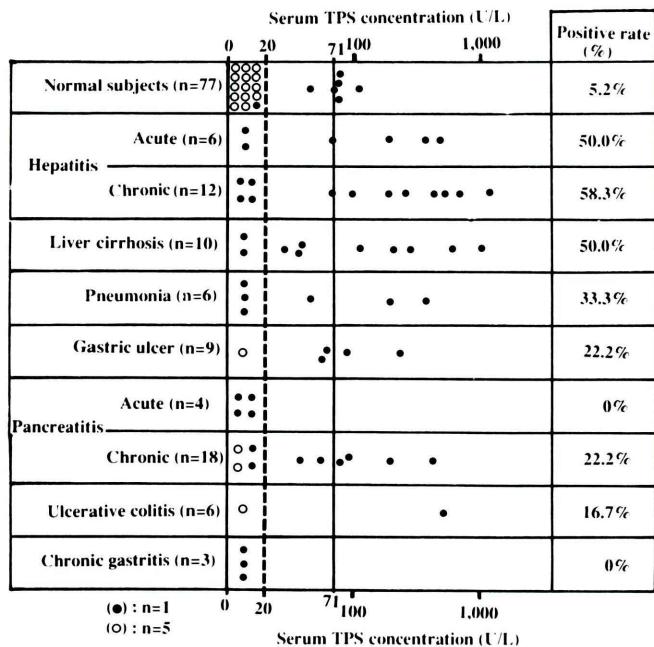


Fig. 5 Assay results of serum TPA concentrations in normal subjects and patients with benign diseases measured by BEKI TPS IRMA kit.

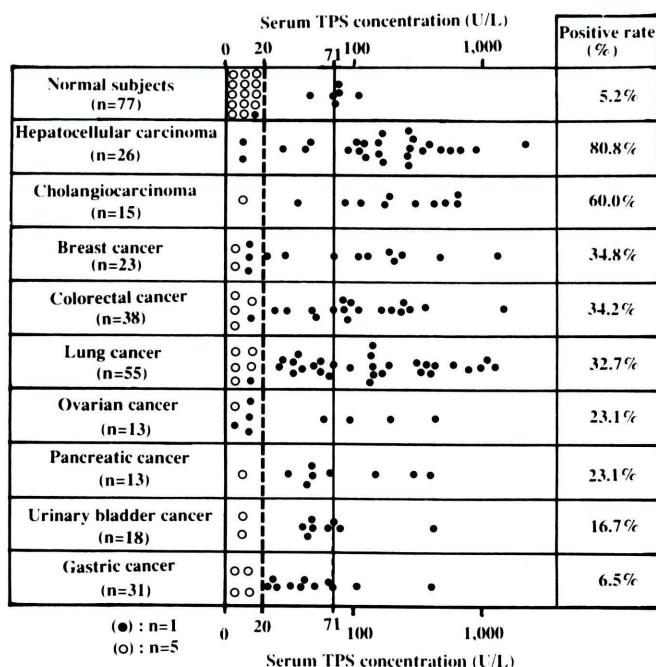


Fig. 6 Assay results of serum TPA concentrations in normal subjects and patients with malignant diseases measured by BEKI TPS IRMA kit.

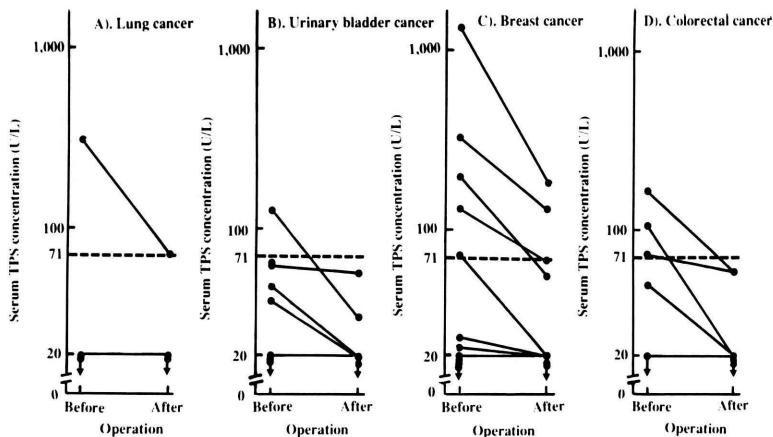


Fig. 7 Serum TPA level before and after surgical treatment in patients with malignant diseases measured by BEKI TPS IRMA kit.

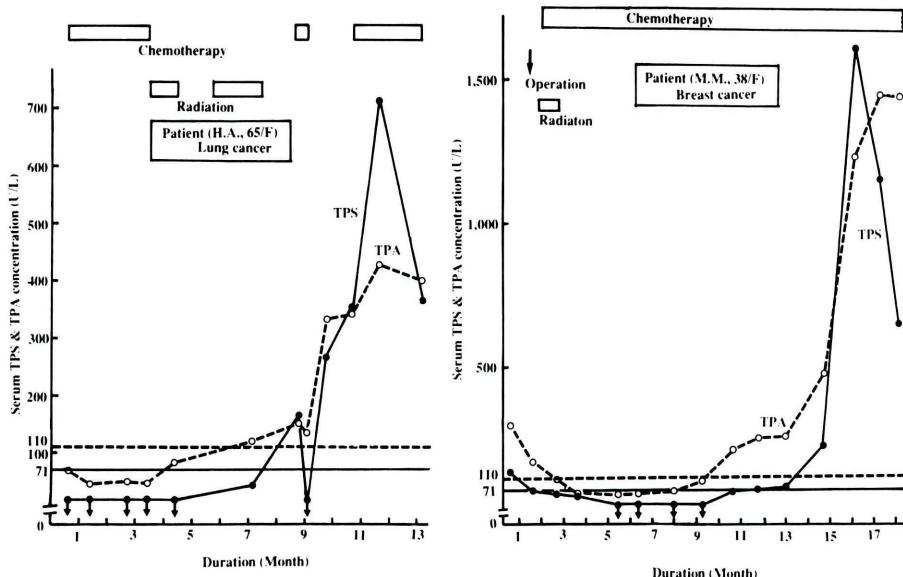


Fig. 8 Serum TPA level during the clinical course of patients with malignant diseases measured by BEKI TPS IRMA kit.

癌 23.1%，膀胱癌 23.1%，膀胱癌 16.7%，胃癌 6.5% の順であった。

4) 治療前後の TPS 値

治療前後の血中 TPS 値の比較を Fig. 7 に示す。図のごとく術前感度以上の測定値が得られた 17 例全例で術後血中 TPS 値は有意に減少した。また、術前血中 TPS 値が測定感度以下を示した 10

例全例で術後の血中 TPS 値も測定感度以下を示し、術後 TPS 値の低下が治療による特異的減少であることが確認できた。臨床経過を追えた 2 例での血中 TPS 値の変動を Fig. 8 に示す。血中 TPS 値は病態をよく反映し、病態の増悪とともに血中 TPS 値は増加し、死亡直前には減少する経過が示された。血中 TPS 値はほぼ血中 TPA 値と同様の

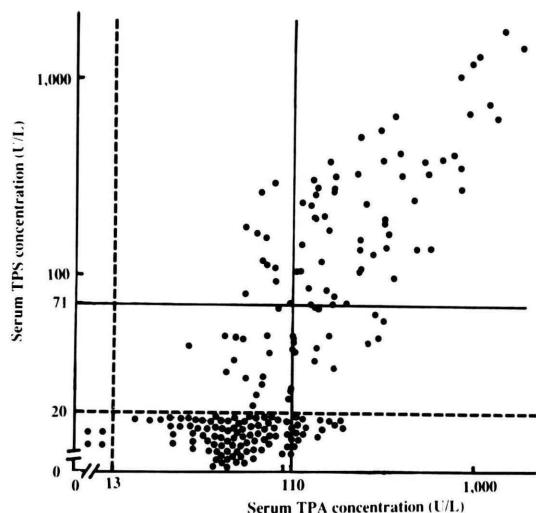


Fig. 9 Correlation of serum TPA concentrations between BEKI TPS IRMA kit and Prolifigen TPA kit "Daiichi" II.

変動を示したが、細部については若干異なり、特に死亡直前の変動に差が見られた。

5) TPA との比較

TPA 値との測定値の比較を Fig. 9 に示す。比較に用いた 200 例中両測定法でおのおのカットオフ値以上を示したのが 59 例 (29.5%), 両測定法で正常範囲を示したのが 17 例 (8.5%), 両測定法で測定感度以下であったのが 4 例 (2.0%) であった。結局、両測定法での評価が一致したのは 200 例中 80 例 (40.0%) であった。これに対し、本法でカットオフ値以上であったのに、TPA はカットオフ値以下を示したのが 12 例 (6.0%), 逆に TPA でカットオフ値以上を示したのに、本法ではカットオフ値以下を示したのが 28 例 (14.0%) あり、そのうち測定感度以下を示したのが 28 例中 15 例 (53.6%) もあった。一方、本法で測定感度以下であった例が 99 例 (49.5%) あったが、うち 4 例は前述のごとく TPA 測定法でも測定感度以下であったが、15 例 (15.2%) は TPA 測定法ではカットオフ値以上を、また、80 例 (80.8%) では正常範囲を示した。両測定法で測定感度以上の測定値が得られた 101 例を基に得られた測定値の相関を見たところ、両者は相関係数 $r=0.835$ ($p<$

0.01), $y=0.82x-0.91$ と良好な相関関係が認められた。

IV. 考 察

TPA は Björklund らにより、1957 年に多種類のヒト癌組織混合ホモジネートの不溶性分画から精製された抗原蛋白で、構造上サイトケラチンと類似の物質であると考えられている^{1~5)}。TPA はあらゆる上皮性腫瘍で産生される腫瘍マーカーで、臓器特異性はないものの他の腫瘍マーカーに比べて陽性率が高いことで知られている⁶⁾。しかし、良性疾患での偽陽性率も 36% と高いのが特徴である⁶⁾。また TPA は各種感染症の 20~36% で高値を示すが、その際の上昇は一過性である⁶⁾。TPA の測定法は、すでにわが国ではポリクローナル抗体を用いた 2-Step 法による IRMA が広く普及している。TPA は種々の分子量 (20~70 kD) をもつエピトープの混合物で TPA 濃度が高くなるにしたがって kD も大となる⁷⁾。 ^{125}I -TPA を用いた検討ではポリクローナル抗体は 35 のエピトープを有し、一方、モノクローナル抗体は 6 つのエピトープを有し、さらに抗体により反応に違いがある⁷⁾。この成績はポリクローナル抗体を用いた測定法では偽陽性率が高くなることが推測され、モノクローナル抗体の応用により比較的特異性が高い測定法の確立が期待される。今回、われわれが検討した BEKI TPS IRMA キットは、ポリクローナル抗体とモノクローナル抗体を用いた 1-Step 法による IRMA で、従来の測定法に比べて特異性を高めることを目的に開発された。今回の検討から本法は感度も 20 U/L と優れ、標準曲線も 0 U/L から 2,500 U/L までの広範囲で直線性を示す良好な標準曲線が得られた。本法は現在普及している TPA 測定法が 2-Step 法であるのに対し、本法は 1-Step 法で測定操作も現在用いられている TPA 測定法が First step に 4 時間、Second step に 17~20 時間必要であるのに対し、本法は全体で 2 時間と測定操作が著しく短縮できるのが特長である。インキュベーション条件もキット添付の指示通りで満足できる結果が得られ、

回収試験、再現性等の基礎的検討成績も満足できる結果であった。ただし、希釈試験では Fig. 4 に示したごとく、特に TPS 濃度が高い血清では原点に集束する直線性は得られなかった。これは TPA が種々の分子量を持つエピトープの混合物であるためと考えられ、事実現在臨床的に広く活用されている TPA 測定法でのわれわれの検討でも同様の結果が得られている⁸⁾。このことは現在の TPA または TPS 測定法は純粋に単一の物質を測定しているのではないことを示していると言える。臨床的検討では TPS は健常人の 92.2% で測定感度以下を示し、本法のカットオフ値 71 U/L を基に評価した健常人での偽陽性率は僅かに 5.2% であった。良性疾患における偽陽性率は 32.4% で、ほぼ TPA における報告と一致した^{6,8)}。これに対し、悪性疾患における陽性率は疾患別では原発性肝細胞癌の 80.8%，胆管癌の 60.0% 等高率であったが、癌全体では 34.1% と TPA 測定法に比べるとさして高率とは言えない成績であった。その理由は Fig. 9 で示したごとく、TPA 測定法でカットオフ値以上を示した 87 例中 TPS 測定法でもカットオフ値以上を示したのは 59 例 (67.8%) で、残る 28 例 (32.2%) は TPS 測定法ではカットオフ値以下であった。特にカットオフ値以下を示した 28 例中 15 検体 (53.6%) は TPS 測定法では測定感度以下であった。一方、TPS 測定法でカットオフ値以上を示した 71 例中 TPA 測定法ではカットオフ値以下を示すのが 12 例 (16.9%) あった。この成績は TPS と TPA は相関係数 $r=0.835$ ($p<0.01$) と良好な相関関係が認められることから、きわめて類似の物質を測定しているものの、測定系に用いられている抗体のエピトープの差から測定結果が若干異なるものと思われる⁷⁾。TPA が多種類のヒト癌組織混合ホモジネートの不溶性分画から精製した抗原蛋白であり、¹²⁵I-TPA を用いた検討結果⁷⁾と合わせ考える時、当然あり得ることのように思われる。問題は腫瘍マーカーとして臨床的に有用か否かだと思われるが、臨床的検討とりわけ Fig. 7 および 8 に示す治療経過の観察における TPS 測定法の評価から、

本法が臨床的に有用であることは明らかである。TPA の測定が癌の存在の指標としてではなく、癌の proliferative rate の指標として臨床的に有用であることが強調されている。特に Fig. 8 で示す臨床経過では、proliferative rate も落ちると推測される末期では TPS が減少することから、TPA 測定法よりも TPS 測定法の方がより病態を反映しているように思われ、TPA 測定法同様に臨床的意義があると結論された。今回の検討でも、癌における陽性率が良性疾患における偽陽性率とさして差がないことから、癌のスクリーニングに用いるには問題があり慎重でなければならないが、癌の診断が明らかな症例における治療経過の観察等のフォローアップではきわめて有用な測定法と思われた。

稿を終えるにあたり BEKI TPS IRMA キットの提供をいただいた日本メジフィジックス株式会社に謝意を表します。

文 献

- 1) Björklund B, Björklund V: Antigenicity of pooled human malignant and normal tissues by cytoimmunological technique: Presence of an insoluble, heat-labile tumor antigen. Int Arch Allergy **10**: 153-184, 1954
- 2) Björklund B, Lundblad G, 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) Redelius P, Lüning B, Björklund B: Chemical studies of tissue polypeptide antigen (TPA). II. Partial amino acid sequences of cyanogen bromide fragments of TPA subunit B1. Acta Chemica Scandinavica **B34**: 265-273, 1980
- 4) Lüning B, Wiklund B, Redelius P, Björklund B: Biochemical properties of tissue polypeptide antigen. Biochem Biophys Acta **624**: 90-101, 1980
- 5) Björklund B: Tissue polypeptide antigen (TPA): Biology, biochemistry, improved assay methodology, clinical significance in cancer and other condition and future outlook. Antibiotics Chemother **22**: 16-31, 1978
- 6) 渡辺直樹: Tissue polypeptide antigen (TPA). 漆崎一朗編, ライフ・サイエンス, 東京, 1987, pp. 30-32

- 7) Björklund KB, Björklund V, Brunkener M, Grönlund H, Back M: The enigma of a human tumor marker: TPA revisited, Cimino F, Birkmayer GD, Klavins JV, Pimentel E, Salvatore F(eds), Human tumor markers, Berlin, Walter de Gruyter & Co., 1987, pp. 169-180
- 8) 西川彰治, 末廣美津子, 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ならびに臨床的検討. 核医学 21: 91-100, 1984

Summary

Evaluation of BEKI TPS Radioassay Kit as a One-Step Immunoradiometric Assay Utilizes Monoclonal and Polyclonal Antibodies Specific for Serum Tissue Polypeptide Antigen

Akihiro HAMASE, Masahiro KAWANAKA, Hiroaki KITANI
and Minoru FUKUCHI

Department of Nuclear Medicine, Hyogo College of Medicine

We evaluated the usefulness of the BEKI TPS radioassay kit as a one-step immunoradiometric assay (IRMA) utilizes monoclonal and polyclonal antibodies specific for serum tissue polypeptide antigen (TPA). This IRMA was found to be highly sensitive to serum TPA; minimum detectable concentration of TPA was 20 U/L. There were no problems in the intraassay and interassay reproducibility and recovery test. However, dilution test of the patient's serum with higher TPA concentrations showed no linear relationship between TPA concentrations and diluted serum samples. The antigen measured by this IRMA was immunologically similar to TPA, and the TPS concentration was closely correlated ($r=0.835$, $p<0.01$) with the TPA concentration in 101 patient's serum.

Four out of 77 healthy subjects (5.2%) and 24 out of 74 patients with benign diseases (32.4%) showed a serum concentration over cut-off value of 71 U/L. The serum TPS concentration was elevated in 80 of 232 patients with malignant diseases (34.5%) including 21 of 26 with hepatocellular carcinoma (80.8%) and 9 of 15 with cholangiocarcinoma (60.0%). In addition, the serum TPA level during the clinical course of patients with malignant diseases was a very useful indicator for the effect of treatment. Thus, our findings suggested that BEKI TPS IRMA kit is a useful assay system for serum TPA as a tumor marker that can be performed by a simple assay operation within about 2 hours.

Key words: TPA, IRMA, TPS, Tumor marker.