

《ノート》

## Prolifigen® RIA キットによる血中 Tissue Polypeptide Antide (TPA) 濃度の測定：第1編 基礎的検討

Fundamental Studies of Measurement of Serum Tissue Polypeptide Antigen (TPA) Using TPA RIA Kit Prolifigen®

遠藤 啓吾\* 阪原 晴海\* 中島 言子\* 中島 鉄夫\*  
太田 仁八\* 鳥塚 莞爾\*

Keigo ENDO\*, Harumi SAKAHARA\*, Kotoko NAKAJIMA\*, Tetsuo NAKAJIMA,  
Hitoya OHTA\* and Kanji TORIZUKA\*

\*Department of Radiology and Nuclear Medicine, Kyoto University School of Medicine

### I. はじめに

RIA を用いて血中に微量に存在する“腫瘍マーカー”濃度の測定により、悪性腫瘍を診断することは長年におたる研究者の夢である。しかしいまなお腫瘍マーカーの測定のみで癌の診断ができる段階には至っていない。

現在最もよく研究され、臨床的に利用されている“腫瘍マーカー”は carcinoembryonic antigen (CEA) と alpha-fetoprotein (AFP) であるが、ともに悪性腫瘍のみに特異的なものではない<sup>1,2)</sup>。正常組織、例えば胎児組織より分泌されるし、炎症性疾患、例えば潰瘍性大腸炎 (CEA) や慢性肝炎 (AFP) では陽性になることが知られている。しかし CEA, AFP とも臨床的に悪性腫瘍の診療に当たって極めて有用であり、手術・放射線治療・化学療法後の効果判定には欠かせない検査の一つとなっている<sup>1,2)</sup>。同時にその限界も明らかになってきており、CEA, AFP とも悪性腫瘍、

特に手術可能な早期癌の発見にはそれ程有効ではない。また両者とも各種悪性腫瘍によりその抗原性に若干の差異があることが指摘されており、特に CEA では同一検体でもそれぞれの RIA キットで測定値に差異があり、用いる CEA 抗原、抗体の差異に起因すると考えられている<sup>3)</sup>。

CEA, AFP とは異なる新しい“腫瘍マーカー”として Tissue Polypeptide Antigen (TPA) が研究されており<sup>3,4)</sup>、最近 RIA を用いた血中・尿中 TPA 濃度の測定が、各種の悪性腫瘍の診断・経過観察に有用であると報告されている<sup>5-7)</sup>。今回 TPA 測定用 RIA キットを入手する機会を得たので、まずその基礎的検討結果について述べる。なお血中 TPA 測定の臨床的検討結果については第2編で報告する<sup>7)</sup>。

### II. 材料および方法

#### 1. 測定原理

各種癌組織より抽出、高度に精製した TPA を標識用 TPA をして用い、抗体としては HeLa 細胞でウマを免疫して作製した抗 HeLa 細胞抗血清を用いる。TPA の測定はまず測定試料あるいは

**Key words:** Tissue Polypeptide Antigen (TPA), tumor marker, HeLa cells.

\* 京都大学医学部核医学科, 放射線部

受付: 58年8月15日

最終稿受付: 58年11月17日

別刷請求先: 京都市左京区聖護院川原町54 (☎606)

京大医学部附属病院核医学科

遠藤 啓吾

標準 TPA と抗血清をインキュベート,  $^{125}\text{I}$ -TPA を遅れて添加する, “delayed addition 法” による RIA で, 二抗体法による B-F 分離により測定する。

## 2. 測定方法

特に指示がない場合は, 操作はすべて  $4^{\circ}\text{C}$  にて指示書<sup>9)</sup>を一部改変して行った. すなわち B-F 分離時に指示書のごとく洗浄液 1 ml を加えて遠心分離後, 沈査にもう一度洗浄液を添加して合計二回遠沈する方法から, 洗浄液 2 ml を加えて一回の遠心分離に操作を簡便化した. その概略は次の通りである.

- 1) 標準 TPA または被検血清 100  $\mu\text{l}$  を各試験管に入れる.
- 2) 抗血清を各 100  $\mu\text{l}$  ずつ入れ, 軽く振とう混和し, 24時間インキュベートする.
- 3) インキュベーション後,  $^{125}\text{I}$ -TPA を 100  $\mu\text{l}$  ずつ各試験管に加え, 振とう混和し, 24時間インキュベートする.
- 4) 第二抗体溶液を 100  $\mu\text{l}$  ずつ各試験管に加え, 振とう混和し, 2時間インキュベートする.
- 5) 洗浄液を 2 ml ずつ加え, よく振とう混和した後,  $2,000\times\text{g}$ , 30分間遠心分離を行う.
- 6) 上澄を吸引除去する.
- 7) 各試験管の放射能量を測定する.
- 8) コンピューターにより下式により各試験管の結合%を求め, 同時に双曲線近似により作成した標準曲線より未知検体の TPA 濃度を読みとる.

$$\text{B-N/Bo-N} (\%) = \frac{\text{各試験管の bound cpm} - \text{NSB cpm}}{\text{Bo cpm} - \text{NSB cpm}}$$

NSB: non-specific binding

## 3. 材 料

TPA 測定用 RIA キットは, AB Sangtec Medical 社 (Bromma, Sweden) で開発したものを第一ラジオアイソトープ研究所より提供をうけ, 検討に用いた. アッセイの特異性をみるための交叉反応試験には, これまで“腫瘍マーカー”として報告されている CEA・フェリチン・カルシトニンはいずれも第一ラジオアイソトープ研究所製のものを, AFP・ $\beta_2$ -ミクログロブリン・HCG はそれぞ

れミドリ十字・Phadebas, Sweden・帝国臓器社のものを用いた.

## III. 結 果

### 1. $^{125}\text{I}$ -TPA, TPA および抗体の性状について

$^{125}\text{I}$ -TPA, TPA 標準品の Sephadex G-150 (1.6 $\times$ 90 cm) カラムクロマトグラフィでは, Fig.1 のごとく,  $^{125}\text{I}$ -TPA の放射能および RIA で測定した TPA 標準品とも最初のピークに溶出された. 両者は分子量30万以上の形で存在しているものと考えられる. 一方アッセイに用いている抗血清の性状の検討は培養ヒト癌細胞細胞 (HeLa S-3) を用いて検討した. すなわち, よく洗浄した HeLa 細胞と抗血清を室温にして24時間インキュベート, 遠沈後その上清分画を  $^{125}\text{I}$ -TPA とインキュベートしたところ, 抗体活性は消失し,  $^{125}\text{I}$ -TPA との結合性はほとんど認められなくなった (Fig. 2).

さらに $^{125}\text{I}$ -TPA, 抗血清, HeLa 細胞抽出物の三者を混和すると  $^{125}\text{I}$ -TPA の抗体への結合がほぼ完全に阻害されることと考えあわせ, TPA は HeLa 細胞に含まれる抗原の一部ではないかと解釈された.

### 2. RIA による測定方法について

血中 TPA 濃度測定に要する時間の短縮, 操作

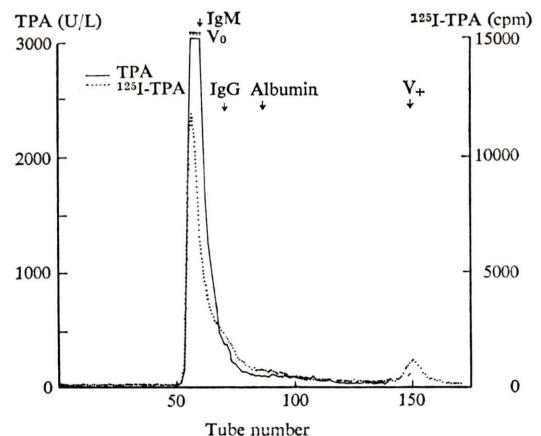


Fig. 1 Sephadex G-150 column chromatography (1.6 $\times$ 90 cm) of TPA (—) and  $^{125}\text{I}$ -labeled TPA (.....). TPA concentration of each tube was measured by RIA and both TPA and  $^{125}\text{I}$  TPA were eluted at the first peak.

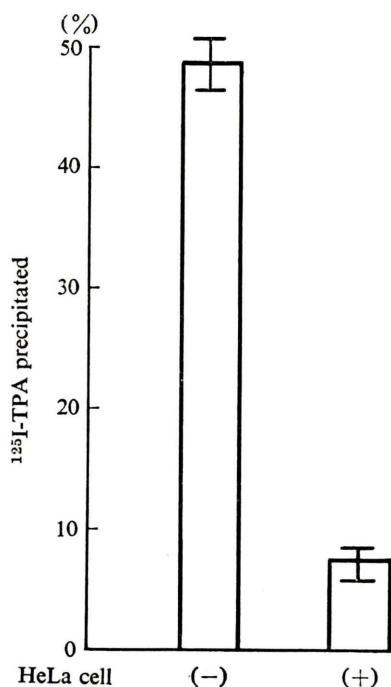


Fig. 2 Effect of preincubation of antibodies with HeLa S-3 cells on its  $^{125}\text{I}$ -TPA binding activity. Antibodies were preincubated with or without HeLa S-3 cells for 24 hrs at 25°C. After centrifuge, supernatant was incubated with  $^{125}\text{I}$ -TPA for 48 hrs at 4°C and then antibody-bound  $^{125}\text{I}$ -TPA was precipitated by the addition of the 2nd antibody.

の簡略化を主な目的として種々の検討を行った。本法は  $^{125}\text{I}$ -TPA を遅れて添加する“delayed addition 法”によるアッセイ<sup>8)</sup>なので、測定試料・抗血清・ $^{125}\text{I}$ -TPA の同時添加が可能かどうか試みた。Fig. 3 に示すごとく同時添加法では“delayed addition 法”に比べ、TPA 測定の感度が著しく低下する。すなわち  $^{125}\text{I}$ -TPA の抗体への結合が、TPA 非添加時の 50% になるような TPA 濃度 (B50 値) は通常の“delayed addition 法”の場合の 250 U/L から同時添加法では 700~1,000 U/L と著しく増加した。しかも同時添加法ではインキュベーション時間を 24~72 時間まで延長してもその測定感度に改善は認められなかった。そこで TPA の測定感度を鋭敏にする目的で抗血清

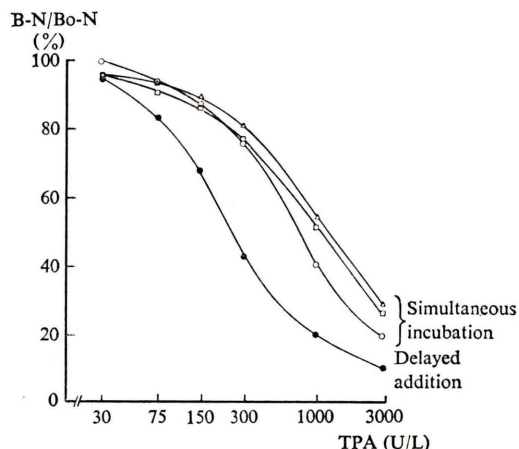


Fig. 3 Comparison of simultaneous and delayed addition of  $^{125}\text{I}$ -labeled TPA.  $^{125}\text{I}$ -TPA, TPA and antibodies were incubated simultaneously for 24 hrs ( $\Delta$ ), 48 hrs ( $\circ$ ) and 72 hrs ( $\square$ ). Standard curves were compared with the original delayed addition method, where TPA and antibodies were preincubated and after 24 hrs,  $^{125}\text{I}$ -TPA was added.

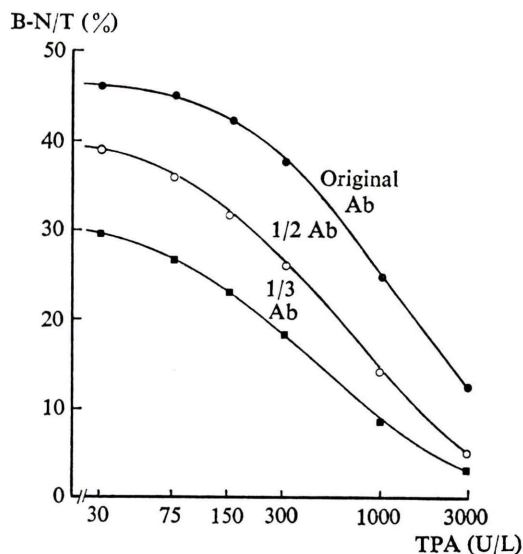


Fig. 4 Effect of antibody concentrations on the RIA of TPA.

をさらに希釈して、抗体濃度を 1/2, 1/3 とするることによりその感度を高めることを試みた。しかし、Fig. 4 に示すごとく抗体濃度を希釈すると  $^{125}\text{I}$ -TPA の抗体への結合率 (B-N/T) は低下するが、測定感度の改善はそれ程認められず、後に述べるように正常人の血中 TPA 濃度が 100 U/L 以下であるため、“delayed addition 法”を同時添加法に変更してアッセイを簡略化することができなかった。ついで B-F 分離時、第二抗体を添加後の沈渣の洗浄の必要性の有無を検討した。B-F 分離時に指示書<sup>8)</sup>のごとく洗浄液 1 ml を加えて遠心分離後、沈渣にもう一度洗浄液 1 ml を添加して合計 2 回遠沈する方法と、洗浄液を 2 ml 加えて 1 回の遠心分離により操作を省略して測定する方法を比較した。両者の間に、標準曲線、コントロール血清の測定値とも有意の差は認められなかったため操作を簡便化して、1 回の遠沈法により B-F 分離を行った。

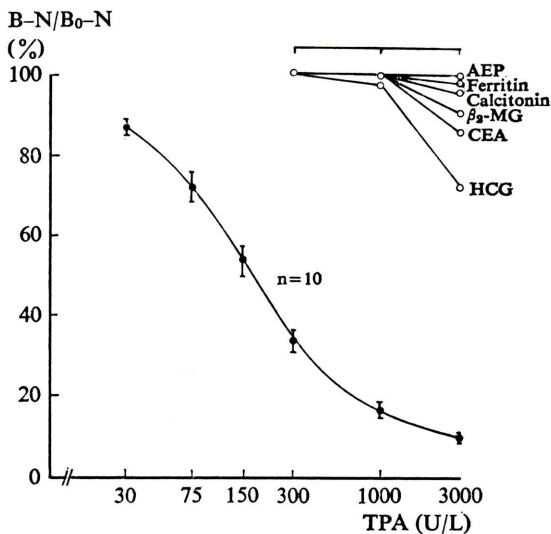


Fig. 5 Reproducibility of TPA standard curves and the effect of high concentrations of CEA, AFP, Ferritin, HCG, Calcitonin and  $\beta_2$ -microglobulin. The highest concentrations used are CEA: 0.6  $\mu\text{g/ml}$ , AFP: 1  $\mu\text{g/ml}$ , Ferritin: 0.8  $\mu\text{g/ml}$ , HCG: 500 U/ml, Calcitonin: 6.4 ng/ml, and  $\beta_2$ -microglobulin: 1  $\mu\text{g/ml}$ , respectively. Each assay was performed at 3 different concentrations.

### 3. 血中 TPA 濃度測定 of 感度・精度および特異性について

TPA の RIA の標準曲線の再現性を Fig. 5 に示すが、標準曲線の再現性は良好で、各 TPA 濃度での結合率 (B-N/Bo-N) の標準偏差はいずれも数%以内で、B 50 値はいずれも 250~300 U/L の間に分布した。アッセイの特異性を検討するためこれまで“腫瘍マーカー”として報告されている CEA・AFP・フェリチン・カルシトニン・ $\beta_2$ -ミクログロブリン・HCG との交叉試験を行ったが、大量の HCG により  $^{125}\text{I}$ -TPA の抗体への結合が若干阻害される以外に、他の“腫瘍マーカー”との間に交叉反応は認められなかった。なお用いた HCG は粗抽出品で、高度に精製された HCG に関しては検討していない。

同一アッセイ内、異なるロットのアッセイ間における 10 回の測定値の再現性は良好で (Table 1), 回収率も平均 97.3% である (Table 2). 高 TPA 値を示す検体を希釈した場合の希釈曲線も、ほぼ原点を通る直線となり、満足すべきものであった (Fig. 6).

採血、血清分離後の血清を 25°C で 48 時間まで

Table 1 Reproducibility of TPA assays

Intra-assay variation n=10			Inter-assay variation n=10		
Mean U/L	SD U/L	CV %	Mean U/L	SD U/L	CV %
90.7	2.7	3.1	33.7	2.0	6.3
113.3	6.5	6.0	88.6	5.6	6.6
367.5	15.2	4.4	296.0	18.5	6.6

Table 2 Recovery test of additional TPA in serum

Added U/L	Measured U/L	Recovery rate %
—	58	—
37.5	90	85.3
75	123	86.7
150	213	103.3
500	600	108.4
1,500	1,600	102.8
Mean		97.3%

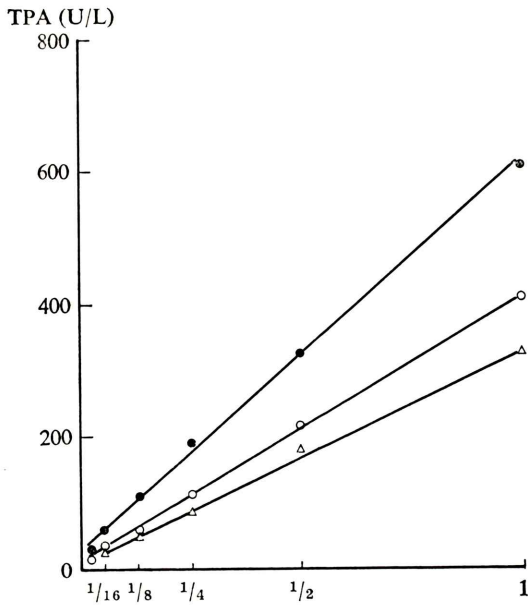


Fig. 6 Dilution curve of 3 different sera with high TPA values.

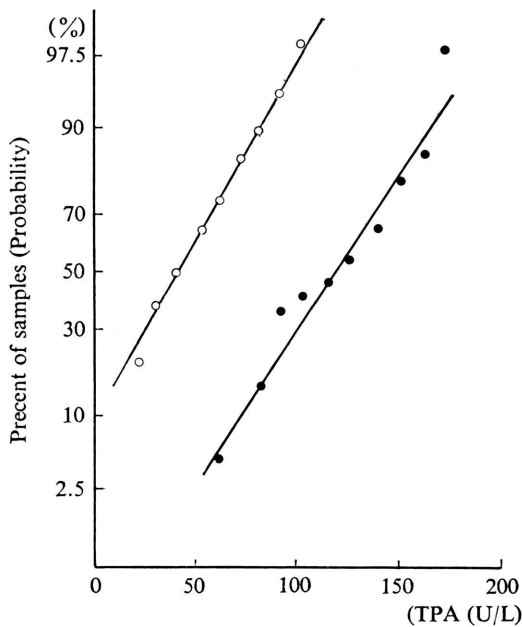


Fig. 7 Cumulative frequency distribution of serum TPA values from 83 normal controls (○) and 30 pregnant women (●).

Table 3 Effect of time and temperature of preservation on serum TPA values

Temperature	time hours	Serum sample		
		A U/L	B U/L	C U/L
4°C	0	92	300	800
4°C	24	94	320	860
4°C	48	92	340	830
25°C	0	92	300	800
25°C	24	91	320	840
25°C	48	93	300	850
37°C	0	92	300	800
37°C	24	95	270	580
56°C	0	92	300	800
56°C	0.5	130	290	440

Table 4 Effect of freeze and thawing of serum samples on TPA values

Number of freeze and thawing	Serum sample		
	A U/L	B U/L	C U/L
1	95	300	820
2	100	310	780
3	98	300	760
4	84	310	720
5	80	300	760

放置していても測定値にはほとんど影響を及ぼさない。しかし、TPA は比較的溫度に敏感で 37°C・24時間、56°C・30分間などの高温下に放置すると測定値が低くなることがあり (Table 3)、血清の凍結・融解をくり返した場合には TPA 値が若干低下する傾向が認められた (Table 4)。なおへパリン採血した血漿を用いても、血清の場合とほぼ同一の測定値が得られる。

#### 4. 健常人における血中 TPA 濃度について (Fig. 7)

本キットによる健常人83例の血中 TPA 濃度は  $52.3 \pm 24.4$  U/L であった (以下いずれも平均±標準偏差)。そのうち男子41例 (9~74歳, 平均36.8歳), 女子42例 (20~82歳, 平均49.4歳) の血中 TPA 濃度はそれぞれ 20~95U/L, 10~90 U/L の間に分布し, 男子で  $56.0 \pm 23.9$  U/L, 女子で  $49.4 \pm 24.6$  U/L と男子でやや高値であるが, 両者の

間に有意差は認められなかった。平均値+2倍の標準偏差をとれば男子では103.8 U/L, 女子では97.6 U/L となり, 100 U/L を正常上限値と設定した。なお20~60歳台の間では加齢による TPA 値の変動は認められなかった。

HCG の添加により  $^{125}\text{I}$ -TPA の抗体への結合が阻害されるため, 血中 HCG が生理的に高値となる妊娠中の女性30例の血中 TPA 濃度を測定した。血中 TPA 濃度は 55~170 U/L の間に幅広く分布し, 平均  $111.8 \pm 35.3$  U/L と非妊娠女性に比べ高値を示す例が多かった。

#### IV. 考 察

TPA は, Björklund らにより, 悪性腫瘍組織・胎盤より抽出, 精製されたものである<sup>3)</sup>。分子量 43,000, 30,000, 17,000 の3つの fragment よりなる蛋白質で, CEA・AFP と異なり糖成分は含まない<sup>3,4)</sup>。Fig. 1 で示すごとくカラムクロマトグラフィで最初のピークに溶出されることより TPA,  $^{125}\text{I}$ -TPA とも凝集して大分子となって存在しているものと考えられる。これまで TPA は赤血球凝集反応により測定されていたが, 今回の測定は RIA によるもので, 血中 TPA 濃度を測定する場合には RIA の感度・精度ともほぼ満足するものであった。赤血球凝集反応と RIA 法による測定法を比較検討していないが, RIA を用いることにより血中 TPA 濃度測定の感度・精度とも著しく改善されたものと思われる。

本法は  $^{125}\text{I}$ -TPA を遅れて添加する delayed addition 法により感度を上げているが, 操作を簡便化することを目的として測定試料・抗血清と  $^{125}\text{I}$ -TPA を同時に混合・インキュベートすることを試みた。しかし同時添加法では delayed addition 法の場合に比べ感度が低く, 正常値と異常値の判定が困難であり, 抗血清の希釈などにより感度の上昇を試みても感度の低下を補うことができなかった。RIA では, delayed addition 法により測定感度が上昇することがあるということが知られているが, その正確な機序は不明である。元来 RIA は抗原-抗体反応を利用したもので, 本

アッセイ系でも理論的には  $^{125}\text{I}$ -TPA・TPA・抗血清を長時間インキュベートすれば三者は平衡に達し, 同時添加法と delayed addition 法の間で TPA 測定感度が同じになるはずである。しかし市原らの  $\text{T}_3$ , インスリン, TSH, AFP など二抗体法による RIA の検討でも抗原分子が大きくなる程, 抗原-抗体反応が平衡状態に達するのに長時間を要するという<sup>9)</sup>。本アッセイで同時添加法で感度が著しく低かったのは,  $^{125}\text{I}$ -TPA, TPA とともに述べたごとく, 少なくともアッセイ中には巨大な分子を形成しており,  $^{125}\text{I}$ -TPA・TPA・抗体が平衡に達するためには極めて長時間のインキュベーションが必要なことに起因すると思われる。

本法では抗血清として代表的な培養ヒト癌細胞である HeLa 細胞を免疫して得られた抗 HeLa 抗血清を用いており, 実際 HeLa 細胞と混和することにより抗体活性はほぼ完全に失活した (Fig. 2)。HeLa 細胞の抗原特異性に関しては不明であるが, TPA は少なくとも HeLa 細胞に存在する一部分を抗原として利用しているものと解釈される。本アッセイ系では標識用抗原として高度に精製した TPA を用いており従来の“腫瘍マーカー” CEA・AFP・フェリチン・カルシトニン・ $\beta_2$ -ミクログロブリンとは明らかな交叉反応は認められなかった。ただ大量の HCG の添加では  $^{125}\text{I}$ -TPA の抗血清への結合が若干阻害されること, 妊婦では健康人に比べ TPA が高値の例が多いことなど, TPA と胎盤・胎児組織が深い関係にあることを示唆する所見である。CEA・AFP などでも正常な胎児性抗原が癌組織によっても作られ, 胎児組織と癌細胞の間に共通した抗原・遺伝子が存在すると考えられており<sup>1,2)</sup>, TPA も同様であると解釈すべきかもしれない。TPA のアミノ酸構造の一部は報告されているが<sup>4)</sup>, TPA の役割, その生物学的作用はなお明らかではなく, 解明すべき多くの事が残されている。なお本法を用いて測定した血中 TPA 濃度の各種悪性疾患における臨床的意義に関しては第二編で述べる<sup>7)</sup>。

## V. まとめ

新しい“腫瘍マーカー”TPA 測定用の RIA キットの基礎的検討を行った。

1)  $^{125}\text{I}$ -TPA, TPA とも Sephadex G-150 カラムクロマトグラフィにて最初のピークに溶出され、大きな分子の形で存在していると思われる。また抗血清は HeLa 細胞との混和により抗体活性が吸収され、失活した。

2) 血中 TPA 濃度測定の RIA の感度・精度とも満足すべきもので、他の“腫瘍マーカー”CEA・AFP・フェリチン・カルシトニン・ $\beta_2$ -ミクログロブリンとは交叉反応を認めなかった。

3) 健常人における血中 TPA 濃度の平均±標準偏差は男子  $56.0 \pm 23.9$  U/L, 女子  $49.4 \pm 24.6$  U/L であった。ただ HCG では若干の交叉反応が認められ、妊婦では血中 TPA 濃度がやや高値であった。

## 文 献

1) 大倉久直：癌胎児性抗原。(CEA). 日本臨床 **38**: 1403-1413, 1980

- 2) 石井 勝： $\alpha$ -feto protein (AFP). 日本臨床 **38**: 1387-1396, 1980
- 3) Bjöklund B, Bjöklund 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
- 4) Lünig B, Wiklund B, Redelius P, et al: Biochemical properties of tissue polypeptide antigen. *Biochem Biophys Acta* **624**: 90-101, 1980
- 5) Edgington T S, Nakamura R M: Breast cancer markers. in Sell S, Wahren B eds. *Human cancer markers*. Human Press, Clifton, New Jersey, pp. 191-232, 1982
- 6) 高橋 弘, 嵐山恭志, 西山正照：悪性腫瘍患者における Tissue Polypeptide Antigen (TPA) の臨床的有用性に関する検討：各種腫瘍マーカーとの比較。日本消化器病学会雑誌 **80**: (臨時増刊号) 601, 1983
- 7) 阪原晴海, 遠藤啓吾, 中島言子, 他：Prolifigen® RIA キットによる血中 Tissue Polypeptide Antigen (TPA) 濃度の測定：第2編, 消化器系悪性腫瘍患者における臨床的検討。核医学 **21**: 83-89, 1984
- 8) Prolifigen® Radioimmunoassay kit for determination of tissue polypeptide antigen (TPA) manual
- 9) Ichihara K, Yamamoto T, Azukizawa H, et al: Kinetic aspect of the antigen-antibody reaction in various radioimmunoassays: Effect of delayed addition of labeled or unlabeled antigens on sensitivity of assay. *Clin Chim Acta* **98**: 87-101, 1979