

《ノート》

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

Fundamental and Clinical Evaluation of Radioimmunoassay
for Tissue Polypeptide Antigen (TPA)

西川 彰治* 末廣美津子* 石村 順治* 福地 稔*

Akiharu NISHIKAWA*, Mitsuko SUEHIRO*, Junji ISHIMURA*
and Minoru FUKUCHI*

*Division of Nuclear Medicine, RI Center, Hyogo College of Medicine, Nishinomiya, Hyogo

I. はじめに

Tissue Polypeptide Antigen (以下 TPA と略) は、腫瘍関連抗原の一つとして、近年注目されつつある。TPA 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るようになり今日に至っている⁵⁾。TPA は、腫瘍の起源やそのタイプと関係なく、種々の悪性腫瘍に広く関連する抗原であると同時に、胎盤や胎児にも存在することが知られている⁶⁾。

今回、われわれは、TPA の radioimmunoassay (以下 RIA と略) につき、その測定法としての基礎的検討を行うとともに、各種腫瘍患者を含む疾患群に対し、実際の臨床応用を行ったので、その成績につき報告する。

II. 方法および対象

検討には、TPA の RIA kit である Prolifigen® を用い、実際の測定手順は Table 1 に示すごと

く行った。

1. 基礎的検討

異なる 6 回の測定で得られた標準曲線を平均士標準偏差で求め、その再現性および最低感度をみた。

インキュベーション時間、およびインキュベー

Table 1 Assay procedure of TPA radioimmunoassay

(1) TPA standards or assay samples	0.1 ml
(2) Anti-TPA antibody solution (Anti-HeLa horse serum)	0.1 ml
	↓	Mix and incubate for 17 hours at 4°C (Preincubation)
(3) I-125-TPA solution	0.1 ml
	↓	Mix and incubate for 24 hours at 4°C (First incubation)
(4) Precipitating antibody (Anti-horse IgG rabbit serum)	0.1 ml
	↓	Mix and incubate for 2 hours at 4°C (Second incubation)
(5) Wash fluid (2.3% PEG-6000 in 0.013 M Phosphate, 0.14 M NaCl, pH7.5)	1.0 ml
	↓	Mix and centrifuge at 2,000 g for 30 min at 4°C
(6) Aspirate the 1.2 ml of supernatant		
(7) Wash fluid (2.3% PEG-6000 in 0.013 M Phosphate, 0.14 M NaCl, pH7.5)	1.0 ml
	↓	Mix and centrifuge at 2,000 g for 30 min at 4°C
(8) Aspirate the 1.0 ml of supernatant		
(9) Count and calculate the assay results		

Key words: radioimmunoassay, tissue polypeptide antigen (TPA), tumor marker.

* 兵庫医科大学病院 RI センター診療部

受付: 58 年 7 月 18 日

最終稿受付: 58 年 11 月 21 日

別刷請求先: 西宮市武庫川町 1-1 (〒 663)

兵庫医科大学病院 RI センター診療部
福地 稔

ション温度が本測定系に与える影響につき比較検討した。すなわち、インキュベーション時間を、Preincubation 時間を 3, 6, 17, 24 時間と、first incubation 時間を 6, 18, 24, 48, 71 時間と、また second incubation 時間を 1, 2, 3 時間とおのおの変えた際のそれぞれの標準曲線につき比較した。一方、インキュベーション温度についても Preincubation 温度、first incubation 温度、および second incubation 温度をいずれもおのおのの 4°C, 25°C, および 37°C と変えた際のそれぞれの標準曲線についても比較した。

同一測定内 ($n=5$) における再現性につき、濃度の異なる A, B, C の 3 種類の血清試料を用い検討した。また、異なる 5 回の測定間における再現性についても、濃度の異なる D, E, F の 3 種類の血清試料を用い検討した。

血清試料に濃度の異なる 5 種類の標準 TPA を添加した際の回収率を検討した。

血中 TPA 濃度が比較的高値を示す A, B, C の 3 種類の患者血清を 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 と段階的に希釈して希釈試験を行った。

本測定系の特異性をみる目的で、Carcinoembryonic antigen (以下 CEA と略)、 α -Fetoprotein (以下 AFP と略)、elastase I、Ferritin、 β_2 -microglobulin (以下 BMG と略)、human chorionic gonadotropin (以下 hCG と略)、human placental lactogen (以下 hPL と略) をおのおの本測定系に添加した際の影響の有無とその程度を検討した。

2. 臨床的検討

本測定法における正常値をみる目的で、健常人 68 名の血中 TPA 値を測定した。これら健常人 68 名は男子 49 名、女子 19 名で年齢は 20 歳から 56 歳の間に分布し平均 29 歳であった。

実際の臨床応用として、診断が確定した各種悪性疾患患者と各種良性疾患患者の血中 TPA 値を本測定法で測定し、健常人のそれと比較した。これら疾患の内訳は、悪性疾患群では食道癌 6 例、胃癌 16 例、結腸および直腸癌 33 例、原発性肝細胞癌 48 例、胆のう癌 8 例、脾癌 16 例、肺癌 20 例、甲状腺癌 17 例、子宮癌 8 例、卵巣癌 10 例、乳癌 8 例、

膀胱癌 5 例、前立腺癌 5 例、睾丸癌 4 例、悪性リンパ腫 2 例、急性骨髓性白血病 5 例、および慢性骨髓性白血病 4 例の計 215 例であった。一方、良性疾患群の内訳は、急性肝炎 12 例、慢性肝炎 20 例、肝硬変 14 例、慢性胃炎 14 例、胃潰瘍 10 例、十二指腸潰瘍 9 例、胃・十二指腸潰瘍 7 例、肺炎 3 例、糖尿病 23 例、慢性腎不全 22 例、鉄欠乏性貧血 12 例、および再生不良性貧血 4 例の計 150 例であった。

なお、妊婦 13 名についても本測定法でその血中 TPA 値を測定した。

一方、脾臓癌 1 例、S 字状結腸癌 1 例、原発性肝細胞癌 3 例の計 5 例については、その臨床経過中の血中 TPA 値を経時的に測定し、CEA あるいは AFP 値の変動と比較観察した。

また、今回、本測定法で血中 TPA 値を測定した症例のうち、同時に血中 CEA 値を測定した 142 例と血中 AFP 値を測定した 78 例については、得られたおのおのの値を血中 TPA 値と比較した。

III. 成 績

1. 基礎的検討成績

異なる 6 回の測定で得られた標準曲線を各濃度の Bound の cpm/0 濃度の Bound の cpm % (以下 B/Bo % と略) で表示し、その平均 \pm 標準偏差で求めたところ Fig. 1 のごとき結果が得られた。Fig. 1 でも明らかなごとく比較的再現性のよい標

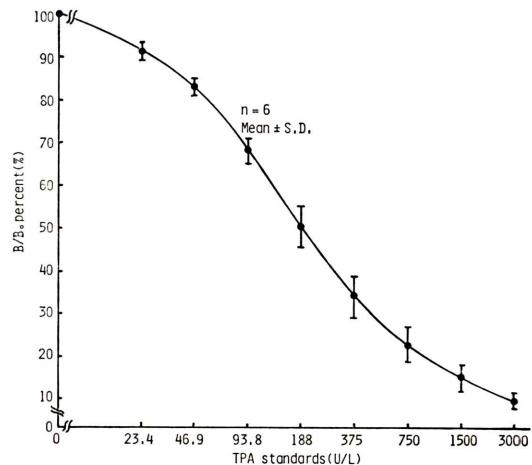


Fig. 1 Standard curve of TPA radioimmunoassay.

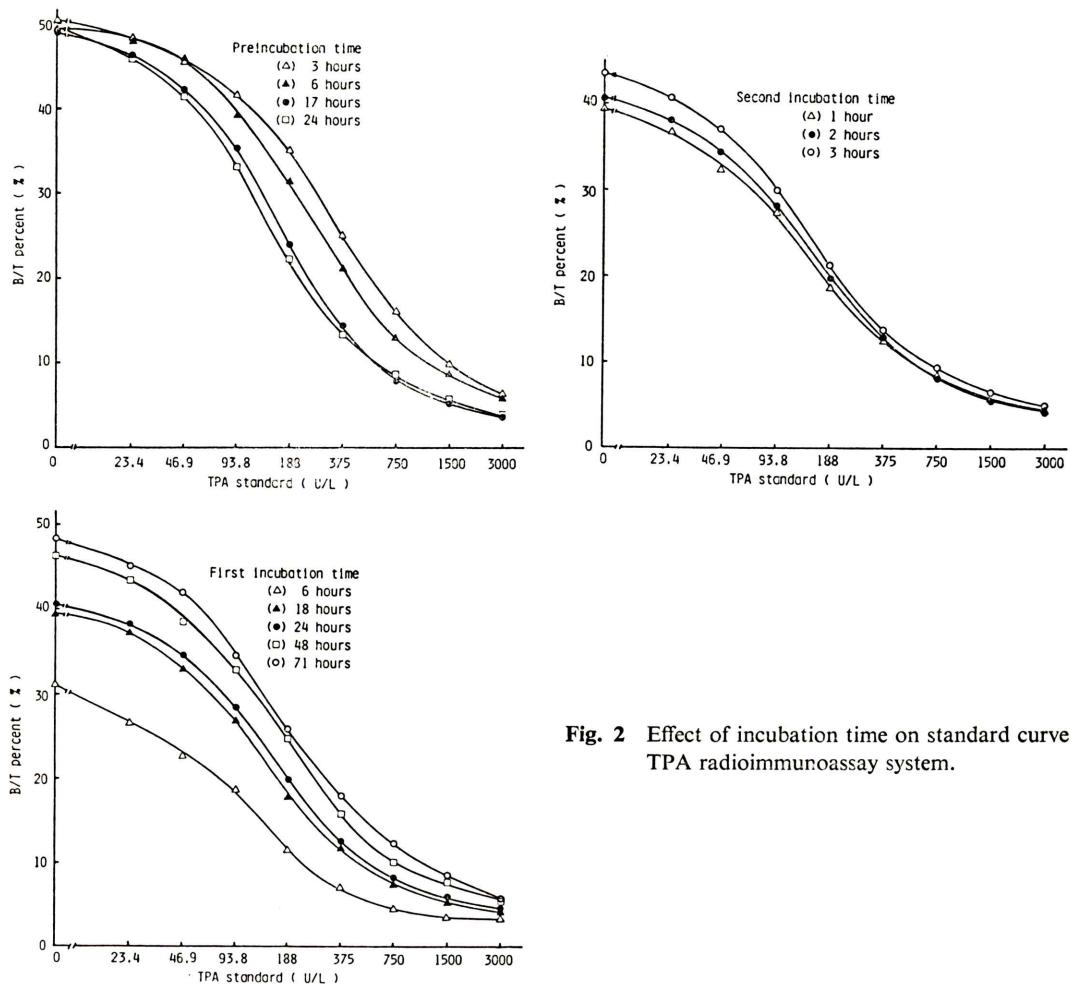


Fig. 2 Effect of incubation time on standard curve of TPA radioimmunoassay system.

準曲線が得られた。感度についてみると TPA 0 濃度の Bound のカウントの平均に対するおのおのの Bound のカウントの比、すなわち%は、平均±標準偏差(以下 S.D. と略)が $100.0 \pm 1.58\%$ ($n=6$) となり、 $-2 S.D.$ を最小測定感度とすると 13 U/L 、 $-3 S.D.$ を最小測定感度とすると 16 U/L まで測定が可能との成績であった。

インキュベーション時間が本測定系の標準曲線に与える影響につき $B/Bo\%$ よりその差異をより明瞭に指摘できる Bound の cpm/Total の cpm % (以下 B/T %と略) を指標に検討しその成績を Fig. 2 で一括した。Fig. 2 でも明らかなるとく、Preincubation time では24時間で最も急峻で、安

定した標準曲線が得られ、17時間でも、ほぼ同様な標準曲線であり、24時間との間に差は認められなかった。First incubation time に関する検討では、48時間、71時間と反応時間が長くなるにつれて B/T % が高くなる成績であったが、24時間と18時間の間には有意差はなく、ただ6時間では B/T % の著しい低下が認められた。Second incubation time に関する検討では、反応時間が長くなるにつれ B/T % が若干高くなる成績であったが、検討した時間の間では有意な差とはいえない成績であった。

インキュベーション温度が本測定系の標準曲線に与える影響につき、インキュベーション時間の

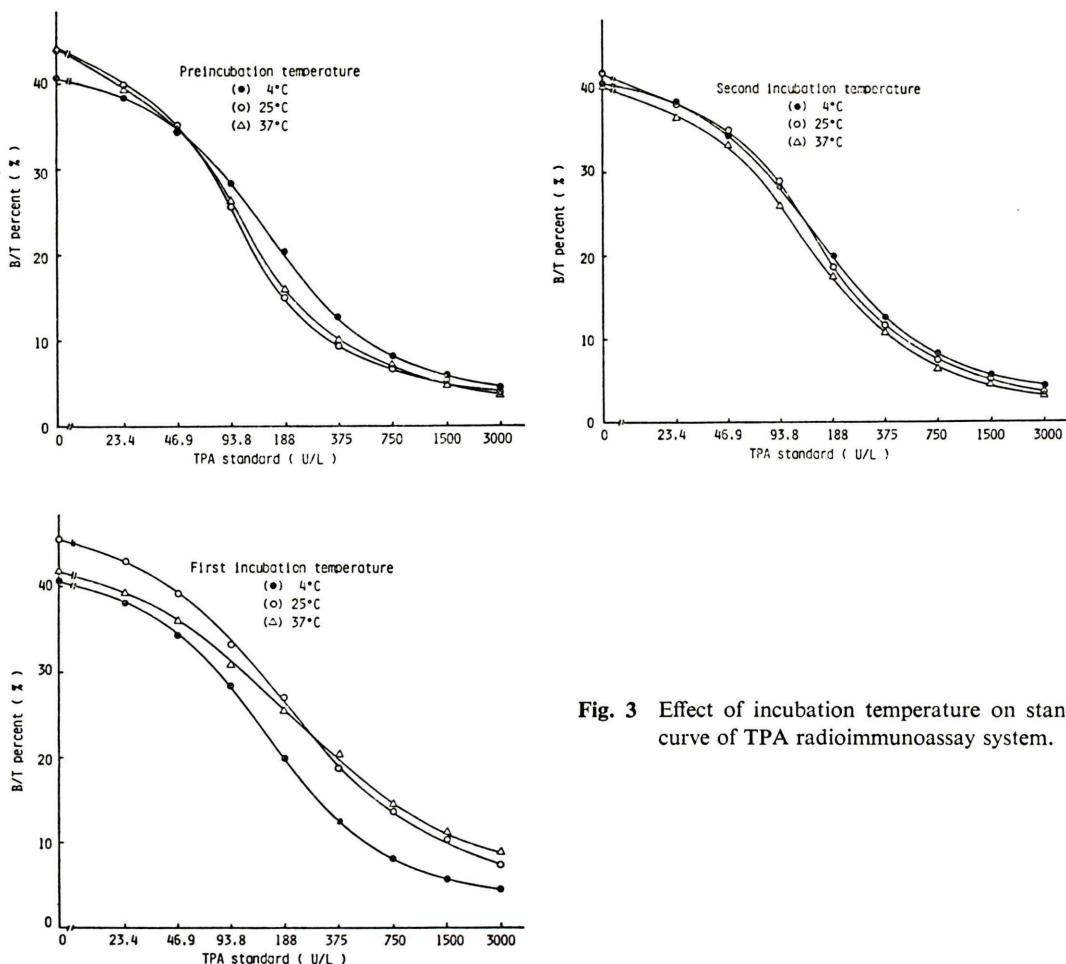


Fig. 3 Effect of incubation temperature on standard curve of TPA radioimmunoassay system.

検討同様 B/T % を指標に検討し、その成績を Fig. 3 で一括した。Fig. 3 でも明らかなごとく Preincubation, First incubation および Second incubation ともに 4°C で十分再現性の良い標準曲線が得られた。

同一測定内 ($n=5$) および異なる 5 回の測定間における再現性を、おのおの濃度の異なる 3 種類の血清試料を用い検討し、その成績を Table 2 で一括した。Table 2 でも明らかなごとく、同一測定内における再現性は C.V. が 8.3%, 5.6%, 5.9% であった。一方、異なる 5 回の測定間における再現性は C.V. が 7.4%, 11.0%, 6.6% であった。

2 種類の血清試料におのおの濃度の異なる 5 種

類の標準 TPA を添加し、その回収率をおのおの求めたところ、Table 3 に示す結果が得られた。すなわち、血清試料 A での回収率は 89.6% から 107.7% の範囲を示し平均 99.6%，また血清試料 B での回収率は 87.4% から 112.5% の範囲を示し平均 99.7%，そして全体の平均回収率は 99.6% との成績であった。

血中 TPA 濃度が比較的高値を示す 3 種類の血清試料を用い希釈試験を行ったところ、Fig. 4 のごとき結果を得た。Fig. 4 でも明らかなごとく、いずれもほぼ直線性を示す希釈曲線が得られたが、原点を通る直線は得られなかった。

本測定系の特異性を検討した結果を Fig. 5 で

Table 2 Intraassay and interassay reproducibility of TPA radioimmunoassay

(1) Intraassay reproducibility

	Assay results (U/L)							C.V.* (%)
	1	2	3	4	5	Mean	S.D.	
Serum A	74.8	78.8	67.5	65.4	66.5	70.6	5.9	8.3
Serum B	176	167	161	166	151	164	9.1	5.6
Serum C	688	741	721	790	788	746	43.9	5.9

(*): Coefficient of variation

(2) Interassay reproducibility

	Assay results (U/L)							C.V.* (%)
	1	2	3	4	5	Mean	S.D.	
Serum D	70.0	70.6	83.7	74.4	76.4	75.0	5.5	7.4
Serum E	189	191	161	145	165	172	19.0	11.0
Serum F	777	746	799	674	783	756	49.6	6.6

(*): Coefficient of variation

Table 3 Recovery of TPA added to serum sample measured by TPA radioimmunoassay

		Added Tissue Polypeptide Antigen (TPA)-Unit					
		0	46.9	93.8	187.5	375	750
Serum A	Measured (Unit)	134	176	235	313	510	919
	Recovered (Unit)	—	42.0	101	179	376	785
	Recovery (%)	—	89.6	107.7	95.5	100.3	104.7
Serum B	Measured (Unit)	189	230	289	400	556	895
	Recovered (Unit)	—	41.0	100	211	367	706
	Recovery (%)	—	87.4	106.6	112.5	97.9	94.1

Mean recovery: 99.6%

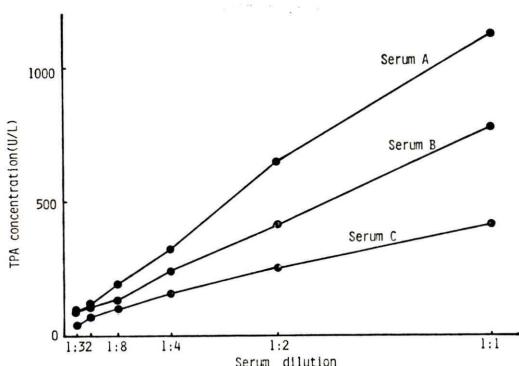


Fig. 4 Dilution test of serum TPA on TPA radioimmunoassay system.

一括した。Fig. 5 でも明らかなごとく hPL では、強い交叉性が認められた。ところが検討に用いた他の腫瘍関連抗原を主とする物質の添加では、検

討範囲内では有意の抑制効果は認められなかった。

2. 臨床的検討成績

本測定法の正常値をみる目的で、健常人68名の血中 TPA 濃度を本測定法で測定したところ、37.9 U/L～154 U/L 範囲に分布し、平均 77.3 ± 28.2 U/L であった。いま、平均 ± 2 S.D. を正常値とするとわれわれの今回の検討における正常値は 133.7 U/L までとの成績であった。これを性別にみると男子の平均は 77.1 ± 27.5 U/L、女子の平均は 77.9 ± 30.7 U/L となり有意の性差を認めなかった。また、年齢差、喫煙習慣の有無についても検討したが一定の傾向は得られなかった。また健常人68名の中に平均 ± 2 S.D. を越えるものが2名 (2.9%) あった。

実際の臨床応用は、まず診断が確定した各種悪

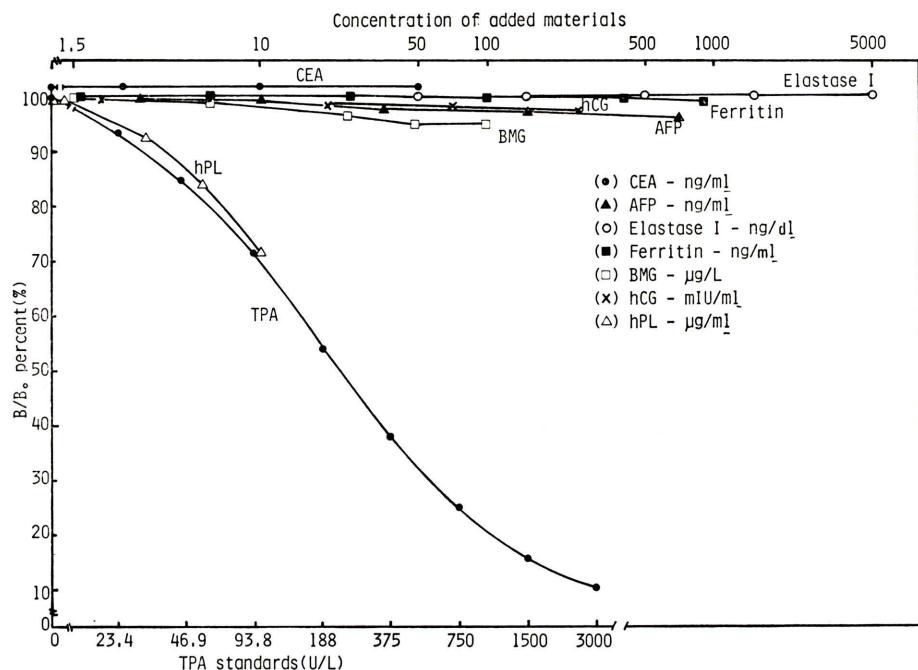


Fig. 5 Specificity of TPA radioimmunoassay system.

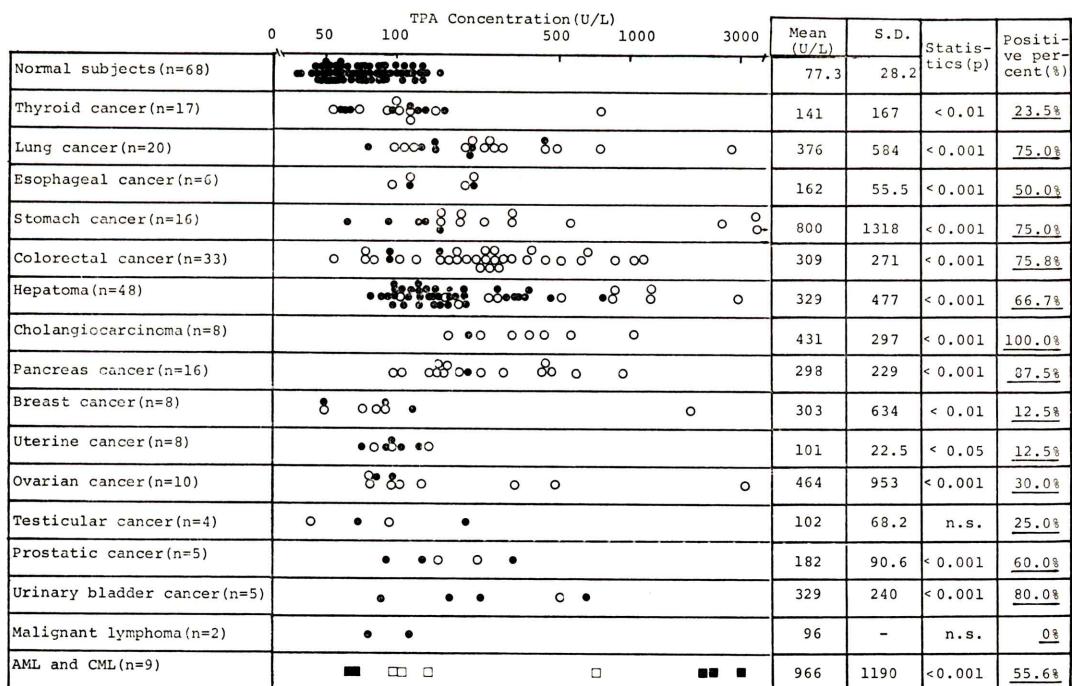


Fig. 6 Assay results of serum TPA concentration in normal subjects and various malignant diseases.

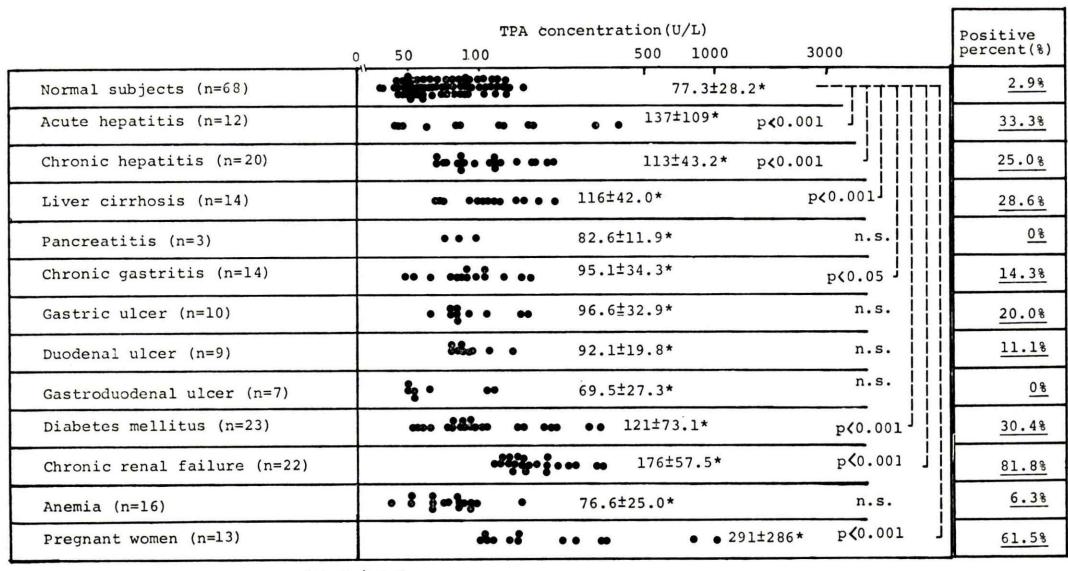
(*) : $\bar{x} \pm S.D.$

Fig. 7 Assay results of serum TPA concentration in normal subjects, pregnant women and various benign diseases.

性疾患群215例を対象に行い、Fig. 6 に示すとおり成績を得た。Fig. 6 でも明らかなごとく、悪性腫瘍群では、高値を示す症例がきわめて多く特に転移が明らかな症例で、その傾向が顕著であった。そこでこれら各悪性疾患での平均値を基に健常人68名のそれと統計学的に有意か否かを検討したところ Fig. 6 で示すとく、睾丸腫瘍および悪性リンパ腫を除く、全悪性疾患群で有意に高値となることを確めた。さらに、健常人の平均値+2 S.D. 以上を示すものを陽性とし、各疾患別の陽性率を求めたところ Fig. 6 で示すとく、胆のう癌 100%、肺癌 87.5%、膀胱癌 80%、肺癌・胃癌 75%、結腸直腸癌 75.8%、原発性肝細胞癌 66.7%、前立腺癌 60%、白血病 55.6%、食道癌 50%との成績が得られた。一方、診断が確定した良性疾患群150例と妊婦13名についても、その血中TPA値を測定し、その成績をFig. 7 で一括した。Fig. 7 でも明らかなごとく、良性疾患群でも健常人の血中TPA値に比べ高値を示す例のあることが認められ、陽性率でみると慢性腎不全で81.8%と高率であった以外全体としては悪性腫瘍群に比べ低い成績であった。そこで、これら各良性疾患での平

均値を基に、健常人68名のそれと統計学的に有意差が認められるか否かを検討したところ、Fig. 7 で示すとく、急性肝炎、慢性肝炎、肝硬変、慢性胃炎、糖尿病、および腎不全では有意に高値であるとの成績であった。一方、妊婦13例についてもその血中TPA値を測定したところ 291 ± 286 U/L と有意に高値の成績が得られ、これを陽性率でみると61.5%であった。

膀胱癌1例では最初の血中TPA測定から224日、またS字状結腸癌1例では最初の血中TPA測定から107日まで、おのおのその臨床経過中の血中TPA値と血中CEA値を測定し経過観察を行った。その結果はFig. 8 に一括したが、Fig. 8 でも明らかなごとく、血中TPA値は血中CEA値とほぼ同様の変動を示す成績であった。これは同一症例で病態のStageによる血中TPA値を測定観察したことになり、その立場からいえば血中TPA値はStageが進むにつれ高値となる傾向にあることを示唆する成績といえる。

原発性肝細胞癌3例については、その臨床経過中の血中TPA値と血中AFP値を測定し経過観察したが、肝部分切除術施行1～2日後で血中

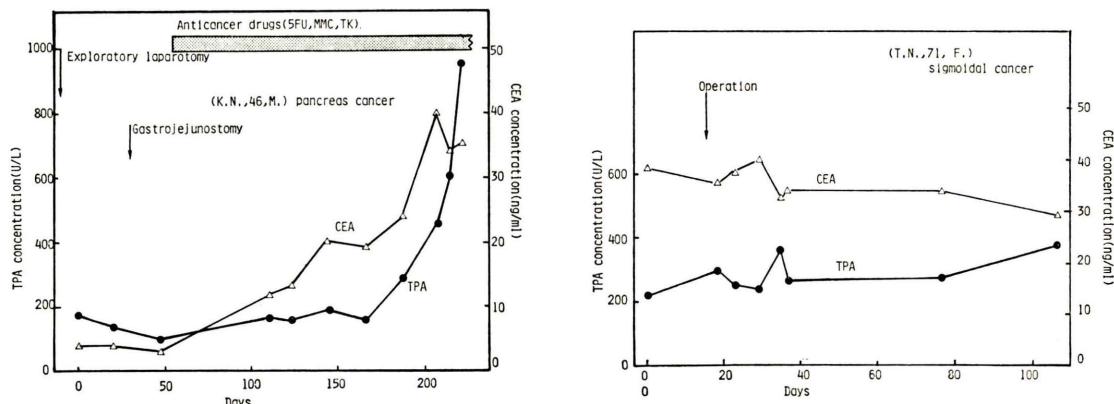


Fig. 8 Serum TPA level in clinical course of patients with cancer.

TPA 値の一時的上昇がみられたが、以後減少し、血中 AFP 値とは全く異なる変動を示す成績であった。

血中 TPA 値を測定した悪性腫瘍群のうち、同時に血中 CEA 値を測定した 142 例については、得られた両測定値の相関をみたところ Fig. 9 に示したごとく $r=+0.423$, $y=13.9x+109$ との成

績であった。ところがこのうち膵臓癌 16 例についてみたところ $r=+0.813$, $y=17.1x-38.4$ また、結腸・直腸癌 33 例についてみたところ $r=+0.702$, $y=9.5x+26.8$ と良好な相関が得られ、疾患により血中 CEA 値との相間に差異のあることを示唆する成績が得られた。一方、血中 TPA 値を測定した症例のうち、同時に血中 AFP 値を測定した肝疾患 78 例については、両測定値の比較を試みたが、両者の間には $r=+0.283$, $y=0.00077x+210$ との成績が得られ、個々の疾患別の相間についても検討したが有意の相関は得られなかった。

IV. 考 案

1957 年 Björklund らにより、新しい腫瘍関連抗原である tissue polypeptide antigen (TPA) の存在が報告され^{1,2)}、これを契機にその物理化学的性状^{3,4)}や臨床的意義に関する検討が活発となり、多くの知見が報告されるようになった⁵⁾。

これに伴い日常臨床上の関心は、日常臨床検査法として TPA の測定法の確立が可能か否か、またその測定値が臨床的にどのような意義を持つかに向けられていたといえる。TPA の RIA の確立と臨床応用の成績が報告されたのはごく最近のことであり⁷⁾、それまでの TPA の測定は主に赤血球凝集阻止反応を利用した方法によるものであった^{8,9)}。

RIA は臨床検査法としては特異性にすぐれ、

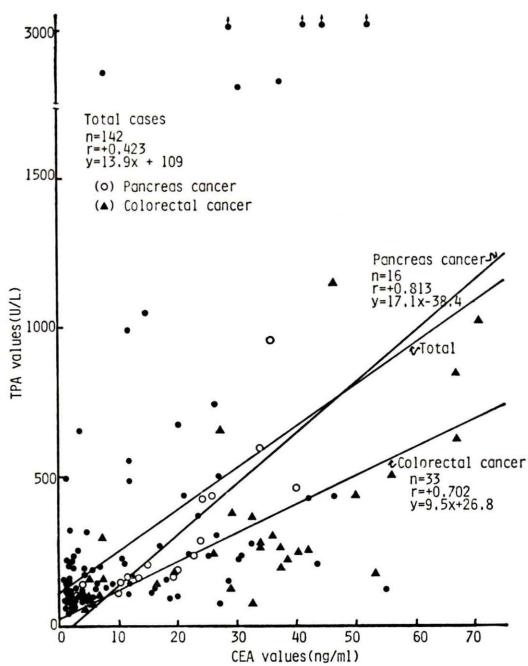


Fig. 9 Correlation between serum TPA values and CEA value in patients with cancer.

微量の生体成分の測定に適しており、また大量の検体が一度に処理できる点で、すぐれていることはすでに広く認められているところである。TPA の RIA として、入手が可能となった Prolifigen® について、臨床検査法に要求される諸条件を満足するか否かを検討した、今回のわれわれの成績では、すでに成績の項で指摘したごとく他の RIA と同様十分満足できることができた。ただ特異性の検討で、hPL との間に強い交叉が認められる成績であった。これについてはさらに妊娠13名を対象に、その血中 TPA 値と血中 hPL 値とを同時に測定し比較したところ、両者の間には相関係数 $r = +0.851$ 、回帰直線 $y = 50.5x + 4.5$ と良好な相関関係が認められた。その理由については今回の検討で、明らかにすることはできなかった。ただ TPA が胎盤にも存在することが知られており、一方、hPL は胎盤の合胞体栄養細胞より分泌され、免疫学的にも成長ホルモンと類似性を有するなど多様な側面を有している¹⁰⁾。これらの事実から推測すると、今回のわれわれの成績は TPA と hPL との間に免疫学的に交叉性を有する共通の性質のあることを示唆するものと考えられる。しかし、結論的なことは今後の検討に待たねばならない。ただ問題は臨床検査法としての TPA 測定への影響であると思われる。これについては hPL が妊娠 5 週頃から検出され、妊娠月数とともに増加し、分娩とともに 20 分という短い半減期で減少することから、妊娠時にも血中 TPA 値は高値を示すことを理解している限り、特に問題となる成績とはいえない。また、希釈試験の成績では原点を通る直線が得られなかった。その理由については不明だが、Fig. 4 でも示したごとく、ほぼ直線性が得られていることから、測定上問題となることはないといえる。血中 TPA の正常値については、他の疾患の血中 TPA 値を評価する上からも重要なことである。われわれは、68名の病院職員を主とする明らかな疾病のない人を厳選して採血し測定した。その結果はすでに成績の項で触れたごとく、 77.3 ± 28.2 U/L であった。そこで正常値の上限を健常人の平均値 + 2 S.D. と定め

算出したところ 133.7 U/L との値が得られた。これを基に各疾患における陽性率、つまり 133.7 U/L 以上を示す患者の割合を求めたところ Fig. 6 および Fig. 7 で示したごとき結果が得られた。この成績は、一部の疾患を除くほとんどの悪性腫瘍症例で血中 TPA 値が高値を示す割合が高いことを示すと同時に、逆に一部の症例では健常人の値と差異を認めえないものもあることを示す成績だといえる。高値を示す症例をみると転移の存在が明らかな症例ほど高値傾向を示すことがわかる。一方、良性疾患群および妊娠では、慢性腎不全で 81.8%、妊娠で 61.5% と悪性腫瘍症例同様に陽性率が高いものの他の疾患群では、悪性腫瘍症例群に比べると陽性率は低いといえる。しかし、健常人でも陽性率が 2.9% あり、また他の良性疾患群でも 1/10~1/3 の症例で陽性であることから、血中 TPA 値の測定結果を評価する上で慎重な配慮が必要であるといえる。しかし、膀胱と S 字状結腸癌の 2 例で血中 TPA 値を測定し、その臨床経過を追跡したところ、Fig. 8 で示したごとく Stage とともに血中 TPA 値の上昇がみられ、この変動は血中 CEA 値とほぼ同様であることから、血中 TPA 測定が腫瘍関連抗原を測定していることは間違いないところである。事実、膀胱 16 例において血中 TPA 値と血中 CEA 値を同時に測定し、両測定値を比較したところ、両者の間には相関係数 $r = +0.813$ 、 $y = 17.1x - 38.4$ また、大腸直腸癌 33 例における同様の検討では相関係数 $r = +0.702$ 、回帰直線 $y = 9.5x + 26.8$ といずれもほぼ良好な相関関係が認められていることからも明らかである。したがって、ある種の癌に特異的でないことから血中 TPA 値測定の臨床的意義としては、癌の診断への直接的な応用には無理があり、むしろ癌のスクリーニングや他の検査法との併用で補助的診断法として活用していくことではきわめて有用であり、特に診断が明らかとなった癌疾患症例の転移の有無の評価や Stage の評価には最も有用であるといえる。

癌の診断およびその治療が、医療上大きな課題であることを考えると、あらたに腫瘍関連抗

原として血中TPAの測定が可能となったことは、きわめて意義のあることであり、今後は、得られた測定値を正しく評価していくことによって、広く臨床的に活用されるものと期待される。

V. 結語

血中TPAのRIAに関し、その基礎的ならびに臨床的検討も行い以下の成績を得た。

1) 血中TPAのRIAは、測定法に要求される諸条件を満足するものであり、臨床検査法として臨床的に応用可能である。

2) 健常人の血中TPA値は、37.9 U/Lから154 U/Lの範囲に分布し、平均 77.3 ± 28.2 U/Lであった。この成績から平均値+2 S.D.を正常上限とすると133.7 U/Lとの成績が得られた。

3) 各種悪性腫瘍群では一部の疾患群を除くほとんどの疾患でその平均値は健常人のそれに比べ統計学的に有意に高く、また133.7 U/L以上を示す割合も多かった。この傾向は、特に転移が明らかな症例でより顕著であった。

4) 血中TPA値を測定し、臨床経過を観察した2例の悪性腫瘍患者では疾患のStageの進行とともに血中TPA値も上昇する成績が得られた。

5) 血中TPA値と血中CEA値との間には相関が認められ、特に肺癌および結腸直腸癌患者群で最も良好な相関が得られた。

6) 良性疾患群でも血中TPA値が健常人に比べ有意に高値を示す疾患が多く、133.7 U/L以上を示す割合は悪性腫瘍患者群より低いものの、健常人に比べるとるかに高率で、特に慢性腎不全では81.8%、健常妊娠では61.5%と高率であった。

以上の成績から血中TPA値の測定は、新しい腫瘍関連抗原の測定法として臨床的に有用と考える。しかし、癌の直接的診断法としては問題があり、癌のスクリーニング、癌の転移の有無の評価、癌のStageの評価、治療効果の評価、他の検査法と併用して補助的診断などで広く活用されるものと思われる。

稿を終わるにあたり血中TPAのラジオイムノアッセイキット「Prolifigen®」の提供をいただいた第一ラジオアイソトープ研究所に謝意を表します。

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, 1957
- 2) Björklund B, Lundblad G, Björklund V: Antigenicity of pooled human malignant and normal tissues by cyto-immunological 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 Scandicavica*, **B34**: 265-273, 1980
- 4) Lüning B, Wiklund B, Redelius P, et al: Biochemical properties of tissue polypeptide antigen. *Biochimica et Biophysica 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) Skryten A, Unsgaard B, Björklund B, et al: Serum TPA related to activity in a wide spectrum of cancer conditions. *Tumor Diagnostik* **2**: 117-120, 1981
- 7) Björklund B, Wiklund B, Lüning B, et al: Radioimmunoassay of TPA: A laboratory test in cancer. *Tumor Diagnostik* **1**: 78-84, 1980
- 8) Björklund B, Paulsson J: Studies of hemagglutination as a means for assay of malignant and normal human tissue antigens. *J Immun* **89**: 759-766, 1962
- 9) Björklund B: Systematic antigenic change in human carcinoma tissues by hemagglutination techniques. *Int Arch Allergy* **36**: 191-203, 1969
- 10) Josimovich JB, Maclare JA: Presence in the human placenta and term serum of a highly lactogenic substance immunologically related to pituitary growth hormone. *Endocrinology* **71**: 209-220, 1962