

## 《ノート》

# 血中 Thymidine kinase 活性測定法の基礎的検討とその血液 悪性増殖性疾患での臨床的意義

A Study on the Measurement of Serum Thymidine Kinase and its Clinical  
Significance in Hematological Neoplastic Disorders

鳥住 和民\* 間島 宏文\* 山田 龍作\* 清水 映二\*\*  
岡本 幸春\*\* 辻本 真人\*\* 津田 忠昭\*\* 大田喜一郎\*\*

Kazutami TORIZUMI\*, Hirofumi AIBATA\*, Ryusaku YAMADA\*, Eiji SHIMIZU\*\*,  
Yukiharu OKAMOTO\*\*, Masato TSUJIMOTO\*\*,  
Tadaaki TSUDA\*\* and Kiichiro OTA\*\*

\*Department of Radiology, \*\*Department of Laboratory Medicine,  
Wakayama Medical College

## I. はじめに

Thymidine kinase (TK) は細胞分裂の G<sub>1</sub> から S 期にかけて関与するスカベンジャー酵素, すなわち Thymidine が DNA 代謝に組み入れられる時に, Thymidine mono-phosphate に変換させる働きをつかさどっている酵素である<sup>1)</sup>. この酵素は必ずしも細胞分裂の際に必須なものではないが, ある種のウイルスに罹患すると TK 活性の誘導が引き起こされること<sup>2)</sup> や, DNA 代謝異常を伴う悪性腫瘍では血中 TK の活性が高まること<sup>3-5)</sup> 等がこれまでに報告されている.

そこで, 今回は [<sup>125</sup>I]iododeoxyuridine を基質とした radioenzyme assay による Sangtec Medical 社の Prolifigen® TK-REA キットに関する基礎的検討, ならびに血液悪性増殖性疾患を対象に血清中の TK 活性測定を行い, DNA 代謝異常マーカーとしての意義につき検討した.

## II. 方法および対象

### 1. TK 活性の測定方法

Prolifigen® TK-REA キットを用いて血清 TK 活性を測定した. 本キットは TK の基質として [<sup>125</sup>I]iododeoxyuridine を用い, 酵素反応によって生成した [<sup>125</sup>I]iododeoxyuridylic acid を選択的に捕獲し, その放射能を測定することによって検体中の TK 活性を測定する. Fig. 1 にその測定法を示した. 検体は血清を用い, 測定まで -20°C で凍結保存した.

### 2. 基礎的検討

#### 1) 検量線の作成

標準 TK の活性を横軸に, 標準 TK 40 U/L の計数率 (B) から標準 TK 0 U/L の計数率 (B<sub>0</sub>) を差し引いた計数率 (B-B<sub>0</sub>) を縦軸にプロットして作成した.

#### 2) 回収試験

低 TK プール血清に標準 TK 溶液 0, 5, 10, 20, 40 U/L を等量添加し, 回収率を求めた.

#### 3) 希釈試験

異なる 3 種の患者血清をキット添付の標準 TK

**Key words:** Thymidine kinase, Radioenzyme assay, DNA metabolism.

\* 和歌山県立医科大学放射線科  
\*\* 同 検査診断学講座

受付: 62 年 5 月 7 日

最終稿受付: 63 年 3 月 17 日

別刷請求先: 和歌山市七番丁一番地 (〒640)

和歌山県立医科大学附属病院放射線科

鳥住 和民

溶液 0 U/L で倍々希釈して TK 活性を求めた。

#### 4) 再現性の検討

##### ① アッセイ内再現性

TK 活性値が異なる 2 種の被検血清を、同一アッセイ内で 1 血清につき 6 本測定し、精度を検討した。

##### ② アッセイ間再現性

TK 活性値が異なる 2 種の被検血清を異なるアッセイキットで 3 回測定し、再現性を検討した。

#### 5) 血清 LDH との関係

無作為に選んだ 80 例の病院母集団について、血清中の TK 活性と LDH (乳酸脱水素酵素) を測定し、両者の関係を検討した。

#### 6) CEA, $\alpha$ -fetoprotein との関係

血清中の TK 活性と腫瘍マーカーである CEA や  $\alpha$ -fetoprotein との関係についても検討した。

### 3. 臨床的検討

#### 1) 健常人における血清 TK 活性値

健常人として男性 45 名 (20~66 歳), 女性 45 名 (19~64 歳), 計 90 名の血清 TK 活性を測定した。健常人は健康診断の目的で当院に来院し、臨床的および生化学的検査で異常を認めない人とした。

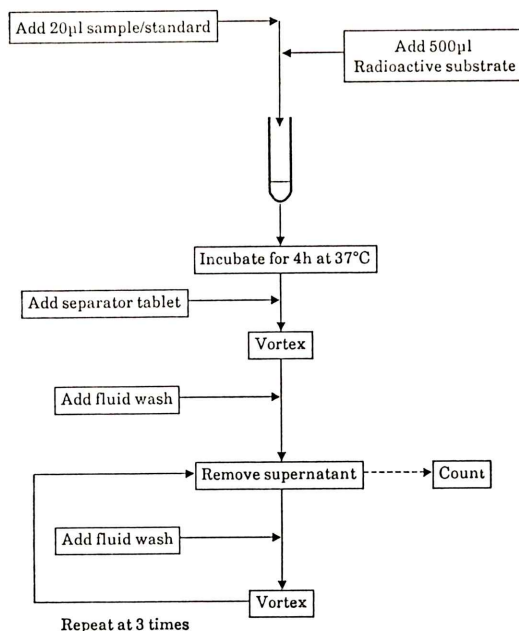


Fig. 1 Assay procedure of TK REA kit.

#### 2) 血液悪性増殖性疾患での血清 TK 活性

慢性骨髄性白血病 (CML) 6 例, 急性骨髄性白血病 (AML) 7 例, 急性リンパ性白血病 (ALL) 5 例, 骨髄異形成症候群 (MDS) 2 例, 多発性骨髄腫 (MM) 5 例の計 25 例について検討した。

## III. 結 果

### 1. 基礎的検討

#### 1) 検量線

標準 TK 0 および 40 U/L を測定して得られた検量線の 1 例を Fig. 2 の実線で示した。破線は標準 TK 溶液 40 U/L を標準 TK 溶液で 0 U/L 倍々希釈したものを測定して得られた検量線で、これにより求められた TK 活性値は標準 TK 0 および 40 U/L の 2 点で作成した検量線から求めた値よりもやや低値を示した。

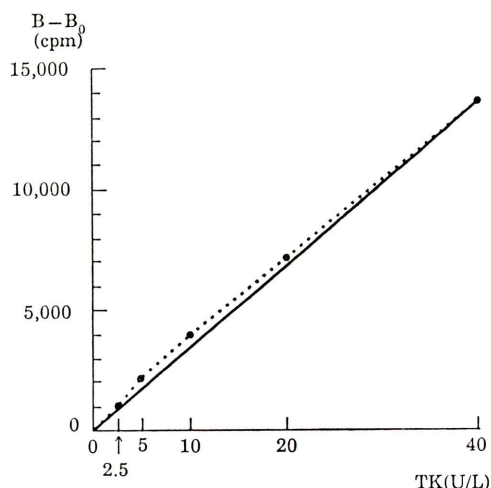


Fig. 2 Standard curve of TK REA kit.

Table 1 Recovery of TK added to serum sample

Added TK (U/L)	Measured (U/L)	Recovered (U/L)	Recovery (%)
0	1.4	—	—
2.5	3.7	2.3	92.0
5	7.0	5.6	112.0
10	12.6	11.2	112.0
20	21.9	20.5	102.5

Mean  $\pm$  S.D. 104.6  $\pm$  9.5%

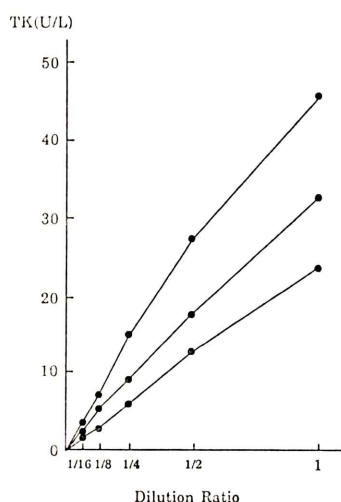


Fig. 3 Dilution study of serum TK.

Table 2 Precision and reproducibility of TK PEA kit

## a) Intraassay Variance (n=6)

	Serum sample	
	I	II
Mean (U/L)	5.9	25.2
S.D. (U/L)	0.3	1.6
C.V. (%)	5.1	6.3

## b) Interassay Variance (n=3)

	Serum sample	
	I	II
Mean (U/L)	5.7	24.9
S.D. (U/L)	0.4	2.5
C.V. (%)	7.0	10.0

## 2) 回収試験

平均回収率は  $104.6 \pm 9.5\%$  (Mean  $\pm$  S.D.) であった (Table 1).

## 3) 希釈試験

倍々希釈により得られた TK 活性値は原点に向かう直線のやや上方にプロットされ, 計算値より若干高い値を示した (Fig. 3).

## 4) 再現性

## ① アッセイ内再現性

変動係数 (C.V.) はおおよそ 5.1%, 6.3% と満足できる精度が得られた (Table 2-a).

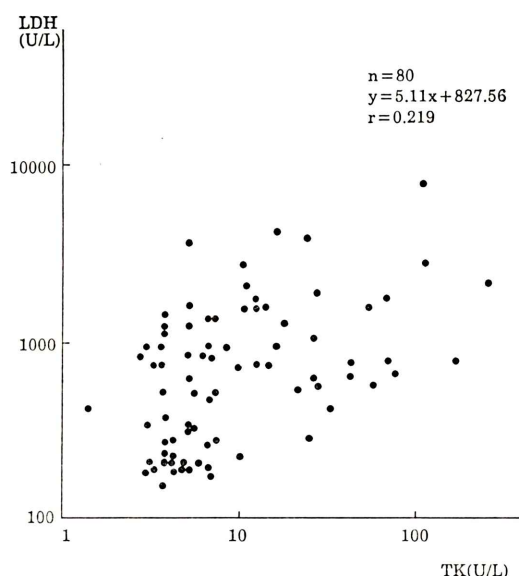


Fig. 4 Relationship between serum TK activity and serum LDH activity.

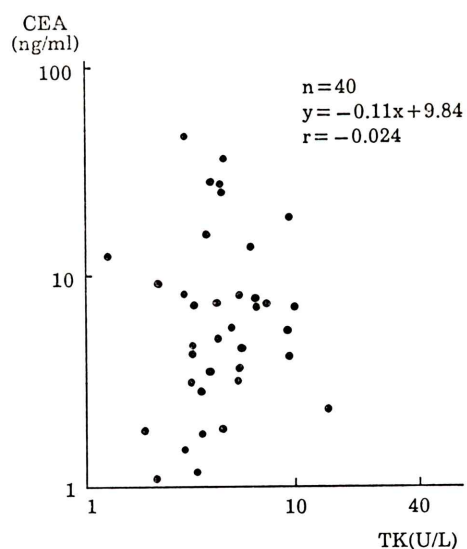


Fig. 5 Relationship between serum TK activity and serum CEA value.

## ② アッセイ間再現性

C.V. 7.0%, 10.0% と十分満足できる結果であった (Table 2-b).

## 5) 血清 LDH との関係

相関係数  $r=0.219$  と有意の相関関係は認めら

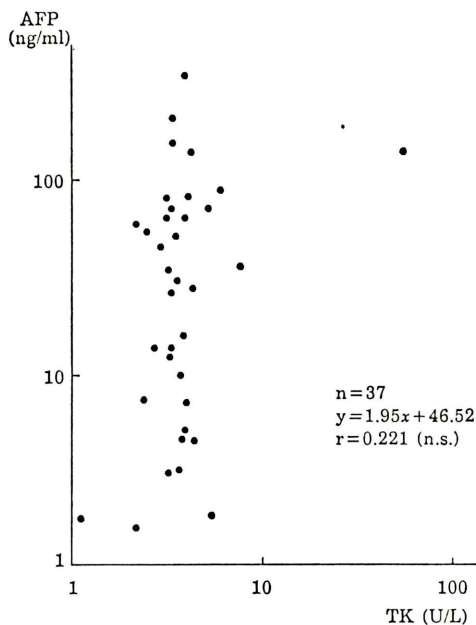


Fig. 6 Relationship between serum TK activity and serum  $\alpha$ -fetoprotein value.

れなかった (Fig. 4).

#### 6) CEA, $\alpha$ -Fetoprotein との関係

CEA,  $\alpha$ -Fetoprotein と TK 活性の関係はおのの  $r = -0.024, 0.221$  と、ともに有意の相関関係は認められなかった (Figs. 5, 6).

### 2. 臨床的検討

#### 1) 健常人における血清 TK 活性

健常人 90 名における TK 活性は  $3.5 \pm 1.1$  U/L (Mean  $\pm$  S.D.) で、1.6~6.5 U/L の範囲に分布する成績が得られた。これを男女別に求めてみると、男性 45 名では  $3.4 \pm 1.0$  U/L、女性 45 名では  $3.5 \pm 1.0$  U/L と男女間に有意の差は認められなかった。

腎不全で透析中の患者 15 例の血清 TK 活性を測定したところ、 $3.2 \pm 0.9$  U/L (2.0~5.5 U/L) と健常人の値との間に有意の差は認めなかった。

#### 2) 血液悪性増殖性疾患での血清 TK 活性

CML, AML の血清 TK 活性と末梢血液所見を Table 3 に示した。CML における未熟顆粒球は myelocyte, metamyelocyte, promyelocyte および myeloblast を含め、AML では blast の項に myeloblast を分類した。CML と AML の血清

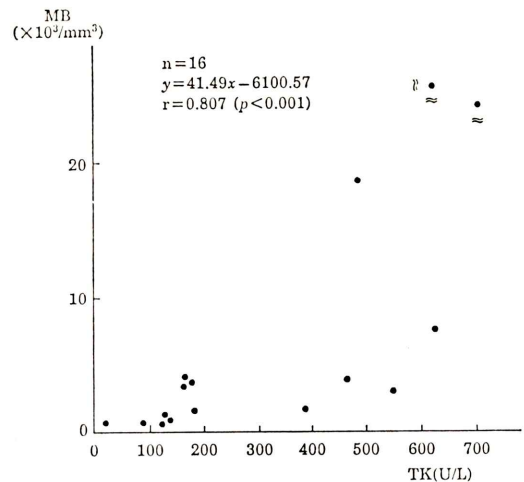


Fig. 7 Relationship between serum TK activity and absolute counts of myeloblasts in peripheral blood.

TK 活性は健常人に比べ著明に亢進し、100 U/L を超える例が CML で 6 例中 6 例、AML で 7 例中 4 例認められた。しかも AML においては blast の比率の高い症例ほど、血清 TK 活性が高値となる傾向にあった。なお、AML のうち 7 U/L と TK 活性値の低かった症例 T.Y. は骨髓所見では白血球細胞が確認されていない。

ALL, MDS および骨髓腫における血清 TK 活性は、1 例を除き高値を示した。同様に ALL や MDS においても、blast の比率に比例して血清 TK 活性が高値となる傾向が得られた (Table 4).

CML および AML の 16 例 (臨床経過に伴う同一症例 5 例を含む) について、末梢血の myeloblast の絶対数と血清 TK 活性の関係を調べてみると、相関係数  $r = 0.807$  と正の相関関係が得られた (Fig. 7).

### IV. 考 察

TK は cytosol 内の酵素<sup>1-5)</sup>であり、細胞分裂の G<sub>1</sub> から S 期にかけてその活性は上昇する<sup>1)</sup>といわれている。また、細胞の再生、胎生期、ウイルスの融解期においても TK 活性が高くなることから、悪性腫瘍やウイルス疾患の診断の指標に應用できると報告されている<sup>1-5)</sup>。

Table 3 TK level and serological parameters of peripheral blood in the patients with CML and AML

Disease	Patients	Age/ Sex	TK U/L	RBC× 10 <sup>4</sup>	WBC× 10 <sup>3</sup>	Hb g/dl	Ht %	PBC× 10 <sup>4</sup>	Immature cell %	Blast %	St %	Seg %	E %	B %	Mono %	Lym %	Others
CML	H.A.	23/M	130.9	440	507	13.7	44.5	55.8	40.0		11.0	41.0	4.0	1.0	1.0	2.0	
CML	S.M.	32/F	460.0	359	2,002	12.0	37.2	76.6	50.0		3.0	35.0	4.0	5.0	1.0	2.0	
CML	H.T.	29/M	550.0	250	2,410	10.1	33.4	18.3	50.0		3.0	40.0	3.0	1.0	1.0	2.0	
CML	Y.T.	46/M	395.0	351	1,110	10.0	33.4	25.6	28.0		14.0	46.0	2.0	1.0	8.0	1.0	
CML	T.H.	73/M	170.4	350	789	10.5	33.6	57.3	22.0		7.0	47.0	1.0	12.0	0	11.0	
CML	M.T.	43/M	195.0	460	428	13.5	43.7	96.2	34.0		15.0	39.0	0	10.0	0	2.0	
AML	T.U.	16/F	624.0	286	86	8.7	25.6	14.2		78.0	4.0	7.0	1.0	0	1.0	9.0	
AML	H.D.	45/F	123.4	184	14	5.4	15.6	1.0		21.0	0	4.0	0	0	13.0	62.0	
AML	H.T.	19/M	10.0	448	22	14.4	42.5	17.4		7.0	1.0	31.0	1.0	2.0	7.0	50.0	1.0
AML	N.K.	11/M	430.4	247	296	7.2	22.4			64.0	7.0	11.0	0	0	2.0	16.0	
AML	M.M.	60/M	159.0	211	468	6.9	22.8	2.7		73.0	0	23.0	0	0	0	4.0	
AML	M.K.	11/M	63.9	472	117	13.1	38.1			0	12.0	64.0	0	1.0	9.0	14.0	
AML	T.Y.	34/M	7.0	511	40	16.9	46.8	8.4		0	0	6.0	71.0	0	8.0	15.0	

Table 4 TK level and serological parameters of peripheral blood in the patients with ALL, MDS and MM

Disease	Patients	Age/ Sex	TK U/L	RBC× 10 <sup>4</sup>	WBC× 10 <sup>3</sup>	Hb g/dl	Ht %	PBC× 10 <sup>4</sup>	Blast %	St %	Seg %	E %	B %	Mono %	Lym %	Others
ALL	M.S.	1/F	92.0	422	180	11.6	35.8		22.0	0	1.0	0	0	13.0	64.0	
ALL	S.W.	16/M	107.0	307	109	9.2	27.9		67.0	0	5.0	0	0	0	28.0	
ALL	D.H.	13/M	15.0	376	63	11.6	35.9	27.6	2.0	4.0	61.0	1.0	0	4.0	28.0	
ALL	S.T.	61/M	17.1	409	21	10.5	37.0	16.4	0	0	13.0	2.0	0	28.0	57.0	
ALL	M.K.	11/M	63.4	472	117	13.1	38.1		0	12.0	64.0	0	1.0	9.0	14.0	
MDS	Y.N.	78/M	12.9	306	28	9.9	33.6	2.6	0	1.0	33.0	0	1.0	46.0	19.0	
MDS	T.K.	62/M	144.0	205	47	6.9	23.3	18.3	22.0	8.0	43.0	0	0	9.0	18.0	
MM	M.K.	56/M	7.7	399	51	12.2	36.8	31.0	0	7.0	60.0	2.0	0	6.0	24.0	1.0
MM	L.E.	43/M	22.4	303	117	10.3	31.1	4.9	1.0	15.0	61.0	0	0	8.0	12.0	3.0
MM	K.K.	56/F	6.8	199	53	5.5	17.5	2.9	0	13.0	4.0	0	0	0	0	83.0
MM	K.H.	54/F	3.9	387	42	10.5	32.2	12.4	0	0	51.0	3.0	0	19.0	27.0	
MM	N.M.	73/F	17.6	207	33	7.4	22.4	6.8	0	6.0	68.0	0	0	8.0	18.0	

すでに、著者らは各種疾患について検討し、血清 TK 活性の測定は従来の腫瘍マーカーとは異なり、DNA 代謝異常マーカーとして位置づけられると報告した<sup>6)</sup>。そこで今回は、血清 TK 活性測定の臨床的意義をより明確にするために、測定キットに関する基礎的検討を含め、血液悪性増殖性疾患患者での血清 TK 活性測定を行った。キットの説明書に従って算出された TK 活性は、標準 TK 溶液 40 U/L を標準 TK 溶液 0 U/L で倍々希釈して得られた検量線から求めた値よりも多少高くなる傾向にあった。しかし、これは臨床で、問題にはならない程度と考えられ、本検討では説明書に従って求められた TK 活性を採用した。回収試験、希釈試験、再現性についての成績はほぼ満足できるものであった。

さらに、血清中の TK 活性と LDH、CEA および  $\alpha$ -fetoprotein との関係をみたが、いずれも有意の相関関係はみられなかったことから、血清 TK 活性はこれらとは異なった特性を有するものと考えられた。一方、ビタミン B<sub>12</sub> 欠損症や肺小細胞癌で血清 LDH と TK 活性の間に相関関係が存在するとの報告もある<sup>7,8)</sup>。また、血清 TK 活性は CEA と相関する<sup>9)</sup> との報告もあるが、TK は DNA 代謝合成時の G<sub>1</sub> 期から S 期にかけて存在する<sup>1)</sup> のに対し、CEA は ribosome 内で胎生期に産生される蛋白<sup>9)</sup> で、両者の産生機構は異なっており、測定する時期によって両者間の関係が異なることも考えられる。

今回対象とした CML、AML、ALL、MDS および骨髄腫では DNA 代謝に異常をきたしており、これらの患者の血清 TK 活性が健常人に比べて高値を示したことは、血清 TK 活性が DNA 代謝異常マーカーとしての意義を有することを示唆するものである。

CML では症例により血清 TK 活性のばらつきが大きく、しかも末梢白血球数が増加するにつれ、血清 TK 活性も亢進していることがうかがえる。CML の末梢血顆粒球は、みかけ上は正常な形態であっても DNA 自身に異常をきたしていること<sup>10)</sup> から、白血球数の上昇に伴い血清 TK 活性

が高くなるものと考えられる。

一方、AML では末梢白血球数よりも芽球数の比率が増加した時に、血清 TK 活性が亢進し、しかも両者の間には相関性がみられたことから、血清 TK 活性が DNA 代謝異常マーカーになり得るとの確証を得たと考える。

また、ALL や MDS でも AML と同様、末梢血に芽球の出現率が高い症例ほど、血清 TK 活性は高値を示した。一方、骨髄腫では前述の血液悪性増殖性疾患に比べ、血清 TK 活性は低い値であった。これらの細胞形態は多様性を有することから、症例により DNA 代謝の異常も異なるものと推測される。

## V. 結 語

TK-REA キットを用いる血清 TK 活性測定法について基礎的ならびに臨床的検討を行った。

本キットは 1 日で測定結果が得られ、再現性、希釈、回収試験の成績は良好であった。

血液悪性増殖性疾患における血清 TK 活性の測定は、DNA 代謝の異常の観察であることが示唆され、治療効果を評価する指標および予後の判定に有用であると考えられた。

## 文 献

- 1) Gronowitz JS, Källander CFR: Extracellular expression of TK isozymes in human body fluids with special reference to herpesvirus diagnostics and use for monitoring antiviral therapy. *New Horizons in Microbiology*, A. Sanna and G. Morace, eds, Elsevier Science Publishing BV, Amsterdam, pp. 273-284, 1984
- 2) Källander CFR, Gronowitz JS, Olding-Stenkvist E: Rapid diagnosis of Varicella-Zoster virus infection by detection of viral deoxythymidine kinase in serum and vesicle fluid. *J Clin Microbiol* **17**: 280-287, 1983
- 3) Källander CFR, Simonsson B, Hagberg H, et al: Serum deoxythymidine kinase gives prognostic information in Chronic Lymphocytic leukemia. *Cancer* **54**: 2450-2455, 1984
- 4) Hagberg H, Glimelius B, Gronowitz S, et al: Biochemical markers in non-Hodgkin's lymphoma stages III and IV and prognosis: A multivariate analysis. *Scand J Haematol* **33**: 59-67, 1984

- 5) Gronowitz JS, Källander CFR, Hagberg H, et al: Deoxythymidine-kinase in Cerebrospinal Fluid: A New Potential "Marker" for Brain Tumours. *Acta Neurochirurgica* **73**: 1-2, 1984
- 6) 鳥住和民, 間島宏文, 木路成志, 他: 悪性腫瘍および HB 陽性肝疾患における血中 Thymidine Kinase 活性について. *Radioisotopes* **36**: 133-136, 1987
- 7) Hagberg H, Gronowitz JS, Killander A, et al: Serum thymidine kinase in Vitamin B<sub>12</sub> deficiency. *Scand J Haematol* **32**: 41-45, 1984
- 8) Gronowitz JS, Steinholtz L, Källander CFR, et al: Serum deoxythymidine kinase in small-cell carcinoma of the lung; relation to clinical features, prognosis and other biochemical markers. *Cancer*, in press, 1986
- 9) Dent PB, McCulloch PB, Wesley-James O, et al: Measurement of carcinoembryonic antigen in patients with bronchogenic carcinoma. *Cancer* **42**: 1484-1491, 1978
- 10) Ganesan TS, Rassool F, Guo A-P, et al: Rearrangement of the bcr Gene in Philadelphia Chromosome-Negative Chronic Myeloid leukemia. *Blood* **68**: 957-960, 1986