

《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* 間畠 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 G₁ 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¹⁾。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²⁾ 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^{3~5)} 等がこれまでに報告されている。

そこで、今回は [¹²⁵I]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 [¹²⁵I]iododeoxyuridine を用い、酵素反応によって生成した [¹²⁵I]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 (B₀) を差し引いた計数率 (B - B₀) 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（番 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(乳酸脱水素酸素)を測定し、両者の関係を検討した。

6) CEA, α -fetoproteinとの関係

血清中のTK活性と腫瘍マーカーであるCEAや α -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。

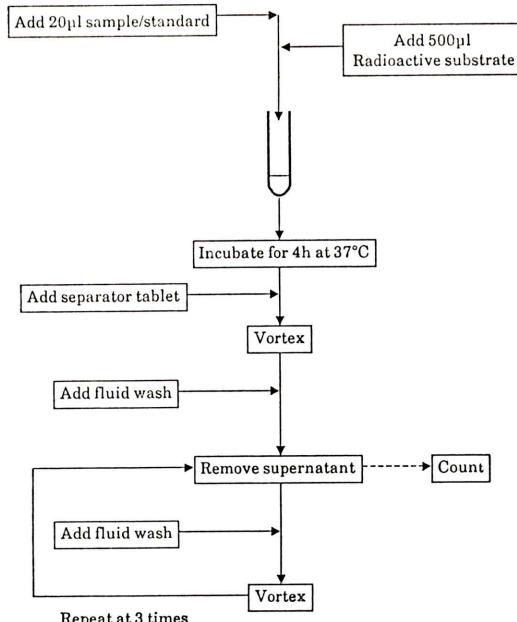


Fig. 1 Assay procedure of TK REA kit.

2) 血液悪性増殖性疾患での血清TK活性

慢性骨髓性白血病(CML)6例、急性骨髓性白血病(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TK0および40U/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40U/Lを標準TK溶液で0U/L倍々希釈したもの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TK0および40U/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。

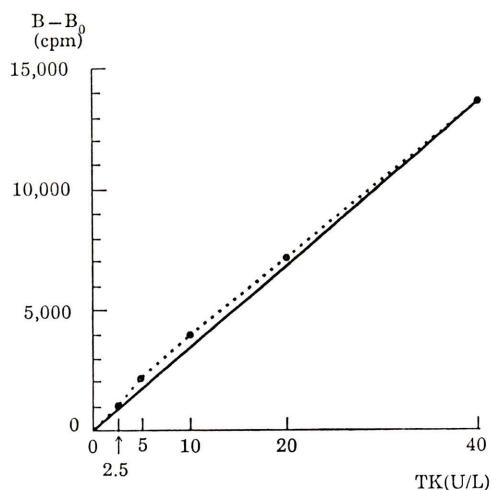


Fig. 2 Standard curve of TK REA kit.

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. $104.6 \pm 9.5\%$

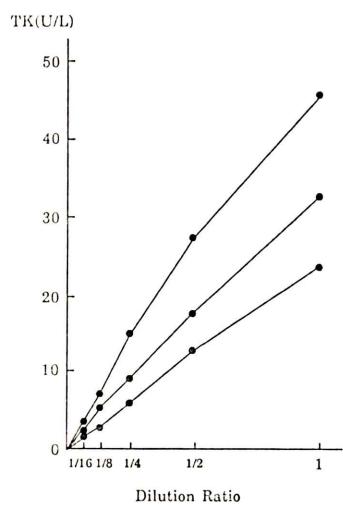


Fig. 3 Dilution study of serum TK.

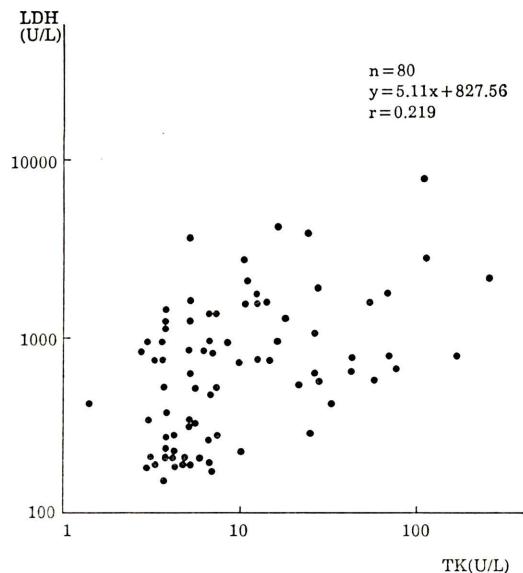


Fig. 4 Relationship between serum TK activity and serum LDH activity.

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.) はおのおの 5.1% , 6.3% と満足できる精度が得られた (Table 2-a).

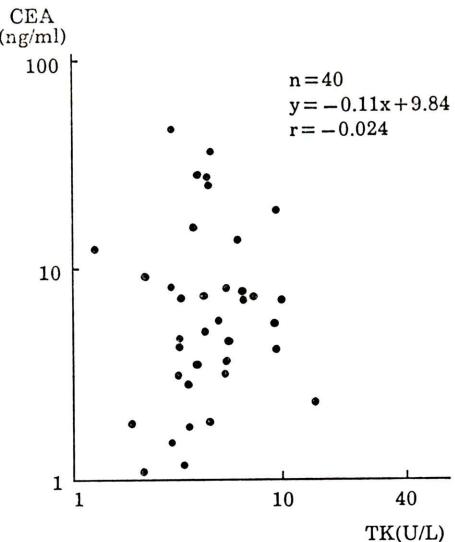


Fig. 5 Relationship between serum TK activity and serum CEA value.

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

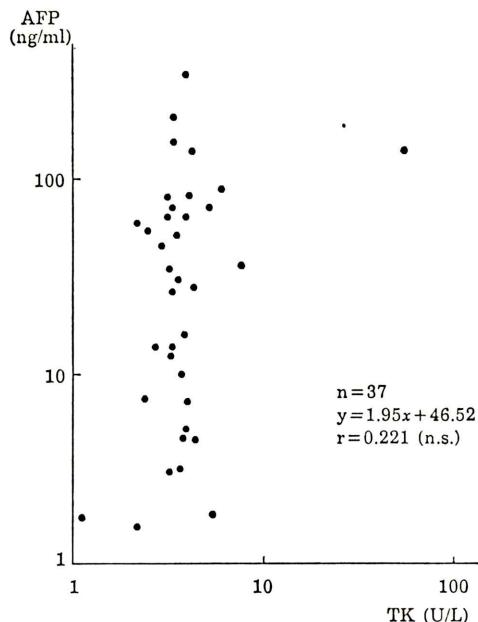


Fig. 6 Relationship between serum TK activity and serum α -fetoprotein value.

れなかった(Fig. 4).

6) CEA, α -Fetoproteinとの関係

CEA, α -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 ± 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 ± 1.0 U/L、女性45名では 3.5 ± 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 ± 0.9 U/L (2.0~5.5 U/L)と健常人の値との間に有意の差を認めなかった。

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

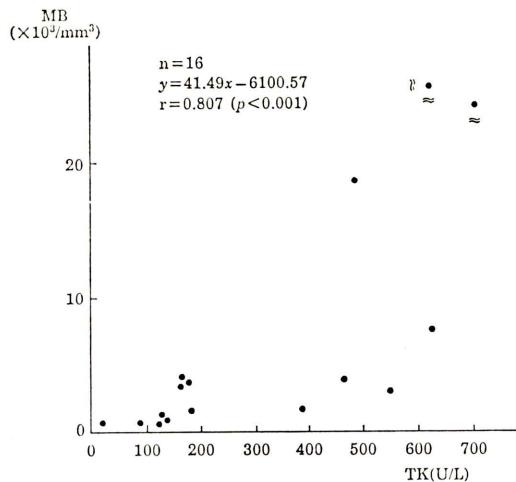


Fig. 7 Relationship between serum TK activity and absolute counts of myeloblasts in peripheral blood.

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.は骨髄所見では白血病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^{1~5)}であり、細胞分裂のG₁からS期にかけてその活性は上昇する¹⁾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応用できると報告されている^{1~5)}。

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 \times 10^4	WBC \times 10^3	Hb g/dl	PBC \times 10^4	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	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 \times 10^4	WBC \times 10^3	Hb g/dl	PBC \times 10^4	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	83.0	
MM	K.H.	54/F	3.9	387	42	10.5	32.2	12.4	0	51.0	3.0	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⁶⁾。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、これは臨床上、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 α -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 B₁₂ 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^{7,8)}。また、血清 TK 活性は CEA と相関する⁸⁾との報告もあるが、TK は DNA 代謝合成時の G₁ 期から S 期にかけて存在する¹⁾のに対し、CEA は ribosome 内で胎生期に產生される蛋白⁹⁾で、両者の产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¹⁰⁾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-Stenkivist 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, 間畠宏文, 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 B₁₂ deficiency. *Scand J Haematol* **32**: 41-45, 1984
- 8) Gronowitz JS, Steinholtz L, Källander CFR, et al: Serum deoxythymidine kinase in small-cell carci-noma 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 pa-tients with bronchogenic carcinoma. *Cancer* **42**: 1484-1491, 1978
- 10) Ganesan TS, Rassool F, Guo A-P, et al: Rearrange-ment of the bcr Gene in Philadelphia Chromosome-Negative Chronic Myeloid leukemia. *Blood* **68**: 957-960, 1986