

《原 著》

大腸癌患者血清および組織中 thymidine kinase 活性の臨床的意義

坂本 忍* 嘉和知靖之** 塚田 邦夫** 三島 好雄**
岡本 良平*

要旨 DNA 合成系酵素 thymidine kinase (TK) は、増殖の盛んな組織でその活性が増加していることが知られている。³H-thymidine よりも ¹²⁵I-iodo deoxyuridine を基質とした測定系が高感度であると報告されており、ヒト大腸癌患者血清 TK 活性を後者の測定系で測定し、その臨床的意義を検討した。①血清 TK 活性正常値は、平均 2.93 ± 0.85 U/l であり、低 TK 活性領域では後者の測定系で安定した結果が得られた。②大腸癌組織中総 TK 活性と特異な TK アイソザイム活性との間には正の相関が成立したが、血清 TK 活性との間には相関が認められなかった。③大腸癌患者で、stage V および再発症例、ことに遠隔転移を伴う症例で、血清 TK 活性が高値を示した。

以上の結果、固形癌症例における血清 TK 活性測定は、病態、病期を把握するうえで有用と思われる。

I. はじめに

DNA 合成系酵素 thymidine kinase (TK) は、pyrimidine 代謝の salvage 経路に位置し、胎児組織¹⁾、再生肝^{2,3)}、癌などの増殖の盛んな組織でその活性が増加していること、また特異な TK-isozyme の存在することが知られている⁴⁻⁶⁾。われわれは、従来、Taylor ら¹⁾の方法に準じて、³H-thymidine を基質とした assay 系で TK 活性を測定してきた。

最近、Gronowitz ら^{7,8)}が、¹²⁵I-iodo deoxyuridine を基質とした assay 系を確立し、血清 TK 活性も測定可能となり、radioenzyme assay kit (Sangtec 社製) が利用できるようになった。

今回、ヒト大腸癌患者血清および癌組織中 TK 活性につき、前記二方法による測定値の比較とその臨床的意義を検討したので報告する。

II. 材料および方法

1) 東京医科歯科大学附属病院、および新潟県立十日町病院におけるヒト大腸癌患者および白血病患者血清 TK 活性測定について、³H-thymidine (³H-Tdr) を基質とした assay 系と、¹²⁵I-iodo deoxyuridine (¹²⁵I-IdUrd) を基質とした assay 系で比較検討した。前者は、Taylor ら¹⁾の方法に準じ、5 mM MgCl₂、10 mM ATP、2 μM [6-³H]thymidine (22.0 Ci/mmol, Amersham, UK)、0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.5)、および患者血清から成る反応混合液を 30°C、15 分間反応させた。反応停止後、上清 100 μl を 1.8×1.8 cm の DEAE 紙に吸収させ、1 mM 融酸アンモニウムで 4 回洗浄後、メタノールで脱水、乾燥させて液体シンチレーションカウンターでその放射活性を測定し、その酵素活性を fmol/min/ml で表示した。後者は、Gronowitz ら^{7,8)}の方法に準じた TK-REA キット (Sangtec Medical, Sweden) を用いた。患者血清 20 μl に ¹²⁵I-IdUrd 500 μl を加え混和後、37°C、4 時間反応させた。分離試薬(水酸化アルミニウムゲル)を加え混和後、洗浄液(硫酸アンモニウム)で沈澱部分を 4 回洗浄。沈澱部分の放射活性をウェル型シンチレーションカウンターで測定し、そ

* 東京医科歯科大学難治疾患研究所

** 同 第二外科

受付：63年2月8日

最終稿受付：63年6月8日

別刷請求先：東京都文京区湯島 1-5-45 (〒113)

東京医科歯科大学難治疾患研究所

坂本 忍

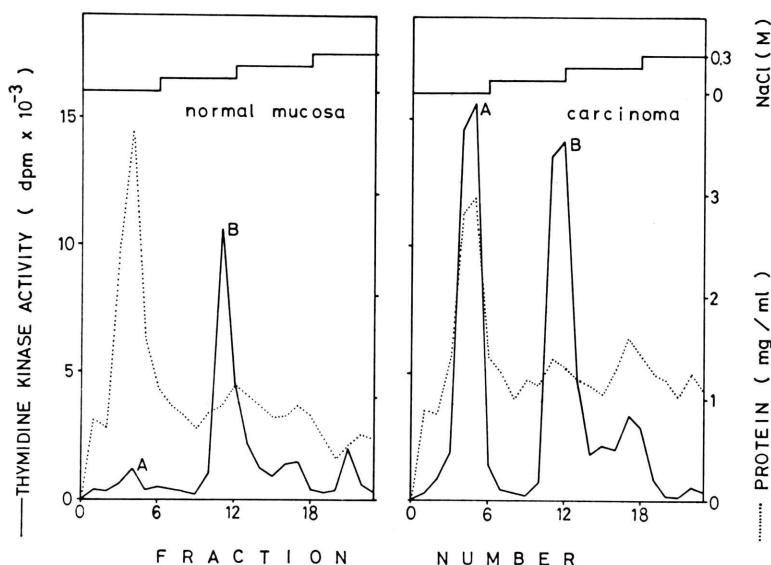


Fig. 1 Typical elution profiles of TK activity from DEAE-cellulose column chromatography in normal mucosa and colon cancer in humans. The column was eluted with 6.0 ml each of the same buffer containing increasing quantities of NaCl. The activities eluted at NaCl concentration of 0 M and 0.1 M were designated peaks A and B, respectively. Low concentrations (0.5–1.0 mM) of dCTP did not inhibit peak A activity, and in fact slightly increased the activity, but reduced peak B activity (Sakamoto S, et al: Carcinogenesis 5: 183–185, 1984). It was suggested that peak A corresponded to an isozyme involved closely in DNA synthesis.

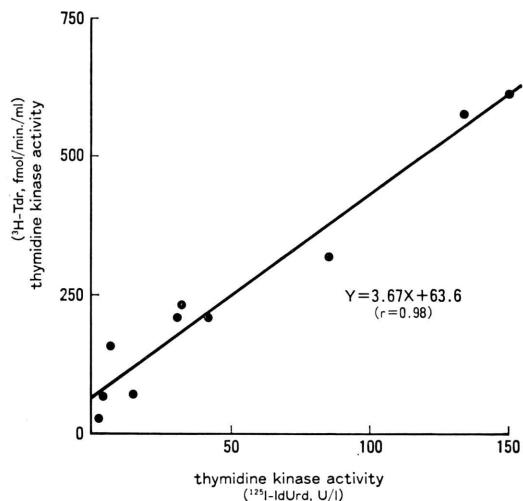


Fig. 2 Correlation between the serum TK activities determined by REA system using ^{125}I -iodo deoxyuridine (U/l) and that using ^3H -thymidine (fmol/min/ml). Means of TK activities in sera of 10 patients with colorectal cancer or leukemia were well correlated positively ($Y = 3.67X + 63.6$), with a correlation of 0.977.

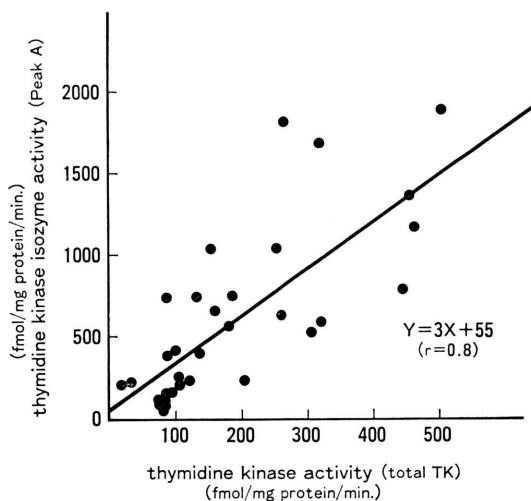
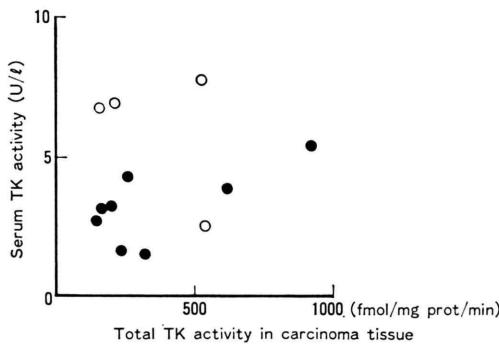


Fig. 3 Correlation between activities of cytoplasmic total TK and TK-isozyme (peak A) eluted by 0 M buffer without NaCl from DEAE-cellulose column chromatography in human colorectal cancer. Means of activities were well correlated positively ($Y = 3X + 55$), with a correlation coefficient of 0.8.

Correlation of Thymidine Kinase activities between carcinoma tissue and serum



Correlation of TK-isozyne (peak A) activities between carcinoma tissue and serum

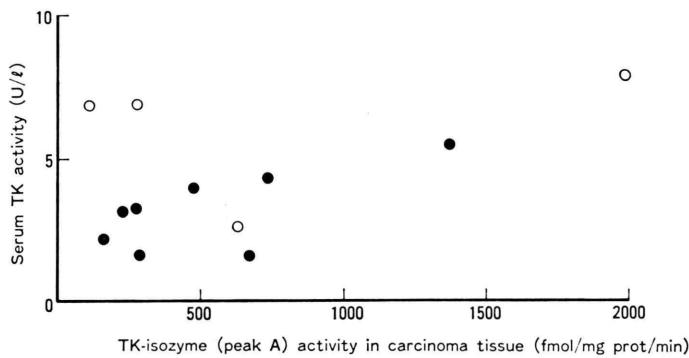


Fig. 4 Correlation between activities of cytoplasmic total TK (upper figure) or TK-isozyne (peak A) (lower figure) and the serum TK activity in the patients with colorectal cancer. Open circle (○): the cases with distant metastasis.

の酵素活性を Gronowitz ら⁷が樹立した単純ヘルペスウイルス感染培養細胞株 (BHK21/13S) より抽出して得た standard TK を用いて U/l で表した。2) ヒト大腸癌組織中 TK-isozyne を DEAE-cellulose column chromatography で分離した (Fig. 1)。0 M および 0.1 M NaCl を含む buffer で溶出される TK 活性分画をそれぞれ peak A および peak B とした。正常大腸粘膜の TK 活性はほとんど peak B の活性分画に回収されたが、大腸癌組織では peak B の軽度活性増加と peak A の顕著な活性増加が認められた (5 倍, $p < 0.001$)⁴⁾。

そこで総 TK 活性と TK-isozyne 活性の相関について検討した。

- 3) 血清 TK 活性と、癌組織中総 TK 活性および TK-isozyne 活性について検討した。
- 4) 大腸癌患者を stage 別に分類し、血清 TK 活性との比較検討を行った。
- 5) 大腸癌患者を遠隔転移の有無により分類し、血清 TK 活性との比較検討を行った。

III. 結 果

- 1) 血清 TK 活性について、³H-Tdr を用いる

Serum TK activities in colorectal cancer patients

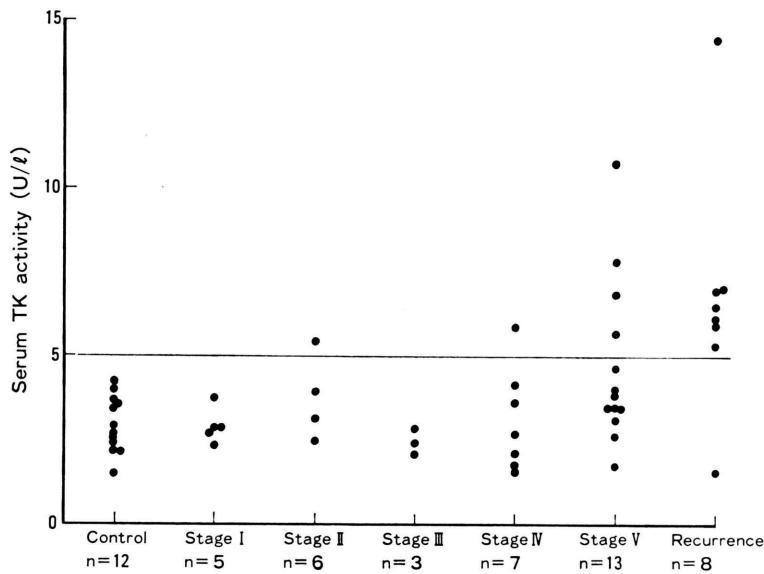


Fig. 5 Serum TK activities in the subjects of control, and clinical stages (I-V) and recurrence with colorectal cancer.

assay 系と、¹²⁵I-IdUrd を用いる assay 系との測定値について相関を求めた (Fig. 2)。回帰直線は、 $Y=3.67X+63.6$ であり、相関係数は、 $r=0.98$ であった。血清 TK 活性は、³H-Tdr を用いる assay 系では僅かに高値に測定され、また低濃度における血清 TK 活性は、¹²⁵I-IdUrd を用いる assay 系でより安定した精度と再現性が得られた。

2) ヒト大腸癌組織での総 TK 活性と TK-isozyme 活性の相関を検討した (Fig. 3)。peak A と総 TK 活性では、回帰直線 $Y=3X+55$ 、相関係数 $r=0.8$ と、正の相関を示したが、peak B と総 TK 活性は相関が認められなかった ($Y=0.8X+617$, $r=0.3$)。

3) ヒト大腸癌組織の総 TK 活性および peak A 活性と血清 TK 活性の相関について検討したが (Fig. 4, 上・下)、血清 TK 活性と組織中 TK 活性とは相関が認められなかった。

4) 大腸癌患者を stage 別に分類し、血清 TK 活性の検討を行った (Fig. 5)。対照群として、炎症性疾患を除く成人の良性疾患患者および健常人血清を用いた。この対照群血清 TK 活性は、

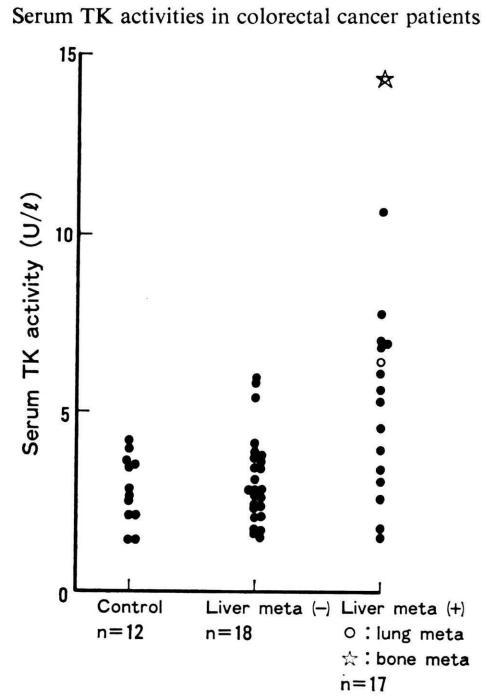


Fig. 6 Serum TK activities in the patients with or without distant metastasis to liver, bone or lung.

$2.93 \pm 0.85 \text{ U/l}$ (n=12) であり, mean + 2 S.D. = 4.63 であるところから, 正常値は 5.0 U/l を cut off 値とした。stage I から IV までの大腸癌患者血清 TK 活性は, 対照群と比べて差が認められなかったが, stage V では 13 例中 4 例 (31%) が高値を示した。また, 再発群では 8 例中 7 例 (88%) で高値を示した ($p < 0.05$)。

5) 大腸癌症例を肝・肺・骨といった遠隔転移の有無により分類し, 血清 TK 活性を検討した (Fig. 6)。遠隔転移を有する症例では, 対照群および遠隔転移の認められない症例に比べて, 血清 TK 活性が有意に高かった ($p < 0.05$)。

IV. 考 察

Gronowitz ら⁷⁾は, ^{125}I -IdUrd を基質とした REA システムを開発し, 悪性血液疾患では血清 TK 活性が高値を示す症例で予後の悪いことを報告した。従来の ^3H -Tdr を基質とした assay 系よりも高感度測定が可能であるとの報告から, 今回 ^{125}I -IdUrd を基質とした REA キットを用いて, ヒト大腸癌患者血清 TK 活性について検討した。

正常値は, 平均 $2.93 \pm 0.85 \text{ U/l}$ と, 他施設⁹⁾の報告と差がなく, cut off 値も同じく 5 U/l とした。

血清 TK 活性について, 従来の ^3H -Tdr を基質とした assay 系と ^{125}I -IdUrd を基質とした assay 系で比較した結果, 相関係数 $r = 0.98$ と良い正の相関を示したが, TK 活性低値の標本では, ^3H -Tdr を基質とするとばらつきが多く, ^{125}I -IdUrd で安定した測定結果が得られた (Fig. 2)。

ヒト大腸癌組織の TK を DEAE-cellulose column chromatography で分離したところ, 2 つの活性分画に分かれた (Fig. 1; peak A, peak B)。peak A に溶出される TK-isozyme が, deoxy cytidine-triphosphate (dCTP) による活性阻害を受けにくいためから, この TK-isozyme は DNA 複製に密接に関与しているものと考えられ⁴⁾, いわゆる cytoplasmic TK または foetal type TK と同じものであるという可能性もある^{1,2)}。一方, peak B に溶出されてくる TK-isozyme は, いわゆる mitochondrial TK または adult type TK で

あるかもしれない^{1,2)}。ヒト大腸癌組織の総 TK 活性に, TK-isozyme の前者 (peak A) が正の相関を示すこと (Fig. 3), また, Gronowitz ら⁸⁾が, 血清 TK は cytoplasmic TK と類似した性質を有していると報告しており, ヒト大腸癌組織中の総 TK 活性, peak A 活性と血清 TK 活性について検討したが, 正の相関は得られなかった (Fig. 4)。

しかし, 大腸癌患者を stage 別, または遠隔転移の有無で区別し, 血清 TK 活性を検討すると (Figs. 5, 6), stage V および再発症例, ことに遠隔転移を伴う症例で高値を示した。血清 TK 活性の測定は, 大腸癌では腫瘍マーカーとしての意義よりも, むしろ病態, 病期を知るうえで有用で, 術後症例の follow up に応用されるものと思われる。

V. 結 語

①血清 TK 活性正常値は, $2.93 \pm 0.85 \text{ U/l}$ であった。②大腸癌組織中総 TK 活性および peak A (TK-isozyme) 活性とは正の相関が成立するが, 血清 TK 活性との間には相関が認められなかった。③大腸癌患者で stage V および再発症例, ことに遠隔転移を伴う症例において血清 TK 活性が高値を示した。④固形癌症例での血清 TK 活性測定は, 病態, 病期を把握するうえで有用と思われた。

本論文の要旨は, 第 25 回日本癌治療学会総会 (1987, 10 月, 札幌) で発表した。

TK-REA キットを用いた血清 TK 活性測定に際し, 協力していただいた, 第一ラジオアイソトープ研究所関係各位に深謝する。

文 献

- 1) Taylor AT, Stafford MA, Jones OW: Properties of thymidine kinase partially purified from human fetal and adult tissue. *J Biol Chem* **247**: 1930-1935, 1972
- 2) Nawata H, Kamiya T: Two molecular forms of thymidine kinase in the cytosol of regenerating rat liver. *J Biochem* **78**: 1215-1224, 1975
- 3) Okuda H, Arima T, Hashimoto T, et al: Multiple forms of deoxythymidine kinase in various tissues. *Cancer Res* **32**: 791-794, 1972
- 4) Sakamoto S, Sagara T, Iwama T, et al: Increased

- activities of thymidine kinase isozymes in human colon polyp and carcinoma. *Carcinogenesis* **6**: 917-919, 1985
- 5) Sakamoto S, Iwama T, Ebuchi M, et al: Increased activities of thymidine kinase isozymes in human mammary tumors. *Br J Surg* **73**: 272-273, 1986
- 6) Sakamoto S, Kuwa K, Tsukada K, et al: Relative activities of thymidylate synthetase and thymidine kinase in 1,2-dimethylhydrazine-induced colon carcinomas in rats. *Carcinogenesis* **8**: 405-408, 1987
- 7) Gronowitz JS, Hagberg H, Källander CFR, et al: The use of serum deoxythymidine kinase as a prognostic marker, and in the monitoring of patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Br J Cancer* **47**: 478-495, 1983
- 8) Gronowitz JS, Källander CFR, Diderholm H, et al: Application of an in vitro assay for serum thymidine kinase: results on viral disease and malignancies in humans. *Int J Cancer* **33**: 5-12, 1984
- 9) Yoshikawa O, Takakuwa Y, Miyasawa K, et al: Measurement of thymidine kinase with the radioenzyme assay kit and its clinical significance. *J Clinic Exp Med (Jpn)* **142**: 969-970, 1987

Summary

Clinical Value of Thymidine Kinase Activities in Sera and Tumor Tissues of Patients with Colorectal Cancer

Shinobu SAKAMOTO*, Yasuyuki KAWACHI**, Kunio TSUKADA**, Yoshio MISHIMA** and Ryohei OKAMOTO*

*Medical Research Institute, **The Second Department of Surgery, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo 113, Japan

DNA-synthesizing enzyme, thymidine kinase (TK) has been known to be high in activity in proliferating tissues. It was reported that radioenzyme assay (REA) system using ^{125}I -iodo deoxyuridine as a substrate was more sensitive than that using ^3H -thymidine. In the present work, serum TK activity in colorectal cancer bearing patient was measured by the REA system with ^{125}I -iodo deoxyuridine, and its clinical value was investigated.

1) Average activity of serum TK in control group was 2.93 ± 0.85 U/l. The REA system with ^{125}I -iodo deoxyuridine could detect low activity of serum TK better than that with ^3H -thymidine. 2) The activities of total TK and the specific TK-

isozyme separated by DEAE-cellulose column chromatography were well correlated positively, but there were no correlation between those and the serum TK activity. 3) In the patients in clinical stage V and recurrence, especially in the cases with distant metastasis, high activities in serum TK were observed.

These results indicate that the measurement of serum TK activity may be valuable to determine the clinical stages in the patients with solid tumors.

Key words: Thymidine kinase (TK), ^{125}I -iodo deoxyuridine (^{125}I -IdUrd), Radicenzyme assay (REA)-kit, Serum TK activity, Human colorectal cancer.