

悪性腫瘍に対する尿中 TGF- β 測定の意味

倉 西 文 仁

広島大学医学部外科学第二講座 (主任: 土肥雪彦教授)

受付 平成8年9月10日

受理 平成8年12月5日

増殖因子の中でも Transforming Growth Factor- β (以下 TGF- β) は腫瘍細胞の増殖抑制など種々の作用をもつ因子として近年注目されている。特にその体内動態に関しては数多くの研究がなされてきた。

著者はイオン交換クロマトグラフィーと Enzyme Linked Immunosorbent Assay 法 (以下 ELISA 法) の一種である Avidin-Biotin peroxidase Complex 法 (以下 ABC 法) を用いて尿中 TGF- β を分離精製し, 尿中 TGF- β が腫瘍マーカーとして有用か否かを検討した。

同時に血清中 TGF- β も ABC 法にて検出し, 尿中 TGF- β との関連性を検討し, さらに腫瘍からの TGF- β 産生を証明するために, 腫瘍組織内 TGF- β の局在を免疫組織学的染色法にて検索した。

結果は以下の如く要約される。

1. 悪性腫瘍患者6例またその対象として健康成人6例より得られた尿中 TGF- β 活性を凍結乾燥, 酸-エタノール法, ゲル濾過後 ABC 法にて検出した。

健康成人6例, 悪性腫瘍6例の計12例全てにおいて排除限界をこえる分画に TGF- β 活性を認めしたが, TGF- β の分子量である25,000付近に TGF- β 活性は認められず, 本法では TGF- β は複合体を形成して存在するもののみが検出されていると考えられた。従って凍結乾燥, ゲル濾過, ABC 法による TGF- β の分離・定量は精製率・回収率共に低く, また手技も煩雑なため測定手技としては不適當と考えられた。

2. 著者は今回初めて尿中 TGF- β 濃縮・精製を, イオン交換クロマトグラフィー (DEAE Sephacel) を採用し凍結乾燥などの過程を省略することによりサンプルのゲルへの吸着を最小限とし, 回収率の改善に成功した。

DEAE Sephacel により分離し ABC 法にて TGF- β を検出したところ pH5.2 付近において, 悪性腫瘍群では健康成人に比べ高く幅の広い TGF- β 活性を認めた。TGF- β の1日尿中への排出量を比較してみると健康成人10例では平均値 $9.8 \pm 5.2 \mu\text{g/day}$ と低く, 一方悪性腫瘍群として肺癌10例, 肝癌8例, 胃癌6例計24例は $49.5 \pm 35.8 \mu\text{g/day}$ と有意に高値であった ($p < 0.01$)。

3. イオン交換クロマトグラフィーで精製された TGF- β は Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (以下 SDS-PAGE) により, 分子量25,000付近に単一バンドとして認められた。また等電点電気泳動 (Iso-electric focusing-Polyacrylamide Gel Electrophoresis: 以下 IEF-PAGE) においては pH5.2 付近にバンドを認めた。

4. 尿中 TGF- β の腫瘍マーカーとしてのカットオフ値を, 健康成人の平均値 +2SD (SD=standard deviation) $20.1 \mu\text{g/day}$ とすると, 肺炎の陽性率は20.0%, 肝硬変は33.3%であった。一方肺癌10例の陽性率は80%, Stage 別では Stage I は100.0%, Stage IV は60.0%, 肝癌8例の陽性率は75.0%, Stage I では100.0%, Stage IV では50.0%であった。胃癌6例の陽性率は66.6%であり, Stage I では33.3%, Stage IV では100.0%であった。全悪性腫瘍24例の感度75.0%, 特異度72.7%であった。従って悪性疾患の指標として尿中 TGF- β の定量は非常に有用と考えられた ($\chi^2=6.63$, $p < 0.01$)。

5. 尿中 TGF- β と他の腫瘍マーカーを比較検討した。血清中 CEA においては肺癌10例, 肝癌7

例, 胃癌5例これら悪性腫瘍22症例のCEA陽性率は54.5%に対し, 尿中TGF- β の陽性率は72.7%であった。肝癌7例において, 血清中AFP陽性となる症例は1例(14.3%)であり, PIV-KA-II陽性症例は7例中5例(71.4%)であった。一方尿中TGF- β 陽性症例は7例中5例(71.4%)であった。他の腫瘍マーカーと比較して, 尿中TGF- β は鋭敏と考えられた。

6. 手術前後の尿中TGF- β の変動を治癒切除可能であった肺癌Stage Iの3症例で比較検討した。3症例共に術後, 著明に低下しており, 尿中TGF- β は腫瘍由来と推測され, 手術後の経過を見るパラメーターとしても非常に有用と考えられた。

7. 免疫組織学的にTGF- β の局在を検討したところ, 肺癌, 肝癌, 胃癌の癌細胞の細胞質にTGF- β のびまん性濃染像を認めた。またTGF- β レセプターも癌細胞において濃染像を認めた。

以上の結果より尿中TGF- β は癌細胞由来であり, また今回開発された本測定法は簡便かつ回収率も高く, 得られた尿中TGF- β は悪性腫瘍に対する腫瘍マーカーとして臨床的に有効な指標となると考えられた。

Key words: Urine TGF- β , Tumor marker, Avidin-Biotin peroxidase complex method, Ion exchange chromatography, Immunohistochemical staining

1976年Todaroら⁵³⁾はmurine sarcoma virusにより形質転換を受けた細胞は上皮増殖因子(Epidermal Growth Factor: 以下EGF)EGFレセプターの見かけ上の減少を示すことを発見した。

これを端緒としてその後検索が進み1982年にEGFレセプターと結合しているEGFとは異なる因子が発見されSarcoma Growth Factor(以下SGF)と名づけられた⁸⁾。

当初SGFは, 正常線維芽細胞を増殖させる因子として腫瘍のautocrine的増殖に関与するものと考えられた²⁴⁾。SGFは軟寒天培地中のコロニー形成能からTGFと呼ばれるようになった。その後TGFの中でも軟寒天培地中で単独でコロニー形成能をもつものをTGF- α とし, EGFレセプターへの結合能がなくEGFとの共存下においてコロニー形成能を有するものをTGF- β と統一された⁴⁰⁾。

検索がすすむにつれTGF- β は種々の悪性腫瘍^{14,27)}や種々の細胞株の培養液中にも活性が認められた⁵²⁾。さらに正常組織にも存在し, その由来は多彩であることが判明した^{39,41)}。

また化学的に形質転換した細胞からも放出され³⁴⁾, SGFを含めて総称してTGFと呼ぶようになった。

TGF- β はその後次々とアイソフォームが発見された⁴⁵⁾。1987年ブタ血小板から発見されたTGF- β ²⁹⁾はTGF- β 2とされた。従って従来のTGF- β はTGF- β 1と命名された。

さらに1988年にはTGF- β ³¹⁰⁾が報告され, 現在ではTGF- β ⁴²²⁾, TGF- β ²⁷⁾まで5種類のアイソフォームが区別されている。

発見当初は腫瘍細胞にapocrine的に作用するものとして注目された。しかし研究がすすむにつれてその作用は, 細胞増殖の促進⁸⁾・阻害⁶⁰⁾・抑制³⁾・DNA合成の抑制³⁾・血管新生の促進・免疫抑制⁵⁰⁾等極めて多岐にわたることが判明している。

いまだTGF- β の体内での動態に関して不明の点が多いが健康人⁵⁵⁾, 妊婦⁵⁵⁾, 癌患者⁴⁹⁾, 悪性黒色腫²⁶⁾, 担瘤ヌードマウス⁵⁴⁾等の尿中に認められる事が判明している。

Twardzikら⁵⁵⁾は尿を凍結乾燥にて濃縮し酸-エタノール法で抽出後ゲル濾過したものをNormal Rat Kidney細胞(以下NRK細胞)を使用した生物学的測定を行い腫瘍マーカーとしての有用性を指摘している。

Miyakami³¹⁾は悪性腫瘍患者の尿中にTGF- β を認め, 健康な対象群にはTGF- β が認められないとしており, 尿中TGF- β の腫瘍マーカーとしての可能性を示唆した。

これまで多くの報告は尿を凍結乾燥等の手段により濃縮後, ゲル濾過にて抽出しさらに軟寒天培地を用いた生物学的測定方法により定量されているが, これらの過程においてはTGF- β の損失が多く手順も煩雑である。また人間の体内でlatency associated peptide(以下LAP)と結合し, さらにS-S結合でlatent TGF- β binding protein(以下LTBP)と結合して生理的には不活性の状態で存在している³²⁾。

基礎実験では酸³⁹⁾・アルカリ(pH12.5以上)・8M尿素⁹⁾・0.02%SDS³²⁾・熱処理(100℃5分)・ある種の酵素³¹⁾等の作用により活性型TGF- β となると言われ

ているが, 体内でいかなる過程でLAP, LTBPがはずれて活性化し, 尿中に排出されるかは解明されていない。

そこで著者は活性型TGF- β の強い吸着性を考えると凍結乾燥及びSephadex G-100によるゲル濾過では分離困難と判断し, 今回初めてイオン交換クロマトグラフィーを用いて尿中TGF- β を分離精製した。

またABC法で定量することにより悪性腫瘍に対する腫瘍マーカーとしての有用性を検討した。同時に血清中のTGF- β もABC法にて検出し, 尿中のTGF- β との関連も検討した。

さらに癌細胞での産生を裏付けるためにTGF- β の癌組織中の局在を免疫組織学的染色法にて検索した。

対象と方法

尿を以下の, 1)ゲル濾過クロマトグラフィーあるいは, 2)イオン交換クロマトグラフィーにて分離精製し, 3)ABC法にてTGF- β を測定し, 次にTGF- β を用いて標準曲線を作成し, 1日のTGF- β の尿中排出量を計算した。

分離したTGF- β は, 4)SDS-PAGEにより分子量を確認し, 5)IEF-PAGEにて等電点を確認した。尿を採取した患者の血清及び遠沈のみで前処置をしていない原尿も同様にABC法にてTGF- β の濃度を測定した。また尿を採取した癌患者の組織を抗TGF- β ポリクロナール抗体(R&D systems社製)を使用して, 6)免疫組織染色法にて染色しTGF- β の局在を調べた。

ABC法に使用した抗TGF- β 抗体は抗TGF- β 抗体ポリクロナールキット(R&D systems社製)に含まれるもので抗体溶液(1%ゼラチン, 0.5M塩化ナトリウムを含む0.02M Tris-HCl pH7.5; 以下抗体溶液)に溶解し使用した。

この抗体はブタの血小板から取り出したTGF- β を抗原として, ウサギを免疫動物として作成したものでヒト血小板TGF- β を含んだアフィニティカラムにて精製されたIgG抗体であり, ヒトもしくはブタのnative, SDS-denatured TGF- β と強く反応する。

1)ゲルクロマトグラフィー

Twardzikら⁵⁵⁾の方法に従い尿を凍結乾燥, 酸-エタノール法にて抽出後目的とするTGF- β の分子量が12,500のモノマーからなるダイマーで, 分子量25,000であることよりゲルクロマトグラフィー(Sephadex G-100; Pharmacia社製)に重層し分画器(ISCO社製UA-5)にて1M酢酸にてゲル濾過した。

Sephadex G-100はカラムに充填後カラム容量の2

-3倍の1M酢酸で自然落下にて洗浄し平衡化した。排除限界としてはBlue Dextran 2000(Pharmacia社製)を使用した。Bio Rad社製のGel Filtration standardを使用し標準曲線を作成した。

対象は広島大学第二外科における腎機能が正常と考えられる症例である。すなわち血清中のBUN, creatinineが正常で尿検査上血尿などの異常所見の無い症例とした。

その内訳はTable 1に示す如く悪性腫瘍として前立腺癌, 肝癌, 大腸癌各1例, 胃癌3例(平均年齢59.3±13.3歳)計6例, 対照群として健康成人6例(男性3例, 女性3例; 平均年齢54.0±19.5歳)である。

i) 2 litersの尿を遠沈(10,000 rpm, 30分, 4℃)し, 凍結乾燥した。

ii) 2 litersの尿の残余に375 ml 95%エタノール, 7.5 ml 濃塩酸 phenylmethylsulfonyl fluoride (Sigma社製) 0.1 mg/ml, アプロチニン(0.15 trypsin inhibitory units/ml; Sigma社製)を加えて185 mlの蒸留水に溶解し4℃にて一晩抽出した。

iii) 再度遠沈(10,000 rpm, 1時間)した上清を濃水酸化アンモニウムにてpH5.2に調整した。

iv) 100 mlにつき1 mlの2M酢酸アンモニウムを加え沈殿物は除く。

v) 上清に4倍量の無水エーテルと2倍量のエタノールを加え-20℃にて24時間抽出した。

vi) 遠沈後沈殿物を1M酢酸に溶解し, セルコース透析膜(M.W.cut off 8,000; Spectrum Medical Industries社製)を使用して0.2M酢酸にて透析した。

vii) 透析後凍結乾燥し1M酢酸 6.5 mlに溶解した。

viii) 再度遠沈し上清をSephadex G-100(2.5 cm × 75.0 cm)に重層し, 分画器にてゲル濾過クロマトグラフィーを行った(流量は20 ml/hr, 1分画 4.0 ml)。なおゲル濾過クロマトグラフィーはクロマトチャンバー内を4℃に保ち行った。TGF- β (R&D社製)を使用して標準曲線を作成しTGF- β の1日量を算出した。

2)イオン交換クロマトグラフィー

対象症例は広島大学第二外科及びその関連病院における腎機能が正常と考えられる45例である。その内訳はTable 2に示す如く健康成人(男4例・女6例; 平均年齢64.9±13.9歳), 良性疾患として肺炎(男1例・

女4例; 平均年齢72.8±16.3歳), 肝硬変(男6例; 平均年齢58.5±8.2歳), 悪性疾患として肺癌(Stage I 及び IV の各5例, 男7例・女3例; 平均年齢64.8±9.5歳), 肝癌(Stage I 及び IV の各4例, 男5例・女3例; 平均年齢62.6±9.6歳), 胃癌(Stage I 及び IV の各3例, 男6例; 平均年齢58.5±10.8歳)の24時間尿を遠沈後(12,000 rpm, 10分), 濃塩酸にて pH4.0 に調整して使用した。

i) 内径 1.5 cm のカラムに 6.0 cm の DEAE Sephacel (Pharmacia 社製) を充填し, 4℃一晩静置後, 酢酸ナトリウム緩衝液 (0.2M, pH4.0) で平衡化した。

ii) 尿をイオン交換樹脂カラムに吸着させた後, カラム容量の10倍以上の酢酸ナトリウム緩衝液にてカラムを洗浄した。

iii) 0.2M酢酸ナトリウムを用いて pH4.0-6.0 の間で pH 勾配を作成し分画採取した。

尚この過程はクロマトチャンパー内を 4℃に保ち行った (流量は 20 ml/hr, 1分画 5.0 ml)。

3) ABC 法

i) ゲル濾過クロマトグラフィー (Sephadex G-100) もしくはイオン交換クロマトグラフィー (DEAE Sephacel) にて分離した各分画を 50 μ l ずつマイクロプレート (Falcon microtiter plate 3910; Falcon 社製) に被覆し 4℃にて一晩静置後, hydroxymethyl amino-methane (以下 Tris; ナカライテスク社製) Buffered Saline (以下 TBS) にてプレートを洗浄した。同時に遠沈 (12,000 rpm, 10分) しただけの尿を被覆し TGF- β の検出を試みた。

ii) 非特異的吸着を除外するためにブロック溶液 350 μ l (3%ゼラチンを含んだ TBS) に全てのウェルをブロック後, TTBS (0.05% polyoxyethylene sorbitan mono laurate; Tween 20, 0.5M 塩化ナトリウムを含む 0.02M Tris-HCl pH7.5 を含んだ Tris Buffered Saline) にて洗浄した。

iii) 抗 TGF- β 抗体を抗体溶液に溶解し各ウェルに 50 μ l 加え 1時間, 室温にて静置後 TTBS にて洗浄した。

iv) ビオチン標識化抗ウサギ IgG 抗体を抗体溶液にて100希釈し, 各ウェルに 50 μ l 加え, 1時間室温にて静置後, TTBS にて洗浄した。

v) アビジン標識化アルカリフォスファターゼを抗体溶液にて100倍に希釈し, 各ウェルに 50 μ l 加え 1時間室温にて静置後, TTBS にて洗浄した。

vi) アルカリフォスファターゼ基質溶液 p-nitrophenylphosphate (Behringer Mannheim 社製) を各ウェルに 50 μ l 加え, 1時間後発色を 1N水酸化ナトリウム 50 μ l で停止させたのち, ELISA リーダー (MTP22 Micro plate photometer; Corona electric 社製) にて吸光度を測定 (405 nm) した。なお室温は25℃にて一定とした。

4) SDS-PAGE

i) 凍結乾燥したサンプルをサンプルバッファー (蒸留水 5.0 ml, 0.5M Tris 塩酸 pH6.8, 1.25 ml, グリセオール 1.0 ml, 10% Sodium Dodecyl Sulfate 2.0 ml, 0.05% (W/V) bromophenol blue 0.25 ml) に溶解し, 95℃にて3分沸騰水の中で静置した。SDS はナカライテスク社製を使用した。

ii) TEFCO-GEL SDS-PAGE mini (conc. 4-20T%, Thickness 1.5 mm, Comb 10 well; フナコシ社製) を使用しゲルに重層した。

iii) 25 mAにて1時間通電後クマシーブルー (LKB 社製) にて染色した。

分子量のマーカーとしては SDS-PAGE Molecular Weight Standard-Low (Bio Rad 社製) を使用した。

5) IEF-PAGE

i) 凍結乾燥したサンプルをサンプルバッファー (蒸留水 6.8 ml, グリセオール 3.0 ml, Servalyt レンジ pH3-10; フナコシ社製, 0.2 ml) に溶解する。

ii) 10%スクロース 50 μ l で各ウェルを満たし TEFCO-GEL IEF-PAGE mini (conc. 4T%, Thickness 1.0 mm, Comb10 well; フナコシ社製) を使用し各ウェルに10 μ lずつ重層した。

iii) 100V 30分, 200V 30分, 500V 60分通電後クマシーブルー及び銀染色法にて染色した。銀染色には第一化学薬品社製の銀染色キットを使用した。pH のマーカーとしては Pharmacia 社製の IEF-PAGE Iso-electric focusing calibration キットを使用した。

6) 免疫組織染色法

i) パラフィンに包埋された組織標本から 0.4-0.6 μ の厚みの切片を作成し, 24時間乾

燥後キシレン, エタノールにて脱パラフィン化を行った。

ii) 蒸留水にて洗浄後, PBS (Dulbecco's PBS; 日水製薬社製) 含 0.3% H₂O₂ メタノール溶液にて洗浄した。

iii) 正常血清に反応させ, 一次抗体を PBS 含 0.1% Bovine Serum Albumin (以下 BSA; Sigma 社製) にて10倍希釈し, 抗-TGF- β 抗体, もしくは抗 TGF- β レセプター抗体 (R&D systems 社製) を加えた。

iv) PBS にて洗浄し, ビオチン化抗体を加えた。

v) PBS にて洗浄し, ABC 試薬を加えた。

vi) PBS にて洗浄し, ペルオキシダーゼ基質溶液 (3,3'-diaminobenzidine; 以下 DAB Vector 社製の Vectastain ABC キットを使用) を加え, メチルグリーンにて核染色し乾燥後封入し鏡検した。

normal control としては赤血球内に TGF- β が多量に存在することよりこれを指標とし, negative control としては免疫組織染色の過程で一次抗体を省略したものを用いた。判定は DAB による茶褐色の発色により行った。TGF- β 活性化のための1N塩酸もしくは1N酢酸にて前処置を加えるときは ii) を行った後, 1N塩酸もしくは1N酢酸を30分

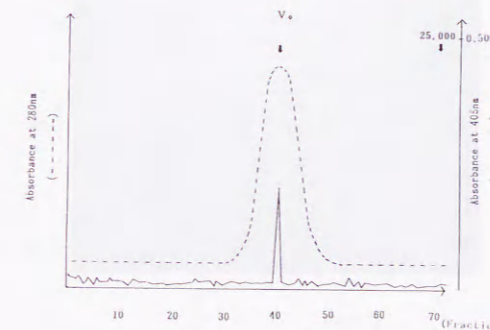


Fig. 1. Urine TGF- β extracted by Gel Chromatography.

Urine specimens were extracted by acid ethanol method and applied to a Sephadex G-100 column (2.5 \times 75.0 cm) equilibrated with 1M acetic acid. Each fractions (4.0 ml) were detected by ABC method. (Vo=Void volume)

間反応させその後 PBS にて洗浄した。反応はすべて25℃の室温にて行った。

なお全ての測定結果における有意差検定には t 検定, χ^2 検定, Seheffno 法を用いた。

結 果

1. 分離精製

1) ゲルクロマトグラフィーによる分離

TGF- β の分子量と考えられている25,000付近に TGF- β は認められなかった。TGF- β がダイマーであることより分子量12,500付近も検索したが検出されなかった。健康成人6例, 悪性腫瘍6例の計12例全てに

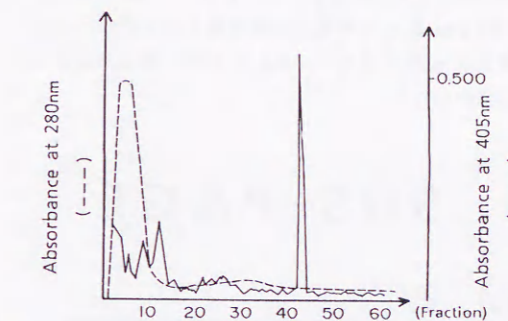


Fig. 2. Benign case (Pneumonia, 43 yrs, Female)

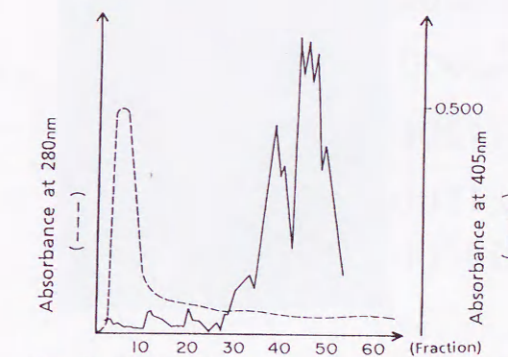


Fig. 3. Malignant case (Gastric Cancer, 39 yrs, Male)

Fig. 2, 3. Urine TGF- β extracted by ion exchange chromatography.

DEAE-Sephacel column (1.5 \times 6.0 cm) was equilibrated with 0.2M acetic acid buffer (pH 4.0). Urine specimens were adjusted pH 4.0 by conc. HCl and applied to DEAE-Sephacel column. Each fractions (5.0 ml) were detected by ABC method.

おいては標準曲線から排除限界と考えられる所に単一ピークとして TGF- β を認めた。

これは Blue dextran 2000 を同じカラムに重層した結果より排除限界に一致すると考えられた (Fig. 1)。

2) イオン交換クロマトグラフィーによる分離

ABC 法にて TGF- β を検出したところ pH5.2 付近に TGF- β 活性を認め, Fig. 2 の健康成人の単一ピークに比べ Fig. 3 の如く悪性腫瘍群では高く幅の広いピークを認めた。

3) SDS-PAGE

Fig. 4 の如く分離された TGF- β は SDS-PAGE により, 分子量25,000付近に単一バンドとして認められた。

4) IEF-PAGE

次に同じイオン交換クロマトグラフィーにサンプルを IEF-PAGE にて等電点電気泳動を行ったが, その等電点は pH5.2 であり, Fig. 5 の如く単一バンドとして認められた。



Fig. 4. Molecular weight estimation of urine TGF- β by SDS-PAGE. Sample was applied to TEF-CO-GEL SDS-PAGE mini (1 hr, 25 mA) and stained by Cumasie Blue. SDS-PAGE Molecular weight Standards-Low: Rabbit muscle phosphorylase b (97400), Bovine serum albumin (66200), Hen-egg white ovalbumin (42600), Bovine carbonic anhydrase (31000), Soybean trypsin inhibitor (21500), Hen-egg white lysozyme (14400). Single band meaned TGR- β appeared in M. W. 25,000 point (\leftarrow).

2. TGF- β の測定

1) 原尿中の TGF- β

遠沈のみで全く前処置をしていない尿原液を ABC 法にて検出を試みたが, TGF- β は検出不可能であった。また1N塩酸を尿原液に加えることにより TGF- β の活性化を計った後, 再度測定を試みたが, 同様にして検出不可能であった。

2) ゲルクロマトグラフィーによる分離

排除限界に含まれる TGF- β を Table 1 の症例においてその量を1日量として算出した。

健康成人6例の TGF- β の1日尿中排出量は平均値 $5.7 \pm 2.2 \mu\text{g/day}$ に対して, 悪性腫瘍6例では $10.4 \pm 6.8 \mu\text{g/day}$ と高値であり, 1%の危険率で有意差を認めた。

3) イオン交換クロマトグラフィーによる分離

TGF- β の1日尿中排出量を Table 2 の症例において比較していると Table 3 の如く健康成人では $9.8 \pm 5.2 \mu\text{g/day}$ と低値であり, 肺炎では $13.9 \pm 14.8 \mu\text{g/day}$, 肝硬変では $25.6 \pm 31.7 \mu\text{g/day}$, これら良性疾患群の平均値は $18.7 \pm 25.5 \mu\text{g/day}$ であった。一方悪性腫瘍群では肝癌10例で平均値は $42.5 \pm 29.7 \mu\text{g/day}$ で

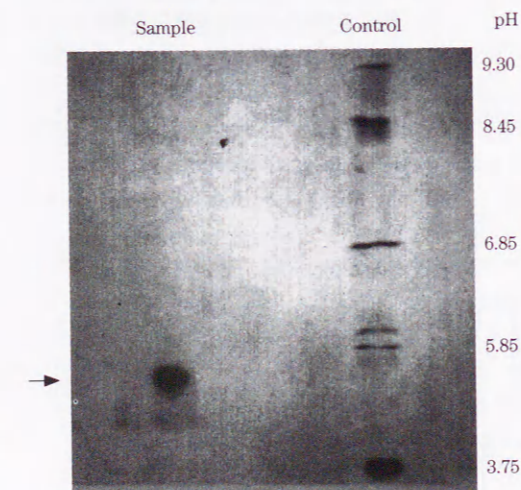


Fig. 5. Isoelectric focusing point of Urine TGF- β by IEF-PAGE. Sample was applied to TEF-CO-GEL IEF-PAGE min (1 hr) and stained by Cumasie Blue. IEF-PAGE Isoelectric focusing calibration kid pH marker; Methyl red (3.75), β -lactoglobulin A (5.20), Bovine carbonic anhydrase B (5.85), Horse myoglobin (6.85), Lentil lectin (8.45), Trypsinogen (9.30). Single band meaned TGF- β appeared in pH 5.2 point (\leftarrow).

あった。肝癌8例の平均値は $69.3 \pm 44.7 \mu\text{g/day}$, 胃癌6例の平均値は $34.9 \pm 13.3 \mu\text{g/day}$ であった。腫瘍群24例全体の平均値は $49.5 \pm 35.8 \mu\text{g/day}$ と高値であった。

Fig. 6 の如く健康成人10例の平均値と各種疾患の平均値を比較したところ Seheffno 法による多重比較検定では健康成人と肝硬変, 肺炎では有意差を認めなかったが, 健康成人と肺癌, 肝癌, 胃癌では有意差を認めた ($p < 0.01$)。

Table 1. Total Output of Urine TGF- β Extracted by Gel Chromatography

	Case	Disease	Age	Sex	Value of TGF- β ($\mu\text{g/day}$)
Normal	1		27	M	6.82
	2		36	M	4.29
	3		36	M	7.74
	4		67	F	5.42
	5		73	F	1.74
	6		78	F	8.08
	Subtotal		54.0 ± 19.5		$5.68 \pm 2.19^*$
Malignant	1	Gastric ca.	32	M	15.31
	2	Colon ca.	57	M	7.80
	3	H.C.C. ^{a)}	63	M	23.08
	4	Gastric ca.	64	M	3.54
	5	Gastric ca.	65	F	7.45
	6	Prostatic ca.	75	M	5.30
	Subtotal		59.3 ± 13.3		$10.41 \pm 6.75^*$
	Total 12		56.7 ± 16.9		8.05 ± 5.55

Urine specimens were clarified by centrifugation, extracted by acid ethanol method, applied to Gel chromatography (Sephadex G-100) and detected by ABC (Avidin-Biotin-Peroxidase complex) method.

*: $p < 0.01$, a) H.C.C: Hepatocellular carcinoma

Table 2. Distribution of Age and Sex

	Disease	Number of case	Age (Mean \pm SD)	Male	Female
	Healthy adult	10	64.9 ± 13.9	4	6
Benign	Pneumonia	5	72.8 ± 16.3	1	4
	Liver cirrhosis	6	58.5 ± 8.2	6	0
Malignant	Lung cancer	10	64.8 ± 9.5	7	3
	stage I	5	67.6 ± 4.3	4	1
	stage IV	5	62.0 ± 12.0	3	2
	H.C.C	8	62.6 ± 9.6	5	3
	stage I	4	65.3 ± 0.8	4	0
	stage IV	4	60.0 ± 13.0	1	3
	Gastric cancer	6	58.5 ± 10.8	6	0
	stage I	3	57.0 ± 1.4	3	0
	stage IV	3	60.0 ± 14.9	3	0
		Subtotal	35	63.3 ± 10.9	24
	Total	45	63.6 ± 12.3	28	17

Urine collected from 10 healthy persons and 35 patients ranging from 36 to 88 years of age. Urine specimens were clarified by centrifugation, adjusted to pH 4.0, and applied to ionexchange chromatography.

また肝硬変, 肺炎の良性疾患と肺癌, 肝癌, 胃癌との間では有意差を認めなかった ($p < 0.01$)。

肺癌, 肝癌, 胃癌の悪性疾患の間では有意差を認めなかった ($p < 0.01$)。

Table 3. Total Output of Urine TGF- β Extracted by Ionexchange Chromatography

Disease	case	Value of TGF- β (Mean \pm SD: μ g/day)
Healthy Adult	10	9.8 \pm 5.2
Pneumonia	5	13.9 \pm 14.8
Liver Cirrhosis	6	25.6 \pm 31.7*
Subtotal	11	18.7 \pm 25.5
Lung Cancer	10	42.5 \pm 29.7*
stage I	5	49.8 \pm 28.2
stage IV	5	35.1 \pm 29.3
H.C.C	8	69.3 \pm 44.7*
stage I	4	81.4 \pm 34.4
stage IV	4	57.2 \pm 50.2
Gastric Cancer	6	34.9 \pm 13.3*
stage I	3	25.6 \pm 9.6
stage IV	3	44.3 \pm 9.1
Subtotal	24	49.5 \pm 35.8

TGF- β was extracted from urine by Ion exchange chromatography (DEAE-Sephacel) and detected by ABC method. (*: $p < 0.01$ versus healthy adult)

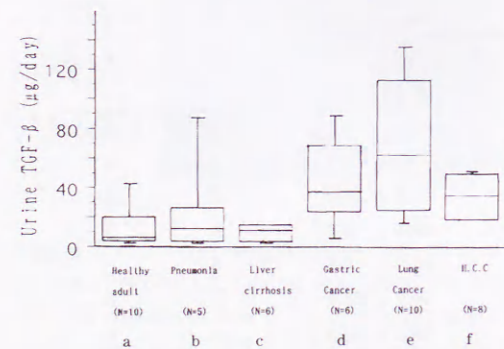


Fig. 6. Daily output of urine TGF- β

Urine specimens adjusted pH 4.0 by conc. HCl were applied to a DEAE Sephacel column (1.5 \times 6.0 cm). Each fractions (5.0 ml) were detected by ABC method and calculated daily output of TGF- β using standard curve. (a-c, d, e, f $p < 0.01$)

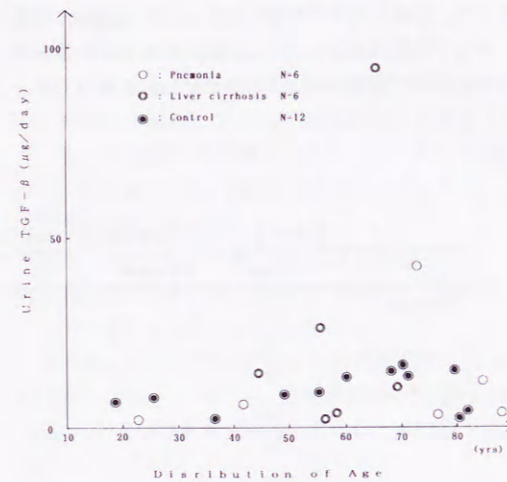


Fig. 7. Correlation between Age and urine TGF- β in non-malignant group.

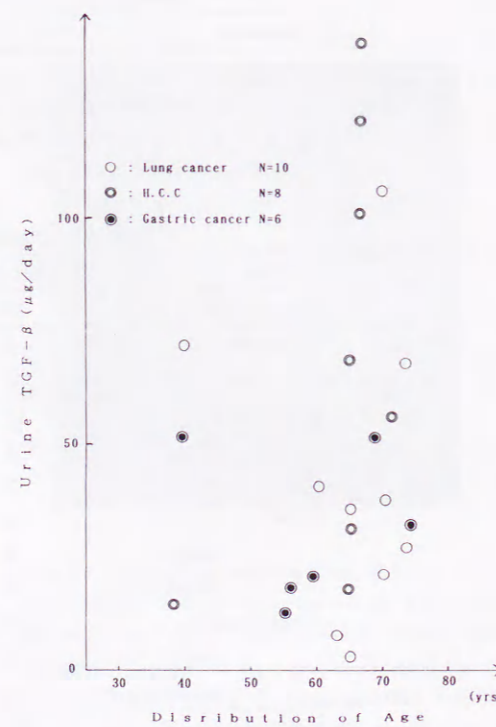


Fig. 8. Correlation between Age and urine TGF- β in malignant group.

ここで尿中 TGF- β と年齢との関係を検討してみると Fig. 7 および8の如く良性疾患24例では $r = 0.15$ (NS), 悪性腫瘍24例では $r = 0.11$ (NS), 良性疾患及び悪性腫瘍症例48例では $r = 0.10$ (NS) であり, いずれも年齢と尿中 TGF- β との間に相関はみられなかった。

4) 手術前後の尿中 TGF- β の変動

肺癌3症例において, Fig. 9 の如く手術前及び術後1カ月に尿中 TGF- β を測定した。

肺癌3症例において術前それぞれ27.8, 37.7, 41.9 μ g/day あったものが, それぞれ0.5, 4.8, 6.3 μ g/day と著明に低下していた。

5) 血清中 TGF- β

Table 4 の如く血清中の TGF- β を ABC 法にて測定したところ, 健康成人では平均 6.2 ± 1.3 ng/ml であるが, 悪性腫瘍では 12.5 ± 7.8 ng/ml と有意に高値であった ($p < 0.01$)。しかし疾患別に Scheffno 法による多重比較検定を行うと, 健康成人と肺癌の間でのみ1%の危険率で有意差を認めた。肺癌, 肝癌, 胃癌のあいだでは有意差を認めなかった ($p < 0.01$)。

健康成人症例における血清中 TGF- β の平均値 $+2SD$ 8.7 ng/ml を腫瘍マーカーとしてのカットオフ

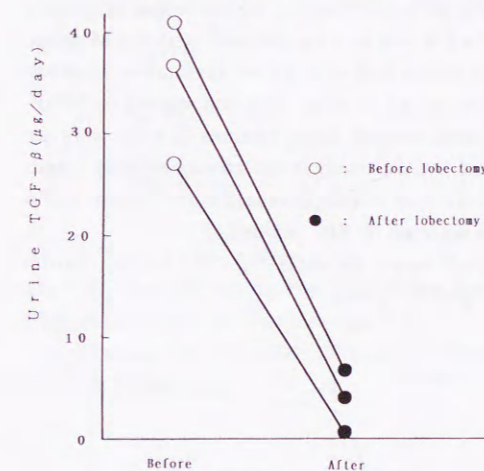


Fig. 9. Change in the daily output of urine TGF- β before and after lobectomy in lung cancer.

DEAE-Sephacel column (1.5 \times 6.0 cm) was equilibrated with 0.2 M acetic acid buffer (pH 4.0). Urine specimens were adjusted pH 4.0 by conc. HCl and applied to DEAE-Sephacel column. Each fractions (5.0 ml) were detected by ABC method and calculated daily output of urine TGF- β using standard curve.

Table 4. Value of Serum TGF- β Detected by ABC Method

Disease	Case	Age (yrs)	Value of TGF- β (Mean \pm SD) (μ g/ml)
Healthy adult	30	66.3 \pm 37	6.16 \pm 1.29
Gastric Cancer	7	66.1 \pm 10.8	7.02 \pm 1.33*
H.C.C	8	63.8 \pm 10.2	12.55 \pm 6.63*
Lung cancer	9	64.4 \pm 5.7	16.82 \pm 8.87*
Subtotal	24	64.6 \pm 9.1	12.54 \pm 7.78
Total	54	65.6 \pm 6.7	8.99 \pm 6.30

Serum specimens were centrifuged, activated by 1N HCl and detected TGF- β by ABC method.

(*: $p < 0.01$ versus healthy adult)

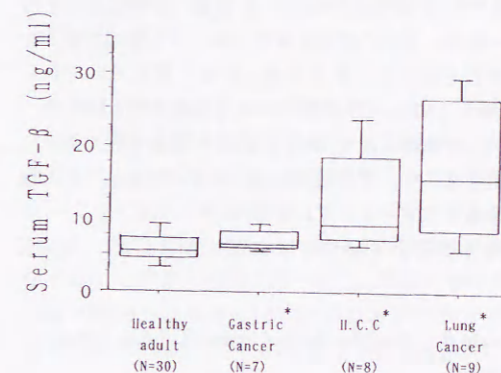


Fig. 10. Serum TGF- β detected by ABC method. Serum specimens were centrifuged, activated by 1N HCl and detected TGF- β by ABC method. (* $p < 0.01$ versus healthy adult)

Table 5. Accuracy of Serum TGF- β as Tumor Marker

Disease	Positive rate
Gastric Cancer	28.6% (2/7)
H.C.C	50.0% (4/8)
Lung Cancer	66.6% (6/9)

Sensitivity 50.0% (12/24), Specificity 90.0% (27/30)
Cut off (Mean value of healthy group $+2SD$) 8.74 ng/ml
Serum specimens was centrifuged and detected by ABC method.

値とすると, 肺癌9例, 肝癌8例, 胃癌7例の陽性率はそれぞれ28.6% (2/7), 50.0% (4/8), 66.6% (6/9), であった。その感度50.0% (12/24), 特異度90.0% (27/30)であった (Table 5)。

6) 尿中 TGF-β の腫瘍マーカーとしての検討

ここで尿中 TGF-β の腫瘍マーカーとしてのカットオフ値を健康成人の平均値 +2SD とすると 20.1 μg/day となる。Table 6 の如く肺炎の陽性率は20.0% (1/5), 肝硬変は33.3% (2/6)であるのに対して, 肺癌10例の陽性率は80.0% (8/10)であり, Stage 別では Stage I は100.0% (5/5), Stage IV は60.0% (3/5)であった。肝癌8例の陽性率は75.0% (6/8), Stage I では100.0% (4/4), Stage IV では50.0% (2/4)であった。胃癌6例の陽性率は66.6% (4/6)であり, Stage I では33.3% (1/3), Stage IV では100.0% (3/3)であった。従って尿中 TGF-β の感度75.0%, 特異度72.7%であった。χ²検定では肺炎・肝硬変の良性疾患群と肺癌・肝癌・胃癌の悪性腫瘍群の間には1%の危険率で有意差を認めた。なお肺癌・肝癌・胃癌それぞれの Stage I と Stage IV の間には有意差を認めなかった。

そこで血清と尿中 TGF-β 両者が測定可能であった良性疾患7例, 悪性腫瘍11例において, Fig. 11 の如く腫瘍マーカーとして比較した。

血清 TGF-β の陽性率は27.2% (3/11)に対して, 尿

Table 6. Positive Rate of Urine TGF-β as Tumor Marker

Disease	Positive rate*
Pneumonia	20.0% (1/5)
Liver Cirrhosis	33.3% (2/6)
Subtotal	27.3% (3/11)**
Lung Cancer	80.0% (8/10)
stage I	100.0% (5/5)
stage IV	60.0% (3/5)
H.C.C	75.0% (6/8)
stage I	100.0% (4/4)
stage IV	50.0% (2/4)
Gastric Cancer	66.6% (4/6)
stage I	33.3% (1/3)
stage IV	100.0% (3/3)
Subtotal	75.0% (18/24)**

Sensitivity 75.0% (18/24), Specificity 72.7% (8/11)

* Cut off (Mean value of healthy adult+2SD) 20.1 μg/day

**χ²=6.63, p<0.01

中 TGF-β の陽性率は63.6% (7/11)であった。両者の相関係数は良性疾患のみ r=0.13, 悪性疾患のみ

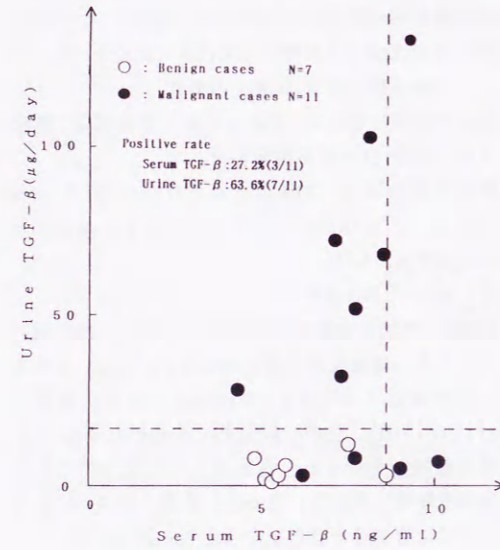


Fig. 11. Correlation of urine TGF-β and serum TGF-β as tumor marker. DEAE-Sephacel column (1.5 × 6.0 cm) was equilibrated with 0.2 M acetic acid buffer (pH 4.0). Urine specimens were adjusted pH 4.0 by conc. HCl and applied to DEAE-Sephacel column. Each fractions (5.0 ml) were detected by ABC method and calculated daily output of urine TGF-β using standard curve. Serum TGF-β was detected by ABC method.

Cut off value: Urine TGF-β=20.1 μg/day, Serum TGF-β=8.74 ng/ml

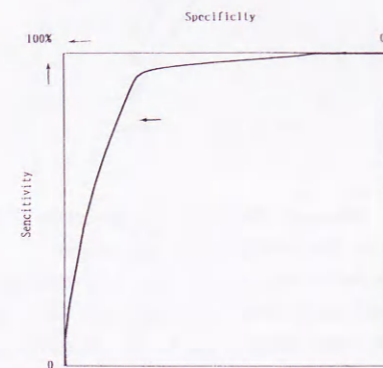


Fig. 12. Receiver operating characteristics curve urine TGF-β. Cut off point as tumor marker 20.1 mg/day (←).

r=0.33, 良性疾患・悪性疾患では r=0.30 であり, いずれも相関を認めなかった。

また腫瘍マーカーとしての測定能力を検討するために, 受信者操作特異性曲線¹⁶⁾ (Receiver Operating Characteristics curve: 以下 ROC 曲線) を作成した。Fig. 12 の如く ROC 曲線では左上角につりあがっており腫瘍マーカーとしての尿中 TGF-β の有用性は高いものと考えられた。

7) 他の腫瘍マーカーとの相関

尿中 TGF-β と CEA との比較においては肺癌10例・肝癌7例・胃癌5例計22例中, CEA の陽性率は54.5% (12/22)であり尿中 TGF-β の陽性率は72.7% (16/22)であった (Fig. 13)。両者の相関係数は r=0.05 (NS) であった。

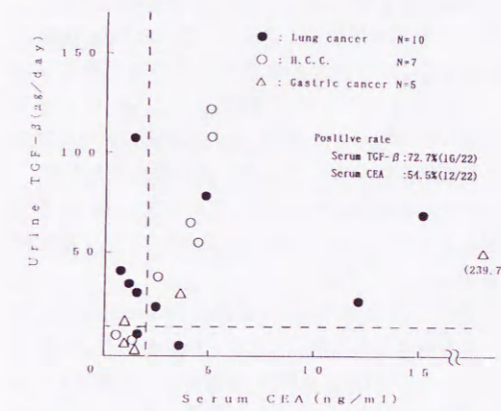


Fig. 13. Correlation of urine TGF-β and serum CEA as tumor marker. Same as Fig. 11.

Cut off value: Urine TGF-β=20.1 μg/day, Serum CEA=2.0 ng/ml

Table 7. Comparison between Urine TGF-β and other Tumor Markers

Tumor Marker	Positive Rate		
	Lung Cancer	H.C.C	Gastric Cancer
Urine TGF-β only	80.0% (8/10)	71.4% (5/7)	60.0% (3/5)
CEA ^{a)}	50.0% (5/10)	71.4% (5/7)	40.0% (2/5)
Urine TGF-β+CEA	90.0% (9/10)	71.4% (5/7)	60.0% (3/5)
AFP ^{b)}	—	71.4% (5/7)	—
Urine TGF-β+AFP	—	85.7% (6/7)	—
PIVKA-II	—	71.4% (5/7)	—
Urine TGF-β+PIVKA-II	—	85.7% (6/7)	—

a) CEA: Carcinoembryonic antigen b) AFP: α-fetoprotein

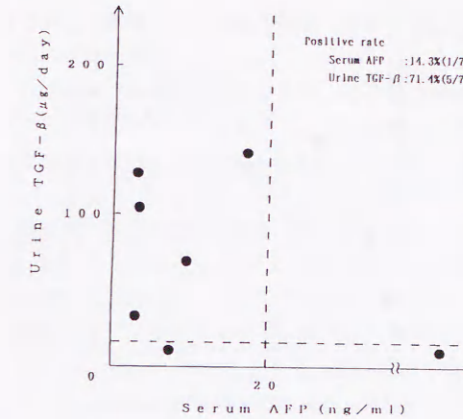


Fig. 14. Correlation of urine TGF-β and serum AFP as tumor marker in patients of H.C.C. Same as Fig. 11.

Cut off value: Urine TGF-β=20.1 μg/day, Serum AFP=20.0 ng/ml

疾患別では Table 7 の如く肺癌では CEA の陽性率は50.0% (5/10)であり尿中 TGF-β の陽性率は80.0% (8/10)で, 相関係数は r=0.14 (NS) であった。肝癌に於いては CEA の陽性率は71.4% (5/7)であり尿中 TGF-β の陽性率は71.4% (5/7)で, 相関係数は r=0.93 (p<0.01) と有意の相関が見られた。胃癌においては CEA の陽性率は40.0% (2/5)であり尿中 TGF-β の陽性率は60.0% (3/5)で, 相関係数は r=0.77 (p<0.01) であった。

肝癌における尿中 TGF-β と AFP との比較では AFP の陽性率は14.3% (1/7)であり, 尿中 TGF-β の陽性率は71.4% (5/7)であった (Fig. 14)。両者の相関係数は r=-0.60 (NS) であった。

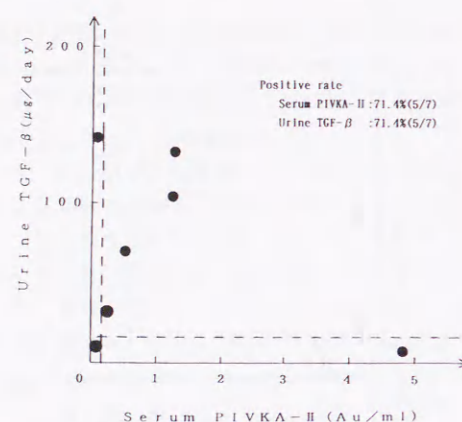


Fig. 15. Correlation of urine TGF- β and serum PIVKA-II as tumor marker in patients of H.C.C. Same as Fig. 11.

Cut off value: Urine TGF- β =20.1 μ g/day, Serum PIVKA-II=0.1 Au/ml

同時に尿中 TGF- β と PIVKA-II との関係においては PIVKA-II の陽性率は71.4% (5/7)であり, 尿中 TGF- β の陽性率は71.4% (5/7)であった (Fig. 15)。両者の相関係数は $r=-0.31$ (NS) であった。

ここで Table 7 の如く TGF- β と他の腫瘍マーカーを組み合わせてみると尿中 TGF- β と CEA では肺癌 90.0% (9/10), 肝癌71.4% (5/7), 胃癌60.0% (3/5)であった。次に肝癌において尿中 TGF- β と AFP では85.7% (6/7), 尿中 TGF- β と PIVKA-II では85.7% (6/7)であった。

8) 回収率の測定

イオン交換クロマトグラフィーでは, TGF- β をサンプルを分画採取したイオン交換樹脂と同様の回路を使用して回収率を測定したところ52.4%であった。一方凍結乾燥, 酸-エタノール法, ゲル濾過法による回収率は30.3%であった。

3. 免疫組織学的検討

Photo. 1, 2, 3 はそれぞれ肺癌, 肝癌, 胃癌症例の H-E 染色標本である。一方標本の TGF- β の局在を調べるために抗 TGF- β 抗体を使用して免疫組織染色を行った。

肺癌 (Photo. 4,5), 肝癌 (Photo. 6,7), 胃癌 (Photo. 8) の細胞質内にも抗 TGF- β 抗体でびまん性の濃染像を認めた。TGF- β の非活性型を活性型に変えるために1N塩酸 (Photo. 9) あるいは1N酢酸 (Photo. 10) でそれぞれ前処置後同様の手順で免疫組織染色を行っ

たが, 腺癌細胞内に得られた TGF- β の染色像は同様であり1N塩酸もしくは1N酢酸による活性化の過程を経なくても充分なる染色像を得ることが可能であった。

また抗 TGF- β 抗体による染色の度合いは Photo. 4, 5, 6, 7, 8 に見られるように癌組織はびまん性に染色されていたが, 一方で Photo. 11 の如く正常胃組織では壁細胞にのみ細胞質がびまん性に染色された像が認められた。

Photo. 3 は HE 染色による肝癌の像であるが, 同標本を抗 TGF- β レセプター抗体を使用して同様の手順で免疫組織染色を行った。やはり腫瘍の細胞質にびまん性に染色像が認められた (Photo. 12)。

考 察

1982年 EGF レセプターの見かけ上の減少から発見された EGF とは異なる因子 (SGF) が発見された^{8,52)}。

SGF は軟寒天培地中のコロニー形成能から TGF と呼ばれ, TGF の中でも軟寒天培地中で単独でコロニー形成能をもつものを TGF- α とし EGF レセプターへの結合能がなく EGF との共存下においてコロニー形成能を有するものを TGF- β と統一された⁴⁰⁾。

TGF- β は 25KDa のホモダイマーとされているが⁴¹⁾, cDNA もすでにクローン化され390個のアミノ酸配列も判明している^{9,29)}。

TGF- β の発見当初は腫瘍細胞に autocrine 的に作用するものと考えられていたが, Braun ら²⁾は肝切除後のラットの TGF- β mRNA を測定し, 肝細胞よりも内皮細胞に TGF- β mRNA が豊富であり TGF- β の paracrine 的な分泌を推測した。

現在のところ TGF- β が paracrine 的に作用するのにか autocrine 的に作用するかは結論はでていない。

ヒトの体内では血小板³⁹⁾がもっとも TGF- β 1 を多量に含んでいることが知られている。

一方, TGF- β は種々の癌組織^{14,27)}に存在し, 培養上清中⁵³⁾への分泌も見いだされている。

以上のように TGF- β は正常細胞でも悪性細胞でも認められ, その由来は多彩であるが, その体内での代謝経路に関しては不明の点が多い。

一方, 当初尿中では Chodak ら⁵⁾が毛細管内皮細胞の遊走を刺激する物質が有ることを見いだしたように, 尿中の腫瘍促進物質の存在が追求されていた。

その後 Twardzik ら⁵⁵⁾は尿を凍結乾燥にて濃縮し, ゲル濾過クロマトグラフィーにて分離し NRK49F 細胞を利用した軟寒天培地を用いた測定法にて TGF- β 活性を検出し, 排出のメカニズムは不明ではあるが癌

患者の尿中にもその TGF- β 活性を認め, 腫瘍由来ではないかと推測した。

同様に Kim ら²⁶⁾はメラノーマの患者の尿を濃縮後ゲル濾過クロマトグラフィー, 逆相高速クロマトグラフィーにて抽出し軟寒天培地を用いた測定法にて TGF- β を検出した。

一方, 菅野ら²³⁾は19例の原発性脳腫瘍患者の尿を NRK49F 細胞, BALB/3T3 細胞を用いた生物学的測定法により調べ, 19例すべての症例の尿中に高い TGF- α 活性を 30-50KDa 高分子領域に認めたと, 5人の健康な対照群では1例に認めたのみであった。

Sherwin ら⁴⁷⁾は末期癌患者の尿において TGF の活性を NRK 線維芽細胞で調べ, 高分子 (M.W. 30-35KDa) の TGF 活性を認め, 有用な腫瘍マーカーであると述べている。

さらに Twardzik ら⁵⁵⁾は担癌ヌードマウスの尿に含まれる TGF (M.W. 20KDa) はヒト横紋肉腫の培養株を移植することにより TGF が4-10倍上昇し, 腫瘍を除去することによりその濃度はもとの値まで低下することを見いだした。

西村ら³⁷⁾は尿中の TGF の活性を検討した。健康人は活性を示さなかった進行期の癌患者の80.0%は活性を示し, 治療後活性は消失した。さらにクローン化した BALB/3T3 標識細胞を使用し尿中の TGF 活性を検討したところ, 健康人は弱い活性を, 進行期の癌患者は中等度もしくは高い活性を示した。

以上のように種々の報告が尿中 TGF- β の腫瘍マーカーとしての有用性を示唆している。本論文では尿中 TGF- β の腫瘍マーカーとしての臨床応用を考えた以下の 1. 分離抽出方法, 2. 腫瘍マーカーとしての可能性, 3. 生物学的意義について考察を加えた。

1. 分離抽出方法

諸家^{5,26,46,55)}の尿中 TGF- β に関する報告は全て生物学的測定法である。

生物学的測定法は尿中に混在する他のホルモン, 成長因子等の影響を考えると手技も難しく定量法としては未解決の問題が多い。

これまでの ¹²⁵Na-EGF や ¹²⁵I-TGF- β 1²⁰⁾ を利用したラジオイムノアッセイ法 (以下 RIA 法) ではアイソトープを使用する必要があり手技も煩雑である。そこで著者はこれらの欠点を持つ生物学的測定法や RIA 法をさげ ABC 法にて定量を試みることにした。

この方法はビオチンとアビジンの特異的で強固な結合を利用し DAB の発色にて判定するものでアイソトープを使用する必要もなく, その全過程は24時間程

度で終了し簡便な上, 抗体が確定であれば TGF- β に対する特異性も高い。

TGF- β の分子量が25,000であり, 分子量12,500のモノマーによるダイマーであることより12,500-25,000が充分補足可能な Sephadex G-100 を用いることとした。

健康成人及び悪性腫瘍患者の尿を凍結乾燥し Twardzik ら⁵⁵⁾の方法に従い, 遠沈・凍結乾燥にて濃縮後1M酢酸にて溶解することにより複合体から TGF- β の分離を計りゲル濾過クロマトグラフィーを行った。

しかし各分画の TGF- β 活性を ABC 法にて検出したところ, TGF- β の分子量である25,000前後の分画, またモノマーである分子量12,500前後の分画からも検出されなかった。

TGF- β の活性が認められたのは健康成人6例, 悪性腫瘍6例の計12例全てにおいて排除限界と考えられる部位に TGF- β 活性を認めるのみであった。

従って Sephadex G-100 の特性 (Fractionation range: M.W. 4,000-150,000) から TGF- β はかなり大きな複合体として尿中に排出されていると考えられた。尿に前処置として1M酢酸を加え活性化を計っているために活性化された分子量25,000の TGF- β が検出されると予想されたが, Sephadex G-100 では困難であった。

そこで TGF- β の標準曲線を作成し, ゲル濾過クロマトグラフィーで分離後 ABC 法にて検出し, TGF- β の1日排泄量を算出すると健康成人の平均値は5.7 \pm 2.2 μ g/day に対して, 悪性腫瘍症例では10.4 \pm 6.8 μ g/day で有意差を認めた ($p<0.01$)。

凍結乾燥, 酸-エタノール法, ゲル濾過クロマトグラフィーによる TGF- β の分離・定量はゲルのカラム容量が約350 cm^3 と多量で TGF- β が吸着・希釈するためか効率が悪く, 作業手順が煩雑で精製も不十分と考えられた。

一方イオン交換クロマトグラフィーではカラム容量約11.0 cm^3 と少ないため, 濃縮・分離が同時に行え結果的に TGF- β の損失が少なく効率もよく, TGF- β の本測定法は従来の測定法に比較して非常に良い方法と考えられた。

なお DEAE Sephacel を使用する際には原尿を濃塩酸にて pH4.0 に調整し, 0.2M酢酸と0.2M酢酸ナトリウムにて pH4.0-6.0 の間でのみ pH 勾配を作成して行った。これは pH4.0 以下の各分画は ABC 法では全く TGF- β を検出できず, また TGF- β の等電点は pH5.2 であり pH4.0-6.0 の間で pH 勾配を作成すれば充分 TGF- β を補足回収できるためである。

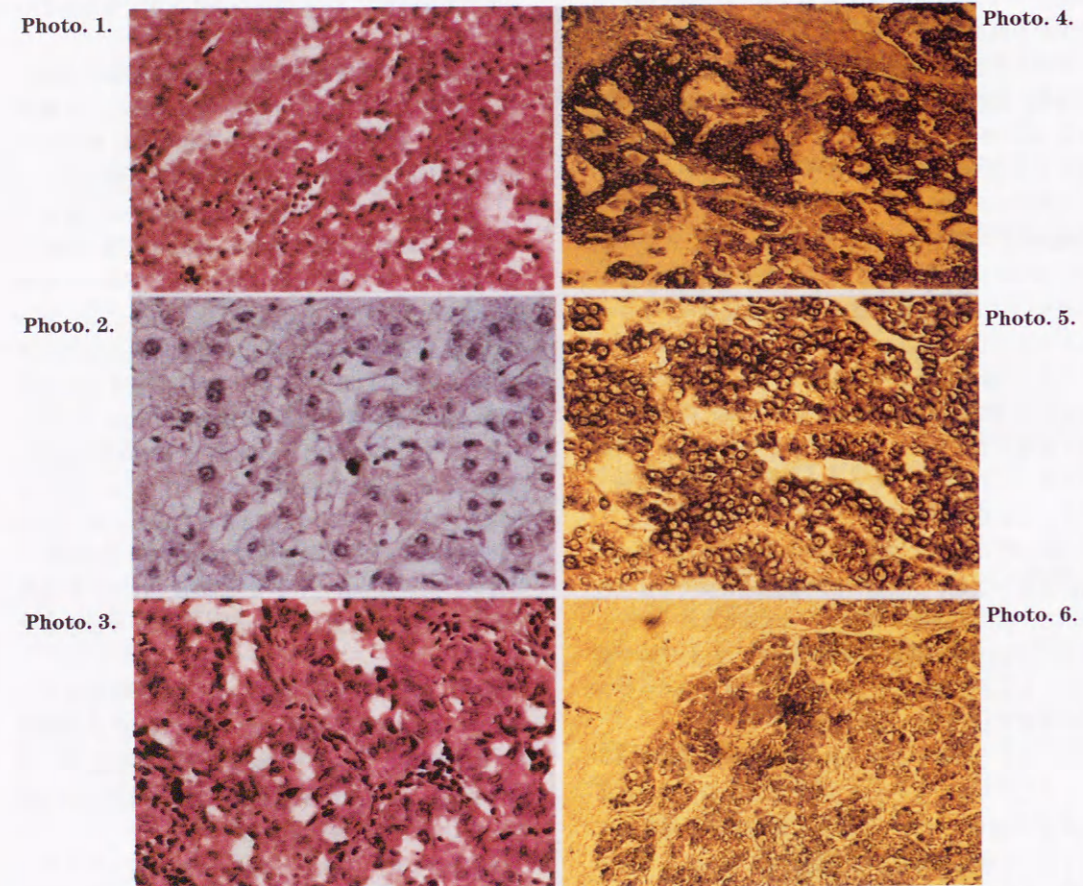


Photo. 1. Moderately differentiated adenocarcinoma of the lung.

He staining $\times 200$

Photo. 2. Well differentiated hepatocellular carcinoma.

HE staining $\times 200$

Photo. 3. Well differentiated tubular adenocarcinoma of the stomach.

HE staining $\times 200$

Photo. 4, 5 Immunohistochemical staining of the lung cancer.

TGF- β immunoreactivity showing strong expression in cytoplasm of all the tumor cells. $\times 100, 200$

Photo. 6, 7 Immunohistochemical staining of the hepatocellular carcinoma.

TGF- β immunoreactivity showing strong expression in cytoplasm of all the tumor cells. $\times 100, 200$

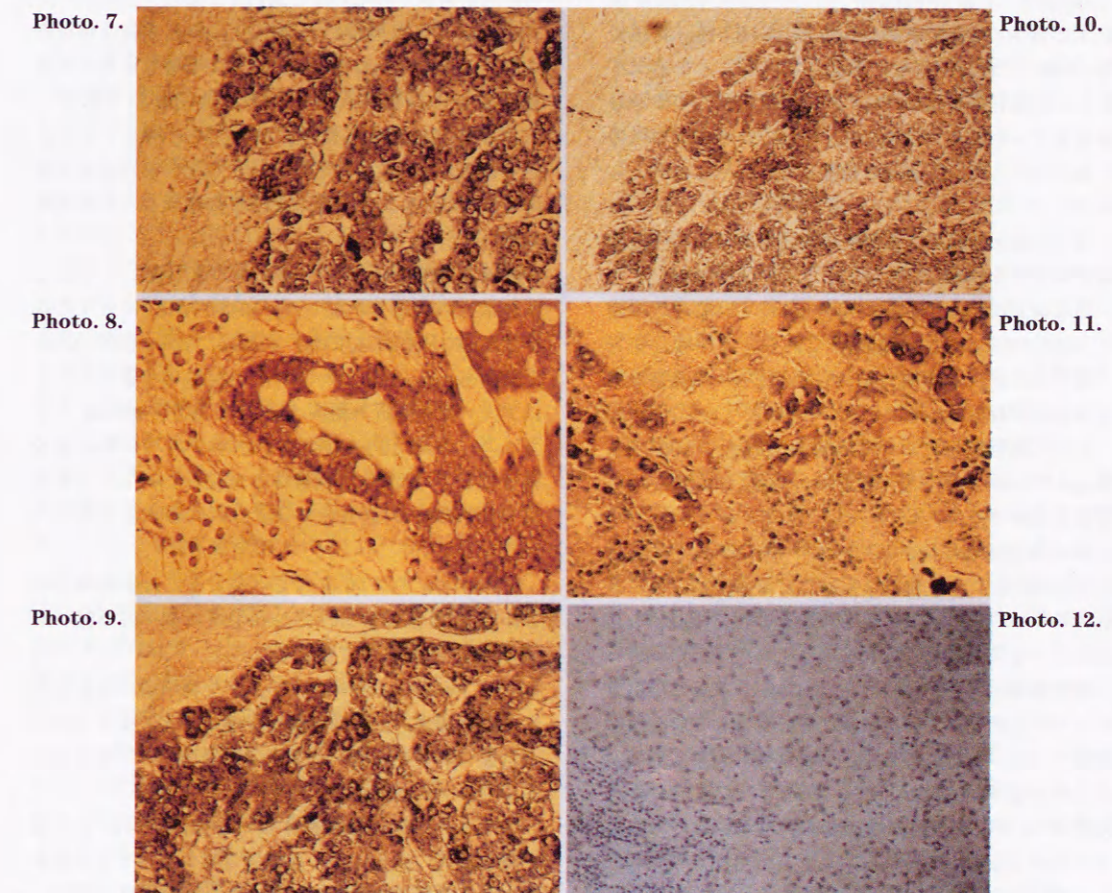


Photo. 8. Immunohistochemical staining of the gastric cancer.

TGF- β immunoreactivity showing strong expression in cytoplasm of all the tumor cells. $\times 200$

Photo. 9. Immunohistochemical staining of the hepatocellular carcinoma.

TGF- β immunoreactivity showing strong expression in cytoplasm of all the tumor cells activated by 1N HCl. $\times 200$

Photo. 10. Immunohistochemical staining of the hepatocellular carcinoma activated by 1N acetic acid. $\times 200$

Photo. 11. Immunohistochemical staining of the normal gastric mucosa.

TGF- β immunoreactivity showing expression only in the parietal cells. $\times 200$

Photo. 12. Immunohistochemical staining of the hepatocellular carcinoma.

TGF- β receptor immunoreactivity showing strong expression in cytoplasm of all the tumor cells. $\times 200$

2. 腫瘍マーカーとしての有用性

1) 尿中 TGF- β の測定結果

尿中 TGF- β は肝硬変患者では健康成人と比較して有意に高かった ($p < 0.05$)。

Shirai⁴⁸⁾ は acid-ethanol 法にて抽出後 ELISA 法にて血清中 TGF- β を調べ、肝癌 ($p < 0.01$), 肝硬変 ($p < 0.05$) において有意に上昇していることを述べている。線維化の促進は TGF- β の作用のひとつであり肝硬変では血清中 TGF- β が上昇しているのは当然のことと考えられ、肝硬変の指標にもなりうると考えられた。

悪性腫瘍と比較しても健康成人との間で1%の危険率で有意差を認めた。

ここで尿中 TGF- β を腫瘍マーカーと考えた時のカットオフ値は 20.1 $\mu\text{g/day}$ である。この場合肺炎 (陽性率20.0%), 肝硬変 (陽性率33.3%) の良性疾患では陽性率は低い。

しかし悪性腫瘍においては肺癌 (Stage I 100.0%, Stage IV 60.0%), 肝癌 (75.0%), 胃癌 (66.6%), いずれも高かった。

他の悪性腫瘍は検討していないが、TGF- β は多くの悪性腫瘍に存在していることが判明している (14,18,20,27,34,45,48,60)。また血小板などの正常細胞にも存在している (21,33,39,41,57)。

悪性腫瘍において尿中への TGF- β が多量に排出されるのかは判明していないが CEA 等よりも広範囲の腫瘍マーカーとしての臨床応用が期待される。

本検出法の感度は70.8%, 特異度72.7%であり、AFP のような臓器特異性は認められないものの腫瘍マーカーとしても十分に有用と考えられた。

t 検定では肺炎・肝硬変の良性疾患群と肺癌・肝癌・胃癌の悪性腫瘍群の間には1%の危険率で有意差を認めたが、Seheffno 法によると有意差は無く、腫瘍マーカーとしては有用と考えられた。

肺癌・肝癌・胃癌の Stage I と IV の間では有意差は今回は認められず、進行度の判定についてはさらに検討を重ねる必要があると考えられた。

TGF- β の腫瘍マーカーとしての有用性を検討するために ROC 曲線を作成した。

ROC 曲線は左上角に突出すればするほどそのマーカーとしての感度がすぐれていることを示している¹⁶⁾。尿中 TGF- β の ROC 曲線の形状は左上角につらあがっておりマーカーとしての測定能力は高いものと考えられた。

2) 手術後の尿中 TGF- β

Maureen ら³⁰⁾ は ¹²⁵I-TGF- β を使用し TGF- β が血

清中で結合している蛋白を SDS-PAGE とゲル濾過クロマトグラフィーにより検索した結果、それが α_2 -Macroglobulin (以下 α_2 -M) と結合しているとした。そのために細胞表面のレセプターと結合せず、その活性が抑制されていると述べている。

Huang ら¹⁹⁾ は同様に α_2 -M と TGF- β が複合体を形成し、実験室レベルでは酸・尿素で解離し血小板に富む血清から精製された α_2 -M は非活性型であり、TGF- β が活性化するためには α_2 -M と解離することが必要であることが判明した。以上のように血清中の TGF- β は本来非活性の状態では存在することは判明していた。

1989年 Miyazono ら³³⁾ はヒトの血小板から TGF- β を非活性の状態に精製した。SDS-PAGE によりこの非活性 TGF- β が 13KDa, 40KDa, 125-160KDa の3個の component にわかれ、13KDa のサブユニットはアミノ酸の解析の結果 TGF- β であり、40KDa のサブユニットと 125-160KDa のサブユニットが S-S 結合により TGF- β と複合体を形成していることを発見し、TGF- β の活性化のメカニズムがある程度明らかとなった。

Wakefield ら⁵⁹⁾ も述べているように血小板中には TGF- β が多量に含まれており手術により血小板が崩壊し TGF- β が血中に放出される。

更に Roberts ら⁴⁴⁾ は TGF- β が生物学的には非活性型で貯蔵され、生体内の微小環境の変化により活性化され血管新生やコラーゲン産生を誘導すると述べている。

つまり、手術直後に血小板から放出された TGF- β が微小環境の変化により活性化されコラーゲン生成を増やし、創傷治癒促進に作用すると考えられた⁵⁷⁾。

手術直後は測定の時期としては不適当であり、測定に際しては注意を必要とする。

今回著者は手術前後の尿中 TGF- β の変動を肺癌 Stage I の3症例にて検索した。すなわち手術により血小板から放出された TGF- β の影響を避けるために手術より1ヵ月以上経過し患者が充分回復した時点で測定した。3例共に Stage I の症例で治癒切除可能であった症例であり、Fig. 9 に示す如く術後に著しく低下しており、尿中で増加していた TGF- β は腫瘍由来の TGF- β と推測された。従って尿中 TGF- β は経過を見るためのパラメーターとしても有用と考えられた。

同様に Newcom ら³⁶⁾ は SDS-PAGE, Immunoblotting analysis にてホジキン病患者の尿中の TGF- β を検索した。その結果健康人の尿中には存在しないが、患者の尿中には高分子 TGF- β (M.W.=300KDa) が存在

し、さらに治療後これが消失し、尿中の TGF- β が Reed-Sternberg 細胞もしくは Reed-Sternberg 細胞にて刺激された細胞由来であることを示した。

以上のように尿中の TGF- β を検索することは手術後の経過観察だけでなく、治療の指標としても有用と考えられる。

3) 尿中 TGF- β と年齢の関連

Coupes ら⁷⁾ は ELISA 法にて尿中の TGF- β を検索し尿中 TGF- β と年齢との関連はなかったとしている。今回の検索においても加齢による TGF- β の変化は健康成人、良性疾患、悪性腫瘍患者共に相関が認められなかった。

加齢という生理的变化により尿中 TGF- β が変化するのではないかと推測されたが、年齢が尿中 TGF- β を変化される因子とは考えられず、腫瘍マーカーとして適当と考えられた。

4) 尿中 TGF- β と血清中 TGF- β との関連

悪性腫瘍症例の血清中 TGF- β は健康成人に比べて有意に高い ($p < 0.01$)。その尿中と血清中 TGF- β の相関係数は良性疾患のみでは $r = 0.008$ であり、悪性腫瘍では $r = 0.329$ (全症例 $r = 0.313$) で尿中と血清中 TGF- β の間に有意の相関関係は認めなかった。

Childs⁴⁾ が述べているように血小板の中には多量の TGF- β が存在しているために血清中にも TGF- β が存在することは当然と考えられる。Coupes ら⁷⁾ は ELISA 法にて血清中と尿中の TGF- β を検索し健康人のすべての血清サンプルには認められなかったが、全ての尿サンプルに認められその範囲は 1 ng/ml-35 ng/ml であり、腎機能・年齢などの関連はなかったとしている。

Shirai ら⁴⁸⁾ が肝臓癌の患者の血清中の TGF- β が有意に高く、これが肝切除により低下すると述べているように癌患者の血清中 TGF- β レベルは高いと考えられる。

本実験においては尿中と血清中 TGF- β の間に有意の相関関係は認められなかったが、陽性率は尿中 TGF- β は63.6% (7/11) と高く、一方血清中 TGF- β は27.3% (3/11) であり、その腫瘍マーカーとしての有用性は高いと考えられる。

5) 尿中 TGF- β と他の腫瘍マーカーとの相関

腫瘍マーカーとしての独立性を検討するために血清中 CEA, AFP, PIVKA-II と尿中 TGF- β の相関性を検討した。

悪性腫瘍患者の TGF- β 陽性率は72.7%であり、これは CEA 陽性率54.5%より高く、臓器別には胃癌において TGF- β の陽性率は60.0%, 肝癌は71.4%, 肺

癌では80.0%であり、肝癌をのぞいて CEA よりも高い陽性率を示した。

特に肺癌に於いては Stage I で100.0%陽性であり、むしろ早期診断の指標としても有用である可能性が示唆された。

同様に肝癌における血清中 AFP, PIVKA-II と尿中 TGF- β との比較では、血清中 AFP 陽性の症例は1例 (14.3%) のみであるが尿中 TGF- β の陽性症例は5例 (71.4%) であった。

これに関して Ito ら²⁰⁾ は肝癌における TGF- β mRNA の発現を観察し腫瘍のサイズ、血清中 AFP との相関はないことを指摘した。

さらに肝細胞癌組織中では TGF- β mRNA は全ての症例で発現しており、その蛋白量は mRNA の発現の強さと相関していることを指摘している。mRNA の発現があれば TGF- β の合成促進が考えられ、肝癌からの TGF- β の産生が示唆される。TGF- β が AFP よりも癌細胞の増殖を忠実に示していると予想される。

従って尿中 TGF- β は CEA より陽性率が高く、また尿中 TGF- β と AFP, CEA, PIVKA-II との間に相関関係も認められなかったことにより、尿中 TGF- β は肝癌においても独立した有効な腫瘍マーカーと考えられた。

他の腫瘍マーカーと組合せると肺癌においてその診断率は向上している。胃癌では陽性率の上昇は見られませんが肺癌、肝癌においては有用と考えられた。

尿中 TGF- β は測定の時期さえ選ばれば CEA, AFP, PIVKA-II 以上に鋭敏な腫瘍マーカーと考えられ、肺炎などの炎症性の良性疾患でも値が高い傾向に有るが悪性腫瘍では有意に悪性腫瘍が高く ($p < 0.01$)、尿中の TGF- β は腫瘍マーカーとして有効と思われた。

従って尿中 TGF- β の測定は特に癌患者の早期診断と再発予知において有用な指標となり得るものであり、十分に臨床応用されることが期待できる。

3. 生物学的意義

TGF- β の局在に関しては、既に多くの免疫組織化学的検索がなされている。まず正常組織中の TGF- β の発現については、胃粘膜では胃底腺壁細胞に²¹⁾、肝臓では TGF- β 1 が門脈域間質、類洞壁細胞と内腔側に、TGF- β 2 が肝細胞、毛細胆管に⁶²⁾、皮膚においては TGF- β 1 が真皮に (特に血管周辺に著明)¹¹⁾、等に認められていることが判明している。

一方で癌組織中 TGF- β の発現に関しても報告がなされているが、里中ら⁴⁵⁾ は大腸の腺腫、腺腫内癌、sm癌、平坦陥凹癌、進行癌において免疫組織化学的に TGF- β の発現率を調べ、進行につれその発現率は高

いことを示した。

平山ら¹⁸⁾も免疫組織学的手法により、胃癌の深部浸潤型14例、表層拡大型14例、早期胃癌14例、進行型14例を検討し、深部浸潤型、進行型は早期胃癌、表層拡大型より癌細胞中の TGF- β の発現率が有意に高く ($p < 0.05$)、深部浸潤型、進行型は浸潤増殖様式が浸潤性のものほど、また癌の実質と間質との量比が硬性のものほど TGF- β の陽性率が高かった ($p < 0.05$)。一方で早期胃癌、表層拡大型ではそのような傾向を認めなかった。深部浸潤型、表層拡大型においては組織型が低分化なものは高分化なものに比べ TGF- β の陽性率が高かった ($p < 0.05$)。

岩田²¹⁾は線維化に関与すると考えられる増殖因子 (TGF- β , platelet-derived growth factor: 以下 PDGF) を免疫組織化学的にスキルス胃癌48例と非スキルス分化型胃癌20例において検討した。TGF- β はスキルス胃癌48例中31例 (64.6%) が陽性で、非スキルス胃癌20例中15例 (75.0%) が陽性であった。TGF- β は癌の分化度、組織型、浸潤度と関係無かったが、癌細胞の細胞質にびまん性に認められ正常胃粘膜では胃底腺壁細胞に僅かに認められるのみであった。胃癌における線維芽細胞の増殖およびコラーゲン合成の促進に TGF- β が一役かっていることを示した。

Mizoi ら³⁴⁾は胃癌25例、大腸癌6例について免疫組織学的に TGF- β と LTBP を検討した。胃癌の癌細胞、間質紡錘形細胞 (線維芽細胞) では共に TGF- β を認めるが、一方で LTBP は胃癌の癌細胞では認められなかったが、胃癌の間質細胞に高率 (92.3%, 12/13) に認められた。

さらに LTBP は癌の間質細胞の粗面小胞体に認められたことにより癌細胞が TGF- β との複合体を形成せずに TGF- β を産生していると報告した。

以上のように進行度に応じて TGF- β の陽性率が高く認められ、TGF- β が線維芽細胞に対する強力な増殖因子であることより胃癌の硬性発育における TGF- β の関与が推測されている。

一方 Walker ら⁶⁰⁾は乳癌組織の TGF- β を非浸潤癌27例とし浸潤癌54例において抗 TGF- β 1 抗体を使用し免疫組織学的に検討した。

組織学的分類、エストロゲン受容体と TGF- β 1 の染色性との間に関連性はなく、染色の程度とリンパ節転移の間には関連性が認められ、転移と浸潤における決定因子であると推測した。

Gorsch ら¹⁵⁾も同様に TGF- β 1, 2, 3 それぞれに特異的な抗体を使用して検討した所、年齢、Stage、リンパ節転移、エストロゲン受容体と TGF- β 2, TGF- β 3 に

関して、その染色性には生存曲線に差が見られなかったが、TGF- β 1 に関しては再発・進行・癌死に関して差が見られた。またその染色の強度により生存率において他の年齢、Stage、エストロゲン受容体、リンパ節転移等の危険因子を考慮しても有意差が認められた。さらに TGF- β 1 に関しては乳管上皮の細胞質にもっとも著明に TGF- β 1 が存在することを免疫組織化学的に示した。そして乳癌細胞からの TGF- β の産生を推測している。

一方 mRNA レベルにおける検討では伊藤²⁰⁾や Braun ら²⁾は外科的に切除した肝細胞癌の mRNA の発現を Northern hybridization 法にて免疫組織学的に検討し、すべての肝癌組織において正常の肝組織よりも高いレベルの mRNA の発現を認めた。

癌組織中の TGF- β を Roberts ら⁴³⁾の方法 (酸-エタノール法) に準じて抽出し、mRNA 発現レベルと TGF- β 蛋白質の間には正の相関関係があることを示し、TGF- β は癌細胞中に顆粒状の集積として認められ癌細胞が TGF- β を産生していることを示した。

著者が行った免疫組織化学的検索においても肺癌、肝癌、胃癌において癌細胞の細胞質に TGF- β を認めた。TGF- β は正常組織にも存在するが、その染色の強度は悪性細胞においてより著明であり悪性腫瘍患者において尿中 TGF- β が高値を示しているのは悪性細胞から分泌されるものと推測された。これは肺癌の術後尿中 TGF- β が正常値まで低下することによっても裏付けられた。また TGF- β の非活性型を活性型に変えるために 1N塩酸もしくは 1N酢酸で前処置後にも同様の TGF- β の染色像が認められた。従って細胞内で TGF- β は α_2 -M, LAP, LTBP といった大きな分子量の物質と結合しているのではないことは推測される。

抗 TGF- β は活性型 TGF- β を認識するための抗体であり、少なくとも Mizoi ら³⁴⁾の報告にあるように LTBP との複合体を形成せずに存在し、抗 TGF- β 抗体で認識できるように抗原決定基が露出するような形で存在しているものと思われる。

TGF- β は免疫抑制と同時に本来腫瘍の増殖抑制作用⁶¹⁾を合わせもっており、その腫瘍抑制作用は細胞膜表面のレセプターを介して伝達される。Hebert¹⁷⁾はヒト扁平上皮癌細胞株の TGF- β に対する反応性を調べ、TGF- β により抑制を受けたり受けなかったりするのレセプター type の変化が原因ではないかと推測した。

このように TGF- β の作用はレセプターを介することが当初より指摘されていたが、1984年 Frolík ら¹³⁾は type I と type II の 2種類のレセプターの存在を示

し、現在では type V まで判明し³⁸⁾、また TGF- β の増殖抑制作用は type III よりも type I が関与することが認められている³⁹⁾。

Kimchi ら²⁵⁾は網膜芽細胞腫細胞株は TGF- β 1 の抗分裂作用に対して抵抗性であり、腫瘍細胞がレセプターを欠如しているため網膜芽細胞腫を形成しているメカニズムを考えた。

一方扁平上皮癌 (SCC25) や大腸癌 (SW480)⁶⁾ の細胞株では TGF- β レセプターが欠如しているものも報告され、Boyd¹⁾は TGF- β により増殖抑制される細胞は、53KDa, 73KDa, 300KDa の大きさのレセプターをもっており、TGF- β の成長抑制作用に抵抗する Mv1Lu 細胞には 53KDa のレセプターが欠如していることを示している。

TGF- β の作用発現に関しては発見当初は腫瘍に対する autocrine 的作用が注目されたが、その後 paracrine 説も登場し単純な理論で説明できない状況であったが、このようなレセプターのレベルまで考慮に入れる必要がある。

つまりレセプターが欠如していると腫瘍細胞の増殖作用が発揮できない。TGF- β レセプターが欠如しているために癌細胞の増殖が抑制されずに尿中に排泄されるのではないかと推測される。

TGF- β が上皮細胞をはじめとして多くの悪性細胞に対して増殖抑制作用¹²⁾を持つ一方で種々の培養細胞において TGF- β の過剰産生が知られている。癌細胞が TGF- β を産生するという autocrine 説、もしくは癌細胞の周囲組織へ影響を与えるという paracrine 説があるが、実際に生体内ではどのような過程によっているかは不明の点が多い。

TGF- β は正常では LTBP と結合して非活性型として人間の体内に存在していると考えられている。活性化したリンパ球を TGF- β の中和抗体にて処理すると増殖が促進されることも確認されているが²⁸⁾、潜在型 TGF- β がどのような過程を経て活性化しレセプターと結合して抑制へと導かれるかは明らかではない。

TGF- β は線維芽細胞を増殖しコラーゲン合成を促進し組織の修復に関与する増殖因子であり、赤血球、血小板に遍く含まれている。

また岩田²¹⁾や Vuckovic ら⁵⁸⁾も述べているが TGF- β は正常胃粘膜の胃底腺の壁細胞の一部に陽性であったとしているように TGF- β は体内に普遍的といてよほど存在しているものであるが癌細胞に TGF- β の濃染像を認め、免疫組織化学的染色像より尿中 TGF- β の由来は癌細胞と推測された。

以上により癌細胞中に存在する TGF- β が尿中に分

泌されると考えられる。それに対して効率よく、簡易的に行い得るイオン交換クロマトグラフィー、ABC法による尿中 TGF- β の測定法は有用であり、また腫瘍マーカーとしても十分に臨床応用可能と思われた。

尚本論文の要旨は第51回日本癌学会 (平成4年9月大阪)、第94回日本外科学会 (平成6年3月東京) において発表した。

謝 辞

稿を終るにわたり懇切なる御指導を賜った広島大学医学部外科学第二講座・土肥雪彦教授に深甚なる謝意を表します。また御指導、御教授を頂いた広島大学医学部保健学科・西亀正之教授・放射能影響研究所秋山實利先生に深く感謝致します。併せて終始御支援、御協力を頂いた第二外科教室・山根基先生、片岡健先生、吉岡伸吉郎先生ほか研究室諸兄先生、第二外科教室・神田千穂氏、新保利江氏に深謝致します。

参 考 文 献

1. Boyd, F. T. and Massague, J. 1989. Transforming growth factor- β inhibition of epithelial cell proliferation linked to the expression of a 53-kDa membrane receptor. *J. Biol. Chem.* 264: 2272-2278.
2. Braun, L., Mead, J. E., Panzica, M., Mikumo, R., Bell, G. I. and Fausto, N. 1988. Transforming growth factor β mRNA increases during liver regeneration: A possible paracrine mechanism of growth regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 1539-1543.
3. Carr, B. I., Hayashi, I., Branum, E. L. and Moses, H. L. 1986. Inhibition of DNA synthesis in rat hepatocytes by platelet-derived type β transforming growth factor. *Cancer Res.* 46: 2330-2334.
4. Childs, C. B., Proper, J. A., Tucker, R. F. and Moses, H. L. 1982. Serum contains a platelet-derived transforming growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 5312-5316.
5. Chodak, G. W., Scheiner, C. J. and Zetter, B. R. 1981. Urine from patients with transitional-cell carcinoma stimulates migration of capillary endothelial cells. *New Eng. J. Med.* 305: 869-874.
6. Coffey, R. J. Jr., Goustein, A. S., Mangelsdorf-Soderquist, A., Shipley, G. D., Wolfshohl, J., Carpenter, G. and Moses, H. L. 1987. Transforming growth factor α and β expression in human colon cancer lines: Implication for an autocrine model. *Cancer Res.* 47: 4590-4594.
7. Coupes, B. M., Newstead, C. G., Short, C. D.

- and Brenchley, P. E. C. 1994. Transforming growth factor β 1 in renal allograft recipients. *Transplantation* 57: 1727-1731.
8. DeLarco, J. E. and Todaro, G. J. 1978. Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 4001-4005.
9. Derynck, R., Jarrett, J. A., Chen, E. Y., Eaton, D. H., Bell, J. R., Assoian, R. K., Roberts, A. B., Sporn, M. B. and Goeddel, D. V. 1985. Human transforming growth factor- β complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells. *Nature* 316: 701-705.
10. Dijke, P. T., Hansen, P., Iwata, K. K., Pieler, C. and Foulkes, G. 1988. Identification of another member of the transforming growth factor type β gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 4715-4719.
11. Falanga, V., Gerhardt, C. O., Dasch, J. R., Takehara, K. and Ksander, G. A. 1992. Skin distribution and differential expression of transforming growth factor β 1 and β 2. *J. Dermatol. Sci.* 3: 131-136.
12. Fernandez-Pol, J. A., Talkad, V. D., Klos, D. J. and Hamilton, P. D. 1987. Suppression of the EGF-dependent induction of c-myc proto-oncogene expression by transforming growth factor β in a human breast carcinoma cell line. *Bio. Bio. Res. Commun.* 144: 1197-1205.
13. Frolik, C. A., Wakefield, L. M., Smith, D. M. and Sporn, M. B. 1984. Characterization of a membrane receptor for transforming growth factor- β in normal rat kidney fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 259: 10995-11000.
14. Gomella, L. G., Sargent, E. R., Wade, T. P., Anglard, P., Linehan, W. M. and Kasid, A. 1989. Expression of transforming growth factor α in normal human adult kidney and enhanced expression of transforming growth factor α and β 1 in renal cell carcinoma. *Cancer Res.* 49: 6972-6975.
15. Gorsch, S. M., Memoli, V. A., Stukel, T. A., Gold, L. I. and Arrick, B. A. 1992. Immunohistochemical staining for transforming growth factor- β associates with disease progression in human breast cancer. *Cancer Res.* 52: 6949-6952.
16. 長谷川敏彦 1986. Medical Decision Making. 臨床医 12: 136-141.
17. Hebert, C. D. and Birnbaum, L. S. 1989. Lack of correlation between sensitivity to growth inhibition and receptor number for transforming growth factor β in human squamous carcinoma cell lines. *Cancer Res.* 49: 3196-3202.
18. 平山大介, 藤盛孝博, 荒尾素次, 前田 盛 1990. 深部浸潤型および表層拡大型早期胃癌の臨床病理学的ならびに免疫組織学的検討. 日消誌 87: 2434-2443.
19. Huang, S. S., O'Grady, P. and Huang, J. S. 1988. Human transforming growth factor β · α ₂-macroglobulin complex is a latent form of transforming growth factor β . *J. Biol. Chem.* 263: 1535-1541.
20. Ito, N., Kawata, S., Tamura, S., Takaishi, K., Yabuuchi, I., Matsuda, Y., Nishioka, M. and Tarui, S. 1990. Expression of transforming growth factor- β 1 mRNA in human hepatocellular carcinoma. *Jpn. J. Cancer Res.* 81: 1202-1205.
21. 岩田啓吾 1990. スキルス胃癌における免疫組織化学的検討. 聖マリアンナ医科大学雑誌 18: 734-742.
22. Jakowlew, S. B., Dillard, P. J., Sporn, M. B. and Roberts, A. B. 1988. Complementary deoxyribonucleic acid cloning of an mRNA encoding transforming growth factor β 4 from chicken embryo chondrocytes. *Mol. Endocrinol.* 2: 1186-1195.
23. Kanno, H., Kuwabara, T., Yasumitsu, H. and Umeda, M. 1988. Transforming growth factor in urine from patients with brain tumors. *J. Neurosurg.* 68: 775-780.
24. Kaplan, P. L., Anderson, M. and Ozanne, B. 1982. Transforming growth factor(S) production enables cells to grow in the absence of serum: An autocrine system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 485-489.
25. Kimchi, A., Wang, X., Weinberg, R. A., Cheifetz, S. and Massague, J. 1988. Absence of TGF- β receptors and growth inhibitory responses in retinoblastoma cells. *Science* 240: 196-199.
26. Kim, M. K., Warren, T. C. and Kimball, E. S. 1985. Purification and characterization of a low molecular weight transforming growth factor from the urine of a melanoma patients. *J. Biol. Chem.* 260: 9237-9243.
27. Kondaiah, P., Sands, M. J., Smith, J. M., Fields, A., Roberts, A. B., Sporn, M. B. and Melton, D. A. 1990. Identification of a novel transforming growth factor- β (TGF- β 5) mRNA in xenopus laevis. *J. Biol. Chem.* 265: 1089-1093.
28. Lucas, C., Bald, L. N., Fendly, B. M., Moraworms, M., Figari, I. S., Patzer, E. J. and Palladino, M. A. 1990. The autocrine production of transforming growth factor- β 1 during lymphocytes activation. A study with a monoclonal antibody-based ELISA. *J. Immunology* 145: 1415-1422.
29. Marquardt, H., Lioubin, M. N. and Ikeda, T. 1987. Complete amino acid sequence of human transforming growth factor type β 2. *J. Biol. Chem.* 262: 12127-12131.
30. Maureen, D. and Wakefield, L. M. 1987. Latent transforming growth factor- β in serum. *J. Biol. Chem.* 262: 14090-14099.
31. Miyakami, K., Yosida, H., Yanagawa, T., Yura, Y., Azuma, M., Hayashi, Y. and Sato, M. 1987. Urinary transforming growth factors in squamous cell head and neck cancer. *Cancer J.* 6: 277-282.
32. Miyazono, K. and Heldin, C. 1989. Role for carbohydrate structures in TGF- β 1 latency. *Nature* 338: 158-160.
33. Miyazono, K., UlfHellman, Wernstedt, C. and Heldin, C. H. 1988. Latent high molecular weight complex of transforming growth factor- β 1. *J. Biol. Chem.* 263: 6407-6415.
34. Mizoi, T., Ohtani, H., Matsuno, S. and Nagura, H. 1992. Immunohistochemical identification of transforming growth factor- β and its binding protein in human gastrointestinal carcinoma. *Tohoku J. Exp. Med.* 168: 271-273.
35. Moses, H. L., Branum, E. L., Proper, J. A. and Robinson, R. A. 1981. Transforming growth factor production by chemically transformed cells. *Cancer Res.* 41: 2842-2848.
36. Newcom, S. R. and Tagara, K. K. 1992. High molecular weight transforming growth factor β is excreted in the urine in active nodular sclerosing's disease. *Cancer Res.* 52: 6768-6773.
37. Nishimura, R., Okumura, H., Noda, K., Yasumitsu, H. and Umeda, M. 1986. High level of β -type transforming growth factor activity in human urine obtained from cancer patients. *Jpn. J. Cancer Res.* 77: 560-567.
38. O'Grady, P., Kuo, M., Baldassare, J. J., Huang, S. S. and Huang, J. S. 1991. Purification of a new type high molecular weight receptor (type V receptor) of transforming growth factor β (TGF- β) from bovine liver. *J. Biol. Chem.* 266: 8583-8589.
39. Ohta, M., Greenberger, J. S., Anklesaria, P., Bassols, A. and Massague, J. 1987. Two forms of transforming growth factor- β distinguished by multipotential haematopoietic progenitor cells. *Nature* 329: 539-541.
40. Pirchner, R., Lawrence, D. A. and Jullien, P. 1984. Latent β -transforming growth factor in non-transformed and Kirsten sarcoma virus-transformed normal rat kidney cells, clone 49F. *Cancer Res.* 44: 5538-5543.
41. Roberts, A. B., Anzano, M. A., Lamb, L. C., Smith, J. M., Frolik, C. A., Marquardt, H., Todaro, G. J. and Sporn, M. B. 1982. Isolation from murine sarcoma cells of novel transforming growth factors potentiated by EGF. *Nature* 295: 417-419.
42. Roberts, A. B., Anzano, M. A., Meyers, C. A., Wideman, J., Blacher, R., Pan, Y. E., Stein, S., Lehrman, S. R., Smith, J. M., Lamb, L. C. and Sporn, M. B. 1983. Purification and properties of a type β transforming growth factor from bovine kidney. *Biochemistry* 22: 5692-5698.
43. Roberts, A. B., Lamb, A. C., Newton, D. L., Sporn, M. B., DeLarco, J. E. and Todaro, G. J. 1980. Transforming growth factors: Isolation of polypeptides from virally and chemically transformed cells by acid/ethanol extraction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 3494-3498.
44. Roberts, A. B., Sporn, M. B., Assoian, R. K., Smith, J. M., Roche, N. S., Wakefield, L. M., Heine, U. I., Liotta, L. A., Falanga, V., Kehrl, J. H. and Fauci, A. S. 1986. Transforming growth factor type β : Rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 4167-4171.
45. 里中和廣, 藤盛孝博, 平山大介, 藤田昌幸, 徳田好勇, 寺本忠久, 北沢荘平, 堀尾光三, 前田盛, 屋代庫人, 長廻 紘 1991. 大腸腺腫, 癌およびその周辺粘膜における癌遺伝子産物発現の免疫組織学的検討. 日本大腸肛門病学会誌 44: 46-52.
46. Seyedin, S. M., Thomas, T. C., Thompson, A. Y., Rosen, D. M. and Piez, K. A. 1985. Purification and characterization of two cartilage-inducing factors from bovine demineralized bone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 2267-2271.
47. Sherwin, S. A., Twardzik, D. R., Bohn, W. H., Cockley, K. D. and Todaro, G. J. 1983. High-molecular-weight transforming growth factor activity in the urine of patients with disseminated Cancer. *Cancer Res.* 43: 403-407.
48. Shirai, Y., Kawata, S., Ito, N., Tamura, S., Takaishi, K., Kiso, S., Tsushihma, H. and Matsuzawa, Y. 1992. Elevated levels of plasma transforming growth factor- β in patients with hepatocellular carcinoma. *Jpn. J. Cancer Res.* 83: 676-679.
49. Shirai, Y., Kawata, S., Tamura, S., Ito, N., Tsushima, H., Takahashi, K. and Kiso, S. 1994. Plasma transforming growth factor beta 1 in patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer* 73: 2275-2279.
50. Stromberg, K., Hudgins, W. R. and Orth, D. N. 1987. Urinary TGF-1 in neoplasia: Immunoreactive TGF- α in the urine of patients with disseminated breast carcinoma. *Bio. Bio. Res. Commun.* 144: 1059-1068.

51. Tada, T., Ohzeki, S., Utsumi, K., Takiuchi, H., Muramatsu, M., Li, X., Shimizu, J., Fujiwara, J. and Hamaoka, T. 1991. Transforming growth factor- β induced inhibition of T cell function. *J. Immunol.* 146: 1077-1082.
52. Tada, T., Yabu, K. and Kobayashi, S. 1993. Detection of active form of transforming growth factor- β in cerebrospinal fluid of patients with glioma. *Jpn. J. Cancer Res.* 84: 544-548.
53. Todaro, G. J., DeLarco, J. E. and Cohen, S. 1976. Transformation by murine and feline sarcoma viruses specifically blocks binding of epidermal growth factor to cells. *Nature* 264: 26-31.
54. Todaro, G. J., Fryling, C. and DeLarco, J. E. 1980. Transforming growth factors produced by certain human tumor cells: Polypeptides that interact with epidermal growth factor receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 5258-5262.
55. Twardzik, D. R., Kimball, E. S., Sherwin, S. A., Ranchalis, J. E. and Todaro, G. J. 1985. Comparison of growth factors functionally related to epidermal growth factor in the urine of normal and human tumor-bearing athymic mice. *Cancer Res.* 45: 1934-1939.
56. Twardzik, D. R., Sherwin, S. A., Ranchalis, J. E. and Todaro, G. J. 1982. Transforming growth factors in the urine of normal, pregnant, and tumor-bearing humans. *J. Natl. Cancer Inst.* 69: 793-798.
57. VanLeuven, F., Cassiman, J. J. and Van den Berghe, H. 1981. Functional modifications of α_2 -M by primary amines. II. *J. Biol. Chem.* 256: 9023-9027.
58. Vuckovic, M., Genbacev, O. and Kumar, S. 1992. Immunohistochemical localization of transforming growth factor- β in first and third trimester human placenta. *Pathobiology* 60: 149-150.
59. Wakefield, L. M., Smith, D. M., Flanders, K. C. and Sporn, M. B. 1988. Latent transforming growth factor- β from human platelets. *J. Biol. Chem.* 263: 7646-7654.
60. Walker, R. A. and Dearing, S. 1992. Transforming growth factor- β 1 in ductal carcinoma in situ and invasive carcinomas of the breast. *Eur. J. Cancer* 28: 641-644.
61. Wollenberg, G. K., Semple, E., Quinn, B. A. and Hayes, M. A. 1987. Inhibition of proliferation of normal, preneoplastic, and neoplastic rat hepatocytes by transforming growth factor- β . *Cancer Res.* 47: 6595-6599.
62. 山口正明, 大谷明夫, 増田高行 1993. 慢性肝炎, 肝硬変の病態における TGF- β の関与. *消化器と免疫* 28: 162-166.

Detection of Urinary TGF- β as a Tumor Marker

Fumito KURANISHI

Second Department of Surgery, Hiroshima University School of Medicine

(Director: Prof. Kiyohiko DOHI)

Recently, studies on the biological effects of transforming growth factor- β (TGF- β) have documented that urinary TGF- β may serve as a good tumor marker.

Using ion exchange chromatography and the avidin-biotin peroxidase complex method, urinary TGF- β from cancer patients as well as good numbers of normal controls was detected.

TGF- β activity in the malignant group (N=24 patients) was compared with that in the control group (N=10). Among the 24 patients with cancer, 10 had lung cancer, 8 had hepatocellular carcinoma, and 6 had gastric cancer. There was a significant difference in the daily output of urinary TGF- β between the two groups. The level in the control group (N=10) was $9.8 \pm 5.2 \mu\text{g/day}$ whereas the level in the malignant group was $49.5 \pm 35.8 \mu\text{g/day}$. ($p < 0.01$)

The positive rate of urine TGF- β as a tumor marker (cutoff=20.1 $\mu\text{g/day}$) for pneumonia, liver cirrhosis, lung cancer, hepatocellular carcinoma, gastric cancer was 20.0%, 33.3%, 80.0%, 75.0%, and 66.6%, respectively. In the malignant group, the sensitivity was 75.0% and specificity was 72.7%. ($\chi^2=6.63$, $p < 0.01$)

Immunohistochemical staining showed strong diffuse expression in the cytoplasm of malignant cells. The present results indicates that urinary TGF- β originates from malignant cells and serves as good clinical marker of malignant tumors.