Radioimmunoassay 法による尿中上皮成長因子測定法の 基礎的検討およびその臨床応用

富山医科薬科大学医学部泌尿器科学教室

(主任: 片山 喬 教授)

布施 秀 樹, 水 野 一 郎, 片 山 喬

三菱油化ビーシーエル

栗 本 文 彦, 堀 内 淳 子

Measurement of Urinary Epidermal Growth Factor by Radioimmunoassay and its Application

**Hideki FUSE¹⁾, Ichiro MIZUNO¹⁾, Fumihiko KURIMOTO²⁾,
Junko HORIUCHI²⁾ and Takashi KATAYAMA¹⁾**

1) Department of Urology, Faculty of Medicine, Toyama Medical &
Pharmaceutical University, Toyama, Japan

2) Mitsubishi Yuka Bio-clinical Laboratories, Inc., Tokyo, Japan

Epidermal growth factor (EGF), a polypeptide hormone originally discovered in the mouse submaxillary gland, stimulates growth in a variety of tissues in several species. This hormone has recently been identified in human urine. Herein, radioimmunoassay (RIA) for human EGF (hEGF) has been developed, using human recombinant EGF as reference standard and radioiodinated tracer and antibodies raised against hEGF. Its sensitivity was somewhat higher than that of RIAs reported formerly. This method had no cross reactivity with high molecular weight EGF. Urinary concentrations of hEGF in normal males and females were $30.2 \pm 13.0 \text{ ng/mg creatinine}$ and $46.4 \pm 17.4 \text{ ng/mg creatinine}$, respectively. Urinary concentration of hEGF in patients with renal cancer was somewhat low. The patients with bladder cancer had lower urinary excretion of hEGF than normal adults ($p < 0.05$). However, the role of hEGF in health and disease remains to be determined.

緒 言

上皮成長因子 (Epidermal growth factor, EGF) は雄マウス顎下腺より単離され各種細胞に増殖効果をもつポリペプチドである¹⁾。一方, Gregory ら²⁾によりヒト尿中から分離され, 胃酸分泌抑制作用をもつウロガストロンはその構造や生物活性がマウス EGF ときわめて類似していることより現在ではヒト EGF (hEGF) とみなされている。

EGF には新生児マウスの開眼, 切歯の出現を促したり, 上皮の発育を促進する等の作用がしら

れているが²⁾, 生体における EGF の生理作用や各種疾患における病態生理的役割についてはいまだ不明な点が少なくない。

今回尿中 hEGF 測定のための radioimmunoassay (RIA) 法を確立するとともにその臨床応用を行ったので報告する。

対象および方法

各種泌尿器疾患(前立腺癌7例, 腎腫瘍9例, 膀胱腫瘍31例)および健常者77例(男子43例, 女子34例)を対象とした。

採取した尿を -80°C にて凍結保存し, 以下のごとき手順で尿中 hEGF を測定した。すなわち, 被検尿を解凍後, RIA用緩衝液(0.05M phosphate buffer, pH 7.4, 0.1% BSA, 0.1% Tween 20)にて300倍希釈し, その $100\mu\text{l}$ に抗血清(working 15,000倍)を $100\mu\text{l}$ に加え, 4°C にて1晩インキュベーションした。 ^{125}I -hEGF (Amersham 社)を約10,000cpm/ $100\mu\text{l}$ 添加し, 更に1晩インキュベーション後, B/F分離のため marcella-10 (大日本製薬社)を $100\mu\text{l}$ 添加し, 4°C 30分インキュベーションした。そののち3000rpm で 4°C 30分遠沈して上清を吸引除去し, 沈渣の放射能活性を γ -counter (Aloka 社)にて測定した(図1)。尿中 creatinine を Jaffe 法にて測定し, 尿中 hEGF 濃度を creatinine にて補正した。

- * 1 Standard: EGF, human (Wakunaga Seiyaku Co.)
500, 250, 100, 50, 25, 10, 5 pg/tube
- * 2 Sample
diluted by buffer ($\times 100$)
- * 3 0.05 M Sodium Phosphate Buffer pH 7.4
0.1 % BSA, 0.1 % Tween 20
- * 4 Rabbit-anti-EGF-serum (Mitsubishi Yuka,BCL)
titer 1 : 15000 (working)
- * 5 ^{125}I -EGF, human (Amersham Co.)
10000 CPM/tube
- * 6 Marcella 10 (Dainippon Pharmaceutical Co.)

Fig. 1 Assay procedure for measurement of EGF in human urine.

抗 hEGF 抗体は, human-recombinant-EGF (湧永製薬社) を porcine thyroglobulin (Sigma 社) と結合させ, Freund 完全アジュバント (Difco 社) と混和し, これを家兎に免疫して作製した。

結 果

I. 基礎的検討

i) 標準曲線および抗体の交差反応性

標準曲線は, 標準 hEGF の5~500pg/tube の範囲で良好な dose response 曲線を示した。また, α -transforming growth factor との交差反応性は全く認められなかった (図2)。

ii) Sephadex G-50 によるゲル濾過分画

ヒト尿の hEGF 免疫活性は標準 hEGF と同一ピークに溶出され, peak は one peak であった (図3)。

iii) 再現性試験

同時再現性, 日間再現性とも変動係数は, 5%前後であり良好な再現性がえられた (表1)。

iv) 回収試験

既知検体に標準 hEGF の10, 25および50ng/ml の添加で回収率は $85.9 \pm 5.4\%$ であり, ほぼ満足すべき結果であった (表2)。

v) 希釈試験

異なる5種の検体を用いた1/10~1/320倍の倍々希釈による希釈曲線は, 各検体とも原点に収束する直線性を示した (図4)。

Fig. 2 A typical standard curve of EGF and specificity of anti-EGF antibody.

Fig. 3 Gel filtration profile of immunoreactive EGF in human urine.

Table. 1 Intra-assay coefficients of variation.

Intra-assay precision

	I	II
n	8	6
mean (ng/ml)	109	14.4
S. D.	4.9	0.8
c. v. (%)	4.5	5.3

Table. 2 Recovery studies with different quantities of EGF added to human urine.

Added hEGF (ng/ml)	Test result (ng/ml)	Recovery (%)
0	33.9	
	33.5	
10	42.0	83.0
	42.1	84.0
25	55.4	86.8
	54.5	83.2
50	81.9	96.4
	74.7	82.0
mean ± S. D.		85.9 ± 5.4

Fig. 4 Dilution tests of human urine.

vi) 保存安定性試験

2種の検体を -20°C 、 4°C および 25°C にて1, 3, 7, 14および28日間保存したときの保存安定性は、 -20°C および 4°C では28日目まで保存による影響をみとめなかったが、室温では14日以降、若干の低値傾向を示した(図5)。

vii) 尿中 hEGF の日内変動

健常者3例について2日間排尿ごとに採取した尿中 hEGF 濃度の日内変動は症例により差があり、一定の傾向はなかった(図6)。

II. 臨床応用

i) 健常者の尿中 hEGF 濃度

健常男子(23歳~79歳)の尿中 hEGF 濃度は $30.2 \pm 13.0 \text{ ng/mg creatinine}$ 、健常女子(18歳~83歳)のそれは $46.4 \pm 17.4 \text{ ng/mg creatinine}$ であり、後者が有意に高かった($p < 0.05$)。それぞれ50歳未満と50歳以上での尿中 hEGF 濃度をみると男女とも50歳未満のそれが統計学的に有意に高値を示した(いずれも $p < 0.05$) (表3)。

ii) 各種疾患における尿中 hEGF 濃度

前立腺癌(61歳~88歳)の尿中 hEGF 濃度は50歳以上健常男子のそれと差がなかった。腎腫瘍(53歳~85歳、いずれも男子)では、やや低値の傾向を示したが、統計的有意差はなかった。膀胱腫瘍(42歳~83歳)での尿中 hEGF 濃度は、男女とも50歳以上の健常者のそれより有意に低値であった(いずれも $p < 0.05$) (図7)。

Radioimmunoassay 法による尿中上皮成長因子測定法の
基礎的検討およびその臨床応用 (布施, 他 4 名)

Fig. 5 Long term stability of EGF in human urine.

Fig. 6 Circadian change of EGF in human urine.

Table. 3 Urinary concentration of EGF in normal adults.

age sex		
	<50	≥50
male	33.5 ± 11.8* (n=26)	25.2 ± 13.7 (n=17)
female	46.4 ± 17.3 (n=26)	37.4 ± 17.5 (n=8)

* ng/mg creatinine
mean ± S.D.

Fig. 7 Urinary concentration of EGF in various diseases.

考 按

hEGF は免疫組織学的に顎下腺，十二指腸ブルネル腺等に存在する⁴⁾。体液中にもみとめられ唾液，胃液，精液および尿などにも含まれている¹⁰⁾。

尿中には1日50～100 μg と大量に hEGF が排泄される²²⁾。この hEGF の由来としては血中または腎が考えられている。血中に投与した EGF の10%しか尿中へ排泄されないこと¹⁸⁾，血中 hEGF はほとんどが血小板に含まれており，血漿中 hEGF 濃度は低いこと¹⁷⁾などから尿中 hEGF のすべてが血中由来とは考え難い。一方，マウス腎遠位尿細管には mEGF の mRNA が確認されており²⁰⁾，また EGF の前駆体は腎で膜蛋白として存在していると報告されている¹⁹⁾。したがってこの前駆体がなんらかのプロセッシングをうけて尿中に排泄される可能性がある。しかしヒトにおいては腎組織中の hEGF 活性はわずかであるとされていることより⁸⁾，尿中 EGF が腎由来か否かは今後の検

討を要するところである。

尿中 hEGF 測定のための RIA 系がいくつか報告されている⁹⁾¹¹⁾¹⁴⁾¹⁶⁾。その ID₅₀ はいずれも 100～200pg であるが、我々の RIA 系では 50pg であり他の系に比し感度が優れているといえる。また、ゲル濾過で標準 hEGF の位置にのみ hEGF 免疫活性が溶出され、高分子型の hEGF を測定しないこと、すなわちそれとの cross reactivity がないことも本測定系の特徴といえる。再現性・希釈試験その他について良好な成績を示し、保存による影響も少なく、きわめて安定しており、実用上問題ないものと考えられる。ちなみに Nexo ら¹²⁾は、尿中 hEGF を RIA 法と Radioreceptor assay 法とを比較し、前者のほうが感度、正確度などで優れており本法を推奨している。

尿中 hEGF 濃度の正常値については、佐々木²¹⁾は、RIA 法にて 5～40ng/mg creatinine（平均 20ng/mg creatinine）としており、内橋ら²⁴⁾も同様の成績を報告している。一方、Dailey ら³⁾は前2者の報告より高値としており、自験例でも男子および女子の平均値がそれぞれ 30.2ng/mg creatinine, 46.4ng/mg creatinine とほぼ Dailey らの報告に一致した結果であった。なおいずれの報告も性差を指摘しており、女子の方が男子に比し高値としている。このことは hEGF の合成、分泌に女性ホルモンの関与を示唆するものだろう。年齢によっても尿中 hEGF 濃度は異なるとされ、小児では低値であり年齢とともに増加し成人レベルに達する²²⁾。その後低下傾向を示し高令者では低値を示すという²³⁾。自験例では 50 歳以上のものの尿中 hEGF 濃度は 50 歳未満のそれより有意に低値を示した。したがって各報告者による成績の比較にはこのことを念頭におく必要がある。

尿中 hEGF 濃度は甲状腺機能亢進症、クッシング症候群などの内分泌疾患で増加するとされており²⁴⁾、hEGF の合成、分泌がいくつかのホルモンにより制御されていることが示唆される。一方、肝硬変や腎不全で減少をみることもより²⁴⁾、肝、腎が hEGF の代謝に関与しているのだろう。各種悪性腫瘍患者において尿中 hEGF 濃度が増加することが報告されており⁶⁾¹³⁾、腫瘍の発育との関連が考えられる。自験例では、腎腫瘍および前立腺癌では、それぞれやや低値ないし正常レベルであったが、膀胱腫瘍では健常者に比し有意に低値を示した。後者については Kristensen ら¹²⁾も同様の報告をしており、その理由として尿中の hEGF が腫瘍細胞の膜に存在する EGF レセプターと結合するため、その尿中濃度が減少するとしている。いずれにせよ、尿中 hEGF の各種疾患における臨床的意義については不明な点が少なく今後研究が待たれるところである。

結 語

ヒト尿中 hEGF の RIA 法による測定法を確立し、各種泌尿器疾患の尿中 hEGF を測定し以下の結果をえた。

- 1) 本法は、再現性、希釈試験などいずれも良好で保存による影響も少なく実用上問題ないと思われた。
- 2) 健常者では男子の尿中 hEGF 濃度は、 30.2 ± 13.0 ng/mg creatinine、女子のそれは 46.4 ± 17.4 ng/mg creatinine であり、後者は前者より有意に高値であった。また男女とも 50 歳未満の尿中 hEGF 濃度は 50 歳以上のそれより高値であった。
- 3) 膀胱腫瘍では健常者に比し有意に尿中 hEGF 濃度が低値を示し腫瘍の発育との関連が示唆された。

本論文の要旨は第 62 回日本内分泌学会秋季学術大会において発表した。

文 献

- 1) Cohen, S.: Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *J. Bio. Chem.*, 237: 1555-1562, 1962.
- 2) Cohen, S. and Taylor, J.M.: Part I. Epidermal growth factor: Chemical and biological characterization. *Recent Prog. Horm. Res.*, 30: 533-550, 1974.
- 3) Dailey, G.E., Kraus, J.W. and Orth, D.N.: Homologous radioimmunoassay for human epidermal growth factor (Urogastrone). *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 46: 929-936, 1978.
- 4) Elder, J.B., Williams, G., Lacey, E. and Gregory, H.: Cellular localization of human urogastrone/epidermal growth factor. *Nature*, 271: 466-467, 1978.
- 5) Gregory, H.: Isolation and structure of urogastrone and its relationship to epidermal growth factor. *Nature*, 257: 325-327, 1975.
- 6) Gregory, H., Holmes, J.E. and Willshire, I.R.: Urogastrone levels in the urine of normal adult humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 45: 668-672, 1977.
- 7) Heitz, P.V., Kasper, M., Noorden, S.V., Polak, J.M., Gregory, H. and Pearse, A.G.E.: Immunohistochemical localization of urogastrone to human duodenal and submandibular glands. *Gut*, 19: 408-413, 1978.
- 8) Hirata, Y. and Orth, D.N.: Epidermal growth factor (Urogastrone) in human tissues. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 48: 667-672, 1979.
- 9) Hirata, Y., Moore, G.W., Bertagna, C. and Orth, D.N.: Plasma concentrations of immunoreactive human epidermal growth factor (Urogastrone) in man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 50: 440-444, 1980.
- 10) 平田結喜緒: ヒト EGF の動態とその意義. *日内分泌誌*, 59: 1930-1934, 1983.
- 11) Jaspar, J.M. and Franchimont, P.: Radioimmunoassay of human epidermal growth factor in human breast cyst fluid. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, 21: 1343-1348, 1985.
- 12) Kristensen, J.K., Lose, G., Lund, F. and Nexø, E.: Epidermal growth factor in urine from patients with urinary bladder tumors. *Eur. Urol.*, 14: 313-314, 1988.
- 13) 黒部真章, 林 恭三: ヒト EGF の酵素免疫測定法の応用研究. 31: 193-201, 1987.
- 14) Mattila, A.-L., Perheentupa, J., Pesonen, K. and Viinikka, L.: Epidermal growth factor in human urine from birth to puberty. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 61: 997-1000, 1985.
- 15) Nexø, E., Lamberg, S.I. and Hollenberg, M.D.: Comparison of a receptor binding assay with a radioimmunoassay for measuring human epidermal growth factor-urogastrone in urine. *Scan. J. Clin. Lab. Invest.*, 41: 577-582, 1981.
- 16) Ohmura, E., Emoto, N., Tsushima, T., Watanabe, S., Takeuchi, T., Kawamura, M., Shigemoto, M. and Shizume, K.: Salivary immunoreactive human epidermal growth factor (IR-hEGF) in patients with peptic ulcer disease. *Hepato-gastroenterol.*, 34: 160-163, 1987.
- 17) Oka, Y. and Orth, D.N.: Human plasma epidermal growth factor/ β -urogastrone is associated with blood platelets. *J. Clin. Invest.*, 72: 249-259, 1983.
- 18) Panaretto, B.A., Moore, G.P.M. and Robertson, D.M.: Plasma concentrations and urinary excretion of mouse epidermal growth factor associated with the inhibition of food consumption and of wool growth in Merino wethers. *J. Endocrinol.*, 94: 191-202, 1982.
- 19) Pfeffer, S. and Ullrich, A.: Is the precursor a receptor?

- Nature, 313: 184, 1985. 20) Rall, L.B., Scott, J. and Bell, G.I.: Mouse prepro-epidermal growth factor synthesis by the kidney and other tissues. Nature, 313: 228-231, 1985.
- 21) 佐々木透: ラジオイムノアッセイによる尿中 EGF の測定. SRL 宝函, 11: 27-31, 1987. 22) Starkey, R.H. and Orth, D.N.: Radioimmunoassay of human epidermal growth factor (Urogastrone). J. Clin. Endocrinol. Metab., 45: 1144-1153, 1977.
- 23) Uchihashi, M., Hirata, Y., Fujita, T. and Matsukura, S.: Age-related decrease of urinary excretion of human epidermal growth factor (hEGF). Life Sci., 31: 679-683, 1982. 24) 内橋正仁, 平田結喜緒, 藤田拓男: 尿中上皮成長因子の測定法と臨床的意義. 日本臨床, 44: 223-228, 1986.

(受付日: '90. 7. 24)

(採択日: '90. 10. 22)