尿路性器悪性腫瘍患者における尿中ネオプテリン値の検討

防衛医科大学校泌尿器科学講座

浅野 友彦 中島 史雄 小田島邦男
辻 明 早川 正道 中村 宏

URINARY NEOPTERIN LEVELS IN PATIENTS WITH GENITOURINARY TRACT MALIGNANCIES

Tomohiko Asano, Fumio Nakajima, Kunio Odajima, Akira Tsuji,
Masamichi Hayakawa and Hiroshi Nakamura
Department of Urology, National Defense Medical College

(Background) Neopterin is released from macrophages upon stimulation with γ -interferon, secreted by activated T cell. Therefore it has been recognized as a useful indicator of the activation of the T cell-macrophage system. Increased neopterin levels are observed in patients with acute graft rejections, viral infections, auto-immune diseases and several malignancies. Urinary neopterin concentrations were determined in patients with genitourinary tract malignancies to evaluate the usefulness of neopterin as a tumor marker.

(Methods) Urinary neopterin concentrations were determined by high-performance liquid chromatography in 90 patients with genitourinary tract malignancies and 28 patients with benign urological tumors and 34 healthy subjects.

(Results) Increased urinary neopterin levels were observed in 52% of the patients with genitourinary tract malignancies and 7% with benign urological tumors. The positivity rate in patients with renal cell carcinoma (RCC), renal pelvic and ureteral tumor, bladder tumor (BT), prostatic carcinoma (PC) and testicular tumor was 68%, 80%, 47% and 30%, respectively. The difference in the urinary neopterin levels between low and high stages was highly significant ($p < 0.0005$) in patients with RCC (stage I-II vs. stage III-IV) and BT (T_{1-2} vs. T_{3-4}). The urinary neopterin levels were also correlated with the tumor grade in patients with RCC and PC.

(Conclusion) Our study suggests that urinary neopterin levels may supplement laboratory examinations for patients with genitourinary tract malignancies, providing useful information in evaluating the tumor stage and follow-up of the disease.

Key words: neopterin, genitourinary tract malignancy, tumor marker

要旨: (背景と目的) ネオプテリンは、活性化された T 細胞から分泌される γ -インターフェロンの刺激によりマクロファージから放出が増加することが知られており、T 細胞-マクロファージ系の活性化の指標とされている。そのため、ネオプテリンは、拒絶反応、ウイルス感染症、自己免疫疾患、癌患者で上昇することが報告されている。今回、尿路性器悪性腫瘍患者の尿中ネオプテリンを測定し、腫瘍マーカーとしての有用性について検討を加えた。

(方法) 尿路性器悪性腫瘍患者90名、泌尿器科良性腫瘍患者28名、正常健康人34名における尿中ネオプテリン濃度を高速液体クロマトグラフィーを用いて測定した。

(結果) 尿路性器悪性腫瘍患者の52%、泌尿器科良性腫瘍患者の7%において尿中ネオプテリン値は増加していた。陽性率は、腎細胞癌患者68%、腎盂尿管癌患者80%、膀胱癌患者44%、前立腺癌患者47%、精巣腫瘍患者30%であった。low stage 群と high stage 群を比較すると、腎細胞癌患者 (stage I, II vs. stage III, IV) 及び膀胱癌患者 (T_{1-2} vs. T_{3-4}) で両群間の尿中ネオプテリン値に有意 ($p < 0.0005$)

に差を認めた。腎細胞癌患者及び前立腺癌患者では、尿中ネオプテリン値と異型度との間に相関を認めた。

(結論) 今回の検討の結果、尿中ネオプテリン値は、尿路性器悪性腫瘍患者における腫瘍の進展度の把握や経過観察に有用であると思われた。

キーワード：ネオプテリン、尿路性器悪性腫瘍、腫瘍マーカー

緒 言

tetrahydrobiopterin (THB) は、guanosine triphosphate (GTP) から GTP cyclohydrolase によって誘導される物質であり、ドパミンやセロトニンなどの神経伝達物質を合成する際に co-factor として必要とされるものである。したがって、GTP cyclohydrolase は本来神経組織に多く分布するものであるが、その他にもマクロファージや線維芽細胞にも存在するとされている。そしてマクロファージに含まれる GTP cyclohydrolase 活性は、各種サイトカイン、特に γ -インターフェロン (γ -IFN) によって著明に増強されることが知られている¹⁾。ネオプテリンは、GTP から THB が合成される際に生ずる中間代謝産物であるが、生体内においてサイトカインの分泌が亢進している病態においてその産生が亢進する。このためネオプテリンは、生体における免疫賦活状態、特に T 細胞-マクロファージ系の活性化状態を知る指標として、移植後拒絶反応²⁾、感染症³⁾、自己免疫疾患⁴⁾等の診断や活動性の判定に臨床的に応用されている。また、各種悪性腫瘍患者においてもネオプテリンの産生が増加していることが

報告されている⁵⁾⁶⁾が、今回我々は尿路性器悪性腫瘍患者の尿中ネオプテリンを測定し、各種悪性腫瘍の進行度、異型度との関連について検討を加えたので報告する。

対象及び方法

病理組織学的に診断が確認された尿路性器悪性腫瘍患者90名（腎細胞癌19名、腎盂尿管癌10名、膀胱癌32名、前立腺癌19名、精巣腫瘍10名）、良性腫瘍患者28名（前立腺肥大症23名、副腎腺腫5名）、正常健康人34名を対象とした。

患者の早朝第一尿を10ml 採取し、disodium ethylenediamine tetraacetate 100mg を加え、測定まで-20°C、暗所に冷凍保存し、測定直前に溶解し、Sep-Pak C₁₈ cartridge で固形物質や、非極性物質を吸着除去した後、測定に用いた。

ネオプテリンは、Hausen ら⁷⁾の方法に従って測定した。すなわち、高速液体クロマトグラフィー (Varian Model LC 5100) を用い、300×3.9mm のステンレスカラムに10 μ m Bonda-pak C₁₈を充填したカラムでネオプテリンとクレアチニンの分離を行った。ネオプテ

図1 正常健康人、尿路性器悪性腫瘍患者、泌尿器科良性腫瘍患者の尿中ネオプテリン値

図2 腎細胞癌患者の stage 別尿中ネオプテリン値

図3 腎細胞癌患者の grade 別尿中ネオプテリン値

リンは、蛍光分光光度計(日立 F1000)を用い、励起波長353nm, 蛍光波長438nmにて測定した。クレアチニンは、紫外分光光度計(Varian UV200)を用い、235nmでの吸光度で測定した。尿の濃縮や、希釈による尿中ネオプテリン濃度の変動を取り除くために尿中ネオプテリン濃度を尿中クレアチニン濃度で除した値を尿中ネオプテリン値(μmol/molCr)として検討を加えた。

結 果

1. 正常健康人(図1): 正常健康人34名(年齢25~72歳, 平均44.3歳, 男性20名, 女性14名)の尿中ネオプテリン値は, 119 ± 36 (mean ± SD) μmol/molCrであった。正常健康人の尿中ネオプテリン値の mean + 2SD にあたる $191 \mu\text{mol/molCr}$ を正常上限値に設定し, これを超えるものを陽性と判定した。この場合の正常健康人の陽性率は3%であった。

図4 膀胱癌患者の stage 別尿中ネオプテリン値

2. 腎細胞癌患者(図2, 3): 腎細胞癌患者の尿中ネオプテリン値は, 320 ± 50 (mean ± SE) μmol/molCrであり, 正常健康人と比べて有意 ($p < 0.0005$) に高値を示し, 陽性率は68%であった。Stage別(Robson分類)の尿中ネオプテリン値は, stage I (6名), $136 \pm 18 \mu\text{mol/molCr}$, stage III (3名) $303 \pm 56 \mu\text{mol/molCr}$, stage IV (10名) $463 \pm 90 \mu\text{mol/molCr}$ であり, stageが高くなるほど高値を示し, stage I, IIをlow stage群, stage III, IVをhigh stage群とするとhigh stage群はlow stage群に比べて有意 ($p < 0.0005$) に高値を示した。異型度別(腎癌取り扱い規約)ではG3の患者はなくG1 (9名), G2 (10名) 群の尿中ネオプテリン値は, 各々 222 ± 75 , $409 \pm 56 \mu\text{mol/molCr}$ と異型度が強くなるほど高値を示した ($p < 0.05$)。

3. 腎盂尿管癌患者(図1): 腎盂尿管癌患者10名の尿中ネオプテリンの平均値は, $488 \pm 92 \mu\text{mol/molCr}$ であり, 正常健康人と比べて有意 ($p < 0.005$) に高値を示し, 陽性率は80%であった。

4. 膀胱癌患者(図4, 5): 膀胱癌患者32名の尿中ネオプテリン値の平均値は, $254 \pm 34 \mu\text{mol/molCr}$ であり, 正常健康人と比べて有意 ($p < 0.0005$) に高値を示し, 陽性率は44%であった。深達度別(膀胱癌取り扱い規約)では, Tis, Ta-1, T₂, T₃, T₄で各々 100 ± 5 , 153 ± 11 , 234 ± 40 , 340 ± 75 , $495 \pm 107 \mu\text{mol/molCr}$ と深達度が深くなるほど高値を示し, Tis, Ta-1を非浸潤群, T₂, T₃, T₄を浸潤群とすると浸潤群は非浸潤群に比べて有意 ($p < 0.0005$) に高値を示した。異型度別(膀胱癌取り扱い規約)では, G1群で 171 ± 30 , G2群で 251 ± 41 , G3群で $351 \pm 109 \mu\text{mol/molCr}$ と異型度が強くなるほど高値を示したが有意差は認められなかった。

図5 膀胱癌患者の grade 別尿中ネオプテリン値

5. 前立腺癌患者 (図1): 前立腺癌患者全体の尿中ネオプテリン値の平均は、 $223 \pm 109 \mu\text{mol/molCr}$ であり、正常健康人と比べて有意 ($p < 0.0005$) に高値を示し、陽性率は47%であった。Stage 別(前立腺癌取扱い規約)では、stage A では 194 ± 36 , stage B では 164 ± 27 , stage C では 293 , stage D では $252 \pm 43 \mu\text{mol/molCr}$ であり、各 stage 間で差は認められなかった。

異型度別では、高分化型 142 ± 27 , 中分化型 196 ± 16 , 低分化型 $392 \pm 47 \mu\text{mol/molCr}$ と異型度の大きいものほど高値を示し、中分化型は高分化型に比べ有意 ($p < 0.005$) に、また低分化型は中分化型に比べて有意 ($p < 0.005$) に高値を示した。

6. 精巣腫瘍患者 (図1): 10名の精巣腫瘍患者のうち、stage 別(日本泌尿器科学会病期分類)では、stage I 6名, stage II 3名, stage III 1名で、組織型は seminoma 6名, non-seminoma 4名であった。尿中ネオプテリン値の平均は、 $177 \pm 35 \mu\text{mol/molCr}$ であり、正常健康人と比べて有意差は認められなかった。各 stage 間、及び両組織型間で尿中ネオプテリン値の差は認められなかった。

7. 泌尿器科領域の良性腫瘍患者 (図1): 前立腺肥大症23名, 副腎腺腫5名の尿中ネオプテリン値は、各々 124 ± 16 , $142 \pm 20 \mu\text{mol/molCr}$ と正常健康人と比べて有意差は認められず、陽性率は各々 9%, 0%であった。

考 察

癌細胞に対して宿主の免疫応答がひきおこされるメカニズムとしては、まず抗原提示細胞 (Antigen Presenting Cell: APC) が癌細胞の腫瘍関連抗原 (Tumor Associated Antigen: TAA) をとりこみ、これを T 細胞に提示することで T 細胞系が活性化され

るとする説が現在のところ有力である。このときに、活性化されたヘルパー T 細胞からインターロイキン 2 や γ -IFN などのサイトカインが分泌されるが、実際にも悪性腫瘍患者において γ -IFN の血中濃度が上昇しているという報告もみられる⁸⁾⁹⁾。しかしながら、 γ -IFN は産生される量が微量であり、半減期が短く、細胞や蛋白に付着するため、腫瘍マーカー、あるいは免疫状態のモニタリングの手段としては有用ではないとされている。一方、ネオプテリンは、 γ -IFN の刺激によりマクロファージからの分泌が増加するが、血中、尿中においても比較的安定しており、T 細胞—マクロファージ系の活性化状態を間接的に知る指標として有用であるとされている。

今回、各種尿路器悪性腫瘍患者90名の尿中ネオプテリンを測定したところ、その陽性率は52%であった。尿路器悪性腫瘍患者のネオプテリンについては、Fuchs¹⁰⁾, Kuzmitz¹¹⁾らの報告があるが、その陽性率は各々54%, 55%と著者らの成績とほぼ同様であった。我々の検討では、悪性腫瘍の進展度が高くなるほどネオプテリンは高値を示し、腫瘍の進行度を把握するのに有用であると思われた。特に膀胱癌患者においては、T2-4群は Tis-1群と比べて有意 ($p < 0.0005$) に高く、腫瘍の筋層浸潤の有無を判定するのに有用であると思われた。Aulitzky ら¹²⁾も、同様な成績を報告しており、腫瘍細胞が lamina propria を越えて浸潤性になったときに T 細胞—マクロファージ系が賦活化されネオプテリンが上昇するからではないかと推察している。また、膀胱癌患者と比べて同じ移行上皮癌である腎盂尿管癌患者で尿中ネオプテリン値の陽性率が80%と高かったのは、10名中8名が stage III, IV と high stage の患者が多かったためと思われる。一方、前立腺癌患者では、stage D 患者10名のうち5名で尿中ネオプテリン値は正常範囲内にあり、進展度による差がみられなかった。これら5名中3名はすでにホルモン療法を受けており、他の腫瘍マーカーも正常化していたためと思われる。

組織学的異型度別にみても、腎細胞癌患者、前立腺癌患者で異型度が高くなるほど尿中ネオプテリン値は高値を示す傾向がみられた。しかしながら、異型度の高い腫瘍は進展度が進んでいることが多く、ネオプテリンが異型度と進展度のどちらにより影響を受けているのかは明かではなかったが、同一の進展度の患者間で比較すると異型度によるネオプテリンの差はほとんどみられなかったため、異型度よりは進展度に影

響を受けるのではないかと考えられた。

ネオプテリンと患者の予後との関連については、ネオプテリンが高い患者では病期や異型度にかかわらず予後が不良であるとの報告が多い¹³⁾¹⁴⁾。著者らの検討でも腎細胞癌患者において、尿中ネオプテリン値、病期、異型度、腫瘍径などを多変量解析を用いて分析したところ、これらの因子の中では尿中ネオプテリン値が最も長期予後と相関することが明らかとなった¹⁵⁾。癌患者においてネオプテリンが上昇しているということは、 γ -IFN によりマクロファージが刺激されている状態を示すが、このことは必ずしも有効に細胞障害性 T 細胞や、マクロファージ等のエフェクター細胞が産生されていることを示しているわけではない¹⁶⁾。逆に、 γ -IFN により活性化されたマクロファージが、TGF- α などの腫瘍増殖因子や、血管造成因子を放出したり、あるいは活性化されたマクロファージのうちのサブレッサー・マクロファージが腫瘍局所で免疫抑制的に作用しているため、ネオプテリンが高値を示す患者の予後が悪いのではないかとする報告もある¹⁷⁾。一方、ネオプテリンやその代謝産物が免疫系に及ぼす影響はほとんどないとされており、ネオプテリンが直接免疫を抑制している可能性は少ないと考えられている¹⁸⁾。また、癌が活動性であるときに血中の γ -IFN が上昇するという報告¹⁹⁾もあり、ネオプテリンが癌そのものの生物学的活性を反映している可能性もある。

感度については、進展度の高い腫瘍では陽性率が高く、進展度の把握や治療効果のモニターとしては有用であると思われたが、早期癌におけるネオプテリンの陽性率は低く、スクリーニング上、最も意義のある早期癌の発見の手段としての有用性は認められなかった。

また、ネオプテリンの特異性に関しては、正常健康人や良性腫瘍患者（前立腺肥大症、副腎腺腫）における陽性率が各々3%、7%と低く、特異性は高かった。しかしながら、T 細胞-マクロファージ系の賦活化される自己免疫疾患、ウイルス感染症、結核などのときにも上昇するとの報告があり、悪性腫瘍を評価する際には臨床経過や他の検査所見も注意深く観察し、これらの疾患の合併の有無を確認しておく必要があると思われる。また、著者らの経験では、急性腎盂腎炎においても尿中ネオプテリン値が上昇するので尿路感染症の有無についても調べておく必要がある。

尿中ネオプテリン値は、尿路性器悪性腫瘍患者においてスクリーニングの手段としての有用性は認められ

なかったが、特異度は十分に高く、また進行した腎細胞癌患者、膀胱癌患者においては腫瘍の進展度の把握に有用であると思われた。

文 献

- 1) Huber, C., Batchelor, J.R., Fuchs, D., Hausen, A., Lang, A., Niederwieser, D., Reibnegger, G., Swetly, P., Troppmair, J. and Wachter, H.: Immune response-associated production of neopterin. *J. Exp. Med.*, **160**, 310—316, 1984.
- 2) Woloszczuk, W., Troppmair, J., Leiter, E., Flener, R., Schwarz, M., Kovarik, J., Pohanka, E., Margreiter, R. and Huber, C.: Relationship of interferon- γ and neopterin levels during stimulation with alloantigens in vivo and in vitro. *Transplantation*, **41**, 716—719, 1986.
- 3) Fuchs, D., Hausen, A., Kofler, M., Kosanowski, H., Reibnegger, G. and Wachter, H.: Neopterin as an index of immune response in patients with tuberculosis. *Lung*, **162**, 337—346, 1984.
- 4) Lim, K.L., Muir, K. and Powell, R.J.: Urine neopterin: A new parameter for serial monitoring of disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann. Rheum. Dis.*, **53**, 743—748, 1994.
- 5) Zitko, M., Andrysek, O. and Cernovska, M.: Renal excretion of neopterin and biopterin in patients with malignant melanoma and Hodgkin's disease. **33**, 387—391, 1986.
- 6) Gadducci, A., Ferdeghini, M., Malagnino, G., Prontera, C., Fanucchi, A., Annicchiarico, C., Bianchi, R., Fioretti, P. and Facchini, V.: Elevated serum levels of neopterin and soluble interleukin-2 receptor in patients with ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.*, **52**, 386—391, 1994.
- 7) Hausen, A., Fuchs, D., Konig, K. and Wachter, H.: Determination of neopterin in human urine by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **227**, 61—70, 1982.
- 8) Hahn, T. and Levin, S.: The interferon system in patients with malignant disease. *J. Interferon Res.*, **2**, 97—102, 1982.
- 9) 橘 正人, 小倉雄太, 関根智久, 対馬敬夫, 大塚勝幸, 高嶋一敏, 福島松郎: 癌患者の血清中 Interferon 活性と免疫パラメーターとの相関について. *Oncologia*, **21**, 123—126, 1988.
- 10) Fuchs, D., Hausen, A., Huber, C., Reibnegger, G. and Wachter, H.: Urinary neopterin in the diagnosis and follow-up of neoplasia: A biochemical parameter to detect cell-mediated immune response. *Tumor Biology*, **5**, 199—209,

- 1984.
- 11) Luzmits, R., Ludwig, H., Legenstein, E., Szekeres, T., Kratslik, C. and Hofbauer, J.: Neopterin as tumor marker: Serum and urinary neopterin concentrations in malignant diseases. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, **24**, 119—124, 1986.
- 12) Aulitzky, W., Frick, J., Fuchs, D., Hausen, A., Reibnegger, G. and Wachter, H.: Significance of urinary neopterin in patients with malignant tumors of the genitourinary tract. *Cancer*, **55**, 1052—1055, 1985.
- 13) Fuith, L.C., Dapunt, O., Hetzel, H., Reibnegger, G. and Wachter, H.: Second-look operation in women with ovarian cancer: Concentrations of neopterin in urine and CA 125 in serum at second-look laparotomy. *Tumor Diagn. Ther.*, **11**, 147—151, 1990.
- 14) Gunter, W., Kronberger, P., Conrad, F., Bodner, E., Wachter, H. and Reibnegger, G.: Neopterin and prognosis in patients with adenocarcinoma of the colon. *Cancer Res.*, **53**, 260—265, 1993.
- 15) Asano, T., Uwatoko, N., Tsuji, A., Nakajima, F., Hayakawa, M. and Nakamura, H.: Neopterin as a prognostic factor in renal cell cancer patients: seven year follow-up. *J. Urol.*, **155**, 584A, 1996.
- 16) Reibnegger, G., Fuchs, D., Hausen, A., Werner, E.R. and Wachter, H.: Activated macrophages and cancer. *Lancet*, **20**, 1439, 1987.
- 17) Bichler, K.H., Kleinknecht, S. and Strohmaier, W.L.: Immune status and immune therapy of renal cell carcinoma. *Urol. Int.*, **45**, 269—283, 1990.
- 18) Ziegler, I., Hamm, U. and Berndt, J.: Participation of pterins in control of lymphocyte stimulation and lymphoblast proliferation. *Cancer Res.*, **43**, 5356—5359, 1983.
- 19) Horn, Y., Zeidman, J.L. and Heller, A.: Serum intrerferon as a biological marker in malignant tumors. *Oncology*, **42**, 164—168, 1985.

(1996年4月15日受付, 9月9日受理)