

尿路上皮癌診断における尿中 NMP22 の有用性

Clinical Usefulness of Urinary NMP22 (Nuclear Matrix Protein 22) in Urothelial Cancer

高橋 壮 模*

Takahashi, Takenori

高田 稔**

Takada, Minoru

NMP22 (Nuclear Matrix Protein 22) is one of the nuclear matrix proteins recognized by two monoclonal antibodies, MAb302-22 and MAb302-18. Compared with healthy controls or patients with benign diseases, urothelial cancer patients have elevated NMP22 level in their urine. The sensitivities of urinary NMP22 and voided urine cytology were 61.1% (88/144) and 33.3% (48/144), respectively: and this difference was significant ($p < 0.00001$). Urinary NMP22 examination is a simple and highly sensitive method for detection of urothelial cancer, and has many advantages over the conventional methods such as cystoscopy and voided urine cytology.

1 はじめに

腫瘍マーカーは画像診断とは異なった観点から癌の質的・量的変化を感知できることから、各種臓器癌の補助診断法として利用されている。しかしながら、尿路上皮癌（組織学的に移行上皮癌である膀胱癌、腎盂尿管癌、尿道癌）において、臨床上利用されている腫瘍マーカーはいまだにないのが現状である。

NMP22 (Nuclear Matrix Protein 22) は米国 Matritech 社により開発された腫瘍マーカーであり、尿中に出現する NMP22 が膀胱癌の再発を管理する指標として有用であることが米国食品医薬品局により承認されている。¹⁾ 我々は NMP 22 の技術を導入し、日本国内 14 施設による共同研究により、膀胱癌の再発診断に加え、顕微鏡的血尿を有する患者からの尿路上皮癌の診断における NMP22 の有用性を評価した。尿中 NMP 22 は、顕微鏡的血尿患者からの尿路上皮癌の診断、および膀胱癌の再発診断の指標として有用なマーカーであることが認められ、尿路上皮癌の診断用に開発された国内初の腫瘍マーカーとして厚生省から輸入承認を受けた。

尿中 NMP 22 はコニカが昨年商品化した卵巣癌マーカー GAT (Galactosyltransferase Associated with Tumor) に次ぐ腫瘍マーカーであり、今後の市場展開が期待される。

本報では、NMP 22 の生化学的背景、測定原理、尿中 NMP 22 の臨床的有用性について報告する。

2 NMP 22 とは

組織の未分化に認められる細胞核の形態変化は、組織の癌化に密接に関係しているといわれている。癌化した細胞核は大きさや形態で正常細胞と識別されるが、こうした核の形態変化は核マトリックスにより制御されてい

る。こうした観点から、核マトリックスのひとつである NuMA タンパク (Nuclear mitotic apparatus protein) が癌関連物質として注目されてきた。²⁾ NuMA タンパクは細胞周期 M 期に紡錘体と共に出現する 236Kda のタンパクとして分子クローニングされている。その生化学的機能としては、微小管タンパクと結合することにより微小管の成長を安定化させるとの報告があり、細胞増殖の制御に関与している。²⁾ また、正常組織に比べ各種癌細胞から数十倍量の NuMA タンパクが検出されたと報告されている。²⁾ NMP 22 は 2 つのモノクローナル抗体 MAb302-22 と MAb302-18 により認識されるタンパクであり、この 2 つのモノクローナル抗体により認識される NuMA タンパクが NMP 22 と定義づけられる。³⁾

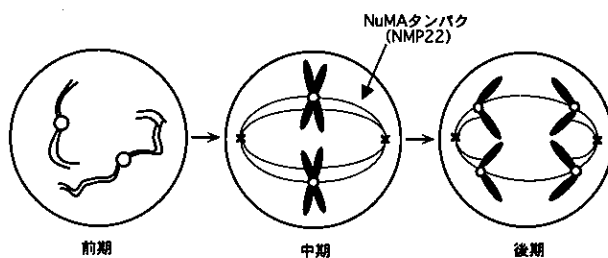


Fig.1 細胞周期M期におけるNuMAタンパク(NMP22)の出現

細胞周期M期においてNuMAタンパク(NMP22)は微小管タンパクとともに紡錘糸の形成に関与している。

3 NMP 22 の測定原理

モノクローナル抗体を用いたサンドイッチ法に基づく ELISA 法 (酵素免疫測定法) により、尿中の NMP 22 濃度が測定される。Fig.2 にその測定原理を示す。96 穴プレートに吸着結合された抗 NMP 22 マウスモノクローナル抗体(302-18)及びジゴキシゲニン結合抗 NMP 22 マウスモノクローナル抗体 (302-22) は、尿中に含まれる NMP 22 と抗原抗体反応を起こし免疫複合体を形成する。この免疫複合体とペルオキシダーゼ標識抗ジゴキシゲニ

* MG 事業本部 MG 開発センター

** 電子材料事業部

ソヒツジポリクローナル抗体が抗原抗体反応を起こし、ペルオキシダーゼがプレートに結合する。NMP 22 はプレートに結合したペルオキシダーゼ量に対応することから、ペルオキシダーゼの酵素活性を過酸化水素とオルトフェニレンジアミン二塩酸塩を用いて求めることにより、尿中の NMP 22 量を測定することができる。

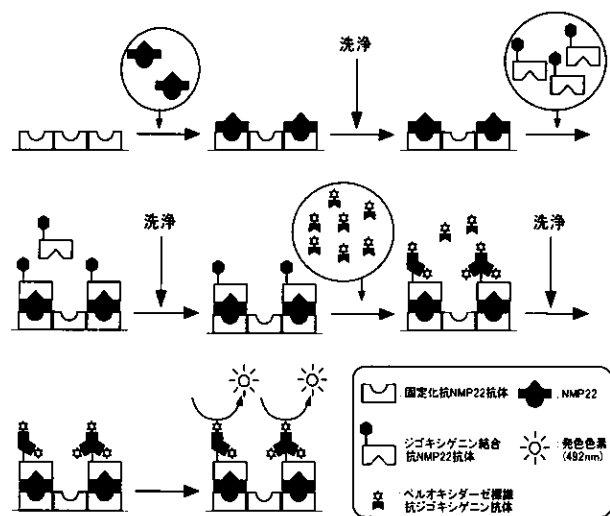


Fig.2 尿中NMP22の測定原理

4 NMP 22 の基礎的検討

4.1 NMP 22 の癌細胞に対する特異性

NMP 22 が癌細胞から特異的に放出されることを確認するために、正常ヒト繊維芽細胞 (ATCC CRL 1222) と膀胱癌細胞 3 種 (UM-UC-3:ATCC CRL 1749、HT-1197:ATCC CRL 1473、HT-1376:ATCC CRL 1472) を一定期間培養し、培養上清中の NMP 22 の量を比較検討した。

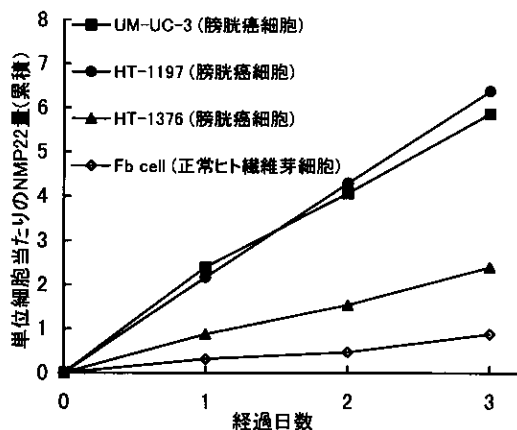


Fig.3 膀胱癌細胞(3種)と正常ヒト繊維芽細胞の培養上清中のNMP22量

3種類の膀胱癌細胞(UM-UC-3、HT-1197、HT-1376)と正常ヒト繊維芽細胞を 1×10^6 個ずつ培養し、1、2、3日経過後の培養上清中のNMP22量を測定した。得られた値を細胞数で除算することにより、単位細胞数当たりのNMP22量を求めた。

Fig.3が示すように、単位細胞当たりのNMP 22 放出量は、正常ヒト繊維芽細胞よりも膀胱癌細胞の方が数倍多いことが明らかとなった。以上の結果から、NMP 22 は正常細胞に比べ癌細胞から特異的に体液中に放出されると考えられる。

4.2 尿中NMP 22 と血中NMP 22 の関係

次に、尿中NMP 22 が血清由来ではなく尿路の癌由来であることを確認するために、健康人および膀胱癌患者の尿中NMP 22 値と血清中NMP 22 値を比較検討した。

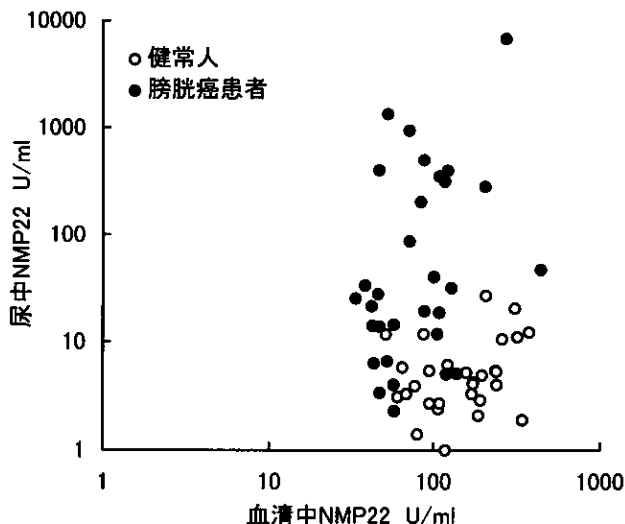


Fig.4 健康人と膀胱癌患者の尿中および血清中のNMP22量の比較

健康人および膀胱癌患者より同時に採尿、採血を行い、尿検体、血清検体各々についてNMP22値の測定を行った。

尿中NMP 22 値と血清中NMP 22 値の間に相関関係は認められず(膀胱癌; $r=0.36$ 、健康人 $r=0.39$)、血清中NMP 22 が腎糸球体を通し尿中NMP 22 値へ影響することはないと考えられた。また、膀胱癌患者の尿中NMP 22 値は健康人に比べ高値であり、一方、血清中NMP 22 値は膀胱癌患者と健康人で差がなかったことから、膀胱癌患者の尿中NMP 22 は膀胱癌から尿中に直接溶出したと考えられる。

5 尿路上皮癌診断における課題

尿路上皮癌を診断するための2つの課題について以下に述べる。

5.1 顕微鏡的血尿患者における尿路上皮癌の診断

尿路上皮癌は初発症状として血尿を伴うことが多く、血尿は尿路上皮癌を見つける上での1次指標に有効であると言われている。血尿は肉眼的血尿と顕微鏡的血尿に分けられるが、肉眼的血尿に占める尿路上皮癌の割合は高く、直ちに膀胱鏡検査が施行すべきであるとされている。一方、顕微鏡的血尿は患者数が多いにもかかわらず尿路上皮癌が発見される頻度が数%以下と低く、しかも内科的疾患を多く含むことから、全例に膀胱鏡検査を施

行することは困難であると言われている。したがって膀胱鏡検査を中心とする精密検査を必要とする患者を選別する必要があるとされている。⁴⁾

尿細胞診は特異性が高く、尿細胞診が陽性の場合には尿路に癌が存在すると言えることから有用な検査法であるとされているが、低グレードの腫瘍や微小な腫瘍の検出には限界があると言われている。以上のことから、膀胱鏡検査および尿細胞診を補う簡便な検査法の開発が望まれている。⁴⁾

5.2 膀胱癌の再発の診断

尿路上皮癌の多くを占める膀胱癌は、表在癌として発見されるケースが多く予後が比較的良好と言われている。⁵⁾ 表在性膀胱癌は経尿道的腫瘍切除術(TUR)により完全切除が可能な例が多いが、術後にその半数以上が再発することから再発腫瘍の早期発見が大きな課題と言われている。通常、術後の経過観察は3ヵ月ごとの膀胱鏡検査によって行われるが、膀胱鏡検査は侵襲性が大きく、検査費用が高いという問題がある。それゆえ膀胱鏡検査を補う目的で尿細胞診が毎月行われるが、尿細胞診は感受性が低く、また定性的な検査であることから膀胱鏡検査を十分に補う検査法とはなっていない。⁶⁾ 従って、膀胱癌の再発診断においては、感受性が高く早期発見に役立ち、かつ非侵襲性の簡便で定量的な診断法の開発が期待されている。

6 尿中 NMP 22 の臨床的有用性

6.1 健康人における尿中 NMP 22 値の分布

20歳代から70歳代の健康人171例における尿中NMP22値の分布をFig.5に示す。健康人の尿中NMP22は正規分布せず、中央値は4.2U/mlであった。健康人の尿中NMP22に性差、年齢差は認められなかった。

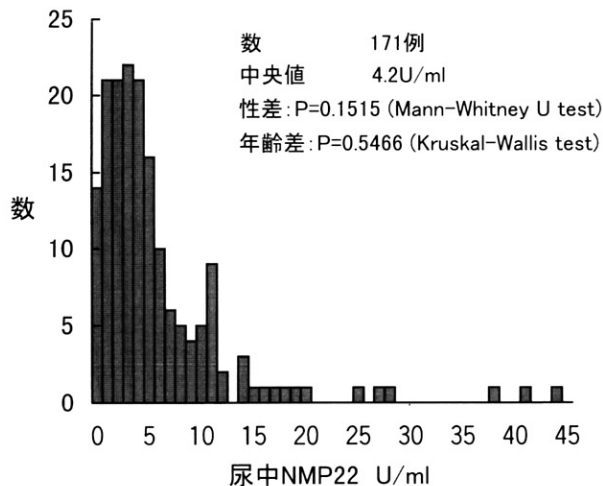


Fig.5 健康人における尿中NMP22値の分布

6.2 健康人と膀胱癌患者における尿中 NMP 22 の比較

健康171例、膀胱癌144例の尿中NMP22値を比較した結果をFig.6に示す。健康171例における尿中NMP22の中央値は4.2(95%信頼区間: 3.6~5.0)U/mlであった。一方、膀胱癌144例における尿中NMP22の中央値は17.8(95%信頼区間: 13.1~29.0)U/mlであった。膀胱癌患者の尿中NMP22値は健康人に比べて有意に高い値を示した。

また、本報ではデータとして示さないが、膀胱癌患者の尿中NMP22の日内変動に有意な差は認められず、随時尿が使用できると報告されている。⁷⁾

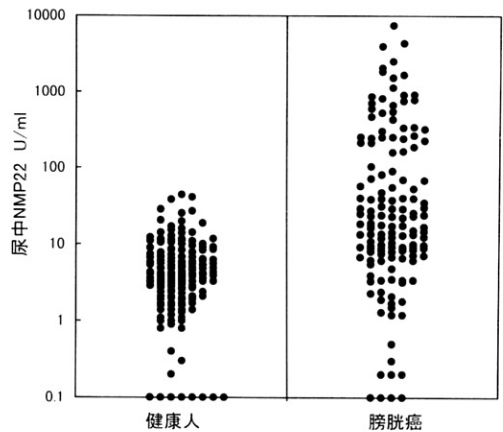


Fig.6 健康人と膀胱癌患者の尿中NMP22値の比較

6.3 尿中 NMP 22 のカットオフ値の設定

健康171例、膀胱癌144例の尿中NMP22値を用いてROC曲線(受信者動作作用曲線)を作成した(Fig.7)。AUC(area under the curve)値は0.791であった。ROC曲線の最区分点(感受性と特異性の和が最大をとる値)である12U/mlを尿中NMP22のカットオフ値とすると、膀胱癌の61.1%(88/144)、健康の9.9%(17/171)が陽性であった。

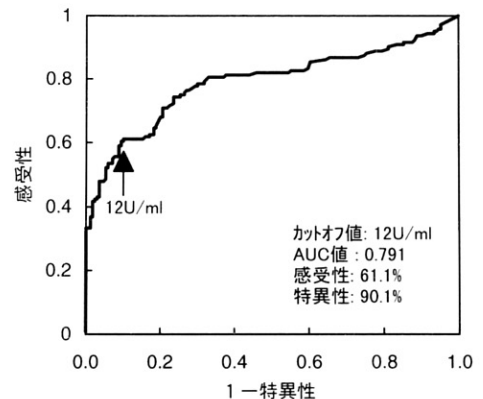


Fig.7 尿中NMP22のROC曲線

感受性と特異性の和が最大値となる12U/mlを尿中NMP22のカットオフ値とした。

6.4 膀胱癌における尿中NMP22と尿細胞診の比較

尿中NMP22と尿細胞診のそれぞれの陽性率と陽性・陰性数を比較した結果をTable 1に示す。尿中NMP22の陽性率は61.1%(88/144)であったのに対して、尿細胞診は33.3%(48/144)であった。尿中NMP22は尿細胞診に比べ有意に高い陽性率を示した(P<0.00001 McNemar Test)。尿中NMP22と尿細胞診の併用による陽性率は65.3%(94/144)であり尿中NMP22単独とほぼ同率であった。すなわち、尿中NMP22が陽性で尿細胞診陰性であったのが46例であったのに対し、尿細胞診のみが陽性となった症例はわずか6例であった。

Table 1 膀胱癌における尿中NMP22と尿細胞診の陽性率

	尿細胞診			Total
	陽性	陰性		
NMP22	陽性	29.2% (42)	31.9% (46)	61.1% (88)
	陰性	4.2% (6)	34.7% (50)	38.9% (56)
Total	33.3% (48)	66.7% (96)	100% (144)	

また、膀胱癌のカテゴリー別に尿中NMP22と尿細胞診を比較した結果をFig.8に示す。

腫瘍径、腫瘍数、浸潤度(Ta~T2-4)、異型度、それぞれ腫瘍の進行につれて、尿中NMP22と尿細胞診ともに陽性率は上昇した。また、全てのカテゴリーにおいて尿中NMP22の陽性率は尿細胞診を上回った。特に、腫瘍径が10mm未満の小さな腫瘍における陽性率は、尿細胞診の11.5%(6/52)に対し尿中NMP22では42.3%(22/52)と高率を示した。

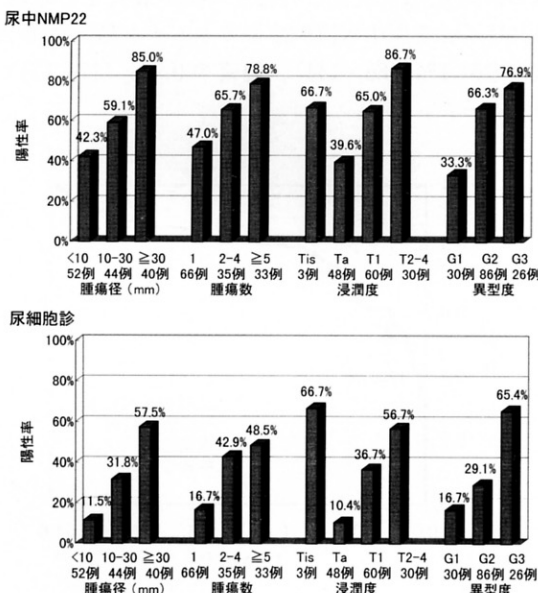


Fig.8 膀胱癌のカテゴリー別に尿中NMP22と尿細胞診の陽性率を比較

6.5 膀胱癌において尿中NMP22に影響する因子

尿中NMP22に影響する因子について多変量解析を行った(Table 2)。その結果、因子の中で腫瘍径が尿中NMP22に最も影響することが判明した。

Table 2 膀胱癌において尿中NMP22に影響する因子

カテゴリー	P *
性	0.5593
年齢	0.6907
腫瘍径	0.0095
腫瘍数	0.9786
浸潤度	0.3598
異型度	0.4066
尿中白血球	0.0527
尿中赤血球	0.9925
ヘモグロビン	0.6173

*: Generalized Linear Models Analysis

6.6 前立腺癌および腎癌における尿中NMP22

前立腺癌および腎癌の尿中NMP22値と陽性率を膀胱癌と比較した結果をTable 3に示す。前立腺癌および腎癌における尿中NMP22の中央値は4.4U/mlおよび6.2U/mlであり、陽性率は24.2%および31.3%であった。これらは膀胱癌に比べて、いずれも有意に低かった。

Table 3 前立腺癌および腎癌における尿中NMP22

	例数	中央値(95%信頼区間)	陽性率	P *
前立腺癌	33	4.4 (2.2 - 6.7)	24.2%(8/33)	<0.001
腎癌	32	6.2 (3.6 - 12.5)	31.3%(10/32)	0.004
膀胱癌	144	17.8 (13.1 - 29.0)	61.1%(88/144)	-

*: χ^2 検定

6.7 顕微鏡的血尿患者からの尿路上皮癌診断における尿中NMP22の有用性

各種疾患での尿中NMP22の陽性率

顕微鏡的血尿を有する患者における尿中NMP22の感受性と特異性についてプロスペクティブに検討した。顕微鏡的血尿患者183例から発見された尿路上皮癌は14例であった。膀胱癌8例、腎盂尿管癌5例、尿道癌1例であった。良性疾患は、前立腺肥大症21例、尿路結石16例、腎嚢胞8例、膀胱炎7例、膀胱瘤2例、遊走腎2例、他の泌尿器疾患9例であり、顕微鏡的血尿以外の基礎疾患が認められなかったNED (No Evidence of Disease) が104例と半数以上を占めた。Fig.9に示すように、尿中NMP22が陽性を示したのは、尿路上皮癌12例を含む48例であり、尿中NMP22の尿路上皮癌に対する感受性は85.7%(12/14)と高率であり、一方、良性疾患、NEDにおける尿中NMP22の特異性は、78.7%(133/169)であった。それぞれの中央値(95%信頼区間)は、尿路上皮癌26.5(18.5-228.2)U/ml、良性疾患4.9(3.6-8.3)U/ml、

NED5.9(4.8-6.5) U/ml であり、尿路上皮癌における尿中 NMP 22 値は良性疾患および NED に比べ有意に高値を示した。

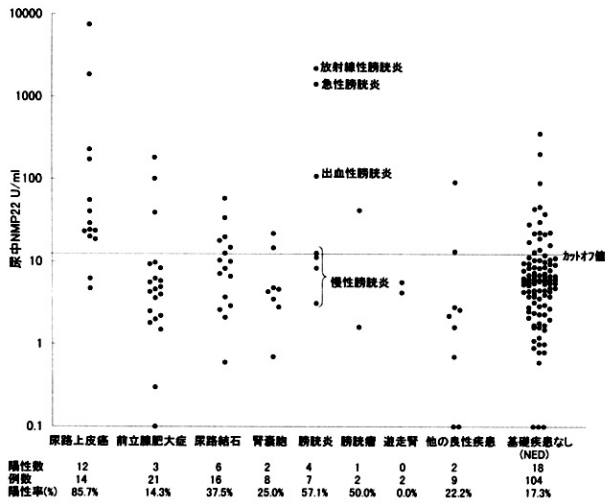


Fig.9 顕微鏡的血尿から発見された疾患と尿中NMP22の関係

膀胱炎の症例の中に尿中 NMP 22 が高値を示す例が認められた。特に尿中 NMP 22 が高値を示したのは放射線性膀胱炎と急性膀胱炎であり、慢性膀胱炎 4 例では低値であった。放射線性膀胱炎や急性膀胱炎が認められた場合には、治療後に尿中 NMP 22 を測定する必要があると考えられた。

顕微鏡的血尿患者での尿中 NMP 22 と尿細胞診の比較

顕微鏡的血尿患者において尿中 NMP 22 と尿細胞診とを比較検討した結果を Table 4 に示す。

Table 4 顕微鏡的血尿患者における尿中NMP22と尿細胞診の比較

	尿路上皮癌			良性疾患およびNED				
	陽性	陰性	Total	陽性	陰性	Total		
NMP22	陽性	7	5	12	陽性	0	36	36
	陰性	0	2	2	陰性	1	132	133
Total	7	7	14	1	168	169		

尿中 NMP 22 の尿路上皮癌に対する感受性は 85.7% (12/14) であり、尿細胞診の 50.0% (7/14) に比べ有意に高かった ($p=0.025$ McNemar test)。尿路上皮癌において、尿中 NMP 22 が陽性で尿細胞診陰性の症例は 5 例であったのに対し、尿細胞診のみが陽性であった症例は存在しなかった。また、尿中 NMP 22 値が陰性であった 135 例のうち尿路上皮癌は 2 例 (1.5%) であったのに対し、尿細胞診では 175 例中 7 例 (4.0%) であった。

6.8 膀胱癌の再発診断における尿中 NMP 22 の有用性 術前・術後の尿中 NMP 22 の変動

経尿道的腫瘍切除術(TUR)により膀胱癌が完全に切除され観察期間中に膀胱癌の再発が認められず、かつ尿中 NMP 22 が術前陽性であった 35 例について、術前・術後の尿中 NMP 22 値の動きを検討した。

35 例のうち 29 例 (82.9%) で尿中 NMP 22 値は治療前に比べ治療後低下した (Fig.10)。また、TUR 後 1 ヶ月以内の尿中 NMP 22 値が高値を示した例があるが、これは TUR による膀胱内の損傷による影響によるものとも考えられる。

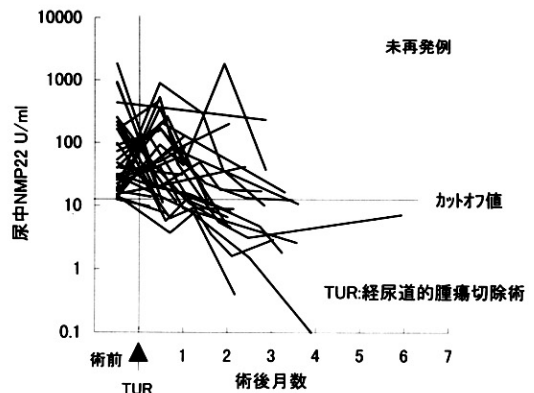


Fig.10 TUR後の尿中NMP22の変動 (n=35) NMP22値は術後に35例中29例 (82.9%)で低下した。

再発時の尿中 NMP 22 の動きの検討

膀胱癌の再発が病理学的に確定された 5 例について検討した。5 例のうち 3 例 (60.0%) で尿中 NMP 22 値は再発にともないカットオフ値以上を示した (Fig.11)。術前の尿中 NMP 22 値が陽性であった 3 例は、全て再発時にも陽性であった。一方、再発時に尿細胞診が陽性を示したのは 1 例のみであった。

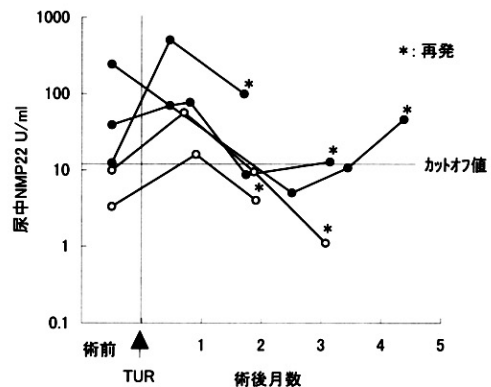


Fig.11 膀胱癌の再発による尿中NMP22値の推移

膀胱癌の再発が確認された 5 例のうち、再発に伴い尿中 NMP 22 値がカットオフ値以上を示したものは 3 例 (60.0%) であった。術前の尿中 NMP 22 値が陽性であった 3 例は再発に伴い全例カットオフ値以上を示した。

術前から再発に至った1症例の詳細

症例：男性 90歳 移行上皮癌、腫瘍径 10-30mm、腫瘍数 6個、浸潤度 T1、異型度 G2

本症例の術前の尿中 NMP 22 値は 242.9U/ml とカットオフ値以上を示した。経尿道的腫瘍切除術により腫瘍は完全切除された。再発予防を目的としマイトマイシン C とファルモルピシンによる膀胱内注入療法が、腫瘍切除後 17 日目から 7 コース施行された。腫瘍切除から 3 カ月後の膀胱鏡検査において腫瘍は確認されなかった。同時に尿中 NMP 22 値はカットオフ値以下に達した。その後、尿中 NMP 22 値は上昇を示し、術後 4 カ月目の膀胱鏡検査において腫瘍径 10mm 未満の小さな再発腫瘍が認められた。再発腫瘍が認められた同日の尿中 NMP 22 値は 45.9U/ml とカットオフ値以上を示した。

本症例において、尿中 NMP 22 値の動きは臨床経過とよく一致した。なお、尿中 NMP 22 は再発予防のため施行された膀胱内注入療法の影響を受けなかった。

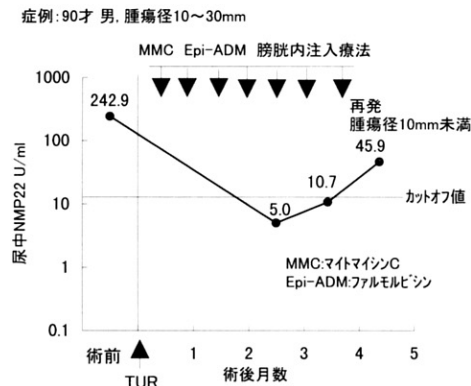


Fig.12 術前尿中NMP22値が陽性を示し再発した1症例

7 まとめ

従来、尿路上皮癌の診断には、尿細胞診および膀胱鏡検査が用いられている。しかしながら、膀胱鏡検査は侵襲性が大きく検査費用が高いことから頻繁に使用することは難しいとされている。また、尿細胞診は尿路上皮癌に対する感受性が低いために膀胱鏡検査を十分に補う検査法とはなっていない。それゆえ、膀胱鏡検査や尿細胞診を補う高感度で簡便な検査法の開発が求められてきた。

顕微鏡的血尿患者から見つかった 14 例の尿路上皮癌のうち、尿中 NMP 22 は 12 例 (85.7%) が陽性であったのに対して尿細胞診は 7 例 (50.0%) のみであったことから、尿中 NMP 22 は感受性の観点で尿細胞診を補い得る診断法と考えられる。また、尿中 NMP 22 が陰性であった場合は尿路上皮癌である可能性が 1.5% (2/135) と尿細胞診の 4.0% (7/175) に比べて低く、尿路上皮癌を見逃す確立が低い検査法であると考えられる。

膀胱癌の再発診断における有用性の検討では、治療前

の尿中 NMP 22 値が陽性で、かつ膀胱癌が再発した 3 例は、全て再発時にも陽性を示し、尿中 NMP 22 値の推移と治療効果および腫瘍の再発がよく一致した。一方、再発時に尿細胞診が陽性を示したのは、3 例中 1 例のみであった。腫瘍径が 10mm 未満の腫瘍における陽性率は、尿中 NMP 22 の 42.3% (22/52) に対し尿細胞診では 11.5% (6/52) であり、尿中 NMP 22 は尿細胞診に比べ微小癌での陽性率が高く、再発の発見に有用と考えられる。

尿中 NMP 22 は尿細胞診に比べ感受性が高く、また客観的な定量試験であることから、尿細胞診とは異なった観点で膀胱鏡検査を補助する有用な検査法であると考えられる。

謝辞：本研究は Table 5 に示す NMP 研究会により臨床評価が行われた。NMP 研究会の統括をはじめ多大の御指導をいただいた茨城県立医療大学・小磯謙吉学長（筑波大学名誉教授）、筑波大学臨床医学系泌尿器科・赤座英之教授、宮永直人講師、ならびに NMP 研究会に御参加いただいた先生方に感謝申し上げます。

Table 5 NMP研究会参加施設

医療機関名	診療科長名および担当医師名
札幌医科大学	塚本泰司、宮尾則臣
日立製作所日立総合病院	石川 悟
水戸済生会総合病院	野口良輔
茨城県立中央病院	大谷幹伸
茨城県立医療大学	小磯謙吉(代表世話人)
筑波大学	赤座英之、宮永直人
東京大学	河邊香月、亀山周二、久米春喜、有賀誠司、山崎哲
横浜市立大学	穂坂正彦、窪田吉信、野口純男、矢尾正祐
浜松医科大学	藤田公生、宇佐美隆利
名古屋第二赤十字病院	小幡浩司、小林弘明
奈良県立医科大学	岡島英五郎、平尾佳彦、影林頼明
大阪府立成人病センター	古武敏彦、黒田昌男
岡山大学	大森弘之、津島知靖、那須保友、宮地積幸、村上貴典
九州大学	熊澤浄一、内藤誠二、魚住二郎

●参考文献

- 1) M.S. Soloway, J.V. Briggman, G.A. Carpinito et al, J Urol 156,363 (1996)
- 2) K.K.Susan, V. B. Joseph, Gregory et al, Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression 6(2&3),189 (1996)
- 3) T.E. Miller, L.A. Beausang, L.F. Winchell, et al, Cancer Res 52,422 (1992)
- 4) 赤座英之、宮永直人、塚本泰司 ほか、癌と化学療法 24(7), 837 (1997)
- 5) 赤座英之、日本医師会雑誌,111,365 (1993)
- 6) 赤座英之、宮永直人、塚本泰司 ほか、癌と化学療法 24(7),829 (1997)
- 7) N. Miyanaga, H. Akaza, S. Ishikawa et al, Eur Urol 31, 163 (1997)