

尿中フィブロネクチンに関する研究

I. 基礎的検討と基準値の設定

川崎医科大学 泌尿器科

中塚 繁治, 田中 啓幹

SRL 特殊検査部

大野 安男

(昭和62年4月13日受理)

Clinical Evaluation of Urinary Fibronectin

I. Modification of Its Method and Reference Values

Shigeharu Nakatsuka and Hiroyoshi Tanaka

Department of Urology, Kawasaki Medical School

Yasuo Ohno

Immunochemical Research

Special Reference Laboratory Inc.

(Accepted on April 13, 1987)

近年、体液中のフィブロネクチン濃度の測定が種々の疾病の診断や病態を知る上で、臨床上重要な情報を与えてくれつつある。

われわれは、簡便でかつ迅速な fibronectin・EIA (FN・EIA) キットを用いて尿中フィブロネクチンを測定し、その基礎的検討ならびに健常人の基準値の設定を試みた。

本法は固相を用いたサンドウィッチ法による酵素免疫測定法 (EIA) で、再現性、希釈による直線性にすぐれ、添加回収も良好で 16~1000 ng/ml の広範囲で測定することができた。

検体の保存は -20°C としポリチューブを用いた。測定は室温で施行し、比較的安定した反応系が得られた。

日内変動も大きな差はなく、腎機能による影響もほとんど認められなかった。

健常人 155 名による尿中フィブロネクチン値は、加齢とともに上昇傾向が認められたが、年齢別の検討では 20 歳代が最も低値を示した。女性に比し男性の方がやや高値を示した。なお、cut off 値は 160 ng/ml であった。

今後各種疾患に対し、尿中フィブロネクチン濃度の測定を行って、その機能と病態との関連を解明し、臨床に大いに役立てられるものと考えられた。

In the present study, the urinary FN values in normal controls and in patients with various urological diseases were measured by the sandwich EIA method (MBL kit). A standard curve was found to be sensitive in the range of 16 ng/ml

to 1000 ng/ml. The respective rates of CV were below 10% in the dilution test and the reproducibility test. The mean rate obtained was 99.4% in the additive recovery test. No particular diurnal changes in the urinary FN values were detected and the spontaneous urine discharged in the morning was measured. More than 95% of 155 normal controls showed FN values of below 160 ng/ml and the cut off value was determined as 160 ng/ml. The value was slightly higher in males than in females. By age group, the lowest value was recorded in the 20s and the values tended to increase with advancing age. The correlation coefficient between FN values and creatinine values in the urine was $r=0.218$ and the effect of the renal function on the FN value was considered to be almost negligible. The urinary FN values in the patients were generally higher than in controls, but the clinical characteristics were difficult to be determined in this study.

Key Words ① Urinary fibronectin ② Enzyme immunoassay

緒 言

フィブロネクチン(FN)は線維芽細胞や平滑筋細胞などの間葉系細胞で作られ、血漿中、細胞表面、結合組織内などに存在する糖タンパクである。FNの機能について *in vitro* では種々の生物活性が報告されているが、臨床的にも各種病態におけるFNの変動に関する報告が増えており、特に悪性腫瘍とFNの関連が注目されてきている。しかしながら、血液中および他の体液中のFN濃度測定の結果は数多く散見されるが、尿中FNに関しては極めて少ない。これは、尿中FNの測定が他と比較して必ずしも容易でなかったことによる。最近、MBL(株)で開発されたFN・EIAキットを用いて尿中FNの測定が日常臨床検査レベルでも可能となった。今回、このキットを用いる機会を得たので、尿中FNの基礎的検討および健常者における測定結果について報告する。

方法および試料

A. 対象

測定対象は健康診断を行った者のうち、内科および臨床検査所見に異常を認めない0~85歳までの男女計155名(男性80名、女性75名)と当科入院患者70名である。

なお、尿は早朝2番尿の部分尿を用い、3000

rpm、10分間遠沈後の上清5mlにTrasyrol® 100 TIUを添加し、測定まで -20°C で凍結保存した。入院患者の検体は入院直後に採尿したものをを用いた。また日内変動測定は、約3時間ごとに採尿しその部分尿を用いて同様の操作と保存を行った。

B. 測定原理

本法は固相を用いたサンドウィッチ法による酵素免疫測定法(EIA)である。すなわち、検体と抗ヒトFN抗体を吸着したポリスチレンボールを反応後、ペルオキシダーゼ(HRP)標識抗ヒトFN(酵素標識抗体)を加え反応させる。未反応の酵素標識抗体を洗浄除去後、ボールに結合している酵素の活性を測定し、標準曲線から検体中の尿中FN濃度を読みとる。

C. 試薬

FN・EIAキット(MBL社)は、次の試薬からなっている。なお、1キットは110回測定用である。

- 1) ペルオキシダーゼ標識抗ヒトFN(9ml, 2本)
- 2) 抗ヒトFN結合ポリスチレンボール(110個入, 1本)
- 3) 標準ヒトFN(15~1000ng/ml) 1~7種(0.3ml, 各1本)
- 4) 酵素基質(O-phenylenediamine) 7錠, 1本

- 5) 酵素基質溶解液 60 ml, 1本
- 6) 反応停止液 (2N H₂SO₄) 60 ml, 1本
- 7) 反应用緩衝液 60ml, 1本
- 8) PBS 粉末 9.1 g, 1袋

Table 1. Reproducibility of standard curve.

level (ng/ml)	16	32	62	125	250	500	1000
A ₄₉₀ ·Mean	0.163	0.272	0.524	0.832	1.178	1.247	1.389
±SD	0.010	0.018	0.052	0.070	0.090	0.099	0.105
CV (%)	6.1	6.6	9.9	8.4	7.6	7.9	7.6

D. 測定法

測定前に試薬は室温にもどし、操作はすべて室温で行う。

- 1) 緩衝液を試験管に0.3ml ずつ分注する。
- 2) これに検体または FN 標準液 50 μl 加え攪拌する。
- 3) 抗体結合ボールを各試験管に1個ずつ入れる。
- 4) 室温で静置し1時間反応させる。
- 5) 反応終了後、アスピレーターで吸収除去する。さらに余分な反応液を除去するため、1ml の PBS で3回洗浄する。
- 6) 酵素標識抗体を0.3ml ずつ各試験管に加えて攪拌する。
- 7) 室温で静置し1時間反応させる。
- 8) 反応終了後、アスピレーターで吸引除去し、よく洗浄する。
- 9) 別の試験管に酵素基質溶液0.5ml ずつ分注する。洗浄したボールを各試験管に移す。
- 10) 室温暗所で30分間静置する。
- 11) 停止液を2.0ml ずつ各試験管に添加する。
- 12) 分光光度計で490nm における吸光度を測定する。
- 13) FN 標準液で作成した標準曲線から検体中の FN 濃度を求める。

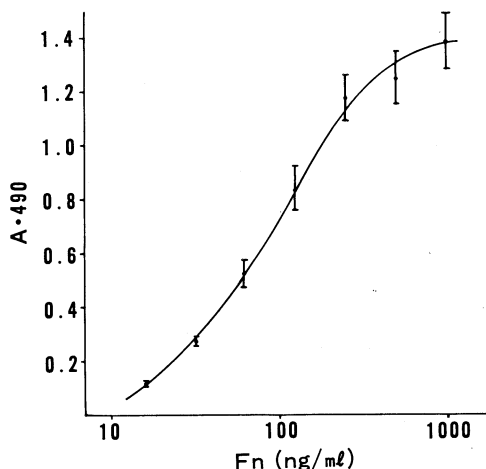


Fig. 1. Standard curve of urinary-Fn EIA kit.

Table 2. Within run assay of urinary-Fn EIA kit.

	control A	control B	control C
1	20	152	690
2	25	125	635
3	17	130	640
4	16	130	625
5	22	141	692
6	21	129	680
7	18	133	615
8	20	148	655
\bar{X} (ng/ml)	19.9	136	654
SD (ng/ml)	2.9	9.8	30.1
CV (%)	14.5	7.2	4.6

結 果

A. 標準曲線

本法における7濃度 (16, 32, 65, 125, 250, 500, 1000 ng/ml) の標準液による標準曲線の安定性をみるために、同一トレイにおいて各々の標準液の10回同時測定を行った。変動係数 (CV) は10%以下で、16~1000 ng/ml の範囲

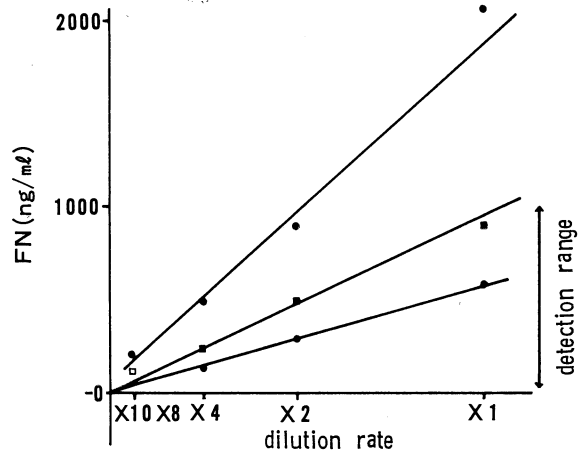
で良好な標準曲線が得られた (Table 1, Fig. 1)。

B. 再現性

3種類の検体について同時および日差再現性について検討した。同時および日差再現性は、検出感度限界値を除けば CV は10%以

Table 3. Between run assay of urinary-Fn EIA kit.

	control A	control B	control C
1	18	148	630
2	21	150	659
3	22	147	654
4	23	130	681
5	15	139	640
6	12	140	652
7			639
8			643
\bar{X} (ng/ml)	18.5	144.0	649.8
SD(ng/ml)	4.3	7.7	15.7
CV (%)	23.2	5.3	2.4

**Fig. 2.** Dilution assay of urinary-Fn EIA kit.

下であり、良好な結果であった (Tables 2, 3). なお、日差再現性試験は2日おきに施行した。

C. 希釈試験

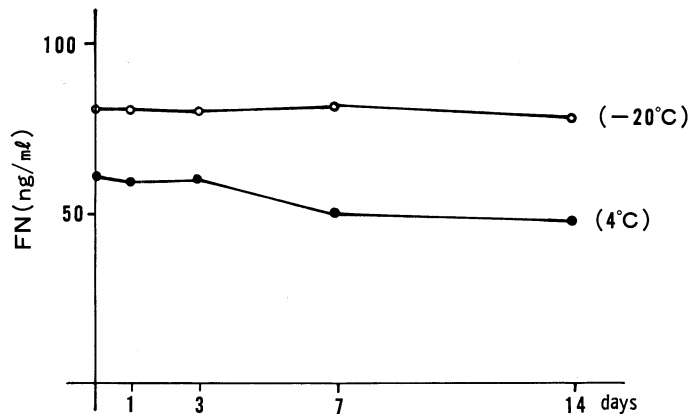
3種類の尿検体をキット反応緩衝液にて順次希釈した時、希釈度に伴い原点を通る直線が得られ、希釈倍数と測定値の関係は3検尿とも良好な直線性が認められた (Fig. 2).

D. 添加回収試験

2種類の尿検体に標準物質を添加し、その添加回収率を求めた。回収率は95.4~102.2%であり、平均回収率は99.4%と良好な値を示した (Table 4).

E. 検体保存条件

2種類の尿検体を、4°Cと-20°Cで2週間保存し、日数ごとにFNを測定した検体の保存はポリチューブを用いた。-20°C保存では

**Fig. 3.** Consideration of urinary-Fn levels according to sample condition.

2週間まで安定した値であったが、4°C保存では3日目から徐々に減少が認められ、2週間後では79%となった。そこで以後の検体保存は-20°Cとした (Fig. 3).

F. 日内変動の検討

成人健常人6名の部分尿を採取し日内変動を

Table 4. Additive recovery assay of urinary-Fn EIA kit.

	urinary-Fn level (ng/ml)	additive volume (ng/ml)	ideal level (ng/ml)	practical level (ng/ml)	recovery rate (%)
control A	55	100	155	148	95.4
	55	250	305	312	102.2
control B	138	250	388	380	97.9
	138	500	638	650	101.9

(mean=99.4%)

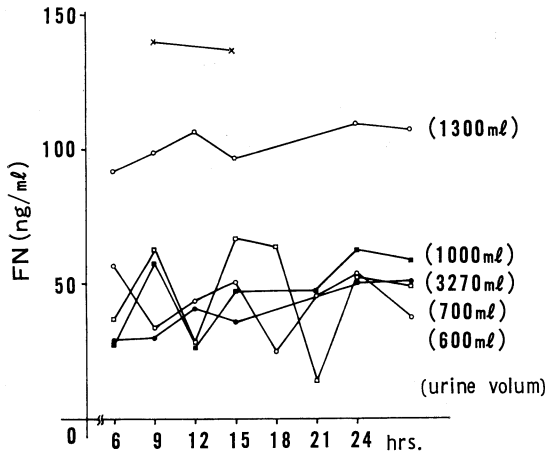


Fig. 4. Diurnal changes of urinary-Fn levels.

検討した (Fig. 4). 早朝尿でも日中尿においても大きな差はなく、これらの結果から尿中FNの日内変動は小さいと考えられた。

G. 尿中FNと尿中クレアチン濃度との関係
 健康人における尿中FN濃度と尿クレアチン濃度との相関係数は $r=0.218$ で、両者の相関は低かった (Fig. 5). これより腎機能の尿中FN濃度への影響はほとんどないと考えられた。

H. 基準値の設定

健康診断を行って、内科的および臨床検査で異常を認めなかった0~85歳代における155名の尿中FN濃度を測定した (Fig. 6). cut off 値は160 ng/mlであった。年齢別では20歳代が最も低値となるが、以後は加齢とともに増加傾向が認められた。男女間では、男性の方がやや高値を示した。

I. 各種泌尿器疾患群における尿中FN濃度

当科入院患者70名の尿中FN濃度を測定し、各種疾患群ごとに示した (Fig. 7). 点滴や造影剤などの影響を除外するため、検体は入院直後の部分尿を用いた。

各種疾患群ごとの平均値を比較

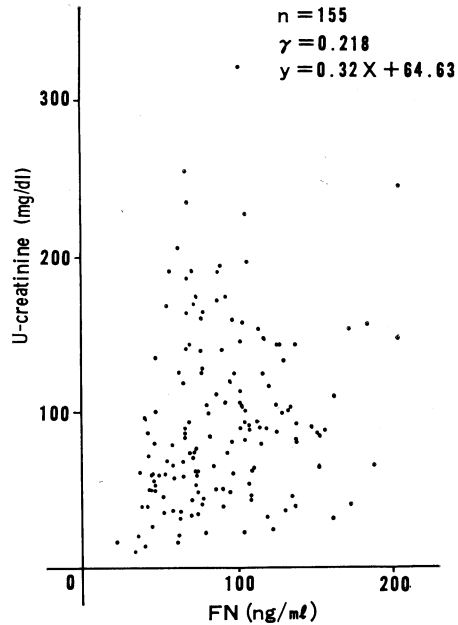


Fig. 5. Correlation between urinary-creatinine and urinary-Fn are drawn from 155 normal subjects.

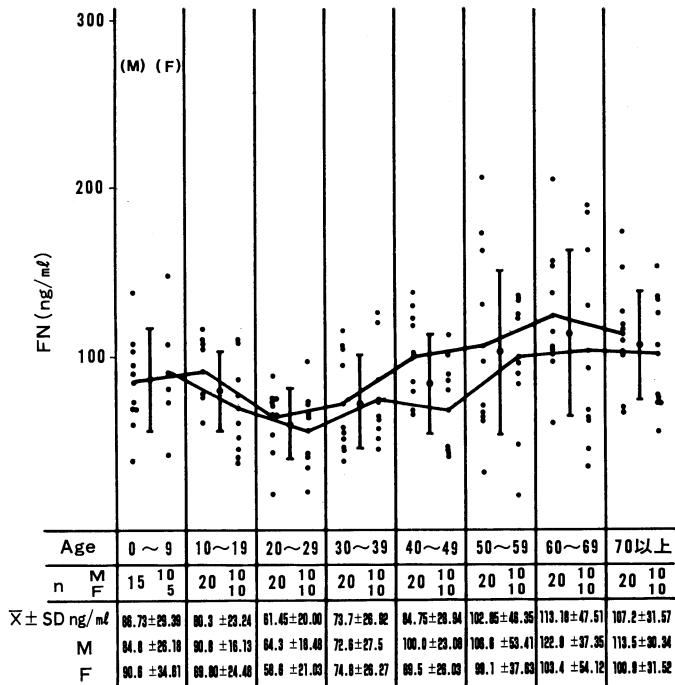


Fig. 6. Urinary-Fn levels in 155 normal subjects, distribution according to age.

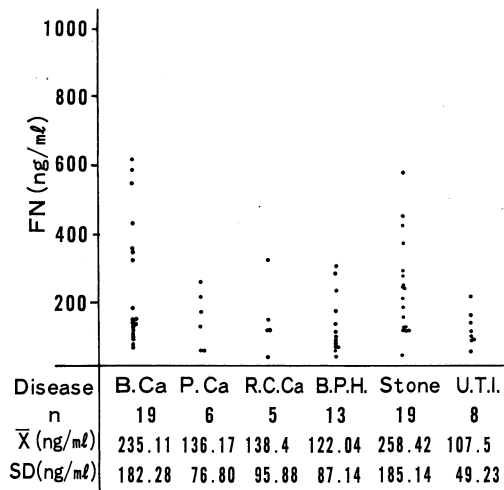


Fig. 7. Urinary-Fn levels in patients with some urological diseases.

すると、膀胱腫瘍群 (B. Ca) 235.11 ± 182.28 ng/ml・前立腺癌群 (P. Ca) 136.17 ± 76.80 ng/ml・腎細胞癌群 (R. C. Ca) 138.4 ± 95.88 ng/ml・前立腺肥大症群 (B. P. H.) 122.04 ± 87.14 ng/ml・尿路結石群 (Stone) 258.42 ± 185.14 ng/ml・尿路感染症群 (U. T. I.) 107.5 ± 49.23 ng/mlであり、B. Ca と Stone は、健常人群に比べて両者とも 1%水準で有意に高値を示していた。なお、統計処理は t 検定による。

考 察

FN は、種々の組織や体液中に広く分布する多機能糖タンパクであり、細胞の接着因子として、細胞の移動、分化、増殖、癌化といった多彩な生物現象に関与している。しかし、FN の生物活性が多岐にわたるため、生体内においてはまだ不明のことが少なくない。

血液や種々の体液あるいは組織中の FN 濃度を測定して、診断や病態の把握に役立てようとする試みは多くなされている。^{1)~4)} たとえば、血管内凝固症候群 (DIC),⁵⁾ 肝疾患,⁶⁾ 手術後などには、血漿中 FN のレベルは有意に低下し、糖尿病患者では増加が認められる。^{7), 8)} また、びまん性間質性肺疾患における肺胞洗浄液中 FN 濃度の上昇⁹⁾ や慢性関節リウマチでは関節

液中 FN の上昇^{10), 11)} が認められ、飢餓状態により血漿 FN が低下することも明らかとされている。¹²⁾ しかしながら尿中 FN に関する報告はまだ少ない。^{13), 14)} これには血漿 FN が通常健常人には約 $300 \mu\text{g/ml}$ の濃度^{15), 16)} で存在するのに比べ、尿中 FN は約 50 ng/ml の濃度^{13), 14)} で存在するため現行の免疫比濁法では感度が悪く測定が難しい点、また、アフィニティクロマトグラフィーを使用した場合は測定までに長時間を要し、検体数がある程度まとまっていないと不経済である点などが挙げられる。この点、本実験で使用した FN・EIA キットでは操作も簡便で日常臨床検査レベルで測定でき、標準曲線も $16 \sim 1000 \text{ ng/ml}$ までほぼ満足すべき結果であった。

再現性試験では、同時および日差再現性ともに CV は約 10% 以下であったが、検出感度限界値では 14~23% と微量時の測定には問題が残っている。FN はコラーゲンプロテオグリカンなどの糖タンパクやフィブリンなどとの結合、蛋白分解酵素による分解などにより濃度の低下がみられるといわれているため、今後は FN の代謝機構を詳細に把握した上での検討が必要と思われた。Webb ら¹³⁾ は尿 FN の分解予防のためにアプロチニン (Trasyrol®) を尿に添加しているが、本実験でもこれを取り入れた。

保存条件は Akiyama ら¹⁷⁾ の報告によると FN の生物活性は温度によって影響を受けないとしている。一方、Bowen ら¹⁸⁾ は FN の安定な保存には -20°C でプラスチックチューブに入れておくのが最もよいと報告している。われわれの実験でも Bowen ら¹⁸⁾ と同様の結果を得た。また、フィブリノーゲン量が測定結果に大きな影響を及ぼす可能性が考えられるが、松田ら¹⁹⁾ は臨床上遭遇する程度のフィブリノーゲンの増加では FN 測定値にはほとんど影響を与えないと報告している。

腎機能の尿中 FN 濃度への影響をみるため尿中クレアチニンと尿中 FN 濃度を同じ検体で測定した。その結果両者間に相関関係は認められ

なかった。Eriksenら¹⁴⁾は腎移植後の血漿FNと尿中FNの測定を行っているが、尿中FN値の上昇は腎機能そのものよりも急性拒絶期の組織の修復と再生に伴うものであると考察している。健常人のFN濃度、すなわち基準値は加齢とともに若干上昇しており、女性に比し男性はやや高値の傾向を示していた。これは血漿FN濃度とほぼ同様の結果であったが、^{20), 21)} 20歳代が最も低値であった点については今後検討を要すると思われた。生体はFNの生物活性を維持するため、加齢による活性力の低下を量によって補っているという報告もある。^{21), 22)} また、網内系機能による影響が強く、新生児では網内系機能が未熟なため血漿FN値が低下しているという考え方もある。²³⁾

FN濃度のcut off値を160ng/mlとし、各種疾患群を検討してみると、膀胱腫瘍群 9/19 症例・前立腺癌群 2/6 症例・腎細胞癌群 1/5 症例・前立腺肥大症群 4/13 症例・尿路結石群 11/19 症例・尿路感染症群 1/8 症例の割合でcut off値を越えていた。polyclonalの抗体を

用いており著しい血尿患者では尿路上皮より尿中へ移行した血漿FNをも含むためと考えられた。現在、細胞性FNと血漿性FNの相異がmonoclonal抗体を用いた反応性の違いによってのみみつかっている²⁴⁾が、現行の免疫学的測定法では交叉反応が認められ、分離測定するにはいたっていない。このため尿中FNが、細胞性FNあるいは血漿性FNのいずれのものなのか、どちらのものの分離産物であるのかは不明である。

尿中FNの測定は、生体の生物活性の異常を知る上で、特に悪性腫瘍、肝疾患などの病態を知る上で臨床上重要な情報を与えてくれるので、今後各種疾患におけるFNの測定により生理的機能も解明され、病態との関係も検討され、臨床に役立てられる日も近いと考える。

稿を終えるにあたり、本研究に協力をいただいた臨床検査部各位に感謝いたします。なお、本論文の要旨は第24回日本癌治療学会総会にて発表した。

文 献

- 1) Chen, L. B., Burrige, K., Murray, A., Wash, M. L., Copple, C. D., Bushnell, A., McDougall, T. K. and Gallimore, P. H.: Modulation of cell surface glycolyx. Studies on large, external, transformation-sensitive protein. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 312: 366—381, 1978
- 2) Anderson, B., Rucker, M., Entwistle, R., Schmid, F. R. and Wood, G. W.: Plasma fibronectin is a component of cryoglobulins from patients with connective tissue and other diseases. *Ann. rheum. Dis.* 40: 50—54, 1981
- 3) Scott, D. L., Morris, C. J., Blake, A. E., Low-Beer, T. S. and Walton, K. W.: Distribution of fibronectin in the rectal mucosa. *J. clin. Pathol.* 34: 749—758, 1981
- 4) Choate, J. F. and Mosher, D. F.: Fibronectin concentration in plasma of patients with breast cancer, colon cancer and acute leukemia. *Cancer* 51: 1142—1147, 1983
- 5) Matsuda, M., Yashida, N., Aoki, N. and Wakabayashi, N.: Distribution of cold-insoluble globulin in plasma and tissues. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 312: 74—92, 1978
- 6) Matsuda, M., Yamanaka, T. and Matsuda, A.: Distribution of fibronectin in plasma and liver in liver diseases. *Clin. Chim. Acta* 118: 191—199, 1982
- 7) Davis, T. M. E.: Plasma fibronectin concentrations in diabetes and the effect of short-term, improved glucose control. *Diabetologia* 21: 262—267, 1981
- 8) 松田文子, 葛谷 健, 松田道生: 糖尿病患者における血漿フィブロネクチンの増加. *医のあゆみ* 121: 31—32, 1983

- 9) Rennard, S. I. and Crystal, R. G.: Fibronectin in human bronchopulmonary lavage fluid. Elevation in patients with interstitial lung disease. *J. clin. Invest.* 69: 113—122, 1981
- 10) Carson, S., Mosseson, M. W. and Diamond, H. S.: Detection and quantitation of fibronectin in synovial fluid from patients with rheumatic disease. *Arthritis Rheum.* 24: 1261—1267, 1981
- 11) Carnemolla, B., Cutolo, M., Castellani, P., Balza, E., Raffanti, S. and Zardi, L.: Characterization of synovial fluid fibronectin from patients with rheumatic inflammatory disease and healthy subjects. *Arthritis Rheum.* 27: 913—921, 1984
- 12) Mckone, T. K., Davis, A. T. and Dean, R. E.: Fibronectin. A new nutritional parameter. *Am. Surg.* 51: 336—339, 1985
- 13) Webb, K. S. and Lin, G. H.: Urinary fibronectin. Potential as a biomaker in prostatic cancer. *Invest. Urol.* 17: 401—407, 1980
- 14) Eriksen, H. O., Skjoldby, O., Kjersen, H., Selmer, J., Tranebjaerg, L. and Clemmensen, I.: Plasma and urine fibronectin concentration in kidney-transplanted patients. *Scand. J. clin. Lab. Invest.* 44: 135—142, 1984
- 15) Yamada, K. M. and Olden, K.: Fibronectins—adhesive glycoproteins of cell surface and blood. *Nature* 275: 179—184, 1978
- 16) Mosessen, M. W. and Amrani, D. L.: The structure and biologic activities of plasma fibronectin. *Blood* 56: 145—158, 1980
- 17) Akiyama, S. K. and Yamada, K. M.: The interaction of plasma fibronectin with fibroblastic cell in suspension. *J. biol. Chem.* 260: 4492—4500, 1985
- 18) Bowen, M. and Muller, T.: Influence of sample preparation on estimates of blood fibronectin concentration. *J. clin. Pathol.* 36: 233—235, 1983
- 19) 松田道生: フィブロネクチンおよびその関連物質と組織修復. *結合組織* 13: 177—184, 1982
- 20) Eriksen, H. O., Clemmensen, I., Hansen, M. S. and Ibsen, K. K.: Plasma fibronectin concentration in normal subjects. *Scand. J. clin. Lab. Invest.* 42: 291—295, 1982
- 21) Labat-Robert, J., Potazman, J. P., Derouette, J. C. and Robert, L.: Age-dependent increase of human plasma fibronectin. *Cell Biol. int. Rep.* 5: 969—973, 1981
- 22) Chandrasekhar, S. and Millis, A. J. T.: Fibronectin from aged fibroblasts is defective in promoting cellular adhesion. *J. cell. Physiol.* 103: 47—54, 1980
- 23) Gerdes, J. S., Douglas, S. D., Kolski, G. B., Yoder, M. C. and Polin, R. A.: Decreased fibronectin biosyntheses by human cord blood mononuclear phagocytes in vitro. *J. Leukocyte Biol.* 35: 91—99, 1984
- 24) 林 正男, 平野英保: フィブロネクチンの構造と機能・ドメイン構造・遺伝子構造を中心に. 蛋, 核, 酵 23: 169—181, 1983