

腎細胞癌における Basic Fibroblast Growth Factor の 腫瘍マーカーとしての有用性の研究

奈良県立医科大学泌尿器科学教室

山口 尚子, 藤本 清秀, 大園 誠一郎,
平尾 佳彦, 岡島 英五郎

武田薬品工業㈱創薬研究本部

分子薬理研究室

市 森 有 三

POTENTIAL USEFULNESS OF BASIC FIBROBLAST GROWTH FACTOR AS A TUMOR MARKER FOR RENAL CELL CARCINOMA

HISAKO YAMAGUCHI, KIYOHIDE FUJIMOTO, SEICHIRO OZONO,
YOSHIHIKO HIRAO and EIGORO OKAJIMA

Department of Urology, Nara Medical University

YUZO ICHIMORI

Pharmaceutical Research Division, Takeda Chemical Industries Ltd.

Received September 29, 1995

Abstract: Serum levels of basic fibroblast growth factor (FGF) by enzyme immunoassay in patients with various urogenital tumors were examined in the present investigation. The incidence of renal cell carcinoma with increased serum levels of basic FGF (28 of 52, 53.8%) was significantly higher than those of any other urogenital tumors such as bladder cancer (6 of 26, 23.1%), testicular tumor (0 of 12, 0%) and prostatic cancer (2 of 7, 28.6%). Increased serum basic FGF was detected more frequently in patients with advanced renal cell carcinoma, stage pT 3, grade G 2. Analysis of histopathological pattern indicated that renal cell carcinoma with a solid or tubular component had a higher tendency of increased serum basic FGF. However, no significant difference was seen in the incidence of patients with increased serum basic FGF between clear cell subtype group (18 of 36, 50.0%) and granular cell subtype group (4 of 6, 66.7%). Thus, increase of serum basic FGF does not appear to depend on the cell type. Serum basic FGF may be produced and secreted from tumor tissue with pathologically high grade malignancy. Forty-five resected renal cell carcinomas were divided into two groups based on the maximum diameter of the primary tumor: ≥ 5 cm and < 5 cm; there was not a significant difference between these two groups. Five of 8 patients with renal cell carcinoma who underwent selective renal venous sampling before operation showed increased serum basic FGF in the renal vein from the affected kidney. After resection of the affected kidney, serum basic FGF disappeared within 2 weeks. However, residual huge tumor or postoperative disease prolonged the increased levels of serum basic FGF in 2 patients, indicating that serum basic FGF is

produced from and secreted by tumor tissue itself. These findings may suggest that serum basic FGF can be a useful tumor marker in patients with renal cell carcinoma.

Index Terms

basic fibroblast growth factor, enzyme immunoassay, renal cell carcinoma, tumor marker, urogenital cancer

緒 言

塩基性線維芽細胞増殖因子(basic fibroblast growth factor : bFGF)^{1,2)}は、現在もっとも強力でかつ内皮細胞に直接作用する血管新生因子として広く知られており、アミノ酸配列の homology が高くて生物学的活性の類似した acidic FGF(以下 aFGF)^{3,4)}, *int-2*⁵⁾, *hst-1*^{6,7)}, FGF-5, *hst-2* および KGF⁸⁾ などとともに HBGF (Heparin-binding growth factor) と呼ばれる増殖因子群を構成している¹⁰⁻¹²⁾。この bFGF に代表される HBGF 群の重要な役割の 1 つに angiogenesis あるいは mesoderm cell mitogenesis があり、これらの増殖因子は正常細胞のみならず悪性腫瘍においても産生されることが知られるようになり、悪性腫瘍の発育や進展に FGF などの血管新生因子が関与していると考えられている¹³⁻¹⁵⁾(Fig.1)。

bFGF は、脳下垂体ならびに脳などの神経系組織あるいは腎、副腎、胎盤、黄体、骨マトリックス、軟骨、腫瘍細胞、マクロファージ、内皮細胞および線維芽細胞などの幅広い組織、細胞から得られている^{16,17)}。

悪性腫瘍に関する研究をみると、山中ら¹⁸⁾は Northern blot analysis を用いて、aFGF と bFGF が隣癌症例で高率に検出されたと報告している。また、bFGF は乳癌症例の予後の評価に有用であるとの報告も見られる¹⁹⁾。しかしながら泌尿器科腫瘍における bFGF の研究はほとんどなく、わずかに Fujimoto ら²⁰⁾が腎細胞癌症例において、血清中 bFGF が比較的高率に検出されることを報告しているにすぎない。

一方、わが国における腎細胞癌の死亡率は、1955 年では人口 10 万人あたり 0.3 であったのが、1975 年では 1.1、1993 年では 2.0 と報告されており、最近の 20 年間でも約 2 倍近く増加している。また、最近の画像診断の進歩により 1980 年代に入ってから偶然発見される腎細胞癌の増加とともに腎細胞癌の発生頻度は増加してきている^{21,22)}。腎細胞癌症例に占める偶然発見腎細胞癌の症例数を、奈良県立医科大学泌尿器科および関連病院の症例についてみると、1980 年から 1986 年までは約 10% 程度であったが、その後 1987 年では 31%、1988 年では 38%

%, 1989 年では 51%、1990 年では 56% と増加している²³⁾。この偶然発見される腎細胞癌には早期癌が多いが、なかには無症状で偶然発見されたときには、すでに進行癌であるものも認められる。また、腎細胞癌は診断時すでに遠隔転移を有する進行癌症例が 23~27% にみられるとの報告もあり^{24,25)}、進行の速いタイプと遅いタイプのあることが知られている²⁶⁾。一般に腎細胞癌は画像診断的にも病理組織学的にも腫瘍血管の豊富な腫瘍であり、その進展も血行性播種による転移形成の頻度もっとも高い²³⁾。一方、腎細胞癌に対する治療としては、放射線療法や種々の化学療法、免疫療法などが試みられてきたが、いずれもその近接効果ならびに長期予後に関する治療成績は悪く、手術療法以外に有効な治療法の確立されていないのが現状である。したがって、治療成績の向上のためには早期発見が重要であることは言うまでもなく、超音波断層診断法などの画像診断法によるスクリーニングとともに、腫瘍マーカーによる診断法も重要である。さらに腫瘍マーカーは術後のモニターとしても画像診断とともに不可欠のものである。

本研究では、bFGF の血清内濃度の上昇が腎細胞癌のような血管増殖性の高い腫瘍に特異的なものか否かを検討するために、種々の泌尿器科腫瘍症例について、two-site sandwich enzyme immunoassay を用いて測定した。また、腎細胞癌症例について、分腎静脈血による bFGF の局在や、腫瘍摘除前後での血清内 bFGF の経時的変化についても併せて検討した。

材料と方法

抗体：本実験では、bFGF に対する 3 種類のモノクローナル抗体(MAb 52, MAb 98, MAb 3 H 3)を使用した^{27,28)}。MAb 52 は subclass IgG 2 b, MAb 98 は sub-

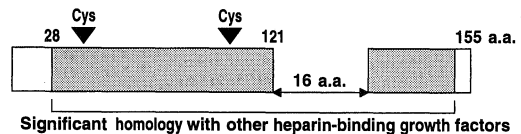


Fig. 1. Characteristics of basic fibroblast growth factor.

class IgG1で、認識する抗原 epitope は両者ともアミノ酸残基 14-40 の範囲であるが、各々違った部位を認識する。この2種類を microtiter plate の coating 用の固相化抗体とし、MAb 3 H 3(subclass IgG 1)を Fab' fragment を horseradish peroxidase で標識した標識抗体として two-site sandwich enzyme immunoassay(検出感度: 30 pg / ml)にて測定した^{29,30}。測定は96穴 microtiter plate 用光度計(EAR 340 AT, SLT-Labinsruments, Austria)にて 492 nm で行った。これらの抗体は、aFGF や *hst-1* 遺伝子産物と cross-reaction を起こさないものであり、(株)武田薬品工業(大阪)より恵与されたものである。

血清と尿: 腎細胞癌症例 52 例, 腎盂尿管癌症例 4 例, 膀胱癌症例 26 例, 精巣腫瘍症例 12 例, 前立腺癌症例 7 例を対象として、朝食前に採血した。尿は腎細胞癌症例 18 例, 腎盂尿管癌症例 1 例, 膀胱癌症例 7 例, 前立腺癌症例 4 例の早朝尿を用いた。

また、腎細胞癌症例中、術前に血管造影を施行した 8 例を対象に分腎静脈血、すなわち両側の腎静脈および下大静脈の腎静脈分岐部の上下から採血した。さらに、腎摘除術施行症例より、7 例を対象として、術後に経時的に採血した。なお、対象症例の選択にあたっては、化学療法や放射線療法などの既治療歴のない新鮮症例のみを抽出し、これらの対象症例からは、すべてあらかじめ

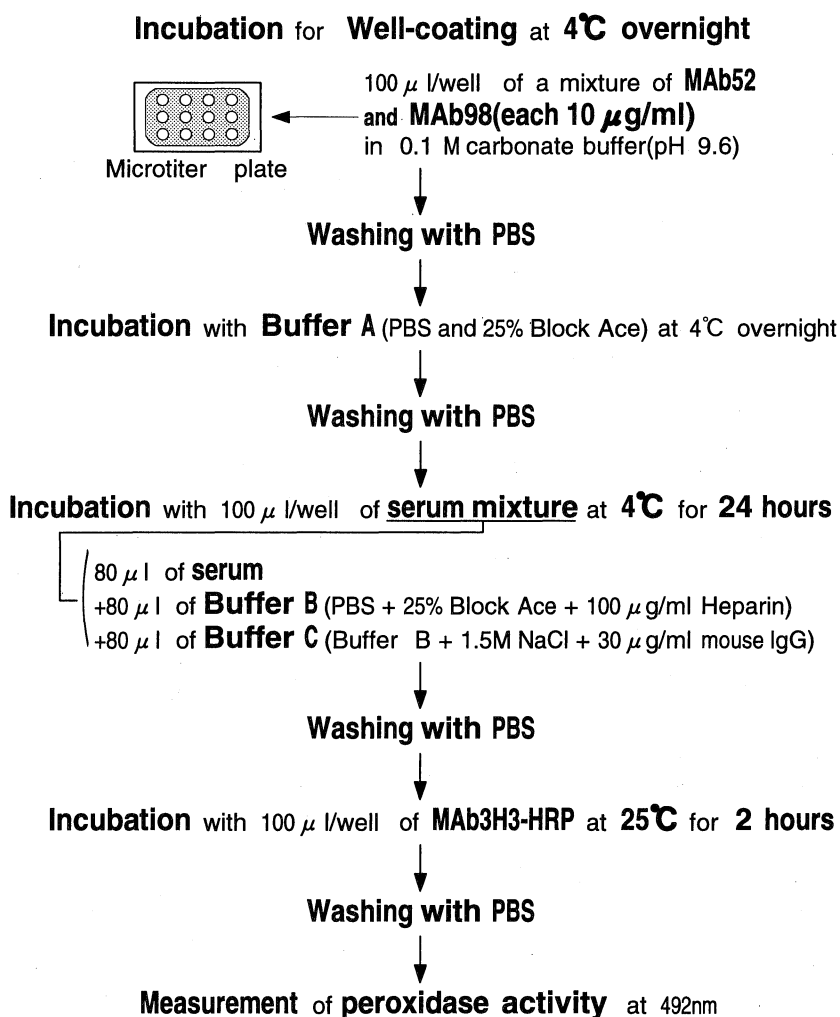


Fig. 2. Enzyme immunoassay for serum basic fibroblast growth factor.

informed consentを得た上で採血あるいは採尿を実施した。

血液は、1,100 gで10分間遠心して血清成分を、尿は、650 gで10分間遠心して上澄成分を、各々 assay までの間 -80°C で保存した。Two-site enzyme immunoassay: 血清 bFGF は two-site sandwich enzyme immunoassay (EIA) で測定した (Fig. 2)。すなわち、MAb52 と MAb98 の 2 つの固相化抗体の混合物を 0.1 M 炭酸緩衝液 (pH 9.6) で $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$ に調整し、96 穴の microtiter plate を用いて 1 穴あたり $100\ \mu\text{l}$ の混合物を 4°C で一晩 incubation した。その後、microtiter plate は 0.02 M リン酸緩衝液 (pH 7.2, 0.15 M NaCl 含有: PBS) で数回洗浄し、 $300\ \mu\text{l}$ の Buffer A (25% Block Ace 含有 PBS, 雪印乳業, 札幌) を各穴に加え、 4°C で一晩 incubation した。それを PBS で洗浄し、serum を同量の Buffer B ($100\ \mu\text{g}/\text{ml}$ ヘパリン含有 Buffer A) と同量の Buffer C (1.5 M NaCl, $30\ \mu\text{g}/\text{ml}$ マウス IgG 含有 Buffer B) で 3 倍に希釈した serum mixture を各穴に $100\ \mu\text{l}$ 加え、 4°C で 24 時間 incubation した。その後、microtiter plate を PBS で数回洗浄し、horseradish peroxidase (HRP) でラベルした $100\ \mu\text{l}$ の MAb 3H3 を $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$ のマウス IgG を含む Buffer A で 200 倍希釈して加え、 25°C で 2 時間 incubation した。Peroxidase 活性は O-phenylenediamine を基質として測定した。この assay 系において血清や尿の bFGF の検出感度は $30\ \text{pg}/\text{ml}$ であり、検出された症例はすべて positive 症例とした。

腎細胞癌 45 例について、切除標本を用いて腫瘍の最大径を測定した。腎細胞癌症例の腫瘍の stage, venous invasion, grade, 組織学的細胞型, 組織学的構築型は腎癌取り扱い規約³¹⁾および TNM 分類³²⁾に準じて診断した。

なお、有意差の検定は χ^2 検定ならびに Wilcoxon 検定で行った。

結 果

(1) 泌尿器科腫瘍の血清中および尿中 bFGF

種々の泌尿器科腫瘍の血清中の bFGF 検出頻度および測定値は、腎細胞癌 52 例中 28 例 (53.8%) ($30\text{--}540$, $155.0 \pm 146.6\ \text{pg}/\text{ml}$), 腎盂尿管癌 4 例中 2 例 (50.0%) (152 , 298 , $225.0 \pm 103.2\ \text{pg}/\text{ml}$), 膀胱癌 26 例中 6 例 (23.1%) ($36\text{--}215$, $95.3 \pm 73.4\ \text{pg}/\text{ml}$), 前立腺癌 7 例中 2 例 (28.6%) (30 , 170 , $100.0 \pm 99.0\ \text{pg}/\text{ml}$) であったが、精巣腫瘍 12 例中では検出されなかった (Table. 1)。したがって、腎細胞癌症例群の血清中 bFGF の検出頻度は膀胱癌や精巣腫瘍症例群に比較して有意に高い結果であった ($p < 0.025$, $p < 0.001$)。

尿中の bFGF は膀胱癌 7 例中 1 例 (14.3%) ($42.0\ \text{pg}/\text{ml}$) に検出されたのみで、腎細胞癌 18 例、腎盂尿管癌 1 例、前立腺癌 4 例中では検出されなかった。

(2) 腎細胞癌症例の血清中 bFGF と各種検出項目との関係

1) 腎細胞癌症例の stage, grade と血清中 bFGF の相関
腎細胞癌症例において血清中 bFGF と病理組織学的各パラメータとの相関関係をみた。Stage では、pT1 の 2 例中 1 例 (50.0%) ($32.0\ \text{pg}/\text{ml}$), pT2 では 27 例中 10 例 (37.0%) ($30\text{--}353$, $98.7 \pm 103.9\ \text{pg}/\text{ml}$), 一方、pT3 では 20 例中 15 例 (75.0%) ($36\text{--}540$, $160.9 \pm 134.6\ \text{pg}/\text{ml}$), pT4 では 3 例中 2 例 (66.7%) (417 , 492 , $454.5 \pm 53.0\ \text{pg}/\text{ml}$) で検出された (Table 2)。検出頻度において各群間に差はみられなかったが、血清中 bFGF の測定値において、pT4 群が pT1+pT2 群に比較して有意に高値を示した ($p < 0.0001$)。また、pT1+pT2 群と pT3 群間では pT3 群が高い傾向があり ($p < 0.1$), pT3 群と pT4 群間では pT4 群が有意に高い結果であった ($p < 0.05$)。

静脈浸潤 (V 因子) についてみると、静脈浸潤のない pV 0 症候群では、31 例中 10 例 (32.3%) ($30\text{--}353$, 104.6

Table 1. Serum and urine basic FGF detected by enzyme immunoassay in human urogenital tumors

Tumor	Serum		Urine	
	No. of positive patients/No. of total patients (%)	Mean basic FGF level of positive patients (pg/ml)	No. of positive patients/No. of total patients (%)	Mean basic FGF level of positive patients (pg/ml)
Renal cell carcinoma	28/52 (53.8)	155.0 ± 146.6	0/18	
Renal pelvic and/or ureteral cancer	2/4 (50.0)	225.0 ± 103.2	0/1	
Bladder cancer	6/26 (23.1) ^a	95.3 ± 73.4	1/7 (14.3)	42.0
Testicular tumor	0/12 ^b		N. E.	
Prostatic cancer	2/7 (28.6)	100.0 ± 99.0	0/4	

a: $p < 0.025$, renal cell carcinoma versus bladder cancer. (χ^2 test)

b: $p < 0.001$, renal cell carcinoma versus testicular tumor. (χ^2 test)

N. E.: not examined

±103.9 pg/ml)に血清中bFGFが検出されたにすぎないが、腎静脈に浸潤のあるpV1症候群では16例中14例(87.5%)(43-280, 159.9±143.9 pg/ml), また大静脈まで浸潤のあるpV2症候群では5例中4例(80.0%)(41-450, 264.0±216.7 pg/ml)で検出された(Table 3). したがって、検出頻度においてpV0症例群とpV1, pV2の各症例群間で有意差がみられた($p < 0.005$)が、bFGFの測定値においては、各群間に差はみられなかった。

Grade別の検討では、G1症例群20例中5例(25.0%)(57-320, 119.6±112.3 pg/ml)にのみbFGFが検出された。しかし、G2症例群では23例中16例(69.6%)(30-353, 130.3±130.5 pg/ml), G3症例群では9例中7例(77.8%)(41-540, 236.9±187.9 pg/ml)で検出された(Table 4). したがって、検出頻度においてG1症例群とG2, G3症例群間で有意差が見られた($p < 0.001$). 血清中bFGF測定値においてG3症例群はG2症例群より高い傾向があった($p < 0.1$).

以上より、high stage, high grade症例ほど血清中bFGFが多く検出され、さらに測定値も高い結果であっ

た。

2) 腎細胞癌の組織学的細胞型、構築型と血清中bFGFの相関

腎細胞癌の組織学的細胞型についてみると、clear cell subtype群の36例中18例(50.0%)(30-492, 116.4±120.0 pg/ml)に血清中bFGFが検出され、granular cell subtype群では6例中4例(66.7%)(4-540, 237.8±214.0 pg/ml)で検出された。Pleomorphic typeは1例のみで、血清中bFGFが(417.0 pg/ml)検出された。Clear cell subtypeとgranular cell subtypeのmixed subtype群の9例のうち5例(55.6%)(43-353, 175.6±135.5 pg/ml)で検出された(Table 5). 以上の組織学的細胞型に関する有意差検定では、検出頻度、測定値ともに差はみられなかった。

組織学的構築型はalveolar, tubular, papillary, cystic, solidの各タイプに腎癌取扱い規約²⁹⁾, TNM分類³⁰⁾に従って分類し、Table 6に示した。

Alveolar型では25例中10例(40.0%)(30-492, 123.7±183.0 pg/ml)に、alveolar+tubular型では5例中2例(40.0%)(48, 65, 56.5±12.0 pg/ml)に、alveolar

Table 2. Serum basic FGF and histopathological stage in patients with renal cell carcinoma

	No. of positive patients/No. of total patients(%)	Mean basic FGF level of positive patients(pg/ml)
pT1+pT2	11/29(37.9)	92.6±100.6
pT3	15/20(75.0)	160.9±134.6
pT4	2/ 3(66.7)	454.5± 53.0 ^{a,b}

a : $p < 0.0001$, pT1+pT2 versus pT4(Wilcoxon test)

b : $p < 0.05$, pT3 versus pT4(Wilcoxon test)

Table 3. Serum basic FGF and venous invasion in patients with renal cell carcinoma

	No. of positive patients/No. of total patients(%)	Mean basic FGF level of positive patients(pg/ml)
pV0	10/31(32.3)	104.6±103.9
pV1	14/16(87.5) ^a	159.9±143.9
pV2	4/ 5(80.0) ^a	264.0±216.7

a : $p < 0.005$, pV0 versus pV1, pV0 versus pV2(χ^2 test)

Table 4. Serum basic FGF and histopathological grade in patients with renal cell carcinoma

	No. of positive patients/No. of total patients(%)	Mean basic FGF level of positive patients(pg/ml)
G1	5/20(25.0)	119.6±112.3
G2	16/23(69.6) ^a	130.3±130.5
G3	7/ 9(77.8) ^a	236.9±187.9

a : $p < 0.001$, G1 versus G2, G1 versus G3(χ^2 test)

+cystic型では2例中1例(50.0%)(79.0 pg/ml)に、
alveolar+solid型では3例中2例(66.7%)(72, 320,
196.0±175.4 pg/ml)に、tubular型では4例中4例
(100.0%)(43-215, 132.5±92.7 pg/ml)に、papillary型
では4例中2例(50.0%)(135, 353, 244.0±150.1 pg/

ml)に、solid型では7例中7例(100.0%)(67-540, 247.3
±175.9 pg/ml)に、各々血清中bFGFが検出された。し
かし、cystic+tubular型では検出されなかった。

以上の組織学的構築型に関する有意差検定では、血清
中bFGF測定値のalveolar型症例群とsolid型症例群

Table 5. Serum basic FGF and cell type in patients with renal cell carcinoma

Cell type	No. of positive patients/No. of total patients(%)	Mean basic FGF level of positive patients(pg/ml)
Clear cell subtype	18/36(50.0)	116.4±120.0
Granular cell subtype	4/ 6(66.7)	237.8±214.0
Pleomorphic type	1/ 1(100.0)	417.0
Mixed subtype	5/ 9(55.6)	175.6±135.5

Table 6. Serum basic FGF and histological patterns in patients with renal cell carcinoma

Histological pattern	No. of positive patients/No. of total patients(%)	Mean basic FGF level of positive patients(pg/ml)
Alveolar	10/25(40.0)	123.7±183.0
Alveolar+Tubular	2/ 5(40.0)	56.5± 12.0
Alveolar+Cystic	1/ 2(50.0)	79.0
Alveolar+Solid	2/ 3(66.7)	196.0±175.4
Tubular	4/ 4(100.0)	132.5± 92.7
Tubular+Cystic	0/ 2(0)	—
Papillary	2/ 4(50.0)	244.0±150.1
Solid	7/ 7(100.0)	247.3±175.9

Table 7. Serum basic FGF in selective renal venous sampling

Case	Pathological diagnosis	Serum basic FGF(pg/ml)(underline : affected kidney)				
		Peripheral	Right renal vein	Left renal vein	Upper than bifurcation	Lower than bifurcation
M.N.	pT4N3MOV2 G3 Solid Pleomorphic	67	<u>N.S.</u>	N. S.	417	N.D.
M.H.	pT3N0M0V0 G2 Alveolar Clear	36	N.D.	<u>52</u>	50	N.D.
N.N.	pT2N0M0V0 G2 Alveolar Clear	N.D.	N.D.	<u>45</u>	N.D.	N.D.
T.T.	pT2N0M0V0 G2 Alveolar Clear	N.D.	<u>42</u>	N.D.	32	N.D.
K.O.*	pT3N0M1V0 G2 Alveolar Mixed	67	<u>215</u>	N.D.	N.S.	N.S.
J.M.	pT2N1M1V1 G2 Tubular&Alveolar Clear	48	<u>253</u>	N.D.	98	N.D.
S.I.	pT2N0M0V0 G2 Alveolar Clear	N.D.	N.D.	<u>N.D.</u>	N.D.	N.D.
M.H.	pT2N0M0V0 G1 Alveolar&cystic Clear	N.D.	<u>N.D.</u>	N.D.	N.D.	N.D.

* : Sampling at operation

N.D. : less than detection limit(30pg/ml)
N.S. : no sampling

Table 8. Postoperative basic FGF in renal cell carcinoma

Cases with decrease	5 Cases
1) Within one week after nephrectomy	4 cases
• pT3N0M1V0, G2	
• pT2N1M1V1, G2	
• pT2N0M0V0, G2	
• pT2N0M0V0, G1	
2) Within two weeks after nephrectomy	1 case
• pT2N0M0V0, G1	

Cases without decrease	2 cases
• pT4N3M0V1, G3 : residual tumor	
• pT3N0M0V1, G2 : ileus*	

* decreased after healing

間の比較において, solid型症例群の方が高い傾向がみられたのみであった($p < 0.1$).

3) 腎細胞癌腫瘍サイズと血清中bFGFの相関

主腫瘍の大きさが明確な腎細胞癌症例45例について, 最大径5 cm以上群と5 cm未満群の2群に分けて腫瘍サイズと血清中bFGFの相関を検討したところ, 5 cm以上群では29例中17例(58.6%)(30-492, 163.1 ± 150.0 pg/ml)に, 5 cm未満群では16例中6例(37.5%)(32-540, 174.0 ± 192.3 pg/ml)で血清中bFGFが検出されたが, 両群間に差はみられなかった.

(3) 分腎静脈血の血清中bFGF

術前の血管造影を行った腎細胞癌症例8例において, 両側腎静脈および下大静脈の腎静脈分岐部の上下より採血し, 血清中bFGFを測定した(Table 7). 末梢血の血清中bFGFが検出されなかった症例4例中2例では腎静脈中のbFGFも検出されなかったが, 残る2例では患側の腎静脈中のbFGFが検出された($42, 45, 43.5 \pm 2.1$ pg/ml). 末梢血中のbFGFが検出された4例中3例では末梢血($36-67, 50.3 \pm 15.6$ pg/ml)と患側の腎静脈($52-253, 173.3 \pm 106.8$ pg/ml)のどちらの血清中bFGFも検出されたが, 測定値に差はみられなかった. 残りの1例は腎静脈内に腫瘍血栓がみられた症例であり, 両側の腎静脈からの採血は不可能であったが, この症例では分岐部上部の静脈血血清中bFGFが検出された(417.0 pg/ml).

(4) 腎摘除術後の血清中bFGFの経時的変化

血清中bFGFが腫瘍組織から産生されていることを確認するために術前に血清中bFGFが検出された腎細胞癌症例7例について腎摘除術後の血清中bFGF値を経時的に測定した(Table 8). その結果, 7例中4例が術後1週以内に, 1例が術後2週目に陰性化した. 残る2例については腎摘除術後も血清中bFGF値は陰性化せず, 1例はリンパ節転移巣および下大静脈内の腫瘍血栓

が切除不能で残存腫瘍がある症例で, 残る1例は術後イレウスを合併した症例であった. しかし, この1例については術後イレウスの治癒後に陰性化した.

考 察

健康診断や人間ドックの発達と普及ならびに画像診断の進歩により偶然発見される腎細胞癌^{21,22)}が増加していることに起因し, 腎細胞癌の症例数も増加してきている. この偶然発見腎細胞癌には当然のことながら早期癌が多く, 治療成績や長期予後としての生存率の向上に貢献している. しかし, 一方では診断時すでに転移を有する進行癌症例も依然としてみられる. 腎細胞癌の治療は手術療法を中心に化学療法, 内分泌療法, 放射線療法および免疫療法などの補助療法を組み合わせた集学的治療が行われており, 近年ではインターフェロンを中心とした種々のBRM療法を加えて治療成績の向上のための努力が払われてきた. しかし, これらの補助療法の成績は決して満足できるものではなく, 手術療法以外に腎細胞癌の有効な治療法は確立されていないのが現状である^{22,23)}. 一方, 根治的腎摘除術を施行し得たと考えられる症例でも比較的早期に遠隔転移が認められたり, あるいは10年以上経過した後に再発転移が認められるなど臨床像は様々である³³⁾. 腎細胞癌の予後に関しては5年生存率42~67%, 10年生存率31~52%と報告されている^{23,34-41)}.

治療成績の向上のためには早期発見や術後の再発を早期に診断することが重要であることは言うまでもない. そのための1つのアプローチは腎細胞癌の生物学的特徴に基づいた特異的な腫瘍マーカーをみつけることである. 生化学的ならびに免疫学的腫瘍関連物質, すなわち腫瘍マーカーによる診断法は腎細胞癌の早期診断や術後のモニターとして画像診断とともに不可欠のものである. 腎細胞癌のマーカーとしては筆者をはじめ種々の基礎的研究の報告がみられるが臨床上の腫瘍マーカーとしての意

義は少ない⁴²⁻⁴⁴。しかし、過去にFujimotoら²⁰が報告したごとく、血清中bFGFは進行性の腎細胞癌症例でよく検出されることから、腎細胞癌の新しいマーカーとなり得る可能性が示唆されている。

一般に、腫瘍は血管に富んだ組織であり、血管のない腫瘍は1~2mm³以上に増殖せず、また腫瘍が爆発的ともいえる増殖をするためには血管新生が必須であると言われている⁴⁵。血管新生には生理的なものと病理的なものがある。生理的なものは個体の発生、成長、成熟や個体維持のための創傷治癒などの際にみられる。一方、病理的なものは、悪性腫瘍、糖尿病性網膜症、リウマチ性関節炎⁴⁶、動脈硬化、角膜の潰瘍化⁴⁷、再生肝⁴⁸、筋ジストロフィーの筋肉⁴⁹など種々の疾患や病態と深くかかわっている。とりわけ、腫瘍血管新生は多くの研究者の注目を集め、古くから腫瘍自らが血管新生を促す液性因子を分泌し、血管を誘引すると考えられていた。1939年に脳抽出液から増殖促進作用が発見され⁵⁰、その後、脳下垂体から、ついで脳から3T3細胞という線維芽細胞の増殖促進因子が発見されたことから、FGFと命名されるに至った⁵¹⁻⁵⁷。このFGFは、酸性の等電点を持つacidic FGF(aFGF)と塩基性の等電点を持つbasic FGF(bFGF)に分類され、両者はアミノ酸配列が55%の相同性を示すことが知られている⁵⁸。bFGFは146個のアミノ酸からなる分子量18,000または22,000~29,000の1本鎖のペプチドである(Fig.1)。近年、他にも類似した構造を持つ増殖因子*int-2*、*hst-1*、FGF-5、*hst-2*、KGFなどが発見され、FGFファミリーとして総括されている。また、いずれもがヘパリンに対して強い親和性を示すことからHBGFと呼ばれている。その後の検討からFGFは中胚葉系細胞、神経系細胞や上皮細胞の一部に広く作用し、とくに血管内皮細胞に対して強い活性を有することが明らかになり、血管新生因子としても知られるに至った⁵⁹⁻⁶¹。血管新生は既存の血管からちょうど出芽するように突起ができて、それが伸びて毛細血管をなし、さらに太い血管へとつながることが、多くの研究によって明らかにされている⁶²。この過程を構築する重要な現象として血管内皮細胞の遊走と増殖がある。*in vitro*の系でFGFは血管内皮細胞の遊走と細胞増殖を促進するとともに、コラーゲンマトリゲルを用いた三次元培養系において、血管内皮細胞の管腔形成をひき起こすことが発見された⁶³。他方、*in vivo*の系においてラットの腎に強力な血管新生作用を示すことが証明され⁶⁴、マウス胚の腎に血管新生作用を示すことも報告されている⁶⁵。そして細胞遊走、細胞増殖はbFGFの産生量と相関することが明らかになり⁶⁶、bFGFの細胞増殖におけるautocrine

mechanismの存在が示唆されている^{67,68}。また、生体内で産生された内因性bFGFが血管新生を調節していることも証明された⁶⁹。つまり、bFGFは癌細胞の増殖を自律的に促進している可能性があると考えられる。

そこで本研究においては、bFGFが腎細胞癌の新しいマーカーとなり得るという予想を明確にするために、腎細胞癌や他の泌尿器科腫瘍症例の血清中および尿中のbFGF濃度を測定した。その結果、血清中のbFGFは他の泌尿器科腫瘍症例より腎細胞癌症例において高い頻度で検出されることが確認された。このことは血清中bFGFが比較的腎細胞癌にとって特異的で、それは栄養血管に富んだ腎細胞癌の血管新生によるものであると考えられる。

Nguyenら^{70,71}は尿中のbFGFは腎細胞癌や膀胱癌を含む種々の悪性腫瘍症例でみられると報告している。また、腎癌(腺癌)症例の組織抽出液から、尿中bFGF類似物質が単離精製されたとの報告や⁷²、腎癌(腺癌)症例や膀胱癌症例の尿中にbFGFに類似した活性がみられたとの報告もある⁷³。Soutterら⁷⁴は動物実験の結果から、癌患者の尿中のbFGFは腫瘍自ら分泌していると報告している。本研究では、尿の解析においては膀胱癌症例の7例中1例で検出されたにすぎず、腎細胞癌、腎盂尿管癌、前立腺癌において尿中bFGFは検出し得なかった。しかし、膀胱癌症例では尿路上皮の炎症や尿管により検出された可能性も否定できないと考えられる。

本研究でpT3またはpV1以上またはG2以上の進行腎細胞癌は血清中bFGF測定値が高値であるという特徴が確認された。また、solid型あるいはtubular型を含む腎細胞癌においても血清中bFGF測定値が高値を示した。このことはhigh gradeのsolid型の腫瘍はもっとも進行が早く、予後不良という臨床所見と一致している。しかし、血清中bFGFの検出頻度、測定値ともにclear cell subtype群とgranular cell subtype群間に差はみられなかったことより、血清中bFGFはcell typeには依存しないことが明らかとなった。血清中bFGFは病理学的に悪性度の高い腫瘍組織から産生され分泌されている可能性があるが、腫瘍の最大径が5cm以上群と5cm未満群間での検討では血清中bFGFの検出頻度、測定値ともに両群間に差はみられず、腫瘍サイズに依存しないことも判明した。径1cmの腫瘍は臨床的に発見できる最小の腫瘍、いわゆる早期癌であるが、腫瘍細胞の増殖動態からみて腫瘍細胞のlife spanの4分の3は仕上がりしており、すでに早期癌ではなくheterogeneityがあり、転移能を有していることが推察される。言い換えれば、これらの微小な腎細胞癌からも血清中bFGFが産

生されていることを示唆している。とくにG3またはsolid型の微小腎細胞癌は、G2やcystic型のような悪性度の低いhigh stageの腫瘍より血清中bFGFを多く分泌しているようである。

血清中bFGFが腫瘍組織から産生されていることを確認するために、末梢血中ではbFGFが検出されなかった症例について、両側腎静脈と下大静脈の腎静脈分岐部の上下の部位から分腎静脈採血しbFGFを測定した。その結果、末梢血血清中でbFGFが検出されなかった2例の患側の腎静脈血清中にbFGFが検出された。すなわち、血清中bFGFは分腎静脈採血することによりlow gradeで悪性度の低い早期癌からでさえも検出された。

経時的变化の検討では、血清中bFGFは腎摘除術による腫瘍の切除後2週間以内に陰性化した。しかし、血清中bFGFの検出が継続することは、残存腫瘍や、術後イレウスのような合併症あるいは創部からの感染や皮下の膿瘍によるものと考えられる。このことは血清中bFGFが創部の治癒過程において重要な役割を果たしていることを示唆していると考えられる。

腫瘍血管新生に対する血清中bFGFの関与を考えると、癌細胞やマクロファージから分泌される血清中bFGF、さらに細胞間基質へ放出される血清中bFGFの作用とともに血管内皮細胞自身の産生する血清中bFGFの自律的作用も考慮すべきである。また、腫瘍血管新生は血清中bFGFによって制御されているだけでなく、他の血管新生誘発物質や抑制物質によっても制御されていることが考えられる。これらの因子の究明は今後の重要な研究課題である。

以上、血清中bFGFは腎細胞癌のような血管の豊富な腫瘍の発育と進展に深くかかわっており、高い特異性を持つ腫瘍マーカーの1つになり得ることが示唆された。

結 語

bFGFの血清内濃度の上昇が腎細胞癌に特異的か否かをみる目的で、種々の泌尿器科腫瘍症例について、two-site sandwich enzyme immunoassayを用いて検討し、以下の結果が得られた。

1) 血清中bFGFは、泌尿器科悪性腫瘍の中で腎細胞癌において52例中28例(53.8%)と高い頻度で検出され、他の泌尿器科悪性腫瘍の血清より、腎細胞癌に比較的特異性のあることが示された。尿中bFGFは、膀胱癌症例7例中1例(14.3%)に検出されたのみで、他の泌尿器科悪性腫瘍では検出されなかった。

2) 腎細胞癌においては、high stage(pT3以上, pV1以上), high grade(G2以上)の腫瘍において、血清中

bFGFはより高い頻度で検出または高い測定値を示し、組織学的構築型ではsolid typeやtubular typeにおいて高い頻度で検出されたが、組織学的細胞型においては差は認められなかった。

3) 分腎静脈血の血清中bFGFは腫瘍側腎静脈血において測定値が高く、血清中bFGFが腎腫瘍組織と関連して分泌されていることが確認された。

4) 血清中bFGFは、腎摘除術を施行した7例中5例において術後2週目までに陰性化した。リンパ節および下大静脈に切除不能な残存腫瘍があった1例と術後イレウスを合併した1例においては、陰性化が認められず、残存腫瘍の有無や創部の治癒と血清中bFGFの関連が示唆された。

5) 以上、血清中bFGFは腎細胞癌のような血管新生の盛んな腫瘍の発育や進展に深く関与しているものと考えられ、腫瘍血管の豊富な腎細胞癌の術前診断や、術後のモニターとして有用性のあることが示唆されたが、血清中bFGFの腫瘍マーカーとしての有用性と意義については今後さらに詳細に検討する必要がある。

(本研究の一部は、対がん10ヵ年総合戦略研究事業助成金および厚生省がん研究助成金によったものであり、ここに謝意を表します。)

文 献

- 1) Abraham, J. A., Mergia, A., Whang, J. L., Tumolo, A., Friedman, J., Hjerrild, K. A., Gospodarowicz, D. and Fiddes, J. C.: Nucleotide sequence of a bovine clone encoding the angiogenic protein, basic Fibroblast growth factor. *Science* **233** : 545-548, 1986.
- 2) Iwane, M., Kurokawa, T., Sasada, R., Seno, M., Nakagawa, S. and Igarashi, K.: Expression of cDNA encoding human basic fibroblast growth factor in *E. Coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **146** : 470-477, 1987.
- 3) Thomas, K. A., Rios-Candelore, M. and Fitzpatrick, S.: Purification and characterization of acidic fibroblast growth factor from bovine brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **81** : 357-361, 1984.
- 4) Esch, F., Ueno, N., Baird, A., Hill, F., Denoroy, L., Ling, N., Gospodarowicz, D. and Guillemin, R.: Primary structure of bovine brain acidic fibroblast growth factor(FGF). *Biochem. Bio-*

- phys. Res. Commun. **133** : 554-562, 1985.
- 5) **Dickson, C. and Peters, G.** : Potential oncogene product related to growth factors. *Nature* **326** : 833, 1987.
 - 6) **Sakamoto, H., Mori, M., Taira, M., Yoshida, T., Matsukawa, S., Shimizu, K., Sekiguchi, M., Terada, M. and Sugimura, T.** : Transforming gene from human stomach cancers and a noncancerous portion of stomach mucosa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83** : 3997-4001, 1986.
 - 7) **Taira, M., Yoshida, T., Miyagawa, K., Sakamoto, H., Terada, M. and Sugimura, T.** : cDNA sequence of human transforming gene *hst* and identification of the coding sequence required for transforming activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84** : 2980-2984, 1987.
 - 8) **Sakamoto, H., Yoshida, T., Nakakuki, M., Odagiri, H., Miyagawa, K., Sugimura, T. and Terada, M.** : Cloned *hst* gene from normal human leukocyte DNA transforms NIH3T3 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **151** : 965-972, 1988.
 - 9) **Finch, P. W., Rubin, J. S., Miki, T., Ron, D. and Aaronson, S. A.** : Human KGF is FGF-related with properties of a paracrine effector of epithelial cell growth. *Science* **245** : 752-755, 1989.
 - 10) **Bovi, P. D. and Basilico, C.** : Isolation of a rearranged human transforming gene following transfection of Kaposi sarcoma DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84** : 5660-5664, 1987.
 - 11) **Bovi, P. D., Curatola, A. M., Kern, F. G., Greco, A., Ittmann, M. and Basilico, C.** : An oncogene isolated by transfection of Kaposi's sarcoma DNA encodes a growth factor that is a member of the FGF family. *Cell* **50** : 729-737, 1987.
 - 12) **清水信義** : 細胞増殖因子の基礎研究—現状と展望. 蛋白質・核酸・酵素 **36** : 971-977, 1991.
 - 13) **Folkman, J., Watson, K., Ingber, D. and Hanahan, D.** : Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. *Nature* **339** : 58-61, 1989.
 - 14) **Folkman, J.** : What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J. Natl. Cancer Inst.* **82** : 4-6, 1990.
 - 15) **Weidner, N., Semple, J. P., Welch, W. R. and Folkman, J.** : Tumor angiogenesis and metastasis—correlation in invasive breast carcinoma. *N. Engl. J. Med.* **324** : 1-8, 1991.
 - 16) **今村 亨, Burgess, W. H., 三井洋司, Maciag, T.** : 血管新生因子 HBGFs と内皮細胞. *臨床科学* **25** : 1012-1021, 1989.
 - 17) **三井洋司, 今村 亨** : FGF と新規 ECGF による血管系細胞の増殖制御. 蛋白質・核酸・酵素 **36** : 1237-1246, 1991.
 - 18) **Yamanaka, Y., Friess, H., Buchler, M., Beger, H. G., Uchida, E., Onda, M., Kobrin, M. S. and Korc, M.** : Overexpression of acidic and basic fibroblast growth factors in human pancreatic cancer correlates with advanced tumor stage. *Cancer Res.* **53** : 5289-5296, 1993.
 - 19) **Watanabe, H., Nguyen, M., Schizer, M., Li, V., Hayes, D. F., Sallan, S. and Folkman, J.** : Basic fibroblast growth factor in human serum—a prognostic test for breast cancer. *Mol. Biol. Cell.* **3**(Suppl.): 234a, 1992.
 - 20) **Fujimoto, K., Ichimori, Y., Kakizoe, T., Okajima, E., Sakamoto, H., Sugimura, T. and Terada, M.** : Increased serum levels of basic fibroblast growth factor in patients with renal cell carcinoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **180** : 386-392, 1991.
 - 21) **Aso, Y. and Homma, Y.** : A survey on incidental renal cell carcinoma in Japan. *J. Urol.* **147** : 340-343, 1992.
 - 22) **岡島英五郎, 大園誠一郎** : Incidence and prognosis (Incidental RCC, surgical treatment). *腎と透析* **34** : 681-684, 1993.
 - 23) **岡島英五郎, 大園誠一郎** : 腎細胞癌治療の現状. 第18回尿路悪性腫瘍研究会記録. 尿路悪性腫瘍研究会事務局, 協和企画通信, 東京, p101-118, 1992.
 - 24) **里見佳昭, 仙賀 裕, 福田百邦, 中橋 満, 西村隆一, 大島博幸, 近藤猪一郎, 吉邑貞夫, 福島修司, 古畑哲彦, 石塚栄一, 福岡 洋** : 腎癌患者の10年生生存率及び10年以上生存例の検討. *日泌尿会誌.* **75** : 118-125, 1984.
 - 25) **大園誠一郎, 高島健次, 吉川元祥, 平尾佳彦, 岡島英五郎** : 腎細胞癌の治療成績と問題点. *泌尿紀要.* **38** : 1285-1292, 1992.
 - 26) **里見佳昭** : 腎癌の予後に関する臨床的研究—特に生体側の因子を中心に. *日泌尿会誌.* **64** : 195-216, 1973.

- 27) Seno, M., Iwane, M., Sasada, R., Moriya, N., Kurokawa, T. and Igarashi, K.: Monoclonal antibodies against human basic fibroblast growth factor. *Hybridoma* 8 : 209-221, 1989.
- 28) Watanabe, H., Hori, A., Seno, M., Kozai, Y., Igarashi, K., Ichimori, Y. and Kondo, K.: A sensitive enzyme immunoassay for human basic fibroblast growth factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 175 : 229-235, 1991.
- 29) Ehrlich, P. H., Moyle, W. R., Moustafa, Z. A. and Canfield, R. E.: Mixing two monoclonal antibodies yields enhanced affinity for antigen. *J. Immunol.* 128 : 2709-2713, 1982.
- 30) Suzuki, N., Kondo, K., Tominaga, S., Kuroki, M. and Matsuoka, Y.: Heterogeneity of circulating carcinoembryonic antigen analyzed by sandwich-enzyme immunoassays with different specificities. *Cancer Res.* 47 : 4782-4787, 1987.
- 31) 日本泌尿器学会. 日本病理学会: 日本医学放射線学会編: 腎癌取扱い規約. 金原出版, 東京, 1983.
- 32) International Union Against Cancer(UICC): "TNM Classification of Malignant Tumors." 3rd Ed, Geneva, 1978.
- 33) McNichols, D. W., Segura, J. W. and DeWeerd, J. H.: Renal cell carcinoma: Long-term survival and late recurrence. *J. Urol.* 126 : 17-23, 1981.
- 34) 西尾恭規, 西村一男, 飛田収一, 岡田裕作, 竹内秀雄, 宮川美栄子, 岡田謙一郎, 吉田 修: 腎細胞癌に対する根治的腎摘除術の治療成績. 第1報: 腎癌取扱い規約による進展度分類と予後. *泌尿紀要.* 33 : 337-343, 1987.
- 35) 阿曾佳郎, 増田宏昭, 広瀬 淳, 麦谷荘一, 丸山正明, 三橋 孝, 山口安三, 中野 優, 塚田 隆, 鈴木明彦, 中原正男, 北川元昭, 鈴木俊秀, 神林知幸, 牛山知己, 畑 昌宏, 太田信隆, 大見嘉郎, 大田原佳久, 鈴木和雄, 田島 惇: 腎細胞癌の治療成績. *日泌尿会誌.* 79 : 1096-1102, 1988.
- 36) 里見佳昭, 福田百邦, 穂坂正彦, 近藤猪一郎, 吉邑貞夫, 福島修司, 井田時雄, 広川 信, 森田 上, 古畑哲彦, 熊谷治己, 塩崎 洋, 石塚栄一, 宮井啓国, 仙賀 裕, 福岡 洋, 佐々木紘一, 公平昭男, 中橋 満: 腎癌の予後に関する臨床統計. *日泌尿会誌.* 79 : 853-863, 1988.
- 37) 齋藤和男, 岩室紳也, 藤井 浩, 近藤猪一郎: 腎細胞癌 55 例の臨床的検討. *泌尿紀要.* 35 : 1847-1852, 1989.
- 38) 佐藤 健, 河合弘二, 西島由貴子, 佐々木 明, 桐山 功, 吉井慎一, 宮永直人, 岩崎明郎, 阿弥良浩, 真鍋文雄, 石川博道, 小磯謙吉: 腎細胞癌の臨床的研究—新しいTNM分類に基づいた予後の検討. *日泌尿会誌.* 80 : 1802-1808, 1989.
- 39) Störkel, S., Thoenes, W., Jacobi, G. H. and Lippold, R.: Prognostic parameters in renal cell carcinoma—a new approach. *Eur. Urol.* 16 : 416-422, 1989.
- 40) 高士宗久, 坂田孝雄, 中野洋二郎, 長井辰哉, 高羽秀典, 田中純二, 岡村菊夫, 高村真一, 金井 茂, 佐橋正文, 村瀬達良, 下地敏雄, 三宅弘治: 腎細胞癌の臨床病理学的特徴と予後—遠隔転移・静脈腫瘍血栓・リンパ節転移に関する因子の統計学的評価. *日泌尿会誌.* 83 : 321-327, 1992.
- 41) 高橋 敦, 熊本悦明, 塚本泰司, 宮尾則臣, 小谷典之, 柳瀬雅裕, 舛森直哉: 腎細胞癌の再発に関する因子の検討. *日泌尿会誌.* 83 : 59-65, 1992.
- 42) Takashi, M., Haimoto, H., Tanaka, J., Murase, T. and Kato, K.: Evaluation of gamma-enolase as a tumor marker for renal cell carcinoma. *J. Urol.* 141 : 830-834, 1989.
- 43) 岡島英五郎, 平尾佳彦, 大園誠一郎, 三馬省二: 腎癌マーカー, *泌尿器外科* 2 : 423-426, 1989.
- 44) Yamaguchi, H., Ozono, S., Kitagawa, H., Uemura, H., Tabata, S., Matsuki, H., Samma, S., Hirao, Y., Okajima, E., Kitahori, Y. and Hiasa, Y.: Tumor markers in rats with renal tumor induced by N-ethyl-N-hydroxyethyl-nitrosamine. *J. Toxicol. Pathol.* 3 : 239-243, 1990.
- 45) 中村敏一: 発癌とがん細胞. *がんのバイオサイエンス* 3(黒木登志夫編). 東京大学出版, 東京, p75-98, 1991.
- 46) Sano, H., Forough, R., Maier, J. A. M., Case, J. P., Jackson, A., Engleka, K., Maciag, T. and Wilder, R. L.: Detection of high levels of heparin binding growth factor-1(acidic fibroblast growth factor) in inflammatory arthritic joints. *J. Cell. Biol.* 110 : 1417-1426, 1990.
- 47) Thompson, P., Desbordes, J. M., Giraud, J., Pouliquen, Y., Barritault, D. and Courtois, Y.: The effect of an eye derived growth factor (EDGF) on corneal epithelial regeneration. *Exp. Eye. Res.* 34 : 191-199, 1982.

- 48) Kan, M., Huang, J., Mansson, P. -E., Yasumitu, H., Carr, B. and Mckeehan, W. L. : Heparin-binding growth factor type 1(acidic fibroblast growth factor) : a potential biphasic autocrine and paracrine regulator of hepatocyte regeneration. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **86** : 7432-7436, 1989.
- 49) DiMario, J., Buffinger, N., Yamada, S. and Strohman, C. : Fibroblast growth factor in the extracellular matrix of dystrophic(mdx) mouse muscle. Science **244** : 688-690, 1989.
- 50) Trowell, O. A., Chir, B. and Willmer, E. N. : Studies on the growth of tissues *in vitro*. VI. The effects of some tissue extracts on the growth of periosteal fibroblasts. J. Exp. Biol. **16** : 60-70, 1939.
- 51) Armelin, H. A. : Pituitary extracts and steroid hormones in the control of 3T3 cell growth. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **70** : 2702-2706, 1973.
- 52) Gospodarowicz, D., Jones, K. L. and Sato, G. : Purification of a growth factor for ovarian cells from bovine pituitary glands. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. **71** : 2295-2299, 1974.
- 53) Gospodarowicz, D. : Localisation of a fibroblast growth factor and its effect alone and with hydrocortisone on 3T3 cell growth. Nature **249** : 123-127, 1974.
- 54) Folkman, J. and Greenspan, H. P. : Influence of geometry on control of cell growth. Biochim. Biophys. Acta **417** : 211-236, 1975.
- 55) Gospodarowicz, D., Bialecki, H. and Greenburg, G. : Purification of the fibroblast growth factor activity from bovine brain. J. Biol. Chem. **253** : 3736-3743, 1978.
- 56) Maciag, T., Cerundolo, J., Ilsley, S., Kelley, P. R. and Forand, R. : An endothelial cell growth factor from bovine hypothalamus : identification and partial characterization. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **76** : 5674-5678, 1979.
- 57) Burgess, W. H., Mehlman, T., Friesel, R., Johnson, W. V. and Maciag, T. : Multiple forms of endothelial cell growth factor. J. Biol. Chem. **260** : 11389-11392, 1985.
- 58) Esch, F., Baird, A., Ling, N., Ueno, N., Hill, F., Denoroy, L., Klepper, R., Gospodarowicz, D., Böhlen, P. and Guillemin, R. : Primary structure of bovine pituitary basic fibroblast growth factor(FGF) and comparison with the amino-terminal sequence of bovine brain acidic FGF. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **82** : 6507-6511, 1985.
- 59) Folkman, J. and Klagsbrun, M. : Angiogenic factors. Science **235** : 442-447, 1987.
- 60) 今村 亨, 三井洋司 : 血管新生研究の最前線. 蛋白質・核酸・酵素 **33** : 373-381, 1988.
- 61) 佐藤靖史, 松田貴雄, 岡村一樹, 桑野信彦 : 血管新生と癌化における増殖因子応答. 蛋白質・核酸・酵素 **36** : 1384-1390, 1991.
- 62) Furcht, L. T. : Critical factors controlling angiogenesis : cell products, cell matrix, and growth factors. Lab. Invest. **55** : 505-509, 1986.
- 63) Montesano, R., Vassalli, J. -D., Baird, A., Guillemin, R. and Orci, L. : Basic fibroblast growth factor induces angiogenesis *in vitro*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **83** : 7297-7301, 1986.
- 64) Hayek, A., Culler, F. L., Beattie, G. M., Lopez, A. D., Cuevas, P. and Baird, A. : An *in vivo* model for study of the angiogenic effects of basic fibroblast growth factor. Biochem. Biophys. Res. Commun. **147** : 876-880, 1987.
- 65) Risau, W. and Eklblom, P. : Production of a heparin-binding angiogenesis factor by the embryonic kidney. J. Cell. Biol. **103** : 1101-1107, 1986.
- 66) Tsuboi, R., Sato, Y. and Rifkin, D. B. : Correlation of cell migration, cell invasion, receptor number, proteinase production, and basic fibroblast growth factor levels in endothelial cells. J. Cell. Biol. **110** : 511-517, 1990.
- 67) Sato, Y. and Rifkin, D. B. : Autocrine activities of basic fibroblast growth factor : regulation of endothelial cell movement, plasminogen activator synthesis, and DNA synthesis. J. Cell. Biol. **107** : 1199-1205, 1988.
- 68) Lindner, V., Reidy, M. A. and Fingerle, J. : Regrowth of arterial endothelium : denudation with minimal trauma leads to complete endothelial cell regrowth. Lab. Invest. **61** : 556-563, 1989.
- 69) Broadley, K. N., Aquino, A. M., Woodward, S. C., Buckley-Sturrock, A., Sato, Y., Rifkin, D. B. and Davidson, J. M. : Monospecific anti-

- bodies implicate basic fibroblast growth factor in normal wound repair. *Lab. Invest.* **61** : 571-575, 1989.
- 70) **Nguyen, M., Watanabe, H., Budson, A., Richie, J. P., Hayes, D. F. and Folkman, J.** : Basic fibroblast growth factor(bFGF) is elevated in the urine of patients with a wide variety of neoplasms. *Mol. Biol. Cell.* **3**(Suppl) : 234a, 1992.
- 71) **Nguyen, M., Watanabe, H., Budson, A. E., Richie, J. P. and Folkman, J.** : Elevated levels of the angiogenic peptide basic fibroblast growth factor in urine of bladder cancer patients. *J. Natl. Cancer Inst.* **85** : 241-242, 1993.
- 72) **Mydlo, J. H., Heston, W. D. W. and Fair, W. R.** : Characterization of a heparin-binding growth factor from adenocarcinoma of the kidney. *J. Urol.* **140** : 1575-1579, 1988.
- 73) **Chodak, G. W., Hospelhorn, V., Judge, S. M., Mayforth, R., Koeppe, H. and Sasse, J.** : Increased levels of fibroblast growth factor-like activity in urine from patients with bladder or kidney cancer. *Cancer Res.* **48** : 2083-2088, 1988.
- 74) **Soutter, A. D., Nguyen, M., Watanabe, H. and Folkman, J.** : Basic fibroblast growth factor secreted by an animal tumor is detectable in urine. *Cancer Res.* **53** : 5297-5299, 1993.