

## RT-PCR 法による前立腺癌患者末梢血中の PSA mRNA の検出に関する研究

東京医科大学泌尿器科学教室 (主任 : 三木 誠教授)  
大久保雄平, 伊藤 貴章

### RT-PCR ASSAY FOR DETECTING PSA mRNA IN PERIPHERAL BLOOD OF PROSTATE CANCER PATIENTS

Yuhei OKUBO and Takaaki ITO  
*From the Department of Urology, Tokyo Medical College*

A sensitive technique using reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR) has been used to detect circulating tumor cells in the peripheral blood of men with prostate cancer. We evaluated the clinical utility of this method for staging and monitoring for prostate cancer. Peripheral blood from 39 patients with prostate cancer and 7 non-prostate cancer controls was analyzed for prostate specific antigen (PSA) messenger RNA (mRNA) using RT-PCR. In 8 among 22 patients (36.4%) with clinically localized prostate cancer (T2 or T3), PSA mRNA was detected by RT-PCR (RT-PCR positive). Five out of 8 patients (62.5%) with regional lymph node and/or bone metastases were RT-PCR positive. The number of patients with RT-PCR positive was more frequent in a higher clinical stage. In 22 patients with clinically localized prostate cancer, 2 of the 9 patients who underwent radical prostatectomy had positive surgical margins and both patients were RT-PCR positive. Six of the 7 patients with negative surgical margin were RT-PCR negative. In the 9 cases that had been treated by combined antiandrogen blockade for metastatic prostate cancer, 4 patients whose serum PSA level were less than 4 ng/ml were all RT-PCR negative. More over 4 of 5 patients with more than 4 ng/ml of serum PSA level were RT-PCR positive. All control samples were RT-PCR negative.

This study suggested that this technique using RT-PCR may provide useful information in treating patients with prostate cancer, especially for candidates for radical prostatectomy. The value of this modality as a prognostic factor awaits for further follow-up.

(Acta Urol. Jpn. 45 : 25-30, 1999)

**Key words :** Prostate cancer, RT-PCR, PSA mRNA

### 緒 言

近年本邦において前立腺癌と診断される患者が急速に増加している。その理由の1つとして、前立腺癌の腫瘍マーカーである前立腺特異抗原 (prostate specific antigen : PSA) の測定法が開発され、広く臨床応用されるようになったことがあげられる。また、新たに前立腺癌と診断された症例の約50%が前立腺に限局した癌であるという報告もあり<sup>1)</sup>、早期発見の前立腺癌が増えるに従い、前立腺全摘除術の適応症例が増加している。しかしながら、臨床的に局所限局癌と診断され手術を受けた患者の50%までが、手術標本からみると過小診断であるといわれている<sup>2,3)</sup> また局所限局癌と考えられた症例のおよそ30%が治療後早期の段階で再発、再燃を起こしているとの報告<sup>4,5)</sup>もあり、このような症例では手術時にすでに微少転移が存在していた可能性が示唆される。現状の画像診断ならびに血清 PSA 値を用いての診断法のみでは、前立腺全摘

除術による根治治療の候補者を確実に鑑別するのは困難であり、新たな診断法を用いて、より正確な病期診断を行うことが必要である。

そこで最近 RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) 法を用いて、前立腺癌患者の末梢血中や骨髄、リンパ節より PSA の messenger RNA (mRNA) を検出することで、微少転移の予測や病期診断に役立てるという試みがなされている<sup>6-16)</sup> しかしその有用性については否定的な見解もあり<sup>11,13)</sup>、いまだ結論がでるまでには至っていない。そこで、未治療前立腺癌症例を中心に本法を施行し、臨床病期、血清 PSA 値、手術標本などと対比検討し、本法が臨床的にいかなる意義があるか明らかにすることを目的として本研究を行った。

### 対象と方法

対象は未治療前立腺癌30例、臨床的に転移を有する患者 (M1) で CAB (combined androgen blockade)

療法実施中の患者9例, および negative control として, 病理学的に前立腺癌が否定された前立腺肥大症患者5例, 健常成人男性1例, 健常成人女性1例であった. なお RT-PCR 法に際しての positive control として前立腺癌のリンパ節転移巣の培養細胞株で, PSA 産出細胞である LNCaP (lymph node carcinoma of the prostate) を用いた.

前立腺癌の診断は, 経直腸的超音波ガイド下に系統的6カ所生検を行って確定した. 血清 PSA 値の測定は, Markit-M PSA kit を使用した. 臨床病期の決定には直腸診, 経直腸的超音波検査, CT scan, bone scintigram を用い, TNM 分類にしたがった.

未治療前立腺癌30例では, 生検前に5mlの静脈採血を行いこれを RT-PCR 法に供した. そのうち T2, T3 と診断した9例で, neoadjuvant 療法として CAB 療法を3カ月間行い, 血清 PSA 値が測定限界以下となってから前立腺全摘除術を実施したが, その直前にも採血し RT-PCR 法に供した. 摘出した前立腺は前立腺癌取り扱い規約<sup>17)</sup>ののっとり検索し, 切除断端の癌浸潤の有無を判定し, 対比検討した. またすでに M1 と診断し CAB 療法を施行していた9例では, 任意の時期に採血し RT-PCR 法を実施した.

RT-PCR 法による PSA mRNA 検出の実際は以下のごとく実施した.

#### 1. 患者血液 sample の処理と保存

血液 sample は EDTA 採血管にて採取し, ただちに buffer にて希釈後 Ficoll 溶液 (Pharmacia) 6 ml と混和し 3,000 rpm にて30分遠心した. 上清の有核細胞層 (buffy coat) を抽出し, phosphate-buffered saline にて2~3回洗浄後 guanidine thiocyanate lysis buffer にて溶解した. つづけて RNA の抽出を行わない場合には $-80^{\circ}\text{C}$  にて保存した.

#### 2. RNA の抽出

Total RNA は acid guanidine thiocyanate-phenol-chloroform 法<sup>18)</sup> にて抽出した. Positive control として用いた LNCaP 細胞は10% heat inactivated fetal bovine serum 加 RPMI 1640 溶液にて培養した. 抽出した total RNA 量は紫外線分光器にて OD 値 260 nm にて計算した. RT-PCR 法の検出閾値の決定のために健常成人の全血 10 ml あたり 1, 10,  $10^2$ ,  $10^3$  個の LNCaP 細胞の割合となるように連続希釈し, PSA mRNA の検出の有無を確認した.

#### 3. RT-PCR

Complementary DNA (cDNA) の合成は  $4\mu\text{g}$  の total RNA と  $0.5\mu\text{g}$  の oligo (dT) を用い, 200 U の Reverse Transcriptase, 0.5 mM の dNTPs, 10 mM の dithiothreitol, 2 U の RNase inhibitor と共に溶液 (50 mM Tris HCl; pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM  $\text{MgCl}_2$ ; GibcoBRL) に溶解し RT 反応を行っ

た. 反応条件は  $37^{\circ}\text{C}$  1時間, 計  $21\mu\text{l}$  の反応液から  $5\mu\text{l}$  を PCR に用いた.

PCR は Israeli らの報告<sup>8)</sup> に準じ nested PCR で行った. 10 mM Tris HCl (pH: 8.3), 50 mM KCl, 15 mM  $\text{MgCl}_2$  の溶液 (TAKARA) を用い, primer は PSA の cDNA に特異的な oligonucleotide を使用した (outer primer: PSA-494; 5'-TACCCACTGC-ATCAGGAACA-3', PSA-960; 5'-CCTTGAAGCA-CACCATTACA-3', inner primer; PSA-559; 5'-ACACAGGCCAGGTATTTTCAG-3', PSA-894; 5'-GTCCAGCGTCCAGCACACAG-3'). PCR は programmable thermal controller (MJ リサーチ) にて行い, outer primer を用いた 1st PCR を計 40 cycle 施行 ( $95^{\circ}\text{C}$  で2分,  $60^{\circ}\text{C}$  で2分,  $72^{\circ}\text{C}$  で3分を1 cycle,  $95^{\circ}\text{C}$  で30秒,  $60^{\circ}\text{C}$  で2分,  $72^{\circ}\text{C}$  で2分を38 cycle,  $95^{\circ}\text{C}$  で30秒,  $60^{\circ}\text{C}$  で2分,  $72^{\circ}\text{C}$  で3分を1 cycle), 続いて inner primer を用いて 2nd PCR を計 25 cycle 行った ( $95^{\circ}\text{C}$  で2分,  $50^{\circ}\text{C}$  で2分,  $72^{\circ}\text{C}$  で3分を1 cycle,  $95^{\circ}\text{C}$  で30秒,  $50^{\circ}\text{C}$  で2分,  $72^{\circ}\text{C}$  で2分を23 cycle,  $95^{\circ}\text{C}$  で30秒,  $50^{\circ}\text{C}$  で2分,  $72^{\circ}\text{C}$  で3分を1 cycle).

PCR 産物は2.0%の agarose gel 上で電気泳動を行い, ethidium bromide にて染色し band を検出した. また ALF express sequencer (Pharmacia) を用いて PCR 産物の direct sequence を行い, PSA の遺伝子であることを確認した.

RNA sample が十分に抽出され, PCR がかかっていることを確認するため, human glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) の遺伝子配列からの primer (Lysate mRNA Capture Kit for RT-PCR: Amersham Life Science) を使用し, これを内因性 control とし並行して RT-PCR を施行した.

## 結 果

#### 1. LNCaP 細胞希釈試験結果

LNCaP 細胞を用いた希釈試験では, 1st PCR の 40 cycle 後, 健常成人の全血 10 ml あたり1個の LNCaP 細胞から PSA mRNA を検出した (Fig. 1). 25 cycle の 2nd PCR 後では, PCR 産物の band はさらに明確になり, 2nd PCR を行うことで本法の検出力がさらに高められた. また control として用いた LNCaP 細胞を含まない血液では, band が検出されなかったことより RT-PCR 法の高い感受性と特異性が示された. さらに, 今回の実験条件および用いた primer の設定は妥当であると考えられた.

#### 2. 前立腺癌患者と対照例の RT-PCR

未治療前立腺癌患者30例と CAB 療法施行中の前立腺癌患者9例の血清 sample において RT-PCR を施行した. なお, 患者 sample より抽出できた total

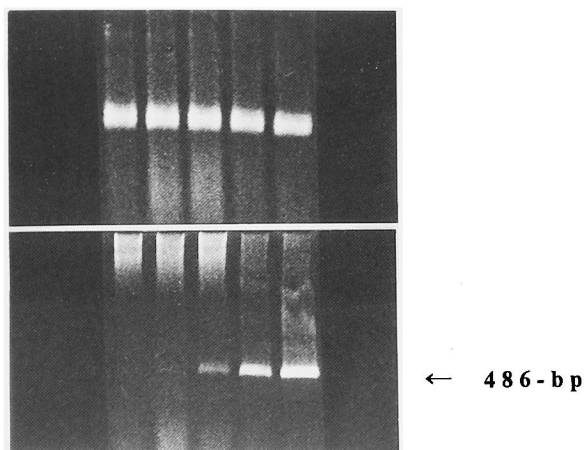


Fig 1. Detection of PSA transcripts by nested RT-PCR in serial dilutions of LNCaP cells in 10 ml blood samples of healthy donors. The concentration of LNCaP cells in each sample is indicated: 0=0 cell; 1=1 cell; 2=10 cells; 3=10<sup>2</sup> cells; 4=10<sup>3</sup> cells. The upper ethidium bromide gel depicts results of the first PCR using the control primer of G3PDH.; the lower ethidium bromide gel depicts results of the first PCR for PSA mRNA, which promotes the amplification of a 486-base pair (bp) fragment.

RNA 量の平均は 10.0 μg であり, RT-PCR を行うのに十分量であった.

Fig. 2 に positive control の LNCaP, 前立腺癌患者 2 例および negative control の成人男性の 1st および 2nd PCR の結果を示した. 電気泳動にて, 目的とする 355 base pair (bp) のところに band を認め, direct sequence にて PSA の遺伝子であることを確認した. Negative control の成人男性では 1st, 2nd ともに band は確認されなかった.

### 3. 臨床病期および分化度と RT-PCR

未治療前立腺癌患者30例の背景および RT-PCR の結果を Table 1 に示した. 30例中 T2 の 7例はすべて RT-PCR 陰性, T3 以上の症例では23例中13例 (56.5%) で RT-PCR 陽性であった. 全体的にみると臨床病期が進むにしたがい RT-PCR の陽性率は増加し, 両者の間で有意な相関を認めた (p=0.02).

なお, 生検標本による分化度と RT-PCR の結果も検討したが, 分化度を well, moderate, poor の 3群に分け検討した場合, 両者の間に相関を認めなかった (p=0.89).

### 4. 血清 PSA 値と RT-PCR

血清 PSA 値と RT-PCR の結果では血清 PSA 値を <4, 4~10, >10 ng/ml の 3群に分け検討した

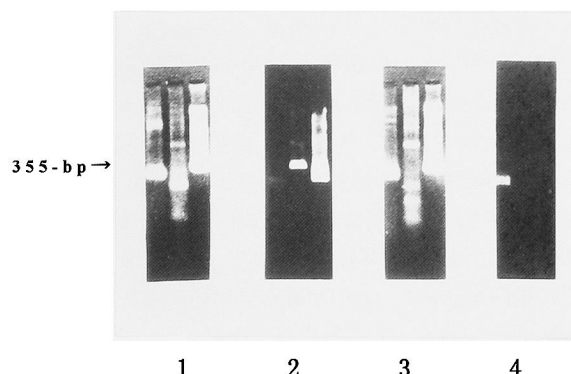


Fig 2. Detection of PSA transcripts in patients' blood. The results of nested RT-PCR assay of PSA and RT-PCR assay of G3PDH transcripts are shown, 1=LNCaP cells; 2=patient with M1; 3=patient with T3N0M0; 4= healthy young male volunteer. The left lane in each sample demonstrates the amplifications of G3PDH transcripts. The middle and right lanes demonstrate the amplifications of PSA transcripts with 1st and 2nd RT-PCR, respectively.

Table 1. Relationship between prognostic factors and RT-PCR results

| Factor             | No. positive/<br>No. tested (%) | P value |
|--------------------|---------------------------------|---------|
| Clinical stage     |                                 |         |
| T2                 | 0/ 7 ( 0%)                      | 0.02*   |
| T3                 | 8/15 (53%)                      |         |
| T3N1               | 0/ 1 ( 0%)                      |         |
| T3N1M1             | 5/ 7 (71%)                      |         |
| Histological grade |                                 |         |
| well               | 1/ 3 (33%)                      | 0.89*   |
| moderate           | 5/11 (46%)                      |         |
| poor               | 7/16 (44%)                      |         |
| Serum PSA (ng/ml)  |                                 |         |
| <4                 | 2/ 6 (33%)                      | 0.05*   |
| 4~10               | 3/13 (23%)                      |         |
| >10                | 8/11 (73%)                      |         |

RT-PCR: reverse transcriptase-polymerase chain reaction. PSA: prostate specific antigen. \* Spearman rank correlation test

が, 血清 PSA 値が高値であるほど RT-PCR の陽性率は高くなり, 両者の間で有意な相関を認めた (p<0.05).

### 5. 手術摘出標本と PCR

T2, T3 症例で neoadjuvant 療法後に前立腺全摘除術を行った 9 例で, 手術直前の RT-PCR の結果と手術標本の組織所見とを比較したが, 切除断端陽性例が 2 例であり, 2 例とも RT-PCR 陽性であった. 切除断端陰性例 7 例中の 6 例 (85.7%) が RT-PCR 陰性であり, 切除断端陽性例で RT-PCR 陽性となる傾向が見られたが, 統計学的には有意ではなかった

( $p=0.08$ )\*

#### 6. 再燃前立腺癌と RT-PCR

M1 症例で CAB 療法施行中の 9 例における RT-PCR の結果では、血清 PSA 値が 4 ng/ml 以下の非再燃癌 4 例はすべて RT-PCR 陰性であった。また血清 PSA 値が 5.1 から 2,300 ng/ml (中央値 80 ng/ml) の再燃癌 5 例中 4 例において RT-PCR 陽性であり、CAB 療法施行例の再燃の有無と RT-PCR の結果の間に相関を認めた ( $p<0.005$ )\*

Negative control である前立腺肥大症 5 例、健常男性 1 例、健常女性 1 例の計 7 例はすべて RT-PCR 陰性であった。

### 考 察

癌の新たな診断手法として RT-PCR 法を用い特定の腫瘍マーカーを検出し、それを産生している細胞、すなわち癌細胞を検出し癌病変そのものや微少転移を予測しようという試みが行われるようになってきた。Wu ら<sup>19)</sup> は乳癌患者の微少転移の予測のため、患者のリンパ節および骨髄より PCR 法を用いて keratin 19 の mRNA の検出を行っており、1992 年に Miyomura ら<sup>20)</sup> が急性リンパ性白血病に対して微少残存病変の検出に PCR 法を用いている。前立腺癌に関しては Moreno ら<sup>6)</sup> が、RT-PCR による PSA の mRNA の検出を試み、12 例の転移を有する前立腺癌患者のうち 4 例 (33%) が RT-PCR 陽性で、negative control である健常女性の volunteer と生検で前立腺肥大症と証明された患者の計 17 例で、すべて RT-PCR 陰性であったとしている。Katz ら<sup>7)</sup> は骨転移を有する前立腺癌 18 例中 14 例 (77.8%) で RT-PCR 陽性、臨床的に局所に限局した癌 65 例中 25 例 (38.5%) で RT-PCR 陽性であり、RT-PCR 法が敏感度、特異度ともに高い検査法であると報告した。Ghossein ら<sup>9)</sup> は臨床的に局所に限局した癌 25 例中 4 例 (16%)、局所進展癌もしくはリンパ節に転移を有する癌 10 例中 3 例 (30%) で RT-PCR 陽性であり、局所の進展にしたがい RT-PCR の陽性率が上昇するものの、遠隔転移を有する癌に関しては、72 例中 25 例 (35%) で RT-PCR 陽性とその陽性率が低く、遠隔転移例における検出力の低さを挙げている。また Seiden ら<sup>10)</sup> も臨床的に遠隔転移を有する未治療前立腺癌では 7 例全例が RT-PCR 陰性であり、とりわけ遠隔転移例に対する本法の敏感度の低さを指摘している。末梢血以外の組織を用いた検討では、Deguchi ら<sup>15)</sup> は 35 人の前立腺癌患者の骨髄を用いて RT-PCR による PSA mRNA の検出を試み、bone scintigram で骨転移を認めた 9 人中 5 人で RT-PCR

陽性、bone scintigram が陰性の 26 人中 7 人で RT-PCR 陽性であり、bone scintigram で検出できない骨転移を RT-PCR により検出しようと述べている。また、毛ら<sup>16)</sup> の 18 例の前立腺癌患者の骨盤リンパ節の吸引細胞を用いた検討では細胞診で陽性 6 例、class III 2 例および陰性 2 例の計 10 例が RT-PCR 陽性であり、15 例の膀胱癌の骨盤リンパ節の吸引細胞では全例 RT-PCR 陰性で、前立腺癌患者の骨盤リンパ節転移の診断に有用性が示唆されたとしている。われわれの結果では臨床的に局所に限局した癌では 7 例全例で RT-PCR 陰性、局所浸潤癌では 15 例中 8 例 (53.3%) で RT-PCR 陽性、遠隔転移例では 7 例中 5 例 (71.4%) で RT-PCR 陽性であり臨床病期がすすむにしたがい RT-PCR の陽性率が上昇し、臨床病期と RT-PCR の結果に相関を認めた。RT-PCR の結果の解釈は、敏感度と特異度を十分に考慮した上でなされるべきだが、われわれの結果からは、臨床病期を決定する際に有用な診断法になりうると考えられた。ただし流血中の癌細胞の 99% は転移病巣を形成することなく死滅するといわれており、たとえ RT-PCR 陽性で末梢血中に前立腺癌細胞の存在が示唆されても、それが即転移の存在を意味するものではない。RT-PCR の検出感度を高めることだけでなく、転移巣を形成する能力のある細胞をいかに検出しようかが重要であり今後の課題と思われる。

血清 PSA 値と RT-PCR の関係についてみると Ghossein ら<sup>9)</sup> は血清 PSA 値を 0~4, 4~20, 20~150, >150 ng/ml と 4 群に分け検討し、血清 PSA 値の上昇に伴い RT-PCR の陽性率も高くなり、両者の間に有意な相関を認めたと報告している。一方 Ennis ら<sup>12)</sup> は血清 PSA 値が 4 ng/ml 以下の 25 例中 7 例 (28%)、4~10 ng/ml の 127 例中 34 例 (27%)、10 ng/ml 以上の 75 例中 20 例 (27%) で RT-PCR 陽性であり、血清 PSA 値と RT-PCR の結果に相関を認めなかったとしている。われわれの検討では血清 PSA 値が 4 ng/ml 以下の 6 例中 2 例 (33%)、4~10 ng/ml の 13 例中 3 例 (23%)、10 ng/ml 以上の 11 例中 8 例 (73%) で RT-PCR 陽性であり、血清 PSA 値と RT-PCR の結果に相関を認めた。理論的に本法は、末梢血中に循環する前立腺癌細胞内で発現している PSA mRNA を検出するため、流血中の細胞の性状によって結果が左右されてしまう。すなわち、たとえ癌細胞が末梢血中を循環していてもその細胞内で PSA mRNA が発現していなければ、RT-PCR 陰性となる。また、血清 PSA 値が高値であっても、前立腺内に限局した癌細胞のみから PSA が産生されているならば、やはり RT-PCR 陰性という結果となるであろう。しかしながら、血清 PSA 値が高値となればなるほど、癌が進行している可能性が高いということ考

\* Fisher's exact probability test

えれば, われわれの結果のように血清 PSA 値の上昇に伴い RT-PCR 陽性率が高くなることは妥当であると考えられる. この点に関しては, さらなる症例の集積と予後の正確な追跡が必要であろう.

前立腺全摘除術による摘出標本と RT-PCR の関係に関しては, Katz ら<sup>7)</sup>は切除断端に癌浸潤が陽性であった15例中13例 (86.7%), 被膜浸潤28例中19例 (68%), 精嚢浸潤6例中5例 (83.3%) で RT-PCR 陽性であり, 前立腺全摘除術後の病理学的病期と PCR 法の結果に強い相関を認めたと報告している. Sokoloff<sup>11)</sup>らは病理学的に局所に限局した癌51例中30例 (59%), 局所浸潤癌18例中13例 (72%) で RT-PCR 陽性であったとし, 局所に限局した癌で RT-PCR の偽陽性が高いことを指摘し, また RT-PCR と病理学的病期, ならびに切除断端の癌浸潤の有無との間に有意な相関を認めなかったとしている. われわれの検討では, neoadjuvant 療法後前立腺全摘除術を行った9例では, 術直前の RT-PCR が陽性であった3例中2例で摘出標本の切除断端に癌細胞を認め, 陰性例6例では全例で切除断端に癌細胞を認めず, 切除断端陽性例で RT-PCR 陽性となる傾向が見られた. これらのことを考えると, 現状では RT-PCR の結果のみで前立腺全摘除術後の病理学的病期を推測することは危険であるが, 血清 PSA 値や他の画像診断と併用することによって, より正確な病期診断が可能となり, 前立腺全摘除術の適応の判断に有用であると考えられた.

再燃前立腺癌と RT-PCR の関係では, Ghossein ら<sup>9)</sup>は転移を有する前立腺癌症例で, hormone 療法に反応し, 血清 PSA 値が正常もしくは検出感度以下となり, 制癌されていると考えられた8例中5例 (62%) で RT-PCR 陰性であり, hormone 不応癌と考えられた57例中21例 (37%) で RT-PCR 陽性であったとしている. また, hormone 不応癌で血清 PSA 値が正常もしくは検出感度以下の症例は8例で, そのうちの3例 (38%) が RT-PCR 陽性であったとしている. この理由として血清 PSA 値が正常範囲内にあり癌の進行が抑えられていると考えられていても実際には転移巣において癌細胞の増殖が続いて起こっていると推測している. 血清 PSA 値が上昇を示す場合には癌の再燃, 進行を意味することは異論のないところであるが, 血清 PSA 値が正常範囲内にあっても RT-PCR 法が陽性の場合, 実際には癌の増殖を十分に抑えられていない可能性も考慮する必要がある. われわれの検討では, CAB 療法施行中の転移を有する前立腺癌症例の RT-PCR の結果, 血清 PSA 値が 4 ng/ml 以下の非再燃癌と考えられた4例すべて RT-PCR 陰性, また血清 PSA 値が上昇し再燃癌と診断した5例中4例において RT-PCR 陽性であり,

CAB 療法施行症例の再燃, 非再燃の有無と RT-PCR の結果で相関を認めた. これらのことを考えあわせると, 本法は前立腺癌の再燃の診断に応用できると考えられる. さらに血清 PSA 値より敏感に再燃を診断できる可能性も示唆された.

本法は非常に感度が高いゆえに特異性が低下してしまう懸念がある. Smith ら<sup>21)</sup>は肺癌, 卵巣癌, 骨髄性白血病の培養細胞から RT-PCR 法により PSA mRNA が検出されたと報告している. しかしながら彼等の研究においては, 6人の女性を含めた13人の健常人すべてにおいても PSA mRNA が検出されており, RT-PCR 法は非常に sensitive であるがゆえに偽陽性の割合も高いことが示唆されている. また対象症例の違いや, 実際の RT-PCR の手技や protocol の違い, すなわち RNA の抽出法, 用いる primer および PCR の条件設定の相違などによっても, RT-PCR 法の感度, 特異度に差が生じる可能性がある. なおわれわれの研究においては対照とした前立腺肥大症5例, 健常男性1例, 健常女性1例のすべてにおいて RT-PCR 陰性であったし, Katz ら<sup>7)</sup>, Ghossein ら<sup>9)</sup> および Seiden ら<sup>10)</sup>の報告でも negative control である健常者の volunteer, 前立腺肥大症を含む良性泌尿器科疾患の患者すべてで RT-PCR 陰性で, 本法の特異性の高さをしめしており, いかに RT-PCR の感度をいかにしながら検査の特異性を維持させるか, 本法を臨床応用するのに, 最も注意しなければいけない点であろう.

今後さらに多数例を対象とした多くの報告が続き, RT-PCR 法による末梢血中の PSA mRNA の検出の最終的な役割が決まるであろう. 現時点では, 画像診断, 血清 PSA 値, 直腸診などに本法を併用することでより正確な病期診断, 再燃診断ができると考えられる. 特に前立腺全摘除術の適応の決定に際し, surgical failure の予測が可能で, 有用であると思う.

## 結 語

1. Nested RT-PCR 法に用いて, 前立腺癌患者の末梢血中より前立腺腫瘍マーカーである PSA の mRNA を検出し, 臨床診断, 血清 PSA 値, 手術標本などと対比検討し, 本法が臨床的にいかなる意義があるかを検討した.
2. 未治療前立腺癌においては臨床病期がすすむにしたがい RT-PCR の陽性率が上昇し, 本法が病期診断を行う際の有用な情報を提供しうる可能性が示唆された.
3. Neoadjuvant 療法 (CAB 療法) 後の前立腺全摘除術施行症例において, 切除断端陽性例で RT-PCR 陽性となる傾向が見られ, 本法が手術適応を決定する際の補助的手段として有用であると考えられ

た。

4. CAB 療法施行中の転移を有する症例では再燃の有無と RT-PCR の結果に相関を認め、前立腺癌の再燃の診断に応用できる可能性が示唆された。

稿を終えるにあたり、御指導、御稿閲を賜った恩師三木誠教授に深甚なる謝意を表します。また、終始御協力を頂きました栄研化学株式会社細胞工学研究部の納富継宣氏および渡辺恵子さんに心から感謝いたします。

## 文 献

- 1) Scardino PT, Weaver R and Hudson MA: Early detection of prostate cancer. *Hum Pathol* **23**: 211-222, 1992
- 2) Lu-yao G, McLerran D, Wasson J, et al.: An assessment of radical prostatectomy. Time trends, geographic variation, and outcomes. The Prostate Patient Outcomes Research Team. *JAMA* **269**: 2633-2655, 1993
- 3) Voges GE, McNeal JE, Redwine EA, et al.: Morphologic analysis of surgical margins with positive findings in prostatectomy for adenocarcinoma of the prostate. *Cancer* **69**: 520-526, 1992
- 4) Schellhammer PF: Radical prostatectomy. patterns of local failure and survival in 67 patients. *Urology* **31**: 191-197, 1988
- 5) Lerner SP, Seale-Hawkins C, Carlton CE, et al.: The risk of dying of prostate cancer in patients with clinically localized disease. *J Urol* **146**: 1040-1045, 1991
- 6) Moreno JG, Croce CM, Fischer R, et al.: Detection of hematogenous micrometastasis in patients with prostate cancer. *Cancer Res* **52**: 6110-6112, 1992
- 7) Katz AE, Olsson CA, Raffo A, et al.: Molecular staging of prostate cancer with the use of an enhanced reverse transcriptase-PCR assay. *Urology* **43**: 765-775, 1994
- 8) Israeli RS, Miller WH Jr, Su SL, et al.: Sensitive nested reverse transcription polymerase chain reaction detection of circulating prostatic tumor cells: comparison of prostate-specific membrane antigen and prostate-specific antigen-based assays. *Cancer Res* **54**: 6306-6310, 1994
- 9) Ghossein RA, Scher HI, Gerald WL, et al.: Detection of circulating tumor cells in patients with localized and metastatic prostatic carcinoma: clinical implications. *J Clin Oncol* **13**: 1195-1200, 1995
- 10) Seiden MV, Kantoff PW, Krithivas K, et al.: Detection of circulating tumor cells in men with localized prostate cancer. *J Clin Oncol* **12**: 2634-2639, 1994
- 11) Sokoloff MH, Tso C-L, Kaboo R, et al.: Quantitative polymerase chain reaction does not improve preoperative prostate cancer staging: a clinicopathological molecular analysis of 121 patients. *J Urol* **156**: 1560-1566, 1996
- 12) Ennis RD, Katz AE, Vries GM, et al.: Detection of circulating prostate carcinoma cells via an enhanced reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay in patients with early stage prostate carcinoma: independence from other pretreatment characteristics. *Cancer* **79**: 2402-2408, 1997
- 13) Cremoux P, Ravery V, Podgorniak MP, et al.: Value of the preoperative detection of prostate-specific-antigen-positive circulating cells by nested RT-PCR in patients submitted to radical prostatectomy. *Eur Urol* **32**: 69-74, 1997
- 14) 伊藤貴章, 大久保雄平, 三木 誠, ほか: RT-PCR 法による PSA の mRNA の検出. *泌尿器外科* **10**: 727-731, 1997
- 15) Deguchi T, Yang M, Ehara H, et al.: Detection of micrometastatic prostate cancer cells in the bone marrow of patients with prostate cancer. *Br J Cancer* **75**: 634-638, 1997
- 16) 毛 厚平, 星 宣次, 高橋とし子, ほか: 前立腺癌患者の血中および骨髄内リンパ節吸引細胞からの RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) 法を用いた PSA mRNA の検出. *日泌尿会誌* **89**: 596-603, 1998
- 17) 日本泌尿器科学会, 日本病理学会編: 前立腺癌取り扱い規約, 第2版, 金原出版, 東京, 1992
- 18) Chomczynski P and Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Ann Clin Biochem* **162**: 156-159, 1987
- 19) Wu A, Ben-Eyra J and Columbero A: Detection of micrometastases in breast cancer by PCR. *Lab Invest* **62**: 109A, 1990
- 20) Miyomura N, Tanimoto M, Morishima Y, et al.: Detection of Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia by polymerase chain reaction: possible eradication of minimal residual disease by marrow transplantation. *Blood* **79**: 1366-1370, 1992
- 21) Smith MR, Bigger S and Hussain M: Prostate-specific antigen messenger RNA is expressed in non-prostate cell: implications for the detection of micrometastases. *Cancer Res* **55**: 2640-2644, 1995

(Received on August 17, 1998)  
(Accepted on November 20, 1998)

(迅速掲載)