

## ユーロピウム (Europium) を標識物質とした Delfia PAP キット®を用いた血清前立腺性酸性 ホスファターゼ測定の検討

千葉大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 島崎 淳教授)

秋元 晋, 大木 健正, 市川 智彦

赤倉 功一郎, 島崎 淳

### MEASUREMENT OF SERUM PROSTATIC ACID PHOSPHATASE (PAP) BY DELFIA PAP KIT® USING EUROPIUM AND CLINICAL EVALUATION IN PATIENTS WITH PROSTATE CANCER

Susumu Akimoto, Takemasa Ohki, Tomohiko Ichikawa,  
Koichiro Akakura and Jun Shimazaki

*From the Department of Urology, School of Medicine, Chiba University*

Fundamental and clinical studies of serum prostatic acid phosphatase (PAP) detected by a Delfia PAP kit® were performed. The system is a time-resolved fluoroimmunoassay using europium as a tracer. The lower limit of detection was 0.2 ng/ml. Sera from 54 patients with prostate cancer, 20 with benign prostatic hypertrophy, 20 with urological malignancies other than prostate cancer and 140 adult males over 46 years old were determined. From the mean+2 S.D. of serum PAP values obtained on the adult males, 1.5 ng/ml was considered as the upper normal level of adult males. By calculating the efficiency and ROC curve using the PAP values of prostate cancer and benign prostatic cancer, 2.5 ng/ml was decided as a cut-off value of this kit. The positive rates of adult males, prostate cancer, benign prostatic cancer and urological malignancies other than prostate cancer were 0.7%, 65%, 20% and 10%, respectively. The sensitivity of stage A2, B2, C and D1+D2 was, 0%, 0%, 64% and 83%, respectively. The efficiency of the Delfia PAP kit® was 52% and that of the Markit M PA kit® was 71%. The correlation between the values assayed with the Delfia PAP kit® and the Dinabot PAP kit® was very high; the value obtained with the Delfia PAP kit® was about 80% of that obtained with the Dinabot PAP kit®.

(Acta Urol. Jpn. 40: 987-993, 1994)

**Key words:** Prostatic acid phosphatase, Prostate cancer, Delfia PAP

#### 緒 言

前立腺性酸性ホスファターゼ (PAP) の測定は、前立腺癌の診断や治療後の経過観察に広く用いられてきた<sup>1-4)</sup>。しかし、PAP は、低病期での感度が低いこと<sup>5)</sup>、再発、再燃時に腫瘍マーカーが再上昇する場合でも前立腺特異抗原 (PSA)、ガンマセミノプロテイン ( $\gamma$ -Sm) よりも遅れること<sup>6)</sup> などより、現在では PSA が最も信頼のおける前立腺癌の腫瘍マーカーとされる<sup>6)</sup>。

反面、PAP には、PSA では高率な前立腺肥大症の陽性率が低いこと、急性炎症時の一過性上昇幅が

PSA や  $\gamma$ -Sm より少ないことなど<sup>7)</sup>、PSA がない利点がある。

Kabi Pharmacia Diagnostics 社の蛍光免疫測定法による Delfia PAP キット®は、<sup>63</sup>Eu (ユーロピウム) 標識抗体を用いた micro plate 固相法による抗原抗体反応により、低濃度よりの測定を可能とした。今回、本キットについて基礎的および臨床的検討を行ったので報告する。

#### 対象および方法

未治療前立腺癌54例、前立腺肥大症20例、前立腺癌以外の泌尿器科癌20例、男子成人140例、計234例を材

料とした。男子成人は、1992年千葉県館山市にて行われた前立腺集団検診にて直腸指診にて異常所見を認めず、経腹的超音波断層法にて、前立腺重量が40g未満の46歳～79歳のものを健常とみなして対象とした。前立腺の重量は、既報の方法<sup>8)</sup>にて行った。前立腺肥大症は、手術にて組織学的に確認されたものを用いた。前立腺癌以外の泌尿器科癌の内訳は、膀胱腫瘍11例、腎癌5例、精巣腫瘍3例、陰茎腫瘍1例であり、年齢は35歳から80歳、平均63歳である。これらは、直腸指診などで前立腺癌を否定した。前立腺癌の臨床病期分類は、前立腺癌取り扱い規約<sup>9)</sup>に準じた。

未治療前立腺癌および前立腺肥大症の検体を用いて、大日本製薬社のマーケットM PA<sup>®</sup> キット<sup>10)</sup>によるPSAと比較した。また、未治療前立腺癌の検体を用いて、ダイナボット社のPAPキット<sup>11)</sup>との相関性を検討した。Delfia PAPキット<sup>®</sup>は、時間分解蛍光免疫測定法であり、マウス由来の二種の単クロナール抗体を用いた固相2ステップのサンドイッチ型測定法である。標識物質は、ユーロビウム (Eu) を用いた。操作手順を示す。固相の anti-PAP IgG と検体中の PAP を反応させた後、Eu 標識 anti-PAP IgG (tracer 溶液) を加えて再度インキュベーションし、増強試薬を加える。このことにより、tracer から Eu イオンが遊離して、新たなキレート形成する。Eu キレートは界面活性剤のミセル中に取り込まれるため、この蛍光を測定した。測定値は PAP を含まない blank との差を用いた。全測定時間は約3時間であった。基礎的検討では検体は3-5重測定し平均値を用いた。臨床検体はできるだけ2重測定を行って平均を求めた。

二群間の有意差の検定は分散の等しくない二群間の

t 検定を用いた。感度の設定では、Porter の方法<sup>12)</sup>を用いた。

## 結 果

### 1) 基礎的検討

#### a) 標準曲線

標準曲線は、ヒト PAP をブタ血清およびリン酸緩衝液に希釈して作製した。0.5, 1.5, 10, 100, 200 ng/ml の5点のブタ血清希釈液を用いた標準血清にて標準曲線を作成した (Fig. 1)。各点は、3重測定し、平均を用いた。0 ng/ml は、平均 992 cps 蛍光強度で、100 ng/ml は平均 724,346 cps 蛍光強度であり、その間は両対数でプロットすると、PAP 値と蛍光強度との間は直線関係のみた。これ以上ではやや低下した。

#### b) 再現性

同時再現性については、低濃度 (L)、高濃度 (H) およびその中間 (M) の、三種類のヒト血清をおのの10回同時に測定し、その再現性を検討した。L, M, H それぞれの平均値および分散係数 (C.V.) は、3.1 ng/ml, 1.6%, 16.5 ng/ml, 1.6% および 97.9 ng/ml, 3.8% であり、良好な再現性であった。日間再現性を求めるため、H, M, L をそれぞれ4日間連続して測定した。その間検体は、-20°C にて保存し凍結融解は行わなかった。L, M, H それぞれの平均値および C.V. は、3.0 ng/ml, 9.4%, 16.4 ng/ml, 9.0% および 101.0 ng/ml, 3.0% であり、いずれも C.V. は10%以下であり、良好な再現性であった。

#### c) 希釈試験

H, M, L の、種類をブタ血清で2～16倍希釈したが、いずれの検体も良好な希釈直線性を示した (Fig. 2)。

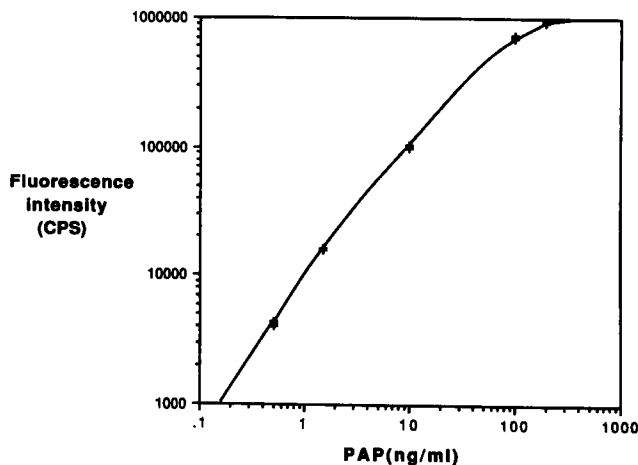


Fig. 1. Standard curve.

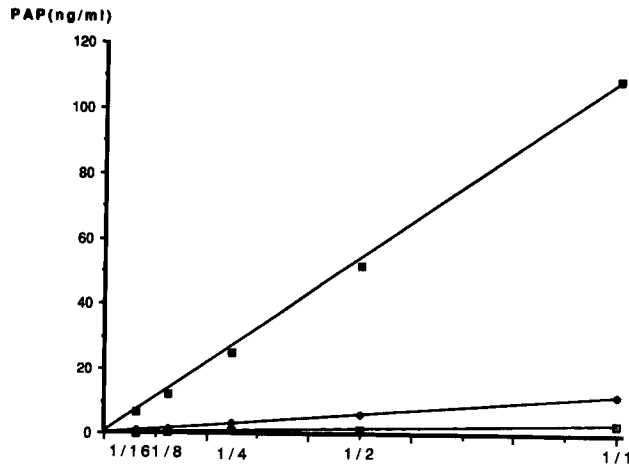


Fig. 2. Dilution test.

## d) 回収率試験

測定値 2.2, 8.5 および 17.3 ng/ml の血清に 10, 27.5 ng/ml の標準血清を 1 : 1 で添加して, 回収率試験を行ったが, 回収率は, 82~104%であった。

## e) 感度試験

最小検出感度を求めるために, 0.5 ng/ml 標準血清をブタ血清にて希釈し測定した。各濃度と blank とのカウンターの差と各濃度と 0 濃度標準血清とのカウンターの 2SD の和は, 1/5 に希釈したものでは後者が大きく, 4/5, 3/5, 2/5 に希釈したものでは前者のほうが大きかった。このために, 最小検出感度は 0.2 ng/ml と考えた。

## 2) 臨床的検討

## a) 男子成人の PAP

男子成人の正規確率分布は, 直線を示し, ほぼ正規分布とみなせた。年代別の平均値および標準偏差を Table 1 に示すが, 年代別の PAP 値の差をみなかった。前立腺重量と PAP 値との関係について, 前立腺重量が増すにつれ PAP 値は高くなったが, 統計的な差はみられなかった。前立腺重量と PAP との相関性も  $r=0.21$  と低いものであった。男子成人の平均値+2SD は 1.41 ng/ml であり, これにより男子成人の正常上限値は 1.5 ng/ml と考えた。

## b) 前立腺肥大症, 前立腺癌および前立腺癌以外の泌尿器科癌の PAP

20例の前立腺肥大症の PAP 値は, 0.74 ng/ml から 3.1 ng/ml まで分布し, 平均値および SD は, 1.70 ng/ml と 0.72 ng/ml であった (Fig. 3)。前立腺癌の各病期別では B までは男子成人と変わらず, C とな

Table 1. PAP values assayed with the Delfia kit for adult males according to age and prostate weight

(1) Patients Age		
40 - 49	( 3)*	0.94±0.14**
50 - 59	(23)	0.85±0.21
60 - 69	(74)	0.92±0.31
70 - 79	(39)	0.84±0.17
(2) Weight of prostate		
10 g >	( 4)	0.77±0.09
10 - 19 g	(63)	0.85±0.19
20 - 29 g	(63)	0.91±0.33
30 - 39 g	(17)	0.98±0.18

\* Figures in parentheses are, number of patients.

\*\* ng/ml, mean±S.D.

り上昇をみた。前立腺癌以外の泌尿器科癌の PAP は前立腺肥大症の範囲と同じであった。

## c) 正常上限値の設定

男子成人の正常上限値である 1.5 ng/ml を体キットの正常上限値として用いると, 大半の前立腺肥大症は異常値となり腫瘍マーカーの本来の目的である前立腺癌との鑑別が困難となるので, 前立腺癌と前立腺肥大症の検体を用いて, 検出率, 特異性および診断効率を算定した。診断効率が最も高いのは, 2.6 ng/ml であったので, 2.5 ng/ml を正常上限値とした (Fig. 4)。これは, 受信者操作特性曲線 (ROC 曲線) にも妥当なものであった (Fig. 5)。

この値に cut off としたとき, 男子成人, 前立腺癌, 前立腺肥大症および前立腺癌以外の泌尿器科癌で

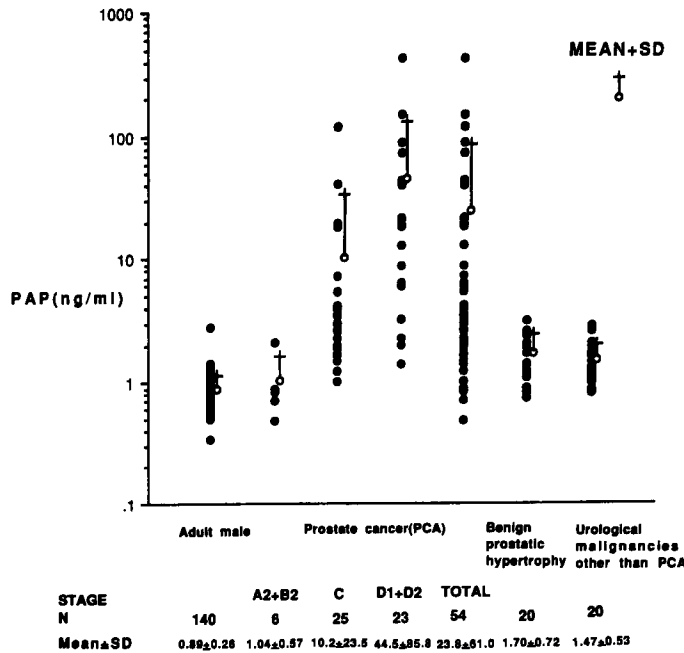


Fig. 3. Scattergram of PAP values assayed with the Delfia kit.

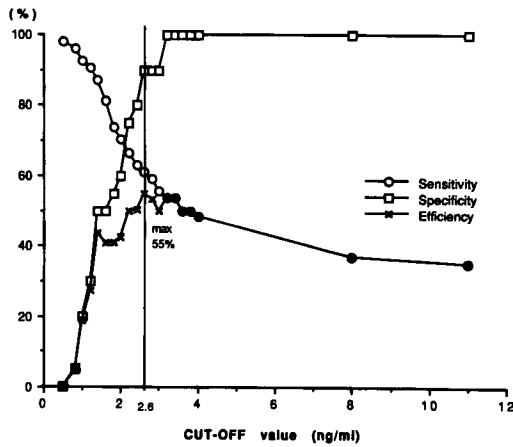


Fig. 4. Sensitivity, specificity and efficiency.

の異常値出現率は、それぞれ0.7%, 65%, 20%および10%であった。また、病期別の検出率は、病期 A2, B2, C, D1+D2 それぞれ 0%, 0%, 64%および83%であり、低病期の検出率は低かった。マーケット M PA キット®にて、前立腺癌および前立腺肥大症を測定したので、Delfia PAP キット®との前立腺癌の病期別の正常値、異常値の組み合わせ表を作製した (Table 2)。診断効率は前者が71%, 後者が52%と、前者が約20%高かった。正診率でも、Delfia PAP

キット®69%, マーケット M PA キット®84%と、後者が優れていた。Delfia PAP キット®とマーケット M PA キット®との相関性をみた 両者の相関性は低かった (Fig. 6)。

ダイナボット PAP キット®にて前立腺癌の検体を測定して、デルフィア PAP キット®との相関性を検討した。相関性は、非常に良かったが、デルフィア PAP®での測定値は、ダイナボット PAP キット®での測定値の約80%であった (Fig. 7)。

### 考 察

本キットは、希釈することなく 0.2~100ng/ml の範囲を測定でき、これは前立腺癌では転移病期も含めて96%の検体を測定でき、希釈の必要がなかった。検査所要時間も約3時間と、短時間であり、測定範囲の広さを考えると優れたキットと考えた。

また、近年検診項目の1つとして前立腺が組み込まれ、フィールド方式および人間ドック方式における前立腺検診<sup>13,14)</sup>が普及してきたが、この分野でも高感度 PAP は、期待できる。山中ら<sup>15)</sup>は、50歳以上の前立腺検診者を対象として、酵素免疫測定キットを用いて、男子健康成人の95%は1.4 ng/ml 以下と報告したが、これは今回の検討での1.41 ng/ml と大差なく、この結果は、本邦における50歳以上の男子成人の正常

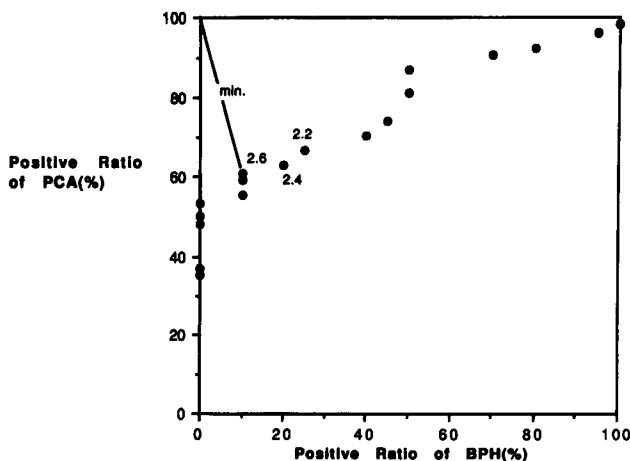


Fig. 5. ROC curve.

Table 2. Number of the patients with prostate cancer showing positive or negative by the Delfia PAP kit® and the Markit M PA kit® according to stage

	PAP (+) PSA (+)	PAP (+) PSA (-)	PAP (-) PSA (+)	PAP (-) PSA (-)
Stage				
A2	0	0	0	3
B2	0	0	2	1
C	14	2	8	1
D1+D2	18	1	3	1

(+), (-) showed abnormal value, normal value, respectively.

PAP: Delfia PAP kit

PSA: Markit MPA kit

Efficiency of Delfia PAP kit=51.9%

Efficiency of Markit MPA kit=70.8%

値と考えられる。PSA は、年齢とともに上昇すると報告され、各年代ごとの正常上限値を設定して癌の検出に応用され<sup>16)</sup>、年齢を60歳未満から80歳以上を4段階に分けた場合、年齢とともに上昇する。また PSA は前立腺の大きさで変化し、クルミ大以下、小鶏卵大、鶏卵大以上の3分類で分けた場合、この順に上昇する<sup>13)</sup>。しかしながら 今回の PAP の測定では、年代による差を認めず、PSA とは異なる結果であった。

2.5 ng/ml を本キットの正常上限値としたが、前立腺肥大症の特異性が80%とやや低かった。これは全例手術を要した大きな腺腫であったためと推測した。千葉大学における以前の検討にて、栄研キットでの前立腺肥大症の特異性は89~93%であった<sup>17)</sup>が、15例の手術例のみの検討では77%と低下していた<sup>17)</sup>。

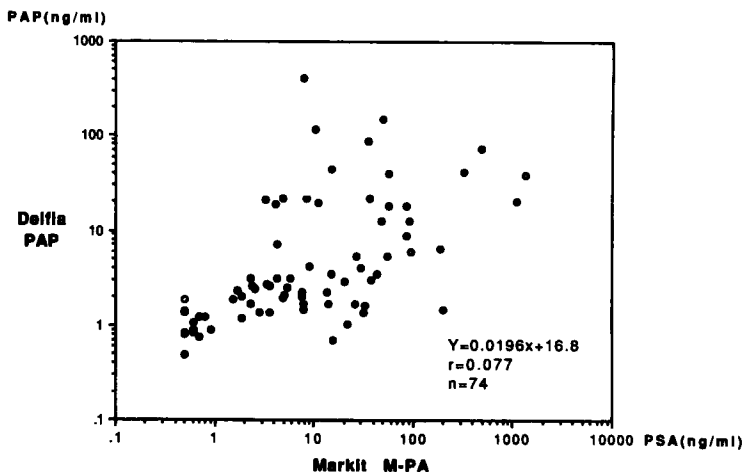


Fig. 6. Correlation between Delfia PAP kit® and Markit M PA kit®.

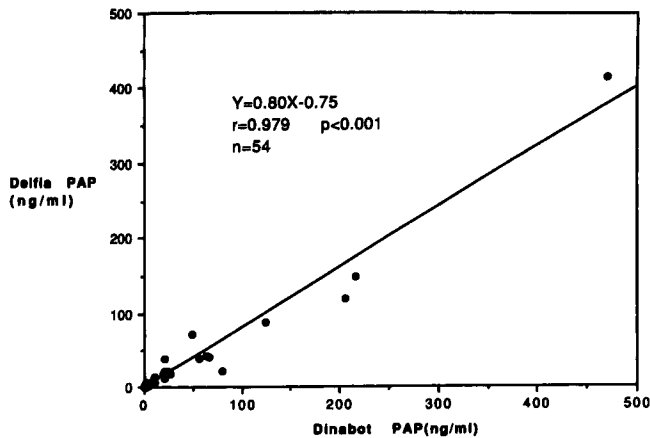


Fig. 7. Correlation between Delfia PAP kit® and Dinabot PAP kit®.

前立腺癌では、病期別の検出率については欧米や本邦の従来報告と大差ないものであり、低病期において低く、また転移病期において10数%の正常値例のあることは本キットでも同様であった。診断効率で、本キットは、マーキット M PA®よりも約20%低い成績であったが、診断効率や正診率で評価した場合、PSAは、PAPよりも優れていることは今までの発表と同様であり、診断時での PSA の優位性が示された。しかし、PSA と PAP とは相関性が低く、また PSA 正常値、PAP 異常値の前立腺癌が3例(病期C, 2, D2, 1)あったことから、診断時マーカーの併用を考えると、PSA と同じセリン蛋白分解酵素である $\gamma$ -Smよりは、PAP との併用のほうが有用性が高いと考えた。

PAP の他キットとの相関は、ダイナボットキットのみ行なったが、相関性は良好で測定値は、ダイナボットキットでの値の約80%であった。このことと、栄研キット値とダイナボットキット値がほぼ同じであること<sup>1)</sup> 栄研キットでの正常上限値は、3 ng/ml であることより、Delfia PAP キット®の正常上限値の設定が 2.5 ng/ml としたことは、妥当といえよう。

## 結 語

ユーロピウムを標識物質とした時間分解蛍光免疫測定法である Delfia PAP キットを用いて基礎的および臨床的検討を行い以下の結論をえた。

1. 測定検出感度は、0.2 ng/ml であった。
2. 46歳以上の男子成人の平均値+2SD は 1.41 ng/ml であったので、男子成人の正常上限値は 1.5 ng/ml とした。
3. 前立腺癌および前立腺肥大症より、診断効率、

ROC 曲線をえて、両者の鑑別が最も良好な 2.5 ng/ml を本キットの cut off とした。この結果、男子成人、前立腺癌、前立腺肥大症および前立腺癌以外の泌尿器科癌での異常値出現率は、それぞれ 0.7%、65%、20%および10%であった。

4. 前立腺癌の病期別の検出率は、病期 A2, B2, C, D1+D2 それぞれ 0%、0%、64%および83%であった。

5. マーキット M PA キット®による PSA と本 PAP にて、前立腺癌および前立腺肥大症を測定した。Delfia PAP キット®およびマーキット M PA キット®の診断効率は前者が52%、後者が71%と、後者が約20%高かった。正診率でも、前者が69%、後者が84%と、後者が優れていた。

7. Delfia PAP キット®とダイナボット PAP キット®との相関性は、非常に良く Delfia PAP キット®での測定値は、ダイナボット PAP キット®での測定値の約80%であった。

## 文 献

- 1) 秋元 晋, 赤倉功一郎, 島崎 淳: 前立腺癌における腫瘍マーカー(前立腺性酸性ホスファターゼ,  $\gamma$ -セミノプロテイン, 前立腺特異抗原)の検討. 泌尿紀要 34: 1389-1396, 1988
- 2) 秋元 晋, 赤倉功一郎, 正井基之, ほか: 病期 D2 前立腺癌内分泌療法による前立腺性酸性ホスファターゼ,  $\gamma$ -セミノプロテインおよび前立腺特異抗原の変動と予後. 泌尿紀要 36: 783-791, 1990
- 3) 齊藤 泰: 前立腺癌の腫瘍マーカーとしての酸性フォスファターゼ. 日泌尿会誌 82: 1723-1731, 1991
- 4) Lowe FC and Trauzzi SJ: Prostatic acid

- phosphatase in 1993. Its limited clinical utility. *Urol Clin North Am* 20: 589-595, 1993
- 5) 秋元 晋, 正井基之, 北川憲一, ほか: PSA. 泌尿器外科 4: 1065-1072, 1991
  - 6) Oesterling JE: Prostate specific antigen: a critical assessment of the most useful tumor marker for adenocarcinoma of the prostate. *J Urol* 145: 907-923, 1991
  - 7) 公平昭男, 絵鳩哲哉, 中井川昇, ほか: 急性前立腺炎および急性尿閉における偽陽性からみた前立腺腫瘍マーカーの評価. 泌尿器外科 6: 1123-1127, 1993
  - 8) 島崎 淳, 布施秀樹, 市川智彦, ほか: 前立腺集団検診. 協栄生命健康事業団研助成論文集 4: 13-21, 1988
  - 9) 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, 東京, 1992
  - 10) 栗山 学, 江崎奈奈, 篠田育男, ほか: 新しいEIAによる前立腺特異抗原の測定, 特に早期前立腺癌と前立腺肥大症との鑑別診断における有用性について. 日泌尿会誌 84: 244-250, 1993
  - 11) 榊鏡年清, 安藤 研, 島崎 淳: Enzymeimmunoassay 法による前立腺性酸性フォスファターゼの検討. 泌尿紀要 30: 1691-1695, 1984
  - 12) Porter WR: Proper statistical evaluation of calibration. *Anal Chem* 55: 1290A, 1983
  - 13) 今井強一, 鈴木孝憲, 栗原 潤, ほか: 前立腺集団検診における血清前立腺抗原値の意義. 日泌尿会誌 83: 1484-1489, 1992
  - 14) 内藤誠二, 小藤秀嗣, 熊澤浄一, ほか: 福岡県におけるドック前立腺検診の現状と問題点. 日泌尿会誌 84: 1227-1235, 1993
  - 15) 山中英寿, 湯浅久子, 名取悦子, ほか: Amplified enzyme linked immunoassay (AELIA) による前立腺酸性ホスファターゼ (PAP) 測定—前立腺集団検診および臨床への応用—: 臨病理 35: 1154-1158, 1987
  - 16) Oesterling JE, Jacobsen SJ, Chute CG, et al.: Serum prostate-specific antigen in a community-based population of healthy men: establishment of age-specific reference ranges. *JAMA* 270: 860-864, 1993
  - 17) 秋元 晋, 赤倉功一郎, 布施秀樹, ほか: 前立腺特異抗原 (PA) の前立腺癌における検討. 泌尿紀要 34: 636-642, 1988

(Received on June 1, 1994)  
(Accepted on July 29, 1994)

(迅速掲載)