

Immunoenzyme assay 法による 前立腺性酸性フォスファターゼの臨床的検討

日本医科大学附属病院泌尿器科学教室 (主任: 秋元成太教授)
吉田 和弘, 佐藤 三洋, 西村 泰司, 秋元 成太

CLINICAL APPLICATION OF IMMUNOENZYME ASSAY FOR PROSTATIC ACID PHOSPHATASE

Kazuhiro YOSHIDA, Sanyo SATO, Taiji NISHIMURA
and Masao AKIMOTO

From the Department of Urology, Nippon Medical School

We compared the values obtained by double-antibody radioimmunoassay (RIA) and immuno-enzyme assay (IEA) for measuring the prostatic acid phosphatase (PAP) in human serum. Mean PAP value of IEA in normal persons was 0.582 ± 0.228 ng/ml (M+2SD, 1.038 ng/ml). Correlation of two methods in benign prostatic hypertrophy (BPH) and prostate cancer patients was excellent [$r=0.9504$, $Y(\text{IEA})=-0.4378+0.6529X(\text{RIA})$]. False positive cases were two by IEA and one by RIA in BPH patients.

(Acta Urol. Jpn. 35: 1819-1822, 1989)

Key words: Prostatic acid phosphatase, Immunoenzyme assay, Prostate cancer

はじめに

前立腺癌の血清学的検査法として、酸性フォスファターゼの測定は不可欠である。従来の酵素法では、アイソエンザイムの分画より前立腺性酸性フォスファターゼの測定がなされるようになったが、測定感度および特異性の点で劣ることが知られている。1974年 Cooper らにより開発された、radioimmunoassay 法による前立腺性酸性フォスファターゼ (以下、PAP-RIA) 測定は、現在もっとも普及した検査法であり、その特長として測定感度が優れていることである。しかし、非特異的蛋白も測定する欠点を有しているため false positive を示す率も高い¹⁾。最近では、新たに酵素標識法を原理とした免疫化学的酵素抗体法による前立腺性酸性フォスファターゼの測定 (enzyme immunoassay; 以下 PAP-EIA 法) が報告され、その方法においても測定原理に違いをもつ幾つかの測定法が考案され臨床応用されている。今回、われわれは帝國臓器製薬株式会社が開発²⁾した solid phase enzyme immunoassay 法による前立腺性酸性フォスファターゼ測定キット (TZR-516; PAP テスト テイゾー) の提供を受ける機会を得たので臨床応用を試み

た。また、PAP-RIA (栄研) キットと、われわれの試みた免疫酵素測定法 (immunoenzyme assay; 以下 IEA 法) を用いて、同時採血した患者血清について比較検討したので報告する。

方法および対象

われわれが用いた IEA 法の測定原理を Fig. 1 に示した。検体 (血清) 中の PAP を PAP に特異的なモノクローナル抗体に結合させ、他の成分を除去したのち基質を反応させる。酵素反応により生じた基質分解物を呈色剤・反応停止液により発色させたのち、その吸光度を測定する。同時に、測定にて得られた標準曲線を用いて検体中の PAP 濃度を求めるものである。簡単な操作法を Fig. 2 に示した。一方、PAP-RIA 法 (栄研キット) は抗体 (PAPase 抗血清) と結合した患者血清 (抗原) を ^{125}I 標識 PAPase とインキュベーションしたのち、第2抗体 (抗家兎 IgG 山羊血清) を用いることで第1抗体を分離したのち、患者血清中の PAPase 濃度を測定する方法である。3時間インキュベーション後に ^{125}I 標識 PAPase を加え、さらに20時間インキュベーションして第2抗体を加え、また30分インキュベーションし

Stage A, B 群 (5 例) では全例において両検査法とも正常域範囲内であった. stage C 群 (10 例) では, 未治療例 (4 例) のいずれにおいても両検査法で正常域を示した. しかし, すでに内分泌治療を開始していた 6 例では, 両検査法ともそれぞれ 1 例に異常を認めている. stage D 症例 (32 例) では, 未治療の 2 例はいずれの検査法においても異常高値を示した. 一方, すでに骨転移症例として内分泌治療を行っている 30 症例において異常を示した症例は IEA 法にて 11 例 (36.7%), RIA 法では 10 例 (33.3%) であった.

考 察

PAP 測定は前立腺癌の診断および治療効果判定において必須の検査法である. その測定感度および特異性の向上のため多くの研究報告がなされてきた. 免疫抗体法による PAP 測定法の中で, RIA 法は優れた感度を示したために従来からの酵素法による臨床応用に関する報告は少なくなっている. しかし, 放射線を用いるため, γ 線の測定機器を必要とし, また放射線汚染の問題や測定時間が長いことなどの点で RIA 法に代わる検査法の開発・研究が盛んに行われてきている. 免疫酵素測定法 (EIA 法) にはモノクローナル抗体の作成にあたり, 固相化抗体と酵素標識抗体を用いて PAP をサンドウィッチに捕えることで直接測定する ELISA 法, 酵素増幅系と酵素の反応を発色剤を用いて捕える増幅酵素免疫測定法 (amplified-enzyme linked immunoassay, AELIA 法) などがある. また, われわれの用いた方法は抗 PAP モノクローナル抗体を固定化したチューブを用いることで検体中の PAP を捕捉し, その酵素活性を発色剤にて同定する免疫酵素測定法 (IEA 法) である. 一般に, これら免疫化学的測定法では測定感度が向上するにつれて, その結果として定量域を狭める結果となる傾向がある. 特異性や反応に必要な時間などを考えるとそれぞれ一長一短といわざるをえない.

われわれの行った検査成績において, 肥大症例で IEA 法にて異常を示した症例は 2 例あり, そのうち 1 例は IEA 法, RIA 法のいずれも高値であった (Fig. 3). この症例は測定 3 日前に急性尿閉となり, カテーテル留置を施していた. 後日, 開腹にて前立腺被膜下摘除術を行ったが, 悪性所見は認めなかった. 前立腺癌症例では, 病期 A, B 群はいずれも正常域を示した. 病期 C 例 (10 症例) では, すでに内分泌治療を行っていた症例の 1 例において IEA 法, RIA 法ともに異常値を示していた. 病期 D では未治療症例が 2 例だけであったが, 両例ともに IEA 法, RIA 法

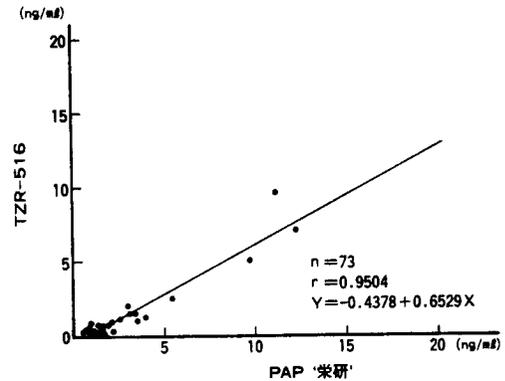


Fig. 4. IEA および RIA (栄研) との相関

で異常値であった. また, 内分泌治療中の 30 症例において, 異常値を示した症例は, RIA 法で 33.3% (10/30), IEA 法にて 36.7% (11/30) である.

これらの結果から, われわれの行った比較成績は RIA 法と IEA 法がほぼ相関する結果が得られている.

PAP-EIA 法の正常域設定は, 測定法の違いにより異なる. ELISA 法⁴⁻⁸⁾では 1.10~1.94 ng/ml, AELIA 法^{9,10)}では 1.45~2.0 ng/ml, またわれわれと同様の IEA 法の報告^{11,12)}では 1.0~1.94 ng/ml (ただし, 健康高齢者) などと報告されている.

これらの報告の多くは PAP-RIA 法との相関性について比較検討がなされており, いずれにおいても, 結果はきわめて相関性が高いとの報告が多い. われわれの症例においても, 正常コントロール例を除いた肥大症および前立腺癌症例 (計 73 例) における RIA 法と IEA 法の相関係数は $r=0.9504$ で, その回帰式 $Y=-0.4378+0.6529X$ と良好な相関を認めた (Fig. 4).

IEA 法に関して, 中内ら¹²⁾は相関係数が低い結果を報告した. その原因として, 酒石酸阻害法での低値領域感度が不良のためとしている. 血清保存の際に, クエン酸を用いることで酸性化することで再現性が良いことも指摘されている. われわれの行った検査法はクエン酸処理法であるとともに, 基質および呈色剤を十分量用いること, さらに呈色後の溶液を希釈して測定することにより 80 ng/ml までの広い定量域を保ちながら高感度を可能にしたことで優れた相関性が得られたものと考えられる.

つぎに, PAP 酵素活性の測定に際して, 安定な 4-ニトロフェニルリン酸がしばしば利用されている. われわれの IEA 法では, 1-ナフチルリン酸の反応系の安定化を計り, 少量検体でも総インキュベーション時間が 2 時間ときわめて短時間測定が可能である点が特長

といえる。したがって、測定感度、特異性、測定時間を比較し、また RIA 法の複雑さを考慮する限り、IEA 法は臨床応用に優れた成果を収めることが期待できる。さらに、前立腺癌の治療効果判定ならびに予後予測因子の解明のため症例を重ねる必要がある。

文 献

- 1) 丸岡正幸：Radioimmunoassay による前立腺性酸性フォスファターゼの研究。日泌尿会誌 **74**：311-320, 1983
- 2) 笹本英彦，宮崎宏一，真仁田英明：免疫酵素測定法によるヒト前立腺性酸性フォスファターゼの定量法の開発。最新検査 **6**：241-248, 1989
- 3) 第2回 PAP 研究会抄録集・PAP 研究会編，東京，1980
- 4) 中村恵美子，小泉文明，石森 章，星 宣次，今井克忠，松田 尚太郎，佐藤恒明：Enzyme immunoassay による Prostatic Acid Phosphatase の基礎的ならびに臨床的検討。機器・試薬 **7**：644-650, 1984
- 5) 南 祐三，小川繁晴，斉藤 泰：モノクローナル抗体を用いた酵素免疫測定法（ABBOTT PAP-EIA キット）による前立腺酸性フォスファターゼ測定の検討。西日泌尿 **46**：801-807, 1984
- 6) 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
- 7) 樋口義典，鈴木 晃，加藤和男，戸川貴史，奥秋興寿，吾妻耕治，星野俊明，木村和衛，片寄功一，坂上善成，長沢正人，一条貞敏，白岩康夫：“ABBOTT PAP-EIA の基礎的・臨床的検討”ホと臨床 **32**：783-788, 1984
- 8) 今吉優子，土井 啓，長谷川恭一，置塩達郎：前立腺性酸性フォスファターゼ測定法（RIA 法および EIA 法）の基礎的検討。衛生検査 **36**：989-993, 1987
- 9) 山中英寿，湯浅久子，名取悦子，今井強一，真下透：Amplified enzyme linked immunoassay (AELIA) による前立腺酸性ホスファターゼ (PAP) 測定。臨床病理 **35**：1154-1158, 1987
- 10) 越田 潔，内藤克輔，久住治男：モノクローナル抗体を用いた免疫酵素測定法（IQ (Bio) PAP-AELIA キット）による前立腺性酸性フォスファターゼ測定の検討。泌尿紀要 **33**：1703-1707, 1987
- 11) 布施秀樹，座間秀一，島崎 淳：前立腺性酸性フォスファターゼの免疫酵素測定法。泌尿紀要 **31**：1957-1964, 1985
- 12) 中内浩二，森真由美，野間昭夫，岡部絃明：Solid Phase Enzyme Immunoassay による高齢者前立腺癌の診断。日老医会誌 **24**：138-145, 1987

(1989年5月22日迅速掲載受付)