

前立腺癌腫瘍マーカーとしての前立腺特異抗原 (PSA) の検討

—MARKIT-M PA による PSA 測定の臨床的意義—

京都大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 吉田 修教授)

荒井 陽一, 大西 裕之, 大石 賢二

竹内 秀雄, 吉田 修

VALUE OF PROSTATE-SPECIFIC ANTIGEN MEASUREMENTS
WITH NEWLY DEVELOPED ENZYME IMMUNOASSAY
(MARKIT-M PA)

Yoichi Arai, Hiroyuki Onishi, Kenji Oishi,

Hideo Takeuchi and Osamu Yoshida

From the Department of Urology, Faculty of Medicine, Kyoto University

Serum prostate-specific antigen (PSA) levels in patients with prostate cancer and benign prostatic hypertrophy (BPH) were investigated with a newly developed enzyme immunoassay (MARKIT-M PA, Dainippon Pharmaceutical Co. Ltd., Osaka, Japan). Sensitivity of the assay system is 0.5 ng/ml and the detection range is 0.5~100 ng/ml. There was a high linear correlation ($r=0.987$) between the assay and MARKIT-F PA, and values obtained with the assay were almost equal to those yielded by MARKIT-F PA assay. Using the BPH group as a negative control, the upper cut-off value in BPH patients was determined to be 3.6 ng/ml. Of the 48 patients with untreated prostate cancer, 77% was detectable by means of MARKIT-M PA assay. Using the BPH group as a negative control, specificity and efficiency were 93% and 86%, respectively. In another group of 27 BPH patients whose blood samples were taken immediately after digital prostatic examination, PSA was elevated in 15%. During follow-up of prostate cancer patients, PSA was elevated in 82% at the time of clinically detectable progression. In 15 patients whose disease was clinically well controlled, all levels of PSA were observed to be negative. These findings suggest that detection of serum PSA with this assay is of great use both in the diagnosis and monitoring of prostate cancer patients.

(Acta Urol. Jpn. 38: 1129-1134, 1992)

Key words: Prostate-specific antigen, Enzyme immunoassay, Prostate cancer

緒 言

前立腺腫瘍マーカーとしての前立腺特異抗原 (PSA) の意義については、現在までに精力的に検討され、前立腺性酸性フォスファターゼ (PAP) に代わるものとして臨床応用がほぼ確立されてきた^{1,2)} われわれもこれまで多くの症例を対象として、PSA と既存のマーカーとの比較検討³⁾、リンパ節転移における PSA の診断意義⁴⁾、内分泌療法後の PSA の予後因子としての意義⁵⁾ などについて報告してきた。

一方、現在 PSA 測定キットとして市販されているものは数種類以上あり、それらの中で測定値のばらつ

きがあることが大きな問題となっている²⁾。また従来と異なるキットを新たに用いる場合は診療面でも支障が生じる可能性が考えられる。最近、より簡便に測定できる PSA 測定キットとして MARKIT-M PA (大日本製薬) が新たに開発された。本キットは現在本邦で広く用いられている同社の MARKIT-F PA⁶⁾ をより簡便化したもので、低濃度の感度も改善されている。今回、本キットについて、MARKIT-F PA との相関性を含めた基礎的および臨床的検討を行ったので報告する。

対象と方法

1986年より1989年までに京都大学医学部泌尿器科を受診した未治療前立腺癌48例を対象とした。前立腺癌の clinical stage 別では, stage A が4例 (A1: 3例, A2: 1例), stage B が7例 (B1: 3例, B2: 4例), stage C が8例, stage D が29例 (D1: 7例, D2: 22例) であった。stage 分類は前立腺癌取り扱い規約⁷⁾に準じて行った。また同時期に内分泌療法を継続されている症例で, 制癌例15例と再燃例11例も測定に供した。

前立腺肥大症の症例については組織学的に確認された88例を対象としたが, 採血された時期によって2群に分類して検討した。すなわち前立腺の直腸内触診前に採血された61例 (group I) と, 触診直後に採血された27例 (group II) とに分けて検討した。

検体は採血後ただちに血清を分離し, -20°C にて凍結保存した後, 一括して測定に供した。

PSA の測定は, 大日本製薬の MARKIT-F PA と MARKIT-M PA の2つのキットにて同時に行った。MARKIT-F PA による測定はすでに報告されている方法に準じて行った。今回検討の対象として用いた MARKIT-M PA は, 2種のモノクローナル抗体を用いたマイクロプレート方式の1ステップサンドイッチ型酵素免疫測定法 (EIA) を原理としたものである。その測定原理・方法の概略を Fig 1 に示した。必要な検体量は 25 μ l であり, 測定に要する時間は約

| | |
|--|-------------|
| Anti-PSA antibody coated microplate well | |
| HRPO conjugated anti-PSA antibody | 100 μ l |
| Standard PSA solution or serum sample | 25 μ l |
| Incubation (room temperature, 1hr) | |
| Wash 4 times with 300 μ l of wash buffer | |
| Substrate solution | 100 μ l |
| Incubation (room temperature, 30 min) | |
| Reaction terminator | 100 μ l |
| Colorimetry (492 nm) | |
| Calculation of serum PSA level | |
| by reference to standard calibration curve | |

Fig. 1. Assay procedure of MARKIT-M PA

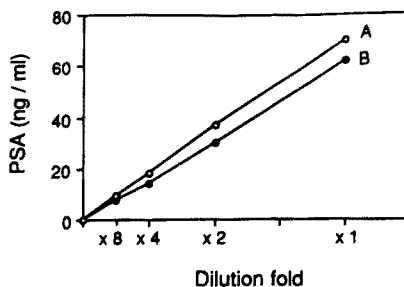


Fig. 2. Results of dilution studies. Two sera were serially diluted and their PSA levels were determined.

2時間である。このキットの標準曲線からえられる PSA の測定範囲は 0.5~100 ng/ml である。

結果

1. MARKIT-M PA の基礎的検討

1) 再現性試験 (Table 1). 3種類の濃度の検体を用いたキット内再現性の検討では, 変動係数 (CV) は 7.9%~5.6%と良好であった。また3種類の濃度の検体を用いたキット間の検討では, CV 値は8.6%, 3.6%, 1.4%であった。なお本試験の結果は大日本製薬に測定を依頼してえられた結果から設定したものである。

2) 希釈試験 (Fig. 2) 2種類の濃度の血清を溶解液を用いて希釈し検討を行った。測定値は原点を通る直線上にプロットされ, 手技の定量性が確認された。

3) 添加回収試験 (Table 2). 3種類の濃度のコントロール血清に3濃度の標準血清を加え, 各検体の計算値および実測値から回収率を求めた。その回収率は89~96%の範囲内であった。

2. MARKIT-F PA との相関性の検討

MARKIT-F PA の感度が 1.5 ng/ml であることから, この値以下のものを除いた69検体について相関性を検討した。両キットの測定値はよく一致しており, きわめて高い相関性 ($r=0.987$) が認められた (Fig. 3)。

3. 前立腺癌と前立腺肥大症患者における PSA 値

Table 3 に各疾患別の PSA 値を, Fig. 4 にそれ

Table 1. Reproducibility test in MARKIT-M PA

| Samples | Intra-assays (n=8) | | | Inter-assays (n=5) | | |
|--------------|--------------------|------|------|--------------------|------|------|
| | A | B | C | D | E | F |
| Mean (ng/ml) | 5.9 | 14.3 | 31.4 | 3.2 | 11.3 | 51.4 |
| S.D. (ng/ml) | 0.47 | 0.80 | 2.31 | 0.27 | 0.41 | 0.72 |
| C.V. (%) | 7.9 | 5.6 | 7.4 | 8.6 | 3.6 | 1.4 |

Table 2. Recovery test in MARKIT-M PA

| Sample | assay value (ng/ml) | added value (ng/ml) | calculated value (ng/ml) | recovery (%) |
|--------|---------------------|---------------------|--------------------------|--------------|
| A | 12.4 | 0 | | |
| | 16.7 | 5 | 17.4 | 96.0 |
| | 20.6 | 10 | 22.4 | 92.0 |
| | 30.2 | 20 | 32.4 | 93.2 |
| B | 5.4 | 0 | | |
| | 9.7 | 5 | 9.4 | 93.3 |
| | 14.0 | 10 | 15.4 | 90.9 |
| | 22.6 | 20 | 25.4 | 89.0 |
| C | 24.5 | 0 | | |
| | 27.4 | 5 | 29.5 | 92.9 |
| | 30.8 | 10 | 34.5 | 89.3 |
| | 39.8 | 20 | 44.5 | 89.4 |

らの分布を示した。前立腺癌症例ではいずれの stage でも group I 前立腺肥大症に比して PSA は有意な上昇がみられた。直腸内触診後に採血された group II 前立腺肥大症では group I に比して統計的に有意な上昇を示さなかった。

4. 陽性率, 特異性, および診断効率

PSA の測定が比較的高齢者を対象としており, 臨床では前立腺癌と前立腺肥大症との鑑別が最も重要であるため, cut-off 値は今回対象とした group I 前立腺肥大症を negative control として設定し検討した。すなわち group I 前立腺肥大症の PSA 値の mean±1SD (3.7 ng/ml), mean±2SD (5.8 ng/ml), mean+3SD (8.0 ng/ml) 三者を cut-off 値の候補と

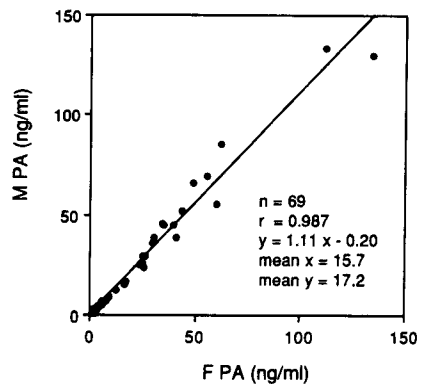


Fig. 3. Correlation between MARKIT-M PA and MARKIT-F PA assays.

Table 3. Serum PSA levels detected by MARKIT-M PA in BPH and prostate cancer patients

| Disease | No. of examined | PSA range (ng/ml) | PSA mean±S.D. (ng/ml) | Student's t test p value (vs fresh BPH) |
|---------------|-----------------|-------------------|-----------------------|---|
| BPH Group I | 61 | <0.5~ 12.6 | 1.6± 2.1 | |
| BPH Group II | 27 | <0.5~ 8.9 | 1.7± 1.9 | N.S. |
| Prostatic Ca. | 48 | <0.5~2567 | 237.7±528.3 | p<0.001 |
| Stage A | 4 | 0.7~ 38.7 | 11.8± 15.6 | p<0.001 |
| Stage B | 7 | <0.5~ 24.1 | 6.9± 7.5 | p<0.001 |
| Stage C | 8 | 2.0~ 52.2 | 20.0± 18.6 | p<0.001 |
| Stage D | 29 | <0.5~2567 | 384.6±638.1 | p<0.001 |

して検討した。さらに本キットと MARKIT-F PA (cut-off 値: 3.6 ng/ml) の相関性が高く, 両者の測定値もよく一致していることから, 3.6 ng/ml についても cut-off 値の候補として検討を加えた (Table 4)。各 cut-off 値における診断効率 (efficiency) を算出した結果, 3.6 ng/ml または 3.7 ng/ml にて最も高

い診断効率 (86%) がえられた。そこで MARKIT-M PA の場合も MARKIT-F PA と同じ 3.6 ng/ml を cut-off 値として設定し以下の検討を行った。なお診断効率は, (異常値の前立腺癌数+正常値の前立腺肥大症数)/(前立腺癌総数+前立腺肥大症総数(×100 (%))として計算した。

Table 4. Positive rates and efficiency in serum PSA determination under various cut-off values

| | No. of examined | Positive No. (Rate %) | | | |
|----------------|-----------------|---------------------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | | F PA cut-off value 3.6 ng/ml | BPH mean+S.D. 3.7 ng/ml | BPH mean+2S.D. 5.8 ng/ml | BPH mean+3S.D. 8.0 ng/ml |
| BPH Group I | 61 | 4 (7) | 4 (7) | 3 (5) | 2 (3) |
| Group II | 27 | 4 (15) | 4 (15) | 1 (4) | 1 (4) |
| Prostatic Ca. | 48 | 37 (77) | 37 (77) | 34 (71) | 27 (56) |
| Stage A | 4 | 2 (50) | 2 (50) | 1 (25) | 1 (25) |
| Stage B | 7 | 4 (57) | 4 (57) | 4 (57) | 1 (14) |
| Stage C | 8 | 6 (75) | 6 (75) | 6 (75) | 4 (50) |
| Stage D | 29 | 25 (86) | 25 (86) | 23 (79) | 21 (72) |
| Efficiency (%) | | 86 | 86 | 84 | 79 |

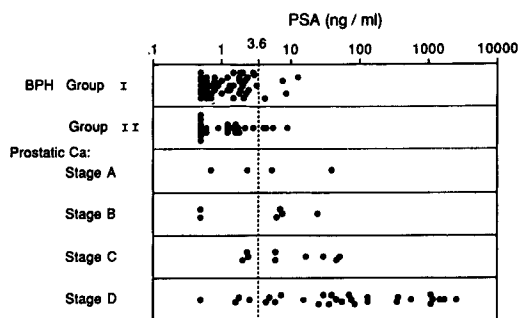


Fig. 4. Distribution of serum PSA in BPH and prostate cancer patients.

cut-off 値 3.6 ng/ml での前立腺癌における PSA 陽性率は stage A で50%, stage B で57%, stage C で75%, stage D で86%であった。group I 前立腺肥大症を negative control とした特異性は93%であった。しかし直腸内触診直後に採血された group II 前立腺肥大症では偽陽性率は15%に上昇していた (Table 4)。

5. 制癌例および再燃例での PSA 値

臨床的に制癌と診断された15例の PSA 値を Fig. 5 に示す。いずれも cut-off 値内にあり臨床的な制癌状態をよく反映していた。また臨床的に再燃と診断された11例中9例 (82%) で PSA は異常高値を示していた。

考 察

PSA は前立腺癌の腫瘍マーカーとして広く臨床応用されている。未治療前立腺癌に対するすぐれた検出率だけでなく、手術療法⁸⁾、放射線療法⁹⁾、内分泌療法⁵⁾ などあらゆる治療後のモニターとしても高い有用性が報告されている。われわれもすでに詳細な検討結

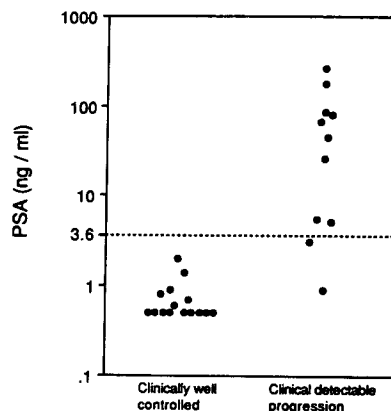


Fig. 5. Serum levels of PSA in patients with and without clinical disease progression.

果を報告してきたが、今回の検討でも前立腺癌に対する PSA 陽性率は緒家の報告とほぼ同様な結果であり、特に初期 stage での比較的高い陽性率が再確認された。ただし、stage A については今回検討の対象となった症例数が少ないために陽性率について結論するには無理があると思われる。今後さらに多くの症例での検討を待たねばならない。各 stage における PSA 値はかなり広い範囲に分布しており、病期間のオーバーラップが認められた。内分泌療法後の臨床的な制癌状態もよく反映しており、再燃時においても80%以上の症例で PSA 陽性であった。

今回の検討では、特異性が93%と比較的高い値を示しており、前立腺肥大症の触診後では PSA 偽陽性率も15%にとどまっていたのが特徴的であった。この点について、異なるキットを用いたわれわれの同様な検討では、前立腺肥大症の触診後の PSA 偽陽性率は40%以上であった³⁾。また Yuan ら¹⁰⁾ の検討では、触診や経直腸の超音波検査では PSA はさほど変化しな

いと報告している。これら触診などの前立腺への操作による PSA 値の変動程度の相違が単に測定キット間の違いによるものかは現在のところ不明である。

ここで検討した MARKIT-M PA キットは、マイクロプレートと2種のモノクローナル抗体を用いたワンステップ型 EIA を原理としたものである。現在本邦で広く使用されている MARKIT-F PA に比べ、測定操作が簡単で遠心分離操作を必要としない。また測定には通常のマイクロプレート用 ELISA 機器システムが使用できるので多数検体処理に適しているといった利点を有している。

これら2キット間の測定値の検討では両者の測定値はよく一致しており、相関性もたいへん良好であった。cut-off 値の設定については種々の方法が報告されており、また同一キット内でも問題にする鑑別対象によっても設定値が変わりえる。MARKIT-F PA の場合、Kuriyama ら⁹⁾ は健常者 PSA 値の mean + 3SD である 3.6 ng/ml を cut-off 値として設定し、その後この値を採用して臨床的検討を行った報告が多い^{4, 9)}。しかしこの値そのものは、MARKIT-F PA の感度未満の値をすべて 1.5 ng/ml として算出されたものである。したがって MARKIT-M PA のように低濃度の感度が 0.5 ng/ml の場合、同じ算出方法を用いると cut-off 値はより低い値に設定されることが予想される。臨床的には前立腺肥大症と前立腺癌との鑑別が最も問題となること、前立腺肥大症を完全に除外した健常者の選択が難しいこと、などを考慮して、ここでは組織学的に確認された前立腺肥大症症例を negative control として cut-off 値を設定した。すなわち前立腺肥大症症例の PSA 値の mean + 1SD の近似値として MARKIT-F PA と同じ 3.6 ng/ml を cut-off 値として検討した。MARKIT-F PA を用いた測定されたこれまで報告や MARKIT-F PA との相関性が確認されている他のキットを用いた報告とも十分比較しえるものと考えられる。

MARKIT-M PA では低濃度の感度も MARKIT-F PA の 1.5 ng/ml から 0.5 ng/ml へと改善されている。これまで PSA は PAP に比べ再燃・再発の早期診断においてもより有用であるとする報告が多い。低濃度の感度の改善が再燃・再発をより鋭敏に診断するのに寄与しうるかどうか今後症例を重ねて検討してみる必要がある。しかし根治的前立腺全摘術後の残存腫瘍の検出の場合、Tandem-R や Pros-Check などを用いた欧米の報告では、0.4 ng/ml 以下の PSA 値を問題にしている報告が多い^{8, 11)}。今後本邦でも根治手術症例が増加することを考えると、より高感度の

PSA 測定系が開発される必要がある。

現在の PSA の臨床応用上のおおきな問題点の一つは、測定キットが数種類以上あり、しかもそれらの間で測定値が大きく相違していることである²⁾。このことがそれぞれの報告を比較することを困難にし結果的に詳細な臨床的検討を妨げている。測定値のばらつきの原因として標準溶液の設定値の不一致が報告されている¹²⁾。Graves ら¹²⁾ は、Tandem-R と Pros-Check について独自に標準液を設定して測定した場合、両者は基本的には同じ結果になることを報告し、PSA の標準液の設定を国際的に統一することが急務であると述べている。MARKIT-F PA でも本邦で使用されている他の PSA 測定キットと比較検討した報告は見られるが¹³⁾、欧米で広く使用されているキットと比較検討した報告は少ない。今後の詳細な検討が待たれるところである。

文 献

- 1) Oestering JE Prostate specific antigen: A critical assessment of the most useful tumor marker for adenocarcinoma of the prostate. *J Urol* **145**: 907-923, 1991
- 2) 秋元 晋, 正井基行, 北川憲一, ほか: 泌尿器腫瘍における腫瘍マーカー (その信頼性と限界): PSA. *泌尿器外科* **4**: 1065-1072, 1991
- 3) Arai Y, Yoshiki T, Oishi K, et al.: The role of prostatic specific antigen in monitoring prostatic cancer and its prognostic importance. *Urol Res* **18**: 331-336, 1990
- 4) Arai Y, Yoshiki T, Yamabe H, et al.: Value of prostate-specific antigen measurements in predicting lymphnode involvement in prostate cancer. *Urol Int* **45**: 356-360, 1990
- 5) Arai Y, Yoshiki T and Yoshida O: Prognostic significance of prostate specific antigen in endocrine treatment for prostate cancer. *J Urol* **144**: 1415-1419, 1990
- 6) Kuriyama M, Shinoda I, Takeuchi T, et al. Clinical evaluation of prostate-specific antigen with an EIA; a co-operative study. *Nishinohon J Urol* **49**: 1431-1438, 1987
- 7) 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1版, 金原出版, 東京, 1985
- 8) Stamey TA, Kabalin JN, McNeal JE, et al.: Prostate specific antigen in the diagnosis and treatment of adenocarcinoma of the prostate. II. Radical prostatectomy treated patients. *J Urol* **141**: 1076-1083, 1989
- 9) Stamey TA, Kabalin JN and Ferrari M: Prostate specific antigen in the diagnosis and treatment of adenocarcinoma of the prostate. III. Radiation treated patients.

- J Urol 1984-1078, 1989
- 10) Yuan JJJ, Coplen DE, Petros JA, et al. :
Effects of rectal examination, prostate massage, ultrasonography and needle biopsy on serum prostate specific antigen levels. J Urol **147**: 810-814, 1992
 - 11) Lange PH, Ercole CJ, Lightner DJ, et al. :
The value of prostate specific antigen determinations before and after radical prostatectomy. J Urol **141**: 873-879, 1989
 - 12) Graves HCB, Wehner N and Stamey TA :
Comparison of a polyclonal and monoclonal immunoassay for PSA: Need for an international antigen standard. J Urol **144**: 1516-1522, 1990
 - 13) 秋元 晋, 赤倉功一郎, 島崎 淳: 前立腺癌における前立腺特異抗原測定キットの比較. 泌尿紀要 **34**: 2143-2148, 1988

(Received on May 8, 1992)

(Accepted on July 17, 1992)

(迅速掲載)