

前立腺の解燐酵素に関する研究

II. 血清中の酸性フォスファターゼに関する研究

長崎大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 近藤 厚教授)

大学院学生 中 野 信 吾

STUDIES ON PROSTATIC PHOSPHATASE

II. STUDY ON SERUM ACID PHOSPHATASE

Shingo NAKANO

*From the Department of Urology, Nagasaki University School of Medicine
(Chairman: Prof. A. Kondō, M. D.)*

First, serum acid phosphatase from healthy adult men was studied by column chromatography with stepwise elution technique using DEAE cellulose. Three distinct peaks of protein (Fr. I, II and III) were obtained and acid phosphatase activity was exhibited in each fraction.

When seminal plasma was added to the same normal serum chromatography demonstrated extremely increased enzymatic activity on Fr. II and III, which were suggested to be of prostatic origin.

Chromatography of the extracts obtained from kidney, liver, spleen and red blood cells suggested that the enzyme contained in these organs was distributed to Fr. I and that in red cells to Fr. II.

The sera of patients with prostatic cancer, benign prostatic hypertrophy and chronic renal insufficiency were then chromatographed. Serum from patients with benign prostatic hypertrophy and chronic renal insufficiency showed the pattern of distribution of acid phosphatase in each fraction similar to that of normal serum. However, the enzymatic activity of Fr. III of patients with prostatic cancer revealed 12.6% of total activity, while those of the other cases represented below 2%.

緒 言

前立腺癌患者で血清中の酸性フォスファターゼ活性値が上昇することがあるということはよく知られ、転移の有無、治療中の経過観察、特に再発の発見、前立腺肥大症との鑑別の一手段として広く応用されている。しかし、前立腺癌患者でも酸性フォスファターゼ活性値が正常域にあるものも少なくなく、あくまで補助的手段の一つにすぎない。Fishman and Lerner¹⁾ は L(+)酒石酸によって阻害される酸性フォスファターゼがほとんど前立腺由来のものである

ことを述べ、正常人とくらべて、前立腺癌患者で阻害率が高いと報告している。しかし、Kurtz and Valk²⁾ は、前立腺癌の初期および限局した症例では、L(+)酒石酸による阻害率はあまり診断的価値がないとしている。Kendall³⁾ は、前立腺癌患者の血清酸性フォスファターゼ活性値が、前立腺マッサージにより上昇することから診断に役だつと述べているが、Still ら⁴⁾ は、これに反対して、前立腺肥大症患者のほうがかえって上昇すると報告している。このように、血清の酸性フォスファターゼ活性値は、転移を有する晩期の前立腺癌患者

では著明な上昇がみられるが、早期の前立腺癌患者の酵素活性には一定した傾向がみられない。

斎藤⁵⁾はヒト前立腺組織より酸性フォスファターゼを分離、精製し、その特性を明らかにし、精製酵素により抗血清を作製して、前立腺癌の免疫学的診断法について報告した。

最近、種々の酵素の isozyme に関する研究がなされている。酸性フォスファターゼについても isozyme を得るために種々の試料、方法を用いて分離が試みられている。Angeletti ら⁶⁾は、血清を用いて DEAE cellulose column chromatography を行ない、正常成人と前立腺癌患者では酵素の分布に明らかな差異があることを認めている。

このように血清を試料として酸性フォスファターゼを分離することによって、前立腺癌に特有の所見を得れば、本症の診断に役だつと思われたので、正常成人男子、前立腺癌患者、前立腺肥大症患者、腎不全患者から得られた血清を用いて column chromatography を行ない、酸性フォスファターゼの分布を比較検討してみた。

実験材料および実験方法

実験材料には、腎臓、肝臓、脾臓および赤血球の抽出液、正常成人男子 4 例、前立腺癌患者 6 例、前立腺肥大症患者 6 例、腎不全患者 5 例の血清を試料として用い、1 例のみ正常成人男子血清に精漿を加えて、stepwise elution による DEAE cellulose column chromatography を行ない、各溶出液における蛋白量と酸性フォスファターゼ活性値を測定した。

1. 組織抽出法

剖検で得られた腎臓、肝臓、脾臓を生理的食塩水でよく洗い流して凍結保存した。これを London and Hudson⁷⁾の方法に従い、薄い切片を作り重量を測定して、その 1gm につき 3ml の 0.2M acetate buffer (pH 5.0) を加えて、ときどき振盪しながら冷蔵庫内に 72 時間保存した。これを濾紙で濾過してから column chromatography の試料として用いた。

赤血球の抽出液は、血液 5ml を用い、血清分離後、その血餅に生理的食塩水を加えてよく攪拌し、これを遠沈して上清をすて、上清に血清蛋白がなくなるまで生理的食塩水で繰り返し洗浄した。最後にその上清を

すて、残った沈渣に純水 10ml を加えて溶血させ、遠沈後その上清だけを取り出して試料として用いた。

2. DEAE cellulose column chromatography

DEAE cellulose を純水で洗い、1/5N NaCl に分散して 2~3 時間放置してから、ガラスフィルターを用いてじゅうぶんに純水で洗った。このような操作を順に 1/5N NaCl と 1/5N NaOH で行ない、純水の pH と一致したときに starting buffer (0.0175M phosphate buffer, pH 7.0) で pH が 7.0 になるまでじゅうぶんに洗った。これを starting buffer に分散して、column chromatography に用いるまで保存した。

column は純水で洗ったあと、starting buffer で洗い流し、層を作らないように注意して、DEAE cellulose を静かにそそぎ、圧を加えずに重力でつめる。これに starting buffer を注入して cellulose を洗い、cellulose がじゅうぶんにつままったのを確認してから、starting buffer が cellulose の上端に一致するまで待ち、上記試料各 3ml を重畳する。これが cellulose に吸収されて上端まで来たときに starting buffer 約 1ml を静かに注入し、吸収されて上端に一致したときに約 5ml の starting buffer を重畳し、その上から硝子瓶に入れた starting buffer を滴下した。流速は 0.4~0.5ml/min で、4ml ずつフラクションコレクターで採取した。120ml (30本) 採取したあと、溶出液を 0.1M phosphate buffer (pH 6.0) に変えて 120ml (30本) 採取した。最後に溶出液を 0.1M phosphate buffer (pH 6.0) + 0.5M NaCl に変えて 120ml (30本) 採取した。

3. 蛋白量と酵素活性値の測定および阻害実験

これらの各分画を光電分光光度計(日立 EPU2A型)で波長 280m μ にて蛋白量を測定した。

血清の酵素活性値測定は、Bessey, Lowry and Brock⁸⁾の方法に従った。阻害実験は、L (+) 酒石酸は Fishman and Lerner¹⁾ 法、フォルマリンは Abdul-Fadl and King⁹⁾の方法によった。

盲検用 (A)、酵素活性値測定用 (B)、阻害率測定用 (C) の 3 本の試験管を用意し、試験管 (A) には基質 (0.01M disodium *p*-nitrophenyl phosphate) 1ml および 0.2M acetate buffer (pH 5.0) 4ml を加え、試験管 (B) には、さらに血清 0.2ml を加えた。試験管 (C) には、血清 0.2ml、基質 1ml、buffer 3.48ml、0.2M L (+) 酒石酸 (1N NaOH で pH 5.2 に調整) または 5% フォルマリン 0.52ml を加えた。これらの試験管を 37°C の恒温槽に 30 分間つけて反応させ、直ちに 1N Na₂CO₃ を 2ml ずつ各試験管に加

えて反応を停止させ発色させた。次に試験管 (A) に血清 0.2ml を加えて盲検とし、光電分光光度計で波長 $402m\mu$ にて測定した。単位は血清 1 μ が 1 時間に分離する *p*-nitrophenol の mM で表わした。

阻害率は全酵素活性値に対する阻害値の百分比であらわした。

4. 至適 pH

酵素活性値と pH との関係をみるために pH 4.0~8.2 の 0.2M acetate buffer と pH 9.0 の 0.1M carbonic buffer を用いて、各 pH における酵素活性値を測定した。

5. Michaelis 恒数の測定

p-nitrophenyl phosphate を基質とする Bessey, Lowry and Brock⁹⁾ 法と disodium phenyl phosphate を基質とする King and Armstrong¹⁰⁾ 法を用い、反応速度が基質濃度に無関係となる零時の反応で、Lineweaver and Burk¹¹⁾ の方法に従って反応速度と基質濃度との関係を求めた。

成 績

1. 正常人血清の成績

正常成人男子の血清を試料として、column chromatography を行なうと Fig. 1 に見るように各溶出液に一致して 3 つの蛋白の peak が見られた (Fr. I, II, III)。この peak に一致して酵素活性値の山が見られた。

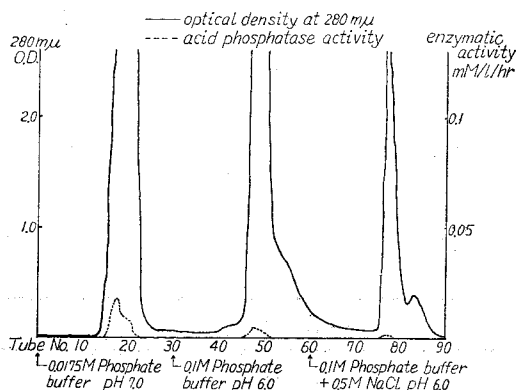


Fig. 1 Column chromatography of normal serum

2. 正常人血清に精漿を加えた場合の成績

正常成人男子血清 3ml に同一人の精漿 1ml を加えて column chromatography を行なうと、Fig. 2 のように Fr. I の酵素活性には、ほとんど変化はなかったが、Fr. II, III では著明な増加がみられた。

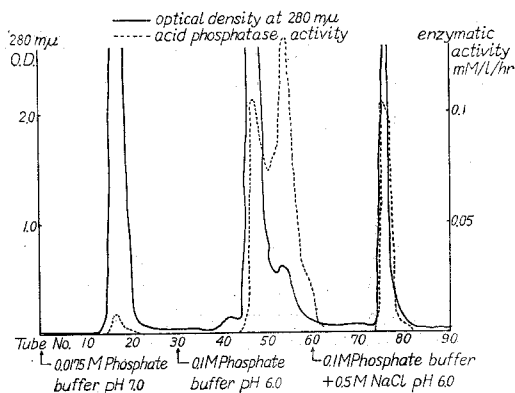


Fig. 2 Column chromatography of normal serum added seminal plasma

3. 腎臓、肝臓および脾臓抽出液の成績

腎臓、肝臓および脾臓の抽出液を使用して column chromatography を行なうと Fig. 3~5 に示すように、Fr. I と II、特に Fr. I に鋭い酵素活性値の山がみられた。

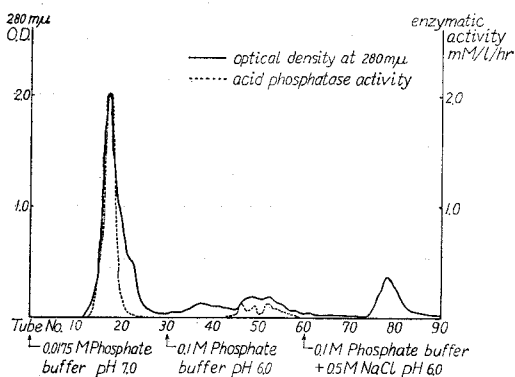


Fig. 3 Column chromatography of kidney extract

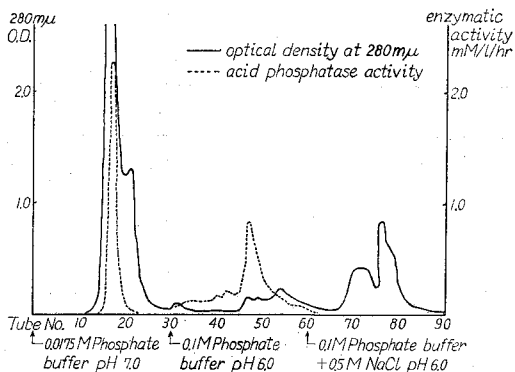


Fig. 4 Column chromatography of liver extract

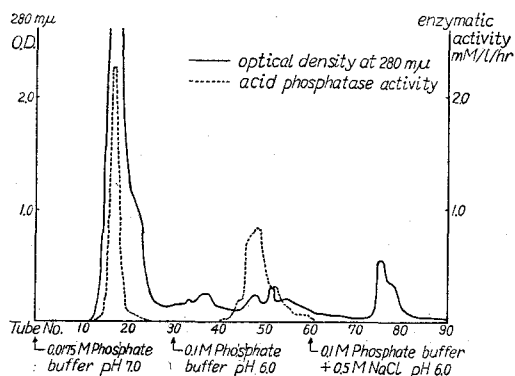


Fig. 5 Column chromatography of spleen extract

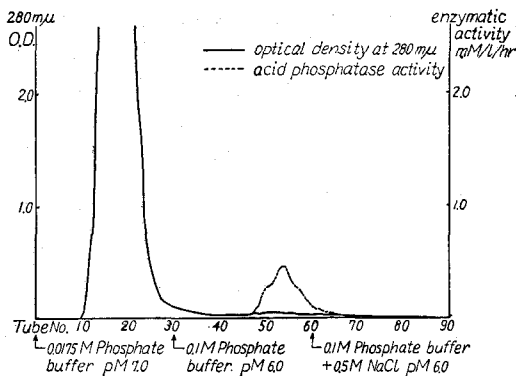


Fig. 6 Column chromatography of red cells extract

4. 赤血球抽出液の成績

赤血球抽出液について column chromatography を行なうと Fig. 6 に示すように Fr. II のみに酵素活性値の山が認められた。

5. 正常成人および各種疾患の成績

正常成人男子、腎不全患者、前立腺癌患者および前立腺肥大症患者の血清を試料として column chromatography を行なった。Table 1~4 は、正常成人

Table 1 Enzymatic activity of normal sera

	Total acid phosphatase (mM/l/hr)	Inhibition rate by L(+) tartaric acid (%)	Fr. I (%)	Fr. II (%)	Fr. III (%)
1	0.607	33.3	74.2	23.2	2.6
2	0.738	24.4	77.1	22.9	0
3	0.550	34.5	65.3	34.7	0
4	0.472	28.2	74.2	25.8	0
Average	0.592±0.097	30.1±4.1	72.7±4.4	26.7±4.8	0.7±1.1

Table 2 Enzymatic activity of the sera of patients with prostatic cancer

	Total acid phosphatase (mM/l/hr)	Inhibition rate by L(+) tartaric acid (%)	Fr. I (%)	Fr. II (%)	Fr. III (%)
1	0.438	45.2	51.5	31.6	16.9
2	0.397	42.8	63.1	21.2	15.8
3	0.476	33.2	61.1	24.8	14.1
4	1.052	29.5	55.5	33.6	10.9
5	1.127	29.0	71.0	23.9	5.1
Average	0.698±0.267	35.9±6.8	60.4±6.7	27.0±4.7	12.6±4.2
6	17.520	91.4	0.1	99.9	0

Table 3 Enzymatic activity of the sera of patients with prostatic hypertrophy

	Total acid phosphatase (mM/l/hr)	Inhibition rate by L(+) tartaric acid (%)	Fr. I (%)	Fr. II (%)	Fr. III (%)
1	0.721	22.6	81.9	15.6	2.5
2	1.563	29.2	78.9	16.1	5.0
3	0.529	32.7	69.3	30.7	0
4	0.796	31.2	79.6	19.1	1.3
5	0.738	36.7	66.8	33.2	0
Average	0.318	43.1	68.9	31.1	0
	0.778±0.386	32.6±6.3	74.2±6.0	24.3±7.5	1.5±1.8

Table 4 Enzymatic activity of the sera of patients with chronic renal insufficiency

	Total acid phosphatase (mM/l/hr)	Inhibition rate by L(+) tartaric acid (%)	Fr. I (%)	Fr. II (%)	Fr. III (%)
1	0.652	43.6	75.0	21.4	3.7
2	0.856	33.4	84.7	15.3	0
3	0.529	39.1	70.8	25.7	3.2
4	0.784	36.1	64.8	35.2	0
5	0.742	37.3	65.7	34.3	0
Average	0.713 $\pm$ 0.113	37.9 $\pm$ 3.4	72.2 $\pm$ 7.3	26.4 $\pm$ 7.6	1.4 $\pm$ 1.7

男子および各種疾患患者の血清酸性フォスファターゼ値, L(+) 酒石酸による阻害率の測定結果および column chromatography を行なって各分画に分布する酵素活性値の割合を%で示してある。

a. 酵素活性値

骨転移を有した症例6を除外すると, 血清の酵素活性値の平均値は, 前立腺肥大症患者が 0.778 ± 0.386 mM/l/hr と最も高く, これに次いで腎不全患者 0.713 ± 0.113 mM/l/hr, 前立腺癌患者 0.698 ± 0.267 mM/l/hr と高い値を示し, 正常成人男子が 0.592 ± 0.097 mM/l/hr と最も低い。前立腺癌の1例(症例6)は骨転移を有し, 血清の酵素活性値は 17.52 mM/l/hr と著明な増加を示した。

b. L(+)酒石酸による阻害率

L(+)酒石酸による阻害率は, 症例6を除外すると, 腎不全患者が最も高く $37.9 \pm 3.4\%$ となっている。次いで前立腺癌患者が $35.9 \pm 6.8\%$, 前立腺肥大症患者が $32.6 \pm 6.3\%$ で, 最も低い値を示したのは正常成人男子で $30.1 \pm 4.1\%$ であった。前立腺癌の症例6の阻害率は非常に高く 91.4% であった。

c. Column chromatography による各分画の酵素活性

column chromatography を行なった各分画の酵素活性値の全活性値に対する割合は, Fr. I では前立腺癌患者は 60.4% と低く, 他のものは 70% 以上となっている。Fr. II では, すべて 20% 台で大差がなかったが, Fr. III では, 前立腺癌患者は 12.6% と高値を示し, 他のものは 2% 以下であった。前立腺癌の症例6では酵素活性値の分布は, Fig. 7 および Table 3 にみるように, Fr. II は 99.9% と著明に増加し, Fr. I は 0.1% を占めるにすぎない。

6. 各分画の酵素学的特性

a. 至適 pH

各分画の酵素活性の至適 pH を測定した結果は Fig. 8~10 に示すごとくである。

血清では, Fr. I が pH 4.8 に, Fr. II は pH 5.0

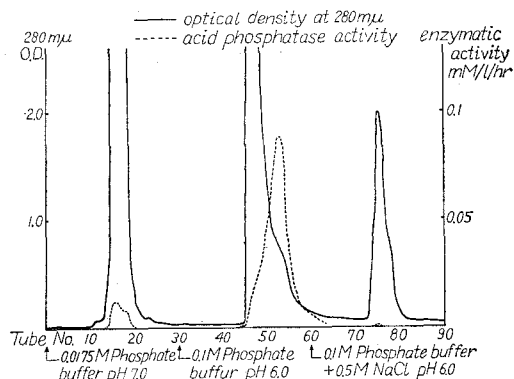


Fig. 7 Column chromatography of the patient with metastatic cancer of prostate

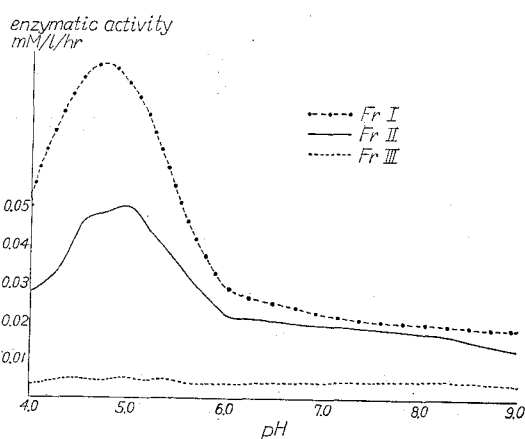


Fig. 8 Optimum pH of the enzyme on each fractions of sera

に peak を有する曲線を得ている。Fr. III は pH 5.0 に peak をもつ, やや平坦な曲線を得ている。

腎臓, 肝臓, 脾臓抽出液の Fr. I では pH 4.8 に最高の酵素活性値を示す曲線が得られた。Fr. II では, 腎臓では pH 4.2 と 5.2 に, 肝臓では pH 5.0 と 5.4 に, 脾臓では pH 4.8 にそれぞれ peak をもつ曲

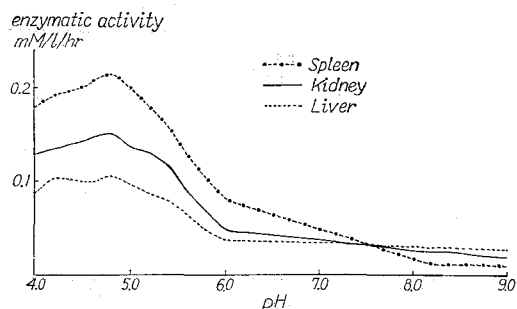


Fig. 9 Optimum pH of the enzyme on Fr. I (kidney, liver and spleen)

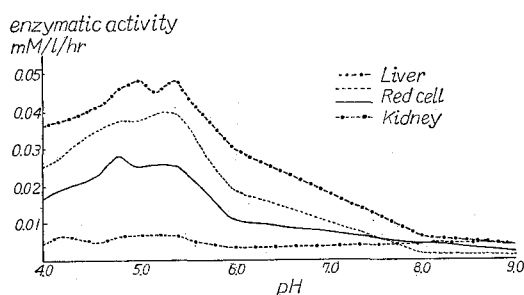


Fig. 10 Optimum pH of the enzyme on Fr. II (kidney, liver, spleen and red cells)

線が得られた。赤血球の Fr. II では、pH 5.2 と 5.4 に peak をもつ曲線が得られた。

Table 7 Inhibition rate of organ extracts

	Kidney		Liver		Spleen		Red cell
	Fr. I	Fr. II	Fr. I	Fr. II	Fr. I	Fr. II	Fr. II
Inhibition rate by 0.2M L(+)tartaric acid (%)	44.2	5.3	75.8	5.0	51.8	18.5	-13.4
Inhibition rate by 5% formalin (%)	7.7	27.0	11.6	77.5	14.5	50.0	95.5

酒石酸により、それぞれ44.2%、75.8%、51.8%とかなり阻害されているが、フォルマリンでは7.7%、11.6%、14.5%とあまり阻害されていない。Fr. II ではL(+)酒石酸により5.3%、5.0%、18.5%とあまり阻害されず、フォルマリンでは27.0%、77.5%、

b. L(+)酒石酸およびフォルマリンによる阻害実験の成績

血清から得られた各分画の酵素活性に対する阻害実験の成績は Table 5, 6 のごとくである。L(+)酒石酸による阻害率は、Fr. I で51.1%、Fr. II で34.6%、Fr. III で19.6%であった。フォルマリンでは、Fr. I が5.4%とわずかに阻害されたが、Fr. II とIII は反対に賦活された。

Table 5 Inhibition rate by L(+) tartaric acid

Molality	2×10^{-1}	2×10^{-2}	2×10^{-3}	2×10^{-4}
Fr. I (%)	51.1	25.1	-17.5	-23.3
Fr. II (%)	34.6	4.2	-22.3	-15.8
Fr. III (%)	19.6	-41.2	-61.8	0

Table 6 Inhibition rate by formalin

Percentage	5	5×10^{-1}	5×10^{-2}	5×10^{-3}
Fr. I (%)	5.4	-15.4	-15.4	-10.2
Fr. II (%)	-1.6	-1.6	-4.9	-3.2
Fr. III (%)	-112.6	-93.7	-10.8	0

腎臓、肝臓および脾臓の抽出液より得られた各分画の酵素活性に対する阻害実験の成績は Table 7 のごとくである。腎臓、肝臓、脾臓の Fr. I ではL(+)

酒石酸により、それぞれ44.2%、75.8%、51.8%とかなり阻害されているが、フォルマリンでは7.7%、11.6%、14.5%とあまり阻害されていない。Fr. II ではL(+)酒石酸により5.3%、5.0%、18.5%とあまり阻害されず、フォルマリンでは27.0%、77.5%、

50.0%とかなり阻害されている。赤血球抽出液の Fr. II は、L(+)酒石酸により賦活され、フォルマリンでは95.5%とほぼ完全に阻害されている。

c. 各分画の Michaelis 恒数 (K_m)

Fr. I, II, III の K_m 値は Table 8 にみるように

Table 8 K_m values of each fraction

	Fr. I	Fr. II	Fr. III
<i>p</i> -nitrophenyl phosphate	$3.3 \times 10^{-3} M$	$1.2 \times 10^{-3} M$	$1.9 \times 10^{-4} M$
disodium phenyl phosphate	$3.0 \times 10^{-2} M$	$5.3 \times 10^{-3} M$	$4.6 \times 10^{-3} M$

p-nitrophenyl phosphate では、それぞれ 3.3×10^{-3} M, 1.2×10^{-3} M, 1.9×10^{-4} M であり、disodium phenyl phosphate では、それぞれ 3.0×10^{-2} M, 5.3×10^{-3} M, 4.6×10^{-3} M であった。

考 按

1. 血清酸性フォスファターゼ活性値および阻害実験について

正常成人男子および各種疾患患者の血清酸性フォスファターゼ活性値および L(+) 酒石酸による阻害率は Tabel 1~4 に示している。血清の酵素活性値では、骨転移がありきわめて高い値を示した前立腺癌の症例 6 を除外すると、前立腺肥大症患者が 0.778 ± 0.386 mM/l/hr ともっとも高く、前立腺癌患者は 0.698 ± 0.267 mM/l/hr と腎不全患者より低い値を示した。もっとも低いのは、正常成人男子であった。

L(+) 酒石酸による阻害率では、前立腺癌の症例 6 を同じように除外してみると、腎不全患者が $37.9 \pm 7.3\%$ ともっとも高い阻害率を示し、前立腺癌患者はそれに次いで $35.9 \pm 6.8\%$ であった。もっとも低い阻害率を示したのは正常成人男子であった。

Mathes ら¹²⁾ は、前立腺癌患者の血清酸性フォスファターゼ活性値と L(+) 酒石酸による阻害実験を行なっている。骨転移、臓器転移などの遠隔転移を有するものでは、正常人や前立腺肥大症患者に比し酵素活性値は高値を示し、L(+) 酒石酸による阻害率でも、遠隔転移を有するものでは、治療の有無にかかわらず 70~80% の高い阻害率を示したが、遠隔転移を有しないものでは、ホルモン剤非投与群で 50% 近くの阻害率を示し、ホルモン剤投与群では、正常成人とほぼ同じ阻害率であったと報告している。

Kurtz and Valk²⁾ は、253 名の前立腺癌患者と 100 名の良性前立腺肥大症患者の血清酸性フォスファターゼ活性値と前立腺性酸性フォスファターゼ活性値 (L 酒石酸により阻害されるもの) とを測定している。かれは、前立腺癌患者を 4 群に分け、すでにホルモン剤投与または除瘤術を行なった群では、血清全活性値および前立腺性活性値ともに正常範囲にあるものが 69

% を占め、治療を受けていないものでは、前立腺に局限している群で 81%, 局所の浸潤を有する群で 47%, 骨転移を有する群で 23% が正常範囲となっている。前立腺肥大症患者では 93% が正常範囲であった。癌が前立腺に局限している早期の症例では、酸性フォスファターゼおよび前立腺性酸性フォスファターゼの測定の意味はあまりないとしている。その他、Fishman and Lerner¹⁾ および Nobles ら¹³⁾ もほぼ同様の見解を発表している。

著者の前立腺癌の症例でも、症例 6 を除けば、臨床的に転移は認められず、現在治療中であるので血清全酵素活性値はあまり高くなく、L(+) 酒石酸による阻害もそれほど強くなかったものと思われる。症例 6 は骨転移を有し進行した症例であるので、酵素活性値も正常の約 30 倍に増加し、阻害率も 91.4% と他にくらべて著明に高かった。

このように晩期の遠隔転移を有するような前立腺癌の症例では酵素活性値の測定は有力な診断の根拠になると思われるが、早期の前立腺に局限するような症例では、酵素活性値および阻害率は正常域にあるものが大部分であり、その診断的価値は少ないと思われる。

腎不全患者の血清酸性フォスファターゼ活性値は、前立腺肥大症患者に次いで、かなり高い値を示しているが、症例の中で 1 例は腹膜灌流を間歇的に施行している患者であり、他は現在定期的に血液透析を行なっている慢性腎不全患者である。Schoenfeld ら¹⁴⁾ も、急性腎疾患、慢性腎疾患および尿素窒素上昇を伴う腎不全患者の血清酸性フォスファターゼ値を測定し、尿素窒素の上昇を伴わない症例に比し、尿素窒素の上昇を伴うものでは、上昇するにつれて酸性フォスファターゼ活性が高値を示す症例が増加すると述べている。

2. Column chromatography による各分画における酸性フォスファターゼの分布およびその特性について

正常成人男子の血清を試料として、column chromatography を行ない、Fig. 1 のように Fr. I, II, III の 3 つの蛋白の peak を認め、

これに一致して酸性フォスファターゼ活性値の山を認めた。

腎臓、肝臓、脾臓および赤血球の抽出液を試料として column chromatography を行なうと、Fig 3~6 のような曲線を得ている。腎臓、肝臓、脾臓では、Fr. I に鋭い酸性フォスファターゼ活性値の山が見られ、それに続いて Fr. II に、Fr. I にくらべてやや低いなだらかな活性値の山を認めている。赤血球の抽出液では、Fr. II のみに酵素活性値の山がみられた。これらの各分画の peak の部分を集めて、L(+)酒石酸とフォルマリンを用いて阻害実験を行なうと Table 7 のようになった。腎臓の Fr. I は L(+)酒石酸によって 44.2% 阻害されており、肝臓、脾臓の Fr. I も 75.8%, 51.8% とかなり強く阻害されている。しかしフォルマリンでは、腎臓、肝臓、脾臓ともに Fr. I はあまり阻害されていない。このように Fr. I は、L(+)酒石酸によりかなり強く阻害され、フォルマリンではあまり阻害されていないという点で共通している。Fr. II の阻害実験に関しては、Fr. I と逆の性質を示している。赤血球の Fr. II はフォルマリンで 95.5% とほぼ完全に阻害され、腎臓、肝臓、脾臓の Fr. II でもかなり阻害率が高い。L(+)酒石酸では、赤血球の Fr. II は -13.4% とかえって賦活され、腎臓、肝臓、脾臓でもあまり阻害されていない。この結果より、腎臓、肝臓、脾臓などの Fr. II は赤血球由来の酸性フォスファターゼにより占められているものと思われる。

これらの各臓器抽出液で、各分画の酵素活性と pH との関係調べてみると Fig. 9, 10 のようになった。これをみると腎臓、肝臓、脾臓の Fr. I の酵素の至適 pH は 4.8 であり、曲線の形も類似している。このように、腎臓、肝臓、脾臓の酸性フォスファターゼのうち Fr. I に分布するものは、L(+)酒石酸およびフォルマリンによる阻害率、至適 pH などそれぞれ似かよった性質を示している。これに反して、Fr. II では至適 pH およびその曲線も異なっているように思われる。

Angeletti ら¹⁵⁾ は、赤血球抽出液を試料とし

て、NaCl の濃度を変えて gradient elution で column chromatography を行ない、1 峰性と多峰性の 2 つの蛋白質の山を認め、後のほうに出現する蛋白の山に一致して 3 峰性の酸性フォスファターゼ活性値の peak を認めた。この 3 つについて至適 pH をみると、1 番目のものは pH 4.4 で、2 番目と 3 番目のものはもっと高く pH 5.5 付近であった。L 酒石酸による阻害率は、1 番目のものは約 40% であったのに対して、2 番目および 3 番目のものはほとんど阻害されていない。このように赤血球抽出液には至適 pH および L 酒石酸によって明らかに性質が異なる酸性フォスファターゼが混在すると報告している。同様のことは Abdul-Fadl and King⁹⁾ によっても報告され、その至適 pH は、4.3~4.8 と 5.0~5.7 であるとされている。

Hopkins ら¹⁶⁾ も、赤血球の 5 つの phenotype について gradient elution で、DEAE cellulose column chromatography を行ない、electrophoresis で性質が異なる 2 つの酸性フォスファターゼの存在を認めている。

著者の実験では、Angeletti ら¹⁵⁾ や Hopkins ら¹⁶⁾ と異なり、酵素活性値の peak はほぼ左右対称の 1 相性の曲線を得ている。しかし、至適 pH をみると 4.8 とさらに高い 5.2~5.4 に活性値の peak をみている。これは Abdul-Fadl and King⁹⁾ の至適 pH と一致している。

以上の成績から腎臓、肝臓、脾臓の酸性フォスファターゼは Fr. I に分布し、赤血球由来のものは Fr. II に分布すると考えられる。

前立腺性酸性フォスファターゼがどの分画に分布するかをみるために、正常成人の血清に同一人の精漿を加えて column chromatography を行なった。その結果は Fig. 2 に示したが、Fr. I の酵素活性値は Fig. 1 のそれと大差は見られない。しかし、Fr. II と III の酵素活性値は著明な増加を示しており、前立腺由来の酸性フォスファターゼが Fr. II と III に分布することを示している。斎藤⁵⁾ も前立腺組織抽出液を精製しその過程で、DEAE cellulose column chromatography を行ない著者の分画と同じ場所に酵素活性の存在を認めてい

る。

このように各組織に由来する酸性フォスファターゼが固有の分画に分布するならば、各種疾患の診断にも役だつものと思われる。そこで正常成人男子、前立腺癌患者、前立腺肥大症患者、腎不全患者の血清を試料として column chromatography を行ない、各分画の酵素活性の分布をみてみた。その結果は Table 1~4 ならびに Fig. 11 に示している。Fr. I に分布する割

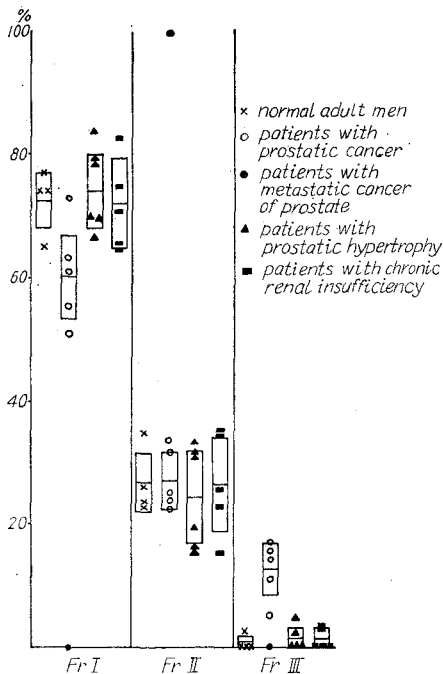


Fig. 11 Distribution of the enzyme activity on each fraction

合は、前立腺肥大症患者で74.2%，正常成人男子で72.7%，腎不全患者で72.2%といずれも70%以上であるが、前立腺癌患者のみが60.4%と低い値を示している。Fr. II では、前立腺癌患者は他の前立腺肥大症患者や腎不全患者などとともに正常成人男子と大差は認められない。しかし Fr. III をみると前立腺癌患者のみが12.6%と他に比べて高値を示している。また、前立腺癌の症例6は、骨転移を有する進行した症例であるが、血清酵素活性値は17.52mM/l/hrと正常成人男子の約30倍の高値を示し、L(+)酒石酸による阻害率も91.4%と高度の阻害率を

示している。column chromatography による各分画における酵素活性の分布は特有で、99.9%が Fr. II に分布している (Fig. 7)。

Angeletti ら⁶⁾ は、正常成人男子、前立腺肥大症患者、前立腺癌患者からの血清および前立腺組織抽出液を試料として、gradient elution による DEAE cellulose column chromatography を行なっている。この方法により、2つの大きな蛋白の peak (Fr. A, B) を認め、これらに一致して酸性フォスファターゼ活性値の山を認めている。正常成人では、Fr. A が酵素活性値の70~80%を占めているが、前立腺癌の血清では、Fr. B が著明に増加して60~80%を占めている。前立腺肥大症患者では、酵素活性値の分布は正常人と大差がない結果を示している。前立腺組織抽出液では、Fr. A に酵素活性の存在は認められず、Fr. B だけに2峰性の活性値の山がみられている。L酒石酸によって阻害実験を行なうと、Fr. A の酵素活性値は約20%阻害され、Fr. B ではほぼ100%阻害される。また、Fr. B の酵素活性が増加している前立腺癌の症例でも、prostatectomy やホルモン療法を行なうと Fr. B の活性値が減少して正常に近い値を示したと述べている。そして、これらの結果から、Fr. B にみられる酵素活性は、前立腺由来のものだとしている。

著者の測定でも、前立腺肥大症患者では、各分画における酵素活性の分布は、ほとんど正常成人男子のものと変りがない。前立腺癌患者のうち症例6を除く5例は臨床的に転移を認めず現在治療中のものである。前述のようにこれらの症例では血清の酸性フォスファターゼ値およびL(+)酒石酸による阻害率は前立腺肥大症患者のものと差異がなかった。これらの症例について前立腺由来の酵素が分布すると思われる Fr. II とIIIを検討すると、Fr. II では他の疾患とくらべて大差は認められない。しかし、Fr. III は正常人や他の疾患群とは明らかに異なり、増加しているのがわかる。

Ostrowski¹⁷⁾ は、前立腺組織抽出液を精製して stepwise elution による DEAE cellulose column chromatography を行なっている。溶

出液を5種類使用して、各溶出液に一致して蛋白の peak を認め、その2番目と3番目の peak に一致して酸性フォスファターゼ活性値の山を認めている。そして、この酵素の至適 pH を4.8と報告している。

斎藤⁵⁾は、前立腺組織抽出液を用いて、前立腺性酸性フォスファターゼの精製を行ない、その精製の段階で、Ostrowski¹⁷⁾と同様の方法で DEAE cellulose column chromatography を行ない、3つの酵素活性値の山を認めている。その中の最初の山は、Ostrowski¹⁷⁾の実験ではみられなかったものである。そして、これらの酵素の至適 pH は、1番目のものが3.8に、2番目のものが5.3に、3番目のものが4.6にあり、おのおのの至適 pH が異なっていることを報告している。

著者の実験における至適 pH は斎藤⁵⁾の結果と異なり、Fr. II は pH 5.0 であり、Fr. III も同じく pH 5.0 であるがやや平坦な曲線を得ている。

血清の column chromatography によって得られた各分画の酵素活性を L(+)酒石酸およびフォルマリンによって阻害すると、その阻害率は Table 6, 7 のようになった。L(+)酒石酸では、各分画ともに 0.2M (反応液最終濃度は 0.02M) の濃度でもっとも強く阻害されている。0.2M での阻害率は、Fr. I で 51.1% であり、Fr. II と III を上まわっている。フォルマリンでは、反応最終液濃度が 0.5% のときに、Fr. I がわずかに阻害されているが、Fr. II および III ではかえって賦活されている。前立腺性の酸性フォスファターゼが分布すると考えられる Fr. II と III の酵素活性値は、L(+)酒石酸によってそれほど阻害されていないが、これは column chromatography を行なってから透析、濃縮する過程で酵素の変性がおこったのではないかと考えられる。

各分画の基質特異性をみるために Michaelis 恒数の測定を行なった。その結果は Table 8 のようである。disodium phenyl phosphate を基質とした場合には、Hudson ら¹⁸⁾は、前立腺の精製酵素で 1.8×10^{-4} M、40倍精製酵素で 2.0

$\times 10^{-4}$ M、300倍精製酵素で 1.5×10^{-4} M であったとしている。Schmidt¹⁹⁾は30倍精製酵素で 7.5×10^{-4} M、300倍精製酵素で 1.5×10^{-4} M と報告している。斎藤⁵⁾が精製分離した前立腺の酸性フォスファターゼでは 8.3×10^{-4} M と 7.7×10^{-4} M であったと述べている。p-nitrophenyl phosphate では、斎藤⁵⁾は 2.3×10^{-5} M と 1.8×10^{-5} M と報告している。著者の実験では、両基質ともにこれらより大きい値を示したが、これは血清を分離しただけで、未精製のためと思われる。

結 論

血清の column chromatography を行ない酸性フォスファターゼを分離し、その酵素学的特性および腎臓、肝臓、脾臓および赤血球より分離した同酵素との関係を検討した。さらに前立腺癌、前立腺肥大症および腎不全患者血清の各分画における同酵素の分布を調べた。

1. 血清酸性フォスファターゼ活性値は、骨転移を有する前立腺癌の1例を除くと、前立腺肥大症患者がもっとも高く、次いで腎不全患者、前立腺癌患者、正常成人男子の順であった。

L(+)酒石酸による阻害率は、腎不全患者がもっとも高く、次いで前立腺癌患者、前立腺肥大症患者、正常成人男子の順であった。

これらの前立腺癌患者は、転移のない治療中のものであった。転移を有する前立腺癌の1例では、酵素活性値は正常の30倍近くを示し阻害率も91.4%と著明な高値を示した。

2. 正常成人血清を試料として column chromatography を行ない、Fr. I, II, III に酵素活性の存在を認めた。前立腺性酸性フォスファターゼがどの分画に分布するかを調べるために血清に精漿を加えて行ない、Fr. II と III に分布することを認めた。

3. 腎臓、肝臓、脾臓の抽出液を試料として column chromatography を行なって Fr. I と II に酵素活性の存在を認めた。赤血球抽出液では Fr. II のみにみられた。得られた各分画の至適 pH の測定ならびに L(+)酒石酸とフォルマリンによる阻害実験を行なった結果、腎

臓、肝臓、脾臓の酸性フォスファターゼは Fr. I に分布しており、おのおのその性質がよく似ていた。Fr. II にあらわれた酵素活性は赤血球由来のものと考えた。

4. 各種疾患患者の血清を試料として column chromatography を行なった。Fr. II では、正常成人男子、前立腺癌患者、前立腺肥大症患者、腎不全患者の間で酵素活性に大差は認められなかったが、Fr. III では、前立腺癌のみに活性値の増加がみられた。

5. Fr. I~III に存在する酵素は、至適 pH および L(+)酒石酸、フォルマリンによる阻害率および K_m 値からみると、おのおの異なる特性を有するように思われた。

6. 前立腺に限局した前立腺癌の場合には酸性フォスファターゼ活性値および L(+)酒石酸による阻害率は正常域にあることが多く、この方法は診断的価値が少ない。血清の column chromatography による Fr. III の増加は前立腺癌に特有の所見であり、診断に役だつものと思われる。

稿を終るに臨みご指導とご校閲を賜った恩師近藤厚教授に深謝し、実験についてご助言を賜った斉藤泰博士に感謝いたします。またご協力をいただいた当泌尿器科教室員各位に感謝いたします。なお本研究経費の一部は文部省科学研究費（総合研究、前立腺癌の研究）の補助を受けたことに対して謝意を表します。

本論文の要旨は1969年3月30日、第57回日本泌尿器科学会総会において発表した。

文 献

- 1) Fishman, W. H. and Lerner, F. : J. Biol. Chem., 200 : 89, 1953.
- 2) Kurtz, C. W. and Valk, W. L. : J. Urol., 83 : 74, 1960.
- 3) Kendall, A. R. : J. Urol., 86 : 442, 1961.
- 4) Still, B. M. and Warwick, R. T. T. : Brit. J. Urol., 38 : 279, 1966.
- 5) 斉藤 泰 : 泌尿紀要, 12 : 760, 1966.
- 6) Angeletti, P., Moore, B., Suntzeff, V. and Gayle, R. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 108 : 53, 1961.
- 7) London, M. and Hudson, P. B. : Arch. Biochem. Biophys., 46 : 141, 1953.
- 8) Bessey, O. A., Lowry, O. H. and Brock, M. J. : J. Biol. Chem., 164 : 321, 1946.
- 9) Abdul-Fadl, M. A. M. and King, E. J. : Biochem. J., 45 : 51, 1949.
- 10) King, E. J. and Armstrong, A. R. : Canada. M. A. J., 31 : 376, 1936.
- 11) Lineweaver, H. and Burk, D. : J. Am. Chem. Soc., 56 : 658, 1934.
- 12) Mathes, G., Richmond, G. R. and Sprunt, D. H. : J. Urol., 75 : 143, 1956.
- 13) Nobles, E. R., Kerr, W. S., Dutoit, C. H. and Rourke, G. M. : J. A. M. A., 164 : 2020, 1957.
- 14) Schoenfeld, M. R. : J. Urol., 90 : 373, 1963.
- 15) Angeletti, P. U. and Gayle, R. : Blood, 20 : 51, 1962.
- 16) Hopkins, D. A. and Harris, H. : Ann. Hum. Genet., London, 31 : 29, 1967.
- 17) Ostrowski, W. and Tsugita, A. : Arch. Biochem. Biophys., 94 : 68, 1961.
- 18) Tsuboi, K. K. and Hudson, P. B. : Arch. Biochem. Biophys., 55 : 19, 1955.
- 19) Schmidt, G. : The Enzymes, Vol. 5, 40, Academic Press, New York, 1961.

(1969年3月24日受付)