

モノクローナル抗体を用いた酵素免疫測定法 (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

金沢大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 久住治男教授)

越田 潔・内藤 克輔・久住 治男

EVALUATION OF A MONOCLONAL ANTIBODY-BASED ENZYME IMMUNOASSAY (IQ(BIO) PAP-AELIA KIT) FOR PROSTATIC ACID PHOSPHATASE

Kiyoshi KOSHIDA, Katsusuke NAITO and Haruo HISAZUMI

*From the Department of Urology, School of Medicine, Kanazawa University
(Director: Prof. H. Hisazumi)*

The clinical application of enzyme immunoassay (EIA) for prostatic acid phosphatase (PAP) is reported. PAP concentration was measured by an IQ(Bio)PAP-AELIA kit. Serum samples were collected from 20 healthy individuals, 31 patients with benign prostatic hypertrophy, 14 patients with prostatitis, 23 patients (47 samples) with prostatic cancer and 29 patients with various other malignancies. The coefficients of variation (%CV) in intraassay and interassay ranged from 2.3 to 4.4%, and from 3.0 to 3.6%, respectively. The recovery rate in the dilution test and recovery test were $106.2 \pm 8.9\%$ and $101.3 \pm 6.9\%$ respectively. A significant correlation ($r=0.994$, $p<0.01$) was observed between EIA and RIA methods in the prostatic cancer patients. PAP concentration was elevated above 2.0 ng/ml in 0/2 (0%) of the treated patients with stage B prostatic cancer, 1/5 (20%) of those with stage C, 6/16 (38%) of those with stage D, and in 4/5 (80%) of the untreated patients with stage D prostatic cancer. False positive results were seen in 2/31 (6%) of the patients with benign prostatic hypertrophy, 3/14 (21%) with prostatitis and 3/29 (10%) of the patients with various other malignancies. In the majority of the false positive cases, elevated levels were only just above the normal value. In conclusion, the PAP level measured by this EIA kit was correlated with the clinical response to hormone therapy for prostatic cancer.

Key words: PAP, Enzyme immunoassay, Prostatic cancer

はじめに

前立腺性酸性フォスファターゼ (PAP) は、前立腺癌の腫瘍マーカーとして広く認められ、その血清レベルの測定は、前立腺癌の診断および患者の臨床経過を観察する際に、必須の検査項目としてあげられる。現在、PAP の測定法として広く用いられている方法は、radioimmunoassay (RIA) 法であるが、同法が放射性同位元素を利用しているため、測定施設が限定される。最近、抗体標識法を放射性同位元素から酵素に置き換えた enzyme immunoassay (EIA) の開発が進み、その有用性が報告されている^{1,2)}。今回、わ

れわれは、英国 IQ (Bio) 社製、PAP-AELIA キットを入手しうる機会を得たので、若干の基礎的検討を加え、その臨床的成績について報告する。

対象および方法

1. 測定対象

正常男子17例、正常女子3例、前立腺癌23例 (stage B: 2例, stage C: 5例, stage D: 16例)、前立腺肥大症31例、前立腺炎14例 (急性3例、慢性10例、結核性1例)、前立腺癌以外の悪性腫瘍29例 (膀胱腫瘍21例、腎腫瘍3例、睾丸腫瘍2例、肝細胞癌2例、血管周皮細胞腫1例) の計117例である。

2. 方法

1) RIA 法: 栄研イムノケミカル研究所製, RIA キットを用いた. 本キットではヒト前立腺肥大結節組織から抽出精製された PAP に対する抗 PAP 抗体が作製されており, これを用いた二抗体法にて測定した.

2) EIA 法: 英国 IQ (Bio) 社製, PAP-AELIA キットを用いた. 本キットの特徴は酵素増幅法を用いることにより, より迅速でより高感度な測定を可能にしたことである. Fig. 1 にこの操作手順を示す. 本法におけるプレートの洗浄操作は1カ所のみで, 全工程は約3時間で終了する. 一検体につき3 wells の平均値をもってその PAP 濃度とした.

結 果

1. 基礎的検討

1) 標準曲線の再現性 (Table 1)

各濃度における変動係数 (CV%) は 4.7~9.9% であった.

2) Intra-assay (Table 2)

PAP 濃度の異なる3検体を同一アッセイ内で8回測定した. CV%は2.3~4.4%であった.

3) Inter-assay (Table 3)

PAP 濃度の異なる3検体について施行日を変えてそれぞれ5回測定した. CV%は3.0~3.6%であった.

Pipette 60 μ l of conjugate into each well

Add 20 μ l of serum or standard

Incubate for 2 h.

Wash four times

Add 80 μ l of substrate

Incubate for 20 min.

Add 220 μ l of amplifier

Incubate for 10 min.

Add 50 μ l of stopping solution

Read absorbance at 492 nm

Fig. 1. Test procedure flow chart of IQ (Bio) PAP-AELIA kit.

Table 1. Reproducibility of standard curve.

PAP std. (ng/ml)	NO.	Mean absorbance at 492nm	S.D. $\times 10^{-3}$	%CV
2.5	7	0.243	24.1	9.9
3.75	7	0.328	29.0	8.8
5.0	7	0.454	21.3	4.7
7.5	7	0.638	38.4	6.0

4) 希釈試験 (Fig. 2)

PAP 濃度, 9.0 ng/ml の血清サンプルをキット添付の試料希釈液を用いて希釈し測定した. 再現率は 96.5~117.0% (106.2 $\pm$ 8.9%) であった.

5) 添加回収試験 (Table 4)

PAP 濃度の異なる2検体に対して各濃度の標準液を1:1の割合で混合した場合の回収率は, 91.7~114.1% (101.3 $\pm$ 6.9%) と良好であった.

2. 臨床的検討

Table 2. Intra-assay precision.

No.	Sample		
	I	II	III
1	2.14	3.91	9.28
2	2.07	4.04	9.45
3	2.15	4.00	9.04
4	2.27	4.09	9.43
5	2.15	4.23	10.19
6	2.18	4.05	9.95
7	2.12	3.99	9.91
8	2.15	4.02	9.16
Mean	2.15	4.04	9.55
S.D.	0.05	0.10	0.42
C.V.	2.3	2.5	4.4

Table 3. Inter-assay precision.

No.	Sample		
	I	II	III
1	2.35	4.56	6.01
2	2.33	4.34	5.78
3	2.20	4.25	6.13
4	2.40	4.50	6.36
5	2.31	4.70	6.24
Mean	2.32	4.47	6.10
S.D.	0.07	0.17	0.22
C.V.	3.0	3.8	3.6

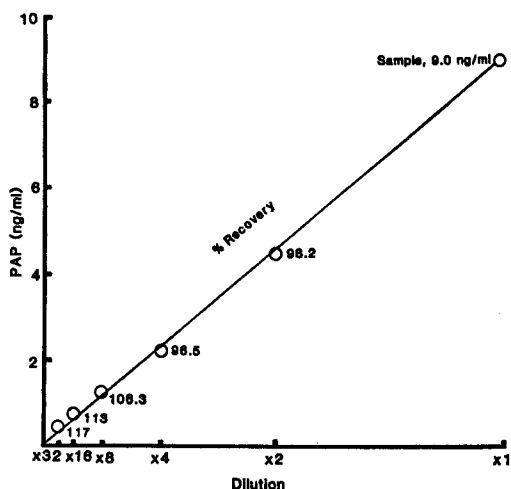
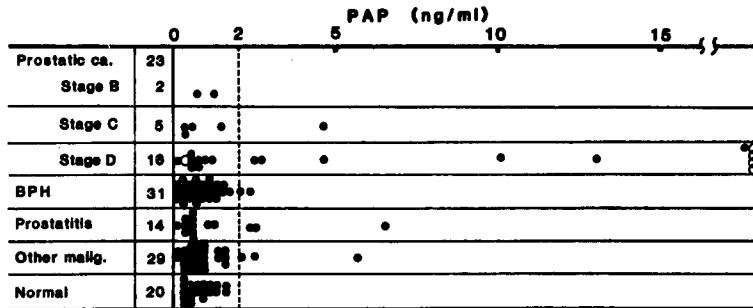


Fig. 2. Dilution test.

Table 4. Recovery test.

Sera	PAP(ng/ml)				% Recovery
	Added	Expected	Determined	Recovered	
S1 (3.0 ng/ml)	2.50	2.75	2.81	1.31	104.8
	3.75	3.38	3.64	2.14	114.1
	5.00	4.00	3.97	2.47	98.8
	7.50	5.25	5.27	3.77	100.5
S2 (0.9 ng/ml)	3.75	2.33	2.32	1.87	99.7
	5.00	2.95	2.93	2.48	99.2
	7.50	4.20	3.89	3.44	91.7



○:untreated case in prostatic ca.

Fig. 3. Serum PAP levels by EIA.

Table 5. PAP positive rate in prostatic cancer.

Stage	No.	Positive cases	
		EIA	RIA
B	2	0	0
C	5	1	1
D	16	6	7
	(5)	(4)	(5)

(); untreated cases

正常男子17例および正常女子3例の血清 PAP 値の平均値 $\pm$ 3SD は、それぞれ 0.85 ± 1.18 ng/ml, 0.60 ± 0.60 ng/ml であった。また正常男子の最高値は、1.7 ng/ml であり、2.0 ng/ml を越えるものは認められなかった。以上より本キットの正常域は、2.0 ng/ml 以下とした。Fig. 3 に各疾患の血清 PAP の測定値を示す。

前立腺癌症例についてみると、異常高値を示した症例は、stage B: 0/2, stage C: 1/5 (20%) stage D: 未治療, 4/5 (80%), 既治療, 6/16 (38%) であった。一方、前立腺肥大症では 2/31 (6%), 前立腺炎 3/14 (21%), その他の悪性腫瘍 3/29 (10%) に異常高値を認めた。これら前立腺癌以外で異常高値を示した大部分の症例の測定値は、正常上限値を僅かに越える程度であったが、急性前立腺炎の1例 (6.6 ng/ml) と、腎細胞癌の1例 (5.7 ng/ml) では、明らかな上昇が認められた。前立腺癌23例において、RIA 法との比較を行なうと、Table 5 に示すごとく異常高値の出

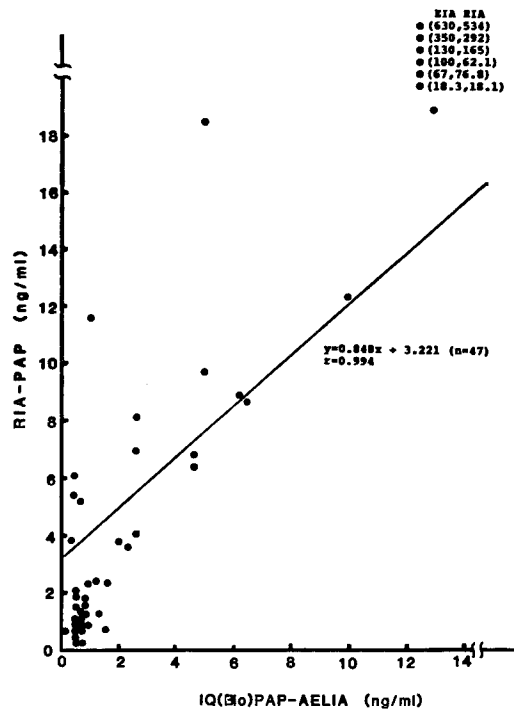


Fig. 4. Correlation of PAP results between EIA and RIA

現率はほぼ一致していた。同一症例より経時的に得られた血清サンプルを含む前立腺癌症例47検体における比較検討では、相関係数 $r=0.994$ と高い相関関係が

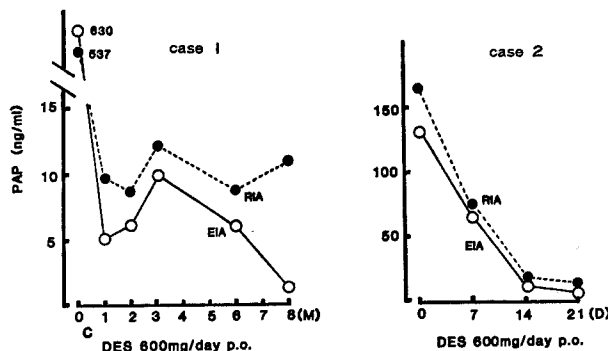


Fig. 5. The change in PAP level in response to hormone therapy in patients with prostatic cancer.
DES: Diethylstilbestrol diphosphate C: Castration.

得られた (Fig. 4).

次に本法の測定値と臨床経過との相関を示した症例を提示する。

症例 1: 食思不振を主訴に某医を受診し, PAP の異常高値を指摘され, 当科に紹介された。前立腺生検の結果は, 未分化型腺癌であり, 骨スキャンにて脊椎骨への広汎な転移が疑われ, stage D と判定された。除手術に引き続きホルモン療法にて follow-up した際の血清 PAP 値の変動を Fig. 5-A に示す。治療開始 7 カ月後の骨スキャンでは, もはや異常集積は認められず, 全身状態も良好であり, 患者は, ホルモン療法でよくコントロールされている状態と考えられた。この時の血清 PAP 値は, EIA 法では正常化していた。

症例 2: 排尿困難, 腰痛, 肉眼的血尿および骨スキャンにて RI の異常集積が広汎に認められ当科に紹介された。前立腺生検の結果は未分化型腺癌で, stage D としてただちにホルモン療法を開始した。治療前 130 ng/ml あった PAP 値は, 排尿困難や腰痛の軽快とともに漸次下降し, 3 週間後にはほぼ正常化した (Fig. 5-B)。

考 察

今回われわれは, 免疫学特異性を利用した方法である enzyme immunoassay (EIA) 法により PAP 活性を測定し, 現在当科で使用している RIA 法による測定結果と比較検討した。従来の 2 抗体法 EIA 法と呼ばれるものは, 標識第 2 抗体の固相への結合量をできるだけ多くする必要があり, このために昼夜といった長時間のインキュベーションが要求される。これに対して IQ (Bio) PAP-AELIA キットでは, 基本的には従来の EIA 法と同様に PAP に対する抗原認識部位の異なる 2 種類のモノクローナル抗体を用い,

PAP をサンドイッチ方式で捕える方法を用いている。しかし本キットは標識されている酵素の活性を直接測定するのではなく, この酵素より生成される化合物とこの化合物が trigger となる酵素増幅系とを反応させることでえられる発色を測定する方法である。この増幅系は約 500 倍の増幅能力をもつとされ, したがって感度を下げることなく反応時間の短縮が可能となる。本キットの基礎的検討において標準曲線の再現性は良好で, Intra-assay, Inter-assay における変動も測定上の誤差の範囲と思われた。希釈試験ではほぼ満足すべき直線性が得られ, 添加回収試験においても回収率 $101.3 \pm 6.9\%$ と良好であった。前立腺癌症例における EIA 法と RIA 法の相関係数は $r=0.994$ ($n=47$) と良好な正の相関が得られ, また陽性率もほぼ一致していた。前立腺肥大症において EIA 法による false positive 例が報告されているが¹⁾, 今回の検討では前立腺肥大症で 2/31 (6%), 前立腺炎で 3/14 (21%), その他の悪性腫瘍で 3/29 (10%) の false positive が認められた。これら false positive 8 例中 6 例までは, 2.7 ng/ml 以下であり, 正常域を 2.0 ng/ml 以下とした設定に問題があるのかもしれない。明らかな高値を示した前立腺炎の症例は, RIA 法でも異常高値を示していたが, 腎細胞癌の 1 例では, RIA 法では正常値を示しており, 本キットの抗体と cross reaction を起こしうる物質の存在を考えさせる。臨床経過との比較においては, EIA 法による測定値は RIA 法の値とおおむね平行して推移し, ホルモン療法の治療効果をよく反映するものと考えられた。

結 語

前立腺性酸性フォスファターゼ (PAP) の enzyme immunoassay キット (IQ (Bio) PAP-AELIA) による測定を前立腺癌 23 例を含む計 117 例に対して施行

した。

1) キットの基礎的検討において、Intra-assay および Inter-assay における PAP 濃度の変動係数、さらに希釈試験、添加回収試験における再現率は満足すべき結果であった。

2) 前立腺癌23例47検体における RIA 法との相関係数は0.994と良好な正の相関を認めた。

3) 前立腺癌症例における陽性率は、stage B: 0/2 (0%), C: 1/5 (20%), D: 未治療, 4/5 (80%), 既治療, 6/16 (38%) であった。

4) False positive は前立腺肥大症 2/31 (6%), 前立腺炎 3/14 (21%), その他の悪性腫瘍 3/29 (10%) にみられたが、その大部分は正常域をわずかに上まわる程度であった。

5) Stage D の2例における臨床経過との比較から、本キットによる PAP 測定値はホルモン療法の治療効果をよく反映していることが示された。

以上 IQ (Bio) PAP-AELIA キットは、正常値の

設定については検討の余地を残すものの、感度および再現性に関しては RIA 法に匹敵することが示され、その簡便な操作と放射性同位元素を必要としない点を考慮すれば、今後 RIA 法に代わりうる方法であると考えられた。

本研究にご協力を頂いた本学検査部、奥村次郎博士に深謝致します。

文 献

- 1) Cooper EH, Glashan R, Robinson MRG, Morgan DB and Trautner K: The evaluation of a new enzyme immunoassay for the measurement of prostatic acid phosphatase. Clinica Chimica Acta 113: 27~34, 1981
- 2) 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
(1987年3月26日迅速掲載受付)