

前立腺性酸性フォスファターゼの免疫酵素測定法

千葉大学医学部泌尿器科学教室（主任：島崎 淳教授）

布施 秀樹・座間 秀一・島崎 淳

PROSTATIC ACID PHOSPHATASE MEASURED BY IMMUNOENZYMEASSAY

Hideki FUSE, Shuichi ZAMA and Jun SHIMAZAKI

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

(Director: Prof. J. Shimazaki)

Prostatic acid phosphatase was determined with Merck-Kanto's test kit on the cases of prostatic cancer experienced at our University Hospital from August in 1983 to February in 1985.

Untreated cases were 4 stage A cases, 1 stage B cases, 3 stage C cases, 3 stage D₁ cases and 12 stage D₂ cases. Nine cases were determined before and after hormonal treatment. From 67 controlled cases and 19 recurrent cases, 144 and 56 samples were selected, respectively. This method showed good reproducibility and even the serum stored at -80°C after separation could be used for determination by addition of tartrate just before the measurement. The occurrence of abnormal values in untreated prostatic cancer cases, was 0% for stage A, 1 case for stage B, 33% for stage C and D₁ and 75% for stage D₂. Hormonal treatment decreased the high values of 5 cases and 1 case returned to normal. Compared to the recurrent cases, controlled cases showed a significantly larger ratio of negative, and it suggests that the test is useful for follow-up. Prostatic hypertrophy showed the increase of the value in 6% of the cases. Both prostatitis and urinary tract stone cases remained in the normal range.

Key words: Prostatic acid phosphatase, Immunoenzymeassay, Prostatic cancer

緒 言

転移をもつ前立腺癌の血中に酸性フォスファターゼが上昇することが見だされてから、すでに約半世紀が経過した。当初は酵素活性によりこの酵素が測定され、感度を良くするためいろいろの基質が応用された。しかし酸性フォスファターゼは前立腺のみでなく、赤血球、白血球、血小板、肝、脾、腎、骨などに広く分布しており、血中の酸性フォスファターゼはこれらすべてに由来するので特異性に乏しかった¹⁾。前立腺の酸性フォスファターゼがL(+)酒石酸により阻害を受けることを利用する前立腺性酸性フォスファターゼ測定法も、特異性をそれほど改善したものではなかった。

1970年代になってから、前立腺肥大症や癌の手術材料、前立腺液または精液を材料として酸性フォスファターゼが精製され、この抗血清を利用して前立腺に特異的な酸性フォスファターゼが定量されるにおよび、前立腺癌における本酵素の測定の意義が信頼性を増した。はじめはゲル拡散法や免疫電気泳動法などがおこなわれたが、競合結合法、とくに2抗体法であるラジオイムノアッセイ法(RIA)が出現してから、キットの普及とあわせ酸性フォスファターゼ測定法の主流となった²⁾。現在国産、海外のものが数種実用化されている。

RIAはすぐれた方法であるが、 γ 線測定機器を要し、放射能汚染も問題視される。これを改善すべく、またさらに感度や特異性を向上するため免疫酵素測定

法が開発された。このひとつである固相化したヒツジ抗体に結合した酵素の活性を測定するメルク・関東化学のキットを検討した。

対象および方法

1983年8月より1985年2月までの千葉大学医学部附属病院泌尿器科でとりあつかった前立腺癌を対象とした。治療前症例は、Stage A, B, C, D₁, D₂ はそれぞれ4, 1, 3, 3, および12例であり、D₁ は B および C とおもわれたものに staging operation をして確定した。去勢、および直後よりジェチルスチルベストロール・2 磷酸 250～500 mg 連日4週間投与という内分泌療法³⁾を実施したもののうち9例(stage A₂ 1例, C 1例, D₁ 2例, D₂ 5例)に治療前後の測定をおこなった。

この期間に治療の前立腺癌で、制癌しているもの67例、再燃し進行中のもの19例について検討した。各症例1～4回の測定をおこなったので、検体数は制癌144, 再燃56である。

採血後血清を分離し、一部は本キットの指示に従い血清 1 ml につき10% クエン酸 20 μ l を添加したのち-80°C に保存した。他は血清をそのまま -80°C に保存した。

前立腺性酸性フォスファターゼ (PAP) の測定は、メルク・関東化学のキットの順序によった。すなわち200 μ l の試料を抗 PAP ヒツジ抗体の付着せるポリスチレン管に入れ、20～25°C で24時間反応させる。液をのぞき、管を 0.1 M NaCl 添加 0.05 M 酢酸緩衝液 (pH 6.0) にて洗浄後、20 μ moles の 4-ニトロフェール磷酸と 0.1 M 1-ペンタノールを含む 0.05 M クエン酸緩衝液 (pH 4.8) 中で2時間反応させ、0.1 M NaOH にて反応を停止して 405 nm にて吸光度を測定した。既知量の PAP を別に反応させ、比較した。

ラジオイムノアッセイによる PAP は栄研キットによった。

結 果

1. 同一キット内における再現性

濃度の異なる3種の血清を用いて、PAP を測定した (Table 1)。いずれも変動係数は3%以下と、きわめて良好である再現性がえられた。

2. 希釈試験

25 ng/ml の値である血清をキットに添加せる加熱により不活性化したヒト血漿の凍結乾燥末の溜水による溶解液を用いていろいろの濃度に希釈し、反応をおこなった (Fig. 1)。測定値は原点をとる直線を示

Table 1. 同一キット内における再現性

	0.59	1.88	4.53
	0.58	1.76	4.59
	0.58	1.73	4.78
	0.61	1.82	4.64
	0.60	1.76	4.70
	0.60	1.82	4.62
	0.61	1.84	4.61
	0.61	1.81	4.43
	0.61	1.80	4.65
	0.61	1.83	4.36
n :	10	10	10
Mean:	0.60	1.81	4.59
SD :	0.01	0.04	0.12
CV :	2.1 %	2.5 %	2.7 %

しており、手技の定量性が確認された。

3. 保存期間の測定におよぼす影響

血清を2分し、一方にクエン酸を添加して数本に分け保存、他はそのまま数本として保存する。一定の期間後、後者は溶解してからクエン酸を添加して、両者を経時的に測定した (Fig. 2)。クエン酸添加の有無にかかわらず、両血清とも9カ月まで保存の影響はみられない。したがって血清を -80°C に保存すれば、クエン酸の添加をしていない血清でも試料に用いることがわかった。

4. 凍結融解の測定におよぼす影響

クエン酸添加後保存した血清と、血清分離後ただちに保存し、測定時クエン酸を添加するものについて、4回まで凍結融解をくり返し、そのつど測定した (Fig. 3)。同一検体の凍結融解は測定値に影響を与えず、またクエン酸添加の時期を異にしてもほぼ同じ結果を得た。

5. 保存時のクエン酸添加有無の影響

血清を -80°C にて保存しその後 PAP を測定するに当たり、クエン酸を保存の前に添加しても、融解して反応時に添加しても得られる値は大きな差がないことが、前記の実験で推測された。このことをさらに確認するため、いろいろの濃度の血清を2分し、クエン酸添加の有無と測定の関係を検討した (Fig. 4)。その結果、保存時添加しても、融解して測定時添加しても、両者の値はよく相関することがわかった。

6. 前立腺癌治療前の PAP

治療前の症例を採血し、血清分離後クエン酸を添加して保存後測定した PAP を Fig. 5 に示した。メル

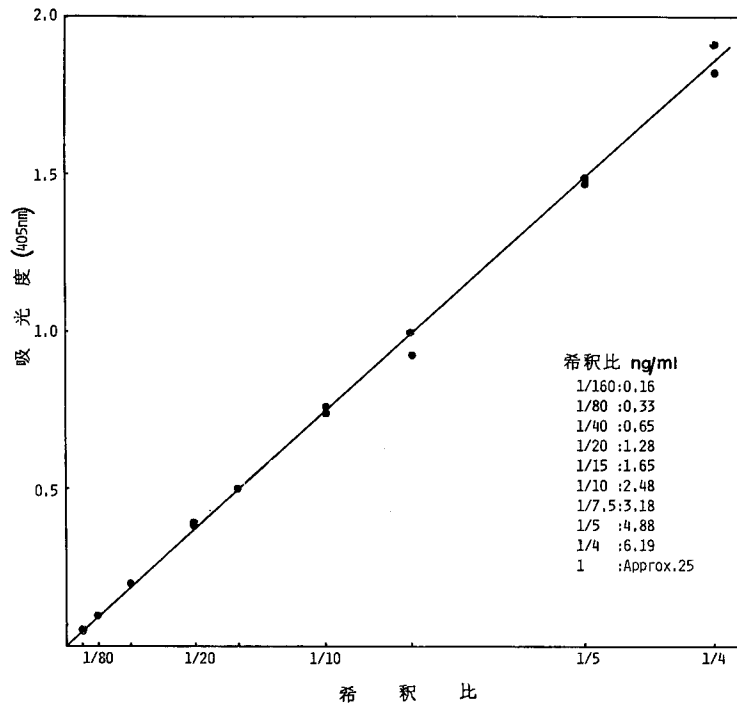


Fig. 1. 希釈の測定に及ぼす影響

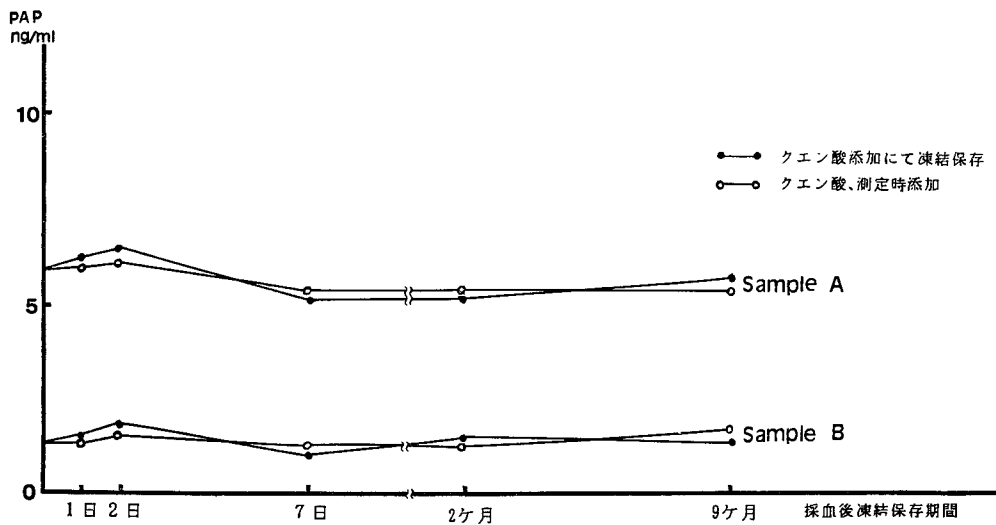


Fig. 2. 保存期間の測定に及ぼす影響

ク・関東化学キットによる PAP の正常上限は 1 ng/ml であるので、異常値出現率は stage A 0%, B は 1 例の測定のみであるが高値, C は 3 例の測定中 1 例高値, D₁ は 33%, D₂ は 75% であった。骨盤内リンパ節に転移をみるも遠隔転移のない D₁ はあきらかに骨転移を有する D₂ と異なっているので、前立腺癌が原

発巣に局限しているか所属リンパ節転移がおこっているかの鑑別には本測定法が利用できないと考えられた。stage D₂ で正常範囲の PAP を示したものは、高値のものとの間に骨転移の状態に差をみなかった。内分泌療法を実施した 9 例に、治療開始後 1 カ月のときの PAP を治療前値と対比させた (Fig. 6)。高値

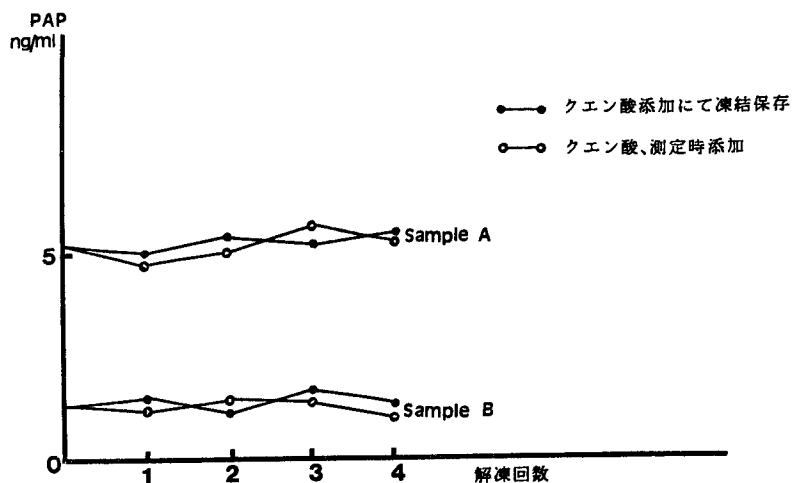


Fig. 3. 凍結融解の測定に及ぼす影響

クエン酸添加にて凍結保存

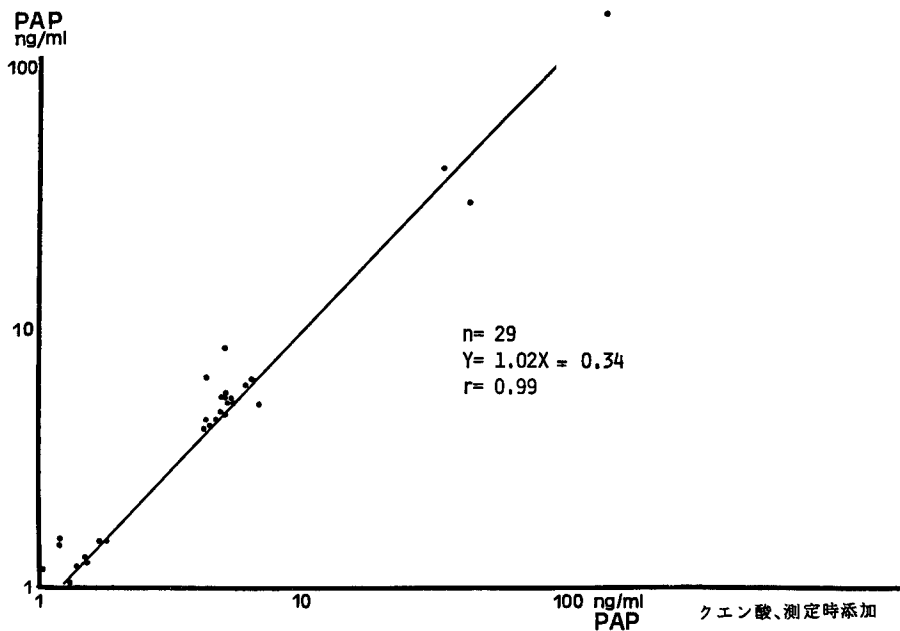


Fig. 4. 保存時のクエン酸添加の有無と反応との関係

であった5例はいずれも内分泌療法によって低下したが、1例のみが正常範囲となったのみで他は異常値を示していた。これらの5例はいずれも原発巣の縮小を示しており、内分泌療法有効例と判定されたので、PAPは治療の反応性の観察に有用であると考えられた。

7. 前立腺癌以外の PAP

前立腺肥大症、前立腺炎、および尿路結石と診断さ

れたものを採血し血清分離後クエン酸添加し保存して、測定に供した (Fig. 7)。前立腺肥大症はその後手術し組織学的に診断されたものであり、前立腺炎と尿路結石はどちらも慢性経過をとって症状をほとんど欠くものを対象とした。正常上限を 1 ng/ml とするとき、前立腺炎も尿路結石も検査した全例正常範囲にあった。前立腺肥大症は2例、6%の上昇であるが、測定値は 2 ng/ml 以下と軽度の上昇をみるのみであ

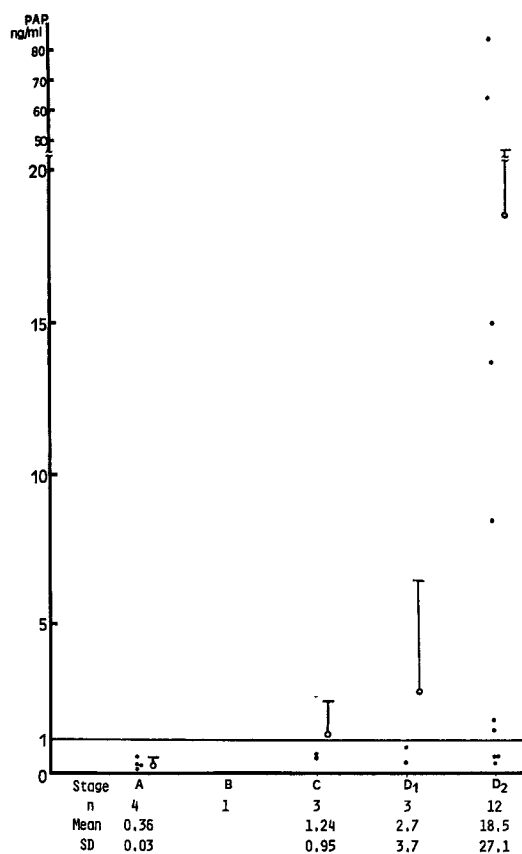


Fig. 5. 前立腺癌治療前症例の前立腺性酸性フォスファターゼ

った。

8. 本法とラジオイムノアッセイによる PAP との比較

私どもの研究室にラジオイムノアッセイによる PAP の判明している血清中、保存期間が9カ月未満のものを用い、融解後クエン酸を添加してメルク・関東化学キットによる PAP を測定した。大部分は前立腺癌で治療中のものである。ラジオイムノアッセイ法と本法とは、本法で 2 ng/ml 以下のものにおける比較でも (Fig. 8), 全例における比較でも (Fig. 9) よい相関を示した。

9. 前立腺癌の経過と PAP

前立腺癌の治療中または後の症例で、制癌されているものと、再燃したものと PAP をみた (Table 2)。治療は大部分は内分泌療法、一部は放射線照射で開始されており、制癌の大部分は合成エストロゲンの投与を受けている。再燃は抗癌剤を投与されている。なおこれらの血清は、測定されるときクエン酸が添加

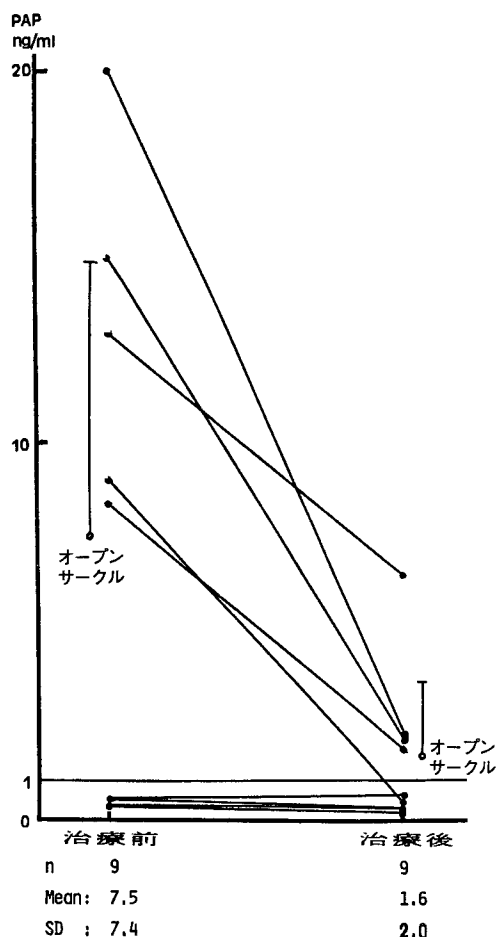


Fig. 6. 内分泌療法前後の前立腺性酸性フォスファターゼ

されており、Fig. 8 および Fig. 9 に用いたと同じ測定値である。

制癌のものは8%のみ上昇しているのに対し、再燃は73%と有意に上昇を示していた。これより PAP は経過の把握に役立つことが確認された。

考 察

PAP の測定において、正常上限をどこに設定するかは重要な問題であろう。以前は 10 ng/ml とされていたときもあったがラジオイムノアッセイが普及するにつれ、3 ng/ml が多く用いられている¹⁾。しかし前立腺由来の酸性フォスファターゼの精製が良くなり、これによる抗血清の特異性が高くなれば測定値が少なくなることになり、実際モノクローナル抗体を用いた方法により 1.94 ng/ml が正常上限であった⁴⁾。今回実施した免疫酵素測定法のキットによれば、正常上限

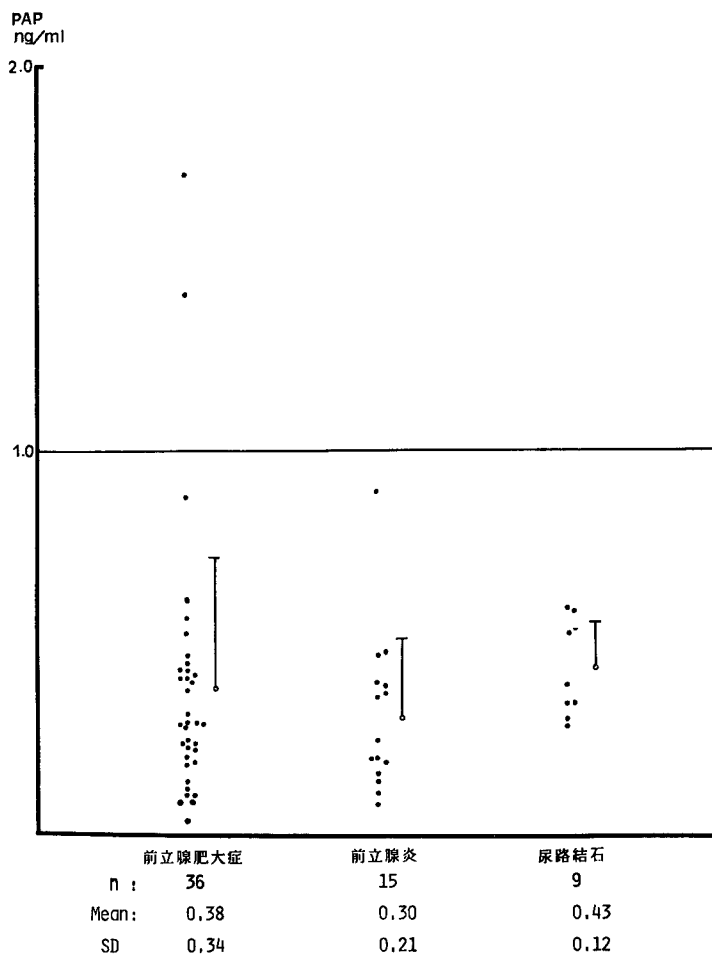


Fig. 7. 前立腺肥大症, 前立腺炎, 尿路結石患者の前立腺性酸性フォスファターゼ

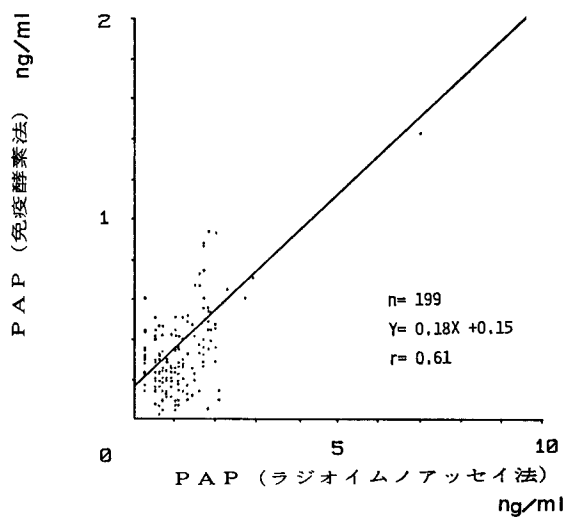


Fig. 8. 本法とラジオイムノアッセイ法との比較

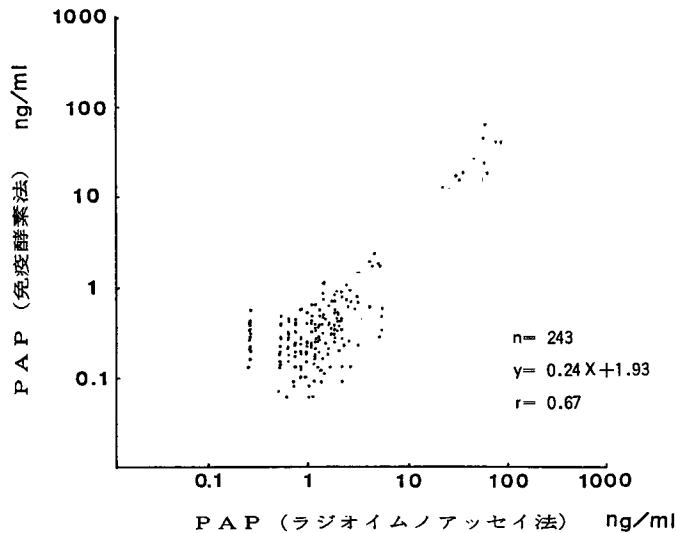


Fig. 9. 本法とラジオイムノアッセイ法との比較

Table 2. 前立腺癌の経過と前立腺性酸性フォスファターゼ

	上昇	正常	計
制癌	12	132	144
再燃	41	15	56
計	53	147	200

p<0.005

は 1 ng/ml となっており、特異性がきわめて高いといえる。さらに本法の最小検出感度は 0.2 ng/ml から直線性が得られているので、正常域における測定についても良い結果が得られている⁵⁾。

酵素活性の測定による酸性フォスファターゼの定量のときには、前立腺癌は stage D とならなければ上昇しないとされ、実際に異常高値は骨転移の診断ともいえた。ところがラジオイムノアッセイがおこなわれるようになり、stage B 30%, C 50%以上, D 80%以上に上昇することがわかった⁶⁾。ほぼこれと同じ傾向が、今回の本法による結果でも示されていた。さらに多数例の検討後に待ちたいが、本法のごとき感度と特異性にすぐれている免疫酵素測定法によっても、現在のほぼ標準化したラジオイムノアッセイと似た結果

が得られることになり、おそらく PAP の測定はこのあたりが限度であるのだろう。酸性フォスファターゼとは異なる前立腺癌の腫瘍マーカーが要求されるところで、現在前立腺特異抗原や γ -セミノプロテインが検討されている^{7,8)}。これらと PAP の併用により早期癌にも応用できるという報告がある。

前立腺肥大症は PAP 測定にあたり、唯一の偽陽性となるものであり、ラジオイムノアッセイでは 3~14%が高値となる⁹⁾。今回も 6%の異常値をみたが、その値は軽度の上昇であった。

酸性フォスファターゼは失活しやすいので、血清の保存に注意する必要があるといわれている¹⁰⁾。本法は血清の保存時にクエン酸による酸性化が指示されていた。しかし今回の実験では、分離後ただちに -80°C で保存

された血清でも、融解後クエン酸をくわえて測定することにより、保存の影響を受けずに定量可能であることがわかった。-20°Cでの保存において酸性化の有無にかかわらず156日までPAPが安定であったという報告があるので¹⁰⁾、本法は保存血清でもおこなうるといえる。酵素活性の測定では失活しやすいPAPが、免疫酵素法でなぜ長期間安定であるか不明であるが、PAPを抗体と結合することにより反応に影響を与える因子を除外するのか、抗原抗体反応が活性基に良い効果を及ぼすためかもしれない。

前立腺癌の臨床に不可欠であるPAP測定に、感度、特異性に秀れ操作が簡便な方法が実用化されたことは、大いに利用価値のあることといえる。

結 語

メルク・関東化学の免疫酵素測定法を利用したPAPのキットを検討した。本法は再現性がよく、-80°Cの保存により測定値に影響を受けず、さらに分離後すぐ保存された血清でも測定時クエン酸添加により測定しうることがわかった。

前立腺癌の初期癌では、異常出現頻度が低いが、骨転移をおこしたものは75%の上昇をみた。治療中の経過の把握には有用であると考えた。

前立腺炎や尿路結石はすべて正常範囲であったが、前立腺肥大症では6%の上昇をみた。

文 献

- 1) 島崎 淳・丸岡正幸：前立腺由来酸性フォスファターゼ。臨床検査 Mook 19, 腫瘍マーカー。98~108 金原出版, 東京, 1984
- 2) 丸岡正幸・野積邦義・伊藤晴夫・島崎 淳・村上

信乃：前立腺性酸性フォスファターゼ：Enzymatic Assay, Counter Immunoelectrophoresis (CIEP) および Radioimmunoassay (RIA) 法による比較。西日泌尿 42: 1159~1164, 1980

- 3) 島崎 淳・伊藤晴夫・宮内大成・布施秀樹・井坂茂夫：前立腺癌の内分泌療法。Oncologia 10: 82~98, 1984
- 4) 榊鏡年晴・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
- 5) 岡部紘明・中内浩二・森真由美・野間昭夫：酸性フォスファターゼアイソザイムによる前立腺癌の診断法。現代の診療 25: 679~685, 1983
- 6) 島崎 淳・布施秀樹：前立腺癌の腫瘍マーカー。臨泌 39: 379~386, 1985
- 7) 島崎 淳・伊藤晴夫・宮内大成・丸岡正幸・井坂茂夫・榊鏡年清・安藤 研：泌尿器科領域における腫瘍マーカー。癌の臨床 29: 684~692, 1983
- 8) 布施秀樹・榊鏡年清・片海善吾・島崎 淳：前立腺癌患者血清中 γ -セミノプロテイン。泌尿紀要 31: 81~85, 1985
- 9) Chen IW, Sperling MI, Maxon HR and Kaplan LA: Stability of immunologic activity of human prostatic acid phosphatase in serum. Clin Chem 28: 1163~1166, 1982
- 10) Lin TM, Chin-See MW and Halbert SP: The stability of prostatic acid phosphatase, as measured by a capture immunoenzyme assay. Clin Chim Acta 138: 78~86, 1984

(1985年6月19日迅速掲載受付)