

前立腺特異抗原 (PSA) キット間における Free および Complex type の免疫認識の違いに関する検討

—Delfia 法, ケミルミ ACS-PSA 法, Eiken 法を対象として—

獨協医科大学泌尿器科学教室 (主任: 吉田謙一郎教授)

寿美 周平, 梅田 宏, 古賀 文隆, 矢野 雅隆
今井 利一, 細谷 吉克, 本田 幹彦, 前田 節夫
鈴木 徹, 吉田謙一郎

春日部市立病院泌尿器科 (院長: 根岸壮治)

根 岸 壮 治

DETERMINATION OF FREE TYPE AND COMPLEX TYPE PROSTATE-SPECIFIC ANTIGEN (PSA): DIFFERENCES IN IMMUNORECOGNITION BY DELFIA PSA, ACS-PSA AND EIKEN PA KITS

Shuhei SUMI, Hiroshi UMEDA, Fumitaka KOGA, Masataka YANO,
Toshikazu IMAI, Yoshikatsu HOSOYA, Mikihiro HONDA, Setsuo MAEDA,
Toru SUZUKI and Ken-ichiro YOSHIDA

From the Department of Urology, Dokkyo University School of Medicine

Takeharu NEGISHI

From the Department of Urology, Kasukabe Municipal Hospital

To study immunorecognition of free type and complex type prostate-specific antigen (PSA) by current commercial PSA assays, sera from 3 patients with stage D2 prostate cancer were separated by Sephacryl S-200 chromatography and determined by Delfia PSA, ACS-PSA and Eiken PA kits. Two antibodies used in the 3 kits are 2 monoclonal, 1 monoclonal and 1 polyclonal and 2 polyclonal antibodies, respectively. Following chromatography, two PSA peaks were obtained in all patients. One was about 100 kDa and the other about 30 kDa. The former was considered to be the complex type PSA (complex with α -1 antichymotrypsin) and the latter to be free type PSA. As to free type PSA, the ACS-PSA kit and Eiken PA kit quantitated PSA values approximately 5.1 and 2.5 times higher than the Delfia PSA kit. For complex type PSA, the quantity determined by ACS-PSA kit was approximately 1.3 times higher than that determined by the Delfia PSA kit, while the quantity determined by the Eiken PA kit was about one third of that determined by Delfia PSA kit. The ratio of complex type PSA to total PSA (free type PSA + complex type PSA) was $74.8 \pm 14.9\%$ (mean $\pm$ SD) when determined by Delfia PSA kit, $59.3 \pm 18.4\%$ by ACS-PSA kit and $52.9 \pm 13.8\%$ by Eiken PA kit. The range of this ratio determined by ACS-PSA kit was from 47.3% to 80.5% in the 3 patients.

These findings suggest that there are qualitative differences in immunorecognition of free type PSA and complex type PSA among current commercial PSA assays and that there are quantitative differences in the ratio of the 2 forms of PSA in serum among prostatic cancer patients. The measurement and follow-up of both free type and complex type PSA might be important for diagnosis and monitoring of prostate cancer.

(Acta Urol. Jpn. 42 : 279-284, 1996)

Key words : Prostate-specific antigen, Free type PSA, Complex type PSA, Immunorecognition, PSA kit

緒 言

前立腺癌の診断, および病勢をモニターする上で
の, 血中 PSA 測定の高い有用性はすでに確立されて

おり¹⁻³⁾, 今後社会の高齢化に伴い前立腺癌患者の増
大が見込まれることも相まって, 新たな PSA 測定
キットが次々と開発され, 測定感度の向上とともに
測定手順の簡素化, 自動化が図られている。本邦に

においてもすでに10種以上のキットが使用可能で、測定精度、最小測定感度、腫瘍マーカーとしてのカットオフ値などが報告されている⁴⁻⁶⁾。しかしながら実際には同一検体を測定してもキット間でその測定値が異なり、その結果正常値も異なるという重大な問題が存在する。このメカニズムについてはいまだに十分な解明がなされていないが、臨床上的必要性から異なるキット間のデータ比較のために換算式も求められている^{6,7)}。

一方最近の知見として、PSA は血中において protease inhibitor と結合した complex type PSA と非結合型の free type PSA として存在することが明らかにされているばかりでなく^{8,9)}。前立腺癌症例では前立腺肥大症に比較して complex type PSA の比率が高く、この比が両者の鑑別効率を向上させるとの報告^{10,11)}もなされている。Complex type では free type と比べると蛋白結合により PSA の立体構造が変化したり、測定キットの抗体が認識するエピトープが PSA と結合した蛋白により隠れたりする可能性が考えられる。すなわちキット間で使用する抗体が異なれば、PSA の free type と complex type の認識に偏りが生ずることを示唆するとともに total としての測定値にキット間で違いを生ずることを示唆する。しかしながらこのことはいまだに一部のキットでしか示されていない^{12,13)}。

PSA 測定キットの多くは2種の抗体を使用しているが、今回は、2種ともにモノクローナル抗体を使用する系である Pharmacia Delfia® 法 (Delfia 法)¹⁴⁾、モノクローナル抗体とポリクローナル抗体を組み合わせた系である Ciba Corning ACS-PSA 法® (ACS 法)¹²⁾、2種のポリクローナル抗体を使用した系である Eiken PA® 法 (Eiken 法)¹⁵⁾の3者を選び、free type および complex type の免疫認識の相違について検討を行ったので報告する。

対象および方法

PSA 測定用の血清は獨協医科大学および春日部市立病院泌尿器科に受診した前立腺癌 stage D2 の患者3人よりえた。いずれも未治療例で治療開始前の血清を対象とした。Sephacryl S-200 (ファルマシア社) を pH 7.4 に調整した phosphate buffered saline にて膨化させた後、カラム (直径×高さ: 2.4×120 cm) に充填した。カラムをゲル濾過用キャリブレーションキット (ファルマシア社) にてキャリブレーションした後、血清検体 1 ml を添加し、fraction collector にて1分画を 1 ml として採取した。各分画中の PSA 濃度を Delfia 法、ACS 法、Eiken 法の各キットにて測定し、PSA 溶出曲線を求めた。さらにこれらの結果よりキット間の回帰式を PSA の free type と com-

plex type の type 別に算出し、測定の違いについて検討した。Delfia 法、ACS 法、Eiken 法による PSA の測定法についてはすでに報告されており、ここではその説明を略す。なお図中に示す最小測定値はそれぞれの最小測定感度の値であり、測定感度以下は最小測定感度をもって図に示した。なお PSA の free type と complex type の比率に関するキット間の差の検定は、対応のある t 検定 (two group t-test: paired) を用いた。

結 果

1) PSA 溶出曲線

対象3症例のすべてにおいて2つの PSA ピークがみられ、その分子量はおよそ 100 kDa と 30 kDa であった (Fig. 1~3)。ヒト精漿を本カラムに添加し、その PSA を測定するとそのほとんどが 30 kDa の部分に溶出された。これらより 100 kDa が complex type PSA、30 kDa が free type PSA と判断された。

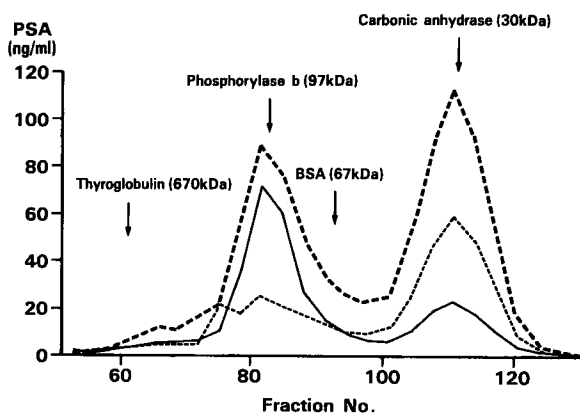


Fig. 1. Elution profile of serum PSA separated by Sephacryl S-200 chromatography (case 1). —: Delfia, ---: ACS,: Eiken.

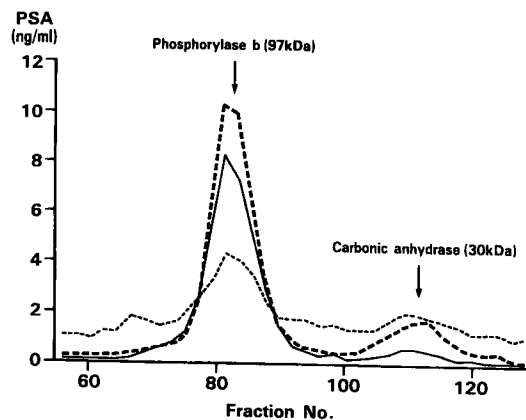


Fig. 2. Elution profile of serum PSA separated by Sephacryl S-200 chromatography (case 2). —: Delfia, ---: ACS,: Eiken.

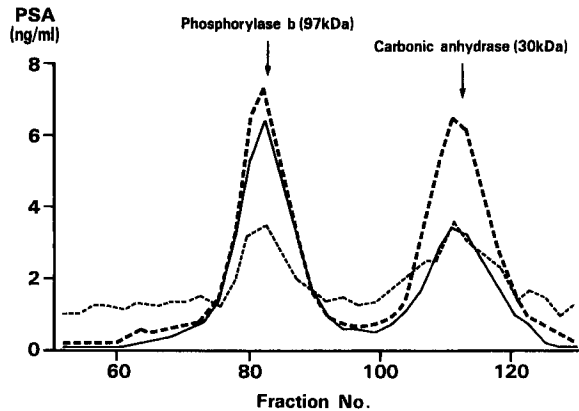


Fig. 3. Elution profile of serum PSA separated by Sephacryl S-200 chromatography (case 3). —: Delfia, ---: ACS,: Eiken.

100 kDa 付近のピークは complex type の中でも α 1-antichymotrypsin と結合した PSA と考えられたが, PSA に対するもう 1 つの主たる protease inhibitor とされる α 2-macroglobulin との結合 PSA (780 kDa) についてはそれに該当するピークは検出されなかった。

症例 1 の PSA 溶出曲線を Fig. 1 に示す free type PSA と complex type PSA の各認識が 3 つのキット間ですべて異なっていることが判る。complex type PSA の認識についてみると ACS 法が最も優位で, 以下 Delfia 法, Eiken 法の順であった。一方 free type の認識については ACS 法が最優位であるが, 以下 Eiken 法, Delfia 法と続き, complex の場合と異なった順位を示した。また症例 1 を Delfia 法で評価すれば complex type 優位であるが, ACS 法と Eiken 法で評価すれば free type が優位であることがグラフより明らかに示されており, free と complex の比率の評価はキット間で異なることが判る。症例 2 と 3 は症例 1 よりも総 PSA 値が低いいため, グラフ (Fig. 2, 3) の縦軸のスケールは異なるが, 今回, 測定感度以下を最小測定感度をもって示した結果, Eiken 法は Delfia 法, ACS 法より基線が高くなっていることが示された。また Eiken 法は他 2 者より最小測定感度が劣るばかりでなく, free と complex の type 別の評価においても感度が低いことが示された。また症例 2 と 3 は complex type の PSA 値は各測定キットで近い値を示したが, free type は 3 測定法のすべてで大きく異なっていることが示された。

2) 症例別および PSA キット別にみた free type と complex type の比率

Fig. 1~3 の溶出曲線から, free type と complex type のそれぞれの PSA 値を求め, その比率を症例間およびキット間で比較した (Table 1)。3 症例の PSA 値の complex/total (free+complex) の比率をみると

Table 1. The ratio of complex type PSA to total PSA among 3 prostatic cancer patients calibrated by 3 PSA assay systems

	Case 1	Case 2	Case 3
Delfia	73.2%	90.5	60.8
ACS	47.3	80.5	50.2
Eiken	39.3	66.9	52.5

Delfia 法では症例 3 が 60.8%, 症例 1 は 73.2%, 症例 2 では 90.5% と最大 29.7% の違いを症例間で示した。ACS 法では症例 1 で 47.3%, 症例 3 では 50.2% であるのに対し, 症例 2 では 80.5% と症例間で最大 33.2% の違いを示した。また Eiken 法ではその比率は症例 1 で 39.3%, 症例 3 で 52.5%, 症例 2 で 66.9% と最大 27.6% の症例間での違いを示した。このように同一測定法でも症例間で差がみられ, 前立腺癌患者間で total PSA に対する complex PSA の比率が一定せず大きな違いがあることが示された。キット別にみると total PSA に対する complex PSA の比率は, Delfia 法では $74.8 \pm 14.9\%$ (平均 $\pm$ 標準偏差), ACS 法では $59.3 \pm 18.4\%$, Eiken 法では $52.9 \pm 13.8\%$ であった。検体数が少なく有意差は認めなかったが, ACS 法と Eiken 法では Delfia 法に比して complex type の比率を低く評価する傾向がみられた。

3) Free type と complex type の type 別にみた PSA キット間の回帰関係

PSA 溶出曲線では free type と complex type を反映していると考えられる 2 つのピークがみられた。そこでこれらのピークを形成する 5 分画を各ピーク毎に選択しその PSA 測定値を free と complex の type 別に症例 1~3 で集計し, キット間の相関を検討した (Fig. 4~6)。

Free type につき各キット間の相関係数と回帰分析をみると最も低いもので Delfia 法と Eiken 法の相関係数である 0.992 であり, 回帰分析の p 値は 0.0001 以下であった。complex type についても同様であり, 回帰分析の p 値はいずれのキット間においても 0.0001 以下であった。このように free type, complex type のいずれも各キット間できわめて高い相関を示すが, その回帰直線につき傾きをみると ACS 法は Delfia 法に比して complex type を 1.3 ± 0.156 倍 (回帰直線の傾きの 95% 信頼区間, 以下同様に表記), free type を 5.138 ± 0.32 倍の高値として測定し (Fig. 4), Eiken 法は Delfia 法に比し complex type を 0.347 ± 0.67 倍と低く評価するが, free type は 2.584 ± 0.195 倍と高く評価する (Fig. 5) ことが示され, また Eiken 法は ACS 法に対して, complex type を 0.273 ± 0.21 倍, free type を 0.504 ± 0.013 倍と低く測定す

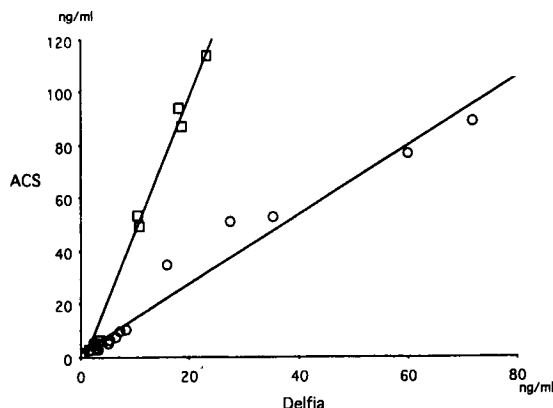


Fig. 4. Correlation between PSA values determined by Delfia PSA and ACS PSA according to types. $ACS = 1.555 + 1.3 \times Delfia$, $r = 0.980$, $p < 0.0001$ (complex type). $ACS = -4.558 + 5.138 \times Delfia$, $r = 0.995$, $p < 0.0001$ (free type). $\bigcirc$: complex type, $\square$: free type.

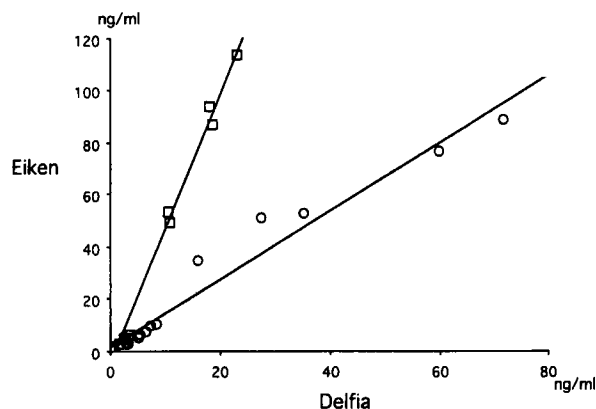


Fig. 5. Correlation between PSA values determined by Delfia PSA and Eiken PSA according to types. $Eiken = 2.187 + 0.347 \times Delfia$, $r = 0.952$, $p < 0.0001$ (complex type). $Eiken = -1.741 + 2.584 \times Delfia$, $r = 0.992$, $p < 0.001$ (free type). $\bigcirc$: complex type, $\square$: free type.

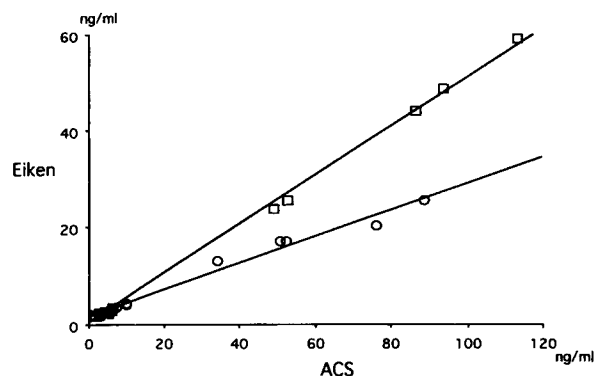


Fig. 6. Correlation between PSA values determined by ACS PSA and Eiken PSA according to types. $Eiken = 1.628 + 0.273 \times ACS$, $r = 0.992$, $p < 0.0001$ (complex type). $Eiken = 0.528 + 0.504 \times ACS$, $r = 0.999$, $p < 0.0001$ (free type). $\bigcirc$: complex type, $\square$: free type.

ることが示された (Fig. 6).

考 察

PSA は分子量約 30 kDa のセリンプロテアーゼの 1 つで精漿中に高濃度 (0.5~5 mg/ml) に存在する。主要な生理学的役割は精漿中のゲル形成性の蛋白である seminogelin と fibronectin を分解し精子の運動性の向上に寄与することである。1979年に同定されて以来¹⁶⁾, 前立腺上皮細胞によってのみ分泌されると考えられてきたが最近では傍尿道腺¹⁷⁾や一部の腫瘍組織 (乳癌や卵巣癌) でも微量に産生されていることが報告されている^{18,19)}。正常の前立腺上皮と前立腺肥大症組織は, 前立腺癌組織よりも PSA を大量に産生しており²⁰⁾, PSA の mRNA も悪性よりも良性の前立腺組織で高レベルに発現されている²¹⁾。したがって PSA は腫瘍細胞によってより大量に産生される通常の腫瘍マーカーとは異なり, 血中 PSA の上昇は前立腺組織の構造的異常によって PSA が間質中, そして血流中に漏出する量が増大した結果と考えられる。

活性を有する PSA が血中に放出されるとプロテアーゼインヒビターと結合して complex を形成する。インヒビターは血清中に PSA の 10^{5-6} 倍の高濃度で存在するため, 活性を有する PSA が血中に存在することはほとんどないと考えられている。実際には非結合型の free PSA が血中にみられるが, これらは活性を持たない pro PSA か, 血中に放出される前に部分的な修飾を受けて不活化された PSA とされる⁹⁾。PSA に対するプロテアーゼインヒビターとして $\alpha 1$ -antichymotrypsin (ACT), $\alpha 2$ -macroglobulin (MG), $\alpha 1$ -antitrypsin (AT), inter- α trypsin inhibitor (IT) が報告されており, PSA はこのうちおもに ACT と MG に結合する^{10,23)}。分子量は ACT との complex (ACT-PSA) が約 100 kDa, MG との complex (MG-PSA) が約 780 kDa とされている⁹⁾。今回カラムクロマトグラフィー上, 780 kDa の部分に PSA が検出されなかったが, これは MG-PSA が存在しないことを示すものではなく, 4 量体として存在する MG により PSA のすべてのエピトープが隠されたためと考えられる^{8,24)}。この他に AT や IT との complex も存在するがごく微量であり, 通常は free PSA と ACT-PSA を合わせて total PSA としている。

以上のように PSA の存在様式についての解明が進んだのと平行して, ACT-PSA と free PSA の比が, 前立腺癌と前立腺肥大症との鑑別に有用であるとの報告が最近なされている^{6,7,18)}。Christensson ら⁷⁾ は彼らの作成したキットを用いて free PSA/total PSA の中央値が前立腺癌患者では 0.18, 前立腺肥大症患者では 0.28 で両群間に統計上有意差が認められたとしているが, 両群間にはオーバーラップがみられており, こ

Table 2. Coefficients of correlation and linear regression lines among PSA assay systems for prostate cancer patients

X	Y		
	Delfia	ACS	Eiken
Complex PSA	LR	$Y=1.555+1.3X$	$Y=2.187+0.347X$
	r	0.980	0.952
Free PSA	LR	$Y=-4.558+5.138X$	$Y=-1.741+2.584X$
	r	0.995	0.992
Total PSA	LR	$Y=9.48+2.62X$	$Y=4.6698+0.3247X$
	r	0.99*	0.9466*

* 文献13

* 文献7

の比が両疾患の鑑別に有効なのは PSA の軽度上昇の症例に限定されるとしている。今回の検討結果が示すように、使用するキットにより total PSA の値が異なるのみならず、free と complex の測定比も大きく異なることは、前立腺癌と肥大症との鑑別を total PSA に対する free PSA の比率で求めるには PSA キットの free PSA, ACT-PSA の免疫認識を検討した上で行うべきであることを示している。今回検討した3つのキット間での回帰式を、既報告の総 PSA 値での回帰式と比較したものを Table 2 に示す。Table で示されるごとく complex, free, total の回帰直線の傾きに明らかな解離がみられる。今回3症例で示されたごとく free PSA と ACT-PSA の比率が症例間で異なること、また用いる PSA キットにより free PSA と ACT-PSA の測定が異なることなどを考えると、キット間での総 PSA 値の換算については、慎重に行うべきであると考ええる。

現在、MG-PSA については前述したごとの理由からその測定はできないが、*in vitro* の実験では MG は ACT よりも PSA との complex 形成が早いとの報告も⁸⁾あり、その濃度測定についても、今後検討する必要がある。

結 語

PSA 測定について、PSA の免疫認識の点からモノクローナル抗体・モノクローナル抗体の組み合わせ、モノクローナル抗体・ポリクローナル抗体の組み合わせ、ポリクローナル抗体 ポリクローナル抗体の組み合わせとし、Delfia 法、ACS 法、Eiken 法をこれらの代表的キットとして検討した。その結果、PSA の血中存在様式である free PSA と ACT-PSA の免疫認識にキット間で大きな違いがあること、また free PSA と ACT-PSA の比率がわずか3症例であるが症例間で大きく異なることが示された。これらの事実、前立腺癌の診断およびモニター上血中 PSA を、total PSA 値のみならず free PSA と ACT-PSA の存在様式別にも表現しておくことが重要である可能性を

示唆したものと思われる。

稿を終えるにあたり、カラムクロマトグラフィーにつき御指導いただいた新井京子氏に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Stamey TA, Yang N, Hay AR, et al.: Prostate-specific antigen as a serum marker for adenocarcinoma of the prostate. *N Engl J Med* **317**: 909-916, 1987
- 2) Miller JI, Ahmann FR, Drach GW, et al.: The clinical usefulness of serum prostate specific antigen after hormonal therapy of metastatic prostate cancer. *J Urol* **147**: 956-961, 1992
- 3) Stein A, deKernion JB, Smith RB, et al.: Prostate specific antigen level after radical prostatectomy in patients with organ confined and locally extensive prostate cancer. *J Urol* **147**: 942-946, 1992
- 4) Kuriyama M: Prostate-specific antigen as a tumor marker in prostate cancer. *Int J Urol* **1**: 99-113, 1994
- 5) 荒井陽一, 大西裕之, 大石賢二, ほか: 前立腺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—。泌尿紀要 **38**: 1129-1134, 1992
- 6) 栗山 学, 山本直樹, 篠田育男, ほか: 日本人症例における Tandem PSA の臨床的評価と他法との比較。泌尿紀要 **41**: 39-46, 1995
- 7) Kuriyama M, Akimoto S, Akaza H, et al.: Comparison of various assay systems for prostate-specific antigen standardization. *Jpn J Clin Oncol* **22**: 393-399, 1992
- 8) Christensson A, Laurell CB and Lilja H: Enzymatic activity of prostate-specific antigen and its reactions with extracellular serine protease inhibitors. *Eur J Biochem* **194**: 755-763, 1990
- 9) Lilja H, Christensson A, Dahlen U, et al.: Prostate-specific antigen in serum occurs predominantly in complex with α 1-antichymotrypsin. *Clin Chem* **37**: 1618-1625, 1991
- 10) Stenman UH, Leinonen L, Afthan H, et al.: A complex between prostate-specific antigen and α 1-

- antichymotrypsin is the major form of prostate-specific antigen in serum of patients with prostatic cancer: assay of the complex improves clinical sensitivity for cancer. *Cancer Res* **51**: 222-226, 1991
- 11) Chritensson A, Bjork T, Nilsson O, et al.: Serum prostate specific antigen complexed to α_1 -antichymotrypsin as an indicator of prostate cancer. *J Urol* **150**: 100-105, 1993
 - 12) Zhou AM, Tewari PC, Bluestein BI, et al.: Multiple forms of prostate-specific antigen in serum: differences in immunorecognition by monoclonal and polyclonal assays. *Clin Chem* **39**: 2483-2491, 1993
 - 13) 吉田謙一郎, 新井京子, 竹内信一, ほか: ケミルミ ACS-PSA 法による前立腺特異抗原の測定—Delfia 法を対照とした検討, 特に血中 free type PSA (遊離型 PSA) と complex type PSA (複合型 PSA) 測定の違いを中心として—. *西日泌尿* **56**: 1357-1362, 1994
 - 14) Vihko P, Kurkela R, Ramberg J, et al.: Time-resolved immunofluorometric assay of human prostate-specific antigen. *Clin Chem* **36**: 92-95, 1990
 - 15) 三木 誠, 町田豊平, 柳沢宗利, ほか: RIA による前立腺特異抗原 (PA) 測定の臨床評価. *日泌尿会誌* **75**: 1982-1988, 1984
 - 16) Wang MC, Valenzuela LA, Murphy GP, et al.: Purification of human prostate specific antigen. *Invest Urol* **17**: 159-163, 1979
 - 17) Frazier HA, Humphrey PA, Burchette JL, et al.: Immunoreactive prostatic specific antigen in male periurethral glands. *J Urol* **147**: 246-248, 1992
 - 18) Yu H, Diamandis EP and Sutherland DJ: Immunoreactive prostate-specific antigen levels in female and male breast tumors and its associations with steroid hormone receptors and patient age. *Clin Biochem* **27**: 75-79, 1994
 - 19) Yu H, Diamandis EP, Levesque M, et al.: Expression of the prostate-specific antigen gene by a primary ovarian carcinoma. *Cancer Res* **55**: 1603-1606, 1995
 - 20) Papsidero LD, Kuriyama M, Wang MC, et al.: Prostate antigen: A marker for human prostate epithelial cells. *J Natl Cancer Inst* **66**: 37-42, 1981
 - 21) Qui S-D, Young CYF, Bilhartz DL, et al.: In situ hybridization of prostate-specific antigen mRNA in human prostate. *J Urol* **144**: 1550-1556, 1990
 - 22) Lilja H: A kallikrein-like serine protease in prostatic fluid cleaves the predominant seminal vesicle protein. *J Clin Invest* **76**: 1899-1903, 1985
 - 23) Leinonen J, Lovgren T, Vornanen T, et al.: Double-label time-resolved immunofluorometric assay of prostate-specific antigen and of its complex with α_1 -antichymotrypsin. *Clin Chem* **39**: 2098-2103, 1993
 - 24) Lilja H and Lundwall A: Molecular cloning of epididymal and seminal vesicular transcripts encoding a seminogelin-related protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 4559-4563, 1992

(Received on August 31, 1995)
(Accepted on December 4, 1995)