

RIA 法による前立腺性酸フォスファターゼの診断的価値

山口大学医学部泌尿器科学教室（主任：酒徳治三郎教授）

藤井光正
瀧原博史
安井平造
越戸克和
酒徳治三郎

山口大学医学部第3内科学教室（主任：兼子俊男教授）

小林勝昌

THE EVALUATION OF RADIOIMMUNOASSAY FOR
PROSTATIC ACID PHOSPHATASE

Mitsumasa FUJII, Hiroshi TAKIHARA, Heizō YASUI,

Yoshikazu KOSHIDO and Jisaburo SAKATOKU

*From the Department of Urology, School of Medicine, Yamaguchi University**(Director: Prof. J. Sakatoku)*

Katsuaki KOBAYASHI

*From the Third Division of Internal Medicine, School of Medicine, Yamaguchi University**(Director: Prof. T. Kaneko)*

The measurement of human prostatic acid phosphatase (PAP) was studied using PAP RIA KIT which was first established in Japan by Eiken Immunochemical Laboratory.

The immunological activity of PAP was stable for 24 hours at room temperature and had no cross-reactivity with erythrocytes.

In the clinical phase, PAP was measured in the serum obtained from 37 patients with benign prostatic hypertrophy, 47 patients with treated and untreated prostatic cancer, 43 patients with other urological diseases and 31 volunteers of healthy adult men. From this result, it was concluded that the normal range of PAP was less than 3.19 ng/ml.

In the group of untreated prostatic cancer, the positivity of PAP by radioimmunoassay was 78% in stage III and 100% in stage IV. In both stages, it was higher than that of enzymatic assay. False positive by radioimmunoassay was 5 to 10%, and false negative 14%.

As conclusion the method of radioimmunoassay for measurement of PAP is much more reliable than enzymatic assay.

緒 言

前立腺性酸性フォスファターゼ（以下PAPと略す）の測定は、前立腺癌の診断方法として最も重要なものの1つである。従来それは酵素活性測定により行なわれてきた。しかし酵素活性は室温にて短時間内に容易

に失活し、また溶血の影響を受け易く、さらに感度も十分とはいえず、臨床的には必ずしも有効とはいいがたい状況にある¹⁾。これらの欠点を補うものとして近年、RIA法によるPAP測定法の開発が栄えとなり、今回、栄研イムノケミカル研究所により我国において初めて開発されたPAP RIA KITを入手する機会を得たの

で、KIT の感度、室温における安定性、溶血による影響などの基礎的検討、およびこの KIT を用いて正常男子、前立腺肥大症、前立腺癌、その他の泌尿器科疾患各群の血清 PAP 濃度を測定し、正常域の設定を行なった。また前立腺癌において PAP 活性の陽性率を求め、さらに PAP 濃度と前立腺癌組織 Grade, Stage との関係について検討し、あわせて RIA 法による PAP の臨床的意義を検討した。

方 法

I 基礎的検討

基礎的検討に使用した KIT の試薬内容およびその操作法を以下に示した。

1) 試薬

a) PAP 抗血清

抗ヒト前立腺性酸フォスファターゼ家兎血清が凍結乾燥されている。

b) ^{125}I 標識 PAP

1 バイアル中に $1\mu\text{Ci}$ 以下のヨウ化前立腺性酸フォスファターゼが凍結乾燥されている。

c) 第2抗体

抗家兎 IgG 山羊血清が凍結乾燥されている。

d) 標準 PAP ヒト前立腺性酸フォスファターゼ濃度が 0, 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40, 80 ng/ml に調整されたものが 8 バイアル添付されている。

2) 操作法

あらかじめ作製された PAP 濃度が 0 から 80 ng/ml の標準 PAP を試験管におのおの 100 μl ずつ分注して標準曲線用とした。また被検血清も同様に 100 μl 試験管にずつ分注した。つぎに各試験管に、PAP 抗血清溶液を 200 μl ずつ加えて攪拌混和後、室温にて 3 時間インキュベートした。さらに各試験管に ^{125}I 標識溶液を、200 μl ずつ加えて攪拌混和後、室温にて 20 時間インキュベートした。最後に各試験管に第2抗体溶液を 200 μl ずつ加えて攪拌混和し、室温にて 30 分間インキュベートした後、 4°C , 3000 rpm で 30 分間遠心分離した。遠心分離後の上清を除いた各試験管内の放射能量を測定した。

3) within assay および between assay

within assay は PAP が低濃度から高濃度の血清を 3 検体選び、おのおのを同一アッセイ内で 10 回測定し、その変動係数を求めた。between assay も within assay に使用したものと同一血清を用い、おのおのを異なったアッセイ間にて 5 回測定してその変動係数を求めた。

4) 添加試験

標準 PAP 溶液を用い、PAP が低濃度の血清を分

注した各試験管に 0 ng, 5 ng, 10 ng, 20 ng の PAP を加えて各試験管内の PAP 濃度を測定して recovery を求めた。

5) 希釈試験

PAP が高濃度の血清を緩衝溶液にて 1/2, 1/4 に希釈して各試験管に分注し、各試験管内の PAP 濃度を測定した。

6) PAP 活性安定性試験

PAP が高濃度の血液を遠心分離した後、室温にて放置し、分離直後、2 時間後、4 時間後、8 時間後、12 時間後、24 時間後、36 時間後に各血清を冷凍保存した。

7) 溶血による影響

PAP が低濃度の血液を 2 つに分け、一方を直ちに遠心分離し、他方を機械的に溶血させた後に遠心分離してえた両者の血清中 PAP 濃度を測定して比較した。

II 臨床的検討

1) 対象およびサンプリング

測定対象を 5 群に分けて以下に示した。

A 群：20 歳代から 50 歳代の正常男子 31 名。

B 群：60 歳代から 80 歳代の前立腺肥大症患者 37 名。

C 群：60 歳代から 80 歳代の治療中前立腺癌患者 31 名。

D 群：60 歳代から 80 歳代の未治療前立腺癌患者 14 名。

E 群：20 歳代から 60 歳代のその他の泌尿器疾患患者 43 名（睪丸腫瘍 2 名、膀胱癌 6 名、慢性腎不全 9 名、男子不妊症 26 名）。

採血は空腹時に行ない、採血前 3 日間直腸診検査を行っていない者を対象とした。採血した血液はすべて遠心分離し、血清を測定まで -20°C にて冷凍保存した。PAP の測定は、本 KIT を用い、RIA 法にて全例 2 重測定し、同一検体を King-Armstrong 法にて測定した。

2) RIA 法と酵素法の相関

C 群および D 群において、同一検体の PAP 活性を RIA 法および酵素法 (King-Armstrong 法) にて測定し、両者の相関係数を求めた。

3) 治療による PAP 濃度の変化

D 治療において、治療前、estrogen 剤投与後、除手術施行後の各時点における PAP 濃度を測定してその変化を比較した。

4) PAP と前立腺癌組織 Grade との関係

D 群において、前立腺生検により得られた前立腺組織を、Gleason²⁾ による分類に準じて well differentiated, moderately differentiated, poorly differentiated の 3 型に分類し、各 Grade と PAP 濃度との相関について検討した。

5) PAP と前立腺癌 Stage との関係

D群を遠隔転移がみとめられる症例とみとめられないものに分け、両者と PAP 濃度との相関について検討した。

結 果

I 基礎的検討

1) within assay および between assay

変動係数は within assay にて $2.2 \pm 0.54\%$ (mean $\pm$ SD), between assay にて $6.4 \pm 0.89\%$ であった (Table 1). また最小感度は 1.25 ng/ml, 最大感度は 80 ng/ml であった。

2) 添加試験

添加試験による Recovery は平均で 95.3% であった (Table 1).

3) 希釈試験

希釈倍率と PAP 濃度は標準曲線と平行な直線関係を示した (Fig. 1).

4) 室温における PAP 活性の安定性試験

遠心分離直後の PAP 活性を 100% とすると、24時

間までは各時点での PAP 活性値に有意差をみとめなかったが、36時間後では PAP 活性値は平均で45%に減少し、それ以前の PAP 活性との間に有意差をみとめた。したがって、免疫学的 PAP 活性は室温にて、24時間まで安定であることが示された (Fig. 2).

5) 溶血による影響

溶血した血清と溶血していない血清において、両者

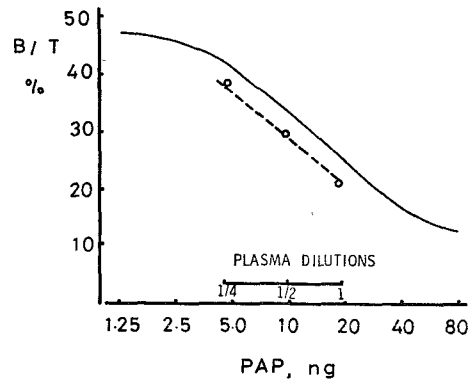


Fig. 1. Dilution Test

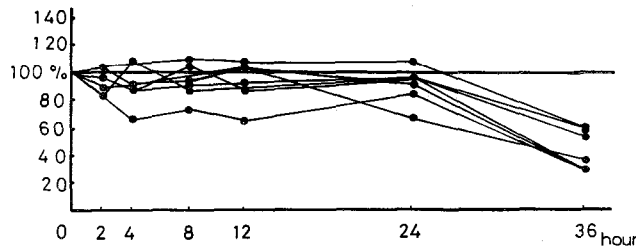
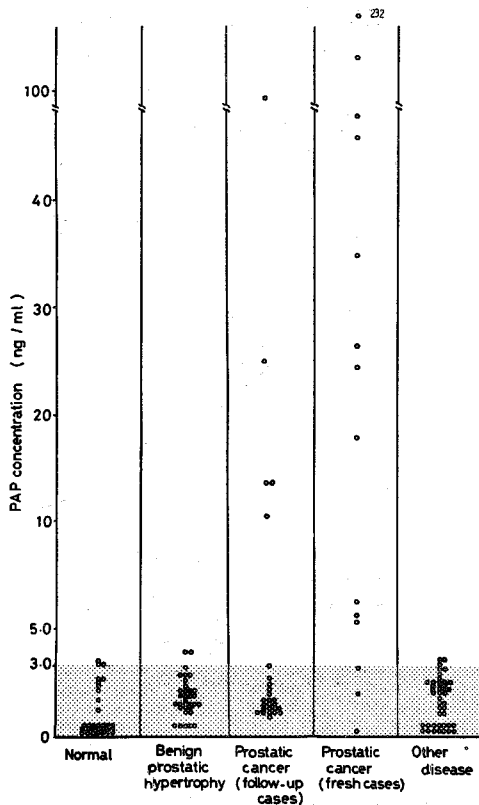


Fig. 2. Stability of immunological PAP activity at room temperature.

Table 1.

The Accuracy of PAP radioimmunoassay

		C.V. , %	
Within assay		2.0	
Between assay		6.0	
Recovery	P A P added (ng)	P A P determined (ng)	Recovery %
	0	2.5	
	5	4.5	86.8
	10	11.5	109.0
	20	18.5	90.2
95.3 (average)			



Testicular tumor 2, Bladder cancer 6, Chronic renal failure 9 Sterility 26.

Fig. 3. Distribution of PAP concentration in serum of healthy men (n=31), of patients with BPH (n=37), of patients with treated prostatic cancer (n=31) of patients with untreated prostatic cancer (n=14), and of patients with other diseases (n=43).

における PAP 濃度に有意差をみとめなかった。

II 臨床的検討

Table 2 に A から E までの各群別に PAP 濃度の mean±SD および range を示した。さらに Fig. 3 に、各群別に PAP 濃度の分布を示した。A, B および E の各群の PAP 濃度は全例低濃度であった。C 群も大部分が PAP は低濃度であったが、少数例に高濃度の症例がみとめられた。これらと異なり、D 群では PAP 濃度が感度以下の低濃度から 200 ng/ml 以上の

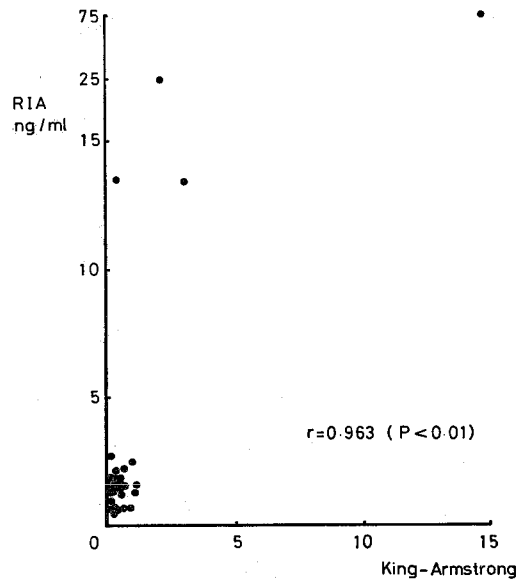


Fig. 4. Correlation between values of serum PAP concentration measured by radioimmunoassay and enzymatic assay in patients of treated prostatic cancer.

Table 2.

Serum PAP level By radioimmunoassay

Patients	No. of cases	PAP (ng/ml)
		Range (mean±SD)
A) Normal males	31	1.09 ± 1.05
B) Benign prostatic hypertrophy	37	1.74 ± 0.88
C) Prostatic cancer (Follow up cases)	33	<1 ~ 75.0
D) Prostatic cancer (Fresh cases)	14	<1 ~ 232.0
E) Other disease*	43	1.85 ± 0.78

* 2 Testicular tumors, 6 Bladder cancers, 9 Chronic renal failures, 26 Sterilities.

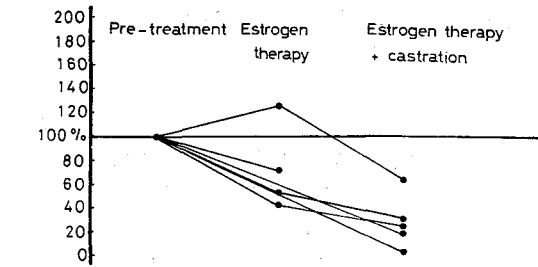
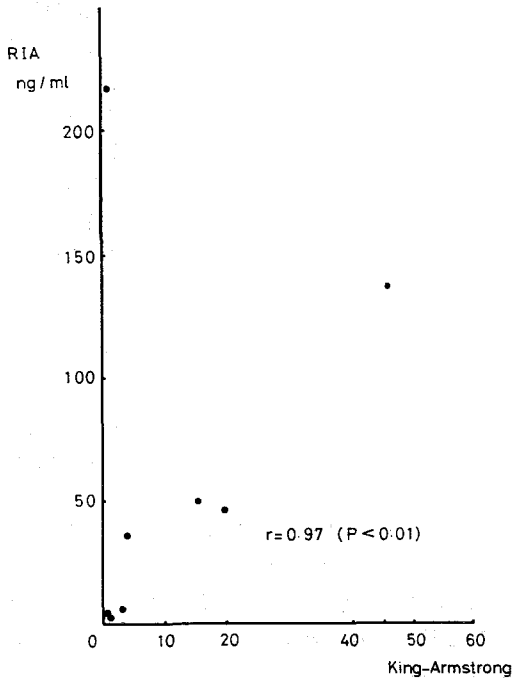


Fig. 6. Effect of estrogen therapy and castration for PAP concentration in patients with prostatic cancer.

Fig. 5. Correlation between values of serum PAP concentration measured by radioimmunoassay and enzymatic assay in patients of untreated prostatic cancer.

Table 3. Correlation between PAP concentration and histological grade in untreated prostatic cancer.

		PAP concentration (ng / ml)				
		~1.09	~2.14	~3.19	~4.24	4.25~
Histological grade	Poorly differentiated (No. of case)					2
	Moderately differentiated (No. of case)					6
	Well differentiated (No. of case)				1	2

Table 4. Correlation between PAP concentration and clinical stage in untreated prostatic cancer.

		PAP concentration (ng / ml)				
		~1.09	~2.14	~3.19	~4.24	4.25~
Clinical stage	Metastasis (-) (No. of cases)	1	1		1	6
	Metastasis (+) (No. of cases)					5

高濃度のものまで幅広い分布を示した。

1) RIA 法と酵素法との相関

RIA 法と酵素法との相関係数は、C群において $r=0.96$ ($p<0.01$), D群にて $r=0.97$ ($p<0.01$) といずれも良好な相関を示した (Fig. 4, 5). また全症例の PAP が低濃度であった B 群においては両者に明らかな相関をみとめなかった。

2) 治療による PAP 濃度の変化

治療前の PAP 濃度を 100% とすると, estrogen 剤投与後は平均73%に減少し, さらに除手術施行後は平均21%に減少した (Fig. 6).

3) PAP と前立腺癌組織 Grade との関係

両者に明らかな相関をみとめなかった (Table 3).

4) PAP と前立腺癌 Stage との関係

遠隔転移をみとめない症例において PAP は低濃度まで広い分布を示したが, 転移をみとめたものは全例 PAP は高濃度であった (Table 4).

考 察

1923年, 赤松らにより酸フォスファターゼ (以下 AP と略す) が発見され, 1936年に Gutman³⁾ により前立腺癌患者の骨転移巣に高濃度の AP がみとめられて, にわかに AP と前立腺癌との関係が注目され初めた。そして1941年には Huggins ら⁴⁾ により, 前立腺癌患者の血清中に AP が著明に増加していることが報

告された。さらに1959年 King ら⁵⁾ が赤血球に影響されない, 前立腺に特異的な AP を発見し, これが前立腺において, より特異的に上昇することを報告して以後, PAP 酵素活性の測定は前立腺癌の補助的診断方法の1つとして認められている。しかしその後の臨床的検討により PAP の酵素活性は安定性に乏しく, また false positive および false negative が高率にみとめられることが明らかとなった¹⁾。したがって現時点では酵素法による PAP 測定は前立腺癌診断に際し, 必ずしも満足できるとはいいがたい^{1,6)}。そこで酵素法にかわる測定法として注目されたのが RIA 法で, 1964年 Shulman⁷⁾ が PAP の抗原特異性を報告して以後研究が積み重ねられ, 最近になってようやく RIA 法による PAP 濃度測定に関する報告がみとめられはじめた。

RIA 法による PAP の特異性に関しては, Cooper⁸⁾, Foti⁹⁾, Vihko¹⁰⁾ らが赤血球, 血小板, 白血球, 滑液組織, 脾臓, 膵臓, 膀胱から抽出した AP と, 抗原として使用した PAP との cross reactivity を検討し, cross reactivity はみとめないことを報告している。著者も溶血による影響を検討したが同様に影響はみとめなかった。したがって本 KIT の RIA 法における PAP の特異性は非常にすぐれていると考えられる。

室温における PAP 活性の安定性についても Foti ら¹¹⁾ の報告と同様, 酵素法に比較して著しく長いよう

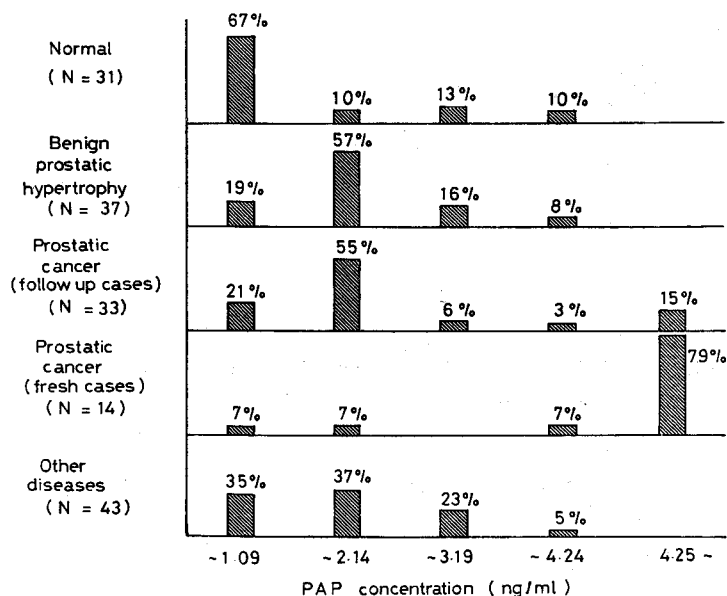


Fig. 7. Percentage of healthy men, patients with BPH, patients with treated and untreated prostatic cancer, and patients with other diseases in each PAP concentration by radioimmunoassay.

である。

つぎに先に示した各群の血清 PAP 濃度の結果をもとに、著者は本 KIT における PAP の正常域の設定を試みた。A群すなわち正常男子の PAP 濃度の mean $\pm$ SD を用い、PAP 濃度を以下の5段階に分けた。

1) mean 以下 (~ 1.09 ng/ml), 2) mean 以上, mean +SD 以下 ($1.10 \sim 2.14$ ng/ml), 3) mean +SD 以上, mean +2SD 以下 ($2.15 \sim 3.19$ ng/ml), 4) mean +2SD 以上, mean +3SD 以下 ($3.20 \sim 4.24$ ng/ml), 5) mean +3SD 以上 (4.25 ng/ml $\sim$)。そして各群別に PAP 濃度の各段階における割合を求めた (Fig. 7)。正常域を mean +2SD すなわち 3.19 ng/ml 以下と設定すると、A, B, E 群ともに $5 \sim 10\%$ の false positive をみとめた。本 KIT を使用した他の報告では 3 ng/ml 以下を正常域としているものが多いが、その場合も同様な率で false positive をみとめている^{12,13)}。また、本 KIT 以外の報告でも Cooper ら¹⁴⁾ が 5.6% 、Foti ら⁹⁾ が $8 \sim 11\%$ の false positive を報告している。false negative に関しては、D 群において 14% みとめた。Cooper ら¹⁴⁾ は 5.6% の false negative を報告している。したがって RIA 法による false positive, false negative は両者ともに酵素法の半分以下である^{1,14)}。

本 KIT 以外の PAP RIA KIT としては、Mal-linckrodt 社、Clinical Assay 社、Serono 社、New England Nuclear 社などがあるが、いずれの製品も正常域は 2 ng/ml 以下となっている。本 KIT の正常域との相異に関して原因は明らかではないが、考えられる可能性としては、抗原に使用した PAP を抽出した材料が異なることが原因であるかも知れない。なお本 KIT は前立腺肥大症患者より切除した前立腺を使用している。以上より著者は PAP 濃度が 3.19 ng/ml 以下を正常、 $3.19 \sim 4.24$ ng/ml の場合は正常と異常と

の境界領域でさらに精査が必要であると考えた。また 4.25 ng/ml 以上の場合は前立腺癌の疑いが強いと判断してもよさそうである。

つぎに D 群を Whitmore¹⁵⁾ の分類により Stage I, II, III, IV の 4 Stage に分け、PAP 濃度が 3.19 ng/ml 以下を正常域とした場合の PAP 陽性率を RIA 法および酵素法において比較検討した。RIA 法における PAP 陽性率は Stage III で 78% 、Stage IV で 100% と酵素法における 63% 、 60% に比較して両者ともに高い陽性率を示した (Table 5)。これは Chu¹⁶⁾、Foti¹¹⁾、Cooper¹⁴⁾ らの報告ともよく一致することから、RIA 法による PAP 測定は前立腺癌が前立腺被膜外に浸潤 (Stage III)、あるいは遠隔転移をみとめる (Stage IV) などの、high stage の前立腺癌において、酵素法に比較してすぐれた診断方法であると思われる。これに対して前立腺癌が前立腺被膜内に限局している Stage I, II などの Low stage において、酵素法では PAP は上昇しない¹⁷⁾ とされてきたが、RIA 法においては Foti ら¹¹⁾ が 50% 、Cooper ら¹⁴⁾ が 43% とかなりの高率で PAP 陽性率をみとめている。したがって今後 RIA 法による PAP 測定により、前立腺癌が被膜内に限局している早期に発見され、根治手術可能な症例が増加することが期待される。

PAP 測定による前立腺癌の経過観察に関しては、D 群において、治療前、estrogen 剤投与後、除睾術施行後の時点での PAP 濃度を測定した結果、RIA 法も酵素法と同様に治療効果をよく反映していると思われた。また前立腺癌の治療中である C群においては PAP は 82% が正常域内であったが、残りの 18% は PAP が高濃度であった。これらは全例、治療経過中新たに遠隔転移をきたしたものの、あるいは疼痛、排尿障害などの症状が発現した症例であった。したがって

Table 5

Percent positivity of serum PAP assay in prostatic cancer *

Stage	Total number of patients	% positive	
		Radioimmunoassay	enzymatic
I			
II			
III	9	78 ($\frac{7}{9}$)	63 ($\frac{5}{8}$)
IV	5	100 ($\frac{5}{5}$)	60 ($\frac{3}{5}$)

* A positive was defined as the serum contained an amount of PAP greater than 3.2 ng per ml in radioimmunoassay or 1.0 unit per ml in enzymatic assay.

RIA 法による PAP 測定は治療経過中前立腺癌の活動期をよく反映していると考えられ、その際に迅速かつ適切な治療を行なうために PAP 測定は重要な意義を有するものと思われる。ただし、PAP 値の変動により治療中前立腺癌の再燃を予知することが可能か否かは今後の課題で、PAP 測定により、注意深く経過観察することにより明らかになるものと思われる。

結 語

榮研 PAP RIA KIT を用いて血清中 PAP 濃度を測定し、以下の結論を得た。

I 基礎的検討

1) within assay, between assay, 希釈試験, 添加試験はいずれも良好な結果を得た。

2) RIA 法による PAP 活性は室温にて24時間まで安定であった。また溶血により PAP 活性は影響されなかった。

II 臨床的検討

1) 前立腺癌症例において、RIA 法と酵素法による PAP 活性は良好な相関を示した。

2) RIA 法による PAP 濃度が 3.19 ng/ml 以下を正常, 3.20~4.24 ng/ml を境界領域, 4.25 ng/ml 以上は前立腺癌の可能性が強いと思われる。

3) RIA 法による PAP 濃度と前立腺癌組織 Grade とは、両者間に明らかな相関をみとめなかった。

4) RIA 法による PAP 濃度と前立腺癌 Stage との関係については、遠隔転移をみとめた high stage の症例で PAP は高濃度の傾向を示した。また Stage III および IV における PAP の陽性率は、両者ともに RIA 法が酵素法に比較して高率であった。

5) RIA 法による PAP 測定は前立腺癌の治療効果判定、経過観察に有用であると思われる。

本論文の要旨は第68回日本泌尿器科学会総会において発表した。稿を終るにあたり、御協力いただいた徳原正洋先生、小金丸恒夫先生、福田和男先生、本永逸哉先生、林田重昭先生、佐長俊昭先生に深謝致します。また、PAP RIA KIT を提供していただいた榮研イムノケミカル研究所に深謝致します。

文 献

- 1) Kurtz, C. W. and Valk, W. L.: Limitations of prostatic acid phosphatase determination in carcinoma of prostate. *J. Urol.*, **83** : 74, 1960.
- 2) Gleason, D. F.: Classification of prostatic adenocarcinomas. *Cancer Chemother. Rep.*, **50** : 125, 1966.

- 3) Gutman, E. B. et al.: Increased phosphatase activity of the bone at site of osteoplastic metastasis secondary to carcinoma of the prostate gland. *Am. J. Cancer*, **28** : 485, 1936.
- 4) Huggins, C. and Hodges, C. V.: The effect of castration of estrogen and androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. *Cancer Res.*, **1** : 293, 1941.
- 5) King, E. J. et al.: Method for the determination of tartrate-labile, prostatic acid phosphatase in serum. *J. Clin. Pathol.*, **12** : 85, 1959.
- 6) 土屋正孝・ほか: 前立腺性血清酸フォスファターゼの診断的価値(第Ⅲ編). *泌尿紀要*, **20** : 62, 1974.
- 7) Shulman, S. et al.: The detection of prostatic acid phosphatase by antibody reactions in gel diffusion. *J. Immunol.*, **93** : 474, 1964.
- 8) Cooper, J. F. et al.: Radioimmunochemical measurement of bone marrow prostatic acid phosphatase. *J. Urol.*, **119** : 392, 1978.
- 9) Foti, A. G. et al.: Comparison of human prostatic acid phosphatase by measurement of enzymatic activity and by radioimmunoassay. *Clin. Chem.*, **23** : 95, 1977.
- 10) Vihko, P. et al.: Serum prostatic-specific acid phosphatase: Development and validation of a specific radioimmunoassay. *Clin. Chem.*, **24** : 1915, 1978.
- 11) Foti, A. G. et al.: The use of RIA to detect prostatic cancer. *Laboratory Measurement*, **105** : 29, 1978.
- 12) 三木 誠・ほか: PAP RIA 測定による臨床成績, 第1回 PAP 研究会抄録集 p.19, 東京 1980.
- 13) 角 文宣・ほか: PAP 臨床データの報告, 第1回 PAP 研究会抄録集 p.31, 東京, 1980.
- 14) Cooper, J. F. et al.: A solid phase radioimmunoassay for prostatic acid phosphatase. *J. Urol.*, **119** : 388, 1978.
- 15) Whitmore, W. F. Jr.: Hormone therapy in prostatic cancer. *Am. J. Med.*, **21** : 697, 1956.
- 16) Chu, T. M. et al.: Immunochemical detection of serum prostatic acid phosphatase (Methodology and clinical evaluation). *Invest. Urol.*, **15** : 319, 1978.
- 17) Prout, G. R.: Chemical test in diagnosis of prostatic carcinoma. *J.A.M.A.*, **209** : 1699, 1969.

(1980年7月4日迅速掲載受付)