

《ノート》

ダイナボット PAP リアキットによる血中前立腺性酸性 フォスファターゼ (PAP) 測定の基礎的臨床的検討

Fundamental and Clinical Studies on the Determination of Serum Prostatic
Acid Phosphatase by Radioimmunoassay—Dainabot PAP-RIA Kit—

保田 徹* 石神 達三* 佐藤 誠也*
石橋 晃** 古屋 聖児*** 横山 英二***

Toru HODA*, Tatsuzo ISHIGAMI*, Seiya SATO*, Akira ISHIBASHI**,
Seiji FURUYA*** and Eiji YOKOYAMA***

*Kitasato Biochemical Laboratories

**Department of Urology, Kitasato University School of Medicine

***Department of Urology, Kitami Red Cross Hospital

I. はじめに

前立腺癌における血清学的検査方法の1つとして前立腺性酸性フォスファターゼ(以下 PAP と略す)の測定が重要視されている。従来この PAP 測定には Kind-King 法などの酵素法が用いられてきたが、特異性および感度の両面から必ずしも満足できるものとは言えなかった。このため血中 PAP の酵素学的測定法は主として、前立腺癌進行患者の follow-up, あるいは治療効果の判定に利用され、前立腺癌の診断にはほとんど無効であった。こうした欠点を解決すべく PAP の純化、精製法の改良が精力的に行われるとともに、特異性の高い抗 PAP 血清が得られるようになった。

* 北里バイオケミカルラボラトリーズ (ブリストル・マイヤーズ)

** 北里大学医学部泌尿器科

*** 北見赤十字病院泌尿器科

受付: 57年6月8日

最終稿受付: 57年8月20日

別刷請求先: 相模原市北里 1-15-1 北里大学病院内

(☎ 228)

北里バイオケミカルラボラトリーズ

保田 徹

この成果として Chu¹⁾ らによる counter immunoelectrophoresis (CIEP) 法, Cooper²⁾ らによる radioimmunoassay (RIA) 法が確立され, PAP 測定はより高感度でより特異性の高い免疫学的方法へと移行した。現在, わが国では3種の PAP RIA キットが供給されているが, 今回私どもは New England Nuclear (NEN, ダイナボット) 社製の RIA キットを入手する機会を得, その基礎的検討ならびに臨床的検討を行ったので報告する。

II. 方法および対象

1. 測定方法

キットに添附されている仕様書には短時間法と長時間法の2種類の測定操作内容が記載されている。短時間法は血清 200 μ l を用いて室温で1時間のプレインキュベーションを行う方法である。これに対して長時間法は 100 μ l と少量の被検血清で測定するが, プレインキュベーションの時間は 4°C で 16~24 時間と長くなっている。他の反

Key words: Prostatic Acid Phosphatase, Radioimmunoassay Dainabot PAP-RIA Kit, Prostatic Carcinoma, Transurethral Resection.

応条件はいずれの場合にも室温で3時間(第1反応)および5分間(第2反応)と同一である。本検討では長時間法を使用し、その操作手順を Fig. 1 に示したが、概要は以下の通りである。

まず各濃度の標準液または被検血清 100 μ l をプラスチック製試験管に入れ、ついで抗 PAP 家兎血清 200 μ l を NSB 用 (non specific binding 盲検用) 試験管を除くすべての試験管に加える。なお NSB 用試験管にはリン酸緩衝液 200 μ l および 0 ng/ml の標準液 100 μ l を加える。各試験管を良く混和した後、4°C で20時間インキュベートする。つぎに 125 I 標識 PAP 溶液を 100 μ l ずつ加え十分に攪拌、混和した後室温で3時間インキュベートする。さらに第2抗体溶液 500 μ l ずつをすべての試験管に分注し、混和後、室温にて5分間インキュベートする。ついで 4°C, 1,000 \times g で10分間遠心分離を行い、上清をデカントして除去する。試験管の内壁を濾紙で十分に拭いた後、 γ -カウンターで1分間計測する。

2. 測定対象

今回検索した対象は健常成人男性70例、同女性35例、ならびに北里大学泌尿器科外来および入院患者で前立腺癌26例(未治療例5例)、前立腺肥大症26例、慢性前立腺炎2例である。さらに12例の

前立腺肥大症患者について TURP 術実施前後の血清 PAP 値について検討した。

III. 結 果

1. 基礎的検討

1) 標準曲線

Fig. 2 に長時間法と短時間法による標準曲線を示した。長時間法は 25 ng/ml 以上の高値域で標準曲線が平坦化し、変動係数がやや大きくなるが、2.5 ng/ml 以下の低値域での感度が優れ、PAP 測定をスクリーニングとして使用する場合には短時間法よりもより適していると考えられる。以後の検討は長時間法で行った。

2) 再現性 (Table 1)

本キットの長時間法による within-assay variation (n=10) を濃度の異なる2種類の血清を用い

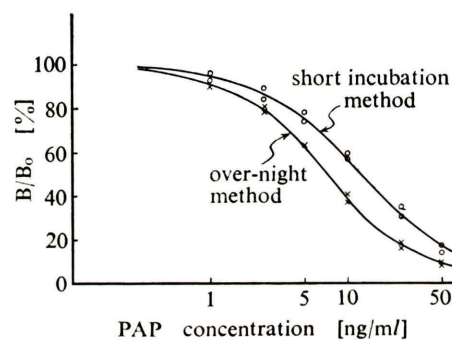


Fig. 2 Typical standard curve

Table 1 Reproducibility
(within-assay variation)

	Sample A	Sample B
n	10	10
mean (ng/ml)	2.8	13.9
S.D. (ng/ml)	0.18	0.30
C.V. (%)	6.4	2.2
between-assay variation		
	Sample C	Sample D
n	14	14
mean (ng/ml)	2.9	15.5
S.D. (ng/ml)	0.19	0.93
C.V. (%)	6.6	6.0

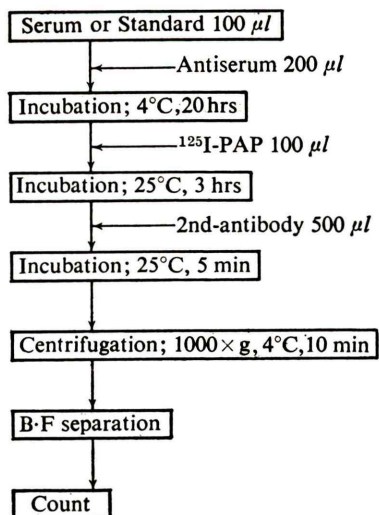
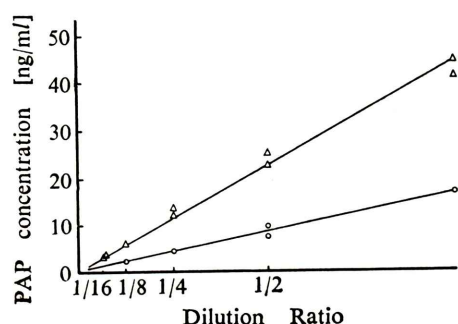


Fig. 1 Procedure of over-night method for PAP-RIA

Table 2 Recovery test

PAP Concentration, ng/ml			Recovery, %
added	measured	recovered	
0	0.8	—	
2.5	3.2	2.4	96.0
5	5.4	4.6	92.0
12.5	12.1	11.3	90.4
25	26.4	25.6	102.4
mean±S.D(%)			95.2±4.6


Fig. 3 Dilution test (Diluent: standard 0 ng/ml).

て検討した。この結果を Table 1 に示したが、PAP が比較的低濃度の血清 A では変動係数 (C.V.) 6.4%，また PAP 高濃度の血清 B では、2.2% と良好な再現性であった。また between-assay variation は異なる 3 ロットの試薬を用い、測定日を変えて検討した (n=14) ところ、低濃度の血清 C で C.V. 6.6%，高濃度の血清 D で 6.0% と満足できる成績を得た。

3) 回収率試験

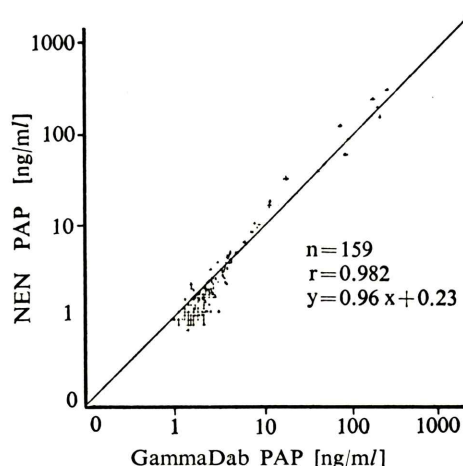
PAP 濃度が 0.8 ng/ml を示した血清と、4 種類の異なった濃度の標準液 (5, 10, 25, 50ng/ml) とを、1:1 の割合で混合し、添加回収率試験を行った。Table 2 にその結果を示したが、平均回収率 95.2% (90.4~102.4%) と良好であった。

4) 希釈試験

PAP 高値の血清 2 例について、0 ng/ml の標準液で倍数希釈して測定した。結果は Fig. 3 に示すごとく原点に収束する良好な直線性が得られた。

5) 他キットとの比較

前立腺癌患者を含む 159 例について本キットと Clinical Assays 社の GammaDab PAP キットと


Fig. 4 Correlation of serum PAP values determined by NEN and GammaDab kits

で同時に測定を行った。その結果、両測定法間には相関係数 $r=0.982$ と良好な相関が認められた (Fig. 4)。

2. 臨床的検討

1) 正常値

健常男性 70 例の血清 PAP 値は正規分布型を示し、平均値±標準偏差は 1.2 ± 0.2 ng/ml であった。したがって平均値+標準偏差の 2 倍 (1.6 ng/ml) を正常の上限とすると、70 例中 1 例 (1.8 ng/ml) を除き 98.6% が正常範囲内に分布した。同様に健常女性 35 例の血清 PAP 値は 1.0 ± 0.2 ng/ml (平均値±標準偏差) であり、男女間に有意の差は認められなかった。

2) 前立腺疾患患者の血清 PAP 値

各種前立腺疾患患者の血清 PAP 値と正常値を対比して Fig. 5 に示した。手術後病理学的に明らかに前立腺癌と診断された患者 5 例の未治療時における PAP 値は 50.9 ± 88.2 ng/ml で明らかに高値を示したが、1 例は 1.2 ng/ml と正常値レベルの低値を示した。これらの 5 例はいずれも Stage D であった。前立腺癌で除睾術、ホルモン療法を実施中の 21 例は感度以下 ~26.4 ng/ml に分布し、平均は 4.0 ± 6.5 ng/ml であった。そのうち 5 ng/ml 以上を示した 5 例はいずれも治療後 1 週間以内の症例であった。治療前の前立腺肥大症

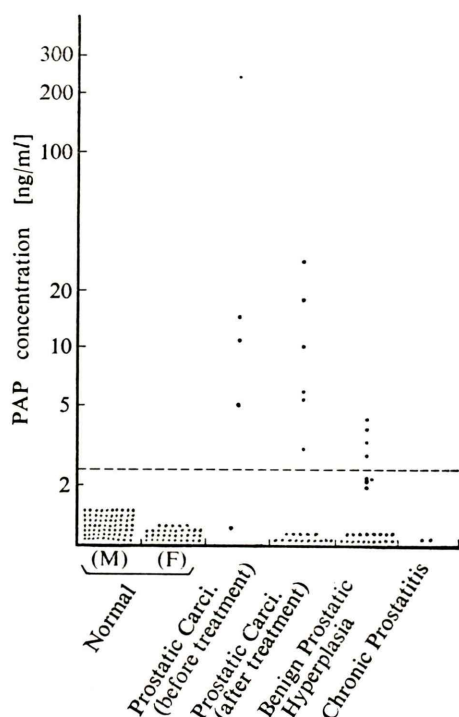


Fig. 5 Serum PAP levels from normal and patients with various diseases

(BPH) 26例の値は 1.6 ± 1.0 ng/ml で、17例が 1.6 ng/ml 以下の低値を示したが、9例(34.6%)は 1.6 ng/ml 以上を示した。慢性前立腺炎の2例はいずれも 1 ng/ml 以下の低値を示した。

3) 前立腺癌患者の治療前後における血清 PAP 値の変動

未治療時から血清 PAP 値を PAP RIA kit で測定した前立腺癌 (adeno carcinoma) 2 例について治療後経時的に観察した成績を酵素法による総酸性フォスファターゼ、前立腺性酸性フォスファターゼ活性値と対比して Table 3 に示した。いずれの症例も未治療時 RIA による PAP 値は 10 ng/ml 以上を示したのに比し、酵素法による PAP 値は正常上限よりもやや高値を示す程度に留まっていた。

除睾術ならびに女性ホルモン Honvan 300 mg/day 投与治療患者の PAP 値の変動も RIA 法の測定値の方が、より著明で治療による効果判定を定量的に把握する上で優れていた。

4) 前立腺肥大症における経尿道的電気切除術 (TURP) 前後の血清 PAP 値

前立腺肥大症12例に TURP を実施した時の血

Table 3 Alteration of serum PAP values in patients with prostatic cancer before and after surgical therapy

Patients	Age & Sex	Stage	Bone meta.	Serum PAP values				Remarks***
				Days (bleeding)	Total KAU*	Chemical KAU**	RIA (ng/ml)	
M.N	71			Feb. 1	3.8	1.4	13.7	untreated (TURP: Jan.27)
		D	+	Feb. 16	1.9	0.7	1.6	7 days after testectomy and Honvan treatment (300 mg/day)
		⊕		Feb. 23	2.3	0.5	1.0	14 days after
M.K	81			Jan. 30	3.6	1.5	11.5	untreated (TURP: Jan.20)
		D	—	Feb. 16	2.6	1.0	5.9	7 days after testectomy
		⊕		Feb. 23	2.1	0.4	3.6	14 days after testectomy 7 days after Honvan treatment (300 mg/day)

*: Total=total acid phosphatase activity (normal range <4.0 KAU)

** : Chemical=enzymatic determination (Kind-King) of PAP (normal range <0.8 KAU)

***: TURP=transurethral resection, Honvan=Diethylstilbestrol diphosphate

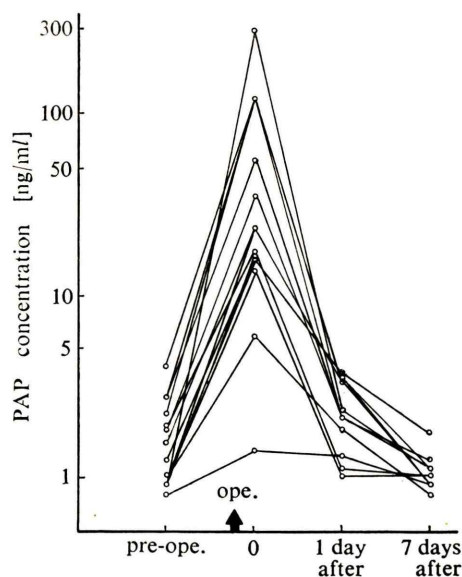


Fig. 6 Alteration of serum PAP values on TUR operation in 12 patients with benign prostatic hyperplasia

清 PAP を経時的に観察し Fig. 6 に示した。手術直後、血清 PAP 値は一過性に急上昇するが、24 時間後にはほぼ手術前値まで下降した。

5) 前立腺肥大症の血清 PAP 値と摘除組織重量との関係

TURP により摘出した前立腺組織重量と術前血清 PAP 値との関係を前立腺肥大症 21 例を対象に検討した成績を Fig. 7 に示した。両者の相関係数 $r=0.632$ で明らかに、摘出組織が大きいほど血清 PAP 値が上昇する傾向を示していた。

IV. 考 察

血中酸性フォスファターゼの測定は一般に酵素活性を測定する Kind-King 法, Bodansky 法などで行われているが、誤差が大きく、再現性に乏しいなどの問題点が指摘されている。また前立腺由来の酸性フォスファターゼ (PAP) と他臓器由来の酸性フォスファターゼとを厳密に区別することも困難で、特異性の高い PAP 測定法の開発が望まれていた。1974 年 Cooper と Foti は前立腺液から PAP を分離、精製し、radioimmunoassay に

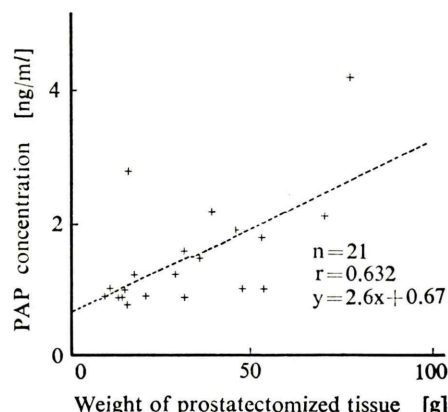


Fig. 7 Correlation between serum PAP values and weight of prostatectomized tissue in 21 patients with benign prostatic hyperplasia

よる血中 PAP 測定法を開発した²⁾。彼らが発表した成績では^{3,4)}, stage A, B の早期前立腺癌でも血中 PAP 値は高い陽性率を示すことが示唆され、前立腺癌の早期発見に対する有効な手段として期待された。

今回私どもが検討した NEN 社 (ダイナボット) の PAP RIA キットはプレインキュベーションを行う非平衡法を採用した 2 抗体法の radioimmunoassay である。現在、精製 PAP を入手する材料としては前立腺組織と精液⁵⁾ が主として利用されている。本邦で供給されている RIA キットの抗原は榮研が前立腺組織⁶⁾, Clinical Assays が精液由来の PAP¹⁰⁾ であり、本キットでも精液由来の PAP が用いられている。標準法 (長時間法) の assay に要する日数は 2 日であるが、2 倍量の血清を用いる短時間法によれば、1 日で全操作を終了できる。短時間法では最高濃度と最低濃度との間で標準曲線の bound % の落差が小さく、長時間法に比べて精度の点でやや劣るが、実用上問題となる程ではないと考えられる。長時間法は特に低濃度域での感度に優れ、スクリーニングとして PAP 測定を行う場合には非常に有用であろう。

本法の within-assay ならびに between-assay variation (Table 1) はいずれも良好で、稀釈試験 (Fig. 3) および回収率試験 (Table 2) の成績もルー

チン法として十分満足できる結果であった。また、他社キットとの相関も 5 ng/ml 以下の低濃度域で若干キットの測定値が低値傾向を示したが、高濃度域を含めれば相関係数 0.98 ときわめて良好であった。正常値は従来より用いられている他の PAP 測定用キットよりも若干低く、70 例の健常人測定結果では 1.6 ng/ml (mean \pm S.D. : 1.2 \pm 0.2 ng/ml) 以下であった。これまで NEN キットに関して海外で報告されている正常値はいずれも私どもの結果より高いレベルを示している。たとえば Büttger ら⁷⁾ は男子 18 例で 4.7 ng/ml 以下 (mean \pm S.D. : 2.1 \pm 1.3 ng/ml) Brody ら⁸⁾ も 3.2 ng/ml 以下 (ただし 4 例が 3.2~5.0 ng/ml を示した) と報告している。これに対して本邦で検討された本キットによる正常値は、樋口ら⁹⁾ によれば 1.21 \pm 0.27 ng/ml (mean \pm S.D.) で、私どもの結果と同様低値傾向を報告している。これは NEN 社の新しい PAP キットがわが国に導入される際に改良され、その結果測定値のレベルが全体に低下したと理解されており、データを参照する上で注意を要する。私どもの前立腺肥大症の成績では 1.6 ng/ml 以上を示す症例が 9 例認められたことから、本キットの cut off 値は 2.5 ng/ml と一応設定して臨床結果を解析することが妥当と思われた。これを本邦で報告されている他社のキットと比較すると榮研の集計データは 3 ng/ml 以下、GammaDab (トラベノール) は 2.5 ng/ml 以下¹⁰⁾、RIA-Quant (マリンクロット, 第一 RI) は 2 ng/ml¹¹⁾ 以下で、本キットの cut off 値は GammaDab PAP キットとより近似した成績を示している。

前立腺癌で未治療時に測定し得た症例はわずかに 5 例で、いずれも stage D であったが、そのうち 1 例を除きいずれも陽性を示した。これは Foti ら³⁾ による前立腺癌 stage D での陽性率 92% とほぼ同等であった。治療中の前立腺癌患者の血中レベルは治療開始後 7 日以内の症例を除けば、大部分 PAP 値は 2.5 ng/ml 以下に降下しているので本法は治療後における臨床状態をよく反映していると考えられる。特に術後病理学的に adeno carcinoma と診断された前立腺癌 2 例について治

療前後の PAP 値を経過観察し報告したが、治療後 RIA による PAP 値は酵素法による値よりもより著明な変動を示し、病態を良く反映していることが明らかとなった。今回のわれわれの検討では stage A, B における前立腺癌の血清 PAP 値と分類して測定できなかったため早期発見のマーカーとして PAP-RIA 法が有効であるか否かの判断はできないが、前立腺癌患者 (stage D) 5 例中 4 例が陽性を示したことより前立腺癌の診断には有用と思われた。また、術後の病態をフォローするモニターとしても本法がきわめて有用であることを確認した。PAP-RIA 法は感度が優れているため前立腺肥大症で偽陽性を示すことは諸家により指摘されており、今回われわれも cut off 値を 2.5 ng/ml とした場合、26 例中約 15% に偽陽性を認めた。前立腺肥大症の偽陽性の出現率も諸家の報告とほぼ一致しており、本キットを用いても PAP-RIA 法の成績判定に注意を要することは言うまでもない。

TURP を実施した際にどの程度血中 PAP 値が変動するかを明らかにする目的で前立腺肥大症患者 21 例について経時的に PAP 値を本法により測定した成績ではほぼ手術直後一過性に血清 PAP 値の上昇が認められるが、24 時間以後にはほとんど前値に復している。したがって前立腺癌でも除糞術前に TURP を行った後 PAP 値を測定する場合 1 日で TURP の影響は考慮に入れる必要はない。このように TURP 術施行時に PAP が血中に一挙に放出される現象は、従来から指摘されている直腸診や前立腺マッサージによる一過性の PAP 放出現象と同様の機序により起こるものと考えられる。すなわち、前立腺組織内に貯留されている PAP が外部からの刺激に反応して放出されるものであろう。したがってこの値は PAP の前立腺における産生、貯留量を反映するはずであるが、今回の検討では、術後 PAP 値と摘除前立腺組織重量との間には有意の相関は認められなかった。しかし、術前 PAP 値と組織重量との間には相関係数 0.632 と有意 ($p < 0.001$) の相関が認められた (Fig. 7)。この点に関してはさらに詳細な

検討を加える予定である。

V. 結 語

NEN 社の PAP RIA キットの基礎的臨床的検討と前立腺肥大症における TURP 術前後の血清 PAP 値の変動に関する検討を行い、以下の結果を得た。

1) 本キットは精度、再現性に優れ、稀釈試験、回収率試験とも満足すべき成績であった。

2) GammaDab PAP-RIA キットとの相関は $r=0.98$ できわめて良好であった。

3) 正常値は70例の健常人の検討および前立腺疾患患者の血中 PAP レベルからみて、本キットの cut off 値は一応 2.5 ng/ml が妥当と推定された。

4) 前立腺疾患患者の血清 PAP 値は未治療の前立腺癌 (stage D) の 5 例で $\text{mean} \pm \text{S.D. } 50.9 \pm 88 \text{ ng/ml}$ であり、その中 1 例は 2.5 ng/ml 以下を示した。治療中の前立腺癌 21 例は $4.0 \pm 6.5 \text{ ng/ml}$ であった。前立腺肥大症 26 例では $1.6 \pm 1.0 \text{ ng/ml}$ を示し、その中 2.5 ng/ml 以上の偽陽性は約 15% であった。

5) adeno carcinoma を呈した 2 例の前立腺癌を治療(除睾術, ホルモン療法を併用)前後で経過観察した結果, RIA による PAP 値は酵素法による測定値よりも著明な変動を示し, 感度, 特異性の点で優れていた。

6) 前立腺肥大症 21 例について TURP 術前後の PAP 値の変動を調べた結果, 術後一過性に PAP が放出されることが明らかになった。摘除前立腺組織重量と術後 PAP 値との間には有意な相関が認められないが, 術前値との間には有意の相関が存在した。

稿を終わるにあたりキットをご提供戴いたダイナボット RI 研究所に深謝致します。

文 献

- 1) Chu TM, Wang MC, Scott WW, et al: Immunochemical detection of serum prostatic acid phosphatase. Methodology and clinical evaluation. Invest Urol 15: 319-323, 1978
- 2) Cooper JF, Foti A: A radioimmunoassay for prostatic acid phosphatase. I. Methodology and range of normal male serum values. Invest Urol 12: 98-102, 1974
- 3) Foti AG, Cooper JF, Hershman H, et al: Detection of prostatic cancer by solid-phase radioimmunoassay of serum prostatic acid phosphatase. New Engl J Med 297: 1357-1361, 1977
- 4) Cooper JF, Foti A, Hershman HH, et al: A solid phase radioimmunoassay for prostatic acid Phosphatase. J Urol 119: 388-391, 1978
- 5) Vries GP, Slob AW, Jöbsis AC, et al: Prostate-specific acid phosphatase. Purification and specific antibody production in rabbits. Am J Clin Pathol 72: 944-951, 1979
- 6) 森川淳二, 中村雅行, 森一泰, 他: ラジオイムノアッセイによるヒト前立腺酸性フォスファターゼの定量法の開発. Radioisotopes 29: 175-180, 1980
- 7) Büttger I, Sintermann R, Langhammer H, et al: First experiences with commercial RIA kits for prostatic acid phosphatase (PAP). Compact News Nucl Med 11: 110-115, 1980
- 8) Brody JP, Savory J, Sturgill BC, et al: Prostatic acid phosphatase as measured with two radioimmunoassay kits in the detection of prostatic adenocarcinoma. Clin Chem 27: 605-607, 1981
- 9) 樋口義典, 鈴木 晃, 加藤和夫, 他: PAP RIA Kit の基礎的・臨床的検討. 医学と薬学 6: 395-400, 1981
- 10) 丸岡正幸, 鈴木繁夫, 佐藤恵子, 他: 前立腺性酸性フォスファターゼ (PAP) の Radioimmunoassay (RIA) 測定キットによる基礎的および臨床的検討. 核医学 18: 1523-1529, 1981
- 11) 今関恵子, 川名正直, 有水昇, 他: Radioimmunoassayによる血中 prostatic acid phosphatase 測定. 核医学 18: 869-875, 1981