

《ノート》

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

Basic and Clinical Studies of Radioimmunoassay Kit for Prostatic Acid Phosphatase

丸岡 正幸* 鈴木 茂夫** 佐藤 恵子** 野積 邦義*
 安田 耕作* 伊藤 晴夫* 島崎 淳*

Masayuki MARUOKA*, Shigeo SUZUKI**, Keiko SATO**, Kuniyoshi NOZUMI*,
 Kosaku YASUDA*, Haruo ITO* and Jun SHIMAZAKI*

*Department of Urology, Chiba University School of Medicine, Chiba, Japan

**Japan Travenol Limited RIA Testing Laboratory, Chiba, Japan

I. はじめに

前立腺性酸性フォスファターゼ (PAP) の測定は、前立腺癌の血清学的検査として非常に重要である。しかし、従来の酵素法では、PAP が上昇するのは、転移のある stage D の前立腺癌がほとんどである。最近 radioimmunoassay (RIA) 法を用いた PAP の測定法が開発され¹⁻³⁾ 一層正確に測定が可能となった。

今回、教室では clinical assays 製 Gamma Dab PAP-RIA kit を使用する機会を得て、測定法の基礎的および臨床的検討を行なったので、その結果を報告する。

II. 対象および方法

1. 対象症例

対象は前立腺癌196検体。その stage 分類は、Veterans Administration group⁴⁾に従い、stage A5

* 千葉大学医学部泌尿器科

** 日本トラベノール株式会社 RIA 試験研究所
 受付: 56年2月27日

最終稿受付: 56年5月22日

別刷請求先: 千葉市亥鼻 1-8-1 (☎ 280)

千葉大学医学部泌尿器科

丸 岡 正 幸

検体 (未治療 2 検体, 治療 3 検体), stage B 6 検体 (治療 6 検体), stage C 19 検体 (未治療 4 検体, 治療 15 検体), stage D 166 検体 (未治療 18 検体, 治療 148 検体), また, 前立腺肥大症 24 検体であった。対照は正常男子 18 検体, 正常女子 134 検体であった。なお, 前立腺癌未治療者と対照群は検体数と患者数が一致しているが, 治療群は治療経過中の採血のため検体数と患者数は一致しない。

2. 方 法

(1) 測定原理

抗原 (患者血清) と結合した抗体 (ヤギ抗 PAP 血清) を ¹²⁵I 標識 PAP とインキュベーションしたのち, 抗体と非結合のそれらを第 2 抗体を用いて分離し, 患者血清中の PAP 濃度を定量する。

(2) 測定手順

キットの使用説明書に従って Fig. 1 のごとく測定法を述べる。

(1) PAP 標準血清および患者血清 100 μ l を各試験管に分注する

(2) 抗 PAP ヤギ血清 100 μ l を各試験管に分注する。

(3) 試験管を室温 (20—27°C) で 18 時間インキ

Key words: PAP, RIA

- ユベーションする。(プレインキュベーション)
- (4) ^{125}I 標識 PAP $100\ \mu\text{l}$ を分注する.
 - (5) 試験管を室温 ($20\text{--}27^\circ\text{C}$) で 3 時間インキュベーションする。(第 1 インキュベーション)
 - (6) 第 2 抗体 $1000\ \mu\text{l}$ を分注する.
 - (7) 試験管を室温 ($20\text{--}27^\circ\text{C}$) で 30 分間インキュベーションする。(第 2 インキュベーション)
 - (8) $1000\times g$, $2\text{--}27^\circ\text{C}$ で 20 分間遠心分離する.
 - (9) 上清をデカンテーションする.
 - (10) 各試験管の放射能を測定する.
 - (11) ^{125}I PAP の百分率 (B/T %) を算出する.
 - (12) 片対数グラフの縦軸に B/T %, 横軸に標準血清の PAP 濃度を記して標準曲線を描き, 患者血清の B/T % から各々の PAP 濃度を計算する.

III. 結 果

1. 基礎的検討

1) インキュベーション時間

インキュベーション時間の検討はすべて室温で行った. プレインキュベーション時間を, 3, 5, 18, 24, 40 時間とした場合の標準曲線の変化を Fig. 2 に示す. プレインキュベーション時間が短かい程 B/T % は増大する傾向にあり, 18 から 24 時間では一定の傾向を示した. したがってルーチンの測定は 18 時間と設定した. 一方, 第 1 インキュベーション時間を 1, 2, 3, 6 時間と変化させた場合の標準曲線の変化を Fig. 3 に示す. それによると第 1 インキュベーション時間は, その延長に従い B/T

% は増加するが, 3 時間以後は一定の傾向を示した. したがって 3 時間で測定した. また, 第 2 インキュベーション時間を 10, 20, 30, 60, 120 分として検討した結果, どの時間でもほぼ一定な結合率であったので, 規定の 30 分で測定した.

2) インキュベーション温度

インキュベーション時間を規定の 18 時間, 3 時間, 30 分として行った.

プレインキュベーション温度を $4, 25, 37^\circ\text{C}$ と変化させた標準曲線を Fig. 4 に描いた. 各温度共, 標準曲線に大きな差はみられなかったので, kit の指示に従い 25°C で測定した. 一方, 第 1 インキュベーション温度も同様に行ない, 標準曲線の変化を Fig. 5 に示す. 図からも明らかなように 25°C で最も良好な標準曲線が得られた. また, 第 2 インキュベーション温度を $4, 25, 37^\circ\text{C}$ として検討した結果, 37°C でわずかに結合率が低下するが, $4, 25^\circ\text{C}$ ではほとんど変化が見られなかった. したがって規定の 25°C で測定した.

3) 標準曲線

標準曲線は 5 回測定し, 平均値 \pm 標準誤差 ($m \pm SE$) を求め, その結果を Fig. 6 に示した. 各点で

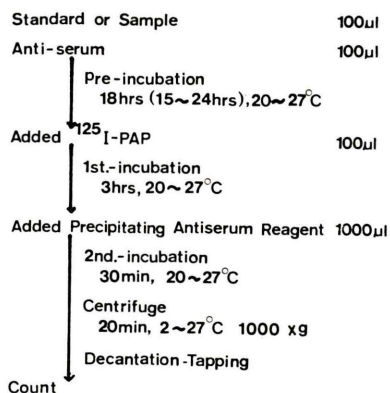


Fig. 1 Assay procedure.

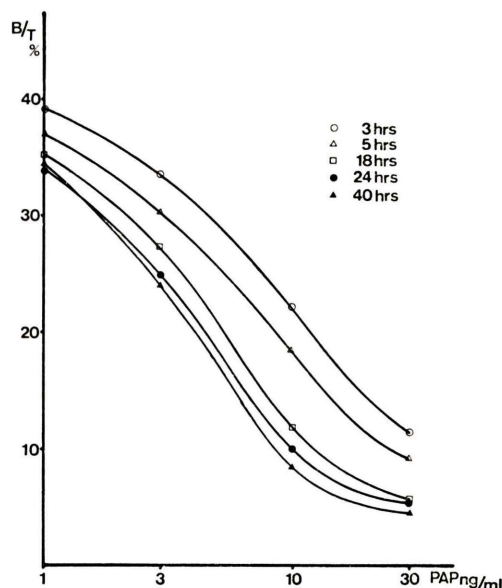


Fig. 2 Effect of pre-incubation time on standard curve (incubation temperature 25°C).

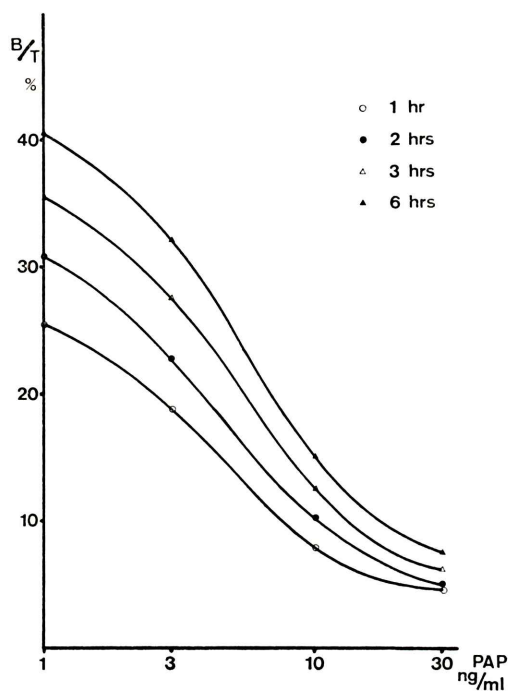


Fig. 3 Effect of 1st-incubation time on standard curve (incubation temperature 25°C).

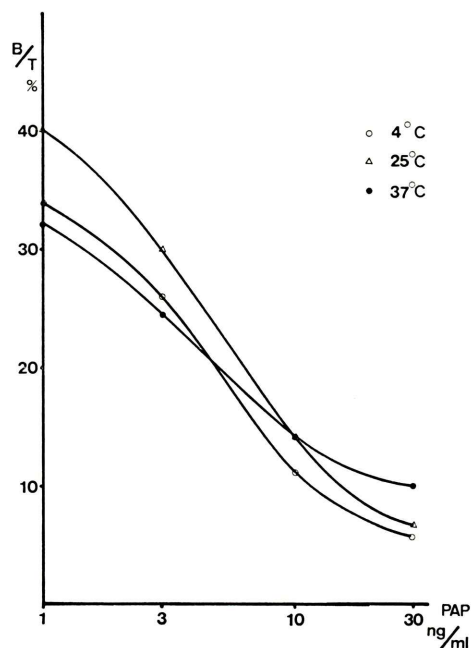


Fig. 5 Effect of 1st-incubation temperature on standard curve (incubation time 3 hrs).

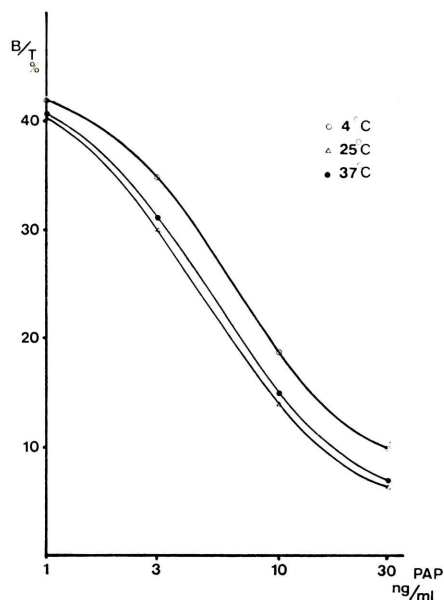


Fig. 4 Effect of pre-incubation temperature on standard curve (incubation time 18 hrs).

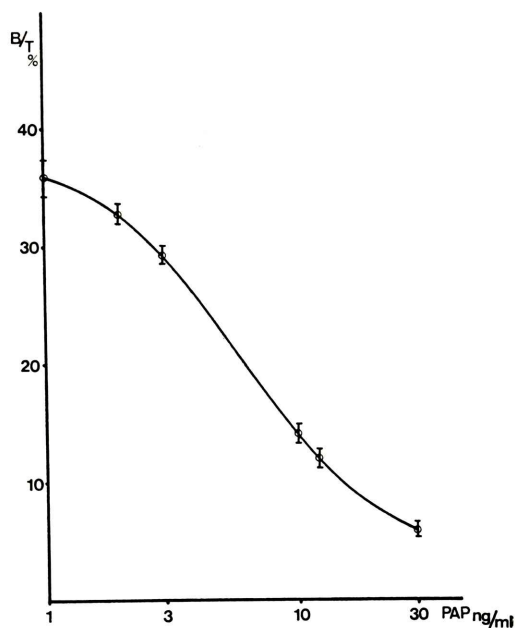


Fig. 6 Standard curve for PAP-RIA kit.

の標準誤差は、0.097から0.412と非常に良好であった。

4) 精度・再現性

PAP 濃度の異なる 3 検体についてアッセイ内精度として 10 重測定を行い、アッセイ間精度として 5 重測定を行った結果を Table 1 に示す。両者とも非常に良好であった。

5) 回収率

PAP 濃度の異なる 3 検体について回収率の検討を行った。

Table 2 に示す通り平均 103.5 から 112.5% と満足する結果を得た。

6) 希釈試験

Fig. 7 にその結果を示す。希釈液として kit 添付の Blank 血清を使用した。その結果、原血清付

近で 3 検体とも多少低値を示したが、ほぼ良好な結果であった。

以上の検討から、本 kit は使用説明書に記載さ

Table 2 Recovery test

Added PAP ng/ml	Sample value	Test result	Recovery value	Recovery %
0.5	0.67	1.17	0.50	100.0
1.5		2.31	1.64	109.3
5.0		5.40	4.73	94.6
15.0		17.2	16.5	110.0
				Av. 103.5
0.5	5.30	5.78	0.48	96.0
1.5		7.00	1.70	113.3
5.0		10.7	5.40	108.0
15.0		25.2	19.9	132.7
				Av. 112.5
0.5	8.45	9.00	0.55	110.0
1.5		9.95	1.50	100.0
5.0		13.7	5.25	105.0
15.0		24.3	15.9	106.0
				Av. 105.3

Table 1 Precision of assay
Intra-assay precision

No.	Sample		
	A	B	C
1	1.49	5.90	21.9
2	1.68	5.50	22.9
3	1.94	5.55	24.0
4	1.98	5.40	20.1
5	1.61	5.55	23.0
6	1.70	5.40	22.1
7	1.60	5.75	21.5
8	1.56	5.80	22.5
9	1.81	5.37	23.8
10	1.59	5.70	23.0
Mean	1.70	5.59	22.5
S.D.	0.16	0.19	1.15
C.V.	9.41	3.40	5.11

Inter-assay precision

No.	Sample		
	A	B	C
1	1.67	5.93	20.5
2	1.62	5.41	19.5
3	1.70	5.60	22.5
4	1.87	5.78	20.3
5	1.71	6.05	23.5
Mean	1.71	5.75	21.3
S.D.	0.09	0.26	1.67
C.V.	5.48	4.44	7.85

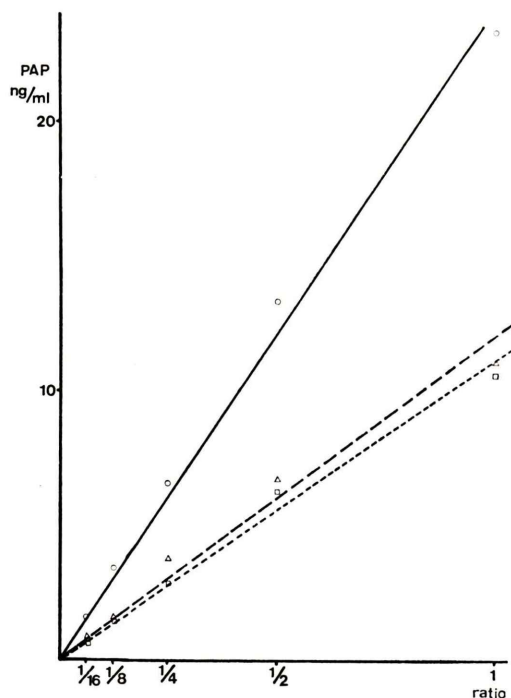


Fig. 7 Dilution test.

れた方法で血中 PAP 濃度を正確に測定できると考えた。

2. 臨床的検討

1) 採血条件と保存条件

前立腺癌の疑われる患者は、外来診察時にまず前立腺触診を施行した後に種々の目的の採血を行うことが多い。ここに前立腺肥大症患者の前立腺マッサージ後の PAP 濃度の経時的变化を Fig. 8 に示すが、24 時間後も前値よりも高値をとる。つまり触診後は少なくとも 24 時間後に採血することが望ましい。

次に、血清分離後の保存温度を、4, 25, 37°C と変化させて測定した PAP 濃度を Fig. 9 に示した。4, 25°C では 4 時間を経ても PAP 濃度は、ほとんど変化していないが、37°C では前値 13.4 ng/ml が 1 時間後 5.3 ng/ml と低下している。つまり採血後は、すみやかに血清分離し冷所保存することがよい。

2) PAP 濃度の測定結果 (Fig. 10)

対照群の正常男子で、平均値±標準偏差を計算すると、1.15 ng/ml±0.35、正常女子は 0.90 ng/ml±0.47、前立腺肥大症は、1.29 ng/ml±0.54 であった。正常値上限を平均値+2×標準偏差とすると、2.5 ng/ml が適当と考えた。

一方、前立腺癌の測定結果を、stage 別、治療の有無別に分類すると、stage C の未治療者で初めて 4 検体中 2 検体異常者が出現し、state D の未

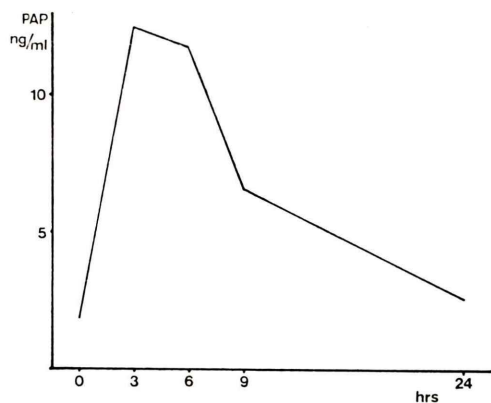


Fig. 8 PAP levels after prostatic massage.

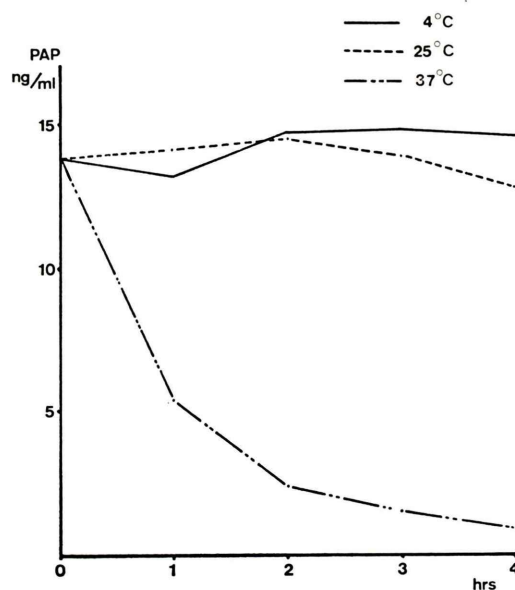
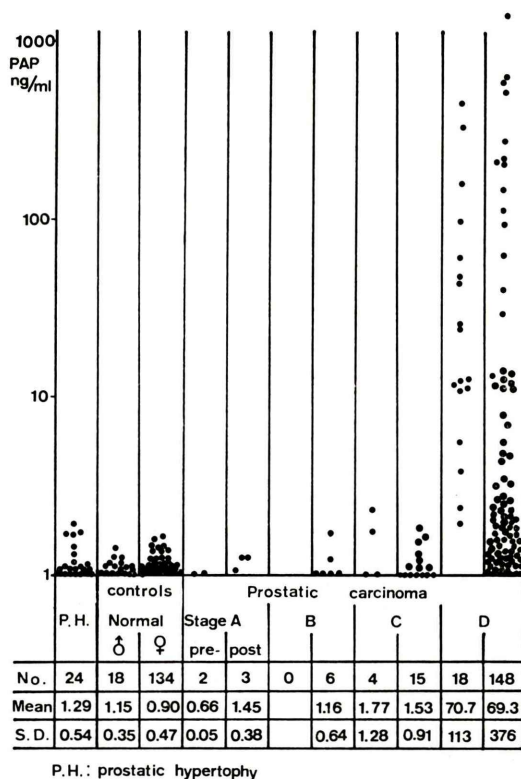


Fig. 9 PAP levels under several temperature.



P.H.: prostatic hypertrophy

Fig. 10 Serum PAP levels with RIA.

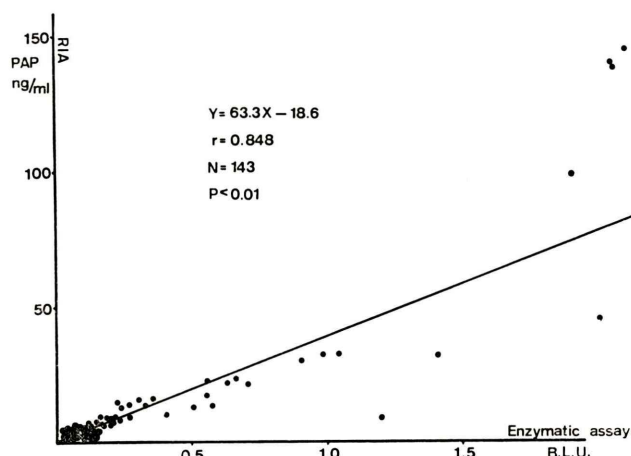


Fig. 11 Correlation between RIA and Enzymatic assay.

治療者は全例異常値を示した。最高値はstage Dの末期癌で4300 ng/mlと高値を示した。また、治療効果をみる目的で、治療開始前、開始後14日、28日、とPAP値の変動を追うと治療に反応する例では、酵素法では14日で正常範囲内に全例入るが、RIA法では14日では依然高値を示し、28日で全例正常化した。

3) 酵素法との相関 (Fig. 11)

酵素法の測定はBessey-Lowry法により行った。酵素法、RIA法の両方法で測定した検体は143検体あり、その相関式は、 $Y = 63.3X - 18.6$, $r = 0.848$ と良い相関を示した。

IV. 考 察

転移のある前立腺癌で血清中の酸性フォスファターゼが上昇する⁵⁾ことは広く知られているが、Yam⁶⁾らは、この酵素の isoenzyme である PAP が前立腺に非常に特異性の高いことを述べている。この事実に基づき、PAPの酵素法による測定が行われているが、今回、教室ではRIA法によるPAPの測定キットを入手しその基礎的、臨床的検討を行った。その結果、プレインキュベーション時間は、18時間をこえるとほぼ一定の傾向を示し、プレインキュベーション温度は、25°Cが最も良好であった。さらに第インキュベーション時

間は3時間をこえるとほぼ一定であった。標準曲線は、測定各点での標準誤差が0.097から0.412と非常に良好であった。再現性も、アッセイ内、アッセイ間とも良好であり、回収率も満足できる結果であった。さらに希釈試験も直線を示し、本kitは、その測定手順に従えば実用上は問題ないと考えた。

臨床的検討で、正常値は、平均値 + 2 × 標準偏差を、その上限とすると、正常者のみでは2 ng/mlであるが、前立腺肥大症を考慮に入れると、2.5 ng/mlを正常上限値と考えた方が良いと考える。さらに、前立腺癌のstage C未治療者では4検体中2検体に異常値が出現し、stage Dで初めて異常値が出現する酵素法に比較して、RIA法の方が、感度が良好で早期発見にも有用と考える。また酵素法との相関は $r = 0.848$ と良好である。

V. 結 果

clinical assays 製 Gamma Dab PAP-RIA kit は、再現性、回収率、希釈試験など、いずれも良好な結果を示した。また酵素法ともよい相関を示し、stage Cの未治療者でも異常値が出現している。さらに、この感度の良さから治療効果判定にも有用と考える。

文 献

- 1) Foti AG, et al: A solid-phase radioimmunoassay for human prostatic acid phosphatase. *Cancer Research* **35**: 2446-2452, 1975
- 2) Foti AG, et al: Detection of prostatic cancer by solid phase radioimmunoassay of serum prostatic acid phosphatase. *N Engl J Med* **297**: 1357-1361, 1977
- 3) Pirkko V, et al: Serum prostate-specific acid phosphatase. *Clin Chem* **24**: 1915-1919, 1978
- 4) The veterans administration cooperative urological research group: Carcinoma of the prostate: treatment comparisons. *J Urol* **98**: 516-522, 1967
- 5) Gutman AB, Gutman EB: An acid phosphatase occurring in the serum of patients with metastasizing carcinoma of the prostatic gland *J Clin Invest* **17**: 473-478, 1938
- 6) Yam LT: Clinical significance of the human acid phosphatases *Amer J Medicine* **56**: 604-616, 1974