

《ノート》

ヒト前立腺性酸性フォスファターゼのラジオ イムノアッセイキット

—RIA-Quant P.A.P. Test Kit の基礎的・臨床的検討—

Radioimmunoassay for Human Prostatic Acid Phosphatase
—Basic and Clinical studies of RIA-Quant P.A.P. Test kit—

若林 克己* 杉山 裕子** 高橋 悅子** 志田 圭三**

Katsumi WAKABAYASHI*, Yuko SUGIYAMA**, Etsuko TAKAHASHI**,
and Keizo SHIDA**

*Institute of Endocrinology, and **Department of Urology, School of Medicine, Gunma University

I. はじめに

ヒト前立腺で産生される酸性フォスファターゼ(PAP)は、他の組織等で作られる酸性フォスファターゼと異なる等電点を有している。また酒石酸塩の存在で活性を失い抗原性も異なるという特異的なものである。そして、精液中には高濃度に放出されるが血中には、通常痕跡的なレベルで存在しているにすぎない。1936年Gutmanらにより前立腺癌の骨転移部位におけるphosphataseの活性が高まることが見出されており、その後、前立腺癌の進行に伴い血中PAPレベルが上昇するという事実が明らかになり、血中PAP測定の臨床的重要性が注目されるようになってきた^{1~6)}。近年に至りその測定法も簡便かつ感度、特異性、安定性の高いラジオイムノアッセイ(RIA)が開発され、感度や特異性、安定性の面で問題のあった従来の酵素活性測定法に代り、PAPの臨床検査に用いられる可能性が示されている^{7~10)}。われ

われはPAPに対する市販RIAキットのひとつであるMallinckrodt社のRIA-Quant P.A.P. Test kitの有用性を検討する機会を得たので、ここにその検討結果を報告する。

検討事項

- 標準曲線について
- 稀釈テスト、精度および再現性のテスト
- 他社キットでの測定値との相関性
- 回収テスト
- 試料の保存性
- 正常値の分布
- 臨床的観察、前立腺癌以外の泌尿器系疾患についての観察
- 治療に伴う血中PAPの変化、Enzyme activity assayとの相関

II. 材料と方法

1. RIA測定キットおよび施行法

検討した測定キットは、米国Mallinckrodt社で作られ、第1ラジオアイソトープ研究所から提供されたRIA Quant™ P. A. P. Test kitである。このキットは、ヒト精漿より抽出精製されたPAP

Key words: Prostatic acid phosphatase, Radioimmunoassay kit, Normal level, Enzymatic activity, Immunoreactivity.

* 群馬大学内分泌研究所

** 群馬大学医学部泌尿器科学教室

受付：56年10月23日

最終稿受付：56年12月10日

別刷請求先：前橋市昭和町3-39-15(番371)

群馬大学内分泌研究所

若林克己

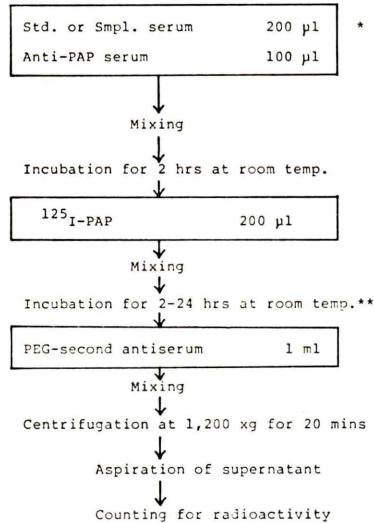
と、それを家兎に投与して作られた抗血清を用いて作製されたものであり、polyethylene glycol による第2抗体結合時間の短縮を行った2抗体法を採用している。

2. キットの構成

- 1) ^{125}I -標識 PAP、赤色に着色された緩衝液に溶解された状態で提供される。
- 2) PAP 標準品、ヒト血清中に 0, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 20.0, 40.0 ng/ml の濃度に溶解したものが凍結乾燥されている。
- 3) 家兎抗 PAP 血清、緩衝液で希釈された溶液で青に着色されている。
- 4) ポリエチレングリコール(PEG)—第2抗体溶液、この溶液は、抗家兎 γ -グロブリン抗体と分子量 6,000 の PEG 3.5% を含む。
- 5) 非特異的結合(NSB)測定用緩衝液

3. 施行法

キットに附属のガイドブックに示されている施行法に従って行った(Fig. 1)。標準曲線は logit B/B_0 と log P. A. P. 濃度のプロットに基づき偏差と変動で重みをつけた直線と3次曲線による回



* Non-specific binding(NBS) tube is prepared by adding 200 μl of 0.0 ng/ml standard and 100 μl of NSB buffer.

** Overnight (about 17 hrs) incubation in the present tests.

Fig. 1 Procedure of RIA-Quant P.A.P. Test Kit.

帰を行い、標準濃度の範囲内では3次曲線で、範囲外では直線にあてはめて試料中のPAP濃度を求めた。

4. 他のPAPキット

本キットによる測定結果との比較のため栄研 ICL社から提供されたPAP「栄研」(以下EIKと略記する)および日本トラベノール社から提供された米国 CLINICAL ASSAY 社の Gamma Dab PAP RIA KIT (以下CLAと略記する)を使用した。

5. 酵素活性の測定

P-Nitrophenyl phosphate の水解を指標とする Andersch ら¹¹⁾および Fishman ら¹²⁾の方法に基づく Acid phosphatase Color-Test kit (Boehringer Mannheim GmbH) を用いて測定した。全 acid phosphatase 活性から酒石酸塩添加による活性の減少分を PAP 活性として unit/l で表現した。1 U/l は 0.06 Bessey-Lowry 単位/ml に相当する。

6. 測定試料

1) 前立腺疾患患者血清

様々な進行状態にある前立腺癌患者および前立腺肥大症の患者より採血、血清を分離して一部は直ちに測定、他は -80°C に凍結保存した。

2) 50 歳以上の前立腺疾患以外の泌尿器系疾患の患者および 50 歳以上の正常男子血清を採取し、 -80°C で測定まで凍結保存した。

3) 正常女子および泌尿器系疾患の患者血清を採取し、プールして凍結保存した。

III. 検討結果

1. 標準曲線について

Fig. 2 は本法による標準曲線の1例を示したものである。標識 PAP を加えるまでの時間を、ガイドブックにある 2 時間 ± 10 分から overnight に延長することにより、感度は 2~4 倍程度向上することを示している。overnight 処理の場合標準曲線は急峻となり同一試料を測定してみると低濃度における performance が改善される一方、高濃度では follow し難くなる。低濃度の試料測定を重視する場合には、この方法が好ましいといえよう。

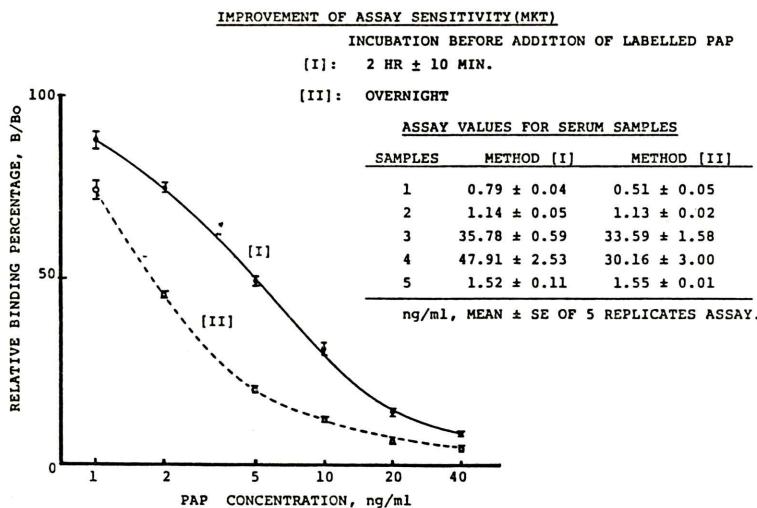


Fig. 2 Standard curves of the standard assay and the high sensitive modification.

The curve (I) was obtained by the standard procedure which is indicated in the manufacturer's instruction. Our present examinations were carried out with this procedure. The curve (II) was obtained by a modified procedure where the incubation period before the addition of labelled PAP was prolonged to overnight (about 17 hrs.). Each point on the curves represents the mean of triplicated tubes with standard deviation. The table in the figure shows the results obtained by these procedures carried out simultaneously with the same samples (mean and standard error of 5 replicates assay).

2. 希釈テスト、精度および再現性

高濃度のPAPを含む前立腺癌患者の血清4種を女性血清で希釈測定した。Fig. 3はそれぞれの測定値を次の計算式を用いて補正したものである。

$$\text{補正式: } A = Y - K \times (N-1)/N$$

A: 補正值, Y: 希釈に用いた血清の測定値(ng/ml), K: 希釈に用いた女性血清中の immunoreactive PAP 値(ng/ml), N: 希釈倍率

直線性は容認できるといえよう。測定は各サンプルにつき4重測定で4回のアッセイをくり返してアッセイ内変動とアッセイ間変動を評価できるよう考慮した。総計48サンプルについてのアッセイ内変動係数は、平均6.19%，その標準偏差は3.52%，また4回のアッセイでのアッセイ間変動係数は、平均15.72%，標準偏差7.67%であった。

3. 他社キットでの測定値との相関性

この希釈テストに用いた血清試料を同時にEIKとCLAのRIAキットで測定した結果をTable 1に示す。各キットによる測定値の相関係

数は MKT: CLA で $R=0.898$, MKT: EIK で $R=0.923$ と良好な相関を示した (Table 1)。

4. 回収テスト

キットに添付されている最高濃度の標準PAP(40 ng/ml)をプールした女性血清で20倍と8倍に希釈した。このことによってプール女性血清中に20 ng/ml, 5 ng/ml のPAPを加えたことになる。このようなサンプルについて3重測定を2回行った。初回に使用した女性血清中のPAP陽性物質は1.25 ng/ml, 2回目に使用したものは1.12 ng/ml であったため、それぞれの測定値を希釈テストで使用した式によって補正した値は、Table 2に示す通りとなり回収率は最低93.5, 最高110.4%, 平均103.4%であった (Table 2)。

5. 試料の保存性

PAPを臨床検査に適用する時、大きな問題のひとつは、血液試料の保存状態に伴うPAP活性の変化である。分離した血清を常温で放置すると、短時間にPAPの酵素活性が失なわれてくるが、

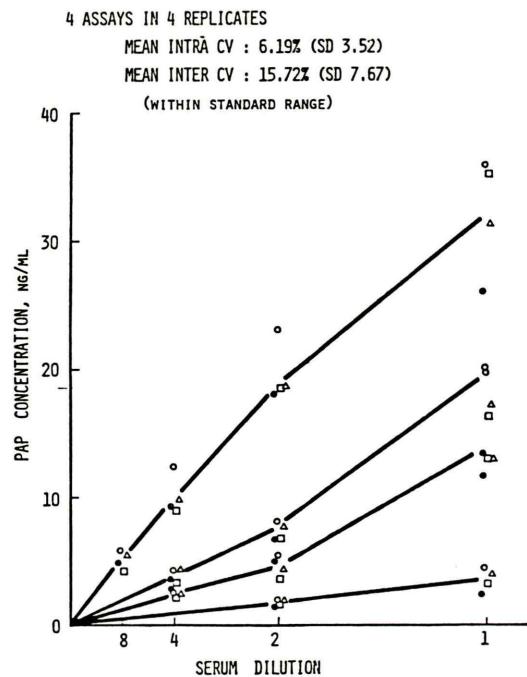


Fig. 3 Serum dilution tests.

Serum samples obtained from 4 patients of prostatic cancer were serially diluted with pooled female sera, and measured in 4 different assays each in quadruplicate. The assay values were corrected for immunoreactive PAP in the female serum used for the dilution according to the equation described in the text. Each mark in the figure represents the mean of individual assay.

一方 PAP の免疫活性は、比較的安定していると報告されている¹³⁾。

PAP の免疫学的な安定性を確認するために3通りの方法で試料の保存実験を行った。第1は、4種の血清を採取、直後に5等分し、ひとつは直ちにアッセイを行い他は4°Cと-20°Cにそれぞれ1日、2日保存した後測定した。その結果は、Table 3に示す如く、いずれの保存法でも2日間までは有意の変動を示さないことが明らかにされた(Table 3)。この結果に基づいて-80°Cに保存してあった5種の試料血清を融解して16等分し、ひとつは直ちに測定、他は4°C、-20°C、-80°Cにそれぞれ1日、2日、4日、1週間および2週

Table 1 Correlation among assay values obtained with three RIA kits

Sample	CLA	MKT	EIK
1	2.61	2.96	3.06
2	3.85	4.79	4.22
3	5.95	15.26	7.10
4	3.96	4.36	5.21
5	6.30	7.68	7.34
6	12.75	16.83	15.19
7	2.24	2.07	2.71
8	3.32	3.41	3.76
9	5.06	5.78	5.37
10	9.43	10.64	9.65
11	18.77	19.62	16.36

$$\begin{array}{ll} X \ldots \ldots \ldots Y \\ R=0.898 & X \ldots \ldots \ldots Y \\ Y=1.09X+1.12 & R=0.923 \\ & Y=0.70X+1.31 \\ X \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots Y \\ R=0.974 & \\ Y=0.90X+1.19 & \end{array}$$

Table 2 Recovery test

Trial	Added, ng/ml	Found, ng/ml	Recovery % (CV)
1	2.00	2.00	100.0 (12.37)
	5.00	5.52	110.4 (1.10)
2	2.00	1.87	93.5 (4.16)
	5.00	5.51	110.2 (2.14)

The standard serum containing 40 ng/ml of PAP was diluted with the pooled female sera containing 1.25 ng/ml (trial 1) and 1.12 ng/ml (trial 2) of immunoreactive PAP at 1:20 and 1:8 and measured in triplicates. The correction of the assay values was carried out to calculate recovery according to the equation described in the text.

間保存して測定した。Table 4 にみられる如くそれぞれの試料に対する測定値には、保存条件、保存時間により一定の変化をする傾向は認められず試料1~5の全ての温度、時間を通しての変動係数は、25.2%，13.9%，15.1%，20.8%，20.3%となり、通常の between assay variation よりは、やや大きいが、保存条件や期間による影響は無いと推論した。したがって、PAP を RIA で測定する限り、保存条件を心配する必要は先ず無いと考えてもよいであろう。もちろん、冷蔵保存は必要であ

Table 3 Preservation test

Sample	4 °C			-20 °C		Mean
	Immediate	1 day	2 days	1 day	2 days	
1	1.34	1.37	1.10	1.65	1.18	1.32
2	1.64	2.12	1.58	1.71	1.04	1.61
3	2.96	3.43	3.17	2.83	2.56	2.99
4	3.55	3.62	3.28	3.93	3.37	3.55

Samples were assayed in triplicates.
Results were expressed as ng/ml.

Table 4 Preservation test

Sample	Immediate	1 day	2 days	4 days	1 week	2 weeks
1	8.25	4°C	9.36	6.68	7.49	4.26
2	7.75		8.21	8.26	9.96	8.21
3	6.50		7.12	5.97	7.37	5.22
4	46.09		50.30	69.92	50.31	47.38
5	46.04		37.35	53.18	38.40	37.18
1		-20°C	9.51	6.62	8.52	4.53
2			8.84	6.92	9.50	6.97
3			8.33	6.22	7.48	5.96
4			47.32	57.77	35.85	42.70
5			39.36	57.23	39.86	33.47
1		-80°C	10.62	7.76	8.26	5.21
2			5.89	7.47	9.64	8.04
3			6.92	6.79	8.65	5.88
4			30.52	63.86	47.12	43.25
5			22.10	46.69	32.92	39.62

Figures in the table are means (ng/ml) of 5 replicates assay.

り、長時間の室温放置は非常識的である (Table 4).

次に凍結乾燥した試料での保存性を検討した。正常男女および前立腺疾患者から採取した血清を2等分し、その一方はアッセイまで-80°Cに冷凍保存し、他方は凍結乾燥した後、蒸留水を加えて原量に戻し測定した。結果は Table 5 に示す如く、一定した変化は無く凍結乾燥処理によっても PAP の免疫活性は保存されることが明らかにされた (Table 5)。

6. 正常血清における PAP 測定値

年齢50歳以上の正常男子および前立腺系疾患以外の泌尿器疾患の男子患者計76名より採取した血清を凍結保存し、男子血清として4回のアッセイで測定した。結果は Fig. 4 に示すような分布である。すなわち、最高値 3.17 ng/ml、最低値 0.26 ng/ml、平均値 1.03 ng/ml、標準偏差 0.59 ng/

Table 5 Effect of lyophilization on PAP RIA

Sample No.	Frozen	Lyophilized
Male 1	14.64±1.91	21.01±3.55
Male 2	2.12±0.04	1.73±0.02
Male 3	0.23±0.01	0.14±0.02
Female 1	0.40±0.03	0.37±0.01
Female 2	0.34±0.02	0.30±0.01
Female 3	0.31±0.02	0.25±0.02

Serum samples obtained from the subjects of both sexes were divided into two aliquots, and stored frozen or frozen-dried until assay. Samples were assayed in triplicates. Figures in the table are: Mean (ng/ml) and SE.

ml であり平均値+2 SD を正常値の上限と考えれば 2.21 ng/ml となる。

7. 前立腺癌以外の泌尿器系疾患および健常人血清中の PAP 測定値

さらに前立腺肥大症 19 例、膀胱癌 8 例、腎癌

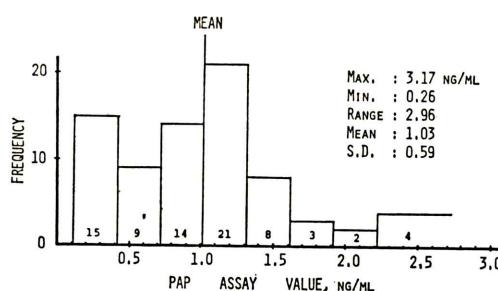


Fig. 4 Frequency distribution of the normal PAP levels.

The figure shows the assay results obtained with 76 serum samples from the normal men and urological patients with non-prostatic diseases over 50 years of age. The width of the column represents one-half the standard deviation of the mean. The last column shows the number of samples with PAP levels over mean +2 SD.

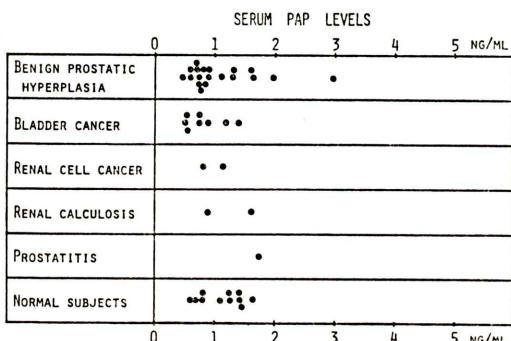


Fig. 5 PAP levels in the sera from normal men and urological patients other than prostatic cancer.

2例、腎結石2例、前立腺炎1例を健常人11例と比較してみた。結果は、前立腺肥大症1例がやや高値を示した(前述の正常値の上限をやや越えていた)。他は正常値の範囲に入っていた(Fig. 5)。

8. 前立腺癌の治療経過におけるPAP酵素活性と免疫活性の変化ならびにその相関

群馬大学医学部附属病院泌尿器科に来院治療を受けた前立腺癌患者4例の治療経過に伴う血清中PAPの酵素活性とRIAによる測定値の変化をTable 6に示した。治療初期に高値を示したPAP酵素活性が治療に伴って低下するとRIAで測定した免疫学的PAP活性も低下することが示され

ている。酵素活性があまり変化しない例では相関はやや劣るが、4例全体を通じての相関係数は0.946($p < 0.001$)とかなり良好であった(Table 6)。

IV. 考 察

今回テストした Mallinckrodt 社の PAP RIA キットは、標準抗原の2時間の delayed addition による感度の上昇および polyethylene glycol を使用して沈殿反応の迅速化をねらった2抗体法に基づくものである。検討の結果、Fig. 2 に示されるように 1 ng/ml ~ 40 ng/ml の間で良好な反応曲線がえられた。この測定範囲は後に示すが、正常値と異常値との判別には一応充分である。しかしながら、2時間の delayed addition を overnight とすることにより、さらに感度が2~4倍増すことが明らかにされた。ただしこの場合、標準曲線は非常に急峻となり Fig. 2 の測定実例に示すように低濃度の測定には都合が良いが、曲線の形から考えて高濃度、すなわち 10 ng/ml 以上に対する測定値の精度は減少することが考えられる。これは使用者がその目的により選択すべき問題であろうが、感度向上の可能性のあることを使用説明書に記しておいても良いのではなかろうか。

希釈テストには、高濃度血清を緩衝液で希釈する方法と、低濃度血清で希釈する方法がある。われわれは、血清成分の濃度の影響を除去するために敢えて女性血清を用いて希釈し、女性血清中に含まれる免疫学的な PAP 陽性物質を補正して希釈曲線を描いてみたが一応満足すべきものと考えられる。またこの際同一検体を4重測定で4回のアッセイをくり返したので、精度ならびに再現性を計算することが出来たがその結果も妥当な値を示している。さらにここで用いられた試料を他社で供給している RIA キットで測定した結果と比較してみると、Table 1 に示すごとく良好な相関を示しており、前立腺癌患者血清を試料とした場合の測定結果は他社の RIA キットと同じ傾向を示すと考えてさしつかえないであろう。PAP 測定の回収率に関して2種の PAP 濃度によるテストを2回行ったがいずれも 94~110% の回収率を

Table 6 Changes of the serum PAP levels in the prostatic cancer patients during treatments

1. Patient S. T., age 70 yr, stage D, multiple bone metastasis.

Date	Enz. Act. U/l	RIA ng/ml	Note
80-05-20	266	359	
05-30	261	379	Peplomycin 10 mg
06-07	221	361	(i.m.)×20
06-16	257	358	
07-30	126	326	
08-18	22	94	Allylestrenol 90 mg
09-01	17	74	(p.o.)
10-03	23	83	
10-31	30	90	
11-21	31	117	
81-01-30	30	88	Good performance status, infiltration in prostate (\pm).

Correlation coefficient between Enz. Act. and RIA:
0.961

2. Patient T. K., age 78 yr, stage D, multiple bone metastasis.

Date	Enz. Act. U/l	RIA ng/ml	Note
80-06-28	242	335	
08-11	247	363	Peplomycin 10 mg
08-18	349	399	(i.m.)×15
08-25	459	332	
09-08	146	422	
09-28	391	465	Allylestrenol 90 mg
10-04	336	402	(p.o.), 6 w.
10-13	307	443	
10-27	19	108	DESP 300 mg (p.o.)
11-10	9	49	
12-08	4	30	Infiltration in prostate (-), dysurea (-).

Correlation coefficient between Enz. Act. and RIA:
0.824

3. Patient C. I., age 64 yr, stage D, hormone resistant, no significant response to several anti-tumor agents.

Date	Enz. Act. U/l	RIA ng/ml	Note
80-06-09	15	48	Estramustine phosphate 4 tab. since Nov. '76.
06-17	4	40	Castration Oct. '79.
07-09	12	49	Peplomycin 5 mg (i.m.)×11 and 5 FU-DS 200 mg (p.o.) since May '80
07-21	18	55	
08-11	23	83	
08-18	17	63	CIS-platinum 50 mg×3
08-25	13	60	
09-01	20	64	
09-08	13	51	
09-28	12	51	
10-13	21	64	Carboquon 2 mg (i.v.)×9
11-14	15	54	
12-01	5	42	X-irradiation 500 Rad×10
12-08	9	42	

Correlation coefficient between Enz. Act. and RIA:
0.885

4. Patient M. K., age 74 yr, stage D, multiple bone metastasis.

Date	Enz. Act. U/l	RIA ng/ml	Note
80-07-28	22	60	
08-11	13	68	Peplomycin 10 mg (i.m.)×16
08-18	13	53	
08-25	12	56	
09-01	10	53	
09-08	9	48	Allylestrenol 90 mg (p.o.) No improvement of status.
10-06	5	27	

Correlation coefficient between Enz. Act. and RIA:
0.703

● Correlation coefficient between Enz. Act. and RIA throughout 4 cases: 0.946 ($p < 0.001$).

得たことからこのキットに使用されている標準品については充分な回収率が保証されると判定した。

PAP の免疫学的活性の安定性に関しては、すでに報告があるが、さらに幅広い範囲での検討を行った結果、酸性の条件にしなくとも、4°Cで少なくとも2週間までは免疫学的活性の変化は起こらないことが確認された。また血清試料を凍結乾燥して保存することも可能であることが示された。これらの結果は、例えば集団検診や遠隔地への試料の輸送に関して極めて有利な事実といえよう。本キットで測定した正常値の分布は、平均値 1 ng/ml 付近に最大の頻度を示し 0.5 ng/ml 以下に第2の頻度を持つ二相性のパターンとなった。指示されている通常の施行法では、スタンダード 1 前後に最大頻度が現われることになるが 0.5 ng/ml の感度以下の値を示すものも 21% 程度は存在することになる。通常の正常値と異常値との区別には、これで充分であるが、もしも使用者の興味が正常値付近を検討することにある場合には、前述のような施行法の modification によって感度を改善することが望ましいと考えられる。

正常者および前立腺癌以外の泌尿器系疾患の血中 PAP 値の分布パターンから計算した標準偏差は 0.59 ng/ml となり、標準偏差の 2 倍を平均値に上載せした上限値は 2.21 ng/ml で、この辺がこのキットによる正常値と異常値との境界と考えられる。前立腺癌以外の泌尿器系諸疾患の患者血清および健常人血清中の PAP レベルはこの上限を超えることは殆んど無く、前立腺肥大症の場合にも同様であり、高 PAP 値は、前立腺癌に極めて特異的であることが示されている (Fig. 5)。進行した前立腺癌患者の治療に伴う PAP 値の変化を観察すると、治療により症状の改善された患者においては、特に治療前の PAP 値が非常に高い患者の場合、治療の経過に伴って PAP 値が減少することが明らかにみられた。一方、症状の改善のみられなかった患者では、PAP 値は、ほとんど変化を示さなかった。またこれらの症例について酵素活性と RIA 測定値との関係を検討してみると、個々の症例における測定値の相関係数は、

それぞれ 0.961, 0.824, 0.885 および 0.703 であった。最後の症例では、検体数が少ない上、PAP 値に大きな変動が無く、測定値が互いに近接したために、相関係数がやや低くなったものである。全体を通しての 43 検体に対する両測定値の相関係数は、0.946 で $p < 0.001$ と極めて良好であり、本キットによる RIA 測定値が酵素活性とよく平行していることが示された。以上のような検討の結果、本キットは、ヒト前立腺性酸性フォスファターゼの RIA による測定キットとしては、充分使用に耐えるものであり、前立腺癌の診断において、正常と異常との判定に極めて有用であると考えられる。

本研究は、厚生省がん研究助成金による前立腺がん班研究の一部として行われたものである。

文 献

- 1) Bonner CD, Homburger F, Smithy GB, et al: "Prostatic" serum acid phosphatase level in cancer of the prostate. *J Am Med Assoc* **164**: 1070-1076, 1957
- 2) Gutman AB, Gutman EB: An "acid" phosphatase occurring in the serum of patients with metastasizing carcinoma of the prostate gland. *J Clin Invest* **17**: 473-478, 1938
- 3) Cook WB, Fishman WH, Clarke BG: Serum acid phosphatase of prostatic origin in the diagnosis of prostatic cancer: clinical evaluation of 2408 tests by the Fishman-Lerner method. *J Urol* **88**: 281-287, 1962
- 4) Herbert FK: The estimation of the prostatic phosphatase in serum and its use in the diagnosis of prostatic carcinoma. *Quart J Med* **15**: 221-241, 1946
- 5) Gutman EB, Sproul EE, Gutman AB: Significance of increased phosphatase activity of bone at the site of osteoplastic metastases secondary to carcinoma of the prostate gland. *Am J Cancer* **28**: 485-495, 1936
- 6) Murphy GP, Reynoso G, Kenny GM, et al: Comparison of total and prostatic fraction serum acid phosphatase levels in patients with differentiated and undifferentiated prostatic carcinoma. *Cancer* (Philadelphia) **23**: 1309-1314, 1969
- 7) 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
- 8) Vihko P, Sajanti E, Janne O, et al: Serum prostate-specific acid phosphatase: Development and validation of a specific radioimmunoassay. *Clin Chem* **24**: 1915-1919, 1978
 - 9) Mahan DE, Doctor BP: A radioimmune assay for human prostatic acid phosphatase-Levels in prostatic disease. *Clin Biochem* **12**: 10-17, 1979
 - 10) Choe BK, Pontes EJ, Morrison MK, et al: Human prostatic acid phosphatase: II. A double-antibody radioimmunoassay. *Arch Androl* **1**: 227-233, 1978
 - 11) Andersch MA, Szczypinski AJ: Use of p-nitrophenyl phosphate as substrate in determination of serum acid phosphatase. *AM J Clin Pathol* **17**: 571-574, 1947
 - 12) Fishman WH, Lerner F: A method for estimating serum acid phosphatase of prostatic origin. *J Biol Chem* **200**: 89-97, 1953
 - 13) Foti AG, Herschman H, Cooper JF: Comparison of human prostatic acid phosphatase by measurement of enzymatic activity and by radioimmunoassay. *Clin Chem* **23**: 95-99, 1977