

高感度PSA、free PSA測定試薬の開発： 前立腺疾患に対する診断効率の改善

バイオサイエンス事業部 開発部 AIA試薬開発G 三澤 孝一
遠田 容子
新谷 晃司
井上 益男
バイオサイエンス事業部 営業部 マーケティングG 嶋津 和博

1. はじめに

前立腺癌の診断・治療において、前立腺特異抗原 (Prostate Specific Antigen ; PSA) はその名のとおり前立腺組織に特異的な蛋白質であり、前立腺癌のスクリーニング、診断、経過観察に用いる有用な腫瘍マーカーとされている¹⁾²⁾。

血中でのPSAは、主に 1・アンチキモトリプシン (ACT) と結合した結合型PSA (PSA-ACT) と 2・マクログロブリン (AMG) との結合型PSA (PSA-AMG) および遊離型PSA (free PSA) の3タイプ型で存在すると報告されている。PSA-AMGは、PSA分子の表面をAMGによりすべて覆われているため、免疫学的方法を用いる測定は不可能である。したがって、血中の総PSA濃度 (total PSA) とはPSA-ACTとfree PSAの総和と考えられている。total PSAの測定は、患者ごとに異なる可能性のある血中free PSA / PSA-ACT濃度比の影響を受けることなく、free PSAおよびPSA-ACTに対して等モル反応 (Equimolar-response) で測定できることが重要とされている。

total PSA濃度が4~10 ng/mLのグレーゾーンと呼ばれる領域では、約20~40%の頻度で前立腺癌 (Prostate Cancer ; PCa) が発見されており、前立腺肥大症 (Benign Prostatic Hyperplasia ; BPH) 等の良性疾患と鑑別するためには直腸診、超音波診断などの精密検査を行い、最終的な診断には生検が行われている。PCaではBPH等の良性疾患に比べfree PSA濃度が低いことが報告されており^{3)~7)}、total PSA濃度におけるfree PSA濃度の比 (F/T比 [%]) を求めることで、BPH等の良性疾患とPCaを効率よく鑑別でき、二次検診や受診者の負担を軽減できると考えられている。

また、近年、PCaに対する前立腺全摘手術後の内分泌治療中の患者の中には、術後のtotal PSA値が0.01 ng/mL付近から徐々に上昇を示す例が多数報告されており⁸⁾、再発の早期予測における高感度PSA測定試

薬の有用性が認識されている。このためPCaの再発の早期診断および早期発見には0.01 ng/mLが測定可能な高感度試薬が要求されている。しかしながら自社total PSA測定試薬 (以下、ST-PA) は測定下限界が0.1 ng/mLであり、術後の経過観察に使用するためには感度の向上が必要である。

そこで、前立腺疾患に対する診断効率の改善を目的として、0.01 ng/mLを測定下限界とする高感度total PSA測定試薬「Eテスト「TOSOH」 (PSA)」(以下、PSA 試薬) および新規にfree PSA測定試薬「Eテスト「TOSOH」 (free PSA)」(以下、free PSA試薬) のAIA試薬化を進め、全自動免疫測定装置AIAシリーズを用いた短時間、高感度な測定試薬の開発を行ったので報告する。

2. 測定原理と材料

PSA 試薬およびfree PSA試薬は抗原抗体反応を利用し、その反応に関与する全ての物質を容量約1 mLのカップ内に凍結乾燥、密封した測定試薬である。すなわち、試薬カップ内にはPSA 試薬の場合、PSA-ACTおよびfree PSAと反応性を有する2種類のモノクローナル抗体、反応環境を安定化させるトリス緩衝剤、試薬の剤形の安定化剤、保存安定化剤として牛血清アルブミン (BSA)、サッカロース等を含む。free PSA試薬の場合、PSA-ACTおよびfree PSAと反応性を有する1種類のモノクローナル抗体とfree PSAのみに反応性を有する1種類のモノクローナル抗体、反応環境を安定化させる緩衝剤、試薬の剤形の安定化剤、保存安定化剤等を含む。本測定原理は1ステップサンドイッチ蛍光酵素免疫測定 (FEIA) 法であり、試薬カップに含まれるモノクローナル抗体は各々PSA上の異なる部位 (エピトープ) を特異的に認識し結合することにより免疫複合体 (磁性単体結合抗体-抗原 (PSA)-酵素標識抗体) を形成する (図1)。測定は、試薬力

カップに抗原を含む検体を分注することにより、凍結乾燥体は溶解し抗原抗体反応が開始する。37℃、10分間の反応後、未反応の抗原および酵素標識抗体をB/F分離により洗浄除去し、酵素基質である4-メチルウンベリフェリリン酸(4MUP)を分注後、経時的に蛍光強度を測定し単位時間あたりの4-メチルウンベリフェロン(4MU)の生成量を測定する。基質の蛍光強度は固定化された酵素量に依存し、さらにPSA抗原量に比例する。したがって、あらかじめ既知濃度のPSAを含む標準品を用いその蛍光強度とPSA濃度による標準曲線を作成し、PSA濃度未知の患者検体の蛍光強度に相当するPSA濃度を標準曲線より算出することによりPSAの定量が可能である。測定の際、検体のカップへの分注、一定時間下での抗原抗体反応、B/F分離、基質分注、蛍光強度の測定は全自動エンザイムイムノアッセイ装置(AIA-1200シリーズおよびAIA-600を除く)により自動で行われ、各試薬ともに測定開始から約18分後に結果が得られる。

3. AIA試薬の開発

(1) PSA 試薬

total PSAの測定は前述のとおり高感度化が要求されるため、非特異的なバックグラウンドの低減を中心とし、また、蛍光強度の測定範囲内でシグナルの増大となるよう、高感度試薬の開発を試みた。

固相へPSAを捕捉する抗体を固定化する磁性ビーズについて、ST-PAに使用している磁性ビーズから、高分子ポリマーで表面を被覆した磁性ビーズに変更し、酵素標識抗体の非特異的結合を低減させる仕様とした。

酵素標識抗体について、抗体への酵素標識手法はST-PAと同様であるが、抗体と酵素を結合させる架橋

試薬の使用量を最適化することでシグナルを増大させる仕様とした。

反応液組成について、検体中に含まれる可能性のある異好性抗体(Heterophilic Antibodies、Human Anti-Mouse Antibodies等)との非特異的結合を防ぐため新規にブロッキング剤を添加した。また、非特異的なバックグラウンドの上昇は抗原を介さず酵素標識抗体と抗体固定化ビーズとが直接結合することにより生ずると考えられるため、抗体固定化ビーズと酵素標識抗体を含む希釈液が直接接触しないように1段階目に酵素標識抗体希釈液を、2段階目に酵素標識抗体を含む希釈液を分注し凍結することで非接触の状態とした。

また、標準曲線作成のためのポイントを、ST-PAの2ポイントから6ポイントに増やし、低濃度域による再現性および測定精度の改善を試みた。なお、標準品のPSA濃度はWHO 96/670を基準として決定した。

その結果、ST-PAと比べ、非特異的な結合によるバックグラウンドは約1/10に低減し、また、抗原抗体反応によるシグナルは約2倍に増大することができた。また、低濃度域に標準液のポイントを増やしたことで、低濃度域による再現性および測定精度を向上させることができた。

(2) free PSA試薬

現行のPSA測定用AIA試薬はtotal PSAを測定する試薬であるが、total PSAは前立腺肥大症等の良性疾患でも上昇する。前述のとおりtotal PSA濃度におけるfree PSA濃度の比(F/T比〔%〕)を求めることで、前立腺肥大症等の良性疾患と前立腺癌の鑑別に有用であることが認知されてきているため、新規にfree PSA測定用AIA試薬の開発を試みた。

図1に示すとおり、total PSA測定試薬に使用する抗体とは異なり、PSAと複合体を形成するACTの影響を

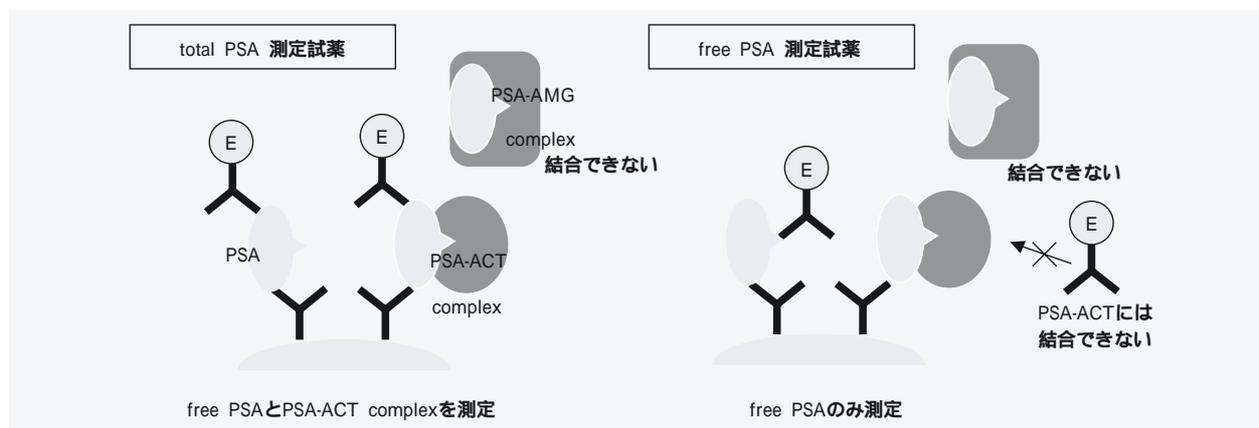


図1 total PSA測定およびfree PSA測定の免疫複合体模式図

受けずfree PSAのみに反応性を有する1種類のモノクローナル抗体と、free PSAおよびPSA-ACTともに反応性を有する1種類のモノクローナル抗体を選択した。試薬仕様の最適化はPSA 試薬と同様な手法により開発を行った。なお、標準品のfree PSA濃度はWHO 96/668を基準として決定した。

4. 基本性能評価

(1) 再現性

測定内再現性、測定間再現性試験を濃度の異なる3種の血清検体を用いて行った。使用した3検体(Low、Middle、High)は1回の測定分を小分け分注し使用まで凍結保存した。10重同時測定による測定内再現性試験の結果、各検体の測定値の変動係数(CV)は、PSA 試薬は2.3~2.6%、free PSA試薬は1.1~1.5%の範囲内であった。20回(90日間)の測定を各4重測定

にて行った測定間再現性試験の結果、各検体の測定値のCVは、PSA 試薬は2.8~3.4%、free PSA試薬は1.9~2.0%の範囲内であった(表1)。

(2) 希釈直線性

希釈直線性試験を濃度の異なる3種の血清検体を用い3重測定にて行った。各々の検体を専用希釈液で7段階の希釈系列を作製し測定した結果、PSA 試薬、free PSA試薬ともに原点を通る良好な希釈直線性を有していることが認められた(図2)。

(3) 感 度

PSA 試薬および自社従来試薬であるST-PAについて、PSA濃度0濃度の標準品および低濃度患者血清をPSA濃度0濃度の標準品を用い16段階に希釈した試料を10重測定し、得られた蛍光量より最小検出限界を求めた結果、0濃度試料の平均値+2倍標準偏差(SD)と

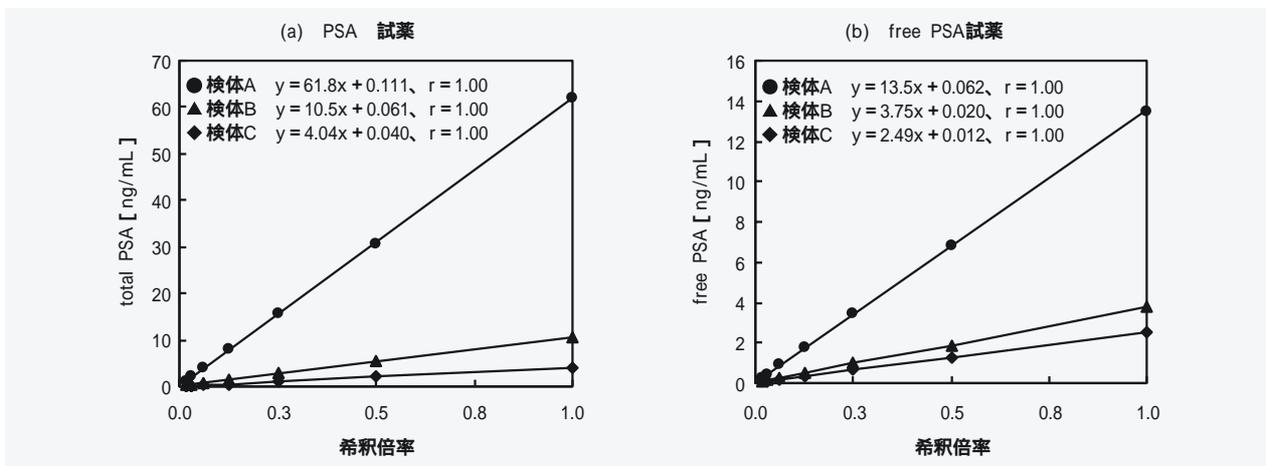


図2 希釈直線性：(a) PSA 試薬、(b) free PSA試薬

表1 測定内および測定間再現性

| | PSA 試薬 total PSA [ng/mL] Pooled serum | | | free PSA試薬 free PSA [ng/mL] Pooled serum | | |
|------------------------|---------------------------------------------|--------|-------|------------------------------------------------|--------|-------|
| | Low | Middle | High | Low | Middle | High |
| 測定内再現性 (n = 10) | | | | | | |
| mean | 1.97 | 9.93 | 61.92 | 0.96 | 3.52 | 13.73 |
| SD | 0.05 | 0.26 | 1.61 | 0.01 | 0.05 | 0.20 |
| CV [%] | 2.3 | 2.6 | 2.6 | 1.1 | 1.5 | 1.4 |
| 測定間再現性 (n = 20) | | | | | | |
| mean | 1.92 | 9.55 | 59.07 | 0.93 | 3.51 | 13.81 |
| SD | 0.05 | 0.30 | 1.99 | 0.02 | 0.07 | 0.28 |
| CV [%] | 2.8 | 3.1 | 3.4 | 1.9 | 1.9 | 2.0 |

希釈試料の平均値 - 2倍SDと重ならない点を最小検出限界値としたとき、その濃度はPSA 試薬で0.005 ng/mL、ST-PAで0.03 ng/mLとなり、PSA はST-PAよりも高い感度を示した(図3)。また、PSA濃度0濃度の標準品を用い低濃度患者血清を8段階に希釈した試料を測定日を変え20回測定(各1重測定)し、プレジジョンプロファイル法による実効感度(CV20%以下)を求めたところ、その濃度はPSA 試薬で0.006 ng/mL、ST-PAで0.036 ng/mLとなり、PSA 試薬はST-PAよりも高い感度を示した(図4)。

(4) 血清検体と血漿検体の相関性試験

血漿は血液凝固を伴わないためサンプル調製に要する時間の短縮、被検体回収量などの点から血清より優れている。そこで、PSA 試薬およびfree PSA試薬が

血漿検体へ対応可能であるか検討した。同時に同一人物から採取した血清とヘパリン血漿との相関性試験を行った結果(血清(x)、血漿(y))、165例を用いたPSA 試薬は相関係数0.999、回帰式 $y = 1.000x - 0.026$ 、164例を用いたfree PSA試薬は相関係数0.998、回帰式 $y = 0.998x - 0.013$ と非常に良好な相関性が認められた(図5)。したがって、PSA 試薬およびfree PSA試薬は血清、血漿のマトリックスの違いによる測定値の差は認められずいずれの検体にも同等な測定値を与える試薬であることが明らかとなった。

(5) 共存物質および抗凝固剤の影響

検体中に含まれる可能性のある各物質を高濃度で血清検体および血漿検体へ添加し、測定値への影響を確認した。共存物質としてはヘモグロビン、遊離型ビリ

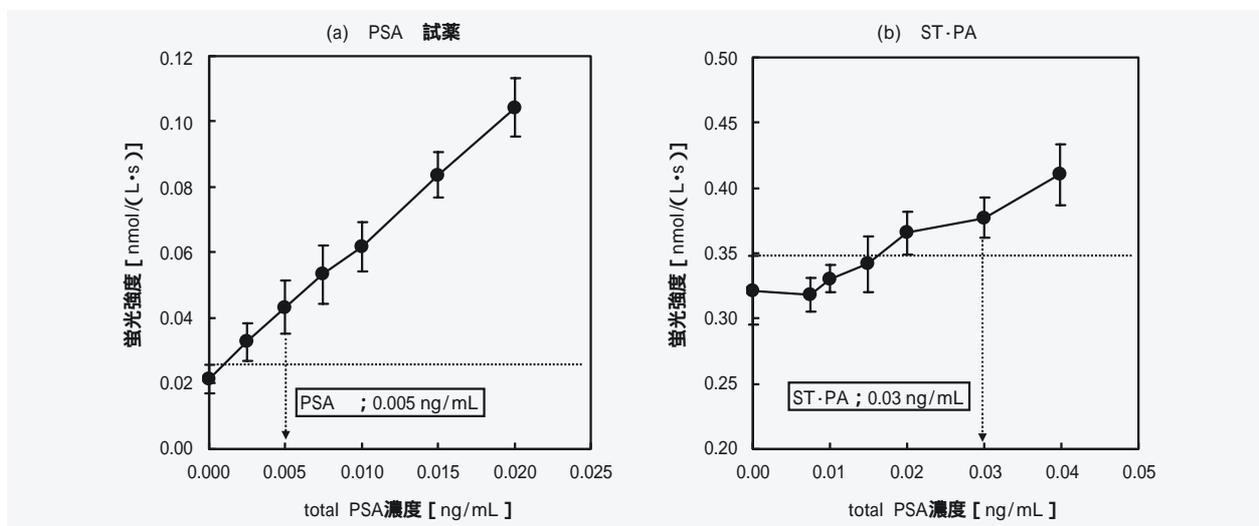


図3 最小検出限界：(a) PSA 試薬、(b) ST-PA

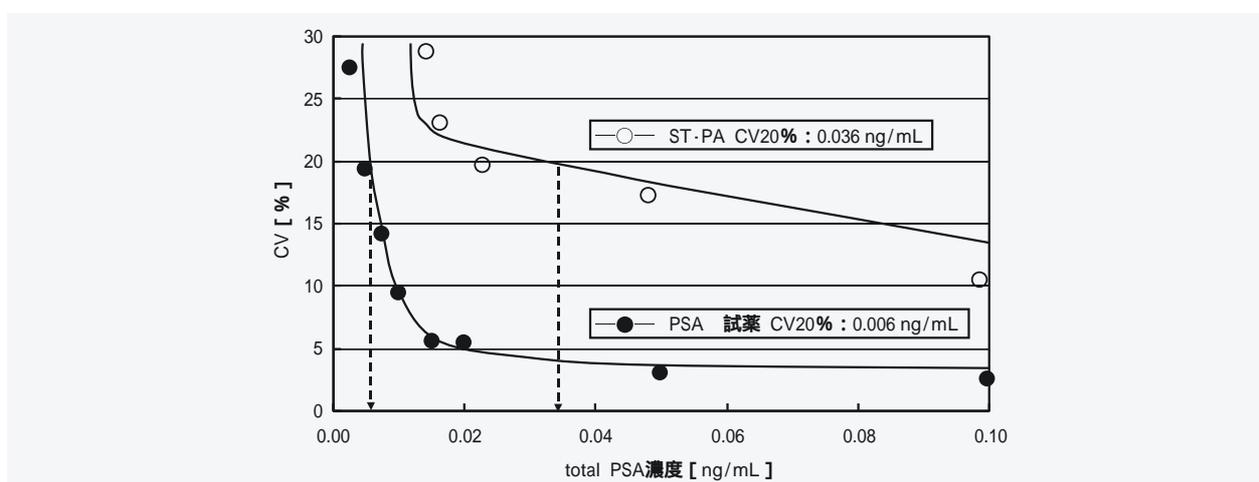


図4 実効感度

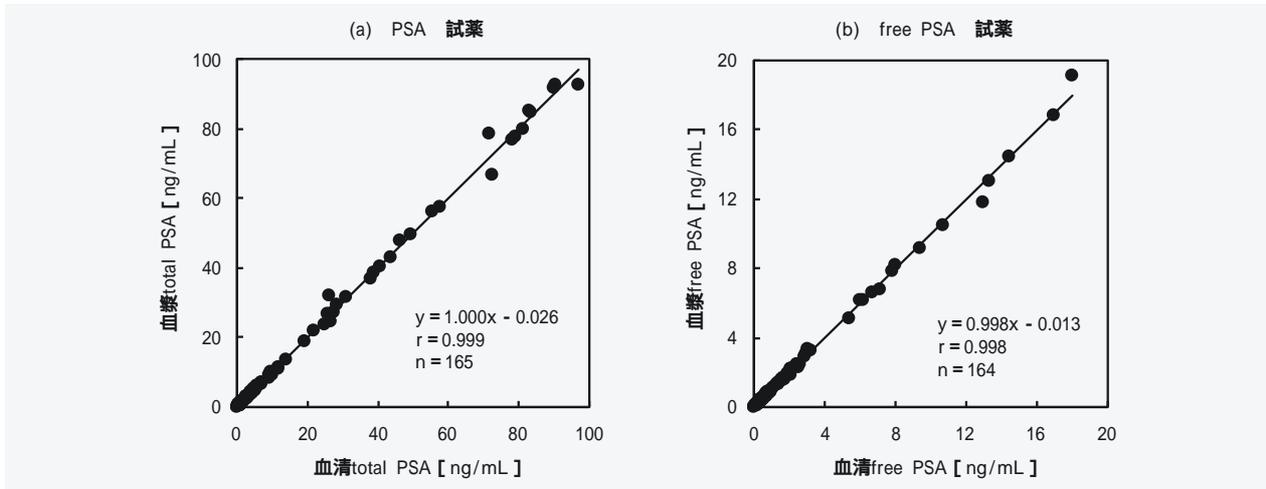


図5 血清検体と血漿検体の相関性：(a) PSA 試薬、(b) free PSA試薬

表2 共存物質および抗凝固剤影響

| | PSA 試薬 | free PSA試薬 |
|-------------------|--------|------------|
| ヘモグロビン [mg/dL] | 445 | 475 |
| 遊離型ビリルビン [mg/dL] | 16 | 17 |
| 抱合型ビリルビン [mg/dL] | 17 | 19 |
| 脂質 [mg/dL] | 1,666 | 1,666 |
| ヒト血清アルブミン [mg/mL] | 50 | 50 |
| アスコルビン酸 [mg/dL] | 20 | 20 |
| クエン酸 [mg/dL] | 20 | 20 |
| ヘパリン [U/mL] | 100 | 100 |
| EDTA [mg/mL] | 5 | 5 |

ルビン、抱合型ビリルビン、脂質、ヒト血清アルブミン、アスコルビン酸を、抗凝固剤としてはクエン酸、ヘパリン、EDTAを各々表2に記載の濃度まで添加し、PSA 試薬およびfree PSA試薬で測定した結果(表2)、未添加に対して測定値はいずれも±10%以内の変動であり、これら物質による影響は認められないと判断した。

(6) 等モル反応性

米国スタンフォード大学より入手した100% free PSAと100% PSA-ACTの精製品を、total PSA量が一定量になるよう比率を変えた混合試料を調製しPSA 試薬で各3重測定した結果(図6)、100% PSA-ACT時に対する各濃度比での回収率は97.1~99.5%であり、比率が変動しても一定の測定値が得られた。したがって、患者ごとに異なる可能性のある血中free PSA / PSA-ACT濃度比の影響を受けずに測定できることが確認された。

(7) 反応特性

free PSAとPSA-ACTの混合物を、高速液体クロマトグラフィーシステム(東ソー株式会社製)によりゲル濾過(TSKgel-G3000SWXL(東ソー株式会社製))

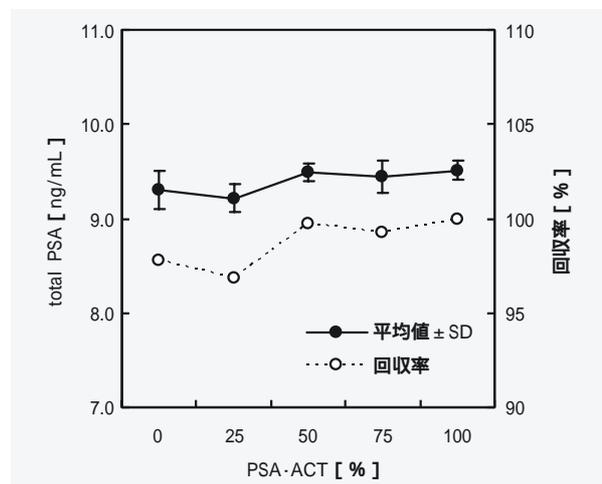


図6 等モル反応性

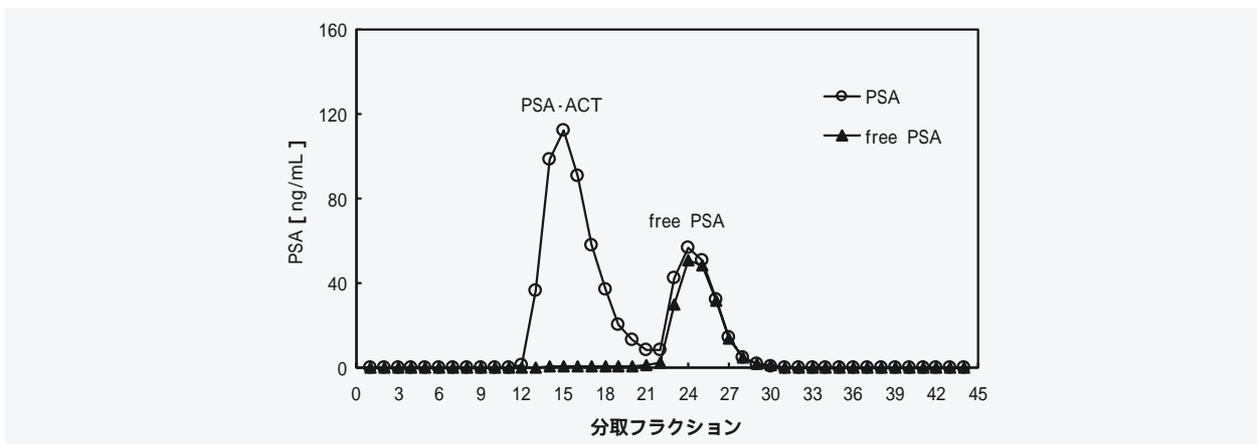


図7 ゲル濾過によるPSA-ACTとfree PSAの溶出曲線

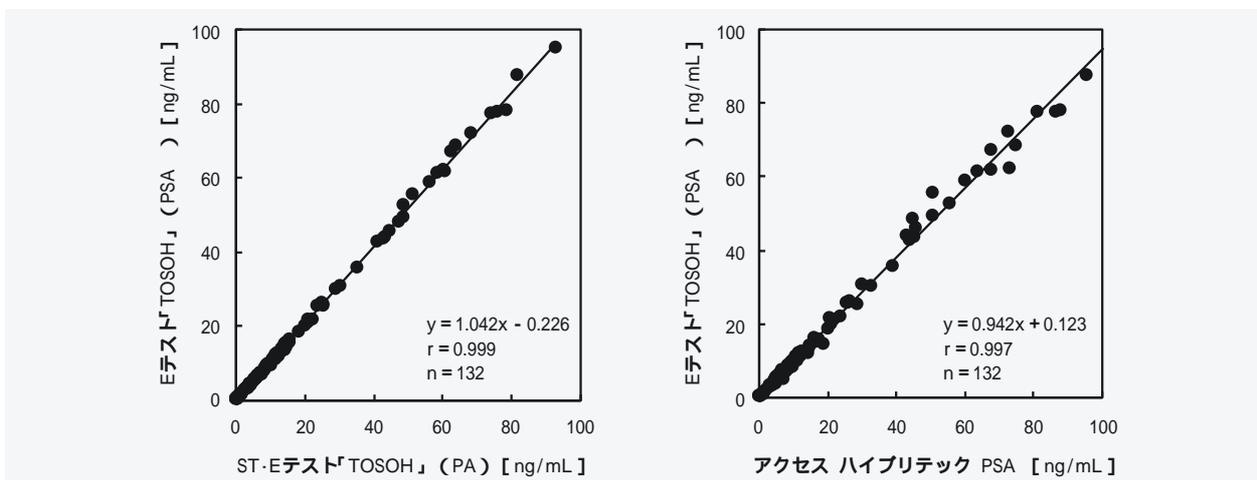


図8 PSA 試薬と他社キットとの相関性

に供し、分取したフラクションについてPSA 試薬およびfree PSA試薬にて各々3重測定し溶出曲線を作成した結果(図7) PSA 試薬はPSA-ACTおよびfree PSAと反応性を有することが認められ、free PSA試薬はfree PSAのみ反応性を有していることが認められた。

(8) 他社キットとの相関性

血清検体132例についてPSA 試薬と自社製品であるST-Eテスト「TOSOH」(PA)および市販キットであるアクセス ハイブリテック PSA(ベックマン・コールター株式会社)で測定し、測定値の比較を行った結果(図8) PSA 試薬による測定値(y)は、ST-Eテスト「TOSOH」(PA)と相関係数 $r = 0.999$ 、回帰式 $y = 1.042x - 0.226$ 、アクセス ハイブリテック PSAと相関係数 $r = 0.997$ 、回帰式 $y = 0.942x + 0.123$ と良好な相関性が認められた。また、前立腺癌の診断にて

内分泌療法、手術療法、放射線療法を行って、total PSA値がST-PAの測定下限以下($< 0.1 \text{ ng/mL}$)となった30例の血清検体について、PSA 試薬と市販の高感度PSA測定キットであるDPC・イムライズ HS-PSA(ニッポン・ディービーシー・コーポレーション)で測定し、測定値の比較を行った結果(図9) PSA 試薬による測定値(y)は、DPC・イムライズ HS-PSAと相関係数 $r = 0.991$ 、回帰式 $y = 1.057x + 0.001$ と低濃度域においても良好な相関性が認められた。

血清検体142例についてfree PSA試薬と市販キットであるアクセス ハイブリテック free PSA(ベックマン・コールター株式会社)およびタンデム・R free PSA(ヤマサ醤油株式会社)で測定し、測定値の比較を行った結果(図10) free PSA試薬による測定値(y)は、アクセス ハイブリテック free PSAと相関係数 $r = 0.996$ 、回帰式 $y = 1.020x - 0.083$ 、タンデム・R

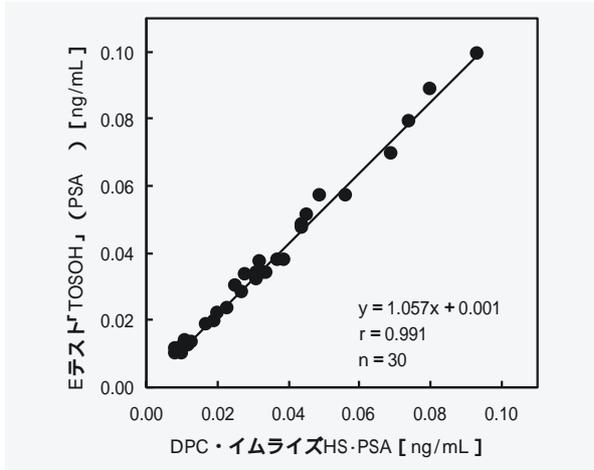


図9 PSA 試薬と高感度PSA測定キットとの相関性

free PSAと相関係数 $r = 0.995$ 、回帰式 $y = 1.034x - 0.002$ と良好な相関性が認められた。

5. 臨床上的有用性確認

(1) 前立腺摘出後のtotal PSA濃度変化

前立腺癌症例で前立腺摘出手術を施行した1例についてPSA 試薬とST-PAによるtotal PSAを測定し、低濃度域での有用性について検討を行った。術後経過観察時のtotal PSA濃度の上昇傾向はST-PAとほぼ一致していたが、ST-PAで測定下限以下 ($< 0.1 \text{ ng/mL}$) の時期において、PSA 試薬では 0.1 ng/mL 以下の濃度域で約4ヶ月早くtotal PSA濃度の上昇が認められた(図11)。

(2) 前立腺癌症例と非癌症例のF/T比 [%]

total PSA値がグレーゾーン ($4 \sim 10 \text{ ng/mL}$) における前立腺癌症例 (51例) および良性疾患 (前立腺肥大症等) の非癌症例 (49例) について、PSA 試薬とfree PSA試薬で測定しF/T比 [%] を求めた結果(図

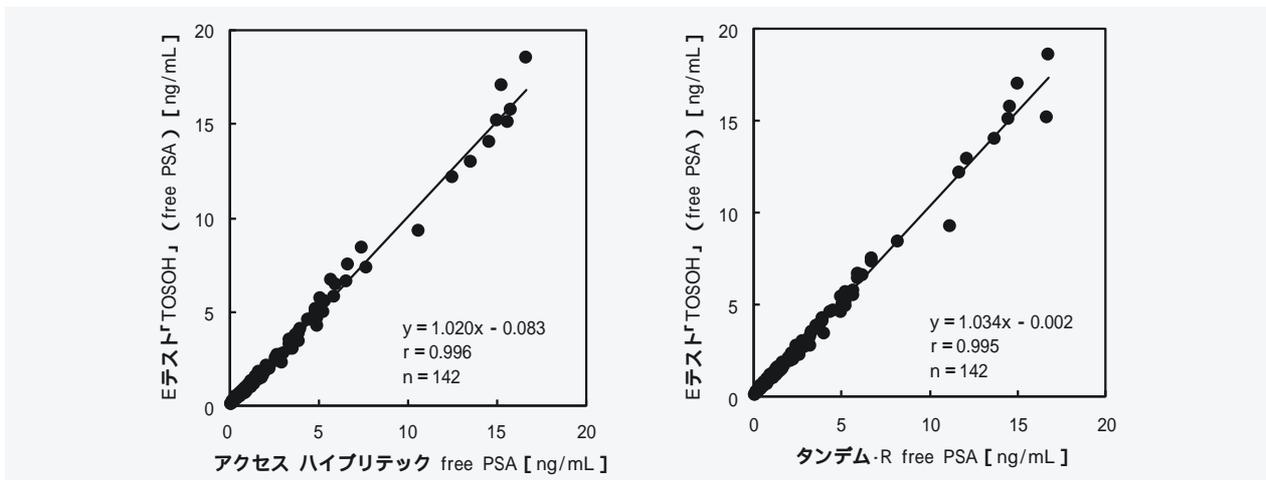


図10 free PSA試薬と他社キットとの相関性

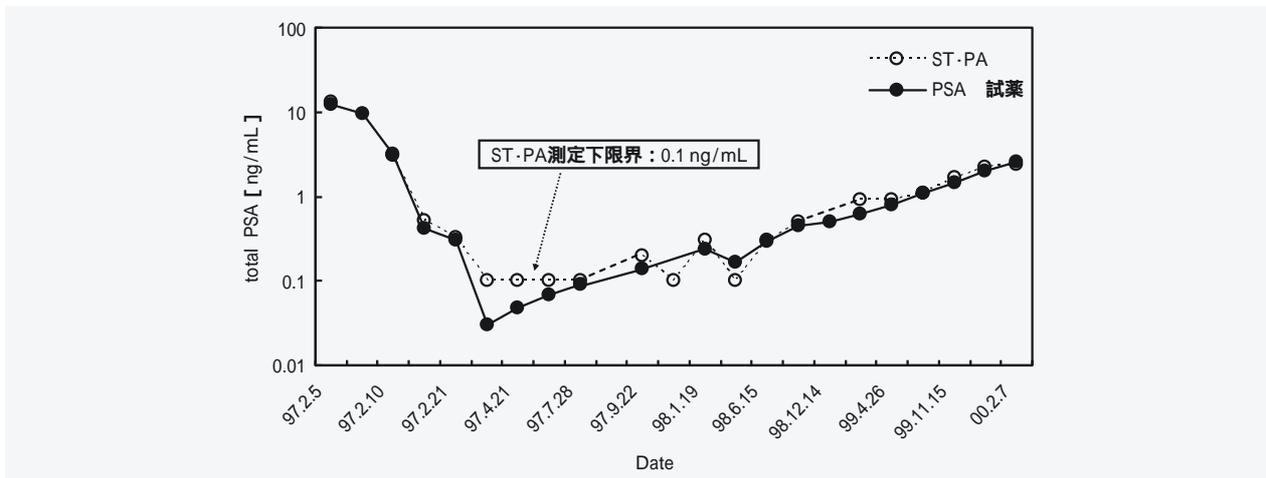


図11 前立腺摘出手術後の経過観察時のPSA値変動

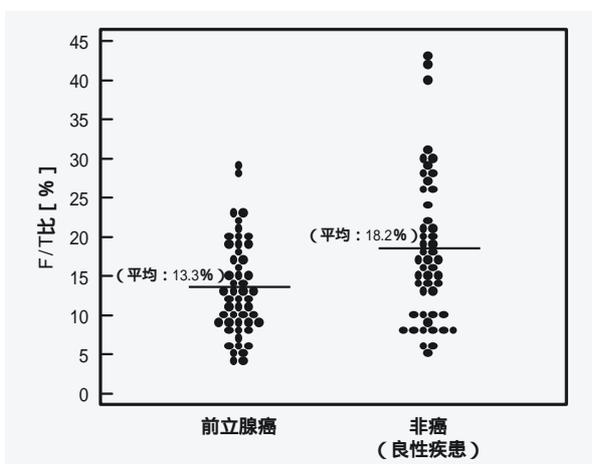


図12 前立腺癌例と非癌例のF/T比 [%]

12、表3) F/T比 [%] の平均値 \pm SD は、前立腺癌症例で 13.3 ± 6.0 、非癌症例で 18.2 ± 9.5 となり、前立腺癌症例では非癌症例に比べ、F/T比 [%] が有意に低い値を示した。

6. 考 察

1) PSA 試薬について

今回開発したPSA 試薬は、抗体固相ビーズの変更、抗体への酵素標識手法の変更および反応液組成を変更したことで、自社従来試薬に比べ高感度なPSA測定試薬を開発することができ、低濃度域に重点をおいて基本的検討および臨床的有用性を確認した。

基本性能としては、測定内、測定間再現性は $< 3.4\%$ と良好であり、検体の希釈直線性も良好であった。今回の開発で重点をおいた感度試験では、最小検出限界値は 0.005 ng/mL 、プレジジョンプロファイル法による実効感度は、CV20%以下で 0.006 ng/mL の結果が得られ、目標感度である 0.01 ng/mL を確実に測定できる高感度試薬であることが確認された。

検体中の共存物質や抗凝固剤の影響を受けないこと、血清、血漿のマトリックスの違いによる測定値の差が認められなかったことから、検体種に影響されない試薬であることが確認された。

臨床的にはtotal PSA測定においてfree PSAとPSA-ACTの反応性が同等であることが重要とされているが、今回開発したPSA 試薬においてもfree PSA / PSA-ACT濃度比の影響を受けず測定でき、free PSAとPSA-ACTに対して等モル反応であることが認められた。

相関性試験でPSA 試薬は自社製品であるST-PAおよび市販キットであるアクセス ハイブリテック PSA

表3 F/T比 [%] における診断感度と診断特異度

| F/T比 [%] | 診断感度 [%] | 診断特異度 [%] |
|----------|----------|-----------|
| 25 | 86 | 24 |
| 20 | 84 | 33 |
| 15 | 67 | 57 |
| 10 | 35 | 73 |

と良好な相関性を示した。また、前立腺癌の診断にて内分泌療法、手術療法、放射線療法を行いtotal PSAが低濃度となった検体において、市販品の中で高感度PSA測定キットといわれるDPC・イムライズ HS-PSAと比較しても良好な相関性を示し、PSA 試薬がST-PAで測定不可能な低濃度域においても適用できることが確認できた。さらにPSA 試薬の臨床上的有用性を確認するために、1例について前立腺摘出後のtotal PSA濃度の推移を検討した結果、ST-PAでは確認できない 0.1 ng/mL 以下の低濃度域でもPSA 試薬は、total PSA濃度の変動を観察することが可能であった。前立腺治療後にtotal PSA濃度の上昇を来たす場合、再燃傾向があると報告されており⁸⁾、低濃度域でのtotal PSA濃度の変動を把握できるようになったことは、臨床的に再燃の予知や再治療開始の判断に有用と考えられる。

2) free PSA試薬について

今回開発したfree PSA試薬についてもPSA 試薬と同等の仕様で開発を進め、基本性能および臨床的有用性を確認した。

基本性能としては、測定内、測定間再現性が $< 2.0\%$ と良好であり、検体の希釈直線性も良好であった。free PSA試薬も検体中の共存物質や抗凝固剤の影響がないこと、血清、血漿両検体を同等に測定可能なことが確認された。

free PSA試薬の反応特性については、free PSAのみに反応しPSA-ACTに反応を示さなかったことから、free PSAに特異的な試薬であることが確認され、他社キットとの相関性試験においてもfree PSA試薬はアクセス ハイブリテック free PSAおよびタンデム-R free PSAと良好な相関性を示した。

米国の臨床研究では、血中のtotal PSA測定 [T] に加え血中のfree PSAの測定 [F] を実施することにより、F/T比 [%] が前立腺癌においては、良性疾患に比べて低値を示し、疾患の鑑別に有用であると報告されており^{3) 4)}、今回開発したfree PSA試薬についても

臨床上的有用性を確認できた。total PSA値がグレーゾーンにおける前立腺癌症例および良性疾患(前立腺肥大症等)の非癌症例についてF/T比[%]を求めた結果、F/T比[%]の平均値±SDは、前立腺癌症例で 13.3 ± 6.0 、非癌症例で 18.2 ± 9.5 となり、前立腺癌症例では非癌症例に比べ、F/T比[%]が有意に低い値を示し、前立腺疾患の鑑別に有用であると考えられた。

7. まとめ

PSA 試薬は自社製品であるST-PAに比べ低濃度域の感度に優れた測定試薬であることが確認でき、前立腺癌症例による前立腺摘出後の再燃の早期発見に適用が可能であると判断した。また、free PSA試薬を製品化したことで、自社total PSA測定試薬と組み合わせたF/T比[%]を求めることが可能となり、前立腺癌と非癌である良性疾患(前立腺肥大症等)との鑑別における有用性が高いことも確認できた。

8. 謝 辞

本開発において下記施設との共同研究により、貴重な検体の供給および測定の実施に対してご協力していただいた各先生方に厚く御礼申し上げます。

群馬大学大学院医学系研究科器官代謝制御学講座泌

尿器病態学：鈴木 和浩 教授

群馬大学大学院医学系研究科器官代謝制御学講座泌

尿器病態学：伊藤 一人 助教授

東海大学医学部基盤診療学系臨床検査学：宮地 勇人 教授

東海大学病院臨床検査技術科：瀬戸 享住 先生

慶應義塾大学医学部泌尿器科：中島 淳 助教授

慶應義塾大学病院中央臨床検査部：石橋 みどり 先生

文 献

- 1) Armbruster, D. A., *Clin Chem*, 39, 181-195 (1993)
- 2) 桶川 隆、東原 英二、*臨床検査*、47、959-965 (2003)
- 3) Catalona, W. J., et al, *JAMA*, 274, 1214-1220 (1995)
- 4) Catalona, W. J., et al, *JAMA*, 279, 1542-1547 (1998)
- 5) Eiji, Higashihara., et al, *J Urol*, 156, 1964-1968 (1996)
- 6) 栗山 学、他、*泌尿器外科*、11、639-643 (1998)
- 7) 栗山 学、*検査と技術*、27、1073-1076 (1999)
- 8) Thomas, A. S., et al, *J Urol*, 152, 1515-1519 (1994)