前立腺癌における酸性フォスファターゼの研究

第2報 前立腺癌患者血清および骨髓血中酸性フォスファターゼのイオン

交換カラムクロマトグラフィーによるアイソエンザイムについて

長崎大学医学部泌尿器科学教室 森 下 直 由
(主任: 近藤 厚教授)

STUDIES ON ACID PHOSPHATASE IN PROSTATIC CANCER

II. Investigation of Acid Phosphatase Isoenzymes by Ion-Exchange Column Chromatography in Serum and Bone Marrow of the Patient with Prostatic Cancer

Naoyoshi Morishita

Department of Urology, Nagasaki University School of Medicine

(Director: Prof. A. Kondo)

Acid phosphatase (ACP) and its isoenzymes (Fr I, Fr II, Fr III) separated by ion-exchange column chromatography, were assayed in blood and bone marrow sera of 20 patients with prostatic cancer (PC), 3 patients with benign prostatic hypertrophy (BPH), and 6 normal males.

1) ACP activities of sera from normal males were total ACP (TAP), 0.59 ± 0.16 Sigma unit/ml and L-tartrate labile ACP (PAP), 0.16 ± 0.06 Sigma unit/ml. There was no significant difference of serum ACP activity among BPH, stage B and C of PC, and normal males.

Serum ACP isoenzymes in normal males were Fr I $72.4 \pm 6.5\%$, Fr II $14.7 \pm 7.7\%$, and Fr III $12.4 \pm 6.4\%$. The ACP isoenzyme pattern in serum of BPH was almost the same as that of normal serum. The ACP isoenzyme Fr II in serum of PC was more increased in higher stage: $20.8 \pm 3.6\%$ in stage B, $35.5 \pm 21.0\%$ in stage C, and $43.3 \pm 20.2\%$ in stage D. The relationship between hormone therapy and ACP activity was discussed.

2) Bone marrow ACP (BM-ACP) activities were: TAP 1.07 ± 0.28 Sigma unit/ml, PAP 0.17 ± 0.08 Sigma unit/ml in normal males, TAP 1.11 ± 0.39 Sigma unit/ml, PAP 0.11 ± 0.06 Sigma unit/ml in BPH, TAP 16.79 ± 40.30 Sigma unit/ml, and PAP 10.59 ± 27.89 Sigma unit/ml in PC. BM-ACP showed a higher activity than serum ACP in all cases.

BM-ACP isoenzymes in normal males were Fr I $80.2 \pm 7.0\%$, Fr II $12.9 \pm 8.0\%$, and Fr III $8.1 \pm 6.1\%$. The difference between serum and bone marrow ACP isoenzyme patterns of BPH and PC was not significant.

3) The correlation between serum and bone marrow ACP activity (TAP, PAP, isoenzyme Fr II) and bone metastasis was discussed.

要 旨: 前立腺癌 (PC), 前立腺肥大症 (BPH), 正常男性の血清と骨髓血の酸性フォスファターゼ (ACP) をイオン交換カラムクロマトグラフィーにて isoenzyme Fr I, Fr II, Fr III に分離した。血清の総酸性フォスファターゼ (TAP) と L-酒石酸阻害性酸性フォスファターゼ (PAP) では PC の stage D のみ有意の活性上昇を認めた。血清の isoenzyme Fr II は PC の stage の進行とともに増加し, PC の stage C と D では有意の増加が認められた。ホルモン療法と血清の isoenzyme Fr II の関係について検討した。骨髓血 ACP は全例で血清 ACP より高値を示したが, isoenzyme pattern では血清と差がなかった。血清および骨髓血の TAP, PAP, isoenzyme Fr II と骨転移の関係について検討した。

結 言

Mercer (1977)¹⁾は ion-exchange column chromatography による簡易な酸性フォスファターゼ (ACP) の isoenzyme の分離法を提唱した。著者は第1報²⁾において同様の方法によつて、各種組織抽出液の ACP isoenzyme を分離し、その特徴を明らかにした。一方、骨髓血酸性フォスファターゼ (BM-ACP) の上昇は前立腺癌骨転移の early sign であるという報告³⁾がみられる。

前立腺癌の血清と骨髓血を用いて、ACP 活性を ion-exchange column chromatography により測定し、その診断的価値について検討を加えた。

実験材料および方法

I. 実験材料

前立腺癌 (PC) 20例、前立腺肥大症 (BPH) 3例、正常人6例の血清と骨髓血を使用した (Table 1)。なお正常女性5例の血清についても検査した。骨髓血は腸骨稜より、骨髓穿刺針を用いて、5ml ずつ計10ml 採血し、次いで8—10ml の末梢血を採取した。Sample は plain tube に入れ、血清分離後使用まで -70°C に保存

Table 1 Subjects of examinations

	No. Pts.	No. Hormone Therapy	Av. Pt. Age (mean $\pm$ SD)
Prostatic cancer	20	15	73.5 $\pm$ 7.3
stage B	3	2	70.0 $\pm$ 9.4
stage C	8	8	72.3 $\pm$ 4.5
stage D	9	5	75.7 $\pm$ 7.8
BPH	3	—	80.3 $\pm$ 5.7
Normal male	6	—	62.0 $\pm$ 24.4
Total	29	15	70.8 $\pm$ 14.2

した。PC は組織学的にすべて adenocarcinoma であつた。clinical stage 別では、stage B 3例、stage C 8例、stage D 9例であり、そのうち15例はホルモン療法を受けている。

II. 実験方法

1. 酵素活性の測定法、Bessey-Lowry 法によつた。

2. ion-exchange column chromatography, Mercer の方法¹⁾に準じて行い、sample は50mM tris-HCl buffer で2倍希釈した。

実験結果

1. 血清酸性フォスファターゼ (S-ACP) と isoenzyme

Table 2 に示すように正常男性例では total ACP (TAP) 0.59 ± 0.16 Sigma unit/ml (以下 SU/ml と略)、L-tartrate labile ACP (PAP) 0.16 ± 0.06 SU/ml であつた。正常女性例では TAP 0.56 ± 0.19 SU/ml, PAP 0.12 ± 0.06 SU/ml と性差を認めなかつた。TAP と PAP は BPH, PC の stage B, C と正常例との間に有意差がないが、stage D では TAP, PAP ともに有意な上昇を認めた。正常男性例の isoenzyme は、Fr I % 72.4 ± 6.5 %, Fr II % 14.7 ± 7.7 %, Fr III % 12.4 ± 6.4 %で、正常女性例では、Fr I % 78.7 ± 4.9 %, Fr II % 16.1 ± 5.4 %, Fr III % 5.1 ± 3.1 %であつた。BPH では正常との差はみられないが、Fr II %についてみると、PC で増加を認め stage が進行するにつれて増加し、逆に Fr I %は減少、Fr III %は不変であつた (Fig. 1)。stage C, D において ACP はバラツキが大きい、ホルモン療法によるものであろう。TAP と PAP はホルモン療法後1カ月以内に正常化するが、Fr II %では漸減し、3カ月以降のものでも7例のうち3例は高値を示した (Fig. 2)。

Table 2 Acid phosphatase activity of sera

sera	total * activity	L- tartrate * labile	isoenzyme activity * (%)		
			Fr I	Fr II	Fr III
normal male (n=6)	0.59 ± 0.16	0.16 ± 0.06	0.42 ± 0.11 (72.4 $\pm$ 6.5)	0.09 ± 0.07 (14.7 $\pm$ 7.7)	0.06 ± 0.03 (12.4 $\pm$ 6.4)
normal female (n=5)	0.56 ± 0.19	0.12 ± 0.06	0.44 ± 0.15 (78.7 $\pm$ 4.9)	0.11 ± 0.07 (16.1 $\pm$ 5.4)	0.02 ± 0.01 (5.1 $\pm$ 3.1)
BPH (n=3)	0.65 ± 0.14	0.18 ± 0.04	0.46 ± 0.09 (71.3 $\pm$ 9.0)	0.12 ± 0.09 (17.3 $\pm$ 9.7)	0.06 ± 0.03 (11.2 $\pm$ 8.5)
PC	stage B (n=3)	0.50 ± 0.10	0.29 ± 0.07 (59.5 $\pm$ 4.5)	0.10 ± 0.01 (20.8 $\pm$ 3.6)	0.10 ± 0.04 (19.5 $\pm$ 6.9)
	stage C (n=8)	0.76 ± 0.69	0.45 ± 0.47 (46.8 $\pm$ 27.3)	0.19 ± 0.15 (35.5 $\pm$ 21.0)	0.08 ± 0.12 (9.4 $\pm$ 6.7)
	stage D (n=9)	5.83 ± 8.11	1.18 ± 1.55 (39.4 $\pm$ 27.2)	3.53 ± 5.26 (43.3 $\pm$ 20.2)	1.12 ± 1.62 (17.1 $\pm$ 10.2)

* Sigma unit Per ml.

Fig. 1 Acid phosphatase activity of sera B, C, D : stage of prostatic carcinoma

Fig. 2 Duration of hormone therapy and serum acid phosphatase levels in prostatic cancer of stage C and D

2. 骨髓血酸性フォスファターゼ (BM-ACP) と isoenzyme

正常例の BM-ACP では TAP 1.07 ± 0.28 SU/ml, PAP 0.17 ± 0.08 SU/ml と S-ACP より高く, BPH, PC においても BM-ACP は S-ACP より高い値を示した (Fig. 3). 正常例の Fr I % 80.2 ± 7.0 %, Fr II % 12.9 ± 8.0 %, Fr III % 8.1 ± 6.1 % であり, Fr I % が S-ACP よりやや多くなっている. BPH, PC における BM-ACP の isoenzyme pattern は S-ACP の pattern と差がなかった (Fig. 4). PC の stage D における Fr II % は正常例に比して有意に高値を示した.

Fig. 3 Correlation between serum and bone marrow acid phosphatase B, C, D : stage of prostatic carcinoma

Fig. 4 Acid phosphatase activity of bone marrow B, C, D : stage of prostatic carcinoma

考察および総括

血清酸性フォスファターゼは, Gutman⁹⁾らが1936年, 骨転移を来した前立腺癌で, 著明な ACP 上昇を報告して以来, 临床上重要な指標酵素として知られている. しかし Gaucher 病, 多発性骨髓腫, 白血病, 骨疾患, 肝疾患などでも上昇するため, 前立腺癌に対し, より特異的な方法が求められてきた. 前立腺酸性フォスファターゼ (P-ACP) は β -glycerophosphate⁹⁾, α -naphthylphosphate⁷⁾, thymolphthalein monophosphate⁹⁾ に対し基質特異性があるといわれているが, 絶対的なものではないよ

うである^{1),9)}. L-tartrate による阻害も問題があり, 他臓器由来の ACP でもかなり阻害され⁹⁾, 実際正常女性血清にも男性と同程度の L-tartrate labile ACP 活性がみられる (Table 2).

Mercer¹⁾ は mini-column を用いた ion-exchange column chromatography による isoenzyme の分離を報告し, 前立腺組織抽出液の ACP はほとんど Fr II にあり, PC 血清ではこの分画が増加するとしている. disc electrophoresis でも前立腺抽出液は ACP-2 と ACP-4 があり, 前者は Fr II, 後者は Fr I へ溶出される. しかし ACP-2 は P-ACP だけでなく, 顆粒球, 単球などの血球成分や脾臓などからも分離されており⁹⁾, Fr II が増加しているからといって必ずしも P-ACP が上昇しているとはいえないが, TAP, PAP よりも, より特異的に P-ACP を反映しているものと思われる. また Fr II の絶対値よりも %の方が, isoenzyme の異常をみるには, よい指標と考えられる.

一方 BM-ACP は Chua³⁾ ら, Gursel⁴⁾ らによると, その上昇は PC 骨転移の early sign であるとしたが, Dias¹⁰⁾ らは特異性が低いので単独で判断できないとした. 特異性が低くなる原因として, 1) 溶血による赤血球, 血小板由来の ACP の混入, 2) 骨芽細胞, 巨核球の ACP, 3) dilutional effect が挙げられている. 1)は

Fig. 5 Dilutional effect in acid phosphatase activity of bone marrow

注意深い骨髓血採血により避けられ, もし溶血がおこつても, Fr I として測定される²⁾. 3)は採血量を一定にすることにより測定値のバラツキを小さくできると思われる. 骨髓血を2回採血して dilutional effect を調べた

Fig. 6 TAP and Fr II % in bone marrow and blood serum of prostatic cancer

Fig. 7 PAP and Fr II % in bone marrow and blood serum of prostatic cancer

Table 3 Frequency of increased TAP, PAP, Fr II % in serum and bone marrow

	No. Pts.	Serum ACP No. (%) increased			BM-ACP No. (%) increased		
		TAP	PAP	Fr II (%)	TAP	PAP	Fr II (%)
Prostatic cancer	20	8 (40.0)	6 (30.0)	13 (65.0)	11 (55.0)	9 (45.0)	12 (60.0)
stage B	3	—	—	1 (33.3)	1 (33.3)	1 (33.3)	1 (33.3)
stage C	8	1 (12.5)	1 (12.5)	5 (62.5)	4 (50.0)	2 (25.0)	4 (50.0)
stage D	9	7 (77.7)	5 (55.5)	7 (77.7)	6 (66.6)	6 (66.6)	7 (77.7)
BPH	3	1 (33.3)	1 (33.3)	1 (33.3)	1 (33.3)	—	1 (33.3)
Normal	6	2 (33.3)	1 (16.6)	1 (16.6)	1 (16.6)	1 (16.6)	1 (16.6)

Table 4 Bone metastasis and acid phosphatase activity

Group	Bone Survey	Bone Scinti	No. Pts.	Serum ACP No. (%) increased			BM-ACP No. (%) increased		
				TAP	PAP	Fr II (%)	TAP	PAP	Fr II (%)
A	+	+	7	5 (71.4)	4 (57.1)	5 (71.4)	5 (71.4)	5 (71.4)	3 (42.8)
B	—	+	6	3 (50.0)	2 (33.3)	5 (83.3)	4 (66.6)	4 (66.6)	5 (83.3)
C	—	—	7	0 (0)	0 (0)	3 (42.8)	2 (28.5)	2 (28.5)	4 (57.1)

(Fig. 5). dilutional effect は5ml 採血群1~2SU/ml²のものでみられるが、逆に活性の上昇するものもある。

血清と骨髓血の TAP と PAP を比較すると、正常例と BPH では、BM-ACP の方が S-ACP より高値を示した。PC における TAP については、S-ACP の上昇が8例に対し、BM-ACP の上昇が11例であり、上昇例が多いようであるが、ACP Fr II %は両者の間に差がなかった (Fig. 6,7, Table 3)。BM-ACP が S-ACP より高くなる原因としては、Fr I の増加、Fr II, Fr III の軽度増加がみられることから、血球由来などの P-ACP 以外の ACP がすべての分画で高いことが想像される。これらのことより、BM-ACP の Fr II は S-ACP に比し、P-ACP に対する特異性は低いと思われる。

骨シンチグラフィと全身骨撮影による臨床的骨転移の有無により3群に分け検討してみると、骨転移が証明されたものでは BM-ACP と S-ACP の差はほとんどみられない (Table 4)。しかし臨床的に骨転移のない群で、Fr II %では差がないが、BM-ACP の TAP, PAP のみ上昇している例があり、この上昇が骨転移の early sign であるのか否かは follow-up を要する。

TAP と PAP はホルモン療法によりすぐ下降して正常域に入るが、Fr II %はかなりの期間を経て漸減し、ホルモン療法でよく control されたものを除けば、isoenzyme pattern に異常が認められ、治療効果のよい指標になると思われる。

mini-column を用いた本法は、従来の ion-exchange column chromatography と比較すると、操作も簡単で、1検体1時間以内で測定することができる。Fr II %は P-ACP 以外のものを含み、正常では性差がないが、TAP, PAP に比べ、PC に対してより特異的であると思われる。

結 語

PC (20例)、BPH (3例)、正常人 (6例) について血清および骨髓血の ACP 活性を測定するとともに、ion-exchange column chromatography により ACP isoenzyme Fr I, Fr II, Fr III を分離した。

1. 血清 ACP

血清 ACP 活性は、正常人では TAP 0.59 ± 0.16 SU/ml, PAP 0.16 ± 0.06 SU/ml であった。BPH および PC の stage B, C では正常と有意差がなかった。

血清 ACP の isoenzyme は正常例では Fr I 72.4±6.5%, Fr II 14.7±7.7%, Fr III 12.4±6.4%であった。BPH では Fr I 71.3±9.0%, Fr II 17.3±9.7%, Fr III 11.2±8.5%と正常と差がなかった。PC では Fr II %が増加し, stage B 20.8±3.6%, stage C 35.5±21.0%, stage D 43.3±20.2%と進行するにつれ増加を示した。またホルモン療法による影響について検討した。

2. 骨髓血 ACP

BM-ACP は, 正常例では TAP 1.07±0.28 S U/ml, PAP 0.17±0.08 SU/ml, BPH では TAP 1.11±0.39 SU/ml, PAP 0.11±0.06SU/ml, PC では TAP 16.79±40.30 SU/ml, PAP 10.59±27.89 SU/ml であった。S-ACP に比較してすべての例で高い値を示した。

BM-ACP の isoenzyme は, 正常例では Fr I 80.2±7.0%, Fr II 12.9±8.0%, Fr III 8.1±6.1%であった。BPH, PC の isoenzyme pattern は S-ACP の場合と有意の差はなかった。

3. S-ACP と BM-ACP の TAP, PAP と isoenzyme Fr II との相関および骨転移との関係について検討を加えた。

稿を終るにあたり, 御指導, 御校閲を賜った近藤厚教授, ならびに直接御指導を頂いた斉藤泰助教授に深甚なる謝意を表するとともに, 御協力を頂いた関連病院の諸先生ならびに教室員各位に感謝いたします。

(本論文の要旨は第67回日本泌尿器科学会総会において発表した)。

文 献

- 1) Mercer, D.W.: Separation of tissue and serum acid phosphatase isoenzymes by ion-exchange column chromatography. Clin. Chem., **23**, 653—658, 1977.
- 2) 森下直由: 前立腺癌における酸性 フォス フェ

ターゼの研究. 第1報. 各種組織抽出液の酸性 フォス フェターゼ・アイソ エンザイム について. 日泌尿会誌, 投稿中.

- 3) Chua, D.T., Veenema, R.J., Muggia, F. and Graff, A.: Acid phosphatase levels in bone marrow: Value in detecting early bone metastasis from carcinoma of the prostate. J. Urol., **103**, 462—466, 1970.
- 4) Gursel, E.O., Rezvan, M., Sy, F.A. and Veenema, R.J.: Comparative evaluation of bone marrow acid phosphatase and bone scanning in staging of prostatic cancer. J. Urol., **111**, 53—57, 1974.
- 5) Gutman, E.B., Sproul, E.E. and Gutman, A.B.: Significance of increased phosphatase activity of bone at the site of osteoplastic metastases secondary to carcinoma of prostate gland. Am. J. Cancer, **28**, 485—495, 1936.
- 6) Jaffe, H.L. and Bodansky, A.: Diagnostic significance of serum alkaline and acid phosphatase values in relation to bone disease. Bull. New York Acad. Med., **19**, 831—848, 1943.
- 7) Babson, A.L. and Read, P.A.: A new assay for prostatic acid phosphatase in serum. Am. J. Clin. Pathol., **32**, 88—91, 1959.
- 8) Roy, A.V., Brower, M.E. and Hayden, J.E.: Sodium thymolphthalein monophosphate: A new acid phosphatase substrate with greater specificity for the prostatic enzyme in serum. Clin. Chem., **17**, 1093—1102, 1971.
- 9) Yam, L.T.: Clinical significance of human acid phosphatases. Am. J. Med., **56**, 604—616, 1974.
- 10) Dias, S.M. and Barnett, R.N.: Elevated bone marrow acid phosphatase: The problem of false positives. J. Urol., **117**, 749—751, 1977.

(1979年8月11日受付)