前立腺癌における酸性フォスファターゼの研究

第3報 ヒト前立腺酸性フォスファターゼに対する特異的抗体の作製

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

III. Production of Specific Antibody against Human Prostatic Acid Phosphatase

Naoyoshi Morishita

Department of Urology, Nagasaki University School of Medicine

(Director: Prof. A. Kondo)

1. Prostatic acid phosphatase (PAP) was purified about 130 fold from human seminal plasma by DEAE Sephadex A-50 ion-exchange column chromatography and Sephacryl S-200 gel chromatography.

2. Rabbits were immunized with the purified PAP as antigen, and anti-PAP antiserum was obtained. This antiserum was fractionated through a Sephadex G-25 column and the obtained IgG fraction was passed through the immunoadsorbent column coupled to normal female serum.

3. This rabbit anti-PAP IgG was tested by double immunodiffusion, and precipitation lines were observed against seminal plasma, prostatic extract, sera of patients with prostatic cancer, and liver extract of a patient with prostatic cancer. Immunoelectrophoretic examination revealed the single precipitation line in anodic side against the liver extract, but in cathodic side against the other samples.

4. By indirect immunofluorescence technique using the rabbit anti-PAP IgG, fluorescence was demonstrated in the section of prostate, but no staining in sections of liver, spleen, kidney, and pancreas.

要旨: 精漿から前立腺酸性フォスファターゼを約130倍に精製し, ウサギに免疫し抗血清を作製した. この抗血清を IgG 分画とした後, 正常女性血清をカップリングした affinity chromatography にて精製した. この抗体は Ouchterlony 法では精漿, 前立腺抽出液, 前立腺癌患者血清のほか前立腺癌患者の肝抽出液との間に完全に一致する沈降線を認めた. 免疫電気泳動上, 肝抽出液では陰極側に単一の酵素活性を有する蛋白沈降線を認めるのに対し, 他のものでは陽極側に見られた. ウサギ抗 PAP IgG を用いた間接蛍光抗体法では, 前立腺組織のみが反応し, 肝, 脾, 腎, 膵では陰性であった.

結 言

酸性フォスファターゼ (ACP) は各種臓器に存在しており, 前立腺はその活性の高い臓器の1つである. ACP 活性は前立腺癌における marker enzyme の1つであり, その特異的測定法の確立が望まれている. 前報¹⁾にて前立腺組織抽出液と精漿の ACP には disc electrophoresis 上, 同様の isoenzyme ACP-2 があることを示した. 組織化学的にも前立腺の分泌性 ACP は, phosphorylcholine を基質として使用すれば前立腺に特異的であるという報

告²⁾もあるため, 精漿の ACP を精製し, 得られたものを前立腺酸性フォスファターゼ (P-ACP) として, ウサギに免疫して抗血清を作製した. さらにこの抗血清を用いて, 蛍光抗体法を含めた臓器特異性の検討を行った.

実験材料および実験方法

I. 実験材料

1. 精漿, 正常成人男子より得られた精液を使用まで -20°C に保存した.

2. ヒト組織, 前立腺癌 (stage D) による死亡3時

間後に剖検で得られた腎臓、肝臓、脾臓、脾臓、前立腺癌組織と慢性腎不全で死亡した女性の肝臓を用いた。また前立腺腺腫は前立腺肥大症より核出したものを用いた。

II. 実験方法

1. 前立腺酸性フォスファターゼの精製、保存精液を解凍、遠沈して得られた精漿を、DEAE Sephadex A-50 ion-exchange column chromatography にて 200mM NaCl 含有 tris-HCl buffer で溶出される分画を得た。PBS にて充分透析後、濃縮し Sephacryl S-200 (2.6×90cm) にて2回 gel chromatography を行い、得られた酵素活性ピーク部を透析し、1mg/ml まで濃縮し-20℃で凍結保存した。

2. 酵素活性測定法、p-nitrophenyl phosphate を基質とする Bessey-Lowry 法³⁾により測定した。酵素活性は1分間に生成する p-nitrophenol の μmol ($\mu\text{mol}/\text{min}$) で示した。

3. 蛋白質の定量、Lowry らの方法⁴⁾に準じて行った。カラム溶出液の蛋白量は 280nm の吸光度により測定した。

4. disc polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), Reisfeld ら⁵⁾の方法に準じて pH 4.0 用ゲルを調整し、pH 4.5 用電極槽緩衝液を用い、定電流 4mA/カラム、120 分間泳動した。蛋白染色はアミド黒 10B を用い、ACP 活性染色は α -naphthyl phosphate-fast garnet GBC salt をそれぞれ 1mg/ml 含む 0.1M ammonium acetate buffer (pH 5.0) 中37℃で反応させ染色し、7%酢酸中で保存した。

5. 抗ヒト P-ACP 抗血清の作製、精製した P-ACP 抗原液と等量の Freund's complete adjuvant とを混和し、ウサギの背部に皮下注2回(1週間隔)。その後2週目より毎週静注(計5回)し、最終注射の10日後に頸動脈より全採血して血清を分離した。得られた抗血

清は56℃、30分で非働化した。Sephadex G-25にて粗 γ -globulin とした後、CNBr-activated Sepharose 4B に常法にて正常女性血清蛋白を結合させたもので affinity chromatography を行い、抗血清を作製した。

6. 免疫電気泳動、Agarose を1%の割合に veronal HCl buffer (pH 8.2) に溶解し、ゲル板を作製し、定電流 2mA/cm、90分泳動後、室温で抗ヒト P-ACP 免疫ウサギ血清と反応させた。

7. Ouchterlony 法、Agarose を1.0%の割合に PBS に溶解し、ゲル板を作製し、室温で抗ヒト P-ACP ウサギ血清と反応させた。

8. 蛍光抗体法(間接法)
ヒト組織を蛍光抗体法用組織切片とし、精製抗血清をのせ incubate、次いで洗浄後 FITC ラベル抗ウサギ γ -globulin ヤギ血清をのせ incubate 後蛍光顕微鏡にて観察した。

実験結果

I. 前立腺酸性フォスファターゼの精製

前立腺酸性フォスファターゼの精製度は、Table 1 に示すように回収率37.4%、約130倍に精製された標品を得た。精製過程は Fig. 1 に示すごとくであるが、最終的には 280nm における吸光度と酵素活性は symmetric であった。しかし disc PAGE では本来の ACP-2 活性部位とは別に蛋白のバンドがみられた (Fig. 2)。

II. 抗ヒト P-ACP 血清の臓器特異性

得られた抗ヒト P-ACP 血清は免疫電気泳動にて陽極側に ACP 活性のない蛋白沈降線が観察されたが、女性血清による affinity chromatography 後は ACP 活性をもつ蛋白沈降線のみとなつた (Fig. 3)。Ouchterlony 法で観察すると精製 P-ACP、前立腺癌、腺腫抽出液、前立腺癌患者血清と特異的に反応するほかに、前立腺癌患者の肝抽出液との間にも精製 P-ACP と完全に一致する沈降線を認めた (Fig. 4)。しかし女性の肝抽出液と

Table 1 Activity and protein accounted for at each step of the purification procedure

Purification Step	Protein, (mg)	Total activity *	Specific ** activity	Recovery, (%)
1. Seminal plasma	2,405	22,166	9.2	100.0
2. DEAE Sephadex	68.6	18,166	264.8	81.9
3. First Sephacryl S 200	29.4	9,666	328.7	43.6
4. Second Sephacryl S 200	7.0	8,300	1,177.3	37.4

* : micromoles of substrate hydralyzed per minute
** : activity per mg. of protein

Fig. 1 Chromatography on Sephacryl S-200 ($2.6 \times 100\text{cm} = 490\text{ml}$) of (A) seminal plasma, (B) 1st Sephacryl S-200, (C) 2nd Sephacryl S-200, and (D) purified prostatic acid phosphatase; eluant PBS (9ml/hr). The dashed curve represents the activity of acid phosphatase.

Fig. 2 Disc polyacrylamide gel electrophoresis of prostatic acid phosphatase. After electrophoresis, the gel was stained for protein (top) or acid phosphatase (bottom).

は反応しなかつた。免疫電気泳動法では前立腺組織抽出液、精製 P-ACP、前立腺癌患者血清が陽極側に泳動されるのに対し、肝抽出液では逆に陰極側に泳動され (Fig. 5)、抗原性に関与しない部分が異なっていることを示した。

Fig. 3 Immunelectrophoresis of prostatic acid phosphatase, before (A) and after (B, C) affinity chromatography. The plates were stained for protein (A, B) and acid phosphatase (C).

Fig. 4 Gel immunodiffusion analysis of prostatic acid phosphatase (acid phosphatase stain)

Ⅲ. 蛍光抗体法

前立腺癌組織のみが反応し、肝、脾、腎、膵では陰性であった。

考察および総括

精漿より分離精製した P-ACP をウサギに免疫して得た抗血清を女性血清にて吸収すると、免疫学的に精漿、前立腺抽出液、前立腺癌患者血清との間に酵素活性を有

Fig. 5 Immunelectrophoresis of prostatic acid phosphatase (upper half) and liver extract (lower half). After electrophoresis, antiserum was added to the trough and incubated for 24 hours at room temperature. The plate was stained for acid phosphatase

Fig. 6 Indirect immunofluorescence photomicrograph of section of prostatic carcinoma

する蛋白沈降線を認めるほか、前立腺癌患者の肝抽出液にも酵素活性を有する蛋白沈降線を認めたが、免疫電気泳動では前者が陽極側へ泳動されるのに対し、後者では陰極側へ泳動された。前立腺癌患者の脾、腎、脾抽出液、女性肝抽出液、正常男女血清との間に蛋白沈降線は認めなかった。女性の肝抽出液と交叉しない原因としては、PAP 抗原量が少ないか、皆無であることが考えられる。女性肝に PAP が存在しないとするなら、前立腺癌患者の血清 PAP が高い場合に、肝にシアル酸量の異なる PAP と同一抗原性をもつ ACP を含有していると思われる。しかし radioimmunoassay における肝、脾抽出液との抗原交叉性あるいは脾癌組織での PAP 産生⁶⁾が報告されており、肝組織に PAP があることも否定できない。これは ACP が細胞特異性を持ち、前立腺酸性フォスファターゼは他臓器由来の ACP とは免疫学的交叉反応は示さないという報告⁷⁾に反する。前報¹⁾に示し

たように前立腺抽出液にはおもに ACP-2 と ACP-4 があり、neuramidase を作用させるとすべて ACP-4 の位置に泳動されるため、シアル酸量の差⁸⁾により多様性を示すとされている。両者の抗原性は同一であり、肝抽出液の ACP-4 は neuramidase では不変であるので、免疫学的交叉反応を示してもよいと思われる。もし正常肝抽出液中に P-ACP を含有するのであれば、正常血清 ACP 活性に有意の性差がみられないことの説明になるかも知れない。

蛍光抗体法⁹⁾¹⁰⁾によると前立腺癌組織のみが反応し、前立腺癌患者の肝組織で蛍光を認めなかったのは、抗原量または ACP 局在に問題があると推測される。前立腺癌組織では基底膜付近に蛍光が認められるが、ホルモン療法の影響あるいは抗体の不純性が原因かも知れない。

精製した P-ACP で免疫されたこの抗血清は、前立腺癌患者の肝 ACP と交叉反応を示すとはいえ、前立腺癌患者で counter immunelectrophoresis, radioimmunoassay を行えば特異的な相関が期待される。

結 語

1. 精漿より約130倍に精製した前立腺酸性フォスファターゼをウサギに免疫して抗血清を得た。
2. 女性血清による affinity chromatography にて精製した抗血清は、Ouchterlony 法にて精漿、前立腺抽出液、前立腺癌患者血清のほか前立腺癌患者の肝抽出液との間に完全に一致する沈降線を認めた。免疫電気泳動上、肝は陰極側へ、他は陽極側へ単一の沈降線を認めた。
3. 蛍光抗体法(間接法)では、前立腺癌組織のみが反応し、肝、脾、腎、膵では陰性であった。

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。

文 献

- 1) 森下直由：前立腺癌における酸性フォスファターゼの研究 第1報。各種組織抽出液の酸性フォスファターゼ・アイソザイムについて、日泌尿会誌、掲載予定。
- 2) Seligman, A.M., Sternbergen, N.J., Paul, B.D., Freedman, A.E., Shannon, W.A., Wasserkrug, H.L., Plapinger, R.E. and Lynn, D.: Design of spindle poisons activated specifically by prostatic acid phosphatase (PAP) and new methods for PAP cytochemistry. Cancer Chemother. Rep., **59**, 233—242, 1975.

- 3) Bessey, O.A., Lowry, O.H. and Brock, M.J.: A method for rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. *J. Biol. Chem.*, **164**, 321—329, 1946.
- 4) Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265—275, 1951.
- 5) Reisfeld, R.A., Lewis, U.J. and Williams, D.E.: Disc electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gel. *Nature*, **195**, 281—283, 1962.
- 6) Choe, B., Pontes, E.J., Rose, N.R. and Henderson, M.D.: Expression of human prostatic acid phosphatase in a pancreatic islet cell carcinoma. *Invest. Urol.*, **15**, 312—318, 1978.
- 7) Vihko, P., Sajanti, E., Janne, O., Peltonen, L. and Vihko, R.: Serum prostate-specific acid phosphatase: Development and validation of a specific radioimmunoassay. *Clin. Chem.*, **24**, 1915—1919, 1978.
- 8) Dziembor, E., Gryszkiewicz, J. and Ostrowski, W.: Properties of neuraminidase-treated acid phosphatase of prostate. *Acta Biochim. Pol.*, **18**, 249—260, 1971.
- 9) Cocper, J.F., Foti, A. and Imfeld, H.: Production of specific antibody to purified prostatic acid phosphatase. *Urol. Res.*, **4**, 111—117, 1976.
- 10) Pontes, J.E., Choe, B., Rose, N. and Pierce, J.J.M.: Indirect immunofluorescence for identification of prostatic epithelial cells. *J. Urol.*, **117**, 459—463, 1977.

(1979年11月8日受付)