前立腺癌の腫瘍マーカー（前立腺酸性フォスファターゼ 前立腺特異抗原, クレアチンキナーゼ BB）の 精製と酵素免疫測定法

森 下 直 由
南 祐 三
長崎大学医学部泌尿器科学教室
(主任: 斉藤 泰教授)
小 川 繁 晴
斉 藤 泰

PURIFICATION AND ENZYME IMMUNOASSAY OF TUMOR MARKERS FOR PROSTATE CANCER: PROSTATIC ACID PHOSPHATASE, PROSTATE- SPECIFIC ANTIGEN AND CREATINE KINASE BB

Naoyoshi Morishita, Yuzo Minami, Shigeharu Ogawa and Yutaka Saito

Department of Urology, Nagasaki University School of Medicine

(Director: Prof. Y. Saito)

Prostatic acid phosphatase (PAP), prostate-specific antigen (PA) and creatine kinase BB (CK-BB) were purified from human prostate, and single components with molecular weights of about 50K, 35K and 40K daltons were shown on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Prostate homogenate gave a single precipitin arc with each antisera on immunoelectrophoresis. By indirect immunofluorescent technique all of these antigens were present in the cytoplasm of prostatic epithelial cells. Fibronectin (FN) was isolated from normal plasma and its antisera were obtained. Enzyme immunoassays for PAP, PA, CK-BB and FN were established.

Prostate homogenate contained 83.7% of CK-BB in activity, and the antibody against the purified CK-BB cross-reacted to CK-MB from prostate homogenate. High levels of CK-BB were detected in sera from patients with hormone-controlled prostate cancer and benign prostatic hyperplasia after transurethral resection, despite normal PAP and PA concentrations. No correlation was seen among the three in serum levels of patients with prostate cancer.

Hormone-chemotherapy (vincristine, Ifosfamide and peplomycin) brought about normalization of CK-BB levels in sera from patients with stage D prostate cancer, and CK-BB, therefore, seemed to be a useful follow-up marker.

Prostate-specific antigen had two peaks (100K and 35K) in gel chromatography of prostate homogenate.

Radioimmunoassay (RIA), solid-phase immunoabsorbent assay (SPIA) or EIA for PAP showed a different profile from one another in ion-exchange and and gel chromatography of some patient's serum with advanced prostate cancer. RIA also detected immuno-reactive substances which were not measured by SPIA and EIA, and the stabilization effect of PAP activity by antisera was suggested to increase the sensitivity in SPIA.

要旨: ヒト前立腺組織より前立腺酸性フォスファターゼ (PAP), 前立腺特異抗原 (PA), クレアチンキナーゼ BB (CK-BB) を一括して精製した。SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で分子量は50K, 35K, 40K でそれらの抗体は免疫電気泳動上それぞれ単一の沈降線を認め、蛍光抗体間接法ではすべて前立腺上皮細胞質に局在した。フィブロネクチン (FN) を正常血漿より精製し抗体を作製, PAP, PA, CK-BB, FN の酵素免疫測定法 (EIA) を確立した。CK-BB の EIA は前立腺の CK-MB と交叉反応を示した。

前立腺癌ホルモン治療群や経尿道的前立腺切除後の血清で PAP, PA は正常にもかかわらず CK-BB は高値を示すことが多かった。前立腺癌患者血清中の PAP, PA, CK-BB は無相関であった。ホルモン化学療法有効例で CK-BB はほぼ正常化し、follow-up marker として有用と考えられた。転移性前立腺癌血清のカラムクロマトグラフィーでは PAP の RIA, solid phase immunoabsorbent assay (SPIA), EIA は異なる profile を示し RIA では他が検出しない物質を測定しており SPIA の高感度は抗体による活性の安定化が関与していることが示唆された。

緒 言

前立腺癌の腫瘍マーカーとしては、prostatic acid phosphatase をはじめとする血清の酵素や癌胎児性蛋白あるいは尿、前立腺液中のマーカーが挙げられる。現在のところ単一のマーカーで sensitivity と specificity の両方を満足させるものは少なく、多因子測定の意義も明らかでない。そこで前立腺癌患者血清中の prostatic acid phosphatase (PAP), prostate specific antigen (PA), creatine kinase BB isoenzyme (CK-BB) と尿中 fibronectin (FN) の enzyme immunoassay (EIA) による定量をおこない、前立腺癌の診断と治療上の意義について検討したので報告する。

実験材料および方法

I. 実験材料

1. 前方腺腫組織は前立腺肥大症患者より subcapsular prostatectomy あるいは transurethral resection により得た。

2. 検体、前立腺癌36例、前立腺肥大症 (BPH) 13例の治療前後の300血清と一部早期尿 (EMU) を用いた。

II. 実験方法

1. PAP, PA, CK-BB の分離・精製、PA は Wang ら¹⁾の方法、PAP は Lee ら²⁾の方法に準じて、CK-BB は Easterday & Easterday³⁾の方法を参考にして分離・精製した。すなわち、

① ヒト前立腺組織を薄い切片とし、冷生食水で洗浄後、組織重量の3倍量の0.02M EDTA, 0.1M phosphate buffer (pH 6.8) を加え homogenizer で homogenate とし、4℃で一夜抽出した。さらに26,000 g, 30分間遠沈し、得られた上清を crude extract とした。

② crude extract を35~75%硫酸分画し、0.01M Tris-HCl buffer (pH 8.0) にて透析した。同 buffer で平衡化した DEAE-Sephacel column (1.5×40cm) に通し、NaCl gradient (0~0.4M, 1M) にて溶出した。

③ PA の分離・精製、70~100mM NaCl 溶出部を Sephacryl S-200 (2.6×96cm) で分離後濃縮し、0.04

M Tris-phosphate buffer (pH 8.4) にて透析、同 buffer で平衡化した DEAE-Sephacel column (1.5×40cm) に添加し、starting buffer で洗浄後、0.5M Tris-phosphate buffer (pH 3.4) にて pH gradient をつくり溶出した。pH 7.5~6.3 の分画を濃縮し、Sephadex G-100 に添加し、その peak を 1mg/ml まで濃縮し、phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2) で透析した。

④ PAP の分離・精製、100~130mM NaCl 溶出分画を0.5M NaCl 含有0.02M Tris-HCl buffer (pH 7.4) で透析し、同 buffer で平衡化した Con A-Sepharose column (1.0×10cm) に添加し、starting buffer で溶出後、0~0.2M α -methyl mannopyranoside にて溶出した。Bessey-Lowry 法による acid phosphatase (ACP) 活性分画を濃縮後 Sephacryl S-200 (2.6×98 cm) を通し、活性分画を 1mg/ml となるように濃縮、PBS で透析した。

⑤ CK-BB の分離・精製、150~230mM NaCl 溶出分画を0.01M phosphate buffer (2×10^{-6} M 2-mercaptoethanol, 4×10^{-4} M EDTA, 5×10^{-3} M $MgCl_2$ 含有, pH 5.9) で透析、同 buffer で平衡化した Blue Sepharose CL-6B (1.0×20cm) に添加し、十分に starting buffer で溶出後0.01M phosphate buffer (同含有, pH 8.0) で溶出、 2×10^{-6} M 2-mercaptoethanol 含有 PBS にて透析した。同 buffer で平衡化した Sephacryl S-200 (1.6×96cm) を用いて、CK 活性 (CPK-Test Wako 使用) を有する分画を集め、1mg/ml となるように濃縮し、PBS にて透析した。

2. FN の分離・精製、Wood ら⁴⁾の方法 (Engwall & Ruoslahti の変法) によりおこなった。

3. PAP, PA, CK-BB, FN の抗血清の作製、抗原200 μ g を生食水2ml に溶解し、2ml の complete Freund's adjuvant で emulsion とし、雌家兎背部に皮下注射した。その後2週間後に同量を筋注射し、その7~10日毎に同量を筋注射し、適宜試験採血をおこない、Protein A-Sepharose CL-4B で IgG とした。

4. SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-

PAGE), 7.5%ゲルを用い, 蛋白染色はクマシーブリリアント青を用い, low molecular weight (LMW) standard は Pharmacia 社製を用いた。

5. 蛍光抗体間接法, transurethral resection で得られた BPH 組織を蛍光抗体法用切片として各種抗体 IgG および control test として正常ウサギ IgG, 特異抗原で吸収した各抗体 IgG, PBS をのせ incubate, 次いで洗浄後 FITC ラベル抗ウサギ γ -gl ヤギ血清をのせ incubate 後蛍光顕微鏡にて観察した。

6. IgG の酵素標識, horseradish peroxidase (HRPO) と IgG との conjugation は Wilson & Nakane⁵⁾ の過ヨウ素酸改良法によった。さらに Sephacryl S-200 (1.5×70cm) により conjugate を精製した。

7. PAP, PA, CK-BB の EIA, coating buffer (Na_2CO_3 1.59g, NaHCO_3 2.93g, NaN_3 0.2g を水 1l に溶解, pH 9.6) に $10\mu\text{g}/\text{ml}$ の割合に IgG を混ぜ, microplate (Nunc-Immunoplate I) に $100\mu\text{l}$ ずつ入れ, 一夜 4°C にて静置した。次いで 0.05% Tween 20 を含む PBS (PBS-Tween) にて 3 回洗浄した。A 液 (0.1M NaCl, 1mM MgCl_2 , 0.1% BSA, 0.1% NaN_3 を含む 0.01M phosphate buffer, pH 7.0) $100\mu\text{l}$ と sample $5\mu\text{l}$ を各ウェルに入れ振盪, 37°C に 1 時間静置した。PBS-Tween にて 3 回洗浄し, 100~5,000 倍に PBS で希釈した conjugate を $100\mu\text{l}$ ずつ入れ振盪, 37°C 1 時間 incubate した。3 回洗浄後, 基質液 $100\mu\text{l}$ (o-phenylene diamine 34mg, 30% H_2O_2 $40\mu\text{l}$, 0.1M citrate-0.2M phosphate buffer 100ml, pH 5.0) を入れ, 室温, 暗所で 30 分間反応させ, 4N H_2SO_4 $50\mu\text{l}$ で反応を停止した。microplate 用の二波長分光光度計を用い 500nm で測定した。測定はすべて duplicate でおこなった。標準曲線は A 液で溶かした精製抗原希釈液と抗体不溶カラムを通過させた正常女性血清 $5\mu\text{l}$ を sample-buffer として測定, microcomputer を用いて log 変換—2 次式により標準曲線を描き, 濃度を算出した。

8. FN の EIA, 前記 EIA とほぼ同様であるが sample と incubate する buffer を, 2% BSA, 0.05% Tween 20, 0.02% NaN_3 含有 PBS に変更し, 容量比を sample 1: buffer 1 とした。

9. FN の enzyme affinity assay⁶⁾, IgG の代りに $1\mu\text{g}/\text{ml}$ gelatin (0.1M NaHCO_3) を室温で固相し, sample-buffer (1:1) を入れ室温で 20 時間 incubate し, 洗浄後 HRPO 標識抗体を入れ, 以下 EIA も同様におこなった。

10. PAP の solid phase immunoadsorbent assay (SPIA)⁷⁾

① 抗体の固相, よく洗浄したポリスチレンビーズ (直径 4~5mm) を 0.25M phosphate buffer (pH 7.5) にて洗浄, 同 buffer に 5mg/ml の濃度で抗 PAP IgG を溶かし, ポリスチレンビーズを浸し, 4°C で 24 時間静置する。反応液を除き 0.25M phosphate buffer でよく洗浄し, A 液中に保存する (物理的吸着)。

② NaN_3 を PBS-Tween による洗浄で除いたビーズ 1 個と検体 $10\mu\text{l}$ と PBS-Tween $200\mu\text{l}$ をガラス試験管に入れ, 37°C で 1 時間 incubate し, PBS-Tween で 3 回洗浄する。

③ 基質液 $500\mu\text{l}$ (3mM α -naphthyl phosphate, 0.2 M citrate buffer, pH 5.6) を入れ 37°C で 30 分反応。

④ 0.02M Fast red B salt (0.01M HCl) $500\mu\text{l}$ を入れ混和, 直ちに 0.5M NaOH $500\mu\text{l}$ を入れ反応を停止させる。

⑤ 吸光度 (OD 588nm) を測定する。標準曲線は精製 PAP と抗体不溶カラム通過正常女性血清 5% 含有 PBS-Tween を用いて描いた。

11. PAP の solid phase immunofluorescence assay (SPIF)⁸⁾, SPIA と③まで同様におこない, 0.1 M NaOH 2.5ml で反応を停止させ, 蛍光強度を測定した (励起波長 340nm, 蛍光波長 465nm)。

12. RIA, Mallinckrodt 社の RIA kit を用いた⁹⁾。

結果

1. 精製した PAP, PA, CK-BB, FN はすべて disc PAGE 上 single band であり, SDS-PAGE ではおよそ PAP 50K, PA 35K, CK-BB 40K であり, PAP と PA は broad band であった (Fig. 1)。

2. 免疫電気泳動法ではそれぞれ前立腺ホモジネートと単一の沈降線を形成した。蛍光抗体間接法では PAP, PA, CK-BB はすべて前立腺上皮細胞の cytoplasm に反応を認めた (Fig. 2)。

3. CK-BB の精製過程で硫酸分画後の ion-exchange column chromatography (NaCl gradient) を Fig. 3 に示す。CK の活性は 3 つの peak に分かれ, その活性化は MM 3.1%, MB 13.0%, BB 83.7% と CK-BB が最も高い。CK-BB を分取し, Blue Sepharose CL-6B 吸着分画を Sephacryl S-200 に添加し溶出した profile が Fig. 4 である。80K に CK 活性を有し, 精製度は 50 倍であるが回収率は約 5% であった (Table 1)。

4. CK-BB の EIA の標準曲線を Fig. 5 に示す。濃度

Fig. 1 SDS polyacrylamide gel electrophoresis (7.5%) of prostatic acid phosphatase (50K), creatine kinase BB (40K), prostatic antigen (35 K) and low molecular weight standard.

Fig. 2 Indirect immunofluorescence; PAP (top), PA (center) and CK-BB (bottom).

を log 変換し、二次回帰をおこなった。Fig. 3に示すように CK-MBとも cross-reactiveであるが、MBとBBの間にも immunoreactive substanceが存在する。

5. FN の EIA と enzyme affinity assay の標準曲線を Fig. 6 に示す。ほぼ同じ測定感度であった。

6. PA の ion-exchange chromatography 後の Sephacryl S-200 の溶出では PA-EIA では 100K と 35K に peak を認めた (Fig. 7)。

7. PAP, PA, CK-BB の EIA での測定感度は 1ng/ml, SPIA では 0.5IU/ml, 正常上限 (UNL) は PAP enzyme assay (L-tartrate labile ACP) 0.25 Sigma unit/ml, PAP-RIA 2ng/ml, PAP-EIA 3ng/ml, PA-EIA 25ng/ml, CK-BB-EIA 6ng/ml, EMU FN/creatinine ratio 1mg/g であった。

8. 精製 PAP による enzyme assay, SPIA, SPIF を比較すると SPIF が最も高感度であるが低濃度における再現性がよくなかった。次に α -naphthyl phosphate を用いた SPIA が優れていた (Fig. 8)。

9. 前立腺癌患者血清中の各マーカーの陽性率は Table 2 に示すように前報とやや異なるが、再測定に

より得られたものである。PAP, PA, CK-BB は互いに無相関であることは前報で述べた (Fig. 9)。PA は PAP と同様、よく control されている癌では低値を示すのに対し、CK-BB は高値を示すことが多く BPH の TUR-P 後で高くなる点が異なる (Fig. 10, 11)。hormone-chemotherapy (VIP) を施行した stage D 前立腺癌患者の CK-BB (EIA) 値の推移では、効果があったものでは正常範囲となるが、無効であったものは高値をとることが多かった (Fig. 12)。

Fig. 3 DEAE Sephacel chromatography of ammonium sulfate precipitate (35~75%) from prostate homogenate.

Fig. 4 Sephacryl S-200 chromatography of CK-BB partially purified by ion-exchange and affinity chromatography (1.6×96cm, fraction size 2ml).

10. PAP, PA, CK-BB のいずれも高値を示した進行性前立腺癌患者血清を用い, ion-exchange または gel chromatography をおこなった (Fig. 13). ion-exchange chromatography では, SPIA, EIA, RIA はすべて異なるパターンを示した. とくに溶出液の pH 6.0~5.0において酵素法により SPIA の方が高く測定

Fig. 5 Standard curve of CK-BB-EIA (closed squares). Open squares, absorbance at 500nm.

Fig. 6 Standard curve of EIA and enzyme affinity assay for fibronectin.

される分画があり, EIA の peak と SPIA の peak の両方を RIA は測定している. RIA では他では測定していない immunoreactive substance の存在を pH 4.5付近で認め, それ以下の pH での高値には pH が関与していると思われた. Sephacryl S-200でも RIA で

Table 1 Purification of CK-BB from human prostate.

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (IU/ml)	Specific activity (IU/mg)	Yield (%)
Homogenate	864	105	0.12 (×1)	100
Ammonium Sulfate (35~75%)	212	(18.8)	(0.08)	
DEAE Sephacel	44.1	45.5	1.03 (×8.5)	43.3
Blue Sepharose	1.95	7.14	3.66 (×30)	6.8
Sephacryl S-200	0.88	5.20	5.91 (×50)	4.9

Fig. 7 Sephacryl S-200 chromatography of prostate-specific antigen purified by ion-exchange chromatography (Fr. 21-25). Closed squares, PA-EIA.

Fig. 8 Standard curve of SPIF, SPIA and enzymatic assay for PAP.

は200K 以上または50K 以下で immunoreactive substance を認め, SPIA では活性ピーク前後で高く stabilization の関与が示唆された.

考 察

腫瘍マーカーは本来 tumor-specific antigen (TSA)

Fig. 9 Correlation between CK-BB-EIA and PAP-RIA of sera from patients with prostate cancer.

Fig. 10 Serum PA-EIA levels and stage of prostate cancer.

を意味しているが, 腫瘍細胞あるいはその誘導により, 量的, 質的差異として検出されるものを広義の腫瘍

Table 2 Percentage of patients with "Elevated" PAP, PA and CK-BB.

Group	No. of Pts.	PAP				PA	CK-BB
		Enzyme assay	RIA	EIA	SPIA		
BPH	13	23	15	15	0	7	7
Prostate cancer							
Stage B	4	50	50	50	25	25	50
Stage D	8	87	100	62	62	50	62
Stage D controlled	18	22	33	50	72	22	44
Stage D relapsed	6	66	100	66	100	66	50

Fig. 11 Serum CK-BB-EIA levels and stage of prostate cancer.

マーカーとして利用している¹⁰⁾。前立腺癌の腫瘍マーカーのうち PAP と oncodevelopmental proteins は測定法の進歩とともに診断率の向上が見られている。

しかし sensitivity と specificity の両方を満足させるものは少なく、low stage での sensitivity では問題がある。PAP や PA では RIA あるいは EIA で測定感度があがると同時に、特に BPH 患者で 10~30% の false positive が見られる。抗原の精製が癌組織からでなく腺腫または精漿からおこなわれており、いわゆる tissue specific antigen であることや PAP では Choe ら¹¹⁾が指摘しているように抗体の特異性が問題である。今後腫瘍マーカーに対する monoclonal antibody の作製により、specificity の高い測定法が開発されるであろう。PAP, PA, CK-BB は蛍光抗体法で示されたように cytoplasm 由来であり、前立腺癌組織、特に血中に逸脱しやすい転移巣からの量的産生の亢進がおけると推測される。

PAP の測定で現在問題となっているのは EORTC group が指摘しているように、RIA 法でもさほどの specificity の向上はみられなかったことである¹²⁾。また conventional な方法でつくられた抗体は前立腺以外の臓器と cross-reactive であることが多く¹²⁾、monoclonal antibody であっても抗原基により cross-reactive でありうる¹¹⁾ので注意を要する。また同じ抗体を用いても immunoassay の方法の差により出てくる結果はまったく異なってくる。測定感度からいえば

Fig. 12 Variations of CK-BB levels in patients with prostate cancer treated by hormone-chemotherapy (VIP). Open circles, well-controlled; closed circles, ill-controlled.

Fig. 13 DEAE Sephacel chromatography (left) and Sephacryl S-200 chromatography (right) of a patient's serum with advanced prostate cancer.

SPIF が60pg/ml (正常5.62ng/ml)²⁾と最も鋭敏であるが、低濃度領域で非特異的蛍光がみられることがある¹³⁾。本報告のEIAはRIAやSPIAに比し非特異的反応がみられ specificity が低かった。RIAはSPIAやEIA, enzyme assay で検出されない immunoreactive substance を測定するためか、RIA法でのみ依然高値を示すものがあることは follow-up marker としては有用であると考えられる。

PAはWangら¹⁾がpI 6.9, 分子量34,000dalton (monomer) の糖蛋白として報告した前立腺腺管上皮由来の organ specific antigen で PAP とは異なるが生物学的役割は不明である。定量法としては rocket-immunoelectrophoresis¹⁴⁾, EIA¹⁵⁾, RIA¹⁶⁾が報告されている。BPH で36~41%¹⁴⁾¹⁶⁾の false positive を認め tumor marker として問題がないとはいえない。血清中ではほとんどが carrier protein (albumin?) と結合し約100K の形で存在する。前立腺ホモジネート中ではその両者が認められた。

CK-BB については、脳から精製された CK-BB を用いた RIA は報告されており、specificity に問題があること¹⁷⁾, PAP と無相関で早期診断には使えない¹⁸⁾とされている。Silverman ら¹⁹⁾は前立腺液から精製すれば、より specific な CK-BB が測定される可能性を示唆した。前立腺組織は脳の1/10のCKを含み、その60~94%がCK-BBである²⁰⁾。前立腺組織からCK-BBを精製したという報告は見られない。cytoplasm に局在し、40K の subunit から成る dimer であり、PAP, PA とは異なる動きをするマーカーで、ホルモン投与群や TUR-P 後の血清で高値を示すことが判った。後者は

放出したCK-BBがCK-MMとhybridを形成したり²¹⁾, clearance に差があるのかも知れない。前者は Silverman ら¹⁹⁾も指摘するようにホルモン抵抗性の指標とも考えられる。ホルモン投与群とホルモン化学併用療法群の血清CK-BB値を比較すると併用群で正常化している例が多いことは興味深い。

FNの測定法としては Engwall & Ruoslahti⁹⁾が enzyme affinity assay を報告したが sandwich-type の EIA も臨床応用可能であった。しかし前報²²⁾にも示したごとく尿路感染の際は false positive となりやすく前立腺癌のマーカーとしては不適である。

多因子同時測定については睾丸腫瘍、消化器癌、肝癌などでおこなわれているが、その結果の解析については慎重でなければならない。腫瘍細胞の種類や上昇する機序をよく知る必要がある。PAP, PA, CK-BB は前立腺腺管上皮細胞に由来しており、その局在の差は認められなかったが、EIAによる癌血清の測定値では互いに異なる動きをするマーカーであることが確かめられた。診断上 PAP-RIA に優るものではなく多因子測定の有用性はないが、follow-up や予後推定に役立つことは PAP-RIA²³⁾, PA²⁴⁾²⁵⁾で報告されており、CK-BB もまた何らかの意味をもっているものと考えられ、今後さらに検討を必要とする。

結 語

(1) 前立腺組織より一括して PAP, PA, CK-BB を精製し抗体を作製した。前立腺ホモジネートと単一の沈降線を形成し、すべて前立腺上皮細胞の cytoplasm に蛍光を認めた。PAP, PA, CK-BB の sandwich-type EIA を確立した。

(2) CK-BB は前立腺ホモジネート中83.7%と最も多く、CK-BB-EIA ではCK-MBと cross-reactive であった。癌血清中CK-BB, PA, PAP は互いに無相関であり、CK-BB はとくにホルモンで control されている癌患者やTUR-P 後の患者血清で高値を示すことがある。しかしホルモン化学療法有効群では正常値を示し follow-up marker として有用と考えられた。

(3) 進行性前立腺癌患者血清のイオン交換カラムクロマトグラフィーではRIA, SPIA, EIA はすべて異なるパターンを示し、SPIA とEIA の peak の両方をRIA は測定し、他の immunoreactive substance の存在を認めた。SPIA では抗体による stabilization がSPIA の感度を上げていることが示唆された。

本論文の要旨は1983年4月5日、第71回日本泌尿器科学会総会（於大阪）において発表した。

文 献

- 1) Wang, M.C., Valenzuela, L.A., Murphy, G.P. and Chu, T.M.: Purification of a human prostate specific antigen. *Invest. Urol.*, 17, 159—163, 1979.
- 2) Lee, C.L., Wang, M.C., Killian, C.S., Slack, N. H., Murphy, G.P. and Chu, T.M.: Solid-phase immunofluorescent and immunoadsorbent assays of serum prostatic acid phosphatase. *Prostate*, 1, 427—439, 1980.
- 3) Easterday, R.L. and Easterday, I.M.: Affinity chromatography of kinase and dehydrogenases on Sephadex and Sepharose dye derivatives. *Immobilized biochemicals and affinity chromatography*. Dunlap, R.B., ed., p. 123—p. 134, Plenum Press, New York, 1974.
- 4) Wood, G., Rucker, M., Davis, J.W., Entwistle, R. and Anderson, B.: Interaction of plasma fibronectin with selected cryoglobins. *Clin. Exp. Immunol.*, 40, 358—364, 1980.
- 5) Wilson, B.M. and Nakane, P.K.: Recent developments in the periodate method of conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies. *Immunofluorescence and related staining techniques*. Knapp, W., Holubar, K. and Wick, G., eds., p. 215, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, New York, 1978.
- 6) Engwall, E. and Ruoslahti, E.: Principles of ELISA and recent applications to the study of molecular interactions. *Immunoassays in the clinical laboratory*. Nakamura, R.M., Dito, W. R. and Tucker, E.S. III, eds., p. 89—p. 97, Alan R. Liss, Inc., New York, 1979.
- 7) Lee, C.L., Killian, C.S., Murphy, G.P. and Chu, T.M.: A solid-phase immunoadsorbent assay for serum prostatic acid phosphatase. *Clin. Chim. Acta*, 101, 209—216, 1980.
- 8) Wajzman, Z., Lee, C.L., Chu, T.M. and Murphy, G.P.: A new fluorescent immunoassay for human prostatic acid phosphatase in prostate cancer (SPIF). *Surg. Forum*, 30, 568—569, 1979.
- 9) 森下直由, 小川繁晴, 齊藤 泰, 近藤 厚: DRL-9I7 キットによる前立腺酸性フォスファターゼ測定法の検討。泌尿紀要, 26, 899—904, 1980.
- 10) 谷内 昭: 腫瘍マーカーについて。臨床病理, 30, 488—491, 1982.
- 11) Choe, B.K., Lillehoj, H.S., Dong, M.K., Gleason, S., Barron, M. and Rose, N.R.: Characterization of antigenic sites of human prostatic acid phosphatase. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 390, 16—26, 1982.
- 12) Prellwitz, W. and Ehrenthal, W.: Serum and bone marrow acid phosphatase as a diagnostic marker in prostatic carcinoma patients. *Prostate cancer*. Jacobi, G.H. and Hohenfellner, R. H., eds., p. 129—p. 164, Williams and Wilkins, Baltimore, 1982.
- 13) Bowers, G.N. Jr.: Acid phosphatase measurement in the clinical laboratory. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 390, 89—99, 1982.
- 14) Papsidero, L.D., Wang, M.C., Valenzuela, L.A., Murphy, G.P. and Chu, T.M.: A prostate antigen in sera of prostatic cancer patients. *Cancer Res.*, 40, 2428—2432, 1980.
- 15) Kuriyama, M., Wang, M.C., Papsidero, L.D., Killian, C.S., Shimano, T., Valenzuela, L.A., Nishiura, T., Murphy, G.P. and Chu, T.M.: Quantitation of prostate-specific antigen in serum by a sensitive enzyme immunoassay. *Cancer Res.*, 40, 4658—4662, 1980.
- 16) 三木 誠, 柳沢宗利, 吉田正林, 近藤直弥, 町田豊平, 千葉隆一, 石井延久, 森川惇二, 小川祐司: ヒト前立腺特異抗原 (PA) による前立腺癌の診断。第70回日本泌尿器科学会総会予稿集, p. 371, 弘前, 1982.
- 17) Homburger, H.A.: Radioimmunoassay of creatine kinase B-isoenzymes in serum of patients with azotemia, obstructive uropathy, or carcinoma of the prostate or bladder. *Clin. Chem.*, 26, 1821—1824, 1980.
- 18) Huber, P.R., Zaugg, Th., Linder, E., Hagmaier, V. and Rutishauser, G.: Creatine kinase isoenzyme (CK-BB) in combination to prostatic acid phosphatase measured by RIA in the diagnosis of prostate cancer. *Urol. Res.*, 10, 75—80, 1982.
- 19) Silverman, L.M., Chapman, J.F., Jones, M.E.,

- Dermer, G.B., Pullano, T. and Tokes, Z.A.: Creatine kinase BB and other markers of prostate cancer. *Prostate*, 2, 109—119, 1981.
- 20) Neumeier, D.: Tissue specific distribution of creatine kinase isoenzymes. *Creatine kinase isoenzyme*. Lang, H., ed., p. 85—p. 109, Springer-Verlag, New York, 1981.
- 21) Lang, H., editor: *The creatine kinase BB isoenzyme*. *Creatine kinase isoenzyme*. p. 242—269, Springer-Verlag, New York, 1981.
- 22) 森下直由, 南 祐三, 小川繁晴, 齊藤 泰: 腫瘍マーカーに対する研究の現況と展望—前立腺癌—. *西日泌尿*, 45, 255—260, 1983.
- 23) Killian, C.S., Vargas, F.P., Slack, N.H., Murphy, G.P. and Chu, T.M.: Prostate-specific acid phosphatase in monitoring patients with prostate cancer. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 390, 122—132, 1982.
- 24) Kuriyama, M., Wang, M.C., Lee, C.L., Papsidero, L.D., Killian, C.S., Inaji, H., Slack, N.H., Nishiura, T., Murphy, G.P. and Chu, T.M.: Use of human prostate-specific antigen in monitoring prostate cancer. *Cancer Res.*, 41, 3874—3876, 1981.
- 25) Pontes, J.D., Chu, T.M., Slack, N., Karr, J. and Murphy, G.P.: Serum prostatic antigen measurement in localized prostatic cancer: Correlation with clinical course. *J. Urol.*, 128, 1216—1218, 1982.

(1983年7月21日受付)