

前立腺研究財団 平成 14 年度研究助成

血清中総 PSA の基準測定体系の確立 血清ベース標準物質の作成

Establishment of Reference Measurement System for Total PSA in Serum-Preparation  
of Serum-based Reference Material

山本 巧（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）

加野象次郎（東京逡信病院臨床検査科）

石橋みどり（慶應大学病院中央臨床検査部）

谷 渉（福祉医療技術振興会 SR センター）

## 研究目的

前立腺特異抗原 ( prostate-specific antigen; PSA ) は、もっとも優れた前立腺腫瘍マーカーとして臨床や検診の場で広く使用されている。その血清中総 PSA の測定については、等モル反応への方向づけと WHO 一次標準物質の普及により、今日、キット間差は解消の兆しが見られるようになってきたが、依然として縮まらない有意の差異が認められる。その差異はキットの検量の違いによるものであって、実試料マトリックスである血清ベースの二次標準物質が存在しないなか、緩衝液ベースの一次標準物質をキットの検量用標準物質の値付けに直接使用せざるを得ない現状の問題に起因しているものと思われる。そこで、本研究においては、血清中総 PSA 測定のさらなる標準化に向けて、血清ベースの二次標準物質の作成を試み、それを基軸とした標準測定体系を確立することを目的とする。

## 計画の概要

血清標準物質の作成には、血清とほぼ同等の性状を有し、内因性の PSA が存在しない上に、添加した精製遊離型 PSA の免疫活性がそのまま保持されるようなマトリックス ( ベース血清 ) が必要である。その原材料としては、通常 PSA がほとんど認められない女性血清を使用するが、マトリックスの性状を大きく損なわずに、血清中のプロテアーゼインヒビターの PSA に対する結合能をいかに失活させるか、すなわち、血清の不活化をいかに行うかが問題となる。その候補として、血清の非働化 ( 補体の不活化 ) に用いられる血清の熱処理や酸・塩基処理があるが、米国 Hybritech 社が Tandem-R キットのキャリブレーター作成に使用している酸・塩基処理法が現実的であると思われるので、それに準拠しながら、標準化に相応しいベース血清の作成法を検討する。

## 研究の概要

### 1. これまでの研究経過

内因性 PSA が存在しない女性プール血清について、10M 水酸化ナトリウム滴下で pH12.0 にして 3 時間、次に 10M 塩酸の滴下で pH6.0 にして 3 時間、それぞれ 30 分にインキュベーションする酸・塩基処理の予備的検討を行った。この処理による希釈率は 2% 程度であり、総タンパクやアルブミンの濃度に変化はなく、また、免疫学的に測定される 1-アンチキモトリプシンや 2-マクログロブリンの濃度にも変化は認められなかった。この不活化女性血清をベース血清として、これに精製遊離型 PSA を添加したところ、PSA のすべての免疫活性が回収された。一方、新鮮女性血清に添加した精製遊離型 PSA の回収率は 40% 程度にとどまっていた。PSA を添加したベース血清をゲル濾過にて分析すると、すべて遊離型の位置に溶出された。

以上より、女性プール血清の酸・塩基処理により得られるベース血清は、血清ベース二次標準物質作製のマトリックスとして優れた性質を有することが示された。すなわち、第一に、血清タンパクは変性しているがその濃度にはほとんど変化が見られず、血清と同様

のマトリックス性状を有すること、第二に、免疫学的に検出される内因性 PSA を認めないこと、そして第三に、プロテアーゼインヒビターが不活化されているため、添加した精製遊離型 PSA に作用することなく、PSA の免疫学的活性をそのまま保持することである。

その結果、このベース血清に一次標準物質の精製遊離型 PSA を添加し、各種濃度の血清ベース二次標準物質を定量的に作製し、それにより、キット・キャリブレーターの値付けを行うとともに、キット・キャリブレーターの校正を適正に行うことの可能性が明らかになった。そこで、それらを基軸とした PSA の測定体系を提案し、報告した<sup>1)</sup>。

## 2. 本研究の成果

以上の予備的検討により、ベース血清の作製法として、材料に女性プール血清を用いアルカリ処理にて不活化することに絞られてきたのであるが、用いる女性プール血清のロットによっては、pH12.0、30、3 時間のアルカリ処理で血清の粘性が著しく増大し、ついにはゲル化するなど、pH12.0 の条件下では問題のあることが判明した。そこで、血清不活化の最適条件の検討を中心に研究を進め、水酸化ナトリウムと塩酸による酸・塩基処理について、pH、インキュベーション時間、温度の 3 条件をいくつかの組み合わせで変化させ、ベース血清として望ましい最適なマトリックスが得られる条件を検討した。

その結果、女性プール血清に 10MNaOH を滴下し pH11.0 にて 30 4 時間インキュベーションし、その後、10MHCl にて中性とする（酸性側に振る必要のない）条件が、不活化の最適条件であることが明らかとなった。すなわち、この条件で得られた不活化血清は、添加した精製 PSA の免疫活性をそのまま保持し、不活化前後での電気泳動と液体クロマトグラフィー（HPLC）でみた血清タンパク分画の変化や粘度の変化も無視できるものであり、不活化血清がマトリックスとして未処理の血清と同等の性状を有するものであるとの確証が得られた。

以上の条件で得られる不活化女性血清をベース血清として、これに精製 PSA を添加して二次標準物質を作製することが可能となったことは、PSA の標準化にとって重要な進歩であると思われる。本研究の成果の一部は、2003 年 6 月、バルセロナで開かれたヨーロッパ臨床化学会議で報告した<sup>2)</sup>。

## 報告文献

- 1) 血清中総 PSA 測定の標準化に関する考え方 PSA 検査標準化専門委員会作業部会による試案．臨床泌尿器科，57（4 増刊号），316-322，2003．
- 2) Successful Preparation of Serum-Based Secondary Reference Material for Standardization of Total Prostate-Specific Antigen (PSA) Immunoassays. Proceeding of European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 507-511, 2003, Monduzzi Editore.