

新規前立腺癌マーカー測定試薬 「アクセスハイブリテック p2PSA」の基礎的検討

Basic study of new prostate cancer marker the test reagent
“Access Hybritech p2PSA”

千葉美穂¹⁾, 近藤 崇¹⁾, 及川真依¹⁾, 小林 亮¹⁾, 遠藤明美¹⁾, 高橋 聡¹⁾²⁾

要旨 [-2]proPSA測定試薬「アクセスハイブリテック p2PSA」の基礎的性能を評価するために検討を行った。その結果、併行精度、室内再現精度は良好で検出限界は1.196 pg/mL、直線性は4,727.21 pg/mLまで概ね良好であった。また検討範囲内において、プロゾーン現象及び共存物質の測定値への影響は認めなかったことから、基礎的性能に優れ臨床的に有用であると考えられた。しかし、血漿検体では測定値に影響を及ぼすことや採血後に経時的に測定値の上昇を認めたことから、血清を用いての迅速な測定が必要である。

Key words [-2]proPSA, Prostate Health Index(*phi*), Access Hybritech p2PSA, prostate cancer, Access2

1. はじめに

前立腺特異抗原 (Prostate specific antigen; PSA) は、前立腺癌のスクリーニングや治療指標 (モニタリング) に広く用いられているが、前立腺肥大症などの非癌前立腺疾患においても高値を示すため、前立腺癌に対する特異性は高くない。特に、前立腺癌と非前立腺癌が混在する PSA グレーゾーン (4.0~10.0 ng/mL) の前立腺癌診断率は50%未満と低く¹⁾、生検による患者の苦痛、過剰診断が懸念されている。また、非癌と区別する指標として総PSAに対する遊離型 (蛋白非結合型) PSAの割合である F/T比 (遊離型 PSA/総PSA) があるが、その診断率は60%程度であり十分とはいえない²⁾。

[-2]proPSA (p2PSA) は、PSAに2つのアミノ

酸が結合したPSAの前駆体であり、癌組織中で多く発現していることから新たな前立腺癌のバイオマーカーとして注目されている。正常の前立腺組織ではPSAに7つのアミノ酸が結合した[-7]proPSAが前立腺腺腔内に分泌されており、ヒトカリクレイン2 (Human kallikrein 2; hk2) によって7つのアミノ酸が切断され活性化PSAへと変換されるが、腫瘍組織中ではhk2の活性が低下しており活性化PSAへの変換が阻害される。その結果proPSAが増加し、proPSAの最終型でかつ最も安定しているp2PSAが腫瘍組織に蓄積する³⁾。そのp2PSAを組み入れた指標であるプロステートヘルスインデックス (Prostate health index; *phi*: [p2PSA /freePSA] × PSA^{0.5}) は、従来PSAグレーゾーンで非癌と癌の判別に用いられてきたF/T比を上回る前立腺癌

Received Mar. 21, 2024; Accepted May 13, 2024

Miho CHIBA¹⁾, Takashi KONDO¹⁾, Mai OIKAWA¹⁾, Ryo KOBAYASHI¹⁾, Akemi ENDOH¹⁾, Satoshi TAKAHASHI¹⁾²⁾

¹⁾ 札幌医科大学附属病院 検査部

Division of Laboratory Medicine, Sapporo Medical University Hospital.

²⁾ 札幌医科大学医学部 感染制御・臨床検査医学講座
Department of Infection Control and Laboratory
Medicine, Sapporo Medical University School of
Medicine.

〒060-8543 北海道札幌市中央区南1条西16丁目
South-1, West-16, Chuo-ku, Sapporo, 060-8543, Japan.

Corresponding author: 千葉美穂

TEL: 011-611-2111 (内線36430)

FAX: 011-622-8502

E-mail: chibamiho@sapmed.ac.jp

診断精度が得られることが報告されており⁴⁾、2021年11月に保険適用となった。今回我々は、化学発光酵素免疫測定法 (CLEIA法) を原理とし、専用のイムノアッセイシステムに搭載可能な p2PSA 測定試薬であるアクセスハイブリテック p2PSA の基本性能を評価した。

2. 材料及び方法

1) 対象

当院にて PSA の測定を行った患者の既存試料 (血清, ヘパリンリチウム加血漿, EDTA-2K 加血漿, 3.2% クエン酸 Na 加血漿) を用いた。本研究は札幌医科大学附属病院臨床研究審査委員会にて承認を受けて実施した (承認番号: 342-171)。

2) 測定試薬及び機器

全自動化学発光酵素免疫測定装置 Access2 イムノアッセイシステム (ベックマン・コールター株式会社: 以下 BC 社) を用い、アクセスハイブリテック p2PSA (BC 社) にて測定した。phi 関連項目の相関性の検討では、アクセスハイブリテック PSA (BC 社) とアクセスハイブリテック freePSA (BC 社) を用い、対照試薬としてエクルーシス試薬 PSA II (ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社: 以下ロシュ社) とエクルーシス試薬 free PSA (ロシュ社) を使用し、電気化学発光免疫装置 cobas8000 e801 (ロシュ社) にて測定した。

3) 方法

(1) 併行精度

3濃度のプール血清を 20 回連続測定し、平均値, 標準偏差 (Standard deviation; SD), 変動係数 (Coefficient of variation; CV) を算出した。

(2) 室内再現精度

併行精度と同様の試料を -80°C で凍結保存し、初回キャリブレーション後 10 日間一日 2 回測定し、平均値, SD 及び CV を算出した。

(3) 希釈直線性

p2PSA キャリブレーター S6 (4,727.21 pg/mL) を患者プール血清 (p2PSA 値 0 pg/mL) で 10 段階希釈後、各 3 重測定した。得られた平均値より回帰直線を得て理論値に対する偏差率を算出した。

(4) プロゾーン現象

高濃度患者血清 (理論値: 15,823.7 pg/mL) を患者プール血清 (p2PSA 値 0 pg/mL) で 10 段階希釈後、2 重測定した。

(5) 検出限界

約 4 pg/mL の低濃度試料を患者プール血清 (p2PSA 値 0 pg/mL) で 5 段階希釈後、10 重測定し、

ブランク試料 + 2SD と重ならない値をブランク試料と識別される濃度として検出限界を評価した⁵⁾。

(6) 共存物質の影響

干渉チェック・A プラスと干渉チェック・RF プラス (いずれもシスメックス株式会社) を使用し、添付文書に従いプール血清に 5 段階希釈した遊離型ビリルビン, 抱合型ビリルビン, 溶血ヘモグロビン, 乳び及びリウマトイド因子 (Rheumatoid factor; RF) をそれぞれ添加後 3 重測定し、共存物質未添加時の測定値に対する変動を調べた。試薬の再現性および測定値のばらつきを考慮し、未添加時の濃度 $\pm 2\text{SD}$ 以内を許容基準とした。

(7) 抗凝固剤の影響

4 名の患者血清と同時に採取された EDTA-2K 加血漿, ヘパリンリチウム加血漿及び 3.2% クエン酸 Na 加血漿を、患者検体提出後 3 時間以内に凍結保存 (-80°C) し、融解後 p2PSA 濃度を測定し血清検体の測定値に対する変化率を調べた。

(8) 検体安定性

5 名の患者血清の一部を検体提出後 15 分以内に凍結保存 (-80°C) し、残りの血清を室温と 4°C でそれぞれ 1, 3, 8, 24 時間経過後に凍結保存 (-80°C) した。各検体を融解後に p2PSA 濃度を 2 重測定し、15 分以内に保存した検体を基準としてそれぞれの測定値の変化率を算出した。15 分以内に保存した検体と比較し、 $\pm 15\%$ 以内の変動を許容範囲内とした。また、同時に freePSA と PSA を測定し算出した phi 値の経時的変化を検討した。

(9) 結果の解析

併行精度, 日差再現性の解析には日本臨床化学会が提供しているバリデーション算出用プログラム Validation-Support-V61 を使用した。

3. 成績

1) 併行精度

3濃度の試料の CV は、それぞれ 4.90% (平均 12.25 pg/mL), 2.86% (平均 193.05 pg/mL), 2.15% (平均 1,125.24 pg/mL) であった (Table 1)。

2) 室内再現精度

3濃度の試料の総合 CV は、それぞれ 8.19% (平均 12.96 pg/mL), 3.90% (平均 191.32 pg/mL), 3.59% (平均 1,136.59 pg/mL) であった (Table 2)。

3) 希釈直線性

理論値に対する偏差率は $-11.9\% \sim +6.3\%$ を示し、最大は希釈倍率 0.3 の試料の -11.9% であった (Fig. 1)。

Table 1 Repeatability.

	(n=20)		
	Low	Medium	High
Mean (pg/mL)	12.25	193.05	1,125.24
SD (pg/mL)	0.60	5.52	24.24
CV (%)	4.90	2.86	2.15

Table 2 Intermediate precision.

	(n=20)		
	Low	Medium	High
Mean (pg/mL)	12.96	191.32	1,136.59
SD (pg/mL)	1.06	7.46	40.77
CV (%)	8.19	3.90	3.59

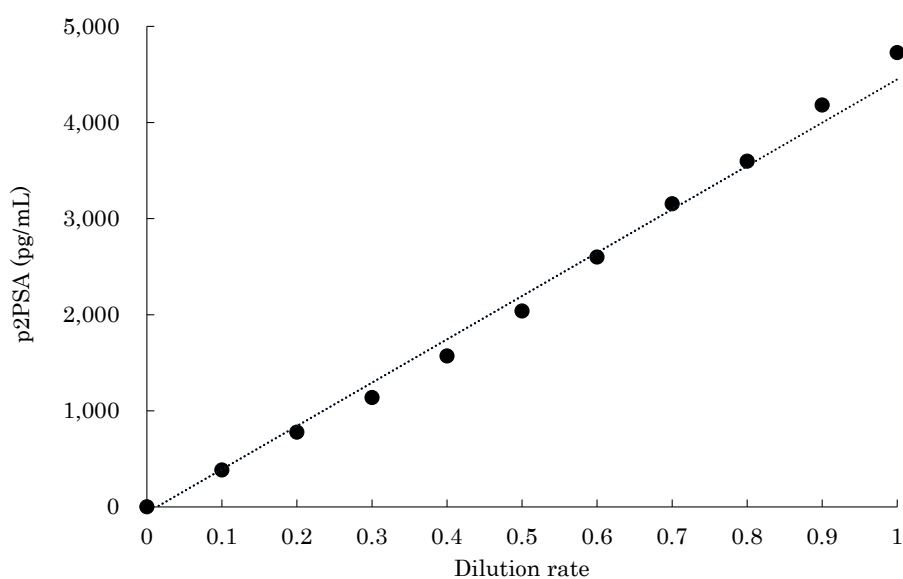


Fig. 1 Dilution linearity test.

4) プロゾーン現象

検討範囲内（理論値：15,823.7 pg/mL）でプロゾーン現象は認められなかった（Fig. 2）。

5) 検出限界

ブランク試料と識別される濃度として、検出限界は1.196 pg/mLであった（Fig. 3）。

6) 共存物質の影響

遊離型ビリルビン 20.9 mg/dL, 抱合型ビリルビン 20.1 mg/dL, 溶血ヘモグロビン 490 mg/dL, 乳び 1.510 FTU（ホルマジン濁度数）, RF 500 IU/

mLまで、未添加時の濃度 \pm 2SDを超える変動はみられなかった（Fig. 4）。

7) 抗凝固剤の影響

血清に比べ、ヘパリンリチウム加血漿で約15～34%低値, EDTA-2K加血漿で約7～34%高値, 3.2%クエン酸Na加血漿で約0～11%低値を示した（Fig. 5）。

8) 検体安定性

5検体中1検体のp2PSA濃度が、室温及び4℃保存で1時間後に17%上昇し、その後も上昇を認めた。

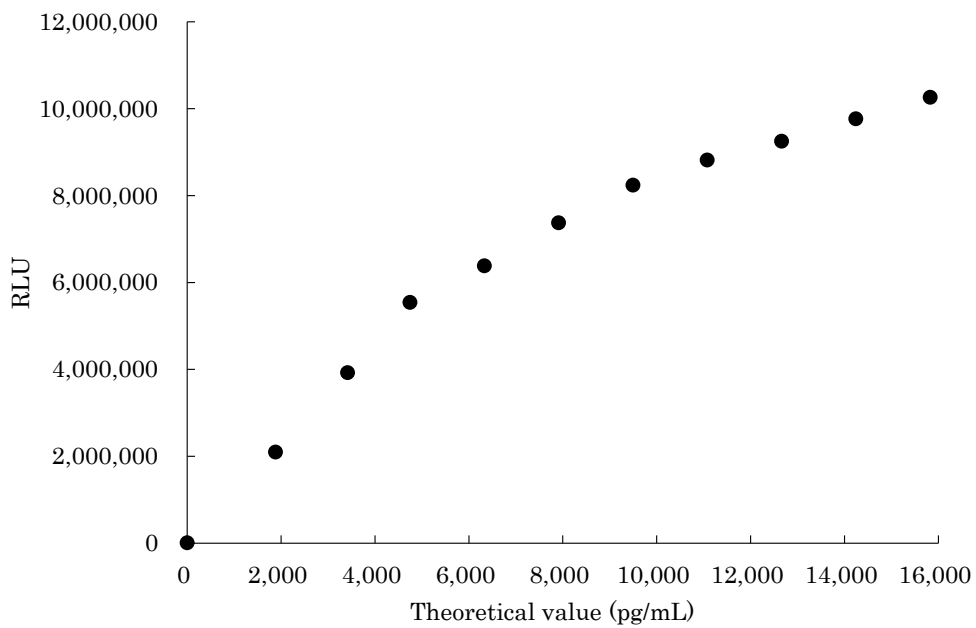


Fig. 2 Prozone phenomenon analysis.
RLU means Relative Light Unit.

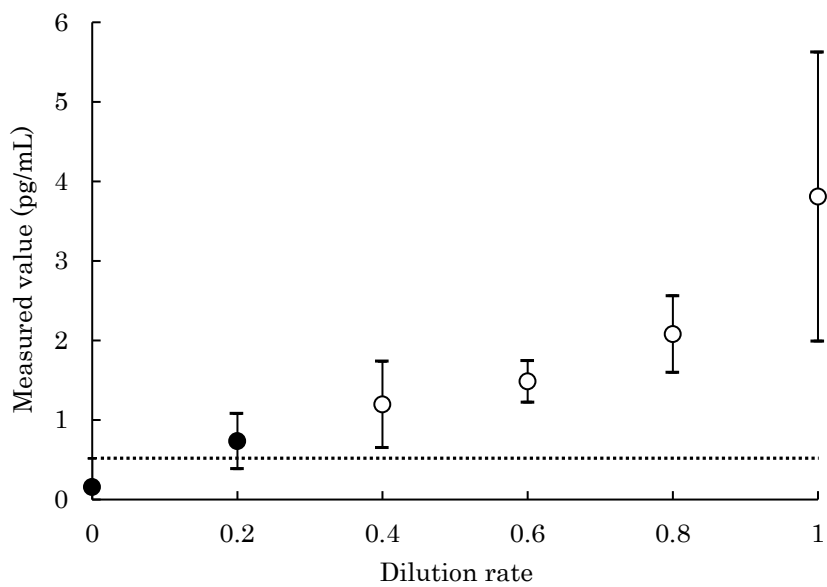


Fig. 3 Detection limit analysis.
The broken line indicate the upper limit of blank sample +2SD. The open circle (○) indicate that sample were distinguished with the blank sample.

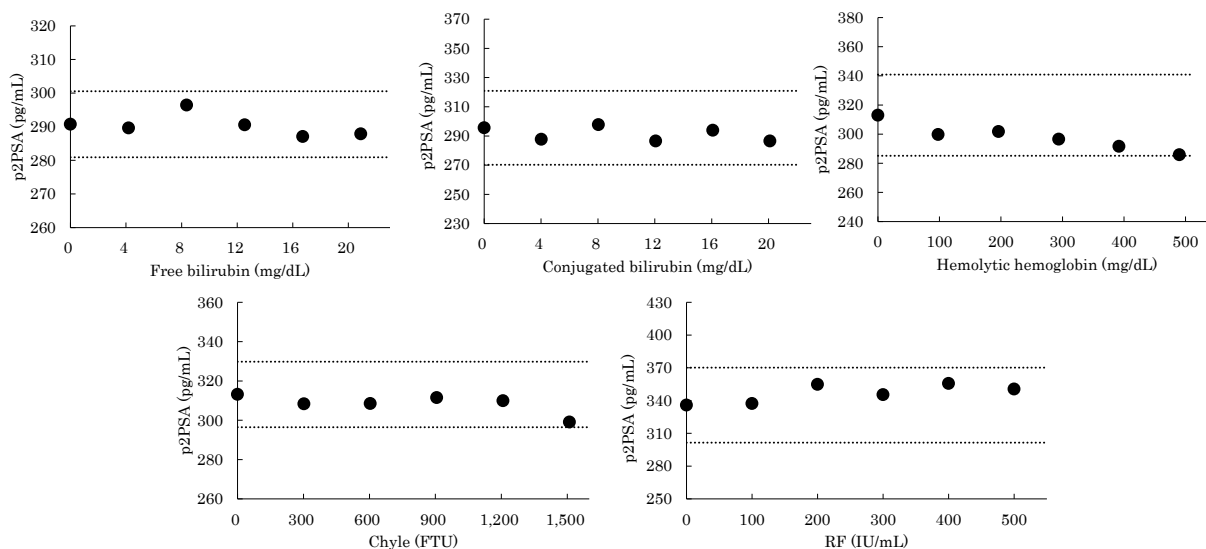


Fig. 4 Effects of interfering substances.

The broken line indicate untreated value \pm 2SD. The plot indicate that sample were mean value of triple measurement.

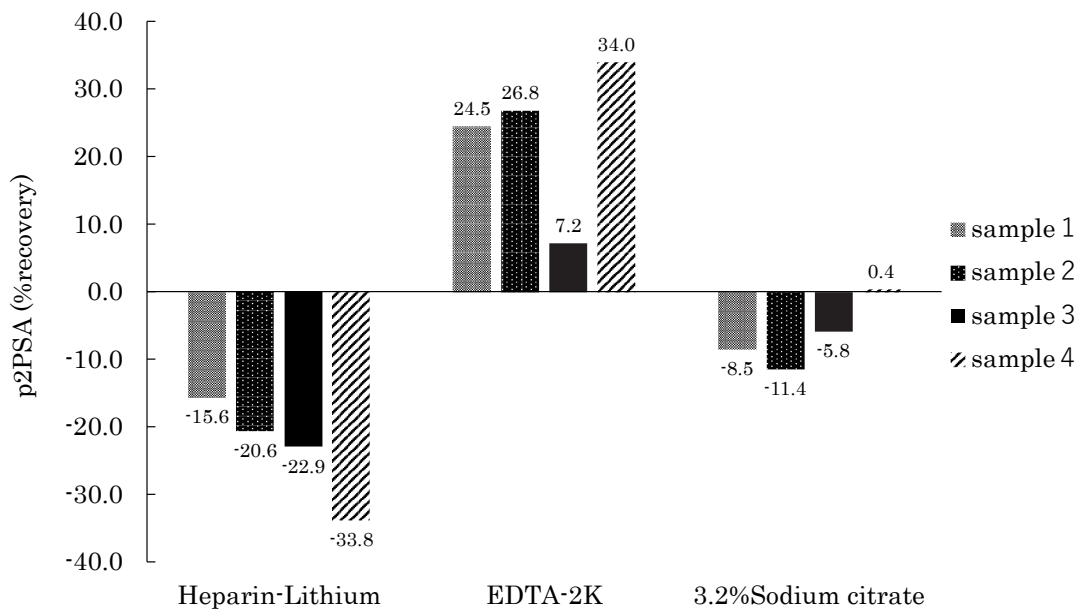


Fig. 5 Effect of Anticoagulant (Heparin-Lithium, EDTA-2K, 3.2% Sodium citrate).

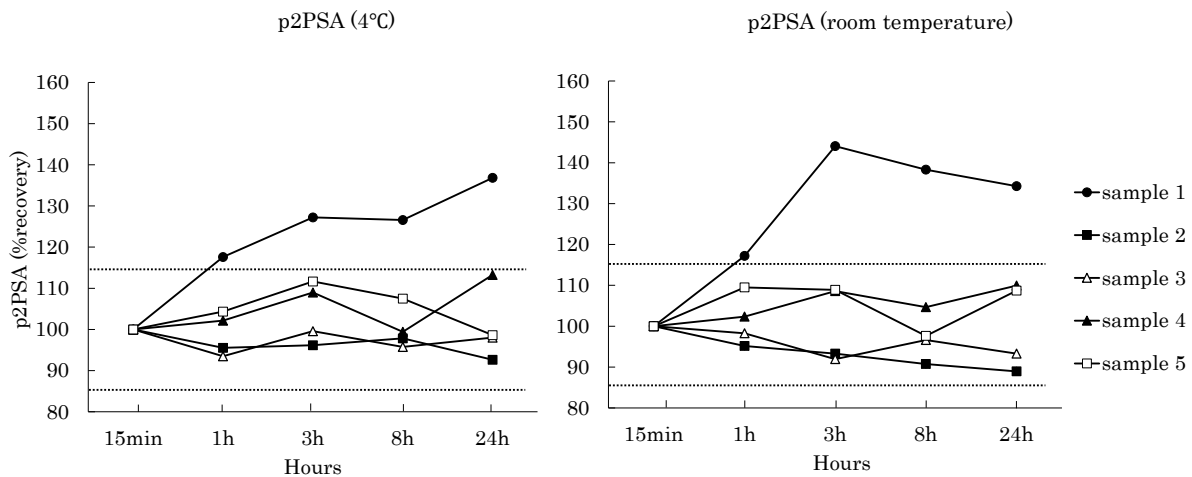


Fig. 6 Changes in percentage recovery of p2PSA in serum at 4°C and room temperature. The broken line indicate untreated value \pm 15%.

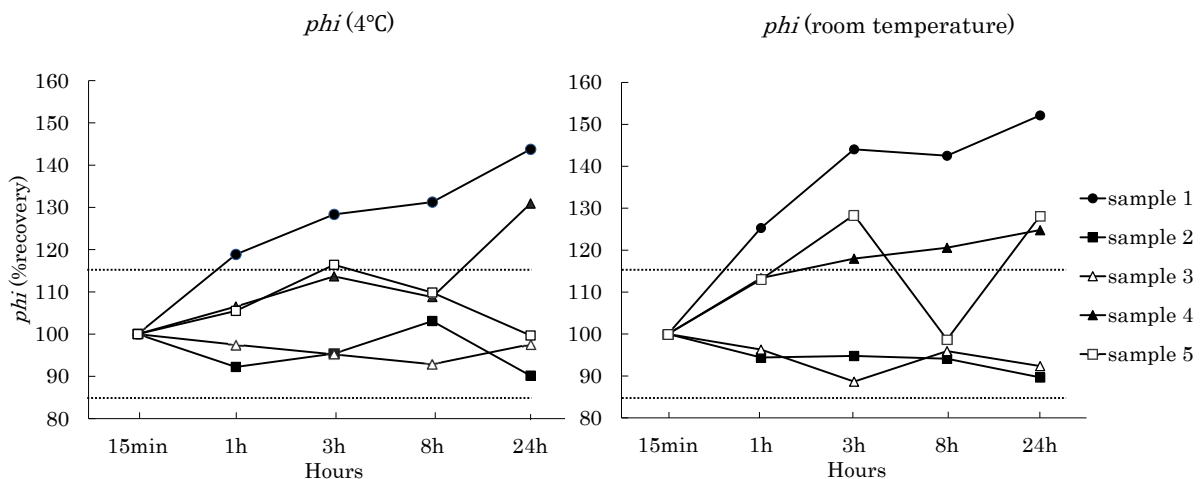


Fig. 7 Changes in percentage recovery of Prostate Health Index (*phi*) in serum at 4°C and room temperature. The broken line indicate untreated value \pm 15%.

残りの4検体のp2PSA濃度は、保存方法に関わらず24時間まで概ね安定していた (Fig. 6)。phiと比較した結果、室温保存及び4°C保存で5検体中1検体が1時間後に15%以上上昇し、残りの4検体中2検体が室温保存3時間後に15%以上上昇した (Fig. 7)。

4. 考察

今回、アクセスハイブリテック p2PSAの基本性能を評価した。併行精度のCV%は最大でも4.90%と良好であった。室内再現精度は12 pg/mL付近のプール血清において総CV%が最も大きく、8.19%であった。CV10%以下であり日常検査には十分対応

可能と考えられた。

希釈直線性は一定程度認められたが最大偏差率は11.9%であり、今後試薬のさらなる改善が期待される。また、測定上限であるキャリブレーションのS6値の約5,000 pg/mLを超える15,823.7 pg/mLまで、プロゾーン現象は認めなかった。

検出限界の結果は1.196 pg/mLであり、グレーゾーン患者332名におけるp2PSA値の中央値は13.79 pg/mL、最低値は2.33 pg/mLであることから (アクセスハイブリテック p2PSA添付文書⁶⁾、臨床的に十分な感度を有していると考えられた。

共存物質の影響は検討の範囲内で認めなかったが、溶血ヘモグロビンの濃度が上がるにつれて \pm 2SD

の範囲内で測定値の若干の低下が認められた。原因は不明だが、溶血ヘモグロビン値が490 mg/mL以上となる検体の測定においてはp2PSA測定値に影響を及ぼす可能性があるため、注意を要する。

ヘパリンリチウム加血漿のp2PSA濃度は、血清と比較して約15~30%低値となった。同時測定したPSAとfreePSAがヘパリンリチウム加血漿検体で高値傾向がみられたことから（血清比平均：PSA 6.8%, freePSA 7.7%）、血漿中のproPSAが活性化PSAへと変化したことがヘパリンリチウム加血漿で低値を示した一因であると推察された。proPSAが活性化PSAへ変換された理由については、プロテアーゼ等が推測されたが詳細は不明である。3.2%クエン酸Na加血漿でも血清と比べ約0~10%低値となったが、程度が小さいことや液状抗凝固剤であることから検体の希釈による影響と考えられた。一方、EDTA-2K加血漿のp2PSA濃度は、血清と比較して約7~35%高値であった。EDTAによる2価の陽イオンをキレートする作用⁷⁾によってproPSAのN末端を切断するhk2などのプロテアーゼ活性が抑制され、活性化PSAの生成が抑えられた結果proPSAが蓄積し、proPSAの最終型でありサブタイプの中で最も安定しているp2PSA濃度が上昇したのではないかと考えられた。

検体安定性の検討では、p2PSA濃度は5検体中1検体が室温及び4℃保存で1時間後に17%上昇し、その後上昇を認めた。井川らは、血清p2PSA濃度は室温及び冷蔵保存下で24時間概ね安定していたと報告している⁸⁾。本検討では5例中1例が1時間後から上昇を認めた為、検体によっては1時間の保存でもp2PSA濃度が上昇することが示唆された。この検体の患者は転移性骨腫瘍と診断され、骨転移患者で多く発現するマトリックスメタロプロテイナーゼなどのプロテアーゼによって各proPSAからp2PSAへの変換が亢進したと考えられたが、詳細は不明である。また、同時に測定したPSAとfreePSAを用いて算出した ϕ で評価すると、p2PSAの結果同様、室温及び4℃保存で5検体中1検体が1時間後に15%以上上昇した。残りの4検体中2検体は、室温保存で3時間後に15%以上上昇した。 ϕ の経時的変化はp2PSAと同様の変化を示していたが、値の変動はより大きかった。これは、p2PSAは経時的に上昇する一方でfreePSAは経時的に減少するため、 ϕ 算出により値が増幅するためである。さらに、全血検体室温保存下で ϕ は採血後1時間で約13%、3時間後で27%上昇すると報告されていることも考慮すると⁹⁾、 ϕ の算出を目

的とする場合、採血後は速やかに遠心分離を行い測定することが望まれる。

前立腺癌診療ガイドライン2023年版¹⁰⁾の前立腺癌診療アルゴリズムでは、直腸診や超音波検査に並んで ϕ を含む補助診断マーカーによる評価が記載されており、 ϕ のさらなる普及が期待される。また、 ϕ は臨床的に重要なグリソンスコア7以上の癌の予測に有用であることや¹¹⁾、低悪性度前立腺癌に対する監視療法において再生検後の病理学的悪化を予測するマーカーとして有用であることが報告されており¹²⁾、今後さらに臨床的有用性が増していくと予想される。

5. 結論

アクセスハイブリテック p2PSAの基礎的性能は良好であり、日常検査で使用するにあたり十分な性能を有していた。ただし、p2PSAは抗凝固剤や検体保存条件による測定値への影響が認められたため、測定には血清検体を使用し採血後速やかな測定が必要である。

著者のCOI開示：本論文発表内容に関連して特に申告する事項なし

文献

- 1) Ito K, Ohi M, Yamamoto T, et al. The diagnostic accuracy of the age-adjusted and prostate volume-adjusted biopsy method in males with prostate specific antigen levels of 4.1-10.0 ng/mL. *Cancer* 2002;95:2112-2119.
- 2) 大内秀紀, 三賢訓久, 三好康秀ほか. 前立腺癌診断におけるPSAのF/T比の検討. *日本泌尿器科学会誌* 2000;91:695-699.
- 3) 伊藤一人. 新規バイオマーカー [-2]proPSA 前立腺癌診療における臨床応用の可能性. *泌尿器外科* 2017;30:1321-1323.
- 4) William J C, Alan W P, Martin G S, et al. A Multi-Center Study of [-2]Pro-Prostate-Specific Antigen (PSA) in Combination with PSA and Free PSA for Prostate Cancer Detection in the 2.0 to 10.0 ng/mL PSA Range. *The Journal of Urology* 2011;185:1650-1655.
- 5) 山中基子, 吉弘苑子, 堀田多恵子ほか. 前立腺癌特異抗原アイソフォーム p2PSA 測定試薬の基礎的検討. *生物試料分析* 2012;35:95
- 6) アクセスハイブリテック添付文書 第2版.

- 2021.
- 7) 村本良三, 下垣里河, 佐々木真弓ほか. BNP値をどのように解釈するか? 臨床検査の立場からみた問題点. 日本臨床生理学会雑誌 2017;47:181-186.
- 8) 井川掌. *phi*測定における臨床上の留意点 検体採取から保管・測定まで. prostate Journal 2022;9:172-177.
- 9) Igawa T, Takehara K, Onita T, et al. Stability of [-2]Pro-PSA in whole blood and serum analysis for optimal measurement conditions. Journal of Clinical Laboratory Analysis 2014; 28:315-319.
- 10) 前立腺癌診療ガイドライン2023年版. 日本泌尿器科学会 2023.
- 11) Stacy L, Sanghyuk S S, Dennis L B, et al. Prostate Health Index improves multivariable risk prediction of aggressive prostate cancer. BJU International 2017;120:61-68.
- 12) Kato T, Hirama H, Mitsuzuka K, et al. Reclassification prediction of first-year protocol biopsy on active surveillance of prostate cancer by p2PSA-related parameters from PRIAS-JAPAN. Prostate Cancer and Prostatic Diseases 2022;25:666-671.