

## ヒト前立腺酸性ホスファターゼの免疫化学的研究

沢田英夫，浅野進吾，原 明，中山俊裕，酒井俊助

（岐阜薬科大学学生化学教室）

### Immunochemical Studies of Human Prostatic Acid Phosphatase

HIDEO SAWADA, SHINGO ASANO, AKIRA HARA, TOSHIHIRO NAKAYAMA,

and SHUNSUKE SAKAI

*Department of Biochemistry, Gifu College of Pharmacy*

(Received February 27, 1982)

Acid phosphatase is distributed in various human tissues and body fluids. This glycoprotein has been classified into several isozymes, which are distinct in charge and molecular weight. Human prostates are known for its high specific activity of acid phosphatase. Isozyme 2 is a major enzyme, while isozyme 4 is present as minority. The two enzymes are different in chemical, enzymatic and immunological properties. Antibody prepared in rabbits against isozyme 2 precipitates only the homologous isozyme. Other isozymes of human origin including isozyme 4 are not able to give a precipitin line in agarose gel by Ouchterlony immuno-diffusion method. The antigenic determinants of the isozyme seem to locate in its protein portion rather than its carbohydrate moiety. The antiserum raised against isozyme 2 possesses unusual property upon enzyme reaction. This stabilizes the homologous enzyme after immuno-complex formation. It was confirmed that immune IgG is the causative of the stabilization effect on the enzyme against heat inactivation, and isolated  $F(ab')_2$  fragments kept this property as well. More than 2 days-incubation of the antibody and antigen mixture was required for inhibition of the enzyme activity. This is also based on its  $F(ab')_2$  fragments activity.

The addition of the antibody fraction followed by heating at  $56^\circ\text{C}$  for 30 min allows a specific assay for prostatic acid phosphatase in serum, since the protecting activity of the antibody is good only for the homologous enzyme of prostate origin and antibody discriminates other isozymes probably for different antigenic determinants. The specificity and usefulness of this assay for clinical diagnosis of prostatic carcinoma were herein demonstrated, showing the results of practical measurements. Good correlation was obtained between the enzyme activity in sera of patients and the degree of carcinoma.

#### 1. はしがき

前立腺がん患者の血清中には前立腺由来の酸性ホスファターゼ（EC 3.1.3.2）が異常に増加する。このため臨床化学上、ヒト血清中における本酵素の増減が前立腺がんの有無および進行度の重要な判定基準となる。しかしながら、従来よりの血清中酵素測定法では、前立腺がんの有無と血清中酸性ホスファターゼ活性の増減が必ずしも一致せず、さらに有用な測定法の開発が期待される現状である。さきに、著者らは、このヒト血清中の前立腺由来酸性ホスファターゼについて、その酵素-抗体複合体の特異的な熱安定性を利用して、精確簡便な前立腺がんの臨床化学的診断法を開発した。さらに、その特異抗体による熱安定性、また酵素活性阻害作用の機構など、酵素とその特異抗体との相

相互作用についての解析をすすめた。臨床化学上、抗血清を用いた本酵素の免疫学的測定法については、近年、種々報告されている。しかし、その特異抗体が本酵素活性におよぼす影響についての詳しい報告はまだない。酵素とそれに対する抗体を用いた酵素-抗酵素系は、酵素と基質という特異的な反応系に、抗原である酵素とその抗体というさらに特異的なもうひとつの反応系を共存させるということであり、これら三者の相互作用は酵素学的・免疫学的に興味深い。以下に、最近の前立腺酸性ホスファターゼ (prostatic acid phosphatase: PAP) の免疫化学的知見について著者らの研究を中心に概説したい。

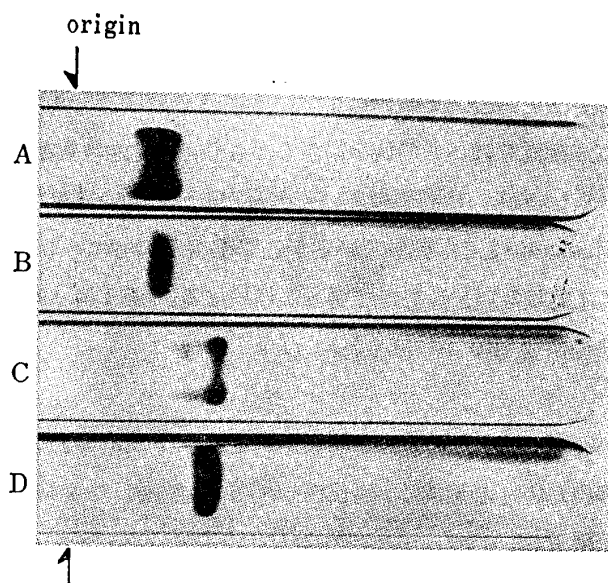
### I. PAP の酵素化学的性状

酸性ホスファターゼ (acid phosphatase: AP) はヒトの全組織および外分泌液に広く分布し、特に前立腺、赤血球、精液に多く存在する。他の動物と同様にヒト組織中にも分子量の異なる数種の AP isozyme が認められている。Sensabaugh (1975) は分子量 200,000 またはそれ以上の高分子量の I 型、分子量 100,000~130,000 の II 型、分子量 30,000~60,000 の III 型および低分子量 (13,000~18,000) の IV 型に分類している。I と II 型は類似の性状を示し、L-tartrate および fluoride により阻害され種々のモノリン酸エステルを加水分解するが、IV 型は L-tartrate では阻害されず、formaldehyde および SH 阻害剤によって強く阻害され、基質として FMN に高い特異性を有する。III 型に属する isozyme は臓器により異なる性状を示す。また、isozyme の分布に臓器特異性がみられ、赤血球では I および II 型が、精液では I および IV 型が、前立腺では III および IV 型が欠除している。Li *et al.* (1970) はヒト白血球中の AP isozyme を酸性ポリアクリルアミドゲル電気泳動により、isozyme 0,1,2,3,4,5 に分類した。ヒトの他の組織の AP isozyme も同様に分類でき、その臓器特異性が明確に示され、本法は前記の分子量による isozyme の分析より少量の試料で簡単にその分析が行える点で優れている (Lam *et al.*, 1973)。著者らの推定も含めて、上記 2 つの分類法による isozyme を区分すれば、isozyme 0 および 1 は高分子量の I 型に、2 および 3 は II 型、4 および 5 は III 型に相当する。しかし、IV 型はこの電気泳動ゲル上で AP 活性染色に用いる基質  $\alpha$ -naphthyl phosphate に対する低い反応性のため、本電気泳動法では検出されない。赤血球には IV 型の isozyme が多いが、phenolphthalein diphosphate を基質とした場合、澱粉ゲル電気泳動でさらに多数の isozyme に分離される (Hopkinson *et al.*, 1963)。前立腺には特異的に isozyme 2 が多く存在するが、isozyme 1 および 4 も検出されている (Lam *et al.*, 1973)。isozyme 2 は後述のように多くの研究者によって精製され、その性状が明らかになっているが、isozyme 4 は、最近著者ら (1981 b) によってはじめて単離されたものである。

#### 1. PAP の精製

PAP は一般に、前立腺分泌液、前立腺肥大症およびがん患者、または、死体から剔出した前立腺組織を用い、硫酸分画、種々のクロマトグラフィーにより精製される。硫酸分画では 30~70% 飽和で沈殿する分画が用いられ、さらに、DEAE-cellulose および CM-Sephadex などのイオン交換クロマトグラフィー、阻害剤である L-tartrate または PAP が糖タンパク質であることを利用した Concanavalin A (Sephacryl 4B を用いる方法) をリガンドとした Sepharose によるアフィニティクロマトグラフィーおよび等電点分画を用いた報告などがある。精製法の 1 例として、著者らの方法を次にのべる (Sawada *et al.*, 1981 b)。

前立腺組織の粗抽出液を、45~95% 飽和で硫酸分画した後、phospho-cellulose カラムクロマトグラフィーを行うと、isozyme 2 は未吸着画分に、isozyme 4 は吸着画分に溶出する。isozyme 2 は、さらに、Sephacryl S-300、次いで、DEAE-cellulose の各カラムクロマトグラフィーにより精製し、回収率約 20%、精製率約 30 倍の標品を得た。一方、isozyme 4 は、DEAE-cellulose で 2 回、Sephacryl S-300 の各クロマトグラフィーにより回収率 0.1%、約 4 倍に精製した。isozyme 2 および 4 の精製標品を用いたディスク電気泳動図を図 1 に示す。



Acid phosphatase bands were stained with  $\alpha$ -naphthyl phosphoric acid and diazonium *o*-dianisidine (A,C). Protein was stained with Coomassie Brilliant Blue R-250 (B,D).

A,B: purified isozyme 2. C,D: purified isozyme 4.  
Right: cathode. Left: anode.

図1 isozyme 2 および 4 のポリアクリルアミドディスク  
電気泳動図

## 2. 前立腺局在 isozyme 2

分子量は通常100,000前後と報告されているが，著者らは，Sephacryl S-300を用いたゲル透過法で107,000の値を得た。また，SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で52,000の値を示し，2量体構造である（Sawada *et al.*, 1981 b）。Smith and Whitby (1968) および Ostrowski *et al.* (1970) は澱粉ゲル電気泳動および DEAE-cellulose クロマトグラフィーで本酵素が多形を示すことを報告している。DEAE-cellulose により分離した2つの酵素画分を neuraminidase 処理することにより pI 6.5の同一酵素タンパク質に変化することを認め，その多形の原因は sialic acid 含量の違いに基づく電荷異質性 (charge heterogeneity) とされている。その後，本酵素タンパク質部分93%，残りの7%が糖からなる糖タンパク質であることが明らかにされた。構成アミノ酸は1分子中764個で，特に Thr と Ser 含量が高く，また含硫黄アミノ酸も比較的多く，16個の (Cys)<sub>2</sub> 残基のうち2つが Cys として存在する。糖は38-41残基で，glucosamine 15, mannose 11, galactose 4, fucose 3 および sialic acid 7~8個を含む（Ostrowski *et al.*, 1976）。

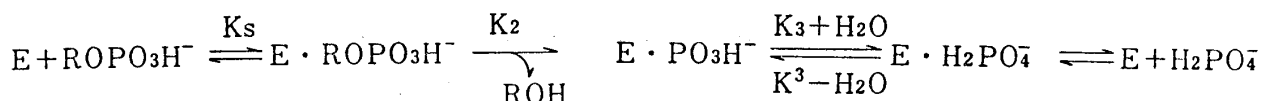
本酵素は種々のモノリン酸エステルを加水分解する。このうち，*p*-nitrophenyl phosphate, phenyl phosphate および  $\alpha$ -naphthyl phosphate などの合成基質が容易に加水分解される。Roy *et al.* (1971) によって紹介された，thymolphthalein monophosphate は，前立腺以外の組織の AP には反応性が低いことから，PAP の特異基質として有用であるとされている。阻害剤として，L-tartrate, fluoride, oxalate, heparin が知られている。また直鎖の1価アルコール類は本酵素を活性化し，炭素数に比例して活性化率の増大が認められる。最も高い活性化を引き起こす *n*-pentanol は，*K<sub>m</sub>* 値一定，*V<sub>max</sub>* 値の増加の非拮抗型を示す。この活性化はアルコールが加水分解生成物であるリン酸の acceptor として働き，後述のリン酸転移過程が促進されることによると考えられている（Gallati and Roth, 1971 ; Sawada *et al.*, 1980）。

### 3. 前立腺局在 isozyme 4

isozyme 4 の前立腺局在については従来から指摘されていたが、最近、著者らによって、はじめて単離された。前立腺組織からの低収率（約0.1%）がその精製を困難にしている。分子量は Sephacryl S-300ゲル濾過法で100,000、SDS-ポリアクリルアミドゲル電泳泳動で79,000の値を得たことより、isozyme 2 とは異なり単量体と考えられる。基質特異性は isozyme 2 と変わらないが、比活性において全般的に $\frac{1}{2}$ と低い値を示す。その他、阻害剤に対する感受性、至適 pH (5.0~6.0) は isozyme 2 と類似しているが、等電点 (isozyme 2, pI 5.3; isozyme 4, pI 6.1), 抗原性 (抗 isozyme 2 血清とは反応しない) において明らかに異なる。表 1 に isozyme 2 と 4 の基質特異性、動力学定数 ( $K_m$ ,  $V_{max}$ ) および各種阻害剤の  $K_i$  値を要約した。

### 4. 反応機構と酵素活性部位

PAP の反応機構は、Van Etten (1979) らによって明らかにされ、下式に示すように、PAP(E) は基質 ( $ROPO_3H^-$ ) と PAP 基質複合体 ( $E \cdot ROPO_3H^-$ ) を形成し、生成物 (ROH) を離脱したリン酸が共有結合した中間体 ( $E \cdot PO_3H^-$ ) を経て、水にリン酸基を転移する。



この中間体  $E \cdot PO_3H^-$  の存在は、PAP に $^{32}P$ -リン酸または $^{32}P$ -基質を反応させ、これをアルカリ分解して得られた $^{32}P$ -phosphohistidine の同定により証明された。

PAP には酵素 1 分子あたり His 26 分子が存在するが、このうち 1 分子以上が触媒部位に存在し、また、カルボキシル基 2 分子が同部位において R-OH の離脱に関与していることを推定している。一方、Arg の特異修飾試薬で処理すると失活し、Arg が酵素分子中の基質結合部位に存在し、基質のリン酸基との結合に関与していることも示唆されている (McTigue and Van Etten, 1978 a, b; Saini and Van Etten, 1978, 1979)。

### 5. PAP の前立腺組織内分布

一般に、AP は、前立腺のほか、かなり広い組織分布を示し、血清、赤血球、血小板、白血球、肝臓、脾臓、膵臓、腎臓、その他の臓器および尿、精液に存在する。組織化学的研究により、ヒトの臓器では AP は主として上皮に局在し、細網内皮系細胞にはいくつかの酵素活性を含むが、間質または支持組織にはほとんど AP 活性は検出されない。

前立腺組織において PAP は、リソゾーム由来の  $\beta$ -glycerophosphate 感受性のものと、分泌顆粒由来の phosphoryl choline, D-ephedrine phosphate 感受性の 2 種の isozyme が存在することが、組織化学的研究で報告されている (Serrano *et al.*, 1977; Paul *et al.*, 1978)。著者らの生化学的研究によると、この 2 種の isozyme は 2 および 4 に相当するが、両者の間には Paul ら (1978) が主張する基質特異性の差異は認められなかった (未発表)。おそらく、細胞化学的手法における基質の膜透過性の違いがこのような結果を生じさせたのではないと思われる。電子顕微鏡学的観察では、AP は小胞体のリボゾームからゴルジ体に、またそこからリソゾーム顆粒に移動すると言われている。その合成は、Gutman ら (1938, 1939) によって、未成熟のアカゲザルに testosterone を投与することにより PAP 活性が誘導されることから内分泌系のコントロールをうけていることが示唆されている。前立腺細胞において、PAP の中間代謝における意義は、ほとんどわかっていない。しかし、細胞外で前立腺液中の AP は、精のう腺液に含まれているリン酸化炭水化物 (phosphoryl choline, glycerophosphoryl choline など) の加水分解を行い、精子の運動エネルギーのためリン酸転移を触媒し、遊離の糖を供給し、精子の代謝活性に関与していると考え

表1 PAP isozyme 2 と 4 の基質特異性,  $K_m$ ,  $V_{max}$ ,  $K_i$  値の比較  
(Sawada *et al.*, 1981 b)

Substrate (2 mM)	Relative rate of hydrolysis	
	Isozyme 2	Isozyme 4
<i>p</i> -Nitrophenyl phosphate	100.0	100.0
Deoxyadenosine 5'-monophosphate	96.6	110.4
Adenosine 5'-monophosphate	78.3	83.2
Adenosine 2'(3')-monophosphate	98.3	109.1
Glucose 6-phosphate	2.4	5.0
Phosphorylcholine	13.7	16.1
D-Ephedrine phosphate	25.1	23.5
$\beta$ -Glycerophosphate	41.1	57.1
$\alpha$ -Naphthyl phosphate	109.6	82.1
Thymolphthalein monophosphate		
(− Brij 35) <sup>a)</sup>	0.1	0.2
(+ Brij 35)	17.3	20.1
Phenolphthalein monophosphate	163.5	210.8
4-Methylumbelliferyl phosphate	891.7	842.3
Naphthol AS-BI phosphate	2.6	5.0

a) Brij 35: 5 mg/ml.

Substrate	Isozyme 2		Isozyme 4	
	$K_m$ (M)	$V_{max}$ <sup>a)</sup>	$K_m$ (M)	$V_{max}$ <sup>a)</sup>
<i>p</i> -Nitrophenyl phosphate	$6.3 \times 10^{-4}$	250.0	$2.9 \times 10^{-4}$	149.1
$\beta$ -Glycerophosphate	$2.3 \times 10^{-3}$	69.0	$3.4 \times 10^{-3}$	112.0
Phosphorylcholine	$5.0 \times 10^{-3}$	64.5	$5.6 \times 10^{-3}$	5.6
D-Ephedrine phosphate	$1.5 \times 10^{-3}$	26.3	$2.3 \times 10^{-4}$	6.6
Adenosine 5'-monophosphate	$1.6 \times 10^{-3}$	156.3	$2.5 \times 10^{-3}$	31.7

a)  $\mu$ mol substrate hydrolyzed/min/mg protein.

Inhibitor	$K_i$ (M)	
	Isozyme 2	Isozyme 4
L(+)-Tartrate	$1.5 \times 10^{-5}$	$3.5 \times 10^{-5}$
Molybdate <sup>a)</sup>	$7.5 \times 10^{-6}$	$4.4 \times 10^{-6}$
Metavanadate <sup>a)</sup>	$5.0 \times 10^{-6}$	$2.6 \times 10^{-6}$
Phosphate	$2.0 \times 10^{-4}$	$4.9 \times 10^{-4}$

a) Ammonium molybdate,  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ; Ammonium metavanadate,  $\text{NH}_4\text{VO}_3$ .

られている。

## II. PAP 特異抗体の免疫化学的性状

酵素を抗原とするとき、そこには抗原、抗体、基質の3成分系が成立することになり、それらの成分系の1つは互いに他の成分と競合し合う関係となる。酵素とその抗体の複合物は、酵素の種類によって、酵素活性が完全、あるいは部分的に阻害されるか、または酵素活性を阻害しない場合などさまざまである。酵素—抗体複合体形成による酵素活性の阻害は、(1)酵素分子の立体構造の変化、または(2)結合した抗体分子による酵素基質複合体の形成の立体的障害によると考えられている (Cinader, 1977)。

ヒト PAP に対する抗血清は、最初に Suyama and Sawada (1963) によって作製され、前立腺由来の PAP とのみ反応するが、ヒトの他の組織の AP とは全く反応しないことが明らかにされた。その後、多数の研究者によって本抗血清がヒト前立腺以外の臓器、またサル以外の各種動物前立腺の AP とも反応しないことが確認され、法医学領域において精液の有用な証明法となっている (Suyama *et al.*, 1968)。

表2 抗 PAP IgG の精製

step	protein concentration (mg/ml)	total protein (mg)	recovery (%)
anti-PAPase serum	141.7	9919	100.0
20% saturated (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ppt.	198.4	99	1.0
33% saturated (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> sup.	87.1	6100	61.5
33% saturated (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ppt.	236.0	3305	33.3 (100.0)
Protein A Sepharose CL-4B non-adsorbed fractions	2.1	1517	15.3 (45.9)
Protein A Sepharose CL-4B adsorbed fractions	2.8	1391	14.0 (42.1)

### 1. 抗 PAP 血清および特異抗体の精製

現在、PAP の抗血清あるいは特異抗体 (IgG) 作製のために、抗原として使われているのは isozyme 2 であって isozyme 4 に対する抗体についての報告はされていない。著者らは、精製 PAP (0.4~1.0mg) と等量の complete Freund's adjuvant との混和液をウサギに4回筋肉注射し、最終注射10日後に採血して、非働化した抗血清を用いた。抗 PAP IgG は、抗血清を20~33%飽和で硫酸分画した後、IgG の Fc 部分と特異的な吸着能を持つ Protein A-Sepharose CL-4B を用いたカラムクロマトグラフィーによって精製される。表2に、その精製結果を示す。さらに、抗原である PAP を担体とした PAP 結合 Sepharose 4B カラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーによって精製し、前段階とくらべて精製率約10倍の PAP 特異抗体を得た (図2)。Peak I は未吸着の PAP 非特異 IgG 画分を示し、Peak II は PAP 特異 IgG 画分を示す。しかし、Peak II には PAP に吸着はするが非特異の IgG 画分も含まれ、これを完全に分離することはできなかった。

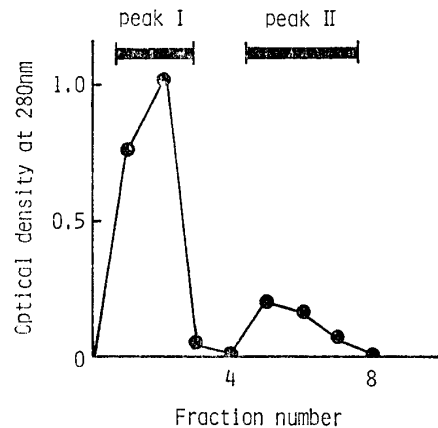


図2 PAP 結合 Sepharose 4B カラムによる抗 PAP IgG の精製

## 2. 抗原 PAP と抗 PAP 血清の性状

抗PAP 血清については，その臓器特異性，種特異性が認められており，PAP の抗原性については多くの研究者によりその性状が明らかにされている。

### 1) 臓器特異性と種属特異性

Albin *et al.* (1970) は抗ヒト前立腺組織血清を用いて，1本の AP 活性を有する強い沈降線の形成を観察し，これは  $\gamma$ ~ $\beta$  領域に位置すると報告している。また，この抗血清はサル前立腺抽出物とはわずかに反応するが，イヌ，ウサギの同抗原とは反応しないこと，すなわち，ヒト PAP はその臓器特異性ととも種特異性も存在することを指摘した。著者らも，免疫拡散法で観察した結果，抗 PAP 血清は本酵素とのみ特異的に反応し，肝，赤血球 AP，血小板，脳，肺，肝臓，脾臓，腎臓ホモジネート上清のいずれとも反応しないことを認めた（沢田ら，1979）。また，抗ヒト PAP 血清を用いて免疫電気泳動所見から Suyama *et al.* (1968) は，サル PAP は本抗血清と反応するが，澱粉ゲル電気泳動によりその易動度が異なることを報告している。最近，Wojcieszyn *et al.* (1979) は幼女子（8才以下）の尿から分子量100,000の前立腺 AP とほぼ同様の生化学的性状を示す AP を分離し，これが抗 PAP 血清と反応することを報告している。

### 2) PAP に対する neuraminidase 処理

Choe *et al.* (1978) はヒト精液より得た精製 AP をさらに DEAE-Sephadex により，2種の isozyme (DI, DII) を分離したが，これを neuraminidase 処理して脱シアル酸を行った両者はともにその酵素活性および抗原特異性に変化なく，酵素活性中心ならびに抗原決定部位はそのタンパク質部分に存在することを報告した。また，著者ら（沢田ら，1979）も，前立腺組織から得た精製酵素は，neuraminidase 処理をしても酵素活性は100%残存し，抗 PAP 血清ともよく反応することを確認した。すなわち，neuraminidase 処理により，酵素活性および抗原性の失活はみられないことより，抗原性はタンパク質部分にあり，糖質のシアル酸は活性部位および抗原決定部位には関与していないことを認めた。

### 3) 抗原性の消失

著者らはさきに，精製 PAP を尿素，SDS，2-メルカプトエタノール，塩酸グアニジンで処理し，酵素活性が50~80%残存する場合は，抗 PAP 血清との間に沈降線を認めたが，酵素活性が100%阻害された場合は，抗 PAP 血清と反応せず，沈降線も認められないことを確認した（沢田ら，1979）。すなわち PAP を高濃度のタンパク質変性剤

で処理し、高次構造を変化させるか、または、サブユニットに解離させた場合、酵素活性と同時に抗原性は消失した。しかし、最近、Choe *et al.* (1981) は、ヒト PAP をサブユニット、あるいはさらに小さいペプチドに分解し、その分解物単独では触媒活性を示さないが、抗 PAP IgG の存在下では、分解物のうちの一部は触媒活性が回復することを報告している。

### 3. PAP-抗 PAP 複合体の性状

#### 1) 各種基質に対する PAP 活性

酵素に対する抗体が酵素の活性部位に結合する場合、その酵素活性は消失し、また、抗体が酵素の活性部位近くで結合する場合、高分子基質による酵素反応は抗体の立体障害により阻害されることがわかっている (Cinader, 1977)。Foti *et al.* (1975, 1976) の報告によると、PAP-抗 PAP 複合体は、活性測定に用いる基質の種類によってその反応活性に相異がみられ、その反応活性は基質の分子構造の大きさに比例して低下することを報告しているが、著者ら (1979) は基質として、*p*-nitrophenyl phosphate, phenyl phosphate,  $\beta$ -glycerophosphate, phenolphthalein monophosphate, thymolphthalein monophosphate を用い、PAP 活性におよぼす抗血清の影響について検討した結果、いずれの基質を用いた場合にも抗血清による酵素活性の顕著な変化は認められなかった。

#### 2) PAP 活性におよぼす熱および pH 安定性

Foti *et al.* (1975, 1976) はヒト前立腺分泌液より AP を分離精製し、これを用いて抗血清を得て、酵素-抗血清複合体を作製し、抗血清による AP の熱安定性、pH 依存性の影響を検討した。その結果、pH 7.0 において AP 単独の場合、熱処理によって酵素活性が50%失活する時間は56°C 処理で30分以内、46°C で1時間以内、37°C で2時間以内と活性の減少を示した。これに対し、酵素-抗血清 (抗血清添加は5倍等量) 複合体では、56°C 熱処理で6時間後に50%失活、46°C 処理では約10%失活、37°C 処理では全く失活を示さなかった。また、pH 9.1 および pH 3.9 においては、AP 単独では、37°C 熱処理で2時間以内に完全に失活するのに対し、複合体では37°C、6時間熱処理でも約30%の残存活性を示した。また、複合体と酵素単独ではその至適 pH においても変化を示し、酵素単独の場合、*p*-nitrophenyl phosphate を用いて至適 pH 5.0 であるのが、複合体では pH 3.5 に移動し、phenolphthalein monophosphate では至適 pH 5.0 が pH 5.5 に、また、thymolphthalein monophosphate では至適 pH 6.0 が pH 5.5 に移動した。すなわち、PAP の場合、酵素-抗血清複合体は酵素単独の場合に比べ、pH 変化、熱処理に対して、著しくその安定性を増すことが示された。

著者ら (沢田ら, 1979) の実験でも、精製 PAP に抗血清を加え、pH 3.9, 7.0, 9.1 において、4°C、48時間反応させ、23°C、37°C、56°C でそれぞれ0.5, 1, 2, 6時間後の酵素活性を *p*-nitrophenyl phosphate を基質として測定した結果、抗 PAP 血清添加により、PAP 活性の安定化が認められ、pH 9.1, 37°C および pH 9.1, 56°C の条件の場合を除き、すべて6時間処理後も75~100%の残存活性が認められた。いずれの pH においても、56°C、30分の熱処理では、PAP 単独および正常ウサギ血清添加の場合、速やかに活性の消失が認められた。これに対し、抗 PAP 血清の場合、pH 3.9, pH 7.0 で PAP 活性の安定化が顕著に認められた。抗 PAP 血清による PAP 活性の安定化の至適 pH は、4.5~5.8で、56°C、6時間熱処理後も100%活性が残存した。これに対し、正常ウサギ血清添加では、30分間の熱処理により活性が速やかに消失することを認めた (図3)。

最近、著者ら (Sawada *et al.*, 1981 a) はこの抗 PAP 血清中の熱安定化作用物質を分離し、その熱安定化作用の機構を解析した。すなわち、抗 PAP 血清から、硫酸分画、Protein A-Sepharose CL-4B カラムクロマトグラフィーにより分離した IgG 画分は著しい熱安定化作用を示すことを認めた (図4, 図5)。また、Sephacryl S-300 のゲル濾過と Protein A-Sepharose CL-4B を組み合わせて得た PAP とその抗体の免疫複合体に熱安定性が認め



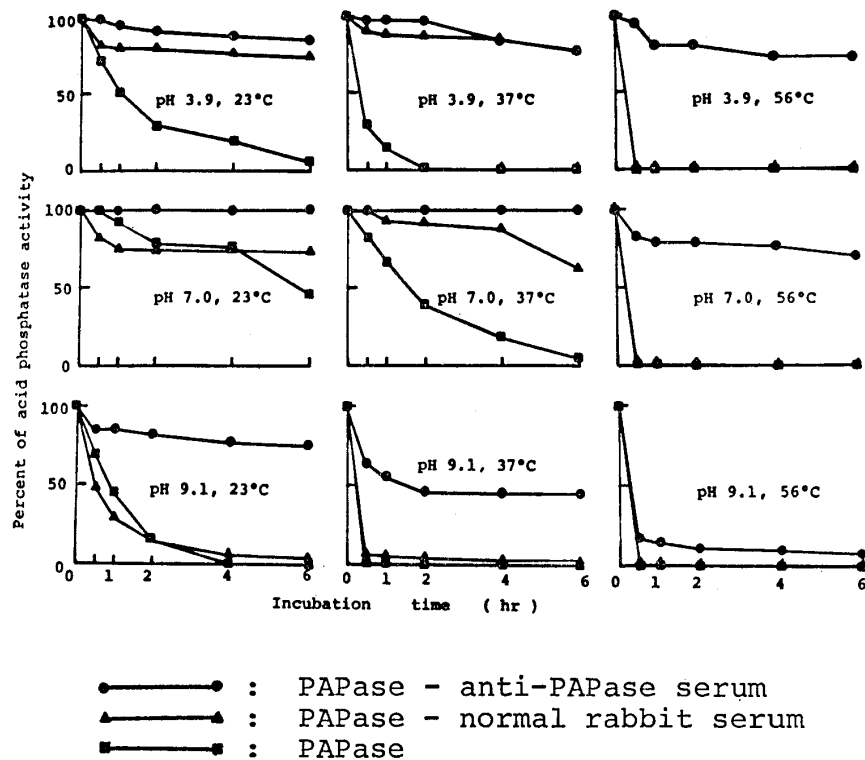
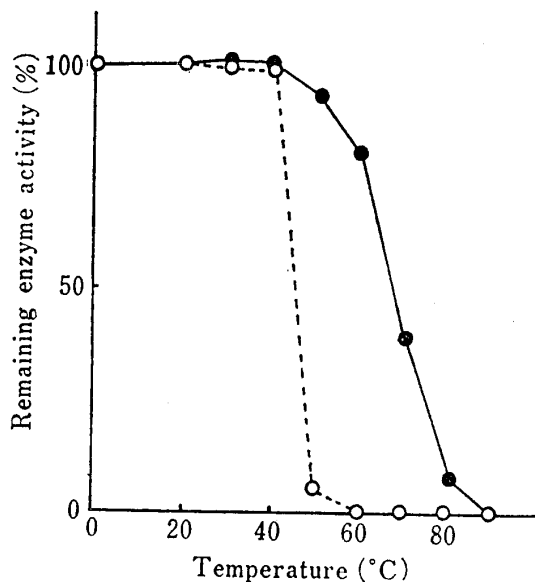
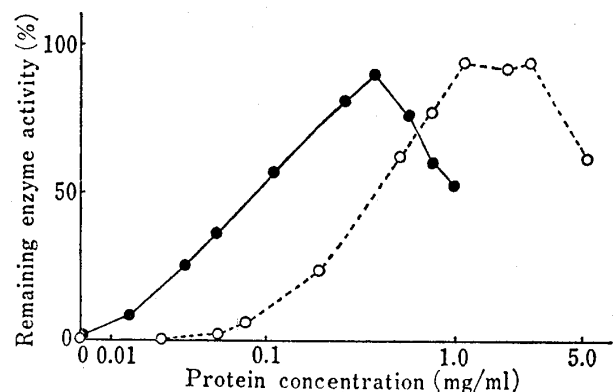


図3 抗 PAP 血清による PAP 活性の熱および pH 安定性に対する影響



One milligram of normal rabbit serum or anti-PAPase serum was added to 0.06 Unit of PAPase and the residual activity after heat treatment at each temperature was measured. ○—○; normal rabbit serum, ●—●; anti-PAPase serum.

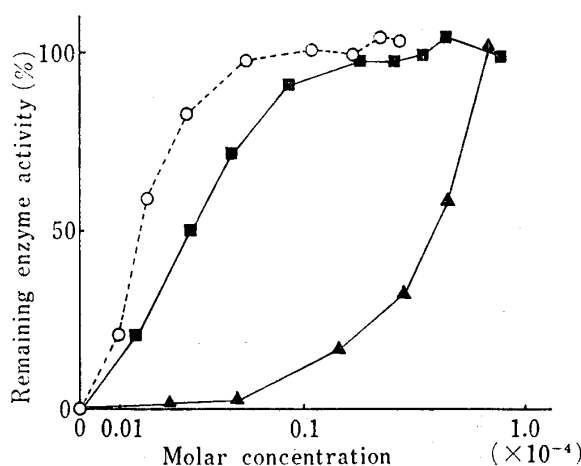
図4 抗 PAP 血清の PAP 熱安定性におよぼす影響



Various amounts of anti-PAPase serum or anti-PAPase IgG fraction were added to 0.06 Unit of PAPase and the residual activity after heat treatment was measured. ○—○; anti-PAPase serum, ●—●; anti-PAPase IgG fraction.

図5 抗 PAP IgG の PAP 熱安定性 (56°C, 30分間) におよぼす影響

られたが、PAP 非特異的 IgG には熱安定化作用のないことを示した。さらに、抗 PAP IgG をパパイン処理して得た Fab フラグメントとペプシン処理して得た  $F(ab')_2$  フラグメントの熱安定化作用を、未処理の IgG の同作用と比較すると、Fab フラグメントの熱安定化作用は、IgG と比較して弱く、 $F(ab')_2$  フラグメントの熱安定化作用は、IgG とほぼ同様に顕著であることを認めた (図 6)。したがって、格子形成した IgG 分子が PAP の活性中心を熱に対し安定化させているものと考えられる。



Various amounts of IgG, Fab fragments, or  $F(ab')_2$  fragments were added to 0.06 Unit of PAPase and the residual activity after heat treatment was measured. ○—○; IgG, ▲—▲; Fab fragments, ■—■;  $F(ab')_2$  fragments.

図 6 抗 PAP IgG の Fab フラグメントおよび  $F(ab')_2$  フラグメントの PAP 熱安定性 (56°C, 30分間) におよぼす影響

### 3) PAP-抗体複合体の形成

Ostrowski *et al.* (1966) は、精製ヒト PAP を使用して、抗 PAP 血清を作製し、酵素-抗体複合体形成につき検討を行った。本酵素の抗原抗体結合試験で抗体/抗原の最適比は 8 を示し、本酵素は抗原 1 分子に対して抗体が 1 分子以上結合する多価抗原で、また、本酵素-抗体複合体は単独酵素と変らぬ酵素活性を示し、抗体結合部位が基質結合部位と異なることを示した。しかし、PAP はヨウ素、2-メルカプトエタノールによって酵素活性は阻害されるが、抗原抗体反応に対しては影響をうけないことを明らかにした。この事実、酵素内ジスルフィド結合の切断が、抗体の結合に関与しないことを示し、6~8M 尿素処理、55°C 熱処理 (pH 7.0) によって、はじめて酵素活性とともに、抗体との反応性も失なわれる。著者らの実験でも、ゲル透過および免疫沈殿法を用い、本酵素は抗原決定部位を 4~8 個有する多価抗原であることが示唆されている (未発表)。また、本酵素-抗体複合体と単独の PAP との基質特異性、 $K_m$  値、至適 pH がほぼ等しいことから、抗体が酵素に結合する部位は酵素の活性中心とは異なる別の位置にあって、活性中心は格子内に拡散できる基質に対して、酵素の機能を発揮できるような状態におかれていると考えられる (Sawada *et al.*, 1981 a)。

### 4) PAP 特異的 IgG による酵素阻害作用

最近、著者ら (未発表) は、抗 PAP IgG は、いわゆる抗原抗体反応がおきたと考えられる短時間では PAP 活性に影響を与えないが、放置時間が長くなるに従い PAP 活性を阻害することを認めた。さらに、この阻害効果には

至適濃度が存在し，漸次抗 PAP IgG の添加量を増加させると，酵素活性は再び回復した。また，比較のため行った正常ウサギ IgG は PAP を活性化することを認めて，これら IgG による PAP 活性の阻害，回復，活性化の機構を明らかにするため検討を行った。PAP と両 IgG の反応様式は，抗 PAP IgG による阻害は不拮抗型であり，高濃度でおこる抗 PAP IgG による活性の回復，正常ウサギ IgG による活性化はともに非拮抗型であった。また，精製した PAP を結合させ作製したカラムを用いて，アフィニティークロマトグラフィーを行った結果，抗 PAP IgG，正常ウサギ IgG とともに PAP に吸着する画分が得られた。しかし，抗 PAP IgG より得られた PAP 吸着画分のみが免疫二重拡散法で PAP と反応することを認めた。また，neuraminidase 処理した PAP に対して，抗 PAP IgG は未処理 PAP に対するのと同様の阻害効果を示したが，正常ウサギ IgG は活性化を示さなかった。以上，PAP は免疫学的に特異結合をする PAP 特異抗体と，正常ウサギ血清中に存在する自然抗体である IgG と，2 種類の IgG と結合できることが明らかとなった。すなわち，PAP は，基質，PAP 特異抗体，PAP 非特異抗体の 3 種のそれぞれ異なる結合部位を有し，その相互作用により，PAP 活性に影響を与えているものと考えられる。

PAP 特異抗体による阻害について，2 価抗体である抗 PAP IgG F(ab')<sub>2</sub> フラグメントでは阻害効果が認められるが，1 価抗体である抗 PAP IgG Fab フラグメントでは阻害効果は認められなかった。しかし，Fab フラグメントでもそれに対する抗体を用いて人工的に 1 価抗体を 2 量体構造にすると阻害効果を示した。したがって，PAP 特異抗体による PAP 阻害効果は，抗体を介した酵素と酵素の架橋により生ずるものと考えられる。正常ウサギ IgG による活性化については，各フラグメントでは PAP 活性に影響が認められないことより，IgG 分子そのものが必要であると考えられる。最近，正常ヒト IgG のうち，PAP と結合するものがあるという報告（Papsidero *et al.*, 1980）もあり，特異抗体以外の IgG 画分における PAP の活性化は臨床生化学の面において興味深い。

表 3 前立腺がん，前立腺肥大症患者および正常者における血清 AP 活性

	Sex	Disease	Total activity <sup>a)</sup>	Activity inhibited by L-tartrate	Activity stabilized by anti-PAPase
1	M <sup>b)</sup>	P.C. <sup>c)</sup>	15.56	11.00	5.69
2	M	P.C.	12.78	5.91	4.99
3	M	P.C.	17.72	14.22	8.96
4	M	P.H.	7.06	3.72	0.15
5	M	P.H.	8.06	4.06	0.62
6	M	P.H.	5.50	4.15	0.40
7	M	P.H.	10.39	7.83	0.85
8	M	P.H.	9.83	7.94	0.04
9	M	P.H.	6.78	1.95	0.55
10	M	P.H.	7.67	3.67	0.35
11	M	N.	4.61	0.56	0.14
12	M	N.	4.39	1.78	0.05
13	F	N.	8.56	5.11	0
14	F	N.	4.44	2.06	0
15	F	N.	7.44	3.00	0.58
16	F	N.	9.33	5.72	0.10
17	F	N.	10.56	4.72	0.77
18	F	N.	3.89	1.89	0.42
19	F	N.	5.00	2.56	0.07

a) Acid phosphatase activity is expressed in nmoles of *p*-nitrophenol produced per minute per ml.

b) Abbreviation used: M, male; F, female.

c) Abbreviation used: P.C., prostatic carcinoma; P.H., prostatic hypertrophy; N., normal.

### III PAP-抗体複合体の臨床化学的応用

著者ら(1979)は、ヒト血清中の PAP のみその活性を測定する方法として、次の簡便迅速な方法を開発した。すなわち、ヒト血清試料 0.5ml を用い、抗 PAP 血清を 0.05ml 添加した後、56°C 熱処理30分間行い、前立腺由来以外の AP を失活させ、0.1M クエン酸緩衝液 (pH 5.5) 中で、基質 *p*-nitrophenyl phosphate を用いて、37°C、30分間 incubate 後、遊離する *p*-nitrophenol 量を測定する方法であり、本法によれば、男女正常者、前立腺がん患者および前立腺肥大症患者の血清中の PAP 活性値が従来より用いられている L-tartrate による阻害により測定した AP 活性値と比較し、明らかにがん患者血清のみを識別できることを認めた(表3)。

治療前の患者、治療後の患者、肥大症および他の悪性腫瘍患者(肝、腎、膀胱)および正常健康成人の値は酒井ら(1980)によれば、治療前26例の活性値は、 $3.88 \pm 5.34$  (nmols per min) と高い値を示したが、肥大症患者54例では $\frac{1}{10}$ の低値( $0.33 \pm 0.29$ )、他の臓器がん患者13例では、 $0.17 \pm 0.12$  とさらに低く、健康成人の値と同値であった。健康成人男子7例で、 $0.18 \pm 0.16$ 、女子7例で、 $0.13 \pm 0.20$ といずれも低値を示した。前立腺がん患者の各 stage による PAP 活性と全活性に対する割合をみると、治療前後の活性差異は、各 stage において明らかで、治療後の経過をよく示す結果を得た。抗 PAP 血清の特異的な安定化を利用した免疫化学的な測定は、経済性、簡便迅速の利点があり、直接 PAP の酵素活性値として示すことができ臨床化学的にも診断価値の高い方法と考える。

#### 謝 辞

本総説の研究は、岐阜大学医学部泌尿器科学教室西浦常雄教授はじめ同教室の方々ならびに佐々木恵美、丸山仁美、篠田道夫、仙石妃嗣吏の諸氏の協力によって行われたものであり、厚く感謝いたします。

#### 引用文献

- Ablin, R. J., Bronson, P., Soanes, W. A. and Witebsky, E., (1970) Tissue- and species-specific antigens of normal human prostatic tissue. *J. Immunol.*, 104, 1329-1339.
- Choe, B. K., Dorg, M. K., Walzand, D. and Rose, N. R., (1981) Antibody restores catalytic activity of a small molecular weight fragment of human prostatic acid phosphatase. *Mol. Immun.*, 18, 451-454.
- Choe, B. K., Pontes, E. J., McDonald, I. and Rose, N. R., (1978) Purification and characterization of human prostatic acid phosphatase. *Prep. Biochem.*, 8, 73-89.
- Cinader, B., (1977) Enzyme-antibody interaction, in *Method in immunology and immunochemistry*, ed. by Williams, C. A. and Chase, M. W., pp. 313-375, Academic Press, New York, San Francisco and London.
- Foti, A. G., Glovsky, M. and Cooper, J. F., (1975) The effect of antibody on human prostatic acid phosphatase activity-I: Temperature and pH stabilization of acid phosphatase enzyme activity by rabbit antibody to acid phosphatase. *Immunochemistry*, 12, 131-136.
- Foti, A. G., Herschman, H., Cooper, J. F. and ImFeld, H., (1976) The effect of antibody on human prostatic acid phosphatase. Substrate utilization by enzyme of enzyme-antibody complex. *Arch. Biochem. Biophys.*, 176, 154-158.
- Gallati, H. and Roth, M. (1976) Activation of acid prostate phosphatase by 1-pentanol. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 14, 581-587.
- Gutman, A. B. and Gutman, E. B., (1938) "Acid" phosphatase and functional activity of the prostate (man) and preputial glands (rat). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 39, 529-532.

- Gutman, A. B. and Gutman, E. B., (1939) Adult phosphatase levels in prepubertal rhesus prostate tissue after testosterone propionate. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 41, 277-281.
- Hollander, V. P., (1971) Acid phosphatase, in *The enzymes*, Vol. IV, ed. by Boyer, P. D., pp. 449-498, Academic Press, New York and London.
- Hopkinson, D. A., Spencer, N. and Harris, H., (1963) Red cell acid phosphatase variants: A new human polymorphism. *Nature*, 199, 969-971.
- Lam, K. W., Li, O., Li, C. Y. and Yam, L. T., (1973) Biochemical properties of human prostatic acid phosphatase. *Clin. Chem.*, 19, 483-487.
- Li, C. Y., Yam, L. T. and Lam, K. W., (1970) Studies of acid phosphatase isozymes in human leukocytes. Demonstration of isozyme cell specificity. *J. Histochem. Cytochem.*, 18, 901-910.
- McTigue, J. J. and Van Etten, R. L., (1978 a) An essential active-site histidine residue in human prostatic acid phosphatase. *Biochim. Biophys. Acta*, 523, 407-421.
- McTigue, J. J. and Van Etten, R. L., (1978 b) An essential arginine residue in human prostatic acid phosphatase. *Biochim. Biophys. Acta*, 523, 422-429.
- Ostrowski, W., Bhargava, A. K., Dziembor, E., Gizler, M., Gryszkiewicz, J. and Barnard, E. A., (1976) Acid phosphomonoesterase of human prostate. Carbohydrate content and optical properties. *Biochim. Biophys. Acta*, 453, 262-269.
- Ostrowski, W., Wasyl, Z., Weber, M., Guminska, M. and Luchter, E. (1970) The role of neuraminic acid in the heterogeneity of acid phosphomonoesterase from the human prostate gland. *Biochim. Biophys. Acta*, 221, 297-306.
- Ostrowski, W., Weber, M. and Rybarska, J., (1966) Immunochemical properties of acid phosphomonoesterase from human prostate gland. *Acta Biochimica Polonica*, 13, 343-352.
- Papsidero, L. D., Wojcieszyn, J. W., Horoszewicz, J. S., Leong, S. S., Murphy, G. P. and Chu, T. M., (1980) Isolation of prostatic acid phosphatase-binding immunoglobulin G from human sera and its potential for use as a tumor-localizing reagent. *Cancer Res.*, 40, 3032-3035.
- Paul, B. D., Serrano, J. A., Wasserkrug, H. L., Serrano, A. A. and Seligman, A. M., (1978) D-Ephedrinephosphate, DEP: A new substrate with specificity for prostatic acid phosphatase (PAP). *Histochem.*, 56, 133-145.
- Roy, A. V., Brower, M. E. and Hayden, J. E., (1971) Sodium thymolphthalein monophosphate: A new acid phosphatase substrate with greater specificity for the prostatic enzyme in serum. *Clin. Chem.*, 17, 1093-1102.
- Saini, M. S. and Van Etten, R. L., (1978) An homogeneous isozyme of human liver acid phosphatase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 191, 613-624.
- Saini, M. S. and Van Etten, R. L., (1979) An essential carboxylic acid group in human prostate acid phosphatase. *Biochim. Biophys. Acta*, 568, 370-376.
- 酒井俊助，土井達郎，河田幸道，西浦常雄，沢田英夫，(1980) 前立腺酸性ホスファターゼに関する研究。第68回日本泌尿器科学会総会，神戸。

- 沢田英夫, 佐々木恵美, 浅野進吾, (1979) ヒト前立腺酸性ホスファターゼに関する研究 (第2報) 抗ヒト前立腺酸性ホスファターゼ血清の性状とその臨床的応用. 薬誌, 99, 83-89.
- Sawada, H., Asano, S., Maruyama, H., Shinoda, M. and Aoki, Y., (1980) Studies on human prostatic acid phosphatase. III. The effects of alcohols on human erythrocyte acid phosphatase and on human prostatic acid phosphatase. *Chem. Pharm. Bull.*, 28, 3466-3472.
- Sawada, H., Maruyama, H., Sengoku, H. and Nakayama, T., (1981 a) Studies on human prostatic acid phosphatase. IV. Stabilization of prostatic acid phosphatase against thermal inactivation by the homologous antibody. *Chem. Pharm. Bull.*, 29, 2934-2939.
- Sawada, H., Shinoda, M., Maruyama, H. and Nakayama, T., (1981 b) Studies on human prostatic acid phosphatase. V. Isolation and characterization of a prostatic acid phosphatase isozyme. *Chem. Pharm. Bull.*, 29, 3624-3629.
- Sensabaugh, G. F., (1975) Genetic and non-genetic variation of human acid phosphatases, in *Isozymes I. Molecular structure*, ed. by Markert, C. L., pp. 367-380, Academic Press, New York.
- Serrano, J. A., Wasserkrug, H. L., Serrano, A. A., Paul, B. D. and Seligman, A. M., (1977) The histochemical demonstration of human prostatic acid phosphatase with phosphorylcholine. *Invest. Urol.*, 15, 123-136.
- Smith, J. K. and Whitby, L. G., (1968) The heterogeneity of prostatic acid phosphatase. *Biochim. Biophys. Acta*, 151, 607-618.
- Suyama, H. and Sawada, H., (1963) Die Bestimmung der menschlichen Samenflüssigkeit durch ein anti-säures Prostata-Phosphatase-Serum. *Deutsche Zeitschrift für gerichtliche Medizin*, 53, 175-185.
- Suyama, H., Sawada, H. and Tsugawa, N., (1968) Prostatic acid phosphomonoesterase of the Japanese Monkey (*Macaca f. fuscata*), *Primates*, 9, 141-147.
- Wojcieszyn, J. W., Wang, M. C., Lee, C. L., Murphy, G. P. and Chu, T. M., (1979) Purification and characterization of a human urinary acid phosphatase. *J. Appl. Biochem.*, 1, 223-234.