

## 간편형 전립선특이항원검사 키트<sup>®</sup>의 유용성

### Usefulness of Rapid PSA Kit<sup>®</sup>

Jin Seon Cho, Eui Yul Choi<sup>1</sup>, Sang Yol Park<sup>1</sup>, Doo Jin Lee, Chang Hee Hong, Byung Soo Chung

From the Departments of Urology and <sup>1</sup>Genetic Engineering, Hallym University College of Medicine, Chuncheon, Korea

**Purpose:** The incidence rate of prostate cancer has increased remarkably in Korea. The serum prostate specific antigen (PSA) value has been used for screening, although its clinical significance in prostate cancer screening is still inconclusive. However, if the measurement time was short and the cost was low, such an assay kit should be sufficient for prostate cancer screening.

**Materials and Methods:** We developed paired monoclonal antibodies against PSA which could be used in assay kits for PSA. The Rapid PSA Kit<sup>®</sup> used an immunochromatographic method to qualitatively judge a positive or negative result. Serum specimens from 78 men with benign prostate hyperplasia or prostate cancer were tested using the kit.

**Results:** The sensitivity of the kit was determined to be 4ng/ml. 33 samples had a value of greater than 5ng/ml, so were considered positive. 5 samples had values between 4ng/ml and 5ng/ml, of which 3 were positive. The other 40 samples had values less than 4ng/ml, and 11 of these were judged positive. These results indicated that the sensitivity and specificity of the Rapid PSA Kit<sup>®</sup> were 94.7 and 72.5%, respectively.

**Conclusions:** Tests using the Rapid PSA Kit<sup>®</sup> can be easily performed at outpatient clinics or elsewhere. This kit is useful in the initial screening of prostate cancer as the results can be obtained within 15 minutes and the cost is lower than with ordinary serum PSA tests. (**Korean J Urol** 2003;44:6-11)

**Key Words:** Prostate-specific antigen, Prostate cancer screening, Rapid PSA kit

대한비뇨기과학회지  
제 44 권 제 1 호 2003

한림대학교 의과대학 비뇨기과학교실,  
<sup>1</sup>유전공학과

조진선 · 최의열<sup>1</sup> · 박상열<sup>1</sup> · 이두진  
홍창희 · 정병수

접수일자 : 2002년 5월 29일  
채택일자 : 2002년 7월 25일

교신저자 : 조진선  
한림대학교 성심병원  
비뇨기과학교실  
경기도 안양시 동안구 평촌동  
896  
☎ 431-070  
Tel: 031-380-3851  
Fax: 031-380-3852  
E-mail: js315@hallym.or.kr

본 연구는 보건의료기술 연구개발사업(HMP-97-D-3-0010)의 지원으로 수행하였음.

## 서 론

전립선암 발생률과 사망률은 인종에 따라 다른데, 흑인이 가장 높고, 미국 백인이 중간 정도이며, 동양계가 가장 낮다.<sup>1</sup> 복지부의 한국중양암등록사업 보고서에 따른 1999년 우리나라 전립선암 발생률은 남자 전체 암 환자의 2.5%를 차지하였으며, 식생활의 서구화와 평균수명의 증가로 전립선암의 발생률이 점차 증가하고 있다.<sup>2</sup>

전립선암을 조기진단하여 치료하기 위해서는 전립선암 선별검사가 필요하다. 전립선암 선별검사로 전립선특이항원검사, 경직장초음파검사, 직장수지검사 등이 있으며, 현재 각 검사의 민감도 및 특이도와 경제적 비용을 고려할 때 전립선특이항원검사가 전립선암 선별검사로 많이 쓰이고 있다.<sup>3</sup>

그러나 선별검사로써 전립선특이항원검사는 국소 전립선암의 진단율을 높일 수 있는 반면 이에 동반되는 시간과 비용이 많이 든다. 전립선암 선별검사를 위해서는 정성검사만으로도 충분하다고 생각된다. 전립선암 선별검사를 위한 정성검사 키트는 많은 시료를 빠르고, 저렴하게 시행할 수 있어야하고, 특별한 장비가 필요하지 않아야 하며, 특이도와 민감도도 높아야 한다.

저자들은 전립선특이항원치를 정성검사할 수 있는 간편형 전립선특이항원검사 키트를 제작하여, 전립선암 선별검사로써 임상적 가치가 있는지를 평가하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

PSA (Scripps Lab., San Diego, USA), protein A-sepharose와

avidin-alkaline phosphatase conjugate (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA), Freund's adjuvant (GIBCO, Grand Island, USA), sulfo-NHS-LC-biotin (Pierce, Rockford, USA), BluPhos substrate (KPL, Gaithersburg, USA)와 BALB/c 마우스 (Charles River, Yokohama, Japan)를 사용하였다. 단일클론 항체 생산을 위해 10마리의 BALB/c 마우스를 사용하였다.

## 2. 단일클론 항체 생산

Freund's complete adjuvant와 동량의 15 $\mu$ g 전립선특이항원을 4-6주 되는 BALB/c 마우스 복강에 주사하였다. 3주 간격으로 Freund's incomplete adjuvant를 마우스 복강에 3회 주사하였다. 마지막 주사 4일 후에 비장세포를 수확하여 Sp2/O-Ag14 마우스 골수종세포와 융합시켰다.<sup>4,5</sup>

융합세포가 2주간 자라도록 한 뒤 배양액 상층에 항체가 있는 지를 ELISA 방법으로 선별하였다. 선별된 콜로니는 제한효소법으로 subcloning하였다. 단일클론 항체를 분비하는 하이브리도마 세포를 마우스 복강에 주사하여 복수를 얻었다.

## 3. 복수생산 및 항체 정제

선택된 항체를 분비하는 하이브리도마 세포주를 BALB/c 마우스의 복강에 주사하여 복수를 생산하였다. 단일클론 항체를 정제하기 위해 복수를 ammonium sulfate로 침전시킨 후 다시 PBS로 녹이고, protein-A affinity column chromatography를 시행하였다.

## 4. 단일클론 항체의 Biotinylation

Gretch 등<sup>6</sup>의 방법에 따라 정제된 단일클론 항체를 sulfo-NHS-LC-biotin으로 biotinylation하였다.

## 5. 단일클론 항체의 특성

하이브리도마에서 생산된 단일클론 항체 중에 전립선특이항원과 특이적으로 결합하는 항체를 선별하기 위해 전립선특이항원을 well당 10ng을 부착시킨 후 indirect ELISA를 수행하였다. 500개의 하이브리도마 세포주에 대해 우선적으로 1차 탐색을 실시하고, 1차 선별된 92 하이브리도마 세포주에 대해 동일한 실험을 반복하였다. 이 중 마우스 다클론 항체와 비슷한 활성을 보이는 12 하이브리도마 세포주를 선별하였다.

## 6. 전기영동 및 Western Blot

전립선특이항원을 Laemmli의 방법<sup>7</sup>으로 전기영동을 시행하였다. SDS 전기영동으로 분리된 단백질을 Towbin 등<sup>8</sup>의 방법에 따라 nitrocellulose membrane에 옮겼다. 이후 2%

분말 우유액으로 차단시키고 PBS로 30분 동안 세척하였다. Nitrocellulose membrane을 희석된 전립선특이항원 단일클론 항체 수용액에 4°C에서 하룻밤 두었다. 이후 alkaline phosphatase와 짝을 이룬 이차 항체로 nitrocellulose membrane을 처리하였다. PBS로 nitrocellulose membrane을 30분간 세척한 다음 기질용액으로 발색시켰다.

## 7. Epitope mapping

정액단백질을 Staphylococcus V8 protease로 절단한 다음 SDS 전기영동을 실시하고 nitrocellulose membrane으로 옮겼다. 생산된 단일클론 항체를 사용하여 Western Blot을 실시하였다.

## 8. 단일클론 항체 짝짓기

12개 각각의 단일클론 항체를 capture 항체로 ELISA plate에 부착시켰다. 다음 PSA 10ng/ml을 반응시킨 후 상온에서 1시간 배양하였다. Detector 항체로 12개 각각의 단일클론 항체를 biotin으로 표지하여 plate에 가하였다. 30분간 배양 후 avidin-alkaline phosphatase로 처리하고 배양한 후 평판을 씻어내고 발색제를 첨가하였다.

## 9. 간편형 전립선특이항원검사 키트<sup>®</sup> 제작

단일클론 항체 중 민감도가 가장 우수한 짝으로 immunochromatography와 sandwich ELISA 방법을 이용하여 간편형 전립선특이항원검사 키트<sup>®</sup>를 만들었다. 간편형 전립선특이항원검사 키트<sup>®</sup>는 바디텍(주)에서 제작하였다.

## 10. 환자 및 혈청 시료

1999년 5월부터 2000년 7월까지 본원에 내원한 환자 78명의 혈청을 이용하였으며, 이 중 26명이 전립선암 환자였다. 전립선암 환자는 경직장조음과하 전립선생검 혹은 전립선수술 조직으로 확진하였다. 채취한 혈청을 -70°C에 보관하였으며, 간편형 전립선특이항원검사 키트<sup>®</sup> 평가 당시 전립선특이항원치를 정량분석하였다. 전립선특이항원치는 ARCHITECT<sup>™</sup> (Abbott Diagnostics; IL, USA)로 chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA) 법으로 측정하였다.

## 11. 간편형 전립선특이항원검사 키트<sup>®</sup> 판정

간편형 전립선특이항원검사 키트<sup>®</sup> 오른쪽 주입구에 혈청을 200 $\mu$ l 주입하고, 15분 후 대조부위인 C표시 부위에만 적색선이 나타날 때는 음성, 시험부위인 T표시 부위에도 적색선이 나타나면 양성으로 판정하였다 (Fig. 1). T표시 부위에 약하게 적색선이 출현하여도 양성으로 판정하였다.

**결 과**

**1. 단일클론 항체의 민감도**

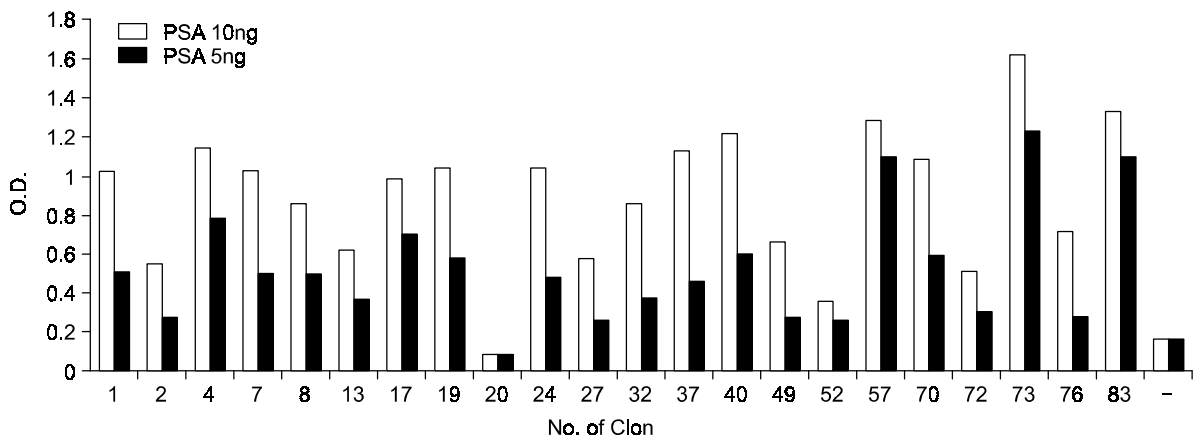
선별된 12 하이브리도마 세포주에서 생산된 단일클론 항체의 민감도를 알아보기 위한 ELISA 검사에서 다수의 단일클론 항체가 5ng/well에서 OD 1.0에 근접하는 반응을 나타냈다 (Fig. 2).

**2. 단일클론 항체의 특이도**

생산된 단일클론 항체의 특이도를 알아보기 위한 Western Blot에서 다수의 단일클론 항체가 정액단백질에서 전립선 특이항원을 인지하였다 (Fig. 3). 이들이 인지하는 항원이 전립선특이항원인가를 확인하기 위해 정제된 전립선특이



**Fig. 1.** Design of Rapid PSA Kit<sup>®</sup> tests. Serum was dropped into right well. Right colored line (T) was compared with comparative line (C) in middle of test field. Left colored line (C) served as function of test.



**Fig. 2.** Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) of monoclonal anti-human PSA antibodies against purified human PSA (10ng, 5 ng/well). Purified human PSA (10ng/well) was coated onto microtiter plates. After blocking, monoclonal anti-human PSA antibodies were added into each well and incubated for 1 hour. Each well was probed with alkaline phosphatase conjugated goat anti-mouse IgG. After addition of substrate solution, absorbance was read at 620nm.

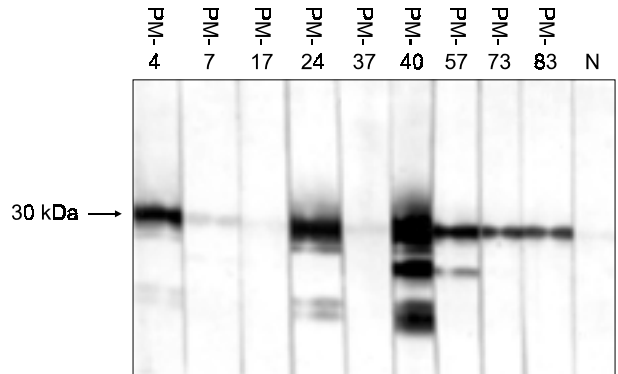
항원과 Western Blot을 실시한 결과 이들 단일클론 항체들은 정제된 전립선특이항원을 인지하였다.

**3. Epitope map**

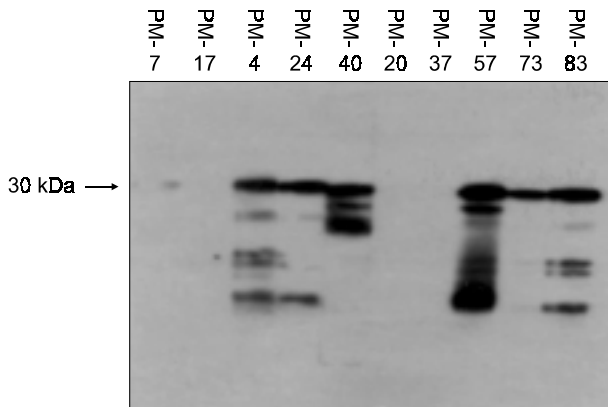
생산된 단일클론 항체의 상대적 위치를 알아보기 위해 Western Blot을 이용한 epitope mapping 결과 펩티드 패턴은 7 그룹 이상의 단일클론 항체 집단을 나타냈다 (Fig. 4).

**4. 단일클론 항체의 정제**

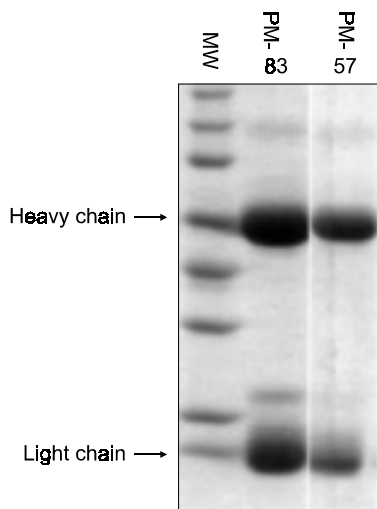
Protein-A affinity column chromatography 방법으로 항체단



**Fig. 3.** Western blot analysis of total proteins of seminal fluid probed with some representative monoclonal antibodies. Total proteins of seminal fluids were electrophoresed (12% SDS-PAGE), and proteins were transferred onto nitrocellulose membrane. After blocking, strip was incubated with anti-human PSA antibodies for 1 hour at room temperature. Each strip was probed with alkaline phosphatase conjugated goat anti-mouse IgG. After addition of BCIP/NBT substrate solution, band was visualized (N: negative control).



**Fig. 4.** Epitope mapping of representative monoclonal antibodies. Total proteins of seminal fluid had been digested with *Staphylococcus aureus* V-8 protease separated by SDS-PAGE (16% gel). Following steps were same as previous result except developing with ECL solution.



**Fig. 5.** Coomassie blue stained SDS-Gels of anti-human PSA antibodies purified by protein-A affinity column chromatography.

백질을 정제하여 capture와 detector 항체로 서로 다르게 표지하였다 (Fig. 5).

**5. 단일클론 항체 짝짓기**

단일클론 항체의 배열에 따라 다양한 반응도를 나타냈다. Epitope이 동일하거나 중첩될 경우 반응도가 낮게 나타났다. 높은 반응도를 나타내는 쌍은 클론 pm-83을 capture 항체로 사용하고, 클론 pm-57, pm-70, pm-73을 detector 항체로 사용한 경우였다.

**Table 1.** Correlation of serum PSA and Rapid PSA Kit<sup>®</sup> test stratified according to serum PSA levels

PSA (ng/ml)	No. pts. with Rapid PSA Kit <sup>®</sup> test		Total
	-	+	
0-0.9	7	0	7
1-1.9	9	2	11
2-2.9	7	5	12
3-3.9	6	4	10
4-4.9	2	3	5
5-9.9	0	18	18
10≤	0	15	15
Total	31	47	78

**Table 2.** Correlation of serum PSA and Rapid PSA Kit<sup>®</sup> test classified according to serum PSA 4.0ng/ml

PSA (ng/ml)	No. pts. with Rapid PSA Kit <sup>®</sup> test		Total
	-	+	
0-4	29	11	40
4≤	2	36	38
Total	31	47	78

Sensitivity of Rapid PSA Kit<sup>®</sup> was 94.7% and specificity was 72.5%

**6. 간편형 전립선특이항원검사 키트<sup>®</sup>의 임상적 평가**

간편형 전립선특이항원검사 키트<sup>®</sup>로 검사한 78례 중 31례에서 양성을 보였다. PSA 1ng/ml 미만에서는 완전 음성을 나타냈다. 그러나 PSA 1ng/ml 이상 2ng/ml 미만에서는 9례 중 2례에서 약양성으로 나타나기 시작했다. PSA 4ng/ml 이상 5ng/ml 미만에서는 5례 중 3례에서 양성으로 나타났으나, PSA 5ng/ml 이상에서는 전례에서 양성으로 나타났다 (Table 1). 전립선특이항원치가 높아질수록 간편형 전립선특이항원검사 키트<sup>®</sup>는 강양성을 나타냈으며, PSA 5ng/ml 이상에서 적색선이 뚜렷하게 나타났다.

전립선암 선별검사의 cutt-off 치인 PSA 4ng/ml을 기준으로 할 때 간편형 전립선특이항원검사 키트<sup>®</sup>의 민감도는 94.7%, 특이도는 72.5%였다 (Table 2).

## 고 찰

국소 전립선암의 치료 중 경과관찰은 치료의 한 방법이 될 수 있으나 근치요법이 아니고, 진행성 전립선암이 되었을 때 완치할 수 있는 치료법은 없다. 또한 치명적인 암도 국소암에서 시작한다는 것을 고려하여 Hugosson 등<sup>9,10</sup>은 전립선암 조기진단의 중요성을 강조하였다. Catalona 등<sup>11</sup>도 전립선특이항원검사로 선별검사를 시행할 경우 진행성 전립선암의 발견율을 57%에서 29%으로 낮출 수 있어, 전립선특이항원 선별검사가 근치적전립선적출술로 완치가 가능한 국소 전립선암의 진단율을 높일 수 있다고 하였다. 그러나 생존율이나, 비용적인 측면, 수술의 위험도, 삶의 질을 고려할 때 국소 전립선암의 치료로 대기요법을 주장하는 일부 의학자<sup>12-14</sup>도 있어 전립선암 선별검사를 노령 남성에서 시행하는 것은 논란의 여지가 있다.

1989년 1년 동안 의료보험 청구건수로 추산한 국내 전립선암 환자 수는 274명이었다.<sup>15</sup> 2,000년도 통계청 사망원인 통계연보에 따른 전립선암으로 사망한 환자 수는 548명이었으며, 대한비뇨기과학회의 전국 수련병원 통계에 따른 전립선암 환자 수는 1,561명으로 국내 전립선암의 발생률은 지난 10여년간 지속적으로 증가한 것을 알 수 있다. 전립선암 발생률이 계속 증가하는 것을 고려할 때, 전립선암 선별검사가 간편하고 저렴하다면 전립선암 선별검사를 보다 광범위하게 시행할 수 있다.

전립선암 선별검사로 직장수지검사, 전립선특이항원검사 등이 주로 쓰인다. Catalona 등<sup>16</sup>은 50세 이상 미국인 남성 6,630명을 대상으로 전립선특이항원검사와 직장수지검사를 시행한 결과, 직장수지검사와 전립선특이항원검사의 전립선암 발견율은 각각 3.2%, 4.6%이었으며 직장수지검사와 전립선특이항원검사를 동시에 시행하였을 경우의 전립선암 발견율은 5.8%였다. 전립선암 양성 예측률은 전립선특이항원검사가 32%, 직장수지검사가 21%였다. 유럽에서 Rietbergen 등<sup>17</sup>이 시행한 연구에서도 전립선암 선별검사로써 직장수지검사, 경직장초음파검사, 전립선특이항원검사를 평가한 결과 전립선특이항원검사가 조기 전립선암 발견율이 가장 높았다. 이러한 결과로 전립선특이항원검사가 전립선암 조기 진단에 가장 유효한 방법이며, 현재 가장 많이 쓰이고 있다.

전립선특이항원치의 정량 검사 비용은 13,340원이다. 반면 간편형 전립선특이항원검사 키트<sup>®</sup>는 보다 저렴한 비용으로 정성검사가 가능하다. 단순히 전립선특이항원치가 증가되어 있는지를 평가하는 선별검사는 시행하기 간단하고, 빠르고, 저렴해야 한다. 간편형 전립선특이항원검사 키트<sup>®</sup>

는 면역크로마토그래피 방법을 사용하기 때문에 특별한 장비가 필요없다.

간편형 전립선특이항원검사 키트<sup>®</sup>의 임상평가에서 전립선특이항원치가 4ng/ml 이상인 환자 38례 중 36례가 양성으로 나와 민감도는 94.7%였으며, 전립선특이항원치가 5ng/ml 이상인 33례 전부에서 양성으로 판정되어 민감도는 우수한 것으로 평가되었다. 반면에 전립선특이항원치가 4ng/ml 이하인 경우에도 40례 중 11례가 양성으로 나타나 위양성률이 27.5%를 보였다. 이러한 위양성률은 시험부위인 T 표시 부위의 적색선이 약하게 나타나도 양성으로 판정한 결과로 보인다.

본 연구진이 국내에서 최초로 개발한 간편형 전립선특이항원검사 키트<sup>®</sup>는 외국에서 개발된 키트<sup>18,19</sup>의 민감도 67-73%, 특이도 87-97%에 비해 민감도와 특이도가 대등하거나 우수한 것으로 보인다.

전립선특이항원치가 4-10ng/ml인 중간대에서 전립선암의 진단율을 높이기 위해 전립선특이항원 밀도 (PSA density),<sup>20</sup> 전립선 특이항원 증가속도 (PSA velocity),<sup>21</sup> 전립선특이항원 연령별 참조범위 (age-specific PSA reference),<sup>22</sup> 유리 전립선특이항원 대 전체 전립선특이항원 비율 (free/total PSA) 등<sup>23</sup>이 이용된다. 간편형 전립선특이항원검사 키트<sup>®</sup>는 정성검사이기 때문에 이러한 수치들을 계산해 낼 수 없다. 그러나 간편형 전립선특이항원 키트<sup>®</sup>는 전혈에서 혈청만 분리하는 것 이외는 특별한 장비가 필요없고, 빠르고 간편하게 현장에서 판독할 수 있기 때문에 전립선암 선별검사로 유용하다. 추후 혈청이 아닌 전혈을 이용하여 더욱 간편한 전립선특이항원감시 키트의 개발이 필요하다.

## 결 론

저자들은 전립선암 선별검사를 위해 개발된 간편형 전립선특이항원검사 키트<sup>®</sup>의 임상 평가 결과 민감도는 94.7%, 특이도는 72.5%였다.

간편형 전립선특이항원검사 키트<sup>®</sup>는 특별한 장비가 필요 없고, 빠르고, 저렴하기 때문에 전립선 선별검사에 유용하다.

## REFERENCES

1. Taylor JD, Holmes TM, Swanson GM. Descriptive epidemiology of prostate cancer in metropolitan Detroit. *Cancer* 1994; 73:1704-7
2. Pyun SS, Cho KS, Seo SI, Oh SJ, Chung JS, Lee SE. The change of clinical characteristics of prostate cancer before and after the introduction of prostatic specific antigen assay. *Ko-*

- rean J Urol 1997;38:270-4
3. Hwang KH, Chung MK. Screening for prostatic cancers in Korean. Korean J Urol 1995;36:1062-70
  4. Kohler G, Milstein C. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 1975;256:495-7
  5. Kohler, Milstein C. Derivation of specific antibody producing tissue, culture and tumor lines by cell fusion. Eur J Immunol 1976;6:511-9
  6. Gretch DR, Suter M, Stinski MF. The use of biotinylated monoclonal antibodies and streptavidin affinity chromatography to isolate herpes virus hydrophobic proteins or glycoproteins. Anal Biochem 1987;163:270-7
  7. Laemmli UK. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970;227:680-5
  8. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoresis of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci USA 1979;76:4350-9
  9. Hugosson J, Aus G. Natural course of localized prostate cancer. a personal view with a review of published papers. Anticancer Res 1997;17:1441-8
  10. Hugosson J, Aus G, Bergdahl C, Bergdahl S. Prostate cancer mortality in patients surviving more than 10 years after diagnosis. J Urol 1995;154:2115-7
  11. Catalona WJ, Smith DS, Ratliff TL, Balsler JW. Detection of organ-confined prostate cancer in increased through prostate-specific antigen-based screening. JAMA 1993;270:948-54
  12. Albertsen PC, Fryback DG, Storer BE, Kolon TF, Fine J. Long-term survival among men with conservatively treated localized prostate cancer. JAMA 1995;274:626-31
  13. Lu-Yao GL, Yao SL. Population-based study of long-term survival in patients with clinically localised prostate cancer. Lancet 1997;349:906-10
  14. Fowler FJ Jr, Barry MJ, Lu-Yao G, Wasson J, Roman A, Wennberg J. Effect of radical prostatectomy for prostate cancer on patient quality of life: results from a Medicare survey. Urology 1995;45:1007-13
  15. Lee C, Lee ES, Choi H, Koh SK, Lee JM, Chai SE, et al. Incidence estimation of genitourinary cancer in Korea. J Kor Med Science 1992;7:154-61
  16. Catalona WJ, Richie JP, Ahmann FR, Hudson MA, Scardino PT, Flanigan RC, et al. Comparison of digital rectal examination and serum prostate specific antigen in the early detection of prostate cancer: results of a multicenter clinical trial of 6,630 men. J Urol 1994;151:1283-60
  17. Rietbergen JB, Kransse R, Kirkels WJ, De Koning HJ, Schroder FH. Evaluation of prostate-specific antigen, digital rectal examination and transrectal ultrasonography in population-based screening for prostate cancer: improving the efficiency of early detection. Br J Urol 1997;79 Suppl 2:57-63
  18. Jung K, Zachow J, Lein M, Brux B, Sinha P, Lenk S, et al. Rapid detection of elevated prostate-specific antigen levels in blood: performance of various membrane strip tests compared. Urology 1999;53:155-60
  19. An CD, Yoshiki T, Lee G, Okada Y. Evaluation of a rapid qualitative prostate antigen assay, the One Step PSA<sup>TM</sup> test. Cancer Lett 2001;162:135-9
  20. Benson MC, Whang IS, Olsson CA, McMahon DJ, Cooner WH. The use of prostate specific antigen density to enhance the predictive value of intermediate levels of serum prostate specific antigen. J Urol 1992;147:817-21
  21. Carter HB, Pearson JD, Metter EJ, Brant LJ, Chan DW, Andres R, et al. Longitudinal evaluation of prostate-specific antigen levels in men with and without prostate disease. JAMA 1992; 267:2215-20
  22. Oesterling JE, Jacobsen SJ, Chute CG, Guess HA, Girman CJ, Panser LA, et al. Serum prostate-specific antigen in a community-based population of healthy men. establishment of age-specific reference ranges. JAMA 1993;270:860-4
  23. Christensson A, Bjork T, Nilsson O, Dahlen U, Matikainen MT, Cockett AT, et al. Serum prostate specific antigen complexed to alpha 1-antichymotrypsin as an indicator of prostate cancer. J Urol 1993;150:100-5