口腔扁平上皮癌の臨床的, 免疫組織学的検討
——癌胎児性抗原, 上皮膜抗原について——

原田 猛・篠原正徳・嶋田 誠
中村誠司・岡 増一郎

Clinico-pathological and immunohistochemical study of
carcinoembryonic antigen and epithelial membrane antigen
in squamous cell carcinoma of the oral cavity

Takeshi HARADA · Masanori SHINOHARA · Makoto SHIMADA
Seiji NAKAMURA · Masuichiro OKA

Abstract: We studied 74 cases of squamous cell carcinoma in the oral cavity, clinico-pathologically and immunohistochemically. Of the 74 cases, primary cervical lymph node metastasis was observed in 19 cases and secondary cervical lymph node metastasis in 8 cases. The materials were obtained before the treatment, fixed in 10% formalin or 2% PLP and embedded in paraffin. Immunostaining of carcinoembryonic antigen (CEA) and epithelial membrane antigen (EMA) was performed by the avidin-biotin peroxidase complex (ABC) method with monoclonal mouse anti-human CEA antibody and anti-human EMA antibody respectively. CEA- and EMA-positive stainings were graded as "slight": less than 25%, "moderate": 25-75%, "marked": more than 75%, judging by stained area in the 100X field.

The results showed that the grade of CEA and EMA staining correlated with the degree of epithelial differentiation of the tumor, although EMA was more sensitive marker than CEA. In addition, high frequency of "marked" CEA and EMA expression in no cervical lymph node metastatic cases was observed significantly. However, there was no significant relation between the grade of CEA and EMA stainings and the presence of cervical lymph node metastasis as a whole. Thus, by examining these factors, we were unable to satisfactorily predict the presence of cervical lymph node metastasis.

Key words: squamous cell carcinoma (扁平上皮癌), carcinoembryonic antigen (癌胎児性抗原), epithelial membrane antigen (上皮膜抗原)

緒 言

癌胎児性抗原(Carcinoembryonic antigen, CEA)は, Goldら¹⁾によって発見された分子量約180,000の glyco-

protein で, 当初は癌特異抗原として注目された. しかしその後の研究の結果, 正常組織においても CEA の存在が認められることがわかり, 現在では癌特異的というよりはむしろ癌組織に量的に多く存在する抗原と考えられている²⁾. 臨床的には, 頭頸部癌³⁾, 胃癌⁴⁾, 乳癌⁵⁾, 子宮癌⁶⁾, 大腸癌⁷⁾などで血清学的に治療効果や予後を判定するのに有用であることが認められている.

一方, 上皮膜抗原 (Epithelial membrane antigen, EMA) は Heyderman ら⁸⁾によって human milk fat globule membrane から単離された分子量 265,000~400,000 の glycoprotein で, 正常組織から腫瘍組織ま

九州大学歯学部口腔外科学第2講座
(主任: 岡 増一郎教授)

Second Department of Oral Surgery, Faculty of
Dentistry, Kyushu University (Chief: Prof. Masuichiro Oka)

受付日: 平成3年4月16日

表 1 検索症例

部 位	男 性	女 性	計
舌	18(6)	9(1)	27(7)
下顎歯肉	14(7)	3(1)	17(8)
上顎歯肉	4(2)	2(0)	6(2)
口底	11(6)	3(1)	14(7)
頬粘膜	5(1)	3(2)	8(3)
下唇	0(0)	1(0)	1(0)
軟口蓋	1(0)	0(0)	1(0)
計	53(22)	21(5)	74(27)

() : 転移症例

で広く分布することが知られている⁹⁾。免疫組織学的には、腫瘍の発生源の同定や micrometastasis の有無の判定に有用であることが認められている^{10~12)}

一般に CEA, EMA とともに上皮性腫瘍のマーカーとされ¹³⁾、それらの抗体を用いた各臓器における免疫組織学的検索は数多くみられるが、口腔扁平上皮癌の原発巣における病理組織学的分化度との関連、さらに頸部リンパ節における様相まで言及した報告は少ない。そこでわれわれは、これらについて臨床的、病理組織学的、免疫組織学的に観察し、それらが口腔扁平上皮癌において診断や予後を知るうえで有用であるか否かを検討した。

材 料 と 方 法

対象は、昭和60年から平成2年までに当科で治療を行った口腔扁平上皮癌一次症例で男性53例、女性21例の計74例であった。部位は舌27例、下顎歯肉17例、上顎歯肉6例、口底14例、頬粘膜8例、下唇・軟口蓋がそれぞれ1例であった。このうち、初診時に頸部リンパ節に転移を認めた症例（一次転移症例）は19例、初診時には頸部リンパ節に転移を認めなかったが、後に転移を認めた症例（後発転移症例）が8例であった（表1）。

免疫組織学的検索は、10%ホルマリン、または2%PLP 固定後¹⁴⁾パラフィン包埋した治療前生検組織、あるいは未治療切除組織を用いた。これより4μm 切片を作成し、脱パラフィン後、通常のHematoxylin and Eosin 染色、およびABC 法（Vectastain ABC kit）による免疫組織染色を行った。一次抗体には、モノクローナルマウス抗ヒト CEA 抗体（BioGenex Lab.）、モノクローナルマウス抗ヒト EMA 抗体（Dako）を使用した。なおコントロールには、マウス正常血清、あるいは PBS を用い、全例陰性であった（表2）。

鏡検に際しては、100 倍の光顕視野下で腫瘍部の75%以上に CEA, EMA 陽性を示したものを＋、腫瘍部の25~75%に陽性を示したものを＋、25%未満の陽性しか

表 2 免疫組織染色方法

1. 10%ホルマリン、2% PLP 固定（生検、未治療切除組織）
 2. 4μm 連続切片作製
 3. 脱パラフィン
 4. 内因性 peroxidase activity の blocking
(0.3% H_2O_2 加 50%methanol, 30 min.)
 5. 非特異的反応の blocking
(10%正常血清, 30 min.)
 6. 一次抗体反応 (室温, 30 min.)
 7. ビオチン化二次抗体反応 (室温, 30 min.)
 8. 酵素試薬反応 (ABC complex, 室温, 1 hour)
 9. AEC, DAB による発色
 10. Mayer のヘマトキシリンによる核染
 11. 封入

* コントロール：マウス正常血清、PBS

示さなかったものを－として評価した。また統計学的検定はカイ二乗検定にて行った。

結 果

1. CEA, EMA の陽性程度について

CEA は正常上皮～異型上皮内においては、錯角化層の下層から有棘細胞層にかけて細胞質内に弱陽性の所見を呈した（写真1）。原発腫瘍においては、分化の良い胞巣の角化層の中心部からその周囲、および細胞内角化の認められる細胞質内に強陽性を呈し（写真2）、低分化な部位、あるいは細胞内角化の認められない部位ではほとんど陰性であった（写真3）。転移リンパ節内では、原発腫瘍とはほぼ同様に腫瘍細胞の分化、あるいは角化が良好な部位に（EA 陽性を呈した（写真4）。

一方EMA は、正常上皮～異型上皮内、原発腫瘍、転移リンパ節内において CEA と似た分布を示したが、細胞質内に陽性を示すものと（写真5）、desmosome 様の陽性を示すものが認められた（写真6）。なお腫瘍間質において plasma cell に陽性が観察されたが、一定の傾向は認められなかった（写真7）。

腫瘍発生部位別による染色性の違いでは、CEA, EMA とともに差異は認められなかった。ただ、それぞれの同一部位での染色性を比較すると、統計学的な有意差は認められなかったもののEMAの方が鋭敏な染色性を示す傾向がうかがえた。

2. CEA, EMA の陽性程度と原発腫瘍の病理組織学的分化度との比較について

原発巣の病理組織学的分化度の指標として Willén¹⁵⁾、花沢¹⁶⁾の分類を用い、CEA および EMA の陽性程度と比較した。その結果、非転移症例、転移症例、および転

表 3 Willén, 花沢らの分化度評価と CEA の陽性
程度の比較
—非転移症例, 転移症例—

分化度	CEA 陽性程度			計
	±	+	++	
1	2	6	7	15
2	5	15	14	34
3	7	10	4	21
4	4	0	0	4
計	18	31	25	74

$P < 0.01$

表 4 Willén, 花沢らの分化度評価と EMA の陽性
程度の比較
—非転移症例, 転移症例—

分化度	EMA 陽性程度			計
	±	+	++	
1	2	5	7	14
2	0	9	26	35
3	7	3	11	21
4	1	2	1	4
計	10	19	45	74

$P < 0.05$

表 5 Willén, 花沢らの分化度評価と CEA の陽性
程度の比較
—非転移症例—

分化度	CEA 陽性程度			計
	±	+	++	
1	1	4	3	8
2	2	10	12	24
3	6	3	4	13
4	2	0	0	2
計	11	17	19	47

$P < 0.05$

移巣において, CEA, EMA とともに腫瘍の分化度が良いものほど強陽性を呈し, 分化度が悪くなればなるほど弱陽性～陰性となる傾向が認められ, 両者の間には統計学的有意差が認められた (CEA: $P = 0.01$, EMA: $P < 0.05$) (表 3, 4)。

表 6 Willén, 花沢らの分化度評価と EMA の陽性
程度の比較
—非転移症例—

分化度	EMA 陽性程度			計
	±	+	++	
1	1	3	3	7
2	0	4	21	25
3	4	2	7	13
4	1	0	1	2
計	6	9	32	47

$P < 0.05$

表 7 Willén, 花沢らの分化度評価と CEA の陽性
程度の比較
—転移症例—

分化度	CEA 陽性程度			計
	±	+	++	
1	1	2	4	7
2	3	5	2	10
3	1	7	0	8
4	2	0	0	2
計	7	14	6	27

$P < 0.05$

表 8 Willén, 花沢らの分化度評価と EMA の陽性
程度の比較
—転移症例—

分化度	EMA 陽性程度			計
	±	+	++	
1	1	2	4	7
2	0	5	5	10
3	3	1	4	8
4	0	2	0	2
計	4	10	13	27

$P = 0.05$

3. CEA, EMA の陽性程度と頸部リンパ節転移との比較について

CEA, EMA とともに, 頸部リンパ節転移頻度との関連については統計学的有意差は認められなかった。しかし, 強陽性 (++) を呈した症例についてみると, CEA では非転移症例 47 例中 19 例 (40.4%) (表 5), 転移症例 27 例中 6 例 (22.2%) (表 7), リンパ節内転移巣症例 21

表 9 原発巣における Willén, 花沢らの分化度評価と転移巣における CEA の陽性程度の比較

原発巣の 分化度	転移巣での CEA 陽性程度			計
	±	+	++	
1	0	5	0	5
2	1	5	3	9
3	4	1	1	6
4	1	0	0	1
計	6	11	4	21

P<0.01

例中 4 例 (19.0%) (表 9), EMA では非転移症例 47 例中 32 例 (68.1%) (表 6), 転移症例 27 例中 13 例 (48.1%) (表 8), リンパ節内転移症例 21 例中 7 例 (33.3%) (表 10) で, 転移症例およびリンパ節内転移巣症例に比較すると, 非転移症例において強陽性を示す頻度が高かった。

考 察

CEA, EMA の各臓器における免疫組織学的な検索は数多くみられ, われわれも口腔領域の扁平上皮癌についてその有用性を検討した。

現在 CEA には分子量, 糖含量の違う NCA (non-specific cross-reacting antigen), BGP (biliary glycoprotein) などの CEA related antigen の存在が知られており¹⁷⁾, 交叉反応を示すことから, CEA を免疫組織学的に観察しようとする際には常にそれらのことを念頭にしておかねばならない。この点について植野¹⁸⁾や藤崎¹⁹⁾らは, NCA 吸収済み抗 CEA 抗体と未処置抗 CEA 血清を用いて検討した結果, 前者の方が後者に比較すると染色性が低下したが, 異型上皮～扁平上皮癌においてはその陽性部位に違いは認められなかったと報告している。さらに吉成²⁰⁾, Tsutsumi ら²¹⁾ は, モノクローナル抗 CEA 抗体と抗 NCA 抗体との染色性の違いに言及し, 正常上皮内における角化層, 間質における好中球などを除けば陽性部位に差が認められず, この点からモノクローナル抗 CEA 抗体の有用性を示唆している。われわれはこれらのことを考慮して, 非特異的反応と思われる陽性部位は除外して観察した。その結果 CEA については Willén, 花沢らの分類による病理組織学的分化度と相関性が認められ, CEA の検索が分化度判定の指標となりうるという過去の報告^{3,4,7)}を支持する結果であった。

また篠原²²⁾は, 転移リンパ節における腫瘍の浸潤様式は原発巣と相関性が認められることを報告し, リンパ

表 10 原発巣における Willén, 花沢らの分化度評価と転移巣における EMA の陽性程度の比較

原発巣の 分化度	転移巣での EMA 陽性程度			計
	±	+	++	
1	0	3	2	5
2	1	5	3	9
3	3	1	2	6
4	0	1	0	1
計	4	10	7	21

P>0.05

節内の転移腫瘍部でも原発巣の性格が反映されていると述べている。今回の結果でも, CEA の陽性程度は原発腫瘍と転移巣は類似し, 同程度の分化傾向をなしていることが示唆された。また頸部リンパ節転移と CEA の発現との関係は, CEA 強陽性を示す頻度が非転移症例の原発巣に比較して, 転移症例の原発巣, あるいは頸部リンパ節転移症例の転移巣で少なくなっていた。しかし CEA の陽性程度から頸部リンパ節転移を起こすか否かの予想は難しく, 予測因子となりうるとは考えられなかった。これらのことを総合すると, CEA 染色動態は癌特異的というよりはむしろ正常組織に比較し, 単に癌組織で量的に多く存在していることを表現しているにすぎないと考えられた。

一方 EMA は, Willén, 花沢らの分類による病理組織学的分化度との比較では, CEA と同様に両者間に統計学的有意差が認められた。また転移リンパ節内における EMA の陽性程度も CEA と大差なかった。しかし, CEA に比較すると EMA はより鋭敏な染色性を呈していた。また EMA 強陽性を呈する頻度については, 転移症例の原発巣, 頸部リンパ節転移巣に比較して非転移症例の原発巣の方が高かった。しかしながら, これらの所見を総合して考えても, Pinkus ら¹¹⁾のいうように上皮の分化の指標に対するマーカーとしては優秀でも EMA の陽性程度から頸部リンパ節転移を予想しうるとは考えられず, CEA と同様に EMA が転移能の予測因子になりうるとは考えられなかった。

結 語

- 1. CEA, EMA とともに Willén, 花沢らの分類による病理組織学的分化度と相関性を示した。
- 2. EMA は CEA に比較すると, より鋭敏な上皮分化の marker となりうると思われた。
- 3. CEA, EMA 強陽性を呈する頻度は, 転移症例, 頸部リンパ節転移巣症例に比較して, 非転移症例におい

て高かった,

4. CEA, EMA とともに頸部リンパ節転移を予測する因子にはなり得なかった.

引用文献

- 1) Gold, P. and Freedman, S.O.: Demonstration of tumor-specific antigens in human colonic carcinoma by immunological tolerance and absorption techniques. *J Exp Med* 121: 439-462 1965.
- 2) Huitric, E., Laumonier, R., et al.: An optimal and ultrastructural study of the localization of carcinoembryonic antigen in normal and cancerous human rectocolonic mucosa. *Lab Invest* 34: 97-107 1976.
- 3) Yanagawa, T., Hayashi, Y., et al.: Immunohistochemical demonstration of carcinoembryonic antigen on tissue sections from squamous cell head and neck cancer and plasma CEA levels of the patients. *Int J Oral Maxillofac Surg* 15: 296-306 1986.
- 4) Mori, M., Ambe, K., et al.: Prognostic value of immunohistochemically identified CEA, SC, and S-100 protein-positive cells in gastric carcinoma. *Cancer* 62: 534-540 1988.
- 5) Mansour, E.G., Hastert, M., et al.: Tissue and plasma carcinoembryonic antigen in early breast cancer, a prognostic factor. *Cancer* 51: 1243-1248 1983.
- 6) 横山 隆, 金子久恵, 他: 免疫組織学的 CEA 産生子宮頸癌の一例: 子宮癌201例の血中 CEA 値の検索. *癌臨* 33: 975-980 1987.
- 7) Hamada, Y., Yamamura, M., et al.: Immunohistochemical study of carcinoembryonic antigen in patients with colorectal cancer. *Cancer* 55: 136-141 1985.
- 8) Heyderman, E., Steele, K., et al.: A new antigen on the epithelial membrane: Its immunoperoxidase localization in normal and neoplastic tissues. *J Immunol Suppl* 32: 35-39 1979.
- 9) Sloan, J.P. and Ormerod, M.G.: Distribution of epithelial membrane antigen in normal and neoplastic tissues and its value in diagnostic tumor pathology. *Cancer* 47: 1786-1795 1981.
- 10) Sloan, J.P., Hughes, F., et al.: An assessment of the value of epithelial membrane antigen and other epithelial markers in solving diagnostic problems in tumor histopathology. *Histochem J* 15: 645-654 1983.
- 11) Pinkus, G.S. and Kurtin, P.J.: Epithelial membrane antigen-A diagnostic discriminant in surgical pathology: Immunohistochemical profile in epithelial, mesenchymal, and hematopoietic neoplasms using paraffin sections and monoclonal antibodies. *Hum Pathol* 16: 929-940 1985.
- 12) Fernandez, B., Lund, J., et al.: Epithelial membrane antigen expression in benign and malignant squamous epithelium of the head and neck. *Otolaryngol Head Neck Surg* 97: 288-294 1987.
- 13) Seifert, G., and Hubner, K.: Pathology of cell receptors and tumor markers. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1987, p 24-45.
- 14) McLean, I.W. and Nakane, P.K.: Periodate-lysine-paraformaldehyde fixative: A new fixative for immunoelectron microscopy. *J Histochem Cytochem* 22: 1077-1083 1974.
- 15) Willén, R., Nathanson, A., et al.: Squamous cell carcinoma of the gingiva. Histological classification and grading of malignancy. *Acta Otolaryngol* 79: 146-154 1975.
- 16) 花沢 秀: 舌癌における組織学的悪性度 (Willén 分類変法) と頸部リンパ節転移との関連性. *日癌治* 21: 34-41 1986.
- 17) 黒木 求, 松岡雄治: 癌胎児性抗原 CEA, 病理と臨床 8(腫瘍マーカーの新展開): 32-59 1990.
- 18) 植野 茂, 阪本貴司, 他: 口腔扁平上皮癌の免疫組織学的研究—CEA の局在について—, *口科誌* 38: 187-197 1989.
- 19) 藤崎 誠: 口腔扁平上皮癌における病理組織学的所見と予後に関する臨床的研究—免疫組織学的検索を加えて—, *日口外誌* 36: 343-357 1990.
- 20) 吉成美子, 佃 富夫, 他: 扁平上皮癌の免疫組織学的研究—CEA, SC, IgA について—, *口科誌* 36: 602-612 1987.
- 21) Tsutsumi, Y., Onoda, N., et al.: Immunohistochemical demonstration of nonspecific cross-reacting antigen in normal and neoplastic human tissues using a monoclonal antibody. *Acta Pathol Jpn* 40: 85-97 1990.
- 22) 篠原正徳, 嶋田 誠, 他: 口腔癌の頸部リンパ節転移に関する臨床的・病理組織学的検討. *頭頸部腫瘍* 16: 113-118 1990.

写真説明

- 写真1** 正常～異型上皮内における錯角化層から有棘細胞層の CEA 陽性所見 (×200).
- 写真2** 原発巣の高分化な胞巣における角化層中心部からその周囲に認められる CEA 陽性所見 (×100).
- 写真3** 原発巣の低分化な部位における CEA 陰性所見 (×200).
- 写真4** 転移リンパ節内の分化，角化良好な部位における CEA 陽性所見 (×100).
- 写真5** 原発巣の細胞質内における EMA 陽性所見 (×200).
- 写真6** 異型上皮における desmosome 様の EMA 陽性所見 (×200).
- 写真7** 腫瘍間質の plasma cell における EMA 陽性所見 (×400).

写真 1 ～ 7