原 著

電顕酵素抗体法による CEA の細胞組織学的検討

——子宮頸部・体部腺癌の鑑別を中心として——

癌研究会附属病院婦人科¹⁾, 東海大学医学部病理学教室²⁾福田 耕一¹⁾ 秦 宏樹¹⁾ 佐竹 公一¹⁾増淵 一正¹⁾ 長村 義之²⁾ 渡辺 慶一²⁾

前回の Hata の報告²⁾では酵素抗体法間接法を用い、婦人科悪性腫瘍における CEA の局在を光顕レベルで観察し、その臨床細胞学的意義を明らかにしたわけであるが、今回は酵素抗体法直接法を用いることで電顕レベルでの CEA の局在を観察した。PLP (Periodate Lysine Paraformaldehyde) 固定の組織標本、捺印細胞標本を用い子宮頸部腺癌と体部腺癌の免疫細胞化学的鑑別を中心に CEA の局在を観察したわけであるが、同時に頸部扁平上皮癌における CEA の局在もあわせて観察した。

組織学的に光顕レベルでの観察では頸部腺癌においては腫瘍組織にびまん性に CEA 陽性部位が観察されたのに対し、体部腺癌では変性部位や化生部位に局限して CEA 陽性部位が観察された。このことから電顕レベルで腫瘍細胞のどこに CEA 陽性部位、すなわち CEA の局在を認めうるかというのが、今回のおもな研究目的であった。すなわち体部腺癌では腫瘍細胞の microvilli を中心とした apical portion にのみ CEA 陽性部位を観察したのに対し、頸部腺癌では apical portion のみならず、細胞の baso-lateral membrane を含め全周性に CEA 陽性部位を観察できた。このことより超微形態学的に頸部腺癌と体部腺癌の両者の CEA 局在の相違を明らかにし両者の免疫細胞化学的鑑別を可能とした。また頸部扁平上皮癌では細胞膜の全周性に、また perinuclear space, それに細胞質の vesicle にも CEA を観察できた。

Key words : Uterine cancer—CEA—Ultrastructural immunoperoxidase staining—Differential diagnosis—Adenocarcinoma of cervix and endometrium

I. 緒 言

一般的上皮性腫瘍マーカーの代表的存在として知られている CEA (Carcinoembryonic antigen) の免疫組織化学的研究は近年多くのものをみている。特に大腸癌、

乳癌、膀胱癌、子宮癌などにおいてその報告が多い。今回、癌研究会附属病院婦人科において入院治療した子宮癌患者より採取した組織標本、細胞標本を用い、酵素抗体法直接法により超微形態学的に CEA を検出し、特に細胞学的に CEA 局在の相違から頸部腺癌、体部腺癌の鑑別を試みた。

Ultrastructural localization of carcinoembryonic antigen (CEA) in uterine cancer—Differential diagnosis between cervical adenocarcinoma and endometrial adenocarcinoma—

Koichi FUKUDA¹⁾, M.D., Hiroki HATA¹⁾, M.D., Kazumasa MASUBUCHI¹⁾, M.D., F.I.A.C. (hon), Koichi SATAKE¹⁾, C.T., J.S.C., Yoshiyuku OSAMURA¹⁾, M.D., Keiichi WATANABE²⁾, M.D.

¹⁾ Department of Gynecology, Cancer Institute Hospital, Tokyo 170, Japan

²⁾ Department of Pathology, Tokai University School of Medicine, Kanagawa 259-11, Japan

論文別刷請求先 ☎170 東京都豊島区上池袋1の37の1
癌研究会附属病院婦人科 福田耕一

昭和60年6月19日受付

昭和60年8月8日受理

Table 1 Peroxidase labeled antibody method
(The direct method)

Histological, Cytological specimens	
↓	
Fixation (PLP solution)	4 hrs
↓	
Washing 1) 10% Sucrose added PBS	4 hrs
2) 15% Sucrose added PBS	4 hrs
3) 20% Sucrose added PBS	4 hrs
↓	
Inactivation for Endogenous Peroxidase	
↓	
Inactivation for non-specific binding protein incubate in 10% normal rabbit serum	
↓	
The antibody incubate over night HRP labeled antihuman CEA rabbit IgG Fab	
↓	
Fixation (1% Glutaraldehyde)	20 min.
↓	
Incubation (DAB solution)	30 min.
(DAB-H ₂ O ₂ solution)	5 min.
↓	
Fixation (2% OsO ₄)	45 min.
↓	
Electronmicroscopic observation	

II. 材料および方法

材 料

1) 病理組織標本

- 子宮頸部扁平上皮癌 5例
- 子宮頸部腺癌 5例
- 子宮体部腺癌 4例 (G₁ 1例, G₂ 3例)

2) 捺印細胞標本

- 子宮頸部扁平上皮癌 8例
- 子宮頸部腺癌 3例
- 子宮体部腺癌 6例 (G₁ 2例, G₂ 4例)

頸部扁平上皮癌は全例 large cell non-keratinizing type (WHO 分類) であり、頸部腺癌は全例 endocervical type, well differentiated adenocarcinoma であった。また体部腺癌では CEA 陽性を呈した G₁, G₂ 症例のみが観察の対象となった。

固定方法

病理組織標本、捺印細胞標本ともに PLP (Periodate Lysine Paraformaldehyde) 固定液を用いた。

抗体および免疫酵素抗体法^{3,4)} (Enzyme-labeled antibody method-Nakane)

Table 2 Positive rate for CEA using
immunoperoxidase staining

	Histological specimens	Cytological specimens
EC. Adeno. Ca.	28/30 (93.3%)	9/9 (100%)
EM. Adeno. Ca.	12/27 (44.4%)	12/20 (60%)
Sq. cell Ca.	7/7 (100%)	7/7 (100%)

直接法の抗体は Horseradish Peroxidase (HRP) を標識した Antihuman CEA rabbit IgG Fab (DAKO 社製) をヒト脾乾燥粉末で吸収し 1% BSA 加 PBS で 25 倍に希釈したものを用いた。すなわち分子量を小さくすることで細胞内への標識抗体の浸透を計った。反応手順は Table 1 に示すごとくで PLP 固定した標本を 10, 15, 20% の Sucrose で洗浄し、内因性 peroxidase を 6mM 過ヨウ素酸でブロックしたのち、10% 正常家兎血清のなかで非特異的結合蛋白を非活性化した。その後、HRP を標識した Antihuman CEA rabbit IgG Fab を over night incubation した。反応後は 1% Glutaraldehyde で再固定したのち、DAB-H₂O₂ 液にて発色させ、さらに 2% Os O₄ にて後固定し、アルコール脱水、エポン樹脂包埋ののち、超薄切切片を作成し電顕観察を行った。なお negative control としては Peroxidase labeled normal rabbit IgG Fab を 1% BSA 加 PBS で 25 倍に希釈して用いた。

III. 結 果

従来よりの研究成績を含めた酵素抗体法間接法による頸部腺癌、体部腺癌、頸部扁平上皮癌における組織標本、ならびに細胞標本の CEA 陽性率を Table 2 に示した。頸部扁平上皮癌は細胞、組織標本ともに陽性率 100%、ついで頸部腺癌では組織標本で 93.3%、細胞標本で 100% の陽性率を示しているが、体部腺癌では組織標本で 44.4%、細胞標本で 60% とその陽性率は前二者と比較して低い数値を示した。

酵素抗体法直接法を用い超微形態学的観察を行った結果、まず頸部腺癌において組織切片を用いた観察では microvilli から cytoplasmic membrane 全周性に CEA 陽性部位が観察された (Fig. 1)。また頸部腺癌の細胞標本では組織標本同様に microvilli を中心とした apical portion をはじめ、baso-lateral membrane を含んだ cytoplasmic membrane 全周性に CEA の局在が認められた (Fig. 2)。これに対し体部腺癌では microvilli を中心とした apical portion にのみ CEA 陽性部位が観察さ

Fig. 1 Adenocarcinoma of the uterine cervix. The CEA positive area was observed at the microvilli (MV) and baso-lateral (BL) membrane (arrow). PLP fixed tissue specimen ($\times 13,000$)

Fig. 2 Adenocarcinoma of the uterine cervix. The CEA localization was observed at the microvilli (MV) and baso-lateral (BL) membrane (arrow). PLP fixed cytological specimen ($\times 8,500$)

Fig. 3 Adenocarcinoma of the uterine endometrium. The CEA positive area was observed only at the microvilli (MV) but baso-lateral (BL) membrane was negative for CEA (arrow). PLP fixed cytological specimen ($\times 12,000$)

Fig. 4 Squamous cell carcinoma of the uterine cervix. The CEA positive area was observed at perinuclear space (PS) and cytoplasmic membrane (arrow). PLP fixed tissue specimen ($\times 8,300$)

Fig. 5 Squamous cell carcinoma of the uterine cervix. The CEA localization was observed at perinuclear space (PS) and cytoplasmic membrane (arrow). PLP fixed cytological specimen ($\times 7,600$)

Table 3

Histology Authors	Cervical Adeno Ca.	Endometrial Adeno Ca.	Cervical Squamous cell Ca.
Goldenberg (1978)		4/49 (8.2%)	29/75 (38.7%)
Yamasaki (1978)	2/2 (100%)		4/6 (66.7%)
Rutanen (1978)	7/9 (78%)	1/11 (9.1%)	11/14 (79%)
Wahlström (1979)	131/163 (80%)	11/137 (8%)	
Van Nagell (1980)	? (36%)	? (18%)	
Ueda (1983)	10/10 (100%)	0/20 (0%)	
Okudaira (1984)	19/23 (83%)	9/37 (24.3%)	
Fukuda (1985)	28/30 (93.3%)	12/27 (44.4%)	7/7 (100%)

れ, baso-lateral membrane では CEA 陰性であった (Fig. 3). 頸部扁平上皮癌においては組織標本では cytoplasmic membrane 全周性に, また Perinuclear space (PS) に CEA 局在が観察され (Fig. 4), 細胞標本では cytoplasmic membrane 全周性と PS, それに細胞質内の vesicle にも CEA 陽性部位が観察された (Fig. 5).

IV. 考 察

光顕レベルで免疫組織化学的に CEA を検出し, その陽性率で頸部腺癌, 体部腺癌の鑑別診断を試みた報告⁹⁾があり, またそれに対し異議を唱えた報告⁸⁾もある. 確

かに CEA 陽性率は組織学的には頸部腺癌の方が体部腺癌よりも高いということは諸家の報告⁵⁻⁹⁾で一致をみている。参考までに子宮癌における組織標本での CEA 陽性率を組織型別にまとめた諸家の報告^{1,5-10)}を Table 3 に示した。前回のわれわれの報告²⁾でも明らかなように CEA 陽性率のみでは頸部腺癌、体部腺癌の鑑別は困難で、むしろ CEA 陽性部位の相違により両者の鑑別が可能であることを示唆した。すなわち酵素抗体法間接法による場合、組織学的に頸部腺癌では癌組織の apical portion を中心に細胞全体がびまん性に CEA 陽性を呈してきたが、体部腺癌では metaplastic portion, あるいは acanthomatous portion に局限して CEA 陽性を呈してきた。ただし光顕レベルでの細胞標本では体部腺癌においても CEA 陽性率は高く、組織標本の場合と比較し抗 CEA 抗体に対する感受性のよさが考えられた。以上のことより直接法を用いさらに超微形態学的に頸部・体部腺癌の CEA の局在を観察検討する必要があった。

電顕学的に細胞レベルの観察は組織切片の場合と違い癌細胞が個々散々に出現してくる場合も多く CEA 局在の観察に適していた。細胞学的に頸部腺癌では cytoplasmic membrane 全周性に CEA 陽性が観察されたのに対し、体部腺癌では microvilli を中心とした apical portion にのみ陽性部位が観察されたのが特徴的であった。ただし頸部腺癌においては同一症例で cytoplasmic membrane 全周性に CEA 陽性を呈する部位と apical portion にのみ CEA 陽性を呈する部位が混在するのが観察されることもあったが、体部腺癌では全周性に CEA 陽性を呈してきた例はなかった。このことから超微形態学的に、また細胞学的に頸部腺癌、体部腺癌の鑑別診断が CEA の局在様式を観察することで可能となったわけである。ただし今回用いた症例は頸部腺癌は endocervical type, well differentiated adenocarcinoma であり、体部腺癌は高分化型 (G₁)、ならびに中等度分化型 (G₂) であった。また頸部扁平上皮癌 (large cell non-keratinizing type, WHO 分類) では組織標本、細胞標本ともに perinuclear space (PS), cytoplasmic membrane 全周性、それに一部 cytoplasm の vesicle にも CEA 陽性部位が観察されたわけだが、腺癌との局在様式の相違が明らかにされただけで、その臨床細胞学的意義はこれからの研究に待たれる。

V. 結 語

酵素抗体法 (直接法) を用い超微形態学的に子宮癌における CEA の局在を組織、細胞レベルで検出すること

により、その臨床細胞学的意義を明らかにした。すなわち頸部腺癌、体部腺癌における細胞レベルでの CEA の局在様式の相違から両者の鑑別診断を可能とし、また頸部扁平上皮癌においても組織、細胞レベルでの CEA の局在を明らかにした。

本論文の要旨は The 8th International Congress of Cytology (1983 年 6 月, Montréal), 第 21 回日本癌治療学会 (1983 年 10 月, 名古屋市), 第 22 回日本臨床細胞学会秋期大会 (1983 年 11 月, 長崎市), The 2nd International Congress on Human Tumor Markers (1984 年 2 月, Vienna), 第 25 回日本臨床細胞学会総会 (1984 年 5 月, 千葉市), 第 43 回日本癌学会総会 (1984 年 11 月, 福岡市) において発表した。

Summary

The ultrastructural immunocytochemical technique using peroxidase-labeled CEA antibody was applied for the localization of carcinoembryonic antigen (CEA) on PLP fixed tissue specimens and imprinted smears taken from surgically removed uterus. Tissues were obtained from 5 cases of cervical squamous cell carcinoma, five were from cervical adenocarcinoma and four were from endometrial adenocarcinoma. Smears were also taken from 8 cases of cervical squamous cell carcinoma, three were from cervical adenocarcinoma and six were from endometrial adenocarcinoma.

Cervical adenocarcinoma had different staining pattern for CEA from endometrial adenocarcinoma in cytological specimens ultrastructurally. The former showed CEA localization not only at apical portion but also at baso-lateral membrane of the cell, but the latter showed it only at apical portion of the cell. That suggested the possibility of the differential diagnosis between cervical adenocarcinoma and endometrial adenocarcinoma using immunocytochemical technique.

Cervical squamous cell carcinoma had different CEA distribution from adenocarcinoma of the cervix and the endometrium, that showed CEA localization at perinuclear space (PS) and entire cytoplasmic membrane of the cell.

文 献

- 1) Goldenberg, M., Sharkey, R.M., Primus, F.J.: Immunocytochemical detection of carcinoembryonic antigen in conventional histopathology specimens, *Cancer*, 42: 1546~1553, 1978.

- 2) Hata, H., Fukuda, K., Satake, K., et al. : Cytochemical & histochemical study on carcinoembryonic antigen (CEA) using immunoperoxidase technique in gynecological malignancies, *J. Jpn. Soc. Clin. Cytol.*, 23 : 111~117, 1984.
 - 3) Nakane, P.K., Ram., J.S., Pierce, G.B. : Enzyme-labeled antibodies for light and electron microscopic localization of antigens, *J. Histochem. Cytochem.*, 14 : 789~794, 1966.
 - 4) Nakane, P.K. : Recent progress in peroxidase-labeled antibody method, *Ann N.Y. Acad. Sci.*, 254 : 203~211, 1975.
 - 5) Okudaira, Y., Ohtsuru, Y., Matsui, Y., et al. : Immunohistochemical demonstration of carcinoembryonic antigen and ultrastructural features of the endometrial adenocarcinoma, *Acta Obst. Gynaec. Jpn.*, 36 : 173~181, 1984.
 - 6) Rutanen, E.M., Lindgren, J., Sipponen, P., et al. : Carcinoembryonic antigen in malignant and nonmalignant gynecologic tumors, *Cancer*, 42 : 581~590, 1978.
 - 7) Ueda, S., Tsubura, A., Izumi, H., et al. : Immunohistochemical studies on carcinoembryonic antigen in adenocarcinomas of the uterus, *Acta Pathol. Jpn.*, 33 : 59~69, 1983.
 - 8) Van Nagell, J.R. Jr., Goldenberg, D.M. : Carcinoembryonic antigen staining of endometrial and endocervical carcinomas, *The lancet*, January 26 : 213, 1980.
 - 9) Wahlström, T., Lindgren, J., Korhonen, M., et al. : Distinction between endocervical and endometrial adenocarcinoma with immunoperoxidase staining of carcinoembryonic antigen in routine histological tissue specimens, *The lancet*, December 1 : 1159~1161, 1979.
 - 10) Yamasaki, M., Ueda, G., Sato, Y., et al. : Immunohistological study of carcinoembryonic antigen (CEA) in cervical carcinomas, *Acta Obst. Gynaec. Jpn.*, 30 : 345~348, 1978.
-