原 著

モノクローナル抗体 Ber-EP 4 (“epithelial antigen”) の体腔液細胞診への応用

東海大学病院病理診断科¹⁾, 同 産婦人科²⁾

伊藤 仁¹⁾ 篠田 玲子¹⁾ 赤塚 由子¹⁾ 堀 貞明¹⁾
堤 寛¹⁾ 長村 義之¹⁾ 平菌 賢一²⁾ 篠塚 孝男²⁾
藤井 明和²⁾

体腔液中に出現する癌細胞と中皮細胞を鑑別するためにモノクローナル抗体 Ber-EP 4 を用いてその有用性について検討し、同時に CEA についても行い比較検討した。その結果、Ber-EP 4 は中皮細胞では陰性で、癌細胞では陽性を示した。また卵巢癌症例を除いた癌症例 29 例の体腔液を用いた検討では、Ber-EP 4 の陽性率は 48% で、CEA における 76% よりも低い結果を示した。しかし卵巢癌例の場合、Ber-EP 4 の陽性率は高く、卵巢癌患者 29 例の体腔液を用いた検討では、Ber-EP 4 は 93% の陽性率を示した。また卵巢癌組織 46 例のパラフィン切片を用いた検討では、Ber-EP 4 は 87% の陽性率を示し、同時に行った CEA における 20% よりも著明に高かった。これらの結果より Ber-EP 4 は中皮細胞と癌細胞の鑑別に有用であり、特に卵巢癌で高い陽性率を示すため、体腔液中の卵巢癌細胞と中皮細胞の鑑別には有用であることが示唆された。

Key words : Body fluid—Immunocytochemistry—Ber-EP 4—Carcinoembryonic antigen—Ovarian cancer

I. はじめに

これまでわれわれは免疫細胞化学的手法を体腔液細胞診に応用し中皮細胞と癌細胞の鑑別には CEA が有用であると報告してきた⁹⁾。しかし検出する癌細胞が

胃癌、大腸癌などのように CEA の陽性率が高い場合は有用であるが、CEA の陽性率が低い場合は、中皮細胞との鑑別に CEA は期待できない。たとえば卵巢の漿液性嚢胞腺癌の CEA 陽性率は 9~46% と比較的低く^{4,8)}、われわれの経験では漿液性嚢胞腺癌細胞と中皮細胞の鑑別に CEA が有用であったことは少ない。また漿液性嚢胞腺癌は通常 CA 125 がマーカーとなるが、体腔液中では、CA 125 は中皮細胞も陽性を示すため鑑別診断には用いることはできない⁵⁾。

そこで今回われわれは、ほとんどの上皮細胞と反応し中皮細胞とは反応しないといわれるモノクローナル抗体 Ber-EP 4 を用いて⁶⁾、体腔液中に出現する種々の癌細胞と中皮細胞の鑑別、特に CEA の陽性率が低い卵巢の漿液性嚢胞腺癌細胞と中皮細胞の鑑別を中心に、その有用性について免疫細胞化学的に検討を行った。また同時に CEA についての検索をし、Ber-EP 4 との比較検討を行い、卵巢癌組織における Ber-EP 4

Application of monoclonal antibody Ber-EP 4 to body fluid cytology

Hitoshi ITOH¹⁾, C.T., I.A.C., Reiko SHINODA¹⁾, C.T., I.A.C., Yuko AKATSUKA¹⁾, C.T., I.A.C., Sadaaki HORI¹⁾, M.T., Yutaka TSUTSUMI¹⁾, M.D., Yoshiyuki OSAMURA¹⁾, M.D., F.I.A.C., Kenichi HIRAZONO²⁾, M.D., Takao SHINOZUKA²⁾, M.D., Akikazu FUJII²⁾, M.D.

¹⁾Division of Diagnostic Pathology, ²⁾Department Obstetrics and Gynecology, Tokai University Hospital, Isehara, Kanagawa

論文別刷請求先 ☎ 259-11 神奈川県伊勢原市望星台 東海大学病院病理診断科 伊藤 仁

平成 4 年 1 月 29 日受付

平成 4 年 4 月 17 日受理

の局在については免疫電顕的観察も行った。

II. 材 料

体腔液：癌症例 58 例，非癌症例 50 例のアルコール固定標本を用い，癌症例には肺腺癌 8 例，胃腺癌 6 例，大腸腺癌 1 例，膵臓腺癌 2 例，胆嚢，胆管腺癌 2 例，乳腺腺癌 3 例，卵巣癌 29 例（漿液性腺癌 23 例，粘液性腺癌 3 例，未分化癌 1 例，類内膜癌 1 例，明細胞癌 1 例），子宮頸部癌 3 例（扁平上皮癌 2 例，腺癌 1 例），子宮体部腺癌 1 例，腎癌 1 例，悪性黒色腫 1 例，悪性中皮腫 1 例が含まれる。

卵巣癌組織：漿液性腺癌 31 例，粘液性腺癌 4 例，未分化癌 4 例，類内膜癌 2 例，明細胞癌 2 例，胎児性癌 1 例，中胚葉性混合腫瘍 1 例，間質肉腫 1 例の 46 例の 10% ホルマリン固定パラフィン切片を用い，免疫電顕的検索には 4% パラホルムアルデヒド固定の漿液性腺癌組織を用いた。

III. 使用抗体

抗ヒト上皮抗原モノクローナル抗体 Ber-EP 4 (DAKO)：乳癌培養株 MCF 7 を免疫原とし，免疫グロブリンサブクラスは IgG 1, kappa, 34 KD および 39 KD の 2 つの糖蛋白を認識する⁶⁾。

抗 CEA ポリクローナル抗体 (DAKO)：抗体中に含まれている抗 NCA (nonspecific cross reacting antigen) 抗体をヒト脾臓の過塩素酸抽出物で吸収した抗体を使用した。

写真 1 体腔液中の卵巣癌細胞。Ber-EP 4 は主に癌細胞の細胞膜に強い陽性局在を認める (×600)

IV. 方 法

酵素抗体法間接法を用いて免疫細胞化学的に染色した。また Ber-EP 4 についてはパラフィン切片の場合，抗原性の unmasking のためトリプシンによる前処理を行った。また免疫電顕的検索には pre-embedding 法を用いた。

判 定：少数であっても細胞膜あるいは細胞質に陽性反応を認めたものを陽性と判定した。

V. 結 果

Ber-EP 4 は体腔液中の癌細胞に陽性を示し，非癌例の体腔液 50 例の中皮細胞ではすべて陰性であった。また，その局在は癌細胞の細胞膜および細胞質に認められたが，ほとんどの場合細胞質の染色性は弱く細胞を縁どるような染色パターンを示した (写真 1)。この染色性は卵巣癌の組織切片においても同様であり (写真 2)，また癌細胞が乳頭状の発育を示す場合は，Ber-EP 4 は主に腫瘍細胞の basolateral membrane に陽性局在を示した (写真 3)。Ber-EP 4 は免疫電顕的にも細胞膜にその局在が認められ，組織像，細胞像をよく反映していた (写真 4)。

また卵巣癌を除く癌症例 29 例の体腔液を用いた検討では，Ber-EP 4 は 14 例に陽性で，陽性率は 48% で，同時に行った CEA の 76% に比較し低い結果であった (表 1)。しかし卵巣癌症例 29 例の体腔液では，Ber-EP 4 は，29 例中 27 例に陽性で，93% の陽

写真 2 卵巣低分化腺癌のパラフィン切片。細胞膜に Ber-EP 4 の陽性局在を認める (×300)

写真 3 卵巣乳頭状腺癌のパラフィン切片. Ber-EP 4 は主に baso-lateral membrane に陽性局在を認める (×150)

表 1 体腔液中に出現する悪性細胞の Ber-EP 4, CEA の陽性率

原発	Ber-EP 4	CEA
肺：腺癌	63% (5/8)	88% (7/8)
胃：腺癌	50% (3/6)	100% (6/6)
大腸：腺癌	0% (0/1)	100% (1/1)
膵：腺癌	50% (1/2)	100% (2/2)
胆嚢, 胆管：腺癌	50% (1/2)	100% (2/2)
乳腺：腺癌	0% (0/3)	33% (1/3)
子宮頸部：扁平上皮癌	100% (2/2)	100% (2/2)
腺癌	100% (1/1)	100% (1/1)
体部：腺癌	100% (1/1)	0% (0/1)
腎癌	0% (0/1)	0% (0/1)
悪性黒色腫	0% (0/1)	0% (0/1)
悪性中皮腫	0% (0/1)	0% (0/1)
計	48% (14/29)	76% (22/29)

* 卵巣癌については表 2 に示す

性率を示し, 特に漿液性腺癌では 23 例中 22 例に陽性で高い陽性率を示した. 同時に行った CEA は 5 例中 2 例に陽性で陽性率は 40% であった (表 2). また卵巣悪性腫瘍のパラフィン切片 46 例を用い Ber-EP 4 と CEA を比較すると, Ber-EP 4 では 40 例に陽性で 87% の陽性率を示し, 漿液性腺癌を中心にほとんどの組織型で高い陽性率を示した. しかし CEA においては粘液性腺癌で高い陽性率を示したが, 漿液性腺癌では陽性は 31 例中わずかに 4 例で, その他の組織型においても陽性率は低く, 全体では 20% であった (表 3).

写真 4 卵巣癌の免疫電顕像. Ber-EP 4 は免疫電顕的にも細胞膜に陽性を示す (矢印)

表 2 体腔液中に出現する卵巣癌細胞の Ber-EP 4, CEA の陽性率

組織型	Ber-EP 4	CEA
漿液性腺癌	96% (22/23)	0% (0/4)
粘液性腺癌	100% (3/3)	100% (2/2)
未分化癌	100% (1/1)	—
類内膜癌	100% (1/1)	—
明細胞癌	0% (0/1)	0% (0/1)
計	93% (27/29)	29% (2/7)

表 3 パラフィン切片における卵巣腫瘍の Ber-EP 4, CEA の陽性率

卵巣腫瘍	Ber-EP 4	CEA
漿液性腺癌	97% (30/31)	17% (4/31)
粘液性腺癌	75% (3/4)	100% (4/4)
未分化癌	75% (3/4)	0% (0/4)
類内膜癌	50% (1/2)	0% (0/2)
明細胞癌	100% (2/2)	0% (0/2)
胎児性癌	100% (1/1)	100% (1/1)
中胚葉性混合腫瘍	0% (0/1)	0% (0/1)
間質肉腫	0% (0/1)	0% (0/1)
計	87% (40/46)	20% (9/46)

VI. 考 察

パパニコロー染色で形態学的に中皮細胞, 中皮腫, 腺癌を鑑別することはしばしば困難を伴うため, 免疫細胞化学的にこれらを鑑別する試みは多数報告されている^{1,3,7,10,12)}. それらの代表的なマーカーの一つとして CEA があげられる. これまでわれわれは, CEA

は中皮細胞、中皮腫細胞では陰性であり、癌細胞は陽性を示すため体腔液細胞診に有用であると報告してきた⁹⁾。しかし卵巣癌、甲状腺癌（髄様癌を除く）、前立腺癌、腎細胞癌などのように CEA が陰性あるいは CEA の陽性率が比較的低い癌細胞と中皮細胞との鑑別には、CEA が有効である可能性は低い。今回われわれが検討したモノクローナル抗体 Ber-EP 4 は、Latza ら⁶⁾の報告によると、34 KD および 39 KD の 2 つの糖蛋白と反応し、凍結切片およびパラフィン切片を用いた検討では扁平上皮の表層細胞、肝細胞、壁細胞を除くすべての上皮細胞、癌細胞の細胞膜および細胞質と反応し、また 10 種類のヒト癌細胞の培養株とも広く反応したと述べている。また中皮細胞、筋肉、リンパ組織などの間葉系細胞や、神経、神経膠細胞では陰性を示したと述べている。さらにアセトン固定の体腔液塗抹標本を用いた検討では、25 例の反応性体腔液中の中皮細胞ではすべて Ber-EP 4 陰性で、11 例の悪性体腔液ではすべて陽性を示したと報告している。また、Sheibani ら¹¹⁾の報告によると、種々の腺癌のパラフィン切片を用いた検討で、腎癌と乳癌を除く腺癌（肺、胃、十二指腸、結腸、膀胱、子宮体部、卵巣、前立腺、甲状腺）においては、Ber-EP 4 の陽性率は 100% を示し（腎癌では 0%、乳癌では 68%）、悪性中皮腫 115 例においては、1 例を除いてすべて陰性を示したと述べている。一方、Diaz-Arias ら²⁾は 131 例の良性体腔液のセルブロックを用いた検討で、6 例（5%）が Ber-EP 4 陽性を示したと報告している。われわれの検討においては中皮細胞は Ber-EP 4 陰性を示し、癌細胞との鑑別診断に有用であろうと考えられた。しかし卵巣癌症例を除いた体腔液中の癌細胞の Ber-EP 4 陽性率は 48% で、固定液の違いはあるものの前述の 2 つの報告に比べて著明に低い結果を示した。この中で乳癌例では、3 例しか行っていないがすべて陰性で、Sheibani らの報告においても乳癌ではほかの癌に比べると低い陽性率を示したと述べており、このモノクローナル抗体が乳癌培養株 MCF-7 を免疫原としていることを考えると興味深い。これに比べ、同時に行った CEA の陽性率は消化器癌あるいは肺癌などを中心に高い陽性率を示し、体腔液中の癌細胞と中皮細胞の鑑別には CEA の方が有効である可能性が高いと考えられる。しかし卵巣癌症例の体腔液の場合、卵巣癌細胞、特に漿液性嚢胞腺癌細胞と中皮細胞の鑑別には、CEA に比べ著明に高い陽性率を示す Ber-EP 4 がより有用であることが示唆された。

VII. 結 語

モノクローナル抗体 Ber-EP 4 は、癌細胞の細胞膜および細胞質に陽性局在を認め、中皮細胞あるいは中皮腫細胞は陰性を示し体腔液中の癌細胞との鑑別に有用であることが示唆された。特に卵巣癌では高い陽性率を示し、CEA の陽性率が低い漿液性腺癌細胞の検出には有用であろうと考えられた。

本論文の要旨は第 30 回日本臨床細胞学会秋期大会学術集会（於東京）にて発表した。

Summary

The usefulness of monoclonal antibody Ber-EP 4 and polyclonal anti-CEA antibody to distinguish carcinoma cells from mesothelial cells in body fluid was examined. Anti-CEA antibody was absorbed by the perchloric acid extract of human spleen to eliminate nonspecific crossreacting antigen. We evaluated Ber-EP 4 and CEA on alcoholfixed cytologic smears from 34 randomly selected malignant effusions and 50 benign effusions. Although carcinoma cells of effusion were positive for Ber-EP 4 in 18 cases (53%) and for CEA in 24 cases (71%), no mesothelial cells of benign effusion were reactive for Ber-EP 4. In ovarian carcinoma, positive staining was seen in body fluid in 27 of 29 cases (93%) and in paraffin-embedded sections of primary tumors in 40 of 46 cases (87%).

These results suggested that immunocytochemical staining with Ber-EP 4 in body fluid is useful in distinguishing CEA negative carcinoma cells such as serous cyst adenocarcinoma of the ovary from reactive mesothelial cells.

文 献

- 1) Croonen, A.M., et al.: Cytology, immunopathology and flow cytometry in the diagnosis of pleural and peritoneal effusions, *Lab. Invest.*, 58: 725~732, 1988.
- 2) Diaz-Arias, A., et al.: Utility of antibody Ber-EP4 in the cytologic diagnosis of adenocarcinoma in body fluids, *Modern Pathology*, 4(1): 24A, 1991.
- 3) Duggan, M.A., Masters, C.B., Alexander, F.: Immunohistochemical differentiation of malignant mesothelioma, mesothelial hyperplasia and metastatic adenocarcinoma in serous effusions, utilizing staining for

- carcinoembryonic antigen, keratin and vimentin, *Acta Cytol.*, 31(6) : 807~814, 1987.
- 4) Fujimoto, I., Hirai, Y., Hasumi, K., et al. : The Value of Epithelial Membrane Antigen in the Diagnosis of Ovarian Tumors, *Acta Cytol.*, 34(4) : 549~554, 1990.
- 5) 伊藤 仁, 篠田玲子, 赤塚由子・他 : 中皮細胞の免疫細胞化学的検討—CA125を中心に—, *日臨細胞誌*, 26(4) : 581~584, 1987.
- 6) Latza, U., et al. : Ber-EP4 : new monoclonal antibody which distinguishes epithelia from mesothelia, *J. Clin. Pathol.*, 43 : 213~219, 1990.
- 7) Nelson, G.O. : The immunohistochemical diagnosis of mesothelioma, *Am. J. Surg. Pathol.*, 13(4) : 276~291, 1989.
- 8) 野沢志郎・他 : 腫瘍マーカーの新展開, *病理と臨床*, 8 (臨時増刊号) : 321~335, 1990.
- 9) Osamura, Y., Watanabe, K., Akatsuka, Y. : Peroxidase-labeled antibody staining for carcinoembryonic antigen of cytologic specimens for light and electron microscopy, *Acta Cytol.*, 29(3) : 254~256, 1985.
- 10) Rosen-Levin, E., et al. : Distinguishing benign from malignant pleural effusions by lectin immunocytochemistry, *Acta Cytol.*, 33(4) : 499~504, 1989.
- 11) Sheibani, K., et al. : Ber-EP4 antibody as a discriminant in the differential diagnosis of malignant mesothelioma versus adenocarcinoma, *Am. J. Surg. Pathol.*, 15(8) : 779~784, 1991.
- 12) Tickman, R.J., et al. : Distinction between carcinoma cells and mesothelial cells in serous effusions, *Acta Cytol.*, 34(4) : 491~495, 1990.
-