原 著

腹腔内臓器癌における腫瘍マーカーCA19-9の免疫組織学的研究

—腫瘍別及び血清値との対比—

島根医科大学第1外科（主任：中瀬 明教授）

安 藤 静一郎 板 倉 正 幸 野 原 隆 彦

小 野 恵 司 瀬 下 達 之 中 瀬 明

抗 CA19-9モノクローナル抗体を用いて、腫瘍組織の免疫組織学的検索を行った。症例は膵癌4例、胆道癌6例、胃癌4例、乳頭部癌3例、十二指腸癌1例、結腸癌1例及び卵巣奇形腫1例の計20例で、切除組織及び生検組織のホルマリン固定後のパラフィン切片を作成し、酵素抗体法(Peroxidase-antiperoxidase method, PAP 法)にて染色した。ほとんどの症例(18例)に染色がみられ、臓器特異性はなかった。染色態度は、細胞膜型、細胞質型(微漫型、顆粒型)間質漏出型、腺腔内分泌型等様々であったが、間質漏出型に血清 CA19-9高値例が多かった。非癌組織では膵管上皮、変性膵腺房細胞、胆管上皮、腸上皮化生部、卵巣の顆粒膜細胞に染色がみられた。抗 CA19-9モノクローナル抗体を用いた免疫組織学的検索は、診断及び治療への応用に有用であると思われる。

索引用語：腫瘍マーカー、CA19-9、モノクローナル抗体、酵素抗体法、免疫組織学的検索

はじめに

Koprowski ら¹⁾は1979年、Hybridoma technique を用いてヒト結腸癌に対するモノクローナル抗体を作製し、この抗体が gastrointestinal cancer-associated antigen (GIGA) を認識することを発見した。この抗原は Cartinoembryonic antigen (CEA) とは異なる消化器系の腺癌の膜表面に存在する monoganglioside であることがわかり、当初、結腸、直腸癌の腫瘍マーカー Carbohydrate antigen 19-9 (CA19-9) として診断応用された。その後、radioimmuno-assay (RIA) 法が確立され、臨床応用が進むにつれ、膵癌、胆道癌に高い感受性および特異性を示すことがわかり注目されている²⁾。

今回、抗 CA19-9モノクローナル抗体を用いた酵素抗体法(Peroxidase-antiperoxidase method, PAP 法)により、種々の癌組織を染色し、その染色性や染色態度を観察し、血清 CA19-9値、組織学的分化度等との関係につき検索を行い、若干の文献的考察を加えた。

対象及び方法

当教室において経験した症例、膵癌4例、胆道癌6

例、胃癌4例、乳頭部癌3例、十二指腸癌1例、結腸癌1例、卵巣腫1例の計20例を対象とした(表1)。尚、Case 14と18は重複癌の症例である。

上記切除組織あるいは生検組織の10%ホルマリン固定後のパラフィンブロックから厚さ6 μ mの薄切連続切片を作製し、HE染色及びCA19-9免疫組織染色を施行した。免疫組織染色は酵素抗体法(PAP法)を用いた。パラフィン切片を脱パラフィンののち、内因性ペルオキシダーゼ除去の為、0.3%過酸化水素水を含むエタノールに30分浸し、純水にて洗浄後、staining bufferに10分浸した。さらに、非特異的背景染色を減弱される為、10%正常ウサギ血清を30分間湿潤箱中で作用させ、500倍希釈抗CA19-9モノクローナル抗体(Centocor社より供与)を湿潤箱に一夜反応させた。つぎに、20倍の抗マウス・ウサギIgG(DAKO社)を湿潤箱中で30分間反応させ、20倍PAP(マウス)反応を30分間行った。staining bufferで洗浄後、0.05% diaminobenzidine に30%過酸化水素水を1滴加えたものを反応させ、発色した瞬間純水にて洗浄し、ヘマトキシリン染色(20秒間)施行、脱水、脱アルコール、封入した。

CA19-9染色性の判定は、染色が強く陽性でかつほぼ

表 1 症例

	臨床診断	組 織 診 断	血清 CA 19-9 値 (U/ml)	PAP 染色性
Case 1	脾 癌 stage IV	papillo-tubular adenocarcinoma duct cell ca.	1500	+び慢型, 漏出型+分泌型
Case 2	脾 癌 stage IV	well diff. adenocarcinoma duct cell ca. scirrhou type	10000	++び慢型, 漏出型
Case 3	脾 癌 stage IV	adenocarcinoma (needle biopsy)	190343	+++び慢型+顆粒型, 漏出型
Case 4	脾 癌 stage III	mucinous cystadenocarcinoma	260	+膜型, 分泌型
Case 5	胆 管 癌 stage IV	poorly diff. adenocarcinoma mucus secreting	2100	+++顆粒型
Case 6	胆 管 癌 stage IV	adenocarcinoma	9100	++び慢型, 分泌型+漏出型
Case 7	胆 管 癌 stage IV	adenocarcinoma	1205	++び慢型, 漏出型+分泌型
Case 8	胆 管 癌 stage IV	moderately diff. adenocarcinoma	68	+膜型, 漏出型
Case 9	胆 嚢 癌 stage II	moderately to poorly adenocarcinoma papillare	330	++び慢型, 分泌型 (一部顆粒型)
Case10	胆 管 癌 stage IV	well, moderately, poorly diff. adenocarcinoma	228	++び慢型, 分泌型+漏出型
Case11	胃 癌 stage IV	adenocarcinoma mucocellulare	240	+び慢型+顆粒型
Case12	胃 癌 stage IV	adenocarcinoma with signet ring cell	39081	++び慢型+顆粒型, 漏出型
Case13	胃 癌 stage IV	poorly diff. and mucocellular adenocarcinoma	742507	+び慢型, 漏出型
Case14	胃 癌 stage IV	cystadenocarcinoma papillare	60	—
Case15	乳頭部癌 stage IV	adenocarcinoma (duodenal biopsy)	1400	++び慢型, 分泌型
Case16	乳頭部癌 stage IV	adenocarcinoma (duodenal biopsy)	2362	+++び慢型, 漏出型
Case17	乳頭部癌 stage IV	well to moderately diff. adenocarcinoma	870	++び慢型, 分泌型+漏出型
Case18	十二指腸癌 stage IV	adenocarcinoma papillotubulare	60	—
Case19	結 腸 癌 stage II	adenocarcinoma	303	+膜型, 分泌型
Case20	卵巣嚢腫	cystic teratoma	250	+顆粒型, 漏出型

全ての腫瘍細胞にそまるものを(++), 染色が強いが部分的なもの, 染色が弱いが全体的に染まるものを(++), 染色が弱くかつ部分的に染まるものを(+), 腫瘍細胞に全く染色のみられないものを(—)とした(表2). 組織局在については, 細胞質型と細胞膜型とに分類し,

間質に漏出の見られるものを漏出型, 腺腔内に分泌のみられるものを分泌型とした. 細胞質型はその染色態度により, 顆粒型とび慢型に分類した. 血清 CA19-9値は37U/ml以上を陽性とした.

結 果

1) CA19-9染色は胃癌と十二指腸癌の重複癌の1例で陰性で、その他はすべて陽性であった。染色性の強さは、癌種による差異はなかった。組織局在は細胞膜型(図1)、細胞質型(顆粒型、微漫型)(図2)等様々で、症例によっては、染色された細胞周囲の間質にも染色がみられ(図3)。また、形成された腺腔内の分泌物にも染色がみられた(図4)。組織局在についても癌種による一定の傾向はなかった。

2) 染色態度と血清CA19-9値と関係を検討すると、血清CA19-9値が高値になるにつれ染色性が強くなる傾向があり、1,000U/mlを越える高値例では、(++), (+++)の強陽性例が多かった(表3)。組織局在では細胞質型の方が、細胞膜型より若干血清CA19-9値が高い傾向が認められた。また、間質漏出のみられるものは血清CA19-9値が高かった(表4)。腺腔内への分泌は、血清値に影響はなかった。

3) 組織型と染色態度との関係では、腫瘍の組織型はすべて腺癌であり、CA19-9染色は、低分化腺癌に比べ、

高分化腺癌は良く染色される傾向にあった。しかし、印環細胞癌では低分化型でも強陽性に染色された。

表2 CA19-9染色性

Grade of Staining	
+++
++
+
-

A)

B)

図2 A) **cytoplasmic type** (diffuse pattern), CA19-9 is diffusely localized in the cytoplasm. (case 2), B) **cytoplasmic type** (granular pattern), CA19-9 is granularly localized in the cytoplasm. (case 5)

図1 **membranous type**: CA19-9 is localized along the luminal surfaces of the cancer gland (case 8).

図3 **stromal type**: CA19-9 is distributed in cancer cells and the surrounding stroma. (case 7)

図4 **secreting type**: CA19-9-positive debris is observed in the lumen of the stained cancer gland. (case 17)

図5 CA19-9 is distributed in the gastric mucosa with intestinal metaplasia adjacent to the cancer nests. (case 14)

表3 Serum CA19-9 and Tissue CA19-9

Serum CA 19-9 level (U/ml)	Staining of the tumor tissues			
	(-)	(+)	(++)	(+++)
0~37 (n=0)				
37~400 (n=7)	1	4	2	
400~1000 (n=1)			1	
1000~5000 (n=5)		1	2	2
5000~ (n=5)		1	3	1

表4 CA19-9 distribution and Serum CA19-9

CA 19-9 distribution	Serum CA 19-9 level (Mean $\pm$ SD U/ml)
Apical type	281 $\pm$ 22 (n=2)
Cytoplasmic type	864 $\pm$ 757 (n=4)
Stromal type	90660 $\pm$ 212956 (n=12)

4) 非癌組織で染色のみられたのは Case 14, 18の重複癌症例で、胃癌及び十二指腸癌部に接し、腸上皮化生変化をともなった胃粘膜が陽性に染色された(図5)。Case 2の膵癌の症例においては、非癌部の正常膵管上皮ならびに周辺の腺房細胞の化生変化を示す部分に陽性に染色された(図6)。唯一の良性疾患である Case 20の卵巣奇形腫では、黄体化した顆粒膜細胞が染色され、嚢胞壁の扁平上皮部分は染色されなかった(図7)。

考 案

CA19-9抗体による腫瘍組織の染色は Atkinson ら³⁾の報告では結腸癌で59%, 膵癌で86%, 胃癌で89%に

図6 CA19-9 is localized in the epithelium of the duct and degenerated acinar cells of the pancreas. (case 2)

図7 CA19-9 is localized in the granulosa cells of the ovarian teratoma. (case 20)

主に細胞質型の染色を示し、染色性及び組織局在上臓器特異性を認めていない。今回著者らは膵癌4例、胆道癌6例、胃癌4例、乳頭部癌3例、十二指腸癌1例、

結腸癌 1 例で、胃癌及び十二指腸癌の重複癌症例を除いてすべてに染色がみられ、原発巣による染色性の差異はなかった。従来、CA19-9 染色は主に細胞質型に染色されるという報告が多いが³⁾、組織局在は細胞質に顆粒型び漫型に染色される症例の他、細胞膜のみ染色されるものも存在した。

血清 CA19-9 値と染色性については、浜田ら⁹⁾は、胃癌における検討において、一定の傾向は認められないが、血清 CA19-9 高値例では組織 CA19-9 の染色性が強陽性を示すものが多かったとしている。著者例でも、血清 CA19-9 値が 1,000 U/ml を越える高値例では、(++) (+++) の強陽性例が多かった。

また、組織局在では、間質への漏出のみられるものは血清 CA19-9 値の高い傾向があった。細胞外の染色でも腺管腔への分泌のみの例では一定の傾向はみられなかった。しかし、閉塞性黄疸や、慢性膵炎等の症例で血清 CA19-9 値の高値例の見られることから⁵⁾⁶⁾、分泌された管腔の狭窄などにより周囲組織、血中へ吸収された場合、血清値の上昇をきたすと思われる。

各種の疾患の血清 CA19-9 値は多数の研究者によって、悪性疾患のみならず良性疾患についても測定がなされ、詳細な報告があるが、沢武ら⁷⁾は膵癌 83%、胆道癌 70%、胃癌 34%、結腸癌 37%、大倉ら⁸⁾は膵癌 91%、胆道癌 83%、胃癌 39%、結腸癌 59% を示し、胃癌、結腸癌に比し、膵癌、胆道癌に陽性率が高い。しかし、CA19-9 染色の陽性率を比較すると Atkinson ら⁹⁾は、膵癌 86%、胃癌 89% と差異はなく、著者らもそれぞれ同様な染色性を示した。この血清 CA19-9 値の陽性率と組織染色性との相違は、どうして生ずるのだろうか。

浜田ら⁹⁾は結、腸癌症例の検討で、血清 CEA 値と CEA 染色の組織局在とを対比され、間質に染色のみられるものに血清 CEA 高値例が多いとしている。著者らも、CA19-9 染色上、間質に漏出のみられる症例では、血清 CA19-9 値が高値であった。このことは、血清値は CA19-9 抗原の組織局在量よりは、細胞外への分泌あるいは逸脱に影響されると考えられた。つまり、胃癌等の血清 CA19-9 値の陽性率の低い癌では、腫瘍組織に CA19-9 抗原を有するものの、その細胞外への流出、血中への移行が少ない為、血清 CA19-9 値が低いのではないかと考えられた。Atkinson ら⁹⁾も、血清 CA19-9 値を検出しない症例でも癌組織に染色を認める理由として、腫瘍細胞が CA19-9 を産生しても分泌しないか、低濃度すぎて検出し得ないなどの可能性を推察している。

一方、CA19-9 染色は腫瘍組織のみならず正常組織にも染色がみられ、成人では膵管円柱上皮、胆管円柱上皮、胃粘膜、前立腺、気管支腺等に、胎児では唾液腺、膵、肝、胆道、腸管等に認められる。その他、腫瘍組織に隣接した非癌部組織やポリープ、潰瘍性大腸炎、腸上皮化生等の前癌病変部にも染色のみられることがある⁹⁾。著者らも、膵管上皮、胆管あるいは胆嚢上皮に陽性に染色された。case 14, 18 の重複癌症例は、癌組織には染色されずに、非癌部の腸上皮化生部位に染色がみられた興味ある症例であった。卵巣奇形腫は良性疾患のなかでは血清 CA19-9 高値例の報告が多く、毛嚢や皮脂腺に組織局在が認められている¹⁰⁾。本症例では、黄体化した顆粒膜細胞が染色された。この症例は、血清 CA19-9 値が 250 U/ml と高値を示し、嚢胞摘出後半減期約 4 日で正常値に復した。CA19-9 のモニタリングマーカーとしての有用性がうかがわれた。

癌の分化度と染色性については、浜田ら⁹⁾の結腸癌における CEA の検討において、高分化腺癌に比し、中分化腺癌の方が CEA 染色性が強く、血清 CEA 値も高いと報告している。有吉ら¹¹⁾は、膵・胆道癌の CA19-9 染色において分化度との相関を認めていない。著者らの症例は、逆に高分化腺癌が良く染色される傾向にあった。低分化腺癌でも印環細胞癌の染色性は強く、間質への漏出も認められた。

CA19-9 の染色態度は Lewis^a 血液型物質に密接に関係している¹²⁾。Le (a-b-) の人は血清値が極めて低く、組織染色性がみられない。CA19-9 モノクローナル抗体の認識する抗原は Lewis^a 抗原糖鎖にシアル酸が 1 残基結合したものであり、この部分が抗原決定基となっている。Le (a-b-) の人は、Lewis^a 抗原生合成の過程で fucosyltransferase を欠損するため、Le (a-b-) となり、それゆえ、CA19-9 の合成もなされないとされる。逆に、癌組織では CA19-9 陽性細胞は Lewis^a 陽性細胞集団のなかに分布している¹³⁾。CA19-9 抗原の産生は、Lewis^a 糖鎖の蓄積とシアルトランスフェラーゼの活性化とによって生ずるものと推論されており¹³⁾、CA19-9 抗原は、癌化という細胞の生物学的特性の変化により、細胞膜を構成する糖鎖構造の変化という過程を経て生産され、その局在極性は、細胞の異型度が高まるにつれ失われ、細胞膜から細胞質全体が染色されるようになり、さらに細胞膜の抗原の保持能が破壊されて、間質漏出に至ると考えられる。

以上のような、CA19-9 モノクローナル抗体を用いた腫瘍組織の免疫組織学的検索は、良性疾患あるいは正

常組織への染色の可能性や、Lewis^x抗原陰性者での非染色性をふまえたうえで、モノクローナル抗体を利用した原発巣や転移巣の部位診断や、腫瘍に対する免疫学的治療への応用に重要な研究であると思われた。

まとめ

1) CA19-9染色は各種の癌で陽性率が高く、有意な差は認められなかった。染色態度は、細胞膜型、細胞質型、間質漏出型、腺腔内分泌型等様々であった。

2) 血清 CA19-9値と染色態度との相関はみられなかったが、細胞外の間質に漏出のみられる症例では高値の傾向がみられた。

3) 正常組織においても膵管上皮、変性した膵腺房細胞、胆管上皮、及び胃粘膜の腸上皮化性部に染色がみられ、良性疾患では卵巣奇形腫に染色がみられた。

本論文の要旨は、第49回日本臨床外科医学会総会において発表した。

文 献

- 1) Koprowski H, Steplewski Z, Mitchell K, et al: Colorectal carcinoma antigens detected by hybridoma antibodies. *Somatic Cell Genet* 5: 957—971, 1979
- 2) Del Villano BC, Brennan S, Brock P, et al: Radioimmunoassay for a monoclonal antibody-defined tumor marker CA19-9. *Clin Chem* 29: 549—552, 1983
- 3) Atkinson BF, Ernst CS, Henlyn M, et al: Gastrointestinal cancer-associated antigen in immunoperoxidase assay. *Cancer Res* 42: 4820—4823, 1982
- 4) 浜田吉則, 名倉 宏, 田中完児他: 胃癌における糖

鎖抗原 CA19-9 の臨床病理学的検討, 消と免疫 16: 260—263, 1986

- 5) Steinberg WH, Gelfand R, Anderson KK, et al: Comparison of the sensitivity and specificity of the CA19-9 and carcinoembryonic antigen assays in detecting cancer of the pancreas. *Gastroenterology* 90: 343—349, 1986
- 6) 小口寿夫, 本間達二, 長田敦夫他: モノクローナル抗体にて認識される新しい腫瘍マーカー, CA19-9 の臨床的意義の検討, 日消誌 81: 1430—1435, 1984
- 7) 沢武紀雄, 里村吉威, 太田英樹他: CA19-9 と CA125, 肝胆膵 12: 419—428, 1986
- 8) 大倉久直: 腫瘍マーカーCA19-9, 代謝 22: 891—896, 1985
- 9) Hamada Y, Yamamura M, Hioki K, et al: Immunohistochemical study of carcinoembryonic antigen in patients with colorectal cancer. *Cancer* 55: 136—141, 1985
- 10) 根岸能之, 古野健児, 佐野 養他: 卵巣癌患者の腫瘍マーカーとしてのCA125, CA19-9, TPA, IAP に関する研究, 癌の臨 31: 655—663, 1985
- 11) 有吉 寛, 桑原正喜, 赤塚弘道他: CA19-9, 肝胆膵 11: 525—531, 1985
- 12) Koprowski H, Brockhaus M, Blaszczyk M, et al: Lewis blood-type may affect the incidence of gastrointestinal cancer. *Lancet* 1: 1332—1333, 1982
- 13) Hirohashi S, Simosato Y, Ino Y, et al: Distribution of blood group antigen and CA19-9 in gastric cancers and non-neoplastic gastric mucosa. *Gann* 75: 540—547, 1984

IMMUNOHISTOLOGICAL STUDIES OF TUMOR MARKER CA19-9 —COMPARISON OF EACH TUMOR TISSUE OR PLASMA CA19-9 LEVELS—

Seiichiro ANDOH, Masayuki ITAKURA, Takahiko NOHARA, Keiji ONO,
Tatsuyuki SESHIMO and Akira NAKASE

First Department of Surgery, Shimane Medical University

Immunohistological examination of tumor tissues using monoclonal antibody CA19-9 was performed in 20 cases including 4 pancreatic cancer, 6 bile duct cancer, 4 gastric cancer, 3 papillary cancer, 1 duodenal cancer, 1 colon cancer and 1 ovarian teratoma. Peroxidase-antiperoxidase (PAP) method was conducted in fixed paraffin-embedded sections of surgically resected or biopsied tissues. Most cases (18 of 20) could be stained but did not show organic specificity. Distributions of CA19-9 showed various patterns such as membranous type, cytoplasmic type (diffuse or granular pattern), stromal infiltration or secreting (in the lumen of the cancer gland) type. Cases exhibiting CA19-9 distribution in the stroma showed higher plasma CA19-9 levels. In non-malignant tissues the antigen was also detected in the epithelium of pancreatic duct, degenerated pancreatic acinar cells, epithelium of the bile duct, intestinal metaplasia of the gastric mucosa and granulosa cells of the ovary. The monoclonal antibody CA19-9 was thought to be useful for diagnostic and therapeutic purposes.