〔シンポジウム：腫瘍マーカーの新しい展開〕

CEA の分子構造と抗原構造

松岡 雄 治*

はじめに

Carcinoembryonic antigen (CEA) は癌の臨床におけるその有用性が、現在最もよく確立した腫瘍マーカーである。その評価を要約すると、1) いろいろな組織由来の癌に出現する、スペクトルの広い腫瘍マーカーである、2) 早期診断に役立つまでには至っていないが、良性疾患か悪性疾患かの判断には不可欠の情報である、3) 癌の外科手術後のモニターリングに最も有用で、根治手術の成否の判断や再発の早期診断などで重要な情報となる、4) 各種非観血的治療法の効果判定に有用性が認められている、などであろう。この CEA が Gold^{1,2)}により発見されてからすでに 20 数年を経過した。この間その解明が待望され続けてきた CEA の分子構造、とくにそのペプチド一次構造の解明が世界の多くの研究グループに先駆けてサントリー生医研グループにより達成され³⁾、これを契機に CEA の研究が新しい展開を示しつつある。ここではこれまでに得られた CEA の分子構造および抗原構造を要約し、また実際の臨床応用に際しての血中 CEA 濃度測定系の問題点につき若干の考察を試みる。

CEA のペプチド構造

CEA は分子量約 18 万、糖を 50~60% 含む糖タンパク質である。これまで多量に存在する糖鎖のゆえにペプチド構造の化学的解析が困難であったが、cDNA クローニングの成功によりペプチド一次構造が明らかになった³⁾。その結果を要約すると次のとおりである。

CEA ペプチドは 668 個のアミノ酸により構成されている。それは Fig. 1 に示すように、N 端から 108 番目のアミノ酸までのドメイン N、お互いに非常に相溶性の高い、くり返し構造をもったそれぞれ 178 個のアミノ

酸よりなるドメイン I, II, III, と C 端 26 個の主として疎水性アミノ酸よりなるドメイン C の五つのドメインに分けられる。12 個存在するシステイン残基はドメイン I, II, III に各 4 個ずつ存在し、各ドメイン内でのその位置は完全に同一部位にあり、1 番目と 2 番目のシステインの間に 48 個、3 番目と 4 番目のシステインの間に 40 個のアミノ酸よりなる二つのループが形成され、CEA 全体では Fig. 2 に示すように六つのループを保持した形になっているものと思われる。178 個のアミノ酸よりなる三つのくり返し構造部分をそれぞれ前半 92 個、と後半 86 個のサブドメイン A と B に分けると、ドメイン I, II, III のそれぞれのサブドメイン A 同士の間および B 同士の間には強い相溶性が認められるとともに、このサブドメイン単位で他のタンパク質との類似性を検索した結果 immunoglobulin κ 鎖の variable region, マウスおよびラットの Thy-1 抗原, ウサギの polyimmunoglobulin receptor, および T cell receptor γ 鎖などとの間に有意の相溶性が認められ、CEA が immunoglobulin supergene family の一員であることが明らかにしてきた^{4,5)}。

CEA ペプチド鎖にはアスパラギン結合型糖鎖の結合しうる場所すなわち Asn-X-Thr/Ser (X は Pro 以外のアミノ酸) という構造をもった場所が 28 個存在し、その分布はドメイン N に 2 個、ドメイン I, II, III にそれぞれ 11, 7, 8 個存在している。以上の情報を著者なりにまとめて作った CEA の分子モデルを Fig. 2 に示してある。

CEA 分子の膜結合様式

Oikawa^ら³⁾が CEA の一次構造を解明した際、疎水性アミノ酸に富むドメイン C が膜結合に関与するものと考えられた。しかし、われわれは、最近アルカリホスファ

Molecular and antigenic structure of CEA.

* Yuji Matsuoka; 福岡大学医学部

Correspondence address: Yuji Matsuoka, Fukuoka University School of Medicine, Nanakuma, Jonan-ku, Fukuoka 814-01, Japan.

Domain	N	KLT	IESTPF	NVAEGKEV	LLLVHNL	PQHL	FGYSWKGERVD	1- 40			
Domain	I	ELPKP	SISS	NNSKPVEDKDA	VAF	TCEPEITQ	ATYLVWVNN	109-148			
Domain	II	ELPKP	SISS	NNSKPVEDKDA	VAF	TCEPEITQ	ATYLVWVNN	287-326			
Domain	III	ELPKP	SISS	NNSKPVEDKDA	VAF	TCEPEITQ	ATYLVWVNG	465-504			
	N	GNRQ	IIGYVIGT	QQAATG	PPAYS	GREI	IYPNAS	LLIQNIQ	41- 80		
I	I	QSLPV	SPRLQLSNG	NRTLT	LFN	YTRND	IASYK	DEITQNPVS	149-188		
II	II	QSLPV	SPRLQLSNG	NRTLT	LFN	YTRND	VGPY	ECGIONELIS	327-366		
III	III	QSLPV	SPRLQLSNG	NRTLT	LFN	YTRND	ARAY	VCGIQNSVS	505-544		
	N	NDT	GFYTL	HVIKS	DLVNEE	ATGQ	FRVYP		81-108		
I	I	ARR	SDSV	ILNV	LYGPD	APT	ISPL	NES	YRSGEN	LNLSCHAA	189-228
II	II	VDH	SDPVL	ILNV	LYGPD	APT	ISPL	NES	YRSGEN	LNLSCHAA	367-406
III	III	ANR	SDPVL	ILNV	LYGPD	APT	ISPL	NES	YRSGEN	LNLSCHAA	545-584
I	I	SNPP	AQYSW	FVNGH	FQQS	TQEL	FIP	NNS	SGSYTC	QAH	229-268
II	II	SNPP	AQYSW	LTDGN	IQQHT	QELF	IS	TEK	NSGLYTC	QAH	407-446
III	III	SNP	SPOYS	WRING	IQQHT	QELF	IS	TEK	NSGLYTC	QAH	585-624
I	I	NSD	TGL	NRT	VIT	ITV	VA				269-286
II	II	NSA	SGH	SRT	IVK	ITV	SA				447-464
III	III	NLA	TGR	NNS	IVK	ITV	SA				625-642
Domain	C	SGT	SPGLS	AGATV	GIMIG	VLVG	VALI				643-668

Fig. 1. CEA ペプチドの一次構造

四角な枠の中にドメイン I. II. III の相同部分が囲ってある。矢印はシステイン残基の位置を示す。糖鎖の付きうる部位にシャドーがかけてある。右側にアミノ酸番号を示す。

Fig. 2. CEA および癌細胞中 NCA の分子モデル

番号はN端からのアミノ酸番号。システイン残基と糖鎖結合のアスパラギン残基の位置を示す。糖鎖は GlcNAc と Man core のみが示してある。CEA の 174 と 258 の糖鎖は省略してあり、この図には 26 本の糖鎖が示されている。NCA の 258 の糖鎖も省略し、11 本の糖鎖が示してある。

Fig. 3. CEA の膜結合様式

ターゼや Thy-1 抗原あるいは補体関連の decay accelerating factor (DAF) などに認められている glycolipid 型の膜結合が CEA でも関与している可能性を考え、その存否を検討した。得られた結果⁶⁾を要約すると、Fig. 3 に示すごとく、CEA 分子の C 端部はエタノールアミン-糖成分 (多分数個のマンノース)-グルコサミン

を介してホスファチジルイノシトールが結合し、そのジアシルグリセロール部分が膜の脂質二重層に結合しているらしい。C 端部のどの位置で glycolipid への置換が起こるかについては、ごく最近ドメイン III の C 端アミノ酸 Ala に直接エタノールアミンが結合しているという報告⁷⁾があり、もしそうだとすると実際の CEA 分子ではドメイン C は完全に glycolipid に置換され存在しないことになる。いずれにしても CEA 分子が glycolipid を介するという変わった型の膜結合を行っていることは、CEA が immunoglobulin supergene family の一員であるという知見とともに、いまだにその手掛りすら得られていない CEA の生物活性を考える上ではなはだ重要な知見と考えられる。

CEA 関連正常抗原の分子構造

後述するいろいろな CEA 関連正常抗原のなかで最初に見いだされ、ほとんどの CEA 産生腫瘍で CEA と同時に産生される nonspecific cross-reacting antigen (NCA)⁸⁾ のペプチド一次構造が CEA の一次構造決定に引き続き、Tawaragi ら⁹⁾により cDNA のクローニングにより決定された。それによると NCA には CEA と同じく 34 個のアミノ酸よりなるシグナルペプチドにつき、108 個のドメイン N と 178 個のドメイン I が存在する。しかし CEA のドメイン II と III に相当する部分が欠如し、ドメイン I につき 24 個の主として疎水性アミノ酸よりなるドメイン M が存在する (Fig. 4)。NCA のドメイン I の構造は CEA のドメイン I とアミノ酸レベルで 90% 弱の相同性を示し、4 個含まれるシステイン残基の位置もまったく同じである。NCA には 12 個の糖鎖結合部位があり、その位置は 5 カ所で CEA

<u>Signal peptide</u>	MGPPSAPPCRLHVPWKEVLLTASLLTFWNPTTA	-34 - -1
<u>Domain N</u>	KLTIESTPFNVNVAEGKEVLLLAHNLPQNRIGYSWKGERVD	1 - 40
	GNSLIVGYVIGTQQATPGPAYSGRETIYPN <u>ASLLIQNV</u> TQ	41 - 80
	<u>ND</u> ITGFYTLQVIKSDLVNEEATGQFHVYP	81 - 108
<u>Domain I</u>	ELPKPSISS <u>NNS</u> NPVEDKDAVAFTCEPEVQNTIYLWWVNG	109 - 148
	QSLPVSRLQLSNG <u>NMT</u> LTLTSVKRNDAGSYE [▲] CIQNPA [▲] S	149 - 188
	<u>ANR</u> SDPVTLNVLYGPDVPTISPSKANYRPGENL <u>NLS</u> CHAA	189 - 228
	SNPPAQYSWF <u>ING</u> TFQQSTGELFIPN <u>ITV</u> NNSGSYM [▲] CAH	229 - 268
	NSATGL <u>NR</u> ITV [●] MITVSG	269 - 286
<u>Domain M</u>	SAPVLSAVATVGITIGYLARVALI	287 - 310

Fig. 4. 癌細胞中 NCA ペプチドの全構造

矢印はシステイン残基。丸印はメチオニン残基を示す。糖鎖結合部位をアンダーラインで示す。

Table 1. 三つの CEA 標品の糖鎖の数とその type 別割合

Type of sugar chain	CEA preparation		
	(% molar ratio)		
	TY	MY	TT
No. of sugar chain			
High mannose type	26	25	24
Complex type			
without sialic acid (N1)	26	32	21
with sialic acid (AN)	18	48	65
Sialidase resistant			
acidic oligosaccharide	48	10	7

との差異が認められるが他はまったく同じである。Fig. 2 に CEA と比較した NCA の分子モデルを示してある。NCA と CEA のドメイン構造の比較から、両者が同一の ancestor gene をもち、NCA-CEA の一連の糖タンパク質が gene duplication により出現したものであることは容易に想像できる。それが生物学的に何を意味するのか、今後解明すべき興味ある課題である。

われわれが正常成人糞便中に見いだした normal fecal antigen-1 (NFA-1) は分子量約 2 万の小分子であるが CEA と強い交差反応性を示す関連抗原である¹⁰⁾。分子量, N 端部アミノ酸配列, アミノ酸組成などから NFA-

1 はおそらく CEA のドメイン II に相当するものと思われる。

CEA の糖鎖構造

CEA はその分子量の半分以上が糖鎖で占められている。その割には糖鎖が CEA の抗原性に寄与する程度は弱い。糖鎖自体の構造は最近山下, 木幡らの解析によりその概要がやっと明らかになってきた¹¹⁾。標品により異なるが, CEA には 24~26 個の糖鎖が結合している。その構造と糖鎖全体に占める割合を Table 1, 2 に要約してある。シアリダーゼ抵抗性の酸性糖鎖の構造は目下不明で今後の解析をまたねばならない。いずれにしても CEA の糖鎖は標品による糖鎖の数や outer moiety 部分の構造などに著しい多様性が認められる。しかも Fig. 2 から明らかなように CEA 分子はほとんど万遍なく糖鎖に覆われた型になっている。これが以下述べる CEA の抗原構造に複雑にからんでくるらしい。

CEA の抗原構造

CEA の抗原構造の解析は, NCA を初めとする関連正常抗原との対比の上でなされてきた¹²⁾。Table 3 におもな CEA 関連抗原の性状その他を要約してある。これらの CEA 関連正常抗原は大きく二つに分けることができる。一つは NCA, NFA-1 および normal fecal cross-reacting antigen (NFCA) などのように分子量が CEA に比し小さく, 抗原的にも部分的な共通性を示すにすぎ

Table 2. 三つの CEA 標品の complex type 糖鎖の構造

Complex type fraction	CEA preparation			
	TY		MY	TT
	N 1	AN	N 1 + AN	N 1 + AN
Galβ 1→4 GlcNAc	+++	+++	+++	+++
Galβ 1→4 GlcNAcβ 1→3 Galβ 1→4 GlcNAc	+	+	+	++
Galβ 1→3 GlcNAc (Type 1)	0	0	0	+
Fuca 1→2 Galβ 1→4 GlcNAc (Type 2 H)	0	0	0	+
Galβ 1→4 (Fuca 1→3) GlcNAc (X)	+++	+++	+++	+++
Galβ 1→3 (Fuca 1→4) GlcNAc (Le a)	+	0	++	0
Fuca1→2 Galβ 1→4 (Fuca 1→3) GlcNAc (Y)	+++	+++	+	+
	±GlcNAcβ 1 ↓ 4		±Fuca 1 ↓ 6	
Outer Chains	Manα 1↘6 Manα 1↗3 } Manβ 1→4 GlcNAcβ 1→4 GlcNAc→Asn			

N1 および AN は Table 1 参照。AN では非還元末端にさらにシアル酸が結合している。表の下にアスパラギン結合型糖鎖の基幹部の構造が示してある。Outer chain 部分には 1~4 本鎖のものがある。

+, <10%; ++, 10-25%; +++, >25%。

Table 3. 癌組織中与正常組織中 CEA 関連抗原の主な性状と局在組織

抗 原	局在組織	分子量 (daltons)	糖含量 % (w/w)	N末端 アミノ酸	$E_{280}^{1\%}$	同義語ないし類似抗原** () 内は局在組織
癌組織中の CEA	各種腫瘍組織	180000	50~60	Lys	4.88	
正常組織中の CEA 相当成分						
NCA-2*	胎 便	170000	46	Lys	4.52	MA (胎便)
NFA-2***	成人糞便	170000	47	Lys	4.80	CELIA (正常胃液) CEA-No (正常結腸粘膜) NCW (正常腸洗浄液) CEA-LI (正常結腸組織)
正常組織中の部分交差抗原						
NCA	肺・脾臓	90000	30	Lys	7.84	NGP (肺・脾臓, 各種腫瘍組織)
NFA-1***	成人糞便	20000	13	Ala	13.00	
NFCA***	成人糞便	90000	?	?	?	
BGP-I	胆 汁	90000	41	?	?	

* 略語は次のとおり。NCA: nonspecific cross-reacting antigen, NFA: normal fecal antigen, NFCA: normal fecal cross-reacting antigen, BGP-I: biliary glycoprotein-I

** それぞれの抗原の正式名, 報告者, 発表年は次のとおり。MA: meconium antigen (Primus et al., 1983), CELIA: CEA-like antigen (Vuento et al., 1976), CEA-No: CEA in normal colon mucosa (Fritsche and Mach, 1977), NCW: normal colon washings antigen (Todd et al., 1977), CEA-L1: CEA-like component-1 (Keep and Rogers, 1979), NGP: normal glycoprotein (Mach and Pusztaszeri, 1972).

*** NFA-1, NFA-2 および NFCA の三つの総称して normal fecal antigen (NFA) と呼ぶ。

Fig. 5. CEA および関連抗原の抗原構造と対応するモノクローナル抗体 (MAbs) の分類

ない抗原群である。いま一つのグループは正常成人糞便中に見いだされた NFA-2 と胎便中の NCA-2 で、両者とも物質的にも抗原的にも CEA とはなはだよく類似し、通常の抗 CEA 抗体では CEA との差異が認められない抗原である。しかし CEA, NFA-2 および NCA-2 の 3 者は抗原的にまったく同一ではなく、CEA には CEA 特異的抗原活性を証明することができ、Fig. 5 に示したように CEA の抗原構造を NCA- 共通部分, NFCA- 共通部分, NFA-1 共通部分, 糖鎖に由来する多様部分

および癌組織からの CEA に特異的な CEA 特異部分の五つの抗原部分に分けることができる。腫瘍マーカーとしての CEA の癌特異性は、CEA 特異的抗原部分の抗原活性をいかに正確にかつ感度よく検出するかにかかっているものと考えられる。そのためには CEA 特異的抗原部分を認識するモノクローナル抗体 (MAbs) の作製が不可欠である。これまでに 300 株以上の MAbs を作製し、そのうちのおもな 146 株についてその反応特異性を解析した結果、Fig. 5 に示したように上記五つの抗原部分に対応する五つの groups (I~V) に分けることができた¹³⁾。さらに各 group の MAbs 間の mutual inhibition の有無により、group I を四つの subgroups に、II を七つ、III を八つ、IV を四つ、V を二つの計 25 の subgroups に分けることができた。各 subgroup の MAbs が同じ抗原 epitope を認識しているものと単純に考えるならば、CEA 分子上には少なくとも 25 の epitopes が存在することになる。

CEA 特異部分を認識する group V の MAbs は 13 株得られ、それは subgroup a に 7 株、b に 6 株の二つに分けられる。したがって CEA 特異部分には少なくとも二つの抗原 epitope が存在するものと思われる。この二つの epitope はいずれもペプチド性であるが、NFA-2 や NCA-2 と CEA との間にペプチド構造上の差異が認められるか否か現時点では不明である。CEA

Fig. 6. ポリクローナル抗体を用いた従来の測定系 (kit I) とモノクローナル抗体を用いた新しい系 (kit II) の精製抗原との反応性の比較

とこれら関連抗原との抗原性の差が糖鎖による修飾のされ方の差異に基づく可能性もあり、今後のより詳細な検討が必要である。

CEA 特異的抗原部分に対する group V MAb を用いた新しい RIA の癌特異性

CEA の癌特異性は最終的には CEA を腫瘍マーカーとして検出する際の評価にまたねばならない。CEA の腫瘍マーカーとしての有用性が確立するにつれて、多くの CEA 測定キットが市販され入手可能になった。ところが一つの検体の測定値が用いるキットによりまちまちで、測定値にまったく整合性がみられないという新たな問題が生じてきた。その原因を解析した結果、それは患者血清中の CEA 分子上の糖鎖構造の多様性と不安定性および測定系に用いられている抗体標品中の糖鎖を認識する抗体の特異性や量の不均一性に基づくものであることが明らかになった。これらの点を考慮して、われわれは上記の MAbs のなかからとくに糖鎖の影響を受けない MAbs を選び、group II および III の MAbs を固相化抗体とし、group V の一つの MAb を標識抗体とする、現時点では best と考えられる RIA を確立した^{13,14)}。この系は Fig. 6 にみられるようにいずれの CEA 標品ともほぼ均一な反応を示し、標品間の反応性

の差異を解消することができた。

この測定系 (kit II) が実際の患者血清中の CEA 測定に用いられた際どのような癌特異性および癌感受性を示すかをポリクローナル抗体を用いた測定系 (kit I) との比較で検討した。まったく無選択の検体 619 例のうち、kit I での陽性例 (>3.5 ng/ml) は 92 例 (14.9%) で、kit II での陽性例 (>2.5 ng/ml) は 166 例 (26.8%) であった。kit I での陽性例は全例 kit II で陽性で、したがって 74 例 (12.0%) が kit I で陰性で kit II

Table 4. kit I で陰性、kit II で陽性を示した患者の臨床診断名

Diagnosis	No. of patients (sera tested)
Malignant diseases	38 (45)
Gastric cancer	18 (22)
Colorectal cancer	5 (5)
Oesophagus cancer	2 (2)
Pancreas cancer	1 (1)
Biliary cancer	2 (3)
Hepatoma	4 (5)
Breast cancer	5 (6)
Lung cancer	1 (1)
Benign diseases	12 (15)
Remained undiagnosed	8 (10)
Total	58 (70)

Table 5. kit I および kit II の陽性率の比較

	No. positive/No. tested	
	kit I (%)	kit II (%)
Normal	7/183 (3.8)	9/183 (4.9)
Pregnancy (latter months)	0/83 (0.0)	2/83 (2.4)
Benign		
Thyroid disease	0/31 (0.0)	2/31 (6.5)
Allergic disease	0/30 (0.0)	3/30 (10.0)
Hepatitis	7/57 (12.3)	9/57 (15.8)
Liver cirrhosis	19/50 (38.0)	29/50 (58.0)
Malignant		
Gastric ca.	38/97 (39.2)	73/97 (75.3)
Colorectal ca.	27/61 (44.3)	41/61 (67.2)
Esophageal ca.	6/11 (54.5)	9/11 (81.8)
Pancreatic ca.	26/45 (57.8)	33/45 (73.3)
Biliary ca.	8/20 (40.0)	10/20 (50.0)
Hepatoma	32/65 (49.2)	36/65 (55.4)
Lung ca.	19/33 (57.6)	19/33 (57.6)
Breast ca.	1/15 (6.7)	7/15 (46.7)
Bone and soft tissue sarcoma	0/17 (0)	0/17 (0)
Other ca.	4/17 (23.5)	6/17 (35.3)
(Total)	161/381 (42.3)	234/381 (61.4)
Overall sensitivity, specificity and accuracy	401+161/815 (69.0)	
	380+234/815	
	(75.3)	

で陽性という解離例となった。この 74 例の解離例中 70 例 (患者 58 名) の臨床診断を調査できた結果, Table 4 に示すように確定診断の得られた 50 名中 38 例 (76%) が悪性疾患であり, 12 名 (24%) が良性疾患であることが判明した。この解離例の過半数は 5 ng/ml 以下の低い値の CEA 陽性例で, 胃癌と肝癌の各 4 例を除くすべての癌患者が術後患者であった。このことは, 新しい kit II ではより癌特異的な型で CEA 陽性として患者の術後経過を追跡できることを示している。また 2.5 ng/ml という cut off 値が妥当な値であることも示しているものと思われる。

正常人, 末期妊婦, 良性疾患および悪性疾患患者につき, kit I と kit II での陽性率を比較したのが Table 5 である。悪性疾患全体では kit I (42.3%) に比し kit II (61.4%) で約 20% 近い陽性率の上昇が認められた。しかし良性疾患の偽陽性率に若干の上昇が認められ, とくに肝硬変患者においては 58% もの陽性例があ

り, なお完全に癌特異的系とはいいがたい。

ま と め

CEA および関連抗原の抗原構造の免疫化学的解析結果をもとに, 多数の MAbs の反応特異性を分類し, 不均一性の原因となる糖鎖の影響を極力排除するといったいわば理づめに作業を進めて作った測定系が kit II である。その実際の臨床応用の結果が Table 5 に示されている。これがはたして, 腫瘍マーカーとしての CEA の極限に近い姿であるのかどうか? その判断は, これまでのごとくたんに関連抗原との抗原性の差異に癌特異性の拠りどころを求めるのではなく, CEA の産生, 細胞内での存在様式, その放出過程や代謝機序あるいは生物学的活性の解明など CEA のより広い理解の上でなさるべきものと思われる。CEA の構造の解明がここまで進んだ現在, それもそう遠い将来のことではなさそうである。

文 献

- 1) Gold, P. and Freedman, S. O.: J. Exp. Med., **121**: 439, 1965.
- 2) Gold, P. and Freedman, S. O.: J. Exp. Med., **122**: 467, 1965.
- 3) Oikawa, S. et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun., **142**: 511, 1987.
- 4) Oikawa, S. et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun., **144**: 634, 1987.
- 5) Beauchemin, N. et al.: Mol. Cell. Biol., **7**: 3221, 1987.
- 6) Takami, N. et al.: J. Biol. Chem., (in press).
- 7) Hefta, S. A. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (in press).
- 8) von Kleist, S. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **69**: 2492, 1972.
- 9) Tawaragi, Y. et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun., **150**: 89, 1988.
- 10) Kuroki, Ma. et al.: Mol. Immunol., **19**: 399, 1982.
- 11) Yamashita, K. et al.: Cancer Res., **47**: 3451, 1987.
- 12) Matsuoka, Y. et al.: Cancer Res., **42**: 2012, 1982.
- 13) Kuroki, Ma. et al.: Jpn. J. Cancer Res. (Gann), **78**: 386, 1987.
- 14) Matsuoka, Y. et al.: Jpn. J. Clin. Oncol., **18**: 97, 1987.