

## 抗 CEA モノクローナル抗体による免疫組織化学的研究

藤田 英雄 今井 浩三

札幌医科大学内科学第1講座 (主任 谷内 昭 教授)

### Immunohistochemical Studies on Carcinoembryonic Antigen with Monoclonal Antibodies

Hideo FUJITA and Kohzoh IMAI

*Department of Internal Medicine (Section I), Sapporo Medical College*

*(Chief: Prof. A. Yachi)*

Using four distinct monoclonal antibodies to carcinoembryonic antigen (CEA), the molecular profile of which was clarified in our companion paper, immunohistochemical distribution of the antigenic determinants in both cancerous and non-cancerous tissues as well as in fetal tissues was studied using the immunoperoxidase method. All the monoclonal antibodies recognize different antigenic determinants on the tissue section. None of the antibodies stained granulocytes in the tested peripheral blood or normal liver tissues. Three of our monoclonal antibodies stained columnar epithelial cells in morphologically normal colonic mucosa. However, monoclonal antibody YK024 did not stain them. This antibody was also found to be unreactive with intestinal metaplasia lesions of the stomach, but reacted with a 16 week-old fetal stomach as well as cancerous parts of the colon and of the stomach. Moreover it was found that this monoclonal antibody mainly reacted with moderately or poorly differentiated adenocarcinoma lesions of the colon and the stomach. Periodate treatment in this study together with trypsin treatment on the antigen as described in our companion paper may suggest that this antibody recognizes the carbohydrate antigenic determinant in nature. But in the blocking test using several lectins, the determinant recognized by monoclonal antibody YK024 was not blocked.

(Received May 24, 1984 and accepted May 28, 1984)

**Key words:** Carcinoembryonic antigen, Monoclonal antibody, Immunohistochemistry

### 1 緒 言

Carcinoembryonic antigen (CEA)<sup>1,2)</sup>はその分子自体が多様な抗原性をもち<sup>3,4)</sup>、さらにそれと共通抗原性を有する nonspecific cross-reacting antigen (NCA)<sup>5)</sup>、nonspecific cross-reacting antigen 2 (NCA2)<sup>6)</sup>などが発見されるに至り、それらの関係は複雑に論議されてきた。しかし現在ではポリクローナル抗体による CEA および CEA 類縁抗原分子の解析には限界があると言わざるを得ない。この点を解明すべく当教室においては CEA に対するモノクローナル抗体を作製し、守谷・今井<sup>7)</sup>がその特異性、免疫化学的に対応する CEA の抗原決定基を解析し臨床応用への手がかりを得た。本研究においてはそれに平行してわれわれの

作製したモノクローナル抗体により免疫組織学的検索を行ない、抗原決定基レベルでの CEA の分布を観察するとともにその抗原決定基の組織化学的性状の解明を試みた。

### 2 実験方法

#### 2.1 実験材料

実験材料としては1981年2月より2年間に手術により得られた癌あるいは潰瘍病変を有する組織66例を用いた。さらに内視鏡下および腹腔鏡下にて採取された正常とおもわれる胃粘膜5例、大腸粘膜5例および肝組織5例を材料とし、ヒト胎児組織は16, 24 および32週齢のものをそれぞれ1例用いた。なお病理組織診断は胃癌取扱い規約<sup>8)</sup>および大腸癌取扱い規約<sup>9)</sup>に従っ

た。次に培養細胞としてはいずれも CEA を産生するヒト胃癌細胞 KATO III およびヒト大腸癌細胞 BM314 であり、それぞれ東大医科研・関口守正助教授およびカルフォルニア大学 Walter A. Nelson-Ree 教授より供与された。これらの細胞は培養上清中に CEA を放出し、その濃度はそれぞれ 40.5 ng/ml および 37.4 ng/ml であることがポリクローナル抗 CEA 抗体を用いた radio-immunoassay により判明している。

## 2.2 モノクローナル抗体の作製

モノクローナル抗体 YK013 および YK024 は Köhler and Milstein<sup>10)</sup> に準じて以下の方法で作製した。すなわち胃癌培養細胞 KATO III  $1 \times 10^7$  個を 1~2 週間隔で 6 週齢雌 BALB/c マウス (日本クレア) の腹腔内に 4 回免疫し最終免疫より 3 日目に脾を摘出し、HAT 感受性のマウス骨髄腫細胞 X63-Ag 8.653 と細胞融合を行ったが、この論文の姉妹編である守谷・今井の論文<sup>7)</sup> に詳しく記述した。

またモノクローナル抗体 AS001 および AS005 の作製は免疫原として大腸癌肝転移より既報の方法<sup>11)</sup> で純化した CEA を用い、マウス骨髄腫細胞として Sp2/O-Ag14 を使用した以外は上述と同様の方法<sup>10)</sup> による。モノクローナル抗体 CEA010 は精製 CEA に対するもので大阪大学第二外科・森 武貞教授より供与された。

得られたハイブリドーマを細胞培養フラスコ (Corning 25110, USA) を用いて大量に培養、あるいは BALB/c マウス (日本クレア) 腹腔内にて増殖させた。抗体の精製は、培養上清および腹水より細胞成分を除いた後 33% 硫酸を用いて塩析し、次に DE52 (Whatman, England) および Sephadex G200 (Pharmacia, Sweden) を用いてゲル濾過して行った。

## 2.3 組織・細胞の固定および組織切片の作製

手術により得られた胃・大腸組織および生検組織材料は 10% ホルマリンないしは 95% エタノールにて固定した後、パラフィン包埋し 4~5  $\mu\text{m}$  の連続切片を作製した。培養細胞および血液細胞については塗沫後 10% ホルマリン、95% エタノールならびに冷アセトン固定を併用した。なおペプシンの酵素処理に用いた組織切片は 95% エタノールおよび Carnoy 固定したものを使用した。

## 2.4 間接免疫ペルオキシダーゼ法

山田・中根<sup>12)</sup> の方法に準じた。すなわちパラフィン組織切片をベンゼンに 10 分間浸し脱パラフィンを行った後、これを 0.3% 過酸化水素水-メタノール中に室温で 30 分間反応させ内因性ペルオキシダーゼを除去した。

次に二次抗体の非特異的反応を防ぐ目的で組織切片

に、正常ウサギ血清をリン酸生食緩衝液 (PBS) pH 7.4 にて 40 倍希釈したものを室温にて 30 分間反応させ、次に PBS で各 5 分間、3 回洗浄した後、一次抗体としてそれぞれのモノクローナル抗体を加湿器中で室温 30 分間反応させ、再び PBS にて 3 回洗浄した。二次抗体はペルオキシダーゼ標識ウサギ抗マウス免疫グロブリン (DAKO, Denmark) を PBS にて 40 倍希釈し、一次抗体と同様の条件で反応させた後、PBS にて同様に洗浄した。その後ペルオキシダーゼの基質として 3-3' diaminobenzidine (東京化成) 40 mg/dl を 0.01% 過酸化水素水加 0.05 M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.6) 100 ml 中に溶解しその中に組織切片を室温にて 1~2 分間反応させ発色させた。標本切片は滅菌水にて洗浄し 0.2% メチルグリーンに 5 分間浸し染色させ、エタノールおよびキシロールにて脱水し、エンテラン (Merk, West Germany) にて包埋後検鏡した。なおモノクローナル抗体は 1 mg/ml に濃度調整した後、これを PBS にて 50, 100, 200, 400, 800 および 1,600 倍に希釈して検討し、いずれの抗体も 400 倍体まで明らかな染色が得られることを確認した上で一律に 200 倍として使用した。なお対照標本の作製には一次抗体の代わりに、PBS, 正常マウス血清 (PBS にて 100 倍希釈) およびマウス骨髄腫細胞 P3-X63-Ag8 の培養上清をそれぞれ用いた。

## 2.5 ウサギ抗 CEA ポリクローナル抗体による阻止試験

2.4 において一次抗体であるモノクローナル抗体を反応させる前に、ウサギ抗 CEA 血清 (DAKO, Denmark) を PBS にて 40 倍希釈の上、加湿下室温にて 30 分間反応させ、以下 2.4 の手順に従って処理しポリクローナル抗体の反応によってモノクローナル抗体の反応が阻止されるか否かを検討した。対照としてウサギ抗 CEA 血清を反応させた後、ペルオキシダーゼ標識ブタ抗ウサギ免疫グロブリン血清 (DAKO, Denmark) を PBS にて 40 倍希釈したものをを用い、モノクローナル抗体による組織切片の染色性と比較検討した。

## 2.6 抗 CEA モノクローナル抗体の対応抗原決定基に関する組織化学的検討

### 2.6.1 過ヨウ素酸処理

組織切片を内因性ペルオキシダーゼ除去の後、既報の方法<sup>13)</sup> に準じて 1% 過ヨウ素酸にて 5, 10, 20, 30 および 60 分間反応させその後 2.4 に従ってモノクローナル抗体を反応させ、モノクローナル抗体の反応に対する過ヨウ素酸処理の影響を検討した。

### 2・6・2 ペプシン処理

95%エタノール固定あるいは Carnoy 固定した組織切片において内因性ペルオキシダーゼ除去後、既報の方法<sup>14)</sup>に準じて 0.02 N-HCl (pH 1.6) 中 2 mg/ml としたペプシン (Sigma, USA) 溶液中に切片を 30, 60 および 120 分間、37°C 加湿下にてインキュベートし、その後 2・4 の手順に従って処理し、モノクローナル抗体に対応する抗原決定基に及ぼすペプシンの影響を検討した。

### 2・6・3 各種レクチンによる阻止試験

Ulex europeus (UEA), Canavalia ensiformis (Con A), Triticum vulgare (WGA), Ricinus communis (RCA) の各種ビオチン化レクチン (Vector Lab., USA) を用い既報の方法<sup>15)</sup>に従ってそれぞれ 50  $\mu\text{g/ml}$  に濃度調整の上、組織切片を 30 分間室温加湿下にて反応させた後、モノクローナル抗体の反応性を 2・4 の手順に従って検討した。対照として組織切片にビオチン化レクチンを反応させた後、ペルオキシダーゼ標識アビジン (Vector Lab., USA) 1  $\mu\text{g/ml}$  を加湿下室温にて 30 分間処理し、各種レクチンの反応が陽性であることを確めた。

## 3 成 績

### 3・1 方法の検討

#### 3・1・1 固定方法の検討 (Table 1)

CEA 産生性培養細胞 KATO III および BM314 を 10%ホルマリン、95%エタノールおよび冷アセトンに

**Table 1** Comparison of the staining intensity due to fixation method.

Fixation	Monoclonal antibodies			
	YK013	YK024	AS001	AS005
95% Ethanol	++	+/-	++	+/-
10% Formalin	+	++	+	+
Acetone	+	+	+	+

++ : strongly positive staining  
+ : moderately positive staining  
+/- : weakly positive staining  
- : negative staining

より固定した後、抗 CEA モノクローナル抗体の染色性を比較した。

その結果抗体 YK024 および AS005 に関しては、ホルマリン固定ないしはアセトン固定がエタノール固定よりも強く染色され、抗体 YK013 および AS001 においてはエタノール固定ないしはアセトン固定の方がホルマリン固定よりも優れていた。従って以下モノクローナル抗体 YK024 および AS005 の検索には 10%ホルマリン固定を、抗体 YK013 および AS001 の検索には 95%エタノール固定をそれぞれ用いて研究を進めた。

#### 3・1・2 モノクローナル抗体および二次抗体の力価の検討

モノクローナル抗体はあらかじめ純化し、1 mg/ml に調整したが、これを用いる免疫組織学的検討に際して、あらかじめ CEA 産生培養細胞である KATO III および BM314 ならびに組織切片を用いてモノクローナル

**Table 2** Histological distribution of the antigenic determinants detected by monoclonal antibodies.

Tissues	Monoclonal antibodies			
	YK013	YK024	AS001	AS005
Colon	no. positive/no. tested (%)			
colonic mucosa of non-cancerous parts	18/20(90%)	0/20(0%)	11/13(85%)	10/13(78%)
Colon cancer	24/28(86%)	8/32(25%)	14/15(93%)	13/14(93%)
well differentiated adenocarcinoma	19/22(86%)	2/25(8%)	12/12(100%)	11/11(100%)
moderately differentiated adenocarcinoma	4/5(80%)	5/6(83%)	2/3	2/3
poorly differentiated adenocarcinoma	1/1	1/1	n. d.*	n. d.
Stomach				
gastric mucosa of non-intestinal metaplasia	0/16(0%)	0/16(0%)	0/10(0%)	0/11(0%)
gastric intestinal metaplasia	12/13(92%)	0/13(0%)	7/8(88%)	8/8(100%)
Gastric cancer	20/29(69%)	10/29(34%)	15/23(65%)	21/26(81%)
papillary adenocarcinoma	2/3	0/3	2/3	2/3
tubular adenocarcinoma				
well differentiated	8/12(67%)	3/12(25%)	9/11(82%)	11/12(92%)
moderately differentiated	2/3	2/3	1/2	1/2
poorly differentiated adenocarcinoma	2/3	2/3	1/2	3/4
signet-ring cell carcinoma	5/7(71%)	2/7(39%)	2/5(40%)	4/5(80%)
mucinous adenocarcinoma	1/1	1/1	n. d.	n. d.

\*n. d.: not done

抗体の力価を検討した。またそれぞれのモノクローナル抗体は凍結融解をくりかえすことを避けるために50  $\mu$ l 毎分注し、 $-20^{\circ}\text{C}$ に保存したが、この条件下では1年余たってもほぼ安定した抗体力価が維持され、その間200倍希釈での使用が可能であった。

二次抗体についても同様の検討を行ったが、異なるロットにおいても40倍希釈のものが至適希釈とおもわれた。

### 3・2 抗CEAモノクローナル抗体の反応する抗原決定基の分布 (Table 2)

#### 3・2・1 正常および非癌大腸粘膜における分布 (Fig. 1)

手術により摘出された非癌部大腸粘膜15例および内視鏡下生検により得られた正常大腸粘膜5例について各種抗CEAモノクローナル抗体の反応する抗原決定基の分布について検討した。

抗体YK013, AS001 および AS005 はいずれも大腸粘膜表層の被覆上皮および円柱上皮細胞において腺腔に面して、また細胞質に高頻度に陽性所見を認めた。

これに対して抗体YK024は検索しえた正常および非癌部大腸粘膜についてはFig. 1bに示すようにすべて陰性であった。

#### 3・2・2 大腸癌組織における分布

(Fig. 2, Fig. 3 および Fig. 4)

抗体YK013, AS001 および AS005 はそれぞれ86% (28例中24例), 93% (15例中14例) および93% (14例中13例)と高分化、中分化および低分化腺癌のいずれに対しても高率に陽性所見を認めた。これに対して抗体YK024は25% (32例中8例)と陽性率が低く、特に高分化腺癌においては陽性例が少なく、わずかに8% (25例中2例)についてのみ陽性を示したにとどまるが、一方中分化および低分化腺癌においては7例中6例と

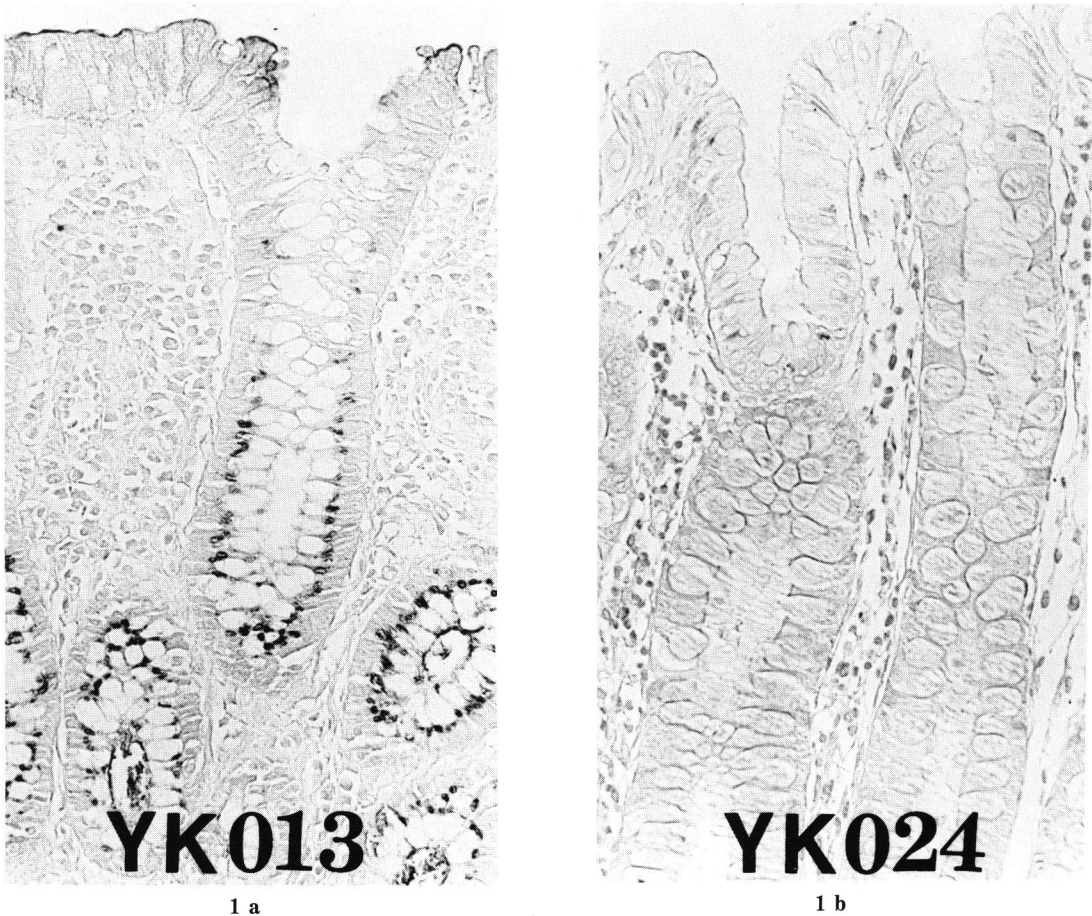
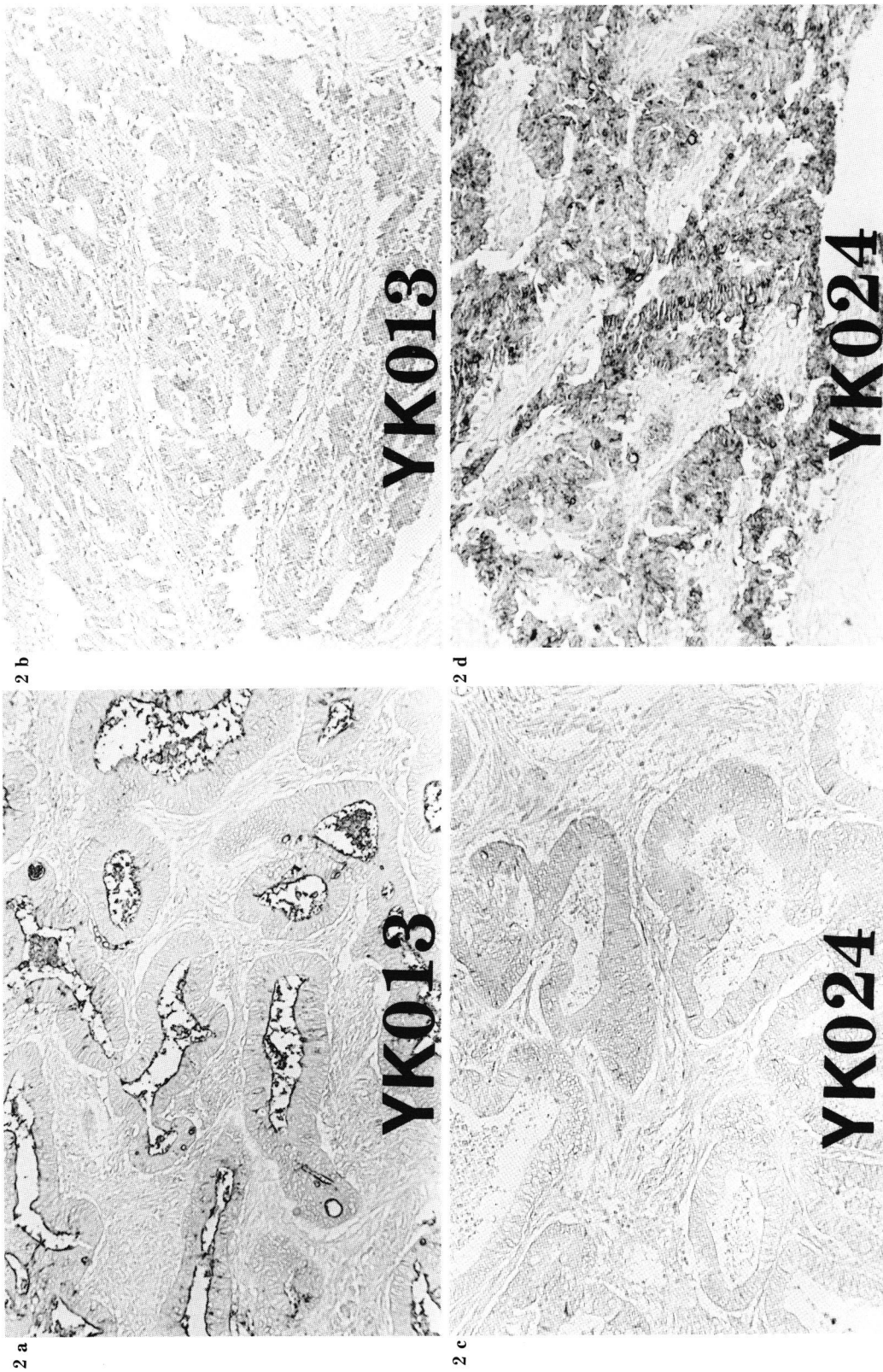
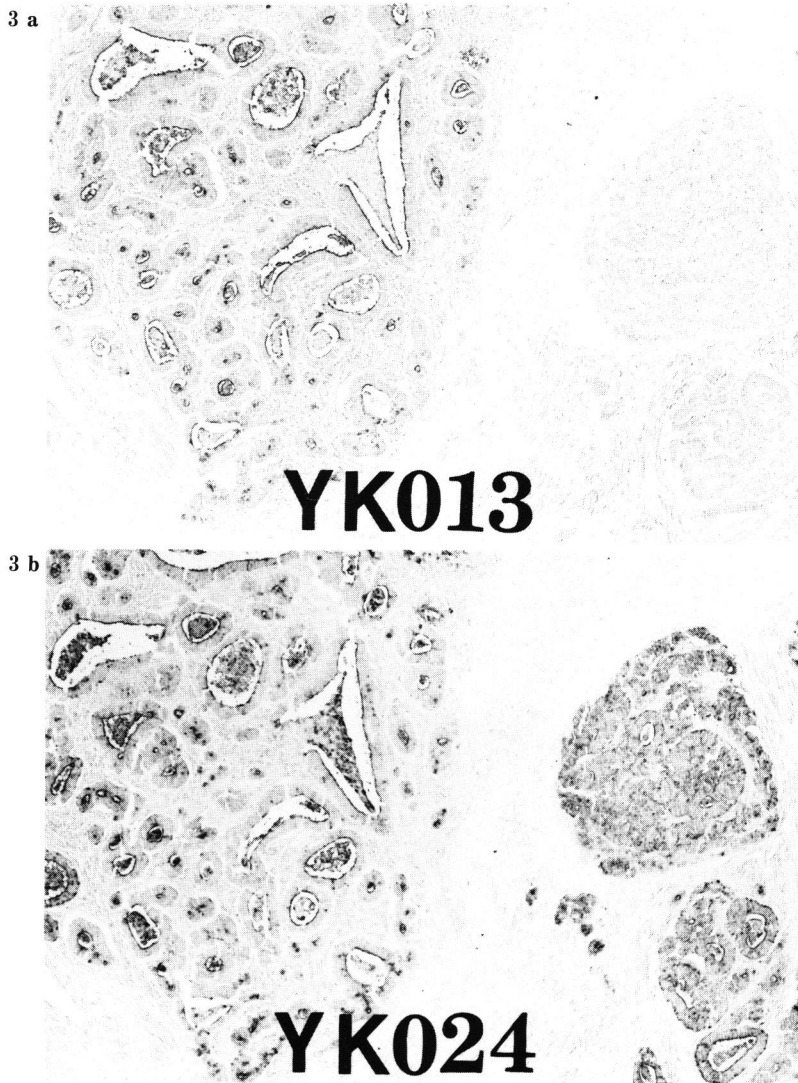


Fig. 1 Staining pattern of normal colonic mucosa. Monoclonal antibody YK013 (a) showed cytoplasmic staining, whereas antibody YK024 (b) did not. ( $\times 250$ )



**Fig. 2** Staining pattern of cancerous tissues. Monoclonal antibody YK013 stained the apical portion of well-differentiated adenocarcinoma lesions of the colon (a), however, it did not stain the moderately differentiated adenocarcinoma lesions of the colon (b). Antibody YK024 did not stain the well-differentiated adenocarcinoma lesions (c), however, it strongly stained the moderately differentiated adenocarcinoma lesions (d). (a, c :  $\times 250$ , b, d :  $\times 100$ )



**Fig. 3** Comparison of the staining pattern between antibody YK013 (a) and YK024 (b) in the moderately differentiated adenocarcinoma lesions of the colon. ( $\times 40$ )

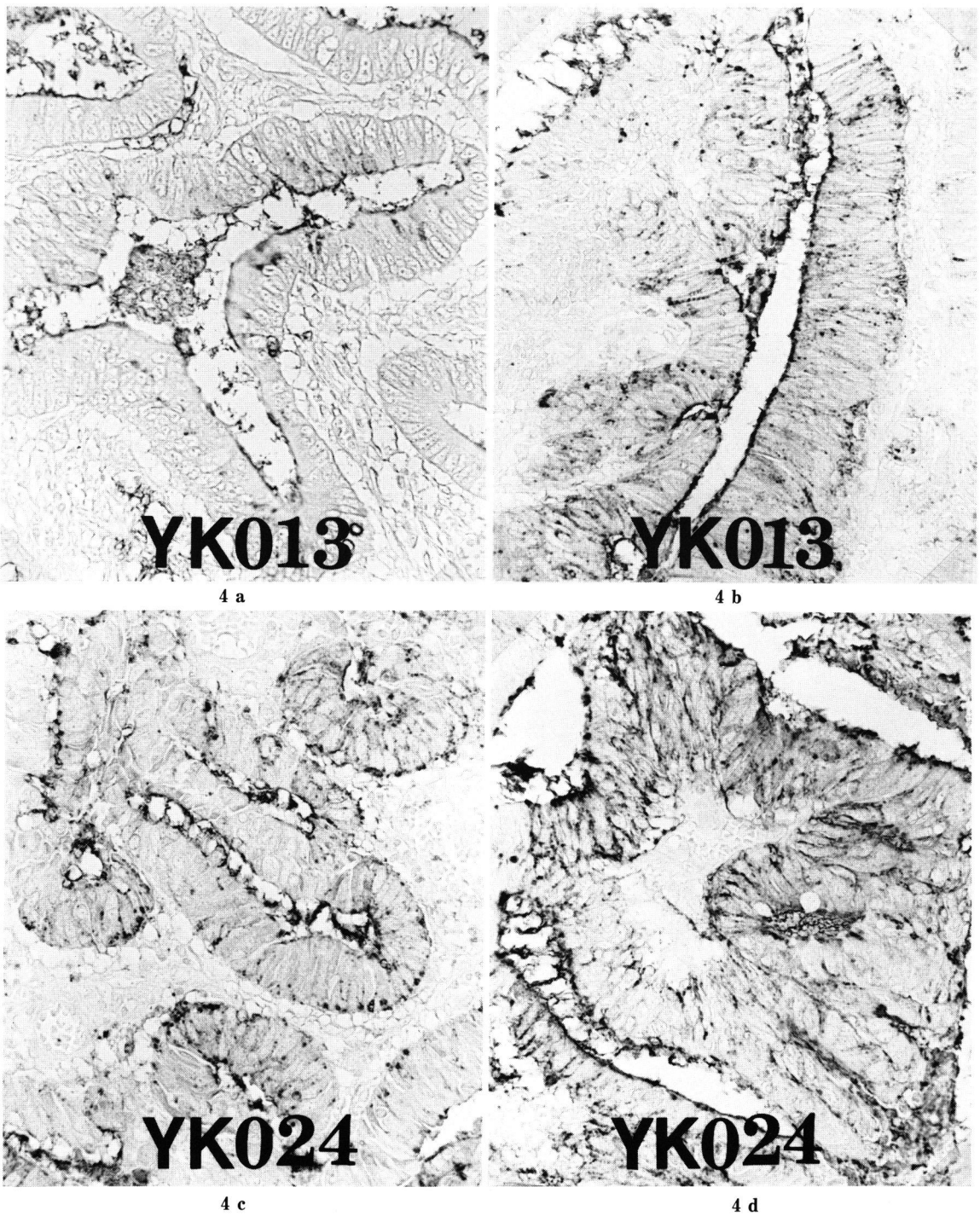
高率に陽性所見が認められ注目された。

そこで中分化腺癌の連続切片においてやや未分化な部位と腺腔形成を伴う部位とについて抗体 YK013 と抗体 YK024 の分布をさらに詳しく観察した。Fig. 3a に示すように抗体 YK013 は分化の程度が高い腺腔形成の明瞭な部位の腺腔内面に陽性所見を認めるが、腺腔形成の不明瞭な部位においては陰性であった。同部位を抗体 YK024 についてみると(Fig. 3b)、腺腔形成の明瞭な部位のみならず抗体 YK013 では陰性を示した腺腔形成の乏しい部位においても強い陽性所見が認められた。すなわち抗体 YK024 は比較的分化度の低い大腸癌

組織に高頻度に陽性所見を示すばかりでなく、同一癌組織内においてもそのような傾向が認められた。

また抗体 AS005 は抗体 YK013 と類似の染色パターンを示すことが多くみられ、抗体 AS001 は一部の切片において抗体 YK013 と YK024 の反応する部位の両者に陽性所見を認め、抗体 YK013 よりもやや広い範囲に染色を認めた。

次にそれぞれのモノクローナル抗体の癌細胞における染色パターンを比較した。抗体 YK013 では多くの場合、Fig. 4a に示すように癌細胞の腺腔に面して陽性を示したが、一部ではそれに加えて側壁膜にも陽性を示



**Fig. 4** Cellular localization of the antigenic determinant in a well-differentiated adenocarcinoma lesion of the colon, detected by monoclonal antibodies YK013 and YK024. The predominant staining pattern was a labeling of the apical surfaces of tumor cells and of intraglandular deposits (a). Both lateral and basement membrane stainings with the antibodies YK013 (b) and YK024 (c, d) in the well-differentiated adenocarcinoma lesions of the colon were also observed. ( $\times 400$ )

した (Fig. 4b). この傾向は抗体 AS001 および AS005 においても同様であった. また抗体 YK024 は Fig. 4c および Fig. 4d に示すように癌細胞の細胞側壁膜および基底膜にも高い頻度で陽性所見が認められた.

### 3・2・3 正常胃粘膜および非癌胃粘膜における分布

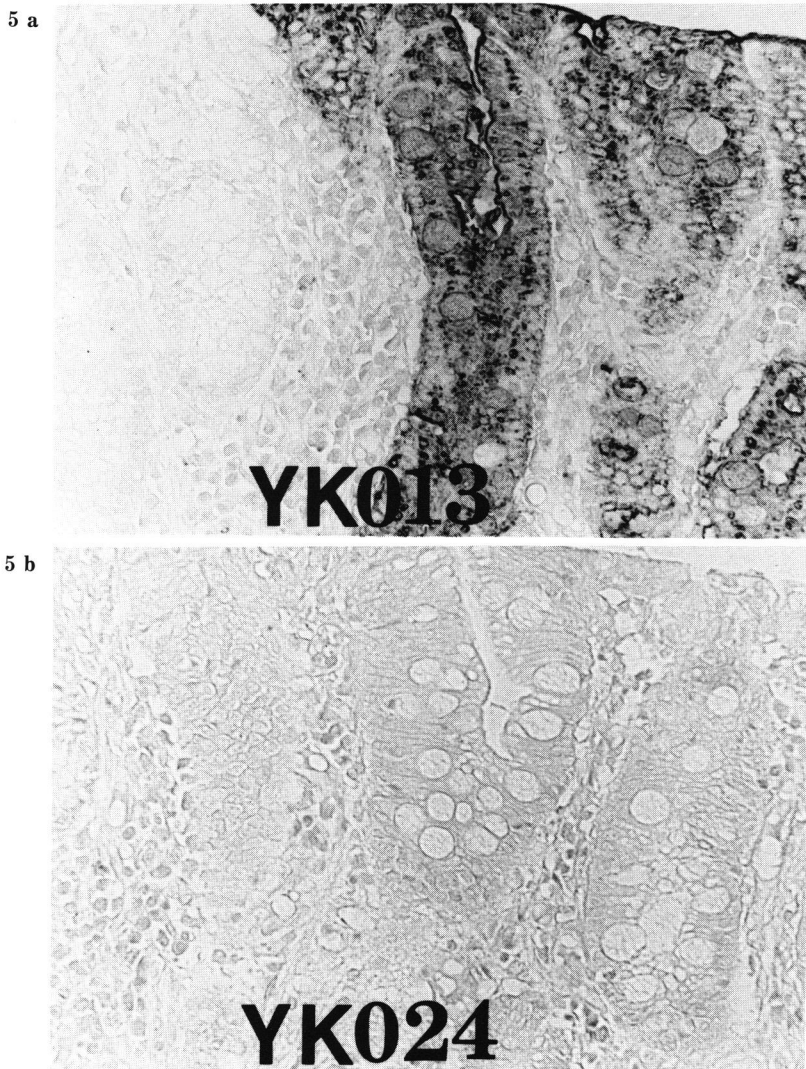
病理組織学的にはほぼ正常および非癌部の胃粘膜 16 例について検討した.

その結果抗体 YK013, YK024, AS001 および AS005 のいずれにおいても陽性所見は全くみられなかった.

### 3・2・4 胃の腸上皮化生組織における分布 (Fig. 5)

胃癌および胃潰瘍の手術症例中腸上皮化生を伴う 10 例と内視鏡下生検にて腸上皮化生を認めた 3 例について検討した.

抗体 YK013, AS001 および AS005 は腸上皮化生部に一致して化生腺管の吸収上皮細胞および杯細胞の細胞質および粘液空胞とその腺腔に面した部位に陽性所見が認められた. 特に抗体 YK013 (Fig. 5a) および AS005 は吸収上皮細胞のゴルジ野に相当すると思われる核上部に強い染色が認められた. これらに対して抗



**Fig. 5** Staining pattern of gastric intestinal metaplasia. Monoclonal antibody YK013 (a) showed cytoplasmic staining in columnar cells in the intestinal metaplasia lesions, whereas it failed to stain non-metaplastic regions adjacent to the metaplasia regions. Antibody YK024 (b) did not stain either regions. ( $\times 250$ )



体 YK024 は腸上皮化生部には全く反応を認めなかった (Fig. 5b).

### 3・2・5 胃癌組織における分布

胃癌手術症例 29 例について同様の検討を行った.

抗体 YK013, AS001 および AS005 は, 胃癌症例全体のそれぞれ 69% (29 例中 20 例), 65% (23 例中 15 例) および 81% (26 例中 21 例) と陽性率が高く, 乳頭腺癌, 高分化型および中分化型管状腺癌, 低分化腺癌, 印環細胞癌および粘液腺癌と広く種々の組織型に反応を示した.

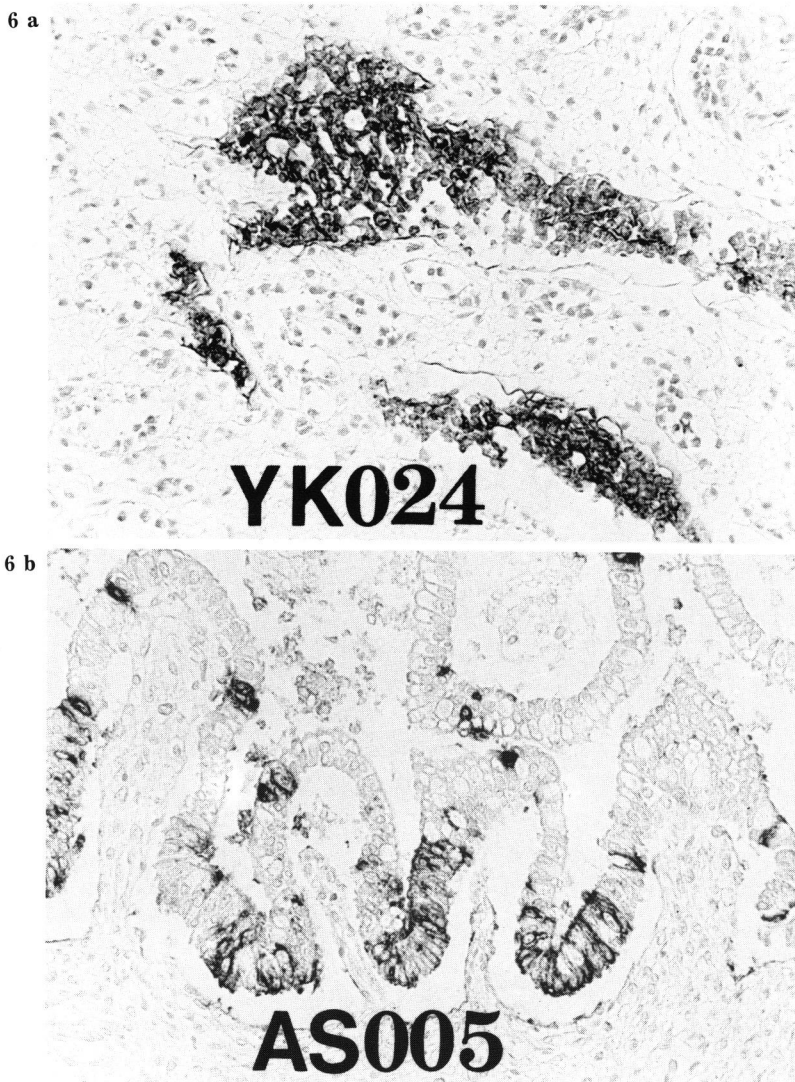
一方抗体 YK024 は全症例中 34% (29 例中 10 例) と

**Table 3** *Histological distribution of the antigenic determinants detected by monoclonal antibodies in human fetal gastrointestinal tissues.*

Tissues	Monoclonal antibodies			
	YK013	YK024	AS001	AS005
Stomach (16 weeks)	-	+	-	+
Colon (16 weeks)	-	-	+	+
Stomach (24 weeks)	-	-	-	+
Colon (24 weeks)	-	-	-	+
Stomach (32 weeks)	-	-	-	-
Colon (32 weeks)	-	-	-	-

+ : positive staining

- : negative staining



**Fig. 6** Representative staining pattern of the human fetal stomach and colon of a 16-week-old. Monoclonal antibody YK024 stained the fetal stomach (a). The typical staining pattern of the colon detected by antibody AS005 is shown in (b). ( $\times 250$ )

陽性率が他のモノクローナル抗体と比較してやや低く、乳頭腺癌、高分化型管状腺癌ではそれぞれ3例中0例、12例中3例と低い陽性率を示したが、中分化型管状腺癌、低分化腺癌、印環細胞癌および粘液腺癌では計14例中7例に陽性所見がみられ、大腸癌と同様に比較的分化の低い癌において陽性例が多く認められた。

### 3・2・6 胎児の胃および腸組織における分布

(Table 3 および Fig. 6)

胎生 16, 24 および 32 週の胎児胃・腸組織を用いて同様の検討を行った。

抗体 YK013 は検索の限りではいずれの週齢において

も陽性を示さなかった。抗体 YK024 は (Fig. 6a) 胎生 16 週の胃組織において腺管形成の乏しい部位の細胞質に強い陽性所見を認めたが、他の組織では陰性であった。抗体 AS001 は 16 週の腸組織において腺腔に面した部位に陽性を認めたが、他の組織では陰性であった。抗体 AS005 (Fig. 6b) は 16 週および 24 週の胃・腸組織の腺細胞およびその腺腔面に陽性を認めたが、32 週の組織では陰性であった。

### 3・2・7 肝・胆管組織における分布

肝生検材料 5 例について抗体 YK013, YK024, AS001 および AS005 の分布を検索したが、いずれも肝

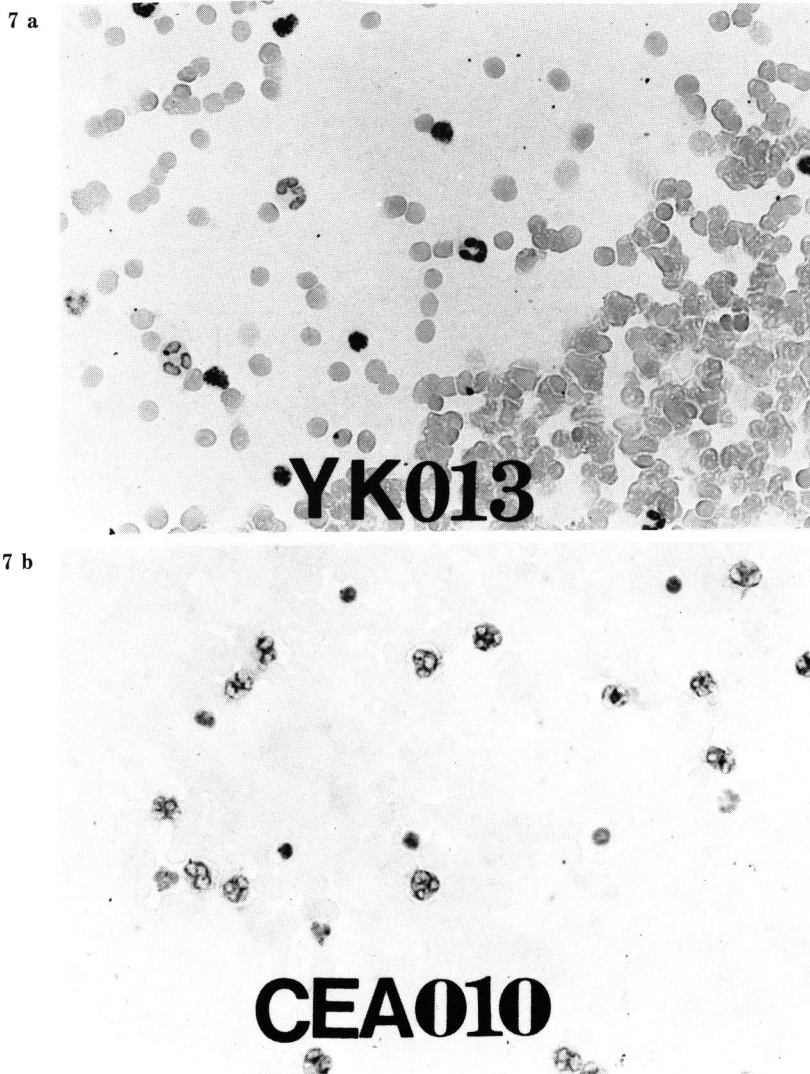


Fig. 7 Failure for the staining of granulocytes in the blood smears with monoclonal antibody YK013 (a). Monoclonal antibody CEA 010 stained the granulocytes (b). ( $\times 400$ )

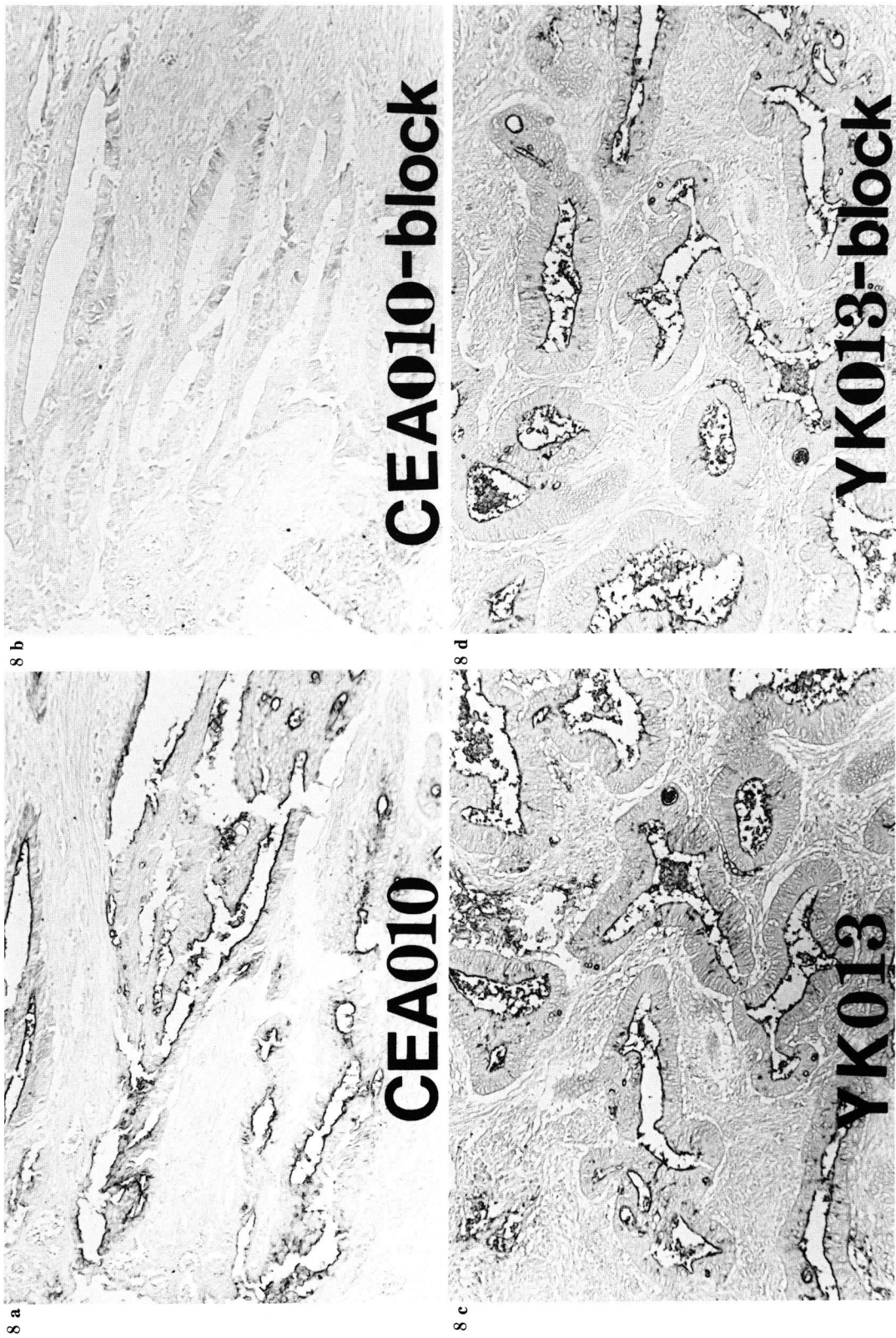
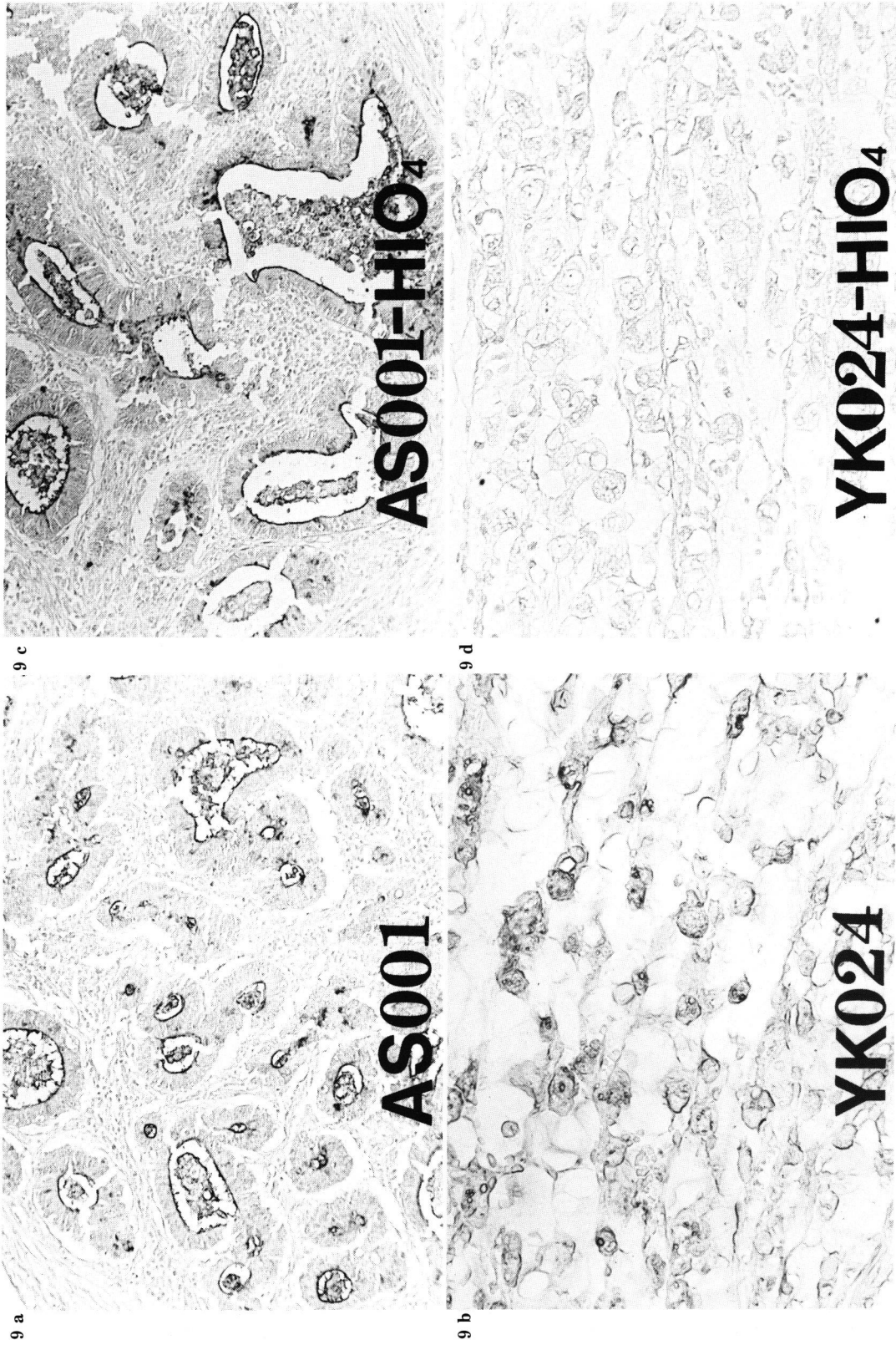


Fig. 8 Blocking experiments with anti-CEA polyclonal antibodies in adenocarcinoma of the colon. The stain of monoclonal antibody CEA010 (a) was completely blocked by the anti-CEA polyclonal antibodies (b), whereas the stain of monoclonal antibody YK013 (c) was not blocked by the polyclonal antibodies (d). (a, b :  $\times 40$ ; c, d :  $\times 250$ )



**Fig. 9** No difference was found on staining pattern of antibody AS001 in intensity and extent between before (a) and after treatment with periodic acid (b), whereas antibody YK024 failed to stain cancerous tissues after they had been treated with periodic acid (c, d). (a, b :  $\times 250$ , c, d :  $\times 400$ )

および胆管組織については陰性であった。

### 3・2・8 末梢白血球における分布 (Fig. 7)

末梢白血球塗沫標本 5 例について同様の検討を行った。抗体 YK013 (Fig. 7a), YK024, AS001 および AS005 はいずれも白血球に対して陰性であり、対照として用いた抗体 CEA010 のみが多核白血球に対して陽性を示した (Fig. 7b)。

### 3・3 ウサギ抗 CEA ポリクローナル抗体による阻止試験 (Fig. 8)

モノクローナル抗体 CEA010 においてはポリクローナル抗体の前処理により、この抗体の反応性は著しく減弱、消失し阻止試験は陽性であった (Fig. 8a, Fig. 8b)。一方同一条件下でモノクローナル抗体 YK013 (Fig. 8c, Fig. 8d), YK024, AS001 および AS005 の反応性はポリクローナル抗体による前処理の影響をうけず、阻止試験は陰性であった。またポリクローナル抗体を 40 倍希釈より 5 倍希釈に変更しても阻止反応は認められなかった。

### 3・4 モノクローナル抗体の反応する抗原決定基の組織化学的検討

抗 CEA モノクローナル抗体の反応する抗原決定基の生化学的性状の一部を検索するために組織切片に 2, 3 の化学的処理を加え、あるいは各種レクチンを用いて、モノクローナル抗体の反応性を比較検討した。

#### 3・4・1 過ヨウ素酸処理 (Fig. 9)

抗体 AS001 は 1% 過ヨウ素酸にて組織切片に 60 分間の処理を加えても、Fig. 9a および Fig. 9b に示すようにその染色性に変化は認められなかった。

抗体 YK013 は組織切片を 30 分間処理すると、その染色性はほぼ保たれているが、60 分間の処理ではその染色性はやや減弱を示した。

一方抗体 YK024 および AS005 は 5 分間の過ヨウ素酸処理にて Fig. 9c および Fig. 9d に示すようにその染色性は消失した。

#### 3・4・2 ペプシン処理

抗体 CEA010 は組織切片にペプシンを 30 分間反応させることによりその染色性は明らかに低下し、さらに 60 分間処理ではその染色性は消失した。抗体 YK013 および AS001 は 60 分間処理にて染色性の低下がみられたが、抗体 YK024 および AS005 はペプシン処理を行ってもその染色性に影響はみられなかった。

#### 3・4・3 各種レクチンによる阻止試験

抗原決定基の組織分布が他のモノクローナル抗体と異なる抗体 YK024 は、過ヨウ素酸感受性・ペプシン抵

抗性よりその決定基に糖鎖の関与が示唆された。そこで UEA, Con A, RCA および WGA のレクチンにより阻止試験を行ったが、いずれのレクチンおよびこれら種々のレクチンを組合せても抗体 YK024 の反応性に影響はみられなかった。

## 4 考 察

本研究においては守谷・今井の研究<sup>7)</sup>と平行して、CEA に対するモノクローナル抗体を用いて CEA 分子の組織内分布を、抗原決定基レベルで免疫組織化学的に明らかにする目的で NCA, NCA2 とは交叉反応を認めない 4 種の抗 CEA モノクローナル抗体を作製し、詳細に検討した。

モノクローナル抗体の反応する抗原決定基の分布を検索するにあたり、まず組織および細胞の固定法について検討した。その結果抗体 YK024 および AS005 の場合にはホルマリン固定ないしはアセトン固定が、抗体 YK013 および AS001 ではエタノール固定が、それぞれ他の固定法に比較して適切であることを確めた。

これまで Goldenberg *et al.*<sup>18)</sup>をはじめとして多くの研究者<sup>17,18)</sup>は、ポリクローナル抗体により CEA の組織分布を検索してきたが、その際には一般にホルマリン固定が用いられた。最近、Primus *et al.*<sup>19)</sup>は正常大腸粘膜の場合にはホルマリン固定では CEA の検出は困難であるが、1% 酢酸-95% エタノール固定では明瞭な陽性染色が得られるとしている。このような固定法による染色性の差異には抗原決定基の化学的性状が反映していると推測される。従って固定法の選択は単一抗原決定基に反応するモノクローナル抗体を用いる場合には特に重要である。

正常および非癌大腸粘膜に対しては抗体 YK013, AS001 および AS005 がそれぞれ陽性反応を示したが、一方抗体 YK024 は興味あることには 20 例の切片においていずれも陰性成績を示した。正常および非癌大腸粘膜上皮には NCA2 の存在が報告されているが、NCA2 は正常胃腺にも分布しており<sup>20)</sup>、この点今回のいずれのモノクローナル抗体も免疫組織学的検索面からも NCA2 との交叉反応性はないと考えられた。

さらに大腸癌について検討すると、抗体 YK013, AS001 および AS005 は高分化腺癌から低分化腺癌のいずれの組織にも高頻度に強い陽性反応を示すのに対して、抗体 YK024 は高分化腺癌でその陽性率はわずかに 8% であるのに中分化ないしは低分化腺癌においては高頻度 86% に反応を認めた。

このように癌の分化の程度により抗体 YK024 の反応

性が他のモノクローナル抗体と異なることが判明したが、その理由については、1) 低分化癌組織における CEA には抗体 YK024 に反応する抗原決定基が多量に存在し、正常ないし非癌大腸粘膜および高分化癌組織における CEA にはそれが極めて少ないか、あるいは欠落している可能性、2) 抗体 YK024 に対応する抗原決定基を共通に有し、CEA、NCA および NCA2 とは異なる分子が低分化癌組織に存在している可能性、などが考えられる。後者についてはこれまでの守谷・今井の検索<sup>7)</sup>からはその可能性は低い、さらに各組織から抗原を抽出して SDS-ポリアクリルアミド電気泳動法ならびに western blotting 法により検討中である。

大腸癌組織においては、CEA の分布と癌の分化程度との関連性についてはこれまでも抗 CEA ポリクローナル抗体を用いて検討されてきた。例えば Denk *et al.*<sup>21)</sup> および O'Brien *et al.*<sup>22)</sup> は大腸癌の中でも高分化腺癌では高率に CEA の存在を認めるが、低分化腺癌ではその一部にしか CEA を認めないとし、Goslin *et al.*<sup>23)</sup> は CEA は低分化腺癌の中でも腺腔形成のみられる比較的分化傾向の高い部分に存在すると報告した。一方 Pihl *et al.*<sup>24)</sup> は癌の分化の程度と CEA の存在との間には関連性を認めないとした。さらに Rognum *et al.*<sup>25)</sup> は蛍光抗体法により CEA は高分化腺癌よりむしろ中分化ないしは低分化腺癌に有意に高濃度に分布していることを報告しており意見の一致をみていない。

これらの成績の相違は主として 1) 使用されたポリクローナル抗体の特異性、2) 免疫組織学的検索方法、3) 癌組織内における CEA 自体の抗原性の違い、あるいはこれらの複数要因によるものと考えられる。特にポリクローナル抗体の特異性がこれまで問題にされてきたが、この限界を打破するものとしてモノクローナル抗体が期待され、個々の抗原決定基の検出およびその吟味が可能になった。

抗体 YK024 の反応する抗原決定基は明確に中分化ないしは低分化腺癌に高濃度に存在するため、これが血中に出現する場合には、本抗体により検出が可能となろう。つまり一般に血中 CEA 値が低い傾向を示す中分化ないしは低分化腺癌において本抗体を利用した微量測定法について検討する必要がある。

癌細胞内における CEA の局在について Ahnen *et al.*<sup>26)</sup> はポリクローナル抗体を用いて非癌細胞においては腺腔面に CEA の局在を認めるが、癌細胞においてはその極性が失われ腺腔面のみならず基底膜および側壁膜にも CEA の存在を認め得ることを報告したが、著者らのモノクローナル抗体を用いた検索でも同様の現象

が認められている。

一方抗体 YK024 の局在は中分化腺癌では腺腔面、基底・側壁膜部位のみならずしばしば癌細胞の細胞質にも認められ、また同一癌組織切片内の観察で、高分化を示す部分では抗体 YK013 と同様腺腔面に陽性所見を示した。以上の成績より抗体 YK024 の反応する抗原決定基の局在は、癌の分化との関連性を推測させ興味が持たれた。

胃の腸上皮化生部においても、抗体 YK013、AS001 および AS005 の反応する抗原決定基は検出されたが、抗体 YK024 のそれは認められず、検索し得た正常および非癌部の大腸・胃組織においては、本抗体の反応性は認められなかった。従って抗体 YK024 の反応する抗原決定基が癌細胞に限局して存在している可能性が示された。しかし厳密な癌特異性を論じるにはさらに消化器以外の組織をも含めた広範な検索を要しよう。

なお抗体 YK013 および AS005 が腸上皮化生の吸収上皮細胞においてゴルジ野に相当する核上部に強い顆粒状の染色を示したことは、細胞での糖蛋白生成の場のひとつとしてゴルジ野が位置付けられている<sup>27)</sup> ことと合わせるとこの両抗体は CEA の合成過程を知る上で有用なものとなる可能性がある。現在これらの抗体を用いて CEA の超微形態の局在や CEA の細胞内における分子形態をも含めて検討中である。

以上考案してきたように、本研究に用いたモノクローナル抗体の反応する抗原決定基の免疫組織学的分布は明らかにこれまでのポリクローナル抗体とは異なっているため、次に抗原決定基の組織生化学的性状を検討した。すなわち抗体 AS001 の反応性は組織切片の過ヨウ素酸処理に影響されないが、抗体 YK024 および AS005 は過ヨウ素酸に対して感受性であり後 2 者の認識する抗原決定基には糖鎖が関与している可能性が示唆された。

Hammerström *et al.*<sup>28)</sup> および Egan *et al.*<sup>29)</sup> は CEA 標品に対して過ヨウ素酸処理による Smith 分解をくりかえし行い糖鎖部分を除去しても抗 CEA 抗体の反応性が変らないことより、CEA の抗原決定基は主として非糖鎖部分にあるとした。これはポリクローナル抗体には CEA のペプチド部分の抗原決定基を認識する抗体が多く含まれているためと考えることもできよう。この点著者らのモノクローナル抗体 YK024 および AS005 の反応性はいずれも抗 CEA ポリクローナル抗体 (DAKO 社製) では阻止されなかった。

さらに抗原決定基に対するペプチドの関与を検討するために組織切片のペプシン処理を行った。過ヨウ

素酸処理に抵抗性である対照として用いたモノクローナル抗体 CEA010 はペプシン処理によりその反応性が消失したことより、この対応抗原決定基にはペプチドの関与が示唆された。一方、過ヨウ素酸処理に対して感受性である抗体 YK024 および AS005 はペプシン処理にて明らかな反応性の低下がみられず、これらの抗原決定基にはペプチドは関与していないことが示唆された。

本研究と平行して、守谷・今井<sup>7)</sup> は CEA 分子を用いた radioimmunoprecipitation および SDS-ポリアクリルアミド電気泳動法により検討し、抗体 YK013 および AS001 は、精製 CEA のトリプシン処理により反応を失うのに対して、抗体 YK024 および AS005 はトリプシンの影響を受けないことが判明しており、今回の成績を支持する結果を得ている。

そこで対応抗原決定基に糖鎖が関与していると推測され、免疫組織学的反応性においても極めて興味のある抗体 YK024 についてあらかじめ切片を UEA, Con A, RCA および WGA のレクチンで前処理しておき、抗体 YK024 の反応性を検討したが、いずれの場合にも阻止反応はみられなかった。従って抗体 YK024 はこれらのレクチンの認識する糖鎖構造には反応していないものと考えられた。

これまで CEA に対するモノクローナル抗体の作製に関してはいくつかの報告があるが、その組織分布について検討したものは少ない。Primus *et al.*<sup>30)</sup> は CEA 標品を免疫原としてモノクローナル抗体を作製し、10%ホルマリンあるいは1%酢酸-95%エタノール固定の組織切片を用いてその分布を検討した。その結果モノクローナル抗体 NP-4 は NCA, NCA2 とは反応しないが、大腸癌および正常大腸粘膜にその抗原決定基の存在を認めると報告した。この抗体 NP-4 は著者らの抗体 YK013, AS001 および AS005 とその組織分布について類似するが、反応する分子ならびにその抗原決定基の性状については全く検索されていない。Wagener *et al.*<sup>31)</sup> は CEA に対するモノクローナル抗体を作製し、大腸癌をはじめ肺癌、乳癌、肝、白血球などについてその組織分布を検討したが、いずれの抗体も白血球あるいは胆管上皮細胞と反応を示しており、この点 NCA とは交叉反応性を認めない著者らのモノクローナル抗体とは異なっている。

以上のことより著者らの作製した抗 CEA モノクローナル抗体 4 種の中、特に抗体 YK024 は反応する抗原決定基のユニークな組織内分布を示し、さらに抗原決定基に糖鎖が関与している可能性からみて、これまでに

全く報告をみないモノクローナル抗体と考えられ、特にその癌特異性、癌の分化度ならびに血中 CEA レベルとの関連性が注目された。血中 CEA レベルについては現在教室において高感度微量測定法を設定して検索中である。

## 5 結 論

CEA 産生細胞および精製 CEA を免疫原として CEA に対する 4 種のモノクローナル抗体を作製し、これを用いて詳細な免疫組織化学的検索を行い以下の成績を得た。

1) 抗体 YK013, AS001 および AS005 は正常大腸粘膜および胃の腸上皮化生部にその陽性反応を認めたが、抗体 YK024 では他のモノクローナル抗体とは異なり反応性を認めなかった。

2) 大腸癌において抗体 YK013, AS001 および AS005 は高分化～低分化腺癌と各種の組織型に高率にその陽性反応を認めたが、抗体 YK024 は高分化腺癌よりむしろ低分化腺癌において高率に陽性成績を示した。さらに同一癌組織内においても抗体 YK024 は低分化傾向を示す腺癌に強い陽性を示すことが観察され、抗体 YK024 の反応する抗原決定基は低分化腺癌に関連している可能性がうかがわれた。

3) 抗 CEA ポリクローナル抗体を用いて組織切片上で阻止試験を行った。対照に用いた抗体 CEA010 の反応はポリクローナル抗体により阻止されるが、抗体 YK013, YK024, AS001 および AS005 は阻止されず、いずれの抗体もポリクローナル抗体では認識されないユニークな抗原決定基を認識していることが示唆された。

4) 組織切片を過ヨウ素酸およびペプシンで処理してその影響を検討し、モノクローナル抗体の反応する抗原決定基の性質について検討した。その結果抗体 YK024 および AS005 の抗原決定基には糖鎖が、抗体 AS001 の抗原決定基にはペプチドがそれぞれ関与している可能性が示された。

5) 以上の知見より抗体 YK024 はこれまでに報告をみないユニークな抗 CEA モノクローナル抗体と考えられ、その意義および臨床応用への可能性について考案を加えた。

## 謝 辞

御指導、御校閲いただいた谷内 昭教授、御指導、御協力いただいた川原田 信博士に感謝します。

また免疫組織学的検索を御指導いただいた本学病理

学第二講座伝法公磨助教授ならびに組織材料を御提供いただいた諸先生に深謝します。

本研究は文部省がん特別研究 I および II (谷内, 今井), 厚生省がん研究助成金 (谷内, 今井) ならびに高松宮妃がん研究助成金 (谷内) の補助によった。

## 文 献

- 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).
- Gold, P. and Freedman, S. O.: Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *J. Exp. Med.* **121**, 467-481 (1965).
- Coligan, J. E., Egan, M. L., Guyer, R. L., Schunute, W. C. and Todd, C. W.: Part V. The biology and chemistry of carcinoembryonic antigen. Structural studies on the carcinoembryonic antigen. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **259**, 355-365 (1975).
- Vrba, R., Alpert, E. and Isselbacher, K. J.: Carcinoembryonic antigen: Evidence for multiple antigenic determinants and isoantigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 4602-4606 (1975).
- von Kleist, S., Chavenel, G. and Burtin, P.: Identification of an antigens from normal human tissue that crossreacts with the carcinoembryonic antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**, 2492-2494 (1972).
- Burtin, P., Chavenel, G. and Hirsch-Marie, H.: Characterization of a second normal antigen that crossreacts with CEA. *J. Immunol.* **111**, 1926-1928 (1973).
- 守谷保夫, 今井浩三: モノクローナル抗体を用いた CEA の免疫学的研究. 札幌医誌 **53**, 455-467 (1984).
- 胃癌研究会編: 臨床・病理 胃癌取扱い規約, 37-86, 金原出版, 東京 (1979).
- 大腸癌研究会編: 臨床: 病理 大腸癌取扱い規約, 33-60, 金原出版, 東京 (1980).
- Köhler, G. and Milstein, C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**, 495-497 (1975).
- 川原田 信, 谷内 昭: Carcinoembryonic Antigen (CEA) の免疫化学的研究. 札幌医誌 **42**, 129-145 (1973).
- 山田剛太郎, 中根一穂: 酵素抗体法, 免疫実験操作法 VII, 1919-1928, 日本免疫学会編, 金沢 (1981).
- Kiernan, J. A.: *Histological & histochemical methods: Theory & practice*, 153-156, Pergamon press. Oxford (1981).
- Pearse, A. G. E.: *Histochemistry, Theoretical and applied*, fourth edition. vol.1. 289-291, Churchill Livingstone, Edinburgh (1980).
- 平野 寛: 組織細胞化学 1981, レクチンの組織細胞化学的応用, 17-39, 学際企画, 東京 (1982).
- Goldenberg, D. M., Sharkey, R. M. and Primus, F. J.: Carcinoembryonic antigen in histopathology: Immunoperoxidase staining of conventional tissue sections. *J. Natl. Cancer Inst.* **57**, 11-22 (1976).
- Wiley, E. L., Mendelsohn, G. and Eggleston, J. C.: Distribution of carcinoembryonic antigens and blood group substances in adenocarcinoma of the colon. *Lab. Invest.* **44**, 507-513 (1981).
- Wagener, C., Hain, F., Födtsch, H. -J. and Breuer, H.: Localization of carcinoembryonic antigen in embryonic and fetal human tissues. *Histochemistry* **78**, 1-9 (1983).
- Primus, F. J., Clark, C. A. and Goldenberg, D. M.: Immunoperoxidase localization of carcinoembryonic antigen in normal human intestinal mucosa. *J. Natl. Cancer Inst.* **67**, 1031-1039 (1981).
- Burtin, P., Sabine, M. C. and Chavenel, G.: A comparative study of the localization of CEA and NCA2 in cancerous and normal gastrointestinal tissues. *Int. J. Cancer* **19**, 634-641 (1977).
- Denk, H., Tappeiner, G., Eckerstorfer, R. and Holzner, J. H.: Carcinoembryonic antigen (CEA) in gastrointestinal and extragastrointestinal tumors and its relationship to tumor-cell differentiation. *Int. J. Cancer* **10**, 262-272 (1972).
- O'Brien, M. J., Zamcheck, N., Kirkham, B. B. S. E., Saravis, C. A. and Gottlieb, L. S.: Immunocytochemical localization of carcinoembryonic antigen in benign and malignant colorectal tissues. *Am. J. Clin. Pathol.* **75**, 283-290 (1981).
- Goslin, R., O'Brien, M. J., Steele, G., Mayer, R., Wilson, R., Corson, J. M. and Zamcheck, N.: Correlation of plasma CEA and CEA tissue staining in poorly differentiated colorectal cancer. *Am. J. Med.* **71**, 246-253 (1981).
- Pihl, E., McNaughtan, J., Ma, J., Ward, H. A. and Nairn, R. C.: Immunohistological patterns of carcinoembryonic antigen in colorectal carcinoma. Correlation with staging and blood levels. *Pathology* **12**, 7-13 (1980).
- Rognum, T., Elgjo, K., Brandtzaeg, P., Ørjasæter, H. and Bergan, A.: Plasma carcinoembryonic antigen concentrations and immunohistochemical patterns of epithelial marker antigens in patients with large bowel carcinoma. *J. Clin.*



- Pathol. **35**, 922-933 (1982).
26. Ahnen, D. J., Nakane, P. K. and Brown, W. R.: Ultrastructural localization of carcinoembryonic antigen in normal intestine and colon cancer. *Cancer* **49**, 2077-2090 (1982).
27. 藤田尚男: ゴルジ装置. *生体の科学* **31**, 2-9 (1980).
28. Hammarström, S., Engvall, E., Johansson, B. G., Svensson, S., Sundblad, G. and Goldstein, I. J.: Nature of the tumor-associated determinant(s) of carcinoembryonic antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 1528-1532 (1975).
29. Egan, M. L., Coligan, J. E., Prichard, D. G., Schnute, W. C. and Todd, C. W.: Physical characterization and structural studies of the carcinoembryonic antigen. *Cancer Res.* **36**, 3482-3485 (1976).
30. Primus, F. J., Kuhns, W. J., and Goldenberg, D. M.: Immunological heterogeneity of carcinoembryonic antigen: Immunohistochemical detection of carcinoembryonic antigen determinants in colonic tumors with monoclonal antibodies. *Cancer Res.* **43**, 693-701 (1983).
31. Wagener, C., Yang, Y. H. J., Grawford, F. G. and Shively, J. E.: Monoclonal antibodies for carcinoembryonic antigen and related antigens as a model system: A systemic approach for the determination of epitope specificities of monoclonal antibodies. *J. Immunol.* **130**, 2308-2315 (1983).

---

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学内科学第1講座 藤田英雄