

# Expression of Human Placental Alkaline Phosphatase in Gastric and Colorectal Cancers : An Immunohistochemical Study Using Monoclonal Antibody

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/8115">http://hdl.handle.net/2297/8115</a>

# 胃・大腸癌におけるヒト胎盤型アルカリフォスファターゼの 発現に関する研究

—特異的単クローン抗体の開発と免疫組織学的検討—

金沢大学がん研究所内科学講座 (主任: 澤武紀雄教授)

渡 辺 弘 之

(平成1年3月13日受付)

胃・大腸癌におけるヒト胎盤型アルカリフォスファターゼ (placental alkaline phosphatase, PLAP) の発現について明らかにする目的で、ハイブリドーマ技法を用いて、PLAP に対する単クローン抗体を開発した。PLAP のみに反応する4種類の特異型抗体 (A10 (10), A10 (50), A10 (64), A11 (94)) と肝・小腸・胎盤の3つのアルカリフォスファターゼアイソザイムに同等に反応する2種類 (G6 (20), G8 (57)) の共通型抗体が得られた。特異型のアイソタイプは、IgG<sub>1</sub>,  $\kappa$  type であり、共通型のそれは、IgM,  $\kappa$  type であった。これらの単クローン抗体のエピトープはいずれもペプチドであると考えられたが、PLAP の活性中心に対して影響を与えなかった。特異型単クローン抗体 A10 (10) を用いて、胃癌107例、大腸癌35例の手術材料を主なる対象に、ABC法により、PLAP の免疫組織化学的検討を行なった。PLAP の陽性率は、大腸癌で11% (4/35)、胃癌では23% (25/107) であり、胃癌の病理組織型別では、乳頭腺癌46% (6/13)、高分化型管状腺癌39% (7/18)、中分化型管状腺癌15% (4/27)、低分化型管状腺癌15% (5/33)、膠様腺癌38% (3/8)、印環細胞癌0% (0/8) と高分化型で高い陽性率を認めた。一方、胃腺腫、腸上皮化生部、癌近傍非癌部には、明らかな染色は認められなかった。以上の成績から、PLAP は胃癌の高分化型に出現しやすく、消化管の癌では、癌特異性の高いものと考えられる。

---

**Key words** placental alkaline phosphatase, monoclonal antibody, immunohistochemistry, gastric cancer, colorectal cancer

---

ヒト胎盤型アルカリフォスファターゼ (placental alkaline phosphatase, PLAP) が腫瘍マーカーとして注目されるようになったのは、1968年に Fishman ら<sup>1)</sup>により、肺癌患者の血清中に PLAP を検出し、剖検時の肺癌組織でも高濃度に PLAP の存在することが見出されてからである。以後、本酵素は代表的な癌性アイソザイムの一つとして内外で多くの研究がなされ、oncodevelopmental gene expression の産物として考えられるようになった。そして、卵巣癌や精巣癌などに強く発現することより、臨床的には主に婦人科や泌尿器科領域で腫瘍マーカーとしての有用性が評価

されている。

消化器領域の癌患者血清での電気泳動法による PLAP の発現は数%で、その臨床的意義は乏しいとされてきた<sup>2)</sup>。一方、胃粘膜の腸上皮化生は、胃癌の前癌状態ではないかということは、かなり以前より指摘されてきたが、今なお議論の多いところである。一般に腸上皮化生を起こした胃粘膜には、アルカリフォスファターゼ (alkaline phosphatase, ALP) 活性の高くなることが知られているが、その活性は小腸型アルカリフォスファターゼ (intestinal alkaline phosphatase, IAP) に由来し、腸上皮化生の癌化に伴い onco-

---

Abbreviations: ABC, avidin-biotin-peroxidase; ALP, alkaline phosphatase; BSA, bovine serum albumin; cDNA, complementary deoxyribonucleic acid; CEA, carcinoembryonic antigen; DMEM, Dulbecco's modified Eagle medium; EIA, enzyme immunoassay; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; HAT, hypoxanthine-aminopterin-thymidine;

developmental gene expression により ALP の形質転換が起こり、PLAP などの癌性アイソザイムの発現してることが想定される。しかし、このような問題に対して、PLAP に注目してなされた研究は電気泳動法で検討された Miki ら<sup>8)</sup>のものがあるのみで、免疫組織化学的あるいは定量的になされたアプローチは内外を通じてみられない。これは、ポリクローナル抗体では、IAP と交差免疫反応を有する抗 PLAP 抗体しか得られず、PLAP のみに反応する特異な抗体を得ることが不可能であったことによると思われる。

そこで、本研究では、PLAP のみに反応する特異な単クローン抗体を確立し、この抗体を用いて、胃、結腸・直腸癌において免疫組織化学的検討を行ない、消化管癌における PLAP の発現について明らかにしようとした。

#### 材料および方法

##### I. PLAP の精製

###### 1. PLAP の抽出

分娩時に回収した、ヒト胎盤組織を直ちに生理食塩水を用いて十分に洗浄し、血液成分を除去した。洗浄後、この胎盤組織に同容積の生理食塩水を加え、15,000rpm、5分間の処理により作製したホモジネートに、Moton 法<sup>4)</sup>の変法に従い、ブタノール(和光純薬工業、大阪)を25% (V/V) に追加した。これに超音波破碎処理を行なった後、4°Cで12時間の攪拌を行なった。ついで6,000g、4°C、30分間の冷却遠心機にて、ブタノールにより抽出された細胞膜成分を含む上清を回収した。

###### 2. 加熱処理とアセトン処理

耐熱性である PLAP の性質に基づいて、56°C、30分間の加熱処理を行ない、不耐熱性物質を失活させた。その後、ろ過にて不溶成分を除き、十分脱塩した。-15°Cの条件下で、アセトンを40% (V/V) になるまでゆっくりと攪拌しながら加えて、アセトン分画を行なった。続いて、3,000g、4°C、20分間の冷却遠心にて得られた沈渣を回収した。これを、2mM 塩化マグネシウムおよび1μM硫酸亜鉛を含む0.01Mトリス塩酸緩衝液(pH7.0)(トリス緩衝液)に溶解させ、次のイオン交換緩衝液にて、十分脱塩した。

###### 3. イオン交換クロマトグラフィー

この試料を DEAE-Sepharose Fast Flow Column (Pharmacia, Uppusala, Sweden) を用いて0.01Mトリス緩衝液(pH7.0)中で、0Mから0.3Mまでの塩化ナトリウムのリニアグラジエントにより、イオン交換クロマトグラフィーを行ない、溶出された有活性分画を回収した。この分画を十分脱塩後、さらに、高速液体クロマトグラフィー装置(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)(Pharmacia)のシステムの下で、Mono-Q HR 5/5 Column (Pharmacia) を用いて、DEAE-Sepharose Fast Flow の場合と同じ条件で、イオン交換クロマトグラフィーを2回繰り返して行ない、PLAP を分離精製した。

##### II. 小腸型、非特異型アルカリフォスファターゼの精製

心不全で死亡した剖検例より得られた成人正常小腸組織と、肺炎で死亡した剖検例より得られた正常肝臓組織を材料に用いて、小腸型(IAP)および非特異型である肝型アルカリフォスファターゼ(unspecific alkaline phosphatase, UAP)の精製を行なった。方法は、両者とも加熱処理を除いて、他は同様なステップにより精製を行なった。

##### III. PLAP 単クローン抗体の作製

###### 1. マウスへの免疫

生後6週の雌 BALB/c マウスに精製した PLAP 200μg づつ2週間おきに3回腹腔内免疫し、その4週間後に、ブスター注射として、200μg を追加免疫した。それから4日目にマウスを屠殺し、無菌的に脾細胞を摘出し、単細胞懸濁液を作製した。

###### 2. 細胞融合法<sup>9)</sup>

SP-2/0-Ag14 マウス骨髄腫細胞とマウス脾細胞は、別々にダルベッコ変法イーグル培地(Dulbecco's modified Eagle medium, DMEM)(Gibco Lab., U.S.A.)と10%ウシ胎児血清(Gibco Lab.)にて洗浄し、1:5の比率で混合した。1,000rpm、5分間遠心後、上清を除去し、沈渣を再懸濁液とした。次いで、0.05Mリン酸緩衝液(phosphate buffered saline, PBS)(pH7.2)を溶媒とした50%ポリエチレングリコール(polyethylene glycol, PEG)4,000(Merck, West Germany)(37°C保温)を1ml加え、2分間ゆっくりと攪拌することにより細胞融合を行なった。その後、前述と同様な遠心にて上清を除去後、25mlの

IAP, intestinal alkaline phosphatase; MAb, monoclonal antibody; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; PBS, phosphate-buffered saline; PEG, polyethylene glycol; PLAP, placental alkaline phosphatase; SDS, sodium dodesyl sulfate; UAP, unspecific alkaline phosphatase

DMEM を加えて攪拌し、同様な操作を繰り返して可及的に PEG 4,000 を除いた。それから、hypoxanthine-aminopterin-thymidine (HAT) 培養液 (和光純薬工業) を 90ml を加えて静かに攪拌 ( $1 \times 10^6$  脾細胞/ml) 後、30分間静置した。一方、生後 4 週の BALB/c マウスより胸腺を無菌的に摘出し、胸腺細胞  $1.5 \times 10^8$  個を回収し、細胞浮遊液に追加した。これを、96 ウェル平底組織培養プレート (Becton Dickinson, New Jersey, U. S. A.) のウェルごとに  $150 \mu\text{l}$  ずつ分注し、 $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  インキュベーターにて培養を行なった。2 日後、選択的 HAT 培養液を  $50 \mu\text{l}$  ずつ各ウェルに追加し、以後、2~3 日ごとに半容量交換を行なった。

### 3. ハイブリドーマの選択と限界希釈法

96 ウェルビニールアッセイプレート (Costar, Cambridge, U. S. A.) に、あらかじめ精製した PLAP, IAP, UAP を抗原として固相化し、各ウェルから培養上清に含まれる抗体を反応させて、後述する酵素免疫測定法 (enzyme immunoassay, EIA) にて吸光度を測定した。次いで、限界希釈法によるクローニングを繰り返してハイブリドーマを選択した。

### 4. 選択したハイブリドーマの培養

その後、選択したクローンを順次 24 ウェル組織培養プレート (Becton Dickinson) ならびに 25ml 組織培養フラスコ (Becton Dickinson) に移して増殖させ、さらに、あらかじめプリスタン (Aldrich Chemical, U. S. A.) を腹腔内に投与していた BALB/c マウス腹腔内に、選択したクローンを注入し、増殖させて、10 日目に腹水を回収した。次いで、この腹水を Mono-Q HR 5/5 Column を用いて前述と同様な緩衝液の下で、0 M から 0.3 M までの塩化ナトリウムのリニアグラジエントによるイオン交換クロマトグラフィーを行ない、抗体の活性分画を回収した。必要なクローンは、液体窒素中に保存した。

## IV. EIA

### 1. 抗原プレートの作製

精製した抗原 (PLAP では  $5 \mu\text{g/ml}$ , UAP と、IAP では  $10 \mu\text{g/ml}$ ) を 96 ウェルビニールアッセイプレート (Costar) にウェルごとに  $50 \mu\text{l}$  ずつ分注した。 $4^\circ\text{C}$ 、12 時間固定し、0.05% Tween 20 (半井化学, 京都) を含む 0.05M PBS (pH 7.4) にて 3 回洗浄した。次いで、1% ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA) (Sigma, St. Louis, U. S. A.) と 0.05% 窒化ナトリウム (和光純薬工業) を含有した 0.05M PBS (pH 7.4) をウェルごとに  $150 \mu\text{l}$  ずつ分注し、 $4^\circ\text{C}$ 、1 時間固定後、使用時まで  $-20^\circ\text{C}$  にて保存した。

### 2. EIA の手順

EIA 施行時には、プレートを室温に戻し、1 回洗浄後、培養上清 (一次抗体) をウェルごとに  $50 \mu\text{l}$  ずつ分注し、 $37^\circ\text{C}$ 、1 時間反応させた。3 回洗浄後、二次抗体のペルオキシダーゼ結合抗マウス免疫グロブリン (Dako, Copenhagen, Denmark) を 0.5% BSA を含有した 0.05M PBS (pH 7.4) により 1,000 倍希釈 ( $2 \mu\text{g/ml}$ ) した後、ウェルごとに  $50 \mu\text{l}$  ずつ分注し、 $37^\circ\text{C}$ 、1 時間反応させた。さらに、3 回洗浄後、ペルオキシダーゼの反応基質であるオルソフェニレンジアミン (和光純薬工業) を 0.1M クエン酸-0.2M PBS (pH 4.8) にて  $1\text{mg/ml}$  とし、さらに、0.015% 過酸化水素水となるように調整した反応基質液を、 $200 \mu\text{l}$  ずつウェルごとに分注し、室温にて 30 分間反応後、2M 水酸化ナトリウムにより反応を停止させた。次いで、EIA READER (Model FL307, 東洋紡, 大阪) を用いて、吸光度 405nm にて測定した。

### V. イムノブロット法 (Western blot 法<sup>9)</sup>)

スラブゲル電気泳動装置 KS-8000 SE 型 (マリソル産業, 東京) を用いて、精製した PLAP をゲル濃度 10% の sodium dodecyl sulfate (SDS)-ポリアクリルアミドスラブゲルにて 100V の定電圧下で電気泳動を行ない、プロモフェノールブルーがゲル下端にまで泳動された時点で電源を止めて、ゲルを取り出した。続いて、ゲルメンブラン転写装置装置 KS-8440 GMT 型 (マリソル) を用いて、35V の定電圧下で 20 時間通電し、ポリアクリルアミドスラブゲルからニトロセルロース膜 (Schleicher & Schull, Dassel, West Germany) に転写した。酵素免疫染色用には、この蛋白を転写されたニトロセルロース膜に一次抗体として抗 PLAP 抗体特異型 A10 (10) (マウス腹水精製抗体 10,000 倍希釈) を反応させ、続いて二次抗体としてペルオキシダーゼ結合ウサギ抗マウス IgG 抗体 (Dako) を反応させた後、0.02% ジアミノベンチチン (Sigma) にて 5 分間反応を行なって発色させた。また、アミドブラック 10B (和光純薬工業) により蛋白を染色した。

## VI. 免疫組織化学的検討

### 1. 対象と方法

対象には、悪性疾患として、胃癌 107 例、結腸癌 22 例、直腸癌 13 例の計 142 例の手術材料を用いた。また、良性疾患として、胃腺腫 15 例、化生部 20 例の生検ならびにストリップバイオプシーの材料を用いた。さらに、陽性対照用に分娩時に得た胎盤を用いた。これらを 10% ホルマリン緩衝液 (pH 6.0) で固定後、ヒストプレップ 568 (和光純薬工業) を用いて、 $62^\circ\text{C}$  のパラフィ

ン自動包埋装置によりパラフィン切片 ( $4 \mu\text{m}$ ) を作製した。また、胃癌症例の一部と胎盤では、同時に新鮮凍結切片を作製し、以後の染色に使用した。

## 2. 免疫組織染色法

切片を脱パラフィン後、0.3%過酸化水素・メタノール溶液に30分間浸し、内因性ペルオキシダーゼ阻止を行ない、0.05Mトリス緩衝液 (pH7.5) にて10分間ごと2回の洗浄を充分に行なった。以下、VECTA-STAIN ABC キット (Vector Labs, California, U.S.A.) を用いたアヴィジンビオチンペルオキシダーゼ複合法 (avidin-biotin-peroxidase complex method, ABC method) にて染色を行なった。すなわち、内因性ペルオキシダーゼ阻止後、切片にウマ正常血清を20分間反応させた後、0.05Mトリス緩衝液 (pH7.5) で5分間ごとに3回で充分に洗浄し、非特異的抗体を除去した。次に、PLAP 抗体特異型 A10 (10) (培養上清10倍希釈) を  $4^\circ\text{C}$  で12時間反応させた。同様に充分に洗浄後、ビオチン化抗マウス IgG ウマ抗体を30分間反応させ、同様に洗浄し、アヴィジンビオチン複合体を45分間反応させた。充分に洗浄後、発色剤として、0.005%過酸化水素を含む0.02%ジアミノベンチデンを5分間反応させた。また、カウンター染色としてヘマトキシリンを使用した。

コントロール用として、単クローン抗体の代わりに正常マウス IgG を用いたり、精製した PLAP 抗原と  $4^\circ\text{C}$ 、12時間の反応にて吸収された後の単クローン抗体を用いた。

## 3. 免疫組織染色の判定

PLAP 免疫組織学的反応は、切片上の腫瘍部位にみられる染色の範囲により、染色がみられないもの: -, 腫瘍部の1/3未満に染色がみられるもの: +, 腫瘍部の1/3~2/3に染色がみられるもの: ++, 腫瘍部の2/3以上に染色がみられるもの: +++と判定し、比較検討した。

## VII. ALP の活性測定と ALP 酵素染色<sup>7)</sup>

一部の材料で免疫染色と酵素染色の所見を比較するため、ALP 酵素組織化学的染色を行なった。

ALP 酵素染色については、PLAP が耐熱性であるため、あらかじめ新鮮凍結切片を、 $65^\circ\text{C}$  で5分間の加熱処理を行なった。その後、この切片に、以上に述べる ALP 酵素染色反応液を室温で20分間反応させて染色した。ALP 染色反応液は、Mason ら<sup>7)</sup>の方法に従い、ナフトール AS-MX リン酸 (Sigma) 2mg をジメチルホルムアミド (和光純薬工業) 0.2ml に溶解し、さらに、0.05Mプロパンジオール緩衝液 (Sigma) (pH 9.7) 9.8ml を加えた。そして、使用時に、この溶液に Fast Blue BB (Sigma) 10mg を添加後、直ちにろ過した溶液を酵素染色用に用いた。

また、4-30%ポリアクリルアミド グラジエントゲル (Pharmacia) 電気泳動後の ALP 酵素染色は、中源ら<sup>8)</sup>の方法に準じて行ない、ALP 活性の測定は、アルカリ性フォスファテーストワコー (和光純薬工業) を用いて行なった。

## 成 績

### I. PLAP の精製

PLAP 各精製段階における成績を表1に示す。ブタノール処理後のステップと比較して、最終段階では、比活性は、96,311KAU/mg で、精製倍率は148倍、回収率は15%であった。

この精製抗原を4-30%ポリアクリルアミド グラジエントゲル (Pharmacia) による電気泳動を行なうと、蛋白染色帯と ALP 酵素染色の活性帯は単一に泳動され、泳動度は一致していた。

### II. PLAP 単クローン抗体の確立

#### 1. PLAP 単クローン抗体の性状

細胞融合法を用いて6種類のハイブリドーマを選択

Table 1. Purification of placental alkaline phosphatase

Step	Total volume (ml)	Total protein (mg)	Total activity (KAU)	Specific activity (KAU/mg)	Total purification (-fold)	Yield (%)
Butanol extraction	920	23,400	$1.52 \times 10^7$	650	1	100
Heat denaturation	870	4,380	$1.39 \times 10^7$	3,180	5	91
Acetone precipitation	300	654	$3.96 \times 10^6$	6,055	9	26
Chromatography on DEAE-Sepharose Fast Flow	370	274	$2.58 \times 10^6$	9,416	14	17
Chromatography on MonoQ HR5/5	185	24.4	$2.35 \times 10^6$	96,311	148	15

した。表2には、各組織より精製した PLAP, IAP, UAP の3種の ALP を抗原プレートに固相化し、選択した6種類の単クローン抗体(ハイブリドーマの培養上清)との反応を酵素免疫定量法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)により検討すると、表2の上段に示すごとく、PLAP にのみ特異的に反応するハイブリドーマは A10 (10), A10 (50), A10 (64), A11 (94) の4種類が得られ、これらを特異型(S)とした。一方、下段に示すごとく、すべての抗原に共通に反応するハイブリドーマは G6 (20), G8 (57) の2種類が得られ、これらを共通型(C)と命名した。また、MonoAb-EIA Kit (ZYMED Lab., San Francisco, U.S.A) を使用して、抗体のアイソタイプの検討をすると、特異型は、IgG,  $\kappa$  type, 共通型は IgM  $\kappa$  type であった。

## 2. PLAP 単クローン抗体の特異性

図1に、3種の ALP に対する特異型と共通型のそれぞれの培養上清を用いた希釈反応の結果を示す。特異型は、IAP, UAP には反応せず、抗体希釈に比例して PLAP に特異的に反応を示した。一方、共通型は、PLAP, IAP, UAP いずれにも共通に反応を示した。

## 3. PLAP 抗原のエピトープの性状

PLAP の抗原エピトープの性状を調べるために、PLAP 抗原プレートを、過ヨウ素酸、リパーゼ、トリプシンを用いて種々の濃度で15分間処理をし、ELISA 法によりその反応性を検討すると、表3に示すように、過ヨウ素酸やリパーゼ処理では、コントロールと反応の差異を認めなかった。しかし、トリプシン処理では、コントロールに比べて反応は低値を示し、さらに、トリプシン濃度の上昇に伴い、反応の低

Table 2. Reactivity on ELISA between 6 clones of monoclonal antibodies against PLAP and types of alkaline phosphatases

Type	Hybridoma	PLAP	UAP	IAP	Isotype of gammaglobulin
(S)	A10 (10)	.703	.018	.029	IgG <sub>1</sub> $\kappa$ type
	(50)	.695	.020	.034	
	(64)	.733	.033	.036	
	A11 (94)	.821	.037	.039	
(C)	G 6 (20)	.738	.592	.533	IgM $\kappa$ type
	G 8 (57)	.968	.607	.775	

(S), Specific type; (C), Common type

Each value was determined by the absorbance at 405 nm.

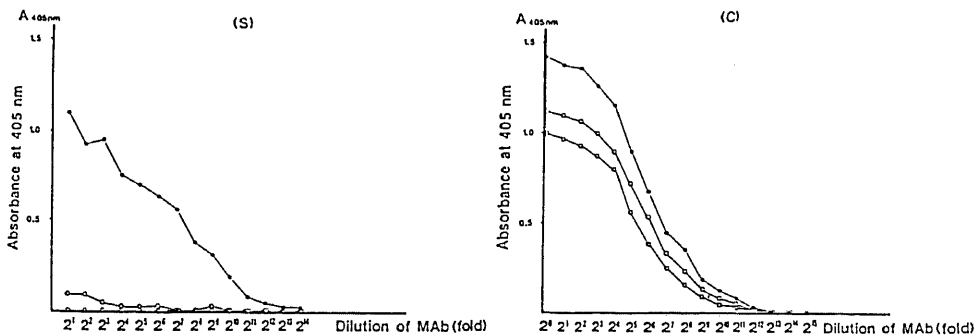


Fig. 1. Effect on serial dilutions of MAb against PLAP (culture supernatant) to each of three ALP isoenzymes (PLAP 5  $\mu$  g/ml (●), IAP 10  $\mu$  g/ml (○), UAP 10  $\mu$  g/ml (□)).

(S), Specific type of MAb (A10, A11) against PLAP only reacted with PLAP. (C), Common type of MAb (G6, G8) against PLAP reacted equally with PLAP, IAP, and UAP.

下を示した。この成績より、本抗体の認識抗原は、ペプタイドであると考えられた。

#### 4. PLAP 単クローン抗体による ALP 活性中心阻害試験

本抗体が活性中心に対する抗体か否かを調べる目的で、一定の抗原量に対して種々の濃度になるように抗体を加え、4°C、24時間反応させた後で PLAP 活性を測定したが、添加抗体量に無関係に、酵素活性は保たれていた(図2)。このことより、活性中心に対する抗体ではないと考えられた。

#### 5. イムノブロット法 (Western blot 法)

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) (10%) による電気泳動後の Western Blot 法では、PLAP の精製抗原は(図3)、蛋白染色で分子量約65,000の単一バンドに泳動されており、PLAP の特異型抗体による酵素免疫染色帯と一致した。このような方法にても、PLAP に対する単クローン抗体であることが確認された。

### III. 免疫組織化学的検討

#### 1. パラフィン切片における PLAP 抗原の染色性について

分娩時胎盤の新鮮凍結切片で ALP の酵素染色を試

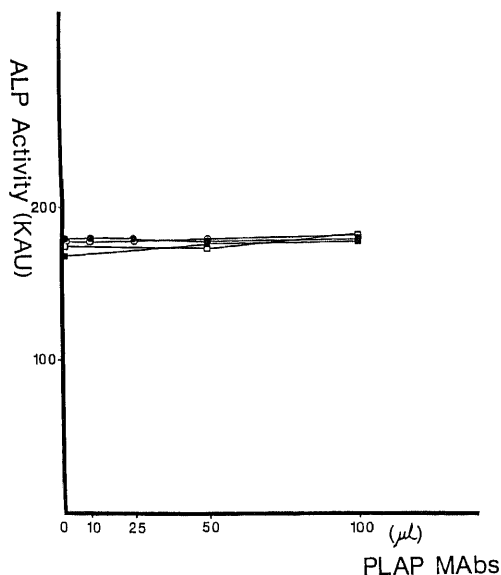


Fig. 2. Dose effect of four MAbs (A10 (●), A11 (○), G6 (■), G8 (□)) against PLAP (culture supernatant) on the enzymatic activity of PLAP. Four MAbs against PLAP had no effect on the enzymatic activity of PLAP. These were not MAbs against the activity center of PLAP.

みると、図4 (A) (B)に示すごとく、胎盤栄養膜合胞細胞の原形質膜に強く染色された。同時に、分娩時胎盤のパラフィン切片で抗 PLAP 特異抗体 A10 (10) で免疫染色を行なうと、図5 (A) (B)に示すごとく、同様に、胎盤栄養膜合胞細胞の原形質膜に強く明瞭に染色されているのが観察された。以上のことより、パラフィン切片においても PLAP 抗原性が保存されていることが確認された。さらに、胃癌10症例においてパラフィン切片と新鮮凍結切片を同時に製作し、免疫染色像を比較すると、染色パターンや染色率にほとんど差が認められなかった。これらのことより、以下の免

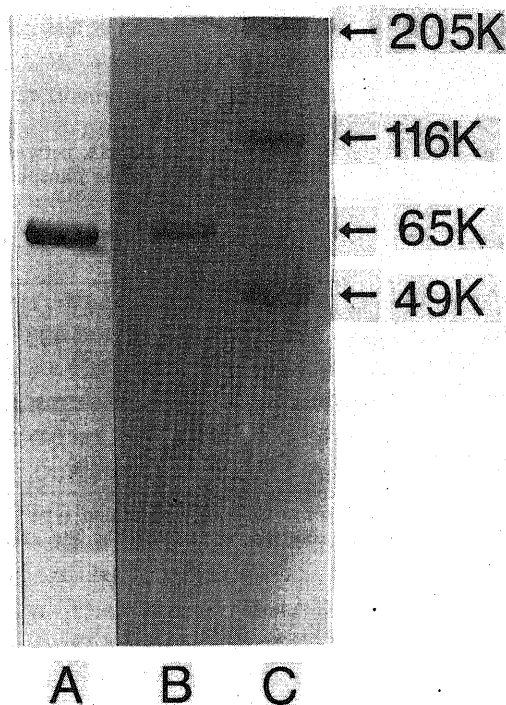


Fig. 3. Western blotting of purified PLAP. Purified PLAP was run on 10% SDS polyacrylamide gel after reduction and heating in SDS. PLAP antigens separated by PAGE were transferred to nitrocellulose sheets. And they were reacted with MAb (A10 (10)) against PLAP for EIA (Lane A) or with amido black for protein staining (Lane B), respectively. The same single band was recognized by both EIA and protein staining (M.W.65,000). Standard proteins were treated in the same manner as PLAP (Lane C). The Molecule mass markers of standard proteins and that of PLAP are indicated to the right of the sheet.

疫組織学的検討はパラフィン切片を用いて行なった。なお、コントロールには、全く染色を認めなかった。

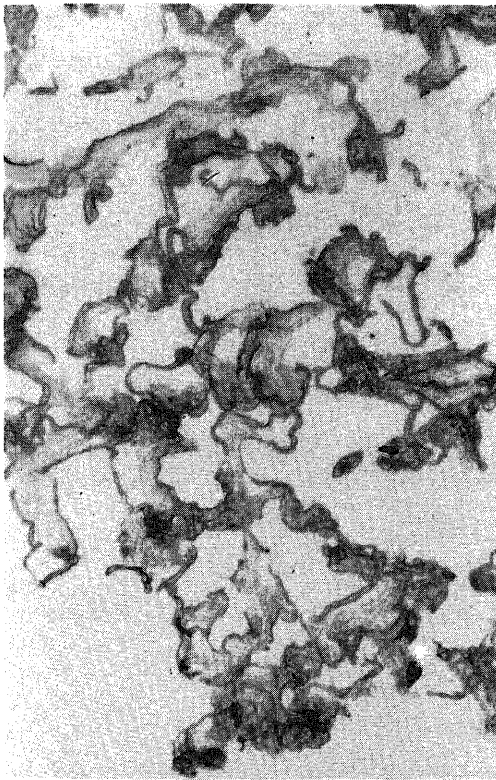
## 2. 免疫組織染色像

胃癌での染色パターンは癌細胞の細胞膜と細胞質が均一に染色されるいわゆる cytoplasmic type である場合が多く、核は全く染色されなかった。また、癌細胞周囲の毛細血管内皮細胞や間質組織を含む非癌組織には、全く染色されなかった。染色範囲については、図 6 (A) (B) に示した中分化型腺管癌の組織型を示す胃癌染色例では、癌組織のほぼ全体が染色されたものもあったが、多くは、図 7 (A) (B) に示すように、癌組織の一部が散在性に染色される場合が多かった。また、染色の極性については、癌細胞質全体に均一に染色される例がほとんどであったが、一部には、細胞質に比べて相対的に腺腔内に面した側の細胞膜が強く染色されるいわゆる apical type もみられた (図 7 (C))。

Table 3. Reactive change of ELISA after antigenic treatment of PLAP

Treatment		ELISA
Control		.748
NaIO <sub>4</sub>	5 mM	.768
	10 mM	.995
	20 mM	.766
	40 mM	.713
Lipase	312 units	.750
	625 units	.760
	1,250 units	.746
	2,500 units	.736
	5,000 units	.730
Trypsin	125 μg/ml	.266
	250 μg/ml	.240
	500 μg/ml	.195
	1,000 μg/ml	.190

Each value was determined by the absorbance at 405 nm.



(A)



(B)

Fig. 4. ALP enzymatic staining of fresh frozen section of placenta after heat treatment (65°C, 5min). Heat-stable ALP enzyme molecules were located in the plasma membrane of syncytial trophoblasts in placenta.

(A) (×40). (B) High power view of the area in Fig. 4A. (×200)



また、腺腔内分泌物にも染色がみられ、癌組織と同等の染色強度であった。

結腸・直腸癌の染色パターンは、胃癌と同様に、癌細胞の細胞膜と細胞質は染色される cytoplasmic type であり、核には染まらなかった。しかし、染色の極性についてみると、細胞全体が染色されるが、腺腔に面した側の細胞膜と腺腔内分泌物がより強く染色される傾向がみられた。しかし、癌近傍の非癌組織は、染色されなかった (図 8 (A) (B), 図 9 (A) (B))。

### 3. 病理組織型別 PLAP 発現頻度

#### 1) 非癌組織

15例の胃腺腫組織, 20例の化生部胃粘膜, および癌近傍の非癌部粘膜組織では、いずれにも PLAP の明らかな染色像は認められなかった。

#### 2) 胃癌組織

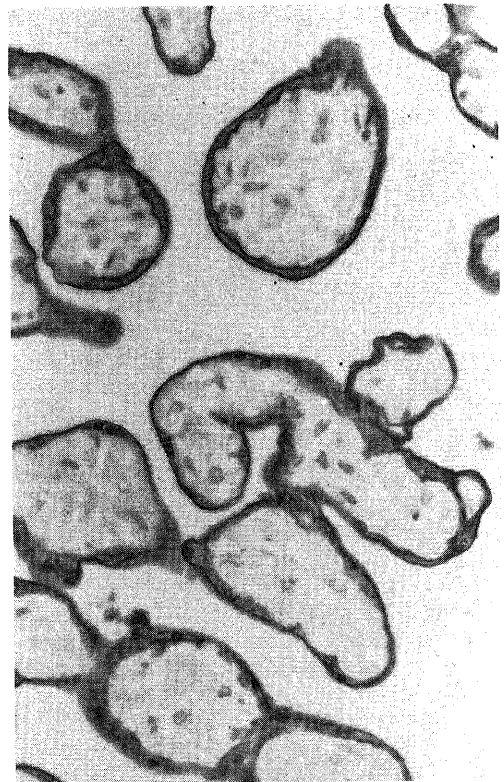
胃癌107例における PLAP の発現頻度について、病理組織型別に、検討した。表 4 に示すごとく、一般に、染色範囲が卍や卐と広範に染まるものは少なかった。胃癌全体の陽性率は23%であったが、乳頭腺癌 (papillary adenocarcinoma, pap): 46%, 高分化型管状腺癌 (well differentiated tubular adenocarcinoma, tub): 39%, 膠様腺癌 (mucinous adenocarcinoma, muc): 38% と、高分化型と muc で比較的高い陽性率がみられた。これに対して、低分化腺癌 (poorly differentiated adenocarcinoma, por) では、15%と低く、印環細胞癌 8 例では染色されたものは認められなかった。

#### 3) 結腸・直腸癌組織

同様に、大腸・直腸癌35例において PLAP の発現頻度について検討した (表 5)。胃癌に比較して、陽性



(A)



(B)

Fig. 5. Immunostaining of placental section embedded in paraffin by MAb A10 (10) against PLAP.

Nuclei were counterstained with hematoxylin. PLAP appeared clearly in the plasma membrane of syncytial trophoblasts in placenta as same as in Fig. 4.

(A)  $\times 40$ .

(B) High power view of the area in Fig. 5A. ( $\times 200$ )

率は11%と低く、表には示していないが、病理組織型別でも有意な差はみとめられなかった。

### 考 察

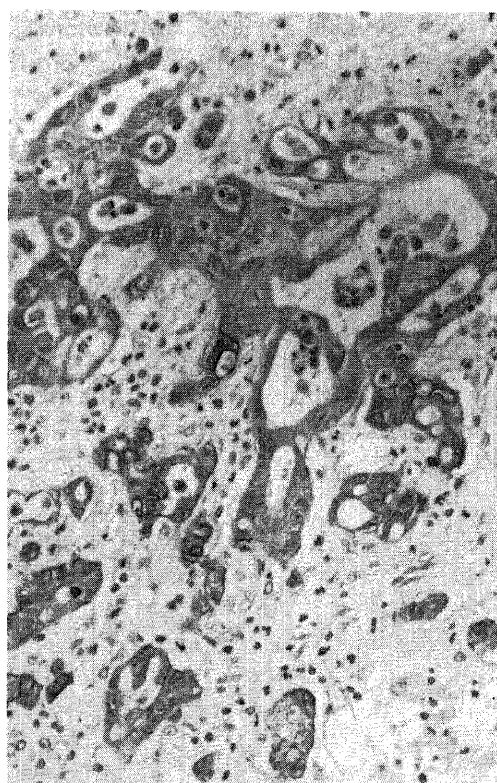
ヒトアルカリフォスファターゼ (ALP) には、少なくとも3種類の遺伝子座を異にするアイソザイムが存在し<sup>9)</sup>、それぞれ小腸型 (IAP)、胎盤型 (PLAP)、非特異型である肝・腎・骨型 (UAP) に分けられる。これらの3つのアイソザイムは、電気泳動度や免疫化学的性質により異なったペプチドであると考えられている。但し、IAP と PLAP は、それぞれに対するポリクローナル抗体に対して、お互いに交差免疫反応を有している。最近、PLAP と IAP のそれぞれに対する complementary deoxyribonucleic acid (cDNA) ク

ローンを用いた研究により、UAP が、第1染色体上に遺伝子座を持つものに対して、PLAP と IAP は、共に第2染色体長腕遠位末端の q34-37 に遺伝子領域を持ち、極めて近接していると報告されている<sup>9)</sup>。また、cDNA バクテリオファージを用いた解析により、PLAP と IAP のアミノ末端39個のアミノ酸配列を比較すると、お互いに80%に相同性を有することが明らかにされている<sup>10)</sup>。これらのことは、PLAP と IAP が、遺伝子発現のうえで、極めて密接に関連していることを示唆していると同時に、ポリクローナル抗体では両者が区別されにくいことを別の面より説明するものであろう。

Fishman ら<sup>11)</sup>は1968年に気管支肺癌患者の癌組織中に PLAP の性質をもつ ALP が産生されていること



(A)



(B)

Fig. 6. Immunostaining of gastric cancer (tub<sub>2</sub>) by MA b A10 (10) against PLAP. Nuclei were counterstained with hematoxylin.

(A) Almost all cancer cells were stained. However, the non-cancerous region in the lower portion of the photograph was free of staining. ( $\times 40$ )

(B) High power view of the area in Fig. 6A. ( $\times 200$ )

The cell membrane and cytoplasm of the gastric cancer were clearly stained except for the nuclei. However, the interstitial tissue adjacent to cancer cells was free of staining.

を発見し、患者の名前をとって Regan アイソザイムと命名した。さらに、この Regan アイソザイムは、免疫学的にも PLAP と異なることが明らかにされ、oncodevelopmental gene expression の産物であると考えられてきた。そして、卵巣癌や精巣癌などで発現率が高いことより、主に、婦人科や泌尿器科領域で腫瘍マーカーとしての有用性が評価されている。

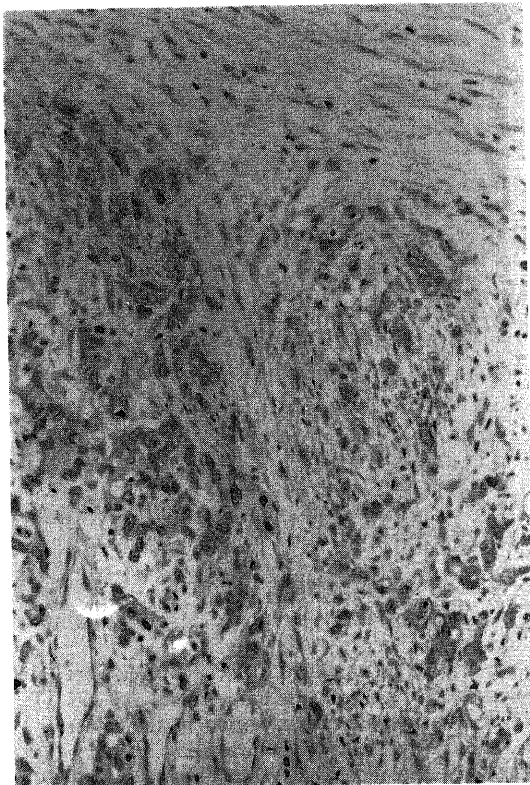
消化器領域でも、Regan アイソザイムのほかに、Warnock<sup>13)</sup> の variant ALP, Higashino ら<sup>12)</sup> の Kasahara アイソザイム, Nakayama ら<sup>13)</sup> の Nagao アイソザイムなどいくつかの癌性 ALP の報告もなされてきた。しかし、消化器領域の癌患者血清での癌性 ALP の出現率は、いずれも10%以下でその臨床的意義は乏しいとされている<sup>2)</sup>。

一方、1976年 Miki ら<sup>9)</sup> は、23例の胃癌組織中の ALP を抽出し、主として電気泳動による分析を行ったところ、23例中8例(35%)に胎盤型が出現し、胃癌細胞による PLAP の産生を示唆する報告を行った。また、Kawasaki ら<sup>14)</sup> は、精製 PLAP をウサ

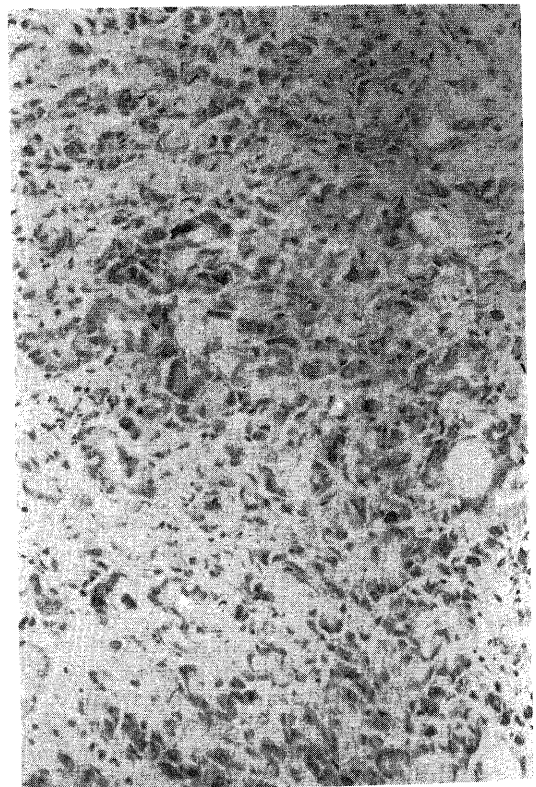
ギに免疫して得たポリクローナル抗体を用いた蛍光抗体法により、胃・直腸癌の免疫組織学的検討を行ったところ、腸上皮化生部では、蛍光を認めなかったが、胃・直腸癌で蛍光を認めたものが少数に認められたと報告している。

しかし、先述したごとくポリクローナル抗体では、PLAP と IAP の間に交差免疫反応性を有するものしか得られず、このような抗体を用いた免疫学的検討では、常に IAP との異同が問題になり、PLAP の発現に関して正確な評価ができていない。そこで、筆者は PLAP を独自に精製し、ハイブリドーマ法を用いて、PLAP に特異的な単クローン抗体を作製し、この抗体を用いて、多数の胃、結腸・直腸癌について免疫組織染色を試み、消化管癌における PLAP の発現について明らかにしようとした。いままでに、こうした特異的な単クローン抗体を用いた消化管癌の免疫組織学的研究は筆者の検索したかぎりではみられていない。

PLAP に対する単クローン抗体は、既に6種類ほど報告されている<sup>15)</sup>。その中の幾つかはアッセイ系も確



(A)



(B)

立されており、泌尿器科や婦人科領域などで血清中の PLAP の測定にも利用されている。1984年に Traversら<sup>19)</sup>により確立された抗 PLAP 単クローン抗体である H17E2 抗体は、マウス IgG<sub>1</sub> 抗体で、PLAP のみならず、耐熱性で L-ロイシン感受性である PLAP-like ALP (Nagao アイソザイム) にも反応するが、IAP, UAP とは反応しない。これを用いたアッセイによる

血清測定では、精巣癌で88%、奇形腫で33%と高い陽性率が報告されている<sup>17)</sup>。また、Johnson ら<sup>18)</sup>により確立された抗 PLAP 単クローン抗体である H317 抗体は、マウス IgG<sub>1</sub> 抗体で、PLAP にのみ反応し、IAP, UAP とは全く反応しない抗体であり、これを用いたアッセイ系による血清測定では、卵巣癌35%、子宮頸癌25%との陽性率の成績も報告されている<sup>19)</sup>。しかし、同じアッセイ系を用いた消化管癌患者における血清測定では、食道癌5例、胃癌10例、大腸癌13例のすべてが陰性であったと報告されている<sup>20)</sup>。

今回、筆者の作製した抗 PLAP 単クローン抗体は、PLAP のみに特異的に反応する特異型として、A10 (10), A10 (50), A10 (64), A11 (94) の4種類と PLAP, IAP, UAP に共通して反応する共通型として、G6 (20), G8 (57) の2種類が確立された。特異型は、マウス IgG<sub>1</sub>  $\kappa$  type であり、共通型は、マウス IgG<sub>1</sub>  $\mu$  type であった。これらすべての抗体は、ALP の活性中心に対して影響を与えず、また、抗原のエピトープは、ペプチドであると考えられる。

前述したように、これまでに確立された PLAP 単クローン抗体には、Regan アイソザイムのみと反応する H317 抗体<sup>18)</sup>や、Regan と Nagao アイソザイムに共通に反応する H17E2 抗体<sup>19)</sup>も報告されている。

筆者の作成した PLAP に対する特異型抗体 A10 (10) を用いたイムノプロット法による免疫染色帯が PLAP の蛋白染色帯と一致し、同様に免疫組織染色においても、PLAP の存在している胎盤の栄養膜合胞細胞の原形質膜に明瞭に染色されたことより、本抗体は、Regan アイソザイムを抗原として認識していると考えられる。一方、Nagao アイソザイムを抗原として認識するかどうかについては、現在検討中である。

PLAP を免疫原として作製した単クローン抗体に、PLAP の特異型のみならず、いずれの ALP にも反応する共通型も得られた。その認識抗原は、いずれもペプチドであり、さらに ALP 活性中心に対する抗体ではないことから、ALP のアイソザイムには、活性中心以外に、共通にエピトープとして認識されるペプチドの存在が示唆され、系統発生の面からも興味深いと考えられる。

今回の免疫組織検討には、主として、10%ホルマリン固定後、62°Cのパラフィン槽で、パラフィン包埋を行ない、薄切切片を作成した。一方、用いた抗 PLAP 単クローン抗体はペプチドを認識するので、ホルマリン固定後のパラフィン切片では、抗原が保持されるかが問題になる。しかし、PLAP は、別名、耐熱性 ALP といわれる位で、65°Cの熱にも影響を受け



(C)

Fig. 7. Immunostaining of gastric cancers by MAb A10 (10) against PLAP. Nuclei were counterstained with hematoxylin.

(A) The cytoplasm-stained cancer cells (por) were scattered sparsely. However, the interstitial tissue adjacent to cancer cells was free of staining. ( $\times 200$ )

(B) Another case of gastric cancer (por) also showed that the cytoplasm-stained cancer cells were scattered sparsely. ( $\times 200$ )

(C) This case of gastric cancer (tub<sub>s</sub>) showed that the luminal surface of glandular neoplastic epithelium was stained more strongly than the cytoplasm of cancer cells. ( $\times 200$ ) (por, poorly differentiated tubular adenocarcinoma; tub<sub>s</sub>, moderately differentiated tubular adenocarcinoma).

ないとされている。実際に、陽性対照とした胎盤組織パラフィン切片の免疫組織染色では、図5 (A) (B) にみられるように、栄養膜合胞細胞の原形質膜に PLAP が明瞭に染色された。さらに、胃癌10症例について、凍結切片とパラフィン切片を作製し、免疫組織染色にて比較検討したところ、染色パターンと染色率にほとんど差を認めなかった。以上のことより、PLAP の検討には、あえて凍結切片を用いる必要はなく、パラフィン切片を用いた検討で十分であると考えられる。

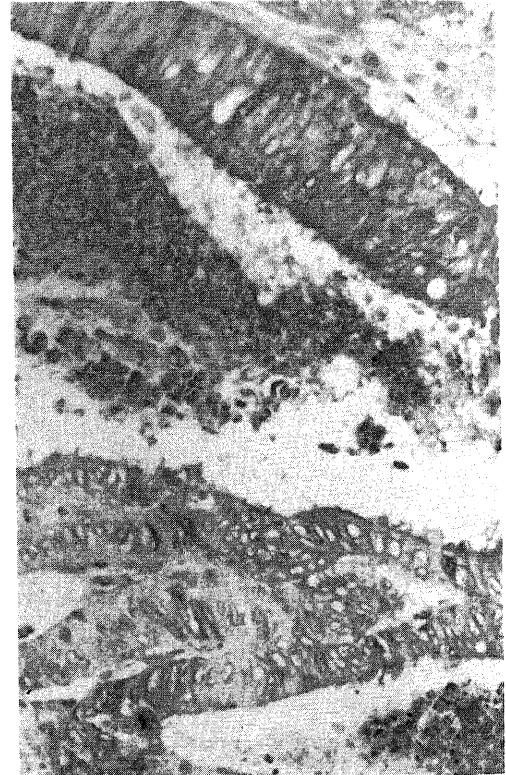
胃、結腸・直腸癌ともに PLAP の染色パターンは、一部に、腺腔内に面した側の細胞膜が相対的に強く染色されるものもみられたが、核を除く細胞膜・細胞質

全体が染色される cytoplasmic type であった。このように、抗 PLAP 単クローン抗体による免疫組織化学的検索では、PLAP 抗原の局在は癌細胞の細胞膜と同時に癌細胞の細胞質にも PLAP がび慢性に存在することが示された。

腸上皮化生は、胃癌の前癌状態ではないかということは、かなり以前より指摘されているが、なお議論の多いところである。病理形態学的には、胃の分化型腺癌組織には、腸上皮化生粘膜にみられる goblet 細胞、Paneth 細胞類似の癌細胞がしばしば出現し、また癌組織に接して腸上皮化生が高頻度に存在している<sup>20)</sup>。疫学的にも、腸上皮化生の頻度と早期胃癌の分化型の占める割合が年齢と平行して極めて高い相関で増加す



(A)



(B)

Fig. 8. Immunostaining of colon cancer (M/D) by MAb A10 (10) against PLAP. Nuclei were counterstained with hematoxylin.

(A) The benign tissue adjacent to the cancerous lesion was free of staining. ( $\times 40$ )

(B) High power view of the areas in Fig. 8A. ( $\times 200$ )

The cell membrane and cytoplasm of the colon cancer were clearly stained except for the nuclei. Especially, luminal surface of glandular neoplastic epithelium and secretory substance in the lumen were strongly stained.

(M/D, moderately differentiated adenocarcinoma)

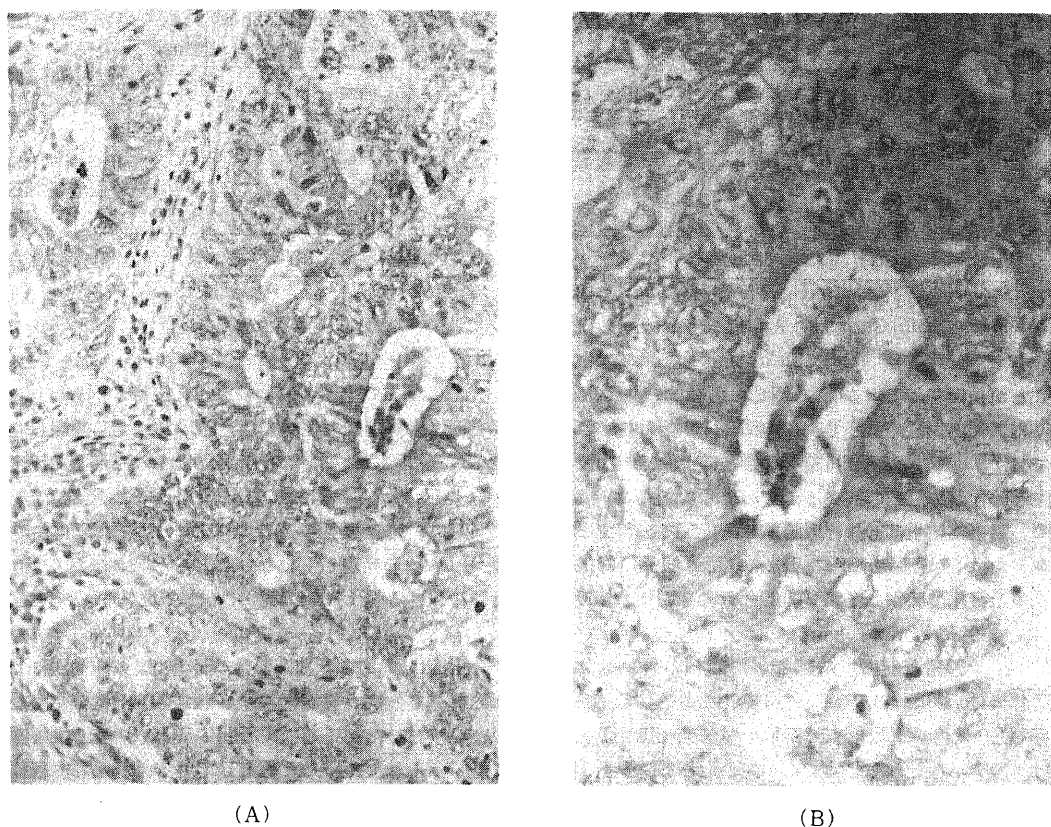


Fig. 9. Immunostaining of another colon cancer (M/D) by MAb A10 (10) against PLAP. Luminal surface of granular neoplastic epithelium and secretory substance in the lumen were stained more strongly than the cytoplasm of colon cancer cells. Nuclei were counterstained with hematoxylin.  
 (A)  $\times 200$   
 (B) High power view of the area in Fig 9A. ( $\times 400$ )  
 (M/D, moderately differentiated adenocarcinoma)

Table 4. Prevalence of PLAP in each pathological type of gastric cancers with immunohistochemical staining

Histology	No.	Negative		Positive		Incidence
		-	+	##	###	
pap	13	7	4	1	1	6/13 (46%)
tub 1	18	11	5	2	0	7/18 (39%)
tub 2	27	23	2	1	1	4/27 (15%)
por	33	28	5	0	0	5/33 (15%)
muc	8	5	2	1	0	3/ 8 (38%)
sig	8	8	0	0	0	0/ 8 ( 0%)
Total	107	82	18	5	2	25/107 (23%)

+,  $<1/3$ ; #,  $1/3 < <2/3$ ; ##,  $2/3 <$   
 (pap, papillary adenocarcinoma; tub 1, well differentiated tubular adenocarcinoma;  
 tub 2, moderately differentiated tubular adenocarcinoma; por, poorly differentiated  
 adenocarcinoma; muc, mucinous adenocarcinoma; sig, signet-ring cell carcinoma)

Table 5. Prevalence of PLAP in colorectal cancers with immunohistochemical staining

Histology	No.	Negative		Positive		Incidence
		-	+	卄	卅	
Colon ca.	22	20	2	0	0	2/22 (9%)
Rectal ca.	13	11	2	0	0	2/13 (15%)
Total	35	31	4	0	0	4/35 (11%)

+, <1/3; 卄, 1/3 < <2/3; 卅 2/3 <

ることが指摘されている<sup>20</sup>。さらに、実験的にもラットに化学発癌物質である N-プロピル-N'-ニトロ-N-ニトログアニジンを経口投与することにより、腸上皮化生と分化型腺癌を作製することが可能である<sup>20</sup>。この際、腸上皮化生は、分化型腺癌に先行して出現するとされている<sup>20</sup>。このように、様々の面から胃の腸上皮化生と分化型腺癌は密接な関係を有することが指摘されている。

ところで、腸上皮化生を起こした部分の胃粘膜には、酵素化学的に ALP 活性が高く、その活性は、小腸型 ALP に由来するとされてきた<sup>20</sup>。また、腸上皮化生は、酵素活性と形態の面から、完全型と不完全型に区別されている。完全型腸上皮化生は、ショ糖分解酵素、トレハラーゼ、ロイシンアミノペプチダーゼ、ALP 活性を示し、粘液性状も小腸上皮と同一であり、杯細胞、Paneth 細胞を有している。一方、不完全型腸上皮化生は、トレハラーゼ、ALP 活性を示さず、粘液性状も小腸上皮と異なり、Paneth 細胞も乏しい<sup>20</sup>。このどちらの型に、より悪性化のポテンシャルが高いかに関しては、今なお議論の多いところである。Matsukura ら<sup>20</sup>は、微小胃癌の周辺には、不完全型腸上皮化生が多くみられたことから、不完全型で悪性化のポテンシャルの高いことを推定している。一方では、不完全型の多い若年齢層には、胃癌の発生率が、加齢により完全型の多くなる高年齢層に比較して少ないということも事実である。また、森ら<sup>20</sup>は、完全型腸上皮化生のなかには、しばしば部分的 ALP 活性のない部位が認められ、この部位に限って腫瘍マーカーのひとつである carcinoembryonic antigen (CEA) の発現が強く認められることにより、完全型より不完全型への転換が癌化の過程として重要であると推論している。しかし、腸上皮化生の不完全型から完全型への移行や、逆に完全型から不完全型への転換が、どのくらいの頻度で、どのように起こるかは、現在のところ解明されていない。

今回の筆者の成績では、腸上皮化生部や固有胃粘膜部あるいは胃腺腫の組織では、PLAP は全く発現していなかった。このことは、腸上皮化生の完全型で活性を有する ALP は小腸型 ALP であることを支持すると同時に、完全型、不完全型を問わず腸上皮化生では、PLAP の発現していないことを示唆しており、消化管における PLAP の発現は癌特異性が高いと考えられる。

分化度については、Miki ら<sup>20</sup>は、電気泳動法による分析をもとに、胃癌における高分化型と低分化型について検討したところ、両者間で PLAP の出現頻度に差がみられなかったと報告している。しかし、筆者の抗 PLAP 単クローン抗体を用いた免疫組織化学的検討では、胃癌の病理組織型別の PLAP の発現頻度は、乳頭腺癌で46% (6/13)、高分化型管状腺癌で39% (7/18) であるのに対し、低分化腺癌で15% (5/33)、印環細胞癌で0% (0/8) と低分化型に比較して、高分化型では明らかに高率であった。また、高分化型腺癌と同じく腸上皮化生を母地として発生すると考えられている膠様腺癌でも、38% (3/8) と比較的高い発現率を示した。一方、前述したように、最近の分子遺伝学的研究により、PLAP と IAP とは、分子構造において類似しているだけでなく、遺伝子発現のうえでも、極めて密接に関連していることが示唆されている<sup>20</sup>。このようなことを合わせて考えると、高分化型胃癌で PLAP の発現の高いことは、固有胃粘膜の腸上皮化生により誘導された小腸型 ALP が、腸上皮化生の癌化に伴う遺伝子の調節機構の異常により、oncodevelopmental gene expression としての形質転換をきたし、PLAP が発現するようになる場合の多いことを示唆しているように思われる。同時にこのことは、胃粘膜の腸上皮化生と高分化型胃癌との関連性の強いことを別の面から支持するものであろう。

結腸・直腸癌における PLAP の出現頻度は11% (4/35) と、胃癌に比較して低く、胃癌の約1/2の出現頻

度であったが、腸上皮化生との関連が乏しい低分化型胃癌(低分化腺癌, 印環細胞癌)における頻度12% (5/41)と、ほぼ同率であった。また、結腸・直腸癌の病理組織型別に比較しても発現率に差がみられず、三木ら<sup>20)</sup>の電気泳動を主体とした検討でも、大腸癌での PLAP の発現率は14% (2/14)と、ほぼ同等の結果が報告されている。一方、正常大腸粘膜中には、通常、活性は弱い、小腸型 ALP が存在するといわれている。しかし、大腸癌の前癌性病変ともいわれる大腸ポリープや潰瘍性大腸炎では、胃の腸上皮化生の場合にみられるような ALP 活性の上昇は認められていない<sup>20)</sup>。このように、大腸には本来小腸型 ALP 活性は存在するが、胃の腸上皮化生のような ALP 活性の誘導されるような病変はないようである。このようなことが、大腸癌における PLAP の出現頻度が胃癌に比較して低い背景になっているように思われる。

### 結 論

癌性アイソザイムの一つである PLAP に対して、ハイブリドーマ法により、特異的な単クローン抗体を作製し、この抗体を用いた免疫組織染色にて、胃、結腸・直腸癌における PLAP の発現について検討し、以下の成績を得た。

1. 得られた単クローン抗体は、PLAP のみに特異的に反応する4種類の特異型(A10 (10), A10 (50), A10 (64), A11 (94))と PLAP, IAP, UAP のすべてに反応する2種類の共通型(G6 (20), G8 (57))に分けられた。特異型のアイソタイプは、IgG<sub>1</sub>,  $\kappa$  type で、共通型のそれは、IgM,  $\kappa$  type であった。共に、活性中心に対して影響を与えず認識抗原のエピトープは、ペプチドであると考えられた。

2. 抗 PLAP 単クローン抗体特異型を用いた免疫組織化学的検討では、胃癌は23% (25/107) に陽性で、病理組織型別では、pap 46% (6/13), tub, 39% (7/18), muc 38% (3/8) と、高分化型と muc に比較的高い陽性率を認めた。結腸・直腸癌は、11% (4/35) と低い陽性率で、病理組織型別では差は認められなかった。

3. 胃腺腫、腸上皮化生部、癌近傍非癌部には明らかかな染色がみられず、消化管における PLAP の発現は癌特異性が高いと考えられた。

### 謝 辞

稿を終えるにあたり、終始、御懇篤なる御指導と御校閲を賜った恩師、澤武紀雄教授に深甚の謝意を表します。また、単クローン抗体の作製について御指導をいただいた、金沢大学がん研究所分子免疫部門、徳山春彦先生に心から感謝致し

ます。さらに、本研究の遂行にあたり、病理標本を提供していただいた金沢大学がん研究所外科磨伊正義教授ならびに大井章史先生および胎盤を供与して頂いた公立石川中央病院婦人科森田明人先生に深謝致します。また、御協力を頂きました金沢大学がん研究所内科教室の諸兄に感謝致します。

なお、本論文の要旨は、第46回日本癌学会総会(1987年東京)と第47回日本癌学会総会(1988年東京)にて発表した。

### 文 献

- 1) Fishman, W. H., Inglis, N. I., Stolbach, L. L. & Krant, M. J.: A serum alkaline phosphatase isoenzyme of human neoplastic cell origin. *Cancer Res.*, **28**, 150-154 (1968).
- 2) 中源雅俊, 澤武紀雄, 千代英夫, 若林時夫, 尾崎監治, 登谷大修, 服部 信: Polyacrylamide gradient gel 電気泳動法による ALP isoenzyme の検討. *日消会誌*, **77**, 1930-1937 (1980).
- 3) Miki, K., Oda, T., Suzuki, H., Iino, S. & Niwa, H.: Alkaline phosphatase isozymes in intestinal metaplasia and carcinoma of the stomach. *Cancer Res.*, **36**, 4226-4268 (1976).
- 4) Morton, R. K.: The purification of alkaline phosphatases of animal tissues. *Biochem. J.*, **57**, 595-603 (1954).
- 5) Kohler, G. & Milstein, C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, **256**, 495-497 (1975).
- 6) Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 4350-4354 (1979).
- 7) Mason, D. Y. & Sammons, R.: Alkaline phosphatase and peroxidase for double immunoenzymatic labelling of cellular constituents. *J. Clin. Pathol.*, **31**, 454-460 (1978).
- 8) Seargeant, L. E. & Stinson, R. A.: Evidence that three structural genes code for human alkaline phosphatases. *Nature*, **281**, 152-154 (1979).
- 9) Griffin, C. A., Smith, M., Henthorn, P. S., Harris, H., Weiss, M. J., Raducha, M. & Emanuel, B. S.: Human placental and intestinal alkaline phosphatase genes map to 2q34-q37. *Am. J. Hum. Genet.*, **40**, 1025-1034 (1987).
- 10) Hua, J. C., Berger, J., Pan, Y. C., Hulmes, J. D. & Udebfriend, S.: Partial sequencing of human adult, human fetal, and bovine intestinal



- alkaline phosphatases: comparison with the human placental and liver isoenzymes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **83**, 2368-2372 (1986).
- 11) **Warnock, M. L. & Reisman, R.:** Variant alkaline phosphatase in human hepatocellular cancers. Clin. Chim. Acta, **24**, 5-11 (1969).
- 12) **Higashino, K., Hashinotsume, M., Kang, K. Y., Takahashi, Y. & Yamamura, Y.:** Study on a variant alkaline phosphatase in sera of patients with hepatocellular carcinoma. Clin. Chim. Acta, **40**, 67-81 (1972).
- 13) **Nakayama, T., Yashida, M. & Kitamura, M.:** L-leucine sensitive, heat-stable alkaline phosphatase isoenzyme detected in a patient with pleuritis carcinomatosa. Clin. Chim. Acta, **30**, 546-548 (1970).
- 14) **Kawasaki, H., Takeuchi, M. & Kimoto, E.:** Immunofluorescent staining of placental alkaline phosphatase in gastric and recral carcinoma. GANN, **65**, 473-479 (1974).
- 15) **Tucker, D. F. & Ward, A. M.:** Monoclonal antibody assays for placental alkaline phosphatase. In H. Z. Kupchik (ed.), Cancer Diagnosis In Vitro Using Monoclonal Antibodies, 1st ed., p267-287, Marcel Dekker, Inc., N. Y., 1988.
- 16) **Travers, P. & Bodmer, W.:** Preparation and characterization of monoconal antibodies against placental alkaline phosphatase and other human trophoblast-associated determinats. Int. J. Cancer, **33**, 633-641 (1984).
- 17) **Tucker, D. F., Oliver, R. T. D., Travers, P. & Bodmer, W. F.:** Serum marker potential of placental alkaline phosphatase-like activity in testicular germ cell tumours evaluated by H17E2 monoclonal antibody assay. Br. J. Cancer, **51**, 631-639 (1985).
- 18) **Johnson, P. M., Cheng, H. M., Molly, C. M., Stern, C. M. M. & Slade, M. B.:** Human trophoblast-specific surface antigens identified using monoclonal antibodies. Amer. J. Reprod. Immunol., **1**, 246-254 (1981).
- 19) **McLaughlin, P. J., Cheng, H. M., Slade, M. B. & Johnson, P. M.:** Expressin on cultured human tumour cells of placental trophoblast membrane antigens and placental alkaline phosphatase defined by monoclonal antibodies. Int. J. Cancer, **30**, 21-26 (1982).
- 20) **McLaughlin, P. J., Gee, H. & Johnson, P. M.:** Placental-type alkaline phosphatase in pregnancy and malignancy plasma: specific estimation using a monoclonal antibody in a solid phase enzyme immunoassay. Clin. Chim. Acta, **130**, 199-209 (1983).
- 21) **Nakamura, K., Sugano, H. & Takagi, K.:** Carcinoma of the stomach in incipient phase: its histogenesis and histological appearances. GANN, **59**, 251-258 (1968).
- 22) **山際裕史:** 胃の腸上皮化生の発生. 医学のあゆみ, **76**, 788-790 (1971).
- 23) **笹島耕二:** N-プロピル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (PNNG) による実験的腸上皮化生の作製. 日消会誌, **76**, 45-53 (1979).
- 24) **松倉則夫:** N-プロピル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジンによる実験腸上皮化生の発生過程の解析と実験胃癌. 日消会誌, **76**, 1253-1258 (1979).
- 25) **Miki, K., Oda, T., Suzuki, H., Iino, S. & Niwa, H.:** Alkaline phosphatase isoenzyme in intestinal metaplasia of the stomach. Clin. Chim. Acta, **76**, 79-88 (1977).
- 26) **松倉則夫, 河内 卓:** 胃癌発生と腸上皮化生. 最新医学, **34**, 453-456 (1979).
- 27) **Matsukura, N., Suzuki, K., Kawachi, T., Aoyagi, M. & Sugimura, T.:** Distribution of marker enzymes and mucin in intestinal metaplasia in human stomach and relation of complete and incomplete types of intestinal metaplasia to minute gastric cancer. J. Natl. Cancer Instit., **65**, 231-240 (1980).
- 28) **森 武貞, 李 伯権, 中城義之, 淡田勝久, 中尾照逸, 畑田率達, 神前五郎:** 癌胎児抗原と腸上皮化生. 胃の腸上皮化生(竹本忠良, 川井啓市, 井田和徳, 鈴木茂編), 第1版, 181-201頁, 医学図書出版株式会社, 東京, 1981.
- 29) **三木一正, 鈴木 宏, 飯野四郎, 丹羽寛文, 織田敏次:** 胃癌組織のアルカリフォスファターゼ, アイソエンザイムの研究(統報)-とくに新たに認められた2つのアイソエンザイムについて-. 日消会誌, **74**, 740-747 (1977).
- 30) **中村孝司:** 消化管粘膜の酵素学的研究. 日消会誌, **64**, 156-175 (1967).

**Expression of Human Placental Alkaline Phosphatase in Gastric and Colorectal Cancers: An Immunohistochemical Study Using Monoclonal Antibody** Hiroyuki Watanabe, Department of Internal Medicine, Cancer Research Institute, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med. Soc., 98, 507—523 (1989)

**Key words** placental alkaline phosphatase, monoclonal antibody, immunohistochemistry, gastric cancer, colorectal cancer

#### Abstract

The present study was undertaken to elucidate the expression of human placental alkaline phosphatase in gastric and colorectal cancers. The monoclonal antibodies (Mab) against human placental alkaline phosphatase (PLAP) were developed using the hybridoma technique. Four specific types (A10 (10), A10 (50), A10 (64), and A11 (94)), which reacted only with PLAP and two common types (G6 (20) and G8 (57)) which reacted equally with isozymes of alkaline phosphatase (liver, intestine, and placenta), were obtained. The isotype of all specific types was IgG<sub>1</sub>,  $\kappa$  type and that of common types was IgM,  $\kappa$  type. The epitope of PLAP was regarded as a peptide. Neither of these had effect on the activity center of PLAP. Using the specific type of Mab (A10 (10)), the immunohistochemical expression of PLAP was examined mainly with surgical materials of gastric cancer (107 cases) and colorectal cancer (35 cases) using the avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) technique. The incidence of PLAP positivity was 11% (4/35) in colorectal cancer, 23% (25/107) in gastric cancer; histologically, 46% (6/13) in papillary adenocarcinoma, 39% (7/18) in well differentiated tubular adenocarcinoma, 15% (4/27) in moderately differentiated tubular adenocarcinoma, 15% (5/33) in poorly differentiated adenocarcinoma, and 0% (0/8) in signet-ring cell carcinoma. Highly differentiated types of gastric cancer had high PLAP positivity. On the other hand, gastric adenoma, intestinal metaplasia, and non-cancerous tissues adjacent to cancerous lesions were free of staining. These results indicate that PLAP is apt to occur in well differentiated grades of gastric cancer and that it is highly specific for cancer.