

原発性肝癌におけるcarcinoembryonic antigenおよびその関連抗原, α -fetoprotein, α 1-antitrypsin,ferritin,secretory componentの局在：
肝細胞癌と肝内外胆管癌の免疫組織化学的相違

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	http://hdl.handle.net/2297/9008

原発性肝癌における carcinoembryonic antigen およびその 関連抗原, α -fetoprotein, α_1 -antitrypsin, ferritin, secretory component の局在

— 肝細胞癌と肝内外胆管癌の免疫組織化学的相違 —

金沢大学医学部病理学第二講座 (主任: 太田五六教授)

田 中 良 則

(昭和57年9月7日受付)

原発性肝癌と肝外胆管癌における carcinoembryonic antigen (以下 CEA と略) および CEA 関連抗原, α -fetoprotein (以下 AFP と略), α_1 -antitrypsin (以下 AAT と略), ferritin, secretory component (以下 SC と略) の局在を, Sternberger らの peroxidase - antiperoxidase 法により検討した。対象は肝細胞癌 67 例, 肝内胆管癌 11 例, 肝外胆管癌 10 例で, 過去 4 年間の剖検材料および外科切除組織を用いた。CEA は, 癌細胞の胞体内, 管腔側辺縁部, 管腔内分泌物に検出され, 肝内胆管癌の 82%, 肝外胆管癌の 80% および混合型肝癌 2 例中 1 例の胆管癌部にみられた。しかし, 肝細胞癌には CEA は検出されなかった。CEA 関連抗原は, 検索したすべてのタイプの癌に高率に検出され, 癌細胞の胞体内, 細胞膜, 管腔内分泌物に検出された。AFP, AAT, ferritin, SC は, 癌細胞の胞体内に顆粒型, 封入体型として, また管腔側辺縁部, 管腔内分泌物に検出された。AFP は, 肝細胞癌の 42%, 肝外胆管癌の 20% に検出されたが, 肝内胆管癌には検出されなかった。AAT は, 肝細胞癌の 91%, 肝内胆管癌の 46%, 肝外胆管癌の 100% にみられた。Ferritin は, 肝細胞癌の 45%, 肝内胆管癌の 27%, 肝外胆管癌の 10% に陽性であった。SC は, 肝内胆管癌の 82%, 肝外胆管癌の 70%, 肝細胞癌の 54% にみられた。肝細胞癌の大きさ別による各抗原の陽性率の検討では, 細小型と大型で有意の差はみられなかった。これらの抗原は, 分化度の高い症例により多く出現する傾向があった。以上より, CEA と AFP は, 肝細胞癌と肝内胆管癌の鑑別診断上有用な免疫組織化学的マーカーと考えられた。一方, CEA 関連抗原, AAT, ferritin および SC は, 3 種類の肝・胆道癌, 特に分化型に共通する免疫組織化学的マーカーと考えられた。

Key words 肝細胞癌, 肝内胆管癌, 酵素抗体法, oncofetal antigen, carcinoembryonic antigen.

肝細胞癌, 胆管癌は, 種々の物質を産生, 貯蔵, また血中に分泌することが知られている¹⁾²⁾。これらの内で, 正常成人には存在しないか, またはあっても微量であるが, 胎児や胆癌患者の血中に増加する物質があり, 癌胎児性蛋白と呼ばれ, その代表的なものに, α -fetoprotein³⁾⁴⁾ (以下 AFP と略), carcinoembryonic antigen⁵⁾ (以下 CEA と略) がある。また正常人にくら

べ胆癌患者の血中で増量する物質, たとえば ferritin, α_1 -antitrypsin (以下 AAT と略) などがある。これら腫瘍関連抗原は, 癌の臨床生化学的診断に応用され, また癌発生過程のマーカーとして形態学的, 生化学的研究に用いられている。

最近, 免疫組織化学的手段により, 原発性肝癌, とくに肝細胞癌腫瘍組織内における各種の腫瘍関連抗原

Immunohistochemical Study on Carcinoembryonic Antigen and Its-related Antigens, α -fetoprotein, α_1 -antitrypsin, Ferritin and Secretory Component in Primary Hepatic Cancer and on Differentiation between Hepatocellular Carcinoma and Intra- and Extrahepatic Bile Duct Carcinoma. **Yoshinori Tanaka**, Second Department of Pathology (Director: Prof. G. Ohta), School of Medicine, Kanazawa University.

の分布に関する成績が報告されはじめている。しかし、未だ系統的な検索はなされておらず、特に CEA に関しては成績は一定していない。これは CEA の糖鎖構造が未確定で、多種類の混合物から成り、その抽出法が各研究機関で異なり、さらに多数の CEA 類似物質が存在するためと考えられる。そこで著者は、まず crude CEA および CEA 関連抗原の抽出から出発し、国際的に通用している市販の各種 CEA 抗体を用いて、上記抗原による吸収操作を行って CEA 抗体の純化を試みた。それを用いて、肝細胞癌および肝内肝外胆管癌腫瘍組織を酵素抗体法で染め、CEA および CEA 関連抗原の局在を知ろうと試みた。さらに CEA と同じく癌胎児性蛋白である AFP、また正常肝でも産生されている腫瘍関連抗原である ferritin, AAT, secretory component (以下 SC と略) の腫瘍組織内分布についても検討を行った。そして、肝細胞癌と胆管癌の免疫組織化学的差異を明らかにしようと試みた。

材料および方法

I. 材 料

対象は、過去 4 年間に摘出または剖検した直後に固定、パラフィン包埋された肝細胞癌 67 例、肝内胆管癌 11 例、肝外胆管癌 10 例であり、大腸癌外科切除例 4 例を対照として用いた。

肝細胞癌、肝内胆管癌および混合型肝癌の定義は WHO 分類に従った⁹⁾。すなわち肝内胆管癌は、線維性間質に富み、粘液産生を伴った腺癌とし、混合型肝癌は、部位により明らかな肝細胞癌がみられ、また他の部位では粘液産生、線維増生を伴う胆管癌のみられる肝癌とした。肝細胞癌を、Okuda らに従い⁷⁾、肉眼的大きさにより細小型肝癌 25 例と大型肝癌 42 例とに 2 分した。大型肝癌 42 例中 2 例は、混合型肝癌であった。肝細胞癌の分化度を、Edmondson に従い I 型から IV 型に分類した⁹⁾。また肝内肝外胆管癌をその分化度により、高分化型、中分化型、低分化型に分類した。上記各症例の腫瘍部より、摘出または剖検直後に 1~4 個の組織片を採取し、10%ホルマリン固定後パラフィン包埋し、4~6 μm の切片を作製した。

II. 方 法

1. 各種抗原の作製

1) 正常肝臓アセトン粉末

正常ヒト剖検肝を細切り、0.01 M リン酸塩緩衝液、pH 7.4 (以下 PBS と略) を加え、ホモジネートとし、これをガーゼで濾過してからアセトンを加え、濾紙で凝集物を集めて乾燥し、正常ヒト肝臓アセトン粉末(以下肝粉末と略)を得た。

2) CEA

剖検時採取したヒト大腸癌の肝転移巣 (950 g) を細切り、ホモジネートとした。これに 2 M の過塩素酸を等量加え、室温、30 分間攪拌後、4°C、4,000 g、30 分間遠心し、その上清を蒸留水で 96 時間透析し、これを凍結乾燥し、再び蒸留水に溶かし、4°C、15,000 g、30 分間遠心後、上清を 1.2 μm 、0.45 μm 、0.22 μm のミリポア膜で順次処理し、濾液を凍結乾燥し CEA 粉末 (1.350 g) を得た⁹⁾。

3) CEA 関連抗原

i) Normal glycoprotein (以下 NGP と略) : 3 例の正常ヒト剖検肺組織 (1,080 g) から、CEA 粉末を作製したのと同様の方法を用いて、NGP 粉末 (1.100 g) を得た¹⁰⁾。

ii) Non-specific cross-reacting antigen-2 (以下 NCA-2 と略) : 正常ヒト新生児 12 例の分娩直後の胎便 (1,050 g) に蒸留水を加え攪拌後、1 M の過塩素酸を等量加え、室温、30 分間攪拌し、4°C、4,000 g で 30 分間遠心した。その上清に飽和硫酸アンモニウムを加え遠心し、沈殿物を蒸留水に溶かした後、蒸留水で 96 時間透析し凍結乾燥した。これを再び蒸留水に溶かし、等量の 100% エタノールを加え遠心し、この上清を蒸留水で透析、凍結乾燥し、NCA-2 粉末 (45 g) を得た¹¹⁾。

iii) Biliary glycoprotein (以下 BGP と略) : Svenberg¹²⁾ の報告した 3 種類の BGP (BGP-I, II, III) の内、正常胆汁中にある BGP-I を、CEA 関連抗原として用いた。6 例のヒト剖検症例の正常胆嚢内胆汁を無菌的に採取し、4°C、13,000 g、30 分間遠心し、その上清を蒸留水にて 48 時間透析した。これを 4°C、28,000 g、1 時間遠心し、その上清に 2 M の過塩素酸を等量加え、30 分間攪拌した。つぎに 4°C、13,000 g、30 分間遠心し、その上清に 2 M 水酸化ナトリウムを加え、蒸留水で充分透析、凍結乾燥し BGP 粉末 (0.131 g) を得た。

2. 使用抗体

1) 一次抗体

i) 抗ヒト CEA ウサギ血清 (以下 CEA 抗体と略) : CEA 抗体は、DAKO 社製 (Copenhagen, Denmark, Lot No. 038 A) を用い、肝粉末で 2 回吸収し、これを肝粉末吸収後 CEA 抗体とした。Ouchterlony 法で、この肝粉末吸収後 CEA 抗体を検すると、CEA の他に NGP, NCA-2, BGP との間にも沈降線を認めたので (Fig. 1), 上記抗体中には、CEA および CEA 関連抗原に対する抗体が含まれていると考えられた。そこで肝粉末吸収後 CEA 抗体の原液 1 ml に対し、NGP, NCA-2, BGP, 各 50 mg で別々に吸収し、これらを部分精製 CEA 抗体とした。また NGP (50 mg) + NCA

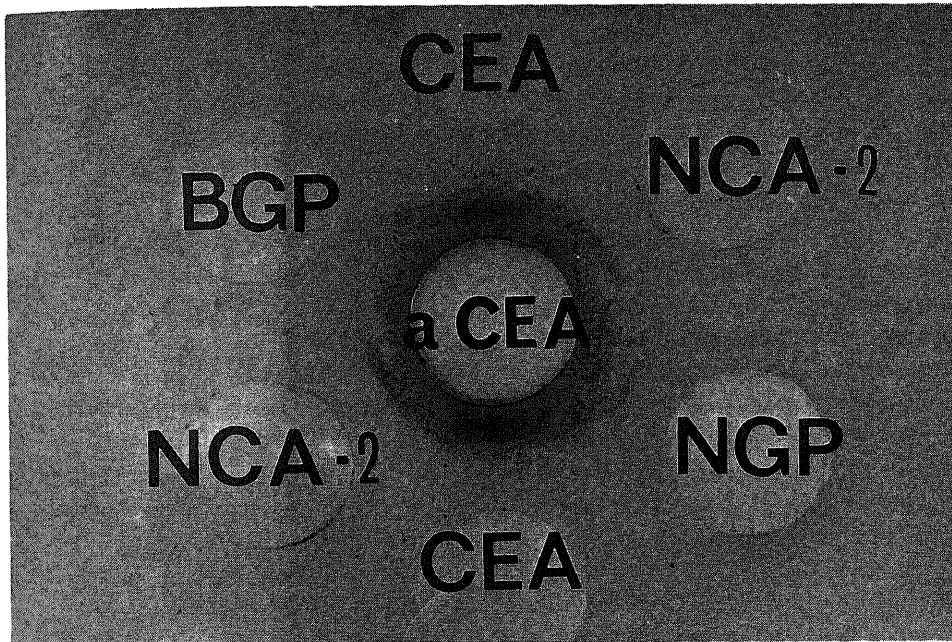


Fig. 1. Ouchterlony analysis of DAKO's anti-CEA sera absorbed with normal liver powder.

CEA: carcinoembryonic antigen
 NGP: normal glycoprotein
 NCA-2: non-specific cross-reacting antigen-2
 BGP: biliary glycoprotein
 aCEA: DAKO's anti-CEA sera

-2 (50 mg) + BGP (50 mg) の三者で順次吸収した抗体を本研究では精製 CEA 抗体として用いた。この精製 CEA 抗体は CEA 関連抗原と交叉反応性を示さなかった。この精製 CEA 抗体と組織内で反応する物質で、さらにその抗体を CEA で吸収して染めると消失する物質を、組織内 CEA とみなした。なお対照とした大腸癌 4 例を 上記精製 CEA 抗体で染色すると、管腔側胞体辺縁部と分泌液に陽性物がみられ、この反応物は CEA で吸収すると完全に消失したので CEA と判断された。この大腸癌における CEA の局在は、従来の報告¹³⁾と一致しており、したがって今回使用した精製 CEA 抗体は、かなり特異性の高いものと考えられた。そして肝粉末吸収後 CEA 抗体、または部分精製 CEA 抗体で染色される物質が、精製 CEA 抗体で染めた時、可染されていない物質を CEA 関連抗原とみなした。

CIS 製 CEA 抗体 (Commissariat à l'Énergie Atomique, Gif - Sur - Yvette, France, Lot No. 18) および Dainabot 社製 CEA 抗体 (東京, Lot No. R - 4) による検索も合わせ行った。

- ii) 抗ヒト AFP ウサギ血清 (以下 AFP 抗体と略): DAKO 社製抗体 (Lot No. 109 A)
- iii) 抗ヒト AAT ウサギ血清 (以下 AAT 抗体と略):

Behring 社製抗体 (Marburg, West Germany, Lot No. B 103420 A)

iv) 抗ヒト ferritin ウサギ血清 (以下 ferritin 抗体と略): DAKO 社製抗体 (Lot No. 110 A)

v) 抗ヒト SC ウサギ血清 (以下 SC 抗体と略): DAKO 社製抗体 (Lot No. 079 C)

2) 二次抗体: 富士臓器社製抗ウサギ IgG ヤギ血清を、肝粉末で 2 回吸収後使用した。

3) Peroxidase - antiperoxidase complex (以下 PAP complex と略): DAKO 社製 PAP complex (Lot No. 090, ウサギで作製)

4) 正常ヤギ血清: Biotest 研究所製血清 (東京, Lot No. 01330248)

3. 染色方法

PAP 法: Sternberger ら¹⁴⁾, Taylor ら¹⁵⁾の方法に従った。脱パラフィン切片を、0.3% 過酸化水素加 100% メタノール液で 20 分間、0.005 M 過ヨウ素酸で 10 分間、0.003 M 水素化ホウ素ナトリウムで 30 分間処理した¹⁶⁾。つぎに 10% 正常ヤギ血清を室温で 15 分間反応させた後、一次抗体 (PBS で 50 倍~240 倍に希釈) を室温で 1 時間、二次抗体 (PBS で 50 倍に希釈) を室温で 40 分間、PAP complex (PBS で 100 倍に希釈) を室

温で20分間、順次反応させた。つぎに0.005%過酸化水素加, 3,3'ジアミノベンチジン溶液中で5分から20分間発色させ、ヘマトキシリンで核染色後、脱水・封入し検鏡した。反応特異性は、一次抗体、二次抗体、PAP complexの各々をPBSで置換、または一次抗体をPBSで50倍に希釈した正常ウサギ血清で置換することにより確認した。

二重染色法¹⁷⁾: 上記PAP法を1回施行後、グリシン・塩酸緩衝液、pH 2.2で充分洗滌し、再び一次抗体、二次抗体、PAP complexを順次反応させ、0.005%過酸化水素加, 4-Cl-1-ナフトール溶液中で紫色に発色させ、2種の抗原の分布・局在を検討した。

蛍光抗体法: Huang¹⁸⁾の方法に従った。脱パラフィン切片を、プロナーゼ(0.1%)で15分から30分間処理し、つぎに一次抗体を30分間、蛍光色素標識二次抗体を30分間、37°Cで反応させ、蛍光顕微鏡(Zeiss, 標準型)で検鏡した。

4. 推計学的検索

χ^2 テスト及びStudentのtテストを用い検討し、危険率5%以下を有意差ありと判断した。

結 果

I. CEA, CEA 関連抗原の癌組織内における分布

1. 肝粉末吸収後 DAKO 社 CEA 抗体での検討

肝細胞癌の染色パターンは、i) 癌細胞の毛細胆管部に一致して樹枝状に検出される樹枝型 (Fig. 2-a), ii) 癌細胞膜の類洞側、側壁、毛細胆管側細胞膜の全周に検出される膜型 (Fig. 2-b), iii) 偽腺管構造部の内腔に分泌液様に検出される分泌液型 (Fig. 2-c) の陽性型がみられた。これら各型のいずれかが、肝細胞癌症例の78%に検出され、樹枝型が75%、膜型が9%、分泌液型が18%の症例にみられた。肝細胞癌の大きさ別による検討では、上記染色形態に差はなかった。肝細胞癌の分化度についてみると、樹枝型はEdmondson I型からIII型に大差なくみられたが、IV型ではその出現が減少し、また膜型はIII型の29例中6例にのみ検出された。分泌液型はEdmondson分類に関係なく、偽腺管構造を呈する部分に検出された。

肝内肝外胆管癌では、全例において癌組織内に陽性像がみられ、腺管構造の内腔側細胞質・細胞膜が染まる管腔型、前述の分泌液型、腺管を構成する癌細胞の細胞質全体が粗大・微細顆粒状に染まる顆粒型の各陽性型がみられた (Fig. 3-a)。管腔型は、肝内胆管癌の91%、肝外性の80%の症例に、分泌液型は、肝内性の64%、肝外性の70%の症例に、顆粒型は、肝内性の73%、肝外性の80%の症例にみられ肝内と肝外との間

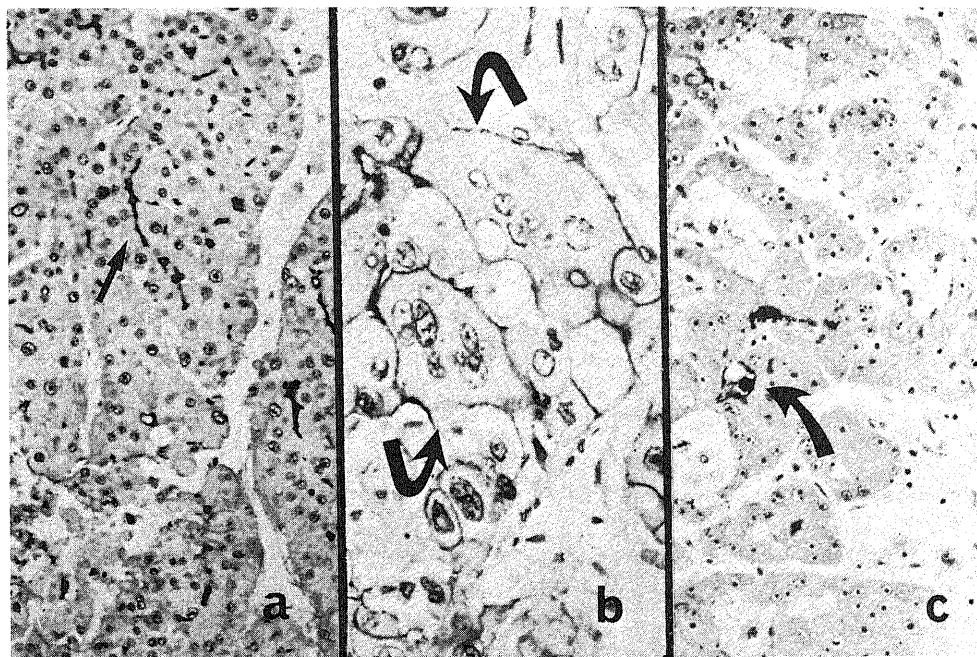


Fig. 2-a. b. c. Reaction products in hepatocellular carcinoma.

Arboreous type (a) (—) ($\times 190$), membranous type (b) (↪) ($\times 380$), secretory type (c) (→) ($\times 190$) are seen. PAP and hematoxylin stain with DAKO's anti-CEA sera absorbed with normal liver powder.

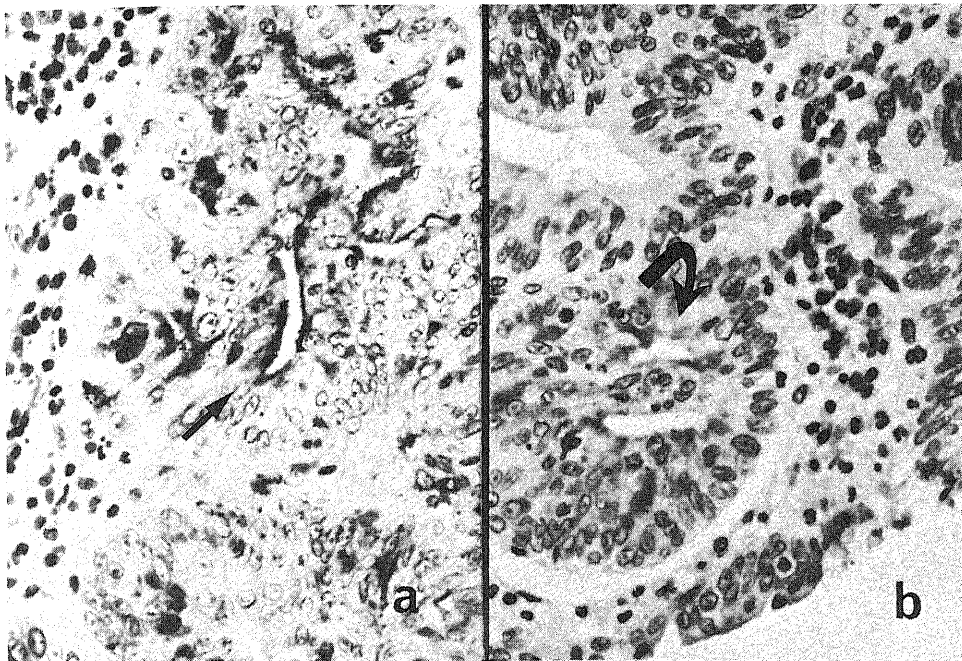


Fig. 3-a. b. Reaction products in intrahepatic bile duct carcinoma stained with DAKO's anti-CEA sera absorbed with only normal liver powder (a) (→) (×380), and stained with DAKO's anti-CEA sera absorbed with normal glycoprotein, non-specific cross-reacting antigen-2 and biliary glycoprotein (b) (↙) (×380). (a) and (b) are from the same case. PAP and hematoxylin stain.

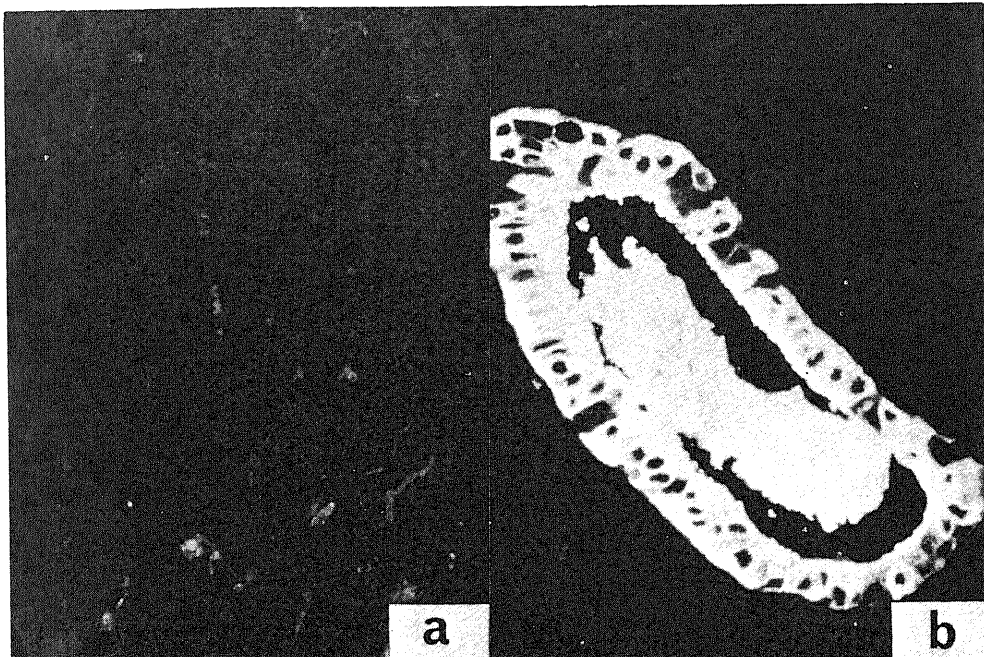


Fig. 4-a. b. Reaction products in hepatocellular carcinoma (a) (×310), and in extrahepatic bile duct carcinoma (b) (×310). Indirect immunofluorescent stain with DAKO's anti-CEA sera absorbed with normal liver powder.

に陽性像の差はみられなかった。

これらの陽性細胞は、肝細胞癌および胆管癌の両者において腫瘍細胞の50%以上を占めていた。なお非癌部の肝細胞の毛細胆管も、しばしば樹枝状の陽性像を示し、細胆管、小葉間胆管、隔壁性胆管の上皮も、種々の程度に管腔型、分泌液型、顆粒型の陽性像を示した。

蛍光抗体間接法で肝粉末吸収後 DAKO 社 CEA 抗体を用い検索したが、PAP 法の結果と同様であった (Fig. 4-a, b)。

2. 部分精製および精製 CEA 抗体での検討 (Table 1).

肝粉末吸収後 DAKO 社 CEA 抗体で陽性を示した肝

細胞癌 20 例、混合型肝癌全例の 2 例、肝内胆管癌全例の 11 例、肝外胆管癌全例の 10 例を用いて検討した (Table 1-a, b)。NGP, NCA-2 および BGP のいずれかで吸収した部分精製 CEA 抗体で染めると、肝細胞癌 (Table 1-a)、混合型肝癌 (Table 1-b)、胆管癌 (Table 1-b) の陽性細胞数は、肝粉末吸収後 DAKO 社 CEA 抗体を用いた時に比べて、軽度または著しく減少した。さらにその出現型にも変化がみられ、胆管癌では顆粒型が減少して管腔型、分泌液型がより多くを占めていた。肝細胞癌では陽性細胞数の減少がもっとも著明であり、NGP で吸収した場合、20 例中 30% の症例に陽性像をみるのみであった。更に、NCA

Table 1-a. CEA & CEA-related antigens in hepatocellular carcinoma

Cases	Anti-sera	DAKO's anti-CEA sera					Dainabot's anti-CEA serum	CIS's anti-CEA serum	
		abs. with liver	abs. with NGP	abs. with NCA-2	abs. with BGP	*abs. with NGP NCA-2 BGP			abs. with CEA
Hepatocellular carcinoma	1	##	-	-	-	-	-	+	-
	2	##	+	-	-	-	-	-	-
	3	##	+	-	-	-	-	-	-
	4	##	-	-	-	-	-	+	-
	5	##	+	-	-	-	-	##	-
	6	##	+	-	-	-	-	+	-
	7	##	-	-	-	-	-	##	-
	8	##	-	-	-	-	-	+	-
	9	##	-	-	-	-	-	+	-
	10	##	-	-	-	-	-	##	-
	11	##	-	-	-	-	-	-	-
	12	##	-	-	-	-	-	-	-
	13	##	-	-	-	-	-	-	-
	14	##	-	-	-	-	-	-	-
	15	##	-	-	-	-	-	-	-
	16	##	-	-	-	-	-	+	-
	17	##	##	-	-	-	-	+	-
	18	##	-	-	-	-	-	+	-
	19	##	+	-	-	-	-	+	-
	20	##	-	-	-	-	-	+	-

Abbreviations:

CEA: carcinoembryonic antigen, NGP: normal glycoprotein, NCA-2: non-specific cross-reacting antigen-2, BGP: biliary glycoprotein, abs.: absorbed, (-): % of positive cells in the tumor tissues, 0%, (+): % of positive cells in the tumor tissues, 0~5%, (##): % of positive cells in the tumor tissues, 6~20%, (##): % of positive cells in the tumor tissues, 21~100%. * This antiserum was used as a specific serum for CEA in this study.

-2あるいはBGPで吸収後の部分精製CEA抗体では全例陰性となった。肝内肝外胆管癌では、肝粉末吸収後DAKO社CEA抗体では全例可染されたが、その抗体をNGPで吸収した場合それぞれ91%と100%の症例に、またNCA-2で吸収した場合82%と80%の症例に、BGPで吸収した場合91%と100%の症例にそれぞれ陽性像をみた。すなわち抗体をCEA関連抗原で吸収

すると、陽性細胞数は減少するが、肝細胞癌ほど著しいものではなかった。精製CEA抗体では、肝細胞癌では全例陰性、混合型肝癌では症例2の胆管癌部にのみ陽性、しかるに胆管癌では肝内性の11例中9例、肝外性の10例中8例に陽性であった。その陽性像は、膵管の内腔側細胞質や、細胞膜が染まるもの、分泌液が染まるものが主であり、顆粒型は一部を除いて減少した

Table 1-b. CEA & CEA-related antigens in combined hepatocellular and cholangiocarcinoma, and bile duct carcinoma

Cases		Anti-sera	DAKO's anti-CEA sera					Dainabot's anti-CEA serum	CIS's anti-CEA serum
			abs. with liver	abs. with NGP	abs. with NCA-2	abs. with BGP	abs.* with NGP NCA-2 BGP		
Combined type	1	hepatocellular carcinoma cholangio-carcinoma	+	-	-	-	-	-	-
	2	hepatocellular carcinoma cholangio-carcinoma	-	-	-	-	-	-	-
Intrahepatic bile duct carcinoma	1		+	+	-	-	-	+	-
	2		+	+	+	+	+	+	-
	3		+	+	+	+	+	+	-
	4		+	+	+	+	+	+	-
	5		+	+	+	+	+	+	-
	6		+	+	+	+	+	+	-
	7		+	+	+	+	+	+	-
	8		+	+	+	+	+	+	-
	9		+	+	+	+	+	+	-
	10		+	-	-	+	-	+	-
	11		+	+	+	+	+	+	-
Extrahepatic bile duct carcinoma	1		+	+	+	+	+	+	-
	2		+	+	+	+	+	+	-
	3		+	+	-	+	-	-	+
	4		+	+	+	+	+	+	-
	5		+	+	+	+	+	+	-
	6		+	+	-	+	-	+	-
	7		+	+	+	+	+	+	-
	8		+	+	+	+	+	+	-
	9		+	+	+	+	+	+	-
	10		+	+	+	+	+	+	-

Abbreviations: see table 1-a

* This antiserum was used as a specific serum for CEA in this study.

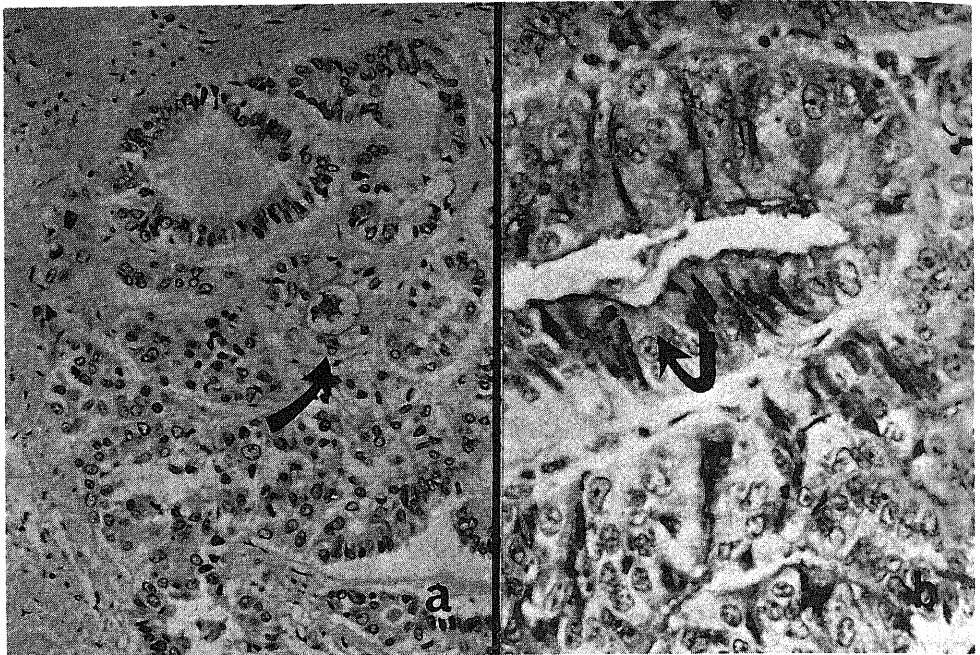


Fig. 5-a. b. CEA in a part of cholangiocarcinoma element in a combined hepatoma case (a) (↗) (×190), and in extrahepatic bile duct carcinoma (b) (↙) (×380) stained with DAKO's anti-CEA sera absorbed with normal glycoprotein, non-specific cross-reacting antigen-2, biliary glycoprotein. PAP and hematoxylin stain.

(Fig. 3-b, 5-a, b). なおこれらの反応陽性物は、CEAで吸収した抗体を用いると完全に消失したのでCEAと考えられた (Table 1-a, b).

3. CIS製, Dainabot社製CEA抗体によるCEAの検討 (Table 1-a, b).

CIS製CEA抗体では、肝細胞癌、肝内肝外胆管癌の全症例に陰性であった。Dainabot社製CEA抗体では、肝細胞癌20例中13例が陽性(胞体が顆粒状に染まるもの、毛細胆管が樹枝状に染まるもの、偽腺管部の分泌液が染まるもの)、混合型肝癌では症例2の胆管癌部に陽性(管腔型に染まるもの、分泌液型に染まるもの)、肝内胆管癌では11例中10例、肝外胆管癌では10例中9例が陽性(管腔型に染まるもの、分泌液型に染まるもの、胞体が顆粒状に染まるもの)であった。

4. 血中CEA値と肝粉末吸収後DAKO社CEA抗体で染めた癌組織内反応陽性物の出現密度との関連性

Fig. 6に示すように、血中CEA値は、肝細胞癌では正常域もしくは軽度上昇を示し、胆管癌では中等度から高度上昇を示す症例が多かった。しかし癌組織レベルでの同抗体との反応陽性物の出現密度と血中CEA値との間に、関連性はみられなかった。胆管癌では、血中CEA値は種々の程度に増加していたが、その値と

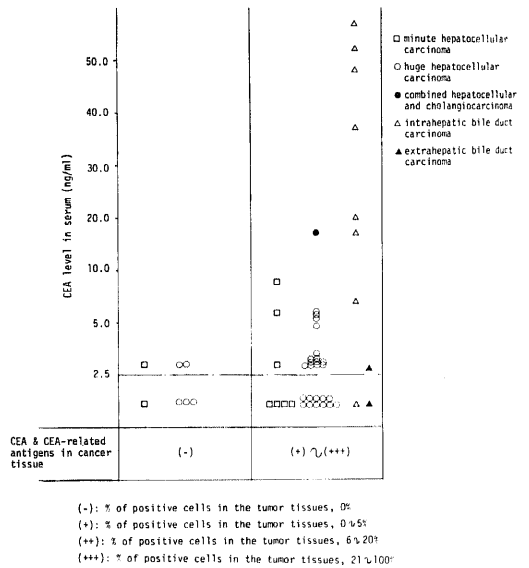


Fig. 6. Relationship between the level of CEA in serum and the presence of CEA and CEA-related antigens in hepatocellular carcinoma cells and intrahepatic and extrahepatic bile duct carcinoma cells.

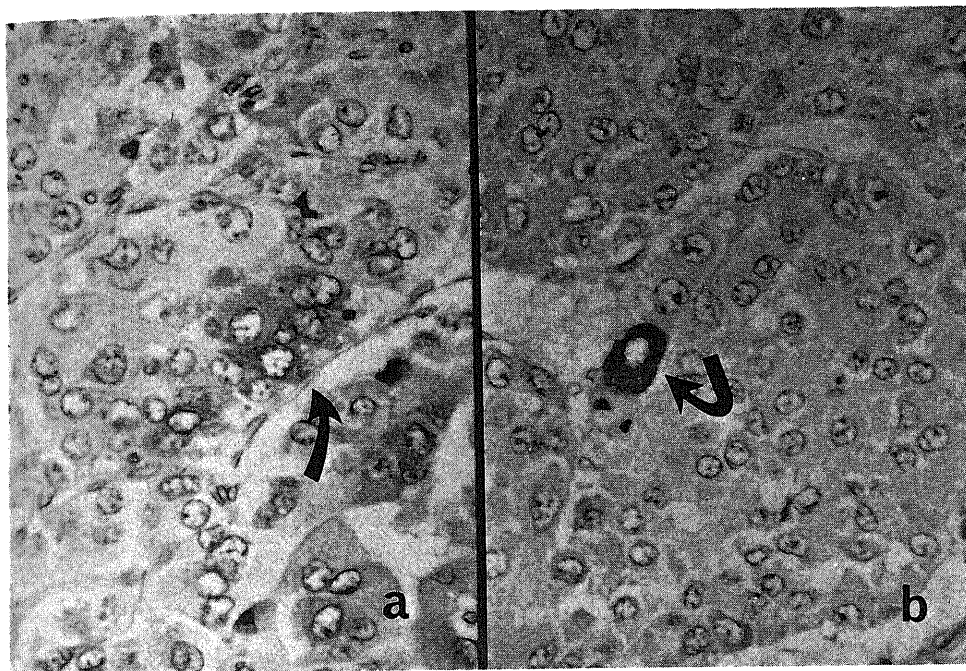


Fig. 7-a. b. α -fetoprotein (a) (→) ($\times 380$), α_1 -antitrypsin (b) (↪) ($\times 380$) in hepatocellular carcinoma. PAP and hematoxylin stain.

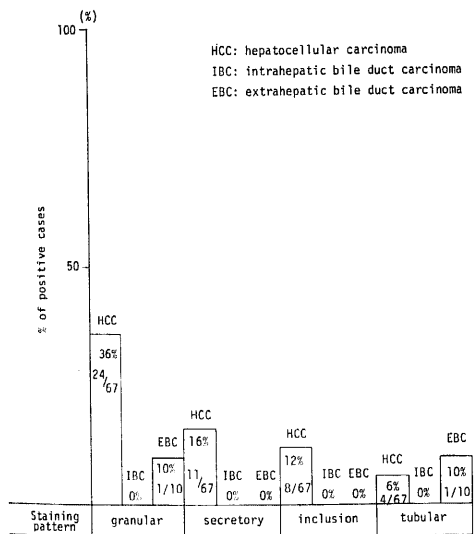


Fig. 8-a. Types of staining pattern of AFP and their incidence in hepatocellular carcinoma, and intrahepatic and extrahepatic bile duct carcinoma.

胆管癌組織レベルでの反応陽性物の出現密度との間に、関連性はみられなかった。

II. 癌組織内における AFP の分布

AFP は、肝細胞癌の癌細胞内では、i) 顆粒型 (Fig. 7-a), ii) 封入体型, iii) 分泌液型, iv) 管腔型の各陽性型がみられた。AFP は肝細胞癌の 42% に出現し、上記各陽性型の内、顆粒型が最も高率で 36%、ついで分泌液型、封入体型、管腔型の順であった (Fig. 8-a)。また陽性細胞の組織内出現密度は、癌細胞の 5% 以内陽性のもの 20 例、6~20% 6 例、21~100% が 2 例であった。なお細小型と大型の肝細胞癌において、その陽性密度に差はみられなかった。肝細胞癌の分化度別にみると、Edmondson II 型では 48%、III 型では 41% の症例に陽性像をみたが、I 型と IV 型では陰性であった。

肝内胆管癌は全例陰性、肝外胆管癌は 10 例中それぞれ管腔型 1 例、顆粒型 1 例に検出されたが、その陽性細胞数は癌細胞の 5% 以内であった。

血中 AFP 値と腫瘍組織内における AFP 陽性細胞の出現密度との関連性では、大型肝細胞癌においてのみ相関関係をみた ($P < 0.05$) が、細小型肝癌では関連性

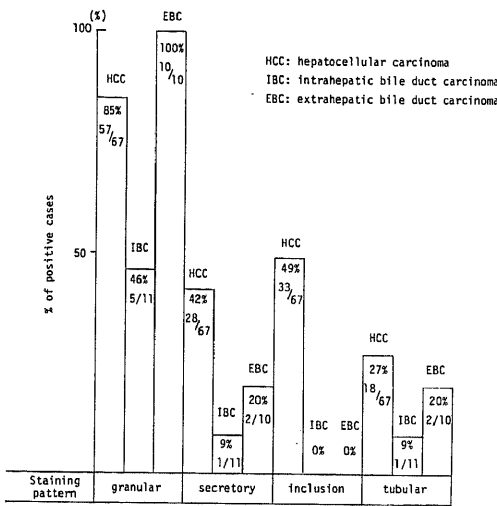


Fig. 8-b. Types of staining pattern of AAT and their incidence in hepatocellular carcinoma, and intrahepatic and extrahepatic bile duct carcinoma.

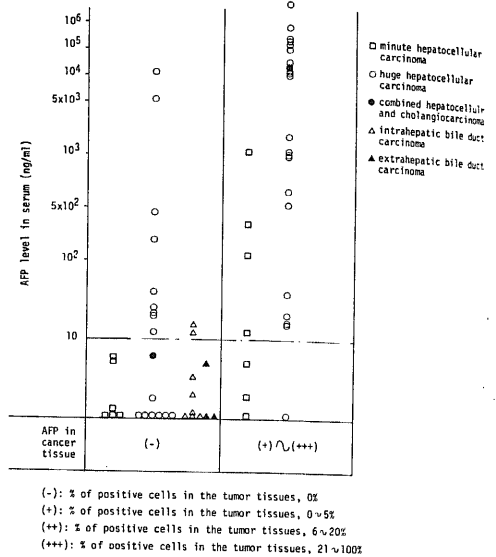


Fig. 9-a. Relationship between the level of AFP in serum and the presence of AFP in hepatocellular carcinoma cells, and intrahepatic and extrahepatic bile duct carcinoma cells.

はみられなかった (Fig. 9 - a).

III. 癌組織内における AAT の分布

AAT は、肝細胞癌の癌細胞内で、i) 顆粒型 (Fig. 7 - b), ii) 封入型, iii) 分泌液型, iv) 管腔型の各陽性型がみられた。AAT は肝細胞癌の 91% に出現し、顆粒型が最も高率で 85%、ついで封入体型、分泌液型、管腔型の順であった (Fig. 8 - b)。また陽性細胞の組織内出現密度は、癌細胞の 5% 以内陽性のもの 35 例、6~20% 17 例、21%~100% は 9 例であった。なお細小型と大型の肝細胞癌において、その陽性密度に差はみられなかった。肝細胞癌の分化度別にみると、Edmondson I 型では 75%、II 型では 94%、III 型では 97%、IV 型では 33% の症例にみられ、全般にその陽性症例頻度が高かった。

肝内胆管癌では 46% に AAT が可染され、肝外胆管癌では 100% の症例にみられ、両胆管癌ともに顆粒型が最も高率で、それぞれ 46%、100% で、ついで分泌液型と管腔型が同率の順にみられたが、封入体型はみられなかった (Fig. 8 - b)。また陽性細胞の組織内出現密度は、癌細胞の 5% 以内陽性のものは肝内性の 4 例、肝外性の 6 例、6~20% は各々 1 例と 4 例であったが、21~100% の症例はなかった。

血中 α_1 -globulin 値 (その 90% が AAT よりなる³²⁾) と腫瘍組織内における AAT 陽性細胞の出現密度との関連性については、肝細胞癌、胆管癌ともに認めな

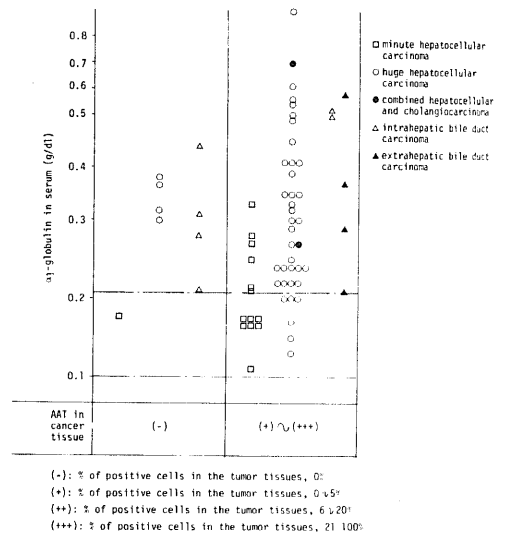


Fig. 9-b. Relationship between the level of α_1 -globulin in serum and the presence of AAT in hepatocellular carcinoma cells, and intrahepatic and extrahepatic bile duct carcinoma cells.

った (Fig. 9 - b).

IV. 癌組織内における ferritin の分布

Ferritin は、肝細胞癌の癌細胞内で、i) 顆粒型 (Fig. 10 - a), ii) 封入体型, iii) 分泌液型の各陽性型がみ

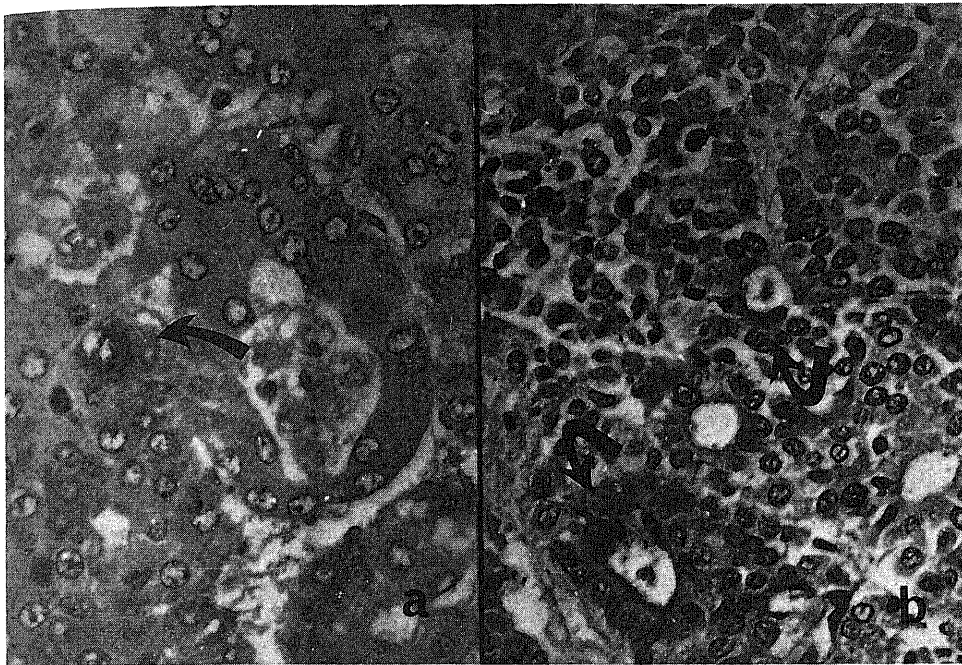


Fig. 10-a. b. Ferritin (a) (→)(×380), and secretory component (b) (↩)(×380) in hepatocellular carcinoma. PAP and hematoxylin stain.

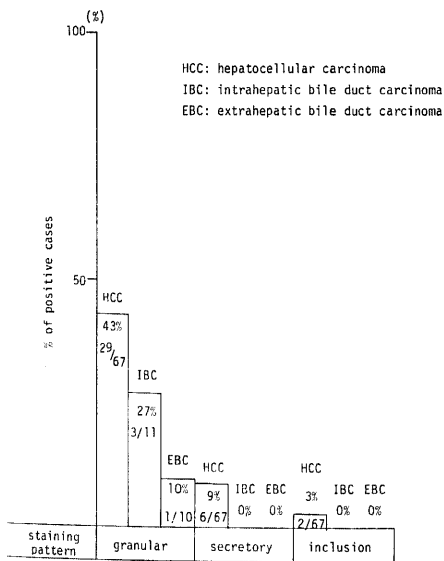


Fig. 11-a. Types of staining pattern of ferritin and their incidence in hepatocellular carcinoma, and intrahepatic and extrahepatic bile duct carcinoma.

られた。Ferritin は肝細胞癌の 45% に出現し、顆粒型が最も高率で 43%、ついで分泌液型、封入体型の順であった (Fig.11 - a)。また陽性細胞の組織内出現密度は、癌細胞の 5% 以内陽性のもので 27 例、6~20% 2 例、21~100% は 1 例であった。なお細小型と大型の肝細胞癌において、その陽性密度に差はみられなかった。肝細胞癌の分化度別にみると、Edmondson I 型では 50%、II 型では 36%、III 型では 59% の症例にみられたが、IV 型では陰性であった。

肝内胆管癌の 27%、肝外胆管癌の 10% の症例が ferritin 陽性であり、その陽性型は肝内肝外胆管癌ともに顆粒型のみであった (Fig.11 - a)。また陽性細胞の組織内出現密度は、両胆管癌ともに癌細胞の 5% 以内に陽性であり、それぞれ 3 例と 1 例にみられた。

V. 癌組織内における SC の分布

SC は、肝細胞癌の癌細胞内で、i) 顆粒型 (Fig.10 - b)、ii) 封入体型、iii) 分泌液型、iv) 管腔型の各陽性型がみられた。SC は肝細胞癌の 54% に出現し、分泌液型が最も高率で 42%、ついで顆粒型、管腔型、封入体型の順であった (Fig.11 - b)。また陽性細胞の組織内出現密度は、癌細胞の 5% 以内陽性のもので 34 例、6~20% 2 例であったが、21~100% の症例はなかった。なお細小型と大型の肝細胞癌において、その陽性密度に差はみられなかった。肝細胞癌の分化度別にみると、

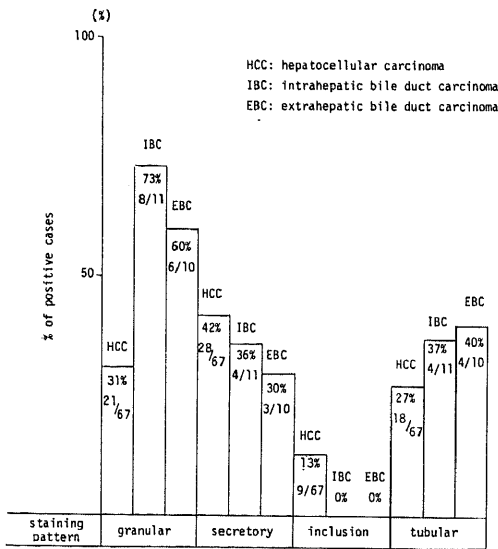


Fig. 11-b. Types of staining pattern of secretory component and their incidence in hepatocellular carcinoma, and intrahepatic and extrahepatic bile duct carcinoma.

Edmondson I型では25%、II型では58%、III型では52%の症例にみられたが、IV型では陰性であった。

肝内胆管癌ではSC陽性例が82%、肝外胆管癌では70%であり、その陽性型は肝内肝外胆管癌ともに顆粒型が最も高率で、それぞれ73%、60%で、ついで管腔型、分泌液型の順にみられたが、封入体型はみられなかった(Fig.11-b)。また陽性細胞の組織内出現密度は、癌細胞の5%以内陽性のものは肝内性の7例、肝外性の5例、6~20%は各々7例と1例、21%~100%は肝外性ではみられず、肝外性では1例みられた。

IV. 同一癌細胞内での複数抗原の検出

標本の固定状態良好で、AFP、AAT、ferritin、SCの4抗原が陽性であった肝細胞癌1例とCEA、AAT、SCの3抗原が陽性であった胆管癌1例を対象として、連続切片を用いPAP法の二重染色を行い、同一癌細胞内における複数抗原の同時検出を試みた。

肝細胞癌の癌細胞内では、AFPとAAT、AFPとSCが同一癌細胞質内で顆粒型陽性像として検出され、その両者の陽性細胞数は癌細胞の5%以下であった。また偽腺管構造部の一部においては、AFPとAAT、AATとSCが分泌液型陽性像として検出された。

胆管癌組織内では、CEAとSC、AATとSCが同一細胞質内で顆粒型陽性像として検出され、その両者の陽性細胞数は癌細胞の5%以下であった。CEAとSCは、一部の同一腺管内腔で分泌液型陽性像としても検

出された。

考 察

Sternbergerら¹⁴⁾、Taylorら¹⁵⁾により開発されたperoxidase-antiperoxidase complexを用いたPAP法、またHuang¹⁸⁾により開発されたプロナーゼ処理後蛍光抗体法は、通常のホルマリン固定後パラフィン切片にも応用出来、かつ微量の抗原も検出可能で、その感度はラジオイムノアッセイ法にも相当するとされている¹⁹⁾。またPAP法は、10年以上前に包埋されたパラフィンブロックにも応用出来るとされている²⁰⁾。今回著者は、過去4年間の新鮮組織ホルマリン固定後パラフィン包埋切片で、上記PAP法を用い、腫瘍関連抗原としてCEA、CEA関連抗原、AFP、AAT、ferritinおよびSCの検出を、肝細胞癌と胆管癌の腫瘍組織内で試みた。

肝原発の癌細胞内CEAは、今回の成績で、肝内胆管癌症例の82%、肝外胆管癌症例の80%、および混合型肝癌の2例中1例の胆管癌部に検出されたが、肝細胞癌腫瘍組織内には検出されなかった。従って、胆管癌はCEAを産生し血中に放出する可能性があるが、肝細胞癌は産生しないと考えられる。Thungら²¹⁾はPAP法を用い、肝細胞癌の30%にCEAが癌細胞の細胞膜部に検出されたとし、また沖田ら²²⁾は蛍光抗体法を用い、肝細胞癌組織にCEAが高率に検出されたと報告している。いずれも今回の著者の成績と異なっている。しかし、Thungらは、家兎で作製したCEA抗体をヒト赤血球と正常ヒト血漿でのみ吸収使用し、沖田らは、DAKO社CEA抗体をそのまま使用し検索している点で著者の実験とは違っている。これに対しGoldenbergら²³⁾、CEA関連抗原であるcolon carcinoma antigen-IIIで吸収したCEA抗体を用いPAP法で検索し、肝細胞癌9例中にCEAは検出されなかったと報告している。このようなCEA検出率の差異は、使用したCEA抗体の質的な差に由来している。この点に留意して著者は、CEA抗体を正常肝粉末および3種類のCEA関連抗原でそれぞれ、あるいは連続して吸収し検索を行った。

まず、肝原発癌組織内でのCEA関連抗原の分布をみた。肝粉末吸収後DAKO社CEA抗体が、CEA関連抗原とOuchterlony法で交叉反応を示すので、このCEA抗体をCEA関連抗原であるNGP、NCA-2、BGPで別々に吸収し、それぞれの部分精製CEA抗体を作製した。そして、肝粉末吸収後DAKO社CEA抗体で検出される反応陽性物と部分精製CEA抗体を用いた場合の反応陽性物と精製CEA抗体との反応陰性像とを比較することにより、CEA関連抗原の分布を検討した。

その結果、本物質は肝細胞癌では主に癌細胞の毛細胆管に一致して樹枝型に、肝内肝外胆管癌では管腔型、分泌液型、顆粒型として検出された。したがって、肝細胞癌と胆管癌には CEA 関連抗原が存在し、おそらく産生・分泌されていると考えられた。また非癌部の肝細胞の毛細胆管にも、本物質がみられた。従来、CEA 関連抗原の局在に関する研究として、Kodama ら²⁴⁾の成績があり、黄疸肝の拡張毛細胆管内に、NCA, NCA-2 を証明している。大腸癌ではすでに Burtin らにより、癌細胞は CEA および正常肺組織に含まれる NCA を産生することが報告されており²⁵⁾、胆管癌でも同じく CEA と CEA 関連抗原が可染された。しかし、肝細胞癌では CEA は可染されず、CEA 関連抗原のみ可染されたので、これらの所見は肝細胞癌と肝内胆管癌の組織鑑別上重要である。CEA をプロナーゼで処理すると normal fecal antigen と NCA の 2 つの抗原フラグメントが得られるとの報告があり²⁶⁾、したがって今回検出された CEA 関連抗原は、腫瘍組織内で産生された CEA そのものが何らかの機序で CEA 関連抗原に転化したものかもしれない。さらに Shuster ら²⁷⁾、Thomas ら²⁸⁾²⁹⁾は、放射性同位元素をラベルした CEA または NCA を、家兎や犬の静脈内に注入し、CEA および NCA は主に肝に摂取され胆汁中に排泄されるとしている。そこで今回明らかとなった非癌部肝細胞および肝細胞癌の毛細胆管部に一致して存在する CEA 関連抗原は、消化管やその他の臓器で産生された CEA 関連抗原が、肝細胞、肝癌細胞に摂取・排泄されている像とも推定される。また胆管癌患者の血中 CEA 値と腫瘍組織内での CEA・CEA 関連抗原出現密度とを対比すると、血中 CEA が高値を示した症例では、低値を示した症例に比べ、腫瘍組織内に高率に CEA・CEA 関連抗原が検出されたけれど、両者の明らかな相関はない。これは、血中 CEA の代謝の特性による可能性と、血中 CEA といわれる物質の中に CEA 関連抗原が多量に含まれている可能性のためであろう。

AFP は、肝細胞癌の 42% に癌細胞内に陽性であったが、肝内肝外胆管癌では極めて低率であった。肝細胞癌内における AFP の陽性率は、報告者により種々であるが (35~90%²¹⁾³⁰⁾、胆管癌での陽性率は一般に低く²³⁾³⁰⁾、従来、報告に一致している。大型肝細胞癌において血中 AFP が高値を示した症例では、腫瘍組織内に高率に AFP が検出された ($P < 0.05$)。このことから考えて、肝癌組織で産生された AFP が、血中へ分泌されると思われる。しかし、非癌部肝細胞からの AFP も血中 AFP 値上昇に関与している可能性もある。細小型肝癌では大型肝癌に見られた関連はない。

AAT は、肝で生成され肝炎のとき血中に増加する

acute phase reactant の 1 つであり³¹⁾³²⁾、また最近では tumor マーカーの一つとしても注目されている²²⁾³³⁾³⁴⁾。とくに AAT 欠損症に合併した肝癌では、組織内に高率に AAT が証明されると報告されている³⁴⁾。今回著者は、肝細胞癌の 91%、肝内胆管癌の 46%、肝外胆管癌では全例に癌細胞内に AAT を検出した。これらの症例で血中 α_1 -globulin 分画 (その 90% が AAT よりなる) の著変を示す症例はなく、AAT 欠損症例は無いと考えられた。また血中の α_1 -globulin 値と腫瘍組織内での AAT の出現密度との対比では、明らかな関連性はなかった。AAT は、acute phase reactant の 1 つであり、癌組織での産生がみられても、それが血中 AAT 値の上昇を反映しないと考えるのが妥当であろう。また胆管上皮にも AAT が検出されることが報告されており³⁴⁾、胆管癌での AAT 陽性像は、母組織の性格を受けついでいるのであろう。しかし、胆管上皮腫瘍の場合、産生か吸収かはわからない。

Ferritin も AAT と同様に、acute phase reactant の一つとして知られており³⁵⁾³⁶⁾、また各種の悪性腫瘍の関連マーカーとして最近注目されているが、腫瘍に特異的な ferritin は未だ報告されていない。今回用いた抗体は、肝および脾由来の ferritin に対する抗体で、肝細胞癌の 45%、肝内胆管癌の 27%、肝外胆管癌の 10% の症例に癌細胞内 ferritin を検出した。正常肝および非癌部肝組織でも広範囲に検出されており、むしろ染まらない肝癌組織の方が問題なのかもしれない。しかし、正常では胆管上皮に存在しないので、胆管癌での ferritin は癌化に伴って出現したものと考えられる。

SC は、正常腸上皮で産生される糖蛋白で、種々の消化器癌の腫瘍組織内に検出されている^{37)~39)}。SC はまた胆管上皮にも存在することが報告されているが⁴⁰⁾、肝細胞癌に関しては一定した結論が得られていない。今回の検索では、SC は肝細胞癌の 54% にまた肝内胆管癌の 82%、肝外胆管癌の 70% の症例に有意差はなく検出された。むしろ SC をもたない肝癌細胞に脱分化的意義があると考えられる。

以上、CEA は肝内肝外胆管癌に陽性で、肝細胞癌に陰性であり、AFP は肝内肝外胆管癌に比して肝細胞癌に高率に検出され、それぞれ肝細胞癌と胆管癌の形態学的鑑別診断に有用と思われた。しかし、CEA 関連抗原、AAT、ferritin、SC の出現率では、肝細胞癌と肝内肝外胆管癌との間に差をみなかった。これらの抗原は、腫瘍に関するマーカーではあるが、非腫瘍部にも高率に検出され、腫瘍に特異的なものではない。また肝細胞癌を細小型と大型に、胆管癌を肝内性肝外性に亜分類し、CEA、CEA 関連抗原、AFP、AAT、ferritin、SC の各陽性率や出現様式を検討したが明らかな差異は

認められなかった。

Edmondson 分類による肝細胞癌の分化度と各抗原陽性率との検討では、AFP は II 型と III 型に検出され、I 型と IV 型で陰性であり、高分化型と低分化型の両極において AFP 検出率は低いとする新沢ら³⁰⁾の報告に一致し、また CEA 関連抗原、AAT、ferritin、SC は I 型から III 型に幅広く検出されたが、IV 型では各抗原の検出率は低下し、3 例中 1 例に CEA 関連抗原と AAT が検出されたのみであった。

各抗原の癌細胞内構造物への出現パターンの検討では、CEA 関連抗原の樹枝型が、Edmondson I、II、III 型の索状型肝細胞癌で高率にみられ、また毛細胆管構造がはっきりしない Edmondson III 型の索状型肝細胞癌では膜型陽性型が検出された。癌細胞が低分化するにつれて、その細胞膜における CEA 関連抗原局在様式の極性喪失、また変化⁴¹⁾が起こると考えられる。AFP、AAT、ferritin、SC は、いずれも顆粒型、封入型、分泌液型が、また ferritin を除く AFP、AAT、SC ではその他に管腔型の陽性型がみられ、これら物質の産生、貯蔵、放出に一定の傾向があることが推定されるが、詳細は免疫電顕による観察が必要である。また肝細胞癌の偽腺管構造部では、上記 4 抗原および CEA 関連抗原は、管腔型または分泌液型を示すことが多く、癌組織の構造とこれら抗原の局在との間に関連性のあることが示唆される。

肝癌や胆管癌の癌細胞内には、マロリー体、脂肪、ムチンなど、光顕的に検索可能な種々の物質が出現し、また今回の検索の如く、免疫組織化学的手法により、初めて同定可能となる物質も出現する。これら物質は、細胞の癌化に伴うその細胞の形質発現と理解されるもの、また非腫瘍細胞に普通にみられ、癌化に伴っても未だその形質が残っているものもある。これらの cytoplasmic expression⁴²⁾の検出率、分布状態は、expression の種類や症例、また同一症例においてもその部位により種々である。また 1 個の肝癌細胞内に複数の expression が同時に出現する場合や、いずれの expression も認めえないのが重要な所見である場合もある。このことは、cytoplasmic expression の一部が遺伝子のコントロールを受けながら、細胞増殖過程で多方向の分化、あるいは脱分化を継続し、肝癌細胞の heterogeneity が表現されて来ると思われる。そこで問題は、前癌病変においてこれらの expression が、どう出現しているかということである。肝細胞癌と肝内胆管癌には、光顕電顕レベルでの前癌病変が確立されていない。本研究の成果をふまえて、類似の方法を用いて、前癌病変への解析が今後の課題となるだろう。

結 論

PAP 法を用い肝細胞癌 67 例、肝内胆管癌 11 例、肝外胆管癌 10 例における CEA、CEA 関連抗原、AFP、AAT、ferritin、SC の腫瘍細胞内での分布を検討した。

1. CEA は肝細胞癌症例には検出されず、混合型肝癌 2 例中 1 例の胆管癌部に陽性、また肝内胆管癌症例の 82% に陽性で、管腔型と分泌液型が同率、ついで顆粒型の順に、また肝外胆管癌症例の 80% に陽性で、管腔型、分泌液型、顆粒型の順に検出された。CEA 関連抗原は、肝細胞癌症例の 78% に陽性で、樹枝型、分泌液型、膜型の順に、また肝内肝外胆管癌症例は全例陽性で、肝内性は管腔型、顆粒型、分泌液型の順に、肝外性では管腔型と顆粒型が同率、ついで分泌液型の順に検出された。

2. AFP は、肝細胞癌症例の 42% に陽性で、顆粒型、分泌液型、封入体型、管腔型の順に検出されたが、肝内胆管癌症例では 0%、肝外胆管癌症例では 20% に陽性で、顆粒型と管腔型の各々 1 例に陽性と低率であった。

1 と 2 の成績から、肝細胞癌と肝内胆管癌の鑑別に CEA と AFP の染色が有用と思われた。

3. AAT は、肝細胞癌症例の 91% に陽性で、顆粒型、封入体型、分泌液型、管腔型の順に、また肝内胆管癌症例の 46%、肝外胆管癌症例の全例に陽性で、肝内性、肝外性ともに顆粒型、ついで分泌液型と管腔型が同率の順に検出された。

4. Ferritin は、肝細胞癌症例の 45% に陽性で、顆粒型、分泌液型、封入体型の順に、また肝内胆管癌症例の 27%、肝外胆管癌症例の 10% に陽性で、肝内性、肝外性ともに顆粒型のみ検出された。

5. SC は、肝細胞癌症例の 54% に陽性で、分泌液型、顆粒型、管腔型、封入体型の順に、また肝内胆管癌症例の 82%、肝外胆管癌症例の 70% に陽性で、肝内性、肝外性ともに顆粒型、管腔型、分泌液型の順に検出された。

6. CEA 関連抗原、AFP、AAT、ferritin、SC は、細小型と大型肝癌症例の間に有意差はなく検出された。肝細胞癌の分化度との関連性では、Edmondson II 型と III 型に高率であったが、型別の陽性率に有意差は認められなかった。しかし、Edmondson IV 型においては各抗原とも低率であった。

原発性肝癌細胞の上記の cytoplasmic expression は、同一腫瘍内でも多様であり、癌細胞の増殖につれて流動的な形質転換があることを示唆している。

謝 辞

稿を終るにあたり、終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました。恩師太田五六教授に深く感謝の意を表すると共に、御協力いただいた野々村昭孝助教授、中沼安二講師はじめ第2病理学教室の諸先生方に心から感謝いたします。

また絶大な協力を賜った下記の機関に深謝いたします。東京大学第一内科、大阪大学第二外科、近畿大学第一外科、福井県立中央病院病理、国立金沢病院病理、国立金沢病院外科、石川県立中央病院病理、ミドリ十字 R-1 商事、ダイナボット社。

なお本論文の一部は、第71回日本病理学会総会、第18回日本肝臓学会総会で発表した。

文 献

- 1) Edmondson, H. A. & Peters, R. L.: Function and laboratory Diagnosis, p1324 - 1329. In W. A. D. Anderson & J. M. Kissane (ed.), Pathology, 7th ed. Mosby Co., Saint Louis, 1977.
- 2) Alpert, E.: AFP in the adult, p359 - 360. In Okuda & R. L. Peters (ed.), Hepatocellular carcinoma, John Wiley & Sons Inc., New York, 1976.
- 3) Bergstrand, C. G. & Czar, B.: Demonstration of a new protein fraction in serum from the human fetus. *Scandinav. J. Clin. & Lab. Investigation*, 8, 174 (1956).
- 4) Abelev, G. I., Perova, S. D., Khramkova, N. I., Postnikova, Z. A. & Irlin, I. S.: Production of embryonal α -globulin by transplantable mouse hepatomas. *Transplantation*, 1, 174 - 180 (1963).
- 5) Gold, P. & Freedman, S. O.: Demonstration of tumor-specific antigen in human colonic carcinomata by immunological tolerance and absorption techniques. *J. Exp. Med.*, 121, 439 - 471 (1965).
- 6) Gibson, J. B.: Histochemical typing of tumors of the liver, biliary tract and pancreas. p20 - 25, World Health Organization, Geneva, 1978.
- 7) Okuda, K., Nakashima, T., Obata, H. & Kubo, Y.: Liver physiology and disease. Clinico-pathological studies of minute hepatocellular carcinoma. *Gastroenterol.*, 73, 195 - 115 (1977).
- 8) Edmondson, H. A.: Tumors of the liver and intrahepatic bile ducts. p63 - 64, Armed Forces Institute of Pathology, Washington, D. C., 1958.
- 9) Krupey, J., Wilson, T., Freedman, S. O. & Gold, P.: The preparation of purified carcinoembryonic antigen of the human digestive system from large quantities of tumor tissue. *Immunochimistry*, 9, 617 - 622 (1972).
- 10) Mach, J. P. & Pusztaszeri, G.: Communications to the editors. Carcinoembryonic antigen (CEA): Demonstration of a partial identity between CEA and a normal glycoprotein. *Immunochimistry*, 9, 1031 - 1034 (1972).
- 11) Burtin, P., Chavanel, G. & Hirsch-Marie, H.: Characterization of a second normal antigen that cross-reacts with CEA. *J. Immunol.*, 111, 1926 - 1928 (1973).
- 12) Sevenberg, T.: Carcinoembryonic antigen-like substances of human bile. Isolation and partial characterization. *Int. J. Cancer*, 17, 588 - 596 (1976).
- 13) Primus, F. J. & Wang, R. H.: Detection of carcinoembryonic antigen in tissue sections by immunoperoxidase. *J. Immunol. Methods*, 8, 267 - 276 (1975).
- 14) Sternberger, L. A., Hardy, P. H. JR., Cuculis, J. J. & Meyer, H. G.: The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry. Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (Horse radish peroxidase-anti-horse radish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J. Histochem. Cytochem.*, 18, 315 - 333 (1970).
- 15) Taylor, C. R., Kurman, R. J. & Warner, N. E.: The potential value of immunohistologic techniques in the classification of ovarian and testicular tumors. *Human Path.*, 9, 417 - 427 (1978).
- 16) Isobe, Y., Chen, S., Nakane, P. K. & Brown, W. R.: Studies on translocation of immunoglobulins across intestinal epithelium. I. Improvements in the peroxidase-labeled antibody method for application to study of human intestinal mucosa. *Acta. Histochem. Cytochem.*, 10, 161 - 171 (1977).
- 17) Nakane, P. K.: Simultaneous localization of multiple tissue antigens using the peroxidase-labeled antibody method: A study of pituitary glands of the rat. *J. Histochem. Cytochem.*, 16, 557 - 560 (1968).
- 18) Huang, S.: Immunohistochemical demonstration of hepatitis B core and surface antigen in paraffin sections. *Lab. Invest.*, 33, 88 - 95 (1975).
- 19) 川生明: 酵素抗体法の基礎と応用 (川島編), 1 ~ 14 頁. 東京, 日本卒後教育センター. 1980.
- 20) Sternberger, L. A.: *Immunocytochemistry*, 2d ed., p122 - 129, John Wiley & Sons Inc., New

York, 1979.

- 21) **Thung, S. N., Gerber, M. A., Sarno, E. & Popper, H.**: Distribution of five antigens in hepatocellular carcinoma. *Lab. Invest.*, **41**, 101 - 105 (1979).
- 22) 沖田極・竹本忠良: ウイルス肝炎から肝細胞癌へ (服部編), 初版, 259~273 頁, 東京, 癌と化学療法社, 1982.
- 23) **Goldenberg, D. M., Sharkey, R. M. & Primus, F. J.**: Carcinoembryonic antigen in histopathology: Immunoperoxidase staining of conventional tissue sections. *J. Natl. Cancer, Inst.*, **57**, 11 - 22 (1976).
- 24) **Kodama, T., Fujino, M., Endo, Y., Fukazawa, M., Sugiura, M., Oda, T., Wada, T. & Burtin, P.**: Carcino - Embryonic Proteins, Vol. II, p93 - 98, In F. G. Lehman (ed.), Carcinoembryonic antigen (CEA) and CEA - like substances in hepatobiliary disease, Elsevier/North - Holland Biomedical Press, 1979.
- 25) **Burtin, P., von Kleist, S., Sabine, M. C. & King, M.**: Immunological localization of carcinoembryonic antigen and nonspecific cross - reacting antigen in gastrointestinal normal and tumoral tissues. *Cancer, Res.*, **33**, 3299 - 3305 (1973).
- 26) 古賀芳子・黒木政秀・松岡雄治: CEA 及び関連抗原の抗原構造の解析. IV pronase 感受性の差異よりみた CEA 及び関連抗原の多様性. 日本癌学会総会記事, **39**, 315 (1980).
- 27) **Shuster, J., Silverman, M. & Gold, P.**: Metabolism of human carcinoembryonic antigen in xenogenic animals. *Cancer, Res.*, **33**, 65 - 68 (1973).
- 28) **Thomas, P. & Summers, J. W.**: The biliary excretion of circulating asialoglycoproteins in the rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **80**, 335 - 339 (1978).
- 29) **Thomas, P., Edwards, R. G. & Westwood, J. H.**: The hepatic uptake of the non - specific cross - reacting antigen, a glycoprotein related to carcinoembryonic antigen. *Biochem. Soc. Trans.*, **7**, 699 - 701 (1979).
- 30) 新沢陽英・笠島武・平野雄一郎・上野恒太郎・今井大・石川誠: 消化器癌における α - fetoprotein の peroxidase antiperoxidase (PAP) 法による検討. 日消会誌, **77**, 1250 - 1256 (1980).
- 31) **Ward, A. M., Cooper, E. H., Turner, R., Anderson, J. A. & Neville, A. M.**: Acute - phase reactant protein profiles: an aid to monitoring large bowel cancer by CEA and serum enzymes. *Br. J. Cancer*, **35**, 170 - 178 (1977).
- 32) 猪熊茂子: α_1 -アンチトリプシン. 臨床免疫, **8**, 861 - 867 (1976).
- 33) **Palmer, P. E. & Wolfe, H. J.**: α_1 -antitrypsin deposition in primary hepatic carcinomas. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, **100**, 232 - 236 (1976).
- 34) **Reintoft, I. & Hägerstrand, I.**: Demonstration of α_1 antitrypsin in hepatomas. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, **103**, 495 - 498 (1979).
- 35) **Reissmann, K. R. & Dieterich, M. R.**: On the presence of ferritin in the peripheral blood of patients with hepatocellular disease. *J. Clin. Invest.*, **35**, 588 - 595 (1956).
- 36) **Konijn, A. M., Carmel, N., Levy, R. & Hershko, C.**: Ferritin synthesis in inflammation. II. Mechanism of increased ferritin synthesis. *Br. J. Haematol.*, **49**, 361 - 370 (1981).
- 37) 中村達・阪口周吉・室博之・白澤春之: 消化器と免疫 (戸部・斎藤・濱島・太田・玉置・辻編), 第1版, 237 - 244 頁, 東京, 医歯薬出版, 1980.
- 38) 磯辺善成・磯辺遺代子・戸部隆吉: 消化器と免疫 (戸部・斎藤・濱島・太田・玉置・辻編), 第1版, 245~250 頁, 東京, 医歯薬出版, 1980.
- 39) 名倉宏: 酵素免疫組織化学の肝病変の研究・検査への応用 (川島編), 39~50 頁, 東京, 日本卒後教育センター, 1980.
- 40) 名倉宏・渡辺慶一・長谷川英章・杉本栄一: 消化器と免疫 (戸部・斎藤・濱島・太田・杞置・辻編), 第1版, 117~122 頁, 東京, 医歯薬出版, 1980.
- 41) 浅井俊夫・名倉宏・渡辺慶一・長谷川英章・鈴木荘太郎・三輪剛・中沢三郎: 消化器と免疫 (戸部・斎藤・濱島・太田・玉置・辻編), 第1版, 145~150 頁, 東京, 医歯薬出版, 1981.
- 42) 中沼安二・杉浦仁・太田五六: 肝細胞癌の cytoplasmic expression. 肝臓, **22**, 266 - 273 (1981).

Immunohistochemical Study on Carcinoembryonic Antigen and Its-related Antigens, α -fetoprotein, α_1 -antitrypsin, Ferritin and Secretory Component in Primary Hepatic Cancer and on Differentiation between Hepatocellular Carcinoma and Intra- and Extrahepatic Bile Duct Carcinoma Yoshinori Tanaka, Second Department of Pathology (Director: Prof. G. Ohta), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920 – J. Juzen Med. Soc., **91**, 727–743(1982)

Key words: Hepatocellular carcinoma, Intrahepatic bile duct carcinoma, Immunoperoxidase method, Oncofetal antigen, Carcinoembryonic antigen.

Abstract

Carcinoembryonic antigen (CEA) and CEA-related antigens, α -fetoprotein (AFP), α_1 -antitrypsin (AAT), ferritin and secretory component (SC) in primary hepatic cancer and extrahepatic bile duct carcinoma were studied by Sternberger's peroxidase-antiperoxidase method. The materials were composed of 67 hepatocellular carcinomas, and 11 intrahepatic and 10 extrahepatic bile duct carcinomas. They were obtained from autopsy materials and surgically resected tissues during the last four years. CEA was demonstrated within the cytoplasm, on the luminal surface and in the intraluminal secretory products of the cells, and detected in 82% of intrahepatic and in 80% of extrahepatic bile duct carcinomas, and in the cells of cholangiocarcinomatous elements of one of two cases of combined hepatocellular and cholangiocarcinomas. No CEA was noticed in the cells of hepatocellular carcinomas. CEA-related antigens were detected with high rate in all types of the carcinomas examined, locating within the cytoplasm, on the cell membranes and in the secretory products in the lumen. AFP, AAT, ferritin and SC were, when detected, stained in a granular or inclusion pattern in the cytoplasm, on the luminal surface and in the secretory products. AFP was detected in 42% of hepatocellular carcinomas and in 20% of extrahepatic bile duct carcinomas, but not in intrahepatic bile duct carcinomas. AAT was found in 91% of hepatocellular carcinomas, and in 46% of intrahepatic and in 100% of extrahepatic bile duct carcinomas. Ferritin was positive in 45% of hepatocellular carcinomas, and in 27% of intrahepatic and in 10% of extrahepatic bile duct carcinomas. SC was seen in 82% of intrahepatic and in 70% of extrahepatic bile duct carcinomas, and in 54% of hepatocellular carcinomas. The size of the tumor showed no effect on the incidence of these antigens. There was a tendency that the more differentiated was the tumor, the more increased the incidence of the antigens. The results indicate that CEA and AFP are valuable immunohistochemical markers for a differentiation between hepatocellular carcinoma and intra- and extrahepatic bile duct carcinoma. On the other hand, CEA-related antigens, AAT, ferritin and SC are common immunohistochemical markers among these three types of hepato-biliary carcinomas, especially of the well-differentiated type.