

膀胱癌組織中 carcinoembryonic antigen と 血液型抗原の検討

岩手医科大学泌尿器科学教室（主任：大堀 勉教授）

藤 岡 知 昭
丹 治 進
小 池 博 之
久 保 隆
大 堀 勉

IMMUNOHISTOCHEMICAL DEMONSTRATION OF CARCINOEMBRYONIC ANTIGEN (CEA) AND ABO (H) BLOOD GROUP ANTIGENS ON TISSUE SECTIONS OF URINARY BLADDER TUMORS

Tomoaki FUJIOKA, Susumu TANJI, Hiroyuki KOIKE,

Takashi KUBO and Tsutomu OHHORI

From the Department of Urology, School of Medicine, Iwate Medical University

(Director: Prof. T. Ohhori)

The carcinoembryonic antigen (CEA) and ABO (H) blood group antigens of 47 bladder tumors were investigated by immunohistochemistry (CEA by peroxidase-antiperoxidase method and blood group antigens by Avidin-biotin-peroxidase complex method) and the results were compared with the histopathological diagnosis.

Twenty five percent of the bladder tumors had CEA-positive tumor cells. They were found in 11.1% of pT₁ cases, in 12.5% of pT₂ cases, 70.0% of pT₃ cases and 50.0% of pT₄ cases and were also found in 13.3% of grade I cases, in 50.0% of grade II cases and in 40.0% of grade III cases. On the other hand, positive blood group antigen cells were found in 85.2% of pT₁ cases, 50.0% of pT₂ cases, 20.0% of pT₃ cases and 50.0% of the pT₄ cases and also in 80.0% of the grade I cases, 41.1% of the grade II cases, and 20.0% of the grade III cases. A statistical difference was seen between the low stage (pT₁) and high stage cases (pT₂~pT₄) and between the low grade (G-I) and high grade cases (G-II, III) ($P<0.01$) for both CEA and the blood group antigens which were statistically related ($P<0.01$).

The detection of CEA and that of the blood group antigens may be valuable for assisting the histopathological findings in the case of the small biopsy specimens especially in addition to the prediction of the malignant potential.

Key words: Bladder tumor, CEA, Blood group antigens, Immunohistochemistry

緒 言

表在性膀胱腫瘍の治療において、その症例が浸潤癌に移行する可能性、すなわち biological malignant

potential を予測することはその治療法を選択するうえで重要である。近年、組織学的悪性度に加え、生物学的悪性度あるいは免疫学的悪性度という立場より見た malignant potential の指標として膀胱組織内血液型

Table 1. Total cases of the bladder cancer in this study

	No.pts	Pathological Stage				Histological Grade		
		pT ₁	pT ₂	pT ₃	pT ₄	G ₁	G ₂	G ₃
Primary								
Tumor	29	15	7	5	2	17	9	3
Recurrent								
Tumor	18	12	1	5	0	13	3	2
(Total No.Pts)	47	27	8	10	2	30	12	5

Table 2. Immunoperoxidase methods

	Carcinoembryonic Antigen	Blood Group Antigens	
		A and B	O(H)
Methods	Peroxidase-anti-peroxidase	Avidin-Biotin-peroxidase complex	
Antisera:			
Primary	Rabbit anti-CEA	Human anti- A or B	Biotinyl-UEA 1
Secondary	Swine anti-rabbit immunoglobulin	Biotinyl-human-IgM+IgG	
Tertiary	Peroxidase-anti-peroxidase	Avidin-Biotin peroxidase complex	

抗原の消失や組織内癌胎児抗原 carcinoembryonic antigen の存在の検索が注目を浴びている¹⁻⁶⁾。

今回、著者は酵素抗体法を用い、膀胱組織内における CEA および血液型抗原の存在の有無を検索したので若干の文献の考察とともに報告する。本研究の目的は組織内 CEA および血液型抗原の存在と、膀胱腫瘍の病理組織学的所見との比較検討である。

対象および方法

初発29例、再発18例の合計47例の膀胱腫瘍を対象とした。これらの組織型は全例、移行上皮癌であり、その病理組織診断は「膀胱癌 取り扱い規約」⁷⁾に従い経尿道的膀胱腫瘍切除術 (TUR-Bt) の手術標本より診断した。しかしながら腫瘍の筋層浸潤が認められた症例ではさらに膀胱全摘除または部分切除を施行し膀胱壁全層を有する検体より原発腫瘍の進展度 (pT) を診断した (Table 1)。なお今回は血中および尿中 CEA に関しては検討していない。

両抗原に関する検索は10%緩衝ホルマリン固定パラフィン包埋薄切 (3~4 μ) に対して施行した。なお検体は各症例 2~3 個のブロックを用いた。CEA は DAKO 社製キット (CEA-PAP 506) を用い Stem-

berg らの方法に基づく peroxidase antiperoxidase (PAP)法により⁸⁾、いっぽう血液型抗原は佐々木の報告に準じた Avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) 法⁹⁾により検索した。なお抗 A、抗 B 血清は血液型判定標準用血清を、また抗 O(H) は Ulex europaeus agglutinin I (Vector 社) を用いた (Table 2)。結果は CEA に関しては移行上皮癌が AEC (3-amino-9-ethylcarbazol) により赤褐色に染色された部位を認められた場合を、また血液型抗原においては腫瘍組織の10%以上が染色された場合を陽性、またこれら染色が認められない場合を陰性と判定した。なお陽性組織対照として CEA においては大腸癌組織を、また血液型抗原では正常膀胱組織を用いた。さらに検体組織内赤血球や血管内皮細胞を血液型抗原の built-in positive control とし、また結合織や平滑筋を built-in negative control とした。内因性ペルオキシダーゼ反応は3% H₂O₂ または、0.3% H₂O₂ メタノールにより阻止した (Fig. 1, 2)。

結 果

対象症例47例中組織内 CEA の陽性は12例、25.3%であり、いっぽう組織内血液型抗原の陽性例は30

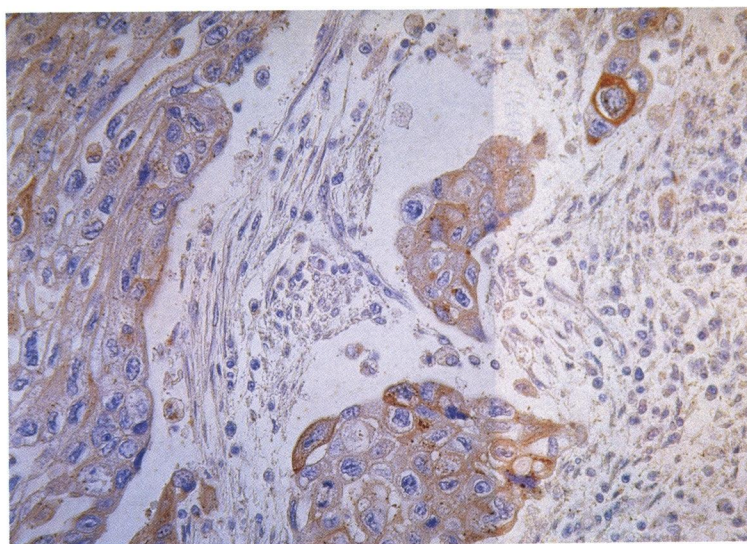


Fig. 1. The infiltrating carcinoma cells of the bladder shows the presence of carcinoembryonic antigen by PAP method. (300 $\times$)

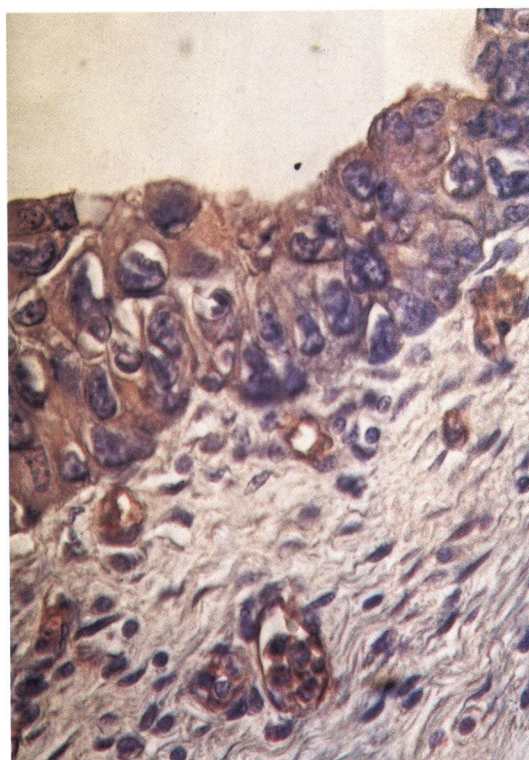


Fig. 2. The histological section of carcinoma in situ of the bladder shows the presence of the blood group antigen on urothelium, vascular endothelium and erythrocytes by ABC method. (300 $\times$)

Table 3. Relationship between CEA- or blood group antigen status and histo-pathological stage in 47 transitional cell carcinomas of the bladder

Path-Stage	No. pTs	CEA(-)	CEA(+)	ABH(-)	ABH(+)
pT ₁	27	24	3	4	23
pT ₂	8	7	1	4	4
pT ₃	10	3	7	8	2
pT ₄	2	1	1	1	1
(Total)	47	35	12	17	30

pT ₁	27	24	3	4	23
pT ₂ -pT ₄	20	11	9	13	7

Table 4. Relationship between CEA- or blood group antigen status and histological grade in transitional cell carcinomas of the bladder

Grade	No. pTs	CEA(-)	CEA(+)	ABH(-)	ABH(+)
G ₁	30	16	4	6	24
G ₂	12	6	6	7	5
G ₃	5	3	2	4	1
(Total)	47	25	12	17	30

G ₁	30	16	4	6	24
G ₂ -G ₃	17	9	8	11	6

例, 63.8%であった。

1) 病理組織学的 Stage と CEA および血液型抗原存在との関係 (Table 3).

組織内 CEA の陽性率は pT₁ で11.1%, pT₂ で12.5%, pT₃ で70.0%, pT₄ で50.0%と Stage の進行にともない CEA の存在がより高率に認められた。ことに pT₁ の low stage 27 症例と、筋層浸潤の認められる pT₂ 以上の high stage 20 症例との間における CEA 陽性率を比較検討すると、前者において11.1% (3例) であるのに対し、後者では45.0% (9例) と両群の間にあきらかな有意差を認めた ($P < 0.01$).

いっぽう組織内血液型抗原の陽性率は pT₁ で85.2%, pT₂ で50.0%, pT₃ で20.0%, pT₄ で50.0%であり Stage の進行とともに血液型抗原の消失がより高率に認められた。さらに, low stage 症例と high

stage 症例との間における血液型抗原陽性率を比較検討すると前者では85.2% (23例), 後者では35.0% (7例) とあきらかな有意差を認めた ($P < 0.01$).

2) 組織学的悪性度と CEA および血液型抗原存在との関係 (Table 4).

組織内 CEA 陽性率は G₁ で13.3%, G₂ で50.0%, G₃ で40.0%であり, G₁ の low grade 症例30例と G₂ および G₃ の high grade 症例17例との陽性率の比較において, 前者の13.3% (4例) に対し後者では47.1% (8例) とあきらかな有意差を認めた ($P < 0.01$).

いっぽう組織内血液型抗原に関してその陽性率は G₁ で80.0%, G₂ で41.7%, G₃ で20.0%であり low grade 症例と high grade 症例との間における陽性率の比較においても前者の80.0% (24例) に対し後者は35.3% (6例) であり grade に関しても, 腫瘍の

Table 5. Relationship between carcinoembryonic antigen biosynthesis and absence of blood group antigens in 47 transitional cell carcinomas of the bladder

Blood Group Antigens	Carcinoembryonic Antigens		(Total No.Pts)
	negative	positive	
Negative	6	11	17
positive	29	1	30
(Total No.Pts)	35	12	47

The antigens are statistically related ($P < 0.01$)

悪性化にともない両者の間にあきらかな有意差を認めた ($P < 0.01$).

以上の結果より、通常正常組織に存在する血液型抗原は low stage, low grade な腫瘍において、より高率に認められ、その陽性率は腫瘍の進展や悪性化にともない減少する反面、腫瘍関連抗原である CEA は腫瘍の進展および悪性化とともに、より高率に認められた。すなわちこの両者の関係をみると血液型抗原陽性 17 例における CEA の陽性率は 67.7% (11 例) であり、いっぽう血液型抗原陽性 30 例中 CEA の陽性例は 3.3% (1 例) であり、両者は相反する関係にあるものと考えた ($P < 0.01$) (Table 5).

考 察

大腸癌特異抗原として、1965 年 Gold と Freedman により¹⁰⁾報告された癌胎児抗原 (CEA) は大腸癌に対する特異性に関しては否定されたものの、各種消化器系癌はもとより膀胱腫瘍をはじめとする泌尿器悪性腫瘍においても有用な腫瘍マーカーであるとして注目されている¹¹⁻²¹⁾。大橋¹⁹⁾は膀胱腫瘍症例において血中 CEA 値の上昇を認めた症例は 438 例中 151 例 (34.5%) であり、限局群では 40.9%、転移群では 70.3% であり、いっぽう尿中 CEA の排泄増加を認めた症例は、膀胱腫瘍 763 例中 393 例 (51.1%) であったと集計報告し、膀胱腫瘍症例における血中および尿中 CEA の測定の実用性について述べている。著者の今回の症例において血中および尿中 CEA については検討していない。

膀胱腫瘍における組織内 CEA の検索は、当初必ずしも臨床上有用でないと考えられていたが、近年その malignant potential としての意義について確認されつつある。すなわち Goldenberg と Wahren²²⁾は免疫ペルオキシダーゼを用い、ホルマリン固定膀胱組織内 CEA の検討において、その陽性率は血中お

よび尿中 CEA 測定の場合よりあきらかに低率の 10% にすぎず、組織内 CEA 検索の実用性を否定している。しかし Wahren²²⁾は、さらに蛍光抗体法を用いて固定しない膀胱組織において組織内 CEA を検索し良好な成績を報告している。すなわち良性の尿路上皮ではすべて陰性であるのに対し、25~26% の癌組織において陽性像を認め、しかもこの方法では $< 1 \mu\text{g}$ CEA/細胞の検索が可能であることより細胞単位の CEA の定量は形態学的異型度とともにその腫瘍の予後のパラメーターとなると述べている。また Leung ら¹⁷⁾は組織中 CEA は血中および尿中 CEA とは別のものであり膀胱腫瘍の malignant potential の指標として臨床重要であると報告している。さらに Jantze と Altenaethe¹⁵⁾は PAP 法を用い 150 例の膀胱移行上皮癌に対し組織内 CEA を検索、CEA の存在と病理組織学的悪性度との関係について報告している。すなわち組織内 CEA の存在は全症例の 57% に認め、しかも grade I では全例陰性、grade II で 34%、grade III で 40%、また pTa で 34%、pT₁ で 59%、pT_{2/3} で 80% の陽性率であり、その CEA の存在と stage および grade の進展とは相関すると述べている。今回の著者の結果でもほぼ同様の結果を得ており組織内 CEA と stage の進行および悪性化との相関を確認した。いっぽう細胞の変化にともない血液型抗原 ABO (H) が消失することが知られており、この抗原の消失は若干の異論はあるものの生物学的悪性度を知るマーカーとして有効であることが知られている^{9, 22-23)}。通常血液型抗原の検索には特異的赤血球吸着試験 (specific red cell adhesion test: SRCA)²³⁾が用いられているが、本法はその性格上数々の問題を有している²²⁾。すなわち、1. SRCA 法は低感度のため false negative や再現性に難点がある。2. 検体の完全な永久保存が困難。3. 同一標本において通常の病理組織学的検索がおこなえない。4.

O(H) 抗原の検出に関してはとくに低感度であるなどの点であり、これらの事項が SRCA 法を血液型抗原消失の検索に用いる限り、その判定結果が膀胱腫瘍の具体的治療法決定に反映されない理由であると思われる。この対策として PAP 法をはじめとする各種酵素抗体法を用い良好な成績^{29,30)}が報告されている。今回使用した ABC 法はすでに佐々木⁹⁾により血液型抗原の検索手段として報告されており、1. PAP 法に比べても感度が非常に高く特異的である。2. O型についても感度を増した。3. 3 step なので操作が簡単などの利点をあげ、血液型抗原の検索手段として推奨されるものと述べている。今回の著者の結果においても ABC 法の高感度 および その再現性により、より有力な検索方法であることが確認された。

膀胱腫瘍症例において同時に組織内 CEA と血液型抗原を検索した2つの報告がある。すなわち Willey ら⁹⁾は PAP 法を用いた48例の検討において ABO 抗原陽性を示したのは stage O の22例であり、そのうち21例は grade I または grade II の症例であり、反面 ABO 抗原陰性26症例はすべて grade III, しかもその14例は浸潤癌であったと報告している。いっぽう CEA に関しては48症例中26例で陽性を認め、うち20例は grade I または II の症例であり、また21例は stage O の症例であったと報告し、膀胱腫瘍における組織内 CEA は血液型抗原の存在と異なり病理組織学的 stage や悪性度 grade, およびその予後とは相関しないと述べている。いっぽう Nakatsu ら⁹⁾は同じく PAP 法を用い同一の膀胱腫瘍症例における組織内血液型抗原および CEA を検索し、ABO 抗原の消失は膀胱内再発とは相関するものの組織学的悪性度 stage および生存率とは相関せず、反面組織内 CEA の存在はこれらとよく相関することにより、PAP 法を用いた CEA の検索は膀胱腫瘍の予後因子として重要であると報告している。われわれの今回の結果でも組織内 CEA および血液型抗原の存在は、ともに膀胱腫瘍の stage および grade とよく反映した。よって組織内 CEA および血液型抗原は腫瘍の malignant potential の指標であるばかりでなく、生検材料、とくに TUR-Bt による小標本における病理組織診断の有用な補助手段であるものと考えられた。

ま と め

膀胱腫瘍47例に対し、PAP 法により組織内 CEA を、また ABC 法により血液型抗原を同時に検索し以下の結果を得た。

1. 膀胱組織内 CEA 陽性例は12例25.3%であり、いっぽう血液型抗原の陽性例は30例63.8%であった。
2. 組織内 CEA および血液型抗原の存在は膀胱腫瘍の進展度および悪性度を反映した。
3. 血液型抗原陰性例における CEA 陽性率は67.7%、血液型抗原陽性例における CEA 陽性率は3.3%であり、両者おのおのの存在は相反する関係にあるものと考えられた。
4. 組織内 CEA および血液型抗原の検索はともに病理組織診断の手助けとなるものと考えられる。

稿を終えるにあたり、種々御教授、御協力していただきました福島労災病院病理科、箱崎半道部長に深謝いたします。

なお本論文の要旨は第49回、日本泌尿器科学会東部連合総会において発表した。

文 献

- 1) Gold P, Gold M and Freedman SO: Cellular location of carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *Cancer Res* 28: 1331~1334, 1968
- 2) Goldenberg DM and Wahren B: Immunoperoxidase staining of carcinoembryonic antigen in urinary bladder cancer. *Urol Res* 6: 211~214, 1978
- 3) Wahren B: Cellular content of carcinoembryonic antigen in urothelial carcinoma. *Cancer* 42: 1533~1539, 1978
- 4) Jautzke G and Altenaetr E.: Immunohistochemical demonstration of carcinoembryonic antigen (CEA) and its correlation with grading and staging of tissue sections of urinary bladder carcinoma. *Cancer* 50: 2052~2056, 1982
- 5) Willey EC, Mendelsohn G, Droller M and Eggleston JC: Immunoperoxidase detection of carcinoembryonic antigen and blood group substances in papillary transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol* 128: 276~180, 1982
- 6) Nakatsu H, Kobayashi I, Onishi Y, Igawa Y, Ito H, Tahara E and Nihira H: ABO (H) blood group antigens and carcinoembryonic antigens as indicators of malignant potential in patients with transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol* 131: 252~257, 1984

- 7) 日本泌尿器科学会, 日本病理学会編: 泌尿器科, 病理膀胱癌取扱い規約. 金原出版, 東京, 1980
- 8) Sternberger LA: The unlabeled antibody peroxidase antiperoxidase (PAP) method. Immunocytochemistry, Sternberger LA, Wiley Medical publication, New York, 1976
- 9) 佐々木綱子: Avidin-Biotin-peroxidase Complex (ABC) 法を用いた表在性尿路腫瘍及び膀胱の Carcinoma in situ の ABH 同種抗原の検索. 日泌尿会誌 74: 1326~1336, 1983
- 10) Gold P and Freedman SO: Demonstration of tumor specific antigens in human colonic carcinoma by immunological tolerance and absorption technique. J Exp Med 121: 439~461, 1965
- 11) 平松秀松: 癌胎児性抗原. 日医師会誌 81: 635~641, 1978
- 12) Gold P, Shuster J and Freedman SO: Carcinoembryonic antigen (CEA) in clinical medicine. Cancer 42: 1399~1409, 1978
- 13) Rule AH and Kirch ME: Gene activation of molecular with carcinoembryonic antigen determinants in fetal development and adenocarcinoma of colon. Cancer Res 36: 3503~3509, 1976
- 14) Zamchdck N: The present status of carcinoembryonic antigen (CEA) in diagnosis detection of recurrence, prognosis and evaluation of therapy of colon and pancreatic cancer. Clin gastroenterol 5: 625~631, 1976
- 15) Hall RR, Laurence DJR, Neville AM and Wallance DM: Carcinoembryonic antigen and urothelial carcinoma. Br J Urol 45: 88~92, 1973
- 16) Frasser RA, Ravry MJ, Segura JW and Go VLW: Clinical evaluation of urinary and serum carcinoembryonic antigen in bladder cancer. J Urol 114: 226~227, 1975
- 17) Leung G, Romas NA, Lonascu L, Bennet S, Tannenbaum M, Veenema RJ and Lattimer JK: Carcinoembryonic antigen and bladder carcinoma. J Urol 115: 45~48, 1976
- 18) Fleisher M, Grabstald H, Withmore WF, Pinsky GM, Oettgen HF and Schwartz MK: The clinical utility of plasma and urinary carcinoembryonic antigen in patients with genitourinary disease. J Urol 117: 635~637, 1971
- 19) 大橋輝三: 膀胱マーカーに関する研究の現況と展望—膀胱癌—. 西日泌尿 45: 241~246, 1987
- 20) 角田和之・宮崎良香・山口秋人・南里和成・原孝彦: 泌尿器科領域における CEA の検討. 西日泌尿 42: 323~329, 1980
- 21) Leung JP, Plow EF, Eshdat Y, Marchesi VT and Eidington TS: Delineation of three classes of CEA antigenic determinants: identification of membrane-associated CEA as an independent species of CEA. J Immunol 119: 722~725, 1977
- 22) Kovarik S, Davidsohn I and Stejskal R: ABO antigens in cancer. Detection with the mixed cell agglutination reaction. Arch Pathol 86: 12~21, 1968
- 23) Davidsohn I: Early immunological diagnosis and prognosis of carcinomas. Am J Clin Path 57: 715~730, 1972
- 24) Decenzo JM, Howard P and Irish CE: Antigenic deletion and prognosis of patients with stage A transitional cell bladder carcinoma. J Urol 114: 874~878, 1975
- 25) 加藤哲郎: 特異性赤血球吸着法 (SRCA) による尿路移行上皮の ABH (O) 同種抗原の観察. 日泌尿会誌 68: 71~81, 1977
- 26) Lange PH, Limas C and Fraley EE: Tissue blood-group antigens and prognosis in low stage transitional cell carcinomas of bladder. J Urol 119: 49~51, 1978
- 27) 公文裕己・朝日俊彦・森岡政明・松村陽右・大森弘之: 膀胱腫瘍における malignant potential の指標としての ABO isoantigens. 日泌尿会誌 71: 767~774, 1980
- 28) Askary A, Colmenares E, Saberi I and Jarman WD: Red cell surface antigen and its relationship to survival of patients with transitional cell carcinoma of the bladder. J Urol 125: 182~184, 1981
- 29) 藤岡知昭: Peroxidase-antiperoxidase 法による膀胱癌組織における血液型抗原の検討. 日泌尿会誌 74: 379~383, 1983
- 30) Coon JS and Weinstein RS: Detection of ABH tissue isoantigens by immunoperoxidase methods in normal and neoplastic uro-

thelium: comparison with the erythrocyte adherence method. Am J Clin Path **76**: 163 ~167, 1981

(1985年2月20日受付)