

Phosphatidylinositol phospholipase C を用いた carcinoembryonic antigen 可溶化の試みと腹腔洗浄細胞診への応用

岐阜大学医学部第2外科

辻 恭嗣 須原 貴志 加藤 元久 鷹尾 博司
杉山 保幸 国枝 克行 梅本 敬夫 宮 喜一
深田 代造 佐治 重豊

腹腔内洗浄細胞診施行時に phosphatidylinositol phospholipase C (PI-PLC) を添加し、癌細胞膜表面の carcinoembryonic antigen (CEA 抗原) を遊出させる PI-PLC 法を考案し、腹膜播種性転移 (P) 診断法としての有用性を検討した。基礎的検討：1) CEA 産生 KATO-III を用いた検討で CEA 濃度は、PI-PLC 添加により約1.7倍に増加した。2) CEA 濃度は PI-PLC 添加時間、標的癌細胞数依存性に増加した。臨床的検討：胃癌81例を対象に開腹時細胞診、細胞 CEA 染色、PI-PLC 法を施行した。1) P 陽性12例の陽性率は細胞診が91.6%、細胞 CEA 染色が75.0%、PI-PLC 法が83.3%、陰性69例ではおのおの2.9%、4.3%、7.2%であった。2) PI-PLC 法による CEA 感度増強程度は1.8から600倍で、陽性例の特徴は臨床病理学的にも顕微鏡レベルの腹膜転移が十分推察される症例であった。3) Po stage III で PI-PLC 法陽性であった2例中1例に腹膜再発を認めた。以上より、PI-PLC 法は胃癌腹膜播種性転移の客観的診断法として有用であると考えられた。

Key words: gastric cancer, peritoneal metastasis, carcinoembryonic antigen, phosphatidylinositol-phospholipase C

はじめに

Carcinoembryonic antigen (以下、CEA) は、分子量18万の糖蛋白で、消化器癌の診断や治療効果の判定に用いられている腫瘍マーカーである。近年、分子構造の解明により、CEA は細胞膜に phosphatidylinositol anchor により疎水結合しているが、phosphatidylinositol phospholipase C (以下、PI-PLC) により選択的に切断され、可溶化して細胞膜より遊出することが知られている¹⁾²⁾ (Fig. 1)。この性質を利用し、CEA 産生癌細胞の CEA 遊出能を高めることにより CEA 感度を向上させ、腹腔洗浄細胞診への応用の可能性を基礎的・臨床的に検討した。すなわち、基礎的には CEA 産生腫瘍細胞、KATO-III を用い、PI-PLC による CEA 抗原の可溶化現象を確認した。臨床的には胃癌症例を対象に開腹時腹腔内洗浄細胞診を施行し、洗浄液中浮遊細胞に PI-PLC を添加した場合の CEA 感度増強程度から判定し、腹膜播種性転移診断法とし

ての有用性を評価した。

研究対象と研究方法

1. 基礎的検討

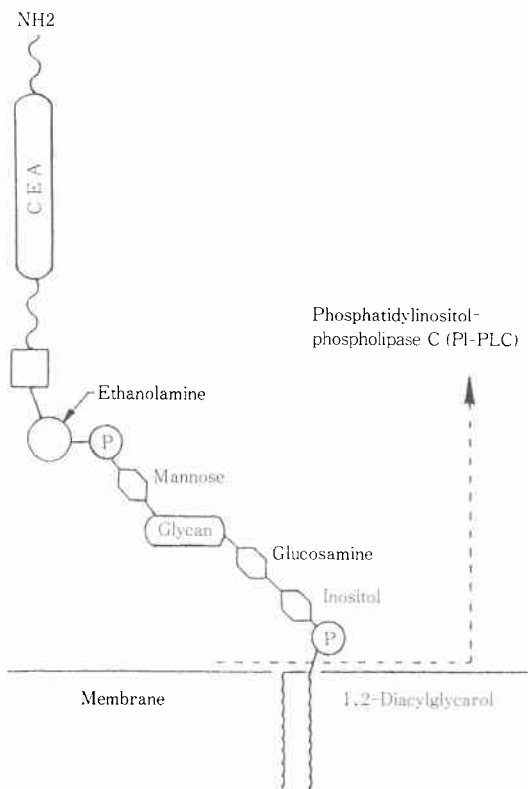
標的細胞に用いた KATO-III はヒト印環状細胞癌から樹立された CEA 産生培養癌細胞である³⁾。また、PI-PLC (Boehringer Mannheim Biochemica 製) は Bacillus cereus 培地より分離された酵素で、4°C で安定、至適 PH は 7.2~7.5、作用温度は 37°C である⁴⁾。

PI-PLC による CEA 抗原遊出法は、KATO-III を 0.1M Phosphate Buffer (以下、PB) 液 1ml 中に加え、1,100rpm にて 5 分間遠心・洗浄後上澄を排液、沈渣に PB 液 1ml と PI-PLC を添加し、37°C 温浴槽にて振盪反応させた後、1,100回転 5 分間遠心後上澄を採取し、sandwich 法⁵⁾にて CEA (Dinabot CEA RIA bease) 値を測定した。

2. 臨床的検討

対象は、1993年3月より約18か月間に当科で開腹した初回単発胃癌の81例である。性別は男56例、女25例、年齢は36歳から87歳、平均61.0±11.3歳で、開腹時の手術的進行程度は⁶⁾ Ia+Ib 41例、II 3例、IIIa+IIIb 16

Fig. 1 Surface antigen of CEA and outline of structure



例, IVa+IVb 21例である。

腹腔洗浄細胞診の方法は、開腹直後にダグラス窩腔内と左横隔膜下腔内に生理食塩水約50mlを注入し軽く攪拌・洗浄後、可及的全量を回収した。各洗浄液は十分振盪後それぞれ4本の試験管に均等分注し、内2本をPI-PLC添加によるCEA抗原遊出程度の検索(以下、PI-PLC法)用に、残り2本を細胞診でのパパニコロウ染色(以下、細胞診)用と細胞CEA免疫染色(以下、細胞CEA)用に供した。

PI-PLC法は、上記CEA抗原遊出程度検索用に採取した2本の試験管を1,500rpm 5分間遠心後に細胞沈渣を採取し、これを1mlのPB液を入れた別の試験管に注入後1,100rpm 2分間遠心洗浄した。排液し得られた沈渣に1mlのPB液を再度注入し、1本にはPI-PLCを0.5単位添加し、残りの1本は無添加のままとした。次いで、各試験管を37°C温浴槽にて120分間振盪反応後、1,100rpm 2分間遠心して上澄を採取しCEA値測定用に供した。上澄中CEA値は、sandwich法(Dainabot CEA RIA bease)にて測定し、キットの変

Table 1 Comparison on CEA value after incubation with 1×10^6 of KATO-III (CEA secreting cancer cells) and PI-PLC for 120 minutes

PI-PLC	CEA concentration (ng/ml)
with	15.9(±2.6)
without	9.7(±2.0)
(n=4)	p<0.001

Table 2 Relationship between dosage of PI-PLC and CEA value after incubation with 1×10^6 of KATO-III (CEA secreting cancer cells) and PI-PLC for 120 minutes

Dosage	CEA concentration (ng/ml)
without	9.7(±2.0)
0.25	15.7(±2.2)
0.5	16.0(±2.7)
1.0	15.9(±2.6)
(n=4)	N.S.

動係数より、10%以上の上昇を観察した場合をPI-PLC法陽性と判定した。

細胞CEA染色は、上記沈渣の塗抹標本を95%アルコールで15分間固定し、0.01Mリン酸緩衝液(以下、PBS)中で5分間洗浄後3% hydrogen peroxideにて内因性ペロキシダーゼを阻止した。次いで、0.01M PBSにて洗浄し非特異的蛋白を阻止後、1次抗体(抗CEAモノクロナール抗体、Lipshaw社製)にて4分間反応させPBSにて洗浄した。その後、2次抗体にて4分間反応後洗浄し、ペロキシダーゼに4分間反応洗浄後クロモゲンにて4分間反応、発色させ水洗後、ヘマトキシリンにて核染色した。

細胞診のパパニコロウ染色は、アルコール固定後ハリス・ヘマトキシリン液を用いて型の如く染色した。統計学的検定法は対応のある2群間の比較はWilcoxon法にて行い、陽性率の比較は χ^2 検定にて施行した。

結 果

1. 基礎的検討

1) PI-PLC添加によるCEA抗原遊出程度

1×10^6 個のKATO-IIIにPI-PLCを1単位添加し120分間反応させた場合、上澄中CEA濃度は15.9(±2.6) ng/mlと非添加群の9.7(±2.0) ng/mlに比べ有意の高値を呈し約1.7倍の増強が観察された(p<0.001)(Table 1)。

2) 添加量とCEA抗原遊出程度との関連

1×10^6 個のKATO-IIIにPI-PLCを0.25, 0.5, 1.0単

Fig. 2 Relationship between CEA value and duration of incubation with KATO-III (CEA secreting cancer cells, 1×10^6) and PI-PLC.

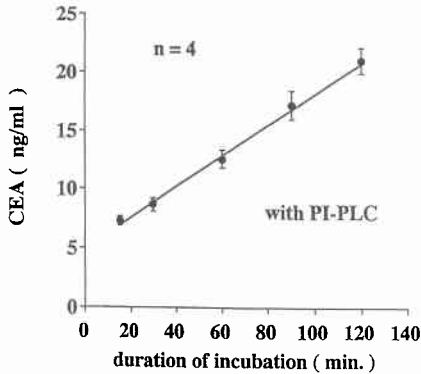
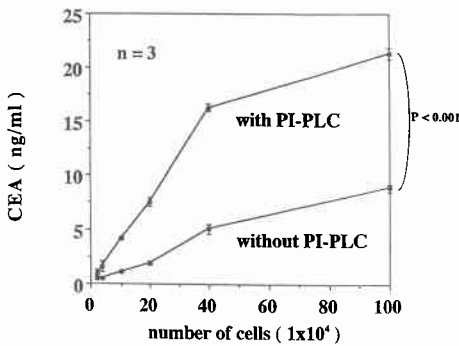


Fig. 3 Relationship between number of KATO-III (CEA secreting cancer cells) and CEA value after incubation with PI-PLC.



位添加し、120分間反応させた。その結果、上澄中 CEA 濃度は非添加群の9.7 (±2.0) ng/ml に比べ増強したが、今回検索した添加濃度範囲内では差は認められなかった (Table 2)。

3) 反応時間と CEA 抗原遊出程度との関連

1×10^6 個の KATO-III に PI-PLC を0.5単位添加し 15, 30, 60, 90および120分間反応させた場合、上澄中 CEA 濃度はそれぞれ7.3 (±0.42), 8.7 (±0.53), 12.6 (±0.76), 17.2 (±1.2), 21.0 (±1.1) (ng/ml) と時間依存性に増加した (Fig. 2)。

4) 腫瘍細胞数と CEA 抗原遊出程度との関連

2, 4, 10, 20, 40および100 ($\times 10^4$) 個の KATO-III に PI-PLC を0.5単位添加し、120分間反応させた場合、上澄中 CEA 濃度はそれぞれ0.9 (±0.43), 1.6 (±0.46), 4.2 (±0.10), 7.5 (±0.42), 16.2 (±0.38),

Table 3 Comparison on CEA value after incubation with KATO-III and various conditioning medium, or after mechanical pipetting, and/or combination with PI-PLC

Conditioning medium	CEA concentration (ng/ml)
0.1M PB*	1.7 (±0.31)
EDTA	1.6 (±0.28)
trypsin	2.2 (±0.25)
pipetting	2.0 (±0.48)
PI-PLC (0.5U)	3.7 (±0.15)
PI-PLC+EDTA	2.8 (±0.23)
PI-PLC+trypsin	4.6 (±0.19)

* : phosphate buffer (n=4)

21.3 (±0.52) (ng/ml) と、細胞数依存性に漸増した。一方、PI-PLC 非添加のまま120分間反応させた場合の上澄中 CEA 自然分泌量は、それぞれ0.5 (±0.08), 0.5 (±0.06), 1.1 (±0.12), 1.9 (±0.23), 5.1 (±0.47), 8.9 (±0.37) (ng/ml) と軽度の増加にとどまった (Fig. 3)。

5) 他の抗原遊出法併用による増強効果について

1×10^6 個の KATO-III に PI-PLC, EDTA あるいは trypsin を単独添加, あるいは pipetting による機械的刺激を加え, 37°Cで60分間反応させ上澄中の CEA 濃度を測定した。その結果, 上澄中 CEA 濃度は PB 液添加時は1.7 (±0.31) ng/ml, 0.5単位の PI-PLC 添加時は3.7 (±0.15) ng/ml, 0.4%の EDTA 1ml 添加時は1.6 (±0.28) ng/ml, 0.25%の trypsin 添加時は2.2 ng/ml, pipetting 100回の機械的刺激負荷時は2.0 (±0.48) ng/ml と PI-PLC 添加群が最も高値であった。trypsin 添加群でも若干の抗原遊出作用が示唆された。次いで, PI-PLC に EDTA あるいは trypsin を併用添加した場合の相乗効果の有無を検索したところ, EDTA との添加で2.8 (±0.23) ng/ml, trypsin との添加で4.6 (±0.19) ng/ml と, trypsin との併用で相乗効果が観察された (Table 3)。

2. 臨床的研究の結果

1) 総合的進行程度, 壁深達度別の検討

総合的進行程度別の検討において細胞診では, stage IIIa+IIIb で16例中1例(6.3%), IVa+IVb で21例中12例(57.1%)が陽性と判定された。また細胞 CEA では, stage IIIa+IIIb で16例中1例(6.3%), IVa+IVb で21例中11例(52.4%)が陽性で, PI-PLC 法では, stage IIIa+IIIb で16例中2例(12.5%), IVa+IVb で21例中13例(61.9%)であり, 三者間に有意差は認め

Table 4 Comparison on rate of positive peritoneal dissemination evaluated by irrigation cytology, cell CEA stain or PI-PLC method according to surgical stage grouping* & depth of sensal invasion

1)			
Stage (cases)	Papanicolaou	Cell CEA	PI-PLC
I (41)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
II (3)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
III a+b(16)	1(6.3%)	1(6.3%)	2(12.5%)
IV a+b(21)	12(57.1%)	11(52.4%)	13(61.9%)
Total (81)	13(16.0%)	12(14.8%)	15(18.5%)
2)			
Depth	Papanicolaou	Cell CEA	PI-PLC
m~mp (52)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
ss (4)	0(0%)	1(25%)	1(25%)
se (20)	8(40%)	7(35%)	10(50%)
si (5)	5(100%)	4(80%)	4(80%)
Total (81)	13(16%)	12(14.8%)	15(18.5%)

* : The general rules for the gastric cancer study (12th edition)

Table 5 Comparison on rate of positive peritoneal dissemination evaluated by irrigation cytology, cell CEA stain or PI-PLC method between the left subphrenic cavity and the Douglas cavity

Cavities	Papanicolaou	Cell CEA	PI-PLC
subphrenic	10(12.3%)	9(11.1%)	11(13.6%)
Douglas	12(14.8%)	11(13.6%)	11(13.6%)
either	13(16.0%)	12(14.8%)	15(18.5%)

N.S.

なかった (Table 4-1). 壁深達度別の検討では, 各検査法とも m から mp 例には陽性例は認めなかった. ss 例では細胞 CEA と PI-PLC 法に各 1 例 25% の陽性例を認めた. se, sei 例では細胞診陽性率が各々 40.0%, 100%, 細胞 CEA 例が 35.0%, 80%, PI-PLC 法が 50%, 80% に認められた (Table 4-2).

2) 洗浄液採取部位別検討

左横隔膜下腔内 (以下, LD 腔) 洗浄液での陽性率は, 細胞診で 10 例, 12.3%, 細胞 CEA で 9 例, 11.1%, PI-PLC 法で 11 例, 13.6% と各群間で著差はみられなかった. 一方, ダグラス窩腔内 (以下, DA 腔) での陽性率は, 細胞診で 12 例, 14.8%, 細胞 CEA で 11 例, 13.6%, PI-PLC 法で 11 例, 13.6% と差はみられなかつ

Table 6 Summary of cytological examination evaluated by Papanicolaou stain cell CEA or PI-PLC in 12 gastric cancer patients with macroscopic peritoneal dissemination obtained from the left subphrenic cavity or the Douglas cavity

Cavities	Papanicolaou	Cell CEA	PI-PLC
subphrenic	8(66.6%)	6(50.0%)	7(58.3%)
Douglas	10(83.3%)	9(75.0%)	9(75.5%)
either	11(91.6%)	9(75.0%)	10(83.3%)

N.S.

Table 7 Summary of cytological examination evaluated by Papanicolaou stain, cell CEA or PI-PLC in 69 gastric cancer patients without macroscopic peritoneal dissemination obtained from the left subphrenic cavity or the Douglas cavity

Cavities	Papanicolaou	Cell CEA	PI-PLC
subphrenic	2(2.9%)	3(4.3%)	4(5.8%)
Douglas	2(2.9%)	2(2.9%)	2(2.9%)
either	2(2.9%)	3(4.3%)	5(7.2%)

N.S.

た. また, LD 腔と DA 腔を合せた評価でも, 陽性率は細胞診で 13 例, 16.0%, 細胞 CEA で 12 例, 14.8%, PI-PLC 法で 15 例, 18.5% と有意差は認めなかった (Table 5).

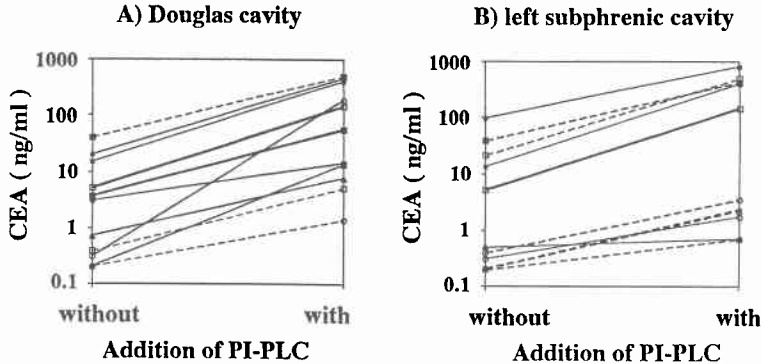
3) 肉眼的腹膜播種陽性例での検討

81 例の肉眼的腹膜播種性転移 (以下, P) 程度は, 陰性が 69 例, 陽性が 12 例で, 内訳は P₁ 5 例, P₂ 4 例, P₃ 3 例であった. P 陽性 12 例の検討で LD 腔内洗浄液は, 細胞診で 8 例, 66.6%, 細胞 CEA で 6 例, 50.0%, PI-PLC 法で 7 例, 58.3% が陽性であった. 一方, DA 腔内での陽性率は, 細胞診で 10 例, 83.3%, 細胞 CEA で 9 例, 75.0%, PI-PLC 法で 9 例, 75.0% であった. また, LD と DA 両腔内を合わせた陽性率は, 細胞診で 11 例, 91.6%, 細胞 CEA で 9 例, 75.0%, PI-PLC 法で 10 例, 83.3% であったが有意差は認めなかった (Table 6).

4) 肉眼的腹膜播種陰性例での検討

P 陰性 69 例の検討で LD 腔内洗浄液は, 細胞診で 2 例 (2.9%), 細胞 CEA で 3 例 (4.3%), PI-PLC 法で 4 例 (5.8%) と PI-PLC 法で陽性率が最も高かったが有意差は認めなかった. また, DA 腔内での陽性率は,

Fig. 4 Changes of CEA value by addition of PI-PLC into irrigation sample obtained from the Douglas cavity (A) or the left subphrenic cavity (B) an case of positive PI-PLC.



細胞診で2例(2.9%),細胞CEAで2例(2.9%),PI-PLC法で2例(2.9%)と各群間では差はみられなかった。LDとDA両腔内を合わせた陽性率は,細胞診で2例,2.9%,細胞CEAで3例,4.3%,PI-PLC法で5例,7.2%とPI-PLC法が高いものの有意差は認めなかった(**Table 7**)。

5) PI-PLC法によるCEA増強程度度の検討

PI-PLC法でCEA濃度が上昇した症例は,LD腔内で11例みられたが,増強程度は1.8から29.2倍,平均11.7倍。一方,DA腔内での11例では4.7から600倍,平均70.2倍であった(**Fig. 4**)。

6) PI-PLC法陽性例の臨床病理学的特徴

PI-PLC法で陽性と判断した15例を,総合的進行度がstage IIIa+IIIb, IVa+IVbで陰性と判断した22例と比較すると,P陽性例(p=0.0002),肉眼的リンパ節転移N₂以上例(p=0.0004),組織学的リンパ節転移n₂以上例(p=0.0004),組織学的深達度se以上例(p=0.015),細胞診陽性例(p<0.0001),細胞CEA陽性例(p<0.0001)で有意に陽性率が高かった(**Table 8**)。

一方,P陰性例でLD腔かDA腔のいずれかでPI-PLC法が陽性であった5例の特徴は,3例が肝転移やリンパ節転移が陽性で,漿膜浸潤程度が高度であったstage IV症例,2例はリンパ節転移を有するseのstage III症例であった(**Table 9**)。これらの予後を見ると,3例は同時性肝転移による癌死であった。stage IIIの2例中1例は腹膜再発をきたしたが,1例は再発は認めていない。

血清CEA値との関連で,PI-PLC法が陽性と判定された15例の検討では6例(40.0%)が高値を示した。また,血清CEA値陰性例でもPI-PLC法により10倍

Table 8 Characteristics of positive PI-PLC case with Stage IIIa+IIIb or IVa+IVb on clinicopathological findings according to the general rules for the gastric cancer study

Factors	Positive (n=15)	Negative (n=22)	p value
P0	5	20	0.0002
P1,2,3	10	2	
H	10	20	
H1,2,3	5	3	N.S.
N0,1	2	16	0.0004
N2,3,4	13	6	
T1,2	0	4	N.S.
T3,4	15	18	
n0,1	1	16	0.0004
n2,3,4	7	3	
m, sm, mp, ss	1	10	0.015
se, sei	13	12	
histology			N.S.
well	0	3	
moderate	3	4	
poor	11	15	
Papanicolaou			0.0001
negative	4	20	
positive	11	2	
Cell CEA			0.0001
negative	3	22	
positive	12	0	

以上増強を示す例が多くみられた。しかし,血清CEA値とCEA増強程度との間には有意の相関はみられなかった(**Table 10**)。

Table 9 Characteristics of the positive PL-PLC cases without macroscopic peritoneal dissemination

Cases	H	N (n)	T (s)	S(s)tage	Papanicolaou	Cell CEA	SerumCEA	Prognosis
1	H3	N2(n2)	T4(ss)	IV(IV)	negative	positive	608.0	dead
2	H3	N4	T4	IV	positive	positive	10.6	dead
3	H0	N1(n2)	T3(se)	III(III)	negative	negative	1.0	alive
4	H0	N2(n1)	T3(se)	III(III)	positive	negative	360.0	dead(2y3m)
5	H3	N2	T3(se)	IV(IV)	negative	negative	4.4	dead

(ng/ml)

Table 10 Relationship on CEA value between serum and irrigation supernatant after treatment with PI-PLC

Case	Serum CEA	Subphrenic cavity	Douglas cavity
1	0.1	13→380(29.2)	15→390(26.0)
2	0.3	93→800(8.6)	20→450(22.5)
3	0.5	0.3→1.7(5.7)	0.3→180(600)
4	0.5	0.2→0.2	3.0→ 14(4.7)
5	0.7	0.4→0.4	0.7→7.7(11.0)
6	1.0	0.5→0.7(1.4)	0.7→7.7(11.0)
7	10.6	21→500(23.8)	0.4→5.1(12.8)
8	2.6	39→410(10.5)	40→490(12.3)
9	227.0	0.4→3.5(7.0)	0.2→1.4(7.0)
10	3.1	0.2→0.7(3.5)	0.2→0.2
11	360.0	0.2→2.2(11.0)	0.2→0.2
12	4.4	0.2→2.3(11.5)	0.2→0.2
13	47.0	5.1→140(27.5)	5.1→140(27.5)
14	6.5	0.5→0.5	3.6→ 56(15.6)
15	608.0	12→12	18→ 13

CEA value without PI-PLC → with PI-PLC (ng/ml)

考 察

進行胃癌では治療切除例でも相当数に腹膜再発がみられ治療に難渋する。かかる症例では、手術時に顕微鏡レベルの腹膜播種が存在する⁷⁾⁸⁾との考えで、腹腔内洗浄細胞診などが施行され^{9)~11)}、早期診断法の開発が試みられている。一方、抗癌剤や免疫賦活剤などの腹腔内投与あるいは持続温熱療法などは、肉眼的腹膜播種性転移陽性例では治療効果は不良であるが、陰性で細胞診陽性例に対し有効との判断で、積極的な治療が試みられ相当程度の効果がみられている^{12)~18)}。

ところで、腹腔内洗浄細胞診は主に病理医や専門細胞検査技師などによりなされているが、診断には腹腔内活性化中皮との鑑別が困難で、また治療への応用には閉腹前に確定診断できる迅速性が必要である。すなわち、細胞診の採取手技は簡便であるが上記条件を満たすには人的あるいは設備の面で問題があり、どの施

設でも常時施行可能な検査法ではない。

そこで著者らは、細胞診と遜色のない方法で、肉眼的には判定困難な早期の腹膜播種性転移を客観的に判定する方法を開発する目的で、今回の検索を行った。

1. 腹腔洗浄細胞診での CEA 測定意義について

CEA は1965年に Gold ら¹⁹⁾によって胎児大腸組織と大腸癌でみられる癌胎児性抗原として発見された分子量約18万の糖蛋白である。現在 CEA は腫瘍マーカーの1つとして注目され、胃癌症例でも血清値²⁰⁾²¹⁾や組織染色所見²²⁾²³⁾と予後との関連、化学療法の効果判定法などに汎用されている。その中で、胃癌手術時の腹腔洗浄細胞診との関連では、1990年浅尾ら²⁴⁾²⁵⁾が洗浄液中 CEA 値が腹膜播種性転移の診断に有効であると報告した。彼らは洗浄液を濃縮遠心し CEA と蛋白量を測定し、1g あたりの CEA 量を算出する方法 (Peritoneal CEA assay) で100ng/g protein 以上を陽性と判定した。一方、西山ら²⁶⁾も同様方法で検討し、腹腔内 CEA 値は胃癌の腹膜再発や予後判定に有用で、由来としては腹腔内遊離癌細胞、血清中 CEA の漏出、癌漿膜浸潤面やリンパ節転移巣からの CEA 分泌の可能性などを指摘している。

ところで、1987年及川、中里ら²⁷⁾は CEA の cDNA cloning に成功し、そのペプチドの全構造を明らかにした。その後遺伝子レベルや物質レベルで構造解析が進み、CEA は細胞膜に Phosphatidylinositol anchor により疎水結合し、同部は PI-PLC により選択的に切断・可溶化され細胞膜より遊出することが明らかになった¹⁾²⁾。そこで著者らは、胃癌手術時の腹腔内洗浄液細胞沈渣に PI-PLC を添加し、細胞膜表面の CEA 抗原を切断遊出できれば、PI-PLC 非添加群との差で CEA 産生細胞の存在を客観的に判定できると考え上記 PI-PLC 法を考案し、腹膜播種性転移の診断法としての有用性を検討した。

松岡ら²⁸⁾は糞便中 CEA 抗原の検討で、PI-PLC で可

溶化された CEA 抗原は大腸癌組織から抽出精製した CEA と全く同じ抗原活性を示したと報告し、西田²⁹⁾らは癌性腹水を免疫染色、フローサイトメトリー法で解析した結果、腹水中の赤血球、白血球、組織球、中皮細胞は CEA にて全く染色されず、悪性細胞の細胞質のみに CEA 陽性像が認められたと報告している。それゆえ、洗浄液細胞沈渣に PI-PLC を添加して増加した CEA 抗原は、腹腔内遊離癌細胞由来であると推察可能と考えている。

2. CEA 産生培養癌細胞を用いた基礎的検討

PI-PLC 添加による CEA 抗原遊出の有無を CEA 産生細胞 KATO-III を用い検討した結果、非添加時に比べ約1.7倍の感度増加を認めた。この結果から、癌細胞膜表面 CEA 疎水結合部分が PI-PLC により可溶化・切断できる可能性が確認されたものと考えている。また、CEA 濃度は添加後の時間依存性に増加し、120分後には非添加時の約3.7倍に増強した。これ以降 CEA 濃度がプラトーに達する時間については未検討であるが、手術時間内に判定するという臨床応用目的においては、反応時間は120分が限度と考えた。標的細胞数別検討でも腫瘍細胞数依存性に漸増した。また、PI-PLC 添加濃度別検討では今回使用した0.25から1.0単位の範囲内では差はみられなかった。以上より PI-PLC 法の臨床応用に際し、添加単位数は0.5単位とし、反応時間は120分に設定した。ところで、細胞膜表面の蛋白融解法として trypsin, EDTA, 機械的 pippinging 法などが従来から試みられている。今回の検索結果では、CEA 抗原遊出能は PI-PLC 法 (3.7ng/ml) が最も優れ、以下 trypsin, pippinging, PB, EDTA の順であった。

また、PI-PLC との併用では trypsin との併用で相加効果 (4.6ng/ml) が認められた。しかし、実地臨床での応用から手技の煩雑さを避け、今回 PI-PLC 単独添加による CEA 遊出法の有用性を比較検討したわけである。

3. 胃癌開腹時腹腔洗浄細胞診での PI-PLC 添加意義について

胃癌81症例を対象に LD 腔内と DA 腔内で洗浄細胞診を施行し、PI-PLC 法による陽性率を細胞診と細胞 CEA の各陽性率と比較検討した。その結果、各腔内での陽性率は11.1%から14.8%で各群間に差はみられなかった。また、両腔内のいずれかが陽性となる頻度も、14.8%から18.5%と著差はみられなかった。従って、PI-PLC 法は少なくとも細胞診や細胞 CEA 染色に比

べ遜色のない検査法と考えられた。

P 陽性12例の検討で、陽性率は LD 腔内で50.0%から66.6%、DA 腔内で75.0%から83.3%と著差はみられなかった。なお、細胞診陽性の11例中、9例は細胞 CEA が陽性で、10例は PI-PLC 法が陽性であり、腹膜再発を惹起する可能性のある癌細胞群の内91.0%は CEA 産生癌細胞であるという興味ある所見が観察された。

ところで、PI-PLC 法施行意義は P 陰性例での潜在的腹膜播種発見にある。そこで P 陰性69症例を用い検討した結果、ダグラス、左横隔膜下腔内いずれかが陽性的場合は、PI-PLC 法が5例 (7.2%) と細胞 CEA の3例 (4.3%) および細胞診の2例 (2.9%) に比べ陽性率は高いものの残念ながら有意差は認められなかった。しかし細胞診に比べ遜色ない検査法であることが示唆された。予後の面からも Po で PI-PLC 法陽性の stage III 症例2例のうち1例は、術後2年3か月にて腹膜再発死しており、PI-PLC 法で陽性と判定された症例に対し術中を含めた早期治療の妥当性があると考えられた。

また、PI-PLC 陽性例と陰性例の臨床病理学的特徴を stage III, IV 症例に限定して検討すると、PI-PLC 法が陽性となる頻度は、P 陽性例、N (n)₂以上例、se 以上例、細胞診陽性例、細胞 CEA 陽性例で有意に高かった。すなわち、PI-PLC で増強される CEA は、漿膜面あるいは転移リンパ節から腹腔内に脱落した癌細胞由来と推察され、それゆえ腹膜播種性転移の診断法としての意義が評価可能と考えている。一方、浅尾ら²⁵⁾の洗浄液中 CEA 測定の検討でも、SE 症例では全例 CEA 高値を示しており、逆に CEA 高値例では腹膜播種の環境準備状態とも推論可能なわけである。

4. PI-PLC による CEA 感度増強程度と将来展望について

PI-PLC 陽性15例の感度増強程度は、1.8倍から600倍、平均41.5倍であった。この値は洗浄液沈渣に含まれる腫瘍細胞数と CEA 産生能に相関するが、少なくとも PI-PLC により1細胞当たり数十倍の感度増強が期待できるものと考えられる。しかし、胃癌細胞の中には相当数 CEA 非産生腫瘍が含まれるが、今回の検討では腹膜播種性転移癌細胞は、予想以上に CEA 産生細胞が多く、高い確率で診断が可能と考えられた。今後、PI-PLC 添加時の感度差を肉眼的に診断できる簡便法の開発が必要と考え、現在種々検討中である。

文 献

- 1) Hefta SA, Hefta LJJ, Lee TD et al: Carcinoembryonic antigen is anchored to membranes by covalent attachment to a glycosylphosphatidylinositol moiety: Identification of the ethanolamine linkage site. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 4648-4652, 1988
- 2) Sack TL, Gum JR, Low MG et al: Release of carcinoembryonic antigen from human colon cancer cells by phosphatidylinositol-specific phospholipase. *J Clin Invest* 82: 586-593, 1988
- 3) Sekiguchi M, Sakakibara K, Fujii G: Establishment of cultured cell lines derived from a human gastric carcinoma. *Jpn J Exp Med* 48: 61-68, 1978
- 4) Twinig SS: Fluorescein isothiocyanatelabeled casein assay for proteolytic enzymes. *Anal Biochem* 143: 30-34, 1984
- 5) 瀬戸 光: モノクローナル抗体を使用した CEA キット「CEA. RIABEAD」による血中 CEA の測定. *胃と薬学* 11: 1641-1648, 1984
- 6) 胃癌研究会編: 胃癌取扱い規約. 改訂第12版. 金原出版, 東京, 1993
- 7) 折田薫三: 消化器癌の腹膜再発. *消外* 14: 1467-1471, 1991
- 8) 貝原信明, 村田陽子: 腹膜播種性転移形成の機序. *消外* 14: 1593-1599, 1991
- 9) 平岡 博, 森田耕一郎, 中原泰生ほか: 胃癌手術時の腹腔内洗浄液の細胞診断書健と予後. *日消外会誌* 17: 713-718, 1984
- 10) 矢川祐一, 小川健治, 勝部隆男ほか: 胃癌手術例における腹腔内洗浄細胞診の検討. *日臨外医学会誌* 51: 461-465, 1990
- 11) 飯塚保夫, 糸原志津子, 塩田摂成ほか: 胃癌における腹腔内遊離癌細胞の出現形態と予後に及ぼす影響について. *日臨細胞会誌* 28: 43-47, 1989
- 12) 秋吉 毅, 安部良二, 有永信哉ほか: 初回手術時の腹膜再発防止対策. *消外* 14: 1473-1480, 1991
- 13) 浜副隆一, 貝原信明: 癌性腹膜炎に対する腹腔内温熱化学療法. *消外* 14: 1481-1488, 1991
- 14) 黒須康彦, 遠藤 潔, 富田涼一ほか: 胃癌回復時腹腔内洗浄細胞診と持続温熱腹膜灌流療法. *日大医誌* 48: 481-481, 1989
- 15) 高尾尊身, 徳重正弘, 帆北修一ほか: 漿膜露出胃癌治療の工夫. *日消外会誌* 22: 985-988, 1989
- 16) 高島成光, 土井原博義, 横山伸二ほか: 胃癌腹膜転移防止を目的とした遺伝子組み換え型 Interferon- β 腹腔内投与の検討. *癌と化療* 17: 1600-1603, 1990
- 17) 杉山保幸, 佐治重豊, 国枝克行ほか: 再発・転移形式別にみた胃癌治療の工夫. *日消外会誌* 27: 2293-2297, 1994
- 18) 佐治重豊, 東 修次, 梅本敬夫ほか: 癌性腹膜炎に対する免疫療法. *消外* 14: 1489-1495, 1991
- 19) Gold P, Freedman SO: Demonstration of tumor-specific antigens in human colon carcinomata by immunological tolerance and absorption techniques. *J Exp Med* 121: 439-462, 1965
- 20) 尾崎行男, 水沢清昭, 木村 修ほか: 胃癌と carcinoembryonic antigen (CEA). *外科診療* 25: 189-192, 1983
- 21) 小川健治, 成高義彦, 湖山信篤ほか: 胃癌, 大腸癌における腫瘍マーカーの臨床的有用性について. *癌の臨* 31: 638-647, 1985
- 22) 西田博之: CEA 産生胃癌の臨床病理学的検討, 血清 CEA と組織 CEA の比較検討及び CEA の局在について. *日外会誌* 84: 328-334, 1983
- 23) 池田博之, 小島 治, 谷奥卓郎ほか: 胃癌における組織 Carcinoembryonic antigen (CEA) 染色性と予後との関係. *日消外会誌* 16: 1638-1644, 1983
- 24) Asao T, Fukuda T, Yazawa S et al: CEA levels in peritoneal washings from gastric cancer patients as a prognostic guide. *Cancer Lett* 47: 79-81, 1989
- 25) Asao T, Fukuda T, Yazawa S et al: Carcinoembryonic antigen levels in peritoneal washings can predict peritoneal recurrence after curative resection of gastric cancer. *Cancer* 68: 44-47, 1991
- 26) 西山正彦, 田中 卓, 吉田和弘ほか: 腹腔内洗浄液中の carcinoembryonic antigen (CEA) による胃癌再発, 予後判定の試み. *臨外* 47: 935-939, 1992
- 27) 中里 紘, 神前五郎: CEA ファミリー: 遺伝子のクローニング一次構造の解析. 谷内 昭編. 消化器癌と腫瘍マーカー. へるす出版, 東京, 1991, p5-16
- 28) 松岡雄治: CEA に関する新知見. *外科治療* 68: 312-319, 1993
- 29) 西田康一, 山本健夫, 坪井一彦ほか: CEA, CA19-9, CA125 の測定, 免疫染色, フローサイトメトリ法細胞解析による癌性腹水の分析. *消と免疫* 17: 227-231, 1986

**Significance and Usefulness of Peritoneal-irrigation Cytology with
Application of the Carcinoembryonic Antigen Releasing
Method of by Phosphatidylinositol Phospholipase C**

Kyoshi Tsuji, Takashi Suhara, Motohisa Kato, Hiroshi Takao, Yasuyuki Sugiyama,
Katsuyuki Kunieda, Takao Umemoto, Kiichi Miya,
Daizo Fukada and Shigetoyo Saji
Second Department of Surgery, Gifu University School of Medicine

To obtain an early diagnosis of peritoneal dissemination of gastric cancer, the usefulness a novel method employing the release of carcinoembryonic antigen (CEA) from cancer cells via peritoneal irrigation with phosphatidylinositol phospholipase C (PI-PLC) was evaluated experimentally and clinically. Experimental study: 1) The CEA value was increased about 1.7 fold by PI-PLC against KATO-III CEA secreting cancer cells. 2) The CEA value increase depended on the duration of incubation with PI-PLC and the number of target cells. 3) The CEA value was increased by combination with trypsin. Clinical study: Three kinds of irrigation cytology were performed at laparotomy on 81 gastric cancer patients, that is irrigation cytology (IR), cell CEA stain (cCEA) and PI-PLC. 1) The positive rate for 12 patients with macroscopic peritoneal dissemination (P) was 91% for IR, 75% for cCEA and 83% for PI-PLC, while corresponding values were 2.9%, 4.3% and 7.2%, respectively, in 69 cases without P. 2) CEA sensitivity ranged from 1.8 times to 600 times, and the characteristic of showing positivity on PI-PLC suggested microscopic peritoneal dissemination reflected by clinico-pathological findings, From the above results, it is suggested that PI-PLC is a potentially useful method of objectively detecting early peritoneal dissemination.

Reprint requests: Kyoshi Tsuji Second Department of Surgery, School of Medicine, Gifu University
40 Tsukasa-machi, Gifu, 500 JAPAN
