

原 著

Carcinoembryonic antigen 可溶化による感度増強法を応用した 腹腔内洗浄細胞診キット化の試み

岐阜大学医学部第2外科

須原 貴志 辻 恭嗣 加藤 元久 国枝 克行
梅本 敬夫 宮 喜一 佐治 重豊

胃癌腹膜播種性転移の簡便な診断法として、CEA 抗原が細胞膜に phosphatidylinositol anchor で疎水結合し、これが phosphatidylinositol phospholipase C (PIPLC) で切断され可溶化する現象を応用した診断用キットを開発・試作した。方法：腹腔洗浄液を Glass Microfibre Filter (GMF) で可及的濾過し、細胞沈渣を抗 CEA 抗体含有固相化フィルム上に接触させ、0.05単位の PIPLC を添加し60分間反応後発色させ、非添加例との間で比較し色調差を認めた例を陽性と判断した (PIPLC-kit 法)。対象は胃癌63例で開腹時に細胞診を施行し PIPLC-kit 法の有用性を評価した。結果：細胞診陽性の16例は PIPLC-kit 法でもすべて陽性であった。陰性47例中 PIPLC-kit 法で5例が陽性と判定された。肉眼的腹膜播種陰性の52例中細胞診で5例、PIPLC-kit 法で10例が陽性であった。以上の結果、PIPLC-kit は腹膜播種性転移の簡便な早期診断法として有用である可能性が示唆された。

Key words: peritoneal dissemination, irrigation cytology, CEA, phosphatidylinositol phospholipase C, assay system

はじめに

Carcinoembryonic antigen (CEA)¹⁾は、分子量18万の糖蛋白で、一般臨床では消化器癌の存在診断や治療効果判定、などを目的とした腫瘍マーカー²⁾³⁾として汎用されている。分子構造から、CEA は細胞膜に Phosphatidylinositol anchor により疎水結合し、Phosphatidylinositol phospholipase C (PIPLC) により選択的に切断されて可溶化し細胞膜より遊出する⁴⁾⁵⁾。

教室の辻ら⁶⁾はこの性質を利用し、腹腔内洗浄細胞診施行時に PIPLC を添加して CEA 遊出能を高めることにより細胞診の検出感度を向上できる可能性を基礎的・臨床的に検討し、臨床応用面での有用性を先に報告した。そこで今回、著者らは上記性質を効果的に活用し、CEA 遊出増強程度から腹膜播種性転移の有無を術中に簡便で安価に診断できるキットを新たに試作した。また、教室経験例を対象にキット法で検索し、従来の洗浄細胞診、腹水および血清中 CEA 濃度、辻らの PIPLC 法と比較して感度、精度を評価した結果、

キット法の有用性が確認されたのでその概要を報告する。

研究対象と研究方法

1. 基礎的検討

CEA 産生標的細胞として、ヒト胃癌培養細胞株、KATO-III (ヒト印環状細胞癌から樹立)⁷⁾と MKN-45 (ヒト低分化腺癌から樹立)⁸⁾を用いた。PIPLC は Boehringer Mannheim Biochemica 社製の Bacillus cereus 培地より分離された酵素を用いた。本 PIPLC は 4°C で安定、至適 PH は 7.2~7.5、作用温度は 37°C である⁹⁾。PIPLC 用のキットは乳癌検診用に開発された抗 CEA 抗体含有固相化フィルム (マンモテック®)¹⁰⁾を一部改変して使用した。CEA 抗原遊出増強程度の検査法は、 1×10^4 個の KATO-III および MKN-45細胞を10mlの生食水中に浮遊させ攪拌後、Glass Microfibre Filter (GMF) で濾過し、0.1M リン酸緩衝液 (PB) で洗浄後マンモテック上に接触させた。次いで、PB 10 μ l と PIPLC を0.05単位あて添加し37°C~40°Cの恒温庫内で60分間反応させ乾燥後、型のごとく発色させ PIPLC 非添加例との色調差を比較検討した。判定は PIPLC 添加群と非添加群を肉眼的に対比

検討し、色調差が存在すると判定された場合を陽性と判断した。以下、本検査を PIPLC-kit 法と略す。

2. 臨床的検討

対象は、1995年5月より32か月間の間に当科で開腹した初回単発胃癌63例である。内訳は性別が男36例、女27例、年齢は33歳から84歳、平均 63.8 ± 12.2 歳。開腹時の手術的進行程度¹⁾は Stage I_{a+b} 17例 (内 Stage Ia 14例), II 7例, III_{a+b} 18例, IV_{a+b} 21例である (Table 1)。

腹腔洗浄液の採取方法は、開腹直後にダグラス窩腔内と左横隔膜下腔内に生食水約50mlを注入し軽く攪拌・洗浄後、可及的全量を回収し少量のヘパリンを添加後以下の検査に供した。

1) PIPLC-kit 法

洗浄液を十分振盪後4枚重ねたガーゼにて濾過し脂肪片などを取り除いた後、GMFで目詰まりするまで可及的濾過(平均約10ml使用)しPBで洗浄後、GMFを半切し抗CEA抗体含有固相化フィルムにそれぞれ接触固定した。次いで、実験者に区別がつかないように工夫された0.05単位PIPLC添加の10 μ l PBおよびPIPLC非添加のPB 10 μ lをそれぞれに加えて手術室常備の恒温庫内で60分間反応させ、同恒温庫内で60分間発色した。判定は、対象症例の胃癌進行程度と固相化フィルムのPIPLC添加の有無を知らされない色覚

正常な数人のスタッフで行い、ダグラス窩腔内あるいは左横隔膜下腔内の検体で何れかがPIPLC添加により濃染したと全員が判定した場合を陽性と判断した (Fig. 1)。

なお、肉眼的腹膜播種が認められないにもかかわらずPIPLC-kit法で陽性と判断された例については、1997年9月に電話により、腹膜再発の有無を調査した(最大術後2年5か月経過)。

2) 洗浄細胞診、上清中CEA濃度測定、および辻らのPIPLC法の検索法

上記PIPLC-kit検索に用いた残りの洗浄液を4本の試験管に均等分注し、2本をパパニコロウ染色による従来の細胞診(細胞診)と上清中CEA濃度測定(上清中CEA)用に供した。すなわち、細胞沈渣を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ごとくパパニコロウ染色した。上清はsandwich法(Dainabot CEA RIA bease)によりCEA値を測定した。

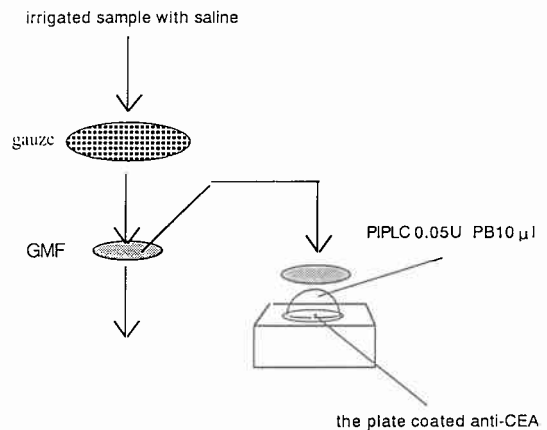
残り2本は辻ら⁹⁾のPIPLC添加時のCEA抗原検索用(PIPLC法)に用いた。すなわち、2本の試験管を

Table 1 Clinicopathological findings of the examined 63 patients with gastric cancer

| | |
|---------------------------------|-----------------|
| Age | |
| average | 63.8 \pm 12.2 |
| Sex | |
| male | 36 |
| female | 27 |
| Surgical Stage grouping | |
| Stage I a + I b | 17 |
| Stage II | 7 |
| Stage IIIa + IIIb | 18 |
| Stage IVa + IVb | 21 |
| Depth of tumor invasion | |
| T ₁ | 14 |
| T ₂ | 10 |
| T ₃ + T ₄ | 39 |
| Peritoneal metastases | |
| P ₀ | 52 |
| P ₁ | 1 |
| P ₂ | 4 |
| P ₃ | 6 |

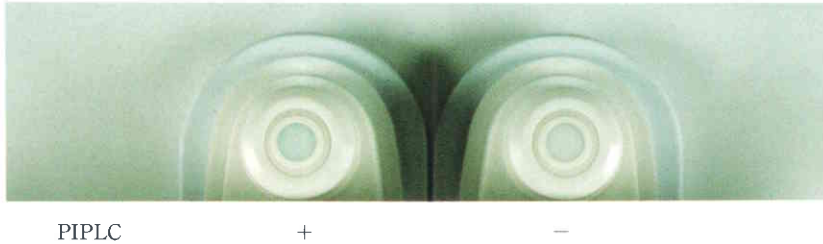
(cases)

Fig. 1 Out line of novel peritoneal irrigation cytology using PIPLC kit



Peritoneal irrigated saline are filtrated by Glass Microfibre Filter (GMF) as much as possible and washed with PB. Cell sample fixed on GMF are put on the plate coated with anti-CEA antibody, and added 0.05U of PI-PLC. After incubation for 60 minutes, the plate are colored by the sandwich method. The results of PIPLC-kit is positive if there is color change between the plate with PI-PLC and that without PI-PLC.

Fig. 2 The gross findings of positive reaction by PIPLC-kit method on experimental study



(the reaction could show positive if there is cancer cells more than 1.0×10^3 of KATO-III in 10ml and 5.0×10^2 of MKN-45)

1,500rpm で5分間遠心後細胞沈渣を採取し、これを1mlのPB液含有試験管に注入後1,100rpmで2分間遠心洗浄した。得られた沈渣に1mlのPB液を再注入し1本にはPIPLCを0.5単位添加、他の1本は無添加のまま37°C温浴槽にて120分間振盪反応させた。次いで、1,100rpmで2分間遠心後上清を採取しCEA値をsandwich法で測定し、非添加群に比べ10%以上の増加がみられた場合をPIPLC法陽性と判定した。

3) 血清CEA濃度

術前未治療時の患者血清を採取し、一連の術前検査として本院中央検査部で施行された検査項目中のCEA値を、術前血清CEA値として比較検討に用いた。

なお、統計学的検定で対応2群間の比較はWilcoxon法で、非対応2群間の比較はMann-Whitney法にて行い、危険率5%未満を有意差ありと判定した。

結 果

1. 基礎的検討

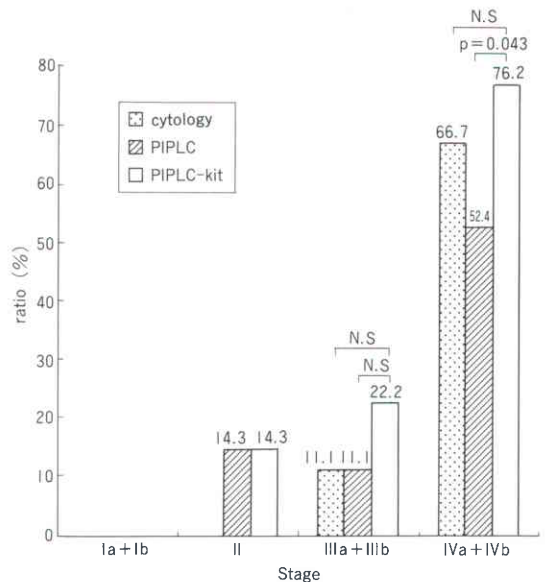
PIPLC-kit法で、標的細胞KATO-III, MKN-45共にPIPLC非添加群に比べ、明らかな色調差がみられ、CEA遊出が確認された(Fig. 2)。また、最小検出可能細胞数は、KATO-IIIの場合は 1.0×10^3 個、MKN-45の場合は 5.0×10^2 個であった。

2. 臨床的検討

1) 臨床病理学的所見との関連

細胞診陽性例は、Stage I, IIにはなく、III_{a+b}で18例中2例(11.1%)、IV_{a+b}で21例中14例(66.7%)にみられた。PIPLC法ではStage IIで7例中1例(14.3%)、III_{a+b}で18例中2例(11.1%)、IV_{a+b}で21例中11例(52.4%)が陽性と判定された。一方、PIPLC-kit法ではStage IIで7例中1例(14.3%)、III_{a+b}で18例中4例(22.2%)、IV_{a+b}で21例中16例(76.2%)が陽性であつ

Fig. 3 The comparison of positive rate according to surgical Stage grouping on various peritoneal irrigation cytology

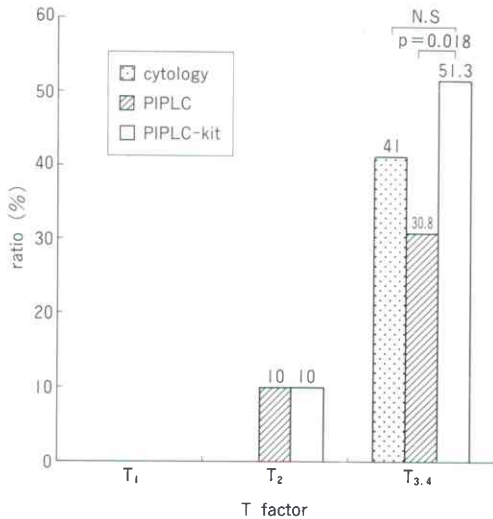


た。各検査法別陽性率は、Stage III_{a+b}ではPIPLC-kit法が細胞診およびPIPLC法に比べ高値を示したが有意差はみられなかった。Stage IV_{a+b}ではPIPLC-kit法が最も陽性率が高く、統計上PIPLC法に比べ有意(p=0.043)に高い陽性率を示した(Fig. 3)。

壁深達度別では、各検査法ともT₁例には陽性例はみられなかった。T₂例ではPIPLC法とPIPLC-kit法に各1例の10%の陽性例を認めたが、何れも転移陽性リンパ節が腹腔内に露出していた症例であった。T₃・T₄例では各検査法別陽性率は細胞診が41.0%、PIPLC法が30.8%、PIPLC-kit法が51.3%で、PIPLC-kit法は

PIPLC 法に比べ有意 ($p=0.018$) の高値を示した (Fig. 4).

Fig. 4 The comparison of positive rate according to depth of tumor invasion on various peritoneal irrigation cytology



肉眼的腹膜播種性転移 (P) 度別では、検索対象63例中11例 (17.5%) が陽性例であった。内訳は P₁ が 1 例、P₂ が 4 例、P₃ が 6 例であった。P 陽性11例の各検査法別陽性率は、細胞診が11例 (100%)、PIPLC 法が 9 例 (81.8%)、PIPLC-kit 法が11例 (100%) で高い相関関係が観察された (相関係数 $R=0.775$) が、検査法間に有意差はみられなかった。一方、P 陰性52例の検討では細胞診で 5 例 (9.6%)、PIPLC 法で 5 例 (9.6%)、PIPLC-kit 法で10例 (19.2%) が陽性と判定され (Fig. 5)、PIPLC-kit 法が他の 2 検査法に比べ有意 (細胞診で $p=0.043$ 、PIPLC 法で $p=0.021$) に高い陽性率を示した (Fig. 6)。

これら10例の予後調査の結果、最大、術後 2 年 5 か月経過した時点で 6 例が腹膜再発死あるいは腹膜再発にて加療中であった (Table 2)。

2) 各検査法別陽性例の特徴

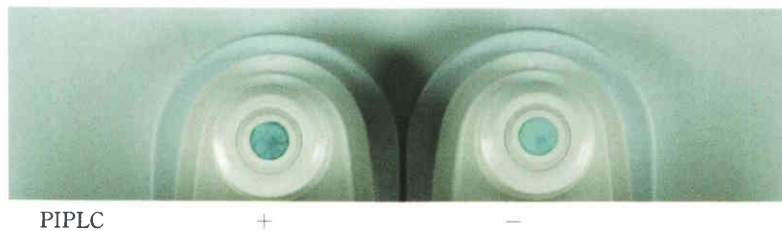
細胞診と PIPLC-kit 法間の検討で、細胞診陽性16例は PIPLC-kit 法も全例陽性であった。一方、細胞診陰性の47例中 5 例で PIPLC-kit 法が陽性であった。この 5 例の特徴は、壁深達度別で T₂ が 1 例、T₃ が 3 例、T₄ が 1 例で、T₃ 以上の 4 例はすべて肉眼的にも癌の露出

Fig. 5 The gross findings of positive reaction by PIPLC-kit method on clinical study

(If there is color change between the plate with PI-PLC and without PI-PLC, gives a positive reaction)

*: The above case showing P(-) and positive PIPLC-kit, at finally he died by peritoneal recurrence on 10 months after operation.

a) the case with P(+)



b) the case with P(-)*



が観察された。また、T₂でPIPLC-kit法が陽性であった1例はN_i症例で、転移陽性リンパ節からの腹膜播種が推察された。なお、本症例はPIPLC法も陽性であった (Table 2)。

3) 腹腔洗浄液 CEA 濃度との関連

左横隔膜下腔内あるいはダグラス窩腔内の洗浄液CEA濃度で、より高値を示した方の値を当該症例の洗

浄液CEA濃度として比較検討に用いた。その結果、洗浄液中CEA濃度は細胞診陽性例が14.8±18.0 (ng/ml, 以下単位省略)と陰性例の4.0±15.4に比べ有意 (p<0.0001)の高値を示した。PIPLC法でも陽性例は23.1±26.0と陰性例の2.0±8.5に比べ有意 (p<0.0001)の高値を示した。一方、PIPLC-kit法は陽性例が15.9±23.5で陰性例の2.1±9.2に比べ同様に有意 (p<0.0001)に高値であった (Table 3)。

4) 術前血清CEA濃度との関連

血清CEA濃度は、細胞診陽性例が86.8±292.8と陰性例の2.9±2.4に比べ高値を示したが、有意差 (p=0.994)はみられなかった。PIPLC法でも陽性例は99.0±312.4と陰性例の2.8±2.4に比べ高値を示したが統計学上有意差 (p=0.673)はみられなかった。一方、PIPLC-kit法では陽性例は67.4±256と陰性例の2.6±2.0に比べ高値を示したが、同様に有意差 (p=0.406)はみられなかった (Table 3)。

考 察

胃癌開腹時、肉眼的腹膜播種性転移が陰性で治癒切除可能例でも相当数が腹膜再発のため癌死する。かかる症例では、手術時すでに顕微鏡レベルの腹膜播種が存在したとの考えで¹²⁾¹³⁾、腹腔内洗浄細胞診などを積極的に施行し¹⁴⁾、早期診断する方法が試みられている。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、P(-)で細胞診陽性例に対しては有効との判断で、閉腹時からの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^{15)~21)}。

ところで、腹腔内洗浄細胞診は主に病理医や専門細

Fig. 6 The comparison of positive rate according to peritoneal metastases on various peritoneal irrigation cytology

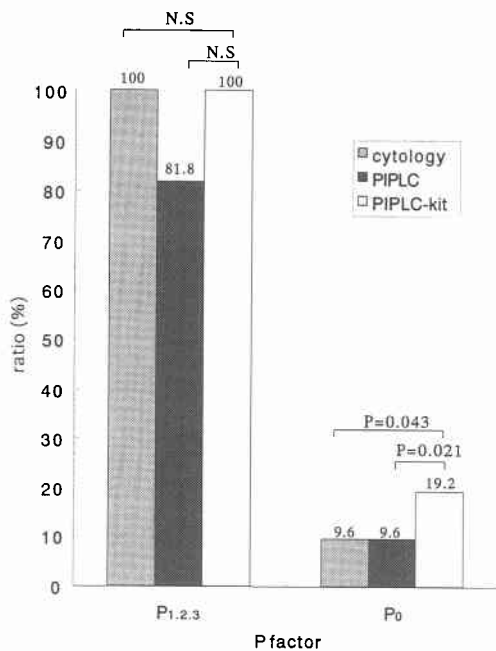


Table 2 Characteristics of the patients showing positive PIPLC-kit without macroscopic peritoneal metastases

| Cases | H* | N** | T*** | Stage | Papanicolaou | PIPLC | CEA (ng/ml) | | outcome |
|-------|----|-----|------|-------|--------------|----------|-------------|-------|--|
| | | | | | | | Peritoneal | Serum | |
| 1 | 0 | 1 | 4 | IIIb | negative | negative | 5.8 | 11.7 | alive(2Y5M) |
| 2 | 0 | 1 | 3 | IIIa | negative | negative | 0.2 | 1.9 | alive(2Y3M) |
| 3 | 0 | 1 | 3 | IIIa | positive | positive | 1.1 | 0.1 | died by peritoneal recurrence (10M) |
| 4 | 0 | 3 | 3 | IVa | negative | positive | 89 | 8.3 | peritoneal recurrence but CR by chemotherapy(6M) |
| 5 | 0 | 2 | 3 | IIIb | positive | positive | 0.5 | 0.2 | died by peritoneal recurrence (6M) |
| 6 | 0 | 2 | 4 | IVa | positive | negative | 0.3 | 6.8 | alive (1Y3M, peritoneal recurrence suspected) |
| 7 | 0 | 4 | 4 | IVb | positive | negative | 1.2 | 5 | died by lymphnode recurrence (3M) |
| 8 | 0 | 2 | 4 | IVa | positive | positive | 10 | 3 | died by peritoneal recurrence (3M) |
| 9 | 0 | 4 | 3 | IVb | negative | negative | 1 | 3.9 | peritoneal recurrence (11M) |
| 10 | 0 | 1 | 2 | II | negative | positive | 0.7 | 2 | alive (10M) |

* : degree of hepatic metastases ** : degree of lymphnode metastases *** : depth of tumor invasion

Table 3 Relationship between the value of preoperative serum CEA and peritoneal CEA according to various peritoneal irrigation cytology

| a) preoperative serum CEA value (ng/ml) | | | |
|---|------------|------------|-----------|
| | cytology | PIPLC | PIPLC-kit |
| positive | 86.8±292.8 | 99.0±312.4 | 67.4±256 |
| negative | 2.9±2.4 | 2.8±2.4 | 2.6±2.0 |
| |]p=0.994 | |]p=0.406 |
| |]p=0.673 | | |
| b) peritoneal CEA value (ng/ml) | | | |
| | cytology | PIPLC | PIPLC-kit |
| positive | 14.8±18.0 | 23.1±26.0 | 15.9±23.5 |
| negative | 4.0±15.4 | 2.0±8.5 | 2.1±9.2 |
| |]p<0.0001 | |]p<0.0001 |
| |]p<0.0001 | |]p<0.0001 |

胞検査技師などによりなされているが、腹腔内活性化中皮との鑑別が困難で、早期治療開始のためには閉腹前に確定診断される迅速性が必要である。しかし、腹腔洗浄液の採取は簡便であるが、上記条件を満たす人材の確保や経済的要因が未解決で、一般臨床で常時施行可能な検査法にはいたっていない。

さて、CEAは1965年にGoldら¹⁾によって胎児大腸組織と大腸癌で見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。現在腫瘍マーカーの1つとして注目され、胃癌症例でも血清CEA値²⁾や組織CEA染色所見²²⁾と予後との関連、化学療法などの治療効果判定法などに汎用されている。胃癌手術時の腹腔洗浄細胞診とCEA値との関連では、1990年浅尾らが²³⁾²⁴⁾洗浄液CEA値が腹膜播種性転移の診断に有効であると報告し注目を集めた。すなわち、洗浄液を遠心濃縮し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。西山ら²⁵⁾も同様方法で検索し、腹水中CEA値は胃癌の腹膜再発や予後判定に有用で、CEAの由来としては腹腔内遊離癌細胞、血清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。

一方、西田ら²⁶⁾は癌性腹水を用いた免疫染色やフローサイトメトリー解析の結果、赤血球、白血球、組織球、中皮細胞はCEA染色が全例陰性で、悪性腫瘍の細胞質のみにCEAが染色されたと報告し、RT-PCR法を用いた腹腔内浮遊細胞のCEA遺伝子解析を利用した高感度の腹腔内癌細胞検出法が試行されている²⁷⁾。しかし、RT-PCR法は経済面で汎用性に難があり、迅速性に乏しく、閉腹前に結果を得ることは時間的に困難である。また、CEA遺伝子はあらゆる細胞に存在するため量的過多により診断されているが、PCR

の回数によっては偽陽性率が高まる危険性が残されている。

ところで、1987年及川ら²⁸⁾、中里ら²⁹⁾はCEAのcDNA cloningに成功し、遺伝子レベルや物質レベルでの構造解析が進み、CEAは細胞膜にPhosphatidylinositol anchorにより疎水結合し、同部はPIPLC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⁵⁾。

そこで教室の辻ら⁶⁾は、胃癌手術時の腹腔内洗浄液細胞沈渣にPIPLCを添加し、細胞膜表面のCEA抗原を強制的に切断遊出できれば、非添加群との間にCEA濃度差が生じるため、CEA産生細胞の存在を客観的に判定できると推察し、腹膜播種性転移の早期診断法として応用の可能性を実験的・臨床的に明らかにした。しかし、本法は手技的に若干複雑で迅速性に問題があり、閉腹前に結果を得ることが困難なため、今回新しくPIPLC-kit法を開発し、その有用性を評価したわけである。

PIPLC-kit法の感度増強効果について

既存の簡易CEA測定キットでの測定限界濃度は50ng/mlで、PIPLC法の0.5ng/mlに比べ明らかに不良である。一方、癌細胞から強制的にCEAを遊出せしめるPIPLC法は、溶媒量を減らすことによりCEA濃度を増加できるが、概算上1μlの溶媒で1mlで測定した通りの1,000倍の濃度増強効果が期待される。また、簡易CEA測定キット、マンモテックは1μlの微量検体を想定した構造で、腹腔洗浄液中の浮遊細胞とPIPLCを微量溶媒で固相化フィルム上で直接反応可能のため、辻らのPIPLC法より約10倍の感度増強が得られると考えている。

CEA産生癌細胞を用いた検討結果について

ヒト胃癌細胞由来のKATO-IIIおよびMKN-45を

標的細胞として PIPLC-kit の感度を検討した結果、KATO-III で 1×10^3 個、MKN-45 で 5×10^2 個の細胞が検出可能であった。PIPLC 法では KATO-III で 1×10^4 個が検出限界と報告されているので¹²⁾、PIPLC-kit 法では約10倍の感度増強効果と推察している。一方、PIPLC 添加量は、PIPLC 法で0.5単位、PIPLC-kit 法では0.05単位(kit 法の PB 量が1/100のため0.005単位でも可能)まで減量可能で、PIPLC の費用面でも1/10削減可能であった。また、反応時間は、むしろは PIPLC による遊出 CEA 濃度が時間依存性に増加するとの考えで120分間と設定したが、PIPLC-kit 法では固相化フィルムの発色反応時間を含めて60分間に短縮し、閉腹前に検査結果の判定が可能となった。

洗浄細胞診で CEA 濃度を応用する本法の欠点は、癌細胞で組織 CEA 陽性例に限定されると推察されることにある。すなわち、組織 CEA 陰性例は適応外との考えであるが、今回、細胞診陽性であった11例はすべて PIPLC-kit 法陽性であった。これらすべてについては組織 CEA は検索されてはいないが、癌の多様性からは組織 CEA 陽性癌細胞の混在が推察される。一方、腹膜播種性胃癌の90%以上は組織 CEA が陽性であったとの報告⁹⁾や、組織 CEA 陽性癌細胞は陰性例よりも悪性度が高い³⁰⁾との報告から、腹膜播種性転移の早期診断法として組織 CEA を検索する意義は十分存在すると考えている。

腹腔洗浄細胞診としての PIPLC-kit 法の施行意義について

著者らは胃癌63例を対象に腹腔洗浄細胞診を施行し、手術的進行度別に陽性率を PIPLC-kit 法、従来の細胞診、むしろの PIPLC 法と比較検討した。その結果、PIPLC-kit 法は細胞診陽性例で全例陽性、陰性例で5例が陽性であった。この陽性例はすべて癌が腹腔内に露出した症例で、腹膜播種性転移高度危険群と推察された。一方、陰性コントロールと目される Stage I_a 14例では PIPLC-kit 法においても1例も陽性例はなかった。この結果から PIPLC-kit 法は細胞診に比べ遜色のない検査法と考えられた。一方、PIPLC 法との関連では Stage III_{a+b} 例で有意に陽性率が高かった。P₍₊₎ 11例での検討で、陽性率は細胞診が11例、100%、PIPLC 法が9例、81.8%、PIPLC-kit 法が11例(100%)と各群間で有意差はみられなかったことから、本邦は遜色のない検査法と推察された。ところで、細胞診の陽性率は諸家の報告に比べ著者らの成績は著しく高いが、P₂以上の進行例が11例中10例と多く、細胞診専属

担当医による積極的な検査体勢による好結果と考えている。

術前血清 CEA 値および洗浄液上清中 CEA 値と各検査法所見を比較すると、血清 CEA 値との間には有意の相関関係はみられず、PIPLC 法と PIPLC-kit 法ともに血清中の CEA の影響は少ないと推察された。洗浄液中 CEA 値は各検査法陽性例で有意の高値を示し、了解可能と思われるが P₍₊₎ 11例中2例の CEA 値が0.5ng/ml 以下と低値で、今後の解明が必要である。一方、P₍₋₎ 例で各検査法陽性例は、52例中細胞診で5例、PIPLC 法で5例、PIPLC-kit 法で10例にみられ PIPLC-kit 法が有意に高い陽性率であった。すなわち、P₍₋₎ 例で細胞診陽性例は潜在的腹膜播種例と推察されるが、PIPLC-kit が陽性であった Stage III の4症例中2例は術後6か月と10か月目に腹膜再発のため死亡した。それゆえ P₍₋₎ で PIPLC-kit 法陽性例が閉腹時を含めた早期治療の必要性が高いと推察される。

PIPLC-kit 法は胃癌手術が可能なら施設であれば何処でも簡便かつ安価に施行でき、閉腹時までに結果が判明するところに利点がある。すなわち、著者らは、PIPLC-kit に必要な吸引器や恒温庫はすべて手術室内常備品で施行可能であり、発色反応時間も恒温庫を利用すれば時間の節約可能で、全経過が150分程度に短縮可能であり、費用の面でも、RT-PCR 法を用いた CEA 遺伝子検出法の約2/3程度まで節約可能と考えている。

P₍₊₎ 例や P 再発例の治療に難渋する昨今にあって、腹腔内洗浄細胞診の普及により P₍₋₎ 例でも早期から治療開始できれば治療効果が期待されるので、医療経済の見地からも裨益するところが大きいと考えている。

(国有特許申請中：特願平9-245990号)

文 献

- 1) Gold P, Freedman SO: Demonstration of tumor-specific antigens in human colon carcinomata by immunological tolerance and absorption techniques. *J Exp Med* 12: 439-462, 1965
- 2) 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
- 3) 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
- 4) Hefta SA, Hefta LJF, 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
- 5) Sack TL, Gum JR, Low MG et al: Release of carcinoembryonic antigen from human colon cancer cells by phosphatidyl-inositol-specific phospholipase. J Clin Invest 82 : 586—593, 1988
 - 6) 辻 恭嗣, 須原貴志, 加藤元久ほか: 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. 日消外会誌 30 : 1725—1733, 1997
 - 7) Sekiguci M, Sakakibara K, Fujii G: Establishment of cultured cell lines derived from a human gastric carcinoma. J Exp Med 48 : 61—68, 1978
 - 8) 北条晴人: ヒト胃癌培養株の樹立とその形態学的特性. 新潟医学会誌 91 : 737—752, 1977
 - 9) Twinig SS: Fluorescein isothiocyanatelabeled casein assay for proteolytic enzymes. Anal Biochem 143 : 30—34, 1984
 - 10) 稲治英生, 菅原敏行, 佐藤 浩ほか: 乳頭分泌液中 carcinoembryonic antigen(CEA)測定による早期乳癌診断法—簡易キットの実用化—. 乳癌の臨 3 : 121—124, 1988
 - 11) 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
 - 12) 折田薫三: 消化器癌の腹膜再発. 消外 14 : 1467—1471, 1991
 - 13) 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
 - 14) 平岡 博, 森田耕一朗, 中原泰生ほか: 胃癌手術時の腹腔内洗浄液の細胞診所見と予後. 日消外会誌 17 : 713—718, 1984
 - 15) 秋吉 毅, 安倍良二, 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
 - 16) 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
 - 17) 黒須康彦, 遠藤 潔, 富田涼一ほか: 胃癌開腹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—487, 1989
 - 18) 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
 - 19) 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
 - 20) 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
 - 21) 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
 - 22) 池田栄人, 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
 - 23) 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
 - 24) 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
 - 25) 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
 - 26) 西田康一, 山本健夫, 坪井一彦ほか: ECA, CA-19, CA125の測定, 免疫染色, フローサイトメトリー法細胞解析による癌性腹膜水の分析. 消と免疫 17 : 227—231, 1986
 - 27) Nakanishi H, Kodera Y, Torii A et al: Detection of carcinoembryonic antigen-expressing free tumor cells in peritoneal washes from patients with gastric carcinoma by polymerase chainreaction. Jpn J Cancer Res 88 : 687—692, 1997
 - 28) Oikawa S, Nakazato H, Kasaki G: Primary structure of human carcino-embryonic antigen(CEA) deduced from cDNA sequence. Biochem Biophys Res Commun 142 : 511—518, 1987
 - 29) 中里 紘, 神前五郎: CEA ファミリー—遺伝子のクローニングと一次構造の解析. 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
 - 30) 蔭山 徹: 胃癌術前血清 CEA 値と組織 CEA の局在様式からみた予後と, CEA 陽性癌細胞の核 DNA 量からみた生物学的悪性度に関する検討. 岐阜大医紀 39 : 598—631, 1991

**A Study of Novel Kits for Peritoneal Irrigation Cytology by Release of
Carcinoem Bryonic Antigen for Incerase of its Sensitivity**

Takashi Suhara, Kyoshi Tsuji, Motohisa Kato, Katsuyuki Kunieda,
Takao Umemoto, Kiichi Miya and Shigetoyo Saji
Second Department of Suugery, Gifu University School of Medicine

CEA antigen is a membrane-bound phosphatidylinositol anchor, and is released from cancer cells with phosphatidylinositol phospholipase c (PIPLC). By useing of this phenomenon, we produced a novel kit for peritoneal irrigation cytology. The peritoneal sediment obtained from peritoneal irrigation and filtered through a glass microfibre filter was fixed on a plate coated with anti-CEA antibody and 0.05 U of PIPLC was added. The reaction was considered positive if there was a color difference between the plates with PIPLC and without it after incubation for 60 minutes and colored by the sandwich method (PIPLC-kit). The PIPLC-kit and conventional irrigation cytology (cytology) were compared in 63 gastric cancer patients. All of the 16 patients showing a positive reaction by cytology were also all positive by the PIPLC-kit, while the 47 patients negative by cytology 5 patients were positive by the PIPLC-kit. Moreover, of the 52 patients without macroscopic peritoneal metastases 5 were positive by cytology and 10 by the PIPLC-kit. The above results suggest that the PIPLC-kit is a useful and simple assay system for the detection of early peritoneal dissemination.

Reprint requests: Takashi Suhara Second Department of Surgery, Gifu University School of Medi-
cine
40 Tsukasamachi, Gifu, 500-8705 JAPAN
