

膵癌胎児抗原 (POA) の特性と その免疫組織学的研究

岡山大学医学部第一外科学教室 (主任：折田薫三教授)

高 倉 範 尚

(昭和61年12月20日受稿)

Key words : 膵癌胎児抗原, POA,
腫瘍マーカー, 胎児性蛋白,
蛍光抗体法

緒 言

近年, 種々の検査法の開発・普及により膵癌の診断は比較的容易になり, また門脈合併切除など手術の拡大化によりその切除成績は向上してきているものの, 膵頭部癌に限っても切除例の5年生存率は2.0~25%¹⁻³⁾と不良である。これらの原因として, 膵癌そのものは臨床症状に乏しく, 発見時すでに進行癌の状態にあることが挙げられ, より早期での発見が望まれる所以である。このため, 最近膵癌に関連した腫瘍マーカーに対する関心が高まっており, これらのうちの一つに膵癌胎児抗原 (Pancreatic oncofetal antigen 以下 POA) がある。一般に, 癌化に伴って認められる胎児性蛋白は, 癌と胎児に共通に認められることより, oncofetal antigen と呼ばれ, 腫瘍関連抗原 (Tumor associated antigen) の一つとして, 腫瘍マーカーとしての有用性が認められている。POA は1974年 Banwo⁴⁾ により, ヒト膵での oncofetal antigen として報告された胎児性蛋白であり, 膵の癌化における抗原性変化 (抗原の先祖帰り現象; antigenic reversion) として膵癌組織で再び産生されると考えられている。POA に関する報告は Banwo 以来, Gelder⁵⁾, Hobbs⁶⁾, Schmiegel⁷⁾, 本邦でも本間⁸⁾, 小口⁹⁾, 西田¹⁰⁾ によりなされているが, その生物学的特性は各報告者

により異なっており, 本態にはなお問題点が多いように思われる。また POA の免疫組織学的検索はこれまで十分なされておらず, 腫瘍細胞における POA 産生の証明, POA の局在を検討する必要がある。以上のことから著者は, 胎児膵を用いて POA の生物学的特性を検討し, さらに蛍光抗体法にて POA の免疫組織学的検討を行った。

実験項目と方法

1. 特異的抗 POA 血清の作製 (図1)

16~22週胎生期ヒト胎児膵10個(約1g/wet weight)を蛋白分解酵素阻害剤 (aprotinin 20 KIE/ml と E-aminocaproic acid 600 mg/ml) を含む緩衝液 (0.02 M PBS pH 7.3) 5 ml で homogenize し, 10,000×g 4°C で30分間遠沈した。上清中の α -fetoprotein (AFP) を抗 AFP を coupling させた CNBr-activated Sepharose 4B による negative affinity chromatography により除去し, この1.0 ml (1~2 mg protein) を同量の complete Freund's adjuvant とともに家兎の背部3ヵ所に初日, 14日, 21日, 28日, 35日と免疫した。抗体価の上昇を確認した後に採血し, このウサギ血清を56°Cにて非働化し, さらに2.5% glutaraldehyde にて不溶化¹¹⁾した正常ヒトブール血清, 正常膵, 胎児肝にて吸収し, これを特異的抗 POA 血清とし, 以下の

実験に供した。

2. 腫瘍特異抗原の抽出¹²⁾ (図2)

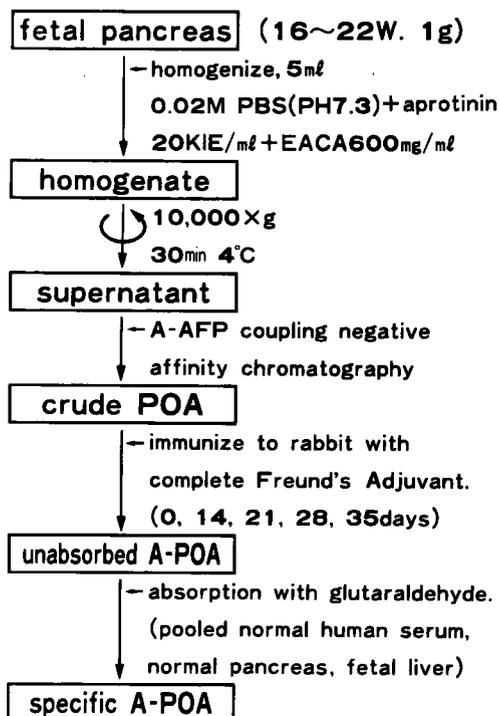


図1 特異的抗 POA 血清の作成法

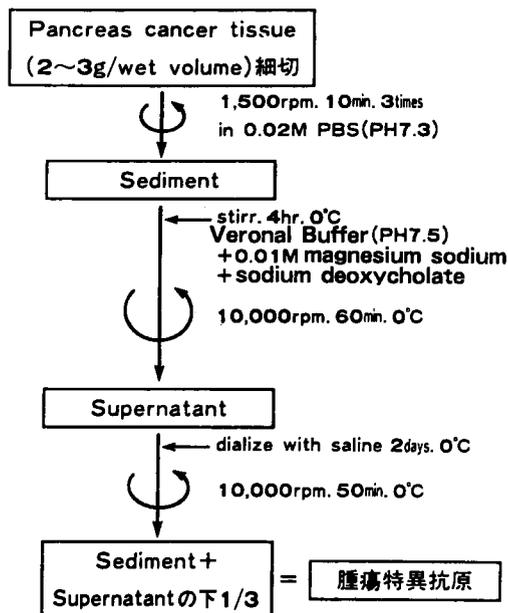


図2 腫瘍特異抗原の抽出法

腫瘍組織 (2~3g/wet weight) を蛋白分解酵素阻害剤 (aprotinin 20 KIE/ml と E-amino-caproic acid 600 mg/ml) を含む緩衝液 (0.02 M PBS pH 7.3) 中ではさみで細切した後, 3 回遠心洗浄 (1,500 rpm, 10分) する. この沈渣 10 ml につき, Veronal Buffer (pH 7.5, barbital sodium 0.375 g, barbital acid 0.575 g, sodium chloride 85 g を 1,000 ml の蒸留水にとかしたものの) 28 ml, 0.01 M magnesium chloride hexahydrate, 2 ml, sodium deoxycholate 0.08 g を混ぜ, magnetic stirrer で 0~4 °C で 4 時間かく拌し, このあと 10,000 rpm で 60 分間冷凍遠心し, この上清を 0~4 °C で 2 日間生食で透析, さらに 10,000 rpm で 50 分間冷凍遠心し, この上清の下 1/3 と沈渣を crude な腫瘍特異抗原とした.

3. Ouchterlony's double immunodiffusion test

0.01 M Tris-HCl Buffer (pH 7.4) 100 ml に polyethylene glycol 2 g, 0.001 M EDTA 0.037 g を加えた 0.7% agarose gel を用い, 検体と抗血清を moist chamber 内で室温で 48 時間反応させた. 抗血清は特異的抗 POA 血清を用い, 検体は, 胎児膵抽出液, 膵癌組織より抽出した膵癌特異抗原, 膵癌患者血清, 胎児肝抽出液, 正常膵抽出液, 正常ヒト血清を用いた. さらに, POA と CEA, AFP, Ferritin との異同を検するために, 胎児膵抽出液を市販の抗 CEA 血清, 抗 AFP 血清, 抗 Ferritin 血清と反応させた.

4. 免疫電気泳動

電気泳動装置 (Corning 社, USA) にて, 0.065 M Barbital Buffer (pH 8.6) に 1% agarose, 5% sucrose, 0.035% EDTA を加えた Universal agarose film に試料抗原として胎児膵抽出液, 抗血清として特異的抗 POA 血清を用い, 室温で 90 V, 55 分間通電し, 24 時間反応させ, POA の電気易動度を検した.

5. gel filtration

胎児膵抽出液を Sephacryl S-300 Column (2.6×35 cm) を用い, PBS (pH 7.2) にて flowrate 11.0 ml/hr, 1 fraction 3.47 ml となるよう perister pump を設定して gel filtration し, 各 fraction を特異的抗 POA 血清と Ouchterlony

test にて反応させ POA 分画を同定し, marker proteins の partition 係数と比較して POA の分子量を測定した.

6. POA の耐熱性

胎児膵抽出液を 70°C で加熱処理し, 特異的抗 POA 血清と Ouchterlony test を行った.

7. 蛍光抗体間接法による POA の免疫組織学的検討

胎児膵 2 例, 正常膵 4 例, 慢性膵炎膵 4 例, 膵癌膵 6 例を実験に供した. 実験操作は以下の如くである.

(1) 新鮮試料の凍結

10×8×5 mm 大の新鮮組織片を isopentane を入れた金属容器に入れ, さらにこれを Dry-ice-acetone の中に入れて 5~10 分間凍結させ, 以後 -70°C 以下で保存した.

(2) 凍結切片の作製

凍結させた試料をプラスチック包埋皿に入れ, TISSUE-TEK (Miles Scientific, Division of Miles Laboratories, Inc) で包埋し, Cryostat 中 (-20°C) で Microtom により 4 μm の厚さの切片とした.

(3) 固定

Paraformaldehyde にて 5 分間固定し, staining buffer (PBS pH7.1~7.2) で洗浄し, さ

ら 5 分間 Vibrator 上で振盪させ, Dryer で乾燥させた.

(4) 染色と検鏡 (図 3)

乾燥させた切片上に特異的抗 POA 血清をかけ moisture chamber におき 37°C, 45 分間 incubate し, さらに staining buffer にて 1 回 5 分間, 計 5 回 Vibrator 上で水洗した. 次に FITC-anti rabbit IgG (Dako 社) をかけ moisture chamber にて 37°C, 45 分間 incubate し, staining buffer で 1 回 5 分間, 計 5 回 Vibrator 上で水洗したあと glycerin buffer にて封入し, 蛍光顕微鏡 (model BHF Olympus 社) にて検鏡した.

なお, 対照として特異的抗 POA 血清にかえ, PBS, および Anti rabbit serum を用い, 以下は同様の方法で染色, 検鏡した.

結 果

1. 抗 POA 血清の特異性

家兔を免疫して得られた抗 POA 血清は, Ouchterlony test にて正常ヒト血清, 正常膵抽出液, 胎児肝抽出液とは反応しなかったが, 胎児膵抽出液と反応し, 抗 POA 血清の特異性が証明された (図 4). しかし膵癌患者血清とは反応しなかった.

2. 膵癌胎児抗原 (POA) の特異性と特性

(1) Ouchterlony test にて, 胎児膵抽出液および膵癌組織より抽出した膵癌特異抗原と特異的抗 POA 血清とのそれぞれの沈降線は融合し, POA と膵癌特異抗原は共通抗原であることが示された (図 4).

(2) Ouchterlony test にて, 胎児膵抽出液は抗 CEA 血清, 抗 AFP 血清, 抗 Ferritin 血清とは反応せず, POA は CEA, AFP, Ferritin とは異なる胎児性蛋白と考えられた (図 5).

(3) 免疫電気泳動で, 胎児膵抽出液と特異的抗 POA 血清の沈降線は α₂-β 領域に位置した (図 6).

(4) Sephacryl S-300 Column による gel filtration で POA は 29~31 fraction に溶出し (図 7), marker proteins の partition 係数と比較してその分子量は約 20 万と推定された (図 8).

(5) 胎児膵抽出液を 70°C で加熱処理し, 特

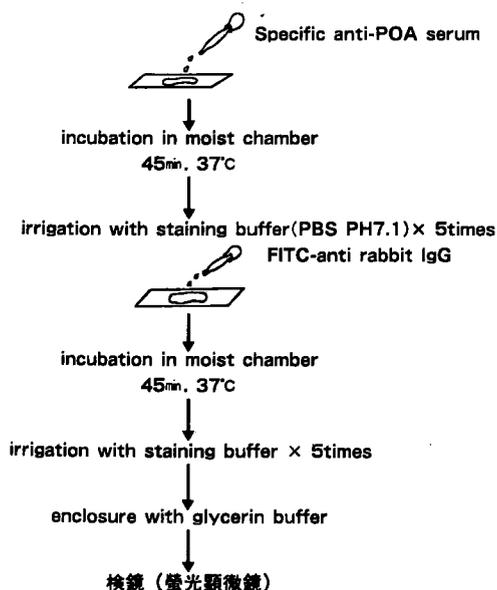


図 3 蛍光抗体間接法の染色法

異的抗 POA 血清と Ouchterlony test で反応させたが沈降線は出現せず、POA の非耐熱性が示された。

3. 蛍光抗体間接法による POA の免疫組織学的検討

(1) 胎児膵の蛍光抗体間接法による染色を 2

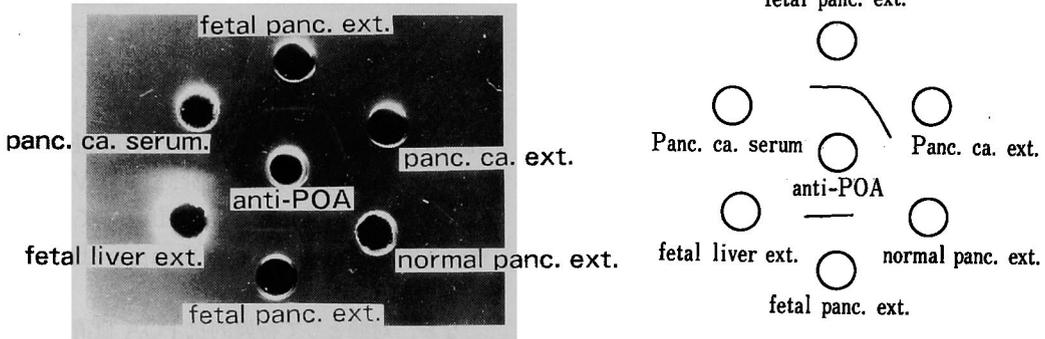


図4 Ouchterlony's double immunodiffusion test : anti-POA と胎児膵抽出液および膵癌組織抽出液の間に互いに融合する沈降線を認める

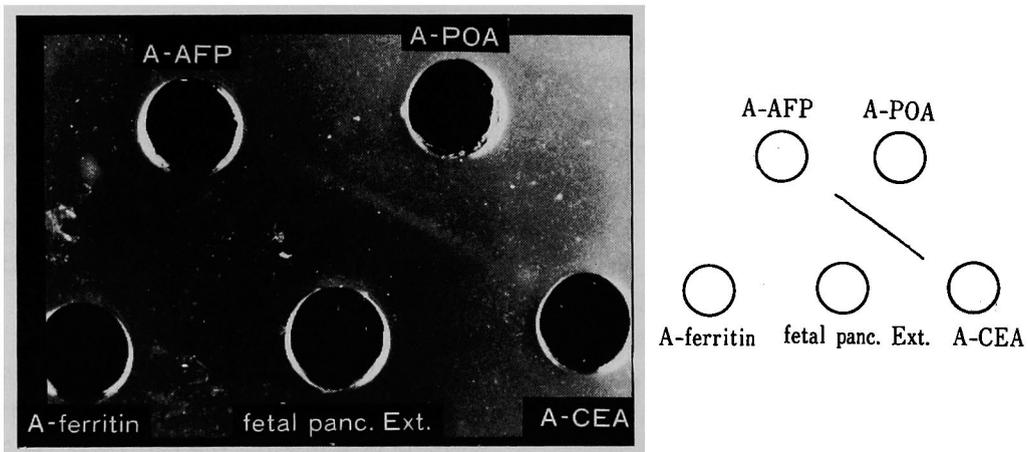


図5 Ouchterlony's double immunodiffusion test : 胎児膵抽出液は A-POA とのみ反応し、A-CEA, A-AFP, A-ferritin とは反応しない

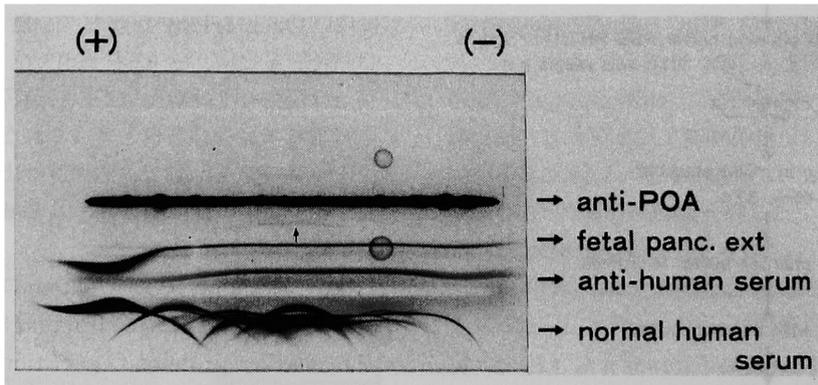


図6 POA の免疫電気泳動パターン
 $\alpha_2\sim\beta$ 領域 (↑印) に沈降線が認められる

例に行ったが、胎児膵細胞の細胞質が強く陽性に染色された (図9)。

(2) 正常膵の蛍光抗体間接法による染色を4例に行ったが、正常膵細胞は線房細胞、膵管上皮、ラ氏島細胞ともどもすべて陰性であった (図10)。

(3) 慢性膵炎膵の蛍光抗体間接法による染色を4例に行ったが、正常膵と同様に陽性所見は認められなかった (図11)。

(4) 膵癌組織の蛍光抗体間接法による染色を6例に行った (表1)。男性4例、女性2例、年齢は48歳から72歳で膵頭部癌5例、膵体尾部癌1例であった。組織型は高分化型管状腺癌2例、

中分化型管状腺癌3例、低分化型管状腺癌1例であった。染色を行った6例すべてが陽性に染色されたが、陽性に染色される細胞は、分化度の高い管腔形成を示す腫瘍細胞で、しかもその陽性部分は細胞質に限られており、間質、管腔内は染色されなかった (図12, 13, 14)。また同じ膵癌組織でも分化度の低い管腔形成を示さない腫瘍細胞はわずかに染色されるのみであり (図15)、壊死の多い腫瘍細胞は陽性に染色されなかった (図16)。また腫瘍近傍の随伴性膵炎組織の染色でも陽性所見は得られなかった。すなわち、膵癌胎児抗原はすべての膵管癌で一樣に生成されるのではなく、分化度の違いにより生成に差があり、むしろ分化度の低い膵癌細胞に

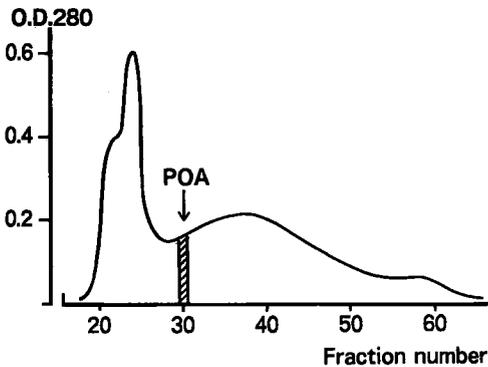


図7 Sephacryl S-300 column (2.6×35 cm) による胎児膵 homogenate の溶出パターン (流速 11.0 ml/hr 1 管 3.47 ml)

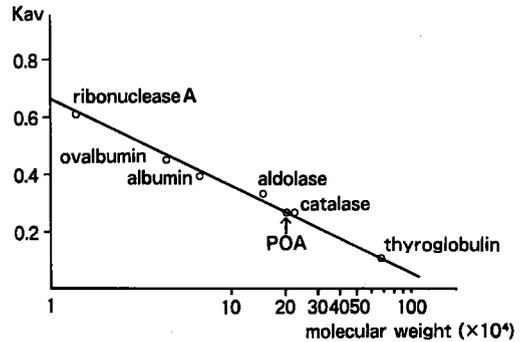
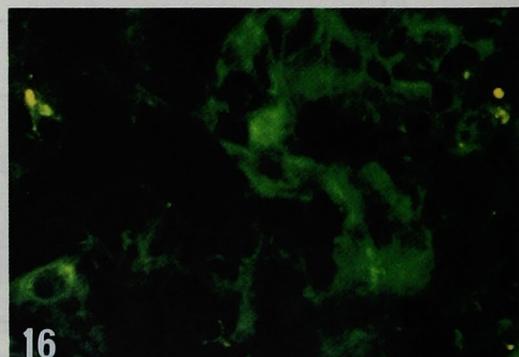
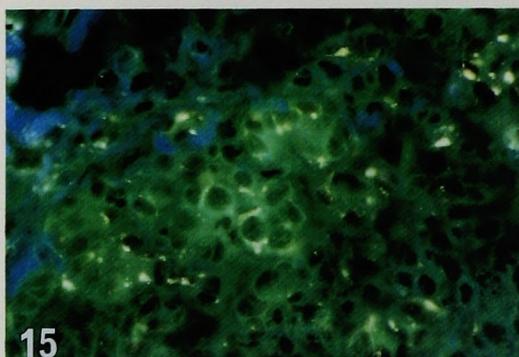
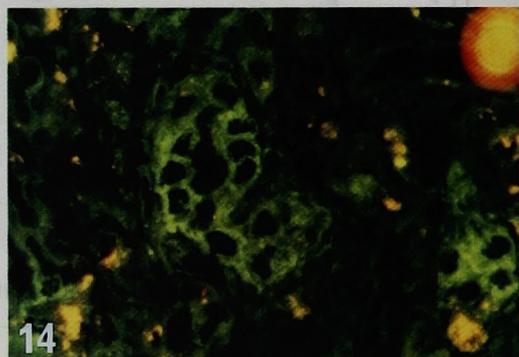
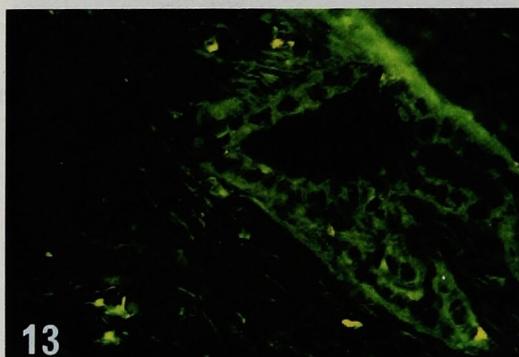
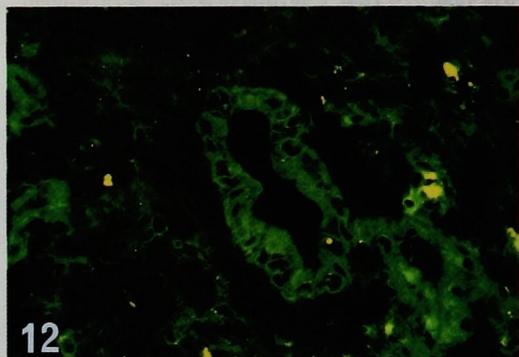
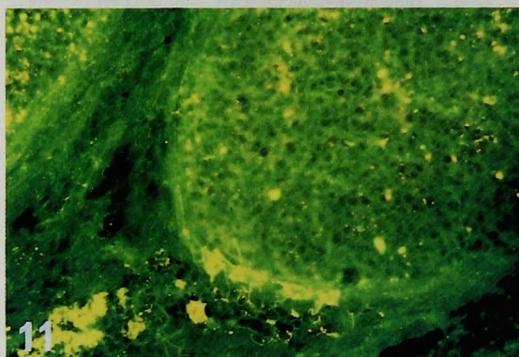
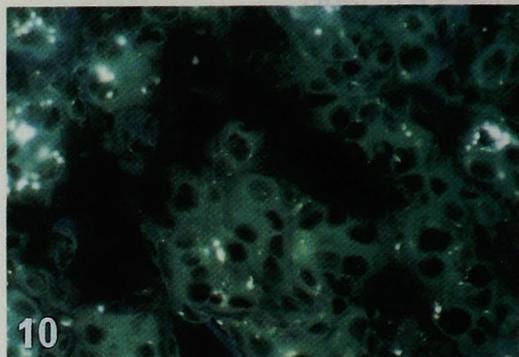
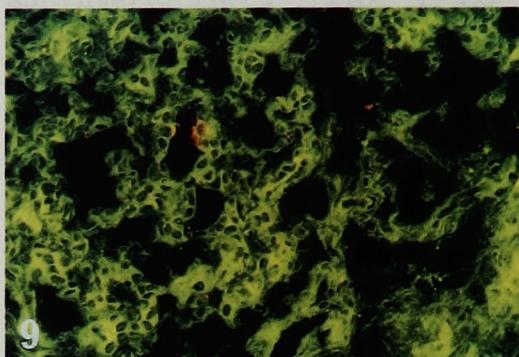


図8 POA の分子量 (Sephacryl S-300 column によるゲル濾過法)

表1 膵癌症例

症例	年齢	性	占拠部位	間質量	INF	組織型	随伴性膵炎	POA陽性細胞
1	64	F	Ph	scirrhou	β	高分化型管状腺癌	+	+
2	56	M	Ph	scirrhou	β	高分化型管状腺癌	+	+
3	48	F	Ph	scirrhou	γ	中分化型管状腺癌	+	+
4	72	M	Ph	scirrhou	γ	中分化型管状腺癌	+	+
5	65	M	Ph	scirrhou	γ	中分化型管状腺癌	+	+
6	61	M	Pbt	scirrhou	γ	低分化型管状腺癌	-	+



比べ、分化度の高い膵癌細胞でより多く生成されることが示唆され、また腫瘍細胞におけるその局在は細胞質内と考えられた。

考 察

1. 膵癌の腫瘍マーカーについて

膵癌に関連した腫瘍マーカーの一つに胎児性蛋白 (oncofetal antigen) がある。胎児性蛋白は、癌細胞における抗原性変化¹³⁾の一つである antigenic reversion の結果、癌化に伴って出現してくるといわれており、これらのうち α -fetoprotein (AFP) や carcinoembryonic antigen (CEA) などは、現在、肝癌、大腸癌などの診断に広く利用されている。一方、膵癌と胎児膵に共通な膵癌胎児抗原 (Pancreatic oncofetal antigen, POA) の存在は、1974年 Banwo ら⁴⁾ によってはじめて報告された。Banwo らは、ヒト胎児膵 homogenate を家兔に免疫して抗血清を得、これを正常ヒト膵、アルブミンで吸収すると、ゲル拡散法で胎児膵および膵癌の homogenates と反応し、さらにこの吸収抗血清は膵癌患者37例のうち36例 (97%) の血清と反応し、膵癌以外の患者血清38例 (慢性膵炎12例、急性膵炎5例、胆石による閉塞性黄疸6例、肝硬変症5例、大腸癌6例、胃癌2例、原発性肝癌2例) では全例陰性であったと注目された。その後1976年、Hegelund ら¹⁴⁾ は胎生12~20週胎児膵と膵癌の各 homogenate を家兔に免疫し、得られた抗血清をさらに正常ヒト血清、赤血球 lysate、正常ヒト膵で吸収し、この吸収血清を用い膵癌抽出液と交叉免疫電気泳動を行ったが反応は認められなかったとし、この抗原の存在を否定した。しかし1978年、Gelder ら⁵⁾、Arndt ら¹⁵⁾、Mihás ら¹⁶⁾、小口ら⁹⁾ によりこの

抗原の存在が支持され、1979年9月の International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine でこの新しい腫瘍マーカーを Pancreatic oncofetal antigen (POA) と呼称することになり、Hobbs ら⁶⁾、Schmiegel ら⁷⁾、西田ら¹⁰⁾ の報告が相次いだ。しかしながら、POA の本態については今なお不明の部分も多く、特性に関しても統一的な見解は得られていない。また腫瘍マーカーとは「癌細胞が産生し、非癌細胞との間に質的または量的差異のある物質」として定義される¹⁷⁾もので、腫瘍マーカーたるには腫瘍における局在を免疫組織学的に証明しなければならないが、POA の免疫組織学的研究は、これまで Hobbs ら⁶⁾ が酵素抗体法にて検討したのみでほとんどなされていない。さらに最近、POA 以外の膵癌関連抗原として、1977年 Chu ら¹⁸⁾ は、膵癌患者腹水より抽出した CEA とは異なる分子量185,000の glycoprotein を報告し、また1979年 Schultz と Yunis¹⁹⁾ は、膵癌細胞およびヒト膵癌培養細胞より抽出した抗原を報告し、Kuntz と Archer²⁰⁾ は、膵癌組織より抽出した抗原を pancreatic-tumor-associated antigen (TAA) として報告した。さらに、1981年には Shimano ら²¹⁾ が、膵癌患者腹水より前述の Chu らの抗原とは異なる抗原を分離し、pancreatic cancer associated antigen (PCCA) とし報告、Klavins²²⁾ は、ヒト膵癌組織より抗原を抽出し、家兔に免疫し得られた抗血清を用い、酵素抗体法にて種々の腫瘍を免疫組織学的に検討している。このように、POA 以外にも多くの膵癌関連抗原の報告はあるが、その各々が同一の抗原成分をもっているのか、また POA との異同があるのかなどについては各研究者の間で十分検討されていない。

図9 胎児膵組織 胎児膵細胞の細胞質が強く陽性に染色されている。

図10 正常膵組織 POA 陽性所見は認められない。

図11 慢性膵炎 59歳、男性、POA 陽性所見は認められない。

図12 膵癌症例1. 64歳、女性、腺管を形成した癌細胞の細胞質が陽性に染色されている。間質、腺腔内は染色されていない。

図13 膵癌症例2. 56歳、男性、腺管を形成した癌細胞の細胞質が陽性に染色されている。

図14 膵癌症例3. 48歳、女性、腺管を形成した癌細胞の細胞質が陽性に染色されている。

図15 膵癌症例6. 61歳、男性、腫瘍細胞はわずかに陽性に染色されている。

図16 膵癌症例1の壊死部分、壊死腫瘍細胞は陽性に染色されない。

2. 抗原の抽出について

著者は胎生16~22週の胎児膵を抗原として使用したが、使用する胎児膵は各報告者により異なり、Gelder ら⁵⁾は18~20週、Mihás ら¹⁶⁾は8~16週、西田ら¹⁰⁾は約22週、本間ら⁸⁾は12~24週の胎児膵を使用している。膵の平均重量は胎生5~6ヵ月でも0.2~1.0g(平均0.58g)と小さく²³⁾、やはり、膵が形態をなしてくる4ヵ月頃より完成する6ヵ月頃までの膵を用いるのが適当と思われる。また胎児膵を homogenize する際、著者は他の報告者と同様 protease inhibitor を用いたが、Kuntz ら²⁰⁾は protease inhibitor を使用することにより抗原活性が失われるとし、protease は実験中の頻回の洗浄操作で除かれるか、あっても protease 活性を失っているとして、protease inhibitor を使用していない。しかし他の報告では protease inhibitor 使用による抗原活性の失活は認められておらず、やはり膵組織を homogenize する際には protease inhibitor を使用すべきと考える。さらにこの胎児膵 homogenate には当然のことながら POA 以外の癌胎児性蛋白といわれる AFP, CEA など存在し、胎児膵 homogenates 中の AFP, CEA 値を測定したところ、AFP

35,000 ng/ml, CEA 1.1 ng/ml が含まれていた。これらを除く方法として、抗原から除く方法と抗血清から除く方法があるが、著者は Anti AFP を coupling させた CNBr-activated Sepharose 4B を用いて negative affinity chromatography を行い、胎児膵 homogenate 中の AFP を除いてこれを crude な POA とした。

3. 抗 POA 血清の作製と特異性について

著者は crude な POA 1 ml (1~2 mg protein) を等量の complete Freund's adjuvant とともに家兎の背部3ヵ所に免疫して抗血清を得た。免疫動物として小口⁹⁾がモルモットを使った以外は家兎が用いられているが、その免疫方法には各報告者により差がある。家兎での抗体価の上昇に個体差もあり、至適抗原量、免疫間隔を一定にさせることは困難で、要は十分な抗原量を用い、抗体価の上昇を確認しつつ免疫することと思われる。著者は家兎より得られた抗 POA 血清の吸収を、glutaraldehyde で不溶化した正常ヒトプール血清、胎児肝、正常膵にて行った。正常膵による吸収操作は、膵組織中の protease のため困難なことがあり、Banwo ら⁴⁾は acrylamid gel で不溶化しており、また Gelder ら⁵⁾、Hobbs ら⁶⁾、西田ら¹⁶⁾は著者と同じく

表2 膵癌関連抗原とその性状

抗原の種類	報告者	抽出材料	分子量	電気易動度	抗原の局在
New oncofetal antigen	Banwo ⁽⁴⁾	胎児膵		α_2	
POA	Hobbs ⁽⁶⁾	胎児膵	40,000	α_2	膵癌細胞細胞質、 管腔内、間質、
POA	Arndt ⁽¹⁵⁾	胎児膵	40,000	$\alpha_1 \sim \alpha_2$	
POA	Nishida ⁽¹⁰⁾	胎児膵	37,000	β	
POA	本間 ⁽²⁴⁾	胎児膵	800,000	β	
POA	Mihás ⁽¹⁶⁾	胎児膵		$\alpha_1 \sim \alpha_2$	
POA	Gelder ⁽⁵⁾	膵癌患者血清	800,000~ 900,000	$\alpha_2 \sim \beta$	
Glycoprotein antigen	Chu ⁽¹⁸⁾	膵癌患者腹水	185,000		
PCAA	Shimano ⁽²¹⁾	膵癌患者腹水	1,000,000	$\alpha_2 \sim \beta$	膵管癌細胞細胞質
POA	Schmiegel ⁽⁷⁾	胎児膵 膵癌組織	40,000	$\alpha_1 \sim \alpha_2$	
PTAA	Kuntz ⁽²⁰⁾	膵癌組織	380,000		
CAPI	Klavins ⁽²²⁾	膵癌組織			
TAPA	Schultz ⁽¹⁹⁾	培養膵癌細胞	900,000~ 1,000,000	$\alpha_2 \sim \beta$	膵癌細胞核膜
PCAA	北田 ⁽²⁵⁾	正常ヒト大腸粘膜	600,000	$\alpha_2 \sim \beta$	
PaA	Loor ⁽²⁶⁾	正常膵	44,000	$\alpha \sim \beta$	腺房細胞細胞質

glutaraldehyde で不溶化させ成功している。この他本間ら²⁴⁾は, CNBr-activated Sepharose 4B affinity chromatography を行い, 正常膵による吸収を行っている。

得られた特異的抗 POA 血清を用い, 胎児膵抽出液, 入江の方法¹²⁾により抽出した膵癌特異抗原, 正常膵抽出液, 胎児肝抽出液, 正常ヒト血清, 膵癌患者血清と Ouchterlony 法にて double immunodiffusion test を行ったところ, 特異的抗 POA 血清は, 胎児膵抽出液と膵癌特異抗原とのみ反応し, 胎児膵と膵癌に共通な抗原, すなわち POA の存在が示された。抗 POA 血清と膵癌患者血清の double immunodiffusion test で Banwo ら⁴⁾は, 37例中36例 (97.3%), Gelder ら⁵⁾は26例中20例 (76.9%), Hobbs ら⁶⁾は45例中44例 (97.8%), 本間ら²⁴⁾は67例中45例 (67.2%) に特異的沈降線を認めているが, 著者はこれを認めなかった。Schmiegel ら⁷⁾も Enzyme-linked double immunodiffusion assay により抗 POA 血清と膵癌患者血清の反応をみているが, 反応を認めておらず, また小口⁹⁾も正常ヒト血清と正常膵抽出物で吸収したのちの抗血清では特異的沈降線を認めなかったとし, その理由として, ①抗血清の抗体価が低すぎる, ②吸収を行う正常膵組織中の酵素活性によって蛋白の消化, 消失がおこること, ③正常膵組織中に POA と部分交差反応を示すものがあること, ④正常膵組織中に POA と同一成分が存在することなどを挙げ, ①②の可能性が強いと述べている。著者は上記の理由に加え, Ouchterlony 法にて検出される程の POA が膵癌患者血清中に存在しなかった可能性も考慮したい。

4. POA の性状について

特異的抗 POA 血清と胎児膵抽出液, 膵癌特異抗原との double immunodiffusion test で互いに fuse する単一の沈降線を得たことより, POA は両者に共通な抗原であることが判明し, さらに既知の CEA, AFP, Ferritin などとは反応せず, POA はそれらとは明らかに異なる新しい癌胎児抗原である。Hobbs ら⁶⁾は血中に認められる既知の物質48種について POA との差異を検討し, POA はすべてのものと異なった

としている。

POA の電気泳動度は, 著者の成績では免疫電気泳動で α_2 - β 領域に泳動されたが, 報告者により差があり, Banwo ら⁴⁾は α_2 , Mihas ら¹⁶⁾は α_1 - α_2 , 西田ら¹⁰⁾は β 領域としている。しかし Gelder ら⁵⁾, 本間ら⁸⁾は著者と同様に α_2 - β 領域に泳動されたとしており, この電気泳動度の違いの原因は明らかでない。

POA の耐熱性についても差があり, 著者は 70°C, 5 分間の耐熱処理で POA の非耐熱性を認めたが, 小口⁹⁾は 70°C, 20 分間の加熱を行った胎児膵抽出液より作製した抗血清を用いて膵癌患者血清と Ouchterlony test を行い, 特異沈降線を認めたとしているが, Gelder ら⁵⁾, 西田ら¹⁰⁾, Mihas ら¹⁶⁾は, POA は非耐熱性であると述べている。

著者は Sephacryl S-300 Column を用い POA の分子量を約 20 万と推定したが, POA の分子量も各報告者によりさまざまである。大きくは Gelder ら⁵⁾, 本間ら²⁴⁾の 80~90 万とする大分子量のものと, Hobbs ら⁶⁾, Arndt ら¹⁵⁾, 西田ら¹⁰⁾の約 40,000 前後の小分子量のものに分けられる。著者の 20 万に近い報告としては, 膵癌関連抗原として報告されたものなかで, Chu ら¹⁸⁾の膵癌患者腹水中の glycoprotein が 185,000, Kuntz ら²⁰⁾の pancreatic-tumor-associated-antigen の 380,000 がある。報告者による分子量の違いについて明確な説明はないが, Hobbs ら⁶⁾は, 彼らの抗 POA 血清と Gelder ら, Arndt らの抗 POA 血清とは同一の抗原成分であったとし, Gelder らのものは polymer か他の複合物をもっているであろうと推測している。また Arndt ら¹⁵⁾は, 彼らが胎児膵および膵癌患者膵液から分離した POA の分子量は 40,000 前後であったが, 膵癌患者血中には分子量 40,000 のもの以外に 120,000, 300,000 のものが存在し, これらは互いに identical であったと述べており, 分子量の差異については Hobbs らの推察が正しいものと考えられる。

さらに POA の特性について, Gelder ら⁵⁾, Arndt ら¹⁵⁾の報告があるが, Gelder らは POA は脂肪を含まない糖蛋白で, 抗原活性は D Nase, R Nase では影響を受けず, trypsin, papain,

pronase, pepsin で完全に消失すると述べているのに対し, Arndt らは POA は Con A-Sepharose に結合せず糖部分が認められないと報告している。このように電気易動度, 耐熱性の有無, 分子量など POA の特性について各報告者の間で差もあり, 今後さらに検討されなければならない。

5. POA の免疫組織学的検討

蛍光抗体間接法にて膵癌組織, 胎児膵組織, 慢性膵炎膵組織, 正常膵組織を染色したところ, 胎児膵組織, 膵癌組織が陽性に染色された。しかし, 同じ膵癌組織でも陽性に染色されるのは管腔を形成した膵癌細胞の細胞質であり, 管腔を形成しない膵癌細胞はわずかに染色されるのみで, 壊死の多い膵癌細胞は染色されず, 細胞の分化度により差があった。また腫瘍近傍の間質, 管腔内は染色されなかった。これまで POA の免疫組織学的検索はほとんどなされておらず, Hobbs ら⁶⁾ が酵素抗体法にて検討しているにすぎない。彼らは胎児膵組織, 膵癌細胞の細胞質, 管腔内, 癌細胞近傍の間質が陽性に染色され, POA が癌細胞から分泌されているかのようにみえると述べているが, 膵癌の組織型による染色性の差異に関しては言及していない。Gelder ら⁵⁾ は Rocket immunoelectrophoresis による膵癌患者血清中の POA の定量で, 25 POA 単位以上の高値例には中～高分化型腺癌が多く, 10 POA 単位以下の低値例には低分化型腺癌が多かったと述べており, 例数は少ないが著者の得た結果とあわせ考えると, 高分化のものほど POA 産生能が高く, 低分化のものは POA 産生能が低いことがうかがわれた。その他の腫瘍関連抗原の免疫組織学的検索では, Schultz ら¹⁹⁾ が膵癌培養細胞に対する抗血清を用い蛍光抗体間接法で検討しているが, 腫瘍細胞の核膜が陽性に染色されており, 著者の結果とは異なり同一抗原ではないと考えられる。また, Shimano ら²¹⁾ の膵癌患者腹水より精製した膵癌関連抗原(PCAA)は, この抗血清を用いた酵素抗体法による検索では, 膵癌細胞の中でも胞体の明るい分化した癌細胞に限局して検出されており, 著者の結果と比較的合致するが, 膵癌以外の胃癌, 大腸癌などでも存在を認められている。いずれ

にしても, POA, 他の腫瘍関連抗原の免疫組織学的検討は, いまだ十分なされておらず, さらに詳細な研究が必要である。

結 論

膵癌の腫瘍マーカーとしての POA について検討した。

胎生16～22週の中絶ヒト胎児膵を抗原(POA)として, 抗 POA 血清を作製し, 抗血清の特異性, POA の性状および蛍光抗体間接法による各膵組織内における POA の局在について検討し, 以下の結果を得た。

1) double immunodiffusion test で抗 POA 血清は胎児膵抽出液, 膵癌特異抗原とのみ反応し, 胎児膵と膵癌に特異な共通抗原の存在が示された。

2) POA は他の胎児性蛋白である CEA, AFP や Ferritin とは double immunodiffusion test で異なるものであった。

3) POA は immunoelectrophoresis で α_2 ~ β 領域に位置し, さらに Sephacryl S-300 Column による gel filtration で分子量は約20万と推定され, また 70°C, 5 分間の加熱で抗原性を失活した。

4) 蛍光抗体間接法によって POA は胎児膵と膵癌膵に存在し, その局在部位は細胞質であった。また同じ膵癌でも分化度の高い管腔を形成する腫瘍細胞に比べ, 低分化な腫瘍細胞はわずかに染色されるのみで, 壊死の多い腫瘍細胞は染色されず, その産生には腫瘍細胞の分化度が関与していることが示唆された。

稿を終えるにあたり, 御指導および御校閲を賜った折田薫三教授に謹んで感謝の意を表します。また終始, 御助言と御指導をいただいた三村 久助教授, 岡山大学医学部第一内科, 辻 孝夫教授, 東海大学医学部内科学3. 泉 正樹講師, 黒瀬アイビークリニック, 黒瀬康平博士に深謝いたします。

なお本論文の要旨は第68回日本消化器病学会総会において発表した。

文 献

1. Levin B, Remine W H, Hermann R E, Scheive P S and Cohn I Jr : Panel : Cancer of the pancreas. *Am J Surg* (1978) **135**, 185-191.
2. Van Heerden J A, Remine W H, Weiland L H and McIlrath D C : Total pancreatectomy for ductal adenocarcinoma of the pancreas. The Mayo clinic experience. *Am J Surg* (1981) **142**, 308-311.
3. 鈴木 敏 : 膵癌の診断および切除成績向上にむけての私どもの試み. *日消外会誌* (1983) **16**, 1001.
4. Banwo O, Versey J and Hobbs J R : New oncofetal antigen for human pancreas. *Lancet* (1974) **13**, 643-645.
5. Gelder F B, Reese C J, Moossa A R, Hall T and Hunter R : Purification, partial characterization, and clinical evaluation of a pancreatic oncofetal antigen. *Cancer Res* (1978) **38**, 313-324.
6. Hobbs J R, Knapp M L, Braufoot A C : Pancreatic Oncofetal Antigen (POA) ; Its frequency and localization in humans. *Oncodev Biol Med* (1980) **1**, 37-48.
7. Schmiegel W H, Becker W N, Arndt R, Hamann A, Sochendra N, Jessen K, Classen-M and Thiele H G : Pancreatic Oncofetal Antigen in Pancreatic Juices. Partial Chemical Characterization and Diagnostic Application of a Pancreatic Cancer-Associated Antigen. *Scand J Gastroenterol* (1981) **16**, 1033-1040.
8. 本間達二, 小口寿夫 : 膵癌の血清学的診断. *Medicina* (1977) **14**, 212-214.
9. 小口寿夫 : ヒト胎児膵による膵癌の血清学的診断の研究. *信州医誌* (1978) **26**, 43-53.
10. 西田康一, 松村直幸, 細川計明, 増田正典, 堀田忠弘, 吉川敏一, 近藤元治 : 膵液中の膵癌胎児抗原による膵癌の診断. *医学のあゆみ* (1979) **110**, 272-273.
11. Avrameas S and Ternynck T : The crosslinking of proteins with glutaraldehyde and its use for the preparation of immunoadsorbents. *Immunochemistry* (1969) **6**, 53-66.
12. 入江礼子 : 腫瘍特異抗原の精製法. 免疫実験操作法, 日本免疫学会編 (1978) 394-399.
13. 星野 孝 : 腫瘍免疫の最近の動向について. *医療* (1978) **32**, 15-24.
14. Hegelund H, Axelen N H, Bock E, Nørgaard-Pedersen B and Røder O C : Immunochemical studies of the antigenic composition of fetal pancreas and pancreas carcinoma. *Protides Biol Fluids* (1976) **24**, 525-528.
15. Arndt R, Nishida K, Becker W M and Thiele H G : Partial molecular characterization of oncofetal pancreas antigen and preliminary experiences concerning its diagnostic value. 6th Meeting Int. Soc Oncodev Biol Med abstr (1978) 229.
16. Mihas A A : Immunologic studies on a Pancreatic Oncofetal Protein. *J Natl Cancer Inst* (1978) **60**, 1439-1444.
17. 石井 勝 : 図説 Tumor marker - 最近の進歩. *日本臨床* (1980) **38**, 2-4.
18. Chu T M, Holyoke E D and Douglass H O : Isolation of a glycoprotein antigen from ascites fluid of pancreatic carcinoma. *Cancer Res* (1977) **37**, 1525-1529.
19. Schultz D R and Yunis A A : Tumor-associated antigen in human pancreatic cancer. *J Natl Cancer Inst* (1979) **62**, 777-785.
20. Kuntz D J and Archer S J : Extraction and identification of a human pancreatic-tumor-associated antigen. *Oncology* (1979) **36**, 134-138.
21. Shimano T, Loor R M, Papsidero L D, Kuriyama M, Vincent R G, Nemoto T, Holyoke E D, Berjian R, Douglass H O and Chu T M : Isolation, characterization and clinical evaluation of a pancreas cancer-associated antigen. *Cancer* (1980) **47**, 1602-1613.

22. Klavins J V : Tumor markers of pancreatic carcinoma. *Cancer* (1981) **47**, 1597-1601.
23. 橋本敬祐：膵の形態と機能. 宇宙堂八木書店, 東京 (1981) pp.76.
24. 本間達二, 小口寿夫, 相沢孝夫, 川 茂幸, 佐々木康之, 古川 猛：胎児膵抗原による膵癌の診断. *綜合臨床* (1980) **29**, 2901-2904.
25. 北田昌之, 森 武貞, 島野高志, 丸山博英, 井口正男, 神前五郎：正常ヒト大腸粘膜より抽出された膵癌関連抗原(PCAA)様物質. *医学のあゆみ* (1982) **122**, 631-633.
26. Loor RM, Shimano T, Manzo M L, Van Dusen L, Papsidero L D, Nicolai J J, Tytgat G N and Chu T M : Purification and characterization of a human pancreas-specific antigen. *Bioch Biophys Acta* (1981) **668**, 222-234.

**Characterization and immunohistological studies of
a Pancreatic Oncofetal Antigen (POA)**

Norihisa TAKAKURA

**The First Department of Surgery, Okayama University Medical School,
Okayama**

(Director: Prof. K. Orita)

Pancreatic oncofetal antigen (POA) is generally accepted as a useful tumor marker for the detection of cancer of the pancreas. However, reports on the biochemical characterization of POA have been contradictory. In the present study, biochemical and immunohistological characterizations of POA were performed with anti-fetal pancreas antibody specific to POA.

POA of the fetal pancreas was located in the region of $\alpha_2\sim\beta$ on immunoelectrophoretograms, and the molecular weight was estimated to be about 200,000 by gel filtration. POA did not react with anti-CEA, AFP, or ferritin antibodies in the Ouchtalony test. POA was also detected in extracts of cancerous pancreas by Ouchtalony test. From immunohistological studies with anti-POA serum, it was confirmed that POA was present in the cytoplasm of fetal and cancerous pancreas. Well differentiated tumor cells stained much more than poorly differentiated tumor cells.

In conclusion, cancerous pancreas shares the same antigen, POA, with fetal pancreas, and the production of POA in cancerous pancreas is related to the degree of tumor cell differentiation.