

Title	Wistar-Furth系ラット自然発生大腸癌一培養系の確立と、その単クローン抗体に関する研究
Author(s)	貴志, 敏夫
Citation	大阪大学, 1984, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/33982">https://hdl.handle.net/11094/33982</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名・(本籍)	貴 志 敏 夫
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	第 6388 号
学位授与の日付	昭 和 59 年 3 月 24 日
学位授与の要件	医学研究科 病理系専攻 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目	Wistar-Furth 系ラット 自然発生大腸癌-培養系の確立と、その 単クローン抗体に関する研究
論文審査委員	(主査) 教 授 北村 旦 (副査) 教 授 松本 圭史 教 授 加藤 四郎

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### (目 的)

宮本らが兄妹交配にて継代維持している Wistar-Furth 系ラット (以下 WF と略) には、高頻度で大腸癌が自然発生するが、いまだその培養系が確立しておらず、in vitro での研究が十分になされていない。そこで、この培養系を確立し、これを用いて、大腸癌自然発生のメカニズム解明の一つとして、大腸癌細胞に対する単クローン抗体を作成した。

#### (方法ならびに結果)

##### I. 自然発生大腸癌の培養系の確立

- (1) 材料：WF 系ラット腹腔内にて継代維持されている可移植性大腸癌を使用した。
- (2) 方法：ハサミで可移植性大腸癌の腫瘤塊を細切り、数mm間隔で細片をシャーレ上に置き、少量づつ培養液を交換した。培養液は、RPMI 1640 + FBS 15%を用いた。数日で細片より細胞が出現するので、細片を少しづつ取除き、細胞のみを培養した。十分に増殖した時点でプロテアーゼを用いて分散し、継代維持した。
- (3) 結果：得られた細胞は、シャーレ上で敷石状配列をもつ多角形の上皮細胞で、核は変形しており、不均衡な腫大を認めた。N/C 比も大きく、分裂期像も多数認め、各所に pile up した像を認めた。PAS 染色陽性、Al-blue 染色陽性で、Doubling time は平均 4.3 日であった。培養細胞の電顕では、巨大な変形した核と、細胞小器官の異型が認められ、細胞表面の microvilli は発達が不十分であり、悪性上皮細胞の像を示した。また、継代した培養細胞を用いて、WF 系ラットの腹腔及び皮下に、大腸癌のもどし移植が成立した。

以上より、この培養細胞は大腸癌細胞と判定した。

## II 大腸癌細胞に対する単クローン抗体の作成と結果

- (1) 免疫：Balb/c マウス雌 8 週齢 4 匹に、可移植性大腸癌の homogenate 1g/匹の割合で腹腔内に投与し、3 週間後に同量追加免疫した。
- (2) 細胞融合：追加免疫後 3 日目に、脾より、リンパ球を採取し、50% Polyethylene Glycol 4000 を用いて融合した。Myeloma cell は、SP2/0-Ag 14 を用いた。
- (3) Screening：抗原として、確立した大腸癌培養細胞を用い、ELISA 間接法で行った。
- (4) Cloning：限界希釈法を用い、2 回行った。単クローン抗体産生 Hybridoma を 2 種類 14 ケを得た。この Hybridoma を Balb/c マウス腹腔内に注射し、腹水を得た。この腹水及び Hybridoma 培養上清には、単クローン抗体が含まれているので、これを用いて、実験を行った。
- (5) 染色：Biotin/Avidin System を用いて、担癌及び非担癌の WF 系ラットの各臓器のパラフィン切片ならびに大腸癌培養細胞を、この単クローン抗体で染色した。

A 群の単クローン抗体は、大腸癌細胞、大腸、胃、子宮及び回腸の腺上皮細胞と反応したが、気管支上皮、肝内胆管とは反応しなかった。

B 群の単クローン抗体は、大腸粘膜の腺上皮細胞に存在する顆粒と反応した。この顆粒細胞は、大腸癌及び担癌ラットの大腸粘膜に多数認めるが、非担癌ラットの大腸粘膜には認めなかった。なお、この顆粒は、胃粘膜の主細胞及び回腸粘膜のパネート細胞中の顆粒と共通の抗原性を有した。

また、A 群の単クローン抗体は、担癌ラットの腎糸球体と反応し、非担癌ラットの腎糸球体とは反応しなかった。担癌ラットの腎糸球体への Immune Complex の沈着が考えられた。

### (総括)

- I WF 系ラット自然発生大腸癌の培養系を確立し、もどし移植により大腸癌由来細胞である事を確認した。
- II 確立した培養細胞を用いて、大腸癌細胞に対する 2 種類の単クローン抗体の作成に成功した。
  - (1) 確立した培養細胞の単クローン抗体に対する染色態度より、この培養細胞が大腸癌由来である事が再確認された。
  - (2) 胃粘膜の主細胞及び回腸粘膜のパネート細胞と共通の抗原性を有する顆粒細胞の、大腸粘膜における存在は、担癌に何らかの関連がある。
  - (3) 大腸、胃、子宮、回腸の腺上皮には共通の抗原性が存在する。
  - (4) 担癌ラットの腎糸球体への Immune Complex の沈着を認めた。

## 論文の審査結果の要旨

Wistar - Furth 系ラットの自然発生大腸癌の発生機序を研究するために、大腸癌細胞の細胞レベルの研究が必要であり、その目的で大腸癌細胞の培養系の確立に成功したものである。またその培養細胞を用いて大腸癌細胞に対する単クローン抗体の作成に成功した。これらの研究は、この大腸癌の性状をより詳細に研究する上で重要な成果であり、学位論文に値するものである。