



Title	Wistar-Furth系ラット自然発生大腸癌：その特異的単クローン抗体の作製と検討
Author(s)	田中，満
Citation	大阪大学，1986，博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/35231
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名・（本籍）	た 田	なか 中	みつる 満
学位の種類	医	学	博 士
学位記番号	第	7 2 1 4	号
学位授与の日付	昭 和 61 年 3 月 25 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 —その特異的単クローン抗体の作製と検討		
論文審査委員	(主査) 教 授 北村 旦 (副査) 教 授 近藤 宗平 教 授 森 武貞		

論文内容の要旨

（目 的）

本学病理学教室において、宮本らにより兄妹交配にて継代維持されているWistar-Furth系ラット（以下WFと略す）には高頻度で大腸癌が自然発生する。この大腸癌の培養系を確立することにより、in vitroでのWF系ラット線維芽細胞、NIH3T3の形質転換の実験およびoncogeneに関する研究を可能にできた。さらに、その延長として、この培養細胞を用いてWF大腸癌に対する特異的単クローン抗体を作製した。この抗体に対する抗原の局在は、酵素抗体法（ABC法）および電顕酵素抗体法を用いて詳細に検討した。

（方法ならびに成績）

1. 培養系の確立：初代培養は、WF系ラット腹腔内に継代維持されている可移植性大腸癌の腫瘍塊を無菌的に採取し、1 mm立方状に細切し、15%FBSを加えたRPMI1640培養液を加え、37℃、5%CO₂気相下で培養した。数日後、細片より細胞が出現し、十分に増殖した時点で、Dispaseを用いて上皮性細胞を選択し、単一の細胞となるまで継代維持した。この培養大腸癌細胞は数石状の配列を示す多角形の細胞で、各所でpile upし、多数のmitosisを認めた。電顕的にも多彩な像を示し、核は巨大で変形し、細胞表面のmicrovilliの発達は不十分であった。
2. 単クローン抗体の作製：培養大腸癌細胞 2.0×10^7 個／匹を用いてBalb/cマウスに3週間の間隔で2回の免疫を行った。追加免疫後3日目に、このマウスの脾臓より採取したリンパ球と、Balb/cマウス由来の骨髓腫細胞SP 2 / 0-Ag14との間に細胞融合を行い、HAT培地で培養選択した。ELISA 間接法を用いて、この融合細胞が抗体産生hybridomaであることを確認した。cloningには限界希釈法を用い、

2回以上施行した。

cloningにて単クローンとなった抗体産生hybridoma細胞をBalb/cマウスの腹腔内に注射し、約2週間後に、この腹水を採取した。この腹水およびhybridoma培養上清にIgGが含有されていることの確認は、Ion Exchange Chromatographyを用いて行った。

3. 酵素抗体法：担癌および非担癌のWF系ラットの各臓器、in vivoで継代維持している可移植性大腸癌、胃癌、子宮体部癌および絨毛膜癌をZamboni固定し、paraffin sectionを作った。また、in vitroで継代している培養大腸癌細胞および絨毛膜癌細胞もZamboni固定し、これらをBiotin/Avidin System (ABC法)を用い、作製された単クローン抗体で染色した。作製された12種類の抗体のうち、5種類の抗体は、原発大腸癌、可移植性大腸癌および培養大腸癌細胞とのみ反応し、正常大腸粘膜をはじめ、すべての上皮性細胞、可移植性胃癌、子宮体部癌および絨毛膜癌、培養絨毛膜癌細胞とは全く反応しなかった。

4. 電顕酵素抗体法：培養大腸癌細胞を浮遊状態のままABC法で染色し、2%glutaraldehydeおよび2%OsO₄で固定後、脱水・包埋した。電顕的観察では、細胞膜表面に高いelectron densityを有する微細顆粒が認められた。

(総 括)

近年、我国において増加傾向にあるヒト大腸癌に関して、特異的単クローン抗体を用いた研究の報告が散見されるが、未だ充分な検索は行われていない。他方、実験動物の自然発生消化器癌は極めて稀であり、これに対する単クローン抗体の研究も極めて不十分である。今回の実験では、WF系ラットの自然発生大腸癌の培養系を確立し、この培養細胞を用いて、WF系ラットの大腸癌に特異的な単クローン抗体を作製した。酵素抗体法により、WF系ラットの種々の臓器・組織を検索し、この抗体が大腸癌に特異的であることを確認した。さらに、電顕酵素抗体法により、この抗体が大腸癌細胞の細胞膜にのみ結合することを確認した。

論文の審査結果の要旨

本学病理学教室で維持されている自然発生大腸癌好発Wistar-Furth系ラットの大腸癌細胞の特異性研究の一つとして、可移植性とした大腸癌組織より培養細胞系を確立し、この培養細胞を用いて単クローン抗体を作製した。この単クローン抗体の抗原局在性は、自然発生大腸癌細胞、その可移植性細胞及び培養細胞の細胞膜表面により、他の検討した臓器組織の細胞にはみられなかったほどの特異性をもつものがえられた。その結果、この自然発生大腸癌の研究に寄与する有力な手がかりをえたものであると考える。