The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	大腸粘膜より抽出した膵癌関連抗原に対するmonoclonal抗体の作製およびその解析
Author(s)	龍田, 眞行
Citation	大阪大学, 1987, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/35708
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

【81】

氏名・(本籍)	龍田眞行（たつた まさゆき）
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 7506 号
学位授与の日付	昭和62年1月7日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	**大腸粘膜より抽出した膵癌関連抗原に対するmonoclonal抗体の作製およびその解析**
論文審査委員	(主査) 教授 森 武貞 (副査) 教授 濱岡 利之　教授 宮井 潔

論文内容の要旨

［目　的］

膵癌の新しい血清学的診断法として，いくつかの膵腫瘍マーカーの臨床応用が試みられている。膵癌関連抗原pancreas cancer-associated antigen（ＰＣＡＡ）は，膵癌患者腹水より分離・精製された分子量約100万の糖蛋白で，精製ＰＣＡＡに対する家兎抗血清は，Gelderらのpancreatic oncofetal antigen（ＰＯＡ）に対する山羊抗血清とidenticalに反応する。また，家兎抗ＰＣＡＡ抗血清を用いたenzyme immunoassayによる血清ＰＣＡＡ値の測定では，膵癌患者の約67％に高値を示す。一方，免疫組織学的検索で，ＰＣＡＡは膵癌細胞以外に，腸粘膜の杯細胞など多くの粘液腺に存在することが判明し，このことから正常大腸粘膜よりＰＣＡＡ様物質（ＰＣＡＡｃ）が抽出・精製され，その物理化学的性状も明らかにされている。本研究は，これらの知見にもとずき，ＰＣＡＡとＰＣＡＡｃとの抗原性の異同を明らかにすることを目的として，ＰＣＡＡｃに対するmonoclonal抗体を作製し，その解析および膵癌の血清学的診断への応用を試みたものである。

［方法ならびに成績］

1. Monoclonal抗ＰＣＡＡｃ抗体の作製

精製ＰＣＡＡｃ10μgで，雄ＢＡＬＢ／ｃマウスを等量のFreund's complete adjuvantとともに腹腔内に免疫し，30日後さらに50μgをbooster shotして3日後に摘脾し，その脾細胞10^8個と，Ｐ３－ＮＳ１／１－Ag４マウス骨髄腫細胞10^7個とを，polyethylene glycol 4000存在下で細胞融合を行った。Screeningおよびcloningを繰り返した後，抗ＰＣＡＡｃ活性を有する５種類のhybridoma cell lineを確立し，これらをpristan処理したＢＡＬＢ／ｃマウスに移植して，腹水化されたmonoclonal

抗体を採取した。Micro-Ouchterlony法で，家兎抗ＰＣＡＡｃ抗血清とＰＣＡＡとの形成する沈降線に一致して，標識したmonoclonal抗体が局在することを，autoradiographyによって確認した。

2. Monoclonal抗体による免疫組織学的検索

Monoclonal抗ＰＣＡＡｃ抗体を用いて，種々の正常および癌組織（95% ethanol固定，paraffin包埋切片）を，avidin-biotin-peroxidase complex法により酵素抗体染色にて検討した。その結果，いずれのmonoclonal抗体も家兎抗ＰＣＡＡｃ抗血清と同様，正常膵組織とは全く反応せず，十二指腸より大腸管の杯細胞には強い反応を示した。他の正常組織，すなわち胃（腺窩上皮），十二指腸（Brunner腺），肝（肝内胆管），乳腺（導管），および胎児膵（導管）に対しては，各monoclonal抗体のlot毎に，反応の相違を認めた。

癌組織に対する検索は，家兎抗ＰＣＡＡｃ抗血清で陽性反応を示したものについて行った。５種類のmonoclonal抗体は，膵癌，肝細胞癌と比較的強く反応を示すタイプと，胃癌，大腸癌との反応が強いタイプ，および癌との反応が概して弱いタイプとに亜分類された。

3. ＰＣＡＡとＰＣＡＡｃとの抗原性の異同

先の検索で，特異性が異なると判断された２種類のmonoclonal抗体（Ａ17－５，７－13）を用いてＰＣＡＡとＰＣＡＡｃとの抗原性の異同について検討した。すなわち家兎ＰＣＡＡｃ抗血清をcatcher抗体としてbeadsに固相化し，tracer抗体には^{125}Ｉで標識したＡ17－５あるいは７－13を使用してsandwich radioimmunoassay（ＲＩＡ）を組み，両者の系におけるＰＣＡＡとＰＣＡＡｃとの反応性の相違を希釈曲線の上から比較した。Monoclonal抗体Ａ17－５を使用した系ではＰＣＡＡとＰＣＡＡｃは同様の反応を示したのに対して，７－13の系ではＰＣＡＡｃのみが反応を示した。

4. Monoclonal抗ＰＣＡＡｃ抗体の臨床的意義

家兎抗ＰＣＡＡｃ抗血清をcatcher抗体とし，tracer抗体にはＰＣＡＡ，ＰＣＡＡｃの両者を認識するmonoclonal抗体Ａ17－５を使用したＲＩＡで，健常人および各種疾患患者の血清ＰＣＡＡｃ値を測定した。健常人40例の平均値（13.9 μg／ml）＋２標準偏差値，すなわち22.3 μg／mlをcut-off値とすると，膵癌では75%（64／84例）において陽性を示し，他の消化器癌では14～51%が陽性となった。膵癌特異性を向上させる目的で，catcher抗体を家兎抗ＰＣＡＡｃから抗ＰＣＡＡ抗血清に変更し，測定値におよぼす影響を検討した。膵癌症例では測定値は変動せず，膵癌以外の症例では測定値が有意に低下し，ＰＣＡＡの測定系としてspecificityの向上が期待できた。

［総　　括］

1. 大腸粘膜より抽出した膵癌関連抗原（ＰＣＡＡｃ）に対する５種類のmonoclonal抗体を作製した。
2. 免疫組織学的に検索したところ，これらのmonoclonal抗体はいずれも正常膵とは反応せず，消化管の杯細胞と反応した。他の正常組織および膵癌を含む癌組織においては抗体のlot毎に反応の相違を認め，ＰＣＡＡｃのmicro-heterogeneityが示唆された。
3. ＰＣＡＡとＰＣＡＡｃの抗原性の異同が，sandwich ＲＩＡによって明らかにされた。すなわち，ＰＣＡＡｃの分子上にはＰＣＡＡにない抗原決定基が存在し，両者に共通する抗原決定基を認識するmonoclonal抗体が得られた。

4. Monoclonal抗ＰＣＡＡｃ抗体を用いたＲＩＡで，健常人および各種疾患患者の血清ＰＣＡＡｃ値を測定したところ，ＰＣＡＡｃは膵癌患者の75%に高値を示し，膵癌の血清学的補助診断法として有用であった。
5. 今後，膵癌特異性の高いmonoclonal抗体を利用することにより，さらに膵癌診断能の高いＰＣＡＡ測定ＲＩＡ系を開発し得る可能性が示された。

論文の審査結果の要旨

本論文は，ＰＣＡＡ（膵癌患者腹水より精製した膵癌関連抗原）と，ＰＣＡＡｃ（正常大腸粘膜より精製したＰＣＡＡ様物質）との抗原性の異同を明らかにすることを目的として，ＰＣＡＡｃに対するmonoclonal抗体を作製し，その解析および血清学的診断への応用を試みたものである。

具体的には，これらの抗体を用いた免疫組織学的な検索と，sandwich radioimmunoassayによる検討がなされている。

また，他の膵腫瘍マーカーに対する比較・検討も充分に考察されており，さらに臨床的には膵癌診断を向上させる工夫もなされ，優れた研究論文である。