



Title	Carcinoembryonic antigen (CEA) に対する monoclonal 抗体の作製とその特異性の解析
Author(s)	直井, 正紀
Citation	大阪大学, 1987, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/35870
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)	なお 直	い 井	まさ 正	のり 紀
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	7507	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	Carcinoembryonic antigen (CEA) に対する monoclonal 抗体の 作製とその特異性の解析			
論文審査委員	(主査) 教授 森 武貞			
	(副査) 教授 宮井 潔	教授 濱岡 利之		

論文内容の要旨

【目 的】

CEA およびその関連抗原には多数の抗原決定基があり、CEA の検出には CEA に特有の抗原決定基に対する monoclonal 抗体の作製が不可欠である。本研究は、細胞融合法により数種の monoclonal 抗 CEA 抗体を作製し、その特異性を sandwich radioimmunoassay (sandwich RIA) および免疫組織学的手法によって検討したものである。また、monoclonal 抗 CEA 抗体を用いて CEA 測定系を組み、癌組織、健常人糞便および癌患者糞便の過塩素酸可溶分画中の CEA 量を測定し、その臨床的意義を検討した。

【方法ならびに成績】

CEA はヒト大腸癌組織より、NCA は正常肺より、NCA-2 は胎便より抽出、精製した。精製した CEA 標品で BALB/c マウスを免疫し、その脾細胞 1×10^8 個とマウス骨髓腫細胞 (P3/NS-1/1-Ag4-1) 1×10^7 個とを細胞融合し、融合細胞の培養上清に含まれる抗体活性を CEA の固相法で screening し、CEA に対して反応が強く、NCA に対する反応の弱い抗体を産生する hybridoma を選択し、限界希釈法による cloning を 2 回行った。その結果、最終的に 6 clone (*13-5, *15-3, *20-3, *29-2, *65-4, *41-7) を選び、それぞれの clone を BALB/c マウスの腹腔に接種し、その腹水より affinity chromatography とゲル濾過により monoclonal 抗 CEA 抗体を精製した。Monoclonal 抗体の immunoglobulin subclass の決定は micro-Ouchterlony 法にて行ったが、抗 CEA 抗体 *15-3 と *20-3 は IgG1 で、*13-5, *29-2, *41-7 と *65-4 は IgG2a であった。また、light chain はすべて κ であった。

Monoclonal抗CEA抗体のCEA関連抗原に対する各反応性は、CEA、NCA-2、NCAをそれぞれ固相化したpolystyrene beadsと¹²⁵Iで標識したmonoclonal抗CEA抗体を用いたsandwich RIAにより検討した。6種の抗体はその反応の特異性によってtype A、B、Cに大別された。すなわち、type A抗体(*41-7, *65-4)はCEA、NCA、NCA-2のいずれに対しても同等の反応を有する抗体であり、type B抗体(*13-5, *20-3)はCEAと強く反応し、NCA-2に対しても反応が見られるが、NCAとは全く反応しない抗体であり、type C抗体(*15-3, *29-2)はCEAとのみ反応が見られ、NCAとNCA-2に対して反応が認められない抗体である。

また、monoclonal抗CEA抗体の特異性を免疫組織学的にも検討した。癌組織では大腸癌8例、胃癌6例、食道癌1例、肝癌4例、胆嚢癌2例、甲状腺髄様癌3例、および乳癌7例を用いた。正常組織では大腸2例、胃4例、脾臓3例、胆嚢2例、および末梢血塗抹標本2例を対象とした。

各組織を各monoclonal抗CEA抗体を用いて、ABC法により免疫染色を行ったところ、消化器癌ではmonoclonal抗CEA抗体の全てが検討した全症例で癌細胞と強く反応した。高分化型腺癌の場合にはtype C抗体が癌細胞の腺腔自由面に限局して反応したのに対して、type A抗体では細胞質にも反応が見られ、type B抗体は両者の中間のパターンを示すという違いがあった。また、低分化型腺癌および乳癌、甲状腺髄様癌の場合は、いずれの抗体も細胞質に瀰漫性の反応を示したが、陽性細胞の数はtype A、type B、type Cの順に少なくなる傾向があった。正常組織では、type A抗体は大腸の粘膜上皮、胃の化生腸上皮、脾臓導管、胆嚢粘膜上皮、甲状腺C細胞、顆粒球に反応し、type B抗体は甲状腺C細胞、大腸粘膜上皮と一部の化生腸上皮に反応し、type C抗体は甲状腺C細胞、一部の化生腸上皮と反応しただけであった。次に、大腸癌切片にtrypsin, protease, 過ヨウ素酸, sialidase, 水酸化カリウム, pepsinを用いて組織化学的処理を加え、6種のmonoclonal抗CEA抗体の認識する抗原決定基の化学構造について検討した。Trypsin処理, pronase処理, sialidase処理, 過ヨウ素酸処理のそれぞれ単独だけでは染色性の変化は見られず、sialidase処理を行った後に過ヨウ素酸処理を行うと*29-2だけが染色性が減弱し、他の5種のmonoclonal抗体では染色性は変化しなかった。次に、水酸化カリウム処理とsialidase処理の後に過ヨウ素酸処理を行うと、全てのmonoclonal抗CEA抗体で染色性が減弱した。このことより*29-2が認識する抗原決定基はO-acetyl基を持たないシアル酸を末端に持つ糖鎖であると考えられ、他の5種のmonoclonal抗CEA抗体の認識する抗原決定基は末端にO-acetyl基を持つシアル酸のついた糖鎖であると考えられた。また、pepsin処理により全ての抗体で染色性が減弱したことより、抗原決定基には糖鎖と同時に蛋白部分も関与していると考えられた。

Type A、B、C、の抗体をそれぞれ¹²⁵I標識し、tracerとして用いたsandwich RIAをそれぞれ測定系A、測定系B、測定系Cと名づけた。これらの各測定系で消化器癌組織6例、健常人糞便12例、大腸癌患者糞便16例および胃癌患者糞便13例のPCA可溶分画を検体として測定し、標準CEAに換算した値を比較検討した。各測定系での測定結果はばらつきが大きく、測定系1つだけでは判定が困難であった。そこで、最も広義のCEAを測定しうると考えられる測定系Aでの測定値で最も狭義のCEAを測定しうると考えられる測定系Cでの測定値を割った値(C/A値と%で表わす)を算出すると、消化器癌組織検体では全例60%以上となり、健常人糞便検体では全例3%以下となった。また、大腸癌患者

糞便検体の16例中12例と、胃癌患者糞便検体13例中6例が3%以上となった。以上の結果は、我々の組んだCEA測定系Cは糞便中の本来のCEAを測定できる系であることを示しており、消化器癌、特に大腸癌の早期診断に利用できるものと考えられた。

〔総 括〕

1. 細胞融合により6種のmonoclonal抗CEA抗体を得た。
2. Monoclonal抗CEA抗体の特異性をsandwich R I Aで検討した結果、3 typeに大別された。すなわち、CEA, NCA, およびNCA-2に反応するtype A抗体と、CEAとNCA-2に反応するが、NCAに反応しないtype B抗体と、CEAとのみ反応するtype C抗体である。
3. 免疫組織学的検討の結果、type C抗体が最も癌に特異的なmonoclonal抗CEA抗体であった。
4. 組織化学的処理によりmonoclonal抗CEA抗体の認識する抗原決定基の構造を解析した結果、6種の抗体の認識する抗原決定基はいずれもシアル酸を末端にもつ糖鎖に蛋白部分が関与したものと推定された。
5. Monoclonal抗CEA抗体を用いて測定系を組み、消化器癌組織と健常人および大腸癌・胃癌患者の糞便検体を測定した。その結果、測定系Cは糞便中の本来のCEAを測定できる系であることが示され、大腸癌の早期診断への応用が期待される。

論文の審査結果の要旨

本論文は、CEAに対するモノクローナル抗体を作製し、その反応の特異性をSandwich R I Aおよび免疫組織学的に検討したものである。また、CEA特異性の高いモノクローナル抗体を用いて新しいCEA測定系を組み、大腸癌および胃癌患者の糞便検体を測定した結果、糞便中の本来のCEAを測定できる系が得られた。この方法は、大腸癌および胃癌の早期診断に応用可能であり、臨床的意義が大きい。