The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

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

【82】

氏名・(本籍)	直井正紀（なおいまさのり）
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個とマウス骨髄腫細胞（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polystylene beadsと^{125}Ｉ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，膵癌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，膵臓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，膵臓導管，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^{125}Ｉ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と名ずけた。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値とし％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 ＲＩＡで検討した結果，３type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 ＲＩＡ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。