

Title	ラット胃癌に対するモノクローナル抗体の作製 : Wistar ーFurth系ラット可移植性大腸癌に随伴する 胃癌を用いて
Author(s)	伏見, 博彰
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/36026">https://hdl.handle.net/11094/36026</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">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="#"></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)	伏見博彰
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 8110 号
学位授与の日付	昭和 63 年 3 月 25 日
学位授与の要件	医学研究科社会系専攻 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目	ラット胃癌に対するモノクローナル抗体の作製—Wistar —Furth系ラット可移植性大腸癌に随伴する胃癌を用いて—
論文審査委員	(主査) 教授 四方 一郎 (副査) 教授 北村 旦 教授 松本 圭史

### 論文内容の要旨

#### 〔目 的〕

本学病理学教室にて継代維持されている Wistar—Furth ラット (以下 WF ラットと略す) に高頻度 (30~40%) に上行結腸癌が自然発生する。この大腸癌は腹腔内にて可移植性腫瘍として継代もされており、それにより子宮内膜癌及び胃癌が高頻度に随伴する。さらに、このラットには 7, 12—dimethyl benz ( $\alpha$ ) anthracene の投与によって絨毛癌が発生することもわかっている。この大腸癌及びその他の腫瘍との関連について考察するため、この随伴胃癌の細胞培養系を確立してそれに対するモノクローナル抗体を作製した。

#### 〔方法ならびに成績〕

##### 1. 細胞培養系の確立

WF系ラット腹腔内にて継代維持されている可移植性胃癌の腫瘍塊を無菌的に採取し、周囲結合織及び壊死組織を除去した後一辺約 1 mm のサイコロ形に細切して培養した。培地は RPMI 1640 培地, DMEM 培地, HAM F—12 培地を用いたところ, RPMI 1640 培地にて最良の発育を示したため, 4 代継代後はこの培地にて培養した。増殖細胞は癌細胞及び線維芽細胞と考えられたため, クローニングを行い, 癌細胞のみを継代維持した。

この細胞の plating efficiency は 43%, doubling time は約 2.8 日であった。形態的には敷石状配列を示して dish 上に密着して増殖し, 所々で pile up する悪性上皮性腫瘍細胞としての性格を示した。この細胞は粘液産生能を有しており, 腺癌としての性格を残していた。

##### 2. モノクローナル抗体の作製

8週齢雌生Balb/cマウスの腹腔内に初回免疫として培養胃癌細胞 $2.0 \times 10^7$ 個/匹を注入し、追加免疫として3週間後及び6週間後に同量を再注入した。最終免疫の3日後に同マウスより脾臓を摘出して脾細胞浮遊液を作製し、この脾細胞と同系マウス由来の骨髓腫細胞SP2/0-Ag14とをpolyethyleneglycolを用いて細胞融合を行った。この融合細胞をHAT培地にて培養した後、HT培地を経てRPMI 1640培地にて培養した。抗体検出はELISA間接法にて行い、抗体産生hybridoma cellを有するwellに対して限界希釈法にてcloningを行った。この抗体検出及びcloningは2回以上施行した。この抗体はOuchterlony immunodiffusion methodにてIgG1に属することが確認された。こうして得られた抗体産生hybridoma cell  $2.0 \times 10^7$  個/匹をBalb/cマウスの腹腔内に注入し、2~3週間後に2~5 ml/匹の腹水を得た。この腹水よりProtein A-sepharose CL-4Bカラムを用いて抗体の精製を行った。精製した抗体をWestern blot法にて検定を行ったところ、この抗体はSDS-PAGE上では分子量約82,000の物質を確認するモノクローナル抗体であることが確認された。

### 3. 酵素抗体法（免疫組織化学）

WF系ラットの食道、胃、回腸、上行結腸、肝、腎、肺、リンパ節、子宮、胎膜、胎児、大腸癌、胃癌、子宮内膜癌、絨毛癌を固定・包埋し、パラフィン切片を作製した。可能なものについては凍結切片及び捺印標本をも作製した。また、slide glass上にて培養した大腸癌、胃癌、子宮癌、絨毛癌の培養細胞も固定を行った。これらに対し、得られたモノクローナル抗体を用いてABC法にて染色し光顕的観察を行った。培養胃癌細胞に対しては同様の方法で固定した後、pre-embedding methodによる電顕酵素抗体法（間接法）を行った。この抗体を用いた染色により、大腸癌、胃癌、子宮内膜癌及び胎膜の羊膜上皮、合胞体栄養細胞の細胞膜に陽性所見が認められ、絨毛癌及び胎膜の羊膜上皮、合胞体栄養細胞を除く正常組織は染色されなかった。

陽性所見を示した組織及び細胞を過ヨウ素酸処理後に同様の染色を行うと、陽性所見の減弱が認められた。この染色結果及び前述のWestern blot法の結果より、この抗体は細胞膜に存在する分子量約82,000の糖蛋白質を認識しているモノクローナル抗体であり、この糖蛋白質は大腸癌とそれを移植することにより随伴する胃癌、子宮内膜癌及び胎膜の羊膜上皮、合胞体栄養細胞において表現されていることが判明した。

#### 〔総括〕

1. WF系ラット大腸癌に随伴する胃癌の細胞培養系を確立した。
2. この培養細胞を用いてモノクローナル抗体を作製したところ、細胞膜に存在する分子量約82,000の糖蛋白質を認識していることが判明した。
3. この糖蛋白質はこの系ラットの胎膜の羊膜上皮、合胞体栄養細胞に表現されており、大腸癌とそれを移植することにより随伴する胃癌、子宮内膜癌にも表現されている一種のembryonic antigenの可能性があると考えられ、薬剤によって誘発される絨毛癌及び胎膜の羊膜上皮、合胞体栄養細胞以外の正常組織には表現されていないことが判明した。

## 論文の審査結果の要旨

自然発生上行結腸癌好発系 Wistar-Furth 系ラットの大腸癌の移植によって発生する胃癌の細胞培養系を確立し、それを用いて胃癌に対するモノクローナル抗体を作製した。

この抗体は Western blot 法, 酵素抗体法 (光顕及び電顕) にて胃癌細胞膜に存在する分子量約 82,000 の糖蛋白質を認識していることが判明した。この糖蛋白質は同系ラットの胃癌の他, 大腸癌, 子宮内膜癌, 胎膜に存在することが酵素抗体法にて確認された。従って, この糖蛋白質は同系ラットの腫瘍関連抗原であると考えられる。

以上の業績は実験病理学的研究に有用であり, 本論文は博士論文として価値のあるものと考えられる。