The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Preparation and Characterization of Monoclonal Antibodies to an N-linked Oligosaccharide
Author(s)	桝谷, 誠三
Citation	大阪大学, 1991, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/37766
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

【19】

氏　　名	桝　谷　誠　三（ますたにせいぞう）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　9884　号
学位授与年月日	平成3年8月8日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	Preparation and Characterization of Monoclonal Antibodies to an N-linked Oligosaccharide （N-グリコシド型糖鎖に対する単クローン抗体の作製とその解析）
論文審査委員	（主査） 教授　森　武貞 （副査） 教授　平野　俊夫　　教授　谷口　直之

論文内容の要旨

〔目　的〕

細胞の癌化や癌の転移にともない糖脂質や糖タンパク質の糖鎖に異常が出現することはよく知られている。ある種の糖脂質やムチン型の糖タンパク質に対する単クローン抗体（MoAb）はすでに作製され，臨床上有用な腫瘍マーカーとなっている。しかし，N-グリコシド型糖タンパク質の糖鎖に対するMoAbの作製は非常に困難であり，また作製されたものとしてもそのエピトープの解析は容易ではない。

本研究は，ヒト免疫グロブリン（IgG）よりbisecting N-acetylglucosamine（bisecting-GlcNAc）構造を持つフコシル化2本鎖糖鎖を精製し，これをBALB/cマウスに免疫してN-グリコシド型糖鎖に対する二種類のMoAbを作製することに成功し，さらにこれらのMoAbに対応するエピトープの解析を行ったものである。

〔方法と結果〕

1）糖鎖の精製：ヒトIgGよりヒドラジン分解，ゲル濾過にて糖鎖を分離した後，2-アミノピリジンによる蛍光標識を行い，高速液体クロマトグラフィーを用いてbisecting-GlcNAc構造をもつフコシル化2本鎖糖鎖を精製した。

2）MoAbの作製と精製：精製した糖鎖5μgをFreundの完全，または不完全アジュバントとともにBALB/cマウス腹腔内に週1回，計5回免疫し，免疫マウス脾細胞をマウスミエローマ細胞P3U1と常法通り細胞融合した。スクリーニングは以下のごとく行った。まず96穴のマイクロタイタープ

レートに50μl のヒトasialoglycophorin（1μg/ml）を37℃，2時間固相化し，300μlの1％牛血清アルブミンにて37℃，1時間blockingした後，hybridoma培養上清50μlを37℃，1時間インキュベートした。次いで二次抗体として2000倍希釈したペルオキシダーゼ結合ヤギ抗マウスIgG＋IgM抗体50μl を37℃，1時間反応させた後，発色基質としてo-phenylenediamineを用いて490 nmの吸光度を測定した。これによりMT-5，MT-9の2種のMoAb を得た。また精製は腹水化MoAbを30－50％硫安塩析後，Sephacryl S-300を用いたゲル濾過により行った。

3）MoAbの特性とそのエピトープ：2種類のMoAb；MT-5，MT-9はdot blot法によりasialoglycophorinと，またwestern blot法によりIgG-Fc fragment及びヒトtransferrin とそれぞれ反応することが確認された。次に，固相化したヒトasialoglycophorin をgalatosidase，β-N-acetylhexosaminidase，α-mannosidase，β-mannosidaseにより逐次消化した後，ＥＬＩＳＡ法にてMoAb との反応性の変化を比較検討し，MoAbのエピトープを推定した。その結果，MT-5のエピトープはbisecting-GlcNAcを含むマンノースコア構造（Gn-M-M（- Gn）-M-Gn）であり，MT-9のそれはfucose を含むβ-mannose，chitobiose（M-Gn-Gn-F）であると考えられた。

〔総　括〕

ヒトIgGから精製したピリジルアミノ化糖鎖を免疫原に用いる方法により，アスパラギン結合型糖鎖に対する二種類のMoAb を作製することに成功した。また種々のglycosidase消化したasialoglycophorinとの反応性をELISA，western blot法にて検討し，MoAbのエピトープはそれぞれbisecting-GlcNAc を含むマンノースコア構造およびfucose を含むβ-mannose，chitobioseと推定した。

論文審査の結果の要旨

細胞の癌化や癌の転移にともない糖脂質や糖タンパク質の糖鎖に異常が出現することはよく知られている。本研究は，ヒトIgGから2-アミノピリジンによる蛍光標識により精製したbisected N-acetylglucosamine構造を持つフコシル化2本鎖糖鎖を免疫原とすることにより，N-グリコシド型糖鎖に対する単クローン抗体を初めて作製することに成功した。さらにELISA法を用いての単クローン抗体のエピトープの推定も行い，今後あらゆる種類のN-グリコシド型糖鎖に対する単クローン抗体の作製を理論上可能にしたという点できわめて興味深いものである。学位論文に値する研究と考える。