

Preparation of Antiidiotypic Antibodies against Anti-DU-PAN-2 Monoclonal Antibody and its Clinical Application for the Serological diagnosis of Digestive Cancers

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8334

抗 DU-PAN-2 抗体に対する抗イデオタイプ抗体の開発と その血清学的癌診断法への応用

金沢大学がん研究所内科部 (主任: 澤武紀雄教授)

山 川 治

(平成4年2月27日受付)

抗イデオタイプ抗体には内部イメージと称される元の抗原エピトープに相同の構造を有しているものがあり、これを元の腫瘍抗原の代用として用い、各種の腫瘍免疫を誘導して癌治療に、あるいは腫瘍抗原に対する自己抗体の測定に応用する可能性が期待されている。本研究では癌関連糖鎖抗原の一種である DU-PAN-2 抗原に対するモノクローナル抗体を、ラットに免疫することによりポリクローナル抗イデオタイプ抗体、マウスに免疫しハイブリドーマ法にてモノクローナル抗イデオタイプ抗体を作製した。さらにそれらを用いた酵素抗体法 (enzyme immunoassay, EIA) を開発し、各種消化器癌患者血中の抗 DU-PAN-2 抗体価を測定し、その診断的意義を検討しようとした。作製した抗イデオタイプ抗体はいずれも免疫原の抗 DU-PAN-2 抗体と特異的に結合し、DU-PAN-2 抗原抗体反応を競合的に阻害することより、DU-PAN-2 抗原の内部イメージを有すると考えられた。そこで、その抗体を固相化した EIA にて、各種消化器疾患患者血清中の抗 DU-PAN-2 抗体価を測定した。カットオフ値を健常対照群の平均 + 2 × 標準偏差とすると、癌患者での陽性率はポリクローナル抗イデオタイプ抗体を用いた測定法、モノクローナル抗イデオタイプ抗体を用いた測定法でそれぞれ42% (42/101), 33% (36/108) であった。一方、良性疾患での偽陽性率はポリクローナル抗体法43%、モノクローナル抗体法21%と、後者で特異性は良好であった。癌患者血清における、DU-PAN-2 抗原値と抗体価との間に相関性は認められず、抗原陰性群中、ポリクローナル抗体法で43% (26/60)、モノクローナル抗体法で31% (20/64) に抗体価が陽性であった。胃、大腸の早期癌12例では、すべて抗原値陰性であったが、ポリクローナル抗体法で、33% (4/12) に抗体価陽性であった。さらに、ポリクローナル抗体を用いた、アフィニティークロマトグラフィーにより癌患者血清中より精製された抗 DU-PAN-2 抗体は免疫化学的分析により、IgG に一致して、モノクローナル抗イデオタイプ抗体と DU-PAN-2 抗原の双方に対し反応する抗体であることが確かめられた。以上より一部の消化器癌患者血中には癌関連糖鎖抗原 DU-PAN-2 に対する抗体の存在することが確認され、さらに、この抗体価測定法は血中抗原値陰性あるいは早期癌症例の診断にも有効な場合がかなりみられ、血清学的診断法として期待できると考えられた。

Key words 抗イデオタイプ抗体, モノクローナル抗体, DU-PAN-2, 消化器癌

ハイブリドーマ法の確立¹⁾により、抗原性の弱い癌関連糖鎖抗原に対しても特異性の高いモノクローナル抗体の作製が可能となった。それにより多くの糖鎖抗原が腫瘍マーカーとして臨床応用され、癌の血清学的診断法は大きく進歩した。しかし、腫瘍が小さいときや抗原が体液内に遊離しにくい場合は、血中には十分量の抗原を検出しえず、その有用性、とくに早期診断は大きな限界があると言わざるを得ない。一方、そのような場合でも癌患者の体内では癌関連抗原に対する免疫応答の一部として、それらに対する自己抗体が産生され、流血中にも検出されることが想定されるが、そのような抗体の検出には有力な方法がなかったため、癌抗原に対する血中自己抗体の測定の意義は不明のままである。

Jerne²⁾の提唱したイデオタイプネットワーク理論 (idiotype network theory) によれば、生体内での抗体分子 (antibody, Ab1) 中には、その超可変部位内に抗原性を持つ構造 (イデオ

タイプ) が存在し、この構造を認識する抗イデオタイプ抗体 (anti-idiotypic antibody, Ab2) を誘導しようとしてきている。また抗イデオタイプ抗体の一部のものは、その可変部位内に内部イメージ (internal image) と称される元の抗原エピトープに相同の構造を有している³⁻⁵⁾。最近このような癌関連抗原の内部イメージを有する抗イデオタイプ抗体を作製し、これを癌治療を目的とした免疫誘導に用いようという試みがいくつか報告されており、その有効性も指摘されている^{6,7)}。

DU-PAN-2 抗原は Metzgar ら⁸⁾によりヒト膵腺癌培養細胞 (HPAF-1) を免疫原として得られたモノクローナル抗体 DU-PAN-2 によって認識される糖蛋白であり、その抗原エピトープはシアル酸を有する糖鎖であるとされている⁹⁾が、未だその糖鎖構造は確立されていない。また膵癌を初めとした腺癌組織に高率に発現し¹⁰⁻¹²⁾、血中遊離抗原としても存在することから、有力な腫瘍マーカーとして臨床的にも用いられてい

Abbreviations: Ab1, antibody; Ab2, anti-idiotypic antibody; Ab3, anti-anti-idiotypic antibody; ABTS, 2,2-azino-di-(3-ethyl-benzoline-6-sulfonic acid); AFP, α -fetoprotein; BDB, bis-diazotized benzidine; BNHS, biotinyl-N-hydroxysuccinimide; BSA, bovine serum albumin; CEA, carcinoembryonic antigen; EIA, enzyme

る¹³⁾。しかし、免疫組織学的に検討した癌組織での発現率と、血中抗原の陽性率との間には隔たりがあり、血中抗原測定による診断能には、ほかの腫瘍マーカーと同様に早期診断に大きな限界がある。

そこで本研究では、抗 DU-PAN-2 抗体を同系マウスに免疫することによって、モノクローナル抗イディオタイプ抗体 (monoclonal anti-idiotypic antibody, Mono-Id) を、またラットに免疫することによってポリクローナル抗イディオタイプ抗体 (polyclonal anti-idiotypic antibody, Poly-Id) を作製した。これらの抗イディオタイプ抗体の性状を分析し、その可変部位に内部イメージの存在を明らかにしたうえで、これに反応する抗 DU-PAN-2 抗体を検出する酵素抗体法 (enzyme immunoassay, EIA) を開発し、各種消化器癌患者血清中に存在する一種の自己抗体である抗 DU-PAN-2 抗体価の測定を試み、その臨床的有用性を検討しようとした。

対象および方法

I. 用いた各種モノクローナル抗体と抗原

本研究において用いられたモノクローナル抗体 (Monoclonal antibody, MoAb) は全て BALB/c マウス脾細胞とマウスミエローマ細胞を細胞融合して作製されたものであり、MoAb DU-PAN-1 (IgG1), MoAb DU-PAN-2 (IgM), MoAb DU-PAN-3 (IgG1) (協和メデックス, 東京) は Metzgar ら⁶⁾により、ヒト膵腺癌培養細胞 HPAF-1 を免疫原として作製された。MoAb ST-439 (IgM) (日本化薬, 東京) は Hirohashi ら¹⁵⁾によってヒト胃癌培養細胞 St-4 を免疫原として作製された。また実験に用いた DU-PAN-2 抗原 (協和メデックス) は HPAF-1 細胞の培養上清より精製したものである⁹⁾。

II. ポリクローナル抗イディオタイプ抗体の作製

精製 MoAb DU-PAN-2 (IgM) 100 μg を Freund's complete adjuvant (Sigma, St. Louis, USA) とともにラット皮下に7日間隔で4回免疫し、最終免疫より10日目にラットより採血した。血清を分離した後、等量の正常 BALB/c マウス血清にて吸収操作を行ったうえで、protein A-Sepharose 4B (Pharmacia, Uppsala, Sweden) を用いたアフィニティークロマトグラフィーにて IgG 分画を精製した。

III. モノクローナル抗イディオタイプ抗体の作製

精製 MoAb DU-PAN-2 (IgM) を Primi らの報告した方法¹⁶⁾にしたがって *Salmonella typhi* 由来の lipopolysaccharide (LPS) W (Difco, Detroit, USA) と結合させ、モノクローナル抗体 20 μl 相当分を1週間間隔で計4回、初回は Freund's complete adjuvant (Sigma) と共に、2回目以降は Freund's incomplete adjuvant (Sigma) と共に BALB/c マウスの腹腔内に注射し、最終免疫より4日目にその脾細胞をマウスミエローマ細胞 Sp 2/0 と50%ポリエチレングリコール (polyethylene glycol, PEG) 1500 (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) を用いて融合させた。その後、hypoxanthine-aminopterin-thymidine (HAT) 培養液 (Flow laboratories, Mclean, USA) にて37℃、5% CO₂ インキュベーター内で培養し、得られたハイブリドーマの上清を用いて、DU-PAN-2 抗原と抗

DU-PAN-2 抗体との抗原抗体反応阻害活性を後にV項で述べる EIA にて測定し、特異的クローンの選択を行なった。ついで限界希釈法によるクローニングを繰り返してハイブリドーマを確立した。それぞれのハイブリドーマを BALB/c マウス腹腔内に注入し、増殖させ、得られた腹水を protein A-Sepharose 4B アフィニティークロマトグラフィーにて精製した。

またハイブリドーマの培養上清とウサギ抗マウス IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA, IgM (Zymed, San Francisco, USA) との反応性を EIA にて検討し、免疫グロブリンサブクラスを決定した。

IV. 抗イディオタイプ抗体の反応特異性

作製した抗イディオタイプ抗体が免疫原の抗 DU-PAN-2 抗体と特異的に反応することを確認するために、次に述べる EIA を用いて Poly-Id および Mono-Id と各種 MoAb との反応性を検討した。0.1M 炭酸重炭酸緩衝液 (pH 9.5) にて 20 μl/ml に希釈した抗イディオタイプ抗体を96穴マイクロタイタープレート (Coster, Cambridge, USA) に1ウエルあたり 100 μl ずつ注入し4℃、一夜インキュベーションし固相化した後、3%ウシアルブミン (bovine serum albumin, BSA) (Sigma) 加 0.1M リン酸緩衝塩化ナトリウム液 (phosphate buffered saline, PBS) (pH 7.4) にて30℃、3時間反応させ、ブロッキング操作を行なった。次に Guesdon らの報告した方法¹⁷⁾に従い biotinyl-N-hydroxysuccinimide (BNHS) (Pierce, Rockford, USA) を用いてビオチン標識した MoAb DU-PAN-1, DU-PAN-2, DU-PAN-3, ST439 と30℃、2時間反応後に、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン・ビオチン複合体 (Vector, Burlingame, USA) を反応させた。最後に0.02% 2,2-azino-di-(3-ethyl-benzoline-6-sulfonic acid) (ABTS) (和光純薬, 大阪) 加 0.1M クエン酸・リン酸緩衝液 (pH 5.3) と、等量の0.03%過酸化水素水を混じたものを発色基質として、ウエルに加え、マイクロプレートリーダー MTP-22 型 (コロナ電気, 茨城) を用いて 415nm における吸光度を測定した。

V. DU-PAN-2 抗原抗体反応阻止試験

1. ハイブリドーマスクリーニングのための DU-PAN-2 抗原抗体反応阻止試験

DU-PAN-2 抗原測定キット¹⁴⁾ (協和メデックス) 中の抗 DU-PAN-2 抗体を固相化した96穴マイクロタイタープレート各ウエルに、ハイブリドーマ培養上清 50 μl を注入し30℃、2時間反応させた。プレートを生理食塩水にて洗浄後、DU-PAN-2 抗原値が高値である癌患者血清を 100 μl ずつ各ウエルに加え30℃、2時間反応させた。続いて酵素標識抗体 100 μl を加え30℃、1時間反応させ、最後に発色剤にて発色させマイクロプレートリーダーにて 660nm での吸光度を測定した。

2. Poly-Id または Mono-Id の反応性の検討

精製 DU-PAN-2 抗原を、ポリスチレンビーズ (積水化学, 東京) に固相化し、3% BSA 加 PBS にて30℃、2時間ブロッキングを行なった。段階的に希釈した Poly-Id または Mono-Id 100 μl と、クロラミンT法¹⁸⁾にてヨード化した¹²⁵I 標識 DU-PAN-2 抗体 100 μl ずつを24穴反応トレイ (ダイナボット, 東京) の各ウエルに加え混和し30℃、1時間反応させた。その

immunoassay; ERCP, endoscopic retrograde cholangiopancreatography; HAT, hypoxanthine-aminopterin-thymidine; IC, immune complex; LAI, leukocyte adherence inhibition assay; LPS, lipopolysaccharide; MoAb, monoclonal antibody; Mono-Id, monoclonal anti-idiotypic antibody; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis;

後ビーズを各ウェルに加え、30℃、3時間反応させた。PBSにてビーズを洗浄後ガンマカウンター(アロカ、東京)にてビーズの放射活性を測定した。

VI. DU-PAN-2 抗原-Poly-Id 反応阻止試験

Poly-Id と Mono-Id の認識するエピトープの差を検討するために、抗 DU-PAN-2 抗体と Poly-Id との反応を Mono-Id がどの程度阻害するかを検索した。0.1M 炭酸・重炭酸緩衝液 (pH 9.5) にて 15 μg/ml に希釈した抗 DU-PAN-2 抗体を24穴反応トレイ上のポリスチレンビーズに固相化し、段階的に希釈した Poly-Id または3種の Mono-Id (1-2-4-4, 1-2-4-6, 1-2-4-7) を 100 μl づつ加えた。その後同様にヨード化した ¹²⁵I 標識 Poly-Id を 100 μl づつ各ウェルに加え反応させ、洗浄後、ビーズの放射活性を測定した。

VII. 抗イデオタイプ抗体を用いた血中 DU-PAN-2 抗体価の測定

対象は当科およびその関連施設において診断された各種消化器癌患者108例(膵癌29例, 胆道癌22例, 胃癌26例, 大腸癌12例, 肝細胞癌19例), 各種消化器良性疾患34例(肝硬変10例, 慢性肝炎13例, 慢性膵炎8例, 急性肝炎2例, 急性膵炎1例)および健常対照20例である。患者の皮下静脈より採血後、遠心にて血清を分離し-80℃にて保存した。膵癌および胆道癌では、手術ないし剖検により病理組織学的に確認されたのは、それぞれ4例と3例で、他は腹部超音波検査とコンピュータ断層撮影の所見を参考に、内視鏡的逆行性膵胆管造影(endoscopic retrograde cholangiopancreatography, ERCP)か経皮経肝胆管造影(percutaneous transhepatic cholangiography, PTC)の所見から診断された。胃および大腸癌はいずれも生検あるいは手

術により、組織学的に診断が確認された。肝細胞癌では3例が病理組織学的に確認され、残りは腹部超音波検査所見と血清αフェトプロテイン(α-fetoprotein, AFP)値を参考に、血管造影における特徴的所見の存在より診断された。

また良性肝疾患はいずれも各種血液生化学的検査に加え肝生検又は腹腔鏡により診断された。慢性膵炎はいずれも日本消化器病学会の臨床診断基準の1群に一致していた。

測定法は、被検血清を0.1M PBS (pH 7.4) にて50倍希釈した後、sepharose 4B (Pharmacia) に結合させた正常ヒト免疫グロブリン(ミドリ十字、東京)と一夜反応させ、その遠心上清50 μl を Poly-Id または Mono-Id を固相化した96穴マイクロタイプレートに添加後30℃、3時間反応させ、2次抗体としてペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒト IgG+A+M (Dako, Copenhagen, Denmark) を2000倍に希釈したものを50 μl 加えて、30℃、1時間反応させ、ABTS にて発色、415nm の吸光度を測定した。

また癌患者血清についてはサンドイッチ EIA 法¹⁰⁾(協和メデックス)にて DU-PAN-2 抗原値をも測定した。

VIII. DU-PAN-2 抗原を用いた血中抗 DU-PAN-2 抗体価の測定

前項にて測定した血清サンプルの一部において、精製 DU-PAN-2 抗原をクロラミンT法を用いてヨード化し、それを用いてのラジオイムノアッセイ (radioimmunoassay, RIA) にて血中抗 DU-PAN-2 抗体価を測定した。即ち PBS にて50倍希釈したサンプル血清 150 μl を protein A (Ucb bioproducts, Brussels, Belgium) を固相化したビーズに30℃、1時間反応させた後、さらに ¹²⁵I 標識 DU-PAN-2 抗原 (10⁸ cpm/ml) 50 μl

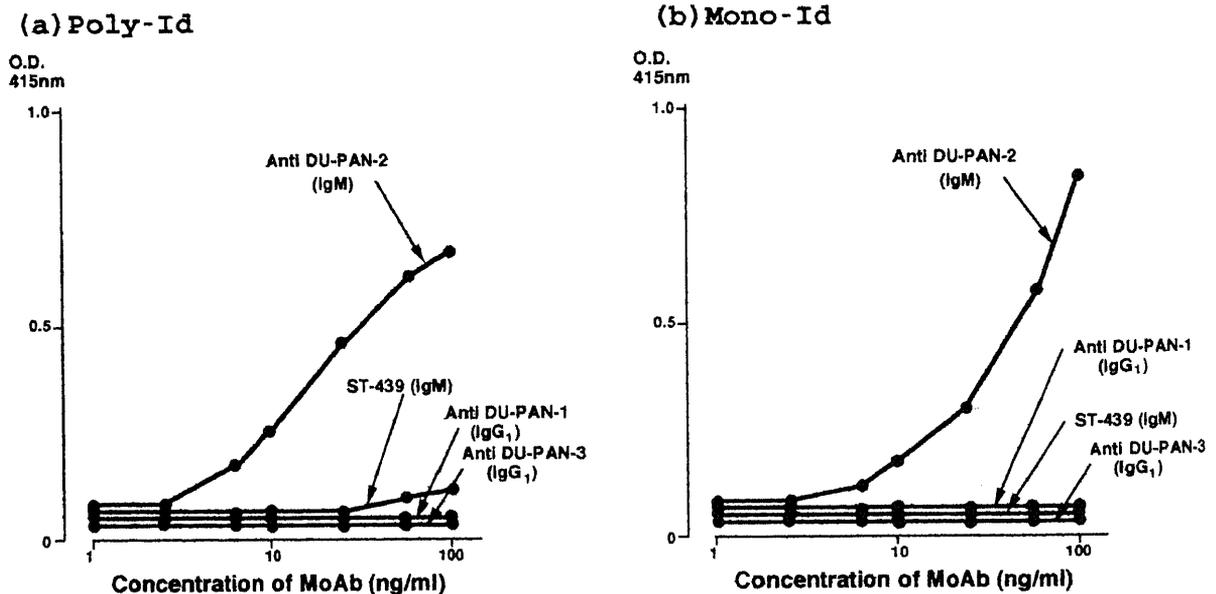


Fig. 1. Reactivity of anti-idiotypic antibodies with anti-DU-PAN-2 MoAb and other MoAbs. 100 μl of Poly-Id (a) or Mono-Id 1-2-4-4 (b) (15 μg/ml) was fixed on 96-well EIA plates. After blocking with 3% BSA solution, each plate was incubated with a serial dilution of biotinyl MoAb DU-PAN-1 (IgG₁), DU-PAN-2 (IgM), DU-PAN-3 (IgG₁) and ST439 (IgM) for 3 hrs at 30℃, reacted with avidin-peroxidase complex, and colored with a substrate solution containing ABTS and H₂O₂. Both Poly-Id and Mono-Id reacted only with MoAb DU-PAN-2 as an immunogen.

PBS, phosphate buffered saline; PEG, polyethylene glycol; Poly-Id, polyclonal anti-idiotypic antibody; PTC, percutaneous transhepatic cholangiography; PVDF, polyvinylidene difluoride; RIA, radioimmunoassay; SDS, sodium dodesyl sulfate

を加えて、30℃、2時間反応させ、洗浄後、ビーズの放射活性を測定した。

K. 患者血清からの抗 DU-PAN-2 抗体の精製

IIにて作製したラット Poly-Id 10mg を CNBr 活性化 sepharose 4B (Pharmacia) 2.5g に結合させ¹⁹⁾、カラム (BioRad, Richmond, USA) に充填した。DU-PAN-2 抗体原価、DU-PAN-2 抗体価がともに高値を示した患者血清 (M. H.) 0.5ml を、このカラムに吸着させ、0.1M Tris HCl (pH 3.0) にて溶出した。各分画についてサンドイッチ EIA により DU-PAN-2 抗原値、Poly-Id を用いた EIA と Mono-Id を用いた EIA により抗 DU-PAN-2 抗体価を測定した。

X. 患者血中抗 DU-PAN-2 抗体の分析

Kで用いたと同じ測定法にて DU-PAN-2 抗体価の高値を示した患者 (M. H.) の血清 0.5 ml をあらかじめ protein A-sepharose 4B カラムにて IgG に分画し、¹²⁵I にて標識後、Poly-Id カラムに吸着させ、0.1M Tris HCl (pH 3.0) にて溶出した。得られた分画を、2-メルカプトエタノール (2-mercaptoethanol) (和光純薬) にて還元状態とした後、スラブゲル電気泳動装置 KS-8000 SE 型 (マリソル産業、東京) を用いてゲル濃度10%のドデシル硫酸ナトリウム (sodium dodesyl sulfate, SDS)-ポリアクリルアミドスラブゲルにて 100V の定電圧下に電気泳動を行った。またマーカー蛋白として ¹²⁵I 標識ヒト IgG, ¹²⁵I 標識ラット IgG を同時に泳動し、泳動後のゲルにてオートラジオグラフィーを行った。

さらに1.2%アガロース A (Pharmacia) ゲルを用いたオクターロニー法にて上述の同じ分画とウサギ抗ヒト IgG 血清およびウサギ抗ラット IgG 血清との沈降線をオートラジオグラフィーにて検出した。またその際、対照として正常ラット IgG を用い、オートラジオグラフィー後のゲルを乾燥後、0.1% アミドブラック 10B (和光純薬) にて蛋白染色を行った。

また、上述と同様に患者 M. H. の血清より、Poly-Id カラムによるアフィニティークロマトグラフィーにて得られた吸着分

画を SDS-ポリアクリルアミドスラブゲルにて泳動した後、ゲルメンブラン転写装置 KS-8460 (マリソル) にて 6 V, 2時間泳動し、ポリ弗化ビニリデン (polyvinylidene difluoride, PVDF) 膜 (Milipore, Bedford, USA) に転写した。PVDF 膜を ¹²⁵I 標識 DU-PAN-2 抗原および ¹²⁵I 標識 Mono-Id と室温、4時間反応させ洗浄後オートラジオグラフィーにて反応を示すバンドを検出した。また転写元のゲルを0.1%アミドブラック 10B (和光純薬) にて染色し、転写位置を確認した。

X1. 統計学的処理

DU-PAN-2 抗原値については対数変換し、以下の検討を行った。平均値の差の検定は、Cochran-Cox test にて、陽性率の差の検定は Yates の補正を加えた χ^2 検定にて、また相関係数の検定は Fisher の r 表にて行ない、危険率 5%未満をもって有意差ありとした。

成 績

1. ポリクローナル抗イデオタイプ抗体の反応特異性

作製した Poly-Id が免疫原の抗 DU-PAN-2 抗体と特異的に反応することを確かめるために、DU-PAN-1, DU-PAN-2, DU-PAN-3, ST439 と Poly-Id の反応性を検討したところ、Poly-Id は抗 DU-PAN-2 抗体とのみ容量依存的に反応したが、他のモノクローナル抗体とは反応を示さなかった (図 1a)。

また、固相化した DU-PAN-2 抗原と抗 DU-PAN-2 抗体との反応に対する、阻害活性の検討では、Poly-Id は 100 μ g/ml 以上の濃度において容量依存的に抗原抗体反応を阻害したが、対照として用いた正常ラット IgG は阻害活性をもたなかった (図 2)。このことより、今回作製した Poly-Id のなかには、DU-PAN-2 抗原と DU-PAN-2 抗体との反応を阻害する、抗イ

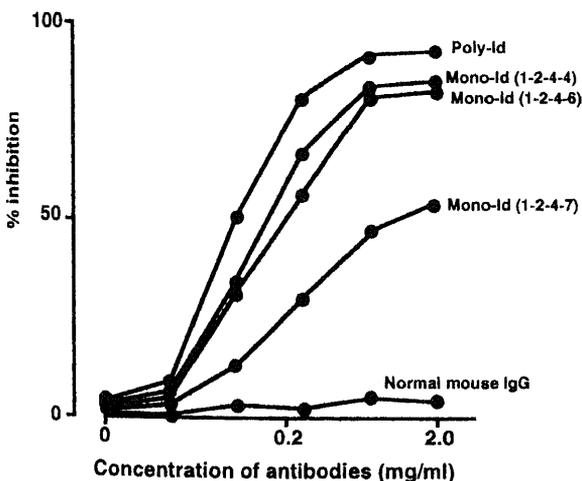


Fig. 2. Inhibition of DU-PAN-2 antigen-antibody reaction by anti-idiotypic antibodies. 100 μ l of ¹²⁵I-anti-DU-PAN-2 MoAb was incubated with 100 μ l of Poly-Id or Mono-Ids at various concentrations on a 24-well plate for 60 min at 30°C. Polystyrene beads coated with purified DU-PAN-2 antigen were put into each well and incubated for 3 hours at 30°C. After washing, radioactivities of the beads were counted in a gamma counter.

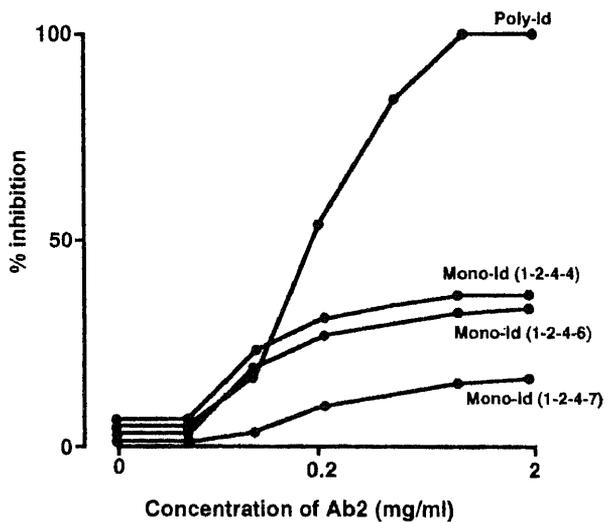


Fig. 3. Inhibition of the reaction between anti-DU-PAN-2 MoAb and ¹²⁵I-Poly-Id by Mono-Ids. Anti-DU-PAN-2 MoAb (15 μ l/ml) was fixed on polystyrene beads. The beads were incubated in a 24-well plate with 100 μ l of Poly-Id or Mono-Ids for 60 min at 30°C. Then 50 μ l of ¹²⁵I-Poly-Id was added to each well and incubated another 60 min. After washing, radioactivities of the beads were counted in a gamma counter. Poly-Id with concentrations higher than 0.2mg/ml strongly inhibited the reaction between DU-PAN-2 antigen and radiolabeled Poly-Id, whereas the inhibition rates of various Mono-Ids never exceeded 30%.

ディオタイプ抗体の含まれることが示された。

Ⅱ. モノクローナル抗イディオタイプ抗体の確立とその反応特異性の検討

マウス・ハイブリドーマ法により作製したハイブリドーマより、固相化抗 DU-PAN-2 抗体に対する結合性および、DU-PAN-2 抗原抗体反応阻止試験により 3 種のクローン (1-2-4-4, 1-2-4-6, 1-2-4-7) を選び出した。これらのクローンは EIA 法を用いた免疫グロブリン亜分画の検討ではいずれも IgG1 型であった。

得られた精製 Mono-Id の抗 DU-PAN-2 抗体と特異的に反応することを確認するために、Mono-Id としてクローン 1-2-4-4 を用いて各種 MoAb との反応を検討したところ、図 1b に示すごとく、免疫原である抗 DU-PAN-2 抗体とのみが容量依存的な反応を示したが、他のモノクローナル抗体とは反応を示さなかった。また他のクローン 1-2-4-6, 1-2-4-7 についても検討したが同等の結果であった。

DU-PAN-2 抗原と、抗 DU-PAN-2 抗体との抗原抗体反応に対する阻止効果の検討では、図 2 に示すごとく、3 種のクローンとも 100 μ g/ml 以上の濃度にて容量依存的な阻害活性を示した。

Ⅲ. ポリクローナル抗イディオタイプ抗体とモノクローナル抗イディオタイプ抗体の反応性の比較

Poly-Id と Mono-Id の認識するエピトープの差を知るために、抗 DU-PAN-2 抗体と Poly-Id との反応を Mono-Id がどの程度阻害しうるかを検討した。図 3 に示すように、固相化 DU-PAN-2 抗体への 125 I 標識 Poly-Id の結合は、Poly-Id をあら

かじめ反応させることにより、95%阻害されたが、Mono-Id 1-2-4-4, 1-2-4-6, 1-2-4-7 はそれぞれ30%, 28%, 13%の阻害活性を示すとどまった。したがって各 Mono-Id の認識する抗 DU-PAN-2 抗体上のエピトープは、ポリクローナル抗イディオタイプ抗体の認識する複数のエピトープの一部であると考えられた。

Ⅳ. ポリクローナル抗イディオタイプ抗体を用いた各種消化器疾患患者血清中抗 DU-PAN-2 抗体価の測定

図 4 は各種疾患患者と健常者血清中において抗 DU-PAN-2 抗体価を Poly-Id を用いた EIA にて測定した成績である。健常者 20 例の平均 + 2 \times 標準偏差に一致する O. D.=0.250 をカットオフ値とすると、膵癌で 50% (14/28)、胆道癌で 33% (6/18)、胃癌で 35% (9/26)、大腸癌で 50% (6/12)、肝細胞癌で 41% (7/17) であり癌患者全体では陽性率は 42% (42/101) と高率であった。一方、良性疾患では慢性膵炎で 29% (2/7)、慢性肝炎で 33% (4/12)、肝硬変で 67% (6/9) と偽陽性も多く、とくに肝硬変では高率にみられた。

Ⅴ. モノクローナル抗イディオタイプ抗体 (1-2-4-4) を用いた各種消化器疾患患者血清中抗 DU-PAN-2 抗体価の測定

図 5 は各種疾患患者と健常者血清中において抗 DU-PAN-2 抗体価を Mono-Id (1-2-4-4) を用いた EIA にて測定した成績である。健常者 20 例の平均 + 2 \times 標準偏差に一致する O. D.=0.300 をカットオフ値とすると、膵癌で 45% (13/29)、胆道癌で 23% (5/22)、胃癌で 19% (5/26)、大腸癌で 25% (3/12)、肝細胞癌で 53% (10/19) であり、癌患者全体での陽性率は 33% (36

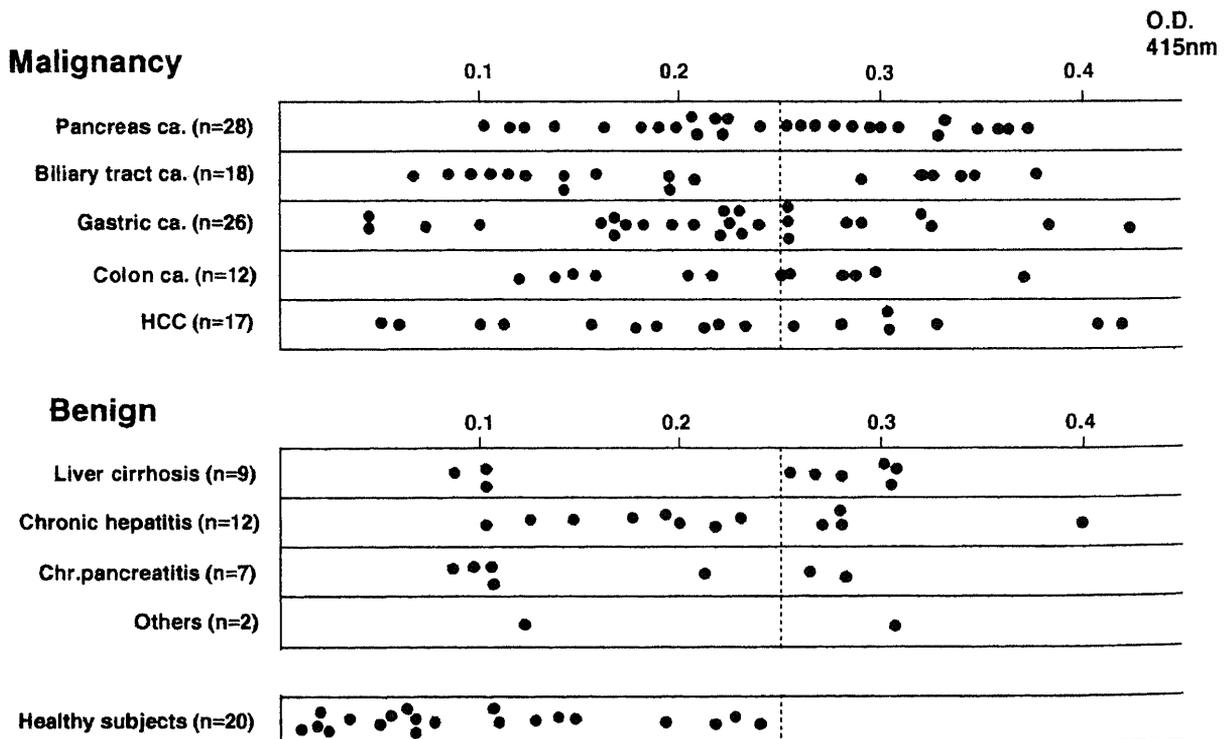


Fig. 4. Levels of anti-DU-PAN-2 antibody in sera of patients with various digestive diseases and healthy subjects detected by Poly-Id. 100 μ l of Poly-Id (15 μ g/ml) was fixed on a 96-well EIA plate and incubated with 50 μ l of 1:50 diluted test sera, which were previously treated with normal human IgG-Sepharose 4b conjugate. After incubation for 3 hours at 30°C, the samples were reacted with peroxidase labeled anti-human IgG+A+M, and colored with a substrate solution containing ABTS and H₂O₂. The dotted line shows the cut-off value (O. D.=0.250).

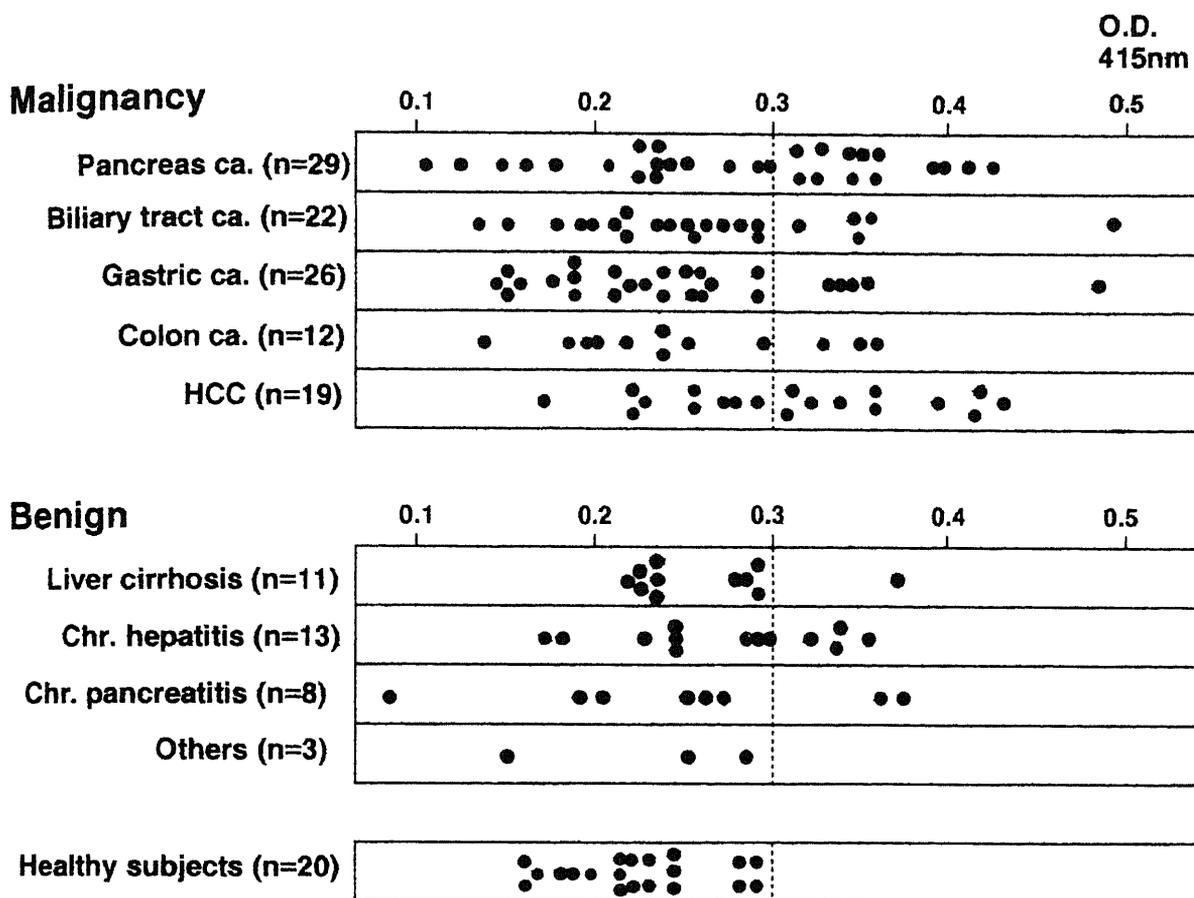


Fig. 5. Levels of anti-DU-PAN-2 antibody in sera of patients with various digestive diseases and healthy subjects detected by Mono-Id (1-2-4-4). The EIA method is the same as the EIA using Poly-Id. Dotted line shows cut-off value (O. D.=0.300).

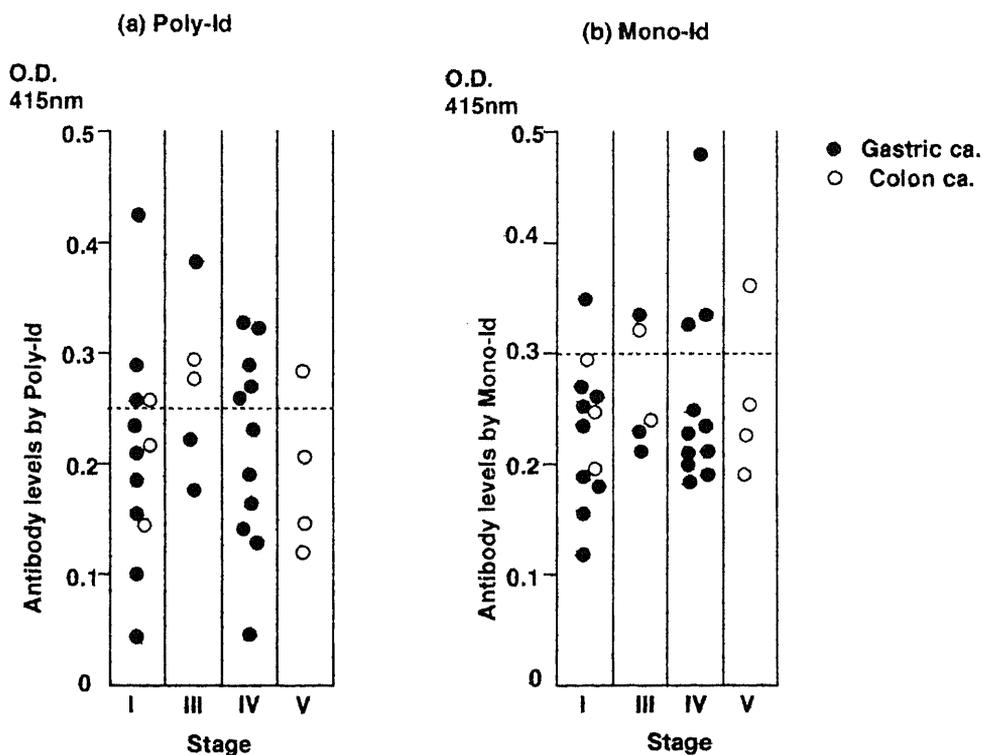


Fig. 6. Serum anti-DU-PAN-2 antibody levels in relation to the histological stages of gastric cancer and colorectal cancer. The dotted lines show the cut-off values of each method. ●; gastric cancer, ○; colorectal cancer.

108)であった。一方、良性疾患の偽陽性率は21%であり、慢性肝炎31% (4/13)、肝硬変9% (1/11)、慢性膵炎25% (2/8)に認められた。以上のようにポリクローナル抗体を用いた方法に比して、癌における陽性率も、良性疾患における偽陽性率も共に低率で、癌特異性は比較的良好であった。

Ⅵ. 癌の進行度と血中抗 DU-PAN-2 抗体価との関係

進行度 (stage) 分類の明らかな胃癌23例と、大腸癌9例について、進行度別に血中抗 DU-PAN-2 抗体価を検討した (図6)。血中抗 DU-PAN-2 抗体価は、Poly-Id 法ではⅠ期で33% (4/12)、Ⅲ期で60% (3/5)、Ⅳ~Ⅴ期で40% (6/15)であり、

Mono-Id 法ではⅠ期で8% (1/12)、Ⅲ期で40% (2/5)、Ⅳ~Ⅴ期で27% (4/15)とⅠ期に比してⅢ期以上での陽性率が高率であった。しかし、早期癌であるⅠ期例においても、Poly-Id 法では、比較的高い陽性率が得られた。

Ⅶ. 測定系にポリクローナル抗イデオタイプ抗体と、モノクローナル抗イデオタイプ抗体を用いた場合での抗 DU-PAN-2 抗体価測定成績の比較

Poly-Id を用いた測定系と Mono-Id を用いた測定系で同時に測定した癌患者血清の抗体価を比較検討した (図7)。両者間に有意の相関性が認められ ($r=0.24$, $p<0.05$)、Poly-Id 法、

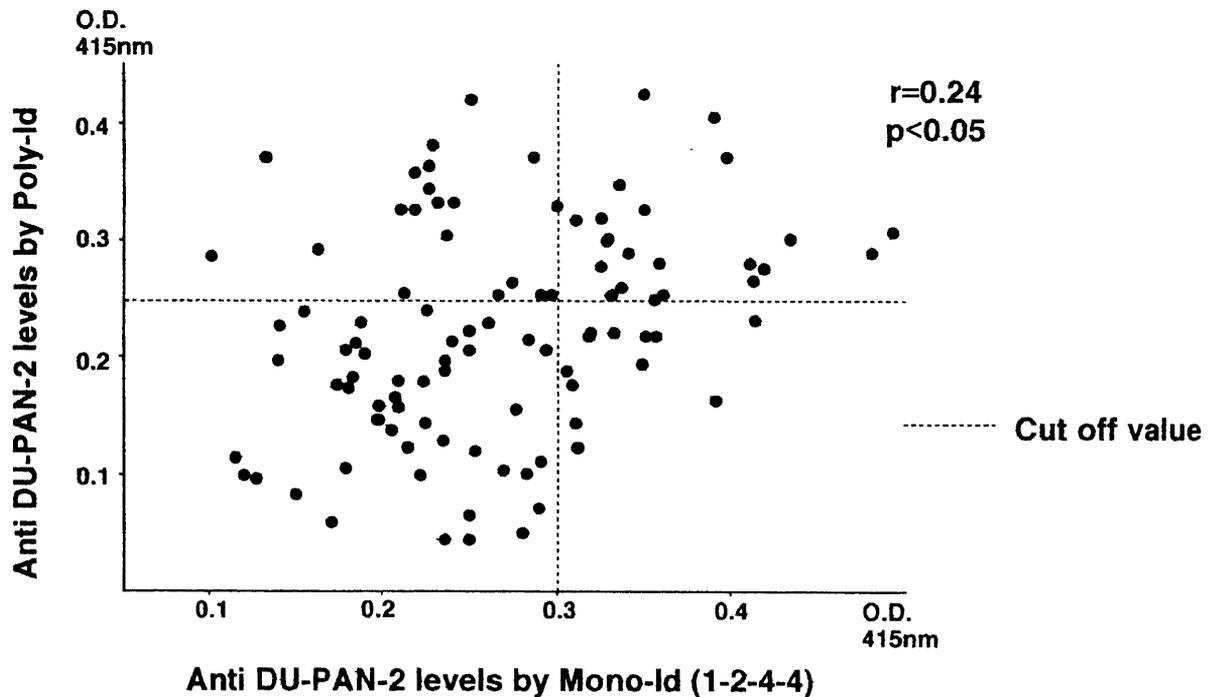


Fig. 7. Correlation of anti-DU-PAN-2 antibody levels in sera of cancer patients determined by two methods. Dotted lines show cut-off values of each method.

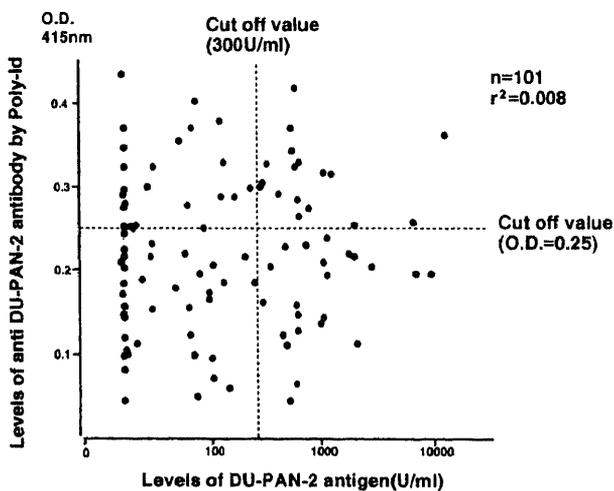


Fig. 8. Correlation between levels of DU-PAN-2 antigen and levels of anti-DU-PAN-2 antibody determined by Poly-Id in sera of cancer patients. DU-PAN-2 antigen was measured by sandwich EIA.

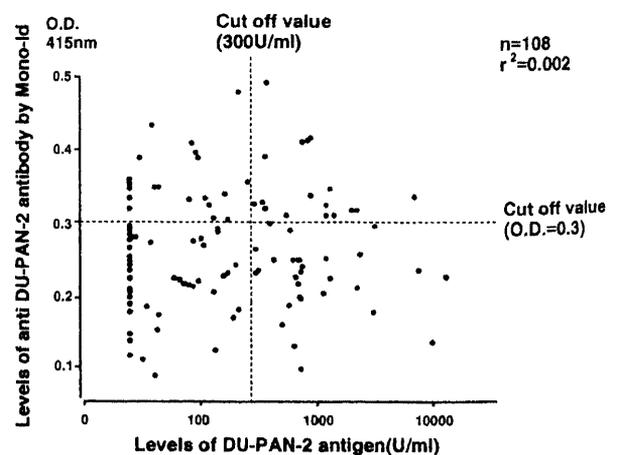


Fig. 9. Correlation between levels of DU-PAN-2 antigen and levels of anti-DU-PAN-2 antibody determined by Mono-Id in sera of cancer patients.

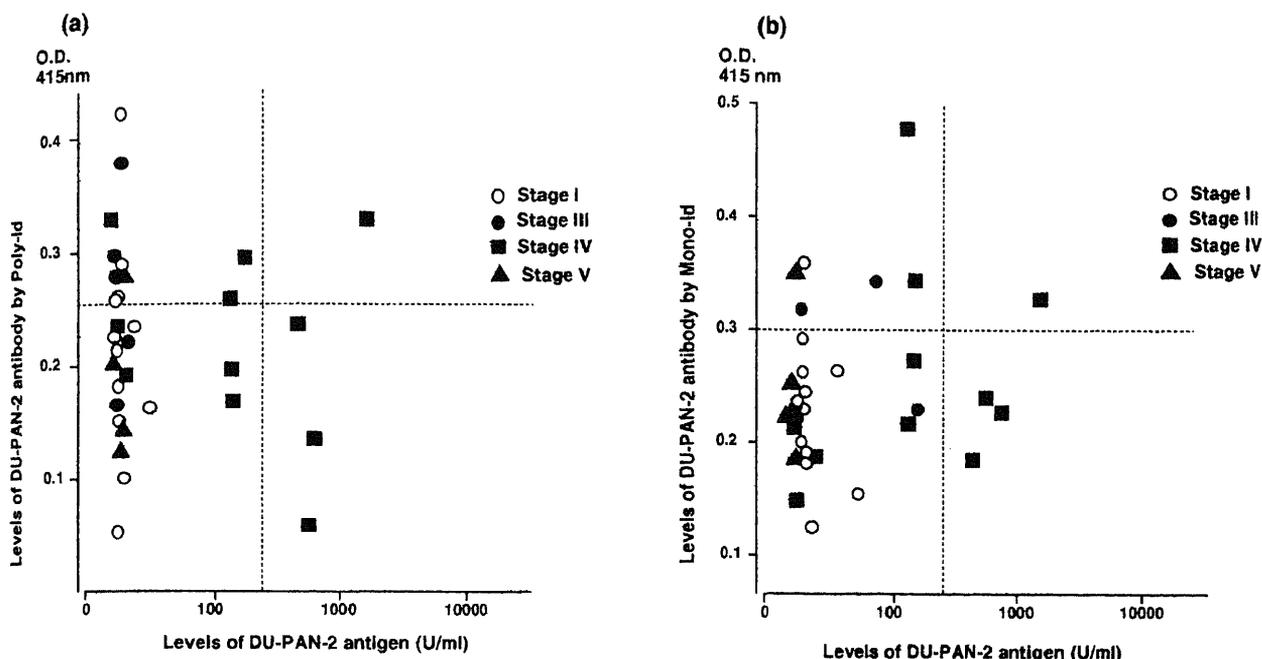


Fig.10. Correlation between levels of DU-PAN-2 antigen and levels of anti-DU-PAN-2 antibody determined by anti-idiotypic antibody (a; Poly-Id, b; Mono-Id) in sera of patients with gastric cancer or colorectal cancer of various histopathological stages. ○, stage I; ●, stage III; ■, stage IV; ▲, stage V.

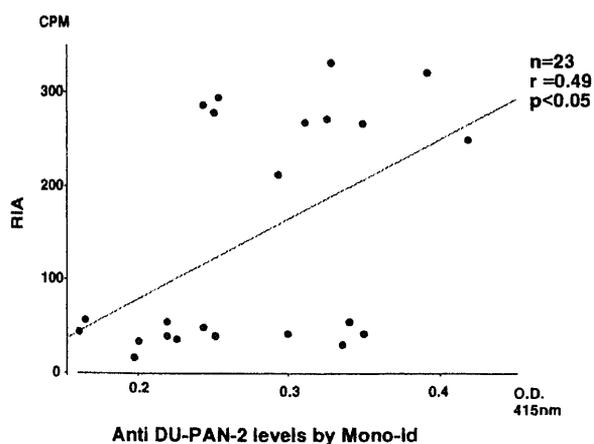


Fig.11. Correlation of anti-DU-PAN-2 antibody levels in patient sera determined by two methods with Mono-Id and ¹²⁵I labeled DU-PAN-2 antigen. Protein A (15 μg/ml) was fixed on polystyrene beads. 150 μl of 1:50 diluted test sera was incubated with the beads for 60 min at 30°C. Then 50 μl of ¹²⁵I-DU-PAN-2 antigen was added to each well and incubated another 2 hours. After washing, radioactivities of the beads were counted in a gamma counter.

Mono-Id 法両者陽性は22例 (22%), 両者陰性は46例 (46%) にみられたが、両者の陰陽性が解離したものは、Poly-Id 法陽性、Mono-Id 法陰性が21例 (21%) であるのに対し、その逆の場合が12例 (12%) に認められ前者の場合の方が多くみられた。

Ⅶ. 血清中の DU-PAN-2 抗原と抗 DU-PAN-2 抗体価との関連性

癌患者血清について同一検体で測定した DU-PAN-2 抗原値

と抗体価の関連性を検討した。DU-PAN-2 抗原値のカットオフ値を 300U/ml とすると癌患者全体での陽性率は42%であった。Poly-Id を用いて測定した抗体価と抗原値との関係を図 8 に、Mono-Id (1-2-4-4) を用いて測定した抗体価と抗原値との関係を図 9 にしめす。いずれの場合にも抗原値と抗体価の間に相関性は見られず、抗原が陰性であっても抗体が陽性である例が、Poly-Id 法で26% (26/101), Mono-Id 法で19% (20/108) と少なからず見られた。一方抗原が陽性であっても抗体陰性である例が、それぞれ22% (22/101), 26% (28/108) に存在した。

V 項と同じく、胃、大腸癌32例において、進行度別に DU-PAN-2 抗原値と抗体価の関係を検討した (図10)。抗原陽性例は32例中 4例 (13%) で、いずれもⅣ期であり、そのうち3例が抗原のみが陽性であった。一方、抗体のみ陽性例は Poly-Id を用いた測定法で34% (11/32) に認められ、その中にはⅠ期の症例が4例含まれていた。また Mono-Id を用いた場合には、19% (6/32) が抗体のみ陽性であり、うちⅠ期が、1例含まれていた。

Ⅷ. DU-PAN-2 抗原を用いた血中抗 DU-PAN-2 抗体価の測定

癌患者血清23例につき、精製 DU-PAN-2 抗原に直接結合する抗体の検出を目的とした RIA にて抗体価を測定した。この方法により得られた抗体価と、Mono-Id を用いた EIA で測定された抗体価との関係を図11にしめす。両者間には有意の相関性 (r=0.49, p<0.05) がみられたが、この RIA 法にて測定された抗体価が 100cpm 以下と低値であっても、Mono-Id による EIA 法で陽性であるサンプルが、17% (4/23) にみられた。

Ⅸ. 血清中における DU-PAN-2 抗原と抗体の存在様式の検討

用いた EIA 法にて、DU-PAN-2 抗原抗体複合体が検出されるか否かを検討するために、ポリクローナル抗イディオタイ

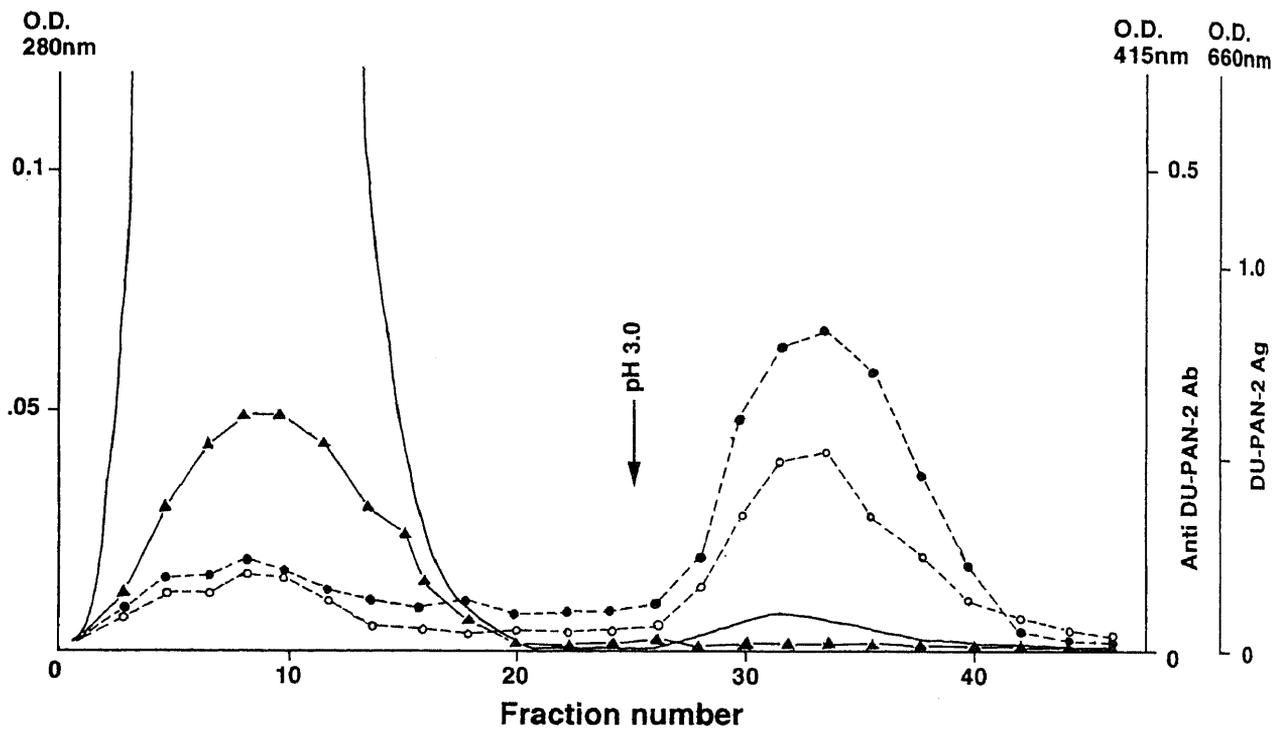


Fig.12. An affinity chromatographic pattern in the purification of anti-DU-PAN-2 antibody from serum of a patient with pancreatic cancer. The column was loaded with 0.5ml of serum of a patient with pancreatic cancer (M. H.) and eluted with 0.1M Tris-HCl (pH 3.0) and 2ml fractions were collected. In all fractions, DU-PAN-2 antigen and anti-DU-PAN-2 antibody were measured by enzyme immunoassay. —, protein concentration; ▲—▲, levels of DU-PAN-2 antigen; ●—●, levels of anti-DU-PAN-2 antibody by Poly-Id; ○—○, levels of anti-DU-PAN-2 antibody by Mono-Id.

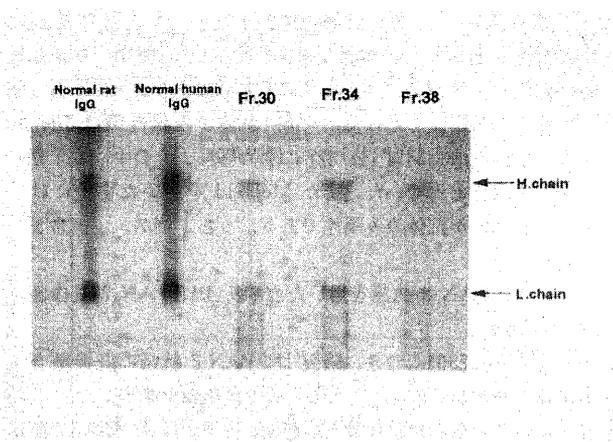


Fig.13. Detection of anti-DU-PAN-2 antibody from serum of a pancreas cancer patient. Human anti-DU-PAN-2 antibody was purified by Poly-Id affinity chromatography from the radiolabeled IgG fraction of serum of a pancreas cancer patient (M. H.). After reduction and heating in SDS, three eluted fractions were run on SDS-PAGE and subjected to autoradiography. Radiolabeled normal human IgG and normal rat IgG were treated in the same manner as the standard proteins. Purified fraction contains radioactive human H and L chains.

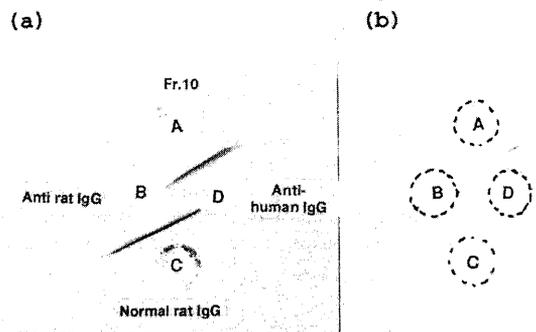


Fig.14. Ouchterlony assay (a) of purified human anti-DU-PAN-2 antibody and antisera, and its autoradiography (b). Well A, radiolabeled anti-DU-PAN-2 antibody purified from the serum of a pancreas cancer patient; B, anti-rat IgG antisera; C, normal rat IgG; D, anti-human IgG anti sera. Radioactivity was detected only in the precipitation line between wells A and D.

抗体を sepharose4B に結合させたアフィニティークロマトグラフィーにて、膵癌患者 M. H. の血清 0.5ml より、抗 DU-PAN-2 抗体を精製した (図12). 各分画にて、Poly-Id および Mono-Id (1-2-4-4) を用いて測定した抗 DU-PAN-2 抗体価の推移をみると、吸着後、0.1M Tris HCl (pH 3.0) にて溶出された分画では Poly-Id, Mono-Id 双方に対して反応を示した. 一方、DU-PAN-2 抗原は素通り分画のみに検出された. 以上より、素通り分画には DU-PAN-2 抗原抗体複合物の存在する可能性は考慮されたが、抗イディオタイプ抗体に対して DU-PAN-2 抗原抗体複合物は反応しないものと考えられた.

X1. 患者血中抗 DU-PAN-2 抗体の分析

患者 M. H. 血清の protein A 吸着分画を ^{125}I にて標識し、Poly-Id カラムに吸着させ溶出した分画は、2-メルカプトエタノールによる還元状態で、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (polyacryl-amide gel electrophoresis, PAGE) にて泳動すると、オートラジオグラフィーにて検出される放射活性バンドは、対照として用いたヒト IgG の H 鎖および L 鎖の位置に一致していた (図13).

また同分画を、オクタロニー法により、ウサギ抗ヒト IgG 抗血清とウサギ抗ラット IgG 抗血清との反応を検討したところ、オートラジオグラフィーにて検出された同分画のもつ放射活性は、ウサギ抗ラット IgG 血清とは反応せず、ウサギ抗ヒト IgG 抗血清との沈降線に一致してみられた (図14). このことより抗イディオタイプ抗体に対して、患者血清中の IgG の一部が反応していることが示された.

さらに、この患者血清より精製した IgG 分画より、Poly-Id

カラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーにて得られた吸着分画を、SDS-PAGE にて泳動後、PVDF 膜に転写し、ウエスタンブロッティングを行なうと、この分画は、 ^{125}I 標識 DU-PAN-2 抗原、ならびに ^{125}I 標識 Mono-Id とのいずれとも反応を示した (図15). このことより、今回の EIA にて検出される抗 DU-PAN-2 抗体は、DU-PAN-2 抗原にも反応することが示され、また患者血中に、そのような抗体の存在することが証明された.

考 察

癌組織には、種々の癌関連抗原と称される抗原が多数発現しており、それらのうち血中に遊離し得るものは、血清腫瘍マーカーとして以前から臨床応用されている²⁰⁻²². しかし、腫瘍の産生する抗原を直接測定しようとする方法では、元来微量の腫瘍抗原が大きなプールを有する血液の中で希釈されるため、腫瘍がある程度の大きさにならないと血中測定値は上昇せず、癌の早期診断に結び付き難い. さらに、癌特異性が高くても結中に遊離しにくい、あるいは遊離しない抗原では血清腫瘍マーカーとして応用することは不可能である. 一方、担癌生体では癌の早期から免疫応答の起こることが想定されているがこのような反応を検出しようとして、従来白血球固着阻止試験 (leukocyte adherence inhibition assay, LAI) などの細胞性免疫反応を応用した方法^{23,24} が検討されてきた. このような方法による検出率は、一般には癌の進行度とは無関係で、免疫能の低下した末期では陽性率はむしろ低下する傾向さえみられ、早期癌での陽性率は進行癌のそれに劣らないという成績も報告されている²⁵. しかし、感作抗原の標準化、再現性、多量の血液サンプルを要する、などにおいて大きな隘路があり、実用化はなされていない. また、免疫応答として腫瘍抗原に感作されたリンパ球の産生する血中自己抗体を検出しようとする試みも幾つかみられるが²⁵⁻²⁷、臨床的有用性を評価できるものは殆どない. その理由として、微量にしか存在しない抗原の精製が難しく、自己抗体に対する鋭敏で安定した測定系の確立が困難であったことなどがあげられる.

ところで Jerne² のイディオタイプネットワーク理論に基づいて、Kunkel ら²⁸ を初めとし、幾人かの研究者^{29,30} は、抗体の超可変部位が、抗原性を有し、抗イディオタイプ抗体を誘導しえることを示している. それらによると、一部の抗イディオタイプ抗体の超可変部位には、内部イメージ (internal image) と称される抗原エピトープと相同の構造が発現し得るとされている. ことに近年、ハイブリドーマ法にて、モノクローナル抗イディオタイプ抗体の作製が可能となり、内部イメージのみをもつ抗体を大量に得ることも可能になった. この均質性に優れたイディオタイプ抗体を、抗原の代用としてワクチン療法的に用いて、各種の腫瘍免疫を誘導しようとする基礎的研究³¹ は活発に行なわれつつあり、一部には臨床的な癌治療への応用³² も試みられている.

筆者はこのような抗イディオタイプ抗体の特性を考慮して、EIA の固相化抗原に癌関連抗原の内部イメージを有する抗イディオタイプ抗体を用いることにより抗 DU-PAN-2 抗体価測定法を立案した. まずラットにてポリクローナル抗イディオタイプ抗体を、つづいて同系マウスにてモノクローナル抗イディオタイプ抗体を作製し、図1および図2に示すように、いずれも免疫原の抗 DU-PAN-2 抗体とのみ強く反応し、かつ

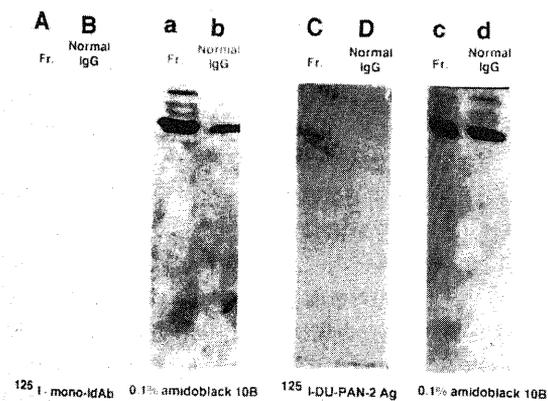


Fig.15. Western blotting analysis of the binding of DU-PAN-2 antigen and Mono-Id to purified human anti-DU-PAN-2 antibody. Anti-DU-PAN-2 antibody was purified from the serum of a pancreas cancer patient (M. H.) Purified human anti-DU-PAN-2 antibody (lanes a and c) and normal human IgG (lanes b and d) were run on SDS-PAGE, and transferred to PVDF membrane. Proteins on lanes a, b, c and d were transferred to lanes A, B, C and D, respectively. Lanes A and B were reacted with ^{125}I -labeled Mono-Id, and Lanes C and D were reacted with ^{125}I -labeled DU-PAN-2 antigen. Membranes were washed and subjected to autoradiography. Lanes a, b, c and d were stained with 0.1% amidoblack 10B. Purified human anti-DU-PAN-2 antibody reacted with both DU-PAN-2 antigen and Mono-Id, whereas normal human IgG failed to react.

DU-PAN-2 抗原抗体反応を容量依存的に阻害することを確認した。このことより、得られた抗イディオタイプ抗体は抗 DU-PAN-2 抗体の抗原結合部位を認識する、つまり内部イメージと呼ばれる DU-PAN-2 抗原のエピトープと相同な構造を有する特異的な抗体であると考えられる。このような同系マウスにてモノクローナル抗イディオタイプ抗体を作製した報告はこれまでにいくつかみられており^{36,37)}、また、Leger ら³²⁾は、ラットを用いて同種抗イディオタイプ抗体の作製に成功している。これらの実験結果は、同種内では原則的に抗原性をもたないとされる血清蛋白の一部である Ab1 を同種動物に免疫して抗イディオタイプ抗体 (Ab2) を作製することは可能であることを示しており、さらに、単一個体内で、同種の免疫グロブリン分子どうしが抗原抗体関係をもち得るというイディオタイプネットワーク理論の裏付けともなっている。筆者の実験においても、ラットおよび同系マウスで内部イメージを有する抗イディオタイプ抗体の作製に成功しており、従来の研究報告と一致しているといえる。

Diakun ら³³⁾は、構造の明らかな糖鎖を免疫原として用いて、ウサギで Ab1, Ab2, さらに抗抗イディオタイプ抗体 (anti-anti-idiotypic antibody, Ab3) を作製し、お互いの反応性を検討した結果、抗原と Ab2 との相同性は高く、わずかの糖鎖構造の変化にても反応性が失われるとしている。本研究で対象として用いた DU-PAN-2 抗原は、発見者の Metzger ら⁸⁾によればシアル化糖鎖抗原であることが明らかにされているが、抗原エピトープの糖鎖構造は確立されていない。しかし、抗体可変部位のアミノ酸構造で、糖鎖の立体構造を再現することは可能であるといわれており⁸⁾、筆者の実験結果からも上述したように得られた抗イディオタイプ抗体は DU-PAN-2 抗原の構造を再現していると思われ、抗 DU-PAN-2 抗体検出のための EIA における固相化抗原として用いることは十分可能であると考えられた。また、DU-PAN-2 抗原に対して、このような内部イメージを有する抗イディオタイプ抗体を確立したのは本研究が初めてである。

本研究のように癌患者の流血中に腫瘍抗原に感作されたリンパ球の産生する特異な自己抗体を測定しようとする試みは未だ少ないが、Gold²⁵⁾の Bis-diazotized benzidine (BDB) 凝集法による、carcinoembryonic antigen (CEA) に対する自己抗体の検出を初めてとして、von Kleist ら²⁶⁾の大腸癌患者血中の抗腸管組織抗体に関する報告や、川原田ら²⁷⁾の各種悪性腫瘍患者血中の抗 α 組織抗原抗体についての報告などがあげられる。しかしいずれの報告も抗体価の定量化がなされておらず、検討例数も少ないことなどより、腫瘍マーカーとしての有用性を論ずるまでには至っていない。

抗イディオタイプ抗体を利用した血中自己抗体の測定としては、自己免疫疾患である全身性エリテマトーデス患者で検討された成績³¹⁾と、悪性腫瘍の患者で腫瘍抗原の内部イメージをもつイディオタイプ抗体を応用した2つの報告^{35,38)}をみるにすぎない。山本³⁵⁾は、アシアロ型の糖鎖抗原である YH206 に対する、抗 YH206 抗体を用いて、ポリクローナルおよびモノクローナル抗イディオタイプ抗体の開発に成功し、各々を用いて作製した EIA により、癌患者血中の抗 YH206 抗体価について検討している。それによると抗 YH206 抗体は、健常対照ですべて陰性であり、癌患者では Poly-Id 法で34例中13例 (38%)、Mono-Id 法で34例中11例 (32%) に陽性である。また、良性疾患

では、Poly-Id 法のみでの検討で、例数は少ないものの、カットオフ値を越えるものはなかったと報告している。筆者の抗 DU-PAN-2 抗体の成績では、健常対照で抗体価は低値でありカットオフ値を越えるものはなく、癌患者では Poly-Id 法で42%、Mono-Id 法で33%が陽性であったが、良性疾患では Poly-Id 法で43%、Mono-Id 法で21%と、前述の報告と異なり、良性肝疾患を中心として偽陽性の高いという結果が得られた。

また抗 YH206 抗体に関する検討では、Poly-Id と Mono-Id を用いて測定した抗体価は高度な相関性 ($r=0.80$, $p<0.01$) を示したとされている。これに対して、筆者の抗 DU-PAN-2 抗体価の測定では図6示すごとく、Poly-Id と Mono-Id を用いて測定した抗体価には有意な相関性はみられるものの、抗 YH206 においてみられたような高い相関性はみられず、かなりばらつく傾向がみられた。さらに原田ら³⁶⁾はヒトメラノーマの糖脂質画分と反応するヒト型モノクローナル抗体 (11-50) に対する3種の特異的モノクローナル抗イディオタイプ抗体を用いて抗 11-50 抗原抗体価の検討を行なったところ、捕獲抗体として用いる抗イディオタイプ抗体によって抗体価がかなり異なり、お互いに相関のない測定結果が得られたと報告している。このように用いる抗イディオタイプ抗体の種類により抗体価がかなり異なるようであり、このような差異がどのような臨床病態的意義を反映するかは、興味深い課題であると思われる。さらに特定のイディオタイプを有する抗体が特異的にある種の疾病や病態を鋭敏に反映することも考慮され、今後、このような可能性を念頭におき、得られた Mono-Id 抗体の反応性を検討していくことも必要であると思われる。

Poly-Id 法では、サンプル血清に対しても十分な吸収操作を行ない、非特異的抗体を除去したが、良性疾患群に於ても比較的高率に偽陽性がみられた。これは良性疾患、とくに肝疾患で高率に DU-PAN-2 抗原が発現しており¹⁴⁾、それに対する抗体が、より感度の高い Poly-Id 法で検出されたとも考えられるが、Poly-Id のなかには多種の抗イディオタイプ抗体が含まれるために、抗 DU-PAN-2 抗体以外の交差反応性を有する抗体による可能性も考慮される。これに対して Mono-Id クローン 1-2-4-4 を用いた場合の偽陽性率は Poly-Id を用いた場合に比して $1/2$ 以下と良好であった。今後 Poly-Id を1次抗体に、Mono-Id を2次抗体に用いるサンドイッチアッセイなどを開発すれば、より優れた測定系の開発が期待できるかもしれない。

DU-PAN-2 抗原は、既知の血液型物質や種々の腫瘍マーカーとは免疫学的交差反応性を示さない⁸⁾ 特異な抗原であることより、固相化 Protein A に患者血清より免疫グロブリンを吸着させ抗体の比活性を高め、その ¹²⁵I 標識 DU-PAN-2 抗原捕獲能を測定するという RIA でも抗 DU-PAN-2 抗体価の測定を行ったところ、図11でみられるように Mono-Id を用いた EIA で測定した抗体価と相関性を示した。しかし、Mono-Id を用いた EIA で高値であったが、この RIA で低値を示した例もかなり存在した。これは筆者の用いた RIA では Protein A に吸着する抗体のみを捕獲しているために、Protein A への親和性の低い免疫グロブリン分画、とくに IgM 型抗 DU-PAN-2 抗体を多く含むサンプルでは、低反応となった可能性が考えられる。いずれにしても DU-PAN-2 抗原を用いて、直接血中の抗体価を測定しうることを示した点で大いに注目されよう。

Poly-Id 法、Mono-Id 法のいずれによっても血中抗 DU-PAN-2 抗体価は膀胱癌と肝細胞癌で比較的高い陽性率がみられ

た。また従来報告されている血中 DU-PAN-2 抗原値の成績をみても¹⁰⁾、膵癌患者でもっとも高い陽性率が報告されており、さらに組織レベルでの発現においても膵癌組織で90~100%^{10)~12)}と、胃癌の50%や大腸癌の46%などに比して、膵癌で著しく高率である。このように元来本抗原は膵癌で強く発現する頻度が高く、膵癌患者で本抗原に対して免疫応答の起きる場合の多いことを反映して、血中抗体価の陽性率も高くなるのかもしれない。一方、図8、9に示すように癌患者において、抗原値と抗体価の間には相関は認められず、血中抗原値が低値であっても抗体価が高値を示した症例が Poly-Id 法で29%、Mono-Id 法で19%にみられた。これらの症例に於ては、組織での DU-PAN-2 抗原の発現が軽度で、血中への抗原の遊離が少ないが、本抗原に対しては免疫応答が強く起こり、抗体産生が活発になり、血中抗体価も上昇していると解釈することも可能であろう。このように血中抗原がカットオフ値以下であるため、抗原を測定しても陰性と判定されるが、抗体価が高ければ間接的に抗原の存在を推定しえる。

このような抗体価測定の特長がもっとも期待されるのは、免疫応答は腫瘍が小さくても強く惹起されることから早期癌の診断の場合であろう。そこで、臨床的に早期癌症例が得られやすく、進行度の判定も比較的容易な胃、大腸癌での進行度と抗 DU-PAN-2 抗体価の関係を検討したところ、I期に比してIII期以上で陽性率が高率であったが、Poly-Id 法では、早期癌の12例中4例(33%)で抗体価が陽性を示した。胃癌や大腸癌の組織レベルでの DU-PAN-2 抗原の発現率は高々50%であることを考慮すれば、I期における抗体価の33%という陽性率はかなり注目される。さらに進行度別の DU-PAN-2 の抗原値と抗体価との関係(図10)をみると、抗原値のみの陽性例は8%(3/32)で、いずれもIV期以上であった。一方、抗体価のみ陽性例は Poly-Id 法で34%(11/32)、Mono-Id 法で19%(6/32)と抗体価のみの陽性例が明らかに多く、しかも、I期で抗原陽性例はみられなかったのに対し、抗体陽性例は Poly-Id 法で4例、Mono-Id 法で1例に認められたことから、早期癌診断での血中抗 DU-PAN-2 抗体価測定の有効性の高いことが窺えよう。また、先述したように、胃、大腸癌組織での本抗原の発現は高々50%位であるのに対して、早期癌の診断がもっとも難しいと言われている膵癌組織では前述のごとく本抗原は90%以上に発現しているが、血中では抗原値陽性は60%前後にしか得られない現状を考えれば、膵癌診断においての本抗体価測定に今後大きな期待が寄せられる。

近年、抗原特異的 (antigen specific) な癌関連抗原の血中免疫複合体 (immune complex, IC) の検出について、Kapsopoulou-Dominos ら³⁷⁾ は CEA 高値を示す癌患者の血清の分析より、CEA の IC が遊離状態の CEA とは異なった分画に出現することを示し、血中 IC の存在を示唆した。その後、CEA の IC 測定に成功した Staab ら³⁸⁾ の、あるいはヒトメラノーマ細胞由来の糖蛋白抗原の IC の検出法を開発した Wong ら³⁹⁾ の癌患者血清における IC を測定した報告では、いずれも予後、再発など術後のモニタリングとしての有用性が強調されているが、早期診断を目指した癌の存在診断における有用性については言及されていない。筆者の測定したサンプル血清のなかにも、図8、9に示すように DU-PAN-2 抗原値と DU-PAN-2 抗体価の双方が高値を示す例がかなり認められ、それらの血清中には免疫複合体の存在している可能性がある。そこで Poly-Id のカラムを

用いて、そのような血清のアフィニティークロマトグラフィーを行ったところ、図12に示すように溶出分画中には DU-PAN-2 抗原は検出せず、そのほとんどが素通り分画中に存在した。このことより本研究において開発した抗体測定系では、抗原に結合している血中抗体の検出はできないと考えられた。一方、素通り分画には本法では測定できない IC の存在する可能性はあるが、癌関連抗原とそれに対する抗体の患者体内での存在様式については、不明の点が多く、正確な免疫複合体測定法の開発を含めて、今後の研究課題の一つであると思われる。

筆者の開発した測定系の重要な問題点として、抗イディオタイプ抗体を用いて測定された血中抗 DU-PAN-2 抗体が真の DU-PAN-2 抗原に対する自己抗体であるかどうかということが挙げられる。図11に示したごとく、抗イディオタイプ抗体に高い反応を示す血清の大部分は、DU-PAN-2 抗原とも反応を示したが、同一の抗体が DU-PAN-2 抗原、抗イディオタイプ抗体の両者に反応し得ることを示すには至っていない。そこで、筆者は抗体価の高い患者の血液から抗イディオタイプ抗体のアフィニティークロマトグラフィーを用いることによって、Poly-Id に結合する血清の抗体分画を精製し、得られた分画のなかに、図13~15に示すごとく、IgG に一致して、Mono-Id のみならず DU-PAN-2 抗原自身にも反応しえる抗体の存在することを示した。このことは少なくとも一部の癌患者体内では、本来自己抗原である細胞表面糖鎖構造の癌化による変異に対しても、免疫応答としての自己抗体産生が活発に行なわれていることを示すものであり、癌患者における免疫動態を考えるうえで重要な現象を実証したと言えよう。また抗イディオタイプ抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーにて患者血液より、可溶化の状態で癌関連抗原に対する自己抗体を精製可能であることも示され、このようにして得られた抗体は、ヒトモノクローナル抗体などと並んで、臨床的にも免疫学的診断や治療の分野で応用可能な手段となり得るものと思われる。

結 論

抗 DU-PAN-2 モノクローナル抗体を免疫原として、ラットにて Poly-Id を、マウスのハイブリドーマ法にて Mono-Id の作製を試み、得られた抗体の性状を分析した。さらにこの抗イディオタイプ抗体を用いて、EIA を開発し各種消化器癌患者血中抗 DU-PAN-2 抗体の測定を行ない、その意義を検討しようとし、以下の結論を得た。

1. 得られた Poly-Id は、免疫原である抗 DU-PAN-2 抗体と特異的に反応し、DU-PAN-2 抗原抗体反応を阻害することより抗 DU-PAN-2 抗体の抗原結合部位と結合する抗体を含むと考えられた。また作製した Mono-Id のアイソタイプはすべて IgG1 であり、同様に抗 DU-PAN-2 抗体の抗原結合部位と結合し、DU-PAN-2 抗原エピトープの一部と相同の構造を持つ抗体とであると推定された。

2. 1で得られた抗体を用いて開発した EIA により各種消化器疾患患者血中抗 DU-PAN-2 抗体価を測定したところ、癌患者では陽性率は Poly-Id 法で42%(42/101)、Mono-Id 法で33%(36/108)であった。一方、良性疾患での偽陽性率は Poly-Id 法で42%(13/30)、Mono-Id 法で21%(7/33)と特異性は後者で比較的良好であった。

3. 癌患者血清の抗原値と抗体価との間に有意な相関性はなく、各々の陰陽性の解離するものが Poly-Id 法で48%、

Mono-Id 法で44%とかなりみられ、抗体価のみ陽性の癌症例が Poly-Id 法で25%、Mono-Id 法で19%に認められた。

4. 胃、大腸癌において進行度との関係を見ると、1期の12例ではすべて抗原値は陰性であったが、Poly-Id 法で4例、Mono-Id 法で1例血中抗体価陽性のものが認められた。

5. DU-PAN-2 抗原を用いた RIA にても直接血中抗体価の測定が可能であり、その測定値はイディオタイプ抗体を用いた EIA による測定値と有意な相関性を示した。

6. Poly-Id を用いたアフィニティークロマトグラフィーの結合分画には DU-PAN-2 抗原活性は存在せず、DU-PAN-2 の IC は、抗イディオタイプ抗体には反応していないものと考えられた。

7. 6 で得られた結合分画の免疫化学的分析により、抗体価が高値を示した癌患者血中には、IgG に一致して抗イディオタイプ抗体と DU-PAN-2 抗原の双方に対し反応する自己抗体の存在することが確認された。

以上のように担癌患者体内では DU-PAN-2 抗原に対して、比較的早期から抗体産生が行なわれていることが示唆された。その定量的評価として抗イディオタイプ抗体を用いた EIA を開発し、臨床的に検討したところ、血中抗原値が陰性であっても抗体価の陽性なものがかかなりみられ、さらには血中 DU-PAN-2 抗原陰性の早期癌でも抗体価の高値を示す場合もあることから、本法は従来の腫瘍マーカーの欠点を補う、癌の新たな血清学的診断法として期待できると考えられる。

謝 辞

稿を終るにあたり、御指導、御校閲を賜りました恩師澤武紀雄教授に深甚なる謝意を捧げます。また有益な御助言、御協力をいただきました本研究所免疫生物部坂井俊之助助教授に深謝の意を表します。また研究遂行にあたり終始御協力いただいた本研究所内科太田英樹博士に深く感謝いたします。さらに、御協力いただいた本研究所内科五味由布子女史をはじめとした教室員各位に厚く御礼申し上げます。

なお本論文の要旨の一部は第48回(1989年)ならびに第50回(1991年)日本癌学会総会において発表された。

本研究の一部は、文部省科学研究費補助金一般研究 B (No. 03454226) と癌特別研究 (No. 03151056) および第12回癌集学的治療研究財団一般研究助成による。記して謝意を表する。

文 献

- 1) Kohler, G. & Milstein, C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, **256**, 495-497 (1975).
- 2) Jerne, N. K.: Towards a network theory of immune system. *Ann. Immunol. (Paris)*, **125**, 373-389 (1974).
- 3) Sacks, D. L., Kirchoff, L. V., Hieny, S. & Sher, A.: Molecular mimicry of a carbohydrate epitope on a major surface glycoprotein of *Trypanosoma cruzi* by using anti-idiotypic antibodies. *J. Immunol.*, **135**, 4155-4159 (1985).
- 4) McNamara, M. K., Ward, R. E. & Kohler, H.: Monoclonal idiotypic vaccine against *Streptococcus pneumoniae* infection. *Science*, **226**, 1325-1326 (1984).
- 5) Raychaudhuri, S., Saeki, Y., Fuji, H. & Kohler, H.: Tumor specific idiotypic vaccines. I. Generation and characterization of internal image tumor antigen. *J. Immunol.*, **137**, 1743-1749 (1986).
- 6) Herlyn, D., Wettendorf, M., Schmoll, E., Ilponlos,

- D., Schendel, L., Dreikhsen, U., Raab, R., Ross, H., Jaksche, H., Screba, M. & Koprowski, H.: Anti-idiotypic immunization of cancer patients: modulation of the immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 8055-8059 (1987).
- 7) Ferrone, S. & Kageshita, T.: Human high molecular weight-melanoma associated antigen as a target for active specific immunotherapy. *J. Dermatol.*, **15**, 457-465 (1988).
- 8) Metzgar, R. S., Gaillard, M. T., Levine, S. J., Tuck, F. L., Bossen, E. H. & Borowitz, M. J.: Antigens of human pancreatic adenocarcinoma cells defined by murine monoclonal antibodies. *Cancer Res.*, **42**, 601-608 (1982).
- 9) Lan, M. S., Khorrami, A., Kaufman, B. & Metzgar, R. S.: Molecular characterization of a Mucin-type antigen associated with human pancreatic cancer. *J. Biol. Chem.*, **262**, 12863-12870 (1987).
- 10) Borowitz, M. J., Tuck, F. C., Sindelar, W. F., Fernsten, P. D. & Metzgar, R. S.: Monoclonal antibodies against human pancreatic adenocarcinoma: Distribution of DU-PAN-2 antigen on glandular epithelia and adenocarcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.*, **72**, 999-1005 (1984).
- 11) Satomura, Y., Sawabu, N., Takemori, Y., Ohta, H., Watanabe, H., Okai, T., Watanabe, K., Matsuno, H. & Konishi, H.: Expression of various sialylated carbohydrate antigens in malignant and nonmalignant pancreatic tissues. *Pancreas*, **6**, 448-458 (1991).
- 12) 里村吉威, 太田英樹, 竹森康弘, 澤武紀雄, 南 修二, 北村徳治, 磨伊正義, 服部 信, 秋山高儀, 渡辺駿七郎: 各種消化器癌における DU-PAN-2 の免疫組織学的検討. *医学のあゆみ*, **137**, 143-144 (1986).
- 13) Sawabu, N., Toya, D., Takemori, Y., Hattori, N. & Fukui, M.: Measurement of a pancreatic cancer associated antigen (DU-PAN-2) detected by a monoclonal antibody in sera of patients with digestive cancers. *Int. J. Cancer*, **37**, 639-636 (1986).
- 14) 竹森康弘, 澤武紀雄, 里村吉威, 太田英樹, 渡辺弘之, 岡井 高, 磨伊正義, 服部 信, 秋山高儀, 橋本琢磨: 各種消化器癌における血清 DU-PAN-2 値の測定 - 酵素免疫測定法 (EIA) による検討 - . *癌と化学療法*, **14**, 119-126 (1987).
- 15) Hirohashi, S., Watanabe, M., Shimosato, Y. & Sekine, T.: Monoclonal antibody reactive with sialyl-sugar residue of a high molecular weight glycoprotein in sera of cancer patients. *Gann*, **75**, 485-488 (1984).
- 16) Primi, D. & Cazenave, P. A.: Monoclonal antibodies coupled to LPS specifically induce synthesis of immunoglobulins with complementary variable region determinants. *J. Immunol.*, **129**, 1124-1129 (1982).
- 17) Guesdon, J. L., Ternynck, T. & Avrameas, S.: The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. *J. Histochem. Cytochem.*, **27**, 1131-1139 (1979).
- 18) Hunter, W. M. & Greenwood, F. C.: Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity. *Nature*, **194**, 495-496 (1962).
- 19) Cuatrecasas, P., Wilcheck, M. & Anifinsen, C. B.: Selective enzyme purification by affinity chromatography.

- Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 61, 636-643 (1968).
- 20) **Koprowski, H., Stepleski, Z., Michell, K., Herlyn, M., Herlyn, D. & Fuhrer, P.**: Colorectal carcinoma antigens detected by hybridoma antibodies. *Somatic Cell Genet.*, 5, 957-972 (1979).
- 21) **Lindholm, L., Holmgren, J., Svennerholm, L., Fredman, P., Nilsson, O., Persson, B., Myrvold, H. & Lagergard, T.**: Monoclonal antibodies against gastrointestinal tumor-associated antigens isolated as monogangliosides. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 71, 178-181 (1983).
- 22) **Motoo, Y., Satomura, Y., Kawakami, H., Watanabe, H., Ohta, H., Okai, T. & Sawabu, N.**: Serum levels of tumor-associated glycoprotein (TAG-72) in digestive cancers. *Oncology*, 47, 456-462 (1990).
- 23) **Ayeni, A. O., Thomson, D. M. P., MacFarlane, J. K. & Daly, D.**: A comparison of tube leukocyte adherence inhibition assay and standard physical methods for diagnosing colorectal cancer. *Cancer*, 48, 1855-1862 (1981).
- 24) **Koyama, S., Sakita, T., Fukutomi, H., Kawakita, N. & Tamura, N.**: Leukocyte adherence inhibition microtest for the detection of cell-mediated immunity to tumor in gastric cancer patients. *Oncology*, 38, 13-17 (1981).
- 25) **Gold, P.**: Circulating antibodies against carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *Cancer*, 20, 1663-1667 (1967).
- 26) **von Kleist, S. & Burtin, P.**: On the specificity of autoantibodies present in colon cancer patient. *Immunology*, 10, 507-515 (1966).
- 27) **川原田信, 谷内昭, 福屋祥三, 赤保内良和, 和田武雄**: 胃癌由来 α 組織抗原およびその抗体の血中出现. *医学のあゆみ*, 103, 744-746 (1977).
- 28) **Kunkel, H. G., Agnello, V., Joslin, F. G., Winchester, R. J. & Capra, J. D.**: Cross-idiotypic specificity among monoclonal IgM proteins with anti-r-globulin activity. *J. Exp. Med.*, 137, 331-342 (1973).
- 29) **Cazenave, P. A.**: Idiotypic anti-idiotypic regulation of antibody synthesis in rabbits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 5122-5125 (1977).
- 30) **Williams, W. V., London, S. D., Weiner, D. B., Wadsworth, S., Berzofsky, J. A., Robey, F., Rubin, D. H. & Greene, M. I.**: Immune response to a molecularly defined internal image idiotope. *J. Immunol.*, 142, 4392-4400 (1989).
- 31) **Kennedy, R. C., Eichberg, J. W., Lanford, R. E. & Dreesman, G. R.**: Anti-idiotypic antibody vaccine for type B viral hepatitis in chimpanzees. *Science*, 232, 220-223 (1986).
- 32) **Leger, O. & Dean, C. J.**: Characterization of syngeneic rat monoclonal antibodies to the HSN tumor using syngeneic monoclonal anti-idiotypic antibodies. *J. Immunol.*, 146, 2879-2866 (1991).
- 33) **Diakun, K. R. & Matta, K. L.**: Specificity analysis of an Anti-Anti-Idiotypic Antibody to a Carbohydrate Tumor-Associated Antigen. *J. Immunol.*, 142, 2037-2040 (1989).
- 34) **Halpern, R., Schiffenbauer, J., Solomon, G. & Diamond, B.**: Detection of masked anti-DNA antibodies in lupus sera by monoclonal anti-idiotype. *J. Immunol.*, 133, 1852-1856 (1984).
- 35) **山本公雄**: 腺癌関連モノクローナル抗体 YH206 に対する抗イデオタイプ抗体の作製とその臨床応用. *札幌医誌*, 57, 197-207 (1988).
- 36) **原田良策, 大脇一朗, 高橋直文, 岡本暢夫, 中島健一, 遠藤則明, 神奈木玲児**: ヒト型単クローン抗体に対する抗イデオタイプ抗体の血清診断への応用の試み. 第10回腫瘍マーカー研究会記録, 48-50 (1990).
- 37) **Kapsopoulou-Dominos, K. & Anderer, F. A.**: Circulating carcinoembryonic antigen immune complexes in sera of patients with carcinomata of the gastrointestinal tract. *Clin. Exp. Immunol.*, 35, 190-195 (1979).
- 38) **Staab, H. J., Andrer, F. A., Stumpf, E. & Fischer, R.**: Are circulating CEA immune complexes a prognostic marker in patients with carcinoma of gastrointestinal tract?. *Br. J. Cancer*, 42, 26-33 (1980).
- 39) **Wong, J. H., Xu, S., Saxton, R. E., Gupta, R. K. & Morton, D. L.**: Detection and Isolation of Antigen Specific immune complexes from sera of melanoma patients. *Int. J. Cancer*, 45, 445-449 (1990).

Preparation of Antiidiotypic Antibodies against Anti-DU-PAN-2 Monoclonal Antibody and its Clinical Application for the Serological diagnosis of Digestive Cancers Osamu Yamakawa, Department of Internal Medicine, Cancer Research Institute, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-J. *Juzen Med Soc.*, **101**, 454-468 (1992)

Key words anti-idiotypic antibody, monoclonal antibody, DU-PAN-2, digestive cancer

Abstract

Some anti-idiotypic antibodies mimic the structure of the epitope of the original antigen and are its "internal image". Application of such antibodies, in lieu of antigen, for the induction of anti-tumor activity and the measurement of anti-tumor autoantibodies is expected. In this study, polyclonal anti-idiotypic antibody (Poly-Id) was produced by immunization of monoclonal anti-DU-PAN-2 antibody in a rat, and syngeneic monoclonal anti-idiotypic antibody (Mono-Id) was developed by hybridoma technique. Furthermore, an enzyme immunoassay (EIA) utilizing these anti-idiotypic antibodies has been developed and was used to examine the clinical significance of levels of anti-DU-PAN-2 antibody in sera of patients with various digestive cancers. The Poly-Id and Mono-Id thus prepared specifically reacted with DU-PAN-2 antibody and inhibited the specific binding of DU-PAN-2 antibody with antigen. These results suggested that these anti-idiotypic antibodies represent the configuration of a certain epitope of DU-PAN-2 antigen. The sera of 20 healthy individuals, 34 patients with benign diseases and 108 cancer patients were screened by the enzyme immunoassay using these anti-idiotypic antibodies as the capture antibody. With the mean+2SD of healthy individuals regarded as the cut-off value, levels among the cancer patients exceeding this value were detected in 42% (42/101) by Poly-Id assay, and in 33% (36/108) by Mono-Id assay. False-positive rates of Poly-Id assay in benign diseases were 43%, significantly higher than those of Mono-Id assay (21%). No significant correlation between serum DU-PAN-2 antigen and anti DU-PAN-2 antibody was observed in the sera of cancer patients. However, when 300 U/ml was chosen as the cut-off value of antigen, 43% (26/60) (Poly-Id assay), and 31% (20/64) (Mono-Id assay) of antigen negative cancer patients showed levels of anti-DU-PAN-2 antibody exceeding the cut off values. In the patients with gastric and colorectal cancer, all 12 cases classified as histological stage I showed low levels of DU-PAN-2 antigen, but 4 cases (33%) were revealed as antibody positive by Poly-Id assay. Using Poly-Id immunoaffinity chromatography, anti-DU-PAN-2 antibody was purified from the serum of a patient with pancreatic cancer, and this antibody fraction, corresponding to IgG, proved to react with both DU-PAN-2 antigen and Mono-Id by various immunochemical techniques. This study revealed that anti-DU-PAN-2 antibody was detected in the sera of some patients with digestive cancers, and that measurement of serum levels of anti-DU-PAN-2 antibody may be useful in detecting cancers, including early cases or antigen-negative cases.