

# Production and Analysis of Monoclonal Antibodies against Human Colorectal 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	<a href="http://hdl.handle.net/2297/8219">http://hdl.handle.net/2297/8219</a>

## ヒト大腸癌に対するモノクローナル抗体の作製とその解析

金沢大学医学部外科学第一講座 (主任: 岩 喬教授)

中 島 久 幸

(平成2年9月17日受付)

大腸癌にのみ特異的なモノクローナル抗体 (Monoclonal antibody, MoAb) の確立を目的として、大腸癌細胞株 COLO-201 から抗原活性を有する細胞膜系可溶性蛋白質分画を抽出し、これに対する MoAb を作成した。その結果、大腸癌に高率に反応し、正常腸粘膜、大腸癌以外の悪性腫瘍とは反応しない2種の MoAb (KC-1, KC-2) を得た。そのアイソタイプはいずれも IgM,  $\alpha$  であり、両 MoAb が認識する抗原はいずれも蛋白質であると考えられた。KC-1 を用いて、酵素抗体法により免疫組織染色を行ったところ、13種の正常臓器、9種の胎児臓器とは反応しなかった。大腸癌における陽性率は、高分化型腺癌100% (15/15)、中分化型腺癌86.7% (13/15)、粘液癌0% (0/3) であり、15種その他臓器悪性腫瘍とは反応しなかった。以上より、KC-1, KC-2 は大腸癌に特異性の高いモノクローナル抗体であると考えられた。

**Key words** colorectal cancer, monoclonal antibody, immunohistochemistry, 細胞膜抗原

癌細胞が特異的な抗原成分を有するか否かを明らかにすることは、癌の診断や治療の上で重要な意義を持っている。以前より免疫学的手法を用いた癌細胞表面抗原の研究が行われ、癌関連抗原の存在が明らかにされつつある。大腸癌においては、癌胎児性抗原 (carcino-embryonic antigen, CEA) が発見され診断と治療の指標になっているが、これはいわゆる腫瘍関連抗原 (tumor associated antigen) であり、大腸癌に特異的なものではない。

一方、Köhler と Milstein<sup>1)</sup>による細胞融合法を用いたモノクローナル抗体 (monoclonal antibody, MoAb) 作製法の確立で癌に特異性の高い抗原の研究が急速な進歩をした。しかし、現在までに報告されている MoAb はいずれも目的とする腫瘍以外の腫瘍細胞や正常細胞とも反応し特異性に限界がある。

そこで、著者は、大腸癌により特異性の高い MoAb の作製を目的として、大腸癌細胞から細胞膜系可溶性蛋白質分画を抽出し、これに対するモノクロー-

ナル抗体の作製を試み、免疫組織化学的検討を行ったので報告する。

#### 材料および方法

##### I. 組織材料

大腸癌組織 (高分化型腺癌15例, 中分化型腺癌15例, 粘液癌3例) は手術時切除大腸より採取した。大腸以外の癌組織も手術または剖検時に採取し、正常臓器は手術または死後2時間以内の非癌患者から採取した。胎児臓器は6ヶ月の胎児数例から得た。材料はすべて $-40^{\circ}\text{C}$ で保存した。なお、CEA 抽出の材料として大腸癌の肝転移巣を使用した。

##### II. 細胞株

使用した培養細胞株は以下の29種である。  
大腸癌 (COLO-201<sup>2)</sup>, SW1116, C-1) 胃癌 (KATOIII, MKN-1, MKN-28, MKN-45) 肺癌 (PC-3, PC-6) 肝癌 (CHC-4) 膵癌 (Panc-1, Mia-paca-2) 腎癌 (KN-41, KU-2, Ko-RCC-1) 膀胱癌 (T-24) 甲状腺癌 (TPC-1) 乳

Abbreviations: ABC, avidin-biotin-peroxidase complex; BSA, bovine serum albumin; CEA, carcinoembryonic antigen; DMEM, Dulbecco's modified Eagle medium; DMSO, Dimethylsulfoxide; DOC, desoxycholate; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay;

癌 (ZR-75-1) 子宮癌 (HeLa) 卵巣癌 (HOC-21) 黒色種 (HMV-1) 喉頭癌 (HEp-2) 白血病細胞 (BALL1, CCRF-CEM) 骨肉腫 (OST) 神経芽細胞腫 (IMR-32) 胎児腎細胞 (HEK) 正常腸粘膜 (Intestine-407) マウス骨髄腫細胞 (SP-2/0-Ag14) 細胞株は10%ウシ胎児血清 (fetal calf serum, FCS) (Gibco Lab., New York, U.S.A.) を含むダルベコ変法イーグル培地 (Dulbecco's modified eagle medium, DMEM) (Gibco Lab.) を用い、炭酸ガス培養器中で5% CO<sub>2</sub>、37°Cの条件下で培養した。

### III. 免疫抗原の作製

Smithら<sup>3)</sup>の方法の倉田・岡田変法<sup>4,7)</sup>に準じて細胞膜系可溶性蛋白分画を抽出した。すなわち、ヒト大腸癌細胞株 COLO-201 を BALB/c ノードマウスの背部皮下に移植し、腫瘍が増大したところで無菌的に摘出した。この腫瘍組織を細切し、約2倍量の溶液 I (塩化カリウム 11.93g/l, モノヨード酢酸186mg/l, クエン酸ナトリウム 5 g/l) を加え、ユニバーサルホモジナイ

ザー (日本精機, 東京) で氷冷下約5分間ホモジナイズする。ガーゼで濾過した濾液を10,000×G, 30分間冷却遠心して得た沈渣に溶液 II (塩化カリウム74.5g/l, モノヨード酢酸186mg/l, クエン酸ナトリウム10g/l, pH 4.7) を約10倍容量加え、テフロンホモジナイザーで氷冷しながら約5分間磨砕した後、上記同様に遠心して沈渣を得る。溶液 II による磨砕・遠心を8回繰り返し、沈渣を得る。

この沈渣に5倍量の0.2%デオキシコール酸ナトリウム溶液を加え、48時間冷室中で攪拌した後、10,000×G, 30分遠心して上清をとりわけ、沈渣について再び同様の操作を繰り返す。2回の抽出上清に10倍量の冷アセトンを加え-20°Cで一晩放置し、生じた白色沈殿を2,000×G, 10分遠心して集め、少量の蒸留水に溶かす。これを sepharose 4B (Pharmacia Fine Chemicals Ind., Uppsala, Sweden) のカラムによりゲル濾過を行ない、低分子画分 (Low molecular weight protein fraction, LPfr) を得る。これを blue sepharose CL-6B (Pharmacia Fine Chemicals Ind.) のカラムを通して混在するアルブミンを除いた後、DEAE-sephacel (Pharmacia Fine Chemicals Ind.) のカラムに負荷し、NaCl によるイオン強度勾配でイオン交換クロマトグラフィーを施行し、peak II 部分を濃縮し抗原とした。(図1, 2)

### IV. マウスへの免疫

前述の方法で得られた peak II 部分500μg に同量の BCG-CWS (半井化学, 京都) とミネラルオイル0.5 ml を加えてホモジナイズし、0.01 M リン酸緩衝液 (phosphate buffered saline, PBS)-Tween80 (半井化学) を1 ml 加える。これを生後4週令の BALB/c マウスの腹腔内に2週間ごとに4回免疫した。

### V. モノクローナル抗体の作製

#### 1. 細胞融合法

最終免疫の4日後にマウスを屠殺し、無菌的に脾を摘出し脾細胞浮遊液を作製した。細胞融合は脾細胞とマウス骨髄腫細胞 SP-2/0-Ag14 を10% FCS を含む DMEM で洗浄後、細胞数5:1の比率で混合し、50%ポリエチレングリコール (polyethylene glycol, PEG) (Merck, Frankfurt, West Germany) を用いて行った。これを、1,000rpm 5分間遠心後上清を除去し、DMEM を加え遠心し、可及的に PEG を除去した。この後、hypoxanthine-aminopterin-thymidin

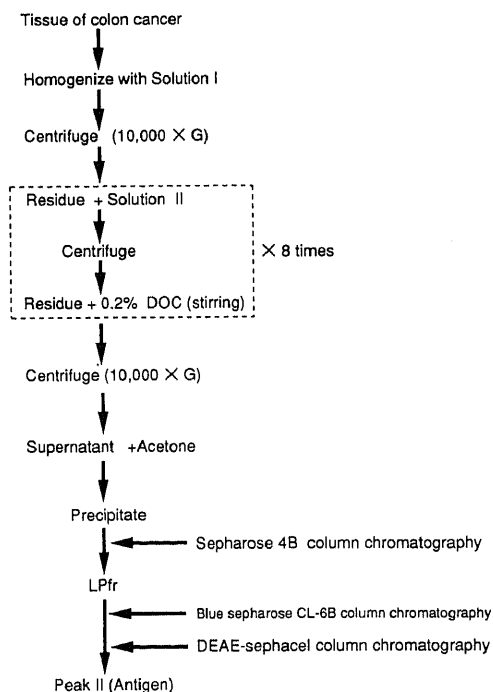


Fig. 1. Method of an antigen extraction from colon cancer tissue.

FCS, fetal calf serum; HAT, hypoxanthine-aminopterin-thymidine; MoAb, monoclonal antibody; LPfr, low molecular weight protein fraction; PEG, polyethylene glycol; PBS, phosphate buffered saline

(HAT) 培養液 (和光純薬, 大坂) を加え静かに攪拌後, 30分間静置した. さらに, 生後4週の BALB/c マウスより胸腺を無菌的に摘出し, 胸腺細胞  $1.5 \times 10^6$  個を回収して融合細胞 (ハイブリドーマ) 浮遊液に追加した. これを96ウェル平底組織培養プレート (Becton Dickinson, New Jersey, U.S.A.) にウェル当り  $150 \mu\text{l}$  ずつ分注し,  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  インキュベーターにて培養した. 2日後, HAT 培養液を  $50 \mu\text{l}$  ずつ各ウェルに追加し, 以後2~3日ごとに半容量交換を行った.

## 2. ハイブリドーマの選択

ハイブリドーマのコロニーが認められたウェルより培養上清を採取し, その抗体活性を酵素抗体法 (Cell-enzyme linked immuno-sorbent assay, Cell-ELISA) を用いて検討した. (後述)

スクリーニングとして, 大腸癌細胞株 (COLO-201, SW-1116, C-1) 胎児腎細胞 HEK, 腸粘膜細胞 Intestine 407 を用い, 大腸癌細胞株3種ともに反応陽性で, 胎児腎細胞と腸粘膜細胞とともに反応陰性の抗体を産生するハイブリドーマを選択した.

## 3. クローニングと MoAb の産生保存

選択されたハイブリドーマについて, 限界希釈法によるクローニングを3回行ない, 各段階で抗体活性を確認し, 一部を10% dimethylsulfoxide (DMSO) (半井化学) 含有 FCS を用いて凍結保存した. また, 高濃度

の MoAb を得るため, 西ら<sup>9</sup>の方法に従い, あらかじめプリスタン (tetramethylpentadecan, Aldrich Chemical, Milwaukee, U.S.A.)  $0.5\text{ml}$  を腹腔内投与した BALB/c マウスの腹腔内に  $1 \times 10^7$  個のハイブリドーマを注入し, 腹水を回収した. この腹水に飽和硫酸 (半井化学) を加えて40%溶液とした後,  $10,000 \times \text{G}$ , 15分間, 遠心して得た沈渣に  $0.05\text{M}$  PBS を加えて1晩透析した. さらに,  $10,000 \times \text{G}$ , 15分遠心して上清を回収し  $-40^\circ\text{C}$  で凍結保存した.

## VI. Cell-ELISA

ハイブリドーマが産生する抗体の活性測定と反応特異性を検討するため Cell-ELISA を行なった.

### 1. 細胞抗原プレートの作製

96ウェルビニールアッセイプレート (Costar, Cambridge, U.S.A.) に Poly-L-Lysine (半井化学) をウェル当たり  $5 \mu\text{g}$  ずつ添加して室温で1時間静置した後, PBS で洗浄した. 前述のすべての細胞株をそれぞれ  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  含有 PBS で3回洗浄後, 細胞数が  $10^6/\text{ml}$  となるよう調整し, ウェル当たり  $50 \mu\text{l}$  ずつ分注し  $4^\circ\text{C}$ , 1時間静置した ( $5 \times 10^4$  cells/well). 0.5% グルタルアルデヒドを  $50 \mu\text{l}$  ずつ添加し室温で5分間静置した後, PBS で3回洗浄した. 1% ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA) を含有した PBS を  $150 \mu\text{l}$  ずつ添加し  $4^\circ\text{C}$ , 1晩固定した後, プレートを  $-20^\circ\text{C}$  で保存した.

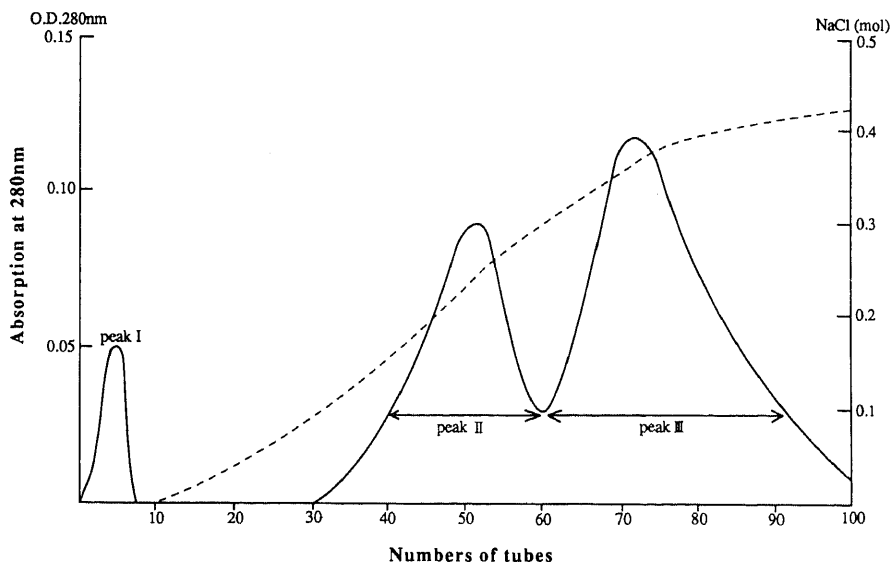


Fig. 2. DEAE-sephacel ion exchange chromatography of the fractions solubilized from the insoluble lipoproteins of COLO-201.

Table 1. Reactivity of monoclonal antibody (KC-1, KC-2) against human culture cells

		KC-1	KC-2
Screening	Normal intestinal mucosa Intestine-407	○	○
	Fetal kidney HEK	○	○
	Colonic carcinoma COLO-201	●	●
	SW 1116	●	●
	C-1	●	●
	Gastric carcinoma KATO III	○	○
	MKN-1	○	○
MKN-28	○	○	
MKN-45	○	○	
Pancreatic carcinoma Panc-1	○	○	
Mia-Paca-2	○	○	
Hepatoma CHC-4	○	○	
Renal cell carcinoma KN-41	○	○	
KU-2	○	○	
Ko-RCC-1	○	○	
Bronchogenic carcinoma PC-3	○	○	
PC-6	○	○	
Thyroid carcinoma TPC-1	○	○	
Mammary carcinoma ZR-75-1	○	○	
Laryngeal carcinoma HEp-2	○	○	
Bladder carcinoma T-24	○	○	
Uterus carcinoma HeLa	○	○	
Ovarian carcinoma HOC-21	○	○	
Malignant melanoma HMV-1	○	○	
Leukemia BALL 1	○	○	
CCRF-CEM	○	○	
Osteosarcoma OST	○	○	
Neuroblastoma IMR-32	○	○	

●: value determined by the absorbance  
490nm  $\geq$  0.1

○: value determined by the absorbance  
490nm < 0.1

## 2. ELISA の手順

プレート室温に戻してから3回PBSで洗浄後、ハイブリドーマ培養上清(1次抗体)をウエル当たり50 $\mu$ lずつ添加し37°Cで1時間反応させた。陰性コントロールとして、DMEM 50 $\mu$ lを添加した。PBSで4回洗浄後、ペルオキシダーゼ結合抗マウス免疫グロブリン(Daco, Copenhagen, Denmark)(2次抗体)を0.5%BSAを含む0.05M PBSで1.000培に希釈し、ウエル当たり50 $\mu$ lずつ分注し室温で1時間反応させた。さらに6回洗浄後、ペルオキシダーゼの反応基質であるオルソフェニレンジアミン(和光純薬)を0.1Mクエン酸-0.2M PBS(pH4.8)で1mg/mlに調整し、さらに0.015%過酸化水素水溶液となるよう調整してから、ウエル当たり150 $\mu$ lずつ添加し、室温で30分間反応させた。このプレートをEIA reader(Biotec Inst, New York, U.S.A.)を用いて吸光度490nmにて測定した。陰性コントロールの測定値を0に補正し、0.1以上を反応陽性とした。

## VII. CEAとの反応性

CEAは大腸癌肝転移巣よりKruppy<sup>9)</sup>の方法に従い作製した。これを0.05M PBSで希釈し96ウエルビニールアッセイプレートにウエル当たり50 $\mu$ lずつ分注し4°C、12時間固定した。0.05%Tween20(半井化学)を含む0.05M PBSで3回洗浄した後、1%BSAと0.05%窒化ナトリウム(和光純薬)を含む0.05M PBSをウエル当たり150 $\mu$ lずつ分注し、4°C、1時間固定後、使用時まで-20°Cで保存した。ELISAは前述の方法で行ない判定した。

## VIII. MoAbのクラス・サブクラスの検索

作製したMoAbのクラス・サブクラスをMono Ab-ID EIA kit(Zymed Lab, Inc., San Francisco, U.S.A.)を使用して検索した。

## IX. 抗原の生化学的分析

### 1. 加熱による抗原性の変化

免疫源とした大腸癌細胞株COLO-201を固定したプレートを100°C、5分間、湿熱で処理しCell-ELISAを行なって検討した。

### 2. 酵素および過ヨウ素酸処理

大腸癌細胞株COLO-201を0.2%プロナーゼ(科研製薬, 東京)で37°C、30分間、0.2%トリプシン(Sigma, St.Louis, U.S.A.)37°C、30分間、ニューラミダーゼ(Sigma, 20u/ml)で37°C、1時間それぞれ処理した。また、過ヨウ素酸(100mM)で室温、1時間処理してCell-ELISAを行なって抗原性の変化を検討した。

## X. 凍結組織標本との免疫染色

凍結した組織ブロックから凍結切片 ( $8 \mu\text{m}$ ) を作製した。0.3%過酸化水素・メタノール溶液で内因性ペルオキシダーゼ阻害を行ない、PBS で5分間3回洗浄した。VECTASTAIN Avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) キット (Vector Labs, California, U.S.A.) を用いて酵素抗体法にて免疫染色を行なった。すなわち、切片にウマ血清を20分間反応させて非特異的抗体をブロックした。PBS で洗浄後、ハイブリドーマ培養上清を  $100 \mu\text{l}$  加え1時間反応させた。洗浄後、ビオチン化抗マウスイムノグロブリン抗体を30分間反応させ、洗浄後アヴィジン-ビオチン複合体を30分間反応させた。洗浄後、発色剤としてジアミノベンチジン溶液を10分間反応させた。最後に、洗浄後、ヘマトキシリン溶液で核染色し、脱水・包理した。この切片を鏡検し、茶褐色に染まった部分を陽性と判定

し、その部位の同定を行なった。

## 成 績

### I. 抗体産生ハイブリドーマの選択

細胞融合の結果、384ウエル中151ウエルにハイブリドーマ・コロニーが出現した。このうち、大腸癌細胞株3種 (COLO-201, SW1116, C-1) に対する抗体を産生したものは58コロニーであった。この58コロニー中、胎児腎細胞 HEK および腸粘膜細胞 Intestine 407 と反応をしめさないものは18コロニーであった。この18コロニーを48ウエルついで24ウエル組織培養プレートで増殖させた。ここで、前述のヒト腫瘍細胞株と Cell-ELISA を行ない、大腸癌細胞株3種のみと反応陽性を示した2つのハイブリドーマを選択し、クロニングを行なった。この2種のハイブリドーマが産生

Table 2. Reactive change of ELISA after antigenic treatment of COLO-201

Treatment	ELISA
Control	0.788
$\text{NaIO}_4$	0.762
Pronase	0.092
Trypsin	0.105
Neuramidase	0.768
Heat <sub>(100°C)</sub>	0.086

Each value was determined by the absorbance at 490 nm.

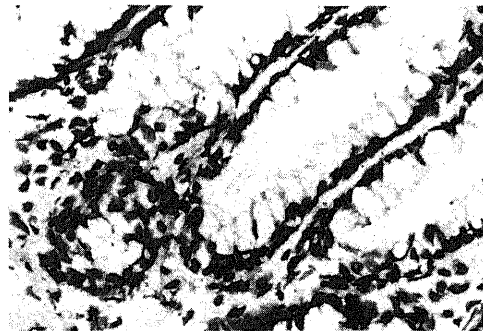


Fig. 3. Immunostaining of normal intestinal mucosa using MoAb KC-1. Nuclei were counterstained with hematoxylin. The benign tissue was not stained. ( $\times 400$ )

Table 3. Reactivity of monoclonal antibody KC-1 against a variety human normal tissues and fetal organs by ABC method

Normal tissue	Reactivity	Fetal organ	Reactivity
Large intestine	—	Intestine	—
Small intestine	—	Stomach	—
Stomach	—	Liver	—
Liver	—	Pancreas	—
Pancreas	—	Kidney	—
Kidney	—	Spleen	—
Spleen	—	Esophagus	—
Esophagus	—	Thyroid	—
Heart	—	Muscle	—
Ovarium	—		
Uterus	—		
Thyroid	—		
Muscle	—		

するモノクローナル抗体をそれぞれ KC-1, KC-2 と命名した。この2種の MoAb と各種ヒト細胞株との反応性を表1に示した。

## II. MoAb の CEA との反応性

ELISA を用いた CEA との反応性は両 MoAb とも反応を示さなかった。

## III. MoAb のクラス・サブクラス

KC-1, KC-2 とも IgM  $\alpha$  であった。

## IV. MoAb 認識抗原のエピトープの性状

MoAb が認識する抗原のエピトープの性状を調べるため、COLO-201 固着プレートを各処理(熱, 酵素, 過ヨウ素酸)して Cell-ELISA を行って検討した。(表

Table 4. Reactivity of monoclonal antibody KC-1 against a variety tumors by ABC method

Tumor histologic type	No.positive/No.tested
Colonic carcinoma	
Well	15/15
Mod	13/15
Muc	0/ 3
Gastric carcinoma	0/21
Esophageal carcinoma	0/ 2
Pancreatic carcinoma	0/ 3
Hepatoma	0/ 3
Bronchogenic carcinoma	0/ 7
Thyroid carcinoma	0/ 7
Renal cell carcinoma	0/ 2
Prostatic carcinoma	0/ 1
Bladder carcinoma	0/ 2
Breast carcinoma	0/ 4
Uterus carcinoma	0/ 2
Ovarian carcinoma	0/ 2
Leiomyosarcoma	0/ 2
Malignant lymphoma	0/ 3
Malignant melanoma	0/ 1

Well, well differentiated adenocarcinoma; Mod, moderately differentiated adenocarcinoma Muc, mucinous adenocarcinoma

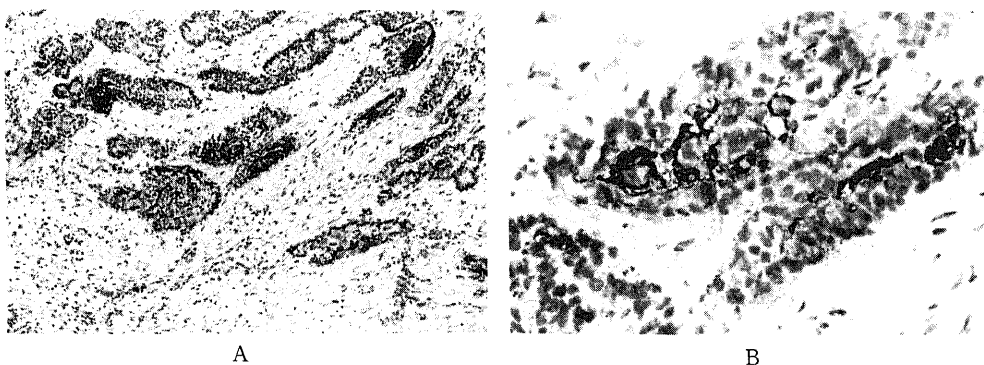


Fig. 4. Immunostaining of colon cancer using MoAb KC-1. Nuclei were counterstained with hematoxylin. (A) The stained cancer cells were scattered. ( $\times 40$ ) (B) High power view of the area in Fig.4A. The luminal surface of grandular neoplastic epithelium were strongly stained. ( $\times 150$ )

2) 結果は、熱処理、プロナーゼ処理、トリプシン処理ではコントロールに比し反応性の低下を認めたが、ニューラミダーゼ処理、過ヨウ素酸処理では反応性の低下は認められなかった。すなわち、抗原決定基は蛋白であると考えられた。

#### V. MoAb の組織標本との反応性

凍結保存したヒト各種悪性腫瘍、正常臓器、胎児臓器と MoAb KC-1 の反応性を酵素抗体法による免疫組織染色を行って検討した。その結果、正常大腸粘膜をはじめ、正常ヒト組織および胎児臓器とはまったく反応しなかった(表3, 図3)。また、大腸癌以外のヒト悪性腫瘍とは、いずれも反応しなかった。大腸癌33例中、粘液癌3例では反応を示さなかったが、高分化型腺癌15/15, 中分化型腺癌13/15に染色像が認められた(表4)。反応陽性となった大腸癌の染色パターンは、癌組織の一部が散在性に染まり、核が染色されず、腺腔内に面した細胞膜が染色されるいわゆる apical type であった(図4)。

#### 考 察

1975年に Köhler と Milstein<sup>1)</sup>が細胞融合法を用いた MoAb 作製法を確立して以来、癌の診断・治療を目的として、種々の MoAb が作製され、その特異性の検討、臨床への応用が研究されている。大腸癌に対する MoAb に関しては、Koprowski らのグループ<sup>10-15)</sup>、Magnani ら<sup>16)</sup>、Thompson ら<sup>17)</sup>、その他の研究<sup>18-20)</sup>があるが、これまでの MoAb は、大腸癌以外の腫瘍や正常大腸粘膜との反応がみられ、MoAb の特異性や感受性に限界がある。たとえば、Thompson ら<sup>17)</sup>の作製した MoAb 250-30.6 は、良性の大腸腫瘍や正常大腸粘膜とも反応し、新鮮凍結標本でなければ腫瘍細胞との反応性は証明されない。Yiu ら<sup>18)</sup>の作製した5つの MoAb も、大腸癌だけでなく正常大腸粘膜とも反応する。一方、Koprowski ら<sup>10,11)</sup>は、大腸癌細胞株 SW1083 と SW1116 を免疫源として MoAb を作製した。その結果、得られた21種の MoAb のうち、1083-17-1A を含む15種が、CEA および正常大腸粘膜とは反応せず、大腸癌に特異的であったと報告しており、今までに作製された MoAb の中では、大腸癌に対する特異性が最も高い。しかし、大腸癌以外の腫瘍との反応性に関しては、肺癌、乳癌、腎癌、膀胱癌、喉頭癌、悪性黒色腫、肉腫、星状細胞腫のみを用いた検討であり、交叉反応のみまれやすい胃癌や肝癌など消化器系腫瘍との反応性は検討されておらず、特異性に問題がある。

さらに、Koprowski ら<sup>10,11)</sup>の、作製した MoAb が認

識する抗原は、シアル酸基を含むガングリオシドであり、著者の作製した MoAb が認識する抗原とは異なっていた。MoAb (KC-1, 2) が認識する抗原は、ニューラミダーゼや過ヨウ素酸処理により抗原活性が失活せず、熱処理、プロナーゼ処理により抗原性が失活したことより、抗原決定基は、糖鎖の関与しない蛋白と推定され CEA や糖鎖抗原 CA 19-9 とは異なるものであることが示された。しかし、分子量は不明で、今後ウェスタン・ブロット法などによる検討を行なう必要がある。

これまでの報告では、ヒト癌に対する MoAb 作製に際し、免疫源として、培養細胞株自身や手術材料を使用しているが、この場合には培養液中の FCS のような異種蛋白の関与の問題<sup>21)</sup>や、同一物質の頻回免疫の困難性の問題が残る。さらに、細胞膜上に存在する種々の抗原に対する抗体を作製することは必ずしも不可能ではないが、抗原性が低く、その量が少ない抗原に対する MoAb を得ることは細胞自身を免疫源とする限り困難なことが次第に判明してきた<sup>22)</sup>。そのような抗原に対する MoAb を得るには、抗原の精製が必須であると考えられた。Colcher ら<sup>23)</sup>は、乳癌の肝転移巣から膜成分に富む分画を抽出して免疫源とし、18種の正常臓器とは反応せず乳癌細胞のみと反応する B72.3 を含む11種の特異性の高い MoAb を報告している。また山田ら<sup>23,24)</sup>は、細胞膜系組織特異抗原抽出法を用い、肺癌組織から細胞膜系可溶性蛋白分画を抽出し、その LPfr の peak II 部分に抗原活性を認めている。さらに、大腸癌においても、同様の抗原抽出法を用いて得た抗血清(ポリクローナル抗体)の免疫学的検討を行ない、大腸癌には共通して存在するが他臓器癌や正常組織、胎児臓器には認められない大腸癌高度関連抗原の存在を報告している<sup>25)</sup>。そこで、著者は、ヌードマウスで増殖させたヒト癌細胞株より細胞膜系可溶性蛋白分画を抽出して免疫源とし、モノクローナル抗体の作製を試みた。得られたクローンについて、多種の細胞株を用いた Cell-ELISA を行い、選択を行った結果、正常大腸粘膜、CEA とは反応せず、大腸癌のみと反応する特異性の高いクローンを得ることができた。

しかし、今回作製した MoAb の新鮮凍結切片における免疫組織染色では、高および中分化型大腸腺癌とはそれぞれ15/15, 13/15と高率に反応したが、粘液癌3例とは反応しなかった。これは、Albino ら<sup>26)</sup>が、同一悪性黒色腫患者の別々の転移巣から樹立した細胞株3種では、MoAb が認識する細胞表面抗原に相違があったと報告しているように、同じ大腸癌でも組織型



により抗原に異質性 (heterogeneity) があるためか、あるいは粘液化に伴い有効抗原量の低下がおこる可能性も考えられ、今後の検討が必要である。しかしながら、今回得られた MoAb は高い大腸癌特異性を有しており、今後、臨床応用の可能性が示唆された。

本研究で作製した MoAb は、高い臓器特異性を有しているが、マウス-マウス型 MoAb であり、臨床応用にあたってはアナフィラキシーの危険性、抗マウス免疫グロブリン抗体による MoAb 活性低下の可能性がある<sup>27,28)</sup>。したがって、ヒト型 MoAb が望ましいと考えられるが、Olsson & Kaplan<sup>29)</sup> 以来、報告されたヒト型 MoAb は、十数種であり、かつ高い臓器特異性を得ることの困難性が示されており、今後、特異性と安全性を両立させた MoAb の確立が望まれる。

### 結 論

大腸癌細胞株 COLO-201 より作製した細胞膜系可溶性蛋白分画を抗原として、マウスモノクローナル抗体を作製し、ELISA 法および免疫組織染色による検討を行って、以下の結論を得た。

1) 得られた MoAb (KC-1, 2) は、粘液癌を除く大腸癌と高率に反応し、他の被検悪性腫瘍とは反応しなかった。

2) MoAb (KC-1, 2) は、大腸を含む正常諸臓器、胎児諸臓器とは反応せず、CEA に対しても反応しなかった。

3) MoAb (KC-1, 2) のアイソタイプは、いずれも IgM, $\kappa$  であった。

4) MoAb (KC-1, 2) が認識する抗原活性部位は、糖鎖の関与しない蛋白であると考えられた。

以上より、この MoAb は、大腸癌の診断・治療において、臨床応用が可能と考えられる。

### 謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御検閲を賜りました恩師、岩喬教授に深甚の謝意をあらわします。また、終始御指導、御教示いただきました金沢大学がん研究所病態生理部前教授、倉田自章先生ならびに金沢大学第一外科前講師、山田哲司先生に深く感謝いたします。

さらに、御助言、御協力いただきました金沢大学がん研究所病態生理部、佐藤信生先生ならびに同教職員各位に厚く御礼申し上げます。

### 文 献

- 1) Kohler, G. & Milstein, C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, **256**, 495-497 (1975).
- 2) Semple, T. U., Quinn, L. A., Woods, L. K.

& Moore, G. E.: Tumor and lymphoid cell lines from a patient with carcinoma of colon for a cytotoxicity model. *Cancer Res.*: **38**, 1345-1355 (1978).

3) Smith, J. T., Funckes, A. J., Barak, A. J. & Thomas, L. E.: Cellular lipoproteins. 1. The insoluble lipoprotein of whole liver cells. *Exp. Cell Res.*, **13**, 96-102 (1957).

4) Kurata, Y. & Okada, S.: Immunological studies of insoluble lipoproteins. 1. Antigen analysis of thyroid lipoproteins. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **29**, 495-509 (1966).

5) Kurata, Y., Watanabe, Y., Okada, S. & Fukuyama, Y.: Immunological studies of insoluble lipoproteins. 2. On the salivary-gland characteristic antigens. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **35**, 392-401 (1969).

6) Okada, S., Kurata, Y., Konishi, K. & Matsuda, T.: Immunological studies of insoluble lipoproteins. 3. Characterization of the lipoprotein-bound thyroid gland-specific antigen. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **39**, 6-15 (1970).

7) 倉田自章, 岡田収司: 組織特異抗原の抽出法. 免疫実験操作法 A (日本免疫学会編) 第 3 版, 390-393 頁, 日本免疫学会, 金沢, 1971.

8) 西 信三, 山崎春城:  $\alpha$ -fetoprotein 特異モノクローナル抗体の作製と診断への応用・臨床科学, **18**, 1070-1074 (1982).

9) Kruppy, J., Wilson, T., Freedman, S. O. & Gold, P.: The preparation of purified carcinoembryonic antigen of the human digestive system from large quantities of tumor tissue. *Immunochemistry*, **9**, 617-622 (1972).

10) Koprowski, H., Steplewski, Z., Mitchell, K. & Herlyn, M.: Colorectal carcinoma antigens detected by hybridoma antibodies. *Somatic Cell Genet.*, **5**, 957-972 (1979).

11) Herlyn, M., Steplewski, Z., Herlyn, D. & Koprowski, H.: Colorectal carcinoma-specific antigen: detection by means of monoclonal antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 1438-1442 (1979).

12) Steplewski, Z., Cang, T. H., Herlyn, M. & Koprowski, H.: Release of monoclonal antibody-defined antigens by human colorectal carcinoma and melanoma cells. *Cancer Res.*, **41**, 2723-2727

(1981).

- 13) **Koprowski, H., Herlyn, M. & Steplewski, Z.**: Specific antigen in serum of patients with colon carcinoma. *Science*, **212**, 53-55 (1981).
- 14) **Herlyn, D. M., Steplewski, Z., Herlyn, M. F. & Koprowski, H.**: Inhibition of growth of colorectal carcinoma in nude mouse by monoclonal antibody. *Cancer Res.*, **40**, 717-721 (1980).
- 15) **Sears, H. F., Atkinson, B., Mattis, J., Ernst, C., Herlyn, D., Steplewski, Z., Hayry, P. & Koprowski, H.**: Phase I clinical trial of monoclonal antibody in treatment of gastrointestinal tumors. *Lancet*, **1**, 762-765 (1982).
- 16) **Magnani, J. L., Brockhaus, M., Smith, D. F. & Ginsburg, V.**: A monosialoganglioside is a monoclonal antibody-defined antigen of colon carcinoma. *Science*, **212**, 55-56 (1981).
- 17) **Thompson, C. H., Jones, S. L., Pihl, E. & McKenzie, I. F. C.**: Monoclonal antibodies to human colon and colorectal carcinoma. *Br. J. Cancer*, **47**, 595-605 (1983).
- 18) **Stramignoni, D., Bowen, R. & Atkinson, B. F.**: Differential reactivity of monoclonal antibodies with human colon adenocarcinomas and adenomas. *Int. J. Cancer*, **31**, 543-552 (1983).
- 19) **Yiu, C. Y., Baker, B. A. & Gusterson, M.**: Monoclonal antibodies with colorectal tumors. *Anticancer Res.*, **6**, 721-724 (1986).
- 20) 小棚木均: ヒト大腸癌に対するモノクローナル抗体の作製とその解析に関する研究. *秋田医学*, **11**, 221-236 (1985).
- 21) **Irie, R. F., Irie, K. & Morton, D. L.**: Natural antibody in human serum to a neoantigen in human cultured cells grown in fetal bovine serum. *J. Natl. Cancer Inst.*, **52**, 1051-1057 (1974).
- 22) **Colcher, D., Hand, P. H., Nuti, M. & Schlom, J.**: A spectrum of monoclonal antibodies reactive with human mammary tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 3199-3203 (1981).
- 23) 山田哲司: 人肺癌特異抗原の研究. *十全医会誌*, **88**, 155-167 (1979).
- 24) 山田哲司, 渡辺洋宇, 木元春生, 岩 喬, 岡田収司, 倉田自章: 人肺扁平上皮癌高度関連抗原の研究 (II) - 酵素抗体法による検討 -. *日外会誌*, **86**, 132-137 (1980).
- 25) 山田哲司, 山脇 優, 橋爪泰夫, 笠原善郎, 中島久幸, 森 善裕, 川浦幸光, 岩 喬: 大腸癌関連抗原の研究. *日大肛病会誌*, **39**, 232-236 (1986).
- 26) **Albino, A. P., Lloyd, K. O., Houghton, A. N., Oettgen, H. F. & Old, L. J.**: Heterogeneity in surface antigen and glycoprotein expression of cell lines derived from different melanoma metastases of the same patient. *J. Exp. Med.*, **154**, 1764-1778 (1981).
- 27) **Miller, R. A., Maloney, D. G., Mckillop, J. & Levy, R.**: In vivo effects of murine hybridoma monoclonal antibody in a patient with T-cell leukemia. *Blood*, **58**, 78-86 (1981).
- 28) **Houghton, A. N., Mintzer, D., Cordon-Cardo, C., Welt, S., Fliegel, B., Vadhan, S., Carswell, E., Melamed, M. R., Oettgen, M. H. & Old L. J.**: Mouse monoclonal Ig G3 antibody detecting GD3 ganglioside: A phase I trial in patients with malignant melanoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 1242-1246 (1985).
- 29) **Olsson, L. & Kaplan, H. S.**: Human-human hybridomas producing monoclonal antibodies of predefined antigenic specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 5429-5431 (1980).

**Production and Analysis of Monoclonal Antibodies against Human Colorectal Cancers** Hisayuki Nakashima, Department of Surgery (I), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Jusen Med. Soc., 99, 805—814 (1990)

**Key words** colorectal cancer, monoclonal antibody, immunohistochemistry, cell membranous antigen

#### Abstract

To establish colorectal cancer-specific monoclonal antibodies (MoAb), soluble protein fractions with antigenic activities were extracted from the colon cancer cell line COLO-201, and MoAb against this fractions were produced. After screening several two MoAb (KC-1, KC-2) commonly reacted with colorectal cancers but did not react with the normal intestinal mucosa or malignant tumors, other than colorectal cancer. The isotype of both MoAb's was IgM,  $\kappa$  type and the epitope recognized by these MoAb's was regarded as a protein. In immunostaining using MoAb (KC-1) and the avidin-biotin-peroxidase complex technique, 13 normal organs and 9 fetal organs were free of staining. In colorectal cancers, 100% (15/15) in well differentiated adenocarcinoma, 86.7% (13/15) in moderately differentiated adenocarcinoma and 0% (0/3) in mucinous carcinoma were positively stained. On the other hand, 15 malignant tumors of other organs tested were free of staining. These results indicate that KC-1 and KC-2 are highly specific for colorectal cancers.