

塩基性フェトプロテインに対するモノクローナル抗体の作製

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/2297/9095

塩基性フェトプロテインに対するモノクローナル抗体の作製

金沢大学医学部内科学第一講座 (主任: 服部 信教授)

小 松 義 和

(昭和58年11月21日受付)

本論文の要旨は第10回日本臨床免疫学会総会 (1981年6月, 東京) において発表した。

細胞融合法を用いて塩基性フェトプロテイン (basic fetoprotein 以下 BFP と略す) に対するモノクローナル抗体を作製した。免疫には8週令の BALB/c 雄マウス5匹を用い10-50 μ g の BFP を腹腔内もしくは静脈内に計4回投与した。2週後にはマウス血中に抗 BFP 抗体が認められた。細胞融合は Herzenberg らの変法に準じ、最終免疫3~4日目に免疫マウスより脾臓を取り出し、親株細胞 (BALB/c マウス由来の P3-X63-Ag8-UI) と細胞数比10:1にて50%ポリエチレングリコール存在下に37°Cにて融合を行った。HAT 培養液により融合細胞を選択後、¹²⁵I 標識精製 BFP を用いた radioimmunoassay にて抗 BFP 抗体産生融合細胞を選び、limiting dilution, single cell manipulation にて5クローンを確立した。5クローンはそれぞれ BMA 1, 2, 3, 4, 5 と命名した。その免疫グロブリンのサブクラスはそれぞれ IgG2a, IgG2a, IgG1, IgG1, IgG1 であった。確立した5クローンの抗体の抗原特異性を competitive inhibition assay と direct antigen binding assay にて検討したところ5クローンはすべて抗原特異的であることが確認された。さらに、患者血清中には BFP と共通抗原性を有する物質が存在する可能性が推測された。今回作製したモノクローナル抗体により、安定な測定系の確立が可能となり、BFP の詳細な解析により BFP においても癌特異的 BFP の発見が期待された。

Key words Basic Fetoprotein, Hybridization, Monoclonal antibody, Antigen specificity.

1963年、ソ連の Abelev が胎児性蛋白である α フェトプロテイン (α -Fetoprotein, 以下 AFP と略す) を肝癌移植マウス血中に発見して以来¹⁾、胎児性癌蛋白と総称される蛋白がいくつか報告されている。塩基性フェトプロテイン (Basic Fetoprotein, 以下 BFP と略す) は1974年石井によりヒト胎児血清および胎児腸組織抽出液から発見された胎児性癌蛋白で²⁾³⁾、肝癌、膵癌、乳癌、白血病、骨髄腫等で高率に高値を示し担癌状態の診断にきわめて有用であると報告されている。しかし、これまで BFP の精製はきわめて困難でありその作製も容易ではなかった。

1975年、Milstein と Köhler は細胞融合法を用いて特異抗体を持続的に産生する B細胞ハイブリドーマを作製した⁴⁾。本法の開発により微量抗原に対する抗体

を大量にしかも単一抗体として作製することが可能となった。

今回 BFP に対するモノクローナル抗体の作製を行ったので報告する。

対象および方法

I) 免疫動物

8週令で体重25~36グラムの BALB/cAnNCrj (Chales River より購入) の雄マウス5匹に免疫を行った。

II) 培養液

各培養液の作製は下記の如く行った。

1) 5%および10%仔牛胎児血清加 RPMI (5%, 10% fetal calf serum-RPMI, 以下5%, 10% FCS-

Establishment of Anti-Basic Fetoprotein Monoclonal Antibody. **Yoshikazu Komatsu**, Department of Internal Medicine (I), (Director: Prof. N. Hattori), School of Medicine, Kanazawa University.

RPMI と略す) : RPMI 1640 (日水社製) に 5% および 10% の仔牛胎児血清 (GIBCO 社製), 2 mM の L-グルタミン, 0.2 mg/ml のカナマイシン, 2 mg/ml の Na_2CO_3 を添加した培養液。

2) HAT 培養液 : 10% FCS-RPMI に Hypoxanthine $1 \times 10^{-4}\text{M}$, Aminopterin $4 \times 10^{-7}\text{M}$, Thymidine $1.6 \times 10^{-8}\text{M}$ 添加した培養液。

3) HT 培養液 : 10% FCS-RPMI に Hypoxanthine $1 \times 10^{-4}\text{M}$, Thymidine $1.6 \times 10^{-8}\text{M}$ 添加した培養液。

III) 親株細胞

BALB/c マウス由来の plasmocytoma cell line (MOPC-21) で 8-アザグアニン耐性株である P3-X63-Ag8-U1 (以下 P3-U1 と略す) を用いた⁹⁾。P3-U1 は免疫グロブリンの L 鎖が細胞質内に存在するが分泌はしない nonsecretor 細胞である。

IV) 細胞融合

抗 BFP 抗体産生 B 細胞を作製するために, BALB/c マウスの腹腔内および静脈内に石井より供与された精製 BFP 10~50 μg を 10~14 日おきに 4 回免疫した (図 1)。初回免疫時には同時にアジュバンドとして *Bordetella pertussis* vaccine (1×10^9 organisms/mouse) を用いた。最終免疫の 3~4 日後に免疫した BALB/c マウスより脾臓を取り出しリンパ球浮遊液を作製し B 細胞とした。親株細胞 P3-U1 は 5% FCS-RPMI にて培養, 増殖させその増殖期にある細胞を細胞融合に用いた。

次に, Herzenberg⁸⁾の変法に準じて抗 BFP 抗体産生 B 細胞と P3-U1 の細胞融合を行った。細胞融合は脾細胞 $1 \sim 2 \times 10^8$ 個と P3-U1 $1 \sim 2 \times 10^7$ 個とを (細胞数比 10 : 1), 50% ポリエチレングリコール (BDH 社製, 分子量 1500) 存在下にて 37°C 恒温水槽内で行った。

細胞融合後, 細胞は 10% FCS-RPMI 20 ml に浮遊させ 96 wells 培養マイクロプレート 2 枚に 200 μl /well ずつ分注した。

培養液の交換は細胞融合後第 1, 2, 3, 5, 8, 11, 14 日目に 100 μl /well ずつ HAT 培養液にて行った。それ以後は融合細胞の増殖の程度をみながら適時培養液を交換した。

HAT 培養液にて約 4 週間融合細胞を培養した後 HT 培養液にて 10 日間培養し以後は 10% FCS-RPMI にて 2 週間培養, 次いで 5% FCS-RPMI にて培養を行った。

V) 血中および培養上清中の抗体価の測定 (表 1)

免疫マウスの血中抗体価は免疫開始後 14 日目と 24 日目に採血し, 下記の方法で測定した。また融合細胞の抗体産生の有無を検討するため培養上清中の抗体価を測定した。抗体価の測定方法はアフィニティーカラムで精製した家兎抗マウス免疫グロブリン (以下 Rabbit anti-mouse Ig と略す) (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を付着させた 96 wells ソフトタイタープレートに被検血清あるいは培養上清 30 μl を加え室温にて 1 時間反応させ洗浄後各 well にクロラミン T 法にて標識した¹²⁵I 標識精製 BFP 30 μl を加えさらに室温にて 1 時間反応させた後洗浄し比活性を γ -カウンターにて測定した (PBA 法)⁷⁾。被検血清はあらかじめ Phosphate-buffered saline (10 mM, pH7.2) (以下 PBS と略す) にて 500 倍もしくは 1000 倍に希釈し測定した。また対照として正常 BALB/c マウス血清もしくは培養液を用いた。

VI) クローニング

単一クローンの融合細胞を得るため培養上清中の抗体価の高値であった well を選択してクローニングを行った。方法はまず limiting dilution を行ないその培

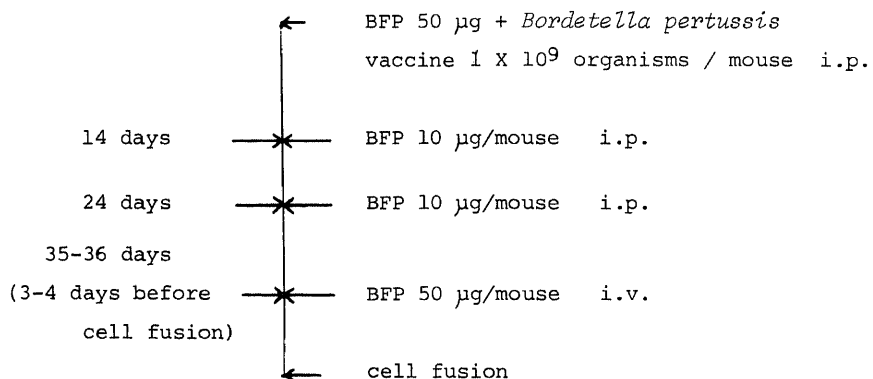


Fig. 1. Protocol of immunization by BFP.

養上清中の抗体価が高くしかも免疫グロブリンのサブクラスの明らかな well についてさらに single cell manipulation を行った。

1) limiting dilution: original plate の各 well をピペティングし 100 個の融合細胞を取り出し約 10 ml の培養液に浮遊させた。次に, feeder layer を含んだ second plate (96 wells 培養マイクロプレート) に 1 well 当り 1 個入るように 100 μ l ずつ分注しクローニングを行った。なお, 1 well より second plate は 1 枚作製した。

2) single cell manipulation: original plate の各 well をピペティングし適当数の融合細胞をシャーレに取り出し, マイクロマニピュレーターを用いて顕微鏡下で 1 個の融合細胞を吸引し feeder layer を含んだ second plate に 1 well 当り 1 個ずつ培養した。

なお, feeder layer は以下の如く作製した。クローニングを行う前日に BALB/c マウスより胸腺を採取しリンパ球浮遊液を作製した。second plate の 96 wells 培養マイクロプレートに 1 well 当り 1×10^6 個/

100 μ l ずつ分注し 24 時間培養後 feeder layer とした。使用した培養液はクローニング時に融合細胞の培養に使用していた液を用いた。

VII) 高力価抗体産生株の選択 (表 2)

クローン化融合細胞より高力価抗体産生株を選択するためクローニングした融合細胞の培養上清中の免疫グロブリン量を以下の方法で測定した。

Rabbit anti-mouse Ig (100 μ g/ml) を付着させた 96 wells ソフトタイタープレートに, PBS にて 100 倍に希釈した培養上清を 30 μ l 加え室温にて 1 時間反応させた後洗浄した。さらに 125 I 標識 Goat anti-mouse Ig 30 μ l を室温にて 1 時間反応させ洗浄後比活性を γ -カウンターにて測定した。対照として培養液を用いた。

VIII) 免疫グロブリンサブクラスの決定 (表 3)

クローン化した融合細胞の産生する免疫グロブリンが IgG1, IgG2a, IgG3, IgM のどのサブクラスに属するものかを検討した。

測定方法は, まず Rabbit anti-mouse Ig (100 μ g/ml) を付着させた 96 wells ソフトタイタープレート

Table 1. Protocol of anti-basic fetoprotein (BFP) titer in mouse serum and culture supernatant.

1. Coat wells with rabbit anti-mouse immunoglobulin (50 μ l of 100 μ g/ml) for 1 hour at room temperature (R. T.)
2. Wash 3 times with 0.5% bovine serum albumin (BSA) + 0.1% NaN₃ in phosphate-buffered saline (PBS) (10mM, pH 7.2) (BSA buffer)
3. Apply diluted immunized mouse serum or culture supernatant (30 μ l)
4. Incubate for 1 hour at R. T.
5. Wash 3 times with BSA buffer
6. Apply 125 I-labeled BFP (30 μ l)
7. Incubate for 1 hour at R. T.
8. Wash 6-7 times with PBS
9. Count

Table 2. Protocol of selection of hyproducer.

1. Coat wells with rabbit anti-mouse Ig (50 μ l of 100 μ g/ml) for 1 hour at R. T.
2. Wash 3 times with BSA buffer
3. Apply diluted culture supernatant (30 μ l)
4. Incubate for 1 hour at R. T.
5. Wash 3 times with BSA buffer
6. Apply 125 I-labeled goat anti-mouse Ig (30 μ l)
7. Incubate for 1 hour at R. T.
8. Wash 6-7 times with PBS
9. Count

に、0.5%牛血清アルブミン加PBS (0.5% bovine serum albumin in PBS 以下 BSA buffer と略す) にて 100 倍に希釈した培養上清 30 μ l を加え室温にて 1 時間反応させた後洗浄した。次に IgG1, IgG2a に対する抗体が C57BL/6 マウス由来 (Becton-Dickinson 社製) であるので非特異的の反応を除去するため正常 C57BL/6 マウス血清 30 μ l を各 well に添加し室温にて 1 時間反応させた上洗浄し、さらに¹²⁵I を標識した抗 IgG1, IgG2a, IgG3, IgM, mouse Ig 抗体と室温にて 1 時間反応後洗浄し各 well の比活性を γ -カウンターにて測定しサブクラスを決定した。対照として培養液を用いた。

IX) 抗原特異性の検討

クローン化した融合細胞の産生する抗体が BFP に特異的抗体であるか否かについて培養上清を用いて以下の方法にて検討した。

1) competitive inhibition assay (表 4)

Rabbit anti-mouse Ig (100 μ g/ml) を付着させた 96 wells ソフトタイタープレートに BSA buffer にて 200~1200 倍に希釈したクローン化融合細胞の培養上清 30 μ l を加え室温にて 1 時間反応後洗浄した。次に BSA buffer にて 0.001~100 μ g/ml に希釈した既知量の精製 BFP 15 μ l もしくは従来の抗体を用いて BEP を除去した検体 (以下 BFP-free sample と略す) の原液および BSA buffer にて 10 倍より段階希釈した BFP-free sample 15 μ l と¹²⁵I 標識 BFP 15 μ l を同時に加え室温にて 1 時間反応後洗浄し γ -カウンターにて比活性を測定した。対照として BSA buffer を用いた。

2) antigen binding assay (ABA 法) (表 5)

精製 BFP (100 μ g/ml) を付着させた 96 wells ソフトタイタープレートに BSA buffer にて 20 倍より倍々希釈したクローン化融合細胞の培養上清 30 μ l を加え室温にて 1 時間反応後洗浄した。次に¹²⁵I 標識 Rabbit

Table 3. Protocol of detection of immunoglobulin subclass.

1. Coat wells with rabbit anti-mouse Ig (50 μ l of 100 μ g/ml) for 1 hour at R. T.
2. Wash 3 times with BSA buffer
3. Apply diluted culture supernatant (30 μ l)
4. Incubate for 1 hour at R. T.
5. Wash 3 times with BSA buffer
6. Apply serum of 57BL/6 (for IgG1, IgG2a) or BSA buffer (for IgG3, IgM, mouse Ig) (50 μ l)
7. Incubate for 1 hour at R. T.
8. Wash 3 times with BSA buffer
9. Apply ¹²⁵I-labeled anti-IgG1, anti-IgG2a, anti-IgG3, anti-IgM or anti mouse Ig (30 μ l)
10. Incubate for 1 hour at R. T.
11. Wash 6-7 times with PBS
12. Count

Table 4. Protocol of competitive inhibition assay.

1. Coat wells with rabbit anti-mouse Ig (50 μ l of 100 μ g/ml) for 1 hour at R. T.
2. Wash 3 times with BSA buffer
3. Apply adequately diluted culture supernatant (30 μ l)
4. Incubate for 1 hour at R. T.
5. Wash 3 times with BSA buffer
6. Apply BFP sample or BFP-free sample (15 μ l) and ¹²⁵I-labeled BFP (15 μ l)
7. Incubate for 1 hour at R. T.
8. Wash 6-7 times with PBS
9. Count

anti-mouse Ig 30 μ l を加え室温にて1時間反応後洗浄し γ -カウンターにて比活性を測定した。対照として培養液を用いた。

X) 標準曲線の作製 (表6)

患者血清中の BFP 値を測定するために、確立したモノクローナル抗体より1種を選び標準曲線を以下の方法にて作製した。

Rabbit anti-mouse Ig (100 μ g/ml) を附着させた 96 wells ソフトタイタープレートに BSA buffer にて 10,000 倍に希釈したクローン化融合細胞の培養上清 30 μ l を加え室温にて1時間反応させた後洗浄した。次に BSA buffer にて 0.0001~100 μ g に希釈した精製 BFP 15 μ l を加え室温にて1時間反応後各 well に 125 I 標識 BFP 15 μ l を添加しさらに室温にて1時間反応後洗浄し γ -カウンターにて比活性を測定した。

XI) 患者血清中の BFP 値の測定

得られた標準曲線を用いて患者血清中の BFP 値を測定し従来の測定法での BFP 値と比較検討した。血清は BSA buffer にて 16~160 倍に希釈して測定した。

なお、測定した患者血清は石井より供与された検体で conventional 抗体 (抗 BFP 家兎血清) を用いた 2 抗体法による radioimmuno assay 法³⁾ による BFP 値はそれぞれ検体 1 ; 640 ng/ml 以上, 検体 2 ; 640 ng/ml 以上, 検体 3 ; 33 ng/ml, 検体 4 ; 42 ng/ml であった。

成 績

I) 免疫マウスの血中抗体価 (表7)

初回免疫後 14 日目と 24 日目について血中抗体価を比較検討すると、14 日目では 770 ± 318 cpm (対照 388 cpm), (1000 倍希釈), 24 日目では 899 ± 352 cpm (対照 384 cpm) (500 倍希釈) であった。初回免疫により抗体価の上昇は認められたが追加免疫では抗体価の上昇はほとんど認められなかった。そこで BFP 50 μ g を静脈内投与しそれから 3~4 日後の脾細胞を用いて細胞融合を行った。

II) 培養上清中の抗体価 (図2)

細胞融合は免疫した 5 匹のマウスを用いて 5 回行った。各融合毎に 80~90% の well に細胞の増殖を認め

Table 5. Protocol of antigen binding assay.

1. Coat wells with purified BFP (50 μ l of 100 μ g/ml)
2. Wash 3 times with BSA buffer
3. Apply serially diluted culture supernatants (30 μ l)
4. Incubate for 1 hour at R. T.
5. Wash 3 times with BSA buffer
6. Apply 125 I-labeled rabbit anti-mouse Ig (30 μ l)
7. Incubate for 1 hour at R. T.
8. Wash 6-7 times with PBS
9. Count

Table 6. Protocol of standard curve for BFP level.

1. Coat wells with rabbit anti-mouse Ig (50 μ l of 100 μ g/ml) for 1 hour at R. T.
2. Wash 3 times with BSA buffer
3. Apply adequately diluted culture supernatant (30 μ l)
4. Incubate for 1 hour at R. T.
5. Wash 3 times with BSA buffer
6. Apply diluted BFP (15 μ l)
7. Incubate for 1 hour at R. T.
8. Add 125 I-labeled BFP (15 μ l)
9. Incubate for 1 hour at R. T.
10. Wash 6-7 times with PBS
11. Count

た、そこで各 well の培養上清中の抗体価を測定したところ、対照は 219 ± 64 cpm であり 7000 cpm 以上を示した 46 wells 中 12000 cpm 以上を示したのは 23 wells であった。この結果より 12000 cpm 以上を示した well より 16 wells を選び limiting dilution によるクローニングを行った。

III) クローニングした融合細胞の培養上清中の抗体価 (図 3)

クローニングにより融合細胞の増殖を認めたのは

Table 7. Anti-BFP antibody titers of BFP-immunized mice.

Mouse number	Anti-BFP titer (cpm) at	
	14 days	24 days
1	787 *	836 **
2	696 *	589 **
3	675 *	891 **
4	1069 *	1048 **
5	622 *	1080 **
NMS ***	388 *	384 **

*: serum dilution, 1: 1000

** : serum dilution, 1: 500

***: normal BALB/c mouse serum

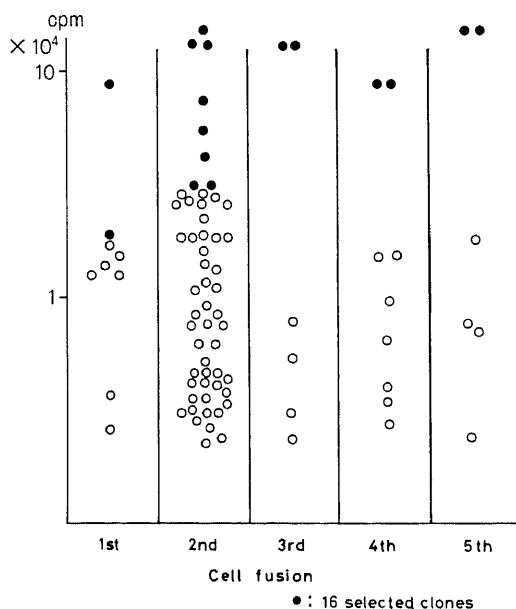


Fig. 2. Anti-BFP titer of culture supernatant of hybridoma cells.

1536 wells 中 463 wells であった。そこで各 well の培養上清中の抗体価を測定したところ対照は 204 ± 76 cpm であり 2000 cpm 以上を示した 108 wells 中 7000 cpm 以上を示したのは 64 wells であった。

IV) 高力価抗体産生株および免疫グロブリンサブクラスの決定 (表 8)

選択した 64 wells よりさらに高力価抗体産生株を選び出した。対照は 1455 ± 99 cpm であり 4000 cpm 以上の well は 51 wells であった。

次にその 51 wells について免疫グロブリンサブクラスについて検討した。対照は IgG1 が 935 cpm, IgG2a が 1909 cpm, IgG3 が 39 cpm, IgM が 944 cpm, mouse Ig が 1682 cpm であった。培養上清と対照の比活性の差を求めサブクラスが決定できたのは 32 wells であった。

V) クローン確立

高力価抗体産生株であり免疫グロブリンサブクラスが決定できた 32 wells より 2A1-C1, 2G8-A6, 3E1-D11, 6C8-F12, 7H5-A6 (以下順次, BFP monoclonal antibody (BMA) 1, 2, 3, 4, 5 と略す) の 5 wells を選び single cell manipulation を行った融合細胞の増殖を認めた 180 wells 中 102 wells について培養上清中の抗体価を測定した。対照は 116 ± 21 cpm であり検討した 102 wells より高抗体力価を示した 5 wells を選択した。選択した 5 wells の各々の抗体価は BMA 1 が 9395 cpm, BMA 2 が 5249 cpm, BMA 3

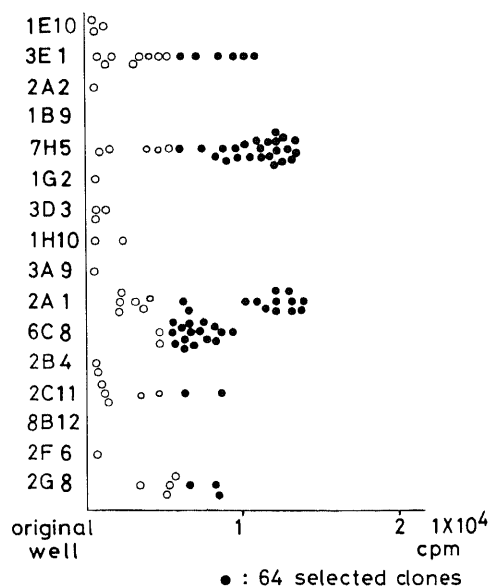


Fig. 3. Anti-BFP titer of culture supernatant of cloned hybridoma cells.

が6626 cpm, BMA 4が6360 cpm, BMA 5が8153 cpmであった。

BMA 1, 2, 3, 4, 5の免疫グロブリンのサブクラスはそれぞれIgG2a, IgG2a, IgG1, IgG1, IgG1であった。

VI) 確立したクローンの抗原特異性の検討

以上より確立された5種の抗体についてその抗原特異性を2方法にて培養上清を用いて検討した。

1) competitive inhibition assayによる抗原特異性の検討(図4)

5種の培養上清をBMA 1は500倍, BMA 2は200倍, BMA 3は600倍, BMA 4は500倍, BMA 5は1200倍に希釈して測定した。精製BFPと5種のモノクローナル抗体の反応を比較検討すると得られた曲線は50%抑制が精製BFP濃度でそれぞれBMA 1, 3, 4が0.5 µg/ml, BMA 2, 5が0.1 µg/mlにあり特異性を有すると考えられた(図4-1)。また, BFP-free sampleと5種のモノクローナル抗体の反応を比較検討すると, BMA 1および5では抑制が全く認められなかった。しかし, BMA 2では40%, BMA 3では27%, BMA 4では65%の抑制がBFP-free sampleの原液では認められ, 精製BFPに対する反応とは全く異っていた(図4-2)。

2) ABA法による抗原特異性の検討(図5)

5種の抗体のうちBMA 5についてさらにABA法を用いて抗原特異性を検討した。培養上清の希釈にともない10000 cpmから300 cpmにまで比活性の低下を認め, 全くBFPを含まない対照では比活性は変化せず200 cpmでありBMA 5が抗原特異的であることが確認された。

VII) 患者血清中のBFP値の測定

BMA 5を用いて作製した標準曲線よりBFPの定量は1 ng/mlから1000 ng/mlまで測定が可能であった(図6)。

この標準曲線より測定した患者血清中のBFP値は検体1は1200 ng/ml, 検体2は800 ng/ml, 検体3は140 ng/ml, 検体4は180 ng/mlであった。

考 察

1974年に石井がBFPを発見して以来²³⁾, BFPは臓器特異性は劣るが担癌状態の診断にきわめて有要であることが報告されている。しかしBFPの精製はきわめて困難でありその抗体作製も容易ではなかった。

1975年にMilsteinとKöhler⁴⁾が単一抗体を持続的に産生するB細胞単一クローンを細胞融合法により作製することに成功して以来各種の微量抗原, 例えばT

Table 8. Hyproducer and immunoglobulin subclass.

clone number	hyproducer ×100 (cpm)	Ig subclass	clone number	hyproducer ×100(cpm)	Ig subclass
2A1-B6	5977	G2a	6C8-B11	5052	G1
*2A1-C1	7896	G2a	6C8-D11	5394	G1
2A1-F3	7583	G2a	6C8-D12	5382	G1
2A1-F11	7031	G2a	6C8-E12	5655	G1
2A1-G12	7794	G2a	6C8-F1	5355	G1
2A1-H4	5033	G2a	*6C8-F12	6115	G1
*2G8-A6	5761	G2a	6C8-G2	5322	G1
3E1-D5	5139	G1	6C8-G8	5098	G1
*3E1-D11	6072	G1	6C8-H1	4868	G1
3E1-G5	6032	G1	6C8-H6	5223	G1
6C8-A5	5428	G1	*7H5-A6	6118	G1
6C8-A10	5219	G1	7H5-A8	4300	G1
6C8-A11	5222	G1	7H5-B5	4800	G1
6C8-B4	5766	G1	7H5-G3	4939	G1
6C8-B6	5141	G1	7H5-H4	4466	G1
6C8-B8	6075	G1	7H5-H8	4175	G1

* : 5 selected clones

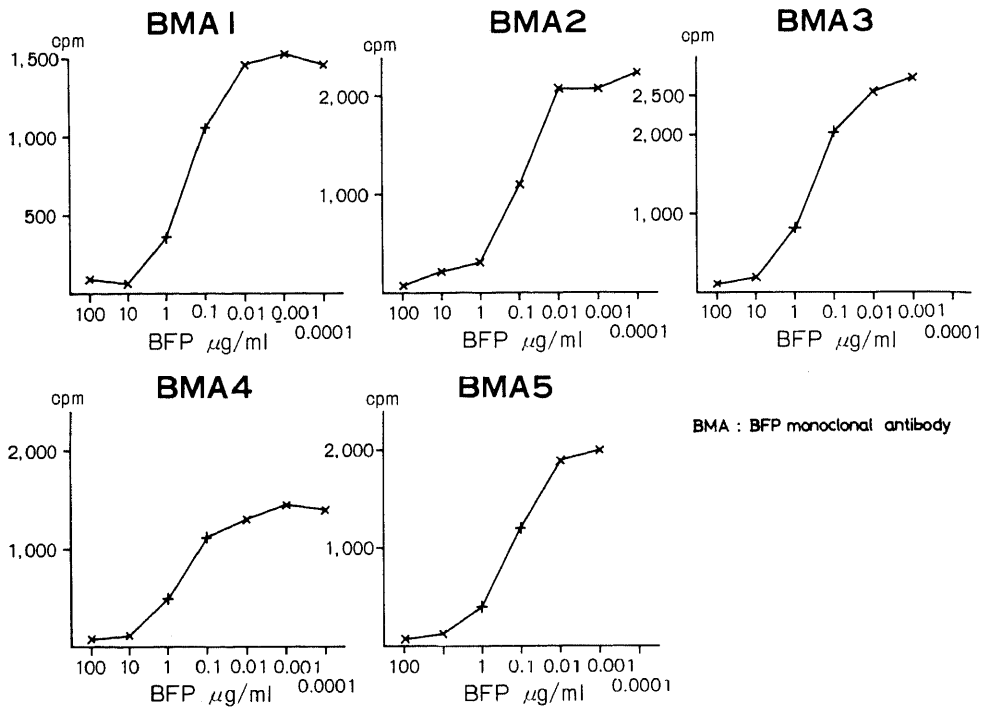


Fig. 4-1. Competitive inhibition assay with purified BFP.

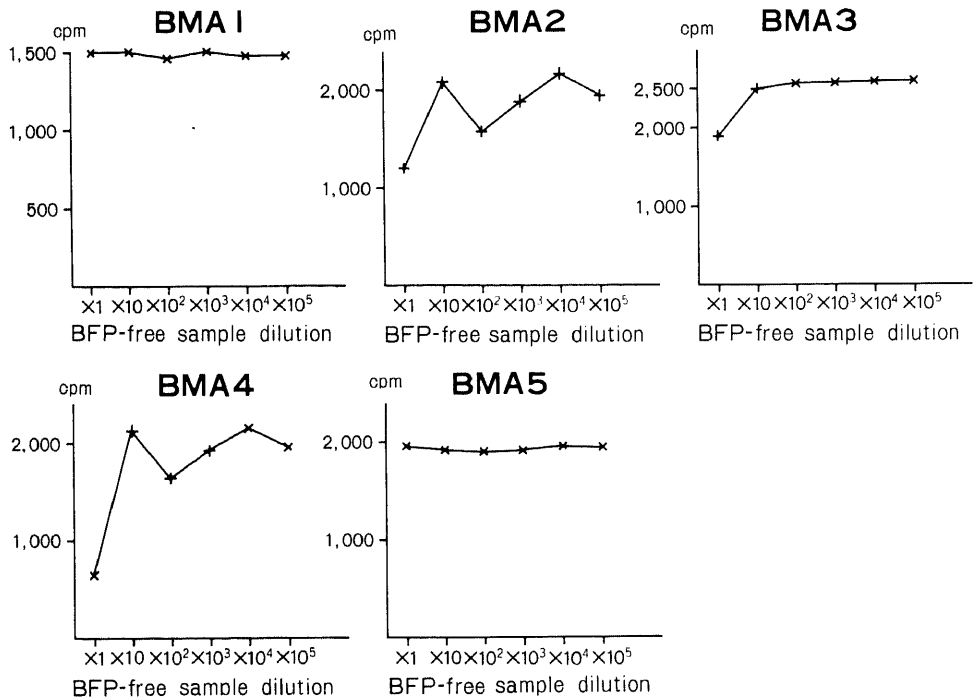


Fig. 4-2. Competitive inhibition assay with BFP-free sample.

細胞膜抗原, 癌細胞膜抗原, その他の微量可溶性抗原の解析に対して本法が応用されている。

今回微量可溶性抗原 BFP に対するモノクローナル抗体を作製したがモノクローナル抗体作製にあたって 2 つのことが問題となる。1 つは微量可溶性抗原による免疫方法である。現在のところ使用する抗原の免疫原性, 免疫動物の違いのため一定の免疫方法は確立されていない。J. R. Wands ら⁸⁾は BALB/c マウスを用い HBs 抗原に対するモノクローナル抗体の作製を種々の抗原量を用いて行い初回, 1, 10 もしくは 20 μg の抗原を腹腔内投与後 0.1, 1, 50 もしくは 100 μg の抗原で静脈内に追加免疫しても抗体価の上昇は著明ではなく, 初回 10 μg の抗原を腹腔内投与後 10 週目に静脈内に 10 μg の抗原を追加免疫した場合に最も高い抗体価の上昇を認めたと報告している。今回, 10~50 μg の BFP を計 4 回免疫したところ, 初回免疫による血中抗体価の上昇は認められたが追加免疫 10 日後では血中抗体価の有意の上昇を認めなかった。このことは HBs 抗原と BFP の抗原性の違いによるものと考えられ, 今後その他の可溶性抗原に対するモノクローナル抗体の作製に際しさらに検討すべき課題と考えられた。

いま 1 つの問題点としては抗体産生融合細胞を簡便に求めるためにはどの様にこれらの細胞を screening するかである^{7)~11)}。BFP のように用いる抗原が微量であるほどその測定方法の選択は重要な問題である。今回行った PBA 法による融合細胞の screening は測定時間も短く, 使用した抗原量も微量ですみ, しかも抗原特異性も期待できる測定法であり, 今後同様の微量可溶性抗原に対するモノクローナル抗体の作製において有用な screening の方法であると考えられた。

今回確立された hybridoma cell line は免疫グロブ

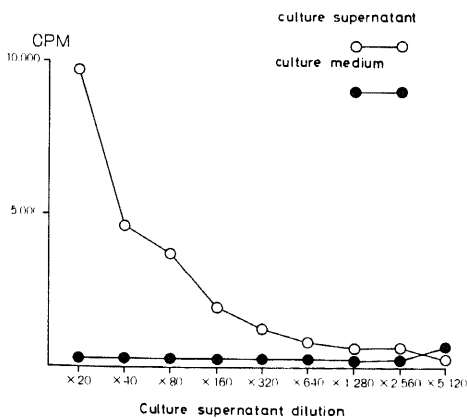


Fig. 5. Antigen binding assay.

リンのサブクラスが IgG2a である 2A1-C1 (BMA 1), 2G8-A6 (BMA 2) の 2 種と IgG1 である 3E1-D11 (BMA 3), 6C8-F12 (BMA 4), 7H5-A6 (BMA 5) の 3 種の計 5 種である。この 5 種のモノクローナル抗体の抗原特異性は competitive inhibition assay の結果より明らかであった。また BMA 5 については ABA 法でも抗体希釈にともない比活性の低下があり対照では比活性に変化を認めておらず抗原特異性が確認された。

また competitive inhibition assay の結果をさらに比較検討してみると, 従来の抗 BFP 抗体では BFP が測定されなかった検体との反応において 5 種のモノクローナル抗体のうち BMA 1 および 5 では BFP は測定されなかったが BMA 2, 3, および 4 では抑制率に差はあるが BFP の存在を示唆する結果が得られた。このことよりそれぞれのモノクローナル抗体は BFP に対して親和性あるいは認識する抗原決定基に差がある可能性が推測された。また患者血清中の BFP 値を従来の抗 BFP 抗体とモノクローナル抗体とで測定した結果を比較検討してみると, モノクローナル抗体による測定値の方が従来の抗体による測定値よりも高値となる血清が認められた。このことより患者血清中には BFP と共通抗原性を有する物質, 例えば BFP の分解産物あるいは modified BFP¹²⁾が存在する可能性が推測された。

これまで BFP の測定は抗原の精製が複雑なため抗体の作製も困難で一般的には測定できなかった。しかし今回モノクローナル抗体が作製されたことにより安価にしかも均一な力価の抗体が容易にかつ大量に入手

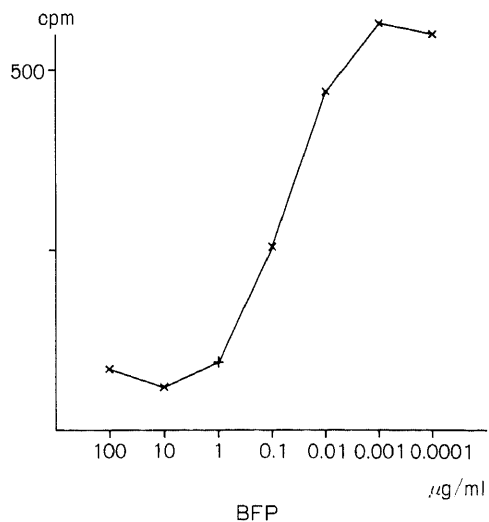


Fig. 6. Standard curve for BFP level.

でき測定キット間に測定誤差のない安定な測定系の確立が可能となった。また AFP や CEA¹³⁾では癌特異的なものと非特異的なものの存在が推測され現在種々のモノクローナル抗体を用いてその違いについて検討されている¹⁴⁾。今回作製したモノクローナル抗体を用いて BFP をさらに解析することにより BFP においても癌特異的な BFP が発見される可能性が期待される。

結 論

今回 BFP に特異的なモノクローナル抗体を作製した。抗体は 5 種類であり BFP に対する親和性、免疫グロブリンサブクラスに差異を認め認識する抗原決定基も異っている可能性が推測された。作製したモノクローナル抗体を用い測定キット間に誤差のない安定な測定系の確立が可能となり、また BFP の微細構造に対する解析も可能となった。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導と御校閲を賜った服部信教授に対し深甚の謝意を表します。また、適切な御指導と御援助を賜りました千葉大免疫研谷口克教授、埼玉ガンセンター石井勝博士に深謝いたします。さらに終始御指導と御教示を賜りました加登康洋講師をはじめ第 2 研究室各位に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Abelev, G. I.: *Acta Unio Intern. Contra Cancer.*, **19**, 80 (1963).
- 2) 石井 勝: 諸種悪性腫瘍に存在する新生児蛋白 basic fetoprotein に関する研究。医学のあゆみ, **100**, 344-346 (1977).
- 3) Ishii, M.: A new carcinoembryonic protein characterized by basic property. *Scand. J. Immunol.*, **8**, 611-620 (1978).
- 4) Köhler, G. & Milstein, C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, **256**, 495-497 (1975).

5) Margulies, D. H.: Regulation of immunoglobulin expression in mouse myeloma cells. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **41**, 781-791 (1976).

6) Oi, V. T. & Herzenberg, L. A.: Immunoglobulin-producing hybrid cell lines, p 351-372. In B. B. Mishell & S. M. Shiigi (ed.), *Selected methods in cellular immunology*, W. H. Freeman Co., San Francisco, 1980.

7) Tsu, T. T. & Herzenberg, L. A.: Solidphase radioimmune assay, p 373-397. In B. B. Mishell & S. M. Shiigi (ed.), *Selected methods in cellular immunology*, W. H. Freeman Co., San Francisco, 1980.

8) Wands, J. R. & Zurawski, V. R.: High affinity monoclonal antibodies to Hepatitis B surface antigen (HBsAg) produced by somatic cell hybrids. *Gastroenterology*, **80**, 225-232 (1981).

9) Köhler, G. & Milstein, C.: Derivation of specific antibody producing tissue culture and nonsecreting myeloma cell lines. *Eur. J. Immunol.*, **3**, 628 (1973).

10) Engvall, E. & Perlmann, P.: Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA: Anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. *J. Immunol.*, **109**, 129 (1972).

11) Wigzell, H.: Quantitative titration of mouse H-2 antibodies using ⁵¹Cr-labeled target cells. *Transplantation*, **3**, 423 (1975).

12) Bianchi, L.: The immunopathology of acute type B hepatitis, p 141-158. In H. C. Thomas, P. A. Miescher & H. J. Mueller (ed.), *Immunological aspects of liver disease*, Springer-Verlag., New York, 1982.

13) 黒木政秀・松岡雄治: 癌胎児性抗原の免疫化学的性状, 代謝, **18**, 717-729 (1981).

14) 西 信三・山崎春城: α -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)

Establishment of Anti-Basic Fetoprotein Monoclonal Antibody Yoshikazu Komatsu, Department of Internal Medicine (I), (Director: Prof. N. Hattori), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920 - J. Jusen Med. Soc., 92 789 - 799 (1983)

Key words: Basic Fetoprotein, Hybridization, Monoclonal antibody, Antigen Specificity.

Abstract

Anti-basic fetoprotein (BFP) monoclonal antibodies were established by a hybridization method. Five BALB/c mice (8-week-old males) were immunized by 10-50 μ g of BFP 4 times via intraperitoneal or intravenous route. Two weeks later, anti-BEP antibodies were detected in the sera of all mice. The spleen cells were removed from immunized mice 72-96 hours after the last antigen priming, and were hybridized with P3-X63-Ag8-U1 BALB/c myeloma cells (ratio: 10:1) at 37°C in the presence of polyethyleneglycol (M.W. 1500) as described by Herzenberg et al (1980). Hybrid cells were selected in HAT medium. Hybrid cells producing monoclonal anti-BFP antibodies were further screened by radioimmunoassay using ¹²⁵I labeled purified BEP antigens and were cloned by limiting dilution and single cell manipulation. Five hybrid clones, which were named BMA 1, 2, 3, 4 and 5, respectively, were established, and those immunoglobulin subclasses were found to be IgG2a, IgG2a, IgG1, IgG1 and IgG1, respectively. The BFP-specificities of the five monoclonal antibodies established were determined by direct antigen binding assay and competitive inhibition assay. The result revealed that the five monoclonal antibodies had specificity to BFP and that all the monoclonal antibodies might be different from each other in affinity and recognized determinant.

Furthermore, it can be speculated that there is a substance possessing the same antigenicity as BFP in the serum of patients with gastric cancer. A more stable assay system will be established with monoclonal antibody than with conventional antibody, and also a cancer specific BFP is expected to be discovered with the monoclonal antibody.