

新規の腫瘍マーカー MOS-1 抗原の膵臓癌に対する 特異性と臨床診断での有用性の検討

坂田 一登 佐藤 昇志
札幌医科大学病理学第一講座 (主任 菊地浩吉 教授)

Characterization of New Tumor Marker MOS-1 Antigen in Pancreatic Cancer and Clinical Usefulness of MOS-1 Antigen.

Kazuto SAKATA and Noriyuki SATO

*Department of Pathology (Section 1), School of Medicine, Sapporo Medical University
(Chief: Prof. K. KIKUCHI)*

ABSTRACT We performed clinical and immunohistochemical studies on MOS-1 antigen, a new marker for pancreatic cancers. The antigen was detected by a new monoclonal antibody, MOS-1. An enzyme immunoassay was devised to measure the value of the MOS-1 antigen in serum. Serum values of MOS-1 antigen exceeding the mean plus three standard deviations for 134 healthy control blood samples were found in a high proportion of patients with pancreatic cancer (71%). The MOS-1 antigen values in serum from patients with benign diseases, including chronic pancreatitis, were within the normal range in 95% of the cases. Furthermore, immunohistochemical analysis indicated that MOS-1 antigen was detected in pancreas cancer, bile duct cancer, and colon cancer. However, it was seldom detected in esophagus cancer, stomach cancer, lung cancer nor in normal cells.

Our data suggested that MOS-1 antigen may be useful in the diagnosis, management, and prognosis of patients with pancreatic cancer. (Received January 7, 1998 and accepted February 4, 1998)

Key words: Tumor marker, Monoclonal antibody, Enzyme immunoassay, Diagnosis, Pancreatic cancer

1 緒 言

膵臓癌の腫瘍マーカーとしては、CA19-9^{1),2)}, Dupan-2³⁾, SPan-1 抗原⁴⁾, KMO1⁵⁾, CA50⁶⁾などのムチン型糖タンパク質や癌胎児性抗原 (CEA)^{7),8)}などが挙げられ、癌の臨床診断や治療の経過観察 (モニタリング)などに用いられている。CA19-9は、シアリルラクト-N-フコペンタオースII糖鎖が結合したムチン型糖タンパク質⁹⁾であり、Dupan-2やCA50はLS-テトラサッカライドa糖鎖が結合したムチン型糖タンパク質^{6),10)}である。また、SPan-1抗原は両方の糖鎖が結合したムチン型糖タンパク質¹⁰⁾である事が知られている。これらのムチン型糖タンパク質腫瘍マーカーはいずれも膵臓癌に対する陽性率が高く、良く似た特異性と感

度を持っているため、臨床の間では代表的なCA19-9が最も広く測定されている。しかし、CA19-9は膵臓癌だけでなく他の癌や良性疾患に対する陽性率も高く、特に胆嚢・胆管癌に対し高い陽性率を示す。今回われわれは、癌細胞株が分泌するムチン型糖タンパク質を認識するモノクローナル抗体の中から膵臓癌に対する陽性率が高く、胆嚢・胆管癌に対する陽性率が低い新規のモノクローナル抗体 (MOS-1モノクローナル抗体)を作製した。更に、MOS-1モノクローナル抗体を用いて作製した酵素免疫測定法 (EIA)で悪性疾患及び良性疾患患者血清中のMOS-1抗原の濃度を測定し、その臨床的意義をCA19-9及びCEAと比較して検討したので報告する。

2 材料と方法

2.1 モノクローナル抗体の作製

大腸癌細胞株 SW1116 1×10^8 を Balb/c マウスの腹腔内に投与して免疫し、2カ月後に再免疫した。再免疫の3日後にマウスから摘出した脾臓細胞と NS-1 細胞とを Köhler & Milstein の方法¹¹⁾ に準じて細胞融合した。次に、ハイブリドーマの中から、SW1116 細胞の培養上清液中に含まれるムチン型糖タンパク質を認識する抗体産生ハイブリドーマを EIA 法²⁾ でスクリーニングし、1クローンのハイブリドーマ (MOS-1 細胞) を得た。この MOS-1 細胞は、IgG1 クラスの MOS-1 モノクローナル抗体を産生した。このハイブリドーマを無血清培地 ASF104 (味の素社製) 中で培養し、培養上清中に分泌される MOS-1 モノクローナル抗体をゲル濾過クロマトグラフィーで精製し、以下の検討に使用した。

スクリーニングに用いたムチン型糖タンパク質は、SW1116 細胞培養上清液に 2 M 過塩素酸を等量加え攪拌後遠心分離し、上清液を脱イオン水で透析し過塩素酸を除いた後、ConA アフィニティークロマトグラフィーを行い、ConA 非結合成分を用いた。この糖タンパク質は、HPLC-ポストカラム法で解析すると構成する糖にマンノースが含まれておらず、また 0.1 N NaOH 中に 37°C、5 hr インキュベーションしてアルカリ処理を行い O-グリコシド結合を切断すると抗原性がなくなるので、ムチン型糖タンパク質の性質を持っていることが確認された。

2.2 MOS-1 抗原測定 EIA の作製

抗体結合ビーズは、Robinson らの方法¹²⁾ に準じて、ガラスビーズ (三洋化成工業、 ϕ 6.8 mm) に MOS-1 モノクローナル抗体を結合して作製した。ペルオキシダーゼ標識抗体は、Nakane らの方法¹³⁾ に準じて、MOS-1 モノクローナル抗体に西洋ワサビペルオキシダーゼを結合して作製した。

2.3 EIA による MOS-1 抗原の測定

測定サンプル 50 μ l に 1% 牛血清アルブミン (BSA) 含有 0.02 M リン酸緩衝生理食塩水 pH 7.2 (PBS) 300 μ l を加え、この中に抗体結合ビーズを入れ 37°C で 15 分間反応させた。反応後、抗体結合ビーズを生理食塩水で洗浄し、1% BSA 含有 PBS で希釈したペルオキシダーゼ標識抗体溶液 300 μ l の中に移し、37°C で 15 分間反応させた。再び洗浄後、抗体結合ビーズを 0.3% O-フェニレンジアミンと 1.7% 過酸化水素を含有した 0.1 M クエン酸-リン酸緩衝液 pH 4.8 の発色溶液 500

μ l 中に移し 37°C で 15 分間反応し発色させた後、1.5 N の硫酸水溶液を 3 ml 加え反応を停止させ、492 nm の吸光度を測定した。

検量線に用いる標準は、予め 1000 U/ml と設定した SW1116 培養上清液を基準にして、15, 30, 60, 120, 240, 480 U/ml の各濃度に調製した。

2.4 特異性の検討

糖鎖に対する特異性は、シアリルラクト-N-フコペンタオース II または LS-テトラサッカライド a をヒトアルブミンに複数個結合した合成糖タンパク質 (バイオカーブ社)²⁾ を 1% BSA 含有 PBS で 1 μ g/ml になるように希釈して EIA で測定し、これら糖鎖に対する反応性の有無を検討することにより判別した。また、Magnani らの方法⁹⁾ に準じて、MOS-1 抗原を Streptococcus sp. 由来のノイラミニダーゼ (生化学工業社) と 0.1% CaCl₂ 含有 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 6.0) 中で 37°C、24 時間インキュベートしてシアリル酸残基を除去した後、EIA で測定して、反応性を検討した。

2.5 クロス試験

MOS-1 モノクローナル抗体結合ビーズとパーオキシダーゼ標識 CA19-9 モノクローナル抗体を組み合わせたサンドイッチ法 EIA で血清を測定し、測定の可否を検討した。

2.6 CA19-9, CEA の測定

CEA 及び CA19-9 の測定は市販の EIA キット (三洋化成工業社製 グラオザイム CEA, グラオザイム CA19-9) で行った。

2.7 測定の対象症例

健常人 134 例、膵臓癌 24 例、胆嚢・胆管癌 18 例、食道癌 3 例、肝臓癌 27 例、胃癌 53 例、結腸・直腸癌 29 例、肺癌 49 例、子宮癌 4 例、甲状腺癌 6 例、慢性膵炎 63 例、胆石症 9 例、慢性肝炎 3 例、肝硬変 12 例の血清を測定の対象とした。

2.8 組織切片の染色

膵臓癌、胆管癌、胃癌、結腸癌及び正常組織の組織標本は通常の方法でパラフィン切片とし、MOS-1 モノクローナル抗体及び CA19-9 モノクローナル抗体²⁾ を用いて ABC 法¹⁴⁾ により染色した。

3 成績

3.1 MOS-1 抗原測定 EIA の基本性能

本 EIA の最小検出感度は 0.5 U/ml であり、測定範囲は 0.5~480 U/ml で、Fig. 1 のような直線的な検量線を示した。同時再現性は 1.5%~3.2% であり、添加回収率 95%~102% と良好な性能を示した。

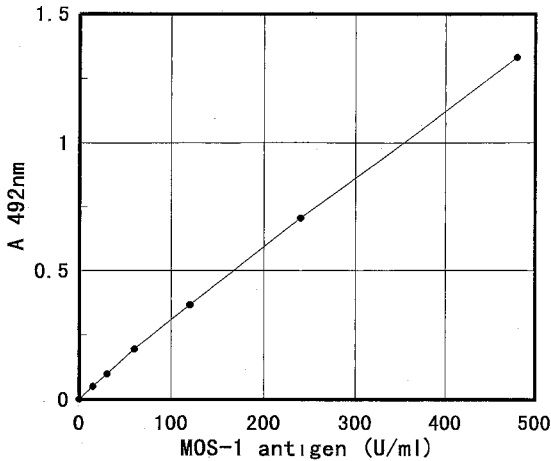


Fig. 1 Calibration curve of MOS-1 EIA

3・2 健康人血清中の MOS-1 抗原濃度とカットオフ値の設定

Fig. 2 に健康人 134 人の血清中 MOS-1 抗原の測定値を示した。カットオフ値は健康人測定値の平均値 + 3SD (パラメトリック法) から算出し、42 U/ml とした。

3・3 疾患別 MOS-1 抗原濃度, CA19-9 濃度及び CEA 濃度の比較

疾患別の MOS-1 抗原, CA19-9 及び CEA の測定値

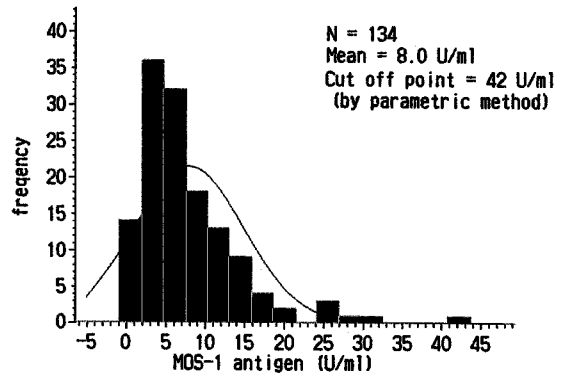


Fig. 2 Histogram of healthy controls

を Fig. 3 に示した。MOS-1 抗原は、膵臓癌患者血清で高値を示すものが多く認められた。

3・4 疾患別陽性率の比較

カットオフ値として、MOS-1 抗原は 42 U/ml, CA19-9 は 37 U/ml, CEA は 5 ng/ml を用いた時の各疾患の陽性率を Table 1 に示した。MOS-1 抗原は、膵臓癌で 71% と高い陽性率を示したが、その他の疾患に対する陽性率は低く、特に良性疾患に対する陽性率が低かった。CA19-9 は膵臓癌で 88% と高い陽性率を示したが胆嚢・胆管癌や肝臓癌に対しても 61%, 44% と高い陽性率を示した。CEA は、膵臓癌で 67% の陽性率を示し、肺癌, 食道癌, 結腸・直腸癌, 胃癌, 肝硬変

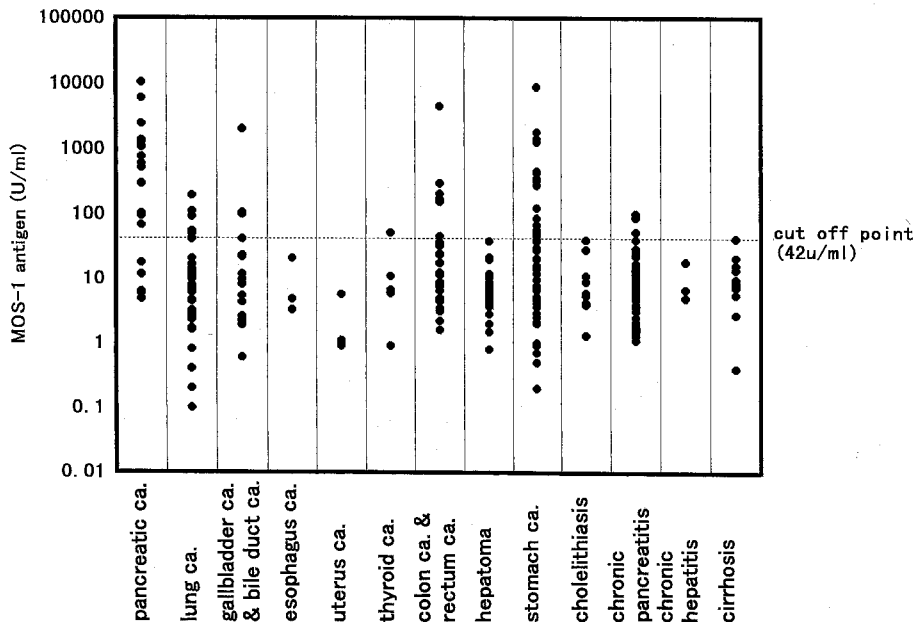


Fig. 3-1 The value of MOS-1 antigen in serum

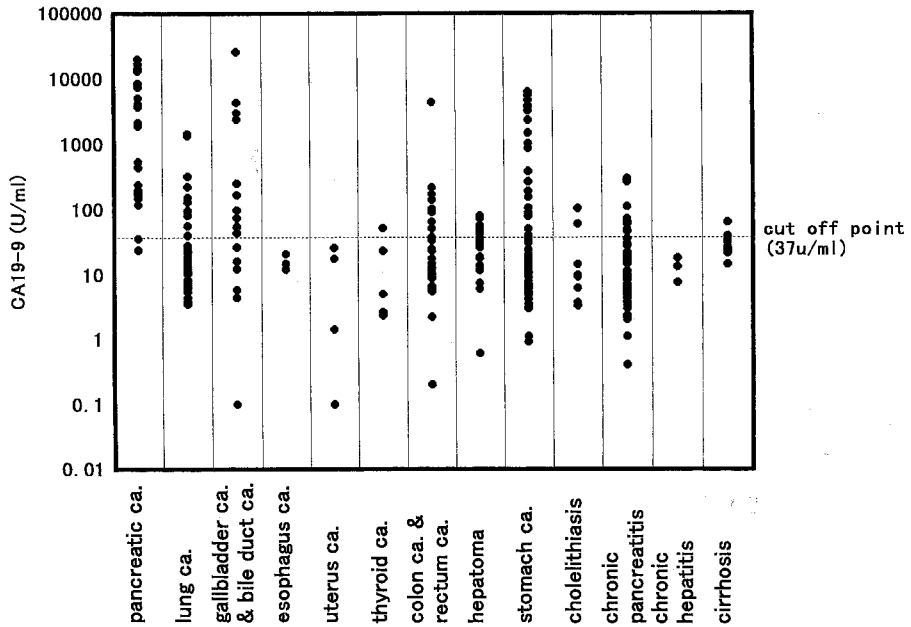


Fig. 3-2 The value of CA19-9 in serum

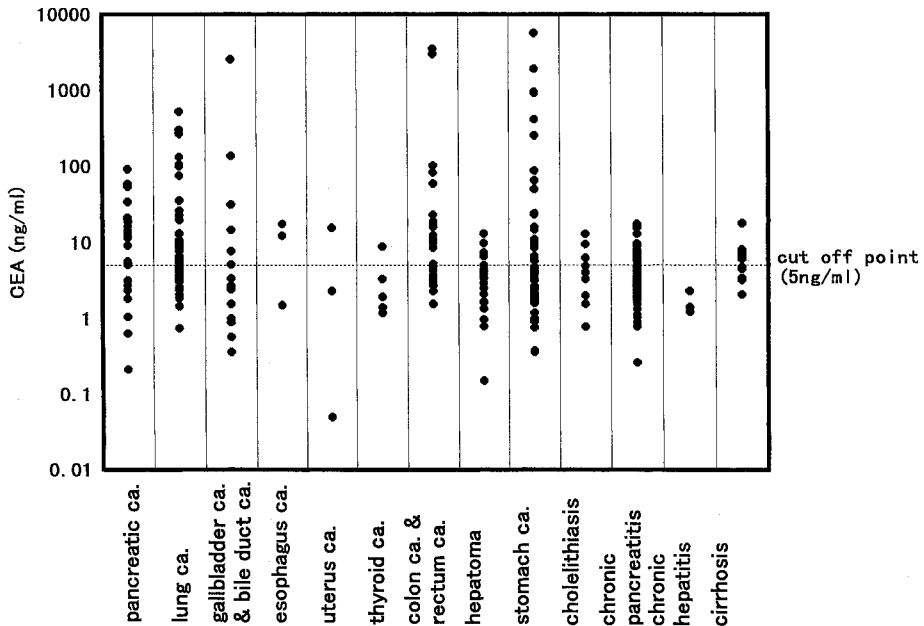


Fig. 3-3 The value of CEA in serum

でも 45~67%の高い陽性率を示した。

3.5 膵・胆・肝疾患における感度と特異度の比較

膵臓癌、胆嚢・胆管癌及び肝臓癌に対する感度と特異度を Table 2 に示した。膵疾患の中で膵臓癌に対す

る感度は CA19-9 が 88%と最も高く、MOS-1 抗原が 71%、CEA が 67%といずれも高い感度を示した。しかし、膵臓癌に対する特異度は、MOS-1 抗原が 95%と最も高く、CA19-9 が 73%、CEA が 71%とやや低く

Table 1 Positive number and ratio of each disease

Tumor marker		MOS-1 antigen		CA19-9		CEA	
Cut off point		42 U/ml		37 U/ml		5 ng/ml	
Disease	Number of tested	Number of positive	% of positive	Number of positive	% of positive	Number of positive	% of positive
pancreatic ca.	24	17	71%	21	88%	16	67%
lung ca.	49	6	12%	12	24%	31	63%
gallbladder ca. & bile duct ca.	18	4	22%	11	61%	6	33%
esophagus ca.	3	0	0%	0	0%	2	67%
utrus ca.	4	0	0%	0	0%	1	25%
thyroid ca.	6	1	17%	1	17%	1	17%
colon ca. & rectum ca.	29	6	21%	9	31%	14	48%
hepatoma	27	0	0%	12	44%	6	22%
stomach ca.	53	17	32%	19	36%	24	45%
cholelithiasis	9	0	0%	2	22%	3	33%
chronic pancreatitis	63	3	5%	9	14%	17	27%
chronic hepatitis	3	0	0%	0	0%	0	0%
cirrhosis	12	0	0%	2	17%	6	50%

Table 2 Sensitivity and specificity of each tumor marker

Disease	MOS-1 antigen		CA19-9		CEA	
	Sensitivity ^{a)}	Specificity ^{b)}	Sensitivity ^{a)}	Specificity ^{b)}	Sensitivity ^{a)}	Specificity ^{b)}
pancreatic ca.	71%	95%	88%	73%	67%	71%
gallbladder ca. & bile duct ca.	22%	81%	61%	67%	33%	65%
hepatoma	0%	81%	44%	65%	22%	63%

a) : Sensitivity (%) = Positive number of each cancer / all number of each cancer × 100.

b) : Specificity (%) = Negative number of each benign disease / all number of each benign disease × 100.

なった。胆嚢・胆管癌及び肝臓癌に対する感度は、CA19-9が61%、44%と高いのに対し、MOS-1抗原が22%、0%と極めて低く、MOS-1抗原は膵臓癌と胆嚢・胆管癌や肝臓癌を判別するために最も適していることが判明した。

3・6 糖鎖に対する反応性

MOS-1抗原測定EIAでは、Table 3に示したように、MOS-1抗原をノイラミニダーゼ処理しシアル酸残基を除くと測定できなくなることから、MOS-1抗原はシアル酸残基を持つ糖鎖であることが判明した。また、Table 4に示したように、シアル酸残基を持つシアリルラクト-N-フコペンタオースII及びLS-テトラサッカ

Table 3 Change in antigenicity of MOS-1 antigen after treatment with neuraminidase

Sample	Value of MOS-1 antigen (U/ml)
Blank	0
Untreated	480
Treated	0

イドaの合成糖鎖のいずれもMOS-1抗原測定EIAでは測定できなかった。このことから、MOS-1抗原はこれらとは異なる糖鎖であることが判明した。

また、Table 5に示したように、クロス試験で測定で

Table 4 Reactivity to synthetic glycoprotein

Sample	Value of MOS-1 antigen (U/ml)	Value of CA19-9 (U/ml)
Blank	0	0
Sialylated lacto-N-fucopentaose II (1 µg/ml)	0	over range
LS-tetrasaccharide a (1 µg/ml)	0	0

きる血清があることから、MOS-1 モノクローナル抗体と CA19-9 モノクローナル抗体の両方のエピトープを持つ抗原の存在が示唆された。

3・7 膵臓癌、胆管癌、胃癌、結腸癌及び正常組織の組織切片の染色結果

MOS-1 モノクローナル抗体と CA19-9 モノクローナル抗体に対する組織切片の反応性を免疫染色法で検討した結果を Table 6 に示した。MOS-1 モノクローナル抗体では膵臓癌、胆管癌、結腸癌及び胃癌の一部が染まったが、膵臓癌、胆管癌及び結腸癌の正常組織部分、食道癌、肺癌、多くの胃癌は染まらなかった。しかし、CA19-9 モノクローナル抗体では、膵臓癌、胆管癌及び結腸癌の正常組織部分も染まった。Fig. 4 に MOS-1 モノクローナル抗体と CA19-9 モノクローナル抗体で膵臓癌と胆管癌の癌組織領域と正常組織領域の免疫染色組織像を比較して示した。

4 考 察

4・1 MOS-1 抗原の特徴

MOS-1 抗原は、ノイラミナーゼ処理を行って糖鎖のシアル酸残基を切断すると抗原性がなくなることから、シアル酸残基を持つ糖鎖抗原であるが、この糖鎖はシアル酸残基を持つシアリルラクト-N-フコペンタオース II 及び LS-テトラサッカライド a とは異なる糖鎖である。したがって、CA19-9^{1),2)}, Dupan-2³⁾, SPan-1 抗原⁴⁾, KMO1⁵⁾, CA50⁶⁾ など既知の腫瘍マーカーとは異なるエピトープを持つ糖鎖抗原であると考えられる。クロス試験の結果から、血清中の MOS-1 抗原の中には、CA19-9 モノクローナル抗体と MOS-1 モノクローナル抗体の両方と反応するものが存在することから、MOS-1 抗原の本質は CA19-9 と同じくムチン型糖タンパク質であると考えられる。ムチン型糖タンパク質の腫瘍マーカーの特異性は、ムチン型糖タンパク質のコアタンパクに結合する糖鎖の種類に特徴づけられており、MOS-1 抗原は、これらの中でも膵臓癌に特異性の高い糖鎖が結合したムチン型糖タンパク質であると考

Table 5 Measuring serum by using EIA kit consist with MOS-1 mAb bound on beads and CA19-9 mAb bound with POD.

Sample	A 492 nm
Blank	0.001
serum 1	0.001
serum 2	0.001
serum 3	0.325
serum 4	0.439
serum 5	1.285

えられる。

4・2 臨床的な有用性

MOS-1 抗原のカットオフ値として健常人の測定値から算出した 42 U/ml を用いると、MOS-1 抗原は膵臓癌に対して高い特異性を示す。膵臓癌では、陽性率が 71% と高いのに対しその他の癌では 32% 以下と低い。また、良性疾患では慢性膵炎の陽性率が 5% であり、胆石症、慢性肝炎及び肝硬変では陽性例がなく陽性率 0% と腫瘍マーカーとしては極めて低い値であった。一方、CA19-9 は、膵臓癌で陽性率が 88% と高いものの、胆嚢・胆管癌や肝臓癌でも 61%、44% と高い陽性率を示し、更に慢性膵炎、胆石症、慢性肝炎及び肝硬変などの良性疾患の中でも陽性率 10%~20% と MOS-1 抗原より高い陽性率を示した。また、CEA は膵臓癌、肺癌、食道癌、結腸・直腸癌、胃癌など多くの癌で高い陽性率を示し、良性疾患でも陽性率が高いため、膵臓癌を判別することは困難であった。この結果から、MOS-1 抗原は、臨床で広く使われている CA19-9 や CEA などの腫瘍マーカーより、膵臓癌をスクリーニングすることに優れた腫瘍マーカーといえる。このため、CA19-9 では陽性率が高く判別がむずかしい膵臓癌と胆嚢・胆管癌の識別や膵臓癌と良性疾患との識別が容易になると期待できる。

また、本 EIA は、全自動酵素免疫測定機に適用で

Table 6 Reactivity of MOS-1 mAb and CA19-9 mAb to cancer tissue

No.	origin	MOS-1 mAb		CA19-9 mAb	
1	pancreatic ca.	tumor cells	+++	tumor cells	++
		normal cells	-	normal cells	+
2	pancreatic ca.	tumor cells	+	tumor cells	+
		normal cells	-	normal cells	+
3	pancreatic ca.	tumor cells	++	tumor cells	+
		normal cells	±	normal cells	+
4	bile duct-poor. ca.	tumor cells	++	tumor cells	++
		normal cells	ND	normal cells	ND
5	bile duct-poor. ca.	tumor cells	++	tumor cells	++
		normal cells	ND	normal cells	ND
6	bile duct-poor. ca.	tumor cells	+++	tumor cells	+++
		normal cells	-	normal cells	++
7	bile duct-mod. ca.	partly	++	partly	++
8	Vater's ca.		-	only partly	+
9	colon-mod. ad. ca.	tumor cells	+++	tumor cells	+++
		normal cells	+	normal cells	+
10	colon-mod. ad. ca.		-	only partly	+
11	colon-well. ad. ca.		-		++
12	colon-well. ad. ca.	tumor cells	+++	tumor cells	++
		normal cells	-	normal cells	+
13	colon-poor. ad. ca.		++		+
14	esophagus-mod. SCC		-		-
15	esophagus-mod. SCC		-		-
16	esophagus-mod. SCC	partly positive in surface		partly positive in surface	
17	stomach-poor. ad. ca.		-		-
18	stomach-mod. ad. ca.		++		++
19	stomach-mod. ad. ca.	almost negative		almost negative	
20	stomach-well. ad. ca.		-		-
21	lung-SCC		-		-
22	lung-SCC		-		-
23	lung-SCC		- (br. gl.+)		-

+++ : all positive
+ : partly positive
- : negative

++ : almost positive and partly negative
± : almost negative
ND : Not Determine

き、迅速かつ簡単に測定が行えるため、検査室などでの日常的な臨床検査への応用も可能であると考えられる。

4・3 MOS-1 抗原の組織中での分布領域について

組織の免疫染色の結果から、血清中 MOS-1 抗原の

疾患別陽性率のパターンと各組織中に存在する MOS-1 抗原の分布領域とは似た傾向が見られた。MOS-1 抗原は、膵臓癌、胆管癌、結腸癌の各組織に存在するが、胃癌、食道癌、肺癌の組織にはほとんど存在していなかった。また、膵臓癌、胆管癌、結腸癌の正常組織部

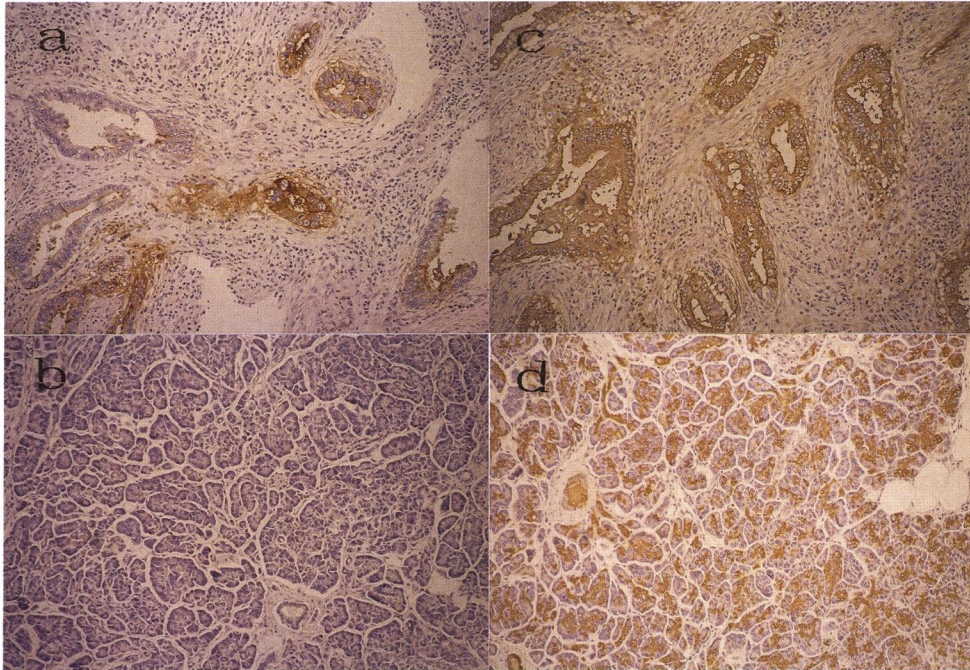


Fig. 4-1 Immunohistochemical staining of No. 1 pancreatic ca. ($\times 40$)
 a : tumor cells by using MOS-1 mAb c : tumor cells by using CA19-9 mAb
 b : normal cells by using MOS-1 mAb d : normal cells by using CA19-9 mAb

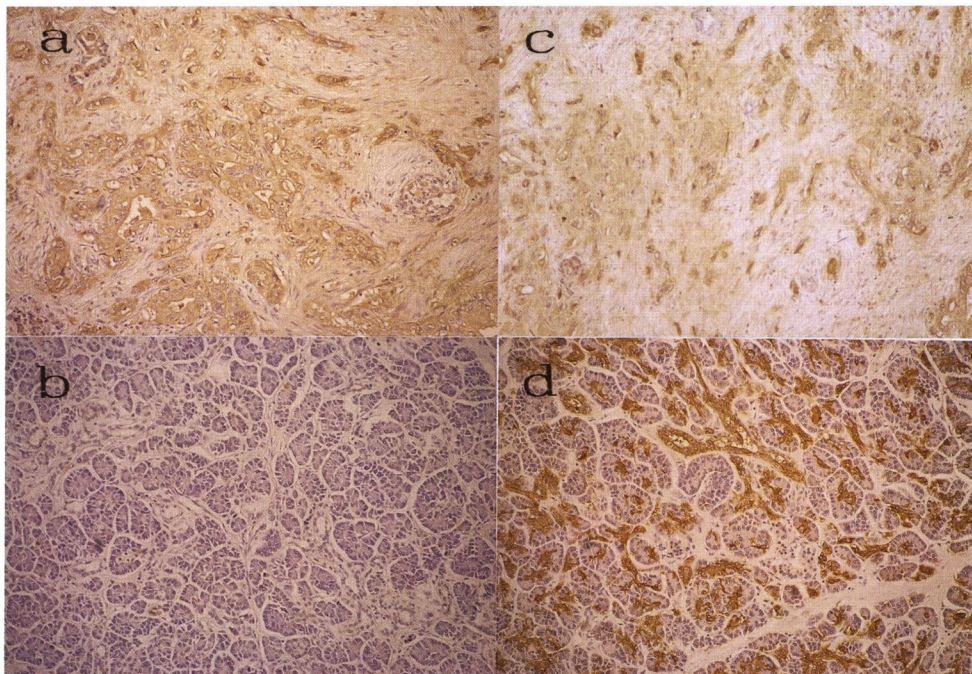


Fig. 4-2 Immunohistochemical staining of No. 6 bile duct-poor ca. ($\times 40$)
 a : tumor cells by using MOS-1 mAb c : tumor cells by using CA19-9 mAb
 b : normal cells by using MOS-1 mAb d : normal cells by using CA19-9 mAb

分にも、MOS-1 抗原は存在していなかった。一方、CA19-9 は正常組織にも存在していることから、MOS-1 抗原は、CA19-9 よりこれら癌に対して特異性が高い抗原であると言える。組織中に含有されている MOS-1 抗原がどのような経路で血清中に分泌されるのか不明であるが、MOS-1 抗原が分布している癌組織と血清高値を示す癌疾患に関連が見られることから、癌組織中に含まれている MOS-1 抗原は、癌の成長に伴って血清中に逸脱され、濃度が高くなって行くものと推定される。

以上のように、膵臓癌に特異性の高い MOS-1 モノクローナル抗体を用いた EIA で、各疾患の血清中 MOS-1 抗原濃度を検討した結果、膵臓癌患者で高値を示し、膵臓癌の識別に有用であるという知見を得ることができた。しかし、MOS-1 抗原の生化学的な解析は不十分であるため、今後、その糖鎖構造の解析や生化学的な性質を明らかにするとともに、更に多くの症例に対して血清中 MOS-1 抗原濃度の測定を行い、臨床的な意義を検討する必要がある。

5 要 約

培養大腸癌細胞 SW1116 を免疫原として得られた MOS-1 モノクローナル抗体を用いて作製した EIA で血清中の MOS-1 抗原の濃度を測定し、臨床的意義を CA19-9 及び CEA と比較した。この結果、MOS-1 抗原は、他の腫瘍マーカーより膵臓癌に対する特異度が高く、膵臓癌と膵良性疾患を識別できることが示唆された。MOS-1 抗原は、シアリルラクト-N-フコペンタオース II 及び LS-テトラサッカライド a とは異なるシアリル酸残基を持つ糖鎖が結合したムチン型糖タンパク質であると考えられた。

免疫組織染色により、MOS-1 抗原の組織中の分布を検討した結果、MOS-1 抗原は、膵臓癌、胆管癌、結腸癌の各組織に存在するが、これらの正常組織部分、胃癌、食道癌及び肺癌の組織にほとんど存在していなかった。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲いただきました当教室菊地浩吉教授に深謝いたします。

参 考 文 献

1. Koprowski H, Steplewski Z, Mitchell K, Herlyn M, Herlyn D, Fuhrer P. Colorectal carcinoma antigens detected by hybridoma antibodies. *Somatic Cell Genet.* 1979, 5: 957-971.
2. 坂田一登, 佐藤昇志. CA19-9 抗原に対する新しいモノクローナル抗体の開発. *血液・腫瘍科* 1993, 27: 402-408.
3. Metzgar RS, Rodriguez N, Finn OJ, Lan MS, Daasch VN, Fernsten PD, Meyers WC, Sindelar WF, Sandler RS, Seigler HF. Detection of a pancreatic cancer-associated antigen (DU-PAN-2 antigen) in serum and ascites of patients with adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984, 81: 5242-5246.
4. 鄭容錫, 佐竹克之, 梅山 馨, Kim YS. 膵癌細胞に対する新しいモノクローナル抗体 (SPAN 1~7) の作成と免疫生化学的検討. *日外誌* 1987, 88: 89-95.
5. Ohyanagi H, Saitoh Y, Okumura S, Ishida T, Uesaka K, Ishida H, Yamamoto M, Uemura Y, Kano Y, Suyama T. A new monoclonal-antibody-defined tumor marker (KMO1) for pancreatic carcinoma. *Mt Sinai J Med* 1987, 54: 393-400.
6. Holmgren J, Lindholm L, Persson B, Lagergård T, Nilsson L, Svennerholm L, Rudenstam CM, Unsgaard B, Yngvason F, Pettersson S, Killander AF. Detection by monoclonal antibody of carbohydrate antigen CA50 in serum of patients with carcinoma. *BMJ[Clin Res]*. 1984, 288: 1479-1482.
7. Gold P, Freedman SO. Demonstration of tumor-specific antigens in human colonic carcinoma by immunological tolerance and absorption techniques. *J Exp Med* 1965, 121: 439-462.
8. 坂田一登, 小柴博文, 菊地浩吉. モノクローナル抗体による CEA の新しい Enzyme immunoassay 法の開発と特異性の検討. *臨床免疫* 1986, 18: 1026-1035.
9. Magnani JL, Steplewski Z, Koprowski H, Ginsburg V. Identification of the gastrointestinal and pancreatic cancer-associated antigen detected by monoclonal antibody 19-9 in sera of patients as a mucin. *Cancer Res* 1983, 43: 5489-5492.
10. Kawa S, Tokoo M, Oguchi H, Furuta S, Homma T, Hasegawa Y, Ogata H, Sakata K. Epitope analysis of Span-1 and DUPAN-2 using synthesized glycoconjugates sialyllact-N-fucopentaose II and sialyllact-N-tetraose. *Pancreas* 1994, 9: 692-697.
11. Köhler G, Milstein C. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975, 256: 495-497.
12. Robinson PJ, Dunnill P, Lilly MD. Porous glass as a solid support for immobilisation or affinity chromatography of enzymes. *Biochim*

- Biophys Acta 1971, 242: 659-661.
13. Nakane PK, Kawaoi A. Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation. J Histochem Cytochem 1974, 22: 1084-1091.
14. Yagihashi A, Sato N, Torigoe T, Okubo M, Konno A, Takahashi N, Yamashita T, Fuginaga K, Kuzumaki N, Kikuchi K. Identification of the transformation-associated cell surface antigen expressed on the rat fetus-derived fibroblast. Cancer Res 1988, 48: 2798-2804.
-

別刷請求先：

(〒060-8556) 札幌市中央区南1条西17丁目

札幌医科大学病理学第1講座 坂田一登