

ラット大腸上皮及び大腸癌細胞における膜抗原の分布に関する研究

—モノクローナル抗体による解析—

杉山敏郎

札幌医科大学内科学第1講座 (主任 谷内 昭 教授)

Studies on the Distribution of Membrane Antigens in Rat Colonocytes and Colonic Cancer Cells

— Analysis with Monoclonal Antibodies —

Toshiro SUGIYAMA

*Department of Internal Medicine (Section 1), Sapporo Medical College
(Chief: Prof. Akira Yachi)*

In order to define antigen distribution on the surface membrane of colonocyte, four monoclonal antibodies which reacted with colonocytes were established.

Three out of the four monoclonal antibodies reacted with the microvillus membrane, whereas the remaining one reacted with the laterobasal membrane. The restricted reactivity of monoclonal antibody 522 (IgG2b) and antibody 423 (IgG1) were confirmed by using the immunoelectron microscopic technique. Antibody 522 reacted with the microvillus membrane and the core of microvilli, which recognized a 66K dalton glycoprotein by the radioimmunoprecipitation and dot blotting method, whereas antibody 423 mainly reacted with the laterobasal membrane antigen.

It was suggested that the 66K dalton glycoprotein was not homologous to human carcinoembryonic antigen or its associated antigens by its molecular profile and tissue localization. It was shown that antibody 423 did not recognize the secretory component.

In 1, 2-dimethylhydrazine induced rat colonic cancer cells, it was demonstrated that both the 66K dalton glycoprotein and the antibody 423 corresponding antigen were expressed on the entire cell surface membrane showing the loss of the polarity, which was observed in the antigen distribution on normal colonocyte membrane.

The animal model developed in this study will be useful for the investigation of the cellular mechanism responsible for the aberrant polarity in colonic cancer cells. In addition, this model may be useful in the analysis of immuno-targeting therapy by employing the monoclonal antibody.

(Received December 21, 1984 and accepted January 21, 1985)

Key words: Rat colonocyte, Rat colon cancer, Membrane antigen, Monoclonal antibodies

Abbreviations:

ABTS : 2, 2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)

CEA : carcinoembryonic antigen

DAB : 3, 3'-diaminobenzidine • 4HCl

DMH : 1, 2-dimethylhydrazine • 2HCl

DPBS : Dulbecco' PBS

ELISA : enzyme linked immunosorbent assay

FSC : free secretory component

LBM : laterobasal membrane

MoAb : monoclonal antibody

MVM : microvillus membrane

PBS : phosphate buffered saline

SC : secretory component

SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

TPA : 12-0-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate

1 緒 言

小腸上皮細胞においては管腔側に面した細胞膜には微小絨毛が発達しその吸収面を挙げ、一方、側・底面側細胞膜は微小絨毛を欠き形態的に異なる。さらに、微小絨毛膜 microvillus membrane (MVM) と側・底面膜 laterbasal membrane (LBM) の機能上の差を反映してアルカリフォスファターゼ、ロイシンアミノペプチダーゼおよびサッカラーゼ等の酵素は主として微小絨毛膜に局在し、一方、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ \text{ATPase}$ は側・底面膜に比較的局限して存在しており、小腸上皮細胞は形態的にも機能的にも極性を有しているといわれている¹⁻³⁾。大腸上皮細胞膜においても同様の形態的特性は存在するが、機能的に微小絨毛膜と側・底面膜を区別しうる有用なマーカーの報告⁴⁾は多くない。本研究においては、ラット大腸上皮細胞の微小絨毛膜あるいは側・底面膜に局限して反応するモノクローナル抗体を作製することにより、まず正常大腸上皮細胞膜上で分布を異にして存在する抗原を見出した。次いで実験的大腸癌細胞においてそれらの抗原の分布の変化を検討して癌化に伴う膜抗原発現の機序や、さらにターゲティング療法の動物モデルとしての意義を明らかにすることを目的とした。

2 実験方法

2.1 ラット大腸上皮細胞の分離

体重約 200 g の雄 F344 ラットを 24 時間絶食後、麻酔下に開腹し、近位大腸から直腸までの全大腸を摘出し、0.15 M NaCl 溶液で腸管粘膜面を十分洗浄した後、反転させ粘膜面を外側へ露出、一端を結紮し、その内腔に分離用緩衝液 (30mM NaCl, 5mM Na_2EDTA , 8mM HEPES を含む トリス塩酸緩衝液 pH 7.6) を満たし、他端を結紮した。この "大腸ソーセージ" を分離用緩衝液をいれたビーカー内で振盪恒温槽を用いて 4°C で毎分 75 回の速度で 90 分間振盪し、腸上皮細胞を遊離⁵⁾させた。遊離細胞を 1mM dithiothreitol 加 Dulbecco'PBS (DPBS) で数回洗浄し粘液を除去後、DPBS に浮遊させ、これを分離腸上皮細胞として用いた。位相差顕微鏡下で、以上の方法によって回収した細胞の 80 ないし 90% に微小絨毛を認め腸上皮細胞と同定された。

2.2 ハイブリドーマの作製

2.1 に従って回収した F344 ラット腸上皮細胞 1×10^7 個を 6 週齢雌 BALB/c マウス (Jackson Labo, USA) の腹腔内に 2 週ごと 4 回免疫し、感作脾細胞をマウス

骨髓腫細胞 X63-Ag8-653 と既報⁶⁾ に準じて細胞融合を行った。

2.3 ハイブリドーマのクローニングおよびモノクローナル抗体の大量採取・精製

2.5 および 2.6 に述べる血清学的および免疫組織学的検索により選り出したハイブリドーマは 2 回の限界希釈法によりクローニングした。その後、細胞培養フラスコ (Corning, USA) を用いて大量培養し、培養上清を採取し、一方、BALB/c マウス腹腔内に 5×10^6 個投与し増殖させ約 2 週間後に腹水を採取した。培養上清および腹水は硫酸塩析後、DE52 (Whatman, England) および Sephadex G200 (Pharmacia, Sweden) を用いて既報⁷⁾のごとく精製した。

2.4 モノクローナル抗体の免疫グロブリンクラスの設定

各モノクローナル抗体の免疫グロブリンクラスおよびサブクラスはウサギ抗マウス IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA および IgM 抗体 (Miles, USA) を用いゲル内拡散沈降法により決定した。

2.5 モノクローナル抗体の血清学的検索

2.5.1 Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

poly-L-lysine ($50 \mu\text{g}/\text{ml}$) によりあらかじめ処理したマイクロタイタープレート (Immunolon II, USA) に F344 ラット分離大腸上皮細胞あるいは脾細胞を各ウェルごとに 1×10^5 個分配し、室温下に 2 時間静置しプレート上に固着させた^{8,9)}。その後、0.1% グルタルアルデヒド溶液で 3 分間固定し、DPBS で 3 回洗浄後、0.2% ゼラチン加 DPBS でウェルを満たし、少なくとも 12 時間以上静置 (ポストコーティング) し、蛋白の非特異的吸着を阻止した。各ウェルにハイブリドーマ培養上清を $50 \mu\text{l}$ 加え、室温下 2 時間反応させた後、0.05% Tween 20 および 0.1% ゼラチン加 DPBS で 5 回洗浄、その後 2,000 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ウサギ抗マウス IgG+IgA+IgM(H+L) 抗体 (Zymed, USA) $50 \mu\text{l}$ 加え、さらに室温下で 2 時間反応させ、洗浄後、基質として 0.005% (v/v) 過酸化水素水加 ABTS 液 [$1 \text{mg}/\text{ml}$ ABTS (2,2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)) (Sigma, USA) を含む McIlvain 緩衝液, pH 4.6] を $50 \mu\text{l}$ 加え、30 分後に ELISA reader (Titertek, USA) にて波長 414 nm で吸光度を測定した。

2.6 モノクローナル抗体による免疫組織学的検索

2.6.1 組織の固定および組織切片の作製

F344 雄ラット (体重 150-200 g) の近位大腸、遠位大

腸, 小腸, 胃, 肝, 脾, 腎, 肺および脾を摘出し, McLean and Nakane の方法¹⁰⁾に従ってすみやかに PLP 固定液 (0.01 M periodate, 0.075 M lysine, 2% paraformaldehyde) 中にて約 4 時間固定した後, ショ糖加 PBS でショ糖濃度を 10%, 15%, 20%, と上げながら洗浄し, OCT compound (Miles, USA) に包埋後, 急速凍結させクリオスタットミクロトームで 6 μ m の厚さの切片を作製し, アルブミン処理スライド上への組織切片スライドを作製した. ホルマリン固定の場合には 10%ホルマリン中性緩衝液中で 12 時間固定し, 洗浄, 包埋し組織切片を作製した.

2.6.2 間接免疫ペルオキシダーゼ法による光学顕微鏡下での検索

組織切片は 0.02 M PBS (pH7.2) で 3 回洗浄した後, Isobe *et al.* の方法¹¹⁾に従って内因性ペルオキシダーゼ活性を除去した. 次に組織切片上への二次抗体の非特異的吸着を阻止する目的で 10%ウサギ血清加 PBS を室温下で 30 分間反応させ, 洗浄後, 一次抗体として各モノクローナル抗体を組織切片上へのせ加湿器中室温下で 2 時間反応させた. 以下, 教室の藤田・今井¹²⁾に準じて検索した. さらに, 一部のモノクローナル抗体の認識する抗原決定基の性状を検討するため, 正常大腸組織を PLP 固定あるいはホルマリン固定をした後, 組織切片上で過ヨウ素酸処理を施し, 免疫ペルオキシダーゼ法による染色性の変化を比較した.

2.6.3 間接免疫ペルオキシダーゼ法による電子顕微鏡下での検索

2.6.1 に従い F344 ラット組織を PLP 固定を施し, 10%ウサギ血清で処理後, 一次抗体としてモノクローナル抗体を切片上へのせ加湿器中で 4°C で 16 時間反応させた. PBS で十分洗浄後, ペルオキシダーゼ標識ウサギ抗マウス IgG 抗体 (Zymed, USA) (80 倍希釈) を一次抗体と同条件下で 16 時間反応させた. その後, PBS にて充分洗浄し, さらに 2%グルタルアルデヒド溶液にて 10 分間後固定し, 充分洗浄後, 過酸化水素を含まない DAB (3,3'-diaminobenzidine \cdot 4HCl) 液中に 30 分間浸し, その後に 0.01% (v/v) 過酸化水素水加 DAB 液中で発色させた. さらに, 2%オスミウム酸により後固定を施した後に洗浄し, 充分に脱水後, Epon-Araldite に包埋し, 37°C 下に 24 時間静置し, さらに 60°C 下に 48 時間静置し包埋剤を重合させた. 組織切片を Epon-Araldite を含むカプセルと一緒にスライド上から剝離させ, ultramicrotome 上で超薄切片を作製し, 電子顕微鏡 (Phillips300 あるいは日本電子 100B) 下に観察した. モノクローナル抗体の濃度および陰性

対照は 2.6.2 に従った.

2.7 モノクローナル抗体の大腸腫瘍組織・細胞に対する反応性の検討

2.7.1 大腸腫瘍の作製

体重約 100 g の雄 F344 ラットに体重あたり 20 mg/kg の DMH (1,2-dimethylhydrazine \cdot 2HCl) (Sigma, USA) (1 mM EDTA 加生食水に溶解) を毎週 1 回皮下注射¹³⁾し, 28 週まで継続し, 以後, 大腸内視鏡検査に気管支ファイバーを利用して腫瘍の確認されたラットを麻酔下に開腹し腫瘍塊を摘出し, 2.6.1 に従って PLP 固定を施し, 組織切片を作製した. 一部はヘマトキシリン・エオジン染色を行い, 病理学的診断に用いた.

2.7.2 モノクローナル抗体の大腸腫瘍組織に対する免疫組織学的検索

大腸腫瘍組織切片は 2.6.2 および 2.6.3 に述べたように間接免疫ペルオキシダーゼ法により光学顕微鏡下にあるいは電子顕微鏡下に観察した.

2.8 対応抗原の化学的性状の解析

モノクローナル抗体の対応抗原を検索する目的で radioimmunoprecipitation および sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel 電気泳動 (SDS-PAGE), western blotting あるいは dot blotting を行った.

2.8.1 対応抗原の濃縮およびアイソトープ標識

対応抗原を濃縮する目的で初めにモノクローナル抗体結合セファローズ 4B ビーズを既報¹⁴⁾に従い CNBr 法によって作製した. 一方, 大腸上皮細胞を分離後, 1% TritonX-100 加 PBS に浮遊させ, 10 秒間超音波破碎を行った後, 4°C 下に 2 時間静置し, 13,000 r.p.m. 5 分間遠心し上清を得, 可溶性抗原とした. モノクローナル抗体結合セファローズビーズと可溶性抗原を等容混合し 4°C, 2 時間反応させ, ビーズを充分洗浄後, 3 M NaSCN により結合抗原を解離させ遠心し上清を集め, これを PBS で十分透析後, 限外ろ過法により濃縮して抗原を得た. これを lactoperoxidase enzyme beads (Bio Rad, USA) を用い¹²⁵I 標識をし, 以下の実験に用いた.

2.8.2 Radioimmunoprecipitation および sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel 電気泳動

守谷・今井¹⁵⁾に準じてモノクローナル抗体結合セファローズ 4B ビーズ 100 μ l と ¹²⁵I 標識抗原濃縮液 20 μ l (5 \times 10⁴c.p.m.) を免疫沈降させ, SDS-PAGE に供した. 非還元下での対応抗原の解析はメルカプトエタノールを除いたサンプルバッファーを用いて行った. SDS

-PAGEはWeber and Osborn¹⁶⁾に準じ、10%SDSゲルを用い薄層スラブゲル電気泳動を行い、泳動後ゲルを乾燥させ、XRP-1フィルム(Kodak, USA)上に感光させた。陰性対照としてマウス免疫グロブリン結合セファローズ4Bビーズに¹²⁵I標識抗原を同条件下に反応させたものを用いた。

2・8・3 過塩素酸可溶分画の作製

ラット大腸上皮細胞可溶性抗原(粗抗原)からCEAの抽出法¹⁷⁾に従って0.6 M 過塩素酸(PCA)可溶分画を得、PBSで十分透析後、遠沈し、その上清をAmicon Model 52(membrane UM2)により濃縮し以下の実験に供した。

2・8・4 Dot blotting

2・8・3で得た粗抗原およびPCA可溶分画をmicrofiltration装置BIO-DOT(Bio Rad)を用いてニトロセルロース膜上に吸着させ、3%BSAで膜上の蛋白非吸着部分をブロックした後、一次抗体としてモノクローナル抗体を室温下で2時間反応させ、0.05% Tween 20加PBSで十分洗浄後、二次抗体としてペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG+IgA+IgM(H+L)抗体(Zymed, USA)を300倍希釈して室温下で2時間反応後、洗浄し、基質[0.015% (v/v) 過酸化水素水および0.5 mg/ml 4-クロロ-1-ナフトール(Bio Rad, USA)を含むトリス塩酸緩衝液, pH 7.5]中で発色させた。

2・8・5 Western blotting

F344雄ラットから胆汁を採取後、SDS-PAGEに展開した後、Trans Blot装置(Bio Rad)を用いて、ニトロセルロース膜に転写し¹⁸⁾、以下は2・8・4と同条件下に抗体を反応させ4-クロロ-1-ナフトールを基質として発色させた。

3 成績

3・1 モノクローナル抗体の血清学的検索

3・1・1 ELISAによる腸上皮細胞に対する抗体活性の検討

4回の細胞融合からELISAにより分離大腸上皮細胞と反応し、かつ脾細胞と反応しない約200種のモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを得たが、さらに免疫組織学的検索からPLP固定正常大腸組織上で腸上皮細胞膜の一部に限局して反応する4種のモノクローナル抗体を選び出し、以下の研究に用いた。

ハイブリドーマ培養上清をPBSにて順次希釈し、分離大腸上皮細胞に対する上清中の抗体活性をELISAにより測定した結果をFig. 1に一括して示した。陰性対照として間接免疫ペルオキシダーゼ法によりラット大腸組織とは全く反応しないモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ培養上清を用いた。4種のモノクローナル抗体504, 403, 423および522は、いずれも少なくとも

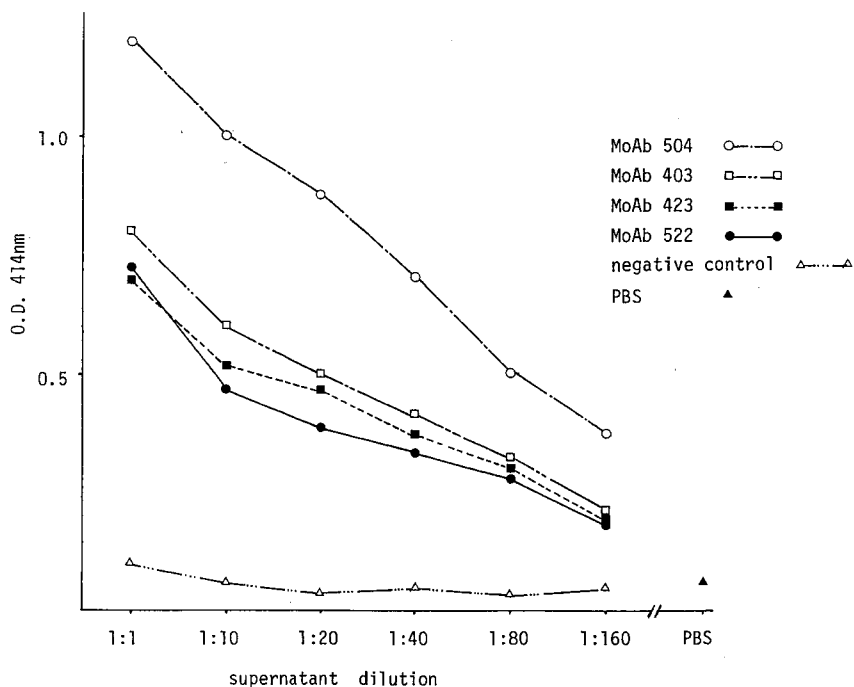


Fig. 1 Antibody activity of culture supernatants by ELISA using colonocytes as targets.

も 160 倍希釈まで陽性を示した。標的細胞として脾細胞を用いた場合には、いずれの抗体も吸光度 0.2 以下で反応を示さなかった。また脾細胞で吸収した培養上清を用いても分離大腸上皮細胞による抗体活性は吸収前と差を認めなかった。

3.2 モノクローナル抗体による免疫組織学的検索

3.2.1 正常大腸組織に対する反応性

4 種のモノクローナル抗体の正常遠位大腸組織に対す

る反応性を間接免疫ペルオキシダーゼ法により検討した。

抗体 522 は Fig. 2 (a) に示すように正常大腸表層吸収上皮細胞に反応し、陰窩内の上皮細胞、杯細胞および粘液とは反応しなかった。さらに表層吸収上皮細胞との反応性は、管腔に面した部分、すなわち微小絨毛膜側部分にのみ陽性であり、側・底面膜側には陽性所見は認められなかった。

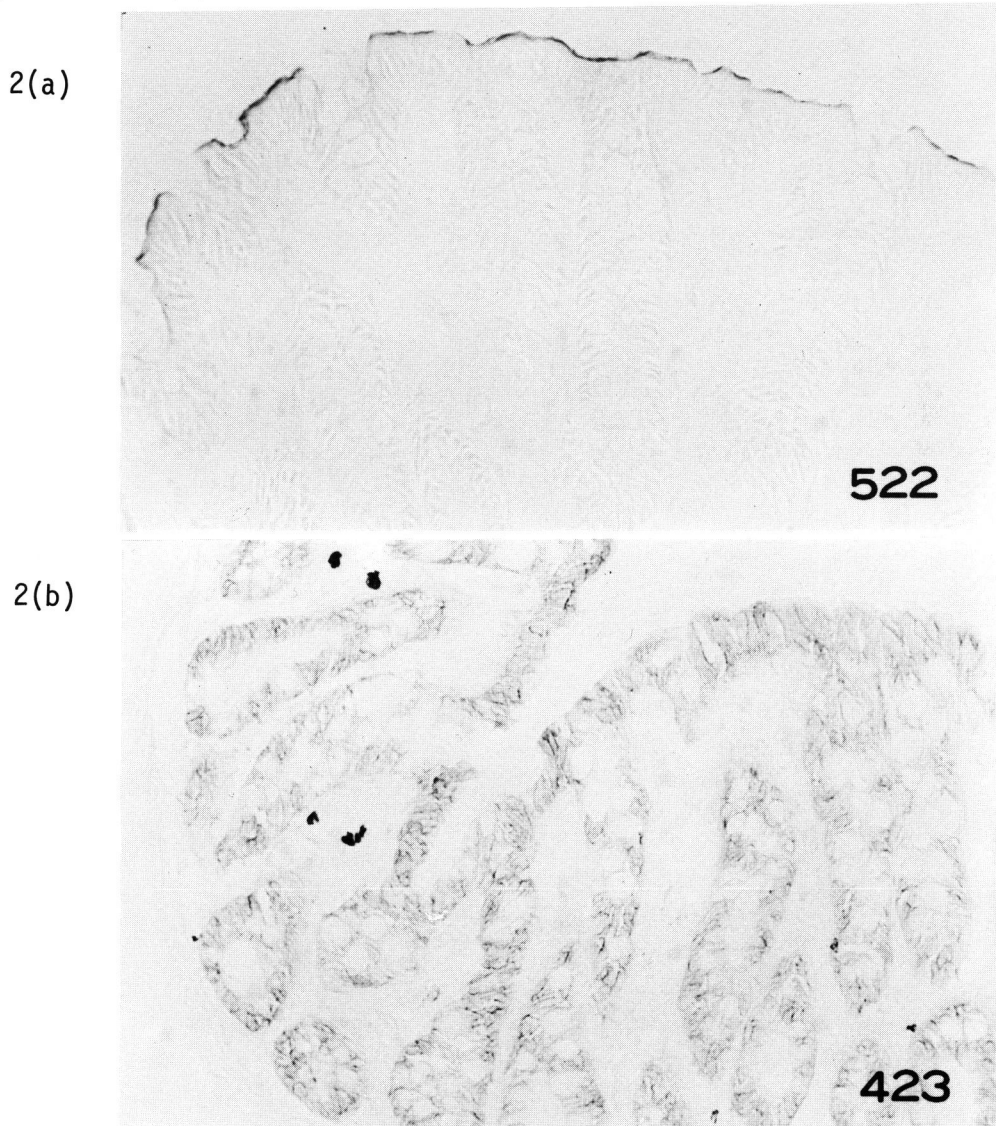


Fig. 2 Reactivity of monoclonal antibodies 522 and 423 to the normal rat colon detected by immunoperoxidase technique.

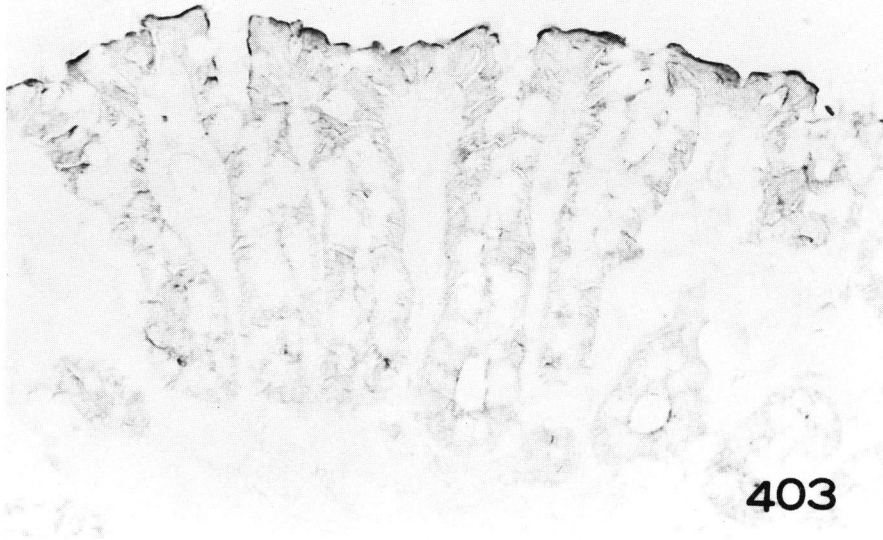
Monoclonal antibody 522 stained the microvillus membrane portion of the surface absorptive epithelial cells and did not stain the laterobasal membrane portion of them (a), whereas antibody 423 stained the laterobasal membrane portion and the cytoplasm of the epithelial cells from the top to the base of crypts and did not stain the microvillus membrane portion of them (b). ($\times 280$)

抗体 423 は Fig. 2 (b) に示すように遠位大腸組織の表層吸収上皮細胞および陰窩の上部から下部、底部にいたるすべての上皮細胞と反応するが、杯細胞および粘液とは反応しなかった。個々の細胞レベルでの反応パターンを観察すると表層吸収上皮細胞および陰窩内上皮細胞の側・底面膜側および細胞質が陽性所見を示すが、管腔および陰窩に面した微小絨毛膜側は陰性であ

り、抗体 522 による反応パターンとは対照的な分布を示した。

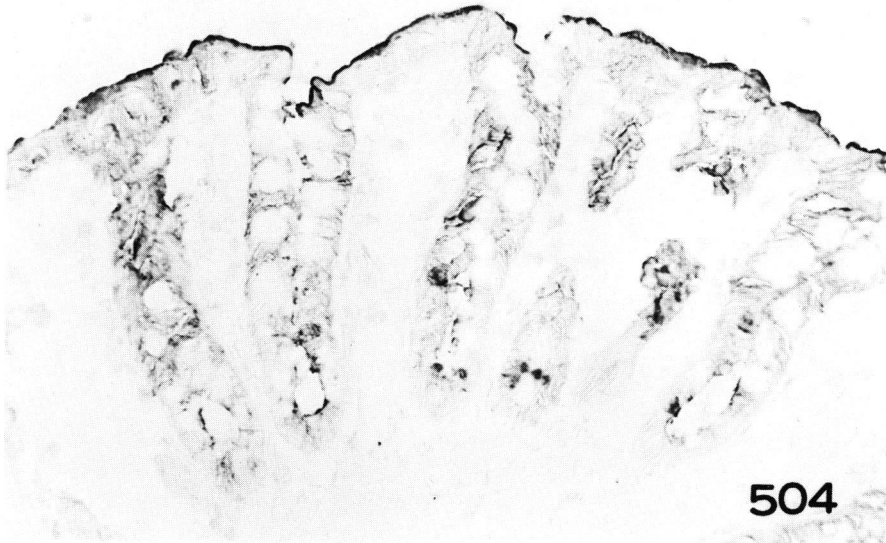
次に抗体 403 による反応パターンを Fig. 3 (a) に示す。表層吸収上皮細胞および陰窩内のすべての上皮細胞に陽性であったが、杯細胞および粘液には陽性を示さなかった。細胞内では主として微小絨毛膜側に強い陽性所見を認めた。

3(a)



403

3(b)



504

Fig. 3 Reactivity of monoclonal antibodies 403 and 504 to the normal rat colon detected by immunoperoxidase technique. Both antibodies 403 (a) and 504 (b) mainly stained the microvillus membrane and the apical portion of epithelial cells. ($\times 280$)

抗体 504 の組織および細胞内での反応パターンは Fig. 3 (b) に示すように抗体 403 と類似するが、杯細胞および杯細胞粘液と反応している部分も認められた。

3・2・2 小腸, 胃, 肝, 膵, 腎, 肺, 脾および血球に対する反応性

4 種のモノクローナル抗体の特異性を正常組織を用いて間接免疫ペルオキシダーゼ法により検討した。その結果を Table 1 にまとめて示した。

抗体 522 は小腸においては、すべての小腸上皮細胞の微小絨毛膜側部分と反応し、側・底面膜側とは反応せず、大腸上皮細胞と類似の反応パターンを示した。しかし、胃, 肝, 膵, 腎, 肺, 脾細胞とは全く反応を認めず、また赤血球および白血球にも反応しなかった。

抗体 423 は小腸上皮細胞の側・底面膜側部分に限局して反応し、微小絨毛膜側部分とは反応しなかった。また、抗体 522 同様、胃, 肝, 膵, 腎, 肝, 脾, 赤血球および白血球にも反応しなかった。

抗体 403 は小腸, 胃, 肝, 膵, 腎および脾のいずれの組織にも反応しなかった。

抗体 504 は小腸, 肝, 膵, 腎および脾とは反応しないが、胃腺体部の一部の上皮細胞と反応し、抗体 403 とは異なる組織分布を示した。

3・2・3 モノクローナル抗体による免疫電顕的検索

光学顕微鏡下でも抗体 522 は大腸表層吸収上皮細胞の微小絨毛膜に、また抗体 423 は大腸上皮細胞の側・底面膜に限局して反応している所見が示されたが、この反応性をさらに詳細に検討する目的で間接免疫ペル

オキシダーゼ法による電子顕微鏡レベルでの検討を加えた。

Fig. 4 (a) は抗体 522 を用いて反応させた大腸上皮細胞の一部を示す。微小絨毛膜および微小絨毛の内部に陽性所見を認めるが、一方、側面膜は陰性であった。

Fig. 4 (b) は抗体 423 用いた場合で、Fig. 4 (a) とは全く対照的に側面膜に強く陽性所見を認めるが、矢印に示したように一部の微小絨毛膜にもわずかに陽性部分を認めた。

以上の 2 種のモノクローナル抗体 522 および 423 により、正常大腸上皮細胞には微小絨毛膜と側・底面膜にそれぞれ局在を異にする抗原が検出された。以下、本論文においては細胞膜の“極性”をかかるとして用いることにする。

3・3 モノクローナル抗体の大腸腫瘍に対する反応性

次に DMH によって誘発された種々の組織型のラット大腸腫瘍に対する 4 種のモノクローナル抗体の反応性および反応パターンを免疫組織学的に検討した結果を Table 2 にまとめて示した。

Fig. 5(a)には抗体 522 を反応させた未分化癌組織を示したが、正常大腸組織あるいは大腸上皮細胞の反応パターンとは異なり、癌細胞膜とは全周性に反応しており、正常細胞における膜極性は喪失している。検索した未分化癌 3 例中 3 例および高分化癌 4 例中 1 例において Fig. 5 (a) に示したごとく細胞膜と全周性に反応した。しかし、他の高分化癌 3 例および良性腫瘍においては細胞の微小絨毛膜側に限局して反応し、膜極性

Table 1 Crossreactivity of monoclonal antibodies 522, 403, 504 and 423 to rat normal tissues detected by immunoperoxidase staining.

Rat Tissue	MoAb 522 (IgG2b)	MoAb 403 (IgM)	MoAb 504 (IgM)	MoAb 423 (IgG1)
Colon	MVM	MVM	MVM	LBM
Small intestine	MVM	—	—	LBM
Stomach	—	—	+	—
Liver	—	—	—	—
Pancreas	—	—	—	—
Kidney	—	—	—	—
Lung	—	n. t.	n. t.	—
Spleen	—	—	—	—
RBC	—	—	—	—
WBC	—	—	—	—
Fetal colon	MVM	MVM	MVM	LBM

MVM: microvillus membrane LBM: laterobasal membrane

n. t.: not tested

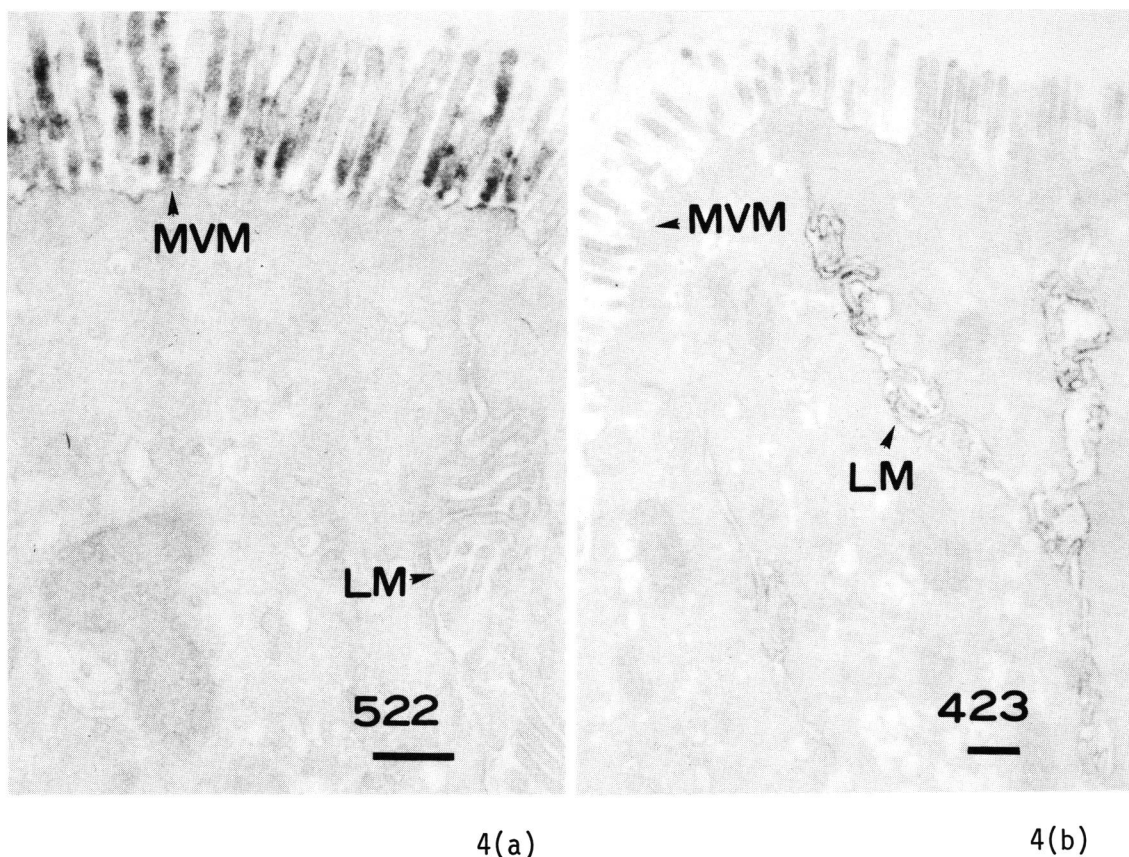


Fig. 4 Electron micrograph of normal colonic epithelial cells. Monoclonal antibody 522 reacted with the microvillus membrane (MVM) and the core of microvilli and did not react with the lateral membrane (LM) (a).

However, antibody 423 mainly reacted with the lateral membrane (b). (bar: 1 μ m)

Table 2 Distribution of reactivity pattern in the different tumor types stained with monoclonal antibodies 522, 403, 504 and 423.

		Adenoma	well differentiated adenocarcinoma	poorly differentiated adenocarcinoma
MoAb 522 (MVM)	MVM alone	3/3	3/4	0/3
	whole cell membrane	0/3	1/4	3/3
MoAb 403 (MVM)	MVM alone	3/3	4/5	0/2
	whole cell membrane	0/3	0/5	0/2
MoAb 504 (MVM)	MVM alone	3/3	4/5	0/2
	whole cell membrane	0/3	0/5	0/2
MoAb 423 (LBM)	LBM alone	n. t.	n. t.	0/2
	whole cell membrane	n. t.	n. t.	2/2

3/4: 3 positive/4 tested n. t.: not tested

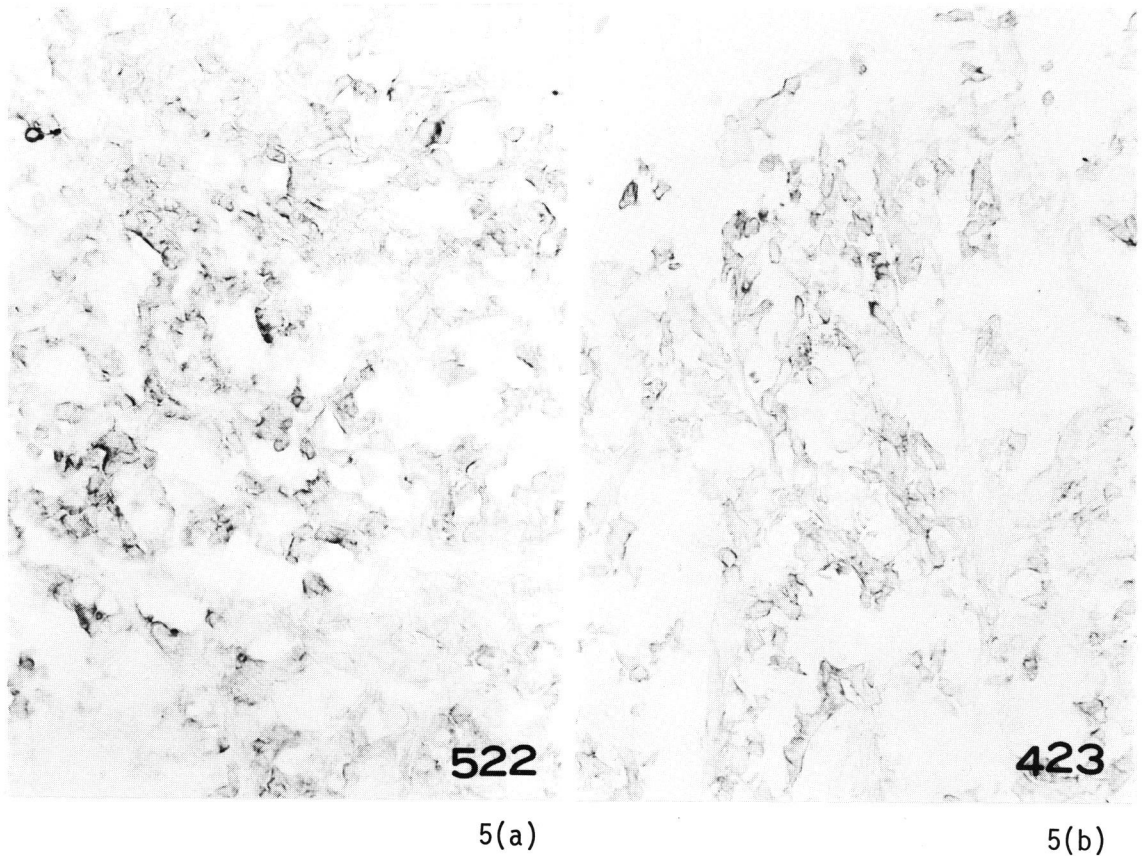


Fig. 5 Poorly differentiated adenocarcinoma of rat colon were stained with monoclonal antibodies 522 (a) and 423 (b). Both antibodies reacted with the entire surface of cancer cells. ($\times 280$)

の喪失は認められなかった。一方、抗体 423 の未分化癌に対する反応性は Fig. 5 (b) に示すごとく、抗体 522 に類似して細胞膜の全周に反応し、膜極性の喪失を認めた。検索した未分化癌 2 例中 2 例において極性の喪失を観察しえた。抗体 403 および 504 では抗体 522 あるいは 423 とは異なる反応パターンが観察された。両抗体ともに未分化癌 2 例中 2 例および高分化癌 5 例中 1 例においては反応を示さず、抗原の消失が認められた。しかし高分化癌 4 例および良性腫瘍においては正常組織に類似して細胞の微小絨毛膜側に限局して反応し、膜極性は保たれていた。

未分化癌細胞における膜極性の喪失をさらに検討するために、間接免疫ペルオキシダーゼ法による電子顕微鏡レベルでの観察を試みた。Fig. 6 (a) および (b) に抗体 522 を反応させた未分化癌細胞の免疫電子顕微鏡像を示したが、微小絨毛を散在性に認め癌細胞の特徴を

示し、さらに、細胞膜上に全周性に抗体 522 の反応陽性部分を認め、膜極性の喪失が認められた。写真は示さないが抗体 423 についても抗体 522 と同様に未分化癌細胞膜と全周性に反応することを確認した。

3・4 モノクローナル抗体の胎仔大腸組織に対する反応性

胎仔大腸組織に対する反応パターンを間接免疫ペルオキシダーゼ法により検討した。抗体 522 は Fig. 7 に示すごとく胎仔 (2 週齢) 大腸上皮細胞の管腔面のみ陽性を示した。また、成熟ラットの場合とはやや異なり、底部の上皮細胞の陰窩に面した膜も陽性と判断され、膜極性は保たれていた。一方、抗体 423 の場合は成熟ラット大腸に対する反応パターンと全く同様に胎仔大腸陰窩の上部から底部に至るすべての上皮細胞の側・底面膜と反応し、膜極性は保たれていた。

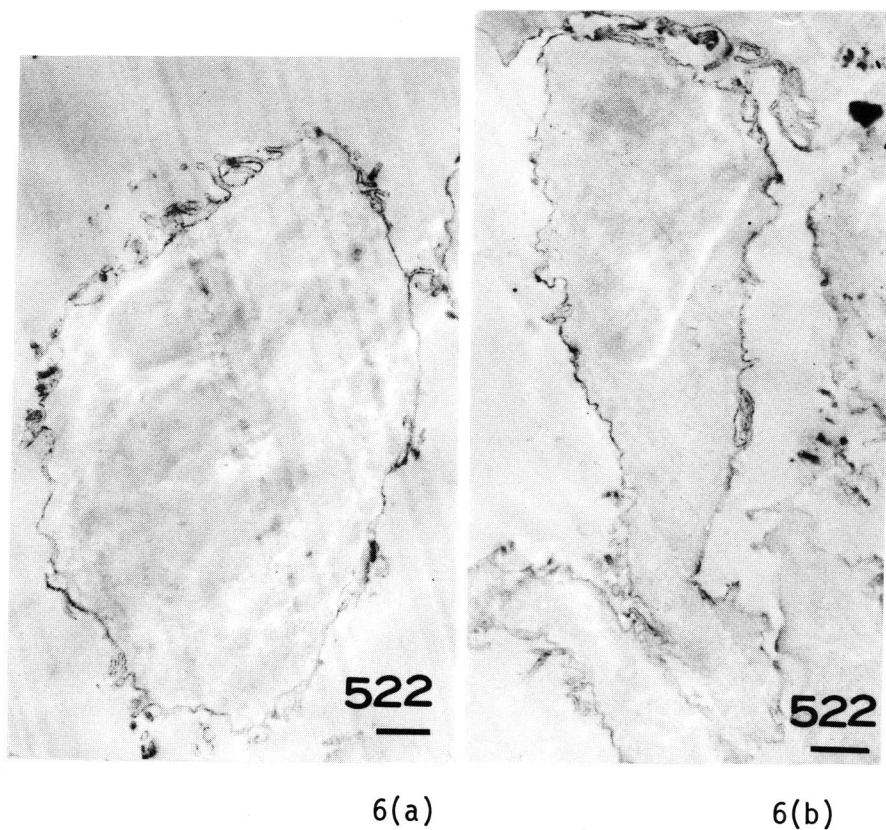


Fig. 6 Electron micrograph of the poorly differentiated colon cancer cells. Monoclonal antibody 522 reacted with the entire surface membrane of a cancer cell (a) (b). (bar:1 μ m)

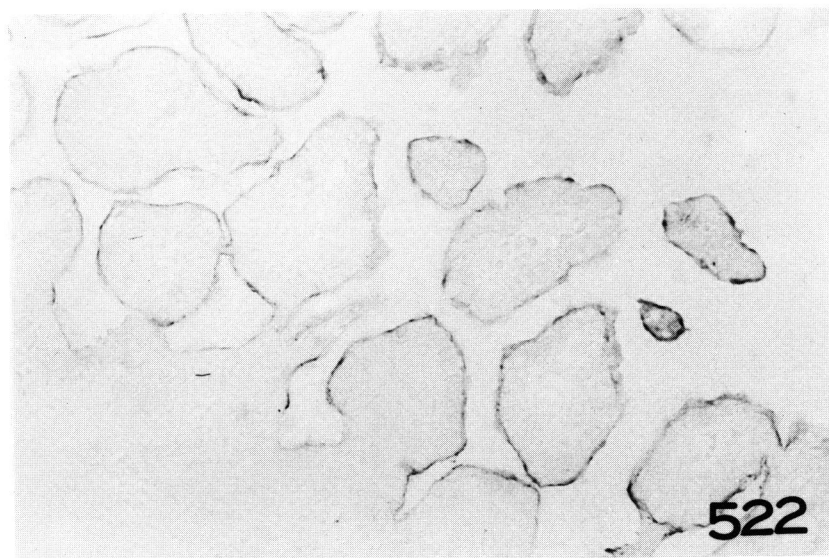


Fig. 7 Monoclonal antibody 522 stained the microvillus membrane portion of epithelial cells of the fetal rat colon (2W). ($\times 280$)

3・5 モノクローナル抗体 522 の対応抗原の分子性状および抗原決定基

抗体 522 により沈降する標識対応抗原を SDS-PAGE (10%ゲル)により分析すると、還元および非還元いずれの条件下においても分子量 66 K ダルトンの位置に陽性バンドを認め、この抗原の蛋白部分は単一ポリペプチドと推定された (Fig. 8). さらに、抗原の性状を検索するため粗抗原の 0.6 M 過塩素酸可溶分画を作製して、粗抗原と対比して dot blotting を行った. Fig. 9 に示すように粗抗原および過塩素酸可溶分画に抗体 522 対応抗原の存在を認め、66 K ダルトン分子は過塩素酸抵抗性で、糖蛋白であることが強く示唆された. さらに、抗体 522 の認識する抗原決定基の性状を検討するため、正常大腸組織を PLP 固定あるいはホルマリン固定をし、過ヨウ素酸処理を施して、免疫ペルオキシダーゼ法による染色性の変化をみた. Table 3 に示すようにホルマリン固定では染色性が著しく減弱するが、いずれの固定法においても過ヨウ素酸処理の染色性への影響はみられなかったことから、抗体 522 は、66 K ダルトン糖蛋白(66 KDgp)上のペプチド部分を認識している可能性が推測された.

3・6 分離大腸上皮細胞での膜極性の観察

ラット大腸上皮細胞を組織から分離し tight junction を破壊しておき、4 ないし 5 時間培養した後に、抗体 522 との反応性を間接免疫ペルオキシダーゼ法により観

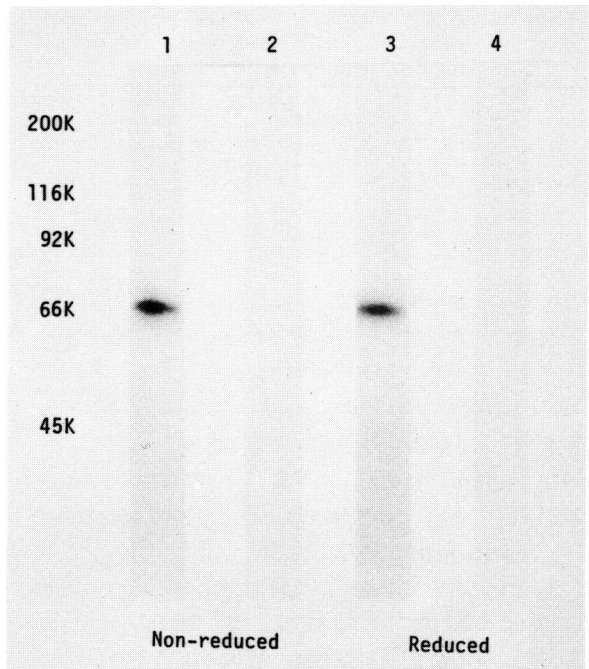


Fig. 8 Radioimmunoprecipitation and SDS-PAGE analysis of the corresponding antigenic molecule to monoclonal antibody 522. Column 1 and 3 showed precipitate products with antibody 522 under the non-reduced and reduced conditions, respectively. Column 2 and 4 were the negative controls to column 1 and 3, respectively.

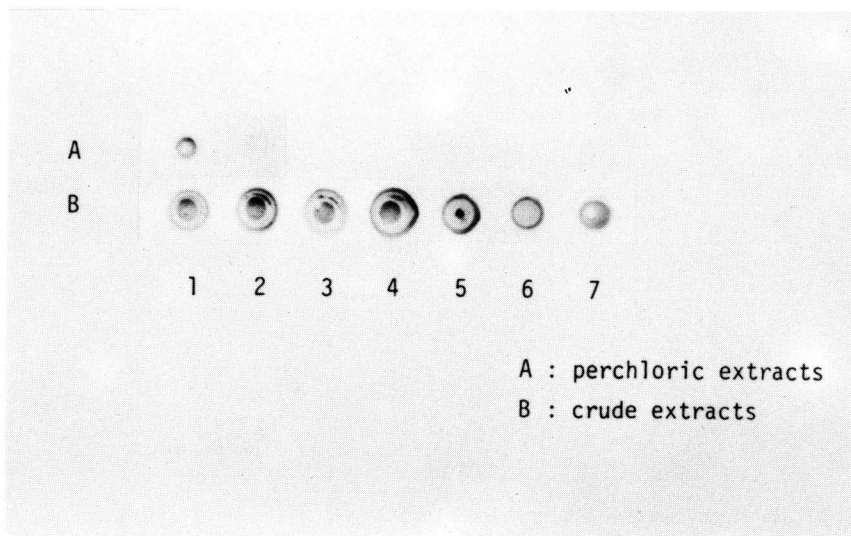


Fig. 9 Dot blotting analysis of perchloric acid extracts treated with monoclonal antibody 522. Row A; 1: perchloric acid extracts of colonocytes (10 μ g/ml protein) 2: PBS, Row B; crude extracts of colonocytes. 1, 2: 500 μ g/ml protein, 3: 250 μ g/ml protein, 4: 125 μ g/ml protein, 5: 50 μ g/ml protein, 6: 25 μ g/ml protein and 7: 12 μ g/ml protein were applied.

Table 3 Effect of fixative methods and periodate treatment on the microvillus membrane antigen recognized with monoclonal antibody 522.

	not treated	treated with periodate for		
		30 min.	60 min.	120 min.
Formaline	+/-	+/-	+/-	+/-
PLP	++	++	++	++

察すると、Fig. 10 に示すように細胞は再び集合するが、細胞膜の全周に陽性所見を認めた。さらに、発癌プロモーターでもあり tight junction を開放するとされる 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA) を培養液中に 10 ng/ml, 100ng/ml と添加するとさらに短時間で膜極性の喪失が認められた。

3.7 モノクローナル抗体 423 とラット遊離 secretory component との反応性

ラット大腸上皮細胞可溶性抗原を用いての western blotting による検索では抗体 423 対応抗原は検出されなかった。そこで既知抗原の中で類似の組織分布を示す secretory component (SC) との反応性をラット胆汁を抗原蛋白としての western blotting および組織切片上での polymeric IgA を含むラット血清 (45% 硫酸沈澱分画) による抗体 423 の結合阻止試験を行った。ラット胆汁中の遊離 secretory component (FSC) との反

応性をみるため、ラット胆汁を 10% ゲルで SDS-PAGE を行った後、western blotting を行ったが Fig. 11 に示すようにクマシー染色で 83 K に位置する FSC は抗体 423 とは反応を示さなかった。さらに、上述のラット血清分画を正常大腸組織切片上への室温下にて 2 時間反応させた後、間接免疫ペルオキシダーゼ法により染色し、ラット血清非処理組織切片と比較したところ、Fig. 12 に示すように抗体 423 の染色性は血清処理によって全く影響されなかった。

4 考 察

本研究においてラット大腸上皮細胞を免疫原として作製した 4 種のモノクローナル抗体のうち、抗体 522, 403 および 504 は大腸上皮細胞の微小絨毛膜に限局して反応し、一方、抗体 423 は大腸上皮細胞の側・底面膜に限局して反応したが、とくに抗体 522 および 423 によって電子顕微鏡レベルにおいても正常大腸上皮細胞膜には免疫学的に明瞭に識別される膜極性が存在することが示された。これらの 2 種の抗体の認識する抗原はそれぞれ正常大腸上皮細胞の微小絨毛膜および側・底面膜のマーカールと見なすことができよう。以下に、これらについて考察を加える。

4.1 抗体 522 および抗体 423 の対応抗原について

上皮細胞における吸収、分泌は一定の方向性をもつ

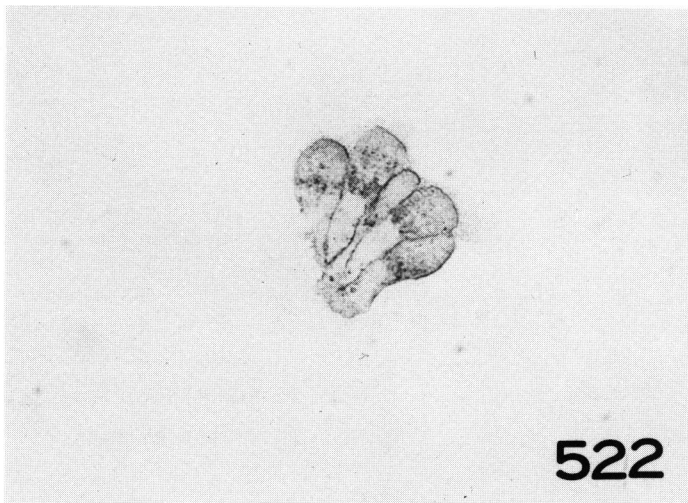


Fig. 10 Reactivity pattern of the isolated colonocytes stained with monoclonal antibody 522. The entire surface membrane as well as cytoplasm was stained. After 1×10^6 /ml isolated colonocyte were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS for 4 hrs under 37°C in CO₂ incubator, they were stained. ($\times 450$)

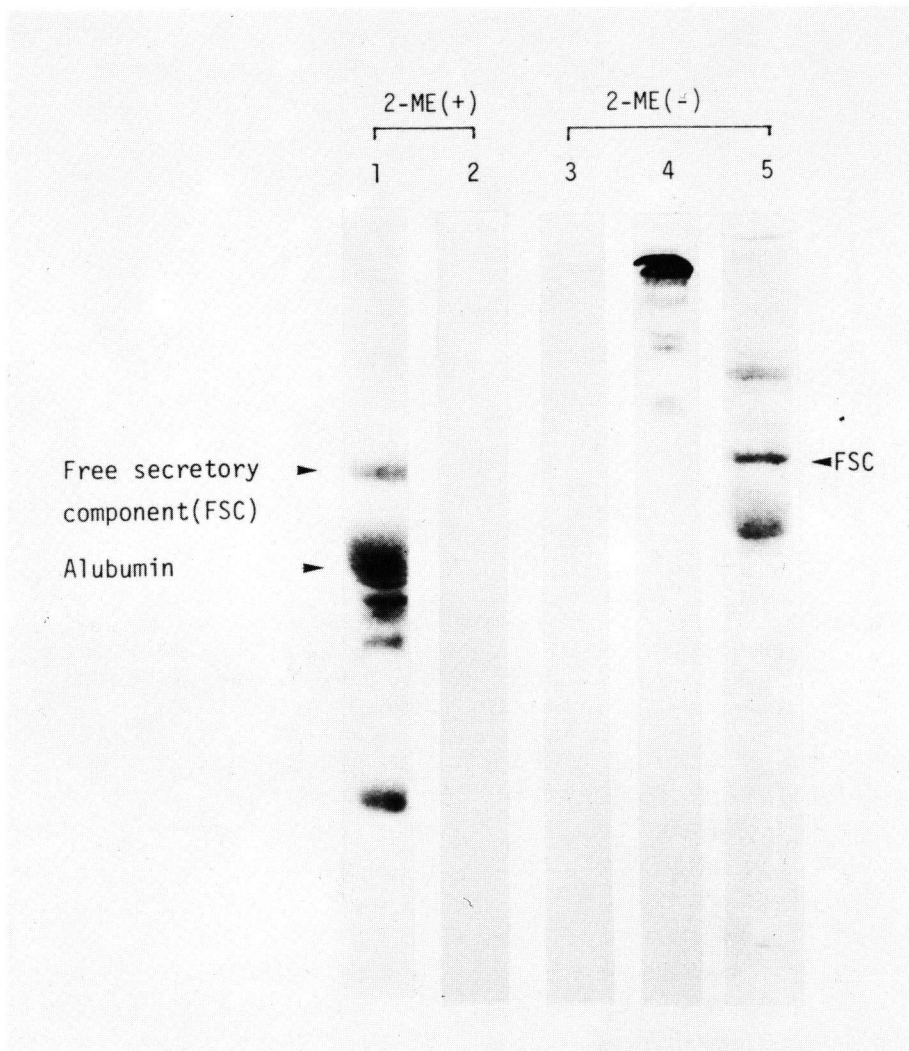


Fig. 11 Immunoblots of rat bile proteins reacted with monoclonal antibody 423. Column 1 and 5 were rat bile proteins which were electrophoresed in reduced and non-reduced conditions, respectively. Both were stained with Coomassie blue. Column 2 and 3 were rat bile proteins which reacted with monoclonal antibody 423 in reduced and non-reduced conditions, respectively, but there was no positive band. Mouse immunoglobulins were electrophoresed in Column 4 (positive control) before reacting with secondary antibody.

て行われており、この機能的方向性は膜上に発現する一連の酵素、糖蛋白あるいはレセプターによって規定されている¹⁹⁾と考えられるため、本研究により示された66KDgp および抗体 423 対応抗原の局在の特徴から、小腸あるいは大腸上皮細胞の何らかの機能と関連している可能性を考えておく必要がある。66KDgp に類似の局在を示す酵素としてアルカリフォスファターゼ、ロイシンアミノペプチダーゼ I および II があるが、アル

カリフォスファターゼは分子量80Kダルトンで40Kダルトンの2つのサブユニットから構成²⁰⁾されている。また、ロイシンアミノペプチダーゼ I は分子量 320 Kダルトンで2本の α 鎖(分子量91Kダルトン)および2本の β 鎖(分子量71Kダルトン)から構成されるテトラマー¹⁾であり、ロイシンアミノペプチダーゼ II は2本の α 鎖からなるダイマーで分子量180Kダルトン¹⁾と報告され、66KDgp は単一ポリペプチドであって、この点、分子性

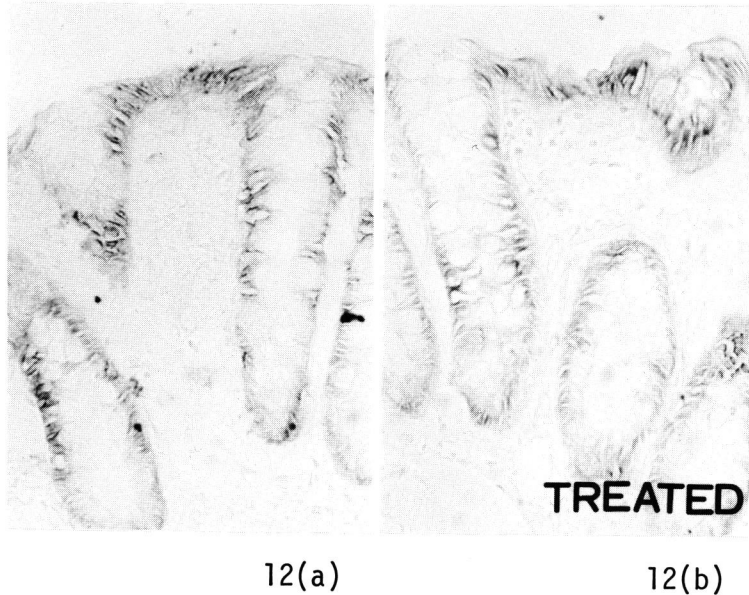


Fig. 12 Reactivity of monoclonal antibody 423 to the normal rat colon after treatment with polymeric IgA (b). Photograph (a) showed a normal staining pattern of antibody 423. No difference was found on the staining pattern of antibody 423. ($\times 280$)

状が大きく異なっている。一方、66KDgpの正常小腸および大腸吸収上皮細胞の微小絨毛膜に局在する点は、ある種のポリクローナル抗CEA抗体によって検索されたヒトCEAあるいはCEA関連抗原の局在²¹⁾に類似しており、また実験的大腸癌組織において、高分化腺癌では管腔面に局在し、胎仔大腸粘膜の所見に類似していること、さらに66KDgpは過塩素酸可溶性であることなどからラットにおけるCEAあるいはCEA関連抗原に相当する可能性が考えられる。CEAは40-60%の糖を含む単一ポリペプチドからなる分子量180K-200Kダルトン糖蛋白で、CEA自身は多様性^{22,23)}であるため組織分布は用いた抗体の特異性により多少異なるが、ポリクローナル抗CEA抗体による検索では、大腸癌、肝癌、胃癌、などの上皮性悪性腫瘍、胎児小腸、大腸のみならず正常小腸、大腸粘膜にも存在する²⁴⁾との報告もある。66KDgpとは分子量は異なるが、さらにCEAとの異同を検討するためポリクローナル抗CEA抗体(DAKO)、モノクローナル抗CEA抗体(YKO13およびYKO24)^{22,23)}を用いてラット大腸組織切片上で、阻上試験を行ったが、抗CEA抗体は抗体522の大腸組織に対する反応性を全く阻止せず、少なくとも、この3種の抗CEA抗体により66KDgpとの交叉反応性は検出し得なかった。CEA関連抗原としてNCA²⁵⁾(non-specific crossreacting antigen)、NCA2²⁶⁾などが知ら

れているが、Burtin²⁷⁾によればNCAは分子量60Kダルトンで約40%の糖を含む糖蛋白であり、正常肺、脾、好中球および単球に存在²⁸⁾するが、66KDgpはそのいずれの組織・細胞にも存在せず、ヒトのNCAとは類似していない。またNCA2とも分子量および組織分布²⁷⁾の上で異なっていると考えられる。以上から66KDgpがヒトCEAあるいはCEA関連相同抗原であるとは結論しえず、むしろ異なる分子の可能性を示唆するが、今後、66KDgpの電気泳動上の移動度、糖含量および構成、アミノ酸構成などを検討する必要があると考えられる。これまでヒトCEA相同抗原についての報告は少なく、Engvall *et al.*²⁹⁾はサル肺および脾PCA抽出物がヒト抗NCA抗体および抗CEA抗体と交叉反応を示すことを報告しており、Abeyounis and Milgrom³⁰⁾はラットでDMHにより誘発された空腸癌および大腸癌さらに正常大腸組織のPCA抽出物中に β 位に移動度をもつ糖蛋白の存在を示しているが、血清学的にはヒトCEAとは交叉しないと報告しており、いずれも対応抗原分子の性状や組織分布について述べられていない。

一方、抗体423の対応抗原は大腸上皮細胞可溶性抗原を用いてのimmunoprecipitation, western blottingでは検出されていない。抗体423は正常小腸および大腸上皮細胞の側・底面膜に主として反応し、その組織分布はポリクローナル抗SC抗体によるSCの局在に類

似する。そこで、ラット胆汁中にFSCが大量に含まれている^{31,32}ことを利用して、胆汁をSDS-PAGEにより分画後、western blottingによって抗体423との反応性を検討したが、陽性バンドは認められなかった。さらにラット血清中にはヒトに比してpolymeric IgAが多量に含まれている³³ため、polymeric IgAがSCに結合することを利用して大腸組織切片上で、polymeric IgAが抗体423の結合を阻止するか否かを検討したが、結合は阻止されなかった。これらの結果から、抗体423はSCとは反応しないものと考えられた。また、ポリクローナル抗SC抗体を用いてMullock *et al.*³⁴はラットでは肝細胞膜上にもSCが存在することをみているが、抗体423は肝細胞とは反応しないことも、本抗体がSCとは反応していないことを支持する。

4.2 実験的ラット大腸癌細胞における膜極性の変化について

DMHにより誘発されたラット大腸癌細胞においては分化型癌細胞では膜極性は比較的良好に保たれているが、未分化型癌細胞においては正常大腸上皮細胞における膜極性が喪失し66KDgpおよび抗体423対応抗原は細胞膜上に全周性に発現する現象が観察された。

この現象の機序として2つの仮説が考えられる。Rindler *et al.*³⁵は2種のウイルスによって感染させたイヌ腎細胞培養株を用いて、腎細胞膜上において極性を示す糖蛋白の発現の振り分け(sorting)が細胞内のどのレベルでなされるかを検討した。2種のウイルスエンベローブ糖蛋白のうち、一方はapical membraneへ、他方はbasolateral membraneに極性をもって振り分けられ発現されるが、この振り分けはゴルジ装置通過後になされるとしている。このことは癌細胞では、sorting機序の異常がおり、細胞膜上に無秩序に発現されるために膜極性の喪失がおこる可能性を示唆する。

最近、Herzlinger and Ojakian³⁶はイヌ腎細胞培養株細胞膜上のある種の糖蛋白は、各々の細胞が孤立した状態下(subconfluent monolayer)では細胞膜上に全周性に発現されるが、接触した状態下(confluent monolayer)になると細胞の側・底面膜に局在し、この極性の維持にtight junctionが関連していることを報告した。本研究において、66KDgpも正常組織中では極性をもって微小絨毛膜に局在するが、分離後の大腸上皮細胞あるいはtight junctionを開放するTPA³⁷で処理後の分離大腸上皮細胞では極性を失って細胞膜の全周に発現する現象がみられ、Herzlinger and Ojakianの報告と同様の現象を観察していると考えられる。分離細胞と癌細胞での膜極性の喪失は同一の機序でおこる

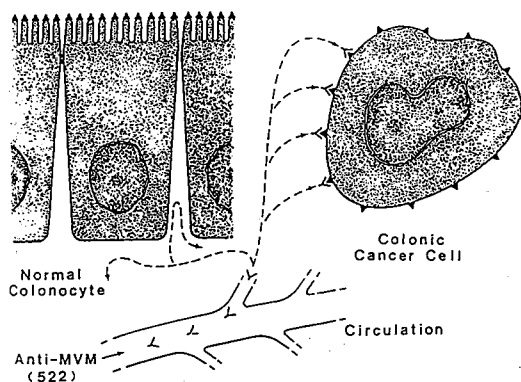


Fig. 13 Therapeutic implication

と考えるのは早計であるが、癌細胞でのtight junctionの減少あるいは構造の変化も報告^{38,39}されていることから、その膜極性の喪失には、その要因の一つとしてtight junctionが関与している可能性も否定し得ない。いずれにしても抗体522は癌細胞における膜極性の変化の機序の解析に役立つものと推測される。さらに、本研究において用いたDMH誘発ラット大腸癌は、抗体522のような特徴的なモノクローナル抗体を利用した癌のターゲティング療法の動物モデルとして利用されるかもしれない。すなわち、Fig. 13.左に示すように抗体522によって認識される66KDgpは正常小腸および大腸上皮細胞では微小絨毛膜に局限して発現される。しかし、この抗体を血中内へ投与した場合には微小絨毛膜への浸透はtight junctionによって妨げられるという組織構築上の特徴により正常小腸あるいは大腸上皮細胞とは結合し難いと考えられる。しかし、Fig. 13右に示すように、癌細胞において66KDgpが細胞膜全周に発現する場合には、抗体522は血流を介してこの標的抗原に達しうる。つまり、66KDgpは正常抗原であっても組織分布の特徴からターゲティング療法の対象となり得る可能性がある。さらに、このような動物モデルはモノクローナル抗体を利用するターゲティング療法の際の基礎的検討に役立つことが期待されよう。

5 結 論

1) 正常ラット大腸上皮細胞に対する4種のモノクローナル抗体を得、とくにそのうち抗体522および抗体423は、免疫組織学的ならびに免疫電頭的に、それぞれ大腸上皮細胞の微小絨毛膜および側・底面膜と反応することが確かめられ、それらの対応抗原は異なる局在を示すことが明らかにされた。すなわち、これらの2種のモノクローナル抗体により免疫学的に識別される

膜極性の存在が明らかにされた。

2) 抗体 522 により認識される抗原は、0.6 M 過塩素酸可溶性の66KD糖蛋白であり、大腸および小腸上皮細胞の微小絨毛膜への局在、実験的大腸癌や胎仔腸粘膜における局在パターンはヒト CEA あるいは CEA 関連抗原に類似するが、分子量、他組織・細胞との反応性などから、ラットにおける CEA 相同抗原とは考え難かった。

3) 抗体 423 対応抗原は小腸および大腸上皮細胞側・底面膜に主に局在し、その分子性状は不明であるが、少なくとも secretory component ではないことが示唆された。

4) 1,2-dimethylhydrazine によって誘発されたラット大腸癌細胞の一部において、とくに未分化癌細胞において 66 KD 糖蛋白および抗体 423 対応抗原は細胞膜上に全周性に発現され、膜極性の喪失が認められた。

5) 抗体 522 は癌細胞における膜極性の喪失現象の細胞レベルでの解析に有用であると同時に、この抗体により認識される66KD糖蛋白はモノクローナル抗体を用いた癌ターゲティング療法の標的抗原となる可能性があり、この抗原-抗体系はその動物モデルとなり得ることが期待される。

謝 辞

御指導、御校閲いただいた本学内科学第一講座谷内昭教授、研究に際して御指導いただいた本講座今井浩三講師および米国コロラド大学内科消化器部門 W. R. Brown 教授ならびに D. J. Ahnen 博士に深謝いたします。

本研究は、文部省がん特別研究 I および II、厚生省がん研究助成金ならびに高松宮妃がん研究助成金の補助によった。

文 献

- Gray, G. and Santiago, N.: Intestinal surface amino oligopeptidases, *J. Biol. Chem.* **252**, 4922-4928 (1977).
- Ahnen, D. Santiago, N. Cezard, J. P. and Gray, G.: Intestinal aminoligopeptidase. *J. Biol. Chem.* **257**, 12129-12135 (1982).
- Tamura, R. Nishi, Y. and Takesue, Y.: Immunolocalization of the 33 kD protein in the microvilli of rabbit small-intestinal epithelial cells. *Exp. Cell Res.* **150**, 356-366 (1984).
- Vengesa, P. and Hopfer, U.: Cytochemical localization of alkaline phosphatase and Na⁺-pump sites in adult rat colon. *J. Histochem. Cytochem.* **27**, 1231-1235 (1979).
- Gustin, M. and Goodman, D.: Isolation of brush border membrane from the rabbit descending colon epithelium. *J. Biol. Chem.* **256**, 10651-10656 (1981).
- Imai, K. Molinalo, G. and Ferrone, S.: Monoclonal antibodies to melanoma associated antigen. *Transplant. Proc.* **12**, 380-383 (1980).
- Imai, K. Nakanishi, T. Noguchi, T. Yachi, A. and Ferrone, S.: Selective in vitro toxicity of puorhionin conjugated to the monoclonal antibody 225.28S to a human high-molecular-weight melanoma-associated antigen. *Cancer Immunol. Immunother.* **15**, 206-209 (1983).
- Suter, L. Bruggen and Sorg, C.: Use of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for screening of hybridoma antibodies against cell surface antigens. *J. Immunol. Methods* **39**, 407-411 (1980).
- Douillard, J. Hoffman, T. and Herberman, R.: Enzyme-linked immunosorbent assay for screening monoclonal antibody production: use of intact cells as antigen. *J. Immunol. Methods* **39**, 309-316 (1980).
- McLean, I. and Nakane, P.: Periodate-lysine-paraformaldehyde fixative. a new fixative for immunoelectron microscopy. *J. Histochem. Cytochem.* **20**, 1077-1081 (1974).
- Isobe, Y. Nakane, P. and Brown, W.: Studies on translocation of immunoglobulins through intestinal epithelium. I. Improvements in the peroxidase labeled antibody method for application to the study of human intestinal mucosa. *Acta Histochem. Cytochem.* **10**, 161-168 (1977).
- 藤田英雄, 今井浩三: 抗 CEA モノクローナル抗体による免疫組織化学的研究. *札幌医誌* **53**, 535-551 (1984).
- Traynor, O. Costa, N. and Wood, C.: A scanning electron microscopy study of changes in the colonic mucus layer during chemical carcinogenesis. *Cancer* **51**, 1847-1853 (1983).
- Axen, R. Porath, J. and Ernback, S.: Chemical coupling of peptides and proteins to polysaccharides by means of cyanogen halides. *Nature* **214**, 1302-1304 (1967).
- 守谷保夫, 今井浩三: モノクローナル抗体を用いた CEA の免疫学的研究. *札幌医誌* **53**, 455-467 (1984).
- Weber, K. and Osborn, M.: The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamido gel electrophoresis. *J. Biol.*

- Chem. **244**, 4406-4412 (1969).
17. Krupcey, J. Wilson, T. Freedman, S. and Gold, P.: The preparation of purified carcinoembryonic antigen of the human digestive system from large quantities of tumor tissue. *Immunohistochemistry* **9**, 617-622 (1972).
 18. Towbin, H. Staehelin, T. and Gordon, J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350-4354 (1979).
 19. Silk, D. and Dawson, A.: Intestinal absorption of carbohydrate and protein in man. *In. Rev. Physiol.* **19**, 151-204 (1979).
 20. Klotz, I. and Darnall, D.: Protein subunits: A table (second edition). *Science* **166**, 126-128 (1969).
 21. Ahnen, D. Nakane, P. and Brown, W.: Ultrastructural localization of carcinoembryonic antigen in normal intestine and colon cancer. *Cancer* **49**, 2077-2090 (1982).
 22. Yachi, A. Imai, K. Fujita, H. Moriya, Y. Tanda, M. Endo, T. Tsujisaki, M. and Kawaharada, M.: Immunohistochemical distribution of the antigenic determinants detected by monoclonal antibodies to carcinoembryonic antigen. *J. Immunol.* **132**, 2998-3004 (1984).
 23. Imai, K. Moriya, Y. Fujita, H. Tsujisaki, M. Kawaharada, M. and Yachi, A.: Immunologic characterization and molecular profile of carcinoembryonic antigen detected by monoclonal antibodies. *J. Immunol.* **132**, 2992-2997 (1984).
 24. Fritsche, R. and Mach, J.P.: Isolation and characterization of carcinoembryonic antigen (CEA) extracted from normal human colon mucosa. *Immunochemistry* **14**, 119-127 (1977).
 25. von Kleist, S. Chavanel, G. and Burtin, P.: Identification of an antigen from normal human tissue that crossreacts with the carcinoembryonic antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**, 2492-2494 (1972).
 26. Burtin, P. Chavanel, G. and Hirsch-Marie, H.: Characterization of a second normal antigen that cross-reacts with CEA. *J. Immunol.* **111**, 1926-1928 (1973).
 27. Burtin, P.: The carcinoembryonic antigen of the digestive system (CEA) and the antigens cross-reacting with it. *Ann. Immunol.* **129**, 185-198 (1978).
 28. Burtin, P. Quan, P. and Sabine, M.: Non-specific cross reacting antigen as a marker for human polymorphs, macrophages and monocytes. *Nature* **255**, 714-716 (1975).
 29. Engvall, E. Vuenyo, M. and Ruoslahti, E.: A monkey antigen crossreacting with carcinoembryonic antigen, CEA. *Br. J. Cancer* **34**, 341-345 (1976).
 30. Abeyounis, C. and Milgrom, F.: A thermostable antigen characteristic for carcinogen-induced rat intestinal tumors. *J. Immunol.* **116**, 30-34 (1976).
 31. Lemaitre-Coelho, I. Jackson, G. and Vaerman, J.: Rat bile as a convenient source of secretory IgA and free secretory component. *Eur. J. Immunol.* **8**, 588-593 (1977).
 32. Kloppel, T. and Brown, W.: Rat liver membrane secretory component is larger than free secretory component in bile: evidence for proteolytic conversion of membrane form to free form. *J. Cell. Biochem.* **24**, 307-317 (1984).
 33. Vaerman, J.: Study on IgA immunoglobulin in man and animals. Ph. D. Thesis, Catholic University. Louvain (1970).
 34. Mullock, B. Hinton, M. Dobrota, M. Peppard, J. and Orlans, E.: Distribution of secretory component in hepatocytes and its mode of transfer into bile. *Biochem. J.* **190**, 819-824 (1980).
 35. Rindler, M. Ivanov, I. Plesken, H. Rodriguez-Boulan, E. and Sabatini, D.: Viral glycoproteins destined for apical or basolateral plasma membrane domains their intracellular transport in doubly infected Madin-Darby canine kidney cells. *J. Cell Biol.* **98**, 1304-1319 (1984).
 36. Herzlinger, D. and Ojakian, G.: Studies on the development and maintenance of epithelial cell surface polarity with monoclonal antibodies. *J. Cell Biol.* **98**, 1777-1787 (1984).
 37. Ojakian, G.: Tumor promoter-induced changes in the permeability of epithelial cell tight junctions. *Cell* **23**, 95-103 (1981).
 38. Martinez-Polomo, A.: Ultrastructural modification of intercellular junctions in some epithelial tumors. *Lab. Invest.* **22**, 605-614 (1970).
 39. Loewenstein, W.: Junctional intercellular communication and the control of growth. *Biochim. Biophys. Acta* **560**, 1-65 (1979).

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学内科学第1講座 杉山敏郎