

ヒト肺腺癌細胞に対するモノクローナル抗体の作製と 癌患者血清中抗原の検出

遠藤 高夫 今井 浩三
札幌医科大学内科学第1講座 (主任 谷内 昭 教授)

Preparation of a Monoclonal Antibody to Human Lung Adenocarcinoma Cells and Detection of Corresponding Antigen(s) in Sera of Malignant Diseases

Takao ENDO and Kohzoh IMAI

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

A monoclonal antibody YH206(IgM) was prepared against cultured A549 cells of human lung adenocarcinoma. This antibody was shown to react immunohistochemically with adenocarcinomas of the lung, the stomach and the pancreas. Among non-cancerous tissues, this antibody reacted very weakly with the renal tubulus and the pancreas only. On the other hand, the antigen corresponding to this antibody was observed as being widely distributed in the fetal-tissues using the immunoperoxidase technique.

Periodic acid treatment on the tissue section completely decreased the reactivity of this antibody, suggesting that the antibody might recognize the carbohydrate determinant. Neuraminidase digestion of the tissue section unmasked the determinant in some portions of the cancerous parts which were negatively stained before neuraminidase digestion. These results suggest that the nature of the carbohydrate epitope is "cryptic".

Molecular size of the antigen detected in the supernatant of A549 cells was estimated to be over 330K daltons by using sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis and western blotting. Gel filtration analysis, employing enzyme-linked immunosorbent assay, also suggested the very high molecular weight of the antigen in the supernatant.

Measurement of the antigen in the sera of cancer patients was performed by reversed passive hemagglutination assay. Only three of 30(10.0%) healthy donors and four of 31(12.9%) patients with benign diseases showed serum antigen levels of more than 1/64 dilution. In contrast, the positive frequency of the antigen (more than 1/64 dilution) was 45.0% to 73.3% in the sera of patients with lung and gastrointestinal cancers.

These data suggest that the monoclonal antibody YH206 can detect the circulating antigen in the sera from certain types of cancer patients. (Received May 13, 1985 and accepted June 10, 1985)

Key words: Monoclonal antibody, Lung adenocarcinoma, Circulating tumor associated antigen, Cryptic antigen

1 緒 言

肺癌は、近年わが国においても増加しつつあり、その診断や治療の進歩が切望されている。一方、癌関連

抗原に対するモノクローナル抗体はその高い特異性と均一性¹⁾のために癌関連抗原そのものの詳細な解析に用いられるばかりでなく、最近特に診断面で血清中抗原の検出²⁻⁴⁾、免疫画像診断(tumor imaging)⁵⁾等に応用

され新しい知見が加えられつつある。ヒト肺癌に対するモノクローナル抗体の作製報告はこれまでもいくつか認められるが⁹⁻¹⁶⁾、腺癌に限局して反応する抗体の報告は少なく、血中抗原の検出に成功している報告はみられない。ごく最近、Iguro *et al.*¹⁷⁾は胃癌細胞に対して作製されたモノクローナル抗体 CSLEX 1 が肺癌を含めた癌患者血清中の抗原を検出し得ることを報告し、抗原決定基は sialylated Lewis^x とされているが、その血中抗原分子については十分な解析がなされていない。本研究において著者らは、ヒト培養肺癌細胞に対するモノクローナル抗体を樹立し、対応抗原決定基の組織学的分布、ならびに抗原の免疫化学的性状を検索し、興味ある知見を得た。また本抗体を用いて肺癌患者血清中の抗原の検出にも成功したのであわせて報告する。

2 研究方法

2.1 培養細胞

本研究においては、ヒト肺腺癌細胞 A549¹⁸⁾(Dr. W. A. Nelson-Rees, University of California, Berkeley, CA より供与)を免疫原として用いた。また細胞融合用マウス骨髄腫細胞としては、X63-Ag 8.653¹⁹⁾を用いた。これらの細胞は10%牛胎仔血清(FCS)加RPMI1640培養液(GIBCO, USA)にて、37°C5%CO₂インキュベーター内で培養した。また培養上清中の抗原分析を目的として一部は低濃度(1%)FCS加培養液(2.6.1参照)にて培養した。

2.2 モノクローナル抗体の作製、精製および免疫グロブリンクラス決定

モノクローナル抗体はKöhlerとMilstein²⁰⁾に準じて作製し、2.3に従って選択したハイブリドーマYH206を限界希釈法にてクローニングした。これを大量に培養し、その上清を採取する一方、型のごとくBALB/cマウス(日本クレア)を用いて腹水を採取した。これらの上清と腹水は硫酸塩析後Sephacryl S-300(Pharmacia, Sweden)を用いてゲル濾過し精製した。またウサギ抗マウスIgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA, IgM(Miles, USA)によりオクタローニー法を用いて免疫グロブリンクラスを決定した。

2.3 ハイブリドーマのスクリーニング

2.3.1 間接免疫蛍光抗体法

A549細胞との反応性を見るため、一次抗体としてハイブリドーマ上清、二次抗体としてFITC標識ウサギ抗マウスイムノグロブリン(DAKO, Denmark)を用い蛍光顕微鏡(Zeiss MC65)にて検討した。対照標本には一次抗体の代りにX63-Ag 8.653の培養上清を用

いた。

2.3.2 間接免疫ペルオキシダーゼ法

2.4.1に示す組織材料から肺腺癌 肺胞上皮癌 肺扁平上皮癌 肺大細胞癌 正常肺を1つのブロックとして作製し、この切片に対して2.4.2の方法で各組織との反応性を調べた。

2.4 対応抗原組織分布の検索

2.4.1 組織材料

1982年4月より1984年12月までに、手術あるいは剖検の行われた肺癌32例、胃癌12例、大腸癌10例、膵癌4例、肝癌3例、乳癌2例、腎癌1例および胆嚢癌1例の計65例ならびに合法的かつ母体の治療目的の人工妊娠中絶例から得られた胎児組織2例(16週齢および24週齢)を用いた。組織は10%ホルマリンにて固定し、パラフィン包埋後4~5μmにて連続切片を作り、4°Cに保存した。各例につきヘマトキシリン・エオシン染色を行い組織学的に検討した。

2.4.2 免疫ペルオキシダーゼ染色

渡辺²¹⁾の方法に準じて間接免疫ペルオキシダーゼ法を行った。0.6% H₂O₂メタノールで内因性ペルオキシダーゼ活性を除去し、次に切片への二次抗体の非特異的吸着を阻止するため正常ウサギ血清を反応させ、その後一次抗体としてモノクローナル抗体を反応させついで二次抗体として、ペルオキシダーゼ標識ウサギ抗マウス・イムノグロブリン(DAKO, Denmark)を反応させた。発色は3-3'-diaminobenzidine(東京化成)を用いた。核染色は0.2%メチルグリーンにより行った。対照標本にはマウスIgM(COULTER CLONE, USA)を一次抗体の代りに用いた。

2.4.3 赤血球との反応性

ヒト赤血球A₁, A₂, B, O(Ortho Diagnostic, USA)の2%浮遊液を調整し、モノクローナル抗体YH206との反応性を、生食法、アルブミン法および間接クームス法を用いて凝集反応により検討した。陽性対照として、抗-H(type 2)モノクローナル抗体S1²²⁾を用いた。さらにニューラミニダーゼ処理血球との反応性もRahman and Longenecker²³⁾の方法により検討した。すなわち5%赤血球浮遊液に、0.5 U/mlの割でニューラミニダーゼ(Sigma No. N-2876, USA)を加え37°Cで1時間インキュベートし、PBSで洗浄後2%浮遊液として用いた。陽性対照として、抗Thomsen-Friedenreich抗原モノクローナル抗体49H.8²⁴⁾を用いた。抗体はいずれも精製されたものを5μg/mlの濃度に調整して用いた。

2.5 対応抗原の化学的性状の検討

2.5.1 組織切片に対する過ヨウ素酸化

組織切片を内因性ペルオキシダーゼ活性除去後, Kiernan²⁵⁾の方法に従って1%過ヨウ素酸溶液に室温で10分および20分間反応させ, その後2.4.2に従って染色を行った。

2.5.2 組織切片に対するニューラミニダーゼ消化および各種レクチンによる阻止試験

ニューラミニダーゼ消化は Atkinson *et al.*²⁶⁾の方法に従った。すなわち内因性ペルオキシダーゼ活性除去後, ニューラミニダーゼ(Sigma, No. N-3001, USA) 1U/ml (0.1 M 酢酸緩衝液 pH 5.1) にて切片を 37°C 12 時間反応させ, その後十分に PBS で洗浄後 2.4.2 に従って染色を行った。対照切片はニューラミニダーゼを含まない 0.1 M 酢酸緩衝液を用いた。レクチンによる阻止試験は, canavalia ensiformis(ConA), ricinus communis(RCA), triticum vulgare(WGA), dolichos biflorus(DBA), arachis hypogaea(PNA)の各種ビオチン化レクチン(Vector Lab., USA)を用い平野の方法²⁷⁾に従ってそれぞれ 50 μg/ml に濃度調整の上 30 分間反応させた後, モノクローナル抗体の反応性を 2.4.2 に従って検討した。

2.5.3 培養細胞に対する酵素処理

Zola *et al.*²⁸⁾に準じて行った。2×10⁶個の培養肺腺癌細胞 A549 を 1 ml の RPMI1640 培養液に浮遊させ, 以下の酵素溶液各 1 ml と 37°C 1 時間反応させてその後 8 ml の 10% FCS 加 RPMI1640 培養液を加え反応を停止させ, RPMI にて十分洗浄後 2.3.1 に従ってモノクローナル抗体との反応性を観察した。用いた酵素は, neuraminidase F (生化学工業) 0.1 U/ml, protease V8 (Miles, USA) 0.5 mg/ml, trypsin (Worthington, USA) 0.5 mg/ml, glycosidase mixed (生化学工業) 2 mg/ml, および endoglycosidase H (生化学工業) 0.1 U/ml である。

2.5.4 培養細胞に対する tunicamycin 処理

Zola *et al.*²⁸⁾に準じて行った。すなわち 2.6.1 に示す条件で培養された 1×10⁷個の A549 細胞に対して tunicamycin(Sigma, USA)が, それぞれ 1.0, 0.5 および 0 μg/ml になるように加え, 各培養液中で 48 時間培養しその上清を実験に供した。

2.6 抗原の免疫化学的検索

2.6.1 粗抗原の抽出

1×10⁷個の A549 を低濃度 (1%) FCS 加培養液 (組成: HAM 培養液 (Flow Laboratories, USA) 50%, RPMI1640 (GIBCO, USA) 50%, HEPES (Sigma, USA) 20mM, ペニシリン 100 mg/l, カナマイシン 50

mg/l, NaHCO₃ 1 g/l, インシュリン (Sigma, USA) 5 mg/l, トランスフェリン (Sigma, USA) 35mg/l, ホスファチジル・エタノールアミン (Sigma, USA) 0.5 mg/l, 亜セレン酸ナトリウム 4.3×10⁻³mg/l) 70ml にて 3 日間培養し, その培養上清を数回採取し粗抗原とした。さらに培養肺腺癌細胞 A549 および大腸癌細胞 BM314 について凍結融解法および 1% NP40 (半井化学) にて粗抗原を抽出した。また胎便については 1% NP40 によった。

2.6.2 酵素抗体法 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)

Magnani *et al.*²⁹⁾の方法に従った。2.6.1 により作製した培養上清を 2.5 倍, 5 倍, 10 倍, 20 倍, 40 倍に濃縮し, 平底マイクロプレート (Falcon, USA) に 50 μl/well ずつ入れ, 37°C 12 時間反応させ 3% 牛血清アルブミン (BSA) にてブロッキング後, モノクローナル抗体を反応させた。次にペルオキシダーゼ標識ウサギ抗マウス・イムノグロブリン (DAKO, Denmark) を反応させ, O-フェニレンジアミンにて発色させ, 492nm で吸光度を測定した。

2.6.3 Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel 電気泳動 (SDS-PAGE), 及び western blotting

Imai *et al.*³⁰⁾の報告に準じて実施した。ゲルは 5% または 10% ゲルを用いた。粗抗原および胎便の 1% NP40 抽出抗原 50 μl を SDS-PAGE にて展開後, 渡辺ら³¹⁾の方法に従って, ゲルよりニトロセルロース膜 (pore size 0.45 μm, Schleicher and Schull, Germany) へ転写し, 酵素抗体間接法を用いて抗原を検出した。

2.6.4 ゲル濾過

粗抗原および肺腺癌患者 (H. F.) 血清それぞれ 3 ml を 2.4 cm×80 cm の Sephacryl S-300 (Pharmacia, Sweden) ゲルカラムを用いてゲル濾過し, 得られた各画分についてモノクローナル抗体との反応性を, 2.6.2 に記載した ELISA 法にて測定した。

2.7 血清抗原の検出

2.7.1 対象

血清抗原の測定対象は, 正常対照群 30 例, 肺癌 87 例, 胃癌 20 例, 膵癌 15 例, 大腸癌 15 例, 良性疾患 31 例 (肺炎 5 例, 慢性肝炎 6 例, 肝硬変 7 例, 慢性関節リウマチ 2 例および消化性潰瘍 11 例), 計 198 例である。

2.7.2 逆受身赤血球凝集反応 (RPHA)

Iguro *et al.*¹⁷⁾に準じて行った。すなわち非働化血清を羊赤血球にて吸収 (室温, 1 時間) 後 PBS にて段階

希釈し、これを丸底マクロタイタープレート（三光純薬）に 30 μ l/well 毎加えた。次に塩化クロミウム法³²⁾にてモノクローナル抗体を結合させた2%羊赤血球浮遊液を等量加え、室温に4時間放置し凝集反応を観察した。また阻止試験として、血清あるいは2・6・1で作製した抗原溶液にあらかじめモノクローナル抗体を加え、抗体濃度依存性に羊赤血球の凝集が阻止されることを確認した。

3 研究成績

間接免疫蛍光抗体法を用いたスクリーニングにおいて免疫に用いた肺腺癌 A549 と結合する26種類のハイブリドーマのうち、組織切片上で肺腺癌と強く反応するハイブリドーマ YH206 を選び、これを2回クローニングした。このモノクローナル抗体 YH206 (IgM) について以下の検索を行った。

3・1 対応抗原の組織分布

3・1・1 癌組織

抗体 YH206 と癌組織との反応性を免疫ペルオキナーゼ法で検討した結果を Table 1 に示す。肺癌においては腺癌および肺胞上皮癌に比較的限局した反応性を示し、両者あわせて15例中11例に陽性であった。肺

腺癌の染色パターンは Fig. 1a に示すように細胞膜性に apical に陽性である。一方肺胞上皮癌では Fig. 1b に示すように、その染色パターンはむしろ細胞質性であった。大細胞癌では5例中1例に染色性を認めたが、その所見は一部の癌細胞に限局していた。小細胞癌で陽性例は認められなかった。

他臓器の癌では、膵癌は4例中3例、胃腺癌9例中6例、胆管癌は1例中1例がそれぞれ陽性であった。胃腺癌では Fig. 1c に示すごとく apical および腺腔内分泌物に陽性所見を呈することが多く、また mucin lake が強く染色される傾向が見られた。一方胃印環細胞癌(0/3)、原発性肝癌(0/2)、大腸癌(0/10)、腎癌(0/1)、乳癌(0/2)および胆嚢癌(0/1)とは反応性を認めなかった。

3・1・2 非癌組織および胎児組織

Table 1 に示すように成人の非癌組織について検索した限りでは、腎尿管(Fig. 2a) 膵外分泌腺組織と強く限局した反応を軽度に認めるのみであった。なお肺組織においては、肺胞上皮、気管支上皮、気管粘液腺のいずれとも反応は認めなかった。

一方胎児組織における対応抗原の分布は、肺を含めて広範囲にわたり、しかもその染色性は対応する成人

Table 1 Tissue distribution of the antigenic determinant recognized by the monoclonal antibody YH 206.

Cancer tissue			Normal tissue		
Organ	Type		Organ	Adult	Fetus
Lung	adenocarcinoma	++* (9/13)**	Lung	- (0/8)	++ (1/1)
	alveolar cell carcinoma	++ (2/ 2)	Colon	- (0/9)	+ (1/1)
	epidermoid carcinoma	F+ (1/ 6)	Kidney	F+ (3/4)	++ (1/1)
	large cell carcinoma	F+ (1/ 5)	Liver	- (0/4)	- (0/1)
	small cell carcinoma	- (0/ 6)	Pancreas	F+ (3/3)	+ (1/1)
Pancreas	adenocarcinoma	++ (3/ 4)	Small intestine	- (0/4)	F+ (1/1)
			Stomach	- (0/8)	+ (1/1)
Stomach	adenocarcinoma	+ (6/ 9)	Adrenal gland	- (0/1)	n. t.***
	signet-ring cell carcinoma	- (0/ 3)	Brain	- (0/1)	n. t.
Liver	cholangiocarcinoma	+ (1/ 1)	Esophagus	- (0/2)	n. t.
	hepatocellular carcinoma	- (0/ 2)	Heart	- (0/1)	n. t.
Breast	scirrhous carcinoma	- (0/ 2)	Lymphnode	- (0/2)	n. t.
			Skeltal muscle	- (0/1)	n. t.
Colon	adenocarcinoma	- (0/10)	Spinal cord	- (0/1)	n. t.
			Spleen	- (0/2)	n. t.
Kidney	Grawitz's tumor	- (0/ 1)	Thyroid gland	- (0/1)	n. t.
Gall bladder	adenocarcinoma	- (0/ 1)			

* staining intensity: ++; strongly positive, +; positive, F+; faintly positive, -: negative

** no. positive/no. tested

*** not tested

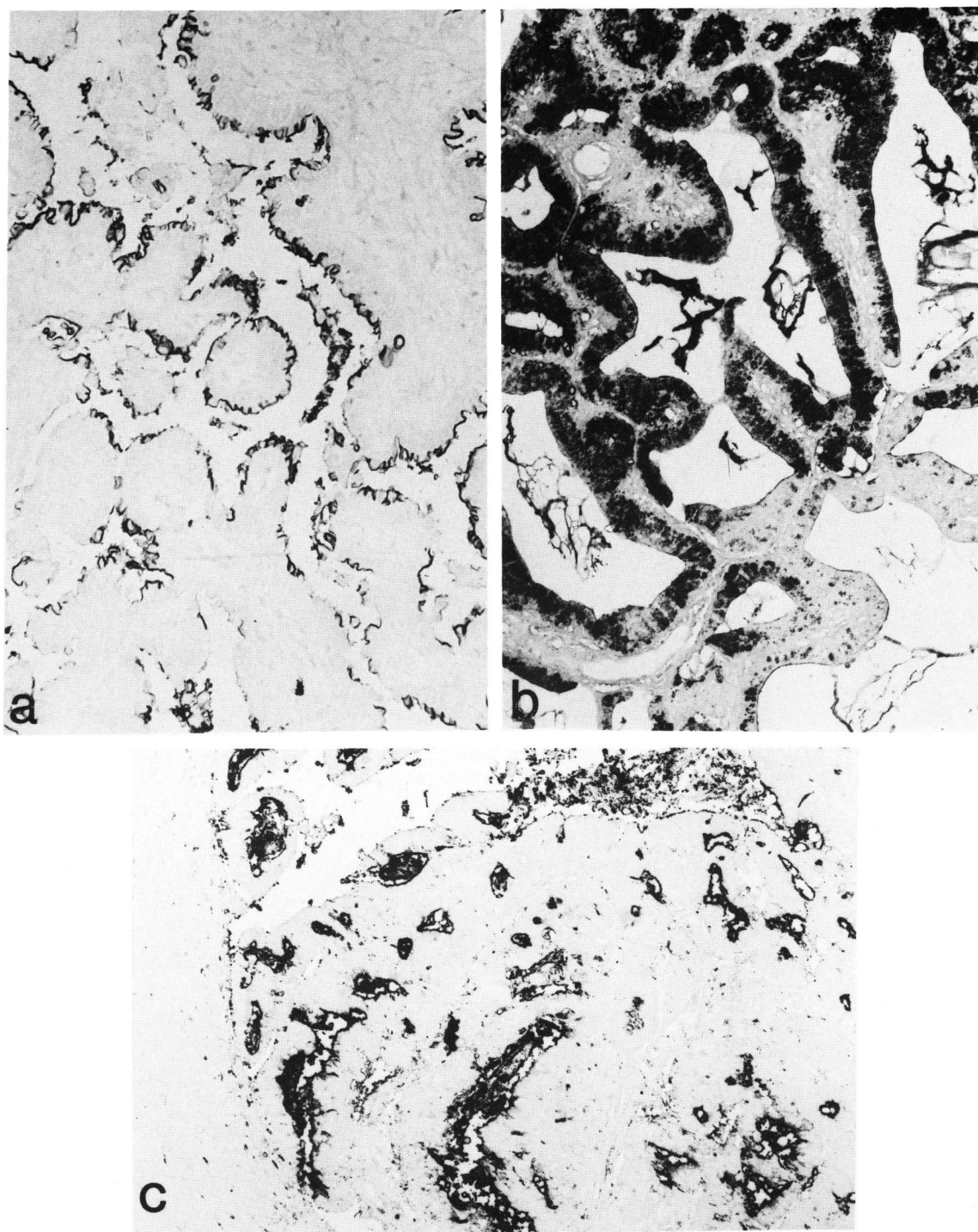


Fig. 1 Staining pattern of cancerous tissues by immunoperoxidase technique. Apical portion of lung adenocarcinoma (a) and cytoplasmic region of alveolar cell carcinoma (b) were stained with the monoclonal antibody YH 206. Apical portion and intra-luminal secretion of gastric adenocarcinoma (c) were also stained. (a, b: $\times 90$, c: $\times 40$)

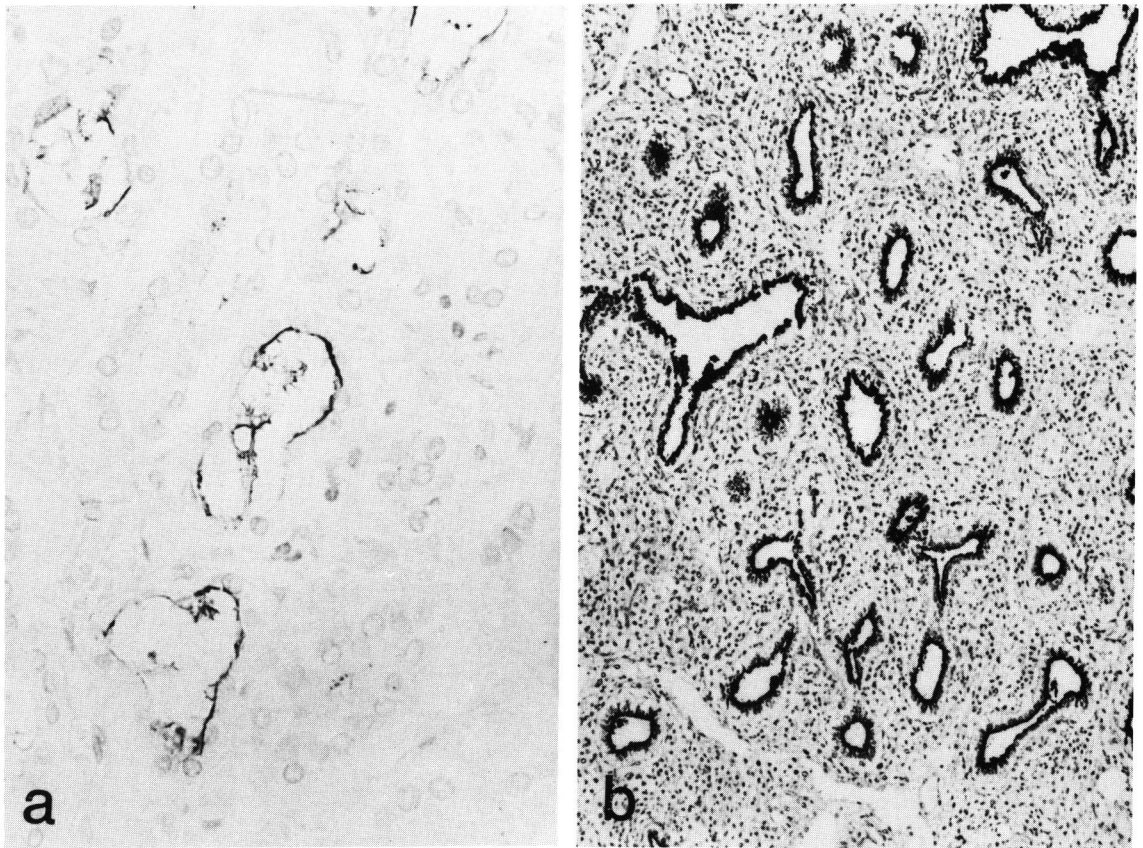


Fig. 2 Staining pattern of noncancerous tissues. Renal tubules (a) were weakly stained. Pseudoglandular period of 16 weeks-old fetal lung tissue (b) was strongly stained. (a: $\times 180$, b: $\times 90$)

臓器のそれに比較し強かった。Fig. 2bに16週齢のpseudoglandular periodに相当する胎児肺組織陽性所見を示す。細小気管支の立方上皮にとくにapicalに強い陽性像を認めた。

3.1.3 赤血球との反応性

Table 2に示すように本抗体はいずれの赤血球とも凝集反応を示さず、A、B、あるいはH型抗原との関連性は認められなかった。またニューラミニダーゼ処理赤血球とも凝集反応を認めなかった。

3.2 対応抗原の化学的性状

3.2.1 組織切片における過ヨウ素酸酸化

抗体 YH206 は Fig. 3 に示すように組織(この場合は肺腺癌)を過ヨウ素酸で酸化すると、抗原との反応性は完全に失われ(Fig. 3b)、対応抗原決定基は糖鎖である可能性が示唆された。

3.2.2 組織切片におけるニューラミニダーゼ消化試験

そこでその抗原決定基にシアル酸が関与しているか

否かを検討するため、免疫ヘルオキシダーゼ法で陽性あるいは陰性を示した癌組織13例および非癌組織8例、計21例についてニューラミニダーゼ消化後に本抗体の反応性を観察したが、染色陽性強度の減弱あるいは染色陽性頻度の低下は全く認められなかった。興味ある

Table 2 Reactivity of red blood cells with monoclonal antibodies assessed by hemagglutination test.

Red blood cells	Monoclonal antibody		
	YH206	SI*	49H.8**
A1	—	+	n. t.***
A2	—	+	n. t.
B	—	+	n. t.
O	—	+	—
NE-O****	—	n. t.	+

* anti-H(type 2) monoclonal antibody

** anti-Thomsen-Friedenreich monoclonal antibody

*** not tested

**** neuraminidase treated RBC (type O)

ことにニューラミナーゼ処理によりむしろ染色性が増強される場合が経験された (Table 3). すなわち 12 例の肺, 胃および大腸癌において未処理の場合検出さ

れない本抗原がニューラミナーゼ消化後には検出される場合が経験された. Fig. 4a および b には肺癌における実例 (黒矢印部分) を示した. また非癌部の肺胞

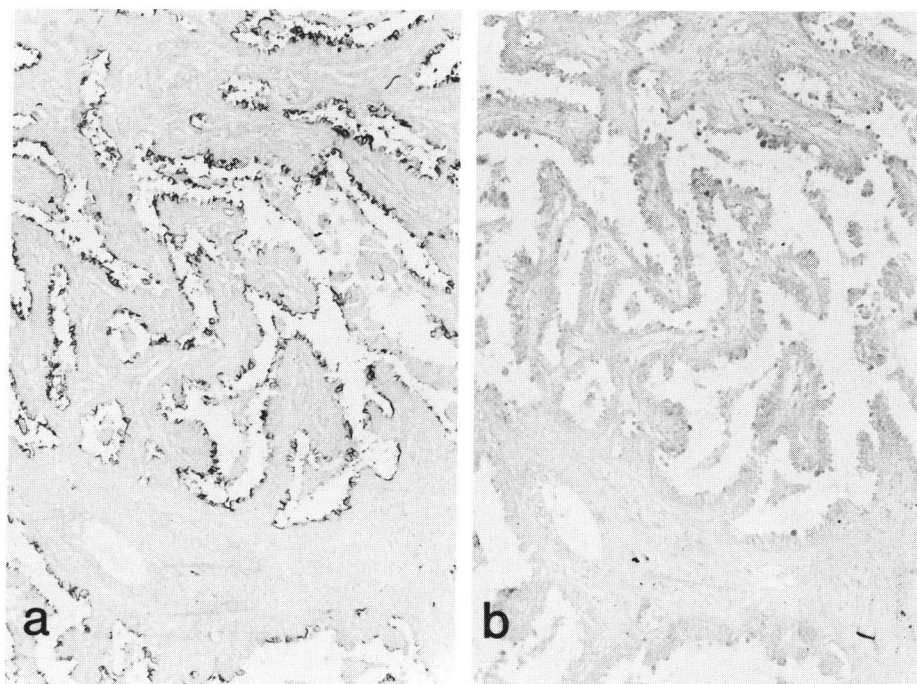


Fig. 3 The effect of periodic acid treatment on the staining intensity of lung adenocarcinoma tissues. The antibody YH 206 failed to stain the tissues after they had been treated with 1% periodic acid for 10 min. at room temperature (a: before treatment, b: after treatment). ($\times 40$)

Table 3 Comparison of the staining pattern detected by the monoclonal antibody YH206 before and after neuraminidase digestion in malignant and non-malignant tissues.

Tissue	Neuraminidase digestion		
	Before	After	
Malignant tissue			(12/13)*
Lung adenocarcinoma	+++**	+++	(2/2)
alveolar cell carcinoma	++	+++	(1/1)
epidermoid carcinoma	-	+	(1/1)
large cell carcinoma	F+	++	(1/1)
small cell carcinoma	-	F+	(1/1)
Stomach adenocarcinoma	+	++	(1/1)
signet-ring cell carcinoma	-	+	(2/2)
Colon adenocarcinoma	-	++	(3/3)
Hepatocellular carcinoma	-	-	(0/1)
Non-malignant tissue			(3/8)
Lung	-	+	(1/2)
Stomach	-	+	(2/2)
Colon	-	-	(0/3)
Liver	-	-	(0/1)

* No. cases that increased the staining intensity/no. cases tested

** staining intensity: +++; very strongly positive, ++; strongly positive, +; positive, F+; faintly positive, -; negative

上皮は、同消化前は陰性であるが (Fig. 4a 白矢印部分), 消化後, 陽性となっている (Fig. 4b 白矢印部分). さらに免疫ペルオキシダーゼ法で対応抗原がほとんど検出されない肺大細胞癌 (Fig. 5a) についても同様の消化を行ったところ, Fig. 5b に示すように抗原陽性細胞の著増を示した. この現象は肺扁平上皮癌においても確認された. また非癌組織においても検索し得た 8 例中 3 例について同様の傾向がうかがわれた. その 1 例を Fig. 6a および Fig. 6b に示したが, この胃粘膜組織においてはニューラミダーゼ処理をしない場合, 抗体 YH206 の反応性は認められないが, 処理後には, 本抗体は胃固有腺および胃腺窩上皮に反応を示した.

以上より少なくとも一部の癌組織および非癌組織においては, 本抗原がシアル酸により mask されており, ニューラミダーゼ処理により, これが露出される可能性が考えられた.

3・2・3 組織切片における各種レクチンによる阻止試験

用いた 5 種類のレクチンのうち抗体 YH206 の反応を完全に阻止するものは認められなかったが, wheat germ agglutinin (WGA) により, YH206 の反応性は軽度減弱を示した (Fig. 7).

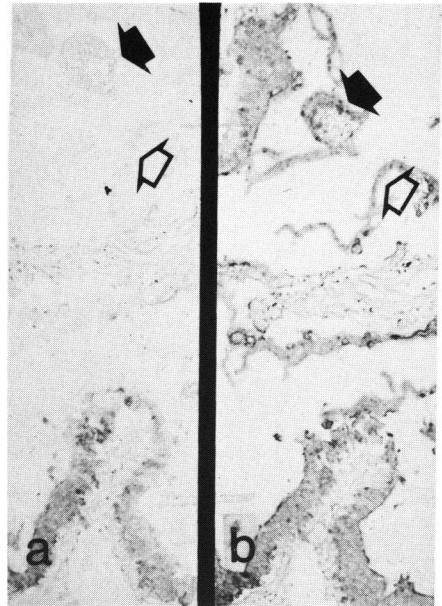


Fig. 4 The effect of neuraminidase treatment on the staining intensity of lung alveolar cell carcinoma. The antigenic determinant on the carcinoma portion (black arrows) as well as the determinant on the normal alveolar epithelial cells (white arrows) were disclosed after the treatment of neuraminidase (a: before treatment, b: after treatment). ($\times 90$)

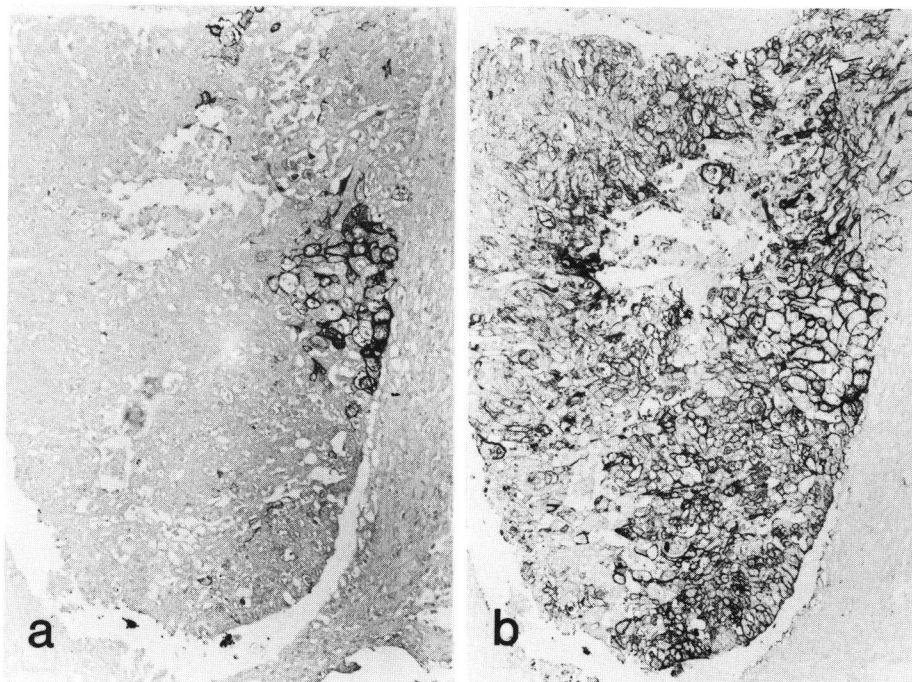


Fig. 5 The effect of neuraminidase treatment on the staining intensity of large cell carcinoma of the lung (a: before treatment, b: after treatment). ($\times 76$)

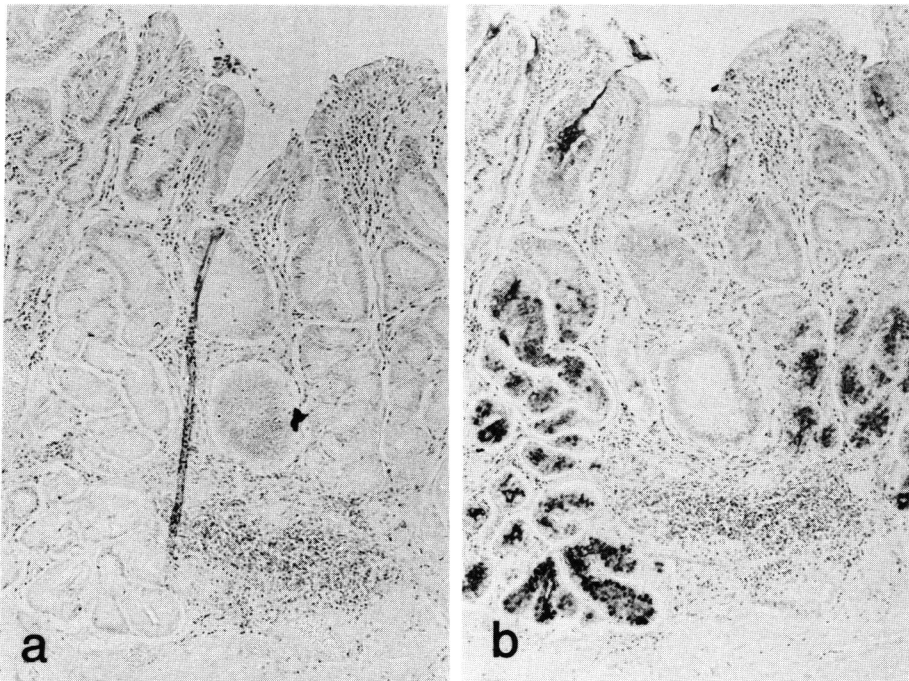


Fig. 6 The effect of neuraminidase treatment on the staining intensity of noncancerous gastric mucosa (a : before treatment, b : after treatment). ($\times 76$)

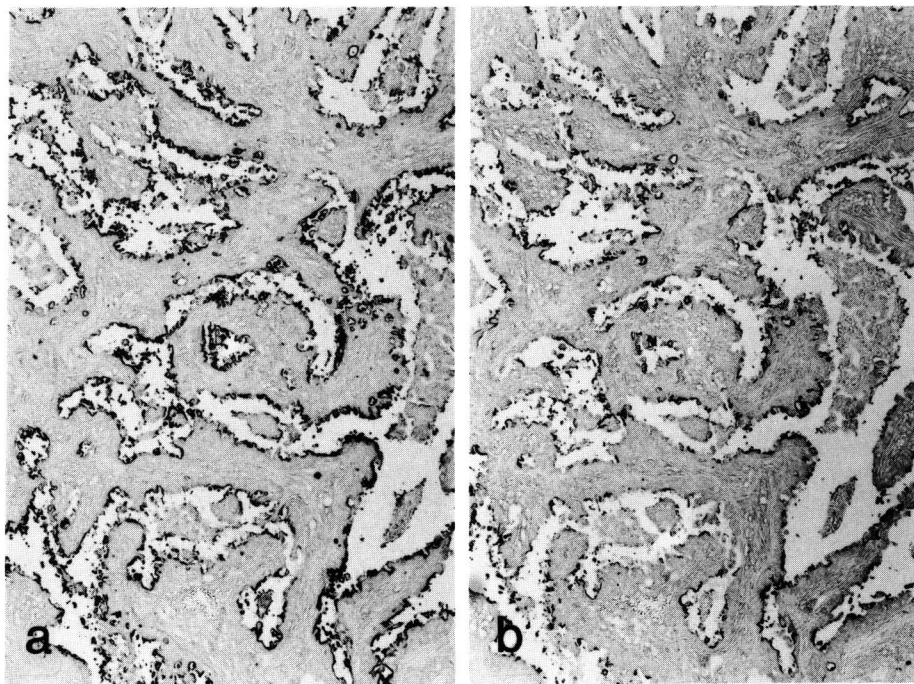


Fig. 7 The effect of the preincubation of lung adenocarcinoma tissues with wheat germ agglutinin upon staining intensity. A slight decrease of intensity was observed after blocking with wheat germ agglutinin (a : without blocking, b : with blocking). ($\times 90$)

3.2.4 培養肺腺癌細胞に対する酵素処理

A549 未固定細胞を protease V8, trypsin, glycosidase mixed および endoglycosidase H による酵素消化後 YH206 の反応性を観察したが、反応性の減弱あるいは増強は観察されなかった。これに対してニューラミンダーゼ消化後には、蛍光陽性細胞の増加と蛍光強度の増加が認められ、組織切片上のニューラミンダーゼ消化試験の結果と一致した。

3.3 培養上清中の抗原の検出

3.3.1 ELISA 法

A549 細胞培養上清中の抗原を検出するため、抗体 YH206 を用いて ELISA 法を施行した。その結果 Fig.

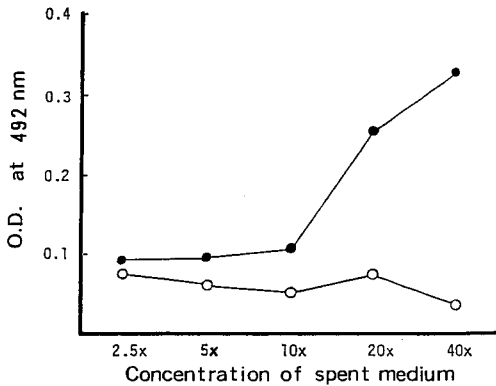


Fig. 8 Dection of the antigen in the spent medium (●) of lung adenocarcinoma A 549 cells by enzyme-linked immunosorbent assay in conjunction with the monoclonal antibody YH 206. (○) represented the medium alone supplemented with 1%FCS (See Materials and Methods 2.6.1).

8 に示すように、A549 細胞培養上清中には YH206 と反応する抗原分子が存在していることが判明した。次にこの培養上清を Sephacryl S-300 によりゲル濾過後、各画分における抗原活性を ELISA 法により測定した。その結果 Fig. 9 に示すように void volume 附近の画分に一致して抗原活性を検出した。さらに癌患者血清についても同様の成績が得られた。

3.3.2 SDS-PAGE および western blotting

次に対応抗原の分子量を検索したが、この場合、粗抗原として A549 細胞、CEA 産生性大腸癌細胞 BM314、および胎便を用いた。抗体のコントロールとして抗 CEA モノクローナル抗体 AS802 を用いた。Fig. 10a に示すように、AS802 は胎便および CEA 産生性大腸癌細胞 BM314 と約 200 K ダルトンの位置で反応を示した。一方 YH206 は CEA より明らかな高分子の位置で胎便と 3 本のバンドで反応を示しているが、免疫原 A549 の NP40 抽出抗原とは有意の反応を認めなかった。そこで次に A549 細胞より凍結融解法により抽出した抗原と A549 の培養上清を粗抗原として同様の手法により解析した。Fig. 10b に示すように凍結融解法により抽出した場合、ならびに A549 培養上清を粗抗原とした場合には、共に 330K ダルトン以上の高分子の位置に明らかな 1 本のバンドを認めた。

3.3.3 培養上清中の抗原に対する tunicamycin の影響

対応抗原の性状をさらに明らかにするべく、N-グリコシド結合型糖鎖の合成阻害剤である tunicamycin 存在下で A549 細胞を培養し、その上清中に存在する抗原

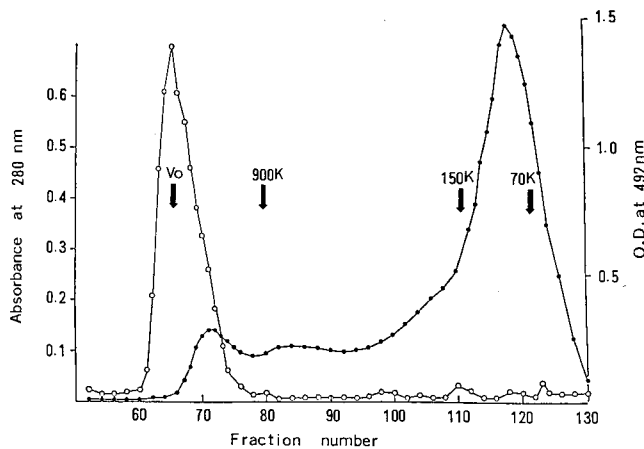


Fig. 9 Gel chromatographic pattern of the spent medium of lung adenocarcinoma A 549 cells using SephacrylS-300. Fractions were monitored for protein (●) by absorbance of light at 280 nm, and for the corresponding antigen (○) by enzyme-linked immunosorbent assay using the antibody YH 206.

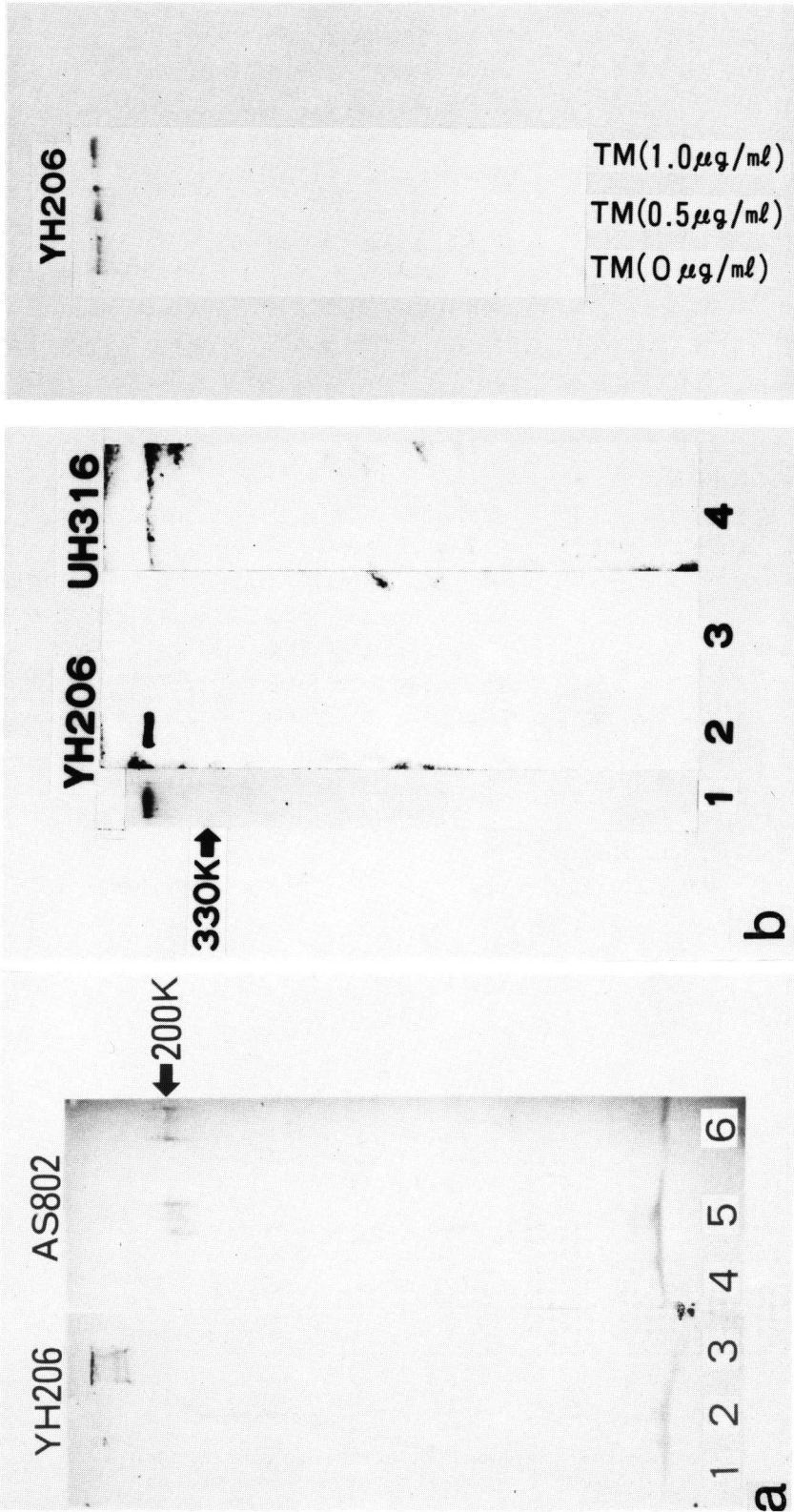


Fig. 10 SDS-PAGE(10% gel) and western blot analysis of the corresponding antigen recognized by the antibody YH206 (lanes 1 and 4, NP-40 extract of A549 cells; lanes 2 and 5, NP-40 extract of BM314 cells; lanes 3 and 6, NP-40 extract of the meconium). The monoclonal antibody YH206 was used for lanes 1-3, and the monoclonal antibody AS802 to carcinoembryonic antigen for lanes 4-6, respectively (a). CEA (Morinaga Biomedical Institute, Japan) was used for a marker protein of 200K daltons. The same type of experiment was performed in (b) where 5% gel was used in SDS-PAGE (lane 1, freezing and thawing extract of A549 cells; lanes 2 and 4, the spent medium of A549 cells; lane 3, FCS-RPMI 1640 medium). The monoclonal antibody YH206 was used for lanes 1-3, and the monoclonal antibody UH316 to monocytes for lane 4, respectively. Thyroglobulin (Pharmacia, Sweden) was used for a marker protein of 330K daltons.

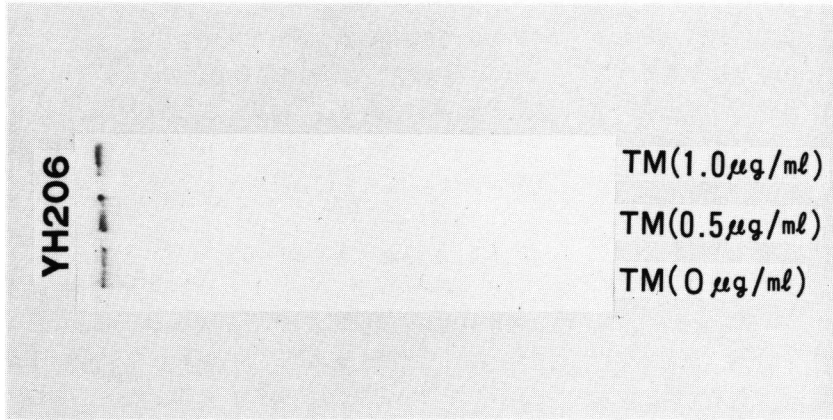


Fig. 11 The effect of the tunicamycin (TM) treatment on the structural profile of the YH206 antigen detected by SDS-PAGE and western blot analysis. The spent medium of A549 cells preincubated with TM 0, 0.5, or 1.0 μg/ml was used as the crude antigen.

を western blotting により解析した。Fig. 11 に示すように、tunicamycin 処理前後でその反応強度ならびにバンドの位置に変化は認められず、本抗原決定基には N-グリコシド結合型糖鎖は関与していないものと推定された。

3・4 血清中抗原の検出

3・4・1 基礎的検討

次に癌患者血清中の YH206 抗原を検出すべく RPHA を施行した。まず A549 の培養上清濃縮液を抗原とした場合、4096倍希釈においても凝集を観察した。次にこの抗原を段階希釈して抗体 YH206 と反応させたのちに凝集反応を行ったところ、その凝集価は、加えた抗体の量に依存して抑制されることを確認した。患者血清を抗原とした場合にも同様の成績が観察された。

3・4・2 健常者ならびに癌患者の血中抗原

以上の基礎的検討の上、各種癌患者血中抗原を RPHA 法で測定した。その結果、32 倍までを陰性と判定すると、Fig. 12 に示すように健常者 30 例中 3 例 (10.0%) に 64 倍の活性が認められた。肺癌では、87 例中 42 例中 (48.3%)、胃癌では 20 例中 9 例 (45.0%)、膵癌では 15 例中 11 例 (73.3%)、結腸癌では 15 例中 9 例 (60.0%) に陽性が認められた。また非癌患者血清を用いた場合 31 例中 4 例 (12.9%) に陽性が認められた。この場合肝硬変で 7 例中 2 例、急性肺炎 (CRP5+以上) で 5 例中 2 例、に陽性が認められたが、慢性肝炎 6 例、慢性関節リウマチ 2 例および消化性潰瘍 11 例ではすべて陰性を示し、陽性例ではその凝集価は 64 倍と

低値であった。

3・4・3 肺癌組織別にみた患者血中抗原

組織型の判明している肺癌患者血清について検討した。Fig. 13a に示すように腺癌では 21 例中 13 例 (61.9%)、類上皮癌 15 例中 6 例 (40.0%)、小細胞癌 16 例中 8 例 (50.0%)、大細胞癌 4 例中 3 例 (75.0%) に陽性を示した。

3・4・4 肺癌臨床病期との関連

臨床病期の明らかな肺癌について、その血中抗原価について検討した。Fig. 13b に示すように Stage I の陽性率 (22.2%) に比較して、進行癌である Stage III および IV では陽性率 (73.3% および 62.5%) が高い傾向を示した。

4 考 察

肺腺癌細胞 A549 を免疫原として細胞融合法により、モノクローナル抗体 YH206 を産生するハイブリドーマを樹立した。抗体のクラスは IgM であった。対応抗原の組織分布は、肺組織では腺癌、肺胞上皮癌に限局し、他組織では胃および膵腺癌にも高頻度に検出された。非癌部成人組織では検索の限りでは腎尿管上皮、膵外分泌腺細胞のごく一部と弱く反応したにすぎず、また正常肺組織には検出されない点が注目された。一方胎児組織における対応抗原の分布は比較的広範囲で、成人組織では検出されない胃、大腸、肺にも反応性を認めた。

このように主として腺癌および胎児組織に検出され、

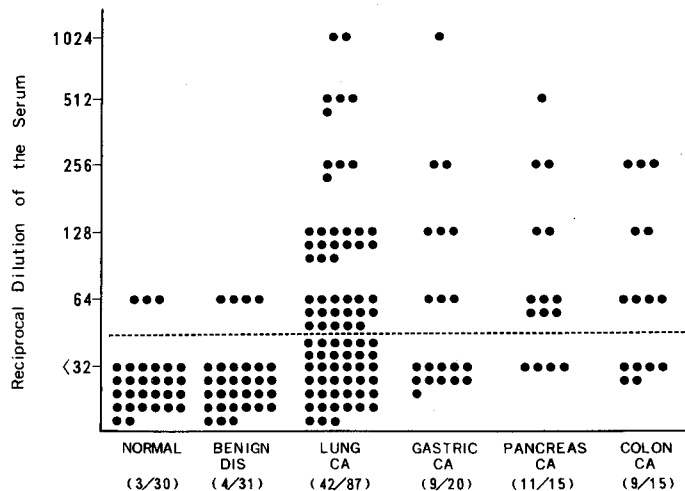


Fig. 12 Serum YH206 antigen levels in normal controls, benign diseases and patients with cancer detected by reversed passive hemagglutination assay.

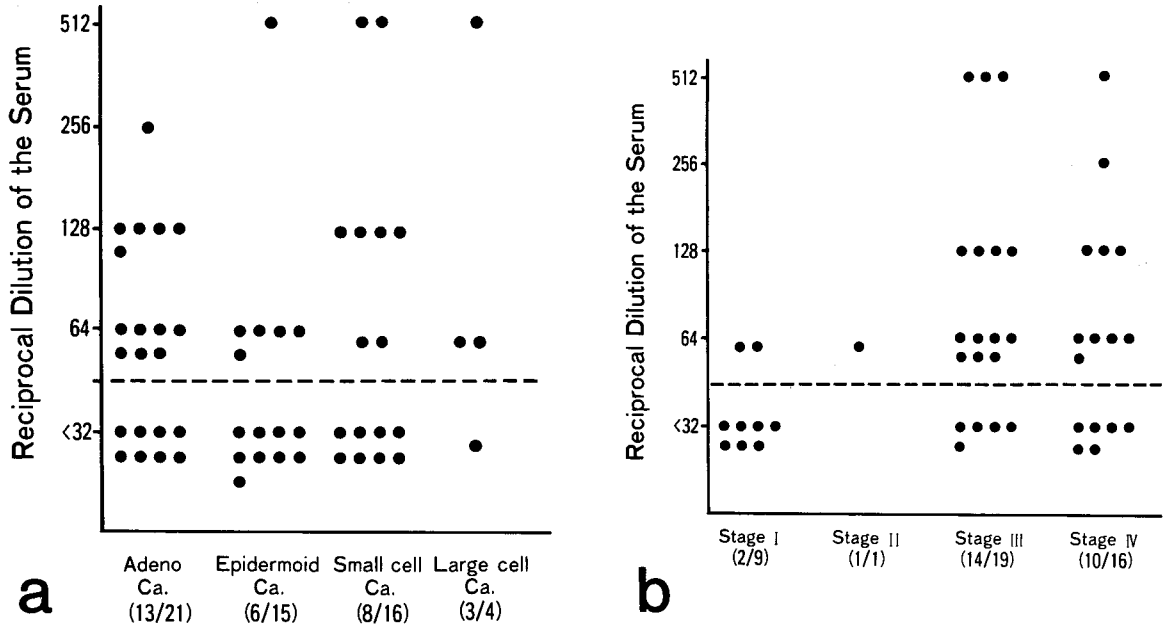


Fig. 13 Serum YH206 antigen levels among lung cancer patients with different histological types(a), and comparison between serum YH206 antigen levels and the clinical stages in patients with lung cancer (b) detected by reversed passive hemagglutination assay.

成人正常組織には微量にしか検出されない抗原としては carcinoembryonic antigen(CEA)^{33,34}や、近年癌化との関係で注目されている血液型物質 H 抗原²²⁾が知られている。後者は胎児期にはひろく全大腸に存在するが、成人になると遠位大腸の H 抗原は消失し³⁵⁾、前癌病変である大腸 polyposis や adenoma に³⁶⁾、さらには癌化により³⁷⁾再び出現するとされる。われわれの YH206 抗原は分子量あるいは赤血球と反応しないことなどより CEA あるいは H 抗原とは異なるが、その組織分布から広い意味での癌胎児性抗原の性質を有していると思われる。

次に YH206 の抗原決定基の化学的性状について検討を進めた。免疫ペルオキシダーゼ法による検索で決定基は、ホルマリン固定組織切片において反応性が保持されており、また過ヨウ素酸により容易に酸化されたため糖鎖の可能性が考えられた。さらにその抗原決定基にシアル酸が関与するか否かを検討するため、糖鎖非還元末端にあるシアル酸を水解するニューラミナーゼを作用させたが抗原決定基は消失ないし減弱を示さなかった。むしろニューラミナーゼ消化後には、陰性である大腸癌や、限局性にしか反応を示さなかった肺大細胞癌等が陽性反応を示すようになり、また一部の非癌部分においても同様な現象が認められた。この

事実は、組織切片のみならず未固定培養癌細胞を用いた実験でも確認された。従って本抗原決定基は、多くの非癌部においては、いわゆる“cryptic”な形で存在しており、その決定基はシアル酸でマスクされている可能性が示唆される。癌部においては、本抗原決定基がそのまま出現しているために、本モノクローナル抗体で高頻度に検出されるのであろう。さらにレクチンによる阻止試験において wheat germ agglutinin (WGA) により軽度の減弱が観察された事は、抗原決定基内に WGA と反応する糖部分(N-acetyl glucosamine)が存在する可能性を示唆するものと考えられる。一方 trypsin, protease V8 等の蛋白水解酵素処理により抗原決定基の減弱ないし消失が認められなかった点も本抗原決定基が糖鎖である可能性を支持する。

A549 細胞培養上清中に抗原が存在することが ELISA 法により示されたため、これを抗原として SDS-PAGE および western blotting 法を行い、その分子量は 330K ダルトン以上の高分子であることを明らかにした。さらに Sephacryl S-300 によりゲル濾過を行い、粗抗原および血清中の抗原は void volume 附近に一致して検出された。また、胎便についても、SDS-PAGE western blotting 法により解析したが、CEA より高分子の位置に 3 本のバンドが観察され、培養上清中の抗

原とは分子量の上で異なる事が判明した。

次に培養上清中に抗原が存在するため流血中にも抗原が検出される可能性を考え、RPHA法により患者血清を測定した。指示細胞として羊赤血球を用いたため、血中のForssman抗体を検出する可能性があるため、あらかじめ羊赤血球にて吸収操作を行い、さらに凝集能の高い血清については、YH206非結合の羊赤血球にて凝集が起こらない事を確認した。健常者では30例中3例に弱い陽性反応をみるのみであったが、各種癌患者ではその陽性率は45.0%から73.3%と高頻度で、そのtiterも高値を示すものが多く注目された。肺癌における検索では臨床病期が進むにつれて、YH206抗原の増量が示唆されたが、血清抗原の場合には、その陽性率、値と、癌の種類、組織型との間には一定の関連性は見出せなかった。この場合、血清抗原を検索した症例と抗原の組織分布を検索し得た症例とは大部分異なっており正確な比較は困難と考えられ、今後同一症例で詳細な検討を行う必要があろう。

次に現在までに報告されている抗肺癌モノクローナル抗体中肺腺癌と反応する抗体について文献の考察を加え、本モノクローナル抗体YH206との異同につき検討する(Table 4)。Mazauric *et al.*¹⁰⁾は、肺腺癌細胞株と反応する5つのモノクローナル抗体を作製した。そのうちA549と反応する抗体は、9812-16b-13, 427-2-f, および480-1-4aであるが、それらはいずれもヒト赤血球およびリンパ球と反応し、しかも対応抗原分子量は、Table 4に示す如くYH206の認識する分子よりいずれも小さい。Mulshine *et al.*⁷⁾の抗体、703D4, 704A1は、小細胞癌と反応せず、非小細胞癌と反応する点でYH206と類似するが、この2つの抗体の認識する抗原は分子量31Kダルトンである。Varki *et al.*¹⁵⁾の抗体でKS 1/4, KS 1/17は腎尿細管上皮、

膵外分泌腺細胞と弱く反応し、胎児肺、胎児腎尿細管、胎児大腸と反応し、肺腺癌の他胃癌、膵癌とも反応するなど抗体YH206の組織分布と類似しているが、これらの抗体は肺扁平上皮癌、肺小細胞癌さらには大腸癌とも反応を示し、対応抗原分子は40Kダルトンの糖蛋白という点で抗体YH206とは異なっている。一方KS 1/9は免疫グロブリンクラスがIgMで、肺腺癌以外の肺癌とは反応しない点でYH206と類似するが、対応抗原が糖脂質ないし脂質であり、培養上清中に抗原が検出されず、また胎児肺との反応性を認めないなどの点で抗体YH206とは異なっている。以上よりモノクローナル抗体YH206によって検出されたYH206抗原は、これまでにいくつかのモノクローナル抗体により報告された肺腺癌関連抗原とは異なっていることがわかった。

次に本抗原がシアル酸によりマスクされているいわゆる“cryptic antigen”の性格を有する点、および培養上清中にも抗原が存在する点で、MN式血型物質の前駆物質であるThomsen-Friedenreich抗原((T-抗原, β Gal (1 \rightarrow 3) α GalNAc))との異同が問題となるが、Rahman *et al.*²³⁾によればT-抗原に対するモノクローナル抗体は大腸癌と反応し、またCooper²⁸⁾はPNAレクチン染色を用いT-抗原が大腸癌細胞のみならず正常大腸細胞の核上部に存在しニューラミニダーゼ消化後には、goblet cellのmucin全体が陽性となると報告している。

これに対してYH206は、1)大腸癌および正常大腸粘膜と反応しない、2)ニューラミニダーゼ消化後にも正常大腸粘膜と反応を認めない、3)PNAレクチンによってもYH206の反応性は阻止されない、さらに4)3 \cdot 1 \cdot 3に示したようにT-抗原に対するモノクローナル抗体49H.8がニューラミニダーゼ処理血球を凝集する

Table 4 Anti-lung adenocarcinoma monoclonal antibodies in the literature.

Authors	Monoclonal antibodies	Antigenic determinant or Molecular weight	Tissue distribution except lung adenocarcinoma
Mazauric <i>et al.</i> ¹⁰⁾	9812-16b-13	37K and 19K	reactive with RBC and lymphocyte
	472-2f	145K, 127K and 113K	
	480-1-4a	unknown	
Mulshine <i>et al.</i> ⁷⁾	703D4	31K	non reactive with small cell carcinoma
	704A1	31K	
Varki <i>et al.</i> ¹⁵⁾	KS1/4	40K glycoprotein	reactive with small cell carcinoma and colon carcinoma
	KS1/17	40K glycoprotein	
	KS1/9	glycolipid	nonreactive with fetal lung

のに対して、本モノクローナル抗体 YH206 は凝集を認めない、などの成績から抗体 YH206 は T-抗原とは異なる糖鎖構造を認識しているものと考察される。

最近血液型類似糖鎖を認識するモノクローナル抗体が作製され、新しい腫瘍マーカーの検出に臨床的に応用されつつある。Koprowski *et al.*³⁹⁾ のグループにより確立されたモノクローナル抗体 19-9 は、この面での貴重な収穫であろう。この対応抗原 CA 19-9 の決定基はシアル化 Lewis^a ((NeuNAc α 2 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 3 (Fuc α 1 \rightarrow 4)GlcNAc β 1 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow))であるとされ⁴⁰⁾、免疫原に用いた結腸癌細胞 SW1116 には糖脂質として検出されるが⁴¹⁾、癌患者血中では巨大な糖蛋白(分子量 \geq 5 \times 10⁶)として検出されている²⁹⁾。そこで本抗原との異同を検討したが、YH206 抗原は CA 19-9 と以下の点で異なっている。すなわち第一に CA19-9 はニューラミニダーゼ感受性である点²⁶⁾、第二に組織分布で CA19-9 は膵癌、胃癌の他に結腸癌にも陽性(59%)であり、肺癌では肺腺癌の他扁平上皮癌(4例中3例)、小細胞癌(9例中4例)とも反応を示し、非癌部では膵管上皮、気管支腺と反応し²⁶⁾、また胎児肺とは反応しない点⁴²⁾などから明らかである。次に Lewis^x 抗原((Gal β 1 \rightarrow 4(Fuc α 1 \rightarrow 3)GlcNAc β 1 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow))に対するモノクローナル抗体 (WGHS29-1, ZWG13, ZWG14, ZWG111⁴³⁾, D₁56-22⁴⁴⁾, anti-SSEA-1⁴⁵⁾)との異同については、ニューラミニダーゼ消化により免疫原細胞との反応性が増大する点⁴⁴⁾では類似しているが、その組織分布ではこれらの抗体が多核白血球、脾、大腸粘膜、脳、脊髄、大腸癌、腎癌、乳癌に陽性で、肺腺癌とは反応していない点^{46,47)}から、YH206 とは異なると思われる。さらに最近この抗原のシアル化物質、すなわち sialylated Lewis^x((NeuNAc α 2 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 4 (Fuc α 1 \rightarrow 3)GlcNAc β 1 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow))が新しい腫瘍マーカーとして報告⁴⁸⁾されている。すなわち血中抗原がモノクローナル抗体 CSLEX-1 による逆受身赤血球凝集反応を用いて測定され、肺腺癌の 48%、肺扁平上皮癌の 31%、その他の肺癌の 12%、胃癌の 20%、結腸癌の 37%、膵癌の 33%、に検出された¹⁷⁾。抗原の組織分布において YH206 抗原と類似している点は、腎尿管、膵外分泌腺、胃腺癌、肺腺癌、膵癌に陽性で、かつ胎児消化管にも存在する点であり、しかも、胃腺癌における染色パターンでも apical および腺腔内分泌物、特に mucin lake に陽性であるなどの点⁴⁸⁾で、YH206 の反応と酷似する。しかしながら CSLEX-1 が多核白血球、大腸粘膜陰窩細胞、肝細胞、Kupffer 細胞あるいは大腸癌と反応している点で異なっており、さらに

決定的な相違として CSLEX-1 対応抗原はニューラミニダーゼ処理によりその抗原性が消失する点、および CSLEX-1 は A549 細胞と反応しない点があげられる。

以上よりモノクローナル抗体 YH206 により認識される抗原決定基は、最近報告されたいくつかの新しい抗原決定基とは異なっていることが示唆された。正確な比較のためには、この YH206 抗原決定基の化学構造を知る必要があり、現在この点についてもシアトルの箱守教授らとの共同研究を開始してその化学構造を決定しつつある。

いずれにしても本モノクローナル抗体 YH206 は、1) 対応抗原は腺癌に比較的限局した抗原であること、2) 血清中抗原の検出される点が興味深く血清診断へ応用し得る可能性があり、今後胸腹水を利用した免疫組織学的診断、あるいは免疫画像診断なども含めて検討の価値があるものと考えられた。

5 結 論

1) ヒト肺腺癌細胞株 A549 を用いてモノクローナル抗体 YH206 を確立した。対応抗原の組織分布は肺腺癌、胃腺癌、膵腺癌に比較的限局し、非癌組織では腎尿管、膵外分泌腺と軽微な反応性を認めたが、正常肺組織は陰性であった。胎児では肺の他、消化管にも抗原の存在が示された。

2) 抗体 YH206 により認識される抗原決定基は糖鎖と考えられ、ニューラミニダーゼ処理により抗原決定基が露出される場合もあり、いわゆる“cryptic antigen”の性格を示した。

3) 抗原は A549 細胞およびその培養上清中に存在し、分子量は 330K ダルトン以上の高分子糖蛋白と推定された。

4) RPHA 法により癌患者血中に本抗原を検出した。癌患者における陽性頻度は正常および良性疾患群に比較して高い傾向を示し、臨床血清診断への可能性が示唆された。

5) 本抗原は現在までにモノクローナル抗体により検出されたいずれの抗原とも性格を異にすると考えられ、その点について文献的考察を加えた。

謝 辞

御指導、御校閲いただいた谷内 昭教授、御指導、御協力くださった日野田 裕治博士、川原田 信博士ならびに貴重な血清を提供くださった本間 威博士(埼玉県立がんセンター)に深謝いたします。本研究は高松宮妃がん研究助成金(谷内)、文部省がん特別研究 I

およびII(谷内, 今井), 厚生省がん研究助成金(谷内, 今井)の補助によった。

文 献

1. 谷内 昭, 遠藤高夫, 今井浩三: モノクローナル抗体による腫瘍抗原の検索と治療への応用. 臨床泌尿器科学 **37**, 49-58(1983).
2. Del Villano, B. C., Brennen, S., Brock, P., Bucher, C., Liu, V., McClure, M., Rake, B., Space, S., Westrick, B., Schoemaker, H., and Zurawski, V. R. Jr.: Radio immunometric assay for a monoclonal antibody-defined tumor marker, CA19-9. *Clin. Chem.* **29**, 549-552 (1983).
3. 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).
4. Metzgar, R. S., Rodriguez, N., Finn, O. J., Lan, M. S., Daasch, W. F., Sandler, R. S. and Seigler, H. F.: Detection of a pancreatic cancer-associated antigen (DU-PAN-2 antigen) in serum and ascites of patients with adenocarcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 5242-5246 (1984).
5. Buchegger, F., Haskell, C. M., Schreyer, M., Scazziga, B. R., Randin, S., Carrel, S. and Mach, J.-P.: Radiolabelled fragments of monoclonal antibodies against carcinoembryonic antigen for localization of human colon carcinoma grafted into nude mice. *J. Exp. Med.* **158**, 413-427 (1983).
6. Sikora, K. and Wright, R.: Human monoclonal antibodies to lung-cancer antigens. *Br. J. Cancer* **43**, 696-700 (1981).
7. Mulshine, J. L., Cuttita, F., Bibro, M., Fedorko, J., Fargion, S., Little, C., Carney, D. N., Gazdar, A. F. and Minna, J. D.: Monoclonal antibodies that distinguish non-small cell from small cell lung cancer. *J. Immunol.* **131**, 497-507 (1983).
8. Brenner, B. G., Jothy, S., Shuster, J. and Fuks, A.: Monoclonal antibodies to human lung tumor antigens demonstrated by immunofluorescence and immunoprecipitation. *Cancer Res.* **42**, 3187-3192 (1982).
9. Brown, D. T. and Moore, M.: Monoclonal antibodies against two human lung carcinoma cell lines. *Br. J. Cancer.* **46**, 794-801 (1982).
10. Mazauric, T., Mitchell, K. F., Letchworth, G. J., Koprowski, H. and Steplewski, Z.: Monoclonal antibody-defined human lung cell surface protein antigens. *Cancer Res.* **42**, 150-154 (1982).
11. Boosslet, K., Kurrle, R., Ax, W. and Sedlacek, H. H.: Monoclonal murine antibodies with specificity for tissue culture line of human squamouscell carcinoma of lung. *Cancer Detect. Prev.* **6**, 181-184 (1983).
12. Kasai, M.: Analysis of cell surface antigens expressed on a human lung carcinoma by monoclonal antibodies. 北海道医学雑誌 **58**, 376-389 (1983).
13. Ball, E. D., Graziano, R. F., Pettengill, O. S., Sorenson, G. D. and Fanger, M. W.: Monoclonal antibodies reactive with small cell carcinoma of the lung. *J. Natl. Cancer Inst.* **72**, 593-598 (1984).
14. Bernal, S. D. and Speak, J. A.: Membrane antigen in small cell carcinoma of the lung defined by monoclonal antibodies SM 1. *Cancer Res.* **43**, 265-270 (1984).
15. Varki, N. M., Reisfeld, R. A. and Walker, L. E.: Antigens associated with a human lung adenocarcinoma defined by monoclonal antibodies. *Cancer Res.* **44**, 681-687 (1984).
16. Rosen, S. T., Mulshine, J. L., Cuttita, F., Fedorko, J., Carney, D. N., Gazdar, A. F. and Minna, J. D.: Analysis of human small cell lung cancer differentiation antigens using a panel of rat monoclonal antibodies. *Cancer Res.* **44**, 2052-2061 (1984).
17. Iguro, T., Wakisaka, A., Terasaki, P. I., Hirota, M., Suyama, N., Fukushima, K. and Chiba, D.: Sialylated Lewis^x antigen detected in the sera of cancer patients. *Lancet* **6**, 817-818 (1984).
18. Giard, D. J., Aaronson, S. A., Todaro, G. J., Arnstein, P., Kersey, J. D., Dosik, H. and Park, W. P.: In vitro cultivation of human tumors: Establishment of cell line derived from a series of solid tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* **51**, 1417-1423 (1973).
19. Kearney, J. F., Radbruch, A., Liesegang, B. and Rajewski, K.: A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody-secreting hybrid cell lines. *J. Immunol.* **123**, 1548-1550 (1979).
20. Köhler, G. and Milstein, C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature(London)* **256**, 495-497 (1975).
21. 渡辺慶一: 酵素抗体法. 理論・手技解説とその応用. 33-39. 学際企画, 東京 (1984).
22. 笹浪哲雄: ヒト肝細胞癌に対するモノクローナル抗体の作製とその応用-とくにH型糖蛋白質と反応する抗体による研究. 札幌医誌 **53**, 223-241 (1984).

23. Rahman, A. F. R. and Longenecker, B. M.: A monoclonal antibody specific for the Thomsen-Friedenreich cryptic T antigen. *J. Immunol.* **129**, 2021-2024 (1982).
24. Longenecker, B. M., Rahman, A. F. R., Leigh, J. B., Purser, R. A., Greenberg, A. H., Willans, D. J., Keller, O., Petrik, P. K., Thay, T. Y., Suresh, M. R. and Noujaim, A. A.: Monoclonal antibody against a cryptic carbohydrate antigen of murine and human lymphocytes. *Int. J. Cancer* **33**, 123-129 (1984).
25. Kiernan, J. A.: *Histological and histochemical methods: Theory and practice.* 153-156. Pergamon press. Oxford (1981).
26. Atkinson, B. F., Ernst, C. S., Herlyn, M., Steplewski, Z., Sears, H. F. and Koprowski, H.: Gastrointestinal cancer-associated antigen in immunoperoxidase assay. *Cancer Res.* **42**, 4820-4823 (1982).
27. 平野 寛: 組織細胞化学1981. レクチンの組織細胞化学的応用. 17-39. 学際企画, 東京 (1982).
28. Zola, H., Moore, H. A., Hohmann, A., Hunter, I. K., Nikoloutsopoulos, A. and Bradley, J.: The antigen of mature human B cells detected by the monoclonal antibody FMC7: Studies on the nature of the antigen and modulation of its expression. *J. Immunol.* **133**, 321-326 (1984).
29. Magnani, J. H., Steplewski, Z., Koprowski, H. and Ginsburg, V.: Identification of the gastrointestinal and pancreatic cancer-associated antigen detected by monoclonal antibody 19-9 in the sera of patients as a mucin. *Cancer Res.* **43**, 5489-5492 (1983).
30. Imai, K., Galloway, D. R., and Ferrone, S.: Serological and immunochemical analysis of the specificity of the xenoantiserum 8986 elicited with hybrids between human melanoma and murine fibroblasts. *Cancer Res.* **41**, 1028-1033 (1981).
31. 渡辺 武, 大原純一, 江田康幸, 松橋幸子: ブロッキング法によるモノクローナル抗体の検出. 右田俊介編集: 免疫実験操作法 **11**, 3485-3489 (1982).
32. Imai, K. and Ferrone, S.: An indirect rosette microassay to characterize human melanoma associated antigens (MAA) recognized by operationally specific xenoantisera. *Cancer Res.* **40**, 2252-2256 (1980).
33. 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).
34. Wagener, C., Hain F., Fodisch, H. J. and Breuer, H.: Localisation of carcinoembryonic antigen in embryonic and fetal human tissues. *Histochemistry* **78**, 1-9 (1983).
35. Szulman, A. E.: The histological distribution of the blood group substance in man as disclosed by immunofluorescence. II. *J. Exp. Med.* **115**, 977-1005 (1962).
36. Yonezawa, S., Nakamura, T., Tanaka, S., Maruta, K., Nishi, M. and Sato, E.: Binding of *Ulex europaeus* Agglutinin-1 in polyposis coli: comparative study with solitary adenoma in the sigmoid colon and rectum. *J. Natl. Cancer Inst.* **71**, 19-24 (1983).
37. Yonezawa, S., Nakamura, T., Tanaka, S. and Sato, E.: Glycoconjugate with *Ulex europaeus* Agglutinin-1-binding site in normal mucosa, adenoma, and carcinoma of the human large bowel. *J. Natl. Cancer Inst.* **69**, 777-785 (1982).
38. Cooper, H. S.: Peanut-lectin-binding sites in large bowel carcinoma. *Lab. Invest.* **47**, 383-389 (1982).
39. Koprowski, H., Steplewski, Z., Mitchell, K., Herlyn, M., Herlyn, D. and Fuhre, P.: Colorectal Carcinoma antigens detected by hybridoma antibodies. *Somatic Cell Genet.* **3**, 952-972 (1979).
40. Magnani, J. H., Nilsson, B., Brockhaus, M., Zopf, D., Steplewski, Z., Koprowski, H. and Ginsburg, V.: A monoclonal antibody-defined antigen associated with gastrointestinal cancer is a ganglioside containing sialylated lacto-N-fucopentaose II. *J. Biol. Chem.* **257**, 14365-14369 (1982).
41. Magnani, J. L., Brockhaus, M., Smith, D. F., Ginsburg, V., Blaszczyk, M., Mitchell, K. F., Steplewski, Z. and Koprowski, H.: A monosialoganglioside is a monoclonal antibody-defined antigen of colon carcinoma. *Science* **212**, 55-56 (1981).
42. Raux, H., Labbe, F., Fondaneche, M. C., Koprowski, H. and Burtin, P.: A study of gastrointestinal cancer associated antigen (GICA) in human fetal organs. *Int. J. Cancer* **32**, 315-319 (1983).
43. Brockhaus, M., Magnani, J. L., Herlyn, M., Blaszczyk, M., Steplewski, Z., Koprowski, H. and Ginsburg, V.: Monoclonal antibodies directed against the sugar sequence of Lacto-N-fucopentaose III are obtained from mice immunized with human tumors. *Arch. Biochem. Biophys.* **217**, 647-651 (1982).
44. Blaszczyk, M., Ross, A. H., Ernst, C. S., Marchisio, M., Atkinson, B. F., Pak, K. Y., Steplewski, Z. and Koprowski, H.: A fetal glycolipid expressed on adenocarcinoma of the colon. *Int. J.*

- Cancer **33**, 313-318 (1984).
45. Solter, D., and Knowles, B. B.: Monoclonal antibody defining a stage-specific mouse embryonic antigen (SSEA-1). Proc. Natl. Acad. Sci. USA **75**, 5565-5569 (1978).
46. Fox, N., Damjanov, I., Knowles, B. B. and Solter, D.: Immunohistochemical localization of the mouse stage-specific embryonic antigen 1 in human tissues and tumors. Cancer Res. **43**, 669-678 (1983).
47. Shi, Z. R., McIntyre, L. J., Knowles, B. B., Solter, D. and Kim, Y. S.: Expression of a carbohydrate differentiation antigen, stage-specific embryonic antigen 1, in human colonic adenocarcinoma. Cancer Res. **44**, 1142-1147 (1984).
48. Fukushima, K., Hirota, M., Terasaki, P. I., Wakisaka, A., Togashi, T., Chia, D., Suyama, N., Fukushi, Y., Nudelman, E. and Hakomori, S.: Characterization of sialosylated Lewis^x as a new tumor-associated antigen. Cancer Res. **44**, 5579-5585 (1984).
-

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 遠藤高夫