

速 報

後期胎盤型 Alkaline Phosphatase に対する
単一クローン性抗体の作成

慶応義塾大学医学部産婦人科学教室

野澤 志朗 ツォクロ・ウィジャヤ 新井 宏治 鄭 成輝
小島 雅彦 蔡 篤仁 太田 博明 栗原 操寿**Key words** : Monoclonal antibody • Term-placental alkaline phosphatase • Immunocytochemistry

緒 言

近年注目されている胎盤性蛋白は酵素, ホルモンを含む種々の物質より構成されているが, alkaline phosphatase (ALP) はその代表的酵素の一つである. ALP は遺伝子支配の異なる三つの isoenzyme 即ち組織非特異型 ALP, 小腸型 ALP, 後期胎盤型 ALP に分類されるが¹⁾, この中で特に耐熱性の後期胎盤型 ALP は, 妊娠後半期に急増することから胎児胎盤機能の指標として利用可能であり, またある種の癌細胞が産生するところから oncodevelopmental protein 即ち腫瘍マーカーとしての意義²⁾も有し, 産婦人科領域に於ては広く研究対象となつてきた糖蛋白である. ところが最近後期胎盤型 ALP も他の oncodevelopmental protein と同じく, “microheterogeneity”が注目されており³⁾, 新たな研究手段の開発が急務となつている. そこで本研究では, 後期胎盤型 ALP に対する単一クローン性抗体の作成を試み, 更に同抗体を用いて胎盤 ALP を染色し酵素抗体法への応用を試みた.

材料および方法

(1) 抗後期胎盤型 ALP 単一クローン性抗体産生 hybridoma 株の樹立

満期産胎盤より抽出した後期胎盤型 ALP (M.W.=125,000, pI=4.5, 比活性450u/mg 以上, The Green Cross Corporation, Osaka) 100 μ g で BALB/c マウスを免疫し, 1 月後 booster を行つた. マウス脾細胞と 8-Azaguanine 耐性マウス骨髓腫由来細胞 P3-X63-Ag8 とを 50% Polyethylen glycol (PEG, M.W. 4000) により融合させ, 融合

細胞のみを HAT 培地により選別し, 各 well の培養上清中の抗体の有無を酵素免疫測定法 (EIA) により測定した. 即ち, 96 穴 EIA plate に抗原として 0.4 μ g/well の後期胎盤型 ALP を coating し, 5% 牛血清で plate 表面を block した後, 第 1 抗体として融合細胞培養上清を, 次いで第 2 抗体として horseradish peroxidase (HRPO) 標識抗マウス Ig 家兎 Ig (DACO 社, Denmark) を Sephadex G-150 で精製したもの (1.0 又は 0.3 μ g/well) を 4 時間反応させた. H₂O₂・orthophenylene diamine 添加により発色させ, 30 分後に 4N 硫酸にて反応を停止させ, 発色の程度を Micro ELISA reader (DYNATECH Co. USA), OD 405nm にて測定した. 次いで抗体の検出された well 中から limiting dilution 法により, 抗体産生単一クローン性 hybridoma を cloning した.

(2) 酵素抗体法による胎盤絨毛の染色

妊娠早期および満期産胎盤組織片を PLP 固定後⁴⁾, cryostat にて 6 μ m の凍結切片を作製し, 3% H₂O₂ にて内在性 peroxidase を block 後, 10% 豚血清にて非特異的染色の軽減を計つた. 第 1 抗体として hybridoma 培養上清 100 倍稀釈液を, 第 2 抗体としては, Sephadex G-150 精製 HRPO 標識抗マウス Ig 家兎 Ig 100 倍稀釈液 (約 4.8 μ g/ml) を使用し, 反応は室温で各々 1 時間行い, 次いで 3, 3'-DAB・H₂O₂ 反応で発色させた.

成 績

(1) 抗後期胎盤型 ALP 単一クローン性抗体産生 hybridoma 株の樹立

PEG 融合後の HAT 選別により 1~2 週後に

写真 1, 2 本抗体を用いた酵素抗体法

写真 1 (320倍): 満期産胎盤の絨毛に DAB 反応陽性の syncytiotrophoblast が認められた。

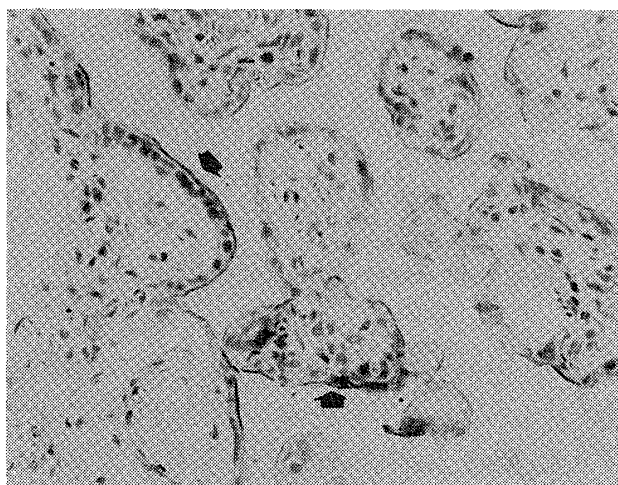
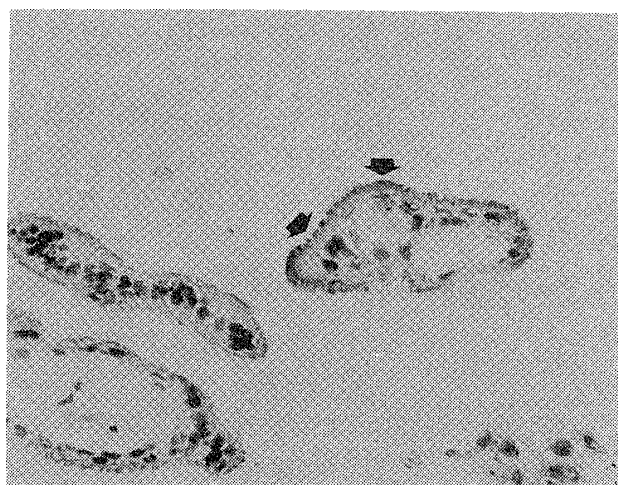


写真 2 (320倍): 妊娠 8 週の胎盤絨毛にも DAB 反応陽性 syncytiotrophoblast が少数認められた。



約1/4の well に融合細胞の増殖コロニーが認められたが、EIA によつてその約半数の well の培養上清中に抗後期胎盤型 ALP 抗体の産生が確認された。しかし、その大半は真菌感染により消滅したため、感染の起らなかった well より融合細胞を他の plate で増殖させ、再び培養上清を用いて EIA を施行したところ、特異抗体の産生が確認された。なお第 2 抗体である HRPO 標識抗マウス Ig 家兎 Ig の濃度を変化させても、同様な傾向が認められ、本 EIA 法の信頼性が裏づけられた。次いで抗体産生量の多い well の細胞を limiting dilution 法により cloning を行つたが、2～3 週間後に増殖してきた単一クローン性 hybridoma 細胞にも抗体の産生が確認された。

(2) 酵素抗体法による胎盤絨毛の染色

後期胎盤型 ALP は妊娠後半期に急増することが証明されているので、抗後期胎盤型 ALP 単一クローン性抗体を用いた酵素抗体間接法によつて妊娠各時期の胎盤を染色した。その結果、満期産胎盤絨毛の syncytiotrophoblast が DAB 反応陽性を示し(写真 1)、本単一クローン性抗体が抗後期胎盤型 ALP 抗体であることが確認された。更に妊娠 8 週の絨毛でも、一部の syncytiotrophoblast は DAB 反応陽性を示し(写真 2)、妊娠週数が増すにつれ陽性絨毛の数は増加した。即ち妊娠

早期でも少数の絨毛により後期胎盤型 ALP の産生されていることが判明した。

考 案

今回われわれは本邦ではじめて後期胎盤型 ALP に対する単一クローン性抗体の作成に成功した。後期胎盤型 ALP は従来胎盤あるいは癌細胞にのみ存在すると考えられてきたが、近年著者は子宮頸部の予備細胞や体内膜の一部に後期胎盤型 ALP が存在し、しかも子宮頸癌や子宮体癌では、その出現頻度が変化することから癌化に伴う酵素偏倚の存在を報告し、更にその発生機序として、ALP 遺伝子の発現調節異常の可能性を指摘¹⁾した。しかし、これら一連の結果は『酵素活性』に基づく手技によつてきたので、本抗体の作成は『酵素蛋白』の測定あるいは局在の証明に極めて大きな武器となり得る可能性を秘めており、マーカー酵素の少ない子宮において、発癌の細胞生物学的研究に役立つものと思われる。

文 献

1. Nozawa, S. and Fishman, W.H.: Heat-stable alkaline phosphatase —Chemistry and biology—. In Pregnancy Proteins (eds. J.G. Gruzinskas, M. Teisner and M. Seppla), 121. Academic Press, Sydney, 1982.

(No. 5364 昭58・9・19受付)