

シンポジウム 婦人科領域におけるがん・胎児抗原の基礎と臨床

モノクローナル抗体による癌・トロホブラスト抗原の検討

旭川医科大学産科婦人科学教室

山下 幸 紀

Studies on Oncotrophoblast Antigens by Monoclonal Antibodies

Kohki YAMASHITA

Department of Obstetrics and Gynecology, Asahikawa Medical College, Asahikawa

共同研究者

石川 睦男, 萬 豊, 牟礼 一秀, 林 博章, 佐川 正
 川村 光弘, 前田 康子, 中村 隆文, 井上 亮一, 柳沼 裕二
 藤井 哲哉, 葛巻 暹 (北海道大癌研分子遺伝)

実験助手

三田 肇子, 山岸美和子

はじめに

悪性腫瘍に発現されている腫瘍特異 (関連) 抗原には、時に、正常トロホブラストに発現されているものと共通しているものがあり、これらは、“癌・トロホブラスト抗原 (Oncotrophoblast antigen)” とよばれ、癌・胎児抗原 (Oncofetal antigen) の範疇に入るものとされている。この癌・トロホブラスト抗原についての、より詳細な知見をえるため、今回、トロホブラスト特異抗原あるいは絨毛癌関連抗原を検出するモノクローナル抗体 (MoAb) の作製を試み、これらを用いて、種々の癌における MoAbs の検出する抗原の分布や特徴を検討した。さらに、MoAbs のいくつかのものについて、それらの検出する抗原量の比較や生体内における腫瘍親和性 (集積性) の有無などについても検討を試みた。

研究方法

1. MoAbs の作製

① トロホブラスト抗原あるいは絨毛癌抗原に対する MoAbs

図1にその概要を示した。絨毛癌細胞株 (BeWo, NUC-1, および JAR) 1×10^7 個をそれぞれ免疫原として BALB/c マウスを免疫 (1回/週 $\times$ 3回, 腹腔内投与) し、その脾細胞 1×10^8 個とマウスミエローマ細胞 1×10^7 個を、45% polyethylen-glycol 4,000 の存在下で、Köhler and Milstein⁴⁾の方法に準じて融合させた。HAT 培地でハイブリドーマを培養し、目的とするハイブリドーマを選択するため、クローニングを限界稀

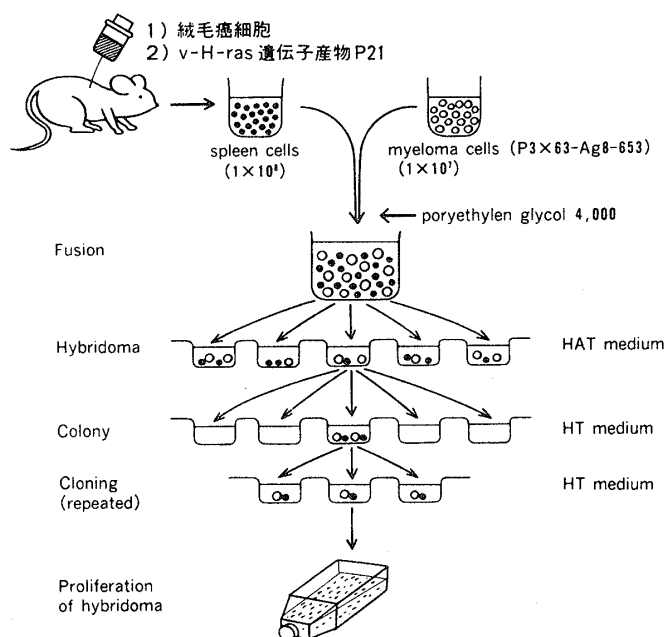


図1 単クローン抗体の作製

釈法による cellular radioimmune assay (CRIA) (図2), および enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) により繰り返し行つた。

② Ras 癌遺伝子産物 P21 に対する MoAbs

大腸菌により産生されるリコンビナント ras 癌遺伝子産物 P21 を免疫原として、前述と同様の操作を行い、P21 に対する MoAbs を産生するハイブリドーマを選択した。

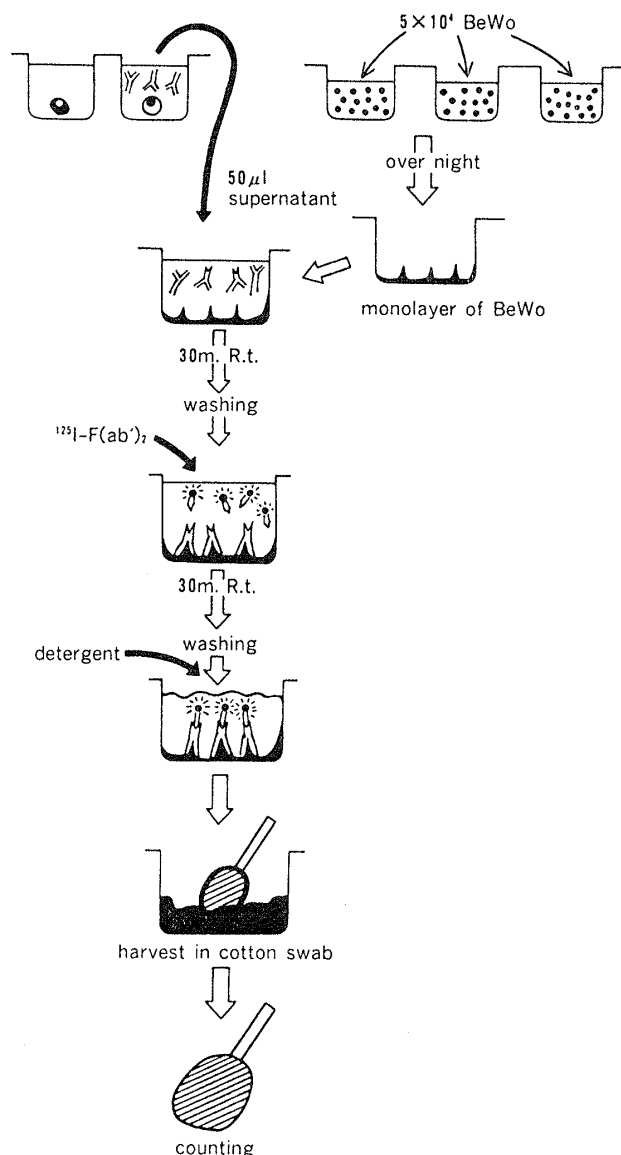


図2 Cellular radioimmunoassay (CRIA)

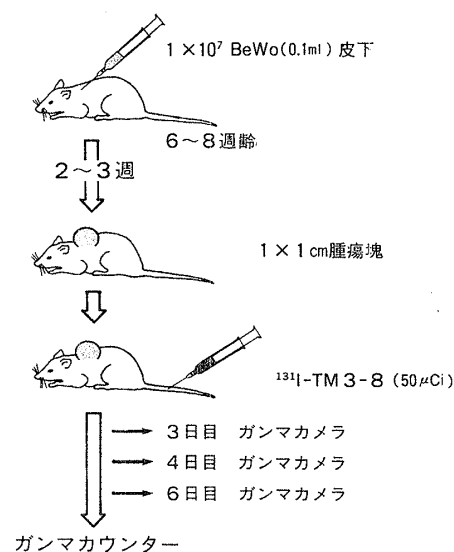


図3 実験方法(イメージングおよび臓器放射能測定)

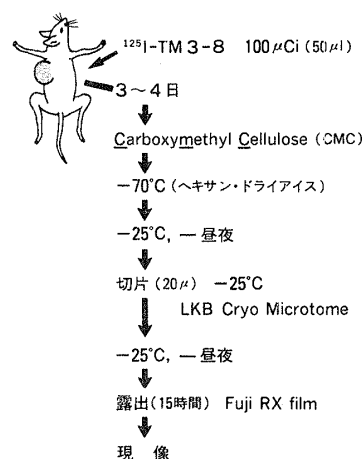


図4 全身オートラジオグラフィー

2. MoAb の immunoglobulin (Ig) isotype の検討
山羊抗マウス IgG1, G2, M および家兎抗マウス IgG3を用いてオクタロー法を行なった。

3. MoAbs の培養細胞に対する反応性

14種類の絨毛癌細胞株 (BeWo, BeWo-N, JAR, HCC-5, HCCM-5, NUC-1, SCH, IMA, GCH-1, GCH-2, Dosmi, Elfa, JEG-3, Z-cell) 7種類の上皮性悪性腫瘍細胞株 (Hela: 子宮頸癌, Lnci 6, PC6, SK-Lu-1: 肺癌, SNG-M: 子宮体癌, MKN-45: 胃癌, SK-RC-1: 腎癌) および 8種類の非上皮性悪性腫瘍細胞株 (Murawski: 悪性黒色腫, G-1, G-2: 巨細胞腫, Oza: 骨肉腫, KusHi-18: 平滑筋肉腫, 2G06: 悪性線維組織球腫, Molt: Tリンパ球, Wa: Bリンパ球) に対し, CRIAを行なった。

4. MoAbs の妊娠絨毛, 胎状奇胎, 絨毛癌, さらに

正常組織および腫瘍組織に対する反応性

妊娠初期絨毛 (5~12週) 5例, 中期絨毛 (24週) 2例, 後期胎盤 3例, 胎状奇胎 (6~8週) 5例, 絨毛癌 1例, また正常組織は, 脳腫瘍 (Glioblastoma) で死亡した85歳男性および無脳児で死産した30週の胎児 (女性) の剖検材料から入手した。絨毛癌以外の悪性腫瘍組織として, 子宮扁平上皮癌10例 (大細胞非角化型), 子宮体癌 5例 (分化型: 2例, 中間型: 2例, 未分化型: 1例), 卵巣腺癌12例 (漿液性嚢胞腺癌: 4例, ムチン性嚢胞腺癌: 5例, 未分化腺癌: 3例), 肺癌 6例, 腎癌 6例を対象として蛍光抗体法, 酵素抗体法 (ABC法), 免疫電顕, flow cytometryなどで検討した。

5. MoAb の生体内における腫瘍への集積性についての検討

(A) シンチグラフィー

6～8週齢のヌードマウス皮下に、 1×10^7 個の BeWo (0.1ml) を移植し、1cm×1cm 程度に増大した頃 (2～3週後)、クロラミンT法で ^{131}I を標識された MoAb (50 μCi) を尾静脈から注射し、3日目から連日6日目まで、ガンマカメラにてマウスを撮影し、シンチグラフィーを行つた (図3)。

(B) 腫瘍および各臓器の放射活性の測定

^{131}I 標識 MoAb を投与されてシンチグラフィーを施行されたヌードマウスを、注射後6日目に屠殺し、腫瘍および各臓器を摘出し、それぞれの放射活性をガンマカウンターで測定した。また、各臓器の腫瘍に対する放射活性の比を

$$\text{T/T Ratio} \left(\frac{\text{Tissue cpm/g}}{\text{Tumor cpm/g}} \right) \text{ で求めた。}$$

(C) 全身オートラジオグラフィー

^{125}I 標識 MoAb (100 μCi) を絨毛癌 (BeWo) を移植されたヌードマウス尾静脈へ注射し、3～4日後に5%Carboxymethyl Cellulose (CMC) を充分塗布し、10%CMC 上に固定した後、全身をさらに5%CMC に埋没させた。そのままヌードマウスをヘキサンドライアイス中で -70°C に冷凍後、 -25°C で一昼夜静置して

おき、その後、 -25°C に維持されている Cryo Microtome 内で全身の切片を Scotch テープに密着させて作製し、乾燥は Cryo Microtome 装置内 (-25°C) にて一昼夜静置しておくことにより行つた。その後、フィルム (Fuji RX) に密着させ、一昼夜露出させた後に現像した (図4)。

研究成績

1. MoAb の選択

今回の研究に合致した MoAbs として、絨毛癌細胞を免疫原としてえられたものの中から、TM7-3, TM3-8, TM5-1, TM8-13, TM4-5, および TM3-3 を、また P21 を免疫原としたものの中から M-rp12 および M-rp28 の計8種類を用いた。これらの Ig イソタイプは表1に示したごとく、TM7-3, TM3-8, TM5-1, TM8-13, および TM3-3 が IgG1, TM4-5 が IgG2a, M-rp12 および M-rp28 が IgM であつた。

2. MoAbs の培養絨毛癌細胞における反応性

CRIA による結果を表2に示した。陽性は対照の3倍以上の cpm を示したものとした。これによれば、NUC-1 および HCCM-5 が、今回選択された MoAbs すべてと反応していた。MoAbs の側からみると TM5-1 (11/11), M-rp12, および M-rp28 (9/9) が検索したすべての絨毛癌細胞株と陽性反応を示した。

3. MoAbs の悪性腫瘍細胞株における反応性

CRIA による結果を表3および表4に示した。上皮性腫瘍細胞株では、Hela が TM8-13 以外のすべての MoAbs と反応しており、肺癌由来の Luci 6 は、8株中5株で陽性であつた。MoAbs の側からみると、M-rp12 および M-rp28 は4株いずれとも陽性であるのに対し、TM5-1 は6株中1株、TM7-3 および TM3-8 は7株中2株に陽性反応がみられたのみであつた。非上皮

表1 単クローン抗体の Immunoglobulin isotype

TM7-3	IgG1
TM3-8	IgG1
TM5-1	IgG1
TM8-13	IgG1
TM4-5	IgG2a
TM3-3	IgG1
M-rp12	IgM
M-rp28	IgM

表2 各単クローン抗体の絨毛癌細胞株における反応性

	BeWo	GCH-1	GCH-2	JAR	NUC-1	HCCM-5	JEG-3	TN-1	SCH	IMa	Dosmi	Z-cell	Elfa
TM7-3	●	○	●	●	●	●	●	●	●	●	●	ND	ND
TM3-8	●	○	●	●	●	●	●	●	●	●	●	ND	ND
TM5-1	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	ND	ND
TM8-13	●	●	ND	●	●	●	●	●	●	●	●	ND	ND
TM1-6	●	ND	ND	ND	●	●	○	○	ND	●	○	ND	●
TM9-6	○	○	ND	ND	●	○	●	ND	●	●	○	ND	○
TM3-2	●	○	ND	ND	●	●	ND	ND	○	●	ND	ND	○
TM4-6	●	ND	ND	●	●	●	●	ND	○	ND	○	ND	●
TM4-5	○	●	ND	●	●	●	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TM3-3	○	●	ND	●	●	●	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
M-rp12	●	●	ND	●	●	●	●	ND	●	●	ND	●	ND
M-rp28	●	●	ND	●	●	●	●	ND	●	●	ND	●	ND

● : + ○ : -

表3 各単クローン抗体の上皮性悪性腫瘍細胞株における反応性

	子宮頸癌 (Hela)	子宮体癌 (SNG-M)	肺 癌			胃 癌 (MKN-45)	腎 癌 (SK-RC-1)
			(Luci 6)	(PC-6)	(SK-Lu-1)		
TM7-3	●	○	○	○	○	○	●
TM3-8	●	○	○	○	○	○	●
TM5-1	●	○	○	○	○	ND	○
TM8-13	○	○	●	○	○	ND	●
TM1-6	ND	○	●	○	ND	ND	○
TM9-6	●	ND	○	○	○	ND	○
TM3-2	●	○	○	ND	ND	ND	ND
TM4-5	●	○	●	●	●	○	●
TM3-3	●	○	●	ND	●	○	●
M-rp12	●	●	●	ND	ND	●	ND
M-rp28	●	●	●	ND	ND	●	ND

表4 各単クローン抗体の非上皮性悪性腫瘍細胞における反応性

	悪性黒色腫 (Murarinski)	巨細胞腫		骨肉腫 (Oza-1)	平滑筋肉腫 (KusHi-18)	悪性線維 組織球腫 (2G06)	Tリンパ球 (Molt)	Bリンパ球 (Wa)
		(G-1)	(G-2)					
TM7-3	○	●	○	○	○	○	○	○
TM3-8	○	●	○	○	○	○	○	○
TM5-1	●	●	ND	○	○	○	○	○
TM8-13	●	●	ND	○	○	○	○	○
TM1-6	●	○	○	○	ND	●	○	○
TM9-6	●	●	○	○	ND	○	○	○
TM3-2	ND	●	○	○	ND	●	○	○
TM4-5	●	●	○	●	○	●	○	●
TM3-3	●	●	ND	●	○	●	○	●
M-rp12	●	●	●	●	●	●	○	○
M-rp28	●	●	●	●	●	●	○	○

表5 各単クローン抗体の妊娠初期絨毛, 奇胎絨毛, 絨毛癌細胞との反応性

	妊娠初期絨毛		胞 状 奇 胎		絨毛癌
	villous	non-villous	villous	non-villous	
TM7-3	wk	wk	⊕	⊕	⊕⊕⊕
TM3-8	wk	wk	⊕	⊕	⊕⊕⊕
TM5-1	⊕	—	⊕	—	⊕
TM8-13	—	⊕	—	⊕	?
TM4-5	⊕	⊕	⊕	⊕	wk
TM3-3	⊕	⊕	⊕	⊕	wk
M-rp12	—	—	—	—	⊕
M-rp28	—	—	—	—	⊕

性腫瘍細胞株では, 巨細胞腫由来の G-1が, 今回とり上げた八つの MoAbs すべてと陽性反応を示し, また悪性黒色腫由来の Murawski も TM7-3および TM3-8以外の MoAbs すべてと陽性反応を示した. 一方, T-リンパ球 (Molt) はすべての MoAbs で陰性, B-リン

パ球 (Wa) も, TM4-5および TM3-3以外のすべてで陰性であった.

4. MoAbs の正常および腫瘍性トロホブラストにおける反応性

組織における MoAb の反応は, 蛍光抗体法および酵素抗体法により観察した. これらの MoAbs のうち, TM7-3と TM3-8, TM4-5と TM3-3, M-rp12と M-rp28は, それぞれトロホブラストにおける反応性は同一のパターンを示した(表5). TM7-3および TM3-8は, 妊娠初期トロホブラストでは極めてわずかの染色性あるいは蛍光しか示さないが, 絨毛癌では強い染色性あるいは蛍光を示した. 陽性所見は, サイトトロホブラストあるいはサイトトロホブラスト様絨毛癌細胞に選択的に認められる傾向が観察された(写真1, 2). TM5-1はこれとは逆に, 妊娠初期トロホブラスト, 胞状奇胎さらに絨毛癌まで, ジンチチオトロホブラスト系の細胞に局限して陽性反応がみられ, その反応性に

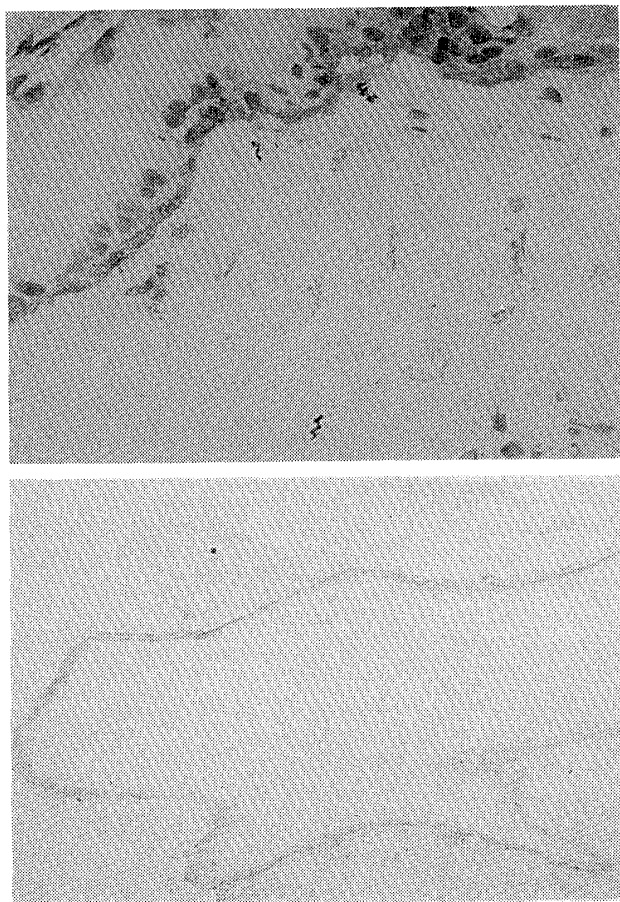


写真1 TM7-3を用いた酵素抗体法(ABC)による所見。上は妊娠6週の妊娠絨毛, 下は妊娠7週の胞状奇胎。いずれも cytotrophoblast に一致して陽性所見を呈している。

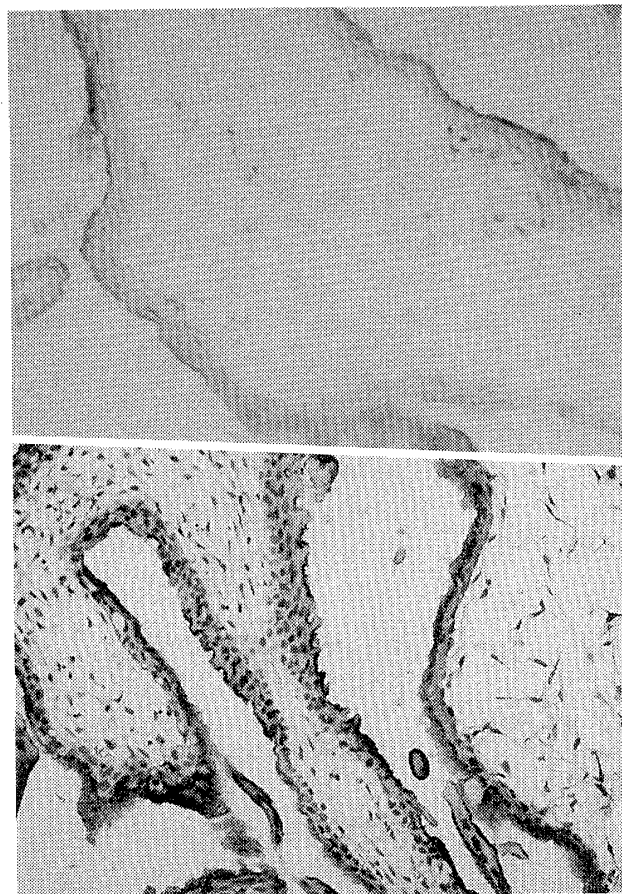


写真3 TM5-1を用いた酵素抗体法(ABC)による所見。上は妊娠6週の妊娠絨毛, 下は妊娠6週の胞状奇胎。いずれも syncytiotrophoblast に一致して陽性所見を呈している。



写真2 TM7-3を用いた絨毛癌に対する蛍光抗体法による所見。Cytotrophoblast 様腫瘍細胞にのみ陽性所見が認められ, syncytiotrophoblast 様腫瘍細胞は陰性所見を呈している。

正常および腫瘍性のトロホプラストにおいて変化は認められなかった(写真3)。TM8-13は, 妊娠初期およ

表6 各単クローン抗体の満期胎盤における反応性

	羊膜上皮	絨毛組織	脱落膜組織内の陽性細胞
TM7-3	wk	wk	⊕
TM3-8	wk	wk	⊕
TM5-1	—	⊕	⊕
TM8-13	⊕	—(一部⊕)	⊕
TM4-5	⊕	⊕	⊕⊕⊕
TM3-3	⊕	⊕	⊕⊕⊕
M-rp12	—	—	wk
M-rp28	—	—	wk

び胞状奇胎トロホプラストのうち, non-villous の一部に陽性所見が認められたが, 絨毛癌では明確な所見がえられなかった。TM4-5およびTM3-3は, 妊娠初期および胞状奇胎トロホプラストで陽性所見を示したが, 絨毛癌では染色性は弱かった。M-rp12およびM-rp28は, 絨毛癌とのみ陽性所見を示した。また胎盤におけるそれぞれの MoAb の反応態度をみると(表6), いず

表 7 各単クローン抗体の正常組織における反応性

		TM7-3	TM3-8	TM5-1	TM8-13	TM4-5	TM3-3	M-rp12	M-rp28
子宮	頸	A	—	—	—	wk	wk	wk	wk
	F	—	—	—	—	ND	ND	ND	ND
内膜	A	—	—	—	—	wk	wk	—	⊕
	F	—	—	—	—	ND	ND	ND	ND
卵 巢	A	—	—	—	—	—	—	—	—
	F	—	—	ND	ND	ND	ND	ND	ND
胃	A	—	—	—	—	⊕	⊕	wk	wk
	F	—	—	—	—	—	—	—	—
肝	A	—	—	—	—	⊕	⊕	—	—
	F	—	—	—	—	⊕	⊕	—	—
脾	A	—	—	—	—	⊕	⊕	—	—
	F	—	—	—	—	⊕	⊕	—	—
膵	A	⊕	⊕	ND	ND	ND	ND	—	—
	F	⊕	⊕	—	—	⊕	⊕	—	—
心	A	—	—	—	—	—	—	—	—
	F	—	—	—	—	—	—	—	—
肺	A	—	—	—	—	wk	wk	—	—
	F	—	—	—	—	—	—	ND	ND
腎	A	⊕	⊕	⊕	—	wk	⊕	wk	wk
	F	⊕	⊕	⊕	—	⊕	⊕	—	—

A：成人 (Adult) F：胎児 (Fetus)

表 8 各単クローン抗体の絨毛癌以外の癌組織との反応性

	卵 巢 腺 癌			子宮頸癌	子 宮 体 癌			肺 癌	腎 癌
	漿液性	ムチン性	未分化		G-1	G-2	G-3		
TM7-3	3/4	1/5	3/3	0/10	2/2	0/2	0/1	0/2	(3)/6
TM3-8	3/4	1/5	3/3	0/10	2/2	0/2	0/1	0/2	(3)/6
TM5-1	0/4	0/5	0/3	0/10	0/2	0/2	0/1	0/2	0/6
TM8-13	0/5	0/4	1/3	0/10	1/2	1/2	0/1	0/2	2/6
TM4-5	5/5	4/4	2/2	3/5	2/2	2/2	0/1	1/2	1/6
TM3-3	5/5	4/4	2/2	2/5	2/2	2/2	0/1	2/2	1/6
M-rp12	4/4	3/4	0/1	4/4	3/3	0/2	0/1	1/4	ND
M-rp28	4/4	4/4	0/1	4/4	3/3	0/2	0/1	2/6	ND

(陽性数/検索数)

れも脱落膜中に陽性細胞が認められた。また羊膜上皮では TM5-1, M-rp12 および M-rp28 が陰性, TM8-13, TM4-5 および TM3-3 が陽性所見を示した。

5. MoAbs の正常組織における反応性

TM7-3, TM3-8, TM5-1, TM8-13, M-rp12 および M-rp28 の六つの MoAbs は、いずれも大部分の正常臓器の組織とは、成人、胎児を問わず反応しないことが確かめられた。しかし、その中で、TM7-3 および TM3-8 は、腎尿細管の一部および膵管上皮の一部で、また TM5-1 は腎の一部の糸球体および各臓器内の小血管内皮細胞で成人、胎児とも陽性所見を示した。M-

rp12 および M-rp28 も、子宮頸部扁平上皮および胃粘膜上皮で陽性所見が認められた。TM4-5 および TM3-3 は、比較的多くの臓器組織との反応がみられる傾向があつた (表 7)。

6. MoAbs の絨毛癌以外の癌組織との反応性

表 8 に、結果を一括して示した。TM7-3 および TM3-8 は、卵巣癌、特に漿液性嚢胞腺癌と未分化腺癌、子宮体癌、分化型腺癌で陽性所見を示した。腎癌 (腺癌) では、6 例中 2 例において、腫瘍細胞の一部に陽性所見を示すものが認められた。TM5-1 は検索した中では陽性所見を示すものは認められなかつた。TM4-5

および TM3-3は, 11例すべての卵巣癌で, 子宮体癌においても 5 例中 4 例で陽性所見を示した. M-rp12および M-rp28は, 子宮頸癌, 子宮体癌, 卵巣癌と陽性反応を示した. 卵巣腫瘍のうち, 上皮性腫瘍の漿液性およびムチン性嚢胞腺腫, 低悪性度腺腫, 腺癌のそれぞれについての M-rp12と M-rp28の反応性をみると(表9), 良性腫瘍では陰性, 腺癌では陽性, 低悪性度腺腫ではその中間的な傾向を示す成績がえられた.

7. TM7-3, TM3-8相互の反応性に対する影響

TM7-3および TM3-8の, 各種細胞, 正常臓器, 癌組織などにおける反応態度が同一のパターンを示していることから, それぞれの反応を相互にどのように影響し合っているかを検討した. 1×10^6 個の BeWo を TM7-3, TM3-8および PBS で30分それぞれ incubation して前処置した後に, 細胞を洗浄し, 次に再び TM7-3および TM3-8を反応させ, これらの MoAbs の活性の吸収の有無を, CRIA を用いて検討し, Inhibi-

tion test を行つた. 表10に示したごとく, 片方で前処置された細胞は, もう一方の MoAb とはほとんど反応しないことが確かめられた. 同様にそれぞれの MoAb で前処置された BeWo に対し, ビオチン化した TM7-3あるいは TM3-8を反応させ, これらに FITC 標識アビジン(フナコシ薬品)を作用させた後に flow cytometry (CS-20, 昭和電工)を行つた. その結果, 図5に示すごとく, それぞれの MoAb による前処置のない BeWo (PBS 処置)が, TM7-3あるいは TM3-8との反応後に示す蛍光強度にくらべ, 同一あるいは他方の MoAb による前処置をうけた BeWo は, いずれも平均蛍光強度の減弱を示した.

8. TM7-3抗原量の各種細胞における比較

TM7-3で検出される抗原の各細胞における量的比較を試みた. TM7-3陽性細胞である Hela 細胞を標準細胞として用い, 1×10^8 個から 1×10^4 個まで漸次稀釈し, これらに ^{125}I 標識 TM7-3 $50\mu\text{l}$ (200,000cpm) を反応させ, CRIA 直接法を行つた. その結果図6に示す抗原量の標準曲線がえられた. 本条件下では, Hela の 1×10^7 個から 4×10^5 個までの間での測定値に信頼度のおけることが示された. そこで, 絨毛癌細胞として BeWo, HCCM-5, JEG-3, IMA, SCH, の5種類, 絨毛癌以外の悪性腫瘍細胞として, G-1, PC-6, KusHi-18, MKN の4種類, 計9種類の細胞を準備し, それぞれ 3.7×10^6 個を用いて CRIA 直接法を行つた. その結果を表11に示した. この結果を図6の標準曲線で計算すると, 3.7×10^6 個の BeWo のもつ TM7-3で検出される抗原量は, Hela の 1×10^7 個のそれに相当し, 同じく 3.7×10^6 個の SCH のそれは, Hela の 7×10^6 個に相当

表9 M-rp12, M-rp28の卵巣腫瘍における反応性

	M-rp12	M-rp28
嚢胞腺腫		
漿液性	○	○
ムチン性	○○○	○○○
低悪性度		
漿液性	●○○	●○○
ムチン性	ND	ND
嚢胞腺癌		
漿液性	●●●●●	●●●●●
ムチン性	●●●○	●●●●●
未分化腺癌	○	○

●: + ○: -

表10 TM7-3および TM3-8による blocking の有無(Inhibition test による)

Blocking Ab.	Absorbed Ab.	binding(cpm)	% Inhibition
TM7-3	TM7-3	8,837	-4.2
TM3-8	TM7-3	6,899	24.2
PBS	TM7-3	2,219	93.1
TM7-3	TM3-8	8,383	6.9
TM3-8	TM3-8	8,614	3.6
PBS	TM3-8	2,003	96.4
Antibody control		binding(cpm)	
TM7-3		8,550	
TM3-8		8,872	
Normal control			
PBS		1,750	

BeWo 細胞を TM7-3あるいは TM3-8と前処理(室温, 30分間 incubation)させた後に, 再び TM7-3, TM3-8と反応(室温, 30分間 incubation)させ, その上清の残存活性を CRIA で測定し, %Inhibition を求めた.

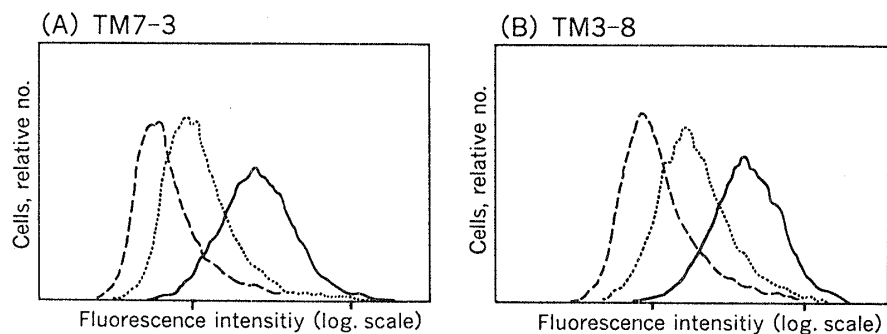


図5 TM7-3およびTM3-8による blockingの有無 (flow cytometry による) BeWo 細胞を TM7-3 (-----), TM3-8 (----) および PBS (——) で前処理 (室温, 10分間 incubation) した後, ピオチン化した (A) TM7-3あるいは (B) TM3-8と反応させ (室温, 10分間 incubation), その後 FITC 標識アビジン (室温, 10分間 incubation) を反応させて (flow cytometry を施行).

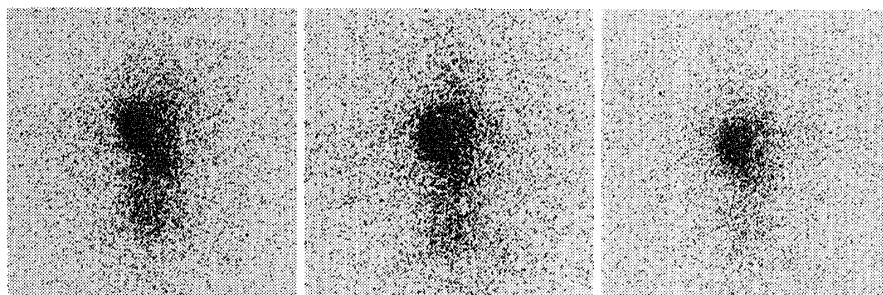


写真4 左から, ^{125}I 標識 TM3-8投与後 3 日目, 4 日目, 6 日目のシンチグラフィー像.

表11 培養細胞株の CRIA (直接法) 値
— ^{125}I 標識 TM7-3を用いて—

	細胞数	cpm
BeWo	3.7×10^6	108,568
G-1	"	113,858
HCCM-5	"	103,177
JEG-3	"	107,104
IMa	"	99,449
SCH	"	97,102
PC-6	"	2,384
KusHi-18	"	1,168
MKN-45	"	1,650

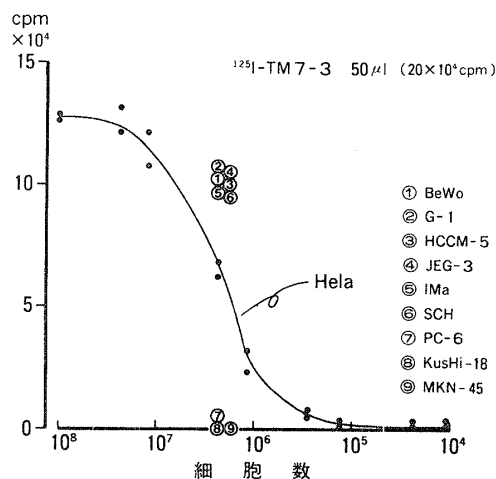


図6 TM7-3抗原量の比較 (Hela による)

することが明らかとなった。PC-6, KusHi-18およびMKN は, 本実験系では感度以下の陰性であった。

9. シンチグラフィー

^{131}I を標識された TM7-3, あるいは TM3-8 を絨毛癌を移植されたヌードマウスに投与し, 3 日目からガンマカメラで撮影した。写真4は, 左肩皮下に $1\text{cm} \times 1\text{cm}$ の絨毛癌を有するヌードマウスに ^{131}I 標識 TM3-8

$50\mu\text{Ci}$ ($50\mu\text{l}$) 投与後 3 日目, 4 日目, 6 日目のシンチグラフィー像を示している。3 日目から明らかな腫瘍に一致した hot area が認められたが, この時期ではまだ全身的にも非特異的な像が観察された。6 日目のシンチグラフィー像では, ほぼ腫瘍部のみに明瞭に描出

表12 各臓器の放射活性
— ^{131}I -TM3-8(50 μCi)投与6日目—

	測定値(cpm/g)	T/T Ratio
腫瘍	45,698	1.00
肺	8,770	0.19
心	12,945	0.28
肝	11,610	0.25
腸管	5,802	0.13
腎	12,245	0.27
脾	8,270	0.18

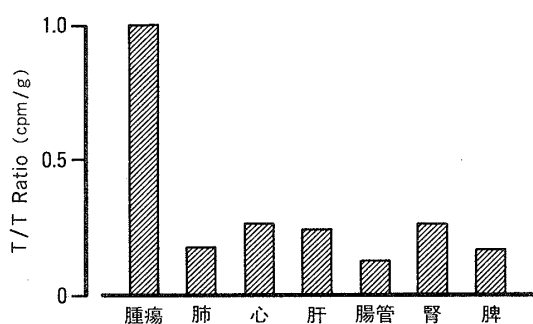


図7 腫瘍(BeWo)に対する各臓器の放射活性
(Tissue/Tumor: T/T Ratio)
—6日目—

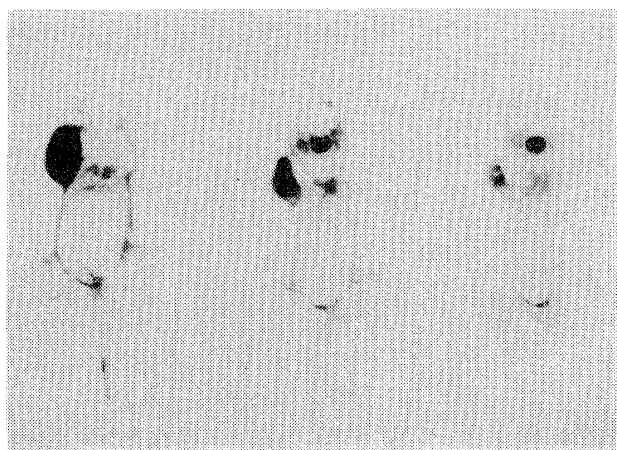


写真5 ^{125}I 標識 TM3-8投与後4日目の全身オートラジオグラフィー像。左肩部の腫瘍に一致して ^{125}I の集積が認められるが、切片の部位により、甲状腺、膀胱、肺などにも ^{125}I の存在が示されている。

される hot area が観察された。

10. ^{131}I 標識 TM3-8の腫瘍および各臓器における放射活性の比較

シンチグラフィーを行つたヌードマウスを、6日目

に屠殺し、腫瘍および各臓器を摘出し、それぞれの放射活性をガンマカウンターで測定した。表12にそれぞれの測定値(cpm/g)を示し、図7に各臓器のT/T Ratioを示した。明らかに、腫瘍部分における選択的な ^{131}I の集積が確かめられた。

11. 全身オートラジオグラフィー

^{125}I を標識されたTM3-8 100 μCi (50 μl)を左肩皮下に絨毛癌の腫瘍をもつヌードマウス尾静脈から注射し、4日後に標本を作製し、15時間露出後に現像した(写真5)。標本を切り出す深さにより異なる像がえられているが、左端の像は、腫瘍のほぼ中央部からえられた切片のオートラジオグラフィー像である。部位によつては、甲状腺、肺、膀胱などに ^{125}I の集積像が認められた。

考 案

今回とりあげたMoAbsのうち、TM7-3およびTM3-8は、種々の細胞、正常および腫瘍組織における反応態度、また相互におけるBlocking活性などから判断して、同一抗原決定基あるいは同一抗原分子のきわめて近接した部位に存在する抗原決定基を認識するMoAbsの可能性が強い。両者は、正常臓器とはほとんど反応せず、いわゆる絨毛癌関連抗原を認識していると考えられるが、同時に、卵巣癌のうち、漿液性嚢胞腺癌、未分化腺癌、および子宮体癌の分化型との反応も認められることが明らかとなり、弱いながら正常絨毛にも反応していることから、この抗原は癌・トロホプラスト抗原の範疇に入るものと思われる。同様の観点から、Retting et al. (1985)⁶⁾も培養絨毛癌細胞を免疫原として6種のMoAbsを樹立し、絨毛癌以外の悪性腫瘍における、それらの反応性を検索しているが、それらの検出する抗原の分布からみて、TM7-3およびTM3-8はそれらとは異なるものと思われる。TM7-3(およびTM3-8)で検出される抗原の活性は、ホルマリン固定で失活し、冷凍標本で観察されることから、Lipinski et al.⁶⁾の報告したTrop1, Trop2とも異なっている抗原と考えられ、その物理化学的性状については現在検討中である。生体内におけるTM7-3(およびTM3-8)の腫瘍への集積性が明瞭に観察されたことは、これらのMoAbsの将来の臨床の場における、腫瘍の局在の診断あるいは免疫療法への応用に向つての足がかりの第1歩がえられたと思われる。TM5-1は、ジンチチオトロホプラストと選択的に反応するMoAbでいわゆるトロホプラスト抗原を認識していると考えられるが、トロホプラストの癌化によつても、その反応態度は変わらず、また現在まで検索した絨毛癌以外の悪性腫瘍とは、いずれも陽性反応が認められなかつた。この点から、結果的には癌・トロホ

プラスト抗原を検出する MoAb とは考え難いこととなつた。またジンチチオトロホプラストにはホルモン以外にも種々の妊娠性蛋白¹⁾, 酵素²⁾, あるいは受容体³⁾などが豊富であり, TM5-1がこれらのいずれかを認識していることも否定はできないので現在これらについて検討中である。TM4-5および TM3-3は, B-リンパ球陽性であるが, 妊娠絨毛, 胎状奇胎トロホプラストで陽性反応を示し, 絨毛癌とは, それらにくらべ明らかに免疫組織化学的には減弱した反応を呈することから, トロホプラストに関連した抗原を検出する MoAbs として今回の研究にとり入れた。これらの MoAbs は, 子宮頸部扁平上皮癌および腎癌を除く多くの腺癌を中心とした悪性腫瘍と陽性反応を示し, 特定の癌に特異的な所見は示さない傾向が認められた。また, ras 癌遺伝子産物 P21 に対する MoAbs の M-rp12 および M-rp28⁵⁾は妊娠初期絨毛, 胎状奇胎では陰性であるのに対し, 絨毛癌では陽性所見を示し, トロホプラストの癌化にともなう発現量の増加をうかがわせたが, 絨毛癌以外では比較的広い範囲の悪性腫瘍との陽性反応が目立つた。その中で特に子宮頸部扁平上皮癌との反応が明瞭であつた。P21 に対する MoAbs のいくつかは, 癌組織より, むしろその前癌状態, あるいは同一タイプの良性腫瘍の組織により強く反応しているとの報告³⁾⁹⁾もあり, 子宮頸癌についても, 現在上皮内癌や異形成組織との反応性を検討中である。

MoAbs を用いる研究は, 特異性が鋭敏であるため, 逆に予期せぬ反応を種々の組織で認めることが多く, それらの判断には慎重な配慮を要する。最近, 種々の, トロホプラストと悪性腫瘍とに共有されている細胞膜成分を検出する MoAbs が作製されているので, これらを組み合わせて利用することにより, それぞれの癌細胞の膜抗原形質のトロホプラスト化現象をより明瞭にすることが可能になると思われる。そのことは, 癌細胞のもつ“分化からの逸脱”あるいは“逆もどり現象”が, 細胞の癌化のきわめて重要な因子か否かについても一つの示唆を与えてくれるだろう。

謝 辞

今回, 新たに絨毛癌細胞株, 腎腫瘍, 肺腫瘍を供与下さい

ました, 佐々木茂日本医大産婦人科助教授, 小柳知彦北海道大学泌尿器科教授, 坂下茂夫同講師, 八竹 直旭川医大泌尿器科教授, 中島 進旭川医大第一外科講師に深謝します。

文 献

1. Bohn, H., Dati, F. and Lüben, G.: Human trophoblast specific products other than hormones, in *Biology of trophoblast* (eds. Y.W. Loke and A. Whyte), 317. Elsevier, Amsterdam, 1983.
2. Galbraith, G.M.P., Galbraith, R.M. and Faulk, W.P.: Immunological studies of transferrin and transferrin receptors of human trophoblast. *Placenta*, 1: 33, 1980.
3. Kerr, I.B., Lee, F.D., Quintanilla, M. and Balmain, A.: Immunohistochemical demonstration of P21 ras family oncogene product in normal mucosa and in premalignant and malignant tumours of the colorectum. *Brit. J. Cancer*, 52: 695, 1985.
4. Köhler, G. and Milstein, C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256: 495, 1975.
5. Kuzumaki, N., Oda, A., Yamagiwa, S., Taniguchi, N., Kobayashi, H. and Oikawa, T.: Establishment of four mouse hybridoma cell lines producing monoclonal antibodies reactive with ras oncogene product P21. *J.N.C.I.*, 77: 1273, 1986.
6. Lipinski, M., Parks, D.R., Rouse, R.V. and Herzenberg, L.A.: Human trophoblast cell—Surface antigens defined by monoclonal antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 78: 5147, 1981.
7. Ovitt, C.E., Strauss, A.W., Alpers, D.H., Chow, J.Y. and Boime, I.: Expression of different—Sized placental alkaline phosphatase mRNA in placenta and choriocarcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 3791, 1986.
8. Retting, W.J., Cordon-Cardo, C., Koulos, J.P., Lewis, J.L. Jr., Oettgen, H.F. and Old, L.J.: Cell surface antigens of human trophoblast and choriocarcinoma defined by monoclonal antibodies. *Int. J. Cancer*, 35: 469, 1985.
9. Williams, A.R.W., Piris, J., Spandidos, D.A. and Wyllie, A.H.: Immunohistochemical detection of the ras oncogene P21 product in an experimental tumour and in human colorectal neoplasms. *Brit. J. Cancer*, 52: 687, 1985.

Synopsis

In order to investigate oncotrophoblast antigens, 8 monoclonal antibodies (MoAbs) which react with normal and/or neoplastic human trophoblasts have been produced, and examined their reactivities with other non-trophoblast origin tumors. In addition, several MoAbs have been studied for their affinities to the tumor *in vivo*. Immunogens of the 6 MoAbs (TM7-3, TM3-8, TM5-1, TM8-13, TM4-5 and TM3-3) were cultured choriocarcinoma cell lines, and those of the other 2 MoAbs (M-rp 12, and M-rp 28) were v-H-ras oncogene product P21.

BALB/c mice were immunized by ip or sc injection with (A) cultured human choriocarcinoma cell lines, BeWo, NUC-1, or JAR respectively, or (B) recombinant P21 produced by *Escherichia coli*. Spleen cells of the immunized mice were fused with mouse myeloma cells with minor modifications according to the technique reported by Köhler and Milstein. To isolate hybridoma cell lines producing antibody specific for (A) normal and/or neoplastic trophoblasts, or (B) v-H-ras oncogene product P21, screening of hybridomas and cloning were performed.

Ig isotypes of TM7-3, TM3-8, TM5-1, TM8-13 and TM3-3 are IgG1, TM4-5 is IgG2a and, M-rp12 and M-rp28 are IgM.

According to the distributions of the antigens detected by the MoAbs, TM7-3 and TM3-8, TM4-5 and TM3-3, and M-rp12 and M-rp28 showed a similar reactive pattern respectively. Among these MoAbs, both TM7-3 and TM3-8 showed a unique reactive pattern. They demonstrated a very strong reaction with choriocarcinoma, particularly cytotrophoblast-like tumor cells, in spite of a very weak reaction in normal chorionic villi. In addition, they showed a positive reaction with ovarian serous cyst adenocarcinomas (3/4) and well differentiated uterine corpus carcinoma (2/2). Scintigraphy performed 6 days after injection of ¹³¹I-labelled TM3-8 to choriocarcinoma (BeWo) transplanted nude mice, demonstrated the excellent visualization of the tumor. Radioactivities of the tumor and other normal tissues at 6th days from the injection, showed a selective binding of TM3-8 to the tumor. Whole body autoradiography of mouse was performed 4 days after injection of ¹²⁵I-labelled TM3-8 to the mice with a choriocarcinoma. The autoradiogram showed a clear positive gains restricted to the tumor.

In contrast with TM7-3 and TM3-8, TM5-1 demonstrated a positive reaction not in cytotrophoblast but in syncytiotrophoblast selectively regardless of normal chorionic villi or choriocarcinoma. With non-trophoblast origin tumor, TM5-1 showed no positive reaction.

A positive reaction of TM8-13 was demonstrable not in villous trophoblast but in partial non-villous trophoblast, and kidney carcinoma (2/6).

TM4-5 and TM3-3 were MoAbs reacting to normal and molar trophoblasts. They gave a weak reaction to choriocarcinoma. Among non-trophoblast origin tumors, a positive reaction was observed clearly in ovarian carcinoma.

A positive reaction of M-rp12 and M-rp28 was not seen in normal and molar trophoblasts, but they reacted to choriocarcinoma. Further, they reacted to uterine cervical carcinoma, endometrial carcinoma and ovarian carcinoma among non-trophoblast origin tumors.

All MoAbs in the present studies are related to trophoblast or choriocarcinoma basically. They react, however, to some kinds of non-trophoblast origin tumors in various patterns respectively. These findings are consistent with earlier reports of cancer cell's phenotypic change to trophoblast. In addition, with some of the MoAbs, encouraging data was obtained for thinking of a possibility of the practical application such as imaging of tumors in clinical field.