

## IIA-15

肺神経内分泌癌細胞株を用いた網羅的モノクローナル抗体の作製及び免疫方法の比較

長塩 亮<sup>1,3)</sup>、松本 俊英<sup>2,3)</sup>、佐藤 雄一<sup>2,3)</sup>、中島 孝<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>群馬大学 大学院医学系研究科 応用腫瘍病理学

<sup>2)</sup>北里大学 大学院医科学系研究科 分子病態診断学

<sup>3)</sup>北里大学 医療衛生学部 遺伝子検査学

【目的】タンパク質の翻訳後修飾は遺伝子の配列からは推定できない。未知の腫瘍関連抗原の獲得や、腫瘍化に伴い変化した種々の翻訳後修飾を受けた分子等に対する単クローン性抗体 (MoAb) を網羅的に作製することを目的として、精製抗原を用いずに肺癌の細胞株をそのまま、もしくは AMeX 固定した細胞で免疫し、MoAb を作製した。さらに、両者で作製した MoAb の相違を比較した。

【方法】免疫には未固定の細胞株と AMeX 固定したヒト肺神経内分泌癌由来細胞株 (LCN1、N231) を用いて、BALB/C マウスに免疫した。3 回の免疫後、抗体価の上昇したマウスより脾臓を摘出し、マウスミエローマ細胞 (SP2/O) と細胞融合を行った。ハイブリドーマの抗体産生のスクリーニングには免疫に用いた細胞の AMeX 固定切片を用いた免疫染色 (IHC) と何らかの分子に対する抗体価の上昇の有無を免疫プロット法 (IB) を用いて行った。

【結果および考察】1 回目のスクリーニングの結果、AMeX 固定細胞では 464well 中 216well (46.6%) で抗体の産生が認められた。内訳は、IB (+)・IHC (+) は 111 (51.4%)、IB (+)・IHC (-) は 57 (26.4%)、IB (-)・IHC (+) は 48 (22.2%) であった。一方、未固定細胞では、632well 中 173well (27.4%) で抗体の産生をしていた。内訳は、IB (+)・IHC (+) は 48 (27.7%)、IB (+)・IHC (-) は 92 (53.2%)、IB (-)・IHC (+) は 33 (19.1%) であった。未固定細胞免疫に比して、AMeX 固定細胞免疫で得た抗体は、IHC 陽性を示す割合が高く、一方、未固定細胞免疫では、IB 陽性の割合が高く、IHC 陽性は少なかった。両者の染色性を比べると、未固定細胞で細胞膜を認識する抗体の割合が高く、AMeX 固定細胞では細胞質を認識する抗体の割合が上昇していた。以上、免疫方法により、獲得できる異なる可能性が示唆された。

## IIA-16

Streptoavidin の染色性を指標とした腎臓組織の発達に関する研究

中杉光宏、中沢綾美、臼田信光

藤田保健衛生大学 医学部 解剖学 II

【背景と目的】Streptoavidin (Str) は、biotin 結合能を利用して、ABC 法として免疫組織化学に広く応用されているが、組織によっては強い非特異反応を示す問題点がある。組織中の内在性の biotin の反応が理由である。複数の carboxylase が biotin を結合する形で含有されることが知られ、ミトコンドリア酵素 pyruvate carboxylase が量的に多い。このような性質から Str はミトコンドリアの染色に用いられる。従来から、成熟した腎臓組織の指標として、近位尿細管の刷子縁に存在するアクチン細糸やペルオキシゾームが知られ、それぞれ phalloidin と catalase 抗体で組織染色ができる。本研究では、発達過程の腎臓組織の成熟の指標として Str 染色が使用可能か検討した。

【材料】胎生期と生後発達過程、および、成体のラット腎臓組織を用いた。

【方法】光顕組織化学:凍結切片を作製し、Alexa 標識 Str と phalloidin、catalase 免疫染色との多重染色を行い局在性を比較した。電顕組織化学:ロビクリル超薄切片をコロイド金標識 Str を用いて染色した。電気泳動:Alpase 標識 Str を用いて染色し、Str の各齢の結合蛋白量を比較した。リアルタイム PCR:組織の全 cDNA を作製し、pyruvate carboxylase の各齢の遺伝子発現量を比較した。

【結果と考察】Str の染色では、成体においては、小棍棒状の反応産物が尿細管の各部位と集合管に観察された。なかでも近位尿細管の蛍光が強かった。電顕観察によりミトコンドリアであることを確認した。発達過程の形態的に未成熟な組織は反応陰性で、成熟した組織は反応陽性となった。同じ時期の尿細管において、catalase の染色も陽性となった。一方、phalloidin は、未成熟な管においての内腔面が陽性となった。電気泳動・リアルタイム PCR において、蛋白質・遺伝子発現の量は組織の成熟とともに増加し、組織染色の所見と一致した。以上の結果から、catalase がペルオキシゾームのマーカーとして、一方、Str はミトコンドリアのマーカーとして、ネフロン成熟の形態学的な指標となることが示された。