



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

Title	臨床応用の可能なマウス型モノクローナル抗体の作製 - 早期癌診断へのモノクローナル抗体2H6の応用 -(内容の要旨)
Author(s)	原田, 弘智
Report No.(Doctoral Degree)	博士(農学) 甲第022号
Issue Date	1995-03-14
Type	博士論文
Version	
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/2363

この資料の著作権は、各資料の著者・学協会・出版社等に帰属します。

氏 名 (本籍)	原 田 弘 智 (秋田県)
学 位 の 種 類	博士 (農学)
学 位 記 番 号	農博甲第 2 2 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 7 年 3 月 1 4 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 及 び 専 攻	連合農学研究科 生物生産科学専攻
研究指導を受けた大学	信州大学
学 位 論 文 題 目	臨床応用の可能なマウス型モノクローナル抗体 の作製 — 早期癌診断へのモノクローナル抗体 2 H 6 の応用 —
審 査 委 員	主査 信州大学教授 唐 澤 豊 副査 信州大学教授 大 谷 元 副査 信州大学教授 佐々木 晋 一 副査 静岡大学教授 森 誠 副査 岐阜大学教授 金 丸 義 敬

論 文 の 内 容 の 要 旨

胃癌は、肺癌と並び死亡率の高い癌であるが、過去 40 年間の胃癌の死亡率は、胃癌の早期診断体制の整備とともに著しく減少してきている。しかし今後更に胃癌死亡率を減少させるためには、受診者の苦痛が少なく放射線の被爆のない簡便な新しい検診法の開発が望まれ、本研究はそのような社会的要請に答えるために、少量の血液で早期診断が可能な胃癌の腫瘍マーカーを開発しようとして行われたものである。そこで本研究では、腫瘍の細胞表面に取り込まれ細胞表面の化学構造を修飾する Cholesteryl-hemisuccinate (CHS) で免疫原性を増強した胃癌細胞株 MKN-45 をマウスに免疫して目的とするモノクローナル抗体を作製し、得られたモノクローナル抗体 2 H 6 (2 H 6 抗体) に対応する抗原 (2 H 6 抗原) の性状と癌患者の血清中 2 H 6 抗原レベルの臨床的意義を調べている。各種癌細胞株、正常繊維芽細胞、正常末梢血細胞および正常ヒトリンパ球刺激細胞に対する 2 H 6 抗体の反応性を間接蛍光抗体法で調べ、2 H 6 抗体は検索したほとんどの胃癌細胞株と腺癌由来の癌細胞株にのみ反応することを示し、これは 2 H 6 抗体が腺癌由来の癌細胞株に高い特異性を持っていることを示唆しているとしている。次にヒト血清から 5 段階の操作方法

(硫酸デキストラン処理, Q Sepharose fast flow, 2H6 affinity chromatography, Seph acry S-300およびProtein A column chromatography)で2 H 6抗原を2, 400倍まで精製し, 分子量をSDS-PAGEで調べた結果, 推定分子量230-250, 75, 68および55 kDaのバンドを認めている. これらの得られたバンドについてウェスタンブロット法で2 H 6抗原に対する反応性を調べた所, 反応性は認められず, この結果から2 H 6抗体はコンフォーメーション認識抗体であることを示唆した. また2 H 6抗体に認識される2 H 6抗原を各種酵素や試薬で処理した後, サンドイッチELISAでそれぞれの2 H 6抗原性を調べたところ, 2 H 6抗原の抗原性はプロテアーゼ処理, 過ヨウ素酸ナトリウム処理あるいはフコシダーゼ処理で低下することから, 2 H 6抗原はフコースを含む糖タンパク質であることを示唆した. 2 H 6抗原の臨床的な血清学的意義を明らかにする目的で各種疾患患者の血清2 H 6抗原レベルをサンドイッチELISAで測定した結果, 抗原レベル300 units/ml以上を陽性とした場合, 検索したすべての癌患者の陽性率は60%であり, 食道癌, 肝癌, 胃癌の順に高かったのに対し, 健常人と良性疾患患者の偽陽性率は1.2から8.3%と低かったため, この血清マーカーは悪性疾患と良性疾患の識別に有効であることを示唆した. 更に本研究では, 胃癌の各ステージ別の2 H 6抗原の陽性率を調べ, この陽性率が進行度に比例して高くなるが早期の胃癌でも約60%と比較的高い陽性率を示すことを明らかにし, 2 H 6抗原が胃癌の早期診断にも使用可能なマーカーであることを示唆した.

以上の結果から, 原田論文は血清2 H 6抗原は良性疾患と悪性疾患の識別に臨床的に応用可能なマーカーであることを示唆している.

審 査 結 果 の 要 旨

平成7年1月19日(木)に信州大学農学部において, 審査員を含む関連教官, 学生多数の出席のもと, 原田論文の公開発表会がおこなわれ, 引き続き質疑応答が行われた.

原田論文の研究の背景には, 癌疾患の中で胃癌が, 現在でも肺癌や大腸癌と共に世界的に見て最も代表的な癌の一つであり, わが国では, 1950年代後半から1960年代前半に胃X線二重造影法, X線テレビ, 胃内視鏡等が開発され, さらに1960年代半ばから間接X線検査による胃癌検診システムも整備され, 胃癌の早期発見, 診断, 治療の体制の確立とともに, 胃癌死亡者数は著しく減少しているにもかかわらず, 胃癌罹患者数はむしろ増加する傾向があり, その傾向は特に高齢者に顕著に見られるという現状がある. 従って, 現在でも胃癌罹患者の早期発見のための新しい技術の発見と普及の必要性はいささかも低下していない. とりわけ, 受診者に時間, 費用及び労力の点で負担がかからず, X線被爆のおそれや苦痛の無い早期診断法の開発は, 検診受診率の向上とそれに伴う早期発見, 早期治療のためには, もっとも緊急かつ重要な課題であるとの認識のもとに本研究は実施された.

原田論文は, Clinica Chimica Actaに発表された二編(228:101-112, 228:195-203, 1994)の基礎となる学術論文を中心にまとめられている. 本論文では, 従来の早期診断法のい

くつかの隘路を開く有望な検査方法として、腫瘍マーカー法を取り上げ、有効な腫瘍マーカーを開発することを目的としてマウス型モノクローナル抗体を作成しこれの実用の可能性を検討し、次の点を明らかにした。

1) Cholesteryl-hemisuccinateで修飾した胃癌細胞株MKN-45をマウスに免疫し作製したモノクローナル2H6抗体は(2H6抗体)、検索したすべての胃癌細胞株と線癌細胞株に高い反応性を持っている。2) ヒト血清から5段階の精製法で2、400倍まで精製した2H6抗原は、SDS-PAGEでは推定分子量250、75、68および50 kDaのバンドが認められ、得られたバンドのウェスタンブロット法での2H6抗原に対する反応性は認められない。3) 2H6抗原の抗原性はプロテアーゼ処理、過ヨウ素酸ナトリウム処理およびフコシダーゼ処理で低下する。4) 抗原レベル300units/ml以上を陽性とした場合、検索した全ての癌患者の陽性率は約60%であり、食道癌、肝癌、胃癌の順に高かったのに対し、健常人および良性疾患患者の偽陽性率は1.2から8.3%と低い。5) 胃癌の各ステージ別の2H6抗原の陽性率は進行度に比例して高くなったが、早期の胃癌でも約60%の高い陽性率を示した。

以上の結果に基づいて申請者は、モノクローナル抗体2H6は腺癌由来の癌細胞株に高い特異性を持っており、コンフォーメーション認識抗体であること、また2H6抗原はフコースを含む糖タンパク質で、良性と悪性疾患の識別に有効であり、特に胃癌の早期診断に応用可能であることを示唆した。

本論文は、作製したマウス型モノクローナル抗体2H6に対する2H6抗原の安定性の問題等、実用に当たってはまだ解決されなければならない点があるものの、社会的要請の強い新しい癌の早期診断法による癌死低減の可能性を提示したものとして、博士学位論文に相当すると評価し、合格とした。