

氏 名 (本籍) たん の ひろ あき
 丹 野 弘 晃

学 位 の 種 類 医 学 博 士

学 位 記 番 号 医 博 第 9 5 5 号

学 位 授 与 年 月 日 昭 和 6 1 年 3 月 2 5 日

学 位 授 与 の 要 件 学 位 規 則 第 5 条 第 1 項 該 当

研 究 科 專 攻 東 北 大 学 大 学 院 医 学 研 究 科
 (博 士 課 程) 外 科 学 系 專 攻

学 位 論 文 題 目 Radioimmunodetection of Hepatoma with
 Radiolabeled Antibodies to Hepatoma-
 Associated Antigens.
 (肝 癌 関 連 抗 原 に 対 す る 抗 体 を 用 い た 免 疫 学 的 局
 在 診 断)

(主 査)

論 文 審 査 委 員 教 授 佐 藤 寿 雄 教 授 京 極 方 久

 教 授 橋 武 彦

論文内容要旨

癌関連抗原に対する抗体を用いた診断と治療の試みが、盛んに行われているが、血中に抗原が存在する場合の投与抗体の動態については、不明な点が多い。そこで、実験Ⅰではラットにおいて、アルファフェトプロテイン (AFP) をモデル抗原として、AFP産生腫瘍と人工的に表面にAFPを固定したビーズとの間で、抗AFP抗体の集積を比較検討した。この結果に基づいて、実験Ⅱでは、ヒト肝癌の特異的診断及び治療に有用な抗原を見いだす目的で、ヒト肝癌培養株を免疫原として、マウスモノクローナル抗体 (MoAb) を作製した。さらに、実験Ⅲにおいては、実験Ⅱで作製した抗体の中から、臨床応用の期待がもてるMoAbを選択し、これを利用してヌードマウス移植肝癌の免疫学的局在診断を試みた。

実験Ⅰ

AFPの細胞表面固定化モデルとして、AFP結合アクリルビーズ (AFP-B) を作製し、AFP-Bのみをドンリ्यूラットに皮下移植した群を正常群、AFP産生A H66肝癌とAFP-Bを共に移植した群を腫瘍群とした。さらに、腫瘍群に、血中AFPを低下させる目的で、全血交換を施行した群を交換群とした。これら3群のラットに、放射標識抗AFPウサギ抗体を静注し、経時的にシンチグラムを撮影し、かつラットを屠殺して各臓器の放射能を測定した。

抗体投与5日後の各群ラットのシンチグラムにおいて、3群ともAFP-B部への標識抗体の集積が認められ、血中AFP値がほぼ0の正常群で、最も明瞭であった。しかし、腫瘍部への標識抗体の集積は、認められなかった。AFP-Bの組織血液比は、正常群で 17.43 ± 5.55 と腫瘍群での 6.66 ± 1.67 に比べ有意に高く、また、血液交換を施行し、血中AFPを低下させると 11.20 ± 0.25 に増加した。腫瘍の組織血液比は、 0.33 ± 0.02 で、血液交換にても変化せず、抗AFP抗体の有意な集積は、認められなかった。組織のマイクロオートラジオグラフィーにても、AFP-B表面への標識抗体の結合が確認されたが、腫瘍細胞表面及び細胞内には、標識抗体は存在しなかった。また、投与抗体は、血中AFPと、投与1分後から、すでに免疫複合体を形成していた。

以上より、AFPの如く、細胞表面にはほとんど存在せず、血中に分泌される抗原は、その抗体を用いた局在診断及び治療に適さないと考えられた。

実験Ⅱ

実験Ⅰの結果を踏まえ、ヒト肝癌の細胞表面に存在し、sheddingしにくいような抗原を見いだす目的で、肝癌培養株 (Li-7またはHuH-7) に対するMoAbを作製した。肝癌培養株を

BALB/cマウスに免疫し、免疫脾細胞とSp-2ミエローマ細胞をPEGを用いて融合した。得られたMoAbの特異性は、各種培養細胞及び正常細胞との蛍光抗体法による反応性にて検討した。組織上での反応性は、肝癌組織及び正常組織の凍結切片を用いて、酵素抗体法（ABC法）にて検索した。また、Li-7細胞表面を¹²⁵Iで標識し、その可溶化分画よりMoAbと反応する抗原を精製し、SDS-PAGEにて分子量を決定した。

得られたMoAbの中で、L-8-1は、蛍光抗体法にて、2種の肝癌細胞株、1種の単球由来細胞株、1種の食道癌細胞株とのみ反応し、線維芽細胞、血液細胞とは反応しなかった。肝癌組織との反応性は、6例中5例に陽性と高率で、肝細胞腺腫及び正常肝とは反応しなかった。他の正常組織との反応性は、腎の近位尿管及びヘンレのループ、胃・大腸の腺組織等に陽性であった。また、L-8-1のisotypeは、IgG2aで、認識する抗原分子は、分子量18Kd、蛋白分解酵素にて抗原性を失い、肝癌細胞培養上清中には検出されなかった。

実 験 III

L-8-1抗体は、肝癌組織と高率に反応し、正常肝と反応せず、かつ分泌またはsheddingしにくい抗原を認識している点などから、免疫学的局在診断への応用を試みた。肝癌移植ヌードマウスに、¹³¹I標識L-8-1及び¹²⁵I標識正常マウスIgGを尾静脈より同時に投与し、3日後にシンチグラムを撮影し、かつヌードマウスを屠殺し、それぞれの抗体の局在を検索した。

標識抗体投与3日後のシンチグラムでは、まだ血中放射能が高いものの、皮下移植された腫瘍部位が明瞭に描出され、L-8-1の腫瘍への集積が示された。この時の腫瘍1gあたりに集積したL-8-1抗体の量は、投与量全体の6.7%で、肝1.7%、脾1.7%、腎1.7%、肺2.2%等に比で、有意に高かった。コントロール抗体の集積量は、すべての臓器で、1g当たり2%以下であった。

以上より、L-8-1抗体は、ヒト肝癌組織と高率に反応し、かつ移植肝癌への集積性にも優れ、正常肝とは反応しない点などから、臨床応用も可能と考えられた。

審査結果の要旨

癌の特異的診断と治療を目的とした癌関連抗原に対する抗体の利用が現在、盛んに行われている。しかし、血中に抗原が存在する場合の投与抗体の動態に関しては、いまだ不明な点が多い。本研究ではこの点に着目し、AFP をモデル抗原として、AFP 分泌性の腫瘍細胞と AFP 表面固定化ビーズの両者への、抗 AFP 抗体の集積度を血中 AFP 値を考慮しながら比較検討している。その結果、抗 AFP 抗体は、細胞表面にほとんど抗原が存在しない腫瘍細胞には集積せず、AFP 固定化ビーズには著明な集積を認めている。また、血中に抗原が存在すると、投与抗体は、すみやかに免疫複合体を形成し、抗原産生部位への到達が阻害され、血中抗原濃度が高いほど、抗体の集積度は低下している。以上の成績より、細胞表面に存在し、血中に分泌または Shedding しにくい抗原が、その抗体を用いた局在診断及び治療に最適であるという明確な結果を得ている。

本研究ではさらに、この結果を踏まえ、ヒト肝癌の局在診断及び治療に有用な抗原を見出す目的で、ヒト肝癌に対するマウスモノクローナル抗体を作製している。ヒト肝癌に対するモノクローナル抗体の報告は、数報散見されるが、正常肝組織と交叉反応を示したり認識する抗原が分泌性であったりして、臨床応用の期待できる抗体はほとんどないのが現状である。本研究において作製した L-8-1 抗体は、肝癌組織と高率に反応し、正常肝と反応せず、認識する抗原が分泌または Shedding しにくい点などから、臨床応用への可能性があるものと考えられた。さらに本研究では、肝癌移植ヌードマウスを用いて、L-8-1 抗体の集積性についても検討を加えており、肝癌移植部への特異的集積を確認している。

以上より、L-8-1 抗体は、肝癌組織と高率に反応し、かつ移植肝癌への集積性にもすぐれ、正常肝と反応しない点などから、この抗体は臨床応用の可能性があるものと考えられた。本研究によって得られた成果は癌の特異的診断と治療の研究に大きな貢献をするものである。よって本研究は学位授与に値するものと認める。