

肺癌関連モノクローナル抗体の 免疫組織化学的解析

第1編

ヒト intermediate cell type 肺小細胞癌細胞株 (SBC-1) に対するモノクローナル抗体の作製と解析

岡山大学医学部第2内科 (主任: 木村郁郎教授)

中 村 邦 彦

(昭和62年1月28日受稿)

Key words : Small cell lung cancer
Monoclonal antibody
Immunohistochemical study

緒 言

各種腫瘍細胞にはその由来した正常細胞の有する抗原の他に種々の腫瘍関連抗原が発現している。この腫瘍関連抗原の大部分のものは正常細胞あるいは胎生期の細胞に存在する抗原であるが、そのほか腫瘍特異抗原が存在するものと考えられてきた。従来よりこの解析のため吸収異種抗血清が用いられてきたが、1975年 Köhler と Milstein¹⁾によりモノクローナル抗体の作製法が確立されて以来、ヒト癌についても腫瘍特異抗原あるいは腫瘍関連抗原の解析を目的として多数のモノクローナル抗体が作製・解析²⁻⁴⁾され、その一部のものについては臨床診断に応用され⁵⁾、また治療への応用⁶⁾も試みられている。

ヒト肺癌は組織型により治療方法が異なり、また集学的治療をもってしてもなお治癒せしめることは困難で、新しい早期診断技術ならびに治療方法の開発が必要である。これら解決の一方法として肺癌においても各種肺癌関連モノクローナル抗体が作製・解析されてきた⁷⁻¹⁵⁾。教室においても現在まで肺腺癌¹⁶⁾、oat cell type

肺小細胞癌¹⁷⁾、肺類表皮癌¹⁸⁾に対するモノクローナル抗体を作製、それぞれ臨床応用の可能性が示唆された。今回あらたに intermediate cell type 肺小細胞癌株細胞、SBC-1 に対するモノクローナル抗体を作製、肺癌およびその他の癌組織ならびに正常組織に対するこれら抗体の反応性を免疫組織学的手法を用いて検討、解析したので報告する。

実験材料および方法

1. 細胞

免疫細胞として用いた intermediate cell type 肺小細胞癌株細胞 (SBC-1¹⁹⁾) は、手術時組織診断が intermediate cell type 肺小細胞癌であった49歳、男性患者の癌性胸水より培養樹立したもので、浮遊状態で増殖し、細胞形態学的ならびにヌードマウス移植 SBC-1 腫瘍の組織形態はいずれも intermediate cell type 肺小細胞癌の特徴を有していた。細胞融合の親細胞としてはマウス骨髄腫細胞、P3-NSI/1-AG-1 (NS-1²⁰⁾) を 8-azaguanine を含む10% 胎児牛血清加 RPMI 1640 培養液にて培養、維持し用いた。

抗体特異性の検討には肺癌細胞株 7 系; intermediate cell type 肺小細胞癌株 4 系 (SBC-1, SBC-2, SBC-4, SBC-5), oat cell type 肺小細胞癌株 (SBC-3), 肺類表皮癌細胞株 (EBC-1), 肺腺癌細胞株 (ABC-1), 造血器腫瘍細胞株 14 系; 急性リンパ球性白血病細胞株 8 系 (NALL-1, KOPN-1, NALM-1, NALM-18, BALL-1, MOLT-3, MOLT-4, TALL-1), 成人 T 細胞性白血病細胞株 2 系 (MT-1, MT-2), 骨髄性白血病細胞株 2 系 (K-562, HL-60), Burkitt's lymphoma 細胞株 2 系 (Raji, Daudi), その他の腫瘍細胞株 4 系; 大腸癌細胞株 (RPMI4788), 肝癌細胞株 (PLC/RPF/5), 子宮頸癌細胞株 (HeLa), 黒色腫細胞株 (DND-1A), ならびに正常 B 細胞株 4 系; (K-81, K-103, K-105, RC-106), 肝細胞株 1 系 (Chang) を用いた。

そのほか正常ヒト赤血球, 末梢単核球, 顆粒球, 骨髄細胞およびヒツジ赤血球についても検討した。

2. 組織

新鮮手術材料または死後 6 時間以内の剖検材料を用い, 凍結切片あるいは 10%ホルマリン固定後パラフィン包埋切片を作製した。肺癌の組織分類は日本肺癌学会編肺癌取り扱い規約に従った。

3. モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞および腹水抗体の作製

BALB/c マウス (7 週令, 雌) の腹腔内に SBC-1 細胞 1×10^7 個を 2 週間隔で 3 回免疫し, 最終免疫後 3 日目に脾細胞を得, 春田²¹⁾の方法に準じて NS-1 細胞と polyethyleneglycol (分子量 4,000, Koch-Light, England) を用い細胞融合した。得られた抗体産生ハイブリドーマ細胞は限界希釈法にて 3 回以上クロニングを繰り返し, モノクローナル抗体産生クローン細胞株を得た。抗体スクリーニングは培養液上清を用い SBC-1, 各種細胞株カクテル (NALL-1, BALL-1, TALL-1) およびヒト赤血球を標的細胞として間接膜蛍光抗体法にて行った。得られたクローン株細胞をプリスタン処理 BALB/c マウスの腹腔内に接種, 得られた腹水抗体を用い以下の実験を行った。陰性

対照としては NS-1 細胞を同様の方法で接種し得られた腹水を用いた。

4. モノクローナル抗体の解析

生細胞膜に対する抗体の反応性は間接膜蛍光抗体法で, 一方組織すなわち凍結切片あるいはパラフィン包埋切片に対する反応性は間接酵素抗体法にて解析した。

間接膜蛍光抗体法は 100 倍希釈の腹水抗体を用い通常の方法にて行い, 落射型蛍光顕微鏡 (オリンパス) 1,000 倍にて観察, 陽性細胞率 75% 以上を (++) , 75~25% を (+) , 25~5% を (±) , 5% 以下を (-) とした。なお抗体の免疫グロブリン・サブクラスの決定は FITC 標識ヤギ抗マウス IgG, IgM, IgA (Cappel, USA) を用い間接膜蛍光抗体法で調べた。

組織に対する抗体の反応性を検討するにあたり, まず固定の抗原性に及ぼす影響を検討した。すなわち SBC-1 細胞小塊の凍結切片²²⁾あるいはパラフィン包埋切片を作製²³⁾, 凍結切片についてはエタノール, アセトン, PLP²⁴⁾ (0.01 M 過ヨウ素酸, 0.075 M リジン, 2% パラホルムアルデヒド) あるいは PFA (4% パラホルムアルデヒド, 8% ショ糖加 0.1 M 磷酸緩衝液, pH 7.4) 固定液にて 4℃, 20 分固定し, 一方パラフィン包埋切片はキシレン, エタノールで脱パラした後, 0.15 M 磷酸緩衝液, pH 7.4 にて洗浄した。いずれの固定切片においても以下に述べる間接酵素抗体法をおこない抗体反応性を比較検討した。この結果, 表 3 に示したごとく, 検討した抗体の反応性は PFA 固定ならびにパラフィン包埋切片において 4 種の抗体で共に強い反応として観察された。しかしアセトン, エタノール, PLP で固定した切片においては抗体の反応性に減弱が認められた。以上より, 組織に対する反応性の検討は PFA 固定凍結切片あるいはパラフィン包埋切片についておこなった。

間接酵素抗体法は, まず 1 次抗体を非特異反応を防止する目的で 400 倍希釈腹水抗体に 10% 正常ヤギ血清を加えたものとし, 室温で 30 分反応させ, 洗浄後ペルオキシダーゼ標識ウサギ抗マウス免疫グロブリン (DAKO, Denmark) を 2 次抗体として同様に反応させた。2 次抗体

はヒト肺アセトン処理粉末で吸収後5%ヒトA B型血清加燐酸緩衝液で20~40倍に希釈し用いた。洗浄後0.1%アジ化ナトリウム, 0.02% 3,3'-ジアミノベンチジン4塩酸, 0.005%過酸化水素加0.05 M トリス塩酸緩衝液, PH 7.6中にて室温5分反応, その後マイヤー・ヘマトキシリンで10分間核染色し脱水, 封入した。

結 果

1. モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞株の樹立と抗体

細胞融合により得られた多数のモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞株のうち, スクリーニングの結果, 興味あるものと考えられた4系を選びそれぞれの産生する抗体をLSI-a, LSI-b, LSI-c, LSI-dと命名した。このうち

LSI-cはSBC-1, NALL-1細胞ならびにO型赤血球と反応したが、他の3系(LSI-a, -b, -d)はスクリーニングに用いたNALL-1, BALL-1, TALL-1および赤血球とは反応せずSBC-1のみと反応した。しかし非小細胞肺癌細胞株であるABC-1とEBC-1への反応は表1に示すごとくそれぞれ異なっていた。

4種いずれの抗体もマウスIgM抗体であり, その反応抗原は固定法の検討結果(表3)過ヨウ素酸を含むPLP固定に対し4種共に不安定であり, いずれも糖鎖を抗原決定基に含む抗原と考えられた。

2. 各種培養株細胞ならびに正常造血細胞に対する反応性

LSI-a, -b, -c, -d 4種の抗体の培養株細胞ならびに正常造血細胞に対する反応性を間接膜

表1 培養株細胞に対するモノクローナル抗体の間接膜蛍光抗体法で検討した反応性

CELL LINE	REACTIVITIES WITH ANTIBODIES;			
	LSI-a	LSI-b	LSI-c	LSI-d
Lung cancer;				
SBC-1 (Small, intermediate)	++	++	++	++
SBC-2 (" , ")	++	++	++	++
SBC-4 (" , ")	++	++	++	++
SBC-5 (" , ")	-	-	-	-
SBC-3 (Small, oat)	-	-	-	-
ABC-1 (Adenocarcinoma)	±	+	++	+
EBC-1 (Epidermoid)	±	±	+	++
Other tumor;				
NALL-1 (Null-ALL)	-	-	++	-
KOPN-1 (")	-	-	-	-
NALM-1 (Pre-B)	-	-	-	-
NALM-18 (")	-	-	-	-
BALL-1 (B-ALL)	-	-	-	-
MOLT-3 (T-ALL)	-	-	-	-
MOLT-4 (")	-	-	-	-
TALL-1 (")	-	-	-	-
MT-1 (ATL)	-	-	-	-
MT-2 (ATL)	-	-	-	-
K-562 (CML-BC)	-	-	-	-
HL-60 (APL)	-	-	-	-
Raji (Burkitt lymphoma)	-	-	-	-
Daudi (")	-	-	-	-
RPMI 4788 (Colon cancer)	-	-	-	-
PLC/RPF/5 (Hepatoma)	-	-	-	-
HeLa (Cervical cancer)	-	-	-	-
DND-1A (Melanoma)	-	-	-	-
Normal;				
K-81 (B-lymphocyte)	-	-	-	-
K-103 (")	-	-	-	-
K-105 (")	-	-	-	-
RC-106 (")	-	-	-	-
Chang (Liver cell)	-	-	-	-

表2 正常造血細胞に対するモノクローナル抗体の間接膜抗体法で検討した反応性

NORMAL HEMATOPOIETIC CELLS	REACTIVITIES WITH ANTIBODIES;			
	LSI-a	LSI-b	LSI-c	LSI-d
Peripheral blood cells;	—	—	—	—
Mononuclear cells	—	—	—	—
Granulocyte	—	—	—	—
Erythrocytes;				
A type	—	—	—	—
B "	—	—	—	—
AB "	—	—	—	—
O "	—	—	+	—
Spleen cells	—	—	—	—
Bone marrow cells	—	—	—	—
Sheep erythrocytes	—	—	—	—

表3 固定法別に間接酵素抗体法で検討した SBC-1 細胞切片に対するモノクローナル抗体の反応性

FIXATION METHODS	REACTIVITIES WITH ANTIBODIES;			
	LSI-a	LSI-b	LSI-c	LSI-d
Aceton	+	+	±	+
Ethanol	±	—	±	±
PLP	±	—	±	±
PFA	+	+	+	+
Paraffin embedded	+	+	+	+

PLP; Periodate-lysine-paraformaldehyde

PFA; 4% paraformaldehyde 8% sucrose in 0.1M phosphate buffer, pH7.4

Cells were stained strongly(+), weakly(±) or negatively(—)

蛍光抗体法で検討した結果を表1, 2にそれぞれ示した。これら4種の抗体はいずれも intermediate cell type 肺小細胞癌細胞株の4系の内3系(SBC-1, -2, -4)のほぼ100%の細胞と反応したが, 1系の intermediate cell type 肺小細胞癌株(SBC-5)および oat cell type 肺小細胞癌株(SBC-3)とはまったく反応しなかった。一方肺腺癌株, ABC-1 および肺類表皮癌株, EBC-1 に対しては4種の抗体いずれも反応したがその反応陽性率は異なっており, 特に LSI-a の ABC-1, EBC-1 への陽性率は25%以下と低率であった。

その他の細胞株および正常造血器細胞に対しては LSI-c が NALL-1 と O 型赤血球に反応した以外ヒツジ赤血球も含めまったく反応は認められなかった。

3. 固定法の抗体反応抗原に及ぼす影響

5種類の固定法を行った SBC-1 細胞切片につき、抗体を間接酵素抗体法にて反応させ、固定の反応抗原に及ぼす影響を染色性の強さで検討した(表3)。この結果、パラフィン包埋および PFA 固定では十分強い染色が4種類の抗体で共に認められた。一方、凍結切片の PLP あるいはエタノール固定においては抗原性はいずれの抗体を反応させた場合にも明らかに減少し、またアセトン固定では LSI-c 反応抗原のみで反応性の減弱がみられた。

4. 各種腫瘍組織に対する反応性

表4に肺癌35症例および非肺癌15症例より得た癌組織に対する4種のモノクローナル抗体(LSI-a, -b, -c, -d)の反応性を間接酵素抗体法で検討した結果を示した。

表4 腫瘍組織に対するモノクローナル抗体の間接酵素抗体法で検討した反応性

TUMOR TISSUES	REACTIVITIES WITH ANTIBODIES;			
	LSI-a	LSI-b	LSI-c	LSI-d
Lung cancer;	*			
Small cell (intermediate type)	4/ 8	0/ 8	5/ 8	0/ 8
Small cell (oat cell type)	0/ 3	0/ 3	0/ 3	0/ 3
Epidermoid	4/10	4/10	6/10	4/10
Adenocarcinoma	6/12	6/12	7/12	4/12
Metastatic colon cancer	0/ 2	0/ 2	0/ 2	0/ 2
Other tumor;				
Stomach	2/ 2	2/ 2	2/ 2	2/ 2
Gall bladder	1/ 1	1/ 1	1/ 1	1/ 1
Pancreas	1/ 1	1/ 1	1/ 1	1/ 1
Colon	0/ 1	0/ 1	0/ 1	0/ 1
Liver	0/ 1	0/ 1	0/ 1	0/ 1
Kidney	0/ 1	0/ 1	0/ 1	0/ 1
Urinary bladder	0/ 1	0/ 1	0/ 1	0/ 1
Thyroid	0/ 1	0/ 1	0/ 1	0/ 1
Ovary	0/ 1	0/ 1	0/ 1	0/ 1
Cervix	0/ 1	0/ 1	0/ 1	0/ 1
Brain	0/ 2	0/ 2	0/ 2	0/ 2
Neuroblastoma	0/ 1	0/ 1	0/ 1	0/ 1
Histiocytoma	0/ 1	0/ 1	0/ 1	0/ 1

* No. of positive cases / No. of cases tested

表5 正常組織に対するモノクローナル抗体の間接酵素抗体法で検討した反応性

NORMAL TISSUES	REACTIVITIES WITH ANTIBODIES;			
	LSI-a	LSI-b	LSI-c	LSI-d
	*			
Lung (Alveoli)	0/19	0/19	0/19	0/19
(Bronchioles)	4/ 5	3/ 5	3/ 5	2/ 5
Stomach	2/ 2	2/ 2	2/ 2	2/ 2
Small intestine	1/ 1	1/ 1	1/ 1	1/ 1
Large intestine	0/ 1	0/ 1	0/ 1	0/ 1
Liver (Hepatic cell)	0/ 1	0/ 1	0/ 1	0/ 1
(Bile duct cell)	1/ 1	1/ 1	1/ 1	1/ 1
Pancreas	2/ 2	2/ 2	2/ 2	2/ 2
Kidney	0/ 2	0/ 2	0/ 2	0/ 2
Urinary bladder	0/ 1	0/ 1	0/ 1	0/ 1
Testis	0/ 1	0/ 1	0/ 1	0/ 1
Thyroid	0/ 2	0/ 2	0/ 2	0/ 2
Adrenal gland	0/ 2	0/ 2	0/ 2	0/ 2

* No. of positive cases / No. of cases tested

原発性肺癌に対し、LSI-a は intermediate cell type 肺小細胞癌の 8 例中 4 例と反応し、その反応性は強いものであった (図 1)。

また、この抗体は類表皮癌および腺癌ともそれぞれ 4/10、6/12 症例と比較的弱く反応した。LSI-c の反応パターンは LSI-a のそれに類似

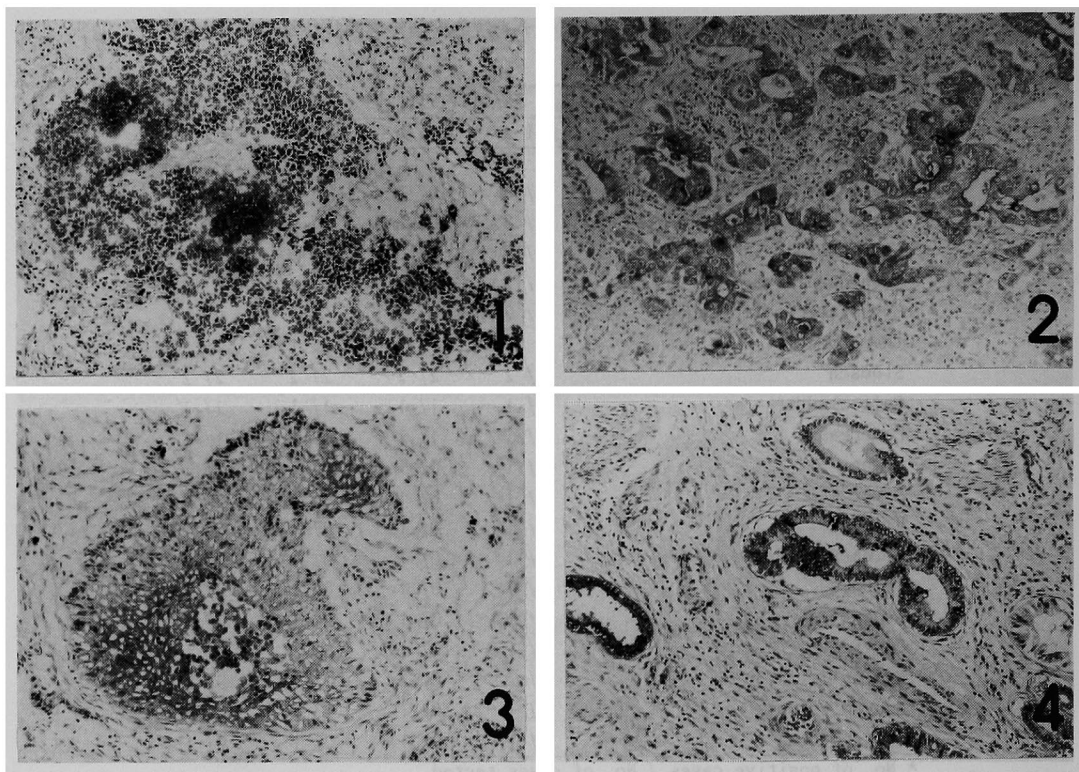


図1 intermediate cell type 肺小細胞癌組織に対する LSI-a の間接酵素抗体法で検討した反応性 (凍結切片, $\times 100$)
 図2 肺腺癌組織に対する LSI-c の間接酵素抗体法で検討した反応性 (パラフィン包埋切片, $\times 100$)
 図3 肺類表皮癌組織に対する LSI-b の間接酵素抗体法で検討した反応性 (凍結切片, $\times 100$)
 図4 胆嚢癌組織に対する LSI-a の間接酵素抗体法で検討した反応性 (パラフィン包埋切片, $\times 100$)

しており intermediate cell type 肺小細胞癌, 類表皮癌および腺癌 (図2) のそれぞれ 5/8, 6/10, 7/12 症例と反応した。一方, LSI-b と LSI-d はともに intermediate cell type 肺小細胞癌とは反応せず一部の類表皮癌 (図3) および腺癌とのみ反応した。4種の抗体はいずれも 3例の oat cell type 肺小細胞癌および大腸癌の肺移転には反応しなかった。肺癌以外の腫瘍については表のごとく検討したが, 4種の抗体はいずれも胃癌, 胆嚢癌 (図4), 肝臓癌と反応するものであった。しかし検討したその他のものとは反応しなかった。

これら腫瘍組織の反応と患者の血液型 (ABO 式) との間に関連性は認められなかった。

5. 各種ヒト正常組織に対する反応性

正常組織に対する反応性を間接酵素抗体法で表5のごとく検討した。この結果, 4種の抗体はいずれも同様の反応を呈した。すなわち肺組織においてはいずれの抗体も気管支上皮および気管支腺と反応したが, 肺胞上皮, 間質, 浸潤細胞とは反応しなかった。肺組織以外では胃および小腸の腺組織, 脾臓の腺房と導管ならびに肝内胆管と反応した。しかし, 大腸, 腎臓, 膀胱, 睾丸, 甲状腺, 副腎組織に対してはまったく反応性を示さなかった。

考 察

近年我が国においても増加傾向の認められる肺癌は, 現在の集学的治療をもってしてもなおその治療に限界があり, 治癒せしめることは困難である。しかし組織学的に検討してみると,

進展様式、臨床像、各種治療効果ならびに予後は著しく異なっており、この不均一な肺癌を組織型のみならず免疫学の立場において再検討することは肺癌臨床において重要な課題である。

教室においては各種肺癌細胞株を用い、モノクローナル抗体を作製・解析し、肺癌を免疫学的に解析しているが、今回著者は intermediate cell type 肺小細胞癌細胞株 (SBC-1) に対する4種のモノクローナル抗体 (LSI-a, -b, -c, -d) を作製し、その反応特異性を肺癌株細胞ならびに組織について検討した。

得られた4種の抗体はいずれも IgM 抗体で、その反応抗原はホルムアルデヒドに安定、過ヨウ素酸に不安定、トリプシンに安定であり、いずれも糖脂質抗原と考えられた。

各種株細胞に対する反応性を膜蛍光抗体法により検討した結果、4種の抗体はいずれも5系の肺小細胞癌細胞株のうち intermediate cell type の3系と反応したが oat cell type の1系、intermediate cell type の1系とは反応しなかった。さらに、いずれの抗体も肺腺癌細胞株と肺類表皮癌細胞株に反応したがその反応細胞率はそれぞれ異なっていた (表1)。一方これらの抗体は正常造血細胞、その他の株細胞に対し、LSI-c がO型赤血球および NALL-1 細胞に反応した以外まったく反応しなかった。以上の結果により、LSI-c の反応抗原は赤血球の分化抗原、その他の LSI-a, -b, -d の対応する抗原は intermediate cell type 肺小細胞癌と肺腺癌、肺類表皮癌に発現されているユニークな肺癌関連抗原であり、抗体の反応性の差はこれら抗体がそれぞれ抗原エпитープの微妙な相違を識別しているためと考えられた。

次に、腫瘍組織ならびに正常組織に対する反応性を間接酵素抗体法で検討した。この結果、4種すべての抗体は胃癌、胆嚢癌、膵癌ならびに正常胃、小腸、膵臓の腺組織、気管支上皮ならびに気管支腺組織と反応するものであり、腺組織分化抗原であることが示された。これらの抗体の肺癌組織に対する反応性は表4に示したごとく、LSI-a と LSI-c は共に intermediate cell type 肺小細胞癌と肺類表皮癌、肺腺癌に反応したが、LSI-b と LSI-d は共に肺小細胞

癌には反応せず、肺類表皮癌、肺腺癌に反応した。これらの結果は気管支腺組織と消化器腺組織に共通し発現されている腺組織分化抗原には少なくとも3種類のものが有ることを示している。すなわち 1) intermediate cell type 肺小細胞癌ならびに肺類表皮癌、肺腺癌に発現され赤血球分化にも関連した抗原 (LSI-c の反応する抗原)、2) 1) とほぼ同じで赤血球分化には関連しない抗原 (LSI-a の反応する抗原)、3) 肺類表皮癌、肺腺癌に認められるが肺小細胞癌組織には見いだせない抗原 (LSI-b, LSI-d の反応する抗原) が存在するものと考えられた。

赤血球分化と肺癌に関連した抗原については、Kasai, Iwaki⁷⁾等が肺類表皮癌細胞株を免疫し得たモノクローナル抗体が Lewis 抗原に対する抗体であり、このものは肺癌とよく関連することを報告している。また教室の羽井佐¹⁶⁾および Anger⁸⁾は肺腺癌細胞株を免疫し、H 抗原に対する抗体を作製、肺腺癌細胞膜にこの抗原が高率に発現していることを報告した。今回得られた LSI-c 反応抗原はパネル赤血球 (Ortho社, Selectogen®) を用いた検討では Lewis 抗原、あるいは H 抗原とは明らかに異なるものであった。これらの結果より、ある種の肺癌細胞には種々の型の赤血球分化関連抗原が発現しているものと考えられた。

intermediate cell type 肺小細胞癌を免疫し、モノクローナル抗体を得、解析した報告としては、1984年の Ball⁹⁾等の研究がある。この抗体は肺小細胞癌細胞と特異的に反応し、検討した他の腫瘍細胞ならびに正常細胞とは反応しないものであった。しかし、組織に対する反応性、特に正常組織への反応については検討されておらず、なお問題が残る。今回得られた抗体の特異性は肺癌株細胞に対する検討では Ball 等の結果と異なり肺癌に対し幅広い特異性を有するものと考えられたが、正常組織を検討することにより、これらのものが腺組織分化に関連した抗原であることが判明した。

正常組織に対する反応性までも検討した研究として、肺小細胞癌に対する抗体; SCLC 2051 (Tong等¹⁰⁾), Moc-1 (Leij等¹¹⁾) なら

びに肺腺癌に対する抗体; K S 1/9 (Valki等¹²⁾) がある. このうち SCLC 2051 は肺小細胞癌に, Moc-1 は肺小細胞癌と神経内分泌細胞に, また K S 1/9 は肺腺癌に高い特異性を有するものであり, 今回得られた肺組織関連抗原に対する抗体とは区別されるべきものである.

4 種のモノクローナル抗体を作製・解析し, 3 種類の腺組織分化抗原が肺癌組織に認められることが判明した. さらに, これらの抗原は肺腺癌, 肺類表皮癌および一部の intermediate cell type 肺小細胞癌に発現されており, oat cell type 肺小細胞癌には認められなかった. 以上の結果より intermediate cell type 肺小細胞癌は oat cell type 肺小細胞癌と異なり, 抗原発現の面からむしろ肺腺癌ならびに肺類表皮癌に類似していることが推測された.

結 論

intermediate cell type 肺小細胞癌株細胞, SBC-1 を免疫細胞とし, 4 種のモノクローナル抗体を作製, 主に組織に対する反応性を酵素抗体法で解析し, 以下の結論を得た.

1) 4 種の抗体はいずれも肺癌株細胞, 肺癌組織と反応したが, 肺癌組織特異性を有していなかった.

2) 反応抗原はすべて腺組織分化抗原で, 抗体の反応パターンより, 赤血球と関連したもの, 赤血球とは関連性の無いもの, 肺小細胞癌組織に認められ無いものの3種類に区別され, その差異は同一糖脂質抗原の抗原エпитープの差によると考えられた.

3) 4 種いずれの抗体も oat cell type 肺小細胞癌に反応せず, intermediate cell type 肺小細胞癌の抗原発現パターンは oat cell type 肺小細胞癌よりむしろ非肺小細胞癌のそれに類似していた.

稿を終えるに臨み御指導ならびに御校閲戴きました恩師木村郁郎教授に謝意を捧げますと共に, 研究に際して御指導戴きました坪田輝彦講師に深謝致します.

なお本論文の要旨は第12回日本臨床免疫学会総会および第43回日本癌学会総会にて発表した.

文 献

1. Köhler G and Milstein C: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* (1975) **256**, 495-497.
2. Ritz J, Pesado J M, McConally N J, Lazarus H and Schlossman S F: A Monoclonal antibodies to human acute lymphoblastic leukemia antigen. *Nature* (1980) **283**, 583-585.
3. Koprowski H, Steplewski Z, Herlyn D and Herlyn M: Study of antibodies against human melanoma produced by somatic cell hybrids. *Proc Natl Acad Sci USA* (1978) **75**, 3405-3409.
4. Schlom J, Wunderlich D and Teramoto Y A: Geranation of human monoclonal antibodies reactive with human mammary carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* (1980) **77**, 6841-6845.
5. Koprowski H, Steplewski Z, Mitchell K, Herlyn M, Herlyn D and Fuhrer P: Colorectal carcinoma antigens detected by hybridoma antibodies. *Somatic Cell Genet* (1979) **5**, 957-972.
6. Levy R and Miller R A: Tumor therapy with monoclonal antibodies. *Fed Proc* (1983) **42**, 2650-2656.
7. Iwaki Y, Kasai M, Terasaki P I, Bernoco D, Park M S, Cicciarelli J, Heintz R, Saxton R E, Burk M W and Morton D L: Monoclonal antibody against A₁ Lewis d Antigen produced by the hybridoma immunized with a pulmonary carcinoma. *Cancer Res* (1982) **42**: 409-411.
8. Anger B R, Lloyd K O, Oettgen H F and Old L J: Mouse monoclonal IgM antibody against human lung cancer line SK-LC-3 with specificity for H(O) blood group antigen. *Hybridoma* (1982) **1**, 139-147.
9. Ball E D, Graziano R F, Pettengill O S, Sorenson G D and Michael M W: Monoclonal antibodies reactive with small cell carcinoma of the lung. *J Natl Cancer Inst* (1984) **2**, 593-598.

10. Tong A W, Lee J and Stone M J: Characterization of two human small cell lung carcinoma-reactive monoclonal antibodies generated by a novel immunization approach. *Cancer Res* (1984) **44**, 4987-4992.
11. De Leij L, Poppema S, Nulend J K, Haar A t, Schwander E, Ebbens F, Postmus P E and The T H: Neuroendocrine differentiation antigen on human lung carcinoma and Kulchitski cells. *Cancer Res* (1985) **45**, 2192-2200.
12. Varki N M, Reisfeld R A and Walker L E: Antigens associated with a human lung adenocarcinoma defined by monoclonal antibodies. *Cancer Res* (1984) **44**, 681-687.
13. Brenner B G, Jothy S, Shuster J and Fuks A: Monoclonal antibodies to human lung tumor antigens demonstrated by immunofluorescence and immunoprecipitation. *Cancer Res* (1982) **42**, 3187-3192.
14. Mulshine J L, Cuttitta F, Bibro M, Fedorko J, Fargion S, Little C, Carney D N, Gazdar A F and Minna J D: Monoclonal antibodies that distinguish non-small cell from small cell lung cancer. *J Immunol* (1983) **131**, 497-502.
15. Rosen S T, Mulshine J L, Cuttitta F, Fedorko J, Carney D N, Gazdar A F and Minna J D: Analysis of human small cell lung cancer differentiation antigens using a panel of rat monoclonal antibodies. *Cancer Res* (1984) **44**, 2052-2061.
16. 羽井佐茂: モノクローナル抗体による肺癌関連抗原の解析 I, ヒト肺癌細胞株 (ABC-1) に対するモノクローナル抗体の作製とその特異性. *肺癌* (1985) **25**, 531-542.
17. 羽井佐茂: モノクローナル抗体による肺癌関連抗原の解析 II, oat cell 肺小細胞癌株 (SBC-3) に対するモノクローナル抗体の作製とその特異性. *肺癌* (1986) **26**, 651-664.
18. 羽井佐茂, 坪田輝彦, 中村邦彦, 春田祐郎, 片岡廉, 平木俊吉, 木村郁郎: ヒト肺癌細胞株に対するモノクローナル抗体の作製とその特異性. 第 12 回日本臨床免疫学会講演抄録集 (1984) pp. 222.
19. 平木俊吉, 宮井正博, 瀬戸匠, 田村哲生, 渡辺洋一, 小沢志朗, 池田裕政, 中田康則, 大熨泰亮, 木村郁郎: ヒト肺癌 (扁平上皮癌, 腺癌, 小細胞癌) 細胞株の樹立と異種移植. *肺癌* (1982) **22**, 53-58.
20. Köhler G, Howe S C and Milstein C: Fusion between immunoglobulin-secreting and nonsecreting myeloma cell lines. *Eur J Immunol* (1976) **6**, 292-295.
21. 春田祐郎: Null 細胞型急性リンパ球性白血病細胞株, NALL-1 に対する monoclonal 抗体の作製とその解析. *岡山医学会雑誌* (1984) **96**, 137-147.
22. 角田力彌: 免疫グロブリン同定のための電子顕微鏡酵素抗体法—実際の手技. *免疫実験操作法 IX* (1980) pp 2809-2818.
23. 福島範子, 田林晃, 佐分利六郎, 大橋成一: 細胞組織診 (Cell Block 法) のすすめ. *最新医学* (1966) **21**, 2095-2105.
24. McLean I W and Nakane P K: Periodate-lysine-paraformaldehyde fixative for immunoelectron microscopy. *J Histochem Cytochem* (1974) **22**, 1077-1083.

Immunohistochemical characterization of lung cancer-associated monoclonal antibodies.

I . Characterization of four monoclonal antibodies against a human intermediate cell type small cell lung carcinoma cell line, SBC-1.

Kunihiko NAKAMURA

Second Department of Internal Medicine,

Okayama University Medical School

(Director: Prof. I. Kimura)

Four IgM monoclonal antibodies against an intermediate cell type small cell lung cancer(SCLC) cell line(SBC-1) were produced and characterized. Reactivities of the antibodies to cell lines were tested by membrane immunofluorescence, and the reactions with normal and neoplasma tissues were analyzed using an indirect immunoperoxidase technique. Each of the 4 antibodies reacted with lung cancer cell lines and lung cancer tissues, but did not exhibit lung cancer histology-type specificity. The 4 antibodies reacted with normal bronchiolar and digestive gland tissues, and the antibody-reactive antigens were shown to be a gland-tissue differentiation antigen. The antigen was expressed on O type red cells, was not expressed on other erythrocytes and was undetectable in intermediate SCLC tissues. This may represent the epitope-difference of the antigen recognized by the antibodies. None of the antibodies reacted with oat SCLC, but intermediate and non-small lung cancer reacted with the antibodies. This result shows the antigen-similarity of intermediate SCLC with non-small lung cancer.