— 綜 説 —

各種モノクローナル抗体を応用した内分泌疾患に対する
組織化学的研究と臨床応用清水 一雄^{1)*}・George S. Eisenbarth^{2)**}・庄司 佑^{1)***}¹⁾ 日本医科大学外科学第2教室²⁾ Department of Medicine, Harvard Medical School, Section of Immunology, Joslin Diabetes CenterAn immunohistochemical study and its clinical application for
endocrine disorders using monoclonal antibodiesKazuo Shimizu¹⁾, George S. Eisenbarth²⁾ and Tasuku Shoji¹⁾¹⁾ The Second Department of Surgery, Nippon Medical School¹⁾²⁾ Department of Medicine, Harvard Medical School, Section of Immunology, Joslin Diabetes Center

はじめに

1975年, Köhler & Milstein¹⁾により開発されたモノクローナル抗体作成の技術は, 基礎免疫学の分野はもちろんのこと, その臨床応用に著しい進歩をもたらした。それは従来のポリクローナル抗体に比べモノクローナル抗体のもつ優れた再生産性, 抗体価の均一性, 特異性のためであるといえる。特に腫瘍マーカーとしての組織化学的研究と臨床応用は, 各分野でみられ確定診断に数多くの重要な働きを示している。

著者は当科で甲状腺を主体とした内分泌外科の外来を受診した1,249症例の中から内分泌臓器由来の腫瘍に対して, 4種のモノクローナル抗体(A2B5, PKK-1, 4F2, H1SL-19)を応用し, 組織化学的研究成果を報告してきた²⁻¹¹⁾。

今回, これらの抗体の組織化学的, 生化学的特徴と臨床的応用性, これらの抗体を用いた我々の現在の研究状況ならびに将来への発展性などについて述べる。

1. 内分泌腫瘍に対する各種モノクローナル抗体の
生化学的特徴と組織化学的評価

(1) モノクローナル抗体 A2B5

モノクローナル抗体 A2B5 (以後 A2B5) は, chicken embryonic retina cell で免疫されたマウスの脾臓リンパ球と mouse myeloma cell (P3X63) を

fusion させ得られたモノクローナル抗体で¹²⁾, ⁶³Cr を用いた cytotoxicity assay, また thin layer chromatography の結果から抗原決定基は GQ ganglioside であり^{4,12)}, その局在は細胞膜にあることが判明している (Table 1)。当初, 本抗体は神経組織に対する免疫学的, 生化学的研究を目的に作成されたものであったが, 各種臓器の正常細胞と, その腫瘍に対し間接蛍光抗体法により反応性の検索を行った結果は Table 2 に示すごとくであり, 胎生期に認められる神経稜 (neural crest) 由来の peptide hormone を産生分泌する APUD 系細胞と, その腫瘍に陽性所見を得た²⁻⁵⁾。このことは, これらの内分泌系正常細胞とその腫瘍には, 神経細胞に存在する GQ ganglioside という共通抗原が存在していることを意味している。Photo 1, 2 は Table 2 に示す陽性所見の中から islet cell と insulinoma (Photo 1) および甲状腺 C cell と髄様癌 (Photo 2) の間接蛍光抗体法による陽性所見を示している。この抗原は, フォルマリン固定で破壊されるため通常のパラフィン切片には使用できず, 標本はすべて手術新鮮標本で実験使用時まで凍結保存し, 4~6 μ の frozen section をアセトン固定したものに免疫染色を施行した。

(2) モノクローナル抗体 PKK-1

免疫抗原はブタ腎尿管上皮細胞であり, 本抗体は上皮細胞由来の細胞骨格を形成する蛋白, intermediate filaments の一つである cytokeratin に対するモノクローナル抗体であり, 抗原蛋白は細胞質に局在し,

*講師, **Associate Professor, ***教授

Table 1 Monoclonal antibodies and their biochemical characteristics

AcAb	Immunized Ag	Biochemical property of Ag	Analysed molecular weight of Ag	Cellular location of Ag
A 2 B 5	chicken embryonic retina cell	GQ ganglioside	150 k dalton	surface
HISL-19	human islet cell	cellular protein	120, 69, 67, 56 kd.	intracellular
PKK-1	pig kidney epithelial cell	cytokeratin	40-70 kd.	intracellular
4 F 2	human T cell lymphoma cell	glycoprotein	120 kd.	surface
Ki-67	Hodgkin's disease-derived cell	unknown	N.D.	intranuclear

N.D.: not detected

Table 2 Binding of A 2 B 5 and tetanus toxin to various normal cells and tumors

Normal tissue	A 2 B 5	Tetanus toxin
Neurons	##	##
Oligodendroglia(Corpus collosum)	—	—
Adrenal medulla	##	##
Adrenal cortex	—	—
Pancreatic islets	##	##
Pancreatic acinar cells	—	—
Pituitary gland	++	##
Thyroid gland	—	++
Thymic epithelial	##	##
Lymphocytes of thymus	—	—
Liver, Kidney, Breast, Lung, Stomach	—	—
Tumors	A 2 B 5	Tetanus toxin
RINm 5 F rat insulinoma	##	##
RIN 14 B rat somatostatinoma	—	++
Human insulinoma	##	##
Medullary Ca. of thyroid(3)	##	##
Pheochromocytoma(4)	3/4 ++	3/4 +
Melanoma cell line(H-99, -100)	++	++
Glioblastoma cell line(H-54, 79, 80)	+	+
Neuroblastoma cell line(H-113, 134, 136)	+	+
Fibrosarcoma cell line(H-202)	—	+/-
Breast Ca. cell line(H-185)	—	—
Colorectal Ca, cell line(H-592)	—	—
Non-islet pancreatic Ca. cell line (CAP-1, 2, Colo-357, HPAF)	—	—
SB-B B cell leukemia cell line	—	—
HSB-2 T cell leukemia cell line	—	++
MOLT 4 T-cell leukemia cell line	+	++
HUT-78 Sezary cell leukemia cell line	—	++
HPB-ALL acute lymphocytic. leukemia cell line	—	—
HPB-MLT T-cell leukemia cell line	—	—

##: strongly positive, ++: positive, +: weakly positive

その分子量はおよそ 40 KDa~70 KDa とされている (Table 1). このため当初, 甲状腺腫瘍の中で上皮細胞由来の未分化癌と, 非上皮細胞由来の甲状腺悪性リン

パ腫の鑑別を目的に研究を開始した. しかし, Table 3 に示すように, この両者の鑑別に満足すべき結果は得られず, 予期に反して未分化癌では陽性率は 25.0%と

Photo 1 Positive staining of A 2 B 5 to human pancreatic islet (left) and insulinoma. (Frozen section, Indirect immunofluorescent method)

Photo 2 Positive reaction of A 2 B 5 to C-cells of the thyroid (left) and medullary thyroid carcinoma (right) which is originated from C-cell.

低く、そのほとんどは large cell type であった。これに反し甲状腺乳頭癌は 95.2% と高率に陽性所見を呈した。一方濾胞腺腫、濾胞癌は共にほとんどが陰性であり、本抗体は乳頭状増殖を示す腫瘍と濾胞状増殖を示す腫瘍の鑑別、すなわち乳頭癌の診断に有効と思われた(Photo 3)¹¹⁾。標本はホルマリン固定、パラフィン切片に ABC 法を施行したものである。

教室の野崎¹⁰⁾は、Sodium Dodecyl Sulphate-Poly Acrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) を応用し、乳頭癌の細胞質内に存在する本抗体に特異的に反応する抗原蛋白の分子量を検索した結果、いまだで本抗体の抗原分子量として認められなかった 40~42

Table 3 Immunohistochemical reaction of PKK-1 to various thyroid nodules

Specimen	Case	Positive percentage
Anaplastic carcinomas	28	25.0
Malignant lymphoma	13	0
Papillary carcinoma	21	95.2
Follicular carcinoma	9	0
Follicular adenoma	20	2.0
Hashimoto's thyroiditis	5	0
Medullary carcinoma	3	66.7

Table 4 Immunoreaction of HISL-19 and A 2 B 5 to various normal endocrine tissues

Specimens	Monodonal antibodies	
	HISL-19	A 2 B 5
Adrenal medulla	+	+
cortex	-	-
Pancreatic islet cell	+	+
acinar cell	-	-
Thyroid C-cell	+	-
follicular cell	-	-
Gut endocrine cell	+	ND
mucosal epithelial cell	-	ND
Thymic epithelial cell	-	+
Pituitary anterior	+	+

ND: not done

KDa 付近に、他の甲状腺腫瘍ならびに非上皮性の組織である筋肉にみられない band を同定した。

(3) モノクローナル抗体 HISL-19

HISL-19 は human islet cell を免疫し得られたマウス IgG モノクローナル抗体で¹³⁾種々の正常組織と、その腫瘍に対し組織化学的 screening を行った結果、特異抗原の存在する組織は peptide hormone を分泌する神経内分泌細胞と、その腫瘍が大半を占めていた。すなわち、正常細胞では、ラ氏島細胞、甲状腺旁濾胞細胞、下垂体、副腎髄質細胞、消化管内分泌細胞に結合し (Table 4)、腫瘍ではインスリノーマ、甲状腺髄様癌、カルチノイドなどに陽性所見を得た (Table 5)。A 2 B 5 との抗原性を比較すると Table 1 でみられるように局在部位、抗原の性状などに相違点を認め、Table 4, 5 から結合する組織が多少とも異なっており、その対象、染色性の若干の相違も理解される。また、A 2 B 5 と比べ本抗体の大きな利点はホルマリン固定パラフィン切片でも抗原性が失活することがなく、このことは本抗体を用い、過去の標本を retrospec-

Photo 3 Immunohistochemical findings of PKK-1 to anaplastic carcinoma of the thyroid (left) and papillary carcinoma (right). Scattered positive cells are recognized (→) in the photomicrograph on the left and almost all cells photo. On the right are shown as positive findings. (Formalin-fixed, paraffin specimen, ABC procedure)

Photo 4 Immunohistochemical reaction of H1SL-19 to familial medullary thyroid carcinoma. Proliferative C cells are recognized in the left field of this photograph while normal one C cell can be visualized in the right field. (Formalin-fixed, paraffin specimen, Indirect immunofluorescent method)

tive に検索を加えるのに十分応用できて好都合である。また、両抗体を使用し、この種の腫瘍の共通抗原に対して、生化学的な見地からの研究は極めて興味のあるところであり、今後発展させていきたい。本抗体は組織化学的に甲状腺に関しては、髄様癌に特異的に結合する(Photo 4)。さらに H1SL-19 を使用した他臓器の神経内分泌腫瘍に対する研究ではカルチノイド、

Table 5 Immunoreaction of H1SL-19 and A 2 B 5 to neuroendocrine tumors and other neoplasms

Neoplasms	Monodonal antibodies	
	H1SL-19	A 2 B 5
Insulinoma	+	+
Pancreatic adenoca.	-	-
Carcinoid	+	ND
Gastric ca.	-	ND
Parathyroid tumor	-	+
Pheochromocytoma	ND	+
Medullary thyroid ca.	+	+
Well-diff, thyroid ca.	-	-
Anaplastic ca. of thyroid	ND	-

ND: not done

Table 6 Positive rate of 4 F 2 to thyroid and parathyroid tumor

	No. of cases	Positive		Rate(%)
		weak	strong	
Papillary carcinoma	19	0	1	5.3
Anaplastic carcinoma	9	0	9	100.0
Follicular carcinoma	4	1	0	25.0
Medullary carcinoma	5	0	5	100.0
Follicular adenoma	11	3	0	27.3
Parathyroid adenoma	9	0	9	100.0
Parathyroid carcinoma	2	0	2	100.0

消化管内分泌腫瘍、副腎髄質腫瘍、膵ラ氏島腫瘍などに陽性所見を得た (Table 5)。

(4) モノクローナル抗体 4 F 2

本抗体を作成する際のマウスに免疫した抗原はヒト acute lymphoblastic leukemia から得られた T-cell line (HSR-2) であり、リンパ球細胞膜抗原と免疫抑制との関係を解明するため作られた抗体である¹⁴⁾ (Table 1)。抗原局在は細胞膜内で、リンパ球の活性化¹⁵⁾、内分泌細胞の機能¹⁶⁾、細胞の成熟ならびに細胞の増殖能¹⁷⁾に深く関与するといわれている。すなわち、activated lymphocytes、睾丸の細精管や表皮の基底細胞など増殖能の強い細胞に出現してくる。このことに着目し、教室の豊島ら¹⁸⁾は悪性腫瘍の中でも増殖能に著明な相違を示す甲状腺癌につき組織化学的検討を加えた結果、著しい増殖能を呈し、生物学的悪性度の極めて強い未分化癌に陽性所見を得 (Photo 5)、発育の緩徐な乳頭癌、濾胞癌など分化癌にはほぼ陰性であった (Table 6)。その他の甲状腺癌では髄様癌が陽性であり、他の内分泌組織では膵臓ラ氏島、上皮小体に結

Photo 5 Positive staining of 4F2 to anaplastic carcinoma (left) and cultured human anaplastic carcinoma cells (right). (Frozen section and living cells, "Indirect immunofluorescent method").

Photo 6 Scintiscanning of pelvic zone in patient with medullary thyroid carcinoma metastatic to right iliac bone using ^{131}I labelled A2B5. Accumulation of ^{131}I -A2B5 to metastatic area (←) is visualized. (→): urinary bladder.

合することが判明している (Table 6). さらに豊島ら¹⁸⁾は本抗体の抗原を生化学的に検索する目的で, SDS-PAGE, Western Blotting 法を用い甲状腺未分化癌を standard marker と比較し, 乳頭癌にはみられない band を 80 KDa および 65 KDa 付近に同定した. 組織化学的・手技上本抗体は A2B5 と同様にホルマリン固定, パラフィン標本に反応せず, 凍結切片標本のアセトン固定によく反応する.

2. 臨床応用への評価

以前, アイトープを標識した A2B5 (^{131}I -A2B5)を用いインスリノーマを移植したラットに静注したところシンチスキャンにて腫瘍に一致して A2B5 が著明に集積することを報告した^{3,4,6~9)}. Photo 6 は甲状腺髄様癌の骨盤転移症例 (calcitonin: 3,000 pg/dl 以上) に対し ^{131}I -A2B5 を投与したところ, シンチグラムで転移巣に一致してその集積を認めた. このことは腫瘍の局在診断のみならず, 本抗体に抗癌剤を標識したミサイル療法に応用できる可能性を示唆している.

このことは我々の使用している他の抗体についてもいえることで, 内分泌系腫瘍に対する特異的マーカーとして組織化学的, 放射線学的に臨床応用は十分可能である.

3. 現在の研究状況と将来への発展性

これらの抗体を使用し, 現在行っている研究の中で, とくに 4F2 と H1SL-19 が興味深く, この臨床応用, 将来への発展性などについて述べる.

4F2 は前述したように増殖能の顕著な細胞, すなわち悪性腫瘍の中では生物学的悪性度の顕著な細胞に陽性所見を呈する傾向を示している. 甲状腺悪性腫瘍の中でも未分化癌は極めて急激な転帰をたどり現在, 発見時にはいかなる治療も無効のことが多い. 可及的早期発見および分化癌からの移行時の診断, 分化癌からの移行の潜在性を事前に把握することが, 本抗体を用いて可能ならば本疾患を治癒せしめることが出来るかもしれない. 乳頭癌の短期再発例で気管浸潤を認めた症例に 4F2 が陽性を示したが¹⁸⁾, この症例の今後の組織型の推移は興味あるところである.

また, 増殖能の強い細胞と同様に, ある種の内分泌細胞と, その腫瘍に 4F2 の共通抗原を有することは, 細胞の活性化により生じるホルモンの過剰分泌の背景がうかがえ, 今後さらに研究を進めていく必要があると考えている.

H1SL-19 の陽性となる内分泌細胞およびその腫瘍は A2B5 とほぼ同様であるが, 抗原の局在部位はまったく異なる (Table 1). また, 本抗体は最近, 病理学的分野にて話題となっている消化管悪性腫瘍のなかで極めて悪性の内分泌細胞癌に陽性所見を得た. 過去に消化管腫瘍の中で稀有な悪性の経過をたどった症例に対し, 本抗体を応用して組織化学的検索を加えることはこの疾患の起源をまとめ, 分類を確立させるの

に重要な研究となろう。また, biopsy 標本の組織化学的検索による術前診断を可能にすれば, 本疾患の手術的治療の術式, 補助療法の選択におおいに役立つであろう。

文 献

- 1) Köhler, G. and Milstein, C.: Continuous cultures of fused cells secreting of predefined specificity. *Nature*, 256, 495~497, 1975.
- 2) Shimizu, K., Eisenbarth, G.S., Bowring, M.A. and Wells, S.A.: Expression of receptors for tetanus toxin and monoclonal antibody A2B5 on "APUD" cells and "APUD" cell tumors. *Surgical Forum*, 419~421, 1981.
- 3) 清水一雄: アイソトープ標識モノクローナル抗体 A2B5 (125I-A2B5), シンチスキャンによる APUD 腫瘍診断への応用. *日医大誌*, 49, 880~881, 1982.
- 4) Shimizu, K., Reintgen, D., Rowley, R., Coleman, E., Briner, W., Seigler, H. and Eisenbarth, G.H.: In vivo and in vitro binding of iodinated monoclonal antibody A2B5 to RIN insulinoma cells. *Hybridoma*, 2, 69~77, 1983.
- 5) 清水一雄, 石王道人, 小林利エ子, 野崎 基, 井出道也, 田中宏治, 庄司 佑, 伊藤國彦, Wells, S.A., Dilley, W.: モノクローナル抗体 A2B5: 甲状腺髄様癌診断への応用. *内分泌外科*, 3, 81~90, 1986.
- 5) 清水一雄, 田中宏治, 井出道也, 野崎 基, 石王道人, 小林利エ子, 渋谷哲男, 金内秀士, 庄司 佑: モノクローナル抗体 A2B5: APUD 系腫瘍に対するその有用性. *癌の臨床*, 29, 100~101, 1983.
- 6) 清水一雄: 腫瘍の産生する物質の臨床, モノクローナル抗体 A2B5. *臨床医*, 12, 576~577, 1986.
- 7) 清水一雄: 癌治療学(下), Tumor marker による follow-up 30. モノクローナル抗体 A2B5. *日本臨床*, 47, 1215~1218, 1989.
- 8) 清水一雄, 庄司 佑: 血液生化学検査, 免疫学的検査(下巻) モノクローナル抗体 A2B5; APUD 系腫瘍診断への応用. *日本臨床(増刊)*, 964, 1990.
- 9) Reintgen, D.S., Shimizu, K., Coleman, E., Briner, W., Kitzmiller, J., Eisenbarth, G.S. and Seigler, H.F.: Immunodiagnosis of tumors in vivo using radiolabeled monoclonal antibody A2B5. *J. Surg. Oncol.*, 23, 205~211, 1983.
- 10) 野崎 基: 抗サイトケラチンモノクローナル抗体による各種腫瘍の組織化学的生化学的研究; 甲状腺腫瘍を中心として. *日外会誌*, 3, 408~415, 1988.
- 11) Eisenbarth, G.S., Walsh, F.S. and Nierenberg, M.: Monoclonal antibody to a plasma membrane antigen of neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 76, 4913~4917, 1979.
- 16) Srikanta, S., Krisch, K. and Eisenbarth, G.S.: Islet cell proteins defined by monoclonal islet cell antibody HISL-19. *Diabetes*, 35, 300~305, 1986.
- 17) Haynes, B.F., Hemler, M.E. and Mann, D.L.: Characterization of a monoclonal antibody (4F2) that binds to human monocytes and to a subset of activated lymphocytes. *J. Immunol.*, 126, 1409~1414, 1981.
- 18) Gerrard, T.L., Jurgensen, C.H. and Fauci, A.S.: Modulation of human B cell responses by a monoclonal antibody to an activation antigen 4F2. *Clin. Exp. Immunol.*, 57, 155~162, 1984.
- 19) Srikanta, S., Telen, M., Posillico, J.T., Dollinar, R., Krisch, K., Haynes, B.F. and Eisenbarth, G.S.: Monoclonal antibodies to a human islet cell surface glycoprotein; 4F2 and LC7-2. *Endocrinology*, 120, 2240~2244, 1987.
- 20) Patterson, J.A.K., Eisinger, M., Haynes, B.F., Berger, C.L. and Edelson, R.L.: Monoclonal antibody 4F2 reactive with basal layer keratinocytes; Studies in the normal and a hyperproliferative state. *J. Invest. Dermatol.*, 83, 210~213, 1984.
- 21) 豊島宏二, 清水一雄, 庄司 佑: モノクローナル抗体 4F2 による甲状腺腫瘍の免疫組織学的, 生化学的研究. *内分泌外科*, 8, 159~166, 1991.

(受付: 1991年9月5日)