胃癌に対して作製されたモノクローナル抗体 GC401 の特異性と 胃の分化過程における抗原性の変化の検討

—GC302 と対比して—

杉江 元彦・森瀬 公友・渡辺 正*
東 秀 好**・秋山 清次*・高木 弘*

Jpn. J. Clin. Immun., 13 (6) : 603~611, 1990.

Characterization of monoclonal antibody GC401 raised against gastric cancer and analysis of phenotypic expression of differentiation antigens in human stomach by monoclonal antibodies GC302 and GC401

Motohiko Sugie, Kimitomo Morise, Tadashi Watanabe*,
Hideyoshi Higashi**, Seiji Akiyama* and Hiroshi Takagi*

First Department of Internal Medicine, Nagoya University School of Medicine

**Second Department of Surgery, Nagoya University School of Medicine*

***Department of Pathology, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University*

【Summary】

A monoclonal antibody, GC401, was established by fusing murine myeloma cells, SP2/0 and the splenocytes of a BALB/c mouse immunized with the human gastric cancer cell line, NUGC4. Immunohistochemically, GC401 reacted with glandular epithelium of various normal tissues and various cancers derived from glandular epithelium. Western blot analysis of the GC401 antigen indicated a molecular weight of ca. 30 K, and the antigenic determinant was suggested to be a glycoprotein with disulfide bonds. In this study, we analyzed the change of phenotypic expression of differentiation antigens in human stomach by monoclonal antibodies GC302 (previously reported) and GC401. GC302 antigen was found not to be expressed in normal adult gastric mucosa, but to be expressed in the fetal gastric mucosa, intestinal metaplasia and almost all of the cancer of the stomach. Whereas GC401 antigen was expressed in all stage of differentiation of the stomach, GC302 reacted more strongly with intestinal metaplasia which was negative in high iron diamine staining and had less goblet cells. But GC401 reacted strongly with all types of intestinal metaplasia of human gastric mucosa.

Key words : monoclonal antibody,
gastric carcinoma,
intestinal metaplasia,
differentiation antigen

【概 要】

ヒト胃癌細胞培養株 NUGC4 を免疫原として作製したモノクローナル抗体 GC401 の認識する抗原分子は、N-glycoside 型の糖鎖をもつ糖蛋白で、分子量は 30 K であった。血清学的特異性では、GC401 は胃から大腸におよぶ腺管上皮および腺管上皮由来の癌と反応したが食道、肝・脾細胞などとは反応しなかった。血清学的、生化学的分析より、GC401 抗原は消化管における新しい分化抗原と考えられた。今回、胃の分化過程を検討するために、既報の GC302 抗原との比較を行ったところ、GC302 抗原は正常胃腺にはなく、胎児胃、癌および腸上皮化生に発現されたのに対し、GC401 抗原は正常胃腺を含めすべての過程に発現された。腸上皮化生では、HID 染色陰性で杯細胞の少ないほど GC302 の反応性は強い傾向がみられたが、GC401 ではすべて強く反応した。以上より、GC401 抗原は強い染色性およびその分布より、胎生期からその発現が変化せず広く分布する分化抗原と考えられた。

I. 諸 言

細胞融合法によるモノクローナル抗体の作製技術¹⁾が癌細胞に対する未知の抗原の検出や分析に応用された結果、癌に関連すると考えられるいくつかの抗原が発見されると同時に、その抗原決定基にシアル酸をもった糖鎖が多いことが明らかになり、さらに分化、癌化過程における細胞膜表面糖鎖構造の変化が注目されている²⁾。

われわれは胃癌関連抗原の検出をめざして、すでにヒト胃癌細胞培養株を免疫原としてモノクローナル抗体を作製し³⁾、この中で GC302 によって認識される抗原は分子量 40 K で、ヒト胃における癌胎児抗原の性格をもつことを報告した⁴⁾。今回ヒト胃癌細胞培養株 NUGC4 を免疫原として、モノクローナル抗体 GC401 を新たに作製し、その特異性および生化学的分析を検討したところ、消化管における新しい分化抗原であることが示唆された。そこで胃癌組織および腸上皮化生粘膜を含めたヒト胃組織における抗原発現の変化について免疫組織学的方法および HID 染色を用いて既報の GC302 との比較検討を行った。

II. 対象および方法

1. 胃癌に対するモノクローナル抗体の作製と特異性の検索

1) モノクローナル抗体の作製

既報の方法³⁾と同様に polyethylene glycol を使っ

た細胞融合法によりハイブリドーマを作製した。すなわち、名古屋大学第 2 外科において樹立したヒト胃癌細胞培養株 NUGC4⁵⁾ (異型性の強い低分化型腺癌) により免疫された BALB/c マウスの脾細胞とマウス ミエローマ細胞である SP 2/0-Ag 14 を 42% (W/V) polyethylene glycol (Mr 4000) を使って細胞融合させ、hypoxanthine, aminopterin, thymidine を含む HAT 培地にて培養しハイブリドーマを得た。ハイブリドーマの 1 次スクリーニングは、NUGC4 を target cell として Mixed Hemadsorption assay (MHA 法—後述)³⁾ によりハイブリドーマ培養上清の抗体活性を調べ、胃癌細胞と反応するモノクローナル抗体 GC401 を得た。

また、GC401 のサブクラスの決定にはウサギ抗マウス IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃ および IgM 血清 (Miles Laboratories, Elkhart, IN) とハイブリドーマ培養上清との反応性を免疫拡散法により検討した。

2) モノクローナル抗体 GC401 の特異性の検討

各種培養細胞における GC401 の反応性を MHA 法により、また各種癌および非癌組織における GC401 抗原の免疫組織化学的検討を酵素抗体 ABC 法により行った。

(1) MHA 法

ヒツジ赤血球 (SRBC) 浮遊液にマウス抗 SRBC 抗体を加え、次にウサギ抗マウス抗体 (DAKO 社) を加え indicator cell を作製した。次に培養細胞の付

着した 96 well microtest plate (Falcon 3034, Beckton Dickinson and Company, Oxford, CA) の各ウェルにハイブリドーマの培養上清を加え、室温で 1 時間反応させた後、洗浄し、indicator cell を加え、さらに室温で 1 時間反応させた。緩徐に洗浄後鏡検し、SRBC による癌細胞周囲のロゼット形成の有無により抗原抗体反応を観察した。

(2) 酵素抗体 ABC 法

ABC Kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA) を用いて行った。各組織を OCT compound に包埋し、厚さ 6μ の凍結切片を作製した。acetone で 4°C 、10 分間固定した後、0.3% H_2O_2 を加えた methanol にて 30 分間反応させ、内因性ペルオキシダーゼ除去を行った。正常ヤギ血清を室温、30 分間反応させた後、ハイブリドーマ培養上清を加え 60 分間反応させ、次に biotinylated horse anti-mouse antibody を 30 分間、avidin DH-biotinylated horseradish peroxidase H complex を 60 分間それぞれ反応させた。そして、0.005% H_2O_2 と 0.02% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride を加えた tris buffer (pH 7.2) 中で発色させ methylgreen にて核染色し鏡検した。

2. GC401 抗原の生化学的性状の分析と分子量の検討

1) 抗原の生化学的分析

GC401 が免疫活性を示す胃癌の組織切片に、以下の各種処理を加えた後、GC401 を使って ABC 法により染色し、未処理切片の染色性に対する反応性の変化を観察した。

(1) 過ヨウ素酸処理

過ヨウ素酸 ($\text{HIO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (和光純薬工業) を phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2) に溶解し、1% 溶液を作製し、室温にて組織切片とそれぞれ 30 分間、60 分間、90 分間反応させ、洗浄後 ABC 法にて染色した。対照として過ヨウ素酸溶液のかわりに PBS を使用した。

(2) ニューラミニダーゼ処理

Neuraminidase (Sigma Chemical Company, St Louis, MO) 10 単位を Hank's balanced salt solution (HBSS, pH 5.5) 1.5 ml に溶解し、 37°C で 60 分間組織切片と反応させ、洗浄後 ABC 法にて染色した。対照として、neuraminidase のかわりに HBSS を使用した。

2) GC401 の認識する抗原の分子量の検討

GC401 が免疫活性を示す胃癌培養細胞株 NUGC4、大腸癌細胞培養株 SW 1083 および HT 29 から 0.5% Nonidet P-40 (NP 40) により膜蛋白を抽出し、0.1% sodium dodecyl sulfate-10% polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)⁶⁾ および Western blotting 後、酵素抗体染色すること⁷⁾ により GC401 抗原の分子量の検討を行った。

なお、GC401 は腹水 (1/100) を、免疫染色には horseradish peroxidase conjugated anti-mouse IgG (1/1,000) (Cappel 社) を使用し、それぞれ 37°C 、1.5 時間反応させた。

β -mercaptoethanol (β -ME) 処理は 10% β -ME 中に細胞膜蛋白を 60°C 、20 分反応させ、ニトロセルロース膜に dot blotting 後、酵素抗体染色して抗原性を検査した。また、膜蛋白の N-glycanase 処理は、0.5% NP 40 extract に SDS を加え 0.5% SDS として 60°C 、20 分間加熱したもの $15\mu\text{l}$ に対し、0.55 M Na-phosphate buffer (pH 8.6) を $2.5\mu\text{l}$ 、10% NP 40 を $4.5\mu\text{l}$ 、N-glycanase (250 unit/ml, Genzyme 社) を $2.7\mu\text{l}$ を加え 37°C で 16 時間 incubate して行った。

3. 腸上皮化生粘膜の評価

手術によって得られた胃幽門前庭組織 (非癌部) のうちで腸上皮化生の認められた 20 例を対象として、GC401 および GC 302 を使った ABC 法による染色と High iron diamine-alcian blue 染色 (HID-AB 染色) による粘液染色の比較検討を行った。HID-AB 染色法の概略は以下のごとくである。40% (W/V) FeCl_3 溶液 1.6 ml にジアミン溶液 50 ml を加え HID 溶液を作製した。ジアミン溶液は N,N-dimethyl-m-phenylenediamine dihydrochloride (Sigma Chemical Company, St Louis, MO) 120 mg と N,N-dimethyl-p-phenylenediamine monohydrochloride (Sigma Chemical Company, St Louis, MO) 20 mg を蒸留水 50 ml に溶解して調整した。次に組織切片を HID 溶液中にて室温で 8 時間反応させた後、水洗し、さらに alcian blue (pH 2.5) で後染色した。

III. 結 果

1. モノクローナル抗体 GC401 の特異性

1) 培養細胞株との反応

MHA 法による各種培養細胞株との反応性を表 1 に

表 1 MHA reactivity of GC 401 with normal and malignant cell lines

Cells	Reactivity	Cells	Reactivity
Esophageal cancers		Bladder cancer	
TE-1	—	T-24	—
TE-2	—	Renal cancers	
Gastric cancers		SK-RC-3	—
NUGC 2	—	SK-RC-6	—
NUGC 3	—	SK-RC-7	—
NUGC 4	+	SK-RC-9	—
MKN 1	+	SK-RC-EP	+
MKN 28	—	Cervical and ovarian cancers	
MKN 45	+	ME 180	—
KATO III	+	SK-OV-3	—
Colon cancers		Astrocytomas	
SKCO 1	+	SK-MG-AJ	—
SW 480	+	SK-MG-AS	—
SW 1083	+	Melanomas	
Colo Y	+	SK-MEL-33	—
SW 1116	+	SK-MEL-37	—
SW 1222	+	SK-MEL-44	—
HT 29	+	Lymphoma and leukemia cells	
Pancreas cancers		Daudi	—
Panc 1	—	Raji	—
PaCa 2	—	MOLT 3	—
Hepatocellular cancers		Normal cells	
SK-HEP-1	—	Fibroblasts (3 cases)	—
HCC 4	—	Lymphocytes (3 cases)	—
Lung cancers		A, B and O blood cells*	—
NULC 2	+	Xenogeneic cells	
Luci 6	—	Colo 26	—
Luci 7	—	Guinea pig kidney	—
Luci 8	—	L cell	—
Luci 13	+	Sheep erythrocytes*	—
Breast cancer			
MCF 7	—		

*Done by agglutination test and absorption test.

示す。GC401は胃癌(4/7)、大腸癌(7/7)、肺癌(2/5)、腎癌(1/5)の培養細胞と反応したが、食道癌(0/2)、肝癌(0/2)、膀胱癌(0/2)、乳癌(0/1)、膀胱癌(0/1)、卵巣癌(0/2)、脳腫瘍(0/2)、メラノーマ(0/3)、白血病(0/3)の培養細胞とは反応を示さなかった。また、線維芽細胞、リンパ球、およびマウス大腸癌 colo26とも反応を示さなかった。AB型赤血球、SRBCとの反応は凝集反応により行い、ともに陰性であった。なお、GC401のサブクラスは、免疫拡散法により IgG_{2a} であることが判明した。

2) 免疫組織学的特異性

各種非癌および癌組織切片における GC401 の免疫組織学的検討の結果を表 2 に示す。GC401 は食道粘膜上皮および食道癌には反応せず、胃においては胎児・新生児・成人正常胃粘膜上皮、腸上皮化生、異型上皮、癌のすべてに反応を示した。さらに胃癌では組織型の区別なく一様に強く反応した(図 1)。また小腸、結腸直腸粘膜上皮および結腸・直腸癌にも反応を示した。肝においては、肝細胞とは反応せず、胆管上皮および胆管細胞癌と反応を示した。さらに乳腺、乳癌とは反応したが、肺癌では腺癌(1/6)、扁平上皮癌(1/

表 2 Immunoperoxidase reactivity of GC 401 with various tissues

Tissues	No. of positive /No. of tested	Tissues	No. of positive /No. of tested
Esophagus		Liver	
normal mucosa	0/4	hepatocytes	0/4
cancer (squamous)	0/4	bile duct	4/4
Stomach		cholangiocarcinoma	1/1
normal mucosa		Gall bladder	
fetus (14, 16, 21 week old)	6/6	normal mucosa	1/1
newborn	1/1	Brain (normal)	0/3
adult	33/33	Breast	
intestinal metaplasia	20/20	mammary gland	3/3
atypical epithelium	6/6	cancer	1/1
adenocarcinoma		Lung	
tubular		adenocarcinoma	1/6
well differentiated	11/11	squamous cell carcinoma	1/6
moderately differentiated	11/11	Kidney	
poorly differentiated	29/29	proximal tubule	3/3
signet-ring cell carcinoma	6/6	glomerulus	0/3
Small intestine		Ovary	
normal mucosa	3/3	cancer	0/2
Colon and Rectum		Uterus	
normal mucosa	9/9	cervical cancer	1/1
cancer (adenocarcinoma)	9/9	Skin	
		epidermis	0/1
		sweat gland	1/1

図 1 Immunohistochemical staining of signet-ring cell carcinoma of the stomach (A), moderately differentiated tubular adenocarcinoma of the stomach (B) and normal kidney (C) with GC 401. Gastric cancer cells were positively stained (A, B) and intestinal metaplasia were strongly stained (A). Whereas normal esophageal mucosa was not stained (B) and proximal tubules of normal kidney were positively stained (C).

図2 Western blot analysis of plasma membranes of NUGC 4 (lanes 1 and 4), SW 1083 (lanes 2 and 5) and HT 29 (lanes 3 and 6). Lanes 1, 2 and 3 are amidoblack staining and lanes 4, 5 and 6 are enzyme-immunostaining with GC 401.

6) ともに反応を示した例は少なかった。腎においては糸球体と反応せず、近位尿細管のみ反応を示した(図1)。卵巣癌とは反応せず、皮膚では汗腺が反応した。

各組織における GC401 の染色性をみると、膜表面のみならず細胞質も強く染色され、また食道を除く消化管粘膜上皮の表層と深層で染色性に差はなかった。

2. GC401 抗原の生化学的性状の分析および分子量の検討

1) GC401 抗原の生化学的性状の分析

過ヨウ素酸処理により GC401 による染色性は、対照に比較して減弱した。また、過ヨウ素酸溶液の反応時間を長くするほど染色性の減弱の程度は強くなった。また、ニューラミニダーゼ処理では GC401 の染色性の変化は認められなかった。

2) GC401 抗原の分子量の検討

Western blotting の結果を図2に示した。lane 1, 2, 3 は各細胞膜蛋白の amidoblack staining,

図3 Western blot analysis of plasma membrane of HT 29 (HT) and SW 1083 (SW) after treatment with N-glycanase (+) and without (-).

A : amidoblack staining

B : enzyme-immunostaining

lane 4, 5, 6 は GC401 との enzyme - immunostaining であり、lane 1, 4 は NUGC4, lane 2, 5 は SW 1083, lane 3, 6 は HT 29 をそれぞれ示している。図2にみられるごとく、GC401 抗原の分子量は約 30 K と推定された。また、NUGC4 および SW 1083 を β -mercaptoethanol で処理すると、GC401 に対する抗原性は完全に失われた。さらに、GC401 抗原を有する HT 29 と SW 1083 を N-glycanase で処理することにより、分子量は 30 K から 25 K に減少した(図3)。

3. 胃の腸上皮化生粘膜における検討

胃の腸上皮化生粘膜の連続切片における HID-AB 粘液染色と、GC401 および GC302 による免疫組織染色の比較を表3に示す。HID 陽性粘膜においても HID 陰性粘膜においても、GC401 および GC302 による染色は陽性であった。しかし GC302 の染色性は、HID 陽性粘膜においてやや弱い傾向が認められた。一方、GC401 では染色性の差はみられなかった。また、腸上皮化生粘膜の杯細胞数の多少による染色性の変化をみると GC401 では差はみられなかったが、

表 3 Correlation of HID-AB staining and reactivity of GC 401 and GC 302 in intestinal metaplasia of the stomach.

Degree of Intestinal metaplasia	Reactivity of GC 401		
	-	+	#
+			● ● ● ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○
#			● ● ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○
Degree of Intestinal metaplasia	Reactivity of GC 302		
	-	+	#
+		● ● ● ○ ○	○ ○ ○ ○ ○ ○ ○
#		● ● ○ ○ ○ ○ ○	○ ○

● : positive in HID staining
○ : negative in HID staining

GC302 では杯細胞が少ないほど染色性が強い傾向が認められた。さらに GC401 による染色では、腸上皮化生腺管の表層の腺窩上皮から深部の固有胃腺まで全例強く染色されたのに対して、GC302 では全例において腸上皮化生腺管の腺窩上皮は染色されたが、深層の固有胃腺は染色されなかった。

IV. 考 案

近年、メラノーマ、白血病、大腸癌などの腫瘍に関しては、多くのモノクローナル抗体が作製され臨床応用もされているが、わが国で最も多い悪性腫瘍である胃癌に関しては報告が少ない⁸⁻¹⁰⁾。われわれは今までに胃癌に関するモノクローナル抗体の作製と臨床応用への検討を行ってきた^{3,4)}。本研究では新たに作製された GC401 の特異性を検討するとともに、胃における癌胎児抗原の性格をもつと考えられる抗原を認識する GC302 と、今回作製した GC401 とを比較しつつ、認識する抗原の分析を行った。

今までに報告されている癌関連抗原はエピトープに糖鎖をもつことが多く、しかも、その末端にシアル酸を含むものが多いとされている¹¹⁻¹³⁾。胃癌関連抗原においても、NCC-ST-439¹⁴⁾や CSLEX1¹⁵⁾もシアル化糖鎖を認識しているとされている。しかし GC401 や GC302 の認識する抗原は、過ヨウ素酸処理により反応性が減弱し、ニューラミニダーゼ処理では変化しないことより、ともに糖鎖構造をもつがシアル酸は関与していないことが示唆された。また、GC401 の対応する抗原分子は SDS-PAGE および Western blot-

ting により、分子量は 30 K と推定され、 β -mel-captoethanol 処理により抗原性が消失することから、S-S 結合をもつ糖蛋白であることが示唆された。さらに、N-glycanase 処理により分子量が 30 K から 25 K に減少したため、N-glycoside 型の糖鎖をもつが、それらはエピトープとなっていないことが判明した。これらの結果は今までに報告された癌関連抗原のうちでその性状が明らかにされているいずれとも異なるものであった。

GC401 の特異性を検討すると、MHA 法による各種培養細胞との反応では、GC401 は胃癌、大腸癌、肺癌細胞に対して陽性であったが、免疫組織学的検討では GC401 は食道を除く消化管の癌をはじめとして非癌組織においても免疫活性を示した。そして各臓器における GC401 の反応性をみると、GC401 は癌や非癌にかかわらず、諸臓器の腺上皮に対する反応性が高いものと考えられた。

胃癌の組織型別の検討では、GC401 は高分化型腺癌、低分化型腺癌および印環細胞癌のすべての組織型において強い反応を示し、GC302 が高分化型では反応性が強く、低分化型になるほど反応性が弱く、印環細胞癌とは反応しないこと⁴⁾と対照的であった。

さらに GC302 抗原が正常の胃粘膜には発現されず小腸や大腸粘膜には発現され、胃においては腸化（腸上皮化生）に伴い発現されてくるという特徴をもつことから、発生学的には前腸由来の消化管には発現されず、中腸および後腸由来の消化管に発現される一種の分化抗原と考えられ⁴⁾、胃においては腸化のマーカー

ともいえる性格をもっているのに対して, GC401 抗原は発生学的にはより早期に分化した抗原で, 広い範囲の組織に発現されており, 胃においては腸化, 癌化にもかかわらず常に強く発現されている分化抗原であることが示唆された。

胃癌と腸上皮化生の関連性については古くから注目されており, 微小胃癌周囲粘膜の組織学的検討¹⁶⁾, 実験動物の胃癌作製¹⁷⁾および疫学的検討¹⁸⁾から両者の密接な関連性が示唆されている。胃の腸上皮化生には多様性が認められており, 形態ならびに指標酵素から完全型と不完全型に分類され¹⁹⁾, また腸上皮化生粘膜の杯細胞のもつ粘液の組成により sialomucin をもつ小腸型と sulphomucin をもつ大腸型に分類されている²⁰⁾。そして小腸型は完全型に, 大腸型は不完全型にほぼ一致するとされている。また, 森らは粘液抗原 GMA および IMA の腸上皮化生粘膜における分布から, 腸上皮化生を胎児型と成人型に分類している²¹⁾。

一方, 免疫学的にも腸上皮化生の特徴, 癌との関連性が検討されており²¹⁻²³⁾, 多くのモノクローナル抗体により腸上皮化生が染色されることが報告されている。しかし, その染色性についての詳細な検討は少ない。われわれは腸上皮化生粘膜を HID-AB 粘液染色により HID 陰性の小腸型と HID 陽性の大腸型に分類し, GC401 と GC302 による染色性を検討した。その

結果, 小腸型と大腸型のいずれにおいても GC401 および GC302 による染色が得られたが, 大腸型では GC302 による染色性がやや弱い傾向がみられた。また, 腸上皮化生粘膜の杯細胞が少ないほど GC302 の染色性が強い傾向がみられた。このように, GC302 により腸上皮化生の型あるいは腸上皮化生の杯細胞数により染色性に差がみられたが, 腸上皮化生の新しい分類を GC302 により行うことには限界がある。今後, モノクローナル抗体を使った免疫学的方法による腸上皮化生の分類が期待される。

現在, 臨床的にモノクローナル抗体を用いた癌の血清学的診断や画像診断あるいは治療がさかんに検討されている。既報の GC302 については, すでに移植腫瘍の画像診断における有用性が明らかとなっている²⁴⁾。GC401 についても臨床応用の検討をすすめているが, 免疫組織化学的に胃癌のリンパ節におけるごくわずかの転移の診断や, 噴門部癌の食道浸潤における正確な浸潤範囲の決定などに有用性が示唆されており, 現在さらに検討を行っている。

本論文の要旨は, 第 72 回日本消化器病学会総会および第 45 回日本癌学会総会において発表した。稿を終えるにあたり, 御校閲を賜りました名古屋大学医学部第 1 内科, 齊藤英彦教授に心から深謝致します。

文 献

- 1) Köler, G., Milstein, C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256: 495~497, 1975.
- 2) Hakomori, S., Kannagi, R.: Glycosphingolipids as tumor-associated and differentiation markers: A guest editorial. *J. Natl. Cancer Inst.*, 71: 231~251, 1983.
- 3) 赤座 協・渡辺 正・秋山清次・他: ヒト胃癌細胞 (NUGC3) に対する monoclonal 抗体の特異性の検索と臨床応用への検討. *日外会誌*, 86: 455~463, 1985.
- 4) Watanabe, T., Nishikimi, M., Akiyama, S. et al.: A stomach oncofetal antigen recognized by monoclonal antibody GC302. *Jap. J. Sug.*, 17: 507~516, 1987.
- 5) Akiyama, S., Amo, H., Watanabe, T. et al.: Characteristics of three human gastric cancer cell lines, NUGC2, NUGC3 and NUGC4. *Jap. J. Sug.*, 18: 438~446, 1988.
- 6) Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680~685, 1970.
- 7) Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 76: 4350~4354, 1979.
- 8) Imai, K., Moriya, Y., Fujita, H. et al.: Immunologic characterization and molecular profile of carcinoembryonic antigen detected by monoclonal antibodies. *J. Immunol.*, 132: 2992~2997, 1984.
- 9) Yachi, A., Imai, K., Fujita, H. et al.: Immuno-

- histochemical distribution of the antigenic determinants detected by monoclonal antibodies to carcinoembryonic antigen. *J. Immunol.*, 132 : 2998~3004, 1984.
- 10) Sugiyama, T., Imai, K., Masukawa, J. et al. : Preparation of human monoclonal antibodies of IgG type to gastrointestinal cancer-associated antigen. *Jpn. J. Cancer Res.*, 77 : 722~729, 1986.
- 11) Magnani, J., Brockhaus, M., Smith, D. et al. : A monosialoganglioside is a monoclonal antibody defined antigen of colon carcinoma. *Science*, 212 : 55~57, 1981.
- 12) Lindholm, L., Holmgren, J., Svennerholm, L. et al. : Monoclonal antibodies against gastrointestinal tumor-associated antigens isolated as monosialogangliosides. *Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 71 : 178~181, 1983.
- 13) Lan, M.S., Khorram, A., Kaufman, B. et al. : Molecular characterization of a mucin-type antigen associated with human pancreatic cancer. *J. Biol. Chem.* 262 : 12863~12870, 1987.
- 14) Watanabe, M., Hirohashi, S., Shimosato, Y. et al. : Carbohydrate antigen defined by monoclonal antibody raised against gastric cancer xenograft. *Jpn. J. Cancer Res.(Gann)*, 76 : 43~52, 1985.
- 15) Fukushima, K., Hirota, M., Terasaki, P.I. et al. : Characterization of sialosylated Lewis^x as a new tumor-associated antigen. *Cancer Res.*, 44 : 5279~5285, 1984.
- 16) Nakamura, K., Sugano, H., Takagi, K. et al. : Carcinoma of the stomach in incipient phase, its histogenesis and histological appearances. *Gann*, 59 : 251~258, 1968.
- 17) Matsukura, N., Kawachi, T., Sasajima, K. et al. : Induction of intestinal metaplasia in the stomach of rats by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *J. Natl. Cancer Inst.*, 61 : 141~143, 1978.
- 18) Correa, P., Cuello, C., Duque, E. et al. : Carcinoma and intestinal metaplasia of the stomach in Colombian migrants. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1970, 44 : 297~306, 1970.
- 19) Matsukura, N., Suzuki, K., Kawachi, T. et al. : Distribution of marker enzyme and mucin in intestinal metaplasia in human stomach and relation of complete and incomplete types of intestinal metaplasia to minute gastric carcinomas. *J. Natl. cancer Inst.*, 65 : 231~240, 1980.
- 20) Jass, J.R., Filipe, M.I. : Sulphomucins and pre-cancerous lesions of the human stomach. *Histopathology*, 4 : 271~279, 1980.
- 21) 森 武貞・李 伯権・門田卓士・他：胃の前癌病変と癌関連疾患. *外科治療*, 45 : 32~44, 1981.
- 22) 堤 寛・名倉 宏・渡辺慶一：腸上皮化生と免疫—新しい概念の提唱—. *最新医学*, 37 : 1140~1151, 1982.
- 23) 森瀬公友：腸上皮化生および胃癌の免疫組織化学的研究. *日消誌*, 79 : 18~27, 1982.
- 24) Yokoyama, I., Watanabe, T., Nishikimi, M. et al. : Radioimmunoscinigraphy of human gastric carcinoma xenografts with ¹²⁵I-labeled monoclonal antibody. *Jpn. J. Cancer Res.(Gann)*, 77 : 1114~1121, 1986.