マウスモノクローナル抗体

——パラフィン切片で染色可能な皮膚悪性黒——
色腫に対するマウスモノクローナル抗体 (M₀Ab)

鷺見 烈*¹ 後藤 政弘*¹ 中島 孝*¹
石原 和之*² 森 俊二*³

Summary

メラノーマの転移巣とヌードマウス移植腫瘍を抗原とし Freund アジュバントを用いて BALB/c マウスに免疫。この BALB/c マウス脾細胞と P3U1 マウスミエローマ細胞をポリエチレングリコールで細胞融合しハイブリドーマを得た。パラフィン切片でスクリーニングすることによりパラフィン切片で染色可能なメラノーマに対する 3 種類のマウス M₀Ab, NCC-SK 1, 46, 56 を得た。これらの M₀Ab はいずれも nodular melanoma (NM) 5 例, acral lentiginous melanoma (ALM) 12 例, superficial spreading melanoma (SSM) 4 例, metastatic melanoma (MM) 3 例の計 24 例全例に ABC 法で陽性所見を呈し, NCC-SK 1, 46, 56 はメラノーマの腫瘍マーカーとしての可能性が示された。

緒 言

Köhler と Milstein がハイブリドーマ技術によって, M₀Ab の作成に成功してから¹⁾, 多くの研究者が癌細胞に特異的な M₀Ab の作製に専念してきた。その結果メラノーマ細胞に対するマウスの M₀Ab が Koprowski ら²⁾ 以後多くの研究者の努力により多数報告されてきた。しかしながら, ほとんどの M₀Ab はメラノーマ細胞に対する特異抗原でなく関連抗原を認識するものであった。さらにこれらの M₀Ab はメラノーマ細胞の膜に対する抗体であり, ホルマリン固定, パラフィン包埋された組織切片と反応せず, 一般の組織染色への応用ができなかった。

しかし近年, 固定した組織に対する M₀Ab^{3)~7)} がいくつか報告されており, これらは組織病理学上レトロスペクティブな研究に非常に有用である。今回われわれはホルマリン固定, パラフィン包埋したメラノーマ組織に対して高率に反応する, 細胞質に対するマウス M₀Ab を作製したので報告する。

材料および方法

4 例のメラノーマ患者の転移巣と 1 例のヌードマウス移植腫瘍の等量を混合しホモジェナイズ後 pH 7.4 の PBS で 4 倍希釈 (重量/体積) した。このホモジェネイトを用いてオスの BALB/c マウスの免疫を行った。初回免疫は 0.04 mg のメラノーマを含むホモジェネイトと Freund の完全アジュバントを混合しマウスの臀部 4 カ所に分けて皮内注射, 以後の追加免疫は 1 週間の間隔で同量のホモジェネイトと

*1 Atushi SUMI, Masahiro GOTO, Takashi NAKAJIMA: 国立がんセンター病理部

*2 Kazuyuki ISHIHARA: 国立がんセンター皮膚科

*3 Shunji MORI: 岐阜大学皮膚科学教室

表 1. Immunohistochemical reactivity of normal human tissues with monoclonal NCC-SK No. 1, 46, 56 antibodies

	No. 01	No. 46	No. 56		No. 01	No. 46	No. 56
Skin				Adrenal glands	+	—	+
Melanocytes	—	±	—	Prostata	+	—	+
Keratinocytes	—	±	—	Nevous tissues			
Liver				Neuron	+	—	+
Hepatocytes	+	—	+	Astroglia	—	+	—
Kupfer cells	—	+	—	Peripheral Nerve	±	±	±
Pancreas				Blood cells			
Exocrine glands	+	—	+	Macrophages	+	+	+
Islet of Langerhans	+	—	+	Neutrophiles	+	—	+
Kidney				Lymphctes	—	—	—
Renal tubules	+	+	+	Muscle	—	—	—
Mesangial cells	—	+	—	Fibroblast	—	—	—
Saliveary glands	+	—	+	Bone	—	—	—
				Cartilage	—	—	—

表 2. Immunocytochemical reactivity of human malignant melanoma tissues with monoclonal NCC-SK No. 1, 46, 56 antibodies

		No. 01	No. 46	No. 51
Nodular melanoma	—	0	0	0
	±	0	0	0
	+	2	2	1
	++	3	3	4
Positive rate		5/5	5/5	5/5
Acral-lentiginous melanoma	—	0	0	0
	±	0	0	0
	+	0	0	0
	++	12	12	12
Positive rate		12/12	12/12	12/12
Superficial spreading melanoma	—	0	0	0
	±	1	0	0
	+	0	0	0
	++	3	4	4
Positive rate		4/4	4/4	4/4
Metastatic melanoma	—	0	0	0
	±	0	0	0
	+	0	0	0
	++	3	3	3
Positive rate		3/3	3/3	3/3
Total	—	0	0	0
	±	1	0	0
	+	2	2	1
	++	21	22	23
Positive rate		24/24	24/24	24/24

(— : 0% ± : 0% <, <10% + : 10% <, <50% ++ : 50% <)

表 3. Immunocytochemical reactivity of human nevus cell nevus tissues with monoclonal NCC-SK No. 1, 46, 56 antibodies

	No. 01	No. 46	No. 56
Junctional nevus	4/4	4/4	4/4
Compound nevus	2/2	2/2	2/2
Intradermal nevus	7/7	7/7	7/7
Blue nevus	2/2	2/2	2/2
Atypical nevus	2/2	2/2	2/2
Total (Positive rate)	17/17	17/17	17/17

表 4. Immunocytochemical reactivity of human skin tumor with monoclonal NCC-SK No. 1, 46, 56 antibodies

	No. 01	No. 46	No. 56
Skin			
Basal cell carcinoma	1/31	30/31	1/31
Squamous cell carcinoma	0/2	2/2	0/2
Malignant eccrine tumor	0/1	1/1	0/1
Paget's disease	0/1	0/1	0/1
Neuilenmoma	0/1	1/1	1/1
Fibroma	0/2	1/2	0/2
Dermatofibroma protubalance	0/1	1/1	1/1
Total (Positive rate)	1/39	36/39	3/39

表 5. Immunocytochemical reactivity of another human tumor tissues with monoclonal NCC-SK No. 1, 46, 56 antibodie

	No. 01	No. 46	No. 51
Breast	0/4	0/4	0/4
Uterus	0/4	0/4	0/4
Lung	10/12	0/12	10/12
Stomach	1/4	0/4	2/4
Colon	1/3	0/3	1/3
Liver	1/3	0/3	1/3
Thyroid	2/3	0/3	2/3
Pheochromocytoma	2/2	0/2	2/2
Carotid body tumor	1/3	1/3	3/3
Glioblastoma	0/2	0/2	0/2
Retinoblastoma	0/1	0/1	0/1
Granular cell tumor	1/3	2/3	3/3
Malignant fibrous histiocytoma	1/1	1/1	1/1
Rhabomyosarcoma	—	0/3	—
Leiomyosarcoma	—	0/1	1/1
Lymphoma (T and B cell)	0/6	0/6	1/6
Total (Positive rate)	12/51	4/55	27/52

図 1.

Freund の不完全アジュバントを用いた。4 回目の免疫の 2 週間後同量のホモジェネイトを単独で腹腔内投与しブースターを行い免疫を終了した。最終免疫 3 日後、BALB/c マウス脾細胞と P3U1 マウスミエローマ細胞を Köhler と Milstein の方法¹⁾でポリエチレングリコールを用いて細胞融合した。この培養上清と 9 種類の正常臓器とメラノーマ、nevus cell nevus (NCN) 各 1 例を含むホルマリン固定、パラフィン包埋切片を用い ABC 法でスクリーニングを行い、メラノーマのパラフィン切片に強く反応する 3 種類のコロニーを最終的に選んだ。これらを limiting dilution でクローニングし、このクローニングされたハイブリドーマをプリスタン処理した BALB/c マウスの腹腔内に接種することにより M_0 Ab を含む腹水を得た。免疫グロブリンクラスの同定はオクタロニーの免疫拡散法によった。ホルマリン固定、パラフィン包埋を行ったメラノーマ 24 例、NCN 17 例、他の腫瘍 55 例と正常人臓器 9 種類を検索に用いた。以下に示す ABC 法でこれらの組織に対して免疫染色を施行した。ゼラチンコートしたスライドガラスに、 6μ に薄切した切片を乗せ、脱パラフィン後メタノール H_2O_2 で内因活性を

ブロック。PBS (pH 7.4) で洗浄後、10% 正常ウマ血清でブロッキング。次に M_0 Ab を乗せ一昼夜反応。PBS で洗浄後 ビオチン化抗マウス IgG を乗せ反応後、PBS で洗浄。0.02% DAB と 0.006% H_2O_2 を含む PBS で発色後ギムザまたはヘマトキシリンで後染色しバルサム封入した。

結 果

われわれが作製した 3 種類の M_0 Ab (NCC-SK 1, 46, 56) の免疫グロブリンクラス、サブクラスは各々 IgG_3 (κ), IgG_1 (κ) および IgG_1 (κ) であった。正常人臓器に対する染色性は (表 1), NCC-SK 46 では肝臓の Kupffer 細胞, 腎臓の尿細管とメサングウム細胞, 神経のアストログリアとマクロファージに陽性を示し, NCC-SK 1, 56 は肝臓の肝実質細胞, 膵臓の Langerhans 細胞, 腎臓の尿細管, 唾液腺, 副腎, 前立腺などの腺細胞, マクロファージや好中球などに陽性を示したが, NCC-SK 1, 46, 56 はいずれも横紋筋, 平滑筋, 線維芽細胞, 骨, 軟骨には陽性所見を示さなかった。メラノーマでは, NM 5 例, ALM 12 例, SSM 4 例, MM 3 例の計 24 例全例に陽性所見を示した (表 2)。メラノーマ組織における染色性は細胞質にびまん性にみられたが, 各細胞間のばらつきが著明であった (図 1)。NCN と青色母斑は全例均一に陽性所見を示した (表 3)。

他の皮膚腫瘍に対して NCC-SK 1, 56 はほとんど陰性であったが, NCC-SK 46 は基底細胞腫 31 例中 30 例に陽性所見を認めた。他の腫瘍に対する反応性は NCC-SK 46 で頸動脈体腫瘍, 顆粒細胞腫, 悪性線維性組織球腫など神経系, 組織球系の腫瘍のみに陽性所見を示し, 55 例中 4 例の陽性率であったが, NCC-SK 1, 56 はその他に胃, 大腸, 肝臓, 甲状腺などの腺癌と反応し, また肺癌とは 12 例中 10 例の陽性率を示し, それぞれ 51 例中 12 例, 52 例中 27 例の陽性率を示した (表 5)。

考 按

現在までに多数のメラノーマ関連抗原に対する M_oAb が報告されてきたが、多くの M_oAb は細胞膜抗原を認識するもので固定された組織とは反応しなかった。今回われわれはパラフィン切片でスクリーニングを行うことにより、ホルマリン固定、パラフィン包埋したメラノーマ組織に高率に反応する 3 種類のマウスモノクローナル抗体 NCC-SK 1, 46, 56 を得た。これらの M_oAb は、24 例中 24 例全例のメラノーマと反応しメラノーマの同定に有用である可能性が示唆された。今後さらに分子量、抗原物質の同定、細胞内局在について検討を行う予定である。

文 献

- 1) Köhler, G., Milstein, C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256: 495-497, 1975.
- 2) Koprowski, H., Steplewski, Z., Herlyn, D., Herlyn, M.: Study of antibodies against human melanoma produced by somatic cell hybrids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75: 3045-3049, 1978.
- 3) Sjoerd, G., et al.: Immunohistochemical and histochemical tools in the diagnosis of amelanotic melanoma. *Cancer* 53: 1566-1573, 1984.
- 4) Barbara, A., et al.: Identification of melanoma-associated antigens using fixed tissue screening of antibodies. *Cancer Res.* 44: 2577-2581, 1984.
- 5) Ashraf, I., et al.: Human monoclonal antibodies that distinguish cutaneous malignant melanoma from benign nevi in fixed tissue sections. *J. Invest. Dermatol.*, 82: 145-148, 1986.
- 6) Allen, M., et al.: Monoclonal antibodies specific for melanocytic tumors distinguish subpopulations of melanocytes. *Am. J. Pathol.*, 123: 195-203, 1986.
- 7) Yutaka, A., Kowichi, J.: Development and characterization of a mouse monoclonal antibody, M_oAb HMSA-1 against a melanomal fraction of human malignant melanoma. *Cancer Res.*, 46: 2904-2911, 1986.