

甲状腺癌特異抗原に対するモノクローナル抗体の作成とその診断・治療への応用

研究課題番号 ( 6 1 4 8 0 2 7 4 )

昭和 6 3 年度科学研究補助金

一般研究 B

研究成果報告書



平成元年 3 月

研究代表者 藤 本 吉 秀

( 東京女子医科大学 医学部 教授 )

## はしがき

我が国は甲状腺癌発生率が欧米より高い。その上近年高年齢者層人口の増加に伴い、予後不良な低分化甲状腺癌患者の絶対数が増えており、その診断と治療に関しては、従来いわれてきた予後良好な高分化甲状腺癌とは全く異なる対処を要求されるようになった。今のところ甲状腺癌の腫瘍マーカーとしては、髄様癌に対するカルシトニンとCEAがあるだけで、甲状腺癌の大半を占める乳頭癌や濾胞癌に対しては信頼のおけるものがない。

本研究では、乳頭癌・濾胞癌が有すると推測される甲状腺癌特異抗原に対するモノクローナル抗体の作成に努め、その特異性を検討し、甲状腺癌の診断ならびに治療への応用を目指す。

この研究と並行して、甲状腺癌既治療例について、臨床的ならびに病理学的検討を加え、甲状腺癌の臨床診断・治療上の問題点を一層明確にすべく努めた。

モノクローナル抗体の作成に関しては、満3年間をついやして最近ようやくでき、その特異性の検討がほぼ終わりにかけたところであり、臨床応用の有用性の検討が今後の課題として残っている。

甲状腺癌臨床例についての検討は幾多の成果が得られ、以下に記す発表を行った。

## 【研究組織】

## 研究代表者

藤 本 吉 秀 (東京女子医科大学 内分泌外科・教授)

## 研究分担者

日 下 部 き よ 子 (東京女子医科大学 放射線科・助教授)

佐 藤 幹 二 (東京女子医科大学 内 科・助教授)

## 【研究経費】

昭和61年度	3,300千円
昭和62年度	2,000千円
昭和63年度	1,000千円
合 計	6,300千円

## 【研究発表】

## (1) 学会誌等

藤本吉秀:甲状腺外科の展望. 日外会誌, 87:247, 1986.

藤本吉秀:特集:新しい画像診断. 甲状腺の画像診断. 内科, 58:137, 1986.

藤本吉秀:甲状腺癌の早期発見と診断法. JOHNS, 2巻8号, 1986.

藤本吉秀:外科Strategy-私の方針, 甲状腺(悪性疾患). 外科診療, 28巻11号, 1986.

藤本吉秀:最近薬物療法Manual-投薬の基本と治療プログラム, 甲状腺癌. 日本臨床, 44巻(秋季臨時増刊号), 1986.

Fujimoto, Y., Obara, T., et. al: Aggressive surgical approach for locally invasive papillary carcinoma of the thyroid in patients over forty-five years of age. Surgery, 100:1098, 1986.

Kodama, T., Fujimoto, Y., et. al: Justification of conservative surgical treatment of childhood thyroid cancer: report of eleven cases and analysis of japanese literature. Jpn. J. Cancer Res. (Gann), 77:799, 1986.

藤本吉秀:特集:化学療法剤, 甲状腺癌. 臨床成人病, 増刊号, 17:555, 1987.

藤本吉秀:特集:頸部腫瘍の臨床, 診断と治療の実際-甲状腺疾患. 臨床外科, 42:515, 1987.

藤本吉秀:特集:甲状腺癌の手術, 甲状腺癌の治療方針と基本的手術術式. 手

術, 41:339, 1987.

藤本吉秀:甲状腺腫瘍の治療:腺腫・腺腫様甲状腺腫・甲状腺悪性腫瘍について. *Mebio*, 4:87, 1987.

藤本吉秀:甲状腺癌. 最新医学, 42:2630, 1987.

藤本吉秀:特集;再発癌の外科的治療. 手術, 41:1183, 1987.

藤本吉秀:甲状腺濾胞癌の治療方針. *JOHNS*, 3:1530, 1987.

Yashiro, T., Ito, K., Akiba, M., Kanaji, Y., Obara, T., Fujimoto, Y. et al:

Papillary carcinoma of the thyroid arising from  
dys hormonogenetic goiter. *Endocrinol. Japan*, 34:955, 1987.

日下部きよ子, ほか:甲状腺全摘後の分化型甲状腺癌患者における血清サイ  
ログロブリン測定の意義. *日本医放会誌*, 47:745, 1987.

日下部きよ子, ほか:甲状腺分化癌の骨転移に対する $^{131}\text{I}$ 治療. *臨放*, 32:  
785, 1987

藤本吉秀:甲状腺腫瘍. 現代医療, 特大号「最新の話題—診断と治療」, 20:228  
7, 1988.

Yamasita, T., Fujimoto, Y., et al:When is total thyroidectomy indi-  
cated as a treatment of "follicular carcinoma"? *World J.*  
*Surg.*, 12:559, 1988.

Kodama, T., Fujimoto, Y., et al:Histochemical demonstration of thyroxine,  
triiodothyronine, and thyroglobulin in the primary lesion  
of thyroid carcinoma, and its predictability for  
radioiodine uptake by metastatic lesions. *World J. Surg.*,  
12:439, 1988.

Fujimoto, Y., et al:Endocrine surgery in Japan and in our series:  
Incidence of surgical endocrine disorders, surgical  
strategy and results of treatment. *Endocrine Surgery*, 5:  
423, 1988.

日下部きよ子,ほか:モノクローナル抗体のシンチグラフィーおよびオートラジオグラフィーによる画像診断技術,実験医学,6:565,1988

(2) 学会発表

金地嘉春,藤本吉秀,日下部きよ子,佐藤幹二:甲状腺癌より抽出したサイログロブリンを抗原としたモノクローナル抗体の作成,第21回甲状腺外科検討会,(抄録集,p.84),1988.

## 研究成果

### I. 研究目的

#### 1. 研究目的とその一部修正

そもそもの研究の出発点において目標としたのは、甲状腺乳头癌の診断に役立てるため、乳头癌が有するであろう特異的な抗原物質に対するモノクローナル抗体 (Monoclonal antibody, 以下MoAbと略す) を作成することであった。しかし研究を進める過程で2つの大きい障害にぶつかり、終局的には日本における全甲状腺癌の80~90%を占める乳頭癌を対象とし、さらに日本でみる未分化癌 (全甲状腺癌の約3~5%を占める) の大半のものが実は乳頭癌が悪性転化したものであることを考慮に入れ、この乳頭癌組織から抽出されるサイログロブリン (Thyroglobulin, 以下Tgと略す) を抗原とし、それに対するモノクローナル抗体 (MoAb) の作成を目的とするにいたった。

2つの障害の1つは、組織培養により純化した甲状腺癌細胞を抗原として扱う利点を考慮して、前田昭太郎<sup>1)</sup>が株化した甲状腺癌細胞を譲り受け、それを抗原として細胞融合を行い雑種細胞 (ハイブリドーマ) を作成した時点でその培養細胞が全くTgをもたないことがわかり、甲状腺癌細胞の性質をすでに喪失している疑いが生じたのと、もう1つは、抗体産生ハイブリドーマの検出のよい方法がみつからなかったことであり、その細胞は凍結保存の状態の研究が中断した。

第2の障害は、甚だ現実的な問題であり、この研究を始めた3年前から甲状腺乳头癌で外科摘除の対象となる患者がほとんどなく、抗原材料を採用できなかったということである。もともと日本では乳头癌の頻度が低かったが近年その傾向がさらに顕著になった。

#### 2. 乳頭癌組織から抽出したTgに対するMoAb作成の意義

今日末梢血中におけるTg濃度の測定が広く行われているが、その測定に用いられている抗Tg抗体は、バセドウ病患者から手術により摘除された甲状腺組織を用い抽出されたTgを抗原とするpolyclonal抗体であるため、各種甲状腺疾患

患者において血中Tg濃度の上昇が認められる<sup>2~10)</sup>。かつて末梢血中Tg濃度の高いときには、甲状腺癌の診断が強く示唆されるものと期待されたが、現在使用している抗体を用いる限りではその期待は裏切られた。

しかし正常甲状腺Tgと甲状腺腫瘍組織のTgを比較すると、腫瘍Tgはヨード含量が少なく<sup>11~14)</sup>、糖鎖構造に差異があると報告されており<sup>15~20)</sup>、その質的差異を利用して甲状腺癌の診断に役立てようとする試みは当然なされるべきであるが、まだ実用の段階に達したものはない。

1975年KöhlerとMilstein<sup>21)</sup>により細胞融合法が開発され、これの免疫学への導入によりMoAbを産生するハイブリドーマの作成が可能となった。今までにも、甲状腺癌から抽出されたTgあるいは細胞膜成分に対するMoAb作成がいくつかの施設で試みられてきた<sup>22~24)</sup>。もし甲状腺乳頭癌特有のTgに対するMoAbの作成に成功すれば、甲状腺乳頭癌の診断、他の種類の甲状腺癌の診断、さらには乳頭腫から悪性転化した未分化癌患者と甲状腺原発悪性リンパ腫患者との鑑別診断に役立つ可能性がある。

また今日高齢者の甲状腺癌でしばしば血行性転移の起こることが問題になっているが、現在用いられているpolyclonal抗TgAbでは有転移例でも血中Tg濃度が高くないものがある。しかしながらよいMoAbができればtumor markerとして有用であり、さらには放射能物質で標識してシンチグラフィーあるいは抗腫瘍療法への応用も十分に期待される。

## II. 研究の実施

今回われわれは、凍結保存しておいた甲状腺乳頭癌組織よりTgを抽出し、その腫瘍Tgに対するMoAbを作成した。

そのMoAbを用いて、免疫組織学的酵素抗体法により、①臓器特異性があるか、②癌特異性があるか否かを検討した。

また甲状腺乳頭癌を移植したヌードマウスに、<sup>125</sup>IでラベルしたMo抗TgAb

を用い、①ヌードマウスの体内分布を検討し、②オートラジオグラフィにて腫瘍内分布を観察した。

さらに③ラジオイムノアッセイ法にて抽出した抗原に対する結合能を検討した。

### Ⅲ．材料と方法

#### 1．材料

##### 1) Tg

正常Tgは、凍結保存しておいたバセドウ病患者からの手術摘出標本より抽出した。腫瘍Tgは、凍結保存しておいた乳頭癌患者からの手術摘出標本より抽出した。

##### 2) 試薬

ポリエチレングリコール2000、及びプリスタンは和光純薬より、hypoxanthine、aminopterin、thymidine、ウシTgはSigma社より、horseradish-peroxidase結合抗マウスIgG抗体はTago社より、ポリクロナル抗Tg抗体はDakopatts社より購入した。尚ヒトモノクローナル抗Tg抗体はラジオイムノアッセイの基礎検討のため、コスモバイオ社製のものを一部使用した。

#### 2. 方法

##### 1) Tgの抽出<sup>25~27)</sup> (図1)

正常Tgは、凍結保存しておいたバセドウ病患者からの手術摘出甲状腺組織を解凍し、ホモジェナイズして超遠心(10万G)分離したのち、硫酸により塩析し、さらにセファクリルS200のカラムを通し、部分純化した。

腫瘍Tgの抽出は、やはり凍結保存しておいた乳頭癌患者17例からの手術摘出甲状腺癌組織を解凍し、正常部分を取り除き、以下は同じように行った。

##### 2) 抗Tg抗体の作製

BALB/cマウス(雌、生後4週)に抽出した腫瘍TgをFreundの完全アジュバントと混和した後、腹腔内に接種し、14日後にTgを腹腔内に追加免疫した。7



日後に採血しサイログロブリンテストを行い抗体価の上昇を確認した。7日後腹腔内に追加免疫し、10日後尾静脈よりTgを静注し、その3日後に細胞融合を行った。

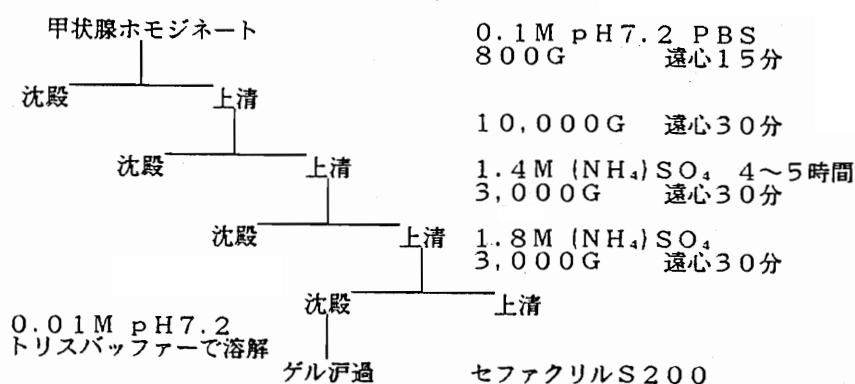


図1. Tgの抽出方法

### 3) ハイブリドーマの作製

前述のマウスの脾細胞を無菌操作で採取し、その $1 \times 10^8$ 個と、抗体非分泌性マウス骨髓腫細胞株SP2/Oの $2.4 \times 10^7$ 個とを50%ポリエチレングリコールを用いて、KöhlerとMilsteinの方法に準じて細胞融合を行った。融合後は、ウシ胎児血清を15%含んだHAT/RPMI1640培地(hypoxanthine  $1 \times 10^{-4}$ M、amino-pterine  $4 \times 10^{-7}$ M、thymidine  $1.6 \times 10^{-5}$ M、L-glutamine  $2 \times 10^{-3}$ M)に懸濁後、96穴microwell plate(Nunc社1-67008)に分注し、5~6日毎に1/2量の培養上清の液交換を行い、ハイブリドーマを選択した。

### 4) 抗体産生ハイブリドーマの検定及び維持

HAT培地にて選択されたハイブリドーマのうち、正常Tgに低く、腫瘍Tgに高い抗体活性をもつ抗体分泌細胞のスクリーニングを、enzyme-linked immunosorbent assay(以下ELISAと略)法を用いて行った。正常Tgと腫瘍Tgを各々 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$  0.01M PBS pH7.4で被覆したNunc-immunoPlate II-96U(Nunc社4-49824)の各wellにハイブリドーマ培養上清を分注して37℃、2時間反応させ洗浄

後、horseradish-peroxidase結合抗マウスIgG抗体を加え、37°C 1時間反応させた。洗浄後に基質としてo-phenylenediamine 0.4mg/mlとH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.01%液を加え、発色反応により抗腫瘍Tg抗体の存在を確認した。この方法によって正常Tgに低く、腫瘍Tgに高い抗体活性を有する細胞群を求め、限界希釈法によるクローニングを2回行い、腫瘍Tgに対するモノクローナル抗Tg抗体産生株を確立した。この確立した細胞株をプリスタンにて14日前にプライムされたBALB/cマウスの腹腔内に接種（ $1 \times 10^6 \sim 7$ 細胞/匹）し、7～14日後に生じた腹水を採取した。

#### 5) 抗体の亜分画および精製の検討（表1）

腹水を希釈し免疫沈降法を用いIgGを決定した上で、硫酸アンモニウムによる塩析法にて濃縮の後に、透析し、抗体を回収した。抗体量はOD280nmにて定量した。

モノクローナル抗体の種類		倍率	IgG種類	蛋白濃度mg/ml
No 1	5D6B6B12	x1000	G1	2.42
No 2	4A10H4E12	x1000	G1	2.54
No 3	5D10F3C12	x1000	G2b	2.49
(No 4	5D6F1D8	x100	G1	2.34)
(No 5	1D2D9	x10	G1	2.36)

表1. MoAbの種類とオクタロニー沈降反応の希釈倍率およびグロブリンの種類、蛋白濃度を示した。2種類（No 4、5）は、反応性が低く、今回は検討から除外した。

#### 6) 酵素抗体法による組織の染色

甲状腺（バセドウ病、乳頭癌、未分化癌）の通常ホルマリン固定パラフィン連続切片標本につき、ポリクローナル抗Tg抗体（DAKOPATTS：ウサギ）と、今回作製した5種類のうちの3種類（No 1、2、3）のMoAbについて、間接法で各種甲状腺組織のそれぞれの部分に結合するのかを比較検討した。

7) オートラジオグラフィー<sup>28)</sup>

手術にて摘出したヒト甲状腺乳頭癌組織を移植したヌードマウスに、ヨードジェン法にて  $^{125}\text{I}$  をラベルした MoAb 抗体 No. 3 を  $80\mu\text{Ci}$  腹腔内に投与し、3日または4日後の臓器内および移植腫瘍部への分布を検討した。アセトン・ドライアイスで凍結した腫瘍移植ヌードマウスを、矢状断にマイクロトームで  $20\mu\text{m}$  の連続切片を作り、コダック X-OMAT フィルムに密着させオートラジオグラフィー法を行い、移植腫瘍部への集積状況を調べた。

## 8) ラジオイムノアッセイ

上記オートラジオグラフィーに使用したのと同じ  $^{125}\text{I}$  ラベル MoAb No. 3 を使用した。

① 抗原固相化法：乳頭癌組織、バセドウ病甲状腺、ウシ甲状腺より抽出したそれぞれの Tg を 96 穴 (Dynatec Labo) に  $37^\circ\text{C}$  2 時間でコーティングさせ洗浄後、 $^{125}\text{I}$  ラベル MoAb No. 3 を反応させ、それぞれの濃度別に各ウエルの放射活性を測定した。

② 抗体固相化法：市販の抗ヒト Tg MoAb (lot No. J7-C9-3) を  $37^\circ\text{C}$  2 時間で固相化し洗浄後、乳頭癌組織、バセドウ病甲状腺、ウシ甲状腺の各種 Tg を 24 時間反応させ洗浄後、サンドイッチ法 (IRMA) でそれぞれ  $^{125}\text{I}$  ラベル MoAb No. 3 を加え洗浄後、濃度別にその放射活性を測定した。

③ 今回作製した  $^{125}\text{I}$  のラベルされていない抗 Tg MoAb No. 3 を固相化し、乳頭癌組織、バセドウ病甲状腺、ウシ甲状腺の Tg を反応させ、さらに  $^{125}\text{I}$  ラベル MoAb No. 3 を反応させてそれぞれの濃度別にその放射活性を測定した。

## IV. 結果

## 1. Tg の抽出

凍結保存しておいた 17 名の甲状腺乳頭癌患者手術摘出組織より Tg を抽出した。セファクリル S200 のカラムを通し 48 本の分画が得られ (図 2)、最初のピークの

№19、20、21、22の4本を透析したのち、凍結乾燥し、約70mgのTgを抽出した。

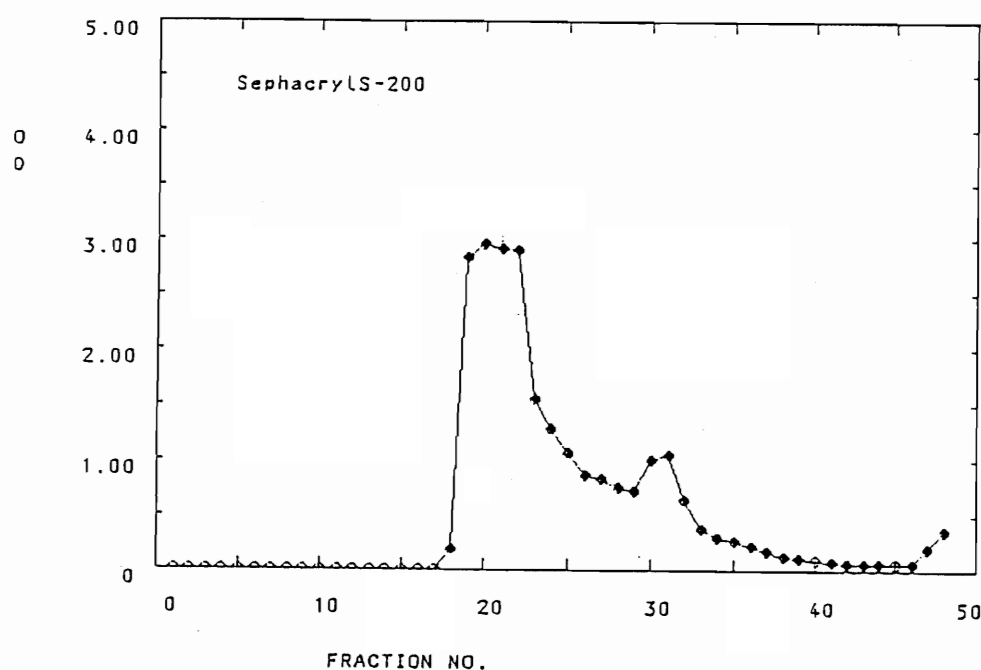


図2. TgのセファクリルS200カラムよりの溶出パターン

## 2. MoAbの作成

細胞融合14日後にELISA法により培養上清を用いて抗Tg抗体活性をスクリーニングした結果、抗Tg抗体活性を33ウエルで認め、うち5ウエルで強く認められた。これらのハイブリドーマに、限界希釈法によるクローニングを2回施行したところ、抗Tg抗体を産生し続けたのは5 clonesとなった(表1)。(№1: 5D6B6B12、№2: 4A10H4E12、№3: 5D10F3C12、№4: 5D6F1D8、№5: 1D2D9)

これらの5つのIgG抗体の亜分画を検討したところ、IgG1、IgG2bに属することが判明した。

得られた5 clonesを腹腔内に接種して生じたマウスの腹水から、IgGを硫酸アンモニウムによる塩析法で精製したところ、それぞれ2.42、2.54、2.49、2.34、

2.36mg/mlであった(表1)。

### 3. 酵素抗体法によるMoAbの特異性の検定

今回作製した5種類のうちの3種類のMoAb (Na 1、Na 2、Na 3) は、ヒトの胃、小腸、大腸、虫垂、子宮頸部、子宮内膜、卵管、胎盤に染色性はなく、甲状腺のみが染色され、しかも抗Tgポリクローナル抗体と似た染色性を示したため、臓器特異性があることが示された。また3種類のMoAbによる染色性の程度は、ポリクローナル抗体(写真3)に比べNa 1(写真4)は若干弱く、Na 2(写真5)、Na 3(写真6)とは差がなく、むしろ、抗原量の多い部位ではNa 2、Na 3のMoAbのほうが、ポリクローナル抗体より強い染色性を示し、抗原量の少ない部位ではポリクローナル抗体の方が、強い染色性を示した。

また、ポリクローナル抗Tg抗体でブロッキングテストを行ったところ、染色性が減弱ないし著しく消失され(写真1、2)、このことから、MoAbの結合部位がブロックされたと考えられ、従ってTgに対する抗体であると云うことがいえる。

乳頭癌、卵胞癌、正常甲状腺およびバセドウ病甲状腺の染色性において、定性的には差がなく、明らかな癌特異性はないように思えた(写真3、4、5、6、乳頭癌と正常甲状腺部分)。また今回用いた未分化癌組織に対する染色性は、認められなかった。

### 4. オートラジオグラフィー

臓器内および移植腫瘍部への分布は、マウス甲状腺へのヨードブロックを行っていないため甲状腺には多く取り込まれているが、移植腫瘍部には、多く取り込まれている(図3)。

さらにそのオートラジオグラフィーを詳細に検討すると、移植腫瘍部内の1部に高濃度に $^{125}\text{I}$ 標識抗Tg MoAb Na 3の集積が認められ、移植甲状腺腫瘍組織がheterogeneousであることが示唆された。(写真7)。

### 5. ラジオイムノアッセイ

抗原固相法では、①乳頭癌より抽出したTgのみに $^{125}\text{I}$ ラベルMoAb Na 3結合

が認められ、バセドウ病甲状腺、ウシ甲状腺のTgには認められなかった(図4)。

②また抗体固相法であるサンドイッチ法でも乳頭癌より抽出したTgと $^{125}\text{I}$ ラベルMoAbNa3と間にboundが得られ、バセドウ病甲状腺、ウシ甲状腺のTgには認められなかった(図5)。

③MoAbNa3固相法では、乳頭癌組織、バセドウ病甲状腺、ウシ甲状腺のTg全てにカウントが得られなかったため、抗原認識部位は1個の可能性がある(図6)。

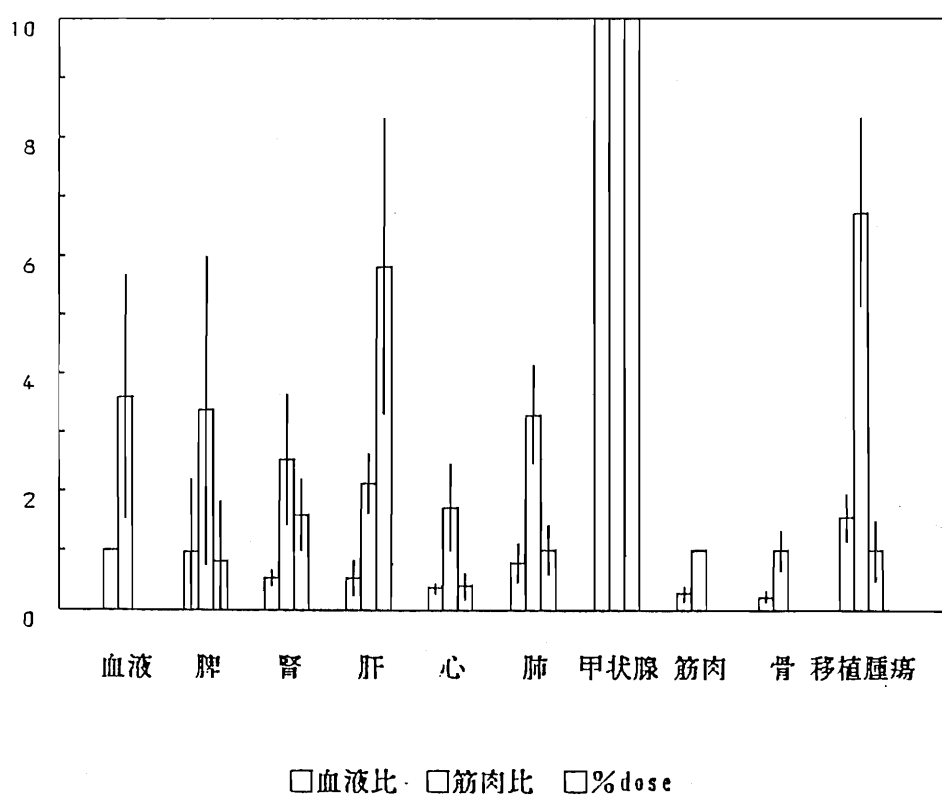


図3. ノードマウスの体内分布

## V. 考察

Tgは1899年Ostwaldによりヨード含有蛋白性成分として甲状腺に発見され、Hutchisonがthyreoglobulinと命名したと報告<sup>29, 30)</sup>されている。今日研究が進

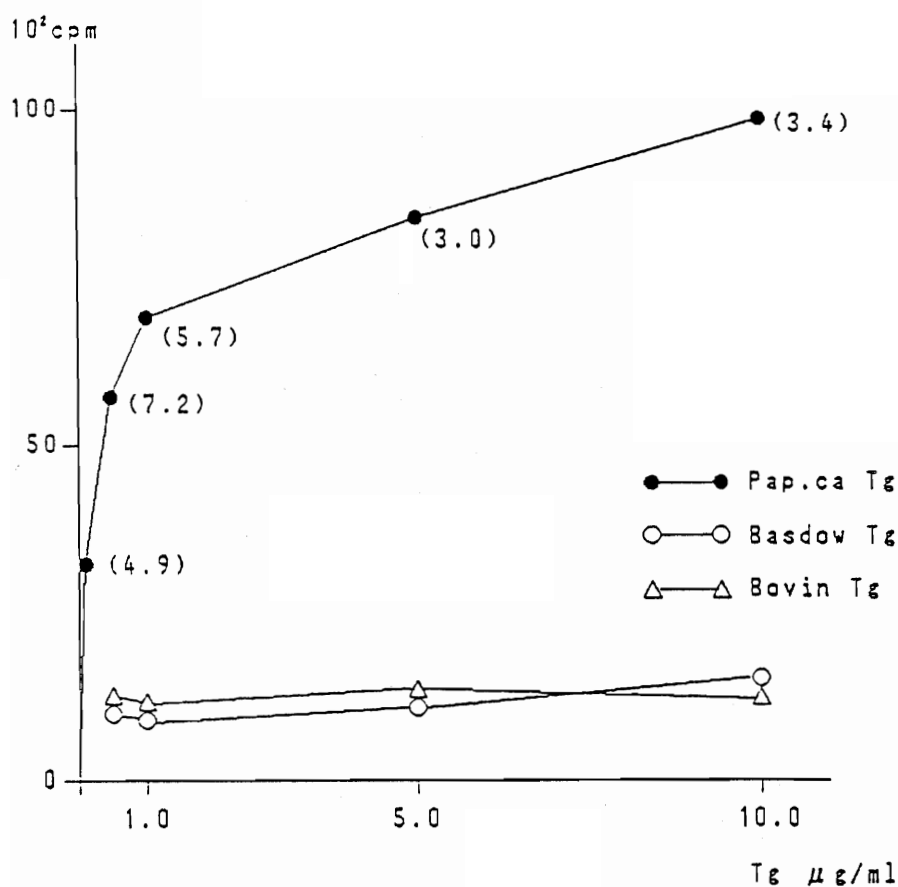
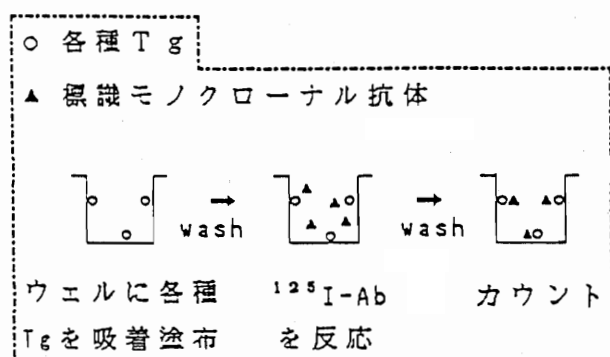


図. 4 サイログロブリンコーティング  
 $^{125}\text{I}$ -monoAb反応性  
( ) 内C.V. %

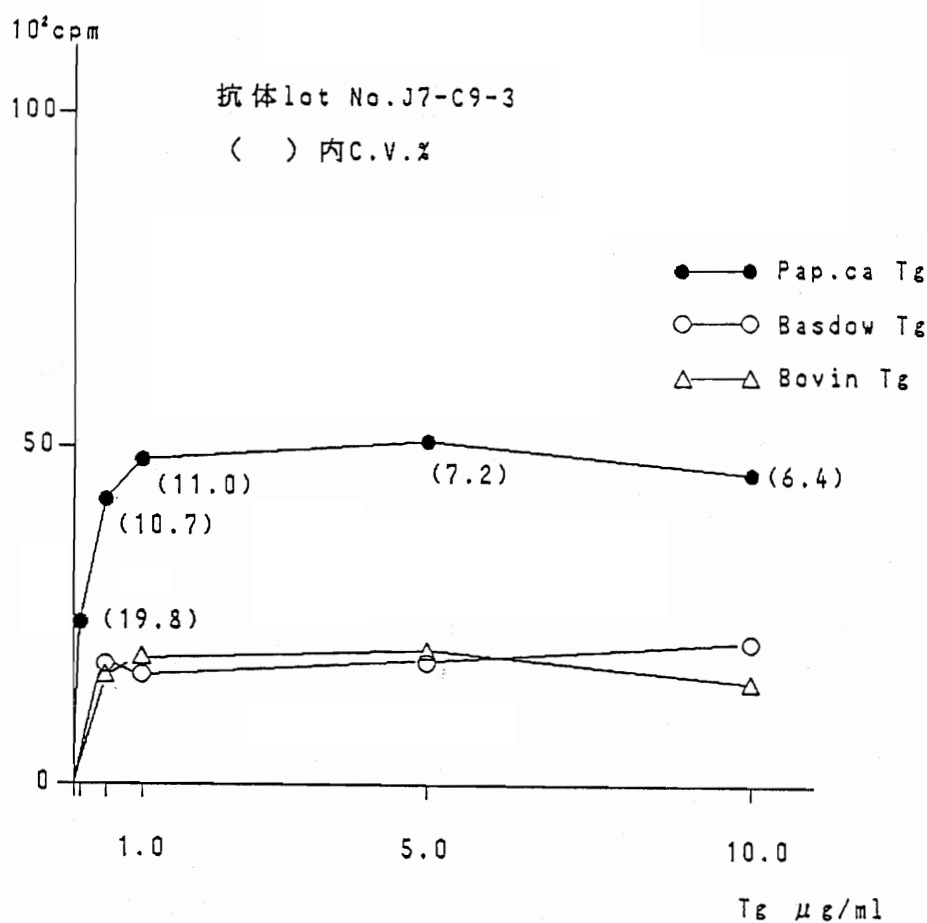
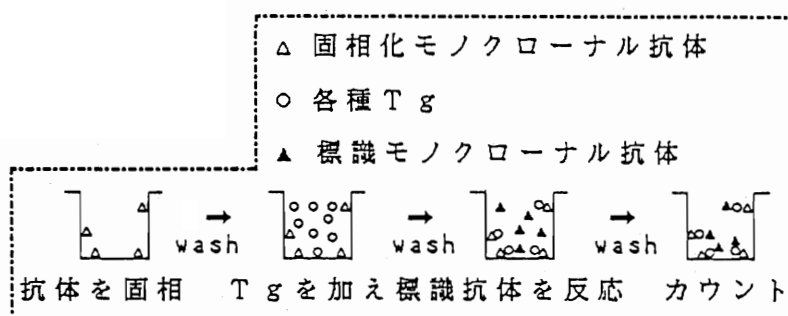
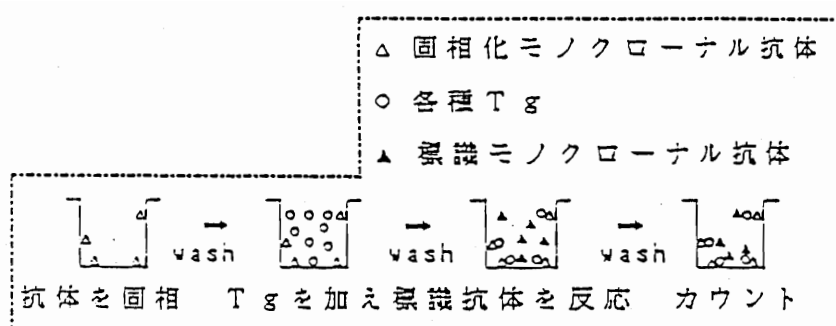


図. 5 モノクローナル抗体固相化サンドイッチアッセイ





抗体 original monoclonal antibody.No3

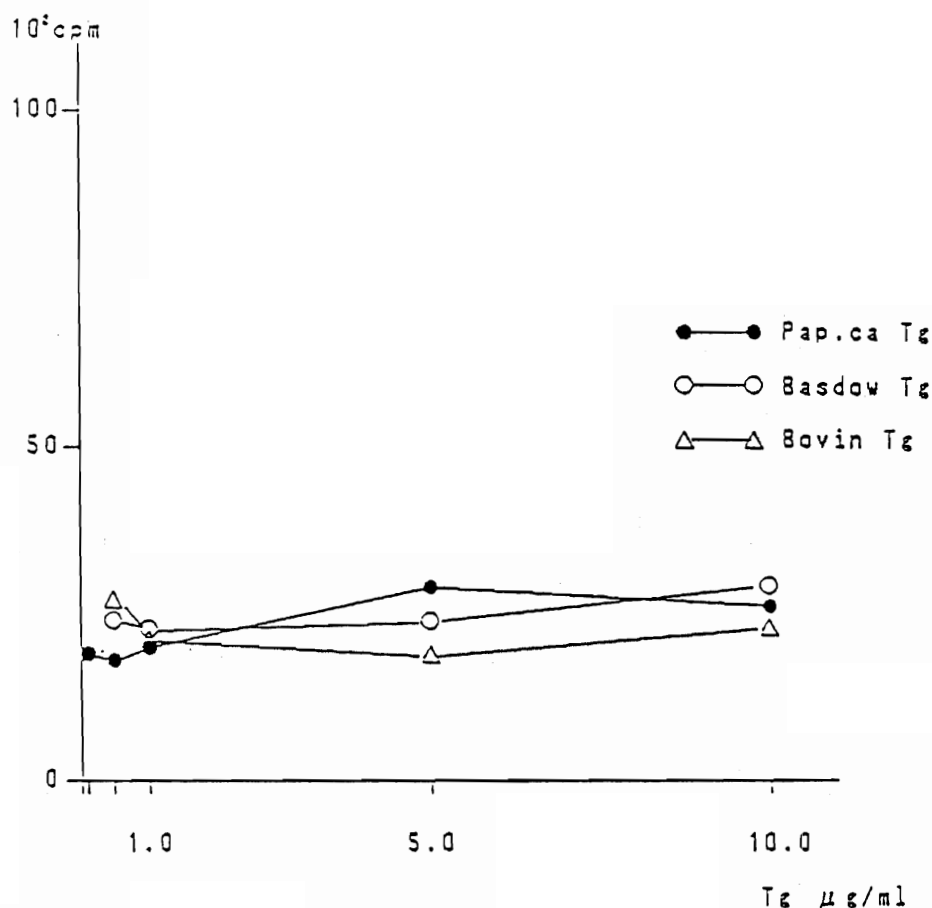


図. 6 モノクローナル抗体固相化サンドイッチアッセイ

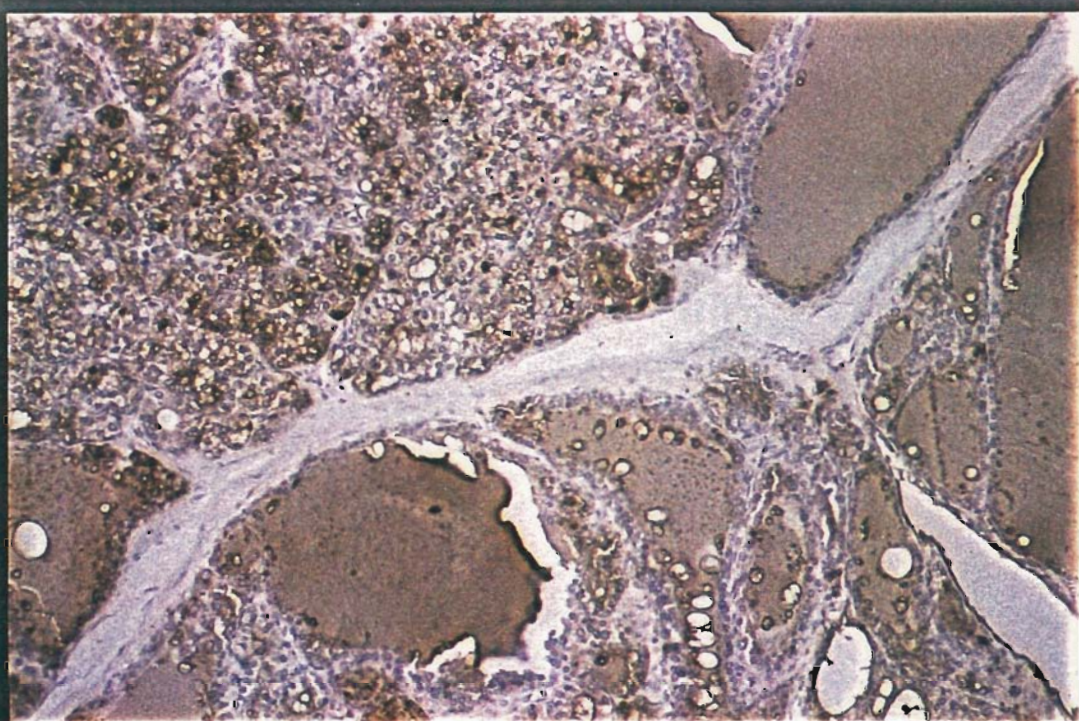


写真1. ブロック前

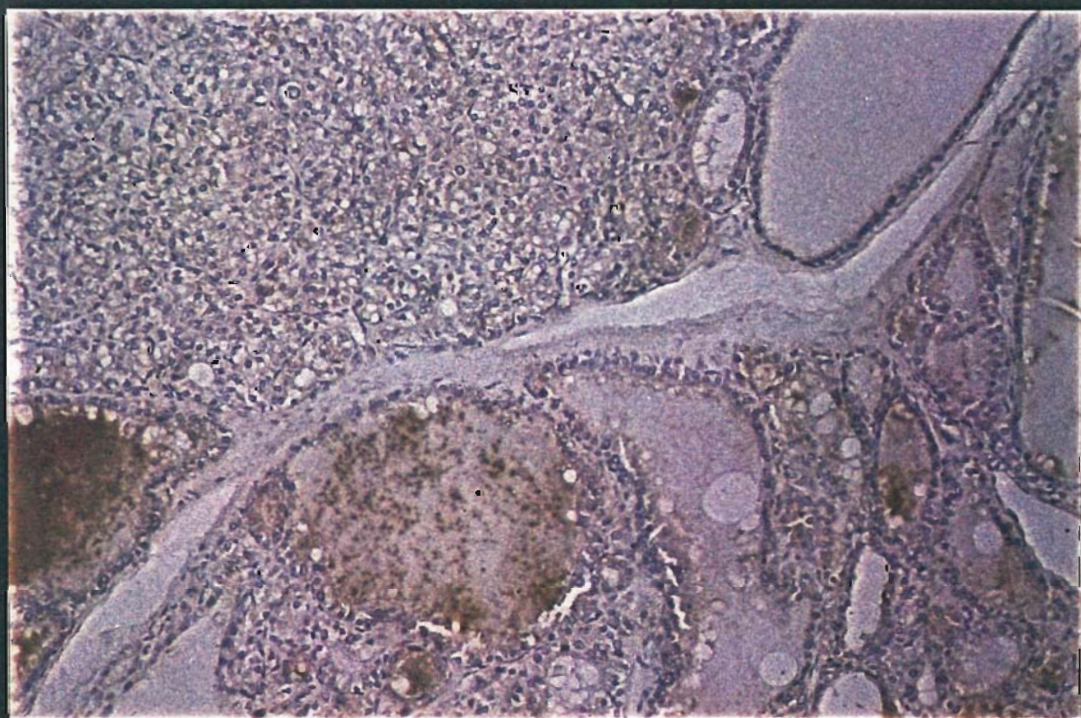


写真2. ブロック後



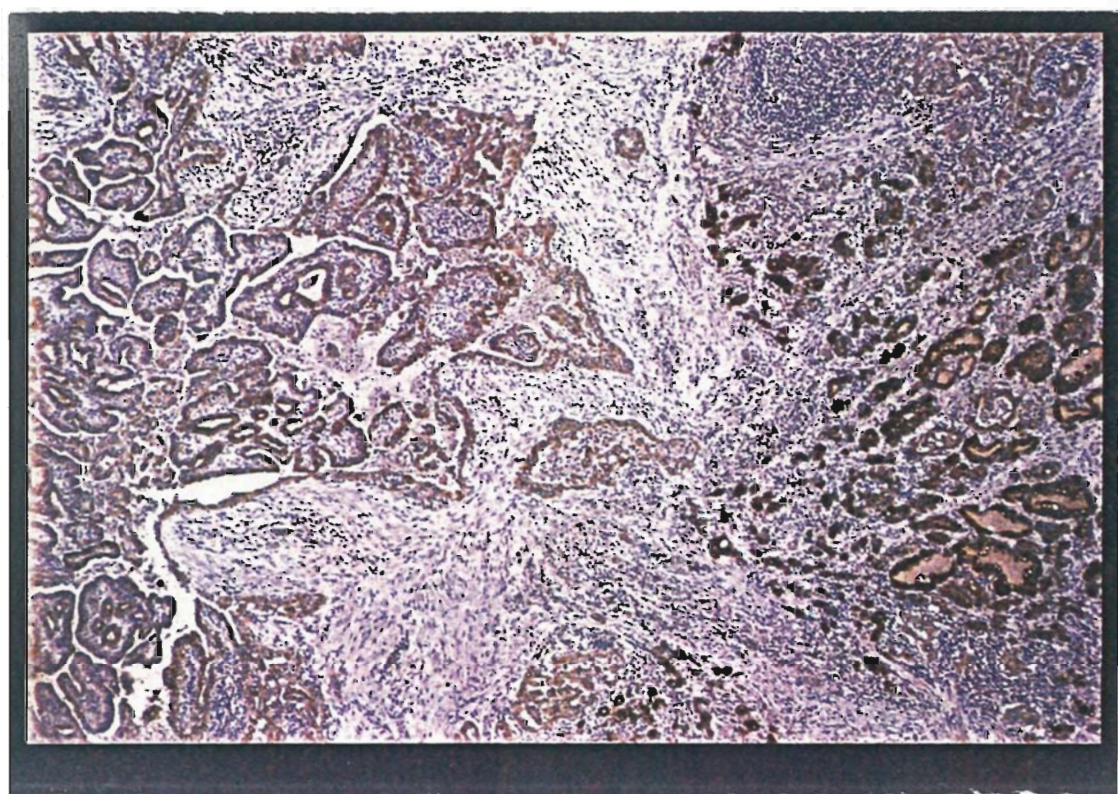


写真3．ポリクローナル抗体（乳頭癌と正常甲状腺）

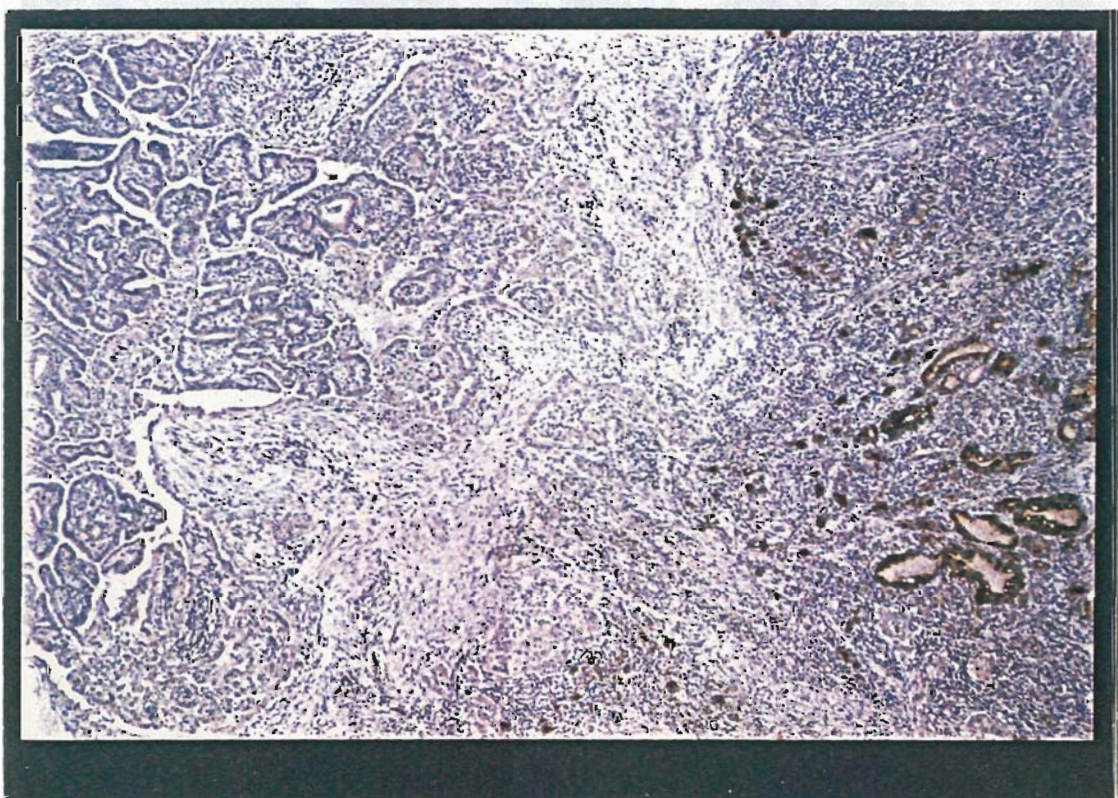


写真4．モノクローナル抗体No. 1（乳頭癌と正常甲状腺）



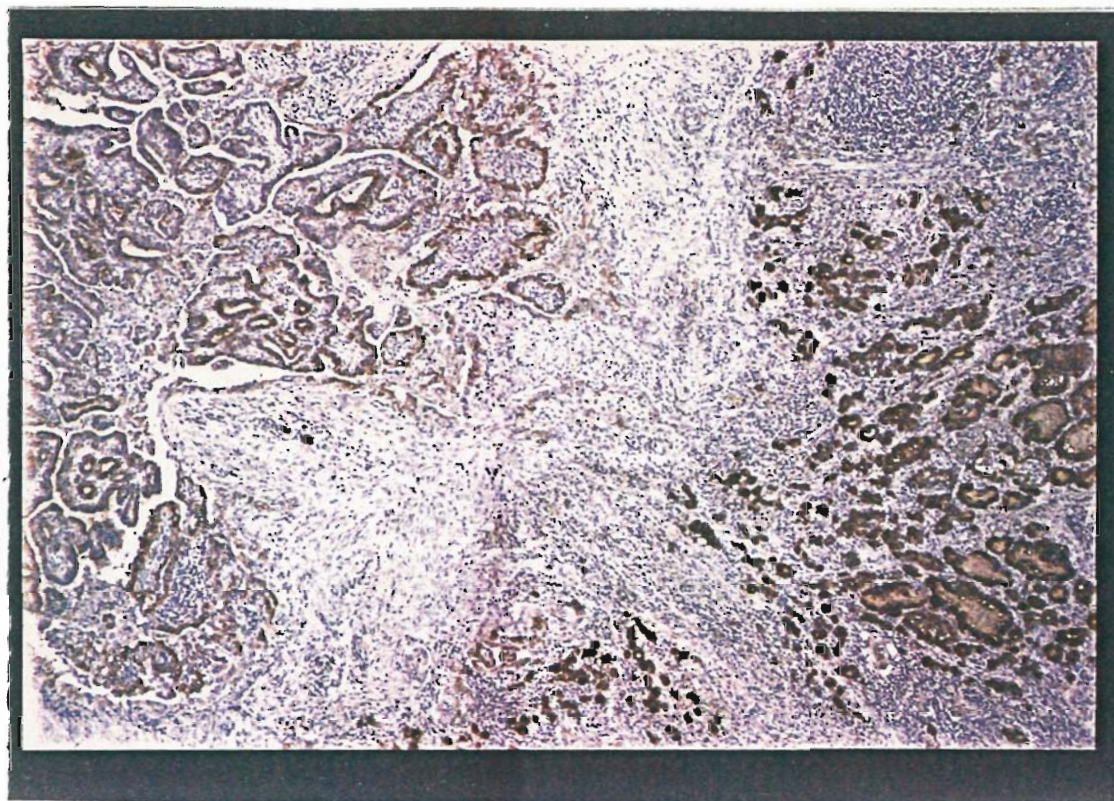


写真5. モノクローナル抗体No. 2 (乳頭癌と正常甲状腺)

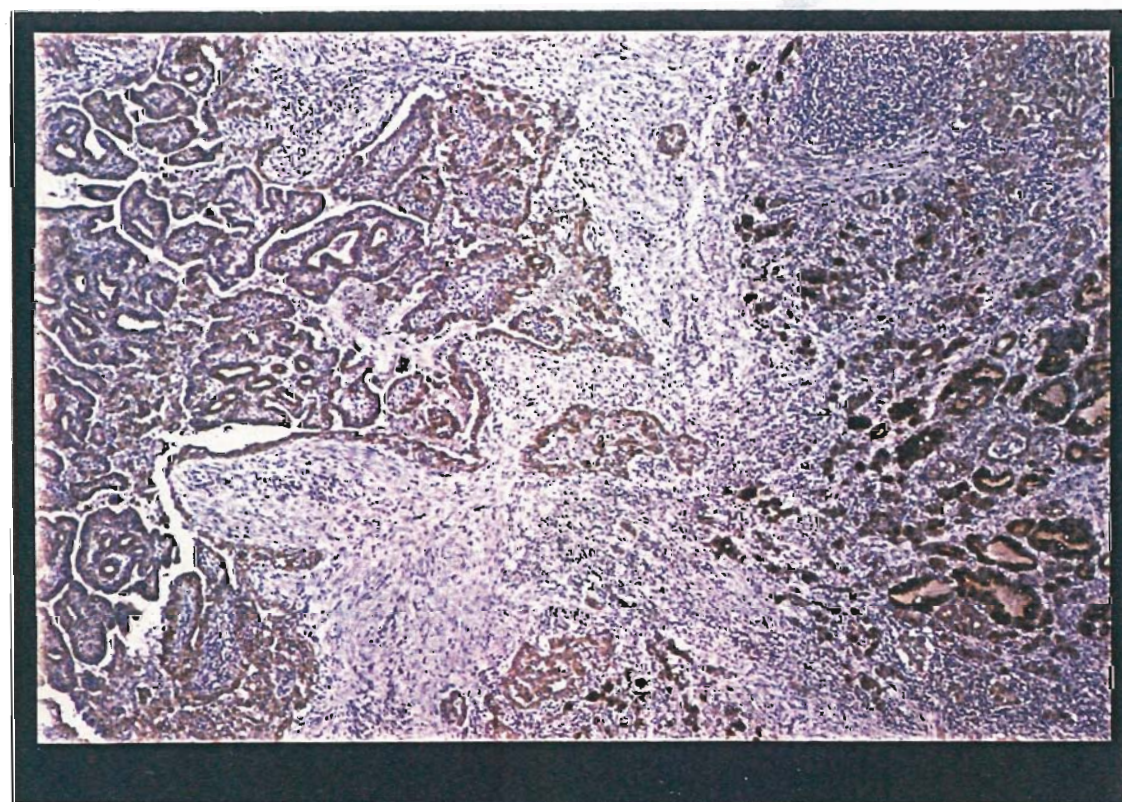


写真6. モノクローナル抗体No. 3 (乳頭癌と正常甲状腺)



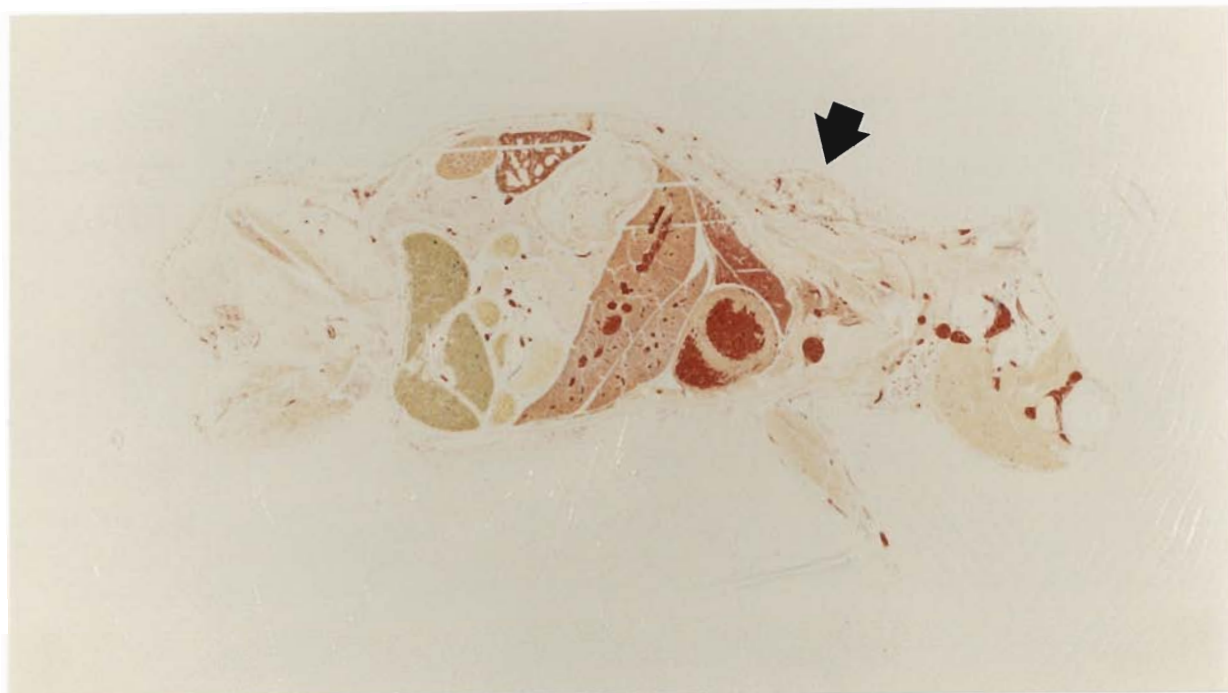


写真7. オートラジオグラフィー（⇒：甲状腺乳頭癌移植部位）

み、分子量66万の巨大なヨウ素化糖蛋白で、糖含量は8-10%、ヨウ素含量は0.1-1.0%で、このヨウ素含量の違いにより沈降係数は19S前後を示す。Tgは甲状腺濾胞上皮細胞内で合成されて、濾胞内に貯蔵され、再び濾胞腔から甲状腺濾胞上皮細胞に再吸収され、その加水分解産物は、細胞から甲状腺ホルモンとして分泌される。しかしTg自身も血中に存在する事が、ラジオイムノアッセイで測定可能となって以来<sup>25)</sup>、種々の甲状腺疾患で血中Tgが異常に上昇する事が報告された。この点からみるとTgは、臓器特異性の高い物質であるが、甲状腺疾患の鑑別という点からTgを測定することは、臨床的意義は乏しい。しかし正常甲状腺Tgと甲状腺腫瘍組織におけるTgを比較すると、腫瘍Tgはヨード含量が少なく、糖鎖構造にも差異があると報告されている。そこでこの研究では、甲状腺乳頭癌組織内のTgの違いを利用して、凍結保存しておいた甲状腺乳頭癌組織より抽出したTgをマウスに免疫し、そのマウスの脾細胞をとり、抗体非分泌性マウス骨髓腫細胞SP2/Oと細胞融合を行い、抗Tg抗体を産生する5種類のハイブリドーマを選出し、MoAbを作成した。そのうち2種類のものは反応性が低かったため、今回は3種類のMoAbについて検討をおこなった。

今回我々が作成したMoAbNo.3をIRMA法でその特異性を検討したところ、甲状腺乳頭癌より抽出したTgを良く認識し、バセドウ病甲状腺やウシ甲状腺より抽出したTgをあまり認識しないMoAbを得ることが出来た。これまでにKohn<sup>31)</sup>らは、正常甲状腺より抽出したTgを抗原としてモノクローナル抗Tg抗体を作成し、正常Tgを良く認識し、腫瘍Tgをあまり認識しないMoAbを作成しているが、我々は最初のもくろみ通りこれとは逆の性質を有するMoAbを得る事が出来た。

そこでこのMoAbを用い、ヒトの各臓器を染色したところ染色性を示さず、甲状腺組織のみが染色され、臓器特異性がある事が判明した。

さらに、ヒト正常甲状腺およびヒト甲状腺腫瘍を染色したところ、甲状腺乳頭癌は良好に染色されたが、正常甲状腺部も強く染色されてしまった。その一因としては、我々の作成したMoAbの特異性が、正常Tgともある程度交差性を示し、且つ正常甲状腺組織は、腫瘍組織に比べ大量の抗原(Tg)を有するためと思われ

る。

Tgは、40ヵ所以上の抗原決定基を有しているとされているが<sup>19)</sup>、我々のMoAbが認識した抗原決定基は、必ずしも腫瘍Tgに特異的なものとはいえないと思われる。これまでに、バセドウ病より抽出したTgを抗原として作成したモノクローナル抗Tg抗体で甲状腺を染色したところ、濾胞細胞内のTgを認識し、濾胞腔内のTgを認識しないMoAbの報告<sup>32, 33)</sup>もされており、抗原の認識部位によっては、このような事も十分あり得ると思われる。

さらにこのMoAbを用いてヒト甲状腺腫瘍を移植したヌードマウスに<sup>125</sup>I MoAb No. 3を投与しオートラジオグラフィーを行ったところ、移植甲状腺腫瘍の一部に<sup>125</sup>I MoAb No. 3の集積が認められた。

現在のところ、甲状腺腫瘍由来のTgと正常Tgとの決定的な違いは不明である。ラベリンの技術や至適pHの問題もあるが、甲状腺腫瘍Tgに対しIRMA法でさらに高い感度の反応が得られれば、甲状腺腫瘍の診断に有用であると思われる。

## VI. 結語

1. 甲状腺乳頭癌組織より抽出したTgに対するMoAbを5種類作製し、そのうち3種類につき、ラジオイムノアッセイ法、酵素抗体法、オートラジオグラフィー法で臓器特異性および癌特異性を検討した。

2. ラジオイムノアッセイ法で抗体の特異性を検討してみたところ腫瘍Tgを良く認識し、バセドウ病やウシより抽出したTgをあまり認識しないMoAbを得る事が出来た。

3. このMoAbを用い酵素抗体法で甲状腺を染色してみたところ、甲状腺腫瘍部が染色されたが、正常甲状腺部も染色性を認め、おそらく使用したMoAbが正常Tgと交差性があること、また正常甲状腺組織内に大量のTgを含んでいるためと思われる。

4. <sup>125</sup>I MoAb No. 3を甲状腺腫瘍を移植したヌードマウスに投与してオートラジ

オグラフィー法を行ったところ、移植甲状腺腫瘍の一部に  $^{125}\text{I}$  MoAbNa 3 の集積像が認められた。



## 文献

- 1) 前田昭太郎, 宇佐美一彪, 副島興二郎, 他: 甲状腺乳頭癌における「核内封入体」の本態ならびに出現意義に関する検討(II). 交通医学, 39:322, 1985.
- 2) Torrigiani, G., Doniach, D., Roitt, I. M.: Serum thyroglobulin levels in healthy subjects and in patients with thyroid disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 29:305, 1969.
- 3) Glinde, D., Puttemans, N., Van Herle A. J., Camus, M., Ermans, A. M.: Sequential study of the impairment of thyroid function in the early stage of subacute thyroiditis. *Acta. Endocrinol.*, 77:26, 1974.
- 4) Van Herle, A. J., Uller, R. P.: Elevated serum thyroglobulin, a marker of metastases in differentiated thyroid carcinomas. *J. Clin. Invest.*, 56:272, 1975.
- 5) Schneider, A. B., Favus, M., J., Stachura, M., E., Arnold, J., E., et al: Plasma thyroglobulin in detecting thyroid carcinoma after childhood head and neck irradiation. *Ann. Inter. Med.*, 86:29, 1977.
- 6) Lo Gerfo, P., Stillman, T., Colacchio, D., Feind, C.: Serum thyroglobulin and recurrent thyroid cancer. *Lancet*, i:881, 1977.
- 7) Izumi, M., Larsen, P. R.: Correlation of sequential changes in serum thyroglobulin, triiodothyronine, and thyroxine in patients with Graves' disease and subacute thyroiditis. *Metabolism*, 27:449, 1978.
- 8) Uller, R. P., Van Herle, A. J.: Effect of therapy on serum thyroglobulin levels in patients with Graves' disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 46:747, 1978.
- 9) Lo Gerfo, P., Colacchio, T., Colacchio, D., Feind, C.: Thyroglobulin in benign and malignant disease. *JAMA*, 241:982, 1979.
- 10) Schlossberg, A. H., Jacobson, J. C., Ibbertson, H. K.: Serum thyroglobulin in the diagnosis and management of thyroid carcinoma. *Clin. Endocrinol.*, 10:17, 1979.
- 11) Valenta, L., Kyncyl, F., Niederle, B., L.: Thyroglobulin-iodine in thyroid tumors. *J. Clin. Endocr.*, 28:437, 1968.
- 12) Valenta, L., Kyncyl, F., Jirousek, L., Niederle, B. L.: Soluble proteins in thyroid neoplasia. *J. Clin. Endocr.*, 28:442, 1968.

- 13) Rolland, M., Montfort, M. F., Valenta, V., Lissitzky, S.: Iodoaminoacid composition of the thyroglobulin of normal and diseased thyroid glands. *Clin. Chem. Acta.*, 39:95, 1972
- 14) Schneider A. B., Ikekubo, K., Kuma, K.: Iodine content of serum thyroglobulin in normal individuals and patients with thyroid tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 57:1251, 1983.
- 15) 山本一夫, 辻 勉, 樽谷 修, 大沢利昭: 癌化に伴うチログロブリン糖鎖構造の変化. *生化学*, 53:766, 1981.
- 16) 樽谷 修: 甲状腺腫瘍サイログロブリンの化学. *ホと臨*, 31:717, 1983.
- 17) Tarutani, O., Shulman, S.: Properties of carbohydrate-stripped-thyroglobulin I. Preparation and physicochemical properties of desialized thyroglobulin. *Biochim. Biophys. Acta.*, 229:642, 1971.
- 18) Davoli, C., Grimaldi, S., Rusca, G., Andreoli, M., Edelhoeh, H.: The isoelectric focusing of human thyroglobulin. *Biochim. Biophys. Acta.*, 705:243, 1982.
- 19) 中島 博: ヒト甲状腺腫瘍組織におけるチログロブリンの性状に関する研究. *北関東医学*, 32:177, 1982.
- 20) Dunn J. T., Ray S. C.: Variations in the structure of thyroglobulins from normal and goitrous human thyroids. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 47:861, 1978.
- 21) Köhler, G. and Milstein, C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256, 495, 1975.
- 22) 戸田雅克: 抗ヒトサイログロブリン・モノクローナル抗体による甲状腺乳頭癌の免疫組織化学的研究. *近大医誌*, 9:549, 1984.
- 23) 武山 浩, 細谷哲男, 篠崎 登, 他: Monoclonal antibodyを用いた甲状腺癌の診断. 第19回甲状腺外科検討会抄録, P130, 1986.
- 24) 宮本ますみ, 須川秀夫, 隈 寛二, 森 徹, 井村裕夫: 甲状腺分化癌特異的モノクローナル抗体を用いた甲状腺患者血清のスクリーニング. *日内分泌会誌*, 64:997, 1988.
- 25) Van Herle A. J., Uller, R. P., Matthews, N. L., Brown, J.: Radioimmunoassay for measurement of thyroglobulin in human serum. *J. Clin. Invest.*, 52:1320, 1973.
- 26) Izumi M., Larsen, P. R.: Triiodothyronine, thyroxine, and iodine in purified

thyroglobulin from patients with Graves' disease. J. Clin. Invest., 59:1105, 1977.

27) 和泉元衛: 血中サイログロブリンの測定法. ホと臨, 31:703, 1983.

28) 日下部きよ子, 山崎統四郎: モノクローナル抗体のシンチグラフィおよびオートラジオグラフィによる画像診断技術. 実験医学, 6:565, 1988.

29) 石川榮治, 河合 忠, 宮井 潔: 酵素免疫測定法, P204, 医学書院, 東京, 1982.

30) 樽谷 修: 甲状腺学 (鈴木・松崎編), P53, 共立出版, 1980.

31) Kohno, Y., Tarutani, O., Sakata, S., Nakajima, H.: Monoclonal antibodies to thyroglobulin elucidate differences in protein structure of thyroglobulin in healthy individuals and those with papillary adenocarcinoma. J. Clin. Endocrinol. Metab., 61:343, 1985

32) Bellet, D., Schlumberger, M., Bidart, J. M. et al: Production and in vitro utilization of monoclonal antibodies to human thyroglobulin. J. Clin. Endocrinol. Metab., 56:530, 1983.

33) 小林 薫: ヒトサイログロブリンに対するモノクローナル抗体: 米子医誌, 37:23, 1986.