

## (1)

氏名(生年月日)	佐 藤 雄 二
本 籍	
学位の種類	医学博士
学位授与の番号	甲第150号
学位授与の日付	昭和59年9月21日
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当(医学研究科専攻, 博士課程修了者)
学位論文題名	ヒト成長ホルモンに対するモノクローナル抗体の性質についての研究
論文審査委員	(主査) 教授 鎮目 和夫 (副査) 教授 吉岡 守正, 教授 平田 幸正

## 論文内容の要旨

## 研究目的

ヒト成長ホルモン(以下hGHと略)は191個のアミノ酸からなる単鎖の単純蛋白質である。そのホルモン作用発現にはhGHがその受容体と結合することが必要である。しかし、hGH分子上の受容体への結合部位の詳細は必ずしも明らかではない。一方、ホルモンに対するモノクローナル抗体(以下MoAbと略)はその抗原決定基が非常に狭い範囲であるためホルモンの生物活性部位、免疫活性部位の研究に有用である。またMoAbと抗原との反応系はポリクローナル抗体(以下PoAbと略)の場合より単純化できるため、抗原抗体反応の解析にも有用である。そこで、hGHに対するMoAbを作製し、その性質について検討した。

## 実験方法

hGHで免疫したBALB/cマウスの脾細胞とマウス由来骨髄腫細胞株SP2/0とをKöhlerとMilsteinらの方法に準じて、50%ポリエチレングリコール下で細胞融合を行ない、Hypoxanthine, Aminopterin, Thymidine添加培地にて選択しハイブリドーマを得た。培養上清をSolid-phase enzyme-linked immunosorbent assayにてスクリーニングを行ない、得られた抗hGH抗体産生クローンをBALB/cマウス腹腔内に接種し、高濃度のMoAbを含む腹水を得た。硫酸塩析およびDEAEカラムにて抗体の精製を行なった。

得られたMoAbによってhGHのRadioimmunoassay(以下RIAと略)を行なうとともにその特異性を、遺伝子工学でつくられたメチオニルhGH、他

の動物のGH、酵素処理や化学修飾を受けたため分子の一部が変化しているhGH、hGHフラグメント、ないしhuman placental lactogen(以下hPLと略)との交叉反応により調べた。次いで、<sup>125</sup>I-hGHとMoAbをブレインキューベートした後にhGHと受容体を反応系に加えることにより、hGHと受容体との結合反応にMoAbが影響を及ぼすか否かを調べた。さらに、パイン処理によりMoAbのFab部分を作製し、これを用いて同様の実験を行なった。

PoAbとの比較を行なうため、抗原抗体反応の時間経過、<sup>125</sup>I-hGHの遅延添加によるRIAの感度の改善の有無を調べた。同様の実験を2つないし3つのMoAbを組み合わせた系でも行なった。

## 実験結果および結論

3種の抗hGH-MoAbを作製した。腹水中の抗体濃度は、1~37mg/mlであった。これらのMoAbはいずれもhGH、メチオニルhGHを同様に認識したが、hPLに関しては1つのMoAbのみこれを認識し、残りの2つのMoAbは全くこれを認識しなかった。hGHフラグメントとの交叉反応の結果より、3つのMoAbの主要な抗原決定基はhGHのN端より47~134番目のアミノ酸残基に存在することが推定された。また、1つのMoAbは<sup>125</sup>I-hGHが受容体へ結合するのを抑制し、他の2つのMoAbはむしろ<sup>125</sup>I-hGHの受容体への結合を増強した。このことから、1つのMoAbはhGHの受容体への結合部位近傍を抗原決定基としていることが推察された。

PoAbと比較してMoAbはRIAの感度は著しく不

良であった。MoAbの抗原抗体反応は極めて迅速であるが、 $^{125}\text{I}$ -hGHの遅延添加効果も認められず、反応は可逆性であった。そこで、2～3つのMoAbを組み合わせたところ、抗原抗体反応の所要時間の延長、遅延

添加効果出現および反応の非可逆化、RIAの測定感度の改善を認めるようになった。すなわち、MoAbは反応が可逆性のため測定感度が不良であると思われた。

## 論文審査の要旨

本論文はヒト成長ホルモンに対する三種のモノクローナル抗体を作製しそれら抗体は成長ホルモンの受容体との結合部位をある程度明らかにし、またそのうち2種は結合を増強、1種は結合を阻害する性質のあることを明らかにしたもので、医学上価値あるものと認める。

### 主論文公表誌

ヒト成長ホルモンに対するモノクローナル抗体の性質についての研究

東京女子医科大学雑誌 第54巻 第6号  
493～506頁 (昭和59年6月25日発行)

### 副論文公表誌

- 1) 皮膚光線過敏症と赤血球プロトポルフィリンの増加を認めた鉄芽球性貧血の1例  
臨床血液 22 (12) 1971～1976 (1981)
- 2) Requirement of at least two distinct monoclonal antibodies for efficient neutralization of Tetanus Toxin in vivo (生体内で破傷風毒素の効果的な中和をおこすには少なくとも2つの異なったモノクローナル抗体が必要である)  
Naturwissenschaften 69 (12) 597～598 (1982)

- 3) Differentiation of human promyelocytic leukemia cells is accompanied by an increase insulin receptors (ヒト前骨髄球性白血病細胞の分化はインスリン受容体の増加を伴っている)  
BBRC 10 (1) 414～420 (1982)
- 4) Analysis of hepatic growth hormone binding sites of pregnant rabbit crosslinked to  $^{125}\text{I}$ -labelled human growth hormone ( $^{125}\text{I}$ 標識ヒト成長ホルモンにクロスリンクされた妊娠ウサギ肝細胞のヒト成長ホルモン結合部位の解析)  
FEBS Letter 147 (1) 49～53 (1982)