

ヒト肺癌に対するモノクローナル抗体の作製と 臨床診断への応用に関する研究

河野 修 興

広島大学医学部内科学第二講座(主任:西本幸男教授)

受付 昭和60年9月6日

肺癌の血清診断に応用可能な肺癌関連抗原を認識するモノクローナル抗体を得る目的で細胞融合をおこない、血清中及び胸水中の肺癌関連可溶性抗原を認識するKL-3抗体(IgM)及びKL-6抗体(IgG₁)を作製した。

これらはヒト肺腺癌由来細胞株 VMRC-LCR を BALB/c マウスに免疫し、その脾細胞とマウス骨髄腫細胞株 P3-NS 1-Ag 4/1 とをポリエチレングリコールを使って融合し、クローニングをくり返すことによって作製した。これらの抗体の特異性の検討及び臨床応用を試み、以下の結論を得た。

1) 細胞抗原をトリプシン、プロナーゼ及びノイラミナーゼなどの酵素あるいは過ヨウ素酸で処理した後に、モノクローナル抗体との結合を検討することにより抗原の生化学的性状を検討した。KL-3 抗体の認識する抗原はトリプシン、プロナーゼ及びノイラミナーゼに抵抗性で、過ヨウ素酸に感受性を示したことにより、KL-3 抗体は末端がシアル化されていない糖鎖を認識しているものと考えられた。一方、KL-6 抗体の認識する抗原は過ヨウ素酸、ノイラミナーゼに感受性を示し、プロナーゼに軽度ながらも感受性を示したことから末端がシアル化された糖鎖で、抗原分子の一部に蛋白部分を含んでいるものと推定された。

2) 可溶性抗原の分子量は、胸水をゲル濾過した各フラクション中の抗原をモノクローナル抗体を使ったサンドイッチ酵素抗体法で定量することにより検討した。KL-3 抗原及び KL-6 抗原の分子量はともに100万以上であった。

3) 酵素抗体法により培養株化細胞に対する反応性を検討したところ、肺癌由来細胞に対しては、KL-3 抗体は腺癌及び小細胞癌に反応し、扁平上皮癌由来細胞には反応しなかった。KL-6 抗体は、これら3種の組織型由来細胞に反応を示した。肺癌以外の悪性腫瘍由来細胞に対する反応性は、KL-3 抗体と KL-6 抗体で異なるものの Sarcoma 細胞を含む多種の細胞株と反応をみとめた。

4) 免疫ペルオキシダーゼ法により凍結組織切片を染色し反応抗原の組織分布を検討した。KL-3 抗原は肺癌では腺癌と小細胞癌に表出されていたが、扁平上皮癌では検出されず、これらの組織型の鑑別に意義あるものと思われた。一方、KL-6 抗原はこれら3種の組織型の肺癌に表出されていた。肺癌以外の癌における両抗原の分布は類似し、ほとんどの腺癌及び一部の扁平上皮癌にみとめられた。KL-3 抗原及び KL-6 抗原はともに正常組織に汎く分布していたが、正常肺では KL-3 抗原は細気管支上皮のみに存在し、KL-6 抗原は肺胞、細気管支、気管支腺上皮に分布していた。

健常者血球に対する反応性は、末梢血単核球及び顆粒球に対しては蛍光抗体法で、また赤血球に対しては凝集反応で検討したが、KL-3 抗体及び KL-6 抗体ともにこれらの血球に対して反応をみとめなかった。

5) 種々の疾患において胸水中に浸出する細胞に対する両抗体の反応性を蛍光抗体法で検討した。両抗体とも血球や活動性上皮細胞などの癌細胞以外の細胞画分には反応しなかったが、KL-3 抗体は胃癌(1/1)、肝癌(1/1)、悪性中皮腫(1/1)由来の細胞と反応し、KL-6 抗体は肺腺癌(7/8)、肝癌(1/1)、悪性中皮腫(1/1)と強く反応した。従って胸水中癌細胞の検出を目的とした免疫化学検査に応用可能と考えられた。

6) 血清 KL-3 抗原は肺癌において有意な増加をみとめなかった。しかし胃癌や肝癌では、それぞれ 10.5% (2/19) 及び 36.4% (4/11) の陽性率をみとめ、これらの疾患における腫瘍マーカーとしての性格が示唆された。

7) 血中 KL-6 抗原の平均値は、健常人 (80例) 278±152 u/ml, 肺癌 (99例) 895±2411 u/ml, 良性肺疾患 (108例) 492±421 u/ml であった。肺癌全体での陽性率は 32.3% (32/99) であり、組織型別には腺癌 40.5% (17/42), 扁平上皮癌 32.1% (9/28), 小細胞癌 17.9% (5/28) が陽性であった。腺癌と扁平上皮癌では臨床病期Ⅲ及びⅣの症例で増加が顕著であった。また血清 KL-6 抗原は CEA や CA 19-9 と異なった動きを示し、これらとの combination assay を行うことにより肺癌診断における陽性率を改善した。

血清 KL-6 抗原は、肝癌や乳癌でもそれぞれ 44.4% (4/9) 及び 75% (6/8) と高率に陽性であった。

一方、血清 KL-6 抗原は、一部の良性肺疾患すなわち肺線維症、びまん性細気管支炎、肺結核などでも高率に陽性であった。しかしながら、炎症の指標としての赤沈値や CRP 値とは相関を示さず、良性肺疾患のなかでも急性肺炎や慢性気管支炎などでは増加をみとめないため、ある種の良性肺疾患の新しいマーカーとしても臨床的有用性を認めるものと思われた。

8) 肺腺癌由来胸水中の KL-3 抗原は、その 52.9% (10/19) が異常高値を示し、KL-6 抗原は 76.5% (13/17) が陽性であった。更に KL-3 抗原あるいは KL-6 抗原の少なくともいずれかが陽性を示した症例は 94.1% (16/17) の高率であった。一方、肺結核、コレステリン胸膜炎による胸水での陽性率はわずかに 12.5% (2/16) であり、胸水をきたす疾患の鑑別にも KL-3 抗原及び KL-6 抗原の定量は有用であると考えられた。

癌の早期診断のため、新しい腫瘍マーカーの発見が期待されている。中でも肺癌は近年の増加が著しく²⁰⁾、組織像は多彩であり、治療法に満足すべきものがないうえ、より早期かつ客観的な診断法の開発が望まれている³⁰⁾。

癌細胞は自律的な無限増殖性を示し、正常細胞とは異なった抗原性を持つと考えられる。その癌細胞固有の抗原を免疫生化学的に検出しようとする試みは古くからあったが^{18, 53, 54, 57, 64, 65)}、近年細胞融合法によるモノクローナル抗体を応用することにより、この分野は飛躍的な進歩をとげている。モノクローナル抗体は、1975年 Köhler と Milstein⁴⁰⁾ により初めて作製され、以後その生物学に与えた恩恵は測り知れないものがある。従来のポリクローナル抗体と比較し、モノクローナル抗体は次のような利点を有している⁴⁹⁾。すなわち、単一の抗原決定基に対する特異性の高い同一の抗体を得ることができる。免疫原として純粋なものを必要とせず、作製後も吸収操作を要さない。産生細胞を凍結保存することにより、ほぼ半永久的に必要な時に大量の抗体を得ることができる事などである。従って、ポリクローナル抗体では困難であった同一抗体を使った同一の実験を何回でも時と所を選ばずにくり返すことも可能となった。

このような利点を有するため、未知の腫瘍抗原の検出を目的としたモノクローナル抗体の開発には大きな

期待がかけられ、多くの腫瘍関連抗原に対してモノクローナル抗体が作製されてきた^{19, 37, 38, 42, 67)}。しかしながら、モノクローナル抗体をもってしても、腫瘍特異抗原の検出は容易ではなく、ヒトにおいて腫瘍特異抗原の検出された例はない。すなわち、今までのところ、正常細胞にも種々の程度に表現されている腫瘍関連抗原の存在しか知られていない。肺癌関連抗原に対しても多数の抗体が作製されてきた^{3, 11-13, 17, 29, 33, 36, 48, 50, 51, 58, 60, 66, 73)}。これらの多くは、単に株化培養細胞に対する反応性によって腫瘍特異性を論じているのみで、実際に臨床的有用性の確認された抗体は少ない。しかし、肺癌から得られた細胞や組織に対し高い特異性を有する抗体も報告されており、これらの抗体には細胞診、組織診、アイソトープ標識抗体による RI シンチグラム^{7, 16)} などの診断分野、またミサイル療法と呼ばれる治療分野^{28, 70)} への応用に対して期待がよせられている。すなわち、扁平上皮癌に対する Kyōizumi ら⁴¹⁾ の LuCa 3 及び LuCa 4 抗体、腺癌に対する Valki ら⁶⁸⁾ の KS 1/9 抗体、小細胞癌に対する Bernal ら^{8, 9)} の SM 1 抗体などである。

しかしながら、血清中の腫瘍抗原を認識し、血清診断における有用性が報告されているモノクローナル抗体は少ない。CEA (Carcinoembryonic antigen), アルファーフェトプロテインなど、細胞融合法によるモノクローナル抗体作製の技術が開発される以前から知ら

れており、既にその性状が明らかにされていた腫瘍抗原に対するモノクローナル抗体^{6,10,31,59)}を除けば、大腸癌に対する NS 19-9 抗体^{1,2,38,43,44,45)}、卵巣癌に対する OC 125 抗体^{4,5)}、胃癌に対する CSLEX-1 抗体^{21,27)} など数える程しかなく、肺癌を免疫原としてつくられたモノクローナル抗体では YH 206 抗体⁷⁵⁾ が報告されているのみである。

著者は、肺腺癌由来細胞株 VMRC-LCR を免疫原としてモノクローナル抗体を作製し、血清及び胸水中の可溶性抗原を検出する2つの特異性の異なったモノクローナル抗体 KL-3 (IgM クラス) と KL-6 (IgG₁ クラス) を樹立した。これらの抗体の臨床診断への応用の可能性を検討したところ、両抗体とも胸水細胞診における有用性が示唆され、血清中及び胸水中の可溶性抗原の測定結果から、これらは従来の腫瘍マーカーと異なった変動を示す新しいマーカーとして臨床的有用性を認めたので報告する。

材料と方法

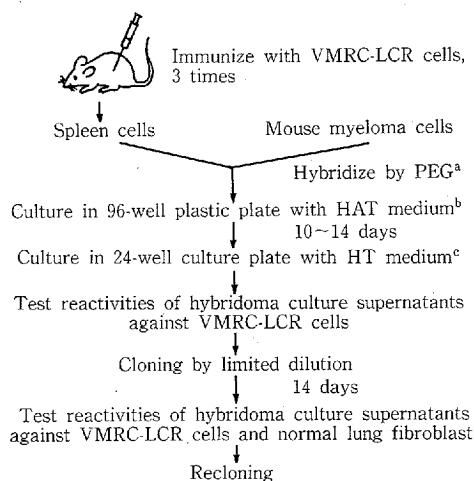
1. 細胞株

肺腺癌細胞株 VMRC-LCR 及び VMRC-LCD, 肺扁平上皮癌細胞株 SK-MES 1, 肺小細胞癌細胞株 SK-AK-LCL 膀胱癌細胞株 T-24, 子宮頸部癌細胞株 ME-180, 悪性黒色腫細胞株 MeWo の各細胞株は Michael A. Bean 博士 (Virginia Mason Research Center, Seattle, WA) より、肺腺癌細胞株 Luci 3 及び Luci 10, 肺扁平上皮癌細胞株 PC-1, 肺小細胞癌細胞株 QG-90, 腎癌細胞株 Scattola, 肉腫細胞株 U-20-S は上田龍三博士 (愛知がんセンター) より、肺腺癌細胞株 ABC-1, 肺小細胞癌細胞株 SBC-3 及び SBC-5 は平木俊吉博士 (岡山大学医学部) より、胃癌細胞株 AZ-521 は今井浩三博士 (札幌医大) より、肝癌細胞株 SK-HEP 1 及び大腸癌細胞株 SW 1222 は渡辺 正博士 (名古屋大学医学部) より、膀胱癌細胞株 PK-1-66 は久野弘武博士 (東北大学医学部) より、乳癌細胞株 YMB-1 は山根 基氏 (広島大学医学部) より、肺扁平上皮癌細胞株 RERF-LC-AI は秋山實利博士 (放射線影響研究所) より供与された。肺線維芽細胞株 CCD-18Lu, 鼻咽頭癌細胞株 K. B., 喉頭癌細胞株 HEP-2, 膀胱癌細胞株 Panc-1 及び MIA PaCa-2 は American Type Culture Collection から得た。これらの細胞株は、complete RPMI 培地 [RPMI 1646 培地 (Grand Island Biological Co., Grand Island, NY), 10% FCS (Hyclone; Sterile Systems, Inc., UT), 4 mM HEPES [4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine-ethanesulfonic acid], streptomycin (100 µg/ml),

penicillin (100 unit/ml), 2 mM L-glutamine] で継代培養した。ハイブリドーマの親株として使用した 8-azaguanine 耐性のマウス骨髄腫細胞株 P3-NS 1-Ag 4/1 (NS 1) は、100 µM 8-azaguanine (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) 添加 complete RPMI 培地で培養した。

2. ハイブリドーマの作製法 (Fig. 1)

8週齢の雌 BALB/c マウスの皮下に 5×10^6 個の VMRC-LCR 細胞を免疫しその後2週間の間隔で2回腹腔内に 8×10^6 個の細胞を免疫した。最終免疫から3日後に脾臓をとり出し、その脾細胞と NS 1 細胞とを Köhler と Milstein⁴⁰⁾ の方法に準じて細胞融合した。すなわち脾細胞と NS 1 細胞を2対1の割合で混合し遠沈後、沈渣に1 ml の42%ポリエチレングリコール6000 (Eastman Kodak, Rochester, NY) を加え、37°C にて5分間ゆるやかに攪拌した。洗浄後、細胞混合液を complete RPMI 培地に懸濁し96穴プラスチックマイクロプレート (Costar, Cambridge, MA) に1穴当り 10^6 個の割合で合計126穴に0.1 ml ずつ分注した。24時間後、各穴に HAT 培地 (100 µM hypoxanthine, 0.4 µM aminopterin, 16 µM thymidine 加 complete RPMI 培地) を0.1 ml 加えた。培養開始2日後、3日後、5日後、7日後、11日後に培養上清0.1 ml を捨て、HAT 培地0.1 ml を加えた。増殖限界に達したハイブリドーマは、あらかじめ1穴当り 5×10^6 個の feeder 細胞 (BALB/c マウス胸腺細胞) を播種して



^aPEG: polyethylene glycole; ^bHAT medium: complete RPMI medium containing 100 µM hypoxanthine, 0.4 µM aminopterin, and 16 µM thymidine; ^cHT medium: complete RPMI medium containing 100 µM hypoxanthine, 16 µM thymidine.

Fig. 1. Schedule of the establishment of hybridoma

おいた24穴カルチャープレートに移し HT 培地 (100 μ M hypoxanthine, 16 μ M thymidine 加 complete RPMI 培地) で培養した。増殖限界になったところで VMRC-LCR 細胞に対する培養上清中の抗体活性を酵素抗体法で検索し、抗体活性のみとめられたハイブリドーマを限界希釈法でクローニングした。即ち細胞を50個/ml及び10個/mlに希釈し、1穴当り 10^6 個の feeder 細胞を播種しておいた96穴プラスチックマイクロプレートに 0.1 ml づつ分注し、HT 培地により2週間培養した。1穴に1個のハイブリドーマコロニーが形成された場合をクローンとみなし、酵素抗体法により VMRC-LCR 細胞に反応し、肺線維芽細胞である CCD-18Lu 細胞に反応しない抗体を分泌しているクローンを選択し、再びクローニングした。

3. 細胞株に対するハイブリドーマ培養上清中の抗体活性を測定するための酵素抗体法

Fig. 2 に示す如く、細胞株を96穴プラスチックプレート中で増殖限界まで培養し、0.25%グルタルアルデヒドで5分間固定後、PBS で洗浄した。ハイブリドーマの培養上清 0.1 ml を加え室温で1時間インキュベートした後洗浄し、ついで10% FCS 溶液で100倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス免疫グロブリン (Cappel Laboratories, Cochranville, PA) 50 μ l を加え室温にて1時間インキュベートした。洗浄後 100 μ l の ABTS 溶液 [150 μ g/ml azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6, 6-sulfonate (半井化学), 50

mM citrate buffer pH 4.0, 1.1% H_2O_2] を加え、室温で5分間反応後 50 μ l の10%シュウ酸を加えて反応を停止させた。microplate photometer (コロナ電気) を使って吸光度 OD_{414} を測定し、complete RPMI 培地を negative control としたときの ΔOD_{414} が0.02以上の例を陽性と判定した。

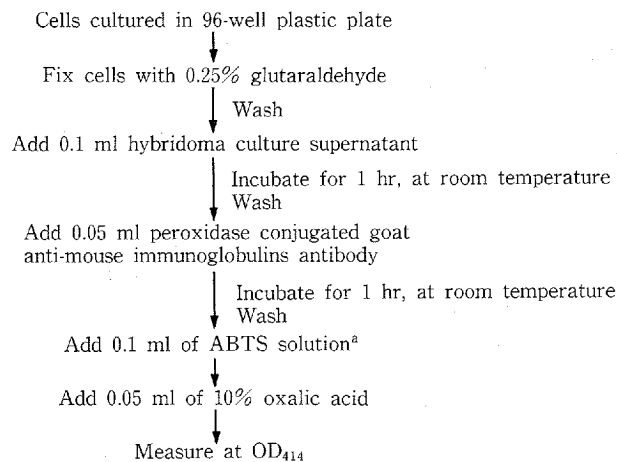
4. 免疫組織化学的検査

組織に対するモノクローナル抗体の反応性の検討はベクタステイン (Vector Laboratories, Burlingame, CA) を用いて免疫ペルオキシダーゼ法 (ABC法) で検討した。即ち厚さ 4 μ m で切り出した凍結組織切片を $-20^\circ C$ で10分間アセトン固定し、乾燥後使用した。

まずウマ血清を用いて抗体の非特異的反応を阻害した後、ハイブリドーマの培養上清と室温で30分間反応させた。PBS で10分間洗浄後ビオチン化ウマ抗マウス IgG と室温で30分間反応させ、洗浄した後、アビジン・ビオチン標識ペルオキシダーゼを1時間反応させて洗浄後、DAB 溶液 (0.5 mg/ml Diaminobenzidine, 0.01% H_2O_2 , 50 mM Tris-HCl buffer pH 7.0) と5分間反応させた。

5. 胸水細胞及び血球の免疫蛍光染色

胸水細胞は胸水中より、また末梢血単核球は末梢血中より Ficoll-Hypaque [比重 1.007 ± 0.001 (SD)] を使って比重遠心法で中間層にある細胞を得た。顆粒球は末梢血を比重遠心後、形成された下層からデキストラン沈降法で得た。すなわち3.0%デキストランを加



^aABTS solution: 150 μ g/ml azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6, 6-sulfonate in 50 mM citrate buffer containing 1.1% H_2O_2

Fig. 2. Method of enzyme immunoassay for testing reactivities of hybridoma culture supernatant against cell lines

え静置後、上層の顆粒球層を採取し混在する赤血球は 0.75%塩化アンモニウム、20 mM トリス塩酸溶液 pH 7.4 で溶血させ洗浄し顆粒球を得た。

以上の方法で得た細胞 5×10^5 個と 0.5 ml のハイブリドーマ培養上清を 1 時間反応させ洗浄後、10 μ l の FITC (fluorescein isothiocyanate) 標識ヤギ抗マウス IgG F(ab')₂ フラグメント (Tago Inc., Burlingame, CA) と 30 分間反応させた。洗浄後 1%パラホルムアルデヒドで固定し、蛍光顕微鏡 (日本光学) 及びセル・ソーター (FACS 420, Becton Dickinson) で解析した。

一部の症例の胸水細胞は比重遠心法で採取した後、サイトスピン (Shandon Southern Products Limited, Cheshire, England) を使ってスライドガラス上に遠心付着させた。-20°C で直ちにアセトン固定し、免疫ペルオキシダーゼ法 (ABC 法) で染色した。

6. 赤血球凝集反応

96穴U底プレートに1穴当り 50 μ l のハイブリドーマ培養上清の希釈系列を Modified Barbital Buffer (MBB: 6.3 mM barbital buffer, 0.15 mM CaCl₂, 0.77 mM MgCl₂, 0.85% NaCl) で作製した。MBB で3回洗浄した0.5%赤血球浮遊液を 50 μ l づつ各穴に加え、37°C で1時間インキュベートし、凝集の有無を観察した。凝集を示さなかった抗体に対しては、更に 50 μ l の 50 μ g/ml ヤギ抗マウス免疫グロブリンを加え1時間反応後、凝集の有無を判定した。

7. 抗体の免疫グロブリンクラスの検討

モノクローナル抗体の免疫グロブリンクラスの決定はオクテロニー法で行った。すなわちミニコン B15 (Amicon Corp., Danvers, MA) を使って培養上清を20倍濃縮し、ヤギ抗マウス IgG₁、IgG_{2A}、IgG_{2B}、IgM (Meloy Laboratories) 及び IgG₃ (Miles Laboratories, Rohovet, Israel) を用いて、1.0%アガールゲル内で反応させ沈降線を観察した。

8. 腹水化抗体の作製と精製

あらかじめプリステン (2, 6, 10, 14-tetramethylpentadecane) を腹腔内に注射しておいた BALB/c マウスの腹腔内に 5×10^6 個のハイブリドーマを注射し、1から3週間後マウスが腹水を形成したところで脱血死させ腹水を採取した。

IgM クラスの KL-3 抗体の場合、50%飽和硫酸で2回塩析し、セファデックス G-200 カラムでゲル濾過した。第1ピークを精製 KL-3 抗体とした。IgG₁ クラスの KL-6 抗体は33%飽和硫酸で2回塩析し、0.02 M リン酸緩衝液 pH 7.8 に透析後、同じ緩衝液で平衡化しておいた DE 52 (Whatman Chemical Separation Ltd, England) カラムを通過させた分画を精製

KL-6 抗体とした。

9. 精製抗体のペルオキシダーゼ標識法

ペルオキシダーゼの抗体への標識は Nakane ら⁵²⁾ によって開発された過ヨード酸架橋法で行った。すなわち、5 mg 西洋ワサビペルオキシダーゼ Grad I (Boehringer Mannheim, West Germany) を 1 ml の 0.3 M 炭酸緩衝液 pH 8.1 に溶解した液に 0.1 ml の 1% 1-fluoro 2,4-dinitrobenzene ethanol 溶液を加え、20分間インキュベート後10,000回転で10分間遠心した。遠心後 0.01 M 炭酸緩衝液 pH 9.5 に 4°C で一夜透析した。透析後 1 ml の 0.06 M エチレングリコール溶液を加え、1時間インキュベートした。再び 0.01 M 炭酸緩衝液 pH 9.5 に透析した後、同じ緩衝液で平衡化した 5 mg の抗体溶液と混合して室温で反応させた。3時間後 5 mg の水素化ホウ素ナトリウムを加え十分に混合した後 4°C で一夜静置した。その後 PBS に透析して、更にセファデックス G-200 カラムでゲル濾過して得られた最初のピークをペルオキシダーゼ標識抗体として使用した。

10. サンドイッチ酵素抗体法 (Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay; Sandwich ELISA)

固相抗体と酵素標識抗体の両者に同一抗体を用いて Sandwich ELISA をおこなった。

a. プレート法 Sandwich ELISA

可溶性抗原の分子量の決定のためセファロース 4B (Pharmacia Fine Chemicals) でゲル濾過して得られたフラクション中の抗原の半定量には本法を用いた。即ち Fig. 3 に示すごとく 10 μ g/ml の精製モノクローナル抗体を 0.1 ml づつ96穴 EIA プレート (住友ベークライト, 東京) に注入し、室温で1時間静置吸着させた後、TB-PBS (0.05% Tween 20, 0.1% Bovine serum albumin, PBS) で洗浄した。ついで 100 μ l の検体を加え 37°C で3時間反応させた後洗浄し、Protein Buffer (0.15 M PBS pH 6.4, 10% Normal rabbit serum, 0.1% Bovine serum albumine) で100倍に希釈したペルオキシダーゼ標識モノクローナル抗体 0.1 ml を加え16から20時間インキュベートした。洗浄後、0.1 ml の OPDA 溶液 (0.3% *o*-phenylenediamine dihydrochloride, 0.02% H₂O₂, 0.05 M Citrate buffer pH 4.0) を加え30分間反応させた後 0.1 ml の 1N 硫酸を加え反応を停止させ吸光度 OD₄₉₂ を測定した。

b. ビーズ法 Sandwich ELISA

血清及び胸水中の可溶性抗原の定量には、ビーズ法 Sandwich ELISA を用いた。

ポリスチレンビーズ (1/4インチ, 和光純薬) を

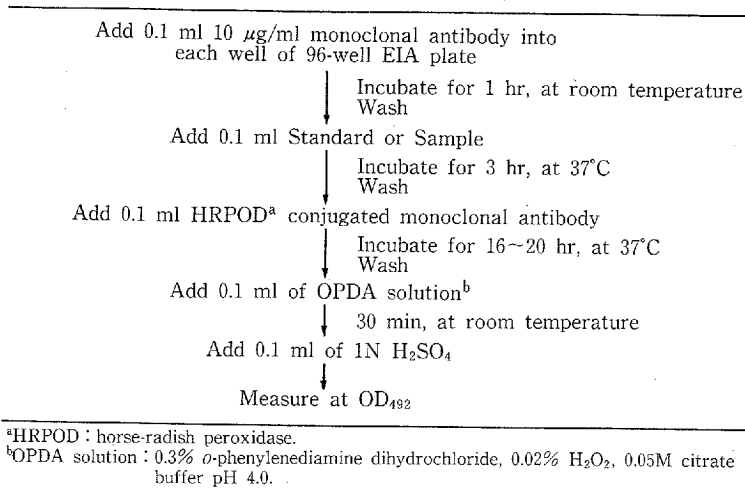


Fig. 3. Method of sandwich enzyme-linked immunosorbent assay using 96-well EIA plate for the detection of soluble antigens

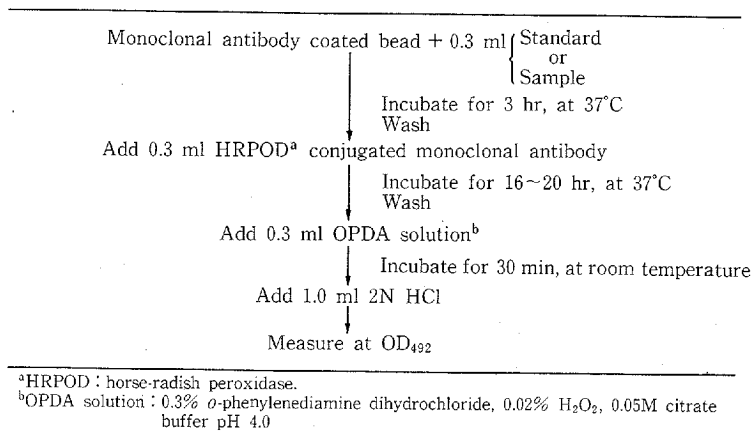


Fig. 4. Method of sandwich enzyme-linked immunosorbent assay using polystyrene bead for the detection of soluble antigens

50 µg/ml のモノクローナル抗体溶液 (0.25 M リン酸緩衝液 pH 7.5) に浸し, 37°C で1時間インキュベートした後, 10分間氷水中で冷却したものを抗体吸着ビーズとして使用した。次いで Fig. 4 に示すごとく, ガラスチューブの中で抗体感作ビーズと検体 0.3 ml を3時間 37°C で反応させた後, 生食で3回洗浄し Protein Buffer で100倍に希釈したペルオキシダーゼ標識抗体 0.3 ml を加えて更に16から20時間反応させた。洗浄後ビーズをポリスチレンチューブ (Elkay Products, Inc., Boston, MA) に移し, 0.3 ml の OPDA 溶

液を加え30分間反応させた後 1 ml の 2N 塩酸を加え反応を停止させ, 吸光度 OD₄₉₂ を測定した。

KL-3 抗体の認識する抗原の測定系では, 抗原量のスタンダードとして, ある癌性胸膜炎患者の胸水を Protein Buffer で80倍希釈したものを 40 u/ml とし, 0, 2.5, 5, 10, 20, 40 u/ml の6点のスタンダードをとり標準曲線を作成した。検体は原則として Protein Buffer を用いて2倍に希釈して測定に供した。KL-6 抗体を使った測定系では, 他の症例の胸水を160倍希釈したものを 64 u/ml とし, 0, 2, 4, 8, 16, 32, 64 u/ml

の7点のスタンダードから標準曲線を作成した。検体の希釈は50倍とした。

11. モノクローナル抗体反応抗原の生化学的性状の検討

a. 蛋白分解酵素に対する感受性試験

10⁵ 個の VMRC-LCR 細胞を0.25%トリプシンまたは0.25%プロナーゼと30分間反応させ、PBS で洗浄後、前述した蛍光抗体法で検討した。

b. ¹²⁵I-Immunoglobulin Binding Assay による過ヨウ素酸及びノイラミニダーゼに対する感受性試験

96穴プラスチックマイクロプレートの中で VMRC-LCR 細胞を増殖限界まで培養し、0.25%グルタルアルデヒドで固定後、50 μ l の過ヨウ素酸またはノイラミニダーゼを加え、30分間反応させた。PBS で洗浄後、ハイブリドーマの培養上清を1時間反応させ洗浄し、1.0 \times 10⁵ cpm の ¹²⁵I 標識ヤギ抗マウス免疫グロブリン (New England Nuclear, Boston, MA) を加え、7回洗浄後、100 μ l の0.2 N 水酸化ナトリウムで細胞を可溶化してポリスチレンチューブに移して、ガンマーカウンターで放射活性を測定した。

過ヨウ素酸は、1, 10, 100 mM, ノイラミニダーゼは0.01, 0.1, 1.0 u/ml のそれぞれ3段階の濃度で検討した。Negative controle としてはマウスミエローマ細胞の MOPC 21 (IgG₁) 及び MOPC 104E (IgM) の培養上清を用いた。

12. 血清 CEA 値の測定

血清 KL-6 抗原値と CEA 値との相関をみるため血清 CEA 値を測定した。測定には CEA キット「第1」(第1ラジオアイソトープ研究所)を用いた。すなわち、試験管内に検体 50 μ l 及び酢酸緩衝液 200 μ l を入れた後、抗体感作ビーズを加えた。室温で4時間インキュベートした後洗浄し、¹²⁵I 標識抗 CEA 抗体 200 μ l を加え、室温で16時間インキュベートした。洗浄した後ガンマーカウンターで放射活性を測定した。

13. 血清 CA 19-9 値の測定

血清 KL-6 抗原値と CA19-9 値との相関をみるため血清 CA 19-9 値を測定した。エルザ CA 19-9 キット (Commissariat a l'energie atomique, France) を用い CA 19-9 抗体感作チューブに検体 0.1 ml と緩衝液 0.2 ml を入れ、37°C で3時間インキュベートした後洗浄し、0.3 ml の ¹²⁵I 標識 CA 19-9 抗体を加え、室温で16時間インキュベートした。洗浄後、ガンマーカウンターで放射活性を測定した。

14. 血清 CRP 値と血沈値

血清 CRP 値は広島大学医学部中央検査部において LA system (栄研科学) をつかって、Latex photo-

metric immunoassay で測定された値を用いた。

また血沈値は、血清採取当日に広島大学医学部付属病院第二内科で測定された値を用いた。

結 果

1. ハイブリドーマの作製とスクリーニング及びモノクローナル抗体の免疫グロブリンクラス

細胞融合後、126穴すべてにハイブリドーマの増殖がみられ、そのうち VMRC-LCR 細胞に反応を示したハイブリドーマの中から無作為に17個を選んでクローニングをおこない268個のクローンを得た。このうち89クローンが VMRC-LCR 細胞に反応を示し、そのうちの27クローンが正常肺線維芽細胞株 CCD-18Lu に反応しなかった。この27クローンについて VMRC-LCR 細胞を含む7種の肺癌細胞株に対する反応性を検討し、類似の反応パターンを示したクローンは同一性状のクローンとみなし、異なった反応パターンを示した計6個のクローンを選んだ。更に、肺癌組織に対して高率に且つ強く反応し、正常肺組織に対して特徴ある反応性を示した KL-3 と KL-6 の2つのハイブリドーマについて抗体を精製し、Sandwich ELISA を用いて血清中及び胸水中の抗原の有無を検討した。なお、オクテロニー法で検討した結果、KL-3 抗体は IgM クラス、KL-6 抗体は IgG₁ クラスであった。

2. KL-3 抗体及び KL-6 抗体の認識する抗原の生化学的性状

a. 細胞抗原の生化学的性状

VMRC-LCR 細胞表面の KL-3 抗原は、トリプシン及びプロナーゼの両プロテアーゼ処理によって全く変化をうけなかった。KL-6 抗原は、トリプシン処理では変化をみとめなかったものの、プロナーゼ処理により蛍光の軽度減弱をみとめ抗原分子の一部に蛋白質部分の存在が推定された。

また、¹²⁵I-Immunoglobulin binding assay で検討した過ヨウ素酸及びノイラミニダーゼ処理による影響は、Fig. 5 に示すごとくであり、KL-3 抗原は過ヨウ素酸処理により結合が低下し感受性を示したが、ノイラミニダーゼ処理では結合は増加し、KL-3 抗原は末端にシアル酸を結合しない糖鎖であるものと思われた。KL-6 抗原は、過ヨウ素酸とノイラミニダーゼの両者に感受性を示し、末端がシアル化された糖鎖構造であるものと推定された。

b. 可溶性抗原の分子量

癌性胸水をセファロース 4B でゲル濾過して得られた各フラクション中の抗原量をプレート法 Sandwich

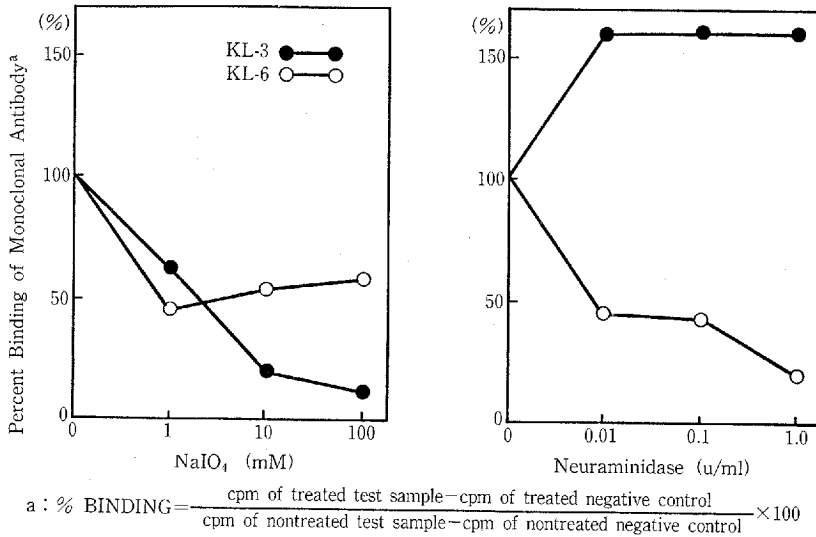


Fig. 5. Effects of periodate and neuraminidase treatment on the binding of monoclonal antibodies to cell surface antigens

ELISA で測定した結果は Fig. 6 に示している。(B)の悪性中皮腫由来の胸水を抗原分析に用いた場合、KL-3 抗原は void フラクシオンのみにピークをみとめ、分子量は500万以上と推定された。(C)の転移性膀胱癌由来胸水の場合は、void フラクシオンのみならず、45番目と57番目のフラクシオンにもピークを有し、(A)の分子量マーカーのゲル濾過による標準曲線から各ピークの分子量はそれぞれ240万から600万及び120万から160万の間にあり、(B)の症例と(C)の症例とは異なった分子量を示した。

KL-6 抗原は、(B)症例では void フラクシオン (分子量500万以上) 及び53番目 (分子量145万から250万) の2つのピークを認めた。(C)症例では void フラクシオン (分子量500万以上) と49番目 (分子量190万から390万) にピークを認めた。

以上、抗原の生化学的性状を Table 1 にまとめた。

Table 1. Biochemical characteristics of antigens recognized with monoclonal antibodies

		KL-3Ag	KL-6Ag
Molecular weight of soluble antigens		>1,000 kDal	>1,000 kDal
Treatment with	Trypsin	Resistant	Resistant
	Pronase	Resistant	Weakly sensitive
	NaIO ₄	Sensitive	Sensitive
	Neuraminidase	Resistant	Sensitive

3. 細胞株に対する反応性

酵素抗体法により肺由来の各種細胞株に対する反応性を検討した結果を Table 2 に示した。KL-3 抗体は肺腺癌及び小細胞癌に反応したが扁平上皮癌細胞には反応しなかった。一方、KL-6 抗体はこれら3種類の組織型由来の細胞株に反応した。

肺癌以外の悪性腫瘍由来の細胞株に対する反応性は Table 3 に示している。両抗体とも反応性は異なるものの、Sarcoma 細胞を含む各種の悪性腫瘍細胞株と反応することが判った。

4. 癌組織における抗原分布

各種の癌組織凍結切片における抗原の分布を免疫ペルオキシダーゼ染色により検討し、その結果を Table 4 に示した。肺癌組織では、肺癌由来の細胞株に対する反応性のパターンと同様に、KL-3 抗原は腺癌と小細胞癌とのみに認められ、扁平上皮癌には検出されなかったが、KL-6 抗原はこれら3種の組織型の肺癌において発現されていた。肺腺癌の1例に対する免疫ペルオキシダーゼ染色の写真を Fig. 7 に示した。両抗体とも間質には反応せず、KL-3 抗体は癌細胞の細胞膜を全周性に染色したが、KL-6 抗体はその luminal side を強く染色している像が認められる。

肺癌以外の他臓器の癌組織における KL-3 抗原及び KL-6 抗原の分布様式は非常に類似しており、大部分の腺癌及び食道の扁平上皮癌にも検出された。

5. 正常組織及び血球における抗原分布

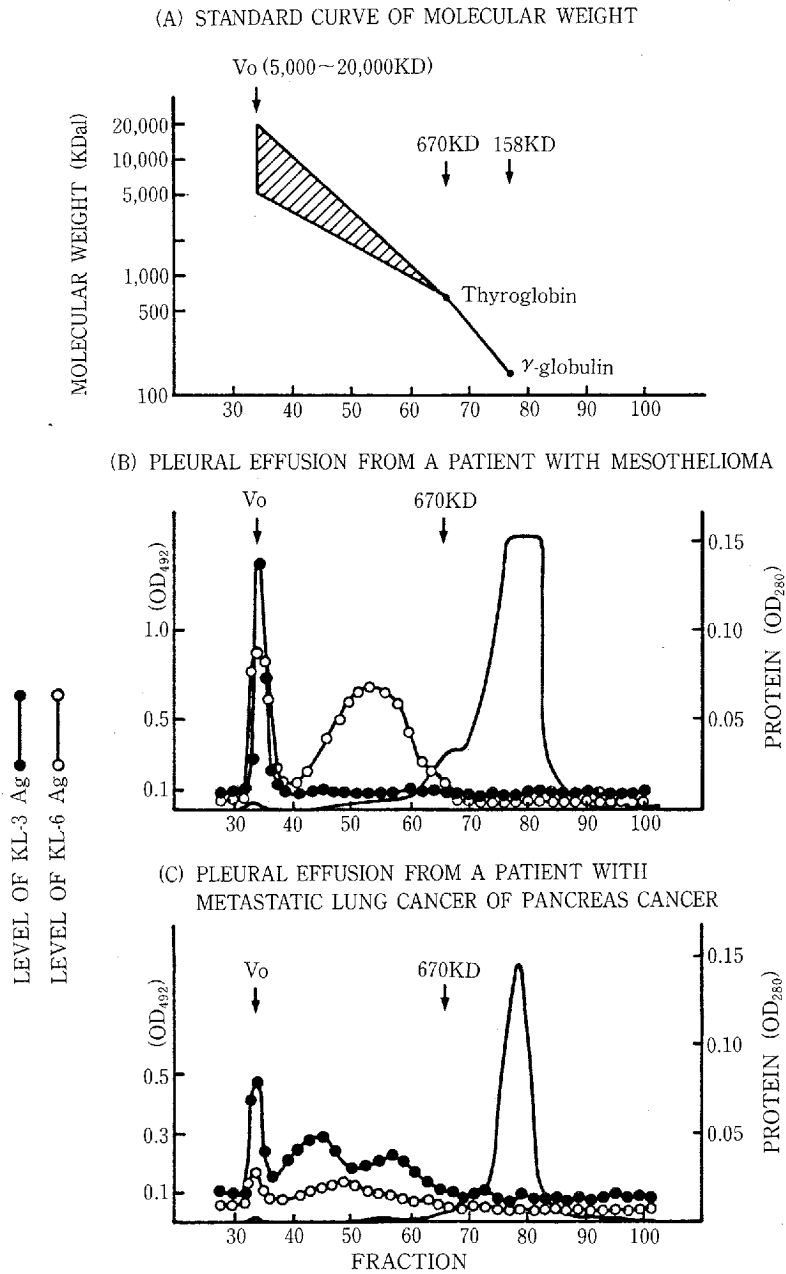


Fig. 6. Analysis of molecular weights of KL-3 and KL-6 antigens with sepharose 4B gel chromatography

正常組織における分布状態を Table 5 に示した。KL-3 抗原は正常肺では細気管支上皮にのみ認められ、肺胞、気管支上皮、気管支腺には検出されなかった。KL-6 抗原は肺胞、細気管支、気管支腺の上皮に

認められ、特に細気管支上皮にはその luminal side に非常に強く印象的に認められた。

肺以外の多くの上皮細胞における両抗原の分布状態を調べると、両抗原はともに汎く存在していたが、検

Table 2. Reactivity of monoclonal antibodies to human lung tumor cell lines and lung fibroblast by enzyme immunoassay

Origin	Cell Line	Reactivity ^a	
		KL-3	KL-6
Lung adenocarcinoma	VMRC-LCR	++	++
	VMRC-LCD	-	-
	Luci 3	±	++
	Luci 10	±	+
	ABC-1	-	++
Lung squamous cell carcinoma	RERF-LC-AI	-	±
	SK-MES 1	-	-
	PC-1	-	±
Lung small cell carcinoma	QG-90	±	-
	SBC-5	-	±
	SK-AK-LCL	++	-
	SBC-3	-	-
Lung normal fibroblast	CCD-18Lu	-	-

^a The reactivity was scored as follows: -, $\Delta OD = \sim 0.019$; ±, $\Delta OD = 0.020 \sim 0.049$; +, $\Delta OD = 0.050 \sim 0.099$; ++, $\Delta OD = 0.100 \sim$

Table 3. Reactivity of monoclonal antibodies to human nonpulmonary tumor cell lines by enzyme immunoassay

Origin	Cell Line	Reactivity ^a	
		KL-3	KL-6
Nasopharyngeal carcinoma	K. B.	-	++
Laryngeal carcinoma	HEp-2	-	±
Gastric carcinoma	AZ-521	-	-
Hepatoma	SK-HEP 1	-	-
Pancreatic carcinoma	Panc-1	+	++
	PK-1-66	+	-
	MIA PaCa-2	-	-
Colorectal carcinoma	Sw 1222	++	-
Renal carcinoma	Scattola	-	±
Bladder carcinoma	T-24	±	++
Cervical carcinoma	ME-180	++	+
Breast carcinoma	YMB-1	++	++
Melanoma	MeWo	±	-
Sarcoma	U-20-S	±	+

^a The reactivity was scored as follows: -, $\Delta OD = \sim 0.019$; ±, $\Delta OD = 0.020 \sim 0.049$; +, $\Delta OD = 0.050 \sim 0.099$; ++, $\Delta OD = 0.100 \sim$

索した範囲内で両者の存在様式の異なっていた点を挙げると次のようであった。即ち、KL-3 抗原は胃粘膜上皮、幽門腺、十二指腸、結腸、直腸上皮に存在したが、KL-6 抗原はこれらの組織には認められず、食道上皮、胃底腺、子宮内膜には KL-6 抗原のみが検出された。

なお表には示していないが、末梢血単核球及び顆粒球には両抗体の反応する抗原は存在せず、また O 型及

び A B 型赤血球にも検出されなかった。

6. 胸水細胞に対するモノクローナル抗体の反応性

Table 6 に示すごとく、胸水細胞に対する反応性を蛍光抗体法で検討したところ、KL-3 抗体は凍結組織切片に対する反応性とは異なり肺腺癌由来の胸水細胞に対して反応をみとめた。KL-6 抗体は肺腺癌 (7/8) 及び細胞診クラス V の小細胞癌 (1/1) と反応し、扁平上皮癌細胞とは反応しなかった。転移性肺腫

Table 4. Reactivity of monoclonal antibodies with tumor tissues by immunoperoxidase staining

Organ	Histology	Reactivity ^a (No. positive/No. tested)	
		KL-3	KL-6
Lung	Adenocarcinoma	+(12/16)	++ (15/15)
	Squamous cell carcinoma	-(0/ 6)	++ (7/ 7)
	Small cell carcinoma	+(4/ 5)	+ (4/ 5)
Stomach	Adenocarcinoma	++(3/ 3)	+ (3/ 3)
Ampulla vater	Adenocarcinoma	+(1/ 1)	+ (1/ 1)
Bile duct	Adenocarcinoma	++(1/ 1)	++ (1/ 1)
Pancreas	Adenocarcinoma	++(3/ 3)	++ (3/ 3)
Colon	Adenocarcinoma	+(1/ 2)	+ (1/ 2)
Rectum	Adenocarcinoma	+(1/ 1)	+ (1/ 1)
Thyroid	Papillary adenocarcinoma	++(1/ 1)	+ (1/ 1)
	Meddulary carcinoma	-(0/ 1)	
Breast	Meddulary tubular carcinoma	+(1/ 2)	+ (2/ 2)
Kidney	Transitional cell carcinoma	+(1/ 1)	+ (1/ 1)
Esophagus	Squamous cell carcinoma	++(1/ 2)	++ (1/ 2)
Cervix	Squamous cell carcinoma	-(0/ 1)	-(0/ 1)
Liver	Hepatocellular carcinoma	-(0/ 1)	-(0/ 1)

^a The staining was scored as follows: -, negative; +, positive; ++, strong positive.

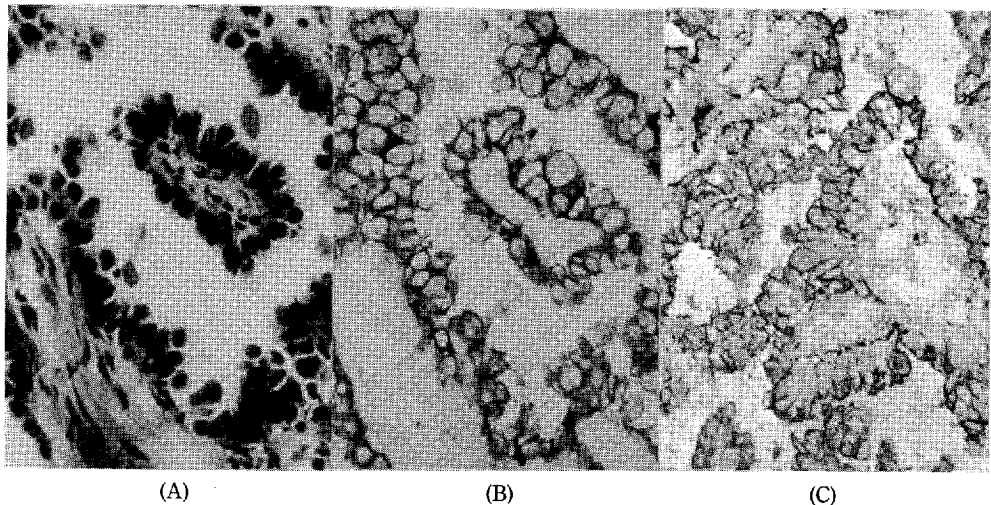


Fig. 7. Immunoperoxidase staining of a well differentiated, papillary (bronchiolo-Alveolar) type of adenocarcinoma of the lung. Frozen sections were stained with hematoxylin-eosin (A), KL-3 antibody (B) and KL-6 antibody (C).

瘍では、胃と膵を原発部位とする腺癌1例ずつの検討にすぎないが、KL-3抗体は両者と反応し、KL-6抗体は膵癌例のみに反応した。悪性中皮腫に対しては両抗体とも強く反応した。一方、両抗体は胸水細胞診でClass I又はIIの肺癌患者由来の細胞に対しては反応

せず、また非癌患者由来の胸水細胞とも反応しなかった。中でも症例PL-33(Class II)の胸水中には多数の炎症性中皮細胞が存在したが、両抗体とも反応を認めなかった。ところで、興味深いことに胸水細胞診でClass IIIと判定された症例PL-5の胸水中にKL-6抗

Table 5. Reactivity of monoclonal antibodies with normal tissues by immunoperoxidase staining

Tissue		Reactivity ^a (No. positive/No. tested)	
		KL-3	KL-6
Lung	Alveoli	-(0/11)	+(11/11)
	Bronchioles	+(3/ 3)	++ (3/ 3)
	Bronchus	-(0/ 1)	-(0/ 1)
	Bronchial gland	-(0/ 1)	+(1/ 1)
Thyroid	Follicle epithelium	+(1/ 1)	++ (1/ 1)
Esophagus	Epithelium	-(0/ 1)	++ (1/ 1)
	Duct of esophageal gland	+(1/ 1)	++ (1/ 1)
Stomach	Surface mucous cells	+(1/ 2)	-(0/ 2)
	Fundic gland	-(0/ 1)	++ (1/ 1)
	Pyloric gland	+(2/ 2)	-(0/ 2)
Duodenum	Epithelium	+(2/ 2)	-(0/ 2)
Colon	Epithelium	+(2/ 2)	-(0/ 2)
Rectum	Epithelium	+(1/ 1)	-(0/ 2)
Liver	Hepatic cells	-(0/ 1)	-(0/ 1)
Pancreas	Gland	-(0/ 2)	-(0/ 2)
	Secretary duct	++ (2/ 2)	+(2/ 2)
Kidney	Glomerulus	-(0/ 1)	-(0/ 1)
	Renal tubule	+(1/ 1)	+(1/ 1)
Bladder	Transitional epithelium	+(1/ 1)	++ (1/ 1)
Uterus	Cervix	-(0/ 1)	-(0/ 1)
	Endometorium	-(0/ 1)	+(1/ 1)
Skin	Epidermis	-(0/ 1)	-(0/ 1)
	Hair follicle	+(1/ 1)	-(0/ 1)

^a The staining was scored as follows; -, negative; +, positive; ++, strong positive

体と強く反応する細胞を認めていたが、本症例は3ヶ月後に施行された開胸肺生検の結果、肺腺癌と診断されており、細胞診で Class III と診断された細胞は腺癌細胞であったものと考えられる。

Fig. 8 は PL-35 症例 (肺腺癌, Class V) の胸水細胞を KL-6 抗体で蛍光染色した写真である。細胞膜表面が強く蛍光を発している像が認められている。Fig. 9 は PL-25 症例 (肺腺癌, Class V) の胸水細胞を KL-6 抗体で蛍光染色したものをセル・ソーターで解析した結果である。negation controle として用いた nonimmune mouse IgG に比べて KL-6 抗体で染色された細胞の蛍光強度は著明に増加している。

なお、未固定の生細胞を染色する蛍光抗体法では、KL-3 抗体により染色されなかった PL-35 症例の胸水細胞は、アセトン固定後に免疫ペルオキシダーゼ法で染色してみると、一部の細胞が KL-3 抗体によって陽性に染色され、細胞の前処置を検討することで抗体の反応性が改善されることが判明した。

7. 可溶性 KL-3 抗原の定量

ビーズ法 Sandwich ELISA により可溶性 KL-3 抗原の定量を試みた。

a. 標準曲線の検討

Table 7 にスタンダードを測定した一例を示した。スタンダードの各濃度における変動係数 (% Coefficient of variation, % CV) はいずれの点においても 10% 以下で良好な結果であった。標準曲線を作成してみると、Fig. 10 の如く 20 u/ml のところで軽度の変曲点を有しているが、ほぼ直線を描いた。

b. 血清 KL-3 抗原値の検討

健常者及び各種悪性疾患患者血清中の KL-3 抗原の値を Fig. 11 に示した。健常者60名の血清 KL-3 抗原値は 4.5 ± 6.5 u/ml (平均値 \pm SD) であり、平均値 +2SD を cut off 値とすると正常上限は 17.5 u/ml となった。肺癌63名では1例の異常高値例のみであった。一方、胃癌では10.5%、肝癌では36.4%で異常高値を示したが、大腸癌では異常値を呈した症例のみとめなかった。

c. 胸水 KL-3 抗原値の検討

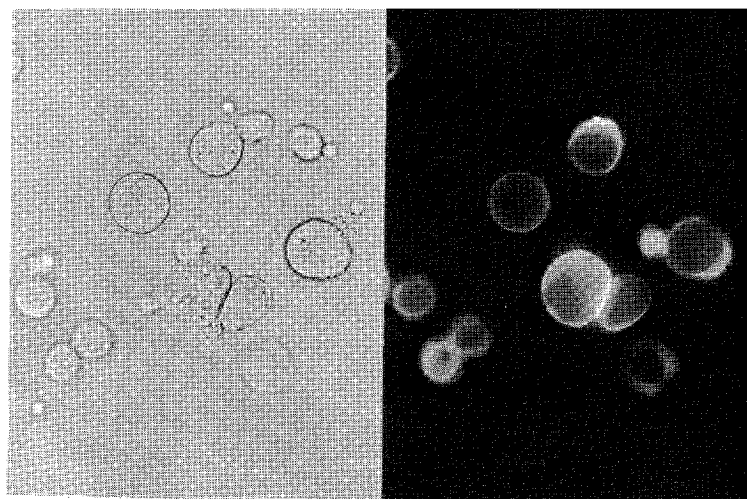
Table 6. Reactivity of monoclonal antibodies with tumor cells in pleural effusions by immunofluorescence staining

Diagnosis	Case	Cytology Class	Reactivity ^a	
			KL-3	KL-6
Lung adenocarcinoma	PL- 5	III	—	++
	PL- 8	V	—	+
	PL-18	V	—	—
	PL-20	V	—	++
	PL-25	V	—	++
	PL-32	V	—	++
	PL-35	V	—	++
	PL-35 ^b	V	+	++
	PL-37	V	—	++
Lung squamous cell carcinoma	PL- 7	V	—	—
	PL- 9	II	—	—
	PL-10	III	—	—
Lung small cell carcinoma	PL-21	I	—	—
	PL-24	V	—	W
Metastatic lung cancer				
	Pancreas carcinoma	PL-19	V	+
Gastric carcinoma	PL-22	V	+	—
Mesothelioma	PL-31	V	++	++
Nonmalignant diseases	PL-28	I	ND ^c	—
	PL-29	I	ND	—
	PL-33	II	—	—

^a The staining was scored as follows: —, negative; W, weak; +, positive; ++, strong positive

^b This sample was stained by immunoperoxidase staining after fixed with acetone

^c ND, not done



(A) Bright field

(B) Fluorescence

Fig. 8. Immunofluorescence staining of lung adenocarcinoma cells in a pleural effusion (Case; PL-35) by KL-6 antibody.

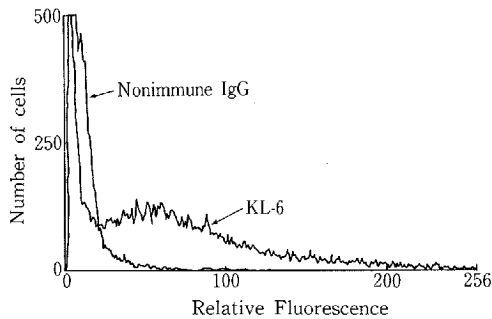


Fig. 9. Flow cytometric analysis of the reactivity of KL-6 antibody to lung carcinoma cells in pleural effusion

種々の疾患に起因する胸水中のKL-3抗原を定量し、Fig. 12に示した。肺腺癌患者の胸水では 30 ± 39 u/mlであり、血清でのcut off値17.5 u/ml以上を呈した症例が52.9% (10/19)認められた。一方、肺扁平上皮癌、小細胞癌、結核性胸膜炎、コレステリン胸膜炎による胸水では10 u/ml以上を呈した例を認めなかった。悪性中皮腫や隣癌、胃癌などの転移性肺腫瘍症例の胸水では、3,000 u/ml以上の著明な高値を示したが、肝癌や子宮扁平上皮癌の転移性肺腫瘍例では低値を示したにすぎなかった。なお、胸水中のKL-3抗原値のcut off値を結核性胸膜炎群の平均値+2SD (5.4 u/ml)とした場合、肺腺癌胸水群では78.9% (15/19)もの高率で異常高値を示した。

8. 可溶性KL-6抗原の定量

ビーズ法 Sandwich ELISAにより、可溶性KL-6抗原の定量化をおこなった。

a. 標準曲線の検討

スタンダードの測定値はTable 8に示すごとくであり、0 u/mlを除いた各濃度における変動係数は10%以下と低値を示した。標準曲線はFig. 13のごとく、上にやや凹の曲線を描いた。

b. 血清KL-6抗原値の検討

健常者及び肺疾患における血清中のKL-6抗原の定量結果をFig. 14に示した。健常人80例の血清中KL-6抗原の平均値は 278 ± 152 u/mlであり、肺癌99例のそれは $895 \pm 2,411$ u/ml、良性肺疾患108例では 492 ± 421 u/mlであった。平均値の差の推定では、肺癌及び良性肺疾患では健常対照に比べてそれぞれ危険率5%以下及び1%以下で有意差をみとめた。健常者の

Table 7. Absorbance levels of KL-3 antigen standards

Concentration (u/ml)	Absorbance (ΔOD_{492})		
	Measured	Average	% CV
0	0.015	0.016	8.8
	0.017		
2.5	0.033	0.035	8.1
	0.037		
5.0	0.055	0.057	5.0
	0.059		
10.0	0.111	0.117	6.7
	0.122		
20.0	0.243	0.228	9.3
	0.213		
40.0	0.396	0.396	0.0
	0.396		

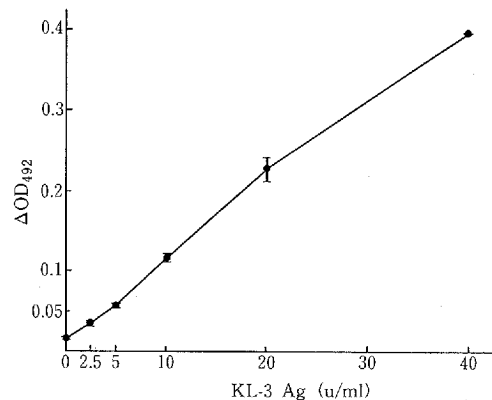


Fig. 10. Standard curve of KL-3 antigen

の平均値+2SDをcut off値とすると582 u/mlとなり、陽性率は健常者で僅か5% (4/80)、肺癌32.3% (32/99)、良性肺疾患27.8% (30/108)となり、陽性率の差を検定すると、肺癌及び良性肺疾患は健常者に比べて5%以下の危険率で有意に高い陽性率を示した。しかしながら、平均値の差の推定及び陽性率の差の推定のいずれにおいても肺癌と良性肺疾患の間に有意差は認めなかった。cut off値を健常者の全例が陰性となる1,000 u/mlとした場合でもこの傾向は同様にみとめられ、肺癌での陽性率を良性肺疾患に比べて有意に高くするためには、cut off値を良性肺疾患の全例が陰性となる2,200 u/mlにまで高くしなければならなかった。この場合、肺癌での陽性率は6.1% (6/99)であった。以下、582 u/ml以下を正常値、583~1,000 u/mlを軽度高値、1,001~2,200 u/mlを中等度高値、2,201 u/ml以上を高度高値とした。

肺癌での血清KL-6抗原値の結果を組織型別に分類

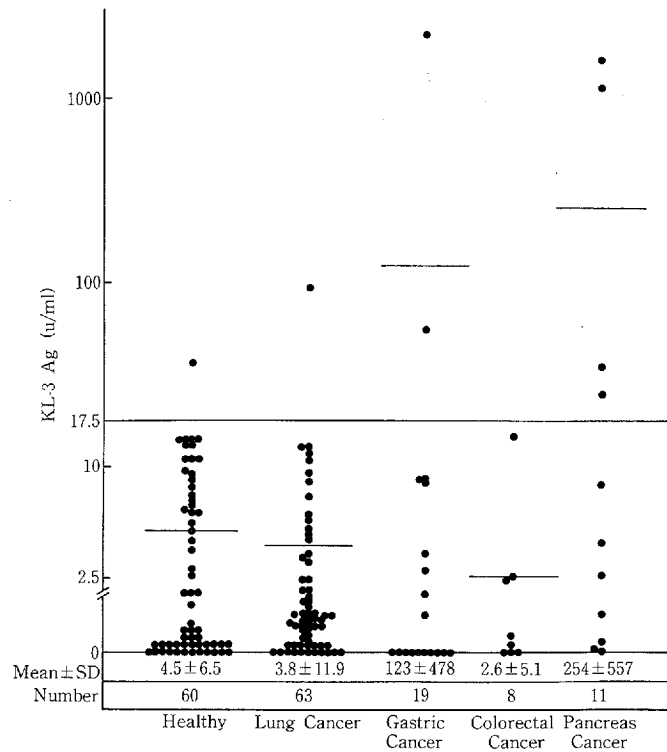


Fig. 11. Levels of KL-3 antigen in sera

して検討した場合、Fig. 15 に示す如く、異常高値を示した症例の大部分は腺癌と扁平上皮癌であり、陽性率は前者では40.5% (17/42) 及び、後者では32.1% (9/28) であった。また中等度及び高度高値を示した症例は全てこれらの組織型の肺癌患者であった。小細胞癌では17.9% (5/28) が軽度高値を示した。表には示していないが、大細胞癌の1例は22,600 u/ml と著明な高値であった。

さらに、組織型別・臨床病期別に血清 KL-6 抗原値を解析すると、Fig. 16 に示す如く腺癌と扁平上皮癌の I 期症例ではすべて正常範囲にあったが、III 期、IV 期と病期の進行につれて高値をとる症例が増加する傾向を示した。また、高度高値を示したものはすべて IV 期症例であった。一方、小細胞癌では、病期による変動をみとめなかった。

次いで良性肺疾患の疾患別に KL-6 抗原値を検討した結果を Fig. 17 に示す。毒ガス傷害者⁵⁶⁾ 12 名を含む慢性気管支炎15例はすべて正常値を示し、急性肺炎や気管支喘息のほとんどの症例は正常範囲であった。一方、上記の疾患程、临床上頻繁には認められな

い疾患である肺気腫、気管支拡張症、肺結核、びまん性細気管支炎などの疾患では高値を示す症例の比率が増加し、特に肺線維症では52.9% (9/17) が高値を示し、中等度高値例が41.2% (7/17) もみられたことは興味ある結果であった。

肺癌以外の悪性腫瘍における血清 KL-6 抗原値は Fig. 18 に示す如くで、胃癌、大腸癌、肝細胞癌では全例が正常値を示したが、膵癌では44.4% (4/9)、乳癌では75% (6/8) の高率に異常高値を呈していた。

肺以外の臓器の炎症性疾患として、慢性肝炎、肝硬変、膵炎（急性2例、慢性12例）、胆嚢炎（急性1例、慢性6例）について血清 KL-6 抗原値を検討したところ、肝疾患の一部症例で軽度高値を示したのみで、大部分は正常範囲にあった (Fig. 19)。

c. 胸水 KL-6 抗原値の検討

Fig. 20 に示すごとく、肺腺癌胸水症例の胸水中 KL-6 抗原量の平均値は $2,165 \pm 2,574$ u/ml であり、結核やコレステリン胸膜炎による胸水での 381 ± 547 u/ml、肺扁平上皮癌での 309 ± 237 u/ml、小細胞癌での 254 ± 223 u/ml に比べて著明に高値を呈した。ま

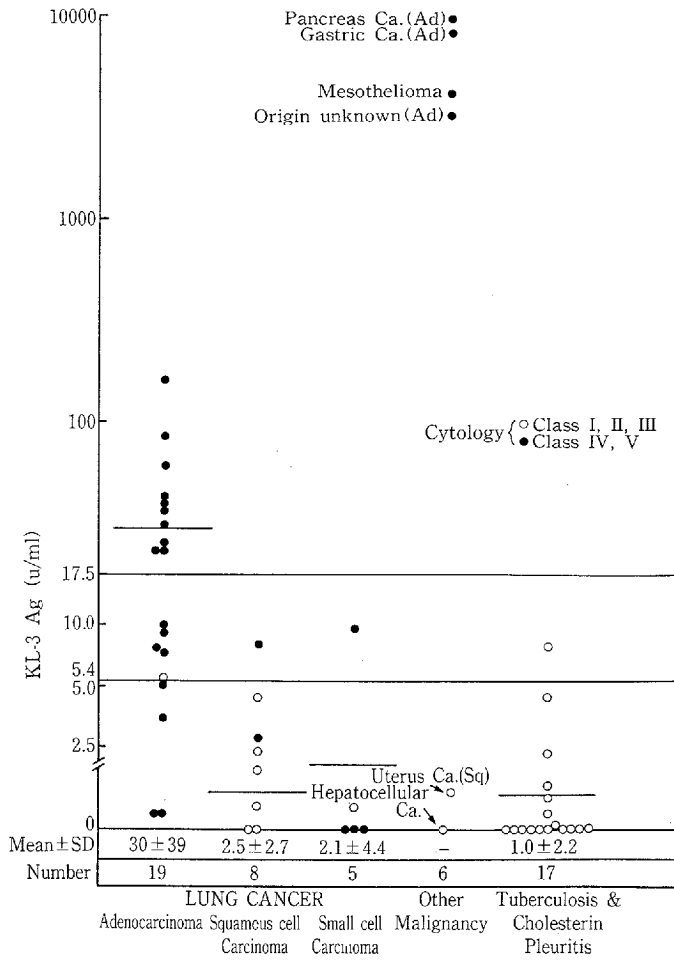


Fig. 12. Levels of KL-3 antigen in pleural effusions

た、悪性中皮腫の一例では非常に高い値を示したが、膀胱癌、胃癌、肝癌由来胸水では低値であった。なお、肺腺癌由来胸水において、血清 KL-6 抗原の cut off 値 582 u/ml 以上を呈したものは76.5% (13/17) であり、肺結核患者ではわずか12.5% (2/16) であった。

d. 血清 KL-6 抗原値と CEA 値との比較

肺癌の腫瘍マーカーとして最も利用されているものの一つである CEA と KL-6 抗原との相関を検討した。肺癌患者25例について比較したところ、Fig. 21 に示すごとく相関係数は0.2908と有意の相関とみとめなかった。なお、CEA 値が異常高値を示したものは32% (8/25) であり、KL-6 抗原値では28% (7/25) であったが、CEA 陰性例の中にも KL-6 抗原陽性例をみとめ、この2つのうち少なくともいずれかが1つが異常高値を示したものは44% (11/25) であり、両者

の併用により診断率の上昇をみとめた。

e. 血清 KL-6 抗原値と CA 19-9 値との比較

血清 KL-6 抗原は、膀胱癌患者でも高率に陽性例をみとめたため、膀胱癌のマーカーである CA 19-9 との異同を検討するために、肺癌患者31例の KL-6 抗原値と CA 19-9 値の比較を行った。Fig. 22 のごとく相関係数は0.0710であり相関を認めなかった。CA 19-9 値及び KL-6 抗原値が異常高値を呈したものはそれぞれ32.3% (10/31) ずつであったが、31例中で少なくともいずれかが異常高値を呈したものは15例、48.4% であり CEA 同様両者の combination assay をおこなうことにより診断率の改善をみとめた。

f. 血清 KL-6 抗原値と炎症のパラメーターとの比較

肺癌患者26例について、KL-6 抗原値と CRP 値と

Table 8. Absorbance levels of KL-6 antigen standards

Concentration (u/ml)	Absorbance (ΔOD_{492})		
	Measured	Average	% CV
0	0.021	0.024	17.7
	0.027		
2	0.078	0.078	0.0
	0.078		
4	0.133	0.137	4.1
	0.141		
8	0.230	0.227	2.2
	0.223		
16	0.331	0.346	5.9
	0.360		
32	0.547	0.536	2.9
	0.525		
64	0.683	0.711	5.6
	0.739		

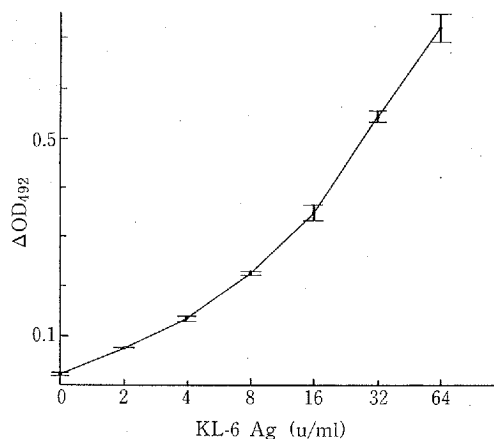


Fig. 13. Standard curve of KL-6 antigen

の相関を検討した結果、Fig. 23 に示すごとく相関係数は-0.1264であり、有意の相関を認めなかった。また、赤沈1時間値との相関は Fig. 24 に示しているが、相関係数-0.2248と有意の相関をみとめなかった。

9. 胸水中の KL-3 抗原量と KL-6 抗原量と比較並びに combination assay

胸水 KL-3 抗原値と KL-6 抗原値との相関を肺腺癌17例及び肺結核・コレステリン胸膜炎症例16例の計33症例について検討した。結果は Fig. 25 に示すごとく相関係数0.1812で有意の相関をみとめなかった。

ところで、肺腺癌症例のうち KL-3 抗原が異常高値を呈したものは52.9% (9/17)、KL-6 抗原は76.5% (13/17)であったが、少なくともいずれか一つが異常高値を示したものが94.1% (16/17)となり、両者を

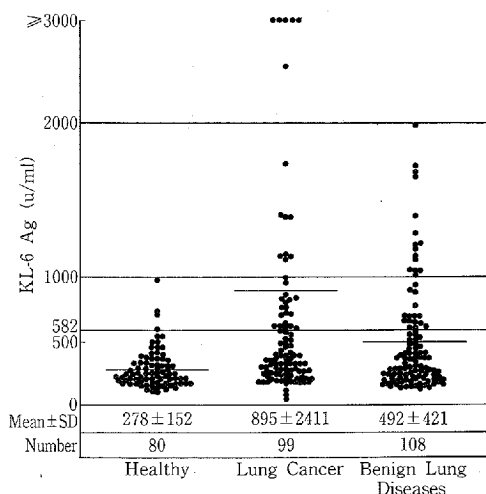


Fig. 14. Levels of KL-6 antigen in sera

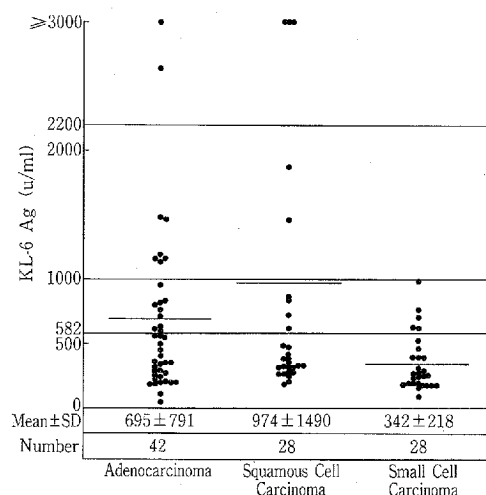


Fig. 15. Levels of KL-6 antigen in sera of lung cancer classified with histological types

用いることにより陽性率は著明に上昇した。一方、肺結核群では、KL-3 抗原あるいは KL-6 抗原の少なくとも1つが異常高値を示したものは僅か12.5% (2/16)のみであった。なお、両抗原ともに陽性を示した肺腺癌は35.3% (6/17)であったのに対し、肺結核群ではかかる症例を1例も認めなかった。

考 察

現在までのところ正常組織にはなく、腫瘍のみに特異的に存在するヒトの腫瘍特異抗原は見だされてい

いが、未知の腫瘍関連抗原を解析するには、モノクローナル抗体の作製は最適の手段と考えられ、種々の悪性腫瘍に対して抗体が作製されており、肺癌に対しても同様である。

ところで現在肺癌の診断にあたって、臨床的に用いられている腫瘍マーカーとしては、CEA^{22, 23, 25, 63, 69}、Neuron specific enolase^{15, 61}、Pregnancy associated

α_2 -glycoprotein^{14, 47}、フェリチン⁵⁵などをあげることができる。これらの腫瘍マーカーは必ずしも腫瘍特異的に血中に増加するわけではなく、担癌の有無や悪性腫瘍の種類を完璧に診断できるものでもない。従って、これらの combination assay をおこなうことによって診断率の向上をはかっている現状である。しかしながら、これらを駆使しても、すべての肺癌症例をカバーできるわけではなく、これらとは異なった特異性を示し、より早期に或いはより確実に診断のできる腫瘍マーカーの出現が期待されている。

著者は、肺癌の新しい腫瘍マーカーを検出するモノクローナル抗体を得る目的で細胞融合をおこない臨床的有用性が高いと考えられる2つのモノクローナル抗体 KL-3 抗体と KL-6 抗体を作製し弱干の検討を加えた。

目的とするモノクローナル抗体を効率よく経済的に得るために最も重要なことは、スクリーニング法がすぐれていることであると言われて⁷²。非常に多数の抗原に対するモノクローナル抗体を産生する無数のハイブリドーマの中から、無作為に、目的とするハイブリドーマを選び出す事は確率的に非常に困難であるからである。可溶性抗原を検出するモノクローナル抗

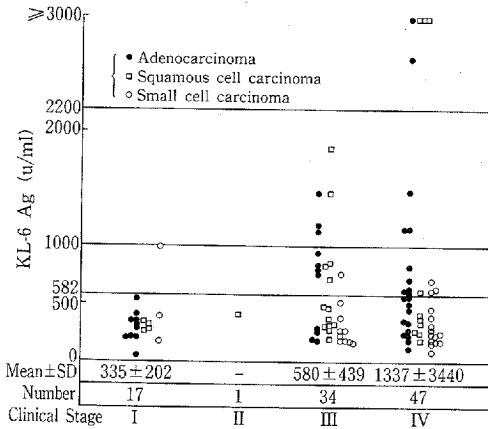


Fig. 16. Levels of KL-6 antigen in sera of lung cancer patients classified with clinical stages and histological types

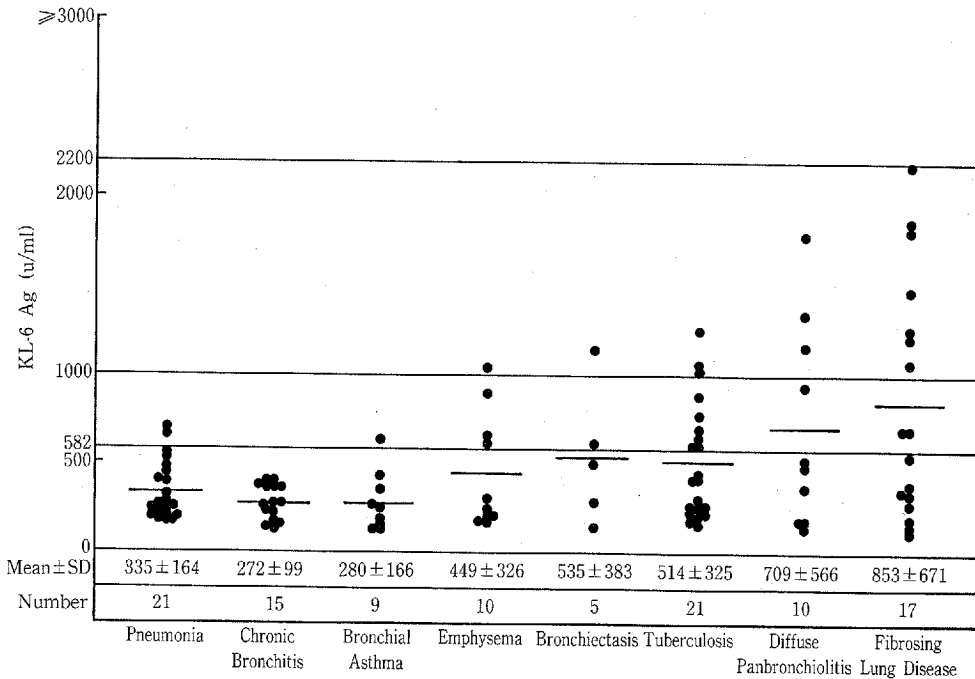


Fig. 17. Levels of KL-6 antigen in sera of benign lung diseases

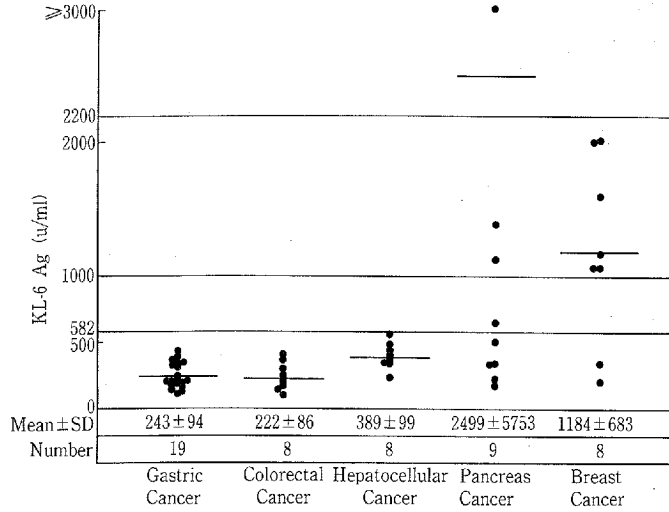


Fig. 18. Levels of KL-6 antigen in sera of malignant diseases

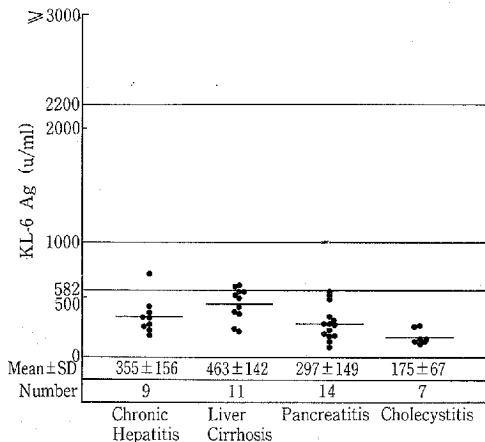


Fig. 19. Levels KL-6 antigen in sera of benign diseases

体をうるためのスクリーニング手順としては、まず免疫した細胞株に反応するものの中から、癌特異性を高める目的で正常肺線維芽細胞に反応しない抗体を選んだ。次に数種の細胞株に対する反応性のパターンを検討することで、重複するクローンを選択する危険性を少なくした。更に、正常肺組織に反応しないもの、或いは正常肺組織に対する染色性が特徴的なものを選んだ。正常肺組織に対して反応をみとめない抗体のみでなく、反応する抗体も選択した理由は、代表的腫瘍マーカーである CEA^{24,32)} や CA 19-9²⁾ などは腫瘍組織のみでなく正常組織にも存在することが明らかにされており、正常組織に対して反応しない抗体のみが必

ずしも血清診断に有力な抗体となるのではなく、正常組織に反応する抗体の中にも有力な抗体があると考えたからである。更に、これらの抗体の中から肺腺癌組織に対して高率に強い反応性を示したハイブリドーマ KL-3 及び KL-6 を選択した。これらの抗体を精製後、Sandwich ELISA の系を用いて抗原の検出を試みたところ両抗体とも血清中及び胸水中の腫瘍関連抗原を検出することが判明した。

KL-3 抗体は末端がシアル化されていない糖鎖抗原を認識しているものと考えられた。この抗原は、肺の細気管支をはじめとして多くの正常組織や腫瘍組織に分布していたが、肺癌では腺癌と小細胞癌には発現していたものの扁平上皮癌には検出されず、肺癌の組織型の鑑別を目的とした免疫組織化学研究に意義を持つ抗体と思われた。ところで KL-3 抗体は肺腺癌組織に対しては75% (12/16) という高率で反応したにもかかわらず、肺腺癌による胸水中の未固定の生細胞に対する蛍光抗体法では1例も反応を認めなかった。この反応性の相違を明らかにする目的で、蛍光抗体法では染色をみとめなかった同一症例の胸水細胞をアセトン固定した後に免疫ペルオキシダーゼ法で染色を試みたところ、蛍光抗体法の結果とは異なり、陽性に染色された細胞を認めた。従って、KL-3 抗原は肺癌の生細胞表面に存在するのではなく、固定処理によりはじめて細胞質中の抗原に対し抗体が反応するようになるものと推察された。一方、胸水中の胃癌由来細胞や肝癌由来細胞には蛍光抗体法でも反応をみとめており、これらの細胞表面には KL-3 抗原が表現されているものと

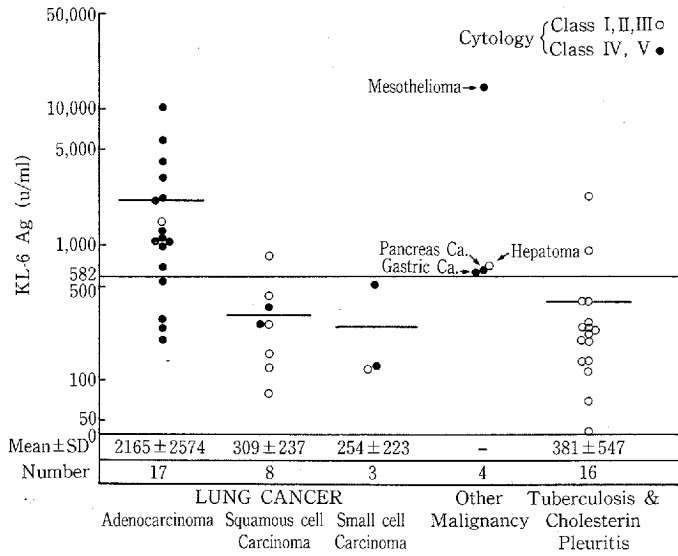


Fig. 20. Levels of KL-6 antigen in pleural effusions

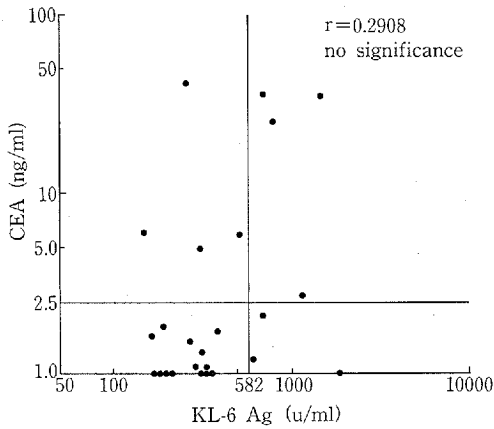


Fig. 21. Correlation between KL-6 antigen and CEA levels in sera of lung cancer patients

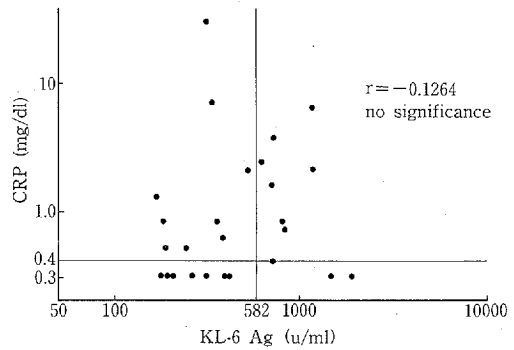


Fig. 23. Correlation between KL-6 antigen and CRP levels in sera of lung cancer patients

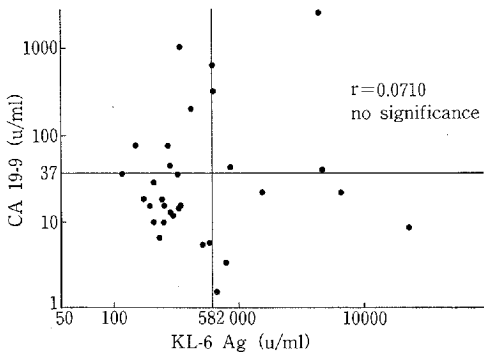


Fig. 22. Correlation between KL-6 antigen and CA 19-9 levels in sera of lung cancer patients

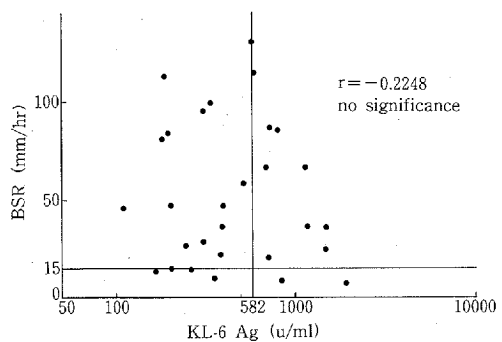


Fig. 24. Correlation between KL-6 antigen and BSR levels of lung cancer patients

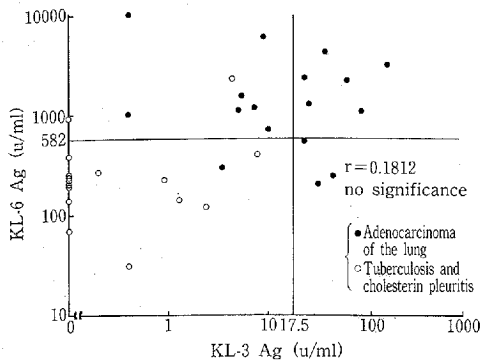


Fig. 25. Correlation between KL-3 antigen and KL-6 antigen levels in pleural effusions

考えられ、KL-3 抗原の存在部位が同じ腺癌であっても原発部位の違いによって異なることが明らかとなった。

KL-6 抗体は、末端のシアル化された糖鎖構造を認識し、抗原の一部には蛋白部分が発見されているものと考えられた。KL-6 抗体の認識する抗原は肺癌のうち腺癌、扁平上皮癌、小細胞癌の各組織型において高率にみとめられた。また正常肺では細気管支に最も強く表現されていたが、肺動脈や気管支腺にも存在していた。肺以外の正常組織における KL-6 抗原の分布は KL-3 抗原と大きく異なっていたが、肺癌以外の癌組織における抗原分布は非常に似通っていた。

このように両抗体とも肺組織に対して腫瘍特異的な反応性はみとめなかったが、胸水細胞診の補助診断法としては応用可能と考えられた。すなわち、細胞診で Class I 及び II と診断され、明らかに悪性細胞を含有せず、血球と炎症性中皮細胞が大部分を占めると考えられる胸水細胞に対しては反応した例を 1 例も認めなかった。ところが、明らかに悪性細胞が存在する検体では KL-3 抗体は胃癌及び膀胱癌由来細胞に対し、また KL-6 抗体は肺癌に対して高率に反応した。従ってこれらの抗体は胸水中の細胞に対しては悪性細胞にのみ反応する可能性が高いものと考えられた。更に、胸水細胞診で Class III と診断された症例 PL-5 は後に開胸肺生検により肺腺癌と診断された症例であり、形態的に悪性と診断することが困難であった癌細胞に対して KL-6 抗体は強く反応したものと解釈できる。これまで、モノクローナル抗体で胸水癌細胞診への応用を検討したものは Kyoizumi ら⁴¹⁾の扁平上皮癌を認識する LuCa 3 及び LuCa 4 抗体、Woods ら⁷⁴⁾の喉頭癌細

胞株 HEp. 2 に対する Ca 1 抗体、Johnston ら³⁴⁾の肺癌細胞膜に対する B72.3 抗体など極く少数しか報告されていない。これらはいずれも細胞診における客観的な診断法としてモノクローナル抗体を使用することの有用性を明らかにしている。KL-3 抗体や KL-6 抗体はこれらの抗体とは異なった反応特異性を有しており、これらのモノクローナル抗体を使って combination assay を行えば、胸水細胞診における診断率を改善するものと思われる。

癌細胞では血液型物質をはじめとする糖鎖が様々に修飾され、多様な抗原性を持つにいたると言われている^{26, 35, 46)}。KL-3 及び KL-6 抗体の認識する抗原決定基も前述したごとく糖鎖であろうと考えられ、ゲル濾過による分析から可溶性抗原の分子量は両抗原とも少なくとも 100 万以上であることがわかった。このような特徴は Koprowski ら⁴⁵⁾の NS 19-9 抗体の認識するシアル化 Le^a 抗原 (CA 19-9) や Watanabe ら⁷¹⁾の ST-4-39 抗体の認識するシアル化 Le^x 抗原などと類似している。これらは血清中ではムチンに結合した大分子として存在するといわれ、ゲル濾過によりその分子量を測定したパターンは、KL-3 抗原や KL-6 抗原に非常に類似している。またムチンは数多くの糖鎖を結合した形で血清中に存在していると考えられており³⁹⁾、KL-3 抗原や KL-6 抗原もこのようなものの一つとして、糖鎖がムチンに結合した形で大分子の可溶性抗原として存在しているものと推定している。

Sandwich ELISA で測定した血清中 KL-3 抗原は、一部の胃癌や膀胱癌では増量していたものの肺癌では健康者と差異をみとめず、肺癌の血清診断には有用とは考えられなかった。しかしながら、癌性胸水を有する症例の胸水中には抗原量の増加しているものがあり、肺腺癌では過半数の症例が異常高値を呈したばかりでなく、膀胱癌、胃癌、悪性中皮腫などでは著明な高値を示した。一方、結核性胸膜炎やコレステリン胸膜炎の非悪性胸水や肺扁平上皮癌による胸水中の KL-3 抗原濃度は低値を示し、湿性胸膜炎をきたす疾患の鑑別診断法として有用性がみとめられた。

一方、KL-6 抗原は血清中でも、肺癌の 32.3% (32/99) が異常高値を呈した。高値を示した症例の大部分は腺癌と扁平上皮癌であり、小細胞癌では低率であった。臨床病期別には病期の進行度と関係が深く、異常高値例のほとんどは III 期と IV 期であり、2200 u/ml 以上の高度高値を呈したものはすべて IV 期症例であった。血清中の KL-6 抗原値と CEA 値とは有意の相関を示さず、CEA 低値例のなかにも KL-6 抗原が異常高値を示した例をみとめ、両者を併用すると陽性率は

増加し、肺癌の腫瘍マーカーとして臨床的有用性をもつものと考えられた。しかしながら、他の多くの腫瘍マーカーと同様に、肺癌のみに特異性をもったマーカーではなく、膀胱癌や乳癌でも高率に陽性例をみとめた。そこで膀胱癌のすぐれたマーカーとして知られている CA 19-9¹⁾ との相関を検討したが有意の相関はみとめず、CA 19-9 と KL-6 抗原を併用することでも肺癌における診断率の向上がみとめられた。CA 19-9 は CEA とも異なった動きを示すと報告されており、これらと KL-6 抗原の combination assay を行えば、肺癌、膀胱癌の診断率が上昇することは明らかであろう。また、胃癌、大腸癌、肝細胞癌では血清 KL-6 抗原の陽性例をみとめず、腹部腫瘍では検索した範囲内で血清 KL-6 抗原の増加がみとめられたのは膀胱癌症例のみであった。このような腹部臓器癌における膀胱癌選択性は膀胱癌のマーカーである CA 19-9 や Pancreatic oncofetal antigen⁶²⁾ でも報告はみられず、腹部腫瘍の鑑別には非常に有用と考えられた。

このように KL-6 抗原は腫瘍マーカーとしての性格を有していたが、一部の良性肺疾患でも異常高値例をみとめた。疾患別には、肺線維症、びまん性細気管支炎、肺結核などで高い陽性率を示した。一方、従来炎症の指標として用いられている赤沈値や CRP 値とは相関がなく、肺の代表的炎症性疾患である急性肺炎や慢性気管支炎では陽性例をほとんどみとめなかった。KL-6 抗原が正常肺組織の肺胞や細気管支に分布していることは前述したごとくであるが、肺の炎症性疾患の中でも肺線維症の如く、肺末梢領域に広範囲の非可逆的な組織障害を惹起するような疾患において、これらの組織から KL-6 抗原が血中に放出され血清中 KL-6 抗原の上昇をきたしたものと考えている。一方、急性肺炎の如く、多くの場合組織障害を残さずに治癒するような種類の炎症性疾患では血清 KL-6 抗原の増加をきたさないものであろうと推定している。また、慢性肝炎、肝硬変、脾炎、胆嚢炎では異常高値を示した例はなく、炎症性疾患の中では肺疾患に高い特異性がみとめられた。従って、肺線維症を代表とする一部の良性肺疾患の病勢診断の指標としても血清中 KL-6 抗原の定量は有用と考えられた。

胸水中の KL-6 抗原は、多くの肺腺癌において著明な高値を示したが、結核性胸膜炎群でも少数ではあるが比較的高値を示す例があり、KL-3 抗原に比べると腫瘍特異性は低いことが示された。

ところが、胸水中の KL-3 抗原と KL-6 抗原の両者の値を検討すると、両者の間に有意の相関はなく、肺腺癌胸水においていずれかの抗原が陽性を呈したものは

94.1% (16/17) もの高率であった。一方、肺結核及びコレステリン胸膜炎症例では 12.5% (2/16) の低率にとどまり、KL-3 抗原及び KL-6 抗原の combination assay が胸水診断に非常に有用であることが示された。

以上、肺腺癌細胞株を免疫して作製した腫瘍関連可溶性抗原を検出する 2 つのモノクローナル抗体について、その反応特異性及び臨床的応用の可能性について報告した。いずれの抗体の認識する抗原も正常上皮組織や癌組織などに汎く分布していたが、胸水中に浸出してくる細胞に対しては癌特異的に反応をみとめ、胸水細胞診の客観的補助診断法として臨床応用可能と考えられた。また KL-3 抗体と KL-6 抗体はそれぞれ胸水中の可溶性抗原を定量することにより胸水をきたす疾患の鑑別に有用であり、両者を併用することによりその診断率は著明に向上した。さらに KL-6 抗体の認識する血清中の可溶性抗原は、肺癌、膀胱癌、乳癌などでは腫瘍マーカーの一つとして、また肺線維症、びまん性細気管支炎、肺結核などの良性肺疾患においては病態把握のマーカーとして有用と考えられた。

謝 辞

稿を終るに臨み、御懇篤な御指導、御校閲を賜った恩師 西本幸男教授に厚く感謝致します。

さらに、御指導、御鞭撻を戴いた山木戸道郎助教授、放射線影響研究所 秋山實利博士、京泉誠之博士、また快く組織材料を提供して戴いた広島大学医学部第二外科 土肥雪彦教授、西亀正之助教授、原医研外科 服部孝雄教授、峠 哲哉講師、第一外科 横山 隆助教授、産婦人科 藤原 篤教授、泌尿器科 仁平寛巳教授、中野 博助教授、広島市民病院外科 妹尾紀具部長、本研究に御助力を戴いた教室並びに放射線影響研究所の方々に深謝いたします。

参 考 文 献

1. 荒川泰行, 小林聖明, 尾崎隆彦, 有賀久幸, 松尾裕, 本田利男, 荒井 徹, 黒須康彦, 森田 建, 小沼 弘, 萩原和男 1984. 消化器癌における糖鎖抗原 CA 19-9 の測定とその診断的意義. 癌と化学療法 11: 917-925.
2. Arends, J. W., Verstynen, C., Bosman, F. T., Hilgers, J. and Steplewski, Z. 1983. Distribution of monoclonal antibody-defined monosialoganglioside in normal and cancerous human tissues: An immunoperoxidase study. Hybridoma 2:219-229.

3. **Ball, E. D., Graziano, R. F., Pettengill, O. S., Sorenson, G. D. and Tanger, M. W.** 1984. Monoclonal antibodies reactive with small cell carcinoma of the lung. *J. Natl. Cancer Inst.* 73:593-598.
4. **Bast, R. C., Feeney, M., Lazarus, H. and Nadler, L. M.** 1981. Reactivity of a monoclonal antibody with human ovarian carcinoma. *J. Clin. Invest.* 68:1331-1337.
5. **Bast, R. C. Jr., Klug, T. L., John, E. S., Jenison, E., Niloff, J. M., Lazarus, H., Berkowitz, R. S., Leavitt, T., Griffiths, C. T., Parker, L., Zurawski, V. R. Jr. and Knapp, R. C.** 1983. A radioimmunoassay using a monoclonal antibody to monitor the course of epithelial ovarian cancer. *N. Engl. J. Med.* 309:883-887.
6. **Bellet, D. H., Wands, J. X., Isselbacher, K. J. and Behuon, C.** 1984. Serum α -fetoprotein levels in human disease: Perspective from a highly specific monoclonal radioimmunoassay. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:3869-3873.
7. **Berche, C., Mach, J., Lumbroso, J., Langlais, C., Aubry, F., Buchegger, F., Carrel, S., Rougier, P., Parmentier, C. and Tubiana, M.** 1982. Tomoscintigraphy for detecting gastrointestinal and medullary thyroid cancers: First clinical results using radiolabelled monoclonal antibodies against carcinoembryonic antigen. *Br. Med. J.* 1982:1447-1451.
8. **Bernal, S. D. and Speak, J. A.** 1984. Membrane antigen in small cell carcinoma of the lung defined by monoclonal antibody SM 1. *Cancer Res.* 44:265-270.
9. **Bernal, S. D., Mabry, M., Stahel, R. A., Griffin, J. D. and Speak, J. A.** 1985. Selective cytotoxicity of the SM 1 monoclonal antibody towards small cell carcinoma of the lung. *Cancer Res.* 45:1026-1032.
10. **Blaszczyk, M., Pak, K. Y., Herlyn, M., Lindgren, J., Pessano, S., Steplewski, Z. and Koprowski, H.** 1984. Characterization of gastrointestinal tumor-associated carcinoembryonic antigen-related antigens defined by monoclonal antibodies. *Cancer Res.* 44:245-253.
11. **Bosslet, K., Kurrle, R., Ax, W. and Sedlacek, H. H.** 1983. Monoclonal murine antibodies with specificity for tissue culture lines of human squamous-cell carcinoma of the lung. *Cancer Detect. Prev.* 6:181-184.
12. **Brenner, B. G., Jothy, S., Shuster, J. and Fuks, A.** 1982. Monoclonal antibodies to human lung tumor antigens demonstrated by immunofluorescence and immunoprecipitation. *Cancer Res.* 42:3187-3192.
13. **Brown, D. T. and More, M.** 1982. Monoclonal antibodies against two human lung carcinoma cell lines. *Br. J. Cancer* 46:794-801.
14. **Burt, R. W., Ratcliffe, J. G., Stack, B. H. R., Cuthbert, J., Kennedy, R. S., Corker, C.S., Franchmont, P., Spilg, W. G. S. and Stimson, W. H.** 1978. Serum biochemical markers in lung cancer. *Br. J. Cancer* 37:714-717.
15. **Carney, D. N., Marangos, P. J., Ihde, D. C., Bunn, P. A. Jr. Cohen, M. H., Minna, J. D. and Gazdar, A. F.** 1982. Serum neuron-specific enolase: A marker for disease extent and response to therapy of small-cell lung cancer. *Lancet*, March 13:583-585.
16. **Chatal, J., Saccavini, J., Fumolean, P., Donillard, J., Curtet, C., Kremer, M., Mevel, B. L. and Koprowski, H.** 1984. Immunoscintigraphy of colon carcinoma. *J. Nucl. Med.* 25:307-314.
17. **Cuttitta, F., Rosen, S., Gazdar, A. F. and Minna, J. D.** 1981. Monoclonal antibodies that demonstrate specificity for several types of human lung cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78:4591-4595.
18. **DeLeo, A. B., Shiku, H., Takahashi, T., John, M. and Old, L. J.** 1977. Cell surface antigens of chemically induced sarcomas of the mouse I: Murine leukemia virus-related antigens and alloantigens on cultured fibroblasts and sarcoma cells: Description of a unique antigen on BALB/c Meth A sarcoma. *J. Exp. Med.* 146:720-734.
19. **Embleton, M. J., Grunn, B., Byers, V. S. and Baldwin, R. W.** 1981. Antitumor reactions of monoclonal antibody against a human osteogenic-sarcoma cell line. *Br. J. Cancer* 43:582-587.
20. 藤本伊三郎, 中村正和, 北村尚代, 平田 均, 花井 彩, 福間誠吾 1985. 肺がん登録患者実態調査. *肺癌* 25 : 291-296.
21. **Fukushima, K., Hirota, M., Terasaki, P. I., Wakisaka, A., Togashi, H., Chia, D., Suyama, N., Fukushi, Y., Nuderman, E. and Hakomori, S.** 1984. Characterization of sialosylated Lewis^x as a new tumor-associated antigen. *Cancer Res.* 44:5279-5285.
22. **Gold, P. and Freedman, S. O.** 1964. Demonstration of tumor-specific antigens in human colonic carcinomata by immunological tolerance absorption techniques. *J. Exp. Med.*

- 121:439-462.
23. **Gold, P. and Freedman, S. O.** 1965. Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *J. Exp. Med.* 122:467-481.
 24. **Goldenberg, D. M., Sharkey, R. M. and Primus, F. J.** 1978. Immunocytochemical detection of carcinoembryonic antigen in conventional histopathology specimens. *Cancer* 42:1546-1553.
 25. **Goslin, R. H., Skarin, A. T. and Zameck, N.** 1981. Carcinoembryonic antigen: A useful monitor of therapy of small cell lung cancer. *JAMA* 13:2173-2176.
 26. **Hakomori, S.** 1984. Philip Levine Award Lecture: Blood group glycolipid antigens and their modifications as human cancer antigens. *Am. J. Clin. Pathol.* 82:635-648.
 27. **Hirota, M., Fukushima, K., Terasaki, P. I., Terashita, G. Y., Kawahara, M., Chia, D., Suyama, N. and Togashi, H.** 1985. Sialosylated Lewis^x in the sera of cancer patients by a cell-binding inhibition assay. *Cancer Res.* 45:1901-1905.
 28. **Houghton, A. N., Mintzer, D., Cordon-Cardo, C., Welt, S., Fliegel, B., Vadhan, S., Carswell, E., Melamed, M. R., Oettingen, H. F. and Old, L. J.** 1985. Mouse monoclonal IgG₃ antibody detecting G_{D3} ganglioside: A phase I trial in patients with malignant melanoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82:1242-1246.
 29. **Huang, L. C., Brockhaus, M., Magnani, J. L., Cuttitta, F., Rosen, S., Minna, J. D. and Ginsburg, V.** 1983. Many monoclonal antibodies with an apparent specificity for certain lung cancers are directed against a sugar sequence found in Lacto-N-fucopentaose III. *Arch. Biochem. Biophys.* 220:318-320.
 30. 井出源四郎, 石川七郎, 香川秀雄, 本間日臣, 佐藤春郎, 梅垣一郎 1985. 日本肺癌学会創立25周年記念シンポジウム肺癌研究の展望. *肺癌* 25: 239-248.
 31. **Imai, K., Moriya, Y., Fujita, H., Tsujisaka, M., Kawaharada, M. and Yachi, A.** 1984. Immunologic characterization and molecular profile of carcinoembryonic antigen detected by monoclonal antibodies. *J. Immunol.* 132:2992-2997.
 32. **Isaacson, P. and Judd, M. A.** 1978. Immunohistochemistry of carcinoembryonic antigen in the small intestine. *Cancer* 42:1554-1559.
 33. **Iwaki, Y., Kasai, M., Terasaki, P. I., Bernoco, D., Park, M. S., Ciccirelli, J., Heintz, R., Saxton, R. E., Burk, M. W. and Morton, D. L.** 1982. Monoclonal antibody against A₁ Lewis d antigen produced by the hybridoma immunized with a pulmonary carcinoma. *Cancer Res.* 42:409-411.
 34. **Johnston, W. W., Szpak, C. A., Lottich, S. C., Thor, A. and Schlom, J.** 1985. Use of a monoclonal antibody (B72.3) as an immunocytochemical adjunct to diagnosis of adenocarcinoma in human effusions. *Cancer Res.* 45:1894-1900.
 35. 神奈木玲児 1985. II. 癌抗原と糖脂質, p. 393-434. 谷内 昭, 高橋利忠 (編), モノクローナル抗体とがん. サイエンスフォーラム, 東京.
 36. **Kasai, M., Saxton, R. E., Holmes, E. C., Burk, M. W. and Morton, D. L.** 1981. Hybridoma monoclonal antibody: Use in defining surface antigens on human lung carcinoma cells. *Transplant. Proc.* 13:1942-1946.
 37. **Kennett, R. H. and Gilbert, F.** 1979. Hybrid myelomas producing antibodies against a human neuroblastoma antigen present on fetal brain. *Science* 203:1120-1121.
 38. **Koprowski, H., Steplewski, Z., Mitchell, K., Herlyn, M., Herlyn, D. and Fuhrer, P.** 1979. Colorectal carcinoma antigens detected by hybridoma antibodies. *Somatic Cell Genetics* 5:957-972.
 39. **Kornfeld, R. and Kornfeld S.** 1976. Comparative aspects of glycoprotein structure. *Ann. Rev. Biochem.* 45:217-237.
 40. **Köhler, G. and Milstein, C.** 1975. Continuous cultures of fused cell secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256:495-497.
 41. **Kyoizumi, S., Akiyama, M., Kouno, N., Kobuke, K., Hakoda, M., Jones, S. L. and Yamakido, M.** 1985. Monoclonal antibodies to human squamous cell carcinoma of the lung and their application to tumor diagnosis. *Cancer Res.* 45:3274-3281.
 42. **Loop, S. M., Nishiyama, K., Hellström, I., Woodbury, R. G., Brown, J. P. and Hellström, K. E.** 1981. Two human tumor-associated antigens, p 155 and p 210, detected by monoclonal antibodies. *Int. J. Cancer* 27:775-781.
 43. **Magnani, J. L., Brockhaus, M., Smith, D. F., Ginsburg, V., Blaszczyk, M., Mitchell, K. F., Steplewski, Z. and Koprowski, H.** 1981. A monosialoganglioside is a monoclonal antibody-defined antigen of colon carcinoma. *Science* 212:55-56.
 44. **Magnani, J. L., Nilsson, B., Brockhaus, M., Zopf, D., Steplewski, Z., Koprowski, M. and Ginsburg, V.** 1982. A monoclonal an

- tibody-defined antigen associated with gastrointestinal cancer is a ganglioside containing sialylated lacto-N-fucopentaose II. *J. Biol. Chem.* 257:14365-14369.
45. **Magnani, J. L., Steplewski, Z., Koprowski, H. and Ginsburg, V.** 1983. Identification of the gastrointestinal and pancreatic cancer-associated antigen detected by monoclonal antibody 19-9 in the sera of patients as a mucin. *Cancer Res.* 43:5489-5492.
 46. 牧田 章 1985. 癌化による糖脂質の変化——ヒト癌関連単クローン抗体に対する糖脂質抗原——. *蛋白質 核酸 酵素* 30:169-183.
 47. 丸石秀正, 山本戸道郎, 大成浄志, 上綱昭光, 稲水 悖, 石岡伸一, 向田邦俊, 秋山実利, 郷力和明, 藤田幹雄, 西本幸男 1984. 肺癌における Pregnancy Associated α_2 -Glycoprotein (α_2 -PAG) の臨床的意義. *肺癌* 24:273-283.
 48. **Mazaauric, T., Mitchell, K. F., Letchworth, G. J., III, Koprowski, H. and Steplewski, Z.** 1982. Monoclonal antibody-defined human lung cell surface protein antigens. *Cancer Res.* 42:150-154.
 49. **Milstein, C.** 1980. Monoclonal antibodies. *Scientific American* 243(4):56-64.
 50. **Minna, J. D., Cuttitta, F., Rosen, S., Bun, P. A., Jr., Carney, D. N., Gazdar, A. F. and Krasnow, s.** 1981. Methods for production of monoclonal antibodies with specificity for human lung cancer cells. *In Vitro* 17:1058-1070.
 51. **Mulshine, J. L., Cuttitta, F., Bibro, M., Fedorko, J., Fargion, S., Little, C., Carney, D. N., Gazdar, A. F. and Minna, J. D.** 1983. Monoclonal antibodies that distinguish non-small cell from small cell lung cancer. *J. Immunol.* 131:497-502.
 52. **Nakane, P. K. and Kawaoi, A.** 1974. Peroxidase-labeled antibody: A new method of conjugation. *J. Histochem. Cytochem.* 22:1084-1091.
 53. **Natori, T., Law, L. W. and Appella, E.** 1977. Biologic and biochemical properties of detergent-solubilized tumor-specific transplantation antigen from a simian virus 40-induced neoplasm: Brief communication. *J. Natl. Cancer Inst.* 59:1331-1333.
 54. **Natori, T., Law, L. W. and Appella, E.** 1977. Biological and biochemical properties of nonidet P40-solubilized and partially purified tumor-specific antigens of the transplantation type from plasma membranes of a methylcholanthrene-induced sarcoma. *Cancer Res.* 37:3406-3413.
 55. 新津洋司郎 1980. 5. 悪性腫瘍と血清フェリチン. *臨床血液* 21:1135-1143.
 56. 西本幸男 1967. 慢性気管支炎の進展と病期病型分類. *日本臨床* 25:2070-2078.
 57. **Nishioka, K., Irie, R. F., Kawana, T. and Takeuchi, S.** 1968. Immunological studies on mouse mammary tumors. III. Surface antigens reacting with tumor-specific antibodies in immune adherence. *Int. J. Cancer* 4:139-149.
 58. **Okabe, T., Kaizu, T., Fujisawa, M., Watanabe, J., Kojima, K., Yamashita, T. and Takaku, F.** 1984. Monoclonal antibodies to surface antigens of small cell carcinoma of the lung. *Cancer Res.* 44:5273-5278.
 59. **Primus, F. J., Newell, K. D., Blue, A. and Goldenberg, D. M.** 1983. Immunologic heterogeneity of carcinoembryonic antigen: Antigenic determinants on carcinoembryonic antigen distinguished by monoclonal antibodies. *Cancer Res.* 43:686-692.
 60. **Rosen, S. T., Mulshine, J. L., Cuttitta, F., Fedorko, J., Carney, D. N., Gazdar, A. F. and Minna, J. D.** 1984. Analysis of human small cell lung cancer differentiation antigens using a panel of rat monoclonal antibodies. *Cancer Res.* 44:2052-2061.
 61. **Schmechel, D., Marangos, P. J. and Brightman, M.** 1978. Neuron-specific enolase is a molecular marker for peripheral and central neuroendocrine cells. *Nature* 276:834-836.
 62. 島野高志, 森 武貞, 丸山博英, 北田昌之, 古川順康, 神前五郎 1982. 胎児生睪(癌)抗原. 免疫と疾患 4:755-762.
 63. 清水信義, 松本 伸, 岡崎哲郎, 和田豊治, 陳鋼民, 荻野健次, 田中 聰, 寺本 滋 1979. 肺癌患者における Carcinoembryonic antigen (CEA) の測定とその臨床的意義について. *肺癌* 19:239-245.
 64. **Siegert, W., Fenyö, E. M. and Klein, G.** 1977. Separation of the Moloney leukemia virus-determined cell surface antigen (MCSA) from known virion proteins associated with the cell membrane. *Int. J. Cancer* 20:75-82.
 65. **Stockert, E. and Old, L. J.** 1977. Preleukemic expression of TL antigens in X-irradiated C57BL/6 mice. *J. Exp. Med.* 146:271-276.
 66. **Tong, A. W., Lee, J. and Stone, M. J.** 1984. Characterization of two human small cell lung carcinoma-reactive monoclonal antibodies generated by a novel immunization approach. *Cancer Res.* 44:4987-4992.
 67. **Ueda, R., Tanimoto, M., Takahashi, T., Ogata, S., Nishida, K., Namikawa, R.,**

- Nishizuka, Y. and Ota, K.** 1982. Serological analysis of cell surface antigens of null cell acute lymphocytic leukemia by mouse monoclonal antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **79**:4386-4390.
68. **Varki, N. M., Resfeld, R. A. and Walker, L. E.** 1984. Antigens associated with a human lung adenocarcinoma defined by monoclonal antibodies. *Cancer Res.* **44**:681-687.
69. **Vincent, R. G., Chu, T. M., Fergen, T. B. and Ostrander, M.** 1975. Carcinoembryonic antigen in 228 patients with carcinoma of the lung. *Cancer* **36**:2069-2076.
70. **Vitetta, E. S., Krolick, K. A., Miyama-Inaba, M., Cushley, W. and Uhr, J. W.** 1983. Immunotoxins: A new approach to cancer therapy. *Science* **219**:644-650.
71. **Watanabe, M., Hirohashi, S., Shimosato, Y., Ino, Y., Yamada, T., Teshima, S. Sekine, T. and Abe, O.** 1985. Carbohydrate antigen defined by a monoclonal antibody raised against a gastric cancer xenograft. *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)* **76**:43-52.
72. 渡辺 武 1984. B細胞ハイブリドーマ, p. 269-280. 内田 駿, 大石道夫, 古沢 満 (編), 動物細胞利用実用化マニュアル, リアライズ, 東京.
73. **Wilson, B. S., Herrig, M. A. and Lloyd, R. V.** 1984. Immunoperoxidase staining for Ia-like antigens in paraffin-embedded tissues from human melanoma and lung carcinoma. *Am. J. Pathol.* **115**:102-116.
74. **Woods, J. C., Spriggs, A. I., Harris, H. and McGee, J. O.** 1982. A new marker for human cancer cells. 3. Immunocytochemical detection of malignant cells in serous fluids with the Ca 1 antibody. *Lancet*, September **4**:512-515.
75. 谷内 昭 1985. モノクローナル抗体——基礎と臨床——. *肺癌* **25**: 265-274.

Monoclonal Antibodies to Human Pulmonary Carcinoma and Their Application to Clinical Diagnosis

Nobuoki KOHNO

The Second Department of Internal Medicine, Hiroshima University School of Medicine
(Director: Prof. Yukio NISHIMOTO)

Two monoclonal antibodies (KL-3 & KL-6) were produced by fusing murine myeloma NS 1 cells with splenocytes from a BALB/c mouse immunized with human pulmonary adenocarcinoma VMRC-LCR cells and their specificity and diagnostic potential were assessed as follows:

1) Immunohistochemical analysis of frozen tissue sections showed that KL-3 antibodies (IgM) preferentially react with lung adenocarcinomas and small cell carcinomas, whereas KL-6 antibodies (IgG₁) react with these as well as squamous cell carcinomas of the lung. Both of these antibodies also react with many different types of cancer tissue and normal epithelia, but not with blood cells.

2) An enzyme immunoassay was used to study the reactivity of KL-3 and KL-6 antibodies against cancer cell lines and showed that both antibodies had similar specificities against tumor cell lines derived from the lung as those noted above for lung cancer tissues, although their reactivity against cell lines derived from other organs did not always reflect that observed for the corresponding cancer tissue.

3) Immunofluorescence was used to demonstrate that KL-3 was only reactive with tumor cells in pleural effusions from patients with mesothelioma, and pancreatic and gastric carcinoma which had metastasized to the lung, whereas KL-6 reacted with malignant pleural effusion cells from the vast majority of lung adenocarcinoma cases and from lung small cell carcinoma, mesothelioma and metastatic pancreatic carcinoma cases. None of antibodies reacted with cells in pleural effusions from patients with lung squamous cell carcinoma and nonmalignant diseases.

4) The antigen determinants recognized by both KL-3 and KL-6 antibodies appear to be carbohydrate in nature, with terminal sialic acid only being involved in the reaction with KL-6. The molecular weights of both soluble antigens in pleural effusions were found by gel filtration to be greater than 1,000 kDal.

5) These antibodies were useful for detecting soluble antigens in sera and pleural effusions using sandwich ELISA. While elevated levels of KL-3 antigen in sera were found only in those of patients with gastric and pancreatic cancer, KL-6 antigen was above normal levels in sera of patients with lung cancer, especially advanced adenocarcinoma and squamous cell carcinoma, pancreatic cancer and breast cancer. In benign disease of the lung and other organs, only sera from patients with tuberculosis, diffuse panbronchiolitis and fibrosing lung disease had notably elevated KL-6 antigen levels. Serum levels of KL-6 antigen also bore no relationship to those of CEA, CA 19-9, CRP, and to BSR. In pleural effusions, the incidence of lung adenocarcinoma cases with elevated levels of KL-3 and KL-6 antigens was 52.9% and 76.5% respectively (94.1% for one of the two). Pleural effusions from mesothelioma and metastatic lung cancer patients also had elevated levels of both antigens, whereas nonmalignant pleural effusions, including those from tuberculosis and cholesterol pleuritis, were mostly shown to have normal levels of these antigens.

These monoclonal antibodies define antigens that in combination with other tumor markers may be useful for tumor diagnosis and monitoring tumor progression.