

4) 皮膚科領域におけるモノクローナル抗体の応用

新潟大学医学部皮膚科学教室 伊藤 雅章・田沢 敏男
清水 直也・伊藤 薫
田中 正明・佐藤 良夫

マウスやラットのミエローマ細胞を用いたモノクローナル抗体 (MoAb) の作製は一般化し、皮膚科領域においても、諸々の大学等の施設で種々の MoAb が作製され、すでに市販されているものとともに、研究および臨床に応用されている。

1. リンパ球 subset

リンパ球 subset に対する MoAb は極めて多種にわたり、その一部のものが市販されている。皮膚科領域では種々の皮膚疾患における組織末血中のリンパ球あるいは組織球の同定に用いられ、とくに皮膚リンパ腫組織への応用は注目すべきものがある¹⁾。菌状息肉症や Sézary 症候群では、皮膚に浸潤する細胞は病後期になるとヘルパー T 細胞が主体となる。また、抗 T 細胞 MoAb を用いた免疫電顕法で、陽性細胞の nuclear contour index (核周囲の長さ ÷ $\sqrt{\text{核の面積}}$) を測定すると、これらリンパ腫では、この比率が、慢性良性皮膚疾患にみられる T 細胞のそれに比し、有意に高いという²⁾。

2. ランゲルハンス細胞

ランゲルハンス細胞に対する MoAb (OKT 6) は histiocytosis X の診断に有用である。この他に、最近、ランゲルハンス顆粒に特異的に反応する MoAb も報告されている²⁾。

3. 悪性黒色腫

悪性黒色腫細胞を抗原とした MoAb はいくつかの施設で作製されているが、それらにより悪性黒色腫細胞と良性の母斑細胞あるいは正常のメラノサイトを正確に鑑別できるという段階には未だ至っていない。最近発表されたメラノサイトに関する MoAb としては、メラノソーム蛋白に対するもの^{3) 4)}、チロジナーゼの T₄ に対するもの⁵⁾がある。このような MoAb は、今後、メラニン代謝の研究に役立つと考えられる。

4. 上皮ないし角化細胞

上皮細胞に含まれるケラチン線維は生化学的に抽出さ

れ、そのペプチドの電気泳動所見は各上皮組織に特有のパターンがあると言われている⁶⁾。一方、免疫学的には、ポリクローナル抗体⁷⁾よりは、MoAbの方がケラチン線維中の個々の抗原決定基に対する titer ははるかに高いと考えられ⁸⁾、ケラチン線維各種間の免疫学的異同の研究には MoAb が不可欠である。実際に単層上皮のケラチン線維⁹⁾や表皮細胞由来の異った分子量のケラチン線維ポリペプチド¹⁰⁾に対する特異的な MoAb が作製され、表皮細胞の角化過程や皮膚上皮性腫瘍の分化の研究に利用されている。しかしながら、皮膚には、毛組織、脂腺、汗腺および表皮という異った上皮が存在し、同一起源の上皮とは言っても、それぞれの形態、機能は特異である。毛ケラチン線維は、成長した毛髪より簡単に抽出することができ、生化学的には表皮ケラチン線維等とはかなり異っていることは理解されていた^{11) 12)}が、その免疫学的性格については未だ十分に解明されていなかった。そこで当皮膚科学教室においては、皮膚の

表 1 ヒト組織における抗毛ケラチンモノクローナル抗体の反応性

		抗毛ケラチンモノクローナル抗体			
		HKN-2	HKN-4	HKN-5	HKN-6, 7
表	皮	+	+	-	-
毛組織	毛母	-	-	-	-
	角化帯: 毛幹と内毛根鞘	+	+	+	+
	外毛根鞘最内層細胞層	+	+	+	-
	その他の外毛根鞘	+	+	-	-
角化した毛幹		-	-	-	-
		-	-	-	-
脂	腺	+	+	-	-
汗	導管, 筋上皮細胞	+	+	-	-
腺	分泌細胞	-	+	-	-
他臓器**: 上皮細胞		-	+	-	-

+: 反応陽性

-: 反応陰性

*: 基底細胞を除き陽性 ***: 肝, 腎, 腸管

各上皮組織間でのケラチン線維の免疫学的異同を調べる目的で、正常ヒト毛髪より抽出した毛線維蛋白(HFPs)に対して、BALB/Cマウスとマウスミローマ細胞を用いてMoAbを作製した。詳しい方法等は他所⁹⁾に譲るが、ここでは得られたMoAbの概略と応用について簡単に述べる。得られた抗毛ケラチンMoAbはHKN-2, 4, 5, 6および7と名づけ、皮膚を含む種々の臓器組織への反応性を免疫組織化学を用いて検索した。

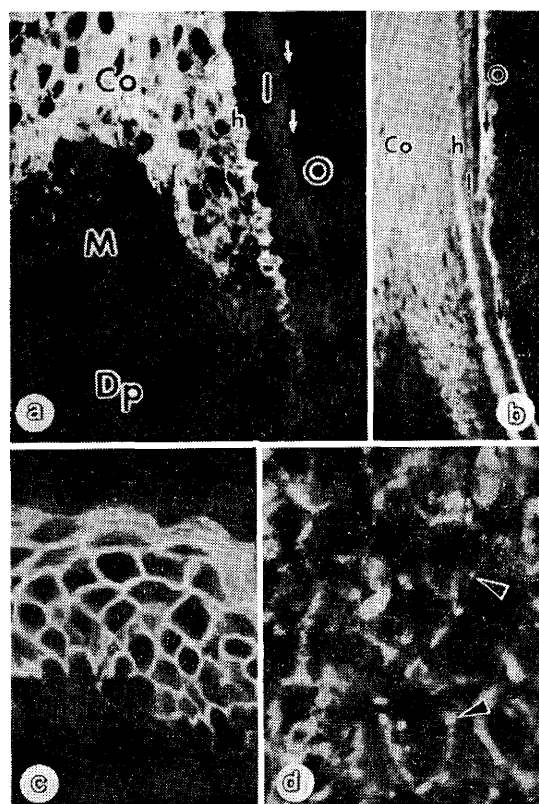


図1 モノクローナル抗体のヒト皮膚組織における反応性

- 毛組織特異性抗体 HKN-6 の毛組織における反応性。HKN-6 は毛乳頭(Dp), 毛母(M)および外毛根鞘(O)には反応しないが、角化帯の毛皮質(Co), 毛小皮(h)には強く、内毛根鞘(1)には弱く反応する。
- 毛組織特異性抗体 HKN-5 の毛組織における反応性。HKN-5 は、外毛根鞘の最内層細胞(矢印)にも反応する。
- 抗デスモゾーム抗体 HK-1 の表皮における反応性。表皮細胞間に強い反応が認められる。
- HK-1 の外毛根鞘における反応性。細胞間に点状の陽性蛍光(矢尻)を認める(強拡大像)。

その結果^{9) 13)}を表1に示す。表1より明らかなごとく、HKN-5, 6, 7は毛組織に特異的なMoAbである。ただし、外毛根鞘の反応性は特異的である。すなわち、HKN-6, 7は外毛根鞘と全く反応しない(図1a)が、HKN-5は外毛根鞘中の一層の最内層細胞に反応する(図1b)。この結果より、この外毛根鞘最内層細胞は他の外毛根鞘細胞とは異なるケラチン分化を示すことが明らかである。一方、HKN-2およびHKN-4は他の上皮組織にも反応する。このうち、HKN-2の反応は皮膚の上皮に限られ、HKN-4は他臓器の種々の上皮細胞に反応し、多くのケラチン種属に共通する抗原決定基を認識すると考えられる。また、皮膚において、表皮基底細胞と汗腺分泌細胞がHKN-2で染色されず、HKN-4で染色される所見も重要と思われる。immunoblot analysisにより、HFPsおよび表皮線維蛋白(EFPs)の各ペプチドに対する反応性を調べたところ、これらすべてのMoAbは、それぞれ反応するポリペプチドの分子量は異なるが、HFPsとは特異的に反応した。しかし、EFPsのポリペプチドに対しては、HKN-2, 4は反応するが、HKN-5, 6, 7は全く反応せず、後者の毛組織への特異性が確認された。

一方、最近、外毛根鞘腫の培養細胞を抗原として作られたMoAbで、汗腺の分泌細胞に特異的に反応するEKH-5, 6が報告されている^{14) 15)}。これらのMoAbはいずれもケラチン線維に対するものではなく、分泌細胞に有意に分布する細胞質蛋白に特異的に反応するものと考えられている。当初、これらはエックリン汗腺に特異的と考えられていた¹⁴⁾が、当科での検索ではアポクリン腺の分泌部もしばしば染色され、現在ではむしろ汗腺分泌部特異性MoAbと考えている。

以上の抗毛ケラチンMoAb, 汗腺分泌部特異性MoAbを用いて、日常皮膚科でよく経験される基底細胞上皮腫(BCE)の10例を検索したところ、本腫瘍の毛包上皮(外毛根鞘)への分化が強く示唆され、たとえ組織像がadenoid型であっても、汗腺組織への分化は否定された。従来、組織学的に本腫瘍は基底細胞様細胞から構成されていると表現されているが、正常表皮基底細胞が有していないケラチン線維要素を本腫瘍細胞が持っていることが判明した。ただし、1例ではあるが、一見BCE様の組織像を示すが、電顕的にアポクリン腺分泌部への分化を示した例では、EKH-5, 6陽性で、毛組織に対する特異抗体HKN-5, 6, 7は陰性を示した。この例に限っては、他の通常のBCEとは異なるものと考えapocrine epitheliomaという名称を提唱した。一方、

稀な例ではあるが、上皮性の腫瘍細胞巢が表皮内に増生するいわゆる *intraepidermal epithelioma* を同様にこれらの MoAb を用いて検索したところ、HKN-5, 6, 7 で腫瘍細胞が特異的に染色され、毛組織への分化が明らかとなった。この腫瘍を、*intraepidermal pilar epithelioma* と名づけた¹⁶⁾。すなわち、これらの MoAb は、皮膚に発生する上皮性腫瘍の origin あるいは分化を知る上で重要なマーカーとなるといえる。

上皮細胞の重要な構造の1つであるデスモゾームに対する MoAb の報告^{17) 18)}がある。このうち HK-1 (または HKN-1) は免疫電顕法でデスモゾームの attachment plaque に関連した蛋白に対する MoAb であることが確認されている¹⁸⁾。この抗体で正常皮膚切片を蛍光抗体法で染色すると、上皮細胞間が強陽性を示す(図 1c)が、強拡大で観察すると、その陽性蛍光は線状ではなく点状であることがわかる(図 1d)。すなわち、デスモゾームの分布が明らかである。表皮細胞の棘融解現象が生じる Darier 病、Hailey-Hailey 病や尋常性天疱瘡(PV)の皮膚病変を、HK-1 を用いて検索すると、先天性疾患である前2者の棘融解細胞は細胞質が diffuse に染色され、細胞辺縁が点状に陽性を示す PV のそれとは異っていた¹⁸⁾。すなわち、デスモゾームの先天的な異常により、前2者では皮膚病変が惹起されることが示唆される。この HK-1 の疾患への応用は角化異常の解明にあると言える。この他、ケラトヒアリン物質に対する MoAb¹⁹⁾、ある種の天疱瘡の自己抗体と同じ抗原を認識する MoAb²⁰⁾ などが報告されている。

お わ り に

本年度開催された The Society for Investigative Dermatology と The Japanese Society for Investigative Dermatology の合同学術大会(5月1~5日、Washington, D.C., U.S.A.)において、以上の他にも数種の皮膚要素に対する MoAb が発表されているごとく、皮膚科領域で作製報告されている MoAb は多種に渡り、その応用も様々である。研究的には、pure な蛋白の同定手段として、MoAb はきわめて有効であることは間違いなく、臨床的にも、治療としての応用には至らないものの、腫瘍、角化異常、水疱症、免疫異常等の診断、病態の解明に有用であると言える。

尚、HK-1 は北里大学皮膚科学教室衛藤 光先生およびアメリカ合衆国 Wayne State University 皮膚科学教室橋本 健先生との共同研究により作製

した MoAb である。また、EKH-5, 6 は同先生方並びに北海道大学皮膚科教室小林 仁先生の御好意によるものであり、ここに深謝致します。

参 考 文 献

- 1) Iwahara, K. and Hashimoto, K.: T-cell subsets and nuclear contour index of skin-infiltrating T-cells in cutaneous T-cell lymphoma, *Cancer*, **54**: 440~446, 1984.
- 2) Kashiwara, M., Ueda, M., Horiguchi, Y., Furukawa, F., Hanaoaka, M. and Imamura, S.: A monoclonal antibody specifically reactive to human Langerhans cell, *J. Invest. Dermatol.*, **84**: 288, 1985.
- 3) Hayashibe, K., Mishima, Y., Kawai, M. and Ichihashi, M.: Monoclonal antibody-defined human melanosomal properties common to divergent oncogenic differentiation of pigment cells and their cell membrane, *J. Invest. Dermatol.*, **84**: 309, 1985.
- 4) Akutsu, Y., Jimbow, K. and Maeda, K.: Establishment of a mouse monoclonal antibody, MoAb HMSA-1 against melanosome-associated antigen(s) of human malignant melanoma, *J. Invest. Dermatol.*, **84**: 321, 1985.
- 5) Tomita, Y., Montague, P.M. and Hearing, V.J.: Monoclonal antibodies to mouse T4-Tyrosinase identify human melanocytes, *J. Invest. Dermatol.*, **84**: 294, 1985.
- 6) Moll, R., Franke, W.W., Schiller, D.L., Geiger, B. and Krepler, R.: The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells, *Cell*, **31**: 11~24, 1982.
- 7) Baden, H.P. and Kubilus, J.: A comparative study of the immunologic properties of hoof and nail fibrous proteins, *J. Invest. Dermatol.*, **83**: 327~331, 1984.
- 8) Ito, M., Tazawa, T., Ito, K., Shimizu, N., Katsuumi, K. and Sato, Y.: Immunological characteristics and histological distribution of human hair fibrous proteins studied with anti-hair keratin monoclonal antibodies, HKN-2, HKN-4 and HKN-6, *J. Histochem. Cytochem.*, **34**: 269~275, 1986.

- 9) **Debus, E., Weber, K. and Osborn, M.:** Monoclonal cytokeratin monoclonal antibodies that distinguish simple from stratified squamous epithelia: characterization on human tissues, *EMBO J.*, 1: 1641~1647, 1982.
 - 10) **Sun, T.-T., Eichner, R., Nelson, W.G., Tseng, S.C.G., Weiss, R.A., Jarvinen, M. and Woodcock-Mitchell, J.:** Keratin classes: molecular markers for different types of epithelial differentiation, *J. Invest. Dermatol.*, 81: 109s~115s, 1983.
 - 11) **Baden, H.P., McGilvray, N., Lee, L.D., Baden, L. and Kubilus, J.:** Comparison of stratum corneum and hair fibrous proteins, *J. Invest. Dermatol.*, 75: 311~315, 1980.
 - 12) **Marshall, R.C.:** Characterization of the proteins of human hair and nail by electrophoresis, *J. Invest. Dermatol.*, 80: 519~524, 1983.
 - 13) **Ito, M., Tazawa, T., Shimizu, N., Ito, K., Katsuumi, K., Sato, Y. and Hashimoto, K.:** Cell differentiation in anagen hair and hair follicles studied with anti-hair keratin monoclonal antibodies, *J. Invest. Dermatol.*, 86: 563~569, 1986.
 - 14) **Hashimoto, K., Eto, H., Matsumoto, M. and Hori, K.:** Anti-keratin monoclonal antibodies: production, specificities and applications, *J. Cutan. Pathol.*, 10: 529~539, 1983.
 - 15) **Eto, H., Matsumoto, M., Kobayashi, H., Mehragan, A. and Hashimoto, K.:** Eccrine-gland-associated antigens, a demonstration by monoclonal antibodies, *J. Invest. Dermatol.*, 80: 339, 1983.
 - 16) **伊藤雅章:** 抗毛ケラチン単クローン抗体によるヒト正常皮膚組織の検索, *日皮会誌*, 94: 1361, 1984.
 - 17) **Stanley, J.R., Koulu, L., Klaus-Kovtuc, V. and Steinberg, M.S.:** A monoclonal antibody against desmoglein I (DGI) binds to pemphigus foliaceus (PF) antigen, *J. Invest. Dermatol.*, 84: 289, 1985.
 - 18) **Eto, H., Tazawa, T., Ito, M., Matsumoto, M. and Hashimoto, K.:** Differential staining of acantholytic cells in pemphigus vulgaris, Darier's disease and Hailey-Hailey's disease with monoclonal anti-desmosome antibody HK-1, *J. Invest. Dermatol.*, 84: 308, 1985.
 - 19) **Dale, B.A., Gown, A.M. and Fleckman, P.:** Characterization of two monoclonal antibodies to human epidermal keratohyalin, *J. Invest. Dermatol.*, 84: 321, 1985.
 - 20) **Negi, M., Goldsmith, L.A. and Lane, A.T.:** Monoclonal antibody (ECS-1) with pemphigus antibody-like properties, *J. Invest. Dermatol.*, 84: 308, 1985.
- 司会 有難うございました。伊藤先生のお話は、前段はいろいろな最近のモノクローナル抗体を用いた皮膚科領域の進歩のご紹介を兼ねて、後段はご自分の所でお作りになった HKN のシリーズを用いて、毛のケラチンに対するモノクローナル抗体を用いて、新しいいくつかの疾患を提唱されたという大変面白いお話だと思っていますが、どなたかご発言ありますか。はい、どうぞ。
- 追手 腎研免疫の追手ですが、三つ程質問があるのですけれど、一つずつお伺いすることにします。最初は HKN-2 は表皮の汗腺に特異的だということですが、同じ外胚葉性の脳なんかではお調べになりましたか。
- 伊藤 そちらの方ではやっていません。実際に入手できたもの、一部は先生のところからいただいた組織でやったものです。ただ、脳研の河野先生に下垂体の前葉を染めていただいたところ、HKN-4 は分泌細胞に反応し、HKN-2 は陰性でした。特に Thymus などはやってみなければいけないと思っています。
- 追手 それから、次ですが、HKN の 5 から 8 番目がかなり面白い抗体だと思ったのですがすけれども、そのモノクローナル抗体の探し得る細胞と悪性度とか、疾患の予後に相関性なんかはあったでしょうか。
- 伊藤 そこ迄は、まだいきません。悪性度の問題でも BCE は、通常、転移をしませんし、本抗体の染色性が BCE の悪性度には関連するという事にはならないと思います。squamous cell carcinoma を染色しますと、やはり 5 番が一部染まって来るので毛包的な要素があるかと思っています。そのような分化が発現されるかされないか等が、悪性度や予後に関連するかもしれません。
- 追手 次の質問も一寸難しいかもしれませんが、腫瘍の皮膚浸潤という事と、腫瘍が産生する、あるいはその回りの extracellular matrix の動態というのは非常に関連していると僕は思っているのですけれど

ども、腫瘍マーカーが探し得る細胞群と、extracellular matrix, 例えば fibronectin です。そういうものと相関性があったでしょうか。なかったでしょうか。

伊藤 まだ、そういうものと combine してはやっていません。これからの問題です。

追手 はい、どうも有難うございました。

司会 他にいかがでしょうか。例えば Histiocytosis X という病気は、ランゲルハンス顆粒に対するモノクローナル抗体を用いて診断を確定してよろしいのでしょうか。

伊藤 今は、OKT 6 で今回示しました症例のように明らかなものはそう言えます。しかし、Histiocytosis X でなくても OKT 6 で陽性の細胞がパラパラ出たりするので、真皮に単に陽性細胞があっても Histiocytosis X だとは言えません。

司会 総合判断の一助という事になりますかね。

伊藤 なると思います。それからランゲルハンス顆粒を染めるモノクローナル抗体は、つい先日の5月アメリカの SID という学会で発表になったばかりですが、い

ずれ有力な抗体となるかもしれません。

司会 そうですか。それからもう一つ、NCI ですね。この index が病気の進展度と関係があるというのですか。

伊藤 はい。汎 T cell モノクローナル抗体により染色して、その陽性細胞百個ぐらい電顕で観察しまして、その NCI を測ると病後期程その値が高くなるというデータがあります。

司会 分子がどっちでしたか。核周の長さでしたか。

伊藤 いいえ、核の面積のルートの方です。

司会 それが分子でしたか。これはどういう事を意味している訳ですか。

伊藤 核の切れ込み具合でそれを数値化したものです。

司会 なるほど。有難うございました。他にございませんか。それでは大分時間が遅れておりますので、次へ移らせていただきます。産婦人科領域での応用を産婦人科の渡辺先生お願いします。

5) 産婦人科領域におけるモノクローナル抗体の臨床応用

産科婦人科学教室 渡辺 重博・本間 滋
湯沢 秀夫・金沢 浩二
竹内 正七

モノクローナル抗体作製の技術が確立されて以来、その高い特異性と安定して多量に得られるという利点のため、今や免疫学的手法に必須のものとなっている。産婦人科領域においても、生殖免疫学をはじめ、内分泌学、腫瘍病理免疫学の各分野で、基礎的研究や臨床に広く導入され、従来の方法によるデータの再確認や新しい知見が得られつつある。

本稿では、そのなかでも臨床応用されている腫瘍マーカー CA 125、及び当教室で試みられている絨毛癌に対するモノクローナル抗体作製の試みについて述べる。

卵巣腫瘍マーカーへの応用

卵巣癌は婦人科悪性腫瘍のなかでも、早期発見され難く、子宮癌に比して予後は不良である。その理由は卵巣が触診の困難な位置にあり、症状が現われにくいためである。現在のところ York sac tumor では alpha fetoprotein が有用なマーカーとして用いられているが、臨

床上で遭遇することの多い上皮性卵巣腫瘍に対するマーカーが望まれていた。

CA 125 は、Bast ら¹⁾により報告された腫瘍関連抗原であり、卵巣癌培養細胞株 OVCA 433 をマウスに免疫して作製したモノクローナル抗体が認識する分子量 11万の糖蛋白である。免疫組織学的検索では、卵巣上皮性腫瘍のうち、漿液性、類内膜、明細胞、分類不能型と反応するが、ムチン性腫瘍と正常卵巣には反応しないと報告されている¹⁾。また胎児の卵管内膜上皮と反応することや、成人でも弱く反応性が認められることから²⁾、CA 125 はミューラー管に関連した分化抗原の1つであると考えられる。

当教室でも CA 125 に対するモノクローナル抗体と卵巣癌の反応性を酵素抗体法で検討したところ、細胞表面に局在していることを確認した。

この CA 125 は患者血中に遊離しやすく、ラジオイムノアッセイによって検出されることが明らかになって