

小胞体 Ca^{2+} -ATPase を認識する単クローン抗体の作製と
人体組織における分布および骨軟部腫瘍での発現について

指導教官 町並陸生 教授

平成元年 4 月

東京大学大学院 医学系研究科
第3種博士課程（医学）
第三基礎医学専攻 入学

黒田 雅彦

①

論文題目 小胞体Ca²⁺-ATPaseを認識する単クローン抗体の
作製と人体組織における分布および骨軟部腫瘍での発現に
ついて

指導教官 町並陸生教授

平成元年4月
東京大学大学院医学系研究科
第3種博士課程(医学)
第三基礎医学専攻 入学
氏名 黒田雅彦

目次

I. 序論

2. 材料と方法

I. 実験材料

1) 実験動物

a. マウス

2) 哺乳動物細胞とその培養

a. ミエローマ細胞

b. マウスBALB/c 3T3細胞、ラットインスリノーマ細胞

3) 人体生検および剖検材料

a. 12週齢胎児

b. 正常組織

c. 外科的に切除された軟部腫瘍手術材料

d. 筋生検材料

4) 試薬及びその入手先

a. 免疫組織化学用試薬及び抗体

b. 培養及びハイブリドーマ作製用試薬

c. 染色剤

d. タンパク質

e. その他

II. 実験方法

1) 細胞分画法

a. 筋小胞体の調製

b. ブタ肝臓の細胞分画

2) モノクロナール抗体の作製

a. マウスの免疫

b. ハイブリドーマの作製

c. スクリーニング及びクローニング

3) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

4) イムノブロットィング

5) ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 法

6) 筋小胞体Ca-ATPaseのトリプシン限定分解

7) 動物細胞の蛍光染色

a. 細胞の固定及び透過性の付与

b. 抗体による染色

c. DiOC6 (3) による小胞体の染色

8) 免疫組織化学的染色法

a. 凍結切片における試料の固定と包埋

b. パラフィン切片における試料の固定と包埋

c. 高圧高温法によるパラフィン切片の前処理

d. 免疫組織化学的染色

9) 酵素組織化学-actomyosinATPase染色

3. 結果

1. モノクロナール抗体の作製

2. モノクロナール抗体の性質

1) 抗体の免疫グロブリンサブタイプの決定

2) SR膜標品によるブロッキング

3) ウサギ骨格筋Ca-ATPaseとの反応

4) Ca-ATPaseのトリプシン限定分解断片に対する反応性

5) ヒト骨格筋Ca-ATPaseとの反応

3. mAb6F5、7F10と非筋細胞の細胞小器官タンパク質との交叉反応

4. 非筋細胞におけるmAb6F5の認識する器官についての検討

5. 正常組織におけるmAb6F5、7F10の発現

6. mAb6F5が認識する筋線維タイプ

7. 軟部腫瘍におけるmAb6F5の発現

4. 考察

5. まとめ

6. 引用文献

7. 図

8. 表

略語

SR	sarcoplasmic reticulum
ER	endoplasmic reticulum
FCS	fetal calf serum
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
SDS-PAGE	SDS-polyacrylamidogel electrophoresis
TBS	tris-buffered saline
TBS-T	TBS-0.1%Tween20
BSA	bovine serum albumin
PBS	phosphate-buffered saline
PB	phosphate buffer
mAb	monoclonal antibody
NMS	normal mouse serum
DiOC6 (3)	3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide

1. 序論

Ca^{2+} イオンは細胞内の情報伝達系の中でもっとも重要なシグナル物質であり、様々な細胞機能の調節にスイッチとして普遍的に働いている。 Ca^{2+} イオンのような細胞外に豊富にある無機イオンを細胞内情報伝達のスイッチとして用いることにより、神経伝達物質の放出のようにミリ秒単位での早い調節が営まれている。また、一方では、筋肉の収縮、血液細胞や内分泌細胞からのサイトカイン、ホルモンの分泌、外分泌腺からの酵素や溶液分泌などのように、やや遅い時間経過で起きる生理機能のさいには、細胞内の細胞器官にいったんCaが貯蔵され、そこから放出されるという精巧な過程を通じて、必要なCaが刺激に応じて適量細胞内に放出されている。そして、生体膜内外における Ca^{2+} イオンの濃度勾配は、生体膜に存在する能動輸送系によって維持されている。

筋小胞体 (sarcoplasmic reticulum: SR) のCa-ATPaseはこのような能動輸送系の代表的な例で、筋細胞中のCa濃度を調節し、筋収縮の制御を行なっていることが知られている (1)。組織学的にも骨格筋において、光顕的あるいは電顕的に筋小胞体のCa-ATPaseに対する抗体を用いてその局在を検討した報告がなされている (2, 3)。Krenacsらは、免疫組織化学的に、筋小胞体のCa-ATPaseに対する抗体を横紋筋肉腫の診断に用いることが有用であることを報告している (4, 5)。

一方、近年になって、心筋SRのCa-ATPaseと相同のATPaseが非筋細胞に存在することが示され (6, 7)、またその様なATPaseが、細胞周期を通じて Ca^{2+} イオン濃度の調節を行ない、様々な細胞機能の制御に寄与していることが示唆されてきた (8-14)。また、現在までのところ、これらのATPaseには互いに相同性の高い3種類の遺伝子の存在が推定され、骨格筋速筋にSERCA1が、心筋と骨格筋遅筋にSERCA2aが、平滑筋および非筋細胞にはSERCA2b及びSERCA3が特異的に発現することが明らかにされている (15, 16)。しかし、骨格筋以外におけるATPase各分子種の発現は、ノーザンブロットを用いて検出したmRNA量から推定されるのみであり、いまだ、タンパク質レベルでの実体やその生理的意義が十分に解明されおらず、生体での分布も不明な部分が多い。免疫組織化学的にも、鳥類の小脳プルキンエ細胞において、その存在を確かめられている過ぎない (17)。細胞の分裂期に特徴的な分裂装置が微小管を主成分としており、染色体の移動を担っていることはよく知られている事実であるが、それだけではなく、分裂装置の中には膜構造体が存在することが明らかになっている。

Heplerの報告によれば、この膜構造体は小胞体 (endoplasmic reticulum: ER) 由来のもので、分裂周期の中期から後期にかけて、ERが形や集合状態をかえることによってできるものであるとされている (11)。単離した分裂装置は、 MgCl_2 存在下でATP依存的に Ca^{2+} イオンを取り込む活性を持っている。この分裂装置をショ糖密度勾配遠心によって分画したところ、粗面小胞体と同じ密度の層に Ca^{2+} イオンを取り込む活性が存在することが、Silverらによって明らかにされた (10)。これらのことは、分裂装置中の膜構造体が確かに Ca^{2+} イオンを取り込みうることを示している。

Silverはまた、ラット骨格筋Ca-ATPaseに対するポリクロナール抗体を2細胞期のウニ卵の一方の割球にマイクロインジェクションすると、抗体を注入された割球ではそれ以

降の卵割が阻害されるという事実を報告している(13)。これは、Ca-ATPaseが細胞分裂の進行に必須であることを示す興味深い事実であると考えられる。しかし、この現象について、更に詳しく解析を進めた結果は報告されていない。

インスリンは血糖調節を行なう重要なホルモンで、膵ランゲルハンス氏島のβ細胞から分泌される。β細胞でのインスリン分泌を調節する最も重要な因子はブドウ糖である。ブドウ糖がどのようにしてインスリン分泌を刺激するかは古くから注目され、多くの研究がなされてきた。高濃度のブドウ糖によるインスリン分泌は細胞外液のCa²⁺イオン濃度に依存しており、このことからインスリン分泌にCa²⁺が関与していることがわかる。β細胞には、現在GLUT2とよばれるブドウ糖の輸送担体(glucose-transporter)がある。このブドウ糖担体によって細胞内へ入ったブドウ糖は解糖系によって代謝される。産生されたATPがふえると、細胞膜に存在するATP感受性K⁺チャンネルが閉鎖し、K⁺の透過性が抑制されβ細胞の脱分極を引き起こし電位依存性Ca²⁺チャンネルが開く。この結果、Ca²⁺の流入により細胞質Ca²⁺イオン濃度が上昇しインスリン分泌を惹起する。Grondaらは、膵ランゲルハンス氏島細胞において、形質膜Ca-ATPaseの活性化と細胞質Ca²⁺イオン濃度との相関を見いだした(18)。さらに、膵ランゲルハンス氏島細胞をホモジナイズし、ホモジュネート中のCa-ATPase活性とインスリン分泌の相関を報告している(19)。その報告では、Ca-ATPase活性が形質膜のものか、あるいは細胞質のものか区別されていない。いまのところ細胞内Ca-ATPaseはどのような機序で、膵ランゲルハンス氏島β細胞からのインスリン分泌に関与しているのかは全く不明であり、その制御の詳細は解明されていない。

一方、癌細胞と細胞内Ca²⁺イオン濃度との関連はNygrenらが興味ある報告をしている(20)。彼らは、アドリアマイシンを用い多剤耐性の肺小細胞癌の培養細胞株を樹立し、それらのうちP糖蛋白質の発現がないものは細胞質Ca²⁺イオン濃度が上昇していることを示した。細胞内のCa²⁺を取り込む能力をもち、同時に貯えられたCa²⁺を放出する機能をもつ細胞内のオルガネラが小胞体であるとするなら、P糖蛋白質の発現がない多剤耐性の癌細胞には、Ca²⁺取り込み機構として細胞内Ca-ATPaseの発現が強い可能性がある。

上述のように、ERと微小管との関係、Ca²⁺輸送系の機能及びインスリン分泌への関与については数多くの興味ある事実が報告されているが、重要な問題の多くが未解決の課題として残されている。また細胞内Ca-ATPaseの生体での分布、腫瘍での発現の有無についての報告はいまのところされていない。このような点について研究を進めるために抗体を作製し、免疫組織化学的に蛍光抗体法のような手法によって、細胞内におけるCa-ATPaseの分布や腫瘍組織における発現を調べることは有効な研究方法の一つであると考えられる。

本研究では、ウサギ下腿筋より筋小胞体を調製し、これを抗原とし、小胞体のCa-ATPaseを認識する抗体を作製し、抗体の性質を調べ、免疫組織化学的に人体組織での発現を検討した。

2. 材料と方法

1. 実験材料

1) 実験動物

a. マウス

抗体産生細胞の採取、および腹水の採取のためには、すべてBALB/c系の6週齢のマウス(メス)を用いた。

2) 哺乳動物細胞とその培養

a. ミエローマ細胞

ハイブリドーマの作製は、免疫したマウスと同系のBALB/c系マウス由来の骨髄腫細胞P3UI株(以後、P3UIと記す)を用いて行なった。P3UIは37℃、5%CO₂存在下で10%牛胎児血清(FCS)を含むRPMI1640培地中で培養した。

b. マウスBALB/c 3T3細胞、ラットインスリノーマ細胞

細胞内のCa-ATPaseの観察には、BALB/c系マウス胚線維芽細胞由来BALB/c 3T3細胞A31-1株(東京都立臨床医学研究所、川喜田正夫博士より分与を受けた。以後、3T3細胞と略す。)及びラットインスリノーマ細胞(東京大学医学部第3内科、岡芳知医学博士より分与を受けた。以後、RINと略す。)を用いた。3T3細胞は、37℃、5%CO₂存在下で、10%FCSを含むMEM培地を用いて培養した。RINは、37℃、5%CO₂存在下で、10%FCSを含むRPMI1640培地を用いて培養した。蛍光標識による観察には、ガラス製のチェンバースライドに細胞浮遊液を加え、数時間の培養を経て細胞を付着させたものを用いた。

3) 人体生検及び剖検材料

a. 12週齢胎児

子宮筋腫合併などで出産不能となり人工的に流産となった12週齢胎児3例を用いた。

b. 正常組織

胎盤組織及び眼球は手術材料より各2例を選び、他の組織に関しては死後時間3時間以内の剖検材料、各3例を使用した。

c. 外科的に切除された骨軟部腫瘍手術材料

1965年から1992年において東京大学医学部付属病院にて外科的に切除された骨軟部腫瘍手術材料91例を対象とした。

d. 筋生検材料

東大付属病院神経内科にて切除された筋生検材料を用いた。その際、組織学的に正常な症例を一例選び、検索対象とした。

4) 試薬及びその入手先

a. 免疫組織化学用試薬及び抗体

ヒストファインSAB-PO (M) キット	ニチレイ
ヒストファインSAB-PO (R) キット	ニチレイ
ECLウエスタンブロッティング検出キット	Amersham
ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウスIg抗体	SEROTEC
FITC標識ウサギ抗マウスIgG抗体	Amersham
テイシュテックOCTコンパウンド	Miles
KL-1	Immunotek
AE1・AE3	ICN
epithelial membrane antigen (EMA)	Dako
ビメンチン	ニチレイ
デスミン	Dako
carcinoembryonic antigen (CEA)	Dako
メチルグリーン	MERCK
マイヤーヘマトキシリン	MERCK

b. 培養用及びハイブリドーマ作製用試薬

牛胎児血清	SIGMA
RPMI1640	IBL免疫生物研究所
EagleMEM	IBL免疫生物研究所
アミノプテリン	SIGMA
ヒポキサンチン	SIGMA
チミジン	SIGMA
ポリエチレングリコール4000	MERCK

c. 発色剤

o-フェニレンジアミン	和光
4-クロロ-1-ナフトール	和光
3,3'-ジアミノベンジジン, 四塩酸塩	和光

d. タンパク質

TPCK処理トリプシン	Worthington
ドライミルク	Amersham

e. その他

フロイント不完全アジュバント	DIFCO
モノクロナール抗体タイピングキット	SEROTEC
DiOC6 (3)	Molecular Probes

II、実験方法

1) 細胞分画法

a. 筋小胞体の調製

ウサギ骨格筋小胞体（主に下腿筋を含む）は、国立循環器センター、重川宗一博士及び、東京都立臨床医学研究所、川喜田正夫博士より分与を受けた。ヒト骨格筋小胞体は、骨肉腫の診断のもと東京大学医学部付属病院にて外科的に切除された下腿より骨格筋を380g採取し、Kawakitaらの方法（21）にしたがって調製した。筋小胞体は、0.1MKCl, 0.3Mショ糖を含む、5mMトリス-マレイン酸緩衝液（pH6.5）に懸濁し、-80℃で凍結保存した。ヒト下腿筋肉380gよりタンパク質284mgの筋小胞体標品がえられた。

b. ブタ肝臓の細胞分画

ブタ肝臓ミクロソーム標品は東京都立臨床医学研究所、川喜田正夫博士より分与を受けた。標品は-80℃で凍結保存した。

2) モノクロナール抗体の作製（22-23）

a. マウスの免疫

抗原（ウサギ骨格筋小胞体標品）0.1mgをPBS0.25mlに懸濁し、これを等量のプロイント不完全アジュバント（FIA）と混合して、油中水型エマルジョンを作製した。このエマルジョンを、2週間おきに2回、マウスの腹腔内に注射した。抗体産生の認められたマウスに最終免疫として、抗原0.05mgをPBSに懸濁したものを、尾静脈に注射し、3日後に脾臓を摘出した。

b. ハイブリドーマの作製（24）

摘出した脾臓を、RPMI1640培地で洗浄後、RPMI1640培地の入ったシャーレに移し、脾細胞を分散させた。1200回転、5分間の遠心分離によって細胞を集め、0.17MNH₄Clを加えて0℃、5分間静置し、混入している赤血球を溶血させた後、2回洗浄した。この後、細胞をRPMI1640培地に懸濁し（脾細胞浮遊液）細胞数を測定した。なお、これまでの操作は全て、0℃のRPMI1640培地を用いて行なった。

P3UIは、37℃のRPMI1640培地中、1200回転、10分間の遠心分離により3回洗浄後、再び37℃のRPMI1640培地に懸濁し（P3UI浮遊液）、細胞数を測定した。

脾細胞とP3UIを1：1の割合で混合し、融合を行なった。脾細胞浮遊液とP3UI浮遊液とを混合した後、1000回転、5分間遠心し細胞を集めた。次に、50%ポリエチレングリコール1mlを1分間かけて攪拌しつつ加え、更に37℃恒温槽中で1分間攪拌を続けた後、37℃に保温したRPMI1640培地1mlを30秒間かけて攪拌しながら加え、引き続き30秒間かけて2ml加え、更に12mlを1分間で加えた。800回転、8分間遠心し、ポリエチレングリコールを除去した後、細胞を20%FCS、13mg/lヒポキサンチン、3.87mg/lチミジン、0.176mg/lアミノプテリンを含むRPMI培地（HAT培地）200mlに懸濁した。この細胞浮遊液を96穴プレートにまき、37℃、5%CO₂存在下で培養した。

c.スクリーニング及びクローニング

ハイブリドーマ作製の1週間から10日後、コロニーが視認可能になってから、ELISA法によりスクリーニングを行なった。その際、発色所要時間5-10分以内のクローンのみを選択し、またスクリーニングを繰り返し行なうことによって、擬陽性クローンの排除に留意した。上記のスクリーニングで陽性を示したウェルの細胞を20%FCS、13mg/lヒボキサンチン、3.87mg/lチミジンを含むRPMI培地（HT培地）によって希釈し、限界希釈法によってクローニングを行なった。

上記のクローニングを2回行ない、得られた陽性クローンを10%ジメチルスルフォキシドを含むFCSに懸濁し、-80℃で凍結保存した。

3) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

SDS-PAGEは、Laemmliの方法 (25) にしたがっておこなった。濃縮ゲル5%、分離ゲル10%のセラブルゲルを用い、28-30mAの定電流にて行なった。泳動後、ゲルを0.04%クマジーブリリアントブルー-R-250 (CBB)、20%イソプロパノール、10%酢酸中で1時間染色後、10%酢酸中で脱色した。

4) イムノブロッティング

試料をそれぞれ図の説明に示した通り、適量ずつSDS-PAGEにより分離した後、192 mMグリシン、20%メタノールを含む25mMトリス-HCl緩衝液 (pH8.3) をブロッティング用緩衝液として、セミドライブロッティング装置 (株) バイオクラフト) を用いて、ニトロセルロースメンブランフィルター (Sartorius) 上にブロッティングを行なった。メンブランの一部は、免疫染色と同様にShinらの方法 (26) にしたがって、ピーカー内に蒸留水とともに入れ高圧高温処理を行なった。メンブランをとり、5%ドライミルクを含むTBSを用いて、室温で10分間、ブロッキングを行ない、0.1%トウィーン20を含むTBS (TBS-T) による洗浄 (5分間、3回) の後、3%牛血清アルブミン (BSA) を含むTBSで希釈した1次抗体 (希釈率は図の説明に示した通り) と反応させた。再びTBS-Tにより5分間、3回洗浄し、ECLウエスタンブロッティング検出キット中の抗体を2次抗体として用いて、室温で、1時間反応させ、キットの方法にのっとり、反応を検出した。ヒト骨格筋小胞体の試料は2次抗体としてECLウエスタンブロッティング検出キット中の抗体を用い、室温で1時間反応させ、同様の洗浄操作を行なった後、発色剤 (0.2-0.6 mg/ml 4-クロロ-1-ナフトール 10%メタノール、0.003%過酸化水素水を含むTBS) を加えた。反応は適時、発色剤を除去し、蒸留水で洗浄することによって停止した。

5) ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 法

96穴マイクロテストプレート (株) 日京製作所) を用いて行なった。ウサギSR標品 (2mg/ml) を各ウェルに0.025mlずつ分注し、4℃一晩静置し、抗原をウェルに吸着させた。抗原を除去し、5%ドライミルクを含むTBSを0.2mlずつ分注し、再び、4℃一晩静置後、TBS-Tで3回洗浄した。このようにして準備したプレートの各ウェルに、分析の対象である希釈した抗血清あるいはハイブリドーマ培養上清を0.025mlずつ分注し、室温

で1時間静置した後、TBS-Tで3回洗浄し、さらにペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウスIg抗体(400倍希釈)を0.025ml分注し、室温で1時間静置した。TBS-Tで3回洗浄後、発色剤(0.4mg/ml o-フェニレンジアミン、0.01%過酸化水素水を含む0.05M酢酸緩衝液(pH5.2))を2滴ずつ分注して発色反応を開始し、適時、INHClにより停止した。

6) 筋小胞体Ca-ATPaseのトリプシン限定分解

Imamuraらの方法(27, 28)に準じて行なった。2mgSRタンパク質/ml、20mMトリス-HCl(pH7.0)、0.1MKCl、5mM $CaCl_2$ を含む溶液に、SRタンパク質の1/100(w/w)量のトリプシンを加え、反応を開始した。0℃で20分反応後、反応液に、2.1%SDS、0.7Mメルカプトエタノールを含む、0.1Mトリス-HClを1.4倍容加え、酵素を失活させ、反応を停止した。

7) 動物細胞の蛍光染色

動物細胞の固定及び蛍光抗体による染色は、OsbornとWeberの方法(29)に従って、下記のように行なった。

a. 細胞の固定及び透過性の付与

チェンバースライドに接着させた3T3細胞及びRINをPBSで洗浄後、4%パラホルムアルデヒドを含むPBによって、室温で10分間固定した。固定後、PBSで4回洗浄し、-20℃、4分間メタノール処理を行ない透過性を付与した。

b. 抗体による染色

透過性を付与した細胞を、室温で10分間、0.1Mグリシンを含むPBSで処理し、PBSで洗浄後、3%BSAを含むPBS(3%BSA-PBS)によりブロッキングを行なった。次に、PBSにより3回洗浄した後、3%BSA-PBSで1/20に希釈した、mAb6F5を室温で1時間静置した。PBSによる5分間の洗浄を3回行なった後、FITC標識抗マウスIgG抗体を1/100倍量含む3%BSA-PBSを与え、室温で30分間静置し、PBS中で5分間の洗浄を3回行なった。その後、共焦点レーザー顕微鏡(MERIDIAN ACAS570)を用いコンフォーカル画像にて観察した。

c. DiOC6(3)による小胞体の染色

Terasakiらの方法(14)に従い、下記に示すように抗Ca-ATPase抗体との二重染色を行なった。

3T3細胞及びRINを前述の方法で固定、洗浄した後、2.5mg/l DiOC6(3)を含むPBSにより室温で10秒間処理し、ただちにPBSで洗浄した後、共焦点レーザー顕微鏡(MERIDIAN ACAS570)を用いコンフォーカル画像にて観察し写真撮影を行なった。観察に用いた細胞をPBSで洗浄し、透過性を付与した後、前項に示した方法で、mAb6F5を用いた蛍光染色を行なった。

8) 免疫組織化学的染色法

a.凍結切片における試料の固定と包埋

外科的に切除された検体を、すばやく0.5x0.5x0.5cm大に細切し、OCT-コンパウンドに包埋した。その後、ドライアイス-アセトン中で急速に凍結し、-80℃で凍結保存した。凍結ブロックはクリオスタットを用い庫内温度-18℃で、厚さ4μmに薄切し、0.025%のポリ-L-リジンを用いて薄く塗布したスライドガラスに密着させた。スライドガラスに貼布した切片は室温で風乾させ、-20℃のアセトン中で5分間固定した。

b.パラフィン切片における試料の固定と包埋

剖検および手術材料は4x2x0.5cm以内に細切し、10%ホルマリンまたは10%緩衝ホルマリンにて固定した。固定された組織片は、自動包埋装置を用いてアルコール中で脱脂、脱水の後、キシロールで透徹しパラフィンに包埋した。パラフィン包埋された組織片はマイクロトームにより厚さ3μmに薄切しスライドガラスに貼布した。切片の乾燥は37℃の孵卵器中で3日間静置した。

c.高圧高温処理法によるパラフィン切片の前処理

mAb6F5, 7F10を1次抗体として用いたパラフィン切片のみ、脱パラフィン後、切片を蒸留水で洗浄し、Shinらの方法(26)にしたがって、ピーカー内に蒸留水とともに切片を入れ高圧高温処理を行なった。

d.免疫組織化学的染色

免疫組織化学的染色は、下記に示すようにSAB法にて行なった(30, 31)。固定された切片は室温で5分間、0.3%過酸化水素水を含むPBSで反応させ内因性ペルオキシダーゼ活性を阻止した。PBSで洗浄後、10%ウサギ正常血清を含むPBSにより、室温で30分間、ブロッキングを行なった。次にPBSにより3回洗浄した後、各一次抗体を20%FCSを含むPBS(20%FCS-PBS)で希釈し(6F5, 7F10, KL-1, EMA, CEAは1/100に希釈、AE1/AE3は1/200に希釈、ピメンチンは希釈済)、4℃で一晩静置させ反応させた。尚、一次抗体として用いた各抗体のうち6F5並びに7F10は一部の切片では培養上清を希釈せずに用いた。二次抗体及び酵素試薬はヒストファインSAB-PO(M)および(R)キット中の試薬を用い、それぞれ室温で30分間反応させた。以上の反応はすべて湿室(moist chamber)内で反応を行なった。PBS中で5分間の洗浄を3回行なった後、発色剤(0.5 mg/ml 3,3'-ジアミノベンジジン,四塩酸塩, 0.003%過酸化水素水を含むPBS)にて反応させた。反応は蒸留水で洗浄することによって停止した。対比染色はマイヤーのヘマトキシリン溶液およびメチルグリーン溶液を用いた。陰性コントロールには、非免疫マウス血清(NMS)を一次抗体として用いた。mAb6F5, 7F10の陽性コントロールには、ヒト骨格筋小胞体を調製する際に用いた大腿四頭筋を一部凍結及びパラフィン切片にして各染色時に使用した。

9) 酵素組織化学-actomyosin ATPase染色

切除された検体を、すばやくOCT-コンパウンドに包埋した。その後、ドライアイス-アセトン中で急速に凍結し、 -80°C で凍結保存した。凍結ブロックはクリオスタットを用い庫内温度 -18°C で、厚さ $10\mu\text{m}$ に薄切し、スライドグラスに密着させた。スライドグラスに貼布した切片は室温で風乾させ、その後actomyosin ATPase染色を行なった。

a.pH11.0

0.02M sodium barbitalと36mM CaCl_2 を含む蒸留水をpH11.0に調製し切片をこの溶液と15分間反応させた。その後、0.02M sodium barbitalと18mM CaCl_2 を含む蒸留水中に $\text{ATP}\cdot 2\text{Na}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ を50mg加えpH9.4に調製した溶液（以後、溶液A）中で45分間反応させた。1% CaCl_2 で3回洗浄後（計10分間）、さらに2% CaCl_2 で3分反応させ、0.01M sodium barbital液で8回洗浄後、水洗を3分間行なった。その後、1%黄色硫化アンモニウムで1分間反応させた後、軽く水洗をし脱水封入を行なった。尚、これらの反応は全て、室温で行なった。

b.pH4.1

43mM HClを含むbarbital acetate液をpH4.1に調製し切片をこの溶液と5分間反応させた。その後、0.02M sodium barbitalと18mM CaCl_2 を含む蒸留水（pH9.4）で切片を1分間軽く洗い、溶液A中で45分間反応させた。1% CaCl_2 で3回洗浄後（計10分間）、さらに2% CaCl_2 で3分反応させ、0.01M sodium barbital液で8回洗浄後、水洗を3分間行なった。その後、1%黄色硫化アンモニウムで1分間反応させた後、軽く水洗をし脱水封入を行なった。尚、これらの反応は全て、室温で行なった。

3. 結果

1. モノクロナール抗体の作製

本研究の期間中2回のハイブリドーマ作製を試みた。いずれの場合にも、融合して1週間から10日後にELISA法によって第1回目のスクリーニングを行なった際には、10-20個の陽性を示すハイブリドーマが得られた。しかし、クローニングを繰り返していく過程で陽性クローンは次第に減少し、最終的に得られたのは6F5, 6G7, 7F10の3クローンであった。

2. モノクロナール抗体の性質

1) 抗体の免疫グロブリンサブタイプの決定

SEROTEC社のモノクロナール抗体サブタイピングキットを用い、サブタイプを決定した。6F5と6G7はIgG2b、7F10はIgMであった。

2) SR膜標品によるブロッキング

ハイブリドーマ培養上清を3%BSAを含むTBSによって1/1に希釈し0.05mlをSR膜標品0.015mgと0℃、1時間静置した後、15000回転、30分間遠心し、上清中の抗体価をELISA法によって、SRとの前処理をしなかったものとの間で比較した。その結果、6F5及び7F10の培養上清では、SR膜標品によるブロッキングの効果が認められたが、6G7の培養上清については認められなかった(表1)。

3) ウサギ骨格筋Ca-ATPaseとの反応

得られたモノクロナール抗体とウサギSRのCa-ATPaseとの反応を確かめた。ウサギSRのCa-ATPaseをSDS-PAGEで分離し、セミドライプロットング装置を用いて、ニトロセルロースメンブレン上に移した。ウサギSRのCa-ATPaseをmAb6F5、7F10が認識しているかどうか判断するために、東京都立臨床医学総合研究所、川喜田正夫博士より供与を受けた筋小胞体Ca-ATPaseを認識するmAb1E5を陽性コントロールとして用いイムノプロットングを行なった(図1)。その結果mAb6F5、7F10、1E5ともに、分子量約110000の領域にバンドが認められ、mAb6F5、7F10はCa-ATPaseを認識することが明らかになった。NMSを用いた場合には分子量約110000のバンドは検出されなかった。

4) Ca-ATPaseのトリプシン限定分解断片に対する反応性

得られたモノクロナール抗体のエピトープに関する情報を得る目的で、ATPaseのトリプシン限定分解断片に対する認識特異性について検討した。1Mショ糖存在下で安定化されているウサギSRのCa-ATPaseを、トリプシン:SR=1:100(W/W)の割合で、0℃、20分消化すると、分子量約50000のA/B断片、約30000のA₁断片、約20000のA₂断片の他、さらにいくつかの断片が生成する(27, 28)。限定分解断片をSDS-PAGEで分離し、セミドライプロットング装置を用いて、ニトロセルロースメンブレン上に移し、

mAb6F5, 7F10及び非免疫マウス血清 (NMS) を1次抗体としてイムノブロッティングを行なった (図2)。その結果mAb6F5, 7F10を一次抗体としてイムノブロッティングを行なった場合は、A/B断片、A₁断片は検出されたが、A₂断片は全く検出されなかった。このことは、mAb6F5, 7F10がA₁断片を認識する感度のよい抗体であることを示している。NMSを1次抗体として用いた場合には、トリプシン断片のみならず、未処理のCa-ATPaseも検出されなかった。

5) ヒト骨格筋Ca-ATPaseとの反応

得られたモノクロナール抗体とヒト骨格筋Ca-ATPaseとの反応を確かめた。ヒトSRのCa-ATPaseをSDS-PAGEで分離し、セミドライブロッティング装置を用いて、ニトロセルロースメンブレン上に移した。高圧高温処理後も抗原性が保持されているかどうか確かめるために、メンブレンの一部はブロッキングの前に、高圧高温処理をした。そして、未処理のものと比較した。mAb6F5, 7F10及び非免疫マウス血清 (NMS) を一次抗体としてイムノブロッティングを行なった (図3)。その結果mAb6F5, 7F10を一次抗体として行なった場合は、高圧高温処理及び未処理のものともに分子量約110000のCa-ATPaseが検出された。これ以外にも高圧高温処理をした際、低分子量領域にバンドが認められたが、NMSを用いた場合にもわずかに同じバンドが検出されることから、非特異的結合によるものと結論した。

3. mAb6F5, 7F10と非筋細胞の細胞小器官タンパク質との交叉反応

小胞体のCa-ATPaseの分子種のうち、SERCA2bの遺伝子が発現していることの知られるブタ肝臓のミクロソーム分画を用いて、mAb6F5, 7F10と交叉反応を示すタンパク質が存在するかどうか検討した。mAb6F5, 7F10, NMSを一次抗体としてイムノブロッティングを行なった結果を図4に示す。mAb6F5, 7F10を一次抗体として用いた場合には、ミクロソーム分画中に、分子量約10万の特異的結合によると考えられるバンドが検出された。このペプチドの分子量はSRのCa-ATPaseの分子量と同程度であり、抗SR-ATPaseと小胞体Ca-ATPaseとの間の免疫交叉反応によるものであることを示唆している。これ以外にもより低分子量領域に数本のバンドが認められたが、NMSを用いた場合にも同じバンドが検出されることから、非特異的結合によるものと結論した。NMSを用いた場合には分子量約10万のバンドは検出されなかった。

4. 非筋細胞におけるmAb6F5の認識する器官についての検討

動物細胞 (3T3細胞, RIN) を用いた蛍光抗体法により、mAb6F5によって認識されるペプチドの細胞内局在を検討した。小胞体を染色することで知られている蛍光色素DiOC₆ (3) を使用して、mAb6F5との二重染色を試みた。その際、蛍光像のフレイヤーを取り除き、鮮明な画像を得るために共焦点レーザー顕微鏡 (ACAS 570) を観察に使用した。図5に示す通り、3T3細胞, RINにおいても、mAb6F5による染色部位は、DiOC₆ (

3) の染色像にみられる小胞体の分布領域とほぼ一致することが明らかになった。また、このとき、細胞膜には、染色がみられなかった。非免疫マウス血清 (NMS) を用いた場合には蛍光物質は何も認められなかった。

5. 正常組織におけるmAb6F5,7F10の発現

mAb6F5、7F10によって認識されるペプチドの人体での分布を明らかにする目的で、手術材料及び剖検材料を用い、免疫組織化学的染色を行なった。パラフィン切片はすべて内因性ペルオキシダーゼ活性を阻止する前に高圧高温処理をし、mAb6F5、7F10及び非免疫マウス血清 (NMS) を一次抗体として用いた。表2に示すように、胎児組織においてはmAb6F5、7F10ともに、骨格筋、軟骨組織、心筋、末梢神経線維に陽性反応が得られた。骨格筋は筋原線維束に沿って陽性所見が見られた。軟骨組織は細胞質に陽性であった。心筋においては、左室に比べ右室により強い反応をみた。末梢神経線維は頸部の動脈周囲のものが陽性であった (図6)。一部線維芽細胞にも陽性所見がみられたが、NMSを用いたコントロールでも陽性所見が見られたこと、3例すべてに陽性所見が見られなかったことから非特異反応と考えた。

成人においては、骨格筋については凍結切片を併用し、他の組織はホルマリン固定のパラフィン切片を用いて検索した。表2に示すごとく、mAb6F5は骨格筋、腓ランゲルハンス氏島細胞の一部、副甲状腺主細胞と好酸性細胞の一部、下垂体前葉好酸性細胞の一部、網膜光受容体細胞に、mAb7F10は骨格筋、腓ランゲルハンス氏島細胞、副甲状腺主細胞と好酸性細胞の一部に陽性反応が見られた。骨格筋は筋原線維束に沿って陽性所見が見られたが、一部に全く反応しない線維束も見られた。腓ランゲルハンス氏島細胞に関しては、mAb7F10はランゲルハンス氏島細胞ほぼ全てに陽性所見が見られたが、mAb6F5はすべての細胞に陽性ではなく、一つのランゲルハンス氏島に数個の陽性細胞が見られた。副甲状腺においては、好酸性細胞に強い陽性所見があり、主細胞においては、一部の細胞に陽性であった (図7)。NMSを一次抗体として用いた場合には、陽性所見はみられなかった。

6. mAb6F5が認識する筋線維タイプ

mAb6F5が認識する筋線維が、赤筋 (タイプ1線維) かあるいは白筋 (タイプ2線維) かどちらのタイプかを検討した。検体は東大神経内科において切除された筋生検材料を用いた。その際、凍結材料から10 μ の厚さで連続切片を作製し、免疫組織化学的染色とactomyosin ATPase染色を同時に行なった。その結果、タイプ2線維が黒く染色されるpH11.0のactomyosin ATPase染色とmAb6F5によって認識される筋線維の分布が一致することが明らかになった (図8)。

7. 骨軟部腫瘍におけるmAb6F5の発現

mAb6F5によって認識されるペプチドがどのような骨軟部腫瘍に発現しているのか、

あるいは悪性度との相関の有無、組織診断への応用の可能性をふまえmAb6F5を用い検討した。表3に示すように外科的に切除され、診断の確定した手術材料91例を対象とし、横紋筋肉腫5例中2例、滑膜肉腫5例中1例、脊索腫4例中4例、軟骨肉腫3例中3例にmAb6F5の陽性所見が見られた(表4-7、図9)。さらに、これらの腫瘍での陽性反応の意義を考察するうえで必要と思われる数種の抗体についても免疫染色を行なった。用いた抗体と結果は表4-6に示した。横紋筋肉腫については、抗デスミン染色を行ない5例中3例が陽性であり、デスミンが陽性で6F5が陰性なものが1例見られた。滑膜肉腫については、抗KL-1, AE1・AE3, EMA, CEA, ビメンチンを行なった。6F5は、2相型滑膜肉腫の上皮様成分に陽性であり、同部では抗KL-1, AE1・AE3, EMAがともに陽性であった。6F5が陽性を示す、2相型滑膜肉腫の上皮様成分には、CEAも陽性であった。脊索腫に関しては、抗KL-1, ビメンチン, EMA, が4例とも陽性で、CEAは全ての例で陰性であった。NMSを一次抗体として用いた場合には、陽性所見はみられなかった。

4. 考察

これまでの研究により、骨格筋小胞体Ca-ATPaseと同様のATPaseが非筋細胞にも存在し、細胞周期を通じての微小管の配列の調節、腓ラングルハンス氏島細胞におけるインスリン分泌の調節など様々な生理的役割を果たしている可能性が示唆されてきた(8-14, 17)。非筋細胞小胞体のCa-ATPaseの実体の詳細に関しては不明であったが、最近cDNAクローニングの結果、非筋細胞中には心筋小胞体型Ca-ATPaseとC末端の一部のみアミノ酸配列の異なるATPaseが存在することが示され(6)、この部分のペプチドに体する抗体を利用した研究によりマイクロソーム分画中にこの抗体と反応する分子量10-11万のタンパク質が存在することが示された。また、ShullとGreebは、カチオン輸送性ATPaseの中でも、ATP結合部位と推定される保存性の高い領域に対応する核酸配列をプローブにして、ラットの脳に2種のカルモジュリン結合型Ca-ATPaseが発現していることを明らかにした(32)。彼らは、同じプローブを用い、ラット脳、腎、胃のcDNAライブラリーをスクリーニングし、赤筋型Ca-ATPaseがこれらの臓器で発現していること、腎では、さらに筋小胞体型Ca-ATPaseと75-77%相同性のある酵素、および今まで知られていないカチオン輸送性ATPaseが発現していることを報告している(33)。そして、現在までのところ、これらのATPaseには互いに相同性の高い3種類の遺伝子の存在が推定され、骨格筋速筋にSERCA1が、心筋と骨格筋遅筋にSERCA2aが、平滑筋および非筋細胞にはSERCA2b及びSERCA3が特異的に発現することが明らかにされている(15, 16)。

組織学的には、心筋小胞体型Ca-ATPaseに対する抗体を用い、小脳プルキンエ細胞におけるCa-ATPaseの局在が免疫電顕レベルで示されている。しかし、このATPaseをタンパク質レベルで精製し、その性質や制御機構を研究することは今後の課題であり、生理的意義についてもまだほとんど解明されていない。また、組織学的にもその分布は不明な点が多く、疾病との関連についての報告は、細胞質内Ca-ATPaseにかぎっていえば皆無である。

本研究では、このような点について理解を深める目的で、小胞体Ca-ATPaseに対する抗体を作製し、その性質を調べると共に、正常組織と骨軟部腫瘍での発現を検討することを試みた。その際、Ca-ATPaseに対して高い特異性を示す単一の抗体分子を得ることが望ましいと考え、モノクローナル抗体の作製を試みた。その結果、培養上清が、ELISA法で陽性を示す3種の抗SR-ATPase抗体産生ハイブリドーマが得られた。

得られた抗体産生クローン6F5、7F10、6G7の産生するモノクローナル抗体の内、mAb6G7については、ブロッキングの実験からnativeSRには結合しないことがわかった。これがハイブリドーマ培養上清のスクリーニングで陽性を示した理由は、スクリーニングの際にELISAプレートに吸着させたSRのCa-ATPaseの中に、Caを含まないTBSに懸濁したために、一部変性したものがあつたためではないかと考えられる。この結果より免疫組織化学的応用はmAb6F5、7F10を用いることにし、その2種の抗体について詳しく検討した。mAb6F5、7F10は、ブロッキングの実験から、nativeSRに結合可能であり、また、SDS-PAGEを用いたイムノブロットングの結果から、SDSにより変性したSRのCa-ATPaseにも結合することがわかった。高圧高温処理をした場合にも結合することが

わかった。さらに、SRのCa-ATPaseのトリプシン断片に対する反応性をイムノブロッティングにより調べた結果から、mAb6F5、7F10は、Ca-ATPaseのA₁断片を認識することが明らかになった。さらに、mAb6F5、7F10を用いて、小胞体膜のCa-ATPaseの分子種のうちSERCA2bのmRNAが発現している肝臓のミクロソーム分画について、イムノブロッティングにより調べた結果、分子量約10万のタンパク質が特異的にmAb6F5、7F10によって認識されることが明らかになった。蛋白の分子量および、すでに樹立されている他のmAbとの反応性から、2つのmAbは、細胞内Ca-ATPaseを認識すると考えられた。

さらに、非筋細胞小胞体と交叉反応を示すことが明らかになったmAb6F5について、動物細胞を用いた蛍光抗体法を用いることにより、mAb6F5によって認識されるペプチドの細胞内局在を明らかにしようとした。動物細胞は、3T3細胞及びRINを染色した。DiOC6 (3) は、膜電位に反応してミトコンドリアを選択的に染色する陽イオン性蛍光染色試薬として知られていたものだが、高濃度で用いると、固定処理により電位を失っているにも関わらず、小胞体膜を染色する性質を持つことが示され、最近、小胞体染色用蛍光試薬として用いられるようになった(34)。この試薬とmAb6F5を用いて二重染色を行なった結果、Ca-ATPaseは小胞体の分布とはほぼ同様の傾向を示す結果が得られた。しかし、この点に関してはさらに、免疫電顕等の手法を用いて検討しなければならないと考える。

このような性質をもつ2種のモノクローナル抗体を用い、正常胎児組織及び成人組織におけるCa-ATPaseの分布を免疫組織化学的に検討した結果、骨格筋以外の種々の非筋細胞にも陽性所見が認められた。骨格筋においては筋原線維束に沿って強い陽性反応がみられた。一部に全く陰性の筋原線維束が見られたが、これは用いた検体が赤筋と白筋が混在している大腿四頭筋であり、赤筋と白筋に対する抗体の反応性の差による可能性が考えられる(後述)。一方、膵ランゲルハンス氏島細胞、副甲状腺主細胞と好酸性細胞の一部、下垂体前葉細胞、網膜光受容体細胞において陽性反応が見られたことは、それらの細胞がもつ細胞質内Ca-ATPaseが筋小胞体Ca-ATPaseと高い相同性を持つことを意味すると考えられる。そして、非筋細胞の中でも分泌能を有する細胞に強い陽性所見があることは、刺激と放出の関連機構における細胞内Ca²⁺イオンの制御にCa-ATPaseが関与している可能性を示唆しているものと推察される。また、mAb6F5に関しては、膵ランゲルハンス氏島細胞及び副甲状腺においては、全ての細胞が陽性ではなく、陽性細胞は疎に認められた。膵ランゲルハンス氏島細胞においては、種々の刺激によるインスリン分泌にCキナーゼ活性化、PI代謝回転が関与していることが知られており(35-37)、最近形質膜及び細胞内Ca-ATPase活性とインスリン分泌との相関が報告されている(19)。このようなことも考えあわせ、機能的に活発な細胞が抗体によって認識されている可能性もあろうと考えられる。このような点については解明には、糖尿病患者での膵ランゲルハンス氏島細胞におけるCa-ATPaseの発現などを免疫組織化学的に研究していくことも一つの方法であると考えられ、この抗体は有用であろう。また、mAb7F10は、6F5と異なり下垂体前葉細胞および網膜光受容体細胞には、反応が見られなかった。これは、mAb7F10とmAb6F5の抗体の認識部位あるいは抗体の力価の差が考えられるが、個々の組織によりCa-ATPaseのアミノ酸の一次構造が若干異なっていることも考えられる。

従来より、免疫電顕の手法を用いて形態学的に細胞内Ca-ATPaseの存在が確認されていたのは、小脳のプルキンエ細胞のみであったが(17)、今回、mAb6F5、7F10を用いた免疫組織化学的染色では陽性所見は得られなかった。東京都立臨床医学総合研究所、川喜田正夫博士より供与を受けた筋小胞体Ca-ATPaseのA₂断片を認識するmAb1E5を用いた検索では、小脳プルキンエ細胞に反応がみられたことから、小脳のプルキンエ細胞の細胞内Ca-ATPaseは筋小胞体Ca-ATPaseのA₁断片よりA₂断片により高い相同性をもっていると考えられる。

一方、細胞内にCa²⁺イオン取り込み機能(細胞内Ca-ATPase)があれば、当然Ca²⁺イオン放出機能も存在すること考えられるが、Waltonらは小脳プルキンエ細胞には2つのCa²⁺イオン放出チャンネル、すなわち、イノシトール(1, 4, 5)三リン酸受容体とリアノジン受容体(39)が共存することを形態学的に証明した(40)。従来はリアノジン受容体は骨格筋にのみ存在すると考えられてきた。今後は、小脳以外の非筋細胞において細胞内Ca-ATPaseの発現が強く見られる組織ではどのようなCa²⁺イオン放出チャンネルが存在するか、より詳細な研究が必要であろう。

胎児組織においては骨格筋、心筋、末梢神経線維、軟骨細胞に陽性反応が見られた。一部線維芽細胞にも陽性所見がみられたが、NMSを用いたコントロールでも陽性所見が見られたこと、3例すべてに陽性所見が見られなかったことから非特異反応と考えた。成人組織との比較では、内分泌組織が陰性の点で差が見られた。このことに関しては、2つの可能性が考えられる。即ち、胎児の非筋細胞の細胞内Ca-ATPaseと成人のそれとに構造的に差がある可能性があることであり、一方、同一の蛋白であっても、胎児組織では成人に比し発現量が少なく、免疫組織化学的手法では陽性所見が得られないことも考えられる。骨格筋については成人と胎児で同様の陽性所見が得られた。ウサギでは新生児と生体において白筋型Ca-ATPaseのカルボキシ末端は異なっており、遺伝子の解析から、それぞれのカルボキシ末端領域に対応するエクソンのみが別々に存在し、スプライシングにより新生児から生体にかかわることが知られている(41)。ヒトにおいてはどのような差があるか詳細な研究は遺伝子レベルで行なわれてはいないが、少なくとも今回の結果より胎児においてもCa-ATPaseのA₁断片は保存されていることが明らかになった。

心筋においては成人と違い胎児に陽性所見が見られた。またそれは右室により強く認められた。発生学的には、骨格筋は筋板から発生し、心筋線維と平滑筋は臓側中胚葉に由来する。今回の結果では、平滑筋は陰性でCa-ATPaseのA₁断片は心筋線維にのみ保存されていることが示された。

1678年Lorenziniは、動物の骨格筋は単一でなく、異なったタイプがあることを指摘した。その外観的な色の差より、それは赤筋と白筋と呼ばれるようになり、19世紀後半にはその生理学的な差も明らかにされた。動物では、ある特定の筋は完全に赤筋のみ、あるいは白筋のみよりなる。ヒト骨格筋では、外眼筋以外では、赤筋優位、白筋優位はあっても、ほとんどの骨格筋は両者がモザイク状に存在する(42, 43)。今回、mAb6F5が認識する筋線維が、赤筋(タイプ1線維)、白筋(タイプ2線維)のどちらのタイプかを調べる目的で、連続切片を用いて免疫組織化学的染色とactomyosin ATPase染色を同時に行なった。その結果、タイプ2線維が黒く染色されるpH11.0のactomyosin ATPase染色

とmAb6F5によって認識される筋線維の分布が一致することが明らかになった。抗体の免疫原としては主として白筋(タイプ2線維)の小胞体が優位であったと考えるが、それと矛盾しない結果であった。

骨軟部腫瘍に関する検討は東大医学部付属病院にて外科的に切除されずにて診断された手術材料91例を対象とし、mAb6F5を用いて免疫組織化学的手法にて行なった。その結果、横紋筋肉腫5例中2例、滑膜肉腫5例中1例、脊索腫4例中4例、軟骨肉腫3例中3例にmAb6F5の陽性所見が見られた。横紋筋肉腫については、検索した症例にさらに、筋原性腫瘍のマーカーである抗デスミン染色を行ない5例中3例が陽性であった。抗デスミン抗体及びmAb6F5が陽性を示す症例はすべて胎児型横紋筋肉腫であった。Krenacs, Harrietteらは、抗SR-ATPase抗体が、筋原性腫瘍のマーカーとして有用であることを示したが(4, 5)、今回の結果も同様であり、抗デスミン抗体が陽性でmAb6F5が陰性なものが1例みられたものの、分化した横紋筋肉腫でmAb6F5が反応する傾向が示され、筋原性腫瘍の組織診断にもmAb6F5が有用であることが示された。

滑膜肉腫は、軟部腫瘍の中でも稀な上皮性の分化を示す腫瘍である(44-46)。今回は、単相線維型1例、単相上皮型1例、2相型3例の計5例について検索した。その結果、2相型の1例に陽性所見が見られた。mAb6F5は、組織学的に上皮様形態を示す部に発現が見られた。さらに陽性部分の組織学的性格を明確にするために、抗KL-1、AE1・AE3、EMA、CEA、ピメンチンを行なった。mAb6F5が陽性を示す部では上皮性マーカーである抗KL-1、AE1・AE3、EMAが同時に発現していた。その例では腺上皮性腫瘍のマーカーであるCEAも一部に陽性であり、検索した5例中、最も上皮性の分化を示す症例と考えられた。

脊索腫に関しては、検索した症例すべてにmAb6F5の発現が見られた。脊索腫は notochord の遺残から発生するとされているが、種々の上皮性マーカーが発現していることが知られている(47, 48)。今回の結果でも、抗KL-1、ピメンチン、EMA、が4例とも陽性であった。CEAは4例とも陰性であった。脊索腫における6F5の染色態度は、細胞質に陽性であり、physaliferous cell と呼ばれる大型で多数の腔胞状の細胞質をもった細胞にも陽性であった。電顕的には、腫瘍細胞質内および細胞間基質に無定型の物質がみられ、これは光顕的に粘液陽性物質と一致するとされている。

軟骨肉腫に関しては、腫瘍細胞の細胞質内に陽性所見がみられ、胎児の正常軟骨組織と同様であった。Ca-ATPaseが細胞質内のどのようなオルガネラに発現しているのかという点は、興味深い問題である。

今回の骨軟部腫瘍における検索では、Ca-ATPaseは横紋筋肉腫の他に、類上皮肉腫を例外として上皮性のマーカーをもつ腫瘍に陽性であった。横紋筋肉腫にCa-ATPaseが陽性である意味は、正常組織の骨格筋における発現と同様で筋小胞体Ca-ATPaseを認識していると考えられる。一方、滑膜肉腫、脊索腫及び軟骨肉腫に一部陽性反応が見られた事実は、細胞内Ca-ATPaseを認識している可能性が高い。今回の動物細胞を用いた蛍光抗体の結果からは細胞内Ca-ATPaseは小胞体に存在すると思われるが、それらの腫瘍細胞ではどのようなオルガネラに存在するのか、さらに免疫電顕などの手法を用いて検討していかなければならない。

5. まとめ

非筋細胞の小胞体に存在するCa-ATPaseはSRのCa-ATPaseと異なり、タンパク質レベルの実体やその生理的意義が十分に解明されていない。本研究は、病理形態学的立場から、このような点について研究を進めるための一つ的手段として、小胞体Ca-ATPaseを認識する抗体を作製し、正常ヒト組織並びに骨軟部腫瘍での発現を検討した。その結果、それらがとくに内分泌細胞に強く陽性所見を示すこと、及び上皮への分化を示す骨軟部腫瘍に陽性反応がみられることを見いだした。これによって、Ca-ATPaseが関与している疾病について、形態学的に細胞内のCa-ATPaseを観察することが可能になった。また、小胞体の細胞内動態と細胞機能の関連についての研究を進めるための一つ的手段もできたと考えられる。今後、これを用いて、上皮性腫瘍での発現、内分泌疾患との関連について研究を進める必要がある。

謝辞

本研究を進めるにあたり貴重な御指導を賜りました、東京大学医学部病理学教室、町並陸生教授ならびに東京都立臨床医学研究所医化学、川喜田正夫部長に深甚なる謝意を表します。また、小胞体の精製、イムノプロテイングに関して御指導頂いた東京都立臨床医学研究所、小野陽先生、抗体の作製に関して御教示頂いた東京大学医学部病理学教室、堀内啓先生、ならびに、貴重な症例を提供して下さった東京大学医学部病理学教室、岡輝明先生、虎の門病院病理学科、松下央先生、酵素組織化学に関して御教示頂いた東京大学医学部神経内科学教室、村山繁雄先生さらに標本作製に御指導、御協力して頂いた東京大学病理学教室、大平嘉一技師、福島るみ子技師に感謝致します。

6. 引用文献

1. Ebasi, S. and Endo, M. (1968) Calcium ion and muscle contraction. Prog. in Biophys. Mol. Biol. 18, 123-183
2. Jorgensen, A. O., Shen, A. Y., Daly, P. and MacLennan, D. H. (1982) Localization of $\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$ -ATPase of sarcoplasmic reticulum in adult rat papillary muscle. J. Cell Biol. 93, 883-892
3. Saito, A., Seiler, S., Chu, A. and Fleischer, S. (1984) Preparation and morphology of sarcoplasmic reticulum terminal cisternae from rabbit skeletal muscle. J. Cell Biol. 99, 875-885
4. Kahn, H. J., Yeager, H., Kassim, O., Jorgensen, A. O., MacLennan, D. H., Baumal, R., Smith, C. R. and Phillips, M. J. (1983) Immunohistochemical and electron microscopic assessment of childhood rhabdomyosarcoma. Increased frequency of diagnosis over routine histologic methods. Cancer 51, 1987-1903
5. Krenacs, T., Stiller, D., Krenacs, L., Bahn, H., Molnar, E. and Dux, L. (1990) Sarcoplasmic reticulum (SR) Ca^{2+} -ATPase as a marker of muscle cell differentiation: immunohistochemical investigations of rhabdomyosarcomas and enhancement of immunostaining after sodium methoxide pretreatment. Acta Histochem. 88, 159-166
6. Lytton, J. and MacLennan, D. H. (1988) Molecular cloning of cDNAs from human kidney coding for two alternatively spliced products of the cardiac Ca^{2+} -ATPase gene. J. Biol. Chem. 263, 15024-15031
7. Wuytack, F., Eggermont, J. A., Raeymaekers, L., Plessers, L. and Casteels, R. (1989) Antibodies against the non-muscle isoform of the endoplasmic reticulum Ca^{2+} -transport ATPase. Biochem. J. 264, 765-769
8. Mazia, D., Petzelt, C., Williams, R. O. and Meza, I. A. (1972) Ca-activate ATPase in the mitotic apparatus of the sea urchin egg (isolated by a new method). Exp. Cell Res. 70, 325-332
9. Petzelt, C. (1972) Ca^{2+} -activated ATPase during the cell cycle of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. Exp. Cell Res. 70, 333-339
10. Silver, R. B., Cole, R. D., and Cande, W. Z. (1980) Isolation of mitotic apparatus containing vesicles with calcium sequestration activity. Cell 19, 505-516
11. Hepler, P.K. (1980) Membranes in mitotic apparatus of barley cells. J. Cell Biol. 86, 490-499
12. Wolniak, S. M., Hepler, P.K. and Jackson, W.T. (1980) Detection of the membrane-calcium distribution during mitosis in *Haemanthus* endosperm with chlorotetracycline. J. Cell Biol. 87, 23-32
13. Silver, R. B. (1986) Microtubules and the endoplasmic reticulum are highly interdependent structures. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 4302-4306
14. Terasaki, M., Chen, L. B. and Fugiwara, K. (1986) Microtubules and endoplasmic

- reticulum are highly interdependent structures. *J. Cell Biol.* 103, 1557-1568.
15. Burk, S. E., Lytton, J., MacLennan, D. H. and Shull, G.E. (1989) cDNA cloning, functional expression, and mRNA tissue distribution of a third organellar Ca^{2+} pump. *J. Biol. Chem.* 264, 18561-18568
 16. Zarain-Herzberg, A., MacLennan, D. H. and Periasamy, M. (1990) Characterization of rabbit cardiac sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase gene. *J. Biol. Chem.* 265, 4670-4677
 17. Villa, A., Podini, P., Clegg, D. O., Pozzan, T. and Meldolesi, J. (1991) Intracellular Ca^{2+} stores in chicken Purkinje Neurons: Differential distribution of the low affinity-high capacity Ca^{2+} binding protein, calsequestrin, of Ca^{2+} ATPase and of the ER luminal protein, bip. *J. Cell Biol.* 113, 779-791
 18. Gronda, C. M., Rossi, J. P. and Gagliardino, J. J. (1988) Effect of different insulin secretagogues and blocking agents on islet cell Ca^{2+} -ATPase activity. *Biochim. Biophys. Acta.* 943, 183-189
 19. Gronda, C. M., Diaz, G. B., Rossi, J. P. and Gagliardino, J. J. (1992) Correlation between Ca^{2+} -ATPase activity of rat islet cells and insulin secretion. *J. Endocrinol.* 134, 221-225
 20. Nygren, P., Larsson, R., Gruber, A., Peterson, C. and Bergh, J. (1991) Doxorubicin selected multidrug-resistant small cell lung cancer cell lines characterised by elevated cytoplasmic Ca^{2+} and resistance modulation by verapamil in absence of P-glycoprotein. *Br. J. Cancer* 64, 1011-1018
 21. Kawakita, M., Yasuoka, K. and Kaziro, Y. (1980) Selective modification of functionally distinct sulfhydryl groups of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} , Mg^{2+} -adenosine triphosphatase with N-ethylmaleimide. *J. Biochem.* 87, 609-617
 22. 岩崎竜夫, 市川かおる, 安東民衛, 保井孝太郎 (1983) 単クローン抗体, 講談社サイエンティフィック
 23. 谷口克 (1988) バイオテクノロジー実験法シリーズ モノクロナール抗体, 実験医学, Vol. 6, 羊土社
 24. McKearn, T. J., Smilek, D. E. and Fitch, F. W. (1980) Monoclonal Antibodies, Plenum Press.
 25. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685
 26. Shin, R. W., Iwaki, T., Kitamoto, T. and Tateishi, J. (1991) Hydrated autoclave pretreatment enhances TAU Immunoreactivity in formalin-fixed normal and Alzheimer's disease brain tissues. *Labo. Inv.* 64, 693-702
 27. Saito, K., Imamura, Y. and Kawakita, M. (1984) Effect of temperature and added ligands on the susceptibility of Ca^{2+} , Mg^{2+} -adenosine triphosphatase of the sarcoplasmic reticulum to trypsin. *J. Biochem.* 95, 1297-1304
 28. Imamura, Y., Saito, K. and Kawakita, M. (1984) Conformational change of Ca^{2+} , Mg^{2+} -

- adenosine triphosphatase of sarcoplasmic reticulum upon binding of Ca^{2+} and adenylyl-5'-yl-imidodiphosphate as detected by trypsin sensitivity analysis. *J. Biochem.* 95, 1305-1313
29. Osborn, M. and Weber, K. (1976) Cytoplasmic microtubules in tissue culture cells appear to grow from an organizing structure towards the plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 867-871
30. Guesdon, J. L., Ternynck, T. and Avrameas, S. (1979) The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. *J. Histochem. Cytochem.* 27, 1131-1139
31. Zuo-Rong, S., Steven H. I. and Young S. K. (1988) A comparison of three immunoperoxidase techniques for antigen detection in colorectal carcinoma tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 36, 317-322
32. Shull, G. E. and Greeb, J. (1988) Molecular cloning of two isoforms of the plasma membrane Ca^{2+} -transporting Na^+ , K^+ - and other cation transport ATPases. *J. Biol. Chem.* 263, 8646-8657
33. G-Hamblin, A-M., Greeb, J. and Shull, G. E. (1988) A novel Ca^{2+} pump expressed in brain, kidney, and stomach is encoded by an alternative transcript of the slow-twitch muscle sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase gene. Identification of cDNAs encoding Ca^{2+} and other cation-transporting ATPases using an oligonucleotide probe derived from ATP-binding site. *J. Biol. Chem.* 263, 15032-15040
34. Terasaki, M., Song, J., Wong, J. R., Weiss, M. J. and Chen, L. B. (1984) Localization of endoplasmic reticulum in living and glutaraldehyde-fixed cells with fluorescent dyes. *Cell* 38, 101-108
35. Prentki, M. and Matschinsky, F. M. (1987) Ca^{2+} , cAMP, and phospholipid-derived messengers in coupling mechanisms of insulin secretion. *Physiol. Rev.* 67, 1185-1248
36. Clark, A. (1989) Islet amyloid and type 2 diabetes. *Diabetes Med.* 6, 561-567
37. Zawulich, W. S. and Rasmussen, H. (1990) Control of insulin secretion: a model involving Ca^{2+} , cAMP and diacylglycerol. *Molecular and Cellular Endocrinology* 70, 119-137
38. Wollheim, C. B. and Regazzi, R. (1990) Protein kinase C in insulin releasing cells. Putative role in stimulus secretion coupling. *FEBS Lett.* 268, 376-380
39. Takeshima, H., Nishimura, S., Matsumoto, T., Ishida, H., Kanagawa, K., Minamino, N., Matsuo, H., Ueda, M., Hanaoka, M., Hirose, T. and Numa, S. (1989) Primary structure and expression from complementary DNA of skeletal muscle ryanodine receptor. *Nature* 339, 439-445
40. Walton, P. D., Airey P. D., Sutko, J. L., Beck, C. F., Mignery, G. A., Sudhof, T. C. and Deerinck, T. J. (1991) Ryanodine and inositol trisphosphate receptors coexist in avian cerebellar Purkinje neurons. *J. Cell Biol.* 113, 1145-1157
41. Korczak, B., Z-Herzberg, A., Brandl, C. J., Ingles, C. J., Green, N. M. and MacLennan, D. H. (1988) Structure of the rabbit fast-twitch skeletal muscle Ca^{2+} -ATPase gene. *J. Biol. Chem.* 263, 4813-4819

42. Hoogenraad, T. U., Jennekens, F. G. I. and Tan, K. E. W. P. (1979) Histochemical fibre types in human extraocular muscles, an investigation of inferior oblique muscle. *Acta Neuropathol.* 45, 73-78
43. Engel, A. G. and Banker, B. Q. Skeletal muscle fiber types. *Myology basic and clinical.* McGraw-hill book company. New York, pp255-283
44. Corson, J. M., Weiss, L. M., Banks-Schlegel, S. P. and Pinkus, G. S. (1984) Keratin proteins and carcinoembryonic antigen in synovial sarcomas: an immunohistochemical study of 24 cases. *Hum.Pathol.* 15, 615-621
45. Leader, M., Patel, J., Collins, M. and Kristin, H. (1987) Synovial sarcomas. True carcinosarcoma? *Cancer* 59, 2096-2098
46. Wrba, F., Fertl, H., Amann, G., Tell, E. and Krepler, R. (1989) Epithelial markers in synovial sarcoma. An immunohistochemical study on paraffin embedded tissues. *Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histopathol.* 415, 253-258
47. Hruban, R. H., Traganos, F., Reuter, V. E. and Huvos, A. G. (1990) Chordomas with malignant spindle cell components. A DNA flow cytometric and immunohistochemical study with histogenetic implications. *Am. J. Pathol.* 137, 435-447
48. Heikinheimo, K., Persson, S., Kindblom, L. G., Morgan, P. R. and Virtanen, I. (1991) Expression of different cytokeratin subclasses in human chordoma. *J. Pathol.* 164, 145-150

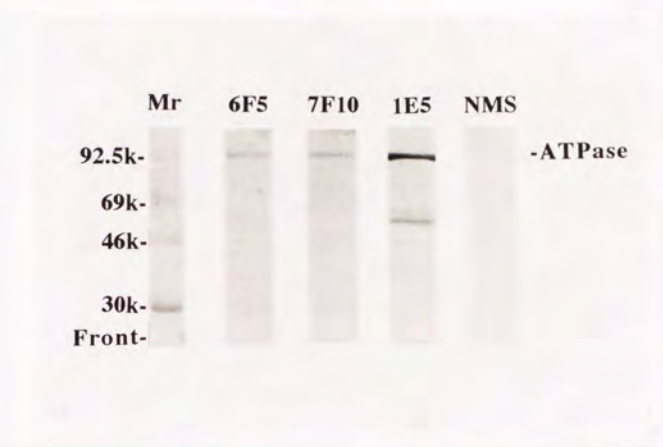


図1 ウサギ骨格筋Ca-ATPaseに対するmAb6F5および7F10の反応性

ウサギSRのCa-ATPaseをSDS-PAGEで分離し、セミドライブロットング装置を用いて、ニトロセルロースメンブレン上に移した。ウサギSRのCa-ATPaseをmAb6F5、7F10が認識しているかどうか判断するために、東京都立臨床医学総合研究所、川喜田正夫博士より供与を受けた筋小胞体Ca-ATPaseを認識するmAb1E5を陽性コントロールとして用いイムノブロットングを行なった。一次抗体はmAb6F5および7F10は培養上清、1E5、NMSは1/100に3%BSAを含むTBSを用いて希釈した。二次抗体はECLウエスタンブロットング検出キット中の抗マウスIg抗体を用いた。Mrは分子量マーカーを示す。

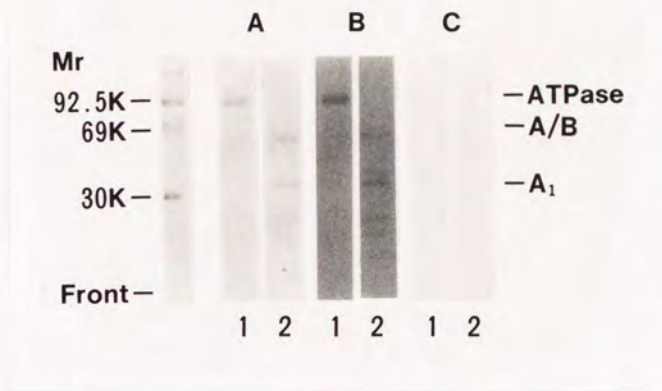


図2 ウサギ骨格筋Ca-ATPaseのトリプシン限定分解断片に対するmAb6F5および7F10の反応性

トリプシン：SR=1：100（W/W）の割合で0℃、20分消化したCa-ATPase2μgをSDS-PAGEにより分析し、ニトロセルロースメンブレン上に移し、mAb6F5(lane A)、7F10 (lane B)、NMS (lane C) を一次抗体としてイムノブロットングを行なった。一次抗体はすべて1/100に3%BSAを含むTBSを用いて希釈した。二次抗体はECLウエスタンブロットング検出キット中の抗マウスIg抗体を用いた。

Lane 1は未消化のSR、Lane 2はトリプシンで消化したSRをそれぞれ試料として用いたことを示す。

Mrは分子量マーカー、A/B、A₁はトリプシンによって消化されたCa-ATPaseのA/B断片、A₁断片をそれぞれ示す。

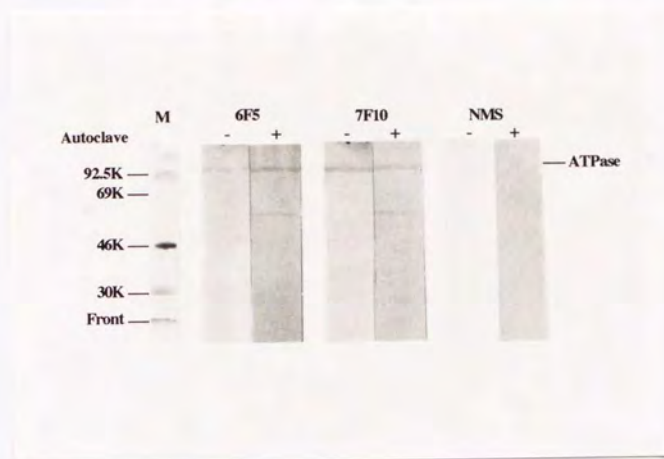


図3 ヒト骨格筋小胞体Ca-ATPaseに対する
mAb6F5および7F10の反応性

ヒト骨格筋小胞体は、Kawakitaらの方法にしたがって調製し、2 μ gをSDS-PAGEで分析し、mAb6F5、7F10、NMS（それぞれ80倍希釈）を一次抗体として用いてイムノブロッティングを行なった。

Mは分子量マーカーを、Autoclave+はメンブレンを高圧高温処理したもの、Autoclave-は未処理のメンブレンを用いたことを示す。

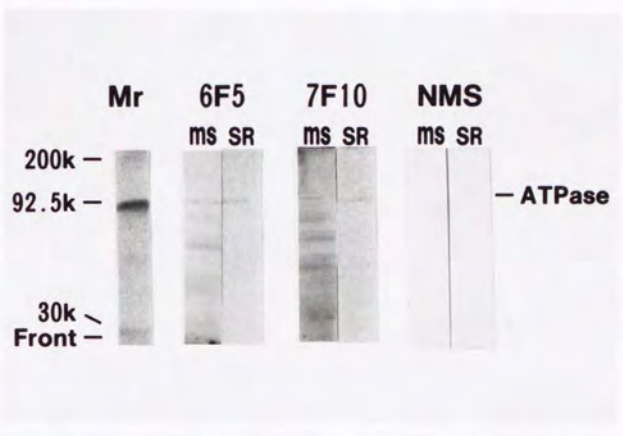


図4 mAb6F5、7F10とブタ肝臓細胞小器官タンパク質との交叉反応

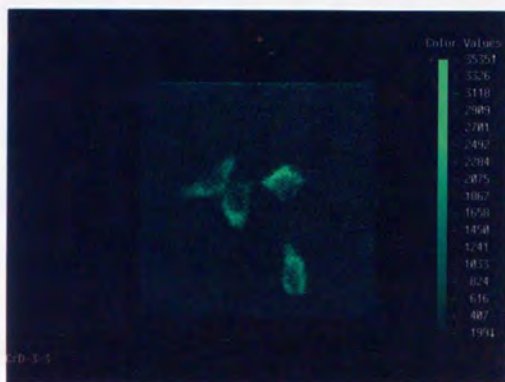
ブタ肝臓のミクロソーム画分10 μ gをSDS-PAGEで分析し、mAb6F5、7F10、NMS（それぞれ80倍希釈）を一次抗体として用いてイムノプロットングを行なった。二次抗体はECLウエスタンプロットング検出キット中の抗マウスIg抗体を用いた。

Mrは分子量マーカー、msはブタ肝臓ミクロソーム、SRは対照試料の筋小胞体を示す。

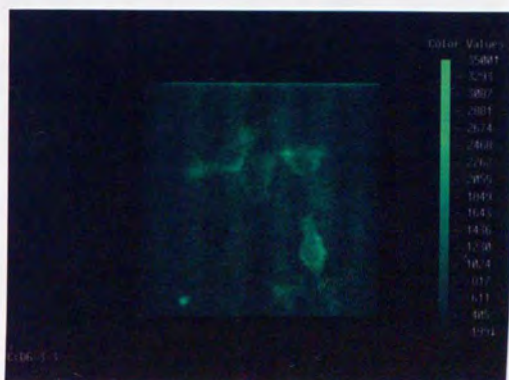
図5 DiOC6 (3) とmAb6F5による二重染色

チャンバースライドに付着しているBALB3T3細胞とRIN細胞を4%パラホルムアルデヒドにより固定した後、DiOC6 (3) で処理し共焦点レーザー顕微鏡 (ACAS570, MERIDIAN社) により観察した。次に透過性処理の後、mAb6F5を一次抗体とした蛍光抗体法による染色を行なった。mAb6F5は1/20に希釈して用い、二次抗体はFITC標識抗マウスIgG抗体を1/100にして用いた。

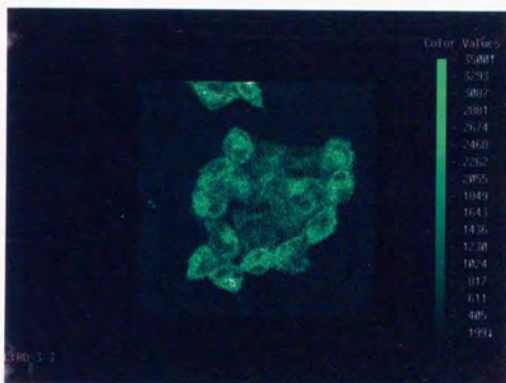
1-A: BALB 3T3細胞におけるDiOC6 (3) による染色像を示す。
核周囲に陽性所見がみられる。



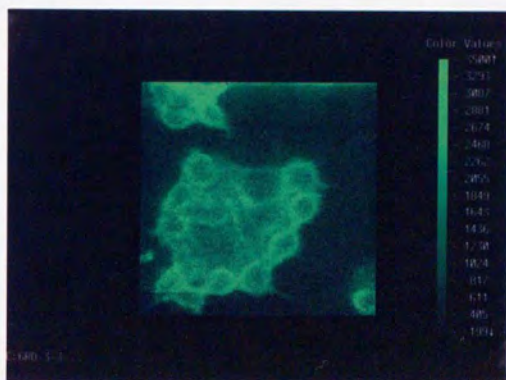
1-B: 1-Aと同一の細胞におけるmAb6F5による染色像を示す。1-Aとほぼ同様に、核の周囲にmAb6F5の陽性所見がみられる。



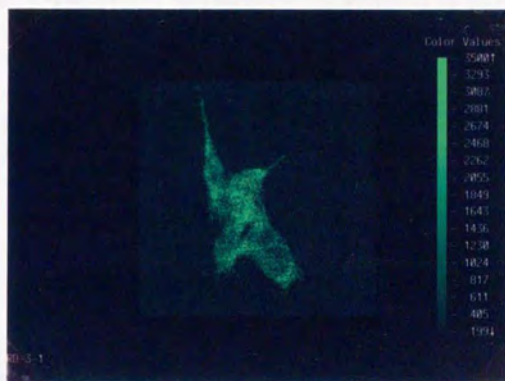
2-A: RIN細胞におけるDiOC6 (3) による染色像を示す。
核周囲に陽性所見がみられる。



2-B: 2-Aと同一の細胞におけるmAb6F5による染色像を示す。2-Aと
ほぼ同様に、核の周囲にmAb6F5の陽性所見がみられる。



3-A: RIN細胞におけるDiOC6 (3) による染色像を示す。
核周囲に陽性所見がみられる。



3-B: 3-Aと同一の細胞におけるmAb6F5による染色像を示す。3-Aと
ほぼ同様に、核の周囲にmAb6F5の陽性所見がみられる。

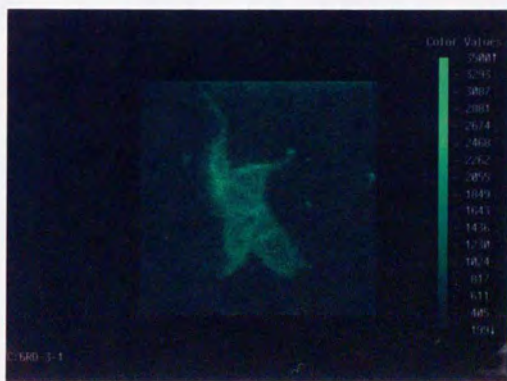
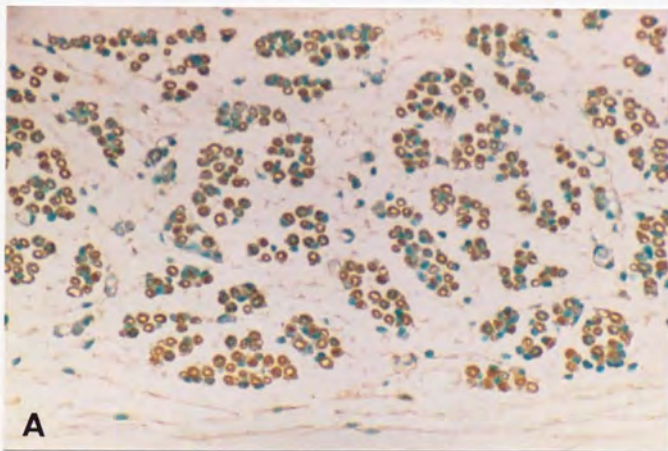


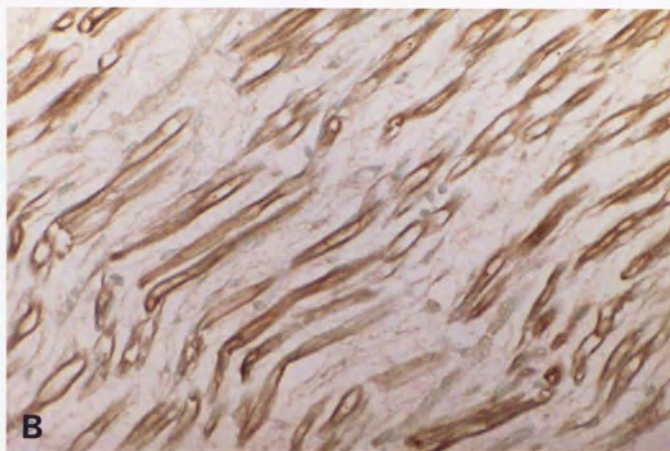
図6 (A-F) 正常胎児組織におけるmAb6F5、7F10の発現

12週胎児組織において免疫組織化学的にmAb6F5、7F10の発現を検討した。全例ホルマリン固定パラフィン切片を用い、内因性ペルオキシダーゼ活性を阻止する前に高圧高温処理をし、一次抗体としてmAb6F5、7F10、NMS（それぞれ100倍希釈）を用いた。二次抗体及び酵素試薬はヒストファインSAB-PO (M) キットを使用し、DABにて発色した。対比染色はメチルグリーンを用いた。

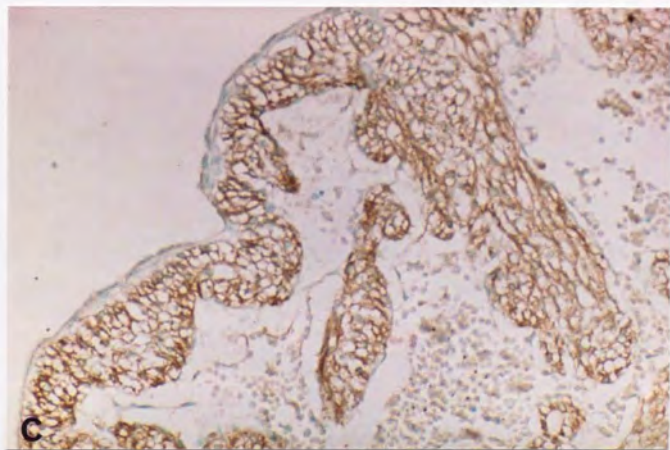
- A 骨格筋横断面組織を示す。筋芽細胞 (myoblast) に陽性所見がみられる。(mAb6F5 x377)



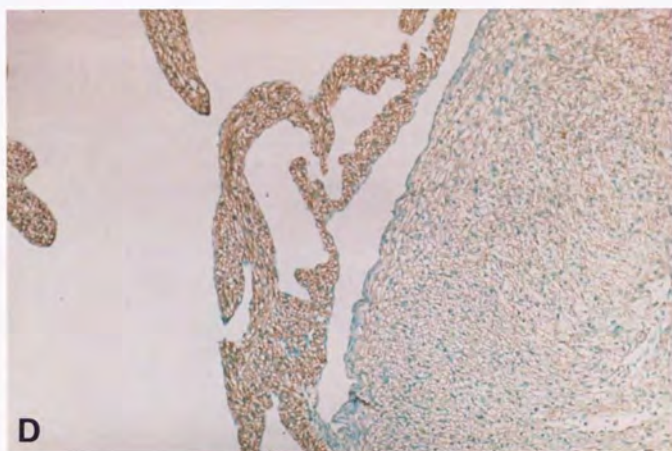
- B 骨格筋縦断面組織を示す。筋芽細胞 (myoblast) に陽性所見がみられる。一部に横紋が認められる。(mAb7F10 x377)



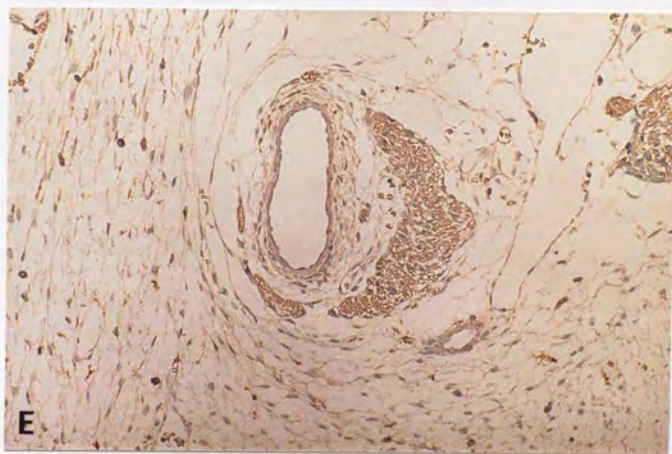
- C 右心室を示す。筋芽細胞 (myoblast) に陽性所見がみられる。(mAb6F5 x245)



- D 左右心室を示す。右室心筋は左室に比べより強い染色態度を示す。(mAb7F10 x123)



- E 頸部動脈周囲の免疫染色陽性の末梢神経線維束を示す。一部、線維芽細胞に陽性反応が見られる (p16参照)。(mAb7F10 x186)



F 軟骨組織を示す。細胞質に陽性所見がみられる。(mAb6F5 x245)

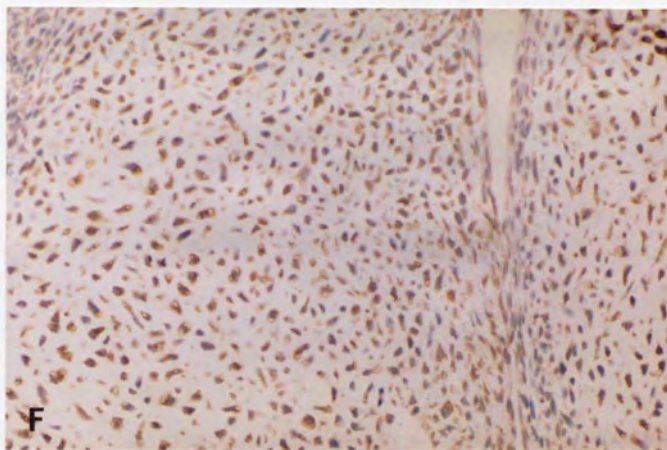
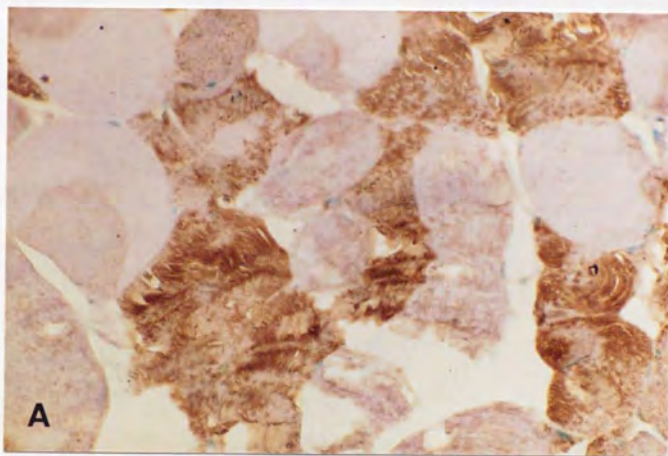


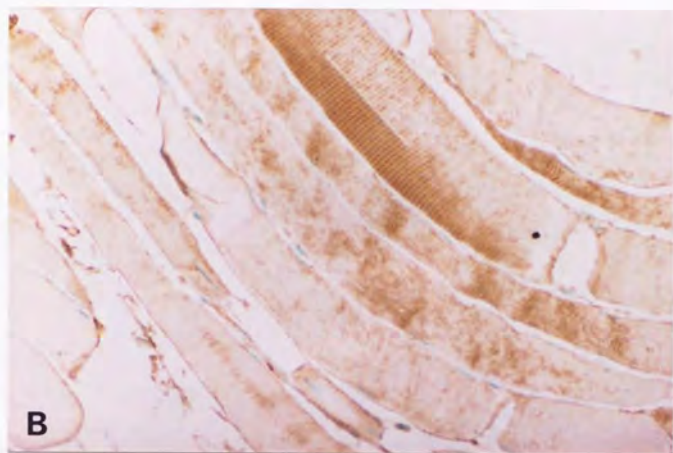
図7 (A-G) 正常成人組織におけるmAb6F5、7F10の発現

正常成人組織において免疫組織化学的にmAb6F5、7F10の発現を検討した。全例ホルマリン固定パラフィン切片を用い、内因性ペルオキシダーゼ活性を阻止する前に高圧高温処理をし、一次抗体としてmAb6F5、7F10、NMS（それぞれ100倍希釈、mAb6F5は一部培養上清原液）を用いた。二次抗体及び酵素試薬はヒストファインSAB-PO（M）キットを使用し、DABにて発色した。対比染色はメチルグリーン及びマイヤーのヘマトキシリンを用いた。

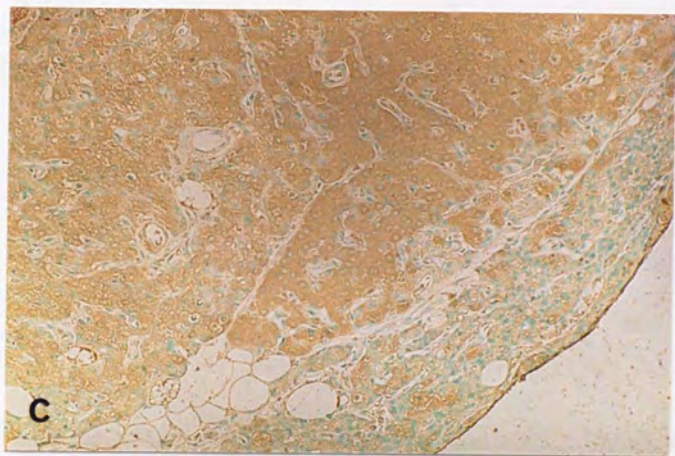
- A 骨格筋横断面組織を示す。筋線維の横紋に沿って陽性所見が見られる。（mAb6F5 x377）



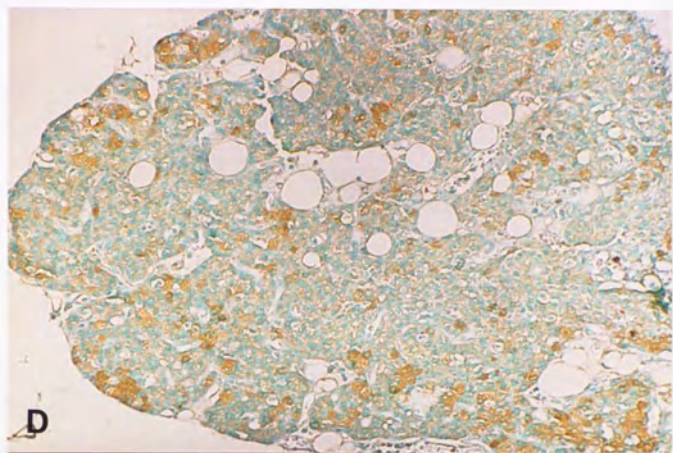
B 骨格筋縦断面組織を示す。筋線維の横紋に沿って陽性所見が見られる。(mAb7F10 x377)



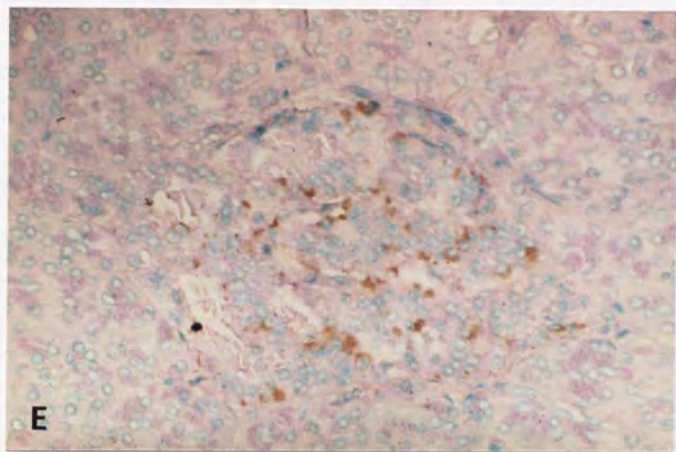
C 副甲状腺を示す。一部の主細胞とほぼ全ての好酸性細胞に陽性所見がみられる。(mAb7F10 x190)



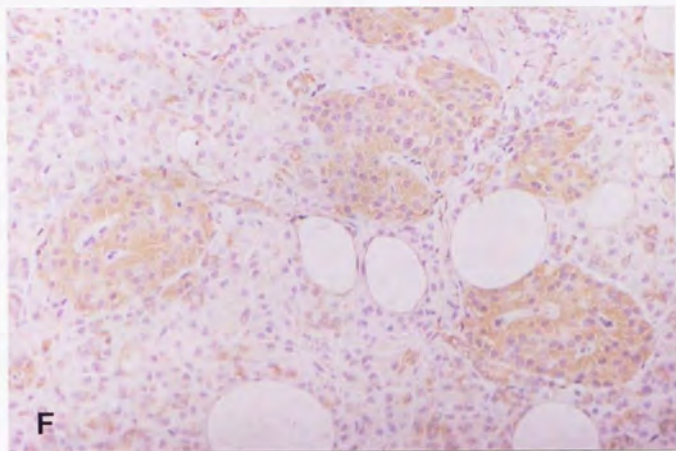
- D 副甲状腺を示す。一部の主細胞に 陽性所見がみられる。
(mAb6F10培養上清 x190)



- E 膵臓を示す。膵ランゲルハンス氏島に数個の陽性細胞が認められる。(mAb6F5培養上清 x377)



- F 膵臓を示す。ほぼ全ての膵ランゲルハンス氏島に陽性細胞が認められる。(mAb7F10 x377)



- G 下垂体を示す。下垂体前葉の好酸性細胞の一部に陽性所見が見られる。(mAb6F5培養上清 x377)

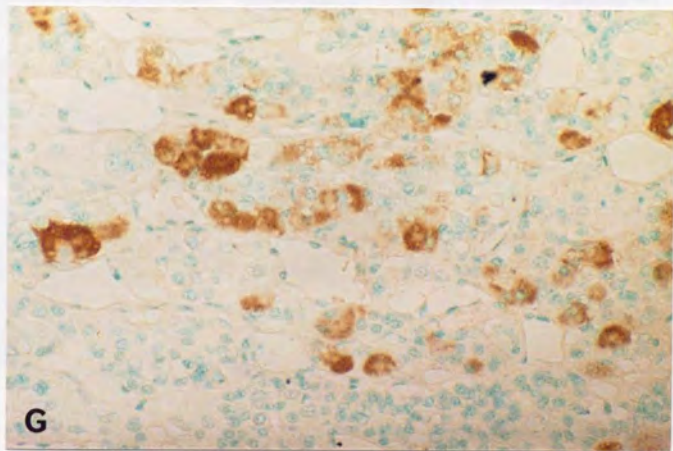
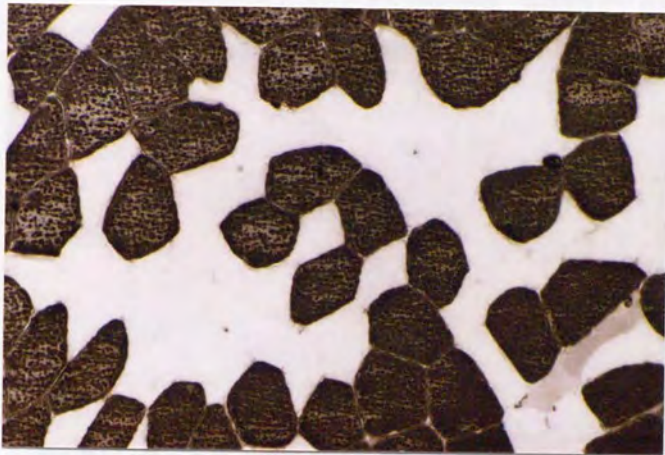


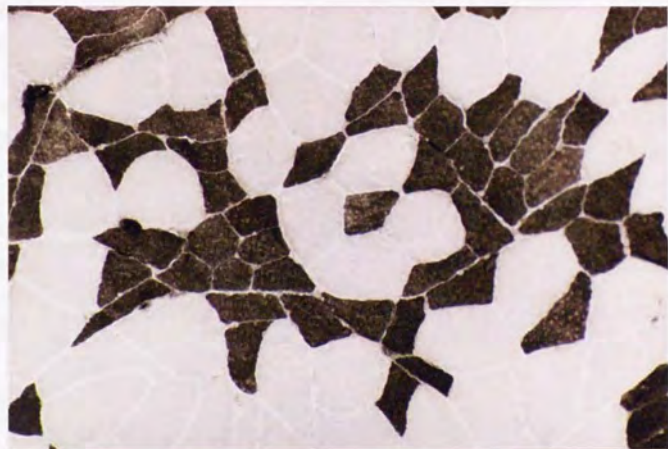
図8 (A-C) mAb6F5が認識する筋線維タイプ

mAb6F5が認識する筋線維が、赤筋（タイプ1線維）かあるいは白筋（タイプ2線維）かどちらのタイプかを検討した。筋生検凍結材料から10 μ の厚さで連続切片を作製し、免疫組織化学的染色とactomyosin-ATPase染色を同時に行なった。免疫組織化学的染色における二次抗体及び酵素試薬はヒストファインSAB-PO (M) キットを使用し、DABにて発色した。対比染色はヘマトキシリンを用いた。

A pH4.1のactomyosin ATPase染色を示す。タイプ1線維が黒く濃染している。(x186)



- B pH11.0のactomyosin ATPase染色を示す。タイプ2線維が黒く濃染している。(x186)



- C mAb6Fの免疫組織化学的染色像を示す。pH11.0のactomyosin ATPase染色で濃染されるタイプ2線維に一致して陽性所見が見られる。(x186)

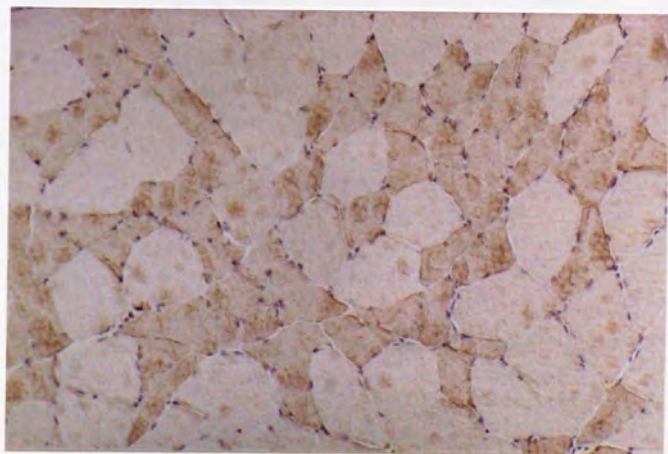


図9 (A-D) 骨軟部腫瘍におけるmAb6F5の発現

外科的に切除された92例の骨軟部腫瘍を対象に免疫組織化学的にmAb6F5の発現を検討した。全例ホルマリン固定パラフィン切片を用い、内因性ペルオキシダーゼ活性を阻止する前に高圧高温処理をし、一次抗体として6F5、KL-1、EMA、CEA（それぞれ1/100に希釈）、AE1・AE3（1/200に希釈）、ビメンチン（希釈済）を用いた。二次抗体及び酵素試薬はヒストファインSAB-PO（M）キットを使用し、DABにて染色した。対比染色はマイヤーのヘマトキシリンを用いた。

A-1,2: 横紋筋肉腫

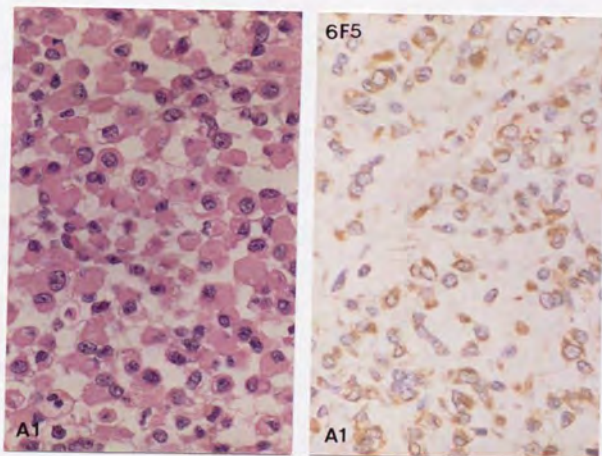
B-1,2: 脊索腫

C-1: 滑膜肉腫

D-1: 軟骨肉腫

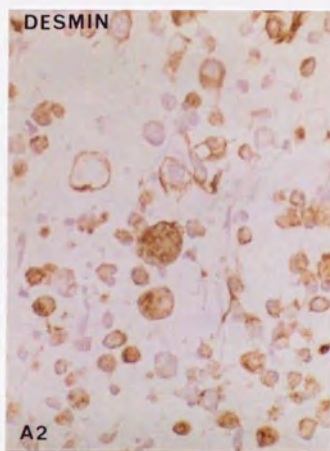
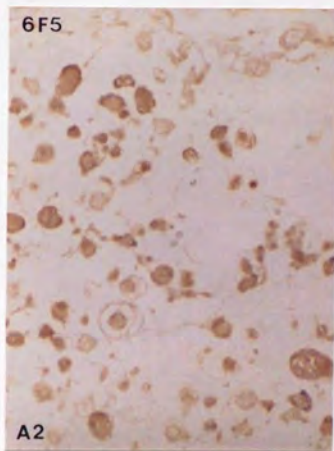
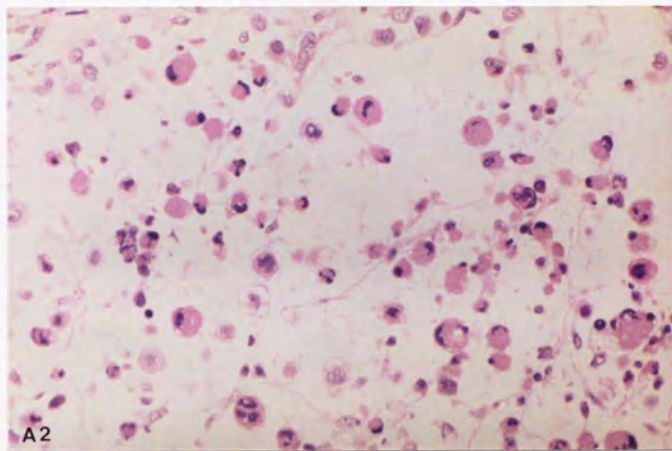
A-1: 横紋筋肉腫

8才男性の眼窩内に発生した胎児型横紋筋肉腫（case1）を示す。左はH.E像、右はmAb6F5の免疫組織化学的所見を示す（左右ともにx377）。mAb6F5は腫瘍細胞の細胞質に陽性である。



A-2: 横紋筋肉腫

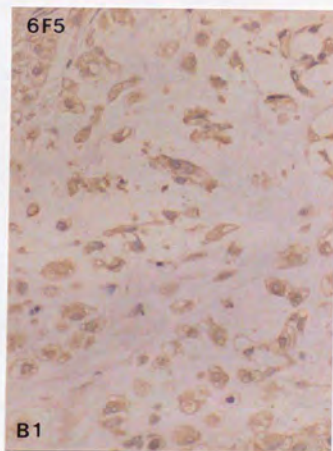
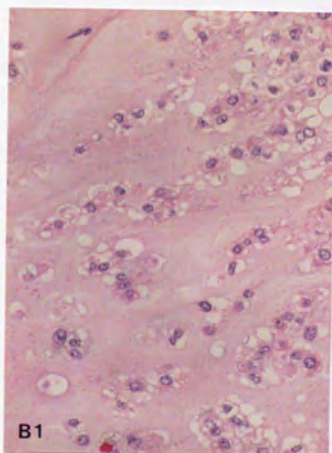
14才女性の左前腕に発生した胎児型横紋筋肉腫 (case2) を示す。上段はH.E.像 (x377)、下段左はmAb6F5 (x377)、右は抗デスミン抗体 (x302) の免疫組織化学的所見を示す。mAb6F5及び抗デスミン抗体がともに腫瘍細胞の細胞質 (Rhabdomyoblast) に陽性である。



B-1脊索腫

40才男性の仙骨部に発生した脊索腫 (Case1) を示す。

左はH.E.像、右はmAb6F5の免疫組織化学的所見 (それぞれx302) を示す。mAb6F5は腫瘍細胞の細胞質に陽性である。

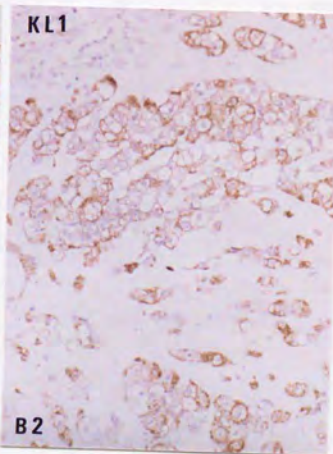
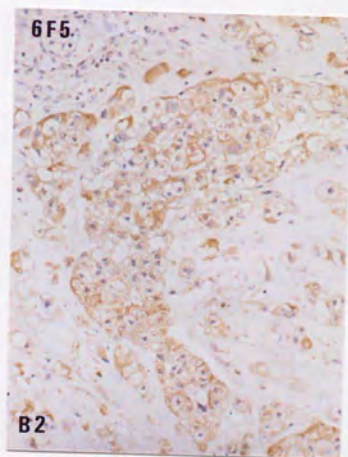
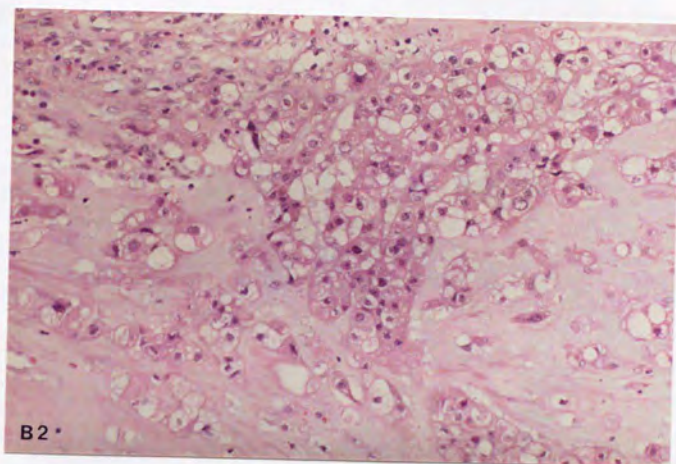


B-2脊索腫

44才女性の頸椎より発生した脊索腫 (Case3) を示す。

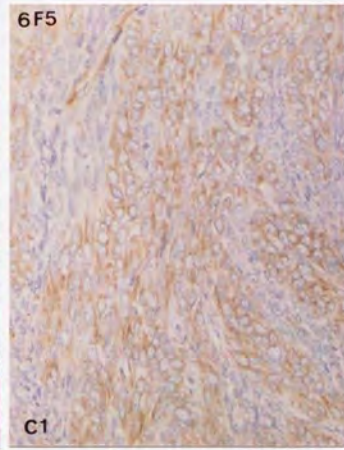
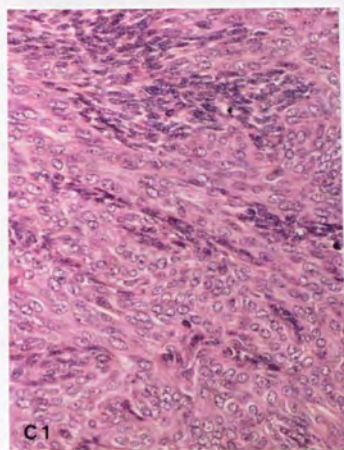
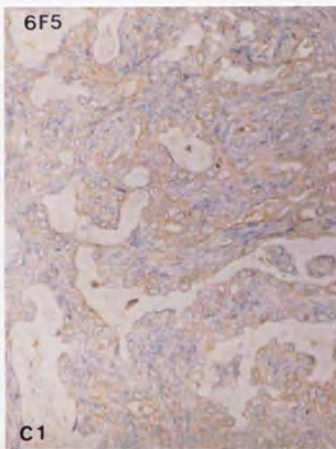
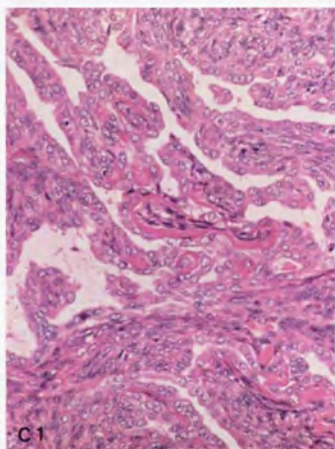
上段はH.E.像 (x189)、下段左はmAb6F5 (x302)、下段右は抗KL-1抗体 (x302) の免疫組織化学的所見を示す。

mAb6F5及び抗KL-1抗体はともに腫瘍細胞の細胞質に陽性である。



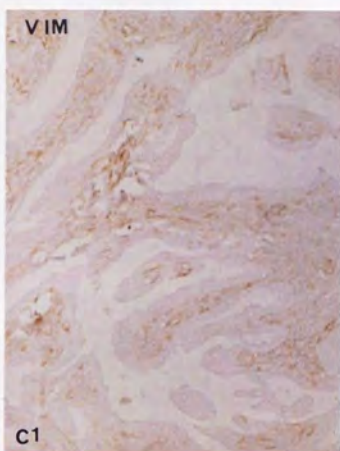
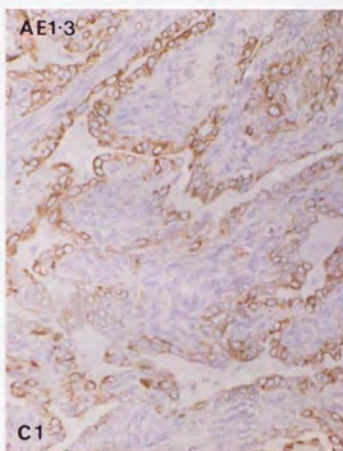
C-1: 滑膜肉腫

52才男性の大腿部に発生した2相型滑膜肉腫 (Case3) を示す。上及び下段左はH.E.像 (それぞれx189, x249)、上及び下段右は、mAb6F5の免疫組織化学的所見 (それぞれx189, x249) を示す。上段H.E.像は1層の上皮様細胞に囲まれた腺管構造と、線維肉腫様の紡錘形細胞から構成される部である。下段H.E.像では、管腔形成は見られないが、上皮的性格を示唆する細胞質の比較的豊富な細胞が見られる。mAb6F5は上皮様細胞に陽性である。



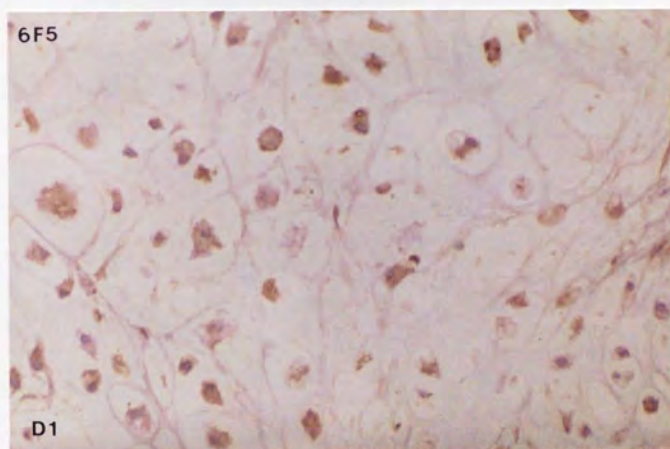
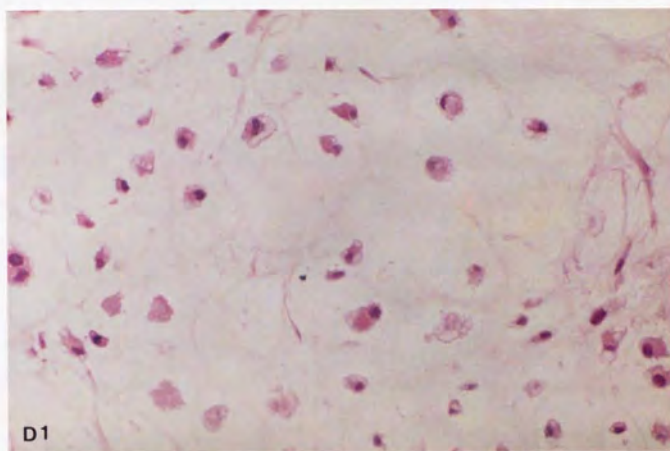
C-1: 滑膜肉腫

52才男性の大腿部に発生した2相型滑膜肉腫 (Case3) を示す。左は抗サイトケラチン抗体 (AE1•3)、右は抗ビメンチン抗体 (それぞれx189) の免疫組織化学的所見を示す。1層の上皮様細胞に囲まれた腺管構造と、線維肉腫様の紡錘形細胞から構成される部である。抗サイトケラチン抗体 (AE1•3) はmAb6F5と同じく上皮様細胞に陽性である。抗ビメンチン抗体は紡錘形細胞に陽性である。



D-1: 軟骨肉腫

54才男性の肩甲骨に発生した軟骨肉腫 (Case2) を示す。
上段はH.E.像、下段はmAb6F5の免疫組織化学的所見 (それぞれx377) を示す。mAb6F5は腫瘍細胞の細胞質に陽性である。



8. 表

antibody	SR+	SR-	blocking
6F5	-	+	yes
7F10	-	+	yes
6G7	+	+	no
NMS	-	-	no

表1 SR膜標品による抗体のブロッキング

希釈した抗体液にウサギSR膜標品を加え、0℃で1時間静置した後、15000回転、30分間遠心し、上清の抗体価を未処理の抗体と比較した。

表2 免疫組織化学的染色による胎児および成人組織におけるmAb6F5、7F10の発現

Tissue and cell	Reactivity*			
	6F5		7F10	
	Fetus	Adult	Fetus	Adult
Skin and skin appendages				
Epidermis				
Keratinocyte	-	-	-	-
Langerhans' cell	-	-	-	-
Dermis	-	-	-	-
Appendages				
Sweat gland	-	-	-	-
Hair follicle	-	-	-	-
Mammary gland	-	-	-	-
Endocrine Tissues				
Pituitary gland				
Anterior	-	+	-	-
Posterior	-	-	-	-
Thyroid gland	-	-	-	-
Parathyroid gland	-	+	-	+
Langerhans islet	-	+	-	+
Adrenal gland	-	-	-	-
Cardiovascular System				
Heart	+†	-	+†	-
Artery and vein	-	-	-	-
Capillary	-	-	-	-
Lymphatic vessel	-	-	-	-
Hemopoietic System				
Lymph node	-	-	-	-
Thymus	-	-	-	-
Spleen	-	-	-	-
Bone marrow	-	-	-	-
Respiratory System				
Trachea	-	-	-	-
Lung	-	-	-	-
Digestive System				
Salivary gland	-	-	-	-
Tongue	-	-	-	-
Esophagus	-	-	-	-
Stomach	-	-	-	-
Small and large intestine	-	-	-	-
Liver	-	-	-	-
Pancreatic acinus	-	-	-	-
Locomotor System				
Bone	-	-	-	-
Chondrocyte	+	-	+	-
Muscle	+	+	+	+
Urogenital System				
Kidney				
Glomerulus	-	-	-	-
Tubules	-	-	-	-
Pelvis	-	-	-	-
Ureter	-	-	-	-
Bladder	-	-	-	-
Testis	-	-	-	-
Epididymis	-	-	-	-
Prostate	-	-	-	-
Ovary	-	-	-	-
Fallopian tube	-	-	-	-
Uterus	-	-	-	-
Neurologic Tissues				
Cerebrum	-	-	-	-
Cerebellar Purkinje cell	-	-	-	-
Spinal cord	-	-	-	-
Peripheral nerve	+	-	+	-
Choroid plexus	-	-	-	-
Eye				
Cornea	-	-	-	-
Sclera	-	-	-	-
Retina	-	+	-	-
Lens	-	-	-	-
Placenta				
Amnion sac	-	-	-	-
Decidua	-	-	-	-
Chorionic villi	-	-	-	-
Syncytiotrophoblast	-	-	-	-
Cytotrophoblast	-	-	-	-

* +: positive reaction with mAb; -: negative. † More strongly positive in the right ventricle than in the left.

表3 骨軟部腫瘍におけるmAb6F5の発現

Lesion	mAb6F5(Positive/total)
I. Benign lesions	
Leiomyoma	0/3
Epithelioid leiomyoma	0/1
Angioleiomyoma	0/1
Dermatofibroma	0/4
Hemangioendothelioma	0/3
Schwannoma	0/5
Neurofibroma	0/4
Pigmented neurofibroma	0/4
Fibrous dysplasia	0/5
Chondroblastoma	0/2
Osteoblastoma	0/1
Giant cell tumor	0/3
Brown tumor	0/1
II. Borderline/malignant	
Osteosarcoma	0/5
Chondrosarcoma	3/3
Leiomyosarcoma	0/4
Dermatofibrosarcoma protuberans	0/3
Malignant fibrous histiocytoma	0/5
Malignant hemangioendothelioma	0/2
Angiosarcoma	0/1
Malignant schwannoma	0/1
Synovial sarcoma	1/5
Rhabdomyosarcoma	2/5
Clear cell sarcoma	0/3
Epithelioid sarcoma	0/3
Paraganglioma	0/6
Chordoma	4/4
Primitive neuroectodermal tumor	0/1
Alveolar soft part sarcoma	0/3

Immunohistochemical Data of Rhabdomyosarcoma

Case	Age/Sex	Site	Type	6F5	Desmin
1	7/M	Orbita	Em	+	+
2	14/F	Forearm	Em	+	+
3	18/M	Thigh	Em	-	+
4	25/M	Thigh	Em	-	-
5	30/M	Buttock	Al	-	-

Em: embryonal type

Al: alveolar type

表4 横紋筋肉腫における免疫組織学的検討

横紋筋肉腫において免疫組織化学的に筋原腫瘍のマーカーであるデスミンとmAb6F5との発現の比較を行なった。

Immunohistochemical Data of Synovial Sarcoma

Case	Age/Sex	Site	Type	6F5		KL-1		AE1/AE3		EMA		CEA		Vim	
				EP	SP	EP	SP	EP	SP	EP	SP	EP	SP	EP	SP
1	20/M	Thigh	B	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
2	23/F	Lower leg	B	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
3	52/M	Thigh	B*	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
4	59/F	Lower leg	ME	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
5	33F	Hip	MF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

EMA: Epithelial membrane antigen CEA: Carcinoembryonic antigen Vim: Vimentin

Ep: epithelial component Sp: spindle cell component

B: biphasic type ME: monophasic epithelial type MF: monophasic fibrous type

*: with squamous differentiation

表5 滑膜肉腫における免疫組織学的検討

mAb6F5が認識する上皮様成分の性格を明らかにする目的で滑膜肉腫5例に対し、上皮性細胞のマーカーである、抗サイトケラチン (KL-1、AE1/AE3)、epithelial membrane antigen、carcinoembryonic antigen 及び間葉系細胞のマーカーとされる中間径フィラメントのVimentinについて免疫組織化学的染色を行なった。mAb6F5が陽性であったCase3には一部に扁平上皮への分化を示す部分が見られた。

Immunohistochemical Data of Chordoma

Case	Age/Sex	Site	6F5	KL-1	EMA	Vim	CEA
1	40/M	Sacrum	+	+	+	+	-
2	50/F	Sphenoid sinus	+	+	+	+	-
3	44/F	Cervical vertebrae	+	+	+	+	-
4	27/F	Ethmoid sinus	+	+	+	+	-

EMA: Epithelial membrane antigen

Vim: Vimentin

CEA: Carcinoembryonic antigen

表6 脊索腫における免疫組織化学的検討

脊索腫においての上皮性マーカーの発現を調べる目的で免疫組織化学的染色を行なった。一次抗体は、上皮性マーカーとしてサイトケラチン (KL-1)、epithelial membrane antigen、carcinoembryonic antigen、及び間葉系細胞のマーカーとして中間径フィラメントのVimentinに対する抗体を用いた。

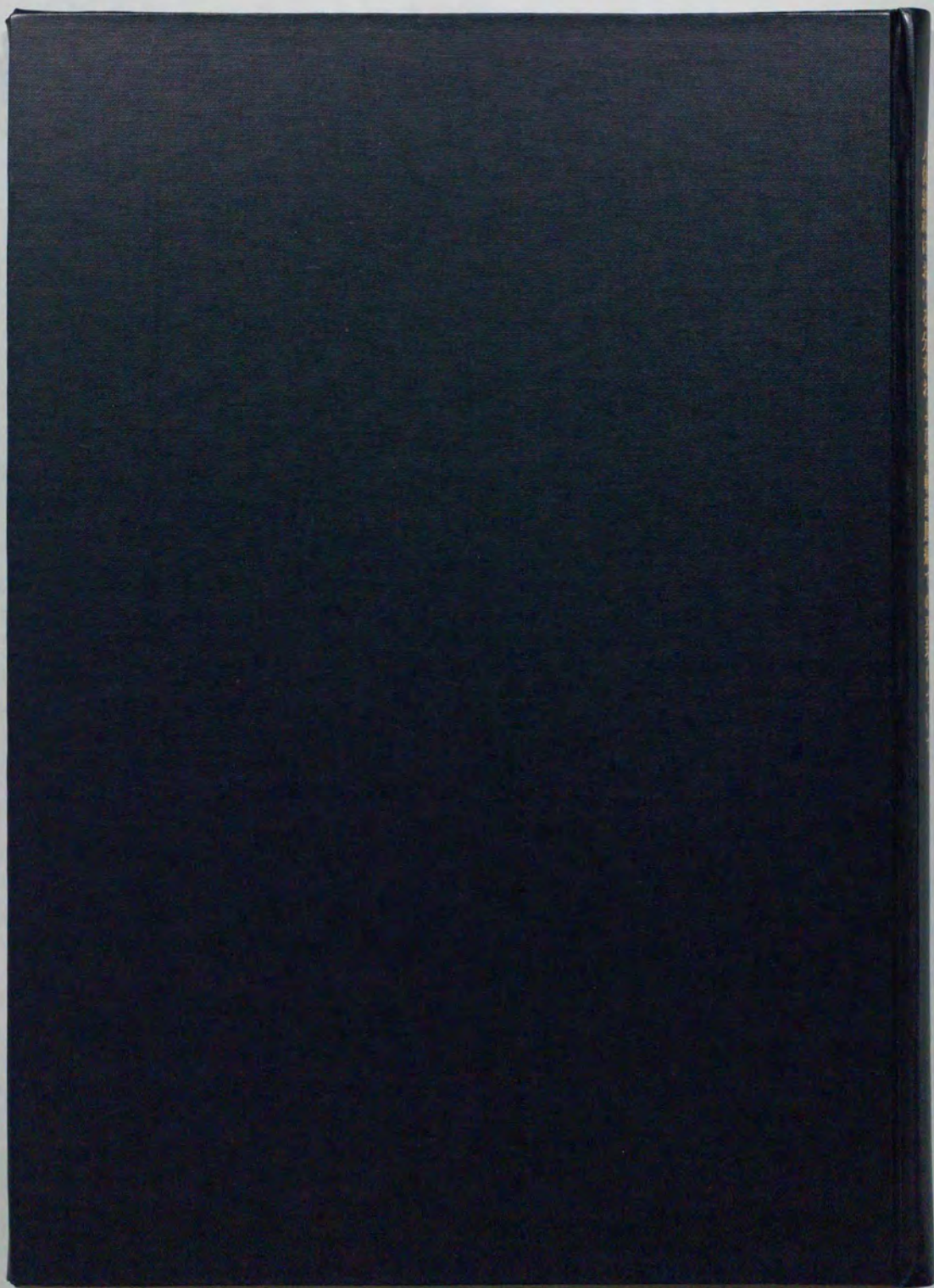
Immunohistochemical Data of Chondrosarcoma

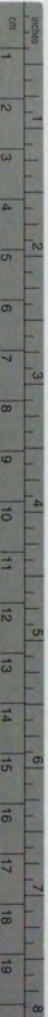
Case	Age/Sex	Site	6F5
1	65/F	Rib	+
2*	54/M	Scapula	+
3	34/F	Pubic bone	+

* associated with Ollier's disease

表7 軟骨肉腫における免疫組織学的検討

軟骨肉腫においてmAb6F5の発現を調べる目的で免疫組織学的染色を行なった。





Kodak Color Control Patches

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black



Kodak Gray Scale

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19



© Kodak, 2007 TM: Kodak