

抗腫瘍抗体結合抗癌剤の研究

第 2 編

抗腫瘍抗体結合 Neocarzinostatin (NCS-immune IgG) の in vivo 抗腫瘍効果

岡山大学医学部第2内科(主任:木村郁郎教授)

佐藤融司

(昭和58年1月10日受稿)

Key words : Antibody-NCS conjugate
In vivo antitumor activity
Transplantable human leukemia cells

緒言

ヒト悪性腫瘍の化学療法に腫瘍特異性を付与する1つの方法として抗癌剤に抗腫瘍抗体を結合させ、腫瘍細胞に特異的な免疫化学療法をおこなうことが考えられ、既にいくつかの報告がある¹⁻⁵⁾。この免疫化学療法の1つの方法として、我々は細胞表面で細胞障害性を発揮する特異な抗癌剤 Neocarzinostatin (NCS)⁶⁾ と家兔抗ヒト白血病細胞抗体 (immune IgG) との結合物 (NCS-immune IgG) を作成し、その in vitro 効果について報告した⁷⁾。さらに著者は第1編においてこの NCS-immune IgG の補体依存細胞障害性ならびに capping 抑制効果について検討し、その補体依存細胞障害性は immune IgG 単独と比較し減弱していること、並びに capping 抑制効果は NCS 単独と同程度に保持されている事を明らかにした⁸⁾。今回は以上の如き特徴を有する NCS-immune IgG の in vivo における抗腫瘍効果をハムスター継代移植系ヒト白血病細胞(BALL-1)を用い検討したので報告する。

実験材料および方法

1) 実験動物。生後24時間以内の newborn hamster (津田動物, 香川, 日本) を使用した。

2) Rabbit anti-hamster thymocyte serum (ATS)

の作成。生後3~4週のhamsterからthymusを無菌的に摘出し細切した後、金属性 mesh を通し thymocyte 浮遊液を得た。この細胞浮遊液を生理的食塩水(以下生食)にて3回洗浄後、再び 1×10^9 個を生食に浮遊させ家兔に静注免疫した。免疫は2週間毎に2回行ない最終免疫より1週間後に採血、ATSを得、56℃30分間補体の非働化を行った後-20℃で保存した⁹⁾。

3) 腫瘍細胞。家兔抗ヒト白血病細胞抗体の作製には、免疫細胞として、平木らによって樹立された non T, non B 細胞型急性リンパ性白血病細胞株 (NALL-1) を用いた¹⁰⁾。NCS-immune IgG の in vivo 抗腫瘍効果を検討する為には、B細胞型急性リンパ性白血病患者末梢血より樹立され、ATS処理 newborn hamster にて継代維持されているヒト白血病細胞株 (BALL-1) を用いた¹¹⁾。実験を標準化するため BALL-1 細胞を BALL-1 移植腫瘍より集め、液体窒素中に保存し、全ての実験に同一条件の細胞を用いた。即ち、newborn hamster に ATS 0.1ml を腹腔内投与後、BALL-1 細胞 5×10^6 個を背部皮下に移植し以後 ATS の週2回腹腔内投与を続け発育した腫瘍を無菌的に摘出し、さらに細切後金属 mesh を通し生食で3回洗浄し

た。洗浄後の細胞を20%胎児牛血清加 RPMI-1640 液にて 1×10^8 /ml に調整し、さらにその細胞浮遊液 1.8ml に対し 0.2ml の Dimethyl sulfoxide (DMSO) を加え、計 2 ml として serum tube (Nunc intermed. Denmark) に入れ液体窒素に保存し、以後の実験にはすべてこの細胞を使用した。

4) NCS-immune IgG の抗体活性の検討。NCS-immune IgG が BALL-1 細胞に反応し hamster cell に反応しないものであることの確認のため、既に報告したごとく間接膜蛍光抗体法を用いて検討した⁷⁾。即ち、BALL-1 細胞、NALL-1 細胞及び正常 hamster 脾細胞、それぞれ 2×10^6 個を階段希釈した NCS-immune IgG に 4℃ 60分間反応させた後、PBS にて3回洗浄し、次に10倍希釈した FITC 標識ヤギ抗家兎 γ globulin (Hyland Labo. Los Angeles Calif. USA) を加え 4℃ 60分間反応させ、さらに PBS にて3回洗浄後、50% PBS-Glycerol buffer に浮遊させ蛍光顕微鏡 (Olympus. Tokyo Japan) で観察した。

5) 使用薬剤。NCS-immune IgG の in vivo での抗腫瘍効果を検討するため以下の薬剤を投与し比較した。即ち報告した方法で得られた NCS-immune IgG, immune IgG, NCS, NCS と immune IgG の混合液、及び NCS と正常家兎 IgG の化学的共有結合物 (NCS-normal IgG) の5種の薬剤と control として生食を使用した⁷⁾。使用薬剤濃度は NCS 濃度 5 単位/ml, 10 単位/ml, 20 単位/ml を使用し、それぞれ 1 回に 0.05ml 腹腔内に投与した。又、immune IgG 濃度は NCS-immune IgG の 5 単位/ml, 10 単位/ml, 20 単位/ml に結合している immune IgG のそれぞれの濃度に匹敵した濃度を使用した。なお、NCS-immune IgG, immune IgG は正常 hamster 細胞と非特異的の反応がある程度認められたため、正常 hamster 脾細胞で充分吸収したものをを用いた。

6) 腫瘍移植ならびに治療方法。NCS-immune IgG の in vivo での効果を、腫瘍細胞を腹腔内に移植後薬剤を腹腔内に投与し治療した場合 (ip-ip system) と皮下移植腫瘍を薬剤の腹腔内投与により治療した場合 (sc-ip system) の 2 系の実験により検討した。ip-ip

system 実験系においては newborn hamster に ATS 0.1ml を腹腔内投与後、BALL-1 細胞 5×10^6 個を生食 0.05ml に浮遊させ腹腔内に移植、この時点を目として Day 1 とした。腫瘍移植 24 時間後に前述 6 種の薬剤を各投与群別に 0.05ml ずつ (NCS 量にして 1 回 0.25 あるいは 0.5 単位腹腔内に投与し以後週 3 回、4 週間計 12 回投与し、これらの処置を受けた hamster の survival, 体重推移、体表より触知し得た腫瘍の percentage を観察した。ATS は 0.1 ml ずつ週 2 回 hamster が死亡するまで腹腔内投与を続けた。sc-ip system 実験系においては newborn hamster に ATS 0.1 ml を腹腔内投与した後、背部皮下に BALL-1 細胞 5×10^6 個を生食 0.05ml に浮遊し移植した。この時点を目として Day 1 とし腫瘍移植 24 時間後より ip-ip system と同じ方法で、既に述べた如く 6 種類の薬剤を腹腔内へ投与し、以後 Day 14, 17, 21, 24 に発育した腫瘍の縦径 Y mm と横径 X mm を測定しその積 $X \times Y$ を求め腫瘍の発育抑制の有無及び体重の推移を観察した。

結 果

I. NCS-immune IgG の抗体活性の特異性。Fig. 1 に正常 hamster 脾細胞で吸収後の NCS-immune IgG の NALL-1 細胞、BALL-1 細胞、正常 hamster 脾細胞に対する反応性を間接膜蛍光抗体法により検討した結果を示した。吸収後の NCS-immune IgG は NALL-1 細胞、BALL-1 細胞いずれに対してもほぼ同程度の抗体価を保有し、NCS 濃度 2^{-4} 単位/ml においても 100% の蛍光を呈した。一方、正常 hamster 脾細胞に対しては全く蛍光が観察されなかった。

II. ip-ip system における示適移植細胞数決定。BALL-1 細胞 2×10^6 個、 5×10^6 個、 1×10^7 個をそれぞれ既述した ip-ip system の方法に準じ腹腔内に移植、薬剤による治療を加えなかった場合の BALL-1 細胞移植 hamster の survival を求めた (Fig. 2)。この結果 5×10^6 個移植群において、バラツキも少なく平均 27.2 日で死亡した。この BALL-1 移植細胞濃度は今回の実験に最適であると考えられたので、以後の ip-ip system による治療実験においては BALL-1 細胞 5×10^6 個を移植した。

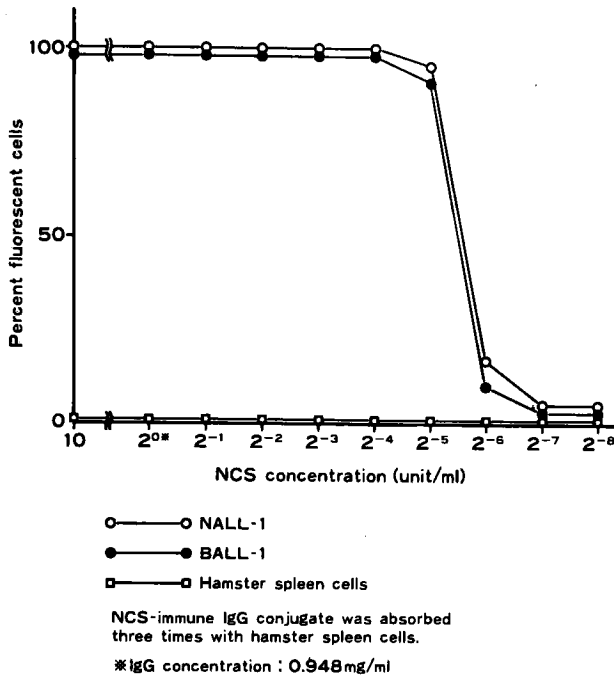


Fig. 1 Titration curves of NCS-immune IgG conjugate measured by indirect membrane immunofluorescent test

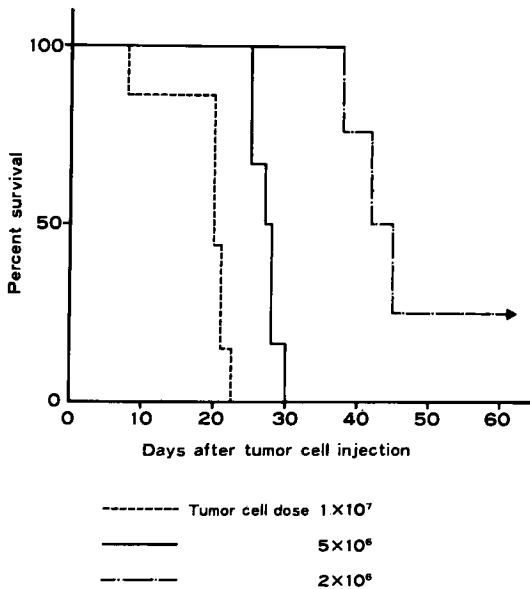


Fig. 2 Percentage of hamsters surviving after i.p. inoculation with BALL-1 cells

III. ip-ip systemにおける NCS-immune IgG の効果検討.

1) 投与 NCS 量 0.25 単位/回の実験系. Fig. 3 に NCS 濃度 5 単位/ml, 0.05ml (NCS 量にして 0.25 単位/回) を 12 回投与した場合の治療 hamster の percent survival を示した. NCS-immune IgG 投与群においては平均 95.8 日生存し他の 5 群 (NCS-normal IgG 投与群, 平均 64.2 日, NCS 投与群, 平均 49.8 日, NCS と immune IgG の混合液投与群, 平均 55.4 日, immune IgG 投与群, 平均 26.7 日, 生食投与群, 平均 25.6 日と比較していずれも危険率 0.01 以下で有意の延命効果を認めた.

2) 投与 NCS 量 0.5 単位/回の実験系. Fig. 4 に NCS 濃度 10 単位/ml, 0.05ml (NCS 量にして 0.5 単位/回) を 12 回投与した場合の percent survival を示した. NCS-

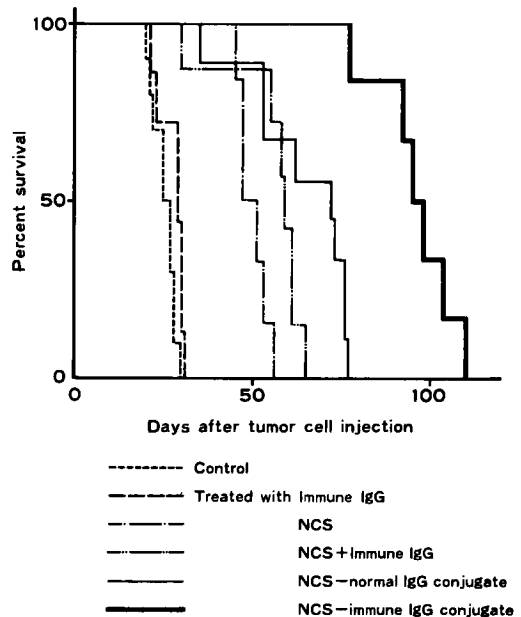


Fig. 3 Percentage of hamsters surviving after treatment with i.p. injections of NCS-immune IgG (NCS activity: 0.25 units)

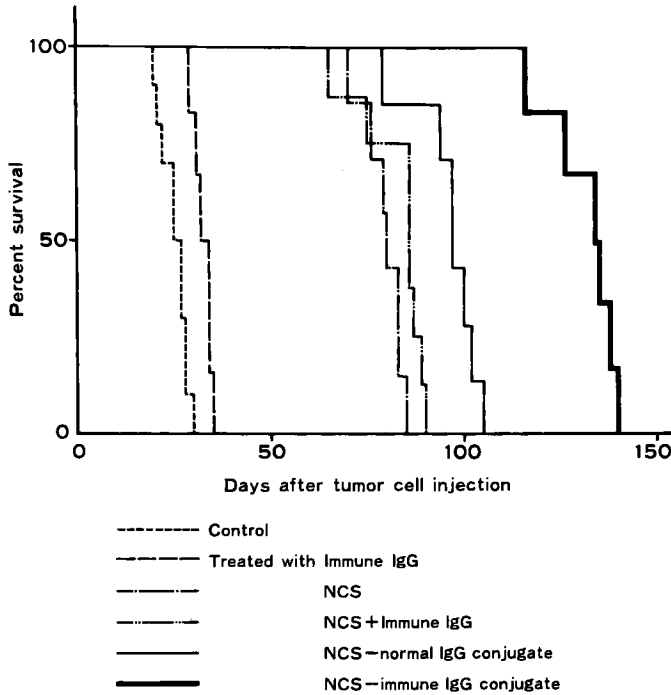


Fig. 4 Percentage of hamsters surviving after treatment with i.p. injections of NCS-immune IgG (NCS activity:0.5units)

immune IgG 投与群では平均131.3日生存し前述の0.25単位/回投与実験群と同様に他の5群(NCS-normal IgG 投与群, 平均96.3日, NCS 投与群, 平均79.4日, NCSとimmune IgGの混合液投与群, 平均79.4日, immune IgG 投与群, 平均82.9日, 生食投与群, 平均25.6日と比較して危険率0.01以下で有意の延命効果を認めた。

3) 体表より触知しうる腹腔内腫瘍形成率, Table. 1に本実験系における体表より触知しえた腹腔内腫瘍形成率を示した, NCS0.25単位/回投与群におけるNCS-immune IgG治療 hamsterの腫瘍形成率は33.3%と他の薬剤による治療群と比較して有意に低率であった。さらにNCS-immune IgG0.5単位/回投与群においては一例も腫瘍形

Table. 1 Percentage of hamsters with palpable tumors after treatment with NCS-immune IgG

Treatment		Percent of Palpable Tumors
NCS-immune IgG conjugate	0.5u	0 (0/7)
	0.25u	33.3 (2/6)
NCS-normal IgG conjugate	0.5u	57.1 (4/7)
	0.25u	87.5 (7/8)
NCS+immune IgG	0.5u	75 (6/8)
	0.25u	100 (7/7)
NCS	0.5u	87.5 (7/8)
	0.25u	100 (6/6)
Immune IgG		100 (13/13)
Control		100 (10/10)

成を認めず, 他の5群と比較して有意差を認めた。

4) 体重推移, Fig. 5にNCS濃度0.5単位/回投与した場合のhamster

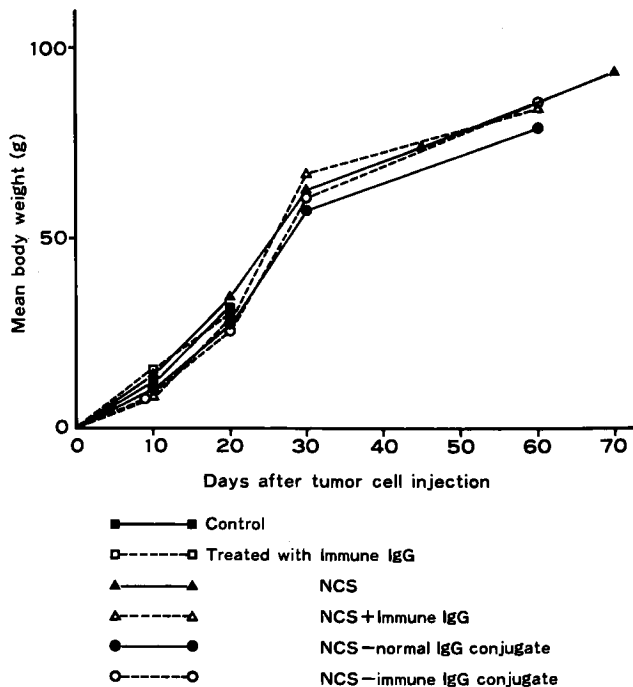


Fig. 5 Mean body weight of hamsters treated with NCS-immune IgG (NCS activity:0.5 units)

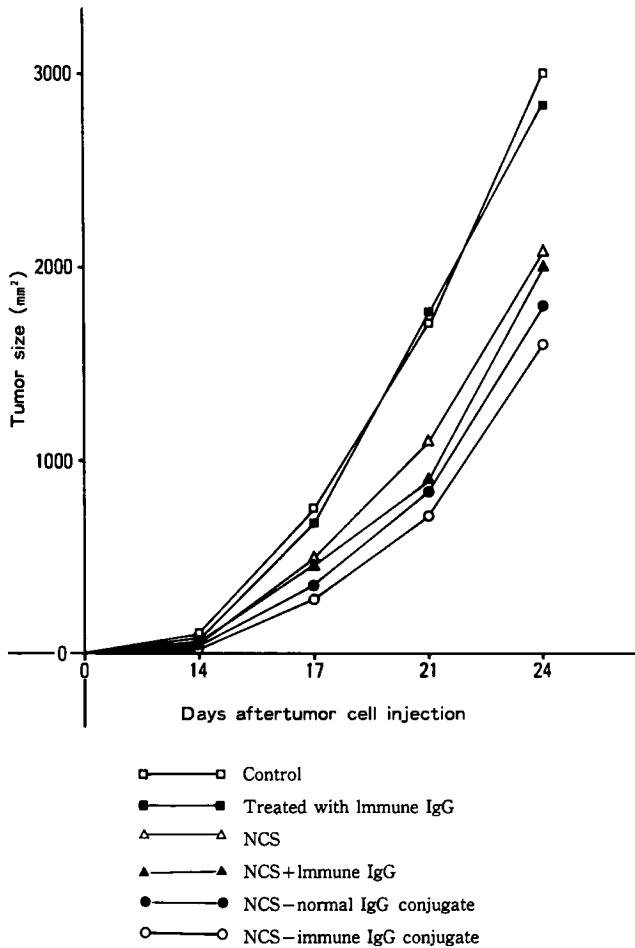


Fig. 6 Tumor size of s.c. implanted BALL-1 cells after treatment with i.p. injections of NCS-immune IgG (NCS activity:1 unit)

の体重推移を示した。この結果 NCS-immune IgG 投与群と他の 5 群を比較した場合、体重推移に差は認められなかった。

IV. sc-ip systemにおける NCS-immune IgG の効果検討。Fig. 6 は NCS 濃度 20 単位/ml, 0.05ml (NCS 量にして 1 単位/回) を 12 回投与した実験において、Day 14, 17, 21, 24 の皮下腫瘍面積を腫瘍縦径×横径の値であらわし経時的に図示したものである。NCS-immune IgG 投与群では腫瘍面積の増加は他の 5 群と比較し最も抑制されており、さらに生食投与群, immune IgG 投与群と比較した場合には危険率 0.01 以下で有意差を認めた。しかし NCS-immune IgG 投与

群の腫瘍面積をそれぞれ NCS-normal IgG 投与群, NCS 投与群, NCS と immune IgG の混合液投与群と比較した場合には有意差を認めなかった。

考 案

我々は既に NCS と immune IgG の化学的共有結合物(NCS-immune IgG)を作製し、このものが in vitro で抗体活性により細胞膜に到達、結合し、NCS 活性により細胞障害性を発揮することを報告した⁷⁾。今回はこの NCS-immune IgG の in vivo での抗腫瘍効果を hamster 継代移植系ヒト白血病細胞株 (BALL-1) 用い、腫瘍腹腔内移植-薬剤腹腔内投与方法(ip-ip system) および腫瘍皮下移植-薬剤腹腔内投与方法(sc-ip system)により検討した。この結果、ip-ip system での実験において、NCS-immune IgG は NCS-normal IgG, NCS と Immune IgG の混合液、NCS および immune IgG に比し、統計学的有意差をもって延命効果ならびに腫瘍形成抑制作用を示した。この結果は先の in vitro の実験で示された、NCS-immune IgG が NCS あるいは immune IgG 比し細胞障害

作用が勝るといふ ³H-TdR 取り込み抑制試験の結果⁷⁾と矛盾しない。この様に in vitro ならびに in vivo で確認された NCS-immune IgG のより強力な細胞障害作用は、in vitro のみならず in vivo においても NCS-immune IgG がその抗体活性により腫瘍細胞に到達、集積され、NCS の作用がより増強された結果、生じたものであると考えられる。第 1 編でも報告した如く NCS-immune IgG の蛍光抗体法で調べた膜抗原との結合活性は immune IgG とほぼ同程度に保たれていたが、一方、補体依存性細胞障害活性は ⁵¹Cr 放出試験で検討した場合有意に減弱していた⁸⁾。これらのことは NCS-immune IgG の増強され

た抗腫瘍作用が抗体の補体依存性細胞障害活性とNCS活性の相加作用に帰因するものでないことを示しており、さらにこのことはNCSとimmune IgGの混合液による治療効果がNCS-immune IgGのそれに比し有意におとるものであった今回の結果からも明らかである。

次にsc-ip systemにおいてもNCS-immune IgGは他の治療群に比較し最も皮下移植腫瘍の成長を抑制した。しかし、この抑制効果はNCSとimmune IgGの混合液およびNCS-normal IgGのそれに比し有意の差ではなかった。この様にNCS-immune IgGを腹腔内に投与し皮下腫瘍を治療した場合、ip-ip systemで認められたほど有意の抗腫瘍効果をNCS-immune IgGは発揮しなかった。この理由は現在までの実験結果ではなお明らかでないが、Hurwitzらも指摘しているごとく、NCS-immune IgGのような大分子化合物は血管外への透過性が悪く¹²⁾、この為腫瘍組織への移行が不充分であり、ip-ip systemで得られたほどの効果が発揮されなかった可能性が考えられる。今後、immune IgGをF(ab)の形に小分化しNCSのcarrierとして使用した場合について追求する必要がある。さらにもう一つの可能性として投与されたNCS量が不充分であった可能性もあり、増量することにより、より有効な結果が得られるかもしれない。

NCS-immune IgGの副作用を知る目的で体重の推移を検討したが、ip-ip systemで有効であった投与量ではハムスターの成長抑制は観察されなかった。この様にNCS-immune IgGはヒト癌治療における新しい免疫化学療法の一つとして有用なものである可能性が示されたものと考ええる。

最後に今回の実験でin vivoでの有効性が確認されたNCS-immune IgGを臨床応用する場合の問題点について若干考察する。(1) carrier抗体が異種蛋白でありその投与により産生される抗体によりアレルギー反応を惹起するか、あるいはcarrier抗体が中和されるものと考えられ、抗体産生を抑制する為steroidあるいはcyclophosphamideの併用が必要であろう。(2) NCS-immune IgG作製に際し大量の抗体を純化する

必要があり、今回の実験のごとく異種吸収抗体を使用する場合、その操作は困難である。この点、各種腫瘍抗原に対するmonoclonal antibodyの開発が報告されており、近い将来解決されるものと考えられる¹³⁾(3)sc-ip systemでも示された腫瘍組織への大分子化合物の移行も問題である¹²⁾。この点に関しては先にも述べた様にF(ab)抗体の使用により改善されよう。(4)最後に抗原・抗体結合に引き続き生ずる細胞膜抗原のmodulationによる標的細胞の免疫反応からのescapeについても解決されなければならない^{14,15)}。我々の作製したNCS-immune IgGは第1編にも報告したごとく、NCS同様capping抑制作用を保有しており、この問題点に関してはより有効なものとして期待できると考えられた。

結 語

抗腫瘍抗体結合抗癌剤NCS-immune IgGのin vivoにおける抗腫瘍効果をハムスターにBALL-1細胞を移植した系を使用し検討した。この結果、腫瘍腹腔内移植一薬剤腹腔内投与(ip-ip system)での実験においてNCS-immune IgGはNCS単独、NCSとimmune IgGの混合液、immune IgG単独、NCS-normal IgG、生食とそれぞれ比較して有意の延命効果ならびに腫瘤形成抑制効果を発揮した。さらに体重減少等の副作用は認められなかった。一方、腫瘍皮下移植一薬剤腹腔内投与(sc-ip system)での実験においてはNCS-immune IgGは他の薬剤投与群に比較し最も皮下腫瘍の増大を抑制したがその効果はNCS、NCSとimmune IgGの混合液、NCS-normal IgGと比較し有意の差をみとめなかった。以上の結果、NCS-immune IgGの腹腔内投与は、腹腔内に移植された腫瘍に対しより有効であることが示された。

稿を終るにあたり、御指導、御校閲いただきました木村郁部教授、および直接御指導いただきました坪田輝彦講師、阿部申次博士に深謝いたします。

なおこの論文の要旨は第39回日本癌学会(昭和55年11月)において発表した。

文 献

1. Mathé, G., Loc, T. et Bernard, J.: Effet sur la leucémie 1210 de la souris d'une combinaison par diazotation d'A-méthoptérine et de globulines de hamsters porteurs de cette leucémie par hétéogreffe. *C.R. Acad. Sci.* **246**, 1626—1628, 1958.
2. Moolten, F.L. and Cooperband, S.R.: Selective destruction of target cells by diphtheria toxin conjugated to antibody directed against antigens on the cells. *Science* **169**, 68—70, 1970.
3. Ghose, T., and Nigam, S.P.: Antibody as carrier of chlorambucil. *Cancer*. **29**, 1398—1400, 1972.
4. Linford, J.H., Froese, G. and Berczi, I.: An alkylating agent-globulin conjugate with both alkylating and antibody activity. *J. Natl. Cancer Inst.* **52**, 1665—1667, 1974.
5. Hurwitz, E., Levy, R. and Maron, R.: The covalent binding of daunomycin and adriamycin to antibodies, with retention of both drug and antibody activities. *Cancer Res.* **35**, 1175—1181, 1975.
6. Ishida, N., Miyazaki, K., Kumagai, K. and Rikumar, M.: Neocarzinostatin, an antitumor antibiotic of high molecular weight. *J. Antibiotics*. **18**, 68—76, 1965.
7. Kimura, I., Ohnoshi, T., Tsubota, T., Sato, Y., Kobayashi, T. and Abe, S.: Production of tumor antibody-Neocarzinostatin (NCS) conjugate and its biological activities. *Cancer Immunol. Immunother.* **7**, 235—242, 1980.
8. 佐藤融司：抗腫瘍抗体結合抗癌剤に関する研究（第1編）
抗腫瘍抗体結合 Neocarzinostatin (NCS-immune IgG) の補体依存細胞障害作用と capping 抑制効果. 岡山医学会雑誌 **94**, 9—15, 1982.
9. Miyoshi, I., Kubonishi, I. and Uchida, H.: Production of lymphoid tumors in hamsters by direct implantation of normal human peripheral and umbilical cord leucocytes. *Int. J. Cancer*. **18**, 67—75, 1976.
10. Hiraki, S., Miyoshi, I., Kubonishi, I., Matsuda, Y., Kishimoto, H. and Masuji, H.: Human leukemic null cell line (NALL-1). *Cancer*. **40**, 2131—2135, 1977.
11. Hiraki, S., Miyoshi, I., Masuji, H., Kubonishi, I., Matsuda, Y., Nakayama, T., Kishimoto, H., Chen, P. and Kimura, I.: Establishment of an Epstein-Barr virus-determined nuclear antigen-negative human B cell line from acute lymphoblastic leukemia: Brief communication. *J. Natl. Cancer Inst.* **59**, 93—94, 1977.
12. Hurwitz, E., Maron, R., Arnon, R. and Sela, M.: Fab dimers of antitumor immunoglobulins as covalent carriers of Daunomycin. *Cancer Biochem. Biophys.* **1**, 197—202, 1976.
13. Blythman, H.E., Casellas, P., Gros, P., Jansen, F.K., Paolucci, F., Pau, B. and Vidal, H.: Immunotoxins: hybrid monoclonal antibodies and a toxin subunit specifically kill tumor cell. *Nature*. **290**, 145—146, 1981.
14. Leong, S.P.L., Sutherland, C.M. and Kremenz, T.: Changes in distribution of human malignant melanoma membrane antigens in the presence of human antibody immunofluorescence. *Cancer Res.* **37**, 293—298, 1977.
15. Norquist, R.E., Anglin, J.H., Lerner, M.P.: Antibody-induced antigen redistribution and shedding from human breast cancer cells. *Science* **197**, 366—367, 1977.

Studies on antibody-anticancer drug conjugates**Part 2. In vivo study of the antibody-Neocarzinostatin conjugate
(NCS-immune IgG)****Yuji SATO****Second Department of Internal Medicine, Okayama University Medical School****(Director: Prof. I. Kimura)**

The *in vivo* antitumor activity of NCS-immune IgG (NCS conjugated with rabbit IgG antibody against the human leukemia cell line NALL-1) was evaluated in immunosuppressed newborn Syrian hamsters implanted with a transplantable human leukemia cell line (BALL-1). After *i.p.* injection of the conjugate, hamsters preinoculated *i.p.* with BALL-1 cells survived longer than hamsters treated with control solutions ($p < 0.01$). The control solutions included NCS, immune IgG, a mixture of NCS and immune IgG, NCS-normal IgG conjugate and physiological saline. Growth retardation was not observed in NCS-immune IgG treated hamsters. The growth of *s.c.* implanted BALL-1 tumors was inhibited by *i.p.* administrations of NCS-immune IgG, however, the degree of inhibition was not significantly different from that obtained by NCS alone, a mixture of NCS and immune IgG or NCS-normal IgG conjugate. These results indicate that NCS-immune IgG was effective against *i.p.* implanted BALL-1 tumors, but was not so effective against *s.c.* implanted tumors.