

抗腫瘍抗体結合 Neocarzinostatin (NCS) による免疫化学療法の研究

第 2 編

抗体結合 Neocarzinostatin (NCS-immune IgG) の生物学的活性の検討

岡山大学医学部第 2 内科 (主任: 木村郁郎教授)

古 林 太 加 志

(昭和57年 4 月14日受稿)

Key words: 免疫化学療法,
抗腫瘍抗体結合抗癌剤,
Neocarzinostatin.

結 言

著者は第 1 編において Neocarzinostatin (NCS) と人急性リンパ球性白血病細胞株 (NAL L-1) に対する家兎 IgG 抗体 (immune IgG) を water soluble carbodiimide (WSCD) を用いて covalent に結合し, 得られた NCS と Immune IgG の結合物, NCS-immune IgG が NCS 活性を有し, かつ温度ならびに凍結融解に安定であることを報告した¹⁾.

すでに, 抗腫瘍抗体を各種抗癌剤に結合させ, 腫瘍選択性を付加せんとする試みは種々なされているが^{2-5, 17)}, その臨床応用には幾多の問題がある。その内, 基本的な問題の一つとして, 抗癌剤と抗腫瘍抗体を結合することによりその分子量が大きくなり, それ自身細胞内に入ることができず, さらにこのものは抗体作用により細胞表面に到達するが, 強固な結合のため, 抗癌剤が抗体から free のものとして遊離され得ず, 抗癌剤の抗腫瘍効果が抗体との結合により, 充分発揮されない可能性がある。

NCS は第 1 編でも述べたごとく細胞内に入ることなく, 細胞表面の receptor と結合して抗腫瘍効果を発揮する特異な抗癌剤であり⁶⁻⁸⁾, この NCS と腫瘍抗体を結合させ得られた NCS-immune IgG は NCS 活性即ち *Sarcina lutea*

増殖抑制作用を保有していた。

本編では, NCS-immune IgG の NALL-1 細胞に対する抗体活性ならびに細胞障害活性を trypan blue 法および ³H-TdR 取り込み抑制試験により検討した結果を報告する。

実験材料及び実験方法

1) 腫瘍細胞

当教室の平木らにより, null 細胞型急性リンパ球性白血病患者より樹立された NALL-1 細胞株を使用した^{9, 10)}。NALL-1 細胞は 37°C, 5% CO₂ のふらん器内にて RPMI 1640 に 20% 牛胎児血清 (FCS) と抗生物質を加えた培養液中で維持した。

2) 抗 NALL-1 細胞血清の作製及び免疫グロブリンの精製

NALL-1 細胞を生食にて洗浄後, 5×10⁶/ml の NALL-1 細胞浮遊液とし, 家兎 1 匹あたり 4.0×10⁷ の NALL-1 細胞を静注し免疫した。この操作を 2 週間隔で計 4 回行い, 最後の免疫より 1 週間後に採血し, 血清も分離した。この得られた家兎抗 NALL-1 血清を 56°C 30 分間の非働化後 -20°C にて保存した。さらにこの血清を硫酸塩析法, ならびに DEAE セルロースクロマトグラフィー法により IgG (immune IgG) を分離精製し用いた。

3) 化学療法剤及びその他の化学物質

NCS は科薬抗生物質研究所より供与された, 1-hydroxybenzotriazole (Hobt) 及び, 1-ethyl-3-(3-dimethyl-aminopropyl)-carbodiimide (W SCD) は国産化薬より購入し使用した。

4) NCS と immune IgG の結合

NCS 100mg を生食 12.5ml に溶解し Hobt 13.4mg と WSCD 19.1mg を加え, 室温にて 1 分間攪拌後, immune IgG 5ml (IgG として 96 mg) を加え室温, 遮光下で 17 時間反応させた。

反応後溶液を Sephadex G 200 カラムにてゲル濾過し NCS 結合 immune IgG (NCS-immune IgG) を作製した。この詳細は第 1 編にて報告したが, NCS-immune IgG は sephadex G 200 分画の Fr. 1 および Fr. 2 として得られたものを用い, 特に記述しない場合は Fr. 2 を NCS-immune IgG として用いた。また正常家免血清より得た IgG (nonimmune IgG) を使用し, 同様の方法にて NCS 結合正常家免 IgG (NCS-nonimmune IgG) を作製した。この得られた分画をそれぞれ polyethylene glycol 20,000 にて濃縮し, PBS を使用し透析を行った後 -20°C にお冷凍保存した。

5) 蛍光抗体法による検討

NCS-immune IgG と家免抗 NALL-1 血清 (immune IgG) の抗体活性を間接膜蛍光抗体法にて検討した。すなわち NCS-immune IgG, immune IgG, NCS-nonimmune IgG あるいは NCS を NALL-1 細胞と 4°C , 1 時間反応させた後, 充分洗浄し, 二次抗血清を加えさらに 4°C , 1 時間反応させた。二次抗血清は FITC 標識ヤギ抗家免 IgG (7S) 血清を使用した。さらに NCS-immune IgG と NALL-1 細胞反応後, NCS-immune IgG の NCS の局在を知る目的で, 二次抗血清として FITC 標識家免抗 NCS 抗体を用い, あわせ検討した。

反応終了後, 充分洗浄し 50% glycerol 加 PBS を 1 滴加え, オリンパス製落射型蛍光顕微鏡にて観察した。

6) trypan blue 法による殺細胞効果の検討

NCS, NCS-immune IgG を 20% FCS 加 RPMI 1640 にて各濃度に希釈し, 各々に NALL-1 細胞を加えた。NALL-1 細胞は最終的に $1.0 \times$

$10^6/\text{ml}$ に調整した。 37°C , 5% CO_2 のふらん器内で 48 時間培養後 trypan blue を 1 滴加え光顕下に観察した。NALL-1 細胞の生細胞率は,

$$\text{生細胞率} = \frac{\text{生細胞数}}{\text{全細胞数}}$$

とした。さらに NCS-immune IgG と NCS-nonimmune IgG の殺細胞効果の比較検討は上記と同様の方法で 1 時間培養後, 生細胞率を求め検討した。

7) ^3H -Thymidine (^3H -TdR) 取り込み抑制率の検討

各試験管に 2.0×10^6 の NALL-1 細胞を入れ, 20% FCS 加 RPMI 1640 で希釈した各濃度の NCS, NCS-immune IgG, immune IgG または NCS-nonimmune IgG 1 ml を加えた後 37°C , 2 時間培養した。その後各試験管に $1 \mu\text{Ci}/\text{ml}$ の ^3H -TdR, 1 ml を加え, 1 時間培養した。なお同様条件下で 20% FCS 加 RPMI 1640 のみで培養した NALL-1 細胞の ^3H -TdR 取り込みをコントロールとした。培養後 NALL-1 細胞を millipore filter に harvest し, 液体シンチレーションカウンターにて測定した。

実験は全て triplicate にておこない, ^3H -TdR 取り込み抑制率は次式により求めた。

$$^3\text{H-TdR 取り込み抑制率} =$$

$$\frac{\text{コントロールのカウント} - \text{実験チューブのカウント}}{\text{コントロールのカウント}}$$

結 果

1) NCS-immune IgG の抗体活性の検討

NALL-1 細胞を標的細胞として用いて行なった膜蛍光抗体法の結果は Table 1 のとおりである。Sephadex G 200 分画の内, NCS-immune IgG 分画である Fr. 1 及び Fr. 2 あるいは immune IgG を一次抗体として NALL-1 細胞に反応させた後, FITC 標識ヤギ抗家免 IgG を二次抗体として加えたところ, 殆んど 100% の NALL-1 細胞に強い膜蛍光が認められた。一方, 一次抗体として Sephadex G 200 分画の内, NCS-immune IgG でない分画 Fr. 3, Fr. 4 さらに NCS, NCS-nonimmune IgG を使用した場合には, 膜蛍光は全く見られなかった。次に, NCS-immune IgG の Fr. 1 及び Fr. 2 を一次抗

1st antibody	2nd antibody	cell surface fluorescence	
NCS-immune IgG	Fr.1	FITC-anti-NCS	+
	Fr.2	FITC-anti-NCS	+
	Fr.3	FITC-anti-NCS	-
	Fr.4	FITC-anti-NCS	-
NCS-nonimmune IgG	Fr.1-4	FITC-anti-NCS	-
immune IgG		FITC-anti-NCS	-
NCS		FITC-anti-NCS	-
NCS-immune IgG	Fr.1	FITC-anti-rabbit 7S	++
	Fr.2	FITC-anti-rabbit 7S	++
	Fr.3	FITC-anti-rabbit 7S	-
	Fr.4	FITC-anti-rabbit 7S	-
NCS-nonimmune IgG	Fr.1-4	FITC-anti-rabbit 7S	-
immune IgG		FITC-anti-rabbit 7S	++
NCS		FITC-anti-rabbit 7S	-

Table 1. Reactivities of NCS-immune IgG, NCS-nonimmune IgG, immune IgG or NCS to NALL-1 cells tested by the indirect membrane immunofluorescent technique.

+, approximatory 100% of NALL-1 cells were positive.

++, 100% of NALL-1 cells were strongly positive.

体とし、FITC 標識家兎抗 NCS 血清を二次抗体として使用したところ、殆んど100%の NALL-1 細胞に膜蛍光が認められた(Fig. 1)。しかしその蛍光は FITC 標識抗家兎 IgG によるそれに比し弱かった。一方、Fr. 3, Fr. 4, immune IgG, NCS および NCS-nonimmune IgG を NALL-1 細胞に反応させた場合 FITC 標識抗 NCS 抗体はまったく反応しなかった。以上の結果は、NCS-immune IgG が NALL-1 細胞に対する抗体活性を保持し、この抗体活性により NALL-1 細胞に NCS-immune IgG が結合した結果、細胞膜上に NCS が局在することを明確に示すものである。また、本実験において二次抗体として FITC 標識抗 NCS 抗体を用いた場合、細胞質内での蛍光は認められず、NCS-immune IgG として用いた Fr. 1, Fr. 2 に free の NCS が混在する可能性ならびに NCS-immune IgG が表面に結合後

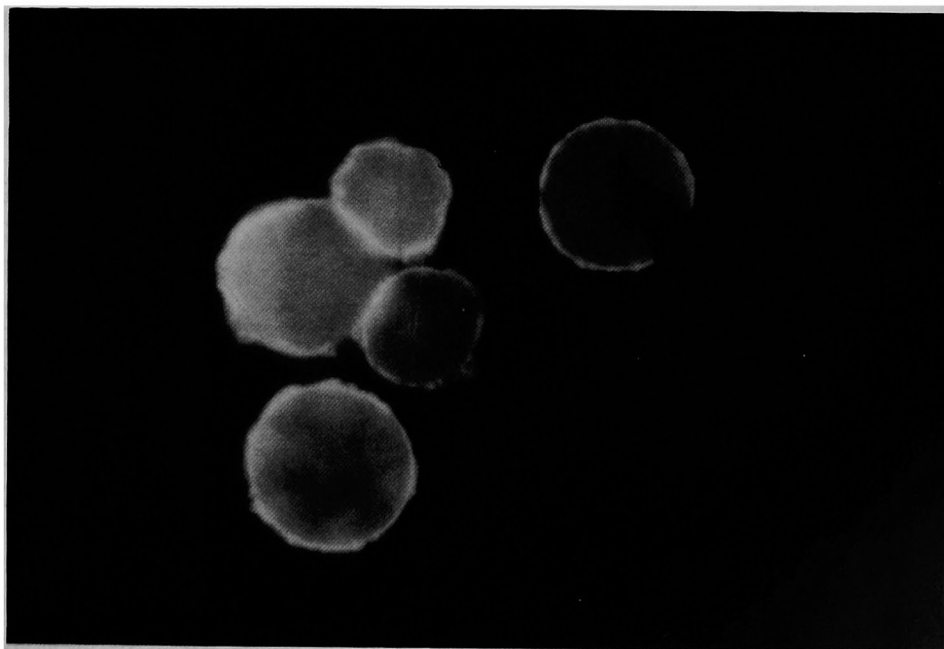


Fig. 1. NALL-1 cells were stained with NCS-immune IgG and FITC labeled rabbit anti-NCS antibodies. Membrane immunofluorescence indicates the localization of NCS.

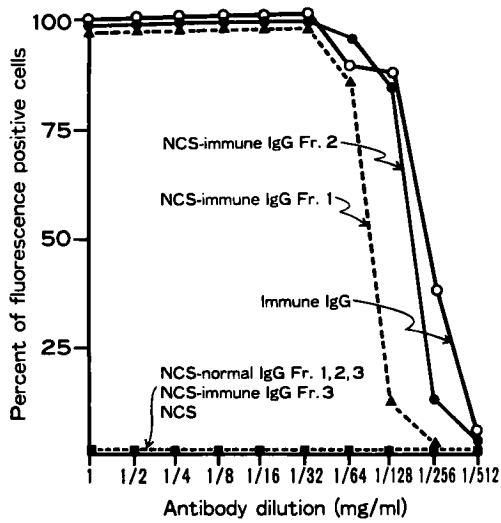


Fig. 2. Comparison of antibody activities before and after conjugation.

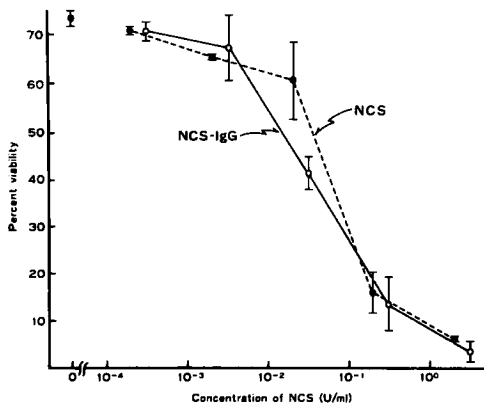


Fig. 3. Cytotoxic activities of NCS-immune IgG and NCS to NALL-1 cells after 48 hour exposure.

free の NCS が遊離し細胞内へ入った可能性は否定的であった。

Immune IgG と NCS-immune IgG である Fr. 1 と Fr. 2 の抗体活性を膜蛍抗体法で比較した結果が Fig. 2 である。Immune IgG 及び NCS-immune IgG の Fr. 2 では 1/128 mg/ml の希釈においてもほぼ100%の NALL-1 細胞に膜蛍光が認められた。これは NCS と immune IgG の結合前後で immune IgG の抗体活性に有意の変化がないことを示すものであり、NCS との結合に

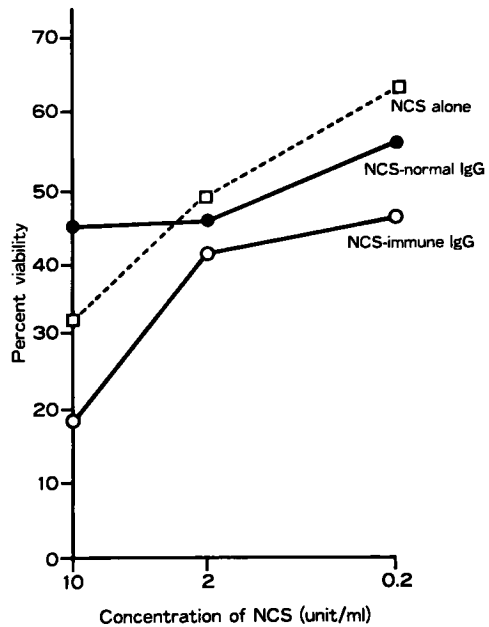


Fig. 4. Cytotoxic activities of NCS-immune IgG, NCS-nonimmune IgG and NCS alone to NALL-1 cells after 1 hour exposure.

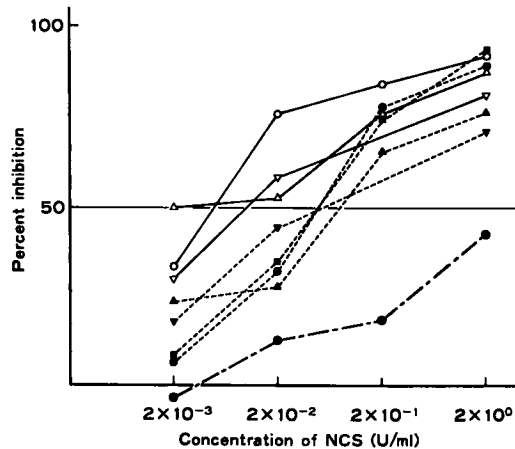


Fig. 5. Effects of NCS-immune IgG, NCS alone and immune IgG on ³H-TdR incorporation in NALL-1 cells. —, NCS-immune IgG, ·····, NCS alone; - - - - - , immune IgG

よる immune IgG の抗体活性の低下はほとんどなかったものと考えられた。

2) NCS-immune IgG の NALL-1 細胞に対す

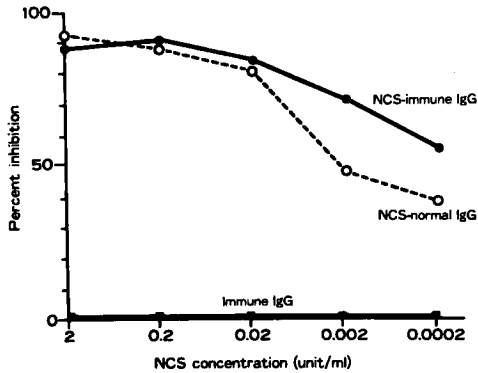


Fig. 6. Effects of NCS-immune IgG and NCS-nonimmune IgG on ^3H -TdR incorporation in NALL-1 cells.

る NCS 活性の検討

Fig. 3 に示すように、NCS-immune IgG と NCS を各濃度にて NALL-1 細胞と 48 時間反応させ、trypan blue 法にて生細胞率を比較検討したところ、NCS-immune IgG と NCS 単独の殺細胞効果はほぼ同等であった。次に NCS-immune IgG、NCS-nonimmune IgG および NCS の NALL-1 細胞に対する効果を比較した。この実験では 10u/ml, 2u/ml, 0.2u/ml の 3 濃度で 1 時間培養し、trypan blue 法にて細胞毒性を比較検討した (Fig. 4)。この結果、NCS-immune IgG は NCS 単独および NCS-nonimmune IgG より強い細胞毒性を有していた。

Fig. 5 に ^3H -TdR 取り込み抑制試験による NCS-immune IgG の NALL-1 細胞に対する効果を NCS 単独ならびに immune IgG と比較検討した結果を示す。この結果、 ^3H -TdR 取り込みを 50% 阻止する NCS-immune IgG の濃度は 1.0×10^{-2} , 0.5×10^{-2} , 0.2×10^{-2} u/ml, 平均 $0.6 \times 10^{-2} \pm 0.4 \times 10^{-2}$ u/ml であり、NCS 単独では 3.4×10^{-2} , 4.8×10^{-2} , 5.9×10^{-2} , 7.8×10^{-2} , 平均 $5.5 \times 10^{-2} \pm 1.9 \times 10^{-2}$ u/ml であった。t 検定では、この 2 群間には 0.05 以下の危険率で有意差があり、NCS-immune IgG は NCS 単独より強い ^3H -TdR 取り込み抑制作用を有していた。なお Immune IgG にはさらに弱い ^3H -TdR 取り込み抑制作用が認められた。同様の方法でおこなった NCS-immune IgG と NCS-nonimmune IgG の効果の比較結果を Fig. 6 に示したが、

NCS-immune IgG が NCS-nonimmune IgG より強い ^3H -TdR 取り込み抑制作用を有することが示された。

考 按

著者は第 1 編において NCS と immune IgG を WSCD を用いて covalent に結合させ、NCS-immune IgG を作製し、NCS-immune IgG が NCS 活性即ち、*Sarcina lutea* 増殖抑制作用を有していることを報告した。

今回の研究では、in vitro における NCS-immune IgG の NALL-1 細胞に対する抗体活性および細胞障害活性を検討した。この結果、膜蛍光抗体法により NCS-immune IgG が NALL-1 細胞に対する抗体活性を有しており、この活性は結合前の immune IgG のそれとほぼ同程度であることが示された。さらに NCS-immune IgG は NALL-1 細胞と反応後、その NCS が細胞膜上に局在することを証明した。

Hurwitz らは Daunomycin と抗腫瘍抗体を periodate binding にて covalent に結合し、B SA-T4 バクテリオファージの不活性化にて抗体活性の変化を検討し、結合後 45% の抗体活性の低下が見られたと報告した¹¹⁾。今回の研究では NCS と immune IgG を WSCD にて結合したが、得られた NCS-immune IgG を NALL-1 細胞と反応させたところ、殆んど 100% の NALL-1 細胞膜表面に結合しており、さらに NCS-immune IgG と immune IgG 溶液について膜蛍光抗体法によりその抗体活性を比較したところ、NCS-immune IgG は immune IgG とほぼ同じ抗体活性を示した。この結果は結合による抗体活性の低下は殆んどないことを示すものであり、今回著者らの行なった WSCD を用いる結合方法は Hurwitz らの Periodate binding にまさる方法であると考えられた。

次に NCS-immune IgG の NALL-1 細胞に対する細胞障害活性を ^3H -TdR 取り込み抑制試験ならびにトリパンブルー法により検討した結果、 ^3H -TdR 取り込み抑制試験では NCS-immune IgG の細胞毒性は NCS 単独ならびに NCS-nonimmune IgG より強いことが証明された。さらにトリパンブルー法によっても NCS-immune

IgG の細胞毒性が NCS 単独または NCS -nonimmune IgG と同程度かやや強いことが示された。これらの結果は NCS の抗腫瘍活性が immune IgG との WSCD を用いた covalent な結合により、減弱されず、むしろ結合により抗腫瘍活性が増強されることを示すものである。

この研究では、著者は膜蛍光抗体法を行い、NCS-immune IgG の NCS ならびに immune IgG が細胞表面に局在することを証明した。膜蛍光法では、死細胞においては細胞質内にも蛍光が見られたが生細胞では膜蛍光のみ観察され、細胞質内には蛍光が全くみられなかった。このことは NCS-immune IgG が NALL-1 細胞内に入ることなく、細胞障害活性を發揮するものであることを明確に示している。

現在まで NCS が腫瘍細胞に対して細胞毒性を發揮する機序は完全には解明されていないが、以下のごとき 2, 3 の興味ある知見が報告されている。すなわち、Lazarus らは NCS を agarose と結合させても NCS が白血病細胞株 CC RF-CEM 細胞に対して細胞毒性を示し、NCS が腫瘍細胞に入ることなくその作用を發揮することを報告し、NCS が腫瘍細胞膜に何らかの形態学的変化を惹起することにより、その標的部に殺細胞効果を伝達するのであろうと考案している¹²⁾。また Ebina らは NCS の Hela 細胞に対する Microtubular paracrystal の形成阻止を見出し⁸⁾、その細胞毒性は腫瘍細胞表面の receptor に結合することにより、microtubulus を介して發揮されると報告した。この様に NCS は細胞内に入ることなく抗腫瘍効果を發揮するユニークな抗癌剤であると考えられ、著者らの今回の実験結果もまた NCS のこのユニークな作用を証明するものである。抗体というような大分子の物質を結合し、その薬剤に特異性を付与しようとする、かかるアプローチにとって NCS は合目的な抗癌剤であると考えられる。

この研究に使用した immune IgG は吸収操作を行ってなく、腫瘍特異的なものばかりではない。しかしこの研究目的は NCS と immune IgG を結合した後も抗体活性及び抗癌剤の抗腫瘍活性が保持されることを証明することであり、非特異的な immune IgG で充分であると考えられた。

当教室の宇野らは、抗 NALL-1 IgG を種々の細胞で吸収し、抗 NALL-1 特異抗体を作成し、その抗体は null 細胞型急性リンパ球性白血病及びリンパ腫細胞に特異的に反応することを証明した¹³⁾。さらに最近 Köhler と Milstein により開発された hybridoma の技術¹⁴⁾ を応用し、諸 monoclonal antibody に関する研究が行われてきた^{15,16)}。1980年 Ritz らはこの方法により C ALLA と呼ばれる急性リンパ球性白血病および急性転化した慢性骨髄性白血病細胞に存在する膜抗原と特異的に反応する monoclonal antibody を作製したと報告している¹⁵⁾。かかる吸収血清あるいは monoclonal antibody を用いるならば、人リンパ球系腫瘍の免疫化学療法として用いえる抗腫瘍特異抗体結合 NCS の作製が可能であると考えられる。

現在、ハムスター移植系人白血病細胞を用い、in vivo での NCS-immune IgG の有効性を検討中である。

結 語

腫瘍細胞表面の receptor に作用して、抗腫瘍効果を發揮すると言われている特異な抗癌剤 NCS と家兎抗 NALL-1 IgG を WSCD を用いて covalent に結合し、NCS-immune IgG を作製した。

NCS-immune IgG は NALL-1 細胞に対し NCS とほぼ同程度の細胞障害作用を保有しており、また、³H-TdR 取り込み抑制作用は NCS にまざっていた。さらに膜蛍光抗体法にて NCS-immune IgG が NALL-1 細胞膜に局在することが観察された。

以上の結果は NCS-immune IgG が NCS 活性及び抗体活の両者を共に保持するものであり、抗体活性により細胞膜と結合後、膜表面に存在する NCS が細胞障害作用を發揮することを示すものである。

NCS-immune IgG は人悪性腫瘍の治療に応用し得る可能性があり、現在 NCS-immune IgG の in vivo での効果について検討中である。

御指導いただいた木村郁郎教授ならびに坪田輝彦博士、阿部申次博士に深謝致します。

文 献

1. 古林太加志：抗腫瘍抗体結合 Neocarzinostatin(NCS) による免疫化学療法の研究 第1編 抗体結合 Neocarzinostatin(NCS-immune IgG) の作製。岡山医学会雑誌, **93**, 931—939, 1981.
2. Davis, D.A.L.: The combined effect of drugs and tumor specific antibodies in protection against a mouse lymphoma. *Cancer Res.* **34**, 3040—3043, 1974.
3. Guclu, A., Ghose, T., Tai, J. and Mammen, M.: Binding of chlorambucil with antitumor globlins and its effect on drug and antibody activities. *Eur. J. Cancer* **12**, 95—100, 1976.
4. Levy, R., Hurwitz, E., Maron, R. and Sela, M.: The specific cytotoxic effects of Daunomycin conjugated to antitumor antibodies. *Cancer Res.* **35**, 1182—1186.
5. Moolten, F.L., Capparel, N.J., Zajdel, S.H. and Cooperband, S.R.: Antitumor effects of antibody-diphtheria toxin conjugates. II. Immunochemotherapy with conjugates directed against tumor antigens induced by Siman virus 40. *J. Natl. Cancer Inst.* **55**, 473—477, 1975.
6. Ishida, N., Miyazaki, K., Kumagai, K. and Rikimaru, M.: Neocarzinostatin, an antitumor antibiotic of high molecular weight. *J. Antibiot. Tokyo Ser. A.* **18**, 68—76, 1965.
7. Maeda, H., Glaser, G.B., Kuromizu, K. and Meienhoffer, J.: Structure of the antitumor protein Neocarzinostatin. amino acid sequence. *Arch. Biochem. Biophys.* **164**, 379—385, 1974.
8. Ebina, T., and Ishida, N.: Inhibition of formation of microtubular paracrystals in Hela-S3 cells by Neocarzinostatin. *Cancer Res.* **35**, 3705—3709, 1975.
9. Hiraki, S., Miyoshi, I., Kubonishi, I., Matsuda, Y., Nakayama, T., Kishimoto, H. and Masuji, H.: Human leukemic NULL cell line (NALL-1). *Cancer* **40**, 2131—2135, 1977.
10. Miyoshi, I., Hiraki, S., Tsubota, T., Kubonishi, I., Matsuda, Y., Nakayama, T., Kishimoto, H. and Kimura, I.: Human B cell, T cell and null cell leukemic cell lines derived from acute lymphoblastic leukemias. *Nature* **843—844**, 1977.
11. Hurwitz, E., Levy, R., Maron, R., Wilchek, M., Arnon, R. and Sela, M.: The covalent binding of Daunomycin and Adriamycin to antibodies, with retention of both drug and antibody activities. *Cancer Res.* **35**, 1175—1181, 1975.
12. Lazarus, H., Raso, V. and Samy, T.S.A.: In vitro inhibition of human leukemic cells(CCRF-CEM) by agarose-immobilized Neocarzinostatin. *Cancer Res.* **37**, 3731—3736, 1977.
13. Uno, J., Tsubota, T., Miyoshi, I., Hiraki, S., Nakamura, K. and Kimura, I.: Characterization of rabbit against a human leukemic cell line. In *Proceedings of 37th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association*, Hitotsubashi Press, Tokyo, p. 62. 1978.
14. Köhler, G. and Milstein, C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**, 495—497, 1975.
15. Ritz, J., Pesando, J.M., Notis-McConarty, J., Lazarus, H. and Shlossman, S.F.: A monoclonal antibody to human acute lymphoblastic leukemia antigen. *Nature* **256**, 493—495, 1980.
16. Yelton, D.E. and Scharff, M.D.: Monoclonal antibodies; a powerful new tool in biology and medicine. *Ann. Rev. Biochem.* **50**, 657—680, 1981.
17. Ghose, T., Norvell, S.T., Guclu, A., Bodurtha, A., Tai, J. and MacDonald, A.S.: Immunochemotherapy of malignant melanoma with Chlorambucil-bound antimelanoma globulins: Preliminary results in patient with disseminated disease. *J. Natl. Cancer Inst.* **845—852**, 1977.

Immunochemotherapy with tumor antibody-Neocarzinostatin (NCS) conjugates.

**Part II. Biological activities of antibody-NCS conjugates
(NCS-immune IgG)**

Takashi KOBAYASHI

Department of Internal Medicine, Okayama University Medical School

(Director: Prof. I. Kimura)

Anti-NALL-1 rabbit IgG was incubated with NCS, an unique membrane-reactive anticancer antibiotic, in the presence of water-soluble carbodiimide. The resulting mixture contained NCS-immune IgG. The conjugates inhibited the growth and ^3H -TdR incorporation of human leukemia cell line (NALL-1) cells. A membrane immunofluorescent test with FITC-labeled rabbit anti-NCS and goat anti-rabbit IgG antibodies showed specific localization of NCS-immune IgG on NALL-1 cell surfaces. These results indicate that NCS-immune IgG retains both NCS and antibody activities, and NCS-immune IgG should be useful for cancer therapy.