

抗腫瘍抗体結合抗癌剤の研究

第 2 編

抗ヒト Ia 単クローン抗体結合

Neocarzinostatin の in vivo 抗腫瘍効果

岡山大学医学部第二内科教室（主任：木村郁郎教授）

岡 崎 守 宏

（昭和59年3月14日受稿）

Key words : Monoclonal antibody-Neocarzinostatin conjugate
Transplantable human leukemia cells
In vivo antitumor activity

緒 言

悪性腫瘍の化学療法において、抗癌剤をより癌細胞に選択的に集中させ、癌特異的抗癌作用を発揮させることを意図して、抗癌剤を抗腫瘍抗体と結合した抗体結合抗癌剤の作製が試みられ、既にいくつかの報告がある^{1,2,3,4,5)}。

我々も細胞表面で細胞障害性を発揮する特異な抗癌剤 Neocarzinostatin (NCS)⁶⁾ と抗ヒト白血病細胞抗体とを共有結合させ、得られた抗体結合 NCS の有用性を in vitro のみならず in vivo においても確認し報告した⁷⁸⁾。

しかし、これらの試みにおいて使用された抗腫瘍抗体は異種吸収血清であるため、均一な抗体を大量に得ることが困難であり、抗体結合抗癌剤の臨床応用を阻む要因のひとつとなっていた。近年 Köhler と Milstein により開発された細胞隔合法による単クローン抗体作製法は⁹⁾、この問題を解決するものであり、著者は第1編において、教室で作製された抗ヒト Ia 単クローン IgM 抗体 (H-2 抗体)¹⁰⁾ と NCS との共有結合物 (H-2-NCS) を作製し、これが in vitro において抗体活性に依存する増強された抗腫瘍効果を有することを報告した¹¹⁾。

本論文では家兎抗ハムスター胸腺血清により免疫抑制した新生児ハムスターに移植された Ia 抗原陽性急性白血病細胞株, BALL-1 に対する

H-2-NCS の in vivo 抗腫瘍効果を検討した結果を報告する。

実験材料および方法

1) 動物

雑種 syrian hamster (津田動物, 香川県) を使用した。

2) Rabbit anti-hamster thymocyte serum (ATS) の作成

生後3～4週のハムスターの胸腺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（生食）にて3回洗浄後、生細胞数を測定、 1×10^9 個を7mlの生食に浮遊し、家兎に静注免疫した。免疫は2週間毎に2回行ない最終免疫より1週間後に採血し血清 (ATS) を得た。ATS は56℃30分間補体の非動化を行った。後、-20℃で保存した。

3) 細胞

In vivo 抗腫瘍効果の検討のため、標的細胞としてB細胞型急性リンパ球性白血病患者末梢血より樹立され、ATS 処理新生ハムスターに継代維持されている Ia 抗原陽性細胞株 BALL-1 を用いた¹²⁾。実験を標準化するため、BALL-1 細胞をハムスター移植腫瘍より集め、10%の dimethyl sulfoxide を含む10%牛胎児血清加 RPMI1640 に浮遊した後、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。

4) 使用薬剤の作製法

H-2-NCS の抗腫瘍効果を検討するため、以下の薬剤を使用し効果を比較した。即ち、(1)NCS (2)H-2 抗体¹⁰⁾ (3)H-2-NCS¹¹⁾ (4)肺癌細胞株を免疫原として得られた単クローン IgM 抗体で BALL-1 には反応しない LA-4 抗体と NCS との結合物 (LA-4-NCS) (5)H-2 IgM 抗体の還元分解物である IgM sub-unit (H-2s 抗体) (6) H-2s 抗体と NCS との結合物 (H-2s-NCS) を用いた。

H-2 抗体の分離法並びに H-2-NCS の作製法は第 1 編で報告した¹¹⁾。また IgM である LA-4 抗体は H-2 抗体と同様に分離し、H-2-NCS 作製と同じく carbodiimide にて NCS との共有結合物 (LA-4-NCS) を作製した。

より分子量の小さな抗体結合抗癌剤作製を意図して五量体である H-2 IgM 抗体を dithiothreitol (DTT, 半井化学薬品, 京都)により還元分解して IgM sub-unit (IgMs, 分子量18万)を得た¹³⁾。即ち、H-2 抗体を0.01M DTT を含む0.2M Tris-HCl 緩衝液 (pH8.6) に溶解し、室温にて1時間反応を進めた後、Sephadex G-25 M (Pharmacia, Sweden) にて phosphate-buffered saline (PBS) に緩衝液を変換し、PBS で平衡化した Sephacryl S-300 (Pharmacia) でゲル濾過した。得られた IgMs 分画を、H-2-NCS 同様、carbodiimide の存在下で NCS と結合、Sephacryl S-300でゲル濾過しH-2s-NCS を得た。この H-2s-NCS は以下に述べる NCS 活性ならびに抗 Ia 抗体活性を保有していた。

5) 薬剤の NCS 活性および抗体活性の検討

薬剤の NCS 活性は、寒天培地上の *Sarcina lutea* の成長抑制活性を測定し求めた。なお使用した NCS は1mg 約1500u の NCS の活性を有していた。

薬剤の標的細胞 BALL-1 に対する活性は間接膜蛍光抗体法により検討した。即ち、 3×10^6 個の BALL-1 細胞に、PBS で段階希釈した薬剤50 μ l を4℃ 30分間反応させ、PBS にて2回洗浄の後、fluorescein-isothiocyanate 標識 goat anti-mouse Ig (EY 社, USA) を加えてさらに4℃ 30分間反応させた。細胞は PBS にて

2 回洗浄後、50% Glycerin-PBS に浮遊し、その膜蛍光を落し、型蛍光顕微鏡 (Olympus, 東京) にて観察した。

6) 腫瘍移植および治療方法

H-2-NCS の in vivo 抗腫瘍効果は薬剤を腹腔内投与し、腹腔ならびに皮下移植 BALL-1 腫瘍に対し検討した。生後24時間以内の新生児ハムスターに0.1ml の ATS を腹腔内注射した後、0.05 ml の PBS に浮遊した 5×10^6 個の BALL-1 細胞を腹腔内あるいは背部皮下に接種した。この時点をも day 1 とした。引き続き day 2 に前述の薬剤を0.1ml 腹腔内投与し、day 4 には、ATS と薬剤を投与した。以後薬剤は週2回計6回、ATS は週2回実験が終了するまで投与した。薬剤は PBS に溶解し、その NCS 投与量は *Sarcina lutea* 成長抑制活性単位とし同一条件とした。また H-2 抗体、H-2s 抗体はそれぞれ H-2-NCS、H-2s-NCS に含まれる抗体量に匹敵する蛋白量を投与した。具体的な抗体投与量については結果の項に記した。

結 果

1) 投与薬剤の NCS 活性および抗体活性

投与薬剤の NCS 活性は、H-2-NCS 8.9 μ /mg H-2s-NCS 12.5u/mg, LA-4-NCS 9.7u/mg であった。

また薬剤の標的細胞 BALL-1 に対する抗体活性を図1に示した。H-2s 抗体は H-2 抗体に匹敵する抗体活性を有しており、今回用いた dithiothreitol による還元分解反応では、抗体活性の低下は認められなかった。一方、H-2-NCS、H-2s-NCS はそれぞれ H-2 抗体、H-2s 抗体に比較して弱干の活性低下が認められた。また LA-4-NCS は BALL-1 には全く反応せず、対照薬剤として使用し得ることが明らかになった。

2) BALL-1 腹腔移植ハムスターにおける抗腫瘍効果

図2は BALL-1 腹腔移植後、薬剤を腹腔内投与して治療したハムスターの生存曲線をしめしている。投与薬剤の NCS 活性は0.2u/回とした。各群の平均生存日数は、H-2-NCS 投与群55日以上 (n=12)、LA-4-NCS 投与群27日 (n=8)、H-2 抗体投与群19日 (n=4)、NCS 投

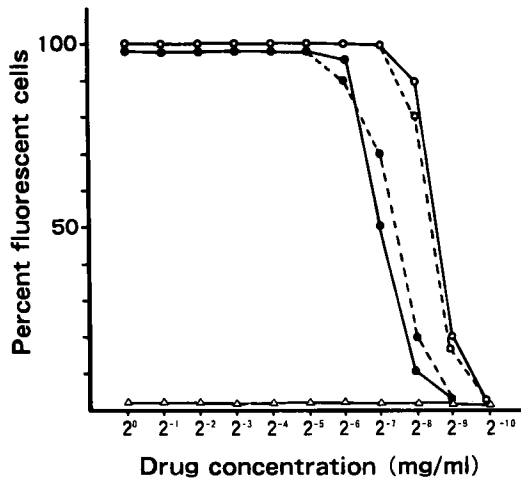


図1. 間接蛍光抗体法による薬剤の BALL-1 に対する抗体活性
H-2 抗体 (○—○), H-2s 抗体 (○—○●)
H-2-NCS (●—●), H-2s-NCS (●—●●)
LA-4-NCS (△—△)

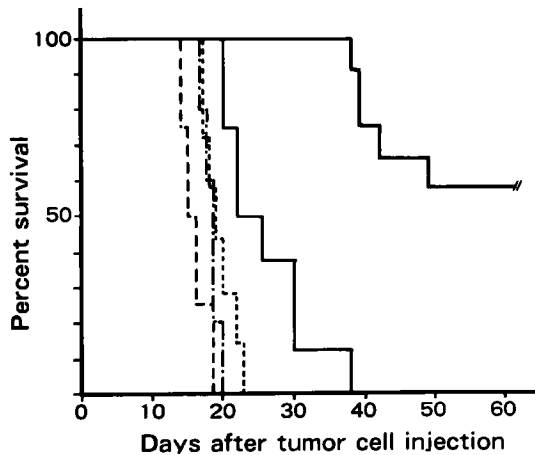


図2. BALL-1 腹腔移植ハムスターの生存曲線
ハムスターは BALL 腹腔移植の後, PBS (.....), NCS (——), H-2 抗体 (---), LA-4-NCS (——), H-2-NCS (——) を, 腹腔内投与して治療した。

与群16日 ($n=4$), PBS 投与群17日 ($n=7$) であった。即ち, H-2-NCS 投与群において最も著明な生存延長が認められ, 他のいずれの実験群との比較においても統計学的有意の差であった ($p<0.001$)。

3) BALL-1 皮下移植ハムスターにおける抗腫瘍効果

図3は, BALL-1 背部皮下移植後, 薬剤を腹

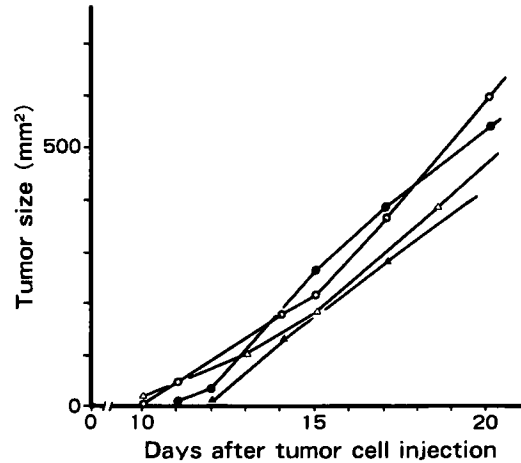


図3. 皮下移植 BALL-1 腫瘍の増殖
BALL-1 皮下移植の後, ハムスターは, PBS (○—○), NCS (●—●), H-2 抗体 (△—△), H-2-NCS (▲—▲), を腹腔内投与して治療した。

腔内投与治療した場合の腫瘍増殖を腫瘍縦径と横径の積として示したものである。薬剤の投与量は NCS 活性 1u/回とした。この結果, H-2-NCS は対照薬剤に比較し, 皮下移植腫瘍に対し有意の腫瘍増殖抑制効果を示さなかった。

以上の結果より H-2-NCS が大分子であるため皮下腫瘍局所への薬剤の移行に問題がある可能性が考えられ, H-2 IgM 抗体の sub-unit である H-2s 抗体あるいは H-2s-NCS を腹腔内投与し, 背部皮下移植 BALL-1 腫瘍を治療した。H-2s-NCS の投与量は 2u/回に増量した。図4

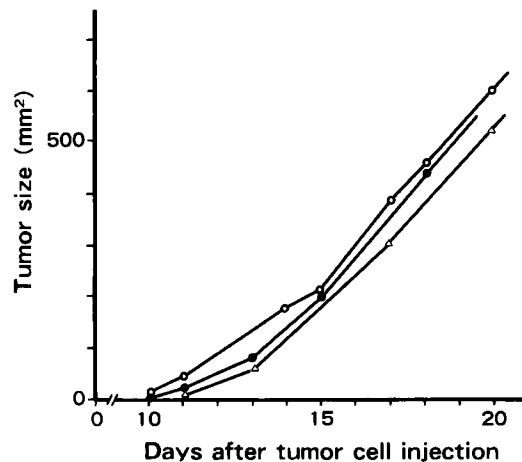


図4. 皮下移植 BALL-1 腫瘍の増殖
BALL-1 皮下移植の後, ハムスターは PBS (○—○), H-2s 抗体 (●—●), H-2s-NCS (△—△), を腹腔内投与して治療した。

にその結果を示したが、H-2s-NCS も有意の腫瘍増殖抑制効果を示さなかった。

4) ハムスターの体重増加

図5に各種薬剤を腹腔内投与したハムスター

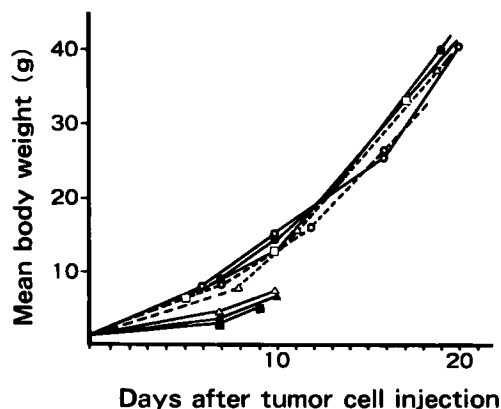


図5. ハムスターの体重増加

PBS 投与群 (○—○) NCS 投与群 (2U/回 △—△, 5U/回 △—△, 10U/回 ▲—▲), H-2 抗体投与群 (●—●), H-2-NCS 投与群 (○—○) H-2s-NCS 投与群 (2U/回 □—□, 5U/回 ■—■)

の体重増加を示した。NCS 5u/回, 10u/回, および H-2s-NCS 5u/回投与ハムスターにおいて著明な生長遅延が認められ全例10日前後に死亡した。また同時に薬剤を投与した腹壁に NCS の副作用と考えられる潰瘍形成, 発毛障害が観察された。しかし NCS 活性 2u/回を投与したハムスターには, コントロール群に比し有意の体重増加抑制は観察されなかった。

考 案

我々は既に, 抗癌剤 Neocarzinostatin をヒト白血病細胞に対する IgG 抗体と共有結合させ得られた抗体結合 NCS の有用性を *in vitro* ならびに *in vivo* 実験において確認し報告した^{7,8)}。さらに, 著者は従来使用されてきた異種吸収血清にかえ, 抗ヒト Ia マウス単クローン IgM 抗体を使用し NCS との共有結合物 (H-2-NCS) を作製, このものが *in vitro* において Ia 抗原陽性細胞表面に集積され, 増強された細胞障害性を発揮することを第1編において報告した¹⁾。今回は, 単クローン抗体を使用した抗体結合 NCS の *in vivo* 抗腫瘍効果を検討するため, ATS

にて免疫抑制したハムスターの腹腔ならびに皮下に移植した Ia 陽性白血病細胞株 BALL-1 腫瘍に対する H-2-NCS の抗腫瘍効果ならびにその副作用を検討した。

使用した H-2 抗体は腫瘍特異的抗体ではないが, ヒト Ia 抗原に対する特異抗体であり, 異種動物であるハムスターに移植した BALL-1 腫瘍に対し, 腫瘍特異的に作用するものと考えられた。

腫瘍腹腔移植ハムスターへの薬剤腹腔内投与の実験 (図2) においては, H-2-NCS は他の4群の対照薬剤に比較して, 有意にハムスターの生存を延長し, 著者が第1編において報告した H-2-NCS の増強された抗腫瘍効果が *in vivo* において確認された。

一方, 腫瘍背部皮下移植ハムスターの治療実験 (図3) においては, 腹腔内投与された H-2-NCS は対照薬剤に比して有意の腫瘍増殖抑制効果を発揮しなかった。腹腔内投与された薬剤は, 作用を発現するためには, 血中に移行しさらに皮下腫瘍組織に到達する必要があるが, H-2-NCS が大分子であるための移行の悪さが両実験系の差の原因と考えられた。このため五量体 IgM (分子量90万) である H-2 抗体を dithiothreitol により還元して, その monomer subunit (H-2s 抗体, 分子量18万) を得, さらにこのものと NCS との共有結合物 (H-2s-NCS) を作製, これらによる治療実験 (図3) を試みた。しかし, H-2s-NCS も皮下移植腫瘍に対し有意の腫瘍増殖抑制効果を発揮しなかった。何故皮下腫瘍に対し有意に増強された抗腫瘍効果が発揮されなかったのか, 現在なお不明であるが, 抗体結合 NCS の代謝経路, 体内での半減期など pharmacokinetics に関する今後の研究が必要である。

新生児ハムスターへの薬剤の静脈内投与は困難であったため, 今回の実験では, 皮下腫瘍を薬剤腹腔内投与で治療する不利な条件を余儀なくされたが, より効果的な投与方法として, さらにまたより臨床治療に近い実験系として, 静脈内投与による抗体結合 NCS の効果の検討が必要と考えられた。

以上の如く, 投与方法の検討はなお残されて

いるが、単クローン抗体結合 NCS は、著者が第 1 編において報告した増強された抗腫瘍効果を有することが、in vivo においても明らかにされた。静脈内投与した¹²⁵I 標識抗体は抗原陽性組織に集積することが明らかにされており¹⁴⁾、抗体結合抗癌剤の研究の根拠となっているが、動物実験においては、単クローン抗体あるいは Ricin 結合単クローン抗体が皮下移ヒト悪性腫瘍の増殖を抑制するという報告もある^{15,16)}。さらに単クローン抗体が末期白血病あるいは悪性リンパ腫患者に、予期された様な大きな副作用もなく投与されたことも報告されており^{17,18)}、今後、より癌細胞特異性の高い抗体が使用されるならば、単クローン抗体結合 NCS は臨床応用可能と考えられる。

結 語

臨床応用可能な抗体結合抗癌剤の開発を目的として、抗ヒト Ia 単クローン IgM 抗体と NCS の共有結合物 (H-2-NCS) を作製し ATS によ

り免疫抑制した新生児ハムスターに移植した Ia 抗原陽性急性白血病細胞株 BALL-1 に対する H-2-NCS の in vivo 抗腫瘍効果を検討した。

腹腔内投与された H-2-NCS は、腫瘍腹腔移植ハムスターの生存を有意に延長し、その抗体活性に依存した増強された抗腫瘍作用が明らかにされた。一方、皮下移植腫瘍に対しては、増殖抑制効果を示さなかった。さらに、IgM である H-2 抗体の分解物である H-2 抗体 sub-unit と NCS との結合物も皮下移植腫瘍に対しては増殖抑制効果を示さなかった。

稿を終るにあたり、御指導・御校閲いただいた木村郁郎教授、直接指導していただいた坪田輝彦講師、佐藤融司博士、NCS 活性の測定等の御協力をいただいた科薬抗生物質研究所の本木宏明氏、また国富尚子技術員の御協力に深謝いたします。

なお、本論文の要旨は第46回日本血液学会（昭和59年4月）に受理、発表予定である。

文 献

1. Ghose, T., and Nigam, S., P.: Antibody as carrier of chlorambucil. *Cancer* 29, 1398—1400, 1972.
2. Mathé, G., Loc, T. et Bernard, J.: Effet sur la leucémie 1210 de la souris d'un combinaison par diazotation d'A-methopérine et de γ -globulines de hamsters porteurs de cette leucémie par hétéogreffe. *C.R. Acad. Sci.* 246, 1626—1628, 1958.
3. Hurwitz, E., Levy, R. and Maron, R.: The covalent binding of daunomycin and adriamycin to antibodies, with both drug and antibody activities. *Cancer Res.* 35, 1175—1181, 1975.
4. Lindford, J.H., Froese, G. and Berczi, I.: An alkylating agent globulin conjugate with both alkylating and antibody activities. *J. Natl. Cancer Inst.* 52, 1665—1667, 1974.
5. Moolten, F.L. and Cooperband, S.R.: Selective destruction of target cell by diptheria toxin conjugated to antibody directed against antigen on the cells. *Science* 169, 68—70, 1970.
6. Ishida, I.N., Miyazaki, K., Kumagai, K. and Rikumar, M.: Neocarzinostatin, an antitumor antibiotic of high molecular weight. *J. Antibiot.* 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. Kimura, I., Tsubota, T., Ohnoshi, T., Sato, Y., Okazaki, M., Manabe, Y. and Abe, S.: In vivo antitumor activity of Neocarzinostatin (NCS)-tumor antibody conjugate against a transplantable human leukemia cell line (BALL-1). *Jpn. J. Clin. Oncol.* 13, 425—434, 1983.
9. Köhler, G., and Milstein, C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined speci-

- ficity. *Nature* **227**, 495—497, 1975.
10. 春田祐郎: Null 細胞型急性リンパ球性白血病細胞株 NALL-1 に対する monoclonal 抗体の作製とその解析, 第 1 編, 3 種の monoclonal 抗体の作製, 抗 HLA, 抗 Ia, 抗白血病共通抗原抗体の特異性. 岡山医学会雑誌印刷中
 11. 岡崎守宏: 抗腫瘍抗体結合抗癌剤の研究, 第 1 編, 抗ヒト Ia 単クローン抗体結合 Neocarzinostatin の作成とその in vivo 活性, 岡山医学会雑誌投稿中
 12. Hiraki, S., Miyoshi, I., Nakamura, K., Ohta, T., Watanabe, Y., Tsubota, T., Tanaka, T. and Kimura, I.: Growth characteristics of human leukemia B cell, T cell, and null cell lines serially transplanted in hamsters. *Gann* **70**, 791—798, 1979.
 13. Miller, F. and Metzger, H.: Characterization of a human macroglobulin II Distribution of the disulfide bonds. *J. Biol. Chem.* **240**, 4740—4745, 1965.
 14. Colcher, D., Zalutsky, M., Kaplan, W., Kufe, D., Austin, F. and Shlom, J.: Radiolocalization of human mammary tumors in athymic mice by a monoclonal antibody. *Cancer Res.* **43**, 736—742, 1983.
 15. Shouval, D., Shafritz, D.A., Zurausky, V.R., Isselbacher, K.J. and Wands, J.R.: Immunotherapy in nude mice of human hepatoma using monoclonal antibodies against hepatitis B virus. *Nature* **298**, 567—569, 1982.
 16. Troubrige, I.S. and Domino, D.L.: Anti-transferrin receptor monoclonal antibody and toxin-antibody conjugates affect growth of human tumor cells. *Nature* **294**, 171—173, 1981.
 17. Ritz, J., Persando, J.M., Sallen, S.E., Clavell, L.A., Notis-McConary, J., Rosenthal, P. and Schlossman, S.F.: Serotherapy of acute lymphoblastic leukemia with monoclonal antibody. *Blood* **58**, 141—152, 1981.
 18. Miller, R.A., Oseroff, A.R., Stratte, P.T. and Levy, R.: Monoclonal antibody therapeutic trials in seven patients with T-cell lymphoma. *Blood* **62**, 988—995, 1983.

Studies on antibody-anticancer drug conjugate**Part 2. *In vivo* antitumor activity of anti-Ia monoclonal antibody-Neocarzinostatin conjugate****Morihiro OKAZAKI****Second Department of Internal Medicine, Okayama University Medical School****(Director; I. Kimura)**

In vivo antitumor activity of anti-Ia monoclonal IgM antibody (H-2)-Neocarzinostatin (NCS) conjugate (H-2-NCS) was evaluated in immunosuppressed newborn hamsters implanted with a transplantable human leukemia cell line (BALL-1). After intraperitoneal injection of H-2-NCS, hamsters preinoculated i.p. with BALL-1 cells survived longer than hamsters treated with control solutions ($p < 0.001$). The control solutions included nonimmune monoclonal IgM-NCS conjugate, H-2 antibody, free NCS and phosphate-buffered saline. Growth inhibition of subcutaneously implanted BALL-1 tumors was not observed in hamsters injected i.p. with H-2-NCS or H-2 monomer subunit antibody-NCS conjugate. These results indicate that H-2-NCS was effective against i.p. implanted BALL-1 tumors, but was not effective against s.c. implanted tumors.