

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

岡山大学医学部第 2 内科 (主任: 木村郁郎教授)

古 林 太 加 志

(昭和56年7月31日受稿)

Key words: 免疫化学療法, 抗腫瘍抗体
Neocarzinostatin

緒 言

近年悪性腫瘍の治療, 中でも化学療法は目ざましい発達を遂げ, 化学療法単独で, あるいは手術療法, 放射線療法などとの併用により, その有用性が数多く報告されている。しかしながら, 現在使用されている抗癌剤はいずれにしても, 腫瘍細胞のみならず, 正常細胞に対しても toxic に作用し, この副作用が化学療法の最大の限界となっている。

この最大の欠点を克服する 1 つの方法として, 抗腫瘍抗体と抗癌剤を化学的に結合させ抗癌剤に腫瘍特異性を付加することが考えられ, 1958 年 mathé はその第 1 報を報告した¹⁾。以来諸種の腫瘍抗体結合抗癌剤の研究が報告されているが²⁾⁻⁹⁾, 実用的な抗腫瘍抗体結合抗癌剤は未だ実現されていない。抗腫瘍抗体を抗癌剤の Carrier として用いることは, 理論的には可能であり, 今回, 細胞内に入ることなく, 細胞表面で抗腫瘍効果を発揮する Neocarzinostatin (NCS) を用いて, 抗体結合 NCS の作製を試みた。

NCS は石田らにより *Streptomyces carzino-staticus* 培養濾液中に見られた単鎖のポリペプチドであるが^{10), 11)}, 実験動物系のみならず人癌に対しても抗腫瘍効果を示すことが報告されている^{12), 13)}。さらに, NCS の作用機序は特徴的であり, 腫瘍細胞内に入らずとも, 細胞表

面の receptor に結合することにより, microtubulus を介して抗腫瘍効果を発揮すると報告されている¹⁴⁾。高分子の抗腫瘍抗体結合抗癌剤は腫瘍細胞表面に到達した後に, 細胞内に penetrate し難いと考えられ, 細胞内に取り込まれることなく抗腫瘍効果を発揮する NCS は抗腫瘍抗体結合抗癌剤による免疫化学療法にとって理想的な抗癌剤の 1 つであると考えられた。

本編では, 以上の如き特徴を有する NCS と免疫 IgG (immune IgG) を water soluble carbodiimide (WSCD) を使用して covalent に結合し, NCS 結合 immune IgG (NCS-immune IgG) の作製に成功したので, その作製方法並びに NCS-immune IgG の性格について報告する。

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白血病細胞株 NALL-1 を使用した¹⁵⁾。NALL-1 細胞は 37℃, 5%CO₂ のふらん器内で RPMI 1640 に 20% 牛胎児血清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

NALL-1 細胞を生食にて洗浄後, 生食に 5 × 10⁶ コ/ml に調製し家兎に 4.0 × 10⁷ コ/匹の 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を分離した。この得られた家兎抗NALL-1血清を56°C30分間の非働化後、-20°Cにて保存した。

3) 抗NALL-1血清免疫グロブリンの精製

抗NALL-1血清を硫酸塩析法、次いでDEAEセルロースクロマトグラフィー法によりimmune IgGを分離精製した。

4) 抗癌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、また1-hydroxybenztriazole (HoBt) 及び、1-ethyl-3 (3-di-methyl-aminopropyl)-carbodiimide (WSCD) は国産化薬より購入し使用した。

5) 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、抗NALL-1細胞immune IgG 5ml (IgGとして96.5mg)を加え、室温遮光下で17時間反応させた。反応後溶液をSephadex G200カラムにてゲル濾過し、その蛋白濃度を波長280nmの

吸光度計を使用し測定した。さらに得られた4つのmajor peakを分画採取し、polyethylene glycol 20,000にて濃縮し、PBSにて充分透析を行なった。以上得られた各分画を-20°Cで冷凍保存した。

コントロールとしてNCSとimmune IgGのsimple mixture、及びWSCDとHoBtで各々処理したNCSとIgGをSephadex G 200カラムにてゲル濾過した。

6) NCS 活性の測定

ゲル濾過にて得られた各分画のNCS活性は*Sarcina lutea*のgrowth inhibitionで測定した。

7) 免疫学的分析

抗NCS抗体と抗家兎IgG抗体を使用して、Ouchterlonyのdouble diffusion test及びImmunoelectrophoresisを行なった。

8) 温度及び凍結融解操作に対する安定性の検討

NCS-immune IgGとNCSを各々NCS活性として20.0u/mlの濃度にPBS溶液に調整し、遮光下、37°C及び56°Cの条件下で1.2.3.4及び5時間後の各溶液のNCS活性の変化を検討した。

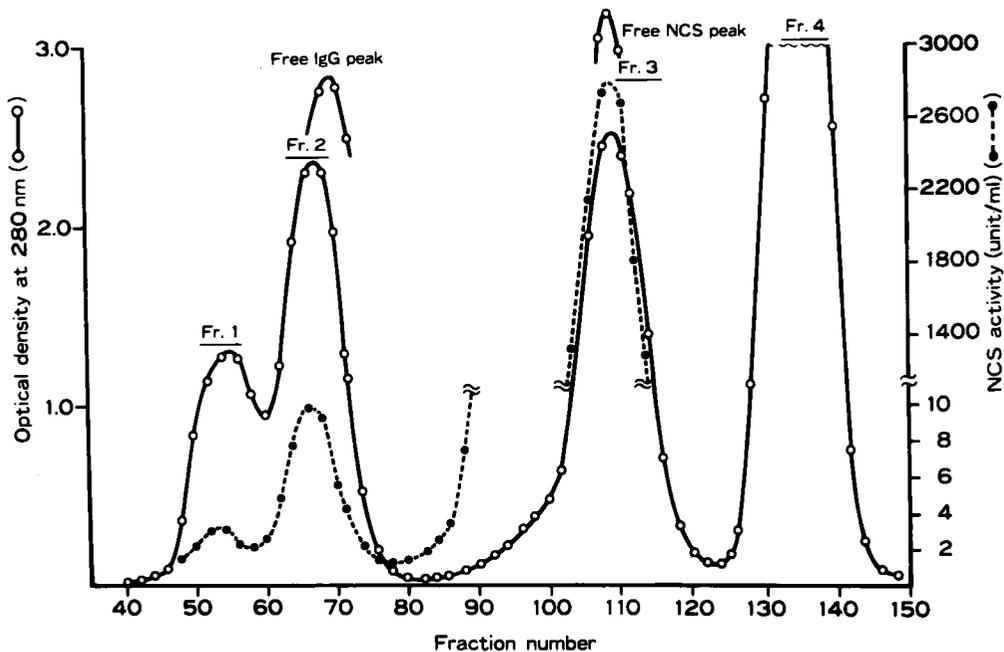


Fig. 1. Gel filtration profile of NCS and immune IgG treated chemically with WSCD and HoBt, using Sephadex G-200 column (3x80cm).
○—○, OD at 280nm; ●-----●, NCS activity assayed by *S. lutea* growth inhibition (unit/ml).

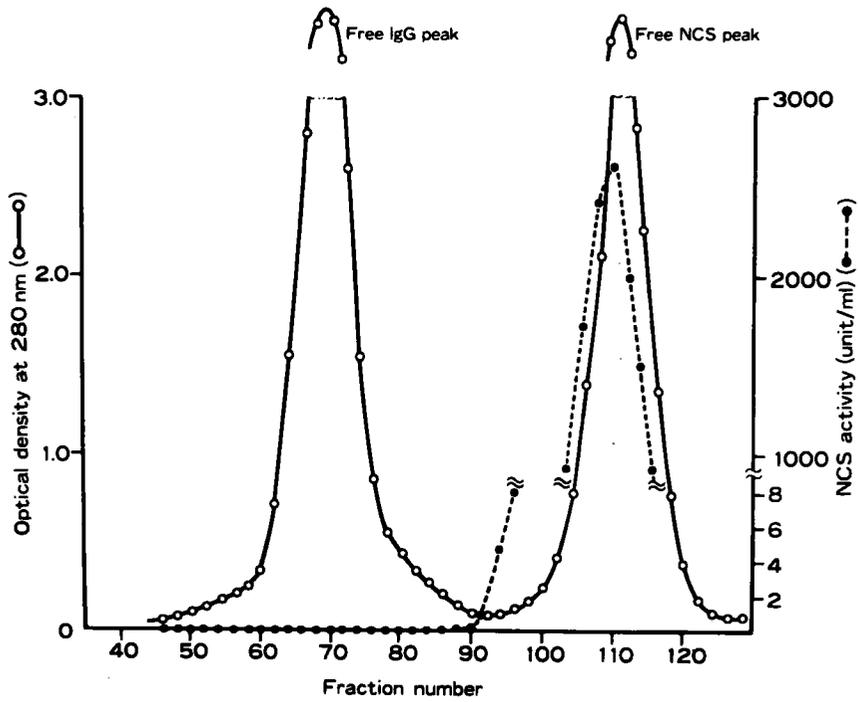


Fig. 2. Elution profile of the simple mixture of NCS and immune IgG.
 ○—○, OD at 280 nm; ●—●, NCS activity (unit/ml).

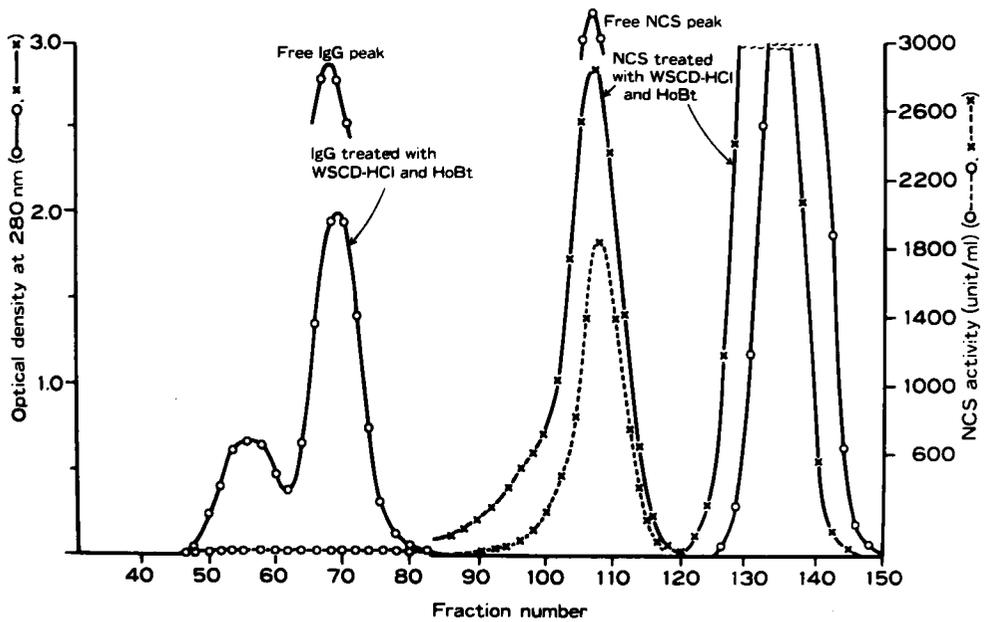


Fig. 3. Elution profile of WSCD and HoBt-treated NCS and immune IgG.
 ×—×, OD of NCS treated with WSCD and HoBt; ○—○, OD of immune IgG treated with WSCD and HoBt; ×—×, and ○—○, NCS activity (u/ml).

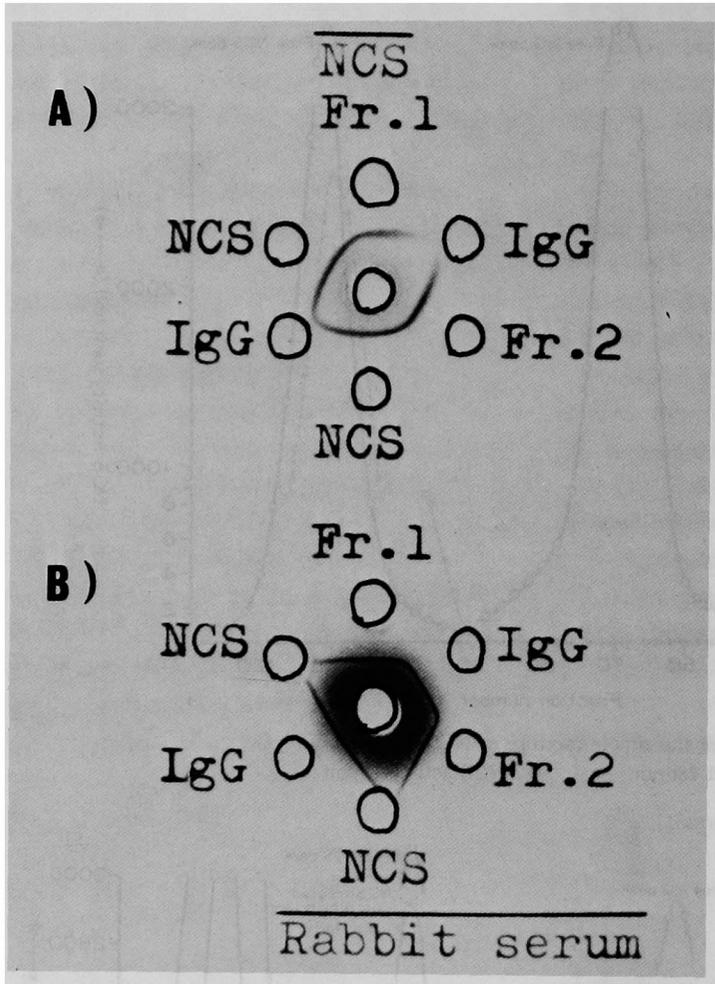


Fig. 5. Ouchterlony double diffusion plate

さらに、凍結融解をくりかえし、NCS 活性の変化を検討した。

結 果

1. Sephadex G-200 カラム分析と各分画の NCS 活性

NCS と家兎抗 NALL-1 immune IgG を W-SCD を使用し、covalent に結合させた。Sephadex G-200 カラムを用いて分画した結果、Fig. 1 に示すように、Fr. 1, 2, 3 及び 4 の 4 つの peak が得られた。一方、NCS と家兎 IgG の mixture を Sephadex G-200 カラムにて分析したところ、Fig. 2 に示すように 2 つの peak が得られた。また NCS と家兎 IgG を各々 WSCD

と HoBt にて処理し、Sephadex G-200 カラム分析を行い、各分画の NCS 活性を調べたところ、Fig. 3 の結果が得られた。

Fig. 1 の Fr. 3, 4 は正常家兎 IgG より遅れて出現する peak で、Fr. 3 は free NCS の peak とほぼ一致し、かつ著明な NCS 活性を有しており NCS と考えられた。また Fr. 4 は NCS 活性はなく、NCS あるいは IgG を WSCD と HoBt で処理した場合も同様 peak が出現し、化学的操作後に生じた小分子の副産物と考えられた。一方、Fr. 1, 2 は正常家兎 IgG より少し早く溶出され、かつ、NCS 活性をも有しており、Fr. 2 は NCS-immune IgG、Fr. 1 は NCS-immune IgG の重合体であると考えられた。

2. 免疫学的検討

Fig. 4 に示す如く、Ouchterlony double diffusion では Fr. 1, 2 とともに抗 NCS

抗体 (Fig. 4 A) 及び抗家兎 IgG 抗体 (Fig. 4B) と反応し、それぞれ 1 本の沈降線を生じ、かつ、前者では NCS と抗 NCS 抗体によって生じた沈降線と、後者では IgG、抗家兎 IgG による沈降線と完全に fuse していた。この結果は Fr. 1, 2 が NCS と IgG をともに含んでいることを明確に示すものである。

Immunoelectrophoresis の実験結果は Fig. 5 である。Fig. 5 A に示す如く、free NCS は陽極側、Fr. 2 は陰極側に泳動し、抗 NCS 抗体と反応し、それぞれ各 1 本の沈降線を形成した。一方、抗 IgG 抗体と反応させた場合には (Fig. 5 B)、Fr. 1 及び 2 は陰極側に泳動されたが、free の IgG に比し、やや陽極側に偏っていた。

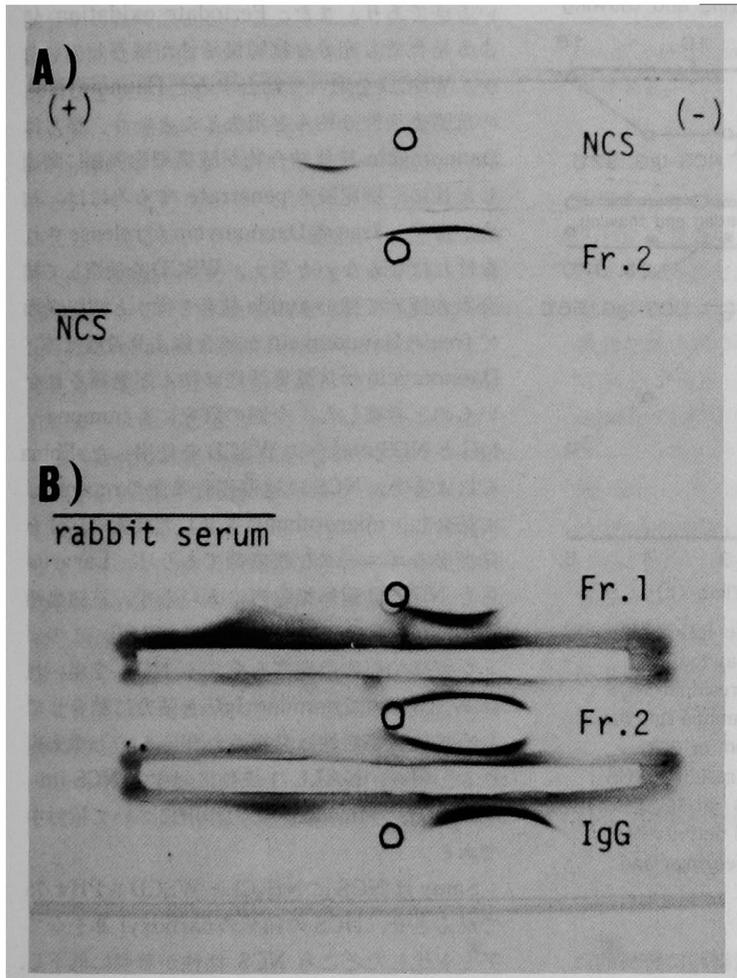


Fig. 5. Immunoelectrophoresis.

この場合もそれぞれ1本の沈降線が認められたのみであった。以上の結果はFr. 1, 2がNCS-IgGであることを証明しており、さらにFr. 1, 2ともに抗NCS抗体との反応において (Fig. 5 A), 陽極側には一切沈降線が形成されず, freeのNCSは殆んど含まれていないものと考えられた。

3. 温度及び凍結融解操作に対する安定性

Fig. 6に示すように、37℃ではNCSはその活性が2時間後に80%と低下したが、NCS-immune IgGのNCS活性は全く低下しなかった。56℃では、NCSは1時間でその生物活性が完全に消失したのに対し、NCS-immune IgGでは1時間後にも95%のNCS活性を保持して

おり、以後時間の経過とともにNCS活性は直線的に消失した。以上により、NCSはIgGとの結合により、温度に対しより安定化することが証明された。さらにFig. 6の如く、NCS-immune IgGは頻回の凍結融解操作に対しても安定であり、15回の同操作後にも82%のNCS活性を有していた。

考 接

本研究において著者はNALL-1細胞を免疫して得られた家兔immune IgGとNCSをWSCDを使用して化学的に結合した。Sephadex G-200カラムによる解析、Ouchterlony double diffusion及びImmuno-electrophoresisの結果、得られたFr. 1及びFr. 2は化学的に結合されたNCS-immune IgGであることが証明された。さらにこのNCS-immune IgGはFig. 1に示した如くに、NCS活性、即ち、S. lutea growth inhibition作用を保持していた。

¹³¹Iでlabelした抗腫瘍抗体がin vivoにて腫瘍組織に取り込まれることは既に証明されており^{16),17),18)}、このことが抗腫瘍抗体を抗癌剤のcarrierとして使用する免疫化学療法の理論的根拠となっている。しかし、この研究では、家兔抗NALL-1血清の吸収操作を行っておらず、使用したimmune IgGは腫瘍特異抗体ではない。本実験においては、その目的が抗体結合NCSを作製し得るか否かを検討することであって、特異的抗腫瘍抗体は必須でないと考えられたため、未吸収抗NALL-1 immune IgGを使用した。一方、当教室の宇野らは家兔抗NALL-1血清に種々の吸収操作を加え、null細胞型急性

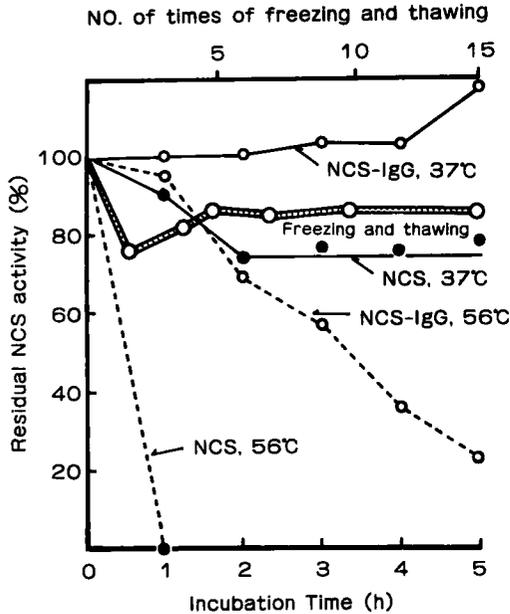


Fig. 6. Stability of NCS-immune IgG against heat and freezing and thawing.

○—○, and ●—●, residual NCS activity (%) of NCS-immune IgG and free NCS in the condition of 37°C.
○-----○, and ●-----●, residual NCS activity of both reagents at 56°C.
○-----○, residual NCS activity of NCS-immune IgG after freezings and thawings.

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抗血清が得られたと報告しており¹⁹⁾, このような吸収家兎 NALL-1 抗体を使用すれば, 抗腫瘍特異抗体結合 NCS の作製は可能である。

抗腫瘍抗体を carrier として抗癌剤を腫瘍に選択的に作用させようとする試みは種々なされており, その抗体と抗癌剤の結合方法も各々異なっている。Ghose らは抗体と Chlorambucil を $\text{pH } 2.2 \pm 0.2$ の条件下で混合し, noncovalent に結合させて, 悪性メラノーマ患者の治療を行っている^{20),21)}, また, Hurwitz らは Daunomycin と抗体を 3 種類の方法で covalent に結合して, その各々の抗腫瘍活性を ³H-uridine incorporation 抑制率及びトリパンプルー法にて比較検討している²²⁾。この報告によると, glutaraldehyde による結合が抗腫瘍活性の障害度が最も少

い方法であり, また, Periodate oxidation による結合でも十分な抗腫瘍活性が残存していたが, WSCD を用いて結合すると Daunomycin の抗腫瘍活性は殆んど消失したという。彼らは Daunomycin-抗体結合物が腫瘍細胞表面に到達した後に, 細胞膜を penetrate する為には, 結合がはずれ free の Daunomycin が release されなければならないと考え, WSCD を使用して結合力の極めて強い amide 結合を行うと細胞表面で free の Daunomycin が結合体より遊離せず, Daunomycin の抗腫瘍活性は殆んど発揮されないものと考察した。今回の研究にも immune IgG と NCS の結合に WSCD を使用した。Ebina らによると, NCS は腫瘍細胞表面の receptor に結合し, microtubulus を介して抗腫瘍活性を発揮するユニークな抗癌剤であり¹⁴⁾, Lazarus らも NCS は腫瘍細胞内に入らず, 抗腫瘍活性を発揮し得ることを証明している²³⁾。このような特徴的な作用機序を有する NCS を用いれば WSCD にて immune IgG と強力に結合してもその抗腫瘍活性は発揮され得るものと考えられる。現在, NALL-1 細胞に対する NCS-immune IgG の in vitro での作用について検討中である。

Samy は NCS に NH_4Cl と WSCD を $\text{pH } 4.75$ で反応させ, NCS の 10 個の carboxyl 基を全てアミド化したところ NCS 活性が著明に低下し, NCS の生物活性には carboxyl 基が重要な働きをしていると報告した²⁴⁾。本実験においても NCS の carboxyl 基と immune IgG の amino 基の間に WSCD を使用して amide 結合が形成されており, 結合後 NCS 活性が低下する可能性が考えられる。しかし, Fig. 1 の如く NCS-immune IgG (Fr. 2) は free IgG より, わずかに早く溶出されており大分子とは考え難く, 1 つの NCS 分子に対して IgG 1 分子程度の結合であると思われる。したがってその結合に必要なとした carboxyl 基はわずかであり, さらに NCS-immune IgG (Fr. 2) には *S. lutea* growth-inhibition 活性が十分に認められ, 結合による NCS 活性の低下は最小限であると考えられた。

WSCD による反応の条件は簡単であり, carboxyl 基を持つ抗癌剤と IgG を WSCD の存在下で

30分から数時間混合することにより、抗癌剤とIgGの間にamide結合が形成される²⁵⁾。この反応系は室温水溶液中の穏やかな条件下で行なわれる為、抗癌剤やIgGの変性が起こりにくく、polypeptideであるNCSと、IgGの結合には都合が良い。この反応系の短所は、重合が起き易いことであるが、WSCDの濃度に比し、抗癌剤やIgGの濃度を高めることにより妨げ得ると報告されている²⁵⁾。Fig. 1のようにNCS-immune IgGはSephabex G200 filtration profileより考えるとIgGと殆んど分子量が違わないと思われ、重合は殆んど生じていないと考えられる。

この研究では腫瘍細胞表面に作用して効果を発揮する特徴的な抗癌剤NCSと家兎抗NALL-1 IgGを反応させてNCS-immune IgGを作製した。その結合にはWSCDを用いたため、その結合はcovalent結合であり、注射部位より腫瘍組織の間に存在する機械的、化学的或いは酵素学的な影響に対し安定であると思われる。さらに、NCS-immune IgGは温度や凍結融解操作に対しても安定であることが証明された。

このNCS-immune IgGは免疫化学療法において、ヒトnull細胞型悪性腫瘍の治療に応用し

得る可能性があり、NCS-immune IgGのinvitroおよびin vivoでの有効性の検討が現在進行中である。

結 語

家兎をnull細胞型白血病細胞培養株(NALL-1)にて免疫し、家兎抗NALL-1血清を作製、IgGを精製した。腫瘍細胞表面のreceptorに作用して抗腫瘍効果を発揮すると言われている特徴的な抗癌剤NCSと家兎抗NALL-1 IgGをWSCDを使用してcovalentに結合し、NCS-immune IgGを作製した。Sephadex G-200カラムによるGel filtrationで得られたFr. 1及びFr. 2は、Ouchterlony double diffusion及びImmuno-electrophoresisにより、NCS結合immune IgG (NCS-immune IgG) であることが証明された。このNCS-immune IgGはSarcina lutea inhibition活性を有しており、現在、NCS-immune IgGのNALL-1細胞に対するinvitro並びにin vivoでの作用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. Mathé, G., Tran, B.L., and Bernald, J.: Effect sur la leucémie 1210 de la souris d'une combinaison par diazotation d'améthoptérine et de α -globulines de hamsters porteurs de ceffe leucémie par heterogrette. *C. R. Acad. Sci.* **246**, 1636—1628, 1958.
2. Ghose, T., and Nigam, S.P.: Antibody as carrier of Chlorambucil. *Cancer* **29**, 1398—1400, 1974.
3. Davies, D.A.L.: The combined effect of drugs and tumor specific antibodies in protection against a mouse lymphoma. *Cancer Res.* **34**, 3040—3043, 1974.
4. Ghose, T., Guclu, A., and Tai, T.: Suppression of AKR lymphoma by antibody and Chlorambucil. *J. Natl. Cancer Inst.* **55**, 1353—1357, 1975.
5. Guclu A., Ghose, T., Tai, J., and Mammen, M.: Binding of Chlorambucil with antitumor globulins and its effect on drug and antibody activities. *Eur. J. Cancer* **12**, 95—100, 1976.
6. Levy, R., Hurwitz, E., Maron, R., and Sela, M.: The specific cytotoxic effects of Daunomycin conjugated to antitumor antibodies. *Cancer Res.* **35**, 1182—1186, 1975.
7. Moolten, F.L., Capparel, N.J., and Cooperband, S.R.: Antitumor effects of antibody-diphtheria toxin conjugates: Use of hapten-coated tumor cells as an antigenic target. *J. Natl. Cancer Inst.* **49**, 1057—1062, 1967.

8. 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 Simian virus 40. *J. Natl. Cancer Inst.* **55**, 473—477, 1975.
9. Rowland, G.F., O'Neill, G.J., and Davies, D.A.L.: Suppression of tumor growth in mice by a drug-antibody conjugate using a novel approach to linkage. *Nature* **255**, 487—488, 1975.
10. Ishida, N., Miyazaki, K., Kumagai, K., and Rikumaru, M.: Neocarzinostatin, an antitumor antibiotic of high molecular weight. *J. Antibioti, Tokyo Ser. A.* **18**, 68—76, 1965.
11. Maeda, H., Glaser, C. B., Kuromizu, K., and Meierhoffer, J.: Structure of the antitumor protein Neocarzinostatin. Amino acid sequence. *Arch. Biochemi Biochemi Biophys.* **164**, 379—385, 1974.
12. Brander, W.T., and Hutchison, D.: An antitumor antibiotic effective against ascitic leukemia L 1210 in mice. *Cancer Chemother Rep.* **50**, 79—84, 1966.
13. Hiraki, K., Kamimura, O., Takahashi, I., Nagao, T., Kitajima, K., and Irino, S.: Neocarzinostatin. Une approche nouvelle dans la chimiothérapie des leucémie aigües. *Nouvelle Revue Française d'Hématologie.* **13**, 445—451, 1973.
14. Ebina, T., and Ishida, N.: Inhibition of formation of microtubular paracrystals in Hela-S3 cells by Neocarzinostatin. *Cancer Res.* **35**, 3705—3709, 1975.
15. 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.
16. Pressman, D., and Keighly, G.: The zone of antibodies as determined by the use of radioactive tracers. The zone of activity of nephritoxic antiskidney serum. *J. Immunol.* **59**, 141—146, 1948.
17. Ghose, T., Guclu, A., Tai, J., MacDonald, A.S., Norvell, S.T., and Aquino, J.: Antibody as carrier of ¹³¹I in cancer diagnosis and treatment. *Cancer.* **36**, 1646—1656, 1975.
18. Ghose, T., Tai, J., Aquino, J., Guclu, A., Norvell, S.T., and MacDonald, A.A.: Tumor localization of ¹³¹I-labeled antibodies by radionuclide imaging. *Radiology.* **116**, 445—448, 1975.
19. Uno, J., Tsubota, T., Miyoshi, I., Hiraki, S., Nakamura, K., and Kimura, I.: Characterization of rabbit antiserum against a human leukemia cell line. In *proceedings of 37th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Tokyo: Hitotsubashi press*, p62, 1978.
20. Ghose, T., Norvell, S.T., Guclu, A., Cameron, D., D., Bodurtha, A., and MacDonald, A.S.: Immunochemotherapy of cancer with Chlorambucil-carrying antibody. *Br. Med. J.* **26**, 495—499, 1972.
21. Ghose, T., Norvell, S.T., Guclu, A., Bodurtha, A., Tai, J., and MacDonald, A.S.: Immunochemotherapy of malignant melanoma with Chlorambucil-bound anti-melanoma globlins: Preliminary results in patients with disseminated disease. *J. Natl. Cancer Inst.* **58**, 845—882, 1977.
22. Hurwitz, E., Levy, R., Maron, R., Wilcheck, 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—1975.
23. 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.
24. Samy, T.S.A.: Neocarzinostatin; Effect of modification of side chain amino and carboxyl groups on chemical biological properties. *Biochemistry* **16**, 5573—5578, 1977.
25. Carraway, K.L., and Koshland, D.E.: Carbodiimide modification of proteins. *Method Enzymol.* **25**, 616—623, 1972.

**Immunochemotherapy with tumor antibody-Neocarzinostatin
(NCS) conjugates**

Part 1. Preparation of antibody-NCS conjugates

Takashi KOBAYASHI

Department of Internal Medicine, Okayama University Medical School

(Director: Prof. I. Kimura)

Rabbit xenoantiserum was produced against a human null cell type leukemia cell line (NALL-1), and immune IgG was purified. NCS, a unique antitumor antibiotic that works on the tumor cell surface, was reacted with anti-NALL-1 rabbit IgG, in the presence of water soluble carbodiimide (WSCD). The resulting mixture was chromatographed on a Sephadex G-200 column. The first and second fractions were shown to contain NCS-immune IgG and no free NCS by the Ouchterlony double diffusion method and by immunoelectrophoresis. The conjugates inhibited the growth of *Sarcina lutea* and were more stable at conditions of 37°C or 56°C than free NCS. The conjugates did not lose inhibitory activities against the growth of *S.lutea* after frequent freezings and thawings. NCS-immune IgG might be useful in treating patients with cancer.