

担癌ヌードマウスにおけるモノクローナル抗体単独及び 抗体・薬物結合体の治療効果に関する研究

丹 田 まり子 今 井 浩 三
札幌医科大学内科学第1講座 (主任 谷内 昭 教授)

Studies on Therapeutic Effect of the Monoclonal Antibody and the Immunoconjugate on Tumor Growth in Nude Mice

Mariko TANDA and Kohzoh IMAI
Department of Internal Medicine (Section 1), Sapporo Medical College
(Chief : Prof. A. Yachi)

The recent development of hybridoma technology, providing monoclonal antibodies (MoAb) of predefined specificity, has opened a new field in tumor immunology. MoAbs are currently being assessed for their usefulness as immunotherapeutic agents, either alone, or coupled with drugs, toxins, or to radioactive compounds. In this study, monoclonal antibody MT008 (IgG3) that reacts with human colonic cancer, was conjugated with puromycin (SP-H) having a molecular weight of 5500 daltons. The MoAb conjugated with SP-H suppressed colorectal carcinoma cells *in vitro*. *In vivo*, this immunoconjugate suppressed the growth of colorectal carcinoma in nude mice as evidenced by a greater number of survival days and smaller volume of tumors in the treated animals.

In another study, monoclonal antibody S1 (IgG2a) that reacted with human hepatocellular carcinoma, mediated no tumor suppression *in vitro*, when used alone, but mediated ADCC activity against human cultured hepatocellular carcinoma cell in conjunction with murine splenocytes. *In vivo*, MoAb S1 alone suppressed the growth of hepatocellular carcinoma cells in nude mice as evidenced by a greater number of survival days and a smaller volume of tumors. ¹²⁵I-labeled MoAb S1 significantly accumulated to this tumor in nude mice and mononuclear cells were infiltrated into the tumor masses. These results suggest that the inhibition of tumor growth might be mediated by an antibody dependent cell-mediated cytotoxicity.

(Received December 26, 1986 and accepted January 26, 1987)

Key words: Monoclonal antibody, Tumor immunotherapy, Immunoconjugate,
Antibody dependent cell-mediated cytotoxicity

1 緒 言

ヒトの癌の免疫療法において、これまで臨床的に用いられてきたいわゆる非特異的免疫療法剤に加えて、最近、免疫学、分子生物学を軸とするバイオサイエンスの発展により、モノクローナル抗体(以下 MoAb と略)、インターフェロン、インターフェロン 2、あるいは tumor necrosis factor (TNF) などが次々に癌の治療分野にも登場し、注目されるようになった。MoAb については、その作製技法が確立¹⁾されて以来、その特徴

である均一性と、永続的供給の可能性などの利点のためにヒト癌関連抗原についても多くの研究が行われ診断応用²⁻⁷⁾及び治療への基礎的アプローチ⁸⁻¹⁰⁾が試みられている。

本研究では固形癌の実験的治療への応用を目的として、ヒト大腸癌に対する MoAb を用いて抗体-薬物結合体を作製しこれによる癌への治療効果を検討するとともに、ヒト肝癌に対する MoAb を用いて抗体単独投与による癌の抑制効果を見出したので報告する。

2 実験材料と方法

2.1 培養細胞及びマウス脾細胞

本研究に用いた培養細胞はヒト大腸癌細胞 BM314, Colo205 及び HCC-Y1, 胃癌細胞 KATO III, AZ521, 肝癌細胞 Hc-4¹¹⁾ 及び Hc-20, 悪性黒色腫細胞 Colo38, リンパ芽球様細胞 Raji, 並びに赤白血病細胞 K562 であり, 10%胎仔牛血清(FCS)加 RPMI1640 培養液 (GIBCO, USA) で培養維持した。なお, 培養細胞 BM314 はカリフォルニア大学, Walter A. Nelson Rees 教授, KATO III は東京大学医学研究所, 関口守正助教授, Hc-4 及び Hc-20 は北海道大学医学部, 内野純一教授, その他の細胞は R. A. Reisfeld 教授 (Scripps Clinic and Research Foundation, USA) より供与を受けた。マウス脾細胞は BALB/c マウスあるいはヌードマウス BALB/cAJcl-nu (日本クレア) の 8 週目, 雌から型のごとく採取し実験に供した。

2.2 モノクローナル抗体

MoAb MT008 はマウス骨髄腫細胞 X-63-Ag 8.653 と, 培養ヒト大腸癌細胞 BM314 で免疫された BALB/c マウスの脾細胞を細胞融合して作製したハイブリドーマから得られた。また, MoAbS1 は同様のマウス骨髄腫細胞と, 培養ヒト肝癌細胞 Hc-4 で免疫された BALB/c マウスの脾細胞を細胞融合して作製したハイブリドーマから得られた⁹⁾。その手技と方法の詳細は守谷・今井¹²⁾の記載に従った。

MoAb 345.134S (IgG2a) は分子量 8.5 万及び 3 万ダルトンの抗原と反応を示し, 悪性黒色腫, 各種固形癌及び血液細胞に広く分布する抗原を認識する¹³⁾。また MoAb 225.28S (IgG2a) は高分子量の悪性黒色腫関連抗原に反応するが, その対応抗原はトリチウム標識グルコサミンを用いた免疫沈降法により分子量 55 万以上及び 28 万の両者が同定されている¹⁴⁾。本 MoAb は血清学的及び免疫組織学的検索により悪性黒色腫, 母斑及び皮膚基底細胞癌に限局した活性を示した^{15,16)}。

以上の MoAb の精製は既報¹⁶⁾のごとく, 腹水を 33% 硫酸を用いて塩析したのち, DE52 (Whatman, England) 及び Sephadex G200 (Pharmacia, Sweden) を用いるカラムクロマトグラフィ及びゲル濾過により行った。

2.3 間接ロゼット法

得られたハイブリドーマの培養上清を用いて, 免疫原と反応する MoAb を産生するハイブリドーマを選別するため, 既報¹⁷⁾の方法で間接ロゼット法を行った。標

的細胞としては免疫に用いた培養大腸癌細胞 BM314 を含む各種培養細胞を使用, 光学顕微鏡下に 5 個以上の指標細胞付着標的細胞を陽性として判定した。なお結果は, 陽性率 90%以上を (+ +), 50%以上 90%未満を (+), 50%未満を (-) として表現した。

2.4 間接免疫ペルオキシダーゼ法

作製された MoAb の認識する抗原決定基の組織学的分布及び局在を検索するために, 藤田・今井¹⁸⁾の方法に従って間接免疫ペルオキシダーゼ法を施行した。

2.5 抗原分子に関する検索

MoAb が反応する抗原分子については遠藤・今井に準じてウエスタンブロット法によった。可溶性粗抗原は大腸癌培養細胞株 BM314 より 1% NP40(半井化学)を用いて作製した。

2.6 治療応用への基礎的検討

2.6.1 モノクローナル抗体と薬物の結合体による治療実験

2.6.1.1 モノクローナル抗体・薬物結合体の作製

細胞障害性に働く薬物として puromycin (SP-H) を用いたが, 本薬物は中西俊博博士 (サントリー生物医学研究所) から供与された。SP-H は麦由来の低分子 (分子量約 5500) 塩基性ポリペプチドであり, その一次構造も判明している^{20,21)}。

MoAb MT008 と SP-H の結合は水溶性カーボディイミドを用いて pH 8.5 で既報¹⁶⁾のように行った。反応終了後, Sephadex G200 を用いてゲル濾過し抗体・薬物結合体と free の薬物の分画に分けた。

2.6.1.2 *In vitro* 殺細胞効果

得られた各分画を加えて大腸癌培養細胞 BM314 及び胃癌培養細胞 KATO III と 7 日間培養後, それらの生存率をトリパンブルーを用いて算定し, 抗体単独でヒト培養癌細胞と培養した場合と比較した。抗体濃度は 10, 25, 50, 及び 100 $\mu\text{g/ml}$ を使用, 比較検討した。

2.6.1.3 ヌードマウス移植腫瘍に対する効果

次に, 担癌ヌードマウスを用い *in vivo* における治療実験を行った。すなわち, BALB/cAJcl-nu(雌, 6 週) に対しヒト大腸癌細胞 BM314, 5×10^6 個/マウスを腹腔内 (ip) 及び皮下 (sc) に注射し腹水型と腫瘍型腫瘍の二群を作製した。それぞれについて 6 匹ずつ, MoAb MT008 単独, SP-H 単独, MoAb MT008 と SP-H の混合物, 及び MoAb MT008・SP-H 結合体をそれぞれ腹腔内に投与して, その治療効果を生存率及び腫瘍増殖抑制率の面から対照群と比較しつつ検討した。

2.6.2 モノクローナル抗体単独による治療実験

MoAb 単独投与による抗腫瘍効果をみる目的で *in*

in vitro, *in vivo* に基礎的検討を行った。

2.6.2.1 *In vitro* 殺腫瘍細胞効果

ヒト肝癌細胞 Hc-4 を免疫して作製された MoAb S1, あるいは対照として悪性黒色腫関連抗原に対する MoAb 225. 28S の 1 mg をヒト肝癌細胞 Hc-4 の 5×10^5 /ml, 5 ml と炭酸ガス孵卵器で 37°C, 12~72 時間インキュベートし, %細胞障害率をトリパンブルー染色法で検討した。

2.6.2.2 Antibody-dependent cell-mediated-cytotoxicity による殺腫瘍細胞効果

さらに, それらの抗体について antibody dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) アッセイを行った。ADCC アッセイは 96 穴マイクロプレート (Cooke Laboratory Products, USA) を用い以下の如く行った。 ^{51}Cr 標識した 4×10^3 個の標的細胞 $100 \mu\text{l}$ に MoAb の各種濃度の $20 \mu\text{l}$ と BALB/c あるいはヌードマウス脾細胞 ($4 \sim 16 \times 10^5$ 個) $100 \mu\text{l}$ を加えた。その後プレートを 5%炭酸ガス孵卵器内 37°C で 12 時間インキュベートし, その上清を用いてガンマカウンターにより ^{51}Cr の遊離率を測定した。細胞からの ^{51}Cr の遊離パーセントは以下のように算定した。 $\%ADCC = (A - B) / (T - B) \times 100$, A = 効果細胞に MoAb を加えたサンプルの cpm, B = 効果細胞に MoAb を含まないコントロールの cpm, T = 標的細胞内に取り込まれた ^{51}Cr の総 cpm, を示す。これらの実験は triplicate で行った。標的細胞からの ^{51}Cr の自然遊離は全体標識量の 8~15% に止まった。

2.6.2.3 ヌードマウス移植腫瘍に対する効果

次に担癌ヌードマウスを用い *in vivo* における治療実験を行ない対照群に比較して生存率及び腫瘍増殖抑制率を検討した。

すなわちヌードマウス (BALB/cAJcl-nu, 雌 6 週) の腹腔内にヒト肝癌細胞 Hc-4, 1×10^7 あるいはヒト悪性黒色腫細胞 Colo38, 1×10^7 を移植し腹水型腫瘍を作製した。さらに MoAb S1 あるいは MoAb 225. 28S の 3 mg を各ヌードマウスに, 細胞接種後第 1, 3, 5 日目 (方法 1), あるいは第 1, 3, 5, 30, 40 日目 (方法 2) に腹腔内に注射した。

さらに Hc-4, 1×10^7 を移植し腫瘍型腫瘍を作製し, その後 MoAb S1 を方法 1 により 1.5 mg/マウスを腹腔内に注射した。各群 6 匹のヌードマウスを使用した。皮下腫瘍の増殖は 6 日毎に直径を測定した。腫瘍体積 (mm^3) は以下の式で計算した。 $d_1^2 \times d_2 / 2$ (d_1 = 短径, d_2 = 長径)。また, クロラミン T 法により ^{125}I 標識した MoAb S1 $50 \mu\text{g}$ ($50 \mu\text{Ci}$) を Hc-4 細胞移植後 40 日目

のヌードマウスに投与し, 投与 12 及び 48 時間後に各臓器を含めて腫瘍に集積した放射能を測定した。

2.6.2.4 推計学的方法

測定値はすべて mean \pm S. D. で示し, 推計処理は Kruskal-Wallis の検定 (H 検定) あるいは Welch's method によった。なお危険率 0.05 以下を有意差とみなした。

3 成 績

3.1 モノクローナル抗体-薬物結合体を用いた治療実験

3.1.1 モノクローナル抗体 MT008 の血清学的反応性

ヒト培養癌細胞と MoAb MT008 (IgG3) との反応性を間接ロゼット法により検討した結果を一括して Table 1 に示す。MoAb MT008 は免疫原の大腸癌細胞 BM314 及び Colo205 に陽性反応を示したが他の検索しえた培養細胞のいずれとも反応性を示さなかった。さらに本抗体は Table 2 に示すように各種の血液細胞との反応性も認めなかった。

Table 1 Reactivity of monoclonal antibody MT008 with a panel of human cell lines in a rosette microassay.

Cell type	Cell line	Monoclonal antibody MT008 (IgG3)
Colon cancer	BM314	++*
	Colo205	+
	HCC-Y1	-
Gastric cancer	KATO III	-
	AZ521	-
Hepatoma	Hc-4	-
	Hc-20	-
Melanoma	Colo38	-
Myeloid cells	K562	-
Lymphoid cells	Raji	-

* ++, rosette forming cells(x) $\geq 90\%$; +, $50\% \leq x < 90\%$; -, $x < 50\%$

Table 2 Reactivity pattern of the monoclonal antibody MT008 with freshly obtained haematopoietic cells in the rosette microassay.

Cells	Monoclonal antibody*	
	MT008 (IgG3)	345. 134S (IgG2b)
Granulocytes	-	+
Erythrocytes (A, B and 0)	-	-
Monocytes	-	+
T & B lymphocytes	-	+
CLL (B) cells	-	+
AML cells	-	+

* Ten μg of the purified monoclonal antibodies per assay was used.

3・1・2 モノクローナル抗体 MT008 の免疫組織学的反応性

MoAb MT008 と癌組織及び非癌組織との反応性を間接免疫ペルオキシダーゼ法で検討した結果を Table 3 に示す。

すなわち本抗体は大腸癌の 70%、胃癌の 60% に陽性を示し、その反応性は癌細胞膜並びに細胞質性に認められた (Fig. 1)。さらに胎児胃及び大腸にも陽性所見が得られたが、非癌部では胃の腸上皮化生部、及び腎尿管に弱く、大腸固有上皮細胞にさらに弱い反応を示したが、他は陰性を示した。

3・1・3 モノクローナル抗体 MT008 の対応抗原分子に関する検討

放射免疫沈降法及びウエスタンブロット法により抗原分子の検索を行ったが、この場合 Fig. 2 の A lane に示すように約 200K ダルトン分子との反応性を示した。さらに SDS ゲルに入らない高分子領域の抗原も検出された。これらの抗原分子は還元下あるいは非還元下でも、図示していないが、ほぼ同様の分子サイズを示した。次に本抗体が約 200K ダルトン分子と反応を示すため、精製 CEA 標品との反応性をウエスタンブロット法により検討した。Fig. 2 の B lane に示すように本抗体は CEA とも反応することが明らかとなった。

Table 3 Tissue distribution of the antigenic determinant detected by monoclonal antibody MT008 with indirect immunoperoxidase technique.

Tissue	Monoclonal antibody MT008	
	positive/tested (%)	staining intensity*
Colon cancer	14/20 (70)	
Adenocarcinoma	14/20 (70)	++
Stomach cancer	6/10 (60)	
Adenocarcinoma	4/7 (57)	++
Signet ring cell carcinoma	2/3 (67)	+
Fetus (16W)		
stomach	1/1	+
colon	2/2	+
Non-cancerous tissue		
colon	0/5** (0)	
stomach	2/4*** (50)	+/-
liver	0/2	
pancreas	0/2	
spleen	0/2	
kidney	2/2****	+/-

* Staining intensity: ++, strongly positive; +, positive; +/-, weakly positive.

** Surface epithelial cells were very faintly positive.

*** Intestinal metaplasia lesion showed positive staining.

**** Kidney tubules were weakly stained.



Fig. 1 Immunoperoxidase staining of a colonic carcinoma section. Colonic carcinoma cells were stained positively with monoclonal antibody MT008. Original magnification: $\times 90$.

3・1・4 抗体—薬物結合体の *in vitro* における効果

作製された MoAb MT008・SP-H 結合体の *in vitro* における効果を検討するため、MoAb MT008 の結合するヒト大腸癌細胞 BM314 並びに結合しない胃癌細胞 KATO III を用いて、その細胞障害性を検討した。その結果、Fig. 3A に示すように MoAb MT008 単独、及び MoAb MT008・SP-H 結合体はいずれも胃癌細胞 KATO III に対して生存率の低下を示さなかった。これに対し Fig. 3B に示すように、大腸癌細胞 BM314 については MoAb 単独投与の場合には生存率は低下しないが、MoAb MT008・SP-H 結合体投与で培養した場合には著明な生存率の低下を認めた。

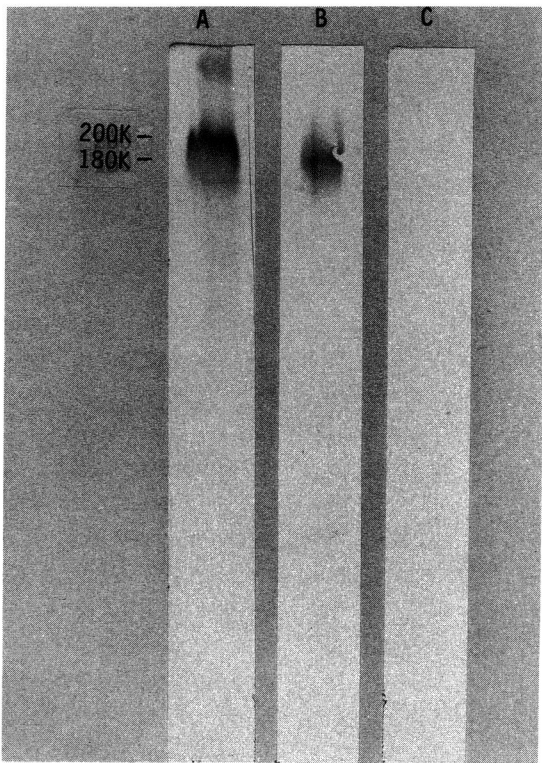


Fig. 2 Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (7.5% gel) and western blot analysis of the corresponding antigen recognized by the monoclonal antibody MT008. Lanes A and C, cultured supernatant (concentrated 50X) from human colonic carcinoma BM314 cells; lane B, carcinoembryonic antigen (CEA) obtained from Morinaga Biomedical Institute, Japan. The monoclonal antibody MT008 was used for lanes A and B. No monoclonal antibody was used for lane C. Peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse IgG (Dako, Denmark) was used as a second antibody for lanes A-C.

3・1・5 抗体—薬物結合体の *in vivo* における効果

次に抗体—薬物結合体の *in vivo* での効果を検討するため担癌ヌードマウスを用いた実験を行った (Table 4). Fig. 4 に示すようにヒト大腸癌 BM314 の担癌ヌードマウス 6 匹に対し MoAb MT008 単独、SP-H 単独、MoAb MT008 と SP-H の混合物及び MoAb MT008・SP-H 結合体を第 1 日目、第 3 日目、第 5 日目に腹腔内注射を行った。その後、MoAb 単独、SP-H 単独 MoAb MT008 と SP-H の混合物投与群では、第 40~60 日で 3 匹は死亡し、その後第 67 日目までに全例死亡した。これに対し MoAb MT008・SP-H 結合体を投与した群においては第 67 日まで全例生存、その後徐々に死亡したが、最長 102 日目まで生存するマウスも認められ、明らかに生存日数の延長を示した ($p < 0.01$)。

さらに、腫瘍型腫瘍に対する効果を検討した。Table 4 のようにヒト大腸癌細胞 BM314, 5×10^6 cells/マウスを皮下移植した担癌ヌードマウスに第 1 日、第 3 日、第 5 日目に MoAb MT008 単独、SP-H 単独、MoAb MT008 と SP-H の混合物、及び MoAb MT008・SP-H 結合体をそれぞれ腹腔内投与した (各群 6 匹毎)。その結果、Fig. 5 に示すごとく、第 46 日目までコントロール群 (抗体非投与)、MoAb 単独、SP-H 単独、MoAb と SP-H の混合物投与群の腫瘍体積は $2095 \pm 305 \text{ mm}^3$ に達したが MoAb MT008・SP-H 結合体投与群については $1340 \pm 190 \text{ mm}^3$ にすぎず、有意な抑制効果 ($p < 0.05$) を認めた (Fig. 5)。

Table 4 Protocol of *in vivo* experiment to assess antitumor effects of conjugate on BM314 bearing nude mice.

Sample	Dose (mg/kg)	Administration
I 1. Control	0	—
2. MT008	1.5	Day-1, 3, 5
3. SP-H	0.015	Day-1, 3, 5
4. MT008+SP-H	1.515	Day-1, 3, 5
5. Conjugate	0.15	Day-1, 3, 5
II 1. Control	0	—
2. MT008	1.5	Day-1, 3, 5
3. SP-H	0.015	Day-1, 3, 5
4. MT008+SP-H	1.515	Day-1, 3, 5
5. Conjugate	0.15	Day-1, 3, 5

Mouse: BALB/cAJcl-nu (female, 6 weeks),
6 mice each,

Tumor: Human colon carcinoma BM314,
 5×10^6 cells/mouse,

I. Ascitic type (ip-ip);

II. Solid type (sc-ip)

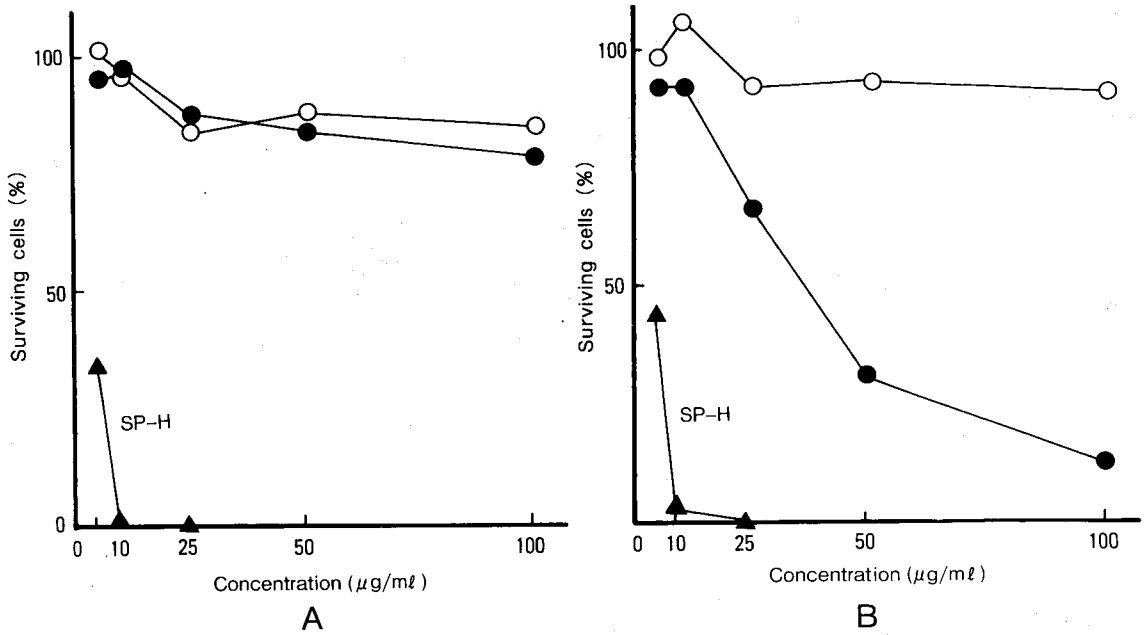


Fig. 3 Antitumor effect of the conjugate upon gastric cancer KATO III cells(A) and colon cancer BM314 cells(B).

●, immunoconjugate (MT008 • SP-H); ○, MT008; ▲, SP-H.

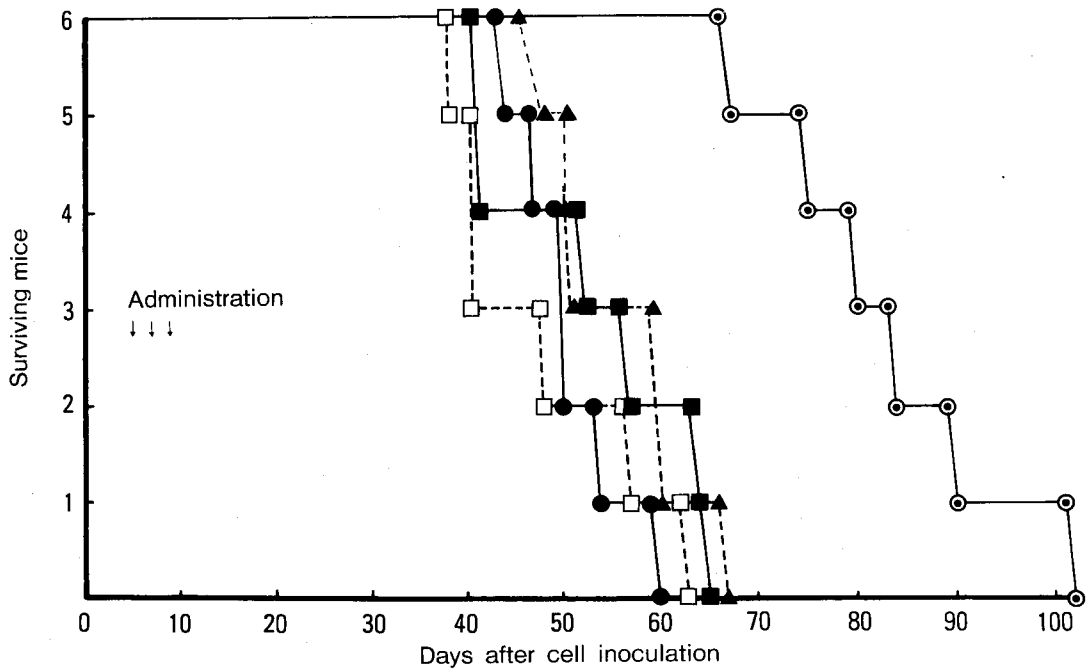


Fig. 4 Antitumor effect of the conjugate on BM314 bearing nude mice (ip-ip).

●, control (without treatment); □, MT008; ▲, SP-H; ■, MT008+Sp-H; ●, immunoconjugate (MT008 • SP-H).

Each group contained six mice.

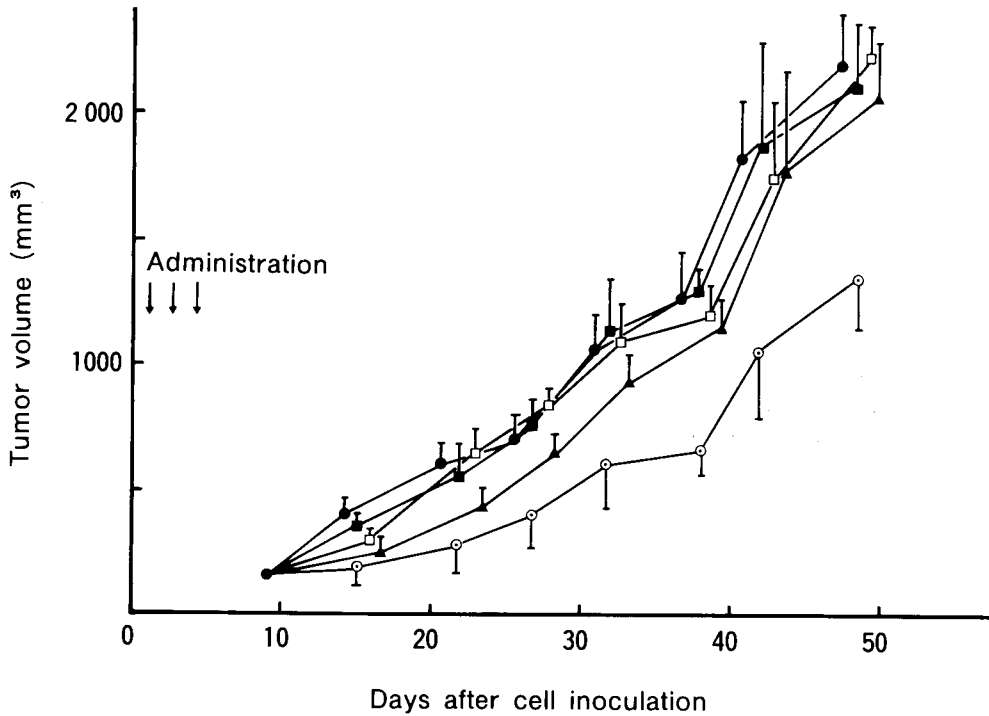


Fig. 5 Antitumor effect of the conjugate on BM314 bearing nude mice (sc-ip).
 ●, control (without treatment); □, MT008; ▲, SP-H; ■, MT008+SP-H;
 ○, immunoconjugate (MT008 · SP-H).
 Each group contained six mice.

3.2 モノクローナル抗体単独による治療実験

3.2.1 モノクローナル抗体 S1 単独による *in vitro* の効果

3.2.1.1 *In vitro* 殺腫瘍細胞効果

MoAb 単独投与による *in vitro* の効果を検討するため、MoAb S1 の結合するヒト肝癌細胞 Hc-4 を用い

てその細胞障害性を検討した。Table 5 に示すようにヒト肝癌細胞 Hc-4, 2.5×10^6 ($5 \times 10^5/ml$) に純化 MoAb S1 あるいは MoAb 225. 28S を加え 37°C, 炭酸ガス孵卵器内で 12 時間~72 時間インキュベートしたが、いずれの抗体を加えてもコントロールに比較して有意な細胞障害は認められなかった。

Table 5 Growth inhibitory activity of the monoclonal antibody S1 on the growth of human cultured hepatoma cells Hc-4 *in vitro*.

Monoclonal Antibody (1 mg/ 2.5×10^6 cells)	Experiment No.	% dead cells after incubation of Hc-4 cells with monoclonal antibodies*			
		12 hrs	24 hrs	48 hrs	72 hrs
S1 (IgG2a)	No. 1	4	6	4	10
	No. 2	2	2	5	8
225. 28S (IgG2a)	No. 1	6	6	8	13
	No. 2	5	4	4	7
None	No. 1	7	10	4	5
	No. 2	3	7	8	12

* Percent dead cells were determined by Trypan Blue dye exclusion test.

Table 6 Specificity of the monoclonal antibodies S1 and 225. 28S in an ADCC assay.

Target cells*		Monoclonal antibodies** (Ig class)	
Tumor type	Cell line	S1 (IgG2a)	225.28S (IgG2a)
Hepatoma	Hc-4	35.2±7.8***	1.3± 0.8
Colon carcinoma	BM314	1.2±0.7	2.7± 0.3
Gastric carcinoma	AZ521	0.9±0.4	0.8± 1.5
Lung carcinoma	A549	2.0±2.5	1.9± 0.9
Melanoma	Colo38	1.6±2.4	30.8±12.4
Lymphoid cells	Molt4	3.4±1.6	0.9± 1.3

* Effector/target cell ratio, 400 : 1.

** Purified monoclonal antibodies (500 ng) were used per 4×10^3 target cells.

*** Percentage specific lysis (mean±SD) in conjunction with splenocytes from BALB/c mice. Spontaneous background leakage of ^{51}Cr from target cells ranged from 8 to 15% of the total incorporated label.

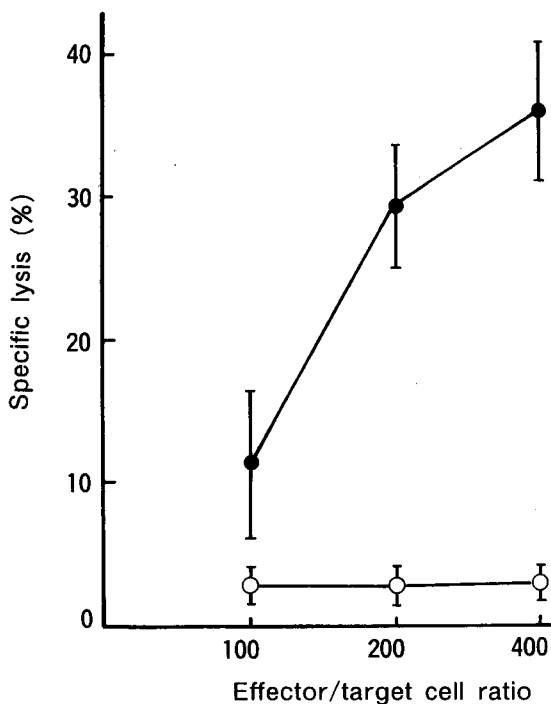


Fig. 6 ADCC assay with monoclonal antibodies S1 and 225. 28S.

Monoclonal antibody S1 (●—●) showed higher ADCC activity than the antibody 225. 28S (○—○) against human hepatoma Hc-4 cells.

Effector cells were splenocytes from BALB/c mice.

Vertical bars denote mean values±SD.

3.2.1.2 ADCCによる殺腫瘍細胞効果

さらにMoAbのADCC活性を検討した。Table 6, Fig. 6に示すようにMoAb S1はBALB/cマウス脾細胞存在下で肝癌細胞Hc-4に対し $35.2 \pm 7.8\%$ と強いADCC活性を示した。しかし、悪性黒色腫細胞Colo38あるいは他の培養細胞に対しては活性を示さなかった。対照に用いた同じIgG2aクラスのMoAb 255. 28Sは肝癌細胞Hc-4に対しADCC活性を示さなかったが、悪性黒色腫細胞Colo38に対しては明らかな活性を示し、それぞれに標的細胞特異性を保持してADCC活性を示した。またMoAb S1のADCC活性はヌードマウス脾細胞を用いた場合にもほぼ同様の傾向を示した。そこでADCCに関する効果細胞についても検索を行ったが、Table 7に示すように、BALB/cあるいはヌードマウスのいずれについても付着細胞及び非付着細胞間にADCC活性の有意な差異は認めず、両細胞ともADCC活性に関与しているものと考えられた。

Table 7 ADCC assay against human hepatoma Hc-4 cells in conjunction with splenocytes from BALB/c or nude mice*.

Effector cells	effector/ target cell ratio		
	50	100	200
BALB/c mice splenocytes			
Adherent	5**	10	26
Non-adherent	7	33	40
Nude mice splenocytes			
Adherent	5	20	35
Non-adherent	5	32	42

* Purified monoclonal antibody S1 (500 ng) was used per 4×10^3 target cells.

** Percentage specific lysis. Target cells: Hc-4 cells.

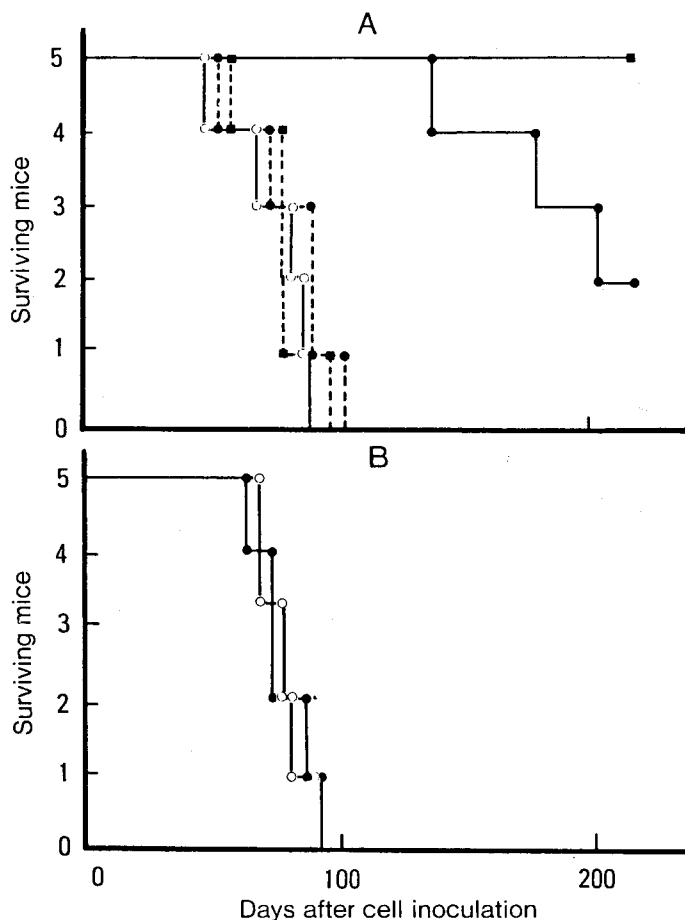


Fig. 7 The effect of the monoclonal antibody S1 and the monoclonal antibody 225. 28S on the survival days of the tumor bearing nude mice.

A: Cultured human hepatoma line Hc-4 (1×10^7 /mouse) had been inoculated intraperitoneally on day 0 before the monoclonal antibody S1 (—) or 225. 28S (---) (3 mg each/mouse) was given intraperitoneally on days 1, 3, and 5 (●) (Method 1) or on days of 1, 3, 5, 30 and 40 (■) (Method 2).

B: Cultured human melanoma line Colo38 (1×10^7 /mouse) had been inoculated intraperitoneally on day 0 before the antibody S1 (3 mg/mouse) was given intraperitoneally on days 1, 3, 5, 30 and 40 (Method 2). In the control groups (○—○) of both panels A and B, no monoclonal antibody was given.

3.2.2 モノクローナル抗体単独による *in vivo*での効果

3.2.2.1 ノードマウス移植腫瘍(腹水型)に対する効果

次に, MoAb S1 単独による *in vivo*での効果を検討すべく担癌ノードマウスを用いた実験を行った. ヒト肝癌細胞 Hc-4 を 1×10^7 cells 毎, ノードマウスに腹腔内注射した上で, 純化した MoAb S1 (IgG2a) の 3 mg を第 1 日, 第 3 日, 第 5 日目(方法 1)に腹腔内注射を行った. その結果, Fig. 7 に示すように無処置のコントロール群が第 100 日目まで全例が死亡しているのに比較

して, 第 200 日目でも 2 匹の生存を認めており, 明らかな生存日数の延長を認めた.

さらに, MoAb を第 1 日, 第 3 日, 第 5 日, 第 30 日, 第 40 日目(方法 2)に MoAb 投与(ip)を行った場合には第 200 日目でも 5 匹全例が生存しており, なお一層の生存日数の延長が認められた(Fig. 7A). 悪性黒色腫に結合する MoAb 225. 28S (IgG2a) の同量を用い同様の実験を行ったが, マウスの生存日数はコントロール群に比較して延長しなかった(Fig. 7A). この実験は 2 回行ったが同じ傾向の成績が得られた.

一方, 同じように悪性黒色腫細胞 Colo38 を腹腔内移

植したヌードマウスに対し同量のMoAb S1を方法2に従って注射した場合には、コントロール群に比較し、何らの生存日数の延長を認めなかった(Fig. 7B). 以上よりMoAb S1単独投与により、ヒト肝癌細胞移植ヌードマウスの生存期間が明らかに延長することが示された。

3・2・2・2 ヌードマウス移植腫瘍(腫瘍型)に対する効果

次に、腫瘍型腫瘍に対するMoAb S1単独投与による効果を検討するべく実験を進めた。すなわち、ヒト肝癌細胞 Hc-4(1×10^7 /マウス)を各群6匹のヌードマウスに皮下接種し、その後MoAb S1, 1.5 mg/マウスを第1日, 第3日, 第5日目に腹腔内注射した(Fig. 8). その結果コントロール群の腫瘍体積は第78日目で $1500 \pm 404.8 \text{ mm}^3$ に達したが、MoAb S1を注射した群は同期間で $250 \pm 145.5 \text{ mm}^3$ であり、有意差($p < 0.01$)を認めた。従って、MoAb S1は腫瘍型担癌ヌードマウスに対しても単独投与により抑制的に働くことが明らかとなった。

3・2・2・3 ヌードマウス移植腫瘍における ^{125}I 標識抗体の集積性と組織学的検討

次に、本抗体が腫瘍局所に到達しているか否かを検討するため ^{125}I 標識抗体を投与後、各臓器を含めて腫瘍に集積した放射能を計測した。その結果、Table 8に示すように、MoAb S1投与群では、対照に用いた同じ免疫グロブリンクラス(IgG2a)のMoAb 225. 28S投与群に比較して投与後48時間で、腫瘍組織に明らかに高い ^{125}I の集積を認めた。

さらに別の実験でMoAb S1を第1, 3及び5日目に投与後10及び20日目に腫瘍をとり出し組織学的検討を行ったが、Fig. 9(10日目)に示すように、対照群に比較して抗体投与群は、腫瘍塊の一部壊死または線維化を認めた。また、腫瘍細胞の周囲に著しい単核細胞

の浸潤も認められた。以上により *in vivo* の実験において、移植された腫瘍皮下とは異なる部位(腹腔内)にMoAb S1投与を行った場合にも、本抗体の一部は、腫瘍局所に集積してその抗腫瘍効果を示していることがうかがわれた。

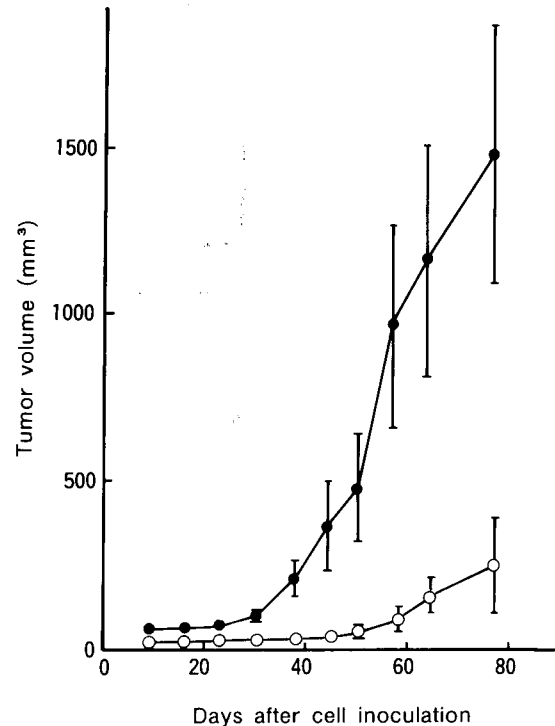


Fig. 8 Antitumor effect of the monoclonal antibody S1 on the tumor growth of the nude mice. Cultured human hepatoma line Hc-4 had been inoculated subcutaneously on day 0 before the monoclonal antibody S1 (○—○) (1.5 mg each/mouse) was given intraperitoneally on days 1, 3 and 5. In the control group (●—●), no monoclonal antibody was given.

Table 8 Accumulation of ^{125}I -labeled monoclonal antibody S1 in human hepatocellular carcinoma cell line Hc-4 and various tissues explanted from nude mice.

Tissue	^{125}I -labeled monoclonal antibody			
	S1 (IgG2a)		225. 28S (IgG2a)	
	12 hours	48 hours	12 hours	48 hours
Hc-4 tumor	20,609 cpm*	8,284 cpm	18,763 cpm	1,940 cpm
Liver	14,849	1,450	15,103	1,628
Lung	16,031	920	12,446	624
Kidney	22,787	2,611	18,387	1,481
Spleen	14,768	1,906	12,482	979

* mean cpm/10 mg (wet weight) tissue.

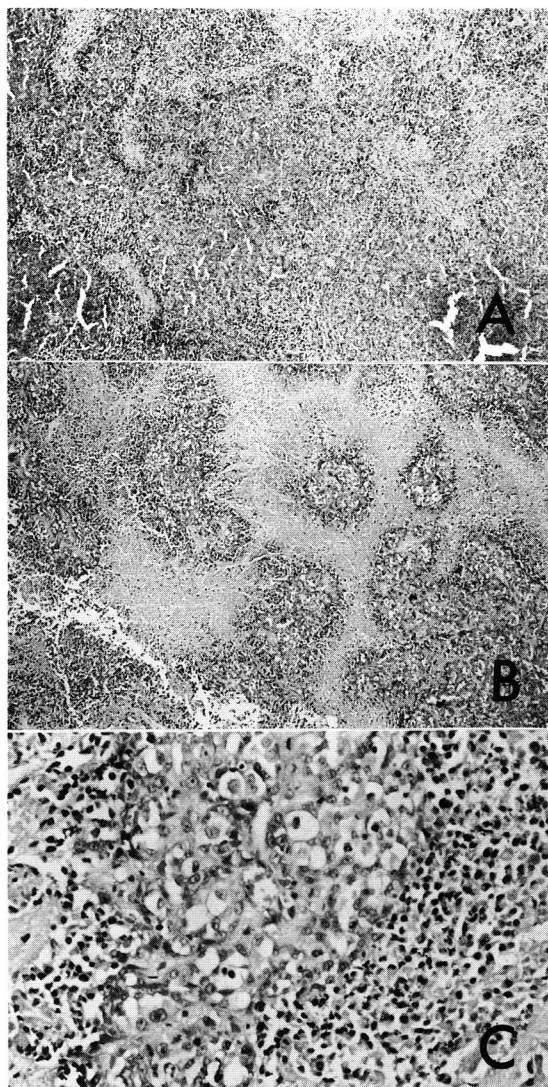


Fig. 9 Microscopic examination of human hepatocellular carcinoma Hc-4 cells explanted from nude mice.
A, control tumor cells (no treatment) ($\times 40$);
B, monoclonal antibody S1 had been given 10 days before the tumor mass was taken ($\times 40$);
C, higher magnification of picture B ($\times 90$).

4 考 察

MoAb の作製が可能になって以来、これまで著者らも癌の治療に応用しようとして基礎的検討を行ってきた。この研究においてはまずヒト大腸癌細胞 BM314 を免疫して作製した MoAb MT008 (IgG3) を細胞毒性を有する化学物質 puerothionin (SP-H) と結合させた、

いわゆる immunotoxin を作製し、その結合体の *in vitro* 及び *in vivo* における抗腫瘍効果を明らかにした。次にヒト肝癌細胞 Hc-4 を免疫して作製された MoAb S1 (IgG2a) を用い、抗体単独投与による *in vitro* での抗腫瘍効果を検討するとともにその抗体の ADCC 活性を検討した。この場合には抗体単独では肝癌細胞 Hc-4 に対して抑制的效果を認めなかったが、ADCC 活性を示すことが明らかとなった。さらに *in vivo* における MoAb S1 の単独投与による治療実験を行ったが腫瘍に対する抑制效果を認め、これには ADCC 機構の関与が示唆された。以下に項目に分けて考察を加える。

4・1 モノクローナル抗体—薬物結合体を用いた治療実験

ヒト大腸癌細胞を免疫原として数回の細胞融合により、MoAb を産生するハイブリドーマを得たが、本研究においてはとくに間接ロゼット試験により免疫原である大腸癌培養細胞 BM314 に強い反応性を示す MoAb MT008 (IgG3) を選択した。本抗体は免疫組織学的検索により大腸癌、胃癌の癌細胞膜並びに細胞質性に陽性反応を示しかつ胃の腸上皮化生部にも陽性反応を示したが、他の血液細胞、脾、肝、腎などの臓器には反応を示さなかった。従って本抗体は癌特異的とはいえないが比較的大腸癌細胞に限局して反応を認めたので、これを薬物と結合することにより、その効果を *in vitro* 及び *in vivo* の系で検討した。今回は一種のモデル実験であるので、細胞障害性の強い低分子の toxin を利用したが、本剤は単独で細胞膜を障害する作用²⁰ が知られており、細胞質内へのとり込みを必須の条件とする他の toxin (ricin, diphteria toxin など) とは、その点で作用機序が異なる。しかし、今後はさらに他の toxin や各種抗癌剤等を用いた immunoconjugate についても検討する予定である。

さて、*in vitro* の系で MoAb MT008・SP-H 結合体の作用をみると、本抗原の存在する大腸癌細胞に対しては対照の MoAb MT008 単独投与例に比較して強い細胞障害性が認められた。この場合抗原の存在しない胃癌細胞 KATO III には障害活性を示さないことより、この結合体は MoAb MT008 の特異性を保持していることが示唆された。

次に担癌ヌードマウスを用いた *in vivo* で MoAb・SP-H 結合体の効果を検討すると、MoAb MT008 単独投与では各種のコントロール群に比較して腫瘍抑制効果に差がみられないのに対して、MoAb MT008・SP-H 結合体を投与した場合には著明な抑制效果を認めた。このことは、大腸腫瘍細胞に選択的に抗体が到達

し細胞毒性を有する SP-H が腫瘍細胞に対して腫瘍障害的に働いたものと考えられる。一般に MoAb—抗腫瘍剤結合体の作製上、中間支持体を介さない場合には、抗体や薬剤の活性が、それぞれの単独の場合に比較して低下することが予想されるが、本研究においては有効にその活性が保持されたといえよう。また成績には示していないが、本 MoAb と SP-H との結合比は 1:4~5 であり、ゲル濾過の成績により高分子複合体は認められなかった。しかし、この toxin を将来ヒトへ投与するには、MoAb・SP-H 結合体の安定性や代謝過程に伴い毒性を発揮するかどうかなどさらに慎重な検討を要することは言うまでもない。

さらに MoAb・抗腫瘍剤結合体の作製については最近種々の方法が開発されている。すなわち中間支持体により、一分子の MoAb に多数分子の薬剤を結合させる工夫が試みられているが、高分子複合体ができやすい欠点もある。Tsukada *et al.*²²⁾ は、中間支持体としては、抗体とは一箇所でのみ結合し、薬剤に対しては全く別の反応基を多数有する点において、ポリ L グルタミン酸やアルブミンが有用であるとし、抗体・アドリアマイシン結合体を作製している。また Leserman *et al.*²³⁾、Hashimoto *et al.*²⁴⁾ は薬剤を多量に封入できるリポソームを実験的に使用している。また Bragman *et al.*²⁵⁾ は、異なったエピトープを認識する 2 種の MoAb をそれぞれ薬剤と結合させ、標的細胞への到達率を上昇させる試みを行っている。

いずれにしても、いわゆる“drug delivery system”として MoAb を利用する研究は特に癌や白血病の治療に重要であろう。このような研究を臨床レベルに応用するには抗体—薬物結合体としては標的細胞に達するまでの安定性、集積性が良好で、細胞に到達した後には薬剤の活性が速やかに出現する必要があり、著者らも高い特異性を有する MoAb の作製と平行して、さらに研究を進めている。

4・2 モノクローナル抗体単独による治療実験

癌免疫療法において MoAb を単独で、薬物との結合なしに使用することができれば、さらに簡便であることは言うまでもない。しかし、これまで抗体単独で抗腫瘍効果を認めたとする報告は非常に少ない。

1985 年 Houghton *et al.*¹⁰⁾ は GD3 に対する MoAb を悪性黒色腫患者に投与して、一部の症例ではあるが明瞭な抗腫瘍効果を認めたとしている。この抗体の作用機序は明らかではないが、これまで諸家の報告から抗体単独による抗腫瘍効果機序としては、1) epidermal growth factor の receptor に対する MoAb のように増

殖因子リセプターに対する阻止あるいは競合効果、2) ADCC あるいは antibody-dependent macrophage-mediated cytotoxicity (ADMC) による抗腫瘍効果、3) 補体を介した抗腫瘍効果、あるいは 4) 抗イディオタイプ抗体の産生及びこれに共軛した抗体(抗・抗イディオタイプ抗体) あるいは免疫担当細胞群の抗腫瘍効果等が想定されている。

著者らは、これまでに作製してきた数 100 種の癌細胞に対する MoAb の中から、主として ADCC (ADMC) 効果 (*in vitro*) を有する MoAb を選別して、抗体単独による抗腫瘍効果を担癌ヌードマウスの系で検討してきたが、今回ヒト肝癌細胞に対する MoAb S1 (IgG2a) が ADCC 効果を発揮することを見出した。

成績に示したように詳細に検討すると、本 MoAb はヒト肝癌細胞移植ヌードマウスの生存期間を著明に延長した。しかも、この効果は MoAb を腫瘍と異所性に投与した場合にも認められた点注目される。また ¹²⁵I 標識抗体を用いた実験より MoAb S1 が腫瘍局所に到達していることは明らかであり、対照に用いた特異性の異なる抗体に比較して腫瘍部位に有意に高く集積していることにより、抗体が非特異的あるいは Fc 部分を介して腫瘍に到達している可能性は低いと考えられた。

癌細胞増殖抑制の機序として、MoAb S1 が、腫瘍細胞表面に存在する細胞増殖に関連する抗原あるいは何らかの増殖因子リセプターに結合している可能性も推測されるが、*in vitro* の実験系で、本 MoAb 単独では何らの細胞障害作用も認められず、これを支持する成績は得られなかった。さらに、ヒト、ウサギ、マウスの補体を用いた別の実験で補体依存性の細胞障害活性も示さなかった (成績は示していない)。

しかし、マウス脾細胞をエフェクターとして ADCC 活性を検討すると、*in vitro* で肝癌細胞 Hc-4 に対し標的細胞特異的に強い障害活性が認められた。

Herlyn and Koprowski²⁶⁾ は大腸癌関連抗原に対する MoAb 17-1A (IgG2a) を作製し、*in vitro* で強い ADCC 活性を示すことをみているが、同抗体の単独投与で担癌ヌードマウスにおいて著明な腫瘍増殖抑制効果を認めている。Seto *et al.*²⁷⁾ はマウス乳癌 MM46 細胞に対する MoAb を用いて、ADMC が IgG2a, IgG2b, IgG1 によりひき起こされたと報告している。Kipps *et al.*²⁸⁾ は ADCC 活性と免疫グロブリンクラスに焦点を合わせた興味ある報告を行っている。すなわち、同じ抗原決定基を認識し、かつ同じアフィニティを有する各免疫グロブリンクラスの MoAb の比較により、IgG2a タイプの抗体に最も強い ADCC 活性が認め

られたとしている。今回の著者らの MoAb も IgG2a であり、ADCC 活性を有しているが、なお *in vivo* において抗体投与後の腫瘍細胞周辺に単核細胞浸潤が認められた点も注目されよう。しかしながら、これらの成績のみでは今回の抗腫瘍効果が ADCC (ADMC) 機序を介したものと確定できず、この点をさらに明らかにするために、1) ADCC の系に、*in vivo* 実験で腫瘍局所に集積した単核球をエフェクター細胞として使用する。2) ADCC (ADMC) 機構には免疫グロブリンの Fc 部が必須であるので MoAb S1 より Fc 部を除いた Fab 部投与による治療実験を行う、などの検討を予定している。

さらに今回は検索を行っていないが、Koprowski *et al.*⁹⁾ は胃・腸癌に対する MoAb を臨床的に応用した際、効果が認められた症例の血中より同 MoAb に対する抗イディオタイプを検出しており、これが次の抗体(抗・抗イディオタイプ抗体)あるいは免疫担当細胞と連動して抗腫瘍効果を示す可能性を示唆している。さらに 1986 年 8 月ブタペストで行われた第 14 回国際癌学会において Koprowski²⁹⁾ は患者血清中に抗イディオタイプ抗体が産生される際には抗マウス免疫グロブリン抗体が高頻度に産生されている点を加えている。この点から考えると、今後の MoAb 単独あるいは drug conjugate による治療法に必須と考えられているヒト型 MoAb の作製研究と平行して、マウス型 MoAb についても、その抗腫瘍効果の機序をさらに詳細に検討する必要があるものと考えられよう。

いずれにしても MoAb を単独に投与して抗腫瘍効果が得られたとする報告はむしろ少なく特にヒト肝癌についての報告は著者らの知る限り認められていない現状からみて、本 MoAb S1 の抗腫瘍効果機序をさらに明らかにすることは極めて有意義と考えられる。

5 結 論

ヒト大腸癌細胞を免疫原として数回の細胞融合により作製された MoAb のうち、血清学的免疫組織学的に特異性の高い MoAb MT008 を用い細胞毒性を有する化学物質 puorhionin (SP-H) との結合体を作製し治療を目的に基礎的検討を試みた。

さらにヒト肝癌細胞に対する MoAb S1 を用い抗体単独による治療について基礎的検討を試み以下の成績を得た。

1. MoAb MT008 は間接ロゼット試験により培養大腸癌細胞に強く反応し他の培養細胞や血液細胞には反応を示さなかった。また、免疫ペルオキシダーゼ法

による検索では MoAb MT008 は大腸癌及び、胃癌に比較的限局して反応した。

2. そこで、MoAb MT008 と、細胞障害性を有する薬物 puorhionin (SP-H) とを結合させ *in vitro* に治療実験を行った。その結果、結合体は抗体の特異性を保持したまま、大腸癌培養細胞 BM314 の生存率を抑制した。

3. さらに大腸癌細胞 BM314 をヌードマウスに移植し、MoAb MT008 単独及び MoAb MT008・SP-H 結合体の腹腔内投与による効果を検討し結合体投与群で生存日数の延長並びに腫瘍増殖抑制効果を認めた。

4. 次に、肝癌細胞に反応する MoAb S1 (IgG2a) を用いて MoAb 単独による治療実験を行った。*In vitro* では、MoAb S1 の結合する肝癌細胞 Hc-4 を標的として抗体存在下に培養したが細胞障害性は認めなかった。一方、MoAb S1 は BALB/c マウス脾細胞存在下で肝癌細胞 Hc-4 に対し強い ADCC 活性を示した。しかし、悪性黒色腫細胞 Colo38 あるいは他の培養細胞に対して活性を示さなかった。

5. さらに、肝癌細胞に反応する MoAb S1 (IgG2a) 単独投与による、ヒト肝癌移植ヌードマウスを用いた、*in vivo* での治療実験を試みた。その結果、MoAb 単独投与群 (ip) で生存日数の延長及び腫瘍増殖抑制効果を認め注目された。この場合、MoAb は腫瘍局所に集積して効果を発揮することが推測され、また腫瘍細胞周辺に単核細胞浸潤が認められた。

以上により、MoAb を用いた癌免疫療法の機序について、その一面を明らかにし得た。

御指導、御校閲いただいた本学内科学第一講座谷内昭教授、研究に際して御協力をいただいた本講座の諸先生に謝意を表します。

本研究は文部省科学研究費補助金・がん特別研究 I (61010062) 及び II (61015088)、厚生省がん研究助成金並びに癌研究振興財団からの補助(谷内)によった。

文 献

1. Köhler, G. and Milstein, C.: Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature(London)* **256**, 495-497 (1975).
2. Koprowski, H. Herlyn, M., Steplewski, z., Sears, H. F.: Specific antigen in serum of patients with colon carcinoma. *Science* **212**, 53-55 (1981).
3. Bast, R. C., Klug, T. L., John, E. S., Jenison, E., Niloff, J. M., Lazarus, H., Berkowitz, R. S.,

- Leavitt, T., Griffiths, C. T., Parker, L., Zurawski, V. R. and Knapp, R. C.: A radioimmunoassay using a monoclonal antibody to monitor the course of epithelial ovarian cancer. *N. Engl. J. Med.* **309**, 883-887 (1983).
4. Metzgar, R. S., Gaillard, M. T., Levine, S. J., Tuck, F. L., Bossen, E. H. and Borowitz, M. J.: Antigens of human pancreatic adenocarcinoma cells defined by murine monoclonal antibodies. *Cancer Res.* **42**, 601-608 (1982).
 5. Fukushima, K., Hirota, M., Terasaki, P. I., Wakisaka, A., Togashi, H., Chia, D., Suyama, N., Fukushi, Y., Nudelman, E. and Hakomori, S.: Characterization of sialosylated Lewis-x as a new tumor-associated antigen. *Cancer Res.* **44**, 5279-5285 (1984).
 6. Imai, K., Sasanami, T., Nakanishi, T., Noguchi, T., Yachi, A.: Circulating blood group-related antigen(s) in cancer patients detected by the monoclonal antibodies produced against hepatocellular carcinoma cell line. *Tumor Biol.* **6**, 257-272 (1985).
 7. Hinoda, Y., Imai, K., Endo, T., Yamashita, T. and Yachi, A.: Detection of circulating adenocarcinoma-associated antigen in the sera of cancer patients with a monoclonal antibody. *Jpn. J. Cancer Res.(Gann)*. **76**, 1203-1211 (1985).
 8. Masui, H., Kawamoto, T., Sato, J. D., Wolf, B., Sato, G. and Mendelsohn, J.: Growth inhibition of human tumor cells in athymic mice by anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies. *Cancer Res.* **44**, 1002-1007 (1984).
 9. Koprowski, H., Herlyn, D., Lubeck, M., DeFreitas, E. and Sears, H. F.: Human anti-idiotypic antibodies in cancer patients: Is the modulation of the immune response beneficial for the patient? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 216-219 (1984).
 10. Houghton, A. N., Mintzer, D., CordonCardo, C., Welt, S., Fliegel, B., Vadhan, S., Carswell, E., Melamed, M. R., Oettgen, H. F. and Old, L. J.: Mouse monoclonal IgG3 antibody detecting GD3 ganglioside: A phase I trial in patients with malignant melanoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 1242-1246 (1985).
 11. 桑原武彦: ヒト肝癌のヌードマウスへの移植に関する研究. *肝臓* **21**, 303-315 (1980).
 12. 守谷保夫, 今井浩三: モノクローナル抗体を用いたCEAの免疫学的研究. *札幌医誌* **53**, 455-467 (1984).
 13. Imai, K., Natali, P. G., Kay, N. F., Wilson, B. S. and Ferrone, S.: Tissue distribution and molecular profile of a differentiation antigen detected by a monoclonal antibody (345.134S) produced against human melanoma cells. *Cancer Immunol. Immunother.* **12**, 159-166 (1982).
 14. Imai, K., Molinaro, G. A. and Ferrone, S.: Monoclonal antibodies to human melanoma associated antigens. *Trans. Plant. Proc.* **12**, 380-383 (1980).
 15. Imai, K., Ng, A. K., and Ferrone, S.: Characterization of monoclonal antibodies to human melanoma associated antigens. *J. Natl. Cancer Inst.* **66**, 489-496 (1981).
 16. Imai, K., Nakanishi, T., Noguchi T., Yachi, A. and Ferrone, S.: Selective *in vitro* toxicity of puromycin conjugated to the monoclonal antibody 225.28S to a human high-molecular-weight melanoma-associated antigen. *Cancer Immunol. Immunother.* **15**, 206-209 (1983).
 17. Imai, K. and Ferrone, S.: An indirect rosette microassay to characterize human melanoma associated antigens (MAA) recognized by operationally specific xenoantisera. *Cancer Res.* **40**, 2252-2256 (1980).
 18. 藤田英雄, 今井浩三: 抗CEAモノクローナル抗体による免疫組織化学的研究. *札幌医誌* **53**, 535-551 (1984).
 19. 遠藤高夫, 今井浩三: ヒト肺腺癌細胞に対するモノクローナル抗体の作製と癌患者血清中抗原の検出. *札幌医誌* **54**, 393-410 (1985).
 20. Nakanishi, T., Yoshizumi, H., Tahara, S., Hakura, A. and Toyoshima, K.: Cytotoxicity of puromycin-A on various animal cells. *Gann* **70**, 323-326 (1979).
 21. Ohtani, S., Okada, T., Yoshizumi, H. and Kagamiyama, H.: Complete primary structures of two subunits of puromycin A, a lethal protein for Brewer's yeast from wheat flour. *J. Biochem.* **82**, 753-767 (1977).
 22. Tsukada, Y., Kato, Y., Umemoto, N., Takeda, Y., Hara, T. and Hirai, H.: An anti- α -fetoprotein antibody-daunorubicin conjugate with a novel poly-L-glutamic acid derivative as intermediate drug carrier. *J. Natl. Cancer Inst.* **73**, 721-729 (1984).
 23. Leserman, L. D., Machy, P., Barbet, J.: Cell-specific drug transfer from liposomes bearing monoclonal antibodies. *Nature* **293**, 226-228 (1981).
 24. Hashimoto, Y., Sugawara, M., Masuko, T. and Hojo, H.: Antitumor effect of actinomycin D

- entrapped in liposomes bearing subunits of tumor-specific monoclonal immunoglobulin M antibody. *Cancer Res.* **43**, 5328-5334 (1983).
25. Bragman, K. S., Heath, T.D. and Papahadjopoulos, D.: Simultaneous interaction of monoclonal antibody-targeted liposomes with two receptors on K562 cells. *Biochim. Biophys. Acta* **730**, 187-195 (1983).
26. Herlyn, D. and Koprowski, H.: IgG2a monoclonal antibodies inhibit human tumor growth through interaction with effector cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 4761-4765 (1982).
27. Seto, M., Takahashi, T., Nakamura, S., Matsudaira, Y., and Nishizuka, Y.: *In vivo* antitumor effects of monoclonal antibodies with different immunoglobulin classes. *Cancer Res.* **43**, 4768-4773 (1983).
28. Kipps, T. J., Parham, P., Punt, J. and Herzenberg, L. A.: Importance of immunoglobulin isotype in human antibody-dependent, cell-mediated cytotoxicity directed by murine monoclonal antibodies. *J. Exp. Med.* **161**, 1-17 (1985).
29. Koprowski, H.: Monoclonal antibody. Abstracts of the 14th International Cancer Congress **1**, 1 (1986).

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学内科学第1講座 丹田まり子