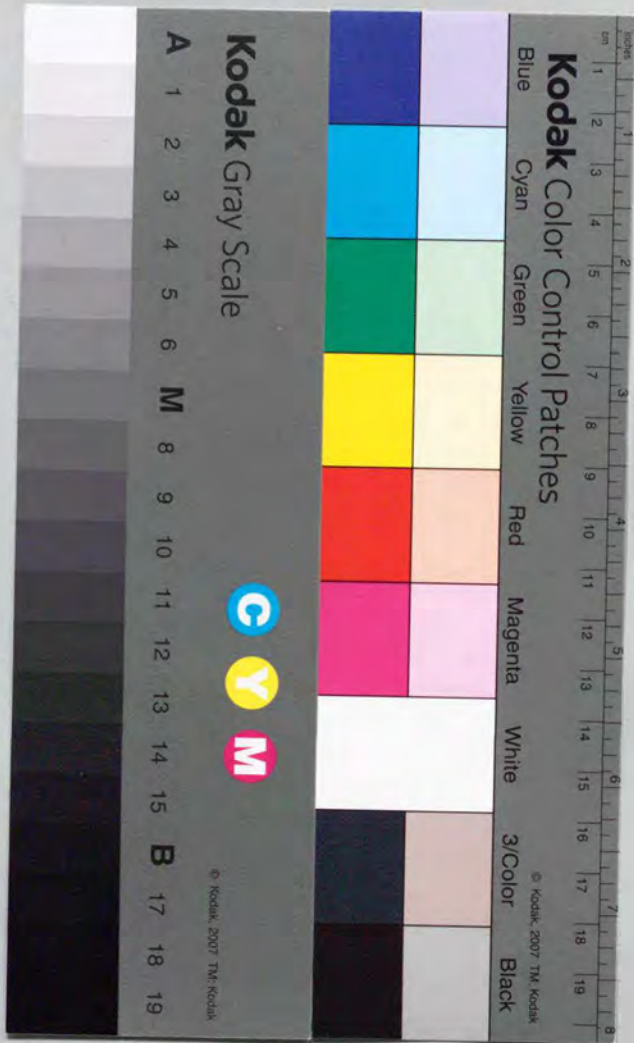


抗α-フェトリプロテイン抗体とビンカルカ  
ロイドとのコンジュゲイトの抗腫瘍作用

中野 隆夫

長田 俊彦





抗  $\alpha$ -フェトプロテイン抗体とビンカルカ  
ロイドとのコンジュゲイトの抗腫瘍作用

## 目次

総論の部	-----	1
緒言	-----	1
第I章 抗 $\alpha$ -フェトプロテイン(AFP)モノクローナル抗体とビンカ		
アルカロイドとのコンジュゲイトの作製	-----	3
第1節 抗AFPモノクローナル抗体の作製	-----	3
1-a ヒト由来AFPの精製と免疫操作	-----	4
1-b 細胞融合とハイブリドーマの選別	-----	4
第2節 抗AFPモノクローナル抗体の腫瘍への親和性	-----	6
2-a 全身オートラジオグラム	-----	7
2-b 組織取り込み速度	-----	10
第3節 コンジュゲイトの作製	-----	11
第4節 コンジュゲイトのAFP結合活性	-----	13
考察	-----	14
第II章 コンジュゲイトの <i>in vitro</i> 抗腫瘍作用	-----	17
第1節 単層培養法による評価	-----	17
第2節 コロニー法(Human Tumor Clonogenic Assay; HTCA)に		
よる評価	-----	19
2-a HuH-7細胞のHTCAにおける基本特性	-----	20
2-b コンジュゲイトの評価	-----	21
考察	-----	23



第III章 コンジュゲイトの選択的な抗腫瘍作用とその作用機序	
の解析	25
第1節 コンジュゲイトの選択的な抗腫瘍作用	25
1-a 35G抗体の抗腫瘍作用	25
1-b 非特異抗体とのコンジュゲイトの抗腫瘍作用	26
1-c VDSと35G抗体との混合物の抗腫瘍作用	27
1-d AFP非産生腫瘍細胞に対する抗腫瘍作用	28
1-e 抗腫瘍作用のまとめ	29
第2節 コンジュゲイトの抗腫瘍作用の特徴	30
2-a 腫瘍細胞との接触時間と抗腫瘍作用	30
2-b 遊離のAFPの抗腫瘍作用に与える影響	32
第3節 コンジュゲイトの作用機序の解析	34
3-a ラット肝臓のホモジナイズ中でのコンジュゲイトの 安定性	37
3-b コンジュゲイトの抗腫瘍作用に及ぼすlysosome酵素 の影響	38
考察	39
第IV章 コンジュゲイトの <i>in vivo</i> 抗腫瘍作用	42
第1節 プロトコール	42
第2節 <i>In vivo</i> 抗腫瘍作用	44
考察	45
総括	47
謝辞	50

実験の部	51
第I章の実験	51
【1】抗AFPモノクローナル抗体の作製	51
1) ヒト肝細胞癌細胞の <i>in vitro</i> 培養	51
2) ヒトAFPのマウスへの免疫	52
3) 細胞融合およびハイブリドーマの選別	52
4) ELISAによる抗AFP抗体の確認	53
5) 抗体のアイスタイピング	53
【2】抗AFPモノクローナル抗体の全身オートラジオ グラム	54
【3】抗AFPモノクローナル抗体の組織分布	54
【4】コンジュゲイトの作製	55
【5】ELISAによるコンジュゲイトのAFPに対する結合 活性	56
第II章の実験	57
【1】単層培養法	57
【2】コロニー法	57
【3】脂溶性の計算	58
第III章の実験	59
【1】HTCAにおける抗腫瘍作用試験	59
【2】35G抗体のAFPに対する結合解離定数	59
【3】ラットの肝臓ホモジネート中でのコンジュゲイト の安定性	60

【4】 Lysosome酵素の影響	-----	61
第IV章の実験	-----	62
【1】 HuH-7細胞のヌードマウスにおける継代	-----	62
【2】 Xenograftにおけるコンジュゲイトの評価	-----	62
引用文献	-----	64

## 総論の部

### 緒言

抗癌剤は癌細胞を標的とするが、癌細胞以外に宿主側の正常細胞にも作用する。特に、消化管の上皮、毛嚢、骨髓、リンパ球などの分裂速度の速い細胞を傷害しやすい。この作用が癌の化学療法にとって大きな障壁となっている。抗癌剤を癌細胞に選択的に送達させることにより、副作用の軽減を図ることが可能となる。さらには、現在では治療が困難な転移性の癌に対しても有効な治療法となりえる。そのための手法としては、Table 1に示したような種々の試みが考案されている。これらのなかでもモノクローナル抗体をキャリアーとする手法は腫瘍に対する選択性に優れている。我々は、腫瘍関連抗原に対するモノクローナル抗体をキャリアーとする抗癌剤の腫瘍細胞に対するtargeting drug delivery system (targeting DDS) の機能特性を調べ、その有用性について検証した。標的の腫瘍には、東洋人に発症率の高い肝細胞癌を選んだ。腫瘍に対する抗体を得る方法としては、細胞自体を抗原として免疫する方法と、癌細胞に特徴的な物質を精製してこれを抗原として免疫する方法がある。Targeting DDSの機能特性を詳細に解析するためには、抗原が明確である必要があり、本研究では後者の方法、すなわち精製した腫瘍関連抗原を免疫源とした。具体的には、肝細胞癌患者の約80%の血液中に特異的に認められるヒト由来の $\alpha$ -fetoprotein (AFP) をマウスに免疫し、細胞融合法を用いて抗AFPモノクロ



ナール抗体を産生するハイブリドーマを得た。この抗体の腫瘍への選択的な分布を確認後、抗体とvinca alkaloidとのコンジュゲイトを合成して、その抗腫瘍作用を*in vitro*で評価した。また、コンジュゲイトのtargeting DDSとしての機能と細胞内での作用機構について解析した。さらに、ヒト肝細胞癌細胞をヌードマウスに移植した系でコンジュゲイトの*in vivo*抗腫瘍作用を調べた。これらの結果から、抗AFPモノクローナル抗体をキャリアーとするコンジュゲイトの癌化学療法としての有用性を評価した。

Table 1 癌化学療法におけるターゲティング製剤の例

方 法	特 徴	文 献
モノクローナル抗体	腫瘍関連抗原に対する抗体または腫瘍細胞を直接免疫して得た抗体をキャリアーとして利用する。	1 - 5
リボソーム	リボソームに抗癌剤を封入し、血液中の滞留性を亢進する。リボソームの表面を抗体や糖鎖で修飾することにより、特定の組織/腫瘍へ送達させる。	6 - 8
エマルション	リンパ節への薬物の送達性を向上させる。	9, 10
マイクロスフェア マイクロカプセル	目標の血管を塞栓し、かつ薬物を徐々に放出する。 または、磁性を持たせて磁気で誘導する。 微小粒子径のものはリボソームまたはエマルションと類似の特徴を有することもある。	11 - 13
ポリマーとの結合	腫瘍血管の特性（透過性亢進、リンパ系の未発達）を利用して、腫瘍部位への薬物の集積性を高める。	14, 15
昇圧療法	アンジオテンシンによる昇圧に対して、腫瘍血管の応答が低下していることを利用して、腫瘍部位の薬物濃度を高める。	16
遺伝子治療	レトロウイルスが分裂している細胞の染色体にしか組み込まれないことを利用して、ある種の蛋白を産生する遺伝子を導入し、抗癌剤の感受性を向上させる。	17

## 第1章 抗 $\alpha$ -フェトプロテイン(AFP)モノクローナル抗体とベンカアルカロイドとのコンジュゲイトの作製

AFPは胎生期の卵黄嚢と胎児の肝臓で産生される分子量が約7万のalbuminと性状が類似した糖蛋白 [18, 19] で、胎児にとってはalbumin様の生理作用を担っていると考えられている [20]。AFPは成人の血液中にはほとんど検出されないが、肝細胞癌の患者では77.6% (200 ng/ml以上の高値を示す患者の比率)、慢性肝炎で21.6%、肝硬変では51.8%の確率で検出される [21]。また、乳幼児期の悪性奇形腫のヨークサック腫瘍でも高い確率でAFPの産生が認められている [21]。Table 2にAFPの特性をまとめて記した。

Table 2  $\alpha$ -Fetoproteinの特性 (18-22)

生理学的特徴；胎生期に主に卵黄嚢と胎児肝で産生される  
血液中濃度；胎生12-14週 4 mg/ml  
新生児 10<sup>4</sup> - 10<sup>5</sup> ng/ml  
7-8ヵ月 20 ng/ml 以下  
化学的特徴；分子量 約7万  
アミノ酸数 590個  
糖含量 4%  
albuminとアミノ酸の1次配列が35%一致する  
生理活性；胎児におけるalbuminの役割を有すると考えられているが、不明な点が多い

### 第1節 抗AFPモノクローナル抗体の作製

特異性の高い抗体を効率良く得るためには、抗原の純度をあらかじめ高めておくこ



とが必要がある。ヒトの肝細胞癌細胞 (HuH-7) を *in vitro* で培養し、その上清をアフィニティクロマトに通じて含有するAFPを精製した。この精製AFPをマウスに免疫して、抗ヒトAFPモノクローナル抗体を作製した [23]。

#### 1-a ヒト由来AFPの精製と免疫操作

佐藤らにより肝細胞癌患者から分離樹立されたHuH-7細胞 [24, 25] を、無血清/無蛋白のIS-RPMI培地 [24] で培養した上清を、家兎の抗AFPポリクローナル抗体を固相化したアフィニティカラムに通し、ヒトAFPの精製と濃縮を行った。

この精製AFPをBalb/Cマウスに2種類の方法で免疫した。第一の方法には、Freund's complete adjuvant (FCA) と乳化して腹腔内に投与後、3週間目にalum adjuvantで連続3日間ブースターをかける、いわゆる通常法を採用した。第二の方法としては、3週間隔で3回免疫する過免疫を採用し、最初はFCAを用い、後の2回はFreund's incomplete adjuvantを用いた。なお、過免疫の3回目の免疫の後alum adjuvantで連続3日間ブースターをかけた。

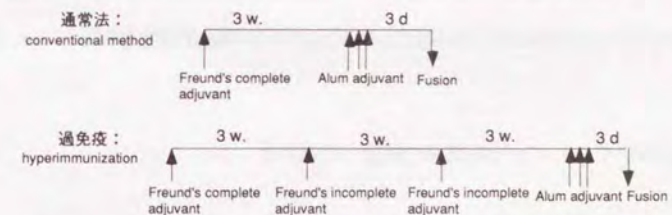
#### 1-b 細胞融合とハイブリドーマの選別

Alum adjuvantを用いたブースターの3日後に、マウスから無菌的に脾臓を摘出し、細胞を解した後、ステンレスメッシュを通して結合組織などを除いた。さらに、トリス塩化アンモニウムで混入した赤血球を溶血させて除去した。得られたB細胞とマウ

スのミエローマ細胞 (NS-1) とをpolyethylene glycol 4000を用いて、両者の比を1:1から1:10までに変えて細胞融合を行った。細胞融合後1週間はHAT培地 (hypoxanthine, aminopterin, thymidine を含有する培地) で、さらに2週間はHT培地 (hypoxanthine, thymidine を含有する培地) で培養して、ハイブリドーマ以外のB細胞またはNS-1細胞を除去した。ハイブリドーマが出現したウェルについては、AFPを固相化したenzyme-linked immunoadsorbent assay (ELISA) で抗AFP抗体の産生を確認した。さらに、human serum albuminとの交差反応をELISAで調べ、AFPに特異的な抗体産生ハイブリドーマを選別した。Table 3に示すように、全まきこみウェルに対してAFP特異抗体を産生するハイブリドーマ出現率は、通常法の免疫で19%、過免疫では3%であった。過免疫ではAFPに対する特異抗体の出現効率は低くなった。

Table 3 免疫方法とスクリーニング結果

免疫方法	通常法	過免疫
まきこみウェル	573	192
ハイブリドーマ出現ウェル	539	192
陽性ウェル	106	6
AFP 特異陽性ウェル (出現率)	100 (19%)	5 (3%)



AFP特異抗体を産生するハイブリドーマのラインについては、すべて限外希釈法で



クローニングした。IgMおよびIgAを産生するラインはクローニング過程でIgGへのクラススイッチが生じたり、抗体産生が停止した。最終的には、Table 4に示すように12ラインの抗AFP特異抗体産生ハイブリドーマを得た。抗体のサブクラスはオクタブロー法で確認を行った。IgG<sub>1</sub>が10ラインであり、IgG<sub>2a</sub>とIgG<sub>2b</sub>がそれぞれ1ラインずつであった。過免疫で得られたのはIgG<sub>1</sub>の80GとIgG<sub>2b</sub>の82Fの2ラインのみで、残り10ラインは全て通常の免疫方法で得られた。

Table 4 Subclass of Anti-AFP Monoclonal Antibodies

Subclass	No. of antibodies (line no.)
IgG <sub>1</sub>	10 (5C, 23G, 26F, 43D, 62B, 62E, 64B, 67D, 70D, 80G* )
IgG <sub>2a</sub>	1 (35G)
IgG <sub>2b</sub>	1 (82F* )

\* : hyperimmunization

これらの抗体の中で、IgG<sub>1</sub>の67Dと80GおよびIgG<sub>2a</sub>の35Gは特にAFPに対する結合活性が高いことをELISAで確認した [23]。腫瘍に対する抗体の選択的な送達性の実験にはIgG<sub>1</sub>の80G抗体を、抗腫瘍作用の評価にはIgG<sub>2a</sub>の35G抗体を使用した。なお、抗体のAFPに対する結合活性は第4節にコンジュゲイトの結合活性と併せ示した。

## 第2節 抗AFPモノクローナル抗体の腫瘍への親和性

抗AFPモノクローナル抗体単独の腫瘍細胞への選択的な移行性を、HuH-7細胞を移植したヌードマウスで検証した。まず、<sup>125</sup>Iで標識した抗体を投与後の放射活性の全

身の分布を調べた。次いで、標識した抗体を投与後の一定時間ごとに各種臓器を摘出し、臓器中の放射活性を測定して組織取り込み速度を求めた [26]。

## 2-a 全身オートラジオグラム

<sup>125</sup>I標識した抗AFPモノクローナル抗体(80G ; 187  $\mu$  Ci/67.5  $\mu$  g/5ml/kg)を、HuH-7細胞を移植したヌードマウスの尾静脈から投与し、一定時間ごとの全身オートラジオグラム(ARG)を作製した。Fig. 1には、腫瘍(17)を含む切断面の投与後4日までのARGを示した。放射活性の強度をカラーで表示した。赤色ほど放射活性が高いことを表わしている。投与0.5日目には腫瘍全体に高い放射活性が認められたが、時間とともに放射活性は低下した。1日目には腫瘍内部で放射活性が不均質化し、2日目移行では腫瘍の中心部に比して腫瘍表面の活性が高かった。

Fig. 2の上段は0.5および1日目のマウスの右体側(腫瘍を移植した側)であり、中段は中心部、下段は左体側の切断面のARGである。血液および甲状腺を除くと、腫瘍の放射活性が高く、抗体が選択的に分布していることが示唆された。



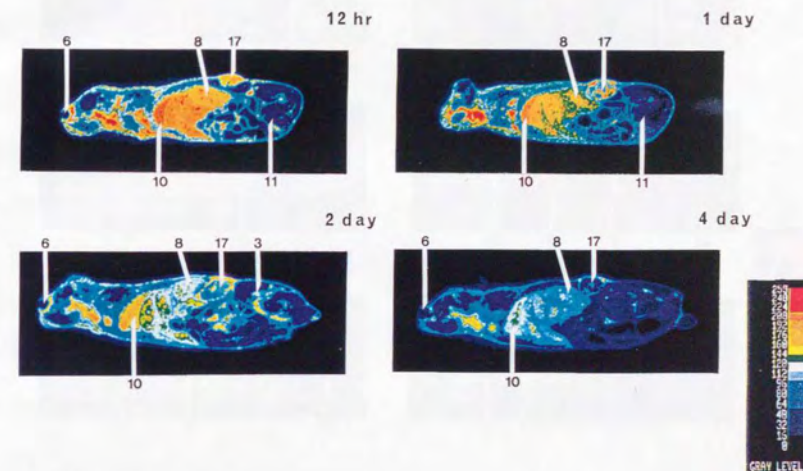


Fig. 1 Pseudo color image of autoradiograms showing RI distribution  
- Section of transplanted tumor at 0.5, 1, 2, 4 days after administrations -

$^{125}\text{I}$ -80G was intravenously administered to male nude mice bearing HuH-7 cells.

Legend:	1. Adrenal	7. Heart	13. Skin
	2. Blood	8. Kidney	14. Spleen
	3. Bone marrow	9. Liver	15. Testis
	4. Brain	10. Lung	16. Thyroid
	5. Brown fat	11. Muscle	17. Transplanted tumor
	6. Eyeball	12. Salivary gland	



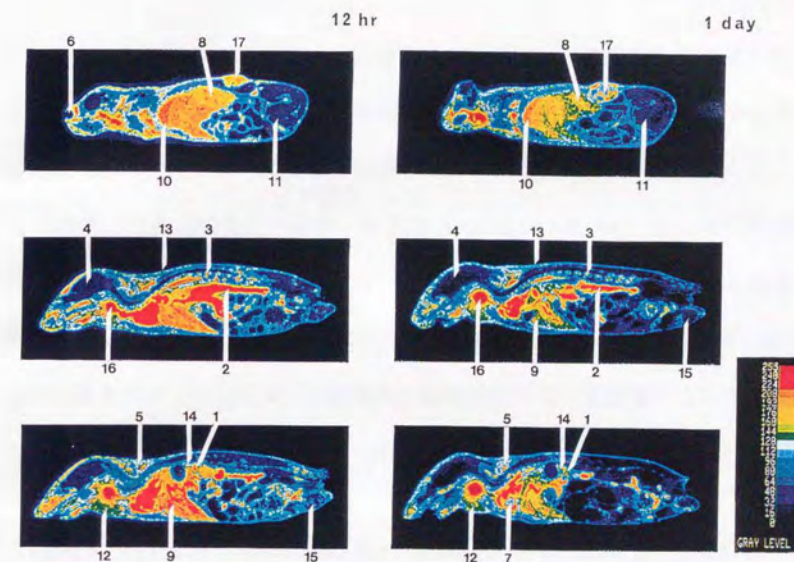


Fig. 2 Pseudo color image of autoradiograms showing RI distribution  
- Section of right (tumor), center, and left sides at 0.5 and 1 days  
after administrations -

$^{125}\text{I}$ -80G was intravenously administered to male nude mice bearing HuH-7 cells.

- Legend:
- |                |                    |                        |
|----------------|--------------------|------------------------|
| 1. Adrenal     | 7. Heart           | 13. Skin               |
| 2. Blood       | 8. Kidney          | 14. Spleen             |
| 3. Bone marrow | 9. Liver           | 15. Testis             |
| 4. Brain       | 10. Lung           | 16. Thyroid            |
| 5. Brown fat   | 11. Muscle         | 17. Transplanted tumor |
| 6. Eyeball     | 12. Salivary gland |                        |



## 2-b 組織取り込み速度

全身オートラジオグラムは抗体の全身分布を相対的に捕捉するのに適しているが、定量性に欠ける。腫瘍及び各組織への抗体の選択的な送達性について、組織取り込み速度を用いて定量的に調べた。

$^{125}\text{I}$ 標識した抗AFPモノクローナル抗体(80G;  $8\text{--}10\ \mu\text{Ci}$ /マウス)をヒト肝癌細胞を移植したヌードマウスに投与し、30分までの各組織への抗体の取り込み速度を求めた。投与5、15、30分後の腫瘍、心臓、肝臓、胃、腎臓、脾臓、筋肉及び血液を採取した。これらの組織中の放射活性から、組織取り込み速度指数を高倉ら [27, 28] の方法によって算出した。結果はTable 5に示した。

Table 5 AUC and Tissue Uptake Rate Indices for  $^{125}\text{I}$ -n-IgG and  $^{125}\text{I}$ -80G in Nude Mice Bearing HuH-7 Cells or HuH-13 Cells

Antibodies		$^{125}\text{I}$ -n-IgG a)	$^{125}\text{I}$ -80G b)	$^{125}\text{I}$ -80G b)
Transplanted cells		HuH-7 c)	HuH-7 c)	HuH-13 d)
Tissue uptake rate index (ml/hr/g tissue)	Tumor	56.9	104	68.3
	Heart	33.9	40.0	66.8
	Liver	138	88.8	51.4
	Stomach	53.6	53.7	45.4
	Kidney	461	117	39.2
	Spleen	530	227	241
	Muscle	7.3	11.9	9.0
AUC (% of dose·hr/ml)		15.0	17.0	17.8

- a) normal mouse IgG
- b) anti-AFP monoclonal antibody
- c) AFP producing hepatoma cells
- d) AFP no-producing hepatoma cells



AFPを産生するHuH-7細胞に対する80G抗体または非特異抗体 (n-IgG) のそれぞれの腫瘍への取り込み速度は、104と56.9 ml/hr/g tissueであり、80G抗体ではn-IgGに比して約2倍高かった。しかし、AFPを産生しないHuH-13細胞に対しては、80G抗体の腫瘍への取り込み速度は68.3 ml/hr/g tissueであり、HuH-7細胞に対するn-IgGの値とほとんど変わらなかった。

先のARG及び腫瘍への取り込み速度から、抗AFPモノクローナル抗体はヌードマウスに移植したヒトAFP産生細胞に選択的に送達することが確認できた。

### 第3節 コンジュゲイトの作製

抗癌剤と結合可能な抗体側の官能基としては、lysineのアミノ基または aspartic acidやglutamic acidのカルボキシル基が代表的である。本研究では、アミノ基を抗体側の官能基に選び、抗癌剤としてはアミノ基と反応可能な官能基を有する抗癌剤の中から服用量が比較的小さいvinca alkaloidを選んだ。

Vinca alkaloidとのコンジュゲイトは、Conradら [29] のvinblastineを出発原料とした、bovine serum albuminとの反応を参考に作製した [30]。すなわち、vinblastineを出発原料として、無水メタノール中でhydrazineで処理し4位の脱アセチル化と3位のヒドラジド体を得た。これを亜硝酸で3位をアジド化した後、塩化メチレンで抽出し、濃縮乾固した。次いで、pH9の緩衝液に溶解した35G抗体を加えて反応させた。反応終了後は、Sephadex G-100のゲル濾過カラムを通して、未反応の低分子を排除した。さらに、コンジュゲイトは

Colloidion bagsを用いて目的の濃度に濃縮した (Chart 1)。

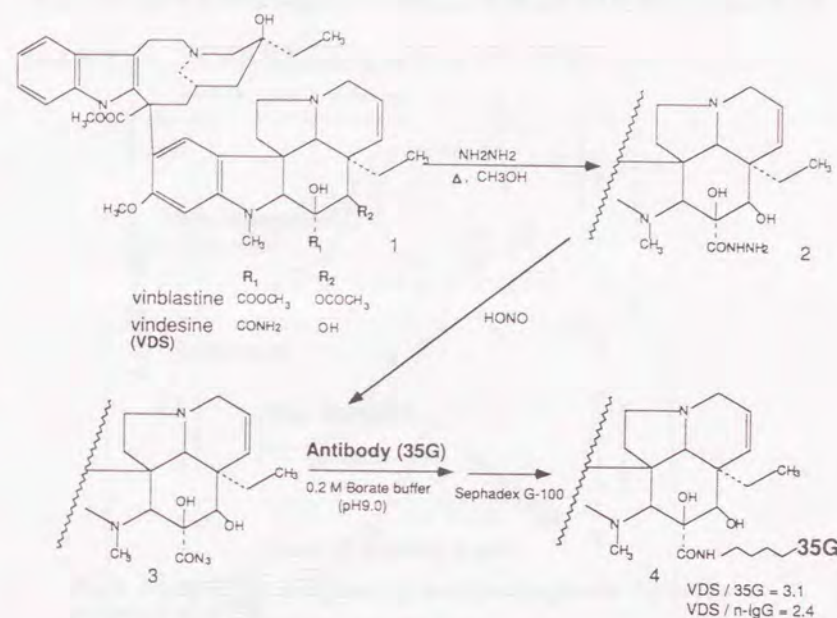


Chart 1. Synthetic Procedure of VDS-35G

Reaction of vinblastine (1) with hydrazine gave 4-desacetylvinblastine monohydrazide (2). 4-Desacetylvinblastine acid azide (3) was obtained from 2 by nitrosation. Reaction of anti-AFP MoAb (35G) dissolved in 0.2 M borate buffer (pH9.0) with 3 gave VDS-35G. VDS-35G was dialyzed with 0.1 M PBS and purified using Sephadex G-100.

ゲル濾過のスペクトルおよびコンジュゲイトのUVスペクトルをFig.3に示した。UV270と280 nmの吸光度差から、抗体1モルに結合したvinca alkaloidのモル数 (コンジュゲイト中のvinca alkaloidの化学構造はvindesineに類似するためvindesineの量として換算した) は、3.1であった。なお、以降は抗癌剤はVDS、コンジュゲイトはVDS-35Gと略す。



35G抗体に換えてマウスのn-IgGを用いた場合には、そのコンジュゲイト (VDS-n-IgG) の抗体1モルに結合したVDSのモル数は2.4であった。

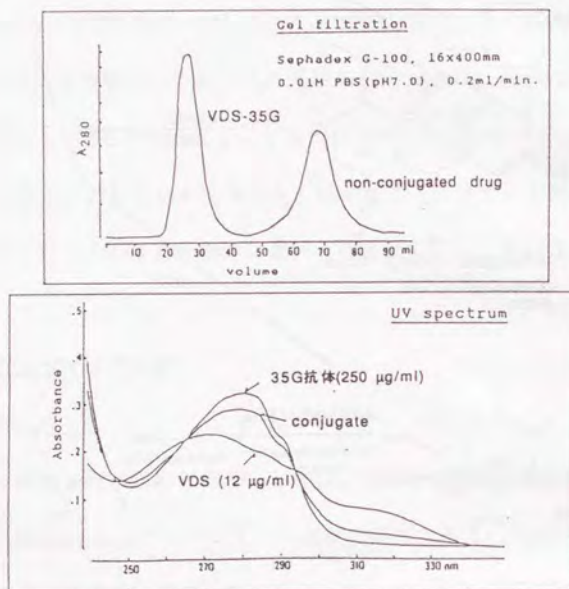


Fig. 3 Gel Filtration Chromatogram and UV Spectrum of VDS-35G

#### 第4節 コンジュゲイトのAFP結合活性

500 mgのAFPを96ウェルマイクロプレートに固相化し、濃度を数水準に変えた35G抗体またはVDS-35Gを反応させ、これに酵素標識した抗マウス抗体を反応させてAFPに結合した抗体の量を測定した [30]。Fig. 4に示したように、VDS-35Gの結合活性は35G抗体とほぼ同等であり、35G抗体のAFPに対する結

合活性はコンジュゲイトの作製にかかわらずよく維持された。また、35G抗体及びVDS-35Gのいずれもhuman serum albuminやnormal human serum (Fig. 4には後者についてのみ記している) にはまったく反応しなかった。

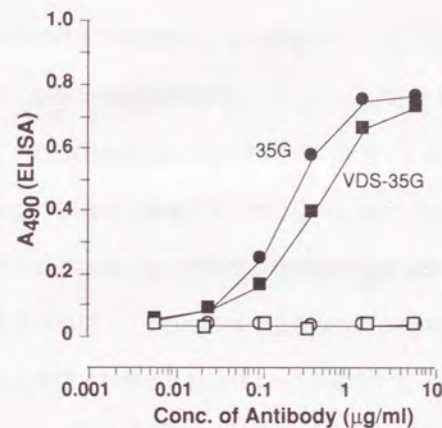


Fig. 4 Affinity of 35G and VDS-35G to AFP and to Normal Human Serum Measured by ELISA

ELISA plates were coated with 50 µl of the solution of AFP (10 µg/ml) or normal human serum. ●, 35G to AFP; ■, VDS-35G to AFP; ○, 35G to normal human serum; □, VDS-35G to normal human serum.

#### 考察

ヒト由来のAFPに対するマウスのモノクローナル抗体を10ライン作製した。AFP産生腫瘍を移植したヌードマウスに対して、<sup>125</sup>I標識した抗AFP抗体 (80G抗体、IgG<sub>1</sub>) を静注すると腫瘍に特異的に分布することが確認できた。また、抗AFP抗体 (35G抗体、IgG<sub>2a</sub>) 1モルに対してvinca alkaloidがVDS換算で3.1



モルが結合したコンジュゲイト (VDS-35G) を作製した。このコンジュゲイトのAFPに対する結合活性は35G抗体とほとんど変わらず、特異性が高かった。

本研究では、抗体単独の*in vivo*における分布と、コンジュゲイトの作製では使用する抗体を変えた。HerlynとKoprowskiによれば、IgGのサブクラスの中ではIgG<sub>2a</sub>抗体が抗腫瘍作用を最も期待できる [31]。本研究でも、抗腫瘍作用を評価するコンジュゲイトにはIgG<sub>2a</sub>の35G抗体を使用した。しかし、抗体単独の分布の測定には抗腫瘍作用が少ない方がより正確になると考え、分布の研究にはIgG<sub>1</sub>の80G抗体を使用した。

AFPは分泌性の蛋白質であり、Table 2に示したように患者では血液中にも存在している。したがって、抗AFP抗体を血管内に投与した場合には、腫瘍部位に送達する前に血液中のAFPによって中和されることが懸念される。しかし、腫瘍のイメージングの研究では、ラジオアイソトープで標識した抗AFP抗体は腫瘍に集積すると報告されている。例えば、ラットAFPに対するポリクロナール抗体 (<sup>125</sup>I標識) を用いてラットの移植肝癌細胞 (AH7974) または原発性肝癌 (アゾ色素で誘発) のイメージングの研究 [32] や、ヒトAFPに対するモノクロナール抗体 (<sup>131</sup>I標識) を用いてヒト睾丸腫瘍移植ヌードマウスのイメージングの研究 [33] では、血液中にAFPが存在するにもかかわらず、抗AFP抗体は腫瘍をイメージング可能と報告されている。我々の研究結果もこれらの報告とはほぼ一致した。液相中のAFPと腫瘍細胞の表面のAFPに対する抗AFP抗体の結合性の解析に関しては、第III章にさらに詳細に記した。

本研究では、モノクロナール抗体を<sup>125</sup>Iで標識してARGを測定した。しかし、<sup>125</sup>Iは細胞からの排出 (efflux) を受けやすく、長時間の分布測定には不向きと言われている [34, 35]。したがって、effluxの影響も少ない短時間での腫瘍への取り込み速度を

あわせて測定した。その結果は、Table 5に示したようにAFP産生細胞に抗AFP抗体が特異的に分布しやすいことが確認できた。



## 第 II 章 コンジュゲイトの *in vitro* 抗腫瘍作用

コンジュゲイトの抗腫瘍作用を *in vitro* で評価した。

一般的には、抗癌剤の殺細胞作用は時間依存性と濃度依存性に分類される [36]。代謝阻害剤や vinca alkaloids などは時間依存性であり、抗生物質の doxorubicin やアルキル化剤の cyclophosphamide などは濃度依存性と言われている。これらの違いは、その薬剤の作用機序と関連すると考えられている [36]。本研究で使用した vinca alkaloids は代表的な時間依存性の抗癌剤であり、その抗腫瘍作用を十分に発揮するためには、薬剤と腫瘍細胞とは継続した接触をさせることが望ましい。したがって、薬剤と腫瘍細胞が連続的に接触する単層培養法 (Monolayer Culture Assay: MCA) で抗腫瘍作用を調べた。また、vinca alkaloid は抗 AFP モノクローナル抗体と化学結合しており、その targeting 機能を評価するために、MCA に加えて、一定時間のみ薬剤と細胞を接触させた後で細胞を寒天培地中で培養するコロニー方法でもコンジュゲイトの抗腫瘍作用を評価した [30]。

### 第 1 節 単層培養法による評価

単層培養法は、培養プレートで培養した腫瘍細胞に対して培地中に薬剤を添加して培養し、一定期間培養後に生細胞数をカウントする方法であり、薬物の *in vitro* の抗腫瘍作用試験として汎用されている。

HuH-7 細胞を 2 日間培養後、種々の濃度の薬剤 (VDS-35G または VDS) を含む培地

に交換し、8 日間培養した。その間 2-3 日毎に薬剤を含む培地を交換した。8 日目に trypsin でプレートから HuH-7 細胞を剥がし、色素排除法で生細胞数を計数した (Chart 2)。

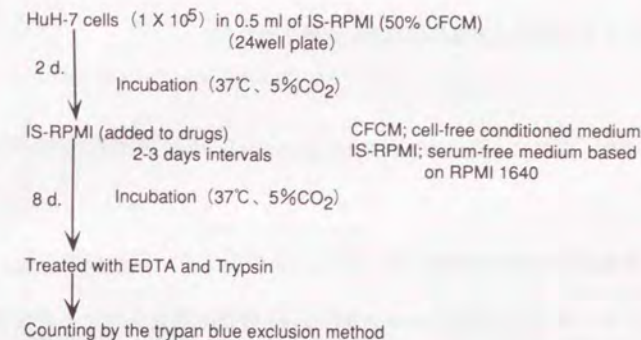


Chart 2 Scheme of Monolayer Culture Assay

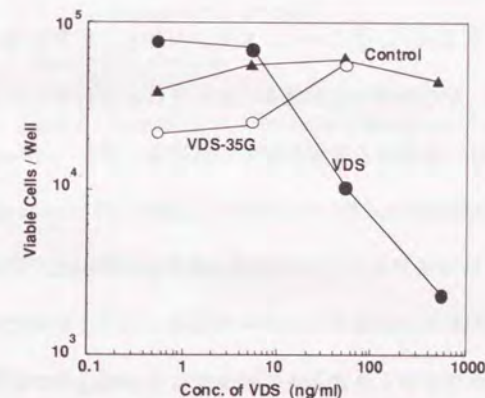


Fig. 5 Sensitivity of VDS and VDS-35G against HuH-7 Cells in Monolayer Culture Assay

HuH-7 cells ( $1 \times 10^5$ ) in IS-RPMI (50% CFCM) were plated on 24-well multiplates. Two days later, the medium was replaced by IS-RPMI containing VDS or VDS-35G. The drug-containing medium was replaced at 2 or 3-d intervals and viable cells were counted using trypan blue exclusion 8 d after initial exposure.  $n=2$   
●, VDS; ○, VDS-35G; ▲, control.



結果をFig. 5に示したが、VDSでは濃度に依存して細胞数が減少した。コントロールに対して細胞数が50%になるVDSの濃度は約50 ng/mlであった。いっぽう、VDS-35Gでは濃度を増しても細胞数の減少が認められなく、コンジュゲイトにすることによりVDSの抗腫瘍作用の消失が懸念された。

## 第2節 コロニー法 (Human Tumor Clonogenic Assay: HTCA) による評価

腫瘍細胞は分化状態の違いから、a) 分裂しない成熟細胞 (end cells)、b) 過渡期の細胞 (transitional cells)、c) 自己増殖能を有する幹細胞 (stem cell) の3種類に分類される [37]。この分化状態の異なる細胞群の中では、幹細胞は腫瘍のコロニーの形成に携わり、幹細胞の数が固形腫瘍の悪性度に関係していると考えられている [37]。すなわち、薬剤を接触後の固形腫瘍細胞のコロニー数を計数すれば、その薬剤の固形腫瘍に対する抗腫瘍作用を評価できる。

コロニー法としては、抗癌剤の臨床成績との相関性に優れたHuman Tumor Clonogenic Assay (以降HTCAと略す) を用いた。HTCAはHamburgerとSalmonが開発した評価方法であり [38-40]、患者から摘出した腫瘍細胞の動力学または生物学的特性の評価や、これらの腫瘍に対して最適の抗癌剤を選別するために用いられている。しかし、これまでにtargeting DDSの評価に適用された報告はない。Chart 3に操作の概略を示したが、HTCAでは浮遊化させた腫瘍細胞と薬剤とを一定時間接触後、溶液中の遊離の薬剤は洗浄で取り除き、腫瘍細胞のみを二重軟寒天培地のの上層部で培養する。本研究では二重軟寒天培

地中で2週間培養後に、Hamburgerらの方法に準じて一定の大きさ ( $20 \mu\text{m}$ ) 以上のコロニー数を計数した。

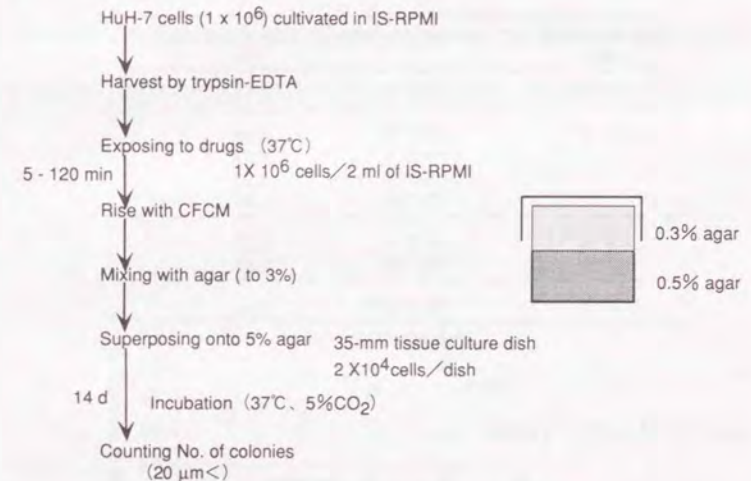


Chart 3 Scheme of Human Tumor Clonogenic Assay

## 2-a HuH-7細胞のHTCAにおける基本特性

HuH-7細胞は無血清・無蛋白のIS-RPMI培地で培養可能な細胞であり、HTCAの培地も寒天をIS-RPMI培地で溶解して作製した。評価実験に先立ち、寒天培地中に播種したHuH-7の細胞数とコロニー数との関係および播種細胞数から求めたコロニー形成確率を調べた。Table 6に示したように、播種細胞数



とコロニー数との間には良好な線形性が認められた。このときのコロニー形成確率は0.3~0.7%であった。

Table 6 Relationship between Number of HuH-7 Cells and Colonies Formed in HTCA

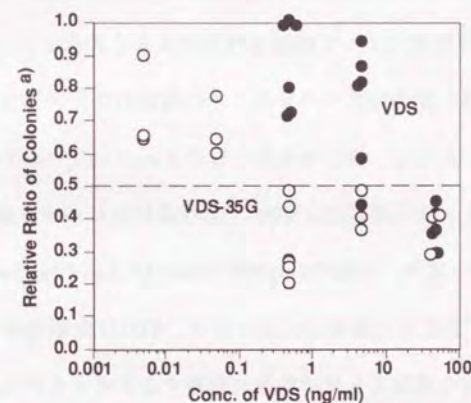
Number of cells (/ dish)	Number of colonies	Colony formation (%)
$1 \times 10^4$	$74 \pm 13$	0.74
$2 \times 10^4$	$136 \pm 14$	0.68
	$114 \pm 5$	0.57
	$106 \pm 14$	0.53
	$121 \pm 20$	0.61
$4 \times 10^4$	$130 \pm 11$	0.33
	$139 \pm 24$	0.35
$11 \times 10^4$	$467 \pm 36$	0.42
Average $\pm$ s.d. n=3		

## 2-b コンジュゲイトの評価

IS-RPMI培地中に分散させた $1 \times 10^6$ 個のHuH-7細胞に対して、種々の濃度のVDSおよびVDS-35Gを1時間だけ接触させた。1時間後に遠心分離で遊離の薬剤を除去し、HuH-7細胞を二重軟寒天培地中で2週間培養した。薬剤を処置群のコロニー数を無処置のコントロール群のコロニー数で割った値 (Relative Ratio of Colonies ; RRC) を抗腫瘍作用の指標とした。コントロールに比してコロニー数が少ない (抗腫瘍効果が高い) 時、その数値は小さくなり、0.5以下を抗腫瘍効果が陽性と判断した。0.5をHTCAの判断基準とする考え方は、川村らの報告 [41] を参考にした。彼らによれば、卵巣癌 (OX-1) に対する

vinblastineやbleomycinなどの抗腫瘍剤のHTCAにおける評価とヌードマウスでの *in vivo* の評価結果は、HTCAの判定基準を0.5にした場合良い一致をみている。

VDS-35GおよびVDSのHTCAの評価結果をFig. 6に示した。VDS-35Gでは0.5 ng/ml以上の濃度でHuH-7細胞に対する抗腫瘍作用が陽性を示した。いっぽう、VDSでは単層培養法の値と同じ50 ng/ml以上で抗腫瘍作用が陽性を示した。すなわち、VDS-35GはVDSと比較して約100分の1の低濃度で抗腫瘍作用を示した。



a) = number of colonies for a test sample / number of colonies for control

Fig. 6 Cytotoxicity of VDS and VDS-35G against HuH-7 Cells in HTCA

HuH-7 cells ( $1 \times 10^6$ ) remained in contact with 2 ml of VDS or VDS-35G solution for 1 h at 37°C. ●, VDS; ○, VDS-35G. Under the dashed line (0.5) is effective.



## 考察

VDSは2種類の*in vitro*評価系でいずれも約50 ng/mlの濃度以上で抗腫瘍作用を示した。しかし、VDS-35Gは単層培養法では無効であったが、HTCAでは0.5 ng/ml以上で抗腫瘍作用を示した。VDS-35Gのようなtargeting DDSの薬剤では、その機能特性を十分考慮した評価系を用いる必要がある。最終的には*in vivo*との相関性に優れた評価系を選択することが重要であるが、以下にVDSとVDS-35Gの*in vitro*評価系と抗腫瘍作用との関係について考察した。

VDSの*in vitro*の抗腫瘍作用は2種類の評価系ではほぼ同じ結果であった。しかし、VDS-35Gでは評価系によって抗腫瘍作用が大きく異なった。これらの結果については、薬剤の腫瘍細胞への分布とその細胞の分化状態との関係で解釈することができる。ただし、自己増殖能を有するstem cellでAFPが特異的に産生されると仮定する。その時には、VDS-35Gは選択的にAFPを産生するstem cellに送達する。いっぽう、VDSのclogP値をHanschとLeoのfragment method [42, 43] に基づいて計算した結果は2.36であり、VDSは脂溶性が高く、その脂溶性によっていずれの細胞にもほぼ均等に分布すると考えられる。単層培養法で色素排除法によってカウントする生細胞数は、その細胞の分化状態とは直接関係しないため、全細胞中に占める割合の低いstem cellを選択的に攻撃するVDS-35Gでは見かけ上は細胞数が減少しない。しかし、VDS-35GはAFPの産生量の多いstem cellに選択的に分布しコロニーの形成が妨げられた結果、HTCAではVDS-35Gの抗腫瘍作用が強く顕れたものと解釈できる (Fig. 7)。

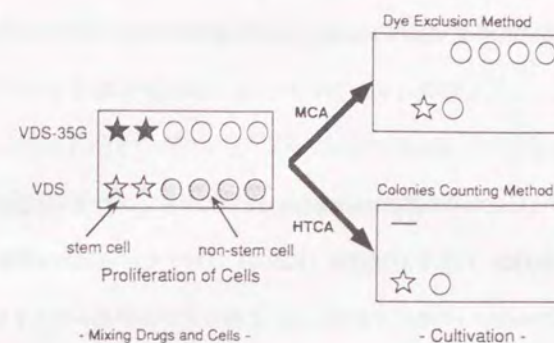


Fig. 7 Prospective Cytotoxic System in MCA and HTCA

VDS-35G may be selectively delivered to stem cells which may produce more AFP. VDS may be evenly distributed to cells. The viable cells in MCA are not virtually affected by the proliferation stage. The colonies in HTCA are considered to be formed by the stem cells.



### 第 III 章 コンジュゲイトの選択的な抗腫瘍作用とその作用機序の解析

第II章の第2節に記したように、vinca alkaloidと抗AFPモノクローナル抗体とのコンジュゲイト (VDS-35G) のヒト肝癌細胞 (HuH-7) に対する *in vitro* の抗腫瘍作用は、VDSと比較して約100分の1の濃度で発現した。このコンジュゲイトのヒト肝癌細胞に対する殺細胞特性を明らかにするとともに、その作用機序の解析を行った [30, 44]。

#### 第1節 コンジュゲイトの選択的な抗腫瘍作用

1)35G抗体単独、2)vinca alkaloidと非特異抗体とのコンジュゲイト (VDS-n-IgG)、3)VDSと35G抗体との非化学結合混合物の3種類について、それぞれの抗腫瘍作用をHTCAで評価し、VDS-35Gの場合と比較した。また、VDS-35GとVDS-n-IgGについてはAFPを産生しないヒト肝癌細胞に対する抗腫瘍作用を評価した。これらの実験から、VDS-35Gの抗腫瘍作用が特定の細胞に対して選択性を有していることを証明した。

##### 1-a 35G抗体の抗腫瘍作用

AFPに対する抗体は、antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) 作用により腫瘍細胞に対して殺細胞作用を示す [45]。しかし、HTCAの評価

試験ではeffector cellsが存在しないため、このADCC作用は期待できず、腫瘍細胞に対する薬剤の直接的な殺細胞作用のみが評価される。 $1 \times 10^6$ 個のHuH-7細胞あたり $4.7 \times 10^{-6} \sim 4.7 \times 10^{-2}$  nMの35G抗体の範囲で抗腫瘍作用をHTCAで評価した。結果はFig. 8に示したように35G抗体単独では全く抗腫瘍作用は認められなかった。

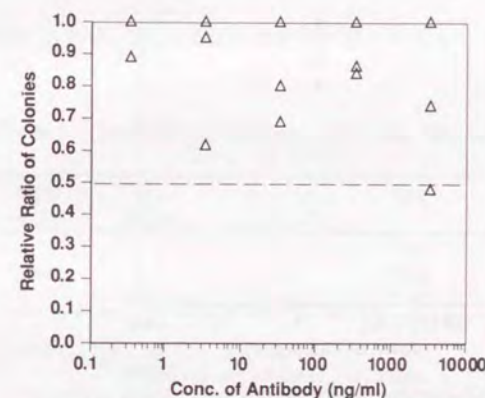


Fig. 8 Cytotoxicity of 35G against HuH-7 Cells in HTCA  
HuH-7 cells ( $1 \times 10^6$ ) remained in contact with 2 ml of 35G solution for 1 h at 37°C.

##### 1-b 非特異抗体とのコンジュゲイトの抗腫瘍作用

35G抗体に換えてマウスの非特異抗体 (n-IgG) と vinca alkaloid とのコンジュゲイト (VDS-n-IgG) を Scheme 1 に示した方法で作製し、その抗腫瘍作用をHTCAで評価した。VDS換算で0.5~50 ng/mlの濃度範囲を用いたが、すべての



濃度で抗腫瘍作用が認められなかった (Fig. 9)。特に、VDSが抗腫瘍作用を示した50 ng/mlの濃度でも、まったく作用が認められなかった。すなわち、VDSはIgGとの化学結合によって高分子化することにより、抗腫瘍作用が発現するのではないことが示された。

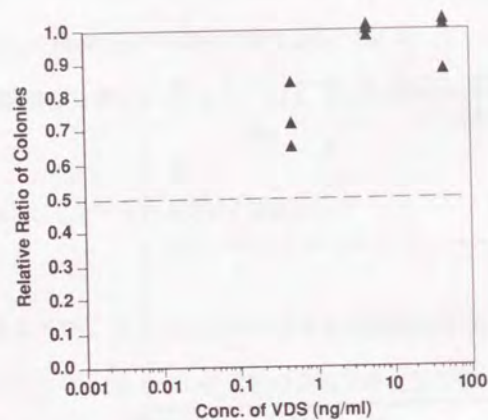


Fig. 9 Cytotoxicity of VDS-n-IgG against HuH-7 Cells in HTCA  
HuH-7 cells ( $1 \times 10^6$ ) remained in contact with 2 ml of VDS-n-IgG solution for 1 h at 37°C.

#### 1-c VDSと35G抗体との混合物の抗腫瘍作用

VDSの濃度が0.05~50 ng/mlに対して、35G抗体をそれぞれ0~3500 ng/mlの範囲で加えて、両者の非化学結合の混合物を作製した。この混合物の抗腫瘍作用をHTCAで評価したが、Table 7に示したように、抗腫瘍作用の増強は認められなかった。VDSの50 ng/mlでは、35G抗体を添加しない時のRRCが0.36であっ

たが、35G抗体を35、3500 ng/ml添加するとRRCは0.58、0.84と大きくなり、抗腫瘍作用が消失した。これは、HuH-7細胞を用いたHTCAでは無血清—無蛋白の培地を使用しているため、多量に添加された35G抗体にVDSが吸着されて、細胞への分配が阻害されたためと考えられる。なお、35G抗体は細胞に取り込まれると考えられるが、その取り込み量は細胞表面のAFP量に依存する。35G抗体を多量に添加した系では、細胞表面の抗原に結合していない35G抗体にもVDSは吸着するため、抗腫瘍作用の増強が認められないものと考えられる。

Table 7 Cytotoxicity of Mixture of VDS and 35G in HTCA

VDS (ng/ml)	35G (ng/ml)	Molar ratio (VDS/35G)	RRC	n
0.05	0	—	n.t.	
	35	0.28	0.69	2
	3500	0.0028	0.86	2
0.5	0	—	0.87	6
	35	2.8	0.91	2
	3500	0.028	0.68	2
5	0	—	0.74	6
	35	28	0.46	3
	3500	0.28	0.60	2
50	0	—	0.36	6
	35	280	0.58	3
	3500	2.8	0.84	2

RRC; Relative Ratio of Colonies n.t.; not tested

#### 1-d AFP非産生腫瘍細胞に対する抗腫瘍作用

AFPをまったく産生しないヒト肝細胞癌細胞のHuH-13に対する抗腫瘍作用を、VDS-35GとVDS-n-IgGについて評価した。細胞数およびVDS換算濃度は



Fig. 6と同一条件であるが、Fig. 10に示したようにいずれのコンジュゲイトとも抗腫瘍作用を示さなかった。

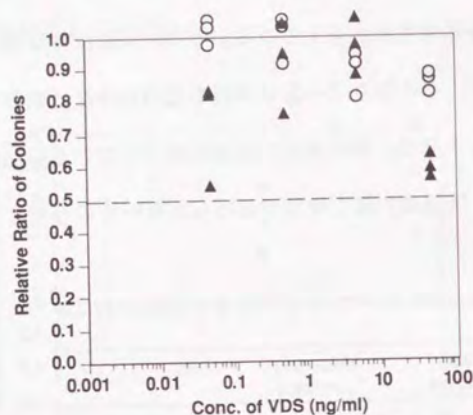


Fig. 10 Cytotoxicity of VDS-35G and VDS-n-IgG against HuH-13 Cells in HTCA

HuH-13 cells ( $1 \times 10^6$ ) remained in contact with 2 ml of VDS-35G or VDS-n-IgG solution for 1 h at 37°C. HuH-13 cells produce no AFP. O, VDS-35G; ▲, VDS-n-IgG.

#### 1-e 抗腫瘍作用のまとめ

以上の結果をTable 8にまとめた。In vitroの抗腫瘍作用はVDS-35GをAFP産生細胞に対して用いた場合のみ発現した。抗腫瘍作用の発現には、1)AFPの産生細胞をターゲットとする、2)抗AFP抗体とVDSとが化学結合している、ことが必要であった。このことから、コンジュゲイトの35G抗体の部分腫瘍細胞表面のAFPを認識して、何らかの作用で細胞内に取り込まれ、その後はVDSが

抗腫瘍作用を発揮しているものと考えられた。

Table 8 Summary of *In Vitro* Cytotoxicity

Antibody / Conjugate	Cells	HTCA
VDS-35G	HuH-7	+ (0.5 ng/ml<)
	HuH-13	—
35G	HuH-7	—
Mixture of VDS and 35G	HuH-7	—
VDS-n-IgG	HuH-7	—
	HuH-13	—

HuH-7 cells produce AFP. HuH-13 cells produce no AFP.  
+, positive cytotoxicity; -, negative cytotoxicity.

#### 第2節 コンジュゲイトの抗腫瘍作用の特徴

本章の第1節では、VDS-35GのAFP産生腫瘍細胞に対する選択的な抗腫瘍作用について調べた。本節では、さらに薬剤と腫瘍細胞との接触時間を調節して、VDS-35GがVDSに比べて腫瘍細胞を如何に速やかに認識するかを調べた。また第1章の第2節では、抗AFP抗体のin vivoの分布を調べ、抗体が腫瘍に選択的に送達することを確認したが、本節では血液中のAFPと細胞表面のAFPに対する結合性を定量化して、コンジュゲイトの抗腫瘍作用の特性をより明確にした。



## 2-a 腫瘍細胞との接触時間と抗腫瘍作用

VDS-35Gのtargeting DDS機能のひとつに腫瘍細胞への速やかな送達性が挙げられる。*In vitro*のHTCA評価系で、VDSとVDS-35Gの抗腫瘍作用が発現する比較的低い濃度（それぞれの濃度はVDSが50 ng/ml、VDS-35GはVDS換算で0.5 ng/ml）を用いて、HuH-7細胞との接触時間を5～120分まで変えて抗腫瘍作用を調べた（Fig. 11）。VDSについては、60分未満の接触時間では十分な抗腫瘍作用は認められなかった。いっぽう、VDS-35Gでは細胞との接触時間が10分間で安定した抗腫瘍作用を示した。すなわち、VDS-35Gでは細胞表面のAFPを35G抗体が速やかに認識して結合するため、わずかな接触時間で十分細胞に薬剤を送達できたものと考えられた。

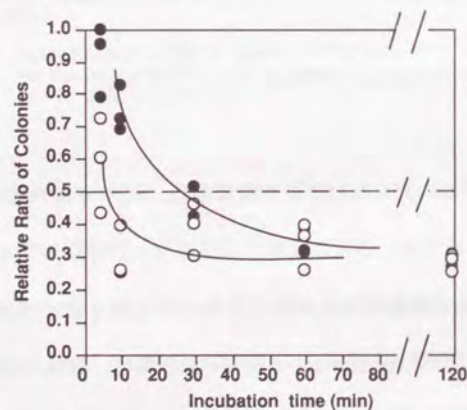


Fig. 11 Effect of Contact Time on Cytotoxicity

HuH-7 cells ( $1 \times 10^6$ ) remained in contact with 2 ml of VDS or VDS-35G solution (each containing 50 or 5 ng/ml of VDS equivalent, respectively) for 5 to 120 min at 37°C. ●, VDS; ○, VDS-35G.

## 2-b 遊離のAFPの抗腫瘍作用に与える影響

AFPは分泌性の蛋白質 [20] であるため、*in vivo*においては血液中の遊離のAFPによる抗AFP抗体の中和が懸念される。しかし、固相化した抗原（細胞表面の抗原）に対する親和性が、液相の抗原（血液中の抗原）に比べて高い抗体を得ることにより、この問題は解消可能と考えた。35G抗体の固相または液相のAFPに対する結合解離定数を求めた。固相のAFPに対する結合解離定数は以下の方法で算出した。すなわち、遊離のHuH-7細胞と濃度を数水準に変えた35G抗体を1時間マイルドな条件で混合後、細胞と結合する35G抗体を定量し、Scatchard plotの傾きから計算した。液相のAFPに対する35G抗体の結合解離定数は、ELISA法の結果をScatchard plotして求めた値を代用した [23]。

ELISAから算出したAFPに対する35G抗体の結合解離定数（2.31 nM）と比較して、細胞表面のAFPに対する35G抗体の結合解離定数（0.18 nM）であった。すなわち、35G抗体の細胞表面のAFPに対する結合力は液相の約10倍高かった。これらの値を元に、下記の式から溶液中のAFP濃度が異なるときの、35G抗体の溶液中のAFPまたは細胞表面のAFPと結合する割合を算出した。

$$C_t = C_f + C_b' + C_b''$$

$$C_b' = \frac{N \times P_1 \times C_f}{K_d + C_f}$$



$$Cb'' = \frac{N_2 \times P_2 \times Cf}{Kd_2 + Cf}$$

$C_t$ と $C_f$ はそれぞれ35G抗体のトータル濃度と未結合濃度である。 $C_b'$ および $C_b''$ は溶液中のAFPおよび細胞表面のAFPと結合した35G抗体濃度である。また、 $N_1$ および $N_2$ は溶液中および細胞表面に存在するAFPの結合サイト数であり、 $P_1$ および $P_2$ は溶液中および細胞表面に存在するAFPのモル濃度である。 $Kd_1$ と $Kd_2$ はそれぞれ溶液中および細胞表面に存在するAFPとの結合解離定数である。結果はTable 9に示したように、AFP濃度が5000 ng/mlでは細胞表面のAFPとの結合の割合が14.8%と低下したが、500 ng/ml以下の濃度では50%以上の35G抗体は細胞表面のAFPと結合していた。

Table 9 Effect of Concentration of AFP in Solution on 35G Bound to AFP on Cell Membrane

AFP (ng/ml)	35G (%)		
	$C_f$	$C_b'$	$C_b''$
50	7.0	6.4	86.6
500	4.0	38.0	58.0
5000	1.0	84.2	14.8

$Kd_1 = 2.31$  nM,  $N_1 = 3$   $Kd_2 = 0.18$  nM,  $N_2 \times P_2 = 3$

$C_f$ : free 35G

$C_b'$ : 35G bound to AFP in the solution

$C_b''$ : 35G bound to AFP on the cell membrane

Fig. 12はVDS-35GとHuH-7細胞との接触時に種々の濃度に調整したAFPを添加して、VDS-35Gの細胞表面のAFPと溶液中のAFPとを競合させて、抗腫瘍作用への影響をHTCAで調べた結果である。1×10<sup>6</sup>個のHuH-7細胞に対して

VDS-35GのVDS換算濃度は5 ng/ml (6.6 pM) であり、蛋白濃度は150 ng/ml (抗体として1 pM) を使用した。AFP濃度は0.5、5、50、500、5000 ng/ml (AFPの分子量を7万とした場合0.00714~71.4 pM) の範囲で添加した。このとき、抗体1モルに対するAFPのモル比は0.00714から71.4に相当する。溶液中のAFPは、5000 ng/mlの高濃度で初めてVDS-35Gの抗腫瘍作用に影響を与えたが、それ以下の濃度では影響は認められず、Table 9の結果と一致した。

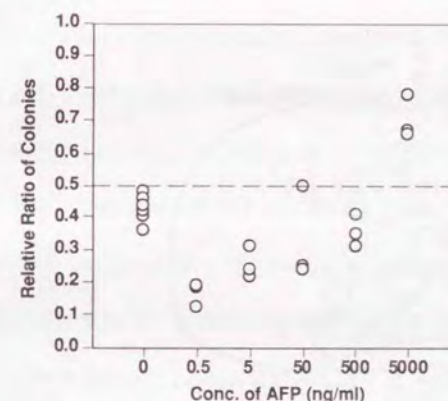


Fig. 12 Effect of AFP in Medium on Cytotoxicity of VDS-35G in HTCA

HuH-7 cells (1 × 10<sup>6</sup>) remained in contact with 2 ml of VDS-35G solution added AFP (0 - 5000 ng/ml) for 1 h at 37°C. The concentration of VDS and 35G in VDS-35G was 5 and 150 ng/ml, respectively. The following procedure in HTCA was the same conditions shown in chart 3.



### 第3節 コンジュゲイトの作用機序の解析

腫瘍細胞に対するコンジュゲイトの抗腫瘍作用の主な機序としては、以下の3通りのメカニズムが考えられる (Fig13)。

- 1) 細胞内に取り込まれ、lysosomeに送達して薬物を遊離する、
- 2) 細胞内には取り込まれないで、細胞周囲の環境で薬物をリリースする、
- 3) 細胞内に取り込まれるが、lysosomeへは移行しない。

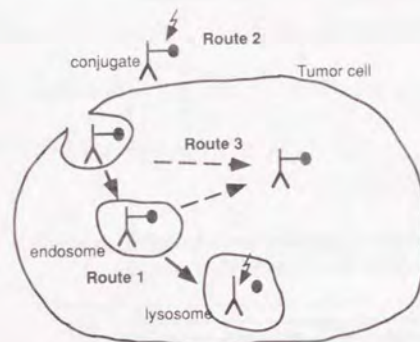


Fig. 13 Three Routes of Conjugate's Cytotoxicity

- Route 1; The conjugate is incorporated into the cell by the endocytosis and transferred to lysosome.  
Route 2; The conjugate is not incorporated into the cell and releases the drug outside the cell.  
Route 3; The conjugate is incorporated into the cell but not transferred to lysosome.

第一のルートについては、従来から多くのコンジュゲイトの作用機序として考えられてきた [46-48]。Endocytosisで細胞内に取り込まれた物質は、endosomeを経てlysosomeに至る。Lysosomeは酵素に富むため、薬物は分解さ

れやすい。したがって、lysosome内の特異的な環境 (低pH、豊富な酵素群など) を利用して、コンジュゲイトから薬物を速やかに遊離させる手法が種々考案されている。pHを利用した手法としては、*cis*-aconitic acidを介して薬物と抗体とを結合し、酸性条件下での薬物の解離を速やかにする方法が報告されている [49-52]。また、lysosome酵素を利用する手法としては、薬物と抗体との間をtripeptide (Leu-Ala-Leu) やtetrapeptide (Ala-Leu-Ala-Leu) で結合する方法があり、酵素でこれらの結合が速やかに切断されて薬物が遊離する [53]。

第二のルートでは、腫瘍と正常組織とのpHの差を利用して薬物を放出させる手法が代表的である。多くの腫瘍の周囲のpHは正常組織と比較して0.5~1低いことが確認されている [54-56]。ヒト腫瘍細胞の表面のgangliosideを認識するL6抗体は、腫瘍細胞を認識するが細胞内には取り込まれない [57-59]。しかし、L6抗体とdaunomycinとを*cis*-aconitic acidで結合させたコンジュゲイトは、腫瘍近傍に集積し、その低いpH環境で化学結合が解離してdaunomycinが遊離する可能性についてLavieらは報告している [59]。

第三のルートについては、抗癌剤のコンジュゲイトでは報告例がほとんどない。従来は、トキシン類またはトキシンと抗体とのコンジュゲイトでこのルートが考えられている [60, 61]。すなわち、トキシン類はendosomeからlysosomeの過程でcytoplasmへ抜け出してribosomeに至り、蛋白合成を阻害する。

VDS-35Gはその化学構造から推察して、コンジュゲイトからVDSまたはそのアナログ体の遊離は困難と考えられた。また、HTCAでHuH-7細胞とコンジュ

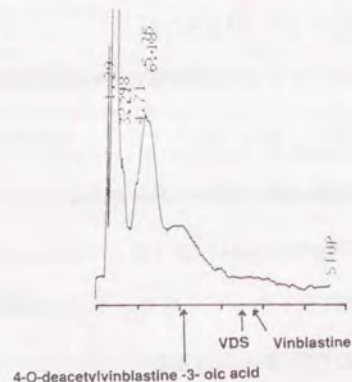


ゲイトとは10分間の短時間の接触で抗腫瘍作用が認められ、腫瘍細胞近傍で遊離した薬物が作用したとは考えにくかった。これらのことから、VDS-35Gの抗腫瘍作用の機序は第一または第二のルートよりも第三のルートの可能性が高いと考えた。

以下では、第一および第二のルートの可能性が少ないことを実験から確認した。

### 3-a ラット肝臓のホモジナイズ中でのコンジュゲイトの安定性

ラットの肝臓の酸性ホモジネート液中にコンジュゲイトを添加して、遊離してくるVDSなどの低分子化合物をHPLCで調べた。Fig. 14には酸性ホモジネート液をクロロホルムで抽出したブランクのHPLCクロマトグラムと各薬物の保持時間を示した。最大25時間まで追跡したが、VDSまたはその類似体の遊離は認められなかった。





Lysosome酵素中のcathepsin Bの阻害剤であるleupeptin [63, 64]、または細胞内のpHを増すことにより非特異的にlysosome酵素の阻害をするammonium chloride [64-66] を評価系に加えたが、Fig. 15に示したように、ammonium chlorideの40 mMを除いて、抗腫瘍作用に阻害は認められなかった。なお、ammonium chlorideの40 mMでは、VDSの抗腫瘍作用にも阻害がかかり、lysosome酵素とは別の機構、例えばtubulinとの結合が阻害されたものと考えられた。

## 考察

抗体が細胞内に取り込まれないで抗腫瘍作用を示した例には、先のLavieらのL6抗体 [59] 以外にSarlingらのB72.3抗体の報告 [67] がある。B72.3抗体とvinca alkaloid (4位のOH基と結合) のコンジュゲイトは、ヒト腫瘍細胞の表面の抗原 (TAG-72) に結合するが、細胞内に取り込まれない。このコンジュゲイトでは抗体とvinca alkaloidとがsuccinic acidを介して結合しているため、腫瘍近傍で酵素で結合が切断され、薬物が遊離すると考えられている [67]。Sarlingらのコンジュゲイトから薬物が遊離するためには、エステラーゼなどの酵素を必要とする。本研究で抗腫瘍作用を評価したHTCAでは細胞内以外では酵素系の働きは期待できないため、VDS-35GはB72.3抗体とも異なった作用機序と考えられる。

VDS-35GではTable 8にその抗腫瘍作用の選択性を示したように、細胞表面

のAFPを認識後、細胞内に取り込まれて抗腫瘍作用を発現している。なお、AFPが腫瘍細胞の表面に存在することに関しては、既に塚田らがラットのAFP産生肝癌細胞 (AH66) で報告している [68]。浮遊化したAH66細胞とウマの抗AFPポリクロナール抗体を反応後、蛍光標識した家兎の抗ウマ抗体を添加すると、細胞の膜表面に蛍光が局在化した。また、AH66細胞を抗AFP抗体で処理後、<sup>125</sup>I標識したprotein Aを加えて抗AFP抗体と反応させた。そのとき、抗AFP抗体の量に応じて放射活性の増大が認められた [69, 70]。これらの事実から、AH66細胞の膜表面にAFPは存在し、抗AFPポリクロナール抗体はこのAFPと結合するものと考えられる。ラットとヒトとの種差およびポリクロナール抗体とモノクロナール抗体の違いはあるものの、HuH-7細胞と35G抗体の組み合わせでもAH66細胞と抗AFPポリクロナール抗体の組み合わせと同じ現象が起きていると推察される。

また、VDS-35GのHTCAでの抗腫瘍作用はlysosome酵素を受けず、さらには肝臓のホモジネート液中でVDS-35Gからvinca alkaloid類が検出されにくいことから判断して、VDS-35Gの作用機序は以下のように推察される。

コンジュゲイトは細胞膜上のAFPと結合して、endocytosisで細胞内に取り込まれた後、endosomeからlysosomeへの経路に乗らないで、少なくとも一部は細胞質中のtubulinに直接作用する。

なお、本研究で採用したHPLC条件ではVDSまたはvinblastineは肝臓への添加実験で約1 ng/mg of liver濃度まで検出可能であったが、VDSの3位がカルボキシル体となった4-O-deacetylvinblastine-3-oic acidは若干ブランクに重なり、



定量精度は十分とは言えなかった。しかし、我々の別の研究からも上述の作用機序の存在が示唆された。すなわち、VDSに換えてトキシン様のgeloninと抗AFP抗体（80G抗体）のコンジュゲイトでも*in vitro*および*in vivo*で抗腫瘍活性が確認された[71, 72]。ここで、geloninはタイプ1リボソーム不活化蛋白であり、細胞内に取り込まれないと殺細胞作用を示さない。また、蛋白のためlysosome酵素では分解される。しかし、このコンジュゲイトは*in vitro*および*in vivo*で抗腫瘍作用を有したことから、endosomeからlysosomeへの経路に乗らないVDS-35Gと同じ細胞内挙動を示すものと考えられる。

以上から、抗AFPモノクローナル抗体をキャリアーとするコンジュゲイトの細胞内の動きをFig. 16にまとめ示した。

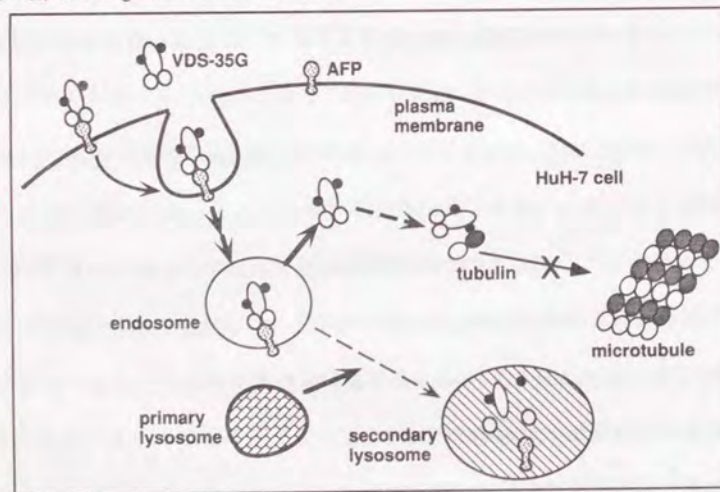


Fig. 16 Fate of VDS-35G after Endocytosis

The fate of VDS-35G is illustrated after it is bound to AFP on the cell surface and incorporated into HuH-7 cells by endocytosis. All the immune complex taken up may not be exposed to the lysosomal enzymes. Some escape from the endosomes and may bind to the tubulin.

## 第 IV 章 コンジュゲイトの*in vivo*抗腫瘍作用

VDS-35GのAFP産生腫瘍細胞に対する*in vitro*の抗腫瘍作用は、VDSに比べて約100倍高かった。また、抗AFPモノクローナル抗体は*in vivo*においてAFP産生腫瘍に選択的に送達することがわかった。

これらの知見を元に、AFP産生ヒト肝細胞癌細胞のHuH-7をヌードマウスに移植した系でVDS-35Gの抗腫瘍作用を調べた。なお、実験に先立ち、ヌードマウスに移植したHuH-7細胞からAFPが産生されることを確認した。

### 第1節 プロトコル

*In vitro*で培養したHuH-7細胞を、ヌードマウス（Balb/c-nu/nu、5-6週齢、雄性）の背部皮下に移植した。Fig. 17は移植後の継代数と血清AFP値との関係であるが、血清中のAFP濃度は腫瘍1gあたり約200 mg/mlであり、ヌードマウスの体内でもヒト型のAFPはほぼ安定して産生していた。実験には3代以上継代した細胞を使用した。

HuH-7細胞を移植したヌードマウスを用いたVDS-35GおよびVDSの抗腫瘍作用の評価試験は、Table 10に示したプロトコルに従って実施した。特に、細胞の移植と薬剤の投与の時期を重要と考え、HuH-7細胞が生着し対数増殖に入る移植後13-14日目から薬剤を投与した。なお、推定腫瘍重量はBattele Columbus Laboratories Protocolに従って計測した。また、各薬剤投与時の推



定腫瘍重量を投与初日の値で割って規格化し、さらに磷酸緩衝生理食塩液（PBS）を投与したコントロールの規格値で割った相対腫瘍重量比を用いた。

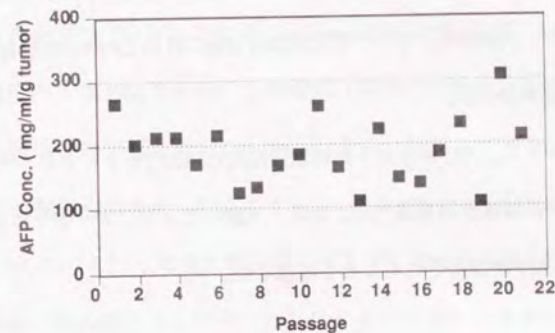


Fig. 17 Serum Concentration of AFP in Different Passages in Nude Mice  
HuH-7 cells cultivated in IS-RPMI were inoculated in nude mice. HuH-7 cells in nude mice were passaged approximately every one month. AFP in serum was determined by enzyme immunoassay.

Table 10 Protocol of Xenograft Study

Animal; nude mice (Balb/c/nu/nu, male, 6-8 weeks old).  
Transplantation; 100-200 mg of HuH-7 fragment was transplanted subcutaneously.  
Dosage of drugs; the drugs were administered intraperitoneally 13-14 days after transplantation.  
Estimated tumor weight (EW);

$$EW = \frac{\text{width}^2 \times \text{length}}{2}$$

Relative tumor weight ratio (RW);

$$RW = \frac{TEW / TEW_0}{CEW / CEW_0}$$

TEW, TEW<sub>0</sub>; EW administered a drug at time t and 0 day.

CEW / CEW<sub>0</sub>; EW administered a control (PBS) at time t and 0 day.

## 第2節 In vivo 抗腫瘍作用

VDSは硫酸塩を注射用蒸留水に溶解させた。VDS-35Gは磷酸緩衝生理食塩液で溶解させた。これらをHuH-7細胞を移植したヌードマウスの腹腔内に4日間隔で4回投与した。投与後、腫瘍の長径と短径から推定腫瘍重量を算出した。また、副作用の指標としてマウスの体重を測定した。

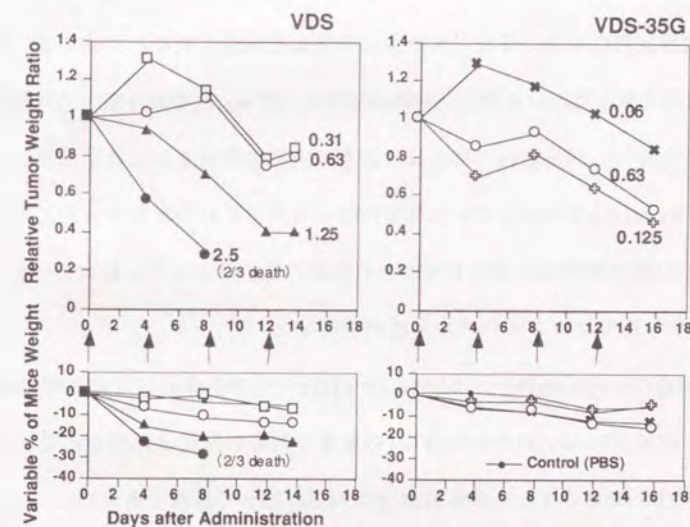


Fig. 18 Relative Tumor Weight Ratio and Variable % of Mice Weight After VDS or VDS-35G administered Intraperitoneally

Experiment conditions were described in table 10.

↑ was shown the day when the drug was administered.

The numbers in fig. were shown the dose (mg/kg) of VDS or VDS-35G (VDS equivalent).  
n = 3



Fig. 18に結果を示したが、横軸は第1回目の投与日（腫瘍移植約13-14日目）を0日として示した。腫瘍重量はTable 10に示した式の相対腫瘍重量比（relative tumor weight ratio: RW）で示した。また、マウスの体重は0日目を基準とした増減%で示した。VDSは0.31~2.5 mg/kgの範囲で投与した。VDS-35GはVDS換算で0.06~0.63 mg/kgの範囲で投与した。

VDSは投与量に依存して抗腫瘍作用が増した。1.25~2.5 mg/kgの投与量で明らかな腫瘍重量の減少が認められたが、2.5 mg/kgの投与群では3匹中2匹が3回目の投与後死亡した。また、マウスの体重も投与量に依存して著しく減少する傾向にあった。いっぽう、VDS-35Gの0.125 mg/kgの投与量（VDS換算）群では、VDSの1.25 mg/kgの群とほぼ同等の抗腫瘍作用を示した。ただし、投与量を0.63 mg/kgまで増しても抗腫瘍作用の増強は認められなかった。VDS-35Gの投与群ではいずれもマウスの体重の減少は少なく、特に0.125 mg/kgの投与群ではコントロールと差がなかった。

VDS-35Gの0.125 mg/kgとVDSの1.25 mg/kgの抗腫瘍作用はほぼ同等の効果であり、VDS-35GはVDSの約10分の1の濃度で同等の抗腫瘍作用を示した。そのときのVDS-35Gのマウスの体重減少はVDSに比して軽微であった。

## 考察

HuH-7細胞をヌードマウスに移植したxenograftの実験系を作製し、VDS-35Gの抗腫瘍作用をi.p.投与で評価した。HTCAを用いた*in vitro*の抗腫瘍

作用の評価では、VDSに対して約100分の1の濃度でVDS-35Gは同等の抗腫瘍作用を示したが、*in vivo*の系でもVDSに対して約10分の1の投与量で同等の抗腫瘍作用を示した。*In vitro*と*in vivo*の評価結果の若干の乖離は、*in vitro*の評価系中の薬剤は腫瘍細胞に対して有効に作用するのに対して、*in vivo*では投与量の一部しか腫瘍細胞に送達していないためと考えられる。



## 総括

ヒト由来 $\alpha$ -フエクトプロテイン (AFP) に選択的に反応するモノクローナル抗体をマウスで作製し、AFPを産生するヒト肝癌細胞 (HuH-7) を移植したヌードマウスに $^{125}\text{I}$ 標識した抗体を静注したところ、この抗体はAFP産生腫瘍に特異的に送達することが確認された。

ついで、Vinblastineを出発原料とした抗癌剤と抗AFPモノクローナル抗体 (VDS-35G) とのコンジュゲイト (VDS-35G) を合成した。AFPに対する結合活性をELISAで調べた結果は、VDS-35Gの結合活性はよく保持されており、特異性も高かった。

このコンジュゲイトの抗腫瘍作用を単層培養法とコロニー法の2通りの*in vitro*評価試験で調べた結果、単層培養法ではVDS-35Gは抗腫瘍作用が認められなかったが、コロニー法のHuman Tumor Clonogenic Assay (HTCA) ではVDS-35Gはvindesine (VDS) の100分1の濃度で活性を示した。評価方法による抗腫瘍作用の違いについては、仮説ではあるが、薬剤の細胞への選択的な分配の結果と考えた。すなわち、stem cellsでAFPの産生能が高いと仮定すると、VDS-35Gは選択的にstem cellsに分配するため、コロニーの形成が抑制されると考えた。

VDS-35Gに加えて非特異抗体とのコンジュゲイト (VDS-n-IgG) やVDSと35G抗体の非化学的結合混合物についても、HuH-7細胞およびAFPを産生しないHuH-13細胞に対する抗腫瘍作用を調べることにより、VDS-35Gの*in vitro*に

おける作用機序を明らかにした。すなわち、VDS-35GはHuH-7細胞表面のAFPを選択的に認識した後、細胞内に取り込まれて、抗腫瘍作用を示した。この作用はlysosome酵素の影響を受けず、トキシン以外では新しい作用機構と考えられた。

しかし、VDSに対してVDS-35Gの抗体部分の分子量は約200倍大きいので、一般的にはVDS-35Gではtubulinに対する結合能が妨害されると思われる。VDS-35Gはvinca alkaloidのvindolineの部分の3位の置換基に抗体を直接結合しているが、Prakashら [73] によればvinca alkaloidのcatharanthineのindoleの部分が主にtubulinとの結合に関与し、vindolineはアンカーの役目を担っている。

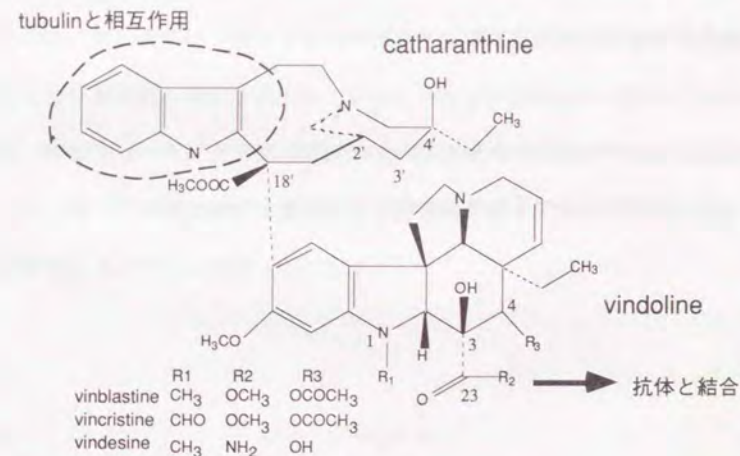


Chart 4 Vinca alkaloidの構造と作用  
-Iwasaki, Prakashらの報告 [73-75] を基に作製-

このことは、catharanthineとvindolineとを別々に加えた系ではtubulinの重合が



阻害されなかったとする岩崎の報告 [74, 75] から指示されている。立体構造的にはcatharanthineとvindolineとの間の自由度は高く、抗体と結合した状態でもcatharanthineのindoleの部分はtubulinと結合可能であり、その結合が抗体を介して複数生じるためか、または抗体の部分が何らかのアンカーの役目を担っているために、VDS-35Gは細胞質内で直接にtubulinと結合すると考えられる。

また、HuH-7細胞をヌードマウスに移植した*in vivo*の評価系で抗腫瘍作用を調べたところ、VDS-35Gの抗腫瘍作用はVDSの投与量の10分の1と同等であり、HTCAの試験結果を反映していた。また、そのときのマウスの体重への影響は、VDSに比べて軽微であり、VDS-35Gは*in vivo*においてもAFPを産生する腫瘍細胞に選択的に送達することにより、抗腫瘍作用はVDSに比べて増強するが、薬物由来の副作用は軽減可能と考えられる。

以上より、AFPに対するモノクローナル抗体をキャリアーとしたコンジュゲイトは、肝臓癌に対する化学療法剤として有望な手段と考えられる。

## 謝辞

終わりに臨み、本研究の遂行と本論文のまとめに際しまして、終始御懇篤な御指導、御助言を賜りました東京大学薬学部首藤紘一教授に深甚なる謝意を表わします。

また、本論文をまとめるにあたっては、東京大学薬学部杉山雄一教授に多くの有益な御助言を賜りました。衷心より謝意を表します。

なお、本研究の端緒にあたりましては、元塩野義製薬株式会社製造部長前川秀幸博士および元北海道大学医学部教授の故平井秀松先生に御指導、御鞭撻を賜わり、心より感謝いたします。

さらに、本研究を行う機会と種々の貴重な御助言を賜りました、塩野義製薬株式会社創薬第一研究所長原田 紘博士、元塩野義製薬株式会社製剤部門長高岸 靖部長ならびに創薬第一研究所DDS研究部門長平野耕一郎博士に深謝致します。また、本研究は原田重憲博士、益田和義博士、野草秀夫修士の御助力の賜物であり、ここに感謝いたします。



## 実験の部

### 第 I 章の実験

#### 【1】抗AFPモノクローナル抗体の作製

##### 1) ヒト肝細胞癌細胞の *in vitro* 培養

ヒト肝細胞癌細胞培養株のHuH-7細胞およびHuH-13細胞を、それぞれ岡山大学名誉教授佐藤二郎博士と基礎腫瘍研究所 所長平井秀松博士から供与を受けた。HuH-7細胞はAFP産生細胞であるが、HuH-13細胞はAFPを産生しない細胞である。HuH-7細胞は佐藤らのIS-RPMI培地 [24] で培養した。HuH-13細胞はfetal calf serum (FCS) を15%添加したRPMI1640培地で培養した。IS-RPMIは、RPMI 1640 (GIBCO BRL, U.S.A.) をベースとして、 $3 \times 10^{-8}$  M  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ 、 $3 \times 10^{-9}$  M linoleic acid、 $3 \times 10^{-9}$  M oleic acid、 $1 \times 10^{-7}$  M  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $3 \times 10^{-10}$  M  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、 $3 \times 10^{-9}$  M  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、 $1 \times 10^{-8}$  M  $\text{NH}_4\text{VO}_3$ と5 mM HEPESおよび1.3 g/lの重炭酸ナトリウムを加えた培地 [24] であり、蛋白質を全く含まない。

いずれの細胞とも37℃、5%炭酸ガスのインキュベーター中で培養し、必要に応じて0.05% EDTA-PBS処理後、trypsin-EDTA (0.05% trypsin、0.53 mM EDTA·4Na; GIBCO BRL, U.S.A.) で細胞を培養フラスコから遊離させた。

##### 2) ヒトAFPのマウスへの免疫

HuH-7細胞の培養上清を、家兎の抗AFPポリクローナル抗体を固相化したSephrose 4Bカラムに通じ、さらに透析、塩析後、DEAEのイオン交換カラムを通じて精製ヒトAFPを得た。この精製ヒトAFPを通常法と過免疫の2通りの方法でマウスに免疫した。

通常法では、精製ヒトAFPをFreund's complete adjuvant (FCA; Difco Laboratories, U.S.A.) で乳化し、AFP量として150  $\mu\text{g}$ をBalb/cマウスの腹腔内に投与した。さらに、3週間後AFP20  $\mu\text{g}$ を懸濁させたalum adjuvantを追加免疫として3日間連投した。

過免疫では、初回はFCAで乳化したものを腹腔内投与したが、さらに3週間間隔で2回Freund's incomplete adjuvant (FIA; Difco Laboratories, U.S.A.) で乳化したAFPを腹腔内に投与した。さらに、FIAを2回投与後にAFP20  $\mu\text{g}$ を懸濁させたalum adjuvantを追加免疫として3日間連投した。

##### 3) 細胞融合およびハイブリドーマの選別

いずれの免疫法でも、追加免疫の3日後に無菌的にマウスから脾臓を摘出し、RPMI-1640培地中で解した。ステンレスメッシュで濾過後、遠心し、トリス塩化アンモニウム溶液で混入した赤血球を溶血させた。RPMI-1640で数回洗浄後、別に用意したマウスのミエローマ細胞 (NS-1) と50% polyethylene glycol 4000 (Merck, Germany) を用いて細胞融合した。このときの細胞の比率は1:1から1:10 (B細胞:NS-1細胞) まで変えた。これを96ウェルマイクロプレ



ートにまきこんだ（細胞数約 $4.5 \times 10^5$ 個/ウェル）。37℃、5%炭酸ガスインキュベーター中で培養し、約1週間はHAT培地（hypoxanthine, aminopterin, thymidine を含有する培地）で、さらに2週間はHT培地（hypoxanthine, thymidine を含有する培地）で培養した。

#### 4) ELISAによる抗AFP抗体の確認

50 mMの $\text{NaHCO}_3$ （NaOHでpH9.3に調製）に溶解した精製AFP（10  $\mu\text{g/ml}$ ）の50  $\mu\text{l}$ を96ウェルマイクロプレートの各ウェルに加え、軽く搅拌した。これを37℃で1時間放置後、Blocking液（10%FCS in 10 mM PBS）の100  $\mu\text{l}$ を加えた。これを37℃で1時間放置後、各ウェル中の溶液を吸引で除去し、洗浄液（0.05% Tween20 in PBS）200  $\mu\text{l}$ で洗浄を3回繰り返した。試料（ハイブリドーマが出現したウェルの培養上清など）の50  $\mu\text{l}$ を各ウェルに添加し、37℃に1時間放置後、洗浄を3回行った。Peroxidase結合抗マウスIgGヒツジ抗体（Cappel, U.S.A.）をBlocking液で200倍希釈したものを各ウェルに50  $\mu\text{l}$ 添加し37℃で1時間放置した。洗浄を3回行った後、基質溶液〔4 mMの2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)と0.03% $\text{H}_2\text{O}_2$ を10 mMのクエン酸緩衝液（pH4.5）に溶解〕を50  $\mu\text{l}$ 加え、室温で30分放置した。2 mMの $\text{NaN}_3$ を50  $\mu\text{l}$ 添加して反応を停止し、直ちに450 nmの吸光値をマイクロプレートリーダー（コロナ、兵庫）で測定した。

#### 5) 抗体のアイスタイピング

マウスのIgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub>, IgG<sub>2b</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgAおよびIgMに対する各抗血清（ICN ImmunoBiologicals, U.S.A.）を用いて、polyethyleneglycol 4000を4%添加した寒天ゲルを使用したオクタロニー法により、マウスの各抗体のアイスタイピングを行った。

#### 【2】抗AFPモノクローナル抗体の全身オートラジオグラム

80G抗体をヨードゲン法により<sup>125</sup>I標識した（187  $\mu\text{Ci}/67.5 \mu\text{g}$ ）。この標識抗体を約100-200 mgのHuH-7細胞を移植後2週間目のヌードマウスの尾静脈から投与した（5 ml/kg）。投与0.5, 1, 2, 4日目にマウスをエーテル麻醉死させ、直ちにドライアイス・アセトンで凍結後、クライオミクロトームを用いて約35  $\mu\text{m}$ 厚の凍結切片を作製した。これを凍結乾燥後、X線フィルムと密着させ、全身オートラジオグラムを作製した。画像解析システムにより、黒化度をカラー表示した。なお、本実験に関しては一部を第一化学薬品の東海研究所（茨城）に委託した。

#### 【3】抗AFPモノクローナル抗体の組織分布

80G抗体およびn-IgGをヨードゲン法により<sup>125</sup>I標識した（4-5  $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ ）。これらの標識抗体をHuH-7細胞またはHuH-13細胞を移植したヌードマウスの尾静脈から投与（8-10  $\mu\text{Ci}/\text{マウス}$ ）した。投与の5, 15, 30分後にマウスを屠



殺し、血液、腫瘍、心臓、肝臓、胃、腎臓、脾臓、筋肉を摘出し、γ-カウンターで放射活性を測定した。各組織については、残存血液に相当する放射活性 ( $^{125}\text{I}$ -n-IgGの投与2分後の各組織の放射活性) を差し引いて補正した。組織移行性は、次式から求めた取り込みクリアランス ( $\text{CL}_{in}$ ) で評価した。

$$\begin{aligned}\text{CL}_{in} &= T(t_1) / \int_0^{t_1} C(t) dt \\ &= T(t) / \text{AUC}_{0-t_1}\end{aligned}$$

ここで、 $T(t)$ は各組織中の放射活性濃度、 $C(t)$ は血液中放射活性濃度を示す。

#### 【4】コンジュゲイトの作製

Vinblastine [硫酸塩 (和光、大阪) をNaOHで中和してクロロホルムで抽出] の約4.4 gを無水メタノール5 mlに溶解させ、これを無水hydrazine 12 mlおよび無水メタノール12 mlを加えた三頸コルベン中に徐々に滴下した。これを、窒素気流下60℃で24時間加熱した。反応終了後、塩化メチレンで抽出、乾燥して、deacetylvinblastine monohydrateを得た。Deacetylvinblastine monohydrate の10 mgを1N-塩酸0.5 mlに溶解し、氷冷下0.1N-亜硝酸ナトリウム溶液0.13 mlを加え、氷冷下で5分間攪拌した。反応終了後、氷冷したtetrahydrofuranを0.5 mlを加え、氷冷下に5%炭酸水素ナトリウム溶液でpHを約8.0に中和して、deacetylvinblastine acid azideを得た。これに、35 G抗体ま

たはn-IgGの20 mgを溶解した0.3 Mホウ酸緩衝液 (pH9.0) 2 mlを加えて、2時間室温で反応させた。反応終了後、Sephadex G-100のカラム (1.6×30 cm、0.01 M 磷酸緩衝液) に通じて未反応の低分子を除去してコンジュゲイトを得た。さらに、目的に応じてColloidion bags (Sartorius, Germany) を用いて、濃縮した。

#### 【5】ELISAによるコンジュゲイトのAFPに対する結合活性

Human serum albuminとnormal human serumは、それぞれSigma (U.S.A.) とMiles Laboratories (U.S.A.) から購入した。

【1】の4) に記したELISAの操作で、試料として数水準に濃度を調整した35G抗体またはVDS-35Gを用い、AFPに対する結合活性を調べた。また、AFPに換えて、human serum albuminまたはnormal human serumをそれぞれ10 μg/ml (後者は蛋白量として) をマイクロプレートに固相化し、AFPの場合と同様に35G抗体またはVDS-35Gの結合活性を調べた。



## 第 II 章の実験

### 【1】単層培養法

Videsineは硫酸塩を塩野義製薬（大阪）から入手した。

24穴のマイクロプレートを用いて、各ウェルあたり $1 \times 10^5$ 個のHuH-7細胞を0.5 mlのIS-RPMI培地（50% CFCM添加）で2日間培養（37℃、5%炭酸ガス）した。CFCMは、HuH-7細胞をIS-RPMI培地で*in vitro*培養した上清（cell-free conditioned medium）である。2日間培養後、培養液を薬剤を添加したIS-RPMI培地と交換し、さらに2-3日間隔で薬剤添加培地の交換を行った。薬剤との接触8日目に0.05% EDTA-PBSで10分間処理後、trypsin-EDTA（GIBCO BRL, U.S.A.）で6分間処理し、typan blue（GIBCO BRL, U.S.A.）を用いた色素排除法で生細胞を計数した。

### 【2】コロニー法

コロニー法としては、Human Tumor Clonogenic Assay（HTCA）を使用した。 $1 \times 10^6$ 個のHuH-7細胞に対して、薬剤を溶解したIS-RPMI培地を2 ml加え、37℃で1時間ゆっくり振盪した。その後、遠心（室温、1000 rpm、5分）して遊離の薬剤を除去した。CFCM 5 mlで洗浄後、再びCFCMに細胞を分散させた。

別途、二重軟寒天培地を準備した。すなわち、寒天（Oxoid, England）1 g

を注射用蒸留水100 mlに分散させ、オートクレーブ処理（121℃、20分）することにより、溶解させ、また滅菌を行った。これを45℃に保温し、2倍濃度に調製したIS-RPMI培地100 ml（45℃に保温）を加え0.5%寒天溶液を作製した。この0.5%寒天溶液の1.7 mlを35 mmのプラスチックディッシュ（Nunc, U.S.A.）に取り、室温でゲル化させた。

先のHuH-7細胞を分散させたCFCM（約 $5 \times 10^4$ 個/ml）を1.5 ml試験管に取り、45℃に保温した0.5%寒天溶液を3 ml添加して、直ちに攪拌後あらかじめ作製した0.5%寒天ゲルの上に1.3 ml重層させた。これを37℃、5%炭酸ガスのインキュベーター中で2週間培養し、 $20 \mu\text{m}$ 以上のコロニー数を光学顕微鏡で計数した。

なお、ディッシュあたりの細胞数はCFCMに対する分散濃度で調整した。

### 【3】脂溶性の計算

HanschとLeoのfragment method [42, 43] に基づいて、“CLOGP3”（MedChem Software Release 3.54 Programs 1989, Chemical Information System, Inc., U.S.A.）のソフトでVDSのclogP値を計算した。



### 第 III 章の実験

#### 【1】HTCAにおける抗腫瘍作用試験

薬剤または標的細胞を種々に変えて、HTCAで抗腫瘍作用を評価した。

HTCAの実験操作については、第II章の実験の【2】に準じた。薬剤としては、35G抗体、VDS-n-IgG、VDSと35G抗体の混合物を使用した。標的細胞としては、HuH-7細胞に加えて、AFPを産生しないHuH-13細胞でもコロニーの形成を評価した。なお、HuH-13細胞では、IS-RPMIに替えて15%FCSを添加したRPMI培地を使用した。

また、VDSまたはVDS-35GとHuH-7細胞との接触時間を5～120分までに変えた時の、コロニー形成をHTCAで調べた。

#### 【2】35G抗体のAFPに対する結合解離定数

35G抗体のAFPに対する結合解離定数を2種類の方法で求めた。第一の方法は、ELISAで求めたAFPに対する35G抗体の反応性をScatchard plotして、算出した。第二の方法は、 $1 \times 10^6$ 個のHuH-7細胞と種々の濃度の35G抗体とを37℃で1時間接触後に、細胞に結合しなかった抗体量をMouse-IgG ELISAキット（Boehringer Mannheim Biochemica, Germany）で定量し、添加した35G抗体の量から細胞に結合した量を算出した。この値を用いてScatchard plotから結合

解離定数を算出した。

#### 【3】ラットの肝臓ホモジネート中でのコンジュゲイトの安定性

雄性Wistarラット（塩野義、大阪）をエーテル麻酔下、肝臓を摘出し、生理食塩水を門脈側から送液して血液を除去した。その6 gを15 mlの生理食塩水中で氷冷下にポリトロン（Kinematica, Switzerland）を用いて乳化させた。このホモジネートを遠心（3000 rpm, 10 min, 4℃）し、上清を生理食塩水で2倍に希釈した。この3 mlに0.5 M 磷酸緩衝液（pH5.5）の2 mlを添加して、酸性肝臓ホモジネート液を作製した。この酸性肝臓ホモジネート液0.2-2 mlにVDS-35G（VDS換算30  $\mu$ g）またはVDSを添加し、37℃で最大25時間まで放置し、経時的に遠心分離（3000 rpm, 10 min, 4℃）してHPLC用の試料とした。

試料にクロロホルム（3%プロパノール）5 mlと14%アンモニア水0.5 mlまたは1N-塩酸を0.5 ml加え、攪拌後遠心（3000 rpm, 4℃, 10min）し、クロロホルム層の4 mlを窒素気流中で乾固した。これをHPLC用の溶離液で溶解し、下記の条件で分析した。

装置；Waters M-6000A（Milipore, U.S.A.）

カラム；Nucleosil 100-CN（ケムコ、大阪）

10  $\mu$ m, 4 mm i.d.  $\times$  25 cm

溶離液；0.01 M 磷酸緩衝液（pH3.0）／アセトニトリル = 25／75

流速；1.5 ml/min



検出器；UV 220 nm（島津、京都）

Vindesineおよびvinblastineはいずれも硫酸塩を塩野義製薬（大阪）と和光純薬（大阪）のものを使用した。また、4-O-deacetylvinblastine-3-oic acidはvinblastineを出発原料とするクリナンの方法 [76] に従って合成した。

#### 【4】 Lysosome酵素の影響

第II章の実験の【2】に記したHTCAに準じて、HuH-7細胞に対する抗腫瘍作用を調べた。

Leupeptinおよびamonium chlorideは、それぞれSigma (U.S.A.) と和光純薬（大阪）から購入した。

VDS-35G（VDS換算で5 ng/ml）をleupeptin（0 - 0.4 mM）またはamonium chloride（0 - 40 mM）を添加したCFCMに溶解した。この2 mlと $1 \times 10^6$ 個のHuH-7細胞とを37℃で1時間接触後、leupeptin（0 - 0.4 mM）またはamonium chloride（0 - 40 mM）を添加した二重軟寒天培地で2週間培養し、コロニー数を計数した。

## 第IV章の実験

### 【1】 HuH-7細胞のヌードマウスにおける継代

*In vitro*のIS-RPMI培地で培養したHuH-7細胞の $1 \times 10^7$ 個を生理食塩水0.2 mlに分散させ、ヌードマウス（Balb/c-nu/nu、5-6週齢、雄性）の背部皮下に移植した。約1ヵ月間隔でヌードマウスの背部皮下から無菌的に腫瘍塊を摘出し、その腫瘍塊を100 - 200 mgに切断して、ピンセットでヌードマウスの背部皮下に移植した。また、腫瘍を移植したヌードマウスの末梢血液を継代直前に採取し、血清中のAFP濃度をenzyme immuno assay（Imzyne AFP mono、富士レビオ、東京）で測定した。

### 【2】 Xenograftにおけるコンジュゲイトの評価

ヌードマウスの背部皮下にHuH-7細胞の腫瘍塊を100-200 mg移植した。移植した腫瘍が対数増殖期に入る13-14日目から、4日間隔で合計4回マウスの腹腔内にVDSまたはVDS-35Gを投与した。VDSは硫酸塩を注射用蒸留水で溶解し、VDS-35GはPBSで溶解し、いずれも投与前に $0.22 \mu\text{m}$ で濾過した。1回あたりの投与量は、VDSが0.31, 0.63, 1.25, 2.5 mg/kgで、VDS-35Gは0.06, 0.125, 0.63 mg/kg（VDS換算）を用いた。投与前から、3-4日間隔で腫瘍の短径と長径をノギスで計測し、またマウスの体重を測定した。腫瘍重量は、すべ



て投与直前の腫瘍重量を基準とした比率で表し、さらに、コントロール (PBS) を投与した群の平均値で割った値 (相対的腫瘍重量比) で表した。

## 引用文献

- 1) Ram B.P. and Tyle P., *Pharm. Res.*, 4, 181 (1987).
- 2) Brodsky F.M., *Pharm. Res.*, 5, 1 (1988).
- 3) Kosmas C., Kalofonos H., and Epenetos A.A., *Drugs*, 38, 645 (1989).
- 4) Ranade V.V., *J. Clin. Pharmacol.*, 29, 873 (1989).
- 5) Koppel G.A., *Bioconjugate Chem.*, 1, 13 (1990).
- 6) Layton D., De Meyere J., Collard M.-P., and Trouet A., *Europ. J. Cancer*, 15, 1475 (1979).
- 7) Juliano R.L. and Layton D., "Drug Delivery Systems," ed. by Juliano R.L., Oxford University Press, New York, 1980, Chapter 6.
- 8) Weinstein J.N., *Cancer Treat. Rep.*, 68, 127 (1984).
- 9) Halbert G.W., Stuart J.F.B., and Florence, *Int. J. Pharm.*, 21, 219 (1984).
- 10) Prankerd R.J. and Stella V.J., *J. Parenter. Sci. Technol.*, 44, 139 (1990).
- 11) Tuma R.F., Forsberg J.O., and Agerup B., *Cancer*, 50, 1 (1982).
- 12) 藤井正博、白石友邦、橋田 充、瀬崎 仁、臨床成人病、14, 697 (1984).
- 13) Widder K.J. and Senyei A.E., "Methods of drug delivery," ed. by Ihler G.M., Pergamon Press, Oxford, 1986, Chapter 3.
- 14) Duncan R., Hume I.C., Kopeckova P., Ulbrich K., Strohm J., and Kopecek J., *J. Controlled Release*, 10, 51 (1989).
- 15) Seymour L.W., *CRC Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 9, 135 (1992).



- 16) 佐藤春彦、涌井 昭、星 正彦、栗原稔、横山正和、清水弘之、癌と化学療法、18, 451 (1991).
- 17) Miyano Y., Schimizu K., Moriuchi S., Yamada M., Nakahira K., Nakajima K., Nakano J., Kuriyama S., Tsuji T., Mikoshiba K., Hayakawa T., and Ikenaka K., *J. Neurosci. Res.*, 36, 472 (1993).
- 18) 西 信三、医学のあゆみ、156, 665 (1991).
- 19) Morinaga T., Sakai M., Wegmann T.G., and Tamaoki T., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 460 (1983).
- 20) 平井秀松、臨床病理 臨時増刊、51, 5 (1982).
- 21) 遠藤康夫、「腫瘍マーカーハンドブック」、編 石井 勝、サイエンスフォーラム、東京、1985、pp.160-173.
- 22) 岡本 司、癌の臨床、33, 1397 (1987).
- 23) Masuda K., Nagata S., Harada S., Hirano K., and Takagishi Y., *Microbiol. Immunol.*, 36, 873 (1992).
- 24) Nakabayashi H., Taketa K., Yamane T., Miyazaki M., Miyano K., and Sato J., *Gann*, 75, 151 (1984).
- 25) 常盤孝義、佐藤二郎、蛋白質 核酸 酵素、33, 2603 (1988).
- 26) Masuda K., Takahashi K., Nagata S., Hirano K., and Takagishi Y., *J. Drug Targeting*, 2, 323 (1994).
- 27) Takakura Y., Takagi A., Hashida M., and Sezaki H., *Pharm. Res.*, 4, 293 (1987).
- 28) Takakura Y., Fujita T., Hashida M., and Sezaki H., *Pharm. Res.*, 4, 339 (1990).

- 29) Conrad R.A., Cullinan G.J., Gerzon K., and Poore G.A., *J. Med. Chem.*, 22, 391 (1979).
- 30) Nagata S., Masuda K., Nogusa H., Hirano K., and Takagishi Y., *Chem. Pharm. Bull.*, 40, 2151 (1992).
- 31) Herlyn D. and Koprowski H., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 79, 4761 (1982).
- 32) 平井秀松、*Radioisotopes*, 33, 474 (1984).
- 33) 阪原晴海、遠藤啓吾、中島鉄夫、小泉 満、太田仁八、鳥塚莞爾、岡田謙一郎、吉田 修、西 信三、核医学、22, 377 (1985).
- 34) Boeran O.C., Mijneheere E.P., Broers J.L.V., Vooijs G.P., and Ramaekers F.C.S., *Int. J. Cancer*, 48, 457 (1991).
- 35) Hartmann F., Horak E.M., Garmestani K., Wu C., Brechbiel M.W., Kozak R.W., Tso J., Kosteiny S.A., Gansow O.A., Nelson D.L., and Waldmann T.A., *Cancer Res.*, 54, 4362 (1994).
- 36) 下山正徳、木村禧代二、最新医学、28, 1024 (1973).
- 37) Mackillop W.J., Ciampi A., Till J.E., and Buick R.N., *J. Natl. Cancer Inst.*, 70, 9 (1983).
- 38) Hamburger A.W. and Salmon S.E., *Science*, 197, 461 (1977).
- 39) Hamburger A.W. and Salmon S.E., *J. Clin. Invest.*, 60, 846 (1977).
- 40) Hamburger A.W., *Int. J. Cell Cloning*, 3, 89 (1987).
- 41) 川村光弘、山下幸紀、佐川 正、萬 豊、清水哲也、産婦人科の実際、35, 1907 (1986).
- 42) Hansh C., Leo A., Unger S.H., Kim K.H., Nikaitani D., and Lien E.J., *J. Med. Chem.*, 16, 1207 (1973).



- 43) Leo A., Jow P.Y.C., Silipo C., and Hansch C., *J. Med. Chem.*, 18, 865 (1975).
- 44) Nagata S., Masuda K., Nogusa H., Hirano K., and Takagishi Y., *Biol. Pharm. Bull.*, 19, 480 (1996).
- 45) Masuda K., Nagata S., Hirano K., Takagishi Y., and Hirai H., *Microbiol. Immunol.*, 37, 165 (1993).
- 46) 原 健, *Oncologia*, 20, 42 (1987).
- 47) Pimm M.V., *CRC Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 5, 189 (1988).
- 48) Blakey D.C., *Acta Oncol.*, 31, 91 (1992).
- 49) Shen W.-C. and Ryser H.J.-P., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 102, 1048 (1981).
- 50) Gallego J., Price M.R., and Baldwin R.W., *Int. J. Cancer*, 33, 737 (1984).
- 51) Yang H.M., Reisfeld R.A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 1189 (1988).
- 52) Yang H.M., Reisfeld R.A., *J. Natl. Cancer Inst.*, 80, 1154 (1988).
- 53) Touet A., Masquelier M., Baurain R., Deprez-De Campeneere D., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 626 (1982).
- 54) Ashby B.S., *Lancet*, 2, 312 (1966).
- 55) Paschen W., Djuricic B., Mies G., Schmidt-Kastner R., and Linn F., *J. Neurochem.*, 48, 154 (1987).
- 56) Thistlethwaite A.J., Leeper D.B., Moylan D.J., and Nerlinger R.E., *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 11, 1647 (1985).
- 57) Hellstrom I., Beaumier P.L., and Hellstrom K.E., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 7059 (1986).

- 58) Hellstrom I., Horn D., Linsley P., Brown J.P., Brankovan V., and Hellstrom K.E., *Cancer Res.*, 46, 3917 (1986).
- 59) Lavie E., Hirschberg D.L., Schreiber G., Thor K., Hill L., Hellstrom I., and Hellstrom K.E., *Cancer Immunol. Immunother.*, 33, 223 (1991).
- 60) Spooner R.A. and Lord J.M., *Trends Biotechnol.*, 8, 189 (1990).
- 61) Timar J., McIntosh D.P., Henry R., Cumber A.J., Parnell G.D., and Davies A.J.S., *Br. J. Cancer*, 64, 655 (1991).
- 62) Lodish H., Baltimore D., Berk A., Zipursky S.L., Matsudaira P., and Darnell J., "Molecular Cell Biology," 3rd ed., Scientific American Books, Inc., USA, 1995, Chapter 16.
- 63) Kyriakos R.J., Shih L.B., Ong G.L., Patel K., Goldenberg D.M., and Mattes M.J., *Cancer Res.*, 52, 835 (1992).
- 64) Press O.W., DeSantes K., Anderson S.K., and Geissler F., *Cancer Res.*, 50, 1243 (1990).
- 65) Shih L.B., Goldenberg D.M., Xuan H., Lu H.W.-Z., Mattes M.J., and Hall T.C., *Cancer Immunol. Immunother.*, 38, 92 (1994).
- 66) Sandvig K. and Olsnes S., *J. Cell Biol.*, 87, 828 (1980).
- 67) Starling J.J., Maciak R.S., Kaw K.L., Hinson N.A., Briggs S.L., Laguzza B.C., and Johnson D.A., *Cancer Res.*, 51, 2965 (1991).
- 68) Tsukada Y., Mikuni M., Watabe H., Nishi S., and Hirai H., *Int. J. Cancer*, 13, 187 (1974).



- 69) 塚田 裕、日比 望、原 彰彦、平井秀松、Hurwitz E.、Sela M.、癌と化学療法, 9, 23 (1982).
- 70) Tsukada Y., Bischof W.K.-D., Hibi N., Hurwitz E., and Sela M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 621 (1982).
- 71) Masuda K., Takahashi K., Nagata S., Hirano K., and Takagishi Y., *J. Drug Targeting*, 2, 323 (1994).
- 72) 益田和義、長田俊治、平野耕一郎、高岸 靖、*Drug Delivery System*, 33, 13 (1994).
- 73) Prakash V. and Timasheff S.N., *Biochemistry*, 30, 873 (1991).
- 74) 岩崎成夫、有機合成化学、49, 892 (1991).
- 75) Iwasaki S., *Med. Res. Rev.*, 13, 183-198 (1993).
- 76) ジョージ・ジェイ・クレナン、日本公開特許 昭51-86500 (1976).



