

抗hCGおよび抗胎盤性アルカリホスファターゼ抗体に結合させた メソトレキセートの絨毛癌培養細胞に対する特異的効果

名古屋大学医学部産科婦人科学教室

服 部 専 英 古 橋 義 人
後 藤 節 子 友 田 豊

Specific Effects of Methotrexate Bound to the antibodies against hCG and Placental Alkaline Phosphatase to the Cultured Human Choriocarcinoma Cells

Sen-ei HATTORI, Yoshihito FURUHASHI, Setsuko GOTO and Yutaka TOMODA

Department of Obstetrics and Gynecology, Nagoya University Medical School, Nagoya

概要 癌に対する化学療法は、その健常組織への副作用のため使用量に限界がある。そこで癌細胞に対する抗体に抗癌剤を結合し、抗体の特異性を利用してその癌組織への集積をはかれば、その効果を増強させ、併せて副作用を軽減することが出来ると考えられる。絨毛癌細胞が産生するhCGおよび胎盤性アルカリホスファターゼ（以下Pl.ALPと略す）に対する抗体とメソトレキセート（以下MTXと略す）の結合物を作製し、その絨毛癌培養細胞に対する特異的効果を検討した。

抗hCGおよび抗Pl.ALP家兎血清より得たIgGに、carbodiimide法およびデキストラン架橋法でMTXを結合させた。Carbodiimide法によるMTX:IgG結合比は16.9:1であつたが、これにより抗体活性は殆ど消失した。デキストラン架橋法ではIgG 1分子あたり2.6—3.4分子のMTXが結合し、抗体活性は約1/4保存された。

デキストラン架橋法で作製したIgG-MTX結合物を絨毛癌培養細胞株BeWoおよびSCHに30分間作用させ4日後の細胞数を算定して細胞増殖抑制効果をみたところ、hCG産生の多いBeWoでは抗hCG-IgG-MTX結合物がコントロールに比べ有意に($p < 0.05$)増殖を抑制した。抗Pl.ALP-IgG-MTX結合物、非免疫IgG-MTX結合物、freeのMTXおよびhCG-IgGは増殖を抑制しなかつた。これに対しPl.ALP産生が多くhCG産生の少ないSCHでは、抗Pl.ALP-IgG-MTX結合物を30分間作用させた場合に有意の($p < 0.05$)増殖抑制が認められた。抗hCG-IgG-MTX結合物では抑制がみられなかつた。子宮内膜癌細胞株HEC50Bには、いずれのIgG-MTX結合物も増殖抑制を示さなかつた。

以上、抗hCGおよび抗Pl.ALP-IgGとMTXの結合物が絨毛癌細胞に対し特異的に増殖抑制を示すことを培養細胞を用いたin vitroのモデル実験で明らかにし、抗体を利用した特異的免疫化学療法の可能性を示唆した。

Synopsis Methotrexate (MTX) was covalently bound to rabbit antibodies (IgG) against hCG and placental alkaline phosphatase (Pl.ALP) by two different methods. By carbodiimide method, 16.9 mols of MTX could be coupled to one mol of IgG, but the antibody activity was completely lost. Whereas, 2.6-3.4 mols of MTX were bound to one mol of IgG and a quarter of original antibody activity was preserved by dextran bridge method.

Choriocarcinoma cells BeWo and SCH were exposed to the IgG-MTX conjugates prepared by the latter method for 30 minutes, and the cell growth was investigated. To BeWo, which produces much hCG and less Pl.ALP, anti hCG-IgG-MTX showed a considerable growth inhibition compared to the control groups ($p < 0.05$). No effect was observed with anti Pl.ALP-IgG-MTX, nonimmunized IgG-MTX, free MTX and anti hCG-IgG. In contrast, to SCH, which produces much Pl.ALP and less hCG, anti Pl.ALP-IgG-MTX exhibited considerable inhibition ($p < 0.05$), whereas anti hCG-IgG-MTX showed no inhibition. Neither anti hCG-IgG-MTX nor anti Pl.ALP-IgG-MTX showed any effect to the endometrial carcinoma cell HEC50B.

We concluded that MTX bound to anti hCG-IgG and anti Pl.ALP-IgG have specific growth inhibition effects to the choriocarcinoma cells in vitro, and suggested the possibility of specific immunochemotherapy of this disease.

Key words: Choriocarcinoma • hCG • Placental alkaline phosphatase • Antibody • Methotrexate

緒 言

癌に対する化学療法は、新しい抗癌剤の開発や投与方法の工夫によりその治療成績は徐々に向上してきている。しかし抗癌剤は一般に健常組織に対する副作用が強く、特に造血器、消化器等への強い障害のために、その投与量に限界があり抗癌剤のみで癌を完治せしめることは一部の腫瘍を除いて未だ困難な現況にある。

近年、癌細胞より産生される α -フェトプロテインなどの腫瘍関連抗原、あるいは白血病やリンパ肉腫などにおいて存在が示唆されている癌特異抗原に対する抗体に抗癌剤を結合し、抗体の特異性を利用して抗癌剤の癌組織への集積をはかる研究がなされている。

絨毛性腫瘍は、腫瘍細胞からhCGが産生され、また細胞膜にはPl.ALPが存在する。抗癌剤をこれらのタンパクに対する抗体に結合させることにより、その腫瘍組織への集積をはかることが出来れば、その効果を増強させ、あわせて健常組織への副作用を軽減させ得るものと考えられる。そこで我々は従来絨毛癌の治療に用いられてきたMTXをhCGおよびPl.ALPに対する抗体に結合させて、抗癌剤-抗体結合物を作製し、絨毛癌培養株細胞を用いたin vitroの実験系により、その特異的な効果を検討した。

材料および方法

(1) 抗血清の作製

a) 抗hCG血清：3kgの家兎を用い、粗精製hCG (5,000IU/0.6mg/アンプル, 持田製薬) 1匹あたり3mgを1mlの生食に溶解し、等量のFreund完全アジュバントに混ぜて足趾に免疫した。初回免疫の1カ月後に同量のhCGをFreund不完全アジュバントと混ぜて背部皮下に追加免疫し、その7~10日後に採血して抗血清を得た。この抗血清をまず正常男子尿アセトンパウダー (50mg/ml 血清) で吸収、次にグルタルアルデヒドで不溶化した等量の正常男子血清で吸収した。

b) 抗Pl.ALP血清：粗精製Pl.ALP (25IU/mg, Calbiochem 社) をIino et al.¹⁵⁾の方法に従ってSephadex G-150によるゲル濾過およびDEAE Sephadex A-50イオン交換クロマトグラフィーにより、さらに部分精製した。比活性はALP測定キット (Kind-King 法, ヤトロン社) で

測定して126IU/mgタンパクであつた。この部分精製したPl.ALPを1匹あたり0.5mgを1mlの生食に溶解し、hCGの場合と同じく等量のFreund完全アジュバントに混ぜて家兎の足趾に免疫し、1カ月後に追加免疫して抗血清を得た。これを等量の正常男子血清および正常ヒト肝アセトンパウダー (100mg/ml 血清) で吸収し、吸収抗血清を得た。

以上の吸収抗hCGおよび抗Pl.ALP血清より1/3飽和硫酸法によりIgG画分をとり、MTXとの結合実験に供した。

(2) IgG-MTX 結合物の作製

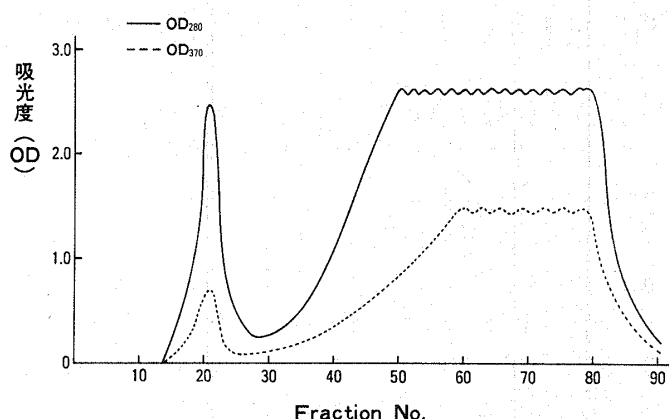
我々はMTXとIgGの結合をcarbodiimideによる方法とデキストラン架橋法の2つの方法で試みた。Carbodiimideによる方法はMTX (日本レダリー社) 15mgを1mlのリン酸緩衝液 (PBS, pH 7.2) に溶解し、これに0.5mlのPBSに溶解した1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide Hydrochloride (半井化学) 6.3mgを加えて室温で30分間攪拌し、そのあと0.5mlのPBSに溶解したIgG 5mgを加えて4℃一晩攪拌した。これを10,000rpm 20分間遠心して生じた沈殿を除去したあと、Sephadex G-25ゲル濾過によりIgG-MTX結合物をfreeのMTXから分離した。

第2のデキストラン架橋法は、まずデキストラン T-10 (Pharmacia 社) 2.5gを0.03M NaIO₄ 500mlに溶かし一夜攪拌してこれを酸化、蒸留水に透析後凍結乾燥してポリアルデヒドデキストランを得た。このポリアルデヒドデキストラン25mgを1mlのホウ酸緩衝液 (pH 9.0) に溶解し、これにMTX 25mgを添加、20時間室温で攪拌、ついでPBS 1mlに溶解したIgG 10mgを加えてさらに20時間4℃で攪拌した。これによりMTXおよびIgGはシッフ塩基を形成してデキストランと結合する。このシッフ塩基を還元して結合を安定化するためにNaBH₄を添加した。反応液をSephadex G-100でゲル濾過しMTX-(デキストラン)-IgG結合物をfreeのデキストランおよびMTXから分離した (図1)。MTXは370nmの吸光を有する。結合物中のMTXの測定は370nmにおける吸光度によつた。

(3) 培養細胞

実験に使用した絨毛癌培養細胞株はBeWoお

図1 IgG-MTX 結合物の分離 (Sephadex G-100)



よび SCH の 2 種である。BeWo は Hertz et al. により樹立された子宮絨毛癌由来の細胞株であり¹²⁾²⁰⁾, SCH は大里ら³⁾⁴⁾により樹立された胃原発絨毛癌細胞株である。また培養細胞株の対照実験には北里大学産婦人科より分与された子宮内膜癌細胞株 HEC50B²⁾を使用した。培地として BeWo, SCH には 10% ウン胎仔血清 (FCS) を含む RPMI 1640, また HEC50B には 15% FCS を含む MEM を使用した。

a) hCG, Pl. ALP 産生量の測定：これら培養細胞の hCG 産生量は, Falcon 社培養シャーレ (ϕ 60mm) に $1 \sim 2 \times 10^5$ 個の細胞を 5ml の培地に播き 5% CO_2 , 37°C の条件で重複培養を行ない, 培養 1 ~ 5 日目の培養上清を -20°C で凍結保存し enzyme immunoassay 法²³⁾で測定した。また Pl. ALP 産生量は, 同様に重複培養した細胞を培養 1 ~ 5 日目に rubber policeman で剥離し, 1ml の生食に浮遊させ凍結保存し, 2 分間超音波破碎のうえ 65°C 4 分間加熱して耐熱性 ALP 活性をヤトロンのキットを用いて測定した。実験は duplicate で行ないその算術平均をとった。

b) MTX 感受性：各培養細胞の MTX 感受性は, 細胞 $1 \sim 2 \times 10^5$ 個を ϕ 60mm シャーレに播き, 24 時間後に培養液中に MTX を最終濃度 $10^{-5} \sim 10^{-1} \mu\text{g/ml}$ となるように添加して 4 日間培養したあとトリプシン-EDTA で細胞を剥離浮遊のうえトリパンブルーを加え, 生細胞数を血球計算板で算定し, MTX を加えなかつたコントロールに対する比 (生存率%) で表現した。本実験は triplicate で行ない, その算術平均を用いた。

(4) IgG-MTX 結合物の効果判定

a) IgG-MTX 結合物の薬剤効果：デキストランを介する方法により作製した IgG-MTX 結合物の培養細胞に対する効果を, 抗 hCG-IgG, 抗 Pl. ALP-IgG および非免疫 IgG それぞれについて, BeWo を対象として上記の感受性の場合と同様の方法で検討した。

b) 抗 hCG および抗 Pl. ALP-IgG-MTX 結合物の特異的効果：抗 hCG および抗 Pl. ALP-IgG-MTX 結合物の絨毛癌細胞に対する特異的効果の検討は, これらの結合物を培養細胞に 30 分間のみ作用させ, その 4 日後の生細胞数を算定する方法で行なつた (表 1)。すなわち BeWo は 1×10^5 個, SCH, HEC50B は 2×10^5 個の細胞を ϕ 60mm シャーレに播き, 24 時間後に培地を捨て 1 回洗浄したあと, 抗 hCG-もしくは抗 Pl. ALP-IgG-MTX 結合物を, MTX 濃度にして $10^{-1} \mu\text{g/ml}$ 含む培地 5ml を加えて 5% CO_2 , 37°C で 30 分間インキュベーションした。そのあとこの培地を捨て, 2 回洗浄したあと FCS を含む増殖培地 5ml を加えて培養し, 4 日後の生細胞数を算定した。コントロールとして ① 非免疫 IgG-MTX 結合物を含む培地, ② free の MTX を含む培地, ③ 抗 hCG, もしくは抗 Pl. ALP-IgG のみを含む培地, および ④ MTX, IgG いずれも含まぬ無処理培地を用いて実験群と全く同様の操作を各細胞につき同時に施行した。MTX の濃度はすべて $10^{-1} \mu\text{g/ml}$ とし, また ③ の IgG のみのコントロールでは実験群の IgG-MTX 結合物に含まれる IgG 濃度に準じて $10 \mu\text{g/ml}$ の濃度の IgG を作用させた。

成績

(1) 抗血清の作製

得られた抗 hCG 血清は, hCG 感作ヒツジ赤血

表 1 IgG-MTX 結合物の特異的効果の検討
(実験方法)

第 0 日：細胞 $1 \sim 2 \times 10^5$ 個/5ml medium + 10% FCS/シャーレ。
第 1 日：1) medium を捨てて, さらに 1 回 medium で洗滌。
2) MTX (MTX-Conjugate) $10^{-1} \mu\text{g/ml}$ medium.
5% CO_2 , 37°C 30 分間インキュベーション。
3) MTX (MTX-Conjugate) medium を捨てる。
medium で 2 回洗滌。
4) 5ml medium + 10% FCS
5% CO_2 , 37°C インキュベーション
第 5 日：細胞数算定

球凝集反応²⁶⁾で16,000—64,000倍希釈まで凝集価を示した。最高凝集価を示した血清を以後の実験に使用した。吸収後の抗血清はゲル内二元免疫拡散法および免疫電気泳動法で、粗精製 hCG との間に1本の沈降線を形成したが、正常ヒト血清との間には沈降線はみられなかった。血球凝集価は16,000倍を示した。

部分精製した Pl.ALP を免疫して得た抗 Pl.ALP 血清は粗精製 Pl.ALP との間にゲル内二元免疫拡散法で2本の沈降線を生じたが、吸収後1本は消失した。また抗体価はゲル内二元免疫拡散法で16倍を示した。

(2) IgG-MTX 結合物の作製

Carbodiimide による結合方法では IgG 1 分子に16.9分子の MTX が結合した。しかしこの方法で作製した抗 hCG-IgG-MTX 結合物は hCG 感作ヒツジ赤血球凝集反応で抗体活性が殆ど認められなかった。従つて本法による結合物は培養細胞での実験には使用しなかった。

デキストランを介する方法による MTX-IgG 結合物の Sephadex G-100 によるゲル濾過を図1に示した。Fraction No. 20 前後に OD₂₈₀, OD₃₇₀ のピークがあり、このピークを IgG-MTX 結合物として pool し、以後の実験に供した。Fr. No.40 以降にも OD₂₈₀, OD₃₇₀ のピークがみられるが、これは IgG に結合しなかった free の MTX と考えられた。得られた IgG-MTX 結合物の MTX : IgG

結合比を計算したところ2.6—3.4 : 1であり、抗 hCG 抗体活性は結合前の IgG に比し約1/4に低下した。

(3) 培養細胞の hCG, Pl.ALP 産生量

結果を図2に示した。すなわち BeWo の培養上清中の hCG は1日目にすでに34mIU/mlを示し、以後細胞増殖に伴つて上昇し5日目には1067mIU/mlを示した。しかし SCH の hCG 産生量は低く培養1日目には3mIU/ml未満で、4日目には35.5mIU/mlであつた。Pl.ALP は反対に SCH で高く、培養1日目に28.4mIU/シャーレ、4日目には71mIU/シャーレを示した。しかし BeWo のそれは培養1～3日目は7.1mIU/シャーレ未満であり4日目、5日目に至つてそれぞれ14.2mIU/シャーレ、17.8mIU/シャーレであつた。HEC50B では hCG, Pl.ALP とともに培養全期間を通してそれぞれ3mIU/ml未満、7.1mIU/シャーレ未満の低値であつた。

(4) 培養細胞の MTX 感受性

3種の培養細胞の MTX 濃度—生存率曲線は図3に示すごとく多少異なるが、いずれも感受性あり50%増殖阻止濃度は $2-3 \times 10^{-3} \mu\text{g/ml}$ を示した。

(5) IgG-MTX 結合物の薬剤効果

各抗体に結合させた MTX の BeWo に対する薬剤効果を図4に示す。free の MTX に比して結合物の濃度—生存率曲線は右方にずれ、50%増殖

図2 各培養細胞の hCG, Pl, ALP 産生量

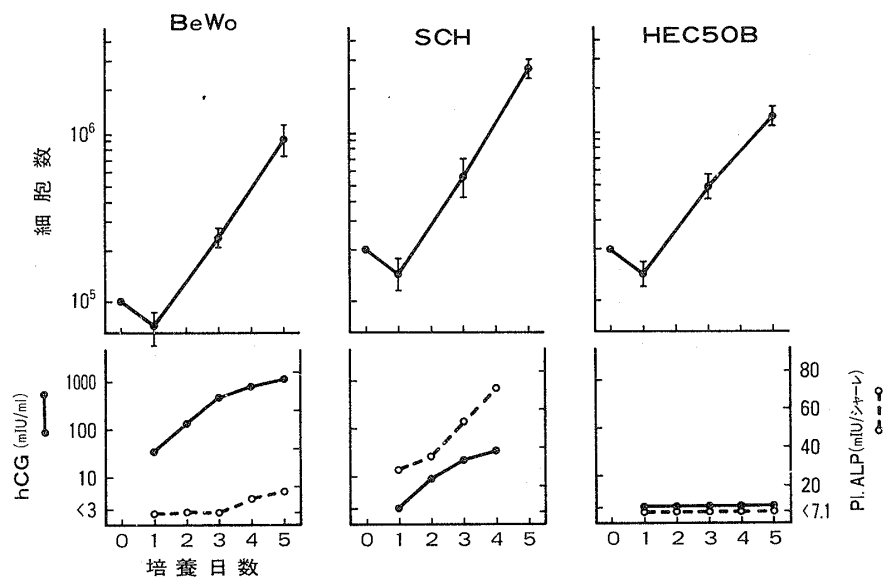
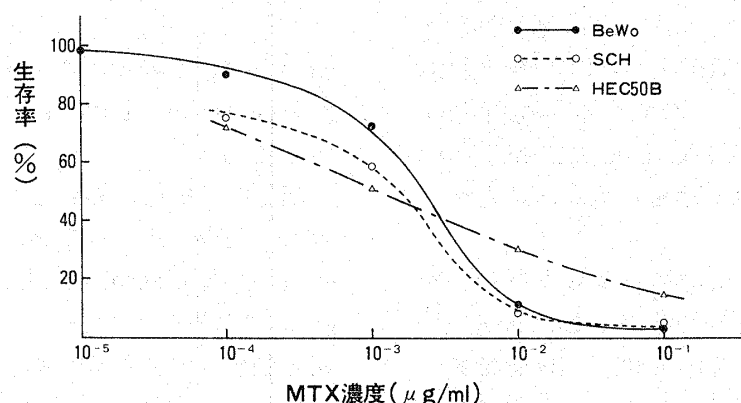


図3 各培養細胞の MTX 感受性



阻止濃度は free の MTX では $2 \times 10^{-3} \mu\text{g/ml}$ であつたものが結合物では約 $4 \times 10^{-3} \mu\text{g/ml}$ を示した。これは IgG への結合により MTX の薬剤効果が 50% ほど低下したものと考えられた。なお抗 hCG-, 抗 PLALP-および非免疫 IgG の間には増殖阻止濃度の差を認めなかつた。

(6) IgG-MTX 結合物の特異的効果

BeWo を対象とした抗 hCG-IgG-MTX 結合物および抗 PLALP-IgG-MTX 結合物の 30 分間作用による特異的効果の検討の結果を図 5-i に示す。無処理培地コントロール群の 4 日後の生細胞数は $(1.55 \pm 0.22) \times 10^6$ 個で、これに対し抗 hCG-

図4 IgG-MTX 結合物の薬剤効果

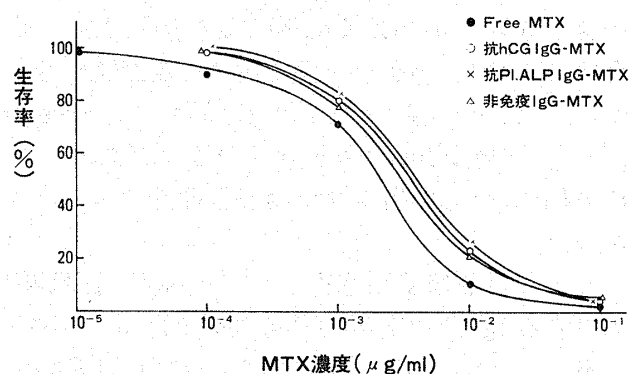
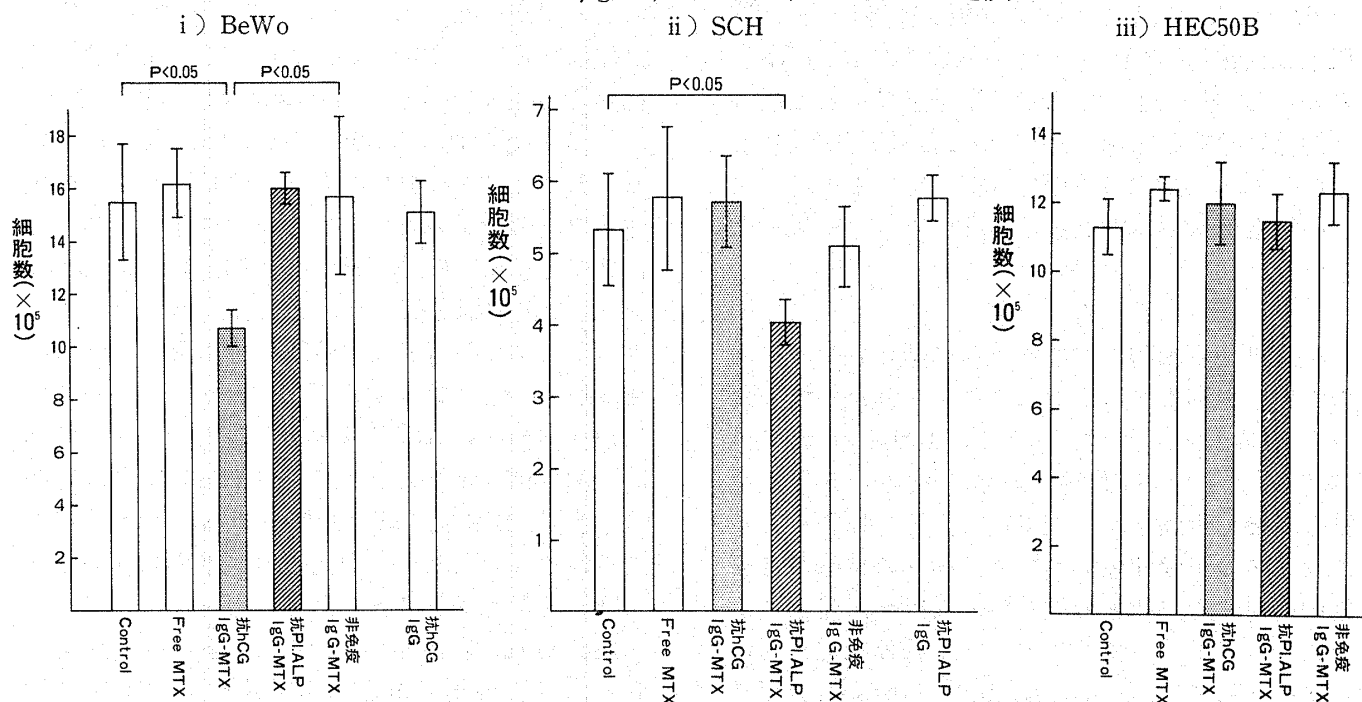


図5 IgG-MTX 結合物の各培養細胞に対する効果
(MTX $10^{-1} \mu\text{g/ml}$, 30 分間作用, 4 日後の生細胞数)



IgG-MTX 結合物を作用させた群は $(1.07 \pm 0.07) \times 10^6$ 個と有意の差で ($p < 0.05$) 増殖抑制がみられた。しかし抗 Pl.ALP-IgG-MTX 結合物およびその他のコントロール群である非免疫 IgG-MTX 結合物, free の MTX, free の抗 hCG-IgG を作用させた群はいずれも増殖抑制を認めなかった。

次に SCH を対象として同様の実験を行なったところ(図 5—ii), 4 日後の生細胞数は無処理培地コントロール群は $(5.20 \pm 0.82) \times 10^5$ 個であつたが, 抗 Pl.ALP-IgG-MTX 結合物を作用させたものは $(4.05 \pm 0.32) \times 10^5$ 個で, 有意の ($p < 0.05$) 増殖抑制を認めた。ところが SCH では BeWo の場合と異なり抗 hCG-IgG-MTX を作用させた場合は $(5.72 \pm 0.70) \times 10^5$ 個で増殖抑制を認めなかった。またその他のコントロール群である free の MTX, 非免疫 IgG-MTX 結合物および free の抗 Pl.ALP-IgG を作用させた場合も抑制はみられなかった。

最後に対照培養細胞株として選んだ HEC50B に対する IgG-MTX 結合物の効果であるが(図 5—iii), この場合は抗 hCG および抗 Pl.ALP いずれの IgG に結合させた MTX も, free の MTX および非免疫 IgG-MTX と同様全く増殖抑制は認められなかった。

以上まとめると, 抗 hCG-IgG に結合させた MTX は, hCG 産生の多い BeWo に対し, また抗 Pl.ALP-IgG に結合させた MTX は Pl.ALP 産生の多い SCH に対して各々 30 分間作用の場合に特異的な増殖抑制を示した。しかし hCG, Pl.ALP とともに産生がみられない HEC50B に対しては, いずれの結合物も増殖抑制を示さないという結果が得られた。

考 案

抗癌剤を癌細胞に対する抗体に結合させ, 抗体の特異性を利用することによりその効果の増強をはかる試みとしては, 古くは Mathé et al.¹⁹⁾ が 1958 年にマウス白血病に対する抗体に MTX を結合させて実験を行なっている。それ以降主としてマウスの実験腫瘍において, 種々の抗癌剤と癌細胞に対する抗体との結合物の有効性が諸家により報告されている⁶⁾¹⁰⁾¹³⁾¹⁴⁾²¹⁾。ヒト腫瘍細胞を用いた研究としては, Latif et al.¹⁸⁾, Ghose et al.⁹⁾,

Kimura et al.¹⁶⁾ の報告がある。また最近塚田ら⁵⁾ は抗 α -フェトプロテイン抗体に daunomycin を結合させたものをマウス実験肝癌に使用し, これが free の daunomycin よりも有効であつたと報告している。

MTX を抗体に結合させた試みとしては, 前述の Mathé et al.¹⁹⁾ のほかに Burstein et al.⁶⁾, Latif et al.¹⁸⁾, Kulkarni et al.¹⁷⁾ の報告がある。Mathé et al.¹⁹⁾ はジアゾ化法により MTX をマウス白血病細胞に対する抗体に結合させ, これを担癌マウスに投与してその有効性を報告している。Burstein et al.⁶⁾ は carbodiimide 法, および酸無水物法の 2 とおりの方法で MTX をマウスの embryonal carcinoma に対する抗体に結合させている。これらを担癌マウスに試みたところいずれの方法による結合物も free の MTX に比べてマウスの生存期間の延長を認めたと述べている。しかし Latif et al.¹⁸⁾ は同じく酸無水物法で MTX をヒト白血病細胞に対する抗体に結合させたところ抗体活性が消失し, ノードマウスを用いた in vivo 実験でも有効性がなかったと述べている。我々は最初 carbodiimide 法による MTX と抗体の結合を試みた。成績で述べたごとくこの方法により抗体 1 分子あたり 16.9 分子の MTX を結合し得たが抗体活性は殆ど消失していた。

Hurwitz et al.¹⁴⁾ はデキストランを介する方法により daunomycin をマウスリンパ腫に対する抗体に結合させているが, この方法により彼らは抗体 1 分子に 25 分子の daunomycin を結合させ, かつ抗体価の低下は 40% であつたと報告している。そこで我々は彼らの方法に準じて MTX の抗体への結合を試みた。しかし結果に示したごとく抗体 1 分子に 2.6—3.4 分子しか結合させ得なかった。また抗体価も約 1/4 に低下した。我々はまたデキストランを 0.3M の NaIO_4 で強く酸化したもので同様の手法により結合を試みたが, この場合は 5.7—6.4 分子の MTX を結合し得た。しかし抗体同士の selfcoupling によると思われる沈殿を多量に生じ, 抗体価の著明な低下がみられた。MTX と抗体の結合方法については今後さらに検討する必要があるものと考えられる。

IgG-MTX 結合物の BeWo に対する効果を, 我々は最初各培養細胞の MTX に対する感受性

の場合と同様の方法で検討したが、その結果結合物は free の MTX に比して約1/2の細胞増殖阻止効果しかなく、また抗 hCG-, 抗 Pl.ALP-, 非免疫 IgG の間に差はみられなかつた(図4)。これは結合物を4日間細胞に作用させたため、この間にいずれの IgG に結合された MTX も IgG から解離して癌細胞に取込まれ結果的に同等の効果を示したものと推測された。そこで抗 hCG-, あるいは抗 Pl. ALP-IgG に結合された MTX の特異的効果をみるため、30分間のみ作用させる実験を行なつたところ図5に示した結果が得られた。MTX は時間依存性の抗癌剤であり30分間の作用では殆ど細胞増殖抑制はみられない。従つて抗 hCG-, あるいは抗 Pl.ALP-IgG に結合された MTX のみが抗原抗体反応により細胞表面あるいは細胞内に残留し、BeWo あるいは SCH に特異的な効果を示したものと考えられる。

Searle et al.²²⁾はヌードマウスに移植したヒト絨毛癌組織へ I¹³¹標識抗 hCG 抗体が集積すると述べている。また Goldenberg et al.¹¹⁾は I¹³¹標識抗 hCG 抗体の投与により絨毛癌患者の癌病巣がスキャンニングにより診断可能であつたと報告し抗 hCG 抗体の腫瘍組織への集積を示唆している。今回我々は hCG を多量に産生する BeWo に対し抗 hCG 抗体に結合された MTX が特異的に増殖抑制を示すことを in vitro の実験で明らかにしたが、彼らの報告から考えると in vivo においても抗 hCG 抗体に結合された MTX が free の MTX に比してより効果的に腫瘍を抑制する可能性があるものと推測される。

Pl.ALP は胎盤絨毛細胞に存在する組織特異酵素であるが、絨毛癌組織および絨毛癌株細胞にも存在することが知られている¹⁷⁾²⁴⁾。この Pl.ALP は他臓器の ALP とは抗原性を異にする⁸⁾²⁵⁾。また Pl.ALP は hCG と異なり、細胞膜の構造タンパクであり流血中には少ないが細胞膜表面微絨毛に多量に存在することが知られている¹⁾。これらのことから抗癌剤の癌組織への集積に抗 Pl.ALP 抗体が利用できるのではないかと考えられる。今回の我々の実験では Pl.ALP を多量に産生する SCH において、抗 Pl.ALP-IgG-MTX 結合物が特異的に増殖抑制を示すことが明らかにされた。抗 Pl.ALP 抗体の in vivo における腫瘍組織への集積

に関しては、今後検討すべき課題であると思われる。

今回の研究で我々は、抗 hCG, 抗 Pl.ALP 抗体として吸収抗血清の1/3飽和硫酸画分を用いて実験を行なつた。しかし抗血清中に含まれる特異抗体の量は、抗体価の高いものでも全 IgG 量の10%前後である(著者未発表データ)。即ち1/3飽和硫酸画分で得た IgG のうち90%は非特異的 IgG である。従つて MTX-IgG 結合物の特異的効果をみた実験(表1, 図5)では $10^{-1} \mu\text{g/ml}$ という高濃度の MTX を作用させたが、このうち抗体の特異性により細胞に作用しえたのは10%未満であると考えられる。抗癌剤-抗体結合物の抗腫瘍効果をより高めるためには、精製した特異抗体を使用する必要があると思われる。

抗 hCG 抗体は従来より LH や TSH との交叉反応性が知られている。また異種抗体を生体に投与した場合、流血中に抗原抗体複合体の形成されることも当然予測される。今後、抗体を利用した免疫化学療法の研究をすすめる場合、臨床応用に先立ちこれらの問題点を動物実験その他で十分検討する必要があるものと考えられる。

本研究の一部は文部省科学研究費(課題番号56480275, 56870135)によるものである。

文 献

1. 板倉甫能: 正常妊娠と流産・胎児死亡, ならびに絨毛性疾患における絨毛およびトロホブラストの alkaline phosphatase isozymes に関する組織化学的研究. 慶応医学, 57: 385, 1980.
2. 蔵本博行, 浜野美恵子, 西田正人, 田口 明, 上坊敏子, 鈴木光明, 長内国臣: 腹水由来ヒト子宮体癌細胞株の樹立. 日産婦誌, 28: 1405, 1976.
3. 大星章一: 絨毛上皮腫. 人癌細胞の培養. (大星章一, 菅野晴夫編), 192, 朝倉書店, 東京, 1975.
4. 大星章一, 清藤 勉, 吉田紘一, 下里幸雄, 小出 勉, 佐野量造: 胃悪性絨毛上皮腫の組織培養. 日病理会誌, 61: 146, 1972.
5. 塚田 裕, 原 彰彦, 日比 望, 平井秀松: 抗 AFP 精製抗体又はその制癌剤複合体による AFP 産生腫瘍の治療の試み. a) その実験的研究. シンポジウム I 抄録. 日本癌学会総会記事, 第40回総会(札幌), 1981.
6. Burstein, S. and Knapp, R.: Chemotherapy of murine ovarian carcinoma by MTX-antibody conjugates. J. Med. Chem., 20: 950, 1977.
7. Chou, J.Y. and Robinson, J.C.: Induction of alkaline phosphatase in choriocarcinoma cells

- by 1- β -D-arabinofuranosyl-cytosine, mitomycin C, phleomycin and cyclic nucleotides. *J. Cell Physiol.*, 92 : 221, 1977.
8. *Fishman, W.H.* : Perspectives on alkaline phosphatase isozymes. *Amer. J. Med.*, 56 : 617, 1974.
 9. *Ghose, T., Norvell, S.T., Guclu, A., Bodurtha, A., Tai, J. and MacDonald, A.S.* : Immunotherapy of malignant melanoma with cholrambucil-bound antimelanoma globulins: Preliminary results in patients with disseminated disease. *J. Natl. Cancer Inst.*, 58 : 845, 1977.
 10. *Ghose, T., Norvell, S.T., Guclu, A., Cameron, D., Bodurtha, A. and MacDonald, A.S.* : Immunotherapy of cancer with chlorambucil-carrying antibody. *Brit. Med. J.*, 26 : 495, 1972.
 11. *Goldenberg, D.M., Kim, E.E., DeLand, F.H., van Nagell, J.R. and Javadpour, N.* : Clinical radioimmunodetection of cancer with radioactive antibodies to human chorionic gonadotropin. *Science*, 208 : 1284, 1980.
 12. *Hertz, R.* : Choriocarcinoma of women maintained in serial passage in hamster and rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 102 : 77, 1959.
 13. *Hurwitz, E., Levy, R., Maron, R., Wilchek, M., Arnon, R. and Sela, M.* : The covalent binding of daunomycin and adriamycin to antibodies, with retention of both drug and antibody activities. *Cancer Res.*, 35 : 1175, 1975.
 14. *Hurwitz, E., Maron, R., Bernstein, A., Wilchek, M., Sela, M. and Arnon, R.* : The effect in vivo of chemotherapeutic drug-antibody conjugates in two murine experimental tumor systems. *Int. J. Cancer*, 21 : 747, 1978.
 15. *Iino, S., Abe, K., Oda, T., Suzuki, H. and Sugiura, M.* : A new method of radioimmunoassay for human placental alkaline phosphatase. *Clin. Chem. Acta*, 42 : 161, 1972.
 16. *Kimura, I., Ohnoshi, T., Tsubota, T., Sato, Y., Kobayashi, T. and Abe, S.* : Production of tumor antibody-NCS conjugate and its biological activities. *Cancer Immunol. Immunother.*, 7 : 235, 1980.
 17. *Kulkarni, P.N., Blair, A.H. and Ghose, T.I.* : Covalent binding of methotrexate to IgG and the effect of Ab-linked drug on tumor growth in vivo. *Cancer Res.*, 41 : 2700, 1981.
 18. *Latif, Z.A., Lozzio, B.B., Wust, C.J., Krauss, S., Aggio, M.C. and Lozzio, C.B.* : Evaluation of drug-antibody conjugate in the treatment of human myelomas transplanted in nude mice. *Cancer*, 45 : 1326, 1980.
 19. *Mathé, G., Loc, T.B. and Bernard, J.* : Effet sur la leucémie 1210 de la souris d'une combinaison par diazotation d'A-methoptérine et de γ -globulines de hamsters porteurs de cette leucémie par hétérogreffe. *C.R. Acad. Sci.*, 246 : 1626, 1958.
 20. *Pattillo, R.A. and Gey, G.O.* : The establishment of a cell line of human hormone-synthesizing trophoblastic cells in vitro. *Cancer Res.*, 28 : 1231, 1968.
 21. *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, 1975.
 22. *Searle, F., Boden, J., Lewis, J. and Bagshawe, K.* : A human choriocarcinoma xenograft in nude mice: A model for the study of antibody localization. *Br. J. Cancer*, 44 : 137, 1981.
 23. *Sekiya, T., Furuhashi, Y., Goto, S. and Tomoda, Y.* : Specific enzyme immunoassay for human chorionic gonadotropin. *Acta Endocrinol.*, 97 : 562, 1981.
 24. *Speeg, K.V., Azizkhan, J.C. and Stromberg, K.* : Characteristics of alkaline phosphatase from two continuous lines of human choriocarcinoma cells. *Exp. Cell Res.*, 105 : 199, 1977.
 25. *Sussman, H.H., Small, P.A. and Cotlove, E.* : Human alkaline phosphatase. Immunohistochemical identification of organ-specific isoenzymes. *J. Biol. Chem.*, 243 : 160, 1968.
 26. *Wide, L. and Gemzell, C.A.* : An immunological pregnancy test. *Acta Endocrinol.*, 35 : 261, 1960.

(No. 5108 昭57・6・9受付)