癌治療とモノクローナル抗体

Paul I. Terasaki, 福島喜代康, 広田正毅, 富樫博之, 麦島秀雄, 岩城裕一, 須山尚史, **Ian Drew**, **Gary Kukes**, **James Ciciarelli**, **David Chia**, **Steven Hardiwidjaja**, **Ronald Billing**, **Chun Deng**, **Pawel Kaszubowski**, **Jane Galton***

—*from conference*

Clinical application of monoclonal antibody for cancer therapy

Paul I. Terasaki • Kiyoyasu Fukushima • Masaki Hirota • Hiroyuki Togashi • Hideo Mugishima • Yuichi Iwaki • Naofumi Suyama • Ian Drew • Gary Kukes • James Ciciarelli • David Chia • Steven Hardiwidjaja • Ronald Billing • Chun Deng • Pawel Kaszubowski • Jane Galton

リンパ球の細胞表面を走査電子顕微鏡で調べてみますと、多数の突起が存在しますが、これをさらに血清学的、化学的に検討しますと、たとえば HLA 分子のような小さな突起があります。私たちは、抗体を用いることによってこの分子の一部のわずかな違いを指摘することができますが、これが HLA 抗原です。このような HLA 抗原系の経験から、癌細胞と正常細胞の膜抗原の化学的な構造上の違いがわからなくても、モノクローナル抗体の技術を用いることによってこの違いをみつけることができと思っています。

現在、私たちは、癌に対するモノクローナル抗体を作製しておりますが、腫瘍抗原に結合し、生体の補体を活性化することによって腫瘍細胞を殺すような細胞障害性抗体の作製を目指しています。

モノクローナル抗体をつくるときには、多数の抗体のスクリーニングをする必要がありますが、私たちの施設では、cytotoxicity test と binding assay を主に用いています。microcytotoxicity test (細胞障害性試験) では、ごく少量の抗体とわずかな細胞で多数テストができ、また細胞障害性抗体をみつける場合にきわめて有力な方法です。

私たちは、腫瘍細胞で免疫したマウスの脾細胞と同系マウスの骨髓腫細胞を細胞融合し、その培養上清を用いて、表 1 に示しましたようなすべての正常末梢血細胞および培養細胞株などに対して細胞障害性試験を行っています。今まで腫瘍細胞で免疫してつくられた多くのモノクローナル抗体のうち、リンパ球、顆粒球、血小板などと反応する抗体がしばしばありますし、また、培養細胞に対してこのテストを行うことによって、blast antigen と反応するモノクローナル抗体も見出されています。そして、細胞障害性試験で正常パネルに対してモノクロー

表 1 cytotoxicity test panel

normal cells	cultured cell lines
3 T lymphocytes	HL 60-Myeloid leukemia
3 B lymphocytes	CEM-T ALL
3 granulocytes	KM 3-cALL
3 monocytes	WEL-B lymphoma
4 red cells	
6 platelets	

表 2 ELISA test

1. Disrupt panel of normal and tumor tissue in nitrogen bomb.
2. Isolate membranes by centrifugation.
3. Stick membranes in wells of microtest plate, store frozen.
4. a. To test antibodies, add to plate, incubate, wash.
b. Add antimouse antibody coupled with peroxidase, wash.
c. Add H_2O_2 to phenylendiamine, read color.

ナル抗体が反応しないとき、これらの正常細胞はすべて、そのモノクローナル抗体に対して陰性と判断しています。

もちろん、種々の正常組織との反応性をみるためには、細胞障害性試験だけでは不十分ですし、また、この方法に適切な腫瘍細胞を得ることがしばしば困難ですので、細胞障害性試験のほかに、binding assay を行っています。

私たちは、binding assay の一つとして、ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) を行っています。私たちの方法は、表 2 に示しましたように、窒素破壊法によって細胞膜分画を分離し、これを microtest plate に coating し、これにモノクローナル抗体を加え、incubation 後、洗浄し、peroxidase を結合した二次抗体や基質を加えることによって発色させ、呈色反応を分光光度計で測定しています。この方法を用いますと、正常と癌細胞の多くの種類の細胞膜分画に対し、多数の検査を行うことが可能です。

このようなことから、最近では、私たちの施設では ELISA がもっとも迅速で簡便なスクリーニングの方法となっています。さらに、モノクローナル抗体の特異性をより詳細に検討するために、種々の組織切片を用いて、組織の immunoperoxidase 法を行っています。このようにして、表 3 に示しましたように正常組織パネルを用いて、2つの binding assay、すなわち、ELISA と組織の immunoperoxidase 法で、正常組織との反応性を検討しています。

* Department of Surgery, UCLA School of Medicine, University of California, Los Angeles, California

腫瘍抗原に対するモノクロナール抗体を作製しようとする私たちの試みのなかで、分化抗原および polymorphic 抗原に対するモノクロナール抗体がいくつか得られています。表4の左側に、私たちが作製しました分化抗原に対するモノクロナール抗体を示しました。最近、私たちは、これらのモノクロナール抗体で、リンパ球以外の細胞を溶解することによって非常に速く、リンパ球のみを分離することができるように、モノクロナール抗体の混合物をつくりました。この製品を私たちは、Lympho-kwik と呼んでいます。これはリンパ球分離に非常に有用で、12検体から1時間以内に、すなわち1つの血液検体につき5分で、リンパ球を分離することができます。表4の右側には HLA-A2, HLA-A11, HLA-B8, HLA-B13, HLA-DR5, HLA-DR9, HLA-Te22, Lea, A1Le^d に対するモノクロナール抗体を示しました。これらは polymorphic 抗原に対するものですが、高い titer と特異性を有しています。

私たちは、腫瘍抗原に対するモノクロナール抗体の作製を行っていますが、腫瘍特異性をもった抗体の作製はきわめて困難です。腫瘍特異抗原そのものの存在が明らかでなく、たとえ腫瘍特異的と思われたモノクロナール抗体でも、幅広い詳細な特異性の検討によって、その特異性が覆されることがしばしばあるからです。

表5に私たちの施設でできたモノクロナール抗体を示

表3 normal tissue panel for screening ELISA and immunoperoxidase

lung	colon
kidney	stomach
lung	pancreas

表4 monoclonal antibodies against differentiation and polymorphic antigens

CHAL 1 antilymphocytic	HLA-A2
CIA 1, 2 Ia	HLA-B8
CGRA 1 granulocyte	HLA-B13
CPLA 1, 2 platelet	HLA-A11
CRBC 1, 2 rbc	HLA-DR5
CBL 1-5 blast cell	HLA-DR9
	HLA-Te22
	Lewis Ald
	Lewis a

表5 monoclonal antibodies against tumor antigens

CLE 101 Leiomyosarcoma (Deng)	CESO 1 Esophagus (Galton)
CAML 1 AML-Monocyte (Israeli)	CCLO 1, 2 Colon (Kaszubowski, Galton)
CCALL 1 Common ALL (Deng)	CSTO 1 Stomach (Togashi)
CCALL 2 Common ALL+platelet (Deng)	CLUN 1-2 Lung (Iwaki, Kaszukowski)

しましたが、これらの抗体が完全に腫瘍特異的であると断定できません。私たちが最初につくったモノクロナール抗体は、leiomyosarcoma に対する抗体でしたが、individual specificity を示し、他の患者の leiomyosarcoma には反応を示しませんでした。AML に対する抗体は単球とも反応し、かつ CFU-C を阻害するので、その臨床的用途は限られたものとなるでしょう。common ALL に対する抗体もつくることができましたが、ご存知のように、すでに Boston の Schlossman などの施設で、このような抗体が白血病の患者に応用されています。

また、私たちの食道癌に対する抗体は、leiomyosarcoma に対するものと同様に、もともとの免疫細胞にのみ反応し、あまりにも特異的であるという問題を抱えています。この抗体は、日本人の患者由来の食道癌培養株 (SH 株) に対してつくられたものです (表6)。この抗体価は、1:1,000 で IgM 抗体でした。細胞障害

表6 CESO 1 esophagus (Galton)

immunogen: SH cultural esophagus cancer line	
titer 1: 1,000	IgM
negative to: cytotoxicity: normal panel cytotoxicity: lymphoblast panel ELISA normal panel immunoperoxidase normal panel	positive to: cytotoxic to SH line 0/6 esophagus cancer

表7 CCOL 1 colon adenocarcinoma (Kaszubowski)

target: 205 colon cancer cultured line	titer 1: 2,000 to 1: 800
IgG 3	
negative by: cytotoxicity: normal panel cytotoxicity: lymphoblast panel ELISA normal panel immunoperoxidase normal sections	cytotoxic to 2 colon adenocarcinoma lines immunoperoxidase positive to: 9/12 colon cancer 4/5 pancreas cancer 1/1 stomach cancer

性試験, ELISA, 組織の immunoperoxidase 法でも, 私たちの正常パネルとは反応せず, 免疫に用いた培養株に明らかに細胞障害性を示しました. しかし, 他の 6 つの食道癌には陰性でした. SH 株は国立がんセンターの飯塚先生によって樹立されたものでした.

私たちの施設でつくられた抗体のうち, 今のところもっともよい抗体は, 大腸癌に対してつくった抗体です (表 7). この抗体は, 大腸癌培養株 (205 colon) で免疫してつくったものですが, 1:800~1:2,000 の抗体価をもつ IgG 3 抗体です. この抗体は, 私たちが検査したほとんどの大腸癌および膵臓癌の組織に対して反応しました. さらに, この抗体は細胞障害性抗体であり, 大腸癌細胞とは強く反応します. 大腸粘膜や膵臓細胞とは少し反応しますが, 他の正常細胞とは反応しませんでした. このようなことから, この抗体は, 治療の応用に必要の特徴をもっています.

一般に, 多くの研究者は, 癌細胞を殺すためにモノクローナル抗体に抗癌剤, radioisotope, immunotoxine, liposome を結合することを試みていますが, 私たちは, まず最初にもっとも単純な可能性, すなわち投与した細胞障害性抗体が, 患者の補体の作用のもとに, 癌細胞を殺すかどうかを検討することにした. そのために私たちは, phase I studyとして, 細胞障害性抗体を用いて癌患者の治療を試みましたが, これは phase I study の目的, すなわちマウスモノクローナル抗体の毒性の検討を主な目的としたものです.

私たちがモノクローナル抗体で治療した 1 例目は, 食道癌培養株 (SH 株) に対してつくったモノクローナル抗体を用いて, 培養株のもともとの患者に治療目的で投与を試みたものです (表 8). モノクローナル抗体 (CESO 1) の投与は UCLA で行いましたが, 治療後患者は国立がんセンターの飯塚先生によって follow up されました. 抗体投与時, 患者は stage IV ですが, 抗体投与に基づく副作用は認められず, 5 日間にわたって総量 479 mg の抗体を経静脈的に投与しました. 自覚症状の改善をみましたが, 抗体投与の効果は客観的には不明でした. 患者は, 4 ヵ月後, 誤飲による窒息で死亡しましたが, 死亡時にはほんのわずかの癌しか残ってい

ませんでした.

その後, このモノクローナル抗体 (CESO 1) の特異性の検討がより進み, この抗体は腫瘍特異抗原に対するものではなく, polymorphic 抗原に対する可能性が最近わかってまいりました.

モノクローナル抗体で治療した 2 例目は, 広範囲転移を有する大腸癌患者でした. 患者のリンパ節転移巣を大腸癌培養株 (205 colon) に対するモノクローナル抗体 (CCOL 1) で調べましたところ, 腺癌の部分に非常に強い陽性を示したので, この患者に細胞障害性抗体 (CCOL 1) の投与を試みました.

この患者に投与された抗体の血中抗体価の推移を図 1 に示しました. 投与前に i.v. tube からとったサンプル中の抗体価を調べてみましたが, 免疫した大腸癌細胞株に対する cytotoxic titer は, 1:32 でした. 投与前の抗体価は, 括弧に示したように 0 でした. 1 日目の 20 mg の抗体の投与で, titer は 1:4 に上がりました. しかし, 2 日目のはじめには, 血清中に抗体は残っていませんでした. 150 mg の投与後, 血清中では 1:8 の titer になりました. 毎日, 抗体の titer は 0 近くまで下がりましたが, 5 日目の 1 g の大量投与によって cytotoxic titer は 1:64 にまで増加しました. この非常に大量の投与によって, 次の日には 1:16 にまでしか落ちませんでした.

このことから, 血中のモノクローナル抗体の titer は,

図 1 CCOL 1 antibody titers

表 8 esophagus cancer patient

55-yr-old Japanese male	day	mg
Jan. 1981 esophagus tumor resected Dr. Izuka, National Gan Center	1	1・10
Feb. 1982 recurrence	2	40
July 1982 recurrence	3	110
Aug. 1982 monoclonal antibody, UCLA	4	318
	total	479 mg

図2 serum complement levels

投与された抗体量に関係し、大量投与でのみ、ある一定レベルの抗体価を維持することができると結論づけています。

モノクローナル抗体の投与に基づくきわめて興味深い所見の一つに、補体レベルの著明な低下があります。2例目の患者の補体価の推移を図2に示しました。一番下の線は、総補体価の推移ですが、この scale は右側に示しました。毎日の抗体の投与前の補体の値は括弧内に示しました。総補体価は、モノクローナル抗体を投与するたびに低下する傾向を示し、4日目の 600mg 投与後には0にまで低下しました。5日目の 1,000 mg の投与により再び0まで低下し、24時間0のままでしたが、7日目になって投与前のレベルまで戻っています。上のほうの実線は補体 C_3 ですが、scale は左側に示しました。

これをみますと、毎回モノクローナル抗体が投与されるたびに C_3 は低下し、5日目に 1,000 mg 投与した後、最低値を示しました。しかし、興味深いことは、破線で示した補体 C_4 の経過です。 C_4 の scale は右側に示しましたが、4日目に 600 mg 投与した後、0まで低下し、5日目および6日目には、検出できないレベルまで再び低下しました。

このようなことから、モノクローナル抗体は、補体と結合していて、 C_3 よりも C_4 値が limiting factor であることが明らかになりました。免疫複合体が補体と結合する可能性もありますが、患者血清中にこの抗体と結合する大腸癌抗原を検出することができませんでしたので、モノクローナル抗体は腫瘍細胞上に結合し、このことによって大量の補体が消費されたのだと考えています。

モノクローナル抗体の第1クールが終わって1カ月後、第2クールの抗体投与を行いました(図3)。3日目と4日目に続けて 500mg の抗体を投与したところ、血中の抗体価は翌日まで維持されましたが、7日目には0まで低下しました。そこで再び 500mg を投与したところ、上昇しすぐまた低下しました。隔日に 500mg 投

図3 MA antibody titers

図4 complement levels

与してみましたら、9日目にも低値を示しました。これらのことより、血中の抗体価を高く維持するためには、毎日 500mg の投与が必要であると結論づけました。第1クール終了から第2クール開始までの間隔は1カ月間でしたが、第2クール開始直前には患者血清中にマウス抗体に対する抗体は認められませんでした。

第2クール期間中の補体価の推移を図4に示しました。補体成分 C_3 はモノクローナル抗体の投与によって著明に変動しませんでした。抗体 500mg を投与した後の全補体価は0に低下しました。また C_4 の著明な低下が4日目から認められました。また、この治療経過中に、補体の問題を考へて、矢印で示した日に新鮮凍結血漿2単位を投与しましたが、 C_4 は低下したままでした。これらのことより、500 mg の抗体投与後、補体価のレベルを維持するためには、より多量の新鮮凍結血漿を投与する必要があると思います。また、この C_4 の急激な低下は、抗体が癌細胞上に付着していたことを示唆し、このことは、モノクローナル抗体を用いての癌治療に希望を与えてくれるものと思われます。

この大腸癌の患者は、治療2カ月後、癌の進行のために死亡しましたが、抗体投与時、すでに癌の量が多すぎ、抗体によってすべての癌細胞を殺すことができなかった

図5 CCOL 1 antibody titer

図6 serum complement levels

ったものと思われます。大量の抗体投与後、転移による痛みがある程度改善されたようですが、客観的には、CT scanなどで腫瘍の縮小は認められませんでした。

3例目の患者は膵癌患者で、腹腔内転移のある進行癌でした。転移巣を大腸癌抗体 (CCOL 1) を用いて、immunoperoxidase 染色法を試みましたが、positive でした。彼は、病理学者で、モノクローナル抗体での治療に同意しました。この患者の治療経過を図5に示しました。モノクローナル抗体 500mg を投与した3日目の患者血清中の抗体価は 1:32 でしたが、4日目には 1:16 でした。この患者は、モノクローナル抗体に対してアレルギー反応があるように思われましたので、しばらく抗体の投与をやめて、9日目に 100mg を投与しました。11日目と13日目にも抗体の投与を行いました。患者の血中の抗体価は0でした。投与開始後13日目に患者は腹痛を訴えましたが、このとき血清中に抗マウス抗体が証明され、17日目には、この抗マウス抗体はさらに上昇していました。患者は、マウス抗体に過敏であったのかもしれませんが。

この患者の血清補体価の治療中の推移を図6に示しましたが、C₃ と C₄ の値は、抗体投与後、著明には低下しませんでした。しかし、矢印で示しました新鮮凍結血漿の投与にもかかわらず、全補体価は治療の経過中に低下しました。この患者も CT scan では、モノクロー

表9 new monoclonal antibody protocol

Mon	Tues	Wed	Thur	Fri	total
5-50	100	200	400	800	1,555 mg
10-100	200	400	800	1,600	3,100 mg

patients with residual metastasis of less than 20 grams
colon, stomach, and pancreas

ル抗体の投与による改善の徴候は認められませんでした。治療2カ月後、患者は癌のため死亡しました。

私たちは、これらの治療経験からも、モノクローナル抗体は、患者に対して毒性はありませんが、腫瘍が大きすぎる場合、その効果を発揮できないであろうと結論づけています。また、抗体投与後、補体が消費されるという事実から、補体結合性抗体である CCOL 1 抗体が患者の癌細胞に結合していることを強く示唆するものと思われれます。

今までに治療した3例の末期癌患者には、重篤な副作用はみられませんでした。phase I study としては少ない症例数ですが、このことより、マウスのモノクローナル抗体を大量投与しても、それ自体毒性を示さないということがわかってきました。それで、次のステップ、すなわち phase II study に進むことが可能と考えています。

ところで、私たちの細胞障害性抗体は、1,000 倍希釈した場合、0.001ml で 1,000 個の細胞を殺すことができます。このことから、1ml の抗体は 10⁹ 個の細胞を殺すことができます。抗体の濃度は 10mg/ml なので、10mg の抗体は 10⁹ 個の細胞を殺すことになります。したがって、1g の抗体は 10¹¹ 個の細胞を殺します。10⁹ 個の細胞は重さにして約 1g なので、1g の抗体は 100g の腫瘍を殺すことができるはずです。このことから、私たちは、phase II study では、20g 以下の腫瘍に対しておよそ 1.5g の抗体の投与、すなわち計算値の7倍量を投与しようと計画しています。

phase II study の治療案を表9に示しましたが、私たちは、抗マウス抗体による合併症を避けるために、5日間だけ治療し、抗体の投与量を日々増やし、もし何らかの好ましくない反応が認められたら、抗体の投与を減量するか、中止することになっています。1日目に 10~50mg の抗体を投与し、投与量は2つのスケジュールに基づいて増加する予定です。もっとも大切なことは、癌組織が 20g 以下ぐらいの患者のみを今度の phase II study の対象としていることです。つまり、癌摘出術を受けた患者か、少量の転移癌のある患者のみが治療の対象となると考えられます。また、もし補体価が低値を示せば、治療の最後の数日間は、新鮮凍結血漿の投与を予定して

います。

モノクローナル抗体を用いての癌治療の phase II study は、今始まったばかりですが、今後何らかの治療効果が得られることを期待しています。

これまで私が述べてきた仕事は、多くの共同研究者の協力によってなされたものです。モノクローナル抗体の作製に携わっている先生方、そのテクニシャンたち以外にも、病理、生化学の section で抗体を調べたり、抗体を大量作製したり、臨床応用のための準備をしたり、最終的には臨床で抗体を応用したりというように、多くの人たちがともに働いています。

腫瘍特異抗原らしきものが存在しない可能性もありま

すが、この新しいモノクローナル抗体のシステムを利用することによって、この古くからの問題の解決に向かって必ずや、新しい希望を与えてくれるでしょう。

最後になりましたが、学会の皆様に対して、この機会を与えて下さったことに深く感謝申し上げます。ありがとうございました。

この講演の要旨は、癌学会九州地方会（昭和58年，長崎），アジア・オセアニア胸部疾患学会（昭和58年，東京）および日本国内の数カ所の施設において発表した。また、Immunohematology（近代出版）に投稿中である。