

ヌードマウス可移植性ヒト唾液腺癌株に対する モノクローナル抗体の作製と唾液腺腫瘍 ターゲティング療法への応用

西 野 宏

Generation of a Monoclonal Antibody against a Transplantable Carcinoma of Human Salivary Gland in Nude Mice (TS-1) and Application to Targeting Therapy against Salivary Gland Carcinoma

Hiroshi Nishino

(平成5年7月8日受付)

緒 言

Köhler と Milstein (1975)^{1,2)} が細胞融合法によるモノクローナル抗体の作製法を確立して以来、様々な腫瘍細胞に対して特異的なモノクローナル抗体が作製され、診断や治療への応用が試みられてきた。一方、唾液腺腫瘍は、発生頻度は決して高いものではないが種類が多く、組織学的に多様な像を呈する興味ある腫瘍である。しかし、同腫瘍に対するモノクローナル抗体（作製およびその応用）の報告は、ほとんどみられない³⁾。

本研究では、当科で継代維持されているヌードマウス可移植性ヒト唾液腺癌株 (TS-1)^{4,5)} を免疫原として、唾液腺腫瘍に特異的に反応するモノクローナル抗体の作製を試みた。次に得られた抗体 NTS4C3 を用いて、免疫組織化学的および生化学的検索により認識抗原の解析を行い、その特異性について検討した。さらに同抗体を用いた唾液腺腫瘍の治療の可能性について検討するため、抗体単独での抗腫瘍効果を comple-

ment dependent cytotoxicity (CDC と略)、antibody dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC と略) 活性で検討するとともに、抗体にダウノマイシン (DNR と略) を結合させその腫瘍集積性を利用したターゲティング療法についても検討した。

材料ならびに方法

I. モノクローナル抗体の作製

1. 免疫原およびその調整法

免疫原：免疫原として TS-1 を用いた。TS-1 の起源腫瘍は、73歳女性の口蓋原発の唾液腺腫瘍（腺様囊胞癌）(図 1A) の頬部皮下再発巣（未分化癌）(図 1B) である。TS-1 は、BALB/c-nu/nu 遺伝背景を有する 6～8 週齢の雄性ヌードマウス（日本クレア）の背部皮下に移植 (3.1978) し、ピニルアイトレーター内で、滅菌した水と飼料により、継代維持している (図 2)。

抗原調整：-70°C で凍結保存後の TS-1 腫瘍あるいは培養細胞を、ドライアイス冷却下、乳鉢にて粉碎し、0.25 M ショ糖および 0.1 M EDTA を含む 50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4) 中でホモジナイズし細胞を破壊した。このホモジネートを 10,000×g にて 4°C、15分間遠心して、核、ミトコンドリア、ライソゾーム画分を除去した後、その上清をさらに 105,000×g にて 4°C、60分間超遠心した。得られた沈渣を 0.1 mM EDTA を含む 50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4) に懸濁し、この溶解液を抗原として免疫原および抗体スクリーニングに用いた。

広島大学歯学部口腔外科学第二講座（主任：石川武憲教授）本論分の要旨は、第33回日本口腔外科学会総会（昭和63年9月30日）、第34回日本口腔外科学会総会（平成元年10月27日）、第49回日本癌学会総会（平成2年7月5日）、第35回日本口腔外科学会総会（平成2年10月25日）において発表した。本研究は一部文部省科学研究費（平成3年度、No. 02454459）によった。

2. 免疫法および細胞融合法

TS-1 抗原を等量の完全アジュバント (Difco labo.) と混合してエマルジョンを作り、6週齢雌の BALB/c マウス腹腔内に投与した。2週間後さらに、TS-1 抗原と等量の不完全アジュバント (Difco Labo.) によるエマルジョンを腹腔内に投与した。ついで2週間後、TS-1 抗原を静脈内投与し、その3日後にマウスより無菌的に脾臓を摘出し脾細胞を分離した。この脾細胞と、P3-X63-Ag8-U1 (P3U1) 細胞 (広島大学歯学部口腔生化学講座より供与) を 5:1 の割合で混合し、45% (W/V) ポリエチレングリコール 4000 (MERCK) を用いて細胞融合を行った。融合細胞は GIT 培地 (日本製薬) に浮遊後、24穴平底プレート (住友ベークライト) に植え込み、5% CO₂ インキュベーター内で 37°C にて培養した。翌日より、HAT 選択培地添加剤 50 X (Boehringer mannheim) を 1/50 容量添加した GIT 培地 (HAT 選択培地と略) にて培養し、コロニー形成を確認後、順次 HAT 選択培地からアミノプテリンを除いた HT 培地を経て、通常の GIT 培地に交換した。TS-1 抗原に反応し、KGK 細胞 (口腔扁平上皮癌由来培養細胞株、当科で樹立)⁶⁾ より調整した抗原と反応しない抗体産生融合細胞を限界希釈法によりクローニングした。クローニングには、Feeder 細胞として3週齢の BALB/c マウス胸腺細胞を用い、抗体産生の認められた融合細胞を96穴平底マイクロプレートにて段階的に希釈した。1 well 中に1個の融合細胞のコロニーが形成された場合をクローンとみなし、増殖したクローンの再クローニングをさらに2回行った。

3. 抗体スクリーニング (ELISA 法)

前記方法により調整した各種抗原を96穴平底マイクロタイタープレート (住友ベークライト) にそれぞれ加え、4°C で12時間静置し抗原吸着を行った。まず 2% (W/V) 牛血清アルブミン (Sigma Chemical Co.) で処理 (室温, 2時間) し、非特異反応を阻止した後、融合細胞培養上清をそれぞれ 100 μ l 加え、室温で2時間静置反応させた。次に、二次抗体としてアルカリフォスファターゼ標識抗マウス (IgG+IgA+IgM) 山羊血清 (Zymed) を室温で2時間反応させ、その後、1 mg/ml p-nitrophenylphosphate (和光純薬) (50 mM 炭酸ナトリウム緩衝液 (pH 9.6), 1 mM MgCl₂) で呈色反応を行った。5 M NaOH 100 μ l 加えることによって反応を停止させ、判定はマイクロプレートリーダー (東ソー) を用い 405 nm で吸光度を測定し行った。

II. 抗体のサブクラス同定

作製した抗体は、Mouse Monoclonal Typing Kit

(ICN Co.) を用いオクタロニー法により同定した。

III. 抗体精製

対数増殖期にある抗体産生融合細胞を GIT 培地にて12~24時間培養後、この培養液を 100,000 \times g にて 4°C, 60分間超遠心した。この上清を以下の酵素抗体間接法による免疫染色に用いた。

またあらかじめプリスタン (Aldrich Chemical Co.) 0.5 ml を腹腔内投与した BALB/c マウスに、 1×10^7 個/匹の抗体産生融合細胞を腹腔内投与した。得られた腹水を2倍容量の 0.5 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) で希釈し、50%飽和硫酸アンモニウムで塩析した後、0.14 M NaCl を含む 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) にて 4°C で24時間透析した。さらに Sephacryl S-300 (Pharmacia) でゲル濾過し免疫グロブリン分画を得た。

IV. 認識抗原の検索

1. 免疫組織化学的検索

(1) 検索材料

1) 腫瘍および正常組織

手術および剖検より得た唾液腺腫瘍87例 (多形性腺腫30例, 粘表皮腫20例, 腺様嚢胞癌20例, 腺癌12例, 未分化癌5例), 正常唾液腺8例, 頭頸部扁平上皮癌15例, 胃および腸腺癌9例およびその他の正常組織。

2) 培養細胞

KSA: 腺様嚢胞癌由来培養細胞株⁷⁾ (当科で樹立) (KSAc3, KSAc4)^{注1)}

KGK: 口腔扁平上皮癌由来培養細胞株

HSG: 唾液腺上皮腫瘍株⁸⁾ (徳島大学歯学部口腔外科学第二講座より供与)

A-431: 外陰部扁平上皮癌由来細胞株⁹⁾ (JCBR より供与)

3) ノードマウス可移植性ヒト唾液腺癌株

TS-1, TS-2^{注2)}

(2) 検索法

採取した腫瘍および正常組織は、ホルマリン固定後パラフィン包埋し約 4 μ m 厚の切片を作製した。一部組織は PLP 液で固定し、クリオスタット (Bright) で

注1) KSAc3, c4 は、KSA 細胞由来のクローン株で、形態的および免疫組織化学的に、c3 は介在部導管上皮様の形質を、c4 は筋上皮様の形質を発現している。

注2) TS-2 の起源腫瘍は、68歳男性の下顎臼後三角部原発の唾液腺未分化癌である。TS-1 同様にノードマウス背部皮下に移植 (5.1984) し、継代維持している。

約 4 μm 厚の凍結切片を作製した。また培養細胞は、カバーガラス上で subconfluent に培養した後、6:4 に混合したアセトンとエタノールで 4°C、10 分間固定した。以上の試料を用い、NTS4C3 との反応性を酵素抗体間接法により検討した。

各試料は、0.3% H_2O_2 加メタノール前処理 (室温、30 分) により内因性ペルオキシダーゼの反応を除去し、さらに 20 倍希釈正常山羊血清 (Cappel Labo.) で処理し (室温、20 分) 非特異的吸着反応を阻止した。

1 次抗体として、NTS4C3 と室温で 30 分間反応させた後、2 次抗体として 50 倍希釈のペルオキシダーゼ標識抗マウス免疫グロブリン山羊血清 (Cappel Labo.) と室温で 30 分間反応させた。その後、DAB にて呈色反応を行い検討した。細胞自体が NTS4C3 に対して明らかな陽性反応を示した場合を陽性とみなし、陽性細胞の出現頻度、管腔構造の内容物や好中球等の間質細胞の反応は考慮しなかった。

2. 生化学的検索 (過ヨウ素酸ならびに酵素処理)

TS-1 の凍結切片を用い、過ヨウ素酸、プロナーゼおよびノイラミニダーゼにてそれぞれ 15 分、30 分および 60 分間処理した。処理した切片は、酵素抗体間接法により免疫染色し、NTS4C3 との反応性を検討した。

過ヨウ素酸処理は、50 mM 過ヨウ素酸 (10 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4)) と 4°C で反応させた。プロナーゼ処理は、0.1~0.2 mg/ml のプロナーゼ (Sigma Chemical Co.) (200 mM 酢酸アンモニウム水溶液 (pH 6.5)) と 37°C で所定時間反応後、20 mg/ml BSA で反応を停止させた。ノイラミニダーゼ処理は、0.1~1.0 IU/ml ノイラミニダーゼ (Type X, Clostridium perfringens 由来; Sigma Chemical Co.) (100 mM 酢酸アンモニウム水溶液 (pH 5.0), 100 mM NaCl, 1 mM CaCl_2) と 37°C で所定時間反応後、10 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.3) で洗浄した。

3. ウエスタンブロッティング

蛋白抽出法: 免疫原調整法と同様の方法で粉碎した腫瘍または培養細胞を lysis buffer (0.1 M phosphate buffer (pH 7.5), 1% Triton X-100, 0.01% NaCl, 5 mM EDTA, 0.4 trypsin inhibitory units of aprotinin/ml, 0.1 mM PMSF) に溶解し、凍結融解を 3 回繰り返した後、12,000 \times g にて 4°C、30 分間遠心し、その上清をサンプル (抽出蛋白) として用いた。

TS-1 および各種培養細胞から上記方法で細胞蛋白を抽出し、7.5% の SDS-PAGE 電気泳動を行った (Laemmli 法 (1970)¹⁰⁾)。SDS-PAGE で分離後、ニトロセルロース膜に Towbin ら (1979)¹¹⁾ の方法を用いてエレクトロトランスファーし、NTS4C3 によって認識される抗原を酵素抗体間接法により検出した。

V. NTS4C3 と DNR との結合体作製および ¹²⁵I 標識

分子量約 1 万のデキストランを介して、NTS4C3 と DNR との結合体を作製した¹²⁻¹⁴⁾。(DNR-NTS 結合体と略) (SRL に依託)

クロラミン T 法により、NTS4C3 の ¹²⁵I 標識を行った。(DAINABOT 社に依託)

また各々の抗体活性を ELISA 法により確認した。

VI. NTS4C3 を用いた *in vitro* における抗腫瘍効果

in vitro の実験系には、NTS4C3 との反応が確認された培養細胞を用いた。

1. 蛍光抗体法による反応部位の検索

培養細胞をカバーガラス上で subconfluent に培養した後、固定を行わず、Tsukada ら (1974)¹⁵⁾ の方法に準じて細胞膜の蛍光抗体染色を行った。まず、20 倍希釈正常山羊血清 (Cappel labo.) で処理し非特異的吸着を阻止した後、Dulbecco's modified minimum essential medium (D-MEM 培地と略, Flow labo.) で希釈した NTS4C3 を、37°C、30 分間作用させた。十分洗浄した後、同様に希釈した FITC 標識抗 Mouse Ig (Cappel labo.) を 37°C、30 分間作用させた。洗浄後、グリセリンと PBS を等量混合した液にて封入し、蛍光顕微鏡 (Nikon) で観察した。

2. CDC 活性

CDC 活性は、⁵¹Cr 遊出法にて測定した。10⁶ 個の培養細胞を、100 μCi $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4/0.1$ ml saline (Amersham) と 37°C で 90 分間反応させ、細胞の放射線標識を行った。⁵¹Cr で標識した培養細胞を PBS にて 3 回遠心洗浄することで未標識の ⁵¹Cr を除去した後、10% FCS 加 D-MEM 培地中に浮遊させた。この細胞浮遊液を 96 穴丸底マイクロタイタープレート (住友ベークライト) に 1 穴当り 10⁴ 個/100 μl の割合で植え込んだ後、段階的に希釈したウサギ補体 (Cappel Labo.) と NTS4C3 (0~10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 100 μl) とを加えた。その後、5% 炭酸ガス培養器中で 37°C、4 時間培養し、遊出した培養上清中の ⁵¹Cr の放射活性を γ -カウンター (Aloka) にて測定し、細胞障害率を求めた。

3. ADCC 活性

ADCC 活性は、CDC 活性の測定と同様の ⁵¹Cr 遊出法にて測定した。エフェクター細胞としてヒト末梢血リンパ球を用いた。分離方法は、健常人より採血したヘパリン (20~50 U/ml) 添加末梢血を約 1/2 容量の Mono-Poly Resolving Medium (Flow labo.) 上に重層して、400 \times g にて室温、30 分間遠心した。この比重遠

心法により形成されたリンパ球層をパスツールピペットで採取した後、PBSで遠心洗浄し用いた。

CDC 活性の測定で述べたと同様の細胞数を植え込んだ後、ヒト末梢血リンパ球 ($0\sim 80\times 10^4$ 個, $100\ \mu\text{l}$) と NTS4C3 ($0\sim 10\ \mu\text{g}/\text{ml}$, $100\ \mu\text{l}$) を加えた。その後、5%炭酸ガス培養器中で 37°C にて4時間培養し、以下同様に培養上清中の放射活性を測定し細胞障害率を求めた。

4. 培養細胞への DNR の取り込み量検討

培養細胞は、60 mm 径プラスチックディッシュ (Corning) にて培養し、subconfluent の状態にした。上清に DNR-NTS 結合体、あるいは単独の DNR をそれぞれ $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$ (DNR 量に換算) 加え、 4°C または 37°C にて0.5, 1, 3, 6, 12および24時間培養した。各培養細胞への DNR の結合および取り込み量は、Bachur ら (1970)¹⁶⁾ の方法に準じて、以下の方法により算定し検討した。

細胞をラバーポリスマンで回収し、PBS にて3回遠心洗浄した後、テフロンホモジナイザーでホモジナイズし、このホモジネートをサンプルとして用いた。同サンプル $0.5\ \text{ml}$ に $0.3\ \text{N HCl}$ を含む50%エタノール $2.0\ \text{ml}$ を加え、1分間振盪し DNR を十分抽出させ、 $2,000\times\text{g}$ にて 4°C 、20分間遠心した。その上清を蛍光分光光度計 (日立) で蛍光光度 (蛍光波長: $590\ \text{nm}$, 励起波長: $500\ \text{nm}$) を測定し、あらかじめ作製しておいた検量線より DNR 量を算定した。

5. DNR-NTS 結合体の細胞障害効果

DNR-NTS 結合体と、DNR 単独の培養細胞へ与える障害効果は、CDC 活性の測定と同様に ^{51}Cr 遊出法で比較検討した。

CDC 活性の測定で述べたと同様の細胞数を植え込んだ後、DNR-NTS 結合体および単独の DNR をそれぞれ加え、5%炭酸ガス培養器中で 37°C にて3, 10, 20および24時間培養し、以下同様に培養上清中の放射活性を測定し検討した。

6. DNR-NTS 結合体の細胞増殖抑制効果

DNR-NTS 結合体と、DNR 単独の培養細胞へ与える増殖抑制効果は、以下の方法により生細胞数を算定し比較検討した。

培養細胞は、60 mm 径プラスチックディッシュにて培養し、subconfluent の状態にした。上清に DNR-NTS 結合体あるいは DNR をそれぞれ加え、5%炭酸ガス培養器中で 37°C にて培養した。培養開始24時間後の生細胞数と死細胞数をトリパンブルーで染めわけ血球計算盤を用いて算定した。

Ⅶ. NTS4C3 を用いた *in vivo* における抗腫瘍効果

in vivo の実験系は、唾液腺腫瘍として TS-1 および TS-2、扁平上皮癌としては KGK 細胞をヌードマウス背部皮下に 10^7 個接種し、いずれも腫瘍重量約 $0.5\ \text{g}$ となった担癌ヌードマウスを用いた。

1. NTS4C3 の生体内分布

担癌ヌードマウスに ^{125}I 標識 NTS4C3 投与4日前より、0.1%ヨードカリウム水溶液を飲水させ、 ^{125}I が甲状腺、胃に非特異的に集積するのを阻止した。 ^{125}I 標識 NTS4C3 $10\ \mu\text{g}$ ($1\ \mu\text{Ci}$) に、未標識の NTS4C3 を加え、マウス1匹あたり NTS4C3 量 10, 50 および $150\ \mu\text{g}/200\ \mu\text{l}$ に調整し、尾静脈および腹腔内に投与した。投与1, 4, 5 および7日後にマウスを屠殺、解剖し、各臓器および移植腫瘍の重量を測定するとともに、 γ -カウンターにより ^{125}I の放射活性を測定し、湿重量当たりの放射活性を求め、抗体の生体内分布を検討した。

2. DNR-NTS 結合体の抗腫瘍効果

担癌ヌードマウスを DNR-NTS 結合体投与群、DNR 単独投与群、NTS4C3 単独投与群およびコントロール (生食投与) 群にわけ、DNR 量に換算して $1\ \mu\text{g}/\text{g}$ Body Weight を腹腔内に隔日、3回投与した。投与終了後より、3日毎に腫瘍の長径 (a mm) と短径 (b mm) を求め、 $1/2\times ab^2$ を推定腫瘍重量とし、各群の相対腫瘍重量比 $= T_N/N_0$ を算出 (T_N : N 日目の実験群の腫瘍重量, T_0 : 薬剤投与前の実験群の腫瘍重量) し、比較検討した。

結 果

I. モノクローナル抗体作製

融合6日後よりコロニー形成を認め、最終的には、200 well 中 88 well にコロニー形成が認められた。TS-1 抗原および KGK 抗原を用いて行った ELISA 法により、TS-1 抗原にのみ反応する抗体産生融合細胞を分離した。この融合細胞は、限界希釈法により3回クローニングを行い、安定した増殖を示す融合細胞クローンを選択した。なおこの細胞クローンならびに抗体を NTS4C3 と命名した。

II. 抗体のサブクラス同定

NTS4C3 の免疫グロブリンは IgM であることが、オクタロニー法により判明した。

III. 認識抗原の検索

1. 免疫組織化学的検索

1) NTS4C3 は、唾液腺腫瘍とは高率に反応した

表1 NTS4C3を用いた免疫染色の結果

腫瘍組織	陽性件数/症例数 (%)	正常組織	陽性件数/症例数
唾液腺腫瘍		唾液腺	7/8
多形性腺種	28/30 (93)	口腔粘膜	0/8
粘表皮腫	10/20 (50)	胃粘膜	0/3
腺様嚢胞癌	17/20 (85)	腸粘膜	0/2
腺癌	9/12 (75)	腎	0/3
未分化癌	2/ 5 (40)	副腎	0/3
他腫瘍		脾	0/3
扁平上皮癌 (頭頸部)	0/15 (0)	甲状腺	0/3
腺癌 (胃)	0/ 6 (0)		
(腸)	0/ 3 (0)		

ヌードマウス可移植性ヒト唾液腺癌株

TS-1	+	
TS-2	+	
培養細胞		
KSA	c3+	c4-
KGK	-	
HSG	-	
A-431	-	

が、今回検索した範囲では頭頸部領域の扁平上皮癌、胃および腸の腺癌とは、いずれも反応が認められなかった。一方正常組織では、唾液腺（顎下腺、耳下腺）とは高率に反応したが、口腔粘膜をはじめ他部位正常組織とは反応がみられなかった（表1）。

多形性腺腫では、30例中28例に陽性反応が観察された。いずれの症例でも、管腔を形成している細胞との陽性反応が観察された。また腫瘍細胞が索状あるいは充実性に増殖している部分にも陽性細胞が散見された。しかし、粘液腫様あるいは軟骨様部を構成する細胞とはいずれも陽性反応は観察されなかった（図3）。

粘表皮腫では、20例中10例に陽性反応が観察された。高分化型では、腺腔あるいは嚢胞様腔を形成する一部の細胞と陽性反応が観察された。また、低分化型では陽性率が低く、形態的に分化の明らかでない中間細胞に時に陽性所見が観察された。類表皮細胞との反応は観察されなかった（図4）。

腺様嚢胞癌では、20例中17例に陽性反応が観察された。主に導管様構造を示す細胞に陽性所見が観察された。本腫瘍に特徴的な篩状胞巣部において、導管様構造を示す細胞に陽性所見が観察されたが、導管様構造の外層細胞や偽嚢胞を形成する一部の細胞にも陽性細胞が散見された（図5）。

胞が散見された（図5）。

腺癌では、12例中9例に陽性反応が観察された。主に管状腺癌の腺腔を形成している細胞に陽性所見が観察された。また形態的に分化の明らかでない細胞にも一部陽性所見が散見された（図6）。

未分化癌では、5例中2例に陽性反応が観察された。

正常唾液腺では、8例中7例に陽性反応が観察された。介在部および線条部導管細胞に陽性所見がみられた。また、漿液性腺房細胞とも弱陽性反応が観察された（図7）。

2) 培養細胞での反応性を検索した結果、KSAc3（介在部導管上皮様細胞）とのみ反応し、KSAc4（筋上皮様細胞）、KGK細胞、HSG細胞およびA-431細胞とは反応しなかった（図8）。

3) 当科で継代維持しているTS-1以外のヌードマウス可移植性ヒト唾液腺癌株・TS-2との反応も観察された（図9）。

2. 生化学的検索

TS-1凍結切片の過ヨウ素酸あるいはノイラミニダーゼ処理は、NTS4C3の反応性に影響を与えなかったが、プロナーゼ処理により、経時的に染色性の低下が認められた（図10）。

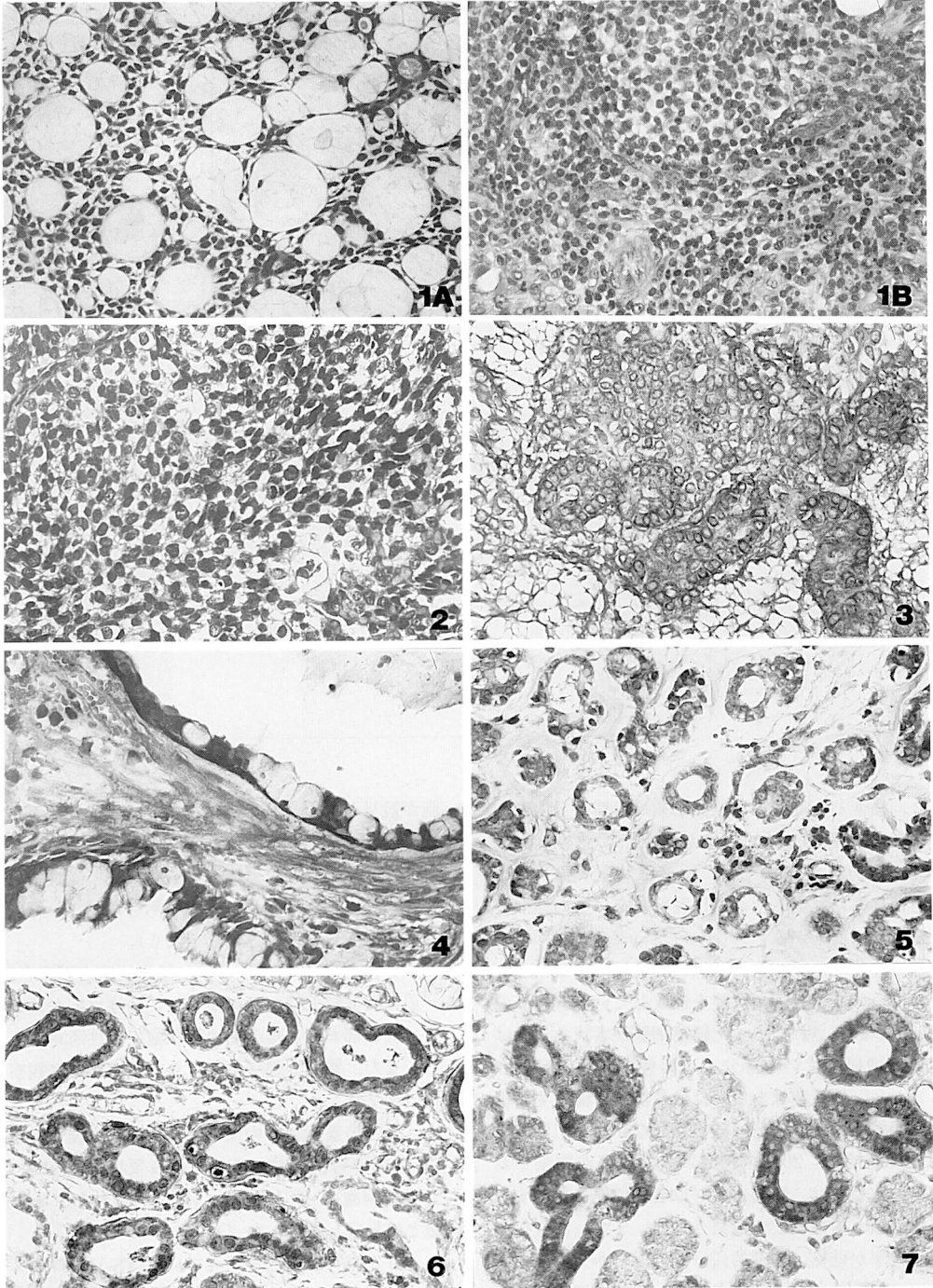


図1 起源腫瘍の組織像 (HE 染色, $\times 100$).

A: 原発巣. B: 再発巣.

図2 TS-1 の30代目の組織像 (HE 染色, $\times 100$).

図3 多形性腺腫の免疫染色所見 ($\times 100$).

腺腔を形成する細胞との反応がみられる.

図4 粘表皮腫の免疫染色所見 ($\times 100$).

腺腔および嚢胞様腔を形成する細胞との反応がみられる.

図5 腺様嚢胞癌の免疫染色所見 ($\times 100$).

導管様構造を示す細胞との反応がみられる.

図6 腺癌の免疫染色所見 ($\times 100$).

腺腔を形成する細胞との反応がみられる.

図7 正常唾液腺の免疫染色所見 ($\times 100$).

介在部および線条部導管細胞との反応がみられる.

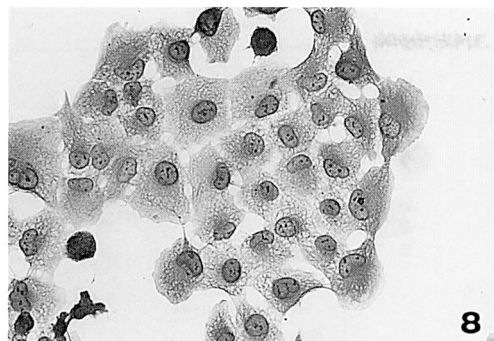


図8 KSAc3細胞の免疫染色所見(×200).

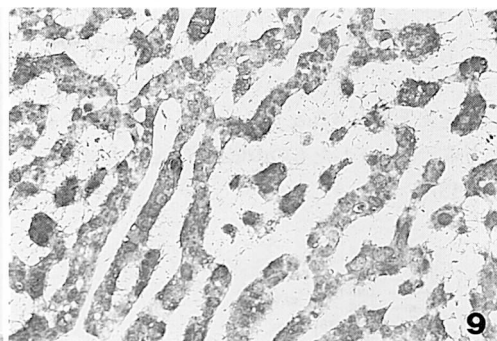


図9 TS-2の免疫染色所見(×100).

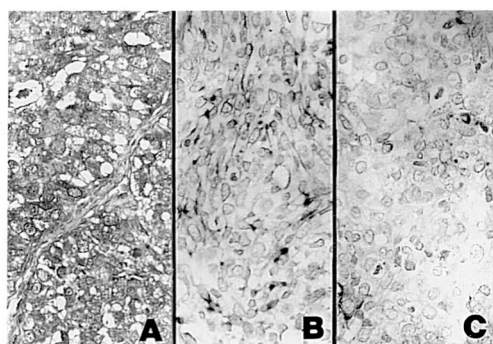


図10 TS-1 プロナーゼ処理後の免疫染色所見.
(×100)
プロナーゼ処理(A)15, (B)30, (C)60分後の免疫染色所見. 経時的に染色性の低下が観察される.

3. ウェスタンブロッティング

TS-1 では分子量約60,000の位置に抗原抗体反応を示すバンドが認められたが, KKGK においては認められなかった(図11).

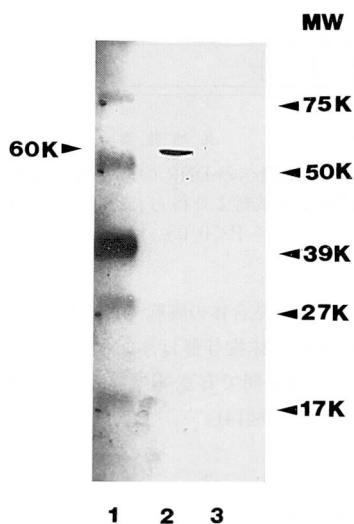


図11 ウェスタンブロッティング.
TS-1 において分子量約60,000の位置にバンドが見られる.
1: マーカー, 2: TS-1, 3: TS-2

IV. NTS4C3 を用いた *in vitro* における抗腫瘍効果

培養細胞として KSAc3 細胞を用いた。

1. 蛍光抗体法による反応部位の検索

固定しない KSAc3 細胞による蛍光抗体染色の結果, NTS4C3 と反応していることを示唆する特異蛍光が, 細胞膜に点状に認められ, 細胞質との反応は認められなかった(図12)。

2. CDC 活性

CDC 活性は検出されなかった。

3. ADCC 活性

ADCC 活性は検出されなかった。

4. KSAc3 細胞への DNR の取り込み量検討

37°C における KSAc3 細胞内の DNR 量は, DNR-

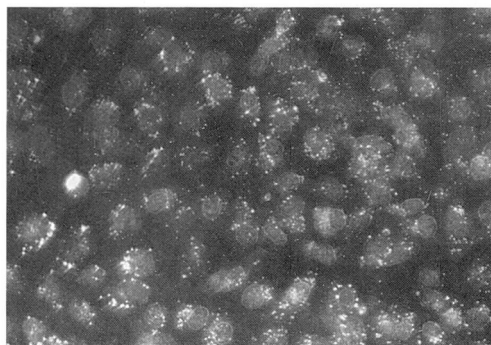


図12 未固定 KSAc3 細胞の蛍光抗体法所見.
(×200)
細胞膜に局在した点状の蛍光反応がみられる。

NTS 結合体投与群が, DNR 単独投与群より高い値を示した。特に15, 24時間では有意 ($P < 0.05$) に高い値を示した。また, 4°C においては, DNR 単独投与群ではほとんど検出されなくなったが, DNR-NTS 結合体投与群では低下したものの依然取り込みが認められた (図13)。

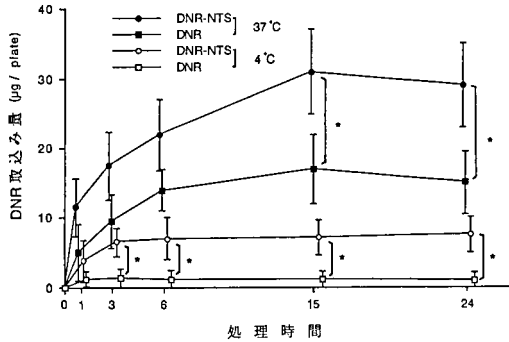


図13 KSAC3 細胞への DNR の取り込み量の推移。各値は, 5 試料より得られた平均値±標準偏差。* $P < 0.05$ 。

5. DNR-NTS 結合体の細胞障害効果

DNR-NTS 結合体投与群は, DNR 単独投与群と比較して, 13, 24時間で有意 ($P < 0.05$) に高い細胞障害効果を示した (図14)。

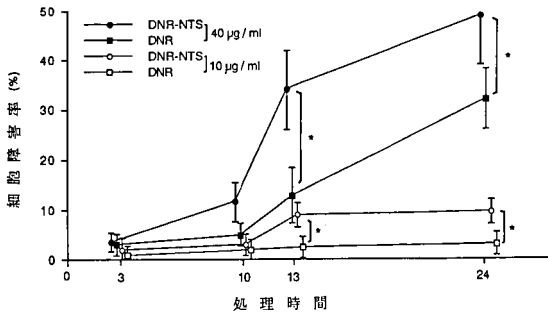


図14 KSAC3 細胞に対する細胞障害効果。各値は, 5 試料より得られた平均値±標準偏差。* $P < 0.05$ 。

6. 細胞増殖抑制効果

DNR-NTS 結合体投与群は, NTS4C3, DNR および DNR と NTS4C3 の混合物の各投与群と比較して細胞増殖抑制効果を示した (図15)。

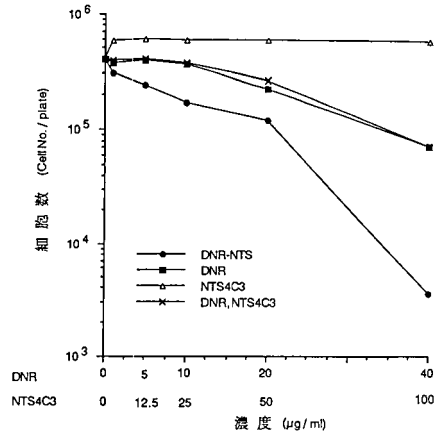


図15 KSAC3 細胞に対する細胞増殖抑制効果。各値は, 5 試料より得られた平均値。

V. NTS4C3 を用いた *in vivo* における抗腫瘍効果

1. NTS4C3 の生体内分布

腫瘍 (TS-1) の放射活性は, 4 日目に最高値を示し, いずれの計測時点でも他臓器より高い値を示した。しかし血液は常に高い値を示した (図16)。

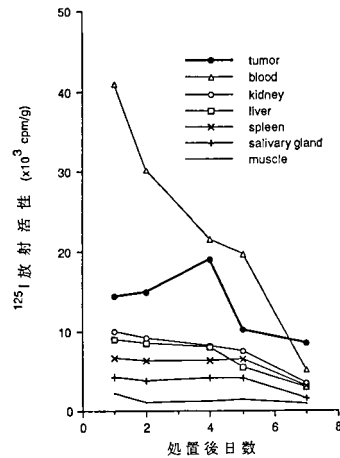


図16 NTS4C3 の生体内分布。各値は, 3 試料より得られた平均値。

また, TS-1, TS-2 および KGK 移植腫瘍の放射活性を比較すると, いずれも 4 日目に最高値を示し, KGK に比べ TS-1, TS-2 は, 高い値を示した (図17)。なお, 静脈投与と腹腔内投与には, 大きな差は認められなかった。

さらに抗体量による各臓器の放射活性量の違いを投与 4 日目で検討した結果, 腫瘍 (TS-1) の放射活性

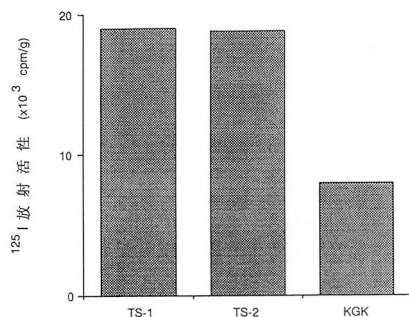


図17 NTS4C3の腫瘍別集積性.

^{125}I 標識 NTS4C3 投与4日後での、各移植腫瘍の放射活性. 各値は、3試料より得られた平均値.

は、抗体量 $10\ \mu\text{g}$ /匹投与群が、最高値を示した。しかし、血液をはじめ他臓器では、抗体量により大きな変化はみられなかった (図18)。

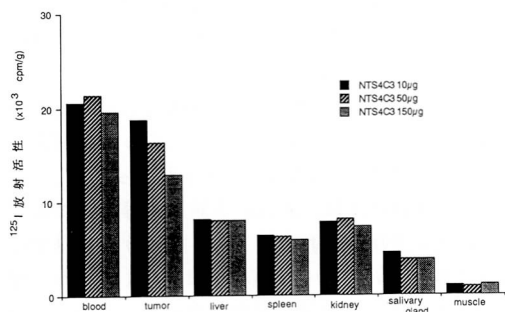


図18 抗体量による NTS4C3 の生体内分布の変化.

^{125}I 標識 NTS4C3 を TS-1 担癌マウスへ投与し、4日後の各臓器および移植腫瘍の放射活性の比較. 各値は、3試料より得られた平均値.

2. DNR 結合体の抗腫瘍効果

腫瘍の増殖の速い TS-2 (体積倍加時間 TS-1: 27.3 日, TS-2: 11.5 日) を用いて検索した (図19)。NTS4C3 単独投与群は、コントロール群とほとんど差異が見られなかった。同量の DNR 投与群と、DNR-NTS 結合体投与群は、投与15日目まではほぼ同様な増殖を示していたが、それ以降 DNR-NTS 投与群は増殖が抑制された状態となった。投与30日目には DNR-NTS 結合体投与群は DNR 投与群と比較し有意 ($P < 0.05$) な抗腫瘍効果が認められた。またその際の腫瘍の組織像は、腫瘍の内部でほとんどの腫瘍細胞が壊死している所見が見られた (図20)。

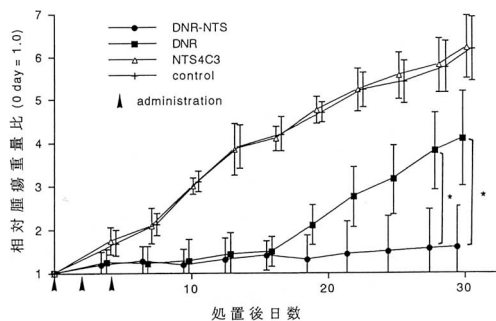


図19 TS-2 に対する抗腫瘍効果.

各値は、5試料より得られた平均値±標準偏差.

* $P < 0.05$.

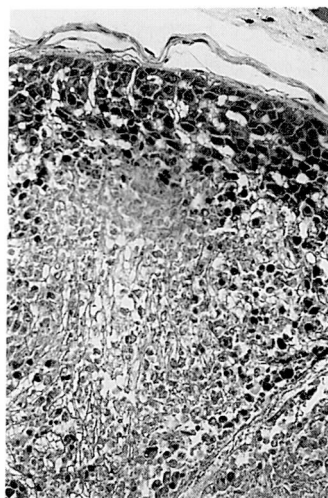


図20 DNR-NTS 結合体投与30日後の TS-1 組織像. (HE 染色 $\times 100$)

考 察

I. NTS4C3 の認識する抗原について

多彩な病理組織像を呈する唾液腺腫瘍は、従来、光学顕微鏡ならびに電子顕微鏡学的観察所見に基づき、組織構築の解釈、組織発生、腫瘍分類等が検討されてきた¹⁷⁻²²⁾。さらに免疫組織化学的手技の発達により、細胞内外に存在するさまざまな物質を同定することが可能となり、細胞の分化の方向性や発生母地の解明が検討されてきた²³⁻³²⁾。今回免疫原に用いた TS-1 は、病理組織学的には未分化癌であった頬部下再発癌から分離継代維持されたものである。しかしその原発腫瘍は、腺様嚢胞癌の組織像を呈していた。このことに関して、Patey ら (1965)³³⁾ は、唾液腺腫瘍の組織像は経過にともなって変化し未分化癌に移行しやすいと報告していることと一致する。TS-1 は、組織学的

観察によると主に未分化な上皮細胞からなっているが、一部に導管上皮様構造も認められ、同部は免疫組織化学的に正常唾液腺の導管細胞にみられると同様の上皮性・分泌上皮性マーカー³⁴⁻³⁷⁾の局在を示した。また電子顕微鏡学的^{4,5)}には、導管上皮様分化を示す細胞とともに胞巣最外層の間質に面して筋上皮様の分化を示す細胞も稀に観察され、TS-1 が終末部小導管に似た性質を保有することを伺わせた。Wirman ら (1976)³⁸⁾も、唾液腺腫瘍の未分化癌を電子顕微鏡学的に観察した結果、同様な所見を得ていて、その構成細胞は単一ではなく導管上皮様ならびに筋上皮様細胞へ分化を示す2種類の細胞よりなっていたと報告している。これらより、TS-1 抗原には、唾液腺腫瘍を構成する腺上皮および筋上皮両方のタイプの細胞に関連した抗原が存在している可能性が示唆される。

唾液腺腫瘍の免疫組織化学的検索を NTS4C3 と他のマーカーとで比較検討すると、NTS4C3 は LF, SC などの分泌機能マーカーの染色所見と類似した染色傾向が見いだされた。つまり NTS4C3 は、腺上皮の関連抗原を認識している可能性が推測された。また NTS4C3 は、一般に筋上皮系の細胞が関与しているといわれている^{29,30)}、多形性腺腫の粘液腫様部および軟骨腫様部の細胞とは全く反応しないが、同腫瘍の充実性および索状増殖部の一部の細胞に反応がみられた。また、腺様嚢胞癌の篩状胞巣部において導管様構造の外層細胞や偽嚢胞を形成する一部の細胞とも反応がみられた。この点に関して Hoshino ら (1970)³⁹⁾は、腺様嚢胞癌を構成する細胞には、電子顕微鏡学的に導管上皮系細胞と筋上皮系細胞の他に、中間的な細胞が認められることから、両細胞は互いに移行しうると報告している。つまりこのことは、腺上皮や筋上皮の関わっている唾液腺腫瘍に言えることであり、従来筋上皮系と見なされてきた細胞にも、腺上皮の性格を示唆する免疫染色性が示されても矛盾はしないと思われる⁴⁰⁾。

以上の結果より、NTS4C3 は、正常唾液腺および唾液腺腫瘍に特異的に反応し、その認識する抗原は、唾液腺腫瘍の腺上皮系の形質を保持した腫瘍細胞に存在することが示唆された。また、酵素処理試験で NTS4C3 により認識される抗原が、蛋白を分解する酵素であるプロナーゼにより抗原性を失うことより、同抗原に蛋白が関与していることが推測され、さらに、ウエスタンブロッティングの結果より分子量約60,000の抗原が関与していることが示唆された。

II. NTS4C3 を用いた唾液腺腫瘍の治療の可能性

唾液腺悪性腫瘍は、浸潤増殖を示しやすく、手術後に再発や遠隔転移しやすい腫瘍であるが、発生頻度が

低く、また種々の治療法を研究するための実験系が少ないことから、今まで有効な治療法は確立されていなかった。

癌細胞に特異的な抗体を用いて癌細胞を選択的に破壊する治療法は古くから報告されており、Ehrlich (1906)⁴¹⁾によって初めて提唱されて以来、いくつかの治療実験が試みられたが、治療効果をもたらすまでに至らなかった。しかし、その後モノクローナル抗体の出現により、抗体を用いた癌治療法は再び脚光を浴びてきた⁴²⁻⁴⁷⁾。モノクローナル抗体を全身投与すると、目的とする癌細胞に選択的に到達し、生体の免疫応答系を介してその癌細胞の排除に働くと考えられている。その発現機序には、CDC 活性および ADCC 活性の2つが考えられていて、モノクローナル抗体が癌細胞に結合し、細胞障害をもたらすためには、補体または F(c) 受容体を有した K, NK あるいはマクロファージ等のリンパ系細胞の存在が必要である⁴⁸⁻⁵⁰⁾。

NTS4C3 は、未固定の KSAc3 細胞を用いた蛍光抗体法による検索により、KSAc3 細胞の細胞膜と結合することが証明された。しかし IgM である NTS4C3 は、補体と結合する可能性があるにもかかわらず、CDC 活性は認められず、また、ADCC 活性も認められなかった。よって KSAc3 細胞に対する NTS4C3 の細胞障害効果は期待できないことがわかった。

一方、NTS4C3 は、*in vivo* 実験系で静脈内および腹腔内より全身投与すると、腫瘍 (TS-1) へ集積することが確認された。その集積性は投与1日目から他臓器より高く、4日目に最高となった。しかしこの際、NTS4C3 の血中濃度は常に腫瘍より高く、肝、脾および腎もやや高い傾向があった。全身投与された NTS4C3 は、腫瘍へ到達する前に血流に乗って全身を循環し①血液中での分解、②血球や血漿蛋白との相互作用、③糸球体濾過による尿中排泄、④肝などによる取り込み、などに曝される。Cance ら (1986)⁵¹⁾は、ヒト副甲状腺に対する2種類のサブクラス (IgG₁, IgM) のモノクローナル抗体を用いて、*in vivo* における抗体の集積性を調べた結果、IgM は IgG₁ に比較して、腫瘍への集積性が低かったと報告している。つまり IgM は毛細血管の内皮細胞を通過し難いために腫瘍への到達性が低くなったと説明している。また Hashimoto ら (1983)⁵²⁾は、IgM であるモノクローナル抗体からそのサブユニット (IgMs) を調整し、腫瘍への集積性を高めたり、制癌剤封入抗体修飾リソソムを作製し細胞障害効果を検討しその効果を報告している。一方抗体量が腫瘍への集積性へ与える影響をみると、NTS4C3 が過剰になるとその集積性が低下しており、目標とする抗原の飽和が考えられる⁵¹⁾。このこ

とは、大量の未標識 NTS4C3 と、 ^{125}I 標識 NTS4C3 が、腫瘍への集積に対して競合し、 ^{125}I 標識 NTS4C3 の腫瘍への集積が相対的に低下したためと考えられる。つまり NTS4C3 の腫瘍への特異性が示唆された。

以上より IgM のモノクローナル抗体は、その高分子であることや非特異的吸着性の強いことより、*in vivo* で目的とする腫瘍以外の臓器に停滞しやすい傾向があるが、NTS4C3 のように特異性が強ければ、十分腫瘍へ集積すると考えられた。

Ⅲ. NTS4C3 を用いた唾液腺腫瘍ターゲティング療法の可能性

モノクローナル抗体が癌細胞の抗原に集積する性質を利用して、モノクローナル抗体と抗癌剤を結合させ、モノクローナル抗体を癌細胞への担体として機能させるというターゲティング療法がある。現在も多くの研究がなされ、改良を繰り返して臨床にも応用されてきている⁵³⁻⁵⁸。ターゲティング療法は、本来抗癌剤の副作用軽減を目的としているが、本研究では、NTS4C3 の腫瘍集積性と抗癌剤 DNR の抗腫瘍効果の相乗効果を検討してみた。DNR は、臨床的に固形腫瘍に対しても抗腫瘍効果を示し、また抗体との結合が可能であり、投与後薬剤が生体内で長時間分解を受けず安定で、しかも組織内濃度の測定方法が確立されているなどから本剤を選択使用した⁵⁹⁻⁶²。その結果、KSAc3 細胞を標的細胞とした *in vitro* では、DNR-NTS 結合体は、DNR 単独に比較し細胞障害効果、細胞抑制効果ともに高かった。また、TS-2 を用いた *in vivo* でも DNR-NTS 結合体は DNR 単独に比較して高い腫瘍増殖抑制効果が得られ、NTS4C3 を用いたターゲティング療法の有用性が示唆された。

in vitro で、KSAc3 細胞への DNR の取り込みをみた実験結果では、DNR-NTS 結合体は同量の DNR に比較し、高い DNR 量を示した。また、 4°C の状態で KSAc3 細胞の活性を低下させた状態での細胞内 DNR は、DNR 単独ではほとんど検出されなくなっているのに対し、DNR-NTS 結合体では低下するがある程度認められた。このことは、DNR 単独では細胞内への取り込みは、非特異的な能動あるいは受動輸送に過ぎないが、DNR-NTS 結合体ではさらに特異的な抗原抗体反応が加わり細胞膜へ結合しているためと考えられる。そこで、細胞膜に結合した DNR-NTS 結合体がどのような機序で抗腫瘍効果を発揮するかについては、1) DNR-NTS 結合体があるままの形で腫瘍細胞内へ取り込まれ、細胞内で DNR が遊離し核にはいる説⁶³と、2) 細胞膜に結合している DNR-NTS 結合体から、徐々に DNR が遊離し細胞内へ入ってその活性を発現

するという説^{14,64}が考えられる。NTS4C3 は、IgM という巨大分子であることを考慮すると、DNR-NTS 結合体が細胞膜に結合しその後、持続的に DNR を供給して効腫瘍効果を発現したと考える後者の説が妥当と思われる。

in vivo での DNR-NTS 結合体の動態は、NTS4C3 の動態とはほぼ一致すると思われる。つまり NTS4C3 は腫瘍への指向性を示す担体として働き、その結果 DNR-NTS 結合体は DNR 単独投与より抗腫瘍効果が認められたと考える。本研究では、DNR-NTS 結合体の投与法は静脈内ではなく腹腔内投与で行っている。一般に薬剤の静脈内投与と腹腔内投与では、血清への移行に大きな差はないとされており⁶⁵、本研究でも同様な結果を得た。一方腹腔内投与では、薬剤が肝で何らかの変化を受けその活性が低下することが指摘されている⁶⁶。しかし結合体の場合、薬剤がデキストランなどの高分子と結合することにより、薬剤が生体内での代謝を受けにくくなると言われている⁶⁴。また、DNR-NTS 結合体は、腫瘍へ到達する前に血液中に長時間留まることが推測される。一般に、癌病巣では毛細血管の新生が著明で、さらに毛細血管の透過性が正常臓器よりも高く、高分子の物質でも血管外へ溢しやすいたことが知られている¹⁴。この現象を利用して、腫瘍細胞に特別な親和性を持たない一般高分子をキャリアーとして用い、抗癌剤との結合体を作製した報告も見られる^{14,64,67}。DNR-NTS 結合体も、血液中に長期間停滞している間に、腫瘍内の毛細血管から DNR または結合体が透過し、腫瘍細胞へ到達し抗腫瘍効果を発揮した可能性も考えられる。このように DNR-NTS 結合体は、DNR 単独投与より抗腫瘍効果という点で優れ、NTS4C3 はターゲティング療法の担体として有用である。

いっぽう高分子である結合体は、肝などの臓器へも蓄積しやすいことから副作用として働く危険性が高い。本田ら (1985)⁶⁸ は、高分子化制癌剤誘導体マイトマイシン C-デキストラン結合体の局所応用に関する研究を行い、静脈内投与では肝への移行が高かった結合体も、腫瘍内局所投与では良好な局所停留性とリンパ移行性を示し、化学療法に抵抗性の固形腫瘍の治療に有用であった報告している。このような考えから DNR-NTS 結合体の腫瘍内投与法は、これら副作用を軽減させる方法として今後有用となる可能性がある。

総 括

I. モノクローナル抗体の作製

ヌードマウス可移植性ヒト唾液腺癌株 (TS-1) を免

疫原として細胞融合法により、モノクローナル抗体 NTS4C3 を作製した。免疫組織化学的ならびに生化学的検索により、認識抗原の解析を行い以下の結果を得た。

1. NTS4C3 のサブクラスは、IgM であった。
2. NTS4C3 を用いた免疫組織化学的検索により以下の結果を得た。
 - 1) 唾液腺腫瘍に対する検索の結果、多形性腺腫に対する陽性率は93%、粘表皮腫は50%、腺様嚢胞癌は85%、腺癌は75%そして未分化癌は40%であった。
 - 2) その他の腫瘍として、頭頸部扁平上皮癌をはじめ胃、腸腺癌とは反応しなかった。
 - 3) 正常唾液腺に対しては、88%の陽性率であった。
 - 4) その他正常組織とは反応しなかった。
 - 5) 培養細胞では、腺様嚢胞癌由来培養細胞株 KSAc3 細胞とのみ反応し、KSAc4 細胞、KGK 細胞、HSG 細胞および A-431 細胞とは反応しなかった。
 - 6) ノードマウス可移植性ヒト唾液腺癌株 TS-1、TS-2 と反応した。

以上より、NTS4C3 は、正常唾液腺および唾液腺腫瘍に特異的に反応し、その認識する抗原は、唾液腺腫瘍の腺上皮系の形質を保持した腫瘍細胞に存在する可能性が示唆された。

3. NTS4C3 の認識する抗原は、過ヨウ素酸およびノイラミニダーゼ処理により変化しないが、プロナーゼにより抗原性が消失したことより、同抗原に蛋白が関与している可能性が推測された。

4. NTS4C3 の認識する抗原は、ウエスタンブロッティングにより、分子量約60,000の抗原が関与している可能性が示唆された。

II. モノクローナル抗体 (NTS4C3) を用いたターゲティング療法

NTS4C3 を用いての唾液腺腫瘍に対するターゲティング療法の可能性について *in vitro*, *in vivo* で検討した。

1. *in vitro* の結果 (標的細胞として KSAc3 細胞を用いた)
 - 1) 蛍光抗体法による検索の結果、NTS4C3 は KSAc3 細胞の細胞膜と結合することが判明した。
 - 2) NTS4C3 は CDC 活性および ADCC 活性を示さなかった。
 - 3) DNR-NTS 結合体は、DNR 単独より標的細胞に多く取り込まれる事が判明した。

4) DNR-NTS 結合体は、DNR 単独より標的細胞に対し高い抗腫瘍効果を示した。

2. *in vivo* の結果

- 1) NTS4C3 は、TS-1、TS-2 腫瘍への高い集積性を示した。
- 2) DNR-NTS 結合体は、DNR 単独より TS-2 腫瘍に対して高い抗腫瘍効果を示した。

以上より、NTS4C3 を用いたターゲティング療法は、唾液腺腫瘍に対する治療に有用となる可能性が示唆された。

謝 辞

本研究に際し、御懇篤なる御指導と御校閲を賜った広島大学名誉教授下里常弘教授に深厚なる謝意を表します。同時に御懇切なる御助言御校閲を賜った本学口腔外科学第一講座高田和彰教授ならびに本学歯科薬理学講座土肥敏博教授に衷心より謝意を表します。本研究を進めるに際し終始御指導頂いた本学口腔外科学第二講座村上和億博士に感謝の意を表します。最後に御協力戴いた本学口腔外科学第二講座石川武憲教授をはじめ、医局員に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Köhler, G. and Milstein, C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495-497, 1975.
- 2) Köhler, G. and Milstein, C.: Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. *Eur. J. Immunol.* 6, 511-519, 1976.
- 3) Yoshida, H., Kaji, R., Hayashi, Y., Yanagawa, T., Yura, Y., Urata, M., Azuma, M. and Sato, M.: Generation and characterization of a monoclonal antibody against a neoplastic human salivary intercalated duct cell. *The Cancer J.* 1, 269-276, 1987.
- 4) 長畑 光: ヒト唾液腺癌由来ノードマウス可移植性腫瘍の確立とその放射線感受性に関する細胞動態学的研究. *日口外誌* 31, 1699-1714, 1985.
- 5) 江崎正人: ノードマウス可移植性ヒト唾液腺癌株の生物学的特性と抗癌剤投与時の細胞動態に関する研究. *広歯誌* 20, 40-54, 1988.
- 6) 池本公亮: ヒト口腔扁平上皮癌細胞株 (KGK) の樹立とその性状. *日口外誌* 39, 367-378, 1993.
- 7) 池本公亮, 村上和億, 大岡俊夫, 西野 宏, 田淵順治, 小原 勝, 安井 淳, 石川武憲, 下里常弘: ヒト腺様嚢胞癌細胞株 (KSA) の樹立とその性状. *口外誌* 35, 3157-3158, 1989.
- 8) Sirasuna, K., Sato, M. and Miyazaki, T.: A neoplastic epithelial duct cell line established from an

- irradiated human salivary gland. *Cancer* 48, 745-752, 1981.
- 9) Fabricant, R.N., DeLarco, J.E. and Todaro, G.J.: Nerve growth factor receptors on human melanoma cells in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 565-569, 1977.
 - 10) Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 277, 680-685, 1970.
 - 11) Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350-4354, 1979.
 - 12) 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, 1175-1181, 1975.
 - 13) Levy, R., Hurwitz, E., Maron, R., Arnon, R. and Sela, M.: The specific cytotoxic effects of daunomycin conjugated to antitumor antibodies. *Cancer Res.* 35, 1182-1186, 1975.
 - 14) Bernstein, A., Hurwitz, E., Maron, R., Arnon, R., Sela, M. and Wilchek, M.: Higher antitumor efficacy of daunomycin when linked to dextran: in vivo and in vitro studies. *J. Natl. Cancer Inst.* 60, 379-385, 1978.
 - 15) Tsukada, Y., Bischof, W., Hibi, N., Hirai, H., Hurwitz, E. and Sela, M.: Effect of a conjugate of daunomycin and antibodies to rat α -fetoprotein on the growth of α -fetoprotein-producing tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 621-625, 1982.
 - 16) Bachur, N.R., Moore, A.L., Bernstein, J.G. and Liu, A.: Tissue distribution and disposition of daunomycin (NSC-82151) in mice: fluorometric and isotopic methods. *Cancer Chemother. Rep.* 54, 89-94, 1970.
 - 17) Eversole, L.R.: Histogenic classification of salivary tumors. *Arch. Pathol.* 92, 433-443, 1971.
 - 18) Hübner, G., Kleinasser, O., Klein, H.J. and Schiefer, H.G.: Role of myoepithelial cells in the development of salivary gland tumors. *Cancer* 27, 1255-1261, 1971.
 - 19) Regezi, J.A. and Batsakis, J.G.: Histogenesis of salivary gland neoplasms. *Otolaryngol Clin. North Am.* 10, 297-307, 1977.
 - 20) Batsakis, J.G.: Salivary gland neoplasia: an outcome of modified morphogenesis and cytodifferentiation. *Oral Surg.* 49, 229-232, 1980.
 - 21) Dardic, I., Nostrand, A.W.P. and Phillip, M.J.: Histogenesis of salivary gland pleomorphic adenoma: (mix tumor) with an evaluation of the role of myoepithelial cell. *Human Pathology* 13, 62-75, 1982.
 - 22) Chandhry, A.P., Leifer, C., Cutler, L.S., Satchidanand, S., Labay, G.R. and Yamane, G.M.: Histogenesis of adenoid cystic carcinoma of the salivary gland; light and electronmicroscopic study. *Cancer* 58, 72-82, 1986.
 - 23) 高田 隆, 小川郁子, 二階宏昌, 小倉睦美, 伊集院直邦, 伊藤博司: 唾液腺腫瘍の免疫組織化学的研究. I. 正常ヒト唾液腺における各種分泌上皮性マーカーの局在について. 歯基礎誌 26, 1190-1199, 1984.
 - 24) 小川郁子, 高田 隆, 二階宏昌, 小倉睦美, 伊集院直邦, 伊藤博司: 唾液腺腫瘍の免疫組織化学的研究. II. 各種良性腫瘍における分泌上皮性マーカーの局在について. 歯基礎誌 26, 1200-1209, 1984.
 - 25) 高田 隆, 小川郁子, 二階宏昌, 小倉睦美, 伊集院直邦, 伊藤博司: 唾液腺腫瘍の免疫組織化学的研究. III. 各種悪性腫瘍における分泌上皮性マーカーの局在について. 歯基礎誌 27, 611-620, 1985.
 - 26) 浜川裕之, 土井 正, 兵頭いずみ, 森 恵造, 谷岡博昭: ヒト唾液腺腫瘍の免疫組織化学的研究. 日口外誌 32, 1109-1120, 1986.
 - 27) Chen, J.C., Gnepp, D.R. and Bedrossian, C. W.M.: Adenoid cystic carcinoma of the salivary glands: an immunohistochemical analysis. *Oral Surg.* 65, 316-326, 1988.
 - 28) 山原幹正: ヒト胎児顎下腺および唾液腺多形性腺腫の形質発現に関する免疫組織化学的検討. 広歯誌 20, 55-69, 1988.
 - 29) Mori, M., Kasai, T., Yuba, R., Chomette, G., Auriol, M. and Vaillant, J.M.: Immunohistochemical studies of S-100 protein α and β subunits in adenoid cystic carcinoma of the salivary glands. *Virchows Arch [Cell Pathol]* 59, 115-123, 1990.
 - 30) Ninomiya, T., Naito, R., Okada, Y., Kobayashi, K., Mori, M. and Tsukitani, K.: Immunohistochemical localization of the α and β subunits of S-100 protein in pleomorphic adenoma of the salivary glands. *Virchows Arch [Cell Pathol]* 57, 63-75, 1989.
 - 31) 徳本憲道: 唾液腺粘表皮腫構成細胞の細胞分化に関する免疫組織化学的研究. 広歯誌 22, 137-156, 1990.
 - 32) 風岡宣暁: 唾液腺腺癌の免疫組織化学的研究—特に組織発生について—. 日口外誌 37, 1440-1453, 1991.
 - 33) Patey, D.H., Thackray, A.C. and Keeling, D.H.: Malignant disease of the parotid. *Brit. J. Cancer* 19, 712-737, 1965.
 - 34) Martin, F. and Devant, J.: Carcinoembryonic antigen in normal human saliva. *J. Nat. Cancer Inst.* 50, 1375-1379, 1973.
 - 35) Itoiz, M.E. and Lanfranchi, H.E.: Immunocytochemical detection of cartinoembryonic antigen in

- salivary gland tumors. *Int. J. Oral Surg.* 12, 340-342, 1980.
- 36) Reitamo, S. and Kontfinen, Y.T.: Distribution of lactoferrin in human salivary gland. *Histochemistry* 66, 285-291, 1980.
- 37) Slöane, J.P. and Ormerod, M.G.: Distribution of epithelia membrane antigen in normal and neoplastic tissues and its value in diagnostic tumor pathology. *Cancer* 47, 1786-1795, 1981.
- 38) Wirman, J.A. and Battifora, H.A.: Small cell undifferentiated carcinoma of salivary gland origin. *An ultrastructural study.* *Cancer* 37, 1840-1848, 1976.
- 39) Hoshino, M. and Yamamoto, I.: Ultrastructure of adenoid cystic carcinoma. *Cancer* 25, 186-198, 1970.
- 40) 二階宏昌, 小川郁子, 高田 隆, 伊集院直邦: 唾液腺腫瘍の免疫組織化学—腫瘍性筋上皮の染色所見を中心に—. *病理と臨床* 7, 574-581, 1989.
- 41) Ehrlich, P.: *Collected studies on immunology*, Vol. II. New York, John Wiley, 442, 1906.
- 42) Nadler, L.M., Stashenko, P., Hardy, R., Kaplan, W.D., Button, L.N., Kufe, D.W., Antman, H. and Schlossman, S.F.: Serotherapy of a patient with a monoclonal antibody directed against a human lymphoma-associated antigen. *Cancer Res.* 40, 3147-3154, 1980.
- 43) Ritz, J., Pesando, J.M., Sallan, S.E., Clavell, L.A., Notis-McConarty, J., Rosenthal, P. and Schlossman, S.F.: Serotherapy of acute lymphoblastic leukemia with monoclonal antibody. *Blood* 58, 141-152, 1981.
- 44) Shawler, D.S., Miceli, M.C., Wormsley, S.B., Royston, I. and Dillman, R.O.: Induction of in vitro and in vivo antigenic modulation by the anti-human T cell monoclonal antibody T 101. *Cancer Res.* 44, 5921-5927, 1984.
- 45) Oldham, R.K., Thurman, G.B., Talmadge, J.E., Stevenson, H.C. and Foon, K.A.: Lymphokines, monoclonal antibodies, and other biological response modifiers in the treatment of cancer. *Cancer* 54, 2795-2806, 1984.
- 46) Goodman, G.E., Beanmer, P., Hellstrom, I., Fernyhough, B. and Hellström, K.E.: Pilot trial of murine monoclonal antibodies in patients with advanced melanoma. *J. Clin. Oncol.* 3, 340-352, 1985.
- 47) Sears, H.F., Herlyn, D., Steplewski, Z. and Koprowski, H.: Phase II clinical trial of a murine monoclonal antibody cytotoxic for gastrointestinal adenocarcinoma. *Cancer Res.* 45, 5910-5913, 1985.
- 48) Houghton, A.N., Mintzer, D., Cordon, C., Welt, S., Fliegel, B., Vadhan, S., Carswell, E., Melamed, M.R., Oettgen, H.F. and Old, L.J.: Mouse monoclonal IgG3 antibody detecting G_{D3} ganglioside: a phase I trial in patients with malignant melanoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 1242-1246, 1985.
- 49) Kipps, T.J., Parham, P., Punt, J. and Herzeberg, L.A.: Importance of immunoglobulin isotype in human antibody-dependent, cell-mediated cytotoxicity directed by murine monoclonal antibodies. *J. Exptl. Med.* 161, 1-17, 1985.
- 50) Steplewski, Z., Herlyn, D., Lubeck, M., Kimoto, Y., Herlyn, M. and Koprowski, H.: Mechanisms of tumor growth inhibition. *Hybridoma* 5, 559-564, 1986.
- 51) Cance, W.G., Wells, S.A. Jr., Dilley, W.G., Welch, M.J., Otsuka, F.L. and Davie, J.M.: Human parathyroid antigen: Characterization and localization with monoclonal antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 6112-6116, 1986.
- 52) Hashimoto, Y., Sugawara, M. and Endoh, H.: Coating of liposomes with subunits of monoclonal IgM antibody and targeting of the liposomes. *Journal of Immunological* 62, 155-162, 1983.
- 53) Ritz, J., Sallan S.E., Bast, Jr, R.C., Lipton, J.M., Clavell, L.A., Feeney, M., Hercend, T., Nathan, D.G. and Schollossman, S.F.: Autologous bone-marrow transplantation in CALLA-positive acute lymphoblastic leukemia after in vitro treatment with J5 monoclonal antibody and complement. *Lancet* 2, 60-63, 1982.
- 54) Connor, J., Sullivan, S. and Huang, L.: Monoclonal antibody and liposomes. *Pharmacol. Ther.* 28, 341-365, 1985.
- 55) Garnett, M.C. and Baldwin, R.W.: An improved synthesis of a methotrexate-albumin-791T/36 monoclonal antibody conjugate cytotoxic to human osteogenic sarcoma cell lines. *Cancer Res.* 46, 2407-2412, 1986.
- 56) 広田正毅, 福島喜代康, 平谷一人, 河野謙治, 岡 三喜男, 朝長昭光, 齊藤 厚, 原 耕平, 佐藤智典, 砂本順三: アドリアマイシン封入モノクローナル抗体結合リポソームを用いた担癌ヌードマウスにおけるターゲッティング療法の治療成績. *癌と化学療法* 13, 2875-2878, 1986.
- 57) 谷内 昭, 今井浩三, 平田博己, 菱川法之: モノクローナル抗体・抗癌剤結合体によるターゲッティング療法. *日本臨床* 47, 1391-1395, 1989.
- 58) 山口俊晴, 高橋俊雄: モノクローナル抗体の臨床応用. 抗ヒト大腸癌モノクローナル抗体A7—ネオカルチノスタチン複合体の臨床応用. *Medico* 21, 9078-9081, 1990.
- 59) Heidelberger, C., Chaudhuri, N.K., Danneberg, P., Mooren, D. and Griesbach, L.: Fluororinated Pyrimidines, a new class of tumorinhibitory compounds. *Nature* 179, 663-666, 1957.

- 60) Pratt, W.B. and Ruddon, R.W.: The anticancer drugs. Oxford university press, Oxford 155-174, 1977.
- 61) Tan, C., Takasaka, H., Yu, K., Murphy, M.L. and Kranofsky, D.A.: Daunomycin, an antitumor antibiotic, in the treatment of neoplastic disease. Clinical evaluation with special reference to childhood leukemia. *Cancer* 20, 333-353, 1967.
- 62) 清見原正騎：ダウノマイシン-抗マウスアミラーゼ抗体結合体の顎下腺への取り込みに関する研究. 広歯誌 22, 14-28, 1990.
- 63) Hurwitz, E., Maron, R., Arnon, R., Wilchek, M. and Sela, M.: Daunomycin-immunoglobulin conjugates, uptake and activity in vitro. *Europ. J. Cancer* 14, 1213-1220, 1978.
- 64) Hashida, M., Takakura, Y., Matsumoto, S., Sasaki, H., Kato A., Koima, T., Muranishi, S. and Sezaki, H.: Regeneration characteristics of mitomycin C-dextran conjugate in relation to its activity. *Chem. Pharm. Bull.* 31, 2055-2063, 1983.
- 65) 小泉 満, 遠藤啓吾：画像診断；単クローン抗体実験マニュアル（富山朔二, 安東民衛編）講談社, 東京, 208-232, 1987.
- 66) 平林光司：〈特集〉がんの局所化学療法, 腹腔内投与. 癌と化学療法 16, 180-186, 1989.
- 67) Hashida, M., Kato, A., Kojima, T., Muranishi, S., Sezaki, H., Tanigawa, N., Satomura, K. and Hikasa, Y.: Antitumor activity of mitomycin C-dextran conjugate against various murine tumors. *Gann* 72, 226-234, 1981.
- 68) 本田和男, 里村紀作, 橋田 充, 瀬崎 仁：高分子化制癌剤誘導体マイトマイシンC-アキストラン結合体 (MMC-D) の局所応用に関する基礎的, 臨床的検討. 癌と化学療法 12 PART 1, 530-535, 1985.