

## 《原 著》

# <sup>131</sup>I 標識モノクローナル抗 CEA 抗体の 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetate による CEA 産生培養腫瘍細胞への集積増強について

綾 部 善 治\*

**要旨** 放射性核種によって標識された抗体を利用した腫瘍の診断と治療の原理は、標識抗体と腫瘍の持つ抗原が特異的に結合することにあるが、抗体と結合する腫瘍細胞の抗原性を増強することにより、抗体の腫瘍親和性が增大することが考えられる。本研究では、CEA 産生性の QG56 細胞を 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) により前処理すると、マウス由来の放射標識モノクローナル抗 CEA 抗体の培養腫瘍細胞集積が増強することを示した。TPA による抗体集積増強効果は処理時間により変化し、24 時間で最高に達し、その後次第に低下した。また、その効果は TPA 濃度によっても変化し、2~50 ng/ml 付近で最高に達し、濃度がこれよりも高くても低くても増強効果は見られなかった。以上から、腫瘍細胞の薬剤処理も <sup>131</sup>I 標識抗体の腫瘍細胞への集積を充める上で有用であり、ひいては悪性腫瘍の画像診断能を向上させる可能性のあることを示した。

## I. はじめに

放射性核種によって標識された抗体を利用した腫瘍の診断と治療の原理は、標識抗体と腫瘍の持つ抗原(腫瘍関連抗原と腫瘍特異抗原)が特異的に結合することにある<sup>1,2)</sup>。今までその臨床利用のための研究においては、腫瘍関連抗原や腫瘍特異抗原と親和性の高い抗体の開発が主に進められてきた。しかしながら、抗体の親和性は、一部の腫瘍と抗体に関する以外は十分ではなく、診断面における利用においては、<sup>99m</sup>Tc-ヒト血清アルブミン(HSA)による subtraction 法, Emission Computed Tomography (ECT) の利用, モノクローナル抗体やその一部 (F(ab')<sub>2</sub>, F<sub>ab</sub>) を用いる法<sup>1,3)</sup>, あるいは、第2抗体を用いたり<sup>4,5)</sup> 標識抗体を投与

前に宿主白血球と培養<sup>6)</sup>して血中の標識抗体を減少させる法や、従来より標識に使用していた <sup>131</sup>I より優れた物理的性質を持った放射性同位元素による標識<sup>1)</sup>などの工夫などが報告されている。

一方、腫瘍の抗原側の要因、すなわち抗体と結合する腫瘍細胞の抗原性を、その出現も含めて増強することによっても、抗体の腫瘍親和性が增大することが考えられる。しかし、この観点からの研究はいまだ少ない<sup>7~14)</sup>。したがって、本研究では特に後者と関連して、腫瘍抗原の薬剤による抗原増強が抗体結合能を高め、ひいては悪性腫瘍の画像診断能を向上させるか否かを検討することを目的とした。

薬剤としては、種々の細胞の抗原性を増強することが明らかにされている 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)<sup>12,13)</sup> を用いた。TPA は発癌のプロモーターであり、直ちに臨床利用することはできないが、細胞の抗原を増強するとされる酵素<sup>7,8)</sup>や interferon<sup>9)</sup> に比べ、分子量が小さく安定性が高く、基礎的研究には適当と考えられ、本研究において使用した。

\* 九州大学医学部放射線科学教室  
(主任: 松浦啓一教授)

受付: 61 年 4 月 1 日

最終稿受付: 61 年 6 月 16 日

別刷請求先: 福岡市東区馬出 3-1-1 (☎ 812)

九州大学医学部放射線科学教室

綾 部 善 治

0.25 M Phosphate buffer (pH 7.5)	10 $\mu$ l
$^{131}\text{I}$ -Aq. solution	3 $\mu$ l
Antibody (1 mg/ml <sup>(1)</sup> )	10 $\mu$ l
Chloramine-T (2.5 mg/ml <sup>(1)</sup> )	20 $\mu$ l
↓ Stirring 2 min. at room temperature	
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub> solution (1.2 mg/ml <sup>(1)</sup> )	100 $\mu$ l
↓	
KI (2 mg/ml <sup>(2)</sup> )	1 ml
↓	
Sephadex G-50 column	
↓	
Eluate	
1) 0.25 M Phosphate buffer (pH 7.5)	
2) 0.05 M Phosphate buffer (pH 7.5)	

Fig. 1 Labeling procedure of the antibody with  $^{131}\text{I}$  by chloramine-T method.

## II. 実験材料

### 1. 実験腫瘍細胞

CEA 産生性の QG56 細胞 (ヒト肺癌扁平上皮癌由来) を用いた。細胞の培養は、細胞  $1 \times 10^4$  個/ml を含む浮遊液、10% FCS (Gibson 製) 加 Eagle 培地 MEM (日水)、の 2 ml ずつを、直径 3.5 cm のプラスチックシャーレ (Falcon 製 Tissue Culture Dish No. 3001) に分注し、CO<sub>2</sub> インキュベーター (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) 内で行った。コントロールとしては、CEA 非産生性の HeLa 細胞を用い、培養には 10% FCS 加 F10 培地 (Gibson 製) を使用した。

### 2. 抗 CEA 抗体

ヒト大腸癌肝転移巣より精製した CEA を免疫源として得られたマウス抗 CEA モノクローナル抗体 28A<sup>(15)</sup> (以下抗体と略す) (北海道大学医学部第一生化学教室西信三教授提供) を用いた。

## III. 実験方法

### 1. 腫瘍細胞の CEA 産生の確認と腫瘍細胞増殖に及ぼす TPA の影響

培養液中の CEA 濃度は市販の CEA 測定用キット (ダイナボット<sup>(株)</sup>製 CEA・リアキット<sup>TM</sup>) を用いて測定した。TPA の細胞増殖に及ぼす影響を調べるため、増殖期にある細胞に 10 ng/ml の

TPA (Sigma 製) を加えて培養し、細胞数を TPA 未処理の control 群と比較した。細胞は、培養終了後 CMF 液 2 ml で 2 回洗浄し、2 ml のトリプシン液で処理してシャーレより剥離し、その 1 ml で細胞数を測定 (Coulter Electronics 製 Coulter Counter<sup>R</sup>) した。実験は duplicate で行った。

### 2. ヨード標識抗体

#### 1) 抗体のヨード標識

クロラミン T 法に準じて (Fig. 1) Na<sup>131</sup>I (第一ラジオアイソトープ研究所<sup>(株)</sup>提供) を用いて標識を行った。

#### 2) 抗体のヨード標識の検討

ヨード標識の過程で得られた溶出液を、薄層クロマトグラフィー (シリカゲル) にて展開 (90% メタノール) した後スキャンニング (Aloka 製 Thin-Layer Chromatogram Scanner) を行い、放射性ヨードの分布を調べた。

#### 3) 標識抗体の抗体活性の検討

ヨード標識の過程で得られた溶出液を用いて、ビーズ固相抗体法を利用した radioimmunoassay (RIA) 法により、CEA に対する標識抗体の抗体活性を調べた。各 CEA 濃度ごとの放射活性 (B) から 0 ng/ml における放射活性 (B<sub>0</sub>) を差し引いた net cpm を、総放射活性 (T) で除して検量曲線を作成して検討した。CEA 標準液と CEA 抗体ビーズは市販キット (ダイナボット<sup>(株)</sup>製 CEA・リアキット<sup>TM</sup>) のものを用い、duplicate にて測定した。操作法は市販キット添付の方法に準じた。実験は 2 回行った。

#### 4) 標識抗体の抗体活性の経時的安定性の確認

標識抗体の抗体活性の確認と同様に RIA 法を用いて、37°C における抗体活性の安定性を 0 ~ 5 日間にわたって調べた。ヨード標識の過程で得られた溶出液を 0.22  $\mu$ m のミリポアフィルター (Millex-GS) を用いて除菌した後、滅菌したペニシリンバイアル内に保存し、各日時に RIA 測定系を構成し、(B-B<sub>0</sub>)/T の日差変動を変動係数 (coefficient variance) を求めて調べた。実験は duplicate の測定で 2 回行った。

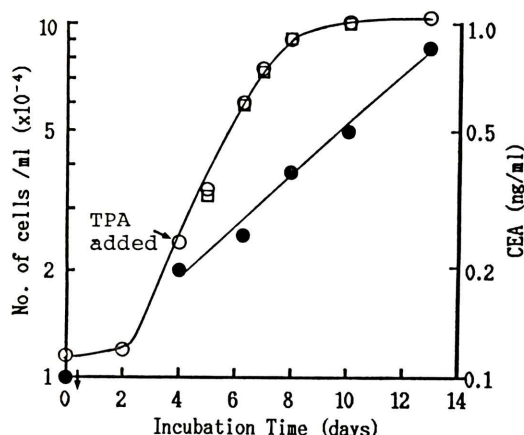


Fig. 2 Growth curves of QG56 cells ( $\square$ ,  $\circ$ ) and CEA concentrations ( $\bullet$ ). Cells were incubated for a given period indicated in modified Eagle's medium (MEM) containing 10% heat-inactivated fetal calf serum with ( $\square$ ) or without ( $\circ$ ) 10 ng/ml of TPA. Each data point was obtained from duplicate samples.

### 3. 標識抗体の腫瘍への集積の検討

#### 1) 遊離ヨウ素 ( $^{131}\text{I}^-$ ) の腫瘍細胞への残存の確認

増殖期にある腫瘍細胞を培養液で2回洗浄し、 $0.2 \mu\text{Ci}$  の  $^{131}\text{I}^-$  を含む 10% FCS 加培地 2 ml を加え、0~24時間培養した。培養終了後 CMF 液で2回洗い、2 ml のトリプシン液で処理して細胞をシャーレより剥離し、その 1 ml で放射能 (CPM) を、残りの中の 0.5 ml で細胞数を測定し、腫瘍細胞への  $^{131}\text{I}^-$  の残存を調べた。実験は triplicate で2回行った。

#### 2) 培養時間との関係

増殖期にある腫瘍細胞を培養液で2回洗浄した後、標識抗体  $0.2 \mu\text{Ci}$  を含む 10% FCS 加培地 2 ml を加え、0~72時間培養した。培養終了後、トリプシン処理して細胞をシャーレより剥離した。そして、CPM と細胞数を測定し、腫瘍細胞への標識抗体の集積を調べた。実験は triplicate で少なくとも3回(最高6回)行った。

#### 3) 標識抗体の投与量との関係

増殖期にある腫瘍細胞を培養液で2回洗浄した

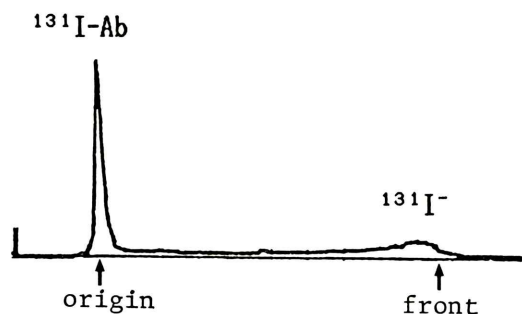


Fig. 3 Thin-layer radiochromatogram. The peak fraction from Sephadex G-50 chromatography of eluate (Fig. 1) was used as the source.

後、標識抗体  $0.0002 \sim 1 \mu\text{Ci}$  を含む 10% FCS 加培地 2 ml を加え、24時間培養した。培養終了後、トリプシン処理して細胞をシャーレより剥離した。そして、CPM と細胞数を測定し、腫瘍細胞への標識抗体の集積を調べた。実験は triplicate で1回行った。

#### 4) HeLa 細胞への標識抗体の集積

増殖期にある HeLa 細胞を培養液で2回洗浄した後、標識抗体  $0.2 \mu\text{Ci}$  を含む 10% FCS 加培地 2 ml を加え、0~24時間培養した。培養終了後、トリプシン処理して細胞をシャーレより剥離した。そして、CPM と細胞数を測定し、HeLa 細胞への標識抗体の集積を調べた。実験は triplicate で2回行った。

#### 4. TPA による標識抗体の腫瘍集積に及ぼす影響

##### 1) 腫瘍と TPA との培養時間との関係

増殖期にある腫瘍細胞に、20 ng/20  $\mu\text{l}$  の TPA を加え、0~72時間培養した後、腫瘍細胞を培養液で2回洗浄した。その後、 $0.2 \mu\text{Ci}$  の標識抗体を含む 10% FCS 加培地 2 ml を加え、24時間培養した。培養後、細胞をトリプシン処理して細胞をシャーレより剥離した。そして、CPM と細胞数を測定し、TPA による処理時間が標識抗体の腫瘍細胞への集積に及ぼす影響を検討した。実験は triplicate で少なくとも2回(最高4回)行った。



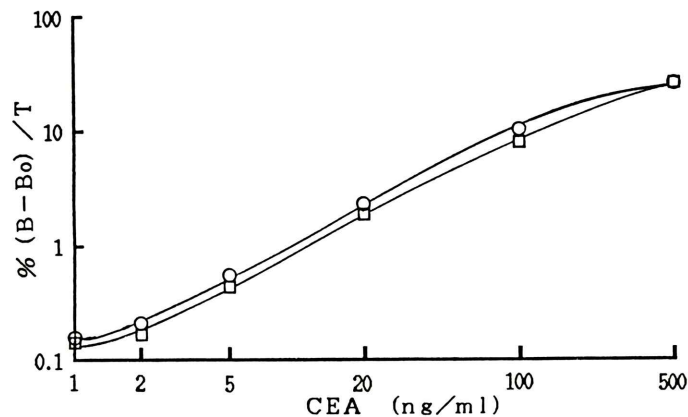


Fig. 4 Calibration curve. The calibration curves were made after the nonspecific counts (B<sub>0</sub>) were subtracted. Points are means of duplicate determinations.

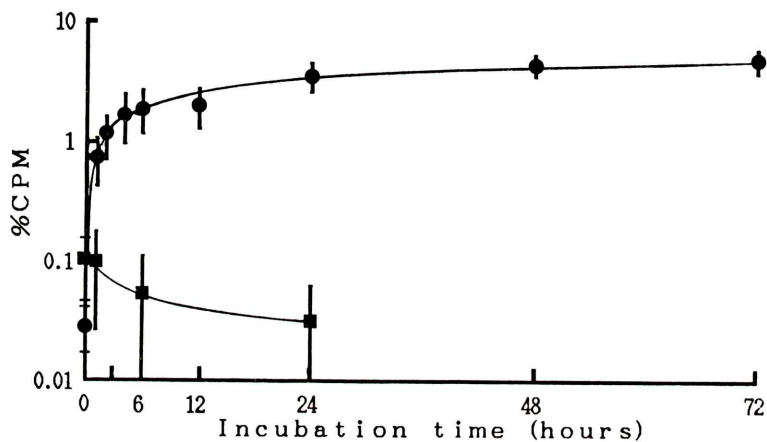


Fig. 5 Time course of the radioactivity of QG56 cells incubated with the medium containing  $^{125}\text{I}^-$  (■) or  $^{125}\text{I}$ -labeled monoclonal anti-CEA antibody (Ab) (●). The results are the mean  $\pm$  SD of 2 (■) or 3 (●) different experiments.

## 2) TPA 濃度との関係

増殖期にある腫瘍細胞に、0.2~100 ng/20  $\mu\text{l}$  の TPA を加え、24時間培養した後、腫瘍細胞を培養液で2回洗浄し、標識抗体を加えて24時間培養した。その後、細胞をトリプシン処理して CPM と細胞数を測定し、TPA 濃度が標識抗体の腫瘍細胞への集積に及ぼす影響について検討した。実験は triplicate で少なくとも3回(最高6回)行った。

## IV. 実験結果

### 1. 腫瘍細胞の CEA 産生の確認と腫瘍細胞増殖に及ぼす TPA の影響

培養液中の CEA 濃度は、培養開始時では検出限界 (0.01 ng/ml) 以下であったが経時的な増加が見られ、腫瘍細胞による CEA 産生が確認された。また、control 群と TPA で処理した群との細胞数に差は見られず、増殖曲線に差はなかった (Fig. 2)。

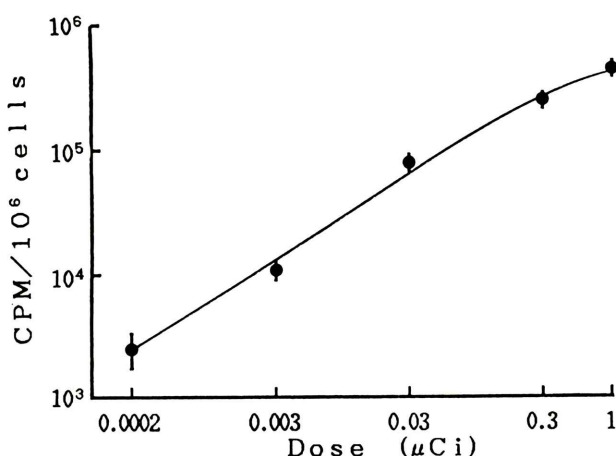


Fig. 6 Effect of  $^{131}\text{I}$ -labeled Ab dose on radioactivity of QG56 cells. The results are the means of triplicate determinations.

Table 1 Stability of  $^{131}\text{I}$ -labeled antibody

CEA (ng/ml)	(B-B <sub>0</sub> )/T (%)		
	Mean	S.D.	C.V. (%)
1	0.14	0.04	29.1
2	0.21	0.04	16.6
5	0.60	0.04	6.4
20	2.13	0.19	9.0
100	9.25	0.60	6.5
500	25.04	1.39	5.6

C.V. = Coefficient variance.

## 2. ヨード標識抗体

### 1) 抗体のヨード標識の検討

ヨード標識の過程で得られた溶出液を、薄層クロマトグラフィーにて展開した後スキanningを行い、放射性ヨードの分布を調べたが、放射活性の大部分(平均82%)は標識抗体の部分にあった(Fig. 3).

### 2) 標識抗体の抗体活性の検討

ヨード標識の過程で得られた溶出液を CEA 抗体液として用いた RIA 法により得られた検量曲線には、CEA 濃度が 1~500 ng/ml の範囲で良好な直線性が見られ、標識抗体が CEA の濃度に存在して CEA と結合することが確認された(Fig. 4).

### 3) 標識抗体の抗体活性の経時的安定性の検討

37°C における抗体活性の 0~5 日間安定性を Table 1 に示す。変動係数は 5.6~29.1%で、CEA 濃度が低いほど変動は大きくなる傾向が見られた。

## 3. 標識抗体の腫瘍への集積の検討

### 1) 遊離ヨウ素 ( $^{131}\text{I}^-$ ) の腫瘍細胞への残存の検討

0~24時間における腫瘍細胞  $10^6$  個あたりの放射能は、投与放射能の 0.1% 以下で、 $^{131}\text{I}^-$  が腫瘍へ残存しないことが確認された(Fig. 5).

### 2) 培養時間との関係

標識抗体の腫瘍細胞への集積は培養時間の延長とともに急激に増大し、24時間後よりほぼ平衡状態となった(Fig. 5).

### 3) 標識抗体の投与量との関係

標識抗体の腫瘍細胞への集積は、標識抗体の投与量に比例して増加し、投与量が 0.0002~1  $\mu\text{Ci}$  の範囲内で、ほぼ直線関係がみられた(Fig. 6).

### 4) HeLa 細胞への標識抗体の集積

0~24時間における HeLa 細胞  $10^6$  個あたりの放射能は、投与放射能の 0.2% 以下で、標識抗体が CEA 非産生性の HeLa 細胞へは集積しないことが確認された。

## 4. TPA による標識抗体の腫瘍集積に及ぼす影響

### 1) 腫瘍と TPA との培養時間との関係

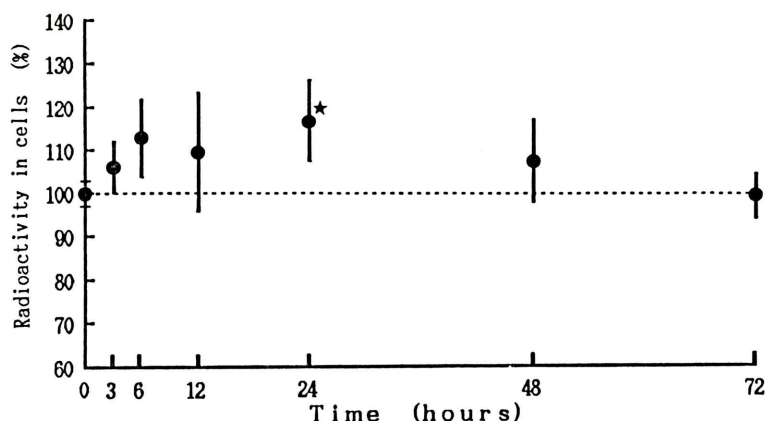


Fig. 7 Time course of the effect of TPA treatment of QG56 cells on uptake of  $^{131}\text{I}$ -labeled Ab. Results are expressed as the percentage of radioactivity found in QG56 cells treated with TPA compared with those without TPA. The results are the mean  $\pm$  SD of at least 2 different experiments. ★: Statistically significant differences existed between the points at 24 and 0 hr ( $p < 0.05$ ).

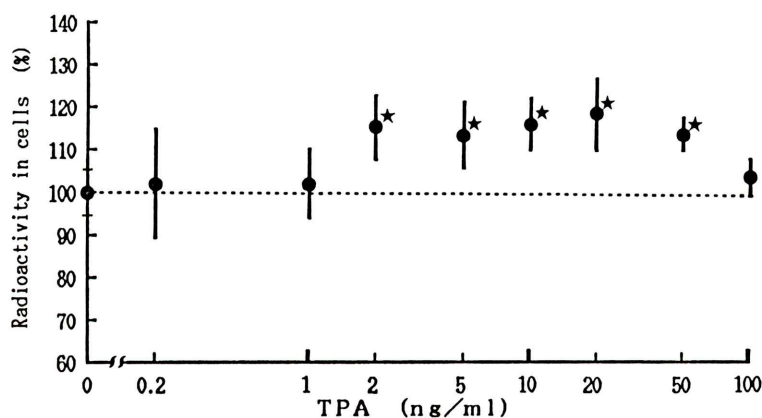


Fig. 8 Effect of treatment of QG56 cells with various concentrations of TPA on uptake of  $^{131}\text{I}$ -labeled Ab. Results are expressed as the percentage of radioactivity found in QG56 cells treated with TPA compared with those without TPA. The results are the mean  $\pm$  SD of at least 3 different experiments. ★: Statistically significant differences existed between the points at 2, 5, 10, 20, 50 and 0 ng/ml ( $p < 0.05$ ).

標識抗体の腫瘍細胞への集積は、TPA 処理 0 時間の腫瘍細胞 ( $100 \pm 3.0\%$ ) に比べて TPA 処理 24 時間の腫瘍細胞 ( $116.7 \pm 9.4\%$ ) では有意に増大し ( $p < 0.05$ )、それより長時間では次第に低下した (Fig. 7).

## 2) TPA 濃度との関係

標識抗体の腫瘍細胞への集積は、TPA 無処理

の細胞 ( $100 \pm 6.9\%$ ) と比べ TPA 濃度が 2, 5, 10, 20, 50 ng/ml の細胞 (それぞれ  $115 \pm 7.5$ ,  $113.4 \pm 7.8$ ,  $115.7 \pm 6.1$ ,  $118.2 \pm 8.5$ ,  $113.6 \pm 3.9\%$ ) では有意に増大し ( $p < 0.05$ )、この濃度範囲内ではほぼ平衡状態が見られた。これより高濃度 (100 ng/ml) では、標識抗体の腫瘍集積に増強は見られなかった (Fig. 8).

## V. 考 察

CEA は、1965 年、Gold ら<sup>16)</sup>によって大腸癌組織から分離された抗原で、腫瘍マーカーの一つとして、その血中濃度の測定は臨床的に非常に重視されている。この CEA に、真に癌特異的な抗原決定基があるかどうかは、なお議論のあるところではあるが<sup>17)</sup>、現在、臨床で測定されている CEA が、癌特異的な抗原活性に基づいていないことは明らかである<sup>18)</sup>。しかしながら、各種の悪性腫瘍患者血清中に高率に出現するため、抗 CEA 抗体は放射性核種によって標識された抗体を利用した悪性腫瘍の診断および治療に利用できると期待され、その基礎的ならびに臨床的研究が進められてきた<sup>1,19)</sup>。これらの研究の主たる目標は、より高い特異性と親和性のある抗体の作製であった。特異性の方は、モノクローナル抗体の出現<sup>20)</sup>により解決されるものと期待されている。しかし、親和性に関してはモノクローナル抗体やその fragment (F(ab')<sub>2</sub> F<sub>ab</sub>) を用いても、満足できるものはいまだ得られていない<sup>1)</sup>。

そこで今回、抗原-抗体反応の一方の要因である抗原の方に目を向け、TPA 処理で腫瘍細胞の抗原性の増強を計り、その結果として抗体との親和性の増大が得られるかどうかを調べた。In vitro における抗原性の強化の方法としては、抗原の付与、誘導による抗原修飾によるものや、抗原の露出のための被覆物質の除去によるもの<sup>21)</sup>が考えられる。また、抗原性が強いとされる S~G<sub>2</sub> 期<sup>22)</sup>で細胞増殖を停止させても、細胞 1 個あたりの抗体の集積は増大する。QG56 細胞の増殖は TPA では停止せず (Fig. 1)、これが関係するとは考え難い。本研究での TPA の腫瘍抗原に及ぼす影響としては、新抗原の付与、修飾よりも抗原露出が考えられる。その機序については、TPA の QG56 細胞の代謝に及ぼす影響のみならず、CEA の構造自体さえ明らかではない<sup>23)</sup> 現状においては、文献の考察によるしか方法がないが、以下のように考えられる。

TPA はそれ自体は発癌性はないが、諸種の正

常および癌細胞の分化誘導を修飾することが知られている<sup>24,25)</sup>。細胞膜には TPA の受容体があり<sup>26)</sup>、その結合は完全に可逆的であると考えられている<sup>27)</sup>。また、TPA は、リン脂質合成<sup>28~30)</sup>、プロスタグランジン合成、脂質の脱アシル化<sup>31)</sup>やポリアミン集積<sup>32)</sup>を刺激することが知られている。酵素系についても、phospholipase C<sup>30)</sup>、protein kinase<sup>33,34)</sup>、NAD<sup>+</sup> nucleosidase、acid phosphatase、lysozyme、nonspecific esterase<sup>35,36)</sup>、N-acetyltransferase<sup>37)</sup>、ornithine decarboxylase<sup>32)</sup>の刺激あるいは集積増大が報告されている。また、細胞の形態学的変化を刺激するとの報告<sup>31,38)</sup>もある。ネズミリンパ球<sup>39)</sup>やネズミ白血病細胞<sup>40)</sup>における免疫グロブリンの分泌誘発の抑制、ヒトリンパ球における抗原性の減弱<sup>41)</sup>あるいは増強<sup>12)</sup>やヒト白血病細胞における表面抗原の発現<sup>13)</sup>も報告されている。

CEA の抗原性は、抗原決定基が糖部分にあるか蛋白質部分にある<sup>22)</sup>か、また両者にある<sup>42)</sup>かについては明確な結論は出ていないが、いずれにしても、抗 CEA 抗体との親和力の強弱には、特に糖鎖構造の多様性が関与することが示唆されている。TPA が作用すると、先に述べたように種々の酵素の活性化を引き起こし、その結果、抗原を被覆している膜蛋白<sup>43,44)</sup>や糖脂質<sup>44,45)</sup>が除かれたり<sup>46)</sup>、糖鎖の長さ<sup>47)</sup>、分枝<sup>48)</sup>あるいは他の微細構造<sup>49)</sup>に変化が生じるため、抗 CEA 抗体と親和性を持つ部分が出現し、抗体に対する親和性が増大したものと考えられる。

親和性は、TPA 処理時間に依存しており、24 時間で最大の増強効果が得られた (Fig. 7)。このことから、抗原性の増強が、TPA により瞬時に生じる Ca<sup>2+</sup> flux<sup>43)</sup> やリン脂質代謝刺激<sup>28)</sup>による直接的な影響ではなく、比較的時間のかかる酵素の活性化などを介して起こることが考えられる。しかし、ヒトリンパ球における OKT-4 と Leu-3A の抗体で検出される抗原は、比較的短時間で減弱したとの報告<sup>41)</sup>があり、その機序は複雑なものと思われる。また、処理時間が長引くと親和性が低下するのは、TPA の消費や分解によるものと



思われる。親和性は濃度依存性 (Fig. 8) もあり、TPA が 2 ~ 50 ng/ml 付近で最大の増強が得られ、濃度が高すぎると増強効果は見られなくなった。これは、CEA 抗原量に変化が生じたか、その抗原性が障害されたからと考えられる。

TPA は発癌のプロモーターであり、直ちに臨床利用することはできない。また、抗体の腫瘍組織への到達性の問題もあり、培養細胞での成績が直ちに in vivo での利用に役立てられるわけではないが、今回の結果は、TPA のように生合成の容易な分子量の小さい化合物でも、<sup>131</sup>I 標識抗体の腫瘍細胞への集積を亢め、腫瘍画像診断能をさらに向上させる可能性があることを示した。今後、TPA の毒性を弱め人体への投与が可能になったり、人体に安全に投与できる同様の作用を持つ薬剤が開発されることが大いに期待される。

## VI. ま と め

1) CEA 産生性の QG56 細胞を TPA により前処理すると、マウス由来の <sup>131</sup>I 標識モノクローナル抗 CEA 抗体の培養腫瘍細胞集積が増強した。

2) TPA による抗体集積増強効果は処理時間により変化し、24時間で最高に達し、その後次第に低下した。

3) TPA による抗体集積増強効果は TPA 濃度によっても変化し、2 ~ 50 ng/ml 付近で最高に達し、濃度がこれよりも高くても低くてもその効果は低下した。

4) 以上から、腫瘍細胞の薬剤処理も放射性核種によって標識された抗体の腫瘍細胞への集積を亢める上で有用であると考えられる。

本研究の一部は厚生省核医学診断薬剤開発研究班(班長: 東京大学教授飯尾正宏)の助成を受けて行った。

稿を終るにあたり、終始ご指導、ご校閲を頂いた本教室松浦啓一教授に深甚の謝意を表します。また、貴重な助言をいただいた榎殿玲子講師、増田康治助教授ならびに一矢有一博士に御礼申し上げますとともに、実験にご協力頂いた同僚の桑原康雄、和田誠、三宅義徳および in vitro 検査室の諸氏に感謝致します。本研究の実施にあたり、研究室使用の便宜を図って頂いた本学放射線基

礎医学教室安徳重敏教授、モノクローナル抗体を提供して頂いた北海道大学第一生化学教室西信三教授に感謝致します。また論文作成にあたっては中山優子女史にお手伝いいただきました。心から御礼申し上げます。

## 文 献

- 1) DeLand FH, Goldenberg DM: Diagnosis and treatment of neoplasms with radionuclide-labeled antibodies. *Semin Nucl Med* **15** (1): 2-11, 1985
- 2) 榎殿玲子, 渡辺克司, 寺嶋広美, 他: 放射性同位元素で標識した抗腫瘍抗体による腫瘍の診断と治療の開発(第1報): 標識抗 MH 134 腫瘍抗体の腫瘍への結合. *日本医放会誌* **32**: 412-424, 1972
- 3) Wahl RL, Parker CW, Philpott GW: Improved radioimaging and tumor localization with monoclonal F(ab')<sub>2</sub>. *J Nucl Med* **24**: 316-325, 1983
- 4) Begent RHJ, Keep PA, Green AJ, et al: Liposomally entrapped second antibody improves tumour imaging with radiolabelled (first) antitumour antibody. *Lancet* Oct (2): 739-741, 1982
- 5) Goodwin DA, Meares CF, Diamanti CI, et al: Use of specific antibody for rapid clearance of circulating blood background from radiolabeled tumor imaging proteins. *J Nucl Med* **24**: 31-32, 1983
- 6) Makidono R, Ayabe Z, Matsuura K, et al: <sup>131</sup>I-labelled tumour-specific antibodies: Trial to concentrate radioisotopes specifically in tumours. 3. Improved radioimaging and tumour localization in nude mice with a monoclonal anti-CEA antibody by preincubation of labelled antibody with syngeneic spleen cells. *Nippon Acta Radiol* **45**: 388-392, 1985
- 7) Currie GA, van Doorninck W, Bagshawe KD: Effect of neuraminidase on the immunogenicity of early mouse trophoblast. *Nature* **219**: 191-192, 1968
- 8) Bekesi JG, St-Arneault G, Holland JF: Increase of leukemia L1210 immunogenicity by vibrio cholerae neuraminidase treatment. *Cancer Res* **31**: 2130-2132, 1971
- 9) Imai K, NG A-K, Glassy MC, et al: Differential effect of interferon on the expression of tumor-associated antigens and histocompatibility antigens on human melanoma cells: Relationship to susceptibility to immune lysis mediated by monoclonal antibodies. *J Immunol* **127**: 505-508, 1981
- 10) Anisimova E, Prachova K, Roubal J, et al: Effects of n-butyrate and phorbol ester (TPA) on induction of Epstein-Barr virus antigens and cell differentiation. *Arch Virol* **81**: 223-237, 1984
- 11) Truneh A, Albert F, Golstein P, et al: Early steps



- of lymphocyte activation bypassed by synergy between calcium ionophores and phorbol ester. *Nature* **313**: 318–320, 1985
- 12) Ashman LK, Gesche AH: Surface antigen expression by a human B-lymphoblastoid cell line treated with 'differentiation' inducers, dimethylsulfoxide and tetradecanoylphorbol acetate. *Leuk Res* **9**: 157–165, 1985
- 13) Shkolnik T, Schlossman SF, Griffin JD: Acute undifferentiated leukemia: Induction of partial differentiation by phorbol ester. *Leuk Res* **9**: 11–17, 1985
- 14) Gearing A, Thorpe R, Bird C, et al: Human B cell proliferation is stimulated by interleukin 2. *Immunol Lett* **9**: 105–108, 1985
- 15) 西 信三: AFP および CEA に対するモノクローナル抗体の作製. 核医学診断薬開発研究班報告(昭和 55 年度～昭和 57 年度の新薬開発の経過について). 飯尾正宏編, pp. 33–38, 1983
- 16) Gold P, Freedman SO: Demonstration of tumor-specific antigens in human colonic carcinomata by immunological tolerance and absorption techniques. *J Exp Med* **121**: 439–471, 1965
- 17) Matsuoka Y, Kuroki M, Koga Y, et al: Immunochemical differences among carcinoembryonic antigen in tumor tissues and related antigens in meconium and adult feces. *Cancer Res* **42**: 2012–2018, 1982
- 18) 松岡雄治, 黒木政秀, 古賀芳子, 他: 血中癌胎児性抗原 (CEA) の新しい測定法の検討——CEA キット「第一」の基礎的検討とその臨床応用——. 核医学 **19**: 1023–1033, 1982
- 19) Mach J-P, Forni M, Ritschard L, et al: Use and limitations of radiolabeled anti-CEA antibodies and their fragments for photoscanning detection of human colorectal carcinomas. *Oncodev Biol Med* **1**: 49–69, 1980
- 20) Accolla RS, Carrel S, Mach J-P: Monoclonal antibodies specific for carcinoembryonic antigen and produced by two hybrid cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* **77**: 563–566, 1980
- 21) 細川真澄男: 癌細胞の抗原性の強化. 癌と化学療法 **9** (Suppl I): 115–123, 1982
- 22) Gesche AH, Ashman LK: Variations in antigen expression during the cell cycle of a human B-lymphoblastoid cell line. *Leuk Res* **9**: 147–156, 1985
- 23) 松岡雄治: 腫瘍マーカーとしての CEA とその問題点. *Oncologia* **6**: 133–148, 1983
- 24) Weinberg JB: Tumor cell killing by phorbol ester-differentiated human leukemia cells. *Science* **213**: 655–657, 1981
- 25) 徳積本男, 本間良夫, 富田幹夫, 他: 細胞分化誘導物質. 癌と化学療法 **40** (Suppl I): 105–114, 1982
- 26) Shoyab M, Todaro GJ: Specific high affinity cell membrane receptors for biologically active phorbol and ingenolesters. *Nature* **288**: 451–455, 1980
- 27) Cooper RA, Braunwald AD, Kuo AL: Phorbol ester induction of leukemic cell differentiation is a membrane-mediated process. *Proc Natl Acad Sci USA* **79**: 2865–2869, 1982
- 28) Balmain A, Hecker E: On the biochemical mechanism of tumorigenesis in mouse skin. VI. Early effects of growth-stimulating phorbol esters on phosphate transport and phospholipid synthesis in mouse epidermis. *Biochim Biophys Acta* **362**: 457–468, 1974
- 29) Wertz PW, Mueller GC: Rapid stimulation of phospholipid metabolism in bovine lymphocytes by tumor-promoting phorbol esters. *Cancer Res* **38**: 2900–2904, 1978
- 30) Guy GR, Murray AW: Tumor promotor stimulation of phosphatidylcholine turnover in HeLa cells. *Cancer Res* **42**: 1980–1985, 1982
- 31) Ohuchi K, Levine L: Stimulation of prostaglandin synthesis by tumor-promoting phorbol-12,13-di-esters in canine kidney (MDCK) cells. *J Biol Chem* **253**: 4783–4790, 1978
- 32) Mufson RA, Fischer SM, Verma AK, et al: Effects of 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate and mezerein on epidermal ornithine decarboxylase activity, isoproterenol-stimulated levels of cyclic adenosine 3':5'-monophosphate, and induction of mouse skin tumors in vivo. *Cancer Res* **39**: 4791–4795, 1979
- 33) Kraft AS, Anderson WB: Phorbol esters increase the amount of Ca<sup>2+</sup>, phospholipid-dependent protein kinase associated with plasma membrane. *Nature* **301**: 621–623, 1983
- 34) Gschwendt M, Horn F, Kittstein W, et al: Calcium and phospholipid-dependent protein kinase activity in mouse epidermis cytosol. Stimulation by complete and incomplete tumor promoters and inhibition by various compounds. *Biochem Biophys Res Commun* **124**: 63–68, 1984
- 35) Rovera G, O'Brien TG, Diamond L: Induction of differentiation in human promyelocytic leukemia cells by tumor promoters. *Science* **204**: 868–870, 1979
- 36) Lotem J, Sachs L: Regulation of normal differentiation in mouse and human myeloid leukemic cells by phorbol esters and the mechanism of tumor promotion. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 5158–5162, 1979
- 37) Yuasa IM, Otani S, Shu ZW, et al: Phorbol esters stimulate spermidine/spermine N<sup>1</sup>-acetyltransferase activity in mitogen-stimulated bovine lymphocytes.

- FEBS **178**: 297–300, 1984
- 38) Skinnider L, Catovsky D, Incarbone E: The effect of tetradecanoyl-12,13-phorbol acetate on 'hairy' cells. *Scand J Haematol* **33**: 301–308, 1984
  - 39) Isakson PC, Simpson L: Phorbol esters inhibit murine B cell differentiation to immunoglobulin secretion but not proliferation. *J Immunol* **133**: 1788–1791, 1984
  - 40) Simpson LG, Isakson PC: Phorbol esters specifically inhibit induction of immunoglobulin secretion in a murine B cell leukemia. *J Immunol* **134**: 2759–2766, 1985
  - 41) Tatsumi E, Piontek C, Sugimoto T, et al: Selective loss of the expression of OKT-4 or Leu-3A defined antigen by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) in human lymphoid cells. *Am J Hematol* **17**: 287–294, 1984
  - 42) Ormerod GM: Antigenic determinants of carcinoembryonic antigen. *Scand J Immunol* **8** (Suppl 8): 433–438, 1978
  - 43) Stein KE, Schwarting GA, Marcus DM: Glycolipid markers of murine lymphocyte subpopulations. *J Immunol* **120**: 676–679, 1978
  - 44) Stellner K, Watanabe K, Hakomori S: Isolation and characterization of glycosphingolipids with blood group H specificity from membranes of human erythrocytes. *Biochemistry* **12**: 656–661, 1973
  - 45) Kannagi R, Urdal DL, Stroup R, et al: A possible regulation in expression of tumor associated glycolipid antigens by their ceramide structure. *Fed Proc* **41**: 726, 1982
  - 46) Gunther GR: Effect of 12-o-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate on  $\text{Ca}^{2+}$  efflux and protein discharge in pancreatic acini. *J Biol Chem* **256**: 12040–12046, 1981
  - 47) Kannagi R, Nudelman E, Levery SB, et al: A series of human erythrocyte glycosphingolipids reacting to the monoclonal antibody directed to a developmentally regulated antigen, SSEA-1. *J Biol Chem* **257**: 14865–14874, 1982
  - 48) Romans DG, Tilley CA, Dorrington KJ: Monogamous bivalency of IgG antibodies. I. Deficiency of branched ABHI-active oligosaccharide chains on red cells of infants causes the weak antiglobulin reactions in hemolytic disease of the newborn due to ABO incompatibility. *J Immunol* **124**: 2807–2811, 1980
  - 49) Young WW Jr, Portoukalian J, Hakomori S: Two monoclonal anticarbohydrate antibodies directed to glycosphingolipids with a lacto-N-glycosyl type II chain. *J Biol Chem* **256**: 10967–10972, 1981

## Summary

### Enhanced Binding of $^{131}\text{I}$ -Labeled Monoclonal Anti-CEA Antibody to a CEA Producing Lung Carcinoma Cell Line (QG56) after Phorbol Ester (TPA) Treatment

Yoshiharu AYABE

*Department of Radiology, Faculty of Medicine, Kyushu University*

Treatment of QG56 cells with 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) resulted in increase of antigenicity of carcinoembryonic antigen (CEA). TRA-treated QG56 cells showed an increased uptake of  $^{131}\text{I}$ -labeled monoclonal anti-CEA antibodies. The effect was dependent on the

incubation time and on the dose of TPA. These observations suggested that the agent which increases the expression of antigens may be useful to improve radioimmunodetection.

**Key words:**  $^{131}\text{I}$ -monoclonal antibody, CEA, QG56, enhanced antigenicity, phorbol ester.