

放射性同位元素を用いた腫瘍局在の免疫検出法

北大医学部第一生化学教室

平 井 秀 松

〔I〕 はじめに

癌細胞には存在するが、正常細胞には無いが、またはあっても極めて低濃度でしか存在しない癌特異の物質を狭義の腫瘍マーカーという。α-フェトプロテイン (AFP), 癌胎児性抗原 (CEA), ある種のイソ酵素, 異所的に産生されるホルモン, フェリチンなどが今日取扱われている腫瘍マーカー蛋白である。

この検出は、今日のところ、これらの物質で動物を免疫し、えられた抗血清との抗原-抗体反応によって行なわれている。今日広く診断に応用されているのは AFP と CEA であるが、これらに対する抗体はこれらを産生する細胞に特異的に結合することが *in vitro* の実験で確かめられており、*in vivo* においても注射された抗体がこれらの物質を産生する腫瘍組織に集積することがみられている。従って、放射標識抗体を用いれば放射能の検出から腫瘍の局在位置を推定することができる。この方法を腫瘍の放射免疫検出法 (Radioimmunodetection) と名づけておく。本法は抗体が抗原を有する細胞に特異的に集積する抗原-抗体反応の特異性に放射能検出を加味したもので、一種の Radioimmunoassay にほかならない。

本法の原理はすでに Goldenberg や Mach (1974) らにより ^{131}I 標識抗 CEA 抗体を用いた実験的、臨床的研究が行なわれ、シンチグラフィによる腫瘍の局在診断に成功している。われわれは抗 AFP 抗体を用い、AFP 産生腫瘍 (主として、ヘパトーマ) のシンチグラフィによる検出を検討した。また CEA 抗体を用い、Goldenberg や Mach らの成績を追試した。

本講演はわれわれの研究結果を中心とし、Radioimmunodetection について述べるものである。

本研究の協力者は下記の如くである。

1) 放射標識特異抗体の製造

北海道大学医学部第一生化学教室

塚田 裕, 原 彰彦, 日比 望

山梨医科大学第一生化学教室

西 信三

ダイナボットラジオアイソトープ研究所

関口 潔

2) 実験的・臨床的研究

長崎大学医学部第一内科

小路敏彦, 棟久龍夫, 石井伸子, 楠本征夫, 古河隆二,

河野健次, 室 豊吉, 中田恵輔, 長瀧重信

長崎大学医学部放射線科

田川文夫, 本保善一郎, 中島彰久

長崎原爆病院放射線科

高橋 朗, 河野恒昭

北海道大学医学部第一外科

内野純一, 葛西洋一

東京慈恵会医科大学泌尿器科

町田豊平

〔II〕 放射標識抗体の分離精製

ヒトまたはラット AFP, ヒト CEA はいずれもそれらに対する特異抗体を結合させた Sepharose を用いた immunoabsorbent column により精製された。これら精製抗原をもって馬を免疫し, えられた抗血清から特異抗体を immunoabsorbent, すなわち精製抗原を結合した Sepharose により精製した。えられた精製抗体 1 mg は約 100~150 μ g の抗原を結合する抗体活性を示した。

(Fab')₂ は精製抗体のペプシン消化によって分離した。((Fab')₂ は抗体の全分子に比較し, 特に勝れた性状を示さなかったので本講では実験結果を省略した) 対照としての正常ウマ血清 IgG は DEAE セルロースクロマトグラフィーによって精製した。

放射標識は ¹³¹I または ¹²⁵I を用い, Chloramine T 法によって行った。えられた標識抗体 (または正常 IgG) の比放射能は概ね 10mCi/mg protein であった。

〔III〕 動物実験

(1) 移植肝癌の免疫検出:

生後4週, 雄のドンリユーラットの大腿皮下に AFP 産生腹水肝癌 AH-7974 細胞を移植し, 動物モデルとした。実験群は ¹²⁵I 標識ウマ抗ラット AFP 抗体を, 対照群には ¹²⁵I 標識正常ウマ IgG をそれぞれ 120 μ Ci 静注し以下の4実験を行った。

(i) 全身シンチグラム——実験群では静注24時間目までの早い時期には血中 RI カウントが高く, 胸腹部臓器が広汎に濃く描出される。その後腫瘍は次第に hot area として現われ, 120, 168 時間目にも腫瘍内のアイソトープ集積は明瞭に認められた。対

照群でも一部軽度の hot area が描出されたが、実験群の集積濃度に比べ著しく低い。

(ii) 組織 (cpm/g)/血液 (cpm/g) 放射活性比——標識抗体投与後 1, 3, 5, 7, 10 日に屠殺し、臓器を取り出して放射能を測定、同時刻の血液の放射能との比を算出した。実験群は対照群に比し、3 日目に腫瘍、脾、腎で軽度の高値を示した。しかるに 7 日目には、実験群の腫瘍放射活性比は 1.0 をこえ対照群の約 4 倍に達した。すなわち標識抗体が active に腫瘍組織内にとりこまれたことを示し、全身シンチグラムの所見とも一致した。

(iii) 腫瘍細胞の細胞下分画の放射活性：実験群、対照群とも 1, 3, 5, 7, 10 日目に屠殺、全身を生食水で灌流後、腫瘍を摘出、Hogeboom の方法により細胞下分画を行い、それぞれの放射活性を測定した。その結果、放射活性の 30~60% は細胞膜、核分画に分布し、かつ経時的にその比率は増大傾向を示した。実験群は対照群に比し常に 10~20% 高値を示した。

(iv) オートラジオグラム：実験(ii)の7日目の腫瘍および各臓器の組織標本を作成し、マイクロオートラジオグラフィーを施行した。その結果、実験群の固定標本(腫瘍)で腫瘍細胞表面に放射活性を示す黒色のグレイン集合像をみとめたが、対照群は陰性であった。

(2) 3'-Me-DAB による原発性肝癌の免疫検出：

ラットを 0.06% 3'-Me-DAB 加食餌で飼育した。

約 20 週後に肝内腫瘍の形成がみられ、血中 AFP 値は 5 $\mu\text{g/ml}$ 以上の高値を示した。このラットに ^{125}I 標識抗体 100 μCi を静注し、経時的に全身シンチグラムを撮影した。その結果、静注 24 時間目は皮下移植癌と同じく血中 RI カウントが高いため腫瘍への取りこみは判然としない。しかし 96, 144 時間目には肝腫瘍と思われる部位に一致して明瞭な hot area を認めた。144 時間目に臓器を摘出、直接にシンチスキャンを施行したところこの hot area は肝内腫瘍に一致した。

以上より ^{125}I 標識 AFP 抗体は AFP 産生腫瘍へ特異的にとりこまれ、シンチグラム上は投与 2~7 日目の比較的遅い時期に腫瘍は描出されることが判明した。因みに標識抗体の血中半減期は約 2 日である。

[IV] 臨床応用

(1) 標識 AFP 抗体による肝細胞癌の放射免疫検出：

血中 AFP の上昇をみとめ、血管造影その他で肝癌と診断した患者 10 名(男 4, 女 6)に ^{131}I 標識ウマ抗ヒト AFP 特異抗体 0.8~1.7 mCi (比放射能約 10 mCi/mg) を静注した。その後 24, 48 時間目に subtraction 法による肝シンチグラフィーを行った。すなわち血液内に分布する RI の影響を除く目的で、各シンチグラフィー施行前に $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 標識ヒトアルブミン 500 μCi を静注し、 ^{131}I の画像から $^{99\text{m}}\text{CT}$ の画像をコンピューター操作により差し引いた画像として表現した。結果は 10 例中 4 例に肝内腫瘍陰影

とほぼ一致する hot area を認めた。

(2) CEA 抗体による CEA 産生癌の放射免疫検出：

血中または胸水、腫瘍内貯溜液中の CEA 高値の悪性腫瘍患者 5 名 (男 3, 女 2) —— 肺がん 2, 大腸がん肝転移 2, 原発巣不明脊椎転移の 1 例 —— に I-131 標識ウマ抗ヒト CEA 抗体 1.0~1.6 mCi (比放射能約 10 mCi/mg) を静注し, AFP 抗体と同様の方法によりシンチグラフィーを施行した。

その結果 2 例 (肺がん, 大腸癌肝転移症例) で肺原発巣, 肝内転移巣にほぼ一致する陽性所見を得た。

以上 AFP, CEA 陽性悪性腫瘍患者 13 例に抗体シンチグラフィーを施行し, それぞれ 4/10, 2/5 の陽性率で腫瘍の描出に成功したと思われる。なお 13 例中 2 例で静注後一過性に軽度の発熱をみた以外に見るべき副作用は皆無であった。

(3) 投与された抗体の血中における状況：

標識抗体を投与された患者の血液を採取し, 血清中の投与抗体の分布状況を Sephadex G-150 column chromatography によって調査した。血中 AFP 値が投与した抗体量より相対的に高値 (antigen excess) であるにもかかわらず, 標識抗体投与 1 時間目では抗原-抗体 complex と free の抗体と思われる 2 つの peak がみとめられ 48, 120 時間に至るも free IgG の peak は消失しなかった。すなわち血中抗原量に比し投与抗体量が僅少であるにもかかわらず, 標識抗体は free の状態で長時間血中を循環していることを示唆した。一方血中 AFP 濃度の高い患者に陽性のイメージがえられ易いことは腫瘍細胞での AFP 合成, 分泌のより旺盛な腫瘍に抗体がとりこまれやすいことを示すものと思われる。¹²⁵I 標識抗体の血中半減期は放射能の消失速度より約 4.5 日と算出された。

【V】おわりに

腫瘍の放射免疫検出法の最重要点は, いかなる抗原-抗体系を用いるかにかかっている。

いいかえれば, いかなる腫瘍特異抗原を用いるかの問題である。

抗原-抗体系が癌に特異的であればあるほど描出像は鮮明となるはずである。今日までのところ, 真の意味での腫瘍特異抗原はその存在が推定されてはいても精製分離されたものはほとんどない。われわれは止むをえず AFP, CEA を腫瘍特異抗原として取扱っているが, これらの物質は正常組織内に多かれ少なかれ存在するので, 描出像のコントラストを低下させていると考えたい。

抗体の腫瘍特異性について重要なのは抗体の抗原に対する親和力の強いことであろう。免疫方法, 免疫動物の選択などが研究課題となる。われわれの研究でも示した通り, 投与抗体は全身に分布し, 腫瘍への局在の度合いが低い。止むをえず subtraction といった方法を用いているが苦肉の策である。しかし抗原-抗体系の特異性, 親和性

が向上されぬ限り subtraction 法など腫瘍描出像のコントラストを増強する方法の検討が大切である。

血中に大量の抗原性物質が存在するにもかかわらず、投与されたごく少量の抗体(約 100 μ g)が標的に到達することは抗原-抗体反応の教科書的な知識では説明しにくい。腫瘍細胞という固相上に存在する抗原と、血清中に溶存する抗原とでは抗体に対する親和力(結合常数)に差があるのであろう。免疫化学者の基礎的研究が必要である。これらの検討をまち、方法の改良を重ねれば腫瘍の放射免疫検出法は重要な臨床診断法の一つに成長するものと思われる。