

## 《原 著》

# 標識抗ヒト $\alpha$ -fetoprotein 抗体を用いる腫瘍イメージングの基礎的検討：第1編 ヨード標識による抗体活性の変化

阪原 晴海\* 遠藤 啓吾\* 中島 鉄夫\* 太田 仁八\*

鳥塚 菅爾\* 岡田謙一郎\*\* 吉田 修\*\* 平井 秀松\*\*\*

**要旨** ヒト  $\alpha$ -fetoprotein (AFP) に対するポリクローナル抗体を用いてヨード標識による抗体活性の変化をみるとともに担癌ヌードマウスにおける  $^{131}\text{I}$ -標識抗体の AFP 産生腫瘍への集積について検討した。抗体はヒト AFP でウマを免疫して得られた抗血清を affinity chromatography で精製したもので、クロラミン T 法によりヨード標識した。標識抗体の AFP への結合親和定数、結合能の変化を RIA を用いた Scatchard plot で解析したところ、低濃度のクロラミン T を用い、抗体 1 分子に結合するヨード原子数が 0.8 までの標識では抗体活性はほぼ完全に保たれていることが示された。 $^{131}\text{I}$ -標識抗 AFP 抗体を AFP 産生ヒト睾丸腫瘍を移植したヌードマウスに投与して得られたシンチグラムでは腫瘍は陽性描画され、標識抗体投与後 7 日目の体内分布も腫瘍/血液比が 0.82 と対照として用いた AFP 非産生ヒト膀胱腫瘍の 0.42 より有意に高く ( $p < 0.01$ )、標識抗体の AFP 産生腫瘍への特異的な集積を裏付けた。

## I. はじめに

現在腫瘍シンチグラフィー製剤として広く臨床に利用されている  $^{67}\text{Ga}$ -citrate は悪性腫瘍のみならず炎症部位にも取り込まれ、癌にのみ特異的なものではない。これに対し腫瘍関連抗原に対する抗体を放射性同位元素で標識し、抗原抗体反応のもつ高い特異性を利用して癌にのみ取り込ませ、癌の局在診断を行う radioimmunodetection は癌にのみ特異的な腫瘍イメージングが得られるのではないかと期待されている<sup>1~4)</sup>。さらに近年細胞融合法によるモノクローナル抗体が開発され、抗体を用いる腫瘍シンチグラフィーは一層注目されている<sup>5~8)</sup>。

抗体を放射性同位元素で標識すると抗体活性が損われることや<sup>9,10)</sup>、標識の程度により腫瘍への集積が異なることが報告されている<sup>11)</sup>。しかし用いる腫瘍関連抗原が精製されたものではないことが多い、標識による抗体活性の変化、特に抗体の抗原への結合親和定数、結合能に及ぼす標識の影響についてはこれまであまり検討されていない。また標識抗体を用いる腫瘍イメージングを臨床的に応用するためにはヒトの腫瘍をモデルとした基礎的検討が必要である。そこで今回ヒト  $\alpha$ -fetoprotein (AFP) に対するポリクローナル抗体を用いてヨード標識の抗体活性に及ぼす影響を検討するとともに  $^{131}\text{I}$ -標識抗体の腫瘍への集積を AFP 産生ヒト睾丸腫瘍を移植したヌードマウスを用いて検討したので、その結果を報告する。

## II. 材料および方法

1) 薬品：実験に用いた主な薬品とその購入先是以下の通りである。蛋白標識用  $\text{Na}^{131}\text{I}$ : New England Nuclear (Boston, Mass., USA), 蛋白標識

\* 京都大学医学部核医学科

\*\* 同 泌尿器科

\*\*\* 北海道大学医学部生化学教室

受付：59年2月23日

最終稿受付：59年4月6日

別刷請求先：京都市左京区聖護院川原町 54 (〒506)

京都大学医学部核医学科

阪 原 晴 海

用  $\text{Na}^{125}\text{I}$ : Amersham International (Buckinghamshire, England),  $^{99m}\text{Tc}$  標識ヒト血清アルブミンキット: Commissariat à l'Energie Atomique (Gif-sur-Yvette, France), クロラミン T, ヨウ化ナトリウム, ヨウ化カリウムおよびポリエチレングリコール #6000: 半井化学薬品(京都), Sephadex G-50(medium): Pharmacia Fine Chemicals(Uppsala, Sweden), AFP (98%以上精製): ミドリ十字(大阪), ウシ血清アルブミン(Cohn fraction V)およびヒト血清 $\gamma$ -グロブリン(Cohn fraction II): Sigma Chemical Company (St. Louis, Missouri, USA), ペントバルビタールナトリウム(ネンプタール®): 大日本製薬(大阪)。

また使用した緩衝液類は 0.3 M リン酸ナトリウム緩衝液 pH 7.5, 0.05 M リン酸ナトリウム緩衝生理食塩水(0.05 M PBS) pH 7.5 および 0.25% ウシ血清アルブミンを含む 0.05 M PBS(PBS/BSA) pH 7.5 である。

**2) 抗 AFP 抗体:** 抗 AFP 抗体は北海道大学医学部生化学教室平井教授より提供されたもので<sup>12)</sup>, ヒト AFP でウマを免疫して得られた抗血清をさらに affinity chromatography にて精製, 凍結乾燥したものである。Scatchard plot<sup>13,14)</sup>による解析ではこの抗体の結合親和定数は  $1.62 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$  であり, 結合能は  $105 \mu\text{g AFP}/\text{mg 抗体}$ , すなわち抗体 1 mgあたり最大  $105 \mu\text{g}$  の AFP と結合しうるものであった。抗体は 0.3 M リン酸ナトリウム緩衝液 pH 7.5 で  $1 \text{ mg/ml}$  となるように溶解し, ヨード標識に用いた。

**3) 担癌ヌードマウス:** ヌードマウス(BALB/c-nu/nu)に継代移植されている AFP 産生ヒト睾丸腫瘍(胎児性癌)<sup>15)</sup>と AFP 非産生ヒト膀胱腫瘍(移行上皮癌)<sup>16)</sup>の二種類のヒト腫瘍を実験に供した。腫瘍はヌードマウスの背部皮下に継代移植され20代以上にわたり維持されているものである。睾丸腫瘍を移植されたヌードマウスでは腫瘍の成長とともに血中 AFP 濃度は上昇し, 最高  $3,500 \text{ ng/ml}$  までに達するが, 膀胱腫瘍移植ヌードマウスでは血中 AFP 濃度は  $50 \text{ ng/ml}$  以下であった。

いずれも腫瘍が直径 1~3 cm に成長した後, 実験に供した。

**4) ヨード標識による抗 AFP 抗体活性の変化**(Fig. 1): クロラミン T 法<sup>17,18)</sup>を用いて抗体のヨード標識を行った。クロラミン T 自身の酸化作用による抗体活性の変化およびヨードが抗体に取り込まれることによる抗体活性の変化を以下の方法により検討した。

(1) クロラミン T 法による抗体のヨード標識の方法: 栄研チューブ 1 号中で室温にて以下の手順でヨード標識を行った。

- i) ヨウ化ナトリウム  $0\sim20 \mu\text{g}/10 \mu\text{l}$  (0.1 N 水酸化ナトリウム溶液) にトレーサー量(約 3,000 cpm)の  $\text{Na}^{131}\text{I}$   $10 \mu\text{l}$  (0.1 N 水酸化ナトリウム溶液)を混和する。
- ii)  $0.3 \text{ M}$  リン酸ナトリウム緩衝液 pH 7.5  $60 \mu\text{l}$  を加える。

iii) 抗 AFP 抗体  $100 \mu\text{g}/100 \mu\text{l}$  ( $0.3 \text{ M}$  リン酸ナトリウム緩衝液 pH 7.5) を加える。

iv) 直前に  $0.3 \text{ M}$  リン酸ナトリウム緩衝液 pH 7.5 で溶解したクロラミン T 0, 3.3 または  $200 \mu\text{g}/20 \mu\text{l}$  を加え総量  $200 \mu\text{l}$  としよく混和した後, 5

Anti-AFP IgG	100 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$
0.3 M Phosphate Buffer	60 $\mu\text{l}$
$^{131}\text{I}$	Tracer/ 10 $\mu\text{l}$
Nal	Various amounts/10 $\mu\text{l}$
Chloramine-T	3.3 or 200 $\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$

incubated for 5 min and applied to the Sephadex G-50 Column (0.7x20cm) equilibrated with 0.05 M PBS/0.25% BSA buffer, pH 7.5.

Iodinated anti-AFP IgG	0.1 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$
AFP	100 $\mu\text{l}$
$^{125}\text{I}$ -labeled AFP	100 $\mu\text{l}$

incubated for 3 hrs, at room temperature. B/F was separated by the PEG method.

**Fig. 1** Procedures of iodination of anti-AFP antibodies and RIA of AFP using iodinated anti-bodies.

分間インキュベートする。

v) 反応液をあらかじめ PBS/BSA を流した Sephadex G-50 カラム ( $0.7 \times 20$  cm) にかけ、PBS/BSA で溶出する。

vi) 最初の放射活性ピークを集め、次に述べる方法で抗体活性の変化を検討した。

(2) Scatchard plot によるヨード標識抗体の抗体活性の解析：ヨード標識抗体を用いて AFP の RIA を行い、Scatchard plot<sup>13,14)</sup>によりヨード標識抗体の抗体活性を解析し、抗体活性に及ぼすヨード標識の影響を検討した。先の方法で得られたヨード標識抗体は PBS/BSA で抗体濃度が  $1\mu\text{g}/\text{ml}$  となるように希釈した。AFP は  $300\mu\text{g}$  を蒸留水  $600\mu\text{l}$  で溶解し、一部を  $^{125}\text{I}$ -標識用 AFP として用いるとともに他はヒト $\gamma$ -グロブリンを含む ( $2\text{mg}/\text{ml}$ )  $0.05\text{M}$  PBS で各種濃度の標準 AFP を作成した。AFP の RIA はすでに報告されている方法<sup>19)</sup>により行った。すなわち標準 AFP  $100\mu\text{l}$ 、クロラミン T 法で標識した  $^{125}\text{I}$ -AFP  $100\mu\text{l}$ 、およびヨード標識抗体  $100\mu\text{l}$ 、計  $300\mu\text{l}$  を混和し、室温で 3 時間インキュベート。21%ポリエチレンゲリコール溶液  $1\text{ml}$  を加えよく混和した後、3,000 rpm 20 分間遠沈して B/F 分離を行いその沈渣の放射活性をカウントした。大量の標準 AFP ( $10\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 添加時の結合カウントを非特異的結合として減算後、Scatchard plot によりヨード標識抗体の AFP への結合親和定数および結合能を求めた。

5) 担癌ヌードマウスにおける  $^{131}\text{I}$ -標識抗 AFP 抗体の腫瘍への集積： $^{131}\text{I}$ -標識抗 AFP 抗体は 4) で示した方法に準じて抗体  $100\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ 、 $0.3\text{M}$  リン酸ナトリウム緩衝液  $60\mu\text{l}$ 、蛋白標識用  $\text{Na}^{131}\text{I}$   $2\text{mCi}/20\mu\text{l}$ 、およびクロラミン T  $2.0\sim3.3\mu\text{g}/20\mu\text{l}$  総量  $200\mu\text{l}$  を混和し作成した。標識率は  $45\sim70\%$  で抗体の比放射能は  $9\sim14\text{mCi}/\text{mg}$  であった。抗体 1 分子あたりに結合する平均ヨード原子数は標識用  $^{131}\text{I}$  の純度を  $12\%$  とすると<sup>20)</sup>、 $0.69\sim1.07$  と計算された。得られた  $^{131}\text{I}$ -標識抗 AFP 抗体を PBS/BSA で希釈、 $500\mu\text{Ci}/\text{ml}$  とし、 $0.22\mu\text{m}$  ミリポアフィルター (Millipore Corporation) に通して実験に用いた。担癌ヌードマウスは標識抗体投与前に血中 AFP 濃度を測定し、投与 3 日前より実験終了まで  $1\text{mg}/\text{日}$  になるようにヨウ化カリウムを飲水に混入して投与した。標識抗体  $100\mu\text{Ci}/0.2\text{ml}$  を尾静脈より静注後 1, 2, 4 および 7 日目にピンホールコリメーターを装備したガンマカメラ (Searle PHO/GAMMA LFOV, Searle Radiographics Inc. Des Plaines, Illinois, USA) を用いて撮像した。撮像時ヌードマウスには生理食塩水で  $5\text{mg}/\text{ml}$  に希釈したペントバルビタールナトリウムを  $0.15\sim0.25\text{ml}$  腹腔内投与し麻酔した。データはオンラインで接続したコンピューター (DEC PDP 11/60, Digital Equipment Corporation, Maynard, Mass., USA) に収集し、必要に応じて  $^{99m}\text{Tc}$ -標識ヒト血清アルブミン ( $100\mu\text{Ci}/0.1\text{ml}$ ) を投与し、 $^{131}\text{I}$  と  $^{99m}\text{Tc}$  の減算シンチグラフィーを得た。標識抗体投与後 7 日目に担癌ヌードマウスを屠殺し、心臓穿刺にて血液を採取した後、腫瘍および主要臓器を摘出し重量および放射活性を測定した。

Bedford, Mass., USA) を通して実験に用いた。担癌ヌードマウスは標識抗体投与前に血中 AFP 濃度を測定し、投与 3 日前より実験終了まで  $1\text{mg}/\text{日}$  になるようにヨウ化カリウムを飲水に混入して投与した。標識抗体  $100\mu\text{Ci}/0.2\text{ml}$  を尾静脈より静注後 1, 2, 4 および 7 日目にピンホールコリメーターを装備したガンマカメラ (Searle PHO/GAMMA LFOV, Searle Radiographics Inc. Des Plaines, Illinois, USA) を用いて撮像した。撮像時ヌードマウスには生理食塩水で  $5\text{mg}/\text{ml}$  に希釈したペントバルビタールナトリウムを  $0.15\sim0.25\text{ml}$  腹腔内投与し麻酔した。データはオンラインで接続したコンピューター (DEC PDP 11/60, Digital Equipment Corporation, Maynard, Mass., USA) に収集し、必要に応じて  $^{99m}\text{Tc}$ -標識ヒト血清アルブミン ( $100\mu\text{Ci}/0.1\text{ml}$ ) を投与し、 $^{131}\text{I}$  と  $^{99m}\text{Tc}$  の減算シンチグラフィーを得た。標識抗体投与後 7 日目に担癌ヌードマウスを屠殺し、心臓穿刺にて血液を採取した後、腫瘍および主要臓器を摘出し重量および放射活性を測定した。

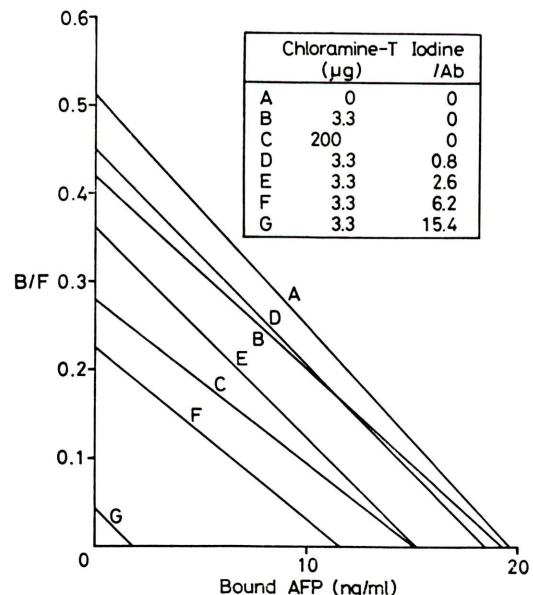


Fig. 2 Effect of iodination on the antigen binding activity of anti-AFP antibodies shown by Scatchard plot. Methods were described in detail in "Materials and Methods".

### III. 結 果

**1) ヨード標識による抗 AFP 抗体活性の変化:** 各種条件下においてヨード標識された抗 AFP 抗体の抗原への結合親和定数、結合能の変化を Scatchard plot を用いて解析した結果を Fig. 2 に示す。クロラミン T は強い酸化剤であるため<sup>10,21</sup>、まずクロラミン T 自身の酸化作用による抗体活性の変化をヨウ化ナトリウムを加えずトレーサーの <sup>131</sup>I のみを加え、クロラミン T 濃度を変えて検討した (Fig. 2, B and C)。クロラミン T 3.3 μg/200 μl と低濃度の場合は抗体活性にほとんど影響しないが、200 μg/200 μl と高濃度の場合には結合親和定数にほとんど変化がないのに対して抗原への結合能が低下することが明らかとなった。そこで以後のヨード標識はクロラミン T 3.3 μg/200 μl と低濃度の条件下で行った。

次にヨード標識による抗体活性の変化をみるためにヨウ化ナトリウム濃度を変えて抗体 1 分子あたりに結合するヨード原子の数が 0.8, 2.6, 6.2, および 15.4 のヨード標識抗体を作成し、RIA を用

いてその抗原への結合の変化を Scatchard plot で検討した。Fig. 2, D, E, F, および G で示すごとく、抗体 1 分子に結合するヨード原子数が 0.8 では抗体活性にほぼ完全に保たれ、結合するヨード原子数が増すに従って結合親和定数よりむしろ抗原への結合能が低下し、15.4 個のヨード原子が抗体 1 分子に統合すると抗体活性はほとんど消失した。そこで抗体活性が保たれる温和な条件で作成した <sup>131</sup>I-標識抗 AFP 抗体を用いて腫瘍イメージングの実験を行った。

**2) <sup>131</sup>I-標識抗 AFP 抗体による担癌ヌードマウスの腫瘍イメージング:** <sup>131</sup>I-標識抗 AFP 抗体を投与された AFP 産生ヒト睾丸腫瘍移植ヌードマウスのシンチグラムを Fig. 3 に示す。日を追つてバックグランドの放射活性の低下とともに腫瘍への集積は相対的に増加し、投与後 7 日目には腫瘍が陽性像として明瞭にとらえられた。コンピューター上で腫瘍と肝に关心領域を設定して得られた腫瘍とバックグランドの集積比は時間経過とともに上昇し、シンチグラムの所見を裏付ける結果が得られた (Fig. 4)。また <sup>131</sup>I-標識抗体のイメー

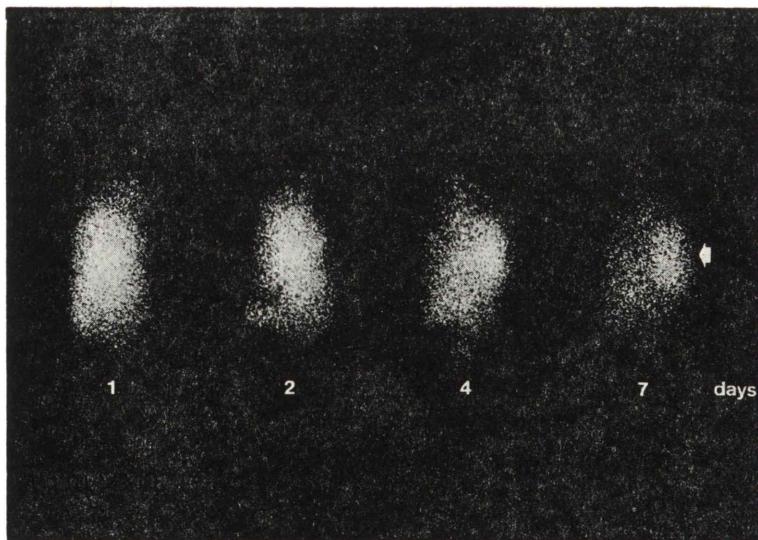


Fig. 3 Scintigrams of nude mouse bearing AFP producing human testicular tumor in the right middorsal region. Scintigrams were taken at 1, 2, 4 and 7 days after the injection of <sup>131</sup>I-labeled anti-AFP antibodies. Arrow indicates the position of the tumor.

ジから $^{99m}$ Tc-標識ヒト血清アルブミンのイメージを減算すると腫瘍がより一層明瞭に描出された

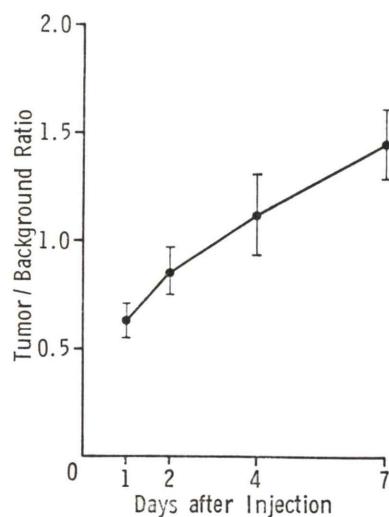


Fig. 4 Time course of tumor/background ratio of  $^{131}$ I-labeled anti-AFP antibodies in nude mice bearing testicular tumor. Tumor/background ratio was obtained from the data stored in computer and shown as mean  $\pm$  SD ( $n=4$ ).

(Fig. 5).一方 AFP 非産生ヒト膀胱腫瘍移植ヌードマウスでも  $^{131}$ I-標識抗体はある程度腫瘍に集積するが、睾丸腫瘍に比べてその程度は弱かった (Fig. 6)。

3)  $^{131}$ I-標識抗 AFP 抗体のマウス体内分布：  
 $^{131}$ I-標識抗体投与後 7 日目の睾丸腫瘍移植ヌードマウスおよび膀胱腫瘍移植ヌードマウスの腫瘍および各臓器 1 gあたりの放射活性と血液 1 mlあたりの放射活性の比を Table 1 に示す。腫瘍/血液比は睾丸腫瘍において 0.82 であるのに対し、対照として用いた膀胱腫瘍では 0.42 と低く ( $p < 0.01$ )、 $^{131}$ I-標識抗 AFP 抗体の AFP 産生睾丸腫瘍への特異的な集積が認められた。

#### IV. 考 察

クロラミン T 法により抗ヒト AFP ポリクローン抗体の  $^{131}$ I-標識を行い、腫瘍イメージングの基礎的検討を行った。これまでヨード標識にはクロラミン T 法以外にも lactoperoxidase を用いる酵素法、ヨードゲン法など多くの方法が報告されているが、このうちクロラミン T 法によるヨ

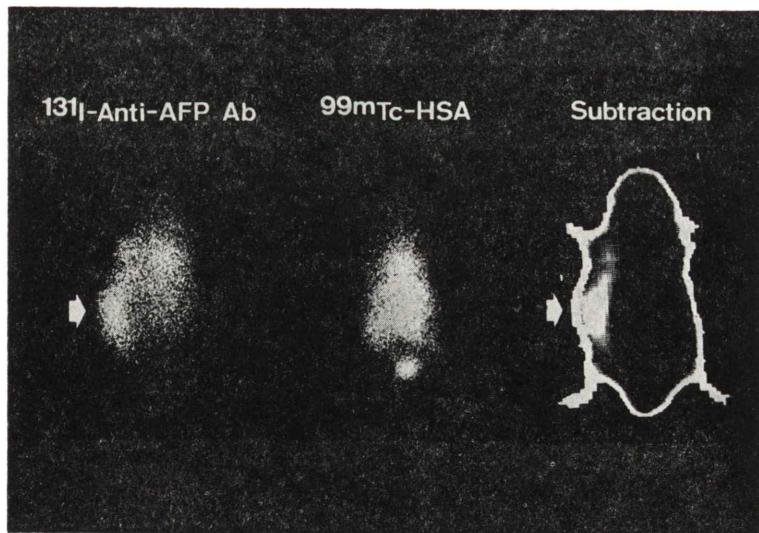


Fig. 5 Subtraction scintigram of nude mouse bearing testicular tumor at 4 days after the injection of  $^{131}$ I-labeled anti-AFP antibodies.  $^{99m}$ Tc-labeled human serum albumin (HSA) was administered intravenously 30 minutes prior to imaging. Arrows indicate the position of the tumor.

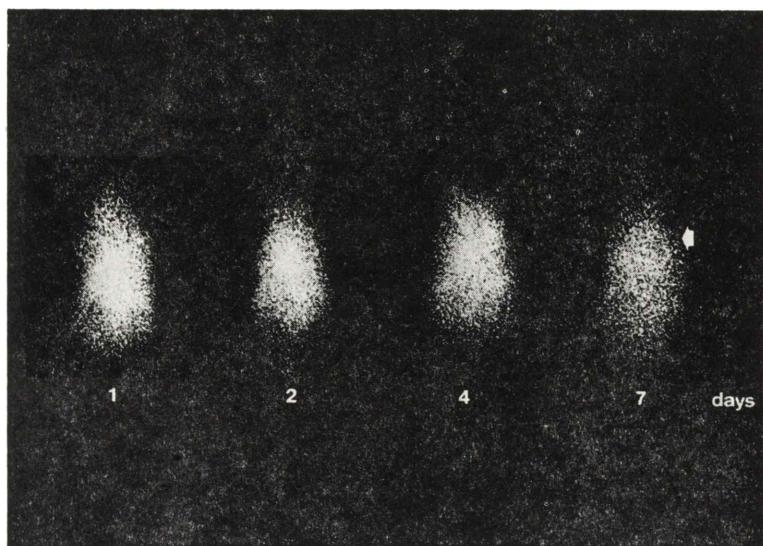


Fig. 6 Scintigrams of nude mouse bearing AFP non-producing human bladder tumor in the middorsal region. Scintigrams were taken at 1, 2, 4 and 7 days after the injection of  $^{131}\text{I}$ -labeled anti-AFP antibodies. Arrow indicates the position of the tumor.

**Table 1** Distribution of  $^{131}\text{I}$ -labeled antibodies to human AFP, 7 days after administration (tissue/blood ratio<sup>a)</sup>)

Tissue	Testicular tumor <sup>b)</sup>	Bladder tumor <sup>c)</sup>
Tumor	$0.82 \pm 0.14^{\text{d)}$	$0.42 \pm 0.07$
Liver	$0.23 \pm 0.02$	$0.17 \pm 0.01$
Kidney	$0.31 \pm 0.09$	$0.33 \pm 0.01$
Intestine	$0.08 \pm 0.01$	$0.10 \pm 0.01$
Stomach	$0.22 \pm 0.14$	$0.27 \pm 0.01$
Spleen	$1.27 \pm 1.40$	$0.15 \pm 0.02$
Lung	$0.48 \pm 0.09$	$0.44 \pm 0.02$
Muscle	$0.11 \pm 0.09$	$0.13 \pm 0$
Bone	$0.12 \pm 0.03$	—

a) cpm per gram of tissue/cpm per ml of blood, mean  $\pm$  SD, b) n=5, c) n=2, d) Tumor to blood ratio was significantly different from that of bladder tumor ( $p < 0.01$ )

ード標識はその手技が簡便であり、高い比放射能の標識物質が得られるため最も広く利用されている。しかしヨード標識においては標識物質の免疫活性、生物活性の保持が重要であり、クロラミンT法の場合クロラミンT自身のもつ酸化作用による標識物質の変性が問題となる<sup>21)</sup>。原法<sup>17,18)</sup>で

はクロラミンTが大量に用いられているが、RIA や radioreceptor assay に用いる標識物質を作成するために、少量のクロラミンTを用いることにより標識物質の損傷をできるだけ少なくする工夫がなされた<sup>22,23)</sup>。一方、標識抗体を用いる腫瘍イメージングでは対応する腫瘍関連抗原が十分精製されていないものが大部分であり、ヨード標識が抗体活性に及ぼす影響、特に抗原への結合親和定数、結合能の変化の解析についてはほとんど検討されていない。

AFP は臨床的に最もよく研究された腫瘍マーカーの一つで肝細胞癌、睾丸腫瘍などの診断に広く利用されている。今回実験に用いた AFP は 98%以上精製されたものであり、標識による抗体活性の変化の解析が RIA を用いた Scatchard plot により可能であった。

クロラミンT自身の酸化作用による抗体活性の低下においても、ヨードが抗体に結合することによる抗体活性の低下においても、いずれの場合も親和定数には変化が少なく、抗原への結合能が低下することが明らかとなった。200  $\mu\text{g}/200 \mu\text{l}$  のク

クロラミン T の濃度はほぼ原法に一致するものでこの条件下でヨード標識した抗体を用いる腫瘍イメージングの報告もみられる。これまで抗体の標識においてクロラミン T 法は他の方法に比較して抗体活性が低下する<sup>10</sup>、あるいは失活する<sup>24</sup>との報告もあるが、この場合クロラミン T が高濃度で用いられているか抗体 1 分子に結合したヨード原子数が多い場合が多い。酵素法、ヨードゲン法によるヨード標識との比較はしていないが、今回の検討によってクロラミン T 法によるヨード標識でも温和な条件下では抗体活性はほぼ完全に保たれることが示された。Scatchard plot による抗体活性の解析法は抗体の抗原への結合能のみならず親和定数の変化もみることができ、ポリクローナル抗体だけでなくモノクローナル抗体の標識の検討、さらには  $^{99m}$ Tc,  $^{67}$ Ga,  $^{111}$ In などの放射性金属核種による抗体標識の検討にも応用することのできる優れた方法といえよう。

標識抗体を用いる腫瘍イメージングの検討、とくに標識抗体の生体内におけるヒトの腫瘍への集積についての検討にはヒトの腫瘍の移植が可能なヌードマウスが利用されている<sup>25,27</sup>。今回用いた AFP 産生ヒト睾丸腫瘍移植ヌードマウスの実験モデルは以下の種々の利点を有している。a) ヒトの腫瘍であること。b) 臨床的に、腫瘍摘出後経過観察中の患者において血中 AFP 値の上昇がみられ再発、転移が疑われるにもかかわらず、その局在診断が困難な場合があり、標識抗体を用いる腫瘍イメージングの開発が期待されること。またこの腫瘍は AFP と同時にヒト絨毛性ゴナドトロピン (hCG) も産生するので、c) 抗 AFP 抗体のみならず標識抗 hCH 抗体を用いる腫瘍イメージングの実験モデルにも応用でき、両者を比較検討できること。d) 抗 AFP 抗体投与による悪性腫瘍治療の研究の場合にも血中 hCG 濃度の RIA 測定により腫瘍の反応の評価が可能であること、などである。

今回の実験により  $^{131}$ I-標識抗 AFP 抗体が AFP 産生腫瘍に特異的に集積することが確かめられた。しかしその集積は十分なものではなく良好な腫瘍

イメージを得るためにコンピューターを用いる減算シンチグラフィーが必要であった。これまでの抗 AFP 抗体を用いる腫瘍シンチグラフィーは今回報告したものと同様に標識ポリクローナル抗体を用いて肝細胞癌あるいは睾丸腫瘍への取り込みをみたものが多い<sup>4,26</sup>。ポリクローナル抗体を用いる場合、たとえ AFP のごとくほぼ完全に精製されたものを抗原として用いて作成される抗体は多様なものである。しかも免疫グロブリン分画に占める特異抗体の割合はそれほど高くない。しかし Köhler, Milstein らにより開発されたモノクローナル抗体の手法<sup>27</sup>を用いれば、理論的には 100% 均一な特異抗体のみよりなる免疫グロブリン分画が得られるわけで、標識抗体を用いる腫瘍シンチグラフィーも著しく改善されるものと期待される。現在われわれも担癌ヌードマウスを用いて標識モノクローナル抗体による radioimmuno-detection の有用性を検討中である。

## V. まとめ

- 1) 抗ヒト AFP ポリクローナル抗体を用いて腫瘍イメージングの基礎的検討を行った。
- 2) クロラミン T 法によるヨード標識では温和な条件下で抗体 1 分子に結合するヨード原子数が 0.8 まででは抗体活性はほぼ完全に保たれた。
- 3)  $^{131}$ I-標識抗 AFP 抗体はヌードマウスに移植された AFP 産生ヒト睾丸腫瘍に特異的に集積した。
- 4) RIA を用いた Scatchard plot による抗体活性の解析法および担癌ヌードマウスのモデルは標識抗体による腫瘍イメージングの基礎的検討に有用であると考えられた。

本研究は厚生省核医学診断薬剤開発研究班の援助を受けた。

## 文 献

- 1) Goldenberg DM, Preston DF, Primus FJ, et al: Photoscan localization of GW-39 tumors in hamsters using radiolabeled anticarcinoembryonic antigen immunoglobulin G. Cancer Res 34: 1-9, 1974

- 2) Ghose T, Tai J, Gulcu A, et al: Tumor Localization of  $^{131}\text{I}$ -labeled antibodies by radionucleid imaging. *Radiology* **116**: 445-448, 1975
- 3) 横殿玲子, 渡辺克司, 寺島広美, 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 MH134 腫瘍抗体の腫瘍への結合. *日本医学会誌* **32**: 412-424, 1972
- 4) Koji T, Ishii N, Munehisa T, et al: Localization of radioiodinated antibody to alpha-fetoprotein in hepatoma transplanted in rats and a case report of alpha-fetoprotein antibody treatment of a hepatoma patient. *Cancer Res* **40**: 3013-3015, 1980
- 5) Ballou B, Levine G, Hakala T, et al: Tumor location detected with radioactively labeled monoclonal antibody and external scintigraphy. *Science* **206**: 844-847, 1979
- 6) 山崎統四郎: モノクローナル抗腫瘍抗体による癌の画像診断. *画像診断* **2**: 677-681, 1982
- 7) 小路敏彦, 石井伸子, 長瀧重信, 他: モノクローナル抗体を利用した癌の局在診断. *癌と化学療法* **10**: 2230-2241, 1983
- 8) Herlyn D, Powe J, Alavi A, et al: Radioimmuno-detection of human tumor xenografts by monoclonal antibodies. *Cancer Res* **43**: 2731-2735, 1983
- 9) Pressman D, Sternberger LA: The relative rates of iodination of serum components and the effects of iodination on antibody activity. *J Am Chem Soc* **72**: 2226-2233, 1950
- 10) Pettit WA, Bennet SJ, DeLand FH, Goldenberg DM: Iodination and acceptance testing of antibodies. In *Tumor Imaging*. Burchiel SW, Rhodes BA, Friedman MA, eds. Masson Publishing USA, Inc., New York, 1982, pp. 99-109
- 11) Beaumier PL, Larson SM, Krohn KA, et al: Effect of iodination on in vitro p97 antigen specific binding and in vivo tumor localization using monoclonal antibody fragments. *J Nucl Med* **24**: 116, 1983 (abst)
- 12) Hirai H, Tsukada Y, Hara A, et al: Purification of specific antibody to  $\alpha$ -fetoprotein and its immunological effect on cancer cells. *J Chromatogr* **215**: 195-210, 1981
- 13) Scatchard G: The attraction of proteins for small molecules and ions. *Ann NY Acad Sci* **51**: 660-672, 1949
- 14) Berson SA, Yallow RS: Quantitative aspects of reaction between insulin and insulin-binding antibody. *J Clin Invest* **38**: 1996-2016, 1959
- 15) Okada K, Yamauchi T, Yoshida O: A study on chemotherapy of testicular tumors in nude mice; combination of CDDP and other drugs. *Proceedings of 19th International Congress of the Société Internationale d'Urologie* **190**, 1982
- 16) Yamauchi T, Okada K, Yoshida O: Chemotherapy with cis dichloroamineplatinum (II) alone and in combination against human bladder cancer xenografts in athymic nude mice. *Proceeding of 13th International Cancer Congress*, 524, 1982
- 17) Hunter WM, Greenwood FC: Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity. *Nature* **194**: 495-496, 1962
- 18) Greenwood FC, Hunter WM, Glover JS: The preparation of  $^{131}\text{I}$ -labelled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochem J* **89**: 114-123, 1963
- 19) 油野民雄, 多田 明, 窪田昭男, 他: PEG 法による AFP ラジオイムノアッセイに関する検討. *核医学* **14**: 355-359, 1977
- 20) Bale WF, Conteras MA, Grady ED: Factors influencing localization of labeled antibodies in tumors. *Cancer Res* **40**: 3036-3042, 1980
- 21) Eckelman WC, Paik CH, Reba RC: Radiolabeling of antibodies. *Cancer Res* **40**: 3036-3042, 1980
- 22) Lefkowitz JR, Roth J, Pricer W, et al: ACTH receptors in the adrenal: specific binding of ACTH- $^{125}\text{I}$  and its relation to adenyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA* **65**: 745-752, 1970
- 23) Goldfine ID, Amir SM, Peterson AW, et al: Preparation of biologically active  $^{125}\text{I}$ -TSH. *Endocrinology* **95**: 1228-1233, 1974
- 24) Gautvik KM, Svindahl K, Skretting A: Uptake and localization of  $^{131}\text{I}$ -labelled anti-calcitonin immunoglobulins in rat medullary thyroid carcinoma tissue. *Cancer* **50**: 1107-1114, 1982
- 25) Mach JP, Carrel S, Merenda C, et al: In vivo localisation of radiolabelled antibodies to carcinogen-embryonic antigen in human colonic carcinoma grafted into nude mice. *Nature* **248**: 704-706, 1974
- 26) 柳沢宗利, 三木 誠, 平井秀松: AFP 産生ヒト生殖細胞腫瘍の実験的研究. 放射性ヨード標識抗ヒト AFP 特異抗体による腫瘍イメージングについて. *日泌尿会誌* **72**: 1559-1568, 1981
- 27) Köhler G, Milstein C: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**: 495-497, 1975

## Summary

### Basic Studies on the Tumor Imaging Using Antibodies to Human $\alpha$ -Fetoprotein

Harumi SAKAHARA\*, Keigo ENDO\*, Tetsuo NAKASHIMA\*, Hitoya OHTA\*,  
Kanji TORIZUKA\*, Kenichiro OKADA\*\*, Osamu YOSHIDA\*\* and Hidematsu HIRAI\*\*\*

*\*Department of Nuclear Medicine, \*\*Department of Urology, Kyoto University School of Medicine, Kyoto*

*\*\*\*Department of Biochemistry, Hokkaido University School of Medicine, Sapporo*

Using polyclonal antibodies to human  $\alpha$ -fetoprotein (AFP), the effect of iodination on the antibody activity and tumor accumulation of radioiodinated antibodies in tumor bearing nude mice were examined.

Antibodies, obtained from horse antiserum and purified by affinity chromatography, were iodinated by the chloramine-T method and their antibody activity was evaluated using RIA and Scatchard plot analysis. When high concentrations of chloramine-T were used or more than 2.6 iodine atoms were incorporated per antibody molecule, the antigen binding capacity rather than the affinity constant was affected by the iodination. The antibody activity was completely destroyed at an iodine to antibody molar ratio of 15.4. Antibodies, however, which were iodinated under low concentrations of chloramine-T and contained less than 0.8 iodines per antibody molecule, showed

almost full retention of their antibody activity.

Nude mice transplanted with AFP producing human testicular tumor or AFP non-producing human urinary bladder tumor were administered intravenously with  $^{131}\text{I}$ -labeled antibodies to human AFP. Scintigrams were taken at 1, 2, 4 and 7 days after the injection of labeled antibodies. At day 7, nude mice were sacrificed and organs and tumor were removed, weighed and counted. In nude mice bearing testicular tumor, tumor image became gradually clear with decreasing background activity and tumor to blood ratio, obtained, was 0.82 for testicular tumor compared to 0.42 for bladder tumor. These results indicated a specific *in vivo* localization of  $^{131}\text{I}$ -labeled anti-human AFP antibodies in AFP producing tumor.

**Key words:**  $\alpha$ -fetoprotein,  $^{131}\text{I}$ -labeled antibodies, antibody activity, nude mouse, tumor imaging.