

## 《原 著》

# 癌の免疫シンチグラフィにおける高免疫活性モノクローナル抗体の有用性に関する実験的研究

—(II) 腫瘍集積性に及ぼすモノクローナルの免疫活性の影響—

横 山 邦 彦\*

**要旨** 抗体の体内動態および腫瘍集積性に対する、放射性核種標識モノクローナル抗体の免疫活性 (IR) の影響を検討する目的で、hydroxylapatite 高速液体クロマトグラフィにより分離・精製された、IR の異なる抗体 F ab 96.5 を用いて動物実験を行った。担癌ヌードマウスでの体内分布およびイメージング実験の結果から、IR のより高い抗体は、腫瘍内で長く安定に留まり、かつ血液等の非腫瘍組織から速やかに消失することが示された。それゆえに高い腫瘍対非腫瘍組織の放射能比が得られ、画像上のコントラスト向上にも大きく貢献した。この結果は診断ばかりでなく治療においても、高 IR 抗体の使用が正常組織の被曝線量を軽減させる点で有用と考えられた。さらに IR の低下によって抗体の体内分布が大きく変化し、腫瘍集積性も不良となるため、癌の免疫検出法の再現性を論ずる際、IR の検討が不可欠であると考えられた。

## I. はじめに

悪性腫瘍に対する特異性と反応性を有するモノクローナル抗体を放射性核種で標識し体内に投与する腫瘍核医学 (Nuclear Oncology) の試みは、理論的に、1) 診断特異性が高く、2) 治療への応用性があるという点において他の核医学領域と異なるユニークな利点を持つ<sup>1)</sup>。

癌抗原を認識するモノクローナル抗体を開発する際、抗原への強い親和性と癌との特異的な反応性および正常組織との低い交叉反応性等、望まれる条件を満たした抗体が臨床応用の対象となる<sup>2,3)</sup>。さらに実際に投与される段階では、その抗体の免疫活性が保持されていることが、癌の局在診断や内部照射療法の原理的な前提条件であることは明らかである<sup>4,5)</sup>。それゆえに高い免疫活性の保持が抗体の良好な腫瘍集積性に必須であると

考えられ、標識操作後ないしは投与前に、免疫活性の定量的測定による確認が一般的に行われている<sup>6-8)</sup>。

しかしながら免疫活性が低下した時、抗体の体内挙動が如何なる影響をうけるかに関して、現在までその具体的な機序は明らかにされていない。抗体の免疫活性は腫瘍と非腫瘍間の抗体分布比に影響があり、標識抗体の免疫活性が低下すると腫瘍部への集積減少と非腫瘍部への取り込み増加を生ずる。それゆえに腫瘍対非腫瘍の放射能比を高め、良好な腫瘍描画を得るためには、高免疫活性抗体の使用が重要であるとのシミュレーションによる理論的予測の報告はみられる<sup>9)</sup>。また、実験的には放射標識による免疫活性の変化が、抗体の特異的腫瘍集積の指標である Localization Index (LI) に影響するとの報告等がみられるものの<sup>10)</sup>、実際に経時的な体内動態を観察することによる、抗体免疫活性の腫瘍集積に及ぼす影響の検討は甚だ不足している。

実験モデルを用いて検討を加えるために、第一報で抗体の分離・精製法を開発し、さらに抗体の免疫活性の評価法を確立した。その結果、同一の

\* 金沢大学医学部核医学科

受付：62 年 10 月 29 日

最終稿受付：62 年 12 月 9 日

別刷請求先：金沢市宝町 13-1 (☎ 920)

金沢大学医学部核医学科

横 山 邦 彦

特異性と親和性を有するものの免疫活性のみが異なる場合、それぞれの抗体を分離し得ることが見いだされた。そこで今回担癌動物での体内分布およびイメージング実験において親和性と特異性は同一だが免疫活性の異なる2種類の抗体を用いた場合、抗体免疫活性の低下が体内動態に如何なる影響を及ぼすかを評価、検討した。

## II. 材 料

### 1. マウスモノクローナル抗体 F ab 96.5

マウスモノクローナル抗体 96.5 は、IgG<sub>2a</sub> サブクラスに属し、ヒト悪性黒色腫関連糖蛋白抗原 p97 の epitope a を認識する<sup>11)</sup>。実験には精製 IgG のパパイン消化にて得られた F ab フラグメントを使用した<sup>12)</sup>。なお今回の全ての実験では、第一報で用いたと同一ロットの Oncogen 社製 (Seattle, USA) F ab を使用した。

### 2. 放射性ヨード標識

クロラミンT法の変法を用い<sup>13)</sup>、体内分布実験用とイメージング用とに2種の比放射能の異なる<sup>125</sup>I 標識 F ab 96.5 を作成した。体内分布実験用には 1 mg の F ab 96.5 と 1 mCi の NEN 社製 Na<sup>125</sup>I を、イメージング用には 0.5 mg の F ab と 5 mCi の Na<sup>125</sup>I を混和し、おのおの 12.5  $\mu$ g のクロラミンTを添加し、室温で反応を開始した。1分後、チオ硫酸ナトリウム 43.75  $\mu$ g を加えて反応を停止し、セファデックス G-25 カラム (Column PD-10, Pharmacia 社) により、標識蛋白分画を分離した。得られた比放射能は体内分布実験用では 0.8 mCi/mg、およびイメージング用では 8 mCi/mg であった。またゲル濾過後の放射化学的純度はいずれも 97% 以上を示した。

### 3. Hydroxylapatite chromatography による <sup>125</sup>I 標識 F ab 96.5 の分離

Bio-Rad 社製 hydroxylapatite (HA) カラムおよび前処理カラムを高速液体クロマトグラフィ (HPLC) 装置に装着し、体内分布実験用およびイメージング実験用に標識した <sup>125</sup>I-F ab 96.5 を HPLC 装置にかけ、2つのピーク分画をそれぞれ第一報の方法に準じて分離・精製した。そのうち

100  $\mu$ l を蛋白濃度測定と in vitro assay に用い、残りの溶液に濃度が 1% (w/v) となるように牛血清アルブミンを加えた。1%牛血清アルブミン加 F ab 溶液を 0.22  $\mu$ m のメンブランフィルター (Millex-GV, Millipore 社) により除菌濾過し、無菌バイアルに入れて保存した。

## III. 方 法

### 1. In vitro study

体内分布実験およびイメージング実験に先立ち、標識や分離操作が正しく行われたかどうかを確認するため、用いた <sup>125</sup>I-F ab の免疫活性 (immuno-reactivity; IR) を in vitro cell binding assay (CBA) によって評価した。未分離の <sup>125</sup>I-F ab もしくは HA-HPLC で分離されたピークの一定量と細胞とを用いて第一報で述べた方法に従い CBA を行った。

### 2. In vivo study

#### 1) 腫瘍モデル

既報の in vitro study で用いたと同一のヒト由来悪性黒色腫継代株 (FEM-XII) をヌードマウスに移植し、腫瘍モデルとした。5~6 週齢 (体重 15 g 前後) の雌ヌードマウス (Balb/c, nu/nu) の右大腿外側皮下に生細胞数として  $5 \times 10^6$  個の FEM-XII を移植し、14~16 日後腫瘍結節が 0.5~1.0 g 前後に増殖した時点で実験に用いた。前実験として、この腫瘍組織切片を F ab 96.5 を用いた免疫蛍光抗体法により染色し、腫瘍結節が p97 を発現していることを確認した。

#### 2) 体内分布実験

5~8  $\mu$ g (4~6  $\mu$ Ci) の高 IR <sup>125</sup>I-F ab または低 IR <sup>125</sup>I-F ab をマウス尾静脈より投与した (体重 20 g のマウスにおける 5~8  $\mu$ g の F ab 投与は、体表面積に基づいて換算すると体重 60 kg の人間における 1.0~1.7 mg の F ab 投与に相当し、これは臨床使用の報告例でみられる一般的な投与量である<sup>14)</sup>)。6, 16, 24, 48, 72 時間後に各群 (n=5~8) のマウスを脱血解剖し、血液、腫瘍および各臓器を摘出し湿重量測定後、自動ウェル型検出器により各組織の放射能を測定した。各個体間で

の投与量のばらつきを補正するため、注射前後の注射器の重さを計り、一匹ずつ個別に総投与量を計算した。さらに尾部に残留した放射能カウントを、得られた総投与量から減じて、血液循環に投与された総カウントを算定した。解剖の時点で担癌マウス体重に14~24 gとばらつきが認められ、% injected dose/g organ (%ID/g)の計算に際しては、大きいマウスではこの値が過小評価され、逆に小さいマウスでは過大評価されると考えられた。そこで、用いたマウスの平均体重である20 gに各マウスの体重を標準化し %ID/gを算定した。

### 3) イメージング実験と体内残留放射能測定

7~10  $\mu$ g (56~80  $\mu$ Ci)の高IR  $^{125}$ I-F abまたは低IR  $^{125}$ I-F abを甲状腺ブロック用のNaIとともに尾静脈より静注した。投与後3, 8, 16, 32時間後にマウスを麻酔し背臥位に固定の後、ピンホールコリメータ装着のガンマカメラ(Picker社)でエ

ネルギーピークは50 keV、ウィンドウ幅は $\pm 50\%$ を用い撮像した。その際コリメータ先端からマウスまでの距離を測定し、常にこの距離が一定になるように設定した。

HA-HPLCより得られた2つの $^{125}$ I-F ab分画は、全身からのクリアランスに関してどのような差異を示すかを評価するために、体内残留放射能の経時的測定を行った。イメージング実験に用い

**Table 1** Percent immunoreactivity of  $^{125}$ I-F ab 96.5 before and after hydroxylapatite column chromatography

	Preparation A	Preparation B
Pre HA-HPLC	75.9	64.3
Post HA-HPLC		
Peak 1	25.5	25.3
Peak 2	81.0	70.7

Preparation A; used in the biodistribution study.

Preparation B; used in the imaging study.

**Table 2** Biodistribution of  $^{125}$ I-F ab 96.5 hydroxylapatite HPLC purified fractions in athymic mice bearing FEM-XII human melanoma xenograft

Antibody	Time	Percent injected dose per g tissue*						
		Blood	Liver	Spleen	Kidney	Muscle	Bone	Tumor
High	6 hr	1.68	0.52	0.64	10.43	0.57	0.62	2.58
		(0.60)	(0.12)	(0.11)	(4.39)	(0.23)	(0.26)	(0.14)
	16 hr	0.51	0.31	0.43	4.52	0.26	0.31	2.38#
		(0.14)	(0.12)	(0.18)	(1.59)	(0.10)	(0.19)	(0.41)
	24 hr	0.11#	0.08#	0.06#	0.67#	0.03	0.05	1.06
		(0.04)	(0.02)	(0.02)	(0.24)	(0.02)	(0.03)	(0.29)
	48 hr	0.04#	0.07	0.03†	0.22†	0.01	0.02	0.83#
		(0.01)	(0.02)	(0.02)	(0.13)	(0.00)	(0.01)	(0.04)
	72 hr	0.03#	0.05†	0.02#	0.11†	0.01	0.01	0.61#
		(0.01)	(0.01)	(0.01)	(0.04)	(0.00)	(0.01)	(0.11)
Low	6 hr	1.44	0.50	0.61	16.36	0.34	0.42	2.07
		(0.12)	(0.08)	(0.11)	(7.92)	(0.04)	(0.05)	(0.72)
	16 hr	0.60	0.30	0.55	4.87	0.22	0.36	1.45
		(0.21)	(0.09)	(0.36)	(1.73)	(0.10)	(0.25)	(0.25)
	24 hr	0.30	0.16	0.17	2.24	0.06	0.08	0.80
		(0.05)	(0.02)	(0.10)	(0.69)	(0.02)	(0.05)	(0.19)
	48 hr	0.13	0.09	0.06	0.73	0.02	0.03	0.36
		(0.02)	(0.02)	(0.01)	(0.31)	(0.00)	(0.01)	(0.04)
	72 hr	0.07	0.09	0.05	0.43	0.01	0.02	0.17
		(0.01)	(0.02)	(0.01)	(0.18)	(0.00)	(0.01)	(0.07)

High: high immunoreactive (peak 2)  $^{125}$ I-F ab 96.5

Low: low immunoreactive (peak 1)  $^{125}$ I-F ab 96.5

\*Values of mean and (standard deviation) from 5 to 8 mice at each time point in each group.

Values with significant differences; #p<0.001, †p<0.01

た各群のマウス (n=3) を撮像直後および撮像と撮像の間に、キュリーメータの中に入れて体内残留放射能を直接測定した。125I-F ab 投与直後の測定量を 100% とし、各時点での放射能の割合 (%) を、片対数グラフ上で時間に対してプロットした。

#### IV. 結 果

##### 1. In vitro CBA による免疫活性の検討

CBA によって評価した分離前および HA-HPLC 分離後の 2 つのピークの IR を Table 1 に示した。今回の検討でも第一報と同様、HA-HPLC により 2 つの抗体分画が良好に分離された。またそれぞれのピークは分離前の 125I-F ab に比べて、より低い IR (ピーク 1) ないしはより高い IR (ピーク 2) を有することが、CBA によって評価された。280 nm での吸光度による蛋白含量の相対比較では、体内分布実験用サンプルの 12.4% およびイメージング実験用サンプルの 15.6% が低 IR 抗体であり、残りの 87.6%, 84.4% がそれぞれ高 IR 抗体であった。

##### 2. 体内分布実験

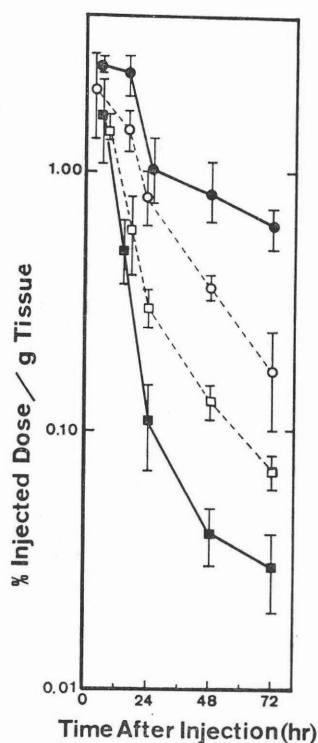
Table 2 に高 125I-F ab ならびに低 IR 125I-F ab の担癌ヌードマウスでの体内分布実験の結果を示した。投与 6 時間後での高 IR 抗体投与群の腫瘍への取り込みは低 IR 抗体投与群に比べて 25% 高く、逆に腎への取り込みは 36% 低かったが、この時点では有意差は認められなかった。しかし 16 時間後では、高 IR 抗体投与群の腫瘍集積は 2.38% ID/g と低 IR 抗体投与群の 1.45% ID/g に比べて有意に高くなり、以後 48 時間後では 2.3 倍、72 時間後では 3.6 倍と高 IR 抗体は有意に高い腫瘍集積を示した。一方腫瘍以外の組織、例えば血液、肝、脾、腎では、腫瘍でみられたと逆の傾向、すなわち 24 時間以降で高 IR 抗体群が低 IR 抗体群よりも低い取り込み傾向を呈した。そこで血液濃度の各臓器濃度に及ぼす影響を検討するため、各時間における肝臓対血液比、脾臓対血液比、腎臓対血液比および筋肉対血液比 (%ID/g/%ID/g) を高 IR 抗体群および低 IR 抗体群でそれぞれで求め、さらにそれらの値の高 IR 対低 IR 比を計算

**Table 3** Comparison of high and low immunoreactive 125I-F ab 96.5 biodistribution in organ to blood activity ratios\*

Organ to blood ratio	6 hr	16 hr	24 hr	48 hr	72 hr
Liver	0.9	1.2	1.3	2.3	1.4
Spleen	0.9	0.9	0.9	1.7	0.9
Kidney	0.5	1.1	0.8	0.9	0.7
Muscle	1.4	1.4	1.6	2.2	1.6
Tumor	1.1	1.9	3.7	6.7	9.1

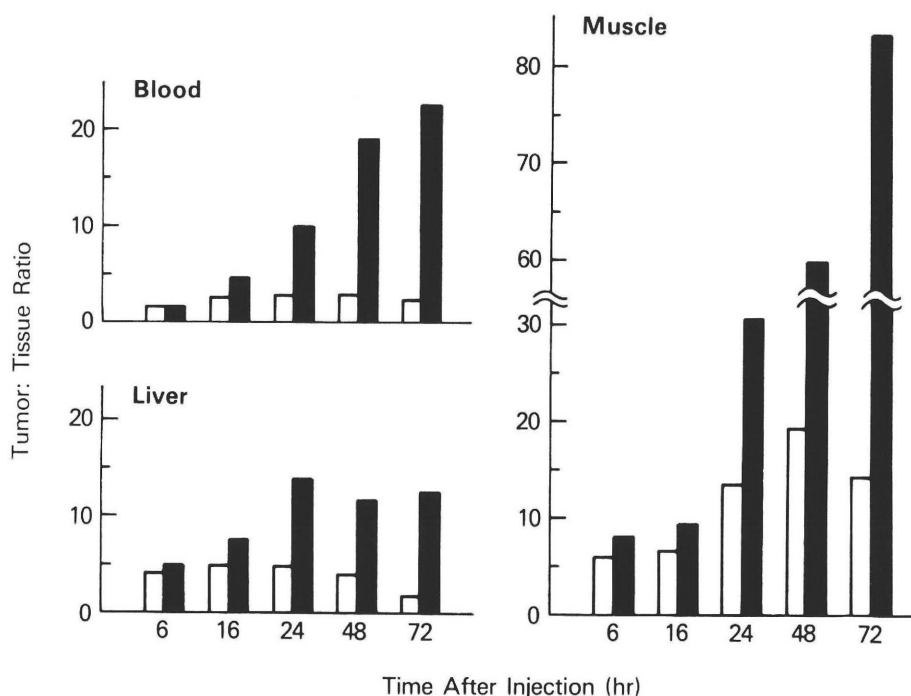
\*Values are expressed as follows;

$$\frac{\text{high immunoreactive (Organ/Blood)}}{\text{Low immunoreactive (Organ/Blood)}}$$



**Fig. 1** Tissue clearance analysis for the hydroxylapatite chromatographic peaks in nude mice bearing FEM-XII human skin melanoma xenograft. The activity concentrations are expressed as a mean and standard deviation from values of percent injected dose per g organ. The blood clearance of the high immunoreactive (IR) preparation (■) was clearly more rapid than the low IR preparation (□). On the other hand the high IR preparation (●) was retained longer in the tumor than the low IR preparation (○).



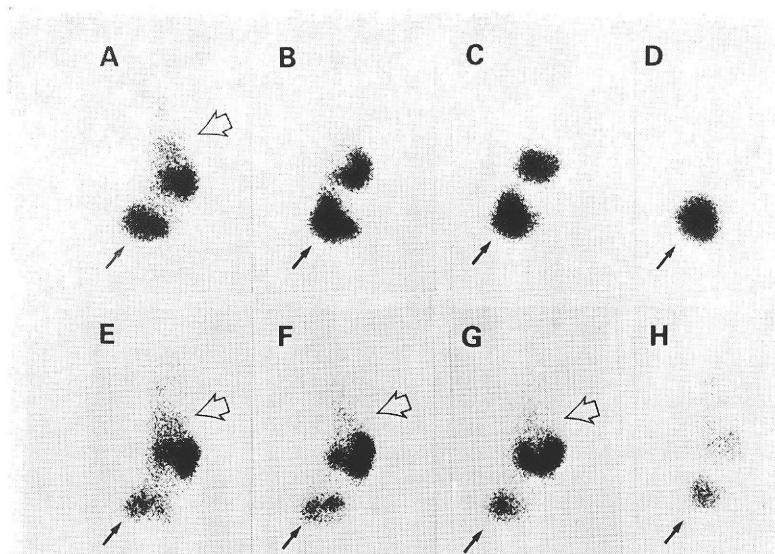


**Fig. 2** Tumor to tissue ratios for the hydroxylapatite chromatographic peaks in nude mice bearing FEM-XII human skin melanoma xenograft. Tumor to blood, tumor to muscle and tumor to liver ratios for the high immunoreactive (IR) preparation (■) increased with time whereas these ratios for the low IR preparation (□) were relatively constant. Thus, at 24 hours and later times, the ratios obtained with the high F ab 96.5 were significantly greater ( $p < 0.01$ ).

した (Table 3). この高 IR 対低 IR 比が 1 であれば, 両抗体での臓器対血液比 (例えば肝臓対血液比) が等しいことを意味するが, Table 3 に示されたごとく, 腫瘍以外の臓器の血液に対する放射能比は, 両抗体間で著しく異なるものではなかった. しかし腫瘍対血液比に関しては, この高 IR 対低 IR 比は経時的に上昇し, 非腫瘍臓器対血液比とは明らかに異なる傾向が示された.

両抗体間の放射能の消失の差異を評価するため, 非腫瘍組織として血液ならびに腫瘍の組織内濃度 (%ID/g) を片対数で, 時間 (hr) に対してプロットした (Fig. 1). 高 IR 抗体は, 腫瘍中での停滞が長く逆に血中からは腫瘍よりもはるかに速やかに減少することが示された. 一方低 IR 抗体では腫瘍と血液からの放射能の消失に明らかな差がなく, したがって高 IR 抗体と比べると, 低 IR 抗体は

相対的に腫瘍から消失するのが速く, 逆に血中に長く停滞することが見いだされた. この傾向を確認するため腫瘍と各臓器の濃度比を求めた. Fig. 2 に腫瘍対血液比 (T/B), 腫瘍対肝比 (T/L), 腫瘍対筋肉比 (T/M) の経時変化を示した. 6 時間および, 16 時間では, IR の腫瘍対臓器比に及ぼす影響は明らかではないが, 24 時間以後高 IR 抗体は T/B および T/L を低 IR 抗体に比べて著しく上昇させた. その結果 72 時間において, 高 IR 抗体の T/B ならびに T/M は 20 と 83 に達し, 低 IR 抗体に比べてそれぞれ 10 倍および 6 倍高い値となった. また T/L も, 24 時間から 72 時間で高 IR 抗体が有意の高値を示し, 24 時間で最高値を示した. 興味深い所見として低 IR 抗体の T/B および T/L は, 経時的にほとんど上昇していないことが認められた.



**Fig. 3** Sequential scintiphotos of FEM-XII melanoma bearing nude mice that received the high (A through D) or the low (E through H) immunoreactive  $^{125}\text{I}$  labeled Fab 96.5. The tumors were grafted on the right thigh indicated by the solid arrows. With the high immunoreactive preparation the tumor was clearly defined by 3 hours (A). At 8 and 16 hours, blood pool activity shown by the open arrows was not evident (B, C). Thirty two hours after injection, the tumor contained the majority of activity remaining in the animals (D). With the low immunoreactive preparation, significant tumor uptake was also observed at 3 hours (E) but this uptake was less than that found with the high immunoreactive preparation, particularly when compared to activity in other organs. Blood pool and non tumor tissue activity persisted in the low immunoreactive animal noted at 8 (F), 16 (G) and 32 hours (H).

### 3. イメージングおよび全身クリアランス

$^{125}\text{I}$ -F ab の HA-HPLC による高 IR 抗体または低 IR 抗体の投与をうけた担癌ヌードマウス群のうち、両抗体間の分布の差異が明瞭であったヌードマウスの経時的シンチグラムを Fig. 3 に示した。投与後最も早期のイメージングにおいて、すでに高 IR 抗体では大腿部の移植腫瘍の明瞭な描画が認められ、16時間後では血液プール像はほとんど消失した。さらに腫瘍以外の臓器（バックグラウンド）の放射能が、腫瘍の放射能より早く減少し、しかも腫瘍内に放射能が比較的長く留まったため、32時間後では腫瘍部と周辺の非腫瘍部とのコントラストがきわめて良好な腫瘍の描画が可能であった。一方低 IR 抗体でも3時間後より放射能の腫瘍集積が認められたものの、集積性は

上段の高 IR 抗体に比べて明らかに不良であった。また腫瘍部と非腫瘍部の放射能が同程度に減少したため、高 IR 抗体でみられたようには経時的な腫瘍描出の向上が得られなかった。以上より、体内分布実験の結果を視覚的に裏づける結果がイメージング実験でも得られた。

Figure 4 に  $^{125}\text{I}$ -F ab の HA-HPLC により得られた高 IR 抗体または低 IR 抗体を投与したヌードマウスの経時的な全身残量の推移を示した。高 IR および低 IR 抗体の全身からの排泄曲線は、わずかな差異を示すものの有意差はなく、両者とも投与後18時間で放射能の90%が体外に排泄された。

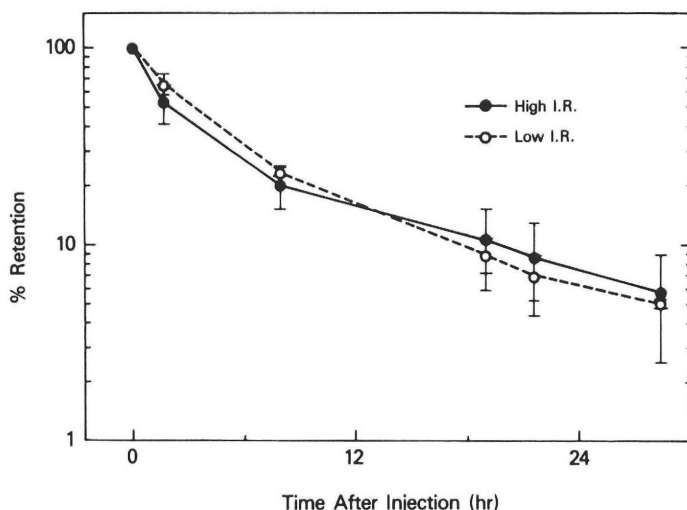
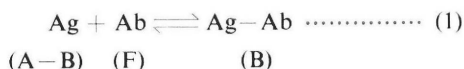


Fig. 4 Whole body clearance analysis for the hydroxylapatite chromatographic peaks in nude mice bearing FEM-XII human skin melanoma xenograft. Activity remaining in the body expressed as a percentage of the value obtained immediately after injection was plotted on a semi-logarithmic scale. Over all excretion of activity for the high IR group (●) and low IR group (○) was the same in the first 30 hours.

## V. 考 察

放射性核種で標識した癌に対するモノクローナル抗体を、診断および治療の目的で用いる場合、標識方法や分離操作ならびに保存条件が、抗体の本来有する特性を変化させる可能性がある<sup>15-18)</sup>。抗体の重要な特性の一つとして、免疫学的活性を有する抗体の割合、すなわち抗原と結合し得る抗体がサンプル中にどの程度含まれているかがあげられる。この抗原結合能を持つ抗体の比率は、immunoreactive fraction または、immunoreactivity (IR) と称される<sup>9,16,19)</sup>。

抗体の特性として、他に親和力(affinity)も無視できない重要な因子の一つである。そこで今回用いた実験系での親和力の体内分布に対する影響を、簡単なモデルを想定し試算してみた。標識抗体が腫瘍組織において熱力学平衡に達した時点では、



のごとく質量作用の法則が適用できる。ここで A

は局所の抗原の総量、B は結合量、F は間質液中の遊離の抗体量であり、おのおのは濃度の単位 (M) を持つとすれば、親和定数  $K_a$  ( $M^{-1}$ ) を用いて (1) 式は、

$$\frac{B}{(A-B)F} = K_a$$

$$\frac{B}{F} = K_a(A-B) \quad (2)$$

と書き表わすことができる。B/F が変化すれば腫瘍対非腫瘍比等の体内分布に影響を及ぼすことになる。ここで腫瘍組織における抗原の総量 (A) と結合に与かった量 (B) を比較すると、A に比べて B はきわめて少ないもの ( $A \gg B$ ) と考えられるので (2) 式は最終的に

$$\frac{B}{F} = K_a \times A \quad (3)$$

とすることができる<sup>20)</sup>。そこで第一報で得られたデータをもとに、FEM-XII (ヒト悪性黒色腫) 結節における抗原量と、投与された F ab 96.5 の親和定数を、(3) 式に実際にあてはめてみた。Scat-

chard plot の x 切片よりアッセイに用いた抗原の濃度は 700 pM であり、インキュベーションは 200  $\mu$ l で行っているため、反応液中の抗原量は  $1.4 \times 10^{-13}$  M となる。実測した FEM-XII 細胞の容積は  $4.45 \times 10^{-3}$  ml/ $10^6$  cells であり、アッセイに用いた  $0.5 \times 10^6$  個の細胞が占める容積中にこの抗原が分布したと仮定すると（実際は膜表面であるが）、FEM-XII 腫瘍結節における抗原濃度は  $6.3 \times 10^{-8}$  (M) とみなすことができる。この値および第一報で求められた Fab 96.5 の  $K_a$  値;  $3.43 \times 10^9$  とを (3) 式に代入すると、

$$\frac{B}{F} = 3.43 \times 10^9 \times 6.3 \times 10^{-8} = 216$$

となる。この実験系では、immunoreactive fraction または immunoreactivity が 100% ならば、抗原濃度と親和力の関係からほぼ 100% の抗体が腫瘍の抗原に結合するといえる。さらに親和力が仮に 1/10 に低下したとしても、その結果生じた抗体の結合率の低下はわずかに 4% にすぎないことになる。したがって今回用いた実験系においては、親和力は体内分布にほとんど影響を与えないと推測された。

$^{125}\text{I}$ -F ab 投与後早い時期 (6 および 16 時間後) では、高 IR 抗体と低 IR 抗体の体内分布に著明な差異は認められなかった。ところが時間経過とともに高 IR 抗体は低 IR 抗体よりも速やかに血中から減少した。逆に高 IR 抗体の腫瘍内放射能は、遅い時間 (48 および 72 時間後) で低 IR 抗体よりも有意に高い結果を示した。さらに他の正常組織においても血液での放射能推移と同じ傾向がみられ、24 時間以後で肝、脾、腎への高 IR 抗体集積は低 IR 抗体集積よりも低い結果が得られた。しかしこの腫瘍以外の組織における両抗体の挙動の違いは、血液濃度の差による二次的な影響と考えられる。なぜならば各時点における臓器濃度を血液濃度で除し、臓器対血液比 (例: 肝/血液比; %ID/g/%ID/g) で両抗体を比較すると、両者の値はほぼ等しく、したがって血液濃度の違いに基づく見かけ上の差であることが確認できたからである。一方腫瘍対血液比の場合、経時的に両者の差は大きくなり、72 時間後では高 IR 抗体は低 IR

抗体の 9 倍に達した。ここで注目されるべき所見として、これらの体内分布の差は全身からの排泄の差に基づくものではないことである。さらに全身からの排泄曲線は両抗体で一致するため、体内での代謝速度は等しいことを意味し、したがって IR の変化は代謝と無関係であると考えられる。一方腫瘍では、血液や他の腫瘍以外の組織と異なり、IR の高い抗体ほど腫瘍に長く留まると考えられる。

それゆえに IR は体内で腫瘍血液間の抗体の分配を変化させ、ひき続き各正常組織濃度に影響を及ぼすことが示唆される。以上より体重 20 g のマウスにおける 0.5~1.0 g の腫瘍モデルでは、IR の高い抗体を用いれば、より高い腫瘍への分布と低い血液への分布が生じ、二次的に各臓器濃度は低下すると考えられる。

IR の影響は、実際の画像にはコントラストの変化として反映される。IR の低下により腫瘍対非腫瘍 (T/NT) の放射能比の低下が生ずるため、画像上 T/NT のコントラストの低下を招くことになる。しかもこの T/NT の放射能比が実験中変化せずむしろ一定した値を示したため、経時的な T/NT のコントラストの向上も期待できない結果となった。一方高 IR 抗体を使用することの利点は、各時間で T/NT のコントラストが高いことであり、かつ経時的にコントラストが増加することである。

動物実験の結果は、理論モデルを用いた予測結果とおおむね一致した<sup>9)</sup>。しかしながら IR の変化が腫瘍ならびに正常臓器の放射能の消失速度にも影響を及ぼすことは、従来報告されておらず今回の検討ではじめて見いだされた。すなわち IR の低下により腫瘍からの放射能消失が促進されるとともに、正常組織 (バックグラウンド) からの放射能消失がより遅延することになる。そのため低 IR 抗体に比べて高 IR 抗体は経時的な T/NT コントラストの改善、および向上にきわめて有利な結果を示すこととなった。

以上今回行った検討により、抗体の IR が体内分布に与える影響が明らかとなり、特に腫瘍と非

腫瘍組織間の抗体分布に大きく関係していることが判明した。この結果は IR によって、癌の免疫イメージングの検出能が左右されることを示唆しており、したがって癌イメージングの再現性を論ずる際、IR の検討は不可欠であると考えられる。また IR の高い抗体を用いることで、次のような利点が考えられる。第一に、一定の良好なコントラストがより早く達成される結果、早期のイメージングが可能となる。これは短半減期核種を標識に用いる際、高 IR 抗体の使用が必須であることを意味する。第二に、腫瘍対非腫瘍比が向上する結果、より小さな病巣の検出の可能性がもたらされる<sup>21,22)</sup>。さらに第三には、治療面で腫瘍以外の正常組織への被曝線量をより減少させることが可能となることであろう。

## VI. 結 論

1. 高 IR 抗体は腫瘍には長く留まり、血液等の正常組織からは速やかに減少するため、高い腫瘍対非腫瘍比が得られた。
2. 用いた実験系では全身からの放射能の消失と IR は無関係であったため、IR は全身における代謝や排泄には影響しないと考えられた。
3. 全身からの排泄は変わらなかったため、IR は体内での抗体分布を変化させるものと思われた。すなわち腫瘍と血液間において、高 IR 抗体は高い腫瘍集積と低い血液分布を生じ、さらに各正常組織への分布を低下させた。
4. IR の違いによって抗体の体内分布が大きく変化することは、癌の免疫検出法の再現性にとって IR の検討が不可欠であることを示した。
5. 高 IR 抗体の使用は、コントラストの良好な画像診断を可能にするばかりでなく、治療においても正常組織の被曝量を軽減させる点で必須と考えられた。

謝辞：本研究にあたり懇切なるご指導を賜りました久田欣一教授に慎んで深謝いたします。また直接のご助言、ご校閲を頂いた油野民雄講師ならびにご協力を頂いた教室員各位に厚く御礼申し上げます。さらに本稿作製にあ

たりご助力を頂きました細川栄美子氏にも謝意を表します。

## 文 献

- 1) Larson SM, Carrasquillo JA, Reynolds JC, Hellström I, Hellström KE: Nuclear Medicine in Clinical Oncology, Winkler C, eds, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1986, p. 187
- 2) Larson SM: Radiolabeled monoclonal anti-tumor antibodies in diagnosis and therapy. *J Nucl Med* **26**: 538-545, 1986
- 3) DeLand FH, Goldenberg DM: Radioimmunoimaging and Radioimmunotherapy, Burchiel SW, Rhodes BA, eds, Elsevier, New York, 1983, p. 330
- 4) 伊藤和夫, 西 信三, 秦 温信: 癌の放射免疫検出法. *日本臨床* **11**: 729-742, 1986
- 5) DeLardo SJ, DeNardo GL, Peng JS, Colcher D: Radioimmunoimaging and Radioimmunotherapy, Burchiel SW, Rhodes BA, eds, Elsevier, New York, 1983, p. 411
- 6) Beaumier PL, Neuzil D, Yang HM, et al: Immuno-reactivity assay for labeled anti-melanoma monoclonal antibodies. *J Nucl Med* **27**: 824-828, 1986
- 7) Sakahara H, Endo K, Nakashima T, et al: Localization of human osteogenic sarcoma xenografts in nude mice by a monoclonal antibody labeled with radioiodine and Indium-111. *J Nucl Med* **28**: 342-348, 1987
- 8) Carrasquillo JA, Bunn PA, Keenan AM, et al: Radioimmunodetection of cutaneous T-cell lymphoma with <sup>111</sup>In-labeled T101 monoclonal antibody. *N Engl J Med* **315**: 673-680, 1986
- 9) Larson SM: A tentative biological model for the localization of radiolabelled antibody in tumor: the importance of immunoreactivity. *Nucl Med Biol* **13**: 393-399, 1986
- 10) Beaumier PL, Krohn KA, Carrasquillo JA, et al: Melanoma localization in nude mice with monoclonal Fab against p97. *J Nucl Med* **26**: 1172-1179, 1985
- 11) Brown JP, Nishiyama K, Hellström I, et al: Structural characterization of human melanoma-associated antigen p97 with monoclonal antibodies. *J Immunol* **127**: 539-546, 1981
- 12) Brown JP, Woodbury RG, Hart CE, et al: Quantitative analysis of melanoma-associated antigen p97 in normal and neoplastic tissues. *Proc Natl Acad Sci* **78**: 539-543, 1981
- 13) Ferens JM, Krohn KA, Beaumier PL, et al: High-level iodination of monoclonal antibody fragments for radiotherapy. *J Nucl Med* **25**: 367-370, 1984
- 14) Keenan AM, Harbert JC, Larson SM: Monoclonal

- antibodies in nuclear medicine. *J Nucl Med* **26**: 531-537, 1985
- 15) Matzku S, Kirchgessner H, Nissen M: Iodination of monoclonal IgG antibodies at a sub-stoichiometric level: immunoreactivity changes related to the site of iodine incorporation. *Nucl Med Biol* **14**: 451-457, 1987
  - 16) Matzku S, Kirchgessner H, Dippold W, et al: Immunoreactivity of monoclonal anti-melanoma antibodies in relation to the amount of radioactive iodine substituted to the antibody molecule. *Eur J Nucl Med* **11**: 260-264, 1985
  - 17) Douillard JY, Chatal JF, Saccavini JC, et al: Pharmacokinetic study of radiolabeled anti-colorectal carcinoma monoclonal antibodies in tumor-bearing nude mice. *Eur J Nucl Med* **11**: 107-113, 1985
  - 18) Soha GB: Radioimmunoimaging and Radioimmunotherapy, Burchiel SW, Rhodes BA, eds, Elsevier, New York, 1983, pp. 177-178
  - 19) Lindmo T, Boven E, Cuttitta F, et al: Determination of the Immunoreactive fraction of radiolabeled monoclonal antibodies by linear extrapolation to binding at infinite antigen excess. *J Immunol Methods* **72**: 77-89, 1984
  - 20) Larson SM, Carrasquillo JA: 1985 Year Book of Nuclear Medicine, Hoffer PB, ed, Year Book Medical Publishers, Chicago, 1985, p. 18
  - 21) Rockoff SD, Goodenough DJ, McIntire KR: Theoretical limitations in the immunodiagnostic imaging of cancer with computed tomography and nuclear scanning. *Cancer Res* **40**: 3054-3058, 1980
  - 22) 中嶋憲一, 久田欣一, 飯田泰治, 他: Single photon emission CT による陽性小病変の検出能: ファントムおよびシミュレーション実験による検討. *核医学* **24**: 397-405, 1987

## Summary

### Advantage of Highly Immunoreactive Monoclonal Antibodies in Radioimmunoscinigraphy for Tumor Detection: (II) Effect of Immunoreactivity on Biodistribution of Monoclonal Antibodies

Kunihiko YOKOYAMA

*Department of Nuclear Medicine, Kanazawa University School of Medicine*

There is theoretically a potential benefit in using a highly immunoreactive monoclonal antibody. The effect of immunoreactivity (IR) on the antibody biodistribution, however, has not yet been described in detail. Thus, this study was designed to investigate the effect of IR on the biodistribution in an animal model. The hydroxylapatite high performance liquid chromatography (HA-HPLC) system has been tested and confirmed to separate the F ab 96.5, an anti melanoma p97 antigen, into high and low IR fractions.  $^{125}\text{I}$ -F ab 96.5 preparations with a different IR were administered to groups of nude mice bearing FEM-XII human skin melanoma xenografts for biodistribution and imaging studies. The biodistribution data showed that the high IR antibody improved tumor targeting by increasing activity ratios of tumor to non tumor tissue; the mechanism for the increased tumor to non tumor ratios was increased tumor activity uptake and prolonged tumor activity retention with associated rapid clearance from the blood and non tumor sites. The imaging study visually

supported the results obtained in the biodistribution study; the high IR antibody demonstrated better and earlier tumor delineation and the tumor to non tumor contrast continued to improve with time. In this model system, where the whole body clearance rate was the same for the high IR and low IR preparations, the overall antibody metabolism and excretion were not significantly dependent on IR. Therefore, the effect of IR is to alter the distribution of antibody between tumor and blood, with high IR having increased tumor activity and reduced blood activity (consequently reduced non tumor organ activity). This would also be beneficial for therapeutic use of radiolabeled antibodies, since high IR antibodies can minimize undesirable radiation exposure to normal organs. In conclusion, high IR antibodies are essential for optimal tumor targeting.

**Key words:** Radioimmunoscinigraphy, Immunoreactivity, Pharmacokinetics, Tumor targeting, F ab 96.5.