

〈原 著〉

In-111 標識モノクローナル抗体の肝細胞内放射能分布に関する検討

絹谷 清剛* 横山 邦彦* 渡辺 直人* 嬉野 孝子*
油野 民雄* 利波 紀久* 久田 欣一*

要旨 In-111 標識モノクローナル抗体 (In-111 MoAb) による radioimmunoscintigraphy の問題点である肝放射能持続の機序解明を目的に、In-111 MoAb の肝細胞内放射能分布について検討を試みた。In-111 MoAb (抗メラノーマ抗体 225.28S, IgG_{2a}) 40 μCi / 10 μg をラットに投与後経時的に肝組織をホモジネートし 3 段階の遠心操作を行った。肝細胞内放射能は、早期には主に上清分画に存在したが (61%, 3 hr), この分画の放射能は経時に減少し (21%, 72 hr), 代ってリソゾームを含むミトコンドリア分画への放射能の増加が認められた (11% → 44%)。一方、核分画、ミクロゾーム分画はどの時間においてもほぼ一定であった。I-125 MoAb でも同様の検討を行ったが、このような変化は認められず常に一定の分布を示した。

以上より、In-111 MoAb が肝細胞に摂取されたのちに、In-111 がリソゾームに貯留することが、肝放射能持続の原因と考えられた。

I. 緒 言

癌組織に対して特異性の高いモノクローナル抗体 (MoAb) を用いた癌の診断 (radioimmunoscintigraphy, RIS) や、治療 (radioimmunotherapy, RIT) が試みられるようになり、その有用性が期待されている。標識方法が確立されていること、RIS のみならず RIT にも応用しうることから、従来より I-131 が多く用いられてきたが^{1,2)}、欠点として 364 keV のエネルギーがガンマカメラによるイメージングに望ましくないこと、体内での脱ヨード化現象が指摘されてきた^{3,4)}。そこで最近は、bifunctional chelate 剤を用いた RI 標識法の発達⁵⁾により、In-111 等の金属性核種が好んで使用されつつある⁶⁾。キレート剤として DTPA (diethylenetriaminepentaacetic acid) を用いる標識法が主流

であり、DTPA 結合 MoAb を作製しておけば In-111 chloride を混合するのみで標識が完了するため、簡便でかつ無菌操作が容易な DTPA 結合 MoAb のキット化が可能である。さらに、In-111 の利点としてガンマカメラによる検出に望ましいエネルギー (171 keV, 245 keV) である上、β線による被曝がないことが上げられる^{3,4)}。またヨード標識抗体に比べ、In-111 と抗体の結合は体内でもより安定である^{4,7)}。しかし、In-111 MoAb は、動物実験の結果から予測されたように肝摂取が高いため、肝内病巣および肝周囲の腹部病巣の検出が困難であることが問題点として指摘されるようになってきた^{8,9)}。そこで筆者らは、この In-111 MoAb の肝内摂取機序の解明が肝放射能減少のための緒になるのではないかと考え、In-111 MoAb の肝細胞内放射能分布、さらに細胞内での In-111 の存在様式について検討を試みた。

II. 材料および方法

1) 抗体および放射性核種による標識

用いた MoAb は、マウス IgG_{2a} であり、分子

* 金沢大学医学部核医学科

受付：63年10月18日

最終稿受付：63年12月8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

絹 谷 清 剛

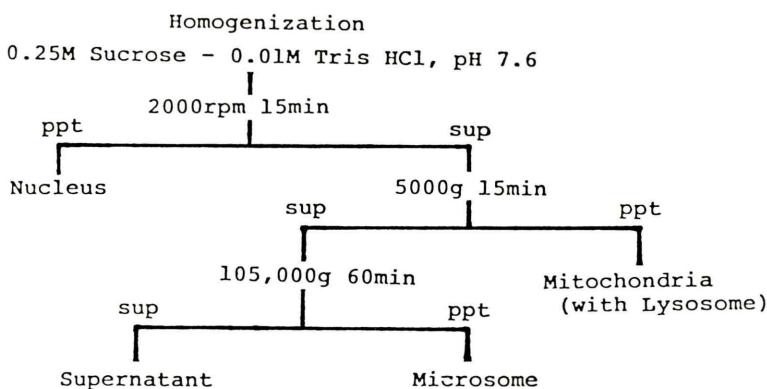


Fig. 1 Preparation of subcellular fractions.

量24万の悪性黒色腫関連糖蛋白抗原(gp240)を認識する抗ヒトメラノーマ抗体225.28Sである¹⁰。

DTPA結合225.28Sは、mixed anhydride DTPA法により作製されたものである(ZME-018®, 米国ハイブリテック社製)。放射標識は、塩化インジウム(In-111)(日本メジフィジックス社製)と混合したのち、室温で30分間インキュベートすることで終了する。In-111標識後、シリカゲル薄層クロマトグラフィ(10% ギ酸アンモニウム:メタノール:0.5 M クエン酸=2:2:1, pH 2.2)では、84.7%の標識率を示し、遊離のIn-111は認めなかった。また、ペーパークロマトグラフィ(0.15 M 塩化ナトリウム)で検討した結果、水酸化インジウム(コロイド)の形成は認められなかった。

2) 動物実験

In-111 225.28S 40 μCi/10 μgを200–250 gの雄SDラット尾静脈より静注し、3, 8, 17, 24, 48, 72時間後に屠殺した。血液、肝の湿重量および放射能を測定し、全投与量に対する各臓器1 g当たりの放射能の割合(%ID/g)を求めた。

同時に肝の一部にその重量の10倍量の0.25 Mショ糖加0.01 M トリス塩酸緩衝液(pH 7.4)を加えて、肝組織をホモジネートしたのち、3段階(2,000 rpm × 15 min, 5,000 g × 15 min, 105,000 g × 60 min)の遠心操作を行った。遠心操作により順に核分画、リソゾームを含むミトコンドリア分画、ミクロゾーム分画、上清分画に分離しておのおのの分画の放射能を測定した(Fig. 1)¹¹。

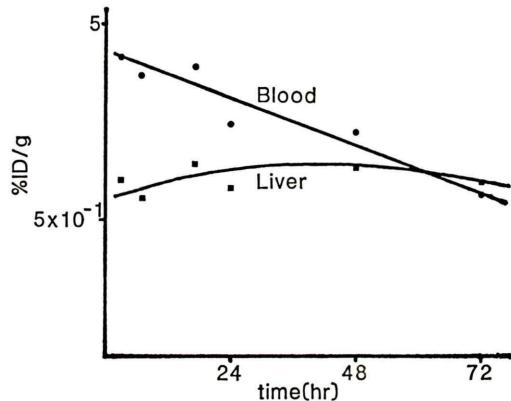


Fig. 2 Clearance of blood (●) and liver (■) with In-111 labeled monoclonal antibody 225.28S. The data in this figure were expressed as the mean values of 4–7 rats at each time point.

さらに細胞内での放射能の存在様式を検討するために上清分画をゲル滌過高速液体クロマトグラフィー(GF-HPLC)により分析した。上清100 μlをTSKgel G3000SWXL(トーソ社製)装着HPLC(島津社製)に添加し、0.1 M リン酸緩衝液(pH 7.4)を用い室温で1 ml/minの流速で溶出した。溶出された放射能を測定し、クロマトグラムを得た。

3) ヨード標識抗体との比較

In-111 MoAbとヨード標識MoAbの肝細胞内放射能分布および放射能存在様式の相違を比較するために、同じMoAbをクロラミンT法でI-125標識し、1), 2)とほぼ同様の検討を行った。

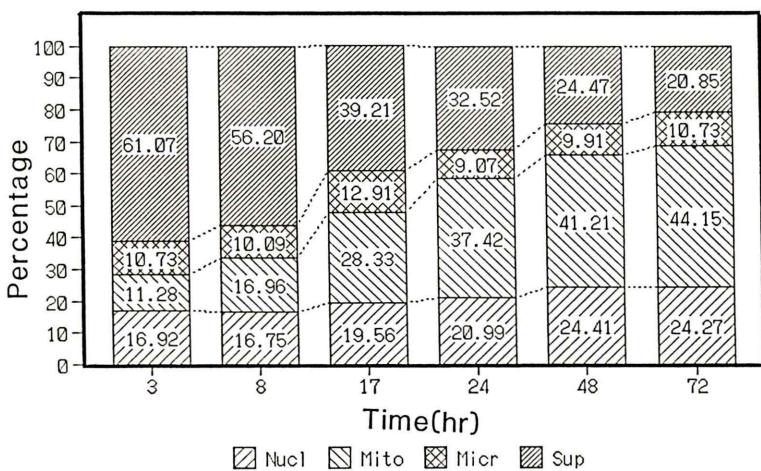


Fig. 3 Subcellular distribution of In-111 labeled monoclonal antibody 225.28S. Mean values of 4-7 rats.

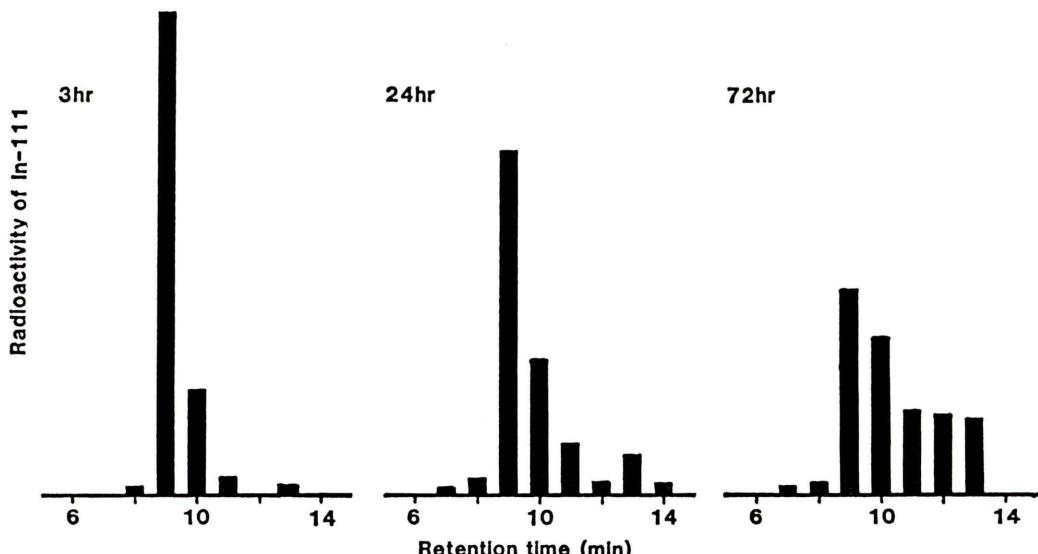


Fig. 4 High performance liquid chromatography for the supernatants with In-111 labeled monoclonal antibody 225.28S.

III. 結 果

Figure 2 に、In-111 MoAb 投与後の血液および肝の経時的放射能推移を示した。In-111 MoAb 投与後24時間まで肝放射能は経時に上昇し、24時間後に約 1%ID/g に達したのち、ほぼ一定の数値を示した。一方、血液の放射能は経時に減少した。

細胞分画法により求めた肝細胞内放射能の経時的な分布を、Fig. 3 に示した。投与後 3-8 時間の早期では放射能は主に上清分画に認められた。8 時間以降では、この分画の放射能は経時に減少し、代ってリゾームを含むミトコンドリア分画の放射能が経時に増加した。一方、核分画、ミクロゾーム分画の放射能に経時の変動はほとんど見られず、ほぼ一定の分布を示した。この傾向は、

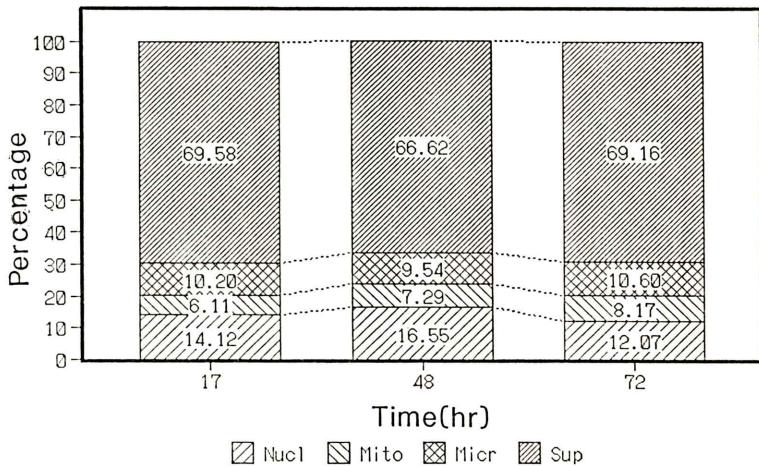


Fig. 5 Subcellular distribution of I-125 labeled monoclonal antibody 225.28S. Mean values of 3-4 rats.

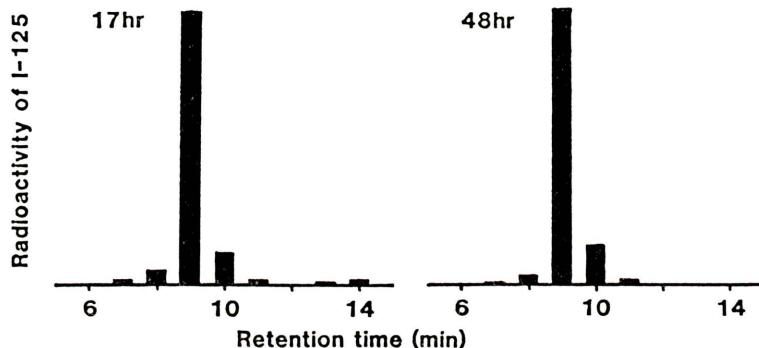


Fig. 6 High performance liquid chromatography for the supernatants with I-125 monoclonal antibody 225.28S.

臓器分布における肝摂取がほぼ一定になった24時間後も持続した。

上清中の放射能を GF-HPLC により分析した結果を Fig. 4 に示した。投与 3 時間後では、放射能の大部分が保持時間 9 分の IgG に相当する分子量分画に溶出された。この分画の放射能は経時に減少し、投与後 24, 72 時間の遅い時期では、IgG より小分子量の分画への移行が認められた。

I-125 MoAb の場合では、肝放射能は比較的早期には In-111 MoAb と同程度 ($6.40 \times 10^{-1} \%ID/g$, 17 hr) であるが、In-111 MoAb と異なり経時に減少する傾向を示した ($3.86 \times 10^{-1} \%ID/g$, 48 hr)。

肝細胞内放射能はどの時間においても主に上清分画に認められ、In-111 MoAb の場合と異なり放射能分布の経時的变化は認められなかった (Fig. 5)。さらに上清の GF-HPLC による検討では、どの時間でも主に IgG 分画に放射能が存在し、小分子量分画への放射能の移行は認められなかった (Fig. 6)。

IV. 討論

RIS は、悪性腫瘍を検出する存在診断法であるばかりでなく、癌組織に特異性の高い MoAb を用いるために、病変部の性状評価可能な質的診断

法でもありうるという利点を持っている。しかし、RIS で示される画像は必ずしも腫瘍関連抗原あるいは抗体の分布を反映しているのではなく、あくまで放射能の分布を反映したものであることを同時に留意する必要がある。

RIS 目的の標識核種としては、In-111 が用いられることが近年多くなってきたが、In-111 MoAb の場合、肝への高い集積のために肝内や肝周囲の病巣の検出に困難であることが問題点として指摘されている^{8,9)}。In-111 MoAb が、肝のみならず脾、骨髄へも多く分布するため、Kupffer 細胞等の網内系細胞の関与が従来考えられていたが、現在では主に肝実質細胞の関与によるものであると考えられている^{9,12)}。今回の検討でも、In-111 MoAb 注射液中にコロイド形成は認められず、さらに、肝摂取がコロイドの網内系での捕捉に由来するものであるとすれば、MoAb 投与後肝放射能は速やかにピークに達するはずであるが、実際には投与24時間後頃まで漸増する傾向が認められたことから、網内系による捕捉が主たる肝摂取の機序とは考えがたい。しかし、In-111 MoAb の肝摂取が主に肝実質細胞に由来するものであることが示されているものの、肝実質細胞のどの部位にどのような形で In-111 が存在するかを検討した報告は見られていない。In-111 chloride を用いて今回われわれが行ったと同様に放射能の細胞内分布を検討した場合には、われわれの得た In-111 MoAb での結果と全く同様に、肝細胞内放射能は上清分画からリゾーム分画へ移行するとの報告がある¹³⁾。In-111 chloride を静脈内投与した場合、In-111 は体内で速やかに transferrin と結合し In-111 transferrin となることが知られている¹⁴⁾。In-111 transferrin は transferrin receptor を介して肝に摂取されたのち、In-111 の解離が生じる。解離した In-111 は、リゾームに取り込まれそのままの状態を保ち続ける結果、高い肝放射能持続状態を示すことになるものと思われる^{13,15)}。もしも In-111 MoAb が体内で In-111 DTPA の形に分解するのなら、速やかに腎から排泄され、問題となる肝摂取はもっと低くなるであろう。故に、

今回われわれの示した In-111 MoAb での結果は、In-111 DTPA が生じた可能性はきわめて低く、遊離の In-111 が生じたことを示唆するものである。すなわち、In-111 MoAb はいったん肝細胞に取り込まれると In-111 が DTPA から解離し遊離の In-111 となりリゾーム内に貯留され、In-111 chloride の場合と同様に肝放射能持続の一因となっているものと考えられる。このことは、RIS の場合、抗原あるいは抗体を直接とらえているのではなく、体内放射能分布から間接的に抗原あるいは抗体の分布をとらえる RIS の限界を示しているものと言えよう。In-111 DTPA MoAb の高い肝摂取の問題は、In-111 の DTPA からの解離、すなわち In-111 DTPA MoAb の in vivo での不安定性に起因すると考えられる。in vitro では In-111 の DTPA への強い結合性は保持されるものの¹⁶⁾、なんらかの原因で in vivo ではその結合を保持できないものと考えられる。

一方ヨード標識抗体の場合、肝に摂取されても比較的速やかに放射能が消失するのは、肝細胞に摂取されても脱ヨード化によって遊離したヨードが細胞外に放出されてしまうことによると考えられる⁸⁾。I-125 MoAb で得られた肝細胞内放射能分布に経時的变化が認められなかったことは、遊離したヨードの貯留の場が肝細胞内に存在しないため、速やかに細胞外に放出されてしまうことを示唆していると思われる。

上清の GF-HPLC による分析で、In-111 MoAb 投与 24 時間後の遅い時期に IgG 分画から小分子量分画への放射能の移行が認められたが、これは、抗体結合 DTPA キレート部位から他の小分子量物質への放射能の移行 (transcomplexation)、あるいは代謝された In-111 MoAb の分解産物に由来するものであろうと推測される。この点に関しては、今後の検討課題として解明が必要であろう。

I-125 MoAb で IgG 分画から小分子量分画への放射能の移行現象が見られないのは、脱ヨード化によって生じた遊離ヨードが細胞外へ放出されるためかもしれないが、In-111 MoAb と I-125 MoAb では経時的な肝細胞分布の差異のみなら

ず、肝細胞内での存在形態も異なることが関与しているためとも思われる。

最後に In-111 MoAb 投与時に問題となる肝摂取を低減させる方法としては、今回の検討結果にもとづくと、以下の方法が考えうる。1) DTPA より結合の強いキレート剤を用いる¹⁷⁾。2) DTPA と MoAb の間での解離を促し、In-111 DTPA として腎からの排泄を促進する¹⁸⁾。3) なんらかの薬剤を前もって投与することにより、In-111 の貯留を防ぐか、または肝に取り込まれた In-111 の放出を促す。4) 静脈以外のルートから投与する¹⁹⁾。これらのうち、1), 2), 4) はすでにいくつかの施設で試みられているが、肝放射能を十分軽減するにはいたっていないようである。肝摂取機序の解明に従い、新たな肝摂取軽減法が得られることが期待される。

V. まとめ

In-111 MoAb の肝摂取に関して、肝細胞内分画における In-111 放射能の存在部位の検討を行った。In-111 MoAb は肝細胞に摂取されたのち、DTPA から解離した In-111 がリソゾームに取り込まれてそのままの状態を保ち続けることが、In-111 MoAb によるイメージ上の高い肝放射能持続状態に強く関与しているものと思われた。

本研究の一部は、昭和63年度厚生省がん研究助成金(松沢班 62-17)の補助によった。また、モノクローナル抗体を提供してくださった帝人株式会社および塩化インジウムを提供してくださった日本メジフィジックス社に謝意を表します。

文献

- 1) Ballou B, Levine G, Hakala TR, et al: Tumor location detected with radioactively labeled monoclonal antibody and external scintigraphy. *Science* **206**: 844-846, 1979
- 2) Mach JP, Buchegger F, Forni M, et al: Use of radiolabelled monoclonal anti-CEA antibodies for the detection of human carcinomas by external photoscanning and tomoscintigraphy. *Immunol Today* **2**: 239-249, 1981
- 3) Carrasquillo JA, Mulshine JL, Bunn Jr PA, et al: Indium-111 T101 monoclonal antibody is superior to iodine-131 T101 in imaging of cutaneous T-cell lymphoma. *J Nucl Med* **28**: 281-287, 1987
- 4) Halpern SE, Hagen PL, Garver PR, et al: Stability, characterization, and kinetics of ¹¹¹In-labeled monoclonal antibodies in normal animals and nude mouse-human tumor models. *Cancer Res* **43**: 5347-5355, 1983
- 5) Hnatowich DJ, Layne WW, Childs RL, et al: Radioactive labeling of antibody: a simple and efficient method. *Science* **220**: 613-615, 1983
- 6) Abdel-Nabi HH, Schwartz AN, Higano CS, et al: Colorectal carcinoma: Detection with indium-111 anticarcinoembryonic-antigen monoclonal antibody ZCE-025. *Radiology* **164**: 617-621, 1987
- 7) Hnatowich DJ, Griffin TW, Kosciuczyk C, et al: Pharmacokinetics of an indium-111-labeled monoclonal antibody in cancer patients. *J Nucl Med* **26**: 849-858, 1985
- 8) Perkins AC, Pimm MV: Differences in tumour and normal tissue concentrations of iodine- and indium-labelled monoclonal antibody. I. The effect on image contrast in clinical studies. *Eur J Nucl Med* **11**: 295-299, 1985
- 9) Sands H, Jones PL: Methods for the study of the metabolism of radiolabeled monoclonal antibodies by liver and tumor. *J Nucl Med* **28**: 390-398, 1987
- 10) Wilson BS, Imai K, Natali PG, et al: Distribution and molecular characterization of a cell-surface and a cytoplasmic antigen detectable in human melanoma cells with monoclonal antibodies. *Int J Cancer* **28**: 293-300, 1981
- 11) Ando A, Ando I, Takeshita M, et al: Subcellular distribution of Gallium-67 in tumor and liver. *Int J Nucl Med Biol* **9**: 65-69, 1982
- 12) Sancho J, Gonzalez E, Escanero JF, et al: Binding kinetics of monomeric and aggregated IgG to Kupffer cells and hepatocytes of mice. *Immunology* **53**: 283-289, 1984
- 13) Ando A, Ando I, Takeshita M, et al: Subcellular distribution of ¹¹¹In and ¹⁶⁹Yb in tumor and liver. *Eur J Nucl Med* **6**: 221-226, 1981
- 14) Hosain F, McIntyre PA, Poulose K, et al: Binding of trace amounts of ionic indium-113m to plasma transferrin. *Clin Chim Acta* **24**: 69-75, 1969
- 15) Ando A, Ando I, Hiraki T, et al: Mechanism of tumor and liver concentration of ¹¹¹In and ¹⁶⁹Yb: ¹¹¹In and ¹⁶⁹Yb binding substances in tumor tissue and liver. *Eur J Nucl Med* **7**: 298-303, 1982
- 16) Hnatowich DJ, Childs RL, Lanteigne D, et al: The preparation of DTPA-coupled antibodies radio-labeled with metallic radionuclides: An improved method. *J Imm Method* **65**: 145-157, 1983
- 17) Cole WC, DeNardo SJ, Meares CF, et al: Com-

- parative serum stability of radiochelates for antibody radiopharmaceuticals. *J Nucl Med* **28**: 83-90, 1987
- 18) Yokoyama K, Paik CH, Quadri SM, et al: Amplification of antibody tumor targeting by chemical modification with ester bond. *J Nucl Med* **28**: 572, 1987
- 19) Keenan AM, Weinstein JN, Mulshine JL, et al: Immunolymphoscintigraphy in patients with lymphoma after subcutaneous injection of indium-111-labeled T101 monoclonal antibody. *J Nucl Med* **28**: 42-46, 1987

Summary

Subcellular Kinetics of In-111 Monoclonal Antibody in Liver

Seigo KINUYA, Kunihiko YOKOYAMA, Naoto WATANABE, Takako URESHINO,
Tamio ABURANO, Norihisa TONAMI and Kinichi HISADA

Department of Nuclear Medicine, Kanazawa University, School of Medicine

To evaluate the mechanism for prolonged retention of In-111 monoclonal antibody (MoAb) by the liver, we investigated the subcellular kinetics of the In-111 225.28S, an antimelanoma IgG_{2a}. Forty μ Ci/10 μ g of the In-111 MoAb was injected IV into groups of SD rats. The liver was excised at 3, 8, 17, 24, 48 and 72 hr and homogenized with 0.25 M sucrose containing 0.01 M Tris-HCl buffer (pH 7.6). Subcellular fractionation was carried out by 3-step (ultra-)centrifugation. The radioactivity of each fraction including nuclear, mitochondrial (lysosomal), microsomal and supernatant fraction was measured and expressed as a percentage of the total radioactivity of all the fractions. Moreover, the supernatant fraction was assessed by size exclusion HPLC.

The supernatant was a predominant fraction of the In-111 radioactivity, 61% at 3 hr, and was decreased with time, 21% at 72 hr ($p < 0.01$), while the activity in the mitochondrial fraction continued to increase from 11% to 44%. As compared to these two fractions, the nuclear and microsomal radioactivities were relatively constant, 10-25%,

throughout the study. The HPLC analysis revealed that the supernatant In-111 activity at early time points was mainly eluted with an intact IgG and thereafter this major peak activity was reduced with associated activity peaks found in smaller moiety fractions.

To compare the In-111 MoAb with the iodine labeled MoAb, we also investigated the subcellular kinetics of the I-125 MoAb in the same manner. We found that I-125 MoAb did not show the sequential distribution changes found with the In-111 MoAb.

Our results demonstrated that the mitochondrial fraction which contained lysosome played an important role in hepatic retention for the In-111 MoAb; once taken up by the liver, the MoAb was metabolized in the supernatant and the In-111 ion was transchelated from DTPA onto the lysosomal substances resulting in prolonged retention by the liver.

Key words: In-111 monoclonal antibody, Hepatic uptake, Subcellular distribution.