《原　著》

^{111}In 標識抗ミオシン抗体-Fab 分画を用いた心筋シンチグラフィの臨床応用

——モノクローナル抗体投与による抗マウス抗体の産生について——

河合　忠一*　遠藤　啓吾**　松森　昭*　西村　恒彦***
細野　真****

要旨　^{111}In 標識抗ミオシン抗体-Fab 分画 (^{111}In-AM, 74 MBq (2 mCi), 0.5 mg) による心筋シンチグラフィの臨床試験を行った症例を対象として，血清中の抗マウス抗体を高感度 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA 法) により測定した．^{111}In-AM 投与後の血清を入手できた 393 例中 11 例 (2.8%) に抗マウス抗体が検出され，高力価を呈した血清は高速液体クロマトグラフィを用いた検討でも，その存在が確かめられた．長期間観察を行った 2 例では，^{111}In-AM 投与約 40 週後でも検出可能であった．^{111}In-AM 2 回投与した12例のうち 1 例では，2 回投与後に一過性に抗マウス抗体が陽性となった．抗体投与前の皮内テストで陽性と判定されたために ^{111}In-AM を投与されなかった 6 例，血管痛を訴えたため投与を中止した 1 例，抗体投与後に軽度の発熱および皮膚発赤の自他覚症状がみられた 3 例では，いずれも血清中に抗マウス抗体は検出されなかった．^{111}In-AM 投与により，ごく一部の症例で血清中に抗マウス抗体が検出されることがあるが，その病因的意義に関してはさらに研究が必要である．

I. はじめに

RI 標識モノクローナル抗体を用いた悪性腫瘍の画像診断と治療[1,2]，抗リンパ球抗体による臓器移植後の急性拒絶反応の治療[3] など，モノクローナル抗体の臨床応用の報告が多く見られるようになった．用いられているモノクローナル抗体のほとんどはマウス由来の抗体である．マウスモノクローナル抗体の投与を受けた患者の血清中に高力価の抗マウス抗体 (human anti-mouse antibody: HAMA) が産生されることが知られている[4]．しかしわが国では RI 標識モノクローナル抗体投与後の抗マウス抗体の産生に関する研究は，これまでほとんどなされていない．

心筋梗塞，心筋炎，心筋症などを対象とした ^{111}In 標識抗ミオシン抗体-Fab 分画 (以下 ^{111}In-AM, 第一ラジオアイソトープ研究所製，東京，抗ミオシン抗体-Fab 分画は Centocor 社製，Malvern, PA, 米国) の臨床試験に付随して行った抗マウス抗体検出の成績を報告する．なお，^{111}In-AM の臨床試験 (治験薬コード：D-8601) は，全国26施設からなる研究会を組織して行ったが (Table 1)，^{111}In-AM を用いた心筋シンチグラフィの心筋梗塞，心筋炎や心筋症の画像診断としての有用性，安全性についてはすでに報告した[5]．

II. 材料および方法

1. ^{111}In 標識抗ミオシン抗体-Fab 分画の投与

^{111}In-AM は Khaw らによって開発された抗体 R11D10[6] を，酵素処理により Fab 分画化し，ジ

* 京都大学医学部第三内科
** 群馬大学医学部核医学科
*** 国立循環器病センター放射線診療部
**** 京都大学医学部核医学科
受付：3 年 6 月 11 日
最終稿受付：3 年 8 月 2 日
別刷請求先：前橋市昭和町 3-39　(〒 371)
群馬大学医学部核医学科
遠藤啓吾

Presented by Medical*Online

エチレントリアミン五酢酸(DTPA)を介して^{111}In標識したものを提供された．被験者には本剤の未標識体0.05 mg (0.1 m*l*)を用いて皮内テストを行い，15分後に陰性であることを確認したのち，^{111}In-AM (蛋白量として0.5 mg) 74 MBq (2 mCi)を肘静脈より緩徐に投与し，生理食塩液でフラッシュした．

2. 対 象

1988年7月から1989年10月までの間に実施された^{111}In-AMの臨床試験において，静脈内投与を受けた449例(うち12例は^{111}In-AMの2回目投与例，投与間隔は2か月～1か年)，事前検査として行った皮内テストで陽性と判定されたために投与されなかった6例および投与時血管痛を訴えたため投与を中止した1例の合計456例を対象とした(Table 2)．採血は初回投与，2回目投与とも原則として投与前，投与直後～投与6週後および投与6週以後に行い，血清分離した後 −20°C以下で測定時まで保存した．

3. 抗マウス抗体(HAMA)の測定

血清中の抗マウス抗体価の測定は，i) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA 法)により行い，波長492 nmでの吸光度(optical density: OD) 0.300以上の値を示した検体については，ii)中和試験を実施した．さらに一部の検体については，iii) 高速液体クロマトグラフィ(high performance liquid chromatography: HPLC)によりその性状を検討した．

ELISA 法(HAMA assay)および中和試験はCentocor社で開発されたもので，欧米における抗マウス抗体の測定と方法，判定基準とも同じである[7]．結果は主として，抗マウス抗体が陽性と判定された最大希釈倍数により表示した．

Table 1 ^{111}In-Antimyosin Fab scintigraphy study group

1	Sapporo Medical College	Dept. of Radiology	Masahiro Kubota
2	Iwate Medical University	Dept. of Radiology	Tsuneo Takahashi
3	Gunma University, School of Medicine	Dept. of Nuclear Medicine	Yasuhito Sasaki
4	Tsuchiura Kyodo Hospital	Dept. of Internal Medicine	Hideomi Fujiwara
5	Chiba Kaihin Municipal Hospital	Internal Medicine	Zenju Yamada
6	University of Tokyo, Faculty of Medicine	Dept. of Radiology	Masahiro Iio
7	The Cardiovascular Institute	Internal Medicine	Takeshi Tanaka
8	Tokyo Medical College	2nd Dept. of Internal Medicine	Takeo Miyashita
9	Hachiohji Medical Center, Tokyo Medical College	2nd Dept. of Internal Medicine	Kenichi Muto
10	Kitasato University, School of Medicine	Dept. of Radiology	Katsumi Ishii
11	Shonan Kamakura Hospital	Dept. of Cardiology	Hidekazu Arai
12	Shizuoka General Hospital	Dept. of Cardiology	Tsuneo Hoshino
13	Shinshu Medical School	Dept. of Radiology	Fumiko Nakanishi
14	University of Gifu, School of Medicine	Dept. of Radiology	Takeyoshi Imaeda
15	Prefectural Gifu Hospital	Dept. of Cardiology	Sachiro Watanabe
16	Kanazawa University, School of Medicine	Dept. of Nuclear Medicine	Hisashi Bunko
17	Maizuru Kyosai Hospital	Dept. of Cardiology	Shozo Ishise
18	Kyoto University, Faculty of Medicine	3rd Div. Dept. of Internal Medicine	Chuichi Kawai
19	Mitsubishi Kyoto Hospital	Div. of Cardiology	Akira Yoshida
20	Takeda Hospital	Dept. of Cardiology	Shunichi Tamaki
21	National Cardiovascular Center	Dept. of Radiology	Tsunehiko Nishimura
22	Hyogo College of Medicine	Dept. of Nuclear Medicine	Minoru Fukuchi
23	Kawasaki Medical School	Dept. of Nuclear Medicine	Koichi Morita
24	Matsuyama Red Cross Hospital	Dept. of Cardiology	Takaya Fukuyama
25	Kokura Memorial Hospital	Dept. of Cardiology	Masakiyo Nobuyoshi
26	Kurume University, School of Medicine	3rd Dept. of Internal Medicine	Hironori Toshima

Presented by Medical*Online

Table 2 Serum sampling of patients receiving ^{111}In-labeled antimyosin Fab fragments

Serum sampling	No. of cases
A, B, C	195*
A, B or C	180*
×, B, and/or C	24
A, ×, ×	57*

A: serum before antibody infusion
B: serum within 6 weeks after antibody infusion
C: serum later than 6 weeks after antibody infusion
×: No serum
*: including 7 cases not receiving ^{111}In-labeled antimyosin Fab fragments

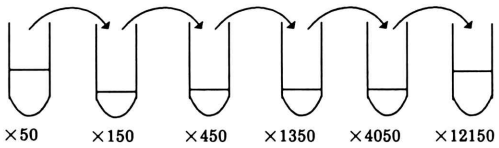
①Coating of polystylene microplate with antimyosin Fab
↓
②Incubation at 4°C for 16 to 20 hr
↓← washing with PBS-Tween 20
↓← blocking with BSA in PBS solution
③Incubation at 37°C for 1hr
↓← washing with PBS-Tween 20
↓← add test serum diluted to 50 times
④Incubation at 37°C for 1hr
↓← washing with PBS-Tween 20
↓← add horseradish peroxidase conjugated goat anti-human
↓ IgG antibody in PBS solution
⑤Incubation at 37°C for 1hr
↓← washing with PBS-Tween 20
↓← add o-phenilene diamine, H_2O_2
⑥Incubation at room temperature for 30 min.
↓← add 4N H_2SO_4
⑦Measure optical density (O.D.) at 492nm

Fig. 1 HAMA assay procedure.

i) ELISA 法 (HAMA assay) による抗マウス抗体の測定

血清検体はウシ，ヤギ血清含有リン酸緩衝液 (検体希釈液) で 50 倍希釈した検体 50 μl を用いて Fig. 1 に示したごとく，ELISA 法により行った．96穴ポリスチレンマイクロタイタープレート (Jackson 社製，米国) に 0.1 mg/ml に調製した抗ミオシン抗体-Fab 分画を各穴に 50 μl 添加し，4°C で 16～20 時間インキュベートしてコーティングを行う．ウシ血清アルブミンでブロッキングさせた後，50倍希釈した検体を加え 37°C で 1 時間インキュベートする．Horseradish peroxidase 結合抗ヒト IgG ヤギ血清を 37°C で 1 時間インキュベートし，次にオルトフェニレンジアミン，過

A : Test serum diluted serially with buffer containg antimyosin Fab fragments
B : Test serum diluted serially with buffer only



After incubation at 4°C for overnight, A and B were subjected to HAMA assay.
Final judgment : Serum whose O.D. at 492nm and percent inhibition were greater than 0.300 and 50%, respetively, was determined as HAMA

Fig. 2 Neutralization test procedure.

酸化水素水を添加して室温で 30 分間反応させる．4 規定硫酸で反応を停止させ，波長 492 nm での OD 値を読み取る．試薬ブランクの OD 値を差し引き，0.300 以上の OD 値を示した検体については，以下の中和試験を実施した．なおカットオフ値については，後述の健常人血清を用いての検討より OD 値 0.300 を設定した．

ii) 中和試験

血清検体は 10% の抗ミオシン抗体-Fab 分画を含有する検体希釈液で50倍に希釈し，さらに 3 倍ずつの段階希釈系列を調製して 4°C で一晩インキュベートしたもの (吸収検体 A) と，対照として単に検体希釈液で50倍に希釈し，さらに 3 倍ずつの段階希釈系列を調製した検体 (対象検体 B) について，前述の ELISA 法 (Fig. 1 の④以下) の手順に沿って行った (Fig. 2)．吸収検体 A, 対象検体 B についてそれぞれ OD 値を求め，次式により inhibition% を算出した．

Inhibition%
=(対象検体 B の OD 値
−吸収検体 A の OD 値)
×100/対象検体 B の OD 値

対象検体 B の OD 値が 0.300 以上でかつ Inhibition% が 50% 以上の検体を抗マウス抗体陽性と判定した．陽性コントロールとして，米国において急性拒絶反応に対し，抗リンパ球抗体 OKT3[8] を投与され，抗マウス抗体陽性になったことが知

Presented by Medical*Online

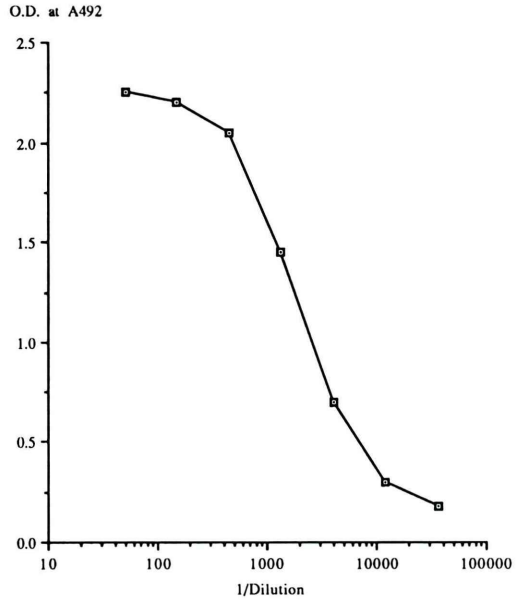


Fig. 3 Titration analysis of anti-OKT3 serum in HAMA assay.

られている患者血清を入手し，そのOD値が約1.2になるように2,000倍希釈したものを用いた(Fig. 3).

実際の検出結果のプレート写真をFig. 4およびFig. 5に示す.

iii) 高速液体クロマトグラフィ(HPLC)による検討

450倍以上希釈しても抗マウス抗体陽性を呈した検体の一部について，さらにHPLCを用いて検討した．検体A: ^{111}In-AM 50 ng/μl, 健常人血清100 μl, リン酸緩衝液250 μl, 検体B: ^{111}In-AM 50 ng/50 μl, 抗マウス抗体陽性患者血清100 μl, リン酸緩衝液250 μl, 検体C: ^{111}In-AM 50 ng/50 μl, 抗マウス抗体陽性患者血清100 μl, 正常マウス血清250 μl を混和し，一晩インキュベートした．フィルターでろ過した後，検体A, B, Cそれぞれ100 μl をTSK gel G3000SWカラム(7.5 cm×60 cm)(東ソー株式会社，東京)にて，経時的に放射能と蛋白量の変化を測定した.

III. 結 果

(1) 基礎的検討

ELISA法(HAMA assay)により0.022～1.567のOD値を示した6検体について，それぞれ3回測定してアッセイ間の測定値の再現性を検討した．抗マウス抗体陽性の3検体における測定値の再現性は良好であった(Table 3).

205人の健常人血清を用いてELISA法(HAMA assay)により抗マウス抗体価を求めたところ，9例(4.4%)で0.300以上のOD値を示した(最大OD値1.510). OD値0.500以上を示した4例の中和試験では，抗ミオシン抗体-Fab分画による吸収はほとんど見られなかった．健常人の95%はOD値0.300以下に分布し，その平均値は0.093ときわめて低い値を示した(Fig. 6).

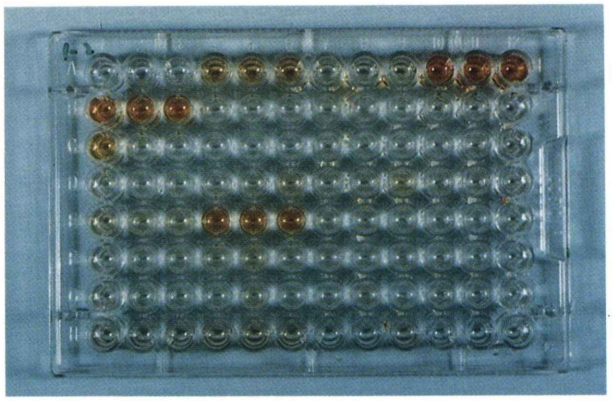
(2) ^{111}In 標識抗ミオシン抗体-Fab 分画投与例における検討

^{111}In-AM投与前の血清432検体において，ELISA法(HAMA assayおよび中和試験)により抗マウス抗体を測定したところ，症例1のみごく弱い陽性を示した(陽性率0.2%). しかし症例1も^{111}In-AM投与後に，抗マウス抗体価の上昇は見られなかった．これに対して，^{111}In-AM投与後の血清を入手できた393例中11例(2.8%)に抗マウス抗体が検出された(Table 4).

症例2から11(症例7を除く)ではいずれも^{111}In-AM投与前は陰性で，投与後に抗マウス抗体価が上昇した症例である.

症例2では^{111}In-AM投与11週後から19週後まで抗マウス抗体が陽性に検出されたが，44週後には陰性化した．症例3では^{111}In-AM投与2週後に450倍，投与8週後から16週後まで150倍の力価上昇を示した．症例4では^{111}In-AM投与7週後に450倍の抗マウス抗体が検出された．症例5, 6では^{111}In-AM投与2週後もしくは3週後に陽性になり，約40週後においても50～150倍の力価上昇を示した．症例3, 6, 11では^{111}In-AM投与2週後の時点ですでに抗マウス抗体価の上昇を示した．症例7は^{111}In-AM投与前の血清がなく，

Presented by Medical*Online



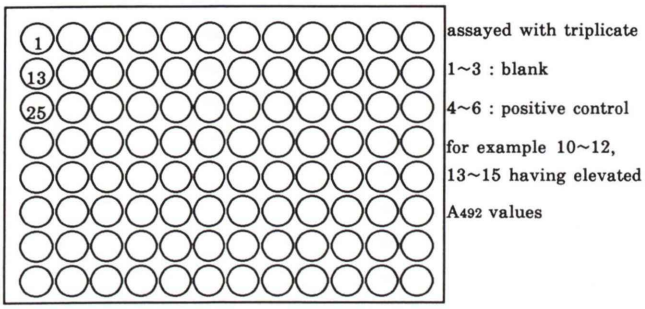
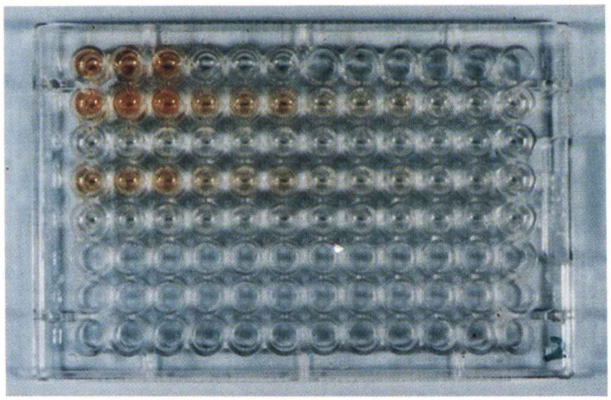


Fig. 4 Typical HAMA assay plate.



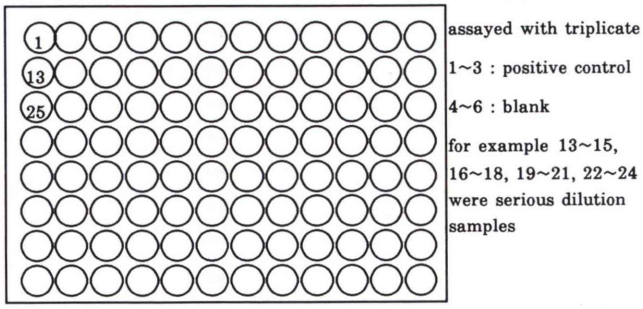


Fig. 5 Typical neutralization test plate.

Presented by Medical*Online

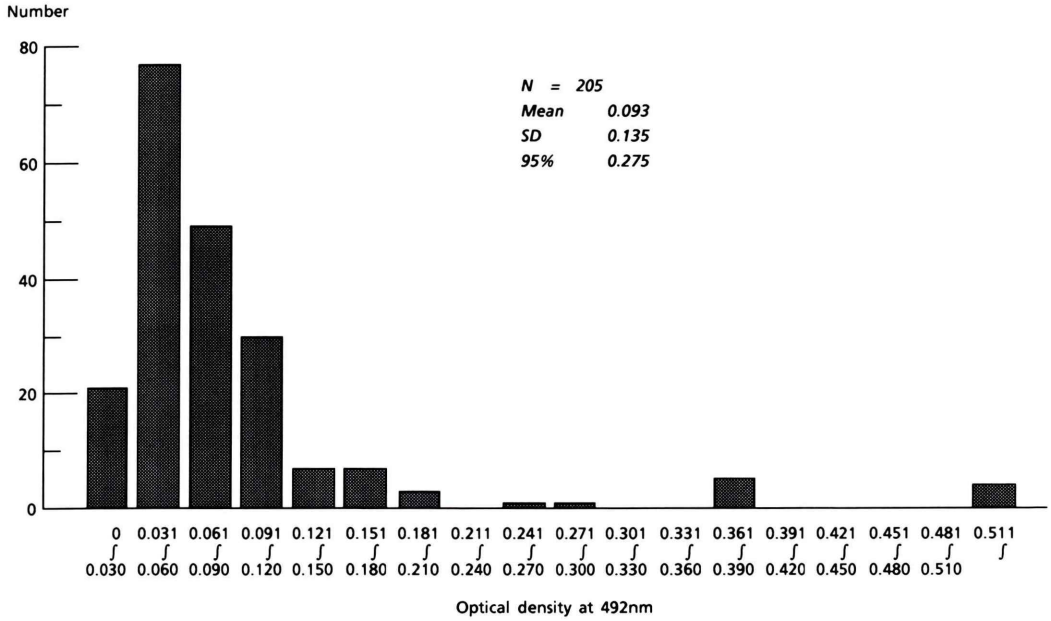


Fig. 6 Distribution of human anti-mouse antibody values in normal controls.

Table 3 Inter-assay reproducibility of HAMA assay using ELISA*

Sample No.	Day 1	Day 2	Day 3	Mean±SD	CV (%)
1	1.567	1.544	1.604	1.572±0.030	1.92
2	1.223	1.196	1.080	1.166±0.076	6.51
3	0.721	0.734	0.729	0.728±0.007	0.90
4	0.066	0.046	0.065	0.059±0.011	19.1
5	0.040	0.047	0.035	0.041±0.006	14.8
6	0.022	0.016	0.045	0.028±0.015	55.3

*: Optical density at 492 nm

投与3週後に150倍と抗マウス抗体の力価上昇を示したが，9週後には50倍に低下，12週後には陰性となった．

症例 2, 8, 9, 10 の 4 例では，OD 値 0.461 以下，力価50倍と弱い抗マウス抗体が検出されたのみである．しかし症例 3, 4, 5, 6, 11 の 5 例では，450倍の希釈検体まで抗マウス抗体が陽性でかつ抗ミオシン抗体-Fab分画との反応によりその活性は中和された．

分子篩を利用した HPLC による検討では，^{111}In-AM は Fab 分画に一致した分子量約 50 K の部位に単一ピークとして溶出される (Fig. 7A)．代表的な症例での検討結果を次に呈示する．^{111}In-AM と症例 6 の血清と混和したところ，24% の放射能は void volume に溶出され (Fig. 7B)，^{111}In-AM が血清中の抗マウス抗体と複合体を形成し，高分子量となったためと考えられた．高分子量の放射能は，正常マウス血清を添加することにより，完全に吸収された (Fig. 7C)．

(3) ^{111}In 標識抗ミオシン抗体-Fab 分画の 2 回投与例

^{111}In-AM を用いた心筋シンチグラフィを 2 回施行した12例では，いずれも初回投与前後もしくは 2 回投与前では抗マウス抗体は陰性であったが，1 例 (8.3%) において，^{111}In-AM 2 回目投与 3 週後に 150 倍，6 週後に 50 倍の弱い抗マウス抗体が検出され，9 週後には陰性化した (症例 12)．

(4) 皮内テスト陽性例，血管痛を訴え投与を中止した例

^{111}In-AM 投与前に皮内テストで陽性と判定され，^{111}In-AM 投与を受けなかった 6 例では，皮内テスト前の抗マウス抗体はいずれも陰性で，

Presented by Medical*Online

Table 4 Results of HAMA assay and neutralization tests in HAMA positive patients receiving ^{111}In-labeled antimyosin Fab fragments

		×50 OD (Inh%)	×150 OD (Inh%)	×450 OD (Inh%)	×1350 OD (Inh%)	×4050 OD (Inh%)	×12150 OD (Inh%)
Case 1	Pre-injection	0.318 (50%)	0.113				
	Post-injection						
	4 weeks	0.244					
	6 weeks	0.277					
	8 weeks	0.183					
	10 weeks	0.171					
	12 weeks	0.205					
	16 weeks	0.204					
Case 2	Pre-injection	0.098					
	Post-injection						
	1 week	0.098					
	11 weeks	0.318 (90%)					
	19 weeks	0.427 (74%)	0.214				
	44 weeks	0.276					
Case 3	Pre-injection	0.200					
	Post-injection						
	2 weeks	1.532 (93%)	0.721 (90%)	0.370 (83%)	0.188		
	8 weeks	1.689 (93%)	0.764 (89%)	0.297			
	16 weeks	0.975 (92%)	0.433 (84%)	0.177			
Case 4	Pre-injection	0.130					
	Post-injection						
	1 week	0.285					
	7 weeks	1.709 (93%)	0.989 (93%)	0.537 (88%)	0.257		
Case 5	Pre-injection	0.146					
	Post-injection						
	3 weeks	2.124 (91%)	2.056 (95%)	1.385 (96%)	0.759 (94%)	0.323 (87%)	
	7 weeks	0.722 (79%)	1.384 (94%)	0.630 (91%)	0.136		
	16 weeks	0.468 (74%)	0.711 (91%)	0.277			
	21 weeks	1.823 (94%)	0.843 (95%)	0.301			
	29 weeks	1.370 (92%)	0.605 (93%)	0.236			
	43 weeks	1.567 (92%)	0.629 (93%)	0.240			
Case 6	Pre-injection	0.085					
	Post-injection						
	2 weeks	2.033 (79%)	1.220 (82%)	0.668 (83%)	0.299		
	7 weeks	1.919 (81%)	1.080 (83%)	0.496 (78%)	0.232		
	15 weeks	1.396 (70%)	0.695 (69%)	0.375 (68%)	0.178		
	23 weeks	1.086 (62%)	0.548 (67%)	0.257			
	36 weeks	0.726 (74%)	0.205 (54%)				
	40 weeks	0.485 (71%)	0.194 (68%)				
Case 7	Pre-injection	Not done					
	Post-injection						
	3 weeks	1.054 (95%)	0.392 (96%)	0.123			
	9 weeks	0.322 (91%)	0.118				
	12 weeks	0.188					
Case 8	Pre-injection	0.270					
	Post-injection						
	4 weeks	0.413 (68%)	0.158				

Presented by Medical*Online

		×50 OD (Inh%)	×150 OD (Inh%)	×450 OD (Inh%)	×1350 OD (Inh%)	×4050 OD (Inh%)	×12150 OD (Inh%)
Case 9	Pre-injection	0.101					
	Post-injection						
	8 weeks	0.461 (68%)	0.165				
Case 10	Pre-injection	0.121					
	Post-injection						
	4 weeks	0.305 (65%)	0.075				
Case 11	Pre-injection	0.085					
	Post-injection						
	2 weeks	2.449 (89%)	2.421 (94%)	2.136 (98%)	0.917 (97%)	0.355 (98%)	0.125
	6 weeks	2.399 (91%)	2.317 (95%)	1.175 (96%)	0.503 (94%)	0.212	
Case 12	Pre-injection	0.249					
	Post-injection						
	3 weeks	0.211					
	6 weeks	0.190					
	8 weeks	0.229					
	Post-reinjection						
	3 weeks	0.696 (68%)	0.346 (62%)	0.124			
	6 weeks	0.477 (61%)	0.214				
	9 weeks	0.284					

Assays were performed as demonstrated in Figs. 1 and 2. OD: optical density at 492 nm.
Inh%: percentage of inhibition of optical density after adsorption with antimyosin Fab fragments.

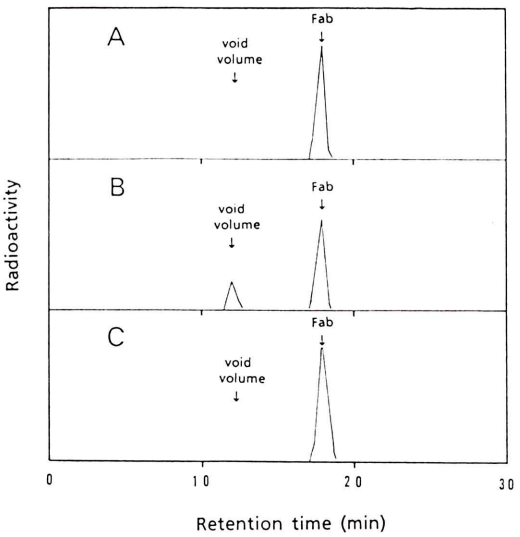


Fig. 7 High performance liquid chromatography (HPLC) patterns. A: incubation of normal human serum and ^{111}In-labeled antimyosin Fab fragments (^{111}In-AM). B: incubation of HAMA positive serum (case 6) and ^{111}In-AM. C: incubation of HAMA positive serum (case 6), ^{111}In-AM and normal mouse serum.

6例中5例については皮内テスト2～8週後の血清についても検討を行ったが，いずれも抗マウス抗体は検出されなかった．また^{111}In-AM投与時に血管痛を訴え投与を中止した1例についても，皮内テスト前，2, 8週後の血清中にはいずれも抗マウス抗体は検出されなかった．

(5) ^{111}In標識抗ミオシン抗体-Fab分画投与に起因すると考えられる自他覚症状を認めた例

^{111}In-AMを用いた心筋シンチグラフィを施行した380例中2例(0.5%)に発熱，1例(0.3%)に掻痒感を伴う皮膚発赤と発熱をきたしたことを報告した[5]．しかしこれら3例の^{111}In-AM投与前後での血中の抗マウス抗体は，いずれも陰性であった．

IV. 考 察

モノクローナル抗体の技術が確立し，その優れた特異性，均一性および経済性などにより，モノクローナル抗体は研究のみならず臨床においても幅広く利用されている[1,2,9,10]．現在利用されてい

Presented by Medical*Online

る大部分のモノクローナル抗体はマウス由来の蛋白で，ヒトにとっては異種蛋白である．したがってモノクローナル抗体の臨床応用にあたっては，免疫応答による抗マウス抗体の産生は重要な問題となる．高力価の抗マウス抗体を有する患者に RI 標識モノクローナル抗体を投与すると，RI 標識モノクローナル抗体は血中の抗マウス抗体と免疫複合体を形成し，血中からの RI の代謝が亢進し，肝臓への RI の取り込みが増加するのに対し，病巣への RI の集積は減少することが報告されている[11]．

^{111}In-AM を用いた心筋シンチグラフィの臨床応用を行った患者血清中の抗マウス抗体の測定を ELISA 法および中和試験により行った．^{111}In-AM を投与し，投与後の血清を入手できた 393 例中11例 (2.8%) の患者血中に抗マウス抗体が検出された．このうち 450 倍以上の明らかに高力価を示したのは 5 例 (1.3%) である．高力価を示した一部の検体を HPLC にて検討したところ，ELISA 法により抗マウス抗体が陽性の血清は ^{111}In-AM と結合すること，その結合は正常マウス血清の添加で完全に吸収されることより，抗マウス抗体の存在が確かめられた．

欧米においては，院内にて DTPA-結合抗ミオシン抗体に ^{111}In 標識し，フィルターろ過して調製した ^{111}In-AM を用いる心筋シンチグラフィの臨床応用が行われ，今回用いたのと同様の ELISA 法および中和試験による血清中の抗マウス抗体の測定がなされているが，投与後の患者血清中に抗マウス抗体は検出されないと報告されている[12]．しかし，今回の検討ではごく一部の症例で ^{111}In-AM 投与後の患者血中に抗マウス抗体が産生されており，日本人と欧米人でなぜ抗マウス抗体の産生が異なるのか，今後の解明が待たれる．

ただ，^{111}In-AM 投与後に検出された抗マウス抗体価はそれほど強いものではない．悪性黒色腫，大腸癌を対象として ^{111}In 標識モノクローナル抗体 (IgG, 20–42 mg) を投与したわが国での多施設共同研究では，64 例中 53 例 (82.8%) の患者血中に抗マウス抗体が検出されている[13]．HPLC による検討でも，Fab 分画 (0.5 mg) である ^{111}In-AM (Fab) 投与により生じた抗マウス抗体は，RI 標識抗体と 24% しか結合しなかったのに対し，IgG (20–42 mg) の形の ^{111}In 標識モノクローナル抗体投与により生じた抗マウス抗体は，ほぼ 100% の RI 標識抗体と結合する (結果略) など，その抗体価や抗マウス抗体との反応性にも差がみられた．投与した抗体の Fab と IgG の違い，^{111}In-AM の投与量が 0.5 mg と少ないことなどがその原因として考えられる．

わが国では，抗マウス抗体の検出方法，その判定基準については，未だ確立するに至っていない．今回は Centocor 社で開発された方法に従って測定を行い，ELISA 法 (HAMA assay) でのカットオフ値については，健常人での検討より，95%である OD 値 0.300 を採用し，この OD 値を超える検体について中和試験を実施した．

Table 4 の症例 2～10 (症例 7 を除く) はいずれも投与前は陰性で，投与後に抗マウス抗体価が上昇しており，^{111}In-AM 投与が起因と考えられた．症例 5, 6 では投与 2 週後から 3 週後に陽性になり，約40週後においても 50～150 倍の力価を有していたことから，^{111}In-AM 投与後かなり長期間抗マウス抗体陽性状態が続くことが示唆された．症例 3, 6, 11 では投与 2 週後の血清ですでに OD 値の上昇を示しており，モノクローナル抗体投与後の抗マウス抗体検出時期の 1 つの指標となるものと考えられた．症例 7 は，投与前の採血がなく，投与 3 週後に抗マウス抗体が検出された症例である．他の陽性例と類似していること，時間の経過とともに力価が低下していることから，^{111}In-AM 投与に起因していると考えられた．症例 2, 8, 9, 10 ではいずれも投与後に陽性になった症例であるが，OD 値は 0.461 以下と低値であった．450倍以上の陽性を示したのは 5 例であり，^{111}In-AM 投与による抗マウス抗体の明らかな陽性は 393 例中 5 例 (1.3%) と考えるべきかもしれない．

^{111}In-AM 2 回投与例の 12 例において，抗マウス抗体が検出された症例12で 2 回目投与 3 週後に 150 倍の抗マウス抗体価を示し，投与 9 週後には

Presented by Medical*Online

陰性化し，一過性の陽性例と考えられた[14]．^{111}In-AMの繰り返し投与については，さらなる検討が必要と思われた．

皮内テストで陽性に判定され，^{111}In-AM投与を受けなかった6例では，皮内テスト前の血清中の抗マウス抗体はいずれも陰性であった．^{111}In-AM投与に伴う一過性の発熱および掻痒感を伴う皮膚発赤と発熱の自他覚症状がみられた3例でも，抗マウス抗体に関してはいずれも陰性であった．したがって^{111}In-AM投与による自他覚症状の発現と抗マウス抗体の関連性はないものと考えられた．今回検討した健常人血清205例中9例(4.4%)がELISA法(HAMA assay)においてOD値0.300以上を示した．しかしながら中和試験において，抗ミオシン抗体-Fab分画を添加しても十分に吸収されず，このような抗マウス抗体様物質の存在の意義は不明である．以前から一部のヒト血清中には，このような物質が存在することが知られており[15,16]，モノクローナル抗体を用いるimmunoradiometric assay (IRMA)の反応液中には正常マウス血清あるいは正常マウスIgGを添加して，その活性を吸収する操作が行われている．RI標識モノクローナル抗体投与後に抗マウス抗体が陽性となった症例も，臨床的にも生化学的にも何ら異常を認めておらず，^{111}In-AM投与後の抗マウス抗体産生の病因的意義は明らかではない．

最近RI標識モノクローナル抗体の臨床利用に関する指針がまとまった[17]．わが国でも移植に伴う急性拒絶反応の治療に抗リンパ球抗体も使用されるようになるなど，モノクローナル抗体の臨床応用が活発になると思われる．一方，抗マウス抗体産生の解決方法として，ヒト／マウスキメラ抗体や遺伝子工学の手法を用いたヒト型モノクローナル抗体の作製が試みられつつある[18,19]．モノクローナル抗体の臨床応用に際して，血清中の抗マウス抗体価を簡便に検出できる測定系の開発とともに，抗マウス抗体産生の病因的意義に関する研究が待たれる．

V. 結　語

1. ^{111}In-AMを用いる心筋シンチグラフィの臨床試験を行い，投与した患者血清中の抗マウス抗体をELISA法により測定した．

2. ^{111}In-AMの投与を受けた393例中11例(2.8%)の血清中に抗マウス抗体が検出された．このうち明らかな陽性は393例中5例(1.3%)のみであった．

3. 高力価を呈した症例では，^{111}In-AM投与約40週後も抗マウス抗体が検出された症例が2例みられた．

4. 皮内テスト陽性の6例，投与時血管痛を訴え投与を中止した1例では，いずれも抗マウス抗体は検出されなかった．

5. 発熱などの自他覚症状を呈した3例では，いずれも抗マウス抗体は検出されなかった．

6. ^{111}In-AMの2回目投与後に一過性に力価上昇した症例が12例中1例(8.3%)にみられた．

7. ELISA法により抗マウス抗体を，高感度に再現性よく検出することができた．

本研究は，^{111}In標識抗ミオシン抗体-Fab分画を用いた心筋シンチグラフィの臨床応用に付随して実施されたものである(治験総括医師：京都大学医学部第三内科河合忠一)．

文　献

1) Schulz G, Buchler M, Mahrer KH, et al: Immunotherapy of pancreatic cancer with monoclonal antibody BW494. Int J Cancer **2**: 89–94, 1988
2) Jaffe RM, Esser PD, Alderson PO, et al: Evaluation of metastatic melanoma with planar and SPECT scintigraphy using ZME018 and 96.5 radiolabeled monoclonal antibodies. Cancer Detection and Prevention **12**: 303–312, 1988
3) 高橋公太，寺岡　慧，東間　紘，他：Muromonab CD3-OKT3 モノクローナル抗体．腎と透析 **25**: 701–707, 1988
4) Goldmann RE, Kaplan EH, Zimmer AM, et al: Long-term persistence of human anti-murine antibody responses following radioimmunodetection and radioimmunotherapy of cutaneous T-cell lymphoma patients using ^{131}I-T101. Exp Hematol

Presented by Medical*Online

13: 861–864, 1988

5) 河合忠一, 松森 昭, 西村恒彦, 他：^{111}In-Antimyosin Fab を用いた心筋シンチグラフィの臨床応用——多施設による共同研究——. 核医学 **27**: 1419–1432, 1990

6) Khaw BA, Mattis JA, Melincoff G, et al: Monoclonal antibody to cardiac myosin: Imaging of experimental myocardial infarction. Hybridoma **3**: 11–23, 1984

7) Brown JM, Dean RT, Kaplan P, et al: Absence of human antimouse antibody (HAMA) response in patients given antimyosin Fab-DTPA monoclonal antibody. J Nucl Med **29**: 851, 1988

8) Chatenoud L, Baudrihaye MF, Chkoff N, et al: Restriction of the human in vivo immune response against the mouse monoclonal antibody OKT3. J Immunol **137**: 830–838, 1986

9) Carrasquillo JA, Sugarbaker P, Colcher D, et al: Radioimmunoscintigraphy of colon cancer with iodine-131-labeled B72.3 monoclonal antibody. J Nucl Med **29**: 1022–1030, 1988

10) Knight LC, Maurer AH, Ammar IA, et al: Evaluation of indium-111-labeled anti-fibrin antibody for imaging vascular thrombi. J Nucl Med **29**: 494–502, 1988

11) Sakahara H, Reynolds JC, Carrasquillo JC, et al: In vitro complex formation and biodistribution of mouse antitumor monoclonal antibody in cancer patients. J Nucl Med **30**: 1311–1317, 1989

12) Johnson LL, Seldin DW, Becker LC, et al: Antimyosin imaging in acute transmural myocardial infarctions: Results of a multicenter clinical trial. J Am Coll Cardiol **13**: 27–35, 1989

13) 遠藤啓吾：画像診断におけるモノクローナル抗体. 日医放会誌 **50**: 901–909, 1990

14) 山田武彦, 松森 昭, 玉木長良, 他：^{111}In-標識抗ミオシンモノクローナル抗体-Fab イメージングの臨床応用（第5報） 反復投与における画像の変化, 安全性の検討. 核医学 **27**: 765–772, 1990

15) 関口 仁, 大竹皓子, 加野象次郎, 他：モノクローナル抗体を用いたcarcinoembryonic antigen (CEA) 測定系における非特異的反応に関する検討. 臨床病理 **37**: 893–898, 1989

16) Morton BA, Tressel M, Beaty BG, et al: Artifactual CEA elevation due to human anti-mouse antibody. Arch Surg **123**: 1242–1246, 1988

17) 社団法人日本アイソトープ協会医学・薬学部会標識抗体医学利用専門委員会：医学研究施設内で作られた RI 標識モノクローナル抗体の臨床利用に関する指針. Radioisotopes **39**: 597–599, 1990

18) Saga T, Endo K, Koizumi M, et al: In vivo and in vitro properties of human/mouse chimeric monoclonal antibody specific for common acute lymphocytic leukemia antigen. J Nucl Med **31**: 1077–1083, 1990

19) Winter G, Milstein C: Man-made antibodies. Nature **349**: 293–299, 1991

Presented by Medical*Online

Summary

Detection of Human Anti-Mouse Antibody in Patients Receiving ^{111}In-Antimyosin Fab: Multicenter Clinical Study in Japan

Chuichi KAWAI*, Keigo ENDO**, Akira MATSUMORI*,
Tsunehiko NISHIMURA*** and Makoto HOSONO****

*Third Division, Department of Internal Medicine, Kyoto University Hospital, Kyoto, Japan
**Department of Nuclear Medicine, Gunma University Hospital, Maebashi, Japan
***Department of Radiology, National Cardiovascular Center, Suita, Japan
****Department of Nuclear Medicine, Kyoto University Hospital, Kyoto, Japan

In the multicenter clinical study of ^{111}In-Antimyosin Fab (74 MBq, 0.5 mg), human anti-mouse antibody (HAMA) titers have been evaluated in serum from 456 patients using the sensitive enzyme-linked immunosorbent assay.

Presence of HAMA was confirmed by the neutralization test or using the size exclusion high performance liquid chromatography (HPLC) analysis in 11 of 393 patients (2.8%). HAMA was still detectable in 2 patients even 40 weeks after injection. None of 7 patients judged as positive for the intradermal test, a patient with vascular pain or 3 patients with fever or flare and itching with fever, developed detectable levels HAMA in their serum. These results suggest that patients may develop HAMA response after infusion of ^{111}In-Antimyosin Fab, but pathogenic role of HAMA in these patients remains to be studied.

Key words: Human anti-mouse antibody, Antimyosin Fab, Enzyme-linked immunosorbent assay, Monoclonal antibody.

Presented by Medical*Online