

《原 著》

99mTc 標識抗体 F(ab')₂ 分画を用いる卵巣癌画像診断の基礎的研究

杉 山 純 夫*

要旨 卵巣癌関連抗原 CA125 を認識するモノクローナル抗体 OC125 の F(ab')₂ 分画を ^{99m}Tc 標識し、^{99m}Tc 標識抗体を用いる卵巣癌画像診断の基礎的検討を放射性ヨード標識抗体と比較しながら行った。^{99m}Tc 標識率は 99.9% と著しく良好で、コロイド形成も認められなかった。細胞表面に CA125 を発現する PC-9 細胞 10⁷ 個への結合率は 47.0% で、¹²⁵I 標識抗体とほぼ同様に抗体活性は保持されていた。PC-9 細胞を移植したヌードマウスでの体内分布で、投与 18 時間後の腫瘍/血液比は 5.73±1.41 と、¹²⁵I 標識抗体投与群の 3.63±0.27 に比べ有意に高かった ($p<0.01$)。シンチグラムでも良好な腫瘍描出が得られ、^{99m}Tc 標識 OC125 抗体 F(ab')₂ 分画の卵巣癌画像診断への臨床応用が期待される。

(核医学 31: 327-336, 1994)

I. はじめに

卵巣癌治療の主体は手術による腫瘍摘出と術後の化学療法であり¹⁾、腫瘍の存在部位および腫瘍量の把握は、治療を行う上で重要である。卵巣癌の腫瘍マーカーとして、CA125 が知られており、血中 CA125 濃度の測定は、卵巣癌の補助診断だけでなく、治療効果や再発転移の有無を判定する方法としても有用である。糖蛋白抗原である CA125 は、卵巣漿液性囊胞腺癌由来の細胞 (OVCA 433) を免疫して得られたモノクローナル抗体 OC125 によって認識される²⁾。

放射性同位元素で標識した抗体を用いる画像診断は、これまで大腸癌、悪性黒色腫などの悪性腫瘍や、心筋梗塞などで行われている。このような抗体を用いる画像診断は免疫シンチグラフィと呼ばれ、抗体 OC125 を利用した免疫シンチグラフィは卵巣癌を対象にすでに欧米でヒトに臨床応用されている。OC125 抗体の標識に用いられて

いる放射性核種は ¹³¹I および ¹¹¹In である^{3~7)}。^{99m}Tc は理想的な核種にもかかわらず、標識法が難しいため、OC125 抗体へ ^{99m}Tc 標識を応用した報告はまだない。また、CA125 を発現する卵巣癌株でヌードマウスに腫瘍モデルを作るのが困難なため、OC125 抗体を用いた動物モデルにおける免疫シンチグラフィの基礎的検討は少ない⁸⁾。今回、OC125 抗体 F(ab')₂ 分画を ^{99m}Tc 標識し^{9,10)}、^{99m}Tc 標識 OC125 抗体 F(ab')₂ 分画を用いる卵巣癌の免疫シンチグラフィの基礎的検討を、放射性ヨード標識抗体と対比しながら行ったので報告する。

II. 材料と方法

1. モノクローナル抗体

フランス原子力庁 (CIS) より提供されたマウスモノクローナル抗体 OC125 (Fab')₂ 分画 (IgG1) を用いた⁸⁾。また、コントロールの抗体として癌胎児性抗原 CEA に対する抗体 F33-104 (whole IgG1, 福岡大生化学教室松岡雄治教授, 黒木政秀教授より提供) を用いた¹¹⁾。

2. 腫瘍

CA125, CA130 抗原は卵巣癌の代表的な腫瘍マーカーであるが、卵巣癌のみならず、内胚葉由

* 群馬大学医学部放射線医学教室

受付: 5年9月24日

最終稿受付: 6年2月15日

別刷請求先: 前橋市昭和町3-39-22 (〒371)

群馬大学医学部放射線医学教室

杉 山 純 夫

来の漿膜細胞や気管支粘膜細胞に抗原が発現することが知られている。そこで細胞表面に CA125, CA130 抗原を発現する肺腺癌由来培養細胞株 PC-9 を用いた¹²⁾。この細胞は CEA 抗原を発現しない。

3. 標識方法

a) ^{125}I 標識

ヨード標識はクロラミンT法を用いて行った¹³⁾。すなわち、抗体 $40\text{ }\mu\text{g}$ を 0.3 M リン酸緩衝液 pH 7.5 で容量を $180\text{ }\mu\text{l}$ に調整し、 ^{125}I (アマシャム薬品、東京) 37 MBq (1 mCi)/ $10\text{ }\mu\text{l}$ を加えたあと、これにクロラミン T $3\text{ }\mu\text{g}/10\text{ }\mu\text{l}$ を添加し、よく混和しながら、5 分間反応させた。Sephadex G-25M (PD-10 column) (Pharmacia, Uppsala, Sweden) を用いて遊離の ^{125}I を分離した。ウエル型シンチレーションカウンタで放射能を計測して、抗体の ^{125}I 標識率を求めた。カラムからの溶出には 0.5% ウシ血清アルブミンを含む 0.05 M リン酸食塩緩衝液 pH 7.5 を用いた。 ^{125}I 標識抗体の比放射能は 253 MBq (6.6 mCi)/mg であった。

b) $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 標識

0.05 M リン酸食塩緩衝液 pH 7.5 で透析した抗体に、2-mercaptopethanol (以下 2-ME) (和光純薬工業、大阪) を Mather らの報告に従って至適モル比 (抗体 : 2-ME = 1 : 1000) で混和し、スターーラーでゆっくり攪拌させながら 30 分間室温で反応させ、抗体の還元を行った¹⁰⁾。なお用いた抗体の濃度は 10 mg/ml であり、この抗体溶液 1 ml に 2-ME $7\text{ }\mu\text{l}$ を加えた。さらに Sephadex G-25 M を用いて還元された抗体と反応していない 2-ME を分離。この還元した抗体溶液は用時使用できるよう、抗体 0.5 mg ずつ試験管に分注し、 -40°C にて凍結保存した。骨シンチグラフィ用クリアボーンキット (HMDP) (日本メジフィジックス、西宮) 1 バイアルを生理食塩水 5 ml で溶解し、そのうち $50\text{ }\mu\text{l}$ を解凍した抗体溶液に加え、混和した。同溶液に $^{99}\text{Mo-}^{99\text{m}}\text{Tc}$ ジェネレータ (ダイナボット、東京) より溶出した $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 740 MBq (20 mCi) を加え、混和しながら室温で 10 分間反応させた。

c) $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 標識率の検討

標識率の検討は Sephadex G-25 M によるゲルクロマトグラフィとセルロースアセテート膜による電気泳動法を用いて行った。標識直後のほかに、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 標識 1, 2, 3, 24 時間後に行い、標識後の時間経過による $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 標識抗体の安定性について調べた。なお標識抗体の保存は室温で行った。さらに血清中での安定性を検討するために、ヒト血清に混和、 37°C で保存し、直後、1, 2, 3, 24 時間後にゲルクロマトグラフィで標識率を求めた。

セルロースアセテート膜による電気泳動法では、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 標識抗体の泳動パターンを $^{99\text{m}}\text{Tc}$ および $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 標識スズコロイドを対照として画像的に対比検討した。泳動条件はセルロースアセテート膜幅 1 cm あたり電流 0.8 mA 、泳動時間 30 分とした。平行多孔型コリメータを装着したガンマカメラ ZLC7500 (シーメンス社、東京) にて 10 分間セルロースアセテート膜の撮像を行った。データの収集および処理はシンチパック 700 (島津製作所、京都) を用いた。収集マトリックスサイズは 512×512 とした。

4. 免疫活性の検討

a) ラジオイムノアッセイによる CA125 抗原との結合

CA130 キット [第一] (第一ラジオアイソトープ、東京) は 2 つのモノクローナル抗体 130-22, 145-9 を用いて測定するラジオイムノアッセイ (IRMA) の原理に基づく。抗体 130-22 は CA125 抗原と同一タンパク上に存在する異なる抗原決定基 CA 130 を認識する¹⁴⁾。この CA130 キットで用いられている ^{125}I 標識 130-22 抗体のかわりに、 ^{125}I , $^{99\text{m}}\text{Tc}$ で標識した OC125 抗体 $\text{F}(\text{ab}')_2$ 分画および $^{99\text{m}}\text{Tc}$ で標識した抗 CEA 抗体 F33-104 を用いて、キットに添付されている標準抗原のアッセイを行った。標準抗原の CA125 抗原濃度は $0, 10, 30, 100, 300, 1,000\text{ U/ml}$ の 6 種類とした。

標識抗体、CA125 標準抗原、および 145-9 抗体を結合させたビーズ固相化抗体を、試験管内で室温 3 時間インキュベート。洗浄後ビーズへ結合した放射能を計測し、標識抗体の免疫活性をみた。

標識抗体は 0.5% ウシ血清アルブミンを含む 0.05 M リン酸食塩緩衝液 pH 7.5 で希釈調整した。

b) 培養細胞との結合

^{99m}Tc 標識抗体の免疫活性は、CA125 抗原を発現した培養細胞 PC-9 を用いても検討した。100 μ lあたり 10⁴, 10⁵, 10⁶, 10⁷ 個に調製した PC-9 細胞と、100 μ l (抗体量 20 ng) に希釈調製した標識抗体溶液を、容量 300 μ l のポリエチレン製マイクロチューブ内で、時々振とうさせながら 1 時間室温で反応させた。マイクロチューブを 10,000 \times g にて 5 分間遠沈し、上清を捨てた後、沈渣部分をナイフで切断し、沈渣の放射能をウエル型シンチレーションカウンタで測定した。

5. 正常マウスにおける ^{99m}Tc 標識抗体の体内分布

ddy マウス (雌、6 週齢) に、^{99m}Tc および ¹²⁵I で標識した OC125 抗体 F(ab')₂ 分画を容量 100 μ l にそれぞれ希釈調製、原則として両者を混合し、尾静脈より投与した。投与した放射能はマウス 1 匹あたり ^{99m}Tc 標識抗体で 29.6~88.8 MBq (0.8~2.4 mCi) (10~30 μ g 抗体), ¹²⁵I 標識抗体では 37~74 kBq (1~2 μ Ci) (0.15~0.30 μ g 抗体) とした。投与後 3 および 18 時間で屠殺解剖し、血液、肝、腎、腸、胃、肺、肺、筋、骨の放射能をウエル型シンチレーションカウンタで測定した。この測定結果より組織重量 (g) あたりの投与した放射能のパーセントを算出し (%ID/g), 両標識抗体の体内分布を比較検討した。なお %ID/g はマウスの重量が異なるため 20 g の体重に補正した。算出は以下の式で行った。

$$\%ID/g = \frac{[\text{臓器全体の放射能 (cpm)}]}{\{ \text{臓器重量 (g)} \times \text{投与量 (cpm)} \}} \times 100 \times \{ \text{マウス体重 (g)} / 20 \}$$

6. 担癌マウスにおける ^{99m}Tc 標識抗体体内分布

balb/c ヌードマウス (雌、6 週齢) の背部皮下に CA125 を発現した PC-9 細胞を約 10⁷ 個移植。腫瘍径が約 1 cm になった時点での標識抗体を尾静脈より投与し、3 および 18 時間後の体内分布を検

討した。また、腫瘍への分布を検討するために、腫瘍/正常組織比 (腫瘍における %ID/g / 正常組織における %ID/g) も算出した。

抗体の体内分布を視覚的に判定するために ^{99m}Tc 標識抗体を投与したマウスの一部では、投与後 3 時間および 18 時間で経時的にイメージングを行った。平行多孔型コリメータを装着したガンマカメラ ZLC7500 にて 10 分間撮像し、シンチパック 700 を用いて、データの収集および処理を行った。収集マトリックスサイズは 512 \times 512 とした。

III. 結 果

OC125 抗体 F(ab')₂ 分画の ^{99m}Tc 標識率は、ゲルクロマトグラフィ、電気泳動法いずれでも 99.5% 以上であり、比放射能は約 1.48 GBq (40 mCi)/mg と高いものであった (Table 1)。生理食塩水中における標識率の経時的变化は標識後 3 時間までほとんど認められず安定していたが、ゲルクロマトグラフィと電気泳動法での検討で、ともに標識 24 時間後では標識率は 90% 以下になり、抗体から ^{99m}Tc の遊離が認められた。一方、血清中では、1 時間後に標識率は 82.4% になり、その後時間が経過するに従い徐々に低下した。

セルロースアセテート膜のシンチグラムでは、添加部位に留まっている ^{99m}Tc 標識スズコロイドに対し、標識直後の ^{99m}Tc 標識 OC125 抗体は陰

Table 1 Stability of ^{99m}Tc labeled F(ab')₂ fragments of OC125 antibody at various time after radio-labeling

Time (hr)	Labeling efficiency*		
	Saline		Serum
	GC	EP	GC
0	99.9%	99.5%	99.5%
1	99.7%	97.1%	82.4%
2	99.7%	94.5%	73.3%
3	98.9%	96.0%	68.2%
24	88.4%	87.0%	54.7%

*; The labeling efficiency was analyzed by the gel chromatography (GL) and cellulose acetate electrophoresis (EP).

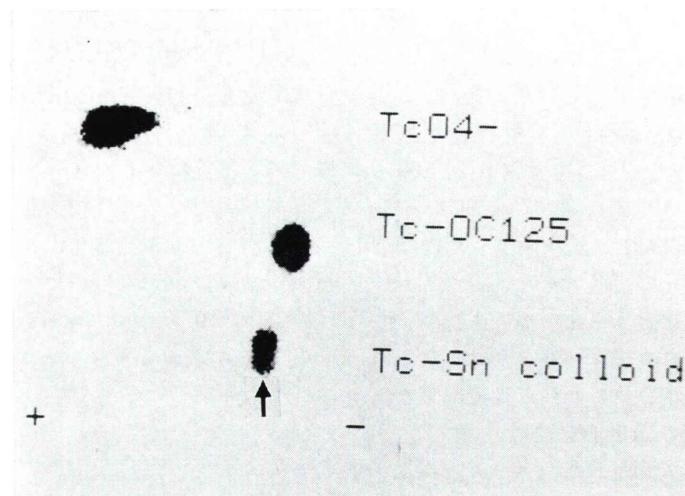


Fig. 1 Cellulose acetate electrophoresis of ^{99m}Tc labeled $\text{F}(\text{ab}')_2$ fragments of OC125 antibody, ^{99m}Tc pertechnetate and ^{99m}Tc labeled stannous colloid. The arrow shows the point of application.

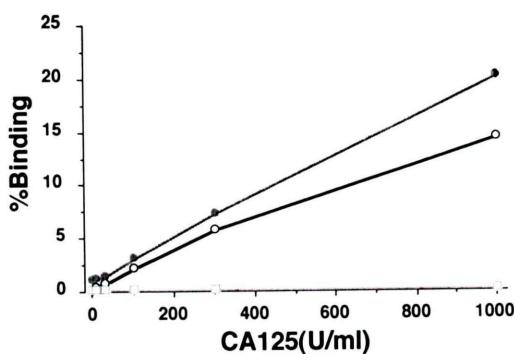


Fig. 2 Radioimmunoassay of CA125 antigen using ^{99m}Tc and ^{125}I labeled $\text{F}(\text{ab}')_2$ fragments of OC125 antibody, and ^{99m}Tc labeled monoclonal antibody F33-104 recognizing CEA. ○-○; ^{99m}Tc OC125, ●-●; ^{125}I OC125, □-□; ^{99m}Tc F33-104.

極方向へ移動しており、明らかなコロイド形成は認められなかった (Fig. 1).

ラジオイムノアッセイによる ^{99m}Tc および ^{125}I 標識 OC125 抗体と CA125 抗原との結合は、CA125 抗原濃度が増えるにつれて上昇した (Fig. 2). CA125 抗原濃度が 1,000 U/ml の時、 ^{99m}Tc 標識 OC125 抗体の結合率は 14.5%， ^{125}I 標識

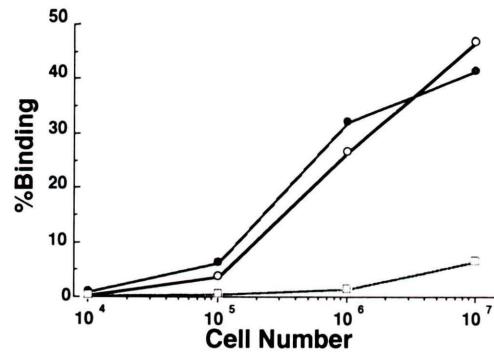


Fig. 3 Percent binding of ^{99m}Tc and ^{125}I labeled $\text{F}(\text{ab}')_2$ fragments of OC125 antibody, and ^{99m}Tc labeled control antibody F33-104 to PC-9 tumor cells. ○-○; ^{99m}Tc OC125, ●-●; ^{125}I OC125, □-□; ^{99m}Tc F33-104.

OC125 抗体においては 20.2% で、 ^{125}I 標識抗体の結合がやや良好な結果を示した。対照として用いた ^{99m}Tc 標識コントロール抗体では、結合率は 0.2% と著しい低値を示した。

CA125 抗原を発現した PC-9 細胞と ^{99m}Tc 標識抗体との結合も、細胞数が増加するのに従って増加した (Fig. 3). PC-9 細胞数 10^6 個および 10^7

Table 2 Biodistribution of ^{99m}Tc and ¹²⁵I labeled F(ab')₂ fragments of OC125 antibody in normal mice at 3 hr and 18 hr after injection

Organ	^{99m} Tc OC125		¹²⁵ I OC125	
	3 hr (n=5)	18 hr (n=6)	3 hr (n=5)	18 hr (n=9)
Blood	3.84±0.73	0.34±0.09	20.01±2.52	2.21±0.70
Liver	1.67±0.13	0.79±0.18	4.53±0.38	0.64±0.27
Kidney	53.25±10.70	22.07±8.69	11.85±0.89	2.03±0.81
Intestine	1.76±0.51	0.88±0.44	2.81±0.60	0.78±0.35
Stomach	1.05±1.55	1.23±1.21	5.06±1.77	6.57±3.27
Spleen	1.07±0.18	0.58±0.06	3.70±0.22	0.85±0.34
Lung	4.16±1.57	0.72±0.78	8.26±2.49	1.70±0.77
Muscle	0.47±0.09	0.18±0.07	1.24±0.33	0.38±0.16
Bone	0.66±0.10	0.33±0.08	1.90±0.35	0.64±0.26

Results are expressed as the mean±S.D. of the percentage of injected dose per g of tissue. The data are normalized to 20 g body weight.

Table 3 Biodistribution of ^{99m}Tc and ¹²⁵I labeled F(ab')₂ fragments of OC125 antibody in nude mice bearing CA125 antigen-expressing PC-9 tumor cells at 3 hr and 18 hr after injection

Organ	^{99m} Tc OC125		¹²⁵ I OC125	
	3 hr (n=4)	18 hr (n=9)	3 hr (n=4)	18 hr (n=5)
Blood	1.89±0.54	0.28±0.07	11.07±4.21	1.31±0.32
Liver	1.26±0.37	1.06±0.24	3.00±1.11	0.65±0.34
Kidney	37.98±15.46	25.11±6.66	7.83±3.48	1.04±0.08
Intestine	1.26±0.52	0.44±0.14	1.58±0.62	0.45±0.14
Stomach	0.28±0.09	0.29±0.12	5.01±1.75	2.47±1.00
Spleen	1.16±0.38	0.97±0.29	3.81±1.54	1.31±0.81
Lung	1.84±0.81	0.91±0.59	4.65±2.11	1.76±1.03
Muscle	0.36±0.22	0.16±0.07	0.83±0.51	0.19±0.07
Bone	0.48±0.15	0.27±0.05	1.45±0.43	0.27±0.22
Tumor	2.07±0.90	1.53±0.27	5.52±2.49	4.74±1.28

Results are expressed as the means±S.D. of the percentage of injected dose per g of tissue. The data are normalized to 20 g body weight.

個における結合率は、^{99m}Tc 標識抗体で 26.8% および 47.0%，また ¹²⁵I 標識抗体では 32.3% および 41.6% であり、両標識抗体の間で明らかな差は認められなかった。^{99m}Tc 標識コントロール抗体では細胞数 10⁶ 個で 1.72%，細胞数 10⁷ 個では 6.6% と著しく低値を示し、特異的な細胞結合はほとんど認められなかった。

標識抗体の正常マウスにおける体内分布は、投与 3 時間後、18 時間後いずれにおいても、^{99m}Tc 標識 OC125 抗体投与群では腎への %ID/g が顕著に高かった (Table 2)。¹²⁵I 標識抗体投与群においては 3 時間後には腎への集積は高いが、時間の

経過とともに腎、血液などの臓器への取り込みは減少し、脱ヨード化を反映して胃が高い集積を示した。血中放射能も ^{99m}Tc, ¹²⁵I 標識抗体で著しい差異があり、^{99m}Tc 標識抗体の方が明らかに低値であった。

CA125 抗原を発現した PC-9 細胞を移植したヌードマウスの検討では、投与 3 時間後、18 時間後において、^{99m}Tc 標識抗体投与群では正常マウスと同様に腎への高い集積を認めた (Table 3)。

腎を除くと、最も高く集積したのは ^{99m}Tc, ¹²⁵I 標識抗体いずれも腫瘍であった。投与 3 時間後の腫瘍/血液比は ^{99m}Tc 標識抗体投与群では 1.06±

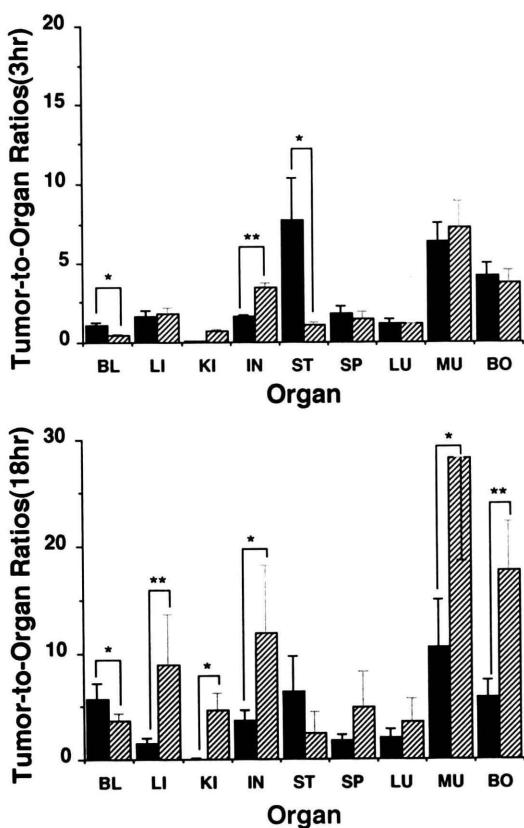


Fig. 4 Tumor-to-organ ratios of ^{99m}Tc and ^{125}I labeled $\text{F}(\text{ab}')_2$ fragments of OC125 antibody in nude mice bearing PC-9 tumor cells at 3 hr and 18 hr after injection. ■; ^{99m}Tc OC125, ▨; ^{125}I OC125. BL; blood, LI; liver KI; kidney, IN; intestine, ST; stomach, SP; spleen, LU; lung, MU; muscle, BO; bone. Vertical bars indicate standard deviation. * $p < 0.01$ ** $p < 0.001$

0.19, ^{125}I 標識抗体投与群では 0.49 ± 0.06 , 投与 18 時間後の腫瘍血液比はそれぞれ 5.73 ± 1.41 , 3.63 ± 0.27 と, ^{99m}Tc 標識抗体投与群が ^{125}I 標識抗体投与群よりも投与 3, 18 時間とも高い腫瘍/血液比を示した ($p < 0.01$) (Fig. 4). 一方, 腫瘍/肝臓比は ^{125}I 標識抗体投与群の方が有意に高い結果であった。しかし ^{99m}Tc 標識抗体投与群においても, 腫瘍/肝臓比は 1.0 以上を示した。

^{99m}Tc 標識 OC125 抗体 $\text{F}(\text{ab}')_2$ 分画投与 3 時間のイメージでは腎, 膀胱への集積のほか, すで

に, 移植した腫瘍が描出されており, 18 時間のイメージでは腫瘍集積がより明瞭となった (Fig. 5).

IV. 考 察

免疫シンチグラフィは欧米では臨床応用が進んでいるが, モノクローナル抗体の標識に用いられる放射性核種は, 主として放射性ヨード, ^{111}In , ^{99m}Tc の 3 種類である。このうち ^{131}I 標識は最も核医学利用の歴史が古く, 標識法が容易であることより, 早くから免疫シンチグラフィに臨床応用された¹⁵⁾。しかし, ^{131}I の放出する γ 線のエネルギーが 364 keV と高く, 画像診断には適していないこと, β 線を放出し, 半減期が約 8 日間と比較的長いため, 患者への放射線被曝量を増すという欠点となっている。さらにヨード標識抗体は生体の中で脱ヨード酵素の作用で, ^{131}I の遊離をおこし, 腫瘍への集積が減少すると同時に, 遊離した ^{131}I が胃や甲状腺への集積が増加する。今回の体内分布の検討においても ^{125}I 標識抗体投与群では, 投与 18 時間後に胃への集積が高くなつた。

^{111}In は 2 官能性 (bifunctional) キレート剤である環状 diethylenetriaminepentaacetic acid 無水物, benzyl-ethylenedinitrilotetraacetic acid などを介した標識法が用いられている。 ^{111}In は ^{131}I に比べエネルギーが 247 keV および 173 keV と低く, 中エネルギー用コリメータを装着したガンマカメラでの撮像に適している。また半減期が 2.8 日と短く, β 線を放出しないため患者への放射線被曝量が ^{131}I に比べ低い。ところが抗体の代謝過程で肝細胞内に ^{111}In が捕捉されることより, 肝臓への集積が多くなり, 肝内病変の診断の妨げになる¹⁶⁾。また, 消化管への排泄の存在も短所となっている。

^{99m}Tc は理想的な放射性核種である。半減期が 6 時間, エネルギー 140 keV の単一な γ 線を出し, また β 線を放出しないため被曝線量が少ない。したがって, 他の放射性核種に比べ, 投与放射能量を増すことが可能で, ^{99m}Tc 標識物を用いることにより, より良好な画像を得ることができる。今回の検討でも, 1.48 GBq (40 mCi)/mg 抗体

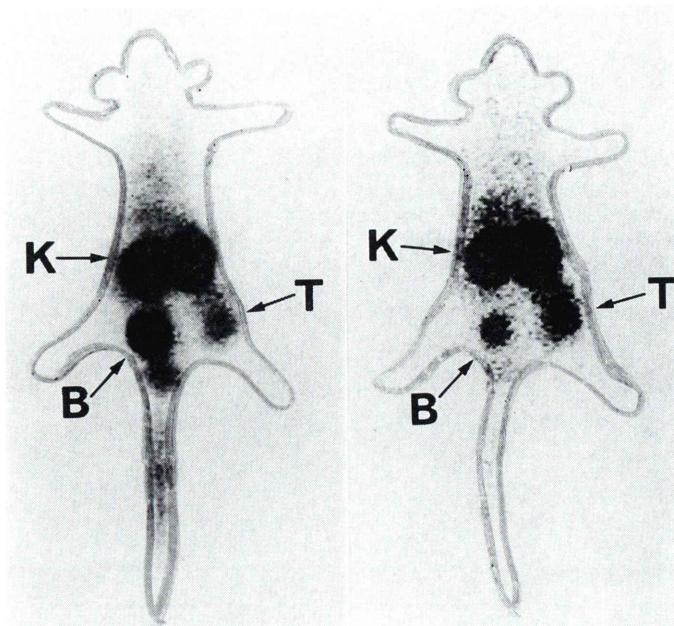


Fig. 5 Scintigrams taken 3 hr (left) and 18 hr (right) after injection of ^{99m}Tc labeled F(ab')₂ fragments of OC125 antibody in nude mouse bearing PC-9 tumor cells. T; tumor. K; kidney. B; urinary bladder.

F(ab')₂ ときわめて高い比放射能の ^{99m}Tc 標識抗体が、簡単に得られた。

理論的には ^{99m}Tc が最も優れているにもかかわらず、^{99m}Tc 標識モノクローナル抗体を用いた画像診断の臨床応用はそれほど多くない。^{99m}Tc 標識抗体の臨床応用が進まなかった理由はいくつかあげられている。血中からの遅い抗体のクリアランスが短半減期の ^{99m}Tc には適さないこと、これまで ^{99m}Tc の有効なモノクローナル抗体標識方法がなく、放射化学的に不純物を形成したり、抗体と ^{99m}Tc の結合が弱いことなどによる^{10,17)}。

今回、著者の用いた直接標識法は、抗体の持つ S-S 結合を 2-ME で還元し、さらに 2 倍の塩化第一スズを加えることにより ^{99m}Tc を効率よく抗体分子に標識できる方法である^{9,10)}。得られた標識率はゲルクロマトグラフィで 99.9% と高く、またセルロースアセテート膜を用いた電気泳動法では明らかなコロイド形成も認められなかった。

還元した抗体を凍結保存しておけば、必要な時

に解凍して、10 分間以内に標識操作は終了する。短時間かつ簡便に済むため、臨床応用に適した標識方法と言えよう。

卵巣癌に対する免疫シンチグラフィは種々のモノクローナル抗体を用いて行われている。OC125 抗体以外にも human milk fat globule に対する HMFG2¹⁸⁾、骨肉腫細胞に存在する抗原に対する抗体 791T/36¹⁹⁾、placental-type alkaline phosphatase に対する H317²⁰⁾ および NDOG₂²¹⁾、糖タンパク抗原 OA3 を認識する抗体 OV-TL3²²⁾ などが報告されている。HMFG2、H317、NDOG₂ は ¹²³I 標識、OV-TL3 は ¹¹¹In 標識、また 791T/36 は ¹³¹I 標識でそれぞれ臨床的に用いられている。OC125 と OV-TL3 は F(ab')₂ 分画であるが、ほかはいずれも whole IgG の形で用いられている。このうち最もよく検討されているのは、¹³¹I あるいは ¹¹¹In 標識 OC125 抗体 F(ab')₂ 分画を用いたものである。ヨーロッパでの臨床例での検討では、その検出率は 50 から 100% である^{3~7)}。planar

画像のみよりは、single photon emission CT (SPECT) 画像を加えた方が検出能は増加する。しかし、SPECTを行うのにはカウント数が少なすぎたとの報告もある³⁾。Hunterらの報告による¹¹¹In 標識 OC125 抗体 F(ab')₂ 分画での検討では検出率は 14/16 (88%) である⁷⁾。

両標識法による読影の再現性をみた Chatal らの報告では、SPECT を用いた場合には¹¹¹In 標識の方が優れているが、planar 画像では有意の差は認められていない³⁾。物理的性質からは¹³¹I に比べて¹¹¹In 標識の方が得られる画像はまさっているが、今回著者が試みた^{99m}Tc は、さらに SPECT 画像の撮像により適しており、優れた画像情報を提供すると考えられ、臨床応用が待たれる。

標識抗体における免疫活性の検討では CA125 抗原との結合をラジオイムノアッセイ、細胞との結合において、いずれも^{99m}Tc と¹²⁵I 両標識法の差はほとんどなく、標識法による免疫活性の明らかな差はないと考えられた。ところが、体内分布、腫瘍/組織比は^{99m}Tc と¹²⁵I 標識抗体で、大きな相違点が認められた。^{99m}Tc 標識抗体では腎臓への高い取り込みが認められ、血清中で標識率が低下するにもかかわらず、遊離の^{99m}Tc の存在を示唆する胃への集積増加はみられなかった。腎臓への高い集積機序については明らかでないが、抗体 F(ab')₂ 分画にこの^{99m}Tc 標識を応用したところ、生体内で低分子の標識化合物が生成されたとの報告もあることから²³⁾、今回の集積増加も同様の変化による可能性は否定できない。しかし、その原因についてはさらに検討が必要である。

本標識法を用いた臨床応用は、すでに^{99m}Tc 標識抗 CEA 抗体 BW431/26 (whole IgG) を使って、大腸癌の診断になされており^{24,26)}、6 あるいは 24 時間後の SPECT 像で、明瞭な病巣描出が得られている。F(ab')₂ 分画は whole IgG より血中クリアランスが早いことが知られており、検討した OC125 抗体は、F(ab')₂ 分画であることから、より早期の病巣描出が可能と考えられる。

免疫シンチグラフィの最終的な目標は、抗体を

用いた腫瘍特異的な癌治療法の開発である。¹⁸⁶Re は^{99m}Tc と元素周期律表で同じ VIIa に属しており、本法を¹⁸⁶Re 標識に応用できれば、腫瘍の特異的な治療 radioimmunotherapy になると期待される。¹⁸⁶Re は物理的には半減期が 3.7 日間、強いエネルギーの β 線を放出し、放射線治療には適している。また、137 keV の γ 線も同時に放出するため、治療量投与後にガンマカメラを用いて標識抗体分布の把握も可能である²⁶⁾。一方、^{99m}Tc に比べ、¹⁸⁶Re は再酸化を受けやすいという問題点も指摘されており²⁷⁾、治療応用に向け今後さらに検討を加えたい。

V. 結 語

- 1) 2-mercaptoethanol を用いての^{99m}Tc 直接標識法を卵巣癌に対する OC125 抗体 F(ab')₂ 分画の標識に応用した。
- 2) 直後の標識率は 99.9% であり、経時的観察においても^{99m}Tc の抗体からの遊離はわずかであった。
- 3) CA125 抗原との結合性、免疫活性は保たれており、¹²⁵I 標識抗体とほぼ同じ活性を示した。
- 4) 投与 18 時間後の腫瘍/血液比は 5.73 と、¹²⁵I 標識抗体に比べ有意に高かった。

謝辞：稿を終えるにあたり、本研究に対して直接ご指導いただいた群馬大学医学部核医学教室遠藤啓吾教授、佐々木康人前教授(現東京大学医学部放射線医学教室)に深甚なる敬意を表します。またご校閲いただいた群馬大学医学部放射線医学教室新部英男教授、国立高崎病院放射線科鈴木良彦医長、OC125 抗体を提供していただいたフランス原子力庁(CIS)に感謝いたします。さらに本研究に終始協力して下さった、群馬大学医学部核医学教室内昇先生、渡辺直行先生に感謝いたします。

文 献

- 1) Slotman BJ, Rao BR: Ovarian cancer (review). *Anticancer Res* 8: 417-434, 1988
- 2) Bast RC, Feeney M, Lazarus H, Nadler LM, Colvin RB, Knapp RC: Reactivity of a monoclonal antibody with human ovarian carcinoma. *J Clin Invest* 68: 1331-1337, 1981

- 3) Chatal JF, Fumoleau P, Saccavini JC, Thedrez P, Curter C, Bianco-Arco A, et al: Immunoscintigraphy of recurrences of gynecologic carcinomas. *J Nucl Med* **28**: 1807-1819, 1987
- 4) Haisma HJ, Moseley KR, Battaile AI, Griffiths TC, Zurawski VR, Knapp RC: Biodistribution, pharmacokinetics and imaging of ¹³¹I-labelled OC125 in ovarian cancer. *Int J Cancer (supplement)* **2**: 109-113, 1988
- 5) Haisma HJ, Moseley KR, Battaile A, Griffiths TC, Knapp RC: Distribution and pharmacokinetics of radiolabeled monoclonal antibody OC125 after intravenous and intraperitoneal administration in gynecologic tumors. *Am J Obstet Gynecol* **159**: 843-848, 1988
- 6) Hnatowich DJ, Gonet M, Rusckowski M, Siebecker DA, Roche J, Shealy D, et al: Pharmacokinetics of ¹¹¹In-labeled OC-125 antibody in cancer patients compared with the 19-9 antibody. *Cancer Res* **47**: 6111-6117, 1987
- 7) Hunter RE, Doherty P, Griffin TW, Gonet M, Hnatowich DJ, Bianco JA, et al: Use of indium-111-labeled OC-125 monoclonal antibody in the detection of ovarian cancer. *Gyn Oncol* **27**: 325-337, 1987
- 8) Thedrez P, Saccavini JC, Nolibe D, Simoen JP, Guerreau D, Gestin JF, et al: Biodistribution of indium-111-labeled OC125 monoclonal antibody after intraperitoneal injection in nude mice. *Cancer Res* **49**: 3081-3086, 1989
- 9) Schwarz A, Steinstrasser A: A novel approach to Tc-99m labeled monoclonal antibody[abstr]. *J Nucl Med* **28**: 721, 1987
- 10) Mather SJ, Ellison D: Reduction-mediated technetium-99m labeling of monoclonal antibodies. *J Nucl Med* **31**: 692-697, 1990
- 11) Kuroki M, Murakami M, Wakisaka M, Krop-Watorek A, Oikawa S, Nakazato H, et al: Epitopes predominantly reatained on the carcinoembryonic antigen molecules in plasma of patients with malignant tumors but not on those in plasma of normal individuals. *Jpn J Cancer Res* **83**: 505-514, 1992
- 12) Matsuoka Y, Nakashima T, Endo K, Yoshida T, Kunitatsu M, Sakahara H, et al: Recognition of ovarian cancer antigen CA125 by murine monoclonal antibody produced by immunization of lung cancer cells. *Cancer Res* **47**: 6335-6340, 1987
- 13) Hunter WM, Greenwood FC: Preparation of iodine-131-labeled growth hormone of high specific radioactivity. *Nature* **194**: 495-496, 1962
- 14) Endo K, Matsuoka Y, Nakashima T, Fujii S, Kunitatsu M, Saga T, et al: Development of a new sensitive immunoradiometric assay for CA125: Mixed use of two monoclonal antibodies reactive with separate epitopes. *J Tumor Marker Oncol* **3**: 65-71, 1988
- 15) Goldenberg DM, DeLand F, Kim E, Bennet S, Primus FJ, Van Nagell JR, et al: Use of radio-labeled antibodies to carcinoembryonic antigen for the detection and localization of diverse cancers by external photoscanning. *N Engl J Med* **298**: 1384-1388, 1978
- 16) Yokoyama K, Carrasquillo JA, Chang AE, Colcher D, Roselli M, Sugarbaker P, et al: Differences in biodistribution of indium-111- and iodine-131-labeled B72.3 monoclonal antibodies in patients with colorectal cancer. *J Nucl Med* **30**: 320-327, 1989
- 17) Rhodes BA, Burchiel SW: Radiolabeling of antibodies with technetium-99m. Burchiel SW, Rhodes BA (eds), *Radioimmunoimaging and radioimmunotherapy*, New York, Elsevier, 1983, pp. 207-222
- 18) Pateisky N, Philipp K, Skodler WD, Czerwenka K, Hamilton G, Burchell J: Radioimmunodetection in patients with suspected ovarian cancer. *J Nucl Med* **26**: 1369-1376, 1985
- 19) Powell MC, Perkins AC, Pimm MV, Al Jetaily M, Wastie ML, Durrant L, et al: Diagnostic imaging of gynecologic tumors with the monoclonal antibody 791T/36. *Am J Obstet Gynecol* **157**: 28-34, 1987
- 20) Crichley M, Brownless S, Patten M, McLaughlin PJ, Tromans PM, McDicken IW, et al: Radio-nuclide imaging of epithelial ovarian tumours with ¹²³I-labelled monoclonal antibody (H317) specific for placental-type alkaline phosphatase. *Clin Radiol* **37**: 107-112, 1986
- 21) Davies JO, Davies ER, Howe K, Jackson PC, Pitcher EM, Sadowski CS, et al: Radionuclide imaging of ovarian tumours with ¹²³I-labelled monoclonal antibody (NDOG₂) directed against placental alkaline phosphatase. *Br J Obstet Gynecol* **92**: 277-286, 1985
- 22) Massuger LFAG, Kenemans P, Claessens PAMJ, Verheijen RHM, Schijf CPT, Strijk SP, et al: Immunoscintigraphy of ovarian cancer with indium-111-labeled OV-TL 3 F(ab')₂ monoclonal antibody. *J Nucl Med* **31**: 1802-1810, 1990
- 23) Mardirossian G, Wu C, Rusckowski M, Hnatowich DJ: The stability of ⁹⁹Tc^m directly labelled to an Fab' antibody via stannous ion and mercapto-ethanol reduction. *Nucl Med Commun* **13**: 503-512, 1992
- 24) Lind P, Langsteger W, Koeltringer P, Lechner P, Beham A, Arian Schad K, et al: ^{99m}Tc-labeled monoclonal anti-carcinoembryonic antigen anti-

- body (BW 431/26). Clinical results in the detection of colorectal carcinomas and recurrences. *Scand J Gastroenterol* **24**: 1205-1211, 1989
- 25) Muxi A, Sola M, Bassa P, Pons F, Garcia A, Moragas M, et al: Radioimmunoscintigraphy of colorectal carcinoma with a ^{99m}Tc -labelled anti-CEA monoclonal antibody (BW 431/26). *Nucl Med Commun* **13**: 261-270, 1992
- 26) Breitz HB, Weiden PL, Vanderheyden JL, Appelbaum JW, Bjorn MJ, Fer MF, et al: Clinical experience with rhenium-186-labeled monoclonal antibodies for radioimmunotherapy: results of phase I trials. *J Nucl Med* **33**: 1099-1112, 1992
- 27) Griffiths GL, Goldenberg DM, Knapp FF Jr, Callahan AP, Chang C-H, Hansen HJ: Direct radiolabeling of monoclonal antibodies with generator-produced rhenium-188 for radioimmunotherapy: labeling and animal biodistribution studies. *Cancer Res* **51**: 4594-4602, 1991

Summary

Basic Study for Immunoscintigraphy of Ovarian Cancer Using ^{99m}Tc Labeled $\text{F}(\text{ab}')_2$ Fragments of Monoclonal Antibody

Sumio SUGIYAMA

Department of Radiology, Gunma University School of Medicine

Basic study was performed to evaluate the efficacy of immunoscintigraphy of ovarian cancer using ^{99m}Tc labeled $\text{F}(\text{ab}')_2$ fragments of monoclonal antibody OC125 which was reactive with CA125 antigen. Labeling efficiency was 99.9% and colloid formation was not observed. Specific activity was 1.48 GBq (40 mCi)/mg antibody and ^{99m}Tc OC125 preparation was stable more than 3 hr after labeling. Percent binding to 10^7 cells of PC-9 cancer cells expressing CA125 antigen was

47.0% in ^{99m}Tc OC125 almost the same as that of ^{125}I OC125. Tumor-to-blood ratio for ^{99m}Tc OC125 was 5.73 ± 1.41 at 18 hr after intravenous injection, which was significantly higher than that for ^{125}I OC125. The scintigram showed a good localization in nude mouse bearing PC-9 tumor cells, and the clinical use of ^{99m}Tc OC125 is promising for the imaging of ovarian cancer.

Key words: Ovarian cancer, CA125, Radioimmunodetection, OC125, ^{99m}Tc .