《原　著》

スペーサ含有および非含有二官能性キレート剤を用いた ^{111}In 標識モノクローナル抗体の比較研究

——(II)　担癌ヌードマウスにおける体内動態の検討——

孫　　保　福*

(主任：久田　欣一　教授)

要旨　succinimido-EGS-DTPA (diester spacer 含有), maleimido-C10-Bz-EDTA (hydrocarbon spacer 含有) で ^{111}In 標識した A7 抗体の担癌ヌードマウスにおける体内動態を検討した．これらの結合抗体は，対照のスペーサを含まないキレート結合抗体より低い正常臓器放射能を示し，特に C10-Bz-EDTA 結合抗体で顕著であった．肝放射能は，C10-Bz-EDTA 結合抗体では投与 96 時間後まで減少したのに対し，EGS-DTPA 結合抗体では投与 24 時間後以降ほぼ一定の値を示した．シンチグラムでも，C10-Bz-EDTA 結合抗体で最もよい腫瘍対正常臓器コントラストが得られた．スペーサを含むキレート結合抗体では，放射能の体外排泄が促進され，C10-Bz-EDTA 結合抗体では，他のキレート結合抗体と異なり，主に便中に排泄された．肝細胞内放射能分布では EGS-DTPA 結合抗体は，C10-Bz-EDTA 結合抗体に比べ，リソゾームを含むミトコンドリア分画の放射能が経時的に増加した．以上より，EGS-DTPA 結合抗体の肝放射能の低減は，血中で解離した ^{111}In-DTPA の尿中への排泄により抗体の肝摂取量が低下したためであり，一方，C10-Bz-EDTA 結合抗体の肝放射能低減は肝内で生じた小分子量代謝物の速やかな胆道系排泄の結果であると考えられた．C10-Bz-EDTA を用いることにより，放射免疫診断における病巣検出能の向上が期待される．

(核医学 **31**: 473–487, 1994)

I. はじめに

^{111}In 標識抗体を用いる放射免疫診断 (Radioimmunoscintigraphy, RIS) における最大の問題点として正常組織，特に肝への放射能摂取が高いことが従来から指摘されている[1~3]．そのため，腫瘍への特異的集積を増加させ，しかも正常組織のバックグラウンドを低減させる方法が種々考案されてきた．特に，^{111}In 標識方法，いいかえれば標識に用いる二官能性キレート剤の種類が大きな因子の 1 つであることが多くの研究者から報告されている[4]．バックグラウンド低減のための 1 つの方法としては体内で熱力学的により安定なキレート剤を用いることがあげられる[4~8]．何故ならば，高い正常組織放射能の一因として ^{111}In の抗体からトランスフェリンへの移行（トランスキレーション）が考えられており，現在，臨床上で最もよく使われている cyclic DTPA dianhydride (cDTPAA) よりも安定な isothiocyanatobenzyl-DTPA (SCN-Bz-DTPA) あるいは isothiocyanatobenzyl-EDTA (SCN-Bz-EDTA) を用いることによりバックグラウンドをある程度低減できることが報告されているものの，十分な改善が得られているとはいえない[9~11]．もう 1 つの方法としては，抗体とキレートの間に体内で代謝されうるスペー

* 金沢大学医学部核医学科
受付：6 年 2 月 18 日
最終稿受付：6 年 3 月 3 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
孫　　保　福

Presented by Medical*Online

サを導入することが考案された[12~15]．例えば，抗体とキレートの間にジエステル基を導入したキレート剤で標識された抗体ではジエステル結合がエステラーゼにより正常組織で代謝され，^{111}In放射能はIn-キレートの形で速やかに腎尿路系から排泄されるため，腫瘍対正常組織の相対的放射能比を改善可能であると報告されている[12,14]．しかし，腫瘍への絶対的な放射能集積も同時に低下するという欠点も明らかになっている[12,14]．

本研究の第一報で[16]，ジエステルスペーサを含むキレート剤 succinimido-EGS-DTPA (EGS-DTPA)，および炭化水素スペーサを含むキレート剤 maleimido-C10-benzyl-EDTA (C10-Bz-EDTA) で標識された抗体の血清中での安定性を，それらの対照キレート剤である cDTPAA あるいは SCN-Bz-EDTA で標識された抗体と比較検討し報告した．その結果，Bz-EDTA 構造をキレート骨格に持つ C10-Bz-EDTA および SCN-Bz-EDTA で標識された抗体はヒト血清中で非常に安定であるのに対し，DTPA 構造をキレート骨格に持つ EGS-DTPA と cDTPAA で標識された抗体は血清中でトランスキレーションを示し不安定であること，さらに，ジエステルスペーサは血清中でもかなりの速度で分解されることが判明した．本報では，これらの血清中での結果が，実験動物における体内での ^{111}In 標識抗体の動態にいかに反映され，かつどのキレート剤を用いれば最も望ましい画像を得ることができるかを検討した．

II. 材料および方法

1. 抗体と動物モデル

ヒト大腸癌細胞に発現される糖蛋白抗原（分子量 45000）を認識するモノクローナル A7 抗体（マウス IgG_1）を用いた．

実験動物としては，4週齢（体重 7～14 g）の雌 BALB/c ヌードマウスの右大腿部外側皮下にヒト大腸癌 LS180 細胞（5×10^6 個）を移植し，腫瘍重量が 0.5～1.0 g になった時点（約3週間後）で実験に用いた．

2. キレート剤と A7 抗体の結合および ^{111}In 標識

1) EGS-DTPA あるいは DTPA 結合抗体の合成

4種類キレート剤と抗体の結合および結合抗体の ^{111}In 標識は第一報での検討により至適と判明した条件で行った[16]．EGS-DTPA-A7 の合成には，succinimido-EGS-DTPA と A7 抗体 (15 mg/m*l*) をモル比 10 : 1 で，12 時間 4°C で反応させた．未結合 EGS-DTPA は centricon-30 (Amicon 社，Beverly, USA) を用いて遠心除去した．

DTPA-A7 の合成には，cDTPAA と A7 抗体 (15 mg/m*l*) をモル比 2 : 1 で，室温で 1 時間反応させた．未結合 cDTPAA は centricon-30 を用いて除去した．

2) C10-Bz-EDTA あるいは SCN-Bz-EDTA 結合抗体の合成

C10-Bz-EDTA-A7 の合成は，まず A7 抗体をモル比 1000 : 1 の 2-メルカプトエタノールにより室温 30 分間で還元し，ゲル濾過カラム (Sephadex G-50) で精製した後，C10-Bz-EDTA と還元 A7 抗体をモル比 1 : 1 で，室温 2 時間で反応させた．抗体の最終濃度は 15 mg/m*l* であった．

SCN-Bz-EDTA 結合抗体では，dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解した SCN-Bz-EDTA を，A7 抗体 (15 mg/m*l*，ホウ酸緩衝液，pH 9.5) とモル比 1 : 1 で混合し，37°C で 4 時間インキュベートして合成した．

3) ^{111}In 標識

塩化インジウム ($^{111}InCl_3$) とキレート結合 A7 抗体溶液を 0.3–0.03 M 酢酸—クエン酸緩衝液 (pH 5) でそれぞれ pH 4.8, 6.0 に調製し，混和後 4°C で 30 分間反応させ標識した．酢酸—クエン酸緩衝液の最終濃度は 0.1–0.01 M であった．未標識 ^{111}In を除去するため，モル比 500～1000 倍過剰の cDTPAA (DMSO に溶解) を加え，5 分間反応させた後，高速液体クロマトグラフィ (HPLC, TSKgel-G3000SWXL, 0.1 M リン酸緩衝液，pH 7.4) により標識抗体を精製し，以下の実験に用いた．使用に先立ち，^{111}In コロイドの有

Presented by Medical*Online

Table 1 Preparations of four radioimmunoconjugates

Chelates	Chelate : Ab (Mole : Mole)	Chelate/ IgG	S.A. (MBq/mg)	C.F.	I.R. (%)	Dose injected (kBq)	Dose injected (μg)
Maleimido-C10-Bz-EDTA (Hydrocarbon spacer)	1 : 1	0.8	32.9	none	87.0	202.4* (13.0)	6.2* (0.4)
Isothiocyanatobenzyl-EDTA	1 : 1	0.7	14.8	none	85.0	69.2 (10.0)	4.7 (0.7)
Succinimido-EGS-DTPA (Diester spacer)	10 : 1	0.7	30.0	none	82.0	86.2 (7.8)	2.9 (0.3)
Cyclic DTPA dianhydride	2 : 1	1.0	27.0	none	91.0	206.5 (33.7)	7.6 (1.2)

S.A.: Specific Activity, C.F.: Colloid Formation, I.R.: Immunoreactivity
*Mean (±SD), n=30

無を 0.15 M 塩化ナトリウム溶液で展開したペーパークロマトグラフィ (2×40 cm 東洋濾紙) で検討した.

3. 生体内分布

HPLC 精製 ^{111}In 標識 A7 抗体は膜フィルター (0.22 μm, Millipore) で除菌し, 担癌ヌードマウス 1 匹当たり 100 μl (1% BSA 含有, 2.9～7.6 μg/69.2～206.5 kBq) を尾静脈より静注した (Table 1). 投与後 3, 24, 48, 72, 96 時間でマウスを屠殺し (n=6), 血液, 肝, 脾, 筋肉, 腸管, 腫瘍を取り出し, 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 当たりの放射能の分布割合 (%ID/g) を求めた. また, 各個体ごとの投与量を正確に得るため, 注射前後の注射器の重量測定を行った. 放射能は, オートウエル型ガンマカウンター (ARC301, アロカ) で測定した.

4. 肝細胞内の放射能分布

肝細胞内における放射能分布の検討のため, 3. の検討に用いたマウスの肝の一部 (0.7 g) 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 7.6) を加えて, ポッター型ホモジナイザーでホモジネートしガーゼで濾過した後, 冷却遠心器 (KR-20000, クボタ, 大阪) および超遠心器 (L5-50B, Beckman, USA) を用い 3 段階の遠心操作 (2000 rpm×15 min, 5000 g×15 min, 105000 g×50 min) を行い[17], 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に含まれる放射能を測定した. 以上の操作は 4°C にて行った.

5. 体外排泄に関する検討

1) 全身の放射能消失

担癌ヌードマウス尾静脈より ^{111}In 標識 A7 抗体 2.8～6.0 MBq/75～193 μg を静注し, 経時的に全身残留放射能を個々のマウスについてキュリーメータで測定した. データを減衰補正を行い, 生物学的全身放射能の半減期を求めた.

2) 尿, 糞便中への放射能排泄

5. 1) で用いたマウスから経時的に尿と糞を採集し放射能を測定し, 累積排泄量を求めた. また, 尿中への放射能の排泄形態の検討のため, 採集した尿を HPLC を用い分析した.

6. イメージング

5. で用いた担癌ヌードマウスの撮像を, 標識 A7 抗体投与後 6, 48 時間に Sigma 414 ガンマカメラ (Aloca, ピンホールコリメータ) を用いて行った.

III. 結　果

1. ^{111}In 標識キレート結合 A7 抗体

EGS-DTPA, cDTPAA, SCN-Bz-EDTA, C10-Bz-EDTA と A7 抗体をおのおのモル比 10 : 1, 2 : 1, 1 : 1, 1 : 1 で反応させた場合, 抗体上に導入されるキレート分子数は抗体分子あたり 0.7～

Presented by Medical*Online

Table 2 Biodistribution (%ID/g) of ^{111}In labeled EGS-DTPA-A7 (EGS) and DTPA-A7 (DTPA) in human LS180 tumor bearing nude mice

	3 hr		24 hr		48 hr		72 hr		96 hr	
	EGS	DTPA	EGS	DTPA	EGS	DTPA	EGS	DTPA	EGS	DTPA
Blood	30.31	29.31	7.96‡	11.32	2.18†	5.56	1.05¶	3.73	0.44*	2.03
	1.15	4.36	1.82	1.34	0.52	1.87	0.14	0.86	0.15	1.25
Tumor	8.98	5.01	15.38	18.28	14.07	20.86	11.04	24.14	5.18	15.51
	3.41	1.58	7.43	8.52	3.35	5.35	3.11	12.65	1.16	5.38
Liver	10.63	11.67	6.97¶	13.37	7.04¶	14.12	6.4*	11.04	5.51‡	8.50
	1.24	2.05	0.68	2.08	1.38	1.15	3.18	1.69	1.49	1.19
Spleen	7.65	7.35	3.58†	7.22	2.56‡	7.76	2.45¶	6.73	2.38*	4.61
	2.17	3.15	0.57	2.09	0.22	1.89	1.38	0.63	0.38	1.59
Muscle	1.06	1.25	0.83‡	1.79	0.43¶	1.19	0.39¶	0.97	0.22†	0.85
	0.22	0.35	0.10	0.42	0.15	0.31	0.17	0.14	0.07	0.34
GIT	2.83†	3.99	2.34	2.37	1.55	1.97	1.01¶	1.70	0.65†	1.00
	0.18	0.65	0.37	0.44	0.40	0.45	0.29	0.15	0.13	0.21

Upper line: Mean; Lower line: S.D. (n=6)
*$p<0.05$, †$p<0.01$, ‡$p<0.005$, ¶$p<0.001$: Comparison of the two conjugates in each time.

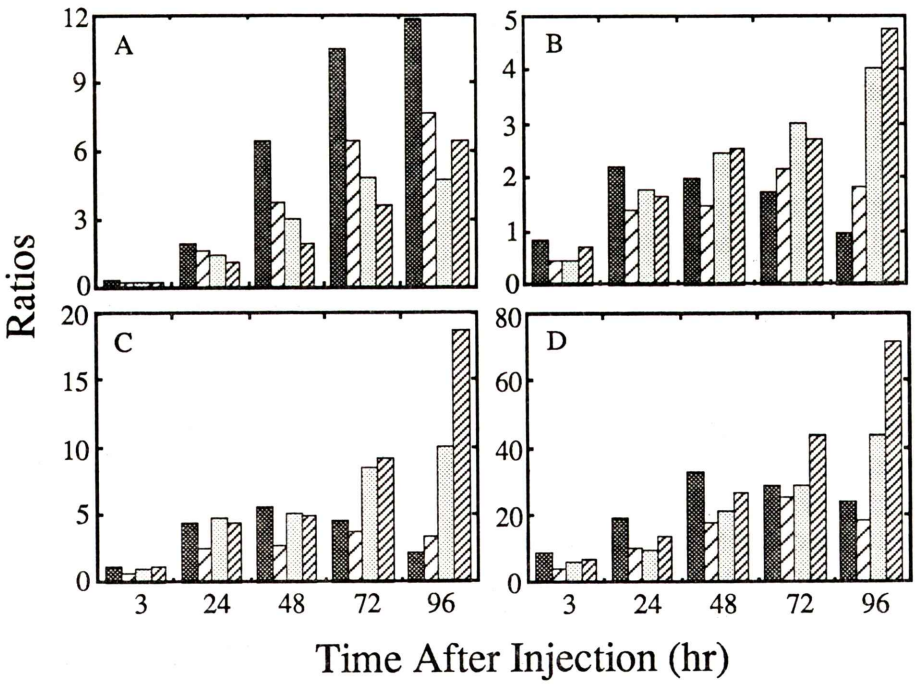

Fig. 1 Tumor to blood (A), tumor to liver (B), tumor to spleen (C) or tumor to muscle (D) ratios for ^{111}In labeled four immunoconjugates in human LS180 tumor bearing nude mice. Note the different scale for each organ. ■ EGS-DTPA-A7, ▨ DTPA-A7, □ C10-Bz-EDTA-A7, ▨ SCN-Bz-EDTA-A7.

Presented by Medical*Online

Table 3 Biodistribution (%ID/g) of ^{111}In labeled C10-Bz-EDTA-A7 (C10) and SCN-Bz-EDTA-A7 (SCN) in human LS180 tumor bearing nude mice

	3 hr		24 hr		48 hr		72 hr		96 hr	
	C10	SCN	C10	SCN	C10	SCN	C10	SCN	C10	SCN
Blood	31.45	34.10	8.74‡	17.39	5.02¶	12.81	2.38*	6.44	1.82*	3.88
	4.00	1.30	0.93	3.19	2.53	2.80	0.86	3.12	0.91	1.37
Tumor	6.06	8.08	12.44	19.51	15.34	25.27	11.39	23.29	8.70	24.93
	1.53	4.26	4.76	7.57	5.41	10.19	4.36	8.93	1.97	4.48
Liver	14.07	11.49	7.08†	11.95	6.25	10.04	3.81	8.60	2.16*	5.26
	2.36	0.83	1.94	3.12	0.78	5.01	1.14	4.99	0.52	1.86
Spleen	6.47	7.43	2.7†	4.57	3.03*	5.10	1.35	2.55	0.87	1.34
	1.57	0.99	0.23	0.98	1.30	1.73	0.57	1.21	0.29	0.48
Muscle	1.01	1.23	1.31	1.46	0.74	0.97	0.40	0.54	0.20*	0.35
	0.18	0.19	0.22	0.33	0.32	0.21	0.17	0.21	0.09	0.12
GIT	6.44‡	3.32	5.58*	2.19	4.15*	1.67	2.07‡	1.15	0.93	0.73
	1.31	0.46	3.09	0.40	1.78	0.41	0.47	0.17	0.46	0.14

Upper line: Mean; Lower line: S.D. (n=6)
*$p<0.05$, †$p<0.01$, ‡$p<0.005$, ¶$p<0.001$: Comparison of the two conjugates in each time.

1.0 個とほぼ同じで，いずれの場合も十分な比放射能を得ることができた (Table 1). またどの抗体溶液中にもコロイド形態の放射能が存在しないことがペーパークロマトグラフィで確認された (Table 1). さらにいずれの標識抗体も免疫活性は 82～91％に保持された (Table 1).

2. 生体内分布

^{111}In 標識 EGS-DTPA 結合 A7 抗体と DTPA 結合 A7 抗体の生体内分布を Table 2 に示した. EGS-DTPA 結合抗体では，正常組織の放射能が投与後 3 時間に最高値を示し，時間の経過とともに速やかに減少した．一方，DTPA 結合抗体の正常組織の取り込みは血中放射能を除き，投与後 24～48 時間の間に最高値に達し，その後徐々に減少した．EGS-DTPA 結合抗体の血中放射能は DTPA 結合抗体と比べ投与 24 時間後に約 30％減少し ($p<0.005$)，さらに 96 時間後には約 80％ ($p<0.05$) 減少した．また，EGS-DTPA 結合抗体の肝，脾の放射能は投与 24 時間後に DTPA 結合抗体の約 50％減少した ($p<0.001$). 腫瘍への放射能の取り込みは EGS-DTPA 結合抗体では投与 24 時間後 15.4％ID/g と最高値を示したが，48 時間以後徐々に減少し，投与後 96 時間で 5.2％ID/g となった．一方，DTPA 結合抗体の腫瘍放射能は投与後経時的に漸増し，投与後 72 時間で最高となり，24.1％ID/g の値を示した．腫瘍対正常組織の放射能比では，投与後 48～72 時間までは，EGS-DTPA 結合抗体の方が高いのに対し，96 時間後には DTPA 結合抗体が高くなる傾向を示した (Fig. 1).

^{111}In 標識 C10-Bz-EDTA 結合 A7 抗体および SCN-Bz-EDTA 結合 A7 抗体の体内分布を Table 3 に示した．抗体投与後 3 時間には両キレート結合抗体は類似の分布を示した．しかし，経時的に観察すると腸管を除くすべての正常組織の放射能が C10-Bz-EDTA 結合抗体で速やかに減少した．すなわち C10-Bz-EDTA 結合抗体の血中放射能は投与後 24 時間以降 SCN-Bz-EDTA 結合抗体の半分以下の低値を示した ($p<0.005$). また，肝放射能も投与後 24 時間に SCN-Bz-EDTA 結合抗体の約 60％に減少し ($p<0.01$)，さらに 96 時間後には約 40％までに低下した．脾の放射能も投与後 24 時間から 96 時間まで，C10-Bz-EDTA 結合抗体では SCN-Bz-EDTA 結合抗体より放射能が 35～47％低減した．一方，腸管放射能は C10-Bz-EDTA 結合抗体の方が高く，投与後 3 時間から 72 時間まで SCN-Bz-EDTA 結合抗体より 1.8～2.5 倍高い放射能を示した ($p<0.01$). 腫瘍放

Presented by Medical*Online

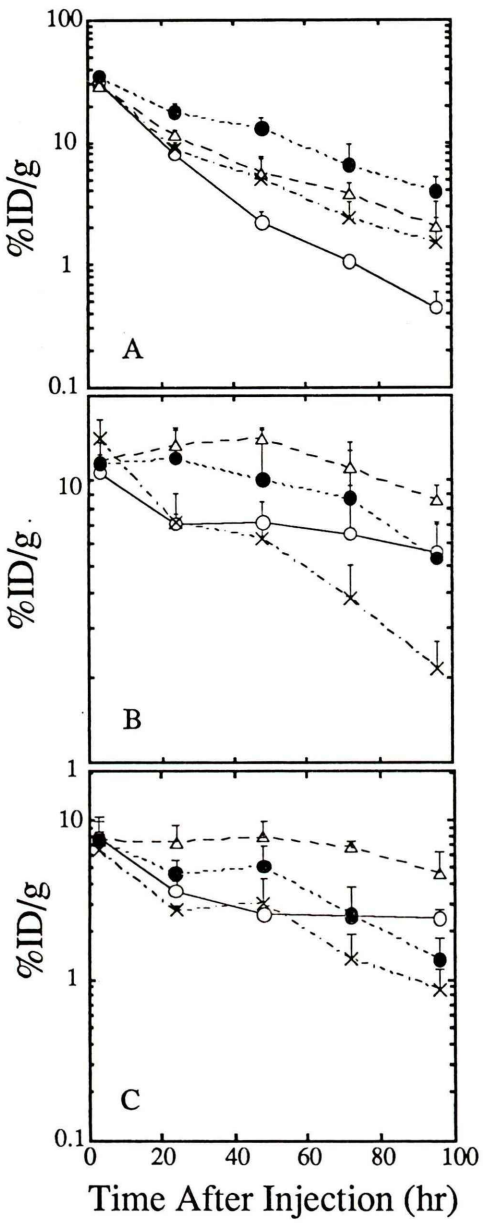

Fig. 2 Clearances of ^{111}In activity from blood (A), liver (B) or spleen (C) after injection of four immunoconjugates in human LS180 tumor bearing nude mice. Vertical bars showed Mean ±S.D. (n=6). ○ EGS-DTPA-A7, △ DTPA-A7, × C10-Bz-EDTA-A7, ● SCN-Bz-EDTA-A7.

射能は，C10-Bz-EDTA 結合抗体では投与後48時間に 15%ID/g の最高値となった後漸減する傾向を示したのに対し，SCN-Bz-EDTA 結合抗体の場合は48時間後に 25%ID/g の最高値を示し，投与後 96 時間でも高い集積を保った．腫瘍対血液の放射能比は投与後 72 時間まで C10-Bz-EDTA の方が高かった．また，腫瘍対他の正常組織の放射能比は筋肉を除いて投与後 48 時間までは C10-Bz-EDTA の方がやや高い傾向を示したものの，72 時間以後では，SCN-Bz-EDTA キレートの方が高くなった (Fig. 1).

血中放射能の経時的変化を Fig. 2A に示した．血中の放射能は EGS-DTPA 結合抗体，C10-Bz-EDTA 結合抗体，DTPA 結合抗体，SCN-Bz-EDTA 結合抗体の順に早く消失した．スペーサを含むキレート剤で標識された抗体はいずれも，おのおのの対照のスペーサを含まないキレート剤で標識された抗体より早い傾向が見られた．肝，脾の放射能も同様にスペーサを含むキレート剤で標識された抗体で速やかに減少した (Fig. 2B, C). 特に C10-Bz-EDTA 結合抗体の減少が著明であった．興味深いことに，EGS-DTPA 結合抗体の肝放射能はその対照である DTPA 結合抗体より低いものの，投与 24 時間以降ほぼ一定の値を示したのに対し，C10-Bz-EDTA 結合抗体では投与 96 時間後まで減少する傾向を示した (Fig. 2B).

3. 肝細胞内の放射能分布

各キレート結合抗体の肝細胞内放射能分布の経時的変化を Fig. 3 に示した．いずれの場合も投与 3 時間後には，放射能は主に上清分画に存在し，24 時間後以降ではこの分画の放射能は経時的に減少し，代わってリソゾームを含むミトコンドリア分画中の放射能が増加した．一方，核分画，ミクロゾーム分画中の放射能に経時的変化は認められずほぼ一定の値を示した．ミトコンドリア分画の放射能の経時的な増加量を見ると，C10-Bz-EDTA，SCN-Bz-EDTA 結合抗体と比べ，EGS-DTPA，DTPA 結合抗体の方が大きい傾向を示した．すなわち投与後 24 時間以降，この分画の放射能は EGS-DTPA 結合抗体が C10-Bz-EDTA 結

Presented by Medical*Online

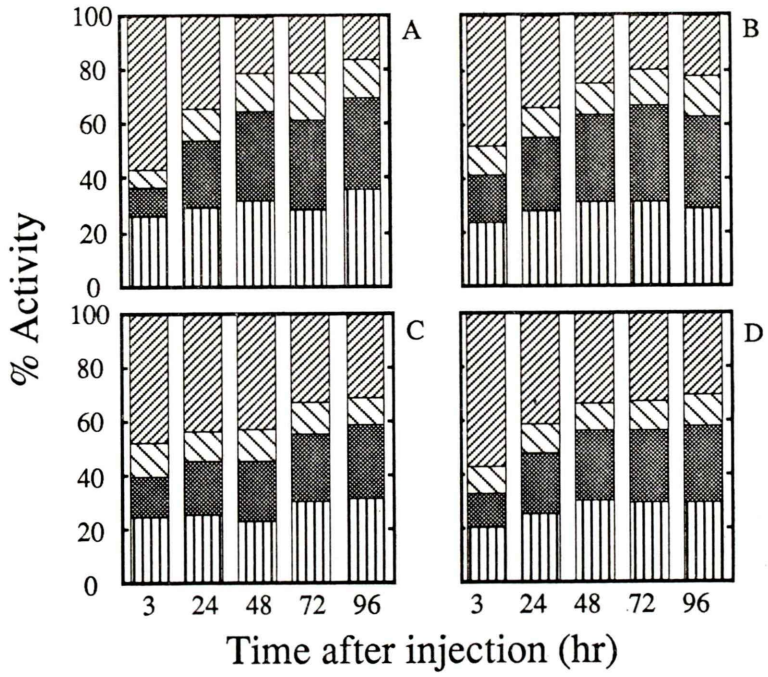

Fig. 3 Subcellular distribution of ^{111}In labeled four immunoconjugates in the livers of human LS180 tumor bearing nude mice. Values were expressed as a percentage of total radioactivity for all fractions. Mean values of 4–6 nude mice. A, B, C and D for EGS-DTPA-A7, DTPA-A7, C10-Bz-EDTA-A7 and SCN-Bz-EDTA-A7, respectively. [[] Nucleus fraction, ▩ mitochondria (including lysosome) fraction, ▨ microsome fraction, ▨ supernatant fraction.

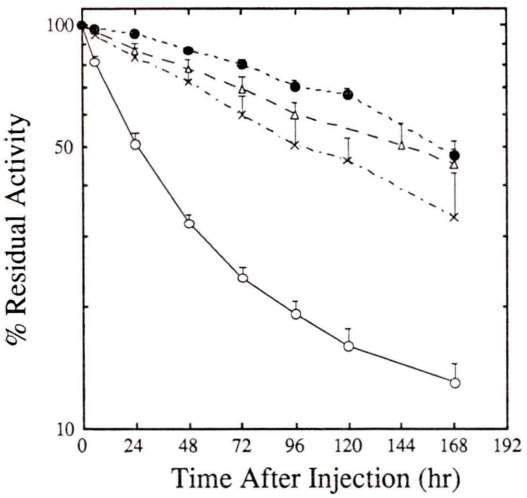

Fig. 4 The whole-body clearance of ^{111}In labeled four immunoconjugates in human LS180 tumor bearing nude mice (n=3–8). ○ EGS-DTPA-A-7, △ DTPA-A7, × C10-Bz-EDTA-A7, ● SCN-Bz-EDTA-A7.

Presented by Medical*Online

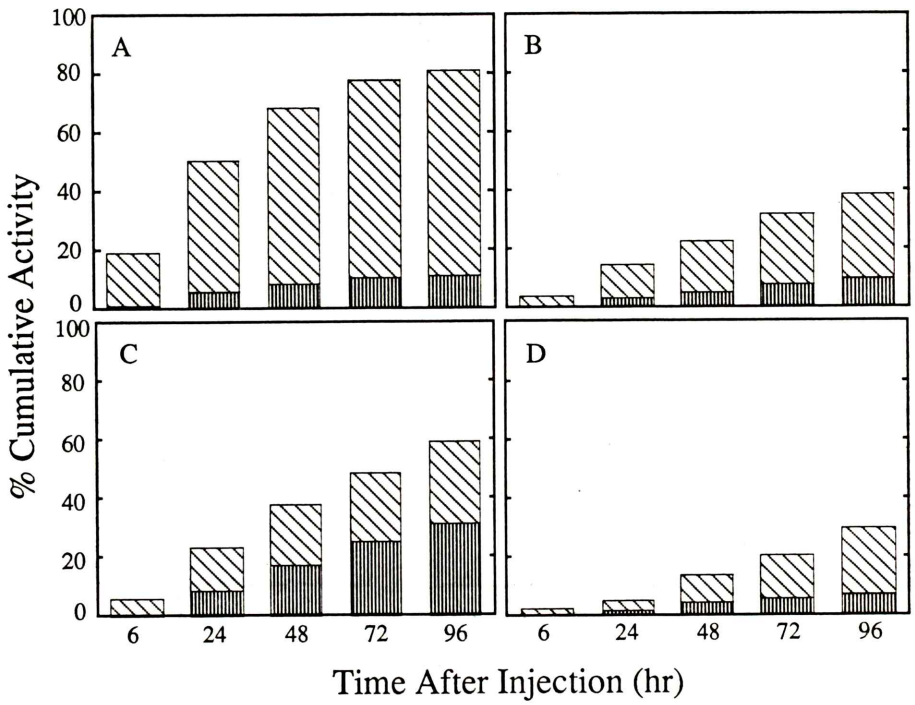

Fig. 5 Cumulative activity excreted through urine (▨) or feces (▥) in human LS180 tumor bearing nude mice for four immunoconjugates. Till 96 hrs postinjection, 81.0% of injected doses for EGS-DTPA-A7 (A), 38.4% for DTPA-A7 (B), 59.3% for C10-Bz-EDTA-A7 (C) and 29.4% for SCN-Bz-EDTA-A7 (D) were excreted. The EGS-DTPA-A7, DTPA-A7, SCN-Bz-EDTA-A7 were excreted predominantly via urine, 86.2%, 74.7%, 77.6%, respectively, while C10-Bz-EDTA-A7 mainly via feces, 52.0%.

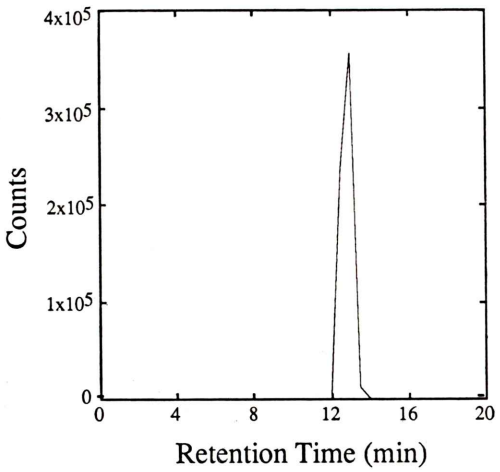

Fig. 6 HPLC analysis of radioactivity profiles of urine for ^{111}In-EGS-DTPA-A7 in human LS180 tumor bearing nude mouse at 24 hrs post-injection.

Presented by Medical*Online

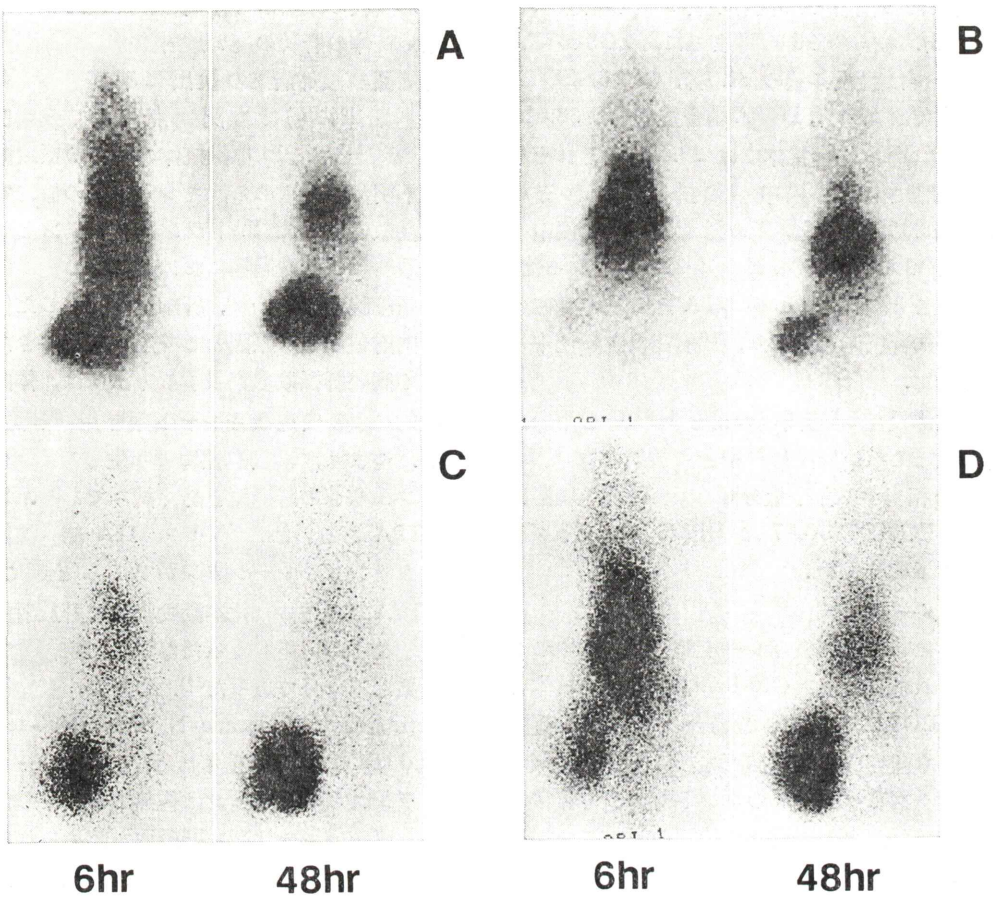

Fig. 7 Radioimmunoscintigraphy of tumor-bearing nude mice after injection of ^{111}In-EGS-DTPA-A7 (A), ^{111}In-DTPA-A7 (B), ^{111}In-C10-Bz-EDTA-A7 (C) or ^{111}In-SCN-Bz-EDTA-AM (D). Radioactivity shown in upper dark area is the abdominal region. Tumor is located in the lower left section of the dark area. Left panels are 6 hrs images and right panels are 48 hrs images.

合抗体より 20～30% ($p<0.05$), SCN-Bz-EDTA 結合抗体より 7～24% ($p<0.05$) 高値を示した. また, DTPA 結合抗体は C10-Bz-EDTA 結合抗体より 20～33% ($p<0.05$), SCN-Bz-EDTA 結合抗体より 14～21% ($p<0.05$) 高値を示した.

4. 代謝経路の検討

1) 全身からの放射能消失

全身からの放射能消失は血中放射能の経時的変化と同様の傾向を示した (Fig. 4). スペーサを含むキレート結合抗体は, いずれも対照のキレート結合抗体に比べ全身からの放射能消失は早く, 特に EGS-DTPA 結合抗体で顕著であった. それぞれの生物学的半減期は EGS-DTPA 結合抗体が 24 時間, C10-Bz-EDTA 結合抗体が 96 時間, DTPA 結合抗体が 144 時間, SCN-Bz-EDTA 結合抗体が 162 時間であった.

2) 尿, 糞便中への放射能排泄

スペーサを含むキレート結合抗体の尿中あるいは糞便中に排泄された全放射能と, おのおのの対照キレート結合抗体のそれを比較すると, 投与後

Presented by Medical*Online

96時間までに前者では後者の約2倍の値を示した(Fig. 5). 投与後96時間までに, EGS-DTPA結合抗体では全投与量の81.0%, C10-Bz-EDTA結合抗体では59.3%, DTPA結合抗体では38.4%, SCN-Bz-EDTA結合抗体では29.4%がそれぞれ体外に排泄された. 尿中への排泄はそれぞれ86.2%, 48.0%, 74.7%, 77.6%を占め, 糞便中への排泄は13.8%, 52.0%, 25.3%, 22.4%であった. 興味深いことに, C10-Bz-EDTA結合抗体は他のキレート結合抗体と異なり, 放射能は主に便中に排泄された.

標識抗体投与24時間後の尿をHPLCを用いて分析したところ, いずれの場合も放射能は^{111}In-DTPAと相当する分子量分画(12～14分)に溶出された. EGS-DTPA-A7のHPLCクロマトグラムをFig. 6に示した.

5. イメージング

Fig. 7に^{111}In標識キレート結合A7抗体のシンチグラムを示した. C10-Bz-EDTA結合抗体とSCN-Bz-EDTA結合抗体の場合は投与後6時間の早期でも腫瘍は明瞭に描画され, しかも肝臓などのバックグラウンドとのコントラストも非常に良好であった. さらに投与後時間の経つにつれ, 特にC10-Bz-EDTA結合抗体でバックグラウンドの減少が顕著であり, 腫瘍対正常組織の放射能比がより改善された. 一方, EGS-DTPA結合抗体とDTPA結合抗体の場合は腫瘍への放射能集積は良好であったものの, 肝臓などへの非特異的集積も高く, コントラストの悪い像であった. DTPA結合抗体とEGS-DTPA結合抗体を比べると, EGS-DTPA結合抗体では正常組織の放射能集積が漸減したため, 腫瘍対正常組織のコントラストが改善されたが, C10-Bz-EDTA結合抗体, SCN-Bz-EDTA結合抗体と比較すると不良であった.

IV. 考 察

RIS用核種として, 二官能性キレート剤を用いた標識法が確立されてきたことにより, ^{111}Inが使用されることが多くなってきた[18~22]. しかし, 動物実験の段階から指摘されていたように, ^{111}In標識抗体の肝脾の高い放射能摂取が, 肝内病巣, 肝周囲の腹部病巣の検出に不都合であることが, 臨床の場でも問題点として上げられてきた[18,20~22]. ^{111}In標識抗体の肝への摂取機序はまだ不明であるものの, キレート剤の体内での不安定性故に生じたIn-トランスフェリンとしての肝摂取[23,24], 標識過程における抗体の変性による網内系細胞の貪食[10,25], 肝細胞内で生じた代謝物の肝内貯留などが原因として上げられてきた[26,27]. この高い肝摂取を克服する方法には, 体内で熱力学的により安定なキレート剤を用いる方法がある. つまり, 不安定性により生じる^{111}In-トランスフェリンの肝摂取を防ぐ試みである. SCN-Bz-DTPAあるいはSCN-Bz-EDTA結合抗体は血中でトランスキレーションがほとんど起こらず, DTPA結合抗体に比べ動物実験で肝放射能を低減することが可能であったが[9,10], 臨床例では低減効果は不十分であった[11]. さらに, 安定性の高いTetraazacyclododecane-N,N′,N″,N‴-tetraacetic acid (DOTA)が開発された. このキレート剤ではトランスキレーションは皆無である. しかしながら, 臨床応用では高い肝摂取が認められた[24]. したがって, このアプローチでは肝摂取の問題点を解決できないと判明した. 他方, 抗体とキレート剤の間に体内で代謝されうる化学スペーサを導入することにより, ^{111}In-キレートの形での体外排泄を促進し, 腫瘍対バックグラウンド比を改善する方法が考案された[12~15]. 実験動物でのイメージング結果では腫瘍対バックグラウンドのコントラストは投与後早期から改善されていた.

本報では等一報で報告した2種類のスペーサを含むキレート剤とそれらの対照であるスペーサを含まないキレート剤との体内動態の詳細な検討を目的とした. 今回用いたC10-Bz-EDTAは10個の炭化水素からなるスペーサを含有し, EGS-DTPAはジエステルスペーサを有する. EGS-DTPAとDTPA結合抗体は第一報で示したように両者ともトランスフェリンへ^{111}Inが移行した. さらに, EGS-DTPA結合抗体はDTPA結合抗

Presented by Medical*Online

体よりも血中消失が著しく早く，尿中の小分子量代謝物もみられるため，ジエステル結合の血中での解離が示唆された．血中での安定性の違いが標識抗体の体内動態に影響を与えることは明らかである．^{111}In-キレートの形で解離が血中で生じれば，血液からの放射能消失が促進され，その結果，腫瘍を含めた全身臓器への放射能摂取が低下すると考えられる．従来，EGS-DTPA 結合抗体が DTPA 結合抗体に比べ肝放射能が低いのは，肝内で代謝が促進され，速やかに排泄されるためであると考えられている[12~15]．しかし，著者の検討したモデルではこの考えは必ずしも妥当とは言えなかった．肝内の放射能分布を見ると，DTPA 結合抗体では ^{111}In 放射能の貯留場と考えられているリソゾーム分画を含むミトコンドリア分画[17,28~31]に放射能が長時間にわたり貯留した．一方，肝内でのジエステル結合の代謝もリソゾームで起こり，EGS-DTPA 結合抗体でもいったん肝内に取り込まれてしまえば，放射能は DTPA 結合抗体と全く同様に小分子量代謝物として肝細胞リソゾーム分画に貯留するものと考えられる．したがって，EGS-DTPA 結合抗体は血中でのジエステル結合が不安定性なために血中放射能が低下する結果，二次的に初期の肝摂取が低下した機序が主体と結論できる．

C10-Bz-EDTA 結合抗体，SCN-Bz-EDTA 結合抗体はともに血中でトランスキレーションや EGS-DTPA 結合抗体のようなスペーサの解離による不安定性は示さなかった．しかしながら，血中からの放射能消失と各臓器への放射能摂取に大きな差が認められた．このことより，^{111}In 標識抗体の体内動態は血中での安定性以外の因子にも大きく影響されることは明白である．臓器での代謝様式の相違が重要な因子と推察される．一般に，標識抗体の代謝に関して最も大きな寄与臓器と考えられているのは肝臓である．C10-Bz-EDTA 結合抗体の肝放射能は投与後早期には SCN-Bz-EDTA 結合抗体と同程度であるが，経時的により速やかに低下した．興味深いことに，C10-Bz-EDTA 結合抗体の体外への排泄は，他の 3 種類のキレート剤の場合と異なり，唯一便中排泄が主であった．そのため，C10-Bz-EDTA 結合抗体では SCN-Bz-EDTA 結合抗体より肝集積が有意に低下したと考えられた．したがって，C10-Bz-EDTA キレート剤では ^{111}In 標識抗体の肝摂取低減効果に関しては最も優れていた．しかし，RIS において C10-Bz-EDTA 結合抗体を用いて大腸癌をイメージングする場合，腸管の放射能が病巣への集積か排泄放射能か区別が困難になる欠点も有している．代謝物が尿路系から排泄されるのか，胆道系から排泄されるのかを決定する因子は今回得られた結果からは明らかではないが，生じた代謝物の化学的性質に基づく可能性がある．体内で生じた代謝物は，In-キレートとほぼ同一分子量物質であった．キレート剤の構造から判断すると，C10-Bz-EDTA では炭化水素鎖のためより脂溶性が高いと思われる．したがって，体内で生じた C10-Bz-EDTA の代謝物が他のキレートで標識された抗体の代謝物より脂溶性が高いものと想像され，この性質が C10-Bz-EDTA 結合抗体の代謝物の胆道系排泄促進の一因であるものと推測される．

SCN-Bz-EDTA 結合抗体と DTPA 結合抗体を比較すると，腫瘍への放射能集積は同程度であった．しかし，血中からの放射能消失は SCN-Bz-EDTA 結合抗体の方が遅く，肝を含めた実質臓器の放射能消失は SCN-Bz-EDTA 結合抗体が逆により速かった．その結果，血液を除いて腫瘍対正常組織のコントラストは SCN-Bz-EDTA 結合抗体で良好であった．先に述べたように，DTPA 結合抗体は血中で ^{111}In のトランスフェリンへの移行を示すが，SCN-Bz-EDTA 結合抗体は血中で安定である．また，SCN-Bz-EDTA はチオウレア基を介して抗体と結合するのに対し，cDTPAA はアミド基である．チオウレア基はアミド基より体内で安定であると報告されている[32]．したがって，キレート剤と In ならびに抗体との結合いずれにおいても SCN-Bz-EDTA の方が全体として cDTPAA より高い安定性を有すると考えられた．両者の体内分布の相違の原因としては SCN-Bz-EDTA 結合抗体が血液から実質臓器への移行が

Presented by Medical*Online

遅いか，あるいは SCN-Bz-EDTA 結合抗体の方が安定なために実質臓器から血中への逆拡散がより多く生じた可能性が考えられた．いずれが原因であるかは十分には解明されていないため，今後の検討が必要と考えられた．

スペーサを含むキレート C10-Bz-EDTA 結合抗体，EGS-DTPA 結合抗体は，いずれもその対照のキレート結合抗体よりも腫瘍への放射能集積は低下した．しかし，血中からの放射能排泄が速く，正常組織の放射能摂取も低値であるため，腫瘍対正常組織の放射能比はきわめて良好であった．イメージングの結果でも，腫瘍以上に正常組織からの排泄が早く，投与後早期からコントラストのよい画像が得られた．ただし，腫瘍対正常組織比をみると，腫瘍からの放射能排泄のため，極端に遅い時間での撮像はおのおのの対照キレート剤結合抗体より良好な画像が得られないことを留意すべきである．しかし，実際上は，早期に良好なイメージが得られるため，遅い時間での撮像は不必要であると考えられ，RIS に関する限りは大きな問題とはならないと思われる．放射免疫治療 (Radioimmunotherapy, RIT) の場合も正常臓器の吸収線量が低減されるため，投与量を増加させることが可能と思われ，腫瘍への集積量の低さを補うことができるのではないかと考えられる．体内分布のみをとらえると，両スペーサを含むキレート結合抗体は一見類似の挙動を示したように思われるが，両者には大きな相違があることが明らかになった．すなわち EGS-DTPA 結合抗体は血中で代謝解裂を受けるのに対し，C10-Bz-EDTA 結合抗体は肝，胆道系より主として排泄される．EGS-DTPA を用いることにより血中および全身からの放射能消失は最も促進される．したがって，血栓，心筋梗塞，白血病あるいは悪性リンパ腫等に RIS を応用する場合には，C10-Bz-EDTA よりも優れた結果が得られる可能性がある．一方，今回新たに開発された C10-Bz-EDTA 結合抗体は，固型癌のイメージングに関しては最も望ましい体内動態を示したものと判断され，本キレート剤を用いることにより，^{111}In 標識抗体の欠点である高い肝放射能を臨床上まったく問題とならない程度まで低減することが可能であると思われる．

V. 結　論

^{111}In 標識モノクローナル抗体による放射免疫シンチグラフィの問題点である高い肝放射能の低減を目的に，新たに炭化水素スペーサを含む二官能性キレート剤による抗体標識法を開発し，これまで報告されている従来のジエステルスペーサを含むキレート剤およびそれらの対照であるスペーサを含まないキレート剤で標識された抗体のヌードマウスにおける体内動態を比較検討し，以下の結論を得た．

1) Bz-EDTA 構造を有する C10-Bz-EDTA, SCN-Bz-EDTA を用いた場合は，DTPA 構造の DTPA, EGS-DTPA を用いた場合よりも，低いバックグラウンド放射能を示すことが判明した．

2) スペーサを含むキレート剤結合抗体は，その対照であるスペーサを含まないキレート剤結合抗体に比べ，体外への放射能排泄が速く，正常組織の放射能も低いことが見いだされた．

3) EGS-DTPA 結合抗体は血中で不安定であり，代謝物が尿中に速やかに排泄されることにより，肝放射能摂取が DTPA 結合抗体に比べて肝放射能の著しい低減が達成できた．しかし，いったん肝内へ取り込まれた放射能は，従来の報告と異なり，DTPA 結合抗体と同様貯留することが明らかとなった．

4) C10-Bz-EDTA 結合抗体は血中で非常に安定であることに加え，肝内での代謝および胆道系からの排泄が速やかであるため，肝放射能が劇的に低減された．その結果，投与後早期から非常に良好な画像を得ることが可能であった．したがって，C10-Bz-EDTA 結合抗体は腫瘍診断に有用性がきわめて高いと考えられる．

謝辞：稿を終えるにのぞみ，ご指導，ご校閲を賜りました恩師久田欣一教授に深く感謝いたします．直接ご指導いただいた金沢大学医学部核医学教室横山邦彦先生，ならびに実験に際しご助力いただいた秀毛範至，絹谷清

Presented by Medical*Online

剛，宮内勉，徳山由紀子諸先生に深謝いたします．またご助言をいただいた金沢大学医学部核医学教室利波紀久助教授，旭川医科大学放射線科学教室油野民雄教授，金沢大学医療技術短期大学部診療放射線学科高山輝彦助教授，さらにご協力をいただいた教室の各先生に厚く御礼申し上げます．モノクローナル抗体 A7 を提供くださいました京都府立医科大学第一外科高橋俊雄教授，山口俊晴先生，塩化インジウム (In-111) を提供してくださいました日本メジフィジックス社に感謝いたします．

本研究の一部は，平成 2 年度厚生省がん研究助成金 (久田班，1–40) ならびに 3，4 年度厚生省がん研究助成金 (久田班，3–35)，および平成 5 年度厚生省がん研究助成金 (小西班，5–31) によったことを付記する．

本論文の要旨は第 39 回米国核医学会 (於 Los Angeles, 1992)，第 40 回米国核医学会 (於 Toronto, 1993)，第 30 回 (於東京，1990)，第 31 回 (於松山，1991)，第 32 回 (於横浜，1992) および第 33 回日本核医学会総会 (於宮崎，1993) にて発表した．

文　献

1) Rainsbury RM, Ott RJ, Westwood JH, Kalirai TS, Coombes RC, McCready VR, et al: Location of metastatic breast carcinoma by a monoclonal antibody chelate labeled with indium-111. Lancet **ii**: 934–938, 1983
2) Halpern SE, Hagan PL, Garver PR, Koziol JA, Chen AWN, Frincke JM, et al: Stability, characterization, and kinetics of ^{111}In-labeled monoclonal antitumor antibodies in normal animals and nude mouse-human tumor models. Cancer Res **43**: 5347–5355, 1983
3) Buchsbaum D, Randall B, Hanna D, Chandler R, Loken M, Johnson E: Comparison of the distribution and binding of monoclonal antibodies labeled with 131-iodine or 111-indium. Eur J Nucl Med **10**: 398–402, 1985
4) Gansow OA: Newer approaches to the radiolabeling of monoclonal antibodies by use of metal chelates. Nucl Med Biol **18**: 369–381, 1991
5) Cole WC, DeNardo SJ, Meares CF, McCall MJ, DeNardo GL, Epstein AL, et al: Comparative serum stability of radiochelates for antibody radiopharmaceuticals. J Nucl Med **28**: 83–90, 1987
6) Mirzadeh S, Brechbiel MW, Atcher RW, Gansow OA: Radiometal labeling of immunoproteins: convalent linkage of 2-(4-isothiocyanatobenzyl) diethylenetriaminepentaacetic acid ligands to immunoglobulin. Bioconjug Chem **1**: 59–65, 1990
7) Srivastava SC, Mease RC: Progress in research on ligands, nuclides and techniques for labeling monoclonal antibodies. Nucl Med Biol **18**: 589–603, 1991
8) Brandt KD, Johnson DK: Structure-function relationships in indium-111 radioimmunoconjugates. Bioconjug Chem **3**: 118–125, 1992
9) Esteban JM, Schlom J, Gansow OA, Atcher RW, Brechbiel MW, Simpson DE, et al: New method for the chelation of indium-111 to monoclonal antibodies: biodistribution and imaging of athymic mice bearing human colon carcinoma xenografts. J Nucl Med **28**: 861–870, 1987
10) Carney PL, Rogers PE, Johnson DK: Dual isotope study of iodine-125 and indium-111-labeled antibody in athymic mice. J Nucl Med **30**: 374–384, 1989
11) 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
12) Haseman MK, Goodwin DA, Meares CF, Kaminski MS, Wensel TG, McCall MJ, et al: Metabolizable ^{111}In chelate conjugated anti-idiotype monoclonal antibody for radioimmunodetection of lymphoma in mice. Eur J Nucl Med **12**: 455–460, 1986
13) Paik CH, Quadri SM, Reba RC: Interposition of different chemical linkages between antibody and ^{111}In-DTPA to accelerate clearance from nontarget organs and blood. Nucl Med Biol **16**: 475–481, 1989
14) Faivre-Chauvet A, Gestin JF, Mease RC, Sai-Maurel C, Thedrez P, Slinkin M, et al: Introduction of five potentially metabolizable linking groups between ^{111}In-cyclohexyl EDTA derivatives and $F(ab')_2$ fragments of anticarcinoembryonic antigen antibody-II. comparative pharmacokinetics and biodistribution in human colorectal carcinoma-bearing nude mice. Nucl Med Biol **20**: 763–771, 1993
15) Quadri SM, Vriesendorp HM, Leichner PK, Williams JR: Evaluation of indium-111- and yttrium-90-labeled linker-immunoconjugates in nude mice and dogs. J Nucl Med **34**: 938–945, 1993
16) 孫　保福：スペーサ含有および非含有二官能性キレート剤を用いた ^{111}In 標識モノクローナル抗体の比較研究——(I) 標識法および in vitro での安定性の検討——．核医学 **31**: 459–471, 1994
17) 絹谷清剛，横山邦彦，渡辺直人，嬉野孝子，油野民雄，利波紀久，他：In-111 標識モノクローナル抗体

Presented by Medical*Online

の肝細胞内放射能分布に関する検討. 核医学 **26**: 231–237, 1989
18) Merino MJ, Monteagudo C, Neumann RD: Monoclonal antibodies for radioimmunoscintigraphy of breast cancer. Nucl Med Biol **18**: 437–443, 1991
19) DeNardo SJ, O'Grady LF, Macey DJ, Kroger LA, DeNardo GL, Lamborn KR, et al: Quantitative imaging of mouse L-6 monoclonal antibody in breast cancer patients to develop a therapeutic strategy. Nucl Med Biol **18**: 621–631, 1991
20) Divgi CR, McDermott K, Johnson DK, Schnobrich KE, Finn RD, Cohen AM, et al: Detection of hepatic metastases from colorectal carcinoma using indium-111 (^{111}In) labeled monoclonal antibody (mAb): MSKCC experience with mAb ^{111}In-C110. Nucl Med Biol **18**: 706–710, 1991
21) Haseman MK, Brown DW, Keeling CA, Reed NL: Radioimmunodetection of occult carcinoembryonic antigen-producing cancer. J Nucl Med **33**: 1750–1757, 1992
22) Peltier P, Curtet C, Chatal JF, Le Doussal JM, Daniel G, Aillet G, et al: Radioimmunodetection of medullary thyroid cancer using a bispecific anti-CEA/anti-indium-DTPA antibody and an indium-111-labeled DTPA dimer. J Nucl Med **34**: 1267–1273, 1993
23) Himmelsbach M, Wahl RL: Studies on the metabolic fate of ^{111}In-labeled antibodies. Nucl Med Biol **16**: 839–845, 1989
24) Hnatowich DJ: Recent developments in the radiolabeling of antibodies with iodine, indium, and technetium. Seminars in Nucl Med **20**: 80–91, 1990
25) Reilly R, Lee N, Houle S, Law J, Marks A: In vitro stability of EDTA and DTPA immunoconjugates of monoclonal antibody 2G3 labeled with indium-111. Appl Radiat Isot **43**: 961–967, 1992
26) Jones PL, Brown BA, Sands H: Uptake and metabolism of ^{111}In-labeled monoclonal antibody B6.2 by the rat liver. Cancer Res (suppl) **50**: 852s–856s, 1990
27) Paik CH, Sood VK, Le N, Cioloca L, Carrasquillo JA, Reynolds JC, et al: Radiolabeled products in rat liver and serum after administration of antibody-amide-DTPA-indium-111. Nucl Med Biol **19**: 517–522, 1992
28) Gobuty AH, Kim EE, Weiner RE: Radiolabeled monoclonal antibodies: radiochemical pharmacokinetics and clinical challenges. J Nucl Med **26**: 546–548, 1985
29) Ando A, Ando I, Takeshita M, Hiraki T, Hisada K: Subcellular distribution of ^{111}In and ^{169}Yb in tumor and liver. Eur J Nucl Med **6**: 221–226, 1981
30) Geissler F, Anserson SK, Venkatesan P, Press O: Intracellular catabolism of radiolabeled anti-μ antibodies by malignant B-cells. Cancer Res **52**: 2907–2915, 1992
31) Duncan JR, Welch MJ: Intracellular metabolism of indium-111-DTPA-labeled receptor targeted proteins. J Nucl Med **34**: 1728–1738, 1993
32) Mardirossian G, Wu C, Hnatowich DJ: The stability in liver homogenates of indium-111 and yttrium-90 attached to antibody via two popular chelators. Nucl Med Biol **20**: 65–74, 1993

Presented by Medical*Online

Summary

Comparative Studies of ^{111}In-Labeled Monoclonal Antibody Using Spacer-Containing and Non-spacer Bifunctional Chelates: (II) Biodistribution, Metabolism and Excretion In Vivo

Baofu SUN

Department of Nuclear Medicine, Kanazawa University School of Medicine

Indium-111-labeled A7 monoclonal antibodies using two spacer-containing chelates, succinimido-EGS-DTPA (EGS-DTPA: diester spacer) and maleimido-C10-Bz-EDTA (C10-Bz-EDTA: hydrocarbon spacer) were investigated in human LS180 colon tumor bearing nude mice and were compared with two non-spacer chelates, cyclic DTPA dianhydride (cDTPAA) and isothiocyanatobenzyl-EDTA (SCN-Bz-EDTA). Compared with immunoconjugates using non-spacer chelates, immunoconjugates using spacer-containing chelates, especially C10-Bz-EDTA-A7 showed lower ^{111}In activity in normal organs. The radioactivity in the liver for C10-Bz-EDTA-A7 decreased continuously till 96 hrs postinjection, however, this liver radioactivity for EGS-DTPA-A7 showed little change after 24 hrs. Moreover, in liver subcellular distribution study, EGS-DTPA-A7 showed a higher activity retention in mitochondrial fraction which contained lysosome, a place for metabolizing and storing of ^{111}In labeled antibody, than that of C10-Bz-EDTA-A7. The C10-Bz-EDTA-A7 conjugate demonstrated more preferable tumor-to-non tumor contrast on the scintigrams than that found with other three immunoconjugates. Up to 96 hrs postinjection, tumor bearing nude mice injecting with immunoconjugates using spacer-containing chelates excreted twice radioactivity from whole body than that excreted by using non-spacer chelates. Interestingly, different from other three chelates, C10-Bz-EDTA-A7 were mainly excreted via feces. We conclude that the decrease of radioactivity in normal tissues in the case of EGS-DTPA-A7 was duo to the rapid decrease of activity in the blood, while in the case of C10-Bz-EDTA-A7 it was due to the quickly excreted small metabolite through faces. ^{111}In labeled C10-Bz-EDTA conjugate is superior, at least when conjugated with A7, to other three chelate conjugates used in this study.

Key words: Monoclonal antibody, Hydrocarbon spacer, Background, Biodistribution, Radioimmunoscintigraphy.

Presented by Medical*Online