

《原 著》

## 標識抗ヒト $\alpha$ -Fetoprotein 抗体を用いる腫瘍 イメージングの基礎的検討

——第2報 モノクローナル抗体 IgG と F(ab')<sub>2</sub> 分画の比較——

阪原 晴海\*    遠藤 啓吾\*    中島 鉄夫\*    小泉 満\*  
太田 仁八\*    鳥塚 莞爾\*    岡田謙一郎\*\*    吉田 修\*\*  
西 信三\*\*\*

**要旨** ヒト  $\alpha$ -fetoprotein (AFP) に対するモノクローナル抗体を用い、IgG と F(ab')<sub>2</sub> 分画の radioimmunoimaging における標識用抗体としての有用性を比較検討した。正常マウスでは F(ab')<sub>2</sub> の代謝は IgG に比べて著しく早く、IgG の血中半減期が 5.5 日であったのに対し、F(ab')<sub>2</sub> のそれは 6.3 時間であった。IgG および F(ab')<sub>2</sub> を <sup>131</sup>I で標識し、AFP 産生ヒト睾丸腫瘍移植ヌードマウスに投与して得られたシンチグラムでは F(ab')<sub>2</sub> はバックグラウンドの放射能の消失が早いため、早期に腫瘍が陽性像として認められ、投与後 2 日目で IgG よりも明瞭な腫瘍イメージが得られた。腫瘍/血液比も 2 日目で IgG の 0.55 に対し、F(ab')<sub>2</sub> では 1.04 と 2 倍近くの値が得られた。したがって腫瘍の radioimmunoimaging に用いる標識用抗体としては IgG よりも代謝の早い F(ab')<sub>2</sub> 分画の方が有利と考えられた。

### I. はじめに

腫瘍関連抗原に対する抗体を放射性同位元素 (RI) で標識して、腫瘍をシンチグラム上陽性像としてとらえる radioimmunoimaging<sup>1)</sup> の研究がモノクローナル抗体の開発<sup>2)</sup> により一層進められている。しかしこの手法の問題点の一つに抗体として IgG そのものを用いた場合、RI 標識抗体の血中からのクリアランスが遅く、シンチグラムで腫瘍が陽性像をとるために十分な腫瘍/バックグラウンド比が投与後かなり長時間の後にしか得られないことがあげられる。そこで IgG を酵素で処理して得られた F(ab')<sub>2</sub> や Fab 分画を利用する試み

がなされている<sup>3,4)</sup>。これらの分画は抗体活性を保持し、かつ代謝が早いので投与後、早期に腫瘍イメージが得られ、radioimmunoimaging には IgG そのものを用いるより有利ではないかと考えられている。今回ヒト  $\alpha$ -fetoprotein (AFP) に対するモノクローナル抗体の IgG および F(ab')<sub>2</sub> 分画を用いて、正常マウスにおけるそれぞれの代謝体内分布を観察するとともに <sup>131</sup>I で標識したモノクローナル抗体 IgG と F(ab')<sub>2</sub> 分画の AFP 産生ヒト睾丸腫瘍移植ヌードマウスにおける腫瘍シンチグラムを比較した。

### II. 材料および方法

**1. 抗ヒト AFP モノクローナル抗体:** ヒト AFP に対するモノクローナル抗体 (IgG1) はマウスハイブリドーマ法により得られたもの (AFY1<sup>5)</sup>) である。

**2. F(ab')<sub>2</sub> 分画:** F(ab')<sub>2</sub> は Nisonoff らの方法<sup>6)</sup> を参考にし、IgG をペプシン分解して得た。すなわち IgG を 0.05 M 酢酸緩衝液 pH 4.5 で透

\* 京都大学医学部核医学科

\*\* 同 泌尿器科

\*\*\* 北海道大学医学部生化学教室

受付: 59年10月15日

最終稿受付: 60年1月14日

別刷請求先: 京都市左京区聖護院川原町54 (☎ 606)

京都大学医学部核医学科

阪 原 晴 海

析した後、IgG 1 mg に対し、0.01 mg のペプシン (Sigma Chemical Company, St Louis, Missouri, USA) を加え、37°C で17.5時間反応させた。1 M トリス (Sigma Chemical Company) で pH を8とし、反応を終了させ、Sephadex G-150 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden) カラムクロマトグラフィを用い、未消化 IgG を含む F(ab')<sub>2</sub> 分画を分離し、さらに Protein A-Sepharose CL-4B (Pharmacia Fine Chemicals) アフィニティークロマトグラフィにより未消化 IgG を取り除き、F(ab')<sub>2</sub> を精製した。

3. ヨード標識: IgG および F(ab')<sub>2</sub> は抗体活性の保持できる温和な条件下でのクロラミン T 法<sup>7)</sup> により <sup>125</sup>I または <sup>131</sup>I で標識した。ヨード標識が抗体活性に及ぼす影響を既報のとおり<sup>7)</sup>。

RIA を用いた Scatchard plot により解析したところ、ポリクローナル抗体の場合と同様、タンパク 1 分子当たりヨード原子が1個以下の結合ではモノクローナル抗体 IgG, F(ab')<sub>2</sub> ともほぼ完全に抗体活性を保持していた。今回の実験に供した標識 IgG, F(ab')<sub>2</sub> は比放射能が4~10 mCi/mg でタンパク 1 分子当たり0.2~0.7個のヨード原子が結合していると計算された。

4. 正常マウスにおける体内分布、代謝: 正常マウスは ddY 系雌を用い、<sup>125</sup>I-標識 IgG と <sup>131</sup>I-標識 F(ab')<sub>2</sub> を同時に投与した。標識タンパク各 1 μCi を尾静脈より投与し、経時的にマウスを屠殺、諸臓器を摘出した。各臓器は重量を測定した後、その放射能をウエル型シンチレーションカウンター (Aloka ARC-300, アロカ, 東京) により測

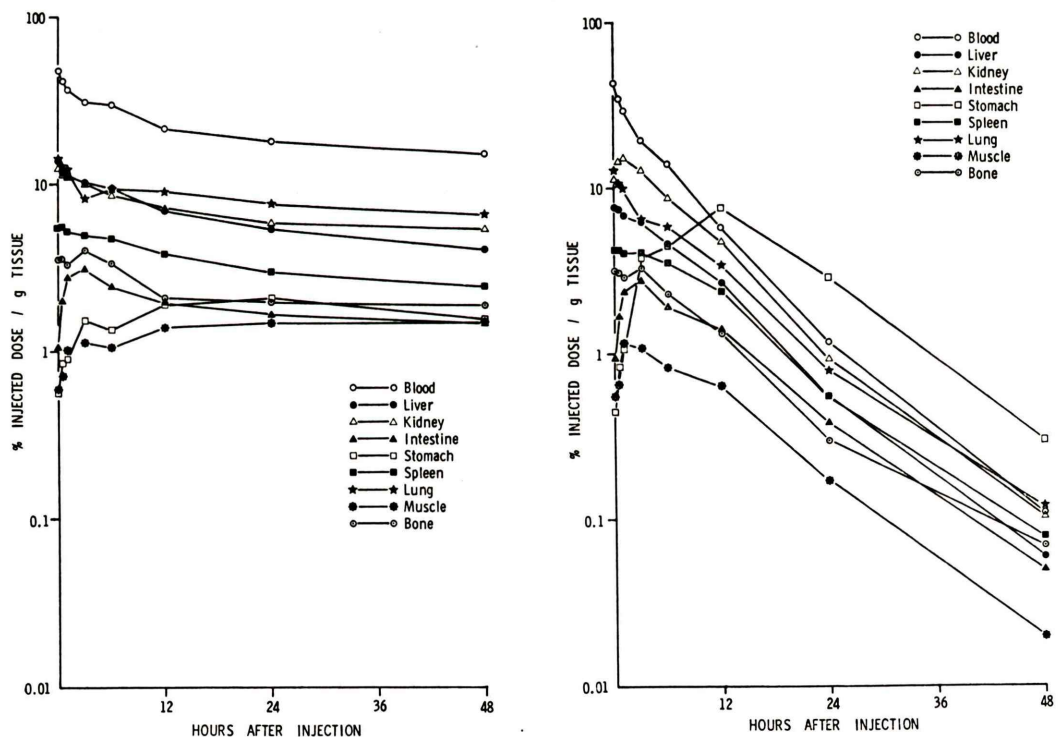


Fig. 1 Time course of biodistribution of <sup>125</sup>I-labeled whole IgG (left) and <sup>131</sup>I-labeled F(ab')<sub>2</sub> fragments (right) in normal mice. Percent injected dose per gram of tissue was plotted against time after the injection and was shown as mean value of 5 animals for each point. F(ab')<sub>2</sub> fragments were cleared more rapidly from the circulation than whole IgG and radioactivity of F(ab')<sub>2</sub> in various organs also decreased much faster than that of IgG.

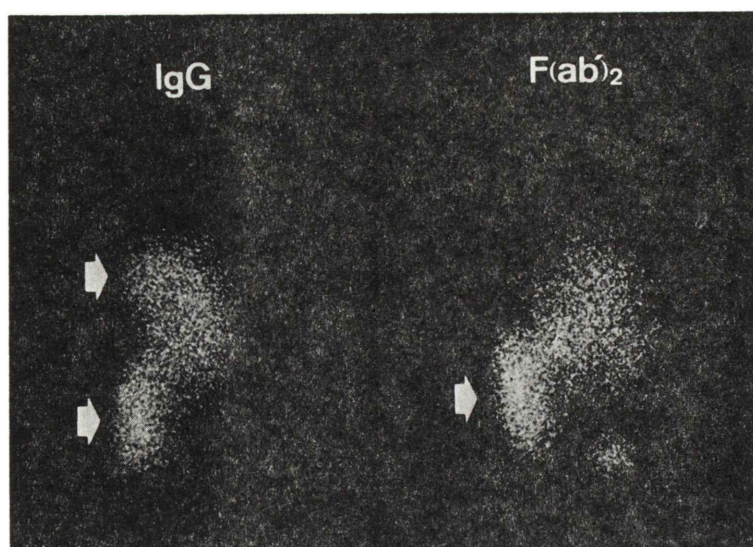


Fig. 2 Scintigrams of nude mice transplanted with AFP producing human testicular tumor, taken at 2 days after the injection of  $^{131}\text{I}$ -labeled monoclonal antibodies against AFP.  $\text{F}(\text{ab}')_2$  fragments (right) were considered to be superior to whole IgG (left) for tumor imaging. Arrows indicate the position of the transplanted tumor.

Table 1 Tissue distribution of  $^{131}\text{I}$ -labeled monoclonal antibodies to AFP (%dose/gram of tissue)<sup>a)</sup>

Tissue	IgG <sup>b)</sup>	$\text{F}(\text{ab}')_2$ <sup>c)</sup>
Blood	$11.22 \pm 2.51$	$2.66 \pm 0.93$
Tumor	$6.07 \pm 1.30$	$2.67 \pm 0.69$
Liver	$2.61 \pm 1.16$	$0.58 \pm 0.22$
Kidney	$3.03 \pm 0.97$	$1.16 \pm 0.35$
Intestine	$0.82 \pm 0.22$	$0.31 \pm 0.18$
Stomach	$1.23 \pm 0.66$	$1.95 \pm 0.82$
Spleen	$2.42 \pm 1.16$	$0.56 \pm 0.34$
Lung	$3.84 \pm 1.13$	$1.15 \pm 0.48$
Muscle	$0.96 \pm 0.34$	$0.25 \pm 0.19$
Bone	$1.25 \pm 0.53$	$0.43 \pm 0.20$

<sup>a)</sup> 2 days after injection, mean  $\pm$  SD

<sup>b)</sup> N=6    <sup>c)</sup> N=5

定した。 $^{125}\text{I}$ の放射能の測定時には $^{125}\text{I}$ のenergy windowへの $^{131}\text{I}$ の影響を補正した。

5. 担癌ヌードマウスにおけるシンチグラム：担癌ヌードマウスはAFP産生ヒト睾丸腫瘍を背部皮下に移植されたもの<sup>7)</sup>で腫瘍径が1~3 cmのものを実験に供した。100  $\mu\text{Ci}$ の $^{131}\text{I}$ -標識IgGあるいは $\text{F}(\text{ab}')_2$ を尾静脈より投与し、シンチグ

ラムを得るとともに標識タンパクの体内分布を求めた。なお正常マウス、担癌ヌードマウスともに実験中はヨウ化カリウムの投与を行い、遊離ヨードの甲状腺への取り込みを阻止した<sup>7)</sup>。

### III. 結 果

正常マウスにおける $^{125}\text{I}$ -標識IgG、 $^{131}\text{I}$ -標識 $\text{F}(\text{ab}')_2$ の体内分布の経時的变化をFig. 1に示す。血中の放射能の減少を2つの指数関数の合成と仮定すると標識IgGの第1相の半減期は0.14日、第2相の半減期は5.54日と計算された。一方、標識 $\text{F}(\text{ab}')_2$ の半減期は第1相が0.58時間、第2相が6.33時間となり、 $\text{F}(\text{ab}')_2$ 分画の方がIgGより血中からの消失が早いことが示された。各臓器の放射能はIgG、 $\text{F}(\text{ab}')_2$ ともほぼ血液のそれと平行して低下し、 $\text{F}(\text{ab}')_2$ の場合、血液と同様に他の臓器においてもIgGに比べて、その放射能の低下がすみやかであることが認められた。ただ $\text{F}(\text{ab}')_2$ 分画では胃への取り込みが他臓器に比べ高くなっているが、早く代謝された $\text{F}(\text{ab}')_2$ より



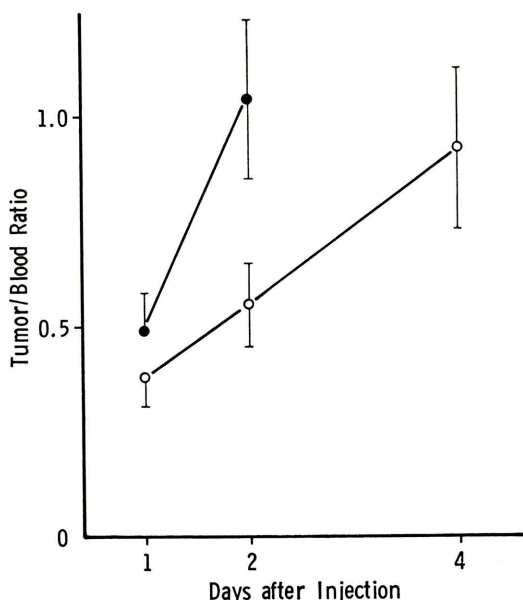


Fig. 3 Time course of the tumor to blood ratio of  $^{131}\text{I}$  labeled monoclonal antibodies against AFP in tumor bearing nude mice. Tumor to blood ratio of  $\text{F(ab')}_2$  fragments (●—●) was significantly higher than that of whole IgG (○—○). Mean  $\pm$  SD for 3–5 animals.

$^{131}\text{I}$  が遊離し、胃に集積したものと解釈される。

IgG,  $\text{F(ab')}_2$  とともに  $^{131}\text{I}$  で標識し、AFP 産生ヒト睾丸腫瘍移植ヌードマウスに投与した時のシンチグラムを Fig. 2 に示す。いずれも標識タンパク 100  $\mu\text{Ci}$  を投与後、2 日目のシンチグラムである。標識 IgG でも腫瘍への放射能の集積が認められたが、バックグラウンドの放射能が高く、腫瘍のイメージがあまり良くないのに対し、標識  $\text{F(ab')}_2$  ではバックグラウンドの放射能は低く、良好な腫瘍イメージが得られた。

放射能の体内分布を標識 IgG, 標識  $\text{F(ab')}_2$  投与後 2 日目で比較すると、正常マウスの場合と同様、 $\text{F(ab')}_2$  では IgG よりも血液および各臓器の放射能が低かった。ただし、腫瘍への集積も IgG に比較して低下したが、その程度は他臓器ほどではなかった (Table 1)。したがって腫瘍/血液比は標識  $\text{F(ab')}_2$  の場合には 2 日目で 1.04 であったのに対し、標識 IgG では 2 日目で 0.55 と  $\text{F(ab')}_2$

分画の場合が有意に高く ( $p < 0.001$ )、4 日目で IgG の腫瘍/血液比はようやく 0.92 であった (Fig. 3)。

#### IV. 考 察

これまでに抗体活性の保持された抗体のヨード標識法および担癌ヌードマウスを用いる腫瘍シンチグラフィの実験系を確立した<sup>7)</sup> ので、今回はヒト AFP に対するモノクローナル抗体を用いてヨード標識 IgG と  $\text{F(ab')}_2$  分画の代謝と腫瘍への集積について比較検討した。正常マウスの実験でこれまでの報告<sup>8)</sup> 通り、 $\text{F(ab')}_2$  分画の血中半減期は IgG に比較してきわめて早いことが確かめられた。担癌ヌードマウスにおいても同様の傾向を示し、その結果、投与後 2 日目の腫瘍/血液比は  $\text{F(ab')}_2$  の方が IgG より 2 倍近くも有意に高くなっていた。シンチグラム上、 $^{131}\text{I}$ -標識 IgG では投与後 2 日目の腫瘍のイメージは不明瞭であった。腫瘍が明瞭な陽性像として認識されるのに IgG を用いた場合には 4~7 日を要したのに対し、 $\text{F(ab')}_2$  分画を用いることにより投与後 2 日目で IgG で得られた 4~7 日目のイメージとほぼ同等の陽性像が得られた。このように  $\text{F(ab')}_2$  分画は代謝が早いために投与後短時間でシンチグラムが得られることが明らかになった。IgG の分画としては  $\text{F(ab')}_2$  以外にさらに分子量の小さい Fab' や Fab 分画も得ることができるが、標識用抗体としてどの分画がすぐれているかについてはさらに検討を要すると思われる。

ヒトにおける抗体の代謝がマウスと等しいと仮定すると  $^{131}\text{I}$ -標識 IgG 1 mCi 投与時の全身被曝線量は MIRD 法<sup>9-11)</sup> により 5.1 rad と計算されるが、 $^{131}\text{I}$ -標識  $\text{F(ab')}_2$  を用いた場合、血中からのクリアランスが早いために 1 mCi 当たり 0.75 rad に被曝線量を著しく軽減することができる。

リンパ球や各種組織に Fc receptor が存在することが報告されている<sup>12)</sup>。もし腫瘍以外の組織に Fc receptor が存在すれば投与された標識 IgG はこの Fc receptor と非特異的に結合し、バックグラウンドの放射能を高めることになる。しかし IgG ではなく、Fc 分画を欠く Fab や  $\text{F(ab')}_2$  を

用いた場合、Fc receptor との結合がおこらず、放射能の腫瘍/バックグランド比が IgG に比べて高くなるものと考えられる<sup>3)</sup>。また Fc 分画がないために抗原性が低下し、ヒトに投与した場合に生じるアレルギー反応も軽減するものと期待される<sup>4)</sup>。

さらに、代謝の早い F(ab')<sub>2</sub> 分画を用いれば、投与後短時間でシンチグラムが得られるので、<sup>131</sup>I より半減期の短い <sup>99m</sup>Tc, <sup>67</sup>Ga, <sup>111</sup>In などの放射性金属核種で標識した抗体の利用が可能となるものと考えられる。これらの放射性金属核種はシンチカメラに適したエネルギーの  $\gamma$  線を放出し良好な画像が得られる。また <sup>131</sup>I と異なり  $\beta$  線を放出せず、半減期が短いために、被曝線量はさらに軽減される。これらの放射性金属核種はまた一般に deferoxamine や DTPA などのいわゆる“bifunctional chelating agent”を介して抗体に標識される。したがって抗体・キレート剤複合体を作成しておけば、後から放射性金属核種を加えるのみで抗体を標識することができるのでキット化が可能になる特徴も有している。このように放射性金属核種には多くの利点があり、われわれも <sup>99m</sup>Tc, <sup>67</sup>Ga, <sup>111</sup>In などの放射性金属核種による抗体の標識法を開発中<sup>13,14)</sup>であるが、これらに用いる標識用抗体としては IgG よりも代謝の早い F(ab')<sub>2</sub> 分画の方が有利であると考えられる。

F(ab')<sub>2</sub> 分画は種々の長所を有しており、腫瘍の radioimmunoimaging に用いる標識用抗体として IgG とともに利用されるものと思われる。

## V. まとめ

- 1) 抗ヒト AFP モノクローナル抗体を用いて IgG と F(ab')<sub>2</sub> 分画の代謝、腫瘍への集積を比較した。
- 2) 正常マウスにおける F(ab')<sub>2</sub> の代謝は IgG に比べて著しく早かった。
- 3) 担癌ヌードマウスのシンチグラムで投与後 2 日目では <sup>131</sup>I-標識 F(ab')<sub>2</sub> の方が <sup>131</sup>I-標識 IgG よりも明瞭な腫瘍イメージが得られた。
- 4) したがって腫瘍の radioimmunoimaging に

用いる標識用抗体としては IgG よりも F(ab')<sub>2</sub> 分画の方が有用であると考えられる。

本研究は厚生省核医学診断薬剤開発研究班の援助を受けた。

## 文 献

- 1) Ballou B, Levine G, Hakala T, et al: Tumor location detected with radioactively labeled monoclonal antibody and external scintigraphy. *Science* **206**: 844-847, 1979
- 2) Köhler G, Milstein C: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**: 495-497, 1975
- 3) Wahl RL, Parker CW, Philpott GW: Improved radioimaging and tumor localization with F(ab')<sub>2</sub>. *J Nucl Med* **24**: 316-325, 1983
- 4) Colcher D, Zalutsky M, Kaplan W, et al: Radio-localization of human mammary tumors in athymic mice by a monoclonal antibody. *Cancer Res* **43**: 736-742, 1983
- 5) Nishi S, Yamazaki H: Monoclonal antibodies against AFP: application in immunoassay and affinity chromatography. *Ann NY Acad Sci* **417**: 452-458, 1983
- 6) Nisonoff A, Wissler FC, Lipman LN, et al: Separation of univalent fragments from the bivalent rabbit antibody molecule by reduction of disulfide bonds. *Arch Biochem Biophys* **89**: 230-244, 1960
- 7) 阪原晴海, 遠藤啓吾, 中島鉄夫, 他: 標識抗ヒト  $\alpha$ -fetoprotein 抗体を用いる腫瘍イメージングの基礎的検討——第 1 編 ヨード標識による抗体活性の変化——. *核医学* **21**: 805-813, 1984
- 8) Spiegelberg HL, Weigle WO: The catabolism of homologous and heterologous 7S gamma globulin fragments. *J Exp Med* **121**: 323-338, 1965
- 9) Brownell GL, Ellet WH, Reddy AR: Absorbed fractions for photon dosimetry, MIRD Pamphlet No. 3. *J Nucl Med* **9**: Suppl No. 1, 27-39, 1968
- 10) Dillman LT: Radionuclide decay schemes and nuclear parameters for use in radiation-dose estimation, MIRD Pamphlet No. 4. *J Nucl Med* **10**: Suppl No. 2, 5-32, 1969
- 11) Snyder WS, Ford MR, Warner GG, et al: Estimates of absorbed fractions for monoenergetic photon sources uniformly distributed in various organs of a heterogeneous phantom, MIRD Pamphlet No. 5. *J Nucl Med* **10**: Suppl No. 3, 5-52, 1969
- 12) Unkeless JC, Eisen HN: Binding of monomeric immunoglobulins to Fc receptors of mouse macrophages. *J Exp Med* **142**: 1520-1533, 1975

- 13) Endo K, Furukawa T, Ohmomo Y, et al: Preparation of Ga-67 labeled monoclonal antibodies using deferoxamine as a bifunctional chelating agent. *J Nucl Med* **25**: No. 5, 56, 1984 (abst)
- 14) Sakahara H, Endo K, Nakashima T, et al: Indium-111 labeled monoclonal antibodies (Ab): the effect of DTPA conjugation on the Ab activity and tissue distribution. *J Nucl Med* **25**: No. 5, 113, 1984 (abst)

### Summary

#### Radioimmunoimaging Using F(ab')<sub>2</sub> Fragment of Monoclonal Antibodies against Human $\alpha$ -Fetoprotein

Harumi SAKAHARA\*, Keigo ENDO\*, Tetsuo NAKASHIMA\*, Mitsuru KOIZUMI\*, Hitoya OHTA\*, Kanji TORIZUKA\*, Ken-ichiro OKADA\*\*, Osamu YOSHIDA\*\* and Shinzo NISHI\*\*\*

*\*Department of Nuclear Medicine, \*\*Department of Urology, Kyoto University School of Medicine*

*\*\*\*Department of Biochemistry, Hokkaido University School of Medicine*

Using monoclonal antibodies against human  $\alpha$ -fetoprotein (AFP), radioiodinated F(ab')<sub>2</sub> fragments were compared with whole IgG as a radio-tracer for radioimmunoimaging of cancer.

F(ab')<sub>2</sub> fragments were obtained by pepsin digestion of whole IgG (IgG1). IgG and F(ab')<sub>2</sub> were labeled with <sup>125</sup>I or <sup>131</sup>I by the chloramine-T method with almost full retention of antibody activity. F(ab')<sub>2</sub> fragments were cleared more rapidly from the circulation in normal mice with a half life of 6.3 hours than whole IgG with a half life of 5.5 days. Radioactivity of F(ab')<sub>2</sub> in various organs also decreased faster than IgG. In nude mice transplanted with AFP-producing human testicular tumor, F(ab')<sub>2</sub> fragments demonstrated superior scintigrams to whole IgG at 2 days after

the injection, because of the fast disappearance of background radioactivity. Although absolute accumulation of <sup>131</sup>I labeled F(ab')<sub>2</sub> in the tumor was less than that of <sup>131</sup>I labeled IgG, tumor to other organ ratios were much higher with F(ab')<sub>2</sub> than those of IgG. The tumor to blood ratio of <sup>131</sup>I labeled F(ab')<sub>2</sub> was 1.04 at day 2, whereas tumor to blood ratio of <sup>131</sup>I labeled IgG was 0.55 at day 2 and 0.92 at day 4, respectively.

These results indicated that for the radiolabeling of monoclonal antibodies, F(ab')<sub>2</sub> fragments would be superior to whole IgG in the radioimmunoimaging of cancer.

**Key words:** Monoclonal antibodies, F(ab')<sub>2</sub> fragments,  $\alpha$ -fetoprotein, Radioimmunoimaging.