

## 《原 著》

# 癌の免疫シンチグラフィにおける高免疫活性モノクローナル抗体の有用性に関する実験的研究

## —(I) 高免疫活性抗体の分離・精製法の開発—

横 山 邦 彦\*

**要旨** 放射性核種標識モノクローナル抗体による癌の診断および治療では、用いる抗体の免疫活性 (IR) が高く保持されていることが前提となる。免疫活性の変化が抗体の体内動態に及ぼす影響を検討するための基礎的段階として、より高い免疫活性のモノクローナル抗体の分離・精製方法を開発し、その方法により得られた抗体を種々の *in vitro* cell binding assay (CBA) を用いて評価検討を行った。その結果既存の精製法で得られた悪性黒色腫に対する抗体 96.5 の *Fab* フラグメントが、さらに 2 つの分画に、hydroxylapatite (HA) カラムを組み込んだ高速液体クロマトグラフィ (HPLC) によって分離された。CBA の結果 2 つの分画は、より IR の低い抗体と高い抗体であることが示され、HA-HPLC によって IR の差に基づき抗体を効率よくかつ簡便に分離精製できることが明らかとなった。

### I. はじめに

ロットによる特異性および親和性の変動が見られるポリクローナル抗体と異なり、細胞融合法によるハイブリドーマ技術は、一定の特異性と親和性を有するモノクローナル抗体の恒常的な安定供給を可能にした<sup>1)</sup>。さらにポリクローナル抗体の時代では困難であった微量で抗原性の弱い未知物質、例えば癌関連抗原に対する抗体の作製をも容易とした。癌に対する特異性の高いモノクローナル抗体を生体内で“担体 (carrier)”として用いるこれらの方法論の成否の鍵を握る第一義的な因子としては、免疫活性 (immunoreactivity), 特異性、親和性等の抗体自身の特性が考えられる<sup>2)</sup>。なかでもモノクローナル抗体の免疫活性は種々の操作により低下することが知られており、例えば放射性核種標識に際しては、できるだけ抗体の免疫活

性を低下させないことが最も重要な目標の一つとされている<sup>3,4)</sup>。このような免疫活性の重要性に関する認識に基づき、抗体を動物実験や臨床投与に使用する以前に、*in vitro* で免疫活性を検討することが不可欠とされている<sup>5)</sup>。しかしながらその重要性の根拠、すなわち免疫活性の変化が、抗体の体内動態にどのような影響を及ぼすかに関しては未だ明確な説明がなされていない。なぜなら、従来適当な実験モデルが得られなかつたためか、免疫活性と体内分布との関係を解明しようとした意図された検討がほとんどなされていなかったからである。わずかに 1986 年 Larson が、免疫活性の変化が腫瘍と非腫瘍間の抗体分布比に影響することを、単に理論的モデルを用いて指摘しているにすぎない<sup>6)</sup>。そこで今回、抗体の免疫活性の変化が体内動態ならびに腫瘍集積にどのような影響を与えるかを、実際に動物実験系において再現を試み検討した。具体的には、まず第一段階として、既存のモノクローナル抗体から、より免疫活性の高い分画を得るために、分離・精製法を開発した。さらにその方法により精製された抗体の免疫活性を *in vitro* で比較し、この精製法の有用性を評価検討した。

\* 金沢大学医学部核医学科

受付：62 年 10 月 29 日

最終稿受付：62 年 12 月 9 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

横山邦彦

## II. 材 料

### 1. モノクローナル抗体

ヒト悪性黒色腫に対するマウスモノクローナル抗体 96.5 (IgG<sub>2a</sub>) の Fab フラグメントを用いた。抗体は NS-1 を親株として作製され、分子量 97,000 の悪性黒色腫関連糖蛋白抗原 (p97) を認識する<sup>7)</sup>。Fab フラグメントは、Balb/c マウス腹水中より得られた抗体 (intact IgG) をパパイン消化し、プロテイン A セファロースカラムクロマトグラフィーを用いて精製した<sup>8)</sup> Oncogen 社 (Seattle, USA) 製 Fab フラグメントを使用した。実験に先立って、抗体の純度をゲル濾過高速液体クロマトグラフィー (TSK 2000SW+TSK 3000SW) で検討し、分子量が Fab に一致した単一ピークのみであることを確認した。

放射性ヨード標識は、クロラミン T 法の変法を用いた<sup>7)</sup>。1 mg の Fab 96.5 と 1 mCi の Na<sup>125</sup>I (New England Nuclear, Boston, MA) に、12.5 μg のクロラミン T を 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) 中で混和し、室温で 1 分間反応後、速やかにセファデックス G-25 カラムにより、蛋白分画を分離した。得られた比放射能は 0.8 mCi/mg であり、10% トリクロロ酢酸ではゲル濾過後 97% 以上の放射能が沈殿分画に認められた。

抗体への DTPA (diethylenetriamine pentaacetic acid) の導入は、cyclic DTPA 法<sup>9)</sup>を用いた。モル比 1:1 の抗体と bicyclic DTPA anhydride を 0.1 M 炭酸緩衝液 (pH 8.3) 中で混和し、室温で 60 分反応させた。DTPA と抗体の conjugation yield は約 60% で、未反応の DTPA を Centricon 30 (Amicon 社) を用いた限外濾過により除去した。<sup>111</sup>In 標識は、適当量の上記反応生成物とクエン酸インジウム (<sup>111</sup>In, New England Nuclear, Boston, MA) を 0.3 M 酢酸緩衝液 (pH 5.5)+0.03 M クエン酸緩衝液 (pH 5) 中で混和させることにより、行った。

### 2. 悪性黒色腫細胞株

ヒト皮膚原発癌由来の悪性黒色腫樹立株 (FEM-XII) を in vitro のアッセイに用いた。細胞膜上の

p97 の発現は、Fab 96.5 を用いた蛍光抗体法により確認した。10% 胎児牛血清加の RPMI 1640 培地で培養を行い、2 mM EDTA (ethylenediaminetetraacetate) 加洗浄緩衝液で遊離細胞を得、当日アッセイに供した。また、実験に使用した細胞株は、あらかじめマイコプラズマ試験を行い、陰性であることを確認した。

## III. 方 法

### 1. Hydroxylapatite (HA) カラムクロマトグラフィ

高速液体クロマトグラフィ (HPLC) 装置に hydroxylapatite (HA) カラム (Bio-Rad 社製、7.8 × 100 mm, 4.8 mL bed volume) およびガードカラム (4.0 × 50 mm, 0.6 mL bed volume) を連装し、吸光度計およびフラクションコレクターを装着して用いた。

50~100 μg の未標識 Fab ないし、<sup>125</sup>I-Fab あるいは、Fab-DTPA (100 μL) に本装置を使用し、0.12 M リン酸緩衝液 (pH 6.8) を用いて、室温で流速を 1 mL/min に設定しカラムの溶出を行った。溶出された蛋白を 280 nm での吸光度でモニターした。また各フラクション内溶出蛋白 1 mL の放射能を自動ウェル型検出器で測定した。さらに以後の実験に用いるため、分離されたピークフラクションの蛋白濃度の定量は、BCA プロテインアッセイ (Pierce 社) で行った。

### 2. In vitro cell binding assay

HA-HPLC により分離された <sup>125</sup>I-Fab 96.5 の各ピークフラクションの免疫活性 (immunoreactivity; IR) および親和定数 (affinity constant, M<sup>-1</sup>) を細胞 (FEX-XII) に対する結合アッセイ (cell binding assay; CBA) により検討した。用いた細胞は、実験直前に 1% 牛血清アルブミン添加 0.1 M リン酸緩衝食液 (pH 7.4, PBS+BSA) で 3 度遠心洗浄 (1,000 rpm, 5 分間) し、生細胞数をトリパンブルー染色で算定した。

#### 1) Immunoreactivity analysis

IR の評価を行うために、一定量 (5 ng) の <sup>125</sup>I-Fab と種々の量の細胞 (0.25~8.0 × 10<sup>6</sup> 個) とを

総量 200  $\mu\text{l}$  で室温 1 時間インキュベートした。アッセイは triplicate であり、また抗体の非特異的な細胞への結合を評価するため、過剰量 (25  $\mu\text{g}$ ) の未標識抗体を加えたインキュベーションも各細胞濃度で行った。インキュベーション後、冷 PBS + BSA 4 mL を加え遠心 (1,500 rpm, 5 分間) 上清を吸引して、細胞を分離し、細胞の放射能を測定した。非特異的結合値で補正して求められた特異的結合カウントの総放射能に対する割合 (% corrected B/T) を縦軸に細胞数を横軸にプロットし、次にこのデータを用い modified Lineweaver-Burk plot<sup>10)</sup> をも行い、両プロットを比較した。

### 2) Scatchard analysis

抗原抗体間の親和定数を評価するために、Scatchard plot を実施した。一定量の細胞 ( $0.5 \times 10^6$  個) に対し、種々の濃度の標識抗体 (5 ng/ml ~ 1 mg/ml) を加え、インキュベーション後細胞を遠心分離し、特異的細胞結合放射能と非結合放射能の比率 (B/F) を計算して、細胞に結合した抗体量 (B) との関係を、プロットした。アッセイ条件等詳細は前述と同様である。また、前述のアッセイより得られた IR 値で、非結合放射能 (F) の補正を行い、求められる傾き(親和定数)の違いを補正前と比較した。

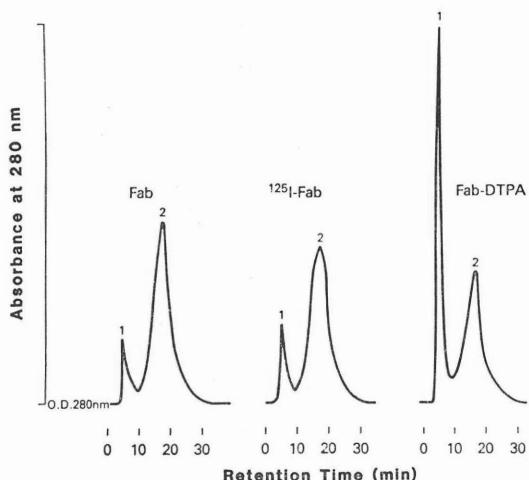
### 3) Competitive binding assay

HA-HPLC により、分離された F ab-DTPA 分画を検討するために、阻害アッセイを行った。トレーサーとして  $^{125}\text{I}$ -F ab 96.5 を用い、種々の濃度の F ab-DTPA のいずれかのピークを加え、トレーサーの細胞への結合の阻害程度を検討した。2.5 ng から 250 ng の F ab-DTPA と 5 ng の  $^{125}\text{I}$ -F ab 96.5 (トレーサー) および細胞 ( $0.5 \times 10^6$  個) を総量 200  $\mu\text{l}$  中で、1 時間室温にてインキュベーションした。また、未分離の F ab-DTPA (HPLC 前) も比較のために用いた。細胞分離等の操作は、前述のアッセイと同様である。

## IV. 結 果

### 1. HA-HPLC による F ab 96.5 の分離

HA-HPLC により、未標識 F ab,  $^{125}\text{I}$ -F ab およ



**Fig. 1** Representative hydroxylapatite (HA) chromatography from an unlabeled F ab 96.5 (left), an  $^{125}\text{I}$  labeled F ab 96.5 (middle) and an F ab-DTPA (right) based on UV absorbance at 280 nm. For three preparations, distinctive two peaks were eluted at retention times of 6 and 16 min. Radioactivity trace of  $^{125}\text{I}$ -F ab 96.5 HA chromatography had an identical pattern to its OD trace.

**Table 1** Protein and radioactivity percentage in peak 1 and peak 2 eluted from hydroxylapatite column chromatography

	Peak 1	Peak 2
Protein (%)		
F ab 96.5	13.2	86.6
$^{125}\text{I}$ -F ab	16.0	84.0
F ab-DTPA	42.7	57.3
Radioactivity (%)		
$^{125}\text{I}$ -F ab	15.0	85.0

び F ab-DTPA は、ともに 2 つのピークに分離され、それぞれの retention time は 6 分と 16 分であった (Fig. 1)。モニターした吸光度に基づく、それぞれのピークの蛋白含量を Table 1 に示す。未標識 F ab と  $^{125}\text{I}$ -F ab は、ほとんど同様のクロマトグラムのパターンを示したのに比して、F ab-DTPA では、相対的にピーク 1 の増加、ピーク 2 の減少を示した。 $^{125}\text{I}$ -F ab では、放射能の 15% がピーク 1 に、85% がピーク 2 に溶出され (Table 1)，これは吸光度によるパターンとほぼ同一であ

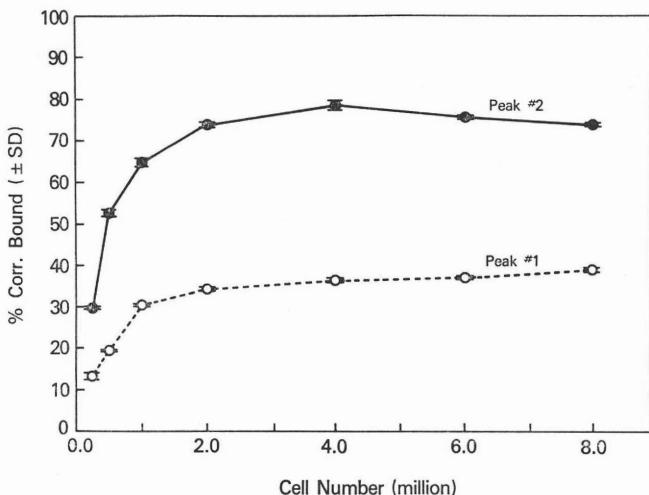


Fig. 2 Result of cell binding assay using the hydroxylapatite chromatographic peak 1 (○) and peak 2 (●). Percent of corrected cell bound radioactivity was plotted against the cell number.

り、それぞれのピークの比放射能が等しいことを示した。F ab-DTPA から得られた 2 つのピーク分画の  $^{111}\text{In}$  標識をそれぞれ行ったところ、反応後 30 分でピーク 1 とは 90% 以上の放射能が結合したのに対し、ピーク 2 はほとんど標識されなかった (5% 以下)。なお今回実験に用いた蛋白量の場合、このカラムからの蛋白量としての回収、および放射能としての回収はそれぞれ 90% 以上であった。

## 2. In vitro cell binding assay (CBA)

HA-HPLC により分離された  $^{125}\text{I}$ -F ab 96.5 の 2 つのピーク間に、抗体の免疫活性の差があるか否かを 2 種の CBA により検討した。2 つのアッセイは、同一の継代培養から得られた細胞を用いて同時に行った。さらに未標識 F ab-DTPA の評価は、結合阻害アッセイによって行った。

### 1) Immunoreactivity analysis

細胞量 (抗原量) を漸増させた時の、一定量 (5 ng) の標識抗体の結合を検討したアッセイの結果を、Fig. 2 に示す。細胞量 (抗原量) が増加するに従い、細胞に結合する標識抗体量は、いずれのピークでも増加しプラトーに達した。一方最大結合率は、ピーク 1 では 39%，ピーク 2 では 79%

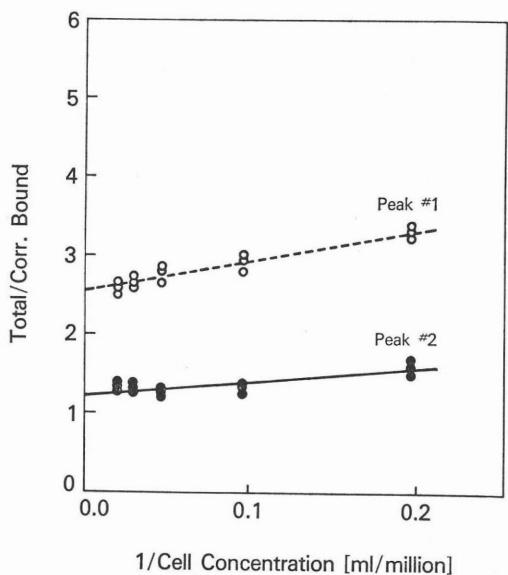


Fig. 3 Double reciprocal plot of the hydroxylapatite chromatographic peaks. Total per corrected cell bound radioactivity of peak 1 (○) or peak 2 (●) was plotted against the reciprocals of cell concentration. Immunoreactive fraction of two peaks was determined as the inverse of the y intercept. Peak 2 possessed two times greater immunoreactive fraction (0.789) than that found in peak 1 (0.392).

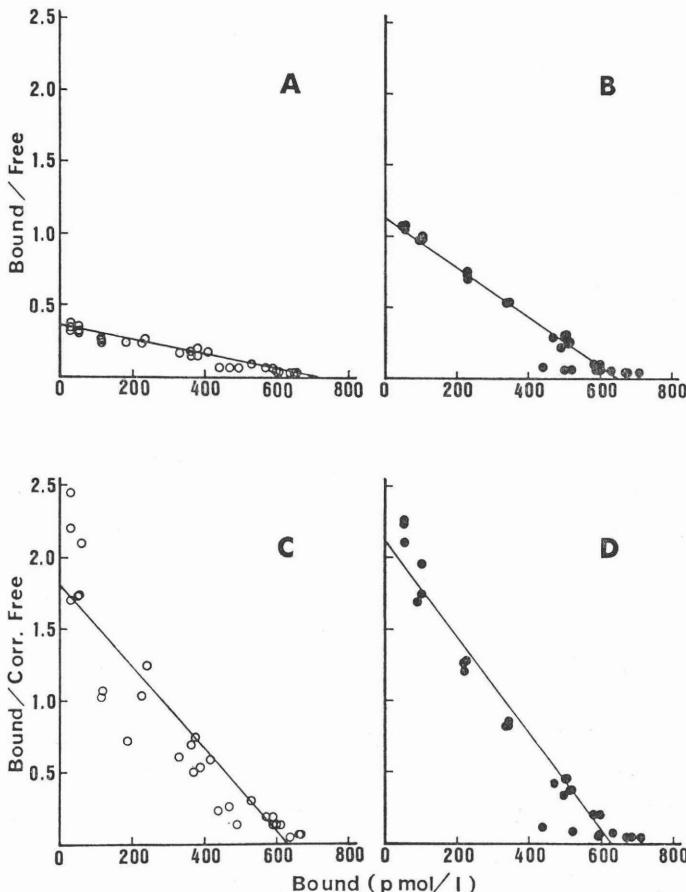
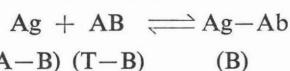


Fig. 4 Scatchard plot of the hydroxylapatite chromatographic peak 1 (A, C) and peak 2 (B, D). The slope of each plot represented the affinity constant. Without correcting for the immunoreactive fraction (A, B), the slopes for two peaks were apparently different. In contrast, with the correction (C, D) the slopes for two peaks came out to be similar.

と、ピーク2の方が約2倍結合性が高い有意な結果を示した。この結果は非特異的結合値を減じて求めたものであるが、両ピークとも過剰量の未標識Fabを加えることにより、細胞への結合は完全に阻害され、抗原に対する特異性に差はないことが示された。抗原(Ag)抗体(Ab)間の反応に質量作用の法則を適用すると、このアッセイ系の反応は以下のように表現される。



この式から文末の付録に示したごとく、次の式が導かれる。

$$\frac{\text{T}}{\text{B}} = \frac{1}{\text{r} \cdot \text{K}_a} \times \frac{1}{\text{A}} + \frac{1}{\text{r}} \quad \dots \dots \dots \quad (1)$$

Aは総抗原濃度、Tは総抗体濃度、Bは抗原と結合した抗体濃度であり、 $\text{K}_a$ は親和定数(affinity constant,  $\text{M}^{-1}$ )である。またrは、実際に免疫活性を有する抗体分画の総抗体量に対する割合(immunoreactive fraction)を示す。したがって、 $\text{T}/\text{B}$ を $1/\text{A}$ すなわち、結合率の逆数と、抗原量の逆数とをプロットすれば、両者は直線関係となり、y切片よりrを求めることができる<sup>10)</sup>。

このmodified Lineweaver-Burk plotまたは両逆数(double reciprocal) plotをFig. 3に示した。最

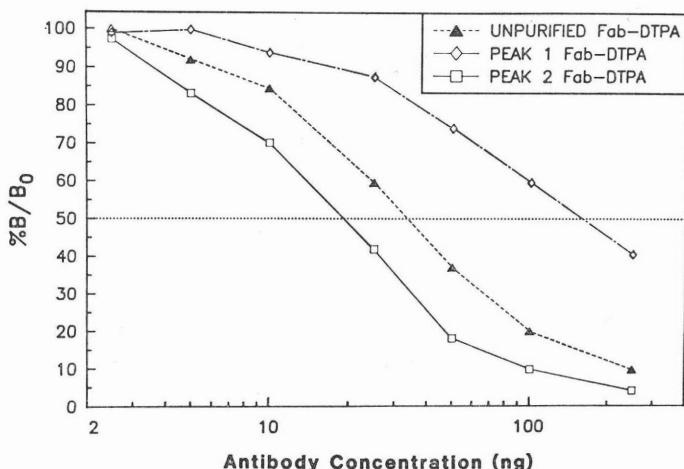


Fig. 5 Results of competitive cell binding assay using the unpurified F ab-DTPA (---▲---), hydroxylapatite chromatographic peak 1 F ab-DTPA (---◇---) and peak 2 F ab-DTPA (—□—). Mass of each antibody preparation required for 50% inhibition of tracer binding was 34 ng, 159 ng and 18 ng, respectively.

小2乗法により得られた直線からy切片を求める  
と、ピーク1,2はそれぞれ2.55, 1.27となった。  
(1)式に基づきimmunoreactive fractionはy切片  
の逆数より求められ、それぞれピーク1が0.392,  
ピーク2が0.789と計算された。この2つの値は  
Fig. 2の最大結合率と全く一致し、今回用いた抗  
体と細胞のアッセイ系では、double reciprocals  
plotでのみ求められるimmunoreactive fraction  
(r)を、便宜的に最大結合率で代用し得ることが  
示された。

## 2) Scatchard analysis

次に、一定量の細胞( $0.5 \times 10^6$ 個)と種々の濃度  
の標識抗体とのScatchard plotをFig. 4-A, Bに  
示した。Scatchard plotでは、その傾きは $-K_a$   
を、x切片は、抗体の最大結合数を表わすため,  
 $^{125}\text{I}-\text{Fab}$  96.5のそれぞれのピークに関して、プロ  
ットされたデータの直線近似を行った。傾きから  
求めた親和定数はそれぞれ、 $0.50 \times 10^9$ (ピーク  
1),  $1.74 \times 10^9$ (ピーク2)となり、みかけの親  
和定数は約3.5倍異なった結果を示した。一方、  
Scatchard plotのデータをimmunoreactive frac  
tionで補正する変法が報告されているが<sup>10)</sup>、同時  
に行なったアッセイから求めたrで補正した結果を

Fig. 4-C, Dに示す。Fを求めるに際して、Fig.  
4-A, Bのプロットでは、加えた標識抗体の総量  
(T)から結合量(B)を減じていたのに対して、結  
合し得る抗体の総量( $r \times T$ )よりBを減じてC, D  
ではプロットを行っている。これより求めたそれ  
ぞれのピークの親和定数は、 $2.93 \times 10^9$ および  
 $2.43 \times 10^9 (\text{M}^{-1})$ と計算された。

## 3) Competitive binding assay

結合阻害アッセイの結果をFig. 5に示した。イ  
ンキュベーションへのF ab-DTPAの添加量を変  
えると、それに応じてトレーサー( $^{125}\text{I}-\text{Fab}$  96.5)  
の細胞への結合が阻害された。F ab-DTPAを加  
えない時のトレーサー結合量( $B_0$ )に対する、添加  
時の結合量(B)の比率(%B/B<sub>0</sub>)を縦軸に、F ab-  
DTPAの添加量(ng)を横軸に片対数でプロット  
した。3種のサンプル間の阻害力の比較は、トレ  
ーサーの結合が50%に阻害される時のF ab-DTPA  
添加量を指標に比較した。50%阻害に必要な、未  
分離、ピーク1、ピーク2のF ab-DTPAはそれ  
ぞれ34 ng, 159 ng, 18 ngであり、ピーク2はピ  
ーク1よりも約9倍、また未分離F ab-DTPAよ  
りも約2倍強い阻害力を持つことが示された。

## V. 考 察

癌組織を認識し反応するモノクローナル抗体を放射性核種で標識し、体内に投与し、癌への放射能の局在を診断<sup>11)</sup> (Radioimmunoscintigraphy) および治療<sup>12)</sup> (Radioimmunotherapy) に利用しようとする試みが今日まで数多くなされてきた。癌組織に対する、より特異性と親和性の高い抗体を開発することが、この方法論を活用するための根本的課題であるが、同時に、効率の良い抗体の生産法、精製法、放射性核種標識法等検討されるべき問題も多々ある。今回、迅速で簡便な抗体の精製法を確立し、分離された抗体を *in vitro* で検討した。その結果得られたモノクローナル抗体に対する知見、本法の分離機構の原理、ならびに有用性と臨床応用の可能性について考察した。

### 1. 抗体の分離・精製に関して

抗体の分離・精製法には大きく分けて、抗体の特異性を利用する方法と、非特異的な物理的性質を利用する方法がある。前者はアフィニティクロマトグラフィであり、抗原を用いる方法とプロテインAを用いる方法があげられる<sup>13)</sup>。後者には、ゲル濾過<sup>14)</sup>、等電点電気泳動<sup>15)</sup>、イオン交換クロマト<sup>15)</sup>等の方法があげられる。たとえモノクローナル抗体といえども、その中に免疫学的には活性のない抗体が混在したり、種々の操作過程で変性失活をうけることを考慮すると、活性のある抗体分画を物性のみで分離・精製する方法には限界がある。したがって抗原に対する特異性を利用する、抗原を用いたアフィニティクロマトグラフィーが既存の方法の中では一番理想に近い。しかしながら、抗原を用いることが逆にこの方法の限界でもある。なぜなら癌に対するモノクローナル抗体のなかで、対応抗原が単離あるいは合成できる場合はきわめて稀と思われるからである。さらに、固相化抗原をそれぞれの抗体に対して準備しなくてはならず、汎用性に乏しいともいえる。特異性では劣るが汎用性の高い点が、物性を利用する方法の特長である。

今回用いた HA-HPLC は、非特異的な汎用性

の高い装置でありながら、抗体の IR に基づき、Fab 96.5 を分離・精製することができた。<sup>125</sup>I-Fab を用いた検討では、IR の低い分画から、高い分画を効率よく精製することが可能であった。IR とは過剰の抗原と結合し得る抗体の割合であり、immunoreactive fraction を意味する<sup>4,10)</sup>。換言すれば、抗体の免疫学的純度となり、<sup>125</sup>I-Fab ピーク 1 では 39% が、ピーク 2 では 79% の抗体のみが、抗原との反応性を持つと考えられる。2 つのピークのみかけ上の親和定数 ( $K_a$ ) は異なっていたが、ピーク 1 の 61%，ピーク 2 の 21% が抗原とは結合し得ない免疫学的不純物であるため、 $K_a$  の過少評価が生じている。そこで IR で補正し、Scatchard plot を再度行うと、 $K_a$  は両者ともに近い値を示した。これは、両ピークの中で、抗体活性を有する抗体の  $K_a$  は、ほぼ等しいことを意味する。それゆえに HA-HPLC は、免疫学的に不純な分画をピーク 1 に、逆により純度の高い分画をピーク 2 に溶出したことになる。

この不活性抗体の成因を <sup>125</sup>I 標識操作による変性失活とするのは妥当ではない。第一に今回の標識操作では添加する酸化剤の量が少なく温和な条件であったこと、<sup>125</sup>I 原子の置換は、抗体 1 分子あたり 0.02 と計算され、一般的な変性の閾値である 2 よりもきわめて低いことがあげられる<sup>16)</sup>。さらに <sup>125</sup>I-Fab 両ピークで比放射能が等しい結果も、標識による変性または失活がピーク 1 を生じたと考える根拠に乏しいことを示唆する。未標識 Fab と <sup>125</sup>I-Fab のクロマトグラムがほとんど同一であったことから、<sup>125</sup>I-Fab での検討で得られた結果は、そのまま未標識 Fab が本来有していた特性と考える方がむしろ合理的である。

今回のモノクローナル抗体 96.5 作製に用いられた親株骨髄腫細胞は NS-1 であり<sup>7)</sup>、細胞融合後ミエローマ由来の k 鎮を分泌することが知られている<sup>17)</sup>。この蛋白が、抗体の構成要素として適当な確率で利用されるとすれば、B 細胞のみで規定される抗体とその免疫学的特性が異なることは十分予想される。Juarez-Salinas らは、ハイブリドーマが活性型と不活性型（ミエローマ由来）の

2種のL鎖を産出し、その組み合わせにより3種の異なったIgGが同時に分泌されることを電気泳動により確認し、HAカラムにより分離できることを報告している<sup>18)</sup>。今回用いたFabは、既存の方法で精製がなされた市販品でありさらに分子量的には均一純度を持つことを確認してあった。それにもかかわらず、不活性抗体の混在がみられたことは、今後モノクローナル抗体を用いる際の留意点としてその物理的純度を免疫学的純度と同一に論ずることができないことを意味している。

## 2. HA-HPLCの分離機構に関して

今回実験に用いられたhydroxylapatiteとは、リン酸カルシウム結晶( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ )であり、従来よりオープンカラム用の充てん剤として、蛋白<sup>19)</sup>、ペプチド<sup>20)</sup>、酵素<sup>21)</sup>、核酸<sup>22)</sup>等種々の物質の分析・精製に用いられてきた。多くの検討により、HAを用いた分離機構は、他の分離手法、例えば、電気泳動・イオン交換・ゲル濾過等とは異なる原理に基づくことが示唆されているが<sup>23)</sup>、未だ明確な結論に至っていない。しかし、今回の実験から、少なくとも分子量が主たる役割を果たしていないことは、明らかである。なぜなら実験に用いたFabはあらかじめ、ゲル濾過HPLCにより単一ピークで構成されることが確認されているからである。

興味深いことにこのHA-HPLCによる分離は、蛋白に結合したDTPAにより影響をうける。Fab-DTPAも2つのピークに分離され、それぞれを阻害アッセイで検討したところ、ピーク2がピーク1に比べて約9倍強い活性を持つことが判明した。さらに未標識Fabや<sup>125</sup>I-Fabの場合と異なり、クロマトグラムのパターンはDTPAを結合させたことにより、低活性のピーク1の割合が増加し、高活性ピーク2の比率が減少した。DTPA結合により抗体に対する何らかの変性機転が働いた結果HA-HPLCは、そのIRを認識して分離するものと予想されたため、当初DTPA結合抗体の精製にも有用であると期待された。ところが、分離されたピーク1は<sup>111</sup>Inと高率に結合

したにもかかわらず、ピーク2は<sup>111</sup>Inとの結合性がきわめて低い結果を示した。<sup>111</sup>Inに対する各ピークの標識率の差は、①各ピーク分画に結合するDTPAの数が異なるためか、または、②各ピーク分画に結合するDTPAが<sup>111</sup>Inに対し異なる反応性をもつかのいずれかと考えられた。Paikらのアフィニティカラムを用いた検討では、DTPA結合時に生じるnon immunoreactiveな抗体に結合したDTPAは、immunoreactiveな抗体に結合したDTPAと<sup>111</sup>Inに対する反応性が変わらないことを示しているため<sup>24)</sup>、今回みられた標識率の差は、①の結合したDTPAの数の違いに起因すると結論づけられる。したがってピーク2分画が<sup>111</sup>Inでほとんど標識されなかつことと併せて考察すると、DTPAと結合した抗体の大部分がピーク1分画に溶出したことになり、このカラムによるIRの差に基づくFab-DTPAの分離精製是不可能と判断された。<sup>111</sup>In等の金属イオンに対するキレート剤であるDTPAは、負の電荷を持つためDTPAの電荷が直接に、あるいは結合によって生ずる何らかの抗体の高次構造の変化が、このカラムの分離機構に影響を与えたものと推察された。またこの結果は、このカラムの応用法の1つの限界を示したものと思われた。

## 3. HA-HPLCの臨床応用に関して

新しくHPLC用に開発されたhydroxylapatiteカラムを用いることにより、高免疫活性モノクローナル抗体を分離・精製できることが、本法の特色であり利点である。また、溶出液のpH、イオン強度が抗体にとって温和な条件であり、分離は30分以内に終了し、室温でも操作可能であり、また、グラディエントポンプも必要としない。さらに得られたカラムはオートクレーブが可能なため、無菌操作に用いることもできる。以上によりHA-HPLCによるモノクローナル抗体の分離精製法は、迅速かつ簡便で、汎用性の高い有用な方法と思われる。したがって、1)未標識(cold)抗体の精製、および2)患者に投与する直前のヨード標識抗体の精製ならばに簡易的な免疫活性の確認に用いることが臨床への応用法として考えられる。

## VI. 結論

1. 既存の精製法で得られた、単一の分子量分画よりなる Fab 96.5 が HA-HPLC を用いることで、さらに 2 つの分画に分離されることが見いだされた。

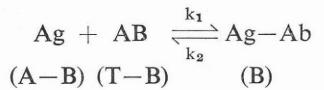
2. 2 つの分画の親和定数は  $2.93 \times 10^9$  および  $2.43 \times 10^9$  ( $M^{-1}$ ) であり、免疫活性は 39% および 79% であったことより、2 つの分画は親和力がほぼ等しく、免疫活性が低いものと高いものであることが判明した。

3. Fab-DTPA を HA-HPLC により分離すると、<sup>111</sup>In との結合性をもつ抗体は、ほとんど最初のピーク(低活性分画)に溶出される結果となった。

HA-HPLC 法は迅速かつ簡便で無菌操作が可能なため、患者に投与直前のヨード標識抗体の精製時に用いる臨床応用方法も可能と考えられた。

## 付録

抗原 (Ag), 抗体 (Ab) 間の反応に質量作用の法則を適用すると、この実験に用いたアッセイ系の反応は以下のように表現される。



ここで A は総抗原量、T は総抗体量、B は結合に関与した抗体量、もしくは、抗原抗体複合体量であり、それぞれ濃度 (M) の次元を持つ。このアッセイでは、T が一定で、A と B が、変数となる。用いた抗体は Fab であるため抗原への結合に関しては一価となり、 $k_1$ ,  $k_2$  はそれぞれ一次、二次の速度定数 (rate constant) となる。熱力学平衡に達した時点では、生成と分離の速度は等しくなり、

$$(\text{A}-\text{B})(\text{T}-\text{B})k_1 = \text{B} \cdot k_2 \quad \dots \quad (1)$$

となる。さらに、(1) 式は、

$$\frac{\text{B}}{(\text{A}-\text{B})(\text{T}-\text{B})} = \frac{k_1}{k_2} = K_a \quad \dots \quad (2)$$

であり、 $K_a$  は親和定数 ( $M^{-1}$ ) になる。ここで加えられた抗原(細胞)量が過剰とすれば ( $A \gg B$ ) (2) 式は、

$$\frac{\text{B}}{\text{A}(\text{T}-\text{B})} = K_a$$

$$\text{B} = \frac{\text{T}}{\frac{1}{K_a \cdot \text{A}} + 1} \quad \dots \quad (3)$$

となる。用いたモノクローナル抗体溶液中には、種々の要因で抗原との結合能を失った分画が存在するため、ここで用いたモノクローナル抗体溶液中、真に免疫活性 (IR) を保持する抗体の比率 (immunoreactive fraction) を r とすると、(3) 式は、

$$\text{B} = \frac{r\text{T}}{\frac{1}{K_a \cdot \text{A}} + 1}$$

$$\frac{\text{B}}{\text{T}} = \frac{r}{\frac{1}{K_a \cdot \text{A}} + 1} \quad \dots \quad (4)$$

と Michaelis-Menten 型の反応式に書き直すことができる。この関係から、細胞量 (A) を無限大に加えた時、 $B/T$  (細胞への標識抗体の結合率) は r となり、r が理論的には求められるが、実際に無限大の細胞は加えられないため、(4) 式の逆数をとると、

$$\frac{\text{T}}{\text{B}} = \frac{1}{r \cdot K_a} \times \frac{1}{\text{A}} + \frac{1}{r} \quad \dots \quad (5)$$

となり、 $T/B$  を  $1/A$  すなわち、結合率の逆数と、抗原量の逆数とをプロットすれば、両者は直線関係となり、y 切片より r を求めることができます。

謝辞：本研究にあたり懇切なるご指導を賜りました久田欣一教授に慎んで深謝いたします。また直接のご助言、ご校閲を頂いた油野民雄講師ならびにご協力を頂いた教室員各位に厚く御礼申し上げます。さらに本稿作製にあたりご助力を頂きました細川栄美子氏にも謝意を表します。

## 文獻

- 1) Köhler G, Milstein C: Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by

- cell fusion. *Eur J Immunol* **6**: 511-519, 1976
- 2) DeLand FH, Goldenberg DM: Radioimmunoimaging and Radioimmunotherapy, Burchiel S, Rhodes BA, Elsevier, New York, 1983, p. 332
  - 3) Bale WF, Contreras MA, Grady ED: Factors influencing localization of labeled antibodies in tumors. *Cancer Res* **40**: 2965-2972, 1980
  - 4) Matzku S, Kirchgessner H, Dippold WG, et al: Immunoreactivity of monoclonal anti-melanoma antibodies in relation to the amount of radioactive iodine substituted to the antibody molecule. *Eur J Nucl Med* **11**: 260-264, 1985
  - 5) Beaumier PL, Neuzil D, Yang HM, et al: Immunoreactivity assay for labeled anti-melanoma monoclonal antibodies. *J Nucl Med* **27**: 824-828, 1986
  - 6) Larson SM: A tentative biological model for the localization of radiolabelled antibody in tumor: the importance of immunoreactivity. *Nucl Med Biol* **13**: 393-399, 1986
  - 7) Brown JP, Nishiyama K, Hellström I, et al: Structural characterization of human melanoma-associated antigen p97 using monoclonal antibodies. *J Immunol* **127**: 539-546, 1981
  - 8) Brown JP, Woodbury RG, Hart CE, et al: Quantitative analysis of melanoma-associated antigen p97 in normal and neoplastic tissues. *Proc Natl Acad Sci* **78**: 539-543, 1981
  - 9) Paik CH, Ebbert MA, Murphy PR, et al: Factors influencing DTPA conjugation to antibodies via cyclic DTPA anhydride. *J Nucl Med* **24**: 1158-1163, 1983
  - 10) Lindmo T, Boven E, Cuttitta F, et al: Determination of the Immunoreactive fraction of radiolabeled monoclonal antibodies by linear extrapolation to binding at infinite antigen excess. *J Immunol Methods* **72**: 77-89, 1984
  - 11) Bischof-Delaloye A, Delaloye B, Buchegger F, von Fliedner V, Mach JP: Nuclear Medicine in Clinical Oncology, Winkler C, eds, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1986, pp. 150-155
  - 12) Larson SM, Carrasquillo JA, Krohn KA, et al: Localization of  $^{131}\text{I}$ -labeled p97-specific F ab frag-
  - ment in human melanoma as a basis for radiotherapy. *J Clin Invest* **72**: 2101-2114, 1983
  - 13) 百瀬玲子: 免疫実験法, 第一版, 右田俊介, 田中渥. 西村書店, 新潟, 1985, p. 8
  - 14) 平山千里: 血漿タンパク質 構造・機能・病態, 第一版, 平山千里, 右田俊介, 医歯薬出版株, 東京, 1979, p. 97
  - 15) Bruck C, Portetelle D, Glineur C, et al: One-step purification of mouse monoclonal antibodies from ascitic fluid by DEAE Affi-gel chromatography. *J Immunol Methods* **53**: 313-319, 1982
  - 16) Argentini M: Labelling with Iodine, A Review of the Literature, Federal Institute for Reactor Research Div. IP, Wuerenlinger, 1982, pp. 255-262
  - 17) 大原純一, 渡辺 武: ハイブリドーマ法とモノクローナル抗体, 渡辺 武, R & D プランニング株, 東京, 1982, p. 19
  - 18) Juarez-Salinas H, Engelhorn SC, Bigbel WL, et al: Ultrapurification of monoclonal antibodies by High-Performance Hydroxylapatite (HPHT) chromatography. *Biotechniques* **2**: 164-168, 1984
  - 19) Tiselius A, Hjertén S, Levin Ö: Protein chromatography on calcium phosphate columns. *Arch Biochem Biophys* **65**: 132-155, 1956
  - 20) Bernardi G, Kawasaki T: Chromatography of polypeptides and proteins on hydroxylapatite columns. *Biochim Biophys Acta* **160**: 301-310, 1968
  - 21) Kerr SJ: Methods in Enzymology vol 29, Academic Press, New York, 1974, pp. 716-726
  - 22) Wilson DA, Thomas CA: Hydroxyapatite chromatography of short double-helical DNA. *Biochim Biophys Acta* **331**: 333-340, 1973
  - 23) Brooks TL: Hydroxylapatite Fast Flow and High Resolution. Behring Diagnostics, San Diego, 1980, pp. 3-15
  - 24) Paik CH, Hong JJ, Ebbert MA, et al: Relative Reactivity of DTPA, immunoreactive antibody-DTPA conjugates, and non immunoreactive antibody-DTPA conjugates toward Indium-111. *J Nucl Med* **26**: 482-487, 1985

## Summary

### Advantage of Highly Immunoreactive Monoclonal Antibodies in Radioimmunoscintigraphy for Tumor Detection: (I) New Purification System for Monoclonal Antibodies

Kunihiko YOKOYAMA

*Department of Nuclear Medicine, Kanazawa University School of Medicine*

Immunoreactivity (IR) is the fraction of a monoclonal antibody (MoAb) preparation capable of binding to an excess of a specific antigen. One of the most important requirements for successful radioimmunoscintigraphy is to use a highly immunoreactive MoAb. To assess the effect of an antibody IR on biodistribution, a fast and simple purification method has been developed using a high performance liquid chromatography (HPLC) system equipped with a hydroxylapatite (HA) column. The column was eluted at ambient temperature with 0.12 M sodium phosphate buffer (pH 6.8). With this system, the F ab fragments from the MoAb 96.5 against the human melanoma associated p97 antigen were separated into two well-resolved peaks at retention times of 6 and 16 min. FEM-XII cells (human skin melanoma cell line) were used in a cell binding assay (CBA) to determine the maximal percent IR and the affinity constant of each HA-HPLC peak. The

second peak from an  $^{125}\text{I}$ -F ab 96.5 showed approximately two times greater maximal binding than did the first peak, whereas the affinity constant for the two was the same. This indicated that the F ab 96.5 preparations used in this study were a mixture of more active and less active components. Moreover, prior to the HA-HPLC experiments, these preparations were analyzed with a gel filtration HPLC showing a single molecular weight peak. This suggested that the HA-HPLC separation was not based on molecular weight differences although the separation mechanism of HA has not yet been fully understood. Thereby, it is concluded that the HA-HPLC is a powerful tool to purify MoAbs into the higher immunoreactive fraction which has a potential advantage in tumor targeting.

**Key words:** Monoclonal antibody, F ab 96.5, Immunoreactivity, Affinity, Hydroxylapatite chromatography.