

《原 著》

RI 標識モノクローナル抗体を用いる新しい 血栓診断法に関する研究

—第2編 放射性ヨード標識抗体による血栓シンチグラフィ—

中島 鉄夫*	山本 和高**	遠藤 啓吾**	阪原 晴海**
小泉 満**	河村 泰孝**	太田 仁八**	国松美帆子**
小西 淳二**	永田 博一***	野村 昌作***	粉川 眩年***
安永幸二郎***	松岡洋一郎****	鳥塚 華爾*****	

要旨 抗血小板モノクローナル抗体を用いたイムノシンチグラフィを血栓検出に応用する目的で、ウサギを用いた基礎検討を行った。I-125 標識した抗血小板抗体は *in vitro* で特異的にウサギ血餅に結合した。また、I-131 で標識した抗血小板抗体は *in vivo* で血栓および脾臓によく集積し、静注投与直後から脾臓の描出を認め、24 時間後には大腿動脈に作成した血栓がシンチグラム上陽性に描画された。また、静注 24 時間後の放射活性の血栓対血液比は 5.6~25.1 に達した。これに対し、対照として用いた抗サイログロブリン抗体では何ら有意な集積を認めなかった。以上より抗血小板モノクローナル抗体を用いたイムノシンチグラフィは、血栓症の診断に有望な方法と思われた。

I. はじめに

血栓症の核医学的診断法には、In-111 で標識した血小板のほか、I-123・I-125・Tc-99m・Ga-67 などで標識したフィブリノーゲンなどが試みられてきた^{1~7)}。特に In-111 標識血小板は心腔内血栓や動脈硬化性病変や人工血管の血栓形成の検討に有用とされるが標識方法は煩雑である^{1,2,8,9)}。

一方、1975 年ケーラーとミルスタインにより、モノクローナル抗体の手法が確立されて以来¹⁰⁾、Immunoscintigraphy (IS) が癌や心筋梗塞の局在診断に盛んに行われるようになった^{11~14)}。われわれはこの IS を応用すれば、煩雑な直接的血小板

標識によらなくても、簡便な抗体を介した間接的血小板標識が可能になると考え、まず血小板に対するモノクローナル抗体を作成、その性状を第1編で報告した¹⁵⁾。本編では、ウサギ大腿動脈に作成した血栓を、放射性ヨードで標識した抗血小板モノクローナル抗体により描出する血栓症 IS の基礎検討を行ったので、その成績を報告する。

II. 材料と方法

1. 放射性ヨード標識モノクローナル抗体の作成

血小板に対する抗体 138-10・1-19、および対照としてヒトサイログロブリンに対する抗体 59A の 3 種類のモノクローナル抗体を実験に供した。

138-10, 1-19 抗体は第1編に述べた方法により作成し、59A 抗体は手術時に得られた甲状腺組織よりサイログロブリンを精製、血小板に対する抗体と同様の方法により、サイログロブリンと特異的に反応するモノクローナル抗体を得た。Scatchard plot により求めた 59A のサイログロブリ

* 福井医科大学放射線科, ***** 同 副学長

** 京都大学医学部核医学科

*** 関西医科大学第一内科

**** 三重大学医学部放射線科

受付：63年2月8日

最終稿受付：63年6月1日

別刷請求先：福井県吉田郡松岡町下合月23 (〒910-11)

福井医科大学放射線科

中島 鉄夫

ンとの親和定数は $3.6 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ と非常に高かった。抗体のヨード標識は、第1編と同様クロラミン-T法により行い¹⁶⁾、いずれも比放射能約 5 mCi/mg のものを得た。蛋白標識用放射性ヨード NaI-125, NaI-131 は New England Nuclear 社(米国)より購入した。

2. 標識抗体の血栓への結合 (in vitro モデル)

既存の血栓、および形成過程にある新鮮血栓への RI 標識抗体の集積を検討する目的で、次の二つの方法により、in vitro で標識抗体の血栓への結合を検討した。

すなわち、①3.2% クエン酸ナトリウムを 10% 加えて心臓採血したウサギ新鮮血 1,000 μl に、まず 0.025 M 塩化カルシウム溶液 100 μl を添加。30 分、37°C にてインキュベートして血栓を形成させた後、I-125 標識抗体 10 万 cpm/100 μl を加え、37°C でインキュベートする方法。

および、②同様に採血した血液に直ちに①と同様の I-125 標識抗体を加え、37°C、30 分インキュベートし、その後塩化カルシウムを加えて血栓を形成させる方法である。

血栓への標識抗体の結合率は、加えた標識抗体の放射活性に対する血栓に結合した放射活性の割合を % で表示した。

3. ウサギ大腿動脈血栓の作成 (in vivo モデル)

ウサギ動脈血栓は鈴木らの方法⁴⁾により作成した。ネンブタール麻酔下に 3 kg のウサギの右大腿動脈を露出、静脈・神経を剥離した後、綿棒にて 10% 硝酸銀溶液を 3 回塗布し内膜を損傷させた。切開創は瞬間接着剤(アロンアルファ[®]、東亜合成化学社製)にて接着閉鎖した。血栓形成の確認は解剖時に大腿動脈を露出、ピンセットで軽く圧迫することにより、動脈壁を通じて容易に視認することができた。なお抗体から遊離した I-131 の甲状腺への摂取をブロックするため、実験の 3 日前から実験終了時まで、飲水中にヨウ化カリを加えて飼育した。

4. シンチグラムおよび標識抗体の体内分布

血栓モデル作成約 1 時間後に、I-131 標識モノクローナル抗体 (0.5 mCi/100 μl) を耳静脈より投

与、以後 24 時間後まで経時に平行コリメータを装着したガンマカメラ(Searl 社製、米国)にてウサギのシンチグラムを撮像した。標識抗体投与 24 時間後にネンブタール麻酔下に脱血屠殺し、各臓器の放射活性をウエル型ガンマカウンターにて測定、結果は各組織の血液に対する放射活性の比として表示した。

III. 結 果

ウサギ血栓に対する I-125 標識モノクローナル抗体の in vitro での結合 (Fig. 1)

血栓への I-125 標識モノクローナル抗体の結合率は、先に血栓を形成させておいて後から標識抗体を加えた場合、それぞれ、138-10: 11.9%, 1-19: 16.1%, 59A: 2.5% であった。一方、先に I-125 標識抗体を加えてから血栓を形成させた場合にはそれぞれ I-125 標識モノクローナル抗体の、138-10: 57%, 1-19: 66.7%, 59A: 7.5% が血栓と結合した。対照に用いた抗体 59A に比べ、抗血小板抗体は血栓との高い結合率を示した。またいずれの抗体

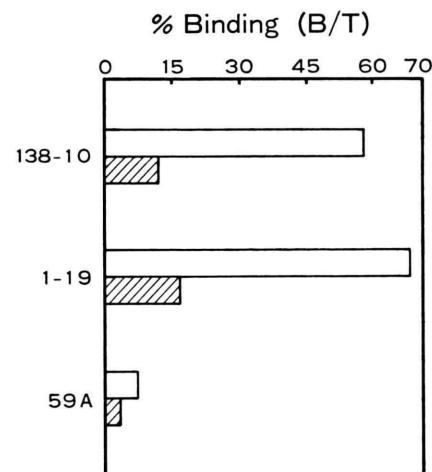


Fig. 1 Bindings of I-125 labeled monoclonal antibodies to rabbit blood clot in vitro. Monoclonal antibodies 138-10 and 1-19 reacted with rabbit platelets. But 59A was not reactive with platelets.

□: labeled antibodies added before clotting
▨: labeled antibodies added after clotting

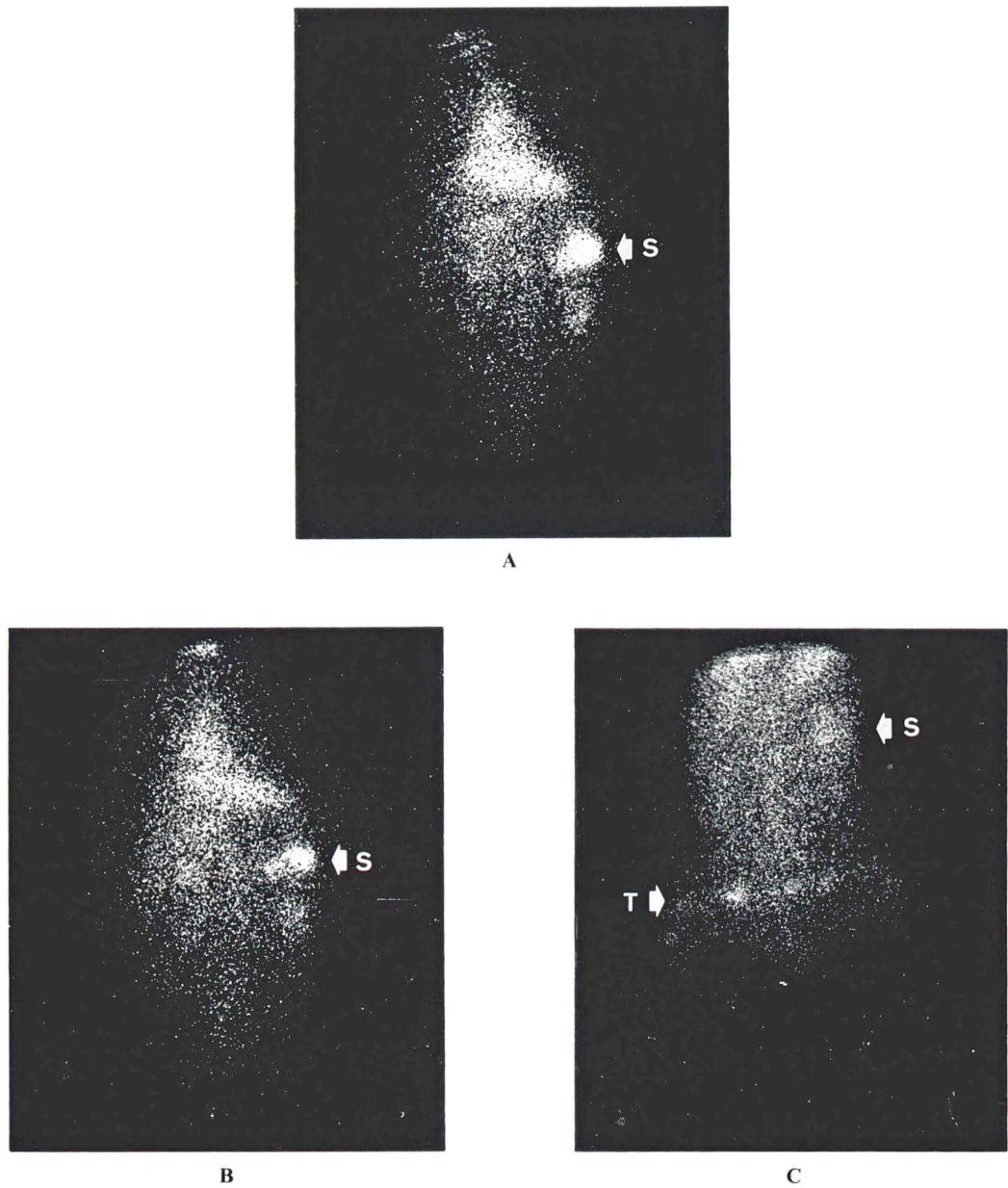


Fig. 2 Scintigrams of a rabbit with right femoral arterial thrombus at 1 hour (A), 6 hours (B), and 24 hours (C) after the injection of I-131 labeled antibody 1-19. Blood pool image and splenic accumulation of radioactivity was seen at 1 and 6 hours. However, thrombus was clearly visualized at 24 hours after the injection of I-131 labeled 1-19. T: thrombus. S: spleen.

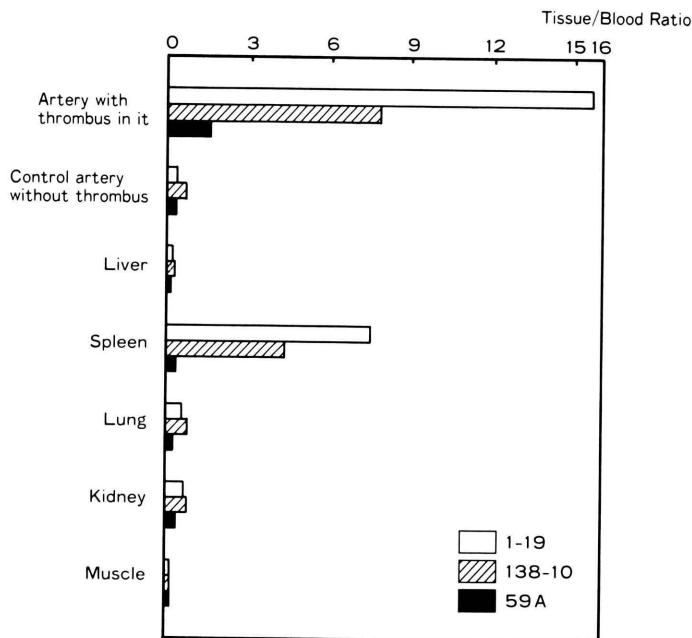


Fig. 3 Biodistribution of I-131 labeled monoclonal antibodies 24 hours after the injection. Thrombus to blood and spleen to blood ratios of radioactivity obtained by using monoclonal antibodies to platelets were much higher than those of control antibody 59A. Data were mean of two rabbits.

においても、血餅形成前に標識抗体を加えた方が、血餅を形成させてから標識抗体を加えたよりも結合率が高くなった。血小板への結合親和定数の最も高かった 1-19 が¹⁵⁾ 血餅へも最も高い結合率を示したが、各抗体の血小板凝集能に及ぼす影響とは一定の関係は見られなかった。

Figure 2A, B, C はそれぞれ I-131 標識抗血小板モノクローナル抗体 1-19 を静脈内に投与 1 時間、6 時間、24 時間後に撮像した代表的なウサギのシンチグラムを示す。抗体 1-19 および 138-10 では、投与直後より心プール像とともに脾臓への強い取り込みが見られたが、標識抗体投与 6 時間後より血栓が陽性画像として見えはじめ、24 時間後には血栓の局在を明瞭な陽性画像として認めることができた。一方、対照の抗体 59A では脾臓への取り込みが見られないのみならず、血栓も 24 時間後まで何ら陽性画像として得ることができなかった。標識抗体投与 24 時間後のウサギ各臓器への放

射活性の分布は、シンチグラムの所見をよく反映し、抗血小板抗体を用いた場合、血栓／血液比で、いずれも 5.6～25.1 と非常に高い値が得られた (Fig. 3)。脾臓にもやや高い取り込みが見られたが、その他の臓器では抗体の有意な取り込みは見られなかった。これに対し I-131 標識 59A 抗体を投与した場合、および血栓を作成しなかった対側動脈での放射活性の対血液比は、0.3～0.5 と著しく低い値であった。

IV. 考 案

I-131 あるいは I-125 などの放射性ヨードで標識した抗血小板モノクローナル抗体は、in vitro で作成した血餅に特異的に結合したのみならず、in vivo でも人工的に作成した小さな血栓に特異的に集積し、血栓を陽性描画することができた。Oster らはイヌ血小板とも反応する抗ヒト血小板抗体 7E3 を用いたイヌの血栓シンチグラムを報

告した¹⁷⁾が、ウサギを用いての検討は本研究が初めてである¹⁵⁾。

標識抗体投与 24 時間後の放射活性の血栓／血液比も 5.6～25.1 と、Ga-67 や I-131 で標識したフィブリノーゲンを用いた報告³⁾とほぼ同程度の値であった。標識抗体の投与により血栓のみならず脾臓にも強い取り込みが見られたが、その他の組織には有意の集積は認められなかった。また対側の未処置動脈、および対照として投与した I-131 標識コントロール抗体は、いずれもシンチグラムでは陰性であった。コントロールとして用いた標識抗体では脾臓が描出されなかつことにより、標識抗血小板抗体が血小板と結合して、血小板・抗体複合物を形成し、脾臓にも集積したものと解釈される。脾臓への RI の集積は従来の標識血小板を用いた場合でも知られ¹⁾、先の Oster ら¹⁷⁾の報告でも認められるが、脾臓に重なる部分の診断を困難にする反面、標識抗体の血中クリアランスを早め、より早期に血栓が陽性描画されやすい可能性があり、標識血小板を用いる方法の特徴といえるだろう。

悪性腫瘍の IS においては結合親和定数がより高い抗体が望ましいとされているが¹⁴⁾、われわれは血栓の IS についても同じことがいえるであろうと考え¹⁵⁾、ウサギ血小板と結合親和定数の高い抗体 1-19, 138-10 を用いて検討した。その結果 *in vitro*, *in vivo* のいずれも親和定数のより高い 1-19 の方が 138-10 よりも血餅／血栓への結合／集積率は高く、われわれの考えと一致する結果が得られた。また、Oster らの抗体 7E3 は、トレーサー量で 50% がイヌ血小板に、ヒト血小板には 90% が結合するという¹⁷⁾。われわれの 1-19 はヒト、ウサギ血小板ともほぼ同様のおよそ 70% が結合し（結果略）、臨床応用前の動物実験系に用いるには、7E3 にまさると考えられるが、血栓 Age と集積率との関係などは未だ検討の余地がある。

これまで IS は主として悪性腫瘍を対象として行われてきたが、血栓症では悪性疾患と異なり、標的となる血栓より循環抗原、つまり血小板の方がはるかに質量が多く、かつ血栓内部には標識抗

体を運ぶ血流がないため、まず循環抗原＝血小板に結合した抗体が、機能を保った血小板とともに血栓に粘着、集積していくものと考えられる⁹⁾。この点、腫瘍内部の血流により標識抗体が直接腫瘍（抗原）に結合していくと考えられる悪性疾患より、血栓症では IS の効率が良い可能性がある。しかし、今回のわれわれの実験では、標識抗体投与 24 時間後に血栓が検出可能となり、Oster らの 7E3 を使った報告¹⁷⁾の 1.5～3 時間よりかなり遅い。この差の原因は実験動物の相違もあり不明である。

血栓症は部位がどこであれ早期診断・治療が原則で、より早い検出が望まれる。この点、これまでの悪性腫瘍に対する広範な IS の研究結果の蓄積、すなわち、より高い結合親和定数を持った抗体の使用、抗体の投与量および方法¹⁸⁾、抗体のフラグメント化¹⁹⁾、標識核種の選択²⁰⁾などの手技による IS の性能の向上が直ちに応用可能と思われるのも、本法の今後の発展に関するメリットであろう。今後これまでの血栓診断方法との比較とあわせた検討が必要と思われる。

血小板に対するモノクローナル抗体の多くは血小板機能に関係した細胞表面蛋白と反応しており^{17, 21)}、われわれの作成した抗体も 1～10 μg/ml の濃度で血小板凝集能に影響を及ぼすことがある¹⁵⁾。このことは前述したような機序で標識抗体が血栓に集積する限り、血小板機能がいくらかでも傷害され、血栓への標識抗体の集積を低下させる可能性があり、望ましくないと考えられる。特に投与抗体の量を増やそうとする時に問題となろう。これは、血栓症の IS に正常の血小板に対する抗体を用いたための本質的な問題であり、脾臓への標識抗体の集積機序とともに、検討の余地がある。

血栓症の治療には抗凝固療法や血栓溶解療法が行われるが、血栓溶解剤を抗体に結合させてより選択的に血栓に運ぶ試みなど、モノクローナル抗体の特異性を活かした新しい血栓治療法に発展することも期待される。

V. まとめ

ウサギ血小板と反応するモノクローナル抗体を

用いて、血栓症診断の IS に関する基礎的検討を行った。抗血小板モノクローナル抗体を放射性ヨードで標識し、ウサギに作成した血栓モデルに投与したところ、投与 24 時間後にガンマカメラ上、血栓は陽性画像として描画された。放射活性の血栓／血液比は、5.6～25.1 と高く、本法を用いた血栓イメージングの有用性が示唆された。

文 献

- 1) Mathias CJ, Welch MJ: Radiolabeling of platelets. *Semin Nucl Med* **14**: 118-126, 1984
- 2) Kenneth MM, Peter FF: Imaging of venous thromboemboli with labeled platelets. *Semin Nucl Med* **14**: 188-197, 1984
- 3) Ohmomo Y, Yokoyama A, Suzuki J, et al: ^{67}Ga -labeled human fibrinogen: A new promising thrombus imaging agent. *Eur J Nucl Med* **7**: 458-461, 1982
- 4) Suzuki T, Sato Y, Aoki S, et al: Standardization and imaging of arterial and venous thrombosis models in rabbits with Ga-67-fibrinogen-DAS-DFO, New bifunctional chelating agent. *J Nucl Med* **26**: 23, 1985 (Abst)
- 5) 川崎幸子: ^{67}Ga -DFO-DAS-Fibrinogen による血栓シンチグラフィー—第2報 ^{67}Ga -DFO-DAS-Fibrinogen の臨床応用—. 核医学 **24**: 827-836, 1987
- 6) Harwig SSL, Harwig JF, Coleman RE, et al: In vivo behavior of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -fibrinogen and its potential as a thrombus imaging agent. *J Nucl Med* **17**: 40-46, 1975
- 7) Denardo SJ, Denardo GL: Iodine-123-fibrinogen scintigraphy. *Semin Nucl Med* **7**: 245-251, 1977
- 8) 北川一夫, 宮井元伸, 恵谷秀紀, 他: 下肢閉塞性動脈硬化症における血小板シンチグラフィーの有用性に関する検討. 核医学 **24**: 115-123, 1987
- 9) 牧野克俊, 山室匡史, 市川毅彦, 他: 心腔内血栓診断における ^{111}In -oxine 血小板シンチグラフィーの有用性について. 核医学 **26**: 187-197, 1986
- 10) Kohler G, Milestein C: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature (Lond)* **256**: 495-497, 1975
- 11) Murray JL, Rosenblum MG, Sobol RE, et al: Radioimmunoimaging in malignant melanoma with ^{111}In -labeled monoclonal antibody 96.5. *Cancer Res* **45**: 2376-2381, 1985
- 12) Haber H, Katus HA, Hurrel JG, et al: Detection and quantification of myocardial cell death: application of monoclonal antibodies specific for cardiac myosin. *J Molecul Cellul Cardiol* **14**: 139-146, 1982
- 13) Sakahara H, Endo K, Nakashima T, et al: Localization of human osteogenic sarcoma xenografts in nude mice by a monoclonal antibody labeled with radioiodine and indium-111. *J Nucl Med* **28**: 342-348, 1987
- 14) Kennel SJ, Foote LJ, Lankford PK, et al: Direct binding of radioiodinated monoclonal antibody to tumor cells: significance of antibody purity and affinity for drug targeting for tumor imaging. *Hybridoma* **2**: 297-310, 1983
- 15) 中島鉄夫, 遠藤啓吾, 山本和高, 他: RI 標識モノクローナル抗体を用いる新しい血栓診断法の研究——第1編 ウサギならびにヒト血小板に対するモノクローナル抗体の作成——. 核医学 **25**: 743-748, 1988
- 16) 阪原晴海, 遠藤啓吾, 中島鉄夫, 他: 標識抗ヒト α -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
- 17) Oster ZH, Strivastava SC, Som P, et al: Thrombus scintigraphy with radiolabeled monoclonal antibody in the dog. *Eur J Nucl Med* **9**: A91, 1984 (Abst)
- 18) Murray JL, Rosenblum MG, Lamki L, et al: Clinical parameters related to optimal tumor localization of indium-111-labeled mouse anti-melanoma monoclonal antibody ZME-018. *J Nucl Med* **28**: 25-33, 1987
- 19) 阪原晴海, 遠藤啓吾, 中島鉄夫, 他: 標識抗ヒト α -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)'2 分画の比較—. 核医学 **22**: 377-382, 1985
- 20) Endo K, Sakahara H, Nakashima T, et al: Preparation and properties of antitumor monoclonal antibodies labeled with metabolic radionuclides indium-111, gallium-67, and technetium-99m. *NCI Monogr* **3**: 135-140, 1987
- 21) Coller BS, Peerschke EI, Scudder LE, et al: A murine monoclonal antibody that completely blocks the binding of fibrinogen to platelets produces a thrombasthenic-like state in normal platelets and binds to glycoproteins IIb and/or IIIa. *J Clin Invest* **72**: 325-338, 1983

Summary

Thrombus Scintigraphy Using Radiolabeled Monoclonal Antibodies to Platelets: (II) Visualization of Arterial Thrombus of Rabbits Using Radioiodinated Antibodies

Tetsuo NAKASHIMA*, Kazutaka YAMAMOTO**, Keigo ENDO**,
Harumi SAKAHARA**, Mitsuru KOIZUMI**, Yasutaka KAWAMURA**,
Hitoya OOTA**, Mihoko KUNIMATSU**, Junji KONISHI**,
Hiroyasu NAGATA***, Syousaku NOMURA***, Hirotoshi KOKAWA***,
Koujirou YASUNAGA***, Youichiro MATSUOKA**** and Kanji TORIZUKA*****

**Department of Radiology, Fukui Medical School*

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

****The First Department of Internal Medicine, Kansai Medical University*

*****Department of Radiology, Mie University School of Medicine*

******Vice-President, Fukui Medical School*

Radioiodinated monoclonal antibodies to platelets were examined for its binding to blood clot in vitro and for the thrombus scintigraphy in vivo. Experimental thrombus was produced in the femoral artery of rabbits. Specific binding of radioiodinated antibodies designated 138-10 and 1-19 was observed in vitro as well as in vivo, and both antibodies clearly visualized experimental thrombus at 6 to 24 hours after the intravenous administration. Thrombus-to-blood ratios reached

5.6-25.1 at 24 hours. On the contrary, no localization was seen with radioiodinated irrelevant antibody. These results indicate that immuno-scintigraphy using monoclonal antibodies to platelets is a promising tool for the localization of arterial thrombus.

Key words: Thrombus scintigraphy, Immuno-scintigraphy, Rabbit, Monoclonal antibody, Platelet.