

《原 著》

¹¹¹In 標識モノクローナル抗体を用いた 免疫シンチグラフィにおける DTPA 投与の 有用性に関する基礎的検討

—(I) 血清中および培養肝細胞での検討—

越智 香* 藤井 崇* 木村 良子* 赤宗 明久*
濱本 研*

要旨 ¹¹¹In 標識モノクローナル抗体 (¹¹¹In-MoAb) を用いた免疫シンチグラフィでの問題点である肝臓等への ¹¹¹In の非特異的集積を低減させる手段として, ¹¹¹In と安定に結合するキレート剤である DTPA 投与の有用性について検討を行った. ヒト血清中での in vitro 血清分析では ¹¹¹In-MoAb から分子量約 7~9 万の分画 (S 分画) への ¹¹¹In の移行が, DTPA 添加により抑制された. また, BALB/c マウスでの in vivo 血清分析でも DTPA を腹腔内投与することにより S 分画の ¹¹¹In の割合が低下した. 肝細胞実験において, DTPA 添加により, 肝細胞による ¹¹¹In-MoAb の取り込みは低下したが, 肝細胞から遊離する ¹¹¹In の割合は変化しなかった. 腫瘍細胞に対する DTPA の影響は認められなかった. 以上の結果から, DTPA 投与が ¹¹¹In-MoAb での免疫シンチグラフィにおいて肝臓等への非特異的な集積を低減させ, かつ速い血液クリアランスを与える有用な手段となる可能性が示唆された.

I. はじめに

¹¹¹In-MoAb を用いた免疫シンチグラフィにおいて, 肝臓などへの ¹¹¹In の非特異的集積が問題となっているが^{1,2)}, その原因の 1 つとして, 血中, あるいは臓器における抗体からの ¹¹¹In の遊離が考えられている^{3,4)}. われわれは, DTPA が In³⁺ と安定に結合するキレート剤であることから⁵⁾, DTPA の投与が, 抗体から遊離した ¹¹¹In による非特異的集積の低減, さらにその迅速な排泄に有効な手段となるのではないかと考え, その可能性の検討を計画した. 今回まず予備検討を行ったので報告する.

* 愛媛大学医学部放射線科

受付: 3 年 5 月 27 日

最終稿受付: 3 年 10 月 28 日

別刷請求先: 愛媛県温泉郡重信町志津川 (☎ 791-02)

愛媛大学医学部放射線科

木村 良子

II. 実験材料, 方法

1) モノクローナル抗体および標識法

モノクローナル抗体はわれわれの研究室で作成したヒト悪性リンパ腫由来細胞株 (SCC-3)⁶⁾ を免疫抗原とする, マウス IgG₁ 抗体 (YK-1, K=1.8 × 10⁸ M⁻¹) を用いた. YK-1 は, SCC-3 上の分子量 50 万以上の抗原を認識し, T 細胞系 (CCRF-CEM), B 細胞系 (RPMI 8226, IM-9), 骨髓球系細胞株 (K562, KG-1, U937), および末梢リンパ球と反応しない等の性質を持つが, 詳細な抗原決定はまだなされていない. ハイブリドーマを移植したヌードマウスの腹水を採取し, 50% 飽和硫酸にて塩析後, さらにプロテイン A (コスモバイオ) カラムにより分離精製した. 純度はポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE, フェルマシア) により確認した. ¹¹¹In 標識を行うため, YK-1 (5 mg/ml/0.1 M NaHCO₃) に 2 倍モル量のサイク

リック DTPA (2 mg/ml DMSO) を混合、室温で 1 時間反応後、セファデックス G25 カラム (PD10, ファルマシア) にて分離し、DTPA-YK-1 複合体を作成した⁷⁾。クロラミン T 法にて ^{125}I 標識し、SCC-3 との Cell Binding Assay により DTPA 結合による抗体活性の低下の有無を確認した。DTPA-YK-1 (1 mg/ml 0.2 M クエン酸緩衝液, pH=6.0) に $^{111}\text{InCl}_3$ を混合、室温で 30 分反応させ、 ^{111}In 標識を行った (1 $\mu\text{Ci}/1 \mu\text{g}$, ^{111}In -YK-1)。標識率はセルロースアセテート電気泳動、および HPLC により確認した。

2) 分 析

セルロースアセテート電気泳動 (CAE) はバルビタール緩衝液 ($\mu=0.05$, pH=8.6) を用い、0.8 mA/cm で 20 分間泳動した。セルロースアセテート膜は 0.5 cm ずつ切り、ガンマカウンターで放射能を測定した。HPLC は、ゲル濾過用 TSK 3000SW カラム (7.5 mm \times 60 cm, 東ソー) を用い、0.05% NaN_3 含有 0.1 M 磷酸緩衝液 (pH 7.0) により溶出、検出器として紫外線分光光度計 (280 nm) およびラジオアナライザーを接続した。さらに放射能の定量化のため、溶出液を 1 ml ずつ採集し、ガンマカウンターで放射能を測定した。

3) In Vitro 血清分析

ヒト血清 2.0 ml に ^{111}In -YK-1 (66 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$) 100 μl 、および各濃度の DTPA 溶液 (0, 0.1, 0.5, 2.0 mg/100 μl , pH 7.4) 100 μl を混合、pH 7 前後に調整後、4 日後まで 37°C, 5% CO_2 のもとでインキュベートし、CAE、および HPLC にて経時的に分析を行った。また、ヒト血清に ^{111}In -YK-1 を混合、1 日間あらかじめインキュベートした後に各濃度 DTPA 溶液 (0, 0.5, 2.0 mg/100 μl) 100 μl を加え、さらに 3 日後までインキュベートし、同様の分析を行った。血清の pH は毎日確認した。

4) In Vivo 血清分析

BALB/c マウスに ^{111}In -YK-1 (70 $\mu\text{g}/200 \mu\text{l}$) 200 μl を静注し、その後、毎日 DTPA 溶液 (0, 0.5, 2.0 mg/200 μl) 200 μl を腹腔内投与した。2 日後、4 日後に屠殺し、血清を CAE、および HPLC で分析した。同時に各臓器の湿重量および放射能を

測定し、% injected dose/gram tissue (%ID/g) を求めた。

5) ラット肝細胞による検討

ラット肝細胞はウイスター系雄性ラットを用い、肝臓内にコラギナーゼ液を灌流させ、分離した⁸⁾。ナイロンストッキングで濾過後、低速遠心 (40 g, 1 min) し、10% 牛胎児血清 (FCS), ハイドロコルチゾン (10^{-5} M), インスリン (10^{-6} M), ペニシリン (100 u/ml), ストレプトマイシン (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を含む MEM 培養液に 5×10^5 cells/ml に調整し、24 穴プレートに $1.25 \times 10^5/0.25 \text{ ml}/1.25 \text{ cm}^2/\text{well}$ の濃度でまき、培養は 37°C, 5% CO_2 インキュベーター内で行った。培養液は毎日交換し、2 日目から 1 週間以内に実験を行った。DTPA の同時混合による ^{111}In 標識抗体取り込みへの影響の検討のため、各濃度の DTPA 溶液 10 μl および ^{111}In -YK-1 (1 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$) 10 μl を各ウェルに加え、5% CO_2 のもとで、37°C で 2 時間インキュベートし、洗浄後、トリプシン処理で細胞を剥離させ、細胞の放射能をガンマカウンターで測定した。また同様の方法で ^{111}In -YK-1 を取り込ませた後に、各濃度の DTPA 含有培養液 250 μl 中で、さらに 2 時間インキュベートし、培養液中に遊離される ^{111}In の割合について検討した。

6) 腫瘍細胞による検討

SCC-3 を比重遠心法で死細胞除去後、RPMI 1640 培養液 (10% FCS を含む) に再浮遊し、 1×10^5 cells/250 μl ずつプラスチックチューブに分注した。DTPA の同時混合による ^{111}In 標識抗体取り込みへの影響の検討のため、各濃度の DTPA 溶液 10 μl および ^{111}In -YK-1 (1 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$) 10 μl を混合、37°C, 5% CO_2 のもとで、2 時間インキュベートし、洗浄後、細胞の放射能を、ガンマカウンターで測定した。また、同様に ^{111}In -YK-1 を細胞に取り込ませた後、各濃度の DTPA 含有培養液 250 μl 中で、さらに 2 時間インキュベートし、培養液中に遊離される ^{111}In の割合について検討した。

III. 結 果

1) モノクローナル抗体および標識

DTPA 結合による抗体活性の低下は認められなかった。また、用いた全ての ^{111}In -YK-1 において標識率は 95% 以上であり、遊離した ^{111}In は検出されなかった。

2) In Vitro 血清分析

Figure 1 に ^{111}In -YK-1 を、コントロール血清 (A)、および 0.5 mg DTPA 含有血清 (B) 中で各時間 (0-4 日) インキュベートした後の、HPLC クロマトグラム (1.0 ml/min) を示す。リテンションタイム 15 分前後に ^{111}In -YK-1、24 分前後に ^{111}In -DTPA が溶出され、コントロール血清において経時的に増加した 16 分前後のピークを S 分画とした。コントロール血清および各濃度 DTPA 含有血清における、各分画の放射能の割合の変化を Fig. 2 に示す。コントロール血清では S 分画の放射能の割合が経時的に増加し、4 日後には 40% となったが、一方、DTPA を加えた血清ではいずれも 4 日後までにその分画に放射能は検出されなかった。DTPA 分画の割合はコントロール血清では

4 日後で 3.7% なのに対して、DTPA を加えた血清ではいずれも 20% 以上となった。開始時を 100% とした ^{111}In -YK-1 の割合はコントロール血清では、2 日、3 日、4 日後でそれぞれ 86%、58%、36% と顕著に減少するのに対して、DTPA を加えた血清ではいずれも 4 日後で 77% 以上であった。いずれにおいても、0.1-2.0 mg/2 ml の濃度範囲では、DTPA 濃度による有意差は認められなかった。また、血清中で ^{111}In -MoAb を 1 日プレインキュベートすると約 17-18% の ^{111}In が S 分画に検出されたが、その後 0.5 mg、2.0 mg の DTPA を混合することにより 1 日後にはその割合は、それぞれ 3.7、1.6% に低下し、2 日後にはともに全く検出されなかった。コントロール血清では経時的に S 分画の割合が増加した (Table 1)。

3) In Vivo 血清分析

Figure 3 に、 ^{111}In -YK-1 を静注したマウスの 2 日、4 日後の血清の HPLC クロマトグラム (0.5 ml/min) を示す。リテンションタイム 29 分前後に ^{111}In -YK-1、45 分前後に ^{111}In -DTPA が溶出され、34 分前後のピークに S 分画が出現する。コントロール群および、DTPA 投与群 (0.5、2.0 mg/day)

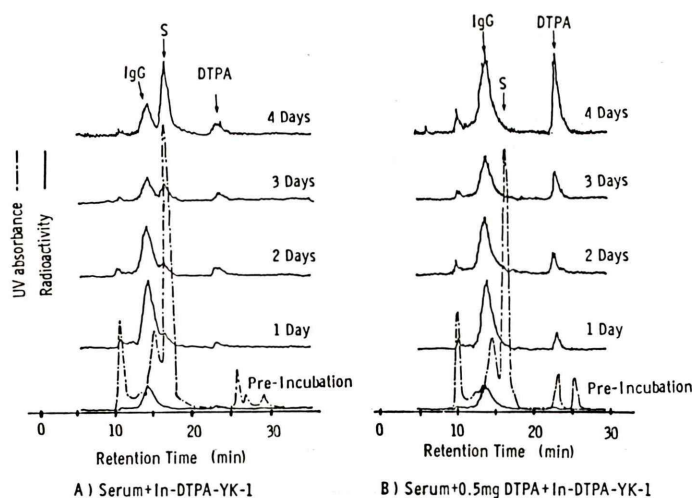


Fig. 1 HPLC-TSK-3000SW chromatograms obtained by analysis of ^{111}In -DTPA-YK-1 before (Pre-Incubation) and after incubation in human serum (1-4 Days), without (A) or with (B) DTPA (0.5 mg): UV absorbance at 280 nm (-----); Radioactivity (—).

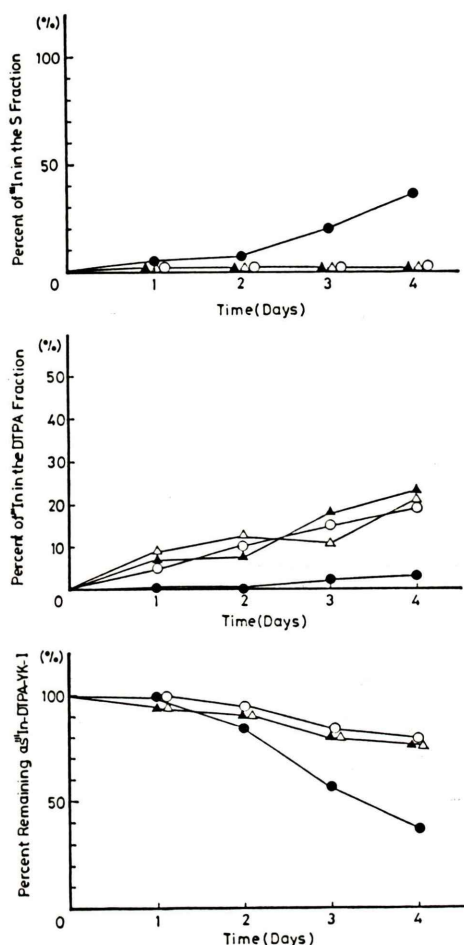


Fig. 2 Percentages of ^{111}In after incubation of ^{111}In -DTPA-YK-1 in human serum with and without DTPA in the S Fraction, the DTPA Fraction, the IgG Fraction; (●)=Control; (○)=0.1 mg DTPA; (▲)=0.5 mg DTPA; (△)=2.0 mg DTPA.

において、S分画の ^{111}In の割合は、2日後では各群間での有意差は認められず約17%であったが、4日後ではコントロール群、および0.5 mg, 2.0 mg DTPA 投与群でそれぞれ12.7, 9.4, 8.1%となり、DTPA 投与によりその割合が低下した。いずれにおいても ^{111}In -DTPA は検出できなかった。体内分布では、4日後、コントロール群および0.5 mg, 2.0 mg DTPA 投与群での肝臓への集積はおおの7.20, 4.72, 3.71 (%ID/g), 腎臓への集積はおおの9.46, 6.10, 4.57 (%ID/g) となり、ともにDTPA 投与により顕著に低下した。また、血中の ^{111}In 残留量もDTPA 投与により低減した (Fig. 4).

4) 肝細胞に対する DTPA の影響

Figure 5 に示すように、肝細胞による ^{111}In -YK-1 取り込みは約2時間で平衡に達した。培養液中に各濃度 (4×10^{-2} – $4 \times 10^2 \mu\text{g/ml}$) のDTPA を混合すると、 $4 \mu\text{g/ml}$ 以上の濃度において、肝細胞による ^{111}In -YK-1 の取り込みは、DTPA 濃度の増加に伴い低下し、 $4, 4 \times 10, 4 \times 10^2 \mu\text{g/ml}$ でそれぞれコントロールの72.4, 53.1, 48.5%であった。しかし、 ^{111}In -YK-1 を取り込ませた肝細胞から各濃度のDTPA 含有培養液中に遊離する ^{111}In の割合はDTPA 濃度により変化しなかった (Fig. 6).

5) 腫瘍細胞に対する DTPA の影響

腫瘍細胞により取り込まれる ^{111}In -YK-1 の割合、および ^{111}In -YK-1 を取り込ませた腫瘍細胞から遊離する ^{111}In の割合はDTPA 添加により変化しなかった (Fig. 7).

Table 1 Analysis of ^{111}In -DTPA-YK-1 after incubation in human serum

Sample	Percent of In-111 in the S fraction				Percent of In-111 in the DTPA fraction			
	Pre-DTPA	Post-DTPA			Pre-DTPA	Post-DTPA		
		1 day	2 days	3 days		1 day	2 days	3 days
Control	18.0	15.0	16.1	33.9	—	—	—	3.2
+0.5 mg DTPA	16.7	3.7	—	—	0.8	10.5	38.0	42.7
+2.0 mg DTPA	17.2	1.6	—	—	—	23.2	45.1	45.6

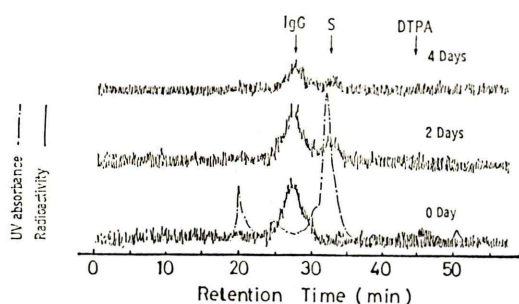


Fig. 3 HPLC-TSK-3000SW chromatograms obtained by analysis of murine serum after injection of ^{111}In -DTPA-YK-1 (0, 2, 4 Days); UV absorbance at 280 nm (-----); Radioactivity (—).

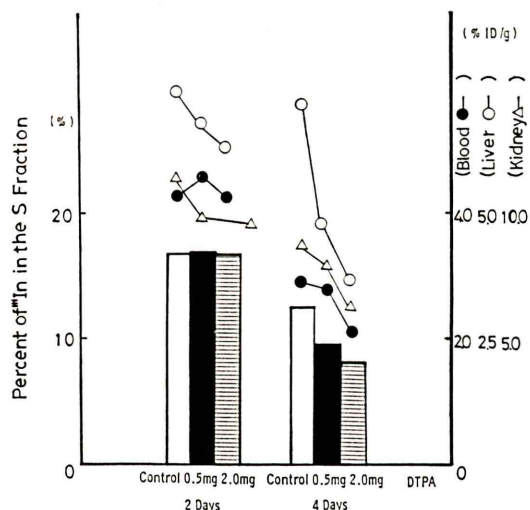


Fig. 4 Effect of DTPA on in vivo transchelation to the S Fraction from ^{111}In -DTPA-YK-1, (□)=Control, (■)=0.5 mg DTPA, (▨)=2.0 mg DTPA, and biodistribution of ^{111}In -DTPA-YK-1 in Balb/c normal mice, (●)=Blood; (○)=Liver; (△)=Kidney.

IV. 考 察

DTPA が ^{111}In と安定に結合するキレート剤であることに着目し, ^{111}In -MoAb を用いた免疫シンチグラフィでの問題点である肝臓等への ^{111}In の非特異的集積を低減させる手段としての, DTPA 投与の有用性について予備検討を行った。

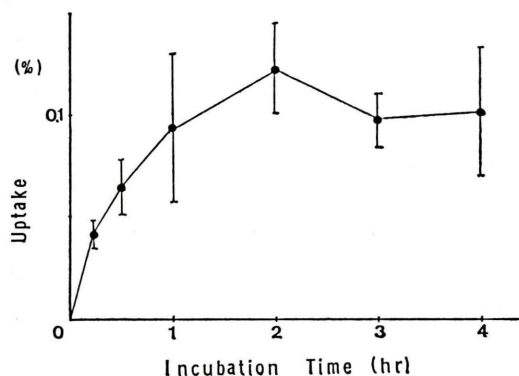


Fig. 5 Time course of ^{111}In -DTPA-YK-1 uptake by hepatocytes.

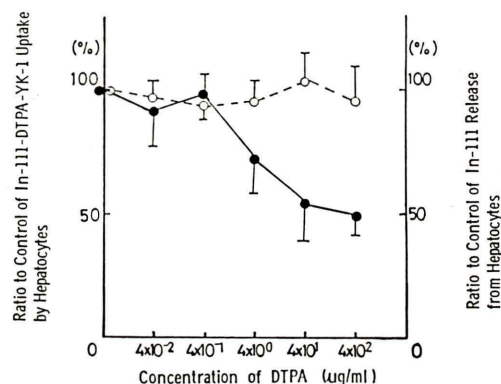


Fig. 6 Effect of DTPA on ^{111}In in hepatocytes: ^{111}In -DTPA-YK-1 uptake (●); ^{111}In release (○).

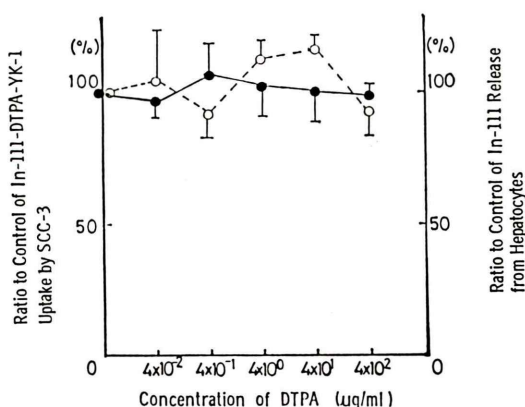


Fig. 7 Effect of DTPA on ^{111}In in SCC-3: ^{111}In -DTPA-YK-1 uptake (●); ^{111}In release (○).

血清分析では, *in vitro*, *in vivo* ともに S 分画への ^{111}In の移行が DTPA を投与することにより抑制されることが認められた. 全ての検討において, ^{111}In -YK-1 の標識率は 95% 以上であり, また遊離した ^{111}In は含まれていなかったことから, S 分画への ^{111}In の移行は ^{111}In -YK-1 からのトランスキレーションによるものと考えられる. S 分画は分子量約 7~9 万であり, トランスフェリン等の血清蛋白質であることが推測される. トランスフェリンは鉄運搬に関与する血清蛋白質で, 血清中で +3 荷の金属イオンのトランスキレーションを引き起こすことが知られており^{11,12)}, さらにトランスフェリンへの ^{111}In のトランスキレーションが In^{3+} の非特異的分布に関与していることが報告されている^{3,4,13)}. 血清分析および, BALB/c マウスでの体内分布の結果は, 抗体から遊離した ^{111}In がトランスフェリン等の金属結合性血清蛋白質に移行するのに対し, DTPA が競合することにより, 血液の ^{111}In 残留量, さらには肝臓等への非特異的な集積を低減させる可能性を示唆するものと考えられる.

肝細胞実験での結果は, DTPA には一度肝細胞に取り込まれた ^{111}In を引き出す効果はないことを示唆するものであった. DTPA は負電荷化合物であるため肝細胞表面膜を通過するのは困難であることから^{9,10)}, 肝細胞に取り込まれた ^{111}In に対しては直接作用しないと考えられる. また同時投与では 4-400 μg の DTPA は肝細胞による ^{111}In -YK-1 の取り込みを低減させたが, その機構に関しては詳細な検討は行っていない. DTPA は Ca^{2+} ともキレートを形成することから, DTPA 添加が細胞の生理学的状況へ及ぼす影響も考えられるが, メディウム中の Ca^{2+} 濃度を考慮すれば DTPA 40 μg 以下の群ではその影響を無視できると思われる. 400 μg 添加群ではその可能性を否定できない.

多くの腫瘍細胞と同様, われわれの用いた腫瘍細胞もトランスフェリンレセプターを発現しており⁶⁾, 腫瘍細胞における ^{111}In 摂取も低下することが懸念されたが, 摂取率, 引出し率に変化を認

めなかった. これは肝細胞に取り込まれる ^{111}In は培養上清中の ^{111}In の 0.1% と非常にわずかであるのに対し, 腫瘍細胞の摂取率は同濃度の抗体で 10-20 倍であったため, 特異的取り込みにマスクされたものと考えられる.

DTPA が血清中での ^{111}In -MoAb の安定性を低下させず, かつ腫瘍細胞に対する影響も認められなかったことから, 腫瘍イメージングにおいて腫瘍への集積の低減は軽度であろうと期待される.

本研究の結果は ^{111}In -MoAb を用いた免疫シンチグラフィ, さらには治療を行う上で, 問題となっている肝臓等への非特異的集積, 血液からの遅いクリアランスを改善する方法として, DTPA 投与が有効な手段となる可能性を示唆するものと思われる. 今後さらに担癌マウス等を用いた *in vivo* での検討を進める予定である.

文 献

- 1) James LM, Michael GR, Robert ES, et al: Radioimmunoimaging in malignant melanoma with ^{111}In -labeled monoclonal antibody 96.5. *Cancer Research* 45: 2376-2381, 1985
- 2) Michael GR, James LM, Thomas PH, et al: Pharmacokinetics of ^{111}In -labeled anti-p97 monoclonal antibody in patients with metastatic malignant melanoma. *Cancer Research* 45: 2382-2386, 1985
- 3) Ban AK, John C, Thomas E, et al: Differences in experimental tumor localization of dual-labeled monoclonal antibody. *J Nucl Med* 27: 1293-1299, 1986
- 4) Ban AK, Otto G, Martin WB, et al: Use of isothiocyanatobenzyl-DTPA derivatized monoclonal antimyosin Fab for enhanced *in vivo* target localization. *J Nucl Med* 31: 211-217, 1990
- 5) Michael JW, Teresa JW: Radiopharmaceuticals, Solution chemistry of carrier free indium, Subramanian G, Rhodes BA, Cooper JF, eds, The Society of Nuclear Medicine, New York, 1975, pp. 73-79
- 6) Kimura Y, Toki H, Okabe K, et al: Establishment and characterization of a monocytic cell line which expresses the interleukin-2 receptor. *Jpn J Cancer Res (Gann)* 77: 862-865, 1986
- 7) Hnatowich DJ, Childs RL, Lantaigne D, et al: The preparation of DTPA-coupled antibodies radiolabeled with metallic radionuclides: an im-

- proved method. *J Immunol Meth* **65**: 147-157, 1983
- 8) Seglen PO: Methods in cell biology, Preparation of isolated rat liver cells. **13**: 29-83, 1976
- 9) Chaim H: A study of the chelating agent diethylenetriaminepentaacetic acid using selective radio-iron probes of reticuloendothelial and parenchymal iron stores. *J Lab Clin Med* **85**: 913-921, 1975
- 10) Hennessy CM, Sharkey RM, Goldenberg DM: Metabolism of indium-111-labeled murine monoclonal antibody in tumor and normal tissue of the athymic mouse. *J Nucl Med* **31**: 1510-1519, 1990
- 11) Paik CH, Herman DE, Eckelman WC, et al: Synthesis, plasma clearance and in vitro stability of protein containing a conjugated indium-111 chelate. *J Radioanal Chem* **57**: 553-564, 1980
- 12) Sally JW, Michael JW: Gallium-68 labeling of albumin and albumin microspheres. *J Nucl Med* **20**: 428-433, 1979
- 13) Yeh SM, Meares CF, Goodwin DA, et al: Decomposition rates of radiopharmaceutical indium chelates in serum. *J Radioanal Chem* **53**: 327-336, 1979

Summary

Potential Application of DTPA for Improving the Image Quality in Radio-immunoscintigraphy with ¹¹¹In Labeled Monoclonal Antibodies

Kaori OCHI, Takashi FUJII, Yoshiko KIMURA,
Akihisa AKAMUNE and Ken HAMAMOTO

Department of Radiology, Ehime University School of Medicine

Studies on application of diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) to decrease the non-specific localization of ¹¹¹In-labeled antibodies (¹¹¹In-MoAb) to the liver were performed. The transchelation of ¹¹¹In to the molecule of M.W. 70,000-90,000 by the incubation of ¹¹¹In-MoAb in human serum was inhibited by adding DTPA. These in vitro findings were also demonstrated by serum analysis after ¹¹¹In-MoAb injection to the normal mice and postinjection of DTPA. By addition of DTPA, the uptake of ¹¹¹In-MoAb by

isolated rat hepatocytes was inhibited, but the ¹¹¹In-release was unaffected. The addition of DTPA had no effect on uptake of ¹¹¹In-MoAb and ¹¹¹In-release in tumor cells.

These results suggest that DTPA administration following ¹¹¹In-MoAb injection may inhibit transchelation of ¹¹¹In to transferrin or other serum proteins, so decrease non-specific liver localization of ¹¹¹In and give rapid blood clearance.

Key words: Radioimmunoscintigraphy, ¹¹¹In, DTPA.