

I-131 標識モノクローナル抗体による悪性
黒色腫の診断と治療に関する基礎的研究
(60570486)

昭和61年度科学研究費補助金(一般研究C)研究成果報告書

昭和62年3月

研究代表者 日下部 きよ子
(東京女子医科大学医学部 放射線医学教室 助教授)

は し が き

研究組織

研究代表者：日下部 きよ子(東京女子医科大学医学部放射線医学教室助教授)

研究分担者：重 田 帝 子(東京女子医科大学医学部放射線医学教室)

研究分担者：広 江 道 昭(東京女子医科大学医学部放射線医学教室)

研究分担者：川 崎 幸 子(東京女子医科大学医学部放射線医学教室)

研究経費

昭和60年度 800千円

昭和61年度 600千円

計 1,400千円

研究発表

(1) 学会誌等

1) Toshiro Yamasaki et al : Specific Biodetection of B16 Mouse Melanoma in vivo by Syngeneic Monoclonal Antibody. J. Investigative Dermatology (in press).

2) 日下部きよ子：単クローン抗体の現状と将来 月刊「新医療」1986年3巻
1986年3月

3) 日下部きよ子：標識モノクローナル抗体による画像診断 日本臨床 第43巻
1985年4月

(2) 口頭発表

日下部きよ子：三種のモノクローナル抗メラノーマ抗体の腫瘍分布に関する基礎的研究 核医学会 1986年9月

研究 成 果

はじめに

Köhler と Milstein の開発した細胞融合法（1975年）は、単一の抗原を認識する特異性の高いモノクローナル抗体の大量生産を可能にした。

モノクローナル抗体は腫瘍マーカーとして癌の *in vitro* test に使用されるのみでなく、体内の癌の広がりを観察する画像診断用薬剤としても応用されつつある。

本研究の目的は I-131 標識モノクローナル抗体による、放射免疫画像診断法（Radio-immunodetection）および放射免疫治療法（Radioimmunotherapy）の可能性と問題点を動物実験にて基礎的に検討することである。モノクローナル抗体の作製に使用したメラノーマの cell line B16 は C57BL/6 マウス由来のもので、同種同系のマウスに投与して *in vivo* の実験を行い、近い将来ヒトモノクローナル抗体が臨床で応用される上で参考となる資料になると推定された。

方 法

モノクローナル抗メラノーマ抗体（M562、M2590）は C57BL/6 マウスに自然発生したメラノーマを同系マウスに免疫し、そのマウスの脾細胞とマウスのミエローマ細胞を融合して得たものである。（千葉大 谷口克教授提供）

M562 は B16 メラノーマのみに反応し、M2590 はメラノーマなら種属を越えてヒト、ハムスター由来のものとも反応するが、正常組織とは反応しない IgM 分画のタンパクである。

用いた動物は C57BL/6 マウスで、下腹部皮下に B16 メラノーマを移植した（図 1）。

移植されたメラノーマは 1 週間で米粒大となり、更に 1 週間後には拇指頭大に発育し 1 ヶ月以内にマウスは死に到る。

I-131 又は I-125 の標識はヨードジェンを用い $0.5\sim 3\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ の比放射能とした。

1. モノクローナル抗体の体内分布

I-131 標識 M2590、 $15\sim 200\mu\text{Ci}$ をメラノーマ移植マウスに投与し、1～7 日後にシンチカメラにて撮像。

撮像後、ネンプタール麻酔下に臓器を摘出し、主要臓器の I-131 標識 M2590 の放射能を計測した。

又一部のマウスでは全身のマクロオートラジオグラムを作成し、I-131 標識 M2590 の体内および腫瘍内分布を観察した。

マクロオートラジオグラムはマウスをネンプタール麻酔下に全身凍結し、クライオトームを用いて 40 ミクロンの全身の切片を作製。

凍結乾燥後ルミラー膜でカバーし、工業用または X 線フィルムに密着させて得た。

2. I-131 標識 M2590 によるメラノーマの治療効果の観察

I-131 標識 M2590、50~200 μ Ci をメラノーマ移植マウス30匹に投与し、生存日数を非投与群と比較した。

又、I-131 標識 M2590 のメラノーマへの摂取率および有効半減期を測定し、I-131 標識 M2590 の腫瘍への集積線量を推定した。

尚、I-131 標識に用いる抗体量は 5 μ g 前後とし、抗体の大量投与に伴う腫瘍縮小効果の影響を無視できる量とした。

3. 二種のモノクローナル抗体 (M2590 と M562) の腫瘍内分布の差の観察

二種の抗体に二種の放射性核種(I-125 および I-131) を各々標識して同一のメラノーマ移植マウスに投与し、物理的半減期の差を利用した二核種トレーサ法の技術を応用して、腫瘍内分布に差があるかどうか観察した。

I-125 標識 M562、30 μ Ci に対し I-131 標識 M2590、100~150 μ Ci を担メラノーママウスに静注。

5 日後に凍結し 40 ミクロンのマウスの全身の切片を作成。

フィルム密着後 1 週間以内に I-131 標識抗体のオートラジオグラムを、そして 3 ヶ月以後に再度フィルムを密着して、I-125 標識抗体の画像を得た。

そして二種の抗体 M2590 と M562 の腫瘍内分布を比較した。

結 果

1. モノクローナル抗メラノーマ抗体の体内分布

I-131 標識 M2590、100 μ Ci 投与後 24 時間のシンチグラム (図 2 左) で下腹部の腫瘍への顕著な集積がみられる。72 時間後 (図 2 右) には、腫瘍への I-131 標識 M2590 の集積は更に高度になっている。

尚、頸部の集積は標識の外れた I-131 の甲状腺への摂取であった。

オートラジオグラム (図 3) ではメラノーマ(↑)に I-131 標識 M2590 の高度の集積を認めるが、腫瘍内の分布は不均一であった。

I-131 標識抗メラノーマ抗体の血中からのクリアランス (図 4) は比較的速く、投与後 3 日以降は血中放射能は無視し得る程度となった。

I-131 標識 M2590 の主要臓器および腫瘍への分布を経時的に観察すると (図 5)、筋肉に対する腫瘍の放射能は 1 日目に比し 3 日以後で上昇した。

そして、腫瘍への集積程度は血液の 2~10 倍と個体間で大きな変動がみられた。

肝臓への集積は 3 日に比し、5 日以後で漸増する傾向がみられた。

2. I-131、標識 M2590 によるメラノーマの治療効果

I-131 標識 M2590 投与群 (n=30) と非投与群 (n=21) で生存日数を比較 (図 6) すると、抗体投与群で生存日数は 35.6 日とコントロール群の 25.5 日に比し有意に延長 (p<0.001) したが、腫瘍の縮小効果は一時的であった。

I-131 標識抗体の投与量と生存日数 (図 7) との間には、明らかな線量依存性はみられな

かった。

I-131 標識抗体の腫瘍への集積率(図8)は腫瘍の大きさにより大きく異なり、全身分布に対する割合で評価すると、 2cm^2 前後の大きさのメラノーマでは、全身に対し10%前後の集積率であった。

I-131 標識抗メラノーマ抗体のメラノーマの有効半減期は1.3日と短かった(図9)。

この為、腫瘍の集積線量を仮に腫瘍内分布が均一と仮定し MIRD 法により累積放射能として求めると、 $2,000\text{rad}$ 以上には至らなかった。

3. 二種のモノクローナル抗体の腫瘍内分布の差

I-131 標識 M2590、 $120\mu\text{Ci}$ と I-125 標識 M562、 $30\mu\text{Ci}$ を同時に投与したマウスのオートラジオグラムをみると、I-131 標識 M2590 (図10左) は腫瘍内の中心部に高度に集積し、辺縁の集積は少ない。

I-125 標識 M562(図10右) はメラノーマの中心部にも集積しているが、その周囲の腫瘍組織に比較的高く分布している。

同様の結果は、15匹のマウスで確認され、M2590 と M562 は異なる抗原を認識していると推定された。

考 察

モノクローナル抗体は単一の抗原決定基と反応するリンパ球の集団であり、非常に特異性が高い反面、同一の起源から発生した腫瘍であっても、クローンの異なる抗原とは反応しない。

本研究に用いたモノクローナル抗メラノーマ抗体は、メラノーマに高濃度に集積し、投与後3日で画像が得られ、更に1.2日の有効半減期で消失するという結果は、Radioimmuno-detection に適した抗体と推定された。

しかし、Radioimmunotherapy への応用には、特に腫瘍内分布が不均一であること、腫瘍からの有効半減期が短いことなどの問題点を解決する工夫が必要と考えられた。

モノクローナル抗体の腫瘍内分布の不均一性を補う方法として、異なる抗原決定基を認識する数種のモノクローナル抗体を同時に投与する(ポリモノクローナル抗体)カクテル療法の導入が必要と考えられた。

そこで我々は、二種のモノクローナル抗体 M2590 と M562 の認識する抗原が異なるかどうかを同一腫瘍内で観察する *in vivo study* を開発した。

抗体の標識に適した二種の放射性ヨード(I-125およびI-131)の物理的半減期の差を利用し、各々 M562 および M2590 に標識して同時に投与した。

オートラジオグラムから M2590 と M562 は腫瘍内分布が異なり、これらを適当な量で調合して同時に投与すると単独投与に比し、Radioimmunodetection として応用する上で感度が上り、更に Radioimmunotherapy においては治療効果が高まると推定された。

現在、これらモノクローナル抗体 M2590 と M562 の認識する細胞の差を組織化学的に解

析し始めた段階である。

そして、更に二種のモノクローナル抗体 M2590 と M562 を適当な量で調合し、I-131 に標識して投与し、腫瘍内分布が単独投与より均一になるかどうかを確認すると共に、カクテル療法の治療効果を観察する研究を計画している。

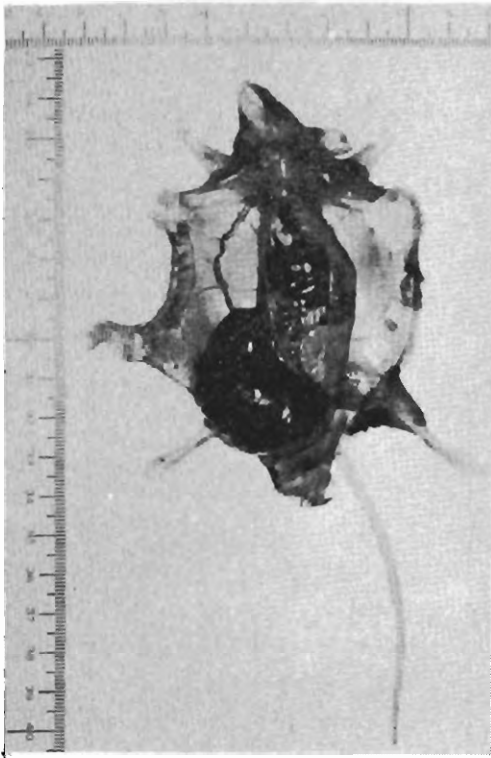
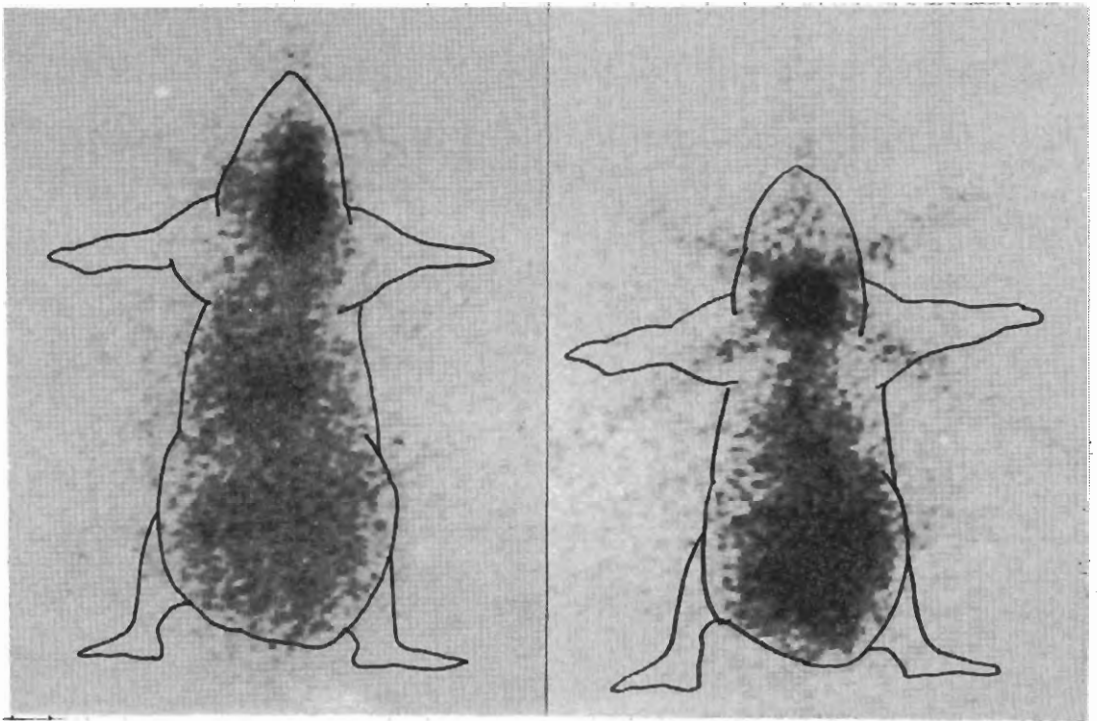


图 1



图 3



1 D

图 2

3 D

¹³¹I 標識抗メラノーマ抗体の血中クリアランス
(cpm/100mg/10 μ Ci)

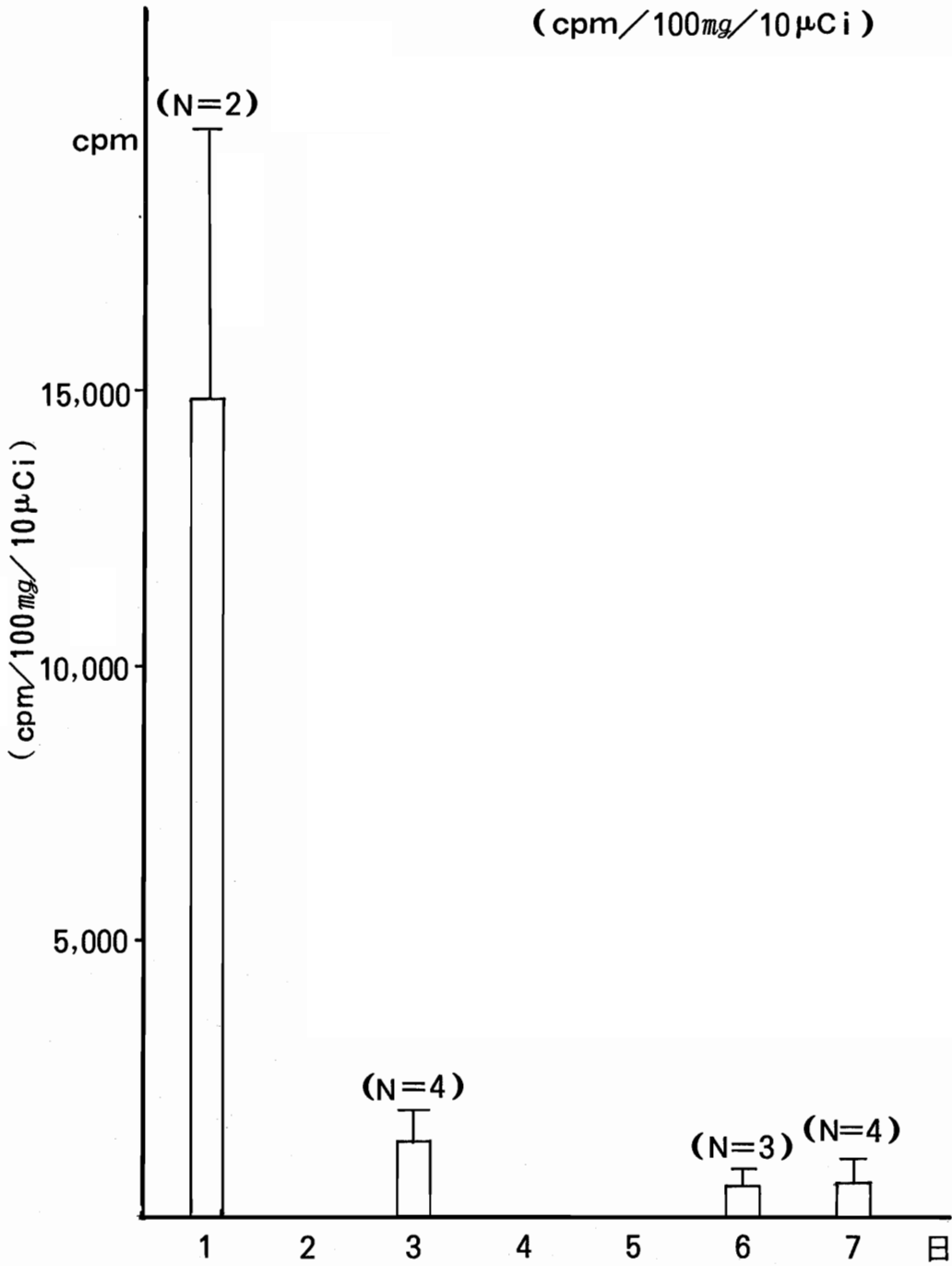


図 4

經時的臟器分布

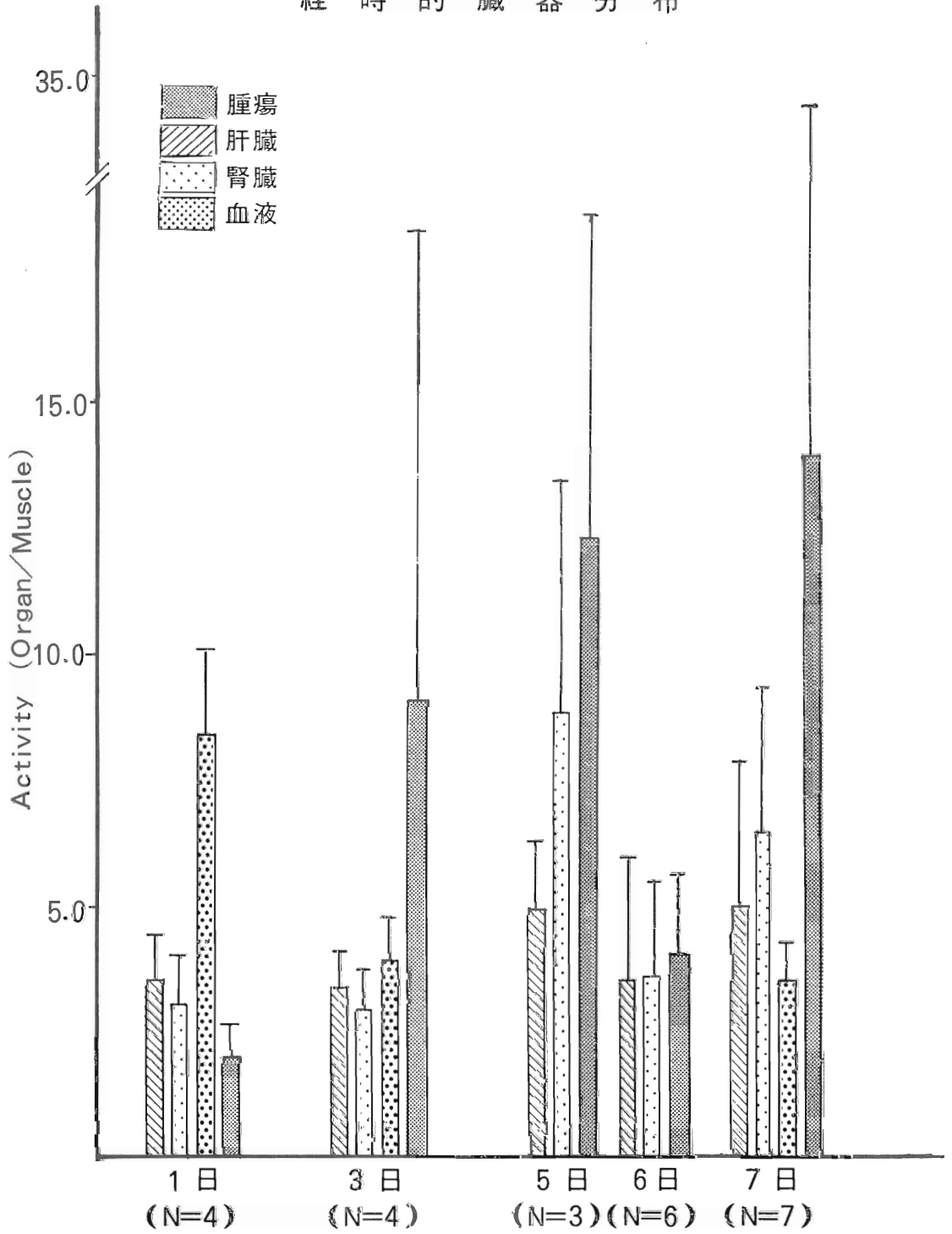


図 5

メラノーマ移植後生存日数

コントロール群

N=21

Mean 25.52

SD 7.382

¹³¹I 標識抗メラノーマ抗体投与群

N=30

Mean 35.56

SD 9.452

\bar{D} 10.04

t 4.070

p < 0.001

図 6

¹³¹I 標識抗メラノーマ抗体投与量と生存日数 (N=28)

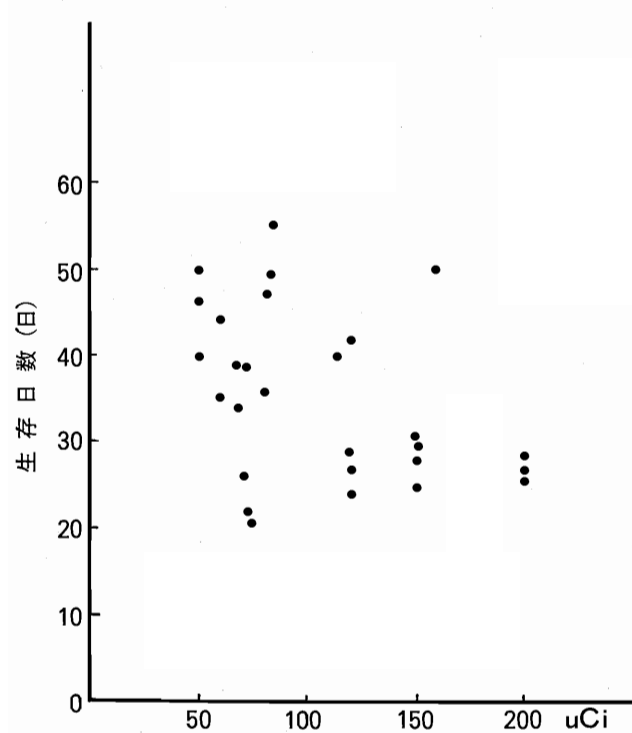


図 7

腫瘍面積と ¹³¹I 標識抗メラノーマ抗体

集積率 (腫瘍/全身 × 100) N=20

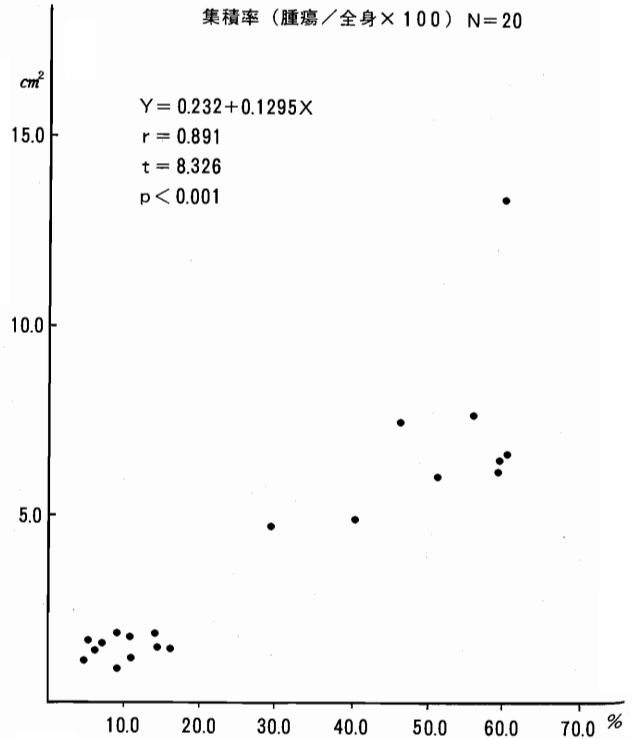


図 8

^{131}I 標識抗メラノーマ抗体の腫瘍放射能の経時的变化

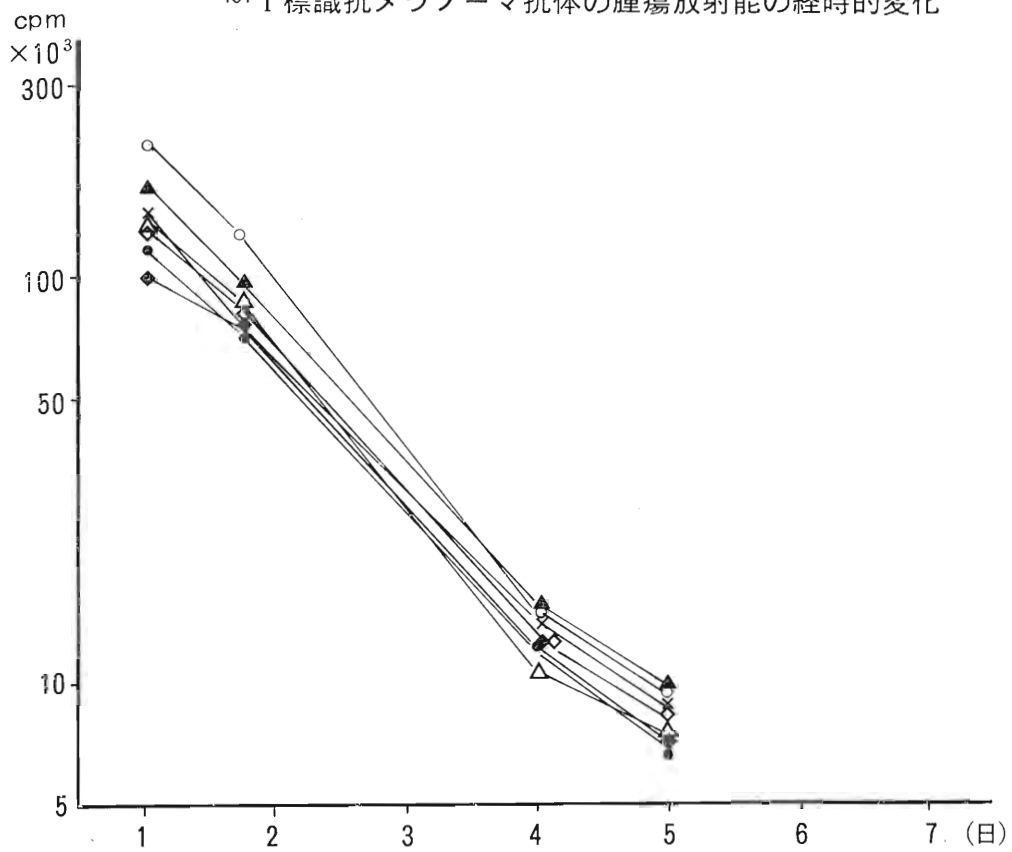


図 9

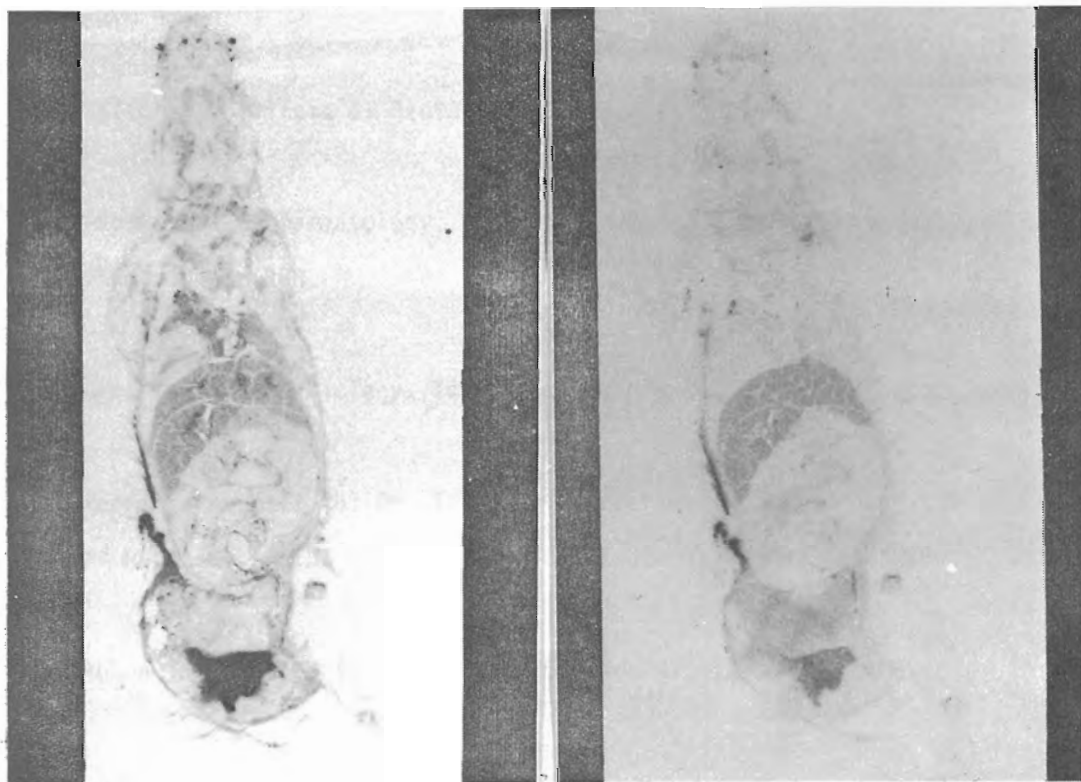


図 10