¹²⁵I 標識抗 γ -seminoprotein モノクローナル抗体を用いた前立腺癌 に対する免疫シンチグラフィの基礎的検討

北里大学医学部泌尿器科学教室

藤野 淡人 須山 一穂 設楽 敏也
青 輝昭 石橋 晃 小柴 健

EXPERIMENTAL STUDIES FOR IMMUNOSCINTIGRAPHY OF ADENOCARCINOMA OF THE PROSTATE WITH ¹²⁵I-LABELED MONOCLONAL ANTIBODY TO γ -SEMINOPROTEIN

Awato Fujino, Kazuho Suyama, Toshiya Shidara, Teruaki Ao,
Akira Ishibashi and Ken Koshiba

Department of Urology, Kitasato University, School of Medicine

We established LNCaP tumor in male nude mice after inoculation of LNCaP cells. The tumor produces the organ-specific glycoproteins in the human prostate, γ -seminoprotein (γ -Sm), which has been verified by immunohistochemistry and enzyme immuno assay. The LNCaP tumor is composed of 2 distinct portions, namely GEL/FLUID portion and SOLID portion. The GEL/FLUID portion contains much more γ -Sm than the SOLID portion does. The monoclonal antibody against γ -Sm (murine IgG₁, K) was radio-labeled with iodine-125 by lactoperoxidase method followed by passage over column chromatography. Finally the conjugates with specific activity of 49.8—56.6 KBq/ μ g were obtained. Biodistribution of ¹²⁵I-labeled monoclonal antibody to γ -Sm (¹²⁵I- γ MAB) was evaluated by whole-body autoradiography (ARG) and by determination of label uptake (DLU) by the LNCaP tumor using the well type gamma counter. The ARG were obtained 1—9 days after intravenous administrations of 32—38 μ g of ¹²⁵I- γ MAB to 12 nude mice bearing LNCaP tumor. The DLU were evaluated 3, 4 and 7 days after intravenous administrations of 18—25 μ g of ¹²⁵I- γ MAB to 9 nude mice bearing LNCaP tumor. The DLU by organs (GEL/FLUID portion, SOLID portion, liver, kidney, spleen, lung, etc.) were expressed as F-values (%) which were calculated by the following formula: $F = \text{radioactivity per gram of tissue (dpm/g)} \div \text{injected dose per gram of animal (dpm/g)} \times 100$ and tissue-to-blood ratios (T/B).

The specific uptake by the LNCaP tumors, especially in the GEL/FLUID portion, was observed on ARG, with optimal images of the tumor evaluated 4—7 days after administrations. The F-values and T/B of the LNCaP tumors were always higher than those of other organs. Especially T/B of GEL/FLUID portion were of 6.7 and 6.3, evaluated 4 and 7 days after administration of ¹²⁵I- γ MAB respectively.

These results suggest that the radio-labeled γ MAB is applicable for immunoscintigraphy of adenocarcinoma of the prostate.

Key words: ¹²⁵I-labeled monoclonal antibody to γ -Sm, adenocarcinoma of the prostate, immunoscintigraphy

要旨: ¹²⁵I 標識抗 γ -seminoprotein (γ -Sm) モノクローナル抗体を用いて, 前立腺癌に対する免疫シンチグラフィの基礎的検討を行った。

ヒト前立腺癌細胞株 LNCaP により樹立した担 LNCaP 腫瘍ヌードマウスを用い, ¹²⁵I 標識抗 γ -Sm 抗体の体内動態を検討した。本 LNCaP 腫瘍は γ -Sm を産生し, 腫瘍は γ -Sm が高濃度を示す GEL/

FLUID 部と低濃度の SOLID 部とに大別される。抗 γ -Sm 抗体は、Lactoperoxidase 法により ^{125}I 標識のあと、Sephadex G-75 カラムを通じて単離・精製し比放射能 $49.8 \sim 56.6 \text{ KBq}/\mu\text{g}$ の標識抗体を得た。標識抗体は除菌の後、全身オートラジオグラフィ (ARG) では $32 \sim 38 \mu\text{g}$ 、また、組織内放射能濃度測定では $18 \sim 25 \mu\text{g}$ を、それぞれ経静脈投与した。投与後、1～9 日目にそれぞれの ARG を得、観察した。組織内放射能濃度測定は投与後 3, 4, 7 日目の各群 3 匹を対象に、血液、腫瘍 GEL/FLUID 部、SOLID 部、肝、腎などにつき検討した。

^{125}I 標識抗 γ -Sm 抗体を用いた ARG により、LNCaP 腫瘍の描出に成功した。画像の点では投与後 3 日目までは肝、腎、肺など background の放射能が高く好ましくないが、4 日以降、7 日目まで、LNCaP 腫瘍が低い background activity のなかで明瞭に観察された。組織内放射能濃度測定でもそれを裏付ける結果が得られ、GEL/FLUID 部および SOLID 部の組織対血液比は 3 日から 4 日目にかけて上昇、7 日目まで持続し、前者で 6.3、後者で 0.8 であった。

LNCaP 腫瘍への集積機序などにつき考察したが、前立腺癌免疫シンチグラフィへの足掛かりとした。

キーワード： ^{125}I 標識抗 γ -Sm 抗体、前立腺癌、免疫核医学

緒 言

前立腺癌 (adenocarcinoma) の臨床病期分類は本邦独自の分類をはじめ¹⁾、欧米諸国を中心に様々な分類法が提唱されている。しかし、いずれの分類によっても、治療指針に、そして、患者の予後に最も大きな影響を及ぼすのが転移 (N および M factor) の有無である。転移の有無について、理学的検査、血清生化学的検査、そして種々の画像診断が行われるが、その主役を担うものとして、骨シンチグラフィおよび血清前立腺マーカーがあげられる。しかし、臨床病期診断においては先ず、最も確立の高い骨転移の有無あるいは局在を知りたいが、骨シンチグラフィは感度が高いかわりに特異度は低いことが知られている²⁾。また、前立腺性酸フォスファターゼ (以下、PAP と略)、 γ -seminoprotein (以下、 γ -Sm と略)、そして、前立腺特異抗原 (以下、PSA と略) などの血清前立腺マーカーが高値で骨シンチグラム陰性の場合、所属リンパ節のみ検索すればよいというわけにはゆかない。さらに、CT や MRI で、リンパ節や肺、肝などの他臓器に異常所見が確認されたとしても、骨シンチグラフィと同様に前立腺癌の転移巣であるという確証は無く、特異性を欠くが他に検査法がないからという妥協線にのった上で臨床病期診断を行っているのが現状である。1983 年、Goldenberg ら³⁾は、抗 PAP ウサギ抗体を ^{131}I で標識し、骨転移を有するが、肺にも異常所見を伴い、原発性肺癌を合併している可能性の高い前立腺癌 2 症例で免疫シンチグラフィを行い、前立腺癌の肺転移巣検出に成功している。免疫シンチグラフィ (radioimmunodetection または immunoscintigraphy) という概念が泌尿器科学領域にもたらされた記念すべき研究

であった。その後、同じ抗体⁴⁾、PAY276⁵⁾、PSA399⁶⁾、そして、CYT356⁷⁾に至るまで、多くの基礎的あるいは臨床的検討がなされている。しかし、現時点では、いずれの抗体を用いた免疫シンチグラフィも米国 FDA あるいは本邦厚生省の認可を得ていない。著者らは前立腺に特異的な糖蛋白である γ -Sm に対するモノクローナル抗体を作製し⁸⁾、それを用いて前立腺組織における γ -Sm の局在を免疫組織化学的に証明してきた^{9)~11)}。今回、本抗 γ -Sm モノクローナル抗体 (以下、抗 γ -Sm 抗体と略) を ^{125}I で標識し、担 LNCaP 腫瘍ヌードマウスにおける体内動態の観察を通じて、前立腺癌免疫シンチグラフィに関する基礎的検討を行ったので報告する。

材料と方法

1. 抗 γ -Sm 抗体

ハイブリドーマ (43-21-1-1)⁸⁾を、Balb/c マウス腹水化の後、精製抗 γ -Sm 抗体 (マウス IgG₁, K) を得た。

2. ヨード標識

抗 γ -Sm 抗体 (intact IgG) をラクトパーオキシダーゼ法 (以下、LPO 法と略)¹²⁾により ^{125}I で標識した。抗 γ -Sm 抗体 $100 \mu\text{g}$ に 18.5 MBq ($37 \text{ KBq} = 1 \mu\text{Ci}$, 以下、国際単位で示す。) の Na^{125}I (IMS 30, Amersham), そして、LPO $0.5 \mu\text{g}$ (Sigma) を加え、室温で 8 分間攪拌、反応させた。標識化合物は溶出液として 0.05 M リン酸緩衝液, 0.14 M NaCl, pH 7.1 を用い、 $25 \times 0.6 (\phi) \text{ cm}$, Sephadex G-75 (Pharmacia) カラムを通じて Free iodine を分離した。なお、本法による抗 γ -Sm 抗体の単離・精製に関しては、予めローリー法を用い、溶出位置を確認している (Fig. 1), Fig. 2 に本

Fig. 1 Gel chromatogram of the monoclonal anti-body (murine Ig G1) to γ -Seminoprotein (γ -Sm) determined by Lowry method (O.D. 700nm).

Fig. 2 Radio-Gel chromatogram of the ^{125}I -labeled monoclonal antibody to γ -Sm.

法による Radio-Gel-chromatogram を示すが、ピークおよび第2ピーク (Fraction 6, 7) を採取し毎ヨード標識ごとに多少の幅はあるが、比放射能49.8~56.6 KBq/ μg の ^{125}I 標識抗 γ -Sm 抗体を得た。また、放射能化学的収率は45~63%であった。標識抗体は滅菌フィルター (0.2 μm , Millipore) を通じて除菌の後、全身オートラジオグラフィ (以下、ARG と略) 用には32~38 μg /200~300 μl , また、組織内放射能濃度測定には18~25 μg /200~300 μl を、それぞれ尾静脈または頸静脈より27G 針を用いて投与した。なお、滅菌フィル

ターを通じた標識抗体は-80℃冷凍庫に保存し、用時解凍、放射能測定の後用いたが、標識から投与までの期間は最長のもので4日間であった。

3. 担 LNCaP 腫瘍ヌードマウス

American Type Culture Collection (Rockville, Maryland) より得た LNCaP clone FGC を雄ヌードマウス BALB/c, nu/nu, SLC の皮下に接種し、担 LNCaP 腫瘍ヌードマウスを樹立した。本腫瘍は継代を重ねても安定して γ -Sm, PSA ならびに PAP を産生する。本腫瘍は肉眼解剖学的にはゼリー様物質および液体部 (以下、GEL/FLUID 部と略) と充実部 (以下、SOLID 部と略) とに区分され、組織ホモジネートの γ -Sm 測定および免疫組織化学的検討では前者の部分で高濃度および強い免疫反応が観察された。また、組織学的に SOLID 部は低分化型腺癌に相当し、細胞間の密着性を欠き、腺管形成は認められず、免疫染色では染色性は低い細胞質内に γ -Sm の局在を認めている¹³⁾。ヌードマウスの飼育は当施設 RI 棟動物実験室内の陰圧式、マルチスポットエアコンディショナー型 RI 動物飼育装置 (BECSEAL, 日東エアテック)、Specific Pathogen Free の条件下、室温22~25℃、湿度55±5%によった。また、飼育水は滅菌塩酸処理水 pH 3.0, 飼育は ^{60}Co - γ -線照射飼料 FR-1 (船橋農場) により、ケージにはフィルターキャップをかぶせた。

評価方法

1. 全身オートラジオグラフィ

前述の操作によって得られた ^{125}I 標識抗 γ -Sm 抗体、1.6~2.1MBq/32~38 μg /200~300 μl を、担 LNCaP 腫瘍ヌードマウスの尾静脈あるいは頸静脈より投与した。投与後、1~9日目にそれぞれ屠殺し、既報¹⁴⁾とほぼ同様の方法で ARG を得た。既報と異なる点は、サランラップで切片を覆った状態で露光が可能な点である。切片作成には全身オートラジオグラフィ用クライオスタット (OT-SEA, Bright) を、粘着テープはサロテープ (久光製薬) をそれぞれ用いた。担 LNCaP 腫瘍ヌードマウスは、第3, 4, 7日目に観察したもののみ2匹、他はいずれも1匹についてのみ検討した。また、標識抗体投与前に内服用ルゴールあるいは非標識抗体の投与は行わなかった。

2. 組織内放射能濃度測定

^{125}I 標識抗 γ -Sm 抗体、0.9~1.4MBq/18~25 μg /200~300 μl を、尾静脈あるいは頸静脈より投与した。LNCaP 腫瘍径がほぼ同等に達したヌードマウスについて、ARG で得られた結果にもとづき、投与後3, 4, そして、7日目に観察し、各群3匹を対象とした。投

与後、各期間を経た後、体重測定に続きエーテル麻酔下に頸静脈より約800~1,400 μ lの採血を行い屠殺した。解剖、臓器摘出に際しては、可能な限り血液を洗い流したが、LNCaP腫瘍に関しては、摘出後一度冷凍し、シャーベット状になったGEL/FLUID部、および、SOLID部を別々に採取した¹³⁾。湿重量を秤量の後、血液、血清、腫瘍GEL/FLUID部、腫瘍SOLID部、肝、脾、肺、腎、筋肉、そして、長管骨の放射能をガンマカウンタ(TDC-501, アロカ)により計測した。組織内放射能濃度としてF値($F = \text{試料中放射能濃度 (dpm/g)} \div \text{単位体重あたり投与量 (dpm/g)} \times 100\%$)および、その組織対血液比(以下、T/Bと略)を算出し比較検討した。

3. 対照試験

¹²⁵I標識抗 γ -Sm抗体の体内動態に関する検討の対照として、生理食塩水で希釈したNa¹²⁵I, 1.3MBq/250 μ lを担LNCaP腫瘍ヌードマウスに経静脈投与し、3, 5, 7, そして、9日目に屠殺、ARGを行った。一方、¹²⁵I標識抗 γ -Sm抗体の放射線および免疫学的安定性については以下のようなin vitro実験系により検討した。前述の方法で得られた¹²⁵I標識抗 γ -Sm抗体、200 μ lをMembrane Ultrafiltration法用のホットクリーンM10(第1化学薬品)に分注し、標識後、1, 3, 6, 7, 8, 11, 14日間それぞれ、36 $^{\circ}$ C恒温器内に保管した。各群4本ずつとし、それぞれの期間を経た後、Lipfordらの方法に従い¹⁵⁾、Free ¹²⁵Iを分離し、¹²⁵I標識抗体との比率を算出した。¹²⁵I標識抗 γ -Sm抗体の免疫学的安定性については、著者らが作製した固相ビーズを用いた2ステップサンドウィッチ法による血清 γ -Sm測定系により検討した。但し、本測定系は血清診断用に作製された測定系であり、第2反応終了後、36 $^{\circ}$ Cで1~14日間にわたり保管した場合の固相担体をはじめとする各試薬の安定性については検討していない。本測定系の抗 γ -Smポリクローナル抗体を吸着した球形ビーズに既知量(25ng/ml)の抗 γ -Sm標準液を加え反応させた後(第1反応)、酵素標識抗体のかわりに前述の期間36 $^{\circ}$ Cで保管した¹²⁵I標識抗 γ -Sm抗体を加え反応させる(第2反応)。その後、洗浄し未反応の標識抗体を取り除いた後、ビーズの放射能をガンマカウンタで計測した。計測後、ビーズに前述の溶出液を加え、36 $^{\circ}$ Cで1~14日間恒温器内に保管し、一定期間経過後、再びビーズを洗浄、ビーズより遊離した¹²⁵I標識抗体を除去した後ビーズの放射能を計測し、洗浄前の総放射能との比率を算出した。

結 果

1. 全身オートラジオグラフィ

Fig. 3に担LNCaP腫瘍ヌードマウスのCarboxymethyl cellulose包埋腫瘍を中心を得た凍結切片を示す。図中、赤褐色の部分(黒矢印)がGEL/FLUID部、黄白色の部分(白矢印)がSOLID部である。¹²⁵I標識抗 γ -Sm抗体の経静脈投与後、1~9日経過した時点でのARGをFig. 4~Fig. 10に示す。各ヌードマウスのLNCaP腫瘍の大きさが不揃いで、かつ、凍結あるいは包埋に際してのズレから皮下における腫瘍の位置も多少異なる。さらに同一切片上で腫瘍を中心に肝・腎・脾、肺など主要臓器を一緒に示すことは困難であるため、二つの異なる切片のARGを合成して示した。Fig. 4に投与後1日目のARGを示す。前胸部および腹部に巨大なLNCaP腫瘍が観察され、全身切片の上では胸腔内あるいは腹腔内に存在しているように見えるが、いずれも皮下で成長したものである。腫瘍部、特にGEL/FLUID部(黒矢印)に著しい集積が認められ、SOLID部での集積は低い(白矢印)。中枢神経系、腸管およびその内容物を除き、肝、腎、脾、肺など、他臓器への集積も高くbackgroundが高い。Fig. 5に投与後3日目のARGを示す。肝、腎、肺などbackgroundの放射能はいぜん高く、腫瘍SOLID部(白矢印)と肝がほぼ同等である。しかし、GEL/FLUID部での放射能はさらに高い(黒矢印)。投与後4日を経過すると、肝、腎、肺などbackgroundの放射能は急激に低下し、それに対して、腫瘍での放射能は維持され

Fig. 3 A whole-body section of nude mouse bearing LNCaP tumor. The LNCaP tumor is composed of two distinct portions, namely GEL/FLUID portion (black arrows) and SOLID portion (white arrows). The GEL/FLUID portion contains much more γ -Sm than the SOLID portion does.

Fig. 4 Whole-body autoradiograms of nude mouse bearing LNCaP tumor 1 day after intravenous administration (i.v.) of ^{125}I labeled monoclonal antibody to $\gamma\text{-Sm}$. The uptakes to the liver, lung and kidney are extremely high, although the tumor is visible. GEL/FLUID portion: black arrows, SOLID portion: white arrows.

Fig. 5 Autoradiograms 3 days after i.v. Accumulation within the tumor is recognized, whereas the background activity is still high. The radioactivity in GEL/FLUID portion (black arrows) is higher than those in lung, liver, kidney and SOLID portion (white arrow).

るため、全体的には腫瘍が際立って観察されるようになる。特に、GEL/FLUID 部の放射能 (黒矢印) は下大静脈内のそれ (解放矢印) よりも高く示されている (Fig. 6). Fig. 7, Fig. 8 にそれぞれ投与後 5 日, 7 日

Fig. 6 Autoradiograms 4 days after i.v. The tumor is relieved against other organs with low activities. The radio-activity in GEL/FLUID portion (black arrows) is much higher than those in the blood of inferior vena cava (open arrow), liver, kidney and SOLID portion (white arrow).

Fig. 7 Autoradiograms 5 days after i.v. The tumor is conspicuously visualized, whereas liver and kidney are still visible for identifying those entities. GEL/FLUID portion: black arrows, SOLID portion: white arrow.

目の ARG を示す。肝、腎など background の放射能は低く、腫瘍が極めて明瞭に観察される。なお、Fig. 7 の尾部および仙骨後部の高い放射能は尿の汚染に伴う。

Fig. 8 Autoradiograms 7 days after i.v. The tumor is merely visualized, except for the thyroid gland. It is impossible to recognize liver, kidney and lung in these photos. GEL/FLUID portion: black arrows, SOLID portion: white arrows.

Fig. 9 Autoradiograms 8 days after i.v. When compared to the Fig. 8, the difference is clearly recognizable. Suddenly the liver, kidney and spleen have become visualized again. GEL/FLUID portion: black arrows, SOLID portion: white arrows.

また、Fig. 8の頸部に相当する部位の高い放射能は甲状腺によるものである。Fig. 9に投与後8日目のARGを示す。ここで示したヌードマウスのLNCaP腫瘍は巨大であり、オリエンテーションをつけにくい。これまでのARGと異なる点には確かに肝、腎の放射能が上昇していることであり、脾の観察も可能である。投与後9日を経過したものをFig. 10に示すが、肝、腎、脾の放射能がさらに上昇し、極めて明瞭に観察される。また、これらの臓器に比し放射能は低い肺も観察される。一方、上段および中段に示した腫瘍の放射能は、GEL/FLUID部(黒矢印)、SOLID部(白矢印)ともに低下し、むしろ、肺や脾のそれよりも低く観察される。なお、中枢神経系への集積は終始認められなかった。

2. 組織内放射能濃度測定

^{125}I 標識抗 $\gamma\text{-Sm}$ 抗体の経静脈投与後、3, 4, そして、7日目に測定した各臓器のF値の平均(平均値 $\pm$ 標準偏差)および組織対血液比をTable 1に示す。F値は各臓器で経時的に低下しており、血液あるいは血清のF値は、3日目に比し7日目には1/7まで低下する。これに対してLNCaP腫瘍、特にGEL/FLUID部では7日目まで他臓器に比べて極めて高いF値が維

持される。SOLID部も4日目の肺を除き、常時肝、脾、肺、腎、筋、そして、長管骨よりも高いF値を示したが、血液よりも高値を示すことはなかった。T/Bは常にGEL/FLUID部が最高値を示すが、3日目から4日目にかけて2倍にはね上がり6.68までに至る。その後、7日目も6.27を維持し、観察期間における他臓器のT/Bと比較すると8~67倍を示した。

3. 対照試験

生理食塩水で希釈した Na^{125}I を担LNCaP腫瘍ヌードマウスに経静脈投与後、3, 5, 7, そして、9日目にARGを得たが、3日目のARGにおいて腎、膀胱、そして、甲状腺のみ観察され、他臓器はLNCaP腫瘍も含めて全く描出されなかった。

in vitro 実験系による ^{125}I 標識抗 $\gamma\text{-Sm}$ 抗体の放射線学的安定性の評価では、Free ^{125}I の占める比率が標識後1日で平均3.8%、3日目には9.1%と上昇するが、その後横ばい状態となり、14日目では10.1%と安定した結果が得られた。

in vitro 実験系による ^{125}I 標識抗 $\gamma\text{-Sm}$ 抗体の免疫学的安定性の検討では、ビーズに結合した ^{125}I 標識抗体の放射能の総放射能(ビーズより遊離した標識抗体

Fig. 10 Autoradiograms 9 days after i.v. The uptakes to the liver, spleen, kidney and thyroid gland are extremely high, although the tumor is still visualized with some-what decreased radioactivity. Re-distributions of the radioisotope in those organs are definitely evident. GEL/FLUID portion: black arrows, SOLID portion: white arrows.

を含めたカウント)に対する比率は36℃, 14日間保管したもので $64.1 \pm 8.1\%$ であった。

考 察

1. ^{125}I 標識抗 $\gamma\text{-Sm}$ モノクローナル抗体の担 LNCaP 腫瘍ヌードマウスにおける体内動態について

^{125}I 標識抗 $\gamma\text{-Sm}$ 抗体の経静脈投与後, 全身オートラジオグラフィによりヒト前立腺癌細胞株である LNCaP 腫瘍の描出に成功した。画像の点では投与後 3 日目までは肝, 腎, 肺など background の放射能が高く好ましくないが, 4 日以降, 7 日目まで LNCaP 腫瘍が低い background activity のなかで明瞭に観察された (Fig. 6~8)。組織内放射能濃度測定でもそれを裏付ける結果が得られ, 腫瘍の GEL/FLUID 部および SOLID 部の組織対血液比は 3 日から 4 日目にかけて

上昇し, 特に GEL/FLUID 部の T/B は 2 倍となり, 7 日目まで持続した (Table 1)。また, 腫瘍の F 値は, 4 日目の SOLID 部の F 値が肺のそれよりもやや低値であったのを除き, GEL/FLUID 部, SOLID 部の F 値は常に肝, 脾, 肺, 腎, 筋, そして, 長管骨のそれを凌駕していた。しかし, 投与後 8 日目を境に突然, 肝, 腎, 脾の放射能の上昇が ARG で観察された (Fig. 9)。9 日目の ARG では肝, 腎, 脾の放射能がさらに上昇し, むしろ放射能が低下した腫瘍とは対照的に, これらの臓器が明瞭に観察された (Fig. 10)。この現象を説明するにあたり, 主としてつぎの 2 つの原因が考えられる。第 1 に標識に放射性ヨードを用いたため腫瘍部での脱ヨード化 (deiodination) を生じ, Free ^{125}I が甲状腺を含めた他臓器に再分布した場合, 第 2 に ^{125}I 標識抗体が結合していた抗原そのものが長期間にわたる放射線の影響を受け, 変性を生じ, internalization や shedding が起こり, 腫瘍から遊離した正常あるいは変性 ^{125}I 標識抗体が再分布した場合である。担 LNCaP 腫瘍ヌードマウスで起こったこの現象がいずれの原因によるものか証明するのは極めて困難である。しかし, in vitro 実験系による ^{125}I 標識抗 $\gamma\text{-Sm}$ 抗体の放射線学および免疫学的安定性の検討では, 標識後, 36℃, 14 日間の保管で, ビーズに結合していた標識抗体の占める比率が 64% であったことより, 脱ヨード化, 抗原の変性と両方に起因する可能性が高いと考えられる。但し, あくまでも in vitro 実験系での検討結果に基づいた説であり, 該当ヌードマウス体内で生じうる体温, 血液 pH, などの変動に加え, 血中に出現しうる抗体や蛋白分解酵素, また de-halogenase の作用など, 多種多様の状況が考えられ, 従って推測の域を越えることはできない。次に, ^{125}I 標識抗 $\gamma\text{-Sm}$ 抗体の排泄経路であるが, 代謝ケージなどを用いての厳密な検討は未だ行っていない。しかし, Table 1 には示さなかったが大便を含む胃より直腸までの腸管の F 値は 0.1 前後と低く, しかも, ARG の上で胆嚢が明瞭に観察されなかったことより, 胆道系よりの排泄率は低いものと考えられた。一方, 膀胱の F 値は, 膀胱内にどの程度尿が含まれているかにもよるが, 投与後 7 日目, 充满膀胱で 17.9 あり, 同マウスの腎の F 値 4.5 や肝の F 値 5.5 よりも高値であったことより排泄経路は腎尿路が主体と考えられた。

2. LNCaP 腫瘍への集積機序について

尾静脈あるいは頸静脈より投与された ^{125}I 標識抗体は心臓よりヌードマウス固有の LNCaP 腫瘍血管にいたり, そこから徐々に腫瘍組織内に浸透してゆくもの

Table 1 Determinations of label uptake by organs, expressed as F-value ($\text{radioactivity per gram of tissue (dpm/g)} \div \text{injected dose per gram of animal (dpm/g)} \times 100\%$) and Tissue/Blood ratio.

TISSUE	3 DAYS		4 DAYS		7 DAYS	
	F-value*	T/B**	F-value	T/B	F-value	T/B
Blood	56.5 $\pm$ 16.6	1.0	27.2 $\pm$ 6.9	1.0	8.1 $\pm$ 0.6	1.0
Serum	88.3 $\pm$ 29.5	1.55 $\pm$ 0.11	44.2 $\pm$ 9.8	1.64 $\pm$ 0.18	12.0 $\pm$ 2.4	1.47 $\pm$ 0.22
Tumor GEL/FLUID	199.9 $\pm$ 138.4	3.32 $\pm$ 1.36	182.6 $\pm$ 71.9	6.68 $\pm$ 1.96	50.1 $\pm$ 17.3	6.27 $\pm$ 2.40
Tumor SOLID	26.6 $\pm$ 10.9	0.48 $\pm$ 0.21	17.4 $\pm$ 1.9	0.66 $\pm$ 0.15	7.1 $\pm$ 1.1	0.84 $\pm$ 0.14
Liver	20.1 $\pm$ 1.3	0.37 $\pm$ 0.10	13.5 $\pm$ 0.9	0.52 $\pm$ 0.12	6.4 $\pm$ 2.4	0.77 $\pm$ 0.23
Spleen	11.2 $\pm$ 2.5	0.20 $\pm$ 0.03	5.9 $\pm$ 0.8	0.22 $\pm$ 0.05	2.0 $\pm$ 0.8	0.25 $\pm$ 0.12
Lung	15.4 $\pm$ 1.8	0.29 $\pm$ 0.10	18.4 $\pm$ 2.3	0.70 $\pm$ 0.20	4.8 $\pm$ 1.0	0.60 $\pm$ 0.17
Kidney	22.6 $\pm$ 3.3	0.42 $\pm$ 0.11	12.5 $\pm$ 1.6	0.49 $\pm$ 0.20	5.0 $\pm$ 0.5	0.62 $\pm$ 0.07
Muscle	4.9 $\pm$ 0.7	0.09 $\pm$ 0.03	4.1 $\pm$ 0.2	0.16 $\pm$ 0.04	2.2 $\pm$ 0.3	0.27 $\pm$ 0.04
Bone	3.5 $\pm$ 0.8	0.06 $\pm$ 0.01	2.5 $\pm$ 0.1	0.10 $\pm$ 0.02	1.4 $\pm$ 0.5	0.17 $\pm$ 0.07

F-value*: Mean $\pm$ SD % (N = 3)

T/B**: Tissue to Blood Ratio

と考えられる。前述のように、著者らが樹立した LNCaP 腫瘍は低分化型腺癌に相当するが γ -Sm は産生する。しかし、腺管を欠くため LNCaP 細胞より分泌された γ -Sm は適当なスペース、例えば皮フと腫瘍の間隙や死滅した細胞や老廃物などが溜った部分に貯留する。この部分が GEL/FLUID 部に相当し、高濃度の γ -Sm を含有し、SOLID 部の濃度と比較すると約 200 倍にも達する。しかし、担 LNCaP 腫瘍ヌードマウス血液中には、いかに巨大な腫瘍を担ったマウスでも γ -Sm はいっさい検出されていない(感度以下)。加えて、抗 γ -Sm モノクローナル抗体を用いた免疫染色では、LNCaP 腫瘍に入るヌードマウス固有の血管内皮細胞は陰性反応を呈している¹³⁾。従って、全身オートラジオグラフィおよび組織内放射能濃度測定の結果は正に、LNCaP 腫瘍内における γ -Sm の局在、分布に一致していることになる。では、腺管構築を有する腫瘍であればどうか、という疑問が生ずる。しかし、残念ながら現在まで著者らが試みた高分化型腺癌を含む前立腺癌全摘出術細切組織のヌードマウス皮下への移植は全て失敗に終わっており¹³⁾¹⁶⁾、検討することさえできない。しかし、免疫組織化学的に腺上皮細胞および腺腔内に γ -Sm の局在が確認されている前立腺肥大症組織¹⁰⁾(以下、BPH と略)の雄ヌードマウス皮下への移植では、組織の明らかな増生はないが生着を認めている¹³⁾。この担 BPH ヌードマウスを対象として、¹²⁵I 標

識抗 γ -Sm モノクローナル抗体を用い、本報告とほぼ同様の検討を試みている¹⁷⁾。但し、その研究では標的腫瘍が極めて小型で、しかも、継代が不可能であるため観察できた担 BPH ヌードマウスは 5 匹であった。従って、厳密な動態解析が示せたとは考えないが、ARG の上でも組織内放射能濃度測定の上でも BPH への集積は肝、腎、肺など他臓器に比べ良好であった。この事実は腺管構築を有する前立腺癌でも、 γ -Sm の産生能力があれば、標識抗体が集積する可能性を示唆している。海外はもとより、本邦でも抗 γ -Sm 抗体を用いた同様の報告はみられない。Larson ら¹⁸⁾は、抗 PSA モノクローナル抗体(Hybritech)を¹²⁵I で標識し、担 DU-145 腫瘍ヌードマウスに腹腔内投与し、ガンマカメラにより 20 日間観察している。DU-145 腫瘍が PSA を産生することは免疫組織化学的に確認している。その腫瘍の免疫シンチグラフィでは、¹²⁵I 標識抗 PSA 抗体投与後、5 日目以降、特に 7~9 日目のスキャンで良好な腫瘍の画像が得られたとしている。

¹¹¹In 標識抗 PAP モノクローナル抗体の、担 PC-82 腫瘍ヌードマウスにおける体内動態の検討では、PC-82 腫瘍より分泌された PAP が血中に出現するため、非標識抗体の同時投与の有用性を示唆している¹⁹⁾。しかし、いずれの報告でも全身オートラジオグラフィによる観察は行っておらず、標識抗体の腫瘍細部にわたる分布までは情報が示されていない。

Table 2 Clinical trials of immunoscintigraphy for adenocarcinoma of the prostate. 1) IS: immunoscintigraphy, 2) Bony metastasis and soft tissue lesions of prostatic carcinoma. 3) HAMA: detectable titer of serum human antimouse antibody, 4) N/M: not mentioned

Reference No.	Antibody	Label	No. Case	Unlabeled Add.	Detected by IS ¹⁾		Adverse Reactions	HAMA ³⁾
					Bone	Soft T. ²⁾		
3, 4 Goldenberg	PAP Polyclonal	I-131	9	NO	0/6 (0%)	7/9 (78%)	NO	N/M
5 Babaian	PAP Monoclonal	In-111	25	YES	7/32(22)- 101/134(75)	N/M	NO	YES 8/16
6 Meyers	PSA Monoclonal	In-111	10	YES	9/9 (100)	1/1 (prostate)	NO	N/M
7 Wynant	LNCaP Monoclonal	In-111	40	NO	22/40 (55)	27/40 (67)	NO	YES 1/40
20 Texter	LNCaP Monoclonal	In-111	25	NO	9/12 (75)	6/8 (75)	N/M	N/M

3. 免疫シンチグラフィについて

免疫シンチグラフィに関する臨床研究について、最近の報告²⁰⁾も含めて Table 2 に示した。これらの臨床研究および本報を含めた基礎的研究の結果は、免疫シンチグラフィにより前立腺癌の転移巣が描出される事実があることを是認するには十分な証拠と考える。但し、是認されたからといって直ちに免疫シンチグラフィが泌尿器科学で市民権を得るとは考えられない。解決すべき問題が山積みである。先づ、第1の問題はγ-Sm, PSA, そして、PAP はいずれも前立腺上皮細胞の細胞質内にその局在が確認されており、これらの標識抗体により描出される機序が不明な点である。これまでの報告者はその集積メカニズムについて、①癌細胞膜の透過性の変化⁵⁾, ② PSA 分泌過程にある細胞膜あるいは PSA が結合した細胞膜⁶⁾, そして、③細胞膜そのものが PSA を認識しており、PSA と同様の抗原性を備えている¹⁸⁾, などの仮説を唱えている。著者らは本研究の結果からも全く異なった仮説を掲げたい。すなわち、前立腺癌転移巣の組織像である。Goldenberg ら³⁾によって行われた免疫シンチグラフィで描出された前立腺癌肺転移巣は腺管構築を有していた。また、原発巣に関してであるが、Meyers ら⁶⁾により描出された前立腺癌は組織像は示されていないが Gleason grade 2/2 の高分化型であり、腺管構築を有す腺癌であったと考えられる。著者らの免疫組織化学に関する経験では、γ-Sm, PSA, そして、PAP とともに前立腺上皮細胞内に局在するが、腺管構築を有する組織では、前立腺肥大症も含めて、腺腔内分泌物も陽性反応を呈

した⁸⁾¹⁰⁾¹¹⁾。また、その現象は骨転移巣および睾丸転移巣に関しても同様であり¹⁰⁾、未報告であるが、リンパ節転移巣についても同様であった。従って、腺管構築を有する腺癌組織であれば、腺腔内に抗原抗体反応物質として止まる可能性が高いと考えられる。一方、腺管構築を欠く腺癌の転移巣では、分泌された γ-Sm が細胞間隙や組織間隙に止まる時間は短く速やかに血中へと移行するものと考えられる。従って、Host 血中に γ-Sm が出現しない本 LNCaP 腫瘍のように、分泌された γ-Sm が停滞するような何らかの組織構造を伴うか、あるいは、正に分泌過程にある γ-Sm に細胞膜上で結合するというようなシャッターチャンスを得ない限りは、腫瘍の描出は困難と考えられる。第2の問題点は CYT356⁷⁾の臨床の有用性についてである。細胞膜抗原を認識したモノクローナル抗体であり、免疫シンチグラフィには理想的な抗体である。しかし、LNCaP の細胞膜を認識しており、理論的には低分化癌あるいは未分化癌に集積しても中分化癌、高分化癌の検出にはあまり期待が持てない。著者らが樹立した担 LNCaP 腫瘍ヌードマウスに¹¹¹In 標識 CYT356 を投与して全身オートラジオグラムを得た場合、SOLID 部に高い放射能が、逆に GEL/FLUID 部は cold area として示され、本報の結果とは正反対の結果が得られるはずであり、極めて興味深い。第3の問題点は副作用についてである。安全性の問題に関しては現在までの臨床研究では重篤な副作用は報告されていない。しかし、マウスの抗体を用いた場合、抗マウス抗体 (HAMA と略) の出現が知られている。HAMA によ

る直接的な人体への影響は少ないものと考えられているが、特に反復検査を行った場合、長期にわたり血清中に検出され、また、長期間の経過観察が行われていないため、注意を要する²¹⁾。

以上、前立腺癌に対する免疫シンチグラフィの現況を中心に、将来、抗 γ -Sm モノクローナル抗体を放射性医薬品として臨床応用した場合に生じうる主な問題点について考察した。

稿を終えるにあたり、本研究の遂行にご協力いただいた(株)コスモ総合研究所の豊島元啓氏に深謝いたします。

なお、本研究は文部省科学研究費(一般研究 B, 研究課題番号03454389)の援助によるものである。

文 献

- 1) 日本泌尿器科学会, 日本病理学会編: 泌尿器科・病理. 前立腺癌取り扱い規約, 第2版, 金原出版, 東京, 1992.
- 2) O'Mara, R.E. and Weber, D.A.: The osseous system. in *Clinical Radionuclide Imaging*, Freeman, L.M., 3rd. ed. p. 1141, Grune & Stratton, Orlando, 1984.
- 3) Goldenberg, D.M., DeLand, F.H., Bennett, S.J., Flanigan, R.C., Bruce, A.W. and Mahan, D.E.: Radioimmunodetection of prostatic cancer. *J.A.M.A.*, 250, 630—635, 1983.
- 4) Goldenberg, D.M. and DeLand, F.H.: Clinical studies of prostatic cancer imaging with radiolabeled antibodies against prostatic acid phosphatase. *Urol. Clin. N. Amer.*, 11, 277—281, 1984.
- 5) Babaian, R.J., Murray, J.L., Haynie, T.P., Hersh, E.M., Glenn, H.J., Unger, M.W., Carlo, D. I. and von Eschenbach, A.C.: Radioimmunological imaging of metastatic prostatic cancer with ¹¹¹In-labeled monoclonal antibody PAY 276. *J. Urol.*, 137, 439—443, 1987.
- 6) Meyers, F.J., Denardo, S.J., Macey, D., White, R.D. and Unger, M.: Development of monoclonal antibody imaging of metastatic prostatic carcinoma. *Prostate*, 14, 209—220, 1989.
- 7) Wynant, G.E., Murphy, G.P., Horoszewicz, J.S., Neal, C.E., Tyson, I., Heal, A. and Winzelberg, G.: Immunoscintigraphy of prostatic cancer, preliminary results with ¹¹¹In-labeled monoclonal antibody 7E11—C5. 3(CYT356). *Prostate*, 18, 229—241, 1991.
- 8) 藤野淡人, 石橋 晃, 小柴 健, 星合 治, 相磯貞和, 安田健次郎, 十河 孝: γ -seminoprotein に対するモノクローナル抗体の研究. *日泌尿会誌*, 81, 37—44, 1990.
- 9) Fujino, A., Utsunomiya, T., Masui, N., Irie, A., Izumi, H., Yokoyama, E., Ishibashi, A., Koshiba, K. and Ohbu, M.: Primary transitional cell carcinoma of the prostate. A case report: Imaging and histologic considerations. *Kitasato Med*, 19, 452—456, 1989.
- 10) 藤野淡人, 志村 哲, 村山雅一, 青 輝昭, 石橋晃, 桑尾定仁: 抗 γ -Seminoprotein モノクローナル抗体による前立腺組織の免疫組織化学的検討. 前立腺肥大症, 前立腺癌転移巣, および腺癌以外の前立腺腫瘍についての検討. *日泌尿会誌*, 84, 527—534, 1993.
- 11) 藤野淡人, 石田裕則, 西村清志, 遠藤忠雄, 小柴健, 桑尾定仁: 抗 γ -Seminoprotein モノクローナル抗体による前立腺組織の免疫組織化学的検討. 前立腺癌組織における分化度と免疫染色態度との相関性について. *日泌尿会誌*, 84, 720—728, 1993.
- 12) Marchalonis, J.J.: An enzymic method for the trace iodination of immunoglobulins and other proteins. *Biochem. J.*, 113, 299—305, 1979.
- 13) 藤野淡人, 古畑誠之, 丸 典夫, 原野裕司, 青 輝昭, 内田豊昭, 小柴 健: ヒト前立腺に特異的な糖蛋白を産生するヌードマウス移植性前立腺腫瘍の検討; LNCaP 腫瘍を中心に. *北里医学*, 29, 194—200, 1993.
- 14) 藤野淡人: 前立腺と Menadiol sodium diphosphate(第2報), 担ヒト前立腺腺腫ヌードマウスにおけるトリチウム標識 MSDP の動態について. *日泌尿会誌*, 73, 516—528, 1982.
- 15) Lipford, G.B. and Wright, G.L.: A method for separating bound versus unbound label during radioiodination. *Anal. Biochem.*, 187, 133—135, 1990.
- 16) 藤野淡人: 前立腺と Menadiol sodium diphosphate(第1報), 酸性フォスファターゼ活性測定法における基質としての応用および前立腺腫瘍モデルの検討. *日泌尿会誌*, 73, 507—515, 1982.
- 17) 藤野淡人: 担ヒト前立腺腺腫ヌードマウスにおける ¹²⁵I 標識抗ガンマーセミノプロテインモノクローナル抗体の体内動態. *核医学*, 30, 795—798, 1993.
- 18) Larson, A., Arnberg, H., Maripuu, E. and Nilsson, S.: Radioimmunodetection of prostatic cancer with ¹²⁵I-labeled antibody against prostate-specific antigen. *Scand. J. Urol. Nephrol.*, 110, 149—153, 1988.
- 19) Perala-Heape, M., Vihko, P. and Vihko, R.: Effect of unlabeled monoclonal antibodies on the biodistribution of ¹¹¹In-labeled anti-prostate-specific acid phosphatase monoclonal antibodies in the nude mouse model. *Anticancer Res.*, 11, 1327—1331, 1991.
- 20) Texter, J.H. and Neal, C.E.: Current applications of immunoscintigraphy in prostatic cancer. *J. Nucl. Med.*, 34, 549—553, 1993.
- 21) 石井勝己: イムノシンチグラフィの現況と将来. *北里医学*, 22, 519—528, 1992.

(1993年8月9日受付, 11月22日受理, 特別掲載)