

線溶機能亢進剤による標識モノクローナル抗体の 腫瘍集積増強効果

千葉大学医学部第2外科, 放射線科*

竹田 明彦 三好 武美* 菊池 俊之 尾崎 正彦
有我 隆光 長島 通 阿部 恭久 高山 亘
有水 昇* 磯野 可一

モノクローナル抗体を放射性核種で標識した免疫核医学診断は、すでに一部臨床応用もなされているが、かならずしも十分な腫瘍特異的集積効果を得ていない。そこで腫瘍内の微小循環動態の改善を図り、抗体(抗CEA抗体; 1B2)の腫瘍到達性を高めるために線溶機能亢進剤であるウロキナーゼと低分子デキストランを併用し担癌ヌードマウスを用いた検討を行った。その結果、抗体投与72時間後の抗体の腫瘍内濃度(cpm/g tumor)と腫瘍集積率(% of injected dose/g tumor)はウロキナーゼと低分子デキストラン処理(マウス腹腔内投与)により有意に増加し(腫瘍内濃度で非処理群より48.3%の増加)、しかも薬剤の投与量および投与回数増加に伴い上昇傾向を認めた。しかし、腫瘍以外の諸臓器への集積に対する薬剤の影響は全くなかった。したがって、腫瘍/血液比、腫瘍/肝臓比の増加を認め、このことは腫瘍の相対的描出能の向上に寄与し、良好な腫瘍画像を可能にするものと考えられた。

Key words: monoclonal antibody, radioimmunodetection, defibrinating agents, tumor vascular permeability, tumor accumulation

1. はじめに

モノクローナル抗体を放射性核種で標識した免疫核医学診断は、すでに一部臨床応用もなされているが^{1)~4)}、in vitro で高い親和性を示す抗体でも in vivo に投与されると、肝臓などへの生理的集積や腫瘍血管の特殊性などの影響により、かならずしも十分な腫瘍特異的集積効果を得るに至っていない⁵⁾。また、悪性腫瘍およびその周辺組織では血管における線溶機能の低下と凝固機能の亢進が著明となり、fibrin などの沈着がおきやすく微小血栓形成による血管の閉塞が多くみられることが知られている^{6)~8)}。したがってこの fibrin barrier が化学療法剤などの腫瘍到達性を阻んでいるものと考えられる^{9)~10)}。そこで今回、線溶機能亢進剤であるウロキナーゼと低分子デキストランを併用して、腫瘍組織内の微小循環動態の改善を図ることによってモノクローナル抗体の腫瘍到達性を高め、これにより抗体の腫瘍集積効果を増強させ、免疫核医学画

像における診断能の向上の可能性について検討を加えた。

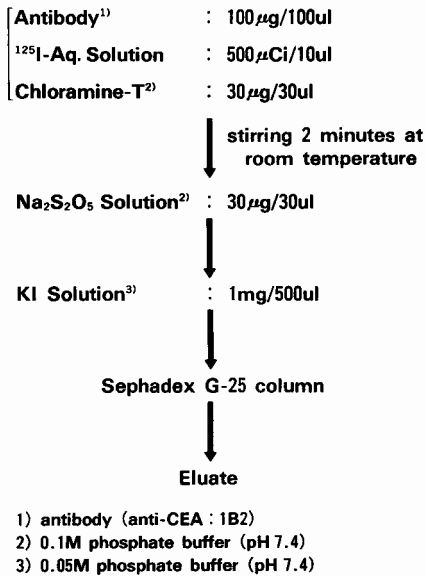
2. 実験材料

(1) モノクローナル抗体

ヒト胃癌培養細胞株 MKN-45 産生 carcinoembryonic antigen (CEA) を免疫源として精製されたマウスモノクローナル抗体 (anti-CEA monoclonal antibody, 1B2) を用いた。この抗体は Balb/c マウス腹水中より得られた抗体 (intact IgG2a) を Protein A-Sephrose CL-4B カラムにて精製したものであり、nonspecific cross-reacting antigen (NCA), normal fecal antigen (NFA) などの関連抗原と交差反応を示さない CEA 特異的な抗体である¹¹⁾。抗体のヨード標識は、Fig. 1 に示すとおりクロラミン T 法に準じて行った。100 μ g の抗体と 500 μ Ci の I-125 溶液 (アマージャム製) に 30 μ g のクロラミン T 溶液を混和し、反応総量 140 μ l にて室温で 2 分間反応後、還元剤にて反応を中止し、速やかに Sephadex-G25 カラム (ファルマシア製 PD-10) にて蛋白分画のみを分離し未結合のヨードを除去した。

<1991年3月13日受理> 別刷請求先: 竹田 明彦
〒280 千葉市亥鼻 1-8-1 千葉大学医学部第2外科

Fig. 1 Labeling procedure of the antibody with ^{125}I by chloramine-T method



(2) 薬剤

ウロキナーゼ(持田製剤 KK 製ウロナーゼ), 10%低分子デキストラン加乳酸リング液(大塚製薬 KK 製低分子デキストラン L 注)を用い, ウロキナーゼを低分子デキストラン液にて溶解し, 100~600単位/0.3ml に調整して, 標識抗体投与後のマウス腹腔内に投与した。

(3) 実験腫瘍細胞

ヒト大腸癌培養細胞株である LS-180細胞を用いた。これは58歳女性の大腸癌巣より採取され継代されている腫瘍で, 移植後はほぼ100%の生着率と安定した増殖速度を示す高分化型腺癌である。また, この細胞は CEA 産生株であるが, 腫瘍移植後はマウス血液中に CEA を分泌することなく(ダイナボット社製 CEA リアビーズにて測定感度以下), 抗 CEA モノクローナル抗体を用いる場合, 血液中に放出される CEA を無視できる実験系を設定できるため都合良いと考えられた。培養は10%の牛胎児血清(Hyclone Co Ltd)を含む Eagle's minimum essential medium (GIBCO 製)にて37°C, 5%CO₂インキュベーター内で行った。

(4) 実験動物

雄性ヌードマウス(Balb/c-nu/nu: 日本 SLC より購入)で生後5~6週齢のものを用いた。マウスの飼育はビニールアイソレーター内で specific pathogen free の状態にて行い, 飼料は放射線滅菌飼料(CE-2,

日本クレア社製)を用い, 飲水はオートクレーブで滅菌後のものを使用し, ともに自由摂取とした。また, 標識抗体注入の3日前より飲水中に一定量のルゴール液を添加し, 甲状腺への非特異的集積を防止した。

3. 実験方法

(1) 実験 1

実験 1 においては, ウロキナーゼと低分子デキストランの LS-180細胞に対する直接作用について検討した。まず, 標識抗体の腫瘍細胞にたいする非特異的な結合能および遊離ヨードの細胞への残存性について各細胞濃度により検討した。抗体の非特異的結合能の評価は, 各濃度の細胞に対して過剰量(20 μg)の未標識抗体を加え, 十分反応後 PBS 溶液にて遠心洗浄を行い, その後一定量(5ng/100 μl)の標識抗体を37°C 3時間反応させ, 細胞成分のみ取り出してその放射活性を測定した。また, 遊離ヨードの残存性については, 各濃度の細胞に対して, 0.2 μCi の I-125溶液(100 μl)を加え同様にインキュベーション後細胞を数回洗浄しその放射活性を測定した。次に薬剤処理による標識抗体の腫瘍細胞への集積性について検討した。すなわち増殖期にある LS-180細胞を2mM-ethylenediaminetetraacetate (EDTA) 加 PBS 溶液中で単離細胞とし, 1%BSA 加 PBS 溶液にて1.0 $\times 10^6$ 個/500 μl の量の細胞に調整した。これに対して0.5~1,000u/100 μl のウロキナーゼと低分子デキストランの混合液を加え37°Cで12時間培養後, 腫瘍細胞を培養液にて2回ほど洗浄し, 一定量の標識抗体(5ng/100 μl)を含む培養液中において総反応量500 μl で3時間インキュベートした。アッセイは triplicate で行い(少なくとも2回), インキュベーション後 PBS 溶液にて2回ほど遠心(2,000rpm, 5分間)洗浄を繰り返したあと細胞の放射活性を自動ウェル型検出器にて測定した。また, 同様の手順で腫瘍細胞に対する薬剤による処理時間と標識抗体の結合率との関係を検討した。すなわち, LS-180細胞1.0 $\times 10^6$ 個/500 μl に一定量(20u/100 μl)のウロキナーゼと低分子デキストランを加え0~72時間培養したあと, 培養液を洗浄し一定量の標識抗体(5ng/100 μl)を反応させた。その後, 反応液を除去し遠心洗浄して細胞の放射能を測定した。実験は triplicate で少なくとも2回行った。いずれの実験に際してもそのつど単離細胞をトリパンブルーにて染色し生細胞数を算定した。

(2) 実験 2

実験 2 においては, 担癌動脈系を用いて, 標識抗体

投与後のウロキナーゼと低分子デキストラン併用による腫瘍集積増強効果に関する検討を行った。ヌードマウスの右大腿皮下にLS-180細胞 5×10^7 個/mouseを移植後、移植腫瘍の重量が0.7~1.2gになる10~14日後に、マウスをTable 1に示すごとく6つの群に分けてA群はmouse 6匹、B-E群は各5匹、F群は4匹とした。各群とも先に示した手順にてヨード標識した抗体(10 μ g/0.3ml/mouse)をマウス尾静脈より注入し、一部腹腔内投与を行った。抗体の投与量は10 μ gであり体表面積に換算すると体重60kgの人間における約2mgの投与に相当し、これは臨床使用の報告例にみられる一般的な投与量である⁹⁾。抗体投与72時間後に心臓採血にて屠殺し、腫瘍および各臓器(肝臓、腎臓、脾臓)を摘出し、表面に付着した血液を水洗後、湿重量にて計測したのちウエル型ガンマカウンターにてその放射活性を測定した。なお、各個体間での標識抗体投与量のばらつきを補正するために、マウス尾部に残留する放射能カウントを総投与量から減じて、血液循環に投与された抗体量を算定した。各群の薬剤投与方法については、A群は対照群であり生食0.3mlのみを投与し、B群では抗体投与直後ウロキナーゼと低分子デキストラン(200単位/0.3ml)を1度だけ腹腔内投与した。C群ではB群の3倍のウロキナーゼ(600単位)を0.3mlの低分子デキストランとともに抗体投与直後のみ投与し、D群では同一の薬剤を200単位/0.3mlずつ3日間連続投与した。E群では100単位/0.15ml/回を1日2回ずつ3日間連続投与した。さらに、F群は同一量の標識抗体を腹腔内投与後D群と同一の形式で薬剤投与を行った群である(Table 1)。以上の方法に従い、測

定を行った結果より下記の項目を求め、標識抗体の腫瘍集積性と体力動態について検討した。

- 1) 標識抗体の腫瘍内濃度(腫瘍組織1gあたりのcpm値:cpm/g tumor)
- 2) 腫瘍集積率(腫瘍組織1gあたりの集積の全投与放射能に対する比率:%of injected dose/g tumor)
- 3) 血液および各臓器への集積率(臓器1gあたりの集積の全投与放射能に対する比率:%of injected dose/g tissue)
- 4) 腫瘍/血液比, 腫瘍/肝臓比(腫瘍組織1gあたりのcpm値/血液または肝臓1gあたりのcpm値:tumor/blood ratio, tumor/liver ratio)

なお、抗体の腫瘍内濃度および腫瘍への集積率については、対照群(A群)を基準にしてt検定により各群間の有意差を検定した。

4. 実験結果

(1) 実験 1

まず、標識抗体のLS-180細胞に対する非特異的結合能および遊離ヨードの残存性については、Fig. 2にみるとおり細胞数の増加とともにわずかな増加傾向を認めるものの、いずれもプラトーに達し、腫瘍細胞 2×10^6 個あたりの標識抗体の結合放射能は、全投与放射能の1%以下であり、抗体の非特異的結合率および遊離ヨードの残存率ともに、通常の標識抗体の結合率と比較してごくわずかであることが確認された。次に、ウロキナーゼと低分子デキストランの濃度と処理時間に

Table 1 The experimental planing of tumor up take of 125-I antibody with treatment of defibrinating agents (urokinase and low molecular weight dextran) in nude mice bearing LS-180 xenografts.

Group	¹²⁵ I-antibody administration (i.v.)			urokinase (u)	dextran (ml)	n
	urokinase (dextran)	0	24			
A group (control)				0	0	6
B group (200u / 0.3ml)	•			200	0.3	5
C group (600u / 0.3ml)	•			600	0.3	5
D group (200u x3 / 0.3ml)	•	•	•	600	0.9	5
E group (100u x6 / 0.15ml)	••	••	••	600	0.9	5
F group (200u x3 / 0.3ml)	•	•	•	600	0.9	4

1) ¹²⁵I-antibody administrated i.p.

Fig. 2 Radioactivity of various number of LS-180 cells incubated with the medium containing free 125-I (■), 125-I labeled antibody (○) and 125-I labeled antibody with nonlabeled antibody excess (▲). The results are mean±S.D. of 4 or 6 different experiments

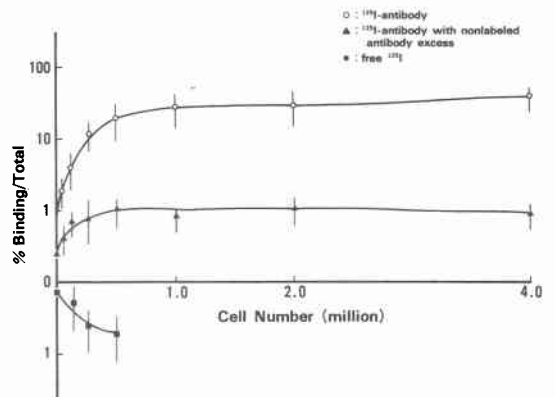
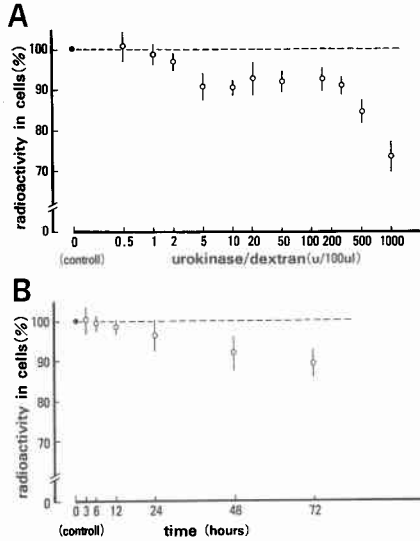


Fig. 3 Effect of treatment of LS-180 cells with various concentrations of urokinase with low molecular weight dextran on uptake of ¹²⁵I-labeled antibody. Time course of effectiveness of the same drugs treatment to LS-180 cells uptake of ¹²⁵I antibody. The upper figure is (A) and the lower is (B). The results are mean ± S.D. of at least 5 different experiments.



よる標識抗体の腫瘍細胞への集積についてみてみると、ウロキナーゼと低分子デキストラン無処置の細胞(対照群)と比較して処置濃度(Fig. 3A)および処置時間(Fig. 3B)が増加しても、集積放射能はほとんど変化はみとめられず、むしろ処理濃度が極端に高い場合(500単位以上)や処理時間が長時間に及ぶ場合(48時間以上)では、細胞への結合率は10%以上低下した。したがって、ウロキナーゼと低分子デキストランのLS-180細胞に対する直接作用による標識抗体の集積増強効果は認められなかった。

(2) 実験 2

1) 抗体の腫瘍内濃度

標識抗体投与72時間後の抗体の腫瘍内濃度を Fig. 4 に示す。対照群である A 群の腫瘍内濃度 (8.196 ± 0.875 × 10⁵cpm/g) と比較して、ウロキナーゼと低分子デキストラン処置を行った B 群から F 群までのすべての群で腫瘍内濃度の上昇がみられた。さらに、これらの薬剤処置群の間では、E 群 (12.155 ± 0.127 × 10⁵cpm/g) の腫瘍内濃度が最も高く、次いで D 群 (11.145 ± 0.776 × 10⁵cpm/g) が続き、以下 C 群

Fig. 4 Radioactivity of ¹²⁵I labeled antibody in tumor as cpm per gram of tumor to LS-180 xenografts with treatment of defibrating agents 72 hours after administration.

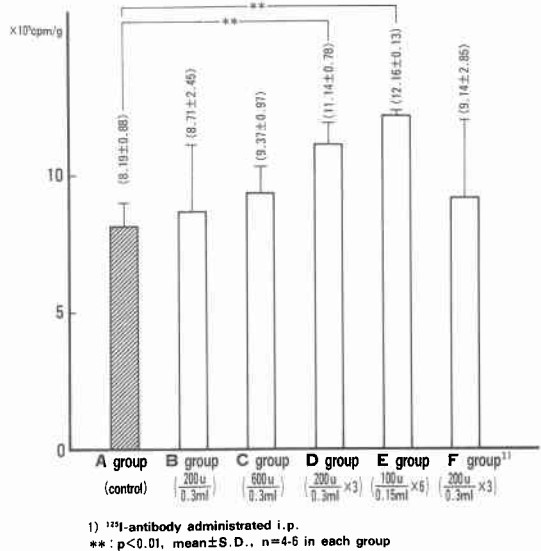


Table 2 Effect of treatment of defibrating agents on tumor uptake of ¹²⁵I antibody as the percentage of injected dose per gram tumor to LS-180 xenografts 72 hours after administration.

(urokinase dextran)	tumor uptake of ¹²⁵ I-antibody ¹⁾ (% of injected dose/g tumor)
A group (Control)	10.60 ± 1.16 (n=6)
B group (200 u / 0.3 ml)	11.23 ± 3.17 (n=5)
C group (600 u / 0.3 ml)	12.03 ± 1.28 (n=5)
D group (200 u / 0.3 ml) × 3	14.23 ± 0.84 (n=5)
E group (100 u / 0.15 ml) × 6	15.48 ± 0.41 (n=5)
F group ²⁾ (200 u / 0.3 ml) × 3	11.80 ± 3.69 (n=4)

1) values of means from 4 to 6 mice in each group(±S.D.)
 2) ¹²⁵I-antibody administrated i.p.
 **: p<0.01

(9.369 ± 0.971 × 10⁵cpm/g), 抗体を腹腔内投与した F 群(9.137 ± 2.849 × 10⁵cpm/g), B 群(8.713 ± 2.452 × 10⁵cpm/g)の順となり、A 群を基準にすると D 群および E 群においては、統計的有意差をもって (p<0.01) 抗体の腫瘍内濃度の上昇を認めた。すなわち、対照群を基準にすると、抗体の腫瘍内濃度は D 群では36.0% E 群では48.3%の上昇を認めた。

2) 抗体の腫瘍集積率

ウロキナーゼと低分子デキストランの投与方法の違

いによる標識抗体の腫瘍集積率の差を Table 2 に示した。対照群と比較して、残りのすべての群で腫瘍集積率は上昇しており、特に D 群 (14.23±0.84%) および E 群 (15.48±0.41%) では統計的有意差 (p<0.01) をもって高い腫瘍集積率を示し、以下 C 群 (12.03±1.28%), F 群 (11.80±3.69%), B 群 (11.23±3.17%) の順となり (1) と同様の結果となった。したがって、A 群を基準にすると、D 群では 1.34 倍、E 群では 1.46 倍の腫瘍集積率の増強効果を認めた。

3) 血液および各臓器への集積率

標識抗体投与 72 時間後の血液および各臓器 (肝臓, 腎臓, 脾臓) への生理的集積を薬剤の投与形式別に一覧表として記載した (Table 3)。いずれの群において

も、血液および各臓器への標識抗体の集積率に有意な差異は認められず、ウロキナーゼおよび低分子デキストラン処置による諸臓器への生理的集積の変動は見られなかった。また、すべての群においてマウス肺および腫瘍に出血斑あるいは壊死巣の形成は認められなかった。

4) 腫瘍/血液比, 腫瘍/肝臓比

腫瘍, 血液, 肝臓の 1g あたりの集積放射能から腫瘍/血液比, 腫瘍/肝臓比を求め、腫瘍と周辺臓器との相対的な集積率の増強効果について検討を加えた (Fig. 5)。対照群と比べて、薬剤処理を加えた残りの群における腫瘍/血液比, 腫瘍/肝臓比ともに有意差は認められないものの、比率の増加傾向を認めた。

5. 考 察

近年、細胞融合法によるモノクローナル抗体産生技術の確立により¹²⁾、種々の腫瘍特異性の高いモノクローナル抗体が開発され、癌の血清学的診断¹³⁾⁻¹⁵⁾や免疫組織化学的手法を用いた癌の組織診断¹⁶⁾のみならず、放射性核種標識抗体による癌の局在診断—いわゆる radioimmunodetection への応用も試みられ、実験動物系における腫瘍集積性の検討¹⁷⁾⁻²¹⁾だけでなく、最近では臨床報告例も多くみられるようになっている⁴⁾²²⁾⁻²⁵⁾。しかし、その多くはまだまだ不十分であり、CT スキャンや超音波検査などの他の画像診断にまさる腫瘍描出能を得るには至っていないのが現状といえる。免疫核医学診断における標識抗体の腫瘍集積性に影響をあたえる因子として、抗体の腫瘍特異性がきわめて重要であることはいうまでもないが、その他に考慮すべきことはかなり多い。すなわち、抗体側因子として抗原にたいする親和性、抗体の持つ免疫活性、純度、分子量と形態などが上げられ、抗原側因子としては、抗原量と密度、抗原の発現様式、組織学的変化などがあり、その他、放射性核種と標識法による影響、血中遊離抗原による blocking、網内系での取り込み、腫瘍の血流と血管透過性、宿主の応答など数多くの因子が相互に作用しあって、実際の体内動態の全体像を形成しているものと考えられている。そこで、標識抗体の腫瘍集積性を増大させるためにさまざまな工夫が検討されてきた。すなわち、抗原決定に必要な部分のみ (Fab) を用いる法²⁶⁾、キラマ抗体の利用²⁷⁾、高免疫活性抗体の精製²⁸⁾など抗体側を変化させることや、種々の薬剤による腫瘍細胞の抗原性を増大させ抗体の腫瘍結合能を増強させるなどといった抗原側の要因を変化させること²⁹⁾、その他第 2 抗体をもちいたり³⁰⁾、短半減

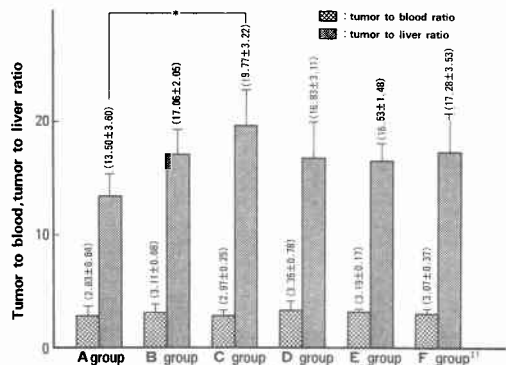
Table 3 Biodistribution of 125-I antibody for normal organs (Blood, Liver, Kidney and Spleen) in tumor-bearing mice 72 hours after administration.

(Urokinase dextran)	n	% of injected dose/g tissue ¹⁾			
		Blood	Liver	Kidney	Spleen
A group (control)	6	4.13±1.34	0.85±0.26	1.04±0.24	1.20±0.49
B group ($\frac{200\text{u}}{0.3\text{ml}}$)	5	3.78±1.30	0.66±0.16	1.05±0.38	1.00±0.86
C group ($\frac{500\text{u}}{0.3\text{ml}}$)	5	4.81±0.25	0.74±0.12	1.35±0.10	1.04±0.22
D group ($\frac{200\text{u}}{0.3\text{ml}} \times 3$)	5	3.78±0.97	0.75±0.20	1.01±0.21	0.89±0.21
E group ($\frac{100\text{u}}{0.15\text{ml}} \times 6$)	5	4.37±1.15	0.87±0.21	1.22±0.24	1.39±0.34
F group ²⁾ ($\frac{200\text{u}}{0.3\text{ml}} \times 3$)	4	3.55±0.81	0.67±0.18	1.03±0.24	0.95±0.46

1) values of means from 4 to 6 mice in each group (±S.D.)

2) ¹²⁵I-antibody administrated i.p.

Fig. 5 Tumor to blood and tumor to liver ratios in nude mice bearing LS-180 xenografts with treatment of defibrinating agents 72 hours after administration.



1) ¹²⁵I-antibody administrated i.p.

*p<0.05, mean±S.D., n=4-6 in each group

期の核種により早期のイメージングを試みる工夫³¹⁾, 標識抗体を投与前に宿主白血球と培養する方法³²⁾などが報告されてきた。しかしながら, 腫瘍の血流や血管透過性に関しては, いまだ十分な検討がなされておらず, しかもなんらかの形で腫瘍血流を改善し, それによる標識抗体の腫瘍集積効果をあげるような研究は現在のところほとんど見当たらない。今回, われわれは腫瘍血流を選択的に改善するといわれている線溶亢進剤であるウロキナーゼと低分子デキストランを用いて, 標識抗体の腫瘍集積増強効果を試みたが, そもそも担癌体では凝固能は亢進傾向を, 線溶能は低下傾向を示し, そのため癌組織内では fibrin の沈着や血栓形成などが起こりやすく^{6)~8)}, さらに癌周辺組織ではフィブリン沈着によるバリアーがあるなど微小循環動態が正常組織とは異なり, 制癌剤などの薬剤の腫瘍組織内到達が阻まれているものと考えられている^{9)~10)}。したがって, 腫瘍組織内に薬剤の到達性を亢進させるためには, 線溶能を亢進させると同時に過凝固能を抑制するような手段が必要になる。そのために, 線溶機能亢進剤であるウロキナーゼや低分子デキストランなどのヘパリンノイドを併用することも有力な方法の1つと考えられる。さらに, これらの薬剤は lipoprotein complex からなる癌細胞膜に作用し, その透過性をも亢進させるほか lysosome 膜の透過性をも高めて細胞内に含まれる各種の水解酵素の遊離放出を促進するとともに³³⁾³⁴⁾, 種々の酵素の活性化を引き起こし, その結果抗原を被覆している膜蛋白³⁵⁾や糖脂質³⁶⁾が除かれたり, 他の細胞膜周辺の微細構造に変化が生じるため³⁷⁾, 今回用いた抗 CEA 抗体と親和性を持つ部分が出現し, *in vitro* における標識抗体の腫瘍細胞に対する結合能が増加することも考えられる。しかし実験1の結果からも分かるように, ウロキナーゼと低分子デキストランの LS-180細胞に対する直接作用による標識抗体の腫瘍集積増強効果は認められず, 今回用いた細胞系においては, 薬剤による細胞膜抗原の表出などの修飾効果はないものと考えられた (Fig. 3)。一方, ウロキナーゼと低分子デキストランを投与することにより, 腫瘍組織の溶存酸素濃度が少なくとも2倍以上, 約5倍の100mmHgに達し, 腫瘍組織の血流が著明に改善されているとの報告もあり³⁸⁾, 実験2に示されたような結果はウロキナーゼと低分子デキストランによる腫瘍血流の改善作用に基づき標識抗体の集積増強効果のあらわれであろうと考えられた。ウロキナーゼと低分子デキストランの投与方法による抗体の

腫瘍内濃度と腫瘍集積率の差異に関しては薬剤処理を施したすべての群で対照群よりも増強効果を認めたが, この中における腫瘍への集積効果はウロキナーゼの投与量および投与回数の増加に従って上昇し, しかも投与量が全く同じ場合には投与回数に依存して上昇する傾向を示していた。これは, ウロキナーゼと低分子デキストランによる腫瘍血流の改善効果が薬剤投与後2~3時間ほどでもとの状態に戻ることが知られており³⁸⁾, しかも1回の投与における血流改善に伴う抗体の集積効果はウロキナーゼの投与量に必ずしも比例した関係を持たず, むしろ投与回数が多いほどそれだけ血流改善状態の時間が長く, その方が腫瘍集積の集積の増強効果につながるものと考えられた。また, この実験系における標識抗体投与後の抗体の血液中からの経時的な排泄率を % of injected dose/g blood として評価すると, 抗体投与24時間後ですでに11.2%まで減少し72時間後では6.5%となり血中に存在する抗体量は時間の経過とともに少なくなっており, このため血流改善作用による抗体の集積効果は相対的に低下してくるものと推定された。このため, ウロキナーゼの投与量が同じで, 投与回数が3倍に増えてもその集積効果はやや増加したものの有意さを伴うほどの大きな差にはならなかったものと考えられた。さらに, 腫瘍以外の各臓器への集積に対するウロキナーゼと低分子デキストランの効果についてはほとんど認められず, この薬剤の効果が腫瘍血流の改善作用のみであり, 他の臓器の血流には全く影響を与えていないものと考えられた。最後に腫瘍/血液比, 腫瘍/肝臓比をみても, 薬剤処理を施したすべての群で対照群よりも比率の上昇を認めた。この腫瘍対臓器 (血液および肝臓) の濃度比は, 免疫核医学画像においては抗体の腫瘍への特異的な分布と非特異的な分布との量的関係を表しており, 周辺バックグラウンドの放射能を考慮にいれた腫瘍集積率であり, ウロキナーゼと低分子デキストラン処理においてこの値が上昇するということは画像診断上, 腫瘍の相対的描出能を向上させ, 良好な腫瘍描出能を可能にするものと考えられた。一般に, 移植腫瘍では腫瘍血流量は正常組織や原発腫瘍の血流量よりも少なく³⁹⁾, また腫瘍組織では間質液圧の上昇により血管内圧の圧勾配が小さく物質が移行しにくいとの報告もあり⁴⁰⁾⁴¹⁾, このような血流, 血管透過性が不良とされる循環動態下で, 血流改善作用による標識抗体の腫瘍集積増強効果が得られたとすれば, 実際の臨床応用において十分な効果が期待できるものと考えられ, し

かもこれらの薬剤は比較的安易に使用できる点においても、線溶機能亢進剤の併用は今後の免疫核医学画像の向上に十分寄与しうる可能性が示唆された。

なお、本論文の要旨は第28回癌治療学会総会(東京)において発表した。また、本研究の一部は平成2年度文部省科学研究費補助金、課題番号02454562の援助による。

文 献

- 1) 小山田日吉丸, 石原和之, 早坂健一ほか: 111-In 標識モノクローナル抗体 (96, 5) によるメラノーマイテージングの試み. 核医 23 : 1595-1611, 1986
- 2) 伊藤和夫, 泰 温信, 西 信三ほか: 131-I 標識抗 carcinoembryonic antigen (CEA) 抗体を用いた腫瘍陽性シンチグラフィ. 核医学 22 : 901-905, 1985
- 3) 小泉 深, 油野民雄, 横山邦彦ほか: 131-I 標識抗 α -fetoprotein (AFP) 抗体を用いた肝癌免疫イメージング. 核医 23 : 397-400, 1980
- 4) 佐々木康人, 井上登美夫, 織内 昇ほか: 131-I 標識抗 CEA および 131-I 標識抗 CA19-9 モノクローナル抗体カクテル (IMACIS-1) を用いたイムノシンチグラフィの臨床的検討. 核医 27 : 349-361, 1990
- 5) Mach JP, Bechegger F, Forni M et al: Tumor localization of radiolabeled antibodies against carcinoembryonic antigen in patients with carcinoma: A critical evaluation. N Engl J Med 303 : 5-10, 1980
- 6) Edwards FA: Migrating thrombophlebitis associated with carcinoma. N Engl J Med 240 : 1031-1035, 1949
- 7) Hiramoto R, Bernecky J, Juraudowski J et al: Fibrin in human tumors. Cancer Res 20 : 592-593, 1960
- 8) Clake N: Intracellular location of tissue thromboplastins and possible relation to fibrin deposits in human neoplasms. Nature 205 : 608-610, 1965
- 9) 山本政勝, 長島 明, 永松正字ほか: 制癌剤の効果増強策に関する研究—Dextran Sulfate の併用効果について. 最新医 28 : 996-1006, 1973
- 10) 山本政勝, 山田武夫, 福永州宏ほか: 制癌剤の効果増強策について—Urokinase 併用の意義. 癌の臨 17 : 750-759, 1971
- 11) 鈴木利光, 清藤 勉, 小野寺昭子: ヒト胃癌株産生 CEA に対する単クローン抗体の作成とその性状. 腫瘍マーカー—第6回記録: 174-176, 1986
- 12) Kohler G, Milstein C: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 256 : 495-496, 1975
- 13) Koprowski H, Herlyn M, Steplewski Z et al: Specific antigen in serum of patient with colon carcinoma. Science 212 : 53-55, 1981
- 14) 服部 信: 腫瘍マーカーの展望. 臨検 28 : 1039-1045, 1984
- 15) 谷内 昭, 研淵 幸, 今井浩三ほか: モノクローナル抗体による tumor marker の測定. 臨免疫 17 : 554-560, 1985
- 16) 渡辺 昌: モノクローナル抗体の腫瘍細胞診断, 組織診断への応用. 臨免疫 17 : 547-553, 1985
- 17) 山下邦康: 抗 CEA 抗体および抗 AFP 抗体の肝癌への結合性に関する研究. 肝臓 24 : 1160-1169, 1983
- 18) 中村佳代子, 塚谷泰司, 西口 郁ほか: モノクローナル抗体 NCC-ST-439, NCC-ST-433 による大腸癌 (CO-4) 胃癌 H-111) シンチグラフィの基礎的検討. 核医 24 : 963-973, 1987
- 19) 橋本禎介: 抗 AFP モノクローナル抗体を用いた RI 腫瘍イメージングに関する基礎的検討. 日医放線会誌 47 : 629-643, 1987
- 20) 久保田哲朗, 中村佳代子, 久保郭司ほか: 125-I 標識モノクローナル抗体 NCC-ST-433 を用いたヒト肺小細胞癌の免疫画像診断. 癌と化療 16 : 393-398, 1989
- 21) 野上俊彦, 三浦 博, 近江昭一ほか: 131-I 標識抗 CA19-9 および抗 CEA モノクローナル抗体による immunoscintigraphy の基礎的検討. 核医 27 : 427-435, 1990
- 22) 塚本純一, 渡辺 正, 加藤知行ほか: モノクローナル抗体を用いた大腸癌肝転移および局所再発に対する腫瘍画像診断. 日消外会誌 23 : 1001-1005, 1990
- 23) 石井勝己, 西山茂夫, 小山田日吉丸ほか: 免疫核医学検査—RI 標識モノクローナル抗体 (96.5 ZME-018) による悪性黒色腫のイメージングを中心に. 癌と化療 16 : 1194-1203, 1989
- 24) Sasaki Y, Inoue T, Okazaki A et al: Clinical assessment of immunoscintigraphy using a cocktail of I-131 antiCEA and antiCA19-9 monoclonal antibodies. J Nucl Med 28 : 637-643, 1987
- 25) 村上康二, 箕島 聡, 宇野公一ほか: 111-In 標識モノクローナル抗体 (ZME-018) と 67Ga シンチグラフィによる悪性黒色腫のイメージング. 核医 26 : 113-119, 1989
- 26) Wahl RL, Parker CW, Philpott GW: Improved radioimaging and tumor localization with monoclonal F(ab')₂. J Nucl Med 24 : 316-325, 1983
- 27) Tsuneo S, Keigo E, Mitsuru K et al: In vitro and in vivo properties of human/mouse chimeric monoclonal antibody specific for common acute lymphocytic leukemia antigen. J Nucl Med 31 : 1077-1083, 1990

- 28) 横山邦彦：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。核医 25 : 49—50, 1988
- 29) 綾部善浩：131-I 標識モノクローナル抗 CEA 抗体の 12-O-Tetradecanoylphorbol 13-Acetate による CEA 産生培養腫瘍細胞への集積増強について。核医 23 : 1403—1412, 1986
- 30) Goodwin DA, Meares CF, Diamanti CI et al: Use of specific antibody for rapid clearance of circulating blood background from radiolabeled tumor imaging proteins. J Nucl Med 24 : 31—32, 1983
- 31) Delaloye B, Bischof-Delaloy A, Buchegger F et al: Detection of colorectal carcinoma by emission-computed tomography after injection of 1231-labeled Fab or F(ab') fragments from monoclonal anticarcinoembryonic antigen antibodies. J Clin Invest 7 : 301, 1986
- 32) 槇殿玲子, 綾部善浩, 塩崎 宏ほか：放射線同位元素で標識した抗腫瘍抗体による腫瘍の診断と治療の開発。日医放線会誌 45 : 388—392, 1985
- 33) 下山正徳, 仁井谷久暁, 谷口 猛ほか：Lysosome と癌化学療法3, lysosome labilizer としての Plasmin と mitomycin -C の併用効果。医のあゆみ 65 : 439—352, 1968
- 34) 木村喜代二, 仁井谷久暁, 鈴木 明ほか：抗癌剤の効果を高めるための条件。臨と研 46 : 747—757, 1968
- 35) Stein KE, Schwarting GA, Marcus DM: Glicolipid markers of murine lymphocyte subpopulations. J Immunol 20 : 676—679, 1978
- 36) Kznagi R, Urdal DL, Stroup R et al: A possible regulation in expression of tumor associated glycolipid antigens by their ceramide structure. Fed Proc 41 : 726—733, 1982
- 37) Yaung WW, Portoukalian J, Hakomori S: Two monoclonal anticarbohydrate antibodies directed to lycosphingolipid with alact-N-glycosyl type 2 chain. J Biochem 256 : 10967—10972, 1981
- 38) 三好武美, 斎藤正好, 有水 昇ほか：線溶機能亢進剤による Ehrlich 固形腫瘍に対する放射線効果の増強作用。日医放線会誌 42 : 895—898, 1982
- 39) 鈴木磨朗, 堀 勝義, 阿部育夫ほか：腫瘍血管の機能的特殊性。癌と化療 6 : 287—291, 1979
- 40) 堀 勝義, 鈴木磨朗, 阿部育夫ほか：Angiotensin II 昇圧時の腫瘍内微小循環の状態。癌と化療 12 : 1323—1330, 1985
- 41) 鈴木磨朗, 堀 勝義, 阿部育夫ほか：腫瘍血管の機能病理学的研究。癌と化療 28 : 592—598, 1982

Enhanced Effect of Radiolabeled Monoclonal Antibody Uptake in Tumor with Defibrinating Agents

Akihiko Takeda, Takeyoshi Miyoshi Toshiyuki Kikuchi, Masahiko Ozaki, Takamitsu Ariga,
Tohru Nagashima, Yasuhisa Abe, Wataru Takayama,
Noboru Arimizu* and Kuichi Isono

Second Department of Surgery, School of Medicine, Chiba University

*Department of Radiology, School of Medicine, Chiba University

Radiolabeled monoclonal antibodies against a variety of cancer associated antigens have already been clinically used for tumor imaging, but reports of specific antibody uptake by tumors are still rare. Therefore tumor targeting and localization experiments were performed by intravenously injecting nude mice bearing LS-180 (colon carcinoma) with 125I-labeled antibody (anti-CEA; 1B2), along with defibrinating agents urokinase and low molecular weight dextran to improve the vascular permeability of the tumor. Tumor activity 72 hr after administration, expressed as counts per minutes per gram of tumor and the percentage of the injected dose per gram of tumor in animals given the defibrinating agents was significantly higher than in the control group. Accumulation of the antibody in the tumor after administration of the mixture of these two agents was 48.3% higher than the control level, and the higher the number of doses and the concentration of the mixture administered to tumor bearing mice, the higher was the specific uptake by the tumor. However nonspecific high accumulation in normal organs, such as the liver, kidneys and spleen, was not observed. Therefore the tumor/blood ratio and the tumor/liver ratio were increased. These results indicated that the mixture of urokinase and low molecular weight dextran could be a useful tool for radioimmunodetection by making the radioactivity of the transplanted tumors high enough to distinguish them from normal organs.

Reprint requests: Akihiko Takeda Second Department of Surgery, School of Medicine, Chiba University
1-8-1 Inohana, Chiba-city, 280 JAPAN