The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	放射性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（第1報）標識抗MH134腫瘍抗体の腫瘍への結合
Author(s)	槇殿, 玲子; 渡辺, 克司; 寺嶋, 広美 他
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1972, 32(5), p. 412-424
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/18111
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

放射性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（第1報）

標識抗 MH 134 腫瘍抗体の腫瘍への結合

九州大学医学部放射線科学教室
槇殿玲子　渡辺克司　寺嶋広美　松浦啓一
九州大学医学部細菌学教室
野本亀久雄
九州大学医学部薬学部放射線薬品化学教室
河野彬

（昭和47年5月13日受付）

^{131}I-labelled Tumor-Specific Antibodies: A Trials to Concentrate Radioisotopes Specifically in the Tumor:

I. Biding of Anti-Mouse Hepatoma Antibody to the Tumor

by

Reiko Makidono*, Kikuo Nomoto**, Hiromi Terashima*, Akira Kono***, Katsuzi Watanabe* and Keiichi Matsuura*

*Department of Radiology, Faculty of Medicine, Kyushu University
**Department of Bacteriology, Faculty of Medicine, Kyushu University.
***Department of Radiopharmacology, Faculty of Pharmaceutical Science, Kyushu University

Research Code No.:

Key Words: Tumor diagnosis and therapy, ^{131}I-labelled Antibody

This series of studies has been undertaken to establish the method of labelling the antibodies against tumor-specific antigens with radioisopopes and to confirm the possibility of application of the labelled antibodies to diagnosis and thrapy of tumors.

I) In vitro assay of binding of ^{131}I-antibody to tumor cells: Tumor cells were incubated in the presence of ^{131}I-antibody for 1, 6, 12, 24, or 48 hours. After each time of incubation, microradioautographs were prepared according to the standard technique. The remarkable binding of ^{131}I-antibody to the tumor cells was demonstrated throughout the first 24 hours (Fig. 7a, b, c). Microradioautographic findings of retention of the labelled antibody on tumor cells became less prominent after 48 hours incubation.

II) In vivo assay of binding of ^{131}I-antibody to tumor tissue: Scintiphotographs were obtained by the aid of scintillation camera (Pho/Gamma III, Nuclear Chicago Co.) 24 hours and 48 hours after intravenous administration of ^{131}I-antibody to the tumor—bearing mice. In the photographs obtained at 24 hours, the tumor was clearly demonstrated with prominent activity of the radioisotope. (Fig. $5b_{1-1}$, $5b_{1-2}$). The photographs obtained at 48 hours after the administration failed to show the tumor localization (Fig. $5b_2$, b_3). Macroradioautographic study was performed immediately after scintiphotography on the animals which had been subjected to scintiphotographic study. Macroradioautographs obtained 24 hours after administration of ^{131}I-antibody showed an excellent activity of the radioisotope in tumor (Fig. $6b_1$). High radioactivities were also seen in the thyroid glands, gastrointestinal tract and urinary bladder. The high activity of the radioisotope in tumor was maintained during another 24 hours. However, increased back ground in the blood was demonstrated macroradioautographically 48 hours after the administration.

The present study showed that the radioactive isotope was carried by the antibody against tumor-specific antigen and concentrated efficiently in tumor tissue.

I はじめに

腫瘍にとり込まれる放射性同位元素の開発は腫瘍の診断並びに治療の両面より期待され多くの研究がなされたが[11]，満足すべき核種は見出されていない．したがつて放射性同位元素を腫瘍により効率よくとり込ませる手段の開発が要求される．そのうち，腫瘍に対する抗腫瘍抗体を利用して放射性同位元素を腫瘍に集めようという試みが，1956年より1967年の約10年間にエネルギッシュに行なわれて来た[1)~3),7)~9),19),22),27),30)~33)]．この際放射性同位元素は積極的に腫瘍に集まるのではなく，標識された同位元素が抗体に荷われて抗原である腫瘍に集まるのである．抗体とともに腫瘍に選択的に集まる同位元素が充分強い γ-emitter であれば，体外よりシンチカメラ，シンチスキャンニングによつてその局在を確認出来るため診断面への応用が可能である．また腫瘍細胞の抗体による障害作用の程度は各腫瘍で一定していないので[14)15)24)34)]抗体自体による効果は期待しがたい場合も多いが，そのような例においても集まつた放射性同位元素の放出エネルギー（α，β，γ）による内照射効果で一定の障害を受ければ，治療に役立つことも期待される．従来の報告でも純粋な腫瘍抗原に対する抗体を標識する試みがなされている．一方腫瘍周囲の炎症性反応の結果，Fibrin や Fibrinogen が正常部位よりも腫瘍病巣に多く見出されることから，Fibrin, Fibrinogen に対する抗体を標識し抗原抗体反応を利用して腫瘍に集めるという試みがなされた[1)3)8)，22)30)-33)]．しかしこの組合せでは Fibrin, Fibrinogen と抗体との反応は特異的反応であるが，腫瘍との関係において特異的ではない．たとえば炎症性機転など Fibrin, Fibridogen の増えた状態であれば，腫瘍以外にも体のどの部分にも集まることになる．

腫瘍に選択的に集まる核種が見つかつていない現時点では，放射性同位元素を腫瘍だけに集める最も有効な手段の一つと考えられる抗腫瘍抗体を放射性同位元素で標識する方法を再検討する必要があろう．そこで近年の免疫学の進歩にともなう知見もとり入れてこの方法の臨床応用の可能性を開発する目的で本研究に着手した．

II 実験材料並びに方法

今回はマウスのMH 134腫瘍に対する抗体を使つて基礎実験を行なった．

1) 動物

① ウサギ：雑系ウサギ，2カ月令，2—2.5 kg.

② マウス；純系C3H，AKR，C57BL. ♀または♂，1.5カ月令，20—25gm. 九大純系動物飼育センターより供給されたもの．

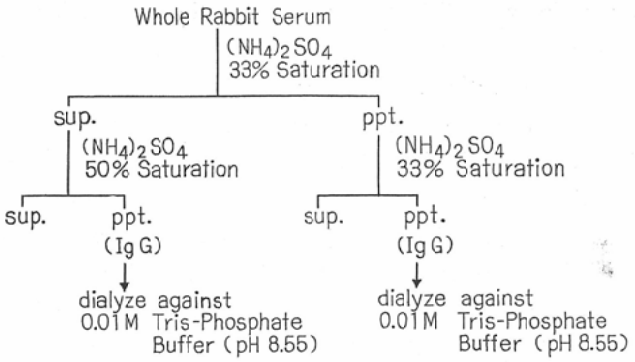

Fig. 1. Salting out of IgG from whole rabbit serum by $(NH_4)_2SO_4$

2) 腫瘍；MH 134腫瘍（C3Hマウス肝癌由来)[28].

3) 標識用放射性同位元素；無担体に近い $Na^{131}I$. ダイボット社.

4) ウサギ免疫法

初回免疫はウサギ1匹あたりMH 134細胞を$^1/_5$容量にハンクス液で細胞浮遊液とし，等量のフロイントの完全アジュバンドと混和する．これをウサギの足蹠並びに皮下に注射する．追加免疫は約8週間後に開始する．1回につきウサギ1匹あたりMH 134細胞をハンクス液で$^1/_8$容量の浮遊液とし，7.5ml 腹腔内に注入する．追加免疫は3日間隔で計5回行ない最終免疫後10日目に全採血して血清を分離する．（血清は1匹平均35ml 得られる）.血清は抗腫瘍抗体を精製するまで−20℃に凍結保存する.

4) 抗腫瘍抗体精製法

① 硫安による粗 IgG の分離（Fig. 1)[35]；

以下の全操作は−4℃で行なう．硫安を血清の33%に加え，pH 7.0に調整し30分間泡のたたない速度で撹伴しながら反応させる．その後3000rpm 10分間遠沈し，沈澱（粗 IgG を含む）を分離する．沈澱は0.01Mトリスリン酸緩衝液（pH8.55, C＝1.2 mho）に溶かし，最初の血清量と等しい溶液量にととのえる．これにもう一度硫安を33%の割に加え，上記の操作をくり返して沈澱を得る．第2回目の沈澱は最初の血清量の半量弱のトリスリン酸緩衝液に溶かし透析に移る．今回は硫安33%飽和を2回くり返して得た粗 IgG のみを実験に使用した.

② 透析

①で得られた粗 IgG を含む溶液を透析用セルローズチューブ（Visking, 27／32型）に入れ，0.01Mトリスリン酸緩衝液（pH8.55）で一昼夜透析する.

③ 吸収操作；

C3Hマウス起源のMH 134細胞で免疫しているため，粗IgG中には抗腫瘍抗体（抗MH 134腫瘍抗体）と抗C3Hマウス正常組織抗体を含んでいる．抗腫瘍抗体のみを残すため，C3Hまたはこれと組織抗原性の近いマウスの組織で抗正常組織抗体を吸収して除去した．AKRマウス(H-2^k)のリンパ節細胞及びC3Hマウス（H-2^k）のリンパ節細胞を各々5×10^9 個ずつ用意する．透析を終えた粗 IgG を含む溶液20ml を先づAKRのリンパ節細胞と混ぜ，4℃30分間反応させる．反応後1000rpm，10分間遠沈してAKRのリンパ節細胞を除去する．次にC3Hのリンパ節細胞と混和してもう一度同じ操作をくり返す.

④ DEAEセルローズクロマトグラフィーによる IgG の精製[36]；

直径 3.5cm長さ60cm のカラムに Whatman DE 23を充鎮し，0.01Mトリスリン酸緩衝液(pH8.55)で充分に緩衝化した後③の粗 IgG 溶液を通す．Fraction collector で5ml ずつ分離すると Fraction 番号30をピークとして純粋な IgG 分画が得

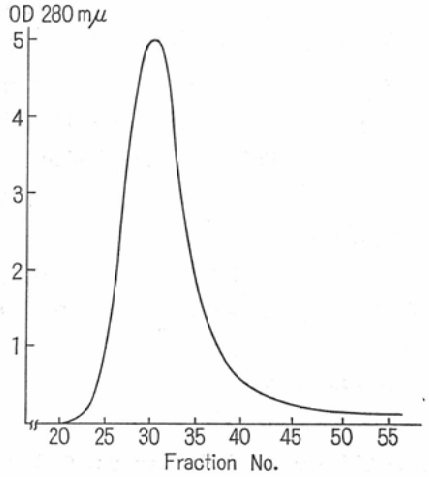

Fig. 2. DEAE Cellulose chromatography of rabbit IgG. (Whatman DE 23)
Column: 3.5 × 65 cm
Sample: Rabbit IgG Fraction
Buffer: 0.01 M Tris—Phosphate Buffer (pH 8.55)
Fraction: 5 ml

^{131}I-Aq. solution ⟶ Paper Chromatography (No. 1)

0.5N Phosphate Buffer(pH 7.4)	0.5ml
^{131}I-Aq. solution	0.2ml
IgG(Fraction No. 30, 7.5mg/ml)	1.0ml
Chrolamin-T(3.5mg/ml*)	0.2ml

↓ pH 7.0 adjust, stirring 15min. in ice water

$Na_2S_2O_5$ sol. (3.5mg/ml*)	0.5ml

↓ stirring 5 min. in ice water

Na I(50mg/ml*)	0.2ml

↓ stirring 5 min. in ice water ⟶ Paper Chromatography(No. 2)

Anion Ion Exchanger(Dowex 2-×8)

↓

Elution(^{131}I-Antibody) → Paper Chromatography (No. 3)

* Buffer: 0.05M Phosphate Buffer(pH 7.4)

Fig. 3 Labelling the Antibody against MH134 Tumor Antigen with radioactive iodine (^{131}I) by Chrolamin-T.

られる (Fig. 2).

5) 免疫学的 IgG 活性の確認法

精製 IgG 及び放射性同位元素 (^{131}I-) 標識後, IgG としての抗原性をオクテルロニー寒天板法[26]によりヤギ抗ウサギ IgG 血清を用いて確認した. IgG 中の抗腫瘍抗体価は受身赤血球凝集反応[17]によつた.

6) 抗腫瘍抗体の^{131}I.標識法[12)18)]; (Fig. 3).

精製 IgG 分画 (Fraction 番号30の溶液) をクロラミンTを使つて標識した. ①精製 IgG 溶液 1 ml (蛋白質量 7.5mg/ml), 0.05Mリン酸緩衝

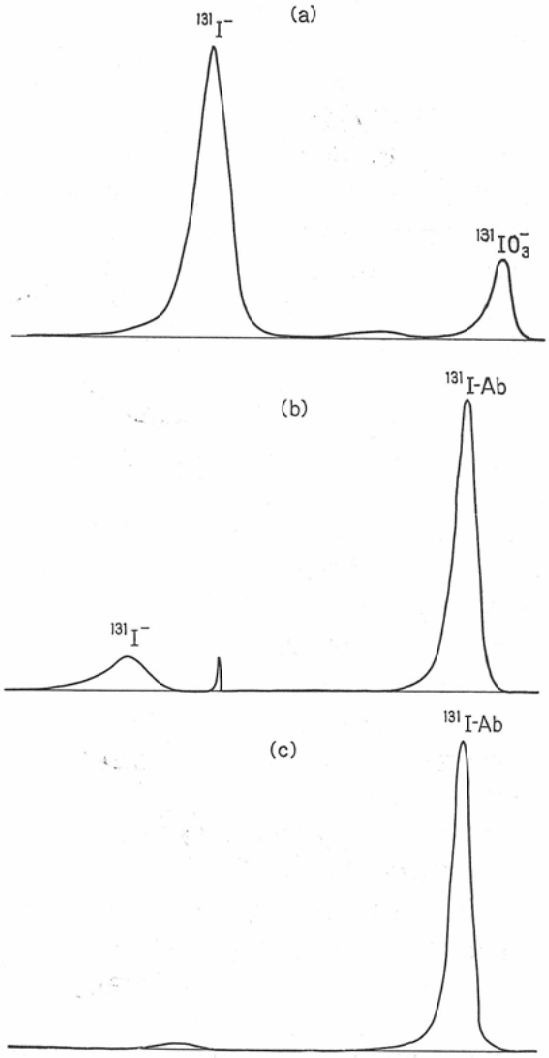

Fig. 4. Paper Radiochromatography.
a: No. 1, original Aq. solution of ^{131}I—(Carrier free).
b: No. 2, ^{131}I—Antibody before Ion exchange Chromatography.
c: No. 3, ^{131}I—Antibody purified by Ion exchange Chromatography.

液（pH 7.4）0.5ml, $Na^{131}I$, 1 mCi（0.5Mリン酸緩衝液 0.2ml に溶かした無担体に近いもの），クロラミンT 0.2ml（3.5mg/ml）の混合液をpH 7.0にととのえ，0℃15分間撹伴しながら反応させる．（以下の反応も全て ice bath 中で stirrer をかけて進める）．②ピロ亜硫酸ナトリウム 0.5ml（3.5mg/ml）を加え5分間反応させる．③非放射性ヨウ化カリウム 0.2ml（50mg/ml）を加え5分間反応させる．この段階ではヨウ素標識抗体（^{131}I-Ab）と未反応の放射性ヨウ素が混在している（Fig. 4b）．④未反応の放射性ヨウ素を分離除去するため陰イオン交換樹脂（Dowex 2—X 8，1 gm）カラムを通す．これで分離が不充分な時は，さらに0.05Mリン酸緩衝液（pH 7.4）で透析する．標識用の放射性ヨウ素の純度及び ^{131}I-Ab と未反応の放射性ヨウ素の分離状態を知るためには，上記クロラミンT法による標識過程の①③④で75%メタノールによるペーパーラジオクロマトグラフィーを行なつた（Fig. 4 a,b,c.）．標識を終了した抗腫瘍抗体はミリポアフィルター（0.45μ）を通した滅菌して使用する．溶液量を減らす必要のある時には，−20℃のフリーザー中で真空吸引し濃縮する．

7）腫瘍への ^{131}I-Ab の結合確認法

①　In vitro 実験

ミクロラジオオートグラフィー[23]；

C 3 Hマウスで移植継代しているMH 134腫瘍細胞をハンクス液で洗い，M 199 組織培養培地（仔牛血清を20%添加）で 1×10^6/ml の浮遊液を作る．^{131}I-Ab の非特異的な細胞吸着をみるためには，1 ml にC57B Lマウスのリンパ節細胞 1×10^2個とMH 134細胞 1×10^4 個を含む細胞浮遊液を作つた．これ等の細胞浮遊液を直径 2.5 cmの プラスチックシャーレ（Falcon）に3 ml ずつ分注し ^{131}I-Ab を3 μCi/ml の割に加えた ^{131}I-Ab を加えて CO_2 インキュベーター 95% air, 5%CO_2）で1，6，12，24及び48時間と培養時間をかえて観察した．細胞は培養終了後ハンクス液で3回洗いミクロラジオオートグラムを作成した．細胞塗沫標本をメタノールで10分間固定する．ここで標本を2群に分け，1群はヘマトキシリンエオジン染色し（前染色群），他は染色せずに乳剤をかけた（後染色群）．ミクロラジオオートグラフィー用乳剤は，Sakura NR—H2 (dipping型，約5μ厚）とFuji ET—2F (stripping型，15μ厚)を使用した．各標本は風乾後，相互のγ線による back ground の高くなるのを防ぐため一枚ずつ別々の暗箱に入れ冷暗所で露出した．露出期間はET—2Fは10日，NR—H2は14日とした．後染色群は露出終了後にギムザ染色した．

②　In vivo 実験

i）シンチカメラ撮影；シンチカメラは米国 Nuclear Chicago 社製 Pho/Gamma Ⅲ を用い，pin hole 型コリメーターによつた．背部正中線上にMH 134細胞を 1×10^8 個移植し，約10日後直径1 cm位の腫瘤を形成したC 3 Hマウスを使用した（Fig. 5a_1,a_2,a_3）．尾静脈より ^{131}I-Abを 300μCi/匹注入し，マウス No. 1は24時間目，マウス No. 2，No. 3 は48時間目に背腹面と側面でシンチカメラ撮影した（Fig.5b_{1-1},b_{1-2},b_2,b_3）．

ii）マクロラジオオートグラフィー

シンチカメラ撮影後のマウスは，直ちにドライアイスで−70℃に冷却したアセトンにつけ冷却固定しマクロラジオオートグラムを作成した．マウスを矢状面で正中切断後−20℃のフリーザー中に一昼夜置く．次日ドライアイスで冷却したマクロラジオオートグラフィー用の金属固定板に，マウスの切断面を上にしてCMC糊で固め固定する．これを冷室中でマクロラジオオートグラフィー用接着テープ（Salotape，マウス用．サロンパス社製）を使つてマイクロトームにより30μの厚さの切片に切る．この標本は一昼夜−20℃のフリーザー中で真空吸引し充分に乾燥する．乾燥後標本表面をサランラップ，セロファン等の透明膜でおおつて，Sakura MR type フイルムと密着させカセッテにはさみ込む．露出期間は投与した ^{131}I-(Ab)の量によるが，今回は冷暗所で3日間露出した．現像はフジ　レンドール液で20℃5分行ない，水洗30秒．フジ　ラテットXを用いて定着した．

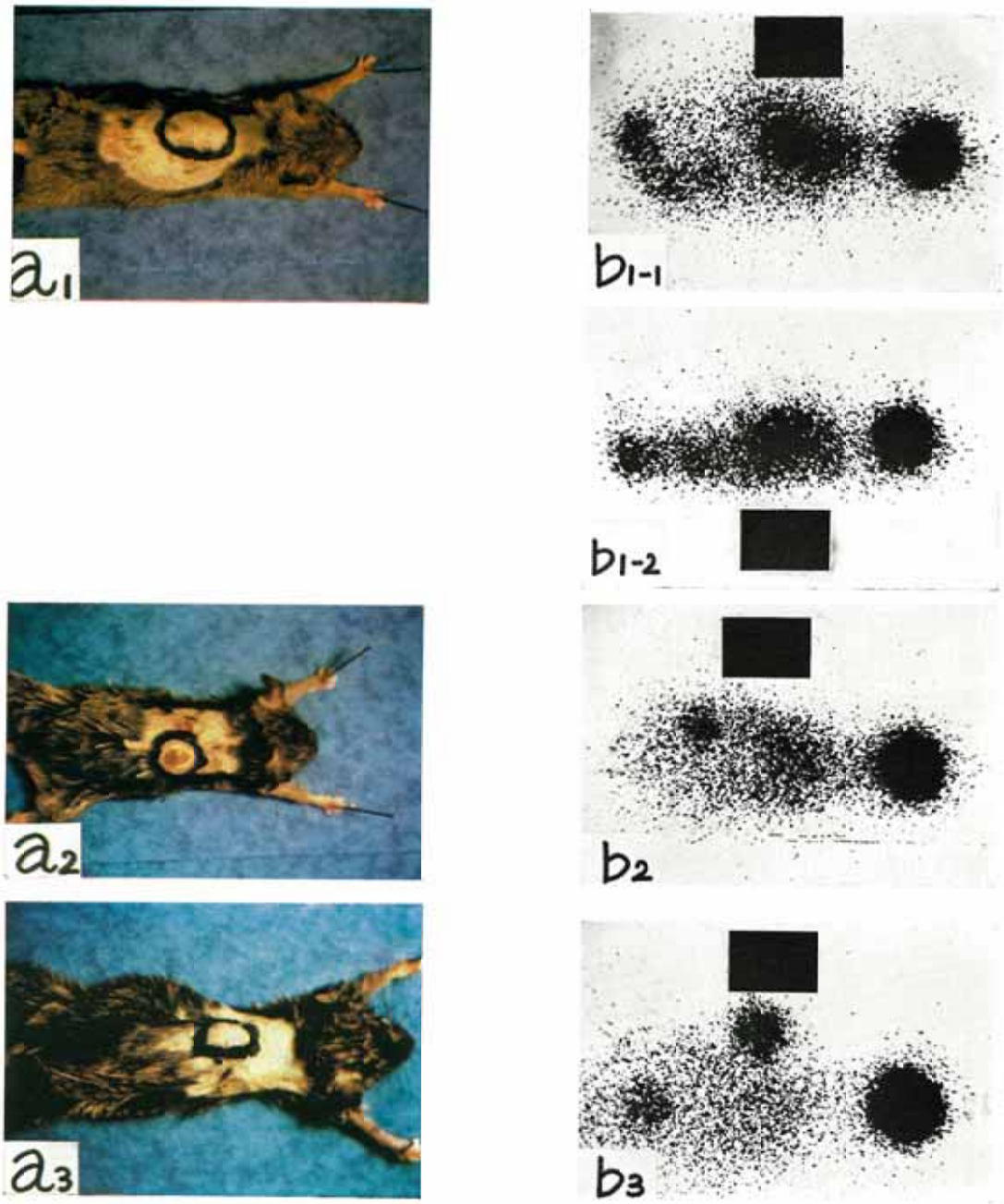

Fig. 5a. Photographs of tumor-bearing mice.

5a[1]: Mouse No. 1, scintiphotographed and killed for macroradioautography at 24 hours after ^{131}-I-antibody administration.

5a$_2$and 5a$_3$: Mouse No. 2 and No. 3, scintiphotographed and killed for macroradioautography at 48 hours.

Fig. 5b. Scintiphotographs of tumor-bearing mice.

b$_{1-2}$: Mouse No. 1, dorsal view.
b$_{1-1}$: Mouse No. 1, lateral view.
b$_2$: Mouse No. 2, dorsal view.
b$_3$: Mouse No. 3, dorsal view.

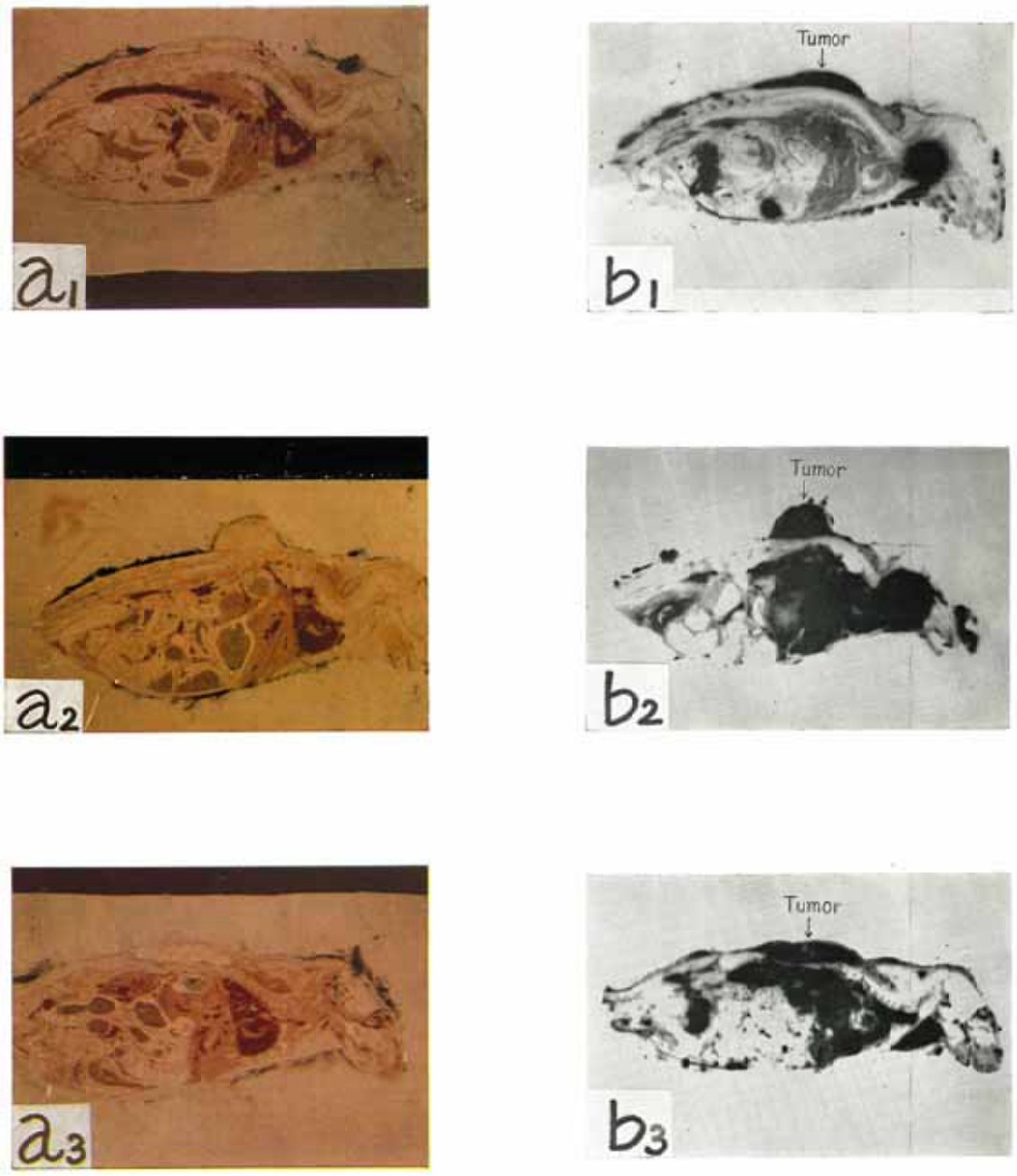

Fig. 6a. Frozen section of mice at median sagittal plane.
Fig. 6b. Macroradioautographs of the frozen sections shown in Fig. 6a.
a_1, b_1: Mouse No. 1
a_2, b_2: Mouse No. 2
a_3, b_3: Mouse No. 3

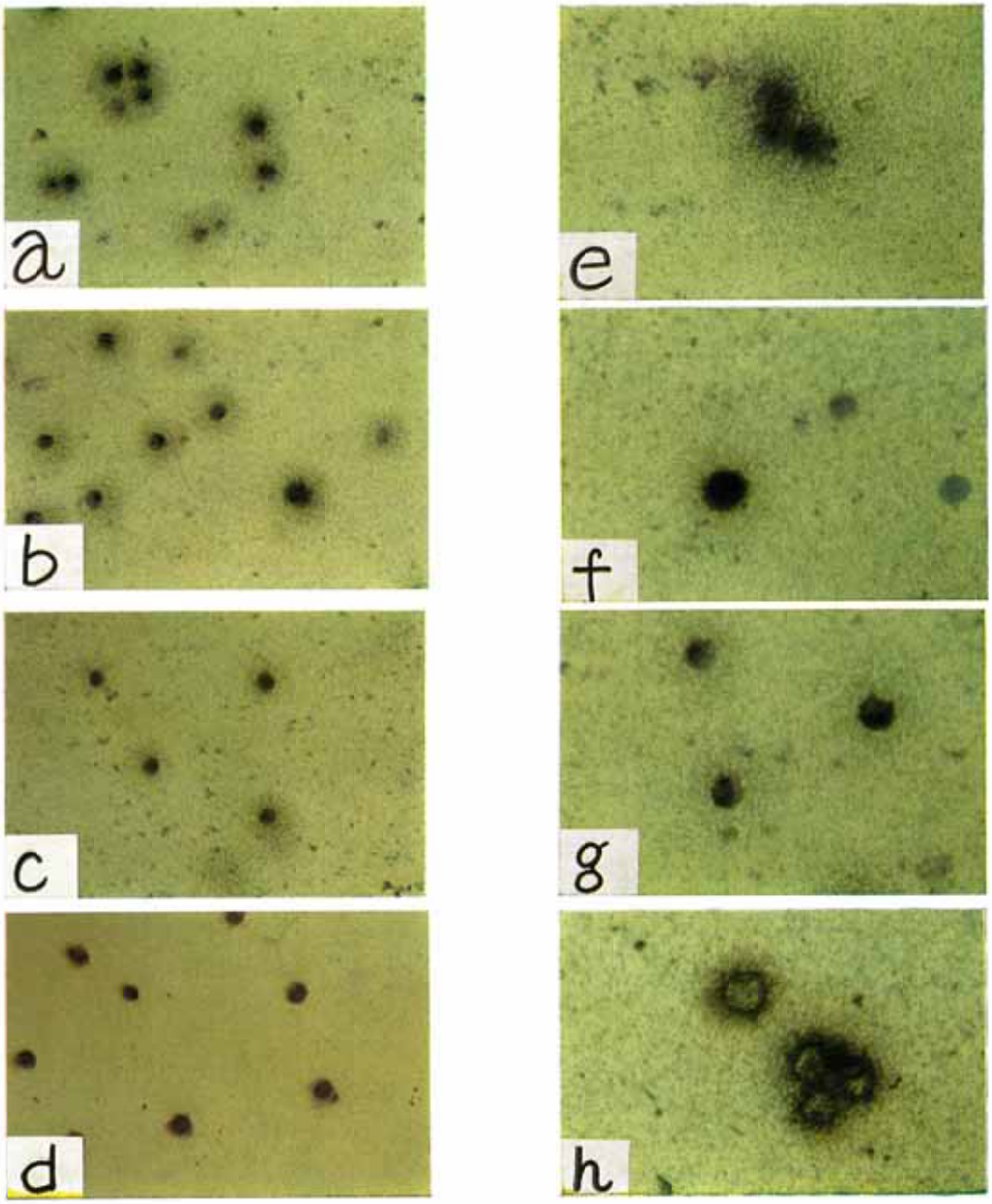

Fig. 7. Microradioautographs.

a: MH134 cells incubated with ^{131}I-Ab for 1 hour (200 ×).
b: MH134 cells incubated with ^{131}I-Ab for 24 hours (200 X).
c: MH134 cells incubated with ^{131}I- Ab for 48 hours (200 ×).
d: MH134 cells in cubated without ^{131}I-Ab for 48 hours (200 ×).
e: MH134 cells incubated with ^{131}I-Ab for 1 hour (400 ×).
f: MH134 cells and C57BL lymph node cells incubated with ^{131}I-Ab for 1 hour (400 ×).
g: MH134 cells incubated with ^{131}I- Ab for 48 hours (400 ×).
h: MH134 cells incu bated with ^{131}I-Ab for 1 hour (400 ×).

Fuji ET-2F emulsion was used for microradioautographs, a—g. Sakura NR-H2 emulsion was used for microradioautograph, h. ^{131}I-Ab means ^{131}I-labelled anti MH134 tumor antibody.

III 結 果

(1) ヨウ素標識抗体の免疫学的活性並びに比放射能；

オクテルロニー寒天板法で IgG 分画の抗原性をテストすると検体とヤギ抗ウサギ IgG 血清との間には，いづれも鮮明な1本のバンドがみられた．これにより標識後も抗体の IgG としての抗原性が保たれていることが確められた．受身赤血球凝集反応で抗腫瘍抗体価を調べると $\log_2$ titer 3—4であつた．この方法によれば，標識により抗体価の低下は認められなかつた．

標識抗体の比放射能は79μCi/mg 蛋白であつた．

(2) In vitro 実験による ^{131}I-Ab の腫瘍細胞への吸着；

MH 134細胞と ^{131}I-Ab を1，6，12，24及び48時間培養すると，ミクロラジオオートグラフィーでいづれも ^{131}I-Ab のMH 134細胞への吸着が証明された (Fig. 7 a, b, c, e, f, g)．またMH 134細胞とC57BLマウスのリンパ節細胞の混合浮遊液に ^{131}I-Ab を加えて培養した場合には，MH 134細胞にのみ ^{131}I-Ab の吸着がみられた (Fig. 7 f)．培養時間と ^{131}I-Ab の吸着程度には，1，6，12，24時間までのミクロラジオオートグラムでは肉眼的に有意差が認められない (Fig. 7 a,b)．48時間培養すると24時間にくらべて吸着の程度が低い (Fig. 7 c,g)．ET—2F によるミクロラジオオートグラムで1—24時間までの培養では，いづれもギムザ染色された腫瘍細胞は無数のグレインでおおわれ透視出来ない (Fig. 7 e)．48時間培養では腫瘍には必ずグレインでおおわれていない部分がみられる (Fig. 7 g)．Sakura NR—H2 のミクロラジオオートグラムは，至適な露出期間の検討が不充分であつたため，吸着程度をグレイン数で定量的に比較する目的には使えなかつた (Fig. 7 h)．肉眼的に比較すると ET—2F と同じ傾向を示した．なお前染色したミクロラジオオートグラムでは像のばらつきが大きかつたので，判定はすべて後染色したものによつた．

(3) In vivo 実験による ^{131}I-Ab の腫瘍への結合；

① シンチカメラ像

^{131}I-Ab 静注後24時間目の動物 (No. 1) では，腫瘍に充分な放射性活性がみられシンチカメラ像でhot spot (陽性描画像)として認められた (Fig. 5 $b_{1\text{-}1}$,$b_{1\text{-}2}$)．腫瘍以外の活性の高い部位は，甲状腺 (今回は前以つて非放射性ヨウ素でブロックしていない．) 消化管系，膀胱であつた．48時間目の動物 (No. 2，No. 3) では，シンチカメラ像で腫瘍の局在がはつきりしなかつた (Fig. 5b_2, b_3)．48時間目の腫瘍以外の活性の高い部位は，24時間目と同様甲状腺，消化管系膀胱であつた．

② マクロラジオオートグラフィー

^{131}I-Ab 静注後のマクロラジオオートグラムは，24時間目の動物でも48時間目の動物でも ^{131}I-Ab が腫瘍に充分に結合した状態であることを証明した (Fig. 6b_1, b_2, b_3)．24時間目の動物 (No. 1) の瘍腫以外の活性の高い臓器は，甲状腺消化管系膀胱に限られ，これ以外の臓器には殆んど活性が認められない (Fig. 6 b_1)．48時間目の動物 (No. 2，No. 3) ではそれ以外の臓器にも全体的に活性が高くなつている (Fig. 6 b_2,b_3)．

IV 考 按

精製した抗腫瘍抗体に放射性同位元素を標識して，腫瘍抗原と抗体との特異的抗原抗体反応を利用して腫瘍に放射性同位元素を集めようという試みは，マウスのMH 134腫瘍細胞を使つたこの実験でも実現可能であることが示された．この一連のモデル実験系において先づ考慮すべきことは，使用する腫瘍は抗原性の強いものを選ぶということである．個々の腫瘍の持つ抗原性は強弱様々であり，抗原性の弱い腫瘍も強い腫瘍と同じ程度の抗体を作らせる確実な免疫方法はまだ開発されていない．したがつて現時点では抗原性の強い腫瘍から手がけて行くことが必要である．そこでC3Hマウスの肝癌由来の移植継代腫瘍MH 134は，抗原性が比較的強い腫瘍であることが他の一連の転移実験より確められているので[20)21)]，この腫瘍を基礎的モデル実験の系として選んだ．

抗腫瘍抗体から変性を起こさせることなく出来

るだけ比放射能の高い標識抗体を作る条件を探さなければならない．われわれは成長ホルモン標識法[12)18)]をもとに予備実験を行ない，一番比放射能が高くかなりの再現性もあり，IgG 活性も損われない条件を選んだ（Fig. 3）．IgG 標識条件に関しては，さらに単独の基礎実験を行ない検討を加えたい．

標識抗体が腫瘍に特異的に結合するかどうかは，ミクロラジオオートグラフィー，マクロラジオオートグラフィー及びシンチカメラ撮影によつて調べた．これ等により ^{131}I-Ab の腫瘍への結合が細胞レベル，組織臓器レベル，個体レベルで検討出来る．抗体の力価が低い場合でも，腫瘍細胞と ^{131}I-Ab の間に特異的抗原抗体反応が起れば，培養細胞のミクロラジオオートグラフィーでその結合が証明されると考えられる．

ミクロラジオオートグラフィーは，腫瘍組織切片によるものと腫瘍細胞浮遊液を塗沫標本として使う方法とある[23)]．後者の方法では，生体内の反応と異なり多くの因子を除外しうるため，^{131}I-Ab の細胞レベルでの結合の有無を確認するためには適している．今回は腫瘍細胞と ^{131}I-Ab は1，6，12，24，48時間と培養した．^{131}I-Ab の濃度は一定にして（3 μCi/ml）37℃で腫瘍細胞と培養すると，1—24時間にわたる各時点での肉眼的ミクロラジオオートグラフィー像は差が認められない．1×10^6 個の腫瘍細胞に対してこの標識抗体量はやや過剰と考えられる．しかし対照として加えたC57BLのリンパ節細胞には全く吸着していないので（Fig. 7f），^{131}-Ab の吸着は腫瘍細胞に特異的であつて抗体過剰域でも非特異的吸着は起つていないといえる．In vitro で ^{131}I-Ab が腫瘍細胞の膜表面の抗原決定基を飽和するのに要する時間は，一般の抗原抗体反応の速度から推定して4℃でも15—20分と考えられるので，この培養時間中には飽和状態が達成されているものと考えられる．

反応時の温度が37℃では結合と同時に一部解離も起り，最大限に結合している ^{131}I-Ab の絶体量は4℃での飽和状態の時よりも少ないと考えられる報告もある[5)]．そこで ^{131}I-Ab は腫瘍細胞表面の抗原決定基をほぼ飽和した後，かなり早い時期（24時間以内）から少しずつはずれ始めることが想定される．今回の ^{131}I-Ab の比放射能で10日間露出の条件では，1—24時間培養までは^{131}I-(Ab) の減少は差としてとらえられなかつたが，48時間培養すると同一条件でも ^{131}I-Ab のはずれる割合が大となつて肉眼的にも認められる差となつて現われたと解釈している．Sakura NR—H2 乳剤（5 μ厚）を使用すると腫瘍細胞周囲のグレインがはつきりして，グレイン数を算定することにより吸着程度が定量的に比較出来るのではないかと期待したが，今回は算定に耐える満足すべきミクロラジオオートグラムが得られなかつた．このようにミクロラジオオートグラフィーによりグレイン数で比較するか，Well 型シンチレーションカウンターで計測したカウント数で比較することにより，腫瘍細胞表面の抗原決定基を飽和するのに必要な ^{131}I-Ab の最小量，^{131}I-Ab の吸着完了時間，吸着持続時間，解離の始まる時期，吸着と解離に及ぼす温度の影響などを詳細にしらべる必要がある．

In vivo 実験では In vitro の条件にさらに幾つかの影響因子が加わる．即ち細胞レベルで^{131}I-Ab の腫瘍細胞への吸着が証明されても，組織臓器個体レベルでの特異的な結合が証明出来るかどうかは，標識抗体の抗体活性，比放射能の強さ，^{131}I-Ab の体内での分布，代謝様式ならびに代謝速度，腫瘍の局所解剖学的条件などに左右される．今回の実験では，マクロラジオオートグラフィーでの腫瘍への経時的な ^{131}I-Ab の結合の所見とシンチカメラ像はよく一致し，又 In vitro の実験結果をよく反映した．マクロラジオオートグラムでは，投与後48時間まで ^{131}I-Ab が腫瘍に充分に結合しているのが証明されたが，シンチカメラでは24時間目の動物でのみ陽性描画が可能であつて，48時間目の動物でははつきりしなくなつた．この現象の機作としては，In vitro 実験でも証明されているように，投与後48時間たつと腫瘍に結合した ^{131}I-Ab がかなりはずれて来るためと考えられ

る.

腫瘍の存在部位の局所解剖学的条件によつて標識抗体の最もよく集まる時期は各々異ると思われる．他の部位との比率において腫瘍にどの位集まつていればシンチカメラ像で陽性描画が可能であるかは，^{131}I-Ab 投与後の経時的な分布を Tumor/Blood ratio, Tumor/Tissue ratio などで算出し，各時点のシンチカメラ像と比較することによつて明かにされうる．今回の実験系では24時間目を中心にさらに時間々隔を短く区切つて検討する必要があり，この結果は追つて報告する.

^{131}I-Ab が腫瘍から解離する時に，^{131}I-Ab の型ではずれるのか放射性ヨウ素のみはずれるのか問題となる．ことなる個体または系統の組織抗原に対する抗体を対応する標的細胞に吸着させて後37℃で培養すると，2時間半で30%近くはずれるという報告があり[5]，^{131}I-Ab の型ではずれる可能性も考えられる．また標識後放射性ヨウ素の一部が free の型ではずれることは，この他の ^{131}I-標識化合物においても常にみられる現象であり，甲状腺消化管膀胱の高い放射活性も放射性ヨウ素が free の型で分布していることを示している．したがつていづれも起る可能性がある.

蛋白を標識する放射性同位元素としては放射性ヨウ素 ^{131}I-, ^{125}I-, が最も一般的であるが，診断と治療とその目的に応じてこの他の核種も検討してみる必要がある．診断の目的には体外計測に適当なエネルギーをもつ γ-emitter で体内被曝の少ない核種であることが望まれる（例. ^{99m}Tc）．また治療の目的では標識抗体の腫瘍への吸着が選択的で確実であれば，γ 線以外にも α-β-emitter も使用しうる（例. ^{51}C）.

本研究を臨床応用の段階にまでおしすすめるには多くの検討すべき問題が残つているが，先づ抗原性のあるといわれているヒトの腫瘍[6)10)13)25)29)]について一つ一つ慎重な実験と検討を積みかさね，たとえ腫瘍の中で限られた種類のものであつても，標識抗体が診断または治療に実用出来るものがあれば探り出すというのが，この研究の将来の方向づけであろう.

V 結　論

C3Hマウス移植継代腫瘍MH 134に対する抗腫瘍抗体を ^{131}I-で標識した標識抗腫瘍抗体は，腫瘍に選択的に結合することが以下の結果より明かとなつた.

(1) 標識抗体は腫瘍細胞と培養すると，24時間までは腫瘍細胞に特異的に吸着しており，その後48時間にかけて一部はずれ始める.

(2) 坦癌マウスに標識抗体を静注して24時間目と48時間目でマクロラジオオートグラフィーを行なうと，いづれも標識抗体は腫瘍に選択的に結合していた.

(3) 坦癌マウスで標識抗体を静注後24時間目と48時間目でシンチカメラ撮影を行なうと，24時間目においてのみ腫瘍は陽性に描画された.

以上の如く標識抗体は一定時間腫瘍細胞に選択的に結合するので，腫瘍の診断および治療に実用可能である.

（稿を終るにあたり，九州大学歯学部生化学教室尾上薫教授の有益な御助言に感謝いたします．なおこの研究は，文部省科学研究がん特別研究費の一部で行つた.）

文　献

1) Bale, W.F.: Research directed toward the use of ^{131}I-labeled fibrinogen and antibody to fibrin in the localization and treatment of tumors. In: Proceedings of the conference on the use of radioisotopes in animal biology and medical sciences. Mexico city. 2: 271—279. New York, Academic Press. 1961.
2) Bale, W.F. and Spar, I.L.: Studies directed toward the use of antibodies as carrier of radioactivity for therapy. In: Advances in biological and medical physics. Vol. 5, p. 285—356. New York, Academic Press. 1957.
3) Bale, W.F., Spar, I.L. and Goodland, R.L.: Experimental radiation therapy of tumors with ---I—carrying antibodies to fibrin. Cancer Res. 20 (1960), 1488—1494.
4) Campbell, D.H., Garvey, J.S., Cremer, N.E. and Sussdorf, D.H.: Isolation and purification of rabbit antibodies. In: Methods in Immunology. p. 114—129. New York and Amsterdam, W.A. Benjamin Inc. 1963.
5) Chang, S., Stockert, E., Boyse, E.A., Hammerling, U. and Old, L.J.: Spontaneous

release of cytotoxic alloantibody from viable cells sensitized in exess antibody. Immunol., 21 (1971), 829—838.

6) Cohen, A.M., Burdick, J.F. and Ketcham, A.S. : Current research rewiew: Tumor-specific cellular immunity. J. Surg. Res., 11 (1971), 421—431.

7) Day, E.D., Lassiter, S., Woodhall, B., Mahaley, J.L. and Mahaley, M.S.Jr.: The localization of radioantibodies in human brain tumors. I. Preliminary exploration. Cancer Res., 25 (1965), 773—778.

8) Day, E.D., Planinsek, J.A. and Pressman, D.: Localization In vivo of radioiodinated anti-rat fibrin antibodies and radioioinated rat fibrinogen in the murphy rat lymphosarcoma and in other transplantable tumors. J. Natl. Cancer Inst., 22 (1959), 413—426.

9) Dewey, W.C., Bale, W.F., Rose, R.G. and Marrack, D.: Localization of antibodies in human tumors. Acta Un. Int. Cancr., 19 (1963), 185—196.

10) Everson, T.C. and Cole, W.H.: Spontaneous regression of cancer. Preliminary report. Ann. Surg., 144 (1956), 366—380.

11) 久田欣一：核医学最近の進歩 8，腫瘍親和性性・RI探索のあゆみ，臨床科学. Vol. 8, No. 1. (1972), 66—78.

12) Hunter, W.M. and Greenwood, F.C.: Preparation of iodine ---I-labeled human growth hormone of high specific activity. Nature 194 (1962), 495—496.

13) Klein, G., Clifford, P., Klein, E., Smith, R.T., Minowada, J., Kourilsky, F.M. and Burchenal, J.H.: Membrane immunofluorescence reactions of Burkitt lymphomacells from specimens and tissue cultures. J. Natl. Cancer Inst., 39 (1967), 1027—1044.

14) Klein, G., Oettgen, H.F.: Immunologic factors involved in the growth of primary tumors in human or animal hosts. Cancer Res. 29 (1969), 1741—1746.

15) Koldovsky, P.: Tumor specific transplantation antigen. p. 34—36. Berlin-Heidelberg-New York, Springer Verlag. 1969.

16) Kono, A., Kojima, M., Maeda, T.: Tumor specific localizing agents for radioisotope image. M., Maeda, T.: Tumor specific localizing agents for radioisotope image. Radioisotopes 21, NO. 2 (1972), 118—120.

17) Korngold, L.: Serological techniques for the analysis of tumor antigens. In: Methods in Cancer Research. (Busch, H. ed.) New York, Academic Press. 1967.

18) 倉田邦夫：ラジオイムノアツセイ法（Ⅱ），放射性同位元素による標識. Radioisotopes 20. No. 9 (1971), 86—93.

19) Mahaley, M.S. Jr., Mahaley, J.L. and Day, E.D.: The localization of radioantibodies in human brain tumors. II. Radioautography. Cancer Res., 25 (1965), 779—793.

20) Makidono, R., Nomoto, K. and Takeya, K.: The role of immunologic capacity in the development of metastatic foci. In: Proceedings of the Japanese Cancer Association. (The 29 th annual meeting) p. 192. 1970.

21) Makidono, R., Nomoto, K. and Takeya, K.: The role of immunologic capacity in the development of metastatic foci. II. Analytical studies on each process in metastasis. In: Proceedings of the Japanese Cancer Association. (The 30 th annual meeting). p. 160 1971.

22) Marrack, D., Kubala, M., Corry, P., Leavens, M., Howze, J., Dewey, W., Bale, W.F. and Spar, I.L.: Localization of intracranial tumors. Comparative study with ^{131}I-labeled antibody to human fibrinogen and neohydrin-Hg. Cancer 20, NO. 5 (1967), 751—755.

23) 松沢大樹編：ラジオオートグラフ手技と応用，朝倉書店，1969.

24) Möller, E. and Möller, G.: Quantitative studies of the sensitivity of normal and neoplastic mouse cells to the cytotoxic action of isoantibodies. J. exp. Med., 115 (1962), 527—553.

25) Morton, D.L., Eilber, F.R. and Malmgren, R.A.: Immune factors in human cancer; Malignant melanomas, skeletal and soft tissue. Progr. Exp. Tumor Res., 14 (1971), 25—42.

26) Ouchterlony, Ö.: Handbook of immunodiffusion and immunoelectrophoresis. p. 21—31. Ann Arbor, Michigan, Ann Arbor science Publishers. 1968.

27) Quinones, J., Mizejewski, G. and Beierwaltes, W.H.: Choriocarcinoma scanning using radiolabeled antibody to chorionic gonadotrophin. J. Nucl. Med., 12, NO. 2 (1971), 69—75.

28) Sato, H., Belkin, M. and Essner, E.: Experiments on an ascites hepatoma. III. The conversion of mouse hepatomas into the ascites form. J. Natl. Cancer Inst., 17 (1956), 1—21.

29) Southam, C.M.: Evidence of immunological

reactions to autochthonous cancer in men. Europ. J. Cancer 1 (1965), 173—181.

30) Spar, I.L., Bale, W.F., Goodland, R.L., Casarett, G.W. and Michaelson, S.M.: Distribution of injected ---I-labeled antibody to dog fibrin in tumor-bearing dogs. Cancer Res., 20 (1960), 1501—1504.

31) Spar, I.L., Bale, W.F., Goodland, R.L. and Izzo, M.L.: Preparation of purified ^{131}I labeled antibody which reacts with human fibrin. Preliminary tracer studies in tumor patients. Cancer Res., 24 (1964), 286—292.

32) Spar, I.L., Bale, W.F., Marrack, D., Dewey, W.C., McCardie, R.J. and Haper, P.V.: Diagnostic studies and therapeutic trials with ---I-labeled antibodies to human fibrinogen. Cancer 20 (1967), 865—870.

33) Spar, I.L., Goodland, R.L. and Bale, W.F.: Localization of ^{131}I-labeled antibody to rat fibrin in transplantable rat lymphosarcoma. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 100 (1959), 259—262.

34) Vanky, F., Sternwärd, J., Klein, G. and Nilonne, U.: Serum-mediated inhibition of lymphocyte stimulation by autochthonous human tumors. J. Natl. Cancer Inst., 47 (1971), 95—103.

35) Williams, C.A. and Chase, M.W. ed.: Methods in Immunology and Immunochemistry. Vol. I, p. 318—319. New York, Academic Press. 1967.

36) Ibid.: Methods in Immunology and Immunochemistry. Vol. II, p. 156—162. New York, Academic Press. 1968.