

Title	マウスモノクローナル抗体ONS-M21の生体内分布とそのヒト型化抗体の画像診断への応用
Author(s)	大川, 元久
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.11501/3128964">https://doi.org/10.11501/3128964</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

①

# 主論文

マウスモノクローナル抗体ONS-M21の生体内分布と  
そのヒト型化抗体の画像診断への応用

The biodistribution of mouse monoclonal antibody  
ONS-M21 and the application for imaging diagnosis  
with its humanized antibody

大阪大学医学部脳神経外科

Department of neurosurgery, Osaka university medical school

大川元久  
Motohisa Ohkawa

(指導：早川 徹教授)

(平成9年1月27日受付)

The mouse monoclonal antibody ONS-M21 combines with medulloblastomas and several gliomas specifically. And also we had already produced its humanized antibody. This study investigated the *in vivo* biodistribution of ONS-M21 and the application for imaging diagnosis using its humanized antibody. The nude mice (BALB/c nu/nu) bearing human medulloblastoma ONS-76 cells subcutaneously were injected  $^{125}\text{I}$ -labeled ONS-M21 antibody via their tail vein. The radioactivities of their normal organs and the s.c. tumor were counted with  $\gamma$ -counter. And their autoradiograph (ARG) 6 hours after this administration was compared with gadolinium enhanced T1-weighted magnetic resonance image (Gd-T1-MRI). The brain tumor models transplanted ONS-76 cells stereotaxically was made by the nude rats (F344/N Jcl-rnu). And compared with MRI and ARG after the administration of  $^{125}\text{I}$ -labeled humanized antibody into these models. The ARG indicated the accumulation of  $^{125}\text{I}$ -labeled ONS-M21 in the tumors which was detected by Gd-T1-MRI study. In this study,  $^{125}\text{I}$ -labeled ONS-M21 remained in the tumor longer than the other normal organs. The mouse monoclonal antibody ONS-M21 have specific affinity for ONS-76 tumor *in vivo*. Then this humanized antibody is considerable to apply for the imaging diagnosis of the malignant brain tumors.

Key Words : medulloblastoma , monoclonal antibody, humanized antibody,  $^{125}\text{I}$ , biodistribution, autoradiograph (ARG)

## 緒言

髄芽腫は小児悪性脳腫瘍の中で神経膠腫について頻度の高い腫瘍であり、外科的手術に加え放射線療法、化学療法および免疫療法等で最近の治療成績は向上している<sup>1)</sup>。これまでに私達は、ヒト髄芽腫細胞株ONS-76を用いてマウスモノクローナル抗体ONS-M21を作製し<sup>2)</sup>、同抗体が*in vitro*で髄芽腫および神経膠腫等の脳腫瘍細胞に対し特

異性を有していることを明らかにした<sup>3)</sup>。また、その抗体のヒト型化にも成功している<sup>4)</sup>。

臨床において悪性脳腫瘍摘出後の残存腫瘍の正確な範囲を画像診断することは、以後の治療方針を決定する上で重要な要素であり<sup>5,6)</sup>、悪性脳腫瘍に特異的なモノクローナル抗体は、治療上非常に有用な手段となると考えられた。また悪性脳腫瘍の診断には、放射性同位元素で標識し

た画像診断法も広く用いられている<sup>15,18</sup>。本研究では、臨床応用への基礎研究として、この悪性脳腫瘍に特異性の高いONS-M21抗体を用いた画像診断の臨床応用の可能性を検討する目的で、ヌードマウスに<sup>125</sup>I標識ONS-M21抗体を投与しその生体内分布を調べると共に、ONS-76細胞を用いた皮下腫瘍モデルの全身オートラジオグラフを作製した。またヌードラットを用いた脳腫瘍モデルを作成し、<sup>125</sup>I標識ヒト型化抗体によるオートラジオグラフとmagnetic resonance image (MRI)を比較検討した。

#### 材料と方法

##### 1. 実験動物

SLC社から購入したヌードマウスBALB/c nu/nu 雌7~12週齢(17~23g)、および日本クレア社から購入したヌードラットF344/NJd-rnu 雌7~12週齢(180~250g)をそれぞれ用いた。

##### 2. 実験モデルの作製

$1 \times 10^6$ 個のヒト髄芽腫ONS-76細胞を0.1Mリン酸塩緩衝液(PBS:PH7.5) 250  $\mu$ lで希釈し、ヌードマウスおよびヌードラットの右側腹部皮下に移植した。その結果、皮下腫瘍径が1.2cmを超えたモデルを以下の実験に供した。また $5 \times 10^6$ 個のONS-76細胞を4  $\mu$ lの0.1Mリン酸塩緩衝液(PBS:PH7.5)に浮遊させ、ヌードラットの頭蓋内に、定位脳手術装置を用いて25Gのハミルトン針で移植した<sup>19,20</sup>。腫瘍形成の確認にMRIを用い、また同一部位の組織切片をHE染色にて病理組織診断した。

##### 3. モノクローナル抗体ONS-M21のヨード標識

モノクローナル抗体のヨード標識には、200  $\mu$ gのONS-M21抗体を0.1Mリン酸緩衝液(PB:PH7.5)100  $\mu$ lで溶解し、さらにNa<sup>125</sup>I(Amersham社) 1 mCi/10  $\mu$ lを加え、1mlクロロフォルムで溶解したIodogen(PIERCE社) 500  $\mu$ gを塗布した1.5mlエッペンドルフ管内に注入し、24℃恒温槽で10分間振盪反応させた<sup>21</sup>。次にPD-10カラム(Pharmacia社)を用いてゲル濾過を行い、蛋白質画分を $\gamma$ -カウンタ(Packard社製AUTO GAMMA 5000)で確認し回収した。Na<sup>125</sup>I標識ONS-M21の収率は、画像解析ソフトNIH imageで画分の放射能曲線下面積を用いて求めた。

##### 4. 標識抗体の生体内分布

22.5~37.5  $\mu$  Ci/gのNa<sup>125</sup>I標識ONS-M21抗体0.6~1.0mg/kgをマウス尾静脈より投与し、投与直後、4、6、12、24、72および168時間目に腹部大静脈から採血すると共に、肝臓、腎臓、心臓、肺、胃、腸管、脳および皮下

腫瘍を摘出し、それぞれの放射活性を $\gamma$ -カウンタで測定した。各実験系における測定結果は、投与全放射能に対する各試料内放射能の単位重量当たりの相対値(F値:% injected dose/g)で表現した。換算式は次の通りである。

$$F \text{ 値} = \frac{\text{試料中放射能}(\text{cpm}) / \text{試料重量}(\text{g})}{\text{投与全放射能}(\text{cpm})} \times 100$$

なお、甲状腺内へのヨード取り込みをブロックする目的で、Na<sup>125</sup>I標識抗体を投与する3日前より、実験期間を通じて0.2%ヨードカリウム水を各実験動物に自由に摂取させた<sup>22</sup>。

##### 5. オートラジオグラフおよびMRIとの比較

ヌードマウスおよびヌードラットの皮下腫瘍モデルに、Na<sup>125</sup>I標識ONS-M21抗体およびNa<sup>125</sup>I標識ヒト型化抗体を静脈内投与し、6時間後にエーテルにて吸入死させ液体窒素下で凍結保存した。その後4%カルボキシメチルセルロースに包埋し、マイナス20℃で凍結させ、マイクロトームを用いて厚さ40  $\mu$ mの全身切片を作製した。この全身切片をX線フィルムに24時間密着させてオートラジオグラフを作製した。また、ヌードラットを用いた皮下腫瘍モデルに関しては、Na<sup>125</sup>I標識ヒト型化抗体の投与前に、MRI装置(GE, CSI Omega II, 4.7T)で腹部のガドリニウム造影T1強調画像を作製した。

ヌードラットを用いた脳腫瘍モデルでは、ガドリニウム造影T1強調MRIを移植2週間目と3週間目に作製し腫瘍形成を確認した後、Na<sup>125</sup>I標識ヒト型化抗体を静脈内投与し、エーテル吸入死させた後脳を摘出し、厚さ40  $\mu$ mの凍結切片を5日間X線フィルムに密着させ脳のオートラジオグラフを作製した。

#### 結果

##### 1. 生体分布

血液中の放射活性の半減期は4~6時間であった。各組織の時間別放射能分布(F値)をFig.1に示す。また組織血液比(T/Bratio)をFig.2に示す。抗体の腫瘍への取り込みは、24時間後に血液中を除き一番高くなり、72時間後には生体内で最高値を示した。

##### 2. オートラジオグラフおよびMRIとの比較

ヌードマウスの皮下腫瘍モデルにNa<sup>125</sup>I標識ONS-M21抗体投与6時間後の全身切片像とオートラジオグラフをFig.4に示した。皮下腫瘍に一致する部位に放射活性の集積を認めた。

ヌードラットの皮下腫瘍モデルのMRIと、Na<sup>125</sup>I標識ヒト型化抗体の投与6時間後の全身オートラジオグラフを

Fig.5 に示した。T1 強調 MRI にてガドリニウムで造影される腫瘍を認めた。そして同部位に、全身オートラジオグラフで放射活性の集積を認めた。また肝臓、腎臓、胃および肺に高い集積を認めたが、これは各臓器内の血液量を反映している可能性が示唆された。また、これら臓器および皮下腫瘍の F 値を Fig.5-C に示した。

ヌードラットの頭蓋内に  $5 \times 10^6$  個の ONS-76 細胞を移植した 3 週間後のガドリニウム造影 T1 強調 MRI とその組織切片の HE 染色像を Fig.3 に示す。濃染する核を有した細胞質の乏しい細胞よりなる組織像を認めた (Fig.3-D)<sup>23</sup>。

脳腫瘍モデルのオートラジオグラフは、ガドリニウム造影 T1 強調 MRI に良く一致することが多かったが、MRI で腫瘍形成を確認できない症例でも、オートラジオグラフで描出できる症例があった (Fig.6)。

#### 考察

マウスモノクローナル ONS-M21 抗体が、免疫組織学的検索にて *in vitro* で正常組織細胞と交差しないことはすでに報告しているが、本研究でも同様に、*in vivo* 放射活性が組織血液比で 1.0 を超える正常臓器が無いことが証明された。このことは、各臓器の放射活性が血液中の  $\text{Na}^{125}\text{I}$  標識 ONS-M21 抗体と動的平衡状態であることを示唆している。 $\text{Na}^{125}\text{I}$  標識 ONS-M21 抗体が代謝分解にて脱ヨード化され、自由化した放射性ヨードの血漿蛋白への再結合率は全投与量の 1% に満たないと一般に報告されており<sup>22</sup>、各臓器への放射能分布に殆ど影響を与えないと考えられている。一方 Fig.2 に示す様に、投与 24 時間から 72 時間後に放射活性の腫瘍血液比は 1.0 を超えており、ONS-M21 抗体の抗原特異性は損なわれていないと考えられる。従って、ONS-M21 抗体は、生体内においても髄芽腫に強い親和性を有し、正常組織には全く交差しないと推定された。全身オートラジオグラフで肝臓、腎臓、胃および肺に放射活性の高い集積を認めるが、放射性ヨードの生体内投与 6 時間後では一般的に生じることである<sup>22</sup>。それ故、 $\text{Na}^{125}\text{I}$  標識 ONS-M21 抗体を投与してから腫瘍組織比が十分高値を示す時点でオートラジオグラフを作製すれば、より特異性の高い腫瘍描出が可能であると考えられる。

また、MRI で腫瘍形成を確認できない症例でも、ヒト型化抗体を用いたオートラジオグラフで放射活性の高い集積を認め、腫瘍の存在を示唆できる症例があった。このことより、ヒト型化抗体も生体内で髄芽腫に高い特異性を有していることが実証された。

モノクローナル抗体と放射性同位元素を用いた診断法

は、現在では広く臨床に応用されている<sup>15,18</sup>。本ヒト型化抗体は、ヒト悪性脳腫瘍の画像診断に応用できる可能性を有し、さらに単鎖抗体を用いれば描出効率がより一層向上できると思われる<sup>18</sup>。特に手術直後アーティファクが多い MRI より、術後残存腫瘍を特異的に描出できれば非常に有用な診断法となろう。モノクローナル抗体の中には、その抗原特異性だけでなく細胞内移行性や核内移行性を有するものがあり、診断および治療への応用が検討されている<sup>24,25</sup>。今後はこのような抗体特異性をも調べ、臨床応用への可能性を広く検討していく予定である。

#### 結論

1. マウスモノクローナル ONS-M21 抗体およびそのヒト型化抗体は生体内でも髄芽腫に高い特異性を示した。
2. ヒト型化抗体は、悪性脳腫瘍の画像診断への臨床応用の可能性が示唆された。

#### 謝辞

稿を終えるにあたり、始終御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜わり、また御稿閲を賜りました大阪大学医学部脳神経外科早川徹教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究遂行に際し、終始御懇切なる御指導を頂きました同脳神経外科清水恵司助教授ならびに日本シェーリング社研究部 鷲尾兼寿氏、高橋昌哉博士に深謝致します。

#### 文献

1. Abrahamson TG, Lange B, Packer R, Patronas N, Poplack D, Horowitz M: High dose cyclophosphamid GM-CSF with granulocyte macrophage colony stimulating factor in malignant brain tumors. *Med Ped Oncol* 201:381, 1992(abstr).
2. Antonio S, Andrea S, Giorgio P, Amerigo B: Successful adoptive immunotherapy with lymphokine-activated killer cells in the treatment of medulloblastoma disseminated via cerebrospinal fluid. *Neurosurgery* 34:1078-1080, 1994.
3. Becker WS, Behr TM, Cumme F, R 噴 sler W, Wendler J, Kern PM, Gramatzki M, Kalden JR, Goldenberg DM, Wolf FG:  $^{67}\text{Ga}$  citrate versus  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  labeled LL2-Fab(anti-CD22) fragments in the staging of B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Res* 55(23 Suppl):5771s-5773s, 1995.
4. Chin HW, Maruyama Y: Early response and long term results in the radiotherapy of childhood medulloblastoma. *J Neurooncol* 1:53-59, 1983.
5. Lefkowitz IB, Packer RJ, Siegel KR, Sutton LN, Shut L, Evans AE: Result of treatment of children with recurrent medulloblastoma/primitive neuroectodermal tumors with lomustine, cisplatin, and vincristine. *Cancer* 65:412-417,

- 1990.
6. Oddens EA, Shapiro WR: Brain tumors. *Cancer Chemo Biol Response Modif* 12:615-633, 1991.
  7. Okamoto Y, Shimizu K, Tamura K, Miyao Y, Yamada M, Tsuda N, Takimoto H, Hayakawa T, Mogami H: An adoptive immunotherapy of patients with medulloblastoma by lymphokine activated killer cells. *Acta Neurochir (Wien)* 94:47-52, 1988.
  8. Packer RJ: Chemotherapy for medulloblastoma/primitive neuroectodermal tumors of the posterior fossa. *Ann Neurol* 28:823-828, 1990.
  9. Tomlinson FH, Scheithauer BW, Meyer FB, Smithson WA, Shaw EG, Miller GM, Groover RV: Medulloblastoma I. Clinical, diagnostic, and therapeutic overview. *J Child Neurol* 7:142-155, 1992.
  10. Tamura K, Shimizu K, Yamada M, Okamoto Y, Matsui Y, Park KC, Mabuchi E, Moriuchi S, Mogami H: Expression of major histocompatibility complex on human medulloblastoma cells with neural differentiation. *Cancer Res* 49:5380-5384, 1989.
  11. Moriuchi S, Shimizu K, Miyao Y, Hayakawa T: Characterization of a new mouse monoclonal antibody (ONS M21) reactive with both medulloblastomas and gliomas. *Br J Cancer* 68:831-837, 1993.
  12. Ohtomo T, Tsuchiya M, Sato K, Shimizu K, Moriuchi S, Miyao Y, Akimoto T, Akamatsu K, Hayakawa T, Ohsugi Y: Humanization of mouse ONS-M21 antibody with the aid of hybrid variable regions. *Molec Immun* 32:407-416, 1995.
  13. Albert FK, Forsting M, Sartor K: Early postoperative magnetic resonance imaging after resection of malignant glioma: objective evaluation of residual tumor and its influence on regrowth and prognosis. *Neurosurgery* 34:45-61, 1994.
  14. Raimondi AJ, Tomita T: Medulloblastoma in childhood: Comparative result of partial and total resection. *Child's Brain* 5:310-328, 1979.
  15. Buchsbaum DJ: Experimental approaches to increase radiolabeled antibody localization in tumors. *Cancer Res* 55(23 Suppl):5279s-5732s, 1995.
  16. Larson SM: Improving the balance between treatment and diagnosis: A role for radioimmunodetection. *Cancer Res* 55(23 Suppl):5756s-5758s, 1995.
  17. Vriesendorp HM, Morton JD, Quadri SM: Review of five consecutive studies of radiolabeled immunoglobulin therapy in Hodgkin's disease. *Cancer Res* 55(23 Suppl):5888s-5892s, 1995.
  18. Behr T, Becker W, Hannappel E, Goldenberg DM, Wolf F: Targeting of liver metastases of colorectal cancer with IgG-F(ab)<sub>2</sub> and Fab' anti-carcinoembryonic antigen antibodies with <sup>99m</sup>Tc: The role of metabolism and kinetics. *Cancer Res* 55(23 Suppl):5777s-5785s, 1995.
  19. Kondziolka D, Lunsford LD, Claassen D, Maitz SPH, Flickinger JC: Radiobiology of radiosurgery. Part II. The rat C6 glioma model. *Neurosurgery* 31:280-288, 1992.
  20. Paxinos G, Watson C, Pennisi M, Topple A: Bregma, lambda and the interaural midpoint in stereotaxic surgery with rats of different sex, strain and weight. *J Neurosci Meth* 13:139-143, 1985.
  21. Haisma HJ, Hilgers J, Zurawski VR: Iodination of monoclonal antibodies for diagnosis and radiotherapy using a convenient one vial method. *J Nucl Med* 27:1890-1895, 1986.
  22. Momose Y, Nishigaki J, Shigenatsu A: Fate of <sup>125</sup>I-labeled compounds in rat intravenous injection (I): Metabolic fate of sodium <sup>125</sup>I-iodine. *薬物動態* 8:457-469, 1993.
  23. Zülch KJ: Histological typing of tumours of central nervous system. Geneva, World Health Organization, 1979.
  24. Vijaykumar V, Topp EM: Diffusion of an anti-transferrin receptor antibody in cultured murine melanoma cell layers. *Pharm-Res* 12:1907-1916, 1995.
  25. de Boer HC, Preissner KT, Bouma BN, de Groot PG: Internalization of vitronectin-thrombin-antithrombin complex by endothelial cells leads to deposition of the complex into the subendothelial matrix. *J Biol Chem* 270:30733-30740, 1995.

#### 抄録

マウスモノクローナル ONS-M2 抗体は、ヒト髄芽腫細胞株 ONS-76 をマウスに免疫して作製したもので、髄芽腫及び神経膠腫に親和性が高く、そのヒト型化抗体も作製した事はすでに報告している。本研究では、ヌードマウスに <sup>125</sup>I 標識 ONS-M2 抗体を投与し、その生体内分布を調べると共に、皮下腫瘍モデルの全身オートラジオグラフを作製した。またヌードラットを用いた脳腫瘍モデルに <sup>125</sup>I 標識ヒト型

化抗体を投与したオートラジオグラフを作製し MRI と比較検討した。本モノクローナル抗体は、生体内でも髄z芽腫に高い親和性を示し、そのヒト型化抗体も同様であった。それ故に、ヒト悪性脳腫瘍の画像診断に、本ヒト型化抗体が非常に有用である可能性が示唆された。

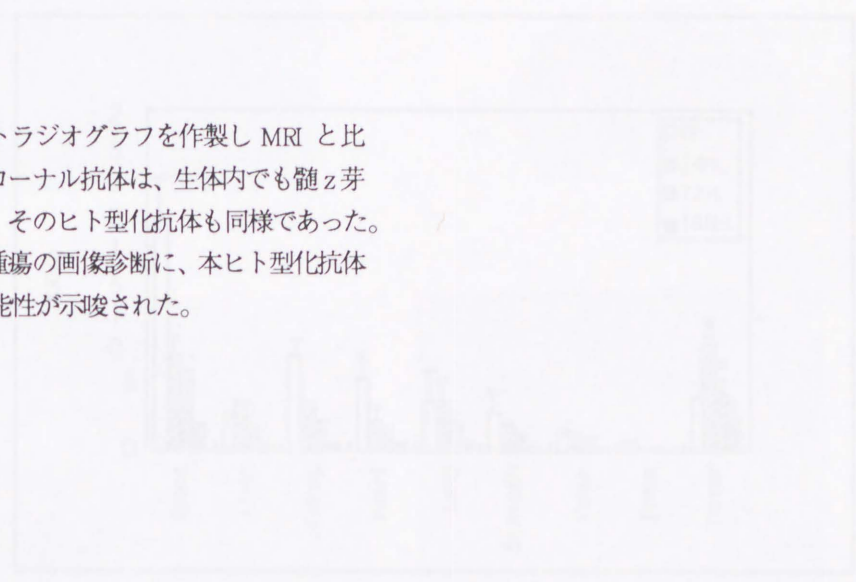


Figure 1. The distribution of <sup>125</sup>I-labeled anti-PC007 antibody in various brain regions. The radioactivity was measured by a gamma counter. The cerebellum and brainstem showed the highest radioactivity. The radioactivity in the frontal cortex, parietal cortex, occipital cortex, temporal cortex, substantia nigra, hypothalamus, pituitary gland, optic chiasm, trigeminal ganglion, and spinal cord was significantly lower than that in the cerebellum and brainstem (P < 0.05).



Figure 2. The distribution of <sup>125</sup>I-labeled anti-PC007 antibody in various brain regions. The radioactivity was measured by a gamma counter. The cerebellum and brainstem showed the highest radioactivity. The radioactivity in the frontal cortex, parietal cortex, occipital cortex, temporal cortex, substantia nigra, hypothalamus, pituitary gland, optic chiasm, trigeminal ganglion, and spinal cord was significantly lower than that in the cerebellum and brainstem (P < 0.05).

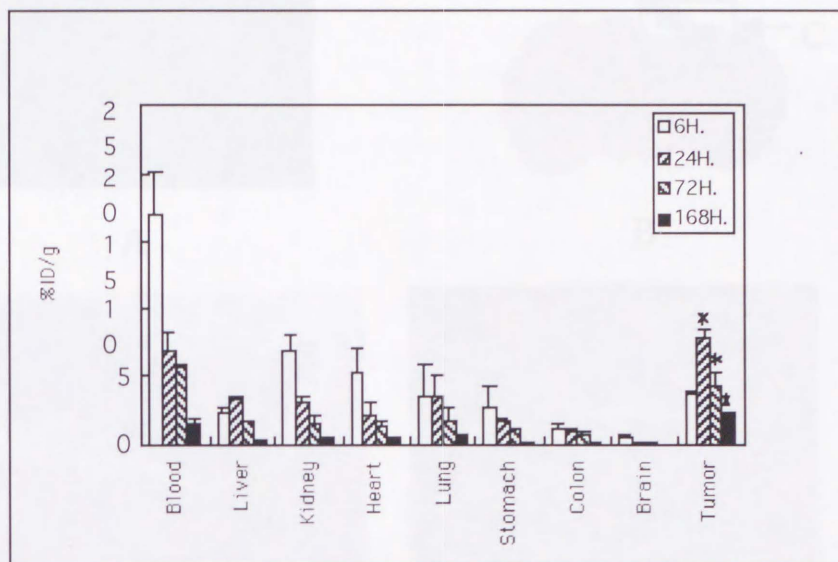


Figure 1. The biodistribution of  $^{125}\text{I}$  labeled mouse monoclonal antibody ONS-M21 at 6hr ( $\square$ ), 24hr ( $\square$  with diagonal lines), 72hr ( $\square$  with cross-hatch) and 168hr ( $\blacksquare$ ) after injection in nude mice bearing the subcutaneous ONS-76 tumor at right flank. In the tumor  $^{125}\text{I}$  labeled ONS-M21 was remained longer than other tissues. % ID/g : % injected dose/g. The vertical bars indicate the standard error of mean ( $P < 0.01$ ). \*: not significant ( $n=3$ )

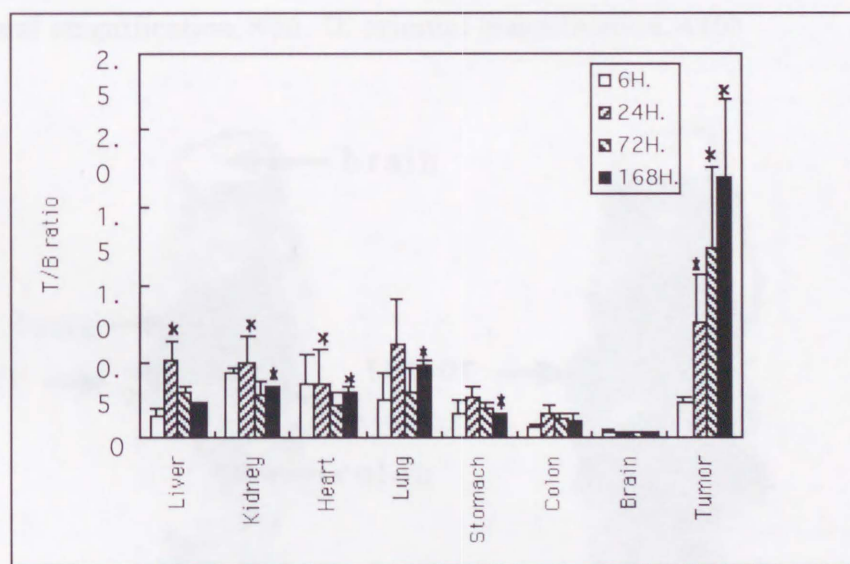


Figure 2. The comparison of tissue to blood ratio of radioactivity at 6hr ( $\square$ ), 24hr ( $\square$  with diagonal lines), 72hr ( $\square$  with cross-hatch), and 168hr ( $\blacksquare$ ) after injection of  $^{125}\text{I}$  labeled mouse monoclonal antibody ONS-M21 in nude mice bearing the subcutaneous ONS-76 tumor at right flank. The tumor indicates over 1.0 between 24hr and 72hr.

The vertical bars indicate the standard error of mean ( $P < 0.01$ ).

\*: not significant ( $n=3$ )

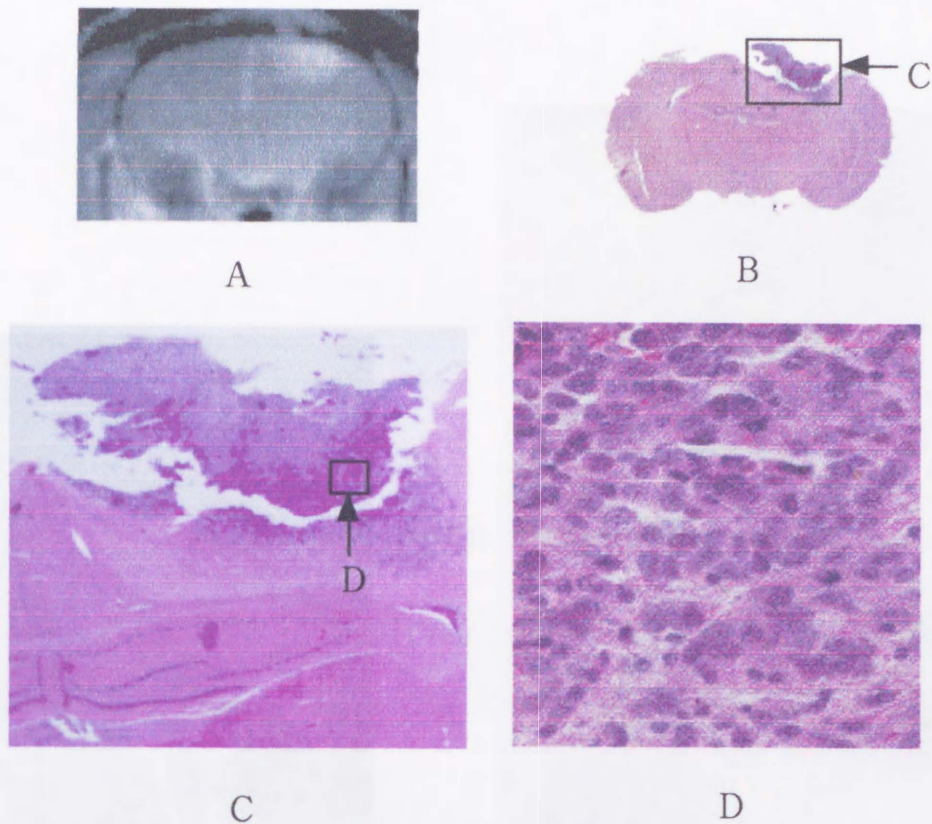


Figure 3. T1-weighted magnetic resonance image(MRI) and histological images of slice of brain in nude rat. A: 3weeks after transplantation the tumor is enhanced with gadolinium DTPA in T1-weighted MRI. B-D: The histological images of hematoxylin and eosin stain shows typical findings of medulloblastoma. C: original magnification,  $\times 20$  , D: original magnification,  $\times 400$

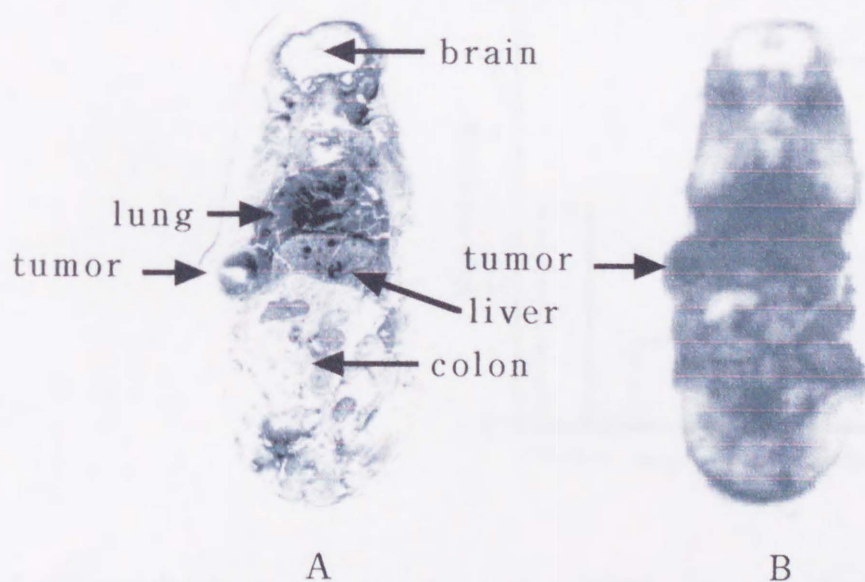
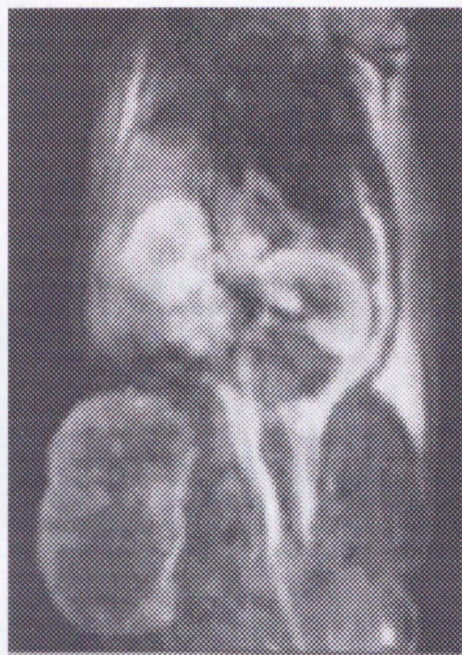
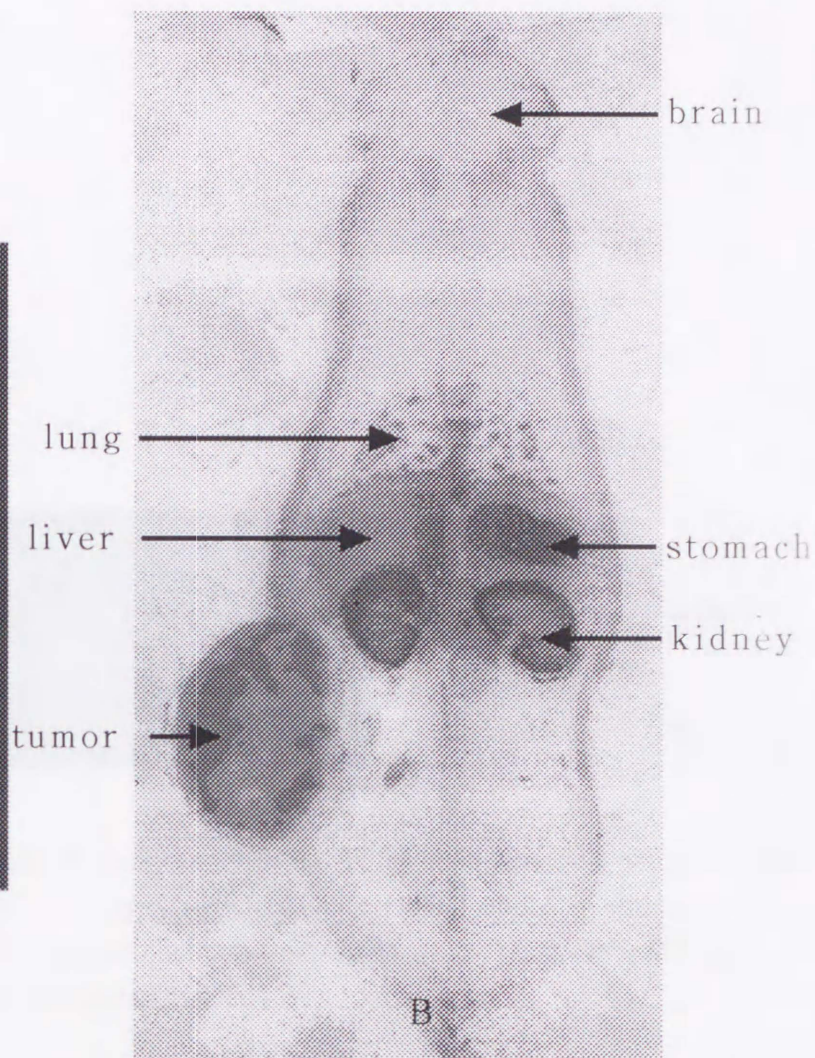


Figure 4. Photograph and autoradiograph of slice of whole body, 6hr after injection of  $^{125}\text{I}$  labeled mouse monoclonal antibody ONS-M21 in nude mouse bearing the subcutaneous ONS-76 tumor at right flank. The tumor shows accumulation of  $^{125}\text{I}$  labeled ONS-M21.

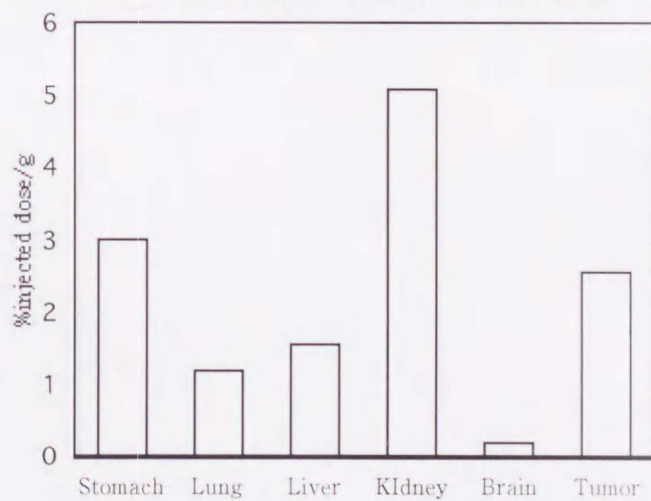




A



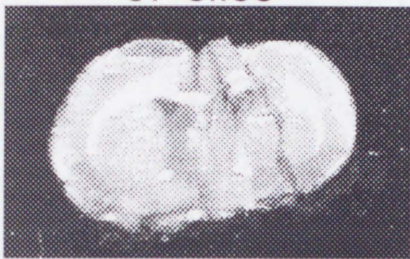
B



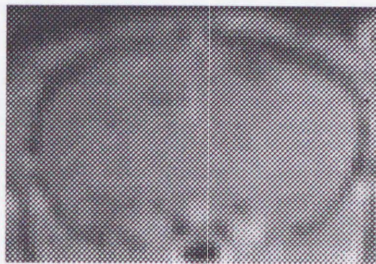
C

Figure 5. T1-weighted magnetic resonance image(MRI) and autoradiographic image of slice of whole body, 6hr after injection of  $^{125}\text{I}$ - labeled humanized monoclonal antibody ONS-M21 in nude rat bearing the subcutaneous ONS-76 tumor at right flank. The graph shows distribution of  $^{125}\text{I}$  labeled humanized antibody of ONS-M21 in another rat on the same conditions. The tumor is enhanced with gadolinium DTPA and shows accumulation of  $^{125}\text{I}$  labeled humanized antibody in autoradiographic image.

Photograph  
of slice



Gd-T1-MRI



ARG



Figure 6. Comparison of the photographs of slice, gadolinium DTPA enhanced T1-weighted MR images (Gd-T1-MRI), and autoradiographic images(ARG) of brain tumor model in nude rat. 6hr after injection of  $^{125}\text{I}$  labeled humanized monoclonal antibody ONS-M21( $^{125}\text{I}$ -h-ONS-M21), 2 weeks after transplantation of brain tumor cells(ONS-76).

ARG

Gd-T1-MRI

Photograph

of slice



Figure 1. Comparison of the brain slice of slice position 141.55 (top) and T1-weighted MRI image (left) and gadolinium-enhanced T1-weighted MRI image (middle) and photograph of brain slice (right) in slice position 141.55. The slice position of 141.55 is indicated by the arrow in the photograph of brain slice.