

Studies on the Hepatic Uptake of In-111 Labeled Monoclonal Antibodies and the Method to Reduce the Hepatic Uptake

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8185

In-111 標識モノクローナル抗体の肝摂取および その低減に関する実験的研究

金沢大学医学部核医学講座 (主任: 久田欣一教授)

絹 谷 清 剛

(平成2年2月6日受付)

Indium (In)-111 標識モノクローナル抗体 (monoclonal antibody, MoAb) による免疫シンチグラフィ (radioimmunoscintigraphy, RIS) の問題点である肝放射能集積持続の機序解明を目的に, In-111 MoAb の肝細胞内放射能分布を検討すると同時に, 肝放射能低減の検討を行った. 正常ラットに In-111 225.28 S (抗メラノーマ MoAb), 1.48MBq/10 μ g を投与したところ, 肝放射能は MoAb 投与24時間後に約1%ID/g に達した後はほぼ一定の値を示した. 肝組織を0.25Mシヨ糖加0.01Mトリス塩酸緩衝液 (pH7.6) でホモジネートした後, 3段階の遠心操作を行い, 核分画, リソゾームを含むミトコンドリア分画, ミクロゾーム分画, 上清分画の4分画を得て肝内放射能分布を検討した. 放射能は早期には主に上清中に存在したが (61%, 3hr), 経時的に減少し (21%, 72hr), 代わってリソゾームを含むミトコンドリア分画の放射能が増加した (11%→44%). 上清分画をゲル濾過高速液体クロマトグラフィーにより分析したところ, MoAb 投与後早期には放射能は主に IgG に相当する分子量分画に溶出されたが, 遅い時間には放射能は IgG より小分子量の分画へ移行した. I-125 225.28 S では肝細胞内放射能分布に経時的変化は認められず, リソゾームを含むミトコンドリア分画の放射能は何れの時間においても常に低値を示した. 大腸癌移植ヌードマウスに In-111 ZCE025 (抗 CEA MoAb), 0.37MBq/5 μ g を投与し, 0.25Mシヨ糖による4段階の遠心操作を行い, より精度良くリソゾーム分画を分離して肝細胞内分布を検討したところ, MoAb 投与後早期に主に上清中に認めた放射能は経時的に減少し (52%, 3hr→20%, 144hr), リソゾーム分画の放射能が代わって増加した (16%→29%). 腫瘍細胞内放射能分布には経時的変化は認められず, リソゾーム分画の放射能は何れの時間でも低値を示した. 従って, 腫瘍における放射能貯留は肝とは異なる機序に基づくものであると考えられた. In-111 ZCE025 投与48時間前に Fe³⁺ 4mg を投与した場合, 肝放射能は抗体投与24時間後において, Fe 非投与群の13%ID/g から Fe 投与群の8%ID/g と約60%に減少した. 一方, 腫瘍への放射能集積に変化は認められなかった. さらに, Fe 投与群では, 肝細胞内リソゾーム分画の放射能が Fe 非投与群に比べ減少し, 常に一定の値を示した (13-15%). 肝放射能は, Fe を2mg 投与の場合でも, 0.5mg を MoAb 投与前日まで4日間連続投与した場合でも同程度に減少した. Fe 投与と MoAb 投与の間隔を48時間より短くした場合でも, 肝放射能は同程度に減少したが, 肝以外の臓器の放射能が増加する傾向を示した. 以上の結果より, In-111 MoAb 投与時に問題となる持続性の, 高い肝放射能集積は, 肝細胞内で diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) から解離した In-111 がリソゾーム分画に貯留することが要因と考えられた. In-111 MoAb 投与の約48時間前に Fe を投与するとにより, 腫瘍への放射能集積を低下させることなく, また他の臓器の放射能を増加させず, 肝放射能のみを低減しうることが示された. 従って, Fe 前投与法により肝内および肝周囲病変の検出率の向上が大いに期待し得る.

Key words In-111 labeled monoclonal antibody, hepatic uptake, subcellular distribution, lysosome, Fe pre-load

Abbreviations: DTPA, diethylenetriaminepentaacetic acid; GF-HPLC, gel filtration high performance liquid chromatography; In, indium; In-Tf, indium-transferrin complex;

癌組織に対して特異性の高いモノクローナル抗体 (monoclonal antibody, MoAb) を放射性核種で標識し体内に投与することにより、癌の局在診断法 (radioimmunosciintigraphy, RIS) が試みられている。従来の X 線写真, CT, 超音波, さらに最近普及が進む MRI が、あくまで癌の形態に基づく診断であるのに対し, RIS は癌の質的診断としての優位性をあわせ持っている。また、この方法は、癌の治療 (radioimmunotherapy, RIT) にも応用可能な特徴をもっているために、一層その優位性が期待されている。

RIS に用いる放射性核種として、標識方法が古くから確立されていること、 γ 線のみならず β 線も放出するため RIT にも応用しうることから、従来より Iodine (I)-131 が多く用いられてきた¹⁷⁻¹⁹。しかし、① 364 KeV のエネルギーがガンマカメラによるイメージングに望ましくないこと、②体内での脱ヨード化現象によるトレーサの不安定性、③RIS として用いる場合 β 線による被爆が大きい等の欠点が指摘されてきた²⁰。

最近では二官能基性キレート剤を用いた RI 標識法の発達⁷⁻¹⁰により、Indium (In)-111 等の金属性核種が使用されることが多くなってきた¹¹⁻¹³。金属性核種は、ヨードと異なり MoAb に直接結合させることができないために、MoAb との間にキレート剤を挿入しておく必要がある。キレート剤として DTPA (diethylenetriaminepentaacetic acid) を用いる標識法が主流であり、DTPA 結合 MoAb を作製しておけば塩化インジウム (In-111) を混合するだけで標識が完了する。従って、簡便でかつ無菌的に、用時調整可能なキット化が可能である。In-111 の利点として、ガンマカメラによる検出に望ましいエネルギー (171KeV, 245KeV) であることに加え、 β 線による被爆がないことがあげられる²⁰。また、ヨード標識 MoAb に比べ、In-111 と MoAb の結合は体内においてより安定である²¹ため、ヨード標識 MoAb ではイメージングできない腫瘍に対しても良好な画像を得ることができる。さらに、RIT 目的には、同じ金属性核種である Yttrium (Y)-90 を同様の標識法で標識可能である¹⁹。従って、I-131 に代わる優れた標識用核種として In-111 MoAb による RIS の臨床応用が進められてきた。

しかし、In-111 MoAb は、肝摂取が高いために、肝内病巣および肝周囲の腹部病巣や肺底部の病巣の検出

が困難であることが臨床応用に際して大きな問題点として注目されるようになってきた¹⁴⁻¹⁹。これは、動物実験等の基礎的検討からもある程度予想された結果であり、打開策として現在様々の方法で肝への集積を低下させる方法が基礎的並びに臨床的に試みられている。しかし、In-111 MoAb の肝への非特異的な集積並びに肝での貯留に関する機序が何等明らかにされていない。わずかに高い肝摂取は、肝細胞による放射能の取り込みに由来することが示されている程度であり²⁰⁻²⁴、In-111 MoAb 投与時の肝放射能持続の原因を細胞レベルまで詳細に検討した報告は、現在まで見られない。

そこで、In-111 MoAb の肝内摂取機序の解明こそが肝放射能低減の理論的な解決法の指針であると考え、In-111 MoAb の肝細胞内放射能分布、さらに細胞内での In-111 の存在様式について検討を試みた。また、肝細胞内放射能分布および、肝細胞内放射能分布と腫瘍細胞内放射能分布の相違等得られた知見に基づき、In-111 MoAb 投与に先立ち Fe を投与することで、肝放射能を低減し得るか否かを試みた。

材料および方法

1. 正常ラットによる検討

1. 実験動物

正常雄ドンリュウラット, 200-250g を用いた。

2. モノクローナル抗体および In-111 標識法

MoAb は、分子量24万の悪性黒色腫関連糖蛋白抗原 (gp240) を認識する抗ヒトメラノーマ MoAb 225.28 S (マウス IgG_{2a}) (Hybritech, 米国) である²⁵。本 MoAb は、DTPA 結合 MoAb の形でキット化供給されたものであり、放射性核種標識は、塩化インジウム (In-111, 74MBq/ml) (日本メジフィジックス, 宝塚) 1ml を標識用緩衝液 (0.26Mクエン酸緩衝液, pH 1.5) 1ml に混合し、これに DTPA 結合 MoAb 溶液 (1mg/2ml) 2ml を加え室温で30分インキュベートした後、中和緩衝液 (DTPA 加0.26Mクエン酸緩衝液, pH 8.5) 4ml を加え反応を停止することにより完了する。

3. 標識抗体の検討

In-111 標識後、シリカゲル薄層クロマトグラフィ (thin layer chromatography, TLC) (DC-Plastikfolien Kieselgel 60 F₂₅₄) (Merck, 西ドイツ) およびパークロマトグラフィ (2×40cm, 東洋濾紙, 東京) で

約0.1 μ gのMoAbをスポットした後、標識率、水酸化インジウム(コロイド)の混入の有無を検討した。TLCは、10%ギ酸アンモニウム、メタノール、0.5Mクエン酸を2:2:1で混合した溶液(pH 2.2)で展開した¹⁰⁾。ペーパークロマトグラフィは、0.15M塩化ナトリウム溶液で展開した。いずれも、展開後乾燥させた後、TLCスキャナーJTC-501(アロカ、東京)で放射能分布を測定した。

4. 実験方法

1) 生体内分布

In-111 225.28 S 1.48MBq/10 μ gをラット尾静脈より静注し、3, 8, 17, 24, 48, 72時間後に屠殺した(n=4-7)。血液、肝の湿重量および放射能を測定し、全投与量に対する各臓器1g当たりの放射能の分布割合(%ID/g)を求めた。また各個体毎の投与量のばらつきは、注射前後のシリンジの重量測定によって補正した。放射能は、オートウエル型ガンマカウンターARC301(アロカ)で測定した。

2) 肝細胞内放射能分布の測定

肝の一部を切離しその重量の10倍量の0.25Mショ糖加0.01Mトリス塩酸緩衝液(pH 7.6)を加えて、ポッター型ホモジナイザー(井内盛栄堂、大阪)でホモジネートしガーゼで濾過した後、冷却遠心器KR-20000(久保田、東京)および超遠心器L5-50B(Beckman、米国)を用い3段階の遠心操作(2,000rpm \times 15min \rightarrow 5,000g \times 15min \rightarrow 105,000g \times 60min)を行った(図1)。肝の自己融解による変化を防ぐため、一連の操作は4

°Cの冷室にて行った。これらの遠心操作により順に核分画、リソゾームを含むミトコンドリア分画、ミクロゾーム分画、上清分画に分離して各々の分画に含まれる放射能を測定した(図1)²⁰⁾。

3) 細胞内放射能存在様式の検討

細胞内での放射能の存在様式を検討するために上清分画をゲル濾過高速液体クロマトグラフィ(gel filtration high performance liquid chromatography, GF-HPLC)により分析した。上清100 μ lをTSKgel G3000SWXL(トース、東京)装着HPLC装置LC-6A(島津、東京)に添加し、0.1Mリン酸緩衝液(pH 7.4)を用いて、室温で1ml/minの流速で溶出した。溶出された放射能を測定し、クロマトグラムを得た。

5. ヨード標識抗体との比較

In-111 MoAbとヨード標識MoAbの肝細胞内放射能分布および放射能存在様式の相違を比較するために、おなじMoAbをクロラミンT法²¹⁾でI-125標識し、4と同様の検討を行った。1mgの225.28 Sに、ヨウ化ナトリウム(I-125)(Amersham、英国)37MBqを混和し、20 μ gのクロラミンT(半井、京都)を添加後、2分間室温で反応させた。ゲル濾過カラムPD-10(Pharmacia、スウェーデン)用い、未反応のI-125を除き実験に用いた。標識率は92%であった。I-125 225.28 S投与17, 48, 72時間後に屠殺した(n=3-4)。

II. 担瘤ヌードマウスによる検討

1. ヒトメラノーマ移植ヌードマウスによる検討

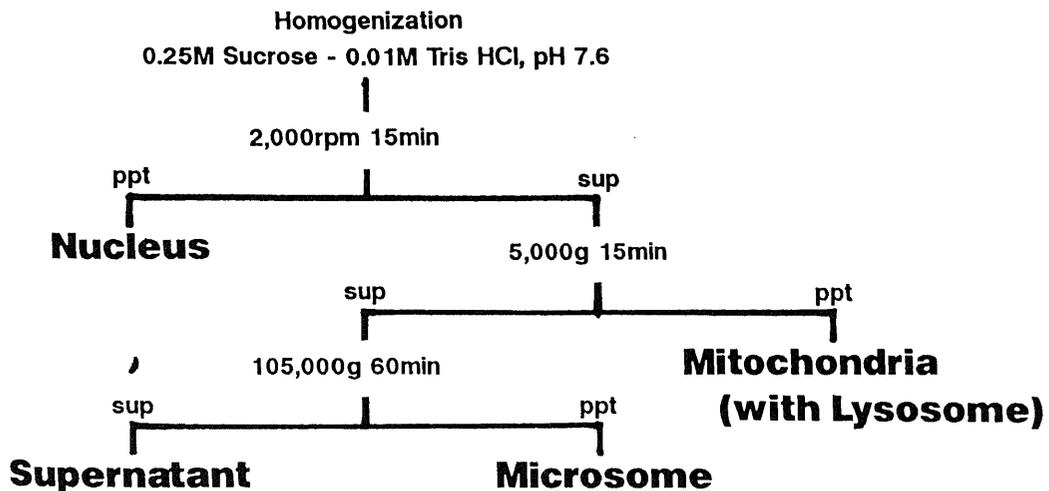


Fig. 1. Three steps subcellular fractionation. Fractionation was carried out at 4°C. Fractions were assessed for radioactivity in a well-type scintillation counter. The lysosome was co-fractionated with the mitochondrial fraction in this method.

1) 動物モデル

SK-14 ヒトメラノーマを移植した4-6週令の雌BALB/cヌードマウスを用いた。ヒトメラノーマ樹立継代株SK-14は、金沢大学医学部皮膚科広根孝衛教授、中村聡先生の御好意により提供を受けた。

2) モノクローナル抗体

I. 2. と同様に作製した In-111 225.28 S, 0.37 MBq/5 μ g を尾静脈より静注した。

3) 実験方法

i. 生体内分布の測定

抗体投与6, 17, 24, 48, 120時間後で屠殺し、血

液、腫瘍、肝、脾、腎、骨、筋を得て、各臓器の放射能分布を%ID/gとして求めた(n=4-7)。

ii. 肝および腫瘍細胞内放射能分布の測定

正常ラットにおける検討と同様に3段階の遠心操作を行い、肝および腫瘍組織における各々の細胞分画中の放射能を求めた。

2. ヒト大腸癌移植ヌードマウスによる検討

1) モノクローナル抗体

抗CEA MoAb, ZCE025 (マウス IgG₁) (Hybritech) を用いた²⁸⁾。本 MoAb も225.28 Sと同様にDTPA 結合 MoAb の形でキット化されており、

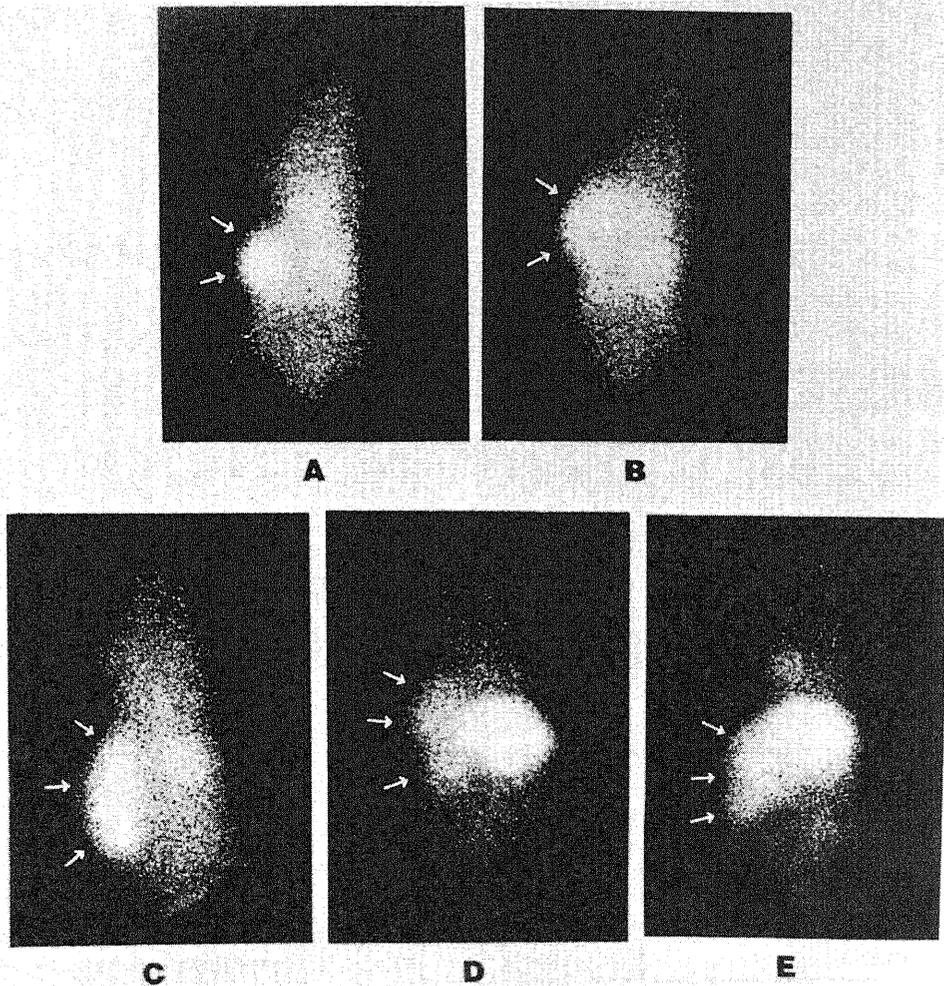


Fig. 2. Posterior scintigrams of tumor-bearing mice obtained 3 days after administration of In-111 labeled ZCE025 (3.7 MBq/50 μ g). Arrows show the radioactivity in the tumors. A, OSS colon cancer; B, SSS colon cancer; C, SCC colon cancer; D, YSC colon cancer; E, YSC (LN) colon cancer. High hepatic activities are noted in all the mice.

In-111 による放射性核種標識は、225.28 S と同様の操作で行った。

2) 動物モデルとその選択法

雌 BALB/c ノドーマウス、4-6 週令を用いた。以下の検討に先立ち、最も腫瘍集積性の良好な腫瘍モデルを選択する目的で OSS, SCC, SSS, YSC, YSC (LN) の5つのヒト大腸癌株をノドーマウス大腿部皮下に移植し、In-111 ZCE025 3.7MBq/50 μ g を静注し経時的なイメージングをシンチレーションカメラ Sigma414 (Aloka, 米国) を用いて行った。イメージングによる視覚的判定の結果、OSS への腫瘍集積が最も良好であったため、この細胞株を以下の検討に用いた (図2)。上記5種の細胞株は、金沢大学医学部がん研究所付属病院外科高橋豊、太田英樹両先生の御好意により提供を受けた。

3) In-114m との二核種同時投与による検討

In-111 MoAb の体内挙動と MoAb から遊離したインジウムイオンの体内挙動の比較のため、In-111 ZCE025 (0.37MBq/5 μ g) と塩化インジウム (In-114m) (0.37MBq) (Du Pont, 米国) を同時投与し

た。この抗体溶液には過剰の DTPA が標識の安定化のために含まれている。そこで In-114m 溶液の混合に先立ち、DTPA と In-114m の結合を防ぐために、抗体溶液を遠心濾過 (Centricon 30, 2,000g \times 20min) (Amicon, 米国) し、DTPA を除去すると同時に、In-114m のコロイド形成を防ぐために、溶液を0.15M クエン酸緩衝液 (pH 5) に置換した。

4) 投与液の検討

投与液中の In-114m DTPA および水酸化インジウム In (OH)₃ の有無を、I. 3. と同じ方法で TLC およびペーパークロマトグラフィで評価した。

5) 実験方法

i. In-111 および In-114m の放射能の分離測定法

In-111 および In-114m の放射能は、各々の核種の物理的半減期の差 (In-111, $T_{1/2} = 2.83$ 日; In-114m, $T_{1/2} = 49.51$ 日) により分離測定した。屠殺直後の放射能 (A) および In-111 が減衰しその放射能がほぼ無視しうる約一ヶ月後の放射能 (B) を、採取した各々のサンプルについて測定した。測定は、150KeV-250KeV に γ 線エネルギー範囲を設定した。次式のごとく、

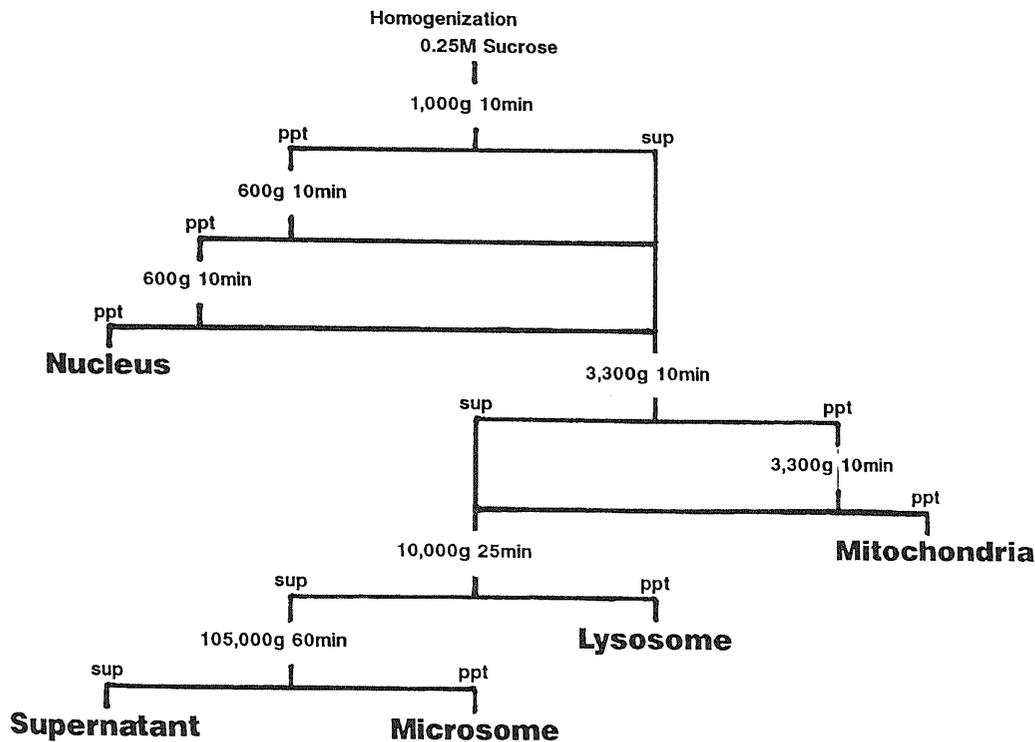


Fig. 3. Four steps subcellular fractionation. Fractionation was carried out at 4°C. Fractions were assessed for radioactivity in a well-type scintillation counter. The lysosomal fraction was isolated from the mitochondrial fraction in this method.

In-111 および In-114m の放射能を算出した。

$$\text{In-111 の放射能} = (A) - (B) \times 2^{t/49.51}$$

t は、(A) 測定後から (B) 測定までの日数

$$\text{In-114m の放射能} = (B)$$

なお、この方法で In-111 と In-114m の放射能の分離算出が可能であることを、In-111 と In-114m の単独溶液および混合溶液の放射能を測定することにより、予め確認した。

ii. 生体内分布の測定

In-111 ZCE025 と In-114m の混合溶液を投与 3, 24, 48, 120 時間後で屠殺し、血液、腫瘍、肝、脾、腎、骨、筋、腸管を採取し、In-111 ZCE025 および In-114m の生体内分布を %ID/g として評価した (n=6-10)。

iii. 肝および腫瘍細胞内放射能分布の測定

遠心操作をさらに一段階追加することによって、リソゾーム分画をより精度良く分離する方法を用いた。肝および腫瘍細片をその 3 倍量の 0.25M ショ糖溶液でホモジネートした後、4 段階の遠心操作 (600g × 10min → 3,300g × 10min → 10,000g × 25min → 105,000g × 60min) を行い、最終的に核分画、ミトコンドリア分画、リソゾーム分画、ミクロゾーム分画、上清の 5 分画を得て各々の分画中の In-111 および In-114m の放射能を求めた (図 3)²⁰。

III. Fe 前投与による In-111 MoAb の体内分布および細胞内分布の変化の検討

1. ヒトメラノーマ移植ヌードマウスによる検討

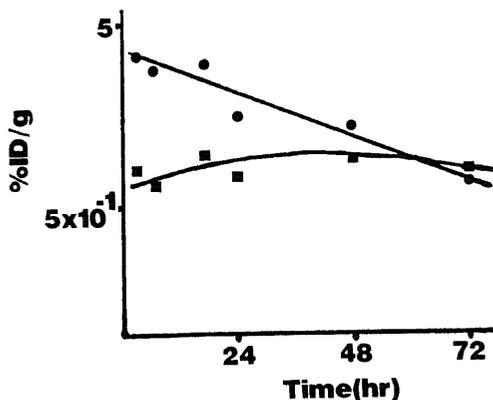


Fig. 4. Time course of radioactivities of the blood (●) and liver (■) in normal rats injected IV with In-111 labeled monoclonal antibody 225.28S. The data in this figure were expressed as the mean values for 4-7 rats at each time point.

Fe³⁺ 4mg (フェジン) (吉富製薬, 大阪) 静注24時間後に In-111 225.28S を投与した。MoAb 投与24時間後に屠殺し、放射能の生体内分布、肝および腫瘍細胞内放射能分布を I. 4. の方法で評価し、Fe 前投与の影響を検討した。

2. ヒト大腸癌移植ヌードマウスによる検討

1) Fe 投与群における放射能の生体内分布および細胞内分布の経時的变化の検討

In-111 ZCE025 および In-114m の混合溶液投与48時間前に、Fe 4mg を静注した。抗体投与 3, 24, 48, 120 時間後に屠殺し、In-111 および In-114m の生体内分布、肝および腫瘍細胞内放射能分布を II. 2. 5) の方法で検討した (n=7-10)。

2) Fe 投与量投与方法の検討

ヒト大腸癌移植ヌードマウスを Fe 4mg 投与群 (n=10)、Fe 2mg 投与群 (n=2)、抗体投与前日までの 4 日間連続 Fe 0.5mg 投与群 (n=2) の 3 群に分け、Fe 投与48時間後に In-111 ZCE025 を投与し、さらに24時間後に解剖し、生体内分布、肝細胞内および腫瘍細胞内放射能分布を Fe 非投与群と比較した。

3) Fe 投与時間の検討

正常ヌードマウスを用いて、4mg の Fe を抗体投与の 6 時間前あるいは30分前に投与し、48時間前に投与した対照群と生体内分布、肝細胞内放射能分布を比較した。

成 績

I. 正常ラットによる検討

1. 標識抗体の検討

用いた TLC は、MoAb 結合の In-111 (Rf=0)、In-111-DTPA (Rf=0.5)、遊離 In-111 (Rf=0.9) に分離可能であり、抗体225.28S への In-111 標識率は 84.7% であった。非 MoAb 結合 In-111 は In-111-DTPA の形態であり、遊離形の In-111 は認められなかった。また、ペーパークロマトグラフィの結果もほぼ同様で、溶液中に水酸化インジウム(コロイド)の形成は認められなかった。

2. 生体内分布

In-111 225.28S 投与後24時間まで肝放射能は経時的に上昇し、24時間後に約 1%ID/g に達した後ほぼ一定の数値を示した。一方、血液の放射能は経時的に減少した (図 4)。

3. 肝細胞内放射能分布

投与 3-8 時間後の早期には、放射能は主に上清分画中に認められた。8 時間後以降ではこの放射能は経時的に減少し、代わってリソゾームを含むミトコンド

リア分画中の放射能が経時的に増加した。一方、核分画、ミクロソーム分画中の放射能に経時変化はほとんど認められずほぼ一定の分布を示した。この傾向は、生体内分布における肝摂取がほぼ一定になった24

時間後も持続した(図5)。

4. 肝細胞内放射能存在様式の検討

上清中の放射能を GF-HPLC により分析した結果、MoAb 投与 3 時間後では、放射能の大部分が保持時間

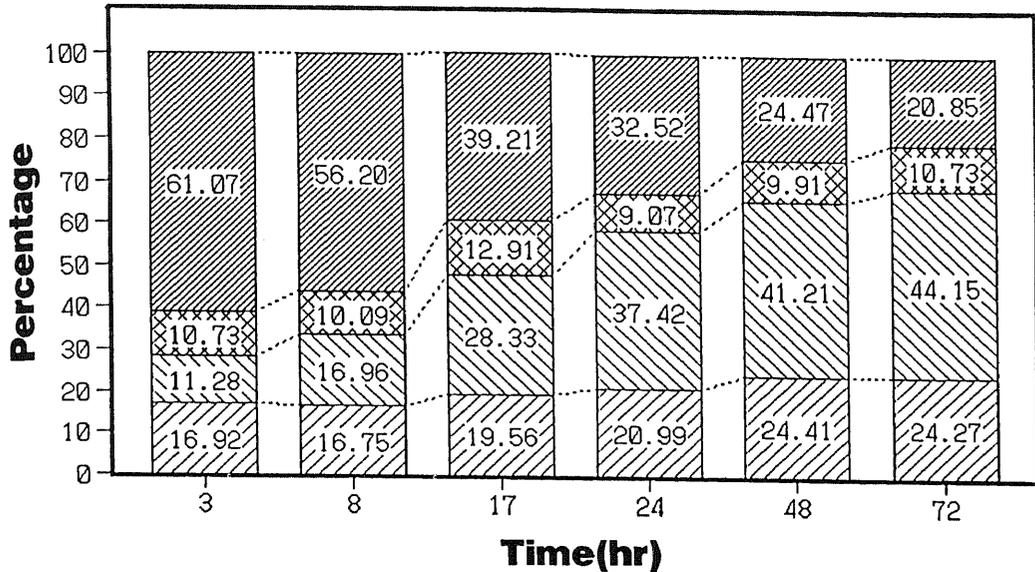


Fig. 5. Subcellular distribution of In-111 225.28S in normal rat livers. Values were expressed as a percentage of the total radioactivity for all the fractions. Mean values for 4-7 rats. ▨, Nuclear fraction; ▩, Mitochondrial fraction; ▤, Microsomal fraction; ▧, Supernatant fraction.

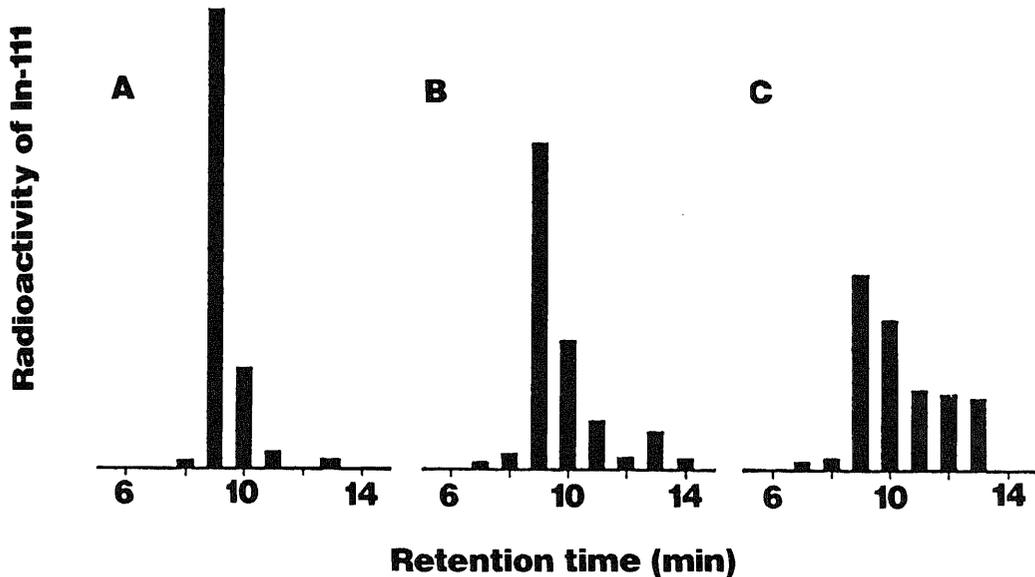


Fig. 6. Gel filtration high performance liquid chromatography for the supernatants from the normal rat liver injected with In-111 225.28S. A, 3 hr after MoAb injection; B, 24 hr after MoAb injection; C, 72 hr after MoAb injection.

9分の IgG (分子量 150KD) に相当する分子量分画に溶出された。この分画の放射能は経時的に減少し、投与後24から72時間では、IgG より小分子量の分画への放射能の移行が認められた (図 6)。

5. ヨード標識抗体との比較

I-125 225.28 S では、肝放射能は投与後早期では In-111 225.28 S とほぼ同程度 ($6.40 \times 10^{-3} \%ID/g$, 17hr) であったが、In-111 225.28 S とは異なり経時的

に減少する傾向を示した ($3.86 \times 10^{-3} \%ID/g$, 48hr)。また、肝細胞内放射能も In-111 225.28 S の場合と異なり放射能の経時的な分布の変化は認められず、どの時間においても主に上清分画中に認められた (図 7)。さらに、上清の GF-HPLC による検討では、全時間経過にわたって主に IgG 分画に放射能が存在し、小分子量分画への放射能の移行は認められなかった (図 8)。

II. 担癌ヌードマウスによる検討

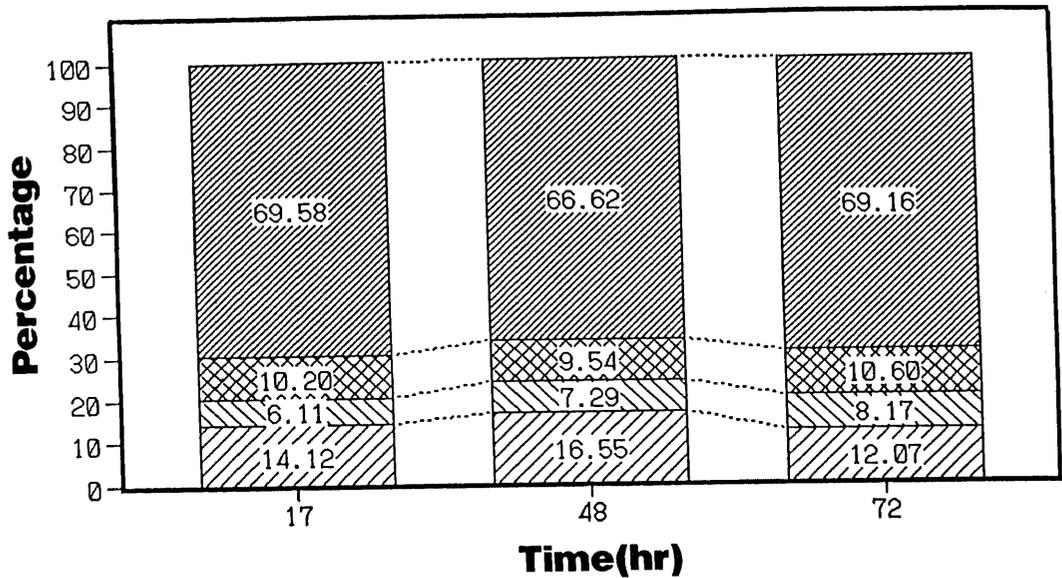


Fig. 7. Subcellular distribution of I-125 225.28S in normal rat livers. Values were expressed as a percentage of the total radioactivity for all the fractions. Mean values for 3-4 rats. [diagonal lines], Nuclear fraction; [cross-hatch], Mitochondrial fraction; [checkered], Microsomal fraction; [diagonal lines], Supernatant fraction.

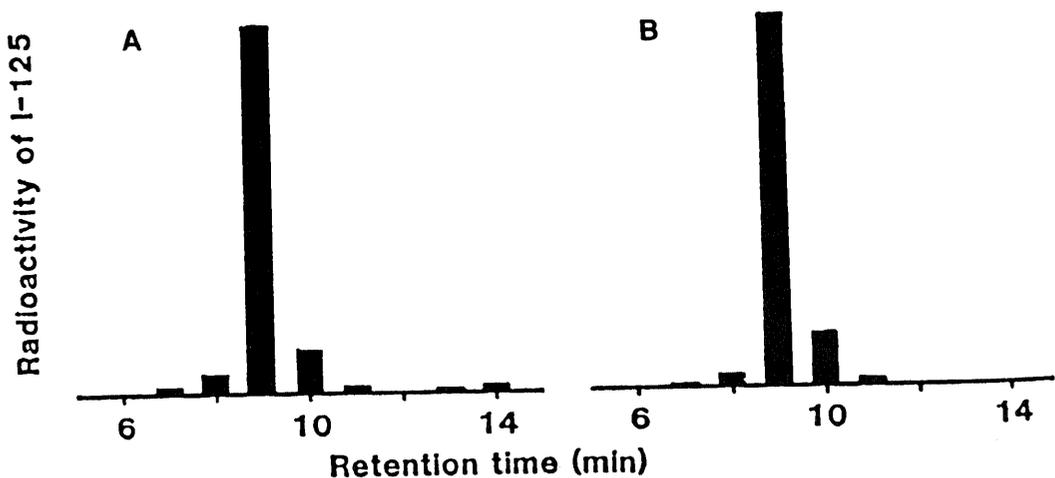


Fig. 8. Gel filtration high performance liquid chromatography for the supernatants from the normal rat liver injected with I-125 225.28S. A, 17 hr after MoAb injection; B, 48 hr after MoAb injection.

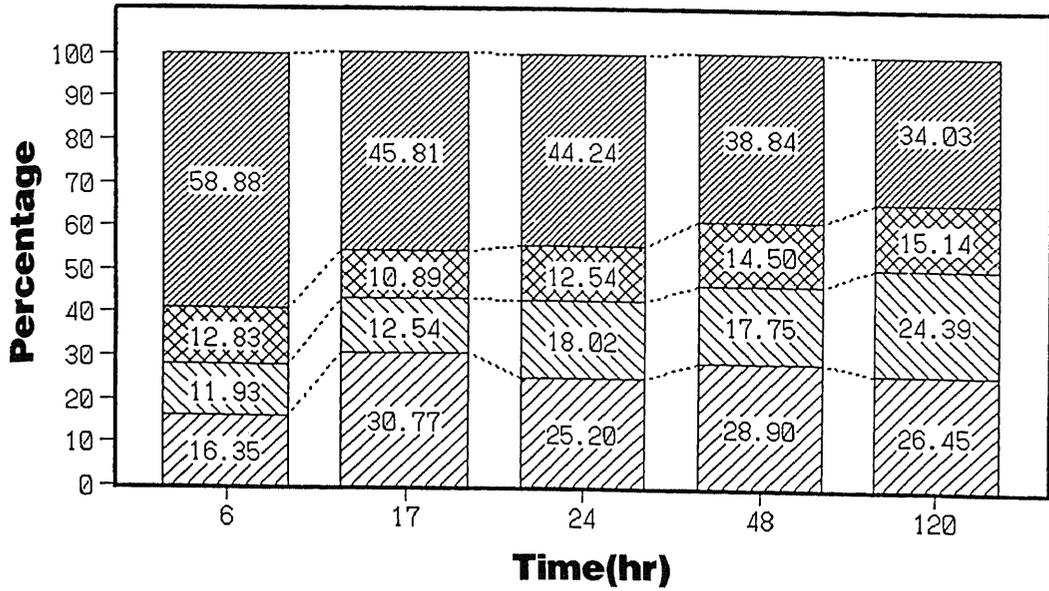


Fig. 9. Subcellular distribution of In-111 225.28S in the livers of melanoma-bearing mice. Values were expressed as a percentage of the total radioactivity for all the fractions. Mean values for 4-7 mice. ▨, Nuclear fraction; ▩, Mitochondrial fraction; ▤, Microsomal fraction; ▧, Supernatant fraction.

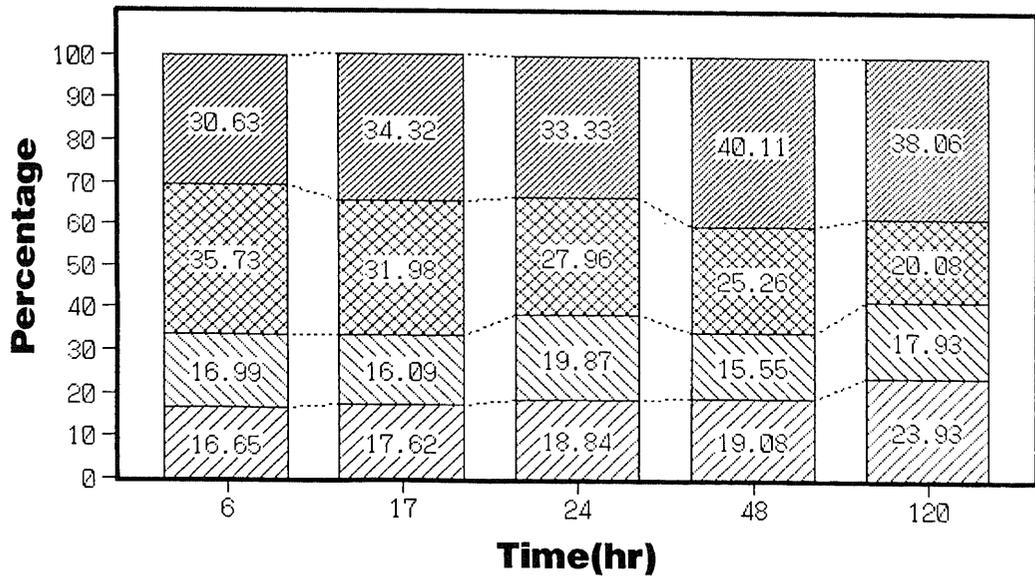


Fig. 10. Subcellular distribution of In-111 225.28S in the melanoma tumor. Values were expressed as a percentage of the total radioactivity for all the fractions. Mean values for 4-5 mice. ▨, Nuclear fraction; ▩, Mitochondrial fraction; ▤, Microsomal fraction; ▧, Supernatant fraction.

1. ヒトメラノーマ移植ヌードマウスによる検討

1) 肝細胞内放射能分布

正常ラットの場合と同様に、MoAb 投与後早期には放射能は主に上清分画中に存在したが、この放射能は経時的に減少し (58.88%, 6hr→34.03%, 120hr), 代わってリソゾームを含むミトコンドリア分画に放射能が移行した (11.93%→24.39%) (図9)。

2) 腫瘍細胞内放射能分布

腫瘍細胞内放射能分布は、肝細胞内放射能分布と異なり、投与後6時間における分布のまま固定し経時的变化を示さず、したがってリソゾームを含むミトコンドリア分画への放射能の局在は認められなかった (図10)。

2. ヒト大腸癌移植ヌードマウスによる検討

1) 投与液の検討

TLC およびペーパークロマトグラフィにより評価したところ、投与液中に In-114m DTPA は殆ど認められず、また水酸化インジウムも存在しなかった。In-111 は、ほとんどが抗体に結合したものであった。したがって、投与液の組成は、抗体結合の In-111 およびイオン形の In-114m のみであることが示された。

2) In-111 ZCE025 の放射能分布

i. 生体内分布

肝放射能は、MoAb 投与早期から比較的高い値を示し (10.96%ID/g, 3hr), 24時間後には 13.38%ID/g に

達した。腫瘍への放射能摂取は48時間まで漸増する傾向を示し、48時間後に 30.05%ID/g の値を示した (図11)。

ii. 肝細胞内放射能分布

正常ラットおよびメラノーマ移植ヌードマウスでの結果と同様に、MoAb 投与後早期には主に上清分画中に存在した In-111 放射能は、経時的に減少し (52.16%, 3hr→19.63%, 144hr), リソゾーム分画の放射能が経時的に増加した (15.55%, 3hr→29.44%, 144hr)。また、ミトコンドリア分画中の放射能も若干増加する傾向を示した。一方、核分画、ミクロゾーム分画中の放射能は経時的にほぼ一定の値を示した (図12)。

iii. 腫瘍細胞内放射能分布

メラノーマ移植ヌードマウスでの結果と同様に、In-111 放射能は常に上清中に存在し、肝細胞内放射能分布で認められた経時的变化は示さなかった (図13)。

3) In-114m の放射能分布

i. 生体内分布

肝放射能は、経時的に漸増し投与48時間後に最高となり、10.77%ID/g の値を示した。腫瘍への放射能の取り込みは、常に 3-4 %ID/g 程度であった (図14)。

ii. 肝細胞内放射能分布

In-114m の放射能は、In-111 ZCE025 の場合と同様に、投与後早期には主に上清分画中に認められたが

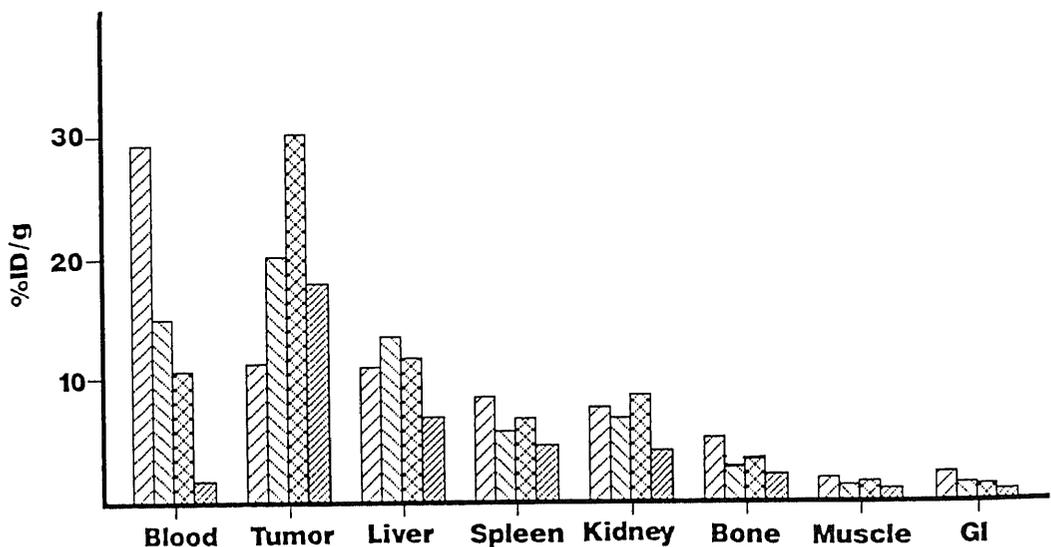


Fig. 11. Biodistribution of In-111 ZCE025 in tumor-bearing mice. Mean values for 6-10 mice. ▨, 3 hr after MoAb injection; ▩, 24 hr after MoAb injection; ▤, 48 hr after MoAb injection.

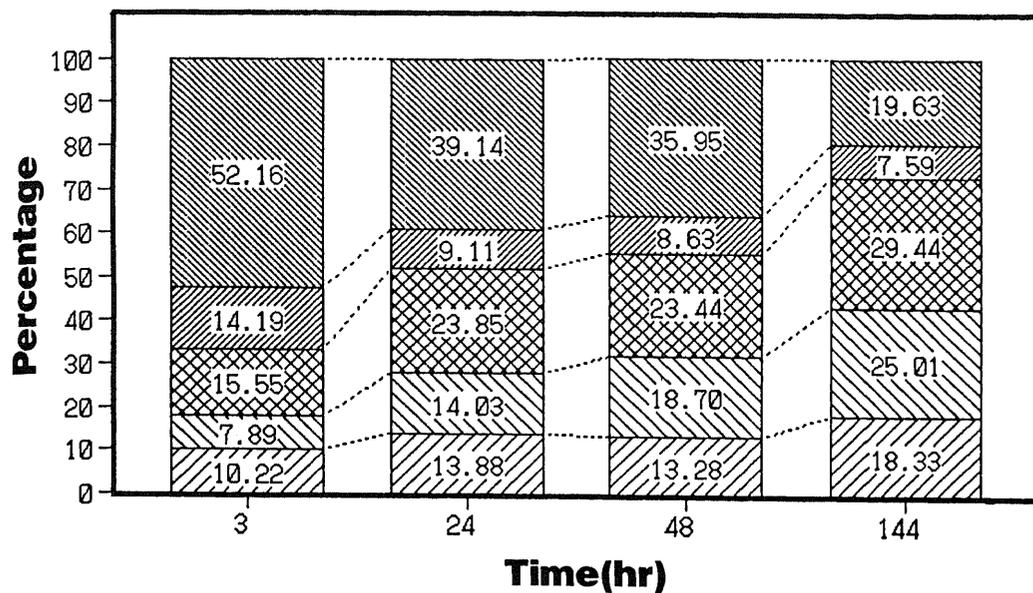


Fig. 12. Subcellular distribution of In-111 ZCE025 in the livers of tumor-bearing mice. Values were expressed as a percentage of the total radioactivity for all the fractions. Mean values for 4-10 mice. ▨, Nuclear fraction; ▩, Mitochondrial fraction; ▤, Lysosomal fraction; ▥, Microsomal fraction; ▦, Supernatant fraction.

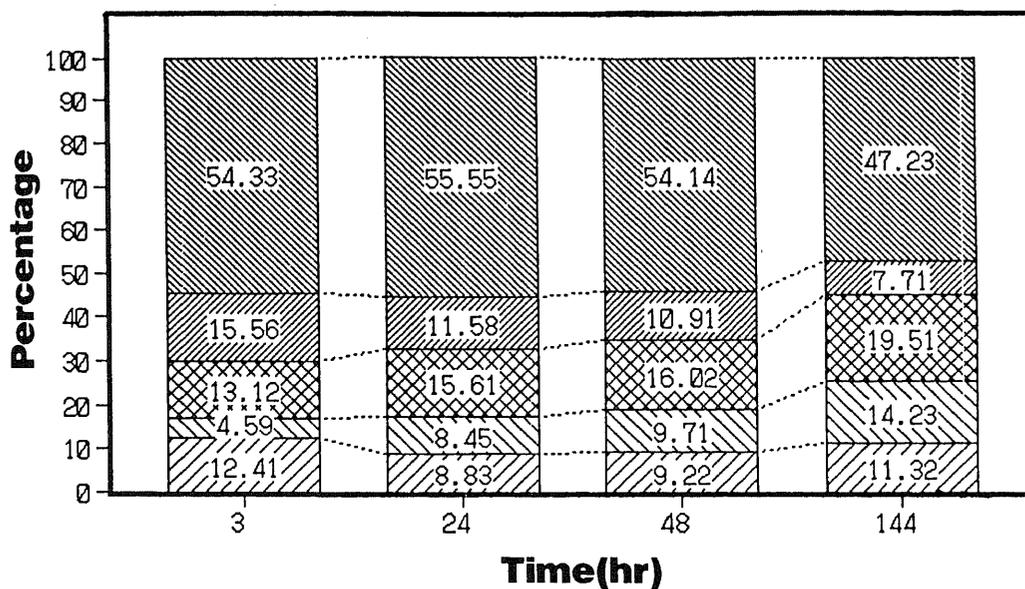


Fig. 13. Subcellular distribution of In-111 ZCE025 in the colon cancer tumor. Values were expressed as a percentage of the total radioactivity for all the fractions. Mean values for 5-10 mice. ▨, Nuclear fraction; ▩, Mitochondrial fraction; ▤, Lysosomal fraction; ▥, Microsomal fraction; ▦, Supernatant fraction.

(44.22%, 3hr), この放射能は経時的に減少し (13.39%, 144hr), リソゾーム分画中の放射能が経時的に増加した (22.19%, 3hr→37.53%, 144hr) (図 15).

iii. 腫瘍細胞内放射能分布

腫瘍細胞内では, In-114m の放射能の経時的変化は認められず, 常に上清分画が主たる局在部位であった (図 16).

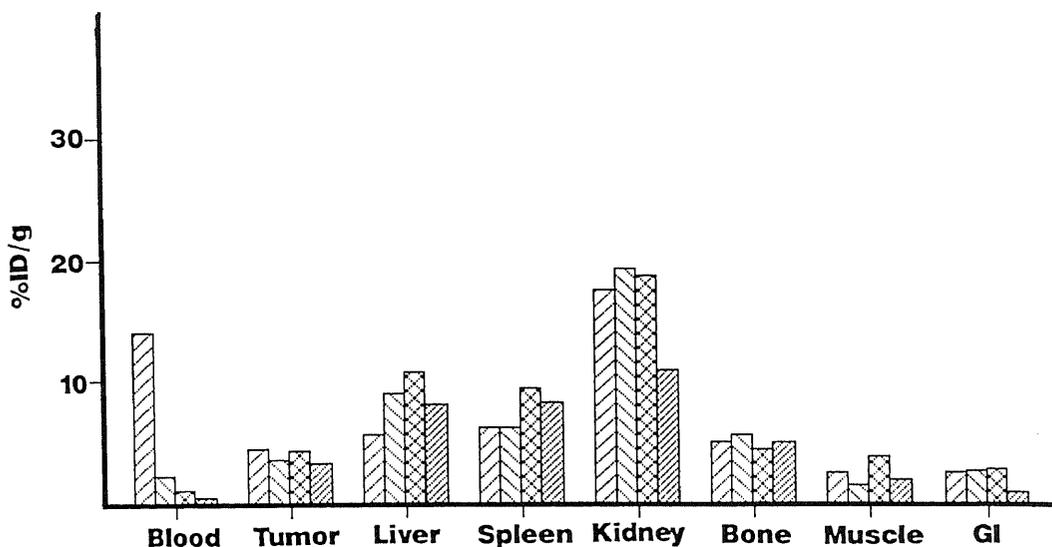


Fig. 14. Biodistribution of In-114m in tumor-bearing mice. Mean values for 4-6 mice. ▨, 3 hr after MoAb injection; ▩, 24 hr after MoAb injection; ▧, 48 hr after MoAb injection; ▦, 144 hr after MoAb injection.

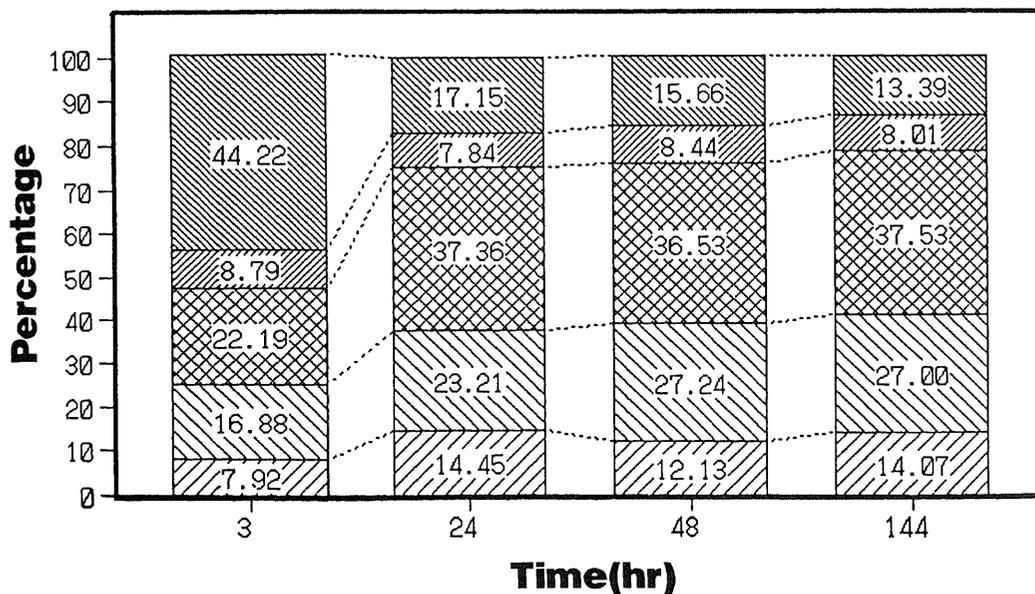


Fig. 15. Subcellular distribution of In-114m in the livers of tumor-bearing mice. Values were expressed as a percentage of the total radioactivity for all the fractions. Mean values for 5-8 mice. ▨, Nuclear fraction; ▩, Mitochondrial fraction; ▧, Lysosomal fraction; ▦, Microsomal fraction; ▥, Supernatant fraction.

III. Fe 前投与による効果

1. ヒトメラノーマ移植ヌードマウスによる検討

1) 生体内分布の変化

In-111 225.28 S 投与24時間後の生体内分布を検討すると、Fe 非投与群で8.53%ID/g であった肝放射能は、4mg の Fe 投与群では7.47%ID/g に減少した。また、腎放射能が非投与群の12.48%ID/g から、投与群の16.57%ID/g と増加する傾向にあった。一方、腫瘍への放射能集積に Fe 投与の影響はなかった(表1)。

2) 肝細胞内放射能分布の変化

Fe を MoAb に先立ち投与することにより、リソ

ゾームを含むミトコンドリア分画の放射能は、MoAb 投与24時間後では非投与群の18.02%から10.55%に低下した(図17)。

2. ヒト大腸癌移植ヌードマウスによる検討

1) Fe (4mg) 投与群における放射能の生体内分布および細胞内分布の経時的変化の検討

i. In-111 ZCE025 の放射能分布の変化

a. 生体内分布の変化

肝放射能は、Fe 非投与群で MoAb 投与24時間後に13.38%ID/g と最高値を示したが、4mg の Fe を前投与することにより8.20%ID/g と約60%に減少した(p<0.05)。一方、この時間における腫瘍への放射能の

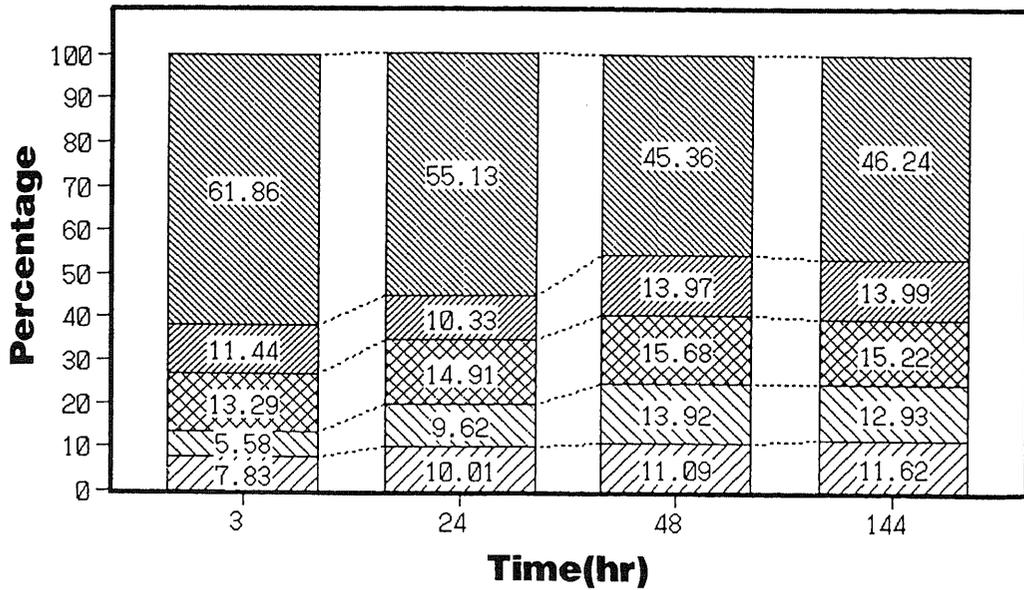


Fig. 16. Subcellular distribution of In-114m in the colon cancer tumor. Values were expressed as a percentage of the total radioactivity for all the fractions. Mean values for 4-5 mice. ▨, Nuclear fraction; ▩, Mitochondrial fraction; ▤, Lysosomal fraction; ▥, Microsomal fraction; ▧, Supernatant fraction.

Table 1. Biodistribution of In-111 225.28S in tumor-bearing mice. Comparison of the Fe-loaded group to the control group.

	Control group	Fe-loaded group
Blood	24.20±4.22	22.33±3.87
Liver	8.53±1.46	7.47±0.77
Kidney	12.48±2.21	16.57±5.63
Tumor	13.16±2.67	13.27±1.81

Values were expressed as percent injected dose per gram wet tissue. Mean ± S.D.

集積性に変化は認められなかった。また、他の臓器の放射能にも大きな変化は認められなかった (図18)。

b. 肝細胞内放射能分布の変化

リソゾーム分画中の放射能は、Fe 非投与群では経時的に増加したが、Fe 4mg 投与群においては経時的

変化は認められず、常にリソゾーム分画中の放射能分布は13-15%とほぼ一定の値を示した。ミトコンドリア分画中の放射能も、Fe 非投与群に比べ低値を示した (図19)。

c. 腫瘍細胞内放射能分布の変化

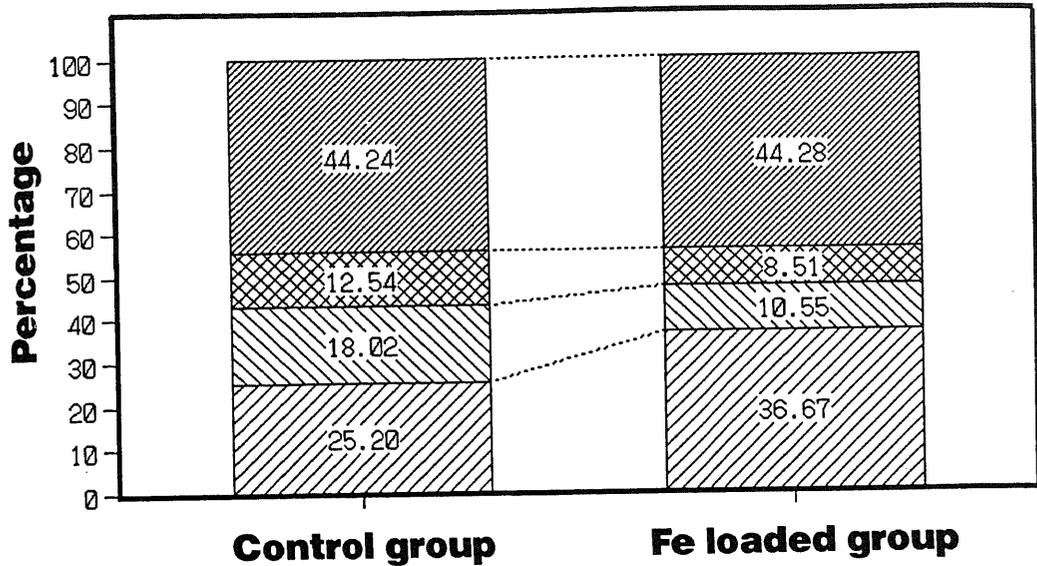


Fig. 17. Comparison at 24 hr after MoAb injection between the control group and the Fe³⁺ (4mg) pre-loaded group in subcellular distribution of In-111 225.28S in the livers of tumor-bearing mice. Mean values for 5-6 mice. ▨, Nuclear fraction; ▩, Mitochondrial fraction; ▤, Microsomal fraction; ▧, Supernatant fraction.

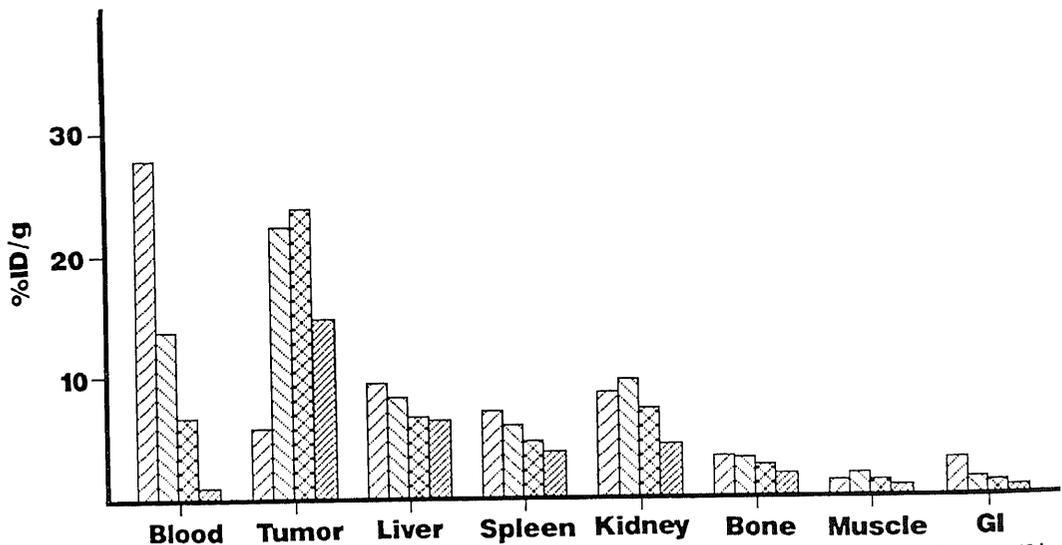


Fig. 18. Biodistribution of In-111 ZCE025 in tumor-bearing mice administered 4 mg of Fe³⁺ at 48 hr prior to the MoAb injection. Mean values for 6-10 mice. ▨, 3 hr after MoAb injection; ▤, 24 hr after MoAb injection; ▩, 48 hr after MoAb injection; ▧, 144 hr after MoAb injection.

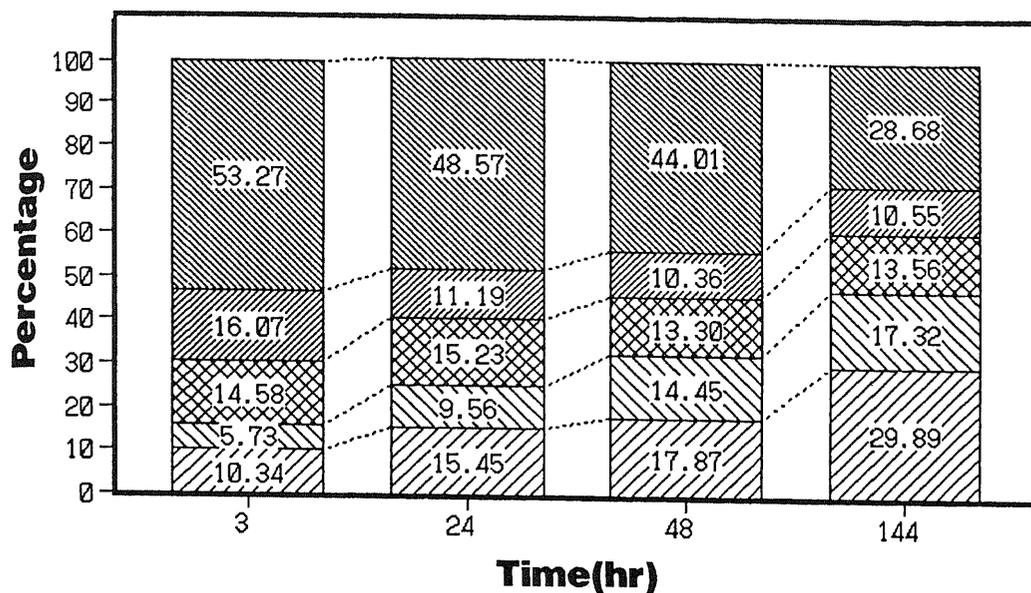


Fig. 19. Subcellular distribution of In-111 ZCE025 in liver of tumor-bearing mice administered 4 mg of Fe^{3+} at 48 hr prior to the MoAb injection. Values were expressed as a percentage of the total radioactivity for all the fractions. Mean values for 7-10 mice. \square , Nuclear fraction; ▨ , Mitochondrial fraction; ▩ , Lysosomal fraction; ▧ , Microsomal fraction; ▦ , Supernatant fraction.

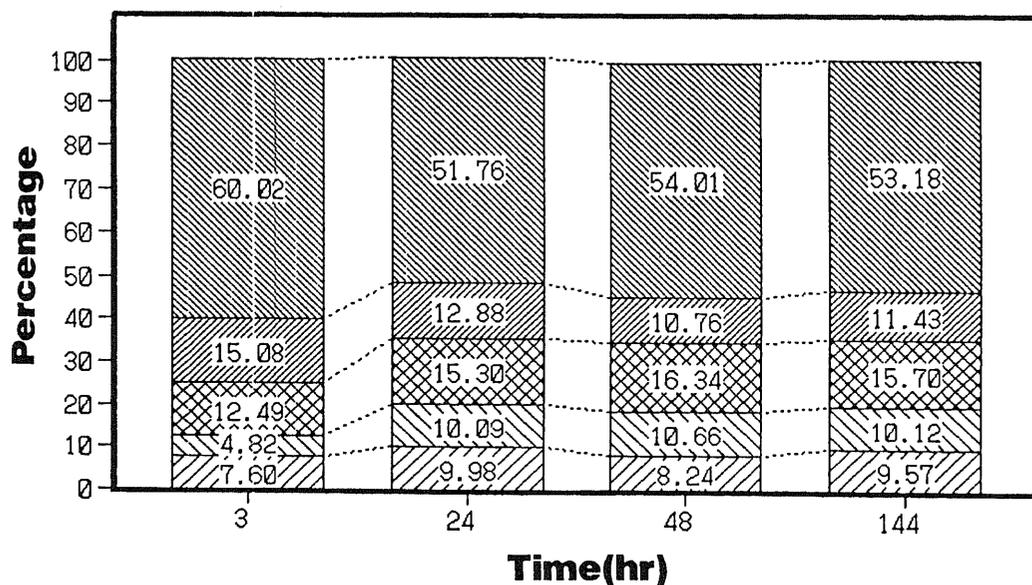


Fig. 20. Subcellular distribution of In-111 ZCE025 in colon cancer tumor administered 4 mg of Fe^{3+} at 48 hr prior to the MoAb injection. Values were expressed as a percentage of the total radioactivity for all the fractions. Mean values for 7-10 mice. \square , Nuclear fraction; ▨ , Mitochondrial fraction; ▩ , Lysosomal fraction; ▧ , Microsomal fraction; ▦ , Supernatant fraction.

Fe 非投与群の場合と同様に、明らかな経時的変化は認められず、常に上清分画中の放射能分布が最も多かった (図20).

ii. In-114m の放射能分布の変化

a. 生体内分布の変化

肝放射能は、Fe 非投与群で In-114m 投与48時間後

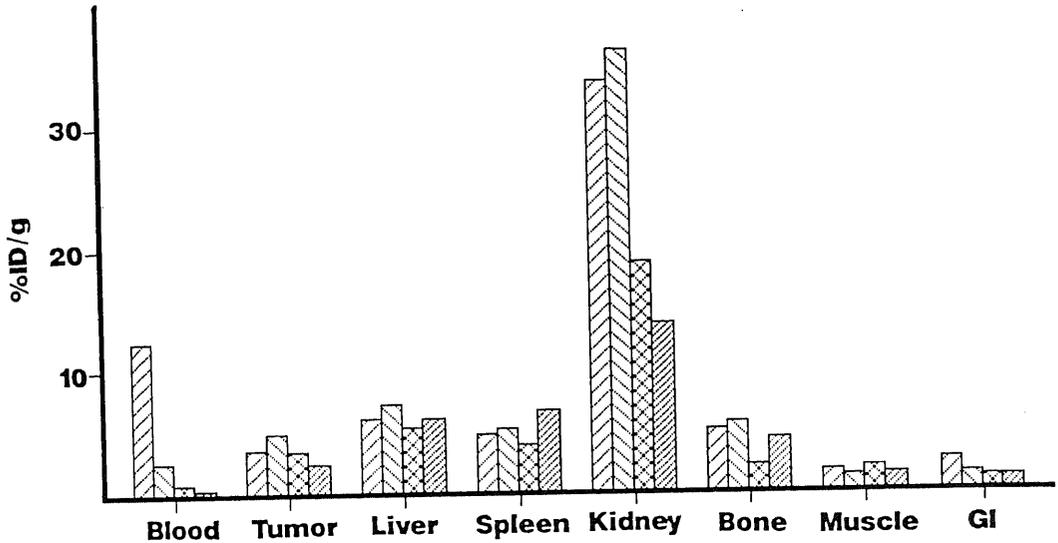


Fig. 21. Biodistribution of In-114m in tumor-bearing mice administered 4mg of Fe³⁺ at 48 hr prior to In-114m injection. Mean values for 4-6 mice. ▨, 3 hr after MoAb injection; ▩, 24 hr after MoAb injection; ▪, 48 hr after MoAb injection; ▫, 144 hr after MoAb injection.

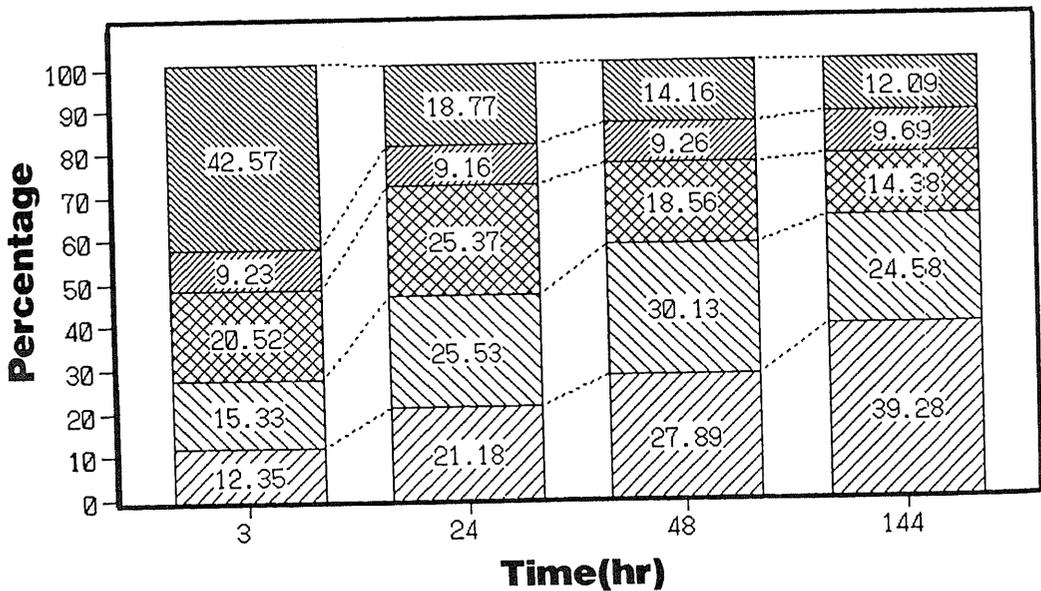


Fig. 22. Subcellular distribution of In-114m in the livers of tumor-bearing mice administered 4mg of Fe³⁺ at 48 hr prior to In-114m injection. Values were expressed as a percentage of the total radioactivity for all the fractions. Mean values for 4-7 mice. ▨, Nuclear fraction; ▩, Mitochondrial fraction; ▪, Lysosomal fraction; ▫, Microsomal fraction; ▬, Supernatant fraction.

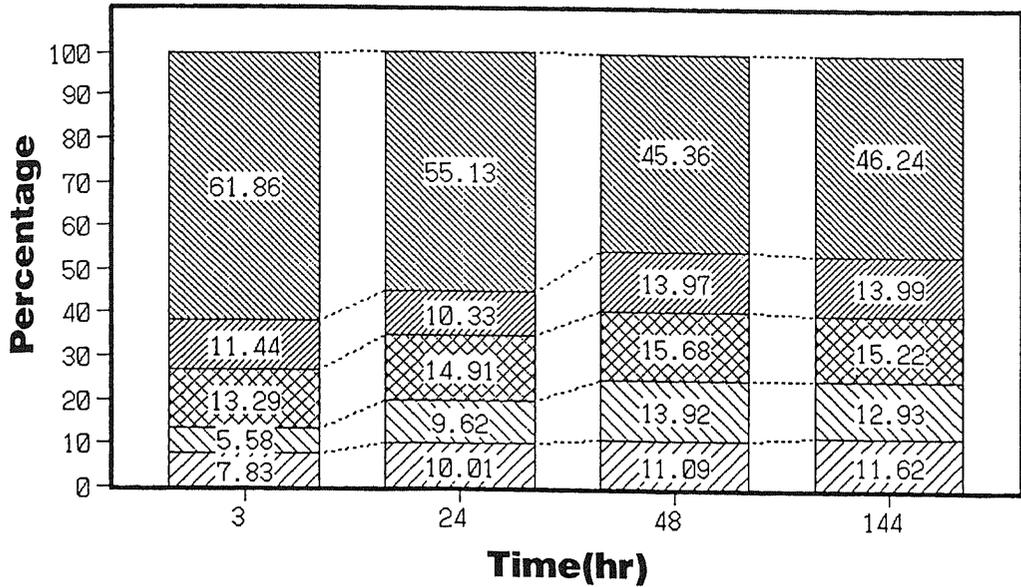


Fig. 23. Subcellular distribution of In-114m in the colon cancer tumor of tumor-bearing mice administered 4 mg of Fe³⁺ at 48 hr prior to In-114m injection. Values were expressed as a percentage of the total radioactivity for all the fractions. Mean values for 3-7 mice. ▨, Nuclear fraction; ▩, Mitochondrial fraction; ▤, Lysosomal fraction; ▥, Microsomal fraction; ▦, Supernatant fraction.

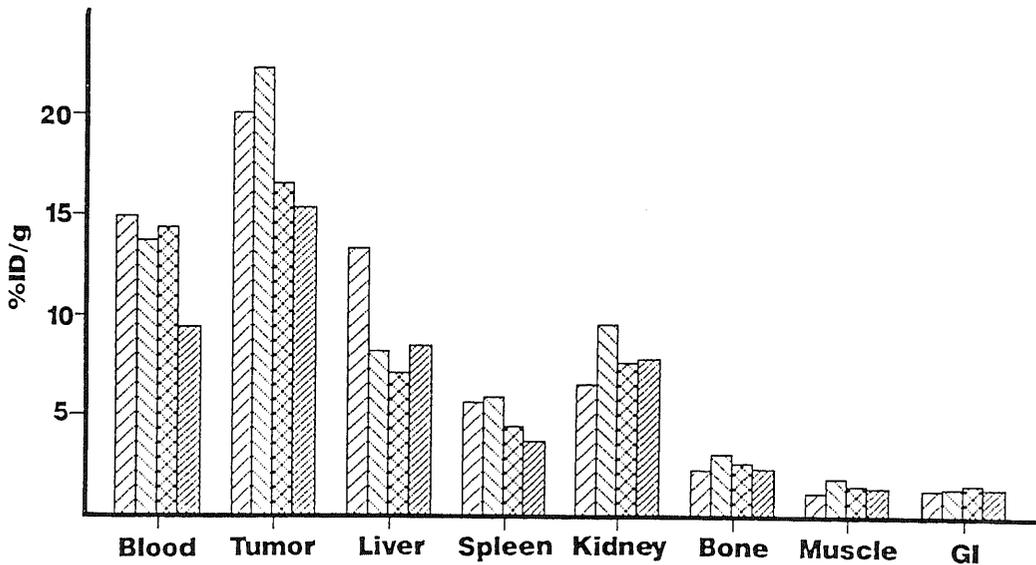


Fig. 24. Changes in biodistribution of In-111 ZCE025 at 24 hr after the MoAb injection with various Fe³⁺ pre-doses. Mean values for 2-10 mice. ▨, Control group; ▩, 4 mg of Fe³⁺ loaded group; ▤, 2 mg of Fe³⁺ loaded group; ▥, 0.5 mg of Fe³⁺ for 4 days.

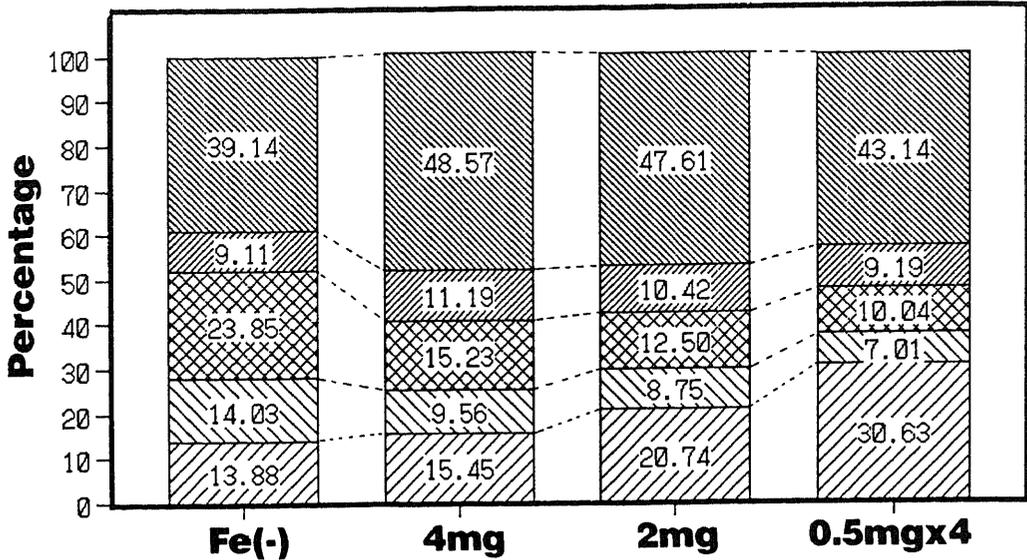


Fig. 25. Subcellular distribution of In-111 ZCE025 in the livers from tumor-bearing mice receiving various Fe³⁺ doses at 48 hr prior to the MoAb injection. Mean values for 2-10 mice. Fe(-), Control group; 4 mg, 4 mg of Fe³⁺ loaded; 2 mg, 2 mg of Fe³⁺ loaded; 0.5 mg×4, 0.5 mg of Fe³⁺ loaded for 4 days. ▨, Nuclear fraction; ▩, Mitochondrial fraction; ▤, Lysosomal fraction; ▥, Microsomal fraction; ▦, Supernatant fraction.

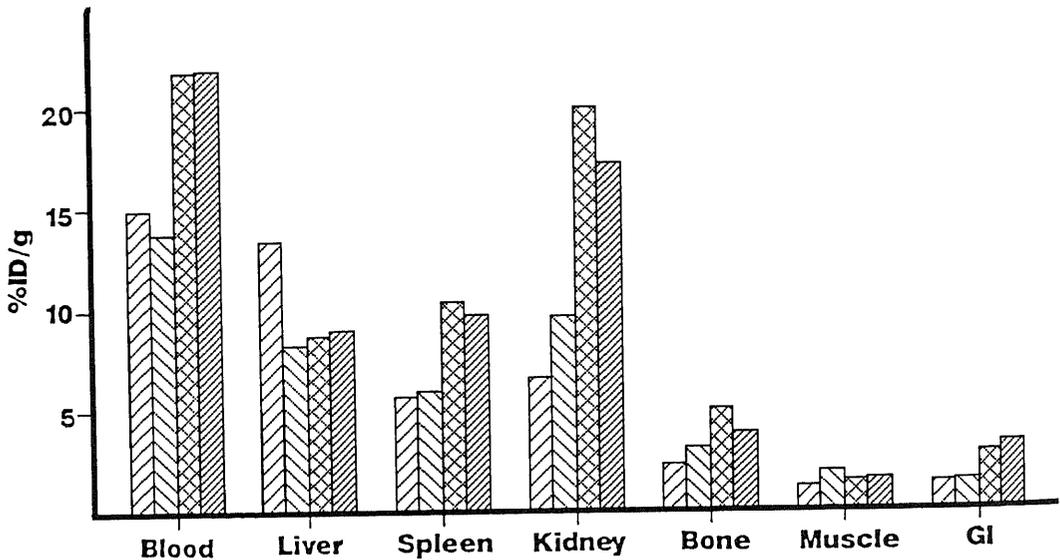


Fig. 26. Effect of the various time intervals of Fe³⁺ preadministration and In-111 ZCE025 injection on biodistribution assessed at 24 hr after MoAb injection. Each mouse received 4 mg of Fe³⁺. Mean value for 4-10 mice. ▨, Control group; ▩, Fe³⁺ was administrated 48 hr prior to MoAb injection; ▤, 6 hr prior to MoAb injection; ▥, 30 min prior to MoAb injection.

に 10.77%ID/g と最高値を示したが、Fe 投与群では 5.27%ID/g と約50%減少した ($p < 0.005$) (図21).

b. 肝細胞内放射能分布の変化

Fe 非投与群でみられたようなリソゾーム分画への放射能の経時的な集積の局在は、Fe 前投与により消失した (図22).

c. 腫瘍細胞内放射能分布の変化

Fe 非投与群と同様に、放射能分布に明かな経時的变化はみられなかった (図23).

2) Fe 投与量投与法の検討

In-111 ZCE025 投与24時間後における肝放射能は、Fe 非投与群での 13.38%ID/g に比較して、Fe 4mg 投与群、2mg 投与群、抗体投与前日までの4日間連続 0.5mg 投与群で各々、8.20%ID/g、7.09%ID/g、8.46%ID/g とほぼ同程度に減少した (図24). また肝細胞内放射能分布は、何れの群でもリソゾーム分画中の放射能が減少した (図25).

3) Fe 投与時間の検討

Fe 投与が、MoAb 投与48時間前、6時間前、30分前の何れの場合でも、肝放射能は、MoAb 投与24時間後において非投与群に比べ約60%に減少した。しかし、Fe 投与と MoAb 投与の間隔が短い場合、脾、腎、骨等の肝以外の臓器の放射能が増加する傾向を示

した (図26). また、いずれの群においても肝細胞内リソゾーム分画の放射能が減少した (図27).

考 察

RIS は、癌組織に特異性の高いモノクローナル抗体 (MoAb) を用いることにより、放射性核種を癌病巣にターゲティングさせ、体外から放射能局在をガンマカメラにより検出する方法である。RIS は、悪性腫瘍の分布や数を検出する存在診断法であるばかりでなく、癌組織に対する特異性によって病変部位の性状評価可能な質的診断法でもありうるという、他の画像診断法にない優位性を持っている。しかし、RIS で示される画像は、必ずしも腫瘍関連抗原あるいは抗体の分布を反映しているものではなく、あくまで放射能の分布を反映したものである事に同時に留意する必要がある。

RIS に使用される標識用核種としては、標識方法が確立されていることより放射性ヨード ($I-131$) が多く用いられてきた。しかし、ガンマカメラによるイメージングに不適當なエネルギー、 β 線による被爆、脱ヨード化現象等の欠点が明らかになったため⁹⁾、In-111 が抗体標識用に頻用されるようになってきた¹⁰⁾¹²⁾。しかしながら、In-111 MoAb でも、肝への非特

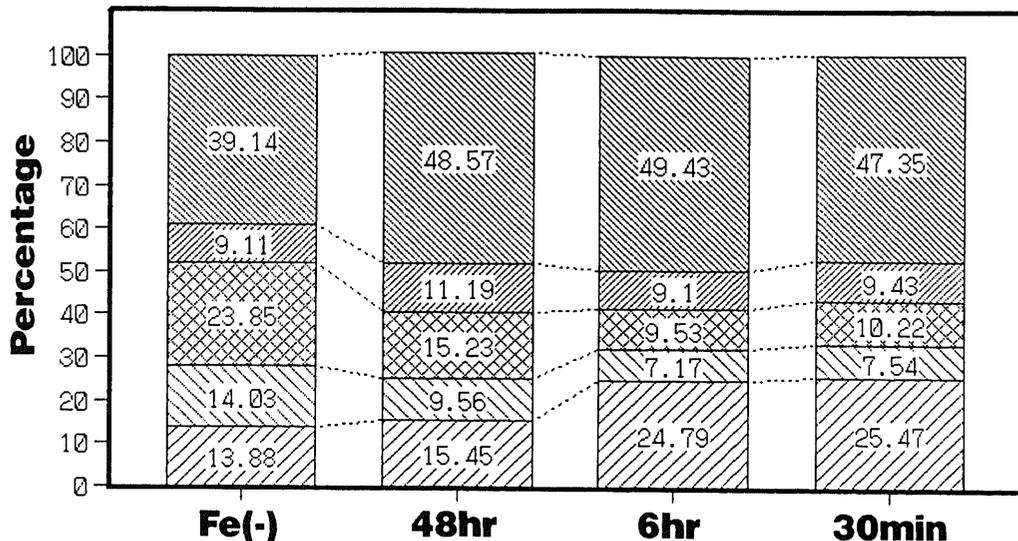


Fig. 27. Subcellular distribution of In-111 ZCE025 in the livers from the mice receiving 4 mg of Fe* at 48hr, 6hr and 30 min prior to the MoAb injection. Mean values for 4-10 mice. ▨, Nuclear fraction; ▩, Mitochondrial fraction; ▤, Lysosomal fraction; ▧, Microsomal fraction; ▨, Supernatant fraction.

異的な高い放射能集積のために、肝内や肝周囲の病巣の検出が困難である限界が徐々に指摘されてきた¹⁸⁻¹⁹。In-111 MoAb が、肝のみならず脾、骨髄へも多く分布するために、Kupffer 細胞等の網内系細胞の関与が示唆された。すなわち、抗体溶液中に何らかの理由で In コロイドが形成され、それが網内系に捕捉されることによって肝、脾、骨髄等の網内系に富む組織が描画されると考えられてきた。しかし、今回の検討でも、In-111 MoAb 注射液中にコロイド形成が認められなかった点、さらに、肝摂取がコロイドの網内系への捕捉に由来するものであるとすれば、MoAb 投与後肝放射能は速やかに最高値に達するはずであるが、実際には投与24時間後頃まで漸増する動態を示した点より、網内系の関与が主たる肝摂取の機序とは考えがたい。Sands 等が、In-111 MoAb 投与後のラット肝の灌流消化より肝細胞を実質細胞と網内系細胞を含む非実質細胞に分離し、In-111 MoAb の主たる摂取部位は肝実質細胞であることを示している²⁰⁽²²⁾⁻²⁴。In-111 MoAb の肝摂取機序に関する現在までの唯一の実験的事実であるが、肝実質細胞のどの部位にどのような形態で In-111 が存在するかを検討した報告は全く見られていない。

塩化インジウム (In-111) を投与して今回行ったとほぼ同様の方法で放射能の細胞内分布を検討した場合には、肝細胞内放射能は上清分画からリソゾーム分画へ移行するとの報告がある³¹⁽³²⁾。この結果は、今回 In-111 MoAb 投与により得られた肝細胞内放射能分布の推移と全く同一である。さらに、In-111 ZCE025 と塩化インジウム (In-114m) の二核種同時投与による検討でも、両者の肝細胞内放射能分布は、非常に類似した経時的変化を示した。インジウムイオン (In) は鉄イオン (Fe) と挙動が類似しており、静脈内投与した場合、In は血中で速やかに担鉄蛋白であるトランスフェリン (transferrin, Tf) と結合しインジウム-トランスフェリン複合物 (indium-transferrin complex, In-Tf) となる³³⁽³⁴⁾。Tf は、分子量74,000の酸性蛋白 (pI=5.5-6.5) で体内での Fe 運搬の主役をなすため、その代謝機構が詳しく解明されている。Tf は細胞表面の Tf 受容体と結合した後、受容体との複合体の形で細胞内へレセプトゾーム (エンドゾーム) として取り込まれ、内部は酸性化 (pH 5) され Fe を解離しやがてゴルジに達し、最終的にはリソゾームで分解をうけるとされている³⁵⁽³⁶⁾。In-111 MoAb と塩化インジウム (In-114m) すなわち In-Tf がほぼ同一の肝細胞内挙動を示した今回の検討結果より、一旦肝細胞内に In-111 MoAb が取り込まれた後は、Tf を介した In

あるいは Fe と極めて類似した代謝経路を経ることが示唆される。すなわち、肝細胞表面の Fc 受容体ないし糖鎖受容体を介して In-111 MoAb が肝細胞内にレセプトゾームとして取り込まれた後³⁷、In-111 MoAb は、その低い pH のため DTPA が配位力を失い、In-111 を解離することが予想できる。解離した In-111 は、リソゾームに取り込まれその状態を保ち続ける結果、高い肝放射能持続状態を示すことになる³⁸。何故なら、リソゾームは種々の金属 (Fe, Cu 等) の沈着部位であることが知られており、少なくとも今回検討した時間 (投与後最大144時間) ではリソゾームからの放出がみられないため、肝放射能が一定値を保つと考えられる。また仮に In-111 MoAb が体内で In-111 DTPA の形に分解するのなら、速やかに腎から排泄され問題となる肝摂取はもっと低くなるであろう。さらにもうひとつの可能性として、今回の実験結果は、In-111 MoAb 投与後血中で In-111 が MoAb から解離し In-Tf を形成したと仮定することによっても説明できる。しかしながら、この可能性も低い。何故なら、DTPA 法によって作製された In-111 MoAb は血中ではきわめて安定で、In-111 MoAb から Tf への In-111 の移行 (transcomplexation) は、一日数%と報告されているからである⁶⁽³⁹⁾。故に、今回示された In-111 MoAb での肝細胞内での経時的変化は、肝細胞内で遊離の In-111 が生じたことを示唆するものであると結論できる。言い替えれば、In-111 MoAb の高い肝放射能摂取の問題は、In-111 の DTPA からの解離、すなわち In-111-DTPA-MoAb の生体内での不安定性に起因するものであると言える。試験管内では In-111 の DTPA への強い結合性は保持されるものの、なんらかの原因で生体内ではその結合を保持できないものと考えられる⁷。このことは、RIS の場合、抗原あるいは抗体の分布を直接画像化しているのではなく、体内の放射能分布から間接的に抗原あるいは抗体の分布を捉える RIS の限界を示すものであると言える。

一方、ヨード標識 MoAb の場合、肝摂取は In-111 MoAb とほぼ同程度であるが、比較的速やかに肝から放射能が消失する。これは、肝細胞に摂取されて後脱ヨード化によってヨードが MoAb から解離し、比較的速やかに遊離したヨードが細胞外に放出されてしまうことによると考えられる¹⁶⁽¹⁷⁾。何故なら、I-125 225.28 S の肝細胞内放射能分布に経時的な変化が認められず、かつ IgG より小分子量の物質への放射能の移行を示す現象も認められなかったことは、遊離したヨードの貯留の場が肝細胞内に存在しないため、速や

かに細胞外に放出された結果と考えられるからである。

上清分画の GF-HPLC による分析では、In-111 225.28S 投与24時間以降に IgG 分画から小分子量分画への放射能の移行が認められたが、この現象は、MoAb 結合 DTPA のキレート部位から他の小分子量物質への放射能の移行 (transcomplexation)、あるいは代謝された In-111 標識抗体の分解産物に由来するものであろうと推測される^{40)~42)}。この点に関しては、より詳細な解明と小分子量物質の同定が必要であり、今後の検討課題と考えられる。

さらに、In-111 MoAb とヨード標識 MoAb では、経時的な肝細胞内放射能分布の差異のみならず、肝細胞内での存在形態ないしは代謝経路が異なることも示されたと考えられる。

肝細胞内放射能分布とは異なり、In-111 MoAb 投与後の腫瘍細胞内放射能分布は、明らかな経時的変化を示さず、リソゾーム分画への放射能局在も認められなかった。これは、In-114m を投与した場合も同様であった。これらの結果より、腫瘍における放射能貯留は、肝における貯留とは明らかに異なる機序に基づくものであると考えられる。

以上の検討結果より、In-111 MoAb 投与時の肝放射能持続を規定する要因が、細胞レベルではリソゾームでの In-111 の貯留によると判明した。したがって、肝放射能を低減し肝病巣の検出を向上させる方法として、リソゾームを飽和させ In-111 の貯留を抑制することが理論的に導かれる。In の生体内における挙動は Fe の挙動に類似しており、Fe と異なり体内でヘモグロビン合成に利用されることはないが、両者とも血中で Tf と結合し肝細胞に取り込まれる。この性質を利用して、In-111 MoAb 投与前に Fe を投与することにより、肝細胞リソゾームをブロックして In-111 の肝内貯留を抑制しようのではないかと考えられた。そこで、In-111 ZCE025 投与48時間前に Fe 4mg を投与した場合、MoAb 投与24-48時間後の肝放射能を Fe 非投与の対照群の約55-60%にまで低減することが可能であることが判明した。一方、腫瘍放射能摂取には、大きな変化は見られなかった。腫瘍と肝の摂取機序が異なること、これが Fe 前投与方法の前提である。得られた実験結果はその前提を矛盾しないことが示された。ちなみに腫瘍対肝放射能比は、MoAb 投与24時間後において Fe 非投与群の1.51から Fe 投与群の2.72に向上した。したがって、核医学的なイメージングにおける腫瘍の描画は、本法により向上すると考えられた。さらに興味深いことに、Fe 投与群では肝細胞内

リソゾーム分画の放射能が非投与群に比べ低値を示し、常に13-15%とほぼ一定の値を示した。この結果は、In-111 MoAb 投与に先立ち Fe を投与することにより、In-111 の貯留の場であるリソゾームがある程度飽和されたことを裏付けるものと思われる。また、Fe 投与により In-114m の肝放射能も In-111 ZCE025 の場合と同様に Fe 非投与群に比べ約50%に低減され、さらに肝細胞内リソゾーム分画の放射能が減少した。In-114m でも In-111 ZCE025 でも Fe 投与により類似の効果が得られた事実は、In-111 を MoAb に結合して投与しても、肝内では、塩化インジウムを投与した場合と同様の挙動すなわち In-111 が DTPA キレート部位から解離するとの推測を傍証するものである。

In-111 ZCE025 の生体内分布の経時的変化を Fe 投与群と非投与群とで比較すると、Fe 投与群の肝放射能の低下は MoAb 投与24-48時間後で顕著であり、144時間後では両者間の差は認められなかった。よって、ヒトに本法を臨床応用する場合、極端に遅い時間での撮像は、Fe 前投与による肝放射能低減効果が減少するために、肝病巣の検出には望ましくないことも判明した。

25g のヌードマウスにおける 4mg の Fe は、体表面積で 50kg のヒトに換算すると、約 600mg に相当する。鉄欠乏性貧血患者に対して Fe を投与する場合、通常一回投与量として 80-120mg 程度用いられる。この量に比べると 600mg はかなりの大量投与となるが、貧血の治療の場合 Fe は連日投与することを考慮すると、今回の検討のような大量の Fe でも一回投与ならば可能であるかもしれない。たとえこのような投与量が困難であるとしても、Fe 2mg 投与でも 4mg 投与の場合とほぼ同様の効果が得られたことにより、より少ない投与量でも満足できる結果を得ることが期待できる。さらに、ヒトの場合の 75mg に相当する 0.5mg をヌードマウスに In-111 MoAb 投与前日まで 4 日間連続投与した場合でも、2mg 一回投与の場合とほぼ同程度まで肝放射能を低減する効果が示された。したがって、Fe 投与方法をヒトの臨床へ応用することは充分可能であると結論できる。

Fe 投与時間の検討では、In-111 MoAb 投与前48時間、6時間、30分のいずれの時間に Fe 投与した場合でも、肝放射能を同程度低減することが可能であった。しかし、Fe 投与と MoAb 投与の間隔が短い場合、脾、腎、骨等の肝以外の臓器の放射能が増加し、腹部病変の検出に新たな障害となることが予想された。したがって、Fe 投与の時期は、MoAb 投与の48

時間程度前が臨床至上適であると考えられた。

Fe 投与により In-114m の肝放射能も In-111 ZCE025 の場合と同様に、Fe 非投与群に比べ約50%に低減され、さらに肝細胞内リソゾーム分画の放射能が減少した。In-114m でも In-111 ZCE025 でも Fe 投与により類似の結果が得られたことは、In-111 MoAb を投与した場合、肝細胞内において In-111 が DTPA から解離するとの説を支持するものであると考える。

今回の検討結果から考えると、In-111 MoAb の問題点である肝放射能摂取を低減させる方法としては、Fe を前投与する方法以外にも以下の方法が考えうる。

1) 低 pH 領域でも DTPA より In-111 に対する結合力の強いキレート剤を用いる。2) DTPA と抗体の間での解離を促し、In-111 DTPA として腎からの排泄を促進する。3) 非標識抗体を投与し腫瘍への集積を待った後、放射性核種を投与する生体内標識法。4) 静脈以外のルートから投与する。1) の方法としては 1-(p-isothiocyanatobenzyl)-DTPA (SCN-Bz-DTPA) の開発が報告されている。DTPA より熱学的に安定なこのキレート剤を用いることにより、現在よく用いられている cyclic anhydride DTPA 法に比べ動物実験では約60%に肝放射能が低減できたと報告されている⁴⁹⁻⁵⁰。2) の方法としては、MoAb と DTPA の間に、エステル基を導入する方法がある⁴⁹⁻⁵⁰。エステル結合は肝に大量に存在するエステラーゼにより特異的に分解されるため、肝からの放射能消失を促進することができる。3) としては、アビジンとビオチンの高い親和性 ($K_a=10^{10}$) を利用して、まずアビジン化抗体を投与しておき、腫瘍に抗体が十分集積する適当な時間において In-111 で標識したビオチンを投与する方法が注目されている^{51,52}。4) の方法としては、経リンパ投与⁵³、腹腔内投与⁵⁴が試みられている。残念なことに、上記の方法は、未だ臨床応用に至っていないかまたは単独では肝放射能を十分に低減するには至っていない。しかし、今回試みた Fe を前投与する方法を含め、これらの方法を組み合わせて使用することで、より大幅な肝放射能低減が可能であると考えられる。それにより、肝内腫瘍および肝周囲病変部の診断が限界となっている In-111 MoAb による RIS の検出感度向上が期待できる。また、これらの方法によるアプローチが合理的であることも In-111 標識抗体の肝摂取機序の解明により改めて示されたと考えられる。

結 論

In-111 標識モノクローナル抗体 (In-111 MoAb) による放射免疫シンチグラフィの問題点はその高い肝放

射能集積にあり、その肝細胞内放射能分布の検討と肝集積低減法の開発を目的として、正常ラット及び2種類のヒト癌細胞株移植ヌードマウスと各々の癌抗原に対応する MoAb を用い、種々の検討を行い以下の結論を得た。

1. 正常肝細胞をホモジネートした後、多段階遠心操作により分画したところ、In-111 は肝細胞内のリソゾーム分画へ経時的に取り込まれた後、排泄されずに長時間留まることが判明した。即ち、肝放射能集積持続を細胞レベルで規定する要因は肝細胞リソゾーム内放射能貯留であることが、今回の検討により初めて明らかとなった。

2. 正常肝細胞上清分画のゲル濾過高速液体クロマトグラフィによる解析の結果、MoAb に結合した In-111 は、経時的に IgG 分画から分子量のより小さな分画へと移行する現象が観察された。従って、肝細胞内では、MoAb と In-111 の結合が必ずしも安定した状態を保ち得ないことが見出された。

3. 一方、同一の MoAb を I-125 で標識して In-111 MoAb と比較検討した場合、生体内では MoAb と I-125 の結合が一層不安定であり、また生体内分布、肝細胞内分布、肝内代謝過程は著しく異なることが判明した。

4. 多段階細胞分画法による検討の結果、腫瘍細胞と正常肝細胞とでは、細胞内放射能分布の経時的なパターンが大きく異なり、従って、腫瘍細胞における In-111 MoAb の放射能の貯留は、正常肝細胞における場合とは異なる機序に基づくものであると考えられた。

5. In-111 MoAb 投与前に予め Fe を投与することにより、In-111 MoAb の肝摂取を低減させる方法を独自に開発した。この Fe 前投与方法により、In-111 MoAb の腫瘍集積性を低下させることなく、In-111 の肝内 (リソゾーム分画) 貯留を低減することに成功した。

6. Fe を少なくとも MoAb 投与の48時間前に投与することが、Fe 前投与により In-111 MoAb の肝摂取を低減する方法における最適な投与間隔であると判明した。また種々の Fe 投与量を検討し、体表面積より換算してヒトへの投与量を推定した場合、Fe 前投与法は臨床応用も充分可能であることが判明した。

以上今回の検討により、In-111 MoAb による放射免疫シンチグラフィ上の問題点である高い肝放射能の持続状態を規定する要因が解明され、さらに、従来困難であった肝内病変の評価が、Fe 前投与方法によって可能となるため、放射免疫シンチグラフィの診断成績は

大いに向上し得るものと思われた。

謝 辞

稿を終えるに望み、御指導、御校閲を賜りました恩師久田欣一教授に深く感謝いたします。メラノーマ継代株を提供して頂いた金沢大学医学部皮膚科広根孝衛教授、中村聡先生、大腸癌継代株を提供して頂いた金沢大学がん研究所付属病院外科高橋豊、太田英樹両先生に深く感謝いたします。細胞分画分離法を行うにあたり御助言頂いた金沢大学医学部医療技術短期大学部診療放射線学科安東醇教授、安東逸子先生に御礼申し上げます、また直接御指導頂いた金沢大学医学部核医学科横山邦彦先生、実験に際し御助力頂いた孫保福、徳山由紀子両先生、さらに教室員各位、宮川幾代文部事務次官に深く御礼申し上げます。

モノクローナル抗体225.28S及びZCE025を提供くださいました帝人株式会社ならびに塩化インジウム(In-111)を提供してくださいました日本メジフィジックス社に感謝致します。

本研究の一部は、昭和63年度厚生省癌研究助成金(松沢班62-17)、平成元年度厚生省癌研究助成金(久田班1-40)によることを付記する。

本論文の要旨は、第35回国核医学会(於サンフランシスコ、1988)、第36回国核医学会(於セントルイス、1989)、第28回日本核医学総会(於東京、1988)、第29回日本核医学総会(於滋賀、1989)、第48回日本医学放射線学会総会(於神戸、1989)、第6回免疫核医学研究会(於東京、1989)にて発表した。

文 献

- 1) Ballou, B., Levine, G., Hakala, T. R. & Solter, D.: Tumor location detected with radioactively labeled monoclonal antibody and external scintigraphy. *Science*, **206**, 844-846 (1979).
- 2) Goldenberg, D. M. & DeLand, F. H.: History and status of tumor imaging with radiolabeled antibodies. *J. Biol. Response Mod.*, **1**, 121-136 (1982).
- 3) DeLand, F. H. & Goldenberg, D. M.: Diagnosis and treatment of neoplasms with radionuclide-labeled antibodies. *Semin. Nucl. Med.*, **15**, 2-11 (1985).
- 4) Henze, E., Kubel, R., Waitzinger, J., Buchler, M., Adam, W. E. & Beger, H.G.: Tumor scintigraphy with I-131 CEA monoclonal antibodies and F(ab')₂ in colorectal cancer. *Eur. J. Nucl. Med.*, **13**, 125-129 (1987).
- 5) Carrasquillo, J. A., Mulshine, J. L., Bunn, P. A. Jr., Reynolds, J. C., Foon, K. A., Schroff, R. W., Perentesis, P., Steis, R. G., Keenan, A. M., Horowitz, M. & Larson, S. T.: Indium-111 T101 monoclonal antibody is superior to iodine-131 T101 in imaging of cutaneous T-cell lymphoma. *J. Nucl. Med.*, **28**, 281-287 (1987).
- 6) Halpern, S. E., Hagan, P. L., Garver, P. R., Koziol, J. A., Chen, A. W., Frincke, J. M., Bartholomew, R. M., David, G. S. & Adams, T. H.: Stability, characterization, and kinetics of In-111-labeled monoclonal antitumor antibodies in normal animals and nude mouse-human tumor models. *Cancer Res.*, **43**, 5347-5355 (1983).
- 7) Krejcarek, G. E. & Tucker, K. L.: Covalent attachment of chelating groups to macromolecules. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **77**, 581-585 (1977).
- 8) Hnatowich, D. J., Childs, R. L., Lanteigne, D. & Najafi, A.: The preparation of DTPA-coupled antibodies radiolabeled with metallic radionuclides: an improved method. *J. Immunol. Methods*, **65**, 147-157 (1983).
- 9) Paik, M. A., Ebbert, M. A., Murphy, P. R., Lassman, C. R., Reba, R. C., Eckelman, W. C., Pak, K. Y., Powe, J., Steplewski, Z. & Koprowski, H.: Factors influencing DTPA conjugation with antibodies by cyclic DTPA anhydride. *J. Nucl. Med.*, **24**, 1158-1163 (1983).
- 10) Paik, C. H., Hong, J. J., Ebbert, M. A., Heald, S. C., Reba, R. C. & Eckelman, W. C.: Relative reactivity of DTPA, immunoreactive antibody-DTPA conjugates, and nonimmunoreactive antibody-DTPA conjugates toward indium-111. *J. Nucl. Med.*, **26**, 482-487 (1985).
- 11) Fairweather, D. S., Bradwell, A. R., Dykes, P. W., Vaughan, A. T., Watson-James, S. F. & Chandler, S.: Improved tumour localisation using indium-111 labelled antibodies. *Br. Med. J.*, **287**, 167-170 (1983).
- 12) Halpern, S. E., Haindl, W., Beauregard, J., Hagen, P., Clutter, M., Amox, D., Merchant, B., Unger, M., Mongovi, C., Bartholomew, R., Jue, R., Carlo, D. & Dillman, R.: Scintigraphy with In-111-labeled monoclonal antitumor antibodies: kinetics, biodistribution and tumor detection. *Radiology*, **168**, 529-536 (1988).
- 13) Hnatowich, D. J., Virzi, F. & Doherty, P. W.: DTPA-coupled antibodies labeled with Yttrium-90. *J. Nucl. Med.*, **26**, 503-509 (1985).
- 14) Hnatowich, D. J., Griffin, T. W., Kosciuszky, C., Ruscowski, M., Childs, R. L.,

- Mattis, J. A., Shealy, D. & Doherty, P. W.:** Pharmacokinetics of an indium-111-labeled monoclonal antibody in cancer patients. *J. Nucl. Med.*, **26**, 849-858 (1985).
- 15) **Stern, P., Hagan, P., Halpern, S., Chen, A., David, G., Adams, T., Desmond, W., Brautigam, K. & Royston, I.:** The effect of the radiolabel on the kinetics of monoclonal anti-CEA in a nude mouse-human colon tumor model. In M. S. Mitchell & H. F. Oettgen (eds.), *Hybridoma in Cancer Diagnosis and Treatment*, 1st ed. p245-253, Raven Press, New York, 1982.
- 16) **Perkins, A. C. & Pimm, M. V.:** Differences in tumor and normal tissue concentrations of iodine- and indium-labelled monoclonal antibody. I. The effect on image contrast in clinical studies. *Eur. J. Nucl. Med.*, **11**, 295-299 (1985).
- 17) **Pimm, M. V., Perkins, A. C. & Baldwin, R. W.:** Differences in tumor and normal tissue concentrations of iodine- and indium-labelled monoclonal antibody. II. Biodistribution studies in mice with human tumour xenografts. *Eur. J. Nucl. Med.*, **11**, 300-304 (1985).
- 18) **Andrew, S. M., Perkins, A. C., Pimm, M. V. & Baldwin, R. W.:** A comparison of iodine and indium labelled anti CEA intact antibody, F(ab)₂ and Fab fragments by imaging tumour xenografts. *Eur. J. Nucl. Med.*, **13**, 598-604 (1988).
- 19) **Yokoyama, K., Carrasquillo, J. A., Chang, A. E., Colcher, D., Roselli, M., Sugarbaker, P., Sindelar, W., Reynolds, J. C., Perentesis, P., Gansow, O. A., Francis, B., Adams, R., Finn, R., Schlom, J. & Larson, S. M.:** Differences in biodistribution of indium-111- and iodine-131-labelled B72.3 monoclonal antibodies in patients with colorectal cancer. *J. Nucl. Med.*, **30**, 320-327 (1989).
- 20) **Sands, H. & Jones, P. L.:** Methods for the study of the metabolism of radiolabeled monoclonal antibodies by liver and tumor. *J. Nucl. Med.*, **28**, 390-398 (1987).
- 21) **Goodwin, D. A.:** Pharmacokinetics and antibodies. *J. Nucl. Med.*, **28**, 1358-1362 (1987).
- 22) **Jones, P. L., Brown, B. A., Nason, T. & Sands, H.:** Uptake of radiolabeled monoclonal antibody, B72.3, by rat liver parenchymal and non-parenchymal cells. *J. Nucl. Med.*, **28**, 573 (1987).
- 23) **Jones, P. L., Brown, B. A., Nason, T. & Sands, H.:** Uptake of radiolabel in rat liver cells after administration of radiolabeled B72.3 and its F(ab)₂ fragment. *J. Nucl. Med.*, **29**, 823-824 (1988).
- 24) **Sancho, J., Gonzalez, Escanero, J. F. & Egido, J.:** Binding kinetics of monometric and aggregated IgG to Kupffer cells and hepatocytes of mice. *Immunology*, **53**, 283-289 (1984).
- 25) **Wilson, B. S., Imai, K., Natali, P. G. & Ferrone, S.:** Distribution and molecular characterization of a cell-surface and a cytoplasmic antigen detectable in human melanoma cells with monoclonal antibodies. *Int. J. Cancer*, **28**, 293-300 (1981).
- 26) **Ando, A., Ando, I., Takeshita, M., Hiraki, T. & Hisada, K.:** Subcellular distribution of gallium-67 in tumor and liver. *Int. J. Nucl. Med. Biol.*, **9**, 65-69 (1982).
- 27) **Ferens, J. M., Krohn, K. A., Beaumier, P. L., Brown, J. P., Hellstrom, I., Hellstrom, K. E., Carrasquillo, J. A. & Larson, S. M.:** High-level iodination of monoclonal antibody fragments for radiotherapy. *J. Nucl. Med.*, **25**, 367-370 (1984).
- 28) **Abdel-Nabi, H. H., Schwartz, A. N., Higano, C. S., Wechter, D. G. & Unger, M. W.:** Colorectal carcinoma: Detection with In-111 anticarcinoma antigen monoclonal antibody ZCE-025. *Radiology*, **164**, 617-621 (1987).
- 29) **Beatty, J. D., Hyams, D. M., Morton, B. A., Beatty, B., Williams, L. E., Yamauchi, D., Merchant, B., Paxton, R. J. & Shively, J. E.:** Impact of radiolabeled antibody imaging on management of colon cancer. *Am. J. Surg.*, **157**, 13-19 (1989).
- 30) **de Duve, C., Preaaman, B. C., Gianetto, R., Wattiaux, R. & Appelmans, F.:** Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochem. J.*, **60**, 604-617 (1955).
- 31) **Ando, A., Ando, I., Takeshita, M., Hiraki, T. & Hisada, K.:** Subcellular distribution of In-111 and Yb-169 in tumor and liver. *Eur. J. Nucl. Med.*, **6**, 221-226 (1981).

- 32) **Takeda, S., Uchida, T. & Matsuzawa, T.:** A comparative study of lysosomal accumulation of gallium-67 and indium-111 in Morris hepatoma 7316A. *J. Nucl. Med.*, **18**, 835-839 (1977).
- 33) **Hosain, F., McIntyre, P. A., Poulouse, K., Stern, H. S. & Wagner, H. N. Jr.:** Binding of trace amounts of ionic indium-113m to plasma transferrin. *Clin. Chim. Acta*, **24**, 69-75 (1969).
- 34) **Wochner, R. D., Adatepe, M., van Amburg, A. & Potchen, E. J.:** A new method for estimation of plasma volume with the use of the distribution space of indium-113m-transferrin. *J. Labo. Clin. Med.*, **75**, 711-720 (1970).
- 35) 木村一郎: トランスフェリン. *日本臨床*, **44**, 156-162 (1986).
- 36) 織田敏次, 横野 靖: 肝細胞のリソゾーム. *代謝*, **5**, 828-834 (1968).
- 37) **Hopf, U., Buschenfelde, K-H. M. & Dierich, M. P.:** Demonstration of binding sites for IgG Fc and the third complement component (C3) on isolated hepatocytes. *J. Immunol.*, **117**, 639-645 (1976).
- 38) **Ando, A., Ando, I., Hiraki, T., Takeshita, M. & Hisada, K.:** Mechanism of tumor and liver concentration of In-111 and Yb-169: In-111 and Yb-169 binding substance in tumor and liver. *Eur. J. Nucl. Med.*, **7**, 298-303 (1982).
- 39) **Mears, C. F., Goodwin, D. A., Leung, C. S-H., Girgis, A. Y., Silvester, D. J., Nunn, A. D. & Lavender, P. J.:** Covalent attachment of metal chelates to protein: The stability in vivo and in vitro of the conjugate of albumin with a chelate of indium-111. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **73**, 3803-3806 (1976).
- 40) **Mitrenga, D., Arnold, W., Muller, O. & Mayersbach, H. V.:** The fate of injected human IgG in the mouse liver. *Cell Tissue Res.*, **156**, 359-376 (1975).
- 41) **Fukumoto, T. & Brandon, M. R.:** Importance of the liver in immunoglobulin catabolism. *Res. Veterinary Sci.*, **32**, 62-69 (1982).
- 42) **Shochat, D., Sharkey, R. M., Vattay, A., Primus, F. J. & Goldenberg, D. M.:** In-111 chelated by DTPA-antibody is retained in the liver as a small molecular weight moiety. *J. Nucl. Med.*, **27**, 943 (1986).
- 43) **Cole, W. C., DeNardo, S. J., Mears, C. F., McCall, M. J., DeNardo, G. L., Epstein, A. L., O'Brien, H. A. & Moi, M. K.:** Comparative serum stability of radiochelates for antibody radiopharmaceuticals. *J. Nucl. Med.*, **28**, 83-90 (1987).
- 44) **Esteban, J. M., Schlom, J., Gansow, O. A., Atcher, R. W., Brechbiel, M. W., Simpson, D. E. & Colcher, D.:** New method for the chelation of indium-111 to monoclonal antibodies: Biodistribution and imaging of athymic mice bearing human colon carcinoma xenografts. *J. Nucl. Med.*, **28**, 861-870 (1987).
- 45) **Blend, M. J., Greager, J. A., Atcher, R. W., Brown, J. M., Brechbiel, M. W., Gansow, O. A. & Das Gupta, T. K.:** Improved sarcoma imaging and reduced hepatic activity with indium-111-SCN-Bz-DTPA linked to MoAb 19-24. *J. Nucl. Med.*, **29**, 1810-1816 (1988).
- 46) **Haseman, M. K., Goodwin, D. A., Mears, C. F., Kaminski, M. S., Wensel, T. G., McCall, M. J. & Levy, R.:** Metabolizable In-111 chelate conjugated anti-idiotypic monoclonal antibody for radioimmunodetection of lymphoma in mice. *Eur. J. Nucl. Med.*, **12**, 455-460 (1986).
- 47) **Quadri, S. M., Paik, C. H., Yokoyama, K. & Reba, R. C.:** Biodistribution of an In-111 labeled antibody DTPA conjugate containing ester bonds. *J. Nucl. Med.*, **27**, 959 (1986).
- 48) **Yokoyama, K., Paik, C. H., Quadri, S. M., Reynolds, J. C., Min, C. Y., Maloney, C. H., Larson, S. M. & Reba, R. C.:** Amplification of antibody tumor targeting by chemical modification with ester bond. *J. Nucl. Med.*, **28**, 572 (1987).
- 49) **Paik, C. H., Yokoyama, K., Quadri, S. M., Min, C. Y., Shin, S. Y., Maloney, P. J., Larson, S. M. & Reba, R. C.:** Reduction of background activities by introduction of a diester linkage between antibody and a chelate in radioimmunodetection of tumor. *J. Nucl. Med.*, **30**, 1693-1701 (1989).
- 50) **Hnatowich, D. J., Virzi, F. & Ruszkowski, M.:** Investigations of avidin and biotin for imaging applications. *J. Nucl. Med.*, **28**, 560 (1987).
- 51) **Hnatowich, D. J., Virzi, F. & Ruszkowski, M.:** Investigations of avidin and biotin for imaging applications. *J. Nucl. Med.*, **28**, 1294-1302

(1987).

52) Keenan, A. M., Weinstein, J. N., Mulshine, J. L., Carrasquillo, J. A., Bunn, P. A. Jr., Reynolds, J. C. & Larson, S. M.: Immunolymphoscintigraphy in patients with lymphoma after subcutaneous injection of indium-111 labeled T101 monoclonal antibody. *J. Nucl. Med.*, 28, 42-46 (1987).

53) Malamitsi, J., Skarlos, D., Fotiou, S., Papakostas, P., Aravantinos, G., Vassilarou, D., Taylor-Papadimitriou, J., Koutoulidis, K., Hooker, G., Snook, D. & Epenetos, A. A.: Intracavitary use of two radiolabeled tumor-associated monoclonal antibodies. *J. Nucl. Med.*, 29, 1910-1915 (1988).

Studies on the Hepatic Uptake of In-111 Labeled Monoclonal Antibodies and the Method to Reduce the Hepatic Uptake Seigo Kinuya, Department of Nuclear Medicine, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med. Soc., 99, 315—341 (1990)

Key words In-111 labeled monoclonal antibody, hepatic uptake, subcellular distribution, lysosome, Fe pre-load

Abstract

To evaluate the mechanism for prolonged retention of In-111 labeled monoclonal antibody (In-111 MoAb) by the liver, the subcellular kinetics of In-111 MoAbs was investigated. In-111 225.28S (anti-melanoma, IgG_{2a}), 1.48 MBq/10 μ g, was injected into groups of normal SD rats. The radioactivity of In-111 in the liver increased with time and reached approximately 1% of the injected dose/g (%ID/g) 24 hr after MoAb injection. The liver was homogenized with 0.25 M sucrose containing 0.01 M Tris-HCl buffer (pH 7.6), and subcellular fractionation was carried out by 3-step (ultra-) centrifugation. The radioactivity for each fraction including the nuclear, mitochondrial (lysosomal), microsomal and supernatant fractions was measured and expressed as a percentage of the total activity from all the fractions. Initially the supernatant was a predominant fraction of the In-111 radioactivity, 61% at 3 hr, but the value decreased with time to 21% at 72 hr, while the activity of the mitochondrial fraction continued to increase from 11% to 44%. The HPLC analysis for the supernatant revealed that In-111 activity at the earlier time points was mainly eluted with the intact IgG peak, thereafter this major peak activity was reduced with associated activity peaks found in smaller moiety fractions. The subcellular kinetics of I-125 225.28S was also investigated in the same manner. The I-125 225.28S, however, did not show the sequential distribution changes found with In-111 225.28S. In-111 ZCE025(anti-CEA MoAb), 0.37 MBq/5 μ g, was injected into groups of mice bearing human colon cancer. The liver and tumor were homogenized with 0.25 M sucrose and then subcellular fractionation was carried out by 4-step (ultra-) centrifugation. This method isolated the lysosomal fraction from the mitochondrial fraction. The activity for each fraction including the nuclear, mitochondrial, lysosomal, microsomal and supernatant fractions was measured. In the liver, the radioactivity of the supernatant fraction decreased with time (52%, 3 hr→20%, 144 hr), while the lysosomal activity continued to increase from 14% to 29%, as found in the experiment using the normal rats. In the tumors, the subcellular distribution of the In-111 radioactivity was relatively

unchanged throughout the study. The lysosomal fraction was not a predominant fraction of In-111 radioactivity in the tumors. To investigate the effect of the ferric ion on the In-111 MoAb uptake by the liver and tumor, 4 mg of ferric ion (Fe^{3+}) was administered 48 hr prior to the In-111 ZCE025 injection. For the Fe pre-loaded group at 24 hr following the MoAb injection, hepatic uptake decreased as compared to the control group ($13\% \text{ID/g} \rightarrow 8\% \text{ID/g}$), while the tumor uptake did not decrease. The intrahepatic lysosomal radioactivity was less for the Fe pre-loaded group than for the control group, but the lysosomal radioactivity did not increase with time (13-17%). When 2 mg of Fe^{3+} was administered at 48 hr prior to the MoAb injection or daily dose of 0.5 mg was administered for 4 days until the day before the MoAb injection, the hepatic uptake also decreased to the same value as found with dose of 4 mg. Although the hepatic uptake was suppressed when 4 mg of Fe was loaded 6 hr or 30 min prior to the MoAb injection, uptakes in other organs (spleen, kidney and bone) in these two groups increased as compared to the control group or the group receiving the same amount of Fe at 48 hr prior to the MoAb injection. These results demonstrated that the lysosome played an important role in the hepatic retention of the In-111 MoAb. Once taken up by the liver, the MoAb was metabolized in the supernatant and the In-111 ion was transchelated from DTPA onto the lysosomal substances resulting in prolonged retention by the liver. The lysosome, as an ionic pool, in the liver could be saturated by the preinjected Fe^{3+} , resulting in a decrease of hepatic uptake without sacrificing the tumor uptake or increasing the radioactivity in any other organs; hence tumor targeting can be enhanced.