



Title	111Inの腫瘍集積機序に関する研究
Author(s)	内田, 常夫; 檜林, 和之; 武田, 俊平 他
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1976, 36(12), p. 1107-1112
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/15158
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

^{111}In の腫瘍集積機序に関する研究

神戸大学医学部放射線医学教室

内田 常夫 楢林 和之

東北大学抗酸菌病研究所放射線医学部門

武田 俊平 松沢 大樹

(昭和51年7月2日受付)

A Study on Accumuration Mechanism of ^{111}In in Malignant Tumor

Tsunao Uchida*, Kazuyuki Narabayashi*, Shumpei Takeda**

and Taiju Matsuzawa**

*Department of Radiology, School of Medicine, Kobe University, Kobe, Japan

**Department of Radiology and Nuclear Medicine, the Research Institute for Tuberculosis,
Leprosy and Cancer, Tohoku University, Sendai, Japan

Research Code No.: 799

Key Words: ^{111}In chloride, Accumulation mechanism, Morris hepatoma 7316A, Lysosomal fraction

Subcellular distribution of ^{111}In was quantitatively determined in order to clarify the accumulation mechanism of the radioisotope in malignant tumor tissues. Buffalo rats bearing Morris hepatoma 7316A in both thighs were injected intraperitoneally 200 μCi ^{111}In chloride and were sacrificed 24 hours later. Subcellular fractionation of tumor tissues was carried out according to the method of C. de Duve et al. and radioactivity of each fraction was counted. As a control the normal rat liver was used. In the case of tumor about 90% of the total radioactivity was distributed among the soluble, nuclear and lysosomal fractions. On account of its low protein content (4.8%), the relative radioactivity was the highest in the lysosomal fraction. The lysosomal fraction was exposed to repetitive freezing (-30°C) and thawing (37°C), and several concentrations of Triton X-100 and the resultant stepwise release of acid phosphatase activity were measured. There was a close relationship between them (correlation coefficient 0.93). From these results it was concluded that ^{111}In accumulated especially in the lysosomes. This comprises an essential mechanism of tumor deposition of radioisotope.

I 序 論

今日、悪性腫瘍の診断に腫瘍シンチグラフィーは非観血的検査法としては重要な位置を占めている。高い診断能のある腫瘍シンチグラフィーを行うために、特異的に腫瘍に集積する物質の開発に努力がなされ、数種類の臨床に有用な腫瘍親和性物質が見出された。 ^{111}In は1969年 Hunter ら⁷⁾⁸⁾

により、その腫瘍親和性が始めて報告された。Edwards ら⁴⁾により見出された ^{67}Ga と共に腫瘍の診断に広く用いられ、その有用性から臨床的研究の報告も多い¹⁰⁾¹²⁾¹³⁾。 ^{111}In や ^{67}Ga は生体内での生物学的変化が少なく安定している利点があり、臨床上好都合である。しかし、これらの核種がどのような機序により腫瘍に集積するのか、又炎症

にも集積するのはいかなる理由なのか不明である。 ^{111}In の腫瘍集積の機序に関する研究の報告は非常に少なく、未解決で残されている。

我々は集積機序を明らかにする目的で、実験腫瘍を用いて腫瘍細胞内の ^{111}In の分布を分析的且つ定量的に検討した。

II 実験材料及び方法

1. 核種

キャリアーフリーの ^{111}In chloride を用いた。(pH 1—3 日本メジフィジックス社取扱)

2. 実験動物及び腫瘍系

体重：約 150g の雌のバッフアローラット(星野実験動物飼育所より購入)を用いた。腫瘍はモーリス肝癌7316A(国立ガンセンター、杉村隆博士より譲渡)を用い、ラットの両側大腿筋肉内に移植した。対照として正常ラットの肝臓を用いた。

3. ^{111}In の放射能活性の測定

東芝製ウェル型シンチレーションカウンターで測定した。

4. 細胞分画の方法

C. deDuve ら³⁾の細胞分画法を用いた。

200 μCi の ^{111}In chloride をラットの腹腔内に注入し、24時間後に屠殺して、直ちに腫瘍及び正常肝を摘出した。この試料に3倍量の0.25MのSucroseを加え、0°CでPotter-Elvehjem型のテフロン製ホモゲナイザーにより1,300rpmで1回の破碎を行った。破碎液を1,000gで10分間の遠心後、沈澱を3倍量の0.25M Sucroseで洗浄した。洗浄はピペットを用いて行い、細胞内小器官の破壊を可能な限り少なくした。これを600gで10分間の遠心によつて核分画を分離した。上清を集めて10倍量になるように0.25MのSucroseを加えて、更にAppelmansら¹⁾の方法に従い分画を続けた。3,300gで10分間の遠心によりミトコンドリア分画を分離し、上清を10,000gで25分間の遠心によりライソゾーム分画を分離した。さらに上清を超遠心機(日立製55 PA型, PR 40 Aローター)を用いて105,000gで60分間遠心を行い、ミクロゾーム分画と可溶性分画とに分離して分画

を終了した。

5. 酸フォスファターゼの測定

ライソゾームのマーカー酵素として酸フォスファターゼを測定した。測定はIgarashiら⁹⁾¹⁴⁾の方法に従つたが、Glucose-6-phosphataseを不活化するために、各分画の稀釈液に基質を添加する前に0.5Mの酢酸ナトリウム緩衝液(pH 5.0)を入れ、37°Cで10分間加温する操作をこの方法に追加した。その後、基質のp-nitro phenyl phosphateを添加し、37°Cで10分間加温後、直ちに0.25Nの水酸化ナトリウムを加えて発色させた。これを分光光度計(日立139型)により410m μ で測定した。

6. 蛋白質の測定

Lowryら¹¹⁾の方法で測定した。各分画の稀釈液に3Mのトリクロロ酢酸を添加し、1,000gで10分間遠心した。沈澱に1Nの水酸化ナトリウムを加えて30分間放置後、2%の炭酸ナトリウムと硫酸銅との混合液を加えて発色させた。これを30分後に分光光度計により546m μ で測定した。

7. ^{111}In とライソゾームとの関係

Fleon R 12による凍結(-30°C)と融解(37°C)を4回繰り返す、ライソゾームを段階的に破壊した。各段階で可溶性化された ^{111}In と酸フォスファターゼの活性を測定し、両者の間の相関係数を求めた。又、Triton X-100によるライソゾームの破壊も行つた。

III 結 果

1. 腫瘍のシンチスキャンニング

200 μCi の ^{111}In chloride をラットの腹腔内に注入し、24時間後にシンチスキャンニングを行うと、Fig. 1の各く、 ^{111}In は腫瘍、肝臓、腎臓に取り込まれていた。

2. ^{111}In の腫瘍細胞内での分布

^{111}In の放射能活性は、Table 1の如くであり可溶性分画(C分画)に約34%で最も多く、核分画(N分画)に約31%、ライソゾーム分画(LM分画)に約26%あり、従つて全体の約90%の放射能活性がこれらの分画に分布していた。ミトコンドリア分画(HM分画)及びミクロゾーム分画(M

Table 1 Subcellular distribution of ¹¹¹In and acid phosphatase in Morris hepatoma 7316A. Statistics refer to the means±standard deviations as percentage. Abbreviations : N=Nuclear fraction, HM=Mitochondrial fraction, LM=Lysosomal fraction, M=Microsomal fraction, C=Cytosol.

	N	HM	LM	M	C
¹¹¹ In (%)	30.5±2.6	4.7±0.8	25.6±1.7	5.6±0.7	33.7±2.4
Protein (%)	44.9±7.5	3.1±1.7	4.8±0.8	12.7±2.8	34.5±4.9
Acid phos. (%)	43.7±3.7	5.5±2.9	16.8±1.9	13.0±5.7	21.1±4.3

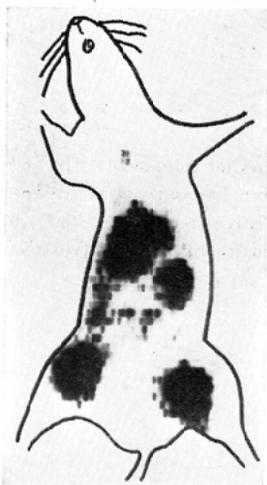


Fig. 1 ¹¹¹In scanning of Morris hepatoma 7316 A in both thighs, both kidneys and liver are also scanned as positive.

分画)には共に約5%の分布しかなかった。

次に多くの放射能活性があつた3つの分画の蛋白量を比べると、蛋白量は可溶性分画に約35%、核分画に約45%あるにもかかわらず、ライソゾーム分画には約5%あるにすぎなかつた。従つて比活性(蛋白量当たりの¹¹¹Inの放射能活性)を求めると、Fig. 2の如くライソゾーム分画が5.3で最も高く、可溶性分画の1.0及び核分画の0.7に

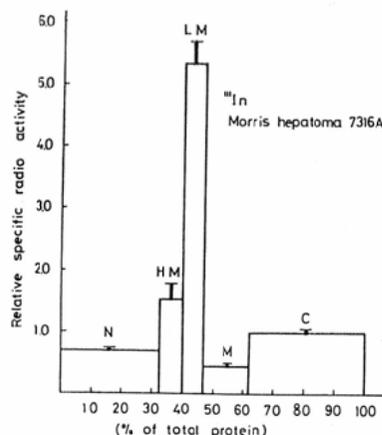


Fig. 2 Distribution pattern of radioactivity of ¹¹¹In in Morris hepatoma 7316A. This graph is constructed for each group of experiments by plotting the mean relative specific radioactivity of the fractions against their mean relative protein content. The area of each block is thus proportional to the percentage of radioactivity recovered in the corresponding fraction.

比べて5倍以上にもなり、¹¹¹Inはライソゾーム分画に最も高濃度に集積していることを示した。

又、放射能活性の少なかつたミトコンドリア分画も比活性では1.5と比較的高値を示した。

3. ¹¹¹Inの正常肝細胞内での分布

Table 2 Subcellular distribution of ¹¹¹In and acid phosphatase in the normal liver.

	N	HM	LM	M	C
¹¹¹ In (%)	13.8±2.5	13.4±1.5	41.5±4.6	6.8±0.9	24.6±1.8
Protein (%)	32.2±5.6	7.5±2.0	6.7±2.7	15.0±2.5	38.6±4.3
Acid phos. (%)	18.5±3.6	10.3±2.1	30.3±2.3	14.1±2.3	27.2±3.3

^{111}In の放射能活性は、Table 2 の如くライソゾーム分画に約42%と最も多く分布し、可溶性分画には約25%、核分画には約14%の分布があつた。蛋白量は可溶性分画に約39%、核分画に約32%あるが、ライソゾーム分画には約7%しかなかつた。

従つて比活性では、Fig. 3 の如くライソゾーム分画が 6.2で最も高かつた。ミトコンドリア分画も約 1.8で比較的高かつたが、その他の分画はすべて 1.0以下であつた。

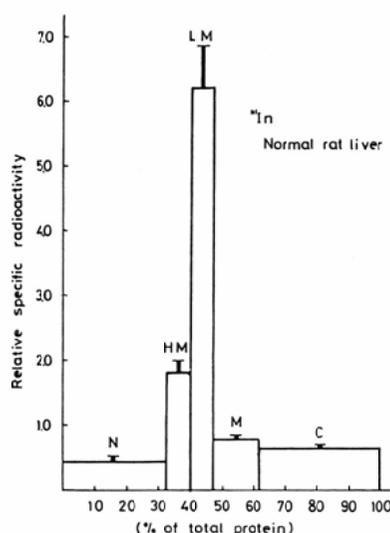


Fig. 3 Distribution pattern of radioactivity of ^{111}In in the normal liver.

4. ライソゾーム分画中の ^{111}In とライソゾームとの関係

ライソゾームの段階的な破壊によつて可溶化された ^{111}In と酸フォスファターゼ (ライソゾームのマーカー酵素) の活性は、Fig. 4 及び Fig. 5 に示す如く腫瘍及び正常肝で共に高い相関関係にあり、相関係数は腫瘍で0.93、正常肝で0.95であつた。

5. 酸フォスファターゼの細胞内分布

正常肝の酸フォスファターゼの細胞内分布に関して、今回の Fig. 6 に示した実験結果は C. de Duve らの報告している結果とほぼ一致してい

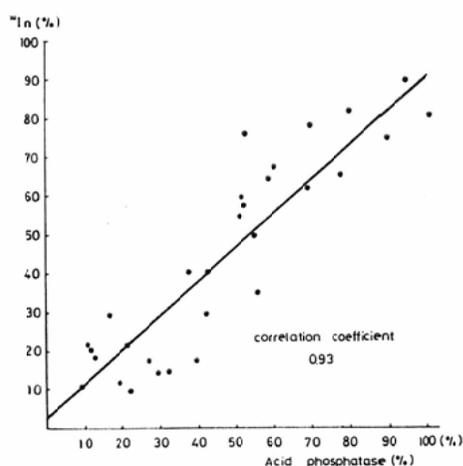


Fig. 4 A parallel release of ^{111}In and acid phosphatase from lysosomes of Morris hepatoma 7316 A by repetitive freezing (-30°C) and thawing (37°C) and treatment with TritonX-100. Correlation coefficient is 0.93.

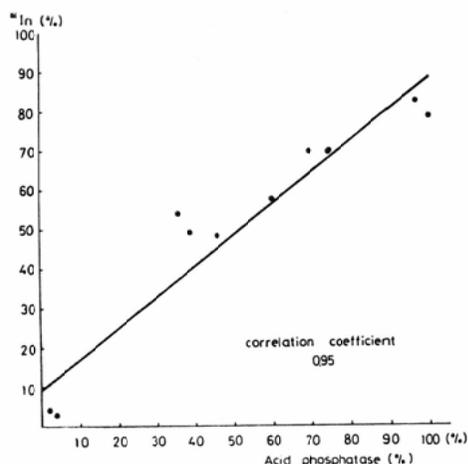


Fig. 5 A parallel release of ^{111}In and acid phosphatase from lysosomes of the normal liver. Correlation coefficient is 0.95.

た。腫瘍では、Fig. 7 の如く核分画の比活性が正常肝に比べて高かつたが、酸フォスファターゼの細胞内分布は両者でほぼ同じパターンであつた。

IV 考 察

1973年 Hayes ら⁶⁾は ^{111}In を取り込んだ腫瘍細胞の 105,000g の上清成分をとり、それをゲル漏

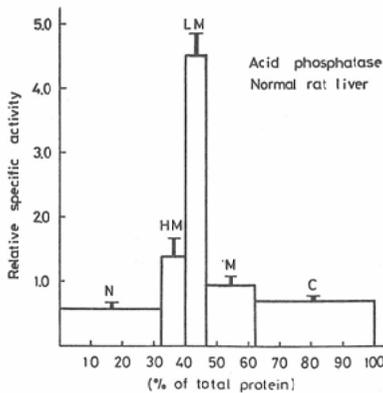


Fig. 6 Distribution pattern of acid phosphatase in Morris hepatoma 7316A. This graph is constructed for each group of experiments by plotting the mean relative specific activity of the fractions against their mean relative protein content. The area of each block is thus proportional to the percentage of activity recovered in the corresponding fraction.

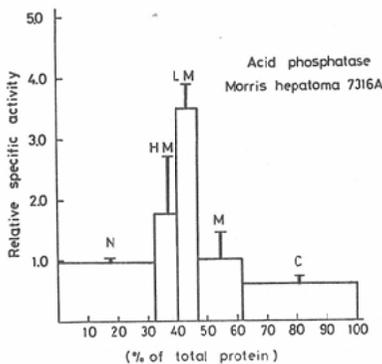


Fig. 7 Distribution pattern of acid phosphatase in the normal liver.

過により分画した。その結果、腫瘍では分子量4～5万に相当する分画に正常肝と比べ著しい放射能活性のピークを認めたので、この分子量に相当する高分子物質が腫瘍細胞内で特異的に ^{111}In と結合しているのであろうと推測した。しかし彼等は上清成分を取るのに蒸留水を用いたため、細胞内小器官が著しく破壊されて、その中に含まれていた ^{111}In が可溶化されて上清成分中へ移行している可能性がある。従つてこの方法では、上清成分に含まれている ^{111}In の割合が本来の可溶性分

画のものか疑問である。

そこで今回、我々は ^{111}In の細胞内での分布を可能な限り定量的に調べるために、細胞内小器官の破壊が最も少ないと考えられているC. deDuveらの方法で細胞内分画を行った。

その結果、腫瘍では ^{111}In は可溶性分画、核分画、ライソゾーム分画に最も多く分布し、この3分画で全体の約90%を占めていた。しかし蛋白量ではライソゾーム分画は他の2つの分画に比べ1/7～1/9しかなく、極端に少なかった。そこで各分画について ^{111}In の放射能活性の濃度を調べるために、蛋白量当たりの ^{111}In の放射能活性(比活性)を求めた。比活性ではライソゾーム分画が最も高く、 ^{111}In が非常に高濃度にライソゾーム分画に集積していることを示していた。ライソゾーム分画は主としてライソゾームを含むので、多くの ^{111}In はこのライソゾーム中に集積していると考えられた。そこで ^{111}In とライソゾームとの関係を確認するために、ライソゾームを段階的に破壊して、その中から可溶化される ^{111}In と酸フォスファターゼ(ライソゾームのマーカー酵素)の活性を測定した。両者の間には高い相関関係(0.93)があり、 ^{111}In はライソゾーム中に集積していることが確かめられた。

可溶性分画にもかなり多くの放射能活性が分布し、腫瘍では正常肝に比べ約1.5倍であり、比活性も両者の間にかかなり大きな差があつた。この分画中の ^{111}In と酸フォスファターゼの活性との相関係数を求めると0.88であり、この分画に分布した ^{111}In は分画操作中に破壊されたものであると推定された。又、腫瘍の可溶性分画に ^{111}In の分布が多い理由として、腫瘍細胞のライソゾームは正常細胞のものに比べて壊れやすいと考えられた¹⁷⁾。

核分画に関しては、腫瘍では正常肝の2倍以上の放射能活性があつたが、腫瘍は正常組織に比べ線維成分に富むのでセルデブリが多くなり、それに付着した ^{111}In が核分画に含まれているためと考えられた。又、今回の実験では細胞内小器官の破壊を最小限にするために破砕を1回のみとし、

沈澱の洗浄もビペットにより行つたためにセルデブリが増したと考えられた。

ミトコンドリア分画の ^{111}In の比活性は腫瘍では約 1.5, 正常肝では約 1.8あり, 比較的高かつた。この分画中の ^{111}In も酸フォスファターゼと高い相関関係にあり, やはりライソゾームに集積していると考えられた。C. deDuve らの方法でもミトコンドリア分画にライソゾームがかなり多く含まれるのは避けられないことが判つている。

最近 Brown ら²⁾は ^{111}In と同じ第Ⅲ族元素である ^{67}Ga を使つた実験で, ^{67}Ga が腫瘍細胞内の micro vesicle に多く集積したと報告している。今回の我々の実験結果では, micro vesicle が含まれるマイクロゾーム分画への ^{111}In の分布は約 6% で非常に少なく, 又, 比活性も約 0.4と低く, micro vesicle に取り込まれているとは考えられない結果となつた。

今回の実験結果より, ^{111}In は腫瘍細胞のライソゾームに集積していることが解明された。ライソゾームはすべての組織に含まれているにもかかわらず腫瘍に特異的に集積する理由として, 腫瘍における ^{111}In の取り込みのみでなく排泄も関係していると考えられる。

腫瘍細胞膜は正常細胞膜に比べて陰性荷電が大きく, 腫瘍の悪性度に比例してその絶対値が大きくなることが知られている。従つてプラス 3 価のイオンである ^{111}In は正常細胞膜よりも腫瘍細胞膜に付着しやすくと推測できる。細胞膜に付着した ^{111}In はパイノサイトーシスによりライソゾーム中に取り込まれるのであろう⁵⁾¹⁶⁾。又, 腫瘍細胞のライソゾームは正常細胞のライソゾームに比べ機能が低下し, 排泄機能が悪いために, 元来生体にとって異物である ^{111}In は長く排泄されずにライソゾーム中に蓄積していると考えられる。Paterson ら¹⁵⁾は ^{67}Ga を用いて腫瘍と正常組織での集積を経時的に測定した。 ^{64}Ga は正常組織では比較的早く減少し, 48時間後には約40%になるのに対し, 腫瘍では75時間後もほとんど減少がないと報告している。

腫瘍の組織型の違いにより, ^{111}In の取り込み

に差がみられる場合があるが, 組織型によりライソゾームの機能が異なることが原因と思われる。今後, 腫瘍の組織型の違いによるライソゾームの排泄機能の差を追求し, その減衰曲線を調べれば, 臨床的に腫瘍シンチグラフィによる腫瘍の組織型の診断が可能と考えられる。

V 結 語

^{111}In は腫瘍細胞内のライソゾーム中に集積することが定量的に確かめられ, 集積機序の本態が解明できた。

References

- 1) Appelmans, F., Wattiaux, R. and de Duve, C.: *Biochem. J.*, 59 (1955), 438—445.
- 2) Brown, D.H., Byrd, B.L., Carlton, J.E., Swartzendruber, D.C. and Hayes, R.L.: *Cancer Res.*, 36 (1976), 956—963.
- 3) de Dube, C., Pressman, B.C., Gianetto, R., Wattiaux, R. and Appelmans, F.: *Biochem. J.*, 60 (1955), 604—617.
- 4) Edwards, C.L. and Hayes, R.L.: *J. Nucl. Med.*, 10 (1969), 103—106.
- 5) Gordon, A.H.: *Lysosomes in Biology and Pathology*, p. 95. Vol. 3, Amsterdam, London, North-Holland Publishing Co. 1973.
- 6) Hayes, R.L. and Carlton, J.E.: *Cancer Res.*, 33 (1973), 3265—3273.
- 7) Hunter, W.W. and Kock, H.W.: *J. Nucl. Med.*, 10 (1969), 343.
- 8) Hunter, W.W. and Riccobono, X.J.: *J. Nucl. Med.*, 11 (1970), 329.
- 9) Igarashi, M. and Holland, V.P.: *J. Biol. Chem.*, 243 (1968), 6083—6089.
- 10) Lillien, D.L., Berger, H.G., Anderson, D.P. and Bennett, L.R.: *J. Nucl. Med.*, 14 (1973), 184—186.
- 11) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.L.: *J. Biol. Chem.*, 193 (1951), 265—275.
- 12) Martin, P. and Goodwin, D.A.: *J. Nucl. Med.*, 12 (1971), 668—672.
- 13) Merrick, M.V.: *J. Nucl. Med.*, 116 (1975), 66—68.
- 14) Neil, N.W. and Horner, M.W.: *Biochem. J.*, 92 (1964), 217—224.
- 15) Paterson, A.H., Yoxall, A., Smith, I., Taylor, D.M. and McCready, V.R.: *Cancer Res.*, 36 (1976), 452—457.
- 16) Trouet, A., Campeneeri, D.D. and de Duve, C.: *Nature, New Biol.*, 239 (1972), 110—112.
- 17) Weissmann, G.: *Federation Proc.*, 23 (1964), 1044.