



Title	Fe-Bleomycin, Co-Bleomycinの腫瘍組織内分布
Author(s)	鰯目, 一郎; 新部, 英男; 原, 富夫 他
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1977, 37(5), p. 472-478
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/18003">https://hdl.handle.net/11094/18003</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

## Fe-Bleomycin, Co-Bleomycin の腫瘍組織内分布

群馬大学医学部放射医線学教室（主任 永井輝夫教授）

鶴 目 一 郎 新 部 英 男

原 富 夫 加 藤 正 臣

(昭和51年11月9日受付)

(昭和51年12月3日最終原稿受付)

### Distribution of Fe-Bleomycin, Co-Bleomycin in Tumor Tissue

Ichiro Yonome, Hideo Niibe, Tomio Hara and Masaomi Kato

Department of Radiology, Gunma University School of Medicine

(Director: Prof. Teruo Nagai)

*Research Code No.: 799*

*Key Words: Fe-Bleomycin, Co-Bleomycin, Tumor affinity*

Ferric bleomycin (Fe-BLM) complex was found stable in the region of BLM excess and in the region of pH greater than 4.8. When this was injected intravenously into a mouse, it did not dissociate during the period of observation.

Localization of Fe-BLM complex in mammary carcinoma of the C3H mouse and MC-induced squamous cell carcinoma was investigated by histochemical analysis of iron. In the tumor tissue, the iron as was identified by the Berlin blue reaction was seen localized in the stroma cells, histiocyte-like cells in granulation tissue and hair roots, but not in the tumor nests. On the contrary, Co-BLM was seen localized in the tumor nests, especially in the nuclear part of the tumor cells as investigated by cobalt staining.

There was a clear-cut difference in the distribution pattern between  $^{59}\text{Fe}$ -BLM and  $^{60}\text{Co}$ -BLM. While Fe-BLM retained much of "bleomycin" character, the Co-BLM behaved like cobalt itself in vivo in the mouse.

Thus, the chelating metal would greatly influence the distribution pattern of bleomycin.

#### 1. はじめに

癌の診断、治療のために悪性腫瘍に特異的に集積する薬剤の開発が積極的におこなわれている<sup>①②③</sup>。

梅沢ら<sup>④</sup>によつて発見されたBleomycin(BLM)は扁平上皮癌に対して特異的に抗腫瘍性を示す薬剤として治療に使用されている<sup>⑤</sup>。

BLM は各種の金属とキレートを形成し易い性

質を有しているために<sup>⑥</sup>、河野ら<sup>⑦</sup>、Nouel ら<sup>⑧</sup>は Tumor scanning の薬剤として腫瘍親和性の  $^{57}\text{Co}$ -BLM を開発している。

抗腫瘍性または腫瘍親和性薬剤の腫瘍組織内分布を知ることは、薬剤と腫瘍細胞との相互作用を知る上で重要なことである。

BLM の細胞内分布を知る方法としては細胞分画法とミクロオートラジオグラフ法 (ARG 法)

があるが、薬剤の局在性を知るために ARG 法が優れている。藤本<sup>11</sup>は塗沫標本によつて腹水型腫瘍細胞内における <sup>14</sup>C-BLM の分布を検討しているが固型腫瘍の組織標本における標識 BLM のミクロ ARG はいまだ成功していないようである。その理由としては BLM が水溶性であるために、技術的な困難さがあるためと思われる<sup>9</sup>。

BLM が発見されたときは銅とキレートした complex の状態で得られた。精製の過程で銅が加えられると、この complex はより精製されやすくなることが発見されている<sup>9</sup>。

金尾は in vivo における BLM と銅の関係を詳細に検討し<sup>10</sup>、BLM とキレートした銅を組織化学的に検出することによって組織内に局在する BLM を間接的に証明している<sup>11)12)</sup>。

この報告では、Fe (III) が BLM と結合すること、C3H 系マウスに自然発生した乳癌（腺癌）の初代移植腫瘍ならびに dd 系マウスに 20-Methylcholanthrene (20-MC) を塗布して誘発させた皮ふ癌（扁平上皮癌）をもつたマウスの体内における <sup>59</sup>Fe-BLM, <sup>60</sup>Co-BLM の分布、および癌組織内における Fe-BLM, Co-BLM の局在性を組織化学的に検索した結果について述べる。

## 2. 実験方法

### 2.1. 担癌マウス

2.1.1. 乳癌：C3H/He. Mr 系雄性マウスに自然発生した乳癌を生後約 8 週の雄性マウスの側腹部皮下に移植した初代移植腫瘍で、腫瘍径が約 1 cm に達したマウスを実験に用いた。

2.1.1. 扁平上皮癌：ddG 系雄性マウスの皮ふに 20-MC (和光純薬製) の 0.25% ベンゾール溶液を週 3 回、合計 20 回塗布し、約 6 カ月後に扁平上皮癌が発生したマウスを実験に用いた。

### 2.2. Fe-BLM, Co-BLM の調製

2.2.1. <sup>59</sup>Fe-BLM, <sup>60</sup>Co-BLM: <sup>59</sup>Fe-Cl<sub>3</sub> (比放射能: 13.5 mCi/mg), <sup>60</sup>CoCl<sub>2</sub> (比放射能: 73.1 mCi/mg) を BLM の食塩水溶液に加えてそれぞれが 10 μCi/ml になるように調製した。

2.2.2. Fe-BLM: BLM (日本化薬 KK から提供を受けた) と Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> (和光純薬製特級)

をそれぞれ生理食塩水に溶解し、遊離鉄が存在しないように、Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> 1 M に対して BLM 約 2 M の割合で混合した<sup>11</sup>。但し BLM の分子量は 1500 として計算し<sup>24</sup>、アンプルの表示による 15 mg 力値は 10 mg 重量<sup>12</sup>とした。

2.2.3. Co-BLM: BLM と CoCl<sub>2</sub> (和光純薬製特級) の生理食塩水溶液を、CoCl<sub>2</sub> 1 M に対して BLM 約 2 M の割合で混合した。

2.3. <sup>59</sup>FeCl<sub>3</sub>, <sup>59</sup>Fe-BLM, <sup>60</sup>CoCl<sub>2</sub>, <sup>60</sup>Co-BLM の担癌マウスにおける体内分布

各標識化合物を担癌マウスの尾静脈からマウスあたり 1 μCi 宛投与し、5 分後に屠殺した。摘出した各臓器の重量を測定した後、ウェル型シンチレーションカウンターで各臓器の放射能を計測した。臓器への分布比は次式により求めた。

$$\text{分布比} = \frac{\text{各臓器の cpm/g}}{\text{全試料臓器の cpm/g}} \\ (\text{平均 cpm/g})$$

<sup>59</sup>Fe-BLM と <sup>59</sup>FeCl<sub>3</sub> の分布の差を比較するために <sup>59</sup>Fe-BLM 分布比/<sup>59</sup>FeCl<sub>3</sub> 分布比値を用いた。<sup>60</sup>Co-BLM, <sup>60</sup>CoCl<sub>2</sub> についても同様な値を用いた。数値は一群 3 匹のマウスの平均値を用いた。

### 2.4. 組織化学的染色

担癌マウスの尾静脈から、Fe-BLM (Fe として 74 ng), 或は Co-BLM (Co として 39 ng) を注射し、Co-BLM の排泄が迅速であることを考慮して<sup>3</sup> 5 分後に屠殺した。

組織標本の作成は鉄についてはベルリンブルー反応<sup>16</sup>、コバルトについては Timm の硫化銀法によつた<sup>12</sup>。

## 3. 実験結果

### 3.1. 扁平上皮癌の発生

20-MC の 0.25% ベンゾール溶液をマウスの皮ふに体毛を抜かないで塗布すると、塗布開始後約 6 カ月で 40 匹中 31 匹に扁平上皮癌が発生した（体毛を抜いて塗布すると肉腫の発生が多く見られた）。

この扁平上皮癌を同系マウスの皮下および腹腔内に 20 個の腫瘍について移植を試みたがすべて失敗した。

### 3.2. Fe-BLM complex の形成

Fe(III) と BLM が complex を形成していることが Fig. 1 に示されている。BLM 溶液は無色,  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$  溶液は淡黄色, 両者の混合物は濃褐色透明溶液である。この Fe-BLM complex 溶液 (pH 4.8) にフェロシアン化カリ溶液を加えても遊離鉄の存在を示すベルリンブルー反応を示さないが, 塩酸で pH を低下させると pH 4.2 以下で鉄反応を示す。

### 3.3. 担乳癌マウスにおける $^{59}\text{Fe}$ -BLM, $^{59}\text{FeCl}_3$ の体内分布

$^{59}\text{Fe}$ -BLM,  $^{59}\text{FeCl}_3$  の体内分布の結果を Table 1 に示す。

Table 1. Distribution of  $^{59}\text{Fe}$ -BLM,  $^{59}\text{FeCl}_3$  in mammary cancer bearing mice

organ	$^{59}\text{Fe}$ -BLM	$^{59}\text{FeCl}_3$	$^{59}\text{Fe}$ -BLM/ $^{59}\text{FeCl}_3$
blood	3.61	4.54	0.80
skin	0.46	0.05	9.80
heart	1.20	0.80	1.50
lung	1.84	2.16	0.85
liver	1.05	1.58	0.66
spleen	0.90	1.32	0.68
kidney	1.05	0.70	1.50
intestine	0.49	0.79	0.62
muscle	0.33	0.09	3.67
bone	0.39	0.29	1.34
tumor	0.59	0.15	3.93
brain	0.09	0.10	0.90
mean	1.00	1.00	1.00

\* These values are normalized by cpm/g of total organs

$^{59}\text{Fe}$ -BLM と  $^{59}\text{FeCl}_3$  の分布の差を示す。 $^{59}\text{Fe}$ -BLM 分布比/ $^{59}\text{FeCl}_3$  分布比値では皮膚において特に高値 (9.80) を示し, 筋肉, 肺瘍でやや高値を示した (3.67, 3.93)。

### 3.4. 担乳癌マウスにおける $^{60}\text{Co}$ -BLM, $^{60}\text{CoCl}_2$ の体内分布

$^{60}\text{Co}$ -BLM,  $^{60}\text{CoCl}_2$  の体内分布の結果を Table 2 に示す。各臓器における  $^{60}\text{Co}$ -BLM 分布比/ $^{60}\text{CoCl}_2$  分布比値は肝臓で低く (0.23), 肺瘍でわずかに高い (2.44) ほかは、ほぼ 1 に近い。

Table 2. Distribution of  $^{60}\text{Co}$ -BLM,  $^{60}\text{CoCl}_2$  in mammary cancer bearing mice

organ	$^{60}\text{Co}$ -BLM	$^{60}\text{CoCl}_2$	$^{60}\text{Co}$ -BLM/ $^{60}\text{CoCl}_2$
blood	2.42	1.72	1.41
skin	0.59	0.43	1.37
heart	1.26	1.06	1.19
lung	1.83	1.42	1.29
liver	0.59	2.58	0.23
spleen	0.29	0.49	0.59
kidney	2.20	2.01	1.09
intestine	0.58	0.85	0.68
muscle	0.40	0.28	1.43
bone	0.56	0.34	1.65
tumor	0.66	0.27	2.44
brain	0.06	0.05	1.20
mean	1.00	1.00	1.00

### 3.5. Fe-BLM ならびに Co-BLM の癌組織内分布

Fe-BLM の局在性を示すと考えられるベルリンブルー反応 (直接可証性鉄)<sup>16</sup> は正常な皮膚とともに毛根部に強い反応がみられるが (Fig. 2), 癌細胞内ではほとんど見られなかつた。乳癌では癌蜂巣をとりまく間質 (Fig. 5) ならびに腫瘍周辺部の肉芽組織 (Fig. 4) には著明な鉄反応が見られたが癌細胞にはほとんどみられずわずかに、のう胞壁の腫瘍細胞の一部に反応を示したにすぎなかつた (Fig. 3)。

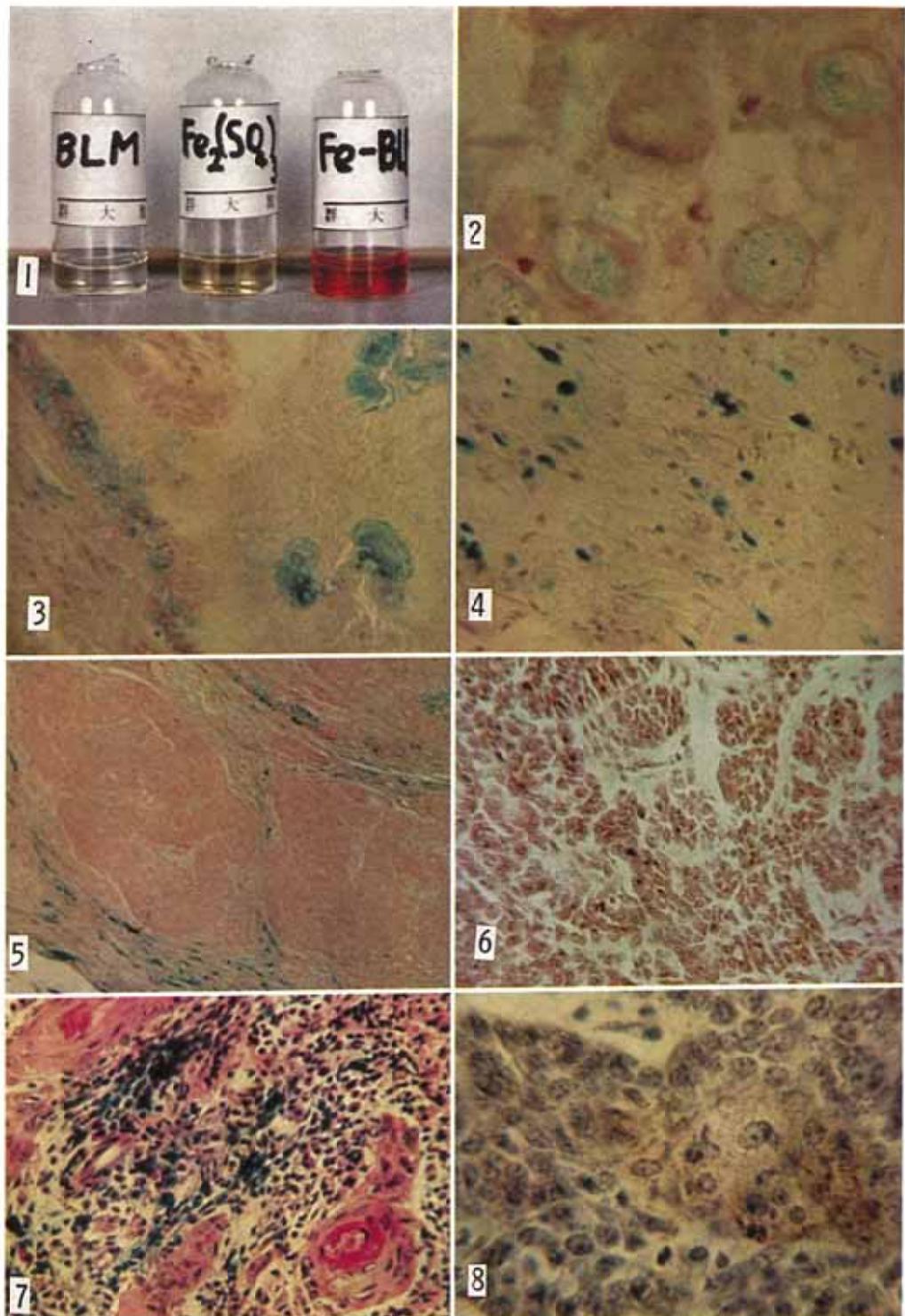
角化扁平上皮癌である皮膚癌でも腫瘍細胞には鉄反応はみられず、癌蜂巣をとりまく間質細胞に著明な反応がみられた (Fig. 7)。

強い鉄反応を示した間質細胞の多くは組織球系の細胞と考えられる。

Co-BLM の癌組織内へのとりこみは Fe-BLM の場合と異なり、腫瘍細胞にコバルトの存在を示す黄褐色の反応が認められた (Fig. 6, 8)。とくに乳癌では、癌細胞の核に一致して濃染している所が認められた (Fig. 6)。

### 4. 考案

Fe-BLM complex について、Grove ら<sup>2</sup>は反応させる塩化鉄の量に比して BLM の量が少ないと酸化鉄を形成するために、この様な条件は BLM



**Explanation of Plates**

- Fig. 1. Brown solution on the right hand is Fe-BLM solution and pale yellowish solution of ferric sulfate on the left side.
- Fig. 2. Berlin blue reaction of Fe-BLM in hair roots.  $\times 400$
- Fig. 3. Berlin blue reaction of Fe-BLM at cyst wall and histiocyte in cyst. (mammary cancer)
- Fig. 4. Berlin blue reaction of Fe-BLM in the granulation tissue circumference of mammary cancer.  $\times 200$
- Fig. 5. Berlin blue reaction of Fe-BLM in the circumference of mammary cancer nest. (the reaction was not recognized in the nest)  $\times 200$
- Fig. 6. Cobalt reaction (brown-colored) in mammary cancer nest; the reaction was remarkably noted in cell nucleus.  $\times 200$
- Fig. 7. Berlin blue reaction in 20-MC-induced skin cancer; the reaction was noted in stroma cells.  $\times 200$
- Fig. 8. Cobalt reaction in 20-MC-induced skin cancer; the reaction was noted in tumor nest.  $\times 400$

代謝研究に不適当であると指摘している。しかし、我々の結果 (Fig. 1) は、Fe-BLM complex は BLM が鉄イオンに比して大過剰に存在し、pH 4.8以上であれば安定な complex を形成していることを示している。

生体内において、Fe-BLM complex が解離されない状態で存在しているとすれば、鉄の存在を組織化学的に証明すれば、Fe-BLM の局在性を間接的に証明し得る。

担乳癌マウスにおいて<sup>59</sup>Fe-BLM分布比/<sup>59</sup>FeCl<sub>3</sub>分布比値が皮ふに高値 (9.80) を示したことは、<sup>3</sup>H-BLM が皮ふ組織に高濃度に分布しているという梅沢ら<sup>22)</sup>の結果と一致しており、生体内において短時間の間では、Fe-BLM は解離されない状態にあることを示唆している。

Fe-BLM の鉄反応が、間質細胞内、毛根部に認められることは、BLM の副作用として知られている間質性肺炎<sup>8)17)</sup>、脱毛<sup>7)</sup>などと関連して興味深い<sup>6)</sup>。特に組織球系と考えられる細胞に鉄反応が強いことは、各種の RI 標識 BLM が炎症に取込まれること<sup>4)</sup>と関連して興味深い。

金尾は<sup>11)12)</sup> Cu-BLM を用いて 20-MC で誘発した扁平上皮癌 (子宮頸癌), 腺癌 (子宮体癌) における銅の局在性を検討し、BLM は癌細胞そのものよりも、間質結合組織に高濃度に分布すると報告している。我々の実験結果でも Fe-BLM は癌蜂巣周辺の間質細胞に分布しており、BLM の抗腫瘍性は腫瘍細胞に直接作用するのではなく、間質細胞の障害による 2 次的なものである<sup>17)20)</sup>可能性を示唆している。

Co-BLM の腫瘍親和性については、すでに良く知られているところであるが、乳癌、扁平上皮癌組織内において、癌蜂巣内にコバルトの強い反応が認められる。特に乳癌では (Fig. 6) 細胞核に一致して強い反応が認められるのは、Co-BLM は DNA-Co-BLM complex を形成するという前田らの結果<sup>14)</sup>を支持する所見である。

## 5. 結論

Fe-BLM complex は鉄イオンに比して BLM が大過剰に存在し、pH 4.8以上のときに安定で

あり、マウス体内においても注射後短時間は解離されない状態にある。

乳癌、扁平上皮癌組織内における Fe-BLM の局在性を鉄反応でしらべると、癌蜂巣周辺部の間質、肉芽組織の組織球と考えられる細胞および毛根部に鉄反応が認められ、癌蜂巣内には認められなかつた。同様に Co-BLM の癌組織内分布をコバルト反応でしらべると、癌蜂巣内および乳癌では癌細胞に一致して強いコバルト反応が認められた。マウス体内における<sup>59</sup>Fe-BLM の分布はの<sup>60</sup>Co-BLMそれと異なる。以上のことから Fe-BLM の行動はより BLM の性格が強く、Co-BLM の行動はよりコバルトの性格が強いように思える。

(御校閲頂いた永井輝夫教授に深謝いたします。本論文の要旨は昭和50年4月第34回日本医学放射線学会総会(神戸)に於いて発表した。)

## 文献

- 1) Fujimoto, J.: Radioautographic studies on the intracellular distribution of bleomycin-<sup>14</sup>C in mouse tumor cells, Cancer Res., 34, 2969, 1974.
- 2) Grove, R.B., Eckelman, W.C. and Reba, R.C.: Distribution of labeled bleomycin in normal and tumorbearing mice, J. Nucl. Med., 14(12) 917, 1973.
- 3) 久田欣一, 安東 醇, 鈴木 豊, 平木辰之助, 安東逸子, 真田 茂, 松平正道: <sup>57</sup>Co-bleomycin, <sup>99m</sup>Tc-bleomycin および <sup>111</sup>In-bleomycin の比較検討, Radioisotope, 23, 53, 1974.
- 4) 久田欣一: がん親和性放射性薬剤 Radioisotope, 21, 204, 1974.
- 5) 市川篤二: ブレオマイシンの紹介, 癌の臨床, 14, 295, 1968.
- 6) Ichikawa, T., Matsuda, A., Miyamoto, K., Tsubasaki, M., Kaihara, T., Sakamoto, K. and Umezawa, H.: Biological studies on bleomycin A, J. Antibiotics Ser. A, 20, 149, 1967.
- 7) Ishizuka, M., Takayama, H., Takeuchi, T. and Umegawa, H.: Activity and Toxicity of bleomycin, J. Antibiotics Ser. A, 20, 15, 1967.
- 8) 金子 仁: 剖検例からみた薬物の副作用—とくにブレオマイシンについて—, 臨床婦人産科, 25, 449, 1971.
- 9) 金尾昌明: ブレオマイシンをめぐる一, 二の新知見, 産婦進歩, 24, 84, 1972.
- 10) 金尾昌明, 富田 慶, 石原真尚, 村上 旭, 岡

- 田弘二：ブレオマイシンの体内における銅キレート化, *chemotherapy*, 21, 1305, 1973.
- 11) 金尾昌明：ブレオマイシンの組織化学的標本, 化学の領域 増刊 104号 (分子レベルからみた生体要素と機能 II) i 1974.
  - 12) 金尾昌明：化学療法剤の金属キレート—化学療法剤の組織化学的証明法への応用について一, 産婦進歩, 26, 1, 1974.
  - 13) Kono, K., Kojima, M. and Maeda, T.: The tumor specific localizing agents for radioisotope radioisotope image—the preparation of labeled bleomycins and their distributions in the tumor bearing mice, *Radioisotope*, 21, 118, 1972.
  - 14) Maeda, T., Kono, A. and Kojima, M.: Tumor scanning with <sup>57</sup>Co-Bleomycin, 10, 109, 1973.
  - 15) Nouel, J.P., Renault, H., Robert, J., Jeanne, C. et Wicart, L.: La bleomycin marquée au <sup>57</sup>Co, *Nouv. Presse, med.* N°, 2, 95, 1972.
  - 16) 岡本耕造, 上田政雄, 前田隆英: 顕微鏡的組織化学 pp. 75, 医学書院 1958.
  - 17) 岡本 光, 天野富蔵, 和田達雄, 原田昌興, 田中俊夫: 実験的ブレオマイシン肺線維症, 医学と生物学, 80 (6), 299, 1970.
  - 18) Suzuki, H., Nagai, K., Akutsu, E., Yamaki,
- H., Tanaka, N. and Umezawa, H.: On the mechanism of action of bleomycin strand scission of DNA caused by bleomycin and its binding to DNA in vitro, *J. Antibiotics*, 13(10) 473, 1970.
- 19) 鈴木史郎, 小川栄一, 本間 刚, 定方邦泰, 都築 博: 担がん動物における <sup>60</sup>Co の体内分布および排泄について, 北関東医学, 18 (1), 66 1968.
  - 20) 田中敬正: 術前照射を行つた食道癌の組織学的研究一とくにブレオマイシンとの併用効果について一, 日医放会誌, 33(9), 723, 1973.
  - 21) Umezawa, H., Maeda, K., Takeuchi, T. and Okami, Y.: New antibiotics bleomycin A and B, *J. Antibiotics Ser. A*, 19(5) 200, 1966.
  - 22) Umezawa, H., Sukara, Y., Takita, T. and Maeda, K.: Purification of bleomycin, *J. Antibiotics Ser. A*, 19(5) 210, 1966.
  - 23) Umezawa, H., Ishizuka, M. and Hori, S.: The distribution of -H-bleomycin in mouse tissue, *J. Antibiotics*, 21(11) 638, 1968.
  - 24) 梅沢浜夫, 滝田智久: ブレオマイシンの化学と生物学的作用, 化学と生物, 11 (6), 354 1973.