

Accumulation Mechanism of ^{67}Ga -Citrate into Malignant Tumor

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/2297/8076

^{67}Ga -citrate の悪性腫瘍集積機序の研究

金沢大学医学部核医学講座 (主任: 久田欣一教授)

山 田 典 央

(昭和63年11月15日受付)

Edwards らが ^{67}Ga -citrate による悪性腫瘍の陽性描画を報告して以来, ^{67}Ga -citrate は悪性腫瘍の陽性描画に非常に広く使用されている. しかしながら, この核種の悪性腫瘍集積機序には諸説があり, 定説はない. ^{67}Ga の腫瘍集積の発見者の一人である Hayes らは腫瘍細胞および肝臓細胞などで実験した結果から, ^{67}Ga はこれら細胞のライソゾームへ特異的に取り込まれる結果, ^{67}Ga は腫瘍および肝臓へ多量に集積すると説明した. この説は多くの人々に支持されているが, 反面, 腫瘍細胞では ^{67}Ga のライソゾームへの集積は少なく, 可溶性分画中に多く存在すると考える人々もあり, 論争が続いている. 本研究は ^{67}Ga がライソゾームへ集積するか否かを明確にし, ^{67}Ga の腫瘍組織での存在状態を明らかにするために行った. 著者は ^{67}Ga と同じ周期律III族元素であり, かなり強い腫瘍親和性が知られている ^{45}Sc の腫瘍親和性機序の研究中に ^{45}Sc が腫瘍細胞のライソゾームに多量に集積することを見いだした. そこで ^{67}Ga -citrate と ^{45}Sc -citrate の混合物を担癌動物へ投与し, 腫瘍組織および肝臓を摘出し, ホモジナイズ後, ライソゾームを分画し, この分画への ^{67}Ga と ^{45}Sc の存在比をこの両核種の物理的半減期を利用して測定したところ, 次の結果を得た. ^{45}Sc は腫瘍細胞のライソゾーム分画に多量に存在したので, 本法による分画操作中にライソゾームは破壊されることなく分取されることが明らかとなった. 一方, ^{67}Ga はライソゾーム分画中には少なく, 可溶性分画に多く存在したので, ^{67}Ga は腫瘍細胞の cytosol 中に主に存在し, ライソゾームへの集積は非常に少ないことが明らかとなった. ^{67}Ga の腫瘍集積機序に関して, 腫瘍細胞のライソゾームによる特異的取り込みという考えが有力な説として存在していたが, 本研究によって, この説は明確に否定された. 肝臓では ^{67}Ga も ^{45}Sc も多量にライソゾーム分画へ集積しており, 両者間に差はなかった. ^{67}Ga は腫瘍および肝臓中で主に分子量約1万の硫酸化酸性ムコ多糖に結合していたが, ^{45}Sc はこれらの組織中で分子量4万以上の酸性ムコ多糖に結合していた. この両核種の結合酸性ムコ多糖の相違が, 腫瘍細胞におけるライソゾームへの集積に違いをもたらすと推定できた. 以上要するに, ^{67}Ga は腫瘍細胞の可溶性分画中に多量に集積しており, ライソゾームは ^{67}Ga の腫瘍集積に重要な働きをしていないことが結論でき, 既に報告されているごとく, ^{67}Ga は腫瘍組織や周辺の炎症巣に取り込まれ, その組織に多量に存在する酸性ムコ多糖に結合していると考えるのが妥当と思われた.

Key words gallium-67, malignant tumor, accumulation mechanism, lysosome, scandium-46

Edwards ら¹²⁾が ^{67}Ga -citrate による悪性腫瘍の陽性描画を報告して以来, ^{67}Ga -citrate は悪性腫瘍の陽性描画に非常に広く使用されている³⁻⁹⁾. しかしながら, この核種の悪性腫瘍集積機序については諸説があり, 定説はない. ^{67}Ga の腫瘍集積機序に関しては, 腫瘍組織および細胞での ^{67}Ga の集積部位⁹⁻¹⁹⁾と ^{67}Ga の結合物質²⁰⁻²⁷⁾について主に研究されている. ^{67}Ga の集積部位

に関しては, ^{67}Ga の腫瘍集積の発見者の一人である Hayes ら⁹⁾は ^{67}Ga はオートラジオグラフィーで腫瘍組織の細胞の生きている部位に集積し, 壊死部には集積が少ないと述べている. これは多くの人々により確認されている. 細胞レベルにおいては, 彼らのグループが数種類の悪性腫瘍細胞および肝細胞等で実験した結果から, ^{67}Ga はこれら細胞のライソゾームへ特異的に

集積することから、 ^{67}Ga は腫瘍および肝臓へ多量に集積されると説明した¹⁰⁾。この説は多くの人々に支持されているが、反面、腫瘍細胞では ^{67}Ga のライソゾームへの集積は少なく、可溶性分画中に多く存在すると考える人々もあり^{11)~13)10)}、1971年以来、論争が続いているが決定的証拠に欠けた。

一方、 ^{45}Sc は ^{67}Ga と同じ周期律III族元素であり、かなり強い腫瘍親和性が知られている²⁰⁾。著者は ^{45}Sc の腫瘍親和性機序の研究中に ^{45}Sc は腫瘍細胞のライソゾームに多量に集積することを見いだした。そこで著者は ^{45}Sc のライソゾームへの集積性を利用することによって、 ^{67}Ga は腫瘍細胞の可溶性分画中に主に存在するのみであることを明確にすることが出来たのでここに報告する。

材料および方法

I. 材 料

1. 使用動物

1) エールリッヒ腫皮下移植マウス

ddY 系雄マウス (体重25~30g) の右大腿皮下に約 4×10^7 個のエールリッヒ腫腹水細胞を移植し、7~10日間飼育して直径約1cmの結節となったときに使用した。

2) 吉田肉腫皮下移植ラット

ドンリュウ系雄ラット (体重182~250g) に吉田肉腫腹水細胞約 1×10^8 個を右大腿皮下に移植し、6~7日間飼育して直径約2cmの結節となったときに使用した。

2. 放射性同位元素化合物

1) ^{67}Ga -citrate 注射液

日本薬局方クエン酸ガリウム (^{67}Ga) 注射液 (第一ラジオアイソトープ研究所, 東京) を、0.08Mクエン酸ナトリウム溶液で希釈したものを一匹当たり0.4ml ($4 \sim 20 \mu\text{Ci}$) 注射した。

2) ^{45}Sc -citrate 注射液

^{45}Sc 塩酸溶液 (NEN Corp., Boston, U.S.A.) 0.1 ml に0.08Mクエン酸ナトリウム溶液を加え、pH 7.6に調製後、沸騰水浴中で15分間加熱して ^{45}Sc -citrateとしたものを一匹当たり0.4ml ($6 \mu\text{Ci}$, Sc 0.06 μg) 注射した。

3) ^{67}Ga , ^{45}Sc -citrate 混合注射液

上記 ^{67}Ga -citrate注射液と ^{45}Sc -citrate注射液を混合したものを一匹当たり0.4ml (^{67}Ga 6 μCi , carrier free, ^{45}Sc 3 μCi , Sc 0.03 μg) 注射した。

4) $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ 注射液

無担体 $\text{H}_2^{35}\text{SO}_4$ 塩酸溶液 (日本原子力研究所, 東

京) を稀水酸化ナトリウム溶液で中和したものを一匹当たり0.4ml (約1mCi) 注射した。

3. 試薬およびゲル濾過剤

p-ニトロフェノールリン酸, フェノール試薬, クエン酸ナトリウム, 水酸化ナトリウム, 炭酸ナトリウム, 酒石酸ナトリウム, 硫酸銅, 蔗糖, エチルエーテル (以上和光純薬, 大阪), 牛血清アルブミン (Miles Lab. Inc., Kankakee, U.S.A.), タンパク分解酵素 (アクチナーゼ E, 科研化学, 東京), セファデックス G-100 (Pharmacia AB, Uppsala, Sweden) を使用した。

4. 器材

冷凍遠心器 (クボタ, 東京, KR-20000S), 超遠心機 (Beckman, Palo Alto, U.S.A., L8-55), ホモジナイザー電動装置 (高島商店, 東京, TH-M 型), テフロンホモジナイザー (池本理化, 東京, 5ml 用), ウエル型シンチレーションカウンター (アロカ, 東京, JDC-701), 液体シンチレーションカウンター (アロカ, 東京, LSC-673 型), 分光光度計 (島津製作所, 京都, 島津ボシユロムスペクトルニク 20A), 恒温槽 (ヤマト, 東京, インキュベーター, BT-22), フラクシオンコレクター (トーヨー, 東京, SF-160Z), ミニポンプ (アトー, 東京, ペリスタ SJ-1220) を使用した。

II. 方 法

1. ^{67}Ga の悪性腫瘍細胞および肝臓細胞における細胞内分布

上記担癌ラットをエーテル麻酔して ^{67}Ga -citrate注射液0.4mlを尾静脈より注射した。担癌マウスについては同様に腹腔内注射した。これらのラットおよびマウスは注射10分, 1時間, 3時間, 24時間, 48時間後に屠殺して、腫瘍組織および肝臓を摘出した。この摘出した腫瘍組織又は肝臓を細切後、直ちに10倍量の0.01Mトリス-HCl, 0.25M蔗糖 (pH 7.6) を加えて、0°CでPotter-Elvehjem型テフロン製ホモジナイザーで破碎した。これをナイロンメッシュで濾過した後、図1に示すごとくHogeboom-Schneider法に準じて²⁰⁾各フラクションに分画した。すなわち、2000rpm (400×g) で15分間遠心分離し、その沈渣を核分画とした。その上清を5000×g (8000rpm) で15分間遠心分離し、沈渣をミトコンドリア分画 (ライソゾームはこの分画に含まれる) とした。さらにこの上清を105,000×g (40,000rpm) で60分間遠心分離し、沈渣をマイクロゾーム分画とし、上清を可溶性分画とした。このように各分画に分けた後、この中に含まれる放射能 (^{67}Ga) をウエル型シンチレーションカウンターで測定して、各分画ごとの ^{67}Ga の割合を次式により求めた。

すなわち、核分画、ミトコンドリア分画、ミクロゾーム分画および可溶性分画の各々の放射能を A, B, C, D (cpm) とすれば、核分画の放射能の割合は、

$$\frac{A}{A+B+C+D} \times 100 (\%)$$

で表され、他の分画についても同様に計算された。

2. ⁴⁵Sc の悪性腫瘍細胞および肝臓細胞における細胞内分布

(1) の ⁶⁷Ga-citrate のかわりに ⁴⁵Sc-citrate を注射し、以下同様に実験した。

3. ⁶⁷Ga, ⁴⁵Sc の悪性腫瘍細胞および肝臓細胞におけるライソゾームへの集積性

⁶⁷Ga-, ⁴⁵Sc-citrate 混合注射液 0.4 ml を上記のラッ

トおよびマウスに ⁶⁷Ga-citrate 注射液の場合と同様に注射し、腫瘍組織および肝臓を摘出した。この摘出した腫瘍組織又は肝臓に、ただちに3倍量の0.25M蔗糖溶液を加えて上記テフロンホモジナイザーでホモジナイズした。これをナイロンメッシュで濾過した後、図2に示す方法^{16,20)}によって分画した。即ち、3500rpm (1000×g) で10分間遠心分離し、この沈渣を核分画とした。その上清を6400rpm (3300×g) で10分間遠心分離し、その沈渣をミトコンドリア (heavy mitochondria) 分画とし、その上清を11,100rpm (10,000×g) で25分間遠心分離し、その沈渣をライソゾーム (light mitochondria) 分画とした。更にその上清を40,000rpm (105,000×g) で60分間遠心分離し、その沈渣をミクロゾーム分画とし、上清を可溶性分画とした。

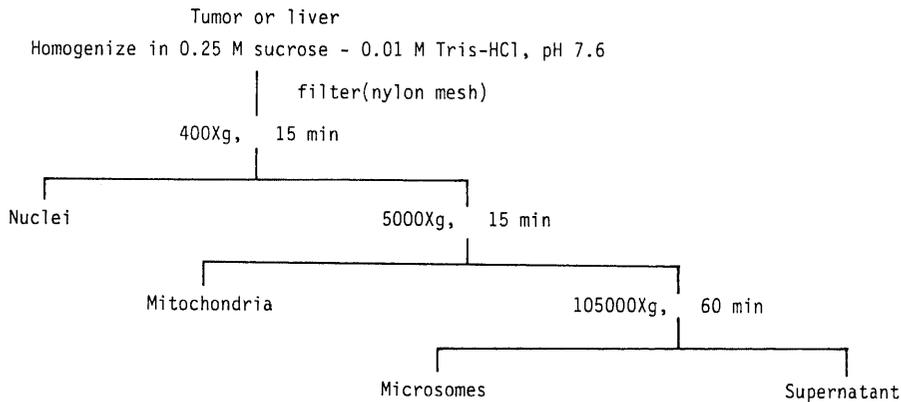


Fig. 1. Preparation of subcellular fractions by the modified method of Hogeboom and Schneider.

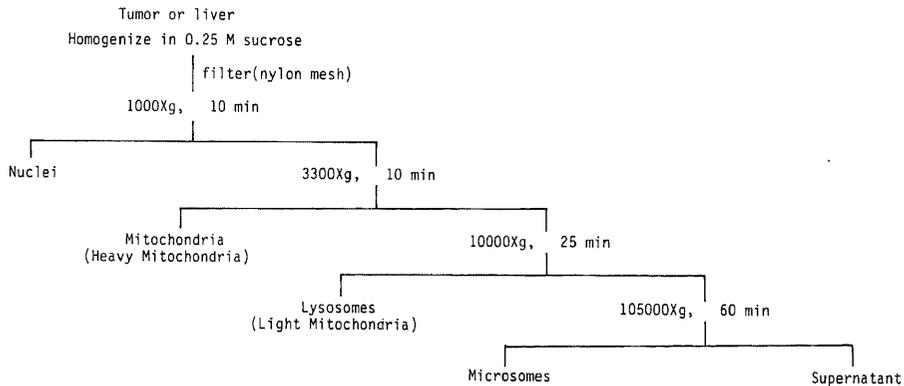


Fig. 2. Preparation of nuclei, mitochondria (heavy mitochondria), lysosome (light mitochondria), microsome and supernatant fraction by the method described by Takeda, et al.

上記のごとくにして分画した各分画中の ^{67}Ga および ^{45}Sc の量を測定するために、各分画中から一定量 (体積で 1ml 以下でウエル型シンチレーションカウンターで測定して 150,000cpm 以下) を放射能測定用チューブに入れ、ウエル型シンチレーションカウンターで測定して ^{67}Ga と ^{45}Sc の合計の放射能を求めた (第一回目の測定)。次いで50日後 (^{67}Ga の物理的半減期は78時間であるので、この時点では ^{67}Ga は事実上ゼロとなっている) に残存している ^{45}Sc の放射能を測定した (第2回目の測定)。この測定値から、核、ミトコンドリア、ライソゾーム、マイクロゾーム、可溶性各分画中への ^{45}Sc の集積比を求めた。 ^{45}Sc の物理的半減期は84日であるので、第1回目の測定から第2回目の測定までの間の減衰を補正し、第1回目測定時における ^{45}Sc の放射能を計算した。第1回目の測定値からその時点における ^{45}Sc の放射能を差し引いて、その時点における ^{67}Ga の放射能を求め、各分画中の ^{67}Ga の集積比を求めた。

一方、放射能測定とは別に、分画後、ただちに核、ミトコンドリア、ライソゾーム、マイクロゾーム、可溶性各分画中の酸性ホスファターゼ量およびタンパク量を下記の方法で測定した。

4. ^{67}Ga および ^{45}Sc の悪性腫瘍および肝臓中での結合物質

エールリッヒ癌皮下移植マウスに ^{67}Ga -citrate 注射液0.4ml (約20 μCi) を腹腔内注射し、24時間後に腫瘍及び肝臓を摘出した。この摘出物を細切後、0.01M トリス-HCl-0.15M KCl (pH 7.6) 緩衝液を10倍量加えて、前記ホモジナイザーでホモジナイズした。腫瘍組織については 2000rpm で15分間遠心分離し、沈澱を除いた上清を以下の実験に使用した。肝臓については核分画を除いた後、5000 \times g で15分間遠心分離し、その沈澱を緩衝液で懸濁液として以下の実験に使用した。腫瘍の場合はこの上清 (6ml) を肝臓の場合はこの懸濁液を0.1M水酸化ナトリウムで pH 8.0 に調整し、アクチナーゼ E 60mg を加えて48時間37°C で加水分解した。反応混合物を 3000rpm (1500 \times g) で20分間遠心分離し、その上清をセファデックス G-100 のカラム (1.2 ϕ \times 75cm) に添加し、0.1M酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) を含む0.15M NaCl 溶液を1分間0.3ml の速さで流し、フラクションコレクターで3ml ずつ分取した。各フラクション中の ^{67}Ga の放射能を上記ウエル型シンチレーションカウンターで測定後に、オルシノール反応によりウロン酸を、ローリー反応によりタンパクおよびアミノ酸を定量した。

^{67}Ga -citrate のかわりに $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ 注射液0.4ml を投

与したものについても同様に実験したが、 ^{35}S の放射能は液体シンチレーションカウンターで測定した。吉田肉腫皮下移植ラットは ^{67}Ga -citrate 注射液および $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ 注射液を各々静注し、それ以後の操作は上記マウスの場合と同様に行った。

エールリッヒ癌皮下移植マウスに ^{45}Sc -citrate 注射液0.4ml (6 μCi) を腹腔内注射し、吉田肉腫皮下移植ラットの場合は ^{45}Sc -citrate 注射液を静注し、24時間後に腫瘍および肝臓を摘出し、 ^{67}Ga -citrate 注射液投与の場合と同様に処理した。

5. 測定

1) ガンマー線

試料溶液 1~3ml を測定用試験管に入れ、ガンマー線エネルギーを 4kev 以上に設定した前記ウエル型シンチレーションカウンターで測定した。

2) ベーター線

試料溶液0.5ml を測定用バイアルに入れ、これに液体シンチレーション用シンチレーター (Amersham Int. Plc., Buckinghamshire, England, ACSII) 5ml を加えて、前記液体シンチレーションカウンターでエネルギー幅 3~167kev で測定した。

3) 酸性ホスファターゼ^{31,32)}

0.1M酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5) 0.3ml に核分画0.2ml を加えて、37°C で10分間ブレインキューベートした。これに0.01M p-ニトロフェノールリン酸ナトリウム0.5ml を加えて、37°C で20分間インキューベートした。次いで0.25M水酸化ナトリウム2ml を加えて反応を停止させ、酸性ホスファターゼにより加水分解で生じた黄色の p-ニトロフェノールの定量を分光光度計で測定 (410nm) して定量した。この方法と全く同様な操作をミトコンドリア分画、ライソゾーム分画、マイクロゾーム分画および可溶性分画についても行った。核分画、ミトコンドリア分画、ライソゾーム分画、マイクロゾーム分画および可溶性分画の全酸性ホスファターゼ活性を各々 a, b, c, d, e (CD) とすれば、核分画の酸性ホスファターゼの割合は、

$$\frac{a}{a + b + c + d + e} \times 100 (\%)$$

で表され、他の分画についても同様に計算した。

4) タンパク

標準液として牛血清アルブミンを使用して Lowry 法³³⁾ の方法によって、各分画のタンパク (アミノ酸を含む) を定量した。

5) ウロン酸

オルシノール法³⁴⁾ により測定した。すなわち、試料

1ml に 3ml のオルシノール試薬(オルシノール0.4g に 1.5%塩化第二鉄溶液 10ml と水 35ml および濃塩酸 155ml を加えて溶かしたもの)を加え、沸騰水浴中で 30分間加熱した。ついで冷水で 5分間冷やした後、660nm の吸光度を測定して定量した。

6) 統計学的検定

得られた成績はすべて平均値±標準偏差であらわした。多群間の平均値の差は一元または二元配置分散分析の後、Scheffé 法または Dunnett 法による多重比較により検定した。p<0.05を有意とした。

成 績

I. ⁶⁷Ga の悪性腫瘍細胞および肝臓細胞における細胞内分布

⁶⁷Ga-citrate を投与した場合の吉田肉腫およびエールリッヒ癌の場合の細胞分画結果を表 1 に示した。吉田肉腫の核分画では ⁶⁷Ga は 12.3±2.7%~20.8±2.0% にあり、投与10分後でも48時間後でもほとんど値は同じであった。ミトコンドリア分画では10分後は 9.5±1.8%と小さいが、1時間以後は15.9±2.9%~17.4±2.1%の間にあり、ほとんど増減はなかった。マイクロゾーム分画では14.7±1.7%~22.5±2.9%の間にあったが、経時的には一定の傾向はなかった。上清では他の分画よりはるかに大きく、10分後で60.4±3.8%であり、1時間以後では43.2±5.2%~54.2±3.4%の間にあり、経時的に一定の傾向はみとめられなかった。

エールリッヒ癌については、核分画では11.3±3.2%~19.6±2.4%にあり、その値は大きくないが、経時的にやや増加の傾向がみとめられた。ミトコンドリア分画でも値は大きくないが、経時的にやや増加がみとめられた。マイクロゾーム分画では12.3±0.8%~16.1±2.5%にあり、経時変化は認められなかった。上清では非常に大きく、48.8±3.8%~66.7±6.6%にあり、経時的にやや減少の傾向が認められた。

⁶⁷Ga-citrate を投与した場合の担癌ラットおよびマウスの肝臓の細胞分画結果を表 1 に示した。吉田肉腫皮下移植ラットの肝臓の核分画では投与10分後は15.5±3.3%であったが、3時間後には21.7±1.4%になり、以後は大きな変化はなかった。これに対しミトコンドリア分画では10分後に15.1±1.3%であったが、経時的に増加し、48時間後には52.6±3.6%となった。マイクロゾーム分画では10分後には28.1±1.4%であったが、経時的に減少の傾向を示し、48時間後には15.3±1.8%になった。上清でも10分後には41.3±4.4%であり、これが経時的に減少し、48時間後には12.5±0.8%となった。

エールリッヒ癌皮下移植マウスの肝臓の場合、核分画では16.8±1.9%~25.5±1.1%の間で経時的な傾向は認められなかった。しかしミトコンドリア分画では10分後に13.4±1.6%であり、経時的に増加して48時間後には49.5±2.6%となった。マイクロゾーム分画では17.3±2.7%~21.8±1.5%の間にあり、経時的に明らかな傾向は認められなかった。上清では10分後に

Table 1. Subcellular distribution of ⁶⁷Ga in experimental tumors and host livers (by the modified method²⁹⁾ of Hogeboom and Schneider)

Time after injection of ⁶⁷ Ga-citrate	Subcellular distribution (%) of ⁶⁷ Ga							
	Tumor				Liver			
	Nuclear fraction	Mitochondrial fraction	Microsomal fraction	Supernatant fraction	Nuclear fraction	Mitochondrial fraction	Microsomal fraction	Supernatant fraction
Yoshida sarcoma								
10 min	14.9±1.3	9.5±1.8	15.2±2.5	60.4±3.8	15.5±3.3	15.1±1.3	28.1±1.4	41.3±4.4
60 min	12.3±2.7	16.4±2.1	22.5±2.9	48.8±2.7	16.8±2.4	27.5±3.3	24.3±1.5	31.4±1.3
3 hr	15.2±2.9	15.9±2.9	14.7±1.7	54.2±3.4	21.7±1.4	36.8±3.2	17.5±2.7	24.0±1.7
24 hr	20.8±2.0	16.6±3.2	19.4±2.2	43.2±5.2	22.5±1.7	40.4±1.6	20.6±1.9	16.5±3.5
48 hr	16.5±1.9	17.4±2.1	19.0±1.9	47.1±5.5	19.6±2.0	52.6±3.6	15.3±1.8	12.5±0.8
Ehrlich tumor								
10 min	11.3±3.2	6.2±2.0	15.8±1.5	66.7±6.6	25.5±1.1	13.4±1.6	21.8±1.5	39.3±3.0
60 min	15.1±2.1	11.3±0.4	14.6±3.1	59.0±5.1	20.6±4.8	20.3±1.4	19.2±0.9	39.9±4.3
3 hr	12.4±2.6	9.6±2.5	12.3±0.8	65.7±4.1	16.8±1.9	33.1±3.9	20.6±3.0	29.5±2.3
24 hr	16.8±4.0	16.0±1.5	16.1±2.5	51.1±2.6	20.3±1.8	47.6±1.3	19.5±3.1	12.6±2.2
48 hr	19.6±2.4	15.7±2.6	15.9±2.2	48.8±3.8	18.9±2.0	49.5±2.6	17.3±2.7	14.3±1.6

Values represent the mean ± S.D. of three experiments.

In Yoshida sarcoma and Ehrlich tumor, most of ⁶⁷Ga accumulated in the supernatant fraction, and only a small amount of ⁶⁷Ga accumulated in the mitochondrial fraction which contained lysosomes. In the liver, however, most of this nuclide accumulated in the mitochondrial fraction containing lysosomes.

39.3±3.0%であり、おおむね減少の傾向をたどり、24時間後には12.6±2.2%となった。

II. ^{45}Sc の悪性腫瘍細胞および肝臓細胞における細胞内分布

^{45}Sc -citrate を投与した場合の吉田肉腫およびエールリッヒ癌の場合の細胞分画の結果を表2に示した。吉田肉腫の核分画では ^{45}Sc は10分後に3.5±0.7%であり、経時的に増加の傾向を示し、24時間後には16.0±2.4%に増加した。ミトコンドリア分画では10分後に4.0±0.2%であったものが、経時的に顕著に増加し、24時間後には36.2±3.4%に達した。マイクロゾーム分画でも経時的に顕著に増加したが、上清では10分後に82.5±1.5%であったものが、顕著に減少し、24時間後には17.3±0.3%になった。エールリッヒ癌についても吉田肉腫の場合とよく類似した結果であった。

^{45}Sc -citrate を投与した場合の担癌ラットおよびマウスの肝臓の細胞分画結果も表2に示した。吉田肉腫皮下移植ラットの核分画では投与10分後に ^{45}Sc は8.7±1.5%であったものが、経時的に増加し、24時間後には22.0±2.6%となり、以後ほとんど変化しなかった。ミトコンドリア分画では10分後に9.0±1.9%であり、経時的に増加し、24時間後には53.8±2.2%に達した。マイクロゾーム分画では集積比も大きくなく、経時的変化も小さかった。これに対し、上清では10分後に66.2±4.3%であったが、経時的に顕著に減少し、

24時間後には4.6±0.3%になった。エールリッヒ癌皮下移植マウスの場合も、ほぼ同様な傾向が見られ、特にミトコンドリア分画における経時的増加と上清における経時的な減少は特によく類似していた。

III. ^{67}Ga および ^{45}Sc のミトコンドリア分画への集積性

以上述べた2種の悪性腫瘍とエールリッヒ癌移植マウスの肝臓のミトコンドリア分画への両核種の集積比を図3に示した。 ^{45}Sc は肝臓のミトコンドリア分画への集積比が非常に大きく、この点では ^{67}Ga によく類似していた。しかし、投与24時間後に ^{45}Sc の集積比は吉田肉腫およびエールリッヒ癌において各々36.2±3.4%、36.7±1.2%であるのに対し、 ^{67}Ga については各々16.6±3.2%、16.0±1.5%であり、 ^{45}Sc と ^{67}Ga で大きな差があるが、これはこの分画中のライソゾームの両元素に対する態度の違いによるのであろうと考えられた。

IV. ^{67}Ga 、 ^{45}Sc の悪性腫瘍および肝臓細胞におけるライソゾームへの集積性

1. ^{67}Ga および ^{45}Sc のライソゾーム集積比

^{67}Ga および ^{45}Sc の吉田肉腫およびエールリッヒ癌における細胞の各分画への集積比の経時的変化を表3に示した。吉田肉腫の場合のライソゾーム (light mitochondria) 分画に注目して見ると、投与10分後に ^{67}Ga の集積比は8.2±1.2%であったが、経時的変化は

Table 2. Subcellular distribution of ^{45}Sc in experimental tumors and host livers (by the modified method²⁹⁾ of Hogeboom and Schneider)

Time after injection of ^{45}Sc -citrate	Subcellular distribution (%) of ^{45}Sc							
	Tumor				Liver			
	Nuclear fraction	Mitochondrial fraction	Microsomal fraction	Supernatant fraction	Nuclear fraction	Mitochondrial fraction	Microsomal fraction	Supernatant fraction
Yoshida sarcoma								
10 min	3.5±0.7	4.0±0.2	10.0±2.3	82.5±1.5	8.7±1.5	9.0±1.9	16.1±1.3	66.2±4.3
60 min	5.0±1.4	7.7±1.4	14.0±2.0	73.3±4.9	12.1±3.2	28.0±3.0	14.4±0.9	45.5±3.6
3 hr	6.3±1.8	15.4±3.0	14.4±1.8	63.9±3.8	15.2±1.9	49.1±2.8	14.7±1.5	21.0±4.0
24 hr	16.0±2.4	36.2±3.4	30.5±6.1	17.3±0.3	22.0±2.6	53.8±2.2	19.6±0.7	4.6±0.3
48 hr	16.2±1.7	34.6±3.8	33.4±2.7	15.8±4.0	23.0±2.8	52.5±3.9	19.2±2.8	5.3±0.2
Ehrlich tumor								
10 min	7.7±0.2	4.2±0.6	8.7±0.5	79.4±1.2	7.3±0.4	5.2±0.2	12.1±2.0	75.4±1.3
60 min	8.5±0.4	6.4±1.5	7.3±0.4	77.8±2.5	14.8±1.1	15.0±3.0	13.7±0.9	56.5±4.6
3 hr	9.5±0.8	14.1±0.4	11.2±2.2	65.2±0.9	18.0±1.8	36.1±1.0	13.1±1.9	32.8±4.4
24 hr	18.5±3.4	36.7±1.2	28.0±0.7	16.8±0.6	20.3±0.9	53.1±3.6	22.2±1.7	4.4±0.4
48 hr	17.4±1.6	35.7±2.8	29.4±1.2	17.5±0.3	17.9±1.1	54.4±4.2	23.7±0.4	4.0±0.2

Values represent the mean ± S.D. of three experiments.

In these tumors and liver, ^{45}Sc in the mitochondrial fraction containing lysosome increased with time after the administration of ^{45}Sc -citrate. In the case of liver about 53% of ^{45}Sc accumulated in this fraction 24 hours after administration. Conversely, ^{45}Sc in the supernatant fraction decreased with time. In the tumors, about 36% of ^{45}Sc accumulated in the mitochondrial fraction 48 hours after administration. But ^{45}Sc in the supernatant fraction decreased with time. ^{45}Sc in the nuclear and microsomal fractions increased with time after administration.

少なく、時間に関係なく、その値は $8.2 \pm 1.2\%$ ~ $14.7 \pm 2.0\%$ の間であった。これに対し、⁴⁵Sc のライソゾームへの集積比は10分後に $6.3 \pm 1.0\%$ であり、60分後に $7.3 \pm 0.6\%$ 、3時間後に $12.1 \pm 1.7\%$ と増加したが、この時点までは⁶⁷Ga の集積比よりも小さかった。⁴⁵Sc は経時的にさらに増加し続け、24時間、48時間後には各々 $20.9 \pm 0.6\%$ 、 $23.5 \pm 2.0\%$ となり、この値は⁶⁷Ga の値より大きかった。各時間における⁶⁷Ga と⁴⁵Sc の集積比の差を、二元配置分散分析の後、Scheffé の多重比較法で検定したところ、投与10分、60分、3時間までは⁶⁷Ga の値が有意に大きく ($p < 0.05$)、24時間、48時間までは⁴⁵Sc の値の方が有意に大きい ($p < 0.05$) ことが確認された。これらの結果は上記のごとく、同一個体に⁶⁷Ga と⁴⁵Sc の混合物を投与し、同一資料を両核種の物理的半減期の違いにより分別測定したものであるから、動物の個体差は存在せず、⁴⁵Sc³⁺ と⁶⁷Ga³⁺ の生物学的性質の違いを示すものである。⁴⁵Sc の場合、核分画、ミトコンドリア分画 (heavy mitochondria) およびミクロゾーム分画も集積比の経時的増加の傾向を示したが、本実験はライソゾーム分画を出来るだけ純粋に分離することを目的としたので、他の分画は十分に純粋に分離していないかもしれない。可溶性分画の値は経時的に減少したので、この分画から⁴⁵Sc がライソゾーム分画へ移行したものであろう。このように同じ正3価の金属イオンでも、悪性腫瘍細胞では⁴⁵Sc がライソゾームへよく集積するのに対し、⁶⁷Ga は集積が非常に少ないことが明らかとなった。

エールリッヒ癌の場合は、ライソゾーム分画への⁶⁷Ga の集積比は投与10分後に $4.8 \pm 0.3\%$ であり、経時的にやや増加して48時間後には $12.0 \pm 0.2\%$ になった。⁴⁵Sc では10分、60分、3時間後に各々 $3.5 \pm 0.5\%$ 、 $5.2 \pm 0.6\%$ 、 $8.2 \pm 1.4\%$ であり、経時的に増加したが、3時間後まで⁶⁷Ga の集積比より小さかった。⁴⁵Sc は経時的にさらに増加し続け24時間、48時間後で各々 $14.4 \pm 1.6\%$ 、 $19.8 \pm 0.3\%$ であり、この値は⁶⁷Ga と⁴⁵Sc の集積比の差を、二元配置分散分析の後、Scheffé の多重比較法で検定したところ投与10分、60分、3時間後までは⁶⁷Ga の値が有意に大きく ($p < 0.05$)、24時間、48時間後では⁴⁵Sc の値の方が有意に大きい ($p < 0.05$) ことが確認された。このようにエールリッヒ癌の場合も吉田肉腫の場合と同様に、⁴⁵Sc はライソゾームへよく集積するのに対し、⁶⁷Ga は集積が非常に少ないことが明らかとなった。

また表3に両核種のマウス肝臓における細胞の各分画への集積比の経時変化を示した。ライソゾーム分

画に注目してみると、⁶⁷Ga、⁴⁵Scともに、その集積比は投与24時間後まで顕著に増加し、その値は10分後の値を除いて極めてよく類似していた。⁶⁷Ga と⁴⁵Sc のライ

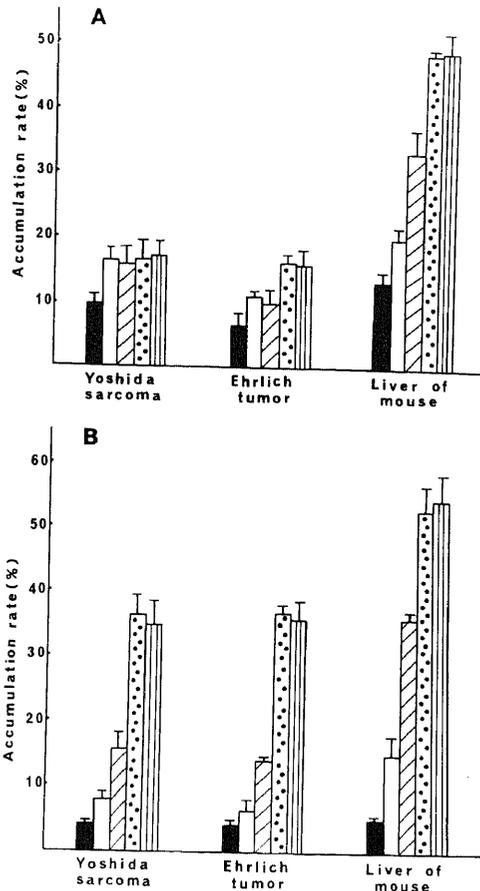


Fig. 3. Accumulation rate (%) of ⁶⁷Ga and ⁴⁵Sc in mitochondrial fraction (containing lysosome) of tumor and liver. A, Animals administered with ⁶⁷Ga-citrate; B, Animals administered with ⁴⁵Sc-citrate.

- Accumulation rate (%) of ⁶⁷Ga or ⁴⁵Sc in mitochondrial fraction (containing lysosome) at 10 min after administration.
- Accumulation rate (%) of ⁶⁷Ga or ⁴⁵Sc in mitochondrial fraction (containing lysosome) at 60 min after administration.
- ▨ Accumulation rate (%) of ⁶⁷Ga or ⁴⁵Sc in mitochondrial fraction (containing lysosome) at 3 hr after administration.
- ▤ Accumulation rate (%) of ⁶⁷Ga or ⁴⁵Sc in mitochondrial fraction (containing lysosome) at 24 hr after administration.
- ▥ Accumulation rate (%) of ⁶⁷Ga or ⁴⁵Sc in mitochondrial fraction (containing lysosome) at 48 hr after administration.

Table 3. Subcellular distribution of ^{67}Ga and ^{46}Sc in experimental tumors and livers (by the method described by Takeda, et al.¹⁶⁾)

Time after injection of ^{67}Ga , ^{46}Sc -citrate	Subcellular distribution (%) of ^{67}Ga					Subcellular distribution (%) of ^{46}Sc				
	Nuclear fraction	Mitochondrial fraction	Lysosomal fraction	Microsomal fraction	Supernatant fraction	Nuclear fraction	Mitochondrial fraction	Lysosomal fraction	Microsomal fraction	Supernatant fraction
Yoshida sarcoma										
10 min	17.2±3.5	9.5±2.6	8.2±1.2	9.0±0.5	56.1±4.4	12.8±3.1	4.3±0.6	6.3±1.0	10.5±0.5	68.1±4.8
60 min	17.8±1.5	13.2±2.7	13.7±1.8	8.7±0.4	46.6±3.3	18.6±4.8	9.3±2.7	7.3±0.6	8.0±0.4	56.8±3.0
3 hr	22.6±2.5	13.6±2.3	14.7±2.0	10.8±0.6	38.3±3.5	22.2±3.0	10.1±0.2	12.1±1.7	11.4±2.7	44.2±3.4
24 hr	22.3±1.9	10.4±0.8	11.8±0.3	21.9±1.7	33.6±0.7	22.7±0.2	14.7±1.8	20.9±0.6	19.4±2.5	22.3±0.2
48 hr	19.9±0.9	16.7±1.1	10.2±1.3	18.5±1.4	34.7±1.2	22.0±0.7	16.1±0.9	23.5±2.0	20.7±3.3	17.7±2.8
Ehrlich tumor										
10 min	27.2±2.4	3.9±0.3	4.8±0.3	7.7±0.6	56.4±4.1	19.4±0.7	2.6±0.2	3.5±0.5	6.2±0.6	68.3±1.0
60 min	27.4±1.8	5.2±0.9	7.9±1.4	8.7±2.1	50.8±2.7	20.1±2.3	5.0±0.2	5.2±0.6	7.5±0.8	62.2±0.8
3 hr	30.7±2.3	5.6±1.4	9.0±0.8	6.9±0.7	47.8±3.2	24.2±1.4	6.9±0.9	8.2±1.4	11.6±2.3	49.1±3.4
24 hr	33.5±4.0	7.9±2.3	8.2±1.3	10.8±1.2	39.6±3.0	38.9±1.7	11.9±3.4	14.4±1.6	17.5±1.5	17.3±2.1
48 hr	31.5±3.4	8.7±1.1	12.0±0.2	23.0±2.1	24.8±2.6	33.7±1.8	13.9±0.8	19.8±0.3	25.9±1.3	6.7±1.3
Liver of mouse										
10 min	39.8±0.5	3.5±0.6	5.7±0.9	10.7±1.5	40.3±1.0	26.9±1.9	2.3±0.1	3.9±0.3	7.3±2.1	59.6±2.7
60 min	44.8±1.3	7.4±1.5	11.4±0.3	11.1±0.6	25.3±3.2	35.3±3.1	6.8±1.3	11.1±0.8	8.9±0.7	38.1±2.9
3 hr	36.1±1.6	10.2±1.3	14.8±1.1	11.6±3.2	27.3±3.1	44.5±4.8	8.9±1.3	14.1±0.6	8.7±2.9	23.8±0.4
24 hr	52.9±0.2	11.3±1.2	22.1±1.0	6.4±0.1	7.3±0.5	56.0±1.1	11.6±0.8	22.7±1.7	6.3±0.8	3.4±0.6
48 hr	52.4±0.3	11.3±0.7	22.2±0.9	3.8±1.1	10.3±2.3	56.0±0.6	11.2±0.5	22.9±1.3	4.0±0.5	5.9±1.1

Values represent the mean \pm S.D. of three experiments.

In Yoshida sarcoma and Ehrlich tumor, ^{46}Sc in the lysosomal fraction increased with time after administration of a mixture of ^{67}Ga - and ^{46}Sc -citrate, and about 20% of this nuclide accumulated in this fraction 48 hours after administration. But a small amount of ^{67}Ga accumulated in this fraction and did not increase with time. In liver, the accumulation rates of both nuclides in this fraction were almost same values. These facts mean that the disruption of lysosome did not occur in the fractionation procedures because ^{46}Sc readily accumulated in the lysosome of tumors. Most of ^{67}Ga exist in the cytosol of tumor cells, and ^{67}Ga did not accumulate essentially into the tumor lysosome.

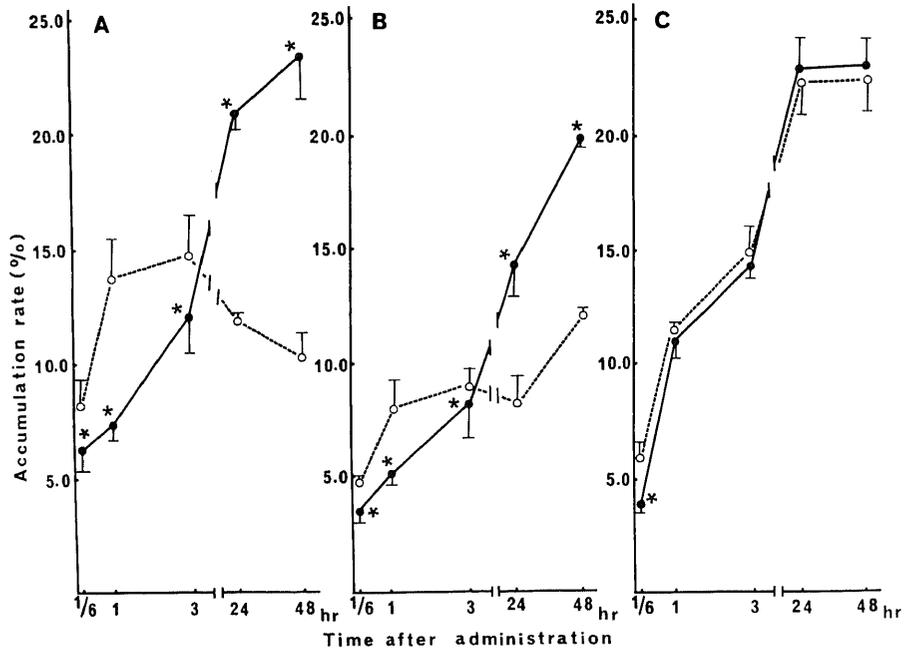


Fig. 4. Accumulation rate (%) of ^{67}Ga and ^{46}Sc in lysosomal fraction of tumors and liver.

A, Yoshida sarcoma; B, Ehrlich tumor; C, Liver of mouse.

○—○, radioactivity (^{67}Ga); ●—●, radioactivity (^{46}Sc).

* $p < 0.05$ vs. ^{67}Ga by two-way ANOVA followed by Scheffé's multiple comparisons.

ソゾーム集積比を、二元配置分散分析の後、Schefféの多重比較法で検定したところ、投与10分後は⁶⁷Gaの方が大きく、1時間、3時間、24時間および48時間値では有意差のないことが確認された。

図4に2種の悪性腫瘍とマウスの肝臓のライソゾーム分画への⁶⁷Gaと⁵¹Scの集積比の経時的変化を示した。このグラフから、肝臓では10分値を除き⁶⁷Gaと⁵¹Scのライソゾーム集積比には全く差がないが、悪性腫瘍の場合には⁵¹Scの集積比は経時的に増加するのに対し、⁶⁷Gaについてはほとんど増加しないことが明らかである。

2. 各分画の酸性ホスファターゼの比活性

表4に2種の悪性腫瘍およびエールリッヒ癌皮下移植マウスの肝臓について、核、ミトコンドリア、ライソゾーム、ミクロゾームおよび可溶性各分画中の酸性ホスファターゼの比活性値を示した。すなわち、各分画の酸性ホスファターゼ活性の相対値(この5つの分画の合計を100%とする)を各分画のタンパク量(mg)で割って求めた。吉田肉腫の場合、ライソゾーム分画での値は4.2±0.1%/mgであり、他の分画の値よりも著しく大きかった。エールリッヒ癌の場合もライソゾーム分画の値は7.1±1.3%/mgであり、他の分画の値よりも著しく大きかった。ライソゾーム分画での値が他の分画のそれより有意に大きいことは一元配置分散分析の後、Dunnnettの多重比較法を用いて確認された(p<0.05)。このことは当然のことながら、ライソゾーム分画へライソゾームが密度濃く集積していることを示すものである。肝臓の場合は1.8±0.2%/mgと比較的小さい値であったが、これは肝臓組織に含まれるタンパク量が多いためであるが、ライソゾーム分画は他のどの分画の値よりも大きな値であることが、一元配

置分散分析の後、Dunnnettの多重比較法を用いて確認された(p<0.05)。この分画にライソゾームが密度濃く集積していることを示している。

V. ⁶⁷Ga および ⁵¹Sc の結合物質

⁶⁷Ga-citrateを投与した場合のエールリッヒ癌の場合を図5に示した。アクチナーゼEにより、タンパクを加水分解した後、反応混合物を3000rpm(1500×g)で20分間遠心分離したさいに、上清には40~60%の⁶⁷Gaが存在していた。この上清をセファデックスG-100のゲルクロマトグラフィにより、各種⁶⁷Ga化合物を分画し、また溶出物の化学定量も行い、この図に示した。

図のように⁶⁷Ga化合物の溶出曲線は3つのピークを示し、第1、第2、第3ピークに、カラムに添加した反応混合物の上清中の⁶⁷Gaの放射能の2.8%、21.8%、61.9%が溶出液中に検出された。安東ら²⁷⁾が報告している文献から判断して、第1ピークはボイドボリューム(分子量4万以上)、第2ピークは分子量約1万、第3ピークは遊離の⁶⁷Gaと考えられる。³⁵S-³⁵SO₄を投与した場合もこの図に示した。³⁵Sのピークもこの3つのピークに一致しており、第1ピークと第2ピークの³⁵Sは硫酸化酸性ムコ多糖の硫酸基であり、第3ピークの³⁵Sは遊離の硫酸イオンであった。オルシノール反応によるウロン酸の定量結果は⁶⁷Gaの第1ピークと第3ピークに一致していたが、⁶⁷Gaの第2ピーク的位置にはウロン酸のピークは認められなかった。ローリー反応によるタンパクとアミノ酸の定量では第1ピークと第3ピークは⁶⁷Gaと一致していたが、第2ピークでは⁶⁷Gaのピークとはかなりずれており、ローリー反応の第2ピークはアクチナーゼEのタンパクに由来するものと考えられた。安

Table 4. Relative specific enzyme activity of acid phosphatase in nuclear, mitochondrial, lysosomal, microsomal and supernatant fractions of tumors and liver

	Relative specific enzyme activity of acid phosphatase (%/mg)				
	Nuclear fraction	Mitochondrial fraction	Lysosomal fraction	Microsomal fraction	Supernatant fraction
Yoshida sarcoma	1.6±0.2 *	2.7±1.0 *	4.2±0.1	2.8±0.4 *	2.5±0.2 *
Ehrlich tumor	3.9±0.7 *	4.5±0.1 *	7.1±1.3	3.2±0.3 *	2.4±0.1 *
Liver of mouse	0.8±0.2 *	0.9±0.3 *	1.8±0.2	0.4±0.1 *	0.9±0.2 *

Results are expressed as acid phosphatase (%) per protein content (mg). Values represent the mean ± S.D. of five animals. This value of acid phosphatase for the lysosomal fraction was the largest among five fractions of tumors and liver. Naturally, this fact attests that the lysosome accumulated in the lysosomal fraction. * p<0.05 vs. lysosomal fraction by one-way ANOVA followed by Dunnnett's multiple comparisons.

東ら²⁶⁾²⁷⁾³⁵⁾は悪性腫瘍および肝臓中での⁶⁷Ga結合物質の研究において、分子量約1万の⁶⁷Ga結合硫酸化酸性ムコ多糖が悪性腫瘍および肝臓中での主な⁶⁷Ga結合酸性ムコ多糖であると述べている。本研究においても全く同じ結果が得られた。吉田肉腫の場合も同様であり、宿主の肝臓についてもほぼ同様の結果であった。このように悪性腫瘍および肝臓を問わず、⁶⁷Gaの主な結合物質は分子量約1万の酸性ムコ多糖であった。

⁴⁵Scを投与した場合のエールリッヒ癌の場合も図5に示した。アクチナーゼEによりタンパクを加水分解した後、反応混合物を3000rpm(1500×g)で20分間遠心分離した際に、上清には40~60%の⁴⁵Scが存在していた。この上清をセファデックスG-100のゲルクロマトグラフィにより、各種⁴⁵Sc化合物を分画し、また溶出物の化学定量も行い、この図に示した。図から判るように、⁴⁵Scは第1ピーク(分子量4万以上)にほとんど(71.7%)が溶出されており、第2ピーク(分子量約1万)にはわずか(4.8%)に溶出されるのみであった。遊離の⁴⁵Scはほとんど認められなかった。すなわち、ほとんどの⁴⁵Scは分子量4万以上の酸性ムコ多糖に結合していることが判った。吉田肉腫および宿主肝臓についても同様であった。

以上のごとく、⁶⁷Gaは動物の悪性腫瘍および肝臓を

問わず、おもに分子量約1万の酸性ムコ多糖に結合しているが、⁴⁵Scは悪性腫瘍および肝臓を問わず、おもに分子量4万以上の酸性ムコ多糖に結合しており、その結合している酸性ムコ多糖は非常に異なることが明らかとなった。

考 察

⁶⁷Gaの動物の肝臓中での主な集積部位はライソゾームであることは多くの人々の研究で明らかであったが^{10)~12)16)19)36)37)}、本研究においても再確認された。悪性腫瘍の場合に⁶⁷Gaはライソゾームへ多量に集積するか、そうでないかについては長らく論争が続いていた。Swartzendruberら¹⁰⁾が⁶⁷Gaが悪性腫瘍細胞のライソゾームへ多量に集積すると報告したのは、肝細胞などの一部の正常細胞や肝臓などのある種の悪性腫瘍細胞での実験結果から、そのように報告したものである。その後、⁶⁷Gaはライソゾームへほとんど集積しないという反論が出た^{11)~13)19)}。これに対しSwartzendruberらのグループ³⁸⁾は、悪性腫瘍細胞からライソゾームを分画中にライソゾームを破壊して⁶⁷Gaが、可溶性分画中へ流出したのであろうと反論し、水掛論が続いていた。著者は最近、⁶⁷Ga³⁺に類似した⁴⁵Sc³⁺が悪性腫瘍細胞のライソゾームへ多量に集積することを見つけ、この2核種の同時投与で上記のごとき結果を得

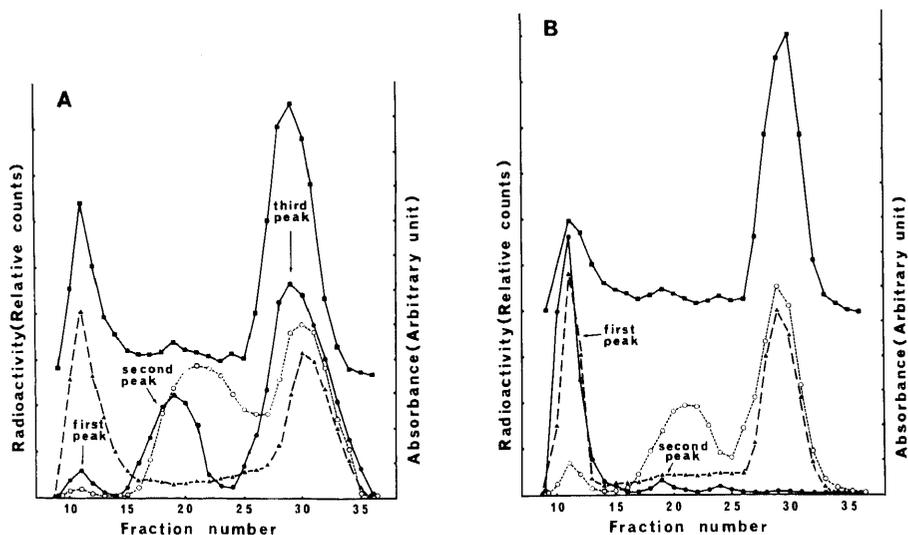


Fig. 5. Sephadex G-100 chromatography profiles for Ehrlich tumor digested with Actinase E at 37°C for 48 hours.

A, Tumor sample of animal administered with ⁶⁷Ga-citrate; B, Tumor sample of animal administered with ⁴⁵Sc-citrate. ●—●, radioactivity of ⁶⁷Ga or ⁴⁵Sc; ■—■, radioactivity of ³⁵S; ▲—▲, uronic acids concentration (Orcinol method); ○—○, protein concentration (Lowry's method).

た。図4に示すごとく、肝臓では ^{67}Ga と ^{45}Sc は全く同じようにライソゾームへ集積するが、悪性腫瘍では明らかに両核種のライソゾームへの集積は異なっており、 ^{45}Sc の集積比は経時的に顕著に増加したが、 ^{67}Ga のそれはあまり増加しなかった。Swartzendruberらのグループが言うように、悪性腫瘍細胞からライソゾームを分画中にライソゾームを破壊して ^{67}Ga が可溶性分画中へ流出しているのならば、当然 ^{45}Sc もおなじように流出するはずであるが、 ^{45}Sc は多量にライソゾームへ集積している事実は分画操作中にライソゾームを破壊していないことを意味している。すなわち、本来 ^{45}Sc は悪性腫瘍細胞のライソゾームへ多量に集積する性質を持つが、 ^{67}Ga は悪性腫瘍細胞のライソゾームへは集積する性質を持たないことが明らかになった。

では何故このような差ができるのかについて検討したところ、 ^{67}Ga は悪性腫瘍および肝臓などの軟組織中で、主に分子量約1万の酸性ムコ多糖に結合していた。しかし、 ^{45}Sc はこれらの組織中で分子量4万以上の酸性ムコ多糖に結合していることが明らかとなった。おそらく肝臓中では ^{67}Ga が結合する分子量約1万の酸性ムコ多糖も ^{45}Sc が結合する分子量4万以上の酸性ムコ多糖も同じようにライソゾームへ向けて集積しており、これらにより ^{67}Ga も ^{45}Sc もライソゾームへ運ばれるが、癌性変化を起こすと、 ^{45}Sc と結合する分子量4万以上の酸性ムコ多糖のライソゾームへの集積はめだつた減少を示さないが、 ^{67}Ga と結合する分子量約1万の酸性ムコ多糖のライソゾームへの集積が顕著に減少するためであろう。

何故 ^{67}Ga が悪性腫瘍組織に多量に集積するかについては、安東ら³⁵⁾³⁹⁾⁴⁰⁾が述べているように、この組織や周辺の炎症巣に多量に存在する酸性ムコ多糖に ^{67}Ga が結合すると考えるならば、容易に理解できる。

結 論

著者は ^{67}Ga の腫瘍細胞中での存在を明らかにするための一連の研究中に ^{67}Ga と同じ周期律III族元素の ^{45}Sc が腫瘍細胞のライソゾームに多量に集積することを見いだした。

^{67}Ga -citrateと ^{45}Sc -citrateの混合物を担癌動物へ投与し、腫瘍組織および肝臓を摘出し、ホモジナイズ後、ライソゾームを分画し、この分画への ^{67}Ga と ^{45}Sc の存在比をこの両核種の物理的半減期を利用して測定したところ、次の結果を得た。

1. ^{45}Sc は腫瘍細胞のライソゾーム分画に多量に存在したので、本法による分画操作中にライソゾームは

破壊されることなく分取されることが明らかとなった。

2. 一方、 ^{67}Ga はライソゾーム分画中には少なく、可溶性分画に多く存在したので、 ^{67}Ga は腫瘍細胞のcytosol中に主に存在し、ライソゾームへの集積は非常に少ないことが明らかとなった。

3. ^{67}Ga の悪性腫瘍集積機序に関して、腫瘍細胞のライソゾームによる特異的取り込みという考えが有力な説として存在していたが、本研究によって、この説は明確に否定された。

4. 肝臓では ^{67}Ga も ^{45}Sc も多量にライソゾーム分画へ取り込まれ、両者間に差はなかった。

5. ^{67}Ga は悪性腫瘍および肝臓中で主に分子量約1万の硫酸化酸性ムコ多糖に結合していたが、 ^{45}Sc はこれらの組織中で分子量4万以上の酸性ムコ多糖に結合していた。この両核種の結合酸性ムコ多糖の相違が、悪性腫瘍細胞におけるライソゾームへの集積に違いをもたらすと推定できた。

以上要するに、 ^{67}Ga は腫瘍細胞の可溶性分画中に多量に集積しており、ライソゾームは ^{67}Ga の腫瘍集積に重要な働きをしていないことが結論でき、既に報告されているごとく、 ^{67}Ga は腫瘍組織や周辺の炎症巣に取り込まれ、その組織に多量に存在する酸性ムコ多糖に結合していると考えるのが妥当と思われた。

謝 辞

稿を終えるに臨み、終始御指導、御校閲を賜りました恩師久田欣一教授に謹んで謝意を表します。データの統計的処理について御指導いただきました本学医学部衛生学教室橋本和夫教授に深く感謝致します。また、御指導、御助言を賜りました金沢大学医療技術短期大学部安東醇教授に深く感謝致します。

なお、本論文の要旨は第41回北陸医学会総会(1987年9月)において報告した。

文 献

- 1) Edwards, C. L. & Hayes, R. L.: Tumor scanning with ^{67}Ga citrate. J. Nucl. Med., 10, 103-105 (1969).
- 2) Edwards, C. L. & Hayes, R. L.: Scanning malignant neoplasm with gallium-67. J. Am. Med. Ass., 212, 1182-1190 (1970).
- 3) 久田欣一, 平木辰之助: ^{67}Ga -citrate 悪性腫瘍診断の限界と意義. 医学のあゆみ, 72, 590-592 (1970).
- 4) 宮前達也, 亘理 勉, 百瀬郁光, 安河内 浩: ^{67}Ga -citrate 使用による各種腫瘍シンチグラムの検討. 臨床放射線, 15, 598-608 (1970).

- 5) 木下文男, 前川 全, 久保敦司, 牛尾暉夫, 西川正夫, 里和スミエ, 七理 泰, 間森 坦, 山形正和, 有輪六朗: ^{67}Ga -citrate による悪性腫瘍の診断 (第一報) 肺癌のシンチグラム. 臨床放射線, **15**, 583-597 (1970).
- 6) Ito, Y., Okuyama, S., Awano, T., Takahashi, K. & Kanno, I.: Diagnostic evaluation of ^{67}Ga scanning of lung cancer and other diseases. Radiology, **101**, 355-362 (1971).
- 7) 鳥塚莞爾, 浜本 研, 鈴木 敏: コンピュータ・シンチグラフィによる腫瘍診断の臨床. 癌の臨床, **18**, 244-250 (1972).
- 8) Higashi, T., Nakayama, Y., Murata, A., Nakamura, K., Sugiyama, M., Kawaguchi, T. & Suzuki, S.: Clinical evaluation of ^{67}Ga -citrate scanning. J. Nucl. Med., **13**, 196-201 (1972).
- 9) Hayes, R. L., Nelson, B., Swartzendruber, D. C., Carlton, J. E. & Byrd, B. L.: Gallium-67 localization in rat and mouse tumors. Science, **169**, 289-290 (1970).
- 10) Swartzendruber, D. C., Nelson, B. & Hayes, R. L.: Gallium-67 localization in lysosomal-like granules of leukemic and nonleukemic murine tissues. J. Natl. Cancer Inst., **46**, 941-952 (1971).
- 11) Ito, Y., Okuyama, S., Sato, K., Takahashi, K., Sato, T. & Kanno, I.: ^{67}Ga tumor scanning and its mechanism studies in rabbits. Radiology, **100**, 357-362 (1971).
- 12) Deckner, K., Becker, G., Langowski, U., Schwing, H., Hornung, G. & Schmidt, C. G.: Die Subcelluläre Bindung von ^{67}Ga -Gallium in Ascites-Tumorzellen. Z. Krebsforsch, **76**, 293-298 (1971).
- 13) Orii, H.: Tumor scanning with gallium (^{67}Ga) and its mechanism studied in rats. Strahlentherapie, **144**, 192-200 (1972).
- 14) Brown, D. H., Carlton, E., Byrd, B., Harrell, B. & Hayes, R. L.: A rate-zonal centrifugation procedure for screening particle populations by sequential product recovery utilizing edge-unloading zonal rotors. Arch. Biochem. Biophys., **155**, 9-18 (1973).
- 15) Brown, D. H., Byrd, B. L., Carlton, J. E., Swartzendruber, D. C. & Hayes, R. L.: A quantitative study of the subcellular localization of ^{67}Ga . Cancer Res., **36**, 956-963 (1976).
- 16) Takeda, S., Uchida, T. & Matsuzawa, T.: A comparative study on lysosomal accumulation of gallium-67 and indium-111 in Morris hepatoma 7316A. J. Nucl. Med., **18**, 835-839 (1977).
- 17) Takeda, S., Okuyama, S., Takusagawa, K. & Matsuzawa, T.: Lysosomal accumulation of gallium-67 in Morris hepatoma-7316A and Shionogimammary carcinoma-115. Gann, **69**, 267-271 (1978).
- 18) Alpert, L. & Friedman, R.: Gallium scintigraphy demonstration of an appendiceal mucocele: A proposed mechanism of uptake. Clin. Nucl. Med., **6**, 378-379 (1981).
- 19) 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).
- 20) Clausen, J., Edeling, C. -J. & Fogh, J.: ^{67}Ga binding to human serum proteins and tumor components. Cancer Res., **34**, 1931-1937 (1974).
- 21) Anghileri, L.: Mineral metabolism in tumors and ^{67}Ga accumulation. Nucl. Med., **13**, 272-276 (1974).
- 22) Anghileri, L. & Heidbreder, M.: On the mechanism of accumulation of ^{67}Ga by tumors. Oncology, **34**, 74-77 (1977).
- 23) Lawless, D., Brown, D. H., Hubner, K. F., Colyer, S. P., Carlton, J. E. & Hayes, R. L.: Isolation and partial characterization of a ^{67}Ga -binding glycoprotein from Morris 5123C rat hepatoma. Cancer Res., **38**, 4440-4444 (1978).
- 24) Hoffer, P. B.: Mechanisms of localization. In P. B. Hoffer, C. Bekerman & R. E. Henkin (eds), Gallium-67 Imaging. 1st ed., p3-8, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1978.
- 25) Wong, H., Ternner, U. K., English, D., Noujaim, A. A., Lentle, B. C. & Hill, J. R.: The role of transferrin in the in vivo uptake of gallium-67 in a canine tumor. Int. J. Nucl. Med. Biol., **7**, 7-16 (1980).
- 26) Ando, A., Ando, I., Hiraki, T., Takeshita, M., Tanabe, S., Yamazaki, R. & Hisada, K.: ^{67}Ga binding substances in the tumor and liver tissue. Radioisotopes, **29**, 250-251 (1980).
- 27) Ando, A., Ando, I., Hiraki, T., Takeshita,

- M., Hisada, K.: Mechanism of tumor and liver concentration of ^{67}Ga : ^{67}Ga binding substances in tumor tissues and liver. *Int. J. Nucl. Med. Biol.*, **10**, 1-9 (1983).
- 28) Ando, A., Ando, I., Hiraki, T. & Hisada, K.: Relation between the location of elements in the periodic table and tumor-uptake rate. *Int. J. Nucl. Med. Biol.*, **12**, 115-123 (1985).
- 29) Hogeboom, G. H.: Fractionation of cell components of animal tissues. In S. P. Colowick & N. O. Koplman (eds), *Methods in enzymology*, vol. 1. pl6-19, 1st ed., 2nd printing, Academic Press, New York, 1959.
- 30) de Duve, C. Pressman, B. C., Glanetto, 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) Igarashi, M. & Hollander, V. P.: Acid phosphatase from rat liver. *J. Biol. Chem.*, **243**, 6084-6089 (1968).
- 32) Neil, M. W. & Horner, M. W.: Studies on acid hydrolase in adult and foetal tissues. Acid p-nitrophenyl phosphate phosphohydrolase of adult guinea-pig liver. *Biochem. J.*, **92**, 217-224 (1964).
- 33) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. H.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951).
- 34) Brown, A. H.: Determination of pentose in the presence of large quantities of glucose. *Arch. Biochem.*, **11**, 269-278 (1946).
- 35) Ando, A., Ando, I., Sanada, S., Hiraki, T. & Hisada, K.: Tumor and liver uptake models of ^{67}Ga -citrate. *Eur. J. Nucl. Med.*, **10**, 262-268 (1985).
- 36) Aulbert, E. & Haubold, U.: Isolation of the ^{67}Ga accumulating fraction in normal rat liver. *Nucl. Med.*, **13**, 72-84 (1974).
- 37) Aulbert, E., Gebhardt, A., Schulz, E. & Haubold, U.: Mechanism of ^{67}Ga accumulation in normal rat liver lysosomes. *Nucl. Med.*, **15**, 185-194 (1976).
- 38) Brown, D. H., Swartzendruber, D. C., Carlton, J. E., Byrd, B. L. & Hayes, R. L.: The isolation and characterization of gallium-binding granules from soft tissue tumors. *Cancer Res.*, **33**, 2063-2067 (1973).
- 39) Ando, A., Doishita, K., Ando, I., Sanada, S., Hiraki, T., Midzukami, M. & Hisada, K.: Study of distribution of ^{109}Yb , ^{67}Ga and ^{111}In in tumor tissue by macroautoradiography-Comparison between viable tumor tissue and inflammatory infiltration around tumor-. *Radioisotopes*, **26**, 421-422 (1977).
- 40) Ando, A., Ando, I., Sanada, S., Katayama, M., Hiraki, T., Doishita, K., Midzukami, M. & Hisada, K.: Study of the distribution of tumor affinity metal compounds and alkaline metal compounds in the tumor tissues by macroautoradiography. *Int. J. Nucl. Med. Biol.*, **11**, 195-201 (1984).

Accumulation Mechanism of ^{67}Ga -Citrate into Malignant Tumor Norihisa Yamada, Department of Nuclear Medicine, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med. Soc., 97, 1123—1136 (1988)

Key words: gallium-67, malignant tumor, accumulation mechanism, lysosome, scandium-46

Abstract

This study was undertaken to evaluate the role of the lysosome in the uptake of ^{67}Ga in malignant tumor tissue and to elucidate the accumulation mechanism of ^{67}Ga in malignant tumor. ^{46}Sc concentration in tumor lysosome was found during the investigation of the lysosomal accumulation of ^{67}Ga and other nuclides. A mixture of ^{67}Ga and ^{46}Sc -citrate was administered to tumor-bearing animals. Tumor and liver were excised at selected intervals after administration of these nuclides. Each tissue was homogenized and the lysosome was separated. The respective radioactivities for ^{67}Ga and ^{46}Sc in the lysosomal fraction were measured by the well type scintillation counter, using the different physical half-lives of these nuclides. From this experiment the following results were obtained. It was clear that the disruption of lysosome did not occur in the process of the fractionation procedures because ^{46}Sc readily concentrated in the lysosome of tumors. Most of ^{67}Ga existed in the cytosol of tumor cells and a small amount of this nuclide accumulated in the tumor lysosome. Concerning the accumulation mechanism of ^{67}Ga in tumor tissues, Swartzendruber and co-workers claim that the lysosome plays an important role. But it was clear from our results that lysosome did not play an important role in the tumor concentration of ^{67}Ga . These nuclides readily concentrated in the lysosome of liver, and the concentration rates were very similar. ^{67}Ga was bound to the acid mucopolysaccharide with a molecular weight of about 10,000 dalton while ^{46}Sc was bound to the acid mucopolysaccharide whose molecular weight exceeds 40,000 dalton. It was presumed that the difference of lysosomal accumulations in tumor tissues were caused by the difference of binding substances of these nuclides in tissues. From the above-described results, it was concluded that lysosome did not play an important role in the tumor concentration of ^{67}Ga . It is reasonable to consider that ^{67}Ga is taken up into the tumor tissue and connective tissue (especially inflammatory tissue), and is bound to the acid mucopolysaccharide in these tissues, as was reported previously.