テクネチウム-99m標識ヘキサキス(2-メトキシイソブチルイソニトリル)による悪性腫瘍の多剤耐性の評価

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: 小西, 章太
	メールアドレス:
	所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9268

金沢大学十全医学会雑誌　第106巻　第1号　72－83（1997）

テクネチウム-99m 標識ヘキサキス (2-メトキシイソブチルイソニトリル) による悪性腫瘍の多剤耐性の評価

金沢大学医学部医学科核医学講座（主任：利波紀久教授）
小　西　章　太

腫瘍組織の抗癌剤感受性を体外から画像による非侵襲的な画像診断法で評価するため，種々の実験モデルにおいてテクネチウム-99m 標識ヘキサキス (2-メトキシイソブチルイソニトリル) (hexakis (2-methoxyisobutylisonitrile) technetium-99m, ^{99m}Tc-MIBI) を用いて検討した．細胞株は P388 マウス単球性白血病細胞の P-糖タンパク (P-glycoprotein, P-gp) を発現している多剤耐性株 (P388/ADR) および非発現の感受性株 (P388/S) を用いた．まず ^{99m}Tc-MIBI の腫瘍親和性と集積機序を検討するため P388/S を培養液中で ^{99m}Tc-MIBI とインキュベーションする際に反応温度や細胞外 ^{99m}Tc-MIBI 濃度を変化させ，結合率への影響を検討した．反応温度を24℃に設定した場合では P388/S の ^{99m}Tc-MIBI の結合率は約40%であったが，0℃では約1～3%と著しい抑制がみられた．また細胞外 ^{99m}Tc-MIBI 濃度を上昇させると細胞内の ^{99m}Tc-MIBI 濃度も比例して上昇し，飽和は確認されなかった．これらより腫瘍細胞の ^{99m}Tc-MIBI の取り込みは受動拡散によると考えられ，輸送膜タンパクなどには依存しないと思われたが，その細胞内保持には何らかの能動的機序が関与していると考えられた．またイオンチャンネル阻害剤や代謝阻害剤の影響を検討したところ，^{99m}Tc-MIBI の取り込みはミトコンドリア活性に依存しており，また ^{201}Tl とは異なる機序によるものと考えられた．つづいて P-gp の発現が腫瘍細胞の ^{99m}Tc-MIBI の取り込みにおよぼす影響を検討した．P388/ADR および P388/S を培養液中で ^{99m}Tc-MIBI とインキュベーションしたところ P388/ADR の取り込み (1%～3%) は P388/S (40%) に比べて著しく低く，また洗い出しも P388/S に比べて速やかであった．インキュベーションの際に多剤耐性克服薬剤であるベラパミル (verapamil) を添加すると P388/ADR の ^{99m}Tc-MIBI の取り込みが促進し，100 μM の濃度では P388/Sと同等の取り込みを示した．生体内においては，両側大腿部にP388/ADRおよびP388/Sを移植したヌードマウスの ^{99m}Tc-MIBI イメージングで P388/ADR は P388/S と比べて ^{99m}Tc-MIBI の集積は乏しかった．またヌードマウスにおける ^{99m}Tc-MIBI の生体内分布では，P388/ADR は P388/S に比べて早期より取り込み率が低値でかつ洗い出しも速やかであり，試験管内細胞実験と一致した結果が得られた．以上より ^{99m}Tc-MIBI による腫瘍イメージングは腫瘍の多剤耐性を非侵襲的に評価することを可能にし，化学療法のプロトコール決定や克服薬剤の効果判定にも有用な情報を提供しうると考えられた．

Key words multidrug resistance, P-glycoprotein, ^{99m}Tc-MIBI, mitochondria, P388

悪性腫瘍の化学療法に対する大きな障害の一つに腫瘍細胞の多剤耐性の発現がある[1)~5)]．化学療法を続けていくうちに，それまで使用していた抗癌剤に対する感受性が低下するばかりか，分子量も構造も全く異なる複数の抗癌剤に対しても同時に耐性となってしまうことがしばしば経験される．このような多剤耐性の腫瘍細胞の多くでは多剤耐性遺伝子 *MDR1* によってコードされる P 糖タンパク (P-glycoprotein, P-gp) とよばれる分子量 170kDa の巨大な疎水性の膜タンパクが発現しており，そのポンプ作用により細胞内に流入した抗癌剤を細胞外へ排出することで細胞の薬剤感受性を下げることがわかっている[2)3)]．

テクネチウム-99m 標識ヘキサキス (2-メトキシイソブチルイソニトリル) (hexakis (2-methoxyisobutylisonitrile) technetium-99m, ^{99m}Tc-MIBI) は ^{99m}Tc 標識の新しい心筋血流診断薬として開発され，現在臨床の場で広く使用されている．また ^{201}Tl は代表的な心筋血流診断薬で生体内で K^+ と類似の挙動を示す[6)]が，腫瘍診断薬としてもその有用性が認められている．そのため ^{99m}Tc-MIBI においても腫瘍親和性が検討されている[7)]が最近 ^{99m}Tc-MIBI が多剤耐性癌には集積しにくいことが報告されている[8)]．腫瘍の多剤耐性を非侵襲的に画像診断で簡便に評価することができれば化学療法を行う前にその効果を予測することができ，その後の治療のプロトコールを決定するにあたり有用な情報が得られると思われる．本研究では ^{99m}Tc-MIBI の腫瘍集積性およびその機序，さらに P-gp が ^{99m}Tc-MIBI の腫瘍集積性におよぼす影響を調べ，^{99m}Tc-MIBI による腫瘍の多剤耐性の評価の可能性を検討した．

材料および方法

I．材　料

1．実験腫瘍

癌化学療法センター (東京) より供給された P388 マウス単球

平成8年11月26日受付，平成9年1月16日受理

Abbreviations：CCCP, carbonylcyanide-m-chlorophenylhydrazone; IAA, iodoacetic acid; IC_{50}, 50% inhibitory concectration; ID, injected dose; PBS, phosphate-buffered saline; P-gp, P-glycoprotein; ^{99m}Tc-MIBI, hexakis (2-methoxyisobutylisonitrile) technetium-99m

性白血病細胞のアドリアマイシン感受性株 (P388/S) および耐性株 (P388/ADR) を用いた．耐性株はアドリアマイシン (adriamycin) を含有する培養液中で繰り返し継代することで得られた．それぞれの細胞株におけるアドリアマイシンの50%阻害濃度 (50% inhibitory concectration, IC_{50}) (平均値±標準偏差) は P388/S が29.4±2.4であったのに対し P388/ADR は9090±600であり，P388/ADR のアドリアマイシンに対する耐性が確認されている．またビンブラスチン (vinblastine)，ビンクリスチン (vincristine)，エトポシド (etoposide) に対する IC_{50} 値も P388/S がそれぞれ2.0±2，1.2±0.2，22.5±1.1であるのに対して P388/ADR では57±2，141±11，13200±600であり，P388/ADR の多剤耐性が示されている．P388/ADR における P-gp の発現は抗 P-gp マウスモノクローナル抗体 C219 (Centocor, Malvern, USA) を用いたフローサイトメトリー法 (flow cytometry) により確認されている[9]．

2．継代および動物モデル

1）浮遊細胞

2種類の浮遊細胞約 10^7 個を4～6週齢の別々の雌 CDF1 マウス (日本 SLC，浜松) に腹腔内投与し，1週後に腹水 0.1ml を採取した．採取した腹水を pH7.4 のリン酸緩衝生理食塩液 (phosphate-buffered saline, PBS) (日水製薬，東京) で10倍に希釈し，その 0.2ml を次代の CDF1 マウスに腹腔内投与した．大量の細胞を要する際には，エーテル麻酔下で開腹したうえで腹水を採取した．腹水細胞を PBS で洗浄，遠心分離 (1000rpm，5分，5回) して実験に用いた．

2）固形腫瘍

まず浮遊状態の P388/S および P388/ADR をそれぞれ 3×10^8 個ずつ4～6週齢の別々の雌 BALB/c ヌードマウス (日本 SLC) の大腿部皮下に注入し固形腫瘍モデルを確立した．以後の継代は移植10日目に固形発育した腫瘍を摘出し，無菌的に細片化した一部をトロッカーにて次代のヌードマウス大腿部皮下に移植した．

3）動物モデル

固形の P388/S および P388/ADR を同一のヌードマウスの左右の大腿部に移植し，移植後10日目に実験に用いた．

3．放射性医薬品の調製

^{99m}Tc-MIBI は添付説明書に従って調製した．^{99m}Tc-MIBI キットバイアル (カーディオライト®第一，第一ラジオアイソトープ研究所，東京) にジェネレーター (Ultra-Techne Kow®，第一ラジオアイソトープ研究所) より抽出した過テクネチウム酸ナトリウム (^{99m}Tc) 溶液 370MBq (2ml) を加えて99℃で15分間加熱したのち，15分間放冷した．

Ⅱ．実験方法

1．^{99m}Tc-MIBI の腫瘍細胞親和性および集積機序の検討

1）温度の影響 (実験1)

24℃と0℃条件下での ^{99m}Tc-MIBI および ^{201}Tl の腫瘍細胞への結合率を検討した．5×10^6 個の P388/S 細胞と ^{99m}Tc-MIBI およびタリウム-201 (^{201}Tl) (塩化タリウム (^{201}Tl) 注 NMP®，日本メジフィジックス，西宮) をそれぞれ 18.5kBq を RPMI1640-10%ウシ胎児血清 (日水製薬) で最終的に 100μl となるように調製し24℃または0℃で反応させた．反応中はサーモミキサー TM-127 (サーモニクス，東京) で振動撹拌した．反応開始後，5分から240分までの各時間で冷 PBS 3ml で細胞を洗浄，遠心分離機 6PR-52 (日立工機，勝田) にて遠心分離 (1000rpm，5分) して上清を除去した後，オートウエル型ガンマカウンター ARC-380 (アロカ，東京) で ^{99m}Tc-MIBI と ^{201}Tl の細胞結合放射能を測定した．ウインドウ幅は ^{99m}Tc では 110～170keV，^{201}Tl では 60～90keV に設定し，あらかじめ求めておいた他チャンネルとの重なりの割合 (^{99m}Tc：0.3%，^{201}Tl ：27%) で補正し，測定した．結果は添加総放射能に対する細胞結合放射能の割合 (% bound) で表現した．

2）細胞外の ^{99m}Tc-MIBI 濃度の影響 (実験2)

細胞外 ^{99m}Tc-MIBI 絶対量の変化によって腫瘍細胞の ^{99m}Tc-MIBI 取り込み量がどのように変化するかをみるために，P388/S を ^{99m}Tc-MIBI とインキュベーションする際に培養液中にさまざまな濃度の非標識の MIBI (cold MIBI) を添加し，10分，30分での ^{99m}Tc-MIBI の結合率を測定した．添加する cold MIBI 溶液は MIBI キットバイアルに生理食塩水を注入して溶解したものを用い，最終的な培養液中の ^{99m}Tc-MIBI 濃度が 0.83μM から 249μM になるように調製した．なお他の手技は実験1に準じた．

3）各種阻害剤の効果 (実験3)

^{99m}Tc-MIBI の腫瘍細胞への集積機序と細胞内局在を検討するために各種阻害剤を用いて腫瘍細胞の ^{99m}Tc-MIBI 取り込みの変化を観察した．用いた阻害剤および最終濃度は Na^+/K^+ ATPase 阻害剤であるウワバイン (ouabain) (Sigma, St. Louis, USA) 100μM，ミトコンドリア電子伝達系阻害剤であるロテノン (rotenone) (Sigma) 10μM，ミトコンドリア膜電位分極阻害剤であるカルボニルサイアニド-m-クロロフェニルヒドラゾン (carbonylcyanide-m-chlorophenylhydrazone, CCCP) (Sigma) 5μM，解糖系阻害剤であるヨード酢酸 (iodoacetic acid, IAA) (Sigma) 1mMである．これらの阻害剤の存在下で30分間あらかじめプレインキュベーションしたのち実験1に準じた反応をさせ，30分，60分での ^{99m}Tc-MIBI および ^{201}Tl の P388/S への細胞結合率を測定した．さらに IAA についてはプレインキュベーションの時間を変えて細胞の結合率の変化を観察した．

2．^{99m}Tc-MIBI の腫瘍集積性におよぼす P-gp 発現の影響の検討

1）P-gp 発現の有無による腫瘍細胞の ^{99m}Tc-MIBI 取り込みの相違 (実験4)

P388/ADR，P388/S について24℃での ^{99m}Tc-MIBI と ^{201}Tl の取り込みを実験1に準じて検討した．

2）P-gp 発現の有無による腫瘍細胞からの ^{99m}Tc-MIBI の洗い出しの相違 (実験5)

実験1に準じて ^{99m}Tc-MIBI と ^{201}Tl を添加した培養液中で P388/ADR および P388/S を24℃で60分間インキュベーションした後，培養液を交換して細胞外の ^{99m}Tc-MIBI と ^{201}Tl を除去した．直後より経時的に細胞を採取し，^{99m}Tc-MIBI と ^{201}Tl の細胞結合放射能を測定し，その推移を調べた．

3）多剤耐性克服薬剤の効果 (実験6)

多剤耐性細胞である P388/ADR の ^{99m}Tc-MIBI 取り込みに対して多剤耐性克服薬がおよぼす影響を検討した．P388/ADR 細胞を培養液中でインキュベーションする際にベラパミル (verapamil) (Sigma)[10][11]の最終濃度が 1μM～100μM になるように調製し，30分，60分での ^{99m}Tc-MIBI の摂取率を実験1に準じて測定した．

4）生体イメージング (実験7)

腫瘍移植ヌードマウスをペントバルビタールナトリウム

(pentobarbital sodium) (Nembutal®, Abbott, North Chicago, USA) 0.75mg 腹腔内投与にて麻酔後，木製の台上に布テープでしっかり固定し，^{201}Tl 11.1MBq を尾静脈より投与して20分後から180分まで経時的にシンチレーションカメラ Sigma414 (アロカ) で撮像した．撮像終了後，モデルヌードマウスを引き続き台上に固定したまま ^{99m}Tc-MIBI 185MBq を尾静脈より投与し，^{201}Tl と同様に撮像した．得られたイメージは白黒インスタントフィルム667 (日本ポラロイド，東京) に記録した．

5）オートラジオグラフィー (実験8)

腫瘍移植ヌードマウスに ^{99m}Tc-MIBI 185MBq を尾静脈より投与し，15分後にエーテル麻酔した後に屠殺し，腫瘍および転移リンパ節を採取した．O. C. T. コンパウンド TISSUE-TEK (Miles, Elkhart, USA) を用いて採取した標本のブロックを作製し，クリオスタット HM505E (カールツァイス，東京) により厚さ 20 μm のスライス標本を作製した．得られたスライス標本をイメージングプレート BAS-SR2025 (富士フィルム，東京) に3時間露光させ，バイオ・イメージングアナライザー BAS-5000 (富士フィルム) によりデータ収集した．データ解析はパーソナルコンピューター Power Macintosh 8500/120 (Apple computer, Cupertino, USA) および解析ソフトウエア MacBAS Ver. 2.3 (富士フィルム) を用いた．

6）生体内分布 (実験9)

腫瘍移植ヌードマウスに ^{201}Tl 74kBq と ^{99m}Tc-MIBI 444kBq の混合液を尾静脈より投与した．投与後15分，60分，120分後の各時間でそれぞれ10匹，6匹，8匹をエーテル麻酔の後に開胸し，心臓より注射器で脱血屠殺した．引き続いて肺，肝，脾，胃，腸，腎，筋，骨，腫瘍，転移リンパ節を摘出した．得られた標本の湿重量を測定した後，各標本の放射能をオートウエル型ガンマカウンターで測定した．なお血管外への注射漏れを考慮し，屠殺後に尾を根本から切断してその放射能を測定して，注射放射能 (injected dose, ID) から尾に残った放射能を差し引いて補正し，注射放射能に対する各臓器 1g あたりの放射能の分布割合 (percent of injected dose/g wet tissue, %ID/g) を求めた．その際，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．

Ⅲ．統計解析

統計解析はまず F 検定を行って，等分散のときは Student の独立2標本間 t 検定，異分散のときは Welch の t 検定を用いて，危険度5％以下をもって有意とした．

成　　績

Ⅰ．^{99m}Tc-MIBI の腫瘍細胞親和性および集積機序の検討

1．温度の影響 (実験1)

24℃では ^{99m}Tc-MIBI の P388/S への結合率は経時的に増加し，60分で約40％のプラトーに達したが，0℃での結合率は各時間で1～3％に抑制された (図 1A)．また ^{201}Tl の結合率も24℃で2～5％であったものが0℃で1～3％に抑制された (図 1B)．

2．細胞外の ^{99m}Tc-MIBI 濃度の影響 (実験2)

インキュベーション開始後10分の P388/S 細胞の ^{99m}Tc-MIBI 取り込みは細胞外 ^{99m}Tc-MIBI 濃度の上昇に伴ってほぼ直線的に増加し，本研究で用いた 249 μM までは飽和は観察されなかった．しかし30分では 83 μM 以上でプラトーであり，それ以上の濃度では増加せず，10分値よりも低い値を示した (図 2A)．一方201Tlの取り込みは細胞外 ^{99m}Tc-MIBI 濃度の上昇とともに低下し，41.5 μM 以上ではコントロールの30～40％でプラトーに達した (図 2B)．

3．各種阻害剤の効果 (実験3)

^{99m}Tc-MIBI の腫瘍細胞結合はロテノン 10 μM 存在下では30分でコントロールの75.2％，60分で71.6％と結合低下が認められた．また CCCP 5 μM 存在下では30分で54.1％，60分で51.5％と結合低下が認められた．一方，ウワバイン 100 μM 存在下では30分で114％，60分で104％であり，ごくわずかに結合率が上昇する傾向がみられた．IAA 1mM存在下では30分では114％，60分で21.7％で，IAA による ^{99m}Tc-MIBI の細胞結合阻害効果の発現は他の阻害剤に比べて遅れることが示された (図 3A)．

^{201}Tl の腫瘍細胞結合はウワバインの存在下では30分で70.7％，60分で63.9％と結合低下が認められた．ロテノンの存在下では30分で99.5％，60分で91.8％，また CCCP の存在下では30分で111％，60分で100％と明らかな影響は認められなかった．IAA

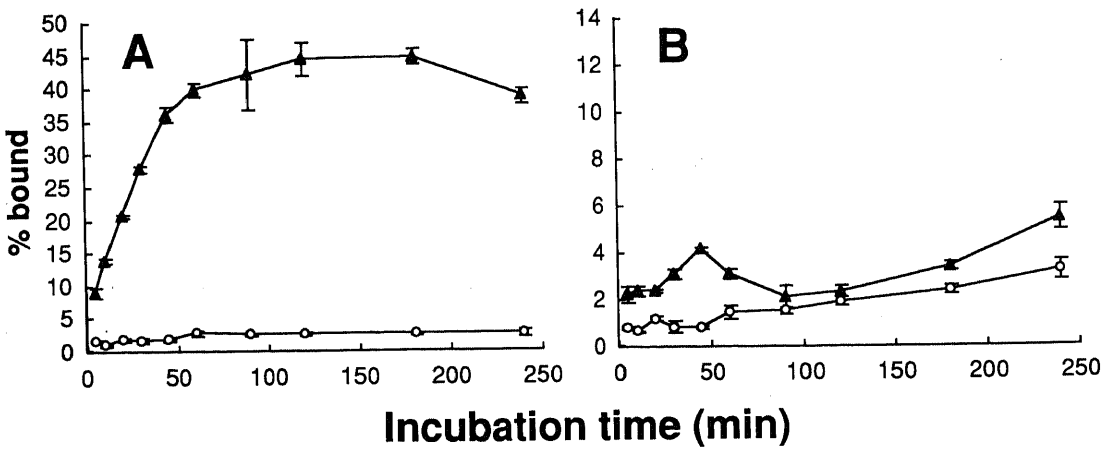

Fig. 1. Effect of temperature on radiotracer cellular uptake by P388/S cells expressed as a percent of the total dose added. (A) ^{99m}Tc-MIBI uptake. (B) ^{201}Tl uptake. ▲, 24℃; ○, 0℃. Each point represents $\bar{x}$ ±SD of three experiments. Error bars not shown are within the symbol.

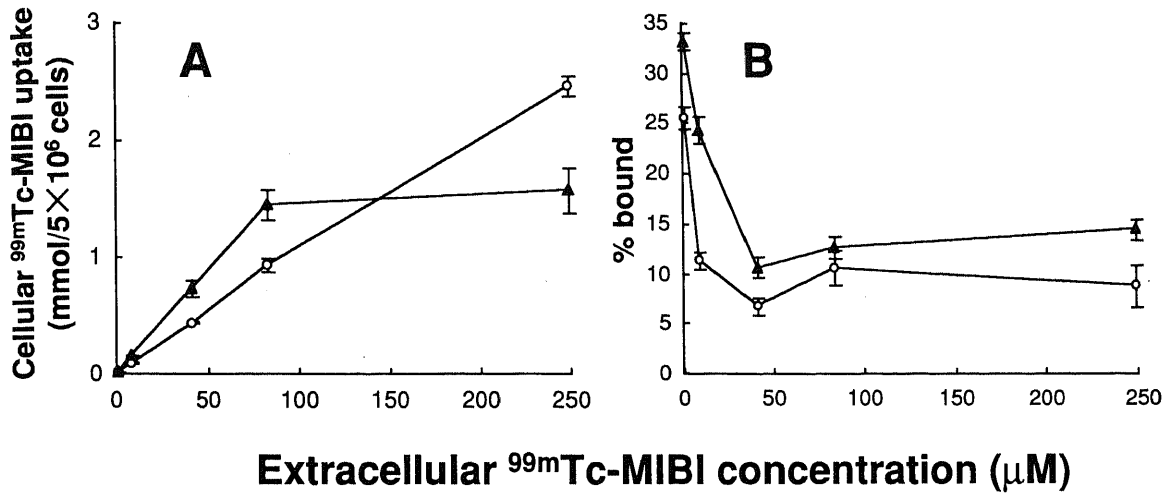

Fig. 2. Effect of the extracellular concentration of ^{99m}Tc-MIBI on radiotracer uptake by P388/S cells. (A) ^{99m}Tc-MIBI uptake expressed as cell bound ^{99m}Tc-MIBI per 5×10^6 cells. (B) ^{201}Tl uptake expressed as a percent of the total dose added. Each point represents $\bar{x}\pm$SD of three experiments. Error bars not shown are within the symbol. ○, 10 min; ▲, 30 min.

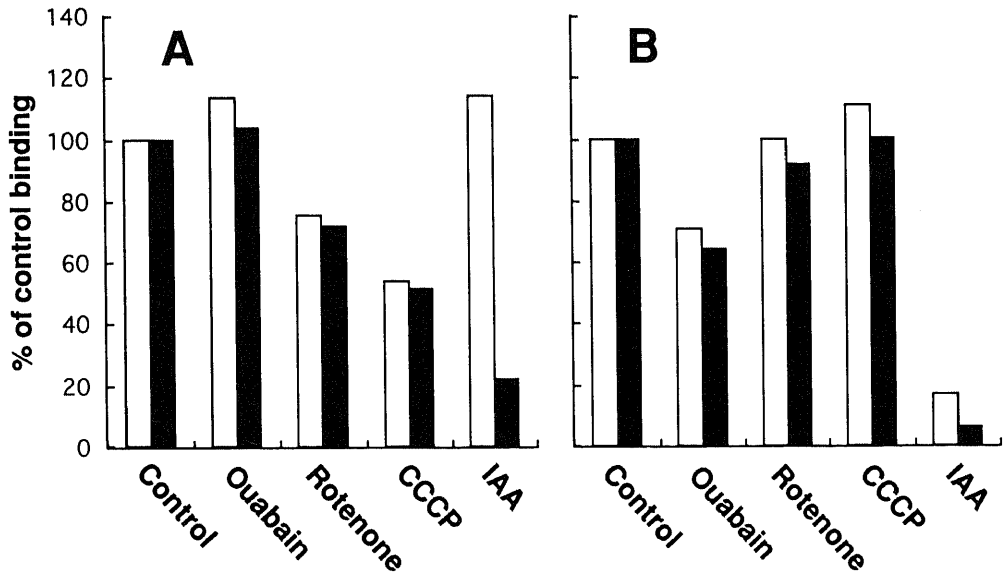

Fig. 3. Effect of ion transport or metabolic inhibitors on radiotracer uptake of P388/S cells after 1h preincubation with each inhibitor expressed as a percent of the control binding. (A) ^{99m}Tc-MIBI uptake. (B) ^{201}Tl uptake. □, 30 min; ■, 60 min.

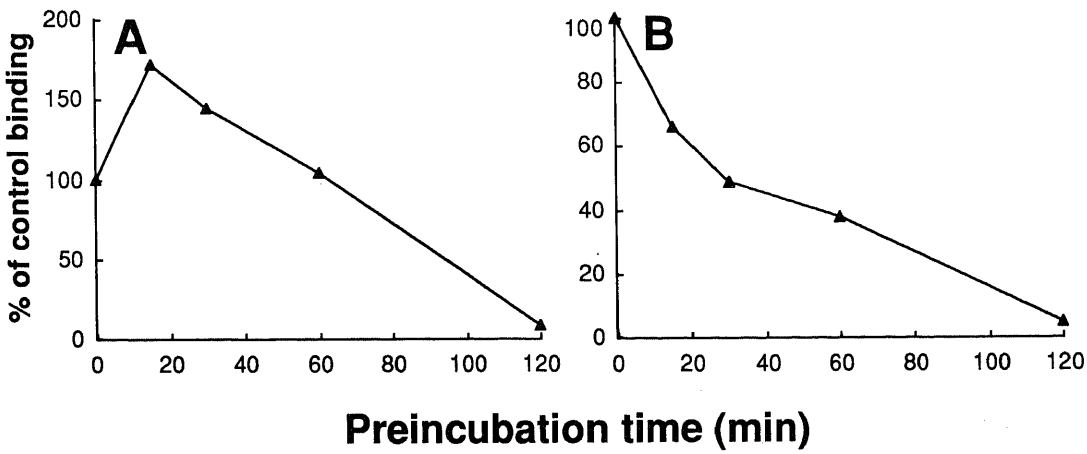

Fig. 4. Effect of IAA on radiotracer cellular uptake by P388/S cells at 60 min after several preincubation time expressed as a percent of the control binding. (A) ^{99m}Tc-MIBI uptake. (B) ^{201}Tl uptake.

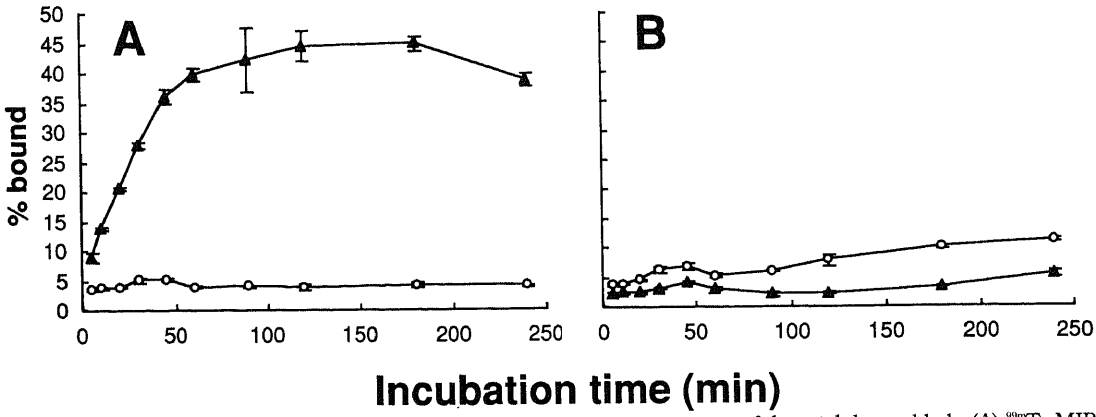

Fig. 5. Curves of radiotracer cellular uptake by two P388 cells expressed as a percent of the total dose added. (A) ^{99m}Tc-MIBI uptake. (B) ^{201}Tl uptake. ○, P388/ADR cell line; ▲, P388/S cell line. Each point represents $\bar{x} \pm$SD of three experiments. Error bars not shown are within the symbol.

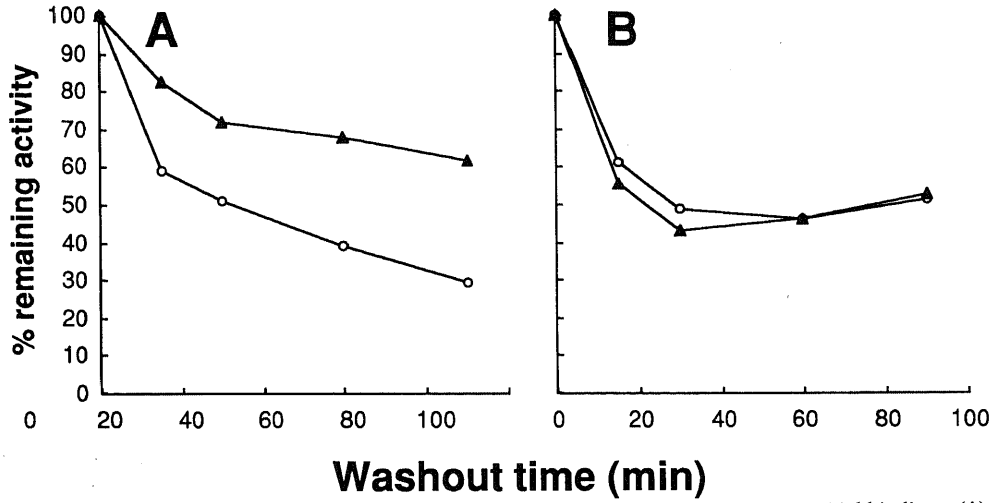

Fig. 6. Curves of relative washout rates of radiotracer from two P388 cells expressed as a percent of initial binding. (A) ^{99m}Tc-MIBI. (B) ^{201}Tl. ○, P388/ADR cell line; ▲, P388/S cell line.

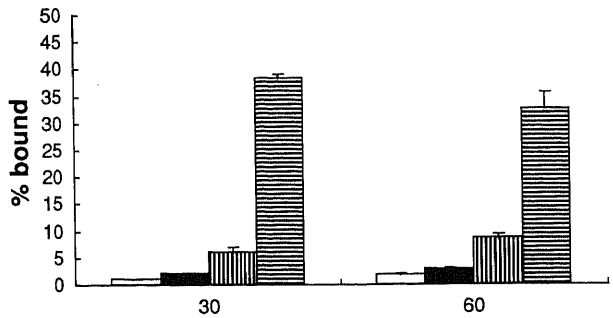

Fig. 7. Effect of verapamil concentration on 99mTc-MIBI uptake by P388/ADR cells expressed as a percent of the total dose added. □, 0 μM; ■, 1 μM; ▥, 10 μM; ▤, 100 μM. Each data represents $\bar{x} \pm$SD of three experiments.

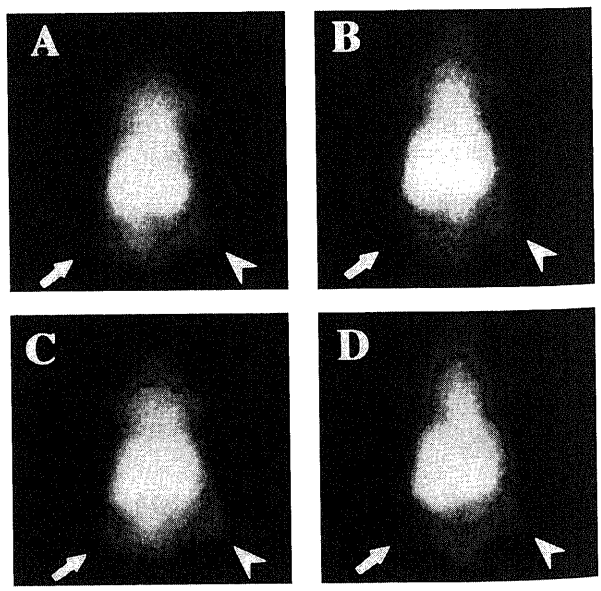

Fig. 8. In vivo imagings of ^{99m}Tc-MIBI and ^{201}Tl in the same nude mouse. P388/ADR cells had been transplanted to the left thigh (arrow), P388/S cells to the right thigh (arrow head). A, ^{201}Tl (20 min); B, ^{99m}Tc-MIBI (20 min); C, ^{201}Tl (180 min); D, ^{9m}Tc-MIBI (180 min)

の存在下では30分では16.9%，60分で6.32%と強く抑制された(図3B).

さらにIAAではプレインキュベーション時間を長くしていくに従って^{201}Tlの結合率は速やかに低下した(図4B). 一方^{99m}Tc-MIBIの結合率は15分でいったん172%まで上昇したあとほぼ直線的に低下し，120分では8%まで抑制された(図4A).

Ⅱ. ^{99m}Tc-MIBIの腫瘍集積性におよぼすP-gp発現の影響の検討

1. P-gp発現の有無による腫瘍細胞の^{99m}Tc-MIBI取り込みの相違(実験4)

実験1で述べたとおり24℃でのP388/Sの^{99m}Tc-MIBI取り込みは60分で約40%のプラトーに達したが，P388/ADRの取り込みは観察したすべての時間で3～5%と極めて低値であった(図5A). また^{201}Tlの取り込みはP388/Sで2～5%，P388/ADRで4～11%であった(図5B).

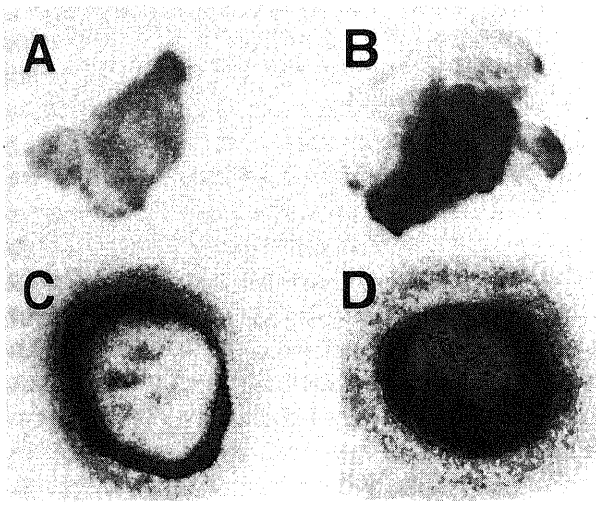

Fig. 9. Autoradiographic images of ^{99m}Tc-MIBI at 15 min after injection. A, P388/ADR tumor; B, P388/S tumor; C, a metastatic lymph-node of P388/ADR; D, a metastatic lymph-node of P388/S.

2. P-gp発現の有無による腫瘍細胞からの^{99m}Tc-MIBIの洗い出しの相違(実験5)

P388/ADR細胞およびP388/S細胞からの^{99m}Tc-MIBIと^{201}Tlの洗い出しを培養液交換直後の結合放射能に対する各時間での結合放射能の百分率(% remaining activity)で比較した. P388/Sからの^{99m}Tc-MIBIの洗い出しは15分，30分，60分，90分でそれぞれ82，72，68，61%であった. それに対してP388/ADRではそれぞれ59，51，39，29%でP388/Sに比べ細胞からの^{99m}Tc-MIBIの放出が速やかであることが示された(図6A). 一方^{201}Tlの洗い出しについてはP388/ADRとP388/Sで明らかな差はなく30分までは放出が続き，それ以後はおよそ50%のプラトーに落ち着いた.

3. 多剤耐性克服薬剤の効果(実験6)

培養液中にベラパミルを添加して1μMの濃度にするとP388/ADR細胞の^{99m}Tc-MIBIの取り込みは30分，60分ともベラパミルを加えなかった場合のおよそ2倍に増加した(図7). さらにベラパミル濃度を10μM，100μMに上昇させていくとそれに伴ってP388/ADR細胞の^{99m}Tc-MIBIの取り込みは著しく上昇し，100μMでは結合率が30分で38%，60分で33%となり，P388/S細胞と同程度の結合率を呈するに至った.

4. 生体イメージング(実験7)

^{201}Tlイメージングでは大腿部に移植したP388/ADR腫瘍とP388/S腫瘍への集積に明らかな差は認められなかった. 一方^{99m}Tc-MIBIイメージングでは静注後20分でP388/ADRへの集積はP388/Sに比べて低く描出不良であった. その後180分まで経時的に撮像したが，どの時点でもP388/ADRへの^{99m}Tc-MIBIの集積はP388/Sに比べて低集積であった(図8).

5. オートラジオグラフィー(実験8)

図9AにP388/ADR，図9BにP388/Sの腫瘍オートラジオグラムを，また図9CにP388/ADR，図9DにP388/Sの転移リン

Table 1. Biodistribution of ^{99m}Tc-MIBI in tumor-bearing nude mice

Organ	% of injected dose of ^{99m}Tc-MIBI/g wet tissue (x ±SD)		
	Time after injection of ^{99m}Tc-MIBI (min)		
	15 (n=10)	60 (n=6)	120 (n=8)
Blood	0.22±0.16	0.07±0.04	0.02±0.01
Heart	10.29±5.77	4.61±1.90	4.53±1.77
Lung	1.65±0.86	0.54±0.43	0.25±0.12
Liver	8.19±5.59	2.59±1.26	1.87±0.40
Spleen	2.10±1.53	0.23±0.11	0.13±0.06
Stomach	4.69±2.61	1.55±0.69	1.61±0.67
Intestine	16.12±8.12	5.41±1.87	3.21±1.93
Kidney	35.98±27.06	7.20±2.36	5.45±3.12
Muscle	1.47±0.96	0.70±0.46	0.77±0.47
Bone	0.97±0.47	0.48±0.34	0.22±0.20
Tumor (P388/ADR)	0.54±0.35	0.07±0.02] *	0.06±0.03] **
Tumor (P388/S)	0.78±0.47	0.31±0.19	0.20±0.10
LN (P388/ADR)	0.64±0.33	0.09±0.04	0.06±0.06
LN (P388/S)	1.21±0.71	0.15±0.03	0.11±0.06

LN, lymph-node. *p<0.05, **p<0.01

Table 2. Biodistribution of ^{201}TI in tumor-bearing nude mice

Organ	% of injected dose of ^{201}TI/g wet tissue (x ±SD)		
	Time after injection of ^{201}TI (min)		
	15 (n=10)	60 (n=6)	120 (n=8)
Blood	0.38±0.09	0.36±0.12	0.28±0.06
Heart	33.29±7.17	13.83±3.80	8.84±1.57
Lung	17.86±5.62	7.31±2.43	5.32±1.28
Liver	5.61±2.49	6.49±1.71	5.64±1.00
Spleen	6.67±2.21	5.35±2.17	5.29±0.89
Stomach	7.62±2.65	7.59±0.78	7.84±0.94
Intestine	14.32±5.41	14.91±6.51	11.46±2.87
Kidney	34.48±15.09	36.57±15.52	50.71±10.01
Muscle	6.58±4.88	5.16±2.96	5.10±1.63
Bone	4.88±2.31	4.45±2.19	3.82±1.50
Tumor (P388/ADR)	2.56±0.86	2.57±1.35	3.47±0.37
Tumor (P388/S)	3.24±1.42	4.44±2.43	3.88±0.77
LN (P388/ADR)	2.16±1.38	1.91±1.26	2.50±1.00
LN (P388/S)	2.02±1.72	2.43±1.05	3.26±2.10

LN, lymph-node.

パ節のオートラジオグラムを示した．P388/ADR の腫瘍組織，転移リンパ節組織ともに P388/S の場合と比べて信号強度は明らかに低く，^{99m}Tc-MIBI の取り込みが低いことが示された．

6．生体内分布 (実験9)

P388/ADR 腫瘍および P388/S 腫瘍の15分，60分，120分での ^{99m}Tc-MIBI の%ID/g (平均値±標準偏差) はそれぞれ0.54±0.35，0.07±0.02，0.06±0.03および0.78±0.47，0.31±0.19，0.20±0.10であり，60分，120分における ^{99m}Tc-MIBI の P388/ADR 腫瘍への集積は P388/S 腫瘍に比べて有意に低かった ($p<0.05$，$p<0.01$)．また P388/ADR の洗い出しは P388/S よりも速やかであった (表1)．^{201}Tl は各時間で細胞株による大きな差はなく，P388/ADR 腫瘍および P388/S 腫瘍の15分，60分，120分での ^{201}Tl の%ID/g はそれぞれ2.56±0.86，2.57±1.35，3.47±0.37および3.24±1.42，4.44±2.43，3.88±0.77であり，いずれの時間でも有意な差は認められなかった．また ^{99m}Tc-MIBI とは異なり，経時的に洗い出される傾向は認められなかった (表2)．

考 察

Juliano らは コルヒチン (colchicine) 選択により多剤耐性となったチャイニーズハムスターの培養卵巣細胞膜上に，野生型細胞にはない糖タンパクが発現していることを発見し，P 糖タンパクと命名，報告した[12]．以後 P-gp は細胞の薬剤感受性を下げる機構として注目され，多くの研究者の興味の対象となった．その後の研究で P-gp は ATPase であることが判明し，細胞内に流入した色々な抗癌剤を能動的に細胞外へ排出することで細胞の薬剤感受性を下げることが明らかになった[13)14]．一般的に ATPase である細胞膜上の輸送タンパクはそれぞれ固有のイオンを輸送することが知られている．しかし P-gp が輸送するのはイオンではなく抗癌剤などの分子であり，その基質選択性は低い．それゆえ P-gp は非常に特殊な性質を持つ膜タンパクであるといえる．また P-gp は多剤耐性腫瘍細胞だけでなく副腎皮質表面や子宮，肝，腎の近位尿細管刷子縁膜，血液脳関門，精巣などの正常組織にも存在することが確認されている[15)~18)]．その生理的な役割はまだ不明な点が多いが，副腎や子宮などではステロイドの輸送に，肝，腎などでは代謝産物や異物の排泄に関与していると推定されている[19)]．また血液脳関門や精巣などでは脳や精巣に移行してくる物質に対する防御機構[17)20)]として機能しているのではないかと考えられている．

P-gp が多剤耐性の主たるメカニズムであるのは前述の通り非常に多くの，しかも分子構造がまったく異なる物質を認識，輸送できるためである．その基質認識の機序は明らかでないが，疎水性で陽電荷をもつ物質が P-gp に認識されやすいことがわかっている[21)]．疎水性で陽電荷をもつ ^{99m}Tc-MIBI は心臓核医学における心筋血流診断薬として開発され，その有用性，簡便性から近年急速に臨床の場に普及してきている．一方，心筋血流診断薬の代表的存在である ^{201}Tl[22)]は悪性腫瘍に親和性があるため腫瘍診断薬としても利用されている[23)24)]．このため ^{99m}Tc-MIBI についてもその腫瘍親和性が検討されてきた[7)25)~27)]．一般的に ^{99m}Tc-MIBI を用いた腫瘍イメージングでは ^{201}Tl で得られた画像に類似した画像が得られる．しかしながら一部の症例で ^{201}Tl と ^{99m}Tc-MIBI で異なる結果が得られることがある．^{201}Tl による腫瘍イメージングは通常，投与直後の早期像と3時間後の後期像を比較するが，Tonami らの報告によれば後期像で腫瘍内残留が強い場合は悪性腫瘍である可能性が高い[28)]．しかし ^{201}Tl で後期像の腫瘍内残留が強い症例でも，^{99m}Tc-MIBI による腫瘍イメージングでは後期像で洗い出されて腫瘍が描画されなくなる場合がある．これは ^{99m}Tc-MIBI が ^{201}Tl とは異なり，腫瘍の良悪性の鑑別以外の腫瘍情報を提供していることを示唆する．Piwnica-Worms らは P-gp を発現した KB-8-5 腫瘍と発現していない KB 腫瘍を移植したヌードマウスモデルを用いて，KB-8-5 腫瘍には ^{99m}Tc-MIBI が集積しにくいことを明らかにした[8)]．これは細胞レベルで ^{99m}Tc-MIBI 分子が P-gp により細胞外へ排出されたためと考えられた．このため ^{99m}Tc-MIBI イメージングは腫瘍の陽性描画による存在診断にとどまらず，陰性描画により P-gp の発現の有無を非侵襲的に知る手段として期待さ

れるようになった[29].

本研究ではまず ^{99m}Tc-MIBI の腫瘍細胞への親和性を検討した．コントロールとして集積度が細胞活性を反映する ^{201}Tl[30]を用いた．24℃で P388/S を培養液中で ^{99m}Tc-MIBI とインキュベーションすると経時的に結合率が増加し60分で約40%のプラトーに達し，^{99m}Tc-MIBI には高い腫瘍親和性があることが示された．Cordobes らは HBL-100 細胞を用いて ^{99m}Tc-MIBI の取り込みは温度の影響を受けることを明らかにした[31]．本研究でも0℃条件下では24℃に比べて P388 細胞の ^{99m}Tc-MIBI の取り込みは著しく低下した．従ってそこにはエネルギー依存性の機序が関与していると考えられた．^{201}Tl の取り込みも0℃で低下したが，これは低温環境下で代謝が停滞し細胞内への ^{201}Tl の能動輸送を担う Na^+/K^+ATPase 活性が低下したためと考えられた[30)32]．また Cordobes らは細胞の ^{99m}Tc-MIBI 取り込みが細胞外の濃度に比例して上昇すると報告している[31]．彼らが用いた細胞外の ^{99m}Tc-MIBI 濃度は 10nM までであったため，本研究では細胞外の ^{99m}Tc-MIBI 濃度を 249 μM まで上昇させたが，やはり比較的早期 (10分) の細胞取り込みは細胞外 ^{99m}Tc-MIBI 濃度に比例していた．従って ^{99m}Tc-MIBI の細胞膜の通過は膜ポンプや特異的な受容体に依存するものではなく受動拡散によるものと考えられた．しかしインキュベーション開始後30分では 83 μM 以上で ^{99m}Tc-MIBI の取り込みの上昇が止まり，逆に10分値よりも低下した．一方 ^{201}Tl の取り込みは細胞外の ^{99m}Tc-MIBI 濃度と反比例するように減少し，細胞外 ^{99m}Tc-MIBI 濃度が 41.5 μM 以上ではコントロールのおよそ60%～70%低下してプラトーとなった．細胞外 ^{99m}Tc-MIBI 濃度が高いポイントで細胞の ^{99m}Tc-MIBI の取り込みが10分よりも30分で低下して飽和状態となった理由としては次の二つが考えられる．まず ^{99m}Tc-MIBI 自体の急性毒性による細胞活性の低下である．それは ^{201}Tl の取り込みは細胞活性と密接な関連をもつといわれており，その取り込みが低下したという現象は何らかの細胞の障害を生じた可能性があるからである．本研究では細胞外 ^{99m}Tc-MIBI 濃度を最高 249 μM まで上昇させたが，これは一般的な臨床常用血中濃度のおよそ600倍程度にあたり，イヌにおける致死量 (DuPont 社のデータによる) である．従って10分よりも30分で細胞活性が低下したとすれば ^{99m}Tc-MIBI の取り込みの低下がおこるであろう．しかしながらそれでは細胞外 ^{99m}Tc-MIBI 濃度が 41.5 μM 以上で ^{201}Tl の取り込みの低下が停止し，プラトーとなったことが説明しにくいと思われる．考えられるもう一つの理由は細胞内の ^{99m}Tc-MIBI の分布容積におけるミトコンドリア分画の飽和である．^{99m}Tc-MIBI の細胞内分布は約90%がミトコンドリアに局在している[33]ためミトコンドリア分画が飽和した場合，細胞質内の ^{99m}Tc-MIBI は細胞内にとどまることができず，徐々に細胞外へ流出していき ^{99m}Tc-MIBI の取り込みが30分で低下した可能性が考えられる．また Llaurado らによれば心筋細胞内の ^{201}Tl のうちおよそ60%がミトコンドリアに分布している[34]．一方 Barrera らは K^+のミトコンドリア膜の通過方向は周囲の陽イオンによって規定され，ミトコンドリア周囲に Na^+や Li^+などの1価の陽イオンが増加するとミトコンドリアからの K^+の放出が増加することを明らかにした[6]．Tl^+は K^+と生体内で類似の挙動を示すため，ミトコンドリアの周囲に一価の陽イオンである ^{99m}Tc-MIBI が高濃度で存在すればミトコンドリア内の ^{201}Tl が放出されることが予想される．従って ^{99m}Tc-MIBI によってミトコンドリアに分布していた ^{201}Tl が駆逐されたと仮定すると本研究でみられたように細胞の ^{201}Tl 取り込みが約60%低下した後にプラトーとなる現象が説明できると考えられる．

本研究では各種の阻害剤を用いて腫瘍細胞の ^{99m}Tc-MIBI と ^{201}Tl の取り込みの変化を検討した．ウワバインは腫瘍細胞の ^{201}Tl の取り込みを阻害したが，これは Na^+/K^+ポンプによる ^{201}Tl の細胞内への能動輸送が阻害されたためと考えられた．しかしながら ^{99m}Tc-MIBI の取り込みは非添加対照群に対して14% (30分) および4% (60分) 微増する傾向がみられた．この挙動の違いは，少なくとも細胞膜の通過に関して ^{201}Tl と ^{99m}Tc-MIBI が異なる機序に依存していることを示すものである．ウワバインにより腫瘍細胞の ^{99m}Tc-MIBI 取り込みがやや増加したのはウワバインが Na^+/K^+ポンプを阻害することによって細胞内の ^{99m}Tc-MIBI の分布容積を広げたためと考えられる[35]．ミトコンドリア呼吸鎖の電子伝達を阻害するロテノン[36]，あるいはミトコンドリアの脱共役剤でミトコンドリア膜内の電位を減極する作用を有する CCCP[33)36)～39]を添加することで ^{99m}Tc-MIBI の取り込みが抑制された．またその他にもミトコンドリア膜と細胞膜電位を過分極させるナイジェリシン (nigericin) によって ^{99m}Tc-MIBI の取り込みが促進されるとの報告がある[37]．従って細胞内での ^{99m}Tc-MIBI の保持はミトコンドリア膜の陰性電位に依存していると考えられる．また従来 ^{99m}Tc-MIBI 取り込みは細胞の代謝状態にはあまり影響されないと考えられてきた[40]が，Piwnica-Worms らは IAA を用いて鶏雛の心筋細胞の解糖系を阻害することで ^{99m}Tc-MIBI の取り込みが著しく抑制されることを見いだした[30)35]．Piwnica-Worms らによれば IAA による ^{99m}Tc-MIBI の取り込みの抑制は IAA との接触時間に依存しており，プレインキュベーションが60分までは一過性の ^{99m}Tc-MIBI の取り込み亢進がみられ，それ以上のプレインキュベーションではじめて細胞の ^{99m}Tc-MIBI の1分結合率が低下したという．本研究でも IAA のプレインキュベーション時間を0分から120分まで変化させたところ，P388/S 細胞の ^{99m}Tc-MIBI の取り込みは一過性の亢進がみられた後にほぼ直線的に低下した．Piwnica-Worms らの報告と同様にプレインキュベーション時間が60分のときの結合率はコントロールの103%であり，IAA による ^{99m}Tc-MIBI の取り込みの抑制はそれ以上のプレインキュベーション時間でみられることが示された．^{99m}Tc-MIBI の取り込みの低下は IAA によって解糖系が阻害された結果，細胞内の ATP 産生が抑制され腫瘍細胞の活性が低下したためと考えられた．従って腫瘍細胞の代謝状態の低下に伴って ^{99m}Tc-MIBI の取り込みも低下すると考えられた．これは反応温度の低下によって腫瘍細胞の ^{99m}Tc-MIBI の取り込みが低下したことと矛盾しない．なおIAAによって一過性に ^{99m}Tc-MIBI 取り込みが亢進したが，これは細胞内 ATP が減少する際にATP感受性，あるいはアラキドン酸 (arachidonic acid) 作動性のカリウムチャンネルが開放することで細胞膜電位が過分極したためと考えられる[30]．一方腫瘍細胞の ^{201}Tl 取り込みは ^{99m}Tc-MIBI とは異なり IAA による取り込みの亢進はみられずプレインキュベーション時間の延長とともに低下した．これは IAA によって腫瘍細胞内の ATP が減少したことにより Na^+/K^+ATPase 活性が低下したためと考えられた[30]．従って腫瘍細胞の ^{201}Tl と ^{99m}Tc-MIBI の取り込みはともに細胞活性あるいは代謝状態などに影響を受けるものの，その反応性や様式は ^{201}Tl と ^{99m}Tc-MIBI で異なることが判明した．

以上より，^{99m}Tc-MIBI は高い腫瘍細胞親和性をもち，その集

積は腫瘍細胞の代謝状態に依存しており腫瘍細胞内ではミトコンドリア膜の陰性電位によってミトコンドリアに結合していると考えられた．また ^{99m}Tc-MIBI と ^{201}Tl の腫瘍細胞への集積機序と細胞内の動態は本質的に異なることが示され，腫瘍診断薬としての ^{99m}Tc-MIBI は ^{201}Tl とは異なる診断情報をもたらす可能性があると思われた．

つづいて本研究では P-gp の発現による腫瘍細胞の ^{99m}Tc-MIBI 取り込みの変化を検討した．P-gp を発現している多剤耐性腫瘍細胞の ^{99m}Tc-MIBI 取り込みは野生型細胞に比べて低いことが知られている[8)41)~44)]．本研究でも試験管内実験での P388/ADR 細胞の ^{99m}Tc-MIBI 取り込みは P388/S の８分の１程度であり，また洗い出しも P388/ADR の方が速やかであった．この傾向は生体内でも同様で，ガンマカメラによる ^{99m}Tc-MIBI イメージング，オートラジオグラフィーでも P388/ADR の ^{99m}Tc-MIBI 取り込みは P388/S よりも低いことが示された．また生体内分布の検討では移植した P388/ADR 腫瘍と P388/S 腫瘍の ^{99m}Tc-MIBI の取り込みは15分では有意差こそ認められなかったが P388/ADR の方が低い傾向がみられた．60分，120分では P388/S に比べて P388/ADR の ^{99m}Tc-MIBI 取り込みは有意に低値であり，洗い出しも P388/ADR の方が速やかである傾向がみられた．さらに耐性克服薬剤であるベラパミルによって P388/ADR の ^{99m}Tc-MIBI 取り込みは促進され，100 μM の濃度で P388/S と同様の取り込みを示すようになった．これは P388/ADR と P388/S の ^{99m}Tc-MIBI 取り込みの差が P-gp に起因していることを示し，^{99m}Tc-MIBI が P-gp によって細胞外へ汲み出されているということを立証するものである．それに対して ^{201}Tl で得られた結果はいずれも P388/ADR と P388/S の間に明らかな差はなかった．従って腫瘍細胞の ^{201}Tl の取り込みは P-gp の発現の有無に影響されないと考えられた．このことから ^{201}Tl がよく集積する腫瘍が ^{99m}Tc-MIBI を取り込まない場合，その腫瘍は P-gp を発現した多剤耐性腫瘍である可能性があると思われる．以上より ^{99m}Tc-MIBI を用いた腫瘍イメージングは ^{201}Tl と比較することで腫瘍の多剤耐性の発現を陰性描画することができる可能性があると思われた．

化学療法を行う前，あるいは化学療法中に治療効果の予測が画像診断という非侵襲的な手段で，しかも必要に応じて何度でもできればその後の治療プロトコール決定が容易になるであろう．瀧らは実際にヒトの悪性骨軟部腫瘍を化学療法前に ^{99m}Tc-MIBI でイメージングし，早期 (15分) で良好な集積を示したものを後期 (３時間) で完全に洗い出された群とそうでなかった群に分類し，それぞれの化学療法に対する感受性を調べている[45)]．それによれば後期像でも集積が残っていた群では７例中５例で治療効果が認められたが，完全に洗い出された３例ではいずれも化学療法は無効であった．この報告の中では P-gp の発現の有無は検討していないため無効例で必ずしも P-gp が発現していたとはいえないが，^{99m}Tc-MIBI イメージングにより化学療法の効果をある程度予測することが可能であるということを示唆するものである．なおその報告は化学療法抵抗性を示す腫瘍の ^{99m}Tc-MIBI 洗い出しが速やかであるという点で本研究の結果と一致するが，早期にはある程度以上の ^{99m}Tc-MIBI 集積が認められている点が本研究の結果と一見一致しないように思われる．化学療法に抵抗性であった３例の悪性骨軟部腫瘍にいずれも P-gp が発現していたと仮定すると，早期に ^{99m}Tc-MIBI がよく集積した理由は以下のようなものが考えられる．まず試験管内実験とは異なり生体内では血流を考慮する必要がある．^{99m}Tc-MIBI は ^{201}Tl と同様にその集積は当該組織の血流を反映する．従って腫瘍が P-gp を発現していたとしても豊富な栄養血管があれば血液内の放射能により早期には腫瘍が描出されることがあるかもしれない．なお本研究のヌードマウスのイメージングでは投与後20分ですでに P388/ADR の ^{99m}Tc-MIBI の取り込みは P388/S に比べて低かったが，これはヒトにおきかえてみると早期像ではなく，すでに後期像をみている可能性もある．また腫瘍の不均一性も関係してくると思われる．化学療法抵抗性の腫瘍でもすべての細胞が P-gp を発現しているとは限らず，一部に薬剤感受性細胞が混在していることもありえよう．そういった場合早期に少数の感受性細胞が ^{99m}Tc-MIBI を大量に取り込むことである程度に腫瘍が描画され，後期には腫瘍の大部分を占める薬剤耐性細胞からの速やかな ^{99m}Tc-MIBI の洗い出しが起こり腫瘍全体としては洗い出しが強調してみられる可能性もあると思われる．

カルシウム拮抗剤であるベラパミルが腫瘍の多剤耐性を克服する効果を有する[10)11)]ことが報告されて以来，シクロスポリンA (cyclosporin A)[46)47)]，キニジン (quinidine)[48)]など数多くの化合物が多剤耐性克服薬剤として報告されている．これらの薬剤は P-gp による抗癌剤の細胞外排出を競合的に阻害することで細胞内の抗癌剤濃度を高め，耐性を克服することが知られている[10)]．特にベラパミルについてはその克服機序，効果について詳細に検討されており，化学療法が無効であった悪性リンパ腫にベラパミルを併用投与することで化学療法が効果を示すようになった例が報告されている[49)]．本研究でもベラパミル濃度が 1 μM で P388/ADR の ^{99m}Tc-MIBI の取り込みの上昇が認められ，100 μM では P388/S と同様の取り込みがみられるようになった．すなわちベラパミル濃度が 100 μM では P388/ADR の多剤耐性がほぼ完全に克服されたと考えられる．しかしながらこれらの克服薬剤が十分な耐性克服作用を示すような血中濃度ではそれぞれの薬剤による副作用が問題となってくる．ベラパミルでは心不全や血圧低下，房室ブロックなど[49)]，シクロスポリンAでは白血球減少，脱毛，筋肉痛など[50)]無視できない副作用が報告されている．鶴尾は多剤耐性ヒト白血病細胞 K562/ADM にベラパミルを作用させた場合，10 μM で毒性が発現したと報告している[51)]．本研究で用いた P388/ADR の場合，ベラパミル 10 μM では ^{99m}Tc-MIBI の取り込みが添加前の５～６倍に増加したが，それでも P388/S に比べると 1/3 から 1/5 の取り込みでしかなく，十分な克服作用を発揮しているとはいいにくい．多剤耐性克服薬剤として理想的な薬剤は少ない副作用でより強力な耐性克服作用をもつものであり，最近はベラパミルやシクロスポリンAなどの誘導体の開発，研究がすすめられている．MS-209 はベラパミルの誘導体でカルシウム拮抗作用はベラパミルの1/30以下でありながらより強力な耐性克服作用を有する[51)]．またシクロスポリンAの誘導体である SDZ PSC833[52)53)]は免疫抑制作用を示さないがシクロスポリンAの約10倍の耐性克服作用をもつとされる．これらの薬剤はすでに臨床試験に入っており，実際に臨床の場で用いられることもそう遠くないことと思われる．本研究の結果から ^{99m}Tc-MIBI を取り込まない，あるいは取り込んでも速やかに洗い出される多剤耐性癌に対して耐性克服薬剤を抗癌剤と併用して治療する際に，^{99m}Tc-MIBI がよく取り込まれるようになれば多剤耐性が克服されたことを示唆し，治療効果を期待することができるのではないかと考えられ

る．すなわち^{99m}Tc-MIBIを耐性克服薬剤の効果のモニターとして用いることができると思われる．

以上，本研究の結果から^{99m}Tc-MIBIの腫瘍集積機序は^{201}Tlとは異なっており，その腫瘍への集積はP-gpの発現により低下することが示された．従って画像診断によって腫瘍組織の抗癌剤感受性を推測することが可能と考えられた．よってそれぞれの患者に最適な治療プロトコールを組み立てる上で^{99m}Tc-MIBIが有用な情報を供与できるものと思われた．また^{99m}Tc-MIBIによって耐性克服薬の効果を判定することもできると考えられた．

結　　論

^{99m}Tc-MIBIを用いた腫瘍の多剤耐性の評価の有用性を検討する目的で，^{99m}Tc-MIBIの腫瘍親和性および集積機序を検討し，腫瘍細胞の^{99m}Tc-MIBI取り込みにおよぼすP-gp発現の影響を試験管内およびヌードマウス生体内で調べ以下の成績を得た．

1．P388/S細胞の^{99m}Tc-MIBIの取り込みは24℃で良好であったが0℃条件下では著しく低下した．従って^{99m}Tc-MIBIは腫瘍細胞に良好な親和性をもつが，その取り込みあるいは細胞内保持には何らかのエネルギー依存性の機序が関与していると考えられた．

2．P388/S細胞の^{99m}Tc-MIBIの早期の取り込みは細胞外の^{99m}Tc-MIBI濃度の上昇に比例して増加し，検討した濃度範囲では飽和は観察されなかった．従って腫瘍細胞における^{99m}Tc-MIBIの細胞膜通過は膜ポンプや受容体に依存するものではなく受動拡散によるものと思われた．

3．^{99m}Tc-MIBIの結合におよぼす各種阻害剤の効果を検討した．イオンチャンネル阻害剤や代謝阻害剤の影響を調べたところ，^{99m}Tc-MIBIの取り込みはミトコンドリア活性に依存していると考えられた．また代表的な代謝阻害剤であるIAAは一過性に^{99m}Tc-MIBIの取り込みを増加させた後に強い抑制効果を示し，腫瘍細胞の^{99m}Tc-MIBIの取り込みは細胞の代謝状態に依存すると考えられた．また今回用いたいずれの阻害剤に対しても^{99m}Tc-MIBIの取り込みは^{201}Tlとは異なる挙動を示し，^{99m}Tc-MIBIは^{201}Tlとは異なる診断情報をもたらしうると思われた．

4．P388/ADRの^{99m}Tc-MIBI取り込みはP388/Sに比べて著しく低く，P-gpを発現している多剤耐性腫瘍細胞には^{99m}Tc-MIBIが集積しにくいことが示された．一方^{201}Tlの取り込みはP388/ADRとP388/Sの間に大きな差は認められず，^{201}Tlの細胞集積に多剤耐性の発現の有無は関係しないと考えられた．

5．腫瘍細胞からの^{201}Tlと^{99m}Tc-MIBIの洗い出しを検討した．^{201}Tlの洗い出しはP388/ADRとP388/Sの間で明らかな差は認められなかったが，^{99m}Tc-MIBIの洗い出しはP388/ADRの方が速やかであった．従ってP-gpの発現した多剤耐性細胞の^{99m}Tc-MIBIの洗い出しは亢進していると考えられた．

6．P388/ADRの^{99m}Tc-MIBIの取り込みは培養液中のベラパミル濃度の上昇に伴って増加し，100 μM ではP388/Sに匹敵した．従って^{99m}Tc-MIBIは多剤耐性克服薬剤の効果のモニターとして用いることができると考えられた．

7．ヌードマウスのイメージングにおいて，^{99m}Tc-MIBIはP388/Sにはよく集積したがP388/ADRには低集積であった．しかし^{201}Tlの集積は両細胞株にほぼ同等であった．^{99m}Tc-MIBIを用いたオートラジオグラフィーでも同様であった．よって^{99m}Tc-MIBIを用いて画像的に腫瘍の多剤耐性を評価することが可能と思われた．

8．ヌードマウスにおける経時的な生体内分布の検討では，P388/ADRへの^{99m}Tc-MIBIの取り込みはP388/Sより低くかつ洗い出しも速やかであった．^{201}Tlの取り込みには両細胞株で有意な差はなかった．

以上の結果より^{99m}Tc-MIBIは^{201}Tlとは異なり，イメージングにより腫瘍の多剤耐性を非侵襲的に評価することを可能にし，化学療法のプロトコール決定や克服薬剤の効果判定にも有用な情報を提供しうると考えられた．

謝　　辞

稿を終えるにあたり，御指導と御校閲を賜りました恩師利波紀久教授に深甚なる謝意を表します．また終始直接の御指導を頂きました横山邦彦助手に深謝いたします．さらに実験手技に関して御指導下さいました絹谷清剛助手，本研究に御協力を頂きました金沢大学医学部附属病院薬剤部中島恵美助教授，金沢大学医学部核医学科，アイソトープ総合センターの諸先生方に厚く御礼申し上げます．

なお本論文の要旨の一部は第40回日本核医学会中部地方会 (1995，名古屋)，第19回免疫腫瘍核医学研究会 (1995，東京)，第35回日本核医学会総会 (1995，横浜)，第21回免疫腫瘍核医学研究会 (1996，東京)，第6回アジア・オセアニア核医学会 (1996，京都) において発表した．

本研究の一部は平成8年度文部省科学研究費基盤研究 (B) (課題番号08457241) によったことを付記する．

文　　献

1) Riordan JR, Ling V. Genetic and biochemical characterization of multidrug resistance. Pharmacol Ther 28: 51-75, 1985

2) Bradley G, Juranka PF, Ling V. Mechanism of multidrug resistance. Biochim Biophys Acta 948: 87-128, 1988

3) Gottesman MM, Pastan I. The multidrug transporter, a double-edged sword. J Biol Chem 263: 12163-12166, 1988

4) Croop JM, Gros P, Housman DE. Genetics of multidrug resistance. J Clin Invest 81: 1303-1309, 1988

5) Endicott JA, Ling V. The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. Annu Rev Biochem 58: 137-171, 1989

6) Barrera H, Gomez PA. Characteristics of the movement of K^+ across the mitochondrial membrane and the inhibitory action of Tl^+. J Biol Chem 250: 5370-5374, 1975

7) Piwnica WD, Holman BL. Noncardiac applications of hexakis (alkylisonitrile) technetium-99m complexes [comment]. J Nucl Med 31: 1166-1167, 1990

8) Piwnica WD, Chiu ML, Budding M, Kronauge JF, Kramer RA, Croop JM. Functional imaging of multidrug-resistant P-glycoprotein with an organotechnetium complex. Cancer Res 53: 977-984, 1993

9) Nakashima E, Matsushita R, Negishi H, Nomura M, Harada S, Yamamoto H, Miyamoto K, Ichimura F. Reversal of drug sensitivity in MDR subline of P388 leukemia by gene-targeted antisense oligonucleotide. J Pharm Sciences 84: 1205-1209, 1995

10) Tsuruo T, Iida H, Tsukagoshi S, Sakurai Y. Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia in vivo and in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. Cancer Res 41: 1967-1972, 1981

11) Tsuruo T, Iida H, Tsukagoshi S, Sakurai Y. Increased accumulation of vincristine and adriamycin in drug-resistant P388 tumor cells following incubation with calcium antagonists and calmodulin inhibitors. Cancer Res 42: 4730-4733, 1982

12) Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. Biochim Biophys Acta 455: 152-162, 1976

13) Horio M, Gottesman MM, Pastan I. ATP-dependent transport of vinblastine in vesicles from human multidrug-resistant cells. Proc Natl Acad Sci U S A 85: 3580-3584, 1988

14) Naito M, Tsuruo T. Competitive inhibition by verapamil of ATP-dependent high affinity vincristine binding to the plasma membrane of multidrug-resistant K562 cells without calcium ion involvement. Cancer Res 49: 1452-1455, 1989

15) Fojo AT, Ueda K, Slamon DJ, Poplack DG, Gottesman MM, Pastan I. Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues. Proc Natl Acad Sci U S A 84: 265-269, 1987

16) Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I, Willingham MC. Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. Proc Natl Acad Sci U S A 84: 7735-7738, 1987

17) Cordon CC, O'Brien JP, Casals D, Rittman GL, Biedler JL, Melamed MR, Bertino JR. Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. Proc Natl Acad Sci U S A 86: 695-698, 1989

18) Sugawara I, Nakahama M, Hamada H, Tsuruo T, Mori S. Apparent stronger expression in the human adrenal cortex than in the human adrenal medulla of Mr 170,000-180,000 P-glycoprotein. Cancer Res 48: 4611-4614, 1988

19) 谷川原祐介, 堀　了平. MDR と尿細管分泌・ステロイド輸送. Mol Med 30: 756-763, 1993

20) 辻　彰. P 糖タンパク質と血液脳関門 (II). Mol Med 30: 748-755, 1993

21) Gros P, Talbot F, Tang WD, Bibi E, Kaback HR. Lipophilic cations: a group of model substrates for the multidrug-resistance transporter. Biochemistry 31: 1992-1998, 1992

22) Strauss HW, Boucher CA. Myocardial perfusion studies: lessons from a decade of clinical use. Radiology 160: 577-584, 1986

23) 利波紀久, 道岸隆敏, 分校久志, 杉原政美, 二谷立介, 久田欣一. ^{201}Tl-chlorideによる臨床腫瘍スキャニング. Radioisotopes 25: 829-831, 1976

24) Tonami N, Hisada K. Clinical experience of tumor imaging with ^{201}Tl chloride. Clin Nucl Med 2: 75-81, 1977

25) Caner B, Kitapcl M, Unlu M, Erbengi G, Calikoglu T, Gogus T, Bekdik C. Technetium-99m-MIBI uptake in benign and malignant bone lesions: a comparative study with technetium-99m-MDP. J Nucl Med 33: 319-324, 1992

26) Hassan IM, Sahweil A, Constantinides C, Mahmoud A, Nair M, Omar YT, Abdel DH. Uptake and kinetics of Tc-99m hexakis 2-methoxy isobutyl isonitrile in benign and malignant lesions in the lungs. Clin Nucl Med 14: 333-340, 1989

27) Delmon ML, Piwnica WD, Van dAA, Holman BL, Davison A, Jones AG. Uptake of the cation hexakis (2-methoxyisobutylisonitrile)-technetium-99m by human carcinoma cell lines in vitro. Cancer Res 50: 2198-2202, 1990

28) Tonami N, Shuke N, Yokoyama K, Seki H, Takayama T, Kinuya S, Nakajima K, Aburano T, Hisada K, Watanabe Y. Thallium-201 single photon emission computed tomography in the evaluation of suspected lung cancer. J Nucl Med 30: 997-1004, 1989

29) 横山邦彦. 多剤耐性癌の放射性アイソトープによる診断. ファルマシア 32: 1110-1111, 1996

30) Piwnica WD, Chiu ML, Kronauge JF. Divergent kinetics of 201Tl and 99mTc-SESTAMIBI in cultured chick ventricular myocytes during ATP depletion. Circulation 85: 1531-1541, 1992

31) Cordobes MD. Technetium-99m-sestamibi uptake by human benign and malignant breast tumor cells: Correlation with mdr gene expression. J Nucl Med 37: 286-289, 1996

32) Maublant JC, Moins N, Gachon P, Renoux M, Zhang Z, Veyre A. Uptake of technetium-99m-teboroxime in cultured myocardial cells: comparison with thallium-201 and technetium-99m-sestamibi. J Nucl Med 34: 255-259, 1993

33) Carvalho PA, Chiu ML, Kronauge JF, Kawamura M, Jones AG, Holman BL, Piwnica WD. Subcellular distribution and analysis of technetium-99m-MIBI in isolated perfused rat hearts. J Nucl Med 33: 1516-1522, 1992

34) Llaurado JG, Madden JA, Meade RC, Smith GA. Distribution of thallium-201 injected into rats following stress: imaging, organ to plasma uptake ratios, and myocardial kinetics. J Nucl Med 19: 172-177, 1978

35) Piwnica WD, Kronauge JF, Delmon L, Holman BL, Marsh JD, Jones AG. Effect of metabolic inhibition on technetium-99m-MIBI kinetics in cultured chick myocardial cells. J Nucl Med 31: 464-472, 1990

36) Piwnica WD, Kronauge JF, Chiu ML. Uptake and retention of hexakis (2-methoxyisobutyl isonitrile) technetium (I) in cultured chick myocardial cells. Mitochondrial and plasma membrane potential dependence. Circulation 82: 1826-1838, 1990

37) Chiu ML, Kronauge JF, Piwnica WD. Effect of mitochondrial and plasma membrane potentials on accumulation of hexakis (2-methoxyisobutylisonitrile) technetium (I) in cultured mouse fibroblasts. J Nucl Med 31: 1646-1653, 1990

38) Piwnica WD, Kronauge JF, Chiu ML. Enhancement by tetraphenylborate of technetium-99m-MIBI uptake kinetics and accumulation in cultured chick myocardial cells. J Nucl Med 32: 1992-1999, 1991

39) Li HY, Dai LJ, Krieger C, Quamme GA. Intracellular Mg^{2+} concentrations following metabolic inhibition in opossum kidney cells. Biochim Biophys Acta 1181: 307-315, 1993

40) Maublant JC, Gachon P, Moins N. Hexakis (2-methoxy isobutylisonitrile) technetium-99m and thallium-201 chloride: uptake and release in cultured myocardial cells. J Nucl Med 29: 48-54, 1988

41) Rao VV, Chiu ML, Kronauge JF, Piwnica WD. Expression of recombinant human multidrug resistance P-glycoprotein in insect cells confers decreased accumulation of technetium-99m-sestamibi. J Nucl Med 35: 510-515, 1994

42) Ballinger JR, Hua HA, Berry BW, Firby P, Boxen I. ^{99m}Tc-sestamibi as an agent for imaging P-glycoprotein-mediated multidrug resistance: in vitro and in vivo studies in a rat breast tumour cell line and its doxorubicin-resistant variant. Nucl Med Commun 16: 253-257, 1995

43) 横山邦彦. 新しい放射性医薬品による診断 ^{99m}Tc-MIBI による多剤耐性腫瘍イメージング. Isotope News 2月号: 11-13, 1995

44) 小西章太, 絹谷清剛, 横山邦彦, 利波紀久, 久田欣一. ^{99m}Tc-MIBI による腫瘍細胞の抗癌剤多剤耐性の評価. 免疫・腫瘍核医学 10: 64-65, 1995

45) 瀧 淳一, 隅屋 寿, 絹谷清剛, 利波紀久, 久田欣一, 土屋弘行, 富田勝郎. ^{99m}Tc-MIBI による悪性骨軟部腫瘍の抗癌剤多剤耐性能 (MDR) の評価. 核医学 32 (suppl): 795, 1995

46) Slater LM, Sweet P, Stupecky M, Gupta S. Cyclosporin A reverses vincristine and daunorubicin resistance in acute lymphatic leukemia in vitro. J Clin Invest 77: 1405-1408, 1986

47) Twentyman PR, Fox NE, White DJ. Cyclosporin A and its analogues as modifiers of adriamycin and vincristine resistance in a multi-drug resistant human lung cancer cell line. Br J Cancer 56: 55-57, 1987

48) Tsuruo T, Iida H, Kitatani Y, Yokota K, Tsukagoshi S, Sakurai Y. Effects of quinidine and related compounds on cytotoxicity and cellular accumulation of vincristine and adriamycin in drug-resistant tumor cells. Cancer Res 44: 4303-4307, 1984

49) Miller TP, Grogan TM, Dalton WS, Spier CM, Scheper RJ, Salmon SE. P-glycoprotein expression in malignant lymphoma and reversal of clinical drug resistance with chemotherapy plus high-dose verapamil. J Clin Oncol 9: 17-24, 1991

50) Sonneveld P, Durie BG, Lokhorst HM, Marie JP, Solbu G, Suciu S, Zittoun R, Lowenberg B, Nooter K. Modulation of multidrug-resistant multiple myeloma by cyclosporin. The Leukaemia Group of the EORTC and the HOVON [see comments]. Lancet 340: 255-259, 1992

51) 鶴尾 隆. 臨床応用に向けての多剤耐性克服薬剤. 癌と化学療法 21: 962-967, 1994

52) Twentyman PR. Cyclosporins as drug resistance modifiers. Biochem Pharmacol 43: 109-117, 1992

53) 内藤幹彦, 柘植はるみ, 渡辺 徹, 鶴尾 隆. 耐性克服薬の基礎と臨床. Mol Med 30: 720-729, 1993

Preclinical Study for Imaging of Multidrug Resistance of Malignant Tumor Using Hexakis (2-methoxyisobutylisonitrile) Technetium-99m

Shota Konishi, Department of Nuclear Medicine, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920－J. Juzen Med Soc., 106, 72－83 (1997)

Key words multidrug resistance, P-glycoprotein, ^{99m}Tc-MIBI, mitochondria, P388

Abstract

To evaluate noninvasively the sensitivity of tumor tissues against carcinostatics, hexakis (2-methoxyisobutylisonitrile) technetium-99m (^{99m}Tc-MIBI) was examined. Two cell lines of P388 murine monocytic leukemia were used, one a multidrug resistance cell line, P388/ADR that expresses P-glycoprotein (P-gp), and the other a drug sensitive P388/S. At first, ^{99m}Tc-MIBI uptake by P388/S cells were determined in vitro in different temperatures and extracellular ^{99m}Tc-MIBI concentrations to investigate the affinity for the tumor cell and the mechanism of tumor cellular uptake. By lowering the temperature from 24℃ to 0℃, the cellular ^{99m}Tc-MIBI uptake was restricted from 40% to 1～3%. The tumor cellular ^{99m}Tc-MIBI uptake was directly proportional to the extracellular concentration of ^{99m}Tc-MIBI and no saturation was observed at the concentrations used. The consequences indicate that the mechanism of ^{99m}Tc-MIBI passage through the plasma membrane is by passive diffusion but the cellular retention is energy-dependent. The study using several ion transport or metabolic inhibitors proved that the cellular ^{99m}Tc-MIBI uptake is dependent upon the mitochondrial activity and that this mechanism is different from the ^{201}Tl uptake. To investigate the effect of P-gp expression on the cellular ^{99m}Tc-MIBI uptake, P388/ADR and P388/S were compared in terms of their ^{99m}Tc-MIBI uptake in vitro. The tracer uptake by the former cells (1～3%) was significantly lower than the latter (40%). It also demonstrated that ^{99m}Tc-MIBI was washed out from P388/ADR more quickly than from P388/S. ^{99m}Tc-MIBI uptake of P388/ADR was remarkably promoted by adding verapamil; at the concentration of 100 μM, ^{99m}Tc-MIBI uptake of P388/ADR was identical to that of P388/S. For in vivo study, nude mice implanted with the two cell lines to the bilateral thighs were prepared. On the imaging study using ^{99m}Tc-MIBI, compared to the P388/S tumor, the P388/ADR tumor was not clearly visualized. The biodistribution study of ^{99m}Tc-MIBI showed that the uptake ratio of the P388/ADR tumor was less than that of the P388/S tumor at an early stage, and that the clearance of ^{99m}Tc-MIBI from the P388/ADR tumor was more rapid than from the P388/S tumor. It is concluded that tumor imaging using ^{99m}Tc-MIBI would make possible a noninvasive imaging technique for multidrug resistance of tumor: it could provide the crucial informations on decision making about the chemotherapeutic protocols and be a diagnostic indicator for the effects of reversing agents.