

169Yb,67Ga,111In

の悪性腫瘍親和性の研究:〔Ⅱ〕 169Yb,67Ga,111In
の類似点と相異点

| | |
|-------|---|
| 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/2297/4615 |

^{169}Yb , ^{67}Ga , ^{111}In の悪性腫瘍親和性の研究〔Ⅱ〕 ^{169}Yb , ^{67}Ga , ^{111}In の類似点と相異点

金沢大学医学部核医学講座 (主任: 久田欣一教授)

安 東 逸 子

(昭和50年8月6日受付)

前報¹⁾において数種の担がん動物における ^{169}Yb , ^{67}Ga , ^{111}In の体内分布を詳しく検討し, これら元素の臓器レベルにおける取り込みの類似点と相異点を報告した. 本研究ではこれら元素の腫瘍親和性および体内分布をさらに詳しく研究する目的で, これら元素の腫瘍結節内分布をマクロオートラジオグラフ²⁾により, 腫瘍細胞内分布を細胞分画法により検討した. また前報¹⁾に報告したごとき体内分布の差異が生ずる原因を明らかにするため, 静注直後の腫瘍取り込みおよび骨取り込みを観察³⁾するとともに, これら元素の骨取り込みの強弱とイオン形の関係⁴⁾等について, これら元素間の類似点と相異点に留意して研究を行なった.

I. ^{169}Yb , ^{67}Ga , ^{111}In の腫瘍内分布のマクロオートラジオグラフィ

1. 実験材料

担吉田肉腫結節ラット: 体重 $153 \pm 23\text{g}$ のドンリウ系ラットの大腿皮下に吉田肉腫腹水細胞を約 1×10^8 個移植し, 市販の固型飼料を用いて6~7日間飼育後, 直径約2cmの結節となったときに使用した.

担 Ehrlich 癌結節マウス: 体重 $24.8 \pm 3.0\text{g}$ の dd Y 系マウスに Ehrlich 癌細胞 (癌細胞数 4×10^7 個) をソケイ部皮下に移植し, 市販の固型飼料を用いて7~10日間飼育し, 直径1~1.5cmになったときに使用した.

^{169}Yb -citrate 注射液 (carrier として金属 Yb に換算して $0.08\mu\text{g}$ の Yb を含む. 以下カッコ内の数字は carrier 量): 既報⁵⁾の方法に準じて調製したものを1匹あたり0.4ml (約 $20\mu\text{Ci}$) 投与した.

^{67}Ga -citrate 注射液 (carrier free): 前報¹⁾の方法に準じて調製したものを1匹あたり0.4ml (約 $50\mu\text{Ci}$) 投与した.

^{111}In -citrate 注射液 (carrier free): 前報¹⁾の方法に準じて調製したものを1匹あたり0.4ml (約 $50\mu\text{Ci}$)

投与した.

2. 実験方法

上記ラットに ^{169}Yb -citrate 注射液, ^{67}Ga -citrate 注射液, ^{111}In -citrate 注射液をそれぞれ別々に尾静脈より注射した. また上記マウスにこれら3種の注射液をそれぞれに腹腔内注射した. 注射3, 24, 48時間後にそれぞれ腫瘍結節を摘出し, Fig. 1 に示すごとく, ただちにドライアイス・アセトンで冷却した n-ヘキサン (-70°C) 中で凍結した. ついで -20°C に冷却したクリオスタット (サクラゴールドーム) 中で 10μ の連続した薄切を作り, そのうちの1枚は医療用エックス線フィルムに密着させて数日~数十日感光させて, マクロオートラジオグラムを作成した. つぎの1枚はヘマトキシリン・エオジン重染色 (H・E 染色) し, さらにそのつぎの1枚はヘマトキシリン染色のみ, そのつぎの1枚はエオジン染色のみを行なった. この H・E 染色した切片について顕微鏡で観察し, 腫瘍細胞の密集部および壊死部を確認し, これらの部分とフィルムの黒化部分 (黒化濃度は放射量に比例する) を対比させた. また H・E 染色でヘマトキシリンにより核の染色されている部分とヘマトキシリンのみの染色で青色に染色されている部位を比較し, 対比させた. 今回, H・E 染色の他にヘマトキシリンの単独染色, エオジンの単独染色を行なったのは, H・E 染色の切片のエオジンのみで染色されている部分とヘマトキシリンおよびエオジンの両方で染色されている部分を黑白写真で表現することが比較的困難であるが, 1種類の染剤で単独染色したものは, 黑白写真での表現が容易なために行なったものである.

3. 実験結果

吉田肉腫および Ehrlich 癌のそれぞれについて, 注射24時間後の摘出標本 (^{169}Yb は吉田肉腫のみ) の H・E 染色したもの, ヘマトキシリン染色のみのも

Affinity of ^{169}Yb , ^{67}Ga and ^{111}In for malignant tumor (II) Comparison of tumor affinity among ^{169}Yb , ^{67}Ga and ^{111}In . Itsuko Ando, Department of Nuclear Medicine, (Director: Prof. K. Hisada), School of Medicine, Kanazawa University.

Fig. 1. Preparation of morphological specimens.

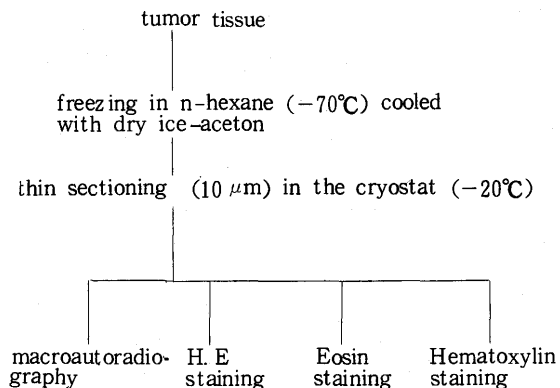
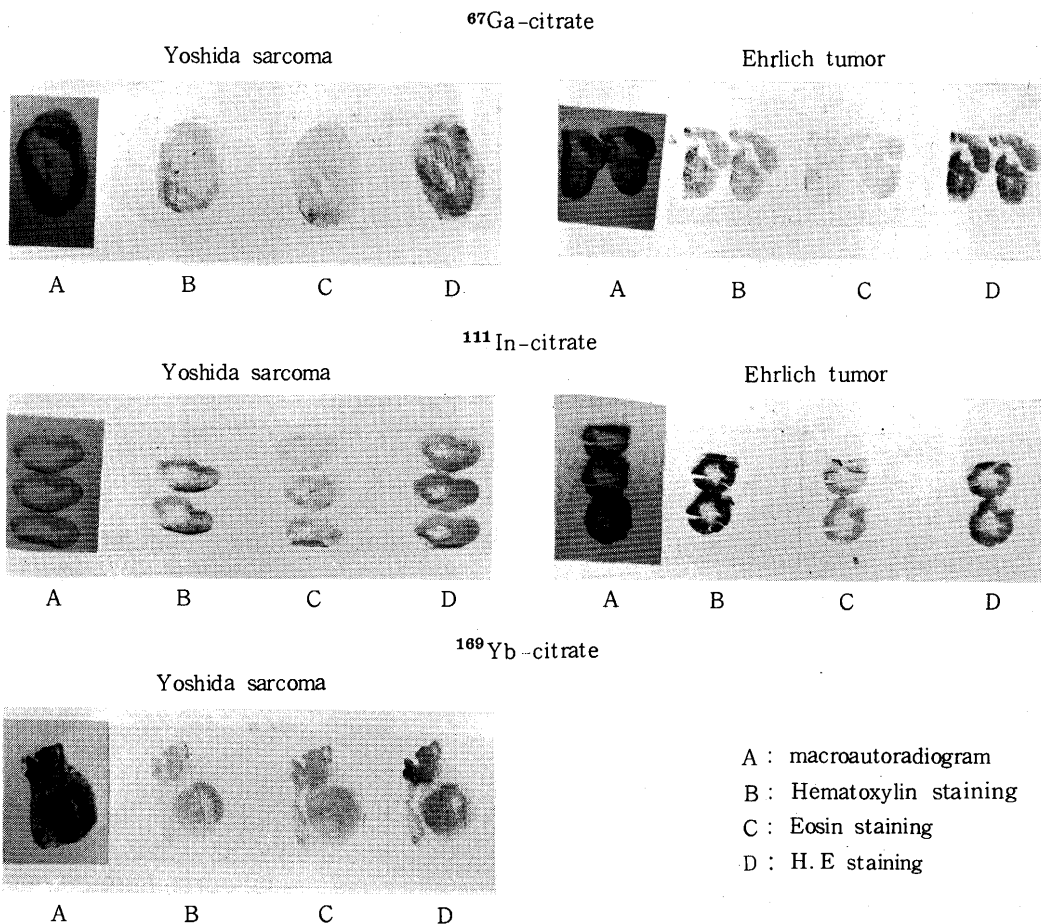


Fig. 2. Morphological specimens at 24 hours after i.v. injection.



の、エオジン染色のみのものおよび染色せずにオートラジオグラムを撮ったフィルムを Fig. 2 に示した。これからわかるように、H・E 染色でヘマトキシリンに濃く染色されている部分と、ヘマトキシリンのみで染色した切片の濃く染色されている部分は当然のことながら全く一致しており、この部分は腫瘍細胞の密集している部分を示していた。これに対し、H・E 染色でエオジンのみで染色されている部分およびヘマトキシリンのみの染色で染色されていない部分もよく一致しており、腫瘍細胞の壊死部はこの部分に含まれていた。これらの個所とオートラジオグラムによるフィルムの黒化個所を比較すると ¹⁶⁹Yb, ⁶⁷Ga, ^{113m}In と黒化個所とヘマトキシリン染色個所はほぼ一致しており、このことからこれら元素はいずれも腫瘍細胞の密集している部分によく取り込まれ、腫瘍細胞の壊死部および結合組織の部分への取り込みは非常に少なかった。また Fig. 2 には示さなかったが、注射 3 時間および 48 時間後の標本についても 3 元素とも Fig. 2 に示すものと全く同様な結果を示し、いずれも腫瘍細胞の密な部分によく取り込まれ、壊死部および結合組織の部分への取り込みは非常に少なかった。

Ⅱ. 細胞分画法による ¹⁶⁹Yb, ⁶⁷Ga, ^{113m}In の腫瘍細胞内分布の比較

1. 実験材料

担吉田肉腫結節ラット：I. 1 で述べたものを使用した。

担 Ehrlich 癌結節マウス：I. 1 で述べたものを使用した。

¹⁶⁹Yb-citrate 注射液 (Yb 0.006μg)：既報⁵⁾⁶⁾の方法に準じて調製したものを1匹あたり0.4ml (約 2 μCi) 投与した。

⁶⁷Ga-citrate 注射液 (carrier free)：前報¹⁾の方法に準じて調製したものを1匹あたり0.4ml (約 5 μCi) 注射した。

^{113m}In-citrate 注射液 (carrier free)：米国ユニオンカーバイド社製 ¹¹³Sn—^{113m}In ジェネレーターにより、ミルキングしたものを0.08モルクエン酸ナトリウムと混合後、15分間加熱して調製したものをラットおよびマウスにそれぞれ0.4ml (約400μCi), 0.2ml (約200μCi) 投与した。

2. 実験方法

上記注射液をそれぞれ別々にラットには尾静脈より静注し、マウスには腹腔内に注射した。いずれも注射 3 時間後に腫瘍結節を摘出し、Fig. 3 に示すごとく、Hogeboom and Schneider 法⁷⁾に準じてホモ

ゲナイズし、核、ミトコンドリア、マイクロゾームおよび可溶性分画の各フラクションに分画した。ついで各フラクションをウエル型シンチレーションカウンターで測定して放射エネルギーを求め、各フラクションでの放射能の割合を求めた。ついで各フラクションのタンパク質を Lowry 法⁸⁾で求め、各フラクションごとのタンパク量の割合として表わした。

3. 実験結果

Table 1 に吉田肉腫および Ehrlich 癌のそれぞれについて核、ミトコンドリア、マイクロゾームおよび上清分画に存在する放射能の存在比を示した。これによると吉田肉腫では ¹⁶⁹Yb は核に一番多く 34.3% であり、ミトコンドリア、マイクロゾームはそれぞれ 18.0%、15.7% と少ないが、上清は 32.1% となり、核とほとんど変らなかった。⁶⁷Ga は ¹⁶⁹Yb に比較し、核、ミトコンドリア、マイクロゾームともに少ないが、上清は逆に多かった。^{113m}In は核、ミトコンドリア、マイクロゾームともさらに少なかったが、上清は最も多く 67.3% であった。Ehrlich 癌の場合は各核種とも吉田肉腫の場合よりも核、ミトコンドリアでは少なく、上清では多かったが、マイクロゾームは一定の傾向を示していなかった。つぎに各分画のタンパク量であるが、Table 2 に示すごとく、吉田肉腫の場合にはどの核種を投与した場合も核には 35~40% のタンパクがあり、ミトコンドリアは 13~16%、マイクロゾームは 7~9%、上清はほぼ 40% であり、当然のことながら核種

Fig. 3. Preparation of subcellular fractions.

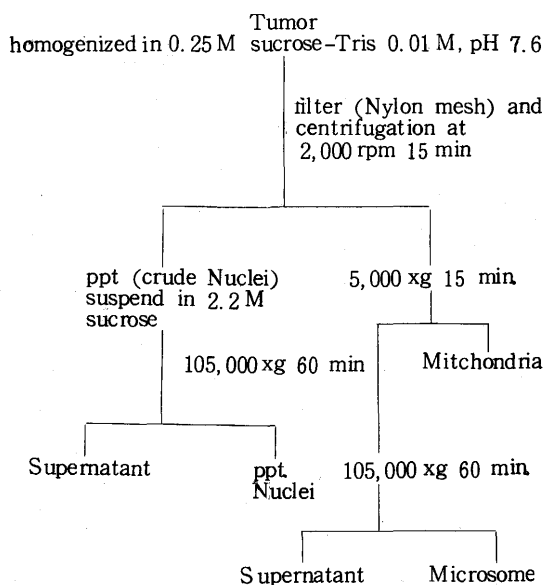


Table 1. Subcellular distribution of ^{169}Yb -citrate ^{67}Ga -citrate and $^{113\text{m}}\text{In}$ -citrate in Yoshida sarcoma and Ehrlich tumor.

| | | Nuclear fraction | Mitochondria fraction | Microsome fraction | Supernatant fluid |
|-----------------|------------------------------------|------------------|-----------------------|--------------------|-------------------|
| Yoshida sarcoma | ^{169}Yb -citrate | 34.3% | 18.0% | 15.7% | 32.1% |
| | ^{67}Ga -citrate | 26.7 | 13.6 | 6.9 | 52.8 |
| | $^{113\text{m}}\text{In}$ -citrate | 16.8 | 9.8 | 6.2 | 67.3 |
| Ehrlich tumor | ^{169}Yb -citrate | 17.5 | 10.6 | 26.1 | 45.7 |
| | ^{67}Ga -citrate | 8.1 | 7.7 | 10.2 | 74.0 |
| | $^{113\text{m}}\text{In}$ -citrate | 6.2 | 8.5 | 3.9 | 81.3 |

Table 2. Subcellular distribution of the protein in Yoshida sarcoma and Ehrlich tumor.

| | | Nuclear fraction | Mitochondria fraction | Microsome fraction | Supernatant fluid |
|-----------------|------------------------------------|------------------|-----------------------|--------------------|-------------------|
| Yoshida sarcoma | ^{169}Yb -citrate | 34.8% | 16.2% | 9.2% | 39.7% |
| | ^{67}Ga -citrate | 39.5 | 13.5 | 7.1 | 40.0 |
| | $^{113\text{m}}\text{In}$ -citrate | 38.8 | 12.7 | 8.9 | 39.7 |
| Ehrlich tumor | ^{169}Yb -citrate | 16.1 | 6.6 | 11.7 | 65.6 |
| | ^{67}Ga -citrate | 20.1 | 8.8 | 12.2 | 58.9 |
| | $^{113\text{m}}\text{In}$ -citrate | 20.1 | 8.3 | 4.6 | 67.0 |

には関係なくよく一致していた。Ehrlich 癌の場合は吉田肉腫の場合と異なり核のタンパクの比率がその約半分であり、ミトコンドリアも同様であった。ミクロソームはバラツキはあるが、吉田肉腫より多い比率を示した。上清は最も多く、吉田肉腫の場合の1.5倍強であった。さて各分画ごとのタンパク量は腫瘍の種類が同一ならば当然のことながら投与した核種によらず同一である (Table 2) が、各分画に取り込まれている核種の量は Table 1 に示すごとく核種により相当に差異を示した。そこで各核種の投与量を標準化した場合の各分画のタンパクの単位重量あたりの放射能 (比放射能) の各分画間の比率を求めて、比較する目的で Table 1 の放射能の%を Table 2 の相当する分画のタンパク%で除して得た値を Table 3 に記した。この値の大きいものはタンパクの単位重量あたりの放射能の強度 (比放射能) の大きいことを意味する。Table 3 からタンパク当りの放射能は吉田肉腫の核では ^{169}Yb 、 ^{67}Ga 、 $^{113\text{m}}\text{In}$ の順に小さくなり、Ehrlich 癌においてもほぼ同様の傾向を示した。

ミクロソームもほぼ同様の傾向を示しているが、上清は逆の傾向を示しており、ミトコンドリアについては ^{169}Yb がやや大きい程度で一定した傾向は認められなかった。

III. ^{169}Yb 、 ^{67}Ga 、 ^{111}In の静注直後の体内分布

前報¹⁾の I、III、IVの実験において、静注3時間後から48時間または72時間後までの担吉田肉腫結節ラットの体内分布は明らかとなったが、静注直後から3時間後までの体内分布を明らかにし、腫瘍取込機序解明の助けとするために行なった。

1. 実験材料

使用動物：体重140±20gのドンリウ系ラットを使用し、以下IIで述べたものと同様のラットを使用した。
 ^{169}Yb -citrate 注射液 (Yb 0.006 μg)：既報⁵⁾で述べた方法に準じて調製したものを1匹あたり0.4ml (約3 μCi) 注射した。

^{67}Ga -citrate 注射液 (carrier free)：前報¹⁾で述べた方法に準じて調製したものを1匹あたり0.4ml

Table 3. Specific activities of the protein in the nuclear fraction, mitochondria fraction, microsome fraction and supernatant fluid. (Specific activities were calculated by dividing the values of Table 1 by the values of Table 2)

| | | Nuclear fraction | Mitochondria fraction | Microsome fraction | Supernatant fluid |
|-----------------|----------------------------|------------------|-----------------------|--------------------|-------------------|
| Yoshida sarcoma | ¹⁶⁹ Yb-citrate | 0.99 | 1.11 | 1.71 | 0.81 |
| | ⁶⁷ Ga-citrate | 0.68 | 1.01 | 0.97 | 1.32 |
| | ^{113m} In-citrate | 0.43 | 0.77 | 0.70 | 1.70 |
| Ehrlich tumor | ¹⁶⁹ Yb-citrate | 1.09 | 1.61 | 2.23 | 0.70 |
| | ⁶⁷ Ga-citrate | 0.40 | 0.88 | 0.84 | 1.27 |
| | ^{113m} In-citrate | 0.31 | 1.03 | 0.85 | 1.21 |

(約 5 μCi) 注射した。

^{113m}In-citrate 注射液 (carrier free) : 前報¹⁾で述べた方法に準じて調製したものを 1 匹あたり 0.4ml (約 4 μCi) 注射した。

2. 実験方法

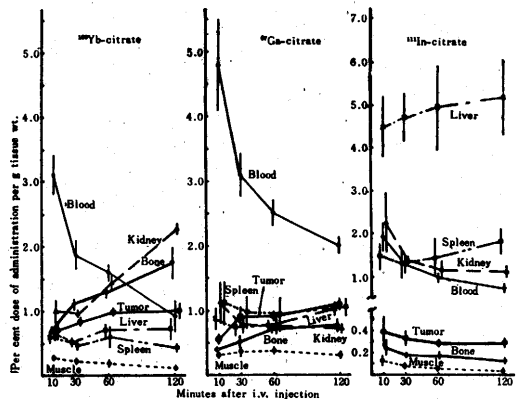
上記吉田肉腫結節ラットをネブタールの腹腔内注射で麻酔し、上記注射液をそれぞれ尾静脈より注射した。静注10, 30, 60, 120分後にそれぞれ 5 匹ずつ屠殺し腫瘍、血液、筋肉、肝臓、腎臓、脾臓、骨(頭頂骨)を摘出し、重量と放射能量を測定して臓器組織 1g 中に含まれる放射能量を投与量に対する割合で求めた。つぎにこの値を用いて主要臓器全体への取込率を算出するために血液、筋肉、肝臓、骨はそれぞれの体重の 7.4, 43, 4.07, 10% と仮定⁹⁾¹⁰⁾し、腫瘍は 2g とし、腎臓、脾臓は全量摘出したものから求めた。また屠殺時にそれまでに生成した全尿を採取し、この中に含まれる放射能量を投与量に対する割合で求めた。

3. 実験結果

体内分布：¹⁶⁹Yb-citrate は Fig. 4 に示したが、血液は10分後に 3.1%/g であり、経時的に急激に減少した。腎臓は10~30分後に約 1%/g であり、以後急激に増大した。腫瘍と骨は10分後に 0.7%/g であり、骨は急激に増大していくが、腫瘍は60分までゆっくりと増大し、以後は変化しなかった。肝臓、脾臓は10分後に約 0.6%/g、筋肉は同じく約 0.27%/g で経時的変化は小さかった。

⁶⁷Ga-citrate も Fig. 4 に示したが、血液は10分後に約 4.8%/g と大きく、経時的に急激に減少した。脾臓、腎臓は10分後に約 1.2%/g、肝臓は同じく 0.9%/g であり、いずれも30分後にやや減少し、その後肝臓はやや増大したが、他の 2 者はほとんど変化しなかつ

Fig. 4. Mean retention values of ¹⁶⁹Yb, ⁶⁷Ga and ^{113m}In in tissues of rats with Yoshida sarcoma.



た。腫瘍、骨、筋肉は10分後にそれぞれ約 0.55%/g, 0.4%/g, 0.3%/g であり、腫瘍は30分後までは急激に増大したが以後はゆっくりと増大した。骨は60分まではかなり急激に増大し以後はゆっくりと増大するのに対し、筋肉は経時的変化がほとんどなかった。

^{113m}In-citrate も Fig. 4 に示すごとく、10分後に肝臓は 4.5%/g と大きく以後はさらに増大した。腎臓、血液、脾臓は10分後にそれぞれ約 2.3%/g, 1.95%/g, 1.5%/g であり、腎臓、血液は経時的に減少したが、脾臓は30分後にやや減少しその後増大した。腫瘍、骨、筋肉は10分後にそれぞれ約 0.4%/g, 0.25%/g, 0.13%/g であり以後腫瘍はわずかに減少し骨、筋肉もやや減少した。

臓器組織全体への取込率は Table 4 に示したごとく、¹⁶⁹Yb-citrate では腫瘍は10分後に 1.38% であ

Table 4. Mean retention values of ^{169}Yb -, ^{67}Ga -, and ^{111}In -citrate in tissues of rats with Yoshida sarcoma.

| | | 10 min | 30 min | 60 min | 120 min |
|----------------------------|--------|---------|---------|---------|---------|
| ^{169}Yb -citrate | Blood | 34.66 % | 19.75 % | 17.44 % | 10.06 % |
| | Liver | 3.63 | 3.01 | 4.28 | 4.31 |
| | Bone | 10.42 | 15.98 | 19.46 | 25.85 |
| | Muscle | 17.20 | 14.84 | 12.04 | 7.98 |
| | Spleen | 0.32 | 0.22 | 0.30 | 0.29 |
| | Kidney | 1.16 | 1.06 | 1.64 | 2.67 |
| | Tumor | 1.38 | 1.65 | 1.96 | 2.09 |
| | Total | 68.77 | 56.51 | 57.12 | 53.25 |
| ^{67}Ga -citrate | Blood | 43.31 % | 30.72 % | 23.59 % | 18.73 % |
| | Liver | 4.34 | 3.98 | 3.99 | 5.43 |
| | Bone | 4.86 | 7.04 | 9.39 | 9.98 |
| | Muscle | 16.49 | 20.87 | 20.45 | 17.10 |
| | Spleen | 0.55 | 0.51 | 0.44 | 0.48 |
| | Kidney | 1.55 | 0.81 | 0.78 | 0.69 |
| | Tumor | 1.09 | 1.80 | 1.81 | 2.20 |
| | Total | 71.79 | 65.73 | 60.45 | 54.61 |
| ^{111}In -citrate | Blood | 20.57 % | 14.33 % | 10.54 % | 7.98 % |
| | Liver | 26.06 | 27.82 | 28.39 | 30.52 |
| | Bone | 3.64 | 2.60 | 2.38 | 1.75 |
| | Muscle | 7.98 | 4.50 | 2.91 | 1.52 |
| | Spleen | 0.70 | 0.77 | 0.76 | 1.06 |
| | Kidney | 2.64 | 1.76 | 1.60 | 1.39 |
| | Tumor | 0.80 | 0.67 | 0.56 | 0.59 |
| | Total | 62.39 | 52.45 | 47.14 | 44.81 |

り、徐々に増大して2時間後に1.5倍になっているが、血液、筋肉は10分後にそれぞれ34.7%、17.2%でありともに急激に減少し、2時間後には血液は1/3以下、筋肉は1/2以下に減少している。これに対し骨 腎臓は10分後にそれぞれ10.4%、1.2%であり経時的に増大し2時間後にはともに約2倍となった。肝臓、脾臓は経時的変化は比較的小さかった。 ^{67}Ga -citrate の場合は腫瘍は ^{169}Yb と大差ないが、血液は各時間とも ^{169}Yb より大きく、筋肉の10分値は ^{169}Yb と同様であるがこの値は2時間後でも減少しなかった。骨は経時的に増大するがその値は ^{169}Yb よりはるかに小さかつ

た。肝臓、脾臓、腎臓は経時的変化は小さかった。 ^{111}In -citrate では腫瘍は経時的変化はほとんどないが、血液は10分後で約20.6%と3元素中最小で経時的に減少した。肝臓は10分後に26.1%と大きく以後徐々に増大した。これに対し筋肉、骨、腎臓は10分後にそれぞれ約8%、3.6%、2.6%と小さく以後さらに減少したが、脾臓はさらに小さく経時的変化も小さかつた。

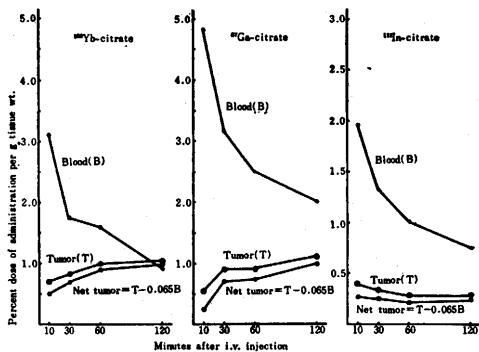
尿中排泄： ^{169}Yb の10分、30分、60分および120分後の排泄率はそれぞれ $7.1 \pm 1.3\%$ 、 $9.5 \pm 1.9\%$ 、 $10.1 \pm 1.0\%$ 、 $10.9 \pm 1.8\%$ であり、 ^{67}Ga は同様に 4.3 ± 0.7

%, 4.2±0.7%, 5.1±1.3%, 5.5±1.1%であり, ¹¹¹In も同様に16.5±1.2%, 28.1±1.9%, 37.4±4.7%, 41.9±3.1%であった。

4. 補正された腫瘍値

さてここで Fig. 4 の腫瘍値を考へてみると、腫瘍組織として抽出したものには血液を含んでおり、腫瘍組織中に取り込まれたもの他に、腫瘍組織中の血管内放射能も計測していることになる。臨床スキヤニングは血液を含んだ状態で行なわれるが、腫瘍取込機序を考へるために血液を除いた腫瘍組織への取り込みを以下のごとくにして求めた。われわれは別の実験で吉田肉腫結節中の血液量は重量で6.5%以下であることを知っている¹¹⁾。そこで腫瘍中の血液量を最大に見積って腫瘍重量の6.5%とし、Fig. 4 の腫瘍値から次の式のごとくにして、血液に由来する放射能を腫瘍値から引き去り“補正された腫瘍値”とした〔補正された腫瘍値 (%/g) = 血液を含んだ場合の腫瘍値 (%/g) - 0.065 × 血液値 (%/g)〕。上記3化合物について静注各時間後の補正された腫瘍値を求め、血液、腫瘍値とともに Fig. 5 に示した。グラフからわかるように補正された腫瘍値は腫瘍値より小さくなり、正の勾配は腫瘍値よりやや大きくなった。補正された腫瘍値は血液量を最大に見積った場合であり、実際にはこれより少ないので現実には血液を除いた腫瘍組織取込値は“腫瘍値”と“補正された腫瘍値”の間にあるはずである。

Fig. 5. Retention values of ¹⁶⁹Yb, ⁶⁷Ga and ¹¹¹In in blood, tumor and tumor from which perfused blood is removed.



IV. ¹⁶⁹Yb, ⁶⁷Ga, ¹¹¹In の骨親和性の強弱とイオン形等の関係

前報¹⁾に示すごとく、¹⁶⁹Yb, ⁶⁷Ga, ¹¹¹In の腫瘍組織取込率はほとんど差がないが、骨取込率では ¹⁶⁹Yb

が最大で ⁶⁷Ga, ¹¹¹In の順に小さくなり、このために軟組織残存率では ¹⁶⁹Yb が最小となり、⁶⁷Ga, ¹¹¹In の順に大きくなることはすでに述べた。このような差は何によりもたらされるかを明らかにする目的で、まずタンパクへの結合力の強い水銀化合物が骨にほとんど取り込まれないことと、トランスフェリンに強力に結合する鉄が骨にあまり取り込まれない事実により、これら核種のタンパク結合力と骨取り込み(骨のモデルとして hydroxyapatite crystal を使用)の関係を探め、ついでこれら核種の溶液中でのイオン形と骨取り込みとの関係を求めた。

1. 実験材料

⁶⁷Ga-citrate, ¹⁶⁹Yb-citrate, ¹¹¹In-chloride, ⁵⁹Fe (ferric)-chloride および ²⁰³Hg-chlormerodrin 溶液: 市販の上記化合物の溶液を多量の蒸留水で希釈して、1滴がウエル型シンチレーションカウンターで測定するのに適当なラジオアイソトープ (RI) 量にしたものを使用した。

hydroxyapatite crystal [Ca10(OH)2(PO4)6] (以下 HA 結晶と略す): 米国マリンクロット社製品を使用した。

ウシアルブミン溶液: Miles Laboratories Inc. 製の bovine albumin powder を 0.01M phosphosaline buffer (pH7.3) に溶かし 62mg/ml に調整したものを使用した。

ウシトランスフェリン溶液: Miles Laboratories, Inc. 製の bovine transferrin の 75mg に 0.3% クエン酸溶液 1.5ml を加えて溶かし、これを透析チューブ中で十分透析して使用した。

強酸性陽イオン交換樹脂: アンバーライト CG-120 を H 型にして使用した。

2. 実験方法

タンパク溶液中で HA 結晶への吸着: アルブミン溶液 1ml にトランスフェリン溶液をトランスフェリンに換算して 0, 2, 10, 16mg を加えたものに上記各 RI 溶液 1滴を加えて 37°C で 20 分間インキュベートしたのち、HA 結晶 5mg を加えて 37°C で 5 分間インキュベートした。こののち遠心分離し、上澄みと沈殿の計数値を加えたもので沈殿の計数値を割ったものを HA 結晶への吸着率とした。

0.01M phosphosaline buff. (pH7.3) 中での HA 結晶への吸着: この緩衝液 0.5ml に各 RI 溶液をそれぞれ 1滴加えたあと HA 結晶 5mg を加えて、37°C で 5 分間インキュベートして遠心分離した。タンパク溶液中での HA 結晶への吸着の場合と同様に吸着率を求めた。

0.01M phosphosaline Buff. (pH7.3) 中での強酸性陽イオン交換樹脂への吸着：この緩衝液0.5mlに各RI 溶液をそれぞれ1滴加えたものにアンバーライトCG-120 0.1mlを加えて37°Cで5分間インキュベートしたあと遠心分離し、上記と同様な方法でCG-120への吸着率を求めた。

3. 実験結果

この実験で⁶⁷Ga と¹⁶⁹Yb はクエン酸塩を使用した。蒸留水で十分に薄めているのでクエン酸から遊離しており、¹¹¹In と⁵⁹Fe と同様に金属イオンと考えてさしつかえない¹²⁾。タンパク溶液中での HA 結晶への吸着は Fig. 6 に示したが、⁵⁹Fe ではトランスフェリンが10mgまでは HA 結晶への吸着率が急激に減少した。¹⁶⁹Yb はトランスフェリン量に関係なく80%強の吸着を示し、⁶⁷Ga は¹⁶⁹Yb と同様に吸着率は大きい。トランスフェリンの量とともに吸着率がやや減少した。¹¹¹In はトランスフェリン量にあまり影響

Fig. 6. Adsorption of labeled compounds to hydroxyapatite crystal in the protein solution (albumin and transferrin).

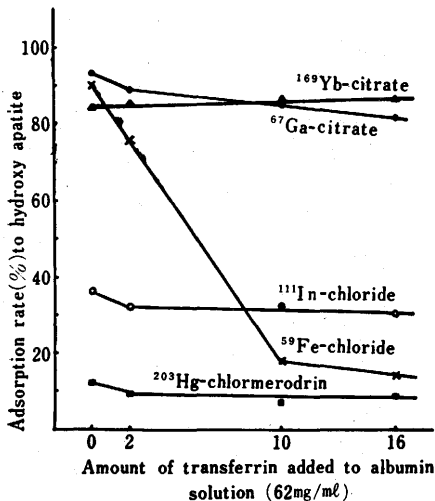


Table 5. Adsorption rate (%) of labeled compounds to the hydroxyapatite crystal and cation-exchange resin in 0.01 mole phosphosaline buffer solution (pH=7.3).

| | ¹¹¹ In-chloride | ⁶⁷ Ga-citrate | ¹⁶⁹ Yb-citrate | ⁵⁹ Fe-chloride | ²⁰³ Hg-chlormerodrin |
|-----------------------|----------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------------|
| hydroxyapatite | 34.5 | 82.3 | 92.4 | 99.5 | 16.2 |
| cation-exchange resin | 70.3 | 95.7 | 99.3 | 97.7 | 61.4 |

されず30~40%の吸着率であり、²⁰³Hg-chlormerodrin もトランスフェリンに関係なく10%前後の吸着率であった。この図からタンパクに強力に結合する²⁰³Hg-chlormerodrin と、トランスフェリンに強力に結合する⁵⁹Fe がこれらタンパクに結合したときには HA 結晶に吸着されないことから、タンパクへ強力な結合力をもつものはそのタンパクにより骨取り込みが妨害されることが明らかとなった。また⁶⁷Ga はトランスフェリンにある程度の結合力があり、これにより骨取り込みがある程度妨害されているらしいこともわかった。またアルブミン結合力の弱い¹⁶⁹Yb⁽¹³⁾⁽¹⁴⁾、⁶⁷Ga⁽¹³⁾⁽¹⁴⁾ が骨によく取り込まれることもわかった。しかし¹¹¹In の HA 結晶への吸着率が¹⁶⁹Yb、⁶⁷Ga より小さい点は動物実験と一致するが、アルブミン結合力も弱い¹¹¹In がトランスフェリンの量に関係なくほぼ30~40%の吸着率しか示さないことは、トランスフェリンを含めたタンパク結合力以外に要因があることを予想させる。この点を明らかにするために、上記緩衝液中での HA 結晶および陽イオン交換樹脂への吸着実験の結果を Table 5 に示した。これによると HA 結晶への吸着率は¹¹¹In は34.5%と小さく、ついで⁶⁷Ga の82.3%、¹⁶⁹Yb の92.4%、⁵⁹Fe の99.5%、²⁰³Hg-chlormerodrin の16.2%となった。既報⁽¹⁴⁾のごとく動物実験でも骨取込率は¹¹¹In、⁶⁷Ga、¹⁶⁹Yb の順に大きくなり同じ傾向を示しており、この原因は¹¹¹In、⁶⁷Ga などでは生理的 pH の溶液中でかなりの部分がマイナスに荷電した多価ヒドロクソ状態等で存在しているので吸着率が小さくなると推定される。陽イオン交換樹脂への吸着実験の結果も同じ表に示したが、吸着率は¹¹¹In が最低で70.3%であり、ついで⁶⁷Ga の95.7%となり¹⁶⁹Yb、⁵⁹Fe はほとんど定量的に吸着した。²⁰³Hg-chlormerodrin は水銀有機化合物であるのでイオン交換体へは他の金属イオンとは異なる性質を示した。

この実験において金属元素でも溶液中で陽イオンと

なれないものは骨に取り込まれないこと、陽イオンとなれるものでも血中でアルブミン、トランスフェリンなどのタンパクへ強力に結合するもの（血球等へ強力に結合するものでも同様に骨へ取り込まれないと考えられる）は、それに結合することにより骨取り込みが妨害されることがわかった。 ^{111}In , ^{67}Ga , ^{169}Yb の骨親和性の差は ^{67}Ga , ^{111}In ではトランスフェリンがある程度骨取り込みを妨害していると思われるが、おもな原因は ^{111}In は多くが血中で陰イオン形で存在し、 ^{67}Ga もかなりの量が血中で陰イオン形で存在するためにこのような差が現われると考えられた。

V. 考 察

^{67}Ga の腫瘍取り込みのマイクロオートラジオグラムは Hayes ら¹⁵⁾、東ら¹⁶⁾¹⁷⁾の報告があり、Hayes らは ^{67}Ga は腫瘍細胞に取り込まれており、壊死したものより現在生きている腫瘍細胞に主として集まり、細胞内の細胞質成分と結合しているらしいと結論づけている。東らも腫瘍細胞に取り込まれていることを述べている。また Hayes ら¹⁵⁾は電顕オートラジオグラムによりこのことを確かめ、東ら¹⁷⁾は同じ電顕オートラジオグラムで核膜やミトコンドリア周辺に ^{67}Ga が多いとしている。 ^{111}In -chloride, citrate 又は nitrate についての基礎的研究も Hunter ら¹⁸⁾¹⁹⁾の報告以来行なわれているが、オートラジオグラム又は細胞分画による研究は報告されていない。 ^{169}Yb については東ら²⁰⁾により全身オートラジオグラムおよびマイクロオートラジオグラムが行なわれており、腫瘍細胞への取り込みが報告されている。今回のわれわれの実験では ^{169}Yb , ^{67}Ga , ^{111}In が腫瘍結節中でどのように分布しているかを経時的に観察するのが目的であった。この実験の結果は上述のごとく、3核種とも腫瘍細胞の現在生きている部分に取り込まれ、壊死部にはほとんど取り込みを認めなかった。このことは注射後の時間によらず3核種とも腫瘍細胞の生きている部分にのみ取り込まれており、吉田肉腫および Ehrlich 癌の両方で同じ結果であったことより ^{169}Yb , ^{67}Ga , ^{111}In は一般的に注射何時間後においても腫瘍細胞の生きている部分にのみ取り込まれていると結論してよさそうである。

さて、つぎにこれら核種の腫瘍細胞内分布であるが、 ^{67}Ga については東¹⁷⁾²¹⁾ら、折井ら²²⁾の報告がある。東ら²¹⁾はまず担 Ehrlich 腹水癌結節マウスに ^{67}Ga -citrate を投与したのち、腫瘍結節ホモジネートを Schneider 法により分画したところ、この放射能の割合は核分画に40%、細胞質分画に52%の割合

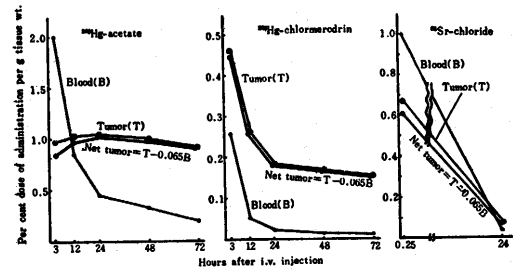
であり、この細胞質分画をさらに分画したところミトコンドリア分画に15%、小顆粒可溶性分画に78%と報告している。その後東ら¹⁷⁾は Fruthis-mastocytoma tumor で行ない、核分画、ミトコンドリア分画、マイクロゾーム分画、上清にそれぞれ27.8%、34.8%、20.5%、16.9%と報告している。ついで折井ら²²⁾は担吉田肉腫結節ラットに ^{67}Ga -citrate を投与したのち、Schneider 法により分画し、核分画、ミトコンドリア分画、マイクロゾーム分画および上清にそれぞれ8%、10%、11%、71%と報告している。折井らの値は、われわれの行なった吉田肉腫の値よりはやや核分画の値が少なく、上清の値が多いが、われわれの Ehrlich 癌で得た値と非常によく一致していた。折井らの結果、われわれの結果から、ミトコンドリア分画およびマイクロゾーム分画には少なく、上清に最も多いようであるが、腫瘍の種類および実験条件により結果は相当に異なるようである。 ^{169}Yb , ^{111}In (^{113}In) を取り込ませた腫瘍の分画はまだ報告がないが、われわれの実験では ^{111}In (^{113}In) はかなりよく ^{67}Ga に類似している。しかし ^{169}Yb はやや異なり吉田肉腫、Ehrlich 癌ともに ^{67}Ga , ^{113}In (^{111}In) よりも核への取り込みが多くなり、上清では少なくなっていた。このことは同じⅢ族元素どうしても性質の違いを示すものであろう。さて各分画あたりのこれら核種の分布は上述 (Table 1)のごとくであるが、各核種の投与量を標準化した場合の各分画ごとのタンパク単位重量あたりの放射能の比として表わしたものが Table 3 である。これから ^{169}Yb はマイクロゾームがやや大きく、他の分画の約2倍であるが、 ^{67}Ga , ^{113}In (^{111}In) においては上清が最も大きく、他の分画の2~4倍であった。現在、腫瘍細胞で特異的に ^{67}Ga と結合するタンパクが検索されているが、このように特に比放射能の大きいタンパクをもつ分画がないことや、極めて類似した機序で悪性腫瘍親和性を示すであろうと考えられる ^{169}Yb , ^{67}Ga , ^{113}In (^{111}In) 間でやや差異のあること等を考慮すると、はたしてこのような特殊のタンパクがあるかどうか疑問である。また ^{67}Ga はライソゾームに特に取り込まれるという報告²³⁾²⁴⁾もあったが、ライソゾームは Schneider 法では大部分ミトコンドリア分画にはいるはずであるが、われわれの実験および折井らの実験ではミトコンドリア分画の放射能は総量の10~20%にすぎず、ライソゾームが重要な働きをしているとは考えにくい。

さてつぎに ^{169}Yb , ^{67}Ga , ^{111}In の腫瘍内での結合様式を推定してみると、Fig. 5 から考えて ^{169}Yb , ^{67}Ga , ^{111}In は腫瘍組織では極めて短時間のうちに取り

込まれ、一度取り込まれたものはほとんど腫瘍外へ排出されないことがわかる。またこれら3元素の静注3時間以後の腫瘍値についてはバラッキはあるにしても腫瘍外へ非常に排出されにくいことは前報¹⁾で報告したごとくであり、これを総合すると、これら3元素は極めて短時間で腫瘍組織へ取り込まれ、一度取り込まれたものはほとんど排出されず長時間にわたってそのままとどまることがわかった。これら元素はいずれもⅢ族元素であるが、他の元素についても同様な考察を試みたい。安東(醇)らは⁸⁵Sr化合物²⁵⁾および水銀化合物²⁶⁾の腫瘍親和性について報告しているので、これから引用し同様に血液値、腫瘍値、補正された腫瘍値を求め Fig. 7 に示した。これからわかるように⁸⁵Sr-chloride は速やかに腫瘍に取り込まれるが、24時間後にはほとんどが腫瘍から排出されていた。Fig. 7 に示すごとく²⁰³Hg-chlormerodrin は腫瘍値および補正された腫瘍値が、静注3時間から24時間後にかけて顕著に減少している(24時間後は分解して水銀イオンになったものがとどまっているのであろう)が、²⁰³Hg-acetate は腫瘍値および補正された腫瘍値ともに静注24時間後まで増大し、以後わずかに減少しており、同じ水銀化合物でも²⁰³Hg-chlormerodrin とは明らかに異なっていた。水銀化合物の腫瘍取り込みにはタンパク結合力が重要な役割をしており、この結合力の極めて強力な²⁰³Hg-acetate は腫瘍組織へよく取り込まれ、一度取り込まれると非常に排出されにくい、この結合力のかなり弱い²⁰³Hg-chlormerodrin は腫瘍組織への取り込みがやや少なく、また排出もより速やかに行なわれ、またある一種の水銀化合物を考えると腎臓以外の主要臓器組織中腫瘍が最も結合力が強いので、時間が経過するほど他の臓器に比べ腫瘍への残存率が大きくなり、丁度²⁰³Hg-chlormerodrin の程度の強さのタンパク結合をもつものが腫瘍/臓器-比の高い値を得ることができると述べられている²⁶⁾。これらのことから考えて、水銀有機化合物の腫瘍親和性はその化合物のもつ適当な強さのタンパク結合に意味があるのであり、おそらく化合物中に水銀を含まなくてもその元素、または化合物が適当な強さのタンパク結合をもてば腫瘍親和性を表わすものと推定される。これに対し¹⁶⁹Yb, ⁶⁷Ga, ¹¹¹In は元素そのもののもつ性質によるものであり、水銀有機化合物とその機序をまったく異なるものと言えよう。

つぎに¹⁶⁹Yb, ⁶⁷Ga, ¹¹¹In がどのような結合様式で腫瘍組織にとどまっているかを考えてみると、まず第一は細胞表面または内部の陰イオン基と結合している

Fig. 7. Retention values of ²⁰³Hg and ⁸⁵Sr in blood, tumor and tumor from which perfused blood is removed.



場合と、第二はキレート結合している場合が考えられる。水銀はS配位が極めて強いので水銀化合物の腫瘍内での結合はキレート結合が予想されるが、⁶⁷Ga, ¹¹¹In, ¹⁶⁹Yb, ⁴⁶ScなどのⅢ族元素はS配位がほとんどなく、N配位も弱いためキレート結合の可能性は少なく、イオン結合の可能性はるかに大きい。生体内でこれら陽イオン結合ができる可能性のある陰イオン基としてはカルボキシル基、リン酸基、スルホン酸基、フェノール性水酸基がある。がん細胞膜の表面は正常細胞よりも負に荷電し、その原因はシアル酸のカルボキシルイオンかリン脂質のリン酸イオンとされているが、細胞内でもこれら陰イオンが活発に動き、あたかも陽イオン交換樹脂のごとき作用を表わしていることが想像される。ちなみに腫瘍組織は正常組織よりもシアル酸やリン酸化合物が多いので、このような結果になるのかもしれない。一般に陽イオン交換樹脂への吸着力は希薄溶液においては陽イオンの価数の多いものほど強く、この傾向は溶液が希薄になるほど大きいとされている。上記のごとく、プラス2価の⁸⁵Sr-chloride は腫瘍へ取り込まれたものが、24時間後にはほとんど腫瘍外へ排出され、プラス3価の¹⁶⁹Yb, ⁶⁷Ga, ⁴⁶Sc, ¹¹¹Inなどはほとんど腫瘍から排出されない点はイオン交換説を支持する材料といえるかもしれない。以上述べたごとく、これらⅢ族元素はイオン交換的にカルボキシルイオン、リン酸イオン、スルホン酸イオンなどに結合していると考えられるならば、上記の事実を比較的スムーズに理解できる。

¹⁶⁹Yb, ⁶⁷Ga, ¹¹¹In は腫瘍結節への取込率では3核種間で大きな差はないが、体内分布において大きな差が生じ、その原因は¹⁶⁹Ybは多量速やかに骨に取り込まれるが、¹¹¹Inはあまり骨に取り込まれないためであることは前報¹⁾で詳しく述べた。この原因を明らかにする目的で行なった実験の結果は Fig. 6, Table 5 である。これらの結果から判断して、この

3核種の骨取り込みに最も大きな影響を与えているのは、 ^{169}Yb は非常に多くが陽イオン形で存在しているために骨に取り込まれやすく、 ^{111}In は相当の部分が陰イオン形で存在しているために骨取込率が少なくなると推定できた。しかしながら生体内での骨取り込みを *in vitro* 実験で推定することは、非常に困難なことであり、今後より生体条件に近い実験モデルで詳細に検討することが必要であろう。

VI. 結 論

マクロオートラジオグラフィ法により ^{169}Yb , ^{67}Ga , ^{111}In の腫瘍結節内分布を調べたところ、3核種とも現在腫瘍細胞が生きている部分に取り込まれ、壊死部にはほとんど取り込まれておらず、3核種は互いによく類似していた。

細胞分画法により ^{169}Yb , ^{67}Ga , ^{111}In の腫瘍細胞内分布を調べたところ、Ehrlich 癌においては ^{169}Yb , ^{67}Ga , ^{111}In とも上清が一番多く、これに対して核、ミトコンドリア、ミクロソームははるかに少なかった。吉田肉腫においては核がやや多く、上清がやや少ない傾向を示し、 ^{169}Yb は核と上清がほぼ同量の取り込みを示したが、 ^{67}Ga , ^{111}In では上清が最大であった。この腫瘍細胞内分布では ^{67}Ga と ^{111}In は比較的良好に類似していたが、 ^{169}Yb はやや核分画に多く、上清が少ない傾向を示した。

^{169}Yb , ^{67}Ga , ^{111}In は静注すると、速やかに腫瘍結節に取り込まれ、一度取り込まれたものはほとんど排出されないことより、腫瘍細胞内で陰イオン基と結合していることが推定された。

^{169}Yb が速やかに骨に取り込まれ、 ^{111}In がほとんど骨に取り込まれないのは ^{169}Yb は血液中で大部分が陽イオンとして存在し、 ^{111}In は大部分が陰イオンとして存在するためであろうと推定された。

稿を終るにあたり、御指導、御校閲を賜りました恩師久田欣一教授に深く感謝いたします。またマクロオートラジオグラムの作成にあたって助言をいただきました本学医療技術短期大学部水上稔教授、細胞分画法について助言をいただきました同竹下正純教授に心より感謝いたします。種々お世話になりました医局長利波紀久講師に感謝いたします。

文 献

- 1) 安東逸子：十全医会誌，投稿中。
- 2) 安東 醇・土井下建治・平木辰之助・真田 茂・久田欣一・安東逸子：日本薬学会第95年会講演要旨集，第4分冊，65頁，1975。
- 3) 安東 醇・久田欣一・平木辰之助・安東逸子・真田 茂：Radioisotopes, 23, 161 (1974).
- 4) 安東 醇・久田欣一・平木辰之助・安東逸子・真田 茂：Radioisotopes, 23, 52 (1974).
- 5) 安東 醇・久田欣一：Radioisotopes, 21, 549 (1972).
- 6) 安東 醇・久田欣一：Radioisotopes, 21, 648 (1972).
- 7) Hogeboom, G. H.: *In Methods in Enzymology* ed. by Kaplan, N. O. & Colowick, S. P., vol. 1, p.16, Academic Press, New York, 1955.
- 8) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J.: J. biol. Chem., 193, 265 (1951).
- 9) 奥木 実：実験動物，第1版，273頁，東京，南山堂，1968。
- 10) Subramanian, G., McAfee, J. G., Bell, E. G., Blair, R. J., O'Mara, R. E. & Ralston, P. H.: Radiology, 102, 701 (1972).
- 11) 安東 醇・久田欣一・安東逸子：Radioisotopes, 投稿中。
- 12) 安東 醇・久田欣一：Radioisotopes, 19, 239 (1970).
- 13) Ando, A., Hisada, K., Hiraki, T. & Sanada, S.: Proceedings of the First World Congress of Nuclear Medicine, p.946, Tokyo, 1974.
- 14) 安東 醇・久田欣一・平木辰之助・安東逸子：Radioisotopes, 22, 415 (1973).
- 15) Hayes, R. L., Nelson, B., Swartzendruber, D. C., Carlton, J. E. & Byrd, B. L.: Science, 167, 289 (1970).
- 16) Higasi, T., Hisada, T., Nakayama, Y., Kinoshita, Y., Kawai, K., Suzuki, S., Kato, H., Murata, A., Sugiyama, M., Kawaguchi, R. & Nakamura, I.: Radioisotopes, 19, 311 (1970).
- 17) Higasi, T., Nakayama, Y., Akiba, C., Hisada, T. & Fields, M. H.: Radioisotopes, 22, 291 (1973).
- 18) Hunter, W. W. Jr. & Dekock, H. W.: J. Nucl. Med., 10, 343 (1969).
- 19) Hunter, W. W. Jr. & Riccobono, X. J.: J. Nucl. Med., 11, 328 (1970).
- 20) 東 与光・藤村忠士・中山義之・久田太郎・戸村健児・川井邦男・中村 功：核医学，10, 27 (1973).

- 21) 東 与光・池本真一・久田太郎・中山義之・鈴木慎二・棚田 勲・加藤秀夫・村田 晃・杉山道雄・大下寿隆：核医学，6，217 (1969).
- 22) Orii, H. : Strahlentherapie, 144, 192 (1972).
- 23) 折井弘武：悪性腫瘍の RI 診断—Ga-67を中心—to (安河内浩編)，第1版，5頁，東京，医学図書出版，1972.
- 24) 東 与光・中山義之・秋場 仁・伊藤勝雄・久田太郎・三木太平・川井邦男：核医学，8，155 (1971).
- 25) 安東 醇・久田欣一：Radioisotopes, 20, 273 (1971).
- 26) 安東 醇・久田欣一：Radioisotopes, 19, 589 (1970).

Abstract

Comparisons of biological behavior of ^{169}Yb -citrate, ^{67}Ga -citrate and ^{111}In -citrate in the tumor tissue were performed by macroautoradiography as well as by subcellular fractionation according to the method of Hogeboom and Schneider, using Yoshida sarcoma-bearing rats and Ehrlich tumor-bearing mice. And the uptake of ^{169}Yb , ^{67}Ga and ^{111}In into the tumor and various organs was assayed at 10, 30, 60 and 120 minutes after i.v. injection, using the rats subcutaneously transplanted with Yoshida sarcoma.

Autoradiographical findings showed that the uptake of these nuclides was predominant in viable tumor tissue rather than in necrotic tumor tissue. Among the subcellular fractions of Ehrlich tumor, most of the radioactivity was localized in the supernatant fraction and a small amount of radioactivity was found in the fractions of nuclear, mitochondria and microsome. In Yoshida sarcoma, the results were almost similar in the three nuclides. And specific activities of protein (cpm/mg) of these four fractions were not greatly different in the three nuclides. After i.v. injection of these nuclides, these nuclides were rapidly taken up into the tumor, and these nuclides taken up into the tumor were not excreted out of the tumor. And it is a well-known fact that ^{169}Yb , ^{67}Ga and ^{111}In are not sulfur coordinators but weak nitrogen coordinators. Considering the above-described facts, it is presumed that the chemical bond of these elements is not chelate ring but ionic bond. From in vitro adsorption test of these nuclides to the hydroxyapatite crystal and cation exchange resin, it is presumed that the reason for the strong affinity of ^{169}Yb to the bone is attributed to the fact that ^{169}Yb stays mostly as cation form in the blood.