

^{67}Ga の腫瘍集積におよぼす FeCl_3 , ScCl_3 , Stable Ga の影響の比較

村中 明* 伊藤 安彦**

* 川崎医療短期大学 放射線技術科

** 川崎医科大学 核医学教室

(昭和57年10月30日受理)

Effects of FeCl_3 , ScCl_3 and Stable Ga
on ^{67}Ga Uptake by Tumor Cells

Akira MURANAKA* and Yasuhiko ITO**

* Dept. of Radiological Technology, Kawasaki College of Allied Health Professions

** Div. of Nuclear Medicine, Dept. of Radiology, Kawasaki Medical School

Kurashiki 701-01, Japan

(Received on Oct. 30, 1982)

Key words : クエン酸 ^{67}Ga , 腫瘍集積機序, transferrin, ^{67}Ga -complex

概 要

^{67}Ga の腫瘍集積機序を明らかにする目的で、腫瘍細胞の ^{67}Ga の集積におよぼす FeCl_3 , ScCl_3 , stable Ga の影響を比較検討した。MEM 中では FeCl_3 あるいは ScCl_3 の投与により、 ^{67}Ga と transferrin の結合は減少し、 ^{67}Ga -Fe あるいは ^{67}Ga -Sc complex の形成が認められた。HeLa S3 の ^{67}Ga uptake はこれらの complex の形成と相関した。一方、stable Ga を投与した場合には complex は形成されず、 ^{67}Ga uptake は減少した。100% 人血清中でも FeCl_3 , ScCl_3 , stable Ga の投与により ^{67}Ga と人血清との結合は減少した。しかし HeLa S3 の ^{67}Ga uptake は FeCl_3 , ScCl_3 の投与によりむしろ増加し、stable Ga の投与では増加しなかった。

したがって、 ^{67}Ga の腫瘍集積機序は transferrin の関与のみならず、 ^{67}Ga の complex の形での集積機序も存在するものと考えられる。

1. はじめに

1969年、クエン酸ガリウム (^{67}Ga) が腫瘍スキャン剤として報告されて以来、 ^{67}Ga の腫瘍集積

性は基礎的, 臨床的に検討され, 現在でも一般的腫瘍スキャン剤として最も広く臨床に使用されている。しかし, その腫瘍集積機序は種々の方法により研究され多くの因子が発表されているが, 未だ十分な解明はなされていない¹⁾。

著者らはひきつづき集積機序の検討を行い, 培養細胞を用いた *in vitro* の実験系において腫瘍細胞の ^{67}Ga 集積におよぼす血清, transferrin, 塩化第 2 鉄 (FeCl_3) の影響を追求し, transferrin の関与した ^{67}Ga の集積機序²⁾のみならず ^{67}Ga の complex の関与した機序も考えている^{3,4)}。この論文においては, 腫瘍細胞への ^{67}Ga 集積におよぼす塩化スカンジウム (ScCl_3), 非放射性クエン酸ガリウム (stable Ga) の影響を FeCl_3 の場合と比較することにより, ^{67}Ga の complex としての集積の証明を試みた結果を述べる。

2. 材料および方法

実験に使用した腫瘍細胞は HeLa S3 で, 10% fetal calf serum (FCS) を含む minimum essential medium (MEM) 中で培養維持した。HeLa S3 の ^{67}Ga uptake を測定する場合には, FCS を除いた MEM only に human transferrin (Tf) を種々の濃度に加えた培地中あるいは正常人血清中で測定した。Tf は 90% 以上 iron free のものを用いた。

HeLa S3 における ^{67}Ga uptake におよぼす FeCl_3 , ScCl_3 , stable Ga の影響の測定は, 先

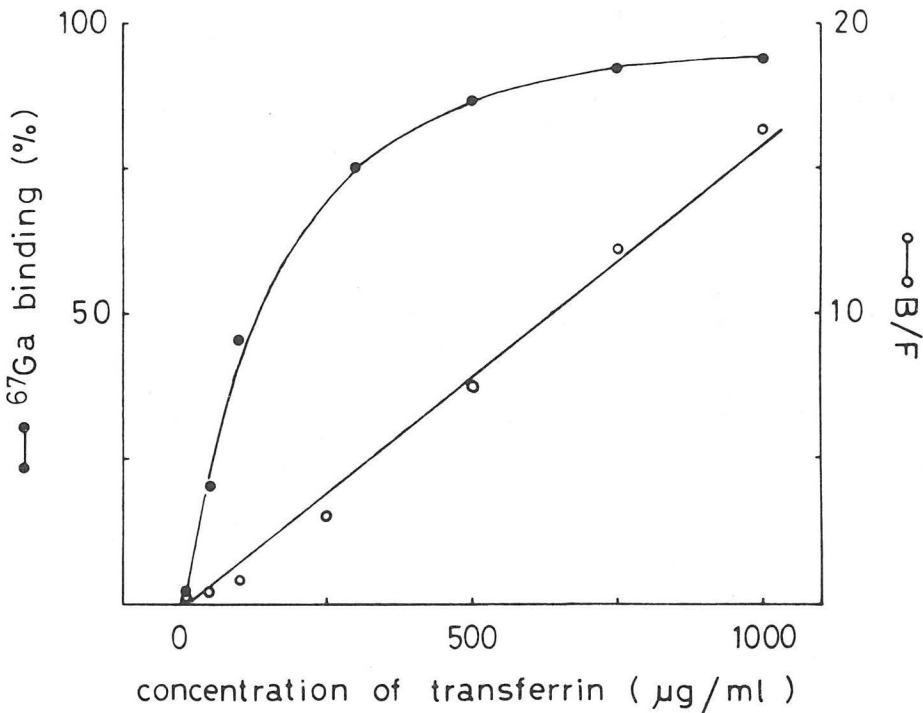


Fig. 1. Binding of ^{67}Ga to various concentrations of human transferrin.

に報告した方法^{3,4)}に従って行った。略記すると、HeLa S3 をプラスチックシャーレにまき込み 20～24 時間 incubate した後、Tf を種々の濃度を含んだ MEM あるいは 100% 人血清に培地を交換し、 ^{67}Ga を $1\mu\text{Ci}/\text{ml}$ -medium の濃度に加えた。さらに、 FeCl_3 , ScCl_3 あるいは stable Ga を $0\sim 10^{-1}\text{mM}$ の濃度に加え、24 時間 incubate し、細胞中の ^{67}Ga uptake を測定した。

^{67}Ga と Tf あるいは人血清との結合は、セルローズ膜を用いた平衡透析によって検討した。平衡透析の方法も先に報告した方法^{3,4)}に従って行った。すなわち、HeLa S3 の ^{67}Ga uptake の測定と同一条件に Tf を含む MEM 中または人血清中に ^{67}Ga と FeCl_3 , ScCl_3 あるいは stable Ga を加え、24 時間 incubate した。その後、その試料 1 ml をセルローズ・バッグの中に充填し、MEM 8 ml に対して 4°C で 24 時間透析した。その後、バッグの中と外側の MEM 中の ^{67}Ga の放射能を測定し、Tf あるいは人血清と結合した ^{67}Ga (Bound) と結合していない free の ^{67}Ga (Free) の割合をもとめた。

3. 結 果

Fig. 1 に MEM 中における ^{67}Ga と Tf の結合と Tf 濃度の関係を、平衡透析によって検討した成績を示した。 ^{67}Ga と Tf の結合は、Tf の濃度が高くなるにつれて大になり、 $750\mu\text{g}/\text{ml}$

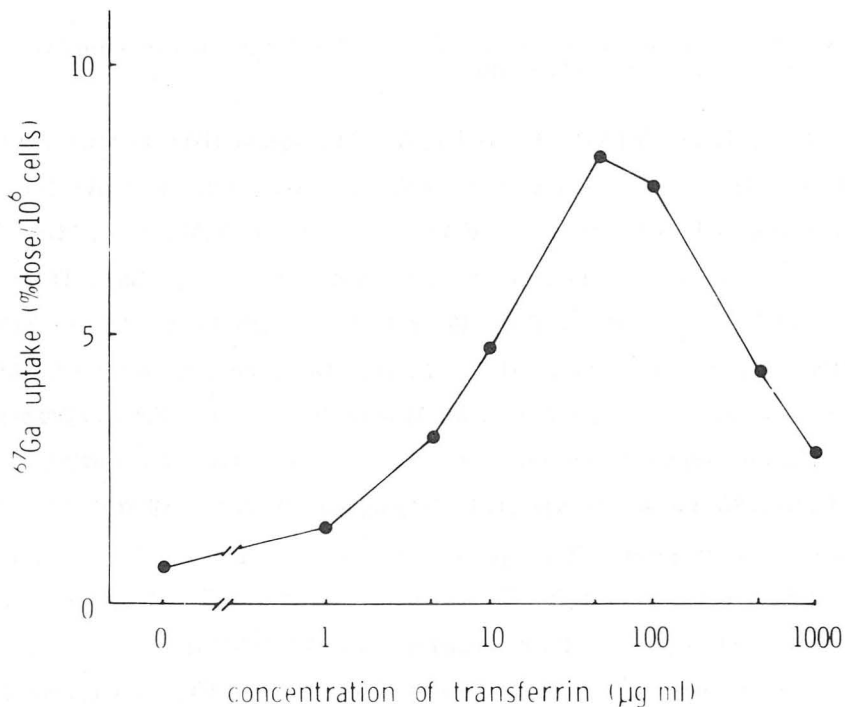


Fig. 2. Effect of various concentrations of human transferrin on ^{67}Ga uptake by HeLa S3.

以上の Tf 濃度では90%以上を示した。また, Bound 対 Free の比率は Tf の濃度に比例した。

Fig. 2に Fig. 1と同一条件で, HeLa S3 の ^{67}Ga uptake におよぼす Tf の濃度の影響を検討した成績を示した。 ^{67}Ga uptake は培地中の Tf 濃度とともに増加し, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度でピークに達するが, さらに, 濃度を増すと漸次減少した。これらの結果は Larson ら²⁾の報告と一致し, ^{67}Ga の腫瘍細胞への集積に Tf が重要な役割を果たしていると考えられる。

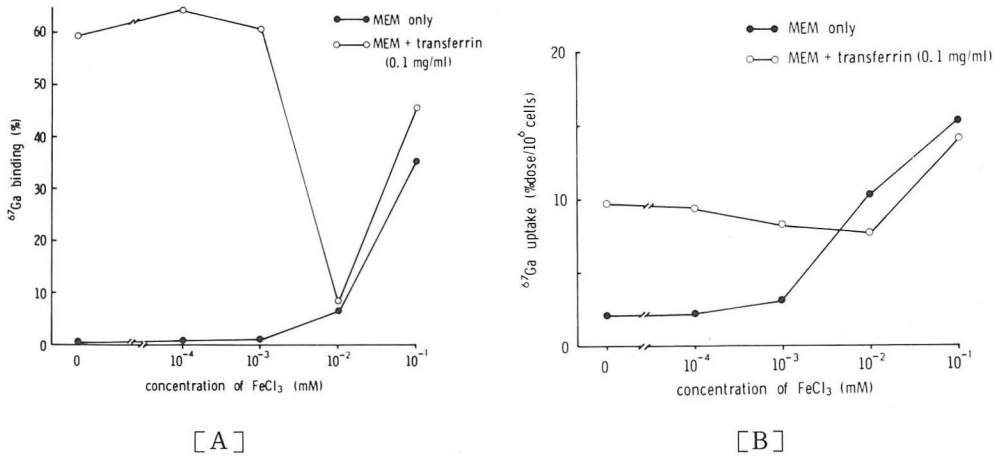


Fig. 3. Effect of various concentrations of FeCl₃ on ^{67}Ga binding to transferrin (A) and ^{67}Ga uptake by HeLa S3 (B).

Fig. 3に ^{67}Ga と Tf の結合 (A) および HeLa S3 の ^{67}Ga uptake (B) におよぼす FeCl₃ の影響を検討した成績を示した。平衡透析によって測定した ^{67}Ga の結合の検討 (A) では, MEM 中に 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の Tf が含まれる場合, FeCl₃ の濃度が 0 ~ 10⁻³mM において ^{67}Ga と Tf の結合が約60%程度認められた。FeCl₃ の濃度を 10⁻²mM に増加すると, ^{67}Ga と Tf の結合が著明に減少した。しかし, FeCl₃ の濃度を 10⁻¹mM にさらに増加すると, 透析バックの中に留まる ^{67}Ga の割合は約45%と逆に増加した。これは, ^{67}Ga と Fe がセルローズ膜を透過しない complex を形成するためと考えられる。MEM only 中においても, FeCl₃ の濃度が 10⁻² mM 以上で ^{67}Ga -Fe complex が形成され, 透析バックにとどまる ^{67}Ga の割合が増加した。

一方, HeLa S3 の ^{67}Ga uptake の検討 (B) では, Tf を 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度に含んだ MEM 中においては, FeCl₃ の濃度が 0 から 10⁻³mM まで ^{67}Ga uptake はやや減少する傾向が認められるが, 10⁻¹mM では著明に増加した。これは, FeCl₃ の投与により ^{67}Ga と Tf の結合は減少するが, 一方 FeCl₃ の濃度の増加とともに ^{67}Ga -Fe complex が形成され細胞に取り込まれているものと考えられる。MEM only 中でも ^{67}Ga -Fe complex の形成と HeLa S3 の ^{67}Ga uptake は相関し, FeCl₃ の濃度が 10⁻²mM 以上では ^{67}Ga uptake は著明に増加した。

Fig. 4に Fig. 3と同様な条件で, ^{67}Ga と Tf の結合 (A) および HeLa S3 の ^{67}Ga uptake (B) におよぼす ScCl₃ の影響を検討した成績を示した。 ^{67}Ga と Tf の結合の検討 (A) では,

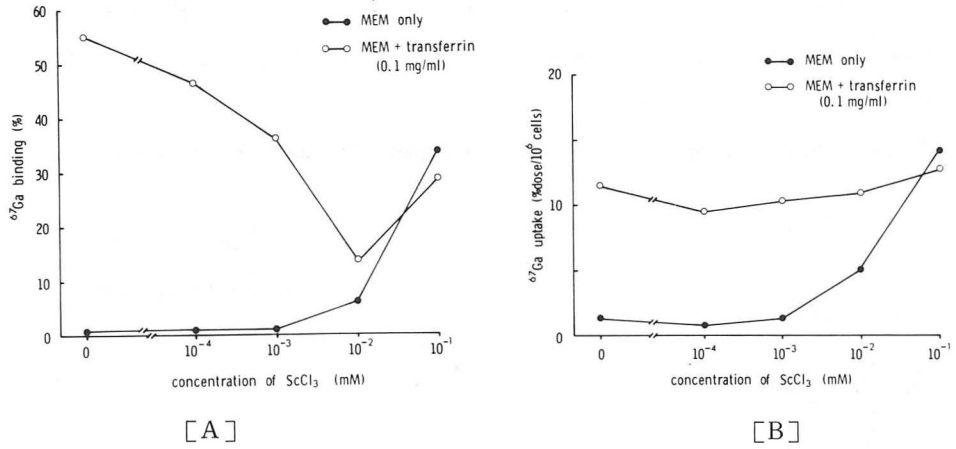


Fig. 4. Effect of various concentrations of ScCl_3 on ^{67}Ga binding to transferrin (A) and ^{67}Ga uptake by HeLa S3 (B).

FeCl_3 の場合と同様に、 ScCl_3 の投与により ^{67}Ga と Tf の結合は減少するが、一方 ScCl_3 の濃度の増加とともに ^{67}Ga - Sc complex の形成が認められた。HeLa S3 の ^{67}Ga uptake の検討 (B) でも、 ScCl_3 の影響は FeCl_3 とほぼ同様な傾向を示した。すなわち、 ScCl_3 の投与により ^{67}Ga と Tf の結合が著明に減少しているにもかかわらず、 ^{67}Ga uptake はほとんど変化せず、 ^{67}Ga - Sc complex が ^{67}Ga uptake に大きく影響しているものと考えられた。

Fig. 5に Fig. 3, 4と同様な条件で、 ^{67}Ga と Tf の結合 (A) および HeLa S3 の ^{67}Ga uptake (B) におよぼす stable Ga の影響を検討した成績を示した。 ^{67}Ga と Tf の結合の検討 (A) では、Tf を含んだ MEM 中においては stable Ga の濃度を増加させると ^{67}Ga と Tf の結合は著明に減少した。しかし、 FeCl_3 や ScCl_3 の場合に認められた complex の形成は、

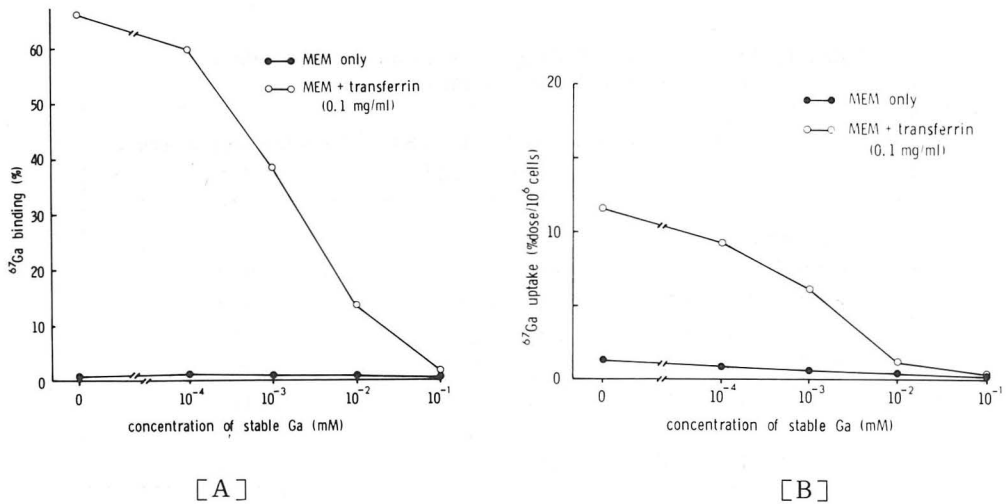


Fig. 5. Effect of various concentrations of stable Ga on ^{67}Ga binding to transferrin (A) and ^{67}Ga uptake by HeLa S3 (B).

Tf を含む MEM 中および MEM only 中においても認められなかった。HeLa S3 の ^{67}Ga uptake の検討 (B) では, stable Ga の濃度を増加させると uptake は減少し, FeCl_3 や ScCl_3 とは全く異なった傾向を示した。

Fig. 6 に ^{67}Ga -Fe complex および ^{67}Ga -Sc complex の培地中の濃度と HeLa S3 の ^{67}Ga

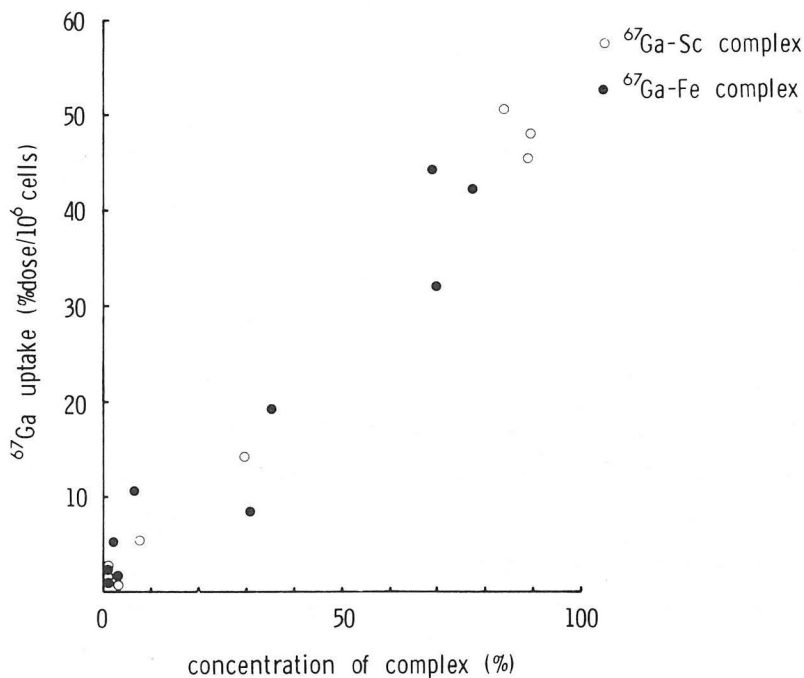


Fig. 6. Relationship between ^{67}Ga uptake by HeLa S3 and concentration of ^{67}Ga -Fe or ^{67}Ga -Sc complex in MEM.

Table 1. Effects of FeCl_3 , ScCl_3 and stable Ga on ^{67}Ga uptake by HeLa S3 and ^{67}Ga binding to human serum.

	^{67}Ga uptake by HeLa S3 (% dose/10 ⁶ cells)*	^{67}Ga binding to serum (%)**
human serum only		
(control)	0.47 ± 0.07	97.4
+ FeCl_3 10 ⁻² mM	0.43 ± 0.07	97.4
10 ⁻¹ mM	1.48 ± 0.24	28.0
+ ScCl_3 10 ⁻² mM	0.52 ± 0.08	95.8
10 ⁻¹ mM	0.94 ± 0.10	43.4
+ Ga - 10 ⁻² mM	0.37 ± 0.03	93.7
citrate 10 ⁻¹ mM	0.47 ± 0.03	25.9

* The values are expressed as the mean of ± standard deviation for 4 experiments.

** The values are expressed as the mean of 2-3 experiments.

uptake との関係を検討した成績を示した。多少のバラツキは認められるが、complex の濃度と HeLa S3 の ^{67}Ga uptake の間に正の相関が認められた。また、 ^{67}Ga -Fe complex と ^{67}Ga -Sc complex の間に ^{67}Ga uptake における差は認められなかった。

Table 1 に人血清 100% における HeLa S3 の ^{67}Ga uptake および ^{67}Ga と人血清との結合におよぼす FeCl_3 , ScCl_3 , stable Ga の影響を比較した成績を示した。 ^{67}Ga と血清の結合は FeCl_3 , ScCl_3 , stable Ga の 10^{-1}mM の投与により著明に減少した。しかし、HeLa S3 の ^{67}Ga uptake は FeCl_3 , ScCl_3 の 10^{-1}mM の投与により control に比し増加しており、 ^{67}Ga の complex が関与しているものと推測される。一方、stable Ga の投与によって ^{67}Ga uptake は増加する傾向を示さなかった。

4. 考 案

^{67}Ga の生体内分布が carrier としての stable Ga の存在の有無によって大きく影響を受け、特に腫瘍組織では ^{67}Ga の uptake が減少することが以前から知られている¹⁾。しかし、Hayes らは⁵⁾ stable Ga のかわりに Sc や Fe を投与した場合には、正常軟部組織の ^{67}Ga uptake は減少するが、腫瘍の ^{67}Ga uptake は減少しないと報告している。stable Ga や Fe, Sc の存在は、生体内に投与された ^{67}Ga の transferrin (Tf) への結合を同様に阻害すると考えられることから、何故このように ^{67}Ga の生体内分布に与える影響が異なるかという問題は、 ^{67}Ga の腫瘍集積機序を解明する上で重要である。

著者らはすでに in vitro の実験において、 ^{67}Ga の腫瘍細胞への集積に Tf とは無関係な ^{67}Ga の complex の関与した機序が存在する可能性を報告してきた⁴⁾。この研究では、この ^{67}Ga -complex という機序によって、stable Ga と Sc, Fe の ^{67}Ga の腫瘍細胞への集積への影響の差異を説明できるか否かを検討した。

MEM 中における実験では、 FeCl_3 と ScCl_3 の投与により ^{67}Ga の complex が形成され、この complex の形成と HeLa S3 の ^{67}Ga uptake はよく相関した。一方、stable Ga の投与では complex の形成は認められず、 ^{67}Ga uptake の増加も認められなかった。したがって、投与された物質と ^{67}Ga の complex 形成の有無が、 ^{67}Ga の生体内分に大きく影響しているものと考えられる。Hayes ら⁵⁾ は、 ^{67}Ga は腫瘍へ free ^{67}Ga または、血漿タンパク質とゆるく結合した ^{67}Ga の形で集積すると推定している。しかし、著者らの実験からは、少なくとも in vitro においては free ^{67}Ga の腫瘍細胞への集積は少なく、 ^{67}Ga -Tf または ^{67}Ga -complex という形で集積しているものと考えられる。

ただし、in vitro の実験結果から直ちに生体内挙動を論ずるには種々の問題があることを考えなければならない。すなわち、HeLa S3 の ^{67}Ga uptake が最大となる Tf 濃度は $50\mu\text{g}/\text{ml}$ と生体血液中よりかなり低い。また、 ^{67}Ga の腫瘍細胞への集積や ^{67}Ga -Fe complex の形成は培地中の血清の濃度や血清の種の違いによって影響を受けた^{3,4)}。その他、血流量や種々の臓器の機能等、生体における ^{67}Ga の腫瘍組織への集積は多くの因子によって修飾されている可能性

がある。したがって、*in vitro* で得られた結果をいかにして *in vivo* の挙動と結びつけるかが今後の大きな課題であると考えられる。

本研究においては、生体に近い一つのモデルとして、人血清 100% 中における HeLa S3 の ^{67}Ga uptake および ^{67}Ga と人血清の結合におよぼす FeCl_3 , ScCl_3 , stable Ga の影響の比較を行った。 ^{67}Ga と人血清の結合はいずれの場合も減少したが、 ^{67}Ga uptake は FeCl_3 , ScCl_3 の投与によりむしろ増加し、stable Ga の投与では増加しなかった。これらの結果からも、 FeCl_3 , ScCl_3 の投与による ^{67}Ga uptake の増加には ^{67}Ga の complex の形成が関与しているものと考えられ、 ^{67}Ga の集積機序は Tf および Tf receptor の関与したもののみならず ^{67}Ga -complex も関与した multiple なものと考えられる。

文 献

- 1) Ito, Y. and Muranaka, A.: Factors influencing the localization of radiotracers in tumors. In General processes of radiotracer localization. CRC Press, Boca Raton, pp 95-151 (1982)
- 2) Larson, S. M., Rasey, J. S., et al.: Common pathway for tumor cell uptake of gallium-67 and iron-59 via a transferrin receptor. J. Natl. Cancer Inst. 64: 41-53 (1980)
- 3) Muranaka, A.: Accumulation of radioisotopes with tumor affinity. II. Comparison of the tumor accumulation of ^{67}Ga -citrate and ^{201}Tl -chloride *in vitro*. Acta Med. Okayama 35: 85-101 (1981)
- 4) Muranaka, A., Ito, Y., et al.: Role of FeCl_3 in ^{67}Ga uptake by HeLa S3 *in vitro*. J. Nucl. Med. 21: 24-25 (1980)
- 5) Hayes, R. L., Rafter, J. J., et al.: Studies of the *in vivo* entry of Ga-67 into normal and malignant tissue. J. Nucl. Med. 22: 325-332 (1981)