



# 67Ga-citrateの腫瘍集積に関する臨床的基礎的研究

藤野, 久武

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1973-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲0126

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1000126>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



## 〔9〕

氏名・(本籍)	よじ 藤	の	ひさ 野	たけ 久	武 (大阪府)
学位の種類	医	学	博	士	
学位記番号	医	博	い	第	124 号
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当				
学位授与の日付	昭和48年3月31日				
学位論文題目	<b><math>^{67}\text{Ga}</math>-citrate の腫瘍集積に関する 臨床的基礎的研究</b>				
審査委員	主査	教授	榎	林	和之
		教授	岡	本	彰祐
		教授		光	野孝雄

## 論文内容の要旨

## 緒言

アイソトープ (RI) による腫瘍診断の1つとして癌親和性物質に RI を標識して検出する方法がある。 $^{67}\text{Ga}$ -citrate はこれに属する RI である。Gallium の歴史は1949年これが骨に集まるという Dudley Maddox らの報告に始まる。1953年 Gallium は骨腫瘍に集まる RI として診断治療への試みがなされたが効果がなかった。1961年に Schmidt らは腫瘍親和性 RI  $^{131}\text{I}$  フィブリノーゲンを報告し1964年には  $^{131}\text{I}$  Antifibrinogen が臨床で脳腫瘍の患者を対象として使われた。1965年に Hayes らによって再び  $^{68}\text{Ga}$ -citrate (半減期68分) で骨シンチグラフィーが行われたが  $^{85}\text{Sr}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{87\text{m}}\text{Sr}$  等の登場で陽の目をみなかった。1969年, Edwards, Hayes らは  $^{67}\text{Ga}$ -citrate (半減期78時間) が Hodgkin 病患者の頸部リンパ節腫瘍に集まることを報告した。その後  $^{169}\text{Yb}$ -citrate,  $^{57}\text{Co}$  プレオマイシン,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  プレオマイシン等の腫瘍集積についても諸家により報告をみたが, これら諸核種の中で  $^{67}\text{Ga}$ -citrate の集積度は最も腫瘍広範性があり, かつその度が高いという事実結果から, その集積機序について注目し続けられ現在に至っている。しかし未だ追究が成功をみていない状態にある。従ってここにおいて本主題追跡研究の意義が生まれ現況よりすぐれた腫瘍 RI 診断を生む重要性があることになった。

## I 臨床的研究

(方法及び成績)

1970年1月から1973年12月まで Nuclear Chicago 製及びコンピューター情報処理方式東芝製ガンマカメラを使って悪性腫瘍特に原発性肺癌 (196例) を対象として  $^{67}\text{Ga}$  シンチグラフィーを行った。原発性肺癌は 169例 (87%) の陽性を示し  $^{67}\text{Ga}$ -citrate 本来の目的 (悪性腫瘍への集積) を満足させる結果

であった。一方非腫瘍性疾患において肺結核は16例中11例、肺化膿症は14例中8例に $^{67}\text{Ga}$ の集積を認めた。サルコイドーシスでも8例中6例に $^{67}\text{Ga}$ の集積があった。肺結核で硬化性病変、結核腫には $^{67}\text{Ga}$ の集積がなかった。

なお肺癌の鎖骨上窩リンパ節転移が直径3 cm以下のものも放射活性が高ければ描出可能であった。肝癌や後腹膜腫瘍で壊死組織には $^{67}\text{Ga}$ の集積がなかった。 $^{67}\text{Ga}$ -citrateの腫瘍への集積には血液が重要な役割を果たすと考えて、試みに $^{67}\text{Ga}$ -citrateを静注した肺癌患者の末梢血から血清を分離してセファデックスG-200カラムに流した。その結果 $^{67}\text{Ga}$ は分子量69,000以上の蛋白と結合する事実を確認し得たので引続き基礎的研究では腫瘍集積機序を $^{67}\text{Ga}$ -蛋白結合面から究明した。

## II 基礎的研究

$^{67}\text{Ga}$ -citrateの癌や炎症への集積機序は未だ明らかでなく、また一方正常の肝臓や骨組織等にも集積するのでこれを克服する課題が残されている。 $^{67}\text{Ga}$ -citrateを炎症や正常組織よりも悪性腫瘍にもっと多く集めて腫瘍診断への応用を高める目的で悪性腫瘍集積機序解明に着手した。従来 $^{67}\text{Ga}$ -citrate(以下 $^{67}\text{Ga}$ と略す)はヒト及びラット、マウス等の正常肝にも集まると報告されてきた。著者は今回、主としてMorrisによって開発されたBuffalo系ラット移植の実験肝癌7316A (rapid growing tumor), 7794A (slow growing tumor)を使って実験を行い $^{67}\text{Ga}$ と高い親和性を示すと思われる結合物質の一つを、ラット正常肝より精製し、その生理的意義を検討した。

### (方法及び成績)

炎症にはLysosomeが重要な働きをするといわれHayesや東らは $^{67}\text{Ga}$ の集積にLysosomeが関係しているらしいと報告している。

$^{67}\text{Ga}$ と蛋白の結合を細胞内レベルでも究明する必要があるので、炎症に重要な役割を演じるLysosomeに着目し、Triton WR-1339を腹腔内注射したラット(肝癌及び宿主肝)よりこれを分離した。分離はLeightonの方法によって行い蛋白質はLowry法にて測定した。予備的にLysosomeと比較のために、細胞顆粒分画を検討し、特に細胞質膜はColemanの方法によって部分精製した。蛋白との結合は遠心チューブ内で行う方法(遠心法と名付ける)によった。各細胞顆粒を $1\text{ mg/ml}$ — $27\text{ mg/ml}$ の範囲で生理的食塩水に懸濁させて $^{67}\text{Ga}$ ( $12 \times 10^4\text{cpm}$ )とインキュベートの後、日立55P高速遠心機で27500 RPM, 15分間遠心した。沈澱として再回収される各細胞顆粒をさらに2回洗浄遠心し各プラスチック管壁に残った遊離放射活性を3回洗ってからウエルタイプシンチレーションカウンターで測定した。

その結果Lysosomeにわずかながら $^{67}\text{Ga}$ との結合がみられ、肝癌7316Aの方が7794Aや宿主肝より集積が多いが比活性(蛋白 $1\text{ mg}$ 当りの放射活性)はLysosome以外の顆粒成分と比べて高くない。Lysosomeの確認は電顕写真及び生化学的方法(酸フォスファターゼ等の酵素をマーカーとした)によった。Lysosome以外で着目すべきことは肝癌及び宿主肝のいずれかにおいても細胞質膜に $^{67}\text{Ga}$ の比活性が高かったが、必ずしも増殖度とは関係なく、脱分化の進んだ7316Aが7794Aより比活性が低いという結果を得た。

$^{67}\text{Ga}$ を筋肉内注射して各細胞顆粒成分への取り込みをみたvivo実験にて核及び膜の分画に $^{67}\text{Ga}$ の分布が少なかったことや肝癌7316Aでは、ミクロゾームよりも $105000 \times g$ 上清により多く $^{67}\text{Ga}$ が分布

した事実から比較的結合蛋白の精製が容易な105000×*g* 上清成分中の蛋白に注目した。

最初に両肝癌(7316Aと7794A)の<sup>67</sup>Ga結合度をこの105000×*g*を使ってミリポアーフィルターを使用する方法で調べると、遠心法における細胞質膜の結果と同様、肝癌7794Aの105000×*g*上清が7316Aの上清より比活性が高かった。このように *in vitro* にて<sup>67</sup>Gaと105000×*g*上清の結合は分化度及び増殖度とは比例しないが増殖度の異なる腫瘍によって差がみられた。

<sup>67</sup>Gaはいかなる物質に結合して、いかなる因子がその結合に影響を与えるかという興味から、細胞増殖調節因子として Pastan らにより注目されている CyclicAMP を加えたところ、これが<sup>67</sup>Gaの結合を競合的に抑えた。

以上の CyclicAMP 添加実験から<sup>67</sup>Caの結合蛋白が CyclicAMP binding protein である可能性を示唆するが、一方 CyclicAMP phosphodiesterase (以下 PDE と略す) の阻害薬理物質として知られる Theophylline が<sup>67</sup>Gaの結合を高めた所見を得たので、PDEに結合する可能性も考えてこの両者の精製を行った。

ウイスター系ラットの肝臓の 35000×*g* 30分間遠心上清より 30—45%の硫酸塩析を行い、次にこれを Tris 緩衝液に透析後蛋白 1 *mg*につき 10 *mg* の Calcium phosphate gel に吸着させた。50 mM 磷酸緩衝液(以下 KPB と略す)にて大部分の Protein kinase を除いたのち、さらに Hydroxylapatite (以下 HA と略す) カラムに吸着させて CyclicAMP binding protein 及び PDE を分離溶出させた。

ミリポアー標準法にて HA50mMKPB 溶出分画(主として CyclicAMP binding protein) や 200mMKPB 溶出分画(主として protein kinase) よりも HA 500mMKPB 溶出分画に<sup>67</sup>Gaが多く結合した。この分画への<sup>67</sup>Gaの結合は0.25M蔗糖及び10%グリセロールを含む20mMKPB (PH 7.5) に4°Cにて15時間透析しても解離せず CyclicAMP binding protein 分画の約 240 倍の結合が保持されていた。この高い<sup>67</sup>Gaの比活性がみられた 500mMKPB 溶出分画には遊離の CyclicAMP を分解する PDE が高度に精製されていた。PDE測定は Chrom AR Sheet を用いて基質 CyclicAMP から生成する 5'AMP 及びアデノシンを分離してそれらの放射活性を Beckman 液体シンチレーションカウンターで測定した。HA 500mMKPB 分画は非常に高い PDE 比活性を示し、HA 溶出前後で PDE 比活性と<sup>67</sup>Ga結合比活性を比べると同程度(約4000倍)の増加があった。この<sup>67</sup>Ga—蛋白(PDE)結合が特異的かどうかを吟味するために、この 500mM 溶出分画と Vitro にて<sup>67</sup>Gaと結合するといわれるトランスフェリンとを比較すると前者は後者の約70倍も<sup>67</sup>Gaに対する親和性を示した。

#### (考 按)

遠心法により肝癌7316A, 7794A, から分離した Lysosome に、増殖度に比例する<sup>67</sup>Gaの結合がわずかにみられた。<sup>67</sup>Gaが Lysosome に高い親和性を示さなかったこと及び Lysosome には PDE がないという報告から<sup>67</sup>Gaは Lysosome における PDE 以外の蛋白と結合したと考えられる。細胞増殖調節因子 (cell growth regulator) としての Cyclic AMP 添加効果があったことと、最近 Appleman らの方法によって得た肝癌の PDE 分画に対して Mg<sup>++</sup>が<sup>67</sup>Gaの結合を高め長鎖脂肪酸 CoA の添加により<sup>67</sup>Gaの結合能が増加する知見を得たので<sup>67</sup>Gaと蛋白の結合は生理的意義を持つ結合であると考察される。

## (結 論)

①  $^{67}\text{Ga}$  静注による悪性腫瘍 289例のシンチグラフィーによって原発性肺癌は 196例中 169例 (87%) , 転移性肺癌は21例中16例 (76%) , 悪性リンパ腫は14例中11例, 上顎癌 (4例) , 骨肉腫 (3例) は全例に陽性を示したが甲状腺癌, 腎癌では集積率が低かった。②原発性肺癌の組織別集積度には特異性がみられなかった。③非腫瘍性疾患63例のうち肺結核は16例中11例, 肺化膿症は14例中8例サルコイドーシスは10例中8例に陽性を示したが結核腫 (3例) や腎囊腫 (3例) には全く  $^{67}\text{Ga}$  の集積がなかった。④肝癌及び宿主肝より Lysosome を分離し,  $^{67}\text{Ga}$  に対する結合を遠心法で調べた。その結果 Lysosome は同時に分離した Lysosome 以外の分画に比べて  $^{67}\text{Ga}$  との結合度が低かった。⑤ ミリポアーフィルターを使った  $^{67}\text{Ga}$ -蛋白結合実験で, 増殖度の異なる肝癌の105000×g 上清間には  $^{67}\text{Ga}$  の結合による差があった。しかし  $^{67}\text{Ga}$  の結合は増殖度及び分化度に比例しなかった。⑥  $^{67}\text{Ga}$ -105000×g 上清結合は, 細胞増殖調節因子 CyclicAMP によって抑えられた。⑦  $^{67}\text{Ga}$  と結合する種々の蛋白の一つとして比較的高い親和性を示す CyclicAMP phosphodiesterase をラット正常肝より精製した。これと vitro にて  $^{67}\text{Ga}$  と親和性を示すトランスフェリンとを比較すると, 前者は後者の約70倍  $^{67}\text{Ga}$  に対する高い親和性を示した。

## 論文審査の結果の要旨

$^{67}\text{Ga}$ -Citrate は悪性腫瘍, 殊に肺癌腫瘍に集積度が他の放射性同位元素に比し最も高度であるが, その集積機序については明らかではない。そこでその追究を行い, 解明によりさらに腫瘍親和性の高い RI を探求するために本研究についた。

### 1) 臨床的研究

Scinticamera により  $^{67}\text{Ga}$ -citrate を 3mCi 静注, 悪性腫瘍 289例の Scintiphoto を求め, 原発性肺癌 196例に対しては 169例 87% の腫瘍に一致した陽性像を得, かつリンパ節転移像も描起出来る成績をみた。 $^{67}\text{Ga}$ -citrate はまた炎症に集積する性質もあるが, 肺結核16例中11例, 肺化膿症14例中8例, Sarcoidosis 8例中6例に陽性像を得ている。肺癌, 後腹膜腫瘍の壊死巣には集積はなく腫瘍内血液が重要な役割を果すと考えられるので,  $^{67}\text{Ga}$ -citrate 静注肺癌症例の末梢血の血清を分離して Sephadex G-200 カラムにより検したが,  $^{67}\text{Ga}$  は分子量69,000以上の蛋白と結合する事が最も多かった。

### 2) 基礎的研究

○Hayes らは最近腫瘍 (RFT, P-1798, 7777, 7794A, 5123C) において, Vivo で投与した  $^{67}\text{Ga}$  が Lysosome に高い比活性を示すと報告した。

今回著者は Vivo における  $^{67}\text{Ga}$ -細胞顆粒結合法 (遠心法) にて Leighton の方法により分離した Lysosome に  $^{67}\text{Ga}$  が結合することを確認した。Lysosome に関して, 増殖度の高い肝癌7316A の比活性が増殖度の低い7794A の約2倍であった。

○Vitro における  $^{67}\text{Ga}$ -可溶性蛋白結合法 (ミリポアー法) が 105000×g 上清よりの  $^{67}\text{Ga}$  結合蛋白の精製及び生理的作用因子の検索に使用出来ることが明らかになった。

○<sup>67</sup>Ga-Cytosol 結合は正常、癌を問わず CyclicAMP によって競合的に解離した。

○<sup>67</sup>Ga-Cytosol 結合は CyclicAMP の含量が少ないといわれる増殖度の低い7794Aの方が7316Aよりも<sup>67</sup>Gaの結合が高かった。

○<sup>67</sup>Ga と結合する種々の蛋白の一つとして高い親和性を示す Cyclic AMP phosphodiesterase (以下 PDE と略す) をラット正常肝から高度精製に有用な hidroキシアパタイト吸着溶出法を活用して分離精製した。この PDE と <sup>67</sup>Ga の結合はトランスフェリンの70倍, Cyclic AMP 結合蛋白の240倍であった。

○PDE の阻害薬理物質として知られる Theophylline は <sup>67</sup>Ga-正常肝 Cytosol 結合と Cyclic AMP との効果を打消して促進した。PDE の生理的阻害作用の新しく知られた長鎖脂肪酸 Coenzyme A は PDE の Cofactor metal である Mg<sup>++</sup> と共存させると <sup>67</sup>Ga-肝癌精製 PDE 結合を著明に促進した。腫瘍にて生理的に <sup>67</sup>Ga-PDE 結合を高める物質を探究し、腫瘍診断の向上を図ることが今後の問題である。

本研究は悪性腫瘍親和性放射性同位元素についてその集積機序を解明し、さらにより一層有効な放射性同位元素探究の機構を究明せんとした基礎的、臨床的研究であるが、従来解明されなかった集積を明らかにし重要な知見を得たものであり、価値のある研究と認める。

よって本研究者は医学博士の学位を得る資格があると認める。