

^{67}Ga の腫瘍集積におよぼす Buffer および pH の影響

*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

村 中 明* 大 塚 信 昭**

森 田 陸 司** 西 下 創 一*

(昭和58年9月10日受理)

Effect of Buffers and pH on ^{67}Ga uptake by tumor cells

Akira MURANAKA*, Nobuaki OTSUKA**,
Rikushi MORITA**, Soichi NISHISHITA*

* Radiological Technology Course, Kawasaki College of Allied Health Professions,

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

Kurashiki 701-01, Japan

(Received on Sep. 10, 1983)

Key words : クエン酸 ^{67}Ga , 腫瘍集積機序, Buffer, pH

概 要

^{67}Ga の腫瘍集積に影響する因子として, ^{67}Ga -transferrin (Tf), ^{67}Ga complexの形成および培養細胞における ^{67}Ga uptake におよぼす Buffer および pH の変化の影響を検討した。MEM 中の Buffer を NaHCO_3 から HEPES に変えると ^{67}Ga と Tf の結合は約1/2に減少したが, HeLa S3 の ^{67}Ga uptake はさらに著明に減少し, Tf が MEM 中に存在しない場合と同程度になった。したがって, 陰イオン (HCO_3^-) の存在は ^{67}Ga と Tf の結合に必要であるのみならず, ^{67}Ga の腫瘍細胞への集積の過程にも影響しているものと考えられる。MEM の pH が低下すると, ^{67}Ga と Tf の結合は減少し ^{67}Ga complex の形成は増加する傾向を示した。また, ^{67}Ga complex の形成の増加に伴って ^{67}Ga uptake の増加も認められた。これらの結果から, pH が低下した腫瘍組織においては, ^{67}Ga -Tf としての集積よりも ^{67}Ga -Tf から解離した ^{67}Ga が何らかの complex の形で細胞へ集積するという機序の方が重要な役割を果たしていると推定される。

1 はじめに

クエン酸ガリウム (^{67}Ga) は腫瘍あるいは炎症部位の核医学的画像診断に繁用されてきているが、その集積機序は不明な点が多く、推定の域を脱していない。著者らはこれまで培養細胞を用いた *in vitro* の実験から、 ^{67}Ga の腫瘍細胞への集積には transferrin (Tf) および Tf receptor の関与した集積機序のみならず ^{67}Ga の種々の complex の関与した機序が存在する可能性があることを報告してきた¹⁾²⁾。

一方、腫瘍組織の間質液では正常組織と比較し pH が 0.2~0.4 低下しているのが知られている³⁾。鉄イオンと Tf の結合は低い pH の領域では不安定であり、また CO_3^{2-} や HCO_3^- などの陰イオンの存在がこの結合に必要である⁴⁾。したがって、pH の変化や Buffer の種類は ^{67}Ga の腫瘍集積にも影響をおよぼすものと推定される。この論文では、 ^{67}Ga と Tf の結合や ^{67}Ga complex の形成および培養細胞における ^{67}Ga の集積におよぼすこれらの因子の影響を検討し、Tf の関与した機序と complex の関与した機序のどちらが生体の腫瘍細胞への ^{67}Ga 集積に重要な役割を果たしているかを考察した。

2 材料および方法

実験に使用した腫瘍細胞は HeLa S3 で、通常 human apotransferrin (Tf) 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ あるいは FeCl_3 0.1 mM を含んだ minimum essential medium (MEM) 中に ^{67}Ga 1 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ を加え、投与後 24 時間で ^{67}Ga uptake を測定した。 ^{67}Ga uptake の実験方法の詳細は先の報告^{1,2)}と同様であるのでここでは省略する。

^{67}Ga と人血清, fetal calf serum (FCS), Tf との結合は、セルローズ膜を用いた平衡透析とポリアクリルアミドゲルを用いたディスク電気泳動によって測定した。ディスク電気泳動においては、control としてクエン酸第二鉄 (^{59}Fe) の結合の測定も行った。人血清, FCS を種の濃度を含んだ MEM に ^{67}Ga または ^{59}Fe 1 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ を加え 24 時間 incubate した。その後、その試料 0.1 ml を内径 5 mm のゲルカラム (疎孔ゲル: アクリルアミドゲル濃度 2.5%, 細孔ゲル: アクリルアミドゲル 7.5%) に加え、5 mA/本 (カラム) の定電流で約 50 分間泳動した。泳動後、ゲルをカラムから取り出してカッターで 5 mm の長さに細断し、 ^{67}Ga または ^{59}Fe の放射能分布を測定して蛋白泳動分画と比較した。平衡透析は先の報告¹⁾の方法にしたがって行ったので、ここでは省略する。

通常、5% CO_2 incubator 中で平衡状態になるように pH の Buffer として NaHCO_3 (1.2 g/l) を加えた MEM を使用している。本研究では、 NaHCO_3 の他に HEPES [N-(2-Hydroxyethyl) piperazine-N'-2-ethanesulfonic Acid] 10 mM を加え普通の空気の下でも実験を行った。培地の pH の調整においては、Buffer として HEPES のみを用い、0.1~0.3N NaOH により pH を 6.5 から 7.8 まで変化させた。

3 結 果

Table 1 に ^{67}Ga と人血清, FCS, Tf の結合を平衡透析によって検討した結果を示した。人血清, FCS とも培地中の濃度が大きくなるにつれて ^{67}Ga の結合も著明に増加した。一方, ^{67}Ga と Tf との結合も著明に認められ, ^{67}Ga は血清中の Tf 成分と主に結合しているものと考えられた。

Table 1. Binding of ^{67}Ga to various concentrations of sera and human transferrin measured by equilibrium dialysis

| Concentration of sera (%) | ^{67}Ga binding (%) | Concentration of transferrin ($\mu\text{g}/\text{ml}$) | ^{67}Ga binding (%) |
|---------------------------|------------------------------|--|------------------------------|
| MEM only | 0 | 10 | 1.3 |
| Human serum | 1 | 50 | 20.1 |
| | 10 | 100 | 45.5 |
| | 100 | 250 | 75.3 |
| FCS | 1 | 500 | 88.2 |
| | 10 | 750 | 92.5 |
| | 100 | 1000 | 94.3 |

Fig. 1 に ^{67}Ga , ^{59}Fe と人血清との結合をディスク電気泳動により検討した結果を示した。(A) の人血清10%における ^{67}Ga と Tf 分画との結合は2～3%であり, (B) の ^{59}Fe の場合の値(80～90%), 平衡透析の結果と比較すると著明に少なかった。しかし, 血清中の他の分画との結合は認められず, 残りは free ^{67}Ga であった。

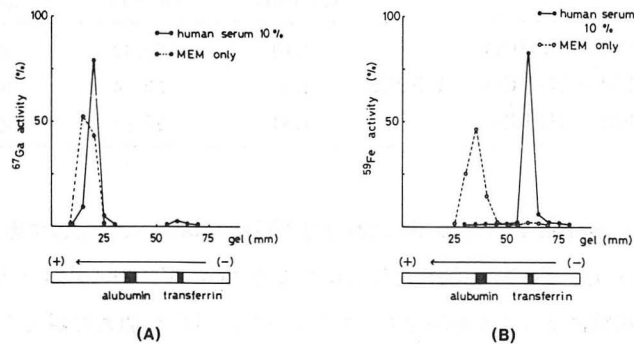


Fig. 1 Distribution of ^{67}Ga (A) and ^{59}Fe (B) in acrylamide gel.

Table 2 にディスク電気泳動で測定した ^{67}Ga , ^{59}Fe と Tf 分画の結合のまとめを示した。いずれの場合も ^{67}Ga の Tf 分画に対する結合は ^{59}Fe より少なく, FeCl_3 の投与により ^{67}Ga , ^{59}Fe の Tf 分画への結合は減少した。これらの結果は Tf に対する ^{67}Ga の親和性は ^{59}Fe よりも小さく, また電気泳動では分析の過程で Tf から ^{67}Ga が分離してしまうものと考えられ,

以下の Tf と ^{67}Ga の結合の測定には平衡透析を用いた。

Table 2. Binding of ^{67}Ga and ^{59}Fe to transferrin measured by disc electrophoresis

| | ^{67}Ga binding (%) | | ^{59}Fe binding (%) | |
|--------------------------------|------------------------------|----------------------|------------------------------|----------------------|
| | free | transferrin fraction | free | transferrin fraction |
| MEM only | 95.3 | 0.8 | 84.0 | 4.7 |
| Human serum 1% | 94.0 | 1.0 | 70.7 | 19.5 |
| 10% | 91.5 | 2.7 | 4.2 | 85.9 |
| FCS 10% | 85.4 | 2.6 | 21.1 | 67.3 |
| Human serum 1% | | | | |
| + FeCl_3 10^{-2} mM | 93.8 | 0.6 | 75.4 | 14.6 |
| Human serum 1% | | | | |
| + FeCl_3 10^{-1} mM | 94.5 | 0.6 | 82.5 | 5.2 |

Table 3 に MEM 中の Buffer の ^{67}Ga と Tf の結合および ^{67}Ga -Fe complex の形成におよぼす影響を平衡透析によって検討した結果を示した。 ^{67}Ga -Fe complex の形成は Buffer を NaHCO_3 から HEPES に変えても大差が認められなかったが、 ^{67}Ga と Tf の結合は HEPES のみでは NaHCO_3 が存在する場合と比較すると約 1/2 に減少した。

Table 3. Effect of buffers on formation of ^{67}Ga -Fe complex and ^{67}Ga -transferrin (Tf)

| | ^{67}Ga bound (%) | | |
|--------------------------------|----------------------------|----------------------|------------------------------------|
| | ^{67}Ga only | ^{67}Ga +Tf | ^{67}Ga + FeCl_3 |
| MEM + NaHCO_3 | 1.14 | 52.33 | 35.44 |
| MEM + NaHCO_3 + HEPES | 1.09 | 62.04 | 30.95 |
| MEM + HEPES | 1.31 | 27.94 | 42.98 |

同様に、Buffer の HeLa S3 における ^{67}Ga uptake におよぼす影響を検討した結果を Table 4 に示した。 FeCl_3 を加えた場合における ^{67}Ga -Fe complex としての ^{67}Ga uptake は Buffer の種類によって大差が認められなかった。Tf を加えた場合の ^{67}Ga uptake は、

Table 4. Effect of buffers on ^{67}Ga uptake by HeLa S3

| | ^{67}Ga uptake (% dose/ 10^6 cells) | | |
|--------------------------------|--|-----------------------|------------------------------------|
| | ^{67}Ga only | ^{67}Ga + Tf | ^{67}Ga + FeCl_3 |
| MEM + NaHCO_3 | 1.50 | 11.68 | 19.91 |
| MEM + NaHCO_3 + HEPES | 1.06 | 9.69 | 14.81 |
| MEM + HEPES | 2.21 | 1.18 | 18.60 |

Buffer を HEPES のみにすると、平衡透析で ^{67}Ga と Tf の結合が約 30 % 程度認められたにもかかわらず、Tf が存在しない場合 (^{67}Ga only) と同程度にまで減少した。

Fig. 2 に Buffer に HEPES を使用し、 ^{67}Ga -Tf と ^{67}Ga -Fe complex の形成 (A) および HeLa S3 の ^{67}Ga uptake (B) におよぼす pH の影響を検討した結果を示した。Fig. 2-(A) の平衡透析の結果においては、点線は ^{67}Ga -Tf および ^{67}Ga -Fe complex 形成の割合から ^{67}Ga only の場合の透析バッグ中に残った ^{67}Ga の割合を差し引いた値を示している。pH が低下すると ^{67}Ga -Fe complex の形成は増加する傾向を示し、 ^{67}Ga と Tf の結合は逆に減少する傾向が認められた。また、 ^{67}Ga only の場合でも低い pH では透析バッグを透過しない ^{67}Ga の割合が増加した。同様な条件で ^{67}Ga uptake を検討すると (Fig. 2-B), FeCl_3 を MEM 中に加えた場合では、pH が低下すると ^{67}Ga uptake は増加し ^{67}Ga -Fe complex の形成の増加と一致した。また、MEM only の場合も pH の低下により ^{67}Ga uptake の増加が認められた。Tf を MEM 中に加えた場合には、平衡透析により 10~20 % 程度の ^{67}Ga と Tf の結合が認められたにもかかわらず、 ^{67}Ga uptake は MEM only とほぼ同程度であった。

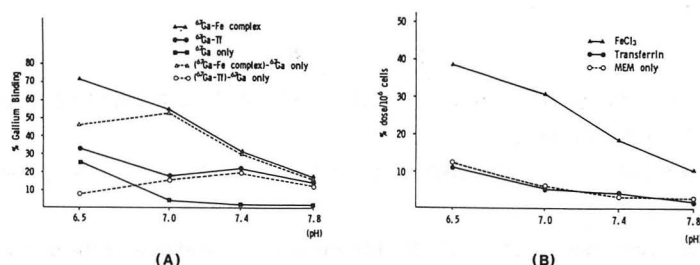


Fig. 2 Effect of pH on formation of ^{67}Ga -Fe complex and ^{67}Ga -transferrin (A) and ^{67}Ga uptake by HeLa S3 (B).

4 考 察

1974年に Glickson ら⁵⁾は、L1210 細胞における ^{67}Ga 集積におよぼす Buffer や pH の影響を検討し、各種 Buffer の ^{67}Ga 集積の抑制作用と pH に依存した ^{67}Ga 集積を報告した。しかし、この時点では Tf の関与した ^{67}Ga の集積機序は報告されておらず、 ^{67}Ga と Tf の結合と Buffer や pH の関係は明らかにされていない。1982年 Vallabhajosula ら⁶⁾は in vitro および in vivo における ^{67}Ga の腫瘍集積におよぼす pH の影響を検討し、 ^{67}Ga -Tf complex の安定性は pH に依存しており、腫瘍部の pH の低下により解離した ^{67}Ga が、その化学形は不明であるが、腫瘍集積の一因として重要な役割を果たしていることを報告している。

本研究における Buffer の影響の検討では、MEM 中の NaHCO_3 を HEPES に変えると鉄イオンの場合と同様に ^{67}Ga と Tf の結合は減少した。しかし、平衡透析では ^{67}Ga と Tf の結合が 10~30 % 残っているにもかかわらず、HeLa S3 の ^{67}Ga uptake は Tf が存在しない場

合と同程度にまで減少した。この結果は NaHCO_3 が単に ^{67}Ga -Tf の結合に必要なものであるのみならず、 ^{67}Ga が腫瘍細胞へ摂取される過程にも影響している可能性を示すものとして注目される。

pH の影響の検討では、Vallabhajosula の結果⁶⁾と同様に pH の低下により ^{67}Ga と Tf の結合は減少する傾向を示した。さらに、pH の低下により ^{67}Ga -Fe complex の形成および MEM only 中においても透析膜を通過しない ^{67}Ga が増加し、それに伴って HeLa S3 の ^{67}Ga uptake も増加した。クエン酸 ^{67}Ga は pH の低下により、クエン酸と ^{67}Ga の polymer を形成することが知られており⁷⁾、MEM only 中の透析されない ^{67}Ga の増加はこの polymer の形成によるものと考えられる。したがって、これらの結果から腫瘍組織周辺で解離した ^{67}Ga は何らかの complex (polymer も含む) の形で腫瘍細胞へ集積しているものと推定される。 ^{67}Ga complex がどのような機序で腫瘍細胞へ摂取されるのか、また実際に生体の腫瘍組織周辺でどの程度の complex が形成されるのか等今後検討を要する問題が多く残されている。しかし、pH が低いという条件のもとでは、Tf の関与した集積機序よりも ^{67}Ga complex の関与した機序の方が ^{67}Ga の腫瘍集積に重要な役割を果たしているものと考えられる。

文 献

- 1) 西下創一, 村中 明, 他: In vitro における HeLa S3 への ^{67}Ga 集積に対する FeCl_3 の役割. 川崎医学会誌 8: 309-315 (1982)
- 2) 村中 明, 伊藤安彦: ^{67}Ga の腫瘍集積におよぼす FeCl_3 , ScCl_3 , Stable Ga の影響の比較. 川崎医療短期大紀要 2: 51-58 (1982)
- 3) Gullino, P. M., Grantham, F. H., et al: Modifications of the acid-base status of the internal milieu of tumors. J. Natl. Cancer Inst. 34: 857 ~ 869 (1965)
- 4) Schlabach, M. R. and Bates, G. W.: The synergistic binding of anions and Fe^{3+} by transferrin. Implications for the interlocking sites hypothesis. J. Biol. Chem. 250: 2182-2188 (1975)
- 5) Glickson, J. D., Webb, J. et al: Effects of buffers and pH on invitro binding of ^{67}Ga by L1210 leukemic cells, Cancer Research 34: 2957-2960 (1974)
- 6) Vallabhajosula, S. R., Harwing J. F., et al: Effect of pH on tumor cell uptake of radiogallium in vitro and in vivo. Eur. J. Nucl. Med. 7: 462-468 (1982)
- 7) Glickson, J. D., Pitner, T. P., et al: Hydrogen-1 and gallium-71 nuclear magnetic resonance study of gallium citrate in aqueous solution. J. Am. Chem. Soc. 97: 1679-1683 (1975)