

《原 著》

がん親和性核種の細胞内動態

I. ゴーナルロータによる連続超遠心分画法

鮫島 和夫* 佐々木有美子* 山口 敦美* 折井 弘武*

はじめに

^{67}Ga , ^{111}In , $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 特定標識化合物等の核種は、その腫瘍親和性のため、大いに利用されている。

それら放射性核種の正常組織、炎症組織、腫瘍組織内における時間的分布、集積機構、各核種間相違については、まだ解明の余地がある。これらを解明するには、各組織の細胞内における正確な分布を調べる必要がある。

現在、そのための遠心分画に水平ロータが使われているが、それに比べゾーナルロータは“Wall effect”が無く試料の乱れが少ないこと、容量が大きく、しかも純度が高いこと、試料の注入抽出が連続的に行なえて試料の損失が少ない等の特長がある。

われわれはゾーナルロータを用い、従来の S 値による分画 (rate-zonal-centrifugation) に、密度による分画 (isopycnic-zonal-centrifugation) を加えて、核、ミトコンドリア、ペルオキシゾーム、ライソゾーム、上清を分離したので報告する。

材料および方法

(i) 肝ホモジェネートの調製

Wister albino rats (80~150g ㊦) を使用した。エーテル麻酔後、門脈より肝臓を 5°C に冷却した

* 東京都臨床医学総合研究所 放射線医学部

受付：52年1月27日

最終稿受付：52年2月18日

別刷請求先：東京都文京区本駒込 3-18-22 (〒113)

東京都臨床医学総合研究所 放射線医学部

折井 弘武

0.25M ショ糖溶液 (10 mM tris buffer pH 7.2 で調製、5 mM Mg Cl_2 を含む) で充分洗滌し、ただちに摘出する。ハサミで細かく切断し、一定量、4~5g 秤量する。これに5倍量の冷却した前記の緩衝液を加え、Dounce 型ホモゲナイザーで2、3回押しつぶした後、Potter-Elvehjem 型のホモゲナイザーで 10°C に保ちつつ 1,000 rpm で上下10回ホモゲナイズ後、二重のガーゼで濾過した。全細胞中の95%以上の核が細胞質と分離していることをギムザ氏液による染色後、光学顕微鏡で確認した。

(ii) 超遠心分画法

遠心機は日立 65 P-7 (zonal speed, zonal switch 付)、ロータは日立 RPZ-48 T を使用した。ショ糖による密度勾配は、ロータを 3,000 rpm に回転しながら、東京理化マイクロチューブポンプ MP-4001 を使用して作成した。種々の濃度のショ糖溶液はすべて 10 mM Tris buffer (pH 7.2) を用いて調製した。始めに 25~35 W/W% の直線勾配を 490 ml/edge 側から入れ、次に 50 W/W% を 170 ml 入れた。前記のサンプル (10~20 ml)、次に overlay として、0.25M ショ糖 (50~60 ml) を center 側から入れる。

edge-unloading する場合には center-unloading より強い圧力が生ずる。このため、あらかじめ edge 側に圧力計を付け注水する水にアミノシュバルツで着色して cross-leaking する圧力を調べた。通常 0.8 kg/cm^2 なので安全を見込んで 0.5 kg/cm^2 以下で行なった。edge 側より出てくるサンプル

の検出には、LKB-8300-UVICORD II を使用、280 m μ で測定し、LKB-recorder Type 6520-4 で記録した。フラクションは、LKB-fraction-collector-7000-ULTRORAC で 10 ml ずつ分取した。実験はすべて 5°C で行なった。

実験に先立ち、ミトコンドリアと lysosome については $\omega^2 t$ とロータ半径 r について、Martin の文献 (1) を参考にして計算した。(Fig. 1)

方法 (1)

3,000 rpm で 3.26×10^8 の $\omega^2 t$ を加えた後、center 側より 0°C に冷却した水 (日立 buffer tank を使用して脈流を除いた) を注入し、核、cell debris を分離した。

方法 (2)

核および cell debris を除却後 edge 側より 40% ショ糖溶液 100 ml, 45% を 100 ml 注入し、さらに 10,000 rpm で 2.32×10^9 の $\omega^2 t$ を加えた後、3,000 rpm にして同様に edge-unloading した。

方法 (3)

Isopyknic-Zonal Centrifugation

Edge 側より 50% ショ糖溶液 70 ml, 45% を、70 ml, 40% を 70 ml 注入し、さらに 40,000 rpm で 6.93×10^{10} の $\omega^2 t$ を加えた後、3,000 rpm にして同様に edge-unloading した。

(iii) 酵素活性の測定

(1) カタラーゼ

カタラーゼ (E. C. 1. II. 1. 6) は Beers & Sizer の方法³⁾を若干変更した。分光光度計は島津 UV-150, じょうご型フローセルを使用した。基質として 50 mM phosphate buffer (pH 7.0) に、H₂O₂ (濃度 30% 三菱瓦斯化学)を加えて、240 m μ における吸光度を 1.8 付近にした。これに 5% sodium-deoxycholate 0.1 ml, 分画したサンプル 50 μ l ~ 200 μ l を加え Thermonics (TM-103, No. 760595, Tokyo サーモニクス株式会社) で攪拌後フローセルに注入し、240 m μ における H₂O₂ の吸光度の減少を測定した。レコーダは、O. D. 2 のフルスケールにし、チャートスピードは 4 cm/min とした。

(2) Acid phosphatase

acid pyosphatase (E. C. 3. 1. 3. 2) は、Trouet の方法³⁾を若干変更した。

0.5M β -glycerophosphate 0.2 ml, 1M acetate buffer pH 5.0, 2% (W/V) Triton X-100 0.1 ml, 水 0.6 ml を含む試験管に、分画したサンプル 1 ml を加え、37°C 数時間インキュベートする。インキュベート後、trichloro acetic acid 8% (W/V) 5 ml を加え、3,000 rpm 10分遠心して変性した蛋白質を除く。この上清 1 ml を別の試験管に取り、1 ml の 2.5% (W/V) ammonium molybdate in 5N H₂SO₄, 0.2 ml の 10 mM aminonaphtholsulfonic acid in 1.5M NaHSO₃ and 10 mM Na₂SO₃, 2.8 ml の水を加え、10 分間放置後 660 nm で測定する。標準曲線は KH₂PO₄ を使用して書き、タンパク質の影響については、6 mg/ml のリゾチムを加えて同様に標準曲線を作り補正した。

また、別法として *p*-ニトロフェニルリン酸を基質として測定する場合には、1 ml の 50 mM citrate buffer (pH 4.8); 5.5 mM *p*-nitrophenol phosphate, sodium salt, 0.2 ml のサンプルおよび 0.1 ml のトリトン X-100 を 37°C で 30 分間インキュベートし、の 10 ml の 0.02 N NaOH 溶液を加え、410 nm で測定した。

(3) チトクローム C オキシターゼ

チトクローム C オキシターゼ (E. C. 1. 9. 3. 1) は、Cooperstein らの方法⁴⁾を若干変更した。すなわちチトクローム C を還元するために用いた Na₂S₂O₄ (Merck sodium dithionite の過剰の分を Dowex-1-X8, 酢酸型, 100~200 メッシュのカラムを通して吸着させて用いた。試験管に上記のように還元したチトクローム C (0.25 mg/ml in 0.1M phosphate buffer pH 7.0) 2 ml を採り、これに分画したサンプルを 100 μ l 加え、Thermonics で攪拌後フローセルに注入し、550 nm における吸光度の減少を測定する。レコーダは、O. D. 1 のフルスケールにし、チャートスピードは 4 cm/min とした。

(4) NAD diaphorase

NAD diaphorase (E. C. 1. 6. 4. 3) は Edelhoch & Mahler の方法^{5), 6)}を若干変更した。すなわち

試験管に 6 mM NADH₂ (シグマ C7010 P-L Biochemicals. Inc.) 0.1 ml, 1.2 mM 2, 6-sodium dichlorophenolindophenol 0.1 ml, 0.2 M Tris buffer pH 7.5 0.3 ml, 水 2.4 ml, Tween-20 5 mg/ml 0.1 ml および分画したサンプル 0.1 ml を加え Thermonics で攪拌後フローセルに注入し, 660 nm における吸収の減少を測定した. レコーダは O. D. 1 のフルスケールにし, チャートスピードは 4 cm/min とした.

(iv) タンパク質の定量

タンパク質は Lowry の方法⁷⁾ を若干変更して測定した. 0.01% (W/V) CuSO₄ と 0.02% (W/V) Na-K tartrate を 1:1 に混合したものと, 0.02% Na₂SO₃ in 0.1 N NaOH を 1:50 に混合し, その試薬 2.5 ml 中にサンプル 0.2 ml を入れ, 10 分間放置後 0.25 ml の Folin フェノール試薬 (2 倍稀釈液) を入れ攪拌し, 20 分間放置後 660 nm の吸光度を測定した. 標準曲線はアルブミン (40 ~ 200 μg/ml) を用いて作成した.

(v) 精度の測定

糖度は, Atago hand refractometer Type N-1, N-2 を使用して測定した.

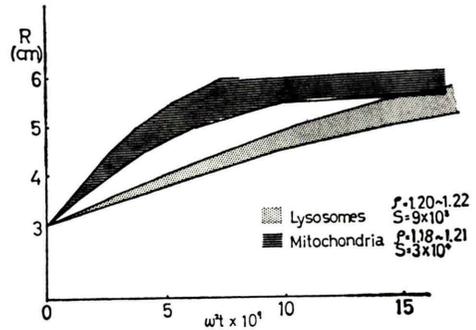


Fig. 1 Graphic simulation of centrifugal equation. Equation of R.G. Martin (1) was used.

$$W^2 S_{20,w} dt = A \cdot \frac{\eta_{T,m}}{(\rho_P - \rho_{T,m})} \cdot \frac{1}{x} dx$$

$$A = (\rho_P - \rho_{20,w}) / \eta_{20,w}$$

$$\int_0^t S_{20,w} \omega^2 dt = S_{20,w} \omega^2 t$$

$$\int_0^{x^{i+1}} F(x) dx = \sum_0^{x^{i+1}} F(x_i)(x_i + 1 - x_i)$$

$$+ \frac{1}{2} \sum_0^{x^{i+1}} [F(x_i + 1) - F(x_i)][x_i + 1 - x_i]$$

$\eta_{T,m}$; viscosity of medium m at $T^\circ\text{C}$
 $\eta_{20,w}$; viscosity of water at 20°C
 ρ_P ; density of protein
 $\rho_{T,m}$; density of medium m at $T^\circ\text{C}$
 $\rho_{20,w}$; density of water at $T^\circ\text{C}$

Zones indicate the calculated value under 490 ml of 25-35% (w/w) sucrose gradient, 50% (w/w) sucrose cushion 170 ml, sample 10 ml, overlay 60 ml, at 5°C .

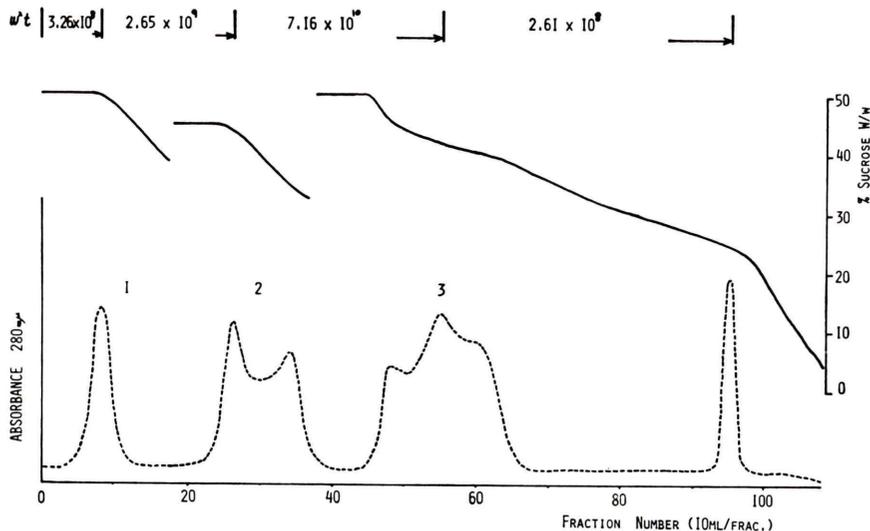


Fig. 2 Fractionation of normal liver from Wistar albino rats by zonal centrifugation. (-----) Effluents were monitored at 280 nm using a LKB-UV recorder. (—) Indicated the concentration of sucrose. (→) Indicated the accumulated centrifugal integral Effluents were fractionated 10 ml each.

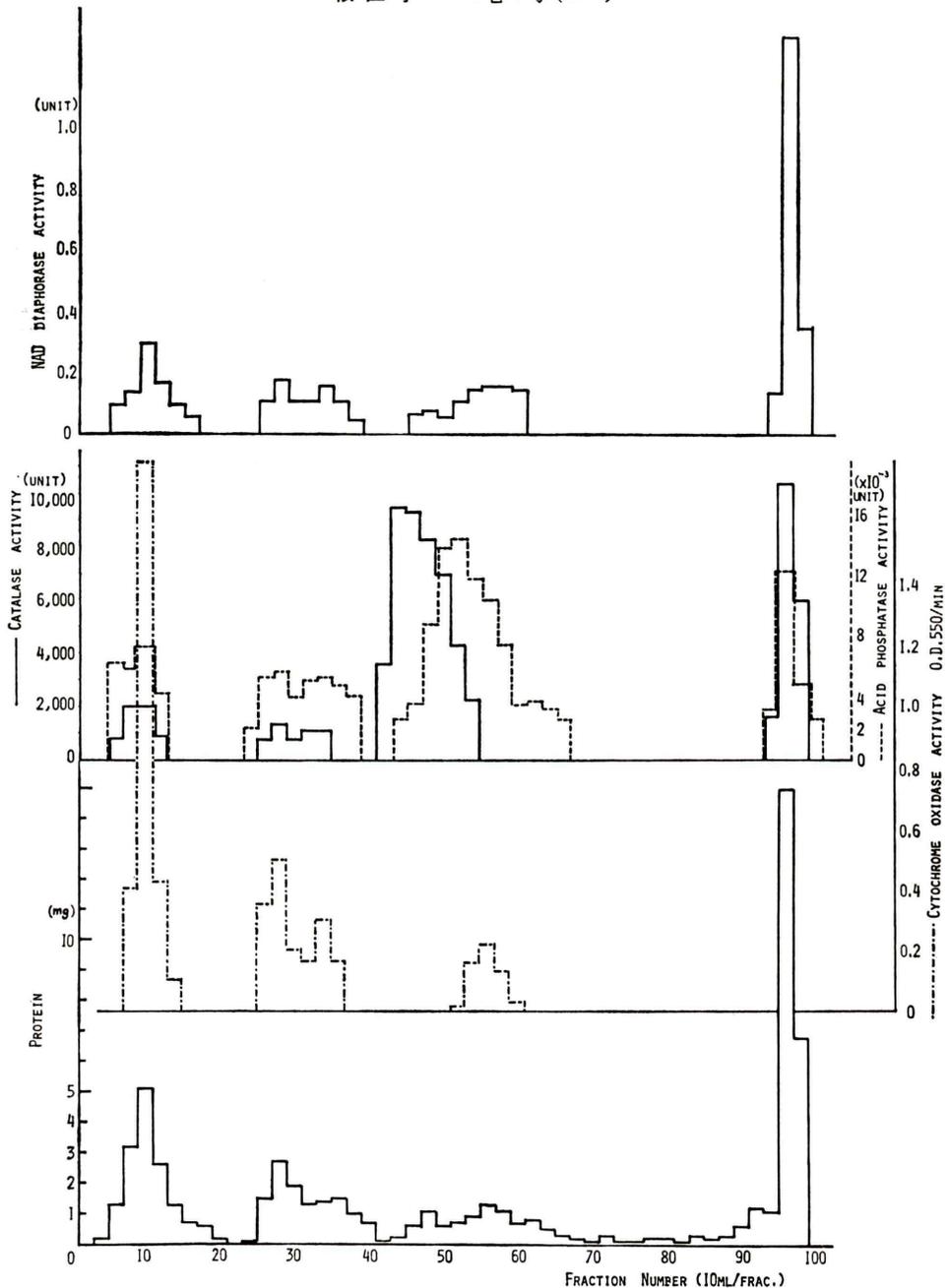


Fig. 3 Enzymatic pattern of subcellular particles of homogenate of Wistar albino rats liver fractionated by rate-isopyknic zonal centrifugation.

NAD diaphorase, marker enzyme of microsomes, one unit equals a decrease of absorbancy of 1.0 per minute under the specified conditions at 25°C.

Acid phosphatase, marker enzyme of lysosomes, one unit is equivalent to one micromole of phosphate hydrolyzed per minute under the specified conditions at 37°C.

Catalase, marker enzyme of peroxisomes, one unit is equivalent to one micromole of hydrogen peroxide decomposed per minute under specified conditions at 25°C.

Cytochrome c oxidase, marker enzyme of mitochondria, the activity is expressed as a decrease of absorbancy at 550 nm per minute under specified conditions at 25°C.

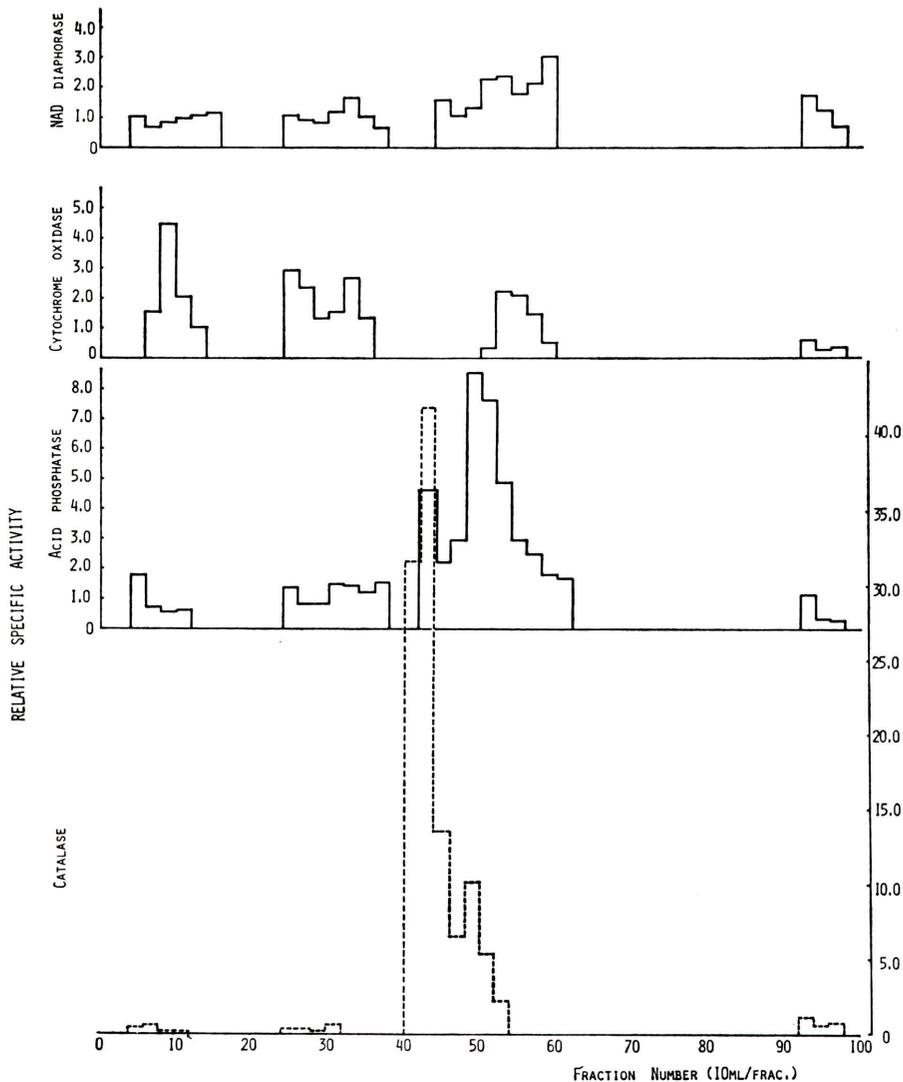


Fig. 4. The specific activities (enzyme activity per mg protein in each fraction) of NAD diaphorase, cytochrome c oxidase, acid phosphatase and catalase.

結 果

ミトコンドリアとライソゾームについて、ゾーナルロータ内における在在所と ω^2t の関係を計算した結果を Fig. 1 に示す。

LKB-UV monitor で記録した 280nm における流出パターンおよび sucrose の濃度、 ω^2t の値を Fig. 2 に示す。流出した順序に従って最初の 3 つ

のピークをそれぞれ分画 1, 分画 2, および分画 3 とする。

各フラクションのタンパク質量および酵素活性を Fig. 3 に、比活性を Fig. 4 に示す。

ミトコンドリアのマーカ酵素であるチトクローム C オキシダーゼは、分画 1 ($3.26 \times 10^8 \omega^2t$, $\rho > 1.23$), 分画 2 ($2.65 \times 10^9 \omega^2t$, $\rho = 1.19$, $\rho = 1.17$) および分画 3 ($7.16 \times 10^{10} \omega^2t$, $\rho = 1.18$) に見られ

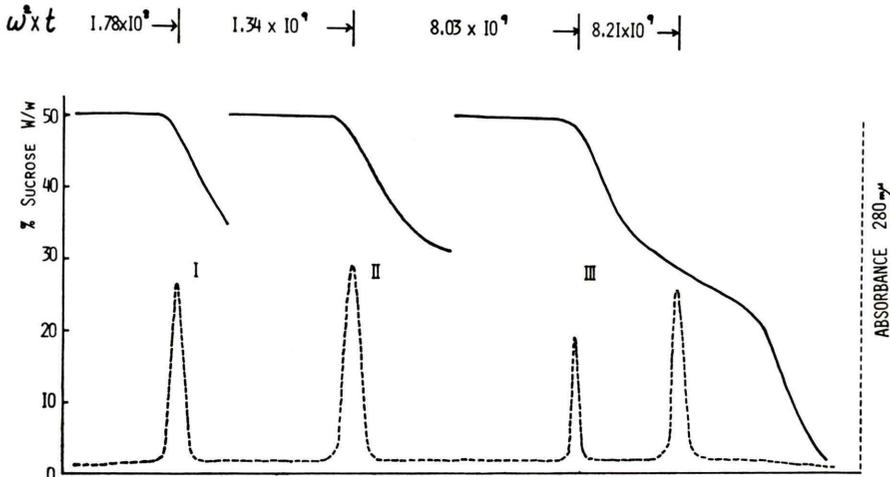


Fig. 5 Centrifugal pattern by procedure (A)

The difference between procedure (A) and our new one is in $\omega^2 t$ and concentration of sucrose cushion.

(-----) Effluents were monitored at 280 nm using a LKB-UV recorder.

(—) Indicated the concentration of sucrose.

(—) Indicated the accumulated centrifugal integral.

た。別法として、核を除いた後50%のショ糖溶液のクッション 100 ml を edge 側より加え、 $1.34 \times 10^9 \omega^2 t$ とした場合、今回のようにミトコンドリアが分画 2 において 2 つのピークにならなかった。分画 3 に見られるミトコンドリアについては、方法 (A) (Fig. 5), すなわち rate-zonal-centrifugation だけでは次のペルオキシゾーム、ライソゾーム分画に入りこんでしまい分離することは、困難であった。チトクローム C オキシダーゼの分布は、54.9% (フラクション 0~20), 24.4% (同 22~32), 9.3% (同 34~40), 11.3% (同 52~62) であった。

ライソゾームのマーカ酵素である Acid phosphatase は分画 3 ($7.6 \times 10^{10} \omega^2 t$, $\rho=1.21$) に高い比活性を示した。分画 2 ($2.65 \times 10^9 \omega^2 t$) に入りこんだ活性は、基質が sodium- β -glycerophosphate の場合、16.4% (フラクション 22~32), 5.3% (同 34~40) で、基質を P-nitrophenyl phosphate にした場合、14.3% (同 22~32), 4.0% (同 34~40) であった。

ペルオキシゾームのマーカ酵素であるカタラーゼについては、今回分画 3 ($7.16 \times 10^{10} \omega^2 t$, ρ

$=1.24$) に分離されたが、方法 (A) では分離することが困難であった。今回は、Isopycnic-zonal-centrifugation を取入れることにより分離することができた。

マイクロゾームのマーカ酵素である NAD diaphorase については、上清に 40.9% と多いが比活性は 0.95 と低く、その他 19.3% (フラクション 0~20), 11.3% (同 22~32), 7.2% (同 34~40), 21.4% (同 42~62) と分布していた。

それぞれの酵素の Total recovery はカタラーゼ 90%, Lowry 法によるタンパク質 101%, チトクローム C オキシダーゼ 87%, NAD diaphorase 71%, Acid phosphatase (sodium- β -glycerophosphate を基質とした場合) 90% であった。

考 案

Zonal-Rotor を使用した遠心分離法は、Anderson ら⁸⁾ が指摘するとおり多くの利点がある。loading-unloading を center, edge より自由に行なえるため、subcellular fraction の S, ρ の違いによりそれらを有効に分画できる。

従来の遠心分離法 differential pelleting では、一部の subcellular fraction の粘性などにより、異種の細胞内粒子がともに沈殿しやすいこと、“wall effect”があり、試料が乱れやすいこと等が考えられる。zonal-centrifugation をする前にサンプルを differential pelleting することは以上のような危険性をはらんでいる。実際、Brown らは differential pelleting-zonal centrifugation を組合せた方法⁹⁾によって、Gallium-binding granules の一部がすでに differential pelleting で失われることを報告している¹⁰⁾。

今回、われわれは Brown の方法⁹⁾ よりもさらに進んで、nuclear cell debris を含むラット肝ホモジェネート全体を rate-isopycnic zonal centrifugation を用いて、ゾナルロータ中において一貫して分画を行なった。

各分画、とりわけライソゾーム分画について β -glycerophosphate を基質として Acid phosphatase の活性を見た場合、ホモジェネートについては 0.028 unit/mg protein で Igarashi¹¹⁾ の値とよく一致し、ピークにおいては 0.238 unit/mg protein, 比活性8.5であった。比活性8.5については Brown ら¹²⁾ の値と一致するが、殺す 3, 5 日前に Triton WR-1339 を注射する Leighton ら¹³⁾ の方法で得られる比活性と比較すると低い。Triton WR-1339 で捕食したライソゾームについては、元来のライソゾームではなく、機能的変化も考えられるので、より自然な状態のライソゾームの機能を観察するためには、比活性だけにこだわることは重要でないと思われる。

ペルオキシゾームのマーカー酵素であるカタラーゼについては Brown らの方法^{9), 10)} では、完全にライソゾーム分画と重なっている。われわれの方法 (A) でも同様に分離不可能であったが、今回 rate-isopycnic zonal centrifugation を取入れることにより、分離可能となった。比活性は、Leighton らの方法で得られるものと同じく高い値を示した。上清のタンパク質について細分画は、目下研究

中である。また、⁶⁷Ga等アイソトープ投与後の細胞内動態については目下研究中であり、近く発表の予定である。

文 献

- 1) Martin RG and Ames BN: A method for Determining the Sedimentation Behavior of Enzymes. Application to Protein Mixtures. *J Biol. Chem* **236**: 1372-1379, 1961
- 2) Berris RF Jr and Sizer IW: A Spectrophotometric Method for Measuring the Breakdown of Hydrogen Peroxide by Catalase. *J Biol Chem* **195**: 133, 1952
- 3) Trauet A: Method in ENZYMOLOGY **31**: 329,, 1974
- 4) Cooperstein SJ and Lazorow A: A Microspectrophotometric Method for the Determination of Cytochrome Oxidase. *J Biol. Chem*, **189**: 665, 1951
- 5) Edelhofer H, Hayashi O and Teply LJ: The Preparation and Properties of a Soluble Diphosphopyridine Nucleotide Cytochrome c Reductase. *J Biol Chem*, **197**: 97-104, 1952
- 6) Mahler HR, Sarkar NK, Vernon LP et al: Studies on Diphosphopyridine Nucleotide-Cytochrome c Reductase II. Purification and Properties. *J Biol Chem*, **199**: 585-597, 1952
- 7) Lowry OH et al: *J Biol Chem*: 193, 265, 1951
- 8) Anderson NG, Ronkin CT, Brown DH, et al: Analytical Techniques for Cell Fractions XV. Totor B-XXIX-A New High-Resolution Zonal Centrifuge Rotor for Virus Isolation and Cell fractionation. *Anal Biochem*, **31**: 271, 1969
- 9) Brown DH, Carlton E, Byrd B, et al.: A Rate-Zonal Centrifugation Procedure for Screening Particle Populations by Sequential Product Recovery Utilizing Edge-Unloading Zonal Rotors. *Arch Biochem Biophys*, **155**: 9-8, 1973
- 10) Brown DH, Swartzendruber DC, Byrd BL et al: A Quantitative Study of the Subcellular Localization of ⁶⁷Ga. *Cancer Research*, **36**: 956-963, 1976
- 11) Igarashi M and Hollander VP: Acid Phosphatase from Rat Liver. Purification, Crystallization and Properties. *J Biol. Chem*, **243**: 6084-6089, 1968
- 12) Brown DH, Swartzendruber DC, Bryd BL, et al: The Isolation and Characterization of Gallium-Binding Granules from Soft Tissue Tumors. *Cancer Research*, **33**: 2063-2067, 1973
- 13) Leighton F, Poole B, Beaufay H, et al: *J Cell Biol*, **37**: 482, 1968

Summary

Intracellular Dynamic State of Tumor-philic Radionuclides.

I. Continuous Cell Fractionation with Rate-isopycnic Zonal Centrifugation.

Kazuo SAMEZIMA, Yumiko SASAKI, Atsumi YAMAGUCHI,
and Hirotake ORII

Department of Radiology, Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science

In an attempt to improve the drawbacks of conventional cell-fractionation method with differential pelleting, we carried out rate-isopycnic zonal centrifugation to fractionate the subcellular particles of rat liver, in Anderson type zonal rotor with sucrose density gradient. The result indicated the better separation of lysosomes from peroxisomes, as well as cell nuclei, mitochondria and cell super-

natent.

Our method yielded fractions including all subcellular components, especially cell nuclei, which were discarded by Anderson's method.

The result indicates the possibility of precise measurement of intracellular dynamics of various radionuclide with tumor affinity.