

《短 報》

放射性ヨード標識 Peanut Agglutinin (PNA) の腫瘍親和性の研究: (第二報) In Vitro 培養腫瘍細胞への結合性の検討

川畑 鈴佳* 横山 邦彦* 渡辺 直人* 向 加津子*
 山田 典央* 小泉 潔* 油野 民雄* 利波 紀久*
 久田 欣一* 鶴野 弘明** 越村 三郎***

I. 緒 言

植物性赤血球凝集素は、現在一般にレクチンと総称されている。レクチンの一種であるピーナツ・レクチン (Peanut Agglutinin, PNA) は、癌糖鎖抗原である Thomsen-Friedenreich (T) 抗原¹⁾ の抗原決定基の β -D-galactosyl (1→3) α -N-acetyl-D-galactosamine のガラクトース部分にきわめて強い親和性をもつ²⁾ため、腫瘍診断薬としての応用が期待できる³⁾。

第一報で筆者らは、PNA のヨード標識方法と生物学的活性について報告した⁴⁾。今回、前回報告した方法に従って ^{125}I 標識した PNA の in vitro での種々の培養腫瘍細胞への結合性を、既存の腫瘍診断薬である ^{67}Ga -クエン酸ガリウム、 ^{201}Tl -塩化タリウムの結合性と比較し、検討したので報告する。

II. 材料と方法

1) PNA の RI 標識と放射性医薬品

PNA (EY ラボラトリーズ社または豊年油社製) は、先に報告した方法⁴⁾に従い、 ^{125}I 標識し、精製して実験に用いた。標識・精製後の比放射能は

0.35~1.5 mCi/mg PNA であり、放射化学的純度は 97% 以上であった。 ^{67}Ga -クエン酸ガリウムと ^{201}Tl -塩化タリウムは、それぞれの注射液 (1 mCi/ml) を使用した。

2) 腫瘍細胞モデル

用いた腫瘍細胞モデルは、吉田肉腫細胞、Ehrlich 腹水癌細胞、肝癌 AH109A 細胞、Lewis 肺癌細胞の 4 種類の実験腫瘍細胞と、ヒト甲状腺乳頭腺癌細胞の計 5 種類である。ヒト甲状腺乳頭腺癌細胞は、甲状腺乳頭腺癌患者の手術材料より確立した培養細胞株である。

3) 方 法

25 cm^2 の培養フラスコ中に約 1×10^6 個の各腫瘍細胞を Eagle の必須培地 (MEM) 5 ml に浮遊させた。これに Dulbecco リン酸緩衝液 (pH 7.4) で希釈した一定量 (100 μl) の ^{125}I -PNA 20 μg (7~30 μCi)、 ^{67}Ga (50 μCi)、 ^{201}Tl (50 μCi) をそれぞれ加え、37°C で一定時間、無菌的にインキュベートした。その後、細胞を試験管に移し、1,000 回転 10 分間遠心分離し、Dulbecco リン酸緩衝液で 3 回洗浄し、トリパンブルー染色による生細胞数の算定と、ウェルタイプ・シンチレーションカウンタによる放射能測定により、生細胞 10^6 個あたりの、全投与量に対する各 RI の結合率を求めた。

4) インキュベーション時間による ^{125}I -PNA の腫瘍細胞結合率の変化

Ehrlich 腹水癌細胞を用いて ^{125}I -PNA 添加後、37°C 下において 10 分、40 分、1, 1.5, 2, 3.3, 4, 6, 9, 12 および 26 時間の各時間のインキュベートによる ^{125}I -PNA の腫瘍細胞結合率を算定した。

* 金沢大学医学部核医学科

** 日本メジフィジックス株技術部

*** 金沢大学癌研究所化学療法部

受付：61年3月18日

最終稿受付：61年7月15日

別刷請求先：金沢市宝町13-1 (郵920)

金沢大学医学部核医学科

川 畑 鈴 佳

5) D-ガラクトース添加による¹²⁵I-PNAの腫瘍細胞結合率の変化

PNAは、T抗原の抗原決定基中のD-ガラクトース部分に親和性をもつたため、¹²⁵I-PNAの腫瘍細胞への結合は、D-ガラクトースにより阻害されることが予想される。

吉田肉腫細胞を用い培地中に¹²⁵I-PNAと同時に、D-ガラクトースを¹²⁵I-PNAの10⁸倍までの種々のモル濃度で加え、24時間インキュベートのうち、同様に、¹²⁵I-PNAの吉田肉腫細胞への結合率を求めて、D-ガラクトース投与による¹²⁵I-PNAの腫瘍細胞結合への阻害率を計算した。

6) 各種腫瘍細胞における¹²⁵I-PNAと、⁶⁷Ga-クエン酸ガリウム、²⁰¹Tl-塩化タリウムの結合率の比較

前記5種類の腫瘍細胞モデルを用い、それぞれ3群に分けた後、各群に¹²⁵I-PNA 20 μg (7-30 μCi, 100 μl), ⁶⁷Ga-クエン酸ガリウム 50 μCi (100 μl), ²⁰¹Tl-塩化タリウム 50 μCi (100 μl)をそれぞれ加えた。添加後、24時間インキュベートのうち、各RIの結合率を算定した。

III. 結 果

1) ¹²⁵I-PNAの腫瘍細胞への結合率とインキュベーション時間との関係

Figure 1に¹²⁵I-PNAのEhrlich腹水癌細胞への結合率の経時的变化を、¹²⁵I-PNA添加後26時

間後の結合率に対する割合(B/B₀)として示した。¹²⁵I-PNAの結合率は、6時間後までは経的に増加を示したが、6時間以後では一定値を示した。

2) ¹²⁵I-PNAの腫瘍細胞への結合に対するD-ガラクトースによる阻害

培地中に加えたD-ガラクトースのモル濃度が¹²⁵I-PNAのモル濃度の10⁵倍以下では阻害が認められなかったが、10⁵倍以上のモル濃度では、加えられたD-ガラクトース量が増加するにつれて阻害率が大きくなり、10⁷倍以上のモル濃度では、D-ガラクトース添加前の約14%に結合率が低下し、約86%の阻害が認められた(Fig. 2)。

3) 各種腫瘍細胞における¹²⁵I-PNAと⁶⁷Ga-クエン酸ガリウム、²⁰¹Tl-塩化タリウムの結合率の比較

吉田肉腫細胞および肝癌AH109A細胞では、¹²⁵I-PNAは⁶⁷Ga, ²⁰¹Tlに比べ有意に高い(p<0.005)結合率を示した。

一方、Lewis肺癌細胞では、¹²⁵I-PNAは⁶⁷Gaに対し有意に高い結合率を示したが、²⁰¹Tlと比較すると有意に低い値を示した。Ehrlich腹水癌細胞では、²⁰¹Tlより有意に高い値を示したが⁶⁷Gaとの比較では、有意差はみられなかった。ヒト甲状腺乳頭腺癌細胞では、⁶⁷Ga, ²⁰¹Tlとともに有意差はみられなかった(Fig. 3)。

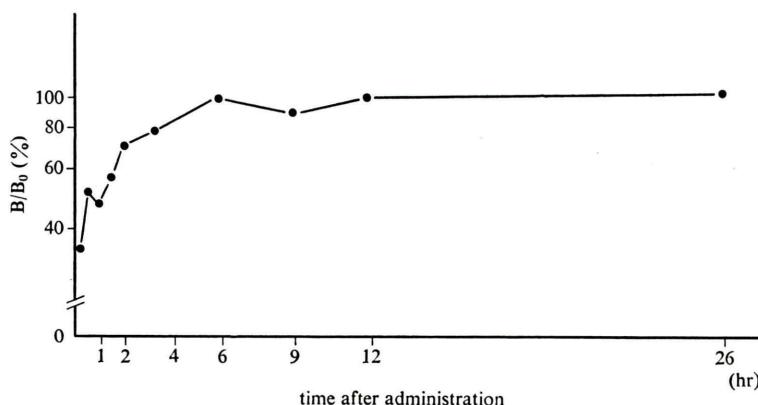
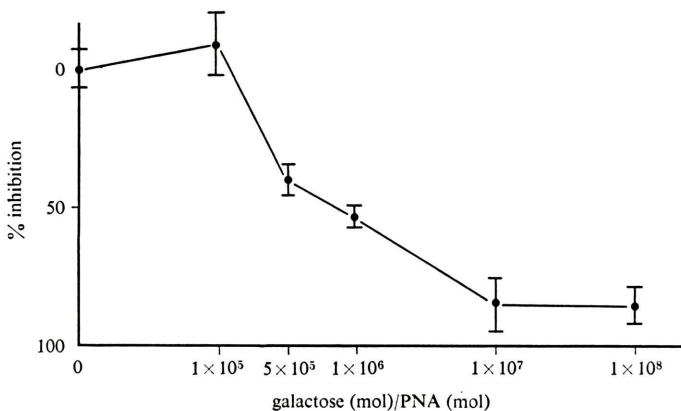
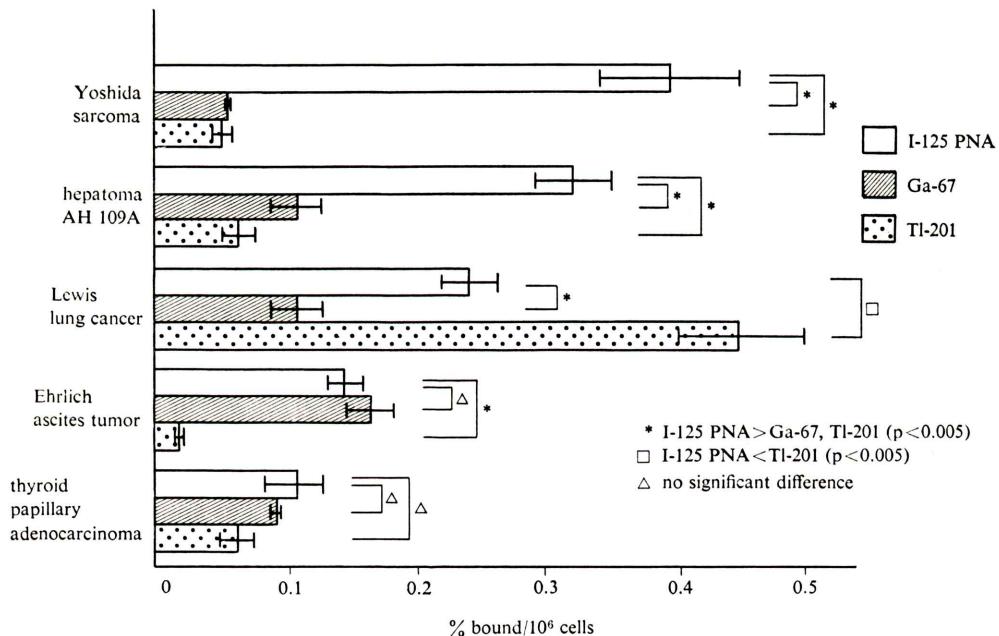


Fig. 1 Time course of ¹²⁵I-PNA binding to Ehrlich ascites tumor cells.

Fig. 2 Effect of galactose on ^{125}I -PNA binding to Yoshida sarcoma cells.Fig. 3 Binding of ^{125}I -PNA, ^{67}Ga -citrate or $^{201}\text{TlCl}$ to various tumor cells.

IV. 考 察

PNA が親和性をもつ、癌糖鎖抗原である Thomsen-Friedenreich (T) 抗原は、MN 型血液抗原からシアル酸を除いた前駆糖鎖であるが、種々のムチン型糖鎖の根本にも存在し、癌化にともなう糖鎖の合成不全により、細胞表面に露出すると

考えられる。Springer らは、T 抗原が、乳癌、肺癌、胃・腸癌の腺癌細胞の膜表面にかなりの高率で存在していると報告⁵⁾しており、一方では腎癌⁶⁾、バーキットリンパ腫、肺扁平上皮癌、胃癌など⁷⁾に PNA のレセプターが存在することが報告されている。それゆえ、PNA はかなり幅広い腫瘍の局在診断に有用であることが期待される。

今回の In vitro での実験結果では ^{67}Ga -クエン酸ガリウム, ^{201}Tl -塩化タリウムと比較して, PNA がすぐれた腫瘍細胞親和性を示すことが明らかになり, 腫瘍診断薬として有用である可能性が示唆された。

このような PNA の各腫瘍細胞への集積機序に関しては, さらに詳細な検討を要すると思われるが, 今回の検討で吉田肉腫細胞への ^{125}I -PNA の結合が, ガラクトースにより濃度依存的に阻害されたことにより, PNA の腫瘍細胞への結合が特異的なものであることが示唆され, その結合は, T 抗原を介するものであることが推測される。

現在 In vivo モデルにおいても同様の結果が得られるかどうか, 担癌動物モデルおよび炎症誘発動物モデルにおける集積性を, ^{67}Ga -クエン酸ガリウムとの比較により検討を試みている。

V. 結論

^{125}I -PNA の腫瘍細胞への結合がガラクトースにより濃度依存的に阻害されたことにより, PNA の腫瘍細胞への特異的結合が示唆された。

^{67}Ga -クエン酸ガリウム, ^{201}Tl -塩化タリウムとの比較では, ^{125}I -PNA の結合率は, 5種類中4種類の腫瘍細胞で同等またはそれ以上の値を示し, 腫瘍診断薬として活用し得る可能性の高いことが示唆された。

本研究の一部は, 昭和58年度文部省一般研究(B)(課題番号 57480259), および昭和59年度文部省一般研究(C)厚生省(課題番号 59570436)の援助によるものであり, 謝意を表します。

文献

- 1) Springer GF, Desai PR, Banatwala I: Blood Group MN specific substances and malignant human breast tissues. *Naturwissenschaften* **61**: 457-458, 1974
- 2) Lontan R, Skutelsky E, Danon D, et al: The purification, composition and specificity of the anti-T lectin from peanut (*Arachis hypogaea*). *J Biol Chem* **250**: 8518-8523
- 3) Shysh A, Eu SM, Noujaim AA, et al: In vivo localization of radioiodinated peanut lectin in a murine TA3/Ha mammary carcinoma model. *Eur J Nucl Med* **10**: 68-74, 1985
- 4) 横山邦彦, 渡辺直人, 川畠鈴佳, 他: 放射性ヨード標識 Peanut Agglutinin (PNA) の腫瘍親和性の研究: (第一報) 標識操作による PNA の生物学的活性の変化の検討. 核医学 **23**: 17-24, 1986
- 5) Springer GF, Murthy MS, Desai PR, et al: Patients immuno response to breast and lung carcinoma-associated Tomsen-Friedenreich (T) specificity. *Klin Wochenschr* **60**: 121-131, 1982
- 6) Vierbuchen M, Klein PJ, Uhlenbruck G, et al: The significance of lectin receptors in the kidney and hypernephroma (renal adenocarcinoma). *Recent Results. Cancer Res* **75**: 68-75, 1980
- 7) Miyauchi T, Muramatsu H, Ozawa M, et al: Receptors for peanuts agglutinin isolated from cell lines of human Burkitt lymphoma, lung squamous cell carcinoma. *Gan* **73**: 581-587, 1982

Summary

Radioiodinated Peanut Agglutinin (PNA): In Vitro Binding to Various Tumor Cells

Suzuka KAWABATA*, Kunihiko YOKOYAMA*, Naoto WATANABE*,
 Katsuko MUKAI*, Norihisa YAMADA*, Kiyoshi KOIZUMI*,
 Tamio ABURANO*, Norihisa TONAMI*, Kinichi HISADA*,
 Kohmei WASHINO** and Saburo KOSHIMURA***

**Department of Nuclear Medicine, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa*

***Research and Development Section, Technical Department,
 Nihon Medi-physics Co., Ltd., Chiba*

****Department of Experimental Therapeutics, Cancer Research Institutes,
 Kanazawa University, Kanazawa*

Peanut Agglutinin (PNA), one of the plant lectins, is expected as a potential tumor seeking agent because of its strong binding affinity for the Thomsen-Friedenreich (T) antigen. We investigated the uptake of ^{125}I -PNA into various tumor cells in vitro, comparing with that of ^{67}Ga -citrate or $^{201}\text{TlCl}$. The uptake of ^{125}I -PNA into Yoshida Sarcoma cells was inhibited by D-galactose dose-dependently, suggesting PNA binds specifically to tumor cells. The uptake of ^{125}I -PNA was higher

than that of ^{67}Ga in Yoshida Sarcoma cells, Hepatoma AH109A cells, or Lewis lung cancer cells. The uptake of ^{125}I -PNA was also significantly higher than that of $^{201}\text{TlCl}$ in Yoshida Sarcoma cells, Hepatoma AH109A cells, or Ehrlich ascites tumor cells. This high affinity of PNA for tumor cells suggests that PNA has a potential for a specific tumor targeting agent.

Key words: Peanut Agglutinin (PNA), In vitro, Cell binding assay.