

《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* 鷲野 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 \rightarrow 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 ¹²⁵I 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 ⁶⁷Ga-クエン酸ガリウム、²⁰¹Tl-塩化タリウムとの結合性と比較し、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、¹²⁵I 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。⁶⁷Ga-クエン酸ガリウムと ²⁰¹Tl-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 cm² の培養フラスコ中に約 1×10^6 個の各種腫瘍細胞を 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 μ l) の ¹²⁵I-PNA 20 μ g (7-30 μ Ci), ⁶⁷Ga (50 μ Ci), ²⁰¹Tl (50 μ Ci) 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、トリパンプ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 10⁶ 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 ¹²⁵I-PNA の腫瘍細胞結合率の変化

Ehrlich 腹水癌細胞を用いて ¹²⁵I-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 ¹²⁵I-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㈱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 (☎ 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 ^{125}I -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め、 ^{125}I -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 ^{125}I -PNA と同時に、D-ガラクトースを ^{125}I -PNA の 10^8 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のち、同様に、 ^{125}I -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 ^{125}I -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 ^{125}I -PNA と、 ^{67}Ga -クエン酸ガリウム、 ^{201}Tl -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 ^{125}I -PNA 20 μg (7–30 μCi , 100 μl)、 ^{67}Ga -クエン酸ガリウム 50 μCi (100 μl)、 ^{201}Tl -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のち、各 RI の結合率を算定した。

III. 結 果

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

間後の結合率に対する割合 (B/B_0) として示した。 ^{125}I -PNA の結合率は、6 時間後までは経時的に増加を示したが、6 時間以後では一定値を示した。

2) ^{125}I -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 ^{125}I -PNA のモル濃度の 10^5 倍以下では阻害が認められなかったが、 10^5 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、 10^7 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 ^{125}I -PNA と ^{67}Ga -クエン酸ガリウム、 ^{201}Tl -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、 ^{125}I -PNA は ^{67}Ga 、 ^{201}Tl 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、 ^{125}I -PNA は ^{67}Ga に対し有意に高い結合率を示したが、 ^{201}Tl と比較すると有意に低い値を示した。Ehrlich 腹水癌細胞では、 ^{201}Tl より有意に高い値を示したが ^{67}Ga 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、 ^{67}Ga 、 ^{201}Tl ともに有意差はみられなかった (Fig. 3)。

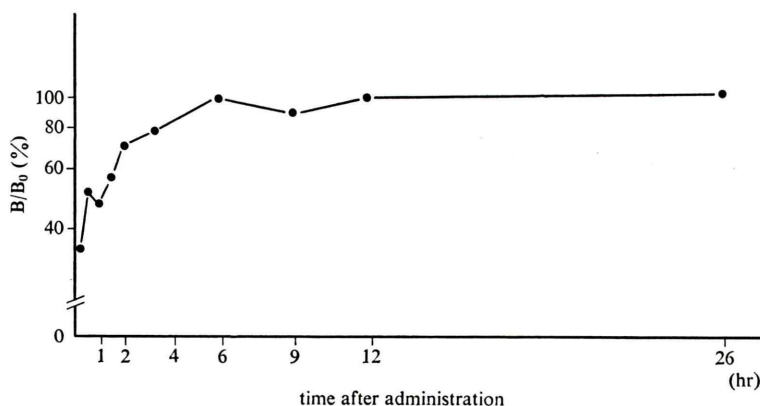


Fig. 1 Time course of ^{125}I -PNA binding to Ehrlich ascites tumor cells.

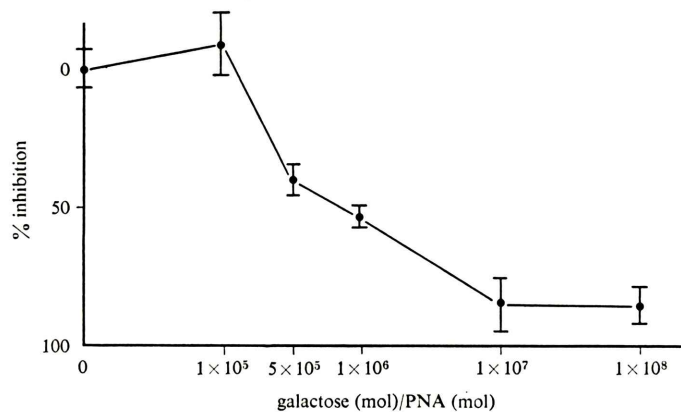


Fig. 2 Effect of galactose on ^{125}I -PNA binding to Yoshida sarcoma cells.

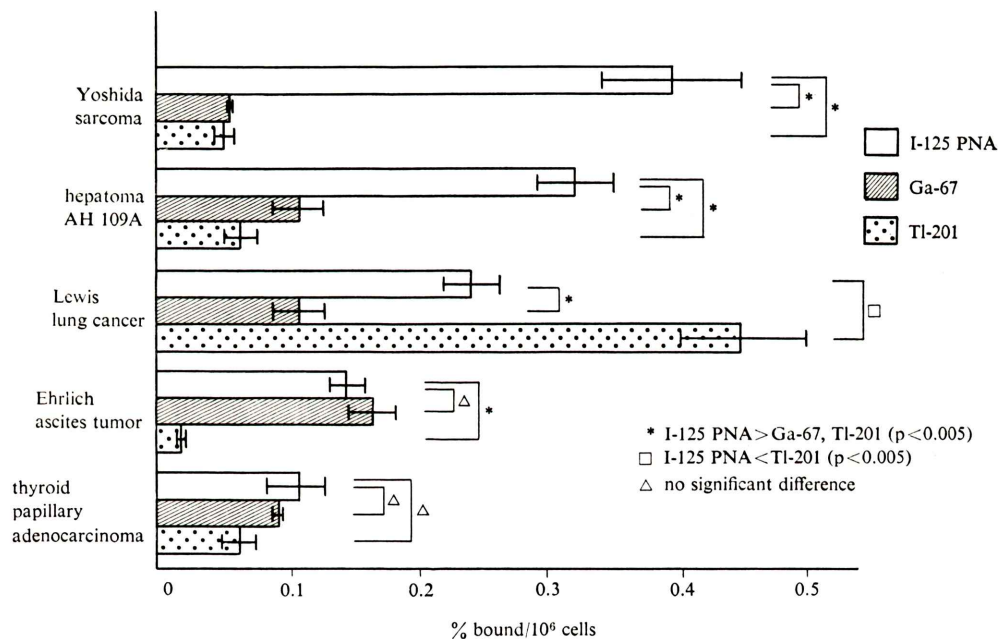


Fig. 3 Binding of ^{125}I -PNA, ^{67}Ga -citrate or $^{201}\text{TlCl}$ to various tumor cells.

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⁾、パーキットリンパ腫、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-high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 hypogoea*). *J Biol Chem* **250**: 8518-8523
- 3) Shysh A, Eu SM, Noujaim AA, et al: In vivo localization of radioiodinated peanut lectin in a murin TA3/Ha mammary carcinoma model. *Eur J Nucl Med* **10**: 68-74, 1985
- 4) 横山邦彦, 渡辺直人, 川畑鈴佳, 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) Vierburchen 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 isorated 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*, Kunihiro 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 targetting agent.

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