

《原 著》

アシアロ糖タンパク—アシアロ糖タンパク受容体系を応用した新しい肝機能検査法の開発

—第1報 ^{99m}Tc 標識ネオ糖タンパクによる肝イメージングの検討—

久保田佳嗣*	小島 通真**	羽間 弘*	河 相吉**
中沢 緑**	西山 豊**	中川 三郎**	村瀬登志彦*
奥野 裕康*	内藤 雄二*	鷲野 弘明****	長谷川武夫**
沢村 隆也*	田代 裕***	田中 敬正**	塩崎 安子*
鮫島 美子*			

要旨 アシアロ糖タンパク (asialoglycoprotein: ASGP)—ASGP 受容体系を用いて肝のイメージングを行う、新しい肝の RI 検査法の有用性について検討した。ASGP と等価に ASGP 受容体と結合し、肝臓に取り込まれるネオ糖タンパクに、 SnCl_2 を還元剤として ^{99m}Tc を標識し、正常家兎ならびに 3'-メチル-4-ジメチルアミノアゾベンゼン (3'-Me-DAB) 肝癌ラットに投与して、シンチグラムを作製した。正常家兎における肝イメージングでは、 $^{99m}\text{Tc-Au}$ コロイドに比べて、遜色のない像が得られた。また、肝癌ラットでも、直径 10 mm 大の腫瘍が、周囲とのコントラストが明瞭な欠損像として描出され、肉眼所見とも良く一致した。また、ラット肝癌の癌部および非癌部の ASGP 受容体活性を測定した結果、肝癌組織中には受容体活性が検出されないことが明らかとなり、シンチグラムの欠損像が裏づけられた。

以上の成績により、 ^{99m}Tc 標識ネオ糖タンパクによる肝のイメージングは、有用な肝 RI 検査法の一つになると考えられる。

I. はじめに

血清糖タンパクの酸性糖鎖非還元末端は、末端より、シアル酸-ガラクトース-N-アセチルグルコサミンという構造をもっている。Ashwell らは、糖タンパクの代謝にこの終末シアル酸が重要な役割を果たしていることを見いだして、以下の事実を明らかにした。すなわち、1) 糖タンパクの糖鎖末端のシアル酸が除去されたアシアロ糖タンパ

ク (asialoglycoprotein; ASGP) は、急速に肝に取り込まれる¹⁾。2) この ASGP のクリアランス現象は、糖鎖非還元末端にガラクトースが露出することによりおこる²⁾。3) この ASGP の糖鎖は、肝細胞表面に存在する受容体(レクチン)と特異的に結合した後エンドサイトーシスされ、取り込まれた ASGP はリソゾーム酵素により、速やかに加水分解される³⁾。などである。

一方、Lee らにより、血清アルブミンと糖を結合させた半合成糖タンパクであるネオ糖タンパク⁴⁾が合成され、彼らは、このネオ糖タンパクが、ASGP と等価に肝細胞膜の受容体に結合し肝細胞内に取り込まれることを証明した⁵⁾。

今回、われわれは、ヒト血清アルブミンに、ガラクトースを 32 個結合させたネオ糖タンパク (galactosyl human serum albumin: GHSA) の

* 関西医科大学第三内科

** 同 放射線科

*** 同 第一生理

**** 日本メジフィジックス社

受付：60 年 12 月 2 日

最終稿受付：61 年 4 月 8 日

別刷請求先：大阪府守口市文園町 1 (番 570)

関西医科大学第三内科

羽 間 弘

^{99m}Tc 製剤を作製し、正常家兎ならびに肝癌ラットに投与して肝シンチグラムを作製し、肝のイメージングを検討した。また、肝癌ラットについては、癌部および非癌部の ASGP 受容体活性を測定してシンチグラムと対比し、 $^{99m}\text{Tc-GHSA}$ シンチグラムの、肝 RI 検査法としての有用性につき検討したので報告する。

II. 対象と方法

(1) GHSA の合成

Lee らにより開発された Imidate 法⁴⁾に基づいて、実験操作を行った。すなわち、ガラクトースをまず、2-イミノメトキシエチル-1-チオ- β -D-ガラクトースの形に修飾し、ゲル濾過法により精製したヒト血清アルブミン (Sigma 社) の、リジンの ϵ -アミノ基および N 末端の α -アミノ基にカッティングさせ合成した。

(2) GHSA の ^{99m}Tc , ^{125}I および ^{123}I 標識

GHSA の ^{99m}Tc -標識については Benjamin らの電極溶解法によるものが報告されているが⁶⁾、今回われわれは、 SnCl_2 を還元剤とした非常に簡単な方法を開発した。すなわち、GHSA 溶液中に 0.2 M 酢酸緩衝液 (pH 3.0), 100 mCi $^{99m}\text{TcO}_4$ 溶液, $1 \times 10^{-3}\text{M}$ アスコルビン酸溶液, $1.5 \times 10^{-4}\text{M}$ SnCl_2 を順次加えて 30 分後に ^{99m}Tc 標識を終了した。以上の操作はすべて室温下で行った。セルロースアセテート膜電気泳動法により測定した標識率は $95.3 \pm 0.5\%$ 、比放射能は 0.26~6.7 mCi/mg であり、コロイド状となった反応物は検出されなかった。また、標識は室温下で 24 時間安定であった。なお、今回は家兎およびラットのような小動物を対象としたために、100 mCi の $^{99m}\text{TcO}_4$ 溶液を使用したが、ヒトに使用する際にはこの 1/20 程度のもので十分と考えられた。

GHSA の ^{125}I 標識は、クロラミン T 法⁷⁾により、また、 ^{123}I 標識は、ヨードゲン (1, 3, 4, 6-tetrachloro-3 α , 6 α -diphenyl glycouril) を用いて行った⁸⁾。

(3) 標識 GHSA の体内動態における検討

ウィスター系雄性ラット、体重 190 g に、 ^{99m}Tc

および $^{123}\text{I-GHSA}$ 200 μg を頸静脈より注入し、経時的に各臓器の放射活性を測定し、ラット全放射能(途中で排泄された尿・糞便もこれに含める)に対する各臓器の放射活性の割合を求め、標識 GHSA 投与後の、体内分布および排泄経路につき検討した。

(4) $^{99m}\text{Tc-GHSA}$ シンチグラム作製

(i) 正常家兎に、 $^{99m}\text{Tc-GHSA}$ を耳静脈より、560 $\mu\text{g}/2\text{mCi}$ 注射して、肝シンチグラムを作製した。また、 $^{99m}\text{Tc-GHSA}$ の画像評価を行うために、他の放射性医薬品 $^{99m}\text{Tc-Sn}$ コロイド、 $^{99m}\text{Tc-pyridoxyl-5-methyltryptophan}$ ($^{99m}\text{Tc-PMT}$) の肝シンチグラムも同様に作製し、 $^{99m}\text{Tc-GHSA}$ の像と比較検討した。

(ii) ウィスター系雄性ラット、体重 200 g に、0.06% 3'-メチル-4-ジメチルアミノアゾベンゼン (3'-Me-DAB) 混合飼料を、4か月間経口摂取させた担癌ラットに、頸静脈より $^{99m}\text{Tc-GHSA}$ 100 $\mu\text{g}/0.35\text{mCi}$ を注射し、肝を切離して、ピンホールコリメータにより肝のシンチグラムを作製した。

以上のシンチグラム撮影は、デジタル γ カメラ 東芝 GCA-90B によった。

Table 1 Assay procedure of the ASGP-receptor activities. The ASGP receptor activities were obtained according to "Assay-A" of Huglin, et al¹⁰⁾, by use of $^{125}\text{I-GHSA}$

Assay of the ASGP-Receptor Activities

incubate the crude extract of ASGP-receptors with excessive $^{125}\text{I-GHSA}$ in reaction mixture (final volume of 500 μl)
 ↓
 chill in ice and precipitate the labeled complex with 500 μl cold 80% Ammonium Sulfate pH 7.8
 ↓
 wash-out the unbound $^{125}\text{I-GHSA}$ on the glass filter
 ↓
 count the radioactivity of the labeled complex

Assay of the Nonspecific Binding of $^{125}\text{I-Ligand}$

incubate the crude extract with $^{125}\text{I-GHSA}$ in reaction mixture containing 10 mM EDTA
 ↓
 same as above

(5) ASGP 受容体活性の測定

$3'$ -Me-DAB 肝癌ラットについては、癌部と非癌部の ASGP 受容体活性を測定した。

方法は、担癌ラットの肝臓を、肉眼的に癌部と非癌部に分離した後、2% triton X-100 により、

おのおのの組織を可溶化して ASGP 受容体を含むタンパクを抽出し⁹⁾、Hudgin らの Assay-A 法¹⁰⁾に準じ、 ^{125}I -GHSA を用いて competitive radio-receptor assay により測定した (Table 1)。

Assay におけるブランクを求めるために、

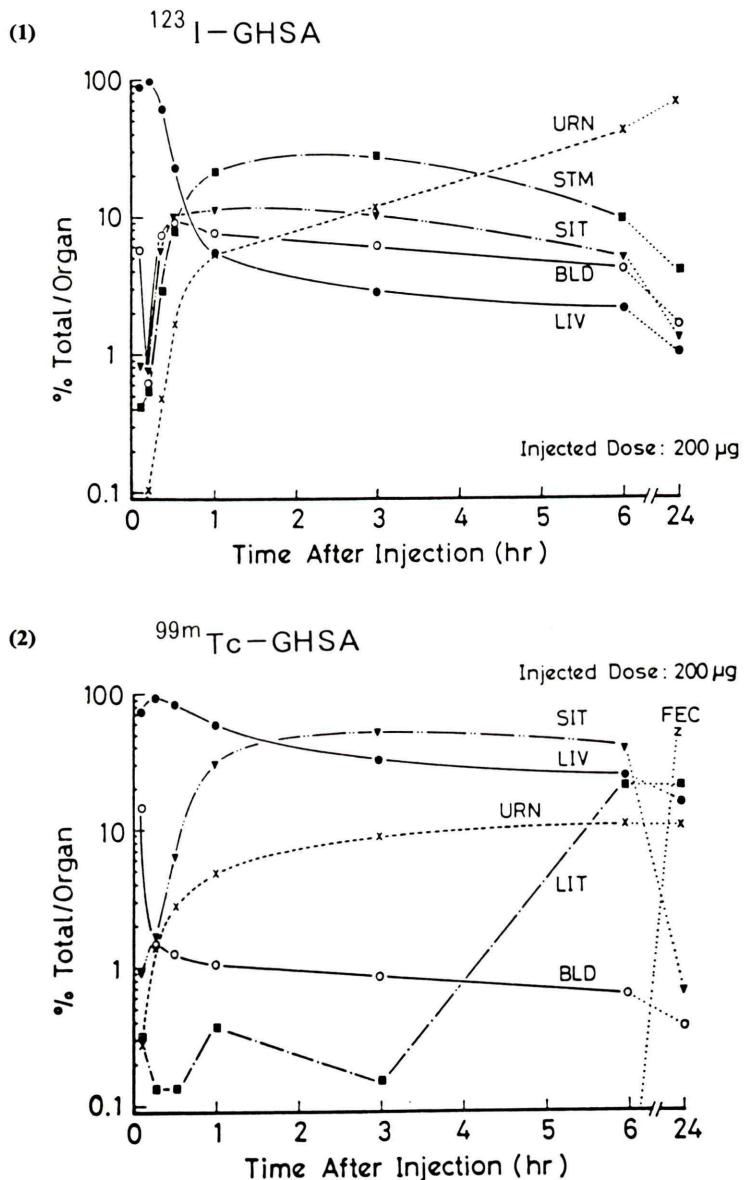


Fig. 1 The kinetic process of ^{123}I -GHSA and $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -GHSA in rat. At the organs, Urine (URN), Stomach (STM), Small intestine (SIT), Blood (BLD), Liver (LIV), Large intestine (LIT) measured for periods up to 24 hours. Each plot represents a mean of three animals.

ASGPとその受容体の結合反応が Ca^{2+} 依存性で、EDTAのようなキレート剤で可逆的に解離する性質を利用して¹⁰⁾、結合解離に十分な量のEDTAを反応液に加え、リガンドのnonspecific bindingを測定した。ASGP受容体活性は、labeled complex中に存在する放射活性より¹²⁵I-GHSAのタンパク量を求め、抽出タンパク1mgならびに肝湿重量1g当たりに結合しうるGHSA量により表わした。

(6) タンパク量定量

タンパク量は、Lowryらの方法¹¹⁾により測定した。

III. 結 果

(1) ^{99m}Tcおよび¹²³I-GHSAの体内動態

^{99m}Tcおよび¹²³I-GHSA投与後の、^{99m}Tc、¹²³Iの、体内動態をFig. 1に示した。両者とも、投与後すばやく肝臓に特異的に集積した。しかし、両者の肝臓からの排泄動態には差が認められ、¹²³Iは^{99m}Tcに比べて比較的すみやかに肝臓より排泄された。それに伴い、¹²³Iの血中の放射活性は1%以下から再上昇し、以後¹²³Iは尿中へ排泄された。また、図には示していないが、甲状腺の放射活性は6時間後で3.69%、24時間後で22.43%であった。以上より、¹²³Iは肝臓へいったん取り込まれた後、血中へ逆拡散して尿中へ排泄され、また、甲状腺に摂取されると考えられた。一方、^{99m}Tcは、肝臓における放射活性の低下に従って主として小腸の放射活性が上昇し、24時間後には主に糞便中へ排泄された。胃の放射活性は、全経過を通じ1%以下であり、¹²³Iでみられたような血中の再上昇は^{99m}Tcではみられなかった。すなわち、^{99m}Tcの排泄は¹²³Iと異なり、主として胆道系を介して小腸へ排泄されると考えられた。なお、^{99m}Tcおよび¹²³Iの脾における放射活性は検出されなかった。

(2) ^{99m}Tc-GHSAの画像評価

(i) 他のシンチグラム製剤との比較検討

Figure 2-(1)は、従来より肝シンチグラムに使われている^{99m}Tc-Snコロイドの像である。Snコ

ロイドは網内系の細胞に貪食されるため、肝および脾が描出されている。

Figure 2-(2)は、肝胆道シンチグラフィー製剤である^{99m}Tc-PMTの像である。注入直後より肝が描出され、約5分で比較的明瞭な肝のイメージが認められるが、10分では主として小腸内へ集積し、肝は不明瞭となる。さらに、投与後20分には肝の集積はほとんど認められなくなった。

Figure 2-(3)は、^{99m}Tc-GHSAの像である。注入直後より肝が描出され、以後60分まで肝が明瞭に認められる。また、50分からは小腸の排泄像が認められはじめた。前記Snコロイドとの相違点は、網内系への取り込みがないということであり、脾臓は描出されてこない。また、^{99m}Tc-PMTとの差は、肝に摂取された^{99m}Tcの排泄が、ゆるやかに進行する点であり、したがって、本法では比

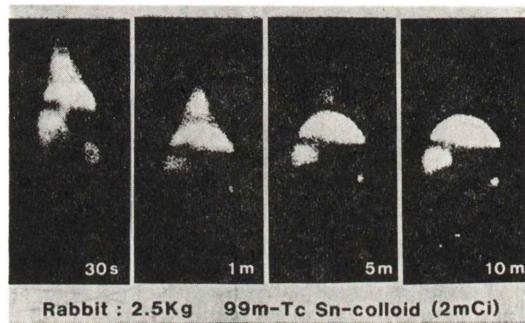


Fig. 2 (1) Serial imaging of Tc-99m-Sn colloid in the rabbit.

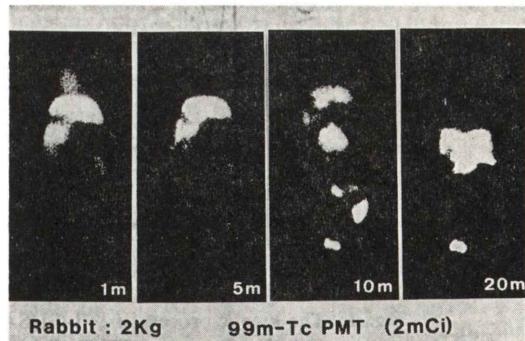


Fig. 2 (2) Serial imaging of Tc-99m-PMT in the rabbit.

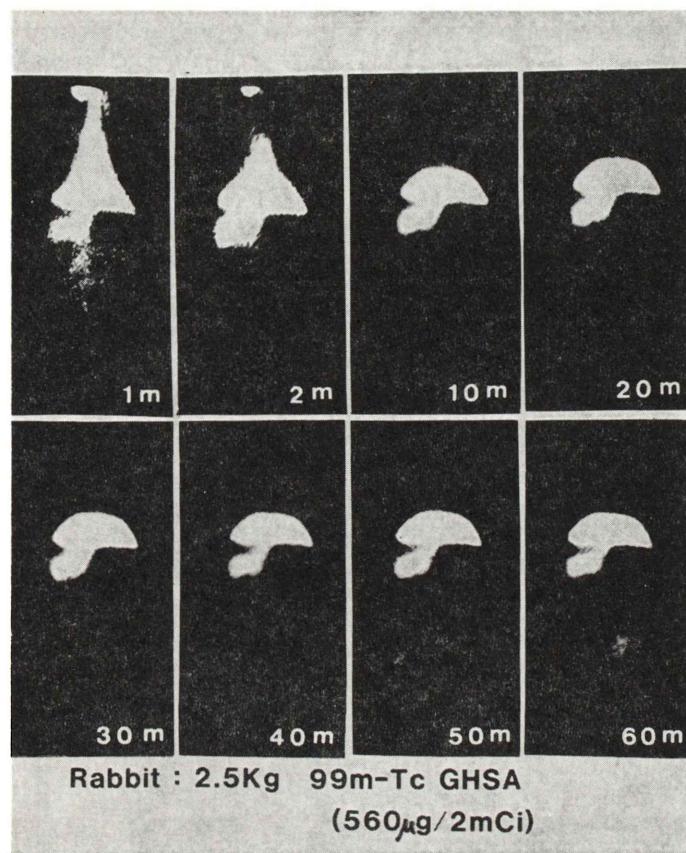


Fig. 2 (3) Serial imaging of Tc-99m-GHSA in the rabbit.

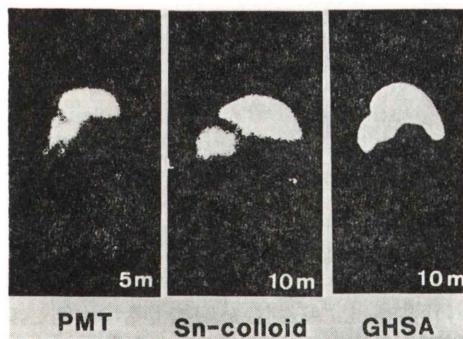


Fig. 2 (4) Comparison of three scanning agents.

較的長時間、肝の安定したイメージを描出することができた。

Figure 2-(4) は、以上 3 種類のシンチグラムの静注後 5 分～10分の像を比較したものである。右

端の GHSA の肝描出能は、Sn コロイドと比べて遜色のないものであることを示した。

(ii) ラット肝癌における ^{99m}Tc -GHSA シンチグラム

$3'\text{-Me-DAB}$ ラット肝癌における ^{99m}Tc -GHSA シンチグラムを Fig. 3-(1) に示した。肝の肉眼的写真 Fig. 3-(2) とよく一致して、直径 10 mm 大の腫瘍が、明瞭な欠損像として認められた。なお、癌部：非癌部の放射活性比は、1:2.4 であった。

Figure 4 には、抽出タンパク 1 mg 当たり、ならびに 1 g 肝湿重量当たりの癌部および非癌部における ASGP 受容体活性を示した。癌部の 1 mg タンパクならびに 1 g 肝湿重量当たりの ASGP 受容体活性は、ほとんど検出されず、非癌部の受容体活性（平均値 $27.22 \pm 7.60 \text{ ng bound/mg protein}$)

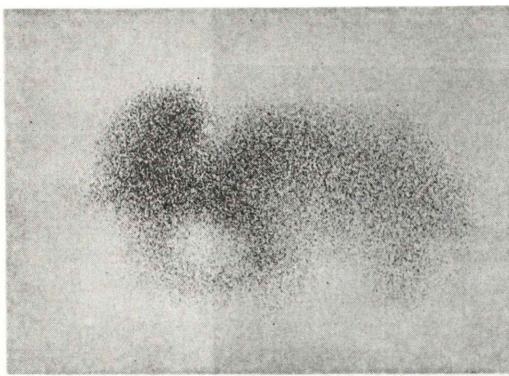


Fig. 3 (1) The scintigram of 3'-methyl-4-DAB induced rat liver cancer.

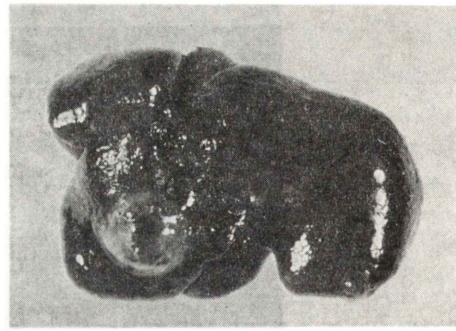


Fig. 3 (2) Macroscopic observation of rat liver cancer.

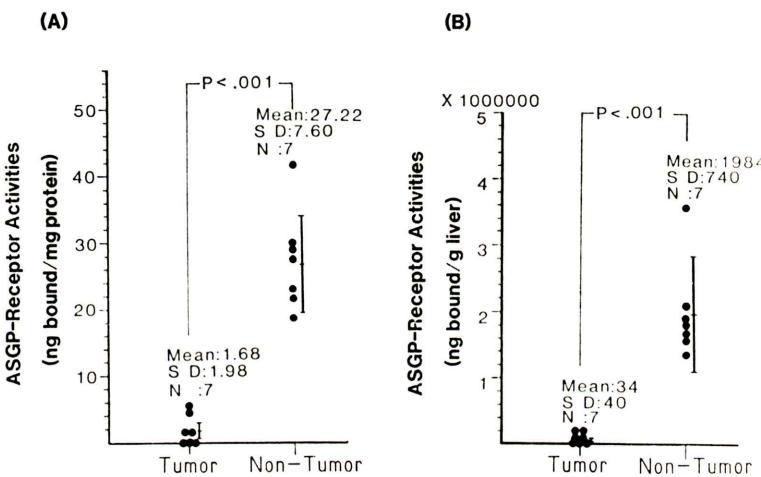


Fig. 4 The ASGP-receptor activities of tumor and non-tumor tissue in rat with liver cancer. The ASGP-receptor activities; are shown in ng bound/mg protein (A), and ng bound/g liver (B).

tein, $1,984 \pm 740$ ng bound/g liver)との差は明確であった。

IV. 考案

$^{99m}\text{Tc-GHSA}$ は、肝細胞膜受容体を介して肝細胞内に取り込まれるために、網内系の phagocytosis を利用した肝コロイドシンチグラムとは異なり、脾への集積は認められず、また、肝の形態抽出についても従来のシンチグラム製剤に比し、遜色のないイメージが得られた。また、肝のイメージは 30~60 分位までは十分に安定であり、多方向撮影

や SPECT のデータ収集にも適していると考えられた。

さきに沢村らは、ヒト肝癌組織中には ASGP 受容体活性が検出されず、このため担癌者では、癌部分の肝内にしめる割合が増加するに比例して、血清アシアロ糖タンパク量の増加が認められることを報告した⁹⁾。今回対象とした肝癌モデルにおいても、非癌部とのコントラストが明瞭な欠損像が描出され、これは、肝癌組織中における ASGP 受容体活性の消失を反映していることを明らかにした。

文 献

- 1) Morell AG, Irvine RA, Sterlieb I, et al: Physical and chemical studies on ceruloplasmin: V. Metabolic studies on sialic acid-free ceruloplasmin in vivo. *J Biol Chem* **243**: 155-159, 1968
- 2) Hickman J, Ashwell G, Morell AG, et al: Physical and chemical studies on ceruloplasmin: VIII. Preparation of N-acetylneurameric acid-1-C-labeled ceruloplasmin. *J Biol Chem* **245**: 759-766, 1970
- 3) Pricer W, Ashwell G: The binding of desialylated glycoprotein by plasma membrane of rat liver. *J Biol Chem* **246**: 4825-4833, 1971
- 4) Stowell CP, Lee YC: Neoglycoproteins: The preparation and application of synthetic glycoproteins. *Adv in Carbohydr Chem Biochem* **37**: 225-281, 1980
- 5) Stowell CP, Lee YC: The binding of D-glucosyl-neoglycoproteins to the hepatic asialoglycoprotein receptor. *J Biol Chem* **253**: 6107-6110, 1978
- 6) Benjamin PP: A rapid and efficient method of preparing 99m Tc human serum albumin: Its clinical applications. *Int J Appl Radiat* **20**: 187-194, 1969
- 7) Greenwood FC, Hunter WM, Glover JS: The preparation of 131 I-labelled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochem J* **89**: 114-123, 1963
- 8) Millar WT, Smith JFB: Protein iodination using iodogen. *Int J Appl Radiat Isot* **34**: 639-641, 1983
- 9) Sawamura T, Nakada H, Hazama H, et al: Hyper-asialoglycoproteinemia in patients with chronic liver disease and/or liver cell carcinoma. *Gastroenterol* **87**: 1217-1221, 1984
- 10) Hudgin PL, Pricer W, Ashwell G: The isolation and properties of a rabbit liver binding specific for asialoglycoproteins. *J Biol Chem* **249**: 5536-5543, 1974
- 11) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**: 265-275, 1951

Summary

A New Liver Function Test Using the Asialoglycoprotein-receptor System on the Liver Cell Membrane: I. Evaluation of Liver Imaging Using the Tc-99m-Neoglycoprotein

Yoshitsugu KUBOTA*, Michimasa KOJIMA**, Hiroshi HAZAMA*, Soukichi KAWA**, Midori NAKAZAWA**, Yutaka NISHIYAMA**, Saburo NAKAGAWA**, Toshihiko MURASE*, Hiroyasu OKUNO*, Yuji NAITO*, Koumei WASHINO****, Takeo HASEGAWA**, Takaya SAWAMURA*, Yutaka TASHIRO***, Yoshimasa TANAKA**, Yasuko SHIOZAKI* and Yoshiko SAMESHIMA*

*The Third Department of Internal Medicine, **Department of Radiology,

***The First Department of Physiology, Kansai Medical University

****Nihon Medi-Physics Co., Ltd.

We evaluated the validity of a new radionuclide liver imaging method using an asialoglycoprotein (ASGP) receptor system on the cell membrane. Neoglycoprotein was labeled with 99m Tc using SnCl₂ as a reductant and administered into normal rats and those with 3'-methyl-4-dimethylaminobenzene induced liver cancer. This protein is physiologically equivalent to ASGP and thus binds to ASGP receptors, and is taken up by the liver.

In the normal rats, liver images obtained with this new method were as clear as those obtained with 99m Tc-Sn colloid. In the rats with liver cancer,

lesions (10 mm in diameter) were visualized as accumulated defects showing a distinct contrast to the surrounding tissues. These defects were consistent with the macroscopic observations, and also were supported by the absence of ASGP receptor activity in lesions confirmed by measurements in cancerous and non-cancerous areas. The results indicate the usefulness of labeled neoglycoprotein as radiopharmaceutical for liver RI imaging.

Key words: A sialoglycoprotein, Asialoglycoprotein receptor, Neoglycoprotein, Liver scintigram.