

99-230 橋本 絵美

(指導教官：川井 恵一 教授)

要旨

神経芽細胞腫は、化学療法や外部照射の奏効率が低いことから、 ^{131}I -MIBG による内用放射線治療が期待されている。本研究では noradrenaline(NA)の擬似物質であり、交感神経系の偽伝達物質で、親和性が MIBG よりも高いと期待される誘導体を ^{125}I 標識し、培養腫瘍細胞を用いて腫瘍診断薬剤としての評価を行った。

培養腫瘍細胞は、uptake-1 の発現が報告されている神経芽細胞腫 SK-N-SH、比較として大腸癌 LS180 を選択し、培養を開始した。 ^{125}I 標識体は、クロラミンT法により高収率で得られ、精製は Sep-pak 法による簡便な分離条件を確立した。また、比較として ^3H -NA を用い、同様に実験を行った。

化学構造と集積との関係を検討した結果、パラ位に水酸基を有する誘導体が早期から細胞への高い集積を示す傾向が認められた。また、当初各誘導体の特性から、uptake-1 輸送機構による腫瘍への取り込みを期待したが、LS180 よりも SK-N-SH に低い集積を示し、この傾向は ^3H -NA にも認められた。この要因として、uptake-1 輸送機構以外にも LS180 と SK-N-SH との増殖能や代謝活性の違いが標識体の取り込みに大きく影響した可能性が示唆された。さらに細胞数だけでなく、蛋白量などによる補正の必要性も考えられた。

1. はじめに

神経芽細胞腫は交感神経幹から発生し、カテコールアミンを産生する腫瘍で、このような神経内分泌系腫瘍群としては神経芽細胞腫のほかに褐色細胞腫などが代表的なものである。特に神経芽細胞腫に対しては化学療法や外部照射の奏効率が低く、 ^{131}I -*m*-iodobenzylguanidine (^{131}I -MIBG)による内用放射線治療が期待されている¹⁾。

MIBG や noradrenaline(NA)の取り込みには、uptake-1 というトランスポータにより神経芽細胞腫に取り込まれることが報告されている²⁾。そこで本研究では、NA の類似物質であり、交感神経系の偽伝達物質で、親和性が MIBG よりも高いと期待される誘導体 dl-*p*-hydroxynorephedrine(PHNE)、dl-octopamine(OCT)、dl-synephrine(SYN)、dl-norphenylephrine(NP)、l-phenylephrine(PE) をヨウ素標識し、培養腫瘍細胞を用いて腫瘍診断薬剤としての評価を行った。まず、PHNE は心筋の交感神経機能診断を目的とした放射性医薬品として、高い有用性を有することが報告されている³⁾。このことより本研究では、腫瘍診断薬への応用を目指して PHNE を選択し、その類似体として他の4つの誘導体も加えて検討を行った。

本研究で用いた誘導体の構造を Fig.1 に示す。PHNE、OCT、SYN はパラ位に水酸基を有する化合物であり、それに対し NP、PE はメタ位に水酸基を有する化合物である。また PHNE、OCT、NP は1級アミンと呼ばれ、NA も1級アミンであることから、他の誘導体よりも NA に似た構造であるといえる。NA の1級アミンにメチル基がつき、2級アミンになると adrenergic と呼ばれる。SYN、PE は2級アミンであり、構造上 adrenergic と類似している。

本研究ではアミン誘導体のヨウ素標識条件を最適化し、加えて簡便な精製方法を確立すること、及び、培養腫瘍細胞を用いて、各標識化合物の腫瘍診断薬としての評価の検討を行った。

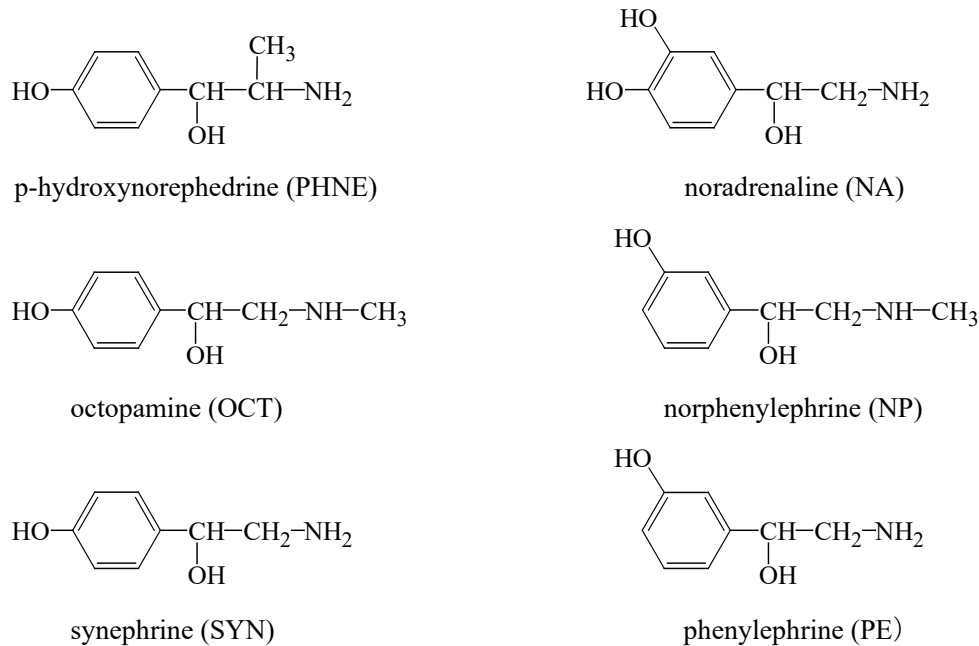


Fig.1 交感神経伝達物質と偽伝達物質の構造

2. 実験材料と方法

A. 腫瘍細胞の培養

培養腫瘍細胞は、uptake-1 の発現が報告されている神経芽細胞腫 SK-N-SH、比較として大腸癌 LS180 を選択した。培地には、Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM: 日水製薬) にウシ胎児血清(大日本製薬)を 10% になるように加えたものを使用した。10cm ディッシュを用いて 37°C・5% CO₂ の環境下で培養を開始した。その後、細胞が 70% コンフルエントになったところでトリプシン-EDTA(ギブコ BRL) 2mL を加えて細胞を剥離し、継代を行った。

B. 各誘導体の ¹²⁵I 標識

各誘導体(PHNE:アルドリッチ、OCT:ナカライテスク、SYN:シグマ、NP:アルドリッチ、PE:シグマ)の ¹²⁵I 標識は、クロラミン T(ナカライテスク)による酸化法を用いて無担体条件下で行った。

PHNE、OCT、SYN、NP、PE 1.0×10⁻⁷mol をホウ酸緩衝液(pH9.0, 0.1M) 200 μl に溶かし、無担体 ¹²⁵I-NaI(アマシャム;IMS30)を加えた。得られた混合液にクロラミン T 2.0×10⁻⁷mol/30 μl ホウ酸緩衝液(pH9.0, 0.1M)を加えることで標識を開始した。反応開始後 15 分にピロ亜硫酸ナトリウム 2.0×10⁻⁷mol/20 μl ホウ酸緩衝液(pH9.0, 0.1M)を加え、反応を停止した。

精製は Sep-pak C-18 カートリッジ(ウォーターズ)で行った。シリンジを用いて Sep-pak C-18 にエタノール 2ml、リン酸緩衝生理液(PBS: pH7.4) 8ml を通水し、Sep-pak C-18 をコンディショニングした。その後、カートリッジに反応液をアプライし、PBS を充分に通水して未標識誘導体、NaI を洗浄した。その後、20%エタノールにて ¹²⁵I-PHNE を、50%エタノールにて ¹²⁵I-OCT、SYN、NP、PE を溶出した。¹²⁵I 標識した各誘導体の標識率、純度は以下の溶媒系の TLC にて確認した。

メタノール : 酢酸 = 100 : 1

Rf 値 ¹²⁵I-PHNE、¹²⁵I-OCT、¹²⁵I-SYN、¹²⁵I-NP、¹²⁵I-PE = 0.50-0.55

¹²⁵I = 0.75-0.80

C. 培養腫瘍細胞への取り込み実験

24well プレートに、1well あたり 2×10⁵ 個になるよう各細胞を蒔き、24 時間後に実験に用いた。アスピレータで培地を除去後、SK-N-SH、LS180 に、各標識体の入った無血清 DMEM(1well あたり 1 μCi/500 μl)を加え、37°C でインキュベーションした。一定時間経過後、アスピレータで培地を除去し、PBS(pH7.30-7.65) 1ml で細胞を 2 回洗った。その後トリプシン-EDTA 100 μl を加え、インキュベータ内で放置した後、PBS 300 μl を加えた。well 内をよく攪拌後、10 μl を採取してノイバ

ウエル血球計算板(エルマ)に入れ、細胞数測定を行った。測定後、0.1N NaOH 500 μ l を各 well に加えて細胞を溶解させ、その溶液を RIA チューブに取り、細胞に取り込まれた放射能を測定した。また比較として、 $^3\text{H-NA}$ (アマシヤム;TRK584)を用いて同様の実験を行った。

3.結果と考察

A. 各誘導体の ^{125}I 標識

各標識体の標識率と純度の結果を Table.1 に示す。

	標識率 (%)	純度 (%)
$^{125}\text{I-PHNE}$	92	99
$^{125}\text{I-OCT}$	80	96
$^{125}\text{I-SYN}$	86	98
$^{125}\text{I-NP}$	87	98
$^{125}\text{I-PE}$	87	98

Table.1 各誘導体の標識率と純度

各標識体とも 80%以上の高い標識率、96%以上の高い純度で得られた。

今回精製には Sep-pak 法を用いた。この方法を用いることで従来のカラム法に比べ簡便かつ短時間に精製を行うことができ、臨床応用にも適したものであると考えられた。今回行った精製方法では遊離ヨウ素を Sep-pak にトラップさせることにより、 $^{125}\text{I-PHNE}$ のみを抽出できることを TLC 解析から確認した。一方、今回の検討では、Sep-pak 法により得られた $^{125}\text{I-PHNE}$ 画分への非放射性 PHNE の混在の有無が確認されておらず、今後の課題となった。

B. 培養腫瘍細胞への取り込み実験

1) SK-N-SH における各標識体の集積結果

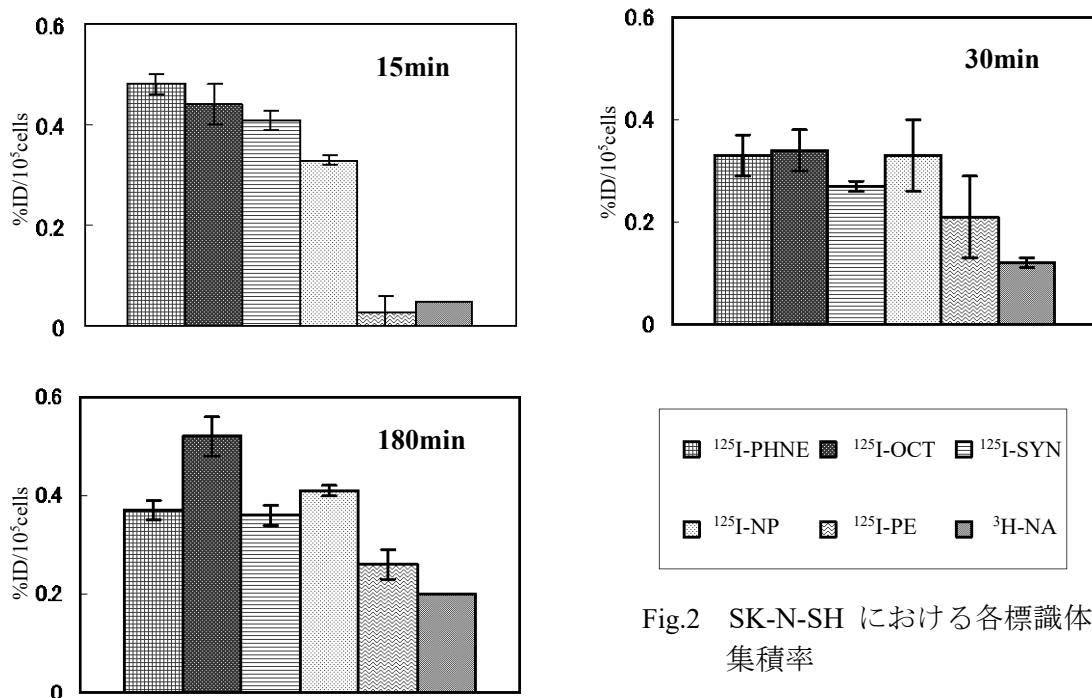


Fig.2 SK-N-SH における各標識体の集積率

Fig.2 には細胞 10^5 個あたりの全投与量に対する集積率を示す。SK-N-SH では投与 15 分後の $^{125}\text{I-PE}$ を除いて全ての標識体で天然の神経伝達物質である $^3\text{H-NA}$ よりも非常に高い集積が見られた。また、 $^3\text{H-NA}$ と比較すると、 $^{125}\text{I-PHNE}$ 、 $^{125}\text{I-OCT}$ 、 $^{125}\text{I-SYN}$ 、 $^{125}\text{I-NP}$ は早期から集積があり、投与 180 分後でも高い割合で集積していることから、滞留性が認められた。

2) LS180 における各標識体の集積結果

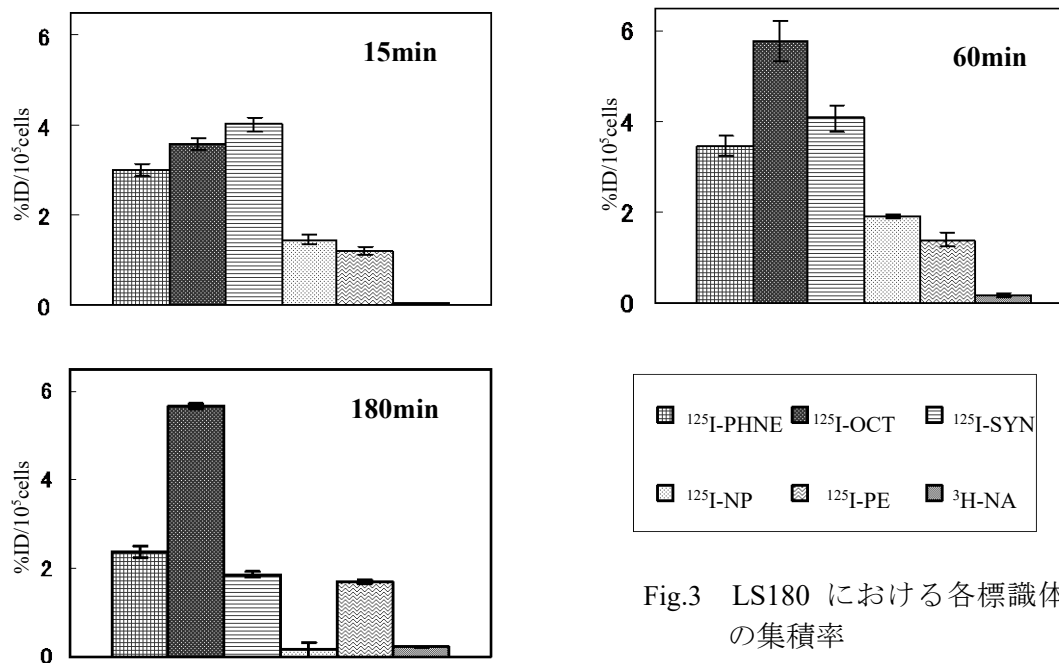


Fig.3 LS180 における各標識体の集積率

Fig.3 より、¹²⁵I-OCT が早期から高い集積を示し、その集積には滞留性が認められた。また、集積は少ないものの ¹²⁵I-PE にも滞留性が認められた。それに対し、¹²⁵I-PHNE や ¹²⁵I-SYN、¹²⁵I-NP にはクリアランスが観察された。当初各誘導体の特性から、uptake-1 輸送機構による SK-N-SH への単位細胞数あたりの高い取り込みを期待していたが、LS180 の集積の結果はすべて SK-N-SH よりも高いものとなり、内因性の ³H-NA にも同様の傾向が認められた。また、化学構造と集積との関係を検討した結果、パラ位に水酸基を有する ¹²⁵I-PHNE、¹²⁵I-OCT、¹²⁵I-SYN が早期から細胞への高い集積を示す傾向が認められた。

以上の結果より、SK-N-SH と LS180 の比較に際しては、uptake-1 輸送機構以外にも増殖能や代謝活性の違いが、標識体の取り込みに大きく影響した可能性が示唆された。従って、今回は細胞数のみで標準化を行ったが、さらに蛋白量などによる標準化の必要性も考えられた。今回の結果を踏まえて、HPLC を用いた標識原料の分離の確認及び、集積機序の解明、さらに対象の細胞を変えて再度比較実験を行うことなどが検討課題となった。

謝辞

本研究を行うにあたり、ご指導下さった川井恵一教授、吉本光喜助手、細胞を提供して頂いた金沢大学大学院医学系研究科バイオトレーサー診療学教室絹谷先生に、心より御礼申し上げます。

参考文献

- 1). Hoefnagel CA. Nuclear medicine therapy of neuroblastoma. Q J Nucl Med, 43(4), 336-343, 1999.
- 2). Smets LA., Janssen M., Metwally E., and Loesberg C. Extragranular storage of the neuron blocking agent meta-iodobenzylguanidine (MIBG) in human neuroblastoma cell. Biochem Pharmacol, 39(12), 1959-1964, 1990.
- 3). 川井恵一. 放射性ヨウ素を標識核種として利用した脳・心筋機能診断薬. 放射線生物研究, 29(4), 363-366, 1990.