

ラット腹水肝癌細胞の FDG 取り込み特性の速度論的解析

夏堀雅宏¹⁾、村上 寧¹⁾、寺崎一典²⁾、山口慶一郎³⁾、畠山 智⁴⁾、佐野忠士¹⁾、伊藤伸彦¹⁾

¹⁾北里大学獣医畜産学部
034-8628 青森県十和田市東 23 番町 35-1

²⁾岩手医大サイクロトンセンター
020-0173 岩手郡滝沢村字留が森 348-58

³⁾仙台厚生病院
980-0873 宮城県仙台市青葉区広瀬町 4 番 15 号

⁴⁾日本アイソトープ協会仁科記念サイクロトンセンター
020-0173 岩手郡滝沢村字留が森 348-58

1 緒論

近年、犬と猫における癌の罹患率は増加しつつあり、主要な死因の一つとなっている。獣医学自身の進歩に加え、飼育者の意識の変化に伴う動物の飼育環境の向上、ワクチン接種をはじめとする予防医学の浸透による伴侶動物の長寿化・高齢化が、癌の罹患率増加の背景として挙げられる[33, 38]。このような飼育者の意識の変化は、高度獣医療への需要につながり、癌の診断および治療技術の向上が求められている。

陽電子放射断層撮影法 (positron emission tomography: PET) は放射性薬剤を使用した核医学診断法の一つである。PET とは、陽電子 (positron) 放出核種で標識されたトレーサー (放射性薬剤) の体内での挙動を三次元的にとらえる診断法であり、トレーサーの種類および標識核種を使い分けることで、体内における種々の物質の体内挙動を調べることが可能である。中でもグルコースの類似薬である¹⁸F-FDG(2-deoxy-2-fluoro-D-glucose)を用いた FDG-PET は、ヒト医学領域においては有用な腫瘍診断法として広く普及し[21, 28]、動物への早期実現に向けての活動が現在行われている[13, 16, 17]。

グルコースは哺乳類における主要なエネルギー源であり、哺乳類細胞の大部分が糖蛋白やトリグリセリド、グリコーゲンの前駆物質としてだけではなく、解糖を介した ATP 生成の重要なエネルギー源としても、グルコースを利用している。グルコースは親水性の複合物で、細胞質に入るために特異的な輸送蛋白を必要とする。小腸および腎尿細管にはナトリウム依存性グルコース輸送担体(sodium-dependent glucose transporter: SGLT)が存在し、グルコースの取り込みに Na⁺の電気化学的勾配を利用している。全ての哺乳類細胞には糖輸送機構として、グルコーストランスポーター (glucose transporter: GLUT) と呼ばれる糖輸送担体が遍在する。このトランスポーターは濃度勾配を利用した促通拡散により基質の双方向性の輸送を行う[26]。

腫瘍においてはその無秩序な増殖に伴って糖代謝が亢進するため、GLUT が過剰に発現する[5, 21, 26, 37, 40]。しかしながら、腫瘍だけでなく炎症性病変においても亢進した糖代謝は認められるため[4, 21, 28]、PET

検査においては腫瘍病変と炎症性病変との鑑別が重要であり、現在これに関する多くの研究が行われている[5, 14, 20, 27, 35, 40]。脂肪細胞や骨格筋細胞、およびある種の腫瘍細胞では糖質コルチコイド投与による細胞内への糖取り込み抑制に関する報告がなされている[9, 10, 14, 25, 27, 35]。腫瘍細胞と炎症性細胞において、ステロイドによる糖取り込みの抑制程度やその作用時間における影響が異なれば、PET における鑑別法への有用なデータとなる。

^{18}F -FDG はグルコースと同じ経路で細胞内に取り込まれるが、ヘキソキナーゼによる最初のリン酸化反応で ^{18}F -FDG-6-phosphate となった後、次の酵素反応系に進まずそのままの化学形で細胞内に留まる[21](Fig.2)。一方、 ^3H -FDG は ^{18}F -FDG と同様の化学構造を有するが、 ^{18}F の結合部位とは異なる部位 ^3H が標識されている (Fig.1)。両者の細胞内への取り込み率には高い正の相関関係が認められ[27]、 ^{18}F -FDG の代用として ^3H -FDG を用いることが可能であることが *in vitro* の実験において確認されている。3-O-methylglucose (3-O-MeG) もまたグルコースの類似体であり (Fig.1)、グルコースや FDG と同様に GLUT を介して細胞内に取り込まれるが、解糖の第一段階であるヘキソキナーゼによるリン酸化反応を受けず (Fig.2)、細胞の GLUT の発現量に依存する糖取り込みを示す薬剤として実験的に用いられている[1, 9, 12, 25, 31, 36, 37]。

武藤らは、Donryu rat 由来の腹水肝癌である AH109A 細胞および炎症性細胞を用いた FDG の細胞内取り込みについての実験で、*in vitro* におけるデキサメサゾンとの 90 分間の培養は AH109A の FDG の取り込みに影響を与えないという結果を報告し、同時に AH109A における FDG 輸送形式が単純な Michaelis-Menten 式では説明できない現象であることを報告した[27]。

一般に、グルコースの細胞内輸送は Michaelis-Menten 式で表現される促進拡散によって行われる[7, 24]。グルコースの類似体である FDG の細胞内輸送も同じ輸送系によって行われる[21]のために、それに準じた方法で解析できると考えられる。そこで本研究では AH109A で観察された特徴的な FDG 細胞内輸送形式について、細胞の培養条件やステロイド作用時間など基本的条件の違いにより生じる影響について検討した。加えて ^3H -FDG および ^3H -3-O-MeG の輸送形式について、各基質濃度と細胞内輸送速度との関係およびトランスポーターとの特異性から速度論的に検討し、*in vivo* で投与したステロイド (デキサメサゾン) によるこの輸送系への影響について検討した。また、対照として Donryu rat 赤血球における FDG 輸送系について解析し、AH109A における糖取り込みの機能的な特徴について考察する。

2 材料および方法

2.1 使用細胞株と培養液

東北大CYRIC核医学研究部より提供されたラット腹水肝癌 (AH109A) を使用した。細胞培養液として、Glucoseを含まないRPMI (RPMI1640- MEDIUM, SIGMA-Aldrich Co. Ltd., USA) に100U/ml penicillin、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin、10mM HEPESおよび7.5% NaHCO_3 (1.5ml/100ml) を加えたものあるいはRPMI Medium 1640 (GIBCO) に100U/ml penicillin、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycinを加えたもの (いずれもNCS(-)RPMI) を用いた。上記のGlucose-free RPMIに10%のNCS (newborn calf serum ; SIGMA-Aldrich Co. Ltd. : 56°C30分非動化済み) を加えたものをNSC(+)/Glucose-free RPMIとした。

2.2 供試動物

7~9 週齢の rat (Donryu、雄、日本エスエルシー、浜松) を購入し、実験に供するまで数日~数週間馴致した。飼料および飲水は自由摂取とし、8~12 週齢(9.9 \pm 1.5 ; mean \pm sd)、体重 250~410g(339 \pm 57)で実験に供した。また、実験前日は絶食、水は自由摂取とした。

2.3 放射性同位元素 (RI)

^3H -FDG (2-Fluoro-2-deoxy-D-glucose[5,6- ^3H] mw 182.1) および ^3H -methylglucose (Methyl-D-glucose, 3-O-[methyl- ^3H] mw 194.2 ;いずれも American Radiolabeled Chemicals Inc., USA) を使用した。いずれの RI も、RPMI を用いて希釈して実験に供した。

2.4 実験使用細胞の準備

2.4.1 ラット赤血球浮遊液の調整

実験を行う約 10 日前に 5×10^7 cell/0.5ml の AH109A を腹腔内接種した Donryu rat(12 週齢、雄)にペントバルビタール (ソムノペンチル、共立製薬、東京) 50mg/kg を腹腔内投与して深麻酔状態を得た後、開腹して腹大動脈から採血した。RPMI を用い 1200rpm で 6 分間の遠心分離を 3 回繰り返せし、RPMI に再浮遊させ、約 2.0×10^7 cell/ml に細胞数を調整した。

2.4.2 腫瘍株 (AH109A) の継代・維持と浮遊液の調整

AH109A は下記の手順で腹水の接種により維持されているものを使用した。本研究室で継代・維持されているラット (Donryu rat の腹腔内に約 5×10^7 個/0.5ml の AH109A を腹腔内接種し 7~10 日経過したもの) より約 1ml の腹水を採取する。これを遠心分離し上清を捨て、適量のグルコース加培養液に浮遊させ、細胞数を 5×10^7 個/0.5ml に調整し、細胞浮遊液を作成した。この細胞浮遊液を、新たな Donryu rat 腹腔内に接種することを繰り返して継代を維持した。

AH109A は 7~10 週齢の雄の Donryu rat へ AH109A 約 5×10^7 個/0.5ml を腹腔内接種し、8~13 日後に腹水が十分に貯留した状態から採取したものを実験に用いた。採取した腹水約 1ml を RPMI に浮遊させ、1200rpm で 6 分間遠心分離後、PBS に再浮遊させ、50%PERCOLL (ICN Biomedicals Inc. OH USA) の上に静かに重層し、再度 2300rpm で 10 分、遠心分離した。分離した細胞は RPMI に再浮遊させ、NCS(-)または NCS(+)RPMI を用いて 1200rpm で 6 分間の遠心分離・洗浄を 3 回繰り返した後、RPMI に再浮遊させ細胞数を 2.0×10^6 個/ml に調整し、細胞浮遊液とした。この処置による分離した腫瘍細胞の純度は、Giemsa 染色により 90%以上であることを確認した。

2.5 ^3H -FDG、 ^3H -3-O-MeG の細胞内輸送速度の測定

調整した細胞浮遊液(ラット赤血球: 約 2.0×10^7 cell/ml, AH109A : 約 2.0×10^6 個/ml) およびトリチウム標識グルコース誘導体 (^3H -FDG 約 68kBq/ml または ^3H -3-O-MeG 約 114kBq/ml) を NSC(-) Glucose-free RPMI で希釈・調整した溶液をそれぞれ作製した。また、D(+)-glucose を NCS(-)RPMI に溶解し、ろ過滅菌後、最終グルコース濃度が約 0.14~26.6mM となるようグルコース希釈列を調整した。

細胞浮遊液 (約 2.0×10^6 cell/ml) を 100 μl ずつ 96 穴マルチウェルプレートに分注し、各ウェルにグルコース希釈列を 50 μl ずつおよび RI 溶液 (^3H -FDG または ^3H -3-O-MeG) を 50 μl ずつ分注した。その後、5%CO₂ インキュベータにて 30-180 分間培養した。

ここで、ラット赤血球では ^3H -FDG について 180 分培養し、AH109A では ^3H -FDG および ^3H -3-O-MeG についてその培養時間の影響も考慮し 30、60、120 および 180 分培養した。その後、マルチウェルプレート内の培養液を、バキュームマニホールド (マルチスクリーン バキュームマニホールド; MILLIPORE Co. MA USA) で吸引し、PBS(-)を 200 μl 加え細胞の洗浄および吸引を 3 回繰り返した。洗浄後、細胞が捕集されたフィルタをパンチキット (マルチスクリーン パンチキット; MILLIPORE Co.) で分離した。このフィルタは、2.5ml の液体シンチレータ (クリアゾル II ; ナカライテクス、京都) を含むバイアル瓶に入れ、デジタル液体シンチレーションアナライザ (TRI-CARB 2500TR シリーズ; PACKARD, CA USA) にてフィルタ中のトリチウム含量を 1 検体につき 10 分間ずつ 2 回測定した。測定結果より、RI の細胞内取り込み率を算出した。また培養時間と AH109A の細胞内取り込み率の時間依存性について、培養 30 分間に対するそれぞれの培養時間との相対比から求めた。

2.6 AH109A 細胞内輸送速度に対するデキサメサゾン投与の影響

AH109A 5×10^7 個/ml をラットに腹腔内接種した約 10 日後に、そのラットから腹水約 1ml を control として採取後、デキサメサゾン（水性デキサメサゾン注 A ; ZENOAQ、郡山）を腹腔内投与（1-2mg/kg）した。さらにその 4 または 6 および 12 時間後に同様に腹水約 1ml を採取し細胞浮遊液を調整した。

これら control およびデキサメサゾン投与 4-12 時間後の AH109A 細胞浮遊液は、前述の方法と同様に調整し、その $^3\text{H-FDG}$ 、 $^3\text{H-3-O-MeG}$ の取り込み速度を求めた。AH109A 約 2.0×10^6 個/ml を 100 μl ずつ 96 穴マルチウェルプレートに分注し、各ウェルにグルコース希釈液を 50 μl ずつおよび RI 溶液を 50 μl ずつ分注した。その後、5% CO_2 インキュベータにて 60-180 分間培養し、細胞洗浄後、フィルタに捕集された細胞内 RI を液体シンチレーションカウンタにて測定した。

2.7 細胞内輸送に関する各パラメータの解析

各基質濃度に対する細胞内への $^3\text{H-FDG}$ あるいは $^3\text{H-3-O-MeG}$ の取り込み率は Eq.1 により計算した。

$$\text{取り込み率 (\%)} = \frac{\text{well当たりの細胞のRI取り込み量}}{\text{well当たりのRI添加量}} \times 100 \quad \dots \text{Eq.1}$$

各基質濃度に対応する細胞内取り込み速度は、その基質濃度での取り込み率に基質濃度を掛け、細胞培養時間で割ることで算出した。各基質濃度と $^3\text{H-FDG}$ および $^3\text{H-3-O-MeG}$ の取り込み速度については下記の三種類のプロットで表現した。

1. 飽和曲線（基質濃度－取り込み速度のプロット）
2. Eadie-Hofstee plot
3. Lineweaver-Burk plot（両逆数プロット）

ここで Eadie-Hofstee plot ではトランスポーターの特異性・最大速度をもっともよく表現できる。これら三種類のプロットより、最大取り込み速度（ V_{max} ）およびトランスポーターとの親和性に関するパラメータには、EXCEL マクロで作成された非線形最小自乗法プログラム(MULTI)を用いてシミュレーションとともに算出した。

2.8 統計解析

$^3\text{H-FDG}$ あるいは $^3\text{H-3-O-MeG}$ の取り込みパラメータ（取り込み率および取り込み速度）は、control とデキサメサゾン投与 4、6 および 12 時間後のパラメータについて、正規性の検定（U 検定）および等分散検定（F 検定）後、二標本 t 検定もしくは Welch の t 検定によって解析した。いずれも $p < 0.05$ の場合に統計学的有意差ありと判定した。

3 結果

3.1 血清中グルコースの影響および赤血球の ^3H -FDG 取り込み特性

NSC(-)RPMI あるいは NSC(+)RPMI を培養液として用いた場合の Donryu rat 赤血球における培養 180 分後の ^3H -FDG 細胞内取り込みを Fig.3、Table1 に示した。NCS 添加によってグルコース濃度に応じて全体の取り込み速度が増加し、Lineweaver-Burk plot (Fig.3-2) および Eadie-Hofstee plot (Fig.3-3) でも低濃度領域での細胞内輸送速度の上昇が観察された。求められた速度論的パラメータでも、NCS 添加の結果、赤血球への FDG の受動拡散定数 γ は約 2.5 倍、見かけ上の K_m は約 0.1 倍以下、最大取り込み速度 (V_{max}) は NCS 添加の有無に関わらず同程度の値であった。

3.2 ^3H -FDG および ^3H -3-O-MeG 取り込みの時間依存性

各基質濃度およびそれぞれの培養時間条件に対する ^3H -FDG および ^3H -3-O-MeG の AH109A への取り込み率を Fig.4-1a、b に示す。各培養時間における平均取り込み率 (Fig. 4-2a、b) は、いずれのトレーサーを用いた場合の取り込みも培養時間に対応して増加が認められた。しかしながら、 ^3H -FDG の取り込み率は培養時間に比例し、ほぼ直線状に増加したことにに対し、 ^3H -3-O-MeG の取り込み率は培養 30 分から 60 分までの増加に対し 60 分以降で漸減していることが示された。

3.3 AH109A の ^3H -FDG 取り込み特性

^3H -FDG の AH109A における取り込み率を Fig.5-1a に示す。 ^3H -FDG の細胞内取り込み率は、基質濃度約 1mM まではほぼ一定で (Fig.5-2a)、1mM 以上では基質濃度の増加に伴って減少した。これは、ラット赤血球において ^3H -FDG の細胞内取り込み率が基質濃度の増加に伴い漸減した傾向を示した (Fig.5-2a、b) こととはやや異なっていた (Fig.5)。また AH109A の取り込み率はラット赤血球に対し、1mM までは約 100 倍以上高く取り込んでいたのに対し、それ以降のグルコース濃度の上昇に伴い急速に低下し、最高濃度 (26.6mM) での取り込み率は赤血球の数倍程度となった。一方で ^3H -FDG の細胞内取り込み速度 (Fig.6) は、基質濃度 1mM まで急激に増加した後、生理的血糖値に近い 5mM 付近までは基質濃度に依存した減少が認められたが、6mM を超えた基質濃度において、再び増加が認められた。

この ^3H -FDG の細胞内取り込み速度 (Fig.7、8) および取り込み率 (Fig.8-4) はデキサメサゾン投与により見かけ上有意な変化は認められなかった。しかしながら高基質濃度領域において取り込み速度の低下と、最大濃度 (26.6mM) で統計的に有意な低下が観察され、解析されたパラメータでも有意な受動拡散定数 γ の著しい低下が示された (Fig.7-1b)。

3.4 AH109A の ^3H -3-O-MeG 取り込み特性

^3H -3-O-MeG の AH109A における取り込み速度および取り込み率を Fig.9 に示した。 ^3H -FDG とは異なり、 ^3H -3-O-MeG の細胞内への取り込み速度は濃度に比例して増加した。また、 ^3H -3-O-MeG の取り込み率は基質濃度に関係なくほぼ一定 (約 0.01%) で、基質濃度の増加による低下などの影響は観察されなかった。

加えて ^3H -3-O-MeG 細胞内取り込み率および取り込み速度は、デキサメサゾン投与 6 および 12 時間後の結果では、用いた最高基質濃度 (6.66mM) において、さらにデキサメサゾン投与 6 時間後に基質濃度 4.44mM において、control に対し有意な低下が認められた (Fig.10-1、10-4)。

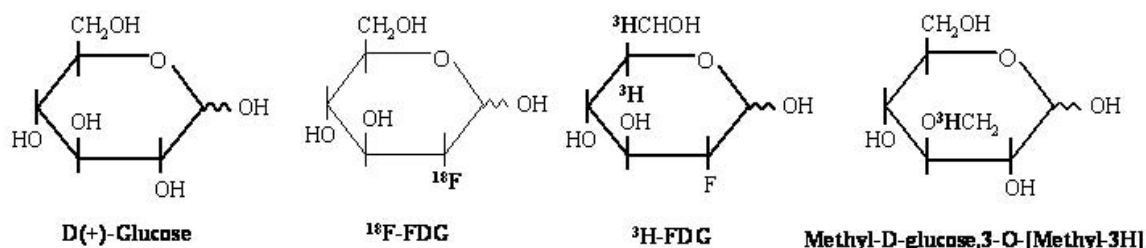


Fig.1 D(+)-Glucose、FDGおよび³H-3-O-MeGの構造式

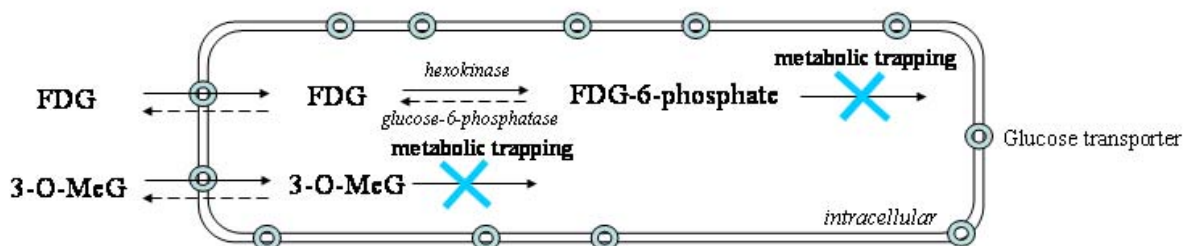


Fig.2 FDGおよび3-O-MeGの代謝経路

FDGおよび3-O-MeGはグルコースと同様、輸送担体により促進拡散として細胞膜を通過して細胞内に取り込まれる。FDGはhexokinaseによるリン酸化を受け、FDG-6-phosphateの形で、3-O-MeGは代謝を受けずそのままの形で細胞内に留まる。

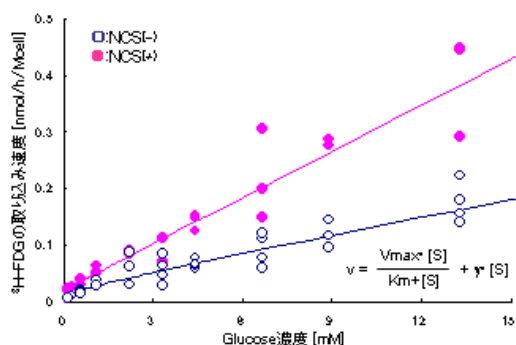


Fig.3-1 赤血球の基質濃度と³H-FDG取り込み速度との関係(飽和曲線)

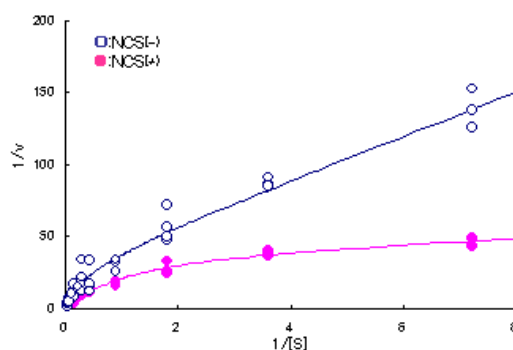


Fig.3-2 赤血球の基質濃度と³H-FDG取り込み速度との関係(Lineweaver-Burk plot)

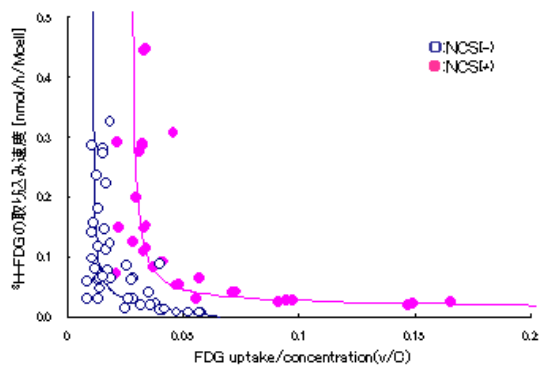


Fig.3-3 赤血球の基質濃度と³H-FDG取り込み速度との関係(Eadie-Hofstee plot)

Table.1 赤血球の取り込みパラメータ

	NCS(-)		NCS(+)	
	mean	sd	mean	sd
Vmax1 (nmol/h/Mcell)	0.023	±0.010	0.022	±0.010
Km1 (mM)	0.417	±0.367	0.031	±0.193
γ (h/Tcell)	0.011	±0.001	0.027	±0.002

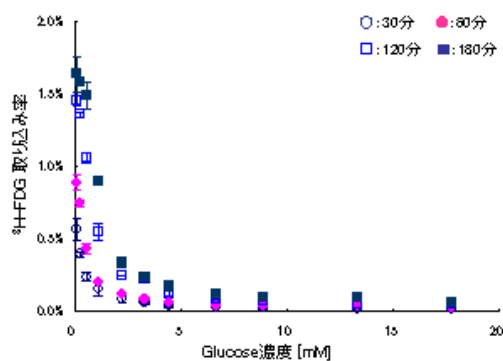


Fig.4-1a AH109Aの各培養時間ごとの³H-FDG取り込み率

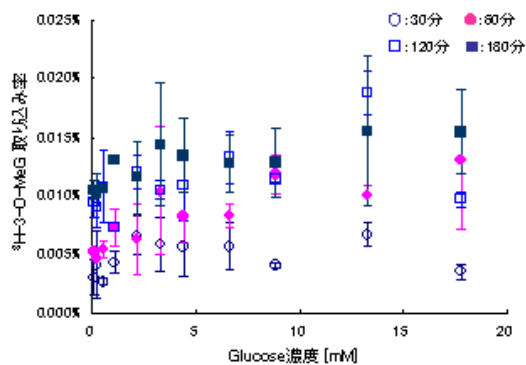


Fig.4-1b AH109Aの各培養時間ごとの³H-3-O-MeG取り込み率

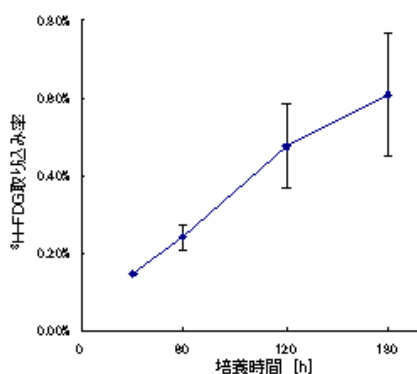


Fig.4-2a AH109Aの各培養時間における平均³H-FDG取り込み率

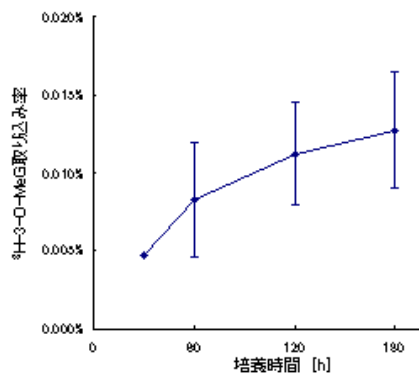


Fig.4-2b AH109Aの各培養時間における平均³H-3-O-MeG取り込み率

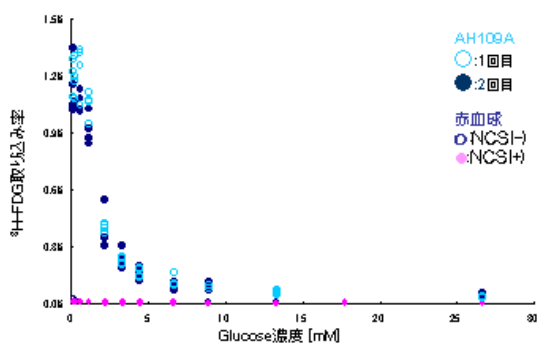


Fig.5-1a AH109Aおよび赤血球の³H-FDG取り込みと基質濃度との関係

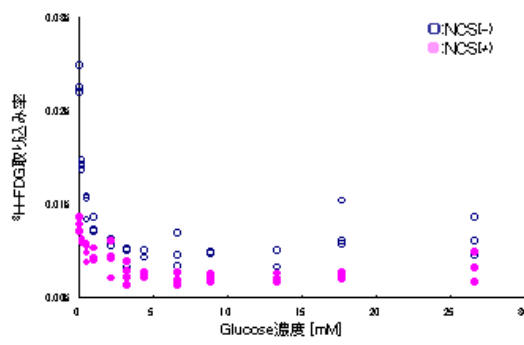


Fig. 5-1b 赤血球の³H-FDG取り込みと基質濃度との関係

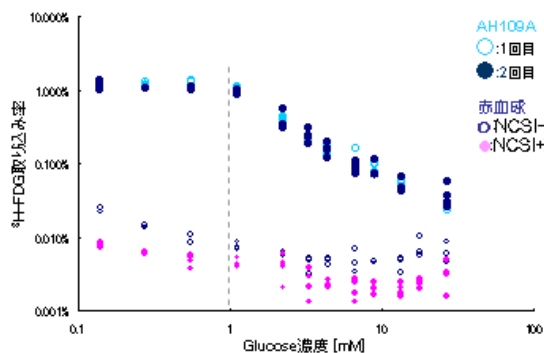


Fig.5-2a AH109Aおよび赤血球の³H-FDG取り込みと基質濃度との関係

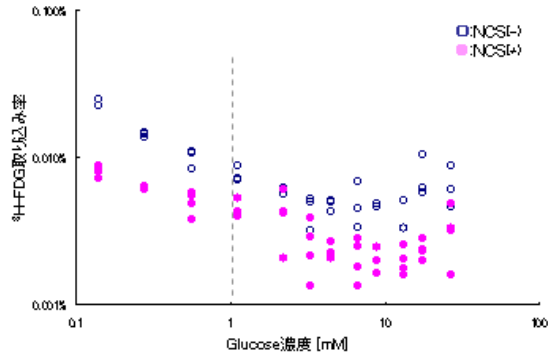


Fig.5-2b 赤血球の³H-FDG取り込みと基質濃度との関係

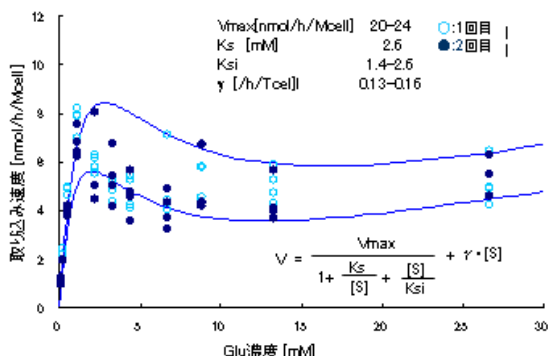


Fig. 6-1 AH109Aの基質濃度と³H-FDG取り込み速度との関係 (飽和曲線)

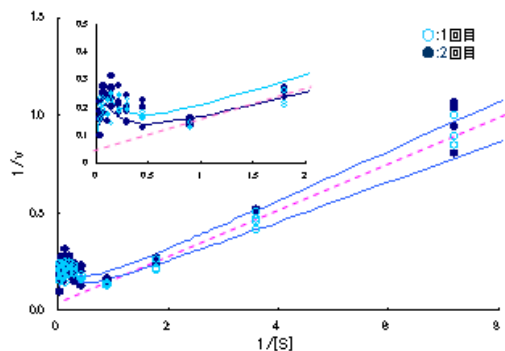


Fig. 6-2 AH109Aの基質濃度と³H-FDG取り込み速度との関係 (lineweaver-Burk plot)

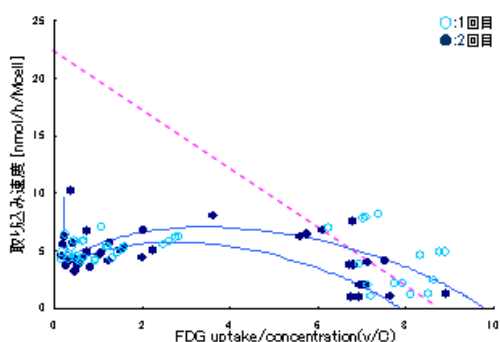


Fig. 6-3 AH109Aの基質濃度と³H-FDG取り込み速度との関係 (Eadie-Hofstee plot)

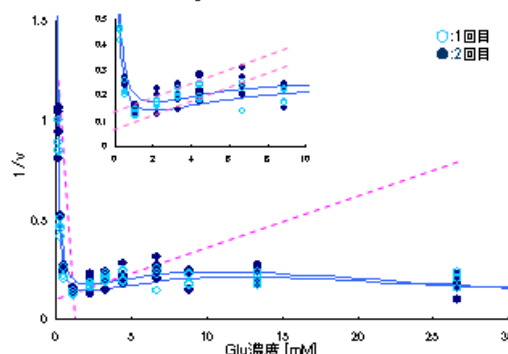


Fig. 6-4 AH109Aの基質濃度と³H-FDG取り込み速度との関係

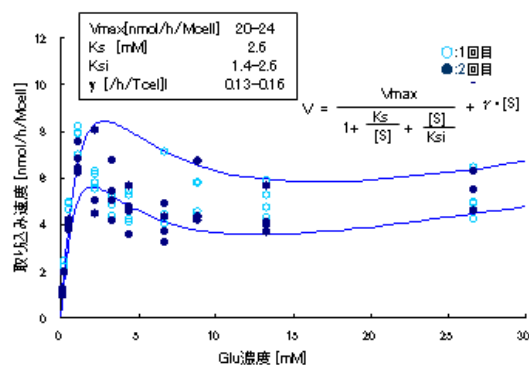


Fig. 7-1a AH109Aの基質濃度と³H-FDG取り込み速度との関係 (飽和曲線)

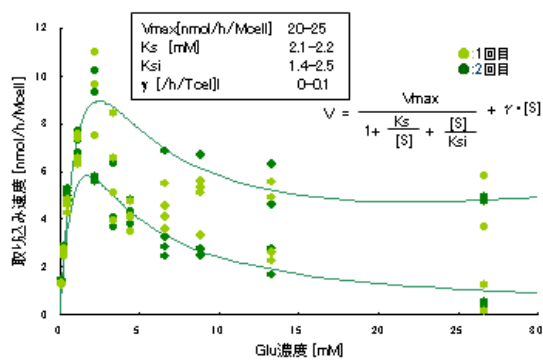


Fig. 7-1b デキサメサゾン投与4時間後のAH109Aの基質濃度と³H-FDG取り込み速度との関係 (飽和曲線)

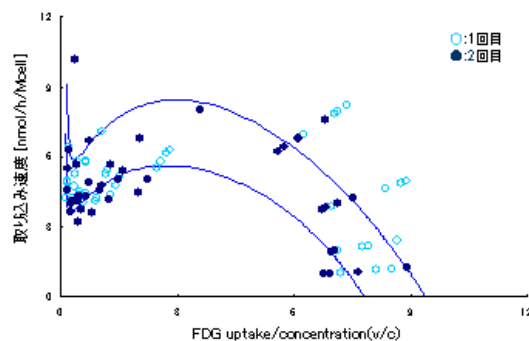


Fig. 7-2a AH109Aの基質濃度と³H-FDG取り込み速度との関係 (Eadie-Hofstee plot)

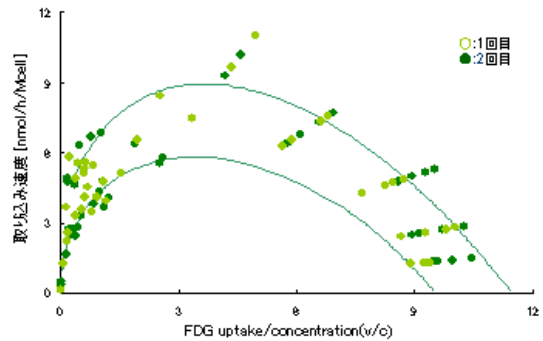


Fig. 7-2b デキサメサゾン投与4時間後のAH109Aの基質濃度と³H-FDG取り込み速度との関係 (Eadie-Hofstee plot)

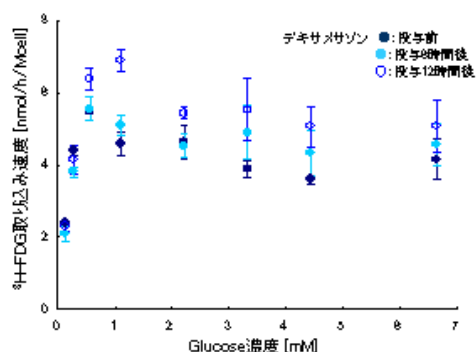


Fig 8-1 デキサメサゾン投与前後のAH109Aの³H-FDG取り込みと基質濃度との関係(飽和曲線)

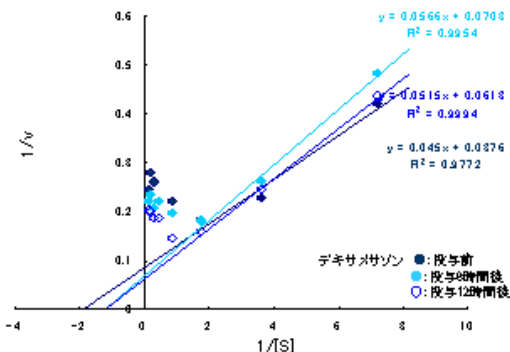


Fig 8-2 デキサメサゾン投与前後のAH109Aの³H-FDG取り込みと基質濃度との関係 (Lineweaver-Burk plot)

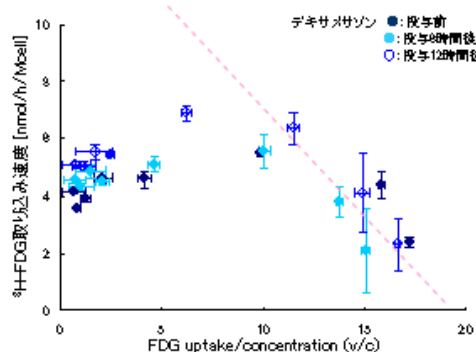


Fig 8-3 デキサメサゾン投与前後のAH109Aの³H-FDG取り込みと基質濃度との関係(Eadie-Hofstee plot)

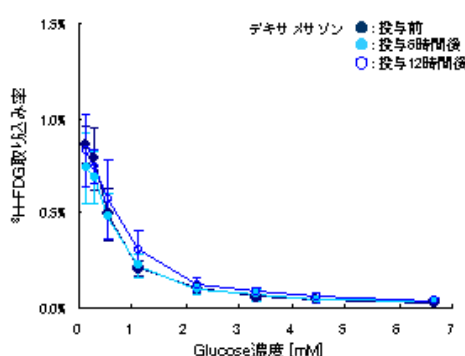


Fig 8-4 デキサメサゾン投与前後の³H-FDG取り込み率と基質濃度との関係

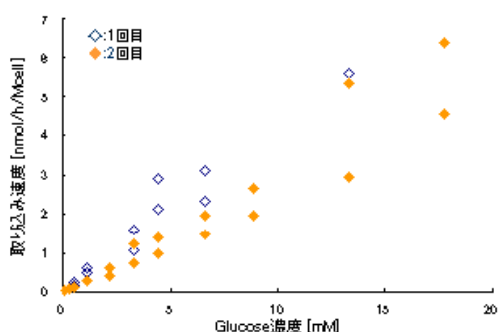


Fig 9-1 AH109Aの基質濃度と³H-3-O-MeG取り込み速度との関係(飽和曲線)

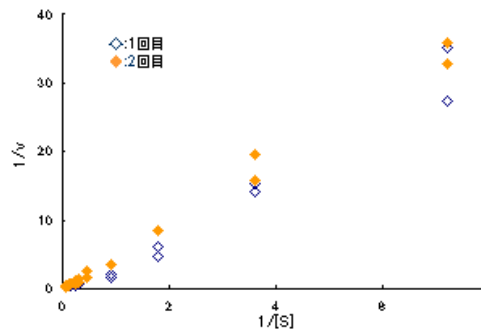


Fig 9-2 AH109Aの基質濃度と³H-3-O-MeG取り込み速度との関係 (lineweaver-Burk plot)

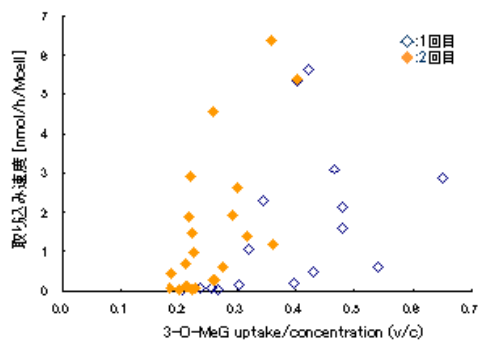


Fig 9-3 AH109Aの基質濃度と³H-3-O-MeG取り込み速度との関係 (Eadie-Hofstee plot)

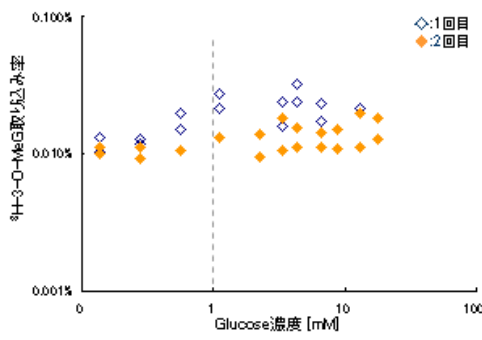


Fig 9-4 AH109Aの³H-3-O-MeG取り込み率と基質濃度との関係

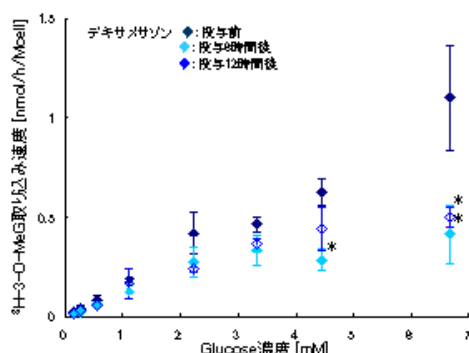


Fig.10-1 デキサメサゾン投与前後のAH109Aの³H-3-O-MeG取り込みと基質濃度との関係(飽和曲線)

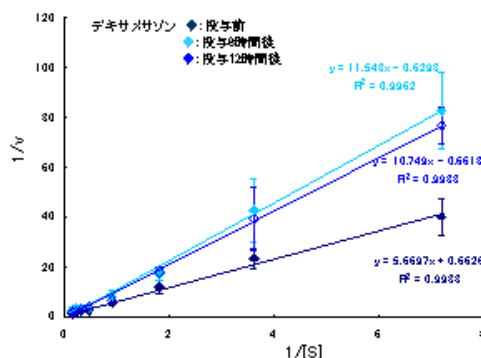


Fig.10-2 デキサメサゾン投与前後のAH109Aの³H-3-O-MeG取り込みと基質濃度との関係 (Lineweaver-Burk plot)

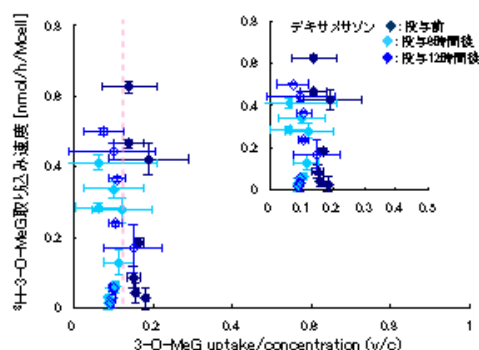


Fig.10-3 デキサメサゾン投与前後のAH109Aの³H-3-O-MeG取り込みと基質濃度との関係(Eadie-Hofstee plot)

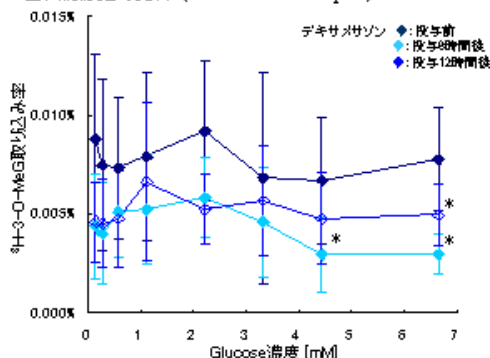


Fig.10-4 デキサメサゾン投与前後の³H-3-O-MeG取り込み率と基質濃度との関係

図中の*印はcontrol群に対して有意差有り (p<0.05)

4 考察

4.1 赤血球の 3H-FDG 取り込み特性

グルコースの取り込みは主に促進拡散型の輸送担体である GLUT を介して行われるが、この輸送担体は基質特異性を有し特定の基質あるいはそれと極めて類似した物質のみを輸送する[24]。輸送担体である GLUT の作用は酵素と非常に類似し[7, 24]、促進拡散の取り込み速度は一般的な酵素反応速度論と同様、Michaelis-Menten の式によって表され[18]、3つのパラメータ (Vmax、Km、 γ) により以下の式 (Eq.2) で表現される。

$$V = \frac{V_{\max} \times S}{K_m + S} + \gamma \times S \quad (S \text{は基質濃度}) \quad \dots \text{Eq.2}$$

Eq.2 において Vmax はトランスポーターの最大取り込み速度、Km は最大取り込み速度の半分に達する時点での基質濃度 (Michaelis 定数)、 γ はリン脂質二重膜を通しての受動拡散定数値を表している[2, 18, 29]。

赤血球におけるグルコース代謝は他の細胞と同様に行われ、GLUT により取り込まれた FDG はヘキソキナーゼによりリン酸化され、FDG-6-phosphate として細胞内に滞留する[39]。GLUT には組織依存性のサブタイプが存在し、赤血球では GLUT1 が発現する。この GLUT1 はグルコースに対して高親和性で、その Km 値は 1.5mM ほどである[7, 24]。赤血球における促進拡散はこの GLUT1 を介して行われ、グルコースは単純拡散と比べて約 5 万倍も早い速度で細胞内に取り込まれる[24]。

Eadie-Hofstee plot は Michaelis-Menten 式を変形した直線式の一つで、 V (取り込み速度) / $[S]$ (基質濃度) と V の値でプロットすることで得られる。このグラフは反応速度の誤差に敏感で、反応が Michaelis-Menten の式に合致するか判定するのに有効である。このグラフでは単純拡散は取り込み速度の高い部分で Y 軸と平行なプロットとして表現される[2]。

赤血球の FDG の細胞内輸送は Michaelis-Menten で表現される飽和曲線を示し(Fig.3-1)、飽和曲線および Eadie-Hofstee plot(Fig.3-3)のいずれにおいても単純拡散を示す現象が認められた。赤血球における糖の取り込みの大部分は促進拡散によって行われると報告されている[18, 24]が、本実験では赤血球への単純拡散の存在も示された。これは、本実験はラットの生理的血糖値(85-132mg/dl[3]、約 4.72-7.33mM)よりはるかに高い基質濃度(最大 26.6mM)を用いて行ったため、外部のグルコース濃度に依存した単純拡散が顕著に現れたものと考えられる。

4.2 血清 (NCS) 添加の FDG 赤血球内輸送速度への影響

Fig.3 および Table1 に示されたように、ラット赤血球の FDG 輸送速度は、NCS 添加により K_m の著しい低下と受動拡散定数 γ の約 2.5 倍の上昇となった。飽和曲線でも、NCS(+RPMI) を用いた場合、いずれの基質濃度においても NCS(-RPMI) を用いた場合と比べ、取り込み速度が上回った。このためこの現象は一見、NCS 添加により GLUT に対する親和性が増加したように考えられた。ところが、これは NCS(+RPMI) を用いた場合の基質濃度は NCS に含まれたグルコース濃度を考慮していなかったため、実際の曲線は NCS に含まれるグルコース濃度の分、基質濃度の高い方 (右方) へシフトすると予想される。実際に NCS 中のグルコース濃度は約 4.1mM[8]程度が報告され、したがって本実験では NCS を RPMI へ 10%添加したため、グラフ全体がおおよそ 0.4mM 分右方へシフトすることとなる。この結果、NCS(-)および NCS(+)の K_m 値の差は添加した血清の量とほぼ一致し、 K_m は実質的に影響を受けないと考えられる。いずれの RPMI を用いた場合も V_{max} の値は実質的に基質濃度に影響を受けないパラメータであるため、NCS の添加による FDG 取り込み速度への影響はほとんどないと考えられる。

一方で、NCS 添加条件で受動拡散定数 γ は約 2.5 倍増加した。このことから、NCS 中のグルコース以外の成分によって、見かけ上の単純拡散定数が増加し、これは細胞膜の透過性亢進、細胞内グルコース濃度の低下、もしくはその両方の作用の結果であると考えられた。

しかしながら、NCS(-)RPMI を用いた場合の赤血球における K_m 値は 0.42 ± 0.37 mM (平均 \pm 標準偏差)であった。これはこれまでに報告されている K_m 値(1.5mM[7, 24])より十分低い値であり、本実験ではトランスポーターとの親和性を過大評価している可能性が示された。この結果は生理的血糖値よりはるかに高い基質濃度 (最大 26.6mM) による単純拡散を反映したものと考えられ、生理的血糖値までの基質濃度に対して同じ値を用いて単純拡散を考慮せずに同様の方法で解析を行った場合、 V_{max} 0.088 ± 0.01 nmol/h/Mcell、 K_m 1.91 ± 0.60 mM となり、報告されている K_m 値に近い値を得た。このことから、細胞内への糖取り込みの大部分が促進拡散といわれる赤血球においても、基質が高濃度である場合には単純拡散による影響が強く反映されることが示された。

in vitro において糖取り込みに関するトレーサー実験を行う場合、一般に実験を行う前は PBS あるいは Glucose-free の培養液により使用細胞のプレインキュベーション (30 分~24 時間) を行い、細胞を糖欠乏状態とする[9, 10, 31]。本実験で用いた AH109A は *in vitro* の環境下では増殖が見られず、プレインキュベーションを行うことによる糖の取り込みや代謝機序の変化が危惧されたため、前日からの絶食により高血糖状態を避けるようにした。また前述のように、今回用いた血液は AH109A を接種した Donryu rat の血液でもあるため、健康な動物の血液を用いれば異なる値となる可能性を有している。しかし、今回の結果より、腫瘍を実験的に接種した個体であっても、その赤血球の糖取り込みはグルコースの促進拡散を表す Michaelis-Menten 式で表現され、腫瘍細胞の FDG 取り込みと比較可能なデータとして利用可能であることが示された。

4.3 ^3H -FDG および ^3H -3-O-MeG 取り込みの時間依存性

^3H -FDG および ^3H -3-O-MeG を AH109A と反応させるための培養時間を決定するために、異なる培養時間における取り込み率を比較した。マイクロオートラジオグラフィにより測定したラットに作製した乳腺腫瘍および肝癌細胞の ^{18}F -FDG および ^3H -DG の取り込みは、RI の静脈内投与後 60 分まで増加し、その後 120 分までは取り込みが減少するという報告[23]、ヒトの PET スキャンにおいて肺原発腫瘍およびリンパ腫では FDG 投与 60 分後より 120 分後で取り込みが高くなるという報告[22]より、培養時間のタイムコースを 30、60、120、そして 180 分とした。結果より、 ^3H -FDG の取り込み率は培養時間に比例してほぼ直線状に増加し(Fig.4-1a、4-2a)、 ^3H -3-O-MeG の取り込み率は平均値では培養 60 分以降で増加の低下が見られた(Fig.4-1b、4-2b)。

しかし、 ^3H -3-O-MeG の取り込み率は ^3H -FDG の約 1.0~25%ほどと小さいため誤差が大きく、誤差を考慮すると増加の程度は ^3H -FDG より緩やかであるものの、時間の延長に比例した取り込み率の増加と考えられた。このため、 ^3H -FDG および ^3H -3-O-MeG によるデキサメサゾン投与 6 および 12 時間後の影響を検討する際のトレーサーとの培養時間を、いずれのトレーサーにおいても取り込みに直線的な比例関係の認められた 60 分間とした。 ^3H -FDG の培養時間の延長に伴う取り込みの増加は 180 分まで直線性が維持されたため、デキサメサゾン投与 4 時間後の ^3H -FDG 細胞内取り込みに対する影響の検討は 180 分の培養時間で実施した。

4.4 AH109A の ^3H -FDG 取り込みの基質濃度依存性

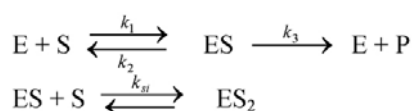
AH109A は Donryu rat の腹水で継代でき、さらに皮下や筋肉内、臓器などに接種することで固形腫瘍を形成するため、腫瘍に関する研究によく用いられる細胞株である[19, 34, 35, 41]。今回、この AH109A を用いた FDG 取り込み実験の結果より、AH109A の FDG 取り込み速度は基質濃度に対し一度増加した後に減少し、再度増加するという特異な現象が認められた(Fig.6)。

この現象は、ある酵素反応において高濃度の基質が存在する場合、酵素に複数の基質分子が結合し不活性な酵素-基質複合体が形成されたり、基質分子が酵素の活性因子を捕捉するなどして、酵素反応の阻害が起こった場合に観察される現象[2, 24]に類似していた。このため AH109A には高濃度の基質存在下では GLUT もしくはその下流のヘキソキナーゼにおいて、この酵素反応と同様の現象が生じている可能性が示された。このような反応が起こる場合の取り込み速度は、Michaelis-Menten の式では表現することができず、阻害定数 K_{si} を考慮した以下の式(Eq.3)で表現される。

$$V = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{K_s}{[S]} + \frac{[S]}{K_{si}}} + \gamma \times [S] \quad (\text{S は基質濃度}) \dots \text{Eq.3}$$

上記の式 (Eq.3) の V_{\max} はトランスポーターの最大取り込み速度、 γ はリン脂質二重膜を通しての受動拡散定数値、 K_s は酵素-基質複合体の解離定数、 K_{si} は過剰の基質による阻害定数を表している[2, 18, 29]。

2 分子の基質が酵素の触媒部位に結合して酵素を不活性化すると仮定すると、酵素反応は下記の反応形式に従って進行する。



酵素-基質複合体の解離定数を K_s 、過剰の基質による阻害定数を K_{si} とおくと

$$K_s = \frac{[E][S]}{[ES]} \quad \dots \text{Eq.4}$$

$$K_{si} = \frac{[ES][S]}{[ES_2]} \quad \dots \text{Eq.5}$$

となる。酵素の濃度の関係式は

$$[E]_0 = [E] + [ES] + [ES_2] \quad \dots \text{Eq.6}$$

である。Eq.4, Eq.5 より

$$[E] = \frac{K_s [ES]}{[S]}$$

$$[ES_2] = \frac{[ES][S]}{K_{si}}$$

これらの式を Eq.6 に代入すると

$$[E]_0 = \frac{K_s [ES]}{[S]} + [ES] + \frac{[ES][S]}{K_{si}} = \left(1 + \frac{K_s}{[S]} + \frac{[S]}{K_{si}}\right) [ES]$$

$$[ES] = \frac{[E]_0}{1 + \frac{K_s}{[S]} + \frac{[S]}{K_{si}}}$$

$$v = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{K_s}{[S]} + \frac{[S]}{K_{si}}} \quad \dots \text{Eq.7}$$

という反応速度と基質濃度との関係式が得られる。この反応を促進拡散による糖輸送にあてはめると、「酵素」とは GLUT あるいは細胞内ヘキソキナーゼ活性を示し、「酵素反応の阻害」は基質による GLUT の機能変化あるいはヘキソキナーゼ以下の酵素活性の変化を表す。実際の糖輸送においては単純拡散による取り込みが存在すると報告されており[24]、また本実験の結果から得られた Eadie-Hofstee plot においても単純拡散を示す Y 軸と平行な成分が認められていた(Fig.6-3)。これらのことより、AH109A における FDG 取り込みの飽和曲線は、Eq.7 に単純拡散を考慮した Eq.3 の式から算出したシミュレーションカーブを用いた場合に非常によく当てはまり、基質阻害を示す促進拡散であると考えられた。非アロステリック酵素の反応速度を示す飽和曲線は双曲線であり、この曲線から V_{\max} および K_m を算出することは困難である。そこで、反応が Michaelis-Menten の式で表現されるとき、その両逆数を取り、直線式へ導き、Y 軸に $1/V$ 、X 軸に $1/[S]$ をプロットした Lineweaver-Burk plot[18, 29]および V (取り込み速度) / $[S]$ (基質濃度) と V の値でプロットすることで得られる Eadie-Hofstee plot の外挿によりそれぞれの Y 切片から V_{\max} を求めることができる[3]。

Lineweaver-Burk plot の傾斜は K_m/V_{max} 、Y 切片および X 切片はそれぞれ $1/V_{max}$ 、 $-1/K_m$ となり、Eadie-Hofstee plot の傾斜は $-K_m$ 、Y 切片および X 切片はそれぞれ V_{max} 、 V_{max}/K_m となる。

しかし、今回用いた AH109A のように基質阻害が存在する場合、ある程度以上の基質濃度では高濃度の基質阻害により反応速度が低下するため、この場合の Lineweaver-Burk plot は直線にならない[2, 18, 29]。AH109A の $^3\text{H-FDG}$ の飽和曲線は 1mM 以上の基質濃度では反応速度が低下し(Fig.6-1)、Lineweaver-Burk plot では基質阻害のパターンのグラフを示し (Fig.6-2)、Eq.3 のシミュレーションカーブと一致した。このため、FDG の取り込みにおいて、Lineweaver-Burk plot で表された「基質阻害」は、グルコースによる GLUT の機能やヘキソキナーゼ活性の変化などに伴う取り込み速度の低下を示していると考えられた。この現象は赤血球では認められず(Fig.3)、今回使用した AH109A に発現する GLUT の特徴であると考えられた。

基質阻害が存在するときの飽和曲線から V_{max} 、 K_m を算出することは困難であり、AH109A の $^3\text{H-FDG}$ の取り込みを表すシミュレーションカーブ(Eq.3)から算出した $^3\text{H-FDG}$ の取り込みパラメータ(Fig.6-1)は誤差が大きく、信頼性が低いと考えられた。しかし、基質による酵素反応の阻害が存在する場合であっても、 $[S] \ll K_s$ では Eq.3 は Michaelis-Menten の式に従うことになるので、Lineweaver-Burk plot の直線部分の外挿により V_{max} と K_m を求めることができる。 $[S] \gg K_s$ の場合には Eq.3 は次の式に近似される。

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{K_{si} \cdot V_{max}} \times [S] + \frac{1}{V_{max}} \quad \dots \text{Eq.8}$$

従って X 軸に $[S]$ 、Y 軸に $1/V$ をプロットしたグラフの X 切片が K_{si} 、Y 切片が $1/V_{max}$ となる。今回 Eq.3 のシミュレーションカーブ(Fig.6-1)より算出したおおよその V_{max} 値は 20-24nmol/h/Mcell であり、Lineweaver-Burk plot(Fig.6-2)、Eadie-hofstee plot(Fig.6-3)およびの Eq.8 (Fig.6-4) の外挿から得られた V_{max} はそれぞれおおよそ 20nmol/h/Mcell、20-25nmol/h/Mcell、7.7-12.5nmol/h/Mcell であった。Eq.8 の外挿より算出した V_{max} は他のプロットから求めた値のおおよそ半分で、ばらつきも大きかった。このことより、Eq.8 は AH109A のように $[S] \gg K_s$ の範囲で単純拡散による影響が顕著に現れるような特徴的な取り込みの評価には適さないと考えられた。

6mM 以上の基質濃度で見られた FDG の取り込み速度の増加は基質濃度による濃度勾配に依存した単純拡散によるものであり、GLUT による糖輸送とは異なる経路の輸送である。通常、1mM 以上の基質濃度ではグルコースによる GLUT の糖輸送能あるいはヘキソキナーゼなどの細胞内酵素活性に変化が生じ、FDG の取り込み速度は減少すると考えられるが、6mM 以上という基質濃度はラットの生理的血糖値(85-132mg/dl[3])よりはるかに高いため、その高い濃度勾配の増加により単純拡散の程度が顕著となり、取り込み速度の増加が生じたのではないかと考えられた。

4.5 AH109A の $^3\text{H-3-O-MeG}$ 取り込みの基質濃度依存性

$^3\text{H-3-O-MeG}$ は GLUT 発現量にその取り込みが依存するトレーサーで、糖の取り込み実験には広く用いられている[9, 12, 21, 25, 26, 36, 37]。基質に 3-O-MeG を用い、非常に短時間 (20 秒~1 分程度) で反応させた場合、その取り込み速度は Michaelis-Menten の式で現される飽和曲線となる[1, 12]。今回、AH109A の $^3\text{H-3-O-MeG}$ 取り込み率は、基質濃度にかかわらず一定で(Fig.9-4)、Lineweaver-Burk plot においては基質阻害を受けないパターンが示された(Fig.9-2)。飽和曲線はほぼ直線状(Fig.9-1)で、Eadie-hofstee plot では Y 軸に平行なプロットとして表され(Fig.9-3)、単純拡散を示すグラフに類似した形となった。また、 $^3\text{H-3-O-MeG}$ 取り込み率の平均値は $^3\text{H-FDG}$ の約 1.0~25%程度であり、FDG に比べて著しく取り込みが少ないことが示された(Fig.4)。これらのことから、今回用いた AH109A において 3-O-MeG は、GLUT を介さない単純拡散に依存した機構においてのみ、細胞内に取り込まれる可能性が示された。

4.6 AH109A における糖取り込みへのデキサメサゾンによる影響

FDG の集積は FDG-6-phosphate の細胞内滞留に依存する。この FDG-6-phosphate の細胞内滞留に影響を与える因子としては、GLUT 発現量、Glucose-6-phosphatase 活性、ヘキソキナーゼ活性、ミトコンドリアによるリン酸化、細胞のエネルギー需要、細胞がおかれた環境の酸素分圧などが挙げられる[1, 6]。今回の実験の結果から、 ^3H -FDG の細胞内取り込みもこれら因子による影響を反映したと考えられた。

低基質濃度(0.14~6.66mM)におけるデキサメサゾン投与 6 時間および 12 時間後の AH109A の ^3H -FDG の取り込み率および取り込み速度は control と比べて有意な差が認められなかった(Fig.8)のに対し、高基質濃度(0.14~26.64mM)におけるデキサメサゾン投与 4 時間後の ^3H -FDG の取り込み率および取り込み速度は、飽和曲線の単純拡散を示す高基質濃度における取り込み速度の明らかな減少(Fig.7)および Eadie-Hofstee plot における Y 軸に平行なプロットの消失(Fig.7-2a, b)が認められ、このことから、ヘキソキナーゼ活性や促進拡散による FDG の輸送にデキサメサゾンは影響を及ぼさないことが示された。

一方、 ^3H -3-O-MeG の取り込み率および取り込み速度は、ラットの正常血糖値(85-132mg/dl[3])に近い基質濃度 6.66mM においてデキサメサゾン投与 6 時間および 12 時間後に、正常血糖値より低い 4.44mM においては投与 6 時間後に control と比べてそれぞれ有意な減少が認められた(Fig.10-1, 10-4)。Lineweaver-Burk plot においては control と比較して基質阻害を示す近似直線の傾きの増加が見られた(Fig.10-2)。

デキサメサゾン投与後、FDG および 3-O-MeG のいずれを用いた場合にも、単純拡散における取り込み速度の有意な減少が認められた。単純拡散による取り込みの減少は濃度勾配の減少によってのみ生じる[24]ため、今回観察された単純拡散の抑制はデキサメサゾン投与により細胞内グルコースが control と比較して増加していたことを意味する。糖質コルチコイドの投与により、全身の蛋白異化や脂肪分解が促進され、血糖が上昇するが、このとき脳および心臓以外の組織におけるグルコース取り込みは抑制される[15]。しかし、肝癌細胞株において *in vitro* でデキサメサゾンによる細胞内の Glucose-6-phosphatase の活性化が報告されており[11]、今回腹腔内にデキサメサゾンを投与したことにより、AH109A 内の Glucose-6-phosphatase が活性化し、細胞内グルコースが増加したことによって濃度勾配が低下したと考えられる。

腫瘍細胞表面では正常な細胞と比べて過剰な GLUT の発現が確認され、そのサブタイプは現在のところ少なくとも GLUT1 から GLUT5 までの 5 種類が確認されている[4, 40]。悪性腫瘍細胞では、その多くで GLUT1 が発現するとされているが、他のサブタイプの発現傾向は腫瘍細胞の種類によって異なり、様々であると報告されている[4, 26, 32, 40]。今回用いた AH109A において発現している GLUT は、1mM 以上の基質においてグルコースにより阻害され、3-O-MeG に特異性を示さないという特徴を有していた。AH109A における GLUT のサブタイプは確認されておらず、フローサイトメトリーあるいは免疫染色によりサブタイプを確認することで、サブタイプの違いにより生じるステロイドへの特異性が明らかとなる可能性がある。

in vitro における 90 分のデキサメサゾンの作用が FDG 取り込みに影響を及ぼさないという報告[27]、デキサメサゾンの最高血中到達時間および作用持続時間を考慮し、本実験では作用時間を 4、6、および 12 時間とし、結果としていずれのタイムコースにおいてもデキサメサゾンによる単純拡散の抑制が認められた。しかし、*in vitro* のヒトメラノーマ細胞における ^3H glucose の細胞内取り込みは、トリアムシノロンアセトニドの作用 4 時間では影響がなく 18 時間においては有意に減少するという報告[10]、ラット脂肪細胞におけるデキサメサゾンによる糖取り込み抑制が作用 1~2 時間で最大になるという報告 [25]もあり、デキサメサゾンによる単純拡散の抑制の作用発現時間および作用持続時間を明らかにするためには異なるタイムコース、異なる細胞を用いた更なる実験が必要である。

本実験の結果により、AH109A における特徴的な糖の輸送機構が示されたが、本実験での比較には同条件のラットの赤血球を用いており、この特徴的な輸送機構が AH109A 特有あるいは細胞種や動物種による性質であるかを確認するためには他の細胞種との比較が今後必要であると思われた。

今回、デキサメサゾンにより糖の単純拡散の抑制作用が生じることが明らかとなったが、これはステロイドによる見かけ上の細胞膜透過性の減少と捕らえられ、細胞内糖代謝の変化による細胞内グルコース濃度の上昇により、細胞外から細胞内へ向けたグルコースの拡散速度の低下によるものと理解された。しかしなが

ら、この仮説を検証するためには、細胞内の free glucose 量や phospholylated glucose 量およびデキサメサゾン投与後の経時的な血糖値の測定などを行い、濃度勾配の減少についてより詳細に確認する必要がある。また今回確認された単純拡散の抑制は、FDG の細胞内輸送速度や GLUT との親和性には影響を与えておらず、このことから PET においてデキサメサゾン投与による腫瘍と炎症との鑑別は困難である可能性が示された。しかし、今回用いた AH109A と同様の特性を有する細胞、すなわち生理的血糖値より低い基質濃度(1-5mM)において FDG の細胞内輸送に抑制が起こるような細胞種に対するステロイドの投与においては、グルコース取り込み速度の明らかな減少が生じ、PET 検査における偽陰性を招く可能性があることを示すことができた。また、糖尿病などの高血糖者に対するステロイドの投与は、今回認められた高い外部のグルコース濃度に依存する単純拡散による取り込みの変化、またそれに対するステロイドによる単純拡散の明らかな減少などと同様の現象が生じると予想され、同様に PET 検査において偽陰性を招く可能性があることが推測された。以上のことから、多くの細胞種との比較、基質濃度やタイムコースなどの実験条件について更に検討することで臨床応用に役立つような基礎的データが得られると考えられた。また、今回 Michaelis-Menten 式で表現できない特徴的な糖輸送の存在が明らかになったことで、細胞内の糖輸送の解析法についてさらに検討する必要があることも示すことができた。

参考文献

1. Aloj, L. Caracó, C. Jagonda, E. Eckelman, W.C. and Neumann, R.D. 1999. Glut-1 and Hexokinase Expression: Relationship with 2-Fluoro-2-deoxy-D-glucose Uptake in A431 and T47D Cells in Culture. *CANCER RESEARCH* 59 pp.4709-4714, September 15
2. 青野力三 1992 6 章 酵素の反応速度論 pp.133-150 酵素科学と工学 (堀越弘, 虎谷哲夫, 北爪智哉, 青野力三/著) 講談社
3. Bihun, C. 1998. 解剖, 生理, 飼育, および臨床で用いられる手技に関する基礎知識 第2部 フェレット, ウサギ, 齧歯類-内科と外科の臨床- Hiller, E.V. Quesenberry, K.E. 編 長谷川篤彦・板垣慎一 監修 学窓社 pp.308-310
4. Brown, R.S. Leung, J.Y. Fisher, S.J. Frey, K.A. Ethier, S.P. and Wahl, R.L. 1995. Intratumoral Distribution of Tritiated Fluorodeoxyglucose in Breast Carcinoma: I .Are Inflammatory Cells Important?. *J Nucl Med.* Vol.36 pp.1854-1861
5. Brown, R.S. Leung, J.Y. Kison, P.V. Zasadny, K.R. Flint, A. and Wahl, R.L. 1999. Glucose transporters and FDG uptake in untreated primary human non-small cell lung cancer. *J Nucl Med* Vol.40 No.4 pp.556-565
6. Burrows, R.C. Freeman, S.D. Charlop, A.W. Wiseman, R.W. Adamsen, T.C.H. Krohn, K.A. Spence, A.M. 2004. [18F]-2-fluoro-2-deoxyglucose transport kinetics as a function of extracellular glucose concentration in malignant glioma, fibroblast and macrophage cells *in vitro*. *Nuclear Medicine and Biology* 31 pp.1-9
7. Darnell, J.E. Lodish, H.F. 1990. Transport across Cell Membranes. pp.531-582. *Molecular Cell Biology* 2nd ed. SCIENTIFIC AMERICAN BOOKS
8. Dietz, R.E. Hall, J.B. Whittier, W.D. Elvinger, F. and Eversole, D.E. 2003. Effect of feeding supplemental fat to beef cows on cold tolerance in newborn calves. *J.Anim.Sci* 81, pp.885-894
9. Dimitrisdis, G. Leighton, B. Parry-Billings, M. Sasson, S. Young, M. Krause, U. Bevan, S. Piva, T. Wegener, G. and Newsholme, A.E. 1997. Effect of glucocorticoid excess on the sensitivity of glucose transport and metabolism to insulin in rat skeletal muscle, *Biochem.J* 321 pp.707-712
10. DiSorbo, D.M. McNulty, B. and Nathanson, L. 1983. *In vitro* growth inhibition of human malignant melanoma cells by glucocorticoids. *CANCER RESERCH* 43 pp.2664-2667
11. Garland, R.C. 1986. Induction of glucose-6-phosphatase in Cultured hepatoma Cells by Dexamethasone. *Biochemical and Biophysical Research Communications* Vol.139, No.3 pp.1130-1134

12. Graff, J.C. Wohlhueter, R.M. and Plagemann, P.G.W 1978. Deoxyglucose and 3-O-methylglucose transport in untreated and ATP-depleted Novikoff Rat Hepatoma cells. analysis by a rapid kinetic technique, relationship to phosphorylation and effects of inhibitors. *J.CELL. PHYSIOL.* 96 pp.171-188
13. 花輪明日美 2003. コンパニオンアニマルの核医学診断に関わる人間の外部被曝線量評価. 北里大学学士論文
14. 原澤菜穂子 2003. ラット皮下炎症および腫瘍への 18F-FDG 集積に対する抗炎症薬の影響. 北里大学学士論文
15. 吐山豊秋 第 16 章 炎症と抗炎症薬 新編 家畜薬理学 改訂版 pp.153-165 養賢堂
16. 伊藤伸彦 2002. ラジオアイソトープを用いたイヌ, ネコ, ウマなどの診断と治療-日本での獣医核医学実現に向けて- *Isotope News No.580 Aug* pp.12-16
17. 伊藤伸彦, 夏堀雅宏, 佐野忠士 2004. 核医学によって変わる日本の獣医療 *Isotope News* 9 月号 pp.2-7
18. 川寄敏祐 1998. タンパク質の性質: 酵素 pp.132-147 キャンベル 生化学 第 2 版 廣川書店
19. Kawasaki, M. Yagasaki, K. Miura, Y. Funabiki, R. 2004. Comparison of the changes in lipid metabolism between hepatoma-bearing and lipopolysaccharide-treated rats. *Biosci Biotechnol Biochem.* Jan;68(1) pp.72-8
20. Kubota, K. 2001. From tumor biology to clinical PET: A review of positron emission tomography (PET) in oncology. *Annals of Nuclear Medicine* vol.15, No.6 pp.471-486
21. 窪田和雄 2003. FDG-PET の原理と評価法 pp.1118-1128 画像診断 Vol.23 No.10 秀潤社
22. Kubota, K. Itoh, M. Ozaki, K. Ono, M. Tashiro, M. Yamaguchi, K. Akaizawa, K. Yamada, K. Fukuda, H. 2001. Advantage of delayed whole-body FDG-PET imaging for tumor detection *European Journal of Nuclear Medicine* Vol.28, No.6, pp.696-703
23. Kubota, R. Kubota, K. Yamada, S. Tada, M. Ido, T. and Tamahashi, N. 1994. Microautoradiographic study for the differentiation of intratumoral macrophages, granulation tissues and cancer cells by the dynamics of fluorine-18-fluorodeoxyglucose uptake. *The Journal of Nuclear Medicine* Vol.35, No.1, pp.104-112
24. Lehninger, A. L. Nelson, D.L. Cox, M.M. 溶質の膜輸送 pp.353-356 レーニンジャーの新生化学 (上) 第 2 版 (山科郁夫監・川寄敏祐編) 廣川書店
25. Livingston, J.N. and Lockwood, D.H. 1975. Effect of glucocorticoids on the glucose transport system of isolated fat cells. *J Biol Chem.* Vol.250, No.21, Issue of November 10, pp.8353-8360
26. Medina, R.A. and Owen, G.I 2002. Glucose transporters: expression, regulation and cancer. *Biol. Res.* Vol.35 No.1 p.9-26
27. 武藤寿法 2003. 腫瘍細胞および炎症性細胞における 18F-FDG の細胞内取り込み特性. 北里大学学士論文
28. 中本裕士 2003. 腫瘍 PET: 入門から PET/CT まで *NIPPON ACTA RADIOLOGICA*;63:285-293
29. 大西正健 1987. □触媒反応の解析 pp.75-107 酵素反応速度論実験入門 学会出版センター
30. Plagemann, P.G.W. and Renner, E.D. 1972. Glucocorticoids: competitive inhibition of glucose transport. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* Vol.46, No.2 pp.816-823
31. Sasson, S. Kaiser, N. Dan-Goor, M. Oron, R. Koren, S. Wertheimer, E. Unluhizarci, K. Cerasi, E. 1997. Substrate autoregulation of glucose transport: hexose 6-phosphate mediates the cellular distribution of glucose transporters. *Diabetologia* 40, pp.30-39
32. Smith, T.A. 1998. FDG uptake, tumor characteristics and response to therapy: a review. *Nuclear Medicine Communication* 19 pp.97-115
33. 高谷不羈 2004. イヌ・ネコの疾病統計 2002 年度データ NO.4 イヌの月齢・年齢別の疾病発生順位 pp.26-27 イヌ・ネコの疾病統計 2002 年度の動向 多摩獣医臨床研究会編
34. Takeda, M. Kobayashi, M. Takayama, M. Suzuki, S. Ishida, T. Ohnuki, K. Moriya, T. Ohuchi, N. 2004. Biophoton detection as a novel technique for cancer imaging. *Cancer Sci.* Aug;95(8) pp.656-661
35. 内田兼司 2004. オートラジオグラフィによるラット皮下炎症および腫瘍への 18F-FDG 集積に対するデ

キサメサゾンの影響. 北里大学学士論文

36. Viñals,F. Gross,A. Testar,X. Palacin,M. Rösen,P. Zorzano,A. 1999. High glucose concentrations inhibit glucose phosphorylation, but not glucose transport, in human endothelial cells *Biochimica et Biophysica Acta* 1450 pp.119-129
37. Waki, A. Kato, H. Yano, R. Sadato, N. Yokohama, A. Ishii, Y. Yoneyama, Y. and Fujibayashi, Y. 1998. The Importance of Glucose Transport Activity as the Rate-Limiting Step of 2-Deoxyglucose Uptake in Tumor Cells *In Vitro*. *Nuclear Medicine and Biology* Vol.25 pp.593-597 1998
38. Withrow,S.J. MacEwen,E.G. 1995. Why worry about cancer in pet animals? pp.1-3 小動物の臨床腫瘍学 加藤元, 大島慧 監訳 文永堂出版
39. 八幡義人 1994 赤血球の形態と機能 pp.30-53 図解 血球-生理・病態・臨床 赤血球 野村武夫, 古沢新平, 長尾大 編 中外医学社
40. Zhao, S. Kuge, Y. Tsukamoto, E. Mochizuki, T. Kato, T. Hikosaka, K. Nakada, K. Hosokawa, M. Kohanawa, M. and Tamaki, N. 2002. Fluorodeoxyglucose uptake and glucose transporter expression in experimental inflammatory lesions and malignant tumors: effect of insulin and glucose loading. *Nuclear Medicine Communications*,23 pp.545-550
41. Zhang, G. Miura, Y. Yagasaki, K. 2002 Effects of dietary powdered green tea and theanine on tumor growth and endogenous hyperlipidemia in hepatoma-bearing rats. *Biosci Biotechnol Biochem*. Apr;66(4) pp.711-716