

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

村上 寧、武藤寿法、夏堀雅宏、畠山 智*1、二ツ川章二*1、寺崎一典*2、山口慶一郎*3

佐野忠士、伊藤 伸彦

北里大学獣医畜産学部
034-8628 青森県十和田市東23番地35-1

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

*2 岩手医科大学サイクロトロンセンター
020-0173 岩手郡滝沢村字留が森 348-58

*3 東北大学サイクロトロンRIセンター
980-8578 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉

1. はじめに

放射性薬剤を使用した腫瘍診断法の1つに、陽電子放射断層撮影 (positron emission tomography : PET) による核医学検査がある³⁾。現在、日本では人間に対して広く用いられている診断法であり、動物利用についても早期実現へ向けての活動が行われている^{9,10)}。PETとは、陽電子 (positron) 放出核種で標識されたトレーサ (放射性薬剤) の体内での挙動を三次元的に画像化する装置であり、トレーサの種類、標識核種を使い分けることで、種々の生体内物質の体内挙動を調べることができる。また、Positron 製剤の中で人の臨床においても汎用され、かつ多くのデータが得られている製剤に¹⁸F-FDG (2-deoxy-2-[¹⁸F] fluoro-D-glucose) がある。

FDGはグルコースの2位の水酸基をフッ素に置換したグルコース類似物で、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。解糖系の第一段階としてhexokinaseによってリン酸化され、FDG-6-phosphateとなる。FDG-6-phosphateはグルコースとは異なり、エンジオール中間体を形成することは出来ず、フルクトース体への異性化は起こらないとされている^{23,24)}。一方、hexokinaseの逆反応である6-リン酸化体の脱リン酸化をおこすglucose-6-phosphatase活性は、腫瘍細胞では著しく低下しているため^{18,22,25,29)}、腫瘍細胞内に取り込まれたFDGは、FDG-6-phosphateとして細胞内に貯留することになり、糖代謝率に応じた放射能の集積率を得ることができる。このようなFDGの集積特性を利用して、¹⁸F-FDGは腫瘍診断のトレーサとして用いられている²⁶⁾。

¹⁸F-FDGの集積は、腫瘍だけでなく炎症性病変でも観察され、臨床現場において誤診を招くおそれがある。腫瘍と炎症性病変の鑑別診断の必要性は核医学検査の普及と共に高まっており、研究が多数行われている。

本研究では、カゼインによりラット腹腔内に誘導したマクロファージ、好中球を*in vitro*における炎症性細胞モデルとし、それらと腫瘍細胞株を用いて腫瘍および炎症性病変の細胞あたりのグルコース要求量

(^{18}F -FDG集積量)を測定することにより、腫瘍と炎症性病変のグルコース取り込みを速度論的な観点から明らかにすることを目的とした。また、腫瘍と炎症性病変の鑑別診断の可能性として抗炎症薬によるFDG集積の抑制を検討するため、腫瘍細胞株および炎症性細胞に*in vitro*にてステロイド系抗炎症薬を作用させた。

2. 材料および方法

2.1 使用細胞株

理化学研究所ジーンバンク細胞開発銀行から購入したマウス由来で浮遊性腫瘍細胞 (Moloneyウイルスで誘発されたLymphoma) のYAC-1細胞、Florida大学のDr. Yamamoto由来で北里大学獣医伝染病学講座から分与されたネコのTcell由来のFeT-J細胞、東北大CYRICより分与された腹水肝癌であるAH109A細胞 (佐々木研の小田嶋成和によって樹立) を使用した。

2.2 供試動物

Donryu rat (6週齢 ♂) (日本エスエルシー株式会社) を購入し、数日間~3週間馴致させた後、6~9週齢 (180g~350g) で実験に供した。飼料 (市販固形飼料) および水道水は自由摂取とし、実験前日は絶食させ水道水は自由摂取とした。ラットは、下表のようにそれぞれの処置に応じて3群に分けた。

Table 1. 使用したラットの群分けとその処理

腫瘍接種ラット	大腿部及び背部皮下にAH109A細胞を0.2mlずつ接種し、約10日間経過したもの
カゼイン接種ラット	腹腔内に5%カゼインナトリウム 3ml/100g B.Wを腹腔内投与したもの
無処置ラット	何処置対照群

2.3 使用培養液

YAC-1細胞、FeT-J細胞、AH109A細胞および炎症細胞はRPMI1640-MEDIUM (SIGMA-Aldrich Co. Ltd., U.S.A.) に10% newborn calf serum (SIGMA-Aldrich Co. Ltd., U.S.A. : 56°C30分非動化済み)、100U/ml penicillin、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin、50 μM 2-mercaptoethanol、10mM HEPESおよび7.5% NaHCO_3 (1.5ml/100ml) を加えたものを培養液 (以下RPMI) とした。グルコース取り込み実験には、RPMI1640-MEDIUMでWithout glucoseのもの (以下Glucose-free RPMI) を用いた。

2.4 放射性同位元素 (RI)

^{18}F -FDG (2-deoxy-2- ^{18}F fluoro-D-glucose) は、(社) 日本アイソトープ協会、仁科記念サイクロトロンセンター (NMCC) で合成されたものを、 ^3H -FDG (2-Fluoro-2-deoxy-D-glucose [$5,6\text{-}^3\text{H}$]) には、American Radiolabeled Chemicals Inc. (U.S.A.) が製造元で分子量182.1のものを使用した。各RIは、Glucose-free RPMIで希釈して用いた。

2.5 細胞浮遊液の調整

2.5.1 YAC-1細胞、FeT-J細胞

継代にはRPMIを用い、各細胞とも継代はコンフルエントの状態になる前に行った。細胞培養フラスコから回収した細胞浮遊液を遠沈管に移し替え、遠心 (1000rpm, 5min) し、上清を除去した。その後、Glucose-free RPMIにて再浮遊させ、5% CO_2 インキュベータで90分間培養し、さらに遠心 (1000rpm, 5min) ・洗浄した後、Glucose-free RPMIに再浮遊させ、細胞浮遊液とした。

2.5.2 AH109A細胞

継代は、Donryu ratの腹腔内から採取した腹水、約1mlを無処置のDonryu ratの腹腔内に接種することにより行った。採取した腹水を0.83% NH₄HCl-Tris溶血bufferにより溶血させ、Glucose-free RPMIにて洗浄後、再浮遊させ、5% CO₂インキュベータで90分間培養し、さらに遠心(1000rpm、5min)・洗浄した後、Glucose-free RPMIに再浮遊させ、細胞浮遊液とした。

2.5.3 腹腔内炎症細胞、マクロファージおよび好中球

Donryu ratを数日間馴致した後、Table.1にあるように各群ラットを処置した。大腿部および背部皮下にAH109A細胞を0.2ml(約 8.0×10^6 個)ずつ投与し、約10日間経過したものを腫瘍接種ラット、安楽死の約8時間前にPBS(-)で5%に調整したカゼインナトリウム(和光純薬工業㈱、大阪)を腹腔内投与(3ml/100g)して炎症を誘発したものをカゼイン接種ラット、コントロールとして何の処置も加えていないものを無処置ラットとした。

各群のDonryu ratの腹腔内の細胞は、ペントバルビタールナトリウム(ネンブタール[®]注射液 大日本製薬㈱、郡山)を皮下投与(0.3ml/body)して麻酔し、剥皮した後に腹腔内に氷冷した滅菌5mM EDTA加 PBS(-)を約50ml注入し、よくマッサージした後に無菌的に回収した。回収した細胞は、PBS(-)で洗浄し、70% PERCOLL(ICN Biomedicals Inc. Ohio, U.S.A.)または、Lymphocyte Separation Medium(for Mouse)(和光純薬工業㈱ 大阪)の上に静かに重層し、遠心(2300rpm、10min)してマクロファージと好中球に分離した。分離した血球はGlucose-free RPMIで3回遠心(1500rpm、7min)・洗浄後、Glucose-free RPMIに再浮遊させ、5%CO₂インキュベータで90分間培養し、さらに遠心(1500rpm、7min)・洗浄した後、Glucose-free RPMIに再浮遊させ、細胞浮遊液とした。分離したマクロファージと好中球の純度はGiemsa染色により90%以上であることを確認した。

また、カゼイン接種ラットから回収した細胞で、分離操作を行っていないものを腹腔内炎症性細胞(主に好中球とマクロファージ)として細胞浮遊液とした。

2.5.4 無処置Donryu ratの赤血球

無処置ラットを上述(2.5.3)の方法で麻酔した後、開腹して腹大動脈からヘパリナイズ(およそ10単位)したシリンジで採血し、Glucose-free RPMIで10倍希釈し、さらに3回遠心(1500rpm、7min)・洗浄した後、Glucose-free RPMIに再浮遊させ、細胞浮遊液とした。

2.5.5 ステロイド添加細胞浮遊液

YAC-1細胞、FeT-J細胞、AH109A細胞および炎症細胞の細胞浮遊液を準備する段階で、90分間のインキュベーションを行う前に水性デキサメサゾン注A(以下デキサメサゾン、ZENOAQ 日本全薬工業㈱、郡山)を最終濃度10 μ g/dlとなるように加えて作用させた。さらに最終的に作製した細胞浮遊液にも同様にデキサメサゾンを加え、デキサメサゾン加細胞浮遊液とした。

2.6 ¹⁸F-FDGと³H-FDGの二重標識によるグルコースの細胞内取り込みの比較

YAC-1細胞、FeT-J細胞および炎症細胞について上記(2.5)の方法で細胞浮遊液を調整した。予めグルコース(D(+)-glucose、関東化学㈱、東京)をGlucose-free RPMIに溶解させ、ろ過滅菌後、グルコース濃度を最終濃度が約18mMから約0.14mMとなるように2倍階段希釈し、グルコース希釈列(12列)を作製した。さらにGlucose-free RPMIを用いて約7.4MBq/mlに調整した¹⁸F-FDGおよび、約74kBq/mlに調整した³H-FDGをともに加えたRI溶液を準備した。

細胞浮遊液(約 2.0×10^6 /ml)を100 μ lずつ96穴マルチウェルプレート(MILLIPORE Corporation, MA, U.S.A.)に分注し、グルコース希釈列を50 μ lずつ分注し、更にRI溶液を50 μ lずつ分注した。その後、5%CO₂インキュベータにて3時間作用させた。その後、バキュームマニホールド(MILLIPORE Corporation MA U.S.A.)で培地を

吸引し、PBS(-)を200 μ l加え吸引・洗浄を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 (MILLIPORE Corporation MA U.S.A.) で小試験管に入れ、AUTO WELL GAMMA SYSTEM (JDC-751、アロカ(株)、東京) で1検体につき20秒間ずつ2回測定した。次に、液体シンチレーション (Scintisol[®]EX-H (同仁化学研究所、熊本)) が2.5ml入っているバイアル瓶に入れ、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社) にて1検体につき5分間ずつ2回測定した。¹⁸F-FDGでは、同一時間における計数率 (cpm) を求めるために物理学的半減期補正 (半減期109.8分) を行った^{23,24)}。

¹⁸F-FDGおよび³H-FDGの取り込み率をEq.1により計算し、相関係数を求めた。

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

2.7 各種細胞間のグルコース取り込みパラメータの比較

YAC-1細胞、FeT-J細胞、AH109A細胞、腹腔内マクロファージ、腹腔内好中球、赤血球および腹腔内炎症性細胞について上記の方法 (2.5) で細胞浮遊液を調整した。予めD(+)-glucoseをGlucose-free RPMIに溶解させ、ろ過滅菌後、D(+)-glucose濃度を最終濃度が約18mMから約0.14mMとなるように2倍階段希釈し、グルコース希釈列 (12列) を作製した。さらにGlucose-free RPMIを用いて約7.4MBq/mlに調整した¹⁸F-FDGおよび、約74kBq/mlに調整した³H-FDGをともに加えたRI溶液を準備した。

細胞浮遊液 (約 2.0×10^6 /ml) を100 μ lずつ96穴マルチウェルプレートに分注し、グルコース希釈列を50 μ lずつ分注し、更にRI溶液を50 μ lずつ分注した。その後、5% CO₂インキュベータにて3時間作用させた。その後、バキュームマニホールドで培地を吸引し、PBS(-)を200 μ l加え吸引・洗浄を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で液体シンチレーション (Scintisol[®]EX-Hまたは、クリアゾルII (ナカライテスク(株)、京都)) が2.5ml入っているバイアル瓶に入れ、デジタル液体シンチレーションアナライザにて1検体につき5分間ずつ2回測定した。

パラメータ解析では、まずEXCEL (Microsoft社) にて測定値から各基質濃度に対する¹⁸F-FDGまたは³H-FDGの細胞内取り込み率を算出し、各基質濃度とFDG取り込み速度の関係をプロットしたグラフ (飽和曲線) およびトランスポータとの特異性を検討できるグラフ (Scatchardプロット) を作成した⁴⁾。その後、EXCELマクロで作成された非線形最小自乗法プログラム (MULTI)³¹⁾を用いてシミュレーションを行い、パラメータを算出した¹¹⁾。グルコースの取り込みは促進拡散型の輸送担体 (GLUT) を介して行われる。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¹⁹⁾。このときの取り込み速度は一般的な酵素反応速度論と同様にMichaelis-Mentenの式によって表され¹¹⁾、2つのパラメータ (V_{max}、K_m) を持ち、次のような式 (Eq.2) で表現される。

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

上記の式 (Eq.2) のV_{max}はトランスポータの最大取り込み速度、K_mは最大取り込み速度の半分に達する時の基質濃度 (Michaelis定数) を表している²⁰⁾。

2.8 各種細胞のFDG取り込みに対するステロイドの影響

YAC-1細胞、FeT-J細胞、AH109A細胞および腹腔内炎症細胞について上記 (5-5) の方法でデキサメサゾン加細胞浮遊液を調整した。また、コントロールとしてデキサメサゾンを含まない細胞浮遊液も調整した。以下2.7.と同様の方法でグルコース取り込み実験を行い、パラメータ解析を行った。

3. 結果

3.1 ¹⁸F-FDGと³H-FDGの二重標識によるグルコースの細胞内取り込みの比較

YAC-1細胞、FeT-J細胞および炎症細胞を¹⁸F-FDGと³H-FDGの双方で標識したときの¹⁸F-FDGと³H-FDGの取り込み率の相関関係をFig.1に示す。その傾きは、³H-FDGの取り込み率に対する¹⁸F-FDGの取り込み率の比を示し、0.974であり、トレーサとして³H-FDGを用いた場合の方が3%程度多く計数された。また、R²値は0.923であり、高い相関関係が得られた。

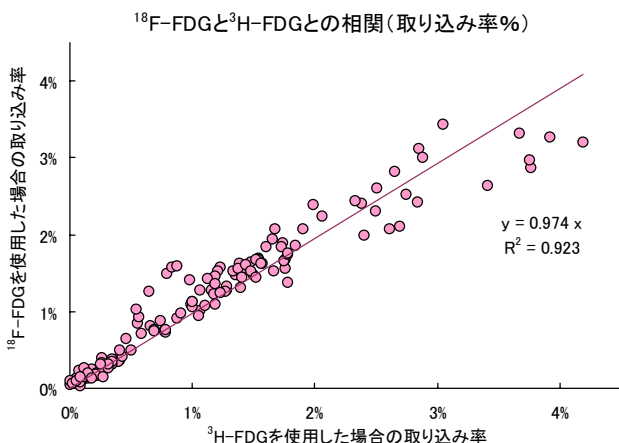


Fig.1 ³H-FDG と ¹⁸F-FDG の取り込み率に関する相関関係
 グラフは、横軸に放射性薬剤として ³H-FDG を使用した場合の取り込み率を、縦軸に ¹⁸F-FDG を使用した場合の取り込み率を示している。高い正の相関関係が得られ、³H-FDG を用いた場合の方が3%程度多く計数された。

3.2 腹腔内マクロファージのグルコース取り込み特性

無処置ラット、腫瘍接種ラットおよびカゼイン接種ラットの腹腔内マクロファージのグルコース取り込み速度と基質濃度の関係および取り込みパラメータをFig.2、table.2に示す。無処置ラットにおいて、Vmaxは2.51nmol/h/Mcell、Km値は5.37mMであった。腫瘍接種ラットにおいてVmaxは8.15nmol/h/Mcell、Km値は1.70mMであった。また、カゼイン接種ラットにおいてVmaxは0.62nmol/h/Mcell、Km値は0.61mMであった。

腫瘍接種ラットでは、無処置のラットに対してグルコースの最大取り込み速度を表すVmaxが約3.2倍の値を示した。また、GLUTに対する特異性を表すKm値は約1/3の値を示した。

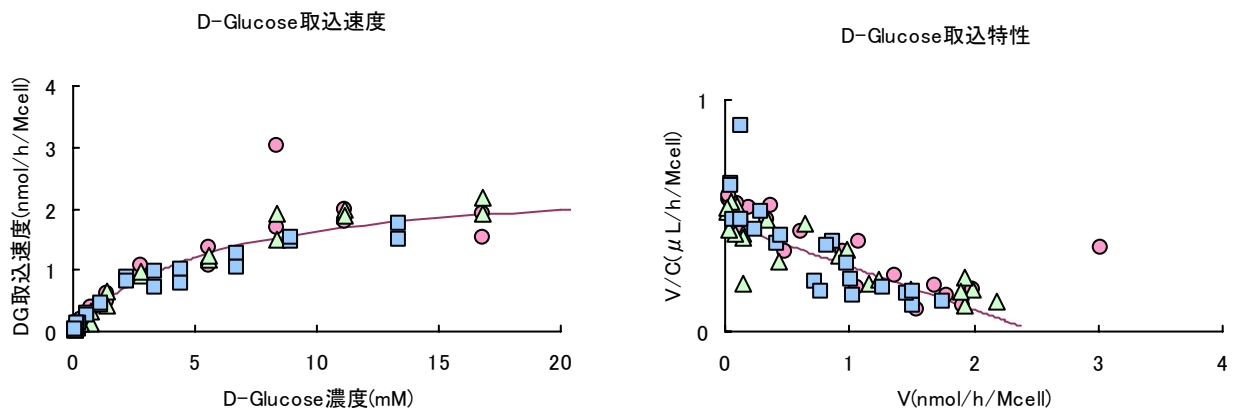
カゼイン接種ラットのVmaxおよびKm値は、無処置ラットに対して、それぞれ約1/4、約1/10の値を示した。

Table.2 腹腔内マクロファージのグルコース取り込みパラメータ

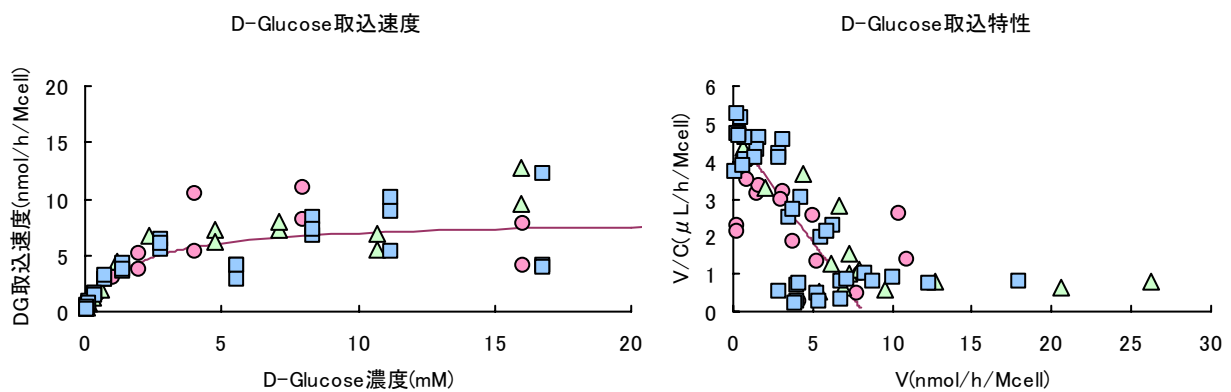
	Vmax (nmol/h/Mcell)		Km (mM)	
	mean	sd	mean	sd
無処置ラット	2.51	0.16	5.37	0.68
腫瘍接種ラット	8.15	0.69	1.70	0.41
カゼイン接種ラット	0.62	0.04	0.61	0.13

Fig.2 腹腔内マクロファージによるグルコース取り込み

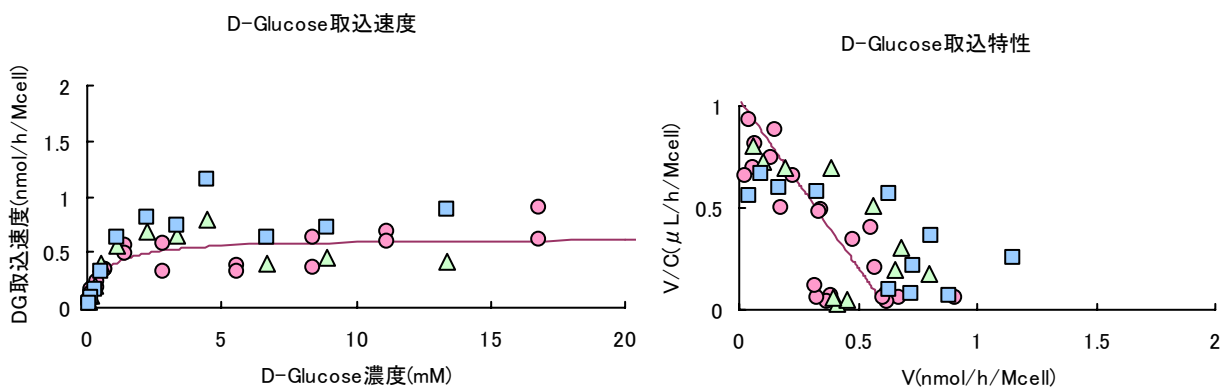
a 無処置ラット腹腔内マクロファージの D-Glucose 取り込み特性



b 腫瘍接種ラット腹腔内マクロファージの D-Glucose 取り込み特性



c カゼイン接種ラット腹腔内マクロファージの D-Glucose 取り込み特性



○ : 実験1回目、△ : 実験2回目、□ : 実験3回目

3.3 腹腔内好中球、赤血球、血液中単核球のグルコース取り込み特性

カゼイン接種ラットの腹腔内好中球および無処置ラットの赤血球のグルコース取り込み速度と基質濃度の関係および取り込みパラメータをFig.3、table.3に示す。腹腔内好中球において V_{max} は 0.09nmol/h/Mcell 、 K_m 値は 0.71mM であった。赤血球において V_{max} は 0.02nmol/h/Mcell 、 K_m 値は 1.51mM であった。また、血液中単核球において V_{max} は 0.53nmol/h/Mcell 、 K_m 値は 0.45mM であった。カゼイン接種ラットにおけるマクロファージの V_{max} は、好中球の約7倍の値を示した。また、 K_m 値は、ほぼ同じ値を示した。

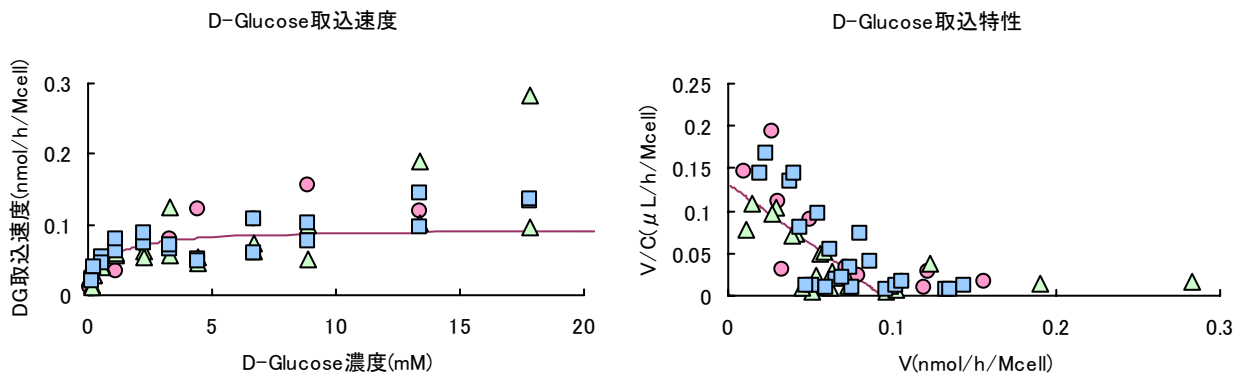
Table.3 無処置ラットの各種細胞のグルコース取り込みパラメータ

	Vmax (nmol/h/Mcell)		Km (mM)	
	mean	sd	mean	sd
腹腔内好中球*	0.09	0.01	0.71	0.20
赤血球	0.02	0.00	1.51	0.12
血液中単核球	0.53	0.05	0.45	0.15

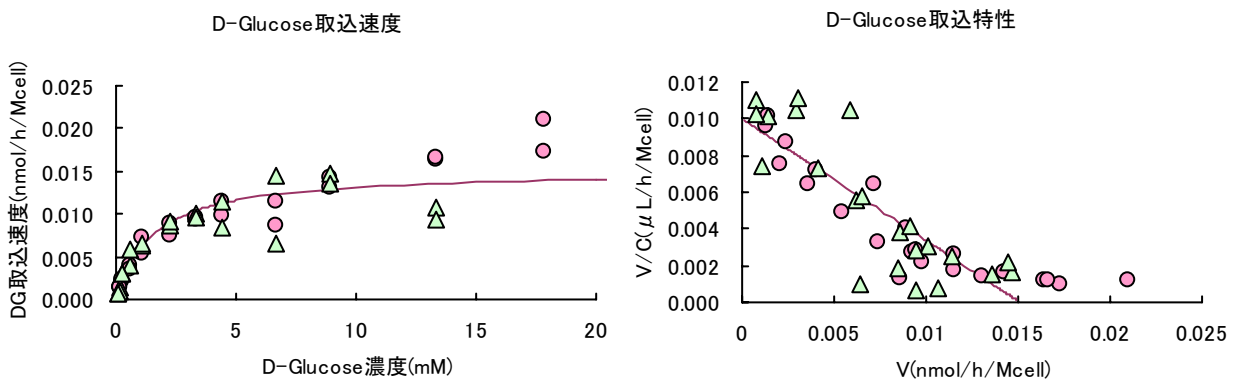
*カゼイン接種

Fig.3 カゼイン接種ラットの腹腔内好中球、無処置ラットの赤血球、血液中単核球によるグルコース取り込み

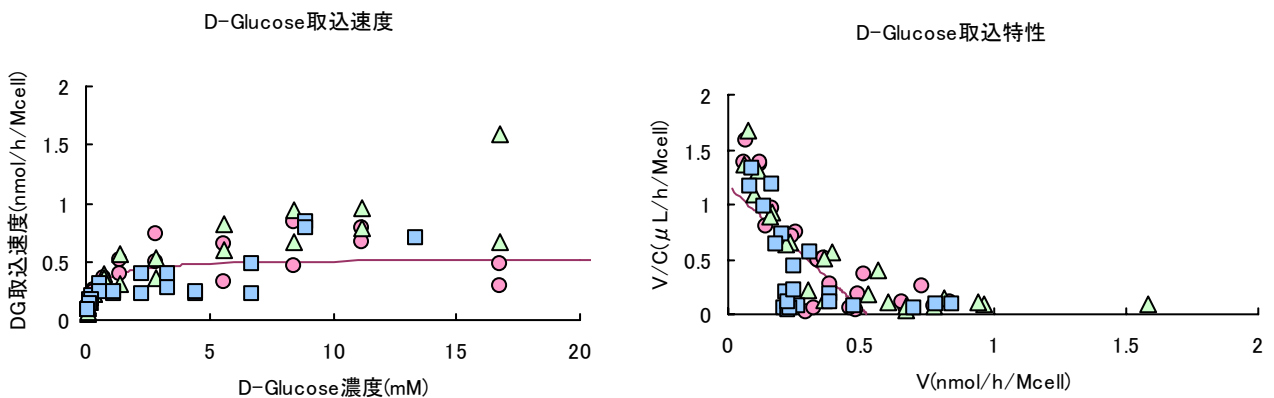
a カゼイン接種ラット腹腔内好中球*の D-Glucose 取り込み特性



b 無処置ラットの赤血球の D-Glucose 取り込み特性



c 無処置ラット血液中単核球の D-Glucose 取り込み特性



○ : 実験 1 回目、△ : 実験 2 回目、□ : 実験 3 回目

3.4 株化細胞のグルコース取り込み特性

YAC-1細胞、FeT-J細胞、AH109A細胞のグルコース取り込み速度と基質濃度の関係および取り込みパラメータをFig.4、table.4に示す。YAC-1細胞においてVmaxは1.15nmol/h/Mcell、Km値は1.01mMであった。FeT-J細胞においてVmaxは1.74nmol/h/Mcell、Km値は3.20mMであった。AH109A細胞においてVmaxは5.53nmol/h/Mcell、Km値は0.96mMであった。

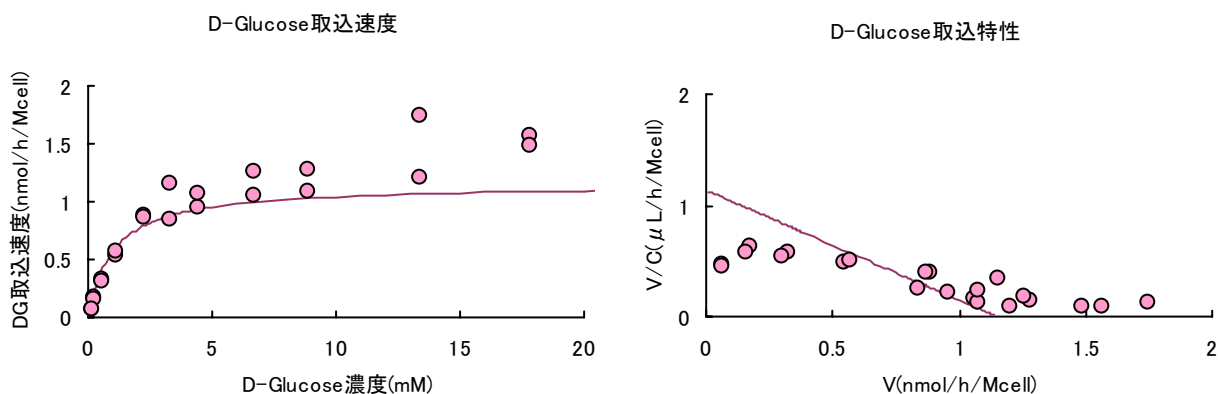
YAC-1細胞、FeT-J細胞のVmaxは、無処置ラットの腹腔内マクロファージ（常在マクロファージ）のそれぞれ約0.5倍、0.7倍の値を示した。また、Km値はそれぞれ約0.2、0.6倍の値を示した。一方、AH109A細胞のVmaxは、腫瘍接種ラットの腹腔内マクロファージの約0.7倍の値を示した。

Table.4 株化細胞のグルコース取り込みパラメータ

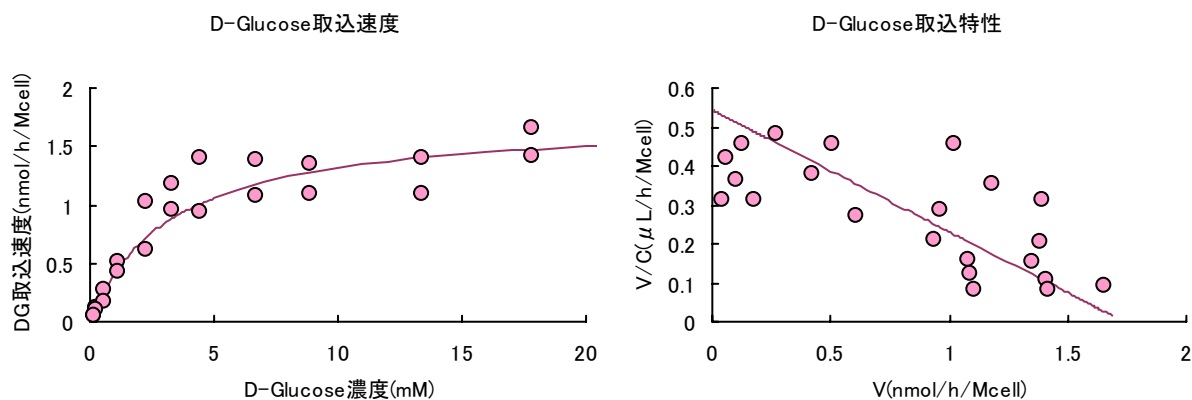
	Vmax (nmol/h/Mcell)		Km (mM)	
	mean	sd	mean	sd
YAC-1細胞	1.15	0.17	1.01	0.41
FeT-J細胞	1.74	0.14	3.20	0.60
AH109A細胞	5.53	0.39	0.96	0.20

Fig.4 株化細胞によるグルコース取り込み

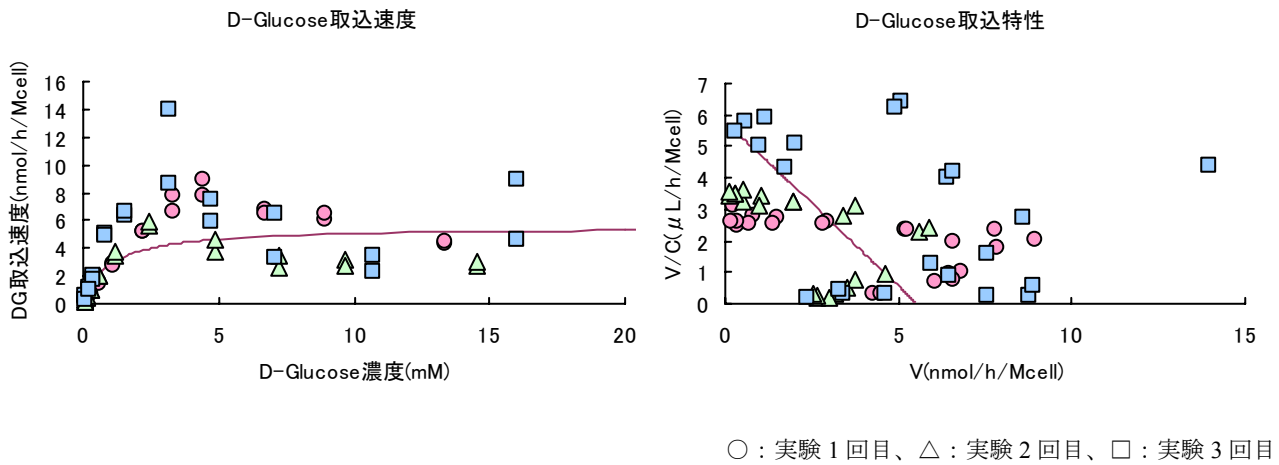
a YAC-1 細胞の D-Glucose 取り込み特性



b FeT-J 細胞の D-Glucose 取り込み特性



c AH109A 細胞の D-Glucose 取り込み特性



3.5 各種細胞のFDG取り込みに対するステロイドの影響

カゼイン接種ラットの腹腔内炎症細胞、YAC-1細胞、FeT-J細胞およびAH109A細胞にステロイドを作用させた場合のグルコース取り込み速度と基質濃度の関係および取り込みパラメータをFig.5、table.5に示す。いずれの細胞もVmax、Km値ともに、ステロイドの有無にかかわらず、ほぼ同様の値を示した。

Table.5a カゼイン接種ラットの腹腔内炎症細胞のグルコース取り込みパラメータ

	Vmax (nmol/h/Mcell)		Km (mM)	
	mean	sd	mean	sd
ステロイドなし	0.28	0.01	0.54	0.10
ステロイドあり	0.30	0.02	1.01	0.19

Fig.5a カゼイン接種 Donryu rat 腹腔内炎症細胞によるグルコース取り込み

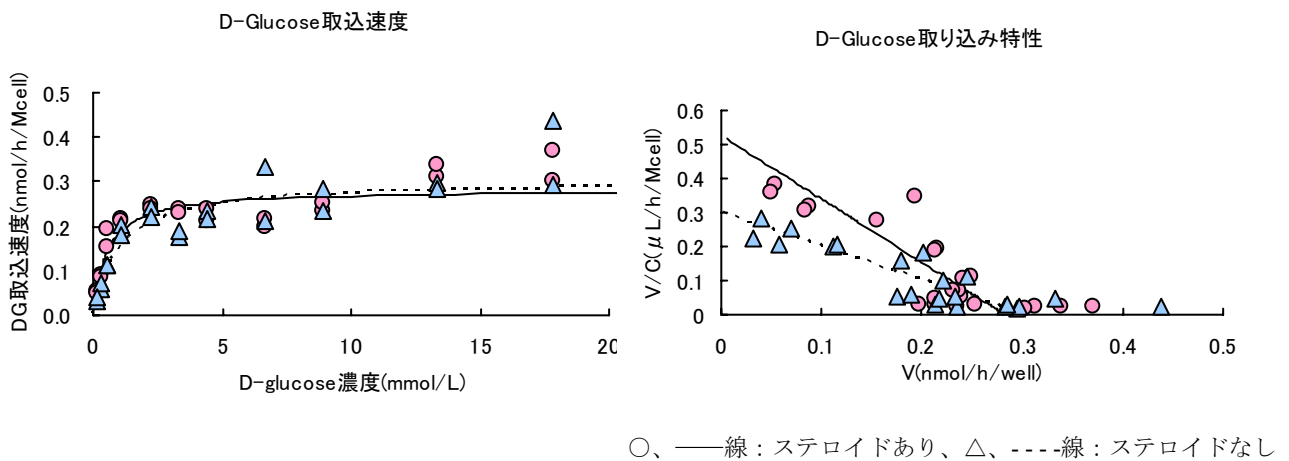


Table.5b YAC-1 細胞のグルコース取り込みパラメータ

	Vmax (nmol/h/Mcell)		Km (mM)	
	mean	sd	mean	sd
ステロイドなし	1.15	0.17	1.01	0.41
ステロイドあり	1.72	0.12	2.05	0.61

Fig.5b YAC-1 細胞によるグルコース取り込み

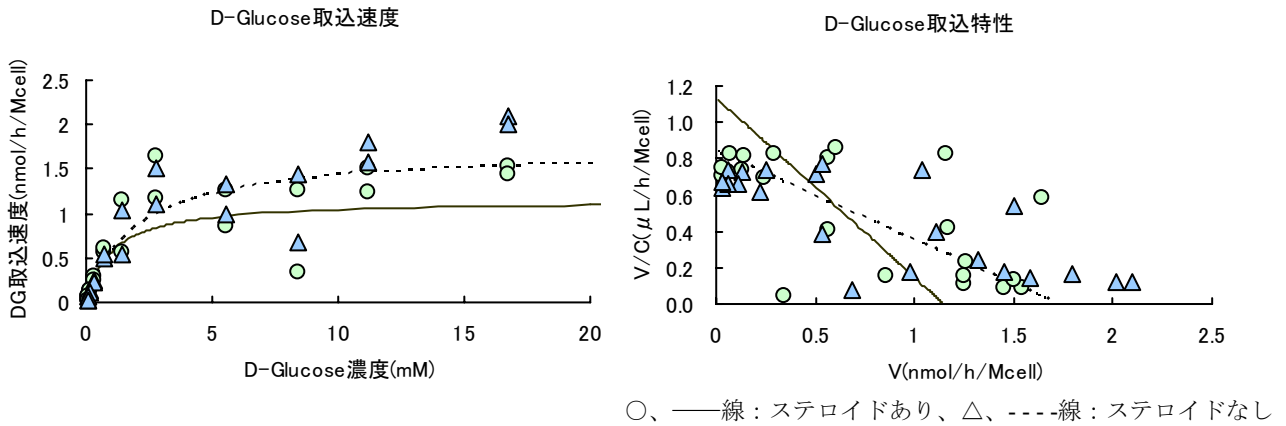


Table.5c FeT-J 細胞のグルコース取り込みパラメータ

	Vmax (nmol/h/Mcell)		Km (mM)	
	mean	sd	mean	sd
ステロイドなし	1.92	0.15	1.78	0.36
ステロイドあり	2.42	0.31	2.80	0.87

Fig.5c FeT-J 細胞によるグルコース取り込み

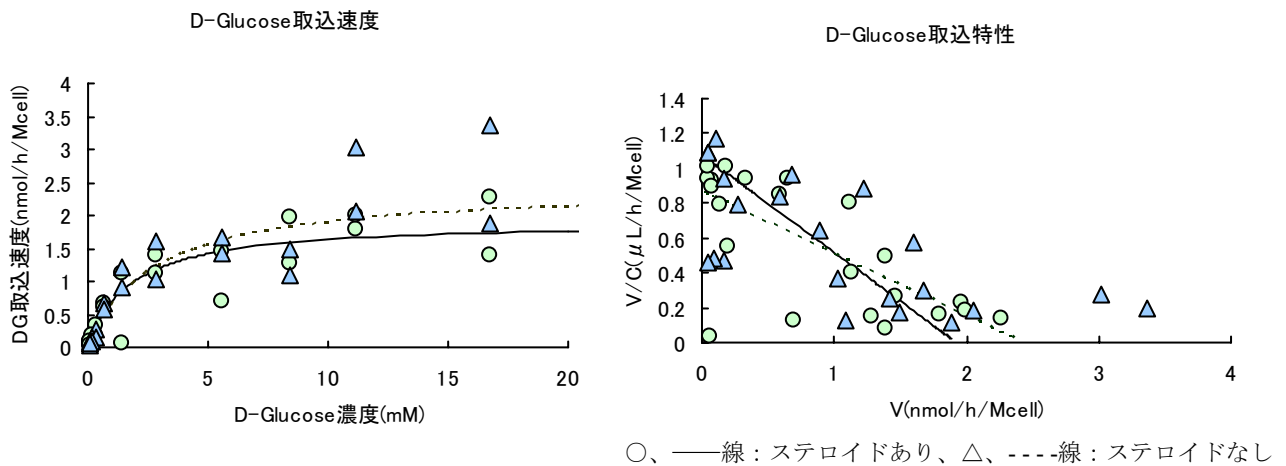
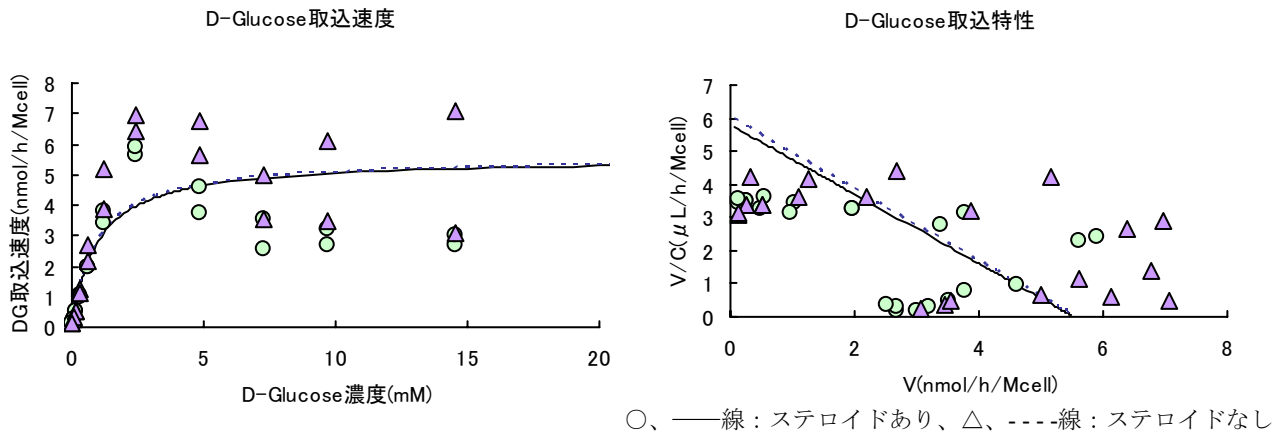


Table.5d AH109A のグルコース取り込みパラメータ

	Vmax (nmol/h/Mcell)		Km (mM)	
	mean	sd	mean	sd
ステロイドなし	5.53	0.39	0.96	0.20
ステロイドあり	5.55	0.62	0.92	0.28

Fig.5d AH109A によるグルコース取り込み



4. 考察

4.1 ^{18}F -FDGと ^3H -FDGの二重標識によるグルコースの細胞内取り込みの比較

ポジトロン製剤である ^{18}F -FDGの半減期は109.8分と短く、その製造にはサイクロトロンを必要とする。一方で、 ^3H -FDGは半減期が12.3年で比較的入手も容易である。 ^{18}F -FDGと ^3H -FDGで二重標識した結果、Fig.1に示したように高い相関関係が得られた。しかし、 ^3H -FDGの取り込み率に対する ^{18}F -FDGの取り込み率の比を示すグラフの傾きは、0.974であり、トレーサとして ^3H -FDGを用いた場合の方が3%程度多く計数された。この原因として半減期の極端な相違による測定誤差、分子量の違い、 γ カウンタと液体シンチレーションカウンタの計数効率の違い等が考えられる。しかしながら、 ^{18}F -FDGと ^3H -FDGとは標識部位は異なっているが、化学構造は同じであるため、体内における挙動は同一であると考えられ、ほぼ同様の結果が得られると考えられる。そこで本研究には、半減期が長く、比較的实验が容易で再現性のある結果が得られると予想される ^3H -FDGを ^{18}F -FDGの代用として用いた。

4.2 グルコース取り込みの速度論的パラメータ解析

グルコースは、特異的なトランスポータ (GLUT) を介して促進拡散により細胞内に取り込まれる。単純拡散は、Scatchardプロットにおいてグルコース取り込み速度の高い部分でX軸と平行な成分として表現される。しかし、炎症性細胞および腫瘍細胞においてそのような現象は見られず、グルコースの取り込み速度は2つのパラメータ (Vmax, Km) で表現され (Eq.2)、グルコースの単純拡散による細胞透過の寄与は十分小さく無視できると考えられた。

4.3 腹腔内マクロファージのグルコース取り込み特性

腹腔内マクロファージのグルコース取り込みにおいて、腫瘍接種ラットでは無処置ラットと比較してVmaxが約3.1倍、Km値は約1/3の値を示し、これは細胞膜上のGLUTの量および質の違いを反映していると考えられ

る。具体的には、腫瘍接種ラットのマクロファージのGLUTは無処置ラットのマクロファージより多数発現し、グルコースとの特異性も高いと考えられる。悪性腫瘍、感染性炎症組織および非感染性炎症組織においてGLUT-1およびGLUT-3の発現レベルが高いことが報告されている³⁵⁾。GLUT-1、GLUT-3ともにグルコースとの特異性 (Km値) は1~5mMと報告されており²⁾、腫瘍接種ラットのマクロファージには、無処置ラットのマクロファージと比較して多数のGLUT-1またはGLUT-3が発現した可能性がある。

ヒトやイヌ等でも上述の現象が単なる炎症性の変化とは異なり、腫瘍細胞の存在のみにより、マクロファージ等の炎症性細胞へのFDGの取り込みが亢進することを証明することができれば、腫瘍のある患者では、腫瘍のない患者よりも高い炎症性細胞へのFDG集積が見られる可能性が推察される。つまり、炎症性細胞によるFDG取り込みを腫瘍マーカーとして用いることが可能であり、その臨床的意義は高いと考えられる。

一方で、カゼインで誘発された炎症で腹腔内に集簇したマクロファージでは、Vmaxが無処置ラットの腹腔内マクロファージに対して約1/4の値を示しており、GLUTの発現レベルが低いことが示唆された。しかしながら、Km値は約1/10の値と低く、GLUTとの特異性が高いという興味深い結果となった。

カゼインなどの化学物質で誘発された炎症性細胞は、未熟であり、殺腫瘍活性を持たないとされている。最近、ヒトにおいてリポ多糖類 (LPS) により非活性型マクロファージを活性化するとグルコースの取り込みが亢進することが示されており⁵⁾、FDGの取り込みが亢進していた担癌ラットのマクロファージは、活性化していた可能性がある。また、腫瘍接種ラット、カゼイン接種ラットおよび無処置ラットのマクロファージのFDG取り込み速度に違いが見られたことは、マクロファージの成熟または活性化の度合いにより、糖代謝またはGLUTの発現に違いがあることを示唆している。

4.4 カゼイン接種ラットのマクロファージと好中球のグルコース取り込み特性

Fig.2、table.2およびFig.3、table.3 (table.6に再掲) に示したように、カゼイン接種ラットにおけるマクロファージのVmaxは、好中球の約7倍の値を示し、またKm値には差異はみられなかった。マクロファージと好中球との間にGLUTのグルコースとの特異性に違いは見られないことから、グルコース濃度に左右されず、グルコース取り込み速度のみに違いがあることを示している。

原澤⁶⁾や内田⁷⁾は、*in vivo*の炎症組織における高い¹⁸F-FDGの集積は、炎症の急性期ではマクロファージ層よりも好中球層に見られることを示している。今回の結果は、このことの一見反する結果となった。炎症の急性期においてはマクロファージ層より好中球層の方が著しく厚く、細胞数も好中球の方が多くを占める (Fig.6a)。今回、*in vitro*で算出した細胞へのFDG取り込み速度 (Vmax) を炎症組織における細胞数に乗じた値をFig.4bに示した。Fig.6bより、テレピン接種後4日目と5日目を境にFDG集積の主体が好中球からマクロファージへと変化しており、原澤や内田の示した結果とほぼ一致すると考えられた。

Table.6 カゼイン接種ラットの腹腔内炎症性細胞のグルコース取り込みパラメータのまとめ

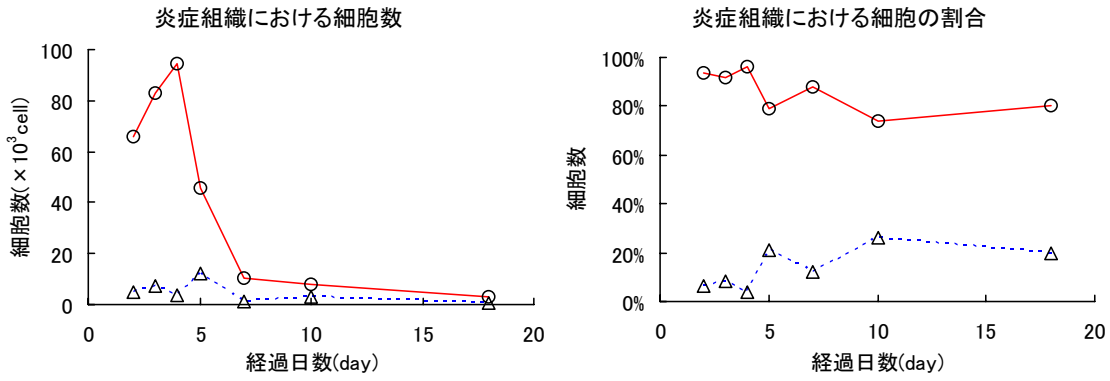
	Vmax (nmol/h/Mcell)		Km (mM)	
	mean	sd	mean	sd
腹腔内マクロファージ	0.62	0.04	0.61	0.13
腹腔内好中球	0.09	0.01	0.71	0.19

Fig.6 *in vivo* 炎症組織切片におけるマクロファージと好中球の細胞数およびグルコース取り込み速度(内田の結果⁷⁾より引用・改変)

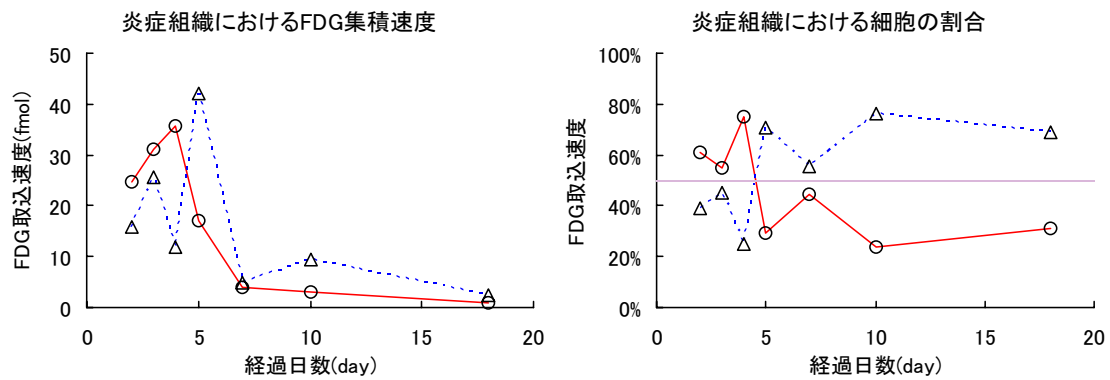
Fig.6a 左は、パラフィン切片 (5μm) における炎症組織のマクロファージ数、好中球数を示している。Fig.6a 右は、全細胞数を1としたとき細胞数の百分率を示している。

Fig.6b 左は、*in vitro* で算出した細胞取り込み速度 (Vmax) を炎症組織における細胞数 (Fig.6a) に乗じた値を示している。Fig.6b 右は、FDG 取り込みの全量を 1 としたとき細胞数の百分率を示している。

a) テレピン油により誘発した炎症組織における細胞数の比較 (マクロファージと好中球)



b) テレピン油により誘発した炎症組織における FDG 取り込み速度の比較 (マクロファージと好中球)



○、—線：好中球、△---線：マクロファージ

4.5 無処置ラットの赤血球および血液中単核球のグルコース取り込み特性

Fig.3、table.3に示したように、赤血球にあるGLUTとグルコースとの特異性 (K_m 値) は1.51mMであり、過去の報告 ($K_m=1.5mM$)²¹⁾とよく一致した。また、血液中単核球の K_m 値 (0.52mM) は、過去の報告 ($K_m=1mM$)¹⁴⁾と近似した値を示した。

4.6 腫瘍細胞のグルコース取り込み特性

Fig.4、table.4に示したように、*in vitro*で培養されたYAC-1細胞、FeT-J細胞の V_{max} は、無処置ラットの腹腔内マクロファージのそれぞれ約0.5倍、0.7倍を示し、*in vivo*で培養されたAH109A細胞では、約2倍の値を示した。このように V_{max} に明らかな違いが見られたことは、倍加時間や細胞のエネルギー要求量の違い等から腫瘍細胞の種類あるいは動物の種類により、GLUTの発現量が大きく異なるためだと考えられる。

4.7 各種細胞のFDG取り込みに対するステロイドの影響

腫瘍と炎症組織の鑑別診断のため、炎症性細胞への集積を抑える方法としてステロイドを前処置する方法が試みられている⁷⁾。そこで、*in vitro*におけるステロイドの炎症性細胞および腫瘍細胞への影響を調べた。カゼイン接種ラットの腹腔内炎症性細胞にステロイドを作用させた場合、Fig.5、table.5に示したとおり、 V_{max} はコントロールとほぼ同じであったが、 K_m 値は約2倍の値を示した。これは、GLUTの特異性がやや低下した可能性を示している。一方、ラットの血中グルコース濃度の正常値である5mM付近では、FDG取り込み速度には殆ど差は見られなかったことから、FDG取り込みに対するステロイドの影響は殆どなかったと考えられる。

しかし、ヒトにおけるデキサメサゾン投与後の血中最高濃度到達時間が90分であることから、ステロイドの作用時間は90分としたが、十分な作用を得るにはさらに長い反応時間が必要であったかもしれない。また、カゼイン接種ラットの腹腔内炎症性細胞は非活性型であると考えられ⁸⁾、炎症組織中で見られる炎症性細胞とはFDG取り込み速度に違いがある可能性があるため、ステロイドが必ずしも有効でないとは言えない。

*In vitro*で腫瘍細胞のみの環境では、腫瘍細胞自体のステロイドによるFDG取り込みの抑制効果はみられなかった。しかし、原澤⁷⁾は、*in vivo*においてステロイドの前処置により、炎症組織だけでなく腫瘍組織のFDGの集積が抑制されたことを示しており、*in vitro*では見られなかった機序が*in vivo*では存在する可能性も考えられる。腫瘍組織は、腫瘍の実質だけではなく血管や線維芽細胞などの肉芽組織、マクロファージ、リンパ系細胞等の免疫細胞からなる間質と呼ばれる組織から構成されている¹²⁾。窪田ら¹³⁾はmARG (micro-autoradiography) の結果、腫瘍組織において実質と同等かそれ以上のFDG集積が間質に見られることを報告している。

以上のことから、腫瘍組織中の間質における炎症性細胞によるFDG集積がステロイドによって抑えられたと考えられ、その炎症性細胞は活性型である可能性が高い。より確実に実証するためには、活性型のマクロファージを誘発できる*C. parvum*やBCG、LPSなどを用いて炎症性細胞を誘発し^{8,33)}、ステロイドによるFDG取り込みの抑制作用を検討する必要がある。

結論として上記の結果について順を追って要約すると、

- ①今回のような*in vitro*の実験系において3%程度の過大評価とはなるものの、結果に重大な影響を及ぼすものではないと考え、¹⁸F-FDGの代用として³H-FDGを用いることで、実験が容易で再現性のある結果が得られたと考えた。
- ②腫瘍接種ラット、カゼイン接種ラット、無処置ラットのマクロファージにおいて V_{max} 、 K_m 値に差が見られたことにより、マクロファージの活性化の違いによりGLUTの発現レベルに差が生じることが示された。
- ③ヒトやイヌ等でも、腫瘍のあることが原因で炎症性細胞のGLUTの発現量の増加および質の変化を確認できれば、腫瘍マーカーとして用いることが出来るかもしれない。
- ④カゼインで誘発されたマクロファージと好中球で、 K_m 値に違いは見られず、 V_{max} に約7倍の差異が見られ

たことは、マクロファージと好中球のGLUTの発現量の違いを反映していると考えられた。

- ⑤しかしながら、*in vivo*で炎症組織には急性期において多数の好中球の浸潤が見られ、組織全体で見た場合、必ずしもマクロファージの方がFDG集積が高いとは言えない。
- ⑥炎症性細胞（非活性型）、腫瘍細胞ともにステロイドのFDG取り込みに対する影響は見られなかったが、活性型の炎症性細胞ではFDG取り込みを抑制する可能性が高いので、今後実験により検討を行う必要がある。

文献

1. Albert L. Lehninger, David L. Nelson, Michael M. Cox. 溶質の膜輸送. pp355-356. 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). 株式会社 廣河書店. 東京
2. Bell GI, Kayano T, Buse JB, Burant CF, Takeda J, Lin D, Fukumoto H, Seino S. 1990. Molecular biology of mammalian glucose transporters. *Diabetes Care*. 13:198-208.
3. C.A.ペリザリ, M.L.ジャイガー. 1998. 腫瘍画像技術の進歩. 癌はここまで治る. 90-93
4. 千田和広. 1999. Binding Assay. pp212-217. 分子生物学研究のための新培養細胞実験法 (黒木登志夫・許南浩・千田和広著). 羊土社. 東京
5. Deichen JT, Prante O, Gack M, Schmiedehausen K, Kuwert T. 2003. Uptake of [¹⁸F]fluorodeoxyglucose in human monocyte-macrophages in vitro. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 30: 267-73.
6. 原澤菜穂子, 藤山博文, 夏堀雅宏, 山口慶一郎, 伊藤正敏, 寺崎一典, 畠山智, ニツ川章二, 伊藤伸彦. 2003. オートラジオグラフィによるラット皮下炎症への¹⁸F-FDG集積特性. NMCC共同利用研究成果報文集10.
7. 内田兼司, 原澤菜穂子, 夏堀雅宏, 畠山智, ニツ川章二, 寺崎一典, 山口慶一郎, 佐野忠士, 伊藤伸彦. 2004. 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. NMCC共同利用研究成果報文集11.
8. 星野孝, 倉文明. 1995. マクロファージ. pp617-621. 免疫実験操作法 (右田俊介・紺田進・本庶佑・濱岡利之編). 南江堂. 東京
9. 伊藤伸彦. 2000. RIの獣医療への応用を目指して —獣医核医学の現状と将来— 報告. *Isotope News*. 7: 30-31.
10. 伊藤伸彦, 夏堀雅宏. 2000. 獣医核医学の現状と将来 —わが国における獣医核医学の実現を目指して—. *JVM*. 53: 903-907.
11. James D. Harvey L. 1990. Transport across Cell Membranes. pp531-582. *Molecular Cell Biology* 2nd ed.
12. 窪田和雄, 福田寛. 1997. 肺・縦隔腫瘍. pp129. クリニカルPET 臨床応用のためのガイドブック (鳥塚莞爾編). 株式会社 寺田国際事務所/先端医療技術研究所. 東京
13. Kubota R, Yamada S, Kubota K, Ishiwata K, Tamahashi N, Ido T. 1992. Intratumoral distribution of fluorine-18-fluorodeoxyglucose in vivo: high accumulation in macrophages and granulation tissues studied by microautoradiography. *J Nucl Med*. 33: 1972-80.
14. Lubert Stryer. 1996. 解糖. pp505-506. ストライヤー生化学 第4版 (Lubert Stryer著). 株式会社トッパン. 東京
15. Milo, G. 1991. Pharmacokinetic variability—body weight, age, sex, and genetic factors. pp234-267. In: *Biopharmaceutics and clinical pharmacokinetics*.
16. Mochizuki T, Tsukamoto E, Kuge Y, Kanegae K, Zhao S, Hikosaka K, Hosokawa M, Kohanawa M, Tamaki N. 2001. FDG uptake and glucose transporter subtype expressions in experimental tumor and inflammation models. *J Nucl Med*. 42: 1551-5.
17. 向井孝夫. 1996. コンパートメント解析. pp41-43. 核医学ハンドブック (鳥塚莞爾監・小西淳二編). 金芳堂. 東京.
18. Nelson CA, Wang JQ, Leav I, Crane PD. 1996. The interaction among glucose transport, hexokinase, and

- glucose-6-phosphatase with respect to ^3H -2-deoxyglucose retention in murine tumor models. *Nucl Med Biol.* 23: 533-41.
19. 野澤義則, 神野耕太郎, 井上圭三, 大木和夫. 1994. 輸送機能. pp22. 第I巻 生体膜編 (野澤義則編). 共立出版株式会社. 東京
 20. 大西正健. 1987. 酵素反応の観測. pp21-31. 酵素反応速度論実験入門 (瓜谷郁三編). 学会出版センター.
 21. P.G. Lefebvre. 1961. *Pharmacol. Rev.* 13: 39
 22. Paul R, Johansson R, Kellokumpu-Lehtinen PL, Soderstrom KO, Kangas L. 1985. Tumor localization with ^{18}F -2-fluoro-2-deoxy-D-glucose: comparative autoradiography, glucose 6-phosphatase histochemistry, and histology of renally implanted sarcoma of the rat. *Res Exp Med (Berl)*. 185: 87-94.
 23. Pouremad R, Wyrwicz AM. 1991. Cerebral metabolism of fluorodeoxyglucose measured with ^{19}F NMR spectroscopy. *NMR Biomed* 4: 161-6.
 24. Shinohara S, Kanazawa Y, Kojima M. 1991. Evaluation of energy metabolism in brain using epimerization of 2-deoxy-2-fluoro-D-glucose by ^{19}F NMR: the effect of anesthesia. *Magn Reson Med.* 21: 191-6.
 25. Suolinna EM, Haaparanta M, Paul R, Harkonen P, Solin O, Sipila H. 1986. Metabolism of 2- ^{18}F fluoro-2-deoxyglucose in tumor-bearing rats: chromatographic and enzymatic studies. *Int J Rad Appl Instrum B.* 13: 577-81.
 26. 鳥塚莞爾. 1997. 臨床. pp55-192. クリニカルPET 臨床応用のためのガイドブック. 株式会社 寺田国際事務所/先端医療技術研究所. 東京
 27. Warburg O. 1956. On the origin of cancer cells. *Sciense* 123: 309-314
 28. Warburg O, Posenser K, Negelein E. 1931. The metabolism of the carcinoma cell. pp129-169. In: The metabolism of tumors. (Richard R. Smith) New York
 29. Weber G. 1977. Enzymology of cancer cells. *N Engl J Med.* 296: 541-551.
 30. Yamada S, Kubota K and Ido T. 1995. Double-tracer tissue distribution study of ^3H -thymidine and ^{18}F -FDG in experimental inflammatory tissue. *CYRIC Annual Report*: 100-1001.
 31. Yamamoto T, Seino Y, Fukumoto H, Koh G, Yano H, Inagaki N, Yamada Y, Inoue K, Manabe T, Imura H. 1990. Over-expression of facilitative glucose transporter genes in human cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 170: 223-30.
 32. Yamaoka K, Tanigawara Y, Nakagawa T, Uno T. 1981. A pharmacokinetic analysis program (multi) for microcomputer. *J Pharmacobiodyn.* 4: 879-85.
 33. Yasuda T, Sobue G, Mitsuma T, Takahashi. 1989 Low uptake of ^3H -2-deoxy-D-glucose by cultured rat Schwann cells. *Neurosci Lett.* 100: 47-52.
 34. Younes M, Lechago LV, Somoano JR, Mosharaf M, Lechago J. 1996. Wide expression of the human erythrocyte glucose transporter Glut1 in human cancers. *Cancer Res.* 56: 1164-7.
 35. Zhuang HM, Cortes-Blanco A, Pourdehnad M, Adam LE, Yamamoto AJ, Martinez-Lazaro R, Lee JH, Loman JC, Rossman MD, Alavi A. 2001. Do high glucose levels have differential effect on FDG uptake in inflammatory and malignant disorders? *Nucler Medicine Communications* 22: 1123-8