

HPLC によるラット腹水肝癌 AH109A およびラット脳・肝臓および赤血球中ヘキソキナーゼ活性測定法の検討

夏堀雅宏¹⁾、山本研吾¹⁾、丸山美理¹⁾、寺崎一典²⁾、畠山 智³⁾
二ツ川章二⁴⁾、山口慶一郎⁵⁾、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⁾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

⁴⁾日本アイソトープ協会アイソトープ部
113-8941 東京都文京区本駒込 2-28-45

⁵⁾仙台厚生病院
980-0873 宮城県仙台市青葉区広瀬町 4 番 15 号

I. はじめに

現在わが国では、伴侶動物の、感染症や寄生虫病などによる死因が大幅に減少したため、伴侶動物の平均寿命が延長し、その結果、「腫瘍」が伴侶動物の死因の大部分を占めるようになってきている[17]。そして、獣医療においても人と同様の X 線診断、超音波検査、コンピュータ断層撮影法 (CT)、そして磁気共鳴画像法 (MRI) 等が、患畜の非侵襲的な腫瘍検査に用いられている。しかし、これらの画像診断法は、形態情報を得ることが主な目的であり、腫瘍の位置情報は得られるが、バイオプシー検査によらない悪性度の鑑別は困難であった。

そこで、2-deoxy-2-[¹⁸F]-fluoro-D-glucose (¹⁸F-FDG) などのポジトロン放出核種を用いたポジトロン断層撮影法 (positron emission tomography : PET) が腫瘍の位置情報に加えて、増殖活性を判断する画像診断法として、ヒト医学領域において臨床および研究に応用されている。

ポジトロン放出核種 (¹⁸F、¹¹C など) で標識した放射性薬剤を生体内に投与すると、集積した組織内で陽電子が放出され陰電子と結合し消滅する。このとき、511 keV のガンマ線 (消滅光子) が 2 本、180°方向に放出される。この 2 本のガンマ線を向かい合った 2 個の検出器で検出し、これを基に非侵襲的に薬剤分布の画像を再構築し、生体内の機能情報を得るのが PET である[21]。

¹⁸F-FDG は現在、腫瘍診断の有効なトレーサーとして用いられ、PET 検査の 90%以上で用いられている放射性薬剤である。FDG-PET はヒト医学領域ではわが国でも 2002 年 4 月より健康保険適用となったこともあり、

その臨床利用が増加している[22]。

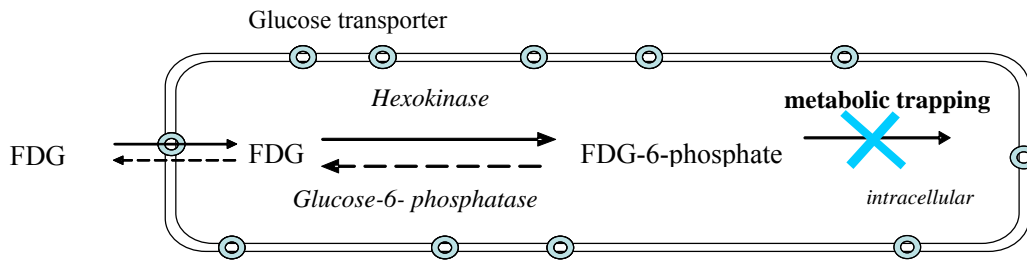
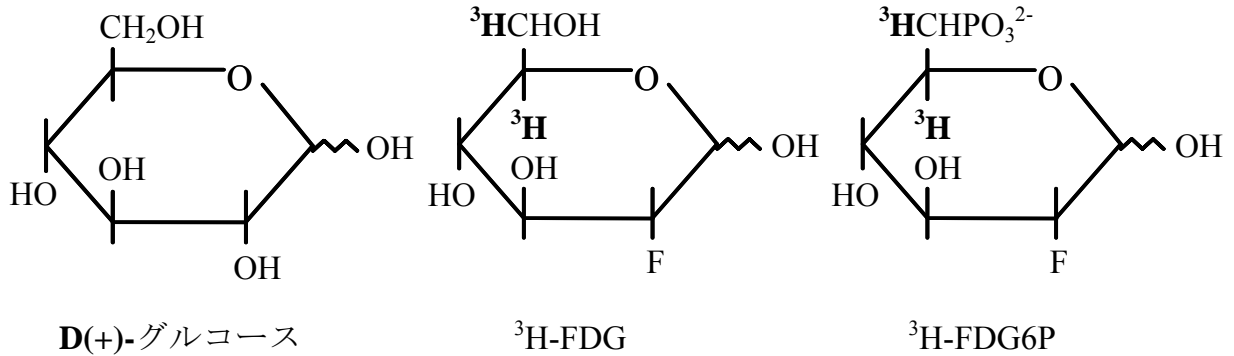


図 1 : 2-Fluoro-2-deoxy-D-glucose[5,6-³H] (³H-FDG) の構造式と代謝経路

FDG は、生体内でグルコース (Glu) と同様の経路で取り込まれ、細胞内のヘキソキナーゼ (HK) によって 6-リン酸化されるが、Glu とは異なりそれ以上代謝されないため組織内に留まる[28] [図 1]。また細胞膜を通しての輸送には、細胞内外の Glu 濃度差に基づいた促進拡散であるグルコーストランスポーター (GLUT) が関与し、この GLUT には構造的に異なる複数のアイソフォームが存在している[34,4,59,24]。悪性腫瘍細胞には赤血球膜、脳、腎臓に存在するものと同じタイプの GLUT である GLUT-1 が発現し、腫瘍細胞では GLUT-3 も過剰に発現しているため、FDG の細胞内取り込み能が高いと言われている[28,59,3,58]。また、腫瘍では糖代謝が盛んで HK 活性が高く、さらに、HK の逆反応であるグルコース-6-フォスファターゼ (G-6-Pase) の活性が低い[37]。細胞内に取り込まれた FDG は速やかに FDG-6-phosphate (FDG6P) に代謝され、FDG6P のまま細胞内に維持されるために、GLUT による腫瘍細胞内への FDG 輸送によって蓄積が進む。この結果、正常組織に比べ腫瘍では糖代謝率に応じて高い集積が認められる。

FDG の集積、すなわち糖代謝率と腫瘍の増殖性は関連があるとされており、相対的に増殖速度が速いものほど FDG の集積が高く、増殖の遅いものは低い[21]。また、増殖速度が同じ場合、実験的には未分化な腫瘍ほど GLUT 発現と HK 活性が高いため FDG の集積が高く、高分化型では逆に GLUT 発現と HK 活性が低いため FDG の集積が低くなると報告されている[37、34]。このことから腫瘍の GLUT 発現および HK 活性を測定することにより腫瘍の増殖速度および分化度など悪性度を判断できる指標になると考えられる。

PET の設備を持たない検査施設でも Biopsy 検査試料から腫瘍の悪性度判定ができるように、本研究では ³H で標識した FDG を用いて HK 活性の簡便な測定方法を確立し、ラットにおける腹水肝癌と正常な赤血球、肝臓、脳について *in vitro* で HK 活性の比較を行い、HK 活性と腫瘍の増殖活性、ひいては悪性度との関連性を明らかにすることを目的とした。

II. 材料および方法

1. 動物実験の実施にあたって

動物実験は北里大学獣医畜産学部動物実験指針（原試案、2003年6月）に従い実施した。供試動物に苦痛を与える可能性のある実験においては、ペントバルビタール（ソムノペンチル 64.8 mg/ml, 共立製薬株式会社、東京）により麻酔・沈静を施した。

2. 供試動物

供試動物として3~4週齢のDonryuラット（日本エスエルシー株式会社、静岡）を購入し、その後実験に用いるまで30~90日間馴致した。餌および水は自由摂取させた。

3. 使用細胞株ならびに継代移植

本実験ではラット腹水肝癌（AH109A）を用いた[44]。AH109A細胞は7~10日毎に供与側のラットの腹腔内より腹水を2ml採取し、継代用のラットに腹水の原液（約 1×10^8 cell/ml）を2ml（約 2×10^8 cell）腹腔内に投与することで継代・維持されているものを使用した。

4. 使用薬剤

HKの基質となる ^3H 標識グルコースとして、2-Fluoro-2-deoxy-D-glucose[5,6- ^3H]（ ^3H -FDG：分子量182.1；American Radiolabeled Chemicals Inc.、USA）を使用した。 ^3H -FDGはリン酸緩衝食塩水（PBS）を用いて370 kBq/ μl に調製して実験に供した。

5. HK活性の測定

5-1. HKによる反応

5-1-1. 酵母由来のHK標準製品を用いた ^3H -FDGおよび ^3H -FDG6Pの濃度測定法の検討

高速液体クロマトグラフィー（HPLC）で分画後に、液体シンチレーションカウンタ（LSC）で放射能を測定し、 ^3H -FDGと ^3H -FDG6Pを区別できるか、市販の酵母由来HK（60 U/mg：東京化成工業株式会社、東京）により測定法の検証を行った。

酵母由来HKは30 U/mlになるように超純水に溶解し、HK溶液100 μl に50 mM アデノシン三リン酸水溶液200 μl （シグマ アルドリッチ ジャパン株式会社、東京）、PBS 640 μl 、0.2 mM 塩化マグネシウム水溶液50 μl を混和した。さらに ^3H -FDG水溶液（1.85 kBq/ μl ）1 μl と1 mM D-グルコース水溶液2 mlを加え、恒温槽で37°C、15分間反応させた。対照実験として、HK溶液の代わりにPBS 100 μl を混和して同様の手技を行った。観測点におけるHKの反応を停止させるために、HKの反応溶液を沸騰湯浴中で2分間浸漬し、HPLCの測定前にクロマトディスク（タイプ4A 孔径0.45 μm ；クラボウ、大阪）で濾過し、測定用試料とした。

5-1-2. AH109A細胞およびラット赤血球の ^3H -FDG取り込みと ^3H -FDGのリン酸化反応

AH109A細胞接種7~9日後のDonryuラット腹腔内から腹水（約 1×10^8 cell/ml）を約3 ml採取した。採取した腹水は1,300 g \times 2分間遠心し、上清を捨て、グルコースを含まないRPMI培地（RPMI）を加えて洗浄し、遠心と洗浄を2~3回繰り返した。また、腹水中の赤血球は遠心分離によりAH109A細胞よりも下層に区画された赤血球を可能な限り取り除いた。RPMIによりAH109A細胞を 1.0×10^7 cell/mlと 2.0×10^7 cell/mlの濃度に細胞浮遊液を調整した。細胞浮遊液中の細胞分画の体積を調べるため、ヘパリン処理済みのヘマトクリット毛細管（Ht管：テルモ株式会社、東京）で腹水を採取し、Ht用遠心機（HEMATOCRIT KH-1200S：久保田商事株式会社、東京）を用いて15,000 g \times 5分間遠心し、細胞容積率（PCV）（%）を測定した。

各測定時間において2本のマイクロチューブにAH109A細胞浮遊液を45 μl ずつ分注したものと、対照実験用にAH109A細胞浮遊液の代わりにPBS 45 μl を分注したものを用意し、それぞれ ^3H -FDG（終濃度0.37

kBq/ μ l) を添加した D-グルコース溶液 (グルコースの終濃度 5 mM) を 5 μ l を加え (計 50 μ l)、37°C の恒温槽で 0、5、15、30、60、90 および 120 分間反応させた。各溶液において、2 本のうち 1 本を培養液分画の測定用に卓上遠心機 (MICRO 6・HG; 旭テクノグラス株式会社、船橋) を用いて 5,000 g \times 1 分遠心し、上清 40 μ l を新しいマイクロチューブに分注し、1 N 過塩素酸を 40 μ l 加える (計 80 μ l) ことで酵素反応を停止させ、培養液分画試料とした。残りの 1 本は直接 1 N 過塩素酸を 50 μ l 加える (計 100 μ l) ことで酵素反応を停止させ、浮遊液全量 (培養液分画に細胞分画を含む) 試料とした。次いで 5,000 g \times 1 分遠心後の上清を培養液分画試料 70 μ l、浮遊液全量試料 90 μ l、別のマイクロチューブに分注し、2 N 水酸化ナトリウムを用いて、pH 7.0 に中和した。HPLC 測定の前に、各試料をクロマトディスクで濾過し、AH109A 細胞浮遊液に関する測定用試料とした。

一方、ラットの赤血球については、Donryu ラットにペントバルビタール 0.01 ml/kg (i.p.) により麻酔し、保定台に保定し、70%エタノール液を用いて全身を消毒した。ラット腹部を正中切開して開腹後、ヘパリン 1000 IU/ml で処理した 20 ml シリンジと 18 G 採血針で腹大動脈より全採血した。血液 10 ml を 1,300 g \times 2 分遠心し、上清を捨て、RPMI を加えて洗浄し、遠心と洗浄を 2~3 回繰り返した。遠心分離によりペレットの表層の白血球分画を可能な限り取り除き、RPMI により赤血球数を 4.9×10^{10} cell/ml、 6.1×10^{10} cell/ml に調整した。調整した赤血球浮遊液は AH109A 細胞の時と同じく PCV (%) を測定した。

各反応時間において、2 本のマイクロチューブに赤血球浮遊液を 45 μ l ずつ分注した。それぞれ D-グルコース (終濃度 1 mM) を添加した $^3\text{H-FDG}$ (0.37 kBq/ μ l) 5 μ l を加え 37°C の恒温槽で 0、5、15、30、60、90 および 120 分間反応した。

その後の操作は AH109A 細胞浮遊液の時と同様に行い、赤血球浮遊液に関する測定用試料を作製した。

5-1-3. ラット腹水肝癌(AH109A 細胞)、赤血球、肝臓、脳のホモジネート抽出液の HK 活性測定

腹水中の AH109A 細胞は Donryu ラット腹腔内から腹水 (約 1×10^8 cell/ml) を 10 ml 採取した。採取した腹水を 1,300 g \times 2 分遠心し、上清を捨て、PBS を加えて洗浄することを 2~3 回行った。また、腹水中の赤血球は遠心分離により可能な限り取り除いた。

皮下腫瘍中の AH109A 細胞は 7 日前に 0.2 ml の AH109A 細胞 (約 1×10^8 cell/ml) を皮下接種し作成した腫瘍塊を使用した。ペントバルビタール 0.01 ml/kg (i.p.) により麻酔し開腹後、腹大動脈からの全採血により安楽死させ、腹部皮下よりピンセットと鉗で腫瘍塊を取り出し、シャーレに移した。このシャーレに 37°C に保温した PBS を約 5 ml 加え、ピンセットと鉗でホモジナイズしやすいように細分した。

赤血球は Donryu ラットにペントバルビタール 0.01 ml/kg (i.p.) により麻酔し開腹後、腹部後大動脈より全採血した。血液 10 ml を 1,300 g \times 2 分遠心し、上清を捨て、PBS を加えて洗浄し、遠心と洗浄を 2~3 回繰り返した。また、遠心分離によりペレットの表層の白血球分画を可能な限り取り除いた。

肝臓の分離は中村[32]の方法に基づき実施した。概要として、まず肝臓中の血液を除去するために肝灌流液を次の組成に従って作製した。塩化ナトリウム 8 g、塩化カリウム 0.4 g、リン酸二水素ナトリウム・二水和物 0.078 g、リン酸水素二ナトリウム・十二水和物 0.151 g、2-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]エタンスルホン酸 (HEPES) 2.38 g、フェノールレッド 0.006 g、エチレンジグリコールビス (2-アミノエチルエーテル) 四酢酸塩 (EGTA) 0.19 g、炭酸水素ナトリウム 0.35 g、グルコース 0.9 g を超純水 900 ml に攪拌しつつ溶解させた。次に 1 N 水酸化ナトリウムで pH 7.2 に調整し、超純水で 1000 ml にメスアップした。これをメディウム瓶に入れて、121°C \times 20 分間オートクレーブ滅菌し、肝灌流液として実験に用いるまで 4°C に保存した。

Donryu ラットをペントバルビタール 0.01 ml/kg (i.p.) により麻酔し開腹後、腹大静脈よりヘパリン溶液 (200 IU/Rat, 吉富製薬、大阪) を注射した。次いで、門脈にたこ糸でループを作り、37°C の肝灌流液をペリスタルティックポンプ (ATTO, 東京) より流出させ、門脈に留置針 (サーフロー留置針 20G, テルモ) を挿入して結紮後、腹大静脈を切断して放血させ、さらに胸郭部を切開して前大静脈を鉗子圧迫し、肝臓灌流系を完成させた。灌流液を流速 14 ml/min として後大静脈から流入し、十分に脱血させた後、肝臓を摘出してシャー

レに移した。このシャーレに 37°C に保温した PBS を約 5 ml 加え、ピンセットと鉗で約 5 g 重の肝葉を切り取り、ホモジナイズしやすいように細分した。

脳の採材は、Donryu ラットにペントバルビタール 0.01 ml/kg (i.p.) により麻酔し開腹後、腹大動脈からの全採血により安楽死させ、頭蓋内よりピンセットと鉗で脳を取り出し、シャーレに移した。このシャーレに 37°C に保温した PBS を約 5 ml 加え、ピンセットと鉗でホモジナイズしやすいように細分した。

上述のように処理した AH109A 細胞、赤血球、肝臓および脳にそれぞれ 50 mM トリス - 塩酸緩衝液 (pH 7.4)、1 mM ジチオトレイトールおよびプロテアーゼ 50 倍希釈水溶液 (プロテアーゼ阻害剤カクテル, ナカライテスク株式会社、京都) をホモジナイズ液として 5 ml 添加し、氷水に浸け冷却しながらホモジナイザー用攪拌機 (井内盛栄堂、大阪) で 5,000 rpm、10 分間ホモジナイズした。ホモジナイズされた試料をマイクロチューブに移し、卓上遠心機で 5,000 g×5 分遠心後、その上清を別のマイクロチューブに移し、ホモジネート抽出液として実験に供するまでディープフリーザーで -80°C 以下に保存した。

グルコース反応液 (グルコース濃度 ; 0.5, 1, 5 mM) を次の組成に従って作製した。ホモジネート抽出液と混和後の終濃度が 50 mM トリエタノールアミン、20 mM 塩化マグネシウム、100 mM 塩化カリウム、1 mM ジチオトレイトール、0.5、1 および 5 mM D-グルコース、20 mM ATP となるように超純水にて希釈して、実験に用いるまで -80°C 以下に保存した。

ホモジネート抽出液に対する酵素の反応は、ホモジネート抽出液およびグルコース反応液を氷水下 (約 4°C) で解凍してから使用した。ホモジネート抽出液 45 μ l にグルコース反応液を 5 μ l 添加して恒温槽で 37°C 5、15、30、60、90 および 120 分間反応させた。

予定の時間に達したら、1 N 過塩素酸を 50 μ l 加える (計 100 μ l) ことで酵素反応を停止した。次いで遠心分離した上清 90 μ l を別のマイクロチューブに分注し、2 N 水酸化ナトリウムを 22 μ l 添加することで約 pH 7.0 に中和した。これをクロマトディスクで濾過し、測定用試料とした。

5-2. 蛋白質濃度の測定

AH109A 細胞および赤血球の浮遊液、または AH109A 細胞、赤血球、肝臓、および脳のホモジネート抽出液の蛋白質濃度を示すため、実験に使用したサンプルの蛋白質濃度を Lowry 法により算出した [18]。

Lowry 法は蛋白質を青色の呈色反応を吸光度により定量する方法で、反応は鋭敏であり、蛋白質溶液の微量定量に適している。Lowry 法については文献 18 の方法に基づいて行った。

Lowry 法における検量線を作成するために、牛血清アルブミン (和光純薬工業株式会社、大阪) を標準溶液として、10 μ g/ml ずつ 0 から 100 μ g/ml までの各濃度に調整し、分光光度計で波長 750 nm における吸光度を測定した。サンプルは吸光度計の至適条件に合わせるため、100~1000 倍に希釈し、吸光度より蛋白質濃度を次式 (Eq. 1) により求めた。

$$\text{蛋白質濃度 (mg/ml)} = (a \times \text{吸光度 (750nm)} + b) \times \frac{\text{希釈倍数}}{1000} \quad \dots \text{Eq. 1}$$

※ a : 近似直線の傾き、b : 近似直線の y 切片

5-3. 高速液体クロマトグラフィー

移動相に 150 mM リン酸二水素ナトリウム・二水和物 (pH4.4) を使い、ポンプ (LC-10AD_{VP}; 株式会社島津製作所、京都) の流速を 0.5 ml/min と設定した。ガードカラム (Asahipak NH2P-50G、4.6 mmID×10 mm、Shodex、東京) を測定用カラムの前に設置し、測定カラムに糖分析用 HPLC カラム (Asahipak NH2P-50 4E、4.6 mmID*250 mm、Shodex、東京) を装着して用いた。測定時はカラムオープン (CTO-10A_{VP}; 株式会社島津製作所、京都) でカラムを 40°C に保温した。測定する試料を 20 μ l ずつ HPLC にインジェクトし、カラムを通過した溶液をフラクションコレクターで測定開始 0 分から 2 分間隔で 24 分までの計 12 区画で 1 ml ずつ回

収し、各フラクション中の溶液をフラクションナンバー1~12 (以降 F1~F12 と表記) とした。

5-4. ³H 濃度の測定

2 ml 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 F1~12 の溶液をそれぞれ 1ml ずつ混和した。また、HPLC で分離、回収する前の試料の ³H 濃度を調べるため、2 ml の液体シンチレータを含むバイアル瓶に各項目で調整した HPLC 測定用試料 20 μl を直接混和した。

³H の壊変にともなう β 線の計数には、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) を用い、1 検体につき 5 分間測定した。

HPLC に注入した ³H-FDG および ³H-FDG6P の何割が分離、回収されているか確認するため、次式 (Eq. 2) により回収率を求め、各反応時間ごとに平均値±標準偏差を算出した。

$$\text{回収率 (\%)} = \frac{\text{全区画の放射能の合計 (Bq)}}{\text{各 HPLC 測定用試料の放射能 (Bq)}} \times 100 \quad \dots \text{Eq. 2}$$

また、赤血球浮遊液を用いた実験においては、回収率が一次速度論的に減少するものとして減少速度定数 (/time) を求め、次式 (Eq. 3) により近似曲線を作成した。

$$\text{赤血球浮遊液の回収率 (\%)} = P_0 \times \exp(-a \times t) \quad \dots \text{Eq. 3}$$

P₀: 初期の回収率

exp: 自然対数

a: 減少速度定数

t: 反応時間

6. データの解析方法

6-1. ³H-FDG と ³H-FDG6P 濃度の解析

5-1-1 の実験において対照実験と HK 反応後の ³H 濃度の変化より、対照実験の F1、F2、および F5~F12 の ³H 濃度と HK 反応後の F3 および F4 の ³H 濃度は反応前後で ³H 濃度の値に変化がないため、この ³H 濃度を差し引いて ³H-FDG 濃度および ³H-FDG6P 濃度を求めた。F2~F5 の放射能から Eq. 4 により ³H-FDG 濃度を算出した。F7~F10 の放射能から Eq. 5 により HK 反応で生成した ³H-FDG6P 濃度を算出した。

$${}^3\text{H-FDG 濃度 (\%)} = \frac{\text{F2~F5 の放射能の合計 (Bq)}}{\text{全区画の放射能の合計 (Bq)}} \times 100 \quad \dots \text{Eq. 4}$$

$${}^3\text{H-FDG6P 濃度 (\%)} = \frac{\text{F7~F10 の放射能の合計 (Bq)}}{\text{全区画の放射能の合計 (Bq)}} \times 100 \quad \dots \text{Eq. 5}$$

上述の解析を AH109A 細胞および赤血球の浮遊液、または AH109A 細胞、赤血球、肝臓、および脳のホモジネート抽出液の実験から測定された ³H 濃度においても同様に解析した。また、³H-FDG 濃度から Eq. 6 により Glu 濃度算出し、³H-FDG6P 濃度から Eq. 7 によりグルコース-6-リン酸 (G6P) 濃度を算出した。

$$\text{Glu 濃度 (mM)} = \frac{\text{FDG の濃度 (\%)}}{100 (\%)} \times \text{添加 Glu 濃度 (mM)} \quad \dots \text{Eq. 6}$$

$$\text{G6P 濃度 (mM)} = \frac{\text{FDG6P の濃度 (\%)}}{100 (\%)} \times \text{添加 Glu 濃度 (mM)} \quad \dots \text{Eq. 7}$$

6-2. AH109A 細胞浮遊液の G6P 濃度における速度解析方法

AH109A 細胞浮遊液については、培養液中の Glu 濃度と細胞内の Glu および G6P の濃度を区別して求めるため、PCV 値より、各フラクションナンバーにおいて浮遊液全量、培養液分画の放射能から Eq. 8 により細胞分画の放射能を算出し、細胞分画の ³H-FDG6P 濃度を Eq. 5 により求めた。

$$\begin{aligned} & \text{細胞分画 (Bq)} \\ & = \text{浮遊液全量 (Bq)} - \text{培養液分画 (Bq)} \times \frac{(100-\text{PCV} (\%))}{100 (\%)} \quad \cdots \text{Eq. 8} \end{aligned}$$

培養液分画の ³H-FDG 濃度から Eq. 6 より培養液の Glu 濃度を、細胞分画の ³H-FDG6P 濃度から Eq. 7 より細胞中の G6P 濃度を算出した。

培養液の Glu 濃度から培養液の Glu 消失速度と、細胞中の G6P 濃度から細胞中の G6P 生成速度を以下のように解析した。

培養液の Glu 濃度は、一次速度論的に減少するものとして消失速度定数 (/time) を求め、次式 (Eq. 9) により近似曲線を作成した。

$$[\text{Glu}] = C_0 \times \exp(-b \times t) \quad \cdots \text{Eq. 9}$$

[Glu]: 培養液の Glu 濃度

C₀: 初期培養液の Glu 濃度

exp: 自然対数

b: 消失速度定数

t: 反応時間

Glu の初期接種量と Eq. 9 をもとに細胞中の G6P 生成速度を次式 (Eq. 10) により求めた。

$$[\text{G6P}] : C'_{\text{max}} - C'_{\text{max}} \times \exp(-c \times t) \quad \cdots \text{Eq. 10}$$

[G6P]: 細胞中 G6P 濃度

C'_{max}: 細胞中 G6P の最終生成濃度

exp: 自然対数

c: 生成速度定数

t: 反応時間

生成速度定数 (/time) および G6P の最終生成量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[52]。

HK 活性の指標として細胞中 G6P 濃度の近似曲線から 0 分から 120 分までの G6P 濃度下面積 (AUC₀₋₁₂₀: Area under the curve) (mM · min) を次式 (Eq. 11) に基づき、台形公式によって算出した。

$$\text{AUC}_{0-120} (\text{mM} \cdot \text{min}) = \int_0^{120} [C'_{\text{max}} - C'_{\text{max}} \times \exp(-b \times t)] dt \quad \cdots \text{Eq. 11}$$

6-3. ホモジネート抽出液の G6P 濃度における速度解析方法

5-1-3 で作成した AH109A 細胞、赤血球、脳および肝臓のホモジネート抽出液において、全タンパク質濃度 - G6P 生成曲線を作成し、AUC₀₋₁₂₀ は台形公式を用いた数値積分により求めた。

Ⅲ. 結果

1. Lowry 法による蛋白質濃度測定検量線の作成

Lowry 法により測定試料中の蛋白質濃度を測定するため、牛血清アルブミンを基準とした検量線を作成したところ決定係数 (R^2 値) は 0.99 以上と良好な直線性を示し、次式 (Eq. 12) が得られた[図 2]。

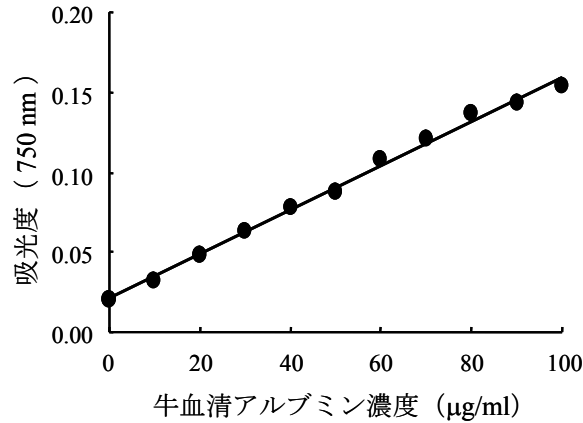


図 2 : Lowry 法で使用した検量線

$$\text{蛋白質濃度 (mg/ml)} = (714 \times \text{吸光度 (750nm)} - 0.021) \times \frac{\text{希釈倍数}}{1000} \quad \dots \text{Eq. 12}$$

2. 酵母由来の HK 標準製品を用いた ^3H -FDG および ^3H -FDG6P の濃度測定法の検討結果

各フラクションの ^3H 濃度を図 3 に示した。HK の反応後は F2~F5 の ^3H 濃度が減少し、F7~F10 の ^3H 濃度が増加した。

HPLC で ^3H -FDG (F2~F5 の放射能の合計) と ^3H -FDG6P (F7~F10 の放射能の合計) を分取できたが、対照実験と HK 反応後の ^3H 濃度の変化から、HK 反応の前後で値に変化がない ^3H 濃度が認められた[図 3 の左図]。Eq. 5 により ^3H -FDG6P 濃度を算出する際に、HK 反応の前後で値に変化がない ^3H 濃度の考慮分を差し引いて ^3H -FDG6P 濃度を算出した。図 3 の右図のように、 ^3H -FDG は ^3H -FDG6P に変換され Eq. 5 より算出された全フラクションの放射能の合計に対する ^3H -FDG6P 濃度 (F7~F10 の放射能の合計) は約 97%であり、良好な FDG6P の分離が確認された。

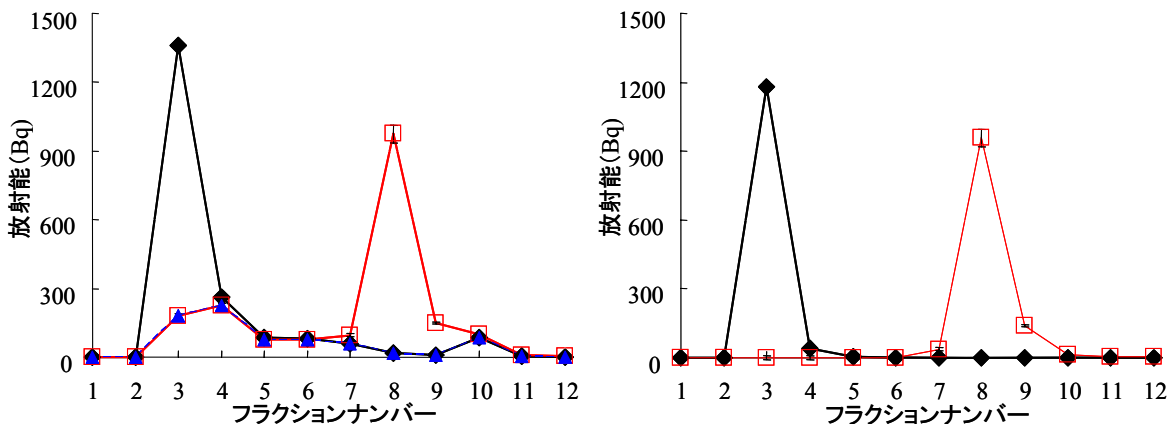


図 3 : 酵母由来のヘキソキナーゼ (HK) 標準製品を用いた濃度測定法の検討

◆ 対照実験 □ HK反応後 (値±標準偏差) ▲ 反応前後で値に変化がない ^3H 濃度

3. AH109A 細胞の FDG 取り込みとリン酸化反応

AH109A 細胞浮遊液の全分画では、 ^3H -FDG および ^3H -FDG6P 濃度を示しており、反応時間に伴い ^3H -FDG 濃度が減少し、 ^3H -FDG6P 濃度が増加した[図 4-A]。

培養液分画の放射能は、細胞に取り込まれなかった ^3H -FDG を、細胞分画の放射能は細胞内に取り込まれた ^3H -FDG と細胞内の HK により生成した ^3H -FDG6P の濃度を示している。培養液分画は反応時間に伴い F2 ~F5 の放射能の合計が減少した[図 4-B]。細胞分画の ^3H 濃度は 5 分、15 分に ^3H -FDG (F2~F5) がわずかに測定されたが経時的に放射能が低下し、反応時間に伴い ^3H -FDG6P (F7~F10) が増加した[図 4-C]。

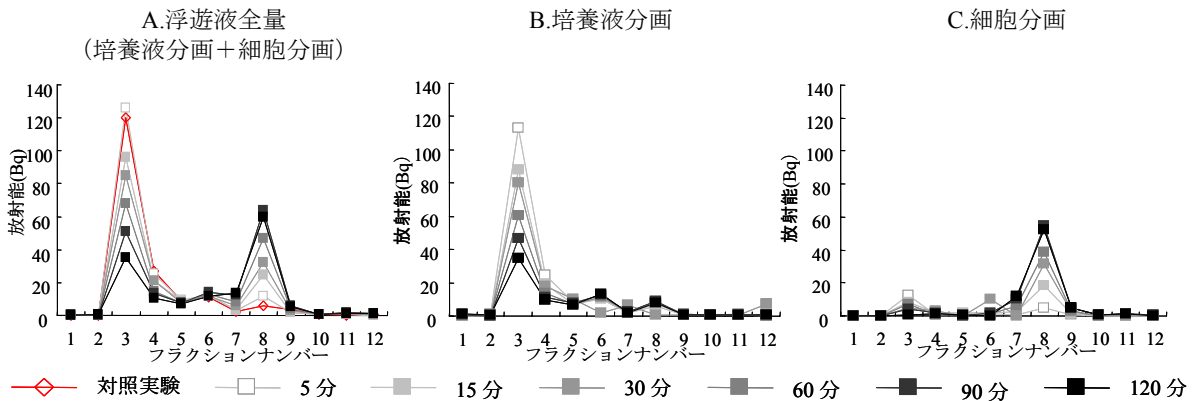


図 4 : AH109A 細胞浮遊液中の ^3H 濃度の培養液分画と細胞分画の分離

- A. AH109A 浮遊液の全分画の ^3H 濃度
- B. AH109A 浮遊液の遠心分離後の上清の ^3H 濃度
- C. Eq. 8 より算出した細胞分画の ^3H 濃度

図中のシンボルは AH109A 細胞浮遊液と ^3H -FDG および Glu を混和した反応時間を示している。

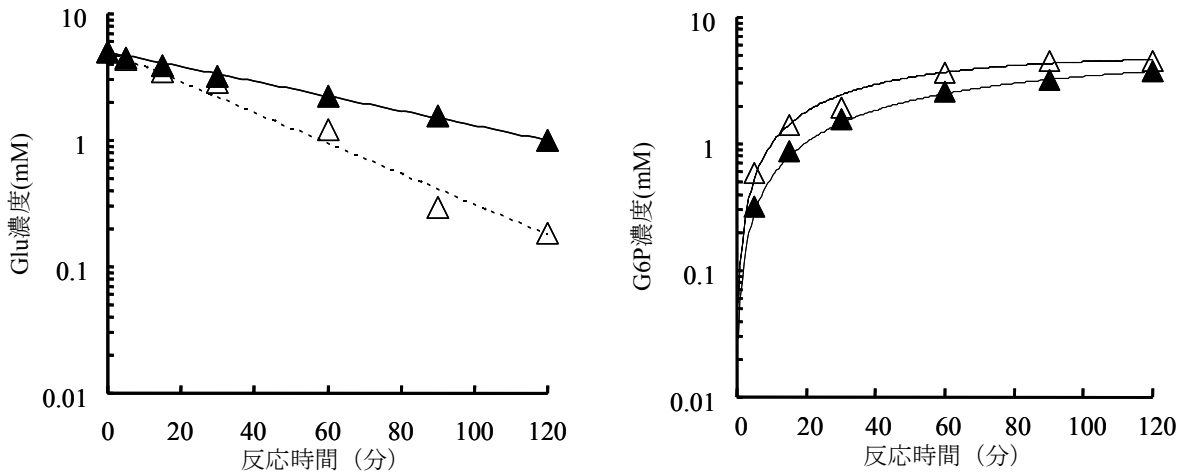


図 5 : ラット腹水肝癌 (AH109A 細胞) 細胞浮遊液の FDG 取り込み反応とリン酸化反応の時間推移

図 4 で求めた培養液分画の ^3H 濃度および細胞分画の ^3H 濃度より経時的に培養液分画の ^3H -FDG および細胞分画の ^3H -FDG6P 濃度を Eq. 4 および 5 に従い算出し、Eq. 6 および 7 よりグルコース (Glu) およびグルコース-6-リン酸 (G6P) 濃度を求めた。

図中のシンボルは AH109A 細胞浮遊液の各細胞数濃度の Glu および G6P 濃度の時間推移を表わす。

培養液中のグルコース (Glu) の消失 (左図)、細胞中グルコース-6-リン酸 (G6P) の増加 (右図)

- ▲— 1.0×10^7 cell/ml_蛋白質濃度 1.014 mg/ml_Ht 2%
 回帰式: Glu濃度 (mM) $[\text{Glu}] = 5 \times \exp(-0.0134 \times t)$ $R^2 = 0.997$
 G6P濃度 (mM) $[\text{G6P}] = 5 - 5 \times \exp(-0.0115 \times t)$
 $\text{AUC}_{0-120} = 274.6 \text{ mM} \cdot \text{min}$
- △-- 2.0×10^7 cell/ml_蛋白質濃度 3.250 mg/ml_Ht 5%
 回帰式: Glu濃度 (mM) $y = 5 \times \exp(-0.0278 \times t)$ $R^2 = 0.976$
 G6P濃度 (mM) $y = 5 - 5 \times \exp(-0.0223 \times t)$
 $\text{AUC}_{0-120} = 391.2 \text{ mM} \cdot \text{min}$

Eq. 6 および 7 より、培養液分画の Glu 濃度と細胞分画における G6P 濃度を算出し、反応時間に伴う濃度変化を図 5 に表した。図 5 の左図で示すように、培養液分画の Glu 濃度は片対数グラフにおいて直線状の消失過程を示した。Eq. 9 より培養液の Glu 消失速度定数は、細胞数濃度 1.0×10^7 cell/ml と 2.0×10^7 cell/ml の条件で、それぞれ 0.0134 /min および 0.0278 /min となり、 2.0×10^7 cell/ml 条件時での Glu 消失速度定数は 1.0×10^7 cell/ml 条件時の約 2.1 倍であった。Eq. 10 より細胞中の G6P 生成速度定数は、細胞数濃度 1.0×10^7 cell/ml の条件では 0.0115 /min、 2.0×10^7 cell/ml の条件では 0.0223 /min となり、 2.0×10^7 cell/ml 条件時の G6P 生成速度定数は 1.0×10^7 cell/ml 条件時の約 1.9 倍であった。図 5 右のように、120 分間の反応における G6P 濃度曲線下面積 (AUC₀₋₁₂₀) は、Eq. 11 に基づき算出した結果、 1.0×10^7 cell/ml では 274.6 mM・min、 2.0×10^7 cell/ml では 391.2 mM・min であった。

4. 赤血球の ³H-FDG 取り込みとリン酸化反応

赤血球浮遊液の全分画において、反応時間に伴い ³H-FDG 濃度 (F2~F5) の減少は認められたが、³H-FDG6P 濃度 (F7~F10) の増加量と ³H-FDG 濃度の減少量は等しくなかった[図 6-A]。

赤血球浮遊液の Glu 濃度および G6P 濃度を Eq. 6 および 7 に従って算出し、時間経過に伴う濃度変化をグラフに表した[図 7]。Glu 濃度は反応時間に伴い減少し、120 分間で実験 1 回目では 0.27 mM、実験 2 回目では 0.36 mM まで減少した。G6P は最大で 0.19 mM (実験 1 回目の 60 分) まで増加したが、それ以上は増加が認められなかった。

また、HPLC に注入した ³H-FDG および ³H-FDG6P の何割が回収されているか確認するため、LSC により測定した各フラクションの放射能の合計および各 HPLC 測定用試料の放射能から HPLC による回収率を Eq. 2 に従い算出したところ、図 8 に示すように、HPLC による回収率の平均値は測定時間に関係なく、約 80% で一定に保たれていた。しかし、赤血球浮遊液の HPLC による回収率では片対数グラフにおいて直線状の減少過程を示し、Eq. 3 より算出した減少速度定数は実験 1 回目では 0.006 /min、実験 2 回目では 0.005 /min だった。

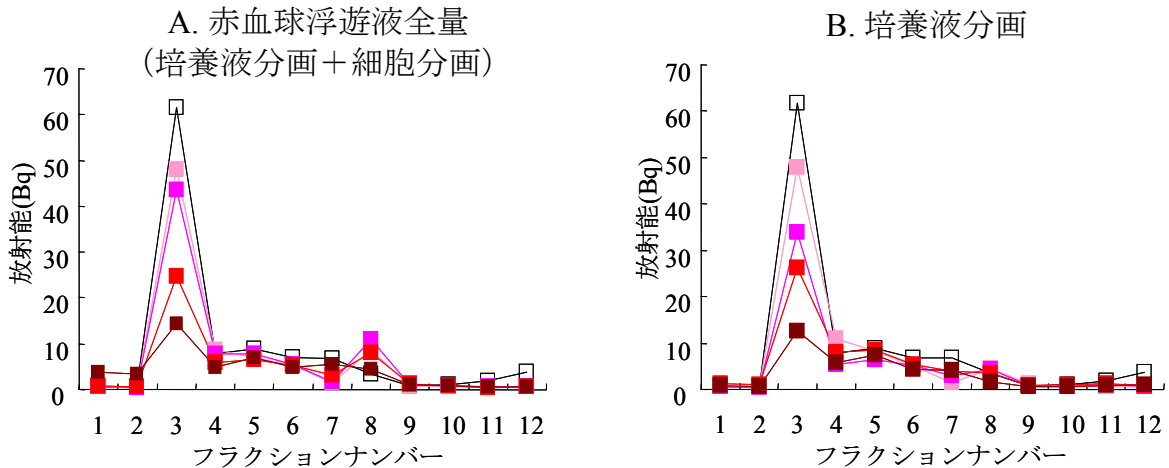


図 6 : 赤血球浮遊液の赤血球浮遊液全量と培養液分画の ³H 濃度

A. 赤血球浮遊液の全分画の ³H 濃度

B. 赤血球浮遊液の遠心分離後の上清の ³H 濃度

図中のシンボルは赤血球浮遊液と ³H-FDG および Glu を混和した反応時間を示している。

- 対照実験
- 120 分
- 15 分
- 30 分
- 60 分

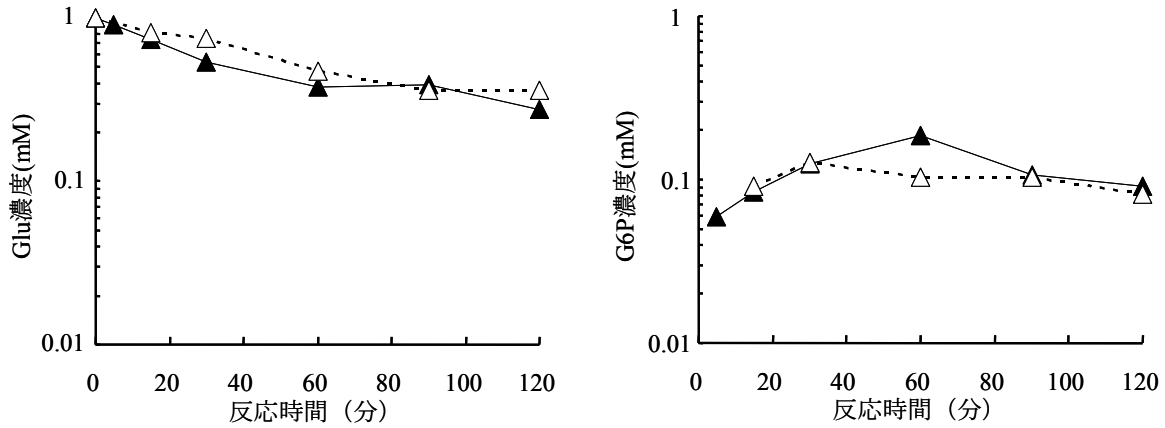


図 7：赤血球浮遊液の FDG 取り込み反応とリン酸化反応の時間推移

図 6 で求めた赤血球浮遊液全量の ^3H 濃度より経時的に ^3H -FDG および ^3H -FDG6P 濃度を Eq. 4 および 5 に従い算出し、Eq. 6 および 7 よりグルコース (Glu) およびグルコース-6-リン酸 (G6P) 濃度を求めた。

図中のシンボルは赤血球浮遊液の各細胞数濃度の Glu および G6P 濃度の反応時間推移を表わす。

Glu の消失 (左図)、G6P の増加 (右図)

- ▲ 実験1回目： $6.1 \times 10^{10} \text{cell/ml}$ _Ht 34%_蛋白質濃度 202.5 mg/ml
- △ 実験2回目： $4.9 \times 10^{10} \text{cell/ml}$ _Ht 30.5%_蛋白質濃度 125.1 mg/ml

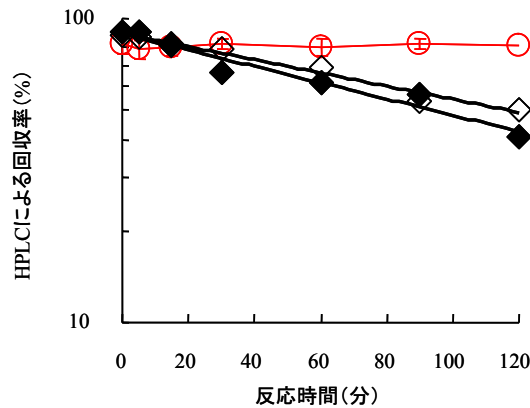


図 8：高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による回収率

- 回収率の平均値 (値±標準偏差)
- ◆ 赤血球浮遊液 (実験1回目) 回帰式: 回収率 (%) = $88.9 \times \exp(-0.006 \times t)$ $R^2 = 0.95$
- ◆ 赤血球浮遊液 (実験2回目) 回帰式: 回収率 (%) = $89.3 \times \exp(-0.005 \times t)$ $R^2 = 0.98$

5. AH109A 細胞、赤血球、肝臓、脳ホモジネート抽出液の HK 活性測定結果

各種ホモジネート抽出液に Glu を混和して反応させた際の ^3H -FDG および ^3H -FDG6P 濃度を Eq. 4 および 5 より算出し、Eq. 6 および 7 より Glu および G6P 濃度を求め、反応時間に伴う濃度変化をグラフで示した[図 9 ~ 図 12]。

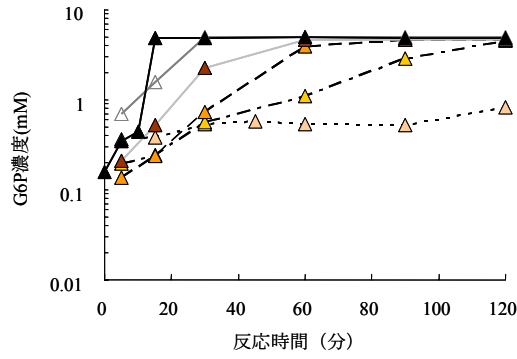


図9：腹水中 AH109A 細胞のホモジネート抽出液の HK 反応による G6P の生成

図中のシンボルは以下に示す腹水中 AH109A 細胞のホモジネート抽出液のそれぞれ蛋白質濃度条件下における G6P 濃度の反応時間推移を表わす。

- ▲ - 0.36 mg/ml protein
- ▲ - 1.63 mg/ml protein
- ▲ - 3.49 mg/ml protein
- ▲ - 7.00 mg/ml protein
- ▲ - 10.29 mg/ml protein
- ▲ - 12.63 mg/ml protein

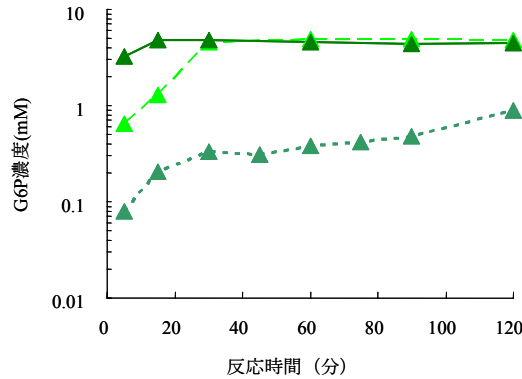


図10：皮下腫瘍中 AH109A 細胞のホモジネート抽出液の HK 反応による G6P の生成

図中のシンボルは以下に示す皮下腫瘍中 AH109A 細胞のホモジネート抽出液のそれぞれ蛋白質濃度の条件下における G6P 濃度の反応時間推移を表わす。

- ▲ - 0.49 mg/ml protein
- ▲ - 5.08 mg/ml protein
- ▲ - 24.68 mg/ml protein

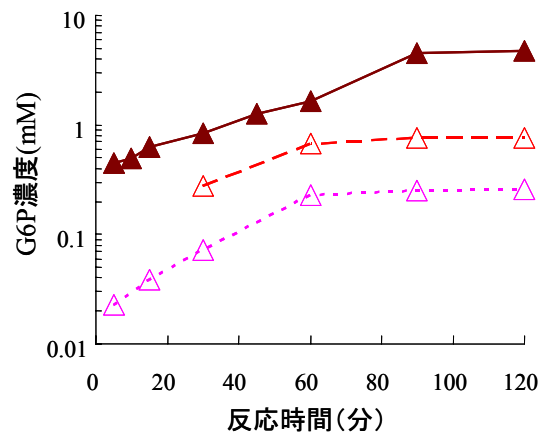
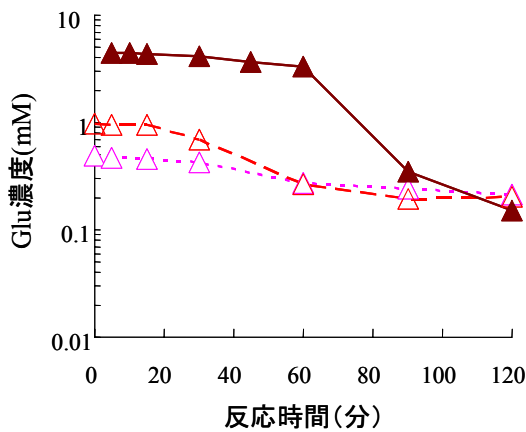


図11：赤血球のホモジネート抽出液の HK の Glu リン酸化反応による G6P の生成

図中のシンボルは以下に示す赤血球のホモジネート抽出液と混和したそれぞれの Glu 濃度条件下における G6P 濃度の反応時間推移を表わす。

- ▲ - Glu 0.5mM
- ▲ - Glu 1mM
- ▲ - Glu 5mM

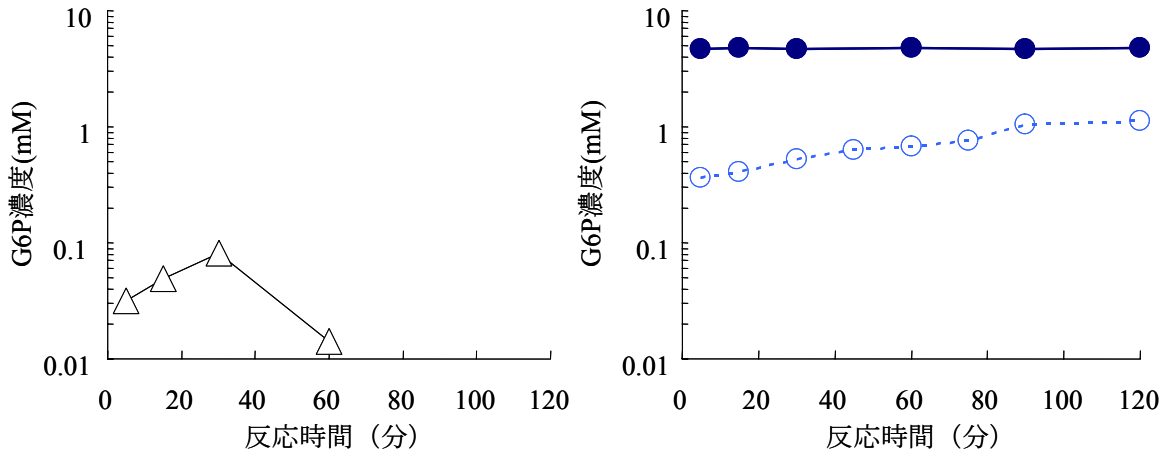


図 12：肝臓および脳のホモジネート抽出液の HK 反応による G6P の生成

図中のシンボルは肝臓（左図）および脳（右図）のホモジネート抽出液の蛋白質濃度それぞれの条件下における G6P 濃度の時間推移を表わす。

肝臓 —△— 38.61 mg/ml protein

脳 -○- 0.29 mg/ml protein
● 14.69 mg/ml protein

赤血球ホモジネート抽出液において、赤血球浮遊液の実験[図 8]と同様に反応時間に伴う HPLC による回収率の減少が確認された[図 13]。120 分間で、Glu 0.5 mM 混和した条件では 49%、Glu 1 mM 混和した条件では 71%、Glu 5 mM 混和した条件では 71%まで減少した。

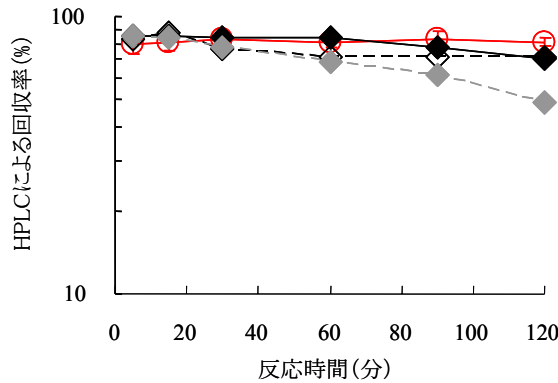


図 13：高速液体クロマトグラフィー（HPLC）による回収率

- 回収率の平均値（値±標準偏差）
- ◆— 赤血球ホモジネート抽出液 Glu 5 mM
- ◆- 赤血球ホモジネート抽出液 Glu 1 mM
- ◆- 赤血球ホモジネート抽出液 Glu 0.5 mM

各種ホモジネート抽出液における G6P 濃度の AUC_{0-120} を台形公式にしたがって数値積分を行うことで算出した[図 14]。腹水および皮下移植した AH109A 細胞の蛋白質濃度と AUC_{0-120} は良好な相関性を示し ($R^2 = 0.936$)、次の対数回帰式 (Eq. 13) に従った。

$$AUC_{0-120} \text{ (mM}\cdot\text{min)} = 130.75 \ln(x) + 178.26 \quad \dots \text{Eq. 13}$$

AUC_{0-120} ：反応時間 0 分から 120 分までの G6P 濃度下面積

x：蛋白質濃度 (mg/ml)

赤血球ホモジネート抽出液において、33.25 mg/ml の蛋白質濃度で Glu と混和した結果、図 14 に示すとおり、赤血球抽出液中の G6P 濃度の AUC_{0-120} (146.4mM・min) は AH109A 細胞の対数回帰曲線より低値を示した。肝臓のホモジネート抽出液において、38.61 mg/ml の蛋白質濃度における AUC_{0-120} (3.1 mg/ml・min) は AH109A 細胞および赤血球の結果よりも低値を示した。脳のホモジネート抽出液では、0.29 mg/ml と 14.69 mg/ml の蛋白質濃度において、 AUC_{0-120} がそれぞれ 86.4 mg/ml・min および 543.6 mg/ml・min となり、AH109A 細胞の結果により導かれた対数回帰式とよい一致を示した。

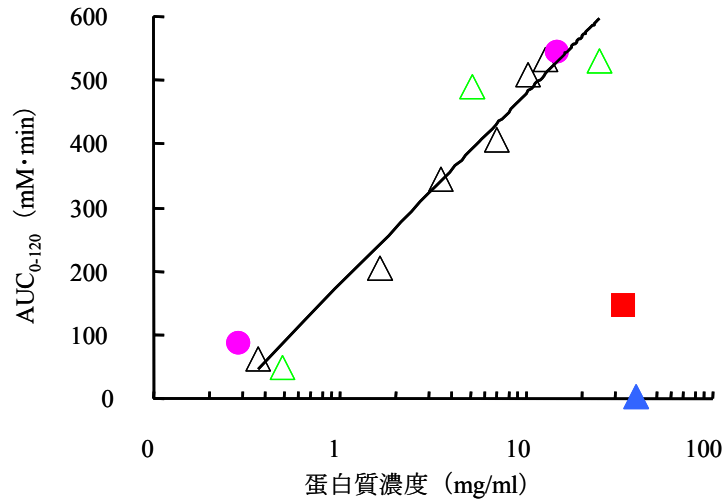


図 14：各種ホモジネート抽出液の蛋白濃度あたりのグルコース-6-リン酸 (G6P) 濃度下面積 (AUC_{0-120})
 図中のシンボルは各種類のホモジネート抽出液における蛋白質濃度あたりの AUC_{0-120} を表わす。

- △ 腹水中AH109A細胞
- 脳
- ▲ 肝臓
- △ 皮下腫瘍中AH109A細胞
- 赤血球

IV. 考察

1. HK 活性の測定法について

1-1. ^3H -FDG および ^3H -FDG6P の HPLC による分離の確認

本実験で用いた糖分析用 HPLC カラムはポリビニルアルコール系基材ゲルにアミノ基を導入した充てん剤を用いたポリマー系アミノカラムである。このアミノ基が種々の物質のイオン基に対してイオン交換作用を起こすため、カラムを通過する速度が物質により異なる。 ^3H -FDG はカラムのアミノ基とのイオン交換作用が働かずにそのまま流出するが、 ^3H -FDG6P は ^3H -FDG6P のリン酸基[図 1 上図]とカラムのアミノ基がイオン交換作用を起こすため、 ^3H -FDG6P はカラム内を通過する際に一定時間保持される。このことから本実験で示した HPLC の測定条件では ^3H -FDG は ^3H -FDG6P よりも先に分取され、LSC による各フラクションの ^3H 濃度の測定結果[図 2]に示したように、F2~F5 の ^3H 濃度は ^3H -FDG であり、F7~F10 の ^3H 濃度は ^3H -FDG6P を示していると考えられる。

HPLC で ^3H -FDG (F2~F5 の放射能の合計) と ^3H -FDG6P (F7~F10 の放射能の合計) を分離して回収できたが、対照実験と HK 反応後の ^3H 濃度の変化から、HK 反応の前後で値に変化がない ^3H の存在が認められた[図 3 の左図]。市販の酵母由来 HK を超純水で希釈した溶液 (30 U/ml) の HK 活性は、混和した Glu 濃度に対して活性が著しく高い反応が迅速に行われ、測定時間内 (15 分) に反応はほぼ完了し、混和した ^3H -FDG

はほぼ $^3\text{H-FDG6P}$ に変換されたものと考えられた。HK 反応の前後で値に変化がない ^3H の存在は HK 反応により ^3H が $^3\text{H-FDG}$ 、 $^3\text{H-FDG6P}$ 以外の物質に標識された可能性が考えられる。Buriova ら[5]は、 $^{18}\text{F-FDG}$ が水溶液中で自己放射線分解によって酸化すると考え、本実験と同じ糖分析用 HPLC カラムを使用し $^{18}\text{F-FDG}$ と Glu の酸化物を測定したところ、10 種の酸化生成物が分離されたと報告している。本実験において $^3\text{H-FDG}$ は約 1 年間 4°C で保存したものを用いていたので、保管中に酸化が起これ、その酸化物により HK による反応後でも F7~F10 以外の区画に ^3H 標識副産物が確認された可能性がある。したがって、 $^3\text{H-FDG6P}$ 濃度を算出する際に、HK 反応の前後で計数値に変化がない ^3H 濃度の考慮分を差し引いて $^3\text{H-FDG6P}$ 濃度を算出した。

HK により $^3\text{H-FDG}$ は $^3\text{H-FDG6P}$ とリン酸基を付加され、Eq. 4 より全フラクションの放射能の合計に対する $^3\text{H-FDG6P}$ 濃度 (F7~F10 の放射能の合計) は約 97%であり、良好な $^3\text{H-FDG6P}$ の分離が確認された。また、 $^3\text{H-FDG}$ は Glu と同一の代謝経路をたどり[28]、 $^3\text{H-FDG}$ と Glu がそれぞれ $^3\text{H-FDG6P}$ と G6P に代謝される比率は同等であると報告されている[7]。このことから HPLC と LSC を用いることで $^3\text{H-FDG}$ と $^3\text{H-FDG6P}$ を区別して濃度を測定できると考えられ、これを基に Eq. 6 および 7 に従って Glu 濃度および G6P 濃度を算出した。したがって、AH109A 細胞および赤血球の細胞浮遊液、または AH109A 細胞、赤血球、肝臓、および脳のホモジネート細胞抽出液を用いた実験において、Glu 濃度と HK のリン酸化反応により生成した G6P 濃度の反応時間に伴う変化を HPLC および LSC を用いて測定することとした。

1-2. AH109A 細胞の $^3\text{H-FDG}$ 取り込みと $^3\text{H-FDG}$ のリン酸化反応

図 4 に示したように、反応時間に伴い培養液分画の $^3\text{H-FDG}$ (F2~F5) が減少し [図 4-B]、細胞分画の $^3\text{H-FDG6P}$ (F7~F10) が増加した[図 4-C]。このことから、緒論で述べたように、培養液の $^3\text{H-FDG}$ は徐々に細胞内に GLUT を介して取り込まれ、細胞内に取り込まれた $^3\text{H-FDG}$ は HK によりリン酸化され $^3\text{H-FDG6P}$ になり細胞内に蓄積するという代謝経路が確認された[28][図 1]。

図 5 の左図で示すように、培養液分画の Glu 濃度は片対数グラフにおいて直線状の消失過程を示した。このことから Glu の細胞内への取り込み反応において、培養液の Glu 濃度は、一次速度論的に消失するものとして取り扱い[35]、Eq. 9 により近似曲線を作成した。Glu の初期接種量と培養液の Glu 消失曲線 (Eq. 9) をもとに細胞中の G6P 生成曲線は Eq. 10 のように近似され、G6P 生成速度定数は Glu 消失速度定数と同程度の値になった。

Whitesell ら[55]は、本実験と別種のラット肝癌細胞 (H4IIE) において、培養液の Glu の細胞内への取り込みは二次速度論的な反応であり、細胞内への Glu 取り込みは GLUT により細胞内に分布し平衡に達した後は HK 活性により制御されると報告されている。

本実験で用いた AH109A 細胞は GLUT が十分な量を発現することで、Glu はきわめて速やかに細胞内に分布し平衡に達し、G6P 生成速度定数は Glu 消失速度定数と同程度の値になったことから、細胞内に取り込まれた Glu は HK によりその活性が高いために速やかに G6P へ代謝されたと考えられる。このことから、一連の反応の流れ全体が一次速度論的に経過したため、培養液の Glu が一次速度論的な消失を示したと推察した。

また、AH109A 細胞濃度 2.0×10^7 cell/ml が 1.0×10^7 cell/ml の 2 倍の濃度であるのに対し、Glu 消失速度定数および G6P 生成速度定数も約 2.1 および 1.9 倍となった。このことから細胞濃度と Glu の細胞内への取り込みおよび HK によるリン酸化反応の速度は単純な正比例の関係にあることが考えられ、HK の仕事量、すなわち活性値を表す AUC_{0-120} も 2.0×10^7 cell/ml の方が 1.0×10^7 cell/ml よりも高値を示す結果となり、AH109A 細胞では細胞数濃度に依存した HK 活性の変化が認められる。

1-3. 赤血球の $^3\text{H-FDG}$ 取り込みと $^3\text{H-FDG}$ のリン酸化反応

成熟赤血球はミトコンドリアをもたないので、その代謝は限られており、エネルギーはグルコースの嫌氣的代謝である解糖で生成している[29]。赤血球では GLUT-1 が主に発現し[1, 8]、GLUT-1 により取り込まれた FDG は HK によりリン酸化され、FDG6P として細胞内に滞留すると報告されている[56]。

図 7 で示したように、培養液中の Glu は GLUT を介して細胞内に取り込まれたため、Glu 濃度は反応時間に伴い減少し、120 分間で実験 1 回目では 0.27 mM、実験 2 回目では 0.36 mM まで減少した。このことから、

赤血球は AH109A 細胞と同じように GLUT を介して $^3\text{H-FDG}$ を細胞内に取り込むため培養液の Glu 消失が確認された。しかし、G6P は最大で 0.19 mM (実験 1 回目の 60 分) まで増加したが、それ以上は増加が認められず、G6P 濃度の増加量と Glu 濃度の減少量は等しくなかった。また、図 8 で示したように、赤血球浮遊液の HPLC による回収率が片対数グラフにおいて直線状の減少過程を示し $^3\text{H-FDG}$ および $^3\text{H-FDG6P}$ の以外の ^3H 標識物質が生成し、その物質が HPLC により回収されなかった可能性が考えられる。

Deichen ら[9]の報告では、ヒトの単球およびマクロファージ (HMMs) を培養して取り込まれた細胞内の FDG の代謝産物において、ラジオ薄層クロマトグラフィにより主に FDG6P および FDG-1,6-diphosphate が検出された。また、他の細胞では微量しか存在しない Glucose-1,6-diphosphate が赤血球では多量に存在していると報告されていることから[57]、赤血球に取り込まれた FDG の FDG6P 以外の代謝産物は FDG-1,6-diphosphate である可能性が考えられる。

1-4. AH109A 細胞、赤血球、肝臓、脳のホモジネート抽出液の HK 活性測定

Biopsy 検査試料から腫瘍の悪性度判定ができるように臨床現場で応用するためには、細胞浮遊液を用いた実験のような細胞数の調整が困難であることが考えられ、このことから、細胞のホモジネート抽出液を用いた実験を行った。

ホモジネート抽出液の HK 活性を比較するため、G6P 濃度の AUC_{0-120} を台形公式にしたがって数値積分を行うことで算出した[図 14]。蛋白質濃度と AUC_{0-120} の良好な相関性関係を利用し、AH109A 細胞の対数回帰曲線を基に赤血球、肝臓、脳のホモジネート抽出液における HK 活性を AH109A 細胞の HK 活性と比較したところ、AH109A 細胞と脳はほぼ同値を示し、次いで赤血球、肝臓の順に活性が低くなることが示され、 AUC_{0-120} を算出することで組織間の HK 活性の比較が達成された。

図 13 に示されたように赤血球のホモジネート抽出液においても赤血球浮遊液を $^3\text{H-FDG}$ と反応させた時と同様に経過時間に伴い、 $^3\text{H-FDG}$ および $^3\text{H-FDG6P}$ の以外の ^3H 標識物質が生成し、その物質が HPLC により回収されなかった可能性が考えられるが、回収率を見る限り、5 mM の Glu 濃度を設定することで、その後の副産物の影響を最小限に抑えることができ、少なくとも AH109A 細胞よりも赤血球の HK 活性が低いことが示された。

2. HK 活性の組織特異性について

AH109A 細胞、赤血球、肝臓、脳のホモジネート抽出液の HK 活性測定により組織ごとに HK 活性が異なることが示されたが、それぞれの組織における研究報告を参考に考察する。

2-1. ラット腹水肝癌細胞(AH109A 細胞)の HK 活性

悪性腫瘍における FDG の細胞内集積の増加は、①GLUT を介する細胞膜への輸送率、②HK によるリン酸化率、③グルコース-6-ホスファターゼ (G-6-Pase) による FDG6P の脱リン酸化率に関連がある。

①GLUT には GLUT-1 から GLUT-5 のアイソフォームがある。悪性腫瘍では特に GLUT-1 と GLUT-3 の発現レベルが有意に増加するため FDG の蓄積が増加する[3,28,58,59]。

②ヘキソキナーゼは HK-I から HK-IV のアイソフォームがあるが、特に悪性腫瘍では骨格筋と脂肪組織で発現する HK-II の活性レベルが増加するため FDG の蓄積が増加する[55]。

また、ラット肝癌細胞の HK の活性は正常肝細胞よりも 100 倍以上高く、他の糖新生酵素よりも HK 活性の相対的増加は 8 倍を超えると報告されている[33,47]。本実験においても図 14 に示すように、AH109A 細胞の HK 活性は、同じく HK 活性が高いと報告されている脳とほぼ同値を示し、赤血球および肝臓よりも高いことが示された。

③腫瘍の増殖と G-6-Pase 活性は負の相関を示すと言われている[23,37]。ラット肝癌細胞の一種である 7794B 細胞 (1×10^7 個/0.05ml) をラットへ接種すると生存日数は 400 日以上であると示されている[37]。このような生存日数の腫瘍細胞では G-6-Pase 活性が高い。しかし、本実験で用いたラット腹水肝癌 AH109A 細胞をラッ

トに 1×10^7 個(0.05 ml) 接種した場合、生存日数は約 12 日前後[23、43]であり 7794B 細胞を接種したラットのように長期生存は AH109A 細胞を接種したラットでは不可能であり、よって AH109A 細胞は G-6-Pase 活性が高いとは言えない。

肝臓では他組織よりも G-6-Pase 活性が高いこと知られている[22、30]が、肝細胞に由来する AH109A 細胞ではむしろ G-6-Pase 活性が減弱することで HK によりリン酸化された G6P を脱リン酸化する作用が HK の Glu をリン酸化する作用と比べ低いため、図 14 に示すように、肝臓よりも AH109A 細胞の蛋白質濃度あたりの AUC_{0-120} が高値を示す結果になったと考えられる。また、肝臓癌も高分化型の場合には G-6-Pase 活性が残存している場合が多く、FDG の集積が弱い場合が多いと報告されている[30]。AH109A 細胞は図 14 において肝臓よりも著しく高い AUC_{0-120} 示していることから高分化型の場合と異なり、HK 活性と相対的に G-6-Pase 活性が低いことが考えられ、未分化型の悪性腫瘍であろうと推察される。

2-2. 肝臓の HK 活性

肝臓に発現する HK のアイソフォームの HK-IV はブドウ糖に高い特異性を認めており、グルコキナーゼとして知られている[46]。図 14 で記されているように、肝臓のホモジネート抽出液において、 AUC_{0-120} は AH109A 細胞および赤血球の結果よりも低値を示したことから HK 活性が低いと考えられる。

また、細胞内で G-6-Pase 活性が高ければ FDG が細胞内に取り込まれても FDG6P が蓄積されにくい、FDG の濃度が細胞内で上昇し細胞外へ輸送される[6]。肝臓は他の組織と比べて G-6-Pase 活性が高いため、細胞内に一旦取り込んだ FDG を再び脱リン酸化して細胞外に排出してしまう働きが強い[22,30]。このことから肝臓の HK 活性の測定において AUC_{0-120} が低値を示したのは、肝臓ホモジネート抽出液における G-6-Pase 活性が高いためグルコキナーゼにより G6P が生成されても G-6-Pase により G6P のほとんどが脱リン酸化されるため AUC_{0-120} が低値を示したと考えられる。

これに対して AH109A 細胞は肝細胞由来の癌細胞であるが、図 14 に示すように、HK による Glu のリン酸化活性が高いことから、肝細胞が腫瘍化することで HK 活性が高く、または G-6-Pase 活性が低く変化したと考えられる。

2-3. 赤血球の HK 活性

赤血球ホモジネート抽出液において、図 14 に示すとおり、赤血球ホモジネート抽出液中の G6P 濃度の AUC_{0-120} は AH109A 細胞の対数回帰曲線より低値を示した。

丸山ら[27]は *in vivo* においてラット血液の ^{18}F -FDG 集積について血漿と血球の ^{18}F -FDG 集積量が同程度であったことから赤血球の HK 活性はほとんどないと考察している。本実験においても赤血球の HK 活性は低く測定され、丸山らの考察を支持する結果となった。

2-4. 脳の HK 活性

脳はその機能を維持するために大量のブドウ糖を消費している。また神経細胞内にはグリコーゲンの貯蔵がほとんどないため、脳血流によって供給されるブドウ糖でエネルギーを産生している[34]。脳では主に HK-I が発現しており、ミトコンドリアに結合して存在する[46]。

図 14 に示すように、脳のホモジネート抽出液では、AH109A 細胞の結果により導かれた対数回帰式にのるような数値を示したことから、脳は AH109A 細胞とほぼ同値を示すと考えられ、赤血球および肝臓の HK 活性よりも脳の HK 活性は正常組織であっても高く維持されており、ミトコンドリアに結合して存在する HK-I の発現が強いことが推察される。

3. FDG の細胞内への取り込み活性の決定因子

Aloj ら[1]は HK、特にミトコンドリアに結合して存在する HK の活性が腫瘍における FDG 蓄積率を決定すると報告している。本実験においても、ミトコンドリアに結合して存在する HK-I の発現が強いとされる脳

のホモジネート抽出液の AUC_{0-120} と肝臓や赤血球よりも HK 活性が高いとされる AH109A 細胞の AUC_{0-120} がほぼ同値を示した結果は、PET 検査において脳で ^{18}F -FDG の高い集積率が確認されていることと一致している。

また、通常のラット肝細胞とくらべ、ラット肝癌細胞は HK-II 遺伝子の複製が 10 倍増加したと報告されており[48]、このことからクロマトグラフィ、ポリクローナル抗体、アミノ酸解析などにより様々な腫瘍の HK の発現量が測定されてきたが、HK のリン酸化活性と HK の発現量は必ずしも相関するものではなく、ミトコンドリアに結合する HK のリン酸化活性を測定するほうが細胞内への Glu 取り込み速度に対して相関性が強いと報告されている [1]。このため本実験で行ったように、HK のリン酸化反応より生成した G6P の AUC_{0-120} を直接観察してサンプルの蛋白質濃度あたりの活性を比較することは、各組織の ^3H -FDG 集積をよく反映すると考えられる。FDG の集積程度と腫瘍の増殖活性および分化度は関連があり FDG の集積が高い腫瘍は、増殖が活発で未分化の悪性腫瘍であると考えられている[21,26,37,]。このことから FDG 細胞内集積率を決定すると報告されている HK によるリン酸化活性を測定することにより悪性度を判定できると考えられる。

4. PET 検査および ^3H -FDG を用いた HK 活性測定法の腫瘍診断への応用について

PET 検査は一度で全身の腫瘍の検出と増殖活性を診断でき、予後の判定が可能であることや、放射線や抗癌剤など治療効果の判定に対しても有用な検査である。また、PET 検査で用いられている ^{18}F -FDG は半減期が 120 分と短く、投与後の患者への被曝を最小限に抑えられ、非侵襲的に行える利点もある。2005 年 9 月に ^{18}F -FDG が健康保険適用となり、各地の医療品メーカーのサイクロトロン施設から配達できるようになった。これを契機に PET 検査施設は急に増加し、2006 年で約 140 施設まで増えてきており、わが国でも汎用性が高い検査になりつつあるが、現在のわが国では PET 検査の専門医が少ない現状にあるため、これからは PET 検査を含む核医学教育がさらに必要と言われている。また、今後は腫瘍が伴侶動物の死因の大部分を占めるようになってきている獣医学領域においても PET 検査を含む核医学教育が必要となると推察される。

しかし、現在わが国では PET 検査が保険適応となる疾病は限られており、健康診断および治療効果判定の検査では保険適応とならないため費用が高くかかることもある。また、PET 検査において、各腫瘍、各臓器の撮影に有効な時間は異なるが、 ^{18}F -FDG の半減期は 120 分と短いため、撮影時間を遅くすると ^{18}F の減衰により画像の劣化が生じることなどの時間的制約を受けることが問題となる。

本実験で示した HK 測定法で使用した各種ホモジネート抽出液は、 -80°C 以下において保存することができる。このことから、侵襲的ではあるが一般の病院にて行われ比較的低コストである Biopsy 検査により、Biopsy 試料からホモジネート抽出液を作成し、 -80°C 以下に保存した状態で RI が利用可能な検査施設に輸送することができれば、時間的制約を受けずにサンプルの HK 活性から悪性度判定を行えることが期待される。また、Biopsy 試料からの病理学的な悪性度診断結果と合わせて判定することで、より真の悪性度判定に迫ることができ、その後の治療方針の決定に有用であると考えられる。

現在の PET 検査における腫瘍診断では、腫瘍の検出が難しい臓器や炎症との鑑別において診断が困難な場合があり、詳細については検査症例が不足で研究段階の面もある。また、 ^3H -FDG を用いた HK 活性測定法においても、AH109A 細胞のような悪性度が高いと推察される腫瘍ならば測定可能になると考えられるが、悪性度の低い腫瘍では HK 活性は低いと報告されており、診断が困難な場合が想定される。

このため、これらの検査は単独で行わず、日本核医学学会が報告している「FDG-PET を用いたがん検診のガイドライン」[10]に従い、問診および血液検査など各種一般検査を怠ることなく、X 線診断、超音波検査、コンピュータ断層撮影法 (CT)、そして磁気共鳴画像法 (MRI) 等、他の画像診断法と合わせて PET 検査を行うことや、内視鏡検査や Biopsy 検査などを用いることで、腫瘍の診断に関してより高度な情報を得ることが必要である。

5. 結論

^3H -FDG を用いて HPLC と LSC による測定から、細胞内の HK による ^3H -FDG のリン酸化反応が観察され

た。また、G6P 濃度曲線の AUC_{0-120} を算出することで、蛋白質濃度あたりの HK 活性が測定でき、異なる組織間における HK 活性の比較を行うことができた。

AH109A 細胞および赤血球を浮遊させて HK 活性を測定する方法は、Biopsy 試料での操作を考慮した際に、細胞数の調整は困難であり、細胞の活性状態により HK 活性が大きく変化する恐れがあるため臨床応用は難しいと考えられる。このことから、ホモジナイズし遠心分離後の上清中に含まれる HK 自体に $^3\text{H-FDG}$ を混和する方法のほうが、Biopsy 試料からのサンプルの調整が比較的簡便に行えると考えられる。

また、HK 活性は組織特異性があり、脳や AH109A 肝癌細胞で高く、肝臓および赤血球で低く測定され、肝臓が癌化することで HK 活性が亢進することが明らかとなった。本実験により HK 活性の組織特異性を示す基礎的なデータは得られたが、HPLC および LSC を用いた HK 活性測定法の腫瘍の悪性度判定への応用のためには、今後他の腫瘍を用いて腫瘍細胞およびその由来正常細胞、または異なる腫瘍間の HK 活性の差について比較・検討する必要がある。

臨床検査において、Biopsy 試料をホモジナイズし遠心分離後の上清から細胞内 HK 活性が HPLC および LSC を用いて簡便に測定可能となれば、Biopsy による簡便な腫瘍の悪性度の判定が可能となると考えられ、臨床応用に向けて更なる研究が必要である。

V. 要約

^{18}F -Fluorodeoxyglucose (FDG) はグルコーストランスポーター (GLUT) を介して細胞内に取り込まれ、ヘキソキナーゼ (HK) の修飾によって $^{18}\text{F-FDG-6-Phosphate}$ (FDG6P) の形で蓄積される。FDG はこの特性によりグルコース (Glu) 要求量の高い悪性腫瘍の高感度検出マーカーとして PET (positron emission tomography) 診断に利用されている。本研究では $^3\text{H-FDG}$ を用いて HK 活性の簡便な測定方法を確立し、Biopsy 検査試料から腫瘍の悪性度判定を行うことを目標として、ラット腹水肝癌 (AH109A) 細胞と正常な赤血球、肝臓、脳について *in vitro* で比較を行い、HK 活性の組織特異性の追及を試みた。

細胞浮遊液内へ $^3\text{H-FDG}$ を添加し反応後の培養液と細胞、または細胞のホモジネート抽出液に $^3\text{H-FDG}$ を添加し、経時的な $^3\text{H-FDG}$ および $^3\text{H-FDG6P}$ の変化を、糖分析カラムを用いた高速液体クロマトグラフィ (HPLC) と、液体シンチレーションカウンタ (LSC) により解析した。また、HPLC による $^3\text{H-FDG}$ および $^3\text{H-FDG6P}$ の回収率を LSC の測定結果から算出した。また、FDG および FDG6P の ^3H 濃度から混和した Glu およびグルコース-6-リン酸 (G6P) 濃度を求め、HK 活性の指標として 0 分から 120 分までの G6P 濃度下面積 (AUC_{0-120}) を算出した。

HPLC による $^3\text{H-FDG}$ と $^3\text{H-FDG6P}$ の分離、回収は良好で、 $^3\text{H-FDG6P}$ 濃度から AUC_{0-120} の算出が可能であった。AH109A 浮遊液の培養液 Glu 濃度は片対数グラフにおいて直線状の消失過程を示し、近似曲線から細胞内の G6P 生成速度定数は培養液 Glu 消失速度定数と同程度の値になった。このことから、GLUT および HK による $^3\text{H-FDG}$ の細胞内集積の一連の反応が一次速度論的に経過したために、培養液の Glu が同様の消失を示したと推察した。赤血球浮遊液において、反応時間に伴い $^3\text{H-FDG}$ 濃度の減少は認められたが、 $^3\text{H-FDG6P}$ 濃度の増加量と $^3\text{H-FDG}$ 濃度の減少量は等しくならず、HPLC による回収率は片対数グラフにおいて直線状の減少を示した。このことから、赤血球では $^3\text{H-FDG}$ および $^3\text{H-FDG6P}$ の以外の ^3H 標識物質が生成し、HPLC により回収されなかった可能性が考えられる。ホモジネート抽出液において、Lowry 法で定量した蛋白質濃度と AUC_{0-120} の良好な相関性関係を利用し、AH109A 細胞の回帰曲線を基に比較したところ、AH109A 細胞と脳はほぼ同値を示し、次いで赤血球、肝臓の順に活性が低かった。以上の方法を用いれば、 AUC_{0-120} を算出することで HK 活性の組織特異性を分析、比較することが可能と考えられた。

HK のリン酸化活性と HK の発現量は必ずしも相関するものでないと報告されており、本実験で行ったように、 AUC_{0-120} から蛋白質濃度あたりの HK 活性を比較することは、各組織の Glu 要求量をよく反映すると考えられ、悪性度を判定できると考えられる。本実験で示した HK 測定法は、低コストである Biopsy 検査からの試料を冷却保存した状態で RI 施設に輸送することができれば、時間的制約を受けずにサンプルの HK 活性から悪性

度判定を行え、病理診断結果とともに真の悪性度追求に期待される。本実験により HK 活性の組織特異性を示す基礎的なデータは得られたが、臨床応用のためには、今後腫瘍の HK 活性について更なる研究が必要である。

参考文献

1. Aloj L., Caraco C., Jagoda E., Eckelman W.C., 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 Res.* 15 ; 59 (18) : 4709-4714
2. Banning, U., Barthel, H., Mauz-Korholz, C., Kluge, R., Korholz, D., Sabri, O. 2006. Effect of drug-induced cytotoxicity on glucose uptake in Hodgkin's lymphoma cells. *Eur J Haematol.* 77 (2) : 102-8.
3. Brown, R.S., Leung, J.Y., Fisher, S.J., Frey, K.A., Ethier, S.P., Wahl, R.L. 1996. Intratumoral distribution of tritiated-FDG in breast carcinoma : correlation between Glut-1 expression and FDG uptake. *The Journal of Nuclear Medicine.* 37 (6) : 1042-1047.
4. Brown, R.S., Leung, J.Y., Fisher, S.J., Frey, K.A., Ethier, S.P., Wahl, R.L. 1995. Intratumoral Distribution of Tritiated Fluorodeoxyglucose in Breast Carcinoma: I. Are Inflammatory Cells Important?. *The Journal of Nuclear Medicine* 36 (10) : 1854-1861.
5. Buriova E., Medova M., Macasek F., Bruder P. 2004. Separation and detection of oxidation products of fluorodeoxyglucose and glucose by high-performance liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 23 ; 1034(1-2) : 133-7
6. Caracó, C., Aloj, L., Chen, L. Y., Chou, J. Y. and Eckelman, W. C. 2000. Cellular Release of [18F]2-Fluoro-2-deoxyglucose as a Function of the Glucose-6-phosphatase Enzyme System. *The Journal of Biological Chemistry.* 275 (24) : 18489-18494
7. Chi, M.M., Pusateri, M.E., Carter, J.G., Norris, B.J., McDougal, D.B., Lowry, O.H. 1987. Enzymatic assays for 2-deoxyglucose and 2-deoxyglucose 6-phosphate. *Anal Biochem.* 161 (2) : 508-13
8. Darnell, J. E. Lodish, H. F. 1990. Transport across Cell Membranes. pp.531-582. *Molecular Cell Biology* 2nd ed. SCIENTIFIC AMERICAN BOOKS
9. Deichen, J. T., 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 (2) : 267-73.
10. FDG-PET を用いたがん検診のガイドライン. 2004. 臨床 PET 推進会議編、日本核医学会
11. Fedders, G., Kock, R., Van, de, Leur, E. 1993. A radiochemical high-performance liquid chromatographic method for the analysis of 2-fluoro-2-deoxy-D-glucose-derived metabolites in human chondrocytes. *Eur. Analytical Biochemistry.* 211:81-86
12. Fernandez-Novell, J.M., Ballester, J., Medrano, A., Otaegui, P.J., Rigau, T., Guinovart, J.J., Rodriguez-Gil, J.E. 2004. The presence of a high-Km hexokinase activity in dog, but not in boar, sperm. *FEBS Lett.* 570(1-3):211-216
13. 堀越弘毅. 1992. 酵素-化学と工学- 講談社、東京
14. 堀尾武一. 1995. 蛋白質・酵素の基礎実験法. 南江堂、東京
15. 福田寛. 吉岡清郎. 井戸達雄. 1983. 18FDG による腫瘍診断の基礎的研究 癌と炎症の鑑別診断. *核医学* 20 : (8) 1189-1192.
16. Ikezaki K., Black K.L., Conklin S.G., Becker D.P. 1992. Histochemical evaluation of energy metabolism in rat glioma. *Neurol Res.* 14 (4) : 289-93
17. 板倉智敏・後藤直彰. 1994. 腫瘍. 動物病理学総論 pp.165-225. 文永堂出版、東京
18. 獣医生理学・生理化学教育懇談会. 2002. N. タンパク質の定性,定量. チクサン出版社、東京

19. Kabir, F., Nelson, B.D. 1989. Synthesis and targeting of hexokinase to mitochondria in hepatoma cells. *Archives Biochemistry Biophysics*. 274(1) : 94-99
20. Kanazama, Y., Yamane, H., Shinohara, S., Kuribayashi, S., Momozono, Y., Yamato, Y., et al. 1996. 2-deoxy-2-fluoro-D-glucose as a functional probe for NMR : the unique metabolism beyond its 6-phosphate. *J Neurochem*. 66:2113-2120
21. 窪田和雄. 2003. FDG-PET の原理と評価法. *Japanese Journal of Diagnostic Imaging*. 23(10)1118-1128
22. 窪田和雄. 2002. 広がる PET の臨床応用 : 悪性腫瘍, 良性と悪性との鑑別に威力 ; CT・MRI 上回る診断精度. *Nikkei Medical* 12 : 133-135
23. 久留勝・三浦義彰 1965. 7. 癌細胞のエネルギー代謝. Pp309 腫瘍生化学. 朝倉書店、東京
24. Lehninger, A. L. Nelson, D.L. Cox, M.M. 溶質の膜輸送 pp.353-356 レーニンジャーの生化学 (上) 第 2 版 廣川書店
25. Lubert, Stryer. 2000. ストライヤー生化学 第 4 版. 東京化学同人、東京
26. Mamede M, Higashi T, Kitaichi M, Ishizu K, Ishimori T, Nakamoto Y, Yanagihara K, Li M, Tanaka F, Wada H, Manabe T, Saga T. 2005. [18F]FDG uptake and PCNA, Glut-1, and Hexokinase-II expressions in cancers and inflammatory lesions of the lung. *Neoplasia* 7 (4) : 369-79.
27. 丸山美理. 2005. ¹⁸F-FDG のラット腹水肝癌 AH109A および赤血球への取り込みに対するデキサメサゾン投与の影響. 北里大学学士論文
28. 箕迫義人・根本昌宏・猪野宣人・白神宜史・倉見美規. 2003. 糖代謝型腫瘍イメージング剤 ¹⁸F-FDG {2-フルオロ-2-デオキシ-D-グルコース(¹⁸F)} の細胞内取り込みに関する研究. *核医学*. 40:23-30
29. 水上茂樹. 1985. 赤血球の生化学. 東京大学出版会、東京
30. 村上康二. 2006. PET 診断. *肝臓* 47(4):203-208
31. 中村隆雄. 1993. 酵素キネティクス. 学会出版センター、東京
32. 中村敏一. 1987. 初代培養肝細胞実験法. 学会出版センター、東京
33. akashima, R.A., Paggi, M.G., Scott, L.T., Pederson, P.L. 1998. Purification and characterization of a bindable form mitochondrial bound hexokinase from the highly glycolytic AS-30D rat hepatoma cell line. *Cancer Research* 15 (48) : 913-919
34. 西村恒彦. 2003. 最新脳 SPECT/PET の臨床. メディカルビュー、東京
35. 緒方宏泰. 2000. 臨床薬物動態学 丸善株式会社、東京
36. 大西正健. 1988. 酵素反応速度論実験入門. 学会出版センター、東京
37. 太田邦夫・山本正・杉村隆・菅野晴夫. 1981. D. 癌の転移と浸潤 pp.73-92. 癌の科学 第 1 巻 癌の生物学. 南江堂、東京
38. Phelps ME, et al. 1986. Positron emission tomography and autoradiography. In: Principles and Applications for the Brain and Heart. Raven Press, New York
39. Pouremad, R., Wyrwicz, A.M. 1991. Cerebral metabolism of fluorodeoxyglucose measured with ¹⁹F NMR spectroscopy. *NMR in Biomed* 4:161-166
40. Salas, M., Vinuela, E., Sols, A. 1963. Insulin-dependent Synthesis of liver Glucokinase in the Rat. *Am. J. Biological Chemistry* 238(11):3535-3538
41. Sanchez-Alvarez, R., Taberner, A., Medina, J.M. 2005. The increase in gap junctional communication decreases the rate of glucose uptake in C6 glioma cells by releasing hexokinase from mitochondria. *Brain Res*. 1039(1-2):189-198
42. 佐々木雅之. 2001. 腫瘍 FDG-PET の臨床. *日本医放会誌*. 61 (8) : 14-20.
43. 佐藤春郎・井坂英彦・黒木登志夫. 1982. C. 移植率と宿主の寿命—腫瘍細胞の増殖速度. pp.81-92. がん細胞. 中外医学社、東京
44. 佐藤博. 1969. b. ラットの腹水腫瘍. pp.485-499. 実験腫瘍学. 朝倉書店、東京

45. Sener, A., Leclercq-Meyer, V., Marchand, J., Giroix, M.H., Dufrane, S.P., Malaisse, W.J. 1985. Anomeric specificity of hexokinase and glucokinase activities in liver and insulin-producing cells. *Biochem J.* 230 (2) : 345-351
46. Smith T.A. 2000. Mammalian hexokinases and their abnormal expression in cancer. *Br J Biomed Sci* 57 (2) : 170-8
47. Smith, T. A. 2000. Mammalian Hexokinases and their abnormal expression in cancer. *British Journal of Biomedical Science* 57 (2) : 170-178.
48. Songji Zhao, Yuji Kuge, Takafumi Mochizuki, Toshiyuki Takahashi. 2005. Biologic Correlates of Intratumoral Heterogeneity in ¹⁸F-FDG Distribution with Regional Expression of Glucose Transporters and Hexokinase-II in Experimental Tumor. *The Journal of Nuclear Medicine* 46 ; 4 : 675-8
49. Storer, A., Cornish-Bowden, A. 1976. Kinetics of rat liver glucokinase:Co-operative interactions with glucose at physiologically significant concentrations. *Biochem J.* 159:7-14
50. Suolinna, E.M., Haaparanta, M., Paul, R., Harkonen, P., Solin, O., Sipila, H. 1986. Metabolism of 2-[¹⁸F]fluoro-2-deoxyglucose in tumor-bearing rats: chromatographic and enzymatic studies. *Int J. Radiat. Appl. Instrum. part B.* 13(5):577-581.
51. 館野之男. 1983. ポジトロンCT. 医学書院、東京
52. 上田太一郎・荻田正雄・本田和恵. 2003. 実践ワークショップ Excel 徹底活用多変量解析—具体的な事例から多変量解析を理解する. 秀和システム、東京
53. Vinuela, E., Salas, M., Sols, A. 1963. Glucokinase and Hexokinase in liver in relation to Glycogen Synthesis. *Am. J. Biological Chemistry* 238(3):1175-1177.
54. Washizu, T., Azakami, D., Bonkobara, M., Washizu, M., Arai, T. 2005. Changes in activities of enzymes related to energy metabolism in canine lymphoma cells. *J. Vet. Med. Sci.* 67(6):615-616.
55. Whitesell, R.R., Ardehali, H., Beechem, J.M., Powers, A.C., Van, der, Meer, W, Perriott, L.M., Granner, D.K. 2005. Compartmentalization of transport and phosphorylation of glucose in a hepatoma cell line. *Biochemistry J.* 386(2):245-253
56. 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. 中外医学社、東京
57. 吉川春寿, 中尾喜久. 1963. 赤血球の生化学-基礎と臨床- 朝倉書店、東京
58. Younes, M., Lechago, L.V., Somoano, J.R., Mosharaf, M., Lechago, J. 1996. Wide expression of the human erythrocyte glucose transporter Glut1 in human cancers. *Cancer Research* 56 (1) : 1164-1167.
59. Zhao, S., Kuge, Y., Tsukamoto, E., Mochizuki, T., Kato, T., Hikosaka, K., Nakada, K., Hosokawa, M., Kohanawa, M., Tamaki, N. 2002. Fluorodeoxyglucose uptake and glucose transporter expression in experimental inflammatory lesions and malignant tumors: effects of insulin and glucose loading. *Nuclear Medicine Communications* 23 (6) : 545-550.

Determination of intracellular hexokinase activity of rat ascites hepatoma AH109A, rat brain, liver and erythrocyte by using HPLC

Masahiro Natsuhori¹⁾, Kengo Yamamoto¹⁾, Miri Maruyama¹⁾, Kazunori Terasaki²⁾,
Satoru Hatakeyama³⁾, Shoji Futatsukawa⁴⁾, Keiichiro Yamaguchi⁵⁾,
Tadashi Sano¹⁾ and Nobuhiko Ito¹⁾

¹⁾ Kitasato University, School of Veterinary Medicine and Animal Sciences
Higashi 23-35-1, Towada, Aomori 034-8628, Japan

²⁾ Cyclotron Research Center, Iwate Medical University
Tomegamori 348-58, Takizawa, Iwate 020-0173, Japan

³⁾ Nishina Memorial Cyclotron Center, Japan Radioisotope Association
Tomegamori 348-58, Takizawa, Iwate 020-0173, Japan

⁴⁾ Radioisotope section, Japan Radioisotope Association
2-28-45, Honkomagome, Bunkyo, Tokyo 113-8941, Japan

⁵⁾ Sendai Kousei Hospital
4-15 Hirosecho, Aoba-ku, Sendai Miyagi 980-0873, Japan

Abstract

Intracellular hexokinase activities of tumor (rat ascites hepatoma AH109A), rat brain, liver and erythrocytes were determined *in vitro* by simultaneous measurement of both ³H-FDG and ³H-FDG6P using reversed phase HPLC with an analytical column of Asahipak NH2P-50 4E. Fractions eluted from HPLC were collected and their ³H activities were determined by liquid scintillation counting. The fractions clearly separated both ³H-FDG and ³H-FDG6P and this enabled to measure the time course of ³H-FDG6P production from ³H-FDG in the homogenized samples. The intracellular hexokinase activities (the ability to produce FDG6P from FDG per amount of protein) were the highest in AH109A of both from ascites and nodules, and in brain. The liver and the erythrocytes were however, the lower activities. Since this procedure allowed determining the hexokinase activity from tissue including ascites and blood, it may be useful for the laboratory screening for the hexokinase activity, especially for biopsy samples to rule in/out its malignancy.