

HeLa S 3 細胞に対する FDG と ⁶⁷Ga citrate 集積の細胞周期依存性

守口 齊, 小豆島 正典

岩手医科大学歯学部歯科放射線学講座

(主任: 坂巻 公男 教授)

(受付: 2002年10月29日)

(受理: 2002年11月28日)

Abstract : Positron emission tomography using fluorine-18 fluoro-deoxyglucose (FDG PET) is useful for the detection of malignant tumor recurrences and for the evaluation of a therapeutic response to these; including ones found in the lung, colon, head and neck regions. The experimental study demonstrated FDG uptake was higher in faster-growing rather than in slower-growing tumors. These findings show FDG accumulation exhibits cell cycle dependency. However, the precise mechanism remains to be elucidated. In this study, the relationship between FDG uptake and the cell cycle phase in HeLa S 3 cells, as well as how they compare to the conventional tracer ⁶⁷Ga citrate (Ga) with single photon emission tomography (SPECT) was assessed.

Synchronization of HeLa S 3 cells was accomplished via a double thymidine block. The uptake of FDG and Ga was determined after cell cycle synchronization. The glucose transporter was independently evaluated for the level of its Glut 1 glucose transporter membrane protein.

FDG uptake in HeLa S 3 cells was significantly higher in the early S phase and G₂/M phase compared to the G₁ phase. In addition, Ga uptake was higher in the G₂/M phase. Immunochemical assays for the Glut 1 transporter showed an increase in membrane expression within S phase cells.

It has been concluded that cell cycle dependency is reflected in the uptake of FDG and Ga, seen during PET or SPECT imaging of tumor tissue. These results reveal tumor proliferative activity, and can assist in evaluating a therapeutic response. Furthermore, the increased FDG uptake, in part due to increased membrane expression of the Glut 1 glucose transporter, contributes to this phenomenon.

Key words : FDG uptake, Ga uptake, cell cycle, Glut 1

緒 言

口腔癌を始め悪性腫瘍患者に対する放射線療法や化学療法の治療効果の判定は、主として computed tomography (CT) や magnetic

resonance imaging (MRI), ultrasonography (US) によって画像化される形態的变化に基づいて行われてきた^{1,2)}。しかし治療後の腫瘍組織には、線維組織や壊死組織、障害を受けた癌細胞などが含まれ、残存する組織が常に増殖可能

Cell cycle dependency of FDG and ⁶⁷Ga citrate uptake in HeLa S 3 cells
Hitoshi MORIGUCHI, Masanori SHOZUSHIMA
Department of Dental Radiology, School of Dentistry,
Iwate Medical University
1-3-27 Chuo-dori, Morioka, Iwate 020-8505, Japan

な癌細胞集団とは限らないという治療上の問題があった³⁾。それに対し、核医学診断は、生体の生理的・生化学的情報を画像化する機能的診断法である。この診断法では、従来より腫瘍親和性薬剤として ^{67}Ga citrate (Ga) が用いられ、single photon emission tomography (SPECT) を用いることにより腫瘍の断層画像診断が行われてきた。しかし Ga-SPECT は病巣/健常部のコントラスト比が良好であるものの、CT/MRI に比べ空間分解能が劣り、複雑な解剖構造を持つ頭頸部領域の診断には限界があった。

最近、新しい核医学診断法として positron emission tomography (PET) が開発され、腫瘍診断に臨床応用されてきた⁴⁾。この目的で広く使用される放射性薬剤は、 ^{18}F -2-deoxy-2-fluoro-D-glucose (FDG) と呼ばれるグルコース類似薬である。腫瘍細胞では、グルコース代謝が亢進しており⁵⁾、グルコース類似薬である FDG は腫瘍細胞内に取り込まれる^{6,7)}。FDG-PET は、このような腫瘍細胞のグルコース代謝亢進を画像化したものであり、SPECT よりも空間分解能が著しく高い^{8,9)}。また肺癌^{10,11)}や大腸癌¹²⁾、頭頸部癌¹³⁾などの治療後の腫瘍残存や腫瘍再発の診断では、CT/MRI より正診率が高くその有用性が報告されている。

しかしながら実際に頭頸部領域で FDG-PET を行うと、腫瘍組織型が同一で、同様の進展度を持つ病巣にもかかわらず、FDG 集積が大きく異なったり、正常と思われる部位にも集積することがある¹⁴⁾。Minn ら¹⁵⁾は、頭頸部の扁平上皮癌で成長の早い腫瘍には遅い腫瘍よりも多くの FDG が取り込まれることを報告し、FDG 集積が細胞周期依存性であることを示唆している。しかし、FDG 集積と癌細胞の細胞周期の関連性については依然として不明な点が数多く残されている。

本研究では、FDG-PET あるいは Ga-SPECT を正しく読影するために必要な腫瘍細胞の生物学的特性を明らかにすることを目的として、ヒト培養癌細胞の HeLa を用い、細胞周期を連続

的に変化させ FDG 集積との関係を詳細に調べるとともに、従来から使用されてきた Ga と比較検討した。

材料と方法

1. 培養細胞と細胞同調法

本研究では、培養癌細胞としてヒト子宮頸癌由来の HeLa S 3 (RCB0191, 理化学研究所, つくば) を用いた。培養液は10% fetal bovine serum (FBS), (GIBCO, N.Y., USA) を添加した Eagle's minimal essential medium (MEM), (日水製薬, 東京) を用い、5% CO_2 ・37°C の条件下で培養を行った。培養には組織培養フラスコ容量50ml, 培養面積25 cm^2 (ナルジェンクインターナショナル, 東京) を用いた。培養細胞数は細胞同調が完了した時点で $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$ 個になるよう調整した。細胞同調法は、Knehr ら¹⁶⁾ の方法に準じて高濃度 thymidine (TdR), (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA) によるダブルブロッキング法を用いて行った。すなわち、2 mM TdR を加えた培地で24時間培養後、TdR-free 培地で11時間培養、さらに 2 mM TdR を含む培地で14時間培養し TdR-free 培地に交換して細胞同調を行った。同調処理が終了した直後を 0 時間とし、2, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14 時間経過後にそれぞれの培養フラスコを4°C に急冷保存した。

2. FDG と Ga の投与

FDG は、仁科記念サイクロトロンセンターで合成し、各ステージに同調した細胞を含む培養フラスコに対し、培地 1 ml あたり 370 kBq (10 μCi) を投与した。また、Ga (^{67}Ga citrate, 第一ラジオアイソトープ研究所, 東京) を用い、培地 1 ml あたり 74 kBq (2 μCi) 投与した。細胞は RI 存在下で 37°C 30 分間の培養を行った後、trypsin で細胞を浮遊させ、5% FCS, 0.1% グルコース添加 phosphate buffered saline (PBS) で 3 回洗浄した。細胞内に取り込まれた FDG あるいは Ga の放射能は、ガンマーカウンター (Auto Well Gamma System ARC-2000,

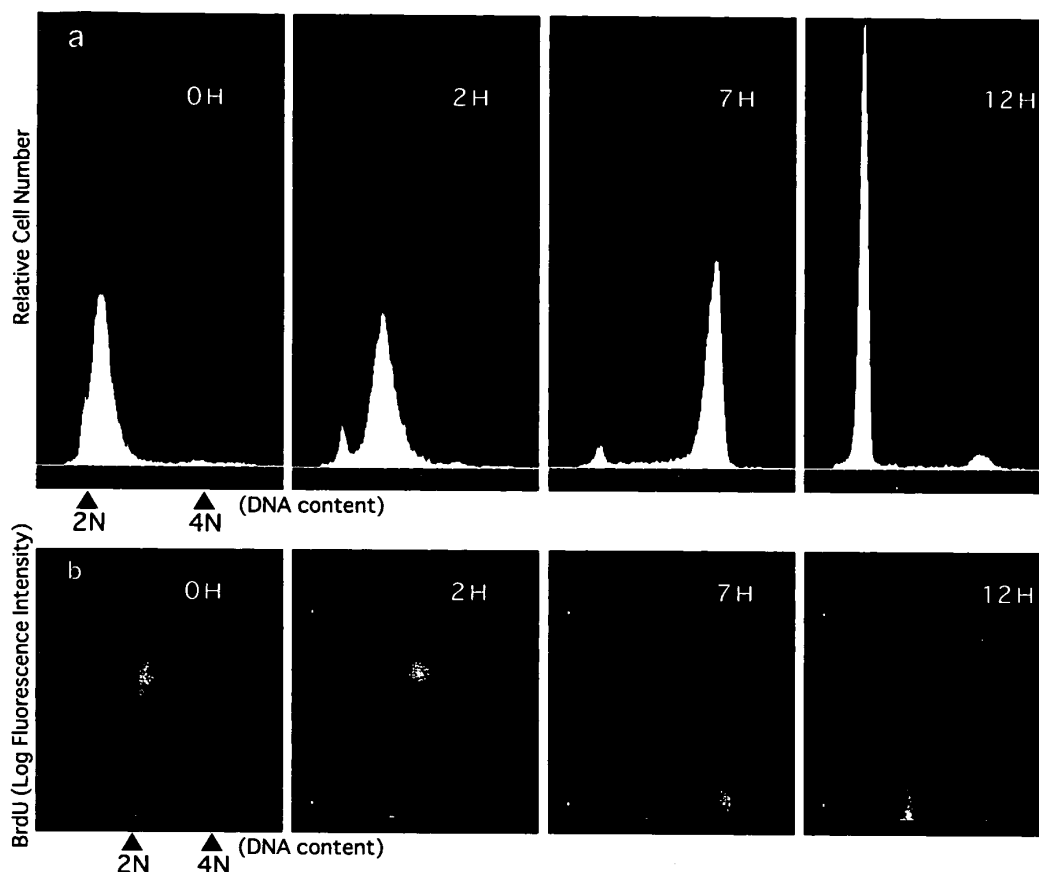


Fig. 1. Flow cytometric analysis of synchronized HeLa S3 cells. a : The histogram showed the DNA content dyed with PI. b : Dot plots showed anti BrdU-FITC (ordinates) and PI (abscissae).

アロカ, 東京) を使用して計測した。その後血球計測板で細胞数を測定し, 単位細胞数あたりに集積した RI 量を求めた。

2. フローサイトメトリーによる DNA 量の測定とグルコース輸送蛋白の分析

細胞同調の確認および相対的 DNA 量および DNA 合成能は, フローサイトメーター (FCM), (FACSCalibur, BD, San Jose, USA) を用いて測定した。すなわち, 2% Triton X-100 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA) に細胞を浮遊させ裸核した後, RNase (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA) (最終濃度 0.5%) を添加し, propidium iodide (PI), (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA) (最終濃度 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) で DNA を染色した。細胞数を 1×10^6 個に調整し, 細胞核 DNA 量を FCM で測定した。また TdR 類似体の bromodeoxyuridine (BrdU), (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA) を用いて, DNA 合成能を調べた。培養フラス

コには BrdU (最終濃度 10 μM) を投与し, 37°C で 30 分細胞培養した。細胞を trypsin で浮遊させた後 70% 冷エタノールにて 1 時間固定した。PBS にて洗浄後, 4 N 塩酸にて 20 分間処理し二重鎖 DNA の単鎖化を行った。ホウ酸-ホウ砂緩衝液で塩酸を中和化し PBS で洗浄, 細胞数を 1×10^6 個に調整し anti BrdU-FITC (藤沢薬品工業, 東京) を加えた。さらに PI (最終濃度 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を用いて細胞核 DNA を染色し, FCM で測定した。また, 細胞膜表面に存在するグルコース輸送蛋白 glucose transporter 1 (Glut 1) と細胞周期との関係を知るため, Glut 1 の蛍光色抗体 anti Glut 1-FITC (Chemicon International, Temacula, USA) を用いた。培養細胞は trypsin で浮遊させ, 2% FCS・PBS で洗浄した後, 10% ホルマリンで 15 分間固定した。2% FCS・PBS で洗浄後, anti Glut 1-FITC を 4°C で 40 分間作用させ, FCM にて Glut 1 の結合を解析した。

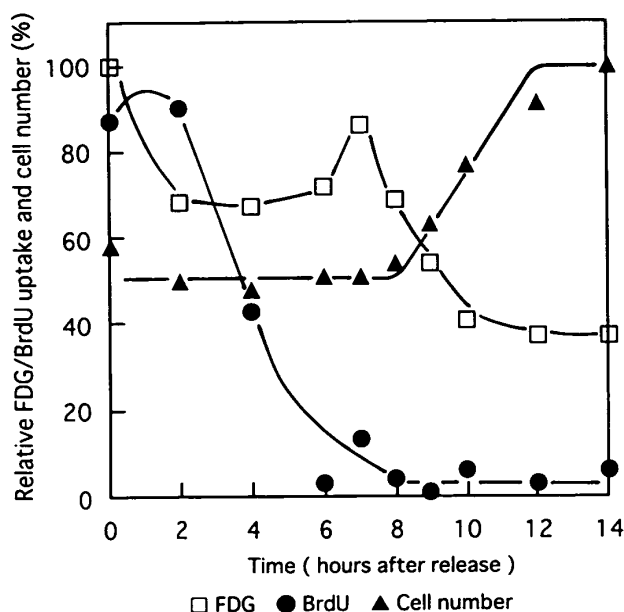


Fig. 2. FDG and BrdU uptake, cell number of the synchronized by double thymidine block. Each point indicates the average RI uptake or cell number of 3 experiments.

結 果

1. 細胞周期と FCM

細胞核 DNA 量と S 期に取り込まれる BrdU 量を FCM によって分析し、本実験で用いた TdR ダブルブロッキング法による細胞同調が、正しく行われているか否かを確認するとともに、同調処理終了後からの経過時間と細胞周期との関係を調べた (Fig. 1)。Fig. 1 a は PI による DNA 染色の FCM で、横軸は DNA 量、縦軸は細胞数を示す。同調処理終了直後の 0 時間には、ヒストグラムのピークは 2N よりわずかに右に移動しており S 期前期に同調されていた。その後 2 時間、7 時間と経過するに従いそのピークは G_2/M 期である 4N に移動、さらに 12 時間経過後には、 G_1 期である 2N に移動することがわかった。anti BrdU-FITC と PI による BrdU/DNA 二重染色の FCM (Fig. 1 b) によると、0 と 2 時間では BrdU 陽性 (BrdU 陽性細胞率はそれぞれ 73% および 90%) で、7 と 12 時間では BrdU 陰性細胞が優勢 (BrdU 陽性細胞率はそれぞれ 9% および 5%) であった。

2. FDG 集積と細胞周期

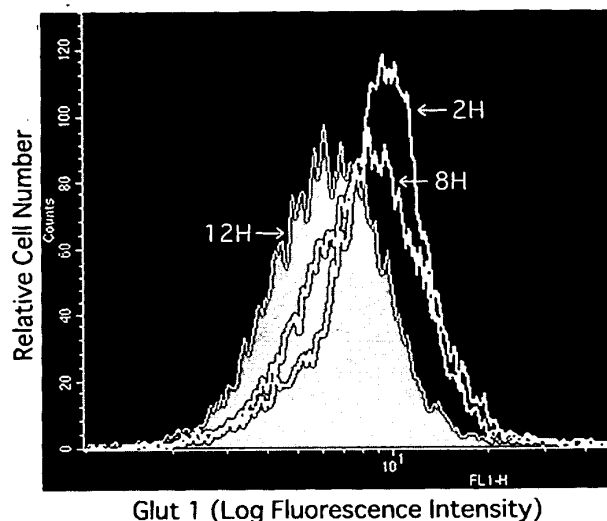


Fig. 3. The expression of Glut 1 on cell surface shown the activation in 2 hours after thymidine release and decrease after 12 hours.

Fig. 2 に、各細胞周期に対する FDG 集積および BrdU 集積、細胞数の変化を示す。横軸には同調処理が終了してからの経過時間、縦軸には単位細胞数あたりの FDG と BrdU 集積量および細胞数をプロットし、最大値を 100% とした相対値として表わした。FDG 集積は、同調処理終了直後と 7 時間後でピークに達した。その後、次第に減少し、10 時間後以降では同調処理終了直後の約 40% まで減少した。DNA 合成の指標である BrdU 集積のピークは 2 時間後であり、その後急峻に低下し 8 時間後以降の集積は数% となった。このことから、細胞集団は同調処理直後にはすでに S 期に入っており、2 時間後にピークに達し約 6 時間後には S 期から G_2 期へ移行することがわかった。また 7 時間後の FDG 集積の 2 番目のピークは、BrdU 集積および Fig. 1 の FCM 所見より G_2/M 期と思われた。細胞数は同調処理が終了してから一定であったが、9 時間経過後から上昇に転じ、12 時間後には細胞数が 2 倍になった。このことから、多くの細胞は 9 時間経過後から分裂を開始し、12 時間後には分裂が完了して G_1 期に入ったことがわかる。

3. グルコース輸送蛋白と細胞周期

FDG は、細胞膜にある Glut を介し細胞内に

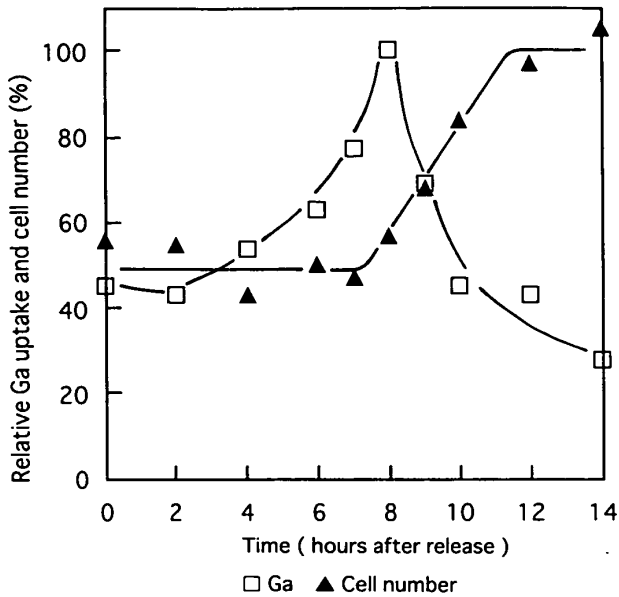


Fig. 4. Ga uptake and cell numbers after synchronization of HeLa S3 cells. Each point indicates the average RI uptake or cell number of 3 experiments.

輸送される。Fig. 2に示す通り、FDGはS期からG₂/M期にかけ高い集積を示すが、G₁期では低下することがわかった。そこで、Glutの発現がG₁期で低下するか否かを調べた。Glutファミリーにはいくつかのサブタイプがあるが、本研究では、多くの腫瘍細胞が保有すると報告されているGlut 1¹⁷⁻¹⁹について調べた。Fig. 3にFCMによるGlut 1のヒストグラムを示す。横軸には細胞膜表面のGlut結合部位に対するanti Glut 1-FITC量、縦軸には、細胞数をプロットした。同調処理が終了して2時間経過後であるS期ヒストグラムおよび8時間後のG₂/M期、12時間経過後のG₁期ヒストグラムとを比較したところ、G₁期ヒストグラムは全体的に左側に移動し、Glut 1の結合部位はG₁期で低下することが示された。また、G₂/M期のヒストグラムはS期とG₁期の間であった。

4. Ga集積と細胞周期

Fig. 4にGa集積と各細胞周期との関係を示す。Fig. 2と同様、横軸には同調処理が終了してからの経過時間、縦軸にはGa集積量と細胞数を最大100%とした相対値でプロットした。Ga集積は2時間後から上昇に転じ、8時間後には最大に達した。その後急峻に減少に転じ、10時

間後にはピーク時の約40%まで低下した。Fig. 4の細胞数変化とFig. 1のFCMから、Ga集積のピークはG₂/M期であり、S期とG₁期ではGa集積が低下することがわかった。

考 察

ヒト正常細胞では、その多くが静止期(G₀期)にあって増殖を停止している。増殖刺激が加えられると細胞は増殖を開始しG₀期からG₁期(第1間期)、S期(DNA合成期)、G₂期(第2間期)、M期(分裂期)と進みG₁期に戻る。本研究に用いたHeLa S3細胞の細胞周期は広く知られており、S期は9時間、G₂期とM期を合わせたG₂/M期は3時間とされている²⁰。細胞同調法には、TdRによるS期同調法やhydroxyureaによるG₁期同調法²¹⁻²³、細胞付着性がM期で低下することを利用した培養フラスコ振盪法²⁴が知られている。本研究では、均一な同調細胞を大量に得る必要性から、Knehrら¹⁶によるTdRダブルブロッキング法を採用した。1回目のTdRブロッキング終了時から2回目のTdRブロッキング開始までの時間は、均一な同調細胞を得る上で非常に大切であり、本研究では、実際にFCMを観察することによりこの時間を決定した。その結果、Fig. 1に示すように多少G₁期細胞が残るものの、良好な同調細胞が得られた。

Minnら²⁵は頭頸部癌のFDG-PETにおいて、FDG集積が組織学的悪性度に依存せず、腫瘍の分裂能に依存しており、S期からG₂/M期に至る増殖細胞分画の割合が多い組織ではFDGの強い集積として描出されることを報告している。これらの所見はG₀期あるいはG₁期にある細胞には、FDGが集積しにくいことを示すものである。彼らの研究では、どのステージでFDG集積が増大するのか詳細に分析していなかったが、本研究では、培養細胞をG₁期からM期まで連続的に細胞を同調させFDG集積との関係を調べた。その結果、FDGは、S期前半とG₂/M期によく集積するが、G₁期では急激に集積低下がおこることがわかり、Minnら

の成績を *in vitro* で証明する結果となった。腫瘍の増殖速度と FDG 集積に関し、いくつかの報告²⁶⁻²⁸⁾がある。それらによると、FDG 集積は、増殖速度が低い腫瘍より高い腫瘍で高値を示し、腫瘍悪性度の良い指標になるということが示されている。今回の成績から、これは腫瘍組織中の S 期前半と G₂/M 期にある細胞の割合が反映したものと推測される。FDG は、腫瘍細胞ばかりでなく増殖が頻回に行われる細胞にも集積する。Sugawara ら²⁹⁾は、癌の化学療法や放射線治療によって生ずる好中球減少に対し、G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor) を投与すると、骨髄の好中球前駆細胞が活性化し、同部の FDG 集積が増大することを示している。またマウスのリンパ球は、レクチン刺激で活性化させられると DNA 合成の指標である ³H-TdR の取り込みのほか、FDG 取り込みも急激に増大することが報告されている³⁰⁾。これらの成績は、FDG が悪性腫瘍細胞のみならず、正常細胞であっても増殖過程にある細胞には取り込まれやすいことを示唆し、このことが一部我々の成績に反映されている可能性がある。本研究で、FDG 集積は S 期前半にピークがあったが、その後次第に低下し再び G₂/M 期で上昇に転じた。細胞周期を駆動させている物質としてサイクリンと称される周期性蛋白が知られている。サイクリン E の量は、S 期前半で最大となり S 期の後期には急速に消失する。またサイクリン B1 は、G₂ 期に急速に増加し、M 期には最大となるが、M 期後期には急速に消失することが知られている³¹⁾。FDG 集積の time course は、サイクリン E と B1 の time course に類似しており、これらサイクリンとの関連性が推測されるが、その詳細についてはさらに研究が必要である。

FDG は、細胞膜にある Glut を介し細胞内に入り、Hexokinase と ATP によってリン酸化され FDG-6-phosphate となる。FDG-6-phosphate は、その後解糖系として代謝されず、細胞内にトラップされる。ヒト癌細胞では、FDG 集積と Glut の発現に強い相関があるが、

Hexokinase 発現には関連性がないことが報告されている^{32,33)}。本研究では、細胞周期と Glut 1 発現との関係について実験したところ、Glut 1 は FDG が最大に取り込まれる S 期前半で発現が多く、FDG 集積が最小となる G₁ 期で発現が低下することがわかった。グルコースの急速な需要亢進は、細胞膜にもともと存在していた Glut の translocation を誘導すると言われて³⁴⁾いる。Translocation した Glut は、膜表面に exofacial loop と称されるグルコース結合部位を出現させ、グルコースの細胞内取り込みが行われる。本研究で用いた anti Glut 1-FITC は、この exofacial loop に結合する蛍光抗体であり、Glut 1 mRNA を測定するよりも、より生理的な Glut 1 活性を測定していると思われる。現在グルコース輸送蛋白ファミリーとして Glut 1 から Glut 12 までのサブタイプ 12 種が同定されているが³⁵⁾、Glut 1 以外のサブタイプ、すなわち Glut 2 から Glut 12 について、細胞周期との関連性は不明である。

Ga は古くから腫瘍親和性薬剤として用いられてきた。Ga-SPECT は PET と比較し空間分解能と感度という点で劣るが、多くの施設で簡便に行うことが可能で、腫瘍の治療効果判定や、再発巣の検出および悪性度の推定に用いられてきた^{36,37)}。Ga 集積と FDG 集積の特性を知ることが、SPECT と PET を検査目的によって使い分ける際、極めて重要であろう。Ga は、FDG と同様に増殖の盛んな腫瘍細胞や、未分化な腫瘍細胞に多く集積するとされている³⁸⁾。その際 Ga は、癌細胞の transferrin receptor に結合し細胞内に取り込まれる³⁹⁾。また、Van Leeuwen-Stok ら⁴⁰⁾は、リンパ腫細胞株 (U-937, U-715) を同調させ、Ga 集積と transferrin receptor の発現との関係を調べた。その結果、両者は細胞周期に依存し S 期と G₂/M 期で増大するが、特に G₂/M 期で最大となることを示している。今回の研究では、Ga 集積は G₂/M 期で最大となり、S 期は G₁ 期と同程度に低かった。我々の成績は、Van Leeuwen-Stok らの成績と多少異なっていた

が、 G_2/M 期で集積が最大となる点で一致している。Ga の化学的性質は Fe イオンと類似しており、Ga の集積は、細胞内の Fe 需要の増大により引き起こされている。Fe 需要に関し Chitambar ら⁴¹⁾は、Fe 需要が亢進するのは、細胞の DNA 合成によるものであることを報告している。しかしながらこれだけでは、 G_2/M 期での Ga 集積のメカニズムを説明できない。Fe 需要の time course に遅れがあるのか、あるいは DNA 合成以外に別の Fe 需要メカニズムがあるのか、今後研究する必要がある。

ヒト固形悪性腫瘍では、すべての細胞が増殖細胞分画にあるのではなく、約33%の細胞だけが、増殖細胞分画にあるとされている³⁾。増殖細胞分画は、DNA 合成期に細胞に取り込まれる ³H-TdR で推測できるが、すでに TdR 類似薬の BrdU を ⁷⁶Br で標識した PET 用放射性薬剤が合成され melanoma の診断に臨床応用されている⁴²⁾。しかし本研究で FDG と BrdU の集積を比較すると BrdU の方が細胞周期依存性が強く、S 期での取り込みは G_1 期、 G_2/M 期の10倍以上高かった。このことから、⁷⁶Br BrdU と PET を組み合わせて得られた画像では、FDG のそれと比較し、細胞周期依存性の強い像が描出されていることが予想される。FDG-PET で得られる画像には、FDG の細胞周期依存性が反映されているほかに、腫瘍組織中の腫瘍実質/間質比も反映されていると推測される。両者のうち、どちらの影響が大きいかわかり不明であり、今後の検討課題であろう。今後さらに新しい腫瘍トレーサーの開発が予想されるが、PET の画像診断には、腫瘍細胞に対する集積特性の十分なる理解が必要と思われる。

結 論

腫瘍細胞に対する FDG と Ga 集積の細胞周期依存性を検討し、以下の結論を得た。

1. FDG は、S 期前期と G_2/M 期で最大に取り込まれ、 G_1 期で低下した。
2. 膜表面の Glut 1 は、FDG が最大に取り込

まれる S 期前半で発現量が増加することから、FDG は、いくつかのサブファミリーのうち少なくとも Glut 1 を介して細胞内に入ることが推測された。

3. Ga は、 G_2/M 期で最大に取り込まれ、 G_1 期と S 期では低下した。

以上より、FDG-PET と Ga-SPECT で得られる画像には、癌細胞に対する FDG あるいは Ga 集積の細胞周期依存性が反映されていると推測された。

謝辞：稿を終えるにあたり、終始ご懇篤なる指導と校閲を賜りました坂巻公男教授に深甚なる謝辞を表します。ならびに、日頃からご助言とご協力をいただきました歯科放射線学講座各位に厚くお礼申し上げます。本研究の一部は、岩手医科大学ハイテクリサーチセンター研究費およびオープンリサーチセンター研究費の補助を受けて行われた。

文 献

- 1) Van den Brekel, M. W., Castelijns, J. A., Croll, G. A., Stel, H. V., Valk, J., Van der Waal, I., Golding, R. P., Meyer, C. J. and Snow, G. B. : Magnetic resonance imaging vs palpation of cervical lymph node metastasis. *Arch. Otolaryngol. Head. Neck. Surg.* 117 : 663-673, 1991.
- 2) Van den Brekel, M. W., Stel, H. V., Castelijns, J. A., Nauta, J. J., van der Waal, I., Valk, J., Meyer, C. J. and Snow, G. B. : Cervical lymph node metastasis : assessment of radiologic criteria. *Radiology* 177 : 379-384, 1990.
- 3) Sasaki, T., Sato, Y. and Sakka, M. : Cell population kinetics of human solid tumors : a statistical analysis in various histological types. *Gann* 71 : 520-529, 1980.
- 4) Bar-Shalom, R., Valdivia, A. Y. and Blafox, M. D. : PET imaging in oncology. *Semin. Nucl. Med.* 30 : 150-185, 2000.
- 5) Warburg, O. : On the origin of cancer cells. *Science* 123 : 309-314, 1956.
- 6) Gallagher, B. M., Fowler, J. S., Guttererson, N. I., MacGregor, R. R., Wan, C. N. and Wolf, A. P. : Metabolic trapping as a principle of radiopharmaceutical design : some factors responsible for the biodistribution of [¹⁸F]2-deoxy-2-fluoro-D-glucose. *J. Nucl. Med.* 19 : 1154-1161,

- 1978.
- 7) Som, P., Atkins, H. L., Bandoypadhyay, D., Fowler, J. S., MacGregor, R. R., Matsui, K., Oster, Z. H. Sacker, D. F., Shiue, C. Y., Turner, H., Wan, C. N., Wolf, A. P. and Zabinski, S. V. : A fluorinated glucose analog, 2-fluoro-2-deoxy-D-glucose (F-18) : nontoxic tracer for rapid tumor detection. *J. Nucl. Med.* 21 : 670-675, 1980.
 - 8) Macfarlane, D. J., Cotton, L., Ackermann, R. J., Minn, H., Ficaro, E. P., Shreve, P. D. and Wahl, R. L. : Triple-head SPECT with 2-[fluorine-18]fluoro-2-deoxy-D-glucose (FDG) : initial evaluation in oncology and comparison with FDG PET. *Radiology* 194 : 425-429, 1995.
 - 9) Martin, W. H., Delbeke, D., Patton, J. A. and Sandler, M. P. : Detection of malignancies with SPECT versus PET, with 2-[fluorine-18]fluoro-2-deoxy-D-glucose. *Radiology* 198 : 225-231, 1996.
 - 10) Patz, E. F., Lowe, V. J., Hoffman, J. M., Paine, S. S., Harris, L. K. and Goodman, P. C. : Persistent or recurrent bronchogenic carcinoma : detection with PET and 2-[F-18]-2-deoxy-D-glucose. *Radiology* 191 : 379-382, 1994.
 - 11) Inoue, T., Kim, E. E., Komaki, R., Wong, F. C., Bassa, P., Wong, W. H., Yang, D. J., Endo, K. and Podoloff, D. A. : Detecting recurrent or residual lung cancer with FDG-PET. *J. Nucl. Med.* 36 : 788-793, 1995.
 - 12) Strauss, L. G., Clorius, J. H., Schlag, P., Lehner, B., Kimmig, B., Engenhart, R., Marin-Grez, M., Helus, F., Oberdorfer, F. and Schmidlin, P. : Recurrence of colorectal tumors : PET evaluation. *Radiology* 170 : 329-332, 1989.
 - 13) Fischbein, N. J., Assar, O. S., Caputo, G. R., Kaplan, M. J., Singer, M. I., Price, D. C., Dillon, W. P. and Hawkins, R. A. : Clinical utility of positron emission tomography with 18 F-fluorodeoxyglucose in detecting residual/recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck. *Am. J. Neuroradiol.* 19 : 1189-1196, 1998.
 - 14) Shozushima, M., Moriguchi, H., Izumisawa, M., Sato, H. and Sakamaki, K. : Evaluation of FDG-PET in the false positive case of oral cancer. *NMCC Annual Report* 7 : 40-45, 2000.
 - 15) Minn, H., Clavo, A. C., Grenman, R. and Wahl, R. L. : In vitro comparison of cell proliferation kinetics and uptake of tritiated fluorodeoxyglucose and L-methionine in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *J. Nucl. Med.* 36 : 252-258, 1995.
 - 16) Knehr, M., Poppe, M., Enulescu, M., Eickelbaum, W., Stoehr, M., Schroeter, D. and Paweletz, N. : A critical appraisal of synchronization methods applied to achieve maximal enrichment of HeLa cells in specific cell cycle phases. *Exp. Cell Res.* 217 : 546-553, 1995.
 - 17) Yamamoto, T., Seino, Y., Fukumoto, H., Koh, G., Yano, H., Inagaki, N., Yamada, Y., Inoue, K., Manabe, T. and Imura, H. : Over-expression of facilitative glucose transporter genes in human cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 170 : 223-230, 1990.
 - 18) Mellanen, P., Minn, H., Grenman, R. and Harkonen, P. : Expression of glucose transporters in head-and-neck tumors. *Int. J. Cancer.* 56 : 622-629, 1994.
 - 19) Brown, R. S. and Wahl, R. L. : Overexpression of Glut-1 glucose transporter in human breast cancer. *Cancer* 72 : 2979-2985, 1993.
 - 20) Cao, G., Liu, L. M. and Cleary, S. F. : Modified method of mammalian cell synchronization improves yield and degree of synchronization. *Exp. Cell. Res.* 193 : 405-410, 1991.
 - 21) Meistrich, M. L., Meyn, R. E. and Barlogie, B. : Synchronization of mouse L-P59 cells by centrifugal elutriation separation. *Exp. Cell. Res.* 105 : 169-177, 1977.
 - 22) Zieve, G. W., Turnbull, D., Mullins, J. M. and McIntosh, J. R. : Production of large numbers of mitotic mammalian cells by use of the reversible microtubule inhibitor nocodazole. Nocodazole accumulated mitotic cells. *Exp. Cell. Res.* 126 : 397-405, 1980.
 - 23) Collins, J. M. : Rates of DNA synthesis during the S-phase of HeLa cells. *J. Biol. Chem.* 253 : 8570-8577, 1978.
 - 24) Tobey, R. A., Petersen, D. F., Anderson, E. C. and Puck, T. T. : Life cycle analysis of mammalian cells. 3. The inhibition of division in Chinese hamster cells by puromycin and actinomycin. *Biophys. J.* 6 : 567-581, 1966.
 - 25) Minn, H., Joensuu, H., Ahonen, A. and Klemi, P. : Fluorodeoxyglucose imaging : a method to assess the proliferative activity of human cancer in vivo. Comparison with DNA flow cytometry in head and neck tumors. *Cancer* 61 : 1776-1781, 1988.
 - 26) Kubota, R., Kubota, K., Yamada, S., Tada, M., Takahashi, T., Iwata, R. and Tamahashi N. : Methionine uptake by tumor tissue : a microautoradiographic comparison with FDG. *J. Nucl. Med.* 36 : 484-492, 1995.
 - 27) Kubota, R., Kubota, K., Yamada, S., Tada, M., Ido, T. and Tamahashi, N. : Microautoradiographic study for the differentiation of intratumoral macrophages, granulation tissues and cancer cells by the dynamics of fluorine-18-fluorodeoxyglucose uptake. *J. Nucl. Med.* 35 : 104-112, 1994.
 - 28) Ohira, H., Kubota, K., Ohuchi, N., Harada, Y., Fukuda, H. and Satomi, S. : Comparison of in-

- tratumoral distribution of ^{99m}Tc -MIBI and deoxyglucose in mouse breast cancer models. *J. Nucl. Med.* 41 : 1561-1568, 2000.
- 29) Sugawara, Y., Fisher, S. J., Zasadny, K. R., Kison, P. V., Baker, L. H. and Wahl, R. L. : Pre-clinical and clinical studies of bone marrow uptake of fluorine-18-fluorodeoxyglucose with or without granulocyte colony-stimulating factor during chemotherapy. *J. Clin. Oncol.* 16 : 173-180, 1998.
- 30) Tsutusmi, R., Hoshino, M., Oda, J., Shozushima, M. and Sato, S. : $^2\text{-}[^{18}\text{F}]$ fluoro-2-deoxy-D-glucose ($^2\text{-}[^{18}\text{F}]$ FDG) incorporation into peripheral mononuclear blood cells and mouse spleen cells : Trial to labelling of antigen specific lymphocytes. *NMCC Annual Report* 4 : 223-229, 1997.
- 31) Darzynkiewicz, Z., Gong, J., Juan, G., Ardelit, B. and Traganos, F. : Cytometry of cyclin proteins. *Cytometry* 25 : 1-13, 1996.
- 32) Waki, A., Fujibayashi, Y. and Yokoyama, A. : Recent advances in the analyses of the characteristics of tumors on FDG uptake. *Nucl. Med. Biol.* 25 : 589-592, 1998.
- 33) Waki, A., Kato, H., Yano, R., Sadato, N., Yokoyama, A., Ishii, Y., Yonekura, Y. and Fujibayashi, Y. : The importance of glucose transport activity as the rate-limiting step of 2-deoxyglucose uptake in tumor cells in vitro. *Nucl. Med. Biol.* 25 : 593-597, 1998.
- 34) Zhang, J. Z., Behrooz, A. and Ismail-Beigi, F. : Regulation of glucose transport by hypoxia. *Am. J. Kidney. Dis.* 34 : 189-202, 1999.
- 35) Joost, H. G. and Thorens, B. : The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators : nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members. *Mol. Membr. Biol.* 18 : 247-256, 2001.
- 36) Kaplan, W. D., Jochelson, M. S., Herman, T. S., Nadler, L. M., Stomper, P. C., Takvorian, T., Andersen, J. W. and Canellos, G. P. : Gallium-67 imaging : a predictor of residual tumor viability and clinical outcome in patients with diffuse large-cell lymphoma. *J. Clin. Oncol.* 8 : 1966-1970, 1990.
- 37) Kostakoglu, L., Leonard, J. P., Kuji, I., Coleman, M., Vallabhajosula, S. and Goldsmith, S. J. : Comparison of fluorine-18 fluorodeoxyglucose positron emission tomography and Ga-67 scintigraphy in evaluation of lymphoma. *Cancer* 94 : 879-888, 2002.
- 38) Bichel, P. and Hansen, H. H. : The incorporation of ^{67}Ga in normal and malignant cells and its dependence on growth rate. *Br. J. Radiol.* 45 : 182-184, 1972.
- 39) Harris, A. W. and Sephton, R. G. : Transferrin promotion of ^{67}Ga and ^{59}Fe uptake by cultured mouse myeloma cells. *Cancer. Res.* 37 : 3634-3638, 1977.
- 40) Van Leeuwen-Stok, E. A., Jonkhoff, A. R., Visser-Platier, A. W., Drager, L. M., Teule, G. J., Huijgens, P. C. and Schuurhuis, G. J. : Cell cycle dependency of ^{67}Ga uptake and cytotoxicity in human cell lines of hematological malignancies. *Leuke. Lymphoma.* 31 : 533-544, 1998.
- 41) Chitambar, C. R., Matthaeus, W. G., Antholine, W. E., Graff, K. and O'Brien, W. J. : Inhibition of leukemic HL60 cell growth by transferrin-gallium : effects on ribonucleotide reductase and demonstration of drug synergy with hydroxyurea. *Blood* 72 : 1930-1936, 1988.
- 42) Boni, R., Blauenstein, P., Dummer, R., von Schulthess, G. K., Schubiger, P. A. and Steinert, H. C. : Non-invasive assessment of tumour cell proliferation with positron emission tomography and ^{76}Br bromodeoxyuridine. *Melanoma. Res.* 9 : 569-573, 1999.