

## 《原 著》

 $^{99m}\text{Tc}$  による血球標識に関する研究 (第1報)In vitro における  $^{99m}\text{Tc}$  赤血球標識の検討

内田 立身\* 秋月 健\* 斉藤 勝\*\* 木村 秀夫\*  
 田中铁五郎\* 松田 信\* 吉田 博\* 刈米 重夫\*

## はじめに

血球を  $^{99m}\text{Tc}$  で標識する試みは、すでに、赤血球<sup>1,2)</sup>、白血球<sup>3)</sup>、血小板<sup>4)</sup>、での報告があり、脾シンチグラフィ<sup>5,6)</sup>、血球の臓器分布<sup>7,8)</sup>、循環血液量の測定<sup>9,10)</sup>などに利用されてきた。しかし、従来の方法によって血球を標識するには、標識操作がかなり複雑であり、高い標識率が得られにくく、また標識されながら elution が見られる<sup>3,10,11)</sup>などの欠点があり、われわれも、脾シンチグラフィへの応用でこの事実を指摘した<sup>6)</sup>。

血球を  $^{99m}\text{Tc}$  で標識することは過去の報告をみても利用価値が高く、広範囲にわたっており、その後、多くの研究者によって標識法の検討がなされてきた<sup>1-3,5,9-11)</sup>。そして、このたび、フランス原子力庁 (CIS) 製  $^{99m}\text{Tc}$  赤血球標識用キットが利用できるようになったので、われわれはこれを赤血球標識に利用して in vitro の検討を行なった。

血球標識においては、in vivo study を行なう前に、標識のさいの至適条件、種々の条件下における標識態度、標識血球よりの elution の程度などを詳細に検討することがきわめて重要であって、

今回の成績より本標識キットは、従来の標識法よりも標識率が高く、elution も少なく、in vivo study に用いて有用であるとの結論を得たので、赤血球における in vitro の成績をここに報告する。

## 方 法

## 実験材料

血液学的に異常のない健康人より得られた赤血球を用いた。採血は、特に記載のない限り、抗凝固剤としてヘパリン 10 単位を用いて行なった。

$^{99m}\text{Tc}$  はマリンクロット社の Ultra Techne Cow より得たもの 0.1 ml (0.2~0.5  $\mu\text{Ci}$  に調整) を 2 ml 血液に対して用い、reducing reagent として(株)ミドリ十字提供の CIS 製  $^{99m}\text{Tc}$  赤血球標識用キットおよび同キットと比較のため、和光純薬製  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  を用いた。

$^{99m}\text{Tc}$  赤血球標識用キットは、Sodium pyrophosphate 0.40 mg, stannous chloride 0.006 mg, NaCl 4.5 mg をふくみ、無菌 pyrogen-free に作られた粉末と、溶解液として 10 ml の無菌 pyrogen-free,  $\text{N}_2$  ガスを通した生理的食塩水より成り、使用の度ごとに、粉末を溶解して用い、 $\text{O}_2$  に接触させないことが注意さるべきこととなっている<sup>12)</sup>。

 $^{99m}\text{Tc}$  による赤血球標識法の検討1)  $^{99m}\text{Tc}$  の incubation time

ヘパリンで採血した血液 2 ml に、使用前に調整した  $^{99m}\text{Tc}$  赤血球標識用キット溶液 (以下還元用キット溶液と称する) 0.5 ml (Sn 量として 0.3

\* 福島県立医科大学第一内科

\*\* 同 RI 研究室

受付: 52 年 1 月 10 日

最終稿受付: 52 年 2 月 25 日

別刷請求先: 福島市杉妻町 4-45

福島県立医科大学第一内科

内 田 立 身

μg)を加え、5分間室温に incubate したのち、1,500 rpm 5分間遠沈し、血清および余分の Sn をふくむ溶液をのぞく。その後、 $^{99m}\text{Tc}$  0.1 ml を加え、0, 2, 5, 10, 15, 30 分間室温に放置した。おのおのサンプルを2回生理的食塩水で洗浄し標識率 (Labeling Yield, %) を求めた。

$$\text{標識率} = \frac{\text{洗浄後の血液の放射能}}{\text{加えた } ^{99m}\text{Tc の放射能}} \times 100$$

## 2) 還元用キット溶液の量、反応時間と標識率の関係

2 ml の血液に、次の各濃度をふくむように調整した還元用キット溶液 0.1 ml を加えて5分間室温に放置した (0, 0.0006 μg, 0.006 μg, 0.06 μg, 0.3 μg, 0.6 μg, 3.0 μg)。遠沈して余分のキット溶液をのぞいたのち、0.1 ml の  $^{99m}\text{Tc}$  を加え、5分間の incubation, ついで2回生理的食塩水で洗浄し標識率を求めた。

また還元用キット溶液の反応時間と標識率の関係をみるために、0.3 μg (0.5 ml) の溶液を加え、0, 2, 5, 15, 30 分 incubate し、対照として、1週間前に作製した同量の溶液を5分間 incubate し、遠沈して余分の plasma 部分を除いたのち、0.1 ml の  $^{99m}\text{Tc}$  を加え5分間室温に放置、生理的食塩水で2回洗浄して標識率を求めた。

## 3) 標識順序の検討

次の3通りの標識操作を行ない、標識率を比較した。

(i) 標準的な標識操作として、血液 2 ml に還元用キット溶液 0.5 ml (Sn 0.3 μg) を加え、5分間室温で incubate したのち遠沈して上清を捨て、 $^{99m}\text{Tc}$  0.1 ml を加え5分間室温で incubate して2回生理的食塩水で洗浄する (pre-tinning method, 以下本法を標準法と略す)。

(ii) 血液 2 ml をまず生理的食塩水で洗浄し、 $^{99m}\text{Tc}$  0.1 ml を加え5分間室温で incubate する。そののち還元用キット溶液 0.5 ml を加え、5分間室温で incubate したのち2回洗浄する (post-tinning method)。

(iii) 既報の標識法<sup>6)</sup>、すなわち還元用キット溶液 0.5 ml の代わりに  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  100 μg (ACD

0.1 ml に溶解)を加えるもの。(ACD: acid citrate dextrose; 2.2 gm trisodium citrate dihydrate, 0.8 gm citric acid, 2.5 gm dextrose in 100 ml distilled water)

## 4) 還元用キット溶液を加えるさいの incubation medium による相違

血液 1 ml を medium として 1.5 ml で ACD (pH=5.4), buffered saline (pH=7.6) および ACD-plasma (pH=7.5) に浮遊せしめ、おのおの還元用キット溶液 0.5 ml を加え、遠沈して上清をすてたのち、 $^{99m}\text{Tc}$  0.1 ml を加えて標識し、2回洗浄して標識率を検討した。

## 5) 温度の影響

$^{99m}\text{Tc}$  による赤血球標識の温度による効果を検討した。標準法による標識操作を、氷室 (4°C), 室温 (20°C) および 37°C で行ない標識率を比較した。

## 6) Elution の検討

$^{99m}\text{Tc}$  標識赤血球を6回まで生理的食塩水で洗浄し、洗浄回数による標識率の減少を観察した。また他の方法として、標識血球を 0.5 ml ずつ14等分して3組作り、おのおのに、2 ml の ACD-plasma, ACD, buffered saline に浮遊し、0, 30分, 1, 2, 4, 17, 24 時間室温に incubate したのち遠沈し、血清と上清部分の放射能を求め、血球の標識率の低下を検討した。

## 7) ヘマトクリット (Ht) と標識率の関係

正常人血液を濃縮または、同一人血漿で稀釈して、次に示す貧血から多血症までの Ht を示す血液を作製し、標準法で標識し、標識率を検討した。Ht: 8, 15, 20, 26, 35, 41, 50, 57, 62%。

## 8) $^{99m}\text{Tc}$ の量と標識率の関係

標準法によって、 $^{99m}\text{Tc}$  の量を 0.1 ml より 1.0 ml まで増加せしめて得られる赤血球の放射性を検討した。

## 成 績

標準的標識法を行なった79例の検討において平均赤血球標識率は  $91.7 \pm 7.0\%$  (mean  $\pm$  1. SD) であった。

### 1) $^{99m}\text{Tc}$ による incubation time

Fig. 1 のように,  $^{99m}\text{Tc}$  を加えて 5 分で標識率はほぼ最大に達し, 以後 plateau を維持した. したがって,  $^{99m}\text{Tc}$  の incubation time は 5-10 分で十分である.

### 2) 還元用キット溶液の量, 反応時間と標識率の関係

Table 1 は還元用キット溶液の濃度を 0, 0.0006, 0.006, 0.06, 0.3, 0.6, 3.0  $\mu\text{g}$  と変えた時の標識率の変化をみたもので, 標識率は 0.06  $\mu\text{g}$  ではほぼ plateau に達し, 3.0  $\mu\text{g}$  まで濃度を高めても増加

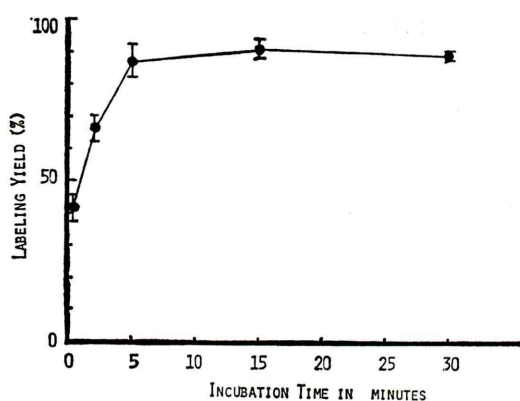


Fig. 1 Time course of  $^{99m}\text{Tc}$  uptake by erythrocytes. Each point represents the mean of 3 experiments and bars represent  $\pm 1$  S.D.

Table 1 Dependence of  $^{99m}\text{Tc}$  Uptake by Erythrocytes on Reducing Reagent Concentration

$\mu\text{g}/2 \text{ ml blood}$	Labeling yield (%)
0	$10.2 \pm 0.3$
0.0006	$13.2 \pm 2.9$
0.006	$23.8 \pm 1.1$
0.06	$71.0 \pm 4.8$
0.3	$72.3 \pm 4.5$
0.6	$76.7 \pm 6.0$
3.0	$76.4 \pm 0$

Each figure represents the mean ( $\pm$ S.D.) of 2-3 experiments.

Microgram of reducing reagent indicated was dissolved in 0.1 ml of solvent instead of 0.5 ml in usual use, so that the labeling yield was lower than the mean of 0.5 ml (91.7%).

も, 逆に減少も見られなかった. Table 2 は, 還元用キット溶液を加えてからの時間と標識率の関係で, 加えた瞬間からただちに 5 分間の遠沈を行ない, 上清をすてて標識を行なっても 90% 以上の標識率が得られた. また, 1 週間前に調整したキット溶液を用いると, 標識率は 26% にすぎず, そのつど調整することは不可欠である<sup>12)</sup>.

### 3) 標識順序の検討

還元用キット溶液を  $^{99m}\text{Tc}$  の前に作用させるか (pre-tinning), 後に作用させるか (post-tinning) を検討したところ, Table 3 のように pre-tinning 84.8%, post-tinning 77.4% であった.  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  100  $\mu\text{g}$  を用いたものでは, 54.9% で, 赤血球標識用キットを用いた方が, 標識率が高かった.

### 4) 還元用キット溶液を加えるさいの incubation medium による相違

Incubation medium として, 赤血球を生理的食塩水に浮遊せしめたときが最も標識率がよく (88.6%), ついで ACD 67.9%, ACD-plasma 53.8% の順であった (Table 4). 血液 1 ml に medium 1.5 ml を加えたため, 標準法より medium の量が

Table 2 Dependence of  $^{99m}\text{Tc}$  Uptake by Erythrocytes on Incubation Time of Reducing Reagent.

Incubation time (min.)	Labeling yield (%)
0	$93.5 \pm 7.3$
2	$100.2 \pm 1.7$
5	$97.7 \pm 1.1$
15	$98.2 \pm 1.3$
30	$95.0 \pm 6.1$
Old reagent	$26.1 \pm 16.3$
No reagent	$10.4 \pm 4.9$

Each figure represents the mean ( $\pm$ S. D.) of 4-8 samples.

Table 3 Comparison of Labeling Yield by Pre- and Post-tinning Method

Method	Labeling yield (%)
Pre-tinning	$84.8 \pm 1.4$
Post-tinning	$77.4 \pm 0.4$
$\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$54.9 \pm 1.4$

Each figure represents the mean ( $\pm$ S.D.) of 5 experiments.

**Table 4** Labeling Yield of Erythrocyte Suspended in ACD, Saline and ACD-plasma.

Medium	pH	Labeling yield
ACD	5.4	67.9± 3.1
Saline	7.6	88.6± 1.9
ACD-plasma	7.5	53.8±11.3

Each figure represents the mean ( $\pm$ S.D.) of 5 experiments.

Each sample consists of 1.0 ml of whole blood and 1.5 ml of medium.

多く、標識率は低い(とくに plasma において)傾向があった。

### 5) 温度の影響

標準操作を 37°C で行なったときの標識率は、92.4% と最も高く (Table 5), ついで室温 (84.9%), 氷室では 64.1% と最も低かった。したがって標識率は 37°C で行なうのが最もよいが、操作の簡便さを考え室温で行なった。

**Table 5** Relationship of Temperature to  $^{99m}\text{Tc}$  Uptake by Erythrocytes

Temperature	Labeling yield (%)
4°C	64.1±1.3
20°C	84.9±1.1
37°C	92.4±4.6

Each figure represents the mean ( $\pm$ S.D.) of 5 samples.

### 6) Elution の検討

赤血球を標識しなかった free technetium を除くには、1 回の洗浄で十分であった。6 回まで標識赤血球を洗浄しても、elution による標識率の変化は認められなかった (Table 6)。さらに elution を検討するため、ACD, buffered saline, plasma に浮遊した赤血球を、あらかじめ定めた時間室温に放置し、血球と上清の放射能を求めた。Fig. 2 に示したように、赤血球よりの  $^{99m}\text{Tc}$  の elution は、2 時間では 6% 以内、4 時間で 10% 以内であるが、24 時間後では、plasma で、11%, ACD, saline で 20% 程度であった。

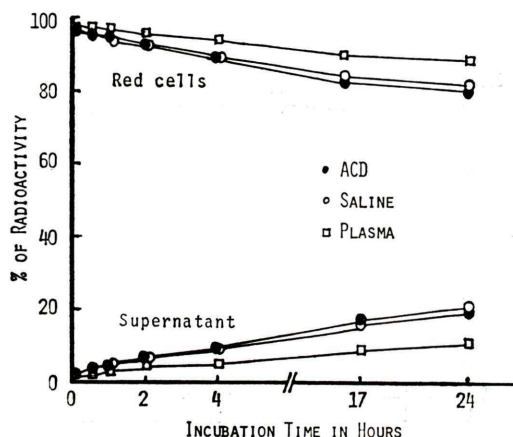
### 7) Ht と標識率の関係

Table 7 に示すように、Ht 8% より 62% の血液に標準法で標識しても、標識率は 85–97% であ

**Table 6** Elution of  $^{99m}\text{Tc}$  from Repeatedly Washed Erythrocytes

No. of Washings	Labeling yield (%)
0	100
1	96.0±1.2
2	92.5±2.6
3	94.6±1.4
4	92.4±2.3
5	93.5±3.1
6	93.7±1.3

Each figure represents the mean ( $\pm$ S.D.) of 3 samples.



**Fig. 2** Elution of  $^{99m}\text{Tc}$  from erythrocytes suspended in ACD, buffered saline and plasma. Bars represent  $\pm 1$  S.D. of 2 experiments. The upper line shows the percent of radioactivity of erythrocytes and the lower shows that of supernatant.

**Table 7** Relationship Between Hematocrit and Labeling Yield

Hematocrit (%)	Labeling yield (%)
8	85.0±0.5
15	95.3±1.3
20	94.2±2.6
26	97.6±1.7
35	95.0±2.0
41	95.6±3.0
50	94.1±0.5
57	94.2±3.5
62	93.8±3.2

Each figure represents the mean ( $\pm$ S.D.) of 2 samples.

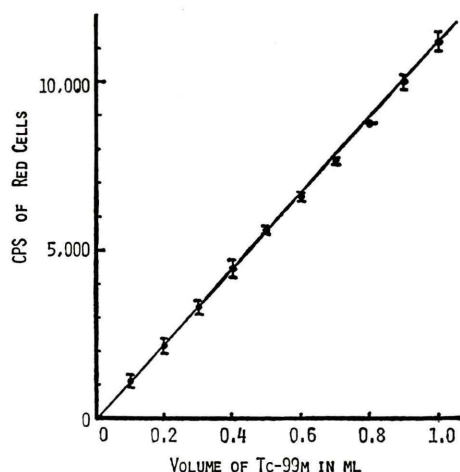


Fig. 3 Relationship between volume of  $^{99m}\text{Tc}$  and specific activity of red cells. Each point represents the mean ( $\pm 1$  S.D.) of 2 experiments.

り, Ht に関係なくよい標識率が得られた。

#### 8) $^{99m}\text{Tc}$ の量と標識率の関係

Fig. 3 のように  $^{99m}\text{Tc}$  の液量を 0.1 ml より 1.0 ml まで増加させると, 血球の放射能は, これに比例して直線的に増加を示した。Fig. 3 においては,  $0.37 \mu\text{Ci/ml}$  ( $=13,690 \text{ dps}$ ) の  $^{99m}\text{Tc}$  を用い, 放射能はこの To に換算して CPS で表現した。

### 考 案

$^{99m}\text{Tc}$  で赤血球を標識する試みは, 1967 年 Fischer ら<sup>1)</sup> によってはじめてなされたが,  $^{99m}\text{Tc}$  を赤血球と incubate するのみで, 標識は安定したものではなかった。その後, stannous chloride を reducing agent として用いるにいたって, 安定した標識が得られるようになったが, 標識率は, Eckelman ら<sup>5)</sup> 40–60%, 著者ら<sup>6)</sup> 30–50%, Kurubin ら<sup>9)</sup> 80%, Schmidt ら<sup>10)</sup> 40–65%, Ryo<sup>13)</sup> ら 66%, Atkins ら<sup>14)</sup> 41–76% といずれも低率であった。近年,  $^{99m}\text{Tc}$  標識化合物調整用キット化が進む中で, 赤血球においても, reducing agent を無菌的に使用できること, より迅速な操作で標識率を向上せしめることを目的にその試みが, Gutkowski ら<sup>15)</sup>, Smith ら<sup>16)</sup>, Bardy ら<sup>17)</sup> によってなされた。Gutkowski らは, キット化した stannous glucohep-

tonate を用いる pre-tinning method で 90% 以上の標識率を得, Smith らは, freeze-dried stannous citrate を用いる pre-tinning method で 97% yield を得ている。また Bardy らは, stannous chlorate の代わりに stannous pyrophosphate を用い 90% 以上の標識率を得た。CIS 製  $^{99m}\text{Tc}$  赤血球標識用キットは, Bardy の変法として作られており, stannous chloride, sodium pyrophosphate, sodium chloride, sodium hydroxyde をふくみ, その作用機序として, まず stannous pyrophosphate が赤血球膜を通過して赤血球に入り, 次いで加えた  $^{99m}\text{Tc}$  が赤血球内に入るさい, 加えた stannous ion が  $\text{TcO}_4^-$  ion を lower valence, おそらくは  $\text{Tc(IV)}$  にして, hemoglobin (正確には globin 分画) との不可逆的結合を容易ならしめると考えられている<sup>12,18)</sup>。そして,  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  を単独で用いたときよりも, stannous pyrophosphate を用いた方が標識率が高く, elution が少ないというわれわれの成績は, Sn イオンの赤血球膜の通過や, 赤血球内の Sn イオンの存在様式が, pyrophosphate を伴った方が容易で安定していることを示していると推察される。

CIS 製赤血球標識用キットを用いたさいの標識率は, 79 サンプルで  $91.7 \pm 7.0\%$  と, 従来の  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  法に比し, はるかに優れていた。また elution も, 6 回までの洗浄操作で有意の減少はなく, 24 時間放置しても 20% 以内で (Fig. 2), これは  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  を用いた Schmidt らの成績<sup>10)</sup> (3 回の洗浄で 40–48% に落ちる) や, われわれの成績<sup>6)</sup> (8 回で 24–31% に落ちる) に比し優れている。

標識操作の赤血球に対する傷害については, われわれが  $100 \mu\text{g SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  を用いて標識した赤血球について赤血球浸透圧抵抗を調べたところ, 正常血球のそれと変わらなかった<sup>6)</sup>,  $0.3 \mu\text{g Sn}$  量の本キットでは問題ないと思われる。

また還元用キットを用いるさい, そのつど調整することが必須であった。pre-tinning と post-tinning method の検討では, pre-tinning の方が標識率が良好であった。このことは,  $^{99m}\text{Tc}$  と赤血球の結合はかなり loose であり, 両者の結合を不

可逆なものにするには、 $\text{Sn}^{++}$ -ion が必要であることを示している。また、標識には  $\text{Sn}^{++}$  の濃度も重要であって、低濃度で標識率の低いのはもちろんであるが、標準法の  $10^2$  倍、 $10^3$  倍の濃度を用いても、標識率の下がるのが認められている<sup>17)</sup>。また、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$  を加えるさいの incubation medium は Schmidt の成績<sup>10)</sup> でも、われわれの成績でも、saline に浮遊せしめた方がよく、plasma の存在は標識率を下げる factor であると思われる。したがって、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$  を加える前に、遠沈して余分の血漿部分を除くことが必要となる。

以上のように CIS 製赤血球標識用キットを用いたさいの標識手順を詳細に検討した結果、方法の項に記した標準的方法をさらに次の諸点で簡略化することが可能である。

1) 還元用キット溶液を加える前に、plasma を除いた方が標識率がよいが、除かなくても 90% 程度の標識率が得られる。

2) 還元用キット溶液の濃度は、示された通りを用いるが、容量は大略 0.5 ml でよい。

3) 還元用キット溶液に浸す時間は、必ずしも 5 分間でなくてよく、加えたのち、2, 3 回振盪してただちに 5 分間の遠沈操作にうつって差しつかえない。

4)  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  の incubation time は 5-10 分で、 $37^\circ\text{C}$  で行なった方が標識率がよいが、室温でも差しつかえない。

5) 加える  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  の液量は 0.1 ml より 1.0 ml の間で目的とする放射能を得るようにすればよい。

6) 標識後のサンプルの洗浄は 1 回で十分であり、90% 程度の標識率があるので、目的によっては洗わずともよい。

7) 使用する血液量は、厳密に 2 ml である必要はなく、貧血、多血症などヘマトクリットの異なる場合も、これを考慮する必要はない。

以上の通り、本キットを用いて 90% 以上の標識率を得ることができたので、われわれは、標識赤血球の熱処理を行なって、脾シンチグラフィーを施行しており、良好な成績を得ている<sup>19)</sup>。またわれわれが従来から行なってきた白血球、血小板

Table 8  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -標識血球の臨床的応用

- |   |
|---|
| A) $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 標識赤血球                           |
| ① 循環赤血球量の測定 <sup>9), 10)</sup>                              |
| ② 熱処理法による脾シンチグラフィー <sup>6), 19)</sup>                       |
| ③ 臓器分布と脾血流量の測定  |
| ④ $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 赤血球アンギオグラフィー <sup>20), 21)</sup> |
| ⑤ 胎盤シンチグラフィー <sup>22)</sup>                                 |
| ⑥ In Vitro における抗体の検索 <sup>23)</sup>                         |
| B) $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 標識白血球                           |
| ① 好中球回転への応用 <sup>3), 8)</sup>                               |
| ② 炎症巣, Abscess の描出 <sup>24)</sup>                           |
| ③ リンパ球回転への応用 <sup>25), 26)</sup>                            |
| C) $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 標識腫瘍細胞 <sup>29)</sup>           |
| D) $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 標識血小板                           |
| ① 血小板回転への応用 <sup>4)</sup>                                   |
| ② 血栓症の部位診断  |
| ③ 血小板消費の部位診断  |

への標識についても考慮中である。現在まで、文献上に見られる、また考えられる  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  標識血球の臨床的応用は、Table 8 の通りであり、これらに CIS 標識用キットの利用が可能である。

## 結 論

$^{99\text{m}}\text{Tc}$  による赤血球標識を、CIS 製赤血球標識用キットを用いて in vitro で検討した。血液 2 ml に stannous pyrophosphate 0.3  $\mu\text{g}$  (キット液 0.5 ml) を加え、遠沈して上清を除いたのち、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$  0.1 ml を加え、5-10 分間 incubate した。

標識後洗浄して標識率を求めたところ、79 サンプルで  $91.7 \pm 7.0\%$  の良好な標識率を得た。標識は室温より  $37^\circ\text{C}$  の方がよく、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$  を加えて 5-10 分で最大に達した。使用する血液の Ht や加える  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  の量には無関係であった。赤血球よりの  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  の elution は、連続せる洗浄操作では認められず、ACD, saline, plasma に浮遊させた場合、24 時間後に当初の放射能の 10-20% の消失が見られた。

本標識用キットは、熱処理による脾シンチグラフィーやアンギオグラフィーに用いられるばかり

でなく、白血球や血小板の標識にも有用であることを論じた。

稿を終るにさいし、CIS  $^{99m}\text{Tc}$  標識赤血球用キット (TCK-11) を提供して戴いた株式会社ミドリ十字に深謝します。

## 文 献

- 1) Fischer J, Wolf R, Leon A: Technetium-99m as a label for erythrocytes. *J Nucl Med* **8**: 229-232, 1967
- 2) Eckelman W, Richards P, Hauser W, et al: Technetium-labeled red blood cells. *J Nucl Med* **12**: 22-24, 1971
- 3) Uchida T, Vincent PC: In vitro studies of leukocyte labeling with technetium-99m. *J Nucl Med* **17**: 730-736, 1976
- 4) Uchida T, Yasunaga K, Kariyone S, et al: Survival and sequestration of  $^{51}\text{Cr}$  and  $^{99m}\text{Tc}$ -labeled platelets. *J Nucl Med* **15**: 801-807, 1974
- 5) Eckelman W, Richards P, Atkins HL, et al: Visualization of the human spleen with  $^{99m}\text{Tc}$ -labeled red blood cells. *J Nucl Med* **12**: 310-311, 1971
- 6) 内田立身, 中島言子, 刈米重夫:  $^{99m}\text{Tc}$ -標識赤血球による脾シンチグラフィ, 核医学 **10**: 79-89, 1973.
- 7) Hegde UM, Williams ED, Lewis SM, et al: Measurement of splenic red cell volume and visualization of the spleen with  $^{99m}\text{Tc}$ . *J Nucl Med* **14**: 769-771, 1973.
- 8) Uchida T, Kariyone S: Organ distribution of the  $^{99m}\text{Tc}$ -labeled white cells. *Acta Haematol. Jap* **36**: 78-81, 1973
- 9) Korubin V, Maisey MN, McIntyre PA: Evaluation of technetium labeled red cells for determination of red cell volume in man. *J Nucl Med* **13**: 760-762, 1972
- 10) Schmidt P, Lohrmann HP, Heimpel H: Sodium pertechnetate as a red cell label. *Brit J Haematol* **32**: 411-420, 1976
- 11) Burdine JA, Legeay R: Spleen scans with  $^{99m}\text{Tc}$ -labeled heated erythrocytes. *Radiology* **91**: 162-164, 1968
- 12) Kit for preparation of  $^{99m}\text{Tc}$  red blood cells. Cea Ire Sorin, TCK-11, 使用説明書.
- 13) Ryo UY, Mohammadzadeh AA, Siddiqui A, et al: Evaluation of labeling procedure and in vivo stability of  $^{99m}\text{Tc}$ -red blood cells. *J Nucl Med* **17**: 133-136, 1976
- 14) Atkins HL, Eckelman WC, Hauser W, et al: Splenic sequestration of  $^{99m}\text{Tc}$ -labeled red blood cells. *J Nucl Med* **13**: 811-814, 1972
- 15) Gutkowski RF, Dworkin HJ: Kit-produced  $^{99m}\text{Tc}$ -labeled red cells for spleen imaging. *J Nucl Med* **15**: 1187-1190, 1974
- 16) Smith TD, Richards P: A simple kit for the preparation of  $^{99m}\text{Tc}$ -labeled red blood cells. *J Nucl Med* **17**: 126-132, 1976
- 17) Bardy A, Fouyé H, Gobin R, et al: Technetium-99m labeling by means of stannous pyrophosphate; Application to bleomycin and red blood cells. *J Nucl Med* **16**: 435-437, 1975.
- 18) Dewanjee MK: Binding of  $^{99m}\text{Tc}$  ion to hemoglobin. *J Nucl Med* **15**: 703-706, 1974
- 19) 内田立身, 秋月健, 刈米重夫, 他:  $^{99m}\text{Tc}$  による血球標識にかんする研究.  $^{99m}\text{Tc}$  赤血球標識用キットを用いた脾シンチグラフィ, 核医学 **15**, (印刷中).
- 20) Atkins HL, Eckelman WC, Klopfer JF, et al: Vascular imaging with  $^{99m}\text{Tc}$ -red blood cells. *Radiology* **106**: 357-360, 1973.
- 21) Ryo UY, Lee JI, Zarnow H, et al: Radionuclide angiography with  $^{99m}\text{Tc}$ -labeled red blood cells for the detection of aortic aneurysm. *J Nucl Med* **15**: 1014-1017, 1974
- 22) Mahon DF, Subramanian G, McAfee JG: Experimental comparison of radioactive agents for studies of the placenta. *J Nucl Med* **14**: 651-659, 1973
- 23) Barth RF, Singra O: A quantitative radioisotope assay for hemolytic antibody by employing technetium-99m labeled erythrocytes. *J Immunol* **112**: 756-762, 1974
- 24) Anderson BR, English D, Akalin HE, et al: Inflammatory lesions localized with technetium-99m labeled leukocytes. *Arch Intern Med* **135**: 1067-1071, 1975
- 25) Barth RF, Singla O: Organ distribution of  $^{99m}\text{Tc}$ - and  $^{51}\text{Cr}$ -labeled thymocytes. *J Nucl Med* **16**: 633-638, 1965
- 26) Barth RF, Singla O: Migratory patterns of  $^{99m}\text{Tc}$ -labeled lymphoid cells. *Cellul Immunol* **17**: 83-95, 1975
- 27) Barth RF, Gillespie Y: The use of technetium-99m as a radioisotope label to assess cell-mediated immunity in vitro. *Cellul Immunol* **10**: 38-49, 1974
- 28) Gillespie Y, Barth RF, Gobuty A: A new radioisotope microassay of cell-mediated immunity utilizing  $^{99m}\text{Tc}$ -labeled target cells. *Pro Soc Exp Biol Med* **142**: 378-382, 1973
- 29) Gillespie Y, Barth RF, Singla O: Use of  $^{99m}\text{Tc}$  as a radioisotope label to study the migratory patterns of normal and neoplastic cells. *J Nucl Med* **15**: 656-661, 1974

## Summary

### **Blood Cell Labeling with Technetium-99m (1) In Vitro Studies of Red Blood Cell Labeling by $^{99m}\text{Tc}$ .**

Tatsumi UCHIDA, Tsuyoshi AKIZUKI, Masaru SAITO\*, Hideo KIMURA,  
Tetsugoro TANAKA, Shin MATSUDA, Hiroshi YOSHIDA and Shigeo KARIYONE

*The First Department of Internal Medicine and Radioisotope Laboratory\*, Fukushima Medical College*

A method for labeling red blood cells (RBC) in vitro with  $^{99m}\text{Tc}$  by using CIS kit for  $^{99m}\text{Tc}$  RBC label is described. Two ml of whole blood are incubated with 0.3  $\mu\text{g}$  of stannous pyrophosphate (0.5 ml of kit solution), followed by removing the supernatant and incubation of  $^{99m}\text{Tc}$  to red cells for 5 to 10 minutes. After washing of two times, labeling yield of  $91.7 \pm 7.0\%$  was obtained in 79 samples. Labeling is better at  $37^\circ\text{C}$  than in room temperature, and maximum labeling occurs after 5 to 10 minutes incubation with  $^{99m}\text{Tc}$ . No

dependence on hematocrit of each sample or volume of  $^{99m}\text{Tc}$  added was seen. No elution of  $^{99m}\text{Tc}$  from red cells was shown by repeated washes of the labeled cells and 10 to 20% of radioactivity to initial counts was lost in ACD, saline and plasma 24 hours after incubation in room temperature.

It was discussed that  $^{99m}\text{Tc}$  RBC kit could be used not only for spleen scan and angiography by  $^{99m}\text{Tc}$ -labeled RBC, but for white blood cell and platelet label by  $^{99m}\text{Tc}$ .