《原 著》

99mTcによる血球標識にかんする研究(第4報)

---- ^{99m}Tc によるリンパ球標識の基礎的検討 ----

松田 信* 内田 立身* 油井 徳雄* 三浦 信雄* 木村 秀夫* 田中鉄五郎* 健* 博* 秋月 吉田 刈米 重夫* 木田 利之*** 勝** 斎藤

要旨 99m Tc によるリンパ球標識を,CIS 製赤血球標識用キットを用いて検討した.標識率は $5.3\pm0.4\%$ (mean ±1 S.D., n=8) であり,トリパンブルー排除試験による viability は $92.1\pm2.3\%$ (n=3) であった.連続洗浄によるリンパ球標識率の変動の観察では,遊離 99m Tc をとり除くのに 3 回の洗浄が必要であった.以上より本標識法は Barth らの方法に優るとも劣らぬ方法であると思われた.

マウスにおける実験では、標識リンパ球は 2 相性に指数関数的に減少した。第 1 相の $T_{1/2}$ は 0.5 時間,第 2 相の $T_{1/2}$ は 0.5 時間であった。臓器分布の検討では、注入直後、肺に高い放射能を認めたが、経時的に減少した。脾・肝臓の放射能は注入後 1 時間まで増加し、その後プラトーに達した。これらのリンパ球回転の成績は、51Cr を用いた実験と同じ結果を示した。

真性多血症患者において、^{99m}Tc 標識リンパの臓器分布をガンマーカメラで観察可能な事を示した。注入 30 分後、脾臓に放射能の集積が認められた。

以上より、99mTcはリンパ球回転の基礎的、臨床的研究に適したものと考えられた。

緒 言

リンパ球を Na2 51 CrO $_4^{1-3}$), 3 H-チミジン 4) 等で標識し,リンパ球回転を調べた報告はすでに多くあるが, 99m Tc で標識する試みは Barth $^{5^{5-7}}$), Goguty 68), Kansas City Gorup のもののみである.従来の 51 Cr で標識する方法は標識率もそう高くなく,また 7 線のエネルギーが強いので(0.320 MeV),アンガー型シンチレーションカメラによる撮像にも適していない. 99m Tc はその 7 線エネルギーが弱く(0.140 MeV),シンチレーションカメラによる描出に適しており,これによってリ

ンパ球を標識して投与すれば、臓器分布などを視覚的にとらえることができる利点を有している. われわれは 99mTc 赤血球標識用キットでリンパ球を標識する際の基礎的検討を行った。またそれを用いてマウスにおけるリンパ球動態を観察し、さらにヒトにおいてリンパ球の臓器分布の観察を行ったので併せて報告する.

方 法

実験材料

実験動物は8週齢のオス C3H マウスを用いた. 99mTc によるリンパ球標識率および溶出に関する実験には、健康人静脈血より得たリンパ球を用いた. また臨床応用として、真性多血症患者における1例を示した.

リンパ球の分離

マウスおよびヒトにおけるリンパ球分離は Boyum⁹⁾の方法にならって、ヘパリン加静脈血から Ficoll-Isopaque 比重遠沈法で分離した. 単球

受付:53年8月21日

最終稿受付:53年12月11日

別刷請求先:福島市杉妻町 4-45 (西 960)

福島県立医科大学第1内科教室

松 田 信

^{*} 福島県立医科大学第1内科教室

^{**} 福島県立医科大学 RI 研究室

^{***} 福島県立医科大学放射線科

を除去する場合には、採血量の1/10量のカルボニール鉄 10 を加え、37°C、60分間 incubate 後、Ficoll-Isopaque 比重遠沈法でリンパ球を分離した。分離後リンパ球は phosphate buffer saline (PBS) を用い、2回洗浄した。

99mTc によるヒトリンパ球標識法の検討

1) 99mTcによるヒトリンパ球標識

われわれ¹¹⁾がヒト赤血球にて検討した方法に準じて行った. 分離したヒトリンパ球 $2\times10^7/ml$ PB S 浮遊液 2ml に,使用直前に調整した 99mTc 赤血球標識用キット液(以下還元用キット液と称す) 0.5 ml (Sn 量として $0.3 \mu g$) を加え, 5 分間,室温で incubate した.余分な Sn を除去するために PBS で 1 回洗浄し,その後リンパ球を PBS 2 ml に再浮遊させ,これに 99mTcO4 200μ Ci を加え 10 分間, 37° C で incubate した. PBS で 3 回洗浄し た後,リンパ球の放射能を測定した.

- 2) 連続洗浄による標識率の変動
- 1) の方法で標識した 99mTc 標識リンパ球を 6 回まで、PBS で洗浄し、洗浄回数による標識率の減少を観察した. また 6 回洗浄後の リンパ球の viability を検討するために 0.3% トリパンブルー排除試験を行った.
- 3) 健康人における各種血球の標識率の検討 ヘパリン加ヒト静脈血を 50 m/ 採血し 2000 rpm 8 分間遠沈後, buffy coat を得る. buffy coat を PBS で1 回洗浄後, すでに述べた方法により 99m Tc 標識細胞浮遊液をつくる. この浮遊液を直ちに Ficoll-Isopaque 比重遠沈法を用い, リンパ球と単球群, 血小板群, 顆粒球群, 赤血球群に分離した. リンパ球と単球はガラスシャーレ附着法により分離し, 顆粒球は混入せる赤血球を 0.83% Tris N H4Cl 液で溶血させて得た. 最後に 各血球間の洗浄回数を 3 回に統一し, 細胞 106 個当りの放射能を測定し, リンパ球を 100 とした場合の相対標識率を求めた.

マウスにおける 99mTc 標識リンパ球の臓器分布の検討

8週齢、オス C3H を用いた. 腋窩動脈切断法にてヘパリン加血液を得た. Ficoll-Isopaque 比重

遠沈法でリンパ球を分離し PBS で1回洗浄し、リンパ球・PBS 浮遊液 (3×10⁷ 個/2 ml) を得た.このリンパ球浮遊液に還元用キット液 0.5 ml を加え、室温で5分間 incubate した. PBS で1回洗浄後、リンパ球・PBS 浮遊液に ^{99m}Tc を 200 μCi 加え、37°C で10分間 incubate した. PBS で3回洗浄後、^{99m}Tc 標識リンパ球を一匹あたり6×10⁵ 個 (0.2 ml)、尾静脈より投与した. 一群を 3 匹とし、経時的に屠殺し血液 0.5 ml、肝臓、脾臓、肺臓、心臓、腎臓をとり出し、その重量と放射能を測定し、^{99m}Tc 標識リンパ球の血中消失曲線および臓器分布を検討した.

ヒトにおける ^{99m}Tc 標識リンパ球の臓器分布の 観察

リンパ球の 99mTc 標識についての基礎的検討の 結果から、ヒトにおける臨床的なリンパ球臓器分 布の観察には次の如き方法を用いた.

- 1) 99mTc によるリンパ球標識法
- 動血用プラスチックバック (ACD-A 液 30 ml を含む) で静脈血 200 ml を得る.
- ② プラスチックバックのまま 2,000 rpm, 8 分間遠沈し, buffy coat を得る. 得られた buffy coat から Ficoll-Isopaque 比重遠沈法でリンパ球を分離する. 生食で1回洗浄後, リンパ球を生食 5 ml に浮遊させる.
- ③ リンパ球・生食浮遊液に還元用キット液 1.5 ml (Sn にして 0.9 μg) を加え、室温で 5 分間 incubate する. 生食で1回洗浄しリンパ球を生食5 ml に浮遊させる.
- ④ リンパ球浮遊液に ^{99m}Tc を 5 mCi 加え, 37°C で10分間 incubate する. その後, 生食で 3 回洗浄し, 最後に生食 20 ml に浮遊させる.
- 2) 臓器分布の観察

99mTc 標識リンパ球(生食 20 ml に浮遊)を被 検者へすみやかに静注する. 同時にガンマーカメ ラで臓器分布を観察する.

成 績

99mTcO₄ によるヒトリンパ球標識率
2×10⁷ 個のヒトリンパ球を ^{99m}Tc 200 μCi で先

に述べた方法で標識した. $3 回洗浄後の標識率は 5.3 \pm 0.4\%$ (mean ± 1 S.D., n=8) であった.

2) 連続洗浄による標識率の変動

連続 6 回洗浄による標識率の結果を Table 1 に示した。リンパ球を標識しなかった遊離の 99m Tc を除くには 3 回の洗浄が必要であった。

3) viability の検討

 99m Tc 標識ヒトリンパ球を 6 回洗浄後, viability を検討した. vialibity は $92.1\pm2.3\%$, n=3 であった.

4) ヒト各種血球の標識率の差の検討

ヒトリンパ球 10^6 個あたりの放射能を100とした時のヒト各種血球の相対標識率は,顆粒球 115 ± 5.9 (mean ± 1 S.D., n=3),単球 107 ± 3.5 ,赤血球 33.0 ± 5.3 ,血小板 29.7 ± 3.2 であった. 顆粒球,単球,リンパ球の順で標識され赤血球,血小板はほぼ同程度でリンパ球の約1/3 であった.

5) マウスにおける ^{99m}Tc 標識リンパ球の血中 消失曲線と臓器分布の検討

Fig. 1 に $^{99\text{m}}$ Tc 標識リンパ球の血中消失曲線を示した. $^{99\text{m}}$ Tc 標識リンパ球は 2 相性の消失曲線を示した. 血中消失曲線は指数関数的に減少し、初期の急減する相の $T_{1/2}$ は 0.5 時間,その後の漸減する相の $T_{1/2}$ は 6.1 時間であった. Scott¹²⁾ の式を用いて lymphocyte pool size (LPS) を計算すると,平均して recovery 46.6%,blood lymphocyte count (BLC) $5,464/\text{mm}^3$,循環血液量 $1.7 \text{ m}/^{1.3}$,blood lymphocyte pool (BLP) 92.8×10^5 ,第 1 相

Table 1 Changes of labeling efficiency of ^{99m}Tc labeled lymphocytes by repeated washing

No of working	Labeling yield (%)			
No. of washing —	Mean	SD		
0	100			
1	22.8	1.2		
2	7.7	0.3		
3	5.2	0.2		
4	4.1	0.1		
5	3.3	0.2		
6	2.6	0.3		

Each figure represents the mean ± 1 S.D. of 3 samples. Free ^{99m}Tc was removed by washing three times.

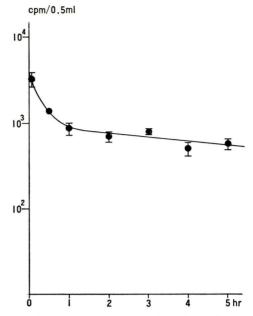


Fig. 1 Disappearance curve of ^{99m}Tc labeled lymphocytes from blood stream in C3H mice.

Lymphocyte disappearance curve showed two exponential components, half time of the first component was 0.5 hrs and that of second one 6.1 hrs, respectively. Recovery was 46.6%. Blood lymphocyte counts were 5464/mm³, blood lymphocyte pool 92.8×10⁵, and Lymphocyte turnover rate was 33.3 times/day.

の 0 時間の放射能を To, 第 2 相の 0 時間の放射能を Te とすると To/Te は 3.6, recirculating lymphocyte pool (RLP) 334.1×10^5 , lymphocyte turnover rate (LTR) 33.3 回/日であった.

Fig. 2 に 99mTc 標識マウスリンパ球の臓器分布の成績を cpm/mg で示し、Table 2 は注入全放射能に対する各臓器の放射能の百分率で示した。99mTc 標識マウスリンパ球注入直後は、肺臓に放射能が高く、注入量の約47%が認められたが、その後、経時的に減少し5時間後は約4%であった.脾臓では放射能は1時間まで経時的に上昇し、その後はその水準を維持した.単位重量あたりの放射能は各臓器中最高であったが、脾全体の放射能は、1時間後からは注入量の15~20%であった.肝臓は単位重量あたりの放射能で比べる限り、腎臓と大差なく低値を示したが、肝臓全体の放射能は注

入量の20~28%を占め、臓器としては最高の放射 能を示した. 腎臓は注入30分後より,注入量の約5

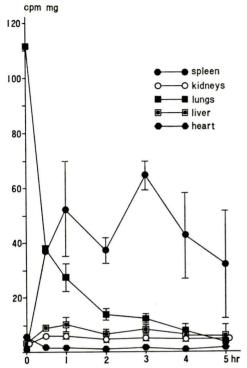


Fig. 2 Organ distribution of ^{99m}Tc labeled lymphocytes in C3H mice.

Immediately after the infusion of labeled lymphocytes, high radioactivity was detected in the lungs and it decreased rapidly in the couse of time. Radioactivity of the spleen and liver increased until 1 hr after infusion and achieved plateau.

~6%の放射能を示した.心臓は終始低値を示した. 6) ヒトにおける ^{99m}Tc 標識リンパ球の臓器分 布の観察

Fig. 3 に ^{99m}Tc 標識ヒト自己リンパ球注入30分後のシンチカメラ像を示した. 被検者は57歳の男性で真性多血症の患者であった. 標識リンパ球が 脾臓に集積しているのが認められた.

考案

^{99m}Tc によりヒトリンパ球を標識した際, その 標識率は、われわれの成績では $5.3\pm0.4\%$ であり、 Barth⁵⁾ 1~2%, Gobuty ら⁸⁾ 2~4%よりやや良好 な結果を得た. われわれは Table 1 に示した様に リンパ球を標識した際、遊離99mTcをとり除くた めに3回洗浄する必要を知ったので、われわれの 成績はすべて3回洗浄によった、Barth⁵⁾, Gobuty ら8) は2回洗浄を用いている。われわれの結果を 2回洗浄後の標識率でみると 7.7±0.3% となり、 彼らの標識率より 2~4 倍高い結果を得た. リン パ球を ^{99m}Tc で標識する際,彼らは ^{99m}Tc でまず リンパ球を標識し、その後 SnCl₂·2H₂O 10 μg で 還元する方法を用いているが、われわれは 99mTc 赤血球標識用キットをリンパ球標識へも応用し. キット還元液で処理したリンパ球に 99mTc を加え る方法を用いた. この方法によるヒトリンパ球の viability は $92.1\pm2.3\%$ と満足すべき結果であった。 連続洗浄によるリンパ球標識率は,遊離 99mTc が

Table 2 Organ distribution of 99mTc labeled lymphocytes in C3H mice

	Percent injected dose of radioactivity							
Organ	5 min	30 min	1 hr	2 hr	3 hr	4 hr	5 hr	
Blood	23.1 ± 2.8	16.3	8.1 ± 1.1	5.9±0.8	6.2±0.4	4.7±0.7	4.5 ± 0.7	
Liver	6.2 ± 1.4	20.1	28.4 ± 5.1	20.8 ± 0.7	24.4 ± 0.8	22.9 ± 0.9	22.8 ± 3.6	
Spleen	0.04 ± 0.01	7.9	14.6 ± 0.6	14.9 ± 1.3	16.0 ± 0.4	19.5 ± 0.8	17.7 ± 0.6	
Heart	1.2 ± 0.8	0.2	0.2 ± 0	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0	0.3 ± 0	
Lung	46.5 ± 0.2	11.9	11.9 ± 3.4	6.2 ± 0.4	6.3 ± 0.4	3.4 ± 1.7	3.8 ± 0.1	
Kidney	2.7 ± 1.6	5.0	5.5 ± 0	5.6 ± 0.7	6.1 ± 0.4	5.7 ± 0.1	6.0 ± 0.9	
Total percent recoverable radioa	activity							
	80.0 ± 2.1	61.4	68.7 ± 10.1	53.6 ± 1.2	59.2 ± 1.8	56.6 ± 4.0	55.0 ± 4.0	

C3H mice were injected through the teil vein with 6×10^{5} 99mTc labeled peripheral blood lymphocytes and killed at the times indicated. Percent recoverable radioactivity was calculated by dividing the cpm of each organ by total infused cpm.

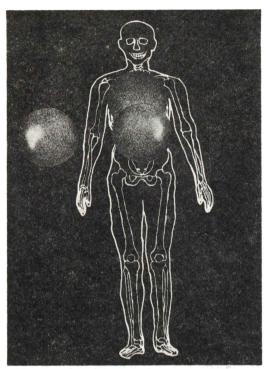


Fig. 3 Organ distribution of ^{99m}Tc labeled lymphocytes in patient with polycytemia vera.

Scintiphotogram was taken 30 min. after the infusion of labeled lymphocytes. The accumulation of radioactivity on the spleen and rather poor uptake on the liver and the lungs were observed.

とり除かれた3回以後は洗浄前後における標識率に推計学的に有意差は認めなかったが、実際には3回洗浄後も標識率はわずかずつ減少した。以上CIS 製キットを用いたリンパ球標識は従来の方法に比し優るとも劣らない方法であった。

マウスを用いた 99mTc 標識リンパ球の臓器分布では、標識リンパ球は注入直後、肺臓に非常に強い放射能 (注入量の47%) を認め、その後経時的に減少し 5 時間後には 3.8 %であった。 この事実はリンパ球の肺通過時間が遅いことを示したものと考えられた。 Barth ら^{6,7)} も注入直後、 肺臓に注入量の50%の放射能を認め、それが経時的に減少し 4 時間後は 5.4 % であったと報告している。 脾臓、肝臓ではともに注入 1 時間後まで各々の放射能は上昇しその後一定の水準を維持した。単位

重量あたりの放射能で比べると脾臓は肝臓より 5 ~8 倍高い放射能を示した. この事実は脾臓がリ ンパ球回転上重要な臓器であることを示したもの といえよう. その他の臓器では放射能は低値を示 した. これらの臓器分布の傾向は 51Cr を用いた われわれの観察¹⁴⁾と大差なく、すなわち ⁵¹Cr 標 識リンパ球を用いたマウスの実験では、注入直後, 肺臓に注入量の22%の放射能を認め、経時的に減 少し5時間後その放射能は1.1%であった。肝臓, 脾臓では注入直後それぞれ注入量の25%,2.4% の放射能を認め、その後増加し5時間後は32%, 16%であった. Barthら ^{6,7)}はリンパ球を ^{99m}Tc で 標識後、SnCl₂ 液で還元すると、⁵¹Cr 標識リンパ 球を用いた場合と臓器分布の傾向の異なることを 指摘した、しかしわれわれが今回用いた方法で標 識したリンパ球は 51Cr を用いた観察と同じ臓器 分布の傾向を示し、この点からも優れた標識法と いえよう.

99mTc 標識マウスリンパ球の血中消失曲線は2相性を示し、初期の急減する相とそれに続く漸減する相よりなっていた. 51Cr を用いたマウスにおけるわれわれの実験¹⁴⁾でも、また Scott およびMcMillan³⁾らの 51Cr 標識リンパ球を用いた人体での観察でも、標識リンパ球は2相性の減少曲線を示し、99mTc を用いた今回の実験結果と一致した. 臓器分布の結果と合わせ考えると、消失曲線の第1相は、標識リンパ球が急速に肺臓、脾臓、肝臓へ抑留されるために生じ、第2相は血中にあって徐々に各臓器へ抑留されるために生じるものと考えられた.

ヒトにおいて、標識リンパ球の臓器分布の観察を行い、Fig. 3 に示した様にガンマーカメラで良好なシンチカメラ像を得た。この場合リンパ球数は 10^8 個単位必要であり、標識に用いる 99mTc は、比放射能の高いものを $5\sim10$ mCi 必要とした。

99mTc 標識リンパ球を用いて, ガンマーカメラで臓器分布を視覚的に観察し, 同時に ⁵¹Cr 標識リンパ球で, リンパ球の動態を観察することは, 臨床的にリンパ球動態を解析する上に非常に有用と思われた.

結 論

リンパ球は CIS 製赤血球標識用キットを用い、キット還元液で処理後、99mTc で標識することにより、従来の報告より、良く標識された。その標識率は 5.3±0.4%、viability は 92.1±2.3% であった。リンパ球を標識しない遊離の99mTcを取り除くには 3 回の洗浄が必要であった。マウスにおける99mTc 標識リンパ球は血液中より 2 相性に減少し、臓器分布では、肺臓、脾臓、肝臓が最も関与していた。これらの結果は51Cr 標識マウスリンパ球を用いた動物実験と同じ結果を得た。この点からも本標識法は優れたものと考えられた。ヒトにおいて99mTc 標識ヒトリンパ球の臓器分布をガンマーカメラで観察可能なことを示した。

本研究は昭和52年度科学研究補助金による研究である。稿を終るに際し、CIS 製 ^{99m}Tc 赤血球標識用キットを 提供して頂いた株式会社ミドリ十字に深謝します。

文 献

- Pfisterer H, Bolland H, Nennhuber J, et al: Lymphozytenabbau nach in-vitro Markierung mit Na₂
 ⁵¹Cr O₄. I. Methode und Ergebnisse bei Normalpersonen. Klin Wochenschr 45: 995-998, 1967
- McMillan R, Scott JL: Leukocyte labeling with 51chromium. I. Technic and results in normal subjects. Blood 32: 738-754, 1968
- Scott JL, Davidson JG, McMillan R, et al: Leukocyte labeling ⁵¹Chromium. III. The kinetics of normal lymphocytes. Blood 40: 276-281, 1972

- 4) Fliedner TM, Bremerk, Pretorius F, et al: Utilisation de la thymidine et de la cytidine tritieés pour l'étude du turnover et du metabolisme des lymphocytes chez l'homme. Nouv Rev Franc Hematol 8: 613-624, 1967
- 5) Barth RF, Singla O, Gillespie GY: Use of ^{99m}Tc as a radioisotopic label to study the migratory patterns of normal and neoplastic cells. J Nucl Med 15: 656-661, 1974
- 6) Barth RF, Singla O: Organ distribution of ^{99m}Tcand ⁵¹Cr-labeled thymocytes. J Nucl Med 16: 633– 638, 1975
- Barth RF, Singla O: Migratory patterns of ^{99m}Tclabeled lymphoid cells. Cellul Immunol 17: 83-95, 1975
- Gobuty AH, Robinson RG, Barth RF: Organ distribution of ^{99m}Tc-and ⁵¹Cr-labeled autologous peripheral blood lymphocytes in rabbits. J Nucl Med 18: 141–146, 1977
- Bøyum A: A one stage procedure for isolation of granulocytes and lymphocytes from human blood.
 Scand J Clin Lab Invest 21: Suppl 1, 51-76, 1966
- 10) 安保 徹, 熊谷勝男: Carbonyl iron と Ficoll-Isopaque 法によるリンパ球の純粋分離. 医学のあゆみ 97: 336-337, 1976
- 11) 内田立身, 秋月 健, 刈米重夫, 他:99mTc による 血球標識に関する研究(第1報). In vitro における 99mTc 赤血球標識の検討. 核医学 14:819-826,1977
- 12) Scott JL, Davidson, McMillan R et al: Leukocyte labeling with ⁵¹Chromium. III. The kinetics of normal lymphocytes. Blood 40: 276-281, 1972
- 13) 内田立身, 吉田 博, 刈米重夫, 他:^{99m}Tc による 血球標識にかんする研究 (第2報). ^{99m}Tc 標識赤血 球による循環血液量の測定. 核医学 15:41-47,1978
- 14) 松田 信, 内田立身, 刈米重夫, 他:リンパ球回転 に関する研究(第1報). ⁵¹Cr によるリンパ球標識 の基礎的検討と慢性リンパ性白血病への臨床的応用. 日血誌 **40**: 599, 1977

Summary

Blood Cell Labeling with Technetium-99m (IV) Studies of Lymphocyte Labeling by 99mTc

Shin Matsuda*, Tatsumi Uchida*, Tokuo Yui*, Nobuo Miura*, Hideo Kimura*, Tetsugoro Tanaka*, Tsuyoshi Akitsuki*, Hiroshi Yoshida*, Shigeo Kariyone*, Masaru Saito**, and Toshiyuki Kida***

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

Lymphocytes were labeled with $^{99\text{m}}\text{Tc}$ using CIS kit for labeling red blood cells. Labeling efficiency was $5.3\pm0.4\%$ (mean ±1 S.D., n=8). Viability was evaluated by supervital staining with trypan blue and its value was $92.1\pm2.3\%$ (n=3). Repeated washing of labeled lymphocytes were performed in order to observe the changes of rates of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ activity from the labeled cells. Free $^{99\text{m}}\text{Tc}$ was completely removed after washing three times. From these results, this labeling method was concidered to be better than that of Barth et al. already described.

In the mice, disappearance curve of ^{99m}Tc labeled lymphocytes from blood stream showed two exponential components. T1/2 of the first component was 0.5 hr and T1/2 of the second one 6.1 hr, respectively. Studies of organ distribution were performed in C3H mice. Immediately after the infusion of the labeled lymphocytes, high radioactivity was

detected in the lung and its radioactivity decreased rapidly in the course of time. The radioactivity of the spleen and the liver increased until 1 hr after infusion and achieved plateau. The organ distriubtion of ^{99m}Tc labeled lymphocytes was similar to that observed with ⁵¹Cr.

In a patient with polycytemia vera, scintiphotogram by gammer camera after infusion of ^{99m}Tc labeled lymphocytes was obtained. The accumulation of radioactivity on the spleen was detected at 30 min. after infusion.

99mTc can be labeled to mice and human lymphocytes efficiently without any damages of the cells. 99mTc labeled lymphocytes is quite useful for experimental and clinical studies of lymphocyte kinetics.

Key words: ^{99m}Tc, lymphocyte, lymphocyte kinetics, Organdistribution