

《原 著》

RI による白血球標識 (II)

— ^{111}In -オキシシンを用いた標識 —

末広 牧子* 飯尾 正宏*

要旨 ^{111}In -オキシシンの合成, および ^{111}In -オキシシンを使った ^{111}In -標識白血球の調製について, 基礎的検討を行ない, 炎症巣の *in vivo* 検出を試みた.

オキシシンは, pH 5~6 の条件下, 50~100 μg で, 20 μCi ~1 mCi の ^{111}In に対して, 70~90% の ^{111}In -オキシシン収率を与えることがわかった. この ^{111}In -オキシシンによる白血球標識は, $\sim 10^6$ の白血球に対しては血球数に比例して増加する. また, この標識白血球の数は, インキュベーション時間に依存して, 非直線的に増加するが, それらの標識 ^{111}In のなかで, 血漿との相互作用後も, 安定に血球中に残るものは, 時間とともに比較的ゆっくと, 直線的に増加していくことがわかった.

動物を使った炎症の *in vivo* 検出では, 静注された ^{111}In 白血球は, 炎症巣に集積して, その像を描出することができた. しかし一方, 失敗例から, 操作の上での白血球の失活は, 最も大きな問題であることがわかった.

I. はじめに

^{111}In -オキシシンによる白血球標識は, ^{111}In -オキシシンの白血球膜透過, 膜構成物質との相互作用, そして膜構造内への組み込みによってなされると考えられる¹⁻³⁾. このようにして行なわれた標識は, 血漿中においても比較的安定で, 血漿タンパクの影響を受けにくい³⁾.

この報告では, われわれは, 前に行なった報告³⁾に基づき, 量的にも質的にも比較的良い標識結果を与えることのわかった ^{111}In -オキシシンによる白血球標識について, その機序とも関連させながら, さらに詳しい検討を加え, 最後に, 動物を用いた炎症の *in vivo* 検出についても述べたいと思う.

II. 方 法

1. ^{111}In -オキシシンの合成

^{111}In に対するオキシシンの反応性を知るために, 塩化インジウム (^{111}In) 20 μl ($\sim 1 \times 10^6\text{cpm}$) に対して, オキシシンのエタノール溶液 (1mg/ml) 5, 10, 20, 50 μl をとり, ^{111}In -オキシシン合成収率をみた. ^{111}In 溶液とオキシシン溶液は, 酢酸緩衝液中 (pH 5~6) で混合し, 5~10分間放置後, ジクロロメタンにより, ^{111}In -オキシシンを抽出した. 次いで窒素気流下, ジクロロメタンを蒸発し, 乾固した ^{111}In -オキシシン中の ^{111}In を測定して収率を求めた.

2. ^{111}In -オキシシンと白血球の反応

^{111}In -オキシシン溶液 (エタノール-生食 1:4 溶液) 50 μl ($\sim 3 \times 10^5\text{cpm}$) を, 白血球懸濁液 100, 150, 250, 350, 500 μl ($2 \times 10^5/100\mu\text{l}$) を分注した試験管に加え, 30分間, 37°C でインキュベーションした後, 白血球を遠沈させて, 白血球に標識された ^{111}In の量を測定した. 標識白血球の洗浄は, 生理食塩水 1ml を用いて 1回行なった.

白血球の全血からの分離, 懸濁液調製法につい

* 東京都養育院附属病院核医学放射線部

受付: 54年9月25日

最終稿受付: 54年9月25日

別刷請求先: 東京都板橋区栄町 35-2 (☎ 173)

東京都養育院附属病院核医学放射線部

末広 牧子

ては、前に報告したとおりである³⁾。

3. 血球標識に及ぼすインキュベーション時間の影響

白血球の懸濁液 200 μ l ($\sim 3 \times 10^6$ の白血球を含む) ずつをとって5試料とし、¹¹¹In-オキシシン溶液 100 μ l ($\sim 4 \times 10^5$ cpm) を加え、それぞれ、5, 18, 30, 60, 90分間、37°C でインキュベーション後、白血球を遠沈、洗浄、さらに遠沈し、生理食塩水 1,000 μ l に懸濁させて、そのうち 10 μ l を、¹¹¹In 測定用とした。

また、さらに、それぞれのインキュベーション時間を経て得られた標識白血球の、血漿中での安定性を調べるため、上述の懸濁液 1,000 μ l から 100 μ l ずつをとり、200 μ l の血漿を加えて、1時間、37°C でインキュベーションし、白血球中に残った標識 ¹¹¹In を測定した。

4. 動物を用いた炎症の in vivo 検出

動物は、ラット (300~400g) と家兎 (~ 2 kg) を用い、ラットの場合は右後足に、家兎の場合には右前足に、テレピン油一流動パラフィン (1:1) 混合物を皮下注入して炎症をつくった。ラットには 0.1ml、家兎には 0.5ml を用い、¹¹¹In 白血球静注はテレピン油注入後 20~24 時間を経てから行なった。血液は、ラットの場合は別の1匹を犠牲にして、腹部大動脈より ~ 8 ml を得、また、家兎の場合には耳動脈より 10~30ml を得て、白血球分離、標識用とした。¹¹¹In 白血球静注後の、¹¹¹In 体内分布は、コンピューターを接続した γ カメラを用いて経時追跡し各臓器への ¹¹¹In の集積度はコンピューターに記憶させた。また、家兎ではその耳静脈より採血し、¹¹¹In の血中濃度、および ¹¹¹In の血球-血漿分布率の変化を調べた。

III. 結 果

¹¹¹In とオキシシンの反応の様子を Fig. 1 にあげる。¹¹¹InCl₃ 20 μ l に対しては、40~50 μ g のオキシシンによってほぼ平衡状態となり、約80%の収率を与える。逆にオキシシンを 50 μ g と一定にした場合、¹¹¹In Cl₃ 20~100 μ l の反応は、Fig. 2 のようであり、オキシシン量の与える収率への影響ほどに

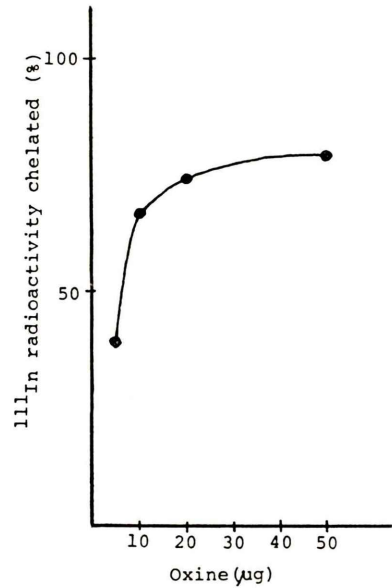


Fig. 1 Chelation of ¹¹¹In by oxine. ¹¹¹InCl₃: 20 μ l ($\sim 1 \times 10^6$ cpm)

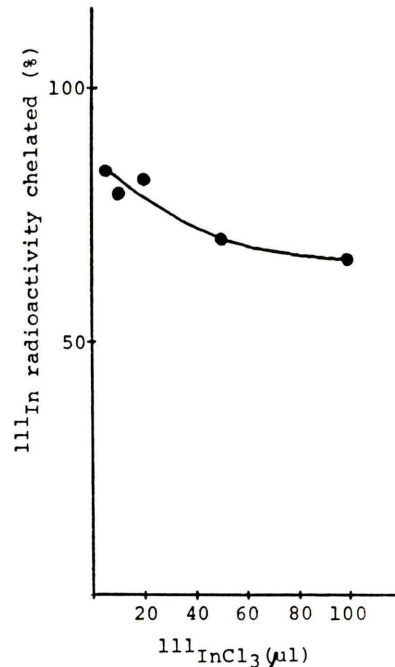


Fig. 2 Chelation of various amount of ¹¹¹In by 50 μ g of oxine

は、¹¹¹In Cl₃ の量は、影響を与えないことがわかる。これは、¹¹¹In の量がごく微量であること、

および、反応速度論から説明できる。

われわれは、pH5~6⁴⁾の緩衝液中で、塩化インジウム (^{111}In) 20 μCi ~1mCi に対し、オキシシン 50~100 μg を反応させて、常に 70~90%の ^{111}In オキシシン収率を得ることができた。

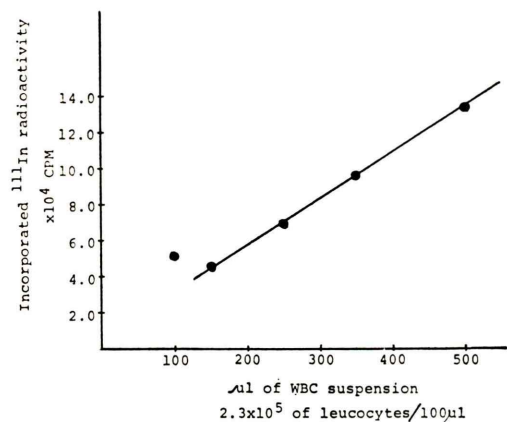


Fig. 3 Incorporation of ^{111}In into leucocytes

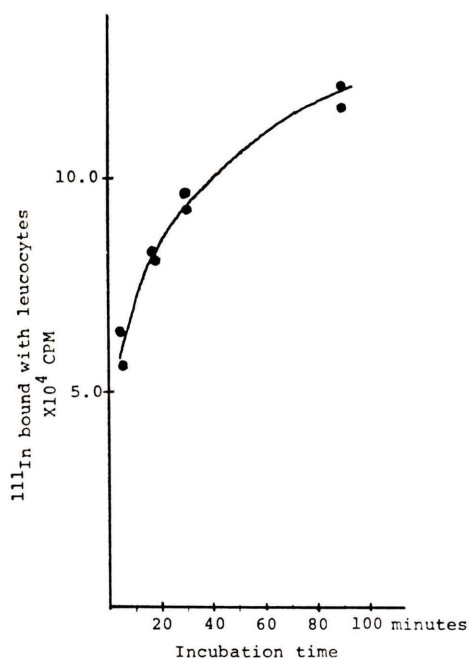


Fig. 4 Incubation-time dependent increase of ^{111}In bound with leucocytes

The leucocytes were incubated with ^{111}In -oxine at 37°C for 5, 18, 60, and 90 minutes.

このようにして得られた ^{111}In オキシシンとの反応によって生成する ^{111}In 白血球の量は、Fig. 3 に示すように、白血球数に比例して、直線的に多くなる。これは、たしかに ^{111}In オキシシンによって白血球が標識されているという実証である。また、これらの白血球標識 ^{111}In の量は、Fig. 4 に示すように、インキュベーションの時間とともに、非直線的に増加する。が、これらの標識 ^{111}In のうち、血漿との相互作用によっても遊離せず血球中に残る安定な標識は、Fig. 5 のように、直線的に増加していくことがわかった。この直線的な増加は急激ではない。つまり、かなりゆっくりした速度で、膜内に ^{111}In -オキシシンは組み込まれ、固定されていくといえる。

Fig. 6 に、 ^{111}In -オキシシンを用いて標識した白血球を、炎症を誘発した動物に投与した場合のシンチグラフを示す。この場合、 ^{111}In -オキシシン調製には、 ^{111}In ~250 μCi 、オキシシン 100 μg を使い、白血球標識のためのインキュベーションは 1 時間

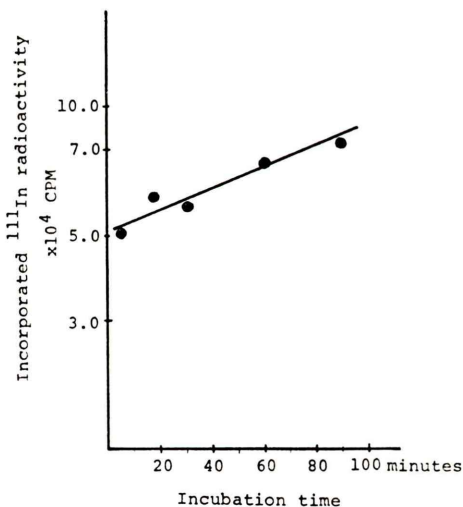


Fig. 5 Incubation-time dependent increase of stable ^{111}In labels that remained in leucocyte cells after the tagged cells were incubated with plasma. The leucocytes tagged with ^{111}In shown in Fig. 4 were incubated with plasma at 37°C for 1 hr. After incubation, the leucocyte suspension was centrifuged and sedimented ^{111}In leucocytes were counted.

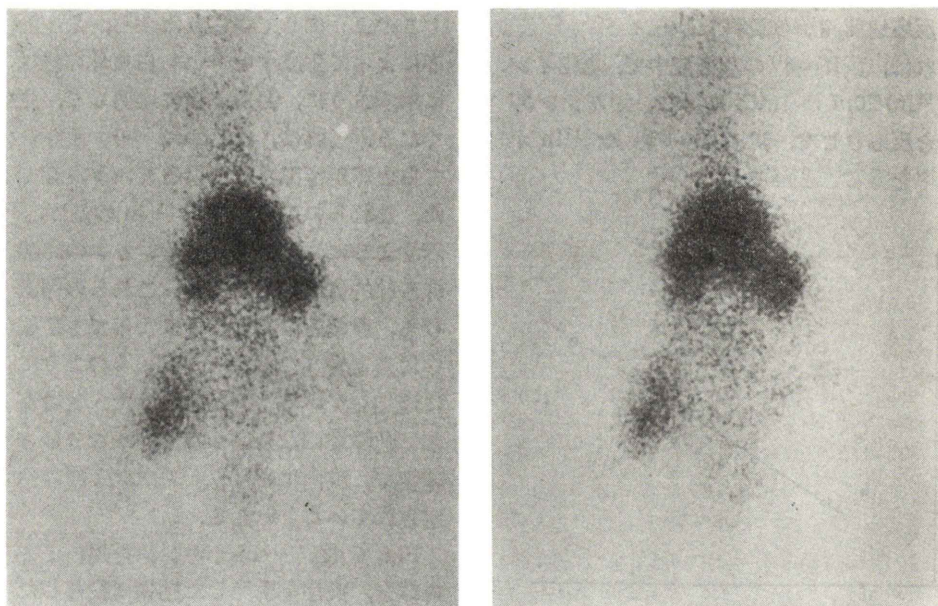


Fig. 6 Scintigraphic anterior image of an abscess bearing rat after injection of ^{111}In leucocytes labeled with ^{111}In -oxine.
Left: 5 hrs later, Right: 17 hrs
Abscess was made in the right hind leg by subcutaneous injection of turpentine oil-liquid paraffin (1:1) mixture.

行なった。右後足にある炎症が明瞭に描出されている。炎症への ^{111}In の集積は、 ^{111}In 白血球静注後、4～5時間に最も大きかった。また、 ^{111}In 白血球は、静注後、肺に一度捕捉され、3～4時間かかって肺から出、炎症巣へと集積しはじめる。

Table 1 に、 ^{111}In 白血球静注後5時間の各臓器への ^{111}In 集積度を示す。得られた画像から、その単位面積当たりの ^{111}In 量を比較している。肝臓への集積が最も大きく、炎症部に対して約2倍の集積度である。これは、標識操作中に失活した白血球のためであろうと考えられる。この白血球の失活のために、肺に捕捉された ^{111}In 白血球のほとんどが、その後炎症巣へは行かず、肝臓と脾臓のみが描出されるという極端な場合も、われわれの経験した例にはあった。

このように、きわめて繊細な白血球を保護することは、 ^{111}In 白血球を臨床応用する上に、標識技術の問題とは別な、非常に重大な問題である。

Fig. 7 に ^{111}In 白血球の血中濃度の経時変化を

Table 1 Abscess/tissue ratios of ^{111}In at 5 hours after injection

Abscess/tissue	
Lung	1.0
Liver	0.54
Spleen	0.77

示す。3～4時間に増加傾向がみられるが、これは、前述した、肺からの ^{111}In 白血球の放出に対応していると考えられる。これら血中に存在する ^{111}In のうち、89～91%が血球相、残りの～10%が血漿相に存在していた。これは、静注後の時間経過に関係なく、測定した静注直後から、28時間後まで、すべてについていえることであった。白血球の ^{111}In 標識は、体内で安定であるといえる。

IV. 考 察

以上の結果をもとにして、 ^{111}In -オキシシンによる白血球標識の最良の方法について考えてみたい。最良の白血球標識とは、効率のよい、安定な、そ

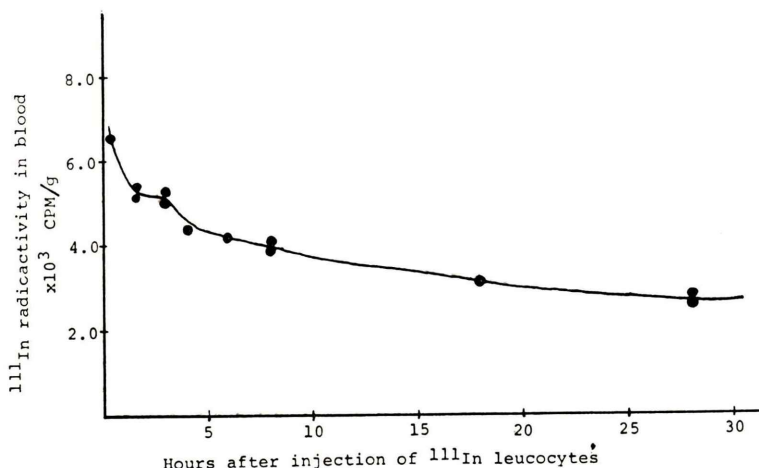


Fig. 7 Blood clearance of ^{111}In after intravenous injection of ^{111}In leucocytes. 200–300 μl s of venous blood were drawn for ^{111}In counting.

して、白血球の活性に対して害をなさない標識のことである。

オキシシン $50\mu\text{g}$, ^{111}In $500\mu\text{Ci}$ をとった場合を一例として考える。この場合、 pH $5\sim 6$ の条件で、 ^{111}In の $60\sim 85\%$ が ^{111}In -オキシシンとなると予想され(Fig. 1. 2),従って、 $300\sim 425\mu\text{Ci}$ の ^{111}In が、オキシシン錯体として、白血球標識に関与することになる。一方、オキシシンは、 ^{111}In -オキシシンの抽出にジクロロメタンを用いているので、未反応のオキシシンも、 ^{111}In -オキシシンとともに抽出され、ほとんど $50\mu\text{g}$ そのままが、標識用白血球懸濁液に加えられる。これら ^{111}In , オキシシンは、それぞれ白血球に作用して、その活性に影響を与えるが、その影響をできるだけ少なくおさえるためには、この場合、どれだけの量の白血球を用いればよいだろうか。オキシシン $1.0\mu\text{g}$ は、白血球 10^6 個に対して有毒である⁵⁾。これに対して、 $0.2\mu\text{g}$ のオキシシンは、ほとんど影響を与えない⁵⁾。従って、 $0.2\mu\text{g}$ 以下のオキシシンが 10^6 個の白血球に対応するように反応させるためには、オキシシンを $50\mu\text{g}$ 使うなら、 2.5×10^8 個以上の白血球があった方がよい。一方、 ^{111}In については、 10^8 個の白血球に対して、 $100\mu\text{Ci}$ 以上は有害であるとされている⁶⁾。これは、ほとんどが、 ^{111}In の放出するオージェ電子によ

るものである。オージェ電子の飛跡は短いので、白血球に結合した ^{111}In の影響のみを考えればよいだろう。Fig. 3より、 $\sim 1\times 10^6$ 個までの白血球に対しては、白血球数に応じて、 ^{111}In 標識量は直線的に増加するが、この増加は、 $\sim 10^7$ 個あたりからはプラトーに達し、 $\sim 70\%$ の標識率を与える⁵⁾とすると、標識に用いられた $300\sim 425\mu\text{Ci}$ のうち、 $210\sim 290\mu\text{Ci}$ の ^{111}In の影響を考えればよい。従って、 ^{111}In による放射線傷害という観点からみると、この場合は、 $2.1\times 10^8\sim 2.9\times 10^8$ 個以上の白血球が必要であるということになる。メチルセルロース法を用いて行なう白血球分離では、白血球の回収率は $65\sim 80\%$ ^{5,7)}であるので、以上のオキシシン、 ^{111}In 両方からの条件を満たせる $\sim 3\times 10^8$ 個以上の白血球を得るためには、 $6,000/\text{mm}^3$ の白血球を持つ人の場合で $60\sim 80\text{ml}$ 以上の採血が必要なことになる。

臨床応用を行なった報告によると、 $300\mu\text{Ci}$ の ^{111}In 白血球で、十分明瞭な炎症巣像が得られる⁸⁾。従って、採血量に制限のある場合は、 ^{111}In の量をさらに減少させて標識することも可能である。

インキュベーション時間については、次のことがいえる。インキュベーション時間を長くすれば、血漿中でも安定な標識 ^{111}In の量は、直線的に増

加していく。これらの標識は、 ^{111}In -オキシンの1:3あるいは1:2錯体が、膜構成物質との相互作用により、1:1錯体となり、膜内に組み込まれ固定されたもの³⁾と考えられる。が、これらの分子の膜内での増加速度は、ゆっくりで、90分間インキュベーションするところを、10分でやめても、25%の安定な標識 ^{111}In 量の減少でしかない(Fig. 5)。この事実と、血漿から分離した白血球は急速に凝集して、活性を低下させていくこと⁹⁾、あるいは、炎症巣に集積する好中球の寿命は短い(TI/2: 7~9時間^{10,11)})ことを考えあわせると、インキュベーションの時間は、短かくてよい。5~10分が適当であろう。

インキュベーション後、 ^{111}In 標識白血球は、生食よりも、血漿で洗浄する方がよいと思われる。これはFig. 4とFig. 5の差に現われたような不安定な標識 ^{111}In を除き、静注後の ^{111}In の遊離を防ぐためと、前述した血漿タンパクの白血球保護作用⁹⁾を利用するためである。

インキュベーション10分、遠心5分とした場合、白血球が血漿から分離された状態に置かれる時間は約30分間である。また、白血球が体外にとり出されてから、再び静注によって体内にもどされるまでに要する時間は、白血球分離のための静置時間を60分とすると、100分前後である。この時間に、とり出した白血球の何%が失活するかは、わかっていない。

in vitroに置かれた白血球の活性保護については、現在検討中であり、追って報告する。また、

^{111}In 標識白血球の生体内での挙動についても報告する予定である。

文 献

- 1) McAfee JG, Thakur ML: Survey of Radioactive Agents for In Vitro Labeling of Phagocytic Leukocytes, *J Nucl Med* **17**: 480-487, 1976
- 2) Hwang KJ: Modes of Interaction of (In^{3+}) -8-Hydroxyquinoline with Membrane Bilayer. *J Nucl Med* **19**: 1162-1170, 1978
- 3) 末広牧子, 飯尾正宏: RIによる白血球標識(I), *核医学* **17**: 133-138 1980
- 4) Thakur ML, Coleman RE, Welch MJ: Indium-111 labeled leukocytes for the localization of abscess: preparation, analysis, tissue distribution, and comparison with gallium-67 citrate in dogs. *J Lab Clin Med* **89**: 217-228, 1977
- 5) Segal AW, Deteix P, Garcia P, et al: Indium-111 Labeling of Leukocytes: A Detrimental Effect on Neutrophil and Lymphocyte Function and an improved Method of cell Labeling. *J Nucl Med* **19**: 1238-1244, 1978
- 6) Frost P, Frost H, Smith J: Nuclear Scanning with Indium-111 Labeled Circulating Lymphocytes in Animals. *J Nucl Med* **18**: 620, 1977
- 7) 末広牧子, 飯尾正宏: 未発表データ
- 8) Thakur ML, Lavender JP, Arnot RN, et al: Indium-111-Labeled Autologous Leukocytes in Man. *J Nucl Med* **18**: 1014-1021, 1977
- 9) Talstad I: Protection of blood cells by plasma proteins. *Acta Med Scand* **190**: 145-148, 1971
- 10) 千葉一夫: 好中球寿命に関する実験的研究, *日本血液学会雑誌* **28**: 30-37, 1965
- 11) Mauer AM: Leukokinetic studies. II. A method for labeling granulocytes in vitro with radioactive diisopropylfluorophosphate. *J Clin Invest* **39**: 1481, 1960

Summary

Basic Studies on WBC Labeling with ^{111}In -oxine

Makiko SUEHIRO, Masahiro IIO

Department of Nuclear Medicine and Radiological Sciences, Tokyo Metropolitan Geriatric Hospital, Tokyo

Basic studies on chelation of ^{111}In by oxine and on labeling of leucocytes with the chelate, ^{111}In -oxine, were performed.

Fifty to hundred μg s of oxine made chelate complexes with $20\mu\text{Ci}$ – 1mCi of ^{111}In , giving 70–90% chelation efficiency. Using these ^{111}In complexes, leucocytes were successfully labeled: the leucocytes tagged with ^{111}In increased in proportion to the number of cells added.

The ^{111}In -oxine molecules which remained stable in the cells when incubated with plasma at 37°C , showed linear and rather slow increase

depending on incubation time, while whole amount of labeling ^{111}In increased nonlinearly and faster. These stable ^{111}In -oxine molecules are considered to be fixed in the cell membrane structure.

The ^{111}In -leucocytes injected intravenously accumulated into the abscess and gave a clear scintigraphic image in animal studies. However, some unsuccessful studies revealed that the labeling procedure produces impaired leucocytes which have lost the ability to function as normal ones.

Key words: WBC labeling, ^{111}In -oxine