

## 《原 著》

## ポジトロン放出核種を用いた定量的 オートラジオグラフィの試み

高橋 和弘\* 村上松太郎\* 羽上 栄一\* 宮戸 文男\*  
三浦 修一\* 佐々木 広\* 菅野 巍\* 上村 和夫\*

**要旨** ポジトロン放出核種  $^{18}\text{F}$  を用いたオートラジオグラフィ (ARG) の定量化を試みた。 $^{18}\text{F}$  標識トレーサーは  $[^{18}\text{F}]$  2-deoxy-2-fluoro-D-glucose, 動物はラットを用い、標準線源にはラット肝ホモジネートにさまざまな放射能濃度のトレーサーを均等に混合し、毎回調製した。なお標準線源はチューブにつめて、動物組織とともに CMC-Na に包埋し、クライオトームで切片を作り、動物組織と同一切片内に配列した。オートラジオグラムの黒化度はミクロデンシシメータで測定し、コンピューターに入力し画像化して分析した。標準線源の黒化度と放射能濃度から標準曲線を求め、それに基づいて各組織の放射能濃度を決めた。本法で求めた放射能濃度から算出した RI の体内分布は、組織摘出法で求めた値によく一致した。本法は  $^{11}\text{C}$  や  $^{13}\text{N}$  などのさらに半減期の短い核種を用いた ARG の定量化にも利用可能と考えられる。

### I. はじめに

オートラジオグラフィ (ARG) は、標識化合物の生体内挙動を視覚的に捉えられるところから、種々の薬物の前臨床段階として、正常、病態および薬物を負荷した動物での生理学的生化学的動態の定性的解析法として有用な手法である。しかし、近年数量的モデル解析法が重要視される中で、ARG の定量的取り扱いが必要となっている。一方、ポジトロン放出核種を用いた多重標識 ARG の手法が、生体の病態や生理的変化の多元的解析法として注目されている。また、定量性を重視したポジトロンエミッショントモグラフィ (PET) の発展とともに、多くのポジトロン標識薬剤の PET 診断への利用が試みられている。このような背景から、ポジトロン標識薬剤を用いた定量的な動物実験系の確立が待たれており、ポジトロン

放出核種を用いた ARG の定量化は重要な課題となっている。

$^{14}\text{C}$  などの半減期の長い核種を用いた ARG の定量化はすでに確立されているが、半減期の短いポジトロン放出核種を用いた定量的 ARG の報告はない。その主な要因は、標準線源作製の困難さにあると考えられる。

われわれはラット肝ホモジネートにトレーサーを混合して標準線源を作ることにより、この問題を解決し、定量的ポジトロンオートラジオグラフィを試み、良好な結果を得たので報告する。

### II. 方 法

ポジトロン核種として  $^{18}\text{F}$  ( $t_{1/2} = 110\text{分}$ ) を用い、標識薬剤は  $[^{18}\text{F}]$  2-deoxy-2-fluoro-D-glucose ( $^{18}\text{F}$ -FDG) である。動物は雄性ラット (約 200 g) を用いた。

ペントバルビタール (和光, 35 mg/kg ip) 麻酔下で、 $^{18}\text{F}$ -FDG 10 mCi/0.3 ml 生理食塩水 (比放射能, 200 mCi/m mol) を静脈内に投与した。同時に別のラットより約 2 倍容の肝ホモジネートを作り、これと段階的な放射能濃度を有する  $^{18}\text{F}$ -

\* 秋田県立脳血管研究センター放射線医学研究部  
受付：59年1月9日

最終稿受付：59年6月8日

別刷請求先：秋田市千秋久保田町 6-10 (〒010)  
秋田県立脳血管研究センター放射線医学研究部  
高橋 和弘

FDG 溶液を混合し、放射性肝ホモジネートとした。各放射性肝ホモジネートは塩化ビニールチューブに封入して標準線源とし、その放射能濃度は較正された井戸型カウンターを用いて cpm/ml で求めた。

$^{18}\text{F}$ -FDG 投与から 60 分後、動物はジエチルエーテルにより麻酔死させ、5% カルボキシメチセルロースナトリウム(CMC-Na)水溶液に包埋し、ドライアイス一ヘキサン( $-76^{\circ}\text{C}$ )で凍結させた。その際、作製した標準線源を動物のまわりに並べて包埋・凍結させた。

凍結した CMC-Na ブロックは  $-25^{\circ}\text{C}$  にてクライオトーム(LKB, 2250)を用い、厚さ  $20\ \mu\text{m}$  の切片をスコッチテープにはりつけて切り出した。なお標準線源は切片断面と直角に並ぶようにした。切り出した切片は凍結したまま X 線フィルム(コダック、NMC-1)にコンタクトし、 $-25^{\circ}\text{C}$  で 10 時間露光させた。なおコンタクトの際、X 線フィルムと切片の間には厚さ  $10\ \mu\text{m}$  の塩化ビニール膜を空気の封入をさけて均一にはさみ込んだ。

露光後、X 線フィルムを切片からはがし、徐々に室温にもどしてから自動現像機(富士 RU-II, 現像液; 富士 RD-III,  $34.5^{\circ}\text{C}$ , 定着液; 富士-F, 90 秒処理)を通して現像しオートラジオグラムを得

た。得られたオートラジオグラムは、ドラム型マイクロデンシトメータ(阿部設計、Model 2605)を用いてその黒化度を数値化し(アパー・チャ―; $100\ \mu\text{m}$ )、コンピューター(Vax-11/750)に入力してデジタル画像を得、データ解析を行った。

### III. 結 果

#### 1. 標準線源

ラット肝ホモジネートを用いて作製した標準線源のオートラジオグラム上の黒化度の濃度分布を Fig. 1 に示した。得られたオートラジオグラムは直徑約  $4\ \text{mm}$  のほぼ均一な円形を示し、黒化度の均一な範囲に比べて黒化度測定のアパー・チャ―が十分小さいので定量化が可能である。したがってこの標準線源はマイクロデンシトメータによる定量化に要する標準線源として利用が可能であった。

#### 2. Concentration-Density 曲線

標準線源の放射能濃度に対して、対応する X 線フィルムの黒化度をプロットして得られる曲線(以下 C-D 曲線; Concentration-Density curve)を各オートラジオグラムについて作成した(Fig. 2)。放射能濃度はコンタクト時に時間補正した。標準線源は 2 倍希釈系列で調製したが、ほぼそれに一致する放射能濃度であることを確認した。作成し

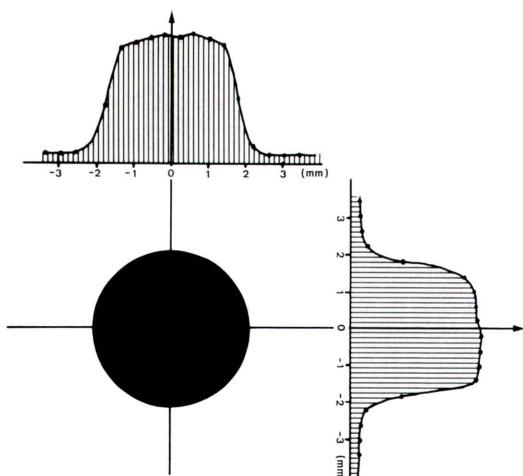


Fig. 1 A profile of a standard source on the autoradiogram.

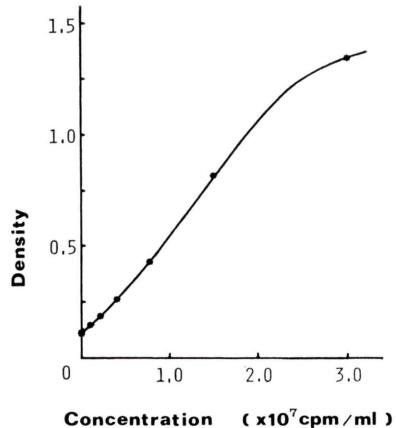


Fig. 2 Concentration-Density curve. Relation between radioactive concentrations at contact with X-ray film (horizontal axis) and optical densities of autoradiogram (vertical axis).

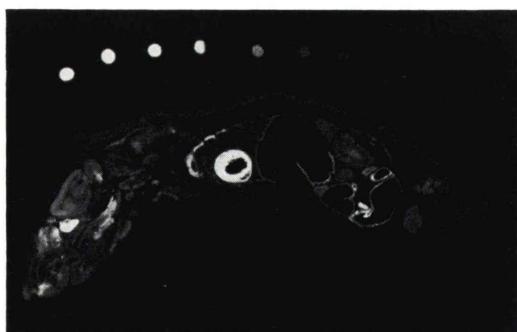


Fig. 3 A  $^{18}\text{F}$ -FDG autoradiogram from an anesthetized rat at 60 min after the injection.

た C-D 曲線は、黒化度 0.5 から 1.0 の範囲では直線性を示したが、その範囲外では直線性を失い sigmoid curve を呈した。

### 3. $^{18}\text{F}$ -FDG の体内分布

$^{18}\text{F}$ -FDG 投与後60分のラット全身オートラジオグラム (Fig. 3) について、作成した C-D 曲線をもとに各臓器の放射能濃度を求めた結果を Table 1 に示す。各臓器の黒化度はばらつきの小さい値を得た。しかし、多くの臓器の黒化度は C-D 曲線上で傾きの小さい範囲にあるので、読み取り誤差は大きいと考えられる。なお放射能濃度は X 線フィルムに動物切片をコンタクトした時間に補正した値である。また、Table 2 はラットにおける  $^{18}\text{F}$ -FDG の体内(臓器)分布を本法により ARG から算出した値と、臓器摘出法から求めた値を比較したものである。両者はきわめてよく相關し ( $r=0.93$ ,  $p<0.005$ )、本定量的 ARG の信頼性が確められた。

### IV. 考 察

定量的オートラジオグラフィの手法は、 $^{14}\text{C}$ -アンチビリンを用いた局所脳血流量の測定にはじまり<sup>1)</sup>、 $^{14}\text{C}$ -デオキシグルコースを用いた局所ブドウ糖代謝量の測定に盛んに利用されている<sup>2~4)</sup>。近年ではアミノ酸代謝量やレセプターとリガンドの結合に関しても in vivo での定量的研究に利用されている<sup>5,6)</sup>。

これらはいずれも人体での PET 測定の基礎と

Table 1 Optical densities of autoradiogram and radioactive concentrations at rat organs

Organs	Optical densities*	Radioactive concentrations**
Blood	0.16±0.006	0.14
Heart	1.25±0.044	2.43
Liver	0.17±0.008	0.17
Kidney	0.23±0.015	0.32
Lung	0.24±0.030	0.36
S. intestine	0.38±0.030	0.62
Brain	0.43±0.020	0.74

\* Values are means±SD

\*\*  $\times 10^7 \text{ cpm/ml}$ , at contact with X-ray film

Table 2 Comparison of the values of tissue uptake fractions of  $^{18}\text{F}$ -FDG at 60 min after injection by two methods

Tissue	Method	
	Quantitative* ARG (%dose/ml)	Tissue excision** (%dose/g)
Blood	0.17	0.15
Heart	3.10	3.31
Liver	0.20	0.27
Kidney	0.39	0.42
Lung	0.45	0.57
S. intestine	0.78	0.97
Brain	0.90	1.27

\* Anesthetized rat

\*\* Mean values of conscious rats ( $n=3$ )

して利用されている。さらに、実際の PET 測定に利用可能なポジトロン標識薬剤を用いた定量的 ARG が実用化すれば、PET 測定の基礎実験の範囲が大きく広がると考えられる。しかし、ポジトロン標識薬剤を用いた定量的 ARG の報告はない。その原因は主として標準線源作製の困難さにあると考えられる。われわれはオートラジオグラム作製時にラット肝ホモジネートを用いて、一定放射能濃度を有するスポット線源を広範囲の濃度にわたって作製し、同一フィルム上に露光させる方法を開発した。その結果、標準線源の実測の放射能濃度とフィルムの黒化度から得た C-D 曲線をもとに、動物各臓器またはより微細な関心領域の黒化度を放射能濃度に換算することができた。本法では、同じ厚さの動物組織と標準線源を同一フィ

ルムに露光させ、同一現像処理を行うことから、各オートラジオグラムについて黒化度と放射能濃度の関係は、動物と標準線源の両者に関して等しく扱うことが可能となる。

次に、本定量的 ARG と臓器摘出法の 2 つの方法で求めたラットにおける  $^{18}\text{F}$ -FDG の体内分布を比較すると、前者の値が単位容量当たりなのに對して後者は単位重量当たりの値であり、単位が異なるために直接比較はできないが、組織の比重を 1 とした場合は両者はよく一致している。ただし、脳については前者の値が小さいが、これは麻酔の影響によると考えられる。両者の一致により、本法は  $^{18}\text{F}$  の定量的 ARG としての有用性が証明された。

しかし、Table 1 からわかるように、オートラジオグラム上の各臓器の黒化度は心臓を除いて低いレベルであり、C-D 曲線の中でも放射能濃度の読み取り上誤差の大きい範囲である。したがって、より信頼性の高い数値を得るために、C-D 曲線から考えて  $^{18}\text{F}$ -FDG の投与量を今回試みた量の 1.5~2.0 倍にすることが望ましい。たとえば、今後脳についてその微細な部分を論ずる場合などではこの RI 投与量に関する検討は重要なポイントとなるであろう。

最後に、他のポジトロン放出核種 ( $^{11}\text{C}$ ;  $t_{1/2}=20$  分,  $^{13}\text{N}$ ;  $t_{1/2}=10$  分)への応用について考察する。本法では RI 投与からコンタクトまでの操作 (RI 投与—標準線源作製—包埋・凍結一切片作製—コンタクト) に 3.5 時間を要し、 $^{18}\text{F}$  ( $t_{1/2}=110$  分) を用いることはできたが、半減期がさらに短い  $^{11}\text{C}$  や  $^{13}\text{N}$  を用いることは時間減衰のため非常に困難であると考える。ただし、全身オートラジオグラフィではなく単一組織 (例えば脳) についてだけのオートラジオグラムを作る場合は、凍結や切片作製時に操作の簡略化および時間の短縮が可能であると予想され、本法の応用が可能となると考えられる。

## V. 結 論

ポジトロン標識薬剤  $^{18}\text{F}$ -FDG を用いた ARG において、肝ホモジネートを用いて標準線源を作製し、ARG 定量化を試みた。動物組織と同一条件でコンタクトした標準線源のオートラジオグラムから C-D 曲線を作成し、これを用いて動物の任意の部位の放射能濃度を数値化した。本法により算出した各臓器の放射能分布は臓器摘出法により求めた値によく一致した。したがって、本法はポジトロン放出核種  $^{18}\text{F}$  を用いた定量的 ARG として有用である。

なお、本論文の要旨は第23回日本核医学会総会において報告した。

## 文 献

- Reivich M, Jehle J, Sokoloff L, Kety S.S: Measurement of regional cerebral blood flow with antipyrene- $^{14}\text{C}$  in awake cats. *J Appl Physiol* **27**: 296-300, 1969
- Sokoloff L, Reivich M, Kennedy C, et al: The [ $^{14}\text{C}$ ] deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization: theory, procedure and normal values in the conscious and anesthetized albino rat. *J Neurochem* **28**: 897-916, 1977
- Goochée C, Rasband W, Sokoloff L: Computerized densitometry and color coding of [ $^{14}\text{C}$ ] deoxyglucose autoradiographs. *Ann Neurol* **7**: 359-370, 1980
- Yonekura Y, Brill AB, Som P, Bennett GW, Fand I: Quantitative autoradiography with radiopharmaceuticals, part 1. digital film analysis system by videodensitometry: concise communication, *J Nucl Med* **24**: 231-237, 1983
- Kennedy C, Suda S, Smith CB, Miyaoka M, Ito M, Sokoloff L: Changes in protein synthesis underlying functional plasticity in immature monkey visual system. *Proc Natl Acad Sci USA* **78**: 3950-3953, 1981
- Rainbow TC, Bleisch WV, Biegdon A, McEwen BS: Quantitative densitometry of neurotransmitter receptors. *J Neurosci Meth* **5**: 127-138, 1982

## Summary

### **Method for Quantitative Autoradiography with Positron Emitters**

Kazuhiro TAKAHASHI, Matsutaro MURAKAMI, Eiichi HAGAMI, Fumio SHISHIDO,  
Shuichi MIURA, Hiroshi SASAKI, Iwao KANNO and Kazuo UEMURA

*Department of Radiology and Nuclear Medicine, Research Institute for Brain  
and Blood Vessels-AKITA, Akita city, Akita, Japan*

Quantification of positron autoradiography (ARG) obtained with positron emitter  $^{18}\text{F}$  was carried out with a computerized imaging system. Quantitative analysis of ARG is essential in the study of pharmacokinetics of any radiopharmaceuticals in normal and diseased state of animals. Recently, many techniques for quantitative ARG were established using  $^{14}\text{C}$  and  $^3\text{H}$ . But ARG with very short lived positron emitting nuclides (e.g.  $^{11}\text{C}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{13}\text{N}$  etc.) have not been treated quantitatively because of difficulty to get the calibrated standard sources for quantification of ARG. Now we tried a new technique for quantitative ARG with positron emitter,  $^{18}\text{F}$ , in which we made the standard sources for each ARG. A positron emitting radiopharmaceutical [ $^{18}\text{F}$ ] 2-deoxy-2-fluoro-D-glucose ( $^{18}\text{F}$ -FDG) was administered intravenously to rats. The rats were killed at 60 min after injec-

tion, embedded in 5% CMC-Na solution and frozen at  $-76^\circ$ . The standard sources which have various concentrations of radioactivity were made of rat liver homogenates containing  $^{18}\text{F}$  radioactivity, packed in each tube and put in the CMC-Na surrounding the rat. The frozen CMC-Na block was cut into 20  $\mu\text{m}$  thick sections consisting of rat and standard sources. From these sections ARG was taken by conventional method. The optical densities of ARG of the standard sources were plotted against its net radioactive concentrations measured by the well counter. By means of this relation we can determine the absolute values of radioactive concentration ( $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ ) at any region of ARG, or which indicates uptake function (% dose/ml tissue) for organs.

**Key words:** Autoradiography, Rats,  $^{18}\text{F}$ -FDG.