

《ノート》

 ^{14}C -標準線源を用いた ^{18}F -オートラジオグラムの定量化The Quantitation of ^{18}F -Autoradiogram Using ^{14}C -Standard Sources

村上松太郎* 高橋 和弘* 羽上 栄一* 近藤 靖**
 飯田 秀博* 三浦 修一* 佐々木 広* 菅野 巖*
 上村 和夫*

Matsutaro MURAKAMI*, Kazuhiro TAKAHASHI*, Eiichi HAGAMI*,
 Yasushi KONDO**, Hidehiro IIDA*, Shuichi MIURA*,
 Hiroshi SASAKI*, Iwao KANNO* and Kazuo UEMURA*

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

I. 緒 言

物理的半減期の異なる核種により標識された数種の化合物を用いて、同一個体、同一切片から数種の情報を得る多重標識オートラジオグラフィが注目されている。本法において、実験時間およびフィルムへの露光時間などの点で、最も使用しやすく、実際、頻度の高いものに ^{18}F -化合物 (T 1/2 110 min, B^+ : $E_{\text{max}}=635 \text{ KeV}$) と ^{14}C -化合物 (T 1/2 = 5,730 y, B^- : $=156 \text{ KeV}$) の組み合わせがある。現在までこれらオートラジオグラムの定量化は、 ^{14}C -化合物については市販の ^{14}C -校正線源を、 ^{18}F -化合物については実験者が作製した線源を用いて行われていた。 ^{18}F -校正線源は脳や肝ホモジネートと ^{18}F -化合物との混合物から調製されたが^{1,2)}、その半減期が短いために、実験のつど、作製することを余儀なくされていた。一方、近年で

は組織内 ^{18}F 濃度を ^{18}F -ゼラチン線源で校正する方法が報告された³⁾。しかしながら、ゼラチンと組織間で ^{18}F からの B^+ の自己吸収率は異なる可能性がある。そこで著者らは長期使用を目的として ^{14}C -線源を作製し、本線源による optical density と、 ^{18}F -4-fluoroantipyrine (^{18}F -FAP) 投与脳の ^{18}F -放射能による optical density を比較することで、 ^{14}C -線源の optical density を脳内 ^{18}F 濃度に校正する方法を試み、その妥当、有用性を確認したので報告する。

II. 方 法

1. ^{14}C -線源の作製

ラット肝の2倍容生理食塩液ホモジネート 200 μl に、 ^{14}C -水溶液の添加量を変化させて加え、最終的に 0, 0.625, 1.25, 6.75, 10.0 $\mu\text{Ci}/300 \mu\text{l}$ の ^{14}C -肝ホモジネートを調製した。本品を凍結後、各濃度につき14枚ずつカバーガラス上に 20 μm 厚で切り出し 60°C で乾燥後、5段階の ^{14}C 濃度を含む14組の標準線源を作製した (Fig. 1)。

2. ^{14}C -線源の校正

^{18}F -FAP を Shiue⁴⁾ らの方法に準じて合成した。

Key words: ^{14}C -standard source, ^{18}F -FAP, Quantitative autoradiography, ^{18}F -FDG.

* 秋田県立脳血管研究センター放射線医学研究部

** 同 神経内科学研究部

受付: 60年12月19日

最終稿受付: 61年2月6日

別刷請求先: 秋田市千秋久保町 6-10 (☎ 010)

秋田県立脳血管研究センター

放射線医学研究部

村 上 松 太 郎

約 20 mCi の ^{18}F -FPA をラットに投与し、60分間の平衡を待ったのち屠殺した。摘出脳の大脳半球について 20 μm 厚の切片を作製し、上記 ^{14}C -肝標準線源と同一フィルム (Kodak, NMC-1 $\text{\textcircled{R}}$) に室温下 8 時間密着しオートラジオグラムを得た。残る半球は、その単位重量あたりの ^{18}F -放射活性を Well カウンターにて測定した。本操作をフィルムと脳切片との密着開始時間を変えて行い、数段階の ^{18}F -放射能と ^{18}F によるフィルム黒化度との関係を得た。これら ^{18}F による黒化度と ^{18}F -放射能との間に存在する回帰直線式に、 ^{14}C による黒化度を代入することでおのおの ^{14}C -標準線源による黒化度をラット脳内 ^{18}F -濃度に校正した (Fig. 1)。

3. オートラジオグラフィ

本標準線源の妥当、有用性を確認する意味で ^{18}F -FAP, ^{18}F -FDG を用いて定量的オートラジオグラフィを行った。

体重 300~500 g の雄性 Wistar ラットを用いた。4% Halothane, O_2 : N_2O (1/1) 1 L/min で麻酔導入後、1% Halothane に切り換え、両側大腿動脈、片側大腿静脈にそれぞれ外径 0.9 および 0.8 mm のポリエチレンカニューレを挿入しヘパリン栓をした。ついでラットの腹部から後肢をギブス固定し 2 時間以上の覚醒を待ったのち以下の測定を行った。

脳糖消費量: Sokoloff らの方法⁵⁾ に準じて測定した。すなわち、 ^{18}F -2-deoxy-2-fluoro-D-glucose

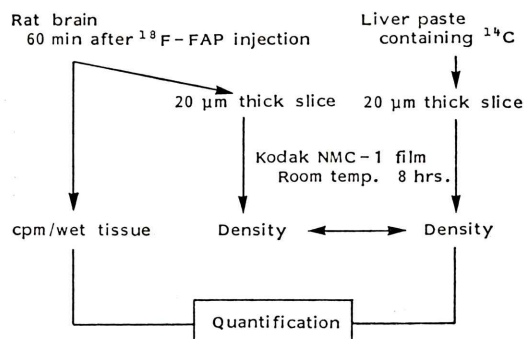


Fig. 1 Preparation and calibration of ^{14}C -sources for ^{18}F -radioactivity in the 20 μm thick slice of rat brain.

(^{18}F -FDG) 5~8 mCi/0.4 ml/body を静脈カニューレから 30 秒かけて注入した。注入開始から 1 分までは 5 秒ごと、1 分から 5 分までは 1 分ごと、その後 10, 15, 30, 45 分の各時点で動脈血を約 60 μl ずつ採血した。最終採血の直後に断頭屠殺し、脳を -80°C に冷却した iso-pentane 中に摘出した。摘出脳は、 -20°C で 20 μm 厚の切片に切り出し 60°C で 5 分以上乾燥させたのち、Kodak NMC-1 $\text{\textcircled{R}}$ フィルムに上述の ^{14}C -標準線源とともに室温下 8 時間密着した。一方、採血した動脈血は冷却遠心後、血漿 20 μl を正確に分取し、その ^{18}F -FDG 放射活性を標準線源校正時に脳内 ^{18}F -放射能の実測に用いたものと同じ Well カウンターにて測定した。なお、トレーサー注入開始直前と約 40 分後の時点で血糖値、ヘマトクリット、血液ガス分圧、pH を測定した。体血圧は終始連続的にモニターした。

脳血流量: Sakurada⁶⁾ らおよび Sako¹⁾ らの方法に準じ、二重標識オートラジオグラフィ法により測定した。すなわち、[N-methyl- ^{14}C]-4-iodoantipyrine (^{14}C -IAP) 100 $\mu\text{Ci/kg}$ と ^{18}F -FAP 5~10 mCi/body を静脈カニューレから 1 分間かけて混合注入した。注入開始から終了までの間、約 3 秒ごとに約 60 μl ずつの動脈血を採血した。注入開始後 1 分の時点で断頭屠殺し、前述同様の手技により 20 μm 厚の切片を得た。本切片と前述の ^{14}C -標準線源を Kodak NMC-1 $\text{\textcircled{R}}$ フィルムに室温下 8 時間密着させ ^{18}F による画像を得た。ついで 2~3 日間 ^{18}F の減衰を待ったのち同フィルムに市販の校正線源 (Amersham) とともに 7 日間密着させ、同一切片の ^{14}C による画像を得た。採取した動脈血は二分し、一方は Well カウンターにて ^{18}F -FAP 放射活性を、他方は 3 日後に液体シンチレーションカウンターにて ^{14}C -IAP 放射活性をそれぞれ測定し、単位重量当たりの放射能を求めた。生理学的パラメータの測定は、トレーサー注入直前のみに行った。なお、 ^{14}C -IAP の測定に際しては、 ^{14}C -toluene (New England Nuclear) を外部標準として同時に測定した。

密着の終了したフィルムの現像は自動現像機

(富士 RU-II, 現像液; RD-III, 34.5°C , 定着液; 富士 F) を用いて行いオートラジオグラムを得た. 本オートラジオグラムの黒化度を, 6~7 脳切片の両半球についてデンストメーター (阿部設計, 2605 型) にて読み取りその平均値を計算に用いた. また二重標識オートラジオグラムの場合, ^{18}F -画像に含まれる ^{14}C の関与は, ^{14}C -画像に 8 hrs/ (24 \times 7 days) を乗じたものを差し引いて補正した.

計算: 脳糖消費量は Sokoloff らの ^{14}C -2-deoxy glucose (^{14}C -DG) 法⁵⁾ に基づき, ^{14}C -DG の lumped constant および速度定数 ($k^*_1 \sim k^*_3$) を用いて計算した. 脳血流量は, ^{14}C -IAP については partition coefficient (λ)=0.80, single pass extraction (m)=1.0 を用い⁶⁾, ^{18}F -FAP については λ =0.89, m =1.0 として⁷⁾ それぞれ計算した.

III. 結 果

^{18}F -FAP 投与ラットの脳内 ^{18}F -放射エネルギーと optical density との関係, 市販の ^{14}C -校正用標準線源の場合と併せて Fig. 2 に示した. Optical density は, いずれもフィルムベースの黒化度を減じた値で示した. 脳内 ^{18}F および脳内 ^{14}C 濃度と optical density との間にはいずれも原点を通る直線関係が存在し, 脳内 ^{18}F の場合, optical density = $0.024 \times ^{18}\text{F}$ cpm/g なる回帰式が得られた. 一方, ラット肝より今回作製した14組の ^{14}C -標準線源は 0.879 ± 0.086 , 0.557 ± 0.087 , 0.129 ± 0.016 , 0.073 ± 0.013 , 0 ± 0 の optical density を有した. これらを個々に上記回帰式に代入校正し, 脳内 ^{18}F 量として 39.214 ± 3.702 , 25.375 ± 4.197 , 5.750 ± 738 , 3.268 ± 665 , 0 ± 0 cpm/g brain に相当する ^{14}C -標準線源を得た.

Table 1 に今回定量的オートラジオグラフィに用いた動物の生理学的パラメータを示す. 脳糖消費量測定の前直前の値に比べ屠殺時点でヘマトクリット値が 3~4% 減少したが, その他の値に変化は認められなかった. ^{18}F -FDG および ^{18}F -FAP と今回 ^{14}C にて作製した ^{18}F -校正用標準線源を用いて測定した覚醒ラットの脳糖消費量, 脳血流量を Table 2 に示す. 脳を 2~3 分割してから切

片作製を行ったため試料台周辺の切片が得られなかったことに加え, 判定に確証を持ってない脳部位についてはその黒化度を読み取らなかったため, 測定部位は少ないものの報告とほぼ一致した値が得られた.

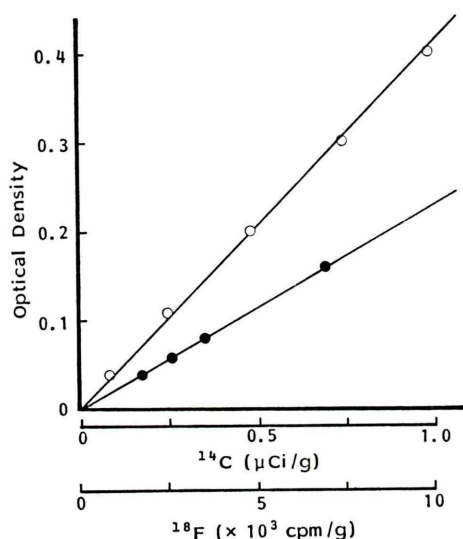


Fig. 2 The correlation between optical density and radioactivity. ^{14}C - and ^{18}F -autoradiograms were obtained from 7 days and 8 hrs exposures, respectively. Optical density is the value that was subtracted the film-base density. Open circles represent the one case of the correlation between optical density and ^{14}C -radioactivity using commercially available sources which was calibrated for ^{14}C -radioactivity in the 20 μm thick brain. Closed circles represent the correlation between the mean of ten optical densities which were obtained from 20 μm thick slices of rat brain after ^{18}F -FAP injection.

Table 1 Physiological variables in 5 rats

Physiological variables	Mean \pm S.D.
MABP (mmHg)	136 ± 7
Hematocrit	48.1 ± 4.1
PaO ₂	107 ± 16
PaCO ₂	41.4 ± 5.3
pH	7.30 ± 0.06

The represented values were determined just before measurement of CMRGlc or CBF.

Table 2 Local cerebral metabolic rate of glucose and local cerebral blood flow using ^{18}F -labelled tracers and ^{14}C -standard source

Structure	CMRGlc* (mg/100 g/ min)	CBF† (ml/100 g/ min)
Gray matter		
Visual cortex	17.7±0.4	117
Auditory cortex	27.2±1.8	252
Parietal cortex	19.2±1.6	200
Sensory-motor cortex	23.4±0.7	230
Frontal cortex	19.4±1.7	146
Thalamus: lateral nucleus	19.2±1.6	186
Thalamus: ventral nucleus	17.4±1.1	164
Medial geniculate body	19.9±1.2	198
Lateral geniculate body	14.3±0.3	164
Hypothalamus	11.4±0.9	100
Mammillary body	17.7±1.2	121
Hippocampus: ammon's horn	11.5±1.1	96
Hippocampus: dentate gyrus	14.1±2.0	113
Amygdala	13.2±1.7	106
Septal nucleus	12.7±0.5	102
Caudate-putamen	16.7±0.3	136
Nucleus accumbens	13.8±0.7	123
Globus-pallidus	12.0±0.0	92
Substantia nigra	10.1±0.9	129
Vestibular nucleus	22.1±2.3	184
Superior olivary nucleus	23.3±2.2	172
Superior colliculus	15.7±2.5	139
Cerebellar cortex	12.4±1.4	77
Cerebellar nucleus	19.3±2.3	107
White matter		
Corpus callosum	6.7±0.3	55
Internal capsule	8.9±1.0	52

*The values represents the mean±standard errors from measurements using ^{18}F -FDG in three conscious rats.

†The values are the mean from measurements using ^{18}F -FAP in two conscious rats.

IV. 考 察

^{18}F -標識化合物を用いた定量的オートラジオグラフィは多重標識オートラジオグラフィの出現とともにその有用性が高まっている。しかしながら組織内 ^{18}F -濃度定量のための標準線源が市販されていないために、各施設で各実験ごとに作製する必要があった。事実著者らもラット肝ホモジネートに ^{18}F を混入した標準線源を作製し、オートラジオグラムおよび組織摘出法により得られた

% dose/g を比較し、よい一致を見た²⁾。また紙を ^{18}F 液に浸した線源を ^{18}F -FDG 投与ラットの肝実放射能と optical density の関係で補正使用し同一ラットの脳糖消費量を計算してきた。しかしながら、これらはいずれも ^{18}F の肝組織内吸収率が脳のそれと等しいと仮定していた点に問題を残していた。この自己吸収に関する問題は ^{18}F -ゼラチンを用いて ^{14}C -線源を補正する場合³⁾ にも同様である。

そこで長期使用を目的として ^{14}C -肝スライスを作製し、 ^{18}F -FAP 投与ラットの脳にて補正する方法を試みた。今回作製使用した ^{14}C -肝線源の一部は較正のための ^{18}F -FAP による optical density を超える高い density を示していたが、著者らによって以前行われた ^{18}F -紙線源を用いた実験で、少なくとも optical density 0.7 までは ^{18}F 放射能との間に明らかな直線性を示し、1.0 までもほぼ直線関係が得られている事実から、回帰直線式に代入補正することは問題ないと考えられた。また、方法で述べた量の ^{18}F -トレーサーを投与したラット脳のオートラジオグラムは作製較正した ^{14}C -標準線源の低濃度側に位置していた。しかしながら、Fig. 2 に示したように ^{14}C , ^{18}F ともに optical density の低い側においても直線性を失っていないことから極端な誤差は生じないものと考えられた。

本標準線源を用いて ^{18}F -FAP によるラット脳血流量を測定した。その結果、 ^{18}F -FAP による測定値は ^{14}C -IAP を用いた著者らの今回の測定値 ($r=0.935$, $p<0.0001$) また Sakurada らによる Sprague-Dawley ラットについての報告値⁶⁾ ($r=0.885$, $p<0.001$) とよく相関した。著者らは ^{18}F -FAP の血流測定用トレーサーとしての評価を行っており、生体内での早い代謝を指摘した⁷⁾。しかしながらオートラジオグラフィは、動物の生理的状态、実験手技、切片の厚さの不均一性、トレーサーの移動など種々の誤差要因を含むため、 ^{18}F -FAP の不安定さがどれほど測定値に影響するか断言はできない。実際、仮に $\lambda=1.0$ と仮定し、動脈血中の放射性代謝産物を補正して血流量値計

算した場合でさえ約 15% の差に留まった。一方、 ^{14}C -IAP も生体内における不安定さが報告されており⁸⁾、 ^{18}F -FAP の正確な λ が判明しない現在では少なくとも ^{18}F -FAP は ^{14}C -IAP に匹敵する測定値を与えると言える(投稿準備中)。また、 ^{18}F -FDG を用いた脳糖消費量は、定数をすべて ^{14}C -DG モデル⁵⁾に従った場合、Sokoloff らの報告値⁵⁾に比べ約 20% の過小値を与えた($y=3.1+0.79x$, $r=0.936$, $p<0.001$)。これは Reivich ら⁹⁾により報告された約 18% 過小評価ともほぼ一致しており、今回作製した ^{14}C -肝標準線源の妥当、有用性が確認された。

以上のように ^{14}C -線源を ^{18}F -FAP により較正使用することで ^{18}F -オートラジオグラムの定量解析は十分可能であると考えられた。また同様手法により ^{11}C -IAP, ^{125}I -IAP を用いて較正し、それぞれ組織内 ^{11}C および ^{125}I 定量用 ^{14}C -線源の作製も可能と考えられた。

今回は標準線源のベースとして肝を用いたが、保存環境を考慮する必要がなく恒常的により安定したベースを使用し、脳オートラジオグラムに同等の optical density を有する標準線源が望まれる。

V. 結 語

1) 脳内 ^{18}F 量の測定のため長期使用を目的とした ^{14}C -肝標準線源を作製した。

2) ^{14}C -肝線源は ^{18}F -FAP を用いて脳内 ^{18}F 量に較正した。

3) ^{18}F -FAP, ^{18}F -FDG を用いて脳血流量、脳糖消費量を測定し、既報告値と一致した値が得られ、有用性が確認された。

文 献

- 1) Sako K, Diksic M, Kato A, et al: Evaluation of [^{18}F]-4-fluoroantipyrine as a new blood flow tracer for multiradionuclide autoradiography. *J Cereb Blood Flow and Metabol* **4**: 259-263, 1984
- 2) 高橋和弘, 村上松太郎, 羽上栄一, 他: 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. *核医学* **21** (11): 1389-1393, 1984
- 3) Kameyama M, Kawashima K, Shirane R, et al: Quantitative positron autoradiography by simplified standardization procedure-Measurement of CMRgl using ^{18}F FDG. *Brain* **85** Scientific Programme Abstracts. 413. 1985. 12th International Symposium on Cerebral Blood Flow and Metabolism. Lund/Ronneby, June, 1985
- 4) Shiue C-Y, Wolf AP: Synthesis of 4-fluoro-2, 3-dimethyl-1-phenyl-3-pyrazoline-5-one (4-fluoroantipyrine) and ^{18}F -labeled analog by direct fluorination of antipyrine with molecular fluorine. *J Lab Compds Radioph* **18**: 1059-1066, 1981
- 5) Sokoloff L, Reivich M, Kennedy C, et al: The (^{14}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
- 6) Sakurada O, Kennedy C, Jehle J, et al: Measurement of local cerebral blood flow with iodo [^{14}C] antipyrine. *Am J Physiol* **234**: H59-H66, 1978
- 7) Murakami M, Takahashi K, Hagami E, et al: Early metabolism of ^{18}F -4-fluoroantipyrine in rat. *Brain* **85** Scientific Programme Abstracts, 394, 1985
- 8) Flora JH, Phillips DF, Arcidiacono F, et al: Distribution of 4-iodo-antipyrine after intravenous injection in the rat. *Cir Res* **11**: 252-257, 1962
- 9) Reivich M, Kuhl D, Wolf A, et al: The [^{18}F] fluorodeoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization in man. *Circ Res* **44**: 127-137, 1979