

《原 著》

RI による白血球標識 (I)

—— 標識の諸条件 ——

末広 牧子* 飯尾 正宏*

要旨 ^{111}In 標識白血球による炎症の *in vivo* 検出を試みるにあたり、白血球標識に与える ^{111}In -キレート化合物の、量的、質的影響を検討した。

脂溶性、水溶性 6 種のキレート化合物による標識率の比較では、脂溶性の ^{111}In 化合物がより高い標識率を示した。しかし、なかでも最も高標識率を示した ^{111}In -アスコルビルパルミテートを用いた標識白血球による炎症巣の描出は失敗に終わり、標識率だけではなく、標識白血球の質的な変化の有無も問われる必要があることがわかった。

同程度の標識率を示した ^{111}In -アセチルアセトン、 ^{111}In -オキシシンについては、血漿タンパクとの相互作用後も、血球中に 50% 以上の標識 ^{111}In を残留させることのできた ^{111}In -オキシシン標識の方が、90% 以上の標識 ^{111}In を血漿中に遊離させてしまう ^{111}In アセチルアセトン標識よりもすぐれていることがわかった。

I. はじめに

RI による血球標識は、ある種のキレート剤を介して行なえる。この機序はまだ明らかでないが、キレート剤の選択が、重要なポイントであると思われる。Thakur らは、多くの金属元素とキレートをつくるオキシシン (8-Hydroxyquinoline) に注目し、 ^{111}In -オキシシンによる血球標識を試みた¹⁾。臨床応用の報告も行なっている²⁾。

われわれは、RI 標識白血球による炎症巣の *in vivo* 検出を行なうにあたり、キレート剤の選択の問題も含めて、標識の諸条件と、その機序を検討するため、基礎的研究を行なったので、ここに、2 編に分けて報告する。本稿は、各種キレート剤の選択を中心に、また、続編では、現在汎用されようとしている ^{111}In -オキシシンによる白血球標識について論じたいと思う。

II. 方 法

1. 標識用放射性同位元素

標識用 RI としては ^{111}In を用いた。 ^{111}In -キレート化合物調製のための塩化インジウム (^{111}In) は、日本メジフィジックス社より提供を受けた。

2. ^{111}In -キレート化合物の調製

6 種のキレート剤—オキシシン、アセチルアセトン、アスコルビルパルミテート、クエン酸、グリシン、アスコルビン酸—を選び、 ^{111}In -キレート化合物を調製した。これらの試薬は、すべて ^{111}In と反応してキレート化合物をつくる。

^{111}In -キレート化合物の生成は、酢酸緩衝液中 (pH 5~8) で、塩化インジウム ($^{111}\text{InCl}_3$) と、それぞれのキレート剤を反応させて行ない。未反応の ^{111}In と、 ^{111}In -キレート化合物との分離は、オキシシン、アセチルアセトン、アスコルビルパルミテートではジクロロメタンによる抽出法、クエン酸、グリシンでは陽イオン交換法、そして、アスコルビン酸の場合にはキレート樹脂による方法を用いて行なった。ジクロロメタンによって抽出された ^{111}In -キレート化合物は、窒素気流下ジク

* 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 (☎ 174)

東京都養育院附属病院核医学放射線部

末 広 牧 子

ロルメタン蒸発後、エタノール-生食 (1:4 または 1:1) に溶かして、白血球標識用とした。また、陽イオン交換樹脂、キレート樹脂からの ^{111}In -キレート化合物の溶出は、生理食塩水を用いて行ない、各溶出フラクションの ^{111}In を測定した後、ピークに相当する溶出液を、白血球標識用とした。陽イオン交換樹脂、および、キレート樹脂は、それぞれ Dowex 50 W, Dowex A1 を用いた。

3. 白血球の分離

標識用白血球は、ラット (300~400 g) の動脈血から次の操作により得た。動脈血は ACD 溶液を入れた注射筒に、ACD:血液が 1:4 となるようにとり、2% メチルセルロース-生理食塩水溶液を加えてよく混和した後、約 1 時間静置する。赤血球沈降後、上清をとり、生食を加えて ~2,000 rpm で 5 分間遠心する。次に、白血球中に混入し遠沈された残存赤血球を溶血させるため、蒸留水 500~1,000 μl を加えて 1 分間放置した後、1.8% 食塩水を加えて等張にもどし、さらに、4~5 倍の生食を加えて遠心する。沈んだ白血球を生食で洗浄、遠沈し、生食に懸濁させて、標識用白血球とした。

懸濁白血球数は、血球計数板を用いて調べた。

4. ^{111}In -キレート化合物による標識白血球の調製

^{111}In -キレート化合物による白血球標識は、方法 3 で得た白血球の懸濁液に、方法 2 による ^{111}In -キレート化合物を加えて、約 1 時間、37°C でインキュベーションして行なった。その後、この反応混合物を遠心、洗浄して、標識白血球を得る。

各 ^{111}In -キレート化合物による白血球標識の対照として、塩化インジウム溶液中のイオン形 ^{111}In による白血球標識についても検討した。この場合、塩化インジウム溶液は、酢酸緩衝液中で pH 6~8 とした後、白血球懸濁液に加えて、インキュベーションした。

5. ^{111}In 標識白血球と血漿の相互作用

4 の操作で得た ^{111}In 標識白血球について、その血漿との相互作用をみた。 ^{111}In 標識白血球の懸濁液 100 μl (4~5 $\times 10^5$ の白血球を含む) に、

血漿 20~1,000 μl を加え、約 30 分~1 時間、37°C でインキュベーションした後、遠心、洗浄し、さらに遠沈させた白血球に標識されている ^{111}In を測定した。

6. 動物を用いた炎症の in vivo 検出

上記の方法で得られた ^{111}In -白血球の生体内での動きをみるため、炎症を動物につくり、 ^{111}In -白血球を静注して、その動きを γ カメラで経時追跡した。動物は、ラット (~300 g) を用い、炎症は、テレピン油-流動パラフィン (1:1) 0.1 ml を皮下注入してつくった。 ^{111}In -白血球の注入は、テレピン油注入後、20~24 時間後に行なった。

III. 結 果

各 ^{111}In -キレート化合物による白血球標識率を Table 1 にあげる。表中には、対照としたイオン形 $^{111}\text{In}^{3+}$ による標識結果も記した。表中の値は、数回の結果から得たもので、各回のばらつきを含めて記してある。白血球は、生体内物質であるため、その in vitro での標識率は、各回の標識条件によって大きく左右され、かなり大きなばらつきがあった。

Table 1 より明らかなことは、水溶性のキレート化合物、 ^{111}In -クエン酸、 ^{111}In -グリシン、 ^{111}In -アスコルビン酸に比べて、脂溶性のキレート化合物、 ^{111}In -オキシシン、-アセチルアセトン、-アスコルビルパルミテートの方が、高い標識率を示すということである。なかでも、 ^{111}In -アスコルビルパルミテートが、最も高い標識率を示した。

アスコルビルパルミテートは、分子量 414 のエ

Table 1 WBC labeling efficiency with various chelate compounds

Chelate compound	Labeling efficiency (%) WBC: 4×10^6
^{111}In -oxine	15 -32
^{111}In -acetylacetone	16 -19
^{111}In -ascorbylpalmitate	43 -54
^{111}In -citrate	4.9
^{111}In -glycine	3.8- 4.7
^{111}In -ascorbic acid	2.9
$^{111}\text{InCl}_3$ (control)	16 -36

ステル化合物である。高い白血球標識率のほかに、分子内に炎症への集積性を示すといわれているアスコルビン酸の構造の一部を持つことから、良い *in vivo* 炎症検出用白血球標識試薬として期待できると思われた。しかしながら、Fig. 1 に示すように、炎症を持つラットを用いて行なったシンチスキャンでは、 ^{111}In -アスコルビルパルミテートを用いて標識した白血球は、肺にのみ集積、かつ長時間（1週間以上）残留し、炎症を起こしている右後足、および右肩には、ほとんど集積がみられなかった。

^{111}In -オキシシン、 ^{111}In -アセチルアセトン、塩化インジウム ($^{111}\text{In}^{3+}$) は、Table 1 中、同程度の白血球標識率を示している。これら、同程度の標識

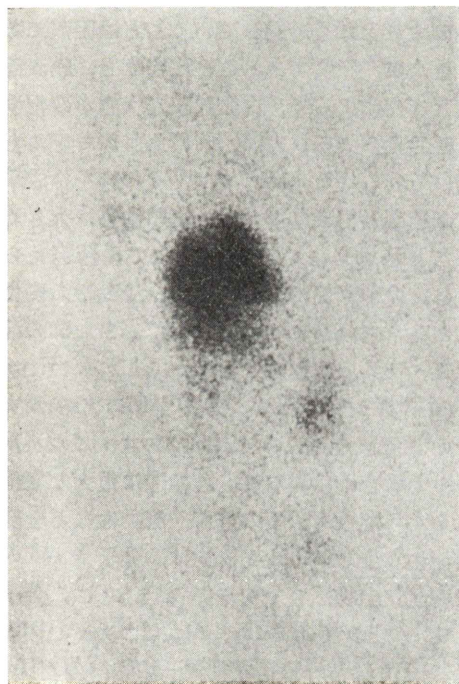


Fig. 1 Scintigraphic anterior image of an abscess bearing rat given intravenously ^{111}In leucocytes labeled with ^{111}In -ascorbylpalmitate. Abscesses were induced by subcutaneous injection of turpentine oil-liquid paraffin (1:1) mixture into the right hind leg and the right shoulder. The ^{111}In -leucocytes failed to visualize the abscesses.

率を示す3つの物質によって標識された白血球が、血中に投与された場合、血漿タンパクは、標識 ^{111}In にどのように作用するだろうか。これは、標識の質の問題である。血漿タンパクとの相互作用によって、 ^{111}In が血球から遊離するようでは、標識の質が悪く、不適格であるといわざるを得ない。Fig. 2 におおのの標識白血球を血漿中でインキュベーションした結果を示す。血漿の代わりに、生理食塩水 1,000 μl を加えてインキュベーションした場合の白血球中に残った ^{111}In 量を 100 としてプロットしてある。この血漿ぬきのインキュベーション後の ^{111}In 標識白血球の回収率は、 ^{111}In -オキシシン、 ^{111}In -アセチルアセトン、 $^{111}\text{In}^{3+}$ それぞれについて、87%, 89%, 85%であった。これは、これらの標識 ^{111}In が、いずれの場合にも、生理食塩水中という環境のなかでは、安定であることを示している。ところが、血漿を、10, 120... 100 μl ... と加えていくに従って、 ^{111}In は白血球から離れはじめ、血漿中に流れ出していく。なかでも、 ^{111}In -アセチルアセトンによる標識白血球からの ^{111}In 遊離率が最も大きく、多量の血漿中では、その標識 ^{111}In のうち約90%が、白血球から失われることがわかった。これに対して、 ^{111}In -

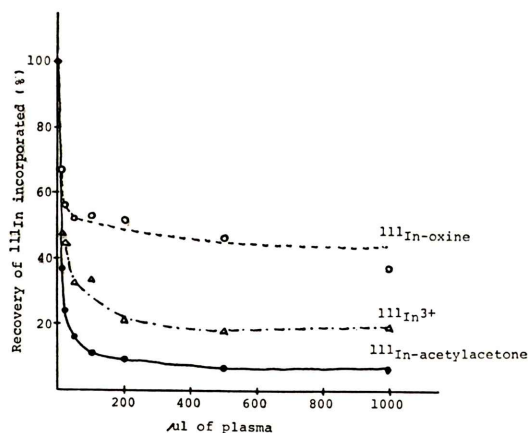


Fig. 2 Interaction between ^{111}In chelate compounds incorporated into leucocytes and plasma protein.

Hundred μl s of leucocytes suspension, which contained $4-5 \times 10^5$ of the cells, were incubated with 20-1000 μl of plasma.

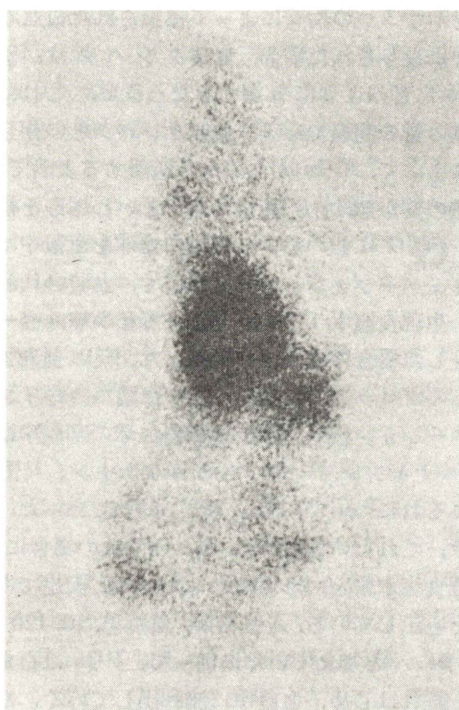


Fig. 3 Scintigraphic anterior image of an abscess bearing rat given intravenously ^{111}In leucocytes labeled with ^{111}In -acetylacetone.

Abscesses were made in the right hind leg and the right shoulder.

オキシシンによる標識白血球では、約 50 %の ^{111}In が血球中に残り安定であった。 $^{111}\text{In}^{3+}$ による標識の場合は、標識 ^{111}In 遊離率は約80%であった。

Fig. 3 に、 ^{111}In -アセチルアセトンによって標識した白血球を使った in vivo 炎症検出の一例を示す。炎症のある右後足、右肩には、たしかに ^{111}In の集積がみられるが、Fig. 2 から予想できるとおり、多量の遊離 ^{111}In のために、バックグラウンドが高かった。

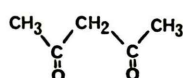
IV. 考 察

血球標識は、 ^{111}In -キレート化合物が、血球表面に吸着し、血球膜内に透過することによって行なわれるといわれている^{1,3,4)}。膜透過性は、脂溶性の大きいものほど大きい³⁾。膜表面への吸着も、生理食塩水懸濁液という条件下では、脂溶性の大きいものほど大きいだろう。とすれば、血球

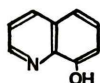
標識は、脂溶性の ^{111}In -キレート化合物を用いた方が、より効率よく行なえると予測できる。われわれの得た結果は、この予測に合致していた (Table 1)。

血球表面に到達し吸着した ^{111}In キレート化合物は、血球膜構成物質と相互作用しながら、膜内を透過して行く。もし、 ^{111}In -アスコルビルパルミテートが、この段階を無事円滑に通過できれば、その高い標識率から考えて、良い白血球標識剤となったであろう。しかし、実際は、 ^{111}In -アスコルビルパルミテートで標識した白血球は、炎症巣に集積し得なかった。これは、アスコルビルパルミテートの分子の大きさと立体構造、および、その脂質としての性質に関係があると思われる。まず第一に、この化合物の場合、血球膜構造に変化を及ぼすことなく透過していくことは困難であろう。第二に、脂質であるこの化合物と、膜表面との相互作用によって、白血球膜の状態が変化することが考えられる。実際、簡単な血球モデルとして用いられる Liposome では、その膜を構成する脂質の種類と組成によって、膜の性質は大きく変わることが知られている^{5,6)}。この場合考えられるのは、血球表面の電荷の変化、流動性の変化などである。これらの変化によって、白血球の活性が低下、あるいは死滅するのかもしれない。

^{111}In -オキシシン、あるいは、 ^{111}In -アセチルアセトンの血球膜透過は、 ^{111}In -アスコルビルパルミテートの場合とは異なり、膜構造に重大な変化をもたらす可能性も、膜の電荷、流動性などを変える可能性も少ない。オキシシンは、分子量 145 の複素芳香族化合物、アセチルアセトン は、分子量 100 のジケトンである (Fig. 4)。これらの ^{111}In 錯体は、 ^{111}In 錯体—膜構成物質—細胞内の ^{111}In 結合タンパクというダイナミックな平衡関係に左右されながら、血球膜を透過していく。オキシシンと ^{111}In の錯体の場合には、オキシシンと ^{111}In が 3:1 の割合で結合したものが、最も膜透過性が大きい。これに対して、1:1 のもの、すなわち、陽イオンの状態にあるものは、膜透過性が小さく、膜構造中に組み込まれる傾向が大きい^{4,7)}。また、2:1 の



Acetylacetone
M. W. 100



Oxine
M. W. 145

Fig. 4 Chemical structure of acetylacetone and oxine.

ものは膜中で、1:1のものへと変化を受け、やはり膜構造の中へと組み込まれるといわれている⁷⁾。これら、膜中に組み込まれた¹¹¹In-オキシンは、移動の特殊な条件が整った時にのみ、膜中を移っていく。したがって、血漿中にあっても、約50%の¹¹¹Inが血球中に残留するというFig. 2の結果は、膜構成物質との相互作用によって、膜中に組み込まれて固定された¹¹¹In-オキシンが、標識に関与した¹¹¹In-オキシンのうち、50%をしめるということであろうと解釈できる。

一方、このような考え方からすると、¹¹¹In-アセチルアセトンの場合には、わずかに、10%弱の錯体が膜内に固定されて、しっかりした標識となったということである。これは、アセチルアセトンが、¹¹¹Inときわめて強い結合をつくって錯体を形成し、その3:1(アセチルアセトン:¹¹¹In)化合物は、安定である^{8,9)}ことと関係があると思われる。3:1に結合した¹¹¹In-アセチルアセトン錯体から、ひとつアセチルアセトンをもぎとって2:1あるいは1:1の錯体とするには、大きなエネルギーを要すると考えられ、したがって、膜内を、親和性の強い環境に向かって移動し得る¹¹¹In-アセチルアセトン分子は数多くあっても、膜構造中に組み込まれ固定される分子はきわめて少ないと予想される。膜内を移動できる分子は、血漿タンパク-膜構成物質-細胞内の¹¹¹In結合タンパク、という新たに生まれた環境のなかでは、崩れた平衡関係のなかを、より親和性の強い血漿タンパクの方へ移動していくと思われる。

最後に、¹¹¹In³⁺による白血球標識について考える。¹¹¹In-キレート化合物の対照とした¹¹¹In³⁺による白血球の標識率は予想外に高く、¹¹¹In-オキシン、¹¹¹In-アセチルアセトンの場合と同等であった(Table 1)。Thakurらの報告³⁾では、塩化インジウムによっては、血球は標識されないとされているが、彼らの実験の場合、塩化インジウム(¹¹¹In)は、血漿の存在下、白血球とインキューベーションされており、このため、¹¹¹Inの99%以上は、血漿中のトランスフェリンと結合したことを考えると、われわれの行なった実験とは、条件が異なっている。血球のみの存在する条件下では、¹¹¹In³⁺は、血球にかなりの親和性を示すといえよう。これは、おそらく、イオン形のインジウムが、血球表面に対して反応性に富んでいるためであろうと思われる。また、¹¹¹In³⁺によって標識した白血球からの血漿中での¹¹¹Inの遊離が、¹¹¹In-アセチルアセトンの場合よりも、わずかではあるが少なかったことは、イオン形は錯体形に比べて膜透過には不利であるとすれば、強い結合で血球表面に結びついている¹¹¹Inがあることを示している。

V. 結 論

良質の白血球標識用¹¹¹In-キレート化合物としての条件は、(1)脂溶性を持つこと、(2)白血球膜の構造および性質に異変をもたらすことなく膜を透過できること、(3)膜透過中、膜構成物質との相互作用により、膜構造内に組み込まれて血漿中でも安定であること、である。

文 献

- 1) Thakur ML, Coleman RE, Welch MJ: Indium-111-labeled leukocytes for the localization of abscesses: preparation, analysis, tissue distribution, and comparison with gallium-67 citrate in dogs. *J Lab Clin Med* **89**: 217-228, 1977
- 2) Thakur ML, Lavender JP, Arnot RN, et al: Indium-111-Labeled Autologous Leukocytes in Man. *J Nucl Med* **18**: 1014-1021, 1977
- 3) McAfee JG, Thakur ML: Survey of Radioactive Agents for In vitro Labeling of Phagocytic Leukocytes. *J Nucl Med* **17**: 480-487, 1976
- 4) Hwang KJ: Modes of Interaction of (In³⁺)-8-Hydro-

- xyquinoline with Membrane Bilayer. J Nucl Med **19**: 1162-1170, 1978
- 5) Richardson VJ, Jeyasigh K., Jewkes RF, et al: Possible Tumor Localization of Tc-99m-Labeled Liposomes: Effect of Lipid Composition, Charge, and Liposome Size. J Nucl Med **19**: 1049-1054, 1978
 - 6) Allison AC, Gregoriadis G: Liposomes as Immunological Adjuvants. Recent Results in Cancer Research **56**: 58-64, Springer-Verlog, 1977
 - 7) Albert A, Hanpton A, Selbie FR, et al: The influence of chemical constitution on antibacterial activity. Part VII. The site of action of 8-hydroxyquinoline. Br. J Exp Pathol **35**: 75-84, 1954
 - 8) 上野景平: 入門キレート化学, 134-137, 南江堂, 東京, 1969
 - 9) Basolo F, Johnson RC: 配位化学, 103, 化学同人, 東京, 1966

Summary

Basic Studies on ^{111}In Chelate Compounds for WBC Labeling

Makiko SUEHIRO, Masahiro IIO

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

Five ^{111}In chelate compounds were compared as WBC labeling agents. Among those, ^{111}In -ascorbylplmitate achieved the highest labeling efficiency. The leucocytes labeled by this compound, however, failed to visualize the abscess.

^{111}In -acetylacetone and ^{111}In -oxine, which both gave 10-30% labeling efficiency against $\sim 4 \times 10^5$ of leucocytes, showed significant difference in stability of the label, when the leucocytes labeled with each compound were incubated with plasma at 37. C. While 50% of ^{111}In -oxine molecules remained in the cells after washing, on the other

hand 90% of ^{111}In -acetylacetone complexes were released into the plasma. As expected from the result, scintigraphy using the ^{111}In -leucocytes labeled with ^{111}In -acetylacetone showed high background ^{111}In level, although the abscess was visualized.

WBC labeling with $^{111}\text{In}^+$ in indium chloride solution resulted in unexpectedly high labeling efficiency, 16-36%. However, release of ^{111}In was also high, 80%, when incubated with plasma.

Key words: WBC labeling, ^{111}In chelate compounds