

《原 著》

¹¹¹In-oxine による血小板標識の基礎的検討

油井 徳雄* 内田 立身* 松田 信* 室井 秀一*
 田中鉄五郎* 斎藤 勝** 刈米 重夫*

要旨 ¹¹¹In-oxine による血小板標識の基礎的検討を行い、血小板寿命測定および血栓の描出等の臨床応用のための標識法を確立した。

¹¹¹In-oxine により血小板を、1) button ACD-saline 法、2) buttonless ACD-saline 法、3) button ACD-saline plasma 法、4) button plasma 法の 4 方法で標識し、標識の際の諸条件について検討した。その結果標識率は、インキュベーション時間、温度、血小板浮遊液中の血小板数、トランスフェリン濃度および pH の影響を受けた。ラットで血小板寿命測定を行った結果、血小板寿命には各々の方法の間に差異を認めなかつたが、回収率は遠心回数の多い 1) 法のみが低値を示した。標識血小板の臓器分布の観察でも 1) 法のみに肝および脾に他の方法よりも有意に高い放射能を認めた。以上の基礎的検討の結果、血漿中のトランスフェリンの影響を少なくするため ACD-saline 液に血小板を浮遊させて標識する 3) 法は、操作が簡便でかつ標識率も $62 \pm 5\%$ と良好であるため臨床応用には最適と考えた。

I. 緒 言

血小板を放射性同位元素で標識してその動態を検査することは、種々の血小板減少症および血栓症等の病態の解明にきわめて有用な方法であり、現在その核種として ⁵¹Cr が最も広く用いられている¹⁾。しかし ⁵¹Cr は血小板寿命測定には適しているが、シンチレーションカメラによる臓器分布の観察には適さず、また標識率が低いため検査には大量の採血が必要である²⁾。シンチレーションカメラによる観察には ^{99m}Tc が使用されてきた^{3,4)}が、物理的半減期が 6 時間と短いために経時的な観察には適さず、また血小板寿命測定にも適していない。¹¹¹In は血小板寿命測定可能な物理的半減期(2.8 日)とシンチレーションカメラによる観察に適した γ 線エネルギー(173 KeV 89%, 247 KeV

94%) をあわせもつ核種であるが、¹¹¹In 単独では血小板をほとんど標識せず使用されなかった。しかし 1976 年 Thakur らは⁵⁾、細胞膜を通過可能な脂溶性キレートである ¹¹¹In-oxine を用いて血板を標識し、非常に高い標識率が得られる事を報告した。この方法を用いて血栓の描出が可能となり、現在までに動脈硬化巣の描出⁶⁾、動脈血栓⁷⁾、および静脈血栓^{8,9)} の描出などが報告されている。また腎移植後の拒否反応の早期診断にも有用であるとの報告⁹⁾もある。

今回我々は ¹¹¹In-oxine による血小板標識の基礎的検討を行い、あわせて臨床応用のための最善の標識方法を作製したので報告する。

II. 方 法**(in vitro における基礎的検討)****1. ¹¹¹In-oxine の作製**

¹¹¹In-oxine の作製は日本メディフィジックス社の塩化インジウム(¹¹¹InCl₃)を使用し、Thakur らの方法⁵⁾を一部改変して行った Scheffel らの方法¹⁰⁾に準じて以下のとく行った。

1) ¹¹¹InCl₃ 1.5 mL(当日検定にて 3 mCi) に同

* 福島県立医科大学第 1 内科

** 福島県立医科大学 RI 研究室

受付: 55 年 10 月 27 日

最終稿受付: 55 年 12 月 19 日

別刷請求先: 福島市杉妻町 4-45 (番 960)

福島県立医科大学第 1 内科

油 井 徳 雄

量の滅菌蒸留水を加える。

- 2) pH 7 の 0.3 M 酢酸緩衝液を 1 ml 加えて pH が 5~6 の間になるように調整する。
- 3) オキシンエタノール溶液(オキシン 1 mg/無水エタノール 1 ml)を 50 μ l 加え良く混和する。
- 4) 4 ml のジクロルメタンにて ^{111}In -oxine を抽出する。
- 5) 100°C の浴槽内でジクロルメタンを蒸発乾燥させる。
- 6) 無水エタノールを 50 μ l 加え ^{111}In -oxine を再溶解し、さらに生理的食塩水を 200 μ l 加え、これを ^{111}In -oxine 溶液として標識に供する。

2. ^{111}In -oxine による血小板標識法

血漿中のトランスフェリンは ^{111}In と強い親和性を有し¹¹⁾、 ^{111}In -oxine による血小板に対する標識率を低下させると考えられている。それ故標識の際は、血小板に傷害を与えぬ様に、血漿を除去する方法が問題となる。この際、血小板分離操作における遠心の条件および ^{111}In -oxine で標識を行う場合の血小板浮遊液中の血漿の混入度の相違をもたらす 4 種類の方法を用い、血小板の標識条件を検討した。4 方法の各称は、Wistow ら¹²⁾が使用している命名にもとづいたものを用いた。遠心方法は血小板浮遊液より管底に血小板のみを button のような形に沈下させる button 法と全血を遠心して赤血球をクッションとしてその上に血小板を薄い膜状に沈下させる buttonless 法を使用した。また血小板を浮遊させる medium としては、ACD-生食水および血漿を用いた。ACD-生食水はテルモ社の ACD-A 液と生食水とを 1 対 7 の割で混合し、かつ 2 N の NaOH にて pH を 6.5 に調整したものである。

1) button ACD-saline 法 (BAS 法) (Fig. 1)

本法は button 法にて遠心し、ACD-生食水による血小板浮遊液を作製して標識する方法であり、血漿をほぼ完全にとりのぞくことを目的としている。まず ACD-A 1 に対して全血 6 の割合にて採血し、22°C, 300g, 15 分の遠心により赤血球および白血球を沈下させ、上澄の多血小板血漿 (PRP) を採取する。次に PRP の 1/20 量の ACD-A 液を

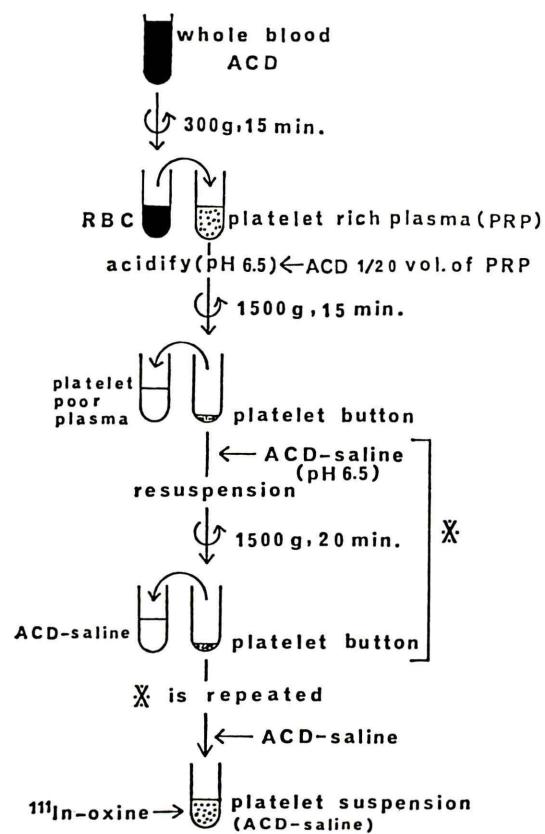


Fig. 1 Labeling procedure of button ACD-saline method.

PRP に添加する。この操作により PRP の pH はほぼ 6.5 に調整される。この pH 6.5 の条件では血小板の自然凝集が最も少いとされている¹³⁾。その後 PRP を 22°C, 1,500 g にて 15 分遠心し、血小板を button のような形に沈下させ、上澄の乏血小板血漿 (PPP) をとりのぞく。次に ACD-生食水を加え血小板を再浮遊させ、再び 22°C, 1,500 g にて 15 分遠心し、血小板を沈下させ上澄を捨てる。このような ACD-生食水により血小板を洗滌する操作をもう 1 回くり返して行い、最後に ACD-生食水による血小板浮遊液を作製し、 ^{111}In -oxine 溶液を添加して血小板を標識する。

2) buttonless ACD-saline 法 (BLAS 法) (Fig. 2)

本法も BAS 法と同じく血漿をほぼ完全にとりのぞくことを目的としており、ACD-生食水によ

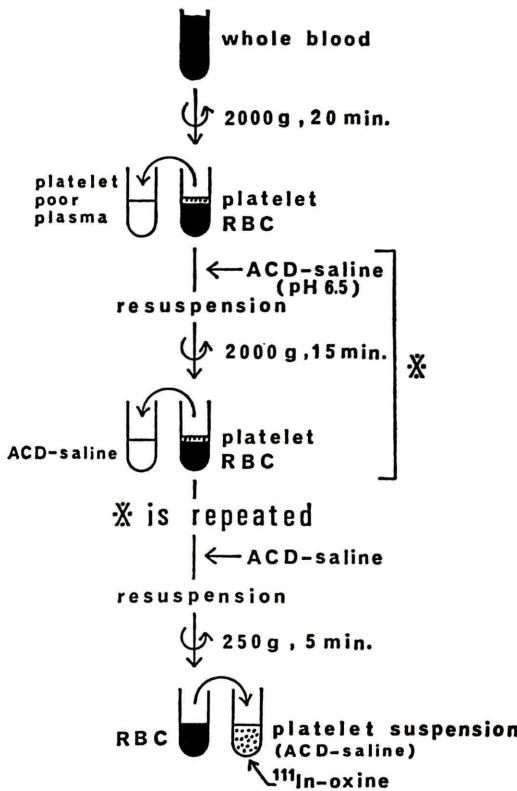


Fig. 2 Labeling procedure of buttonless ACD-saline method.

る血小板浮遊液を作製して標識する。ただし遠心方法は前述した buttonless 法である。まず ACD-A にて採血した全血を 22°C, 200 g にて 20 分遠心し、血小板を赤血球層の上に薄い膜状に沈下させ、上澄の PPP をとりのぞく。次に ACD-生食水を加えて全血球を再浮遊させ、22°C, 2,000 g にて 15 分遠心し、血小板を同様に沈下させ上澄をとりのぞく。このような ACD-生食水にて血小板を洗滌する操作をもう一回くり返して行い、最後に 22°C, 250 g にて 5 分遠心し、赤血球を沈下させ上澄の ACD-生食水による血小板浮遊液を採取して標識に供する。

3) button ACD-saline plasma 法 (BASP 法)

(Fig. 3)

本法は BAS 法を簡略化した方法で、血漿をとりのぞく程度は不完全であるが、遠心回数が少い

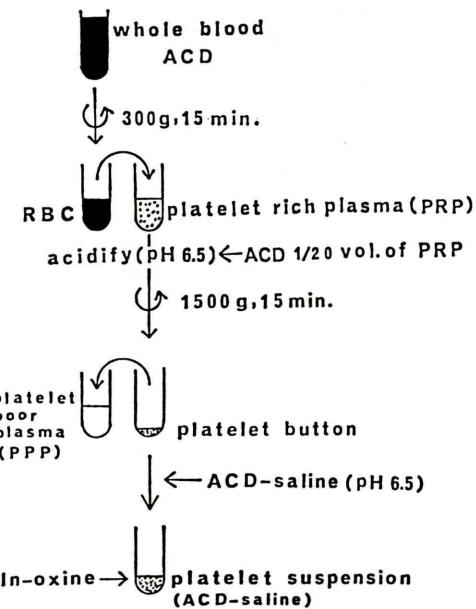


Fig. 3 Labeling procedure of button ACD-saline plasma method.

という利点を有する。まず全血を 22°C, 300 g にて 15 分遠心し、上澄の PRP を採取する。次に PRP を 22°C, 1,500 g にて 15 分遠心し、血小板を button のような形に沈下させ上澄の PPP をとりのぞく。その後 ACD-生食水を加え血小板を再浮遊させ標識に供する。この ACD-生食水による血小板浮遊液には、その前の ACD-生食水による洗滌は省略しているので、血漿の混入が前 2 方方法より多いと思われる。

4) button plasma 法 (BP 法) (Fig. 4)

本法は血漿中に血小板を濃縮して標識に供する一般的な方法で、遠心方法および回数は前項の BASP 法と全く同じであるが、ACD-生食水を使用しないので 4 方法の中では最も操作が簡便である。

以上の 4 方法における遠心方法、血小板の洗滌操作および標識に供する血小板浮遊液の差異を Table 1 に示した。

3. 標識条件の検討

ヒトの血小板を用い ¹¹¹In-oxine による血小板標識を以下のような条件において前述の 4 種の方法

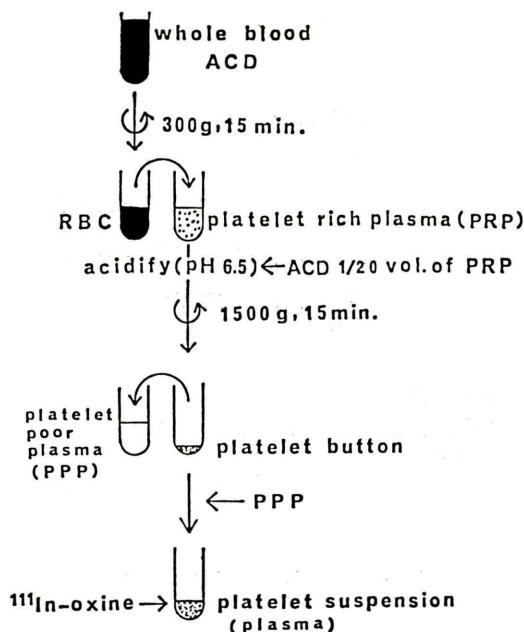


Fig. 4 Labeling procedure of button plasma method.

の血小板遊液で行い、その結果を比較検討した。

1) 標識時間の検討

室温(22°C)、血小板浮遊液の血小板数 $1 \times 10^9/ml$ の条件で、標識時間を0分から60分まで変化させて標識率を調べた。

2) 標識の際の温度の検討

標識時間30分、血小板浮遊液中の血小板数 $1 \times 10^9/ml$ の条件で、温度を4°C、室温(22°C)、37°Cと変化させて、標識を行い標識率を検討した。

3) 血小板浮遊液中の血小板数についての検討
室温(22°C)、標識時間30分の条件で標識した際の血小板浮遊液中の血小板数を、 $0.5 \times 10^9/ml$ から $2 \times 10^9/ml$ まで種々変化させ標識率を調べた。

4) 血小板浮遊液中のトランスフェリン濃度についての検討

室温(22°C)、標識時間30分、血小板浮遊液中の血小板数 $1 \times 10^9/ml$ の条件で標識した場合の識標率と免疫拡散法で測定した血小板浮遊液中のトランスフェリン濃度との関係を調べた。

5) 血小板浮遊液のpHの検討

BASP法の浮遊液において、血小板を浮遊させるACD生食水のpHを2NのNaOHにて4.8から7.0まで種々変化させて標識を行い、標識率を検討した。標識は室温(22°C)、標識時間30分および血小板浮遊液中の血小板数 $1 \times 10^9/ml$ の条件で行った。

以上の種々の条件における標識率は、標識後の血小板の放射能を最初加えた¹¹¹In-oxineの放射能で除して求めた。

(in vivoにおける検討—ラットの血小板回転の検索)

1. ラットの血小板寿命の測定

ラットの血小板を体外で前述の4方法による¹¹¹In-oxineおよび対照としての⁵¹Crにより標識後、 1×10^9 個の標識血小板を尾静脈より輸注した。その後尾静脈より経時的に採血し、それぞれの標本の放射能を同一日にウエル型シンチレーション

Table 1 Preparation of platelet suspensions by four different methods

Method	Form of sedimentary platelets	Centrifugation		Washing		Final suspension for labeling
		No of centrifugation	Washing medium	No. of washing		
BAS method	Button	1,500 g, 15 min × 4 -2,000 g, 20 min × 1	ACD-saline	2	ACD-saline	
BLAS	Buttonless	-2,000 g, 15 min × 2 -1,500 g, 15 min × 1	ACD-saline	2	ACD-saline	
BASP	Button	1,500 g, 15 min × 2	0	ACD-saline plasma	
BP	Button	1,500 g, 15 min × 2	0	plasma	

BAS method: button ACD-saline method. BLAS method: buttonless ACD-saline method

BASP method: button ACD-saline plasma method. BP method: button plasma method

カウンターにて測定することにより注入した総放射能に対する流血中の血小板の放射能の割合を調べた。この割合を回収率とし、それを経時にプロットして血小板生存曲線を得た。血小板寿命は国際血液標準化委員の推せん案の第1法¹⁾により算出した。

2. ラットにおける標識血小板の臓器分布の観察

1) 前項と同様に ¹¹¹In-oxine および ⁵¹Cr による計5種の方法にて標識した血小板の注入1時間後に、ラットを屠殺して肝、脾、腎、肺、心および血液の放射能を調べた。

2) BASP 法により ¹¹¹In-oxine にてラットの血小板を標識後輸注して、2時間および24時間後にシンチレーションカメラにて臓器分布を観察した。

III. 成 績

1. ¹¹¹In-oxine の収率

¹¹¹InCl₃ 3 mCi に前述の方法で oxine 50 μg を反応させた場合の ¹¹¹In-oxine への収率は 85.9 ± 2.1% (n=18) と良好であり、かつその結果は安定していた。

2. in vitro における基礎的検討

1) 標識時間の検討 (Fig. 5)

標識時間と標識率との関係を調べると、BAS BLAS 法との間には差を認めず、両方法ともに標

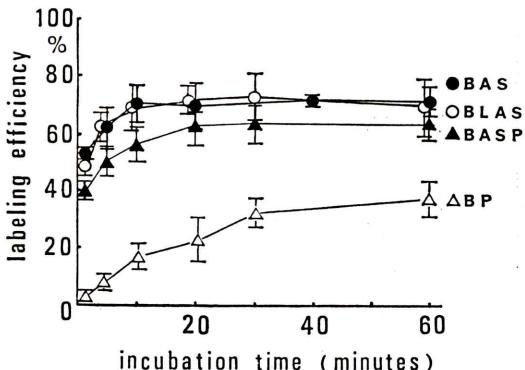


Fig. 5 Relationship between labeling efficiency and incubation time in each labeling method. Each point represents the mean of 4 experiments and bars represent 1 S.D.

法と識率は 10 分で約 70% に達し、以後同一水準であった。BASP 法は 20 分で 62 ± 5% となり、以後一定になった。一方 BP 法での標識率は時間とともに漸次上昇する傾向を示し、60 分における標識率は 36 ± 4% であった。

2) 標識の際の温度の検討 (Fig. 6)

標識の際の温度と標識率との関係を調べると 4 方法ともに 4°C, 室温 (22°C), 37°C の順に標識率は上昇した。方法別にみると、BAS 法と BLAS 法との間には差がなくかつ最も標識率が良好であり、室温 (22°C) における標識率は BAS 法では 74 ± 3%, BLAS 法では 72 ± 5% であった。BASP 法はそれよりやや低く 63 ± 5% であり、BP 法は最も低く 31 ± 4% であった。

3) 血小板浮遊液中の血小板数についての検討 (Fig. 7)

標識に供する血小板浮遊液中の血小板数を変化させ標識率を調べると、4 方法ともに血小板数の増加とともに標識率は上昇した。BAS 法および BLAS 法は標識率が最も高く、また両方法の間に差を認めなかった。次いで BASP 法、BP 法の順に標識率は低下した。血小板数 $1 \times 10^9 / \text{ml}$ 、室温 (22°C)、標識時間30分における標識率は、BAS 法が 71 ± 6%, BLAS 法が 69 ± 5%, BASP 法が 64 ± 6%

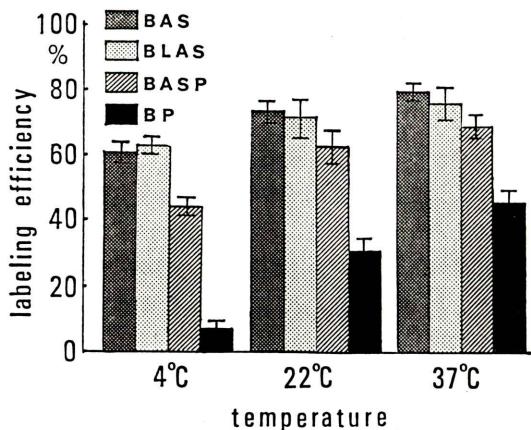


Fig. 6 Relationship between labeling efficiency and temperature of incubation in each labeling method.

Each column represents the mean of 4 experiments and bars represent 1 S.D.

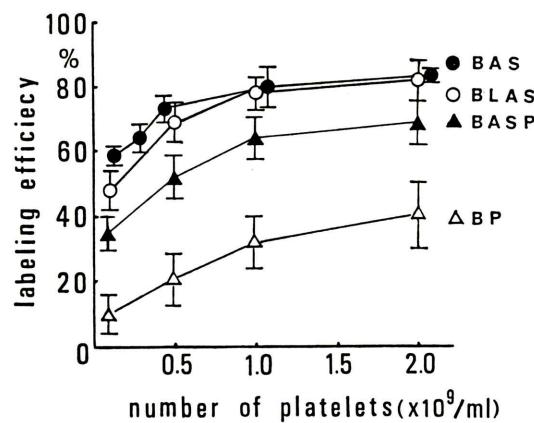


Fig. 7 Relationship between labeling efficiency and platelet number in each suspension.

Each point represents the mean of 4 experiments and bars represent 1 S.D.

Table 2 Relationship between transferrin concentration in platelet suspension and labeling efficiency

Method	Transferrin	Labeling Efficiency
Button ACD-saline	<6 mg/dl	81%
Buttonless ACD-saline	<6 ,,	78 ,,
Button ACD-saline plasma	18 ,,	64 ,,
Button plasma	218 ,,	33 ,,

および BP 法が $33 \pm 6\%$ であった。

4) 血小板浮遊液中のトランスフェリン濃度についての検討 (Table 2)

標識率はトランスフェリン濃度が低い方法ほど高値を示した。ほぼ完全に血漿を、すなわち血漿中のトランスフェリンをとりのぞくことを目的とした BAS 法および BLAS 法の最終血小板浮遊液中のトランスフェリン濃度は 6 mg/dl 以下であり、標識率もそれぞれ 81% および 78% と高い値を得た。標識時に血小板を ACD-生食水に浮遊させる BASP 法でのトランスフェリン濃度は、血漿のまま行う BP 法 (218 mg/dl) の約 $1/12$ である 18 mg/dl に低下し、標識率も 64% と良好であった。BP 法は 4 方法の中では標識率が最も低く 33% であった。

5) 血小板浮遊液の pH についての検討 (Table 3)

Table 3 Relationship between pH of platelet suspension and labeling efficiency in button ACD-saline plasma method

pH of Platelet Suspension	Labeling Efficiency
pH 4.8	$14 \pm 6\%$
pH 5.5	$19 \pm 5\%$
pH 6.0	$32 \pm 5\%$
pH 6.5	$63 \pm 4\%$
pH 7.0	$62 \pm 6\%$

mean \pm 1 S.D. (n=5)

BASP 法において血小板浮遊液の pH を変化させて標識率を調べると、pH 6.5 と 7.0 で最大値を示し $62\sim63\%$ であった。しかしそれ以外の pH では標識率は低値を示した。

3. in vivo における検討——ラットの血小板回転の検索

1) ラットの血小板寿命の測定 (Fig. 8)

^{111}In -oxine にて血小板を標識して行った 4 方法

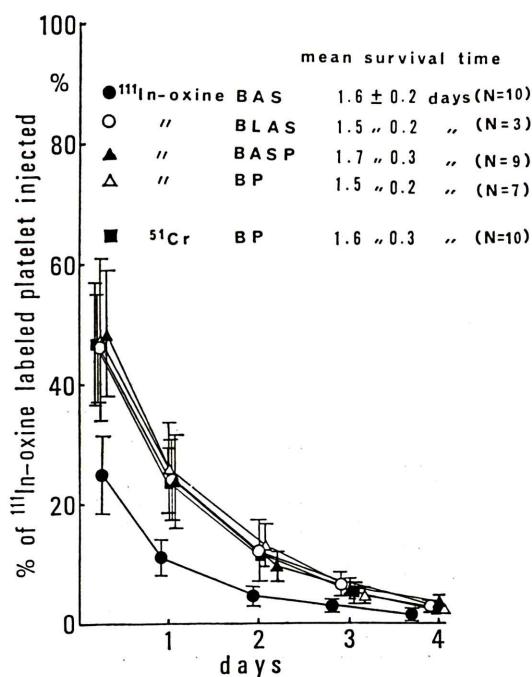


Fig. 8 Platelet survival curves by four labeling methods of ^{111}In -oxine and that of ^{51}Cr in rats. Each point represents the mean and bars represent 2 S.D.

および⁵¹Cr 法による血小板生存曲線は、指数曲線に近い曲線を示した。国際血液標準化委員会の推せん案の第 I 法である加重平均値算出法により求めた血小板平均寿命は全方法による値に推計学的に有意差を認めず、1.5~1.7 日であった。一方標識血小板の注入初期(4 時間後)の回収率は、BAS 法のみが $25 \pm 7\%$ と他の方法の約 50% に比し低値を示した。

2) ラットにおける標識血小板の臓器分布の観察

標識血小板の注入初期(1 時間後)にラットを屠殺し、標識血小板の臓器分布を調べた。Table 4 は各臓器の放射能を、注入した総放射能に対する割合(%)で示したものである。Table 4 中の血液は、血液 1 ml 中の放射能を測定し、total blood volume(体重 100 g 当り 6 ml¹⁴)を乗じて血液全体の放射能で表現した。いずれの方法においても肝、脾および血液に強い放射能を認めたが、腎、肺および心は少く、いずれも 4% 以下であった。方法別にみると BAS 法のみが肝に $45.3 \pm 3.8\%$ 、脾に $20.8 \pm 1.2\%$ と他の 4 方法に比し高く、逆に血液は $23.1 \pm 3.9\%$ と他の 4 方法に比し低かった。BAS 法以外の 4 方法間には推計学的に有意差を認めず、肝は約 27%、脾は約 14% および血液は約 50% であった。

BASP 法により標識して、シンチレーションカメラにて観察した結果を Fig. 9 に示した。標識血小板注入 2 時間後および 24 時間後に観察すると、いずれも肝に標識血小板の強い集積を認めた。

IV. 考察

Thakur らの報告⁵⁾以来¹¹¹In-oxine による血小板

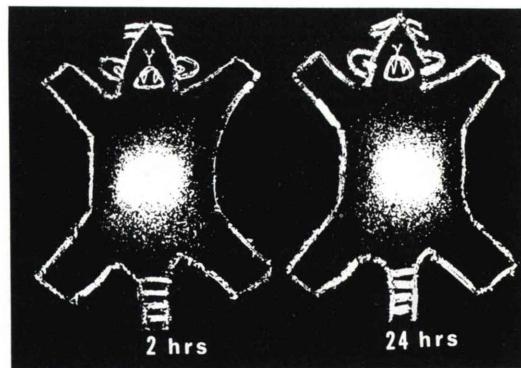


Fig. 9 Anterior images obtained 2 and 24 hours after administration of ¹¹¹In-oxine-labeled platelets by BASP method in a rat.

標識に関する報告が相次いで見られ^{6~10,12,15~17}、血小板寿命測定および血栓の描出等にその有用性は確かめられている。血漿の存在下で血小板を ¹¹¹In-oxine にて標識する場合、¹¹¹In は血漿中のトランスフェリンとの親和性の方がより強いため、血小板に対しては高い標識が得られない。そのため、血小板に障害を与える、血漿を可及的に除去した浮遊液にて ¹¹¹In-oxine による標識を行う種々の方法が報告されている。すなわち Thakur らは tyrodes-albumin 溶液による button 法で標識率 97%⁵⁾、Heaton らは ACD-生食水による button 法(著者の BAS 法より血小板の洗滌が 1 回少い)で標識率 73%¹⁵⁾および Schmidt らは ringer citrate dextrose 溶液による buttonless 法で標識率 52~92%¹⁶⁾を報告した。一方ある程度の標識率の低下を犠牲にしても血小板の viability のためには血漿をとりのぞかずに標識を行う方法が良いと主張している研究者もいる。すなわち Goodwin ら⁸⁾は生食水による button 法では、¹¹¹In-oxine 標識血

Table 4 Organ distribution 1 hour after administration of ¹¹¹In-oxine-labeled platelets in rats

Method	Liver	Spleen	Kidney	Lung	Heart	Blood
¹¹¹ In-oxine, BAS (N=5)	$45.3 \pm 3.8\%$	$20.8 \pm 1.2\%$	$1.9 \pm 0.9\%$	$1.4 \pm 0.5\%$	$<0.1\%$	$23.1 \pm 3.9\%$
,, , BLAS (N=4)	27.0 ± 2.2 ,	13.6 ± 1.8 ,	1.1 ± 0.3 ,	2.8 ± 0.6 ,	<0.1 ,	50.1 ± 3.4 ,
,, , BASP (N=5)	27.5 ± 1.4 ,	14.0 ± 3.5 ,	1.1 ± 0.2 ,	3.1 ± 0.5 ,	<0.1 ,	49.4 ± 4.8 ,
,, , BP (N=5)	25.2 ± 6.5 ,	13.8 ± 4.9 ,	1.1 ± 0.3 ,	2.0 ± 0.4 ,	<0.1 ,	49.8 ± 4.5 ,
⁵¹ Cr , BP (N=5)	27.3 ± 2.5 ,	15.3 ± 2.1 ,	1.3 ± 0.4 ,	2.4 ± 0.8 ,	<0.1 ,	50.0 ± 4.0 ,

BAS: button ACD-saline method. BLAS: buttonless ACD-saline method.

Mean \pm S.D.

BASP: button ACD-saline plasma method. BP: button plasma method.

小板注入初期の回収率の著しい低値を認めたために、血漿による button 法を用い標識率 $34 \pm 15\%$ を報告し、Scheffel ら¹⁷⁾も血漿による button 法で標識率 $55.5 \pm 9.3\%$ と報告している。一般的には血漿を除去した方法が血漿を用いた方法よりも標識率が高い傾向にあるように思われる。標識率が低い方法ほど採血量が多くなり、被検者に対する負担は重くなるので、種々の検討の結果より最善の標識方法を定めた。

in vitro における基礎的検討の結果、¹¹¹In-oxine の血小板に対する標識率は標識時間、温度、血小板浮遊液中の血小板数、トランスフェリン濃度および pH の影響を受けた。

標識時間の検討では、BAS 法および BLAS 法は 10 分、BASP 法は 20 分で標識率が一定に達した。一方 BP 法は 60 分まで調べた範囲では時間とともに標識率は上昇した。BP 法を提唱している Scheffel ら¹⁷⁾は標識時間を 90 分としている。4 方法とも採血から標識血小板輸注までの時間は短い方が、血小板の viability に関しては好ましいので、以上の結果より時間は BAS 法および BLAS 法は 10 分、BASP 法は 20 分および BP 法は 30 分が適当と考えた。

標識の際の温度の検討では、4°C、室温 (22°C)、37°C の順に標識率が上昇した。しかし 4 方法とも室温 (22°C) と 37°C との間にはさほど大きな差はないので、臨床応用には操作が簡便な室温にて行う事にした。

標識に供した血小板浮遊液中の血小板数と標識との関係を調べると血小板数の増加とともに標識率は上昇した。そこで臨床応用の際には、単位体積当たり血小板数をできるかぎり増加させるために血小板を浮遊させる ACD-生食水もしくは血漿の量をできるだけ少くするように調節すれば良いと考えられた。

¹¹¹In-oxine 標識の際の血小板浮遊液中のトランスフェリン濃度が低い方法ほど標識率は高かった。また血小板塊より血漿を可及的に除いたのち ACD-生食水に血小板を浮遊させた BASP 法では、トランスフェリン濃度が血漿の 1/12 以下となり、

標識率も 62% とかなり良好であった。

標識に供した血小板浮遊液の pH と標識率との関係を調べると、pH 6.5 および 7.0 で良好な標識率を示した。この結果より実際の標識は血小板の自然凝集が最も少いとされる pH 6.5¹³⁾ で行う事にした。

ラットにおける血小板回転の検索の結果、標識血小板注入初期 (4 時間) における流血中よりの標識血小板の回収率は、BAS 法のみが他の方法に比し低値を示した。しかも標識血小板注入初期 (1 時間後) にラットを屠殺して臓器の放射能を調べると、BAS 法のみが他の方法に比し肝および脾の放射能が有意に高かった。このように BAS 法のみが他の方法に比し異常な値を示した原因としては、血小板を button の形に沈下させるための遠心回数が多く、血小板がその操作中に何らかの傷害を受け、体内に輸注された後にすみやかに肝および脾に捕捉されたためと考えられた。

¹¹¹In-oxine 法は、血小板寿命の測定、回収率の検討ばかりでなく、シンチレーションカメラによる臓器分布の観察が可能である特徴を有する。ラットにおいて標識血小板注入 2 時間および 24 時間後にシンチレーションカメラにて観察すると肝への集積を認めた。標識血小板注入 1 時間後にラットを屠殺して行った臓器分布の観察では脾への集積を約 14% 認めたが、シンチレーションカメラ像では脾を区別できなかった。この原因としては、肝の放射能が強いうえに、ラットの脾は肝の左葉の下にあり、両者の放射能が重なったためと考えられた。

今回の検討の結果、BAS 法以外の方法は全て臨床応用が可能と考えられた。しかし BLAS 法は標識率は高いが、遠心回数が多く時間がかかる欠点があり、BP 法は操作が最も簡便であるが、標識率が低い。そこで標識率が $62 \pm 5\%$ (22°C、標識時間 20 分および血小板数 $1 \times 10^9/ml$) と比較的良好で、操作が簡便な BASP 法が臨床応用には最も適していると考えられた。BASP 法をもとにした実際の臨床応用のための標識法を Fig. 10 に示した。操作はすべて無菌的に行う。また器具はプラ

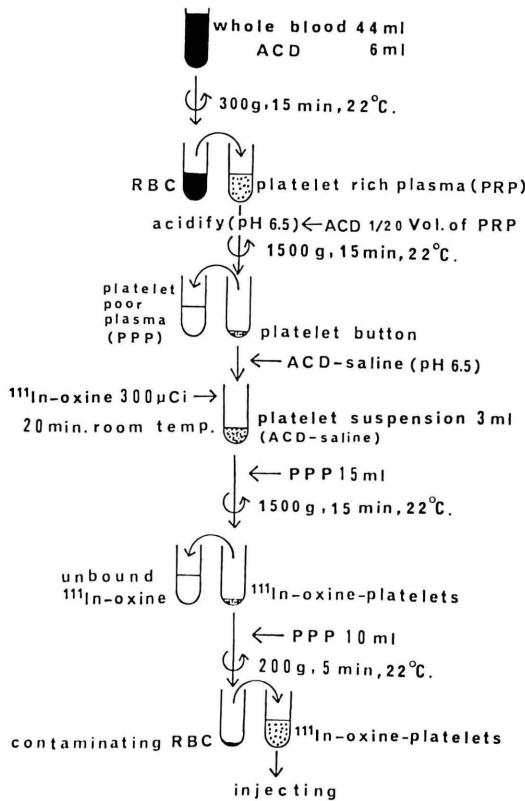


Fig. 10 Procedure of platelet labeling with ¹¹¹In-oxine for clinical use based on button ACD-saline plasma method.

スチック製またはシリコン処理をしたガラス製のものを使用する。シリコン処理は、ガラスへの血小板の粘着を防ぐために行う。標識のための採血量は、従来の⁵¹Cr法の場合は標識率が低いため200 ml以上必要とした²⁾が、¹¹¹In-oxine法では標識が高いため44 mlで良いと考えられる。標識は3 mlのACD-生食水による血小板浮遊液に¹¹¹In-oxine溶液を約300 μCi加え、室温にて20分間インキュベートして行う。この際血小板浮遊液1 ml当たりoxineを5 μg、エタノールを5 μl以下になるように調節する。これらの濃度以上の場合には、血小板のコラーゲン凝集が低下する⁵⁾ので、それ以下の濃度で抑える。標識後、標識に使われなかった¹¹¹In-oxineをとりのぞき、¹¹¹In-oxine標識血小板をPPP 10 mlに浮遊させ被検者の静脈内に

投与する。

V. 結 語

¹¹¹In-oxineによる血小板標識について、ヒト血小板を用いてin vitroにおいて検討し至適条件を定めた。その結果をもとにして血小板寿命測定および血栓の描出等の臨床応用のための標識法を確立した。

本論文の要旨は第19回日本核医学会総会(1979年東京)にて発表した。

塩化インジウム(¹¹¹InCl₃)を提供された日本メリフィックス社に感謝します。

文 献

- 1) The panel on diagnostic application of radioisotopes in hematology. International Committee for Standardization in Hematology: Recommended methods for radioisotope platelet survival studies. *Blood* **50**: 1137-1144, 1977
- 2) Abrahamson AF: A modification of the technique for ⁵¹Cr-labelling of blood platelets giving increased circulation platelet radioactivity. *Scand J Haematol* **5**: 53-63, 1968
- 3) Uchida T, Yasunaga K, Kariyone S, et al: Survival and sequestration of ⁵¹Cr and ^{99m}Tc-labeled platelets. *J Nucl Med* **15**: 801-807, 1981
- 4) 油井徳雄、内田立身、室井秀一、他：^{99m}Tcによる血球標識に関する研究(第6報)。^{99m}Tcによる血小板標識の検討とその臨床応用。核医学 **16**: 685-693, 1979
- 5) Thakur ML, Welch MJ, Joist JH, et al: Indium-111-labeled platelets: Studies on preparation and evaluation of in vitro and in vivo functions. *Thromb Res* **9**: 345-357, 1976
- 6) Davis HH, Heaton WA, Siegel BA, et al: Scintigraphic detection of atherosclerotic lesions and venous thrombi in man by Indium-111 labelled autologous platelets. *Lancet* **1**: 1185-1187, 1978
- 7) Davis HH, Siegel BA, Welch MJ: Sintigraphic detection of an atrial thrombus with In-111-labelled autologous platelets. *J Nucl Med* **21**: 548-549, 1980
- 8) Goodwin DA, Bushberg JT, Doherty PW, et al: Indium-111 labelled autologous platelets for location of vascular thrombi in humans. *J Nucl Med* **19**: 626-634, 1978
- 9) Smith N, Chandler S, Hawker RJ, et al: Indium-labelled autologous platelets as diagnostic aid

- after renal transplantation. *Lancet* **2**: 1241-1242, 1979
- 10) Scheffel U, McIntyre PA, Evatt B, et al: Evaluation of indium-111 as a new high photon yield gamma-emitting "physiological" platelet label. *Johns Hopkins Med J* **140**: 285-293, 1977
- 11) Thakur ML, Coleman RE, Welch MJ: In-111 labelled leukocytes for the localisation of abscesses: preparation, analysis, tissue distribution and comparison with gallium-67 citrate in dogs. *J Lab Clin Med* **89**: 217-228, 1977
- 12) Wistow BW, Grossman ZD, McAfee JG, et al: Labelling of platelets with oxine complexes of Tc-99m and In-111. Part I. In vitro studies and survival in the rabbit. *J Nucl Med* **19**: 483-487, 1978
- 13) Aster RH, Jandl JH: Platelet sequestration in man. I. Methods. *J Clin Invest* **43**: 843-869, 1964
- 14) Wang L: Plasma volume, cell volume, total blood volume and F cells factor in the normal and splenectomized Sherman rat. *Am J Physiol* **196**: 188-192, 1959
- 15) Heaton WA, Davis HH, Welch MJ, et al: Indium-111: a new radionuclide label for studying human platelet kinetics. *Brit J Haematol* **42**: 613-622, 1979
- 16) Schmidt KG, Rasmussen JW: Labelling of human and rabbit platelets with ¹¹¹Indium-oxine complex. *Scand J Haematol* **23**: 97-106, 1979
- 17) Scheffel U, Tsan MF, McIntyre PA, et al: Labeling of human platelets with (111-In) 8-hydroxyquinoline. *J Nucl Med* **20**: 524-531, 1979

Summary

Basic Study of Platelet Labeling with ¹¹¹In-oxine

Tokuo YUI*, Tatsumi UCHIDA*, Shin MATSUDA*, Shuichi MUROI*,
Tetsugoro TANAKA*, Masaru SAITO** and Shigeo KARIYONE

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

Indium-111-oxine has recently been suggested as a new isotopic labeling agent of platelets. In this paper, the results on the investigation of in vitro labeling of human platelets with In-111-oxine and those of platelet kinetics in rats are presented. Based on the findings of those studies, the protocol of human platelet labeling with In-111-oxine for clinical use was established.

All operations should be carried out with sterile techniques at 20-25°C.

- Fourty four ml venous blood is drawn into a 50 ml polystyrene syringe containing 6 ml ACD-A.
- The blood is transferred to a 50 ml tube and centrifuged at 300 g for 15 min.
- Supernatant platelet rich plasma (PRP) is transferred to other 50 ml tube. Then, the pH is adjusted to 6.5 by addition of 1 ml ACD-A per 20 ml PRP.
- Platelets are sedimented by centrifuging at

1,500 g for 15 min and resuspended in 3 ml ACD-A-saline solution (pH 6.5).

- Three hundreds μ Ci of In-111-oxine is added to the platelet suspension. The mixture is incubated for 20 min at room temperature.
- About 15 ml of the platelet poor autologous plasma (PPP) is added into the incubated mixture, followed by the sedimentation of labeled platelets (1,500 g, 15 min).
- The labeled platelets are suspended in 10 ml PPP and the contaminating red cells are sedimented by centrifuging at 200 g for 5 min.
- One hundred and fifty μ Ci of labeled platelet suspension is injected to the patient intravenously.

The labeling efficiency in this method was $62 \pm 5\%$ (mean \pm 1S.D., $n=6$).

Key words: Platelet labeling, In-111-oxine, Cr-51, Platelet survival, Rat