

《研究速報》

 ^{99m}Tc 標識, 水溶性化合物のマイクロオートラジオグラフィー— ^{99m}Tc -DTPAを中心として—

池田 滋* 藤野 淡人* 石橋 晃*

I. 緒 言

各種臓器スキャンニング用放射性医薬品は、現在のところ ^{99m}Tc 標識化合物が主体である。当然、そのほとんどが水溶性であり、かつ短半減期、 γ 線放出物質である。

これら放射性医薬品の正確で微細な臓器内分布を解明することは各種臓器スキャンの読影の裏付けともなり、きわめて重要かつ有用なことと考えられる。しかしこの解析手段としてマイクロオートラジオグラフィー（以下オートラジオグラフィーをARGと略す）を用いる場合、上記のように使用医薬品の物理的あるいは化学的性質を考慮すると、きわめて技術的な困難さが予想される。これらの問題を充分考慮した上で、著者らは今回まず、腎スキャンニング剤、 ^{99m}Tc -DTPA をとりあげ、本剤の細胞レベルでの腎内動態を明らかにする目的で、小動物を用いてマイクロARGを試み、各種技術的検討を重ね、初期の目的を達成できたので、方法論を中心に述べたいと思う。

II. 実験材料

^{99m}Tc はダイナボット社製、 ^{99}Mo - ^{99m}Tc -generator より抽出し、ただちに標識用 DTPA キットと混和し、 ^{99m}Tc -DTPA を作成した。なお、本医薬品は今回使用した条件下では常に安定していることを確認した。

* 北里大学医学部泌尿器科

受付：57年5月24日

最終稿受付：57年7月12日

別刷請求先：相模原市北里1-15-1 (☎ 228)

北里大学医学部泌尿器科

池田 滋

使用動物は7週齢、体重200g前後のS.D.系雄性ラットを用いた。

III. 方法および結果

^{99m}Tc -DTPA 10 mCi/kg を bolus で静注後、2分の時点でラットを開腹し左腎を摘出、ただちにアセトン、ドライアイス混合液中にて急速凍結を行った。この際、過剰な凍結により臓器に亀裂を生じることがあるが、軽度の亀裂では実験上支障をきたすことはないためCMCなどの保護剤は使用しなかった。

急速凍結後は臓器の凍結を均一化させる目的で約1時間、 -25°C のディープフリーザー中に保存した。その後標本を約8~10mm角のブロックに分断し、少量の生理的食塩水を用いてマイクローム載物台に凍結固定した。載物台ごとクライオスタット内に設置し、良好な切片が出るまで荒削りを行った。切片の厚さを6~8 μm にセットし、室内燈より安全光へと切り換え、その後は暗室内操作により薄切々片を作成し、あらかじめ乳剤(Sakura Type NR-M₂)をディッピング法に準じて片面に塗布した後冷却しておいたプレパラートとコンタクトさせた。この際、毛筆の先端や、細い針を使用し、乳剤面に機械的刺激を与えないようにしながら切片を伸展させ密着させた。その後指にてプレパラート底面を軽く昇温させると切片と乳剤面の温度差により切片は凍結したまま乳剤面と密着する。この際温めすぎると切片の融解をきたすため、切片表面を十分に観察しながら密着するのを確認後直ちに昇温を止めるようにした。その後このプレパラートを乾燥剤とともに暗箱中におさめた。

露出はディープフリーザー中に暗箱を入れ、約12～14時間行った。露出終了時には切片は凍結状態のままで充分乾燥されており、以下は常温下で、常法によるマイクロ ARG が可能となる。したがってその後、メタノールを用いて切片の固定を行い、コニドール液、コニフィックス液にてそれぞれ現像、定着を行った。現像操作の終了した切片は水洗、乾燥後、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。

マイクロ ARG の結果では ^{99m}Tc 標識化合物である DTPA の腎内局在が十分に示された。すなわち静注2分後での本剤の分布は糸球体部に特異的に認められ、近位尿細管、遠位尿細管および血管系にはほとんどみられず (Fig. 1) 集合管への分布もほとんどなかった (Fig. 2)。

IV. 考 察

^{99m}Tc は前述のように短半減期核種でありかつ γ 線放出物質であるため、ARG を用いてその標識化合物の局在を追跡するには多くの技術的困難

がある。そのためこのような目的での ARG の利用は十分でなく、ことにマイクロ ARG による検討はきわめて少ない。

著者らは ^{99m}Tc -DTPA の腎内動態、とくに細胞レベルでの解析の目的で ARG を試み、一応満足すべき結果を得たが、その技術上の要点に関して考察を加えたいと思う。

通常水溶性物質を用いたマイクロ ARG には沈殿固定法¹⁾あるいは凍結固定法が用いられている。凍結固定法はさらに包埋操作を行わない凍結薄切法²⁾と、パラフィン樹脂で包埋を行った後薄切を行う凍結乾燥包埋法³⁾および凍結置換包埋法⁴⁾に分けられる。このうち沈殿固定法は、特別な試薬により沈殿可能なものに限られ、少なくとも ^{99m}Tc -DTPA には応用できない。また、凍結乾燥包埋法は、真空乾燥装置を必要とし、操作がきわめて繁雑であり、かつ乾燥に24～48時間を要する。また凍結置換包埋法は凍結置換操作そのものに72時間を要する。したがって半減期の短い ^{99m}Tc -DTPA のマイクロ ARG には不適當である。

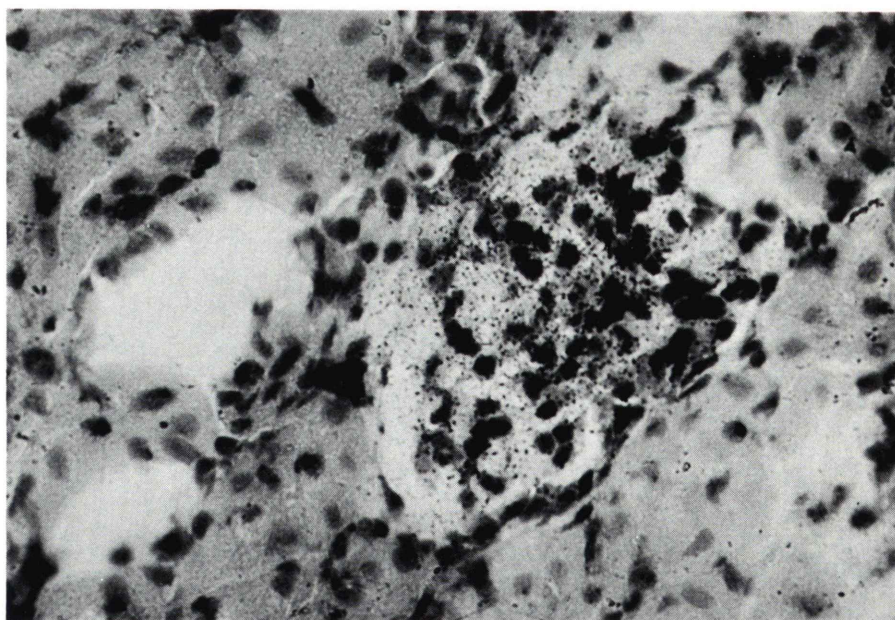


Fig. 1 Microautoradiograph of rat kidney following injection of ^{99m}Tc -DTPA. The radioactive material overlies the glomerulus. Tubules or vessels with localization of grains are not seen. ($\times 400$)

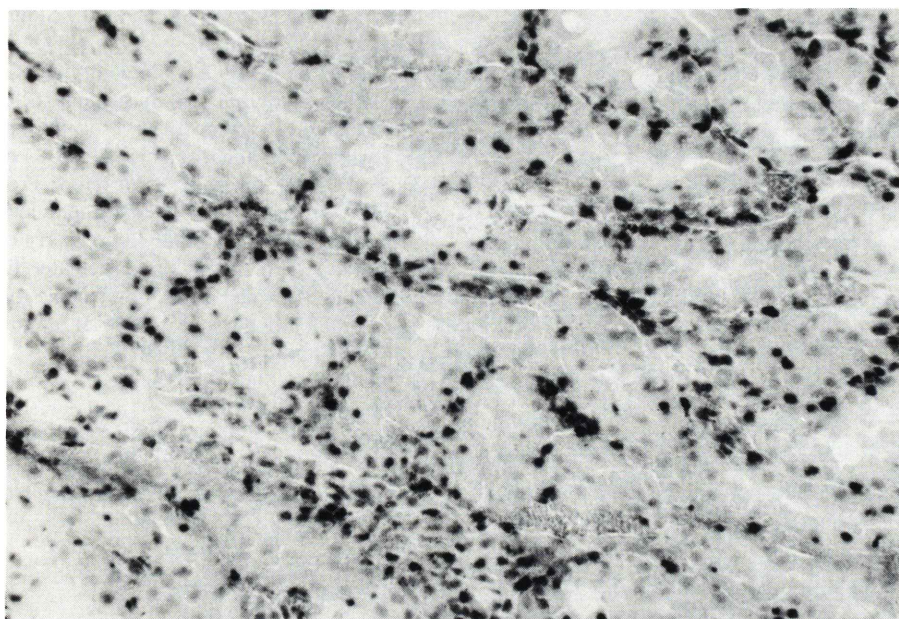


Fig. 2 There are no silver grains concentrated in collecting ducts. ($\times 400$)

そこで薬剤投与より乳剤とのコンタクトまでの時間を最大限短縮しうる方法として、包埋操作のともなわない凍結薄切法を用い、しかも乳剤を塗布したプレパラートを予め用意する、いわゆる乳剤前適用法にてコンタクトを行い、さらに乾燥操作の前に（あるいは同時に）露出操作を行う低温露出法を用いて ARG を作成した。さらに急速凍結時に保護剤を使用せず、その後の凍結も必要最小限の時間内にとどめるなど、操作過程の短縮が可能な部分を可及的最大限削除した。その結果、薬剤投与よりほぼ2~3時間でコンタクトが可能となり、今回のように ^{99m}Tc に代表される短半減期核種を用いても十分な露出が可能となった。

一方、凍結乾燥包埋法などを用いても、30 mCi/kg 以上の大量投与を行えば、ARG の作成は可能であり、すでに ^{99m}Tc -DMSA を用いて行った報告⁵⁾がある。しかし大量投与を行うことにより溶媒量が増加し、したがって実験小動物にとって循環体液の急激な増大をきたすことになる。さらに ^{99m}Tc -DTPA のような排泄の速い物質ではバックグラウンドの急激な上昇をきたし、いわゆる

ARG 上の「かぶり現象」をきたす可能性がある。とはいえ短半減期核種を使用する以上、放射能の減少を考慮し、10 mCi/kg の投与は必要と考える。著者らの経験ではこの程度の量では、上記のような弊害はまず避けられるように思われた。

また γ 線放出物質での ARG に関しては、少なくとも ^{99m}Tc の場合、内部転換電子やオージェ電子の効果により、今回用いた乳剤で十分な黒化が得られるように思われた。

以上 ^{99m}Tc -DTPA でのマイクロ ARG を中心に、特に方法論について若干の考察を加えた。

今回報告した方法は、短時間内に ARG 操作を行わなければならないため、ある程度のテクニックを修得する必要があるが、ARG 手技としては基本的かつ簡便な方法であるため、 ^{99m}Tc 標識化合物のような短半減期、水溶性、 γ 線放出物質の生体内動態を基礎的に解析する手段として有用であると思われる。

今後さらに、部分的な操作法の改良、他の ^{99m}Tc 標識化合物での本法の追試などを加え検討を重ねたいと思う。

V. 結 語

腎スキャンニング剤 ^{99m}Tc -DTPA の細胞レベルにおける腎内動態を検討する目的で、ラットを用いてマイクロ ARG を試みた。

^{99m}Tc は短半減期、 γ 線放出かつ水溶性物質であるため施行上各種技術的検討を重ね、一応満足すべき結果を得ることができた。

本法は、 ^{99m}Tc 標識化合物の生体内動態を解析する一つの手段として有用と思われる。

文 献

- 1) Nagata T, Shimamura K: Radioautographic studies on calcium absorption. 1. Calcium absorption in the stomach of rat. *Med J Shinshu Univ* **3**: 83-90, 1958
- 2) Stumpf WE, Roth LJ: Freeze-drying of small tissue samples and thin frozen sections below -60°C . —a simple method of cryosorption pumping. *J Histochem Cytochem.*, **15**: 243-251, 1967
- 3) Holt MW, Cowing RF, Warren S: Preparation of redioautographs of tissues without loss of water-soluble ^{32}P . *Science* **110**: 328-329, 1949
- 4) Blank H, McCarthy PL, Delemater EP: A non-vacuum freezing-dehydrating technic for histology, autoradiography and microbial cystology. *Stain Technol* **26**: 193-197, 1951
- 5) Willis KW, Martinez DA, Hedley-Whyte ET, et al: Renal localization of ^{99m}Tc -stannous glucoheptonate and ^{99m}Tc -stannous dimercaptosuccinate in the rat by frozen section autoradiography. The efficiency and resolution of Technetium-99m. *Rad Res* **69**: 475-488, 1977

Summary

Microautoradiography of Water-soluble ^{99m}Tc -labelled Compounds —with ^{99m}Tc -DTPA—

Shigeru IKEDA, Awato FUJINO and Akira ISHIBASHI

Department of Urology, School of Medicine, Kitasato Univ., Sagami-hara

Renal localization of ^{99m}Tc -DTPA (diethylenetriamine penta acetic acid) 2 minutes after injection into rats, was investigated using microautoradiography. Besides, optimal technical conditions for the autoradiography with ^{99m}Tc were also studied. Because this radionuclide is water soluble substance with short physical half-life, peculiar methods were required.

For preventing diffusion of soluble radionuclides until exposure to the autoradiographic emulsion, frozen sectioning and frozen exposure methods were accepted in the dark room. Besides, minimizing the decrease of radioactivity, some

modifications against the usual procedure had to be done.

In spite of these disadvantages, we could get favourable result by these methods about the information on the renal distribution of ^{99m}Tc -DTPA.

Microautoradiographs demonstrated the specific accumulation to the glomeruli at 2 minutes after injection. There were little accumulation in the tubules and collecting ducts.

Key words: ^{99m}Tc -DTPA, microautoradiography, water soluble substance, frozen section.