

《ノート》

癌診断薬 ^{99m}Tc (V)-DMS 標識のキット化： キットの作製と標識条件の検討

The Development of New Tumor Imaging ^{99m}Tc (V)-DMS Kit: Preparation and Labeling Condition Studies

四方田 勇* 堀内 和子* 幡 直孝* 枡田 秀祐*
横山 陽* 小川 弘** 中沢 信彦** 押井 哲夫**

Isamu YOMODA*, Kazuko HORIUCHI*, Naotaka HATA*, Hidesuke MASUDA*,
Akira YOKOYAMA*, Hiroshi OGAWA**, Nobuhiko NAKAZAWA**
and Tetsuo Ooi**

*Department of Radiopharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Kyoto University, Kyoto

**Daiichi Radioisotope Labs., Ltd., Tokyo, Japan

I. 結 言

核医学診断の分野において、放射能の性質にすぐれる ^{99m}Tc (以下 Tc と略す) を標識核種とする癌診断薬の開発が非常に強く望まれている。著者らは、最近、ジメルカプトコハク酸 (DMS) を配位子にする 5 価 Tc 多核錯体, Tc (V)-DMS を新しい癌診断薬剤として考案し、この錯体の標識反応ならびに得られた錯体の臨床応用における有用性について検討した¹⁾。

現在, Tc (V)-DMS の基礎的研究ならびに臨床研究が、さらに多角的に進められているが、本報では、その一環として、臨床利用における重要な課題である標識のキット化について検討した結果を報告する。

* 京都大学薬学部放射性薬品化学教室

** 第一ラジオアイソトープ研究所

受付: 61 年 6 月 5 日

最終稿受付: 61 年 9 月 10 日

別刷請求先: 京都市左京区吉田下阿達町 (☎ 606)

京都大学薬学部放射性薬品化学教室

横 山 陽

II. 実験方法

1. Tc (V)-DMS キットの調製

キット用バイアルは、150°C、90 分間乾熱滅菌したものを、また、その他の器具、およびゴム栓は、すべて滅菌済みのものを使用した。また、ジメルカプトコハク酸 (DMS)、およびその他の試薬類は、すべて半井化学薬品㈱より購入した試薬特級品を、水は、注射用蒸留水を使用した。

キットの調製は、DMS、pH 調整用 NaHCO_3 、賦形剤 (グルコース、イノシトール、マンニトール) を一定濃度に溶かした水溶液 20 ml に、窒素ガスを 15 分通した。続いて、これに、同じく窒素気流下で調製した $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ の 0.1 N HCl 溶液を 0.2 ml 加え、さらに 15 分間窒素ガスを通した後、その操作を続けながら、1 ml ずつバイアルに分注し、直ちに凍結乾燥を行った (6 時間)。

以上の操作で得られた凍結乾燥品を窒素ガスで

Key words: ^{99m}Tc (V)-DMS, Kit, Tumor imaging agent.

充填させた状態で、ゴム栓で密封したものを、Tc(V)-DMS キットとし、保存は、デシケータ中、4°C および 25°C で行った。

2. Tc(V)-DMS の調製

Tc(V)-DMS の調製は、以下に述べるようなキットを用いた標識方法(以下キット法と略す)、ならびに前報で報告した標識方法¹⁾(以下 solution 法と略す)に従って行った。

(i) キット法による標識

第一ラジオアイソトープ研究所製ウルトラテクネカウから溶出した TcO_4^- 生理食塩水溶出液の pH を、 NaHCO_3 水溶液で約 8 に調整し、この 1 ml を前述のキットに加え、よく振とうした。最後に、0.22 μm ミリポアフィルタを通したものを検体とした。

(ii) solution 法による標識

0.1 M NaHCO_3 2 ml に、1.09 mg DMS を溶解し ($3.0 \times 10^{-3}\text{M}$)、前述のジェネレータから溶出した TcO_4^- 0.1 ml を加え、15 分間窒素ガスを通した。別に窒素気流下で 0.1 N HCl に溶解し調製した 0.01 M SnCl_2 溶液 20 μl をこれに加え(最終濃度 $0.9 \times 10^{-4}\text{M}$)、さらに窒素ガスを、15分間通した。最後に、0.22 μm ミリポアフィルタを通したものを検体とした。

3. 分析方法

標識体の放射化学的純度の検討には、主に薄層クロマトグラフィ(TLC)を用い、必要に応じて、担癌マウス体内分布実験を行った。TLC には、

シリカゲルプレート(Merck 社)を使用し、展開溶媒には、 $n\text{-BuOH}:\text{AcOH}:\text{H}_2\text{O}=3:2:3$ を用いた。Fig. 1 に、Tc(V)-DMS の典型的な TLC パターンを、 TcO_4^- のそれと比較して示す。標識率は、ラジオクロマトグラム上の全面積に対する Tc(V)-DMS のピーク ($R_f=0.40\sim 0.50$) の面積比によって求めた。なお、この展開溶媒において、 TcO_4^- は、Fig. 1 のように、 $R_f=0.65\sim 0.70$, Tc コロイドは、原点付近にそれぞれピークを示す。

また、担癌マウス体内分布実験は、以下のように行った。左大腿部に、Ehrlich 癌細胞を移植し、一週間経過した ddY 系雄性担癌マウス(25~30 g)に、検体 50 μl を尾静脈より投与した。3 時間後、エーテル麻酔死させ、各臓器を摘出、臓器の重量を測定し、放射活性を、ウエル型ガンマカウンタで測定した。結果は、% dose/g 組織で表示した。

III. 結果および考察

Tc(V)-DMS 錯体において、5 価 Tc の酸化状態と多核化が一定に進んだ化学状態が必要である。もし、この化学状態に変化が与えられれば、癌診断薬としての機能が失われる。このことの典型的な例は、3 価 Tc の酸化状態にあることが報告されている²⁻³⁾、腎診断用 Tc-DMS 錯体にみられる¹⁾。

Tc(V)-DMS 標識方法に関しては、著者らは、これまでに「実験方法」の部に記載した solution 法を確立したが、本研究では、さらに、標識操作を簡易にすることを目的として、 Sn^{2+} と DMS の混合体を主成分とし、 TcO_4^- の添加のみで標識の行われる Tc(V)-DMS キットの作製を計画した。

このタイプのキットは、一般の Tc 放射性医薬品キットにみられるものであるが、これによる標識反応は、pH の変動、ならびに大過剰下での Sn^{2+} 、および DMS の濃度変化を、反応初期に伴うことが理由となつて、化学状態を相違する多種類の錯体を形成することが多い。特に、化学的に多様な多核錯体では、この影響を受けやすく、事実、多核錯体構造を基本構造にする多くの Tc 放射性医薬品において、その成分が単一である例は、

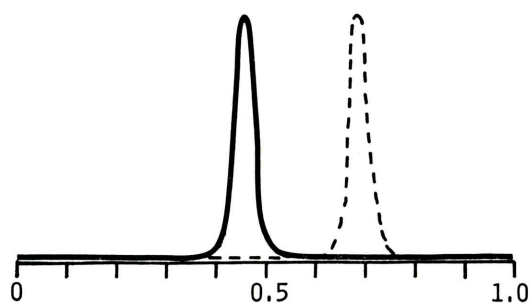


Fig. 1 TLC patterns of Tc(V)-DMS and TcO_4^- . solvent, $n\text{-BuOH}:\text{AcOH}:\text{H}_2\text{O}=3:2:3$. Tc(V)-DMS: —, $R_f=0.40\sim 0.50$. TcO_4^- : ----, $R_f=0.65\sim 0.70$.

Table 1 Effect of added NaHCO₃ on the pH of DMS solution

| NaHCO ₃ /DMS ratio* | pH |
|--------------------------------|-------------|
| 0 | 2.85 |
| 0.5 | 3.02 |
| 1.0 | 3.50 |
| 2.0 | 6.10 |
| 3.0 | 6.62 |
| 4.0 | 6.88 |
| 5.0 | 7.00 |

*NaHCO₃/DMS ratio=moles of NaHCO₃ added per mole of DMS (DMS=3.0×10⁻³M).

きわめて少ない。

したがって、Tc (V)-DMS キットの作製にあたって、標識反応溶液の DMS, Sn²⁺ 濃度に変動の少ない状態を与える Sn-DMS 錯体をキットの主成分にすることを基本的に考えた。さらに、solution 法で求められた標識条件を参考にして、Tc (V)-DMS 調製に最適のキット作製、ならびに、このキットによる標識反応を、以下のように検討した。また、shelf-life の観点から、Sn-DMS 錯体反応溶液の凍結乾燥品を用いるキットが望まれるので、これについても必要な研究を併せて行った。

1. pH

前報で報告したように¹⁾、Tc (V)-DMS の標識反応においては、5 価 Tc の形成に有利な pH 8 付近のアルカリ域²⁾で最も高い収率が得られる。したがって Sn-DMS 錯体からなるキットを使用する Tc (V)-DMS 調製においても、TcO₄⁻ を添加した時、この pH を与える条件をそなえたキットの調製が必要である。しかし、pH 8 では、Sn²⁺ の加水分解のため、安定な Sn-DMS 錯体形成が維持されない。事実、pH 8 で調製したキットに、TcO₄⁻ を加えた時、TLC 分析は、TcO₄⁻ のみの検出結果を示した。

そこで、キットに加える TcO₄⁻ 溶出液を、あらかじめ NaHCO₃ 水溶液で、pH 8 に調整し、一方、キットに、Sn-DMS の錯体形成と、Sn²⁺ の加水分解の進行のバランスを考慮して、必要最少限の NaHCO₃ を pH の調整のために加える方針

を取り、以下の検討および考察によって、その NaHCO₃ の濃度を定めた。

DMS 溶液に NaHCO₃ を加え、NaHCO₃/DMS 比と pH の変化との関係を調べた結果 (Table 1)、NaHCO₃/DMS 比=2 のとき、急激な pH の上昇 (pH 6.10) が認められた。DMS のプロトンの解離定数は、pK₁=2.71, pK₂=3.48, pK₃=8.89, pK₄=10.79 であるので⁵⁾、この結果は、きわめて妥当である。一方、DMS は、2 個のカルボキシル基が解離した pH 域において、Zn²⁺, Ni²⁺ など金属イオンが安定な錯体を形成することが知られているので^{5,6)}、Sn²⁺ との反応にも、この DMS の解離イオンが有利と考えられ、かつ NaHCO₃/DMS 比=2 のときには、pH の上昇が 6 程度に抑えられる条件が満たされている。したがって、DMS に対して 2 等量の NaHCO₃ を加えることにした。

2. DMS と Sn²⁺ 濃度

pH とともに、DMS および Sn²⁺ 濃度は、Tc (V)-DMS の標識に影響する最も重要なパラメータである。これらのそれぞれについて TLC で検討した結果を Fig. 2 に示す。

DMS 濃度と、Tc (V)-DMS の標識率との関係を (A) に示す。なお、Sn²⁺ 1.0×10⁻⁴M, NaHCO₃ は、1. で定めた DMS に対して 2 等量を加え、さらに賦形剤として グルコース 10 mg/ml が用いられた。DMS の濃度が 7.5×10⁻⁴M~3.0×10⁻³M の範囲で、Tc (V)-DMS が高い標識率で得られた。しかし、7.5×10⁻⁴M では、R_f 値の高い方向に、わずかにピークが崩れ、不安定な錯体の混入が高くなったことが示された。一方、6.0×10⁻³M 以上になると、R_f=0.30~0.40 および原点付近に、別種のピークが現れ、Tc (V)-DMS のピーク (R_f=0.40~0.50) が減少し、DMS 濃度増加によって、他種の多核錯体ができることを示している。この結果 DMS の濃度として、1.5~3.0×10⁻³M が最適と考えられ、solution 法と同濃度の 3.0×10⁻³M を選んだ。

Sn²⁺ 濃度と、Tc (V)-DMS の標識率との関係を (B) に示す。DMS 濃度は、先に選んだ 3.0×10⁻³M,

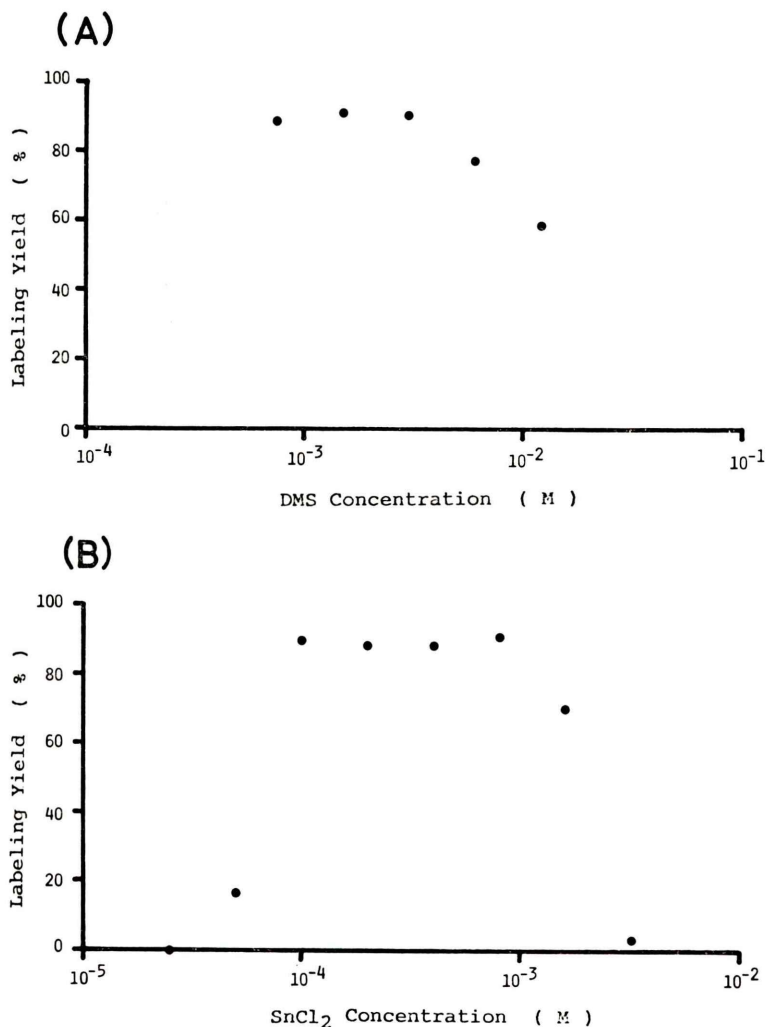


Fig. 2 Studies on Tc(V)-DMS kit preparation parameters: (A) DMS concentration, (B) SnCl₂ concentration. Yield (%) obtained from TLC (solvent, n-BuOH: AcOH: H₂O=3: 2: 3) by integration of peak areas under R_f=0.40-0.50.

また NaHCO₃ 濃度, グルコース濃度は前述のとおりである。Sn²⁺ の濃度が $1.0 \sim 8.0 \times 10^{-4} \text{M}$ の範囲で, 最も高い標識率が得られた。 $5.0 \times 10^{-5} \text{M}$ 以下の濃度では, TcO₄⁻ のピークが現れ, 錯体形成反応が, 進行しなかった。また, $1.6 \times 10^{-2} \text{M}$ 以上の Sn²⁺ 濃度では, 原点付近のピークが増加した。これは, Sn²⁺ の高濃度下では, Sn²⁺ の加水分解が進み, それに伴って, Tc コロイドが形成されたことを示す。 solution 法と同程度の Sn²⁺

濃度 $1.0 \times 10^{-4} \text{M}$ で高い標識率が得られるが, その濃度以下で急激に標識率が低下し, また, Sn²⁺ は, キット保存中, 試薬類の中で最も化学変化する可能性が大きい。したがって, solution 法の約 2 倍の濃度の $2.0 \times 10^{-4} \text{M}$ を最適条件として選んだ。

3. 賦形剤

キット作製において, 一般に行われているように, Sn-DMS の反応液の凍結乾燥操作を容易に

するために、全溶液量の 1~2 % 程度の賦形剤を加えることを考え、賦形剤として、グルコース、イノシトール、マンニトールを選び、キット調製を検討した。他の試薬類の濃度は、これまでの検討結果に従った。Tc 標識後の標識溶液の TLC 分析では、ほとんど差がなく、どの賦形剤を使っても、単一の Tc 錯体のピークが得られた。しかし、マウス体内分布実験の結果 (Table 2)、癌への集積には、それほど大きな差が見られないが、一方、血液クリアランスにおいて、グルコースを賦形剤としたキットを用いて得られた標識体に最も早い傾向が認められた。この結果から、癌イメージングに重要な癌/血液比において、グルコースに最

も高い値が得られたので、グルコースを賦形剤とすることに定めた。グルコースの効果については、その代謝や Tc とのキレート形成能が原因する可能性があり、今後の興味のある課題として残される。

4. キットの shelf-life

次に、このキットを長期間保存した後の有効性、すなわち shelf-life を検討する目的で、25°C および 4°C で種々の期間キットを保存した後、それを用いて、Tc 標識を行い、標識溶液の TLC 分析を行った。その結果、25°C の保存下、1 日後では、Tc (V)-DMS の単一ピークが検出されたが、2 週間保存後では、ほとんど Tc (V)-DMS のピークは認められず、大部分は、 TcO_4^- として検出された。一方、4°C の保存下の状態では、3 か月後でも、TLC 分析上は、変化が認められなかった。

4°C で保存状態をさらに詳しく検討するため、1, 2, 3 か月保存したキットを用いて Tc (V)-DMS を調製し、担癌マウス体内分布を調べ、その結果を、solution 法によって標識した Tc (V)-DMS のそれと比較した。Table 3 に示すように、3 か月保存のキットにおいても、それを用いて得られた標識体の示す癌/血液比は、solution 法による標識体の示すそれとほとんど同じであった。

このように、キットは、調製後、4°C の条件下で 3 か月間は有効であると認められた。

Table 2 Kit excipient: Effect on Biodistribution

| Excipient | Glucose* | Inositol** | Mannitol** |
|-----------|----------------------|-------------|-------------|
| | % dose/g tissue*** | | |
| Tumor | 0.33 (0.03) | 0.34 (0.08) | 0.38 (0.10) |
| Blood | 0.15 (0.03) | 0.18 (0.04) | 0.30 (0.09) |
| Intestine | 0.19 (0.04) | 0.19 (0.04) | 0.35 (0.08) |
| Liver | 0.20 (0.03) | 0.28 (0.07) | 0.38 (0.09) |
| Kidney | 4.31 (1.65) | 2.58 (0.55) | 5.82 (1.54) |
| Stomach | 0.22 (0.18) | 0.14 (0.03) | 0.15 (0.03) |
| Bone | 6.13 (0.77) | 7.20 (0.80) | 6.12 (2.00) |
| Muscle | 0.05 (0.02) | 0.05 (0.04) | 0.08 (0.03) |
| | Tumor/Blood ratio*** | | |
| | 2.30 (0.42) | 1.83 (0.08) | 1.29 (0.08) |

*10 mg/ml

**20 mg/ml

***3 hours post-injection, Mean \pm (1 SD) of 5 animals

Table 3 Biodistribution of ^{99m}Tc (V)-DMS in Ehrlich tumor bearing mice*

| Solution method | Kit shelf-life (months)† | | |
|-----------------|--------------------------|-------------|-------------|
| | 1 | 2 | 3 |
| | % dose/g tissue** | | |
| Tumor | 0.20 (0.07) | 0.33 (0.03) | 0.42 (0.07) |
| Blood | 0.10 (0.02) | 0.15 (0.03) | 0.21 (0.05) |
| Intestine | 0.29 (0.04) | 0.19 (0.04) | 0.15 (0.03) |
| Liver | 0.18 (0.06) | 0.20 (0.03) | 0.22 (0.03) |
| Kidney | 1.97 (0.25) | 4.31 (1.65) | 3.23 (0.51) |
| Stomach | 0.30 (0.21) | 0.22 (0.18) | 0.30 (0.11) |
| Bone | 4.71 (0.85) | 6.13 (0.77) | 6.23 (0.51) |
| Muscle | 0.09 (0.08) | 0.05 (0.02) | 0.08 (0.02) |
| | Tumor/Blood ratio** | | |
| | 2.06 (0.67) | 2.30 (0.42) | 2.00 (0.33) |
| | | | 1.87 (0.24) |

† stored at 4°C, * 3 hours post-injection, ** Mean \pm (1 SD) of 5 animals.

Table 4 Tc(V)-DMS kit content

| | mg/ml | Concentration |
|---|-------|------------------------|
| DMS | 0.547 | 3.0×10^{-3} M |
| $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 0.045 | 2.0×10^{-4} M |
| NaHCO_3 | 0.504 | 6.0×10^{-3} M |
| Glucose | 10 | 10 mg/ml |

以上の検討結果を Table 4 にまとめる. Tc (V)-DMS (1 ml 用) キットは, DMS 0.547 mg (3.0×10^{-3} M), $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.045 mg (2.0×10^{-4} M), NaHCO_3 0.504 mg (6.0×10^{-3} M), グルコース 10 mg/ml を, 「実験方法」に記載した手順に加え, Sn-DMS 錯体を形成させた後, その反応溶液を凍結乾燥することによって調製される. 標識は, ジェネレータから溶出された TcO_4^- 生理食塩水液を, NaHCO_3 溶液で pH 8 に調整し, その 1 ml を, キットに加えて振とうすることによって完了する. また, キットの保存期間は, 4°C 条件下, 3 か月である.

前述したように, 多核錯体が単一の成分として得られることは, きわめてまれである. 今回, キット法によって, Tc (V)-DMS が, 高い標識率で得られたことは, Tc (V)-DMS の癌診断薬としての有用性を, さらに示したものであると考える.

このキットの使用によって, Tc (V)-DMS の日常的臨床応用が可能になり, 現在すでに 400 例以上の臨床診断が行われるに至っている. これまでに, 甲状腺髄様癌や, 骨肉腫, 軟部組織腫瘍などの診断に対する有用性が評価されており⁷⁻¹¹⁾, さらに, その検討が続けられている.

文 献

1) Yokoyama A, Hata N, Horiuchi K, et al: The

design of a pentavalent $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -dimercaptosuccinate complex as a tumor imaging agent. *Int J Nucl Med Biol* 12: 273-279, 1985

- 2) Ikeda I, Inoue O, Kurata K: Chemical and biological studies on $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DMS-II: Effect of Sn (II) on the formation of various Tc-DMS complexes. *Int J Appl Radiat Isot* 27: 681-688, 1976
- 3) Garcia R, Galvez J, Moreno JL: Stoichiometric and kinetic of the $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DMSA complex obtained with stannous excess: A possible model for the physicochemical behaviour of the radiopharmaceutical $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DMSA. *Int J Appl Radiat Isot* 33: 521-524, 1982
- 4) Russell CD, Cash AG: Complexes of technetium with pyrophosphate, etidronate, and medronate. *J Nucl Med* 20: 532-537, 1979
- 5) Lenz GR, Martell AR: Metal chelates of mercaptosuccinic and α, α' -dimercaptosuccinic acids. *Inorg Chem* 4: 378-384, 1965
- 6) Egorava LG, Okonishnikova IE, Nirenburg VL, et al: Comparative study of the interaction of stereoisomers of dimercaptosuccinic acid with certain metals. *Pharm Chem J* 5: 23-26, 1971
- 7) Ohta H, Yamamoto K, Endo K, et al: A new imaging agent for medullary carcinoma of the thyroid. *J Nucl Med* 25: 323-325, 1984
- 8) Ohta H, Endo K, Fujita T, et al: Imaging of soft tissue tumors with Tc(V)- $^{99\text{m}}$ dimercaptosuccinic acids, a new tumor seeking agent. *Clin Nucl Med* 9: 568-573, 1984
- 9) Ohta H, Ishii M, Yosizumi M, et al: Is ECT imaging with Tc(V)- $^{99\text{m}}$ dimercaptosuccinic acids useful to detect lung metastasis of osteosarcoma? *Clin Nucl Med* 10: 13-15, 1985
- 10) Ohta H, Endo K, Fujita T, et al: Imaging of head and neck tumors with technetium(V)- $^{99\text{m}}$ DMSA, a new tumor-seeking agent. *Clin Nucl Med* 10: 855-860, 1985
- 11) 太田仁八, 遠藤啓吾, 小泉 満, 他: 新しい放射性医薬品 Tc (V)- $^{99\text{m}}$ Dimercaptosuccinic acid による腫瘍シンチグラフィに関する研究: 臨床的有用性について. *核医学* 22: 1653-1660, 1985