

## 《研究速報》

2, 2-dimethoxypropane を用いた化学洗浄法による  
定量的二重標識オートラジオグラフィ

—基礎的検討について—

隅屋 寿\* 松田 博史\* 辻 志郎\* 大場 洋\*  
 寺田 一志\* 今井 啓子\* 久田 欣一\* 池田 清延\*\*  
 柴 和弘\*\*\* 森 厚文\*\*\* 関 宏恭\*\*\*\*

## I. はじめに

近年、同一モデルに二種類のアイソトープを投与して血流と代謝を同時に測定する二重標識オートラジオグラフィ法が数多く報告されている。これには二つの核種の半減期の差を利用する半減期法<sup>1-4)</sup>といずれか一方の核種を洗い出す化学洗浄法<sup>5,6)</sup>がある。N-isopropyl-p-<sup>125</sup>I-iodoamphetamine (<sup>125</sup>I-IMP) は脳血流用剤として臨床にも使われている<sup>123</sup>I-IMP<sup>7,8)</sup> の <sup>125</sup>I 標識物質である。IMP と iodoantipyrine による脳血流値は一致することが報告されており<sup>9)</sup>、また IMP の方が計算が簡便であることはすでに著者らが報告した<sup>4)</sup>。今回著者らは、この <sup>125</sup>I-IMP と <sup>3</sup>H-2-deoxyglucose (<sup>3</sup>H-DG) による二重標識オートラジオグラフィを 2, 2-dimethoxypropane (DMP) を用いた化学洗浄法により施行するための基礎的検討を行い、また実際のオートラジオグラムで血流と代謝の独立したイメージが得られたので報告する。

## II. 方 法

DMP の洗浄力をみるために <sup>125</sup>I-IMP のみを投与したラットおよび <sup>3</sup>H-DG のみを投与したラットの脳切片をそれぞれ DMP で洗浄し、経時的に切片のカウントを測定した。また <sup>3</sup>H-DG については洗浄後露光させ、洗浄していない切片とフィルムの黒化度を比較した。<sup>3</sup>H のベータ線の遮蔽に用いる厚さ 6  $\mu$  の均一なポリエチレンの膜 (ルミラ膜) の遮蔽力を見るために上記 2 種類の切片にルミラ膜をかぶせ、かぶせない切片と同時に露光させフィルムの黒化度を比較した。

脳血流と脳代謝の不一致を見るために脳圧迫モデルを作製した。すなわちネンブタール麻酔 (30 mg/kg) 下でウィスターラット 6 匹 (体重 250-350 g) の右感覚運動野直上の右硬膜外腔にゴムのバルーンを装着後、バルーンに 0.1 ml の水を 5 分間かけて注入し脳を圧迫した。1 時間後に <sup>3</sup>H-DG (New England Nuclear 社製) を 100  $\mu$ Ci (比放射能 5 mCi/ $\mu$ mol) 静注し、経時的に動脈血採血を 43 分後まで行った。43 分後に今度は <sup>125</sup>I-IMP (日本メジフィジックス社製) を 50  $\mu$ Ci (比放射能 1 mCi/mmol) 静注し経時的に動脈血採血を 2 分間行った。2 分後すなわち <sup>3</sup>H-DG 静注 45 分後にラットを断頭し、厚さ 20  $\mu$  の連続切片を作製した。血流イメージは切片にルミラ膜をかぶせることにより <sup>3</sup>H-DG のベータ線を遮蔽し、Kodak 社製 X-Omat AR film に 2 か月間露光させることによって得られた。代謝イメージは DMP で切片を 3

\* 金沢大学医学部核医学教室

\*\* 同 脳神経外科学教室

\*\*\* 同 アイソトープ総合センター

\*\*\*\* 富山医科薬科大学放射線科学教室

受付: 62 年 1 月 8 日

最終稿受付: 62 年 2 月 6 日

別刷請求先: 金沢市宝町 13-1 (☎ 920)

金沢大学医学部核医学教室

隅屋 寿

時間洗浄することにより  $^{125}\text{I}$ -IMP を洗い出し、 $^3\text{H}$  専用の LKB 社製 ultrofilm に 2 か月間露光させることにより得られた。定量化のため、既知濃度の標準線源を以前報告した方法で<sup>4)</sup>、ゼラチンを用いて作製し、切片と同じフィルムに露光させた。血流値は reference sample 法<sup>10)</sup>、グルコース代謝率は Sokoloff 法<sup>11)</sup> により求めた。また代謝イメージを得る際に切片の一部にルミラ膜をかぶせて、 $^{125}\text{I}$ -IMP が完全に洗い出されているか毎回確認した。

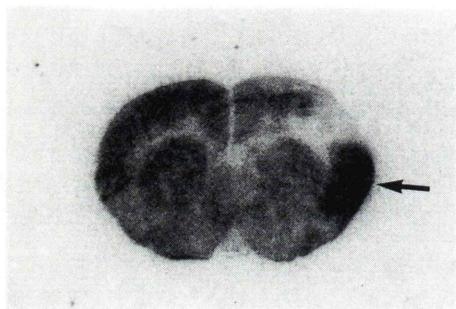


Fig. 1 Cerebral blood flow image by  $^{125}\text{I}$ -IMP autoradiography of the brain-compressed model rat. Marked increase of CBF is observed at a cortex around the compressed area (arrow). The CBF value is much greater than that of the other cortices of the affected side.

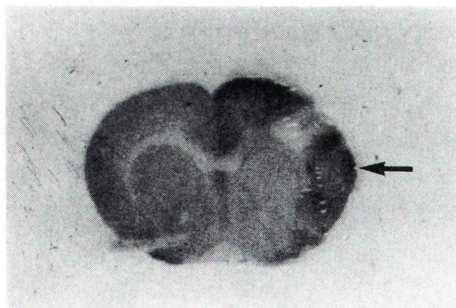


Fig. 2 Cerebral metabolic rate for glucose image by  $^3\text{H}$ -DG autoradiography of the neighbor section of that of Fig. 1. Mild increase of CMRgl is observed at the same cortex as Fig. 1 (arrow). But the CMRgl value is almost the same as the other cortices of the affected side.

### III. 結 果

DMP による 3 時間の洗浄で  $^{125}\text{I}$ -IMP を投与したラットの脳切片はそのカウントが 2% 以下に減少したが、 $^3\text{H}$ -DG を投与したラットの脳切片のカウントは変化がなく、また露光後のイメージでも洗浄を行っていない切片と黒化度において有意の変化はなかった。また切片にルミラ膜をかぶせると、 $^{125}\text{I}$ -IMP のフィルムの黒化度に変化はなかったが、 $^3\text{H}$ -DG は全く露光を示さなかった。圧迫モデルの 1 例では健側の皮質の血流が 139 ml/100 g/min であるのに対し、圧迫部位の直下では 10 ml/100 g/min と低下し、その周囲では 220 ml/100 g/min と増加していたが、さらにその周囲は 123 ml/100 g/min と健側と有意の変化はなかった (Fig. 1)。グルコース代謝は健側では 110  $\mu\text{mol}/100 \text{ g/min}$  であるのに対し圧迫部位直下では 30  $\mu\text{mol}/100 \text{ g/min}$  と低下し、その周囲では 180  $\mu\text{mol}/100 \text{ g/min}$  と上昇し、さらにその周囲も同じく 180  $\mu\text{mol}/100 \text{ g/min}$  と上昇し、血流との不一致がみられた (Fig. 2)。また DMP で洗浄した切片はルミラ膜をかぶせると全く露光を示さなかった (Fig. 3)。

### IV. 考 察

近年報告されている二重標識オートラジオグラフィの多くは半減期法である<sup>1~4)</sup>。すなわち短半

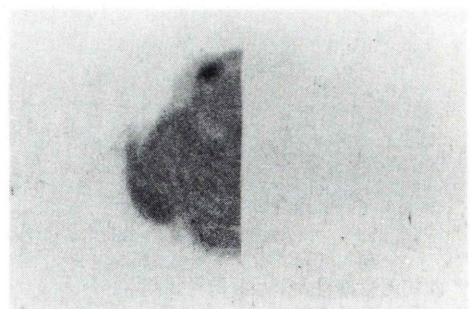


Fig. 3 Autoradiogram of a brain slice after chemical washing with thin membrane on the right half of the slice. No exposure is observed where the thin membrane was on.



減期の核種によるオートラジオグラフィを施行し、その減衰を待って長半減期の核種による 2 回目の露光が施行される。この方法の欠点は、半減期が短い場合は 1 回当たりの投与量が多く、素早く露光を開始しなければならないことである。また逆に最初の核種の半減期が長い場合、2 回目の露光まで時間がかかり過ぎる。例えば、今回の著者らの方法では、 $^{125}\text{I}$  の半減期が約 60 日のため 2 回目の露光までに数半減期すなわち約 1 年を費やしてしまう。これに対し、いずれか一方の核種を洗い出す化学洗浄法によるオートラジオグラフィ<sup>5,6)</sup>では、短半減期核種の減衰を待たずに 2 回目の露光を開始でき、わずかの投与量でも短期間に血流と代謝の両イメージが得られる。また同一切片ではなく隣接する連続切片を用いれば同時に露光を開始でき、さらに時間を短縮できる。今回著者らは化学洗浄物質として DMP を用いた。これは以前 iodoantipyrine の洗浄に用いられた報告はあるが<sup>5)</sup>、IMP の洗浄に使用したという報告はまだない。今回の検討では DMP による洗浄で、IMP はその 98% 以上が洗い出されたが、 $^3\text{H-DG}$  は全く変化を受けず、DMP が  $^{125}\text{I-IMP}$  のみを洗い出していることが確認できた。また洗浄後の切片にルミラ膜をかぶせて露光させることにより、 $^{125}\text{I-IMP}$  が完全に洗い出されているか容易に確認できた。フィルムのおおの核種に対する感度の違いを考慮しても、 $^{125}\text{I}$  に対する  $^3\text{H}$  の影響は無視でき、また、 $^3\text{H}$  に対する  $^{125}\text{I}$  の影響は 2% 以下である。最近、 $^3\text{H-DG}$  が DMP によって洗い出されるという報告<sup>6)</sup>もあるが、これは洗浄時間が 2 日ないし 5 日間と非常に長過ぎるためであると思われる。洗浄時間を 3 時間にすれば、われわれの結果では  $^3\text{H-DG}$  は全く変化を受けない。また圧迫モデルのイメージ上でも、実際に血流と代謝の不一致が確認できた。したがって、本法は二重標識オートラジオグラフィとして cross-contamination の少ない優れた方法と考えられる。

## V. 結 語

DMP を用いた化学洗浄法による定量的二重標

識オートラジオグラフィを施行するための基礎的検討を行い以下の結論を得た。

1. DMP による洗浄を 3 時間行ったら、 $^{125}\text{I-IMP}$  はその 98% 以上が洗い出されたが、 $^3\text{H-DG}$  は全く影響を受けなかった。また、ルミラ膜を切片にかぶせることにより、 $^3\text{H}$  のベータ線をほぼ完全に遮蔽することができた。したがって、cross-contamination は 2% 以下である。
2. DMP で洗浄した切片の一部にルミラ膜をかぶせて露光させることにより、 $^{125}\text{I-IMP}$  が完全に洗い出されているか容易に確認できた。
3. 脳圧迫モデルを作製し、この方法でオートラジオグラフィを施行したところ、血流と代謝の不一致がよく捉えられた。
4. この方法は露光の時間を半減期法より短縮でき、少ない投与量でさまざまなモデルの血流と代謝の状態を同時に評価でき有用である。

$^{125}\text{I-IMP}$  をご提供下さいました日本メジフィジックス社に感謝致します。

## 文 献

- 1) Mies G, Niebuhr I, Hossmann KA, et al: Simultaneous measurement of blood flow and glucose metabolism by autoradiographic techniques. *Stroke* **12**: 581-588, 1981
- 2) Lear JL, Jones SC, Greenberg JH, et al: Use of  $^{123}\text{I}$  and  $^{14}\text{C}$  in a double radionuclide autoradiographic technique for simultaneous measurement of LCBF and LCMRgl. *Stroke* **12**: 589-597, 1981
- 3) Jones SC, Lear JL, Greenberg JH, et al: A double label autoradiographic technique for the quantitative measure of cerebral blood flow and glucose metabolism. *Acta Neurol Scand (Suppl)* **72**: 202-203, 1979
- 4) 隅屋 寿, 松田博史, 関 宏恭, 他: オートラジオグラフィ法によるラットの脳血流脳代謝同時測定. *核医学* **23**: 167-172, 1986
- 5) Diemer NH, Rosenørn J: Determination of local cerebral blood flow and glucose metabolism or transfer by means of a double autoradiographic method. *J Cereb Blood Flow Metab (Suppl)* **1**: S72-S73, 1981
- 6) Ginsberg MD, Smith DW, Wachtel MS, et al: Simultaneous determination of local cerebral glucose utilization and blood flow by carbon-14

- double-label autoradiography: method of procedure and validation studies in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 6: 273-285, 1986
- 7) Winchell HS, Baldwin RM, Lin TH: Development of I-123-labeled amines for brain studies: localization of I-123 iodophenylalkyl amines in rat brain. *J Nucl Med* 21: 940-946, 1980
  - 8) Winchell HS, Horst WD, Braun L, et al: N-isopropyl-<sup>123</sup>I-p-iodoamphetamine: single-pass brain uptake and washout; binding to brain synaptosomes and localization in dog and monkey brain. *J Nucl Med* 21: 947-952, 1980
  - 9) Lear JL, Ackermann RF, Kameyama M, et al: Evaluation of [<sup>123</sup>I]-isopropylidoamphetamine as a tracer for local cerebral blood flow using direct autoradiographic comparison. *J Cereb Blood Flow Metab* 2: 179-185, 1982
  - 10) Malik AB, Kaplan JE, Saba TM: Reference sample method for cardiac output and regional blood flow determinations in the rat. *J Appl Physiol* 40: 472-475, 1976
  - 11) Sokoloff L, Reivich M, Kennedy C, et al: The [<sup>14</sup>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

### Summary

#### Quantitative Double-labeled Autoradiography by Chemical Washing Method Using 2,2-dimethoxypropane

Hisashi SUMIYA\*, Hiroshi MATSUDA\*, Shiro TSUJI\*, Hiroshi OHBA\*,  
Hitoshi TERADA\*, Keiko IMAI\*, Kinichi HISADA\*, Kiyonobu IKEDA\*\*,  
Kazuhiro SHIBA\*\*\*, Hirofumi MORI\*\*\* and Hiroyasu SEKI\*\*\*\*

\*Department of Nuclear Medicine, \*\*Neurosurgery, School of Medicine,

\*\*\*Radioisotope Center, Kanazawa University, Kanazawa

\*\*\*\*Department of Radiology, Toyama Medical and Pharmaceutical University, Toyama

We performed a double-labeled autoradiographic technique by chemical washing using 2,2-dimethoxypropane (DMP). N-isopropyl-p-<sup>125</sup>I-iodoamphetamine (<sup>125</sup>I-IMP) and <sup>3</sup>H-2-deoxyglucose (<sup>3</sup>H-DG) were used for the measurement of cerebral blood flow (CBF) and cerebral metabolic rate for glucose (CMRgl) respectively. CBF image was obtained by <sup>125</sup>I-IMP and X-Omat film (Kodak) with thin polyethylene membrane of 6 μ thickness that shielded the beta-ray of <sup>3</sup>H-DG of the slices. CMRgl image was obtained by <sup>3</sup>H-DG and ultrofilm (LKB) by washing out <sup>125</sup>I-IMP with DMP. DMP removed more than 98% of <sup>125</sup>I-IMP of brain slices but did not influence the con-

tent and distribution of <sup>3</sup>H-DG. No exposure was observed after chemical washing when the thin membrane was put on the slices, which indicates that <sup>125</sup>I-IMP was almost completely removed by DMP. This autoradiographic technique seems to be useful for evaluating CBF and CMRgl simultaneously under various conditions, since it has quite small cross-contamination and little restriction of shelf-life of a tracer.

**Key words:** Double-labeled autoradiography, N-isopropyl-p-<sup>125</sup>I-iodoamphetamine, <sup>3</sup>H-2-deoxyglucose, Cerebral blood flow, Cerebral glucose metabolism.