

## 《研究速報》

# ガリウムヒトフィブリノーゲン ( $^{67}\text{Ga}$ ) 注射液の 体内での安定性の評価

——ラットにおける血中放射能成分の分析——

高橋 啓悦\*    高橋 淳\*    岡野 栄\*    倉見 美規\*  
上田 信夫\*    葉杖 正昭\*

## I. 緒 言

近年、モノクローナル抗体などの生理活性タンパク質の放射性金属核種を用いた標識に Bifunctional Chelating Agent (以下 BCA と略す) が用いられるようになった<sup>1-3)</sup>。われわれは、この BCA 法をさらに展開し、反応性高分子を介して、多数の BCA をタンパク質に結合させるクラスター法を開発した<sup>4)</sup>。反応性高分子として、ジアルデヒドデンプン (DAS) を選択し、BCA であるデフェロキサミン (DFO) をヒトフィブリノーゲンに導入した。これに  $^{67}\text{Ga}$  を加えて標識されたガリウムヒトフィブリノーゲン ( $^{67}\text{Ga}$ ) 注射液 (以後  $^{67}\text{Ga}$ -Fib と略す) は、高い clottability を有し、臨床的にも血栓診断剤としての有用性が示されつつある<sup>5,6)</sup>。

今回、本剤の体内での安定性を評価する目的で、ラットの血中放射能成分の検索を行ったので報告する。

## II. 試料および方法

### 1. ヒトフィブリノーゲン-DAS-DFO 凍結乾燥品 (Fib 凍結乾燥品) の製造

Fib 凍結乾燥品は、既報に準じ調製した<sup>4)</sup>。すなわち、ヒトフィブリノーゲンと DAS および DFO を 0.15 M NaCl を含む 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) 中で混合して反応させ、ヒトフィブリノーゲン上に DAS を介して DFO を導入した。この液を 0.01 M ブドウ糖を含む 0.05 M リン酸-クエン酸緩衝液 (pH 7.0) に対して、透析した後、ゲル濾過クロマトグラフィー法 (TSK-4000 SW カラム, 東洋曹達製) により、タンパクモノマー分画を得た。このヒトフィブリノーゲン溶液に、安定化剤として L-アスコルビン酸ナトリウムを加え、タンパク量が、3.0 mg/バイアルになるようにバイアルに充填し凍結乾燥した。

### 2. $^{67}\text{Ga}$ -Fib の調製

Fib 凍結乾燥品に、検定日時において 2 mCi のクエン酸ガリウム ( $^{67}\text{Ga}$ ) 液 (日本メジフィジックス社製) 2 ml を加え、溶解することにより標識した。得られた  $^{67}\text{Ga}$ -Fib の電気泳動法<sup>7)</sup> による放射化学的純度と clottability<sup>8)</sup> は、それぞれ、90% 以上と 80% 以上であった。

### 3. ラットの血液採取

$^{67}\text{Ga}$ -Fib を Sprague-Dewely 系ラット (雌 180 g~230 g) の尾静脈より 0.2 ml 投与し、3 時間および 24 時間後に下行大動脈から採血した。血液は、ただちに 4°C, 8,000 rpm で 5 分間遠心分離し、プラズマを得た。

\* 日本メジフィジックス株式会社技術部

受付: 62 年 9 月 16 日

最終稿受付: 62 年 9 月 16 日

別刷請求先: 千葉県君津郡袖ヶ浦町北袖 3-1

(☎ 299-02)

日本メジフィジックス株式会社

技術部研究課

高橋 啓悦

**Table 1** Analytical method of radioactivity in plasma

I. HPLC
column: TSK-4000SW (Toyo soda)
eluent: 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0) (containing 0.1% polyethylene glycol)
flow rate: 0.75 ml/min
maximum pressure: 30 kg/cm <sup>2</sup>
II. Electrophoresis
supporting layer: cellulose acetate (Separax, Fuji film)
electrode buffer: barbital (pH 8.6, ion strength 0.06)
constant current: 1 mA/cm
time: 15 min
temperature: room temp.

#### 4. プラズマ中放射能成分の分析方法

採取したプラズマは、Table 1 に示した条件下で HPLC 法と電気泳動法により分析された。

#### 5. トランスフェリンとの競合実験

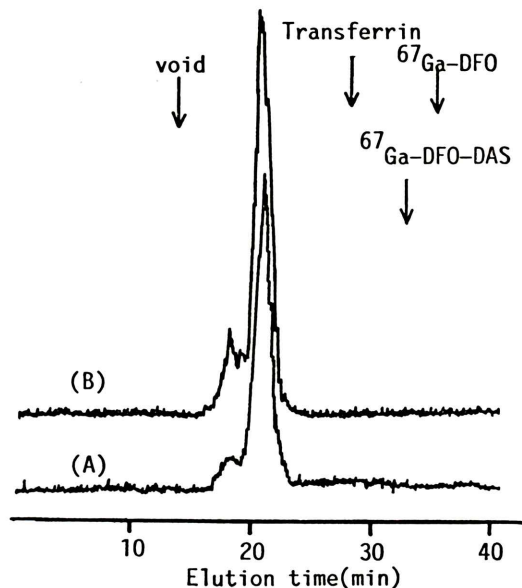
<sup>67</sup>Ga-Fib は、<sup>67</sup>Ga イオンとヒトフィブリノーゲン上の DFO との錯体形成反応により生成する。この反応へのトランスフェリンの及ぼす影響について検討した。

Fib 凍結乾燥品を水で溶解し、ヒトフィブリノーゲン濃度として 1 mg/ml とした。別にヒトトランスフェリン (united states Biochemical Corp. 製) を水で溶解し 1 mg/ml とした。両者を 1:1 に混合し全量で 2.0 ml にした後、1 mCi (検定日時において) のクエン酸ガリウム (<sup>67</sup>Ga) 液を加え、37°C で約 1 時間静置した。この液の放射能成分を HPLC 法により分析した。

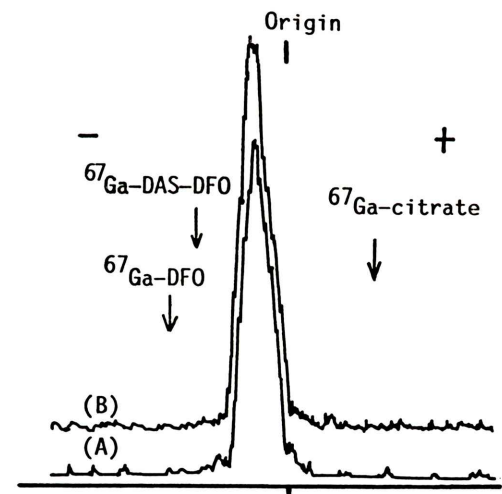
### III. 結果

<sup>67</sup>Ga-Fib をラットに投与した後、3 時間と 24 時間に採血し分離したプラズマの HPLC における溶出プロフィールと電気泳動パターンをそれぞれ Fig. 1 および Fig. 2 に示した。

HPLC 溶出プロフィールにおいて、<sup>67</sup>Ga-Fib の二量体ピークがわずかに認められるものの、溶出時間約 21 分に観察される <sup>67</sup>Ga-Fib のピーク以外の放射能は認められなかった。さらに電気泳動の結果においても、<sup>67</sup>Ga-Fib のピーク以外の放射能は認められなかった。



**Fig. 1** Elution profile of Ga-67 activity in plasma on TSK-4000SW column. (A): Blood was collected at 3 hr postinjection. (B): Blood was collected at 24 hr postinjection.



**Fig. 2** Electrophoretic pattern of Ga-67 activity in plasma. (A): Blood was collected at 3 hr postinjection. (B): Blood was collected at 24 hr postinjection.

Figure 3 は、<sup>67</sup>Ga-Fib 形成に及ぼすトランスフェリンの影響について、HPLC 法により分析した結果である。放射能は、全てヒトフィブリノーゲ

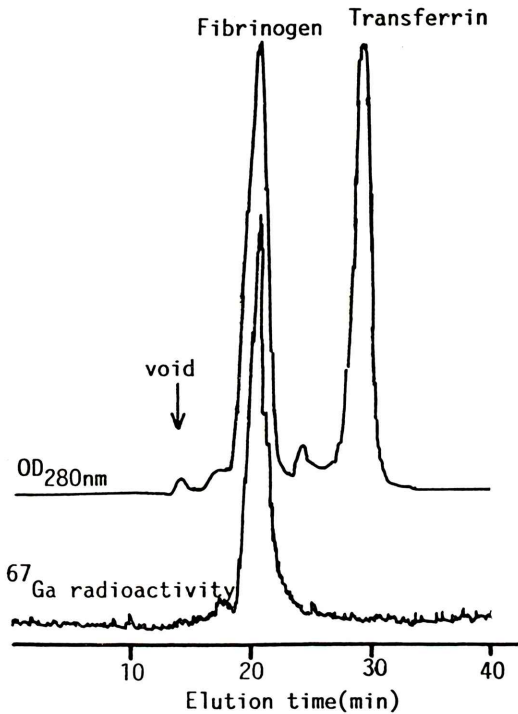


Fig. 3 Elution profile of Ga-67 labeled mixture of fibrinogen and transferrin on TSK-4000SW column.

ンの溶出位置に存在し、トランスフェリンの溶出位置には、何ら放射能の存在を認めなかった。

#### IV. 考 察

BCA を用いて得られた RI 標識タンパク質の RI 金属とタンパク質の結合は、RI 金属と BCA が形成する錯体の安定度定数 ( $K_a$ ) に大きく支配される。したがって、より大きな  $K_a$  を有する BCA と RI 金属との組み合わせを選択することにより、安定性に優れた RI 標識タンパク質が得られる。

また、体内においては、トランスフェリンのような金属結合能を有するタンパク質に、RI 金属のみが標識タンパク質から移行するトランスフェリンが起ることも知られている<sup>9)</sup>。BCA の選択には、このような因子も考慮した上での検討が必要である。

DFO は、3 価の金属イオンと安定な錯体を形成することが知られており、臨床的には、血液中の過剰鉄の除去剤として使用されている。Fe<sup>3+</sup>-DFO の  $K_a$  値は、 $10^{31}$  と大きな値であるが<sup>10)</sup>、Ga-DFO は、Fe<sup>3+</sup>-DFO よりさらに安定であると報告されている<sup>11)</sup>。一方、Fe<sup>3+</sup>-トランスフェリンの  $K_a$  値は、 $10^{30}$  と報告されており Fe<sup>3+</sup>-DFO のそれより小さい<sup>12)</sup>。したがって、Ga においても同様に、Ga-トランスフェリンの  $K_a$  値は、Ga-DFO よりも小さいと考えられる。事実、トランスフェリンの共存下においても、 $^{67}\text{Ga}$ -Fib の生成 (すなわち、 $^{67}\text{Ga}$ -DFO の結合) は、何ら影響されなかった。

このように、DFO の BCA としての優れた特性を用いて、クラスター法によって調製した  $^{67}\text{Ga}$ -Fib は、血液中において、 $^{67}\text{Ga}$  が離脱し、トランスフェリンに移行するトランスフェリンもなく、安定であることが判明した。したがって、静脈内に投与された  $^{67}\text{Ga}$ -Fib は、その形態を維持しており、カルシウムとトロンビンの作用で凝固する生理活性を保持していると考えられる。

#### V. 結 語

血栓診断剤として開発したガリウムヒトフィブリノーゲン ( $^{67}\text{Ga}$ ) 注射液の体内での安定性について、ラットを用いて検討した。血液中の放射能は、全てフィブリノーゲンに存在しており、血液中で安定である。また、その生理活性である clottability は、80% 以上と高く、臨床的有用性が期待される。

本研究は厚生省核医学診断薬開発研究班の一環として行われた。なお本論文の要旨は、第 26 回日本核医学会総会にて発表した。

#### 文 献

- 1) Paik CH, Hermrn DE, Ekelman WC, et al: Synthesis, plasma clearance and in vitro stability of protein containing a conjugated indium-111 chelate. *J Radioanaly Chem* 57: 553-564, 1980
- 2) Hnatowich DJ, Layne WW, Childs RL: The preparation and labeling of DTPA-coupled albu-

- min. *Int J Appl Radiat Isot* **33**: 327-332, 1982
- 3) Yokoyama A, Ohomomo Y, Horiuchi K, et al: Deferoxamine, a promising bifunctional chelating agent for labeling proteins with gallium; Ga-67 DF-HSA. *J Nucl Med* **23**: 909-914, 1982
  - 4) Takahashi K, Ueda N, Hazue M, et al: Preparation and biodistribution of <sup>67</sup>Ga-labelled fibrinogen conjugated with a water-soluble polymer containing deferoxamine. A potential thrombus imaging agent: VIENA International atomic energy agency, pp. 471-482, 1985
  - 5) Suzuki T, Yamazaki T, Aoki S, et al: Clinical imaging of arterial and venous thrombus with Ga-67-fibrinogen-DAS-DFO, newly designed bifunctional chelating agent. *J Nucl Med* **27**: 1036, 1986
  - 6) Kusakabe K, Kawasaki Y, Ohta Y, et al: Gallium-67 deferoxamine (DFO)-dialdehyde starch (DAS)-fibrinogen scintigraphy for location of vascular thrombi. *J Nucl Med* **27**: 965, 1986
  - 7) 渡部昭子: 最新電気泳動法, 青木幸一郎, 永井 裕, 廣川書店, 東京, 1976, pp. 512-521
  - 8) Laki K: The polymerization of proteins: the action of thrombin on fibrinogen. *Arch Biochem Biophys* **32**: 317-324, 1951
  - 9) Hnatowich DJ, Griffin TW, Kosciuczyk C, et al: Pharmacokinetics of an Indium-111-labeled monoclonal antibody in cancer patients. *J Nucl Med* **26**: 849-858, 1985
  - 10) Keberle H: The biochemistry of desferioxamine and its relation to iron metabolism. *Ann NY Acad Sci* **119** (2): 758-768, 1964
  - 11) Goodman MM, Thakur ML, Hoffer PB, et al: Indium-111 desferioxamine complexes: Preparation and stability studies. *J Label Comp Radiopharm* **16**: 1 (abst), 1979
  - 12) 野崎光洋: タンパク質化学 5, 安藤鋭郎, 鈴木友二, 成田耕造, 船津 勝, 共立出版, 東京, 1981, p. 389

### Summary

#### Evaluation of In Vivo Stability of Ga-67 Labeled Human Fibrinogen; Analysis of Plasma Radioactivity Using Rats

Keietsu TAKAHASHI, Jun TAKAHASHI, Sakae OKANO, Miki KURAMI, Nobuo UEDA and Masaaki HAZUE

*Technical Department, Nihon Medi-Physics, Co., Ltd., Chiba*

Human fibrinogen (Fib) was conjugated with a large number of deferoxamine (DFO) through dialdehyde starch (DAS), and the conjugate (Fib-DAS-DFO) was labeled with Ga-67. Thus labeled fibrinogen (Ga-67-Fib-DAS-DFO) showed a high labeling efficiency (more than 90%) and retained clottability (more than 80%).

For the evaluation of plasma radioactive species, blood samples were collected at various time periods after the i.v. administration of Ga-67-Fib-DAS-DFO into rats, and the plasma radioactivity was analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC) and electrophoresis (EP). The radioactive HPLC elution profiles for the plasma samples were identical with that of the original Ga-67-Fib-DAS-DFO; the EP patterns

for the plasma were also identical with the original one, and no radioactive species, except for Ga-67-Fib-DAS-DFO, was detected by HPLC or EP. Furthermore, the presence of transferrin in the labeling formulation did not affect the labeling yield of Ga-67-Fib-DAS-DFO indicating that the transchelation of Ga-67 from DFO on Fib to transferrin is negligible.

These findings indicated that Ga-67 is tightly bound to Fib-DAS-DFO in blood, and the Ga-67-Fib-DAS-DFO can be efficiently trapped by clots as the result of its high retention of physiological activities as fibrinogen.

**Key words:** Deferoxamine, Ga-67 human fibrinogen, Cluster method, Human fibrinogen, Fib-DAS-DFO.