

主論文

新 制
薬
99 函

$^{99m}\text{Tc}$ 標識肝胆道系診断薬に  
関する研究

佐 治 英 郎

# 目 次

緒 言 .....	1
第 1 章 $^{99m}\text{Tc}$ によるペニシラミンの標識反応およびその標識生成物の肝胆移行性 .....	4
第 1 節 $^{99m}\text{Tc}$ とペニシラミンとの錯生成反応の検討 .....	4
第 2 節 臨床に有用な $^{99m}\text{Tc}$ 標識ペニシラミン .....	13
第 1 項 $^{99m}\text{Tc}$ - ペニシラミン Complex I .....	14
第 2 項 $^{99m}\text{Tc}$ - ペニシラミン Complex II .....	21
第 2 章 $^{99m}\text{Tc}$ - 2 -メルカプトプロピオニルグリシン：胆管移行とその動物による違いについて .....	32
第 3 章 N - ( 2,6 -ジメチルフェニルカルバモイルメチル ) イミノニ酢酸の $^{99m}\text{Tc}$ 標識化とその胆汁排泄 .....	39
第 4 章 $^{99m}\text{Tc}$ - 3,3' -ビス ( N,N -ジ ( カルボキシメチル ) -アミノエチル ) - o -クレゾールフタレイン：胆汁排泄し易い $^{99m}\text{Tc}$ の化学状態をもった B S P 類似体の $^{99m}\text{Tc}$ 標識化合物 .....	45
結 語 .....	61
謝 辞 .....	63
引用文献 .....	64

## 緒 言

ラジオアイソトープ（以下、RIと略）を利用して、病気の診断を行おうとする核医学は、新しい医学の領域として、著しい発展を遂げている。このRIを用いる検査法は、RIを体内に投与しない方法と投与する方法の二種に大別される。前者は、一般に *in vitro* 診断法と呼ばれ、RIを用い、体内、特に血中の微量のホルモンや薬物の定量を行い、その結果を診断の指標のひとつとしようとするもので、radioimmunoassay や radioreceptorassay がその代表的な例である。一方、後者は、*in vivo* 診断法と呼ばれ、RIを人体に直接投与し、その放射能を体外から計測したり、血液、尿などの試料を採取し、その放射能を測定することにより、各臓器の形態および機能に関する情報を得て、これを診断に役立てようとするものである。

この *in vivo* 診断法に用いられるRIの中で、テクネチウム- $^{99m}\text{Tc}$  は、(1)半減期が6.02時間と短く、 $\gamma$ 線のみを放出するので被曝線量が少ない、(2)放出 $\gamma$ 線のエネルギーが140 keVであり、NaI検出器に対して感度が高い範囲にあるため、精度良く検出できる、(3)比較的半減期の長い親核種 $^{99}\text{Mo}$ （半減期：67時間）からジェネレータシステムにより簡単にかつ安価に入手できる、などの点から最もすぐれた核種である。ジェネレータシステムとしては、 $^{99}\text{Mo}$ をアルミナカラムに吸着したものが市販されており、これを用いて、放射平衡の状態にある娘核種 $^{99m}\text{Tc}$ を生理食塩水で毎日平均1回ずつ溶出することができる。さらに、TcはVII B族に属する遷移金属であるので、種々の配位子とキレートを生成し易い性質をもっている。その性質を利用することにより、すなわちキレート生成によって種々の $^{99m}\text{Tc}$ 標識化合物を容易にしかも短時間の操作で得ることができるが、この点は短半減期標識化合物の調製には特に有利である。これらの理由により、 $^{99m}\text{Tc}$ は現在最も広く用いられている核種であり、さらに将来とも $^{99m}\text{Tc}$ 標識診断薬に対する期待は大きいと考えられる。

以上のような $^{99m}\text{Tc}$ の核種としての有用性に基づき、種々の $^{99m}\text{Tc}$ 標識診断薬の開発が試みられているが、その中で、 $^{99m}\text{Tc}$ 標識肝胆道系診断薬の開発は最も大きな課題のひとつである。その理由として、従来より用いられてきた $^{131}\text{I}$ -bromosulphothalein ( $^{131}\text{I}$ -BSP)や $^{131}\text{I}$ -rose bengal<sup>1), 2)</sup>などは、肝胆道系の形態および機能の診断に大きい意義を有する<sup>3)</sup>ものの、 $^{131}\text{I}$ が $\beta$ 線および364 keVの高エネルギーの

$\gamma$ 線を放出しかつ半減期が8日と長いため、被曝や測定器に対する感度などの点で満足すべき核種ではないことがあげられる。そのため、 $^{131}\text{I}$ にかわるもっと良い核種、すなわち、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ や $^{123}\text{I}$  ( $\gamma$ 線のエネルギー: 160 keV, 半減期: 13.3 時間)を用いる標識化合物の開発が進められている。<sup>4)~18)</sup>しかし、 $^{123}\text{I}$ はサイクロトロンによって製造されるため、価格が高く、また入手できる範囲がサイクロトロンの比較的近くに限られることなどから、一般に使用されるには至っていない。したがって、現在 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 標識化合物の開発が最も強く望まれているが、いままでに開発された $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 標識化合物は、いずれも診断薬としての有用性の点で不十分であった。<sup>20)</sup>

一方、多価金属イオンであるTcの錯生成反応は極めて多様であり、このTcの多価イオンの反応が、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 標識診断薬の調製すなわち標識反応に複雑に反映し、また得られる標識体の体内動態は、その化学的性質に深く関係するはずである。したがって、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 標識診断薬の開発には、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 標識化合物の化学的性質に基づいた考察が基礎的に不可欠なことと考えられる。それにもかかわらず、これまでの $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 標識診断薬の開発研究は、このような基礎的な考察に基づいたものではなく、ほとんどの場合、経験的な知見に基づいて進められてきた。

以上のような背景を考慮し、著者は、化学的性質の検討からすぐれた $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 標識肝胆道系診断薬を開発することを計画した。まず、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 標識肝胆道系診断薬として最初に報告されながら、体内動態の再現性の低さがその臨床応用の結果において指摘されていた $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -ペニシラミンを選び、この欠点の原因を明らかにするためには標識体の化学的性質を検討することが必要と考え、標識反応および標識体の化学的性質と肝胆道系での挙動との関係を基礎的に詳しく調べた。この際、従来より安定同位体がないため非常におくれていたTcの化学に関する知見は、本研究に必要な情報を得るには極めて不十分であるので、必要に応じ $^{99\text{m}}\text{Tc}$ を用いるトレーサーレベルでの検討の他に、長半減期の $^{99}\text{Tc}$ を用いる化学量論的レベルでの検討も行った。さらに、その他種々の $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 標識化合物に関して同様の検討を加え、それらの結果を基礎として、bifunctional radiopharmaceuticals<sup>10), 21)~24)</sup>という考え方を導入して、 $^{131}\text{I}$ -BSPや $^{131}\text{I}$ -rose bengalにかわり得る新しい $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 標識肝胆道系診断薬の開発を行った。bifunctional radiopharmaceuticalsとは、ある臓器に対し特有の生理作用を示す物質を母体にし、これに適当なキレート生成部位を導入し、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ などの金属放射性核種をキレート生成によって結合することにより、臓器特異性をもつ放射性金属標識化合物を得ようとする考え方によって得られた診断薬のことで、このような考え方は、

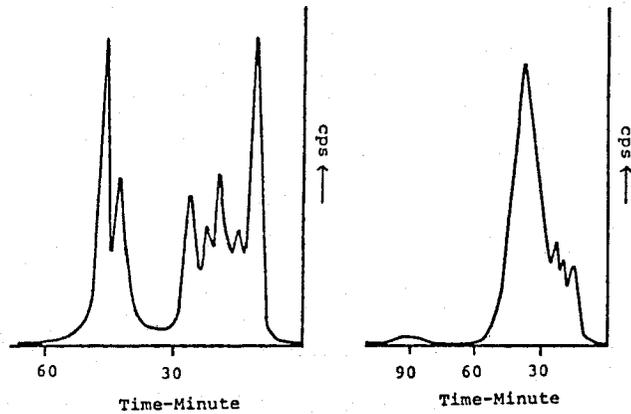
現在核医学診断薬のドラッグデザインの方法として非常に重要視されているものである。

上記の研究によって、以下に詳述するように、臨床に有用な $^{99m}\text{Tc}$ 標識肝胆道系診断薬を開発するとともに、一般に $^{99m}\text{Tc}$ 標識反応に影響を及ぼす種々の要因を明らかにし、かつ良好な診断薬を得るための指針を得ることができた。

# 第1章 $^{99m}\text{Tc}$ によるペニシラミンの標識反応 およびその標識生成物の肝胆移行性

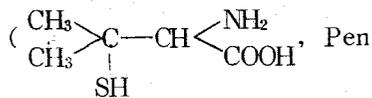
$^{99m}\text{Tc}$ -ペニシラミン(以下,  $^{99m}\text{Tc}$ -Pen と略)は, Tubis らにより  $^{99m}\text{Tc}$ 標識肝胆道系診断薬として最初に報告されたものであったが,<sup>4)</sup>その後臨床に用いられた結果, 胆嚢への集積に再現性が低いことが指摘され, 臨床には用いることができないと結論されていた。<sup>25)</sup>著者は, その欠点の主な原因が, Tcの反応の複雑性, すなわち標識化の際のわずかな反応条件の違いにより, 錯生成反応と加水分解反応や酸化還元反応との交差が複雑に変化し, その結果多数の錯体種が生成するという点にあると考えた。実際, ゲル濾過法を用いて,

Tubisの方法により調製した  $^{99m}\text{Tc}$ -Pen を調べてみると, Fig.1.1のように様々な分子量をもつ錯体種が同時に存在することがしばしばあり, しかもその生成状態は再現性に乏しいということがわかった。



そこで, 著者は, まず Tc とペニシラミン

Fig.1.1 Gel Chromatography of  $^{99m}\text{Tc}$ -Pen  
Sephadex G-15, 1.5 x 20 cm  
Eluent, 0.15 M NaCl  
Flow Rate, 131 ml/hr



と略)との反応を詳しく検討し,

さらに生成する数種の錯体種のうちでわずか二種のみが胆汁排泄されることを見出した。また, 臨床使用を可能にするため, それら二種の錯体種の各々を収率良く選択的にかつ簡単に得る方法を確立し, あわせて, それらの動物体内での挙動について詳しく検討した。

## 第1節 $^{99m}\text{Tc}$ とペニシラミンとの錯生成反応の検討

$^{99m}\text{Tc}$ とペニシラミン(Pen)との反応において, Fig.1.1に示すように, 反応条件のわずかな違いにより種々の錯体種が生成するが, 各錯体種の体内挙動とくに胆管移

行性を検討するためには、各錯体種を各々特異的に調製する方法を見出す必要がある。それ故、Tc と Pen との標識反応に関する化学的な知見を得ることは極めて重要である。この節では、横山、杉浦らによる詳しい検討の結果得られた Pen の金属錯体に関する知見や、<sup>26)~29)</sup> Tc とキレート生成し易い構造の配位子であるタイロンおよびアスコルビン酸との反応に関する知見<sup>30)</sup>を参考にし、<sup>99m</sup>Tc および <sup>99</sup>Tc を用いて、Pen との反応について、分光光度法およびクロマト的手法により検討した結果について述べる。

## 1. 実験方法

### (a) 試薬

Mallinckrodt 社のウルトラテクネカウ・ジェネレータから毎朝溶出した 0.5~1mCi/ml の Na<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub> 生理食塩水溶液および New England Nuclear から購入した NH<sub>4</sub><sup>99</sup>TcO<sub>4</sub> 水溶液を用いた。また、K<sub>2</sub><sup>99</sup>TcCl<sub>6</sub> は Dialziel の方法<sup>31)</sup>に従って合成し、濃塩酸に溶かして保存した。NH<sub>4</sub><sup>99</sup>TcO<sub>4</sub> および K<sub>2</sub><sup>99</sup>TcCl<sub>6</sub> の純度および濃度は UV スペクトルにより確認した。<sup>32)</sup>さらに、Pen は半井化学製・特級試薬の DL-ペニシラミン (H<sub>2</sub> Pen (非解離形)) をそのまま使用し、またその他の試薬・溶媒の調製にはすべて特級試薬をそのまま使用した。

### (b) 標識反応

以下のように、TcO<sub>4</sub><sup>-</sup> に対し異なる還元剤を用いて行った。

(i) 濃塩酸法 (Tubis の方法<sup>4)</sup>) : <sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup> と <sup>99</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup> の混合液または <sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup> 溶液のみを試験管に入れ、これに相当量の濃塩酸および Pen を加え、5~30 分間水溶上で沸騰させる。冷却後、溶液を 10 N, 1 N, 0.1 N NaOH 水溶液を用いて、pH を望む値に調節する。

(ii) 塩化第一スズ (SnCl<sub>2</sub>) 法 : SnCl<sub>2</sub> 溶液は、用時窒素置換した 0.1~1.2 N 塩酸溶液に必要な量の SnCl<sub>2</sub> を溶かして調製した。この SnCl<sub>2</sub> 溶液および Pen を、<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup> または <sup>99</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup> と <sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup> の pH 0 以下の塩酸溶液に加え、10 分間攪拌後、反応溶液に 10 N, 1 N, 0.1 N NaOH 水溶液を順次加えて、pH を望む値に調節する。

(iii) 水素化ホウ素ナトリウム (NaBH<sub>4</sub>) 法 : <sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup> と <sup>99</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup> の混合液または <sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup> のみの溶液に Pen を加え、さらに、0.1 M リン酸緩衝液または 0.2 M 酢酸緩衝液で pH を調節後、5~50 mg の NaBH<sub>4</sub> を加える。

(iv) 亜ニチオン酸ナトリウム (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) 法 : <sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup> と <sup>99</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup> の混合液または <sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup> のみの溶液に Pen を加え、さらに、0.1 M リン酸緩衝液または 0.2 M 酢酸緩衝液で pH を調節後、5~50 mg の Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> を加える。

### (c) 反応生成物の検討

反応生成物の検討には、ゲル濾過法、濾紙電気泳動法、薄層クロマトグラフィーを用いた。ゲル濾過法には、Sephadex G-15 カラム（直径：20 mm，高さ：23 cm）を用い、生理食塩水を溶離液として 108 ml/hr の流速で行った。濾紙電気泳動法には、東洋濾紙 No. 50（巾：2 cm，長さ：40 cm）を使用し、0.2 M リン酸緩衝液（pH 7.0）を用い、500 V の定電圧で泳動時間 1 時間の条件で行った。また薄層クロマトグラフィーには東京化成シリカゲルスポットフィルムを用い、展開溶媒として n-ブタノール：酢酸：水 = 4：1：1 およびメタノール：10% 酢酸アンモニウム水 = 1：1 の二種類の溶媒を使用した。また、 $^{99}\text{Tc}$  を使用した場合には可視吸収スペクトルも測定した。

### (d) 機器

放射能の測定において、ゲル濾過法の場合には、富士通ウェルカウンター EA14 に富士通シングルチャンネルスペクトロメータ AN10 を組み合わせた装置、薄層クロマトグラフィーおよび濾紙電気泳動法の場合には、富士通濾紙クロマトスキャナ EA120 を改良した装置を用いた。また吸収スペクトルの測定には、島津 D-40 R および UV-200・自記分光光度計を用い、pHメーターは日立-堀場 F-7 型を用いた。さらに、濾紙電気泳動法には東洋 C-II 型泳動装置および東洋 PS-1510 型安定電源を使用した。

## 2. 結果および考察

$^{99\text{m}}\text{Tc}$  は、普通前述の  $^{99}\text{Mo} - ^{99\text{m}}\text{Tc}$  ジェネレータから  $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$  の化学形で得られる。この  $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$  は、非常に安定な化学形で反応性も弱いため、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$  標識化合物を得ようとする場合には、 $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$  を還元し、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$  の原子価を低くする必要がある。実際、Pen と  $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$  とを単に混合しただけでは反応は進まず、濃塩酸、 $\text{SnCl}_2$ 、 $\text{NaBH}_4$ 、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  などの還元剤の存在で初めて反応が進む。すなわち、この標識化は低原子価に還元された  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  と Pen との反応で進行する。そこで、低原子価 Tc と Pen との反応を詳しく調べるために、まず、 $^{99}\text{Tc}$  と  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  とを併用して、Tubis らによって報告された調製法<sup>4)</sup> に準じて、さらに種々の条件下で反応を進めた。

さて、Tubis らの調製法とは、 $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$  1 ml に Pen 60 mg，濃塩酸 0.3 ml を加え 100°C で 10 分加熱し、冷却後、11 N，1 N，0.1 N の各濃度の NaOH 水溶液を適当に加え pH を 7.0 にするという方法である。いま、Pen と  $^{99}\text{Tc}$  の濃度が 200：1 になるように Pen と  $^{99}\text{TcO}_4^-$  を混ぜ、これにキャリアフリーの  $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$  を放射能検出の目安として加え、この Tubis の方法に準じて Tc-Pen を調製し、最終の pH を 0 と 6.9 と

にした場合の反応液の Sephadex G-15 カラム法での分析結果を Fig.1.2 (a)(b) に示す。この結果得られた各画分を Fig.1.2 に示すように F-1 ~ F-6 と名づける。また、この Sephadex G-15 で分離された各画分の吸収スペクトルおよび F-3, F-4, F-5 の画分の薄層クロマトグラフを Fig.1.3, Fig.1.4 に示す。ここで、F-6 は別に行ったゲル透過法、薄層クロマトグラフィー、電気泳動法の結果から、 $TcO_4^-$  に対応する画分であることが確認された。F-5 中の Tc 錯体種は非常に安定で、24 時間放置後も吸収スペクトルおよび薄層クロマトグラフにおいて全く変化を認めなかった。

Fig.1.5 は、別に  $^{99}TcCl_6^{2-}$  と Pen とを

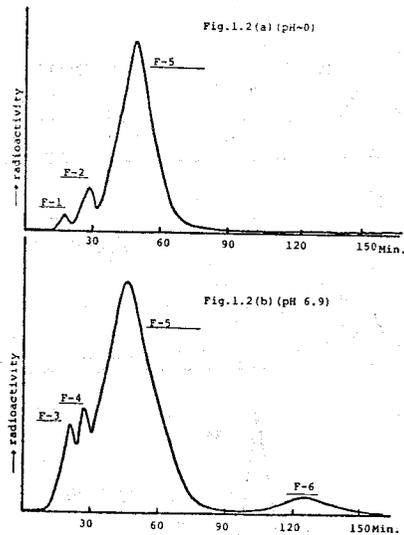


Fig.1.2 Sephadex column chromatography with the labeling solution ( prepared by Tubis' method )  
 $^{99}TcO_4^-$  ( $^{99m}TcO_4^-$ ) :  $1 \times 10^{-3}$  M, 1 ml  
 Pen :  $1 \times 10^{-1}$  M, 2 ml  
 conc. HCl : 0.6 ml  
 incubation time on boiling bath : 30 min.  
 pH ~0 (Fig.1.2(a))  
 pH 6.9 (Fig.1.2(b))

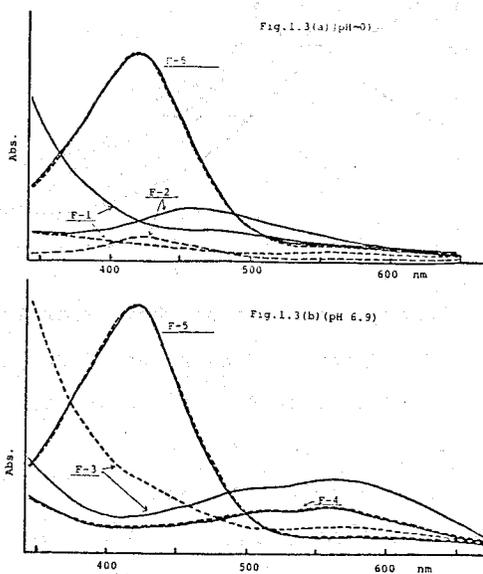


Fig.1.3 Absorption spectra of F-1, F-2, F-3, F-4 and F-5 fractions  
 — immediately  
 - - - after standing for 24 hr.

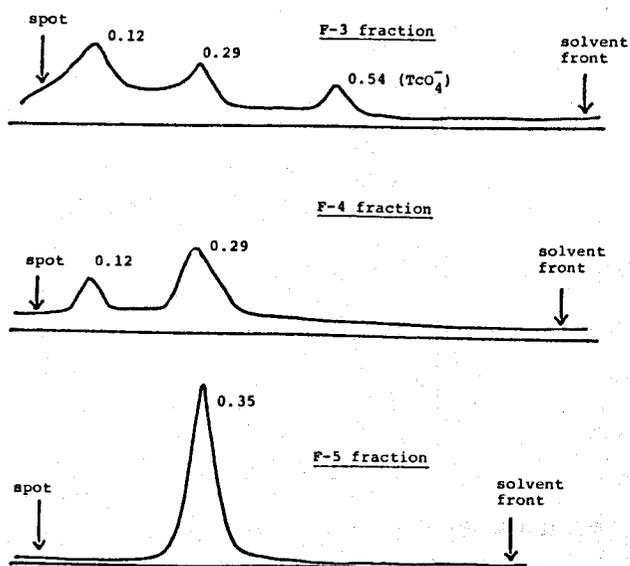


Fig.1.4 Thinlayer chromatography of F-3, F-4 and F-5 fractions

Solvent system : n-BuOH : AcOH : H<sub>2</sub>O = 4 : 1 : 1

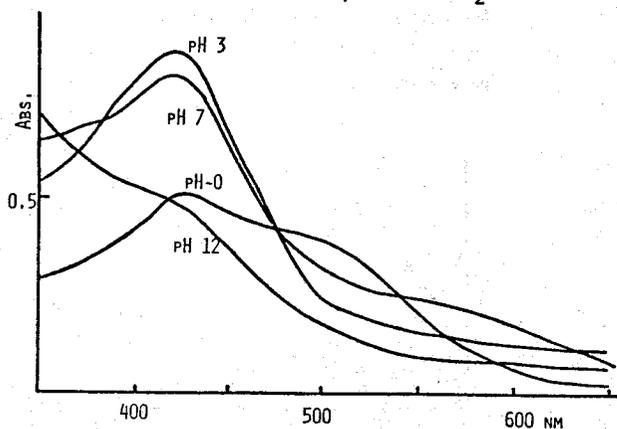


Fig.1.5 Absorption spectral changes of Tc-Pen at different

pH ( prepared by using  $^{99}\text{TcCl}_6^{2-}$  )

$^{99}\text{TcCl}_6^{2-}$  :  $1.25 \times 10^{-3}$  M in conc. HCl, 1 ml

Pen :  $1 \times 10^{-2}$  M, 1 ml

Total volume : 3.5 ml

1 N 塩酸溶液中で混合し、図に示されている各 pH に調製した時の吸収スペクトルを示しているが、図にみられる 420 nm のピークは pH 3~7 の広い範囲にわたって安定である。この F-5 の化合物、すなわち  $\lambda_{\text{max}} = 420 \text{ nm}$ 、Sephadex G-15 のカラムで 48 分（放射性医薬品の分野では、核種の半減期が短いため、製品の検定に要する時間が重

要となるので、ゲル濾過の結果を時間で表わす方が合理的と考え、以後溶出時間で示す)のところに溶出し、 $n$ -ブタノール：酢酸：水=4：1：1のシリカゲル薄層クロマトグラフで $R_f=0.35\sim 0.40$ を示す非常に安定な化合物をComplex Iと名づける。この化合物は、前述したように4価の $TcCl_6^{2-}$ からも生成するので、この化合物におけるTcの原子価は、恐らく4価であろうと推定される。一方、F-3、F-4はともに500 nm付近と540~560 nmに吸収ピークをもち、また薄層クロマトグラフィーの結果から、これらは主として $R_f=0.12\sim 0.15$ の化合物と $R_f=0.27\sim 0.30$ の化合物との混合物であることが示された。前者をComplex III、後者をComplex IIと名づける。このComplex IとComplex IIIの化学的性質および標識条件については、第2節で詳しく述べる。

ところで、F-3の薄層クロマトグラフにおいて、一部 $TcO_4^-$ の存在が認められた(Fig.1.4)。また、Fig.1.2に示すように、Sephadex G-15のゲル濾過法で分析したところ、酸性溶液中では存在しなかった $TcO_4^-$ がpH 6.9になると認められるようになる。このことから、酸性溶液中では、F-1、F-2に溶出されるTc化合物が、pHの上昇によって、F-3やF-4に対するTc化合物に変化したり、またその一部が $TcO_4^-$ に変化したりするものと考えられる。また、F-3の画分中には、薄層クロマトグラフィーの展開中に $TcO_4^-$ になるような比較的不安定な化合物が含まれていると推定される。F-1、F-2、F-3画分中の化合物の不安定さは、吸収スペクトルの時

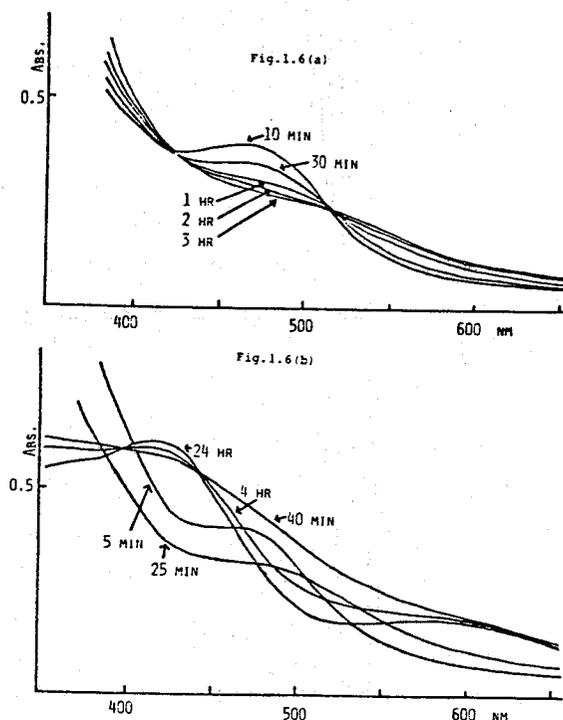


Fig.1.6 Absorption spectral changes of Tc-Pen on standing

( prepared by using  $Na_2S_2O_4$  )

$^{99}TcO_4^-$  :  $1.15 \times 10^{-3}$  M, 1 ml

Pen :  $1.15 \times 10^{-1}$  M, 1 ml

Buffer (pH 7) : 3 ml

$Na_2S_2O_4$  : 10 mg

in the absence of the air ( Fig.1.6(a) )

in the presence of the air ( Fig.1.6(b) )

間の変化からも支持され、Fig.1・3の点線が示すように24時間後には全く異なったものに変化していることがわかった。

実際、F-2に認められる $\lambda_{\max} = 465 \text{ nm}$ のピークは $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ を還元剤として使用した場合、特異的に観察されることを認め、これを窒素ガスで置換し密封しておく、Fig.1・6(a)のようにブロードな吸収スペクトルとなるが、一方、空气中に放置すると、Fig.1・6(b)に示すように415 nmに吸収ピークはシフトし、それより長波長領域ではブロードな吸収スペクトルとなることが認められ、放置時間や空気存在によって大きく影響を受けることがわかった。さらに、この $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ を還元剤として、空气中で調製し、10分放置したものおよび4時間放置したもの(Fig.1・6(b))は、Sephadex G-

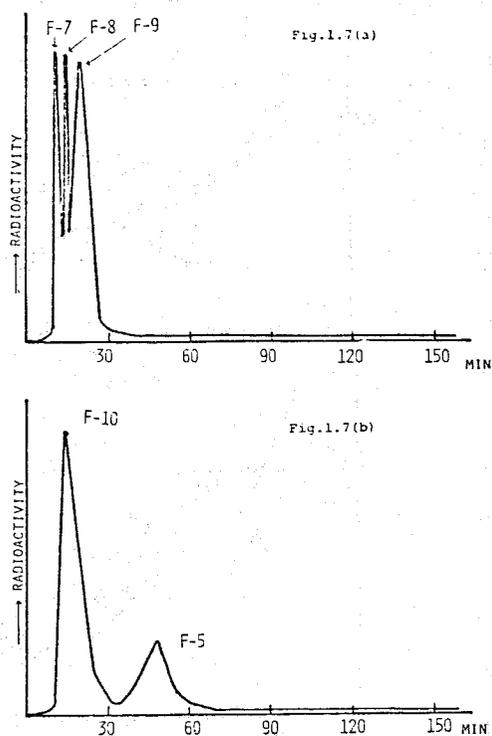


Fig.1.7 Sephadex column chromatography with labeling solution

( prepared by using  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  )

$^{99}\text{TcO}_4^-$  ( $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ ) :  $1.15 \times 10^{-3} \text{ M}$ , 1 ml

Pen :  $1.15 \times 10^{-1} \text{ M}$ , 1 ml

buffer (pH 7) : 3 ml

incubation time : 10 min. ( Fig. 1.7(a) ), 2 hr. ( Fig. 1.7(b) )

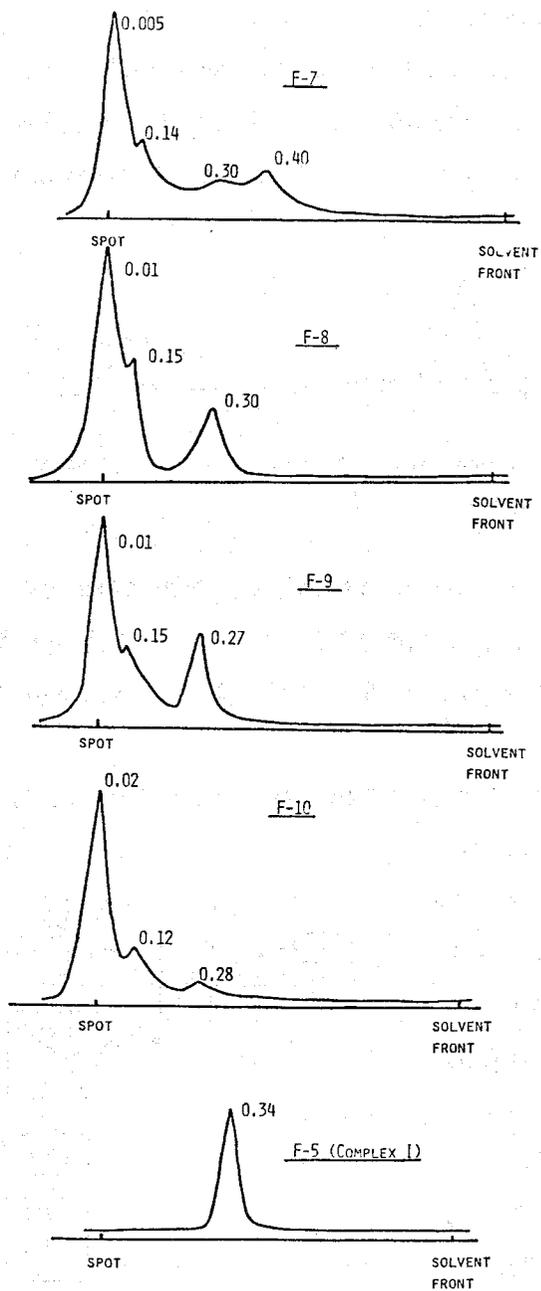


Fig.1.8 Thinlayer chromatography of F-7, F-8, F-9, F-10 and F-5 (Complex I) fractions  
 Solvent system:: n-BuOH : AcOH : H<sub>2</sub>O = 4 : 1 : 1

15 カラム法で分析した結果, Fig.1・7 に示すようにいくつかの生成物の混合物であることがわかった。これらの各画分をF-7~F-10 と名づけ, 各々をn-ブタノール:酢酸:水=4:1:1の薄層クロマトグラフィーで分析してみると, Fig.1・8 に示すように, いずれの画分も主としてComplex II, Complex III, それにRf=0.01~0.05の化合物の混合物であることが認められた。また, F-8を分画後4時間空气中に放置し, 再びSephadex G-15カラムで分析してみるとTcO<sub>4</sub><sup>-</sup>が検出された(Fig.1・9)。

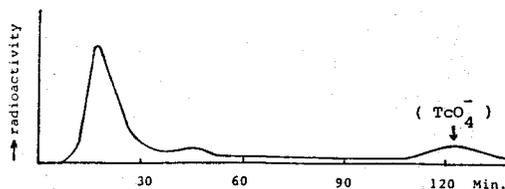


Fig.1.9 Sephadex column chromatography of F-8 after standing for 4 hr.

このことから,  $\lambda_{\max}=465\text{ nm}$ の化合物は比較的簡単に酸化され,  $\lambda_{\max}=415\text{ nm}$ の化合物になり, 一部これがさらに酸化されてTcO<sub>4</sub><sup>-</sup>になるものと考えられる。前者の $\lambda_{\max}=465\text{ nm}$ の化合物をComplex IV, 後者の $\lambda_{\max}=415\text{ nm}$ の化合物をComplex Vと名づける。

以上の検討の結果, 得られた各生成物の性質およびその相互関係をまとめると Fig. 1・10 のようになる。すなわち, 酸性領域で, 4価のTcに対して, Penが作用してComplex Iへ進む錯生成反応と, OH<sup>-</sup>が作用してComplex IVへ進む加水分解反応との間に競争反応が起こっていることがわかる。この時, Complex Iは一旦生成すると比較的広いpH範囲で安定であるのに対し, Complex IVの場合には, pHの上昇にともないPenの濃度が高い時にはPenが作用して錯生成をおこし, Complex II,

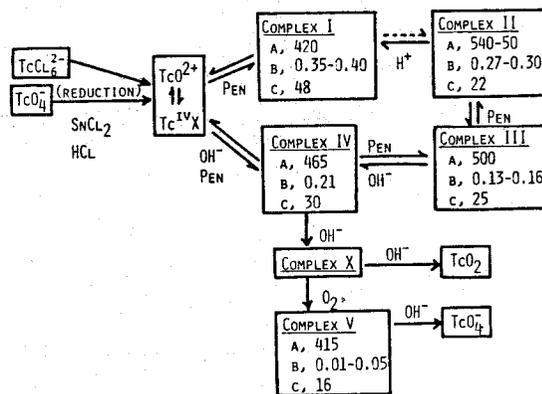


Fig.1.10 Labeling products of <sup>99m</sup>Tc-Pen reaction. (A) Wavelength of absorption maximum (nm). (B) R<sub>f</sub> value on thin-layer chromatography (n-butanol-acetic acid-water, 4:1:1). (C) Elution time (min) in Sephadex G-15 column chromatography (flow rate = 108 ml/hr).

Complex III が生成するが、逆に Pen の濃度が低い時には  $\text{OH}^-$  が作用して加水分解を受け、Complex X を生成する。この Complex X は単一の成分ではなく、Tc が高次に加水分解した状態で配位したいくつかの多核ポリマー錯体種をまとめて名づけたものであるが、この状態は非常に不安定で、加水分解や酸化反応を受けやすく、容易に  $\text{TcO}_2$  や Complex V さらに  $\text{TcO}_4^-$  へと分解される。

このように、反応条件の違いで多くの標識化合物に導かれるという非常に複雑な反応系も、Tc の錯生成反応とそれに競合しておこる Tc の加水分解反応および酸化還元反応を組み合わせて考えることにより矛盾なく説明することが可能である。

また、上記の結果は Pen について示された反応の複雑性であるが、このような反応条件のわずかな相違により種々の化学状態の錯体が生成するという化学的性質の多様性は、一般に Tc の反応においてみられることと考えられ、そのことは、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$  による標識化において反応条件の詳細な検討の必要性を認識させるだけでなく、むしろ今後の新しい  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  放射性医薬品の開発の可能性に結びつくものと期待される。実際、ここに得られた知見は、以後の著者の研究の基礎になったばかりでなく、癌診断薬として注目されている  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -ブレオマイシンや  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -dimercaptosuccinic acid (DMSA) の開発にも大きく貢献することとなった。<sup>33),34)</sup>

## 第2節 臨床に有用な $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 標識ペニシラミン

Fig 1・10 に示した反応系を支配している主な要因が、ペニシラミン、Tc の各濃度、pH、反応時間、さらに還元剤の種類と濃度などであることは第1節の結果より明らかであるので、この各々の要因をうまく調節すれば、各々の錯体種を収率よく調製することができるはずである。一方、各錯体種がいろいろな割合で混合して存在している溶液をラットに投与してみると、Complex I および Complex II の割合の多い溶液ほど胆汁への放射能の排泄量が多いことがわかった。この結果から、Complex I および Complex II が胆汁排泄されやすい性質をもつと考え、これらの各錯体を特異的に生成する反応条件を求め、これを用いて体内とくに胆汁排泄挙動を検討した。

さて、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$  標識診断薬は、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$  が短半減期のため各病院で使用直前に調製される必要があり、この調製には繁雑な操作をできるだけ避け、再現性よくかつ収率の良い反応条件を見出す必要がある。 $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$  の還元剤として、濃塩酸を用いた場合には、操作の繁雑性と再現性の点に問題があり、また  $\text{NaBH}_4$  や  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  を用いた場合には、収率の点で問題があるので、 $\text{SnCl}_2$  を用いるのが最も適当であると考え、以下  $\text{SnCl}_2$

による方法を用いて検討した。

### 第1項 $^{99m}\text{Tc}$ -ペニシラミン ( $^{99m}\text{Tc}$ -Pen) Complex I

Fig.1・10より、 $^{99m}\text{Tc}$ -Pen Complex Iを調製するには、4価の $^{99m}\text{Tc}$ を加水分解させずにPenと反応させる方法と、Complex IIを一旦生成させた後、Penの濃度を高くし、pHをComplex I生成の至適pHである5~6にして反応させる方法とが考えられる。ここでは、収率および調製時間の点で前者の調製法がすぐれていると考えた。この方法によるComplex Iの調製においては、Fig.1・10から予想されるように、4価のTcに対し、加水分解速度より速い速度でPenとの錯生成反応がおこるような条件を設定する必要がある。この点を考慮しながら、Complex I生成に与える各条件の影響を検討した。

#### 1. 実験方法

##### (a) 試薬

$^{99m}\text{TcO}_4^-$ としては、本章第1節と同様に、ジェネレーターから毎朝溶出された0.5~1.0 mCi/mlの生理食塩水溶液を用いた。Penとしては、本章第1節と同様に、市販のDL-Pen ( $\text{H}_2\text{Pen}$  (非解離形))をそのまま使用した。また、その他の試薬・溶媒はすべて特級試薬を使用した。

##### (b) Complex Iの調製

$^{99m}\text{TcO}_4^-$ 溶液、Pen ( $1 \times 10^{-2}$  M)、0.2 M酢酸緩衝液 (pH 6.1)を3 : 1.5 : 3の容量比で混合し、これに窒素置換した $\text{SnCl}_2$ 溶液 ( $4 \times 10^{-5}$  M、0.1 N塩酸溶液) 0.5容量を加える。10分間攪拌後、この反応液を0.22  $\mu\text{m}$ のミリポアフィルターに通す。

##### (c) 標識率の検討

標識率の検討は、ゲル透過法、沓紙電気泳動法、薄層クロマトグラフィーにより、本章第1節に記述した方法に従って行った。

##### (d) 体内分布の検討

25~30 gのddy系雄マウスを1群4~6匹ずつ使用した。検体0.3 ml (約50  $\mu\text{Ci}$ )を尾静脈より投与し、投与後経時的に屠殺し、直ちに血液および主要臓器を摘出し、それらの放射能と重量とを測定した。

##### (e) 胆汁排泄の検討

250~300 gのWistar系雄ラットを1群5~6匹ずつ使用した。高田らの方法<sup>31)</sup>に準じ、ペントバルビタールナトリウムで麻酔後、胆管をポリエチレンチューブでカニ

ュレートし、実験中直腸温が  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  に保つようにした。検体 0.5 ml (約 90  $\mu\text{Ci}$ ) を大腿静脈より投与し、あらかじめ重量を測ってあるバイアルの中へ、投与後 1 時間の間 10 分間隔で胆汁を集め、胆汁の重量と放射能とを測定した。

#### (f) 機器

ゲル濾過溶出液、電気泳動用濾紙、薄層プレート上の放射能の測定は本章第 1 節の実験と同様である。また、動物実験における各臓器および胆汁試料中の放射能の測定は、富士通 ATS-621 および Abbot Laboratories Auto-LOGIC・オートウェルカウンターを用いて行った。

## 2. 結果

### (a) Pen の濃度の影響

2~6 ml の  $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$  を用いた場合、Complex I が収率よく生成するためには、Pen の濃度は  $10^{-3}\text{M}$  以上必要である。Sn $^{2+}$  で還元された 4 価の  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  の加水分解反応をおさえ、Complex I 生成へ反応を進めるためには、できるだけ高い Pen の濃度が好ましいのであるが、毒性を考慮し以下の実験には  $10^{-2}\text{M}$  のものを用いることとした。

### (b) pH の影響

標識反応を種々の pH で以下のように試みた。 $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$  3 ml と Pen ( $1 \times 10^{-2}\text{M}$ ) 1.5 ml との混液に、酢酸緩衝液または塩酸を加え種々の pH に調節した後、窒素置換した SnCl $_2$  溶液 ( $4 \times 10^{-5}\text{M}$ , 0.1 N 塩酸溶液) 0.5 ml を加え、10 分間攪拌する。0.22  $\mu\text{m}$  のミリポアフィルターを通した後、反応溶液を Sephadex G-15 のカラムに添加した。その分析結果を Fig.1-11 に示した。pH 5~6 で Complex I の生成率 (Fig.1-11 の○印) が最も高く、より低いまたは高い pH 域のどちらにおいても生成率は著しく低下した。

### (c) $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ の濃度の影響

以下のように、 $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$  の使用量の反応生成体に及ぼす影響を調べた。Pen ( $1 \times 10^{-2}\text{M}$ ) 1~2 ml に、種々の量の  $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$  溶液を加えた後、pH を 1~2 に調節し、さらにこの溶液に窒素置換した SnCl $_2$  溶液 ( $1 \times 10^{-4} \sim 1 \times 10^{-5}\text{M}$ , 0.1 N 塩酸溶液) 1 ml を加え、10 分間攪拌した後、1N NaHCO $_3$  水溶液で pH 5~7 に調節した。

Sephadex G-15 のカラムを用いるゲル濾過法による分析の結果は、Fig.1-12 にみ

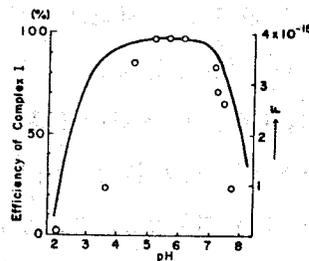


Fig.1.11 Effect of pH on Complex I formation. Circles represent labeling efficiencies determined by Sephadex column chromatography. [Labeling conditions:  $4 \times 10^{-5}\text{M}$  SnCl $_2$  (0.5 ml) was added to mixture of  $10^{-2}\text{M}$  Pen (1.5 ml) and  $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$  (3 ml); pH was adjusted with acetate buffer or HCl (3 ml).] Curve corresponds to calculated F-value  $[K_{\text{ox}}[\text{H}^+]^2[\text{PEN}]^2]$ .

られるように、Complex I の生成率（○印）が  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  の使用量に顕著に依存していることを示している。反応液の全量に対する  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  溶液の使用量の比（横軸）が 0.6 より高くなると、Complex I の生成は殆ど認められず、RI の大部分は Complex II や Complex III などの他の錯体種（これらを総称して Polymer と呼ぶ）に対応するピークに溶出される。このような現象は、還元剤として  $\text{SnCl}_2$  の代わりに濃塩酸を用いる Tubis の方法<sup>4)</sup> によっても認められた。

一方、酢酸緩衝液により反応液の pH をあらかじめ 5~6 にしておくと、Fig.1-12 に示すように、Complex I の生成率（●印）に対する  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  溶液の使用量の影響は認められず、常に高い値が得られた。

#### (d) $\text{SnCl}_2$ の濃度の影響

還元剤として用いる  $\text{SnCl}_2$  の濃度の影響を調べるために、種々の濃度の  $\text{SnCl}_2$  の 0.1 N 塩酸溶液をつくり、これの 0.5 ml を  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  3 ml, Pen ( $1 \times 10^{-2}$  M) 1.5 ml, 酢酸緩衝液 (0.2 M, pH 6.1) 3 ml の混合液に加え、反応液をゲル濾過法で分析した。

Fig.1-13 に示すごとく、 $8 \times 10^{-9} \sim 3 \times 10^{-8}$  mole (0.5 ml を用いる時は、 $1.6 \times 10^{-5} \sim 6 \times 10^{-5}$  M の溶液に相当する) の  $\text{SnCl}_2$  を用いた時には、高い Complex I の生成率が認められるが、 $\text{SnCl}_2$  の濃度が増加するに従い、Complex I の生成率は減少し、逆に Complex II, Complex III などの他の錯体種（総称して Polymer と呼ぶ）の生成率が増加する。

#### (e) Complex I の調製法

以上の結果に基づき、最も収率のよい

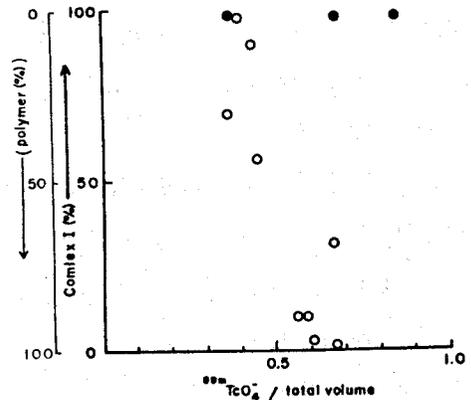


Fig. 1.12 Effect of  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  concentration on Complex I formation. Concentration of  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  is expressed as ratio of added  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  volume to total volume of labeling solution. Efficiency was determined by Sephadex column chromatography. Labeling conditions: (○)  $10^{-1}$  to  $10^{-9}$  M  $\text{SnCl}_2$  (1 ml) was added to a mixture of  $10^{-2}$  M Pen (1-2 ml) and various volumes of  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  at pH 1-2; pH was then adjusted to 5-6. (●)  $10^{-5}$  M  $\text{SnCl}_2$  (0.5-1 ml) was added to a mixture of  $10^{-1}$  M Pen (1-2 ml), with various volumes of  $^{99m}\text{TcO}_4^-$ , and acetate buffer (3 ml at pH 5-6).

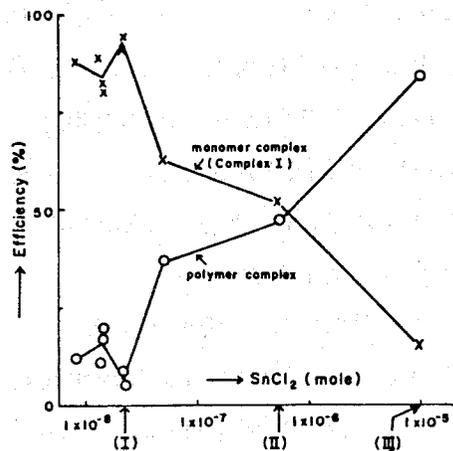


Fig. 1.13 Effect of  $\text{SnCl}_2$  concentration on formation of Complex I and polymerized complex. Efficiency was determined by Sephadex column chromatography. [Labeling conditions:  $\text{SnCl}_2$  (0.5 ml) at various concentrations ( $1.6 \times 10^{-5}$  to  $2 \times 10^{-2}$  M) was added to mixture of  $10^{-2}$  M Pen (1.5 ml),  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  (3 ml) and acetate buffer solution (3 ml, pH 6.0).] Labeling solutions prepared, using  $2.1 \times 10^{-8}$  (I),  $5.5 \times 10^{-7}$  (II), and  $10^{-5}$  mole (III) of  $\text{SnCl}_2$ , were used for biliary excretion studies in rats (Fig. 7).

Complex I の調製法を実験方法(b)に示したように確立することができた。この方法を用いれば、再現性よく95%以上の収率が得られる。Fig.1・14にそのゲル透過の溶出曲線および薄層クロマトグラフを示した。なお、この各クロマトグラフ上の挙動および以下に述べる体内挙動から、Complex IはTubisらによって報告された $^{99m}\text{Tc}$ 標識ペニシラミン<sup>4)</sup>と全く同じものであることがわかった。

(f) Complex Iのマウスにおける体内分布

尾静脈より静脈注射されたComplex Iのマウスにおける体内分布を調べたところ、Fig.1・15に示すように、胆嚢に高い集積を認めた。また、この体内分布には高い再現性が認められた。

(g) ラットにおける胆汁排泄

Fig.1・13の横軸に矢印で示された条件で調製された試料の胆汁排泄の状態をラット胆管カニューレション法で調べた結果をFig.1・16に示した。ここで、Fig.1・16に示された(I), (II), (III)は各々Fig.1・13の(I), (II), (III)すなわち $\text{SnCl}_2$ 量が $2.1 \times 10^{-8}$  mole,  $5.5 \times 10^{-7}$  mole,  $1.0 \times 10^{-5}$  moleの場合の生成物試料の胆汁排泄カーブである。カーブ(I)は、Complex Iの胆汁排泄カーブであり、1時間に投与量の $43.3 \pm 5.2\%$  (平均 $\pm 1\text{s.d.}$ )が胆汁中に回収されたが、 $\text{SnCl}_2$ 量が増すに従い、すなわちComplex Iの割合が減少

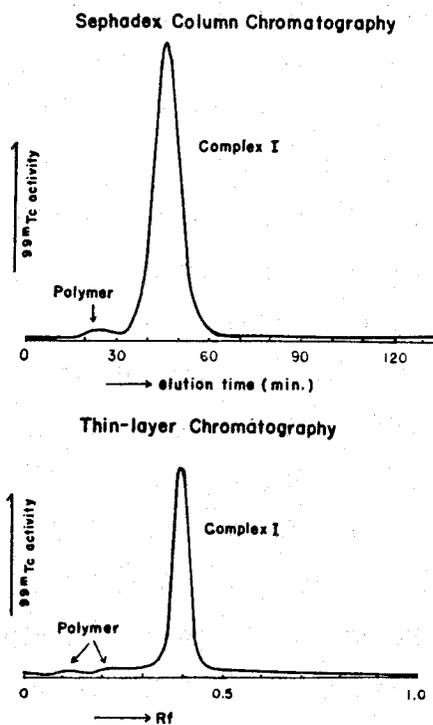


Fig. 1.14 Typical results of Complex I on Sephadex column chromatography and thin-layer chromatography. Sephadex column chromatography: Sephadex G-15, 2.0  $\times$  17-cm column, 0.15 M NaCl elution solvent, 108 ml/hr flow rate. Thin-layer chromatography: Toyo Kasei silica gel spot film, n-butanol-acetic acid-water, 4:1:1.

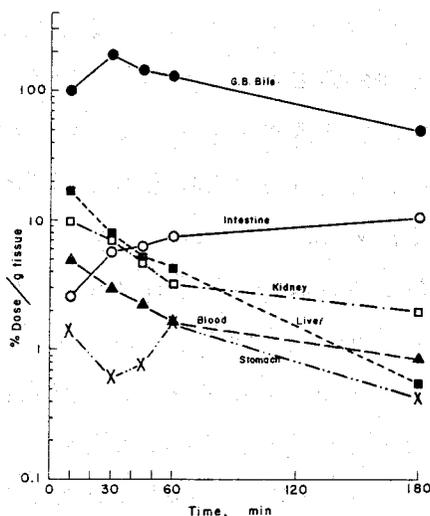
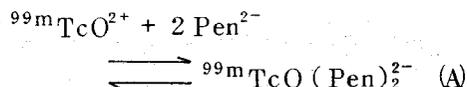


Fig. 1.15 Organ distribution of  $^{99m}\text{Tc}$  in mice after intravenous injection of Complex I. Each point is mean value for 4-6 animals.

するに従い、カーブ(Ⅱ), (Ⅲ)が示すように、放射能の胆汁への回収率は低下した。

### 3. 考 察

Complex I は, Fig.1・10 に示した反応経路から考えると, 反応式(A)によって生成する4価の $^{99m}\text{TcO}^{2+}$ とPenとの錯体 $^{99m}\text{TcO}(\text{Pen})_2^{2-}$ である可能性が高い。



なお,  $\text{TcO}^{2+}$ は4価のTcの最も安定なイオン形であると考えられている。<sup>36)~38)</sup>

Complex I が $^{99m}\text{TcO}(\text{Pen})_2^{2-}$ であることは, Tcと類似する化学的性質を示す $\text{Mo}^{39)}$ のPenやシステイン錯体の研究結果からも支持される。<sup>29), 40), 41)</sup>また, Sephadex

G-15カラムによるゲル濾過において, 化学構造が結晶解析で明らかにされているシステイン(Cys)の複核 $\text{Mo}$ 錯体,  $(\text{Cys})\text{MoO} \langle \text{O} \rangle \text{MoO}(\text{Cys})$  (分子量: 494)<sup>42)</sup>が64mlのところ溶出されてくる条件において, Complex Iの溶出が96mlに認められるという結果が得られているが, このことは, Complex Iに分子量409の $^{99m}\text{TcO}(\text{Pen})_2^{2-}$ の構造を推定することが妥当であることを示している。このような観点にたつて, 今回の結果をさらに詳しく考察してみた。

ここで, まず基本的に考えなければならないことは,  $^{99m}\text{TcO}^{2+}$ が極めて容易に加水分解反応を受ける性質をもつことである。<sup>36), 43)</sup>したがって, Complex I生成の条件を設定するためには,  $^{99m}\text{TcO}^{2+}$ とPenとの錯生成反応が,  $^{99m}\text{TcO}^{2+}$ の加水分解より優位に進む条件が選ばなければならない。

まず, Penの濃度の影響であるが,  $^{99m}\text{TcO}^{2+}$ が加水分解を受けずに反応式(A)に従いComplex Iを生成するには, Penの濃度が高いことが必須条件になる。実際,  $^{99m}\text{TcO}_4^-$ の還元に必要な量の $\text{SnCl}_2$ が与えられた反応溶液においても, Penの濃度が低い場合にはかなりの $^{99m}\text{TcO}_4^-$ が検出された。これは, Fig.1・10におけるPenの濃度が低く反応が4価の $^{99m}\text{Tc}$ の加水分解の方向に進んだ時の反応経路, すなわちComplex IV, Complex Vなどの加水分解錯体の生成, さらにそれらの再酸化で $^{99m}\text{TcO}_4^-$ が生成され

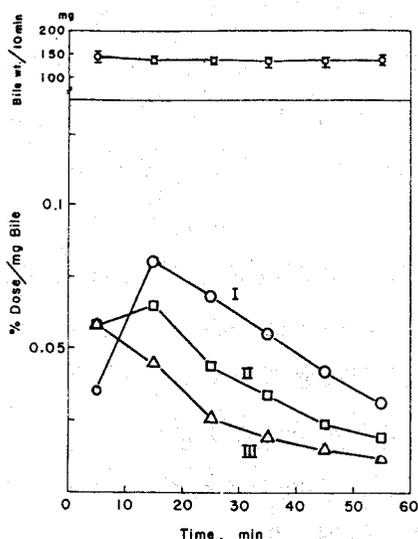
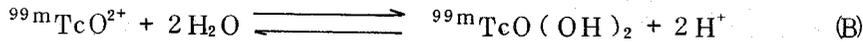


Fig.1.16 Biliary excretion of  $^{99m}\text{Tc}$  and bile volume in rats, at different time intervals after intravenous injection of solutions, prepared using amounts of  $\text{SnCl}_2$  specified for Curves I, II, and III in Fig. 4. [Curve I:  $\text{SnCl}_2$  (I), Complex I 95%, polymer 5%; Curve II:  $\text{SnCl}_2$  (II), Complex I 52%, polymer 48%; Curve III:  $\text{SnCl}_2$  (III), Complex I 15%, polymer 85%.] Each point is mean value for 4-6 animals.

る反応経路を考えると矛盾なく説明される。

さらに、Fig.1・11に示すように、Complex I の生成は pH に著しく影響を受け、pH 5～6 の時最も高い収率で認められる。この結果を理解するために、錯生成反応(A)と加水分解反応(B)との競合を基礎にして、理論的に Complex I の生成に与える pH の影響を考えた。



反応液中の  ${}^{99m}\text{Tc}$  の全濃度を  $C_{\text{Tc}}$ 、Complex I の安定度定数を  $K_f$  (反応式(A))、 ${}^{99m}\text{TcO}^{2+}$  の加水分解定数を  $K_{\text{OH}}$  (反応式(B))として、 $C_{\text{Tc}}$  に対する Complex I の濃度  $[\text{TcO}(\text{Pen})_2^-]$  の比、すなわち反応液中の  ${}^{99m}\text{Tc}$  のうち Complex I として存在している割合を求めると(1)式が導かれる。

$$K_f = \frac{[\text{TcO}(\text{Pen})_2^-]}{[\text{TcO}^{2+}][\text{PEN}]^2}$$

$$K_{\text{OH}} = \frac{[\text{TcO}^{2+}]}{[\text{TcO}(\text{OH})_2][\text{H}^+]^2}$$

$$C_{\text{Tc}} = [\text{TcO}^{2+}] + [\text{TcO}(\text{Pen})_2^-] + [\text{TcO}(\text{OH})_2]$$

であるから、

$$\begin{aligned} \frac{[\text{TcO}(\text{Pen})_2^-]}{C_{\text{Tc}}} &= \frac{K_f [\text{TcO}^{2+}][\text{PEN}]^2}{[\text{TcO}^{2+}] + \frac{[\text{TcO}^{2+}]}{K_{\text{OH}}[\text{H}^+]^2} + K_f [\text{TcO}^{2+}][\text{PEN}]^2} \\ &= \frac{K_f K_{\text{OH}}[\text{H}^+]^2 [\text{PEN}]^2}{1 + K_{\text{OH}}[\text{H}^+]^2 + K_f K_{\text{OH}}[\text{H}^+]^2 [\text{PEN}]^2} \quad (1) \end{aligned}$$

ここで、Gorski らによって測定された値  $K_{\text{OH}} = 10^{3.7 \sim 3.6}$  を用いると、pH 2 以上すなわち  $[\text{H}^+]$  が  $10^{-2}$  M 以下では  $K_{\text{OH}}[\text{H}^+]^2$  の項は無視できるので、 $[\text{TcO}(\text{Pen})_2^-]/C_{\text{Tc}}$  すなわち収率は  $K_f K_{\text{OH}}[\text{H}^+]^2 [\text{PEN}]^2$  の値に依存して変化し、この値が最大の時に最も高い収率が得られることになる。今、 $K_f$  の値を定数として、 $K_{\text{OH}}[\text{H}^+]^2 [\text{PEN}]^2$  (F-Value と略) を種々の pH に対して求めることにする。この時、解離形 Pen の濃度  $[\text{PEN}]$  は、Pen の酸解離定数  $\text{p}K_{a1}=2.5$ 、 $\text{p}K_{a2}=8.32$ 、 $\text{p}K_{a3}=10.31$ <sup>26)</sup> を用いて計算した。求められた F-Value は、Fig.1・11 の実線で示したが、pH 5～6 で最高値を示し、実験値 (○印) とよく一致している。このことは、反応式(A)と(B)との競合が Complex I の生成反応にとって最も重要であるとの仮定が妥当であったことを示している。

さらに、(1)式において、実験結果が示すように pH 5～6 で  $[\text{TcO}(\text{Pen})_2^-]/C_{\text{Tc}} \approx$

1 になるためには、 $K_f$  は  $10^{16}$  以上であると計算される。ところで、Pen の 2 価イオンとの錯体、例えば、 $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$  錯体の安定度定数は各々  $10^{17.1}$ 、 $10^{23.2}$ 、 $10^{21.7}$  であると報告されている。<sup>26),44)</sup> 4 価の  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  の場合、 $^{99\text{m}}\text{TcO}^{2+}$  の 2 価イオンの配位を考えれば、ここに得られた安定度定数の計算値  $10^{16}$  以上は妥当な値であり、Complex I が一旦生成すると種々の条件下に置かれてもかなり安定であることは、この錯体の高い安定性に基づくと考えられる。

Fig.1・11 において、pH 2～4 の範囲で実験結果と計算値とが大きくずれているが、このことは、この pH 域ではオーレションにより生成する多核の  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  と Pen との錯生成反応などの (A)、(B) 以外の反応が進み、これらの反応が Complex I の生成に影響を与える要因となって起ったことと考えられる。実際、 $^{99}\text{Tc}$  を用いた吸収スペクトルの測定からも、この pH 域では Complex I 以外の錯体種の生成が観察された。

さらに、Complex I 生成反応に与える  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  濃度の影響に関して、興味ある結果が得られた。すなわち、pH 1～2 の酸性域で  $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ 、Pen、 $\text{SnCl}_2$  を反応後、pH を 5～6 に調整する条件で Complex I の調製を試みた時、Fig.1・12 に示すように、 $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$  の使用量が反応結果 (○印) に大きく影響する。一方、pH 5～6 の条件下での反応では、 $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$  の使用量の影響は認められない (●印)。還元された  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  種の反応が、Pen の解離が少なく錯生成より加水分解の方向に進み易い酸性下でのみ、 $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$  の使用量の影響が観察され、しかも使用量が多い時多核錯体の生成が認められたことは、明らかに  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  の濃度が高い時加水分解体間の反応が顕著になり、その結果多核錯体の生成が優位となるものと解釈される。技術的な報告のみであるが、Tc の濃度の生成体を与える影響は、Smith らによって赤血球の  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  標識反応でも示唆されており、<sup>45)</sup> 一般に Tc の反応において、いわゆるキャリアフリーの濃度でも、多核の  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  錯体の生成に対する  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  濃度の影響を無視できないであろうと考えられる。

一般に、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$  標識診断薬の調製は酸性条件下で行われることが多い。酸性条件は主に還元剤として使用される  $\text{SnCl}_2$  の安定性の面から考察されて選択されたものである。一方、ジェネレータからの溶出間隔により、溶出液中に存在する  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  の濃度が変化すること、<sup>46)</sup> および親核種の  $^{99}\text{Mo}$  の壊変を同時に考えた場合、病院において、溶出液中の  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  濃度を一定に保つことは不可能に近く、したがって  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  濃度の影響を受けやすい酸性溶液中での  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  標識反応は、一定の化学状態の  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  錯体を再現性よく得る目的には不適當であると結論される。Tubis らに報告による標識法<sup>4)</sup> では Complex I の生成の再現性が低いことを前に述べたが、その大きな原因のひとつに、

酸性域での $^{99m}\text{Tc}$ の濃度変化の影響が指摘される。

このように、 $^{99m}\text{TcO}_4^{2-}$ に対するPenの反応が $\text{OH}^-$ の反応よりはるかに進みやすいpH5~6が、Complex I生成に $^{99m}\text{TcO}_4^-$ の濃度の影響の面で有利であることが理論的にも明らかにされたので、最後に還元剤として使用される $\text{SnCl}_2$ の標識反応への影響の考察を行った。

$\text{SnCl}_2$ の標識反応への影響についてのこれまでの報告は、標識体中のTcの原子価に関するものが多く、実際に、反応溶液のpHや標識される試薬に依存して、3価または4価のTcの状態を示すことが知られている<sup>37),47),48)</sup>が、Complex Iにおいては、上記の考察や第1節での $\text{Tc}^{(IV)}\text{Cl}_6^{2-}$ を用いた実験結果から、Tcは4価の配位状態にあると結論される。Complex Iは、 $\text{SnCl}_2$ 濃度が極低濃度の時に生成するが、濃度が増加すると、Complex II, IIIなどの $^{99m}\text{Tc}$ 多核錯体が生成することがFig.1-13に示される。この結果は、 $\text{SnCl}_2$ が $^{99m}\text{TcO}_4^-$ の4価の $^{99m}\text{Tc}$ への還元のみでなく、 $\text{SnCl}_2$ 濃度が還元された $^{99m}\text{Tc}$ 種の加水分解に対して影響を与えることを示唆している。この $\text{SnCl}_2$ 濃度の多核錯体生成への影響は、次項のComplex IIの調製の条件の設定に重要な因子として利用され、またこの反応機構については、共同研究者であるHoriuchiによって詳しく検討されている<sup>49)</sup>。

以上の標識反応の基礎的検討に基づいて、さらに生成体の胆汁排泄挙動を詳しくべた結果(Fig.1-16)、生成体の構造、性質と胆汁排泄挙動とが関係づけられ、 $^{99m}\text{Tc}$ -Penの胆汁排泄へのComplex Iの構造の重要性が明らかにされ、さらに錯体構造が相違すると異なった胆汁排泄挙動を示すことが示唆された。

## 第2項 $^{99m}\text{Tc}$ -ペニシラミン( $^{99m}\text{Tc}$ -Pen) Complex II

本節の冒頭において、 $^{99m}\text{Tc}$ -Pen錯体種の中でComplex Iの他にもう一種胆汁排泄を示す錯体種としてComplex IIが得られることを記述したが、さらに、このComplex IIは種々の化学的性質から $^{99m}\text{TcO}_4^{2-}$ が低次に加水分解を受けた状態でPenに配位した、おそらく $^{99m}\text{TcO}-\text{O}-^{99m}\text{TcO}$ または $^{99m}\text{TcO} \begin{array}{c} \diagup \text{O} \diagdown \\ \diagdown \text{O} \diagup \end{array} ^{99m}\text{TcO}$ を骨格にもつTcの複核錯体であろうと推定された。 $^{99m}\text{Tc}$ 標識体において、このように異種の比較的安定な錯体種が分離され、選択的に得られた例はいままでにないので、それぞれの錯体種を選択的な生成条件および化学構造や性質と体内動態との関係についての比較検討は、一般に $^{99m}\text{Tc}$ 標識診断薬の開発のために基礎的に重要で興味深い知見を与えることが期待される。

Gorski,<sup>36)</sup> Owunwanne<sup>38)</sup>らによれば、pH 1~2 以下のような酸性領域でさえ、 $TcO^{2+}$  は容易に加水分解を受けて  $TcO_2$  コロイドに導かれることが示されている。また、前項に述べたように、胆汁排泄を示す錯体種を高収率で得るための条件は限られるが、単核錯体 Complex I の生成そのものは、かなり広い pH 域で観察されている。このような Tc および Pen の反応性を考慮すると、Complex II を選択的に調製するためには、 $^{99m}Tc$  の加水分解と Pen への配位との間のバランスを Complex II 生成に有利な状態に保つような反応条件を選ぶことが基本的に必要となる。

$^{99m}Tc$  の加水分解と Pen への配位に影響を与える要因としては、pH、Pen の濃度、Tc の濃度が考えられる。そのうち、Tc の濃度に関しては、前項に記述した結果 (Fig.1.12) から、反応溶液の全容量の 60% 以上の  $^{99m}TcO_4^-$  ジェネレータ溶出液が用いられる時に得られる Tc の濃度が必要であることが既に認められている。さらに、Fig.1.10 の Tc と Pen との反応機構および Complex I 生成への pH の影響 (Fig.1.11) を参考にすれば、pH 1~2 の酸性域で  $^{99m}TcO_4^-$  と大過剰の Pen との  $SnCl_2$  存在下での反応は、 $^{99m}Tc$  の加水分解錯体生成の方向に進むが、一方で、その段階で  $^{99m}Tc$  の加水分解と  $^{99m}Tc$  - Pen 錯体生成との間に安定な平衡関係が保たれていることが期待された。したがって、このような加水分解の状態にある  $^{99m}Tc$  に Pen が錯生成に有利な解離状態で  $^{99m}Tc$  の状態を乱すことなく与えられれば、反応液の平衡は Complex II 生成の方向に傾き、結果的に、反応は Complex I あるいは  $^{99m}TcO_2$  コロイドを生成することなく、Complex II の選択的な生成の方向に導かれるはずである。すなわち、具体的には、この反応条件は、上述の Pen が大過剰に存在する酸性溶液の pH を、Pen の解離定数を参考にして、できるだけ短時間の操作で高い pH に調節することで与えられるであろうと考えた。

また、共同研究者である Horiuchi らは、 $TcO_4^-$  の還元剤として用いる  $SnCl_2$  に関して興味ある知見を得ている。<sup>49)</sup> すなわち、 $TcO_4^-$  と  $SnCl_2$  との反応で、 $SnCl_2$  の濃度が  $Tc \ll Sn^{2+}$  でかつある限られた濃度の範囲では、 $Sn^{2+}$  の加水分解体の存在が還元された Tc 種の加水分解を促進し、また Sn 加水分解体と Tc 加水分解体とがかなり安定な錯体を生成することを認めているが、この  $SnCl_2$  の濃度および化学状態が還元された Tc 種の加水分解に与える影響は、Pen の濃度や pH と共に、Complex II の生成に影響を与える重要な化学的因子であることを示唆している。

以上の考察をもとにして、pH 1~2 の酸性条件で生成する  $^{99m}Tc$  の加水分解錯体を経る Complex II の選択的な調製法を確立し、得られた Complex II を用いて、その化学

的性質，胆汁排泄およびそれらの関係を Complex I の結果と比較検討することを計画した。

## 1. 実験方法

### (a) 試薬

$^{99m}\text{TcO}_4^-$ ，Pen は本章第 1 節に記述したものと同一である。その他の試薬・溶媒はすべて特級試薬を使用した。

### (b) 標識反応および反応生成物の検討

あらかじめ窒素置換した 0.1 N 塩酸溶液を用いて  $\text{SnCl}_2$  溶液を調製し，これを  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  と Pen との混合溶液に加え，10 分攪拌後，1 N  $\text{NaHCO}_3$  水溶液あるいは緩衝液を用いて適当な pH に調節した。操作および条件の詳細は必要に応じて本文中の関連部分に記述した。また，得られた反応生成物の検討は，Sephadex G-15 カラム（直径：2 cm 高さ：23 cm）を用いたゲル濾過法で，生理食塩水を溶離液として，108 ml/hr の流速で行った。

### (c) 体内分布の検討

マウスにおける体内分布の検討には，25～30 g の ddy 系雄マウスを 1 群 4～6 匹ずつ使用し，検体 0.3 ml（約 50～100  $\mu\text{Ci}$ ）を尾静脈より投与した後，本節第 1 項に記述した方法に準じて行った。

また，家兎における体内分布の検討には，約 2.5 kg の家兎を用い，これをペントバルビタールナトリウムで麻酔し，耳静脈より検体 1 ml（約 1～2 mCi）を投与した後，スキャナを用いて 15，30，60，180，360 分でスキャン像を作成した。

### (d) 胆汁排泄の検討

ラットにおける胆汁排泄の検討は，250～300 g の Wistar 系雄ラットを 1 群 4～6 匹ずつ使用し，検体 0.5 ml（約 100  $\mu\text{Ci}$ ）を大腿静脈より投与した後，本節第 1 項に記述した胆管カニューレーション法によって行った。

### (e) 機器

ゲル濾過溶出液中の放射能の測定は，本章第 1 節の実験と同様である。また，動物実験における各臓器および胆汁試料中の放射能の測定には，Abbot Laboratories Auto-LOGIC・オートウェルカウンターを用い，さらに，家兎におけるスキャン像は，動物用特製コリメーターを装置した島津製 SCC-1050 W を用いて作成した。

## 2. 結果

### (a) pH の影響

pHの影響を次のようにして調べた。 $^{99m}\text{TcO}_4^-$ 溶液 3~4 ml と Pen ( $1 \times 10^{-2}$  M) 1.5 ~ 2.0 ml とを混ぜ、pHをあらかじめ 1.5~2.0 とし、これに窒素置換した  $\text{SnCl}_2$  溶液 ( $1 \times 10^{-3}$  M, 0.1 N 塩酸溶液) 0.5 ml を加え 10 分間攪拌後、1 N  $\text{NaHCO}_3$  水溶液を用いて一挙に高 pH に調節した。この反応液をゲル濾過法で分析し、最終 pH と Complex II 生成との関係を調べた。

Fig.1.10 に示すように、Complex II は 22 分の画分に溶出した。Fig.1.17 (I) の結果は、pH を 7.5 にした時に Complex II が最も収率よく生成することを示している。最終 pH を 4~6 にした時には、48 分の画分に溶出してくる Complex I や 15 分の画分に溶出してくる他の錯体種などの混在が認められた。また、pH を 9 以上にすると  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  の生成が認められた。

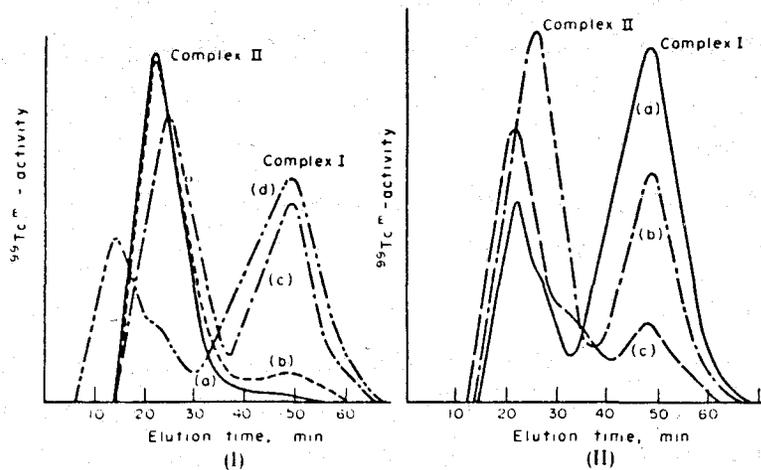


Fig.1.17 Effect of pH on labeling products. (I), Pen ( $10^{-2}$  M),  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  eluate and  $\text{SnCl}_2$  ( $10^{-3}$  M) were mixed at pH 1.5-2.0. After incubation for 10 min, reaction mixture was adjusted to various pH and analyzed by S.C.C. (a) — pH 7.5, (b) — pH 6.5, (c) — pH 5.3, (d) — pH 4.6. (II), the pH of the mixture of Pen ( $10^{-2}$  M) and  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  was adjusted to various values and then  $\text{SnCl}_2$  ( $10^{-3}$  M) was added, and the reaction mixture was analyzed by S.C.C. (a) — pH 7.5, (b) — pH 5.3, (c) — pH 3.6.

一方、Fig 1.17 (II) に示されているように、 $^{99m}\text{TcO}_4^-$  と Pen 濃度が前述の濃度と同じであっても、0.1 M 酢酸緩衝液または 0.1 M リン酸緩衝液を用いて、反応溶液の pH をあらかじめ 3~8 に調節し、その反応溶液に  $\text{SnCl}_2$  を加えると、Complex II 以外に常に Complex I や他の錯体種の生成が認められた。

#### (b) $\text{SnCl}_2$ 濃度の影響

窒素置換した種々の濃度の  $\text{SnCl}_2$  の 0.1 N 塩酸溶液を用いて、標識反応に与える  $\text{SnCl}_2$  の濃度の影響を次のような方法で調べた。すなわち、このように調製された

SnCl<sub>2</sub> 溶液 0.5 ml を, Pen (1×10<sup>-2</sup> M) 2 ml と <sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup> 溶液 4 ml の混合溶液に加え, 10 分間攪拌後, この酸性反応液の pH を 1 N NaHCO<sub>3</sub> 水溶液で 7.2~7.5 に調節し, 最終反応液をゲル濾過法で分析した。

Fig.1.18 に示すように, Complex II は 1×10<sup>-3</sup>~2×10<sup>-2</sup> M (5×10<sup>-7</sup>~1×10<sup>-5</sup> mole) の SnCl<sub>2</sub> 溶液を用いた時, 最も収率よく生成した。これより低い濃度の SnCl<sub>2</sub> 溶液を用いた時には, Complex II の生成率は低下し, Complex I の生成が顕著に認められ, 逆に高い濃度の SnCl<sub>2</sub> 溶液を用いた場合は, 15 分の溶出時間を示す錯体種などの他の錯体種の生成が認められた。

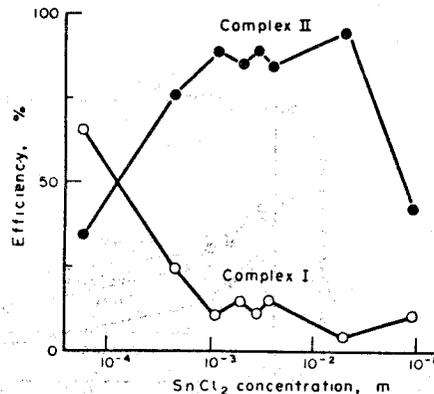


Fig. 1.18 Effect of SnCl<sub>2</sub> concentration on the formation of Complex I and Complex II.

#### (c) Pen 濃度の影響

Complex II の生成には, 3~4 ml の <sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup> を用いた場合, 10<sup>-3</sup> M 以上の濃度の Pen が必要で, それ以下の場合には, 22 分より短い時間に溶出する他の錯体種や <sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup> あるいは <sup>99m</sup>TcO<sub>2</sub> コロイドの生成が認められた。

#### (d) Complex II の調製

以上の結果に基づき, 以下のような最も収率が高く, 再現性も良好な Complex II の調製法を確立した。まず, 4 ml の <sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup> 溶液と Pen (1×10<sup>-2</sup> M) 2 ml との混合液に, 窒素置換した SnCl<sub>2</sub> 溶液 (1×10<sup>-3</sup> M, 0.1 N 塩酸溶液) 0.5 ml を加える。この時の反応液の pH は 1.5~2.0 に保たれる。10 分間攪拌後, 1 N NaHCO<sub>3</sub> 水溶液約 0.3 ml を一挙に加えて pH を 7.2~7.5 に調節し, 最後に, この反応液を 0.22 μm のミリポアフィルターに通す。

この方法を用いることにより, Fig.1.17 (I) の (a) のゲル濾過の溶出曲線が示すように, 収率 95% 以上で Complex II が再現性良く得られる。

#### (e) マウスにおける体内分布

上記の方法で調製した Complex II を尾静脈より注射し, マウスでの体内分布を調べたところ, Fig 1.19 (I) に示すように, 胆嚢に高い集積が認められ, かつこの体内分布は高い再現性を示した。一方, Fig 1.17 (I) の (d) に溶出曲線が示されている最終 pH 4.6:

の条件で調製された反応溶液の体内分布を調べたところ、Fig.1・19(Ⅲ)に示すように Complex Ⅱの結果とは大きく異なり、胆嚢への放射能の取込みは低く、血液、腎、肝への集積が高く、むしろ Fig.1・17(Ⅲ)および(Ⅳ)に示されている  $^{99m}\text{TcO}_2$  コロイドや  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  の体内分布に類似していた。

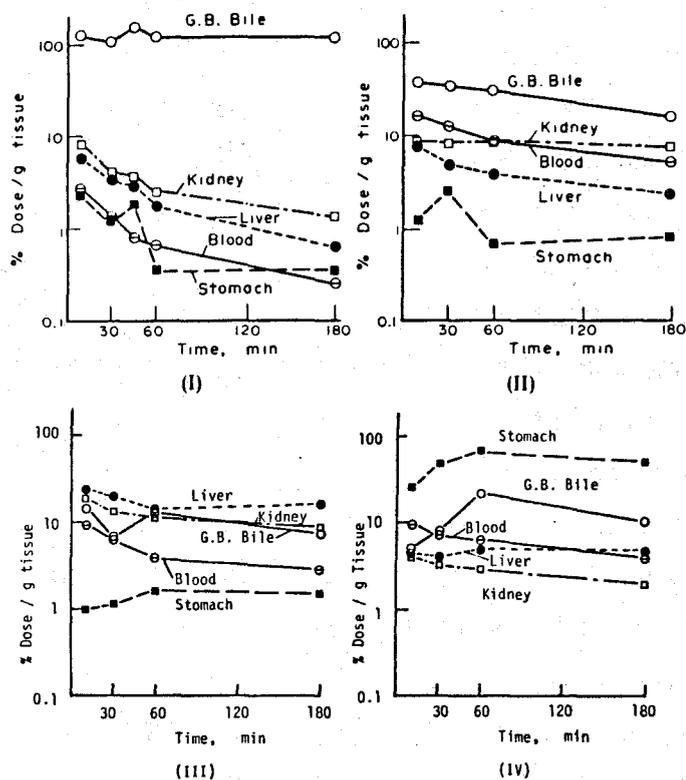


Fig.1.19 Organ distributions in mice after injection of the labeling solutions prepared at pH 7.5 (Complex II) (I), at pH 4.6 (Complex I + Complex II + highly hydrolyzed complexes) (II),  $^{99m}\text{TcO}_2$  colloid (III) and  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  (IV). Each point is a mean value for 4-6 animals.

#### (f) ラットにおける胆汁排泄

Fig.1・17(I)の(a), (b), (c), (d)に溶出曲線が示されている最終 pH 7.5, 6.5, 5.3, 4.6 で調製された各反応溶液を試料として、それぞれの胆汁排泄挙動をラット胆管カニューレーション法で調べたところ、Fig.1・20の(a), (b), (c), (d)に示されている胆汁排泄カーブが得られた。さらに、Fig.1・20には、これらの結果と比較するために、Complex Iの結果(Fig.1・16(I))も同時にカーブ(e)として示した。カーブ(a)は、Complex Ⅱの胆汁排泄カーブであり、1時間に投与量の  $38.0 \pm 2.1$  (平均  $\pm 1$  s.d.) が胆汁中に回収され

ることが示されている。この値に関する限り、Complex Iのそれとよく似ているが、その排泄カーブはComplex I（カーブ(e)）のそれとは全く異なり、初期のComplex IIの排泄速度はComplex Iのそれに比べてかなり速いことが認められた。また、(a), (b), (c), (d)と反応液のpHが低下するに従って、すなわちComplex IIの存在割合が減少するに従って、放射能の胆汁への回収率は低下し、またその排泄カーブのパターンは、Complex IIと異なり、むしろComplex Iのパターンに近くなっていることがわかった。

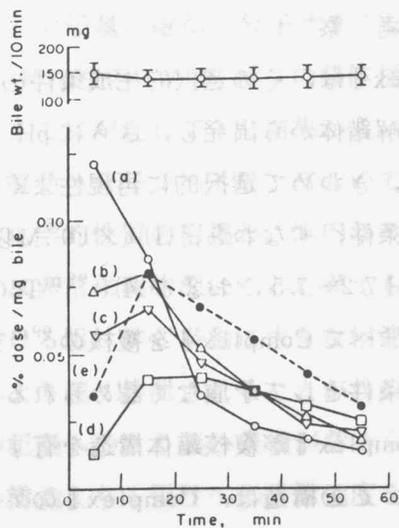


Fig.1.20 Biliary excretion of  $^{99}\text{Tc}^m$  and bile volume in rats at different time intervals after i.v. injection of the labeling solutions, prepared at various pH, and Complex I. (a)  $\circ$  - pH 7.5, (b)  $\triangle$  - pH 6.5, (c)  $\nabla$  - pH 5.3, (d)  $\square$  - pH 4.6, (e)  $\bullet$  - Complex I.

(g) 家兎における体内分布

Complex IおよびComplex IIの投与6時間後のスキャン像をFig.1.21に示した。

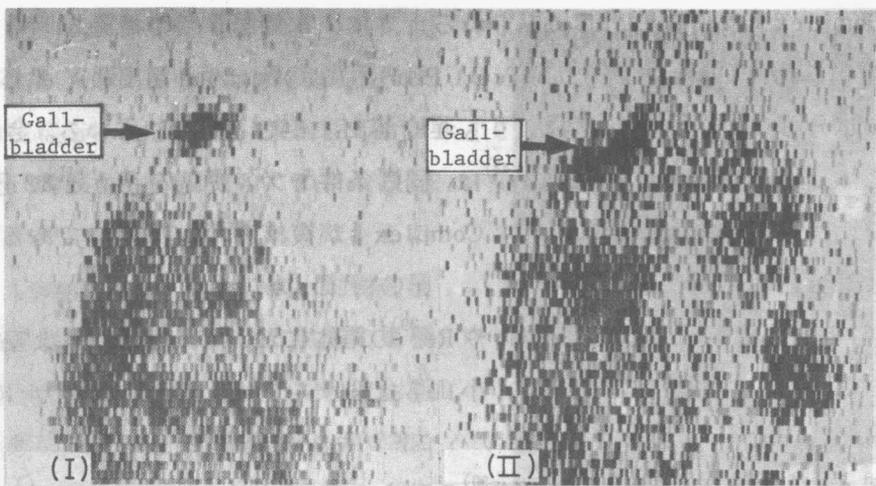


Fig.1.21 Scans of distributions of Complex I, and Complex II in rabbits at 6 hr post-injection.

Complex I の場合には、胆嚢および腸にのみ放射能が認められたが、Complex II においては、同時に、腎、肝および胃にも放射能の集積が認められた。

### 3. 考 察

Complex II は、その選択的生成条件の考察から予期したように、酸性域での<sup>99m</sup>Tcの加水分解錯体から出発し、さらにpH、SnCl<sub>2</sub>、Pen、Tcの各濃度を調整することによって、きわめて選択的に再現性よく得られることがわかった。結果の項(d)にまとめた調製条件、すなわち、(1)  $1 \times 10^{-3}$  M以上のPen、(2)  $2 \times 10^{-2} \sim 1 \times 10^{-3}$  MのSnCl<sub>2</sub>、(3) 最終pH 7.2~7.5、および(4) (<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup>の使用量) / (全反応液量) が0.6以上の諸条件は、すべてComplex IIを複核の<sup>99m</sup>Tc-Pen錯体であると想定すると、その生成に有利な条件として矛盾なく認められるものであり、換言すれば、これらの調製条件から、Complex IIが複核錯体構造を有することが推定される。

さらに、この構造は、Complex IIのゲル濾過の結果(溶出時間: 22分)からも支持される。ゲル濾過において、22分より短い溶出時間を示す錯体種は、Fig. 1-17 (I) (d) に示されるように、錯生成を起こす解離形のPenの濃度が低い酸性pHで生成する。このpH領域においては、Penとの錯生成反応が進みにくく、相対的に<sup>99m</sup>Tcの加水分解が進みやすい。このことを考慮すると、上記の錯体種はComplex IIよりかなり加水分解の進んだ高分子量の<sup>99m</sup>Tcの多核加水分解錯体と考えられる。ところで、Henryらは、種々の加水分解状態のFe<sup>3+</sup>の多核加水分解錯体のゲル濾過を行い、加水分解の割合が増すほど、すなわち分子量の増加にともない、はやく溶出することを見出している。<sup>50)</sup> Complex IIは、Fig. 1-17にみられるように、本節第1項で構造を明らかにした<sup>99m</sup>Tcの単核錯体Complex I (<sup>99m</sup>TcO(Pen)<sub>2</sub><sup>-</sup>) よりもはやく溶出し、また前述した高次に加水分解した<sup>99m</sup>Tc錯体種よりも遅く溶出することを示している。さらに、Moの複核錯体であるMo<sub>2</sub>O<sub>4</sub>(cystein)<sub>2</sub><sup>42)</sup>は、同じ条件でゲル濾過を行うと32分で溶出した。このようなゲル濾過の結果から、Complex IIが複核の<sup>99m</sup>Tc錯体であると推定することは妥当と考えられる。

Tcと化学的性質が類似しているMoやRe<sup>39)</sup>の錯体において、複核錯体は安定な錯体種としてよく知られている。<sup>51), 52)</sup> また、小山らはトルエン-3,4-ジチオールにおいて、<sup>53)</sup> Steigmanらはマンニトールなどのポリヒドロキシン化合物において、<sup>54), 55)</sup> また横山らはアスコルビン酸やタイロンにおいて、<sup>30)</sup> それらのTc錯体として、(TcO<sub>2</sub>(O)<sub>2</sub>TcO)あるいは(TcO-O-TcO)を骨格とするTcの複核オキソ錯体の存在を示唆している。また、Complex IIが、Complex Iに次いで化学的に安定なTc-Pen錯体種であるという

事実は、さらに Complex II が複核錯体である可能性を支持している。

ところで、Firnau は、数種の  $^{99m}\text{Tc}$  標識肝胆道系診断薬の体内挙動を比較した結果から、 $^{99m}\text{Tc}$  錯体が胆汁排泄されるためには、分子量、電荷、分子サイズなどの条件が重要であると述べている。<sup>56)</sup>  $\text{Tc}$  という金属の特殊性のために、種々の錯体種の構造や性質を明確にすることは困難であるが、これまでに記述してきた結果から、Complex I と Complex II とは少なくともその分子量、電荷、分子サイズなどにおいて大きな違いがあることは明らかであるので、これらの化学的性質の相違が、体内挙動とくに胆汁排泄にどのように影響するかを調べることは非常に興味深いことと考えられる。

実際、Fig.1・20 に示すように、ラットにおける胆汁排泄挙動に大きな相違が認められ、Complex II は Complex I に比べて胆汁へより速く排泄されることがわかったが、家兎のスキャン像においても、Complex II の胆嚢へのより速い集積が認められた。このことは、Complex II の構造が Complex I の構造よりも胆汁への排泄速度を速めるのに有利であることを示している。

Complex II の体内挙動における興味深いもうひとつの知見は、マウスと家兎において体内分布がかなり異なるということである。すなわち、マウスにおいては、Fig.1・19 (I) に示すように、Complex I と同様、胆嚢に非常に高い放射能の集積を認め、また、肝、腎、血液などの他の臓器からの放射能の消失は非常に速かった。しかし、家兎においては、前述したように胆嚢への速くてかつ高い集積は認められたものの、同時に腎および肝にもかなりの放射能が認められ、また投与6時間後には3時間後までは認められなかった胃への集積も認められた。

(Fig.1・21)。実際に Complex II を臨床に使用した場合にも、肝での高い放射能の貯留および遅い血液からの消失のために、良好な胆嚢のイメージは得られなかった。これに比べ、Complex I の場合には、動物の種差なく胆嚢および腸への高い放射能の集積を認めただけで、その他の臓器での放射能の貯留は認められず、実際に、Fig.1・22 に示すように、臨床使用においても胆嚢の良好なイメージが得られた。

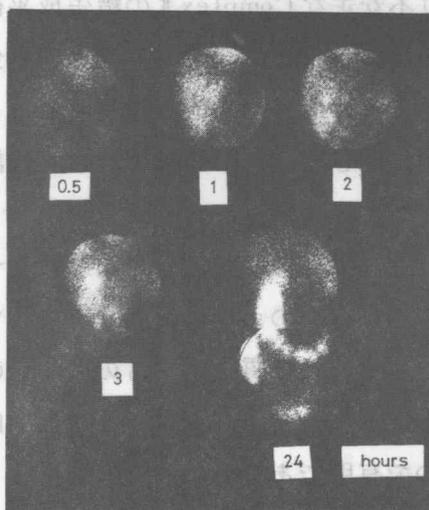


Fig.1.22 Sequential cholescintigrams of  $^{99m}\text{Tc}$ -Pen Complex I in a normal human.

Fig.1・19 (II) に示されたマウスでの体内分

布の結果は、Fig.1・17(I)における(d)の溶出曲線を示す溶液、すなわち、Complex IやComplex II以外に高次に加水分解した $^{99m}\text{Tc}$ の状態に配位した錯体種を含んだ溶液をマウスに投与した時に得られたものである。したがって、この場合の体内分布、すなわちComplex IやComplex IIの時とは異なって特徴的にみられる肝、腎、血液における高い放射能の貯留は、高次に加水分解した $^{99m}\text{Tc}$ の状態に配位した錯体種に基づくものと解釈できる。また、この特徴的な分布パターンは、Fig.1・19(III)、(IV)に示す $^{99m}\text{TcO}_2$ コロイドや $^{99m}\text{TcO}_4$ の体内分布のそれとよく類似している。このような分布パターンは、高次に加水分解した $^{99m}\text{Tc}$ の化学状態で存在している $^{99m}\text{Tc}-\text{DOPA}$ <sup>57)</sup>や $^{99m}\text{Tc}$ -ブレオマイシン<sup>33)</sup>などの他の $^{99m}\text{Tc}$ 錯体にも共通して観察された。以上の結果から考察すると、高次に加水分解された $^{99m}\text{Tc}$ 錯体においては、それらが体内に投与されると、溶液中で保たれていた平衡状態が、pHや配位子の濃度などの大きな変化のためにくずれ、錯体の分解の方向に容易に傾き、 $^{99m}\text{TcO}_2$ コロイドや $^{99m}\text{TcO}_4$ が生成するものと推定された。

ところで、Complex IIの家兎や人の体内での挙動は、マウスでの挙動と異なり、むしろこの高次に加水分解した $^{99m}\text{Tc}$ 錯体種のそれによく類似している。Complex Iの場合には、このような種差はみられなかった。したがって、家兎や人におけるComplex IとComplex IIとの体内分布の相違は、Complex Iに比べComplex IIが化学的により不安定であることに基づいており、その安定性における相違が、これらの体内挙動における相違となってあらわれたものと考えられる。すなわち、これらの動物体内では、より不安定なComplex IIの錯生成平衡がくずれて、還元された $^{99m}\text{Tc}$ 種の加水分解の方向に傾き、その結果、高次の加水分解錯体と同じような $^{99m}\text{Tc}$ の体内分布が観察されるようになったものと説明することができる。この動物種による体内分布の相違の原因に関しては、第2章で詳しく検討する。

以上、第2節に記述した結果に基づき、Complex IおよびComplex IIは、臨床使用の観点から次のように評価される。すなわち、Complex IIはその胆管移行性の速さの点ですぐれた性質を示すものの、その体内での不安定さは臨床使用に際し決定的な欠点となる。一方、Complex Iは化学的安定性のために、良好な胆嚢のイメージを与えるので有用であるといえる。実際、本節第1項に述べた著者の方法に従い無菌的に製造されたComplex Iが京都大学医学部附属病院放射線部で、昭和50年6月から同年12月までの間、肝胆道系診断薬として臨床に使用された。正常人で得ら

れた結果の1例をFig.1・22に示すが、投与後3時間で明瞭な胆嚢のイメージが得られていることがわかる。

しかし、このComplex Iも、良好なイメージを得るには投与後3時間も時間を必要とすること、胆汁排泄量が少なく（ラットで投与1時間で43.5%）、尿排泄量が多い（ラットで投与24時間で32.2%）ため定量的診断には満足すべきものではないなどの問題点を有するので、さらにこの点においてすぐれた性質を示す $^{99m}\text{Tc}$ 標識診断薬の開発が切望された。

## 第2章 $^{99m}\text{Tc}$ -2-メルカプトプロピオニルグリシン： 胆管移行とその動物による違いについて

第1章に記述した胆汁排泄しやすい $^{99m}\text{Tc}$ -Pen 錯体種の性質についての検討から、 $^{99m}\text{Tc}$ の化学状態、分子サイズ、錯体の安定性などが胆汁排泄に大きく影響することを見出した。

一方、第1章に記述したPenとの反応の結果からもわかるように、Tcはチオール基と強く結合するため、多くのメルカプト化合物と $^{99m}\text{Tc}$ とのキレート化合物が、放射性医薬品として可能性があることが報告されている。<sup>54)</sup>これらの化合物のうち、 $^{99m}\text{Tc}$ -Penを含め、 $^{99m}\text{Tc}$ -メルカプトイソ酪酸<sup>8)</sup>、 $^{99m}\text{Tc}$ -ジヒドロチオクト酸<sup>7)</sup>、 $^{99m}\text{Tc}$ -ケトキサールービス(チオセミカルバゾン)<sup>11)</sup>、 $^{99m}\text{Tc}$ -6-メルカプトプリン<sup>5)</sup>などが肝胆移行性を示すため、Tc-チオールの結合が肝胆移行に関係があることが推測されている。<sup>59)</sup>

以上のことを考慮して、分子内にチオール基を有し、Tc以外の数種の金属イオンと安定なキレート化合物を生成することが知られているため、<sup>60)~62)</sup>Tcとの反応で分子内にTc-チオールの結合をもつ安定なキレートを生成することが予想される低毒性の化合物として、肝治療解毒剤のひとつである2-メルカプトプロピオニルグリシン ( $\text{CH}_3-\underset{\text{SH}}{\text{CH}}-\text{CONH}-\text{CH}_2-\text{COOH}$ , 2-MPGと略)を選び、 $^{99m}\text{Tc}$ との標識反応を調べ、その結果生成した標識体の性質と胆汁排泄挙動との関係を考察した。さらに、 $^{99m}\text{Tc}$ -Pen Complex I および Complex II と比較検討しつつ、この $^{99m}\text{Tc}$ -2-MPGの肝胆道系診断薬としての臨床応用における可能性と問題点について考察を加えた。

### 1. 実験方法

#### (a) 試薬

$^{99m}\text{TcO}_4^-$ に関しては第1章と同様に取り扱った。2-メルカプトプロピオニルグリシン(2-MPG)は参天製薬株式会社製のものを用いた。また、他の試薬・溶媒はすべて特級試薬をそのまま使用した。

#### (b) $^{99m}\text{Tc}$ -2-MPGの調製

2-MPG ( $1 \times 10^{-2}\text{M}$ ) 1.5 ml,  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  3 ml, 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 6.1) 3 ml を混ぜ、この混合液に、窒素置換した $\text{SnCl}_2$ 溶液 ( $2.6 \times 10^{-5} \sim 3.2 \times 10^{-5}\text{M}$ , 0.1 N 塩

酸溶液)を加え、10分間攪拌する。最後に、この反応溶液を0.22 $\mu$ mのミリポアフィルターに通す。

(c) 標識率の検討

標識率は、ゲル濾過法、濾紙電気泳動法および薄層クロマトグラフィーにより検討した。ゲル濾過法および濾紙電気泳動法は、第1章に記述した方法に従って行った。また、薄層クロマトグラフィーは、メルクシリカゲル60アルミニウムシート(Art. 5553)を用い、n-ブタノール：酢酸：水=4：1：1の展開溶媒で行った。

(d) Penとの配位子交換反応

前述した条件で調製した $^{99m}\text{Tc}-2\text{-MPG}$ 1ml(2-MPGを $1.9\times 10^{-6}$ moleを含む)に、 $1\times 10^{-2}$ MのPen 0.4ml( $4\times 10^{-6}$ mole)を加え、37°Cで、10分間インキュベートしたのち、前述のゲル濾過法、濾紙電気泳動法および薄層クロマトグラフィーでその生成物を検討した。

(e) トリス緩衝液による希釈の影響

希釈濃度に応じて、 $^{99m}\text{Tc}-2\text{-MPG}$ 溶液を適量とり、これに0.05Mトリス緩衝液(pH 7.4)を加え、全量を5mlとする。これを、37°Cでインキュベートし、10、30、60、120分後の試料をそれぞれ前述の薄層クロマトグラフィーで分析し、 $^{99m}\text{Tc}-2\text{-MPG}$ の残存量および分解物の検討を行った。また、 $^{99m}\text{Tc}-\text{Pen Complex I}$ およびComplex IIを第1章に示した方法で調製し、希釈の影響を同様に検討した。

(f) 体内分布の検討

マウスにおける体内分布の検討には、25~30gのddy系雄マウスを1群3~5匹ずつ使用し、検体0.3ml(約50 $\mu$ Ci)を尾静脈より投与した後、第1章に記述した方法に従って行った。

また、家兎における体内分布の検討には、約2.5kgの家兎を用い、これをペントバルビタールナトリウムで麻酔し、耳静脈より検体1ml(約1mCi)を投与した後、5、30、90、180分でシンチグラムを作成した。

(g) 胆汁排泄の検討

ラットにおける胆汁排泄の検討には、250~300gのWistar系雄ラットを1群5~6匹ずつ使用し、検体0.5ml(約100 $\mu$ Ci)を大腿静脈より投与した後、第1章に記述した胆管カニューレーション法によって行った。

(h) 機器

放射能の測定は第1章の実験と同様である。また、家兎におけるシンチグラムは

Nuclear Chicago PHO/Gamma IIIに低エネルギー用高分解能コーンメーターを装着したものをを用いて作成した。

## 2. 結 果

### (a) 標識反応

pH,  $\text{SnCl}_2$ 量, 2-MPG量などの条件の違いにより, いくつかの標識体が生成したが, その中で, 本章実験方法(b)の方法で調製された標識体が最も高い胆汁排泄率を示した。この標識体を以後 $^{99\text{m}}\text{Tc}-2\text{-MPG}$ と記す。この方法で得られた $^{99\text{m}}\text{Tc}-2\text{-MPG}$ 標識溶液は, 前述の薄層クロマトグラフでRf値0.55~0.60の単一の放射能ピークを示し, かつ $^{99\text{m}}\text{Tc}$ が未反応のまま残り, あるいは一旦還元された $^{99\text{m}}\text{Tc}$ の再酸化があれば生成するはずである $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$  (Rf=0.65~0.70)および $^{99\text{m}}\text{TcO}_2$ コロイド (Rf=0.0)の存在は認められず, 標識体の放射化学的純度は常に99%以上であった(Fig.2-1(a))。また, この反応溶液のゲル濾過の結果は, Fig.2-1(b)の実線に示される。

さらに, 電気泳動の結果から, 調製された標識体は負の電荷をもつことが認められた。

### (b) Penとの配位子交換反応

前述の条件で $^{99\text{m}}\text{Tc}-2\text{-MPG}$ とPenとの配位子交換反応を試みた時, ゲル濾過による溶液の分析結果は, Fig.2-1(b)の点線が示すように, 一部の放射能は22分の画分に溶出された。ところで, 第1章に示したように,  $^{99\text{m}}\text{Tc}-\text{Pen Complex I}$ は同じ条件のゲル濾過で22分の画分に, また $^{99\text{m}}\text{Tc}-\text{Pen Complex II}$ は48分の画分にそれぞれ溶出した。したがって, このFig.2-1(b)の結果は,  $^{99\text{m}}\text{Tc}-2\text{-MPG}$ がPenとの配位子交換反応において,  $^{99\text{m}}\text{Tc}-\text{Pen Complex II}$ に変化し,  $^{99\text{m}}\text{Tc}-\text{Pen Complex I}$ への変化はほとんど行われなことを示している。また, 逆に $^{99\text{m}}\text{Tc}-\text{Pen Complex II}$ に2-MPGを加えた時も,  $^{99\text{m}}\text{Tc}-2\text{-MPG}$ への変化が認められた。

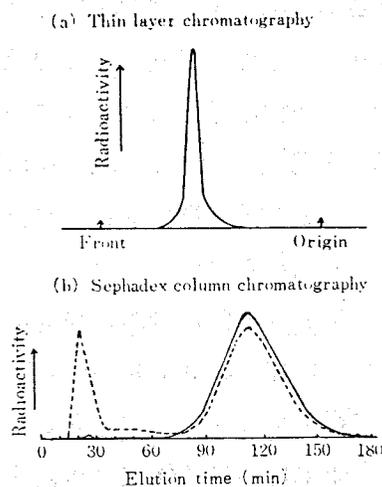


Fig.2.1 Thin layer chromatography ( $n$ -butanol : acetic acid : water = 4 : 1 : 1) and Sephadex G-15 column chromatography of  $^{99\text{m}}\text{Tc}-2\text{-MPG}$  (solid line). Dotted line indicates the  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  activity of the resulting solution when penicillamine is added to the  $^{99\text{m}}\text{Tc}-2\text{-MPG}$  preparation solution and stirred for 10 min.

(c) トリス緩衝液による希釈の影響

$^{99m}\text{Tc}$ -Pen Complex I, Complex II および  $^{99m}\text{Tc}$ -2-MPG の各標識錯体種のトリス緩衝液による希釈の影響は, Fig.2.2(a), (b), (c)に示すとおりである。この場合, 第1章で述べたように,  $^{99m}\text{Tc}$  錯体の分解の最終生成物の化学形は, 一般に  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  か  $^{99m}\text{TcO}_2$  コロイドであるが, 今回の実験条件では,  $^{99m}\text{TcO}_2$  コロイド ( $R_f=0.0$ ) の生成は認められず,  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  ( $R_f=0.65\sim 0.70$ ) の生成のみが顕著であったので, 希釈時に検出される  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  の放射能の全放射能に対する割合(%)を求め, この値(縦軸の値)を  $^{99m}\text{Tc}$  標識体の分解の指標とすることが妥当であると考えた。

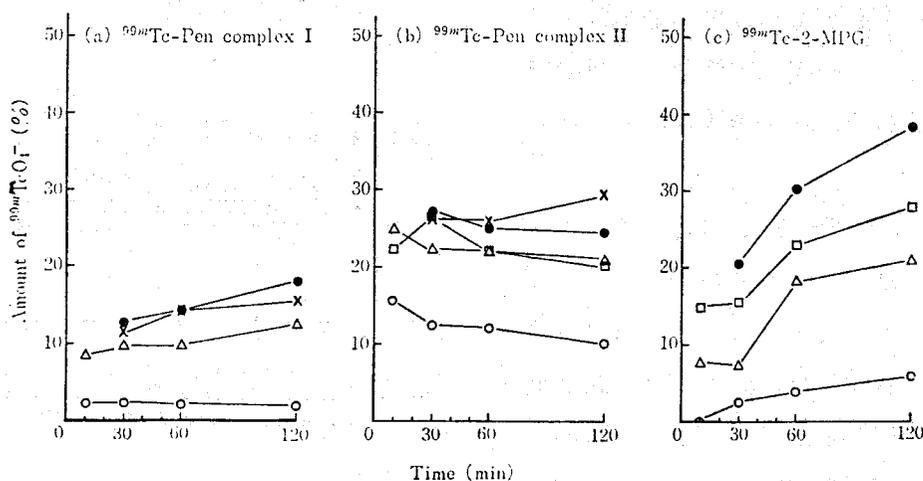


Fig.2.2 Dilution effect of  $^{99m}\text{Tc}$ -Pen complex I (a), complex II (b) and  $^{99m}\text{Tc}$ -2-MPG (c). Each standard preparation was diluted 1:10 (○), 1:100 (△), 1:250 (□), 1:1000 (●) and 1:2500 (×) with 0.05M Tris buffer (pH 7.4). The ordinate is percent of  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  in the resulting solution analyzed by thin layer chromatography (*n*-butanol : acetic acid : water=4 : 1 : 1).

$^{99m}\text{Tc}$ -Pen Complex I においては,  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  の生成率は, Fig.2.2(a)が示すように, 希釈後の時間にあまり依存せず, 10倍希釈で1~2%, 100倍以上の希釈で8.5~18%である。一方,  $^{99m}\text{Tc}$ -Pen Complex II においては, Fig.2.2(b)が示すように,  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  の生成率は Complex I の場合と同様, 希釈後の時間にはあまり依存しないが, その値は Complex I のそれよりはるかに高く, Complex II の10倍希釈溶液では Complex I での100倍以上の希釈の場合とほぼ同じく, 10~15%であり, また100倍以上の希釈溶液では20~30%であった。このように,  $^{99m}\text{Tc}$ -Pen Complex II は Complex I に比べ, 顕著に希釈効果を受けることが認められ, またいずれの場合にも, 10倍希釈と100倍希釈との間に,  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  の生成率に大きな差があることがわかった。

$^{99m}\text{Tc}-2\text{-MPG}$ の場合にも、 $^{99m}\text{Tc}-\text{Pen Complex II}$ の場合と同じように、希釈率が増すに従い、 $^{99m}\text{TcO}_4^-$ の生成が顕著にみられたが、さらに、 $^{99m}\text{TcO}_4^-$ の生成率が時間的に高くなる現象が特徴的にみられた。希釈後2時間においては、10倍希釈で6%、100倍以上の希釈で21~39%の $^{99m}\text{TcO}_4^-$ の生成率を示し、これらの値は、 $^{99m}\text{Tc}-\text{Pen Complex II}$ の場合とほぼ同じである (Fig.2.2(c))。

(d) マウスにおける体内分布とラットにおける胆汁排泄

$^{99m}\text{Tc}-2\text{-MPG}$ をマウスに投与後の各臓器における放射能の経時変化を Fig.2.3 に示した。血液、肝、腎からの消失は速く、肝、腎への放射能の貯留は認められない。同時に、胆汁への放射能の排泄が著しく、その排泄速度もかなり速い。

この $^{99m}\text{Tc}-2\text{-MPG}$ の高くてかつ速い胆汁排泄は、ラットにおける胆汁への排泄曲線からも認められ、Fig.2.4に示すように、静脈注射後、最初の10分間が最も胆汁への排泄量が多く、また1時間に投与量の $50.5 \pm 3.2\%$  (平均 $\pm 1$  s.d.)の放射能が胆汁中に回収された。この挙動は、 $^{99m}\text{Tc}-\text{Pen Complex I}$ よりもComplex IIによく類似している。

(e) 家兎における体内分布

家兎において、 $^{99m}\text{Tc}-2\text{-MPG}$ 投与後、経時的に得られたシンチグラムを Fig.2.5 に示した。かなり早期に肝および腎に取り込まれ、一部肝から小腸への速い移行も認められるが、3時間後にも、なお高い肝および腎への集積が認められる。胆嚢は、1時間半後には一応イメージされてくるが、肝の放射能が比較的少

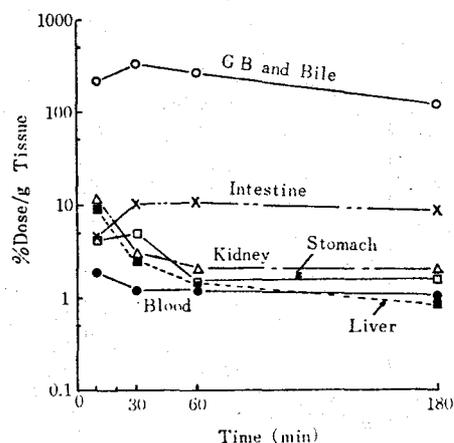


Fig.2.3 Organ distribution of  $^{99m}\text{Tc}$  in mice after intravenous injection of  $^{99m}\text{Tc}-2\text{-MPG}$ .

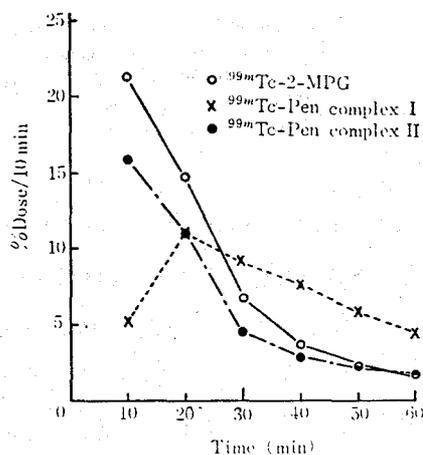


Fig.2.4 Biliary excretion of  $^{99m}\text{Tc}$  in rats at different time intervals after intravenous injection of  $^{99m}\text{Tc}-2\text{-MPG}$ ,  $^{99m}\text{Tc}-\text{Pen complex I}$  and complex II.

なくなる3時間後にならないと、良好なイメージを得ることはできなかった。

### 3. 考 察

2-MPGと $^{99m}\text{Tc}$ との反応において、第1章に述べたPenと同様に、 $\text{SnCl}_2$ 量、pHなどの標識条件の相違で数種の化合物の生成がみられたが、その中で、実験方法(b)に示した条件で調製された時のみ、Fig.2・1に示すような薄層クロマトグラフおよびゲル濾過で単一の放射能ピークを示す標識体を得られた。この標識体が他の条件で得られた標識体よりも化学的に安定であり、しかもラットにおいて胆汁への排泄率が高く、臨床使用に最もすぐれた性質を示すと考えられたので、この標識体について、化学的性質と胆汁排泄挙動との関係を詳しく検討した。

まず、 $^{99m}\text{Tc}$ -2-MPGにおける $^{99m}\text{Tc}$ の配位状態を調べるために、Penとの配位子交換反応を行った。反応溶液のゲル濾過法による分析の結果、Fig.2・1(b)の点線が示すように、一部の放射能が溶出時間22分、すなわち $^{99m}\text{Tc}$ -Pen Complex IIのそれに対応する溶出時間に検出された。この配位子交換反応の結果から、 $^{99m}\text{Tc}$ -2-MPGの $^{99m}\text{Tc}$ は $^{99m}\text{Tc}$ -Pen Complex IIのそれと同じ化学状態にある、すなわち $^{99m}\text{Tc}$ -2-MPGは複核の $^{99m}\text{Tc}$ を骨格にした錯体構造を有すると推定され、 $^{99m}\text{Tc}$ -2-MPGと $^{99m}\text{Tc}$ -Pen Complex IIとにおけるTcの化学状態の類似性が強調された。一方、Fig.2・3, 2・4, 2・5に示すように、 $^{99m}\text{Tc}$ -2-MPGのマウス、ラットの体内挙動の検討で、 $^{99m}\text{Tc}$ の放射能の速くかつ高い胆汁排泄、および家兎での検討で、同様の胆汁排泄挙動と同時に肝、腎での高い貯留がそれぞれ観察され、この標識体の体内挙動が $^{99m}\text{Tc}$ -Pen Complex IIのそれに極めて類似していることが認められた。

一般に、胆汁排泄を示す薬物の分子量の範囲は、動物により異なることが知られており、分子量が300~500の化合物においては相当の種差がみられるが、分子量が500~1000の化合物においては、動物の種には関係なく胆汁排泄される傾向を示すといわれている<sup>(63)</sup>。また、キレート化合物についてはまだ多くの疑問点が残っているが、

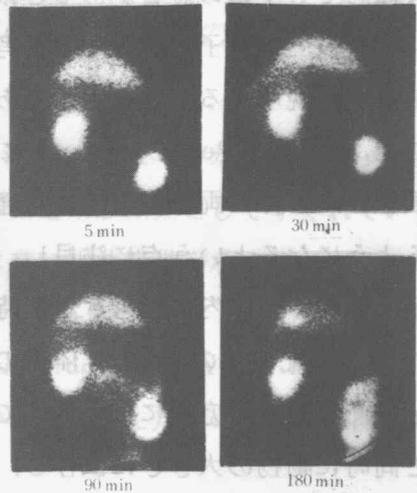


Fig.2.5 Rabbit scintigrams at 5, 30, 90, 180 min after intravenous injection of  $^{99m}\text{Tc}$ -2-MPG.

Wistow,<sup>13)</sup> Firnau,<sup>52)</sup> Rubin<sup>64),65)</sup>らは、キレート化合物においても一般の薬物と同じような傾向で分子量の影響があると報告している。しかし、 $^{99m}\text{Tc}-2\text{-MPG}$ の場合には、500以上の分子量を有すると考えられるので、その体内分布の種差を、この分子量の点から説明することは困難であろうと考えられる。

そこで、 $^{99m}\text{Tc}-\text{Pen Complex II}$ にみられた $^{99m}\text{Tc}$ の化学状態および動物の体内挙動の類似性、とくに両標識錯体に共通して大きな動物になる程肝や腎での貯留が認められるようになるという点に注目し、つぎのような考察を試みた。すなわち、錯体構造を示す標識体が体内に投与された時、標識体自身および平衡関係にあるフリーの $^{99m}\text{Tc}$ および配位子の濃度は、体内の血液および各臓器で希釈されて低くなり、その結果、平衡は分解の方向に傾くはずである。この際、その程度は、錯体の化学的な安定性と同時に動物の大きさに依存し、安定性の低い標識体の場合、大きい動物の場合ほど、この希釈による影響を受けやすくなり、 $^{99m}\text{Tc}$ 標識体の分解産物すなわち加水分解体、コロイドなどの生成率が高くなり、それが体内分布の検討の結果に顕著にあらわれるようになるであろうと考えた。

このような観点で、 $^{99m}\text{Tc}-\text{Pen Complex II}$ および $^{99m}\text{Tc}-2\text{-MPG}$ の安定性に対する *in vitro* での希釈効果を、 $^{99m}\text{Tc}-\text{Ten Complex I}$ のそれと比較しつつ、トリス緩衝液を用いて検討した。予想通り、Fig.2・2が示すように、大きな動物では肝や腎に貯留の認められた $^{99m}\text{Tc}-\text{Pen Complex II}$ および $^{99m}\text{Tc}-2\text{-MPG}$ と、動物の種差なく良好な胆嚢のイメージの得られた $^{99m}\text{Tc}-\text{Pen Complex I}$ との間で、その分解に対する希釈効果はかなり相違しており、前者の場合、後者に比べると、錯体種の分解の指標として求められた $^{99m}\text{TcO}_4^-$ の生成率は、希釈率が高い時に高値を示した。

このような体内での希釈効果が体内分布に影響を与えることは、 $^{99m}\text{Tc}-\text{EHDP}$ や $^{99m}\text{Tc}-\text{グルコン酸}$ 、 $^{99m}\text{Tc}-\text{ピロリン酸}$ <sup>66),67)</sup>などの場合にも示唆されてはいたが、それらの場合には本研究の結果のような定量的な取扱いはなされておらず、推測にとどまっていた。しかし、本研究ではこの点がかなり明確に示されたと考えられる。

このように、 $^{99m}\text{Tc}-2\text{-MPG}$ は、胆汁排泄に有利な $^{99m}\text{Tc}$ の錯体構造を有する一方で、大きな動物の体内での希釈によるその錯体種の不安定さが指摘され、臨床使用を考える場合には、この問題が解決されなければならないことが示唆された。

### 第3章 N-(2,6-ジメチルフェニルカルバモイルメチル)イミノニ酢酸の<sup>99m</sup>Tc標識化とその胆汁排泄

1976年, Lobergらは, <sup>99m</sup>Tc-N-(2,6-ジメチルフェニルカルバモイルメチル)イミノニ酢酸(以下, <sup>99m</sup>Tc-HIDAと略)が肝胆道系診断薬としてすぐれていることを報告し, さらに, その報告の中で, HIDAは高い胆汁排泄を示すリドカインの構造部分と, <sup>99m</sup>Tcのキレート結合部位としてのイミノニ酢酸(以下, IDAと略)との二種の官能基をその分子中に含む, いわゆる bifunctional chelating agentとしてデザインされた化合物であることが紹介され, このような考え方で<sup>99m</sup>Tc標識診断薬の開発が有用であることが示された。<sup>10)</sup>

Lobergらは, <sup>99m</sup>Tc-HIDAの化学状態や構造については詳しく記述していないが, 著者は第2章までに記述した結果および考察に基づき, その標識体についての詳細な検討が診断薬としての有用性の評価に必要と考え, 著者が他の<sup>99m</sup>Tc標識反応において得た知見およびHIDAの化学構造(Fig.3・1)を基礎にして, Lobergらの<sup>99m</sup>Tc-HIDAの反応を考察し, この標識体は複核錯体であってかつその<sup>99m</sup>Tcの化学状態がキレート生成によって安定に保たれているであろうと推測した。

一方, 第2章に記述したように, 複核錯体と考えられる<sup>99m</sup>Tc-Pen Complex IIおよび<sup>99m</sup>Tc-2-MPGで, 速くかつ高い胆汁排泄が認められ, 同時に, これら錯体種の動物体内での安定性が胆汁排泄に深く関係することが明らかにされた。

これらを総合すると, <sup>99m</sup>Tc-HIDAにおいても, <sup>99m</sup>Tcが複核で安定な配位状態を保つことができる構造が, この標識体のすぐれた胆汁排泄に関係する重要な因子のひとつであろうと推定された。

本章では, 以上の観点から, <sup>99m</sup>Tc-HIDAの標識反応, 化学的性質および各種動物での体内挙動を詳しく調べた結果, ならびにこれらの相互関係の考察について記述する。

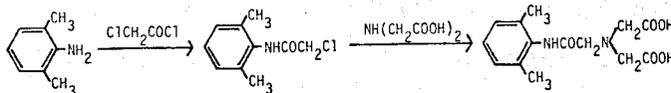


Fig.3.1 Synthesis of N-(2,6-dimethylphenylcarbamoylmethyl)iminodiacetic acid (HIDA).

#### 1. 実験方法

##### (a) 試薬

<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup>に関しては第1章と同様に取り扱った。HIDAは, Fig.3・1に示したCalleryらの方法<sup>68)</sup>に従って合成し, 融点, NMRスペクトル, 元素分析で確認したのち使用し

た。融点：212～213°(未補正)。NMR(DMSO- $d_6$ )： $\delta$  2.24(6H, S.,  $\text{CH}_3$ ), 3.44(2H, S.,  $\text{NCOCH}_2\text{N}$ ), 3.57(4H, S.,  $\text{CH}_2\text{COO}$ ), 7.04(3H, S., aromatic protons). Anal. Calcd. for  $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_5\text{N}_2$  : C, 57.14; H, 6.16; N, 9.52.

Found : C, 57.33; H, 6.05; N, 9.40. 他の試薬・溶媒はすべて特級試薬を使用した。

#### (b) $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HIDAの調製

HIDA 15mg を 1 N NaOH 水溶液 0.3 ml に溶かし、これを 1 N 塩酸溶液で pH5.0～5.5 に調整し、水を加えて全量 1 ml とする。これを 15 分間窒素置換し、これに窒素置換した  $\text{SnCl}_2$  溶液 ( $1 \times 10^{-2}\text{M}$ , 0.1 N 塩酸溶液) 0.1 ml を加える。この時、反応液の pH は 3.0～3.5 となる。この混合液を、さらに 5 分間窒素を通じながら攪拌したのち、 $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$  を 3 ml 加える。窒素の導入を止め、10 分攪拌後、この溶液を 0.22  $\mu\text{m}$  のミリポアフィルターに通す。

#### (c) 標識率の検討

標識率の検討には、ゲル濾過法、濾紙電気泳動法および薄層クロマトグラフィーを用いた。ゲル濾過法、濾紙電気泳動法は第 2 章に記述した方法に従って行った。また、薄層クロマトグラフィーには、展開溶媒として、 $n$ -ブタノール：酢酸：水 = 4 : 1 : 1 および 10% 酢酸アンモニウム水：メタノール = 1 : 1 を使い、第 2 章に記述した方法で行った。

#### (d) Pen との配位子交換反応

前述の条件で調製された  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HIDA 溶液の 0.1 ml (HIDA を  $1.2 \times 10^{-6}$  mole を含む) に、Pen ( $1 \times 10^{-1}\text{M}$ ) を 1 ml ( $1 \times 10^{-4}$  mole) 加え、37°C で 30 分間インキュベートしたのち、前述のゲル濾過法でその生成物を検討した。

#### (e) トリス緩衝液による希釈の影響

前述の条件で調製した  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HIDA 溶液の適量を希釈濃度に応じてとり、これに 0.05 M トリス緩衝液 (pH 7.4) を加えて、全量を 5 ml とする。これを 37°C でインキュベートした後、10, 80, 150 分後の試料をそれぞれ前述の濾紙電気泳動法で分析し、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HIDA の残存量および分解産物の検討を行った。

#### (f) 体内分布の検討

マウスにおける体内分布の検討には、25～30 g の ddy 系雄マウスを 1 群 4 匹ずつ使用し、検体 0.15 ml (約 50  $\mu\text{Ci}$ ) を尾静脈より投与した後、第 1 章に記述した方法に従って行った。

また、家兎における体内分布の検討には、2.5 kg の家兎を用い、これをベントバルビ

ターナルトリウムで麻酔し、耳静脈より検体 1 ml (約 1 mCi) を投与した後、5、8、20、40、60 分でシンチグラムを作成した。

(g) 胆汁排泄の検討

ラットにおける胆汁排泄の検討には、250~300 g の Wistar 系雄ラットを 1 群 5 匹ずつ使用し、検体 0.3 ml (約 100  $\mu$ Ci) を大腿静脈より投与した後、第 1 章に記述した胆管カニューレーション法によって行った。

(h) 機 器

放射能の測定は第 1 章に記述した方法、また、シンチグラフィは第 2 章に記述した方法に従って行った。NMR スペクトル測定では、バリアン社 A-60 スペクトロメーターを使用し、TMS を内部標準として用いた。融点測定は柳本製作所微量融点測定器を使用した。

2. 結 果

(a) 標識反応

反応溶液の pH, SnCl<sub>2</sub> 量, HIDA 量の変化による反応溶液中の標識体の生成状態について調べ、同時に、これらの標識溶液を用いてラットにおける放射能の胆汁排泄率を求めた結果、<sup>99m</sup>Tc-Pen, <sup>99m</sup>Tc-2-MPG の場合と同じように種々の標識体が標識条件に依存して生成し、またラットにおける胆汁排泄率もそれに伴って相違することが認められた。そのことを示す実験結果の一例を Fig.3・2 に示す。その中で、最も高い胆汁排泄率を示したのは、本章実験方法(b)に示した方法で調製されたものであり、その胆汁排泄カーブは Fig.3・2 の○印で示されている。この <sup>99m</sup>Tc-HIDA 標識体の薄層クロマトグラフィ(展開溶媒; n-ブタノール: 酢酸: 水 = 4:1:1), 沔紙電気泳動法およびゲル沔過による分析結果を Fig.3・3 に示した。これらの結果は、Loberg らの報告にみられる結果<sup>10)</sup>と全く同じであ

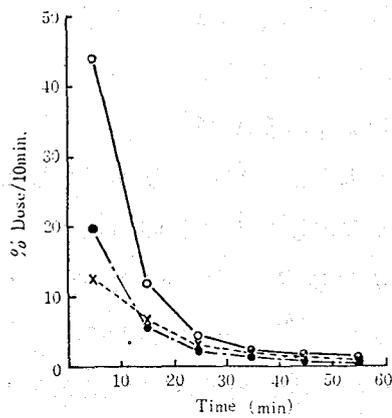


Fig.3.2 Biliary excretion of <sup>99m</sup>Tc in rats at different time intervals after intravenous injection of labeling solution. Labeling condition : (○): HIDA 15 mg ; SnCl<sub>2</sub> 10<sup>-6</sup> mole ; pH 3.2 : (●): HIDA 15 mg ; SnCl<sub>2</sub> 10<sup>-8</sup> mole ; pH 4.5 : (×): HIDA 3 mg ; SnCl<sub>2</sub> 10<sup>-6</sup> mole ; pH 6.9

り、この方法で得られた標識体は、Lobergらが得た標識体と同じ化学状態のものと考えられ、以下、この標識体を $^{99m}\text{Tc-HIDA}$ と記すこととする。

(b) Penとの配位子交換反応

$^{99m}\text{Tc-HIDA}$ とPenとを混合した溶液を前述のゲル濾過法を用いて分析した結果、Fig.3.3の点線で示すように、一部の放射能が溶出時間22分の画分に新たに溶出することが見出された。ところで、第1章で示したように、同じ条件で $^{99m}\text{Tc-Pen}$  Complex Iは48分、Complex IIは22分の画分にそれぞれ溶出することが認められている。したがって、Fig.3.3の結果は、 $^{99m}\text{Tc-HIDA}$ がPenとの配位子交換反応において、一部

$^{99m}\text{Tc-Pen}$  Complex IIに変化するが、Complex Iへはほとんど変化しないことを示すものと考えられる。また、逆に、 $^{99m}\text{Tc-Pen}$  Complex IIにHIDAを加えた時には、 $^{99m}\text{Tc-HIDA}$ の生成が認められた。

(c) トリス緩衝液による希釈の影響

第2章に記述したと同じ理由により、 $^{99m}\text{TcO}_4^-$ の生成率を $^{99m}\text{Tc-HIDA}$ の分解の指標にして、 $^{99m}\text{Tc-HIDA}$ のトリス緩衝液による希釈の影響を調べた結果をFig.3.4に示した。1000倍希釈においても10%以上の $^{99m}\text{TcO}_4^-$ を生成することはなく、Fig.2.2の $^{99m}\text{Tc-Pen}$  Complex IIおよび $^{99m}\text{Tc-2-MPG}$ で得られた結果と比較して、 $^{99m}\text{Tc-HIDA}$ が非常に安定であること

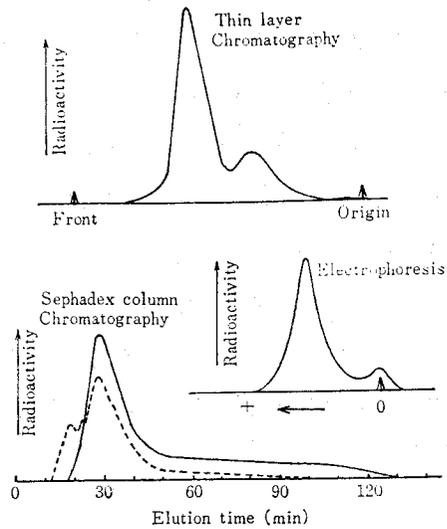


Fig.3.3 Thin layer chromatography (n-butanol : acetic acid : water = 4 : 1 : 1), electrophoresis (500V, 1 hr) and Sephadex G-15 column chromatography (flow rate = 108 ml/hr) of  $^{99m}\text{Tc-HIDA}$  (solid line). Dotted line indicates the  $^{99m}\text{Tc}$  activity of the resulting solution when penicillamine is added to the  $^{99m}\text{Tc-HIDA}$  preparation solution and stirred for 30 min.

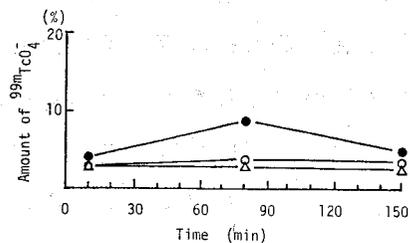


Fig.3.4 Dilution effect of  $^{99m}\text{Tc-HIDA}$ . Standard solution was diluted 1:10 (o), 1:100 ( $\Delta$ ) and 1:1000 ( $\bullet$ ) with 0.05 M Tris buffer (pH 7.4). The ordinate is percent of  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  in the resulting solution analyzed by paper electrophoresis (500V, 1 hr, buffer: 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0)).

とが明らかにされた。

(d) マウスおよび家兎における体内分布

マウスにおける体内分布を調べたところ、Fig.3・5に示すように、胆嚢に著しい放射能の集積が認められ、肝、腎、血液からの放射能の消失は非常に速く、良好な結果が得られた。また、Fig.3・6に示す家兎における経時的シンチグラムも、このマウスにおける結果とよく一致している。すなわち、投与後5分で肝に大部分の放射能が取り込まれ、8分後既に小腸への排泄が認められ、さらに40分後には、肝からの放射能がほとんど消失し、その結果、良好な胆嚢のイメージが得られている。

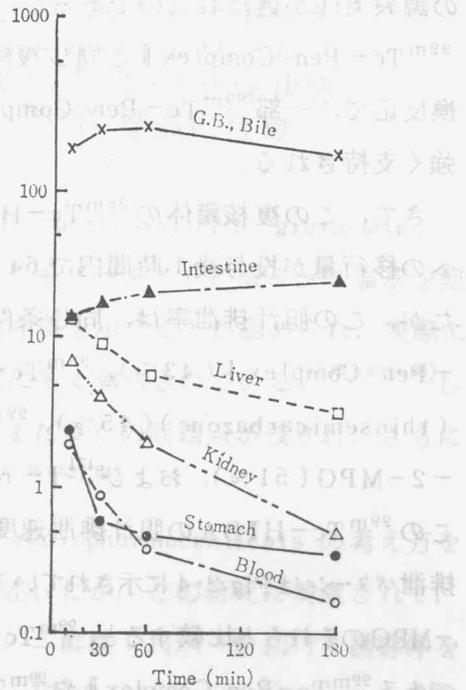


Fig.3.5 Organ distribution of <sup>99m</sup>Tc in mice after intravenous injection of <sup>99m</sup>Tc-HIDA.

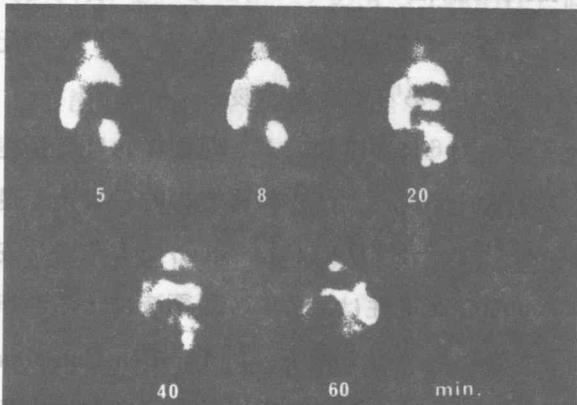


Fig.3.6 Rabbit scintigrams at 5,8,20,40 and 60 min after intravenous injection of <sup>99m</sup>Tc-HIDA.

3. 考 察

$10^{-6}$  mole 程度の  $\text{SnCl}_2$  量の存在下、pH 3.0~3.5 の条件で  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  と大過剰の HIDA とが反応する場合、まず還元された  $^{99m}\text{Tc}$  種の加水分解が進行するが、同時に、HIDA との錯生成反応も競合的に進行し、ある一定の加水分解状態で錯生成との平衡が成立することが予想されるので、本章実験方法(b)に示した調製条件から、この  $^{99m}\text{Tc}$ -HIDA においては、 $^{99m}\text{Tc}$  は  $^{99m}\text{Tc}$ -Pen Complex II や  $^{99m}\text{Tc}$ -2-MPG と同じ複核の  $^{99m}\text{Tc}$  の配位状態にあることが予想された。この予想のもとに実験方法(b)

の調製条件が選ばれたのであるが、実際にこの条件で得られた $^{99m}\text{Tc-HIDA}$ が $^{99m}\text{Tc-Pen Complex II}$ と同じ複核の $^{99m}\text{Tc}$ の状態をもつことは、Penとの配位子交換反応で、一部 $^{99m}\text{Tc-Pen Complex II}$ に変化することを示したFig.3・3の結果から強く支持される。

さて、この複核錯体の $^{99m}\text{Tc-HIDA}$ で、Fig.3・2に示すように、ラットでの胆汁への移行量が投与後1時間内で $64.9 \pm 4.2\%$  (平均 $\pm 1$  s.d.)と非常に高いことが示されたが、この胆汁排泄率は、同じ条件下で行われた種々の $^{99m}\text{Tc}$ 標識体、すなわち $^{99m}\text{Tc-Pen Complex I}$  (43%),  $^{99m}\text{Tc-Pen Complex II}$  (38%),  $^{99m}\text{Tc-kethoxal-bis(thiosemicarbazone)}$  (45%),  $^{99m}\text{Tc-pyridoxylidene glutamate}$  (41%),  $^{99m}\text{Tc-2-MPG}$  (51%), および $^{131}\text{I-rose bengal}$  (51%)などの場合よりも高い。また、この $^{99m}\text{Tc-HIDA}$ の胆汁排泄速度は、Fig.3・2に示すように非常に速く、またこの排泄パターンはFig.2・4に示されている $^{99m}\text{Tc-Pen Complex I}$ ,  $^{99m}\text{Tc-Pen Complex II}$  および $^{99m}\text{Tc-2-MPG}$ のそれらと比較すると、 $^{99m}\text{Tc-Pen Complex I}$ の排泄パターンよりも、同じ複核錯体である $^{99m}\text{Tc-Pen Complex II}$ や $^{99m}\text{Tc-2-MPG}$ の排泄パターンに類似していることがわかる。これらの結果は、最初予想したように、 $^{99m}\text{Tc-HIDA}$ において、複核の $^{99m}\text{Tc}$ の配位状態がその速い胆汁排泄の重要な因子のひとつであることを示唆している。

さらに、この $^{99m}\text{Tc-HIDA}$ では、Fig.3・5, 3・6に示すように、動物における種差がなく、かつ肝、腎、血液からの放射能の消失が速く、また肝や腎での貯留は全く認められなかった。このような体内挙動から、 $^{99m}\text{Tc-HIDA}$ は *in vivo*でも非常に安定であることが推測されるが、この *in vivo*での安定性は、トリス緩衝液による希釈実験の結果(Fig.3・4)からも支持された。すなわち、第2章で、 $^{99m}\text{Tc-Pen Complex II}$ や $^{99m}\text{Tc-2-MPG}$ の体内での不安定性が、*in vitro*での希釈による不安定性と相関して議論できることが示されたが、同じ条件下の検討で、Fig.3・4に示すように、 $^{99m}\text{Tc-HIDA}$ の場合、その分解に対してほとんど希釈効果が認められない。

以上、化学的な性質および動物での体内挙動の考察から、 $^{99m}\text{Tc-HIDA}$ が肝胆道系診断薬として評価し得る化合物であることが証明されたが、実際に臨床使用においても、短時間内に良好な胆嚢のイメージが得られることが報告され<sup>10),69)~74)</sup>現在では、代表的な肝胆道系診断薬のひとつとしてその使用例が多くなっている。しかし、一方で、 $^{99m}\text{Tc-HIDA}$ の肝胆道系における挙動が、臨床において診断的意義の高い $^{131}\text{I-BSP}$ や $^{131}\text{I-rose bengal}$ の挙動と一致しないこと、また尿排泄も比較的多いことが、定量的な肝胆道系の機能診断の面での問題点として指摘されている。<sup>20),72)~76)</sup>

#### 第4章 $^{99m}\text{Tc}$ -3,3'-ビス(N,N-ジ(カルボキシメチル)-アミノエチル)-o-クレゾールフタレイン：胆汁排泄し易い $^{99m}\text{Tc}$ の化学状態をもった BSP 類似体の $^{99m}\text{Tc}$ 標識化合物

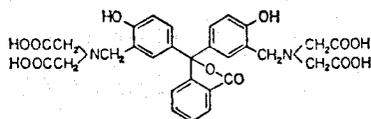
第3章に記述した  $^{99m}\text{Tc}$ -HIDA, および  $^{99m}\text{Tc}$ -pyridoxylidene glutamate,  $^{99m}\text{Tc}$ -pyridoxylidene isoleucine などのピリドキサールアミノ酸シッフ塩基を配位子とする  $^{99m}\text{Tc}$  錯体が胆嚢イメージにすぐれた性質を示すことが認められ、実際にこれらの  $^{99m}\text{Tc}$  錯体を使用した臨床診断例が非常に多く報告されている。<sup>10),20),69)~83)</sup>しかし、これらを用いる肝の機能診断に関しては、まだ多くの問題点が残され、さらにすぐれた  $^{99m}\text{Tc}$  標識診断薬の開発が望まれる。<sup>20),72)~76),82),83)</sup>

一方、 $^{99m}\text{Tc}$ -HIDA がいわゆる bifunctional radiopharmaceuticals の考え方を採用して開発された化合物であることを第3章に記述したが、この研究に刺激されて、薬物やタンパクなどにキレート生成能をもつイミノニ酢酸 (IDA) や EDTA 誘導体を導入し、薬物やタンパクのもつ生理活性と同時に、 $^{99m}\text{Tc}$  との安定なキレート生成能を示す放射性診断薬を得ようとする試みが、この領域での新しいドラッグデザインとして注目されるようになった。<sup>21)~24)</sup> この bifunctional radiopharmaceuticals の考え方に基づいた場合、Fig.4・1 に示すような BSP, rose bengal などの基本骨格であるフタレインおよびフルオレッセイン構造と、キレート生成部位として IDA 基を同時にもつ bifunctional compound の  $^{99m}\text{Tc}$  標識体が新しいタイプの肝胆系診断薬として期待される。

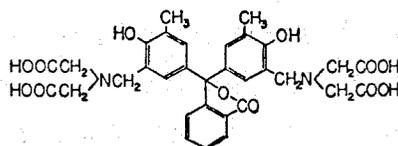
BSP, rose bengal は、従来から良く知られた肝胆道系診断薬であり、各種の肝胆道系疾患に対する豊富な臨床および研究報告がみられる。<sup>3)</sup> これらのデータが  $^{99m}\text{Tc}$  標識体に反映されれば、核医学の新しい技術を通して、肝胆道系診断とくに肝の機能的診断の飛躍的な向上を期待できると考えられる。また、これらの  $^{99m}\text{Tc}$  標識体の研究は、このような臨床的意義からの興味とともに、さらに放射性診断薬の基礎的研究の立場から、次のような点で大きな興味もたれる。すなわち、bifunctional radiopharmaceuticals は、前述したように、確かに新しいドラッグデザインの考え方として注目されているが、実際にそれが具体化された例はまだ極めて少ない。 $^{99m}\text{Tc}$ -HIDA においても、最初に期待したように、HIDA 分子中のリドカイン類似構造が  $^{99m}\text{Tc}$ -HIDA のすぐれた胆汁排泄挙動に寄与している可能性と同時に、むしろ第3章に述べたように、胆汁排泄に有利な  $^{99m}\text{Tc}$  の配位状態を安定に保つのに HIDA の

構造が役立っている可能性も考えられるので、 $^{99m}\text{Tc}$ -HIDAにおいて、HIDAが bifunctional chelating agent として機能しているかどうかは明らかではない。

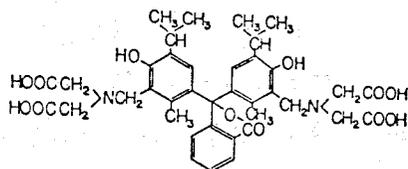
本研究では、このような背景で、Fig.4.1 に示した bifunctional compound の  $^{99m}\text{Tc}$  標識体の化学構造を考察し、さらに、それらの胆管移行性および血液から肝への移行に重要な働きをすることが知られているキャリアタンパク(X, ligandin(Y), Z)<sup>84)~86)</sup>との結合性などを、 $^{99m}\text{Tc}$ -HIDA および  $^{131}\text{I}$ -BSP のそれらと比較しながら検討することを計画した。



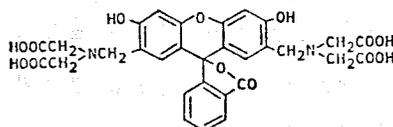
3,3'-Bis[N,N-di(carboxymethyl)-aminomethyl]-phenolphthalein ( PPC )



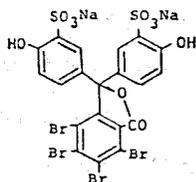
3,3'-Bis[N,N-di(carboxymethyl)-aminomethyl]-o-cresolphthalein ( PC )



3,3'-Bis[N,N-di(carboxymethyl)-aminomethyl]-thymolphthalein ( TPC )



3,3'-Bis[N,N-di(carboxymethyl)-aminomethyl]-fluorescein ( Calcein )



Bromsulphophthalein sodium ( BSP )

Fig.4.1. Structures of compounds evaluated in this study.

## 1. 実験方法

### (a) 試薬

$^{99m}\text{TcO}_4^-$ に関しては第1章と同様に取り扱った。また、四種のフタレインおよびフルオレッセインのIDA誘導体は、同仁化学研究所製・特級試薬をそのまま使用した。 $^{99m}\text{Tc}$ -HIDAは第3章に記述した方法に従って調製し、 $^{131}\text{I}$ -BSPは第1ラジオアイソトープ研究所より購入したものをそのまま使用した。さらに、BSPはシグマ社製のものを用い、その他の試薬・溶媒はすべて特級試薬を使用した。

### (b) 標識反応および標識率の検討

PPC, PC, TPC, Calceinの $^{99m}\text{Tc}$ 標識はすべて第1章第2節第2項に示した $^{99m}\text{Tc}$ -Pen Complex IIの調製の場合とはほぼ同様の条件で行った。すなわち、各IDA誘導体の $1 \times 10^{-5}$  moleを0.8 mlの0.25 M  $\text{NaHCO}_3$ 水溶液に溶かし、さらに、これを0.1 N塩酸溶液でpH 5.0~5.5に調節する。この溶液に $^{99m}\text{TcO}_4^-$  2 mlを加えた後、窒素置換した $\text{SnCl}_2$ 溶液( $1 \times 10^{-3}$  M, 0.1 N塩酸溶液) 0.25 mlを加える。この時、反応液のpHは2.2~2.4となる。10分攪拌後、1 N  $\text{NaHCO}_3$ 水溶液約0.15 mlを一挙に加えてpHを7.4に調節し、最後にこの反応液を0.22  $\mu\text{m}$ のミリポアフィルターに通す。

$^{99m}\text{Tc}$ 標識率の検討には、第2章に記述したと同様のゲル透過法、沝紙電気泳動法および薄層クロマトグラフィーを用いた。

### (c) トリス緩衝液による希釈の影響

前述の条件で調製した $^{99m}\text{Tc}$ -PC溶液の適量を希釈濃度に応じてとり、0.05 M トリス緩衝液(pH 7.4)を加えて、全量を5 mlとする。これを37°Cでインキュベートし、10, 75, 140分後の試料を前述の沝紙電気泳動法で分析し、 $^{99m}\text{Tc}$ -PCの残存量および分解物の検討を行った。

### (d) $^{99m}\text{Tc}$ -PCのマウスおよび家兎における体内分布の検討

マウスにおける体内分布の検討には、25~30 gのddy系雄マウスを1群4匹ずつ使用し、検体0.2 ml(約200  $\mu\text{Ci}$ )を尾静脈より投与した後、第1章に記述した方法に従って行った。

また、家兎における $^{99m}\text{Tc}$ -PCの体内分布の検討には、約2.5 kgの家兎を用い、これをペントバルビタールナトリウムで麻酔し、耳静脈より検体1 ml(約1 mCi)を投与した後、5, 10, 20, 30, 40, 60分でシンチグラムを作成した。

### (e) ラットにおける胆汁排泄の検討

ラットにおける胆汁排泄の検討には、250~300 gのWistar系雄ラットを1群4~

5匹ずつ使用し、 $^{99m}\text{Tc-PPC}$ 、 $^{99m}\text{Tc-PC}$ 、 $^{99m}\text{Tc-TPC}$ 、 $^{99m}\text{Tc-Calcein}$  標識溶液の各0.3 ml (約300  $\mu\text{Ci}$ )を大腿静脈より投与した後、第1章に記述した胆管カニューレーション法によって行った。また、 $^{131}\text{I-BSP}$  (10  $\mu\text{l}$ , 約10  $\mu\text{Ci}$ )の胆汁排泄も同様の方法で調べた。

さらに、 $^{99m}\text{Tc-PC}$ 、 $^{99m}\text{Tc-HIDA}$ 、 $^{131}\text{I-BSP}$ の三種の化合物の胆汁排泄に与えるBSPの影響を調べるために、ラットの体重300 g当り5.0  $\mu\text{mole}$ または25.0  $\mu\text{mole}$ のBSPを各標識溶液と同時に静脈内に投与し、前述したと同様の方法によって投与後30分間の胆汁を採集した。

#### (f) ラットにおける尿排泄の検討

ラットに投与された $^{99m}\text{Tc-PC}$ 、 $^{99m}\text{Tc-HIDA}$ 、 $^{131}\text{I-BSP}$ の放射能の尿中への排泄率の検討には、270~300 gのWistar系雄ラットを1群5匹ずつ使用し、 $^{99m}\text{Tc-PC}$ および $^{99m}\text{Tc-HIDA}$ 溶液の場合には0.3 ml (約300  $\mu\text{Ci}$ )を、また $^{131}\text{I-BSP}$ 溶液の場合には10  $\mu\text{l}$  (約10  $\mu\text{Ci}$ )を大腿静脈より投与した後、24時間の尿をメタボリックケージにて集めた。

#### (g) ラットにおける肝内挙動の検討

$^{99m}\text{Tc-HIDA}$ 、 $^{99m}\text{Tc-PC}$ 、 $^{131}\text{I-BSP}$ の肝での存在状態を調べるために、体重250~300 gのWistar系雄ラットを用いて以下のように検討した。まず、ペントバルビタールナトリウム麻酔下、 $^{99m}\text{Tc}$ 標識体の場合には0.3 ml (約300  $\mu\text{Ci}$ )、また $^{131}\text{I-BSP}$ の場合には10  $\mu\text{l}$  (約10  $\mu\text{Ci}$ )の各標識溶液を大腿静脈より投与した後、定められた時間に、門脈より氷冷された生理食塩水を注入し、肝に残っている血液を除去し、その後直ちに肝を取り出した。肝全体の重量を測定した後、肝全体に存在する放射能の計測のために2 g、また以下に述べるタンパク結合実験のために5 gをそれぞれ使用した。肝上清内でのタンパク結合の状態は、Ariasらの方法<sup>84)</sup>に準じて調べた。すなわち、0.25 Mショ糖-0.01 Mリン酸緩衝液 (pH 7.4)で25%ホモジェネートを調製し、4°C、105,000 g (平均)で120分間遠心分離した後、上清を集め、これを限外濾過法およびゲル濾過法のための試料とした。限外濾過法には、ダイアフロームメンブランフィルターPM10を用いた。また、ゲル濾過法では、Sephadex G-75のカラム (直径: 3.2 cm, 高さ: 52 cm)に試料5 mlを添加し、0.01 Mリン酸緩衝液 (pH 7.4)を溶離液として、4°C、37.4 ml/hrの流速で行った。溶出液は、チューブ1本当たり5.95 mlずつフラクションコレクターで集め、280 nmの吸光度および放射能を測定した。

## (h) 機 器

放射能の測定は第1章に記述した方法，またシンチグラフィは第2章に記述した方法に従って行った。尿の採集には，杉山元医理器社製メタボリカを使用した。遠心分離には日立65P超遠心分離器，また限外濾過にはアミコン社製MC-40型セルを用いた。吸光度は島津UV-100分光光度計を用いて測定した。

## 2. 結 果

### (a) 標識反応

Fig.4・1に示す四種のフタレインおよびフルオレッセインのIDA誘導体の $^{99m}\text{Tc}$ 標識化率を，沔紙電気泳動法および薄層クロマトグラフィーで調べた。

沔紙電気泳動法で調べた結果は，Table 4・1に示すように，

$^{99m}\text{Tc}$ -PPCおよび $^{99m}\text{Tc}$ -PCの標識溶液の場合には，単一ピークとして90%以上の放射能が陽極側に2~3 cm移動し，ごくわずかの放射能が原点に認められた。

$^{99m}\text{Tc}$ -PCの例をFig.4・2に示す。一方， $^{99m}\text{Tc}$ -TPCおよび $^{99m}\text{Tc}$ -Calceinの標識溶液の場合には，上記の2つの画分以外に，

$^{99m}\text{TcO}_4$ の画分に一致する陽極側6~7 cmの画分にも放射能が認められ，同時に，

原点での放射能の量も前二者に比べ多かった。また， $^{99m}\text{Tc}$ -PPCおよび $^{99m}\text{Tc}$ -PCの標識溶液は，24時間室温で放置

しておいても調製直後と全く同じ放射能の分布状態を示すが， $^{99m}\text{Tc}$ -TPCおよび $^{99m}\text{Tc}$ -Calceinの標識溶液の場合には，

陽極側6~7 cmの $^{99m}\text{TcO}_4$ の画分および原点の放射能が増加した。

一方，薄層クロマトグラフィーでは，全体としてブロードな放射能の分布状態を示し，

定量的な分析はできなかったが，その結果は $^{99m}\text{Tc}$ コロイド生成の有無を判断するには，下記の理由により非常に有用であった。すなわち，放射能が電気泳動法で原

TABLE 4.1. RADIOCHEMICAL PURITY OF  $^{99m}\text{Tc}$  CHELATES BY ELECTROPHORESIS

Chelates	Percent of total $^{99m}\text{Tc}$ activity		
	Origin	+ 2 - 3 cm	+ 6 - 7 cm
$^{99m}\text{Tc}$ -PPC	6	94	-
$^{99m}\text{Tc}$ -PC	9	91	-
$^{99m}\text{Tc}$ -TPC	60	31	9
$^{99m}\text{Tc}$ -Calcein	29	60	11

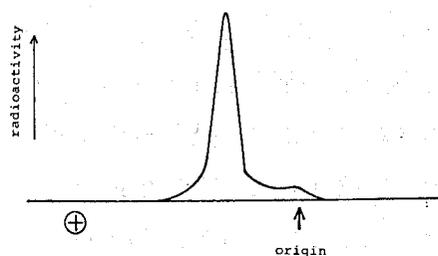


Fig.4.2. Paper electrophoresis of  $^{99m}\text{Tc}$ -PC (500V, 1 hr). Buffer : 0.1 M phosphate buffer

点に認められた場合、その結果は、移動性のない<sup>99m</sup>Tc標識体の生成以外に、<sup>99m</sup>Tcコロイドの生成を示す可能性もあるが、一方で、薄層クロマトグラフィーでは、どの標識溶液の場合にも原点には放射能の集積を認めなかったため、これまでの<sup>99m</sup>Tc-Penなどの他の<sup>99m</sup>Tc標識反応についての同様の検討の結果とあわせて考えると、<sup>99m</sup>Tcコロイドの生成の可能性はどの場合にも考えられないと判断することができた。

(b) ラットにおける胆汁排泄

Fig.4・3 に示すように、投与後1時間以内に胆汁排泄された<sup>99m</sup>Tcの放射能の投与量に対する割合(%)は、<sup>99m</sup>Tc-PC(61.3%) > <sup>99m</sup>Tc-TPC(34.2%) > <sup>99m</sup>Tc-PPC(15.2%) > <sup>99m</sup>Tc-Calcein(4.5%)の各標識溶液の順で少なくなった。

さらに、この四種の<sup>99m</sup>Tc標識体のうち最も高い胆汁排泄率を示した<sup>99m</sup>Tc-PCの胆汁排泄の挙動を、<sup>99m</sup>Tc-Pen Complex I, Complex II, <sup>99m</sup>Tc-2-MPG, <sup>99m</sup>Tc-HIDAのそれらと比較してみると、Fig.4・4 に示すように、<sup>99m</sup>Tc-Pen Complex I 以外はいずれも最初の10分間に最高の排泄率を示し、<sup>99m</sup>Tc-PCは、<sup>99m</sup>Tc-Pen Complex II, <sup>99m</sup>Tc-2-MPG, <sup>99m</sup>Tc-HIDAと共通した胆汁排泄パターンをもつことが示された。また、投与後1時間以内に胆汁中に回収された<sup>99m</sup>Tcの投与量に対する割合を比較してみると、Fig.4・5 に示すように、<sup>99m</sup>Tc-PC(61.3%)は<sup>131</sup>I-BSP(77.0%)よりは少なかったが、<sup>99m</sup>Tc-HIDA(64.9%)とはほぼ同じであった。また、<sup>99m</sup>Tc-PCは、<sup>99m</sup>Tc-HIDAと同様、<sup>131</sup>I-BSPより放射能の胆汁排泄速度は速かった。

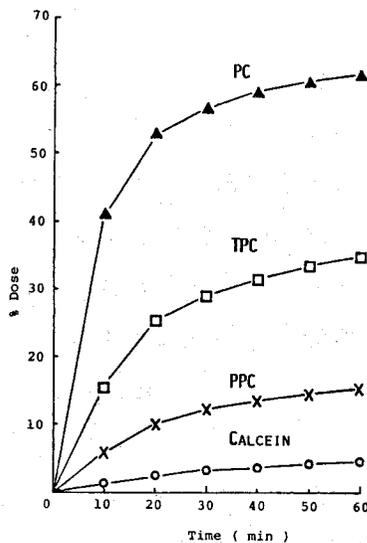


Fig.4.3. Cumulated percent dose in bile. Bile is collected through a cannulated bile duct at different time intervals after <sup>99m</sup>Tc chelates are injected intravenously. Each point is mean value for 4-5 animals.

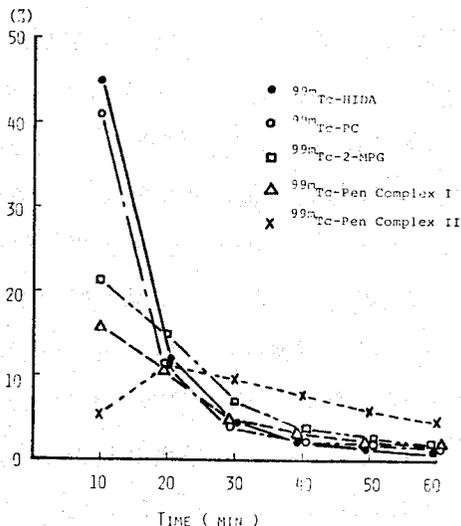


Fig.4.4. Biliary excretion behavior of <sup>99m</sup>Tc compounds in rats. Each point is mean value for 4-6 animals.

一方、 $^{99m}\text{Tc-PC}$  が投与された時、胆汁中に排泄された  $^{99m}\text{Tc}$  の化学状態を調べるために、最初の10分間に採集された胆汁の滷紙電気泳動法および薄層クロマトグラフィーによる分析を行った。その分析の結果から、約85%が投与前と同様の化学状態にあり、残りの約15%が  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  に変化していると判断された。

(c) マウスおよび家兎における

$^{99m}\text{Tc-PC}$  の体内分布

ラットにおける胆汁排泄実験の結果から、四種の  $^{99m}\text{Tc}$  標識体のうち、最も高い胆汁排泄率を示した  $^{99m}\text{Tc-PC}$  の肝胆道系診断薬としての可能性を探るために、 $^{99m}\text{Tc-PC}$  標識溶液を用いてマウスおよび家兎における体内分布の経時的変化を調べた。Table 4・2 にマウスにおける体内分布を示した。速い  $^{99m}\text{Tc}$  の胆汁

排泄が認められ、投与後10分で約30%が小腸に移行しており、その後徐々に排泄がおこり、60分後には約45%が小腸に排泄された。イメージを撮る上で障害となる腎への取り組みは、1~2%と非常に少なかった。また、家兎におけるシンチグラフィーにおいても、Fig.4・6 に示すように、マウスの結果とあまり大きな相違はなく、投与

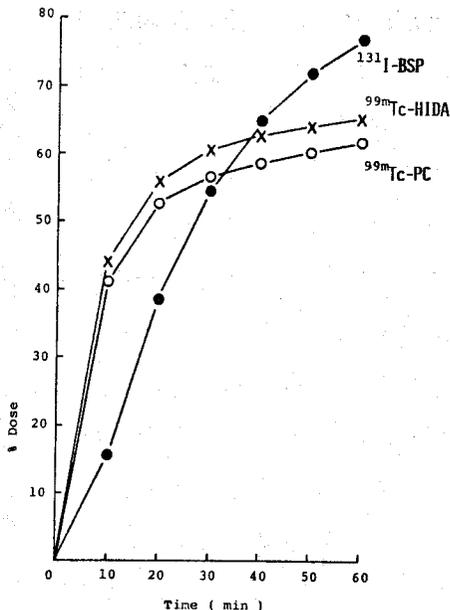


Fig.4.5. Comparative studies of hepatobiliary excretion of  $^{99m}\text{Tc-PC}$  with that of  $^{99m}\text{Tc-HIDA}$  and  $^{131}\text{I-BSP}$  in rats. Cumulative percent dose in bile obtained from cannulated bile duct in rats, at different time intervals, after the intravenous injection of  $^{99m}\text{Tc-PC}$ ,  $^{99m}\text{Tc-HIDA}$  and  $^{131}\text{I-BSP}$ . Each point is mean value for 4-5 animals.

TABLE 4.2. ORGAN DISTRIBUTION OF  $^{99m}\text{Tc-PC}$  IN MICE, AT VARIOUS TIME INTERVALS AFTER I.V. ADMINISTRATION

Organ	10 min		30 min		60 min		180 min	
	(a)	(b)	(a)	(b)	(a)	(b)	(a)	(b)
Blood	-	4.89	-	3.17	-	2.20	-	1.66
Kidney	1.97	4.20	1.72	3.74	1.31	3.08	1.08	2.45
Liver	9.20	5.29	4.68	3.19	3.94	2.41	2.89	2.04
Intestine	27.30	6.03	38.40	9.71	43.85	10.51	47.36	10.71
Stomach	0.86	1.97	0.52	1.15	0.50	0.89	0.31	0.70
Gallbladder	2.09	419.71	2.66	161.10	3.10	199.50	3.32	96.72

(a) % Dose per organ, (b) % Dose per gram organ. Mean results for four mice.

後5分ですでに一部の放射能の小腸への移行が認められ、肝の放射能が少なくなる40~60分で良好な胆嚢のイメージが得られた。

このように、 $^{99m}\text{Tc}$ の放射能の体内分布が、マウスおよび家兎で相違がないことは、 $^{99m}\text{Tc}$ -PCの標識状態の安定性を示すものであるが、このことはトリス緩衝液による希釈に対し $^{99m}\text{Tc}$ -PCはほとんど影響を受けなかったという結果からも支持される。すなわち、第2章のFig.2.2と同様、 $^{99m}\text{Tc}$ -PCの分解の指標として

希釈時の $^{99m}\text{TcO}_4^-$ の生成量を調べると、Fig.4.7に示すように、1000倍希釈においても、体内分布に動物による種差を認めなかった

$^{99m}\text{Tc}$ -Pen Complex Iの場合とはほぼ同じ値の20%以下であることが認められた。

(d) ラットにおける尿排泄

ラットにおける $^{99m}\text{Tc}$ -PC標識溶液投与時の放射能の尿排泄を、 $^{131}\text{I}$ -BSPや $^{99m}\text{Tc}$ -HIDAのそれらと比較した。 $^{99m}\text{Tc}$ -PCの場合、投与後24時間内に投与量の $12.05 \pm 2.15\%$  (1 s.d.)が尿中へ排泄されたが、この値は $^{99m}\text{Tc}$ -HIDAの場合( $14.29 \pm 2.94\%$ )よりは少なく、 $^{131}\text{I}$ -BSPの場合( $0.94 \pm 0.14\%$ )よりも多かった。



Fig.4.6. Rabbit scintigrams at 5, 10, 20, 30, 40 and 60 min after intravenous injection of  $^{99m}\text{Tc}$ -PC.

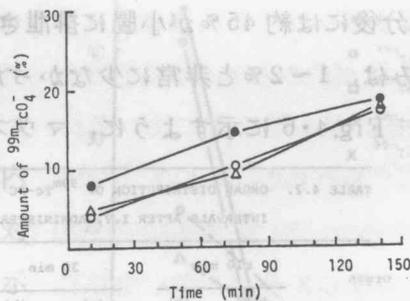


Fig.4.7. Dilution effect of  $^{99m}\text{Tc}$ -PC. Standard solution was diluted 1:10 (O), 1:100 (Δ) and 1:1000 (●) with 0.05 M Tris buffer (pH 7.4). The ordinate is percent of  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  in the resulting solution analyzed by paper electrophoresis (500V, 1 hr, buffer : 0.1 M phosphate, mean value of  $^{99m}\text{Tc}$  buffer (pH 7.0).

(e)  $^{99m}\text{Tc-PC}$ ,  $^{99m}\text{Tc-HIDA}$ および $^{131}\text{I-BSP}$ の胆汁排泄に与えるBSPの影響

Fig.4・8 に示すように、投与後30分間の放射能の胆汁排泄量は、 $^{99m}\text{Tc-PC}$ 、 $^{99m}\text{Tc-HIDA}$ 、 $^{131}\text{I-BSP}$ のいずれにおいても、BSPの投与によりある程度低下することが認められたが、その影響は $^{131}\text{I-BSP}$ 、 $^{99m}\text{Tc-PC}$ 、 $^{99m}\text{Tc-HIDA}$ の順に弱くなり、かつBSPの量に依存していた。

(f) ラットにおける肝内挙動

$^{99m}\text{Tc-PC}$ 投与時の肝からの放射能の消失は、Fig.4・9 に示すように、 $^{99m}\text{Tc-HIDA}$ の場合に比べるとはるかに速かった。放射性診断薬を用いて胆嚢をイメージする場合、肝からの放射能の消失の速さは、その評価のためのひとつのパロメーターであり、 $^{99m}\text{Tc-PC}$ の使用により、より短時間内に良好な胆嚢のイメージを得ることが可能になるとと思われる。

また、肝の中でどのような状態で存在しているかを知るために、まず、肝に存在する全放射能に対し、105,000 g 上清画分中に存在する放射能の割合(%)を $^{99m}\text{Tc-PC}$ 、 $^{99m}\text{Tc-HIDA}$ 、 $^{131}\text{I-BSP}$ について調べた。

Table 4・3 に示すように、三者ともにおいて、投与後の時間に関係なく、かなりの放射能が上清画分中に確認された。

つぎに、105,000 g 上清画分中の $^{99m}\text{Tc}$ の存在状態、すなわちタンパクと結合しているのか、あるいは遊離した状態で存在しているのかをAriasらの方法<sup>84)</sup>に従い、Sephadex G-75によるゲル濾過法を用いて調べた。各検体をラットに投与5分後に処理

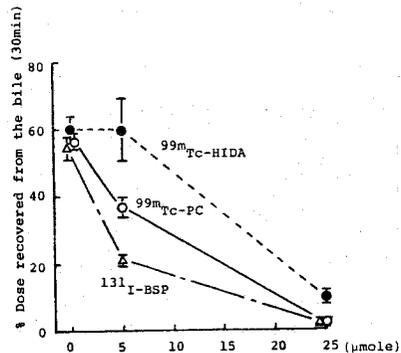


Fig.4.8. Effect of BSP on the hepatobiliary transport of  $^{99m}\text{Tc-HIDA}$ ,  $^{99m}\text{Tc-PC}$  and  $^{131}\text{I-BSP}$ . After  $^{99m}\text{Tc-HIDA}$ ,  $^{99m}\text{Tc-PC}$  or  $^{131}\text{I-BSP}$  was administered intravenously simultaneously with BSP (5.0 and 25.0  $\mu\text{mole}/300\text{g}$  body weight) to rats, the bile was collected for three 10 min. periods and percentage excreted into the bile for 30 min was measured. Each value is the mean  $\pm$  1 s.d. for five rats.

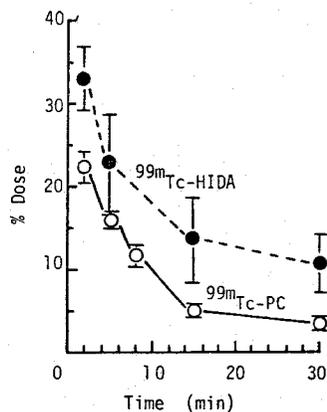


Fig.4.9. Time course of the liver activity in normal rats following i.v. injection of  $^{99m}\text{Tc}$  compounds. Each value is the mean  $\pm$  1 s.d. for 5-6 animals.

TABLE 4.3. LIVER CYTOPLASM LEVEL-TO-WHOLE LIVER HOMOGENATE  
LEVEL OF RADIOACTIVITY RATIO

Time after injection ( min )	Liver cytoplasmic fraction* / Homogenate** (%)			
	2	5	8	15
$^{99m}\text{Tc-PC}$	76.0	79.2	84.1	74.2
$^{99m}\text{Tc-HIDA}$	89.9	86.6	89.3	83.7
$^{131}\text{I-BSP}$	58.0	66.4	74.4	66.4

(\*) The cytoplasmic fraction after the centrifugation of the 25 % liver homogenate at 105,000 g (av.) for 2 hr, was measured.

(\*\*) Each value is the mean for three rats.

して得られた試料の溶出曲線を Fig.4.10 に示した。 $^{131}\text{I-BSP}$  および  $^{99m}\text{Tc-PC}$  の場合には、極めてよく類似した溶出曲線が得られ、Fraction Number 21~23, 28~30, 42~45 の画分に明瞭な放射能のピークが示される。さらに、同じ条件でのゲル濾過法を BSP を用いて試み、これらの画分は、Arias らが BSP やビリルビンのよう

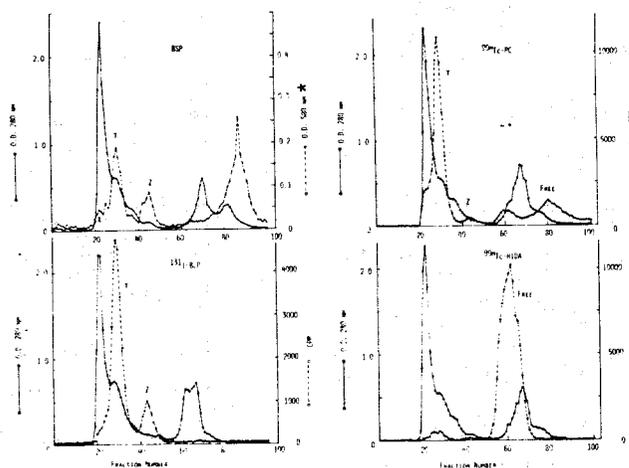


Fig.4.10. Elution patterns of BSP,  $^{131}\text{I-BSP}$ ,  $^{99m}\text{Tc-PC}$  and  $^{99m}\text{Tc-HIDA}$  from the rat liver 105,000 g supernatant. At 5 min after the i.v. administration of compound, the liver was removed, homogenated and 5 ml of the 105,000 g supernatant was applied to a Sephadex G-75 column ( 3.2 X 52 cm ). Elution was performed with 0.01 M phosphate buffer ( pH 7.4 ) at a flow rate of 37.4 ml/hr. Collections were 5.95 ml/tube.

\* The optical density of the supernatant was measured after alkalization with NaOH at 580 nm.

な有機陰イオン化合物の肝摂取に重要な働きをすると報告している肝上清タンパクのX, ligandin (Y), Z<sup>84)~86)</sup> にそれぞれ相当するものであることを確認した。また, <sup>99m</sup>Tc-PCの場合には, さらにFraction Number 58~63 および80の画分にピークが認められるが, 前者は, 高田らが有機陰イオン化合物のキャリアータンパクとして新しく報告したT binder<sup>87)</sup> に相当するものと思われ, さらに後者は, 遊離型の<sup>99m</sup>Tc-PCであることがわかった。この結果から, <sup>99m</sup>Tc-PCの場合, タンパク結合率は約72%と計算される。一方, <sup>99m</sup>Tc-HIDAの場合には, 大半が遊離型の<sup>99m</sup>Tc-HIDAのまま存在しており, タンパク結合率は約12%にすぎない。また, <sup>99m</sup>Tc-PCおよび<sup>99m</sup>Tc-HIDAの溶出曲線は, 投与後の時間にはほとんど関係なく, ほぼ同様のパターンを示した。

<sup>131</sup>I-BSPの場合には, タンパク結合していない<sup>131</sup>I-BSPは一部カラムに吸着してしまうため, タンパク結合率を正確に求めることができなかった。そこで, タンパク結合率を限外濾過法を用いて別に測定することにした。フィルターにPM10(分子量:10,000)を用いて, <sup>131</sup>I-BSPをラットに投与5分後に処理して得られた試料の105,000g上清画分を限外濾過したところ, 約97%がタンパク結合していることが認められた。また, <sup>99m</sup>Tc-PCおよび<sup>99m</sup>Tc-HIDAについても, 同様の限外濾過法によってタンパク結合率を求めたが, その結果は, ゲル濾過法で得られた結果とよく一致していた。

以上の結果から, 有機陰イオン化合物の肝摂取に重要な役割を果たすと言われている肝上清タンパクとの結合において, <sup>99m</sup>Tc-PCのタンパク結合率は<sup>131</sup>I-BSPのそれに近い値を示し, <sup>99m</sup>Tc-HIDAのタンパク結合率に比べ, はるかに高かった。

Table 4・4に, これらの結果をまとめ, あわせてBSP同時投与時の胆汁排泄量を示した。このTableに示した結果から, 胆汁排泄においてBSPの影響を受けやすい

TABLE 4.4. Binding of <sup>99m</sup>Tc-HIDA, <sup>99m</sup>Tc-PC and <sup>131</sup>I-BSP to Rat Liver Cytoplasmic Protein and Effect of BSP on the Hepatobiliary Transport of These Compounds

compound	% bound to liver cytoplasmic protein at 5 min. after administration		% excreted in bile for 30 min.	
	ultrafiltration (PM 10)	gel filtration (Sephadex G-75)	control	BSP (5μmole/300g body weight)
<sup>99m</sup> Tc-HIDA	22.6 ± 4.3	12.6 ± 7.6	60.3 ± 3.8	59.9 ± 9.5
<sup>99m</sup> Tc-PC	76.7 ± 1.7	72.1 ± 6.0	56.4 ± 2.8	36.7 ± 2.9
<sup>131</sup> I-BSP	96.8 ± 1.1	-	54.4 ± 3.8	21.0 ± 1.6

Each value is the mean ± 1 s.d. for 3-6 animals.

化合物ほど、肝上清タンパクとの結合率が高いことがわかった。

### 3. 考 察

マウス、ラット、家兎の動物実験の結果 (Table 4・2, Fig.4・5, Fig.4・6) では、検討された四種の  $^{99m}\text{Tc}$  標識体のうち、 $^{99m}\text{Tc-PC}$  が  $^{99m}\text{Tc-HIDA}$  に劣らないすぐれた胆汁排泄を示し、臨床応用への可能性が認められた。この結果をみる限り、bifunctional radiopharmaceuticals の考えに基づく肝胆道系診断薬の開発は成功したと結論できると思われる。

一方、PC と同じような化学構造をもつ PPC, TPC および Calcein では期待されるような胆汁排泄性を示す  $^{99m}\text{Tc}$  標識体が得られなかったが、これらの結果を総合的に考察すれば、 $^{99m}\text{Tc-PC}$  の化学構造、化学的性質および生体内挙動との関係について、さらに重要な情報が得られることが期待される。

以下、このような考えで、 $^{99m}\text{Tc-PC}$  の化学構造から考察を進めることにする。

#### (a) $^{99m}\text{Tc-PC}$ 錯体の構造

PPC, PC, TPC, Calcein の  $^{99m}\text{Tc}$  標識時の pH, 配位子および  $\text{SnCl}_2$  の濃度などの反応条件は、複核の  $^{99m}\text{Tc}$  の配位状態にあると考えられる  $^{99m}\text{Tc-Pen Complex II}$  調製に用いられた条件とほぼ同じである。

一方、Table 4・1 に示した反応結果で、電気泳動法で陽極側 2~3 cm に検出される放射能のピークが、目的とする複核 Tc 錯体に対応するものであるとすれば、この生成率の序列は、 $\text{PPC} > \text{PC} > \text{Calcein} > \text{TPC}$  であらわされる。換言すれば、この序列は、これら化合物のキレート能の強さの序列、あるいは生成する  $^{99m}\text{Tc}$  錯体の安定性の序列に対応すると考えられる。同時に、この序列を配位子の構造に基づいて考察すると、2つの IDA 基とその IDA 基に隣接する 2つの OH 基が複核 Tc の配位に関与した時に、安定な分子内錯体が生成するであろうという推定が容易に得られる。すなわち、OH 基に隣接する水素、メチル基、イソプロピル基以外は化学構造上大きな相違を認めないフタレイン系化合物において観察される  $\text{PPC} > \text{PC} > \text{TPC}$  の序列は、明らかにこれらの置換基の立体障害に基づく OH 基の配位能の強さの序列であると解釈できる。また、Calcein の構造では、OH 基に隣接する置換基の影響は少ないが、2つのベンゼン環にまたがるエーテル結合のため、分子構造の flexibility が失われ、その結果、PPC の場合と比較して、同一分子からの 2つの IDA 基の  $^{99m}\text{Tc}$  への配位が非常に不利になる。実際、Calcein 構造が分子内錯体生成に不利であることは、分子モデルを組み

立てることにより明瞭になる。

以上、 $^{99m}\text{Tc}$  標識反応の結果から判断する限り、目的とする Tc 複核錯体は、 $^{99m}\text{Tc}$  と PPC および PC との反応の場合に比較的安定に得られ、 $^{99m}\text{Tc}-\text{PC}$  の場合には Fig. 4.11 に示す構造のものであると結論できる。

また、この構造は、複核 Tc が配位した時、錯体の基本構造である 8 面体構造に基づいて考えられる Tc の 6 個の配位がちょうど飽和されることを示しており、この構造の妥当性が強調される。Tc が単核で配位する可能性を全く否定することはできないが、分子モデルを用いて検討した場合、単核錯体の生成には、かなりの分子全体の歪みが強調されることが認められる。また、 $^{99m}\text{Tc}$

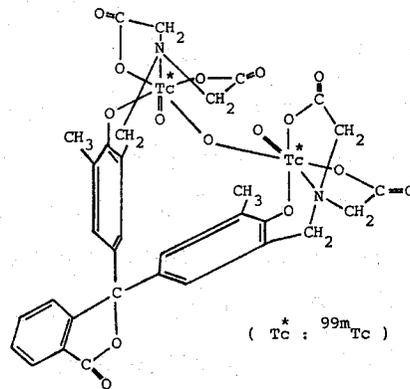


Fig.4.11. Postulated structure of  $^{99m}\text{Tc}-\text{PC}$ .

$-\text{PC}$  と Pen との配位子交換反応をゲル濾過法で検討したところ、Pen の量の増加にもない、 $^{99m}\text{Tc}-\text{Pen Complex II}$  の生成が増加することが認められた。この結果も複核 Tc 配位の可能性を強く支持すると考えられる。

#### (b) $^{99m}\text{Tc}-\text{PC}$ の胆汁排泄

第 1 章から第 3 章に記述したように、 $^{99m}\text{Tc}$  錯体の胆汁排泄において、配位子の化学的性質に加えて、配位した  $^{99m}\text{Tc}$  の化学状態がこれに影響する重要な因子のひとつであり、複核の  $^{99m}\text{Tc}$  の配位状態が少なくとも単核の配位状態より胆汁排泄に有利であろうと結論された。 $^{99m}\text{Tc}-\text{PC}$  の場合にも、すぐれた胆汁排泄と複核の  $^{99m}\text{Tc}$  錯体の構造との関係は成立するように思われる。また、分子内錯体構造を考えた場合の分子量は約 890 であり、胆汁排泄されやすい化合物の分子量が 1000~1200 以下であるという一般則<sup>(63),88)</sup>からも上記の構造は極めて妥当なものとして受け入れられる。しかし、一方で、 $^{99m}\text{Tc}-\text{PPC}$  において、 $^{99m}\text{Tc}-\text{PC}$  より安定な複核 Tc の配位状態が保持されているにもかかわらず、胆汁排泄がほとんど観察されないという実験結果 (Fig. 4.3) が得られた。このことは、 $^{99m}\text{Tc}-\text{PC}$  の構造や化学状態において、上記の因子以外にもそのすぐれた胆汁排泄に寄与している因子があることを示唆するが、この点は本章の実験結果からは明確にすることはできない。

Fig.4.8 に示すように、ラットに BSP が同時に投与された時、 $^{99m}\text{Tc}-\text{PC}$ 、 $^{99m}\text{Tc}-\text{HIDA}$ 、 $^{131}\text{I}-\text{BSP}$  のいずれの場合にも胆汁排泄率の低下が認められるが、その程

度は異なり、 $^{131}\text{I}$ -BSPの場合が最も大きい。 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -PCがそれに続くが、胆汁排泄率の低下は $^{131}\text{I}$ -BSPのそれと類似してかなり大きく観察される。 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HIDAの場合、BSPの影響は最も小さく、排泄率の低下は前の二種の化合物に比べて著しく小さい。これらの結果は、 $^{131}\text{I}$ -BSPの肝胆道系における挙動がBSPのそれに最も類似し、また、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -PCもそれに近い挙動を示すが、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HIDAの挙動はBSPのそれとはかなり相違していることを示唆すると考えられる。

一方、BSPが血液から肝に摂取される時、肝上清タンパクである ligandin (Y) や Zタンパクが重要な働きをされると言われている。<sup>84)~86)</sup>そこで、Fig.4・8の各標識体間に観察されたBSPによる拮抗現象の相違の主な原因のひとつが、それらの肝上清タンパクとの相互作用の相違にあるのではないかと考えられた。実際、検体投与後のラットの肝上清タンパクのゲル濾過法による分析結果 (Fig.4・10) から、予想通り、 $^{131}\text{I}$ -BSPと $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -PCの場合、大半の放射能が ligandin (Y) や Zタンパクに結合した状態で検出されたが、一方、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HIDAの場合には、これらのタンパクへの結合は非常に少ないという大きな違いが見出された。また、BSPは肝内でグルタチオン抱合を受けるために、<sup>89)</sup> Fig.4・10において、Fraction Number 86~88にこの抱合体に対応するピークが認められるが、<sup>90)</sup>このピークを除けば、BSPの溶出曲線は $^{131}\text{I}$ -BSPや $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -PCの場合と極めてよく類似している。このような標識体間のタンパク結合の相違は、肝上清画分の限外濾過法での結果 (Table 4・4) においても確められ、タンパク結合とBSPによる胆汁排泄率の低下との間に相関関係があることが認められた。

なお、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -PCが、肝でBSPと同様に代謝されるかどうかは明確にはわからないが、胆汁の各種クロマトグラフィーによる分析結果やFig.4・8の肝上清のゲル濾過の溶出曲線から判断すると、代謝の受け方が大きいとは考えられず、たとえ代謝を受けているとしても、その割合は小さいものと思われる。

このように、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -PCでは、フタレイン構造部位の胆汁排泄への大きな寄与があり、その肝内挙動は、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HIDAのそれと比べて、 $^{131}\text{I}$ -BSPのそれに類似することが認められた。

以上の結果から、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -PCのすぐれた胆汁排泄には、複核Tcのキレート構造部位とフタレイン構造部位とのそれぞれの性質、すなわち、bifunctional radiopharmaceuticalとしての性質が大きく反映していると結論できるとと思われる。

#### (c) $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -PCの肝胆道系診断薬としての臨床使用への可能性と期待

これまでに記述してきたように、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -PCは肝胆道系診断薬としていくつかのす

ぐれた特徴を有することがわかったが、その臨床使用への可能性と期待については以下のように考察される。

現在、新しい肝胆道系診断薬に対する臨床の評価は、より定量的な診断とより機能的な診断とが可能であるかどうかという観点からなされ、またそれに対応する性質が少しでも改善された診断薬の開発が強く要望されている<sup>20)</sup>

より定量的な診断が可能になるには、診断薬の尿への排泄率が少ないことが必要である。<sup>99m</sup>Tc-PCの場合、24時間内の尿排泄率は12.1%で、<sup>99m</sup>Tc-HIDAの14.3%より少なく、この点にもすぐれた性質がうかがわれる。また、肝から胆管への放射能の移行に際し、肝への放射能の貯留が少ないことも定量的な診断のためのひとつの必要な条件になるが、肝に限らず、体内での放射能の貯留には、錯体としての安定性が大きく影響することをたびたび述べた。特に、病態肝で胆汁排泄が低下した時には、<sup>99m</sup>Tcの配位状態の安定性が肝内挙動に影響するはずである。<sup>99m</sup>Tc-PCの高い安定性は、希釈効果(Fig.4・7)の結果から保障され、また家兎での投与40~60分後のシンチグラム(Fig.4・6)は肝からの良好な消失を示し、in vivoでもこの安定性が保たれることを示している。このような結果は、前に議論したように、動物の種差の観点から考察しても臨床使用の可能性を十分に示している。

機能診断に関係する<sup>99m</sup>Tc-PCの特徴として、前に述べたように、<sup>99m</sup>Tc-PCの肝内挙動がBSPや<sup>131</sup>I-BSPのそれに類似していることがあげられる。この性質は、これまでに報告されている<sup>99m</sup>Tc標識診断薬においては、その構造から考えても期待され難いもので、事実、全く認められなかったものであり、<sup>99m</sup>Tc-PCが、BSPあるいは<sup>131</sup>I-BSPのこれまでの機能診断面での有用性をもあわせ有する診断薬として核医学診断に用いられることが期待される。

以上、<sup>99m</sup>Tc-PCは、新しい肝胆道系診断薬としての価値を十分に備えているように思われるが、さらに、臨床使用には、それを簡易に調製するための技術的な条件が満たされる必要がある。すなわち、<sup>99m</sup>Tc標識体の場合、一般には、各病院でジェネレーターシステムで入手された<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup>を用い、使用する医師自ら調製することが多いため、できるだけ煩雑な操作を避け、かつ常に再現性良く調製できるようにすることが必要である。そのために、本研究の結果を基として、キットが考察されている<sup>91)</sup>そのキットとは、あらかじめPCとSnCl<sub>2</sub>とをバイアルに入れ凍結乾燥し、そのバイアルを窒素置換しておき、必要時にこのバイアルに<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup>を注入することにより<sup>99m</sup>Tc-PCを調製するものである。この方法によれば、標識反応に必要なSn<sup>2+</sup>イオンがPCとキ

レートすることにより安定に保存されるため、少なくとも2カ月は常に良好な $^{99m}\text{Tc}$ -PCを好収率で調製することができた。このキット化の成功により、この $^{99m}\text{Tc}$ -PCは、さらに臨床に用い易いものになったと思われ、現在臨床使用が検討されている。

## 結 語

以上の研究により得られた知見は次のように要約される。

- (1)  $^{99m}\text{Tc}$  によるペニシラミンの標識化においては、 $^{99m}\text{Tc}$  の加水分解反応や酸化還元反応が錯生成反応と交差しておこるが、反応条件、例えば、pH、ペニシラミンの濃度、 $^{99m}\text{TcO}_4^-$  の還元に用いられる試薬の種類と濃度、反応液中の  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  の濃度などのわずかな相違により、これらの反応の交差が複雑に変化し、その結果、単核、複核および  $^{99m}\text{Tc}$  が高次に加水分解した状態で配位した多核ポリマー錯体などの数種の錯体種が生成し、さらにこれらの錯体種において Tc の電荷状態が相違することを認め、これらを吸収スペクトル、沔紙電気泳動、ゲル沔過における挙動により性格づけ、かつそれらの相互関係や生成条件を明らかにし、この Tc の化学的性質に基づく複雑な標識反応が、その生成物である  $^{99m}\text{Tc}$ -ペニシラミンの体内動態の再現性の乏しさの原因であることを見出し、 $^{99m}\text{Tc}$ -ペニシラミンの診断薬としての問題点の根拠を明らかにした。さらに、これら数種の錯体種を分離し、そのラットにおける体内挙動を調べた結果、胆汁排泄される錯体種は、生成錯体種のうちで2種に限られることを認め、標識条件をコントロールすることにより、これら錯体種 (Complex I, Complex II) を収率良く選択的にかつ簡便に得る方法を確立した。一方、それらの錯体は、その諸性質の検討から、4 価の  $^{99m}\text{Tc}$  の単核および複核錯体であることが推定された。さらに、得られた Complex I, Complex II について体内動態を調べた結果、Complex I は良好な胆嚢のイメージを与え、臨床的に有用であることがわかったが、Complex II は速度論的検討の結果、Complex I よりも速く胆汁排泄される性質を示すものの、動物の体内では安定性に欠け、その点が臨床への応用を考慮する場合に問題となることを見出した。
- (2) 2-メルカプトプロピオニルグリシン (2-MPG) を  $^{99m}\text{Tc}$  で標識し、その標識生成物の肝胆移行について調べた結果、マウスやラットでは速くかつ高い胆汁への移行性を示すことを認めた。一方、ペニシラミンとの配位子交換反応の結果から、 $^{99m}\text{Tc}$ -ペニシラミン Complex II の場合と同じく、この標識体は複核の  $^{99m}\text{Tc}$  加水分解錯体であることが推定され、この  $^{99m}\text{Tc}$  の化学状態が胆汁排泄に有利に働く重要な因子のひとつであることが認められた。また、この標識体は、マウスやラット

に比べ、家兎の体内では不安定であることが認められ、動物における安定性には種差があることが見出された。この原因のひとつとして、 $^{99m}\text{Tc}-2\text{-MPG}$ が希釈によって影響を受け易いことが指摘され、この化学的に不安定な性質が、体内とくに血液中での希釈率が高くなるより大きい動物の場合に顕著にあらわれたものと考えられた。

- (3) 肝胆道系診断薬として、近年開発されたN-(2,6-ジメチルフェニルカルバモイルメチル)イミノニ酢酸(HIDA)の $^{99m}\text{Tc}$ 標識体の体内挙動を検討した。その結果、この標識化においても、条件の相違により、数種の錯体種の生成が認められたが、このうち胆汁中に排泄される錯体は一種のみで、ペニシラミンとの配位子交換反応の結果から、この標識体は、 $^{99m}\text{Tc}$ -ペニシラミンComplex IIや $^{99m}\text{Tc}-2\text{-MPG}$ の場合と同様、複核の $^{99m}\text{Tc}$ 加水分解錯体であることが認められた。また、この標識体は、動物の種差なく高い胆汁排泄率を示すことから、イミノニ酢酸基は、胆汁排泄に有利な複核の $^{99m}\text{Tc}$ 加水分解錯体を安定化させるのに適した官能基であることが明らかになった。
- (4) フタレイン類およびフルオレッセイン類の数種のイミノニ酢酸誘導体を用い、上記の検討の結果を参考にして複核の $^{99m}\text{Tc}$ が配位する条件で標識し、それらの標識体の肝胆移行性を比較検討したところ、配位子の構造の相違が $^{99m}\text{Tc}$ 標識率や体内挙動に大きく影響することを認めた。また、検討した化合物のうち、 $^{99m}\text{Tc}-3,3'$ -ビス(N,N-ジ(カルボキシメチル)-アミノエチル)-o-クレゾールフタレイン( $^{99m}\text{Tc}-\text{PC}$ )は、 $^{131}\text{I}-\text{BSP}$ に匹敵するほどの高い胆汁排泄率を示し、かつ胆汁排泄に対するBSPの影響や肝上清中での存在状態から、 $^{99m}\text{Tc}-\text{HIDA}$ よりも $^{131}\text{I}-\text{BSP}$ に近い肝胆道系排泄挙動を示すことが認められたので、RIとしての $^{99m}\text{Tc}$ のすぐれた性質を生かし、かつ機能診断にも使用される可能性のある $^{131}\text{I}-\text{BSP}$ にかわり得る新しい肝胆道系診断薬になるものと考えられ、現在臨床への応用が検討されている。

以上の知見は、 $^{99m}\text{Tc}$ の錯生成や加水分解挙動に対する基礎的な理解を与え、かつ生成する各種錯体の化学的性質と体内動態との関係の考察を可能にしたものであり、 $^{99m}\text{Tc}$ 標識肝胆道系診断薬の開発に対してのみならず、広く各種 $^{99m}\text{Tc}$ 標識診断薬の開発に対しても有用な資料となり得ると考えられる。

## 謝 辞

本研究の実施にあたり、終始御指導と御鞭撻をいただいた京都大学薬学部田中久教授、横山陽助教授、ならびに京都大学医学部鳥塚莞爾教授、森田陸司助教授に深謝致します。

また、実験の御指導をいただいた京都大学薬学部杉浦幸雄博士、干熊正彦博士、京都大学医学部小鳥輝男博士、塩野義製薬株式会社小南悟郎博士、ならびに協和醸酵工業株式会社奥村修造修士、そして実験に協力された京都大学薬学部荒野泰修士、藤林康久修士、ならびに野村麻由美学士、三崎敦司学士、さらに討論に参加していただき、様々の御援助をいただいた京都大学薬学部放射性薬品化学教室、および京都大学医学部放射線核医学教室の各位に感謝致します。

また、本研究に際し、動物実験法全般について貴重な御教示をいただいた京都薬科大学村西昌三教授、神戸女子薬科大学高田寛治講師、NMRスペクトルを測定していただいた京都大学薬学部黒田義弘博士、元素分析を施行された京都大学元素分析センターの方々、ならびにRIの使用に際しRIの管理に御協力下さった京都大学薬学部RI室の平子澄夫氏、上南博史氏に深く感謝致します。

## 引 用 文 献

- 1) M. Tubis, R. Nororyke, E. Posnick, et al.: J. Nucl. Med., 2, 282 (1961)
- 2) G.V.Taplin, O.M.Meredith and H.Kade : J.Lab. Clin. Med., 45,665 (1955 )
- 3) 上田, 飯尾 : “ 核医学一臨床生理診断法 ” , 医歯薬出版, 東京, 1974,p.163.
- 4) M.Tubis, G.T.Krishnamurthy, J.S.Endow, et al. : J. Nucl. Med., 13, 652 ( 1972 )
- 5) F. C.Hunt, D.J.Maddalena and M.G.Yeates : “Recent Advances in Nucl. Med.,” Japan, 1 st World Congress of Nucl. Med., 1974, p.867.
- 6) M.K.Dewanjee, C.Fliegell, S.T.Reves, et al.: J. Nucl. Med., 15, 176 (1974 )
- 7) A.T.Tonkin and F.H.Deland : ibid, 15, 539 ( 1974 )
- 8) T. H.Lin, A.Khentigan and H.S.Winckell : ibid, 15, 613 ( 1974 )
- 9) R.J.Baker, J.C.Bellen and P.M.Ronai : ibid, 16, 720 ( 1975 )
- 10) M.D.Loberg, M.Cooper, E.Harvey, et al. : ibid, 17, 633 (1976 )
- 11) A.Yokoyama, Y.Terauchi, K.Horiuchi, et al. : ibid, 17, 816 (1976 )
- 12) A.R.Fritzberg, D.M.Lyster and D.H.Dolphin : ibid, 17, 907 ( 1976 )
- 13) B.W.Wistow, G.Subramanian, R.L.Van Heertum, et al. : ibid, 18, 455 ( 1977 )
- 14) A.Fotopoulos, E.Chiotelis, C.Koutoulidis, et al. : ibid, 18, 1189 (1977)
- 15) M.Kato and M.Hazue : ibid, 19, 397 (1978 )
- 16) A.Kono, T.Maeda, Y.Karube, et al : ibid, 20, 39 (1979 )
- 17) M.C.Goris : ibid, 14, 820 (1973 )
- 18) A.N.Ansari, H.L.Atkins, R.M.Lambrech, et al. : “Dynamic Studies with Radioisotopes in Medicine,” Vol.1, IAEA, Knoxville & Tennessee, 1974, p.111.
- 19) A.N.Serafini, W.M.Smoak, H.B.Hupf, et al.:J. Nucl. Med., 16, 629 ( 1975 )
- 20) 油野 : “ 核医学動態機能検査法 ” , ( 久田編 ) , 永井書店, 大阪, 1979. p.206.
- 21) M.W.Sundberg, C.F.Meares, D.A.Goodurin and C.I.Diamanti : J. Med. Chem., 17, 1304 (1974 )

- 22) W.C.Eckelman, S.M.Karesh and R.C.Reba : J. Pharm. Sci., 64, 704  
(1975 )
- 23) N.D.Heindel, V.R.Risch, H.D.Burns, et al. : *ibid*, 64, 687 (1975 )
- 24) M.D.Loberg, P.S.Callery, D.W.Porter, et al. : J. Labelled Compds.  
Radiopharm., 16, 77 (1979 )
- 25) R.Morita, A.Yokoyama and T.Odori : Jap. J. Nucl. Med., 13, 601 (1976)
- 26) Y.Sugiura, A.Yokoyama and H.Tanaka : Chem.Pharm. Bull., 18, 693  
( 1970 )
- 27) N.Nakanishi, A.Yokoyama and H.Tanaka : *ibid*, 23, 1684 (1975 )
- 28) Y.Sugiura, Y.Hojo and H.Tanaka : Radioisotopes, 19, 184 (1970 )
- 29) Y.Sugiura, T.Kikuchi and H.Tanaka : Chem. Pharm. Bull., 25, 345  
(1977 )
- 30) A.Yokoyama, G.Kominami and H.Tanaka : Jap. J. Nucl. Med., 11, 179  
(1974 )
- 31) J.Dalziel, N.S.Gill, R.S.Nyholm, et al. : J. Chem. Soc., 4012 (1958 )
- 32) J.E.Boyd : J. Chem. Educ., 36, 2 (1959 )
- 33) A.Yokoyama, Y.Terauchi, K.Horouchi, et al. : Int. J. Appl. Radiat.  
Isotopes, 29, 549 (1978 )
- 34) A.Yokoyama and H.Saji : "Metal Ions in Biological Systems," Vol. 10,  
(Ed. by H.Sigel ), Marcel Dekker Inc., New York, 1980, p.313.
- 35) K.Takada, Y.Mizobuchi and S.Muranishi : Chem. Pharm. Bull., 22, 922  
(1974 )
- 36) B.Gorski and H.Hoch : J. Inorg. Nucl. Chem., 31, 3565 (1969 )
- 37) W.C.Eckelman, G.Meinken and P.Richards : J. Nucl. Med., 13, 577 (1972 )
- 38) A.Owunwanne, J.Marinsky and M.Blau : *ibid*, 18, 1099 (1977 )
- 39) K.V.Kotegov, O.N.Pavlov and V.P.Shredou : Adv. Inorg. Chem. Radio-  
chem., 11, 1 (1968 )
- 40) L.R.Melby : Inorg. Chem., 8, 349 (1969 )
- 41) A.Kay and P.C.H.Hitchell : J. Chem. Soc. (A), 2421 (1970 )
- 42) J.R.Knox and C.K.Prout : Chem. Commun., 1227 (1968 )
- 43) Y.Kanchiku : Bull. Chem. Soc. Jap., 42, 2831 (1969 )

- 44) L.G.Sillen and A.E.Martell : "Stability Constants," Supplement No. 1.,  
Chemical Society, London, 1971, p.394.
- 45) T.D.Smith, J.R.Steimers and P.Richards : J. Nucl. Med., 16, 570 (1975)
- 46) M.L.Lamson, A.S.Krischner, C.E.Hotte, et al. : *ibid*, 16, 639 (1975)
- 47) J.Steigman, G.Meinken and P.Richards : Int. J. Appl. Radiat. Isotopes,  
26, 601 (1975)
- 48) P.Hambright, J.McRae, P.E.Valk, et al. : J. Nucl. Med., 16, 478 (1975)
- 49) K.Horiuchi, A.Yokoyama, H.Tanaka, et al. : Jap. J. Nucl. Med., 12,  
503 (1975)
- 50) R.A.Henry and L.B.Rogers : Separation Sci., 3, 11 (1968)
- 51) E.I.Stiefel : "Prog. Inorg. Chem.," Vol. 22, John Wiley & Sons Inc.,  
New York, 1977, p.1.
- 52) G.Rouschias : Chem. Rev., 74, 531 (1974)
- 53) M.Kawashima, M.Koyama and T.Fujinaga : J. Inorg. Nucl. Chem.,  
38, 801 (1976)
- 54) J.Steigman and P.Richards : Semi. Nucl. Med., 4, 269 (1974)
- 55) J.Steigman and P.Richards : "Radiopharmaceuticals," ( Ed. by G.Sub -  
ramanian, ), Soc. Nucl. Med. Inc., New York, 1975, p.23.
- 56) G.Firnau : Eur. J. Nucl. Med., 1, 137 (1976)
- 57) A.Yokoyama, K.Horiuchi, Y.Terauchi, et al. : Jap. J. Nucl. Med., 13,  
650 (1976)
- 58) 櫻田 : "核医学大系(2)一放射性医薬品", (御園生, 飯尾編), 実業  
公報社, 東京, 1977, p.5.
- 59) R.A.Jacksen, T.F.Bolles, D.O.Kubiatowicz, et al. : J. Nucl. Med., 14,  
411 (1973)
- 60) Y.Funae, N.Toshioka, I.Mita, et al. : Chem. Pharm. Bull., 19, 1618  
(1971)
- 61) Y.Sugiura, Y.Kunishima and H.Tanaka : J. Inorg. Nucl. Chem., 37,  
1511 (1975)
- 62) Y.Sugiura, Y.Hirayama, H.Tanaka and K.Ishizu : J.Amer. Chem. Soc.,  
97, 5577 (1975)

- 63) 村西：“生物薬剤学”，(村田，有田編)，南江堂，東京，1975，p.223.
- 64) E.P.Haddock, E.J.Zapolshi, M.Rubin and J.V.Princiotto : Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 120, 663 ( 1965 )
- 65) M.Rubin, E.Pachtman, M.Aldridge, et al. : Biochem. Med., 3, 271 ( 1970 )
- 66) C.Schumichen, K.R.Schumichen and G.Hoffmann : Nucl. Med., 13, 252 ( 1974 )
- 67) C.Schumichen, B.Mackenbrock and G.Hoffmann : ibid, 16, 157 ( 1977 )
- 68) P.S.Callery, W.C.Faith, M.D.Loberg, et al. : J. Med. Chem., 19, 962 ( 1976 )
- 69) G.Subramian, J.Chander, M.V.Singh, et al. : Nucl. Med., 16, 83 ( 1977 )
- 70) J.Ryan, M.Cooper, M.Loberg, et al. : J. Nucl. Med., 18, 995 ( 1977 )
- 71) S.Kawaguchi, M.Iio, H.Yamada, et al. : Jap. J. Nucl. Med., 15, 933 ( 1978 )
- 72) K.Itoh, M.Furudate, K.Nazuhara and G.Irie : ibid, 15, 679 ( 1978 )
- 73) T.Aburano, A.Kuwajima, K.Koizumi, et al. : ibid., 689 ( 1978 )
- 74) L.Rosenthal, E.A.Schaffer, R.Lisbona and P.Pare : Radiol., 126, 467 ( 1978 )
- 75) P.M.Ronai : J. Nucl. Med., 18, 488 ( 1977 )
- 76) E.Harvey, M.Loberg, J.Ryan, et al. : ibid, 20, 310 ( 1979 )
- 77) P.M.Ronai, R.J.Baker, J.C.Bellen, et al. : ibid, 16, 728 ( 1975 )
- 78) H.Kubota, W.C.Eckelman, K.P.Poulose and R.C.Reba : ibid, 17, 36 ( 1976 )
- 79) R.C.Stadlnik, N.M.Matols and A.L.Jansholt : Radiol., 121, 657 ( 1976 )
- 80) A.B.Sewatkar and O.P.Noronha : Nucl. Med., 15, 290 ( 1976 )
- 81) E.Lubin, M.Rachima, V.Oren, et al. : J. Nucl. Med., 19, 24 ( 1978 )
- 82) T.Odori, R.Morita, H.Saji, et al. : Jap. J. Nucl. Med., 16, 707 ( 1979 )
- 83) T.Odori, R.Morita, H.Saji, et al. : ibid, 16, 795 ( 1979 )
- 84) A.J.Levi, Z.Gatmaitan and I.M.Arias : J. Clin. Invest., 48, 2156 ( 1969 )
- 85) A.J.Levi, Z.Gatmaitan and I.M.Arias : Lancet, 2, 139 ( 1969 )
- 86) K.Kamisaka, I.Listusky, Z.Gatmaitan and I.M.Arias : Biochem., 14, 2175 ( 1975 )
- 87) K.Takada, M.Ueda, M.Ohno and S.Muranishi : Chem. Pharm.Bull., 22, 1477 ( 1974 )

- 88) P.Millburn : "Metabolic Conjugation and Metabolic Hydrolysis," (Ed. by W.H.Fishman ) Vol.2, Academic Press, New York, 1970, p.1.
- 89) N.B.Javitt, H.O.Wheeler, K.J.Baker, et al. : J. Clin. Invest., 39, 1570 (1960 )
- 90) T.Iga, Y.Sugiyama, M.Yokota, et al. : Biochem. Pharmacol., 26, 1867 (1977 )
- 91) K.Horiuchi, A.Yokoyama, Y.Fujibayashi, et al. : Int. J. Appl. Radiat. Isotopes, submitted.