

JAERI-Research
98-015



がん治療医薬の開発を目指した
放射性レニウムに関する研究
—製造・標識化合物の合成とその体内動態—

1998年3月

アイソトープ部
アイソトープ研究委員会アイソトープ製造・標識専門部会
放射性レニウムに関する研究会

日本原子力研究所
Japan Atomic Energy Research Institute

本レポートは、日本原子力研究所が不定期に公刊している研究報告書です。

入手の問合わせは、日本原子力研究所研究情報部研究情報課（〒319-1195 茨城県那珂郡東海村）あて、お申し越してください。なお、このほかに財団法人原子力弘済会資料センター 〒319-1195 茨城県那珂郡東海村日本原子力研究所内）で複写による実費領布をおこなっております。

This report is issued irregularly.

Inquiries about availability of the reports should be addressed to Research Information Division, Department of Intellectual Resources, Japan Atomic Energy Research Institute, Tokai-mura, Naka-gun, Ibaraki-ken 319-1195, Japan.

© Japan Atomic Energy Research Institute, 1998

編集兼発行 日本原子力研究所
印 刷 (株)原子力資料サービス

がん治療医薬の開発を目指した放射性レニウムに関する研究
— 製造・標識化合物の合成とその体内動態 —

日本原子力研究所東海研究所
アイソトープ部
アイソトープ研究委員会アイソトープ製造・標識専門部会
放射性レニウムに関する研究会

(1998年2月9日受理)

放射性レニウム ^{186}Re 及び ^{188}Re の製造、放射性レニウムを用いた標識化合物の合成及びその標識化合物のマウス体内動態について得られた成果をまとめた。

本研究は、アイソトープ研究委員会アイソトープ製造・標識専門部会の放射性レニウムに関する研究会（原研及び協力研究機関）の下で行われたものである。

^{186}Re について、原子炉を用いた $^{185}\text{Re}(\text{n}, \gamma)^{186}\text{Re}$ 反応による ^{186}Re 及び加速器を用いた $^{186}\text{W}(\text{p}, \text{n})^{186}\text{Re}$ 反応による無担体 ^{186}Re の製造法を確立した。また、 ^{188}Re について、 ^{186}W の二重中性子捕獲反応で生成する $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ ジェネレータによる無担体 ^{188}Re の製造法を確立した。次に、放射性レニウムを用いた二リン酸誘導体、DMSA、DTPA、DADS、アミノメチレンリン酸誘導体及び数種のモノクローナル抗体の標識に関して pH、試薬濃度等の条件を検討し、最適標識条件を決定した。さらに、その標識化合物のマウス体内動態を調べ、臨床応用への可能性について検討した。

Development of Pharmaceuticals with Radioactive Rhenium for Cancer Therapy:
Production of ^{186}Re and ^{188}Re , Synthesis of Labeled Compounds
and Their Biodistributions

Department of Radioisotopes
Consultative Committee of Research on Radioisotopes,
Subcommittee for Production and Radiolabeling
Working Group on Radioactive Rhenium

Tokai Research Establishment
Japan Atomic Energy Research Institute
Tokai-mura, Naka-gun, Ibaraki-ken

(Received February 9, 1998)

Production of the radioactive rhenium isotopes ^{186}Re and ^{188}Re , and synthesis of their labeled compounds have been studied together with the biodistributions of the compounds.

This work was carried out by the Working Group on Radioactive Rhenium, consisting of researchers of JAERI and some universities, in the Subcommittee for Production and Radiolabeling under the Consultative Committee of Research on Radioisotopes.

For ^{186}Re , production methods by the $^{185}\text{Re}(n, \gamma)^{186}\text{Re}$ reaction in a reactor and by the $^{186}\text{W}(p, n)^{186}\text{Re}$ reaction with an accelerator, which can produce no-carrier-added ^{186}Re , have been established. For ^{188}Re , a production method by the double neutron capture reaction of ^{186}W , which produces a $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ generator, has been established. For labeling of bisphosphonate, DMSA, DTPA, DADS, aminomethylenephosphonate and some monoclonal antibodies with the radioactive rhenium isotopes, the optimum conditions, including pH, the amounts of reagents and so on, have been determined for each compound. The biodistributions of each of the labeled compounds in mice have been also obtained.

Keywords: Radioactive Rhenium, ^{186}Re , ^{188}Re , RI Production, Labeled Compound, Biodistribution, Radiopharmaceuticals, Cancer Therapy

著者一覧

秋澤 浩行¹・荒野 泰¹・石岡 典子²・今橋 強²・出雲 三四六²
 井上 登美夫³・岩本 清吉²・上園 崇¹・遠藤 啓吾³・大久保 昌武²
 大橋 國雄⁴・長 明彦²・小野 正博¹・絹谷 清剛⁵・櫛田 浩平²
 小泉 光生²・小林 勝利²・小西 淳二¹・近藤 隆⁶・佐治 英郎¹
 鈴木 博和⁴・関根 俊明²・竹内 紀男²・手賀 晴信⁵・照沼 久寿男²
 利波 紀久⁵・富吉 勝美³・野川 憲夫⁷・橋本 和幸²・平松 孝司⁵
 堀内 和子¹・前田 正敏⁶・間賀田 泰寛¹・巻出 義紘⁷・松岡 弘充²
 宮沢 香⁴・本石 章司²・元成 祐司¹・百瀬 静香⁴・森川 尚威⁷
 山林 尚道²・横山 陽^{1,*}・横山 邦彦⁵・脇坂 孝治¹
 Abdul Aziz Rauf²・Guilermína Ferro-Flores²・Jin Du²・Khalil Ahmed³
 Md. Shafiqul Islam²・Muhammad Sarwar³・Muhammad Yanis Musdja²
 Richard M. Lambrecht²・Saleh Ahmed Alyafei³・Sri Bagiawati²

- ¹ 京都大学大学院薬学研究科
- ² 日本原子力研究所アイソトープ部
- ³ 群馬大学医学部核医学科
- ⁴ 千葉大学薬学部
- ⁵ 金沢大学医学部核医学講座
- ⁶ 富山医科薬科大学医学部放射線基礎医学講座
- ⁷ 東京大学アイソトープ総合センター
- * 現 福井医科大学放射性医薬品化学講座

編集委員

森川 尚威（東京大学アイソトープ総合センター）
 佐治 英郎（京都大学大学院薬学研究科）
 野川 憲夫（東京大学アイソトープ総合センター）
 富吉 勝美（群馬大学医学部核医学科）
 橋本 和幸（日本原子力研究所アイソトープ部）
 関根 俊明（ 同上 ）
 石岡 典子（ ” ）
 山林 尚道（ ” ）
 今橋 強（ ” ）
 金谷 一江（ ” ）

This is a blank page.

目 次

1. 緒 言	1
2. 放射性レニウムの製造	2
2.1 原子炉を用いた ¹⁸⁶ Reの製造	2
2.1.1 製 造	2
(原研アイソトープ部)	
2.1.2 検 定	11
(1) レニウムの定量(化学検定法)	11
(原研アイソトープ部)	
(2) レニウムの放射能測定(放射能検定法)	11
(原研アイソトープ部)	
(3) ¹⁸⁶ Re製品の放射化学的純度(Ge半導体検出器による測定)	13
(東京大学アイソトープ総合センター・千葉大学薬学部)	
2.1.3 ¹⁸⁶ Reの開封、希釈時の手の被曝線量	16
(東京大学アイソトープ総合センター・千葉大学薬学部)	
2.1.4 ¹⁸⁶ Re製品の廃棄について	16
(原研アイソトープ部)	
2.2 加速器を用いた無担体 ¹⁸⁶ Reの製造	19
(原研アイソトープ部)	
2.3 ¹⁸⁸ W/ ¹⁸⁸ Reジェネレータによる無担体 ¹⁸⁸ Reの製造	28
(原研アイソトープ部)	
2.4 チェレンコフ計測法を用いた ¹⁸⁶ Re、 ¹⁸⁸ Reの放射能測定	32
(原研アイソトープ部)	
3. レニウム標識化合物の合成及び体内動態の研究	39
3.1 原子炉製 ¹⁸⁶ Reを用いた研究	39
3.1.1 HEDP	39
(1) HEDPの ¹⁸⁶ Re標識とマウス体内動態の検討	39
(京都大学大学院薬学研究科)	
(2) HEDPの ¹⁸⁶ Re標識とマウスによるイメージ	49
(群馬大学医学部)	
3.1.2 HMDP	54
HMDPの ¹⁸⁶ Re標識とマウス体内動態の検討	54
(東京大学アイソトープ総合センター・千葉大学薬学部)	
3.1.3 パミドロン酸(APD)	72
APDの ¹⁸⁶ Re標識とマウス体内分布	72
(群馬大学医学部)	
3.1.4 DMSA(DMS)	79

(1) DMSA の ^{186}Re 標識とマウス体内動態の検討	79
(東京大学アイソトープ総合センター・千葉大学薬学部)	
(2) がんの治療を目的とする DMS の ^{186}Re 標識	100
(京都大学大学院薬学研究科)	
3.1.5 DTPA	115
DTPA の ^{186}Re 標識	115
(東京大学アイソトープ総合センター・千葉大学薬学部)	
3.1.6 DADS	124
DADS の ^{186}Re 標識に関する基礎的検討	124
(京都大学大学院薬学研究科)	
3.1.7 モノクローナル抗体	132
(1) ^{186}Re 標識モノクローナル抗体作製及び動物実験	132
(富山医科薬科大学医学部)	
(2) C10-Bz-EDTA を用いた抗体の ^{186}Re 標識のための予備的検討	142
(金沢大学医学部)	
(3) MAG_3 による抗体の ^{186}Re 標識および標識抗体の安定性	143
(金沢大学医学部)	
3.2 加速器製無担体 ^{186}Re を用いた研究	146
3.2.1 HEDP	146
(原研アイソトープ部)	
3.3 ジェネレータ製無担体 ^{188}Re を用いた標識研究	150
(原研アイソトープ部)	
3.3.1 MDP	150
3.3.2 HEDP	158
3.3.3 DMSA	164
3.3.4 アミノメチレンリン酸誘導体 (EDTMP, EDBMP, NTMP)	169
3.3.5 DTPA	176
3.3.6 モノクローナル抗体	181
(1) ^{188}Re を用いた $\text{MAG}_3\text{-IgG}$ 標識	181
(2) HEDP を用いたモノクローナル抗体及びそのフラグメントの ^{188}Re 標識	187
4. 結 語	195
謝 辞	197

Contents

1. Introduction	1
2. Production of Radioactive Rhenium	2
2.1 Production of ^{186}Re Using a Reactor	2
2.1.1 Production	2
2.1.2 Quality Control	11
(1) Determination of Chemical Quantity of Re	11
(2) Determination of Radioactivity	11
(3) Radiochemical Impurity of a ^{186}Re Product	13
2.1.3 Exposure Dose to Hands During the Process of Unseal and Dilute a ^{186}Re Product	16
2.1.4 Discard of a ^{186}Re Product	16
2.2 Production of No-carrier-added ^{186}Re Using an Accelerator	19
2.3 Production of Carrier-free ^{188}Re via a $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ Generator	28
2.4 Cherenkov Counting of ^{186}Re and ^{188}Re	32
3. Radiolabeling with Radioactive Rhenium and Its Biodistribution	39
3.1 Radiolabeling with ^{186}Re Produced by a Reactor	39
3.1.1 HEDP	39
(1) Radiolabeling of HEDP with ^{186}Re and Its Biodistribution in Mice	39
(2) Synthesis of HEDP- ^{186}Re and Its Imaging in Mice	49
3.1.2 HMDP	54
Radiolabeling of HMDP with ^{186}Re and Its Biodistribution in Mice	54
3.1.3 APD	72
Synthesis of APD- ^{186}Re and Its Biodistribution in Mice	72
3.1.4 DMSA (DMS)	79
(1) Radiolabeling of DMSA with ^{186}Re and Its Biodistribution in Mice	79
(2) Preparation of ^{186}Re -DMS for Tumor Therapy	100
3.1.5 DTPA	115
Radiolabeling of DTPA with ^{186}Re	115
3.1.6 DADS	124
Basic Studies of ^{186}Re Complexation Reactions with DADS	124
3.1.7 Monoclonal Antibody	132

(1) Radiolabeling of Monoclonal Antibody with ^{186}Re and Its Biodistribution	132
(2) Radiolabeling of Antibody with ^{186}Re Using C10-Bz-EDTA	142
(3) Radiolabeling of Antibody with ^{186}Re Using MAG_3 and a Study of Its Stability	143
3.2 Radiolabeling with No-carrier-added ^{186}Re Produced by an Accelerator	146
3.2.1 HEDP	146
3.3 Radiolabeling with Generator-produced ^{188}Re	150
3.3.1 MDP	150
3.3.2 HEDP	158
3.3.3 DMSA	164
3.3.4 Aminomethylenephosphonate Derivatives (EDTMP, EDBMP and NTMP)	169
3.3.5 DTPA	176
3.3.6 Monoclonal Antibody	181
(1) Radiolabeling of $\text{MAG}_3\text{-IgG}$ with ^{188}Re	181
(2) Radiolabeling of Monoclonal Antibody and Its Fragments with Generator-produced ^{188}Re Using HEDP	187
4. Conclusions	195
Acknowledgement	197

配位子略号一覧

APD (パミドロン酸) : 3-Amino-1-hydroxypropilidene-1,1-bisphosphonic acid

DADS : N,N'-bis(mercaptoacetyl)ethylenediamine

DMSA : Dimercaptosuccinic acid

DTPA : Diethylenetriamine-N,N,N',N'',N'''-pentaacetic acid

EDBMP : Ethylenediamine-N,N'-bis(methylenephosphonic acid)

EDTMP : Ethylenediamine-N,N,N',N'-tetrakis(methylenephosphonic acid)

HEDP : 1-Hydroxyethylidene-1,1-diphosphonic acid

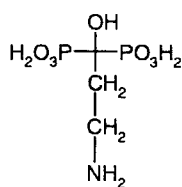
HMDP : 1-Hydroxymethylene-1,1-diphosphonic acid

MAG₃ : N-[N-[N-[(benzoylthio)acetyl] glysyl]glycyl]glycine

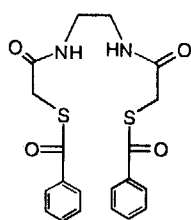
MDP : Methylenediphosphonic acid

MIBG : Meta-iodobenzylguanidine

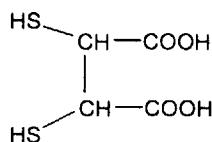
NTMP : Nitritotris(methylenephosphonic acid)



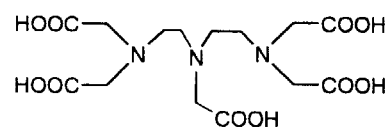
APD



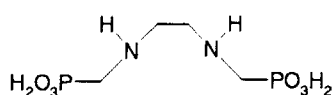
DADS



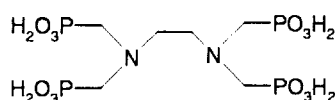
DMSA



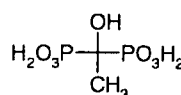
DTPA



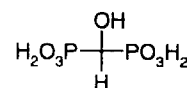
EDBMP



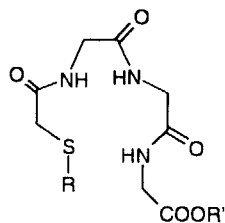
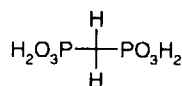
EDTMP



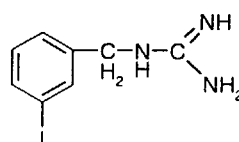
HEDP



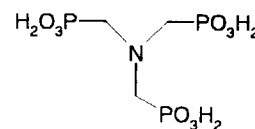
HMDP

MAG₃

MDP



MIBG



NTMP

This is a blank page.

1. 緒言

わが国における放射線・放射性同位元素(RI)の利用は、基礎から応用にわたる科学の広範な分野で活発に研究・開発され、着実に実用されて多大な成果を挙げ、現代社会には欠くことのできない日常的な手段となっている。とくに医療の分野でのその活用は目ざましく、診断に、治療にと、その進展のほどは筆舌に尽くしがたい。

密封されていない RI の医療への応用の歴史は古く、放射性ヨウ素 (^{131}I) が転移性甲状腺がんや甲状腺機能亢進症の治療に用いられてきたのはその例である。

近年、 ^{186}Re , ^{188}Re , ^{211}At など標識したモノクローナル抗体による特異的ながん治療や悪性活性腫等に特異的に集まる ^{131}I -MIBG、また転移骨がんの疼痛軽減に有効な $^{89}\text{SrCl}_2$, $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ などの治療用放射性医薬品の研究・開発が注目されている。

日本原子力研究所(原研)では、かねてより原子炉を使って RI を製造し、それを頒布しているが、原研アイソトープ研究委員会、アイソトープ製造・標識専門部会(部会長: 森川尚威)における「今後の開発が期待される医療用 RI としての放射性レニウムの製造・標識」についての要請をうけて、東海研究所アイソトープ部(部長: 山林尚道)が未開発で輸入の困難な放射性レニウムの製造技術の研究・開発に着手した。また、アイソトープ製造・標識専門部会の関係者が中心になって、がんの診断・治療医薬の開発を目指した放射性レニウムの研究を推進することとなった。平成5年からは定常的に ^{186}Re を試験供給する体制が整った。これを契機に国内の関連分野の研究者が連携して協力研究体制をしき、原子炉を利用した ^{186}Re 及び $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ ジェネレータの製造ならびに加速器を利用した $^{186}\text{W}(p, n)^{186}\text{Re}$ 反応による無担体の ^{186}Re の製造・ ^{186}Re , ^{188}Re を用いた標識化合物の合成とそのマウス体内における動態の研究を展開した。

協力研究体制はアイソトープ部製造課(課長: 今橋 強)を軸として、京都大学大学院薬学研究科(研究代表者: 横山 陽、平成9年より佐治英郎)、東京大学アイソトープ総合センター・千葉大学薬学部(研究代表者: 巻出義紘)、群馬大学医学部核医学科(研究代表者: 遠藤啓吾)、金沢大学医学部核医学講座(研究代表者: 利波紀久)、富山医科薬科大学医学部放射線基礎医学講座(研究代表者: 近藤 隆)で構成され、放射性レニウムに関する研究会として情報の伝達・実験技術の整合・研究成果の考察と評価などを行い、研究の推進母体として機能している。

放射性レニウムを選定した理由としては、レニウムの半減期が適度であり、その放出率の低いガンマ線による診断とかなり強いベータ線エネルギーを利用した治療が同時に行えるであろうこと、診断用の放射性医薬品として多大の使用実績のあるテクネチウムと周期律表上同族であり、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 標識化合物については合成・構造・反応・体内動態がかなり解明されているので、使用経験のない放射性レニウムの挙動がある程度類推できるであろうことが挙げられる。しかしながら、現実には予想に反することが続出した。今後の研究に役立つことを念じ、平成9年末までの放射性レニウムに関する知見を取りまとめた。

2. 放射性レニウムの製造

2. 1 原子炉を用いた ^{186}Re の製造

2.1.1 製造¹⁾

(1) 試験製造

原子炉の熱中性子を用いた ^{186}Re 製造法の特徴は、 $^{185}\text{Re}(n, \gamma)^{186}\text{Re}$ 反応により大量に ^{186}Re が生成できることである。天然レニウムの同位体比は、 ^{185}Re 、 ^{187}Re が約 37%、63% であり、熱中性子捕獲断面積がそれぞれ 112 及び 1.6 バーン²⁾であることから、 $^{187}\text{Re}(n, \gamma)^{188}\text{Re}$ 反応により同時に ^{188}Re が不純物核種として生成する。そこで、放射性核種純度が高く、高比放射能の製品を得るため、ターゲットとして、濃縮安定同位体の金属レニウムを選定した。用いたターゲット (Oak Ridge National Laboratory 製) には、 ^{185}Re 97.4% に対し、 ^{187}Re が 2.6% 存在する。 ^{186}Re 、 ^{188}Re の生成量を計算した結果を Fig. 2.1.1-1 に示す。熱中性子束 $1 \times 10^{14} \text{ cm}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$ として、3 日照射直後の場合、 ^{186}Re 及び ^{188}Re の比放射能は、15 及び 0.55 TBq/g であり、 ^{188}Re の占める割合は約 4 % 以下である。Fig. 2.1.1-2 に示すように、 ^{188}Re の半減期 (半減期: 16.98 時間²⁾) は、 ^{186}Re (90.64 時間²⁾) に比べ短いので不純物核種である ^{188}Re の占める割合は経過時間とともに低下する。例えば、照射後 2 日では 0.82% となるので ^{186}Re 製品の放射性核種純度は 99% 以上になる。

照射容器の概念図を Fig. 2.1.1-3 に示す。ターゲット約 3~5 mg を微量天秤 (感量: 10 μg) で精秤し、石英アンブルに入れて溶封した後、漏洩検査 (気泡試験) による石英アンブルの健全性を確認した。さらに、アルミニウム箔で二重に包装し、アルミニウムカプセルを封入した後、カプセルの漏洩検査を行った。この照射容器を JRR-3M で 3~4 日間照射し、照射容器などの放射化不純物を減衰 (約 30 分放置) させた後、原子炉施設側から直接ラジオアイソトープ製造棟の詰替セルまで転送した。次いで、照射済みカプセルを切断し、内側のアルミニウム箔に包装した状態で試料を製造セルに運び込み、以下の製造試験を行った。

製造前に、石英アンブルのみを未開封のままガラスバイアルに入れ、電離箱 (アロカ製) により放射能を測定し、比放射能を求めた。測定に使用した電離箱は、双子熱伝導型カロリメータを用いた放射能精密測定法により校正した (2.1.2 (2) レニウムの放射能測定の項参照)。

電離箱を用いる測定では、非破壊で ^{186}Re の生成量を精度良く求めることが出来るので、最終製品の放射能濃度調整などが容易となった。原研の原子炉 (JRR-3M: 水力照射孔、HR-1) において、3, 4, 6, 10 日間の試験照射の結果、比放射能 (実測値) は、熱中性子束の変動の範囲内 (5%) で計算値と良く一致していることを確認した。

初期における 3 回目までの試験製造では、ターゲットの溶解に 30% 過酸化水素水を用い、蒸発乾固近くまで加熱して過剰の過酸化水素を分解する製造法を採用した。蒸発乾固後、水を加えて過レニウム酸溶液 (HReO_4) として回収した溶液 (pH=3~4) に水酸化

ナトリウム溶液 (NaOH) を加え pH = 7 に液性を調整し、過レニウム酸ナトリウム溶液 (NaReO_4) とした。しかしながら、蒸留中に ^{186}Re が飛沫同伴や揮散などにより、 ^{186}Re の製造収率は、いずれも 30% 前後と低いことが分かった。この原因は、蒸発乾固時の化学形が七酸化二レニウム (Re_2O_7 ; 融点 220°C) になり昇華しやすい状態のためと推論した。そこでターゲットを硝酸で溶解することで、蒸発乾固時に昇華しにくい過レニウム酸 (融点 360°C) にする方法に変更し、定常製造を行った。

(2) 定常製造

金属レニウムは、1 M あるいは 2 M 硝酸では熱を加えても溶解時間がそれぞれ 1 時間あるいは 20 分間を要するが、6 M 硝酸では熱をかけなくても約 10 分間で溶解する。水を加えて蒸発・乾固した場合、冷却管を通して捕集した蒸発溶液中には ^{186}Re が検出されないことから、 ^{186}Re は飛沫同伴や揮散が少ないことを確認した。製造工程及び製造装置を Fig. 2.1.1-4, 5 に、製造セルの外観及び製造装置の写真を Photo 2.1.1-1, 2 示す。濃縮装置は、熱媒体に沸点 121°C のテトラクロルエチレン ($\text{Cl}_2\text{C}=\text{CCl}_2$) を用い、一定加熱温度を保持するため二重の容器からなっている。製造装置は、鉛 5 cm 厚さのしゃへいセル内に組み込み、遠隔操作により以下の方法で行った。

最初、石英アンプルを開封し、この中に 6 M 硝酸溶液を加えて溶解した。溶液を濃縮槽に移送し、さらに石英アンプル内及び配管などを洗浄しながら濃縮槽に移送した。硝酸を完全に追い出すため、水 5 ml を加えて濃縮・乾固を 5 回繰り返し、最後に水約 10 ml を加え、過レニウム酸溶液として回収し原液とした。製品の配分量が 約 1 ml 程度になるように原液の一部を希釈し製品とした。製品の pH 測定後、検査用試料 (1 ml) の放射能濃度を電離箱で測定した。

出荷放射能量に応じて製品を配分後、鉛容器 (5 mm 厚) に収納し、さらに A 型輸送ダンボール箱に梱包、発送した。製品は、アイソトープ協会の協力により東京都内には製造日翌日 (火曜日)、遠距離地では翌々日 (水曜日) までに到着することが出来るようになった。

平成 5 年～平成 9 年まで合計 20 回、使用時における比放射能 15～20 TBq/g の製品を毎回 50～100 GBq 製造した。Table 2.1.1-1 に、平成 8、9 年度の製品の仕様を示した。製造収率は石英アンプル上部へのターゲットの付着、蒸発・乾固・濃縮中の損失及びガラス壁面への ^{186}Re の吸着などにより変動したが、60～90% の範囲にあった。Fig. 2.1.1-6 に製品の γ 線スペクトルを示す。検定時に僅かに ^{188}Re を含むが、製品規格は 99% 以上の放射性核種純度であり、使用時には 99.9% 以上であった。また、製品の放射能濃度を 0.4～0.5 GBq/ml に調整した場合、Re 濃度は約 0.3 mg/ml 程度であり、pH は 3～5 であった。製品中の硝酸濃度はイオンクロマトグラフ法により確認したところ 10 ppm 以下であり、過レニウム酸 (HReO_4) の化学形であることを薄層クロマトグラフ法及びイオンクロマトグラフ法で確認した。

照射後 244 日経過した製品のガンマ線スペクトル解析の結果では、 ^{192}Ir のピークが顕著に見られた。そのほか、極く僅かに $^{110\text{m}}\text{Ag}$ 及び ^{65}Zn などが確認されたが、照射直後に換算しても ^{192}Ir は、 ^{186}Re 製品中の $1.5 \times 10^{-4} \%$ であり 99%以上の放射性核種純度を維持することができた。

参考文献

- 1) 本石章司、小林勝利、照沼久寿男、今橋強、竹内紀男、岩本清吉、櫛田浩平、第32回 理工学における同位元素研究発表会要旨集 10p-1-3(1995).
- 2) 村上悠紀雄、團野皓文、小林昌敏：“放射線データブック” 地人書館、東京（1982）.

Table 2.1.1-1 Specifications of the ^{186}Re products supplied in FY 1996 and 1997

Production No.	Specific activity (TBq/g.Re)	^{186}Re concentration (GBq/ml)
R-601	17	0.42
R-602	16	0.38
R-603	18	0.39
R-604	17	0.55
R-701	18	0.50
R-702	19	0.47
R-703	20	0.50
R-704	19	0.55
R-705	18	0.45

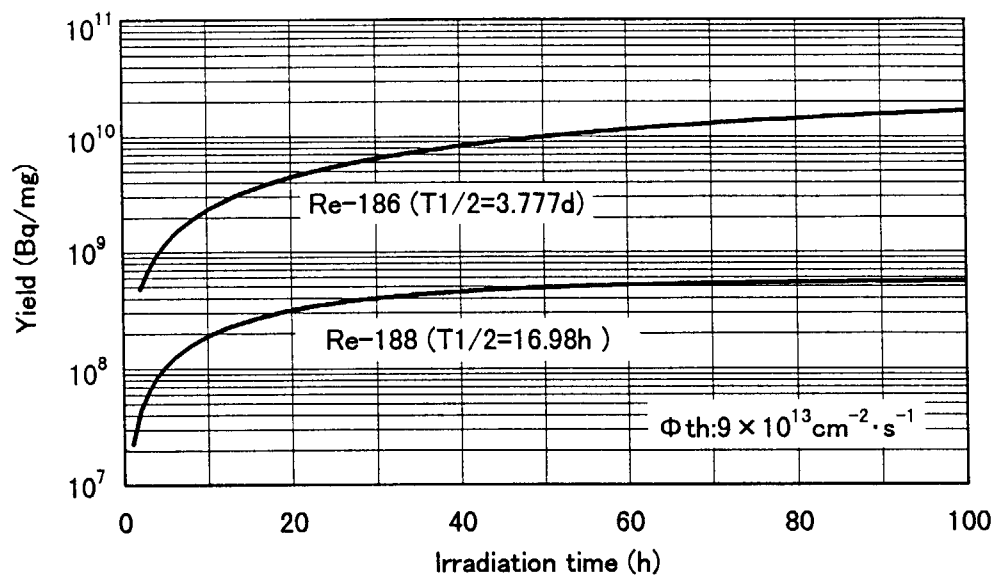


Fig. 2.1.1-1 Calculated yields of Re-186 and Re-188 in an enriched Re-185 (97.4%) target irradiated in JRR-3M.

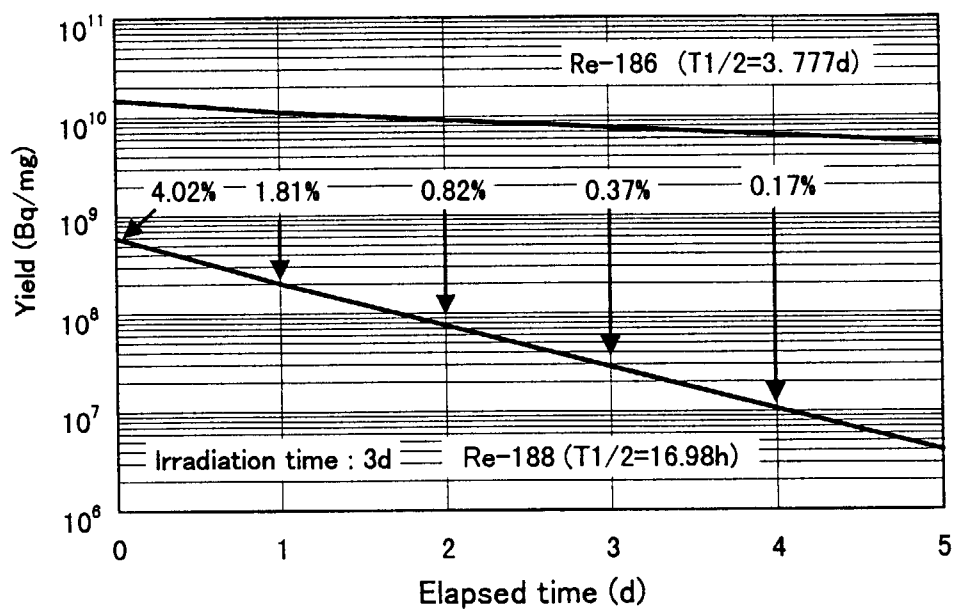


Fig. 2.1.1-2 Decay curves of Re-186 and Re-188 produced under the same conditions as in Fig. 2.1.1-1.

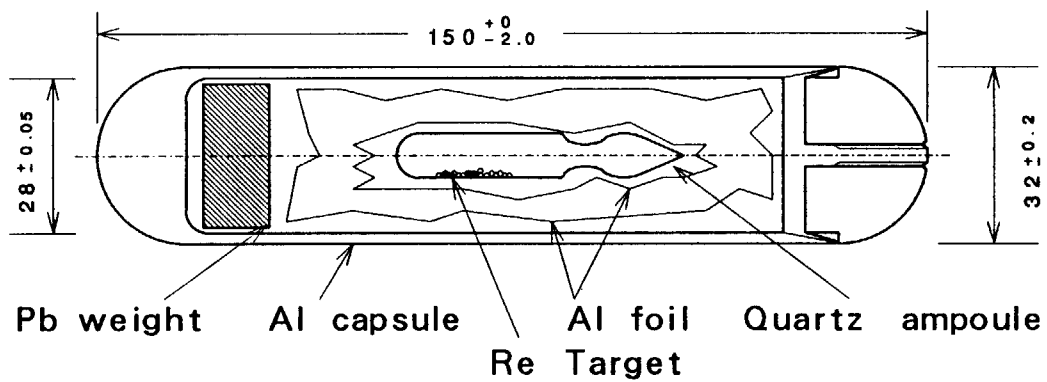
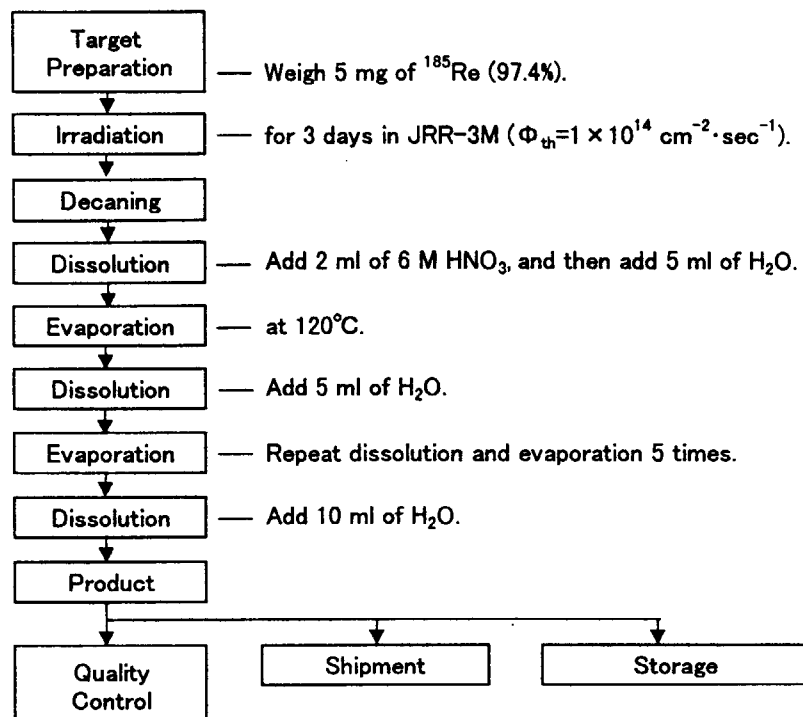


Fig. 2.1.1-3 Irradiation capsule for Re target.

Fig. 2.1.1-4 Flow sheet for the production of ^{186}Re

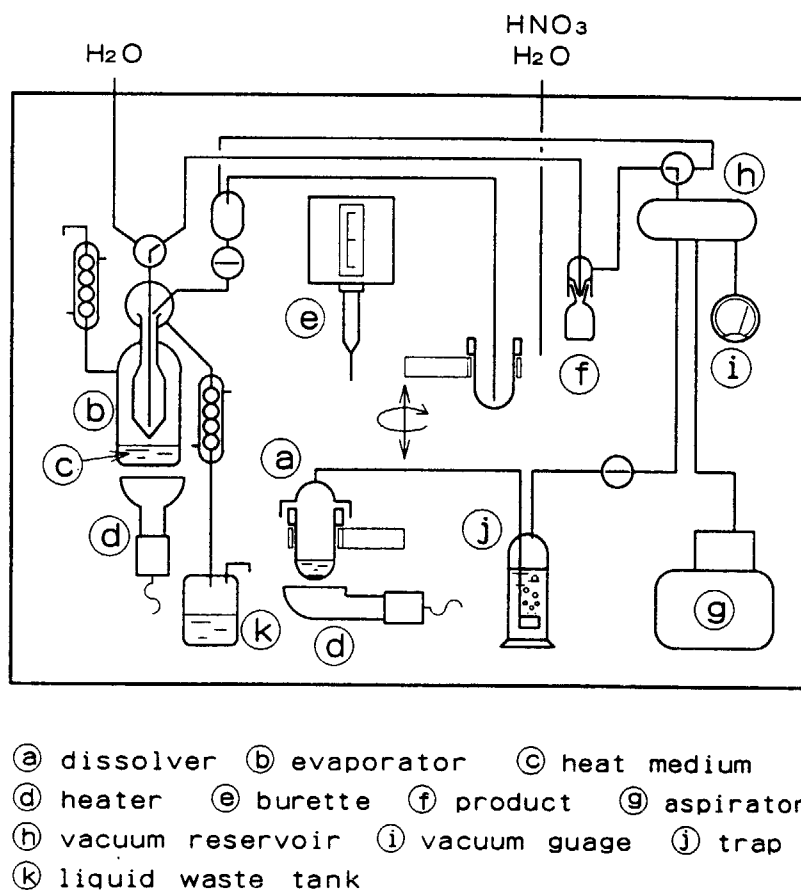


Fig. 2.1.1-5 Schematic diagram of the apparatus used for the production of Re-186.

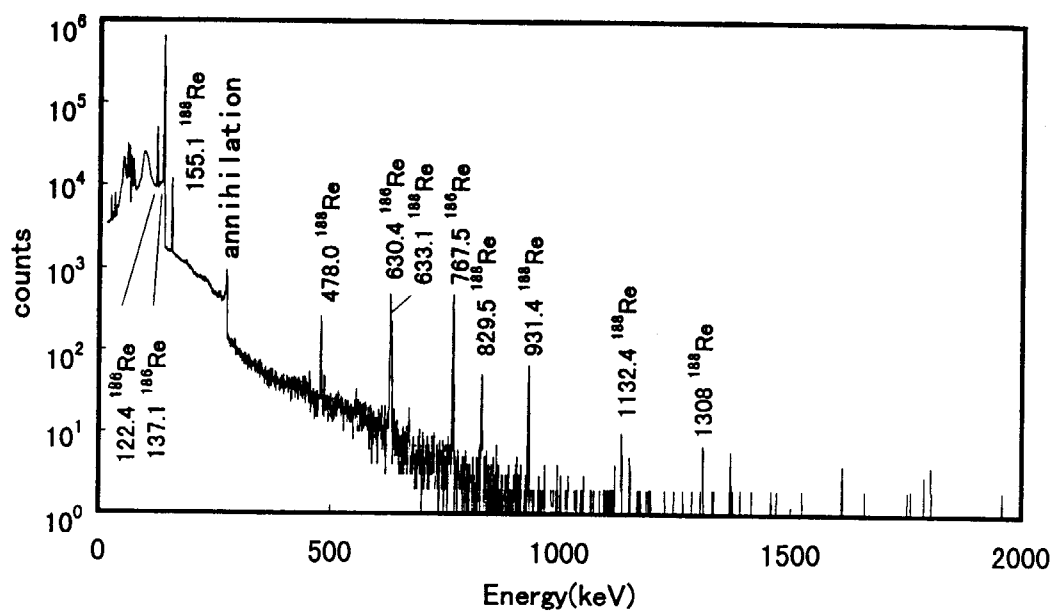


Fig. 2.1.1-6 A typical gamma-ray spectrum of a Re-186 product.

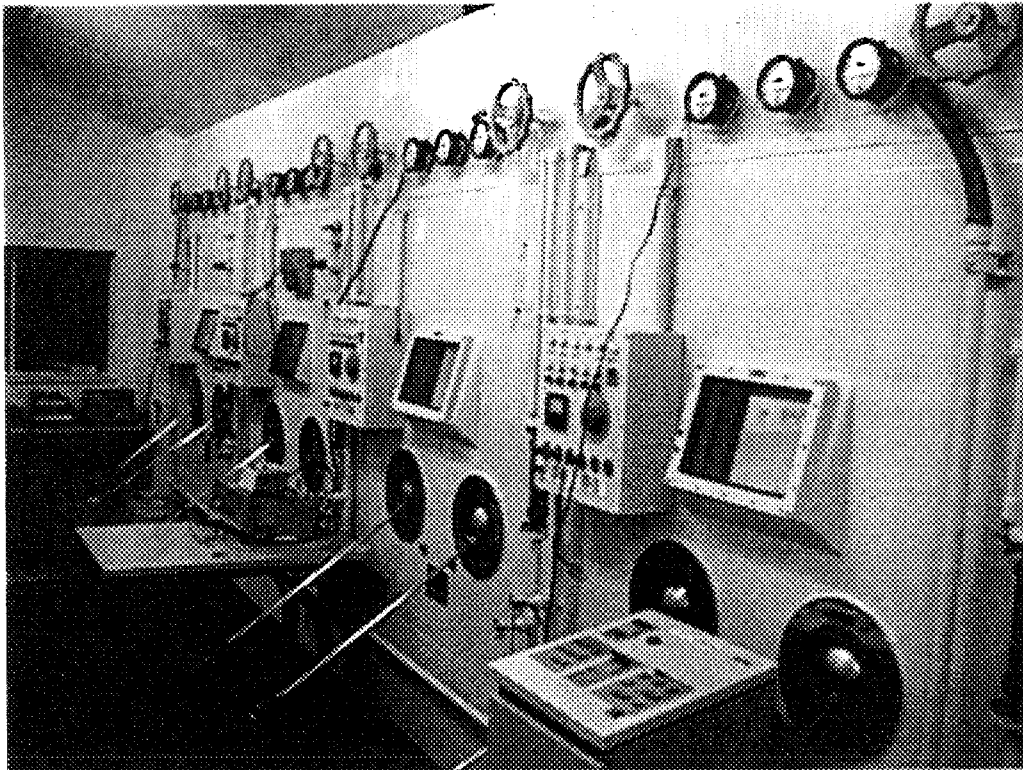


Photo 2.1.1-1 Hot-cell for the production of Re-186

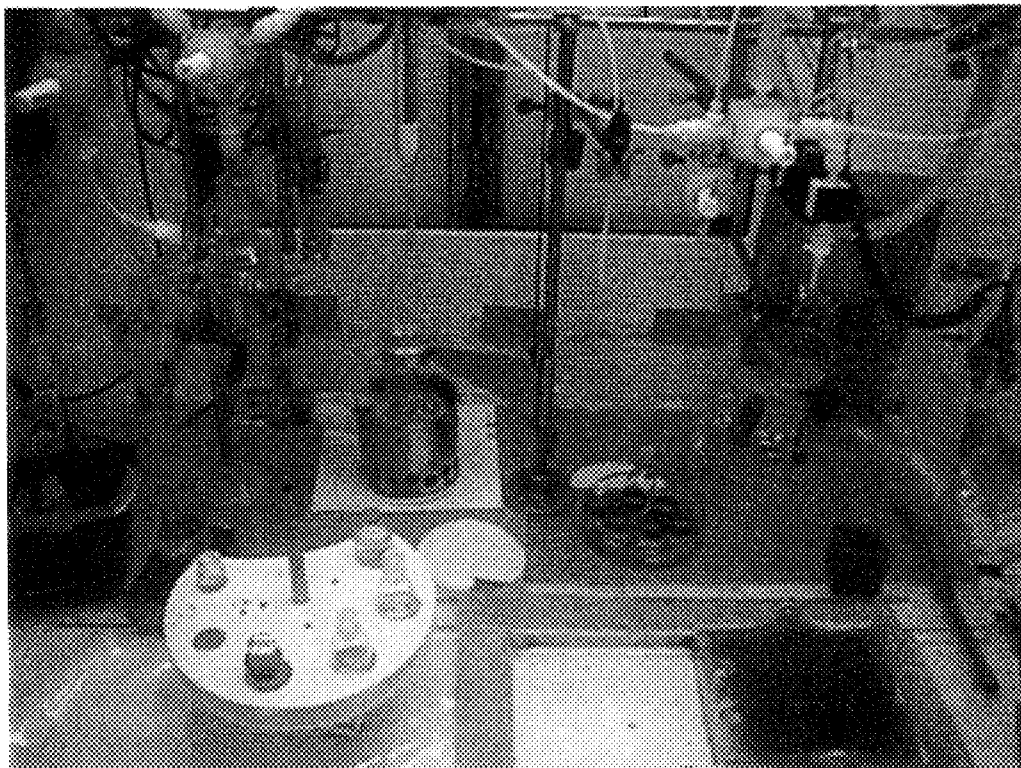


Photo 2.1.1-2 Apparatus for the production of Re-186

This is a blank page.

2.1.2 検定

(1) レニウムの定量（化学検定法）

核医学用薬剤の標識原料に使用される放射性レニウムは、化学的に高純度であるとともに、放射能濃度及び比放射能が常に一定の水準にあることが要求される。特に ^{186}Re の製造ではできるだけ比放射能の高い製品を製造することが望まれている。そこで、原子炉を利用して製造される ^{186}Re の比放射能検定に必要なレニウム担体濃度の検定法について検討し、その定量法を確立した。

従来、レニウムはチオシアン酸と錯体を形成させ、その呈色測定によって定量することができていることが知られていた。しかし、従来法を詳しく検討したところ、推奨されていた測定波長（420 nm、錯体の最大吸収ピーク）では吸光度の経時変化が大きいことが分かった。そこで、錯体の吸収スペクトルの経時変化を調べ、従来の測定波長より短波長側の吸収ピーク（373 nm）が、経時変化に対して安定であることを確認した（Fig. 2.1.2-1）。

これを基に、以下のようにレニウムの定量条件を定めた。まずレニウム試料を 25 ml メスフラスコに分取する（通常 1-5 ml）。同時にブランク、および Re 標準溶液を別途メスフラスコに採取し、純水を加えて 10 ml とする。さらに濃塩酸 6 ml、10% チオシアン酸ナトリウム 4 ml、および 20% 塩化第一スズ溶液（還元剤）3 ml を加えてレニウム錯体を形成させる。さらに純水で溶液を 25 ml に調製する。得られた溶液を攪拌し、約 30 分静置した後にブランク、標準試料および測定試料の吸光度を波長 373 nm で測定する。得られる検量線から試料のレニウム濃度を定量する。本測定法では 0 から約 30 ppm の範囲で直線性のよい検量線が得られる。

なお一般的には RI 製品の化学検定としてさらに外観性状試験、液性試験（pH）、重金属試験等の項目もあり、必要に応じて実施している。

(2) レニウムの放射能測定（放射能検定法）

^{186}Re 製品の放射能検定には通常 γ 線用井戸型電離箱が用いられる。しかし電離箱による測定は絶対測定ではないので、放射能強度を正しく知るためには測定システムの正確な校正定数が必要となる。そこで、検定用電離箱に対する正確な校正定数を求めるため、 $4\pi\beta\cdot\gamma$ 同時計数法およびカロリメトリ（熱量測定法）により、 ^{186}Re の絶対測定を行った。前者は各国の標準研究所で採用されている方法で、現在最も精度の良い方法の一つと考えられている。一方後者のカロリメトリは原研アイソトープ部で開発し実用化に成功した方法であり、大量の放射能測定に適している。ここではカロリメトリによる ^{186}Re の絶対測定について述べる¹⁾。なお放射性核種純度の検定は高純度 Ge 検出器を用いて行ったが、 ^{186}Re 製品中にはその同位体で

ある ^{188}Re が照射直後で 2.5% 存在することが分かっている (2.1.1 製造 Fig. 2.1.1-6 参照)。この不純物核種の混入はターゲットの純度上避けられないものであるが、半減期が短い (16.98 h) のでその割合は急速に減少する。

^{186}Re 製品は、97.4% 濃縮 ^{185}Re ターゲットを原子炉で中性子照射して製造されるが、その放射能の全量をカロリメトリにより測定した。すなわち、 ^{186}Re は半減期 3.777 日の β 線および γ 線放出核種であり、その放出する放射線の平均エネルギーは β 線で 323 keV、内部制動放射 X 線 0.37 keV、内部転換電子 14.0 keV、 γ 線 19.3 keV である。したがってこれらの放射線がすべて熱に変換すると 37 MBq 当たり 2.11 μW の発熱量となる。この発熱エネルギー、およびカロリメータにより測定した ^{186}Re 製品の発熱量から、生成した放射エネルギーの絶対値を知ることができる。

^{186}Re 製造用ターゲットは濃縮 ^{185}Re 金属 (5 mg) を石英アンブルに封入したものであるが、原子炉照射後生成した ^{186}Re からの発生熱を石英アンブルを介して効率よくカロリメータの熱測定セルに伝えるため、Fig. 2.1.1-2 のように双子型カロリメータの一方のセル内に厚手のアルミニウム箔でスタンドをつくり、その中に照射した石英アンブルを挿入した。また熱容量のバランスをとるため、もう一方のダミー用測定セルにも同じようにアルミニウム箔のスタンドに未照射レニウム入り石英アンブルを挿入したものを置いて測定を行った。また試料測定に先立って行ったカロリメータ感熱セルの校正にも、実際の製品測定の時と条件を同じにするため、二つのセル内にアルミ箔で包んだ石英アンブルを置いて校正を行った。

このようにして得られた ^{186}Re の放射能絶対値を用い、また同じ試料を放射能検定用井戸型電離箱で測定することにより、電離箱の校正定数を決定した。得られた校正定数の値は、別途行った $4\pi\beta\text{-}\gamma$ 同時計数法から求めた校正定数とよい一致を示した。この校正定数を用いることにより、電離箱を用いて ^{186}Re 製品の放射能検定を簡便・迅速に行うことができるようになった。

参考文献

- 1) 源河次雄、放射線 Vol.19, No.3, 49 (1993).

(3) ^{186}Re 製品の放射化学的純度 (Ge 半導体検出器による測定)

^{186}Re 製品の放射能は 400 MBq である。レニウム (Re) の化学形は過レニウム酸 (HReO_4)、放射能濃度は 400 MBq/ml、Re 濃度は 18~42 $\mu\text{g/ml}$ 、水溶液の pH は 2.3~4.9 であった。短半減期の RI は、到着直後に試供品の一部を Ge 半導体測定装置 (日本原子力事業、NIGC-1820NPR) で測定した。長半減期の RI は、原液の到着から 60 日以降、測定を繰り返して半減期を求め、核種の決定と定量を行った。測定装置の測定槽は、鉛: 9 cm、ステンレス (SS41): 2 cm、カドミニウム: 0.1 cm、無酸素銅: 0.5 cm、アクリル: 0.5 cm で遮蔽されている。槽内にはラドン、トロン等の浸入を防ぐため Ge 半導体検出器の冷却用液体窒素の揮発分を導入している。標準 γ 線線源として原研製の ^{152}Eu の円盤状密封線源を用いた。

到着 1 日後 Ge 半導体測定装置で 1×10^4 秒測定した γ 線スペクトラムを Fig. 2.1.2-3 に示す。 ^{186}Re の同位体である半減期の短い ^{188}Re が見られる。到着 60 日後から測定して得た主な γ 線の減衰過程を Fig. 2.1.2-4 に示す。 γ 線エネルギーが、316 keV と 468 keV、792 keV と 904 keV は同じ減衰率であることから、前者は、半減期が 74.2 日の ^{192}Ir 、後者は半減期が 38.0 日の ^{184}Re で、1116 keV の γ 線は半減期が 244 日の ^{65}Zn によると考えられる。到着時の ^{186}Re の放射能に対するそれぞれの放射能比は、 ^{188}Re : 0.01 以下、 ^{184}Re と ^{192}Ir : 約 10^{-7} 、 ^{65}Zn : 約 10^{-9} となる。なお、 ^{65}Zn が検出されない試供品もあった。使用時における放射化学的純度は 99% 以上であり、試験製造された ^{186}Re は放射性医薬品として十分利用可能と考えられる。

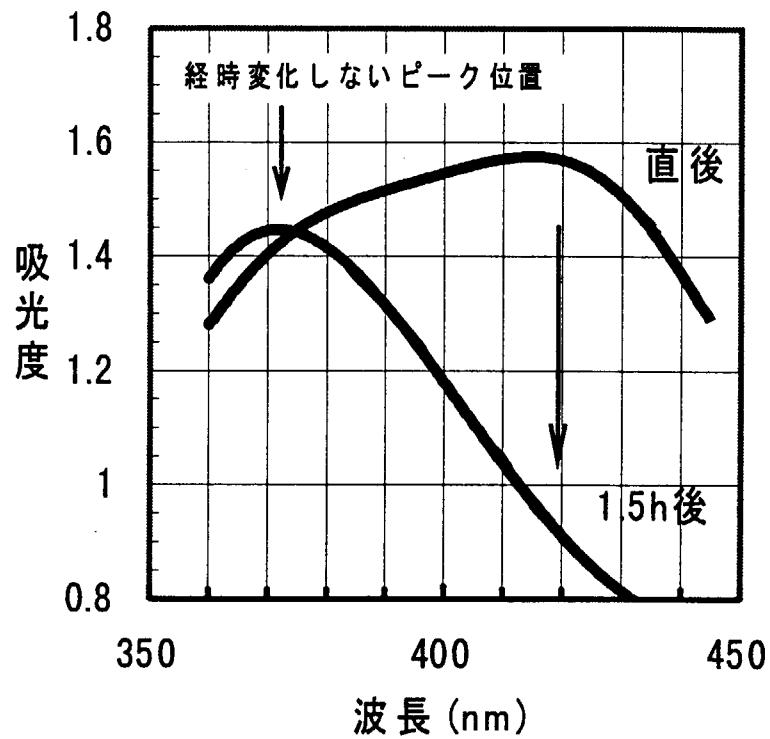


Fig. 2.1.2-1 Change of the absorbance peak of the rhenium complex.

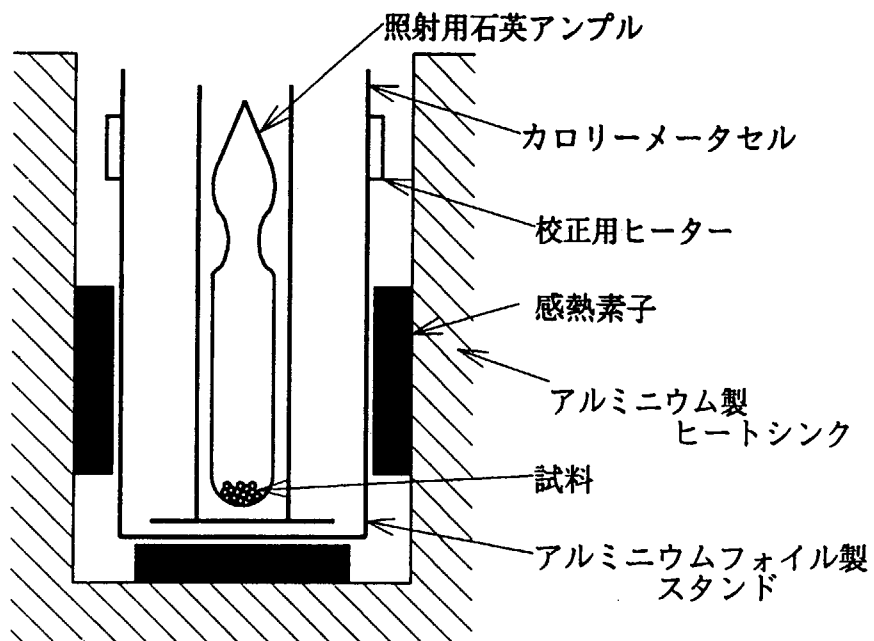


Fig. 2.1.2-2 Cross section of the calorimetric cell with a sample holder assembly.

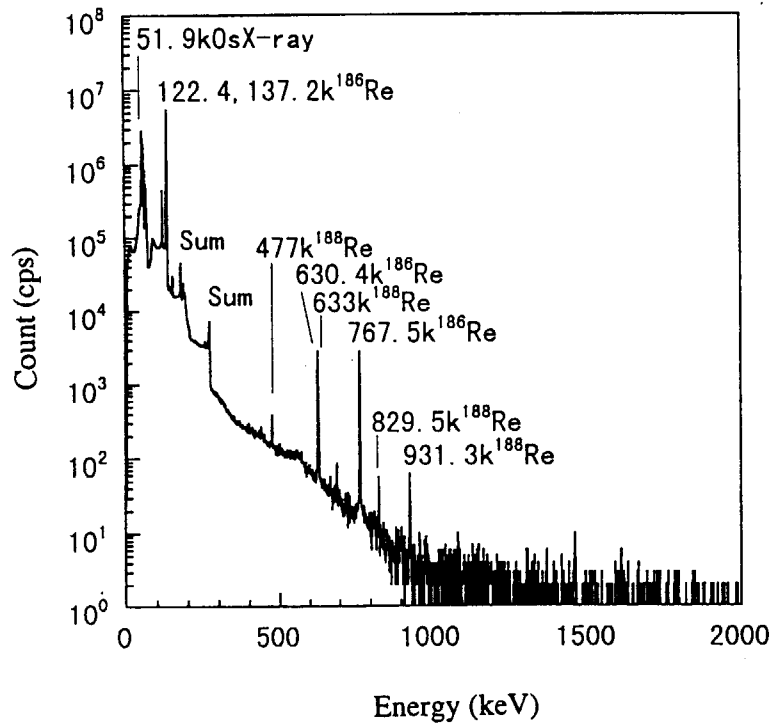


Fig. 2.1.2-3 γ -Ray-spectrum of a ^{186}Re solution produced by JAERI.

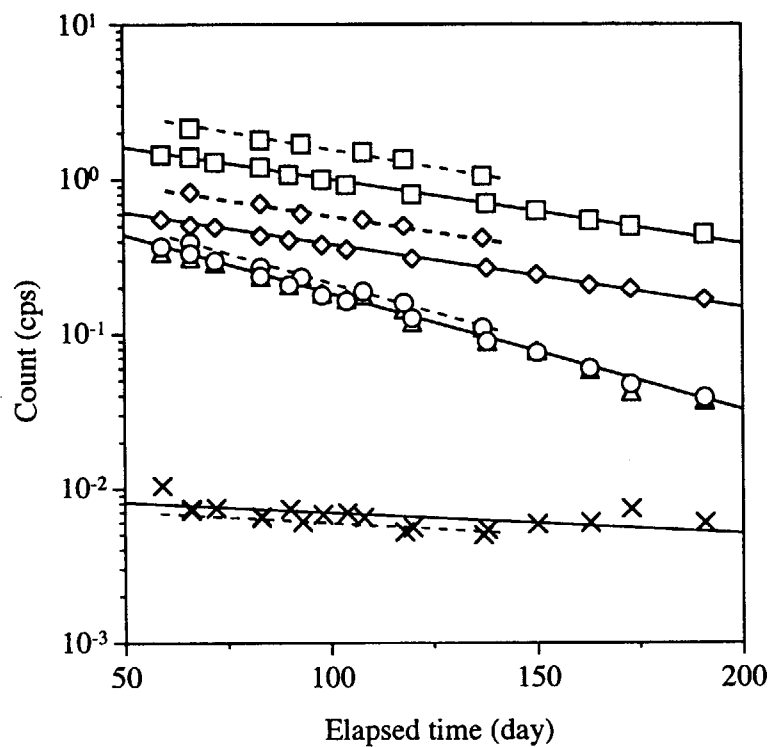


Fig. 2.1.2-4 Decay of γ -rays from a ^{186}Re solution produced by JAERI.

□ 317keV	◇ 468keV	○ 793keV
△ 904keV	× 1116keV	

2.1.3 ^{186}Re の開封、希釈時の手の被曝線量

製品は、マルチドーズバイアル（ペニシリン瓶）またはスクリーキャップ付きVバイアルに入っていた。手の被曝線量の測定は、千代田テクノル(株)の X- γ 線用 ATL リング（ LiBO_4 ）をそれぞれの指先、甲、ひら等に取り付けた。開封、希釈はフードに設置した 5 cm 厚の鉛ブロック内で行った。ペニシリン瓶からピペッタで取り出す様子を Photo 2.1.3-1 に示す。

放射線業務従事者の指先、甲、ひら等の被ばく線量は、すべて 0.1 mSv の検出限界未満であり、胸に着用していたフィルムバッチも検出限界未満を示した。

2.1.4 ^{186}Re 製品の廃棄について

現在、協力研究機関への ^{186}Re の出荷総量約 3 GBq に対し、製造時の取扱量はその 15 ～30 倍であり、残りは液体廃棄になる。この量を少なくするには、ターゲット量（1～5 mg）を減らすことが第一に考えられるが、0.1 mg 以下にすると秤量中に金属レニウムが空気中の水分を吸収するため秤量誤差が増大し、比放射能値への影響が大きくなる。また、石英アンプル開封後、蓋の部分にターゲットが残ると、回収が出来ず高い製造収率が得にくい。このため、出荷後の残留分は放射能が充分無くなるまで減衰を待ってから保管廃棄することとしている。現在、全容量 10～20 ml を貯蔵瓶に収納し、次の製造日まで 2 ～3 ヶ月保管し、水で希釈してからホット廃液設備に送り、廃棄物処理施設で処理している。

放射性物質の使用施設における廃液中又は排水中の濃度限度は、現行の規制によれば ^{186}Re の場合、3 月間についての平均濃度が、 1×10^0 (Bq/cm³)である。使用時の放射能濃度が 0.5 GBq/ml として、製品 1 ml をそのまま廃棄するには、 5×10^8 倍に希釈するか、約 4 ヶ月の保管期間を必要とする。また、 ^{192}Ir 等の不純物は、 ^{186}Re 製品中の $1.5 \times 10^{-4}\%$ 以下であるので、使用時で 7.5×10^2 (Bq/cm³)に相当する。 ^{192}Ir の廃液中又は排水中の濃度限度は、3 月間についての平均濃度が 7×10^{-1} (Bq/cm³)であるから、約 4 ヶ月の保管期間では、 2.4×10^2 (Bq/cm³)になり、 3.5×10^2 cm³ 以上の水で希釈する必要がある。しかしながら、実際には大量の雑水等で希釈され、かつ、使用施設毎に定める液体廃棄物の放出管理基準値等に従って措置するので、1 ヶ月程度の保管廃棄でも差し支えない場合が多いと考えられる。



Photo 2.1.3-1 Handling of ^{186}Re solution.

This is a blank page.

2. 2 加速器を用いた無担体 ^{186}Re の製造^{1), 2)}

(1) はじめに

^{186}Re , ^{166}Ho , ^{153}Sm , ^{111}Ag や $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ ジェネレータのような放射性治療薬剤に適した中性子過剰核種は原子炉で製造されるが、その中で ^{186}Re は加速器によっても製造できる数少ない核種の一つである。原子炉で製造される ^{186}Re の比放射能は $10^{14} \text{ n} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$ の中性子束を用いても約 16 TBq/g・rhenium が限界であるのに対し、加速器によれば実際上無担体で得られる。 ^{186}Re -HEDP や MDP のような骨の疼痛緩和剤を目的とした利用方法では、比放射能は問題とならないが、モノクローナル抗体への標識では ^{186}Re の比放射能が問題となろう。

^{186}Re は半減期 90.64 h で、最大 1.06 MeV の β 線の放出と共に 137.2 keV の γ 線を放出し、安定同位体へと崩壊するので、治療の他に画像による診断にも適している。Table 2.2-1 に、関係する核データ³⁾ を他のレニウム同位体とともに示す。レニウムは、周期律表のマンガン族に属していることから、テクネチウムのような化学的、生理学的挙動が期待される。したがって、 ^{186}Re の無担体製造法の開発は重要である。

我々は、医療用小型サイクロトロンを利用した無担体 ^{186}Re の製造に着目し、 $^{186}\text{W}(\text{p}, \text{n})^{186}\text{Re}$ 反応での製造条件を明らかにすることを目的に本研究を行った。

(2) 実験

ターゲット組成

濃縮 ^{186}W (WO_3) は ISOTEC 社より購入し、励起関数の測定には KOCH Chemical Co. 製のタングステン箔を用いた。Table 2.2-2 にタングステンの天然同位体比と濃縮 ^{186}W の同位体比を示す。濃縮 ^{186}W 中の化学的不純物は、0.05%未満である。

照射

励起関数測定用のターゲットは、28.95 mg/cm² のタングステン箔と一緒に、数種類の厚さのアルミニウム箔および薄い銅箔を重ねた積層ターゲットとした。照射は、原研高崎 AVF サイクロトロン⁴⁾ の 20 MeV の陽子ビームを用いて行った。各タングステン箔への入射エネルギーは、Ziegler の式⁵⁾に基づいて作られた OSCAR コード⁶⁾ を用いて計算した結果から、アルミニウム箔により調節した。照射中の平均ビーム電流は銅箔中に生成した ^{65}Zn の放射能から決定した。照射は、0.1~0.5 μA のビーム電流で 0.5~2 時間行った。

放射エネルギーの測定

各試料の放射能は、HPGe 検出器を用いて γ 線スペクトルから求めた。検出効率は、Amersham 社によって供給された混合 γ 線標準線源を用いて決定した。

製造用ターゲット

$^{186}\text{WO}_3$ は、圧力 680 kg/cm² で 550~735 mg/cm² の厚さに直径 11 mm のディスク状に

成型した。成型したターゲットは、空气中で 24 時間、900°C に加熱した。入射エネルギーを 20 MeV から 13.6 MeV に減少させるためのアルミニウム箔をターゲット前面に置いてアルミニウム製ホルダーに固定した。Fig. 2.2-1 に、ビームライン上のホルダー部及び照射部を示す。サイクロトロン側の真空を Ti 窓 (45 mg/cm²) で保持し、照射は真空外で行った。Ti 窓とターゲットの前面側の冷却は、5~10°C に冷やされたヘリウムガスを流速 30 l/min で循環させて行った。ターゲットの背面側は、流速 20 l/min で 5~10°C の循環水によって冷却した。ビーム電流 5 μ A $\times$ 3 h の最大照射条件において、窓とターゲットの健全性を確認した。Fig. 2.2-2 に、固体ターゲット搬送ラインを示す。ターゲットは、搬送台車によって照射装置とホットセルの間を 35 m 移送され、遠隔的にビームライン上に固定し、脱着した。

化学分離

Fig. 2.2-3 に、¹⁸⁶Re と ¹⁸⁶W の分離方法を示す。¹⁸⁶WO₃ は、98°C の 1 M NaOH 中で溶解した。¹⁸⁶Re の分離は、DIAION-SA100 の樹脂を用いて陰イオン交換法によって行った。樹脂は、直径 10 mm、長さ 5 cm のカラムに充填した。¹⁸⁶Re 溶液をカラムに通じた後、1.5 ml/min の流速で 70 ml の 0.5 M NaOH+0.5 M NaCl を流してタンゲステンを溶離させてから、25 ml の 1.5 M HCl を用いてカラムを洗浄した。Fig. 2.2-4 の溶離曲線に示すように、¹⁸⁶W とともに ¹⁸⁷W と ¹⁸³Ta はカラムから除去され、¹⁸⁶Re は 80 ml の 4 M HNO₃ によってカラムから溶離した。イオン交換分離における ¹⁸⁶Re の放射化学的収率は、90~95% であった。¹⁸⁶Re を含む 4 M HNO₃ 溶液は、乾固近くまで濃縮後、5 ml の H₂O で溶解し、中性溶液になるまでこの操作を繰り返した。最終的に ¹⁸⁶Re 溶液は、引き続き行う標識実験のために 0.9% 食塩水とした。

(3) 結果と考察

¹⁸⁶W(p,n)¹⁸⁶Re 反応の断面積は、Table 2.2-1 の核データと Collé ら⁷⁾によって報告されている ⁶⁵Cu(p,n)⁶⁵Zn 反応の励起関数を用いて、¹⁸⁶Re と ⁶⁵Zn の放射エネルギーから求めた。得られた励起関数の値を Table 2.2-3 に示す。Fig. 2.2-5 は、20 MeV までの ¹⁸⁶W(p,n)¹⁸⁶Re 核反応における実験的な励起関数と理論的な励起関数である。理論的な励起関数は、ALICE コードのハイブリッドモデル⁸⁾を用いて計算した。実験的な励起関数と理論的な励起関数は、ほぼ一致している。

放射性不純物となる ¹⁸⁴Re, ¹⁸³Re, ¹⁸²Re を生成する ¹⁸⁶W, ¹⁸⁴W, ¹⁸³W, ¹⁸²W の(p,xn), 核反応の励起関数を ALICE コードを用いて計算した。結果を Fig. 2.2-6 に示す。¹⁸³Re と ¹⁸²Re は ¹⁸⁴W, ¹⁸³W, ¹⁸²W ターゲット核種から生成するので、高濃縮 ¹⁸⁶W ターゲットを用いるべきである。しかし、¹⁸⁴Re は、¹⁸⁴W 由来の他に ¹⁸⁶W から (p,3n) 反応によって生成される。従って、放射核種的不純物である ¹⁸⁴Re の生成を抑えるために、製造用の濃縮 ¹⁸⁶W ターゲットへの入射エネルギーは、¹⁸⁶W(p,3n)¹⁸⁴Re 反応のしきい値 (16.6 MeV⁹⁾) 以下でなければならない。¹⁸⁶Re のかなり高い生成量が得られ、かつ (p,2n) 反

応による ^{182}Re と ^{183}Re の生成をある程度抑えられる 13.6 MeV を選んだ。実験的に 10 時間までの照射において、照射終了時の不純物を定量した結果、 ^{184}Re (10⁻²%), ^{183}Re (10⁻³%), ^{182}Re (1%) になることがわかった。Fig. 2.2-7 に、実験的な励起関数から計算された ^{186}Re の Thick target yield ^{2),10)}を示す。生成量は、 $^{186}\text{WO}_3$ ターゲットよりもむしろ ^{186}W 金属ターゲットを使用することで 1.6 倍まで高めることが可能である。上述した化学分離方法は、 $^{186}\text{W}(p, \alpha)^{183}\text{Ta}$ 反応で生成した不純物 ^{183}Ta と、二次的中性子による $^{186}\text{W}(n, \gamma)^{187}\text{W}$ 反応で生成した不純物 ^{187}W を含む ^{186}W ターゲットから ^{186}Re を効率良く分離できた。同じ方法が ^{186}W 金属ターゲットにも利用できると思われる。

(4) まとめ

^{186}Re の製造は、ターゲットである酸化タングステンならびに金属タングステンの融点が高いので、病院に通常設置されている小型サイクロトロンを利用して、300 μA のような高電流の陽子ビームによる照射でも充分可能である。この条件で治療に必要な量を製造する場合、 ^{186}W ターゲットを 12 時間照射することが必要である。しかし、将来医療用小型サイクロトロンで 1 mA の照射が可能となれば、照射時間の短縮および生成量の増加が充分期待できる。

参考文献

- 1) Shigeta N., Matsuoka H., Osa A., Koizumi M., Izumo M., Kobayashi K., Hashimoto K., Sekine T. and Lambrecht R. M. : J. Radioanal. Chem., **205**, 85 (1996).
- 2) Ishioka N. S., Sekine T. and Lambrecht R. M. : to be published in J. Radioanal. Chem.
- 3) Lederer C. M. and Shirley V. S. : "Table of Isotopes, 7th Edition", Wiley, New York (1978).
- 4) Arakawa K., Nakamura Y., Yokota W., Nara T., Agematsu T., Okumura S., Ishibori I. and Fukuda M. : "The 14th Int. Conf. On Cyclotron and their Applications, Cape Town, South Africa", World Scientific, Singapore, 57 (1995).
- 5) Hata K. and Baba H.: JAERI-M 88-184, "OSCAR, a code for the calculation of the yield of radioisotopes produced by charged-particle induced nuclear reactions" (1988).
- 6) Ziegler J. F., Biersack J. P. and Littmark U. : "The stopping and range of ions in solids. Volume 1 of the stopping and ranges of ions in matter" Pergamon Press, (1985).
- 7) Collé R., Kishore R. and Cumming J. B. : Phys. Rev. **C14**, 1832 (1976).
- 8) Blann M. : University of Rochester Report C00-3494-29 (1975).

- 9) Keller K. A., Lange J. and Munzel H. : “ Q -values and excitation functions of nuclear reactions”. Springer-Verlag, Berlin (1973).
- 10) Szelecsényi F., Takács S., Tárkányi F., Snock M. and Hermanne A. : “Proc. of the 6th Int. Symp. on the Synthesis and Applications of Isotopes and Isotopically Labeled Compounds, Sep. 14-18, 1997, Philadelphia, Pennsylvania, USA”, John Wiley & Sons, in press.

Table 2.2-1 Decay data of some nuclides relevant to the present work

Radionuclide	Half-life	Decay mode (%branching)	γ -ray energy in keV and abundance (%)	
^{186}Re	90.64 h	β^- 92.2%, EC 7.8%	137.2	9.3%
$^{184\text{m}}\text{Re}$	169 d	EC	921	8.3%
^{184}Re	38.0 d	EC	903	38%
^{183}Re	71.2 d	EC	292	3.2%
^{182}Re	12.7 h	EC 99.8%, β^+ 0.2%	1121	31.8%
	64 h	EC	1121	21.3%
^{187}W	23.9 h	β^-	480	$\approx 21\%$
^{183}Ta	5.1 d	β^-	246	27%
^{65}Zn	224.0 d	EC 98.54%, β^+ 4.16%	1116	50.75%

Table 2.2-2 Isotopic composition of natural and enriched tungsten

Isotope	Natural Composition (%)	Enriched Composition (%)
^{186}W	28.6	99.79
^{184}W	30.67	0.13
^{183}W	14.3	0.04
^{182}W	26.3	0.04
^{181}W	0.13	0.01

Table 2.2-3 Cross sections of proton induced reaction on ^{186}Re

Proton energy (MeV)	Cross section (mb)
5.47	0.213 ± 0.036
7.50	11.9 ± 1.3
8.58	58.3 ± 7.2
9.59	128 ± 13
10.0	66 ± 6
10.8	115 ± 19
11.9	72 ± 20
13.1	54.8 ± 20
15.4	39.5 ± 12
16.2	39.6 ± 4.4
17.0	39.9 ± 4.9
17.9	39.5 ± 5.0
19.0	40.7 ± 8.3
19.8	34.5 ± 8.6

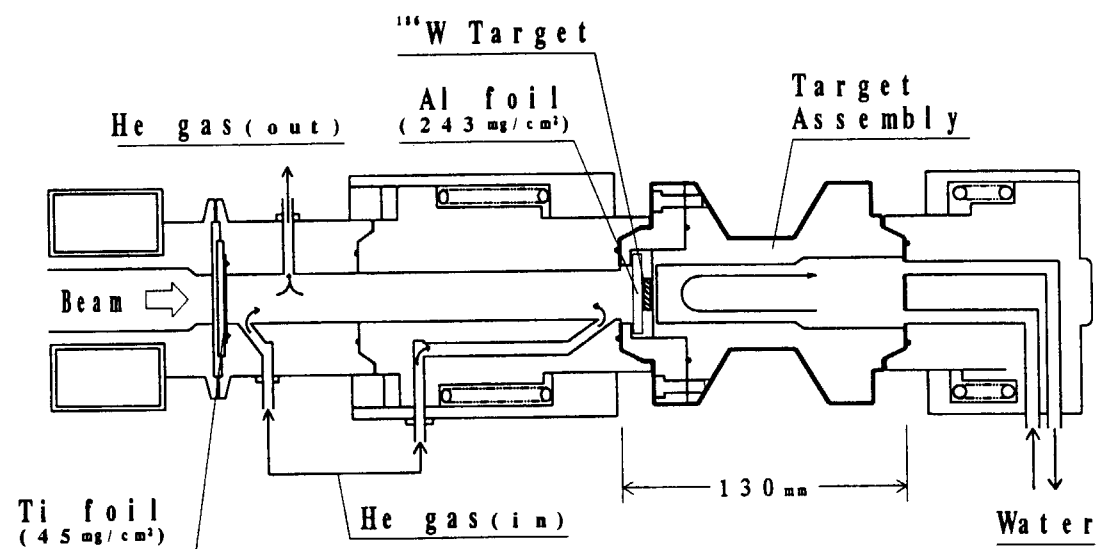


Fig. 2.2-1 Irradiation system for the production of ^{186}Re .

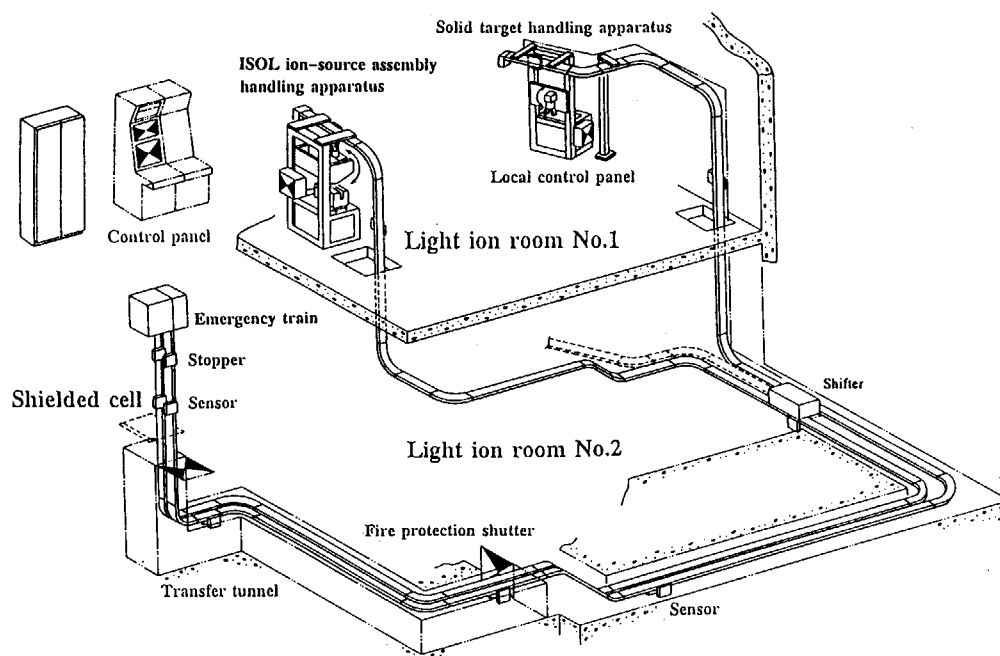
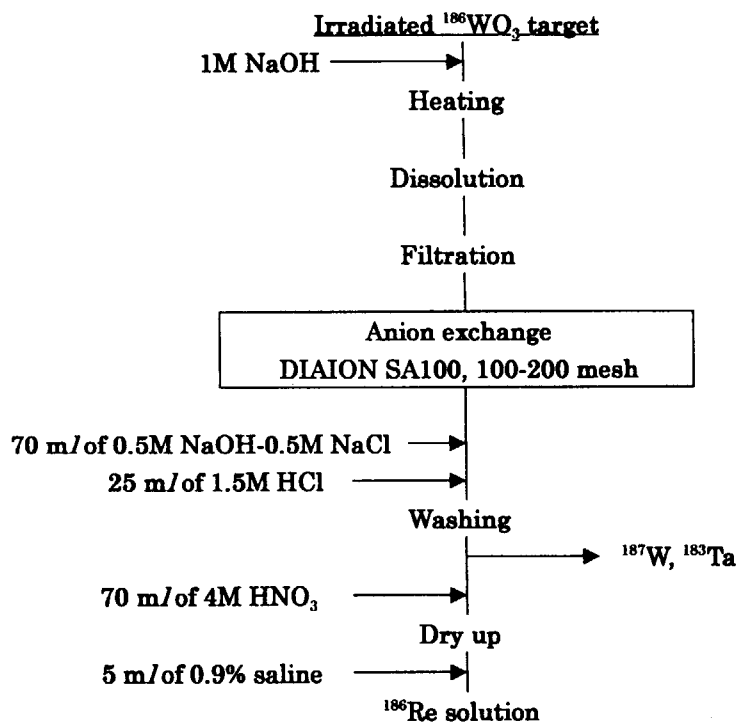
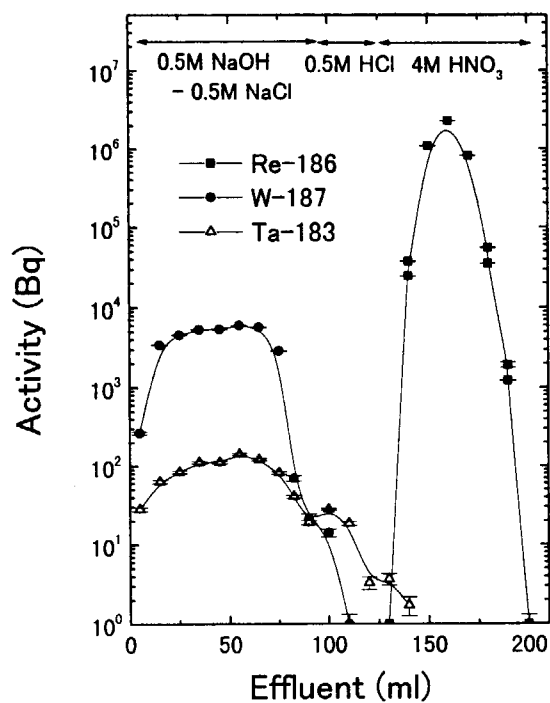


Fig. 2.2-2 Solid-target transfer system between the shielded cell and two ports: the irradiation apparatus and the isotope separator on-line.

Fig. 2.2-3 Chemical procedure of the separation of ^{186}Re from a WO_3 target.Fig. 2.2-4 Elution curve of ^{186}Re in anion exchange.

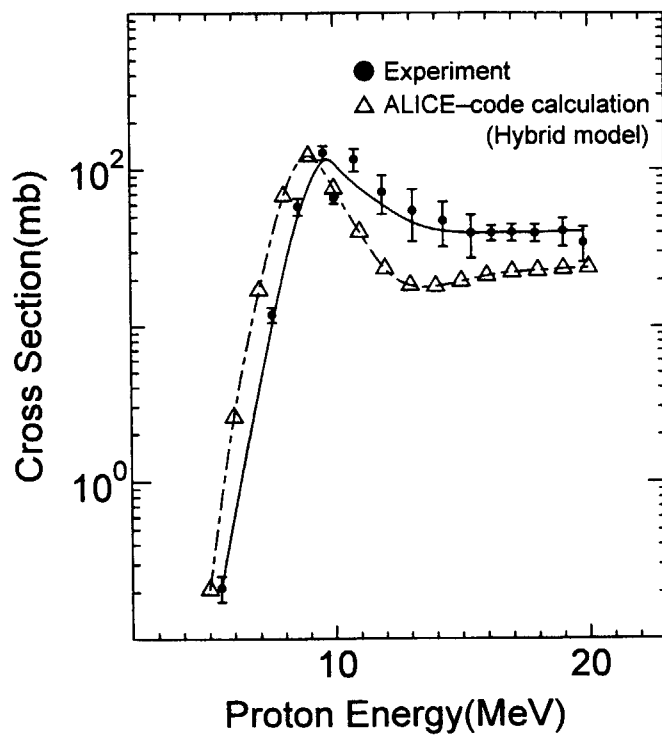


Fig. 2.2-5 Excitation functions for the $^{186}\text{W}(p,n)^{186}\text{Re}$ reaction.

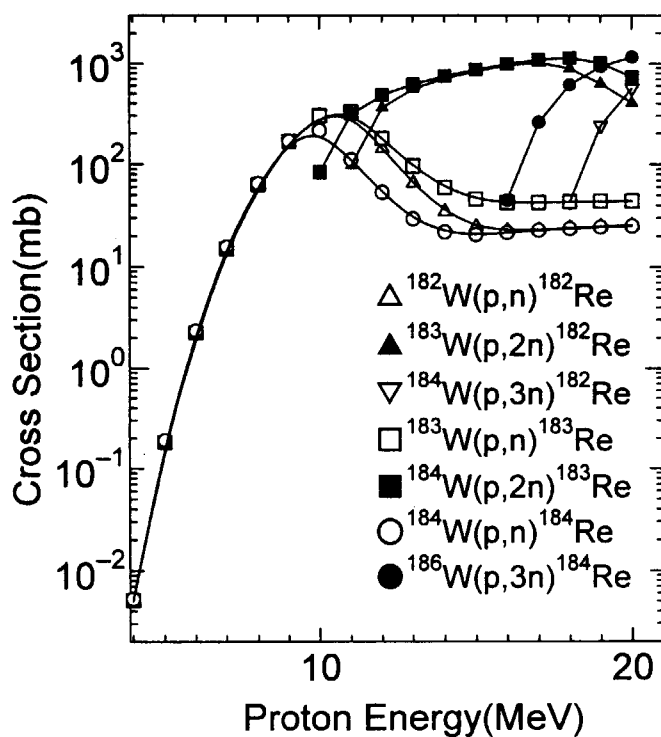


Fig. 2.2-6 Excitation functions calculated by ALICE code for the (p,n), (p,2n) and (p,3n) nuclear reactions on W isotopes.

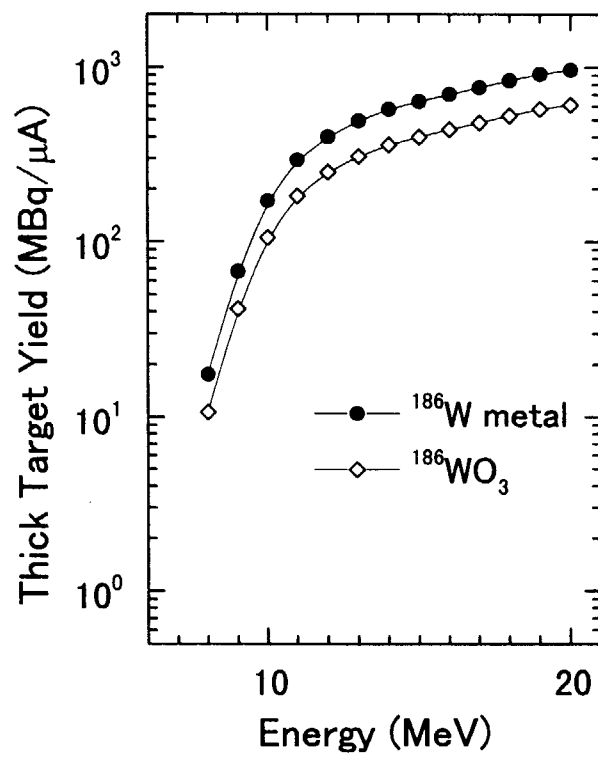
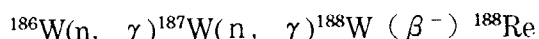


Fig. 2.2-7 Thick target yield for the $^{186}\text{W}(p,n)^{186}\text{Re}$ reaction.

2. 3 $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ ジェネレータによる無担体 ^{188}Re の製造 ¹⁾

(1) ^{188}Re の生成量

$^{187}\text{Re}(n, \gamma)^{188}\text{Re}$ 反応を用いた ^{188}Re の製造では、 ^{187}Re の熱中性子捕獲反応断面積が ^{185}Re の 70 分の 1 と小さいことから ²⁾、 ^{187}Re 安定濃縮同位体を用いても、高い比放射能は期待できない。また、より半減期の長い ^{186}Re が不純物核種として生成するので、 ^{188}Re 製品の放射性核種純度は時間とともに低くなり、定常製造には適さない。そこで、 ^{186}W をターゲットとして、



と表される、熱中性子の二重捕獲反応で無担体 ^{188}Re を製造する方法 ¹⁾ を検討した。ここで、 ^{187}W (半減期: 23.9 時間) ²⁾ 及び ^{188}W (半減期: 69.4 日) ²⁾ は、 β^- 崩壊し ^{187}Re と ^{188}Re になり、後者はさらに β^- 崩壊し ^{188}Os の安定状態になる。娘核種 ^{188}Re は親核種 ^{188}W と比べ半減期が短いので、放射平衡 (過渡平衡) にあると親核種の半減期で崩壊する。したがって、 $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ ジェネレータは、ミルキングにより比較的長期間にわたり ^{188}Re を利用できることが大きな特徴である。

ターゲットは、金属タングステンを用いる方が重量当たりの比放射能は高く好都合な面もあるが、酸やアルカリに溶けにくいとため弗化水素水などを用いることになり、装置の腐食および遠隔取扱いに支障をきたす。そこで三酸化タングステン (Isotec 製、 $^{186}\text{WO}_3$: 99.79%) の安定濃縮同位体をターゲットに用い、照射健全性を保つとともに化学処理を容易にすることとした。

ここで、濃縮 $^{186}\text{WO}_3$ 、1 g あたりの ^{188}W の生成量を求める。 ^{186}W 、 ^{187}W 、 ^{188}W の原子数を N_1 、 N_2 、 N_3 とし、それぞれの熱中性子捕獲反応断面積を σ_1 、 σ_2 、 σ_3 、また、 ^{187}W 、 ^{188}W の崩壊定数を λ_1 、 λ_2 とすると、熱中性子束 ϕ 、照射時間 t において次の微分方程式が成り立つ。 ³⁾

$$dN_1/dt = -N_1 \sigma_1 \phi \text{ ----- 1)}$$

$$dN_2/dt = N_1 \sigma_1 \phi - (\lambda_2 + \sigma_2 \phi) N_2 \text{ ----- 2)}$$

$$dN_3/dt = \lambda_2 N_2 - (\lambda_3 + \sigma_3 \phi) N_3 \text{ ----- 3)}$$

1), 2), 3) を $N_3(t)$ について解くと、

$$N_3 = N_0 \sigma_1 \phi \sigma_2 \phi \left[e^{-\lambda_1 \phi t} / (\lambda_2 + \sigma_2 \phi - \sigma_1 \phi) \{ (\lambda_3 + \sigma_3 \phi) - \sigma_1 \phi \} \right. \\ \left. + e^{-(\lambda_2 + \sigma_2 \phi) t} / \{ \sigma_1 \phi - (\lambda_2 + \sigma_2 \phi) \} \{ (\lambda_3 + \sigma_3 \phi) - (\lambda_2 + \sigma_2 \phi) \} \right. \\ \left. + e^{-(\lambda_3 + \sigma_3 \phi) t} / \{ \sigma_1 \phi - (\lambda_3 + \sigma_3 \phi) \} \{ (\lambda_2 + \sigma_2 \phi) - (\lambda_3 + \sigma_3 \phi) \} \right]$$

で表される。照射直後の ^{188}W の放射能は、 $N_3 \lambda_3$ で与えられる。ただし、 ^{188}W の σ_3 の値が不明であるのでここでは無視し、 $\sigma_1 = 37.8$ 、 $\sigma_2 = 70$ ²⁾ バーンとして計算した。例えば、原研の材料試験炉 JMTR ($2.7 \times 10^{14} \text{ cm}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$) で、1 から 2 サイクル (26 または 52 日) 照射した場合、 $^{188}\text{WO}_3$ の比放射能は、約 16 または 29 GBq/g となる。照射直後は一次生成核種である ^{187}W が殆どを占めるので、安全取扱上、 ^{187}W が減弱するまで 1 ヶ

月程度待ってから製造している。ターゲットの同位体比として、 ^{180}W ($<0.01\%$)、 ^{182}W (0.04%)、 ^{183}W (0.04%)、 ^{184}W (0.04%) が存在するが、 ^{187}W と比べて無視できる。 $^{188}\text{WO}_3$ の比放射能は、原子炉の熱中性子束の二乗に比例するが、原子炉の熱中性子束を高めるには限界がある。そこで、照射時間を ^{188}W の半減期 (69.4 日) の 3 倍程度に延長すると、現在の 2 倍 (60 GBq/g) 以上の比放射能が期待できる。ただし、多量のターゲットを用いた場合には製造コストが高くなる。

(2) ^{188}Re の化学分離

照射後 1 ヶ月以上経過してから照射容器を開封し、石英アンブル (ターゲット約 50 mg) のみを未開封のままガラスバイアルに入れ、予め校正した電離箱 (アロカ製) により放射平衡にある ^{188}W と ^{188}Re の放射能測定から ^{188}W の比放射能 (GBq/g WO_3) を求めた。石英アンブルを切断し、約 2 ml 2 M NaOH を直接加えてターゲットをアンブルから溶解槽に移し、 $2 \sim 3 \text{ ml}$ の水でアンブル内面を洗浄し、全量を溶解槽に回収した。溶解槽を緩やかに加熱して試料を溶解して室温まで冷却した。この化学形は、 NaOH 溶液中でタングステン酸 (Na_2WO_4) と NaReO_4 となっており、この試料を直接利用者に引き渡すことも可能である。この場合、例えば、アルミナカラムを用いた $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ ジェネレータを調製すれば必要な時に ^{188}Re を分離することが出来るので好都合である。

活性化アルミナカラム (Bio-Rad Inc., Al_2O_3 ; 100-200 メッシュ、 $18 \text{ mm I.D.} \times 100 \text{ mm L}$) は、予め 0.01 M HCl で充分コンディショニングした。 $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ 混合溶液に 4 M 塩酸を加えて $\text{pH } 2$ に調整し、アルミナカラムに充填した (吸着能: アルミナ 1 g に対し、 WO_3 0.1 g)。 ^{188}Re は、 0.9% 食塩水 (生理食塩水) を加えることにより W から分離し、過レニウム酸ナトリウム ($\text{Na}^{188}\text{ReO}_4$) の生理食塩水 ($0.9\% \text{ NaCl}$) 溶液として回収した。尚、次回の ^{188}Re の分離は、1 日以上置いて $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ が放射平衡になってから行うが、徐々に回収率は低下する。

^{188}Re 製品の γ 線スペクトル解析から、放射性核種純度は 99% 以上であり、 ^{188}Re の化学形はペーパークロマトグラフィにより、標準試薬 (NH_4ReO_4) と比較し ReO_4^- であることを確認した。製造収率は、約 70% 、製品の放射能濃度は 2 MBq/ml 以上に調整している。

(3) 使用済みアルミナカラムからの濃縮タングステンの回収

ターゲットである安定濃縮同位体は価格が高いため、将来、 ^{188}Re の大量製造を行うためには大量のターゲットを用いることが予想される。そこでターゲットの再利用と廃棄物の低減化を図る目的で、使用済みアルミナカラムから濃縮タングステンを分離・回収する方法を検討した。

最初に、天然の三酸化タングステンを 2 M NaOH に溶解し、これに試験製造した ^{186}Re 及び ^{187}W をトレーサとして $^{187}\text{W}/^{186}\text{Re}$ 模擬ジェネレータ (アルミナカラム) を試

作した。0.9% 食塩水で ^{186}Re を過レニウム酸ナトリウム ($\text{Na}^{186}\text{ReO}_4$) 溶液として溶離する。アルミナカラムに ^{187}W トレーサが吸着していることを確認してから、アルミニウムの混入を避け、 ^{187}W のみを脱離し回収する条件を検討した。種々のアルカリ、鉬酸（塩酸、硫酸など）による試験の結果、3 M NH_4OH と 0.1 M HCl を加える方法または 4 M NaOH 溶液による方法でそれぞれ 90% 及び 99% 以上の ^{187}W を回収できることを確認した。ここでは、後者の方法で回収した Na_2WO_4 溶液に 6 M HCl を加えてタングステン酸 (H_2WO_4) の黄色沈殿を生成させた。沈殿を洗浄・ろ過後、電気炉に入れ 600°C でろ紙ごと加熱して粉末 (WO_3) 試料とした。この試料を原子炉 (JRR-4) で 10 分間照射して得られた γ 線スペクトルを Fig. 2.3-1 に示す。 ^{187}W 以外には NaOH の洗浄不足に起因する ^{24}Na が僅かに残っているが、ターゲットとして充分使用可能であることを確認した。

そこで、調製後 2 年経過した実規模の使用済みアルミナカラムからタングステンを回収してその純度を調べた。その結果、極く微量ではあるが半減期の長い $^{110\text{m}}\text{Ag}$ 、 ^{144}Ce 、 ^{152}Eu が不純物核種として存在することが分かった。これらは、ターゲット中の不純物で $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ ジェネレータから ^{188}Re を溶離する際に一緒に溶離されず、アルミナカラムに残ったものである。したがって、回収したタングステンを再照射し、 $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ ジェネレータを再度調製した場合、これらの不純物はアルミナカラムに残り、 ^{188}Re 製品の放射性核種純度として 99% 以上を確保できるものと考えられる。

参考文献

- 1) 小林 勝利、本石 章司、照沼久寿男、第 33 回 理工学における同位元素研究発表会要旨集 10p-I-3(1996)
- 2) 村上悠紀雄、團野皓文、小林昌敏：“放射線データブック” 地人書館、東京 (1982)
- 3) Friedlander G., Kennedy J. W.: “Nuclear and Radiochemistry”, John Wiley & Sons, Inc. 132 (1955)
- 4) 日本原子力研究所 「放射線利用研究の現状」放射線照射利用とラジオアイソトープの製造・利用 1993年 (38p), 1994年 (57p), 1995年 (45p), 1997年 (44p)

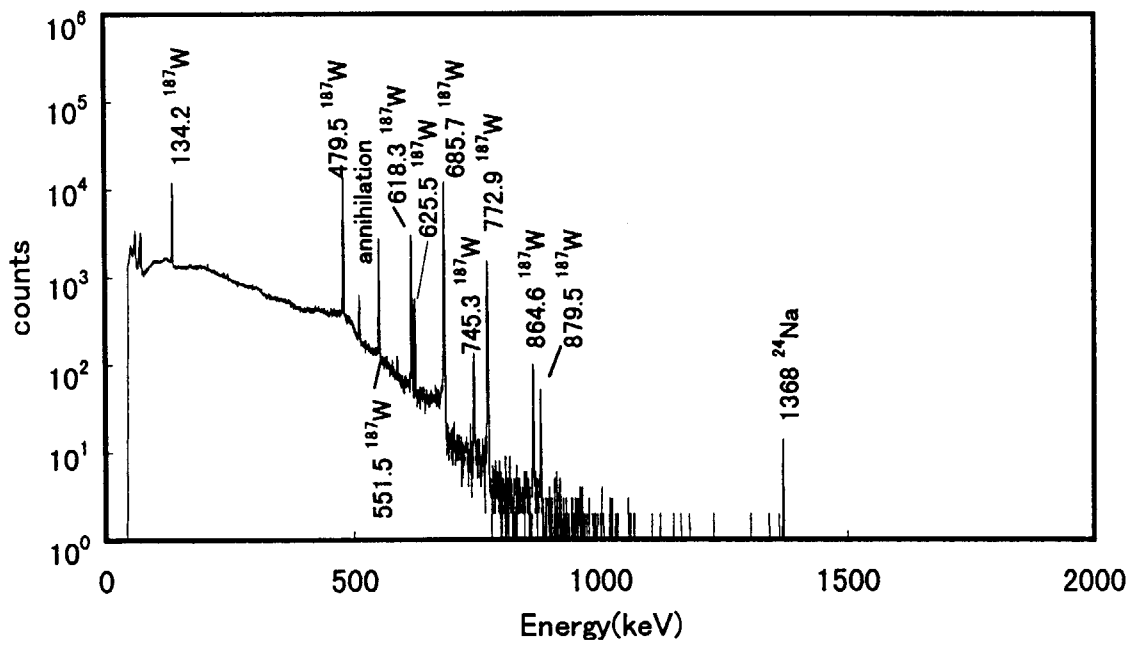


Fig. 2.3-1 Gamma-ray spectrum of a neutron irradiated sample of the tungsten oxide that was recovered from a $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ generator.

2. 4 チェレンコフ計測法を用いた ^{186}Re 、 ^{188}Re の放射能測定 ¹⁾

(1) はじめに

チェレンコフ計測法は比較的高エネルギーの β 放出体の放射能測定に適しているが、今回、本手法を ^{186}Re および ^{188}Re についてその放射能計測の可能性を調べ、同時に各種パラメータの影響についても検討した。

^{186}Re は半減期 90.64 d で、最大 1.069 MeV の β^- 線と 137 keV の γ 線を放出する放射性核種であり、一方 ^{188}Re は半減期 16.98 h で最大 2.120 MeV の β^- 線、155 keV の γ 線を放出する。したがって両者の中では β 線のエネルギーが高い ^{188}Re の方がこの手法により適していると考えられるので、始めにまず ^{188}Re について測定実験を行った。その後、 β 線のエネルギーが約半分の ^{186}Re についても検討した。

Fig. 2-4-1 にチェレンコフ光発生原理を示す。チェレンコフ計測法とは、高エネルギー β 線（理論的には水中で 0.263 MeV 以上、実用的には約 1 MeV 以上）により水などの媒質中で発生する光すなわちチェレンコフ光を観測することによりその放射能強度を定量するもので、従来 ^{32}P などいくつかの RI の測定に利用されてきた。ここでは放射性 Re に対するチェレンコフ計測実験について、以下に ^{188}Re を用いた実験結果を中心に報告する。

(2) 実験

使用した ^{188}Re は、 ^{186}W の原子炉照射によって製造した MBq レベルの $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ ジェネレータから必要の度に溶離して用いた。また ^{186}Re （化学形は ReO_4^- ）は ^{186}Re の原子炉照射により製造し、水溶液を適宜希釈して適当量を測定バイアル中の純水に加え、標準条件および各種の異なる条件でチェレンコフ光を計測した。

^{186}Re および ^{188}Re の母液の放射能値は、別途校正された γ 線スペクトロメータにより、あるいは 4π β ・ γ 同時計数法により求め、減衰補正を施してチェレンコフ計測における計数効率を求めた。

チェレンコフ光の測定には標準的液体シンチレーション計数装置 Packard Tri-carb B3255 を使用した。測定の際はすべてトリチウム測定用ウィンドウを用いた。

試料バイアルは 20 ml のプラスチック（ポリプロピレン）あるいはガラスバイアルを使用した。

始めにチェレンコフ測定の基本的特性、すなわち試料容量および試料容器（バイアル）の影響を調べ、次に基本条件における検量線を作成し、その直線性を調べた。さらに測定に影響を及ぼす様々なパラメータについて検討した。

(3) 結果と考察

試料体積

まず一定の放射能を持つ ^{188}Re 溶液を適当量の水に希釈して測定したときの、計数効率と試

料量の総体積との関係を調べた。その結果、Fig. 2.4-2 に示すように、計数効率は始め体積と共に徐々に増加し、5 ml 程から一定になることが分かった。以下、本実験では 10 ml を標準体積として測定を行った。

試料容器

液シン用試料容器としては通常ガラスバイアルあるいはプラスチックバイアルが用いられる。 ^{40}K の影響を避け、低いバックグラウンドを得るためにはプラスチックバイアルの方が適している。一方チェレンコフ計測においては水を溶媒とするのでそのどちらを用いても構わないが、発生するチェレンコフ光には方向性があるため、その散乱効果によってプラスチックバイアルの方が計数効率が低いことが分かった（下表参照）。

表 バイアルの種類による計数効率の比較

バイアルタイプ	体積/ml	計数効率/%	ブランク/cpm	Figure-of-merit
ガラス	10	54.3	20	147.4
プラスチック	10	58.2	12	282.3

$$\text{Figure-of-merit} = (\text{計数効率})^2 / \text{ブランクの計数率}$$

検量線

Fig. 2.4-3 に示すように、標準条件のチェレンコフ測定で約 1×10^5 Bq 程度までの ^{188}Re について非常に直線性のよい検量線が得られた。

波長変換剤

液シン測定において、蛍光の波長を長波長側に変換する物質（波長変換剤）を加えて計数効率を上げる工夫がなされることがある。本実験では ANDA（7-アミノ-1,3 ナフタレンジスルホン酸ナトリウムまたはカリウム）および PPO（2,5-ジフェニルオキサゾール）を加えて計数効率を比較してみた。その結果、ガラスバイアル使用時には波長変換剤の添加により、Fig. 2.4-4 に示すように、数%程度計数効率の増加が見られた。しかしプラスチックバイアルの場合にはむしろ減少傾向であった（Fig. 2.4-5）。いずれにしても波長変換剤を用いる大きな利点はないと言える。

懸濁物質

懸濁物質の混入による計数効率の変化を、溶媒の水に市販のミルク（牛乳）を加えることにより調べた。Fig. 2.4-6 に示すように、一般に懸濁度の増加にしたがって計数効率は減少するが、ガラスバイアルの場合は始め若干計数効率が増加した。これは微量の懸濁物質によるチェレンコフ光の散乱効果がプラスの効果を示したためと思われる。

液体シンチレーションとの比較

通常の液シン法として市販の液シン用カクテル、アクアゾルⅡと PPO/トルエンを使った測定をチェレンコフ計測法と比較した（Fig. 2.4-7）。その結果液シン法の方が 20%程計数効率が高かった。これは当然の結果であって、むしろチェレンコフ法が十分高い計数効率を持つ

ことを示している。

その他

チェレンコフ計測に影響を及ぼすその他の因子として、色クエンチング、溶媒の違い（水の他にエタノール、食塩水、アセトンなど）、液性等についても実験的に検討し影響を評価した。

^{186}Re のチェレンコフ計測

^{186}Re のチェレンコフ計測は ^{188}Re に比べてその β 線のエネルギーが約半分のため、チェレンコフ計測における計数効率 は約 19% と、 ^{188}Re のそれに比べて約三分の一であった。各種パラメータの影響は基本的に ^{188}Re の場合と同じような傾向を示した。

このように ^{186}Re の場合は計数効率が若干低いものの、実用的には十分であり、本手法の有効性は失われるものではない。

(4) 結論

チェレンコフ計測法による ^{186}Re および ^{188}Re の放射能計測は簡便であり、RI を水に加えるだけで測定試料とすることができるため有機溶媒を用いることなく、測定試料の完全回収・再利用も可能である。また RI の減衰後は排水として廃棄することができるなど多くの利点を有している。したがって医学利用の場、あるいはその基礎的研究などにおける簡便な放射能測定法として有効な手法と考えられる。

参考文献

- (1) Kushita K.N. and Du J., *Apl. Radiat. Isot.*, (1998) in press.

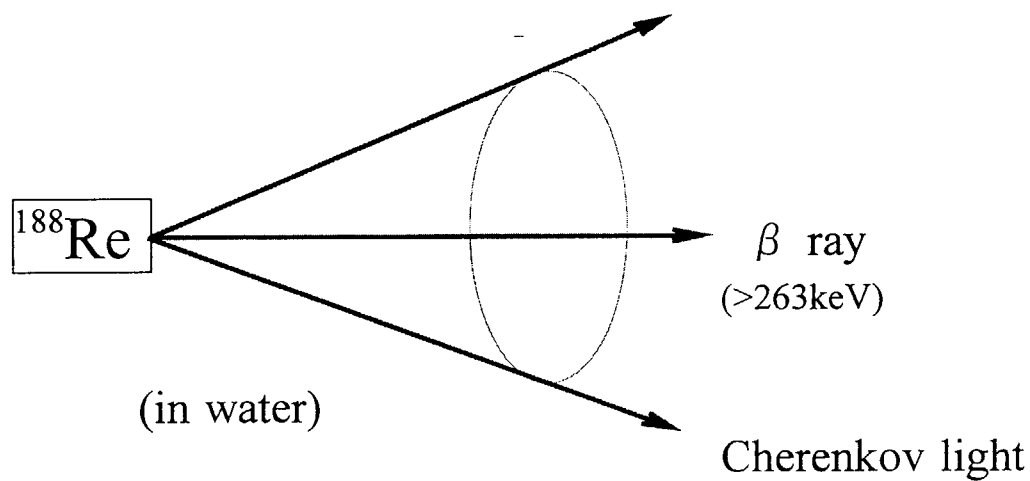
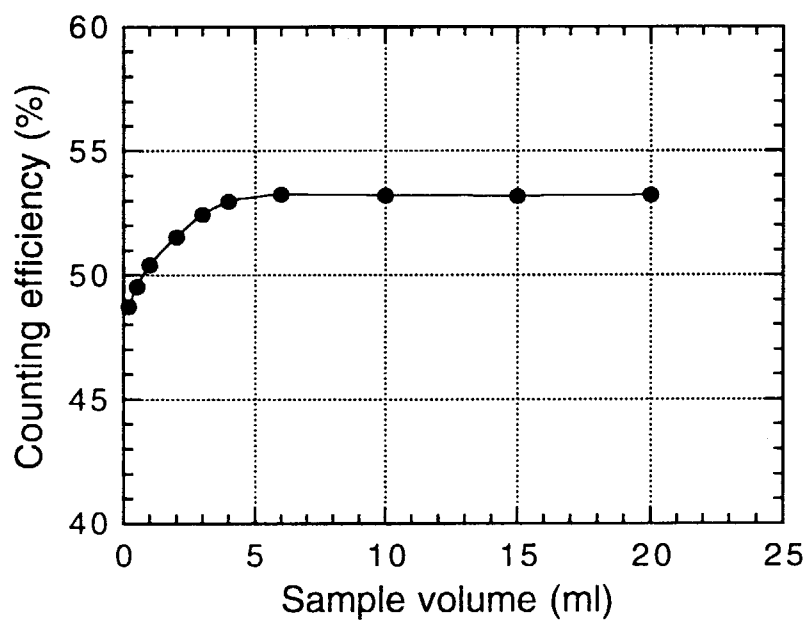
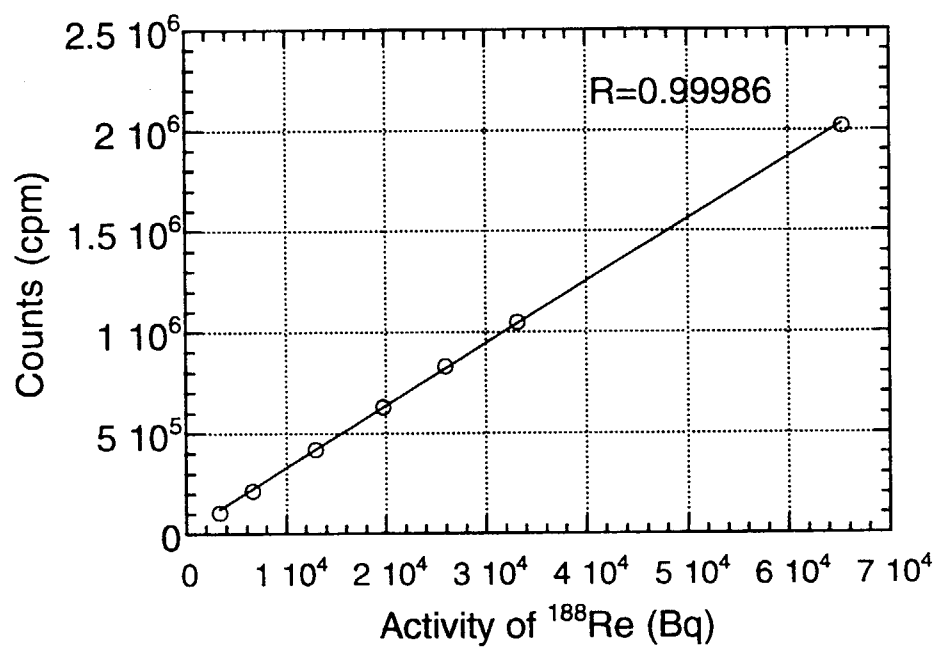
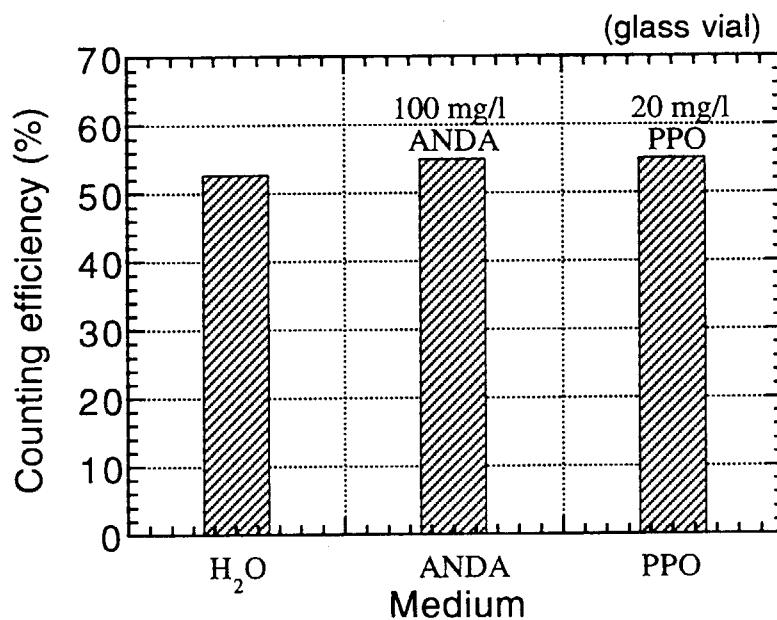


Fig. 2.4-1 Principle of Cherenkov light emission.

Fig. 2.4-2 Volume effect on the Cherenkov counting of ^{188}Re in water with a glass vial.

Fig. 2.4-3 Calibration curve of ^{188}Re in water.Fig. 2.4-4 Comparison of counting efficiencies for ^{188}Re with and without wavelength shifter (glass vial).

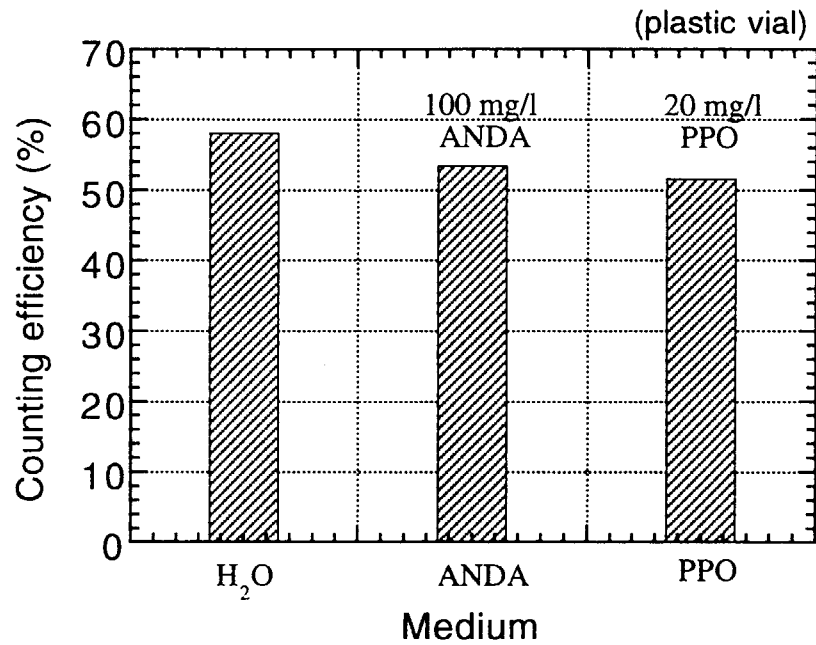


Fig. 2.4-5 Comparison of counting efficiencies of ^{188}Re with and without wavelength shifter (plastic vial).

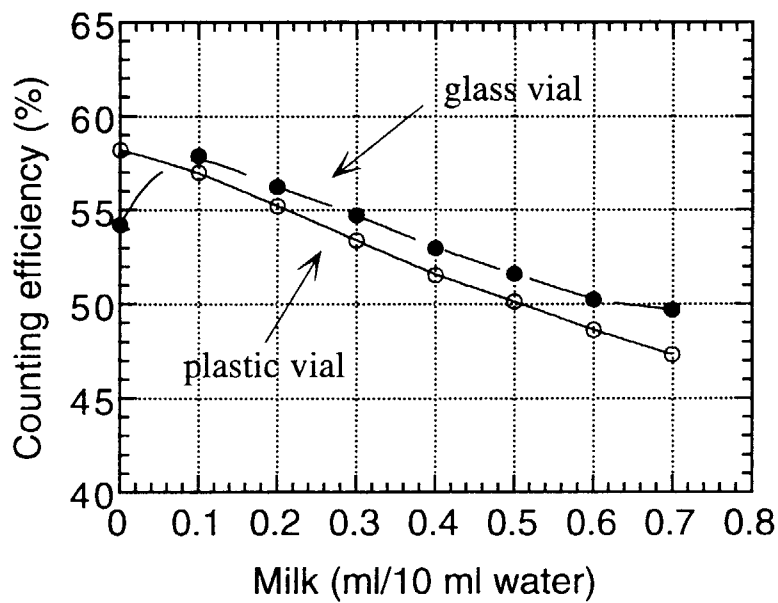


Fig. 2.4-6 Effect of turbidity on the Cherenkov counting of ^{188}Re in water.

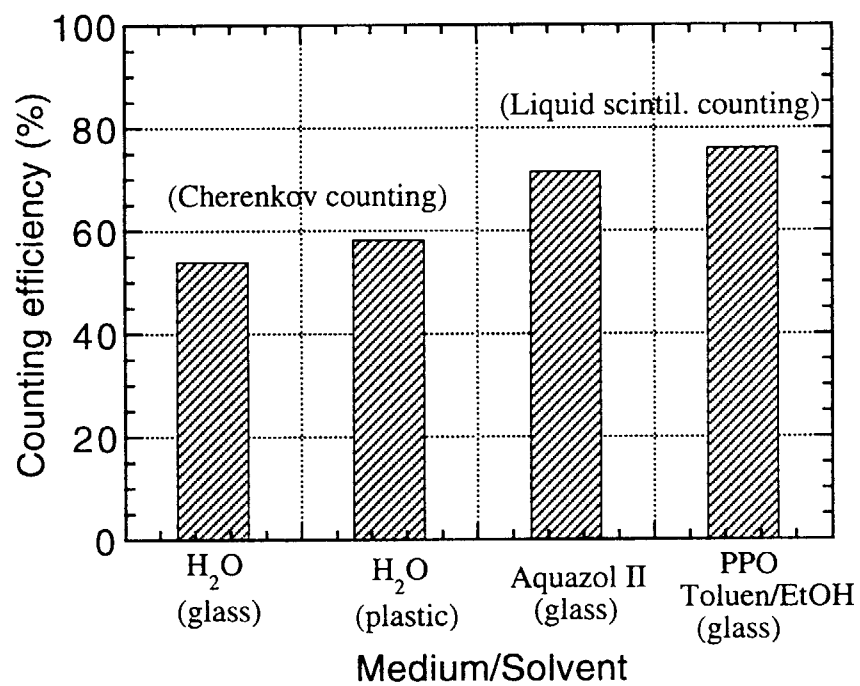


Fig. 2.4-7 Comparison of counting efficiencies of ^{188}Re by Cherenkov counting and liquid scintillation counting.

3. レニウム標識化合物の合成及び体内動態の研究

3. 1 原子炉製 ^{186}Re を用いた研究

3.1.1 HEDP

(1) HEDP の ^{186}Re 標識とマウス体内動態の検討*

1) 緒言

乳癌、前立腺癌、肺癌の多くは激しい痛みの骨転移を引き起こし患者の"Quality of Life"を大きく損なう。放射線の外部照射はこうした癌性疼痛の緩和に有効であるが、転移巣が全身に存在する場合この処置は限定される。一方、methylenediphosphonate (MDP), 1-hydroxymethylene-1,1-diphosphonate (HMDP) などの $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -リン酸錯体は骨転移巣への高い集積を示すことから、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ と似た化学的性質を有し、高エネルギーの β^- 線を放出する ^{186}Re -リン酸錯体の投与による疼痛緩和が期待され、 ^{186}Re 標識 1-hydroxyethylidene-1,1-diphosphonate (HEDP) の臨床研究が行われてきた。初期の臨床研究から、本薬剤 1300 MBq (35 mCi) の投与は癌性疼痛緩和に有効と報告されている。

^{186}Re は 1.07 MeV の β^- 線の他に 137 keV の γ 線を放出し、この γ 線は画像解析による腫瘍組織と骨髄への照射線量の測定に有用であるが、患者あるいは患者の周辺の人間に重篤な放射線障害を与えることはない。また ^{186}Re の半減期は 3.8 日であり、これは医薬品の製造、輸送に適するが、廃棄が問題になるほど長くはない。

^{186}Re は ^{185}Re (n, γ) ^{186}Re で製造されるため ^{186}Re の比放射能はジェネレーターから溶出される $^{99\text{m}}\text{Tc}$ のそれと比べて遥かに低い。一方 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HEDP は多核錯体であり、その生成は金属濃度の影響を強く受ける。従って ^{186}Re -HEDP の合成においても、使用する ^{186}Re の濃度、さらには ^{186}Re 溶液に極微量に混在する金属イオンの種類、濃度が ^{186}Re -HEDP の合成反応に大きな影響を及ぼすと考えられる。

日本原子力研究所より供給された ^{186}Re を用いる ^{186}Re -HEDP 錯体の合成について、その至適条件を探究した。また、 ^{186}Re -HEDP を実験動物に投与した場合の体内放射能分布を $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMDP, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HEDP のそれと比較し、 ^{186}Re -HEDP の臨床応用性についても評価した。

2) 標識法

$^{186}\text{ReO}_4^-$ (11-16.9 TBq/g Re, 0.31-0.46 GBq/ml) は原研より水溶液 (pH 3.4-4.1) として供給され、直接あるいは生理食塩水で希釈して使用した。1-Hydroxyethylidene-1,1-diphosphonate (HEDP) は岸田化学より、2,5-dihydroxybenzoic acid (gentisic acid)、塩化第一スズ (SnCl_2) は和光純薬よりそれぞれ購入し、そのまま使用した。 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMDP は日本メジフィジック社クリアボーンキットを用いて作製した。

* 本論文は、Radioisotopes, 44, 514(1995) に掲載されたものを、日本アイソトープ協会の許可を得て転載したものである。

2)-1 ^{186}Re の HEDP 標識反応の検討

^{186}Re と HEDP との錯形成反応は反応 pH、HEDP 濃度、還元剤として使用する SnCl_2 濃度などが大きな影響を及ぼすことから、これらのパラメーターの至適条件を探究した。なお予備検討から ^{186}Re の標識反応には室温における長時間の反応あるいは沸騰水浴中での反応が必要とされたので、以下の検討では沸騰水浴中で 20 分間反応を行った。

^{186}Re -HEDP の合成に及ぼす反応 pH の影響を検討する目的で、 $[\text{HEDP}]=80.4 \text{ mM}$, $[\text{SnCl}_2]=26.8 \text{ mM}$ を含む種々の pH (1.0, 3.0, 4.5, 6.0) の溶液 $100 \mu\text{l}$ に $^{186}\text{ReO}_4^-$ $100 \mu\text{l}$ ($1.2 \times 10^{-5} \text{ M}$) を加え、沸騰水浴中で 20 分間加熱した。なお、すべての反応において HEDP, SnCl_2 溶液は窒素雰囲気中で調製した。 ^{186}Re -HEDP の放射化学的収率はセルロースアセテート膜電気泳動法 (CAE)、薄層クロマトグラフィー (TLC)、濾紙クロマトグラフィー (PC) を用いて測定した。CAE は常光産業の Separax を使用し、ペロナル緩衝液 (pH 8.6, $I=0.05$), 0.8 mA/cm で 20 分間泳動した。TLC は Merck 社 Art 5553 を用いアセトンを展開溶媒として行った。また PC は Advantec Toyo 社の No. 50 濾紙を使用し生理食塩水を溶媒とした。CAE では ^{186}Re -HEDP, $^{186}\text{ReO}_2$, $^{186}\text{ReO}_4^-$ はそれぞれ陰極側 1.8 cm , 原点、陰極側 2.8 cm に、TLC では ^{186}Re -HEDP, $^{186}\text{ReO}_2$ は原点、 $^{186}\text{ReO}_4^-$ は $R_f=1.0$ に、PC では ^{186}Re -HEDP, $^{186}\text{ReO}_4^-$, $^{186}\text{ReO}_2$ はそれぞれ $R_f=0.7, 1.0, 0$ に観察された。

次いで還元剤である SnCl_2 濃度の影響を検討するため、反応 pH 3.0 において、種々の HEDP 濃度 (80.4, 40.2, 20.1, 10.1 mM)、HEDP と SnCl_2 の濃度比 ($[\text{HEDP}]/[\text{SnCl}_2]=2.1, 3.0, 4.0$) の溶液 $100 \mu\text{l}$ に $^{186}\text{ReO}_4^-$ $100 \mu\text{l}$ ($1.2 \times 10^{-5} \text{ M}$) を加え、沸騰水浴中で 20 分間加熱し、 ^{186}Re -HEDP の放射化学的収率を求めた。

更に、酸化防止剤である gentisic acid 添加の影響を検討するため、反応 pH 3.0, $[\text{HEDP}]/[\text{SnCl}_2]=2.1$ において種々の濃度の HEDP (80.4, 40.2, 20.1, 10.1 mM), gentisic acid (0, 1.5, 7.5, 15, 30 mM) を含む溶液 $100 \mu\text{l}$ に $^{186}\text{ReO}_4^-$ $100 \mu\text{l}$ ($1.2 \times 10^{-5} \text{ M}$) を加え、沸騰水浴中で 20 分間加熱し、 ^{186}Re -HEDP の放射化学的収率を求めた。

2)-2 ^{186}Re -HEDP の安定性の検討

95 % O_2 /5 % CO_2 で予め飽和したリン酸緩衝液 (0.1 M, pH 7.0) 4 ml に ^{186}Re -HEDP 1 ml を加え、 37°C でインキュベートした。混和 1, 3, 6, 24 時間後に溶液中に残存する ^{186}Re -HEDP の割合を CAE, TLC で求めた。また Subramanian らの方法¹⁾に従い、 ^{186}Re -HEDP と同じ濃度の HEDP を含む $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HEDP を作製し、同様の実験を行った。

2)-3 実験動物における放射能分布

^{186}Re -HEDP を窒素置換した酢酸緩衝液 (0.1 M, pH 5.0) で 5 倍に希釈した後、ddY 系雄性マウス (6 週令) に投与した。一群 5 匹のマウスを用い、投与してから 10, 30 分、1, 3, 6, 24 時間後に屠殺、解剖し、血液及び主たる組織の重量、放射能を測定した。同様の実験を $^{186}\text{ReO}_4^-$, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HEDP, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMDP についても行った。

3) 結果

反応 pH を 1 から 6 まで変化させた場合に生成した ^{186}Re -HEDP の放射化学的収率を Fig. 3.1.1(1)-1 に示す。 ^{186}Re -HEDP の生成収率は反応 pH の影響を大きく受け、pH 1 及び 3 では 90% 以上の放射化学的収率を示した。しかし、それ以上の pH では収率が低下したため、反応 pH を 3 として、以下の検討を行った。

Fig. 3.1.1(1)-2 には反応 pH 3 で $[\text{HEDP}]/[\text{SnCl}_2]$ を変化させた場合の ^{186}Re -HEDP の放射化学的収率の変化を示す。幅広い HEDP 濃度 ($[\text{HEDP}] = 80.4 \text{ mM}$ から 10.1 mM) において $[\text{HEDP}]/[\text{SnCl}_2]$ が 2.1 のとき最も高い放射化学的収率で ^{186}Re -HEDP を与えたことから $[\text{HEDP}]/[\text{SnCl}_2]$ を 2.1 とした。

^{186}Re -HEDP の放射化学的収率に及ぼす酸化防止剤 gentisic acid 濃度の影響を Fig. 3.1.1(1)-3 に示す。HEDP 濃度が高い場合には gentisic acid による影響は観察されなかったが、HEDP 濃度が低いときには gentisic acid 濃度の増加に伴い ^{186}Re -HEDP の生成収率が顕著に増加した。しかし HEDP 濃度が 10.1 mM の場合、 30 mM の gentisic acid を使用すると ^{186}Re -HEDP の生成が減少したことから、gentisic acid 濃度は 15 mM が最適と考えた。

反応 pH 3.0, $[\text{HEDP}]/[\text{SnCl}_2] = 2.1$, $[\text{gentisic acid}] = 15 \text{ mM}$, $[\text{HEDP}] = 40.2 \text{ mM}$ において 95% 以上の放射化学的収率で ^{186}Re -HEDP が再現性良く得られたので、この反応条件に従い HEDP-Sn キットを Table 3.1.1(1)-1 に示す方法で作製した。

次いで、種々の量の HEDP-Sn キットに異なる放射能濃度の $^{186}\text{ReO}_4^-$ 溶液 $200 \mu\text{l}$ を加え、沸騰水浴中で 20 分間反応後、 ^{186}Re -HEDP の放射化学的収率を求めた。その結果を Table 3.1.1(1)-2 に示す。2 mg 以上のキットを用いた場合、9.25 から 92.5 MBq (0.25 mCi から 2.48 mCi) の $^{186}\text{ReO}_4^-$ により 95% 以上の放射化学的収率で再現性良く ^{186}Re -HEDP を得られた。

Fig. 3.1.1(1)-4 には、2 mg の HEDP-Sn キットで作製した ^{186}Re -HEDP、同じ濃度の HEDP を有する $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HEDP を 95% $\text{O}_2/5\% \text{CO}_2$ で飽和したリン酸緩衝液中 37°C でインキュベートした場合の放射化学的純度の経時変化を示す。 ^{186}Re -HEDP は経時的な錯体の分解を示し、24 時間後では約 30% が ^{186}Re -HEDP として残存するのみで、残りは $^{186}\text{ReO}_4^-$ へと再酸化された。一方 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HEDP では 24 時間後まで錯体の分解は見られなかった。

Table 3.1.1(1)-3, 4 にはそれぞれ ^{186}Re -HEDP, $^{186}\text{ReO}_4^-$ を ddY 系雄性マウスに投与した場合の体内放射能分布の経時変化を示す。 ^{186}Re -HEDP は投与後速やかな骨への集積と全身からの放射能の排泄を示し、投与 24 時間後では、全投与量の 48%, 8% がそれぞれ尿と糞便中に排泄された。一方 $^{186}\text{ReO}_4^-$ は血液からの放射能消失が遅く、また胃への高い集積が観察された。

Fig. 3.1.1(1)-5 は ^{186}Re -HEDP, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HEDP, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMDP をマウスに投与した場合の放射能分布の経時変化を示す。 ^{186}Re -HEDP 投与後の骨への放射能集積は $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HEDP,

^{99m}Tc -HMDP と同程度であった。また、 ^{186}Re -HEDP の体内挙動は ^{99m}Tc -HEDP, ^{99m}Tc -HMDP のそれと極めて類似していたが、両 ^{99m}Tc 錯体に比べて ^{186}Re -HEDP は血液クリアランスがやや遅く、また胃への放射能集積を示した。

4) 考察

^{186}Re は $^{185}\text{Re}(n, \gamma)^{186}\text{Re}$ 反応から得られるため、 ^{99m}Tc に比べて ^{186}Re 溶液には高濃度のキャリアー Re を含む。キャリアーの存在は ^{186}Re と HEDP との錯形成反応に大きな影響を及ぼし、 ^{99m}Tc に比べて高濃度の還元剤、配位子(HEDP)が必要とされる。HEDP は現在、異所性骨化、骨ページェット病の治療薬剤として臨床使用されており、異所性骨化の抑制には一日最大 1000 mg まで経口投与される。本薬剤の経口投与による吸収量は 20 mg/kg body weight の投与では $6.4 \pm 2.4\%$ であり、本薬剤の副作用である高リン酸化血症は 5mg/kg/day の経口投与では起こらないが 10 mg/kg/day 以上では誘発されると報告されている。これを 70 kg の人に換算すると投与量はそれぞれ 350 mg, 700 mg となり、その 6% が吸収されると考えると吸収量は 21 mg, 42 mg となる。一方、Maxon らは、骨転移に伴う疼痛緩和に 1110 - 2220 MBq (30 - 60 mCi) の ^{186}Re -HEDP の投与で疼痛緩和効果を認めている。以上より、簡便な標識操作かつ高い放射化学的収率で 1110 MBq (30 mCi) の ^{186}Re -HEDP を 20 mg 以下の HEDP で作製可能なキットの開発を目的として検討を行った。

^{186}Re と HEDP との錯形成反応には、反応 pH、温度、HEDP 濃度、還元剤として使用する SnCl_2 濃度、さらには酸化防止剤としての gentisic acid 濃度が影響を及ぼす。Fig. 3.1.1(1)-1~3 に示した種々のパラメーターの探究から、Table 3.1.1(1)-1 に示すキット化条件を得た。キットを用いた ^{186}Re -HEDP の放射化学的収率を Table 3.1.1(1)-2 に示す。本キット 2 mg には約 1.2 mg の HEDP を含み、1.2 mg の HEDP で 76.6 MBq (2.07 mCi) の ^{186}Re -HEDP が約 95% の放射化学的収率で得られた。これは計算上 1110 MBq (30 mCi) の ^{186}Re -HEDP を 20 mg 以下の HEDP で作製できることを示し、副作用が問題となる以下の HEDP 量で疼痛緩和効果に必要な放射エネルギーの ^{186}Re -HEDP が得られると考えられる。なお ^{99m}Tc -HEDP は室温 20 分の反応で 98% 以上の放射化学的収率を示したが、 ^{186}Re -HEDP の反応速度は遅く、室温 20 分、2 時間の反応時間で放射化学的収率はそれぞれ 88%, 95% であった (Table 3.1.1(1)-2)。Tc と Re とは似た化学的性質を有するが、Re はその低い配位子場分裂値から Tc に比べて錯形成反応速度が遅く、これが標識反応速度の相違に反映されたと考えられる。

マウスに投与した場合、 ^{186}Re -HEDP は ^{99m}Tc -HEDP および現在骨シンチグラムに使用されている ^{99m}Tc -HMDP と同程度の骨集積を示した。また、投与 24 時間後に排泄された放射エネルギー、排泄経路にも相違は見られなかった (Fig. 3.1.1(1)-5)。以上の結果から、本検討で作製した ^{186}Re -HEDP は欧米の臨床研究で使用されている ^{186}Re -HEDP と同様の骨親和性を有すると考えられ、癌性疼痛にたいする緩和効果が期待される。一方、 ^{186}Re -

HEDP は ^{99m}Tc -HEDP、 ^{99m}Tc -HMDP と比べて高い胃への集積、やや遅い血液からの放射能消失速度を示した。 $^{186}\text{ReO}_4^-$ の体内分布 (Table 3.1.1(1)-3)、緩衝液中での ^{186}Re -HEDP の安定性 (Fig. 3.1.1(1)-4) を考え併せると、生体内において ^{186}Re -HEDP が $^{186}\text{ReO}_4^-$ へと再酸化され、これが胃への集積、血液クリアランスの遅延に反映されたと考えられる。同様の現象が ^{186}Re -HEDP の臨床研究においても報告されていることから、これは Tc に比べて酸化され易い Re の化学的性質に起因すると考えられる。

以上、原研で製造された ^{186}Re を用いる HEDP の作製ならびに実験動物における体内放射能分布について検討を行った。そして HEDP の副作用が問題となる以下の量で疼痛緩和に必要な放射能の ^{186}Re -HEDP を簡便かつ高い放射化学的収率で与えるキットを開発した。本キットより作製した ^{186}Re -HEDP は ^{99m}Tc -HMDP と同様の骨集積を示すことから、骨転移の疼痛緩和に対する本薬剤の効果が期待される。一方、Tc と Re との化学的性質のわずかな相違に基づく錯体の合成速度、生体内安定性も観察され、この解消を目的とした新たな配位子の探索が望まれる。

参考文献

- 1) Subramanian, G., McAfee, J. G., Blair, R. J., Mehter, A. and Connor, T., J. Nucl. Med., **13**, 947 (1972).

Table 3.1.1(1)-1 Preparation of HEDP-Sn kit

-
- (1) Gentisic acid 15 mM を含む 0.1 M 酢酸ナトリウム溶液に HEDP 1.8 g と NaOH 0.64 g を溶解する。
- (2) Gentisic acid 15 mM を含む 0.1 M HCl 溶液に塩化第一スズ(2 水和物) 0.86 g を溶解し、(1)で作製した溶液に加える。
- (3) (2)で作製した溶液に gentisic acid 15 mM を含む 0.1 M 酢酸ナトリウムあるいは 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH3.0)を加え、全量を pH 3.0, 50 ml とした後、凍結乾燥を行う。
-

Table 3.1.1(1)-2 Radiochemical yields of ^{186}Re -HEDP by kit method ⁽¹⁾

$^{186}\text{ReO}_4$ (MBq)	Re [M]	kit (mg)	MBq (^{186}Re)/ mg (HEDP)	Radiochemical Yield (%)
9.25	1.2×10^{-5}	0.5	30.6	24.6
9.25	1.2×10^{-5}	1.0	15.28	82.6
9.25	1.2×10^{-5}	1.5	10.21	86.1
9.25	1.2×10^{-5}	2.0	7.66	98.2, 95.0
9.25	1.2×10^{-5}	3.0	5.11	97.5
18.5	2.4×10^{-5}	2.0	15.28	99.1 ± 0.46
18.5	2.4×10^{-5}	2.0	15.28	87.9 ± 1.06 ⁽²⁾
18.5	2.4×10^{-5}	2.0	15.28	95.0 ± 0.61 ⁽³⁾
18.5	2.4×10^{-5}	3.0	10.21	97.5
46.25	6×10^{-5}	3.0	25.49	99.5
92.5	1.2×10^{-4}	2.0	76.59	98.3, 94.4

(1) Reactions performed at 95°C for 20 min.

(2) Room temperature for 20 min (n=3).

(3) Room temperature for 2 h (n=3).

Table 3.1.1(1)-3 Biodistribution of radioactivity after injection of ^{186}Re -HEDP in mice[§]

	Time after injection (h)					
	0.17	0.5	1	3	6	24
Blood	3.54 (0.39)	1.37 (0.35)	0.58 (0.04)	0.27 (0.02)	0.27 (0.03)	0.06 (0.02)
Liver	1.28 (0.16)	0.85 (0.15)	0.60 (0.06)	0.48 (0.11)	0.38 (0.04)	0.20 (0.05)
Kidney	15.06 (3.76)	3.47 (0.27)	2.91 (0.52)	1.55 (0.54)	1.23 (0.28)	0.54 (0.12)
Intestine	0.69 (0.06)	0.65 (0.11)	0.56 (0.05)	0.63 (0.05)	0.55 (0.02)	0.15 (0.03)
Spleen	0.96 (0.10)	0.63 (0.14)	0.47 (0.09)	0.39 (0.06)	0.42 (0.01)	0.22 (0.1)
Lung	2.25 (0.27)	1.01 (0.19)	0.47 (0.05)	0.26 (0.06)	0.25 (0.04)	0.09 (0.01)
Muscle	0.94 (0.10)	0.73 (0.20)	0.95 (0.06)	0.61 (0.13)	0.33 (0.14)	0.56 (0.40)
Bone	12.23 (2.77)	11.32 (2.83)	13.07 (1.22)	12.40 (1.17)	10.66 (1.78)	11.67 (5.15)
Stomach*	1.26 (0.20)	1.57 (0.24)	1.64 (0.26)	1.62 (0.28)	1.44 (0.08)	0.48 (0.04)
Urine*						48.65 (2.37)
Feces*						8.19 (0.73)

[§] Expressed as % injected dose/g. Mean (SD) each for five animals.

* Expressed as % injected dose per organ.

Table 3.1.1(1)-4 Biodistribution of radioactivity after injection of $^{186}\text{ReO}_4^-$ in mice[§]

	Time after injection (h)					
	0.17	0.5	1	3	6	24
Blood	6.25 (0.29)	5.80 (0.77)	5.12 (0.66)	3.19 (0.48)	2.63 (0.27)	0.15 (0.06)
Liver	3.92 (0.18)	3.56 (0.57)	3.03 (0.47)	2.04 (0.33)	1.43 (0.08)	0.10 (0.02)
Kidney	3.38 (0.46)	3.05 (0.40)	2.81 (0.52)	1.71 (0.32)	1.35 (0.08)	0.22 (0.18)
Intestine	2.27 (0.10)	2.12 (0.24)	1.68 (0.28)	1.20 (0.14)	0.89 (0.14)	0.05 (0.04)
Spleen	3.67 (0.75)	2.69 (0.36)	2.76 (0.23)	1.67 (0.25)	1.17 (0.18)	0.11 (0.02)
Lung	5.68 (0.79)	4.58 (0.51)	3.58 (0.46)	2.57 (0.33)	2.19 (0.34)	0.11 (0.04)
Muscle	1.32 (0.15)	1.21 (0.14)	0.98 (0.16)	0.57 (0.10)	0.40 (0.05)	0.03 (0.02)
Bone	2.70 (0.30)	2.47 (0.32)	2.14 (0.28)	1.27 (0.17)	0.91 (0.08)	0.03 (0.01)
Stomach*	19.31 (1.59)	30.45 (3.99)	26.20 (2.36)	19.62 (2.15)	14.90 (2.79)	1.00 (0.41)
Urine*						76.09 (5.21)
Feces*						0.88 (0.57)

[§] Expressed as % injected dose/g. Mean (SD) each for five animals.

* Expressed as % injected dose per organ.

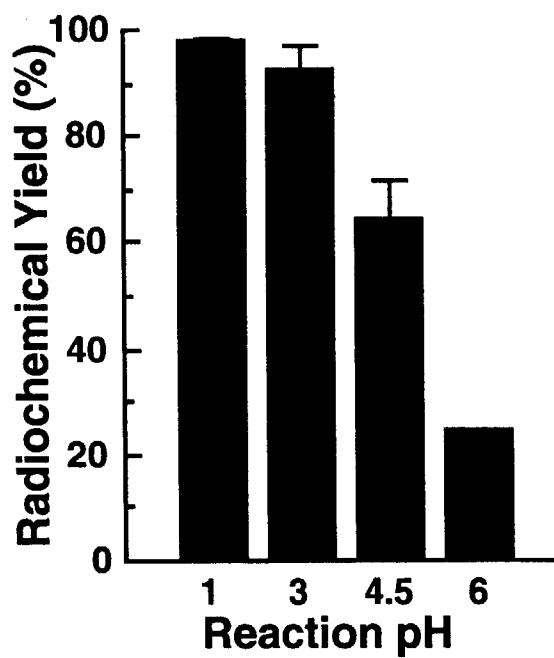


Fig. 3.1.1(1)-1 Effect of reaction pH on the radiochemical yields of ^{186}Re -HEDP.

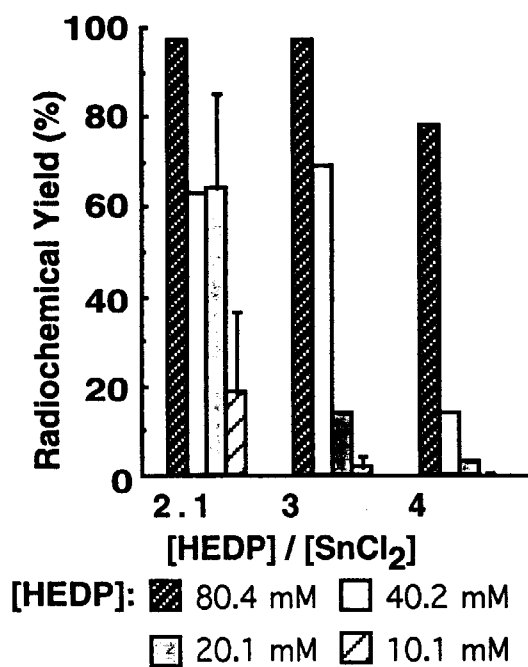
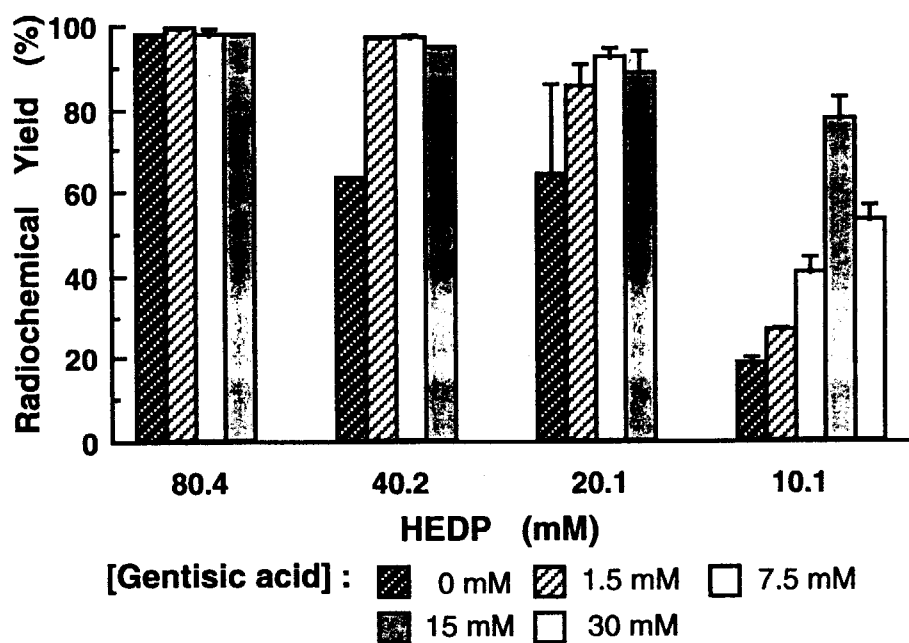
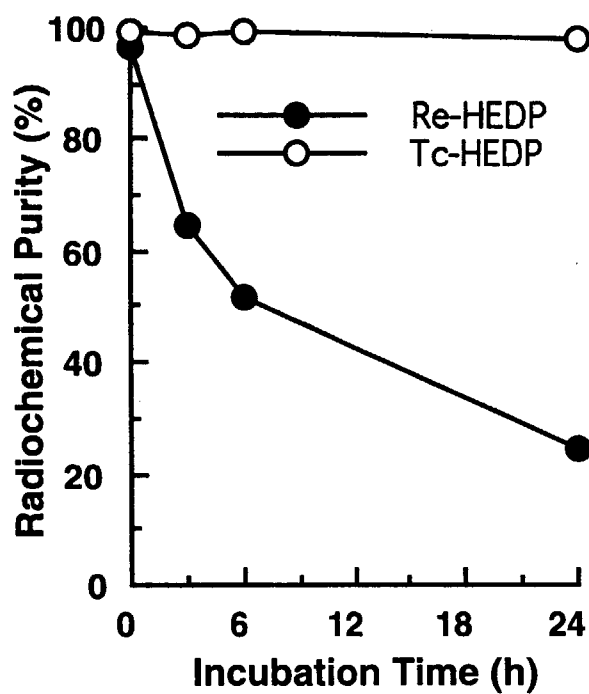


Fig. 3.1.1(1)-2 Effect of $[\text{SnCl}_2]$ on the radiochemical yields of ^{186}Re -HEDP.

Fig. 3.1.1(1)-3 Effect of anti-oxidant on the radiochemical yields of ^{186}Re -HEDP.Fig. 3.1.1(1)-4 Stability of ^{186}Re -HEDP and $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HEDP in buffered-solution.

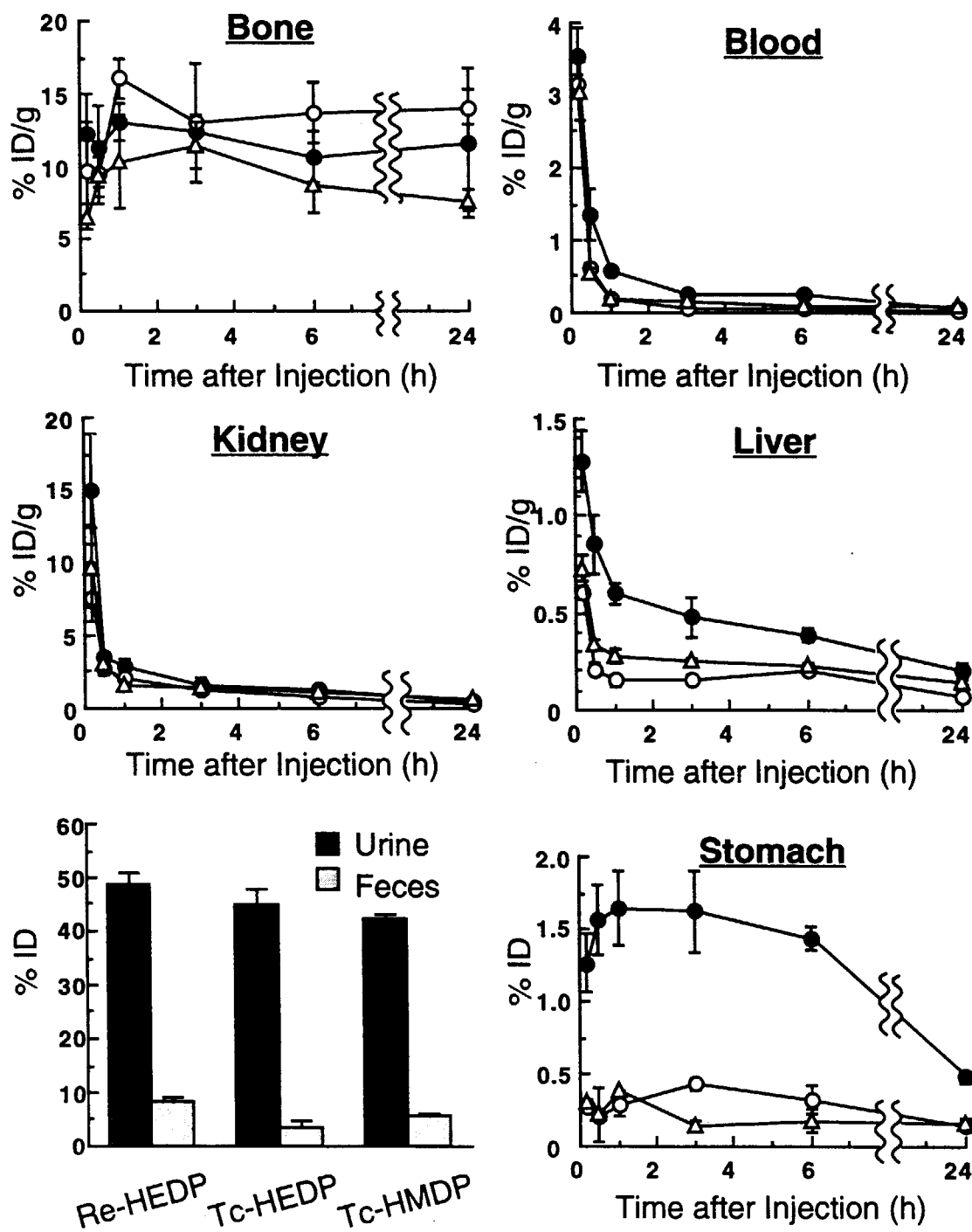


Fig. 3.1.1(1)-5 Comparative distribution of radioactivity after intravenous administration of ^{186}Re -HEDP (●), $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HEDP (○), and $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMDP (△) in normal

(2) HEDP の ^{186}Re 標識とマウスによるイメージ

1) 目的

^{186}Re は高エネルギーの β 線を放出し、細胞障害作用が強いことが知られており、その標識化合物 ^{186}Re -HEDP は骨転位の疼痛緩和剤として臨床研究が行われている。そこで本研究では、原研東海研究所で製造された原子炉製 ^{186}Re を利用した ^{186}Re -HEDP 標識化合物の臨床応用を目的に、標識条件の検討、マウスによるイメージング及びマウス体内分布測定のための基礎的検討を行った。

2) 標識方法

標識は、Eisenhut の方法⁹⁾に準じた。あらかじめ HEDP キットを作成しておき、そこへ ^{186}Re 溶液を加えて標識を行った。

HEDP キットの調製

ゲンチジン酸 10.0 mg を予め窒素置換した水 2 ml に溶解した溶液に、HEDP 溶液 (60% water) 50 μl 及び SnCl_2 12 mg を加えた。さらに、同様に窒素置換した 0.1 N HCl を 9 ml 加え、バイアルに 3 等分し、24 時間凍結乾燥し、HEDP キットとした。

標識手順

- a) ^{186}Re 原液から 0.25 ml (100 MBq) 分取し、0.75 ml の生理食塩水を加えて、100 MBq/ml とする。
- b) a) 液を HEDP キットに加え、水溶性オイルバス中 100℃で 10 分間反応させる。
- c) 放冷後、1 M CH_3COONa 500 μl を加え、pH を 4 から 5 とする。

3) 分析方法

標識率の測定は薄層クロマトグラフィー (TLC) によって行った。

アセトンにより 1 次展開を行い (約 15 分で展開終了)、自然乾燥させたのちに、TLC を 90 度回転させ、生理食塩水により 2 次展開を行った (約 20 分)。Fig. 3.1.1(2)-1 に示したように、2 次元 TLC 上の原点 (番号 2) にレニウム酸化物 ReO_2 が、1 次展開では移動せず、2 次展開で移動する成分 (番号 3) として、レニウム標識化合物 ^{186}Re -HEDP が、1 次展開及び 2 次展開の両方で移動する成分 (番号 4) として、フリーの $^{186}\text{ReO}_4$ が得られる。ガンマカメラ及び BAS2000 により標識率を測定する。バックグラウンド (BG) として番号 1 の部分を測定し、BG のピクセル当たりのカウントを求め、各々のピクセル当たりの BG カウントを差引いて標識率を求めた。

4) マウスの体内分布およびイメージングの測定

体内分布測定およびイメージング用の ^{186}Re -HEDP 溶液の調製は次のように行った。

- 4)-1 ^{186}Re -HEDP 溶液 1500 μl (^{186}Re 100 MBq, HEDP 10 mg) から体内分布測定用とし

て、150 μ l を分取し、そこへ、7.85 ml の生理食塩水を加えた (10 MBq ^{186}Re , 1 mg HEDP)。その溶液からマウス 1 匹 (体重 25 g 換算) 当たり 100 μ l (125 kBq ^{186}Re , 12.5 μ g HEDP) を正常 ICR マウスに投与 (尾静脈注射) して、30 分、60 分及び 120 分後の体内分布を求めた。

4)-2 イメージング用として、 ^{186}Re -HEDP 溶液 150 μ l を分取し、0.85 ml の生理食塩水を加えた。その溶液 100 μ l (^{186}Re 1 MBq, 0.1 mg HEDP) をマウスに投与 (尾静脈注射) し、3 時間後にガンマカメラで画像測定を行った。

5) 結果及び考察

標識条件及び安定性

標識条件について、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ と ^{186}Re の比較を行った。両者は、周期律表上同一族(7A)であるが、化学反応性は異なることを実感した。Re は Tc に比べ、酸化され易く、また不安定であることが報告されている。 ^{186}Re -HEDP を高収率で得るためには、還元剤 (SnCl_2) を Tc に比べ、10 倍以上使用し、かつ窒素置換を行い、酸素の影響をできるだけ少なくする必要があることが分かった。こうして合成した ^{186}Re -HEDP の安定性について、生理食塩水による希釈の効果を希釈直後について調べた。その結果 (Table 3.1.1(2)-1)、50 倍希釈でも、影響は小さいことが分かった。さらに、 ^{186}Re -HEDP の安定性は pH によっても影響を受け、pH が 7 以上になると 3 時間経過後の標識率が下がる傾向が見られた (Table 3.1.1(2)-2)。次に経時変化について調べたところ (Table 3.1.1(2)-3)、3 時間まで変化はなかったが、24 及び 48 時間後の標識率はかなり低下した。

マウスの体内分布およびイメージングの測定

^{186}Re -HEDP 投与後、0.5, 3, 24, 48 時間におけるマウスの体内分布を Fig. 3.3.1(2)-2 に示す。0.5 時間、3 時間では、腎臓、胃への集積が高いが、骨はどの時間においても高い集積を示している。これから、 ^{186}Re -HEDP は骨に集積する薬剤として有効であることがわかる。また $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMDP と ^{186}Re -HEDP の投与 3 時間後のマウス体内分布の比較を Fig. 3.3.1(2)-3 に示した。 ^{186}Re -HEDP は $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMDP に比べて、胃及び腎臓に高い集積が見られた。

マウスにおけるイメージングを Fig. 3.3.1(2)-4 に示す。マウスの体内分布の結果から、投与 3 時間後のイメージを撮像した。 ^{186}Re の骨への高い集積が見られるが、胃、膀胱及び腎臓にも残存している様子が観察された。

参考文献

- 1) Eisenhut M., Int. J. Appl. Radiat. Isot. **33**, 99 (1982)

Table 3.1.1(2)-1 Effect of dilution with saline on the stability of ^{186}Re -HEDP.

	% Yield measured with a γ -camera	% Yield measured with BAS2000
1	98.0	95.1
1 / 4	96.0	94.2
1 / 16	undetectable	92.8
1 / 64	undetectable	91.1

Table 3.1.1(2)-2 Effect of pH on the stability of ^{186}Re -HEDP after 3 hours.

	% Yield measured with a γ -camera	% Yield measured with BAS2000
pH 1	100	95.6
pH 2	100	95.5
pH 4	96.5	95.7
pH 7	98.9	88.5
pH 9	100	83.0

Table 3.1.1(2)-3 Effect of elapsed time on the stability of ^{186}Re -HEDP.
(pH4-5, room temp.)

	% Yield measured with a γ -camera	% Yield measured with BAS2000
0 hour	100	95.1
1 hour	97.9	70.0
3 hours	99.0	92.3
24 hours	63.9	67.9
48 hours	41.1	45.7

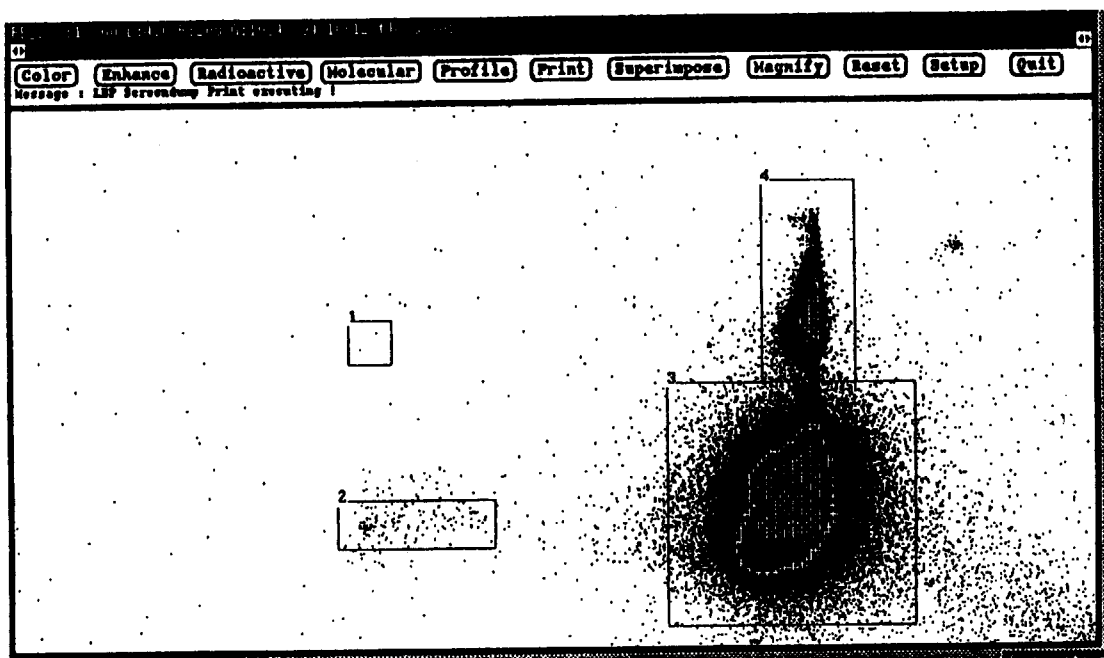


Fig. 3.1.1(2)-1 Distribution of ^{186}Re on a TLC plate detected with BAS2000.

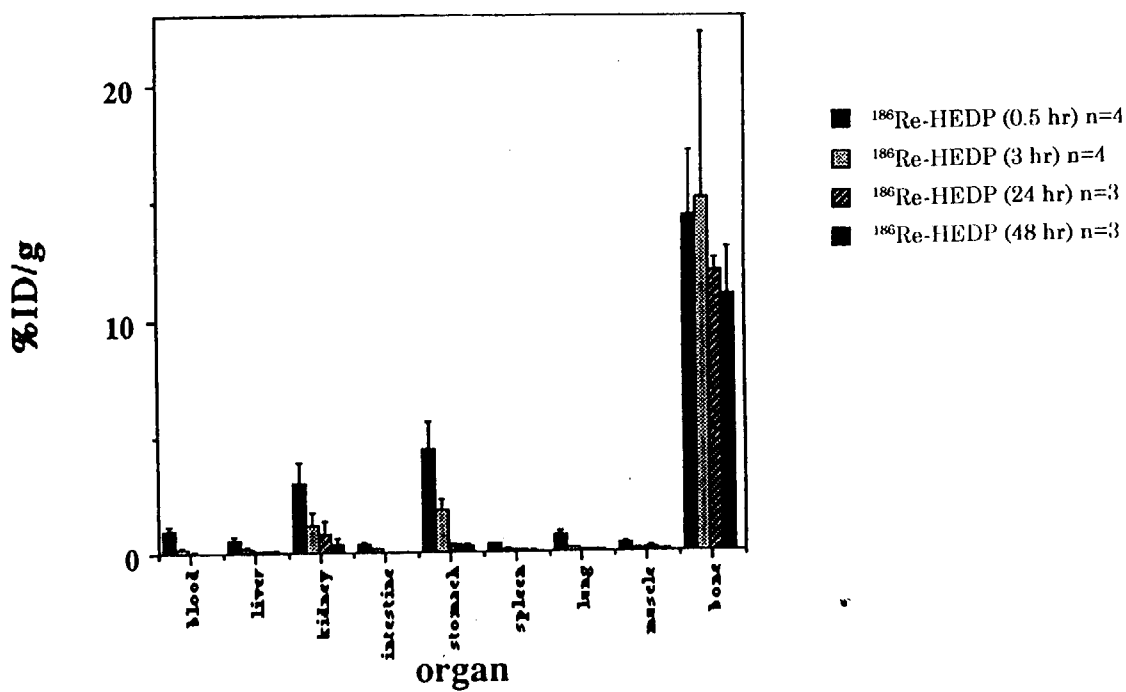


Fig. 3.1.1(2)-2 Biodistribution of ^{186}Re after injection of ^{186}Re -HEDP in mice.

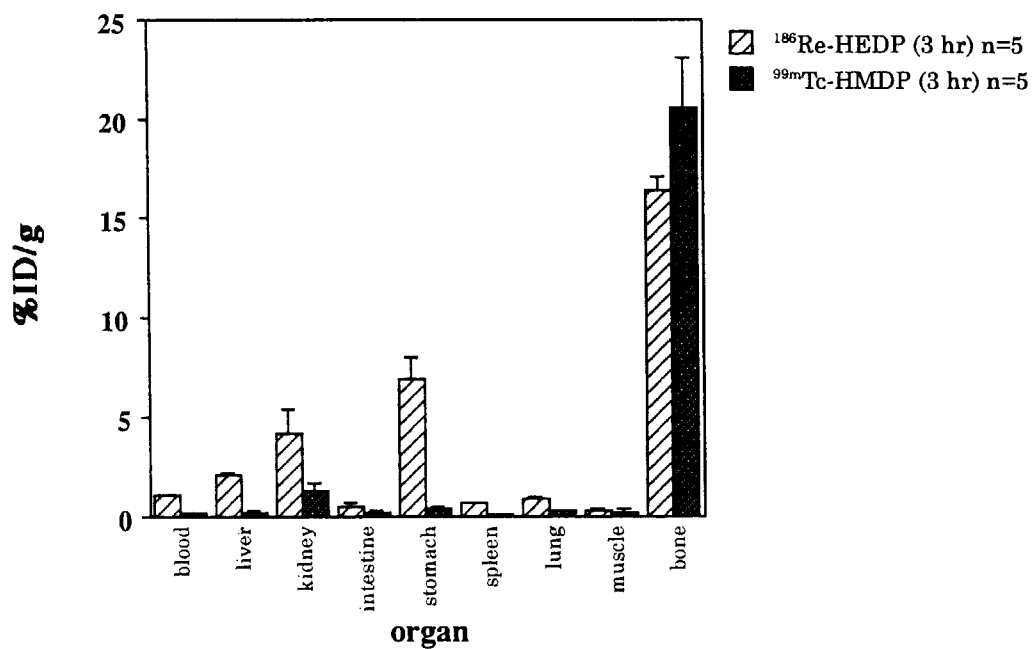


Fig. 3.1.1(2)-3 Comparison of the biodistribution of radioactivity in mice between ^{186}Re -HEDP and $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMDP.

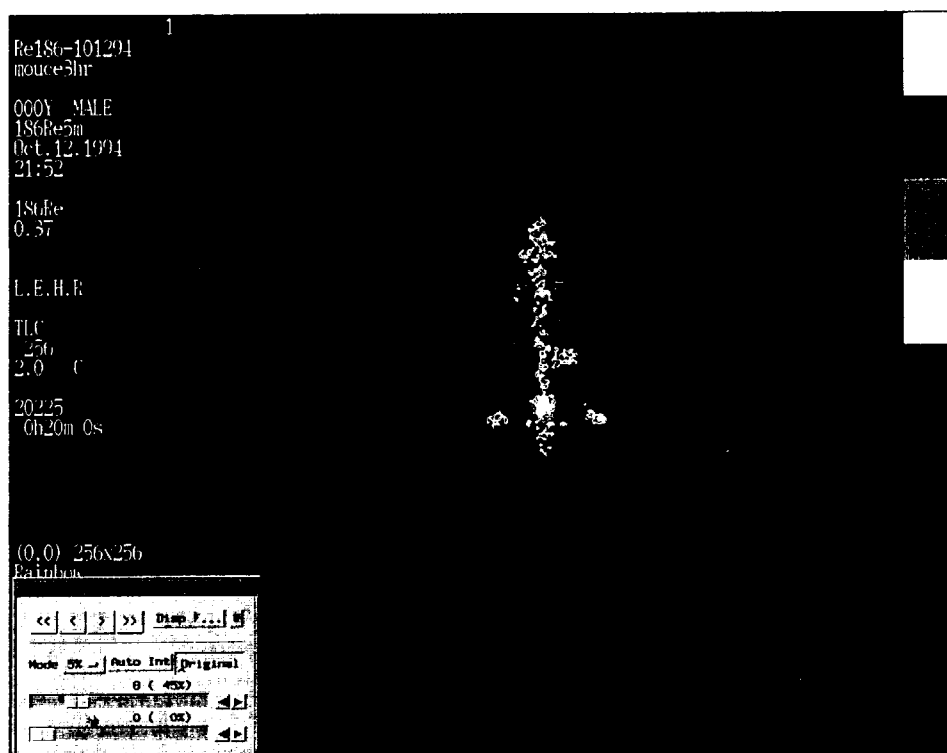


Fig. 3.1.1(2)-4 Biodistribution of ^{186}Re in mice detected with a γ -camera.

3.1.2 HMDP

HMDP の ^{186}Re 標識とマウス体内動態の検討

(実験材料)

試薬

Hydroxymethylene diphosphonate (HMDP) は日本メジフィジックス(株)から提供を受けた。 NH_4ReO_4 、 $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、2,5-dihydroxybenzoic acid は、和光純薬工業(株)から購入した。

酢酸緩衝液

0.1M 酢酸ナトリウム水溶液と 0.1M 酢酸水溶液を容積比 32 : 1 で混合した (pH6.2)。なお、実験に用いた精製水は煮沸後アルゴンで空気を置換し、酢酸緩衝液も使用前にアルゴン置換を行った。電気泳動用酢酸緩衝液は、0.1M 酢酸ナトリウム水溶液と 0.1M 酢酸水溶液を容積比 2 : 1 で混合し、1/5 希釈し作成した (pH5.0)。

^{45}Ca -酢酸緩衝液

^{45}Ca は第一化学薬品(株)より、 $^{45}\text{CaCl}_2$ 水溶液 (1.1 TBq/gCa, 0.37 GBq/ml) として購入した。 ^{45}Ca -酢酸緩衝液の Ca 濃度は、マウスの血中 Ca 濃度と等しく、 $2.40 \times 10^{-3} \text{ M}$ となるように、 $^{45}\text{CaCl}_2$ 水溶液と $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ を酢酸緩衝液に加え調整した。

実験動物

4 週齢の ddY 系雄性マウスを日本 SLC(株)より購入し、1 週間飼育後、実験に使用した。

(1) 化学実験

放射化学的収率の算出法

放射化学的収率 (以下、収率) は、薄層クロマトグラフィー (TLC)、ペーパークロマトグラフィー (PC) を用いて求めた。TLC は Merck 社 Aluminium sheets (Silica gel 60 F₂₅₄) を用い、アセトンを展開溶媒として行った。PC は Whatman 社 3MM Chr (cat.No.3030909) のろ紙を使用し、生理食塩水を展開溶媒とした。TLC では、 ^{186}Re -HMDP および Re の無機物 (ReO_2 等) は $R_f=0$ (原点)、 ReO_4 は $R_f=1.0$ に、PC では無機物のみが $R_f=0$ (原点) に観察されることが明らかにされている¹⁻³⁾。バイオ・イメージングアナライザー (FUJIFILM, BAS-1500Mac) を用いて、乾燥後のプレートおよびペーパの放射能を測定し、TLC の $R_f=0$ での放射能比 A (%)、PC の $R_f=0$ での放射能比 B (%) を求め、収率を $A \times (100-B)/100$ (%) と算出した。

(1)-1 ^{186}Re -HMDP の合成条件の検討

Re 用 HMDP キットは、精製水に HMDP と 2,5-Dihydroxybenzoic acid (酸化防止剤) を溶解し、 $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (還元剤) の 0.01M 塩酸溶液を加え pH を調整後、凍結乾燥 (LBCONCO, Freeze Dryer 8, model 75040) し、作製した。 ^{186}Re -HMDP は、このキットと ^{186}Re 水溶液を混合し、沸騰水浴中で加熱して合成した (Table 3.1.2-1)。

^{186}Re は市販の $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 用キット（日本メジフィジックス）と反応しない。この原因としては、比放射能の低い ^{186}Re は、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ に比べ高濃度の還元剤、配位子が必要であると考えられる^{1), 4-6)}。よって本研究では ^{186}Re 用 HMDP キットを調製することにした。

$^{99\text{m}}\text{Tc}$ および ^{186}Re を直接配位子と結合させるのは容易でなく、配位子と還元剤（多くは Sn）を結合させてから、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ あるいは ^{186}Re と置き換える 2 段階法が一般的⁶⁾である。Sn よりも強い還元剤は他に多くあるが、臨床の現場で用いられている Sn を $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 製剤に倣い用いた。

抗酸化剤にはアスコルビン酸やクエン酸などがある⁷⁾が、ここでは 2,5-dihydroxybenzoic acid を用いることにした。

キット中の pH と Re 濃度

飽和酢酸ナトリウム水溶液で pH を 2.1~5.0 に調整したキット（[HMDP]= 8.58×10^{-2} M、[Sn]= 4.68×10^{-2} M：いずれも ^{186}Re 溶液 250 μl と混合時）10 mg をそれぞれ 0.05~250 $\mu\text{g/ml}$ の ^{186}Re 溶液と 20 分間反応させ、 ^{186}Re -HMDP の収率を調べた（Fig. 3.1.2-1）。 ^{186}Re -HMDP の収率は、pH の低い方が高収率であった。これは、pH が低下すると Sn の還元力が増し、Re の還元反応が容易になるため^{1), 4-9)}と考えられる。pH 2.1 と 2.9 のキットは、どちらも 90~99% の高収率を示した。なお、前者は pH 無調整のキットである。

収率は、Re 濃度が高い方が良好であった。Re 濃度が原研からの供給時の濃度に等しい 25 $\mu\text{g/ml}$ のとき、pH 2.1 のキットは 99% の収率を示した。

HMDP 濃度とモル比[Sn]/[HMDP]

HMDP 濃度 0.56~5.60 mg/ml に対し、それぞれモル比[Sn]/[HMDP]を変えたキットを調製し、その 10 mg を、モル比[Re]/[HMDP]が一定になるような ^{186}Re 溶液と 20 分間反応させて収率を調べた（Fig. 3.1.2-2）。また、HMDP 濃度の高い方が高収率を示し、少なくともモル比[HMDP]/[Re] ≥ 479 （[HMDP]=4.20~5.60 mg/ml）の条件が満たされないと、90%以上の収率は得られないことがわかった。なお、キット調製時において、モル比[Sn]/[HMDP]>0.55 であると、沈殿を生じ、キットは作成できなかった。

モル比[Re]/[HMDP]が一定のときは、モル比[Sn]/[HMDP]の高い方が収率は良かった。HMDP 濃度が 5.60 mg/ml（ 2.4×10^{-2} M、 ^{186}Re 溶液 250 μl と混合時）のとき、モル比[Sn]/[HMDP]=0.14~0.55（[Sn]= 1.41×10^{-2} ~ 4.68×10^{-2} M、同）の広範囲の ^{186}Re -HMDP（Re: HMDP: Sn のモル比、1: 639: 87~1: 639: 349）において、95%以上の高い収率となった。

キットの重量

一定量（250 μl ）の ^{186}Re 溶液と反応するキット（HMDP: Sn のモル比、639: 349）の重量を 1~10 mg まで変化させ、収率を調べた（Fig. 3.1.2-3）。3 mg 以上ではほぼ一定の収率が得られた。本実験は 10 mg で行った。

^{186}Re 溶液量

キット（HMDP: Sn のモル比、639: 349）10 mg および Re（6.25 μg , 3.36×10^{-5} mmol）

一定で、キットを 250~1000 μl の ^{186}Re 溶液と 20 分間反応し、収率を求めた (Fig. 3.1.2-4)。10 mg のキットに対し ^{186}Re 溶液の液量を変えると 250~500 μl まではほぼ一定の収率を示すが、液量が増加すると収率は低下した。これは、Re 濃度の低下が原因と考えられる。

加熱反応時間

HMDP キット 10 mg と ^{186}Re 溶液 (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 250 μl の反応を 20~80 分間加熱して行い、 ^{186}Re -HMDP (Re: HMDP: Sn のモル比、1: 639: 349) の収率を調べた (Fig. 3.1.2-5)。

(1)-2 ^{186}Re -HMDP の安定性

酢酸緩衝液中

^{186}Re -HMDP (Re: HMDP: Sn のモル比、1: 639: 349) 溶液を酢酸緩衝液で 1/10 希釈し、室温で ^{186}Re -HMDP が残存する割合を 3 時間にわたり経時的に調べた (Fig. 3.1.2-6)。動物投与用の酢酸緩衝液に 1/10 希釈した場合には、5 分間で約 7% の分解が認められたが、その後の分解は少ない。

HMDP と Sn のモル比が生成物の残存率に及ぼす影響

高収率の得られる HMDP 濃度 4.20~5.60 mg/ml、モル比 $[\text{Sn}]/[\text{HMDP}]=0.14\sim0.55$ の ^{186}Re -HMDP 溶液を酢酸緩衝液に 1/10 希釈し、10 分後に ^{186}Re -HMDP の残存率を調べた (Fig. 3.1.2-7)。モル比 $[\text{Sn}]/[\text{HMDP}]$ が一定のときは、HMDP 濃度の高い方が高い残存率となった。HMDP 濃度が 5.60 mg/ml のとき、モル比 $[\text{Sn}]/[\text{HMDP}]=0.27\sim0.55$ ($[\text{Sn}]=2.64\times10^{-2}\sim4.68\times10^{-2}\text{ M}$, ^{186}Re 溶液 250 μl と混合時) において、 ^{186}Re -HMDP (Re: HMDP: Sn のモル比、1: 639: 175~1: 639: 349) は、98% 以上の高い残存率を示したが、モル比 $[\text{Sn}]/[\text{HMDP}]=0.14$ のときは 80% 程度であった。このように、収率は同じ程度でも、酢酸緩衝液中の残存率に差が見られた。

モル比 $[\text{Sn}]/[\text{HMDP}]=0.27\sim0.55$ の範囲では、Sn 量に変化しても収率や残存率に差はなかった。これらと同じ pH で、HMDP が入っていないキット溶液 250 μl 中の Sn は約 0.6 mg であり、この溶液を 20 分間加熱すると沈殿を生じる。この値は、HMDP 濃度が 5.60 mg/ml のときのモル比 $[\text{Sn}]/[\text{HMDP}]=0.27$ (0.78 mg) と 0.55 (1.39 mg) のキットに含まれる Sn 量の差にほぼ一致する。Re-HMDP が Re と HMDP のみから構成される錯体であると仮定すれば、 ^{186}Re -HMDP (Re:HMDP:Sn のモル比、1: 639: 349) の生成に必要な Sn 量は 0.78 mg で、他の Sn 約 0.6 mg は free で存在することになり、これらを加熱したときにも沈殿が生じると予想される。しかし実際には、白濁せず、最も高い収率と酢酸緩衝液における残存率を示した。したがって、Re-HMDP は、Re と HMDP と Sn から構成され、さらに分子量も変化する化合物であると推測される。

反応時間が生成物の残存率に及ぼす影響

^{186}Re -HMDP 溶液を酢酸緩衝液に 1/10 希釈し、10 分後に ^{186}Re -HMDP の残存率を調べた (Fig. 3.1.2-8)。20 分加熱の ^{186}Re -HMDP は、40~80 分加熱の ^{186}Re -HMDP より

も、残存率が低かった。

室温放置

合成した ^{186}Re -HMDP (Re: HMDP: Sn のモル比、639: 349/加熱時間 60 分) を 24 時間室温に放置し、 ^{186}Re -HMDP の安定性を経時的に求めた (Fig. 3.1.2-9)。合成した ^{186}Re -HMDP は、そのまま 24 時間室温に放置しても、99%以上の安定性を示した。

正常マウス血清中

酢酸緩衝液に 1/10 希釈した ^{186}Re -HMDP (Re: HMDP: Sn のモル比が 1: 639: 349 で加熱時間 60 分) をさらに、正常マウス血清 (COSMOBIO 社, CL8000) に 1/10 希釈し、37°C でインキュベートして、血清中の安定性を 24 時間後まで経時的に調べた (Fig. 3.1.2-10)。酢酸緩衝液と血清で 1/100 希釈された ^{186}Re -HMDP は、24 時間経過すると 49%しか残存せず、残りは ^{186}Re の無機物として検出された。それに対し、 $^{186}\text{ReO}_4^-$ は血清中でも 99%以上残存し、安定であった。血清中の ^{186}Re -HMDP は、約 6 時間後から沈殿が生じ、血清中で何らかの変化を受けていると推測される。

マウス血清分画中

ddY 系正常マウスオスに ^{186}Re -HMDP を尾静脈投与し、直後に下大静脈より採血して、この血液を 4°C、2000×g で 2 時間遠心分離し、得られた血清を、TLC、PC で分析したところ、約 70%が残存していた。従って、マウスに投与した際血中において ^{186}Re -HMDP は何らかの変化を受けていると考えられる。

(2) 動物実験

(2)-1 体内分布

酢酸緩衝液で 10 倍に希釈したサンプル (Table 3.1.2-2, 3) 100 μl /匹 (0.5 μCi : 18.5 kBq) をマウスに尾静脈から投与した。一定時間 (10 分, 1, 3, 6, 24 時間) 後に、1 群 5 匹のマウスをジエチルエーテルで麻酔し開腹後、下大静脈から採血した。続いて、肺、脾臓、腎臓、胃、腸、筋肉、大腿骨、肝臓を採取した。秤量後、 γ カウンター (Packard Instrument Company, 5003 型オートガンマカウンター) で放射能を測定した。

測定データは、“% Injection dose/g organ”、すなわち投与量に対する器官 g 当たりの値に変換した。胃のデータは、“% Injection dose/organ”に変換した。データの評価は、危険率 1% のスミルノフ検定^{8), 9)-11)}にかけて行った。有意差検定は、一元配置分散分析⁹⁾ (危険率 1%) によってサンプル群の母平均が等しいかどうか調べた後、そのうち母平均が等しくないものについて、Dunnett の多重比較⁹⁾ (危険率 1%) によってどの群の間に有意差があるか調べた。

^{186}Re -HMDP の体内分布の結果を Fig. 3.1.2-11, 12, 13 に示す。3 種の ^{186}Re -HMDP の間に、HMDP および Sn の含量の違いや加熱時間の違いによる差はみられなかった。いずれも肝臓に投与量の 80% 近くが集まり、器官 g 当たりで比較すると脾臓が最も高い集積を示し、胃にはほとんど集積しない結果となった。これは、胃に集積する $^{186}\text{ReO}_4^-$ (Fig.

3.1.2-14) や骨への集積が高い ^{99m}Tc -HMDP (Fig. 3.1.2-15) とは異なる。放射能は、血液→肝臓→肺→脾臓→骨と、経時的に移行した。24 時間経過しても投与量の 40% 近くが主要臓器に残留した。

肝臓では、放射能は投与後 1 時間でピークとなり、24 時間後で投与量の約 30% が残留していた。それに対し、 ^{99m}Tc -HMDP はほとんど集積しなかった。また、モル比 $[\text{Sn}]/[\text{HMDP}]$ が約半分の ^{186}Re -HMDP (Re:HMDP:Sn のモル比、1:719:196) は、1% の危険率において、他の 2 つの ^{186}Re -HMDP (Re:HMDP:Sn のモル比、1:639:349) より高く肝臓に集積した。従って、肝臓への集積性は、加熱時間の違いではなく、HMDP 量あるいは Sn 量の違い (Table 3.1.2-3) によって左右されていると考えられる。

^{186}Re -HMDP は脾臓に集積し、集積しない ^{99m}Tc -HMDP と対照的である。

肺において、3 時間のとき集積ピークが見られた。

骨では、投与後短時間で集積する ^{99m}Tc -HMDP とは異なり、徐々に骨に集積して、6 時間と 24 時間でほぼ同値を示した。これらの値は、 ^{99m}Tc -HMDP の 3 時間のときの約 1/2 である。

腎臓への集積は少ない。

その他、筋肉、腸などへの集積は少なかった。心臓、脾臓、脂肪組織、生殖器、脳には目立った集積は認められない結果を得た。

(2)-2 代謝

100 μl /匹 (0.5 μCi : 18.5 kBq) を尾静脈投与したマウスを 1 匹ずつ代謝ケージ (杉山元, メタボリカ MM-AP 型) に隔離し、24 時間後に尿と糞をそれぞれ採取して放射能を測定した。1 サンプルにつき 5~7 匹のマウスを使用した。

Fig. 3.1.2-16 は、尿および糞における 24 時間の排泄を調べたものである。 ^{186}Re -HMDP、 $^{186}\text{ReO}_4^-$ 共、大部分の放射能が尿から排泄された。3 種の ^{186}Re -HMDP の排泄は、30~40% である。 $^{186}\text{ReO}_4^-$ や、2 時間で約 40% の排泄が確認されている ^{99m}Tc -HMDP¹⁸⁾ とは対照的であった。また、TLC と PC による分析では、尿中に $^{186}\text{ReO}_4^-$ やその他の無機物は検出されなかった。

(2)-3 体内の放射能の経時変化

100 μl /匹 (5 μCi ; 185 kBq) を投与したマウスの放射能を Radioisotope Dose Calibrator (米国キャピンテック, CRC-15 型) で経時的に測定した (Fig. 3.1.2-17)。1 サンプルにつき 3 匹のマウスを用いた。3 種の ^{186}Re -HMDP の間に危険率 1% において有意差はなく、1 日で減少する放射能は約 4 割で、1 日の尿中排泄量とほぼ一致した。 ^{186}Re -HMDP は、24 時間までは排泄されるがその後は少なく、3 日後でもまだ 4 割が体内に滞留していた。

本研究において、1 匹のマウスに投与した放射能は、0.5 μCi (18.5 kBq)、5 μCi (185 kBq) である。5 μCi を投与した場合 (5 週令 ddY 系雄性マウスの平均体重 : 28.1 g⁸⁾) は、成人男性 (体重 : 60 kg) に約 11 mCi (407 MBq) を投与した場合に相当する。す

で、欧米では人体に 30~35 mCi (1110~1295 MBq) の ^{186}Re を投与しており²⁻¹²⁾、本実験でのマウスの被ばくによる影響は問題ないと考えられる。

^{186}Re -HMDP に含まれる HMDP および Sn の LD_{50} はそれぞれ 43.3 mg/kg (ddY 系マウスオス)¹³⁾、20.6 mg/kg (ICR 系マウスオス)¹⁴⁾である。本実験の場合、HMDP、Sn の投与量はそれぞれ 7.20~8.11 mg/kg、1.11~1.96 mg/kg であった (Table 3.1.2-3)。また $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMDP は、成人に対する通常投与量の 1500 倍をマウスに投与しても正常に生育した報告⁶⁾があり、サンプルの安全性および毒性に問題はないと考えられる。しかしながら、HMDP は Ca のようなカチオンとキレート化合物を形成することが知られており¹³⁾、本研究のサンプル中と同量の HMDP を投与し、その全てが血清カルシウムと 1:1 キレート形成すると仮定すると、全血清中 Ca 量の約 20% が除去される計算となる。

(3) ^{186}Re -HMDP の蛋白質および ^{45}Ca との結合性の検討

^{186}Re -HMDP は骨への選択的特異性が低く、肝臓や脾臓に高い集積性が認められた。これは、 ^{186}Re -HMDP が異物として生体内の活性な細胞に認識されて起こったと推測され、また ^{186}Re -HMDP が血液中で受けた変化も影響しているのではないかと考えられる。よって、血液中の成分や Ca と ^{186}Re -HMDP の結合について調べることにした。

正常マウス血清に入れた ^{186}Re -HMDP を Whatman 社の濾紙 1 (Cat.No.1001917) を使用し、一定電圧 (800 V) で 20 分間氷上で泳動した。ペーパーは乾燥後、バイオ・イメージングアナライザを用い分析した (Fig. 3.1.2-18)。 ^{186}Re -HMDP (Re: HMDP: Sn のモル比が 1: 639: 349 で加熱時間 60 分) と $^{186}\text{ReO}_4^-$ は、定電圧 (800 V) で泳動すると、陽極側に移動した (図中、D と A)。動物実験で使った他の 2 つの ^{186}Re -HMDP も同様な泳動結果であったので、 ^{186}Re -HMDP は $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMDP¹³⁾ と同様に陰イオンとして挙動することが確認された。なお電気泳動で無機物は原点に残る¹⁵⁾が、本実験でも $^{186}\text{ReO}_4^-$ と原点の位置の放射能を除いた割合は、TLC と PC から求めた収率と一致した。

酢酸緩衝液で 1/10 希釈後血清に入れた ^{186}Re -HMDP の泳動像 (図中、E) は、 ^{186}Re -HMDP のみの泳動像 (D) とは異なった。従って、 ^{186}Re -HMDP は、血清中で何らかの変化を受けることが確認された。また、 $^{186}\text{ReO}_4^-$ は血清中で変化しないことが示された。

酢酸緩衝液で 1/10 希釈し、さらに正常血清で 1/10 希釈した ^{186}Re -HMDP を電気泳動した。そのペーパーを蛋白質染色液 (0.4% ポンソー 3R, 5% トリクロロ酢酸) で染色し、脱色液 (2% 酢酸) で脱色して、 ^{186}Re -HMDP と血清中の蛋白質との結合を調べた。 $^{186}\text{ReO}_4^-$ と血清中の ReO_4^- (C) の泳動距離は一致しなかったが、血清中の ^{186}Re -HMDP と蛋白質の挙動は一致した。したがって、 ^{186}Re -HMDP は、血清中の蛋白質と結合していることが示唆された。

^{186}Re -HMDP 溶液を ^{45}Ca -酢酸緩衝液中に 1/10 希釈し、Ca との結合性を調べた。 ^{45}Ca -酢酸緩衝液中の ^{186}Re -HMDP の泳動像と ^{45}Ca のみの泳動像の比較を試みたところ、 ^{186}Re -HMDP を入れた ^{45}Ca -酢酸緩衝液中に沈殿を生じ、泳動できなかった。 ^{186}Re -HMDP は、血清中

で約 6 時間後に沈殿を生じており、これらは ^{186}Re -HMDP と Ca の化合物であることが予想される。

以上の結果より、 ^{186}Re -HMDP は、血液中において蛋白質や Ca と結合した形で存在することが示唆された。これは、 ^{186}Re -HMDP が、Ca との結合性の低い $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMDP (0.023% 未満¹³⁾) とは異なった分布を示す理由の一つに挙げられる。

(参考： ^{186}Re -HMDP とよく似た分布を示す薬剤として、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -スズコロイド¹⁴⁾やリン化合物の $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -フィチン酸¹⁶⁾がある。後者は、それ自身コロイドではないが、静注後血中カルシウムと反応してコロイドとなることが知られている¹⁷⁾。これらは、 ^{198}Au コロイドにかわり、主流を占めるようになった肝・脾疾患診断薬であり、細胞内皮系に属する Kuffer's cell が血中に存在するコロイド様粒子を貪食するのを利用して細胞内皮系の機能を測定するもので、肝腫瘍・肝膿瘍の病変部の検出及び肝硬変・脾腫による形態変化をとらえるのに特に有効とされている^{15, 16)}。)

コロイド粒子は、その大きさにより体内分布が変化する。10~12 μm 以上の粒子径は肺へ、0.2~5 μm は肝臓および脾臓（そのうち小さい粒子径のものが肝臓へ、大きいものが脾臓へ分布する傾向にある）へ、0.2 μm 以下は骨髄および全身へ、選択的に集積する。従って、血液中の ^{186}Re -HMDP は、0.2~5 μm の分子を中心とした、様々な粒子径のコロイド状分子であると推測される。それに対し、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMDP の場合は、どのような構造が明らかでないが 0.2 μm 以下のそろった粒子径であることがわかっており¹⁷⁾、その陰イオンとしての性質から、骨のヒドロキシアパタイト結晶とイオン結合して、骨、特に新生が盛んな部分に多く集まると考えられている¹³⁾。ラット、ブタ、イヌに Na_2HMDP を 0.1 mg/kg 以上投与すると、肝臓における $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMDP の取り込みが上昇するという報告¹⁸⁾がある。そのため、 ^{186}Re -HMDP についても、HMDP 量を減らすことを検討したが、Re 濃度が 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のときは、少なくともモル比 $[\text{HMDP}]/[\text{Re}] \geq 479$ を満たさないと 90%以上の収率を与える ^{186}Re -HMDP が生成しないことがわかっており、HMDP を 1/100 量まで減らすことはできなかった。また、キットの量を 40%に減量したり（Re: HMDP: Sn のモル比、1: 256: 140）、酢酸緩衝液の希釈倍率を 1/100 にしたものをマウスに投与したが、生体内の分布は変わらなかった。よって、粒子径さらには生体内分布を左右するのは、合成時の Re の量であり、もっと低い濃度の Re 溶液における検討が必要であることが示唆された。そのためには、比放射能の高い ^{186}Re が必要となる。今後は、ジェネレーターからキャリアフリーで溶出される ^{188}Re に注目し、分子の大きさのそろった組成の ^{188}Re -HMDP を合成し、体内動態を調べていく必要があると考えられる。

参考文献

- 1) Deutsch E., Libson K., Vanderheyden J.-L., Ketring A. R. and Maxon H. R., Nucl. Med. Biol., **13**, 465-477 (1986)

- 2) Maxon III H. R., Schroder L. E., Thomas S. R., Hertzberg V. S., Deutsch E., Scher H. I., Samaratunga R. C., Libson K., Williams C. C., Moulton J. S. and Schneider H. J., *Radiology*, **176**, 155-159 (1990)
- 3) Maxon III H. R., Scheroder L. E., Hertzberg V. S., Thomas S. R., Englaro E. E., Samaratunga R., Smith H., Moulton J. S., Williams C. C., Ehrhardt G. J. and Schneider H. J., *J. Nucl. Med.*, **32**, 1877-1881 (1991)
- 4) Vanderheyden J., Heeg M. J. and Deutsch E., *Inorg. Chem.*, **24**, 1666-1673 (1985)
- 5) Eisenhut M., *I. J. Appl. Radiat. Isot.*, **33**, 99-102 (1982)
- 6) Deutsch E., Libson K. and Vanderheyden J., "The inorganic chemistry of technetium and rhenium as relevant to nuclear medicine" unpublished data 12-20
- 7) Hashimoto K., Islam Md S. and Izumo M.: "Proceedings of 7th International Symposium on Advanced Nuclear Energy Research, March 18-20, 1996, Takasaki, Gunma, Japan", *JAERI-Conf 97-003*, 313 (1997).
- 8) 佐藤徳光, "動物実験の基本", 西村書店.
- 9) 吉村功, "毒性・薬効データの統計解析—事例研究によるアプローチ—", サイエンティスト社.
- 10) 久保田和彦, 神谷大雄, 木皿憲佐, 佐々木健一, "基礎薬理学実験", 南江堂.
- 11) "新生化学実験講座 19 動物実験法".
- 12) Samaratunga R. C., Thomas S. R., Hinnefeld J. D., Von Kuster L. C., Hyams D. M., Moulton J. S., Sperling M. I. and Maxon III H. R., *J. Nucl. Med.*, **36**, 336-350 (1995)
- 13) "医薬品インタビューフォーム クリアボーンキット", 日本メジフィジックス株式会社.
- 14) "医薬品インタビューフォーム スズコロイド Tc-99m 注", 日本メジフィジックス株式会社.
- 15) 荒野泰, 小野正博, 脇坂孝治, 上園崇, 秋沢浩行, 元成祐司, 間賀田泰寛, 小西淳二, 横山陽, *RADIOISOTOPES*, **45**, 514-522 (1995)
- 16) "インビボ放射性医薬品添付文書集 平成 7 年 7 月 1 現在", 社) 日本アイソトープ協会.
- 17) 宮田満男, 放射性医薬品とその薬学的側面.
- 18) Bevan J. A., Tofe A. J., Benedict J. J., Francis M. D. and Barnbett B. L., *J. Nucl. Med.*, **21**, 961-966 (1980)

Table 3.1.2-1 Preparation of ^{186}Re -HMDP

(1) HMDP(Na) ₂ : 560 mg (2.92 mmol) 2,5-Dihydroxybenzoic acid : 300 mg (1.95 mmol) Distilled water : 100 ml
(2) $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 293 mg (1.90mmol) 0.01 M Hydrochloric acid : 28 ml
(3) Freeze-drying
(4) HMDP kit : 10 mg $^{186}\text{ReO}_4^-$ solution : 250 μl Reaction time : 20 min Reaction temperature : 90~95°C

Table 3.1.2-2 ^{186}Re -HMDP runs for injection

Re: HMDP: Sn	Reaction time
1: 639: 349	60 min
1: 719: 196	60 min
1: 639: 349	20 min

Table 3.1.2-3 Control runs for injection

$^{186}\text{ReO}_4^-$ (25 $\mu\text{g/ml}$)
$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMDP*

*This was only used for the biodistribution study

Table 3.1.2-4 Injection dose / mouse (mg/kg)

Re: HMDP: Sn	^{186}Re -HMDP	^{186}Re -HMDP
	1: 649: 349	1: 719: 196
Re	0.0356	0.0356
HMDP	7.20	8.11
Sn	1.96	1.11

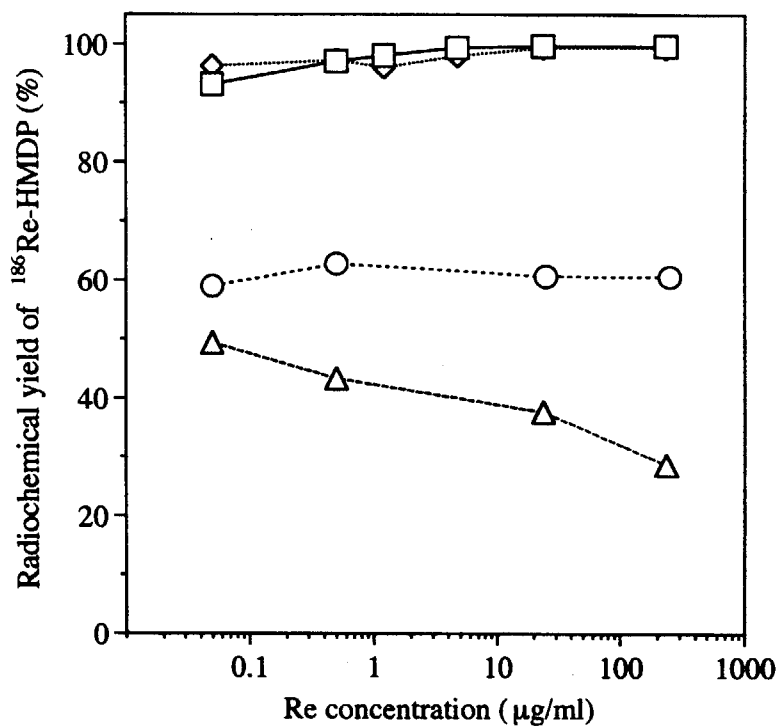


Fig. 3.1.2-1 Effect of Kit-pH and Re concentration on the radiochemical yield of ^{186}Re -HMDP. (□: Kit-pH 2.1; ◇: Kit-pH 2.9; ○: Kit-pH 4.1; △: Kit-pH 5.0)

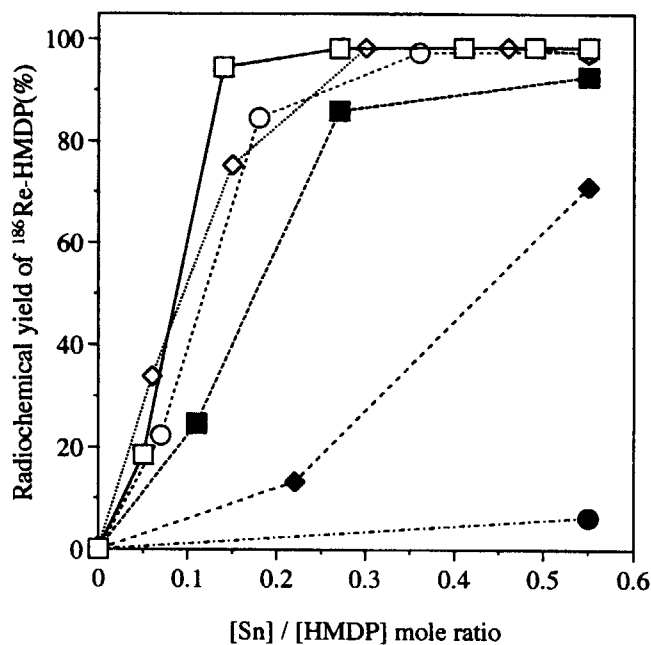


Fig. 3.1.2-2 Effect of concentration of HMDP and $[\text{Sn}]/[\text{HMDP}]$ mole ratio on the radiochemical yield of ^{186}Re -HMDP.

(□: $[\text{HMDP}]=5.60$ mg/ml; ◇: $[\text{HMDP}]=5.04$ mg/ml; ○: $[\text{HMDP}]=4.20$ mg/ml;
 ■: $[\text{HMDP}]=2.80$ mg/ml; ◆: $[\text{HMDP}]=1.40$ mg/ml; ●: $[\text{HMDP}]=0.56$ mg/ml)

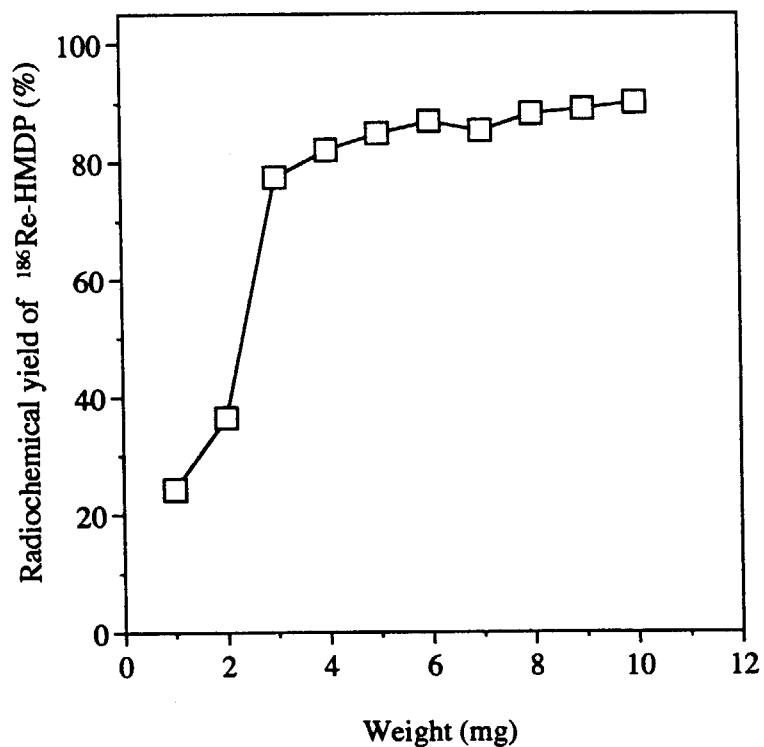


Fig. 3.1.2-3 Effect of kit weight on the radiochemical yield of ^{186}Re -HMDP (^{186}Re -HMDP solution: $250\ \mu\text{l}$; Re: $25\ \mu\text{g/ml}$).

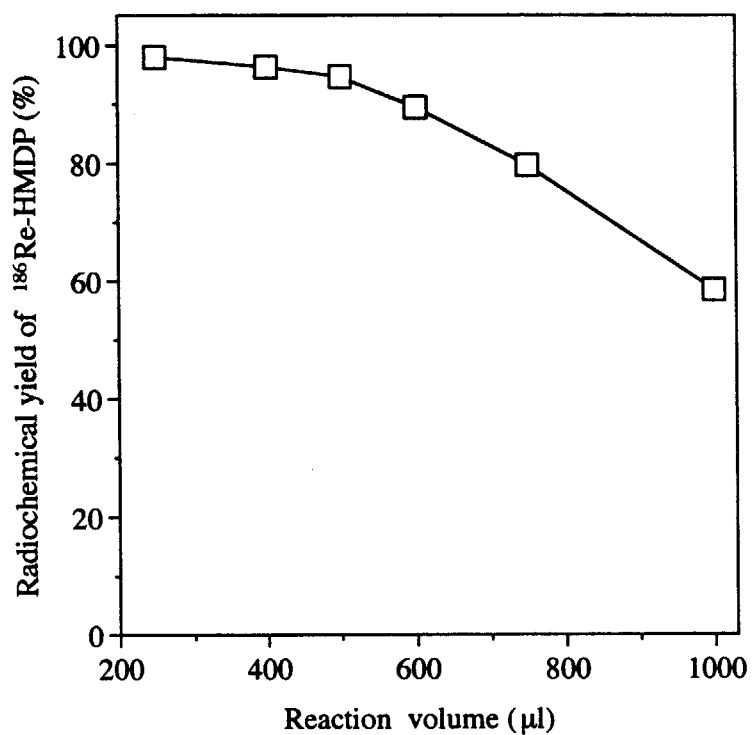


Fig. 3.1.2-4 Effect of ^{186}Re -HMDP solution volume on the radiochemical yield of ^{186}Re -HMDP (Re: HMDP: Sn = 1: 639: 349 in mole ratio).

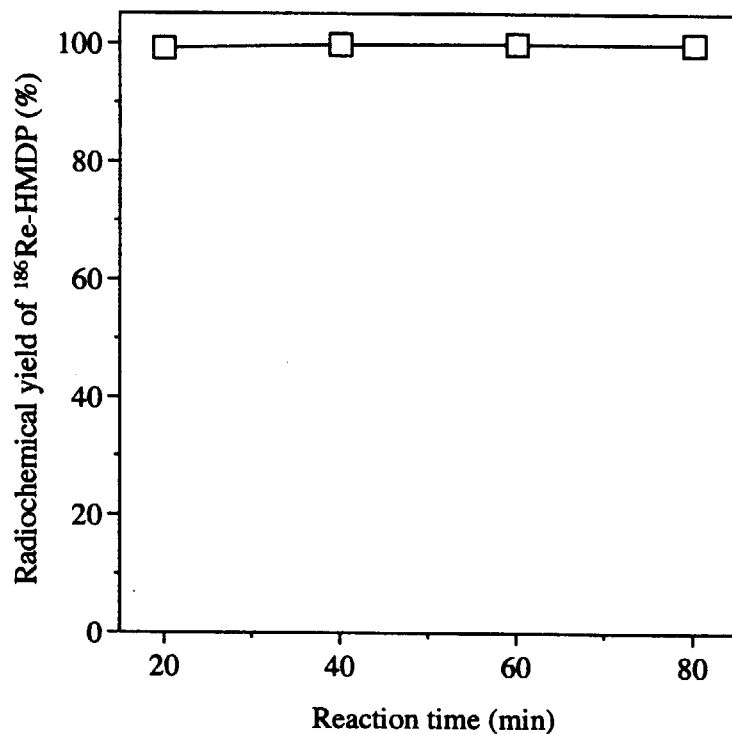


Fig. 3.1.2-5 Effect of reaction time on the radiochemical yield of ^{186}Re -HMDP
(Re: HMDP: Sn =1: 639: 349 in mole ratio).

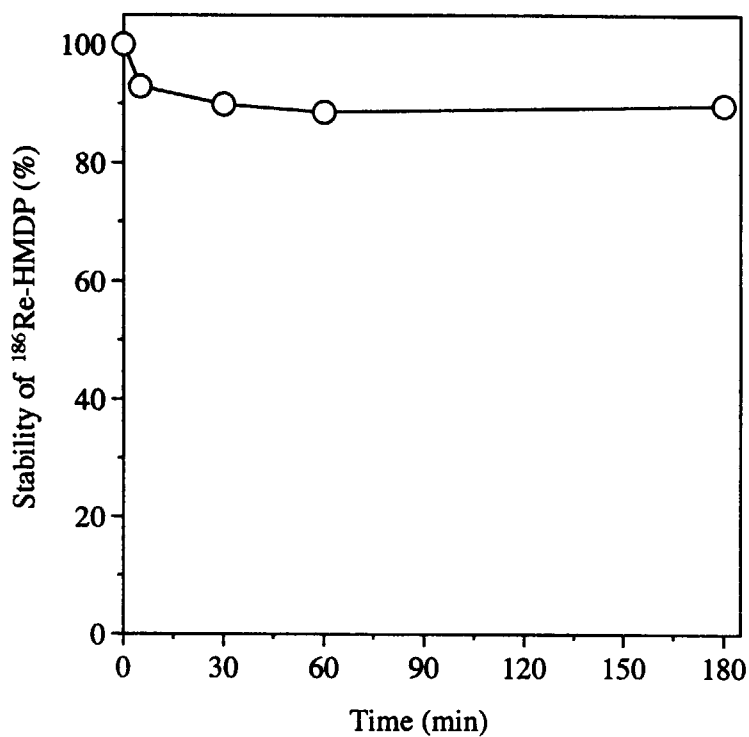


Fig. 3.1.2-6 Stability of ^{186}Re -HMDP in sodium acetate buffer (pH=5.0) for 180 min
(Re: HMDP: Sn =1: 639: 349 in mole ratio). [Radiochemical yield: 99%]

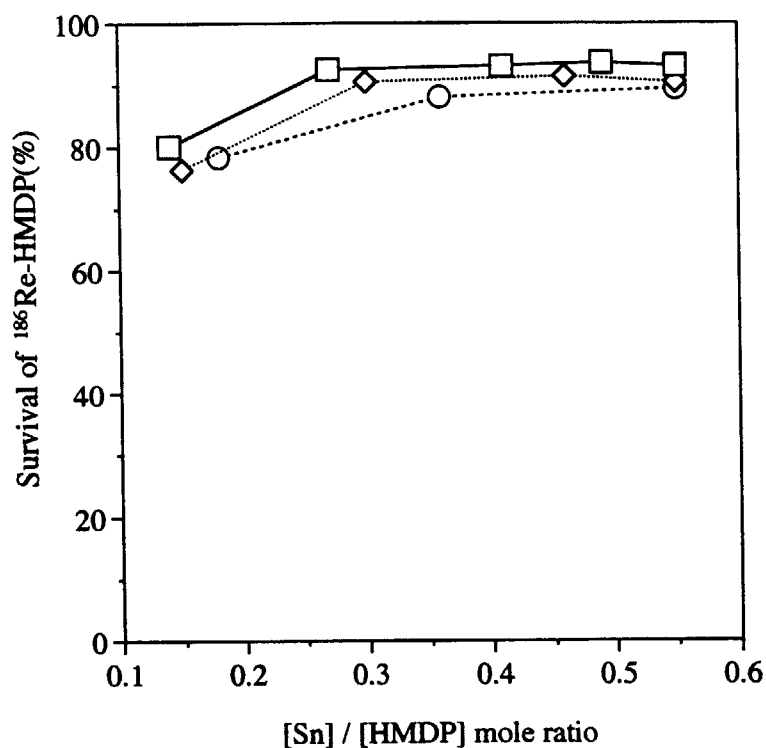


Fig. 3.1.2-7 Effect of concentration of HMDP and [Sn]/[HMDP] mole ratio on the survival of ^{186}Re -HMDP in sodium acetate buffer (pH=5.0) 10 min after dilution. cf. Fig. 3.1.2.-2 (□: [HMDP]=5.60 mg/ml; ◇: [HMDP]=5.06 mg/ml; ○: [HMDP]=4.20 mg/ml)

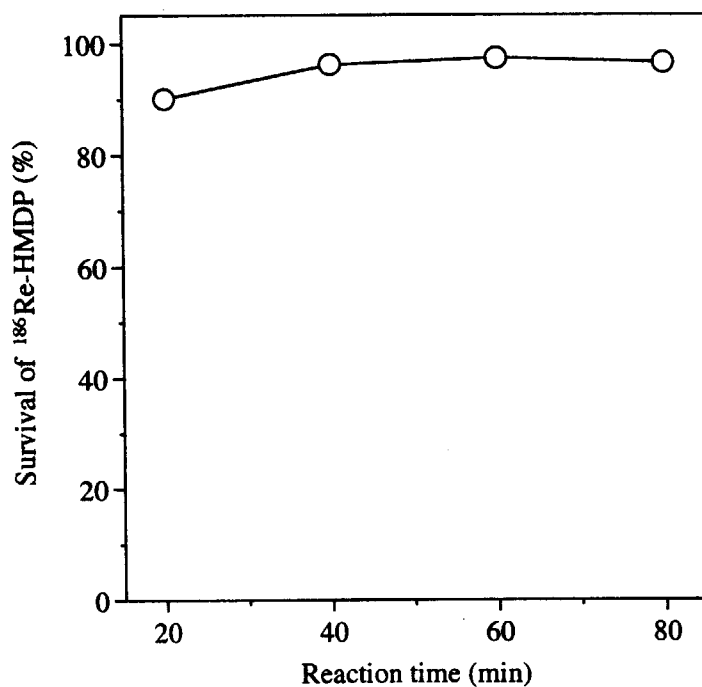


Fig3.1.2.-8 Effect of reaction time on the survival of ^{186}Re -HMDP In sodium acetate buffer (pH=5.0) 10 min after dilution (Re: HMDP: Sn =1: 639: 349 in mole ratio). cf. Fig.3.1.2.-5

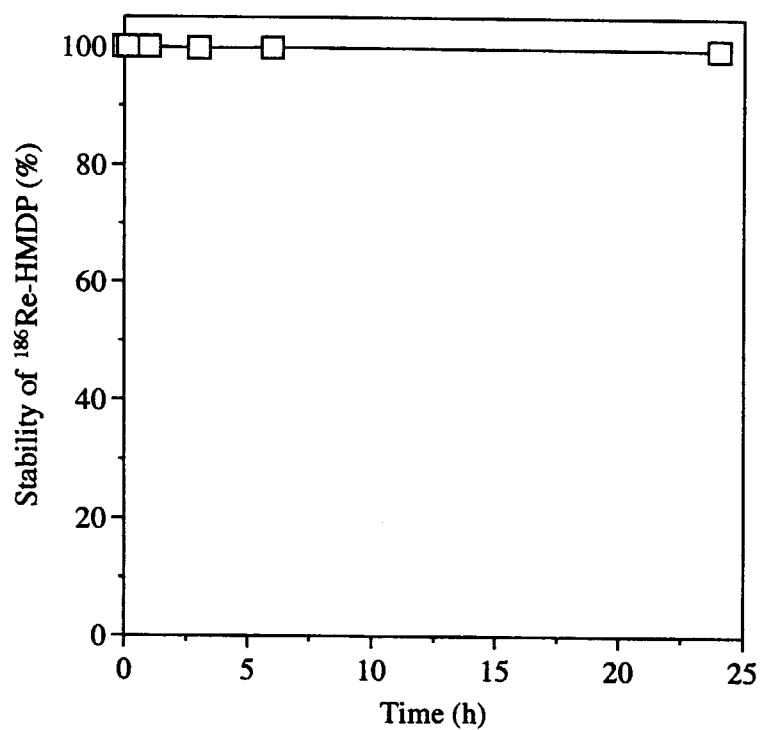


Fig. 3.1.2-9 Stability of $^{186}\text{Re-HMDP}$ at room temperature for 24 hours
(Re: HMDP: Sn = 1: 639: 349 in mole ratio). [Radiochemical yield: 99%]

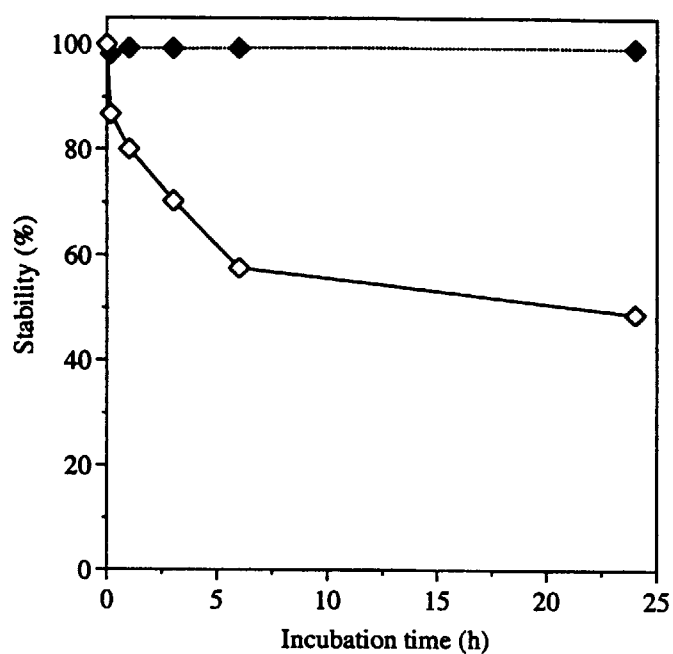


Fig. 3.1.2-10 Stability of $^{186}\text{Re-HMDP}$ in normal mouse serum at 37°C for 24 hours
(Re: HMDP: Sn = 1: 639: 349 in mole ratio).

◇: $^{186}\text{Re-HMDP}$ (Re: HMDP: Sn = 1: 639: 349 in mole ratio)

[Radiochemical yield: 98%]

◆: $^{186}\text{ReO}_4^-$

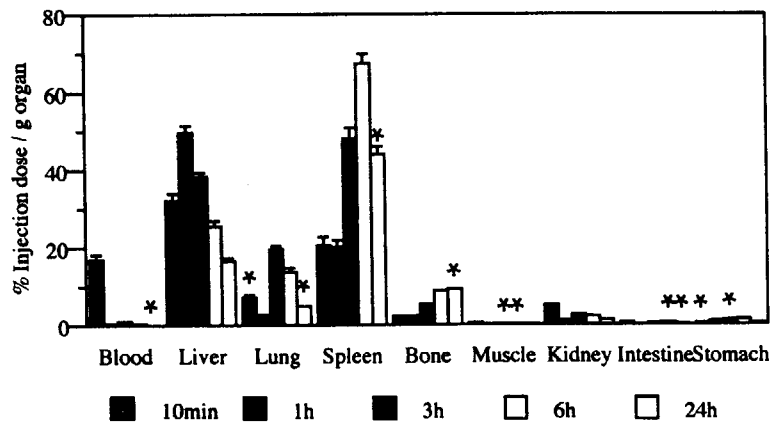


Fig. 3.1.2-11

Biodistribution of radioactivity after intravenous administration of ^{186}Re -HMDP (Re: HMDP: Sn = 1: 639: 349 in mole ratio, reaction time: 60 min) in normal mice.

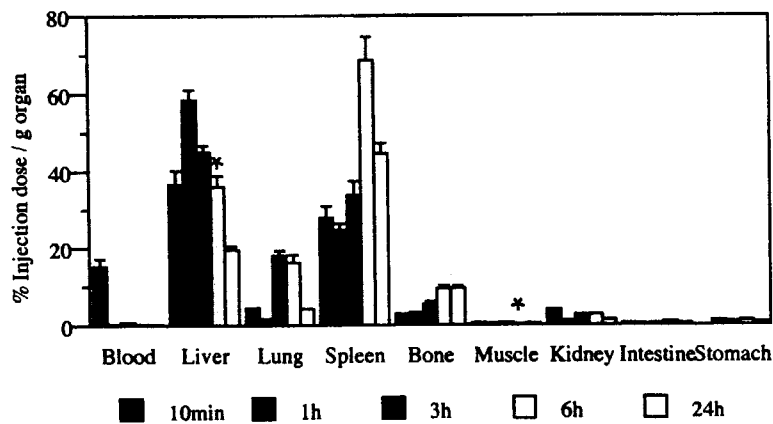


Fig. 3.1.2-12

Biodistribution of radioactivity after intravenous administration of ^{186}Re -HMDP (Re: HMDP: Sn = 1: 719: 196 in mole ratio, reaction time: 60 min) in normal mice.

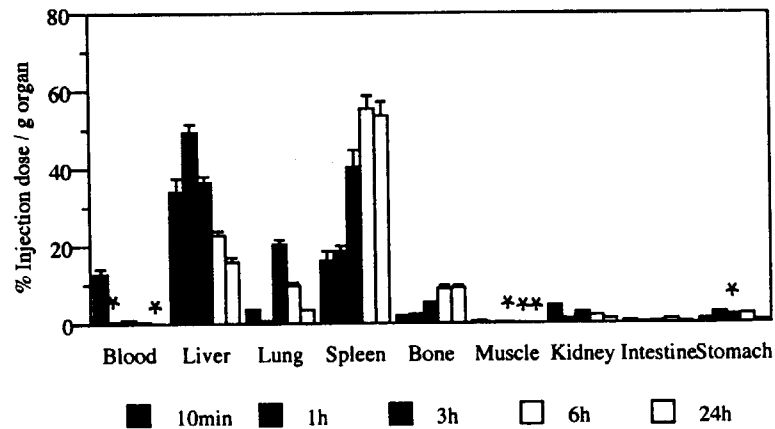


Fig. 3.1.2-13

Biodistribution of radioactivity after intravenous administration of ^{186}Re -HMDP (Re: HMDP: Sn = 1: 639: 349 in mole ratio, reaction time: 20 min) in normal mice.

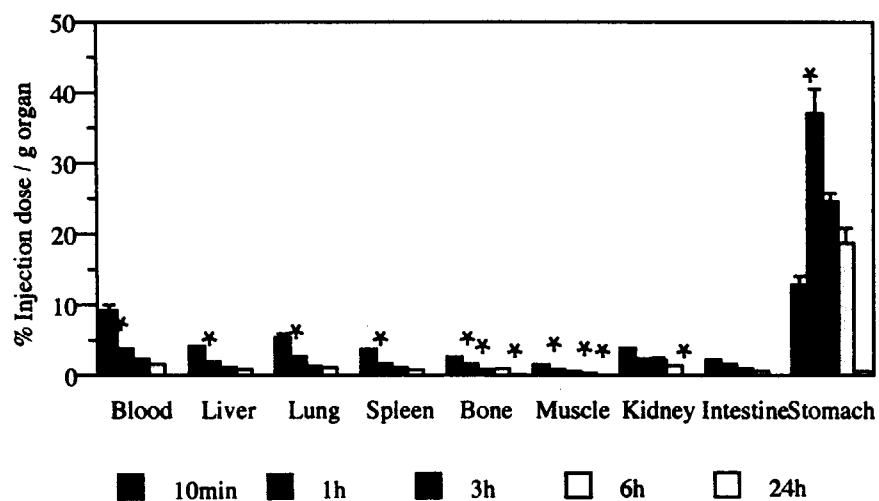


Fig. 3.1.2-14 Biodistribution of radioactivity after intravenous administration of $^{186}\text{ReO}_4^-$ in normal mice.

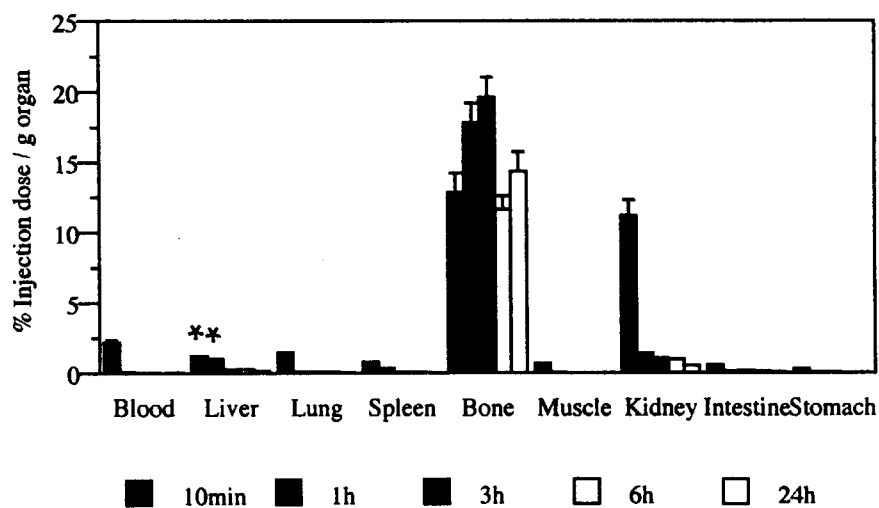


Fig. 3.1.2-15 Biodistribution of radioactivity after intravenous administration of $^{99\text{m}}\text{Tc-HMDP}$ in normal mice.

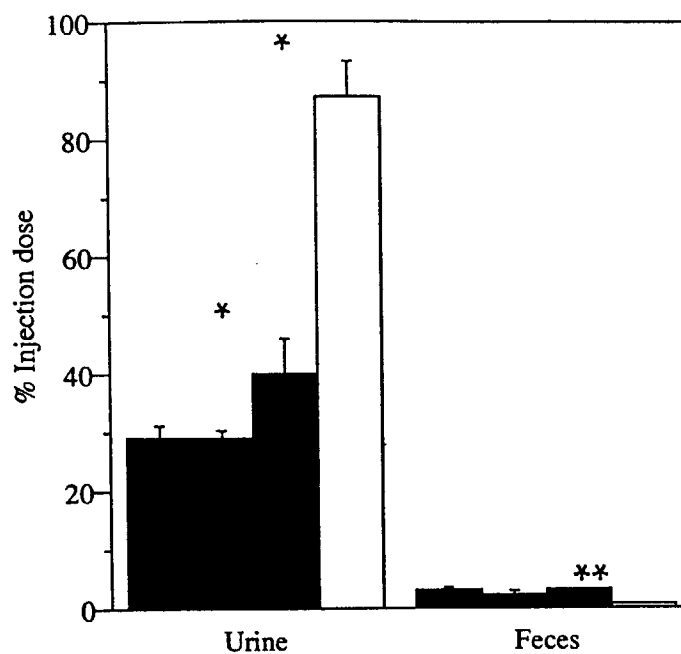
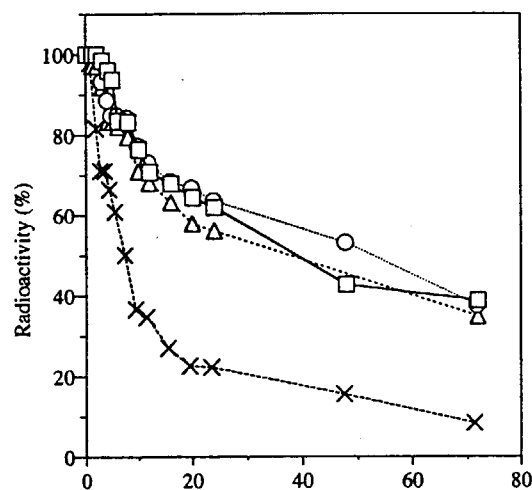


Fig. 3.1.2-16 Excretion for 24 hours

Each column represents the mean+S.D. [n=4-7] *p<0.01, **p<0.05.

- ^{186}Re -HMDP (Re: HMDP: Sn=1: 639: 349 in mole ratio; reaction time: 60 min)
- ^{186}Re -HMDP (Re: HMDP: Sn=1: 719: 196 in mole ratio; reaction time: 60 min)
- ^{186}Re -HMDP (Re: HMDP: Sn=1: 639: 349 in mole ratio; reaction time: 20 min)
- $^{186}\text{ReO}_4^-$

Fig. 3.1.2-17 Decrease of ^{186}Re radioactivity after intravenous administration into normal mice measured with a radioisotope dose calibrator.

Each point represents the mean [n=2-3].

- : ^{186}Re -HMDP (Re: HMDP: Sn=1: 639: 349 in mole ratio; reaction time: 60 min)
- : ^{186}Re -HMDP (Re: HMDP: Sn=1: 719: 196 in mole ratio; reaction time: 60 min)
- △: ^{186}Re -HMDP (Re: HMDP: Sn=1: 639: 349 in mole ratio; reaction time: 20 min)
- ×: $^{186}\text{ReO}_4^-$

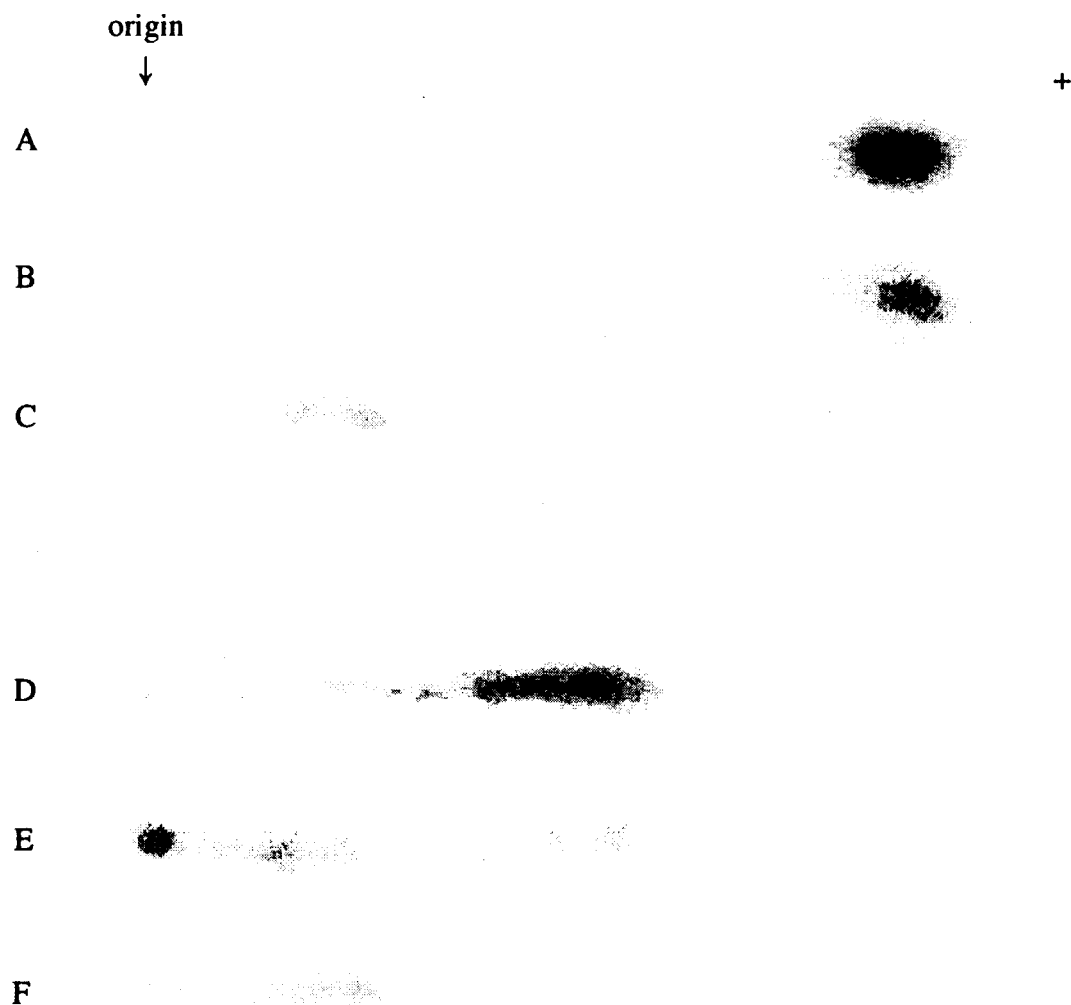


Fig. 3.1.2-18 Electrophoretic patterns of ^{186}Re -labeled compounds on Whatman 1 filter paper in acetate buffer (pH=0.5) at 800 V for 20 min; A: $^{186}\text{ReO}_4^-$ detected by radioactivity; B: $^{186}\text{ReO}_4^-$ in normal mouse serum detected by radioactivity; C: protein in normal mouse serum containing ReO_4^- detected by ponceau 3R; D: ^{186}Re -HMDP detected by radioactivity; E: ^{186}Re -HMDP in normal mouse serum detected by radioactivity; F: protein in normal mouse serum containing Re-HMDP detected by ponceau 3R.

3.1.3 パミドロン酸 (APD)

APD の ^{186}Re 標識とマウス体内分布

(1) 研究目的

乳癌、前立腺癌、肺癌などの悪性腫瘍の末期には、骨に転移し、患者は耐え難い疼痛を来す。アイソトープを用いる骨転移による疼痛の治療については、 $^{89}\text{SrCl}_2$ 、 ^{186}Re -HEDP (1-HydroxyEthylidene-1,1-Diphosphate), ^{153}Sm -EDTMP などの研究が行われている。欧米ではすでに臨床応用されており、この疼痛に対して放射線治療が有効なことが示されている。臨床応用されているパミドロン酸ナトリウム (APD) を放射線による細胞致死作用の強い ^{186}Re で標識し、その標識 APD を投与して、骨転移による痛みを緩和することを目的としている。

(2) はじめに

アレディアキットはスイス CIBA-GEIGY 社で開発された bisphosphonate 剤であり、骨に高い親和性を示し、亢進した骨吸収を抑制する。悪性腫瘍による高カルシウム血症に対する有用性が認められており、臨床に使用されている。一方、 ^{186}Re は β 線を放出し、細胞致死作用が強いことが知られている。この bisphosphonate 剤 (Fig. 3.1.3-1) に ^{186}Re を標識して高カルシウム血症とともに骨転移した腫瘍の治療を目的として実験を行った。

アレディアキットの成分はパミドロン酸二ナトリウムを無水物として 30 mg、添加物として D-マンニトールを 470 mg 及びリン酸を適量含有しており、これらの添加物が標識の妨害をしていると考えられ、アレディアキットを用いた種々の標識実験では標識できなかった。

そこで純粋なパミドロン酸二ナトリウムを使用するため、スイス CIBA-GEIGY 社から研究目的で 1000 mg の Disodium pamidronate (PDS) パミドロン酸二ナトリウムを譲渡してもらい標識実験を行った。 ^{186}Re -HEDP 標識 (3.1.1(2)参照) と同じように凍結乾燥したパミドロン酸二ナトリウム標識用試料を作成し、種々の標識実験を行った。さらに、臨床応用のための動物実験を行った。

(3) 合成方法

APD キットの作成

APD を ^{186}Re で標識するために、APD の標識キットを作成した (Fig. 3.1.3-2)。ゲンチジン酸 10 mg, パミドロン酸二ナトリウム 5 mg を 2 ml の脱気した蒸留水に溶かした。他方、塩化第一スズ 2 mg を 0.1 N HCl 2 ml に溶かし、これらを混合し、バイアルに 2 等分した。この溶液を冷凍し、凍結乾燥器にて 24 時間乾燥させ、パミドロン酸二ナトリウム標識用キットとした。

標識

^{186}Re 原液を 0.5 ml 分取し、生理食塩水 1.5 ml を加えて希釈した後、その ^{186}Re 溶液 0.1 ml を APD 標識キットに加え、水溶性オイルバスで 100°C 、10 分間反応させた。室温まで冷却したのち、1 M CH_3COONa で pH を 4-5 に調整した。APD 標識率を加熱温度、反応時間、反応 pH 及び各試薬濃度を変化させることにより、最適の標識条件を求めた。

(4) ガンマカメラによる標識率の測定

標識率の測定は薄層クロマトグラフィー (TLC) によって行った。まず、アセトンによる 1 次展開を行い、その後、生理食塩水により 2 次展開を行った。これを、ガンマカメラにより、イメージ撮影して、 ^{186}Re -APD 標識化合物、 ^{186}Re 酸化物及びフリーの $^{186}\text{ReO}_4^-$ の 3 種類の放射性化合物を Fig. 3.1.3-3 に示すように分離した。

(5) マウスによる体内分布測定

標識調製した ^{186}Re -APD 溶液 200 μl (10-20 μCi) を尾静脈より、マウスに投与し、それぞれ 1 時間、24 時間そして 48 時間までの体内分布をフリーの $^{186}\text{ReO}_4^-$ と比較して測定した (Fig. 3.1.3-4~6)。

(6) ガンマカメラによるマウスのイメージ

尾静脈より ^{186}Re -APD 溶液 200 μl (約 100 μCi (3.7 kBq)) をマウスに投与し、3 時間後のイメージをガンマカメラにより撮像した (Fig. 3.1.3-4)。

(7) 結果及び考察

標識率及び経時的安定性

^{186}Re -APD の標識率は $87.2 \pm 4.5\%$ ($n=3$) であった。標識率は pH に大きく依存しており、pH2 のとき $87.2 \pm 4.5\%$ 、pH が 3 のとき $69.1 \pm 1.67\%$ 、pH が 5 のとき $50.0 \pm 16.3\%$ 、pH が 7 のとき $48.7 \pm 18.9\%$ であった。合成した ^{186}Re -APD の経時的安定性を 24 時間測定した。その結果、pH2 において標識終了直後 ($t=0$) は、 $91.5 \pm 2.0\%$ 、1 時間後 $87.8 \pm 7.8\%$ 、2 時間後 $88.0 \pm 6.5\%$ 、3 時間後 $85.2 \pm 8.9\%$ 、6 時間後 $80.6 \pm 6.7\%$ 、24 時間後 $70.6 \pm 10.5\%$ であった。

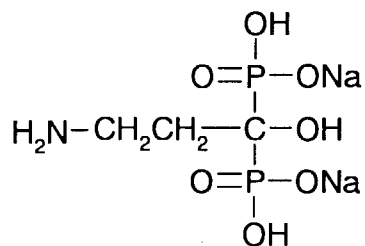
体内分布

Fig. 3.1.3-4~6 に示すように、投与後 1 時間、24 時間及び 48 時間における ^{186}Re の体内分布を測定した。その結果、肺と肝臓そして胃への取込みが高く、骨には、1 時間後 2.96% ID/g、48 時間後 3.96% ID/g で時間と共に相対的に骨への取込みが高くなった。また、Fig. 3.1.3-7 に 30 分、1 時間、2 時間後の血液、腎臓、骨への経時的放射能変化を示した。30 分後では血液の % ID/g は 20% 以上であるが、2 時間後には、骨への集積が一番高い結果が得られた。

ガンマカメラによるイメージを Fig. 3.1.3-8 に示した。腎臓と肝臓、そして膀胱に高い集積がみられるが、骨全体に $^{186}\text{Re-APD}$ が分布していることが認められた。

今後の検討

健常マウス及び骨折マウスにおける $^{186}\text{Re-APD}$ の骨集積及び骨折による骨代謝の亢進を体内分布測定により比較検討し、臨床応用の可能性をみることを計画している。



Disodium 3-Amino-1-Hydroxypropylidene-1,1-Bisphosphonate

Fig. 3.1.3-1 Chemical Structure of APD

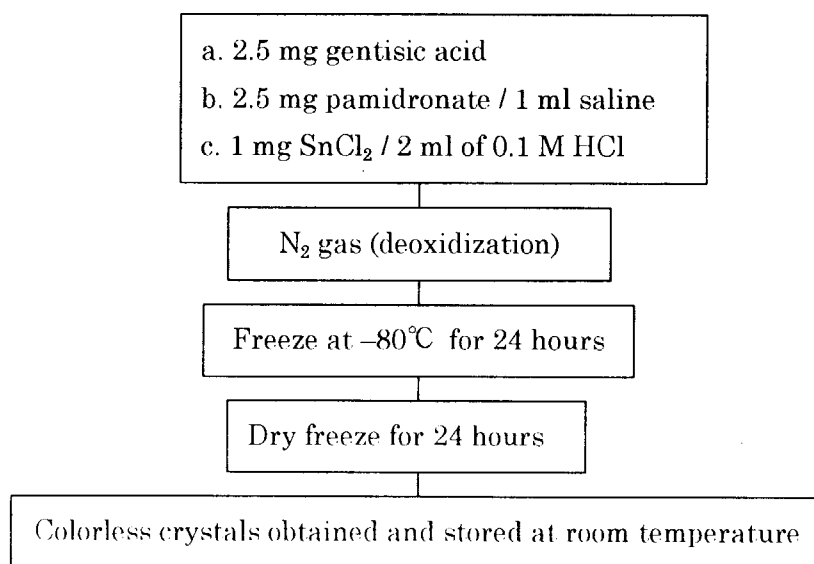


Fig. 3.1.3-2 Preparation of APD kit

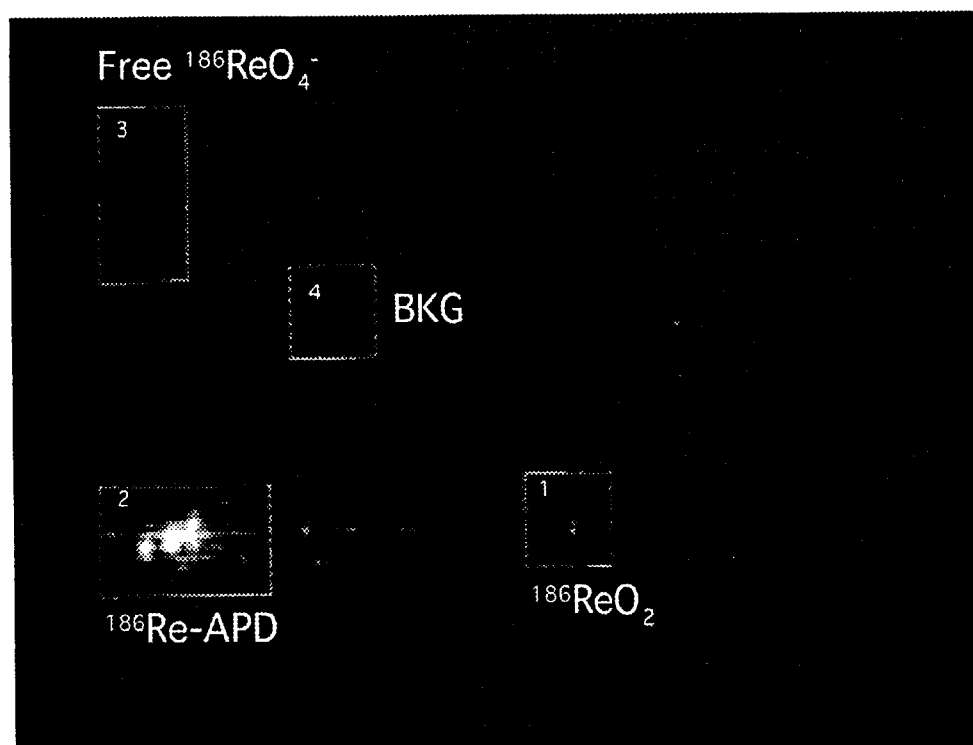


Fig. 3.1.3-3 Two-dimensional TLC.

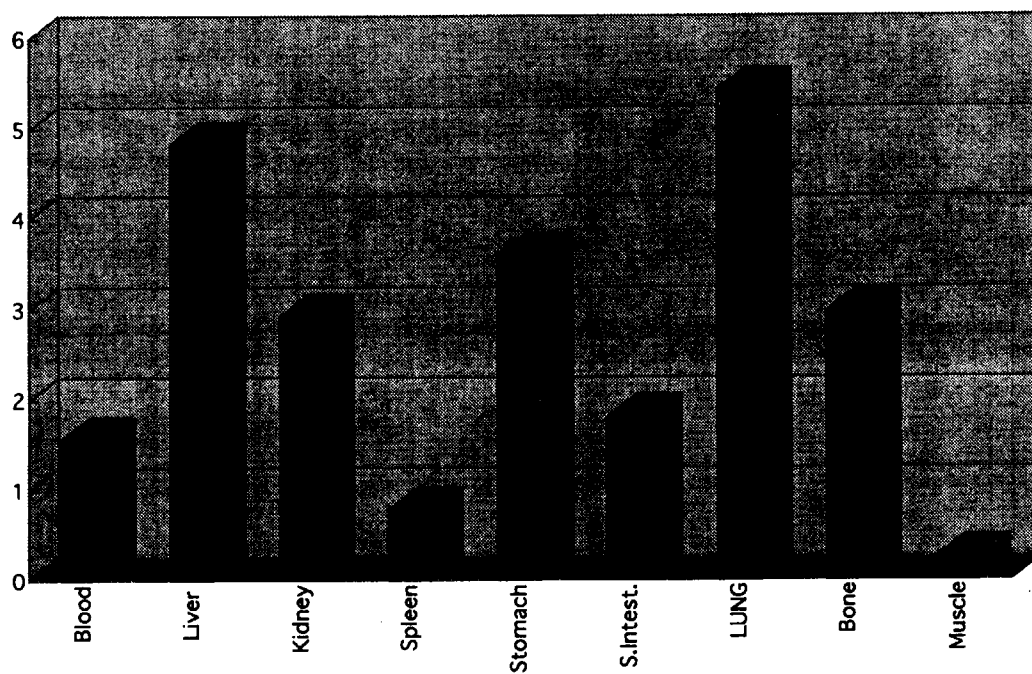


Fig. 3.1.3-4 Biodistribution of radioactivity 1 hour after injection of $^{186}\text{Re-APD}$ in normal mouse.

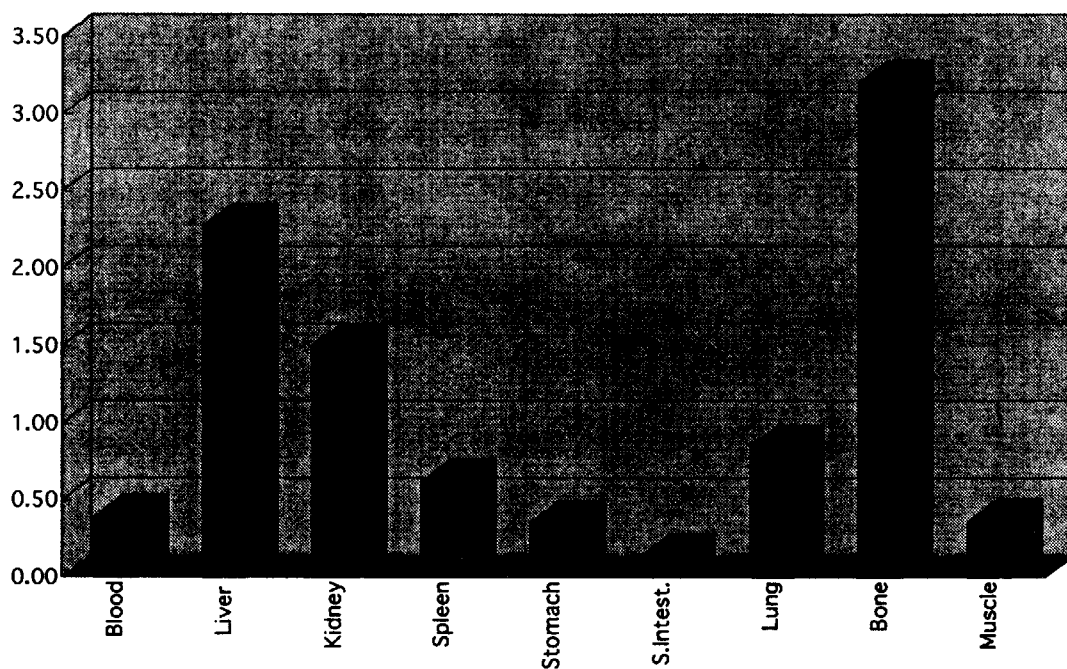


Fig. 3.1.3-5 Biodistribution of radioactivity 24 hours after injection of ^{186}Re -APD in normal mouse.

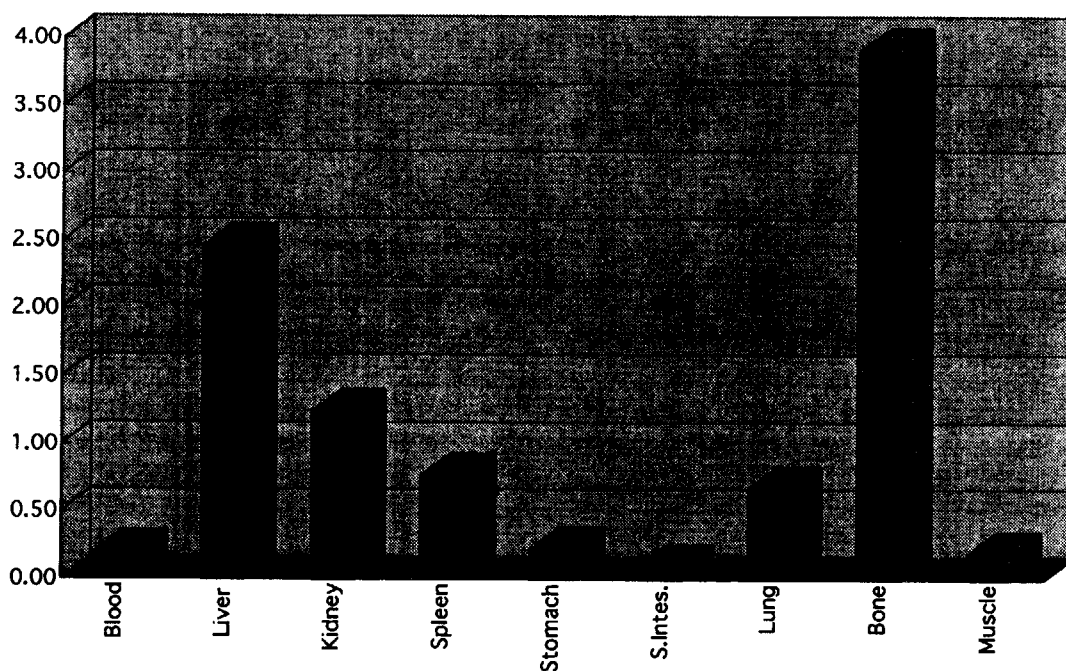


Fig. 3.1.3-6 Biodistribution of radioactivity 48 hours after injection of ^{186}Re -APD in normal mouse.

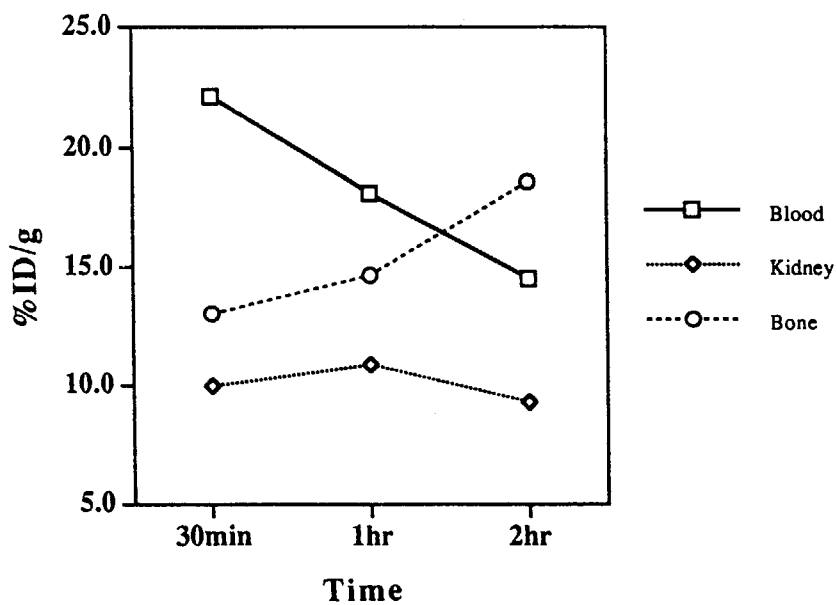


Fig. 3.1.3-7 Time activity curve of ^{186}Re in blood, kidney and bone on injection of ^{186}Re -PDS.

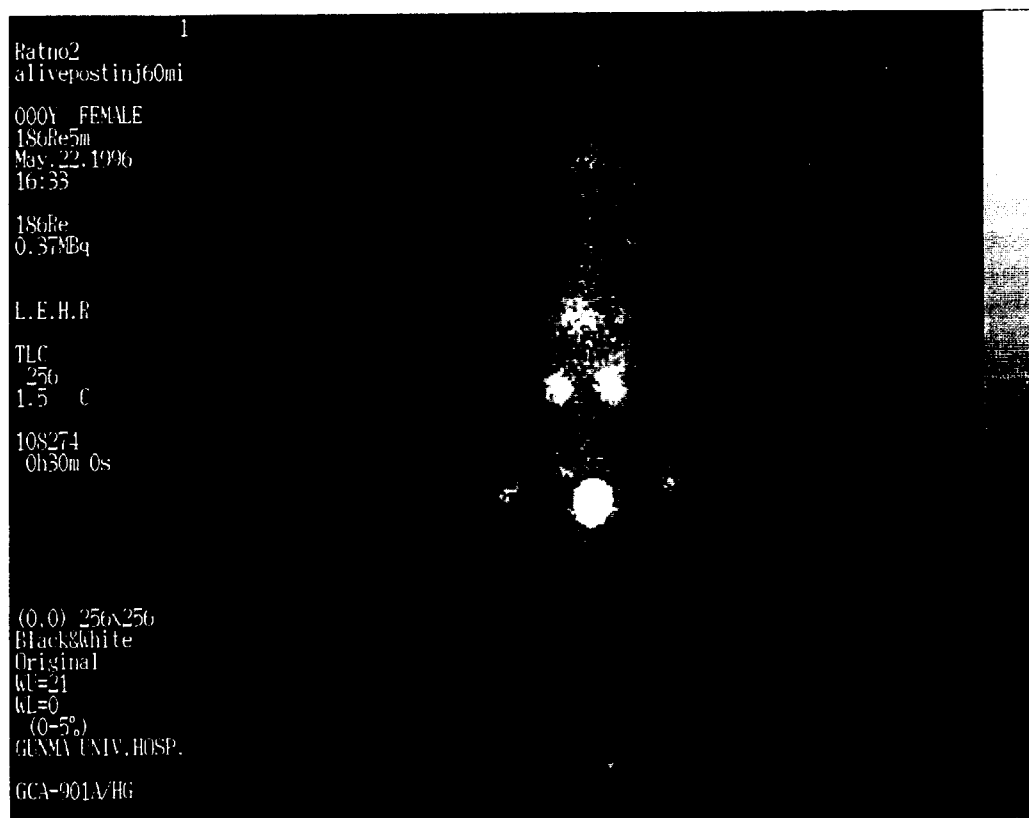


Fig. 3.1.3-8 Biodistribution of ^{186}Re in mice detected with a γ -camera.

3.1.4 DMSA

(1) DMSA の ^{186}Re 標識とマウス体内動態の検討

(実験材料)

試薬

Meso-2,3-Dimercaptosuccinic acid (DMSA) は Aldrich 社より、 NH_4ReO_4 、 $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、L-アスコルビン酸は、和光純薬工業(株)からそれぞれ購入した。

酢酸緩衝液

0.1M 酢酸ナトリウム水溶液と 0.1 M 酢酸水溶液を容積比 32 : 1 で混合した (pH 6.2)。実験に用いた精製水は煮沸後アルゴンで空気を置換し、酢酸緩衝液も使用前にアルゴン置換を行った。電気泳動用酢酸緩衝液は、0.1 M 酢酸ナトリウム水溶液と 0.1 M 酢酸水溶液を容積比 2 : 1 で混合し、1/5 希釈し作成した (pH 5.0)。

^{45}Ca -酢酸緩衝液

^{45}Ca は第一化学薬品(株)より $^{45}\text{CaCl}_2$ 水溶液 (1.1 TBq/gCa, 0.37 GBq/ml) として購入した。 ^{45}Ca -酢酸緩衝液の Ca 濃度は、マウスの血中 Ca 濃度と等しい $2.40 \times 10^{-3} \text{ M}$ となるように調整した。

実験動物

4 週齢の ddY 系雄性マウスを日本 SLC(株)より購入し、1 週間飼育後、実験に使用した。

1) 化学実験

放射化学的収率の算出法

放射化学的収率 (以下、収率) は、薄層クロマトグラフィー (TLC)、ペーパークロマトグラフィー (PC) を用いて求めた。TLC は Merck 社 Aluminium sheets (Silica gel 60 F₂₅₄) を用い、アセトンを展開溶媒として行った。PC は Whatman 社 3MM Chr (cat.No.3030909) のろ紙を使用し、生理食塩水を展開溶媒とした。TLC では、Re-DMSA および Re の無機物 (ReO_2 等) は $R_f=0$ (原点)、 ReO_4^- は $R_f=1.0$ に、PC では無機物のみが $R_f=0$ (原点) に観察されることが明らかにされている¹⁻³⁾。バイオ・イメージングアナライザー (FUJIFILM, BAS-1500Mac) を用いて、乾燥後のプレートおよびペーパの放射能を測定し、TLC での $R_f=0$ の放射能比 A (%)、PC での $R_f=0$ の放射能比 B (%) とし、収率を $A \times (100-B)/100$ (%) と算出した。

ろ紙電気泳動法による定量法

^{186}Re -DMSA および血清中の ^{186}Re -DMSA を Whatman 社のろ紙 1 (cat.No.1001917) にスポットし、一定電圧 (800 V) で 20 分間、氷上で電気泳動した。ペーパーを乾燥後、放射能はバイオ・イメージングアナライザーで測定した。

血清中の蛋白質との結合性を調べるため、 ^{186}Re -DMSA および血清中の ^{186}Re -DMSA を電気泳動し、泳動後のペーパーを蛋白質染色液 (0.4% ポンソー 3R, 5% トリクロロ酢

酸)で染色し、脱色液(2%酢酸)で脱色した。

1)-1 ^{186}Re 水溶液と $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 用 DMSA キットとの反応

日本メジフィジックス社の $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 用 DMSA キット(キドニーシンチ^Rキット)と ^{186}Re 水溶液を混合した反応液に 3M 塩酸を加え pH を調整し、生成した ^{186}Re -DMSA の収率を求めた。 ^{186}Re 水溶液の濃度は供給時の濃度に等しい 25 $\mu\text{g/ml}$ と、検出できる範囲で可能な極低濃度の 2.17×10^{-2} $\mu\text{g/ml}$ の 2 種とし、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ の場合と同じ液量で反応させた。

^{186}Re 水溶液と $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 用 DMSA キットとの反応で生成した ^{186}Re -DMSA の収率を Fig. 3.1.4.(1)-1 に示す。 ^{186}Re -DMSA の収率は反応液の pH の影響を受け、3 M 塩酸を加えないとき(Re 濃度 25 $\mu\text{g/ml}$ では pH 3.2、 2.17×10^{-2} $\mu\text{g/ml}$ では pH 3.6)の収率は 10% に満たなかったが、pH を下げると収率は上昇した。pH の低下で Sn の還元力が増し、Re の還元を容易にしたと考えられる。加熱による収率の上昇も認められた。 ^{186}Re 水溶液が 25 $\mu\text{g/ml}$ のとき、未反応の $^{186}\text{ReO}_4$ が多いのは、このキットがキャリアフリーである $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 用であったため、配位子および還元剤の量が不足していたと考えられる。このキット中の試薬の濃度は、DMSA が 1.5×10^{-3} M、 $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ が 5.0×10^{-4} M である⁴⁾。 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 水溶液とこのキットを用いたとき生成する錯体は $^{99\text{m}}\text{Tc(V)}$ -DMSA であり、 $^{99\text{m}}\text{Tc(V)}$ -DMSA の至適合成条件は DMSA 濃度が 3.0×10^{-3} M、 $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 濃度が 9.4×10^{-5} M、pH は 8.0 であると報告されている⁵⁾。Tc は酸性条件で $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 濃度が高いときには、3 価に還元されるが、アルカリ条件で、 $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ を低濃度にする、5 価までしか還元されない。ところが Re の場合、 $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ による還元反応は進行しにくく、酸性条件で、過剰の $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ の存在下でも 5 価にまでしか還元されない⁶⁻⁹⁾。 $^{186}\text{Re(V)}$ -DMSA を合成するには、これらのことを考慮して高濃度の DMSA、 $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ が必要であると考えられる。

1)-2 ^{186}Re -DMSA の合成条件の検討

DMSA 濃度、還元剤としての $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 濃度、酸化防止剤としての L-アスコルビン酸濃度や反応液の pH 等の至適条件を検討した。反応は沸騰水浴中で行った。求めた合成条件を Table 3.1.4.(1)-1 に示す。以下の実験は、この最適条件に従って ^{186}Re -DMSA を作成した。

$\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

$\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ の最適濃度を求めるため、 $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ と Re のモル比 ($[\text{Sn}]/[\text{Re}]$) を変化させた。DMSA を 7.68×10^{-3} M、L-アスコルビン酸を 2.84×10^{-3} M、pH 調整に用いる塩酸を 5.25×10^{-2} M とし、沸騰水浴中で 30 分加熱した。得られた ^{186}Re -DMSA の収率を Fig. 3.1.4.(1)-2 に示す。Re 濃度 25 $\mu\text{g/ml}$ の場合、 $[\text{Sn}]/[\text{Re}] = 20 \sim 30$ のとき 84% ~ 93% の収率であった。従って、この値 (2.66×10^{-3} M ~ 3.99×10^{-3} M) を $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ の最適濃度とした。Re 濃度が 250 $\mu\text{g/ml}$ のとき $[\text{Sn}]/[\text{Re}] = 4$ で 97% 以上を示し、2.5 $\mu\text{g/ml}$ では $[\text{Sn}]/[\text{Re}] = 30$ で 20% 程度であった。このように、高い収率が得られる $[\text{Sn}]/[\text{Re}]$ の値

は Re 濃度により異なることから、Re 濃度が $2.5 \sim 250 \mu\text{g/ml}$ のとき一定量の $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ が必要と考えられる。また、Re 濃度が $250 \mu\text{g/ml}$ で $[\text{Sn}]/[\text{Re}] > 10$ 、および $25 \mu\text{g/ml}$ で $[\text{Sn}]/[\text{Re}] > 30$ の場合には反応液に沈殿が見られた。過剰な $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ を用いた場合 SnO_2 の沈殿が検出されたという報告から⁹⁾、生じた沈殿は SnO_2 と考えられる。

DMSA

$\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 濃度を $2.66 \times 10^{-3} \text{ M}$ または $3.99 \times 10^{-3} \text{ M}$ とし、DMSA と Sn の濃度比 ($[\text{DMSA}]/[\text{Sn}]$) を変化させ、L-アスコルビン酸を $2.84 \times 10^{-3} \text{ M}$ 、pH 調整に用いる塩酸を $5.25 \times 10^{-2} \text{ M}$ とし、沸騰水浴中で 30 分加熱した。Re 濃度は $25 \mu\text{g/ml}$ とした。得られた ^{186}Re -DMSA の収率を Fig. 3.1.4.(1)-3 に示す。 $[\text{DMSA}]/[\text{Sn}] = 1$ のとき最も高い収率を示した (95%以上)。従って、この値を DMSA の最適濃度とした。また、DMSA と Re のモル比 ($[\text{DMSA}]/[\text{Re}]$) を横軸に取ったグラフを Fig. 3.1.4.(1)-4 に示すが、Re 濃度によって最適条件の $[\text{DMSA}]/[\text{Re}]$ の値が異なっていた。この結果から、 ^{186}Re -DMSA 合成には Re 濃度が $2.5 \sim 250 \mu\text{g/ml}$ の範囲のとき一定量の DMSA であればよいと考えられる。

pH

反応液中の $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 濃度を $2.66 \times 10^{-3} \text{ M}$ 、DMSA 濃度を $2.63 \times 10^{-3} \text{ M}$ とし、L-アスコルビン酸濃度を $2.84 \times 10^{-3} \text{ M}$ とした後、3 M 塩酸または 0.25 M 水酸化ナトリウム水溶液で pH を調整し、沸騰水浴中で 30 分加熱した。Re 濃度は $25 \mu\text{g/ml}$ とした。得られた ^{186}Re -DMSA の収率を Fig. 3.1.4.(1)-5 に示す。pH 調整を行わないとき反応液の pH は 1.6 であり、pH を下げると収率は高くなった (pH 1.3 以下で 96%以上)。pH が低すぎると、HCl の Cl^- イオンと Re が反応して、 ReOCl_4 などの副生成物ができることが知られている⁹⁾。またアルカリ条件では、DMSA のカルボキシル基のイオン化がおこることから¹⁰⁾、pH は 1 前後が適当であるとした。pH 1.1 のとき、塩酸の濃度は $5.63 \times 10^{-2} \text{ M}$ である。

加熱時間

$\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 濃度 $2.66 \times 10^{-3} \text{ M}$ 、DMSA 濃度 $2.63 \times 10^{-3} \text{ M}$ 、L-アスコルビン酸濃度 $2.84 \times 10^{-3} \text{ M}$ の反応液に、 $5.63 \times 10^{-2} \text{ M}$ の塩酸を加え、沸騰水浴中でそれぞれ 5 分、10 分、20 分、30 分、40 分、50 分間加熱した。Re 濃度は $25 \mu\text{g/ml}$ とした。得られた ^{186}Re -DMSA の収率を Fig. 3.1.4.(1)-6 に示す。30 分以上の加熱で 95%以上の収率が得られたので、加熱時間は 30 分と決定した。

L-アスコルビン酸

L-アスコルビン酸以外の酸化防止剤としてゲンチシン酸、クエン酸を用いた報告もあるが、これらと比較した場合 L-アスコルビン酸に高い効果が認められるので³⁾、これを選択した。 $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 濃度 $2.66 \times 10^{-3} \text{ M}$ 、DMSA 濃度 $2.63 \times 10^{-3} \text{ M}$ 、塩酸濃度 $5.63 \times 10^{-2} \text{ M}$ の反応液に、濃度の異なる L-アスコルビン酸を加え、沸騰水浴中で 30 分加熱した。Re 濃度は $25 \mu\text{g/ml}$ とした。得られた ^{186}Re -DMSA の収率を Fig. 3.1.4.(1)-7 に示す。L-ア

スコルビン酸を加えなくても 93%と高収率であったが、添加 (2.8×10^{-3} M 以上) により 96%以上と高くなった。

1)-3 生成錯体の安定性

室温放置

合成した ^{186}Re -DMSA を反応液のまま 1 週間室温放置し、残存率を調べた結果を Fig. 3.1.4.(1)-8 に示す。 $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 濃度の下限 (2.66×10^{-3} M) と上限 (3.99×10^{-3} M) の濃度範囲で合成された錯体は、1 週間放置しても 98%以上残存している。

酢酸緩衝液中

^{186}Re -DMSA 溶液を酢酸緩衝液に 1/10 希釈し、24 時間後まで溶液中に残存する ^{186}Re -DMSA の割合を TLC、PC で求めた。 $^{186}\text{ReO}_4^-$ も経時的な残存率を調べた (Fig. 3.1.4.(1)-9)。 ^{186}Re -DMSA は、24 時間経過してもほとんど変化しなかった。

正常マウス血清中

酢酸緩衝液に希釈した ^{186}Re -DMSA 溶液を、さらに正常マウス血清 (COSMOBI 社, CL8000) に 1/10 希釈し、37°Cでのインキュベートを 24 時間後まで行い残存率を求めた (Fig. 3.1.4.(1)-10)。 ^{186}Re -DMSA は 90%以上残存しており、正常マウス血清中でも安定である。

マウス血清分画中

正常マウス (オス) に ^{186}Re -DMSA 溶液を投与し、直後に下大静脈より採血し、4°C、2000×g で 2 時間遠心分離して、血球成分を取り除き、上清をマウス血清分画とした。TLC、PC により、このマウス血清分画中の ^{186}Re -DMSA の残存率を求めた。 $^{186}\text{ReO}_4^-$ についても同様に行った。 ^{186}Re -DMSA は 80%以上残存することから、マウス血清分画中においても大きな変化は受けていないと考えられる。

^{45}Ca -酢酸緩衝液中

^{45}Ca -酢酸緩衝液中での生成錯体の挙動を調べるため、Table 3.1.4.(1)-1 に示す方法で非放射性的な Re -DMSA を合成した。この Re -DMSA 溶液を ^{45}Ca -酢酸緩衝液中に 1/10 希釈し、 ^{45}Ca イオンとの結合を経時的に 24 時間後まで濾紙電気泳動法で調べた。

^{186}Re -DMSA と $^{186}\text{ReO}_4^-$ を電気泳動した結果を Fig. 3.1.4.(1)-11 に示す。それぞれ、陽極側に 9.0cm、11.5cm に移動した。別に、収率が 80%と確認された ^{186}Re -DMSA を電気泳動したところ、前述の ^{186}Re -DMSA の泳動位置に全体の 80%のピークが見られた。電気泳動で原点に留まった割合は、PC で示された無機物の割合とほぼ同じであったので、原点に留まるものは無機物であると推測される。

血清中のサンプルを泳動した結果を Fig. 3.1.4.(1)-12 に示す。血清中の $^{186}\text{ReO}_4^-$ は、Fig. 3.1.4.(1)-11 の $^{186}\text{ReO}_4^-$ と同様の結果であったが、血清中の ^{186}Re -DMSA は Fig. 3.1.4.(1)-11 の ^{186}Re -DMSA よりも原点に近く、明らかに移動距離が異なった。このことから、 ^{186}Re -DMSA は血清中で何かと結合すると推測される。

マウス血清分画を電気泳動した結果を Fig. 3.1.4.(1)-13、14 に示す。 $^{186}\text{ReO}_4^-$ の血清分

画は、Fig. 3.1.4.(1)-11 の $^{186}\text{ReO}_4^-$ と同様な結果であったが、 $^{186}\text{Re-DMSA}$ の血清分画は Fig. 3.1.4.(1)-12 の血清中の $^{186}\text{Re-DMSA}$ と同様に、Fig. 3.1.4.(1)-11 の $^{186}\text{Re-DMSA}$ よりも原点に近く、移動距離が異なった。このことから、 $^{186}\text{Re-DMSA}$ はマウスの血清分画中で何かと結合すると推測される。

血清中での $^{186}\text{Re-DMSA}$ と蛋白質との結合性を調べるため、サンプルを電気泳動後、蛋白質の確認試験を行った (Fig. 3.1.4.(1)-15)。(A) は $^{186}\text{ReO}_4^-$ 、(B) は酢酸緩衝液に 1/10 希釈しさらに血清中に 1/10 希釈した $^{186}\text{ReO}_4^-$ 、(D) は $^{186}\text{Re-DMSA}$ 、(E) は酢酸緩衝液に 1/10 希釈しさらに血清中に 1/10 希釈した $^{186}\text{Re-DMSA}$ のイメージキャナから得られたパターンである。 ReO_4^- および Re-DMSA を同様の希釈方法で血清中に加え、電気泳動後の蛋白質染色液による発色をそれぞれ (C)、(F) に示した。(A) と (B) との泳動パターンに大きな差はなく、(C) の泳動パターンとは明らかに異なっていたため、 ReO_4^- は血清中で蛋白質と結合していないことが示唆される。(D) と (E) とでは、泳動距離が異なり、(E) は (F) と同じような泳動パターンであった。このことから、 Re-DMSA は血清中の蛋白質と結合しているのではないかと考えられる。マウス血清分画中のサンプルでも同様の結果が得られた。よって、 Re-DMSA は正常マウス血清中およびマウス血清分画中では蛋白質と結合するため、合成時の Re-DMSA とは異なった形態で存在していることが示唆される。

$^{99\text{m}}\text{Tc-DMSA}$ も蛋白質と結合することが知られているが、合成方法によって結合率が異なっており、この違いが体内分布にも影響を及ぼしている¹¹⁾と考えられている。このことは、腎臓への集積性に関係すると考えられる。

2) 動物実験

動物実験用投与サンプルは、 $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 濃度の異なる 2 種の $^{186}\text{Re-DMSA}$ ($2.66 \times 10^{-3} \text{ M}$ および $3.99 \times 10^{-3} \text{ M}$) と、 $^{188}\text{Re-DMSA}$ である。また、 $^{186}\text{ReO}_4^-$ および $^{99\text{m}}\text{Tc-DMSA}$ (キドニーシンチ^R Tc-99m 注) についても行った (Table 3.1.4.(1)-2)。

2)-1 体内分布

酢酸緩衝液で 1/10 希釈したサンプル 100 μl /匹 (0.5 μCi 、18.5 kBq) をマウスに尾静脈より投与した。一定時間 (10 分、1、3、6、24 時間) 後に、1 群 5 匹のマウスをジエチルエーテルで麻酔後、腹壁を開き、下大静脈から採血した。続いて、あらかじめ風袋測定済のチューブに、肺、脾臓、腎臓、胃、腸、筋肉、大腿骨、肝臓を順に採取した。秤量後、 γ カウンタ (Packard Instrument Company, 5003 型オートガンマカウンター) で放射能を測定した。測定データは、減衰補正済の測定値 (cpm) を “% Injection dose/organ”、すなわち投与量に対する器官 g 当たりの値に変換した。胃については “% Injection dose/organ” に変換した。次に、危険率 1% のスミルノフ検定にかけて^{12) ~ 15)}、測定値を評価した。有意差検定は、一元配置分散分析 (危険率 1%) でサンプル群の母平均が等しいかどうか調べ、そのうち母平均が等しくないと出たものについて Dunnett の多重比較 (危

除率 1%) で、どの群の間に有意差が存在するのか調べた¹³⁾。

^{186}Re -DMSA の体内分布の結果を Fig. 3.1.4.(1)-16、17 に示す。2 種類の ^{186}Re -DMSA の間に差はみられなかった。いずれも骨に集積し、胃にはほとんど集まらなかった。 ^{188}Re -DMSA も同様であった (Fig. 3.1.4.(1)-18)。これらの分布は 5 価の $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DMSA の分布に非常によく似ていた²⁾。胃に集積する $^{186}\text{ReO}_4^-$ (Fig. 3.1.4.(1)-19) や腎臓に集積する 3 価の $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DMSA (Fig. 3.1.4.(1)-20) とは異なった。

Re 化合物が分解すると Re は安定な化学形である ReO_4^- になる¹⁵⁾。 ^{186}Re -DMSA は生体内で安定であり、分解されて $^{186}\text{ReO}_4^-$ に変化することなく、胃への集積特異性も持たないことが確認された。

DMSA がリン化合物でないにも関わらず骨に集積したため、ろ紙電気泳動法により、 ^{45}Ca と Re-DMSA の結合を調べたところ、全く結合していないことが確認された (Fig. 3.1.4.(1)-21)。

腎臓では、2 種の ^{186}Re -DMSA は 10 分後最も高く集積したが、このときの値は、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DMSA における 10 分後の 1/2 以下、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DMSA が最大の集積性を示す 6 時間後の 1/5 以下であり、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DMSA よりもはるかに少ない集積であった。また、2 種の ^{186}Re -DMSA の分布に有意差を認められないが、これらの ^{186}Re -DMSA よりも ^{188}Re -DMSA の方が長い間腎臓に滞留していることが観察された。

^{186}Re 、 ^{188}Re -DMSA の血液中放射能濃度は、10 分後が最も高いが、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DMSA の濃度の 1/3 以下であり、血液からの消失が速いことが示唆された。

^{186}Re 、 ^{188}Re -DMSA は、肝臓への集積は少なかった。このことから、 ^{186}Re 、 ^{188}Re -DMSA は肝臓で異物として認識されにくいと考えられる。

脾臓においても、際だった集積性はなく、肝臓と同様なことが考えられる。

その他、肺、筋肉、腸に集積は見られなかった。心臓、脾臓、脂肪組織、生殖器、脳についても同様であった。

2)-2 代謝

サンプル 100 μl /匹 (0.5 μCi 、18.5 kBq) を尾静脈投与したマウスを一匹ずつ代謝ケージ (杉山元, メタボリカ MM-AP 型) に隔離し、24 時間後に尿と糞をそれぞれ採取し放射能を測定した。1 サンプルにつき 5～7 匹のマウスを使用した。

Fig. 3.1.4.(1)-22 に、尿および糞の 24 時間後の排泄量を示す。2 種の ^{186}Re -DMSA の排泄は 1% の危険率において有意な差はみられず、24 時間で約 70% が排泄されていた。これは 1 日に約 90% が排泄される $^{186}\text{ReO}_4^-$ には及ばないが、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DMSA が 36 時間経過後でも 13～15% 排泄されない⁴⁾ のと比較すると、高い排泄率である。尿の TLC と PC による分析では、 ^{186}Re -DMSA の残存率は 95% 以上であり、 $^{186}\text{ReO}_4^-$ や無機物はほとんど確認されなかった。

2)-3 体内放射能の経時変化

サンプル 100 μl /匹 (5 μCi 、185 kBq) を投与したマウスの放射能を Radioisotope Dose

Calibrator (米国キャピンテック, CRC-15 型) で経時的に測定した (Fig. 3.1.4.(1)-23) 。なお、1 サンプルにつき 3 匹のマウスを使用した。2 種の ^{186}Re -DMSA の間に有意差はみられなかった。 ^{186}Re -DMSA を投与したマウス体内から 1 日に減少する放射能は 80% 弱で、1 日の排泄量にほぼ一致した。また、 $^{186}\text{ReO}_4$ についても同様であった。 ^{186}Re -DMSA は 6 時間で投与量の 60% が排泄されており、排泄速度は非常に速いことが観察された。

今回の実験で、1 匹のマウス (5 週齢 ddY 系雄性マウスの平均体重: 28.1g) に投与した最大放射能は 5 μCi (185 kBq) であり、これは成人男性 (体重: 60 kg) に約 11 mCi (407 MBq) を投与した場合に相当する¹²⁾。すでに欧米では、人体に 30~35 mCi (1.11~1.30 GBq) の ^{186}Re を投与していることから¹⁶⁻²²⁾、本実験の場合、マウスの被ばくによる障害はないと考えられる。なお、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DMSA に含まれる DMSA と Sn の LD_{50} は、それぞれ 270 mg/kg (ddY 系マウスオス)⁴⁾、20.6 mg/kg (ICR 系マウスオス) である²³⁾。本実験では、DMSA、Sn の最大投与量はそれぞれ、0.18 mg/kg、0.17 mg/kg であり、投与サンプルの安全性および毒性に問題はないと考えられる。

参考文献

- 1) Singh J., Powell A. K., Clarke S. E. M. and Blower P. J., J. Chem. Soc., Chem. Commun., 1115-1117 (1991)
- 2) Singh J., Reghebi K., Lazarus C. R., Clarke S. E. M., Callahan A. P., Knnapp Jr F. F. and Blower P. J., Nucl. Med. Commun., 14, 197-203 (1993)
- 3) Hashimoto K., Islam Md S. and Izumo M.: "Proceedings of 7th International Symposium on Advanced Nuclear Energy Research, March 18-20, 1996, Takasaki, Gunma, Japan", JAERI-Conf 97-003, 313 (1997).
- 4) 日本メジフィジックス株式会社. "医薬品インタビューフォーム キドニーシンチ^R Tc - $^{99\text{m}}$ 注"
- 5) Yokoyama A., Hata N., Horiuti K., Masuda H., Saji H., Ohta H., Yamamoto K., Endo K. and Torizuka K., Int. J. Nucl. Med. Biol., 12, 273-279 (1985)
- 6) Bisunadan M. M., Blower P. J., Clarke S. E. M., Singh J. and Went M. J., Int. J. Radiat. Appl. Instrum. Part A, 2, 167-171 (1991)
- 7) Singh J., Powell A. K., Clarke S. E. M. and Blower P. J., J. Chem. Soc., Chem. Commun., 1115-1117 (1991)
- 8) Lisic E. C., Miradeh S. and Knapp Jr. F. F., J. Labeled. Comp. Radiopharm., 13, 67-75 (1992)
- 9) Singh J., Reghebi K., Lazarus C. R., Clarke S. E. M., Callahan A. P., Knnapp Jr F. F. and Blower P. J., Nucl. Med. Commun., 14, 197-203 (1993)
- 10) 久保田和彦, 神谷大雄, 木皿憲佐, 佐々木健一 "薬理学実験" 南江堂

- 11) Ikeda I., Inoue O. and Kurata K., *J. Nucl. Med. Biol.*, **4**, 56-65 (1977)
- 12) 佐藤徳光. “動物実験の基本” 西村書店
- 13) 吉村功. “毒性・薬効データの統計解析－事例研究によるアプローチ” サイエンティスト社
- 14) “新生化学実験講座 19 動物実験法”
- 15) Deutsch E., Libson K., Vanderheyden J.-L., Ketring A. R. and Maxon H. R., *Nucl. Med. Biol.*, **13**, 465-477 (1986)
- 16) Maxon III H. R., Schroder L. E., Thomas S. R., Hertzberg V. S., Deutsch E., Scher H. I., Samaratunga R. C., Libson K., Williams C. C., Moulton J. S. and Schneider H. J., *Radiology*, **176**, 155-159 (1990)
- 17) Maxon III H. R., Schroder L. E., Hertzberg V. S., Thomas S. R., Englaro E. E., Samaratunga R., Smith H., Moulton J. S., Williams C. C., Ehrhardt G. J. and Schneider H. J., *J. Nucl. Med.*, **32**, 1877-1881 (1991)
- 18) Maxon III H. R., Thomas S. R., Schroder L. E., Englaro E. E., Samaratunga R., Scher H. I., Moulton J. S., Deutsch E. A., Deutsch K. F., Schneider H. J., Williams C. C. and Ehrhardt G. J., *Seminars in Nuclear Medicine*, **12**, 33-44, (1992)
- 19) Englaro E. E., Schroder L. W., Thomas S. R., Williams C. C. and Maxon III. H. R., *Clin. Nucl. Med.*, **17**, 41-44 (1992)
- 20) de Klerk J. M. H., van Dijk A., van het Schip A. D., Zonnenberg B. A. and van Rijk P. P., *J. Nucl. Med.*, **33**, 646-651 (1992)
- 21) de Klerk J. M. H., van het Schip A. D., Zonnenberg B. A., van Dijk A., Stokkel M. P. M., Han S. H., Blijham G. H. and van Rijk P. P., *J. Nucl. Med.*, **35**, 1423-1428 (1994)
- 22) Samaratunga R. C., Thomas S. R., Hinnefeld J. D., Kuster L. C. V., Hyams D. M., Moulton J. S., Sperling M. I. and Maxon III H. R., *J. Nucl. Med.*, **36**, 336-350 (1995)
- 23) 日本メジフィジックス株式会社. “医薬品インタビューフォーム スズコロイド Tc-99m 注”

Table 3.1.4(1)-1 Preparation of ^{186}Re -DMSA

(1) $^{186}\text{ReO}_4^-$ (100 $\mu\text{g/ml}$): 50 μl (1.34×10^{-4} M)

(2) DMSA solution: 32 μl (2.63×10^{-3} M)

DMSA (28 mg) was dissolved in 2 ml of 0.25 M sodium hydroxide and the volume was increased to 10 ml with H_2O .

(3) $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 5 μl (2.66×10^{-3} M)

$\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (240 mg) was dissolved in 0.25 ml of concentrated hydrochloric acid and the volume was increased to 10 ml with H_2O .

(4) L-Ascorbic acid solution (0.5 mg/ml): 20 μl (2.84×10^{-3} M)

(5) 3 M HCl: 3.75 μl (5.63×10^{-2} M)

(6) H_2O : 89.25 μl

The solution (1)~(6), 200 μl in total, were mixed in a 7ml-vial and heated at 100°C for 30 min.

Table 3.1.4(1)-2 Samples for injection

Sample (Re-DMSA)		
Isotope	DMSA conc.	$\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ conc.
^{186}Re	2.63×10^{-3} M	2.66×10^{-3} M
^{186}Re	2.63×10^{-3} M	3.99×10^{-3} M
^{188}Re	1.54×10^{-3} M	8.86×10^{-4} M
Control		
$^{186}\text{ReO}_4^-$		
$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DMSA*		

*These were prepared for the biodistribution study.

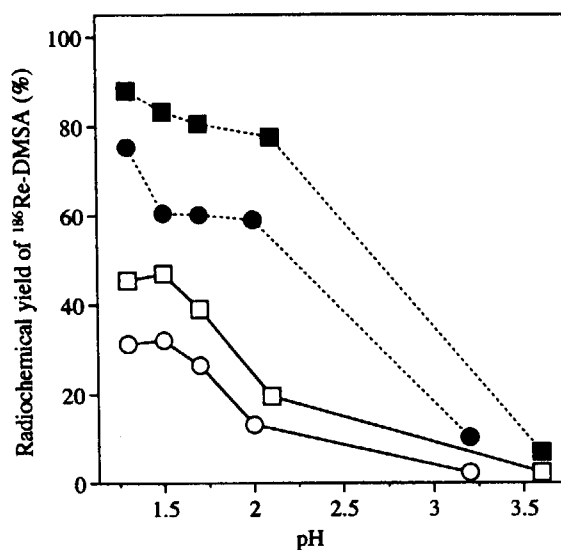


Fig. 3.1.4(1)-1 Effect of pH and reaction conditions on the radiochemical yield of ^{186}Re -DMSA with DMSA kit for $^{99\text{m}}\text{Tc}$.

- Re: $2.17 \times 10^{-2} \mu\text{g/ml}$ ($1.17 \times 10^{-7} \text{M}$) allowed to stand at room temperature for 30 min
- Re: $25 \mu\text{g/ml}$ ($1.34 \times 10^{-4} \text{M}$) allowed to stand at room temperature for 30 min
- Re: $2.17 \times 10^{-2} \mu\text{g/ml}$ ($1.17 \times 10^{-7} \text{M}$) heated at 100°C for 30 min
- Re: $25 \mu\text{g/ml}$ ($1.34 \times 10^{-4} \text{M}$) heated at 100°C for 30 min

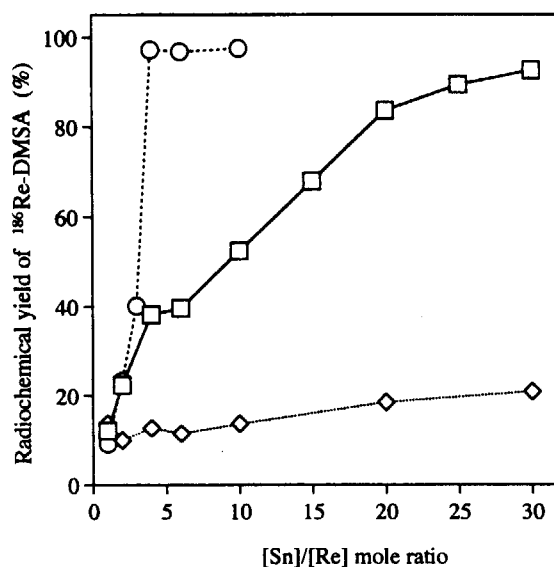


Fig. 3.1.4(1)-2 Effect of $[\text{Sn}]/[\text{Re}]$ mole ratio on the radiochemical yield of ^{186}Re -DMSA. DMSA: $7.68 \times 10^{-3} \text{M}$; L-Ascorbic acid: $2.84 \times 10^{-3} \text{M}$; HCl: $5.25 \times 10^{-2} \text{M}$. Reaction conditions: 100°C , 30min.

- ◇: $[\text{Re}] = 2.5 \mu\text{g/ml}$ ($1.34 \times 10^{-5} \text{M}$); □: $[\text{Re}] = 25 \mu\text{g/ml}$ ($1.34 \times 10^{-4} \text{M}$);
- : $[\text{Re}] = 250 \mu\text{g/ml}$ ($1.34 \times 10^{-3} \text{M}$)

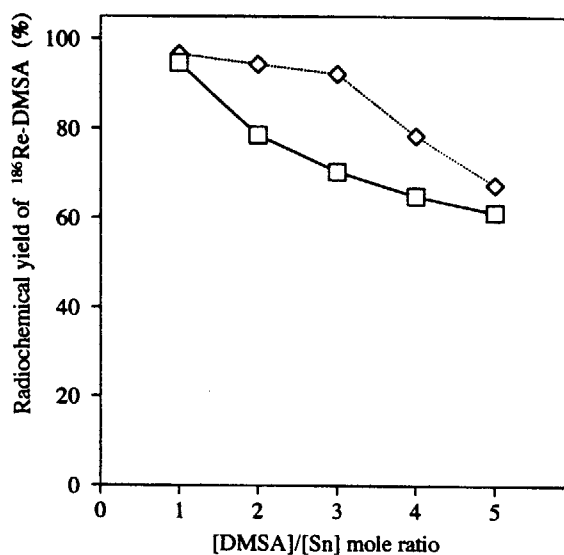


Fig. 3.1.4(1)-3 Effect of $[\text{DMSA}]/[\text{Sn}]$ mole ratio on the radiochemical yield of $^{186}\text{Re-DMSA}$.

Re: $25 \mu\text{g/ml}$ ($1.34 \times 10^{-4} \text{ M}$); L-Ascorbic acid: $2.84 \times 10^{-3} \text{ M}$; HCl: $5.25 \times 10^{-2} \text{ M}$.

Reaction conditions: 100°C , 30min

□: $[\text{Sn}]/[\text{Re}]=20$, $[\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}]=2.66 \times 10^{-3} \text{ M}$

◇: $[\text{Sn}]/[\text{Re}]=30$, $[\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}]=3.99 \times 10^{-3} \text{ M}$

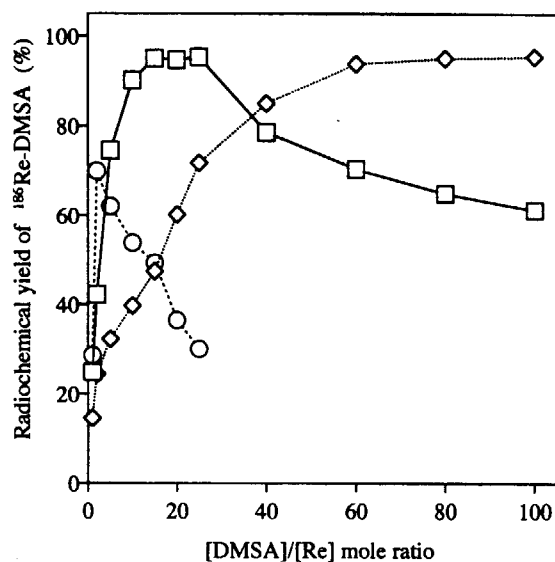


Fig. 3.1.4(1)-4 Effect of $[\text{DMSA}]/[\text{Re}]$ mole ratio on the radiochemical yield of $^{186}\text{Re-DMSA}$.

$\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: $2.66 \times 10^{-3} \text{ M}$; L-Ascorbic acid: $2.84 \times 10^{-3} \text{ M}$; HCl: $5.25 \times 10^{-2} \text{ M}$.

Reaction conditions: 100°C , 30 min.

◇: $[\text{Re}]=2.5 \mu\text{g/ml}$ ($1.34 \times 10^{-5} \text{ M}$); □: $[\text{Re}]=25 \mu\text{g/ml}$ ($1.34 \times 10^{-4} \text{ M}$);

○: $[\text{Re}]=250 \mu\text{g/ml}$ ($1.34 \times 10^{-3} \text{ M}$)

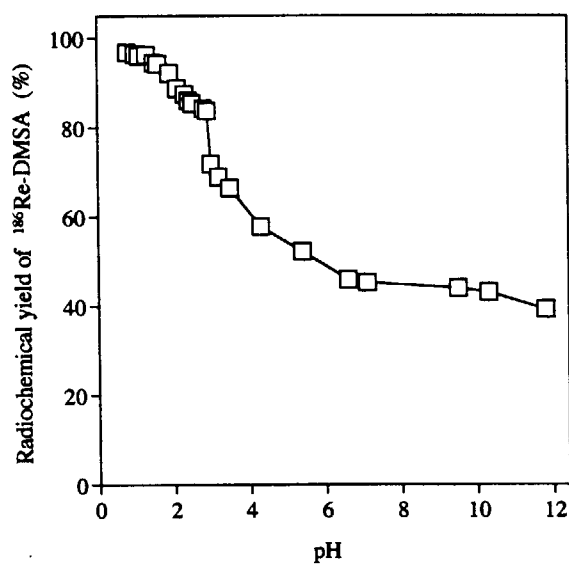


Fig. 3.1.4(1)-5 Effect of pH on the radiochemical yield of ^{186}Re -DMSA.

Re: $25\text{ }\mu\text{g/ml}$ ($1.34 \times 10^{-4}\text{ M}$); DMSA: $2.63 \times 10^{-3}\text{ M}$; $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: $2.66 \times 10^{-3}\text{ M}$; L-Ascorbic acid: $2.84 \times 10^{-3}\text{ M}$. Reaction conditions: 100°C , 30 min.

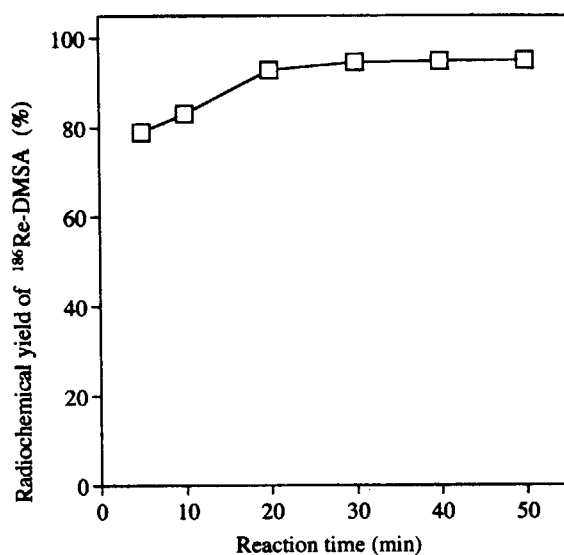


Fig. 3.1.4(1)-6 Effect of reaction time on the radiochemical yield of ^{186}Re -DMSA.

Re: $25\text{ }\mu\text{g/ml}$ ($1.34 \times 10^{-4}\text{ M}$); DMSA: $2.63 \times 10^{-3}\text{ M}$; $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: $2.66 \times 10^{-3}\text{ M}$; L-Ascorbic acid: $2.84 \times 10^{-3}\text{ M}$; HCl: $5.63 \times 10^{-2}\text{ M}$.

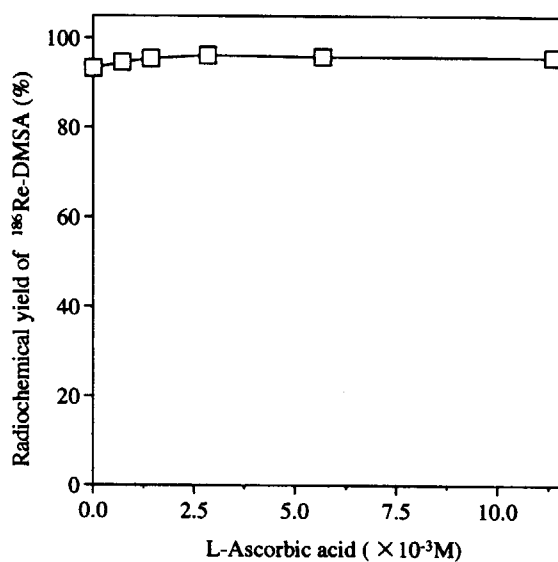


Fig. 3.1.4(1)-7 Effect of concentration of L-Ascorbic acid on the radiochemical yield of $^{186}\text{Re-DMSA}$.

Re: $25 \mu\text{g/ml}$ ($1.34 \times 10^{-4} \text{M}$); DMSA: $2.63 \times 10^{-3} \text{M}$; $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: $2.66 \times 10^{-3} \text{M}$; HCl : $5.63 \times 10^{-2} \text{M}$; reaction conditions: 100°C , 30min.

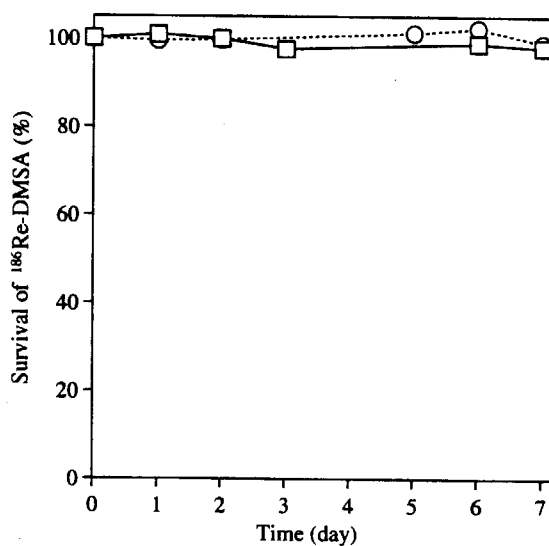


Fig. 3.1.4(1)-8 Survival of $^{186}\text{Re-DMSA}$ at room temperature for 1 week.

Re: $25 \mu\text{g/ml}$ ($1.34 \times 10^{-4} \text{M}$); DMSA: $2.63 \times 10^{-3} \text{M}$; L-Ascorbic acid: $2.84 \times 10^{-3} \text{M}$;

HCl : $5.63 \times 10^{-2} \text{M}$; reaction conditions: 100°C , 30min.

□: $^{186}\text{Re-DMSA}$ ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: $2.66 \times 10^{-3} \text{M}$), [Radiochemical yield: 96%]

○: $^{186}\text{Re-DMSA}$ ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: $3.99 \times 10^{-3} \text{M}$), [Radiochemical yield: 94%]

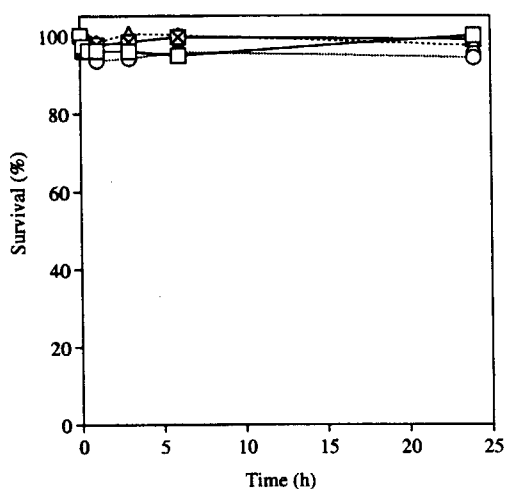


Fig. 3.1.4(1)-9 Survival of ^{186}Re -DMSA in sodium acetate buffer for 24 hours.

Re: $25\ \mu\text{g/ml}$ ($1.34 \times 10^{-4}\ \text{M}$); DMSA: $2.63 \times 10^{-3}\ \text{M}$; L-Ascorbic acid: $2.84 \times 10^{-3}\ \text{M}$;
HCl: $5.63 \times 10^{-2}\ \text{M}$; reaction conditions: 100°C , 30 min.

□: ^{186}Re -DMSA ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: $2.66 \times 10^{-3}\ \text{M}$)

allowed to stand at room temperature, [Radiochemical yield: 96%]

⊠: ^{186}Re -DMSA ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: $2.66 \times 10^{-3}\ \text{M}$)

incubated at 37°C , [Radiochemical yield: 96%]

○: ^{186}Re -DMSA ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: $3.99 \times 10^{-3}\ \text{M}$)

allowed to stand at room temperature, [Radiochemical yield: 94%]

△: $^{186}\text{ReO}_4^-$ allowed to stand at room temperature

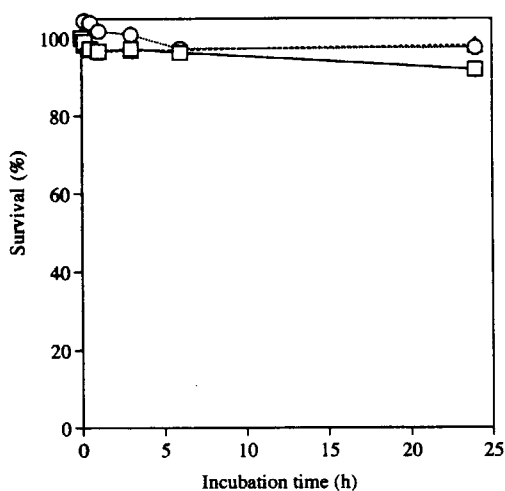


Fig. 3.1.4(1)-10 Survival of ^{186}Re -DMSA in normal mouse serum at 37°C for 24 hours.

Re: $25\ \mu\text{g/ml}$ ($1.34 \times 10^{-4}\ \text{M}$); DMSA: $2.63 \times 10^{-3}\ \text{M}$; L-Ascorbic acid: $2.84 \times 10^{-3}\ \text{M}$;
HCl: $5.63 \times 10^{-2}\ \text{M}$; reaction conditions: 100°C , 30 min.

□: ^{186}Re -DMSA ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: $2.66 \times 10^{-3}\ \text{M}$), [Radiochemical yield: 98%]

○: ^{186}Re -DMSA ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: $3.99 \times 10^{-3}\ \text{M}$), [Radiochemical yield: 94%]

△: $^{186}\text{ReO}_4^-$

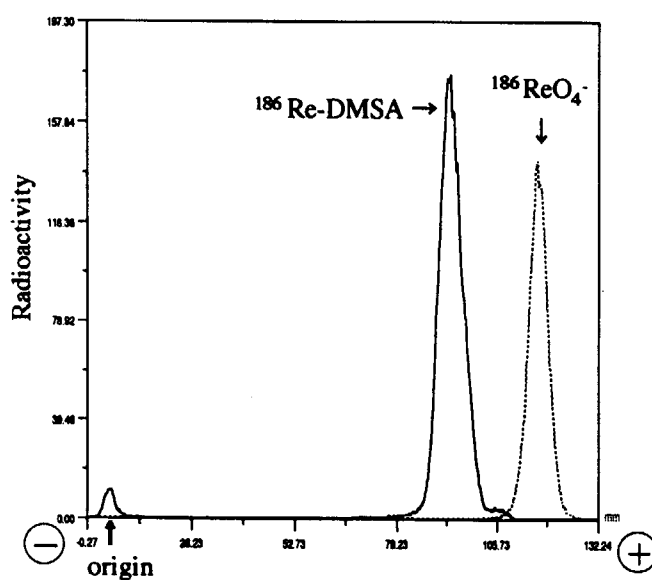


Fig. 3.1.4(1)-11 Electrophoretic profiles of $^{186}\text{Re-DMSA}$.
 ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: $2.66 \times 10^{-3} \text{ M}$) on Whatman 1 filter paper in acetate buffer (pH=5.0)
 at 800 V for 20 min.

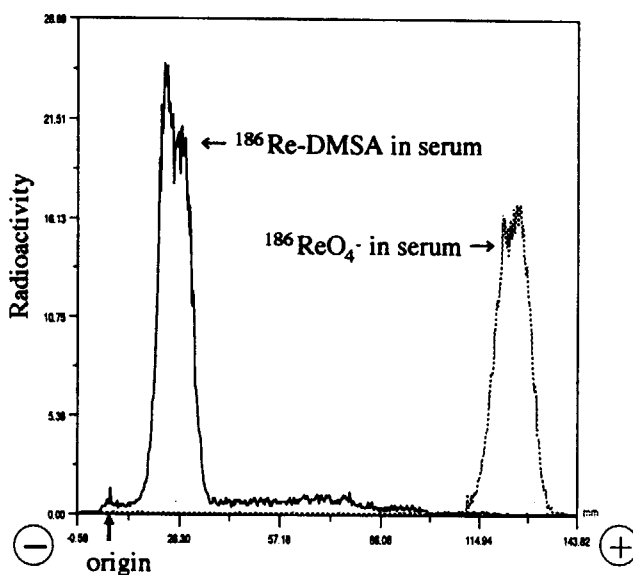


Fig. 3.1.4(1)-12 Electrophoretic profiles of $^{186}\text{Re-DMSA}$.
 ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: $2.66 \times 10^{-3} \text{ M}$) or $^{186}\text{ReO}_4^-$ in normal mouse serum on
 Whatman 1 filter paper in acetate buffer (pH=5.0) at 800 V for 20 min.

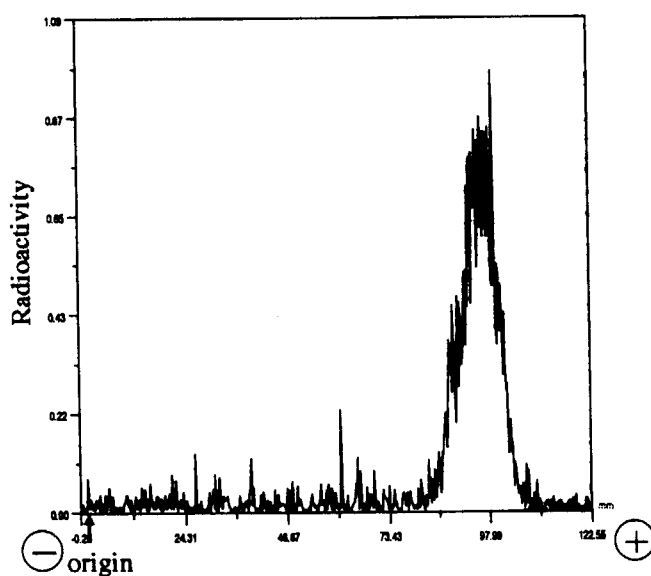


Fig. 3.1.4(1)-13 Electrophoretic profiles of $^{186}\text{ReO}_4^-$ in normal mouse blood, taken 10 min after injection, on Whatman 1 filter paper in acetate buffer (pH=5.0) at 800 V for 20 min.

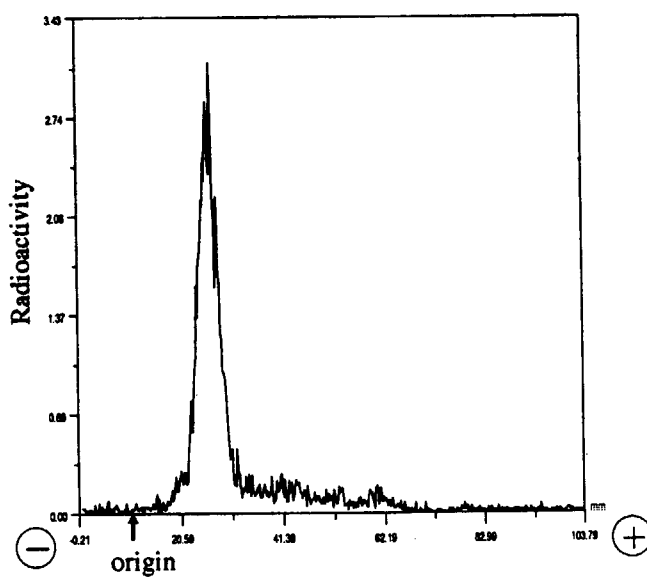


Fig. 3.1.4(1)-14 Electrophoretic profiles of $^{186}\text{Re-DMSA}$ ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: $2.66 \times 10^{-3} \text{ M}$) in normal mouse blood, taken 10 min after injection, on Whatman 1 filter paper in acetate buffer (pH=5.0) at 800 V for 20 min.

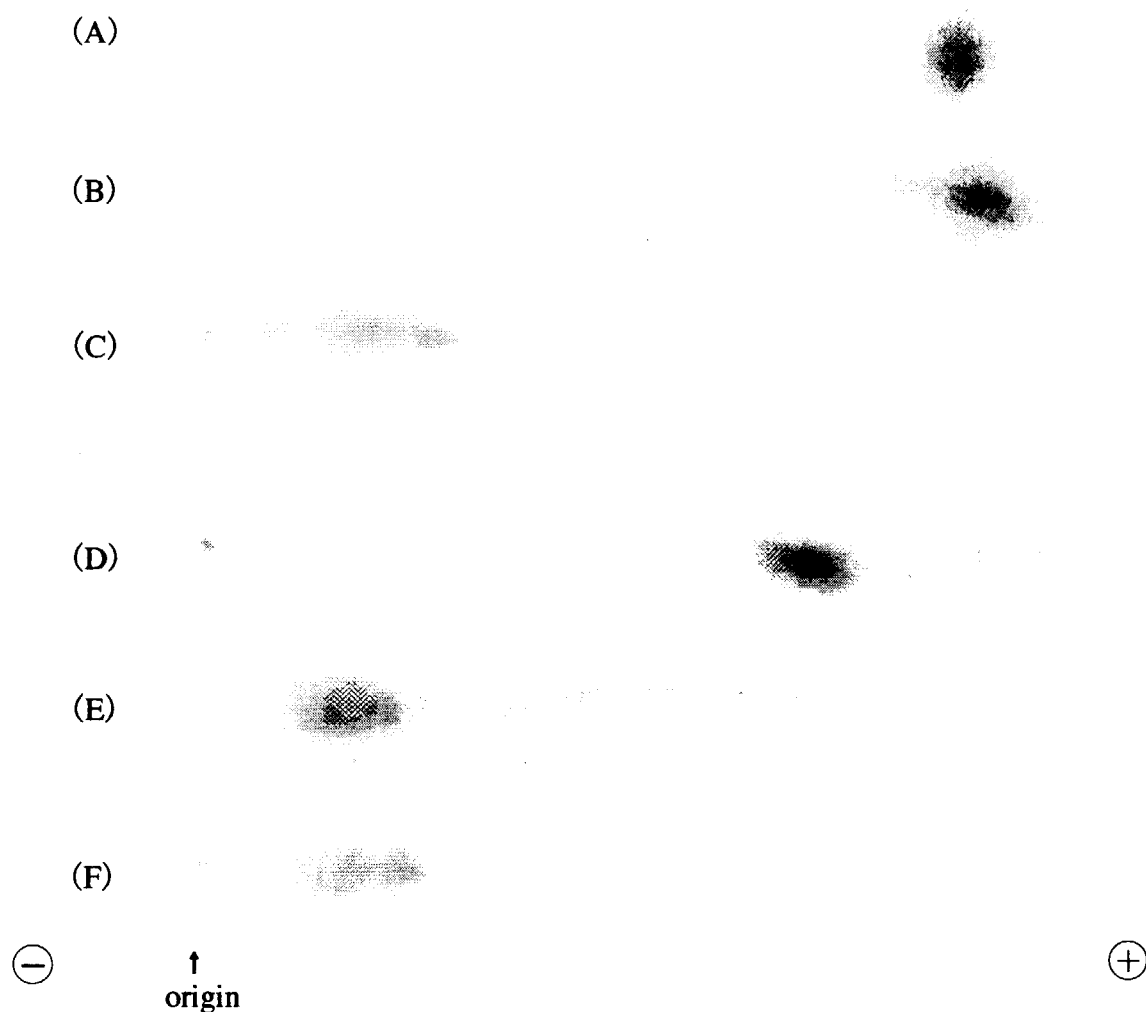


Fig. 3.1.4(1)-15 Electrophoretic patterns of ^{186}Re -labeled compounds on Whatman 1 filter paper in acetate buffer (pH=0.5) at 800 V for 20 min; (A): $^{186}\text{ReO}_4^-$ detected by radioactivity; (B): $^{186}\text{ReO}_4^-$ in normal mouse serum detected by radioactivity; (C): protein in normal mouse serum containing ReO_4^- detected by ponceau 3R; (D): ^{186}Re -DMSA detected by radioactivity; (E): ^{186}Re -DMSA in normal mouse serum detected by radioactivity; (F): protein in normal mouse serum containing Re -DMSA detected by ponceau 3R.

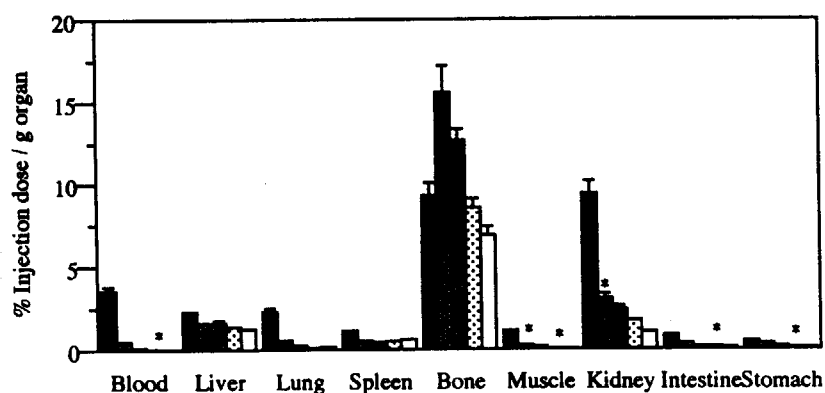


Fig. 3.1.4(1)-16 Biodistribution of radioactivity after intravenous administration of ^{186}Re -DMSA ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: $2.66 \times 10^{-3} \text{ M}$) in normal mice.

■ 10min ■ 1h ■ 3h ▨ 6h □ 24h

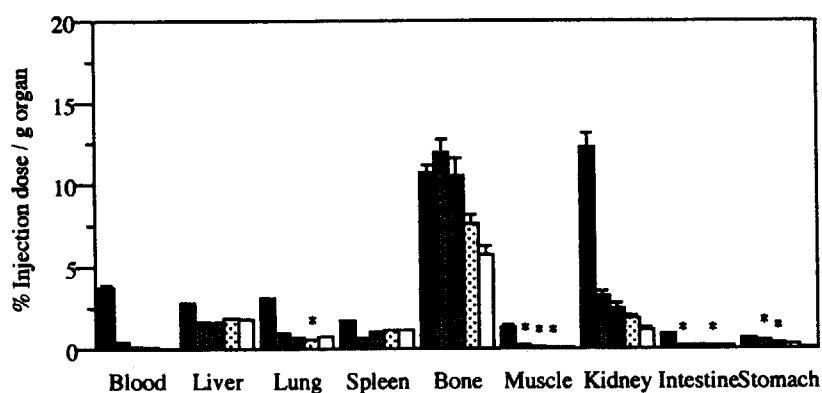


Fig. 3.1.4(1)-17 Biodistribution of radioactivity after intravenous administration of ^{186}Re -DMSA ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: $3.99 \times 10^{-3} \text{ M}$) in normal mice.

■ 10min ■ 1h ■ 3h ▨ 6h □ 24h

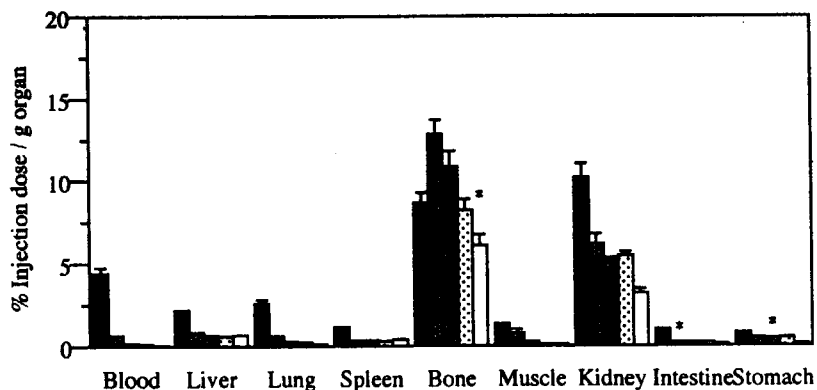


Fig. 3.1.4(1)-18 Biodistribution of radioactivity after intravenous administration of ^{186}Re -DMSA in normal mice.

■ 10min ■ 1h ■ 3h ▨ 6h □ 24h

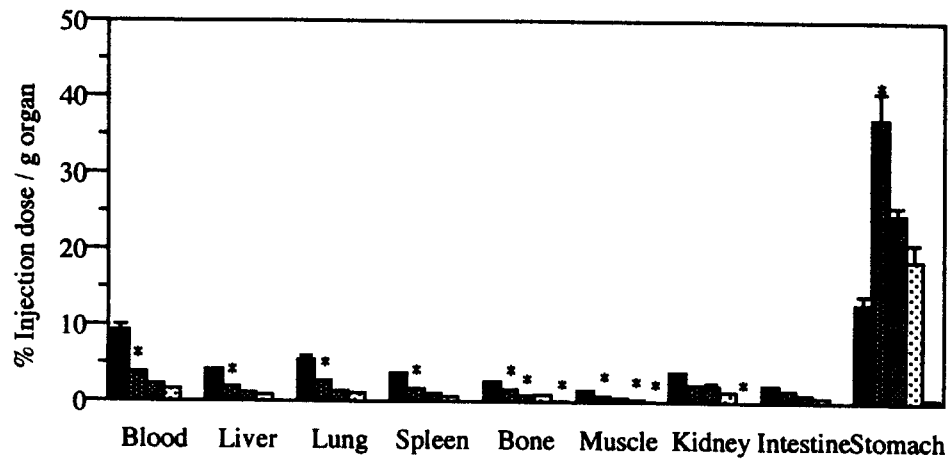


Fig. 3.1.4(1)-19 Biodistribution of radioactivity after intravenous administration of $^{186}\text{ReO}_4^-$ in normal mice.

■ 10min ■ 1h ■ 3h ▨ 6h □ 24h

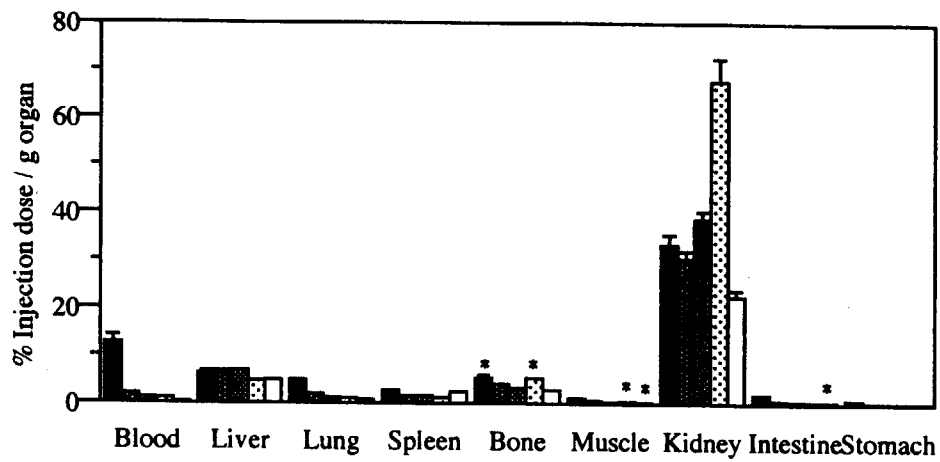


Fig. 3.1.4(1)-20 Biodistribution of radioactivity after intravenous administration of $^{99\text{m}}\text{Tc-DMSA}$ in normal mice.

■ 10min ■ 1h ■ 3h ▨ 6h □ 24h

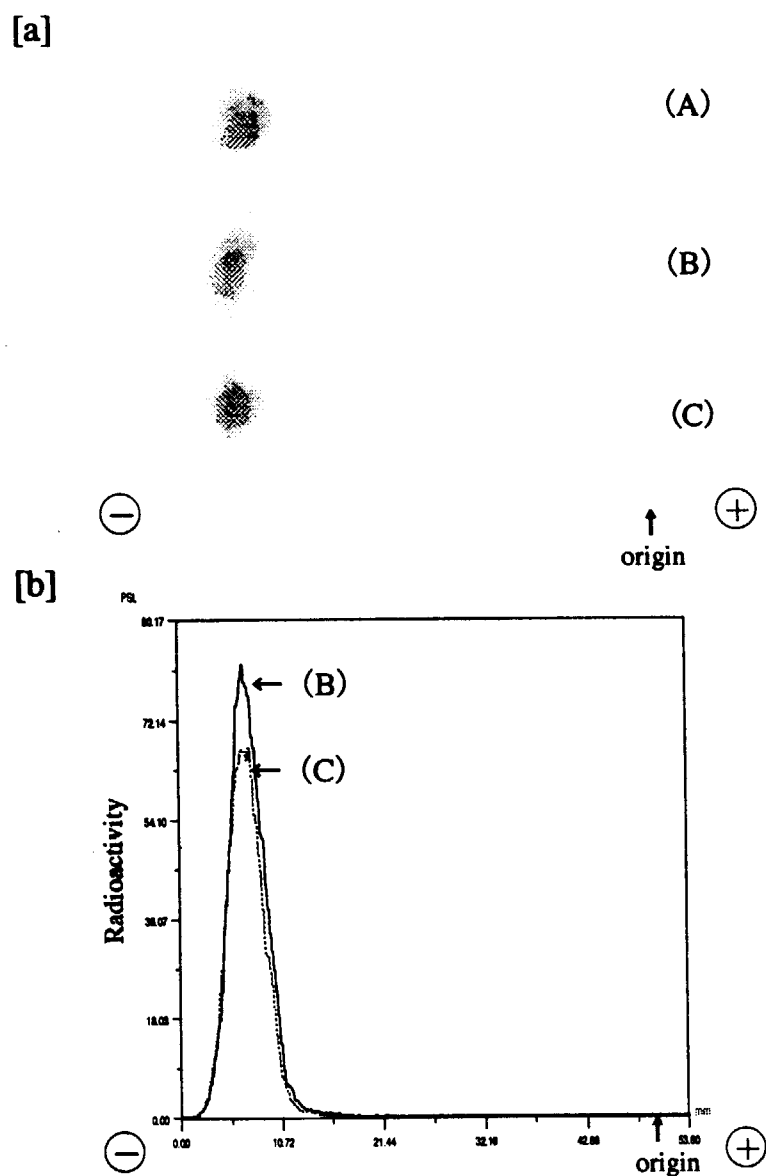


Fig. 3.1.4(1)-21

[a]: Electrophoretic patterns of ^{45}Ca in sodium acetate buffer (pH=5.0) at 800 V for 10 min; (A): without ReO_4^- and Re-DMSA; (B): with ReO_4^- ; (C): with Re-DMSA.

[b]: Electrophoretic profiles of (B) and (C).

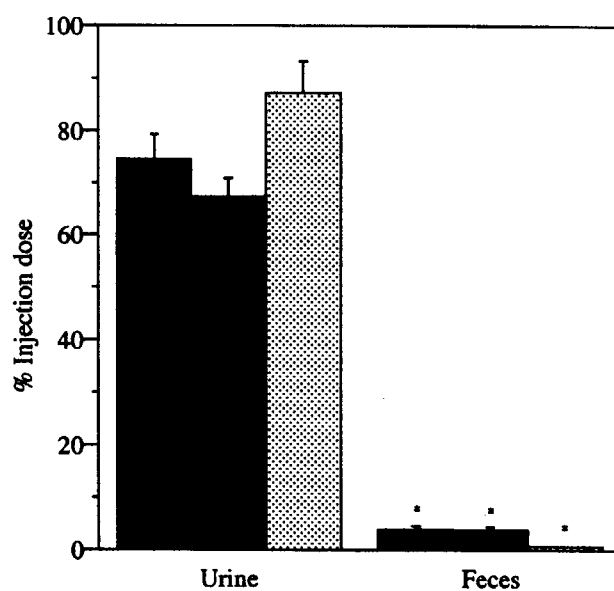


Fig. 3.1.4(1)-22 Excretion of ^{186}Re for 24 hours by normal mice.

- ^{186}Re -DMSA ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: $2.66 \times 10^{-3} \text{ M}$)
- ^{186}Re -DMSA ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: $3.99 \times 10^{-3} \text{ M}$)
- ▨ $^{186}\text{ReO}_4^-$

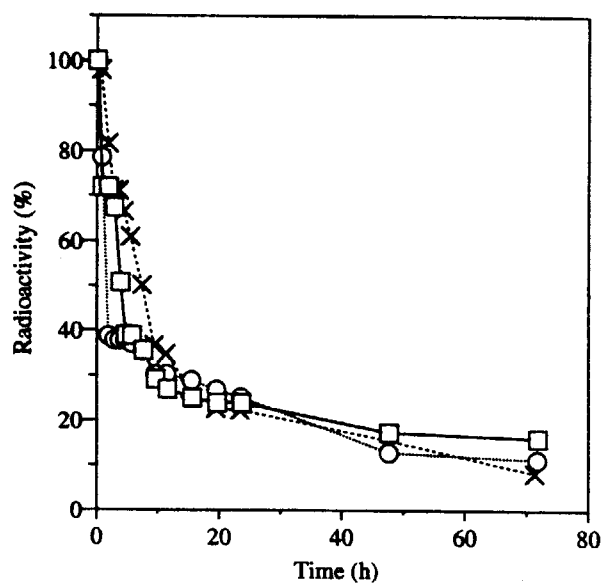


Fig. 3.1.4(1)-23 Decrease of the ^{186}Re radioactivity in normal mice after intravenous administration, measured with a radioisotope dose calibrator.

Each point represents the mean [$n=2-3$].

- : ^{186}Re -DMSA ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: $2.66 \times 10^{-3} \text{ M}$)
- : ^{186}Re -DMSA ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: $3.99 \times 10^{-3} \text{ M}$)
- ×: $^{186}\text{ReO}_4^-$

(2) がんの治療を目的とする DMS の ^{186}Re 標識

1) 緒言

5 価の多核錯体である Tc-99m-demercaptosuccinic acid (DMS) 錯体は、我々の研究室でがんの診断放射性医薬品として開発された²⁹⁾。そしてこれまでに様々な種類のがんの診断のために臨床において検討されてきた^{1, 3, 8, 10-15, 19-22, 26)}。5 価 Tc-DMS 錯体の腫瘍組織への集積には金属多核錯体の性質が大きく関与していると考えられる^{6-7, 28)}。pH 8.4 の条件で作製される Tc (V)-DMS の分子設計の最も重要な点は、アルカリ性の反応条件で観察される金属の加水分解反応である^{18, 23)}。アルカリ性の条件における金属錯体の多核錯体の形成は、分子内にチオール基を有する配位子において報告されている^{9, 16)}。近年、Tc (V)-DMS 錯体の腫瘍への集積を基礎として、がんの放射線内用治療を目的に Re (Re-186, Re-188) の DMS 標識が行われてきた^{2, 24)}。しかし Tc-99m の結果を Re-186 へ応用するには、以下に述べる相違点を考察する必要がある。

- a) 金属核種の化学的性質の相違：とりわけ Tc と Re との酸化還元電位の相違²⁵⁾
- b) ジェネレーターから溶出した Tc-99m と原子炉で作製された Re-186 に含まれるキャリアの濃度

実際、これまで報告された Re (Re-186, Re-188) の検討では、Re 錯体は還元されにくく、また配位子交換反応に対して不活性であることが報告されている。また Re-DMS の標識についての多くの論文が、標識反応を酸性 pH で行うことが必要であり、またその精製には高温での操作が必要であると報告されている^{2, 24)}。またキャリアの濃度については、ジェネレーターから溶出した Tc-99m に比べて Re-186 の比放射能は極めて低い。Table 3.1.4(2)-1 にこの結果をまとめた。

一方、Tc-99m を用いた検討において、pH 8.4 のアルカリ条件で作製された Tc (V)-DMS と腎臓の診断薬剤として使用されている pH 3.0 で作製される Tc (III)-DMS との間に多くの相違点が見られることが明らかにされている (Fig. 3.1.4(2)-1)。また Tc (III)-DMS は Tc (V)-DMS よりも実際に低い酸化状態の Tc 錯体であることが報告されている⁵⁾。これはおそらく還元剤である塩化第一スズが低い pH においてより強い還元能を発揮するためと考えられる²⁵⁾。

これらのことを基礎として、本研究では、アルカリ性の反応条件において Re-DMS の錯形成反応に及ぼす Re のキャリア量の影響を検討した。今回使用した Re-186 の比放射能をこれまでの報告と比較した結果を Table 3.1.4(2)-2 に示す。

2) 方法

2)-1 ^{186}Re (V) - DMS の作製

本研究では、Re のキャリア濃度、DMS 濃度、スズイオン濃度の影響について検討した。これらの溶液は以下の方法で作製した。

(a) 溶液 A : Re-186 溶液

Re のキャリア濃度は $21.60 - 32.20 \mu\text{g/ml}$ ($7.9 \times 10^{-5} \text{ M} - 1.15 \times 10^{-4} \text{ M}$) であり、生理食塩水を用いて種々の濃度に希釈した (Table 3.1.4(2)-4)。

(b) 溶液 B : DMS 溶液

種々の濃度の DMS 溶液を 0.1 N NaHCO_3 あるいは $7\% \text{ Meylon}$ 溶液として反応溶液中での濃度が 1.42 mM から 17.12 mM となるように調整した。

(c) 溶液 C : 塩化第一スズ溶液

0.1 N HCl 2 ml 溶液に窒素ガスを 15 から 20 分通じて溶存酸素を追い出す。この溶液に塩化第一スズを 4.5 mg から 135.0 mg を素早く加えて溶解する。この溶液 $20 \mu\text{l}$ には 0.2 から $6 \mu\text{g}$ の塩化第一スズを含む (Table 3.1.4(2)-6)。

(d) Re (V)-DMS の作製

Re (V)-DMS の作製は Tc-99m-DMS の作製法に基づいて行った²⁹⁾ (Fig. 3.1.4(2)-2)。すなわち、 2 ml の溶液 B へ 0.2 ml の Re-186 溶液 (溶液 A) を加え、この溶液に窒素ガスを 15 分間通じた。次いで調整してから 1 から 2 分後の溶液 C を $20 \mu\text{l}$ 加え、窒素気流下で 30 分反応を行った。反応開始 30 分, 120 分, そして 24 時間後に反応溶液を TLC で分析した。動物実験には、120 分間窒素気流下で反応した溶液を $0.22 \mu\text{m}$ のフィルターでろ過した後に用いた。

2)-2 分析方法

(a) TLC

メルク社のシリカゲル薄層プレート (Aer 5553) を用いて $\text{n-BuOH} : \text{AcOH} : \text{H}_2\text{O} = 6 : 4 : 6$ を展開溶媒として分析した。TLC は 0.5 cm に切断し、それぞれの放射能をガンマカウンターを用いて計測した。

2)-3 担癌マウスにおける体内放射能分布の検討

Ehrlich 腹水腫瘍を移植したマウス (ddY, 5-week, $23-25 \text{ g}$) に Re (V)-DMS および Tc(V)-DMS を投与した。投与 1, 3, 24 時間後にマウスを屠殺し、腫瘍をはじめとする主要組織を摘出し、重量と放射能を測定した。また、体外排泄を受けた放射能を測定するため、マウスをメタボリックケージ内で飼育した。

3) 結果

Tc-99m を用いた場合、Tc-99m-(V)-DMS は DMS 濃度が $5.0 \times 10^{-3} \text{ M}$ ($7.13 \mu\text{mol}$)、還元剤である塩化第一スズ濃度が $0.2 \mu\text{mol}$ の条件で $\text{pH } 8.4$ で錯形成反応を行うことで得られている²⁹⁾。本検討では、DMS 濃度は Tc-99m と同じでスズイオンの濃度を 10 倍高くして行った。Table 3.1.4(2)-7 に示すように塩化第一スズの濃度が Tc-99m の場合の 10 倍量であっても、Re (V)-DMS の放射化学的収率は極めて低い結果となった。しかし、 ReO_4^- 濃度が増加するに伴い、放射化学的収率は増加した。塩化第一スズの濃度をさらに倍量とすることにより、Re (V)-DMS の収率は 72% まで増加した。

さらに Table 3.1.4(2)-8 に示すように、様々な反応条件において検討を行った。しかしどの反応条件においても Re (V)-DMS の放射化学的収率の増加は認められなかった。これらの結果はまた、高い反応温度で標識反応を行わなくても、室温において同様の反応収率が得られることが明らかとなった (Fig. 3.1.4(2)-2)。Table 3.1.4(2)-7 にこれらの結果をまとめて示す。

次いで、Re 濃度の影響についてより詳細に検討を行った (Fig. 3.1.4(2)-5)。その結果、DMS 濃度、塩化第一スズ濃度がそれぞれ 17.7 μmol , 4 μmol のとき、Re 濃度の高いとき錯形成反応はより速やかに進行した ($[\text{Re}] = 10 \text{ nmole}$ のとき $[\text{Re}] = 2 \text{ nmole}$)。この条件では Re(V)-DMS の放射化学的収率は 90% 以上であり、Re(V)-DMS の放射化学的収率は Re 濃度に大きく依存することが明らかになった。さらに詳細に、反応条件と Re (V)-DMS の精製収率の割合を検討した。これらの結果を Fig. 3.1.4(2)-6 に示す。これらの検討から得られた最適条件を Fig. 3.1.4(2)-7 に示す。この条件で作製した Re (V)-DMS は TLC 分析において Tc-99m(V)-DMS と同じ挙動を示した (Fig. 3.1.4(2)-8)。また Fig. 3.1.4(2)-9 に示すように、マウス体内分布の検討においても Re (V)-DMS の放射能分布は腎臓をのぞいて Tc-99m-(V)-DMS のそれとよく一致した。体外へ排泄された放射能は Tc-99m (V)-DMS と Re (V)-DMS との間に大きな相違がみられなかった。

4) 結語

2.0 から 10.0 μmol の濃度の Re を用いて室温、反応 pH 8.4 で目的とする Re (V)-DMS が得られた。この反応は還元剤として使用した塩化第一スズの濃度による影響を強く受けた。Fig. 3.1.4(2)-7 には、本検討より得られた至適反応条件を示す。またこの条件で作製した Re(V)-DMS の実験動物における放射能分布は Tc-99m (V)-DMS のそれと極めて類似したものであった。なお、腎臓への集積には両者の間に相違がみられたが、これは Tc-99m と Re-186 との濃度の相違が考えられ、さらなる検討が必要と考えられる。

参考文献

- 1) Abrams MJ. J. Nucl. Med., **32**, 849-850 (1991).
- 2) Bisunadan MM, Blower PJ Clarke SEM Singh J and Went M, J Appl. Radiat. Isot., **42**, 167-171 (1991).
- 3) Clarke SE, Lazarus CR, Wraight P, Sampson C, Maisey MN, J. Nucl. Med., **29**, 33-38 (1988).
- 4) Deutsch E, Heineman WR, Zodda JL, Gilbert TW and Williams CC, Int. J. Appl. Rad. Isot. **33**, 843-848 (1982).
- 5) Garcia R, Galvez J, Moreno JL, Int. J. Appl. Rad Isot. **33**, 521-524 (1982).
- 6) Glickson JD, Webb J, Gams RA, Can. Res. **34**, 2957-2960 (1974).

- 7) Glickson JD, Pitner TP, Webb J, Gams RA, J. Amer. Chem. Soc. 97, 1679-1683 (1975).
- 8) Hirano T, Otake H, Yoshida I, Endo K, J. Nucl. Med. 36, 202-207 (1995).
- 9) Isab AA and Sadler PJ, J. Chem. Soc. (Dalton Transaction) 1657-1663 (1981).
- 10) Kao CH, Wang SJ, Wey SP, Shen LH, Ting G, Yeh SH, Clin. Nucl. Med. 18, 321-323 (1993).
- 11) Kobayashi H., Horiuchi Suzuki K, Sakahara H, Zheng-Sheng Y, Yokoyama A and Konishi J, J. Nucl. Med. 22, 559-562 (1995).
- 12) Kobayashi H, Sakahara H, Hosono M, Shirato M, Konishi J, Kotoura Y, Yamamuro T and Endo K, J. Nucl. Med. 34, 1745-1747 (1993).
- 13) Kobayashi H, Sakahara H, Makoto MH, Shirato M, Endo K, Kotoura Y, Yamamuro T and Konishi J, Radiology 190, 277-280 (1994).
- 14) Lam ASK, Puncher MRB and Blower PJ, J. Nucl. Med. 23, 1575-1582 (1996).
- 15) Lamki LM, J. Nucl. Med. 36, 207-210 (1995).
- 16) Larworthy LF and Sattari D, J. Inorg. Nucl. Chem. 42, 551-559 (1980).
- 17) Lenz GR and Martell AE, Inorg. Chem. 4, 378-384 (1965).
- 18) Martell AE, Trans. Royal Inst. Technol. 34(248), 3-14 (1972).
- 19) Ohta H, Yamamoto K, Endo K, Mori T, Hamanaka D, Shimayu A, Ikekubo K, Makimoto K, Iida Y and Konishi J, J. Nucl. Med. 25, 323-5 (1984).
- 20) Ohta H, Endo K, Fujita T, Konishi J, Torizuka K, Horiuchi K and Yokoyama A, Clin. Nucl. Med. 9, 568-73 (1984).
- 21) Ohta H, Ishii M, Yoshizumi M, Endo K, Sakahara H, Nakajima T, Yomoda I, Masuda H, Horiuchi K, Hata N, Yokoyama A and Torizuka K, Clin. Nucl. Med. 10, 167-170 (1985).
- 22) Ohta H, Endo K, Fujita T, Konishi J, Torizuka K, Horiuchi K and Yokoyama A, Nucl. Med. Commun. 9, 105-116 (1988).
- 23) Sillen LG. : "Polynuclear Complexes in Solution. In: Coordination Chemistry, (vol I)", ACS Monograph. (Edited by Martell AE). pp 491. Van Nostrand Reinhold Company (1971).
- 24) Singh J, Reghebi K, Lazarus CR, Clarke SEM, Callahan AP, Knapp Jr FF and Blower PJ, Nucl. Med. Comm. 14, 197-203 (1993).
- 25) Shriver DF, Atkins PW, Langford CH.: "Standard potentials. Inorganic Chemistry", Oxford University Press. pp B7, B17 (1994).
- 26) Watkinson JC, Lazarus CR, Mistry R, Shaheen OH, Maisey MN, Clarke SE, J. Nucl. Med. 30, 174-180 (1989).
- 27) Weiner RE, Nucl. Med. Biol. 23, 745-751 (1996).

- 28) Yokoyama A. and Horiuchi K.: "Changes in Biodistribution of Radiopharmaceuticals due to Impurities-Tc-99m Radiopharmaceuticals. Third International Radiopharmaceutical Dosimetry Symposium", U.S. Health and Human Services, FDA, p 32-44 (1981).
- 29) Yokoyama A, Hata N, Horiuchi K, Masuda H, Ohta H, Yamamoto K, Endo K and Torizuka K, Int. J. Nucl. Med. Biol. 12, 273-9 (1985).

Table 3.1.4(2)-1 Comparison of Specific Activity and Total Concentration between Perrhenate versus Pertechnetate

Specific Activity	Rhenium-186 (Published Work)	Technetium-99m
mCi/ mg	160 - 240	1000 - 2000
GBq/mg	5.92 - 8.88	37 - 74
Total Radiometal Concentration	3.5×10^{-4} - 5.5×10^{-4} M.	1×10^{-7} - 1×10^{-8} M

Table 3.1.4(2)-2 Carrier Content in [¹⁸⁶Re]ReO₄ Solution

Supplier	Specific Activity	Total Re amount	Total Re concentration
Published work (Amersham Int)	5.92 - 8.88 GBq/mg 160 - 240 mCi/mg	100-150 µg/mL	$36.6 - 55.0 \times 10^{-5}$ M
Present study JAERI (Tokai Mura)	16 - 19 GBq/mg 430 - 513 mCi/mg	20-32.2 µg/mL	$8.40 - 11.5 \times 10^{-5}$ M

Table 3.1.4(2)-3 ^{186}Re supplied by JAERI

Re batch received	S. a. (TBq/g) (GBq/mg) (mCi/mg)= (A)	Total mL	Radiact. (GBq/mL) (mCi/mL)= (B)	pH	Re conc B/A = mCi/mL/Ci/g = ug/mL	Date	Batch No
Re-1	16 (432.32)	1.46	0.38 (10.27)	4.0	23.75	11/5/96	R-602
Re-2	18 (486.36)	1.44	0.39 (10.5)	4.3	21.60	12/2/96	R-603
Re-3	17 (439.34)	1.02	0.55 (14.8)	3.7	32.20	1/27/97	R-604
Re-4	18 (486.36)	1.12	0.50 (13.5)	4.0	27.75	5/26/97	R-701
Re-5	19 (513.38)	1.19	0.47 (12.7)	4.5	24.74	6/30/97	R-702
Re-6	20 (540.5)	1.13	0.50 (13.5)	4.9	24.98	9/08/97	R-703
Re-7	19 (513.38)	1.02	0.55 (14.86)	3.9	28.90	12/08/97	R-704

Table 3.1.4(2)-4 Working Solutions

Re	[Re] mCi/mL/Ci/g = ug/mL	M = ugx10 ⁻⁶ /273.2x 10 ⁻³ = (x 10 ⁻⁵ M)	Working Solutions nmole (0.2 mL)			Working Solutions μM (Calc at 2.5 mL) (nmole/2.5 x 10 ⁻³ =uM)		
	Dilution with saline		2x	5x	10x	2x	5x	10x
Re-1	23.75	8.4	8.4	3.36	1.68	3.36	1.34	0.53
Re-2	21.60	7.9	7.9	3.16	1.58	3.16	1.26	0.63
Re-3	32.20	11.5	11.5	4.6	2.30	4.6	1.84	0.92
Re-4	27.75	10.2	10.2	4.08	2.04	4.08	1.63	0.81 *
Re-5	24.74	9.05	10.2	4.08	2.04	4.08	1.63	0.81 *
Re-6	24.98	9.14	10.2	4.08	2.04	4.08	1.63	0.81 *
Re-7	28.90	10.57	10.2	4.08	2.04	4.08	1.63	0.81 *

* Adjusted concentration

Table 3.1.4(2)-5 Amount of Dimercapto Succinic Acid Used in Radiolabeling with ^{186}Re
(M. W. = DMS 182.2)

mg DMS (Saline 1 mL)	mg DMS (Saline 2 mL)	umole	mM (2.5 mL)
0.32	0.65	3.5	1.4
0.65	1.3	7.13	2.85*
0.81	1.62	8.89	3.55
1.0	2.0	11	4.4
1.3	2.6	14.27	5.71
1.46	2.92	16.0	6.4
1.6	3.25	17.84	7.13
1.83	3.66	20	8.0
1.95	3.9	21.41	8.56
2.2	4.4	24	9.6
2.6	5.2	28.54	11.41
3.25	6.5	35.67	14.26
3.9	7.8	42.81	17.12

* Used in the radiolabeling of Tc(V)-DMS at carrier free level

Table 3.1.4(2)-6 Amount of Reducing Agent Used in Reduction of Rhenium
(M. W. = $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 225.65)

mg SnCl_2 (HCl 2 mL)	mg (in 20 μL)	umole (in 20 μL added)	mM (2.5 mL)
4.5	0.045	0.2	0.08 *
9	0.08	0.4	0.16
18	0.18	0.8	0.32
27	0.27	1.2	0.48
45	0.45	2	0.8
67.5	0.67	3	1.2
78.75	0.78	3.5	1.4
90	0.90	4	1.6
101.25	1.01	4.5	1.8
115.0	1.15	5.0	2.0
135	1.35	6.0	2.4

* Used in Tc(V)-DMS radiolabeling at Tc carrier free concentration

Table 3.1.4(2)-7 Preliminary Radiolabeling to Produce Re(V)-DMS under Alkaline Conditions

At DMS = 7.1 μ mole (N ₂ , r.t.)		Yield %					
SnCl ₂ μ mole		ReO ₄ = 2 nmole		ReO ₄ = 4 nmole		ReO ₄ = 10 nmole	
Time		30 min	2 h	30 min	2 h	30 min	2 h
2		6.5	6.3	11.2	13.3	17.8	20.3
4		56.7	52.0	30.6	72.9	13.9	38.9

Table 3.1.4(2)-8 Radiolabeling Trials to produce Re(V)-DMS under Alkaline Conditions

[ReO ₄]		2 nmole		4 nmole	10 nmole		16.8 nmole	
Labeling parameter	DMS = μ mole	7.1	14.2	7.1	14.2	17.7	14.2	17.7
	SnCl ₂ = μ mole	2.0	2.0	2.0	2	4.0	2	2
Heating (N ₂) 95 °C, 30 min		10.1	17.2 16.4	17.0	32.1	----	----	----
Autoclave 10 min		---	---	57.3 (60 min)	----	80.2	10.3	15.8
Pre-complex: Sn-DMS Stir, r.t.		4.6	16.3	----	----	----	----	----
Pre-complex: Sn-DMS Heating (N ₂) 95 °C, 30 min		10.1	17.2	----	----	----	----	----
Pre-complex: Sn-DMS N ₂		6.3	25.3	----	----	----	----	----
Conventional N ₂ , r.t.		6.4	17.5	13.3	58.2	80.9	15.0	22.5

Table 3.1.4(2)-9 Comparison of the Excretion of $^{186}\text{Re(V)}$ -DMS and $^{99\text{m}}\text{Tc(V)}$ -DMS in Urine and Faeces for 24 h

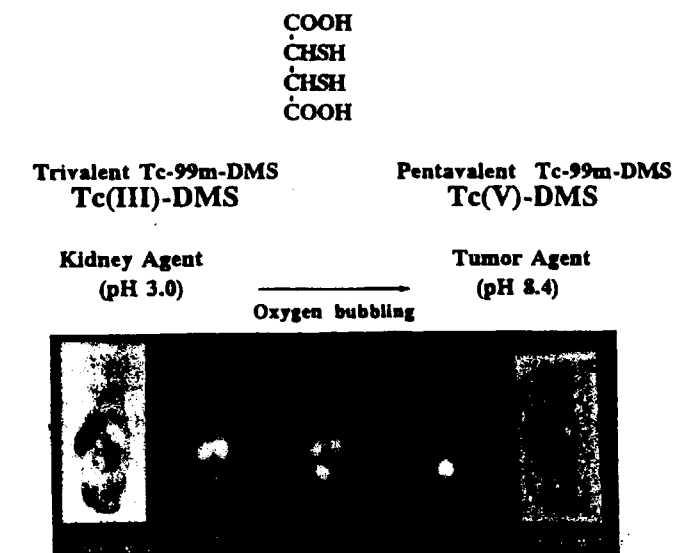
	Re(V)-DMS	Tc(V)-DMS
Urine (%Dose)	59.35	52.4-61.6
Faeces (% Dose)	11.75	4.9-9.9

Table 3.1.4(2)-10 Comparison of Parameters in Synthesizing $^{186}\text{Re(V)}$ -DMS between the Present Work and Previous Works

$^{186}\text{Re(V)}$-DMS	Present Work (Alkaline pH 8.4, r.t., 2.5 mL)	Published Paper * (Acid pH, heat, purif) <i>Recommended Formulation</i>	Published Paper * (Acid pH, heat, purif) <i>Kit Formulation</i>
Radiometal Concentration nmole	2.0 - 20.0	3600	3600
Ligand DMS μmole	17.7 - 24.0	54.8	5.48
SnCl_2 μmole	4.0 - 6.0	26.6	2.0
[Sn] / [Re]	300 ~ 2000	~7.38	~ 0.55
[DMS] / [Sn]	4.0 ~ 4.5	~ 2.06	~ 2.74

* Singh J, Reghebi K, Lazarus CR, Clarke SEM, Callahan AP, Knapp Jr FF and Blower PJ. *Nucl Med Comm* 14:, 197-203, 1993.

**Technetium-Based Radiopharmaceuticals
of Dimercapto Succinic Acid (DMS)**



Comparative Autoradiographic and Scintigraphic Studies

Kobayashi H, Horiuchi K et al.
Europ J Nucl Med 22: 559-562, 1995

Fig. 3.1.4(2)-1 Precedents: Comparative autoradiographic and scintigraphic studies between the kidney agent, Tc(III)-DMS and the tumor agent, Tc(V)-DMS.

Radiolabeling of Tc(V)-DMS

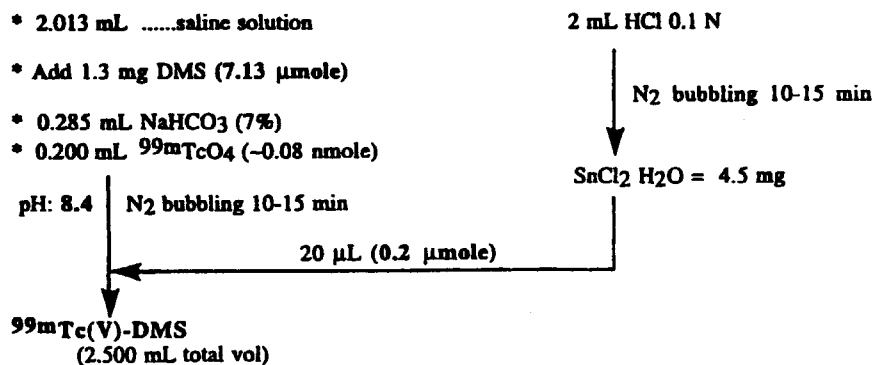


Fig. 3.1.4(2)-2 Flow chart of the ^{99m}Tc(V)-DMS synthesis.

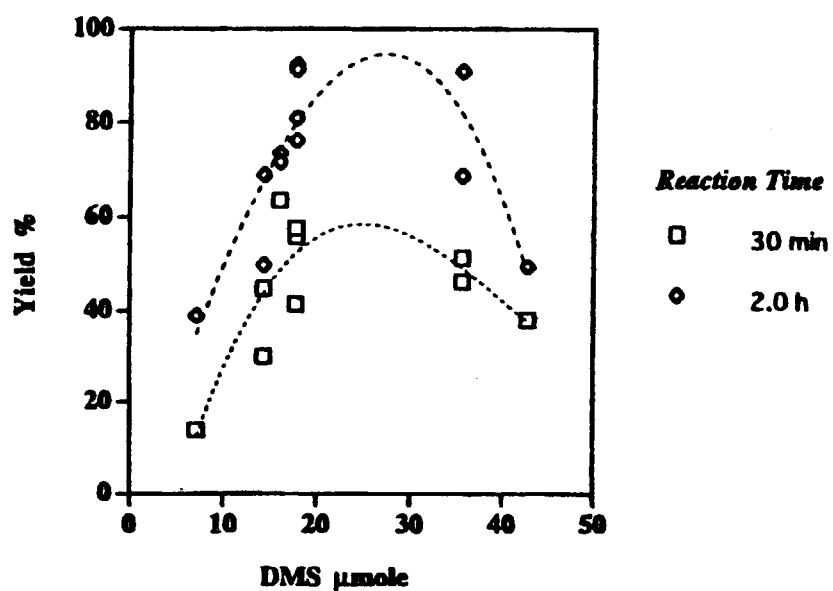


Fig. 3.1.4(2)-3 Radiolabeling $^{186}\text{Re}(\text{V})$ -DMS at alkaline pH: Effect of DMS ligand concentration (at stannous chloride = 4 μmole).

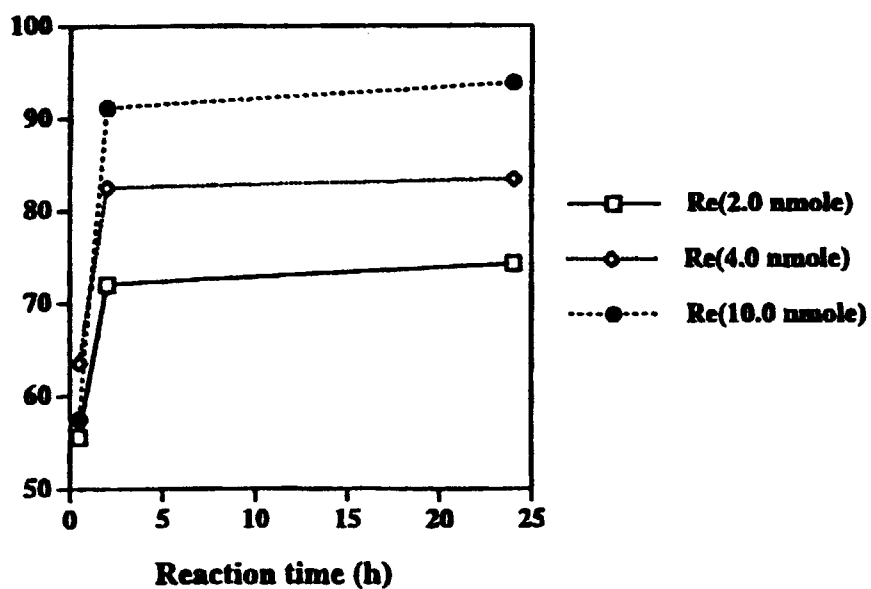


Fig. 3.1.4(2)-4 Radiolabeling $^{186}\text{Re}(\text{V})$ -DMS at alkaline pH: Effect of rhenium concentration (at stannous chloride = 4 μmole , DMS = 17.7 μmole).

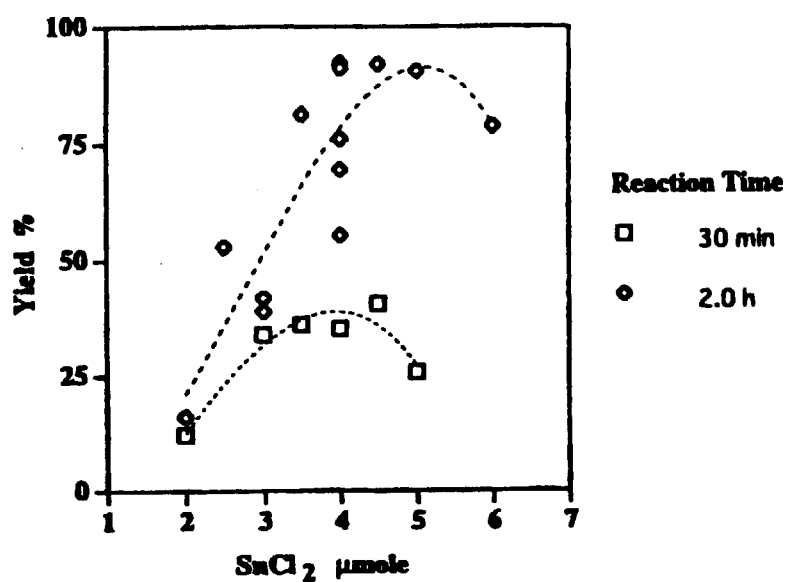


Fig. 3.1.4(2)-5 Radiolabeling $^{186}\text{Re(V)}$ -DMS at alkaline pH: Effect of stannous chloride concentration (at DMS $17.7 \mu\text{mole}$).

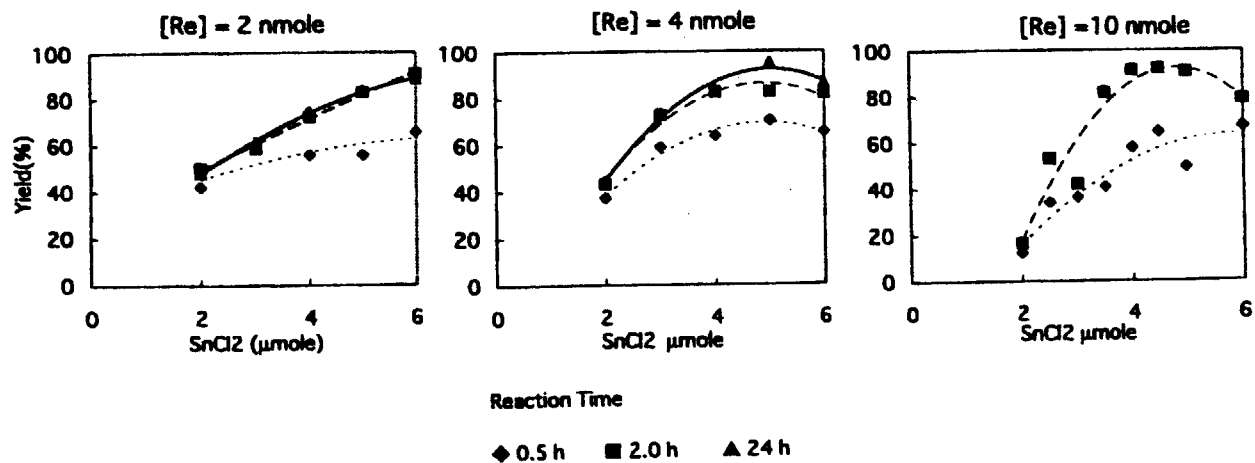
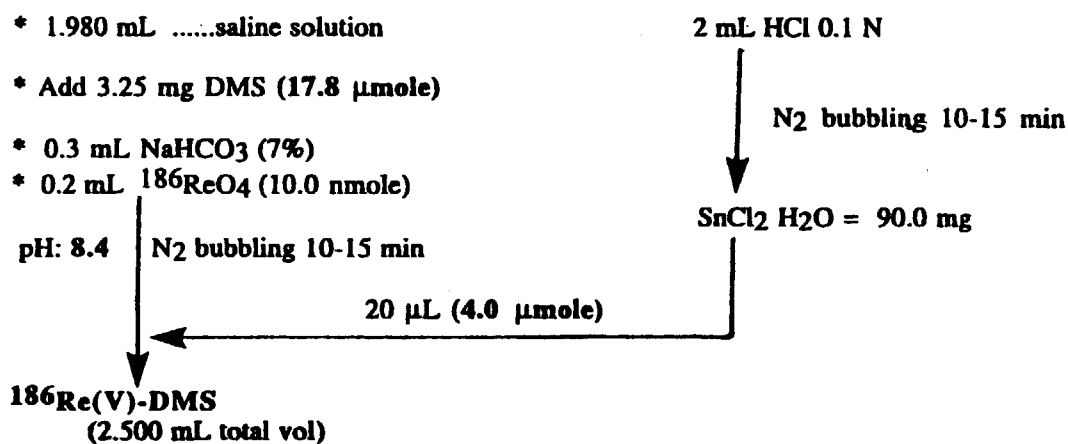
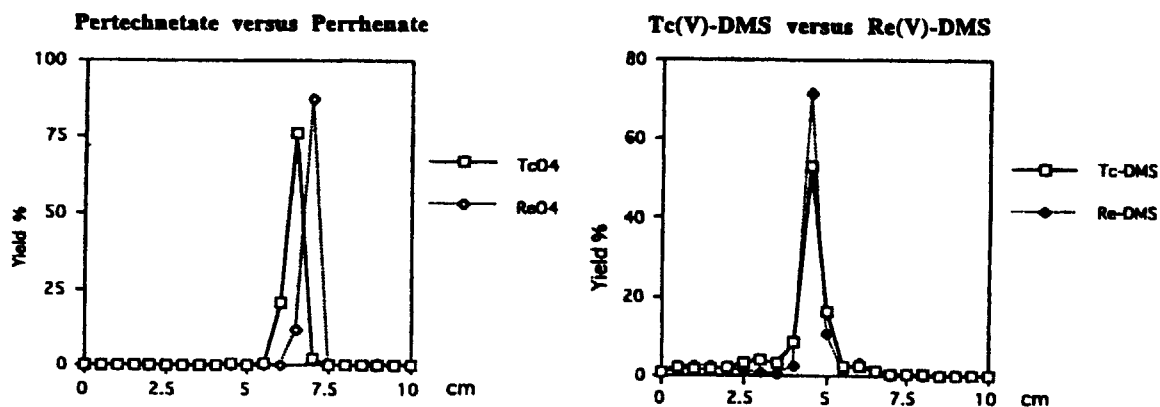


Fig. 3.1.4(2)-6 Radiolabeling $^{186}\text{Re(V)}$ -DMS at alkaline pH: Effect of stannous chloride at various rhenium concentration (at $[\text{DMS}] = 17.7 \mu\text{mole}$).

Radiolabeling of Re(V)-DMSFig. 3.1.4(2)-7 Flow chart of the $^{186}\text{Re(V)-DMS}$ synthesis.Fig. 3.1.4(2)-8 Analysis of $^{99m}\text{TcO}_4^-$, $^{186}\text{ReO}_4^-$, $^{99m}\text{Tc(V)-DMS}$ and $^{186}\text{Re(V)-DMS}$.

Thin Layer Chromatograms on silica gel strips (Merck) developed with the solvent: $\text{Bu(OH)} : \text{AcOH} : \text{H}_2\text{O} = 60 : 40 : 60$.

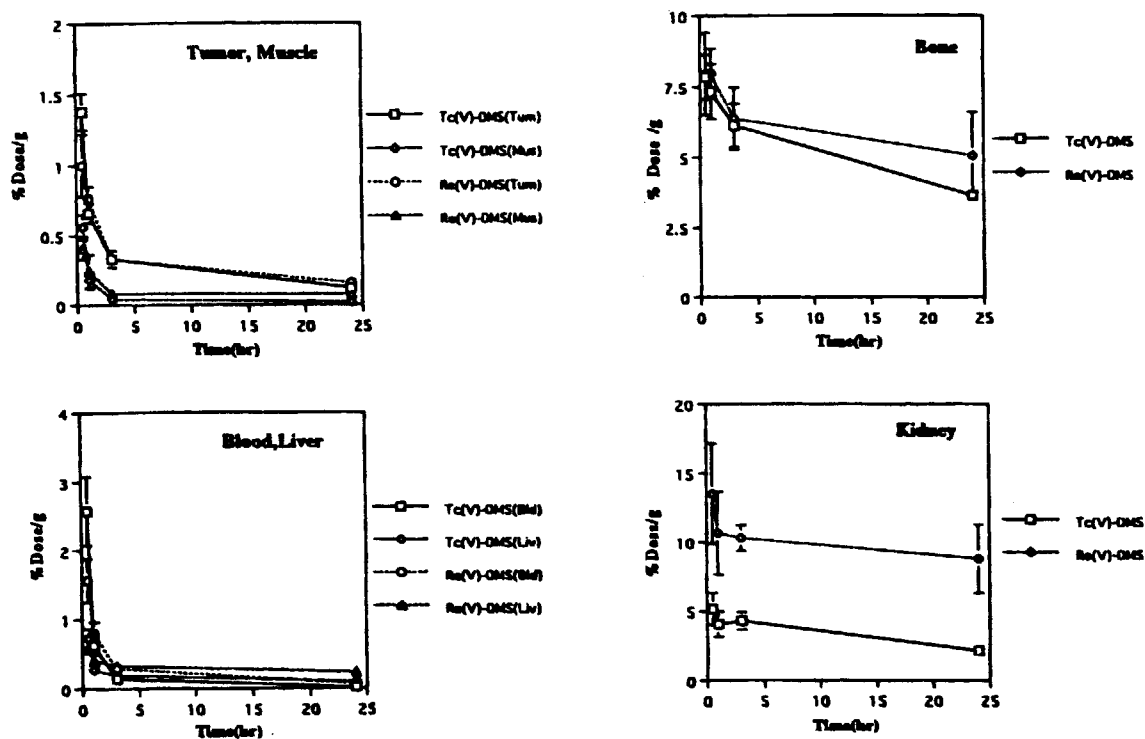


Fig. 3.1.4(2)-9 Biodistributions of $^{99m}\text{Tc(V)}$ -DMS and $^{186}\text{Re(V)}$ -DMS in Ehrlich Ascites Tumor (EAT) Bearing Mice.

3.1.5 DTPA

DTPA の ^{186}Re 標識

(実験材料)

試薬

DTPA 溶液 (24 mg/ml)

 $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 溶液 (25 mg/ml 0.1 N HCl)

2,5-Dihydroxybenzoic acid 溶液 (6 mg/ml)

Ascorbic acid 溶液 (8.8 mg/ml)

 ^{186}Re 溶液 (28 $\mu\text{g/ml}$)実験動物

4 週齢の ddY 系雄性マウスを日本 SLC(株)より購入し、1 週間飼育後、実験に使用した。

(1) 化学実験

放射化学的収率の算出法

放射化学的収率 (以下、収率) は、薄層クロマトグラフィー (TLC)、ペーパークロマトグラフィー (PC) を用いて求めた。TLC は Merck 社 Aluminium sheets (Silica gel 60 F₂₅₄) を用い、アセトンを展開溶媒として行った。PC は Whatman 社 3MM Chr (cat.No.3030909) のろ紙を使用し、生理食塩水を展開溶媒とした。TLC では、Re-DTPA および Re の無機物 (ReO_2 等) は $R_f=0$ (原点)、 ReO_4^- は $R_f=1.0$ に、PC では無機物のみが $R_f=0$ (原点) に観察されることが明らかにされている。バイオ・イメージングアナライザー (FUJIFILM, BAS-1500) を用いて、乾燥後のプレートおよびペーパーの放射能を測定し、TLC の $R_f=0$ での放射能比 A (%), PC の $R_f=0$ での放射能比 B (%) を求め、収率を $A \times (100-B)/100$ (%) と算出した。

(2) 反応条件の検討

反応時間、Sn 量を検討するために、反応時間を 10~120min、 SnCl_2 液を 0~140 μl と変え、DTPA 溶液 200 μl 、 ^{186}Re 溶液 100 μl として、沸騰水浴中で反応を行った。得られた ^{186}Re -DTPA の収率を Fig. 3.1.5-1 に示す。

収率は反応時間が 10~60 分までは高くなるが、60~120 分では 95% 前後と一定になった。Sn 量は、どの反応時間でも、40 μl で一定になった。従って、反応時間は 60 分、Sn 量は 40 μl とした。

反応容器・反応溶液内酸素の収率に与える影響を調べた。反応に用いる精製水、HCl を使用前に Ar 置換を行ってから各試薬を調製した。また反応は、各溶液を混合後、反応容器内を Ar で置換して行った。結果を Fig. 3.1.5-2 に示す。Ar 置換により、収率の増加が見られた。Ar 置換を行わないと Sn 量が 80 μl 以上で ^{186}Re -DTPA の収率の低下が起こるが、Ar 置換を行う事で収率の低下を押さえることができる。以後、実験では Ar 置

換を行うことにした。

酸化防止剤の影響を調べるために、2,5-dihydroxybenzoic acid と L-Ascorbic acid を反応前に添加した。酸化防止剤の濃度はそれぞれ 6 mg/ml、8.8 mg/ml とし、0~140 μ l 加えた。この結果を Fig. 3.1.5-3 に示すが、2,5-dihydroxybenzoic acid を添加すると、無添加と比べて ^{186}Re -DTPA の収率が低下した。また、L-Ascorbic acid の添加は、収率に影響を与えなかった。よって、酸化防止剤の添加は行わないことにした。

Re 濃度が収率に与える影響を見るために、 ^{186}Re の濃度を 0.28 から 0.0007 $\mu\text{g/ml}$ の範囲で反応を行った (Fig. 3.1.5-4)。Re 濃度が低下するにつれ、収率は低下した。

DTPA 濃度が収率に与える影響を見るために、DTPA の濃度を 24 から 0.0024 mg/ml の範囲で反応を行った (Fig. 3.1.5-5)。DTPA 濃度の低下と共に収率は低下した。

pH の影響については、反応溶液に 2N HCl と 2M NaOH を添加して pH を 0.5~12.8 まで変化させて調べた (Fig. 3.1.5-6)。収率は、pH1.3 で最も高い 91%、pH2.8 で約 6%、これ以上の pH で 1%前後である。pH 調整を行う前の反応溶液の pH は 0.9~1.2 であるので、pH 調整を行う必要はないと考えられる。

以上の実験で決定した ^{186}Re -DTPA の至適合成条件を以下に示す。今後の合成はこの条件で行うことにした。

DTPA 溶液 (24 mg/ml) : 200 μ l

$\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 溶液 (25 mg/ml 0.1N HCl) : 40 μ l

2,5-Dihydroxybenzoic acid 溶液 (6 mg/ml) : 0 μ l

L-Ascorbic acid 溶液 (8.8 mg/ml) : 0 μ l

^{186}Re 溶液 (28 $\mu\text{g/ml}$) : 100 μ l

反応条件 : 試薬・反応容器は Ar 置換を行い、沸騰水浴中で 60 分行う。

(3) 生成錯体の安定性の検討

室温及び 37°C

^{186}Re -DTPA 反応液を酢酸緩衝液に 10 倍希釈した溶液、そしてこの希釈液をさらに正常マウス血清で 10 倍希釈した溶液を、24 時間後まで残存する ^{186}Re -DTPA 量を経時的に測定した (Fig. 3.1.5-7~8)。収率が 95% の ^{186}Re -DTPA は、室温及び 37°C で共に 6 時間までは分解していないが 6 から 24 時間の間に約 50% 分解する。酢酸緩衝液中の ^{186}Re -DTPA の残存率は希釈直後に約 80% に低下した。室温ではその後直線的に 20% まで低下する。また、37°C では室温に比べ分解の程度が少なかったが、この原因についてはさらに検討を行う予定である。マウス血清中の ^{186}Re -DTPA の残存率は、室温で 51%、37°C で 41% に低下した。

酸化防止剤を添加しないために分解すると考えられるので、合成完了後に 2,5-Dihydroxybenzoic acid 溶液または L-Ascorbic acid 溶液を 0~120 μ l 加えて 37°C での安定性を調べた (Fig. 3.1.5-9~11) 示す。少量の 2,5-Dihydroxybenzoic acid を加えても

24 時間後でも残存率は高い。L-Ascorbic acid では添加量が多くなるにつれて残存率は高くなり、120 μ l 加えると分解は 1%程度にとどまった。酢酸緩衝液について 24 時間後の分解は、2,5-Dihydroxybenzoic acid を加えても未添加の場合と同様であるが、L-Ascorbic acid では、添加すると約 20%であるが未添加では約 40%となった。正常マウス血清について分解は、2,5-Dihydroxybenzoic acid を加えても未添加の場合と変わらないが、L-Ascorbic acid では無添加時に比べ約 5%多くなったが、分解は同程度と考えられる。

(4) 動物実験

酢酸緩衝液で 10 倍に希釈したサンプル 100 μ l/匹(0.5 μ Ci : 18.5 kBq)をマウスに尾静脈から投与した。一定時間(10 分, 1, 3, 6, 24 時間)後に、1 群 5 匹のマウスをジエチルエーテルで麻酔し開腹後、下大静脈から採血した。続いて、肺、脾臓、腎臓、胃、腸、筋肉、大腿骨、肝臓、胃を採取した。秤量後、 γ カウンターで放射能を測定した。測定データは、“cpm/g organ”、すなわち器官 g 当たりの値に変換した。 $^{186}\text{Re-DTPA}$ の体内分布の結果を Fig. 3.1.5-12 に示す。

腎臓に集積するが、投与 10 分後から 1 時間後にかけて大幅に減少する。胃での集積は 1 時間後に最大となるが、 $^{186}\text{Re-DTPA}$ が $^{186}\text{ReO}_4$ に分解したと考えられるほどの集積は見られなかった。

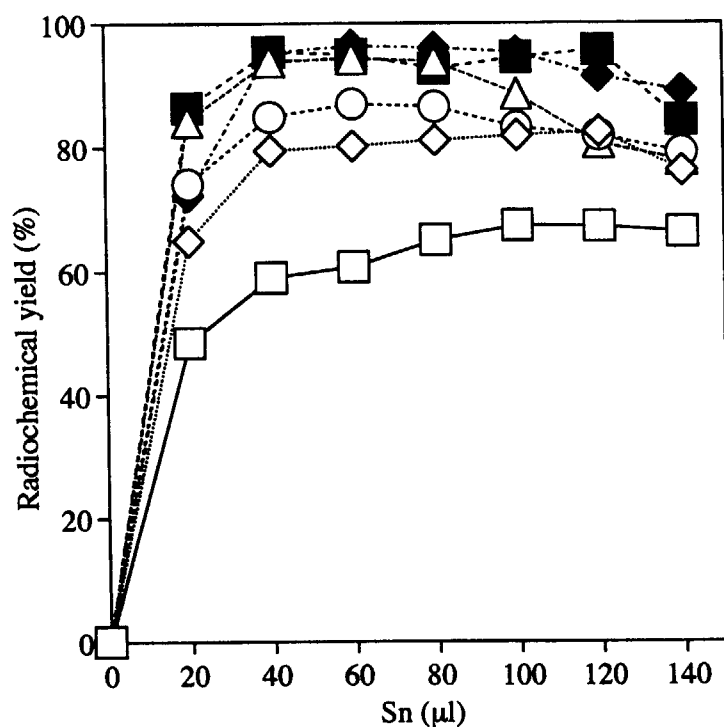


Fig. 3.1.5-1 Effect of SnCl_2 and reaction time on the radiochemical yield of ^{186}Re -DTPA. ^{186}Re : $28 \mu\text{g/ml}$ ($100 \mu\text{l}$); DTPA: 24 mg/ml ($200 \mu\text{l}$); $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 25 mg/ml ; reaction temperature: 100°C .

Reaction time $\square$: 10 min; $\diamond$: 20 min; $\circ$: 30 min; $\triangle$: 60 min; $\blacksquare$: 90 min; $\blacklozenge$: 120 min

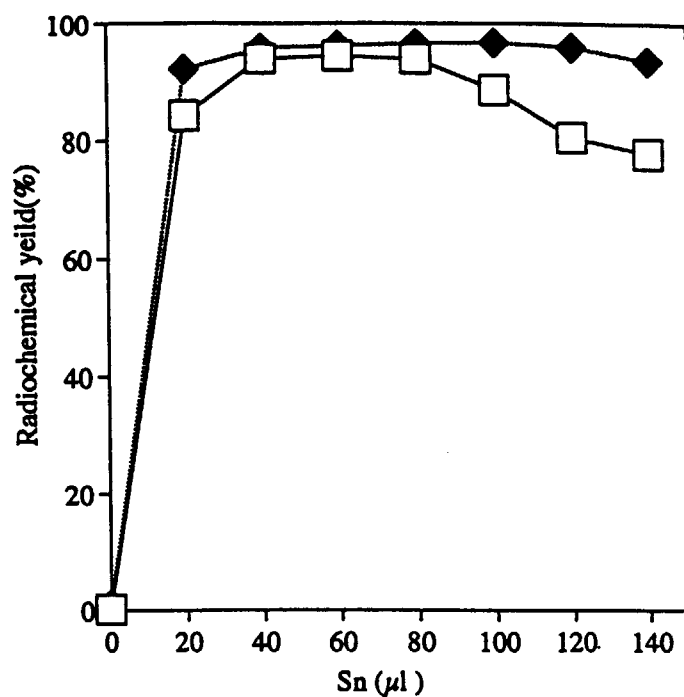


Fig. 3.1.5-2 Effect of Ar purge on the radiochemical yield of ^{186}Re -DTPA.

DTPA: 24 mg/ml ($200 \mu\text{l}$); $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 25 mg/ml ($40 \mu\text{l}$); ^{186}Re : $28 \mu\text{g/ml}$ ($100 \mu\text{l}$); reaction conditions: 100°C .60min. ($\square$: No Ar purge; $\blacklozenge$: Ar purge)

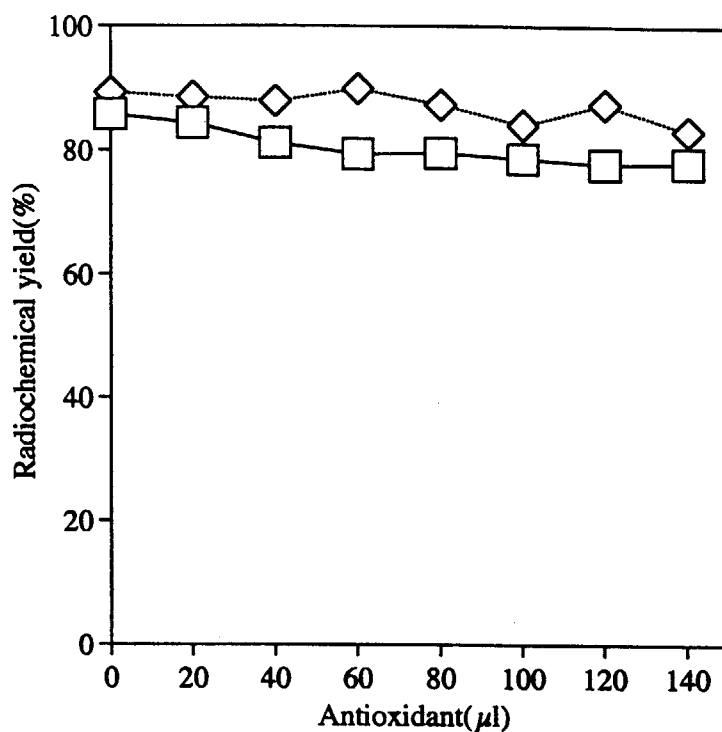


Fig. 3.1.5-3 Effect of 2,5-dihydroxybenzoic acid and ascorbic acid on the radiochemical yield of ^{186}Re -DTPA. DTPA: 24mg/ml(200 μl); $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 25 mg/ml (40 μl); ^{186}Re : 28 $\mu\text{g/ml}$ (100 μl); reaction conditions: 100°C, 60min.

□: 2,5-Dihydroxybenzoic Acid (6 mg/ml); ◇: Ascorbic Acid (8.8 mg/ml)

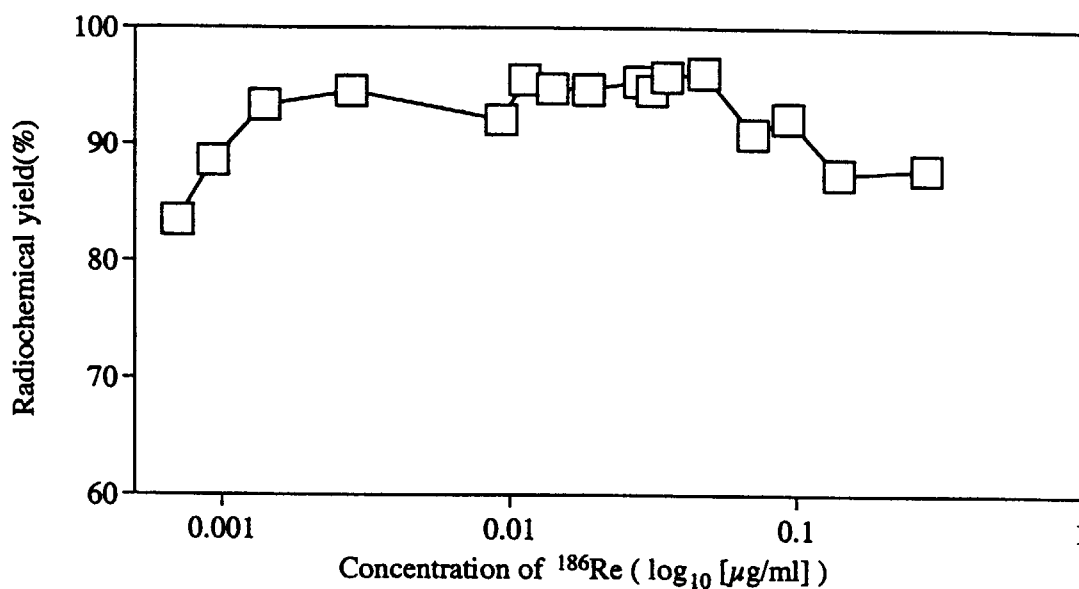


Fig. 3.1.5-4 Effect of the concentration of ^{186}Re solution on the radiochemical yield of ^{186}Re -DTPA. DTPA: 24 mg/ml (200 μl); $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 25 mg/ml (40 μl), ^{186}Re : 100 μl ; reaction conditions: 100°C, 60min.

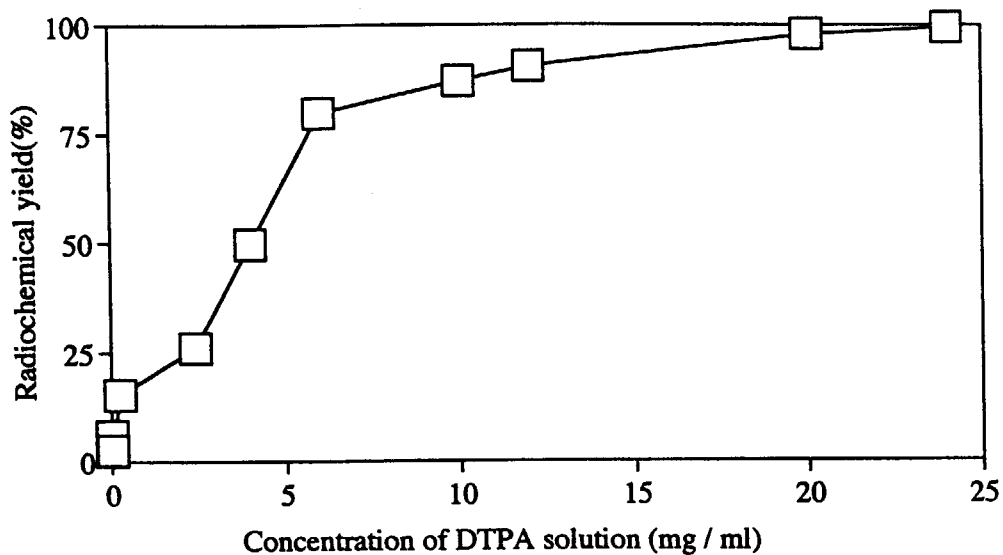


Fig. 3.1.5-5 Effect of the concentration of DTPA solution on radiochemical of ^{186}Re -DTPA. $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 25 mg/ml ($40 \mu\text{l}$); ^{186}Re : 28 $\mu\text{g/ml}$ ($100 \mu\text{l}$); DTPA: 200 μl ; reaction conditions: 100°C, 60min.

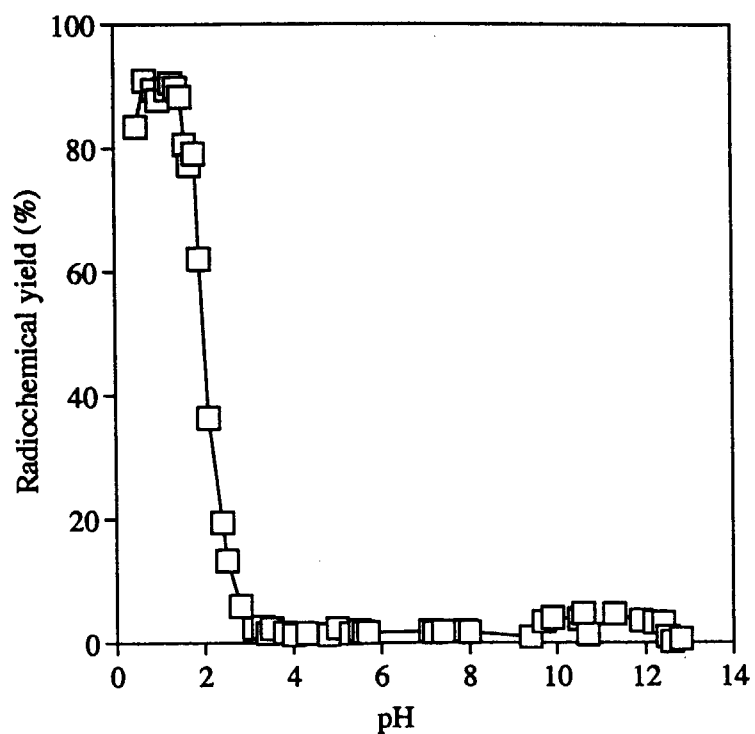


Fig. 3.1.5-6 Effect of the pH of reaction solution on the radiochemical yield of ^{186}Re -DTPA. Re : 28 mg/ml ($100 \mu\text{l}$); DTPA: 24 mg/ml ($200 \mu\text{l}$); $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 25 mg/ml ($40 \mu\text{l}$); reaction conditions: 100°C, 60min.

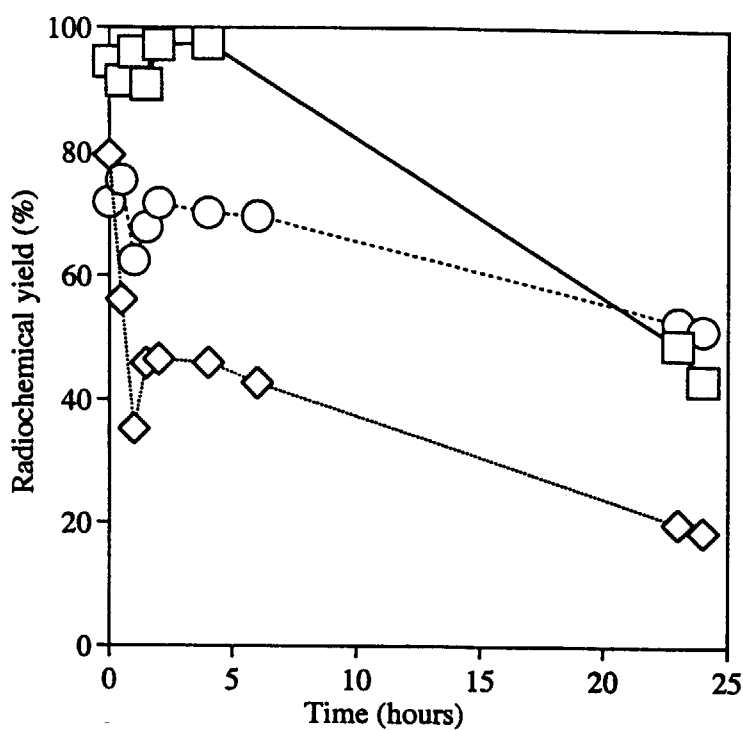


Fig. 3.1.5-7 Survival of ^{186}Re -DTPA at room temperature for 24 hours.
 DTPA: 24 mg/ml ($200\ \mu\text{l}$); $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 25 mg/ml ($40\ \mu\text{l}$); ^{186}Re : $28\ \mu\text{g/ml}$ ($100\ \mu\text{l}$);
 reaction conditions; 100°C , 60min.

□: Original; ◇: Sodium acetate buffer; ○: Normal mouse serum

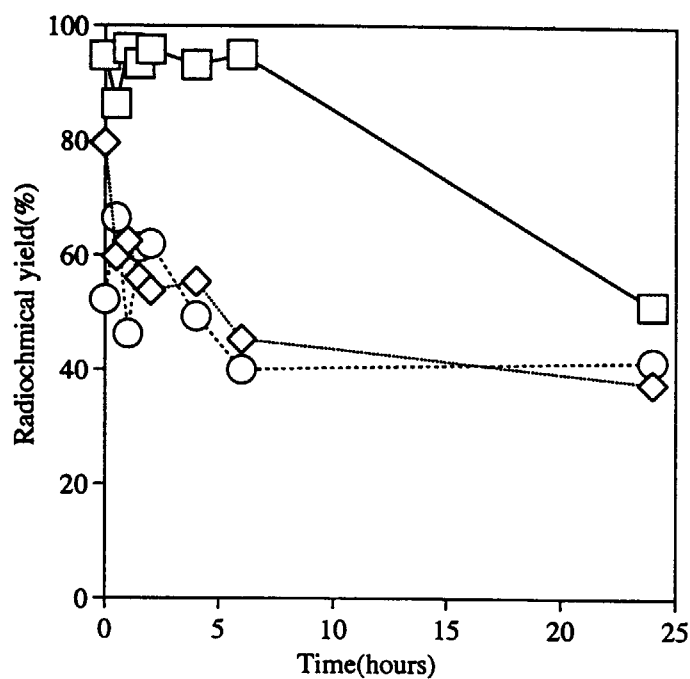


Fig. 3.1.5-8 Survival of ^{186}Re -DTPA at 37°C for 24 hours.
 DTPA: 24 mg/ml ($200\ \mu\text{l}$); $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 25 mg/ml ($40\ \mu\text{l}$); ^{186}Re : $28\ \mu\text{g/ml}$ ($100\ \mu\text{l}$);
 reaction conditions: 100°C , 60min.

□: Original; ◇: Sodium acetate buffer; ○: Normal mouse serum

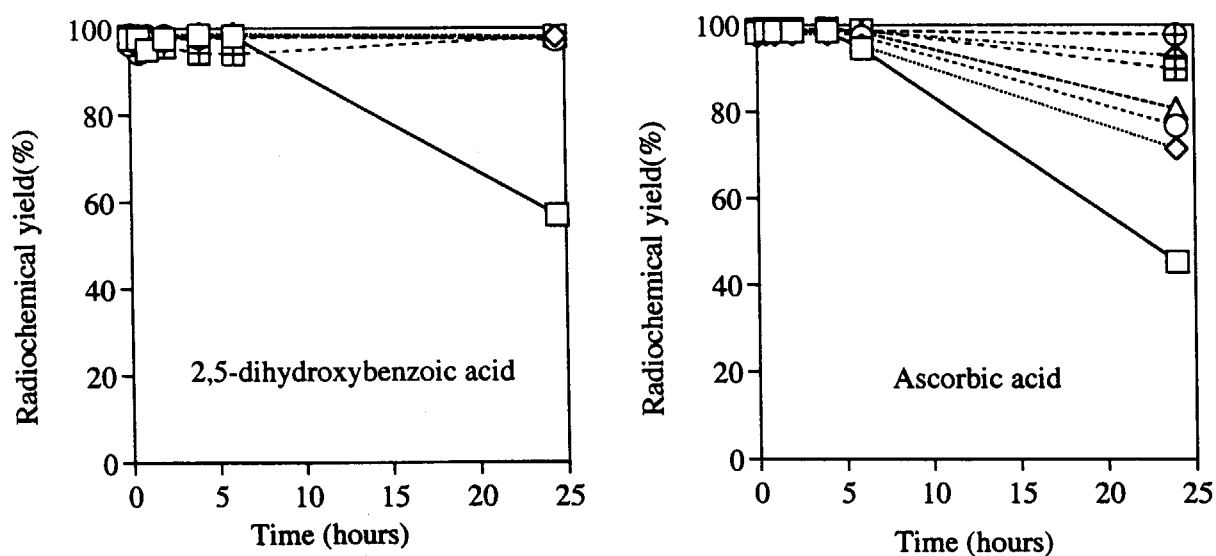


Fig. 3.1.5-9 Effect of 2,5-dihydroxybenzoic acid and ascorbic acid on the survival of ^{186}Re -DTPA at 37°C for 24 hours. DTPA: 24 mg/ml ($200\ \mu\text{l}$); $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 25 mg/ml ($40\ \mu\text{l}$); ^{186}Re : $28\ \mu\text{g/ml}$ ($100\ \mu\text{l}$); reaction conditions: 100°C , 60min.

□: $0\ \mu\text{l}$; ◇: $20\ \mu\text{l}$; ○: $40\ \mu\text{l}$; △: $60\ \mu\text{l}$; ▤: $80\ \mu\text{l}$; ⋈: $100\ \mu\text{l}$; ⊕: $120\ \mu\text{l}$

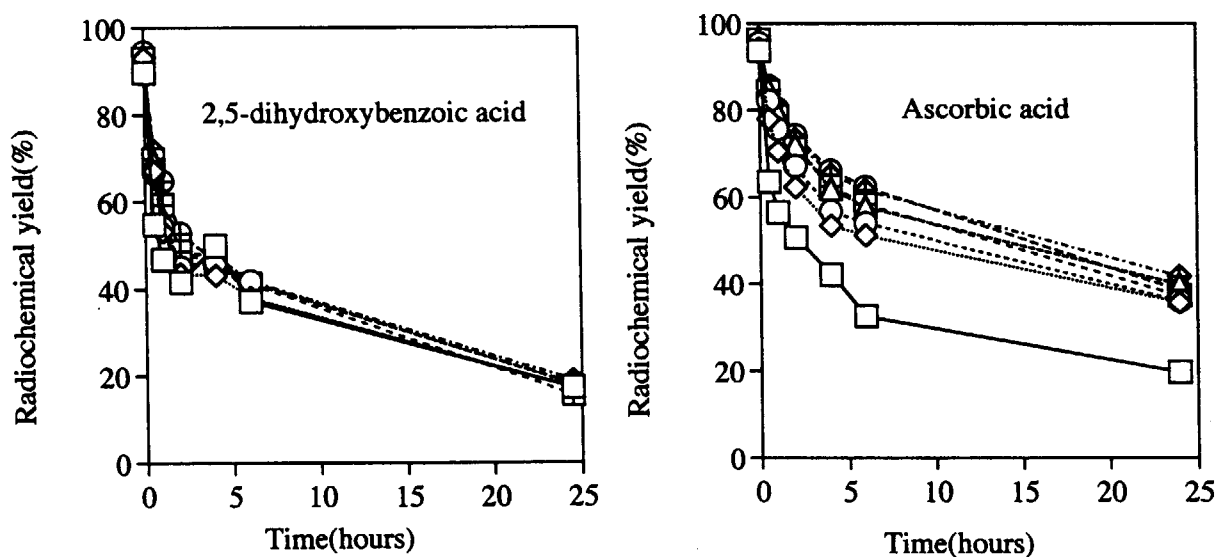


Fig. 3.1.5-10 Effect of 2,5-dihydroxybenzoic acid and ascorbic acid on the survival of ^{186}Re -DTPA in acetate buffer at 37°C for 24 hours. DTPA: 24 mg/ml ($200\ \mu\text{l}$); $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 25 mg/ml ($40\ \mu\text{l}$); ^{186}Re : $28\ \mu\text{g/ml}$ ($100\ \mu\text{l}$); reaction conditions: 100°C , 60min.

□: $0\ \mu\text{l}$; ◇: $20\ \mu\text{l}$; ○: $40\ \mu\text{l}$; △: $60\ \mu\text{l}$; ▤: $80\ \mu\text{l}$; ⋈: $100\ \mu\text{l}$; ⊕: $120\ \mu\text{l}$

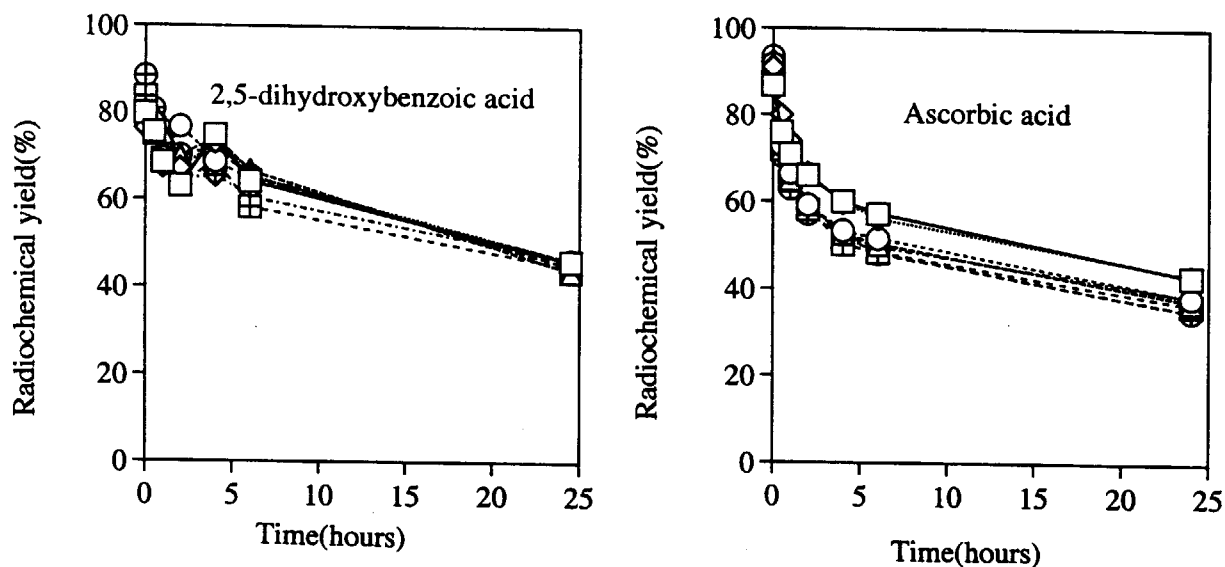


Fig. 3.1.5-11 Effect of 2,5-dihydroxybenzoic acid and ascorbic acid on the survival of ^{186}Re -DTPA in normal mouse serum at 37°C for 24 hours.

DTPA: 24 mg/ml (200 μ l); $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 25 mg/ml (40 μ l);

^{186}Re : 28 μ g/ml (100 μ l); reaction conditions: 100°C , 60min.

□: 0 μ l; ◇: 20 μ l; ○: 40 μ l; △: 60 μ l; ⊠: 80 μ l; ⊕: 100 μ l; ⊙: 120 μ l

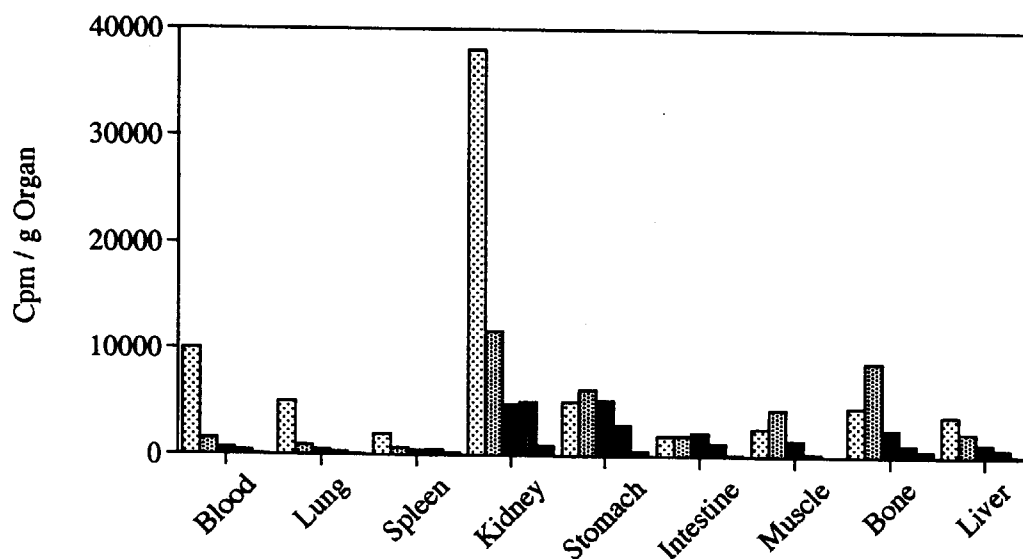


Fig. 3.1.5-12 Biodistribution of radioactivity after intravenous administration of ^{186}Re -DTPA in normal mice.

The initial radiochemical yield of ^{186}Re -DTPA is 97%.

The radiochemical yield of ^{186}Re -DTPA in acetic buffer is 91%.

⊠: 10mins ⊠: 1hr ■: 3hrs ■: 6hrs ■: 24hrs

3.1.6 DADS (N,N'-bis(mercaptoacetyl)ethylenediamine)

DADS の ^{186}Re 標識に関する基礎的検討

(1) 緒言

骨転移巣への速やかな集積と血液を含む全身からの速やかな放射能消失の二つの機能を兼ね備える Re-186 標識ビスフォスフォネート錯体の新たな設計を開発を目的として、二官能性キレート試薬を用いる新たな (Re , Tc) 標識についての基礎的検討を行った。

すなわち、従来のビスフォスフォネートを母体とする Tc -, Re -放射性薬品はビスフォスフォネート部位を Tc や Re との結合部位として利用するとともに骨転移部位への集積を決定する官能基としても利用している。しかし Tc とは異なり、 Re と HEDP とが形成する錯体は骨組織への集積を示すものの、血液中において極めて不安定であり、 ReO_4^- への分解反応が進行する。その結果は血液からの放射能消失の遅延として反映され、骨髄被曝を増大する原因となる。これに対して本研究では、 Re-186 と 1 : 1 のモル比で生体内で安定な錯体を形成する配位子をビスフォスフォネート骨格に導入することを計画した。安定な単核錯体をビスフォスフォネートに結合することにより、生体内における錯体の分解は解消され、血液からの放射能消失が促進されることが期待される。また、本化合物は、分子内にアミノ基あるいは環状構造を有する第二世代、第三世代のビスフォスフォネートと類似した構造を有することから、多核錯体を基本構造とする従来の Tc-MDP , HMDP や Re-HEDP とは異なった機序による骨転移巣への集積が期待される。

ビスフォスフォネート部位に Re (Tc) との配位子を導入する場合、前述のように配位子は Re (Tc) と 1 : 1 の単核錯体を形成すること、その錯体は生体内で安定であること、さらにビスフォスフォネートが存在しても、 Re (Tc) がキレート部位に選択的に結合することが必要である。これまでの研究から、窒素と硫黄を配位原子に有する N_3S や N_2S_2 配位子は Tc や Re と上記の条件を満たす錯体を形成することが知られている。そこで N_2S_2 型配位子として N,N' -bis(mercaptoacetyl)ethylenediamine (DADS (5-5-5)) および N , N' -bis(mercaptoacetyl)propanediamine (DADS (5-6-5)) を、また N_3S 配位子として N -(mercaptoacetyl)triglycine (MAG_3) を選択し、 Re との錯形成反応条件について検討した。それぞれの配位子の化合構造を Fig. 3.1.6-1 に示す。DADS (5-5-5), DADS (5-6-5) は 2 分子のチオール基が、また MAG_3 では 1 分子のチオール基がベンゾイル基により保護されていることから、錯形成反応に先立ち、ベンゾイル基の脱保護が必要である。

(2) 実験

1) 配位子の合成

それぞれの配位子は、既報に従い合成した。すなわち、Thioglycolic acid のチオール基を benzyl chloride により保護した後、カルボン酸を $\text{N-hydroxysuccinimide}$ との縮合反応で活性エステルとし、次いで、ethylenediamine, propanediamine, tri-glycine との反応により得た。

2) DADS および MAG_3 と ^{186}Re との錯形成反応

- (a) S-Bz-DADS (5-5-5) 15 mg (25.6 mM), S-Bz-DADS (5-6-5) 15.5 mg (25.6 mM), S-Bz-MAG₃ 13 mg (25.6 mM)をそれぞれバイアルに入れ、66%エタノール0.5 ml と 1 M あるいは 5 M NaOH 0.15 ml を加えた。
- (b) 30 分間加熱して、ベンゾイル基の脱保護を行った。
- (c) Perrhenate 250 μl (1.3×10^{-5} M)をそれぞれのバイアルに加えた後、 $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (10 mg/ml)の 1 M NaOH 溶液を 500 μl 加えた。
- (d) 沸騰水浴中で 10 分、20 分間さらに 30 分間加熱したサンプルをセルロースアセテート膜電気泳動 (veronal buffer pH8.6, $I=0.06$, 0.8 mA/cm, 20 min)および TLC (展開溶媒; メチルエチルケトン) で分析した。
- (e) さらに DADS (5-5-5)についてはリガンド濃度を 3.2, 6.4, 12.8 mM にして、5 N NaOH に溶解後に同様の操作で標識反応を行った。

3) HEDP 存在下における DADS の Re-186 標識

- (a) S-Bz-DADS (5-5-5) 15 mg (25.6 mM)を 4 本のバイアルに入れ、66%エタノール0.5 ml と 5 M NaOH 0.15 ml を加えた後、30 分間加熱する。
- (b) それぞれのバイアルに HEDP 7 mg (25.6 mM), 35 mg(128 mM), 70 mg(256 mM)を加える。なお、コントロールとして HEDP の存在しない条件でも反応を行う。
- (c) Perrhenate 250 μl (1.3×10^{-5} M), $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (10 mg/ml)溶液 500 μl を加える。
- (d) 沸騰水浴中で 10 分、20 分間さらに 30 分間加熱した後、セルロースアセテート膜電気泳動 (veronal buffer pH8.6, $I=0.06$, 0.8 mA/cm, 20 min)および TLC (展開溶媒; メチルエチルケトン) で分析する。

4) Glucoheptonate 存在下における S-Bz-DADS (5-5-5)と ^{186}Re との錯形成反応

4-1 S-Bz-DADS (5-5-5)濃度変化の影響

- (a) S-Bz-DADS (5-5-5) 0.015 mg (0.0256 mM), 0.15 mg (0.256 mM), 1.5 mg (2.56 mM), 7.5 mg (12.8 mM), 15 mg (25.6 mM)をそれぞれバイアルに入れ、66%エタノール0.5 ml と 5M NaOH 0.15 ml を加える。
- (b) それぞれのバイアルに glucoheptonate 17.4 mg (50 mM)を溶解する。
- (c) 沸騰水浴中で 30 分間加熱して、脱保護する。
- (d) Perrhenate 250 μl (1.3×10^{-5} M)をそれぞれのバイアルに加えた後、DADS: $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (10 mg/ml)=1.6: 1 となるように調製した Sn 溶液を 500 μl 加える。
- (e) 沸騰水浴中で 10 分、20 分間さらに 30 分間加熱したサンプルをセルロースアセテート膜電気泳動 (veronal buffer pH8.6, $I=0.06$, 0.8 mA/cm, 20 min)および TLC (展開溶媒; メチルエチルケトン) で分析する。

4-2 Glucoheptonate 濃度変化の検討

- (a) S-Bz-DADS (5-5-5) 1.5 mg (2.56 mM)をバイアルに入れ、66%エタノール0.5 ml と 5M NaOH 0.15 ml を加えた後、30 分間加熱する。

- (b) Glucoheptonate を 3.5 mg (10 mM), 8.7 mg (25 mM), 17.4 mg (50 mM) を溶解する。
- (c) 沸騰水浴中で 30 分間加熱して、脱保護する。
- (d) Perrhenate 250 μ l をそれぞれのバイアルに加えた後、 $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (50 mg/5 ml) 溶液を 50 μ l 加える。
- (e) 沸騰水浴中で 10 分、20 分間さらに 30 分間加熱したサンプルをセルロースアセテート膜電気泳動 (veronal buffer pH8.6, $I=0.06$, 0.8 mA/cm, 20 min) および TLC (展開溶媒; メチルエチルケトン) で分析する。

4)-3 Perrhenate 濃度変化の影響

- (a) S-Bz-DADS (5-5-5) 7.5 mg (12.8 mM) をバイアルに入れ、66% エタノール 2.5 ml と 5 M NaOH 0.75 ml を加える。
- (b) (a) を 650 μ l ずつ 4 本のバイアルに入れ、17.4 mg (50 mM), 8.7 mg (25 mM) となるように glucoheptonate を 2 本ずつバイアルに加える。
- (c) 沸騰水浴中で 5 分間加熱して、脱保護する。
- (d) Perrhenate 250 μ l (0.0066, 0.0132, 0.0264, 0.066 mM) をそれぞれのバイアルに加えた後、さらに $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (10 mg/ml) 溶液を 500 μ l 加えて、10 分間加熱する。
- (e) 沸騰水浴中で 10 分、20 分間さらに 30 分間加熱したサンプルをセルロースアセテート膜電気泳動 (veronal buffer pH8.6, $I=0.06$, 0.8 mA/cm, 20 min) および TLC (展開溶媒; メチルエチルケトン) で分析する。

(3) 結果と考察

Re との錯形成反応で生成するキレート環構造の異なる 2 分子の DADS 誘導体、および MAG_3 を同じ反応濃度で ReO_4^- との錯形成反応をスズ還元法で行った場合の放射化学的収率を Fig. 3.1.6-2, 3 に示す。チオール基の加水分解反応に 1 N NaOH を用いた場合よりも 5 N NaOH を用いた場合の方が両 DADS 誘導体ともに放射化学的純度の増加が観察された。これは、それぞれの DADS 誘導体の脱保護反応の収率が 5 N NaOH の方が高く、これが標識反応収率の増加に反映されたと考えられる。

一方、両 DADS 誘導体に比べて MAG_3 は予想したよりも放射化学的収率が低い結果が得られた (Fig. 3.1.6-3)。これは、今回行った標識反応条件が MAG_3 に対して適切でなかったことによると考えられるが、それと同時に両 DADS 配位子に比べて MAG_3 と Re とが形成する錯体は、高アルカリにおける加熱では不安定であることを示唆する。そこで、DADS (5-5-5) を選択し、さらに検討を行った。

Bisphosphonate と DADS 結合体を Re で標識する場合、Re が bisphosphonate との結合を形成することなく DADS とのみ選択的に錯体を形成する必要がある。そこで、種々の濃度の HEDP の存在下において DADS と Re との錯形成反応を行い、DADS と Re との錯形成反応に及ぼす HEDP の影響を検討した。その結果、Fig. 3.1.6-6 に示すように、

DADS と HEDP とを 1:1 から 1:10 のモル比で反応しても Re-DADS の放射化学的収率は十分に高く、HEDP 存在下においても Re は DADS と選択的に錯体を形成することが明らかとなった。実際には、DADS と bisphosphonate とを 1:1 のモル比で結合した誘導体の設計を予定していることから、DADS を Re との結合部位に選択した場合、Re との標識反応において Re は DADS 部位とのみ選択的な錯体を生成すると考えられる。

以上の検討から、DADS は bisphosphonate へ導入する Re のキレート部位としての基本的な条件、すなわち、Re と安定な錯体を形成し、かつ bisphosphonate による錯形成反応の阻害を受けないこと、が確認された。そこで、Re と DADS との錯形成反応についてさらに詳細な検討を行った。

DADS と Re との錯形成反応は、低濃度の DADS で高い比放射能を与える条件の設定が必要である。Fig. 3.1.6-2~4 に示した反応条件では、Re 錯体の収率は反応時間と DADS 濃度が増加するに従って反応収率が増加したが、極めて高濃度の配位子が必要とされた。これは、DADS-bisphosphonate conjugate を用いる際に、その毒性を考慮する必要がある、より低濃度の DADS を用いて高い放射化学的収率を与える標識条件の設定が必要である。そこで、DADS と Re との錯形成反応を glucoheptonate の存在下において行った。Fig. 3.1.6-6 に示すように、glucoheptonate の存在により、低濃度の DADS を用いた場合においても高い放射化学的収率が達成された。これは glucoheptonate の濃度による依存性が見られたが (Fig. 3.1.6-6)、perrhenate の濃度を 10 倍変化したときでも Re 濃度による影響は観察されなかった (Fig. 3.1.6-6)。スズで還元された Re は DADS との錯形成を行うと同時に加水分解反応を受ける。この溶液に適切な濃度の glucoheptonate を加えると、Re が高濃度の glucoheptonate と錯体を形成し、Re の加水分解が抑制される。一方、DADS は glucoheptonate に比べて遙かに安定な Re 錯体を形成するため、Re-glucoheptonate から Re-DADS への配位子交換反応が進行し、これが低濃度の DADS における放射化学的収率の増加につながったと結論される。

本標識法は DADS に限らず、5 価の Re との錯体を形成すると考えられる様々な配位子との錯形成反応に応用できることから、DADS のみならず、 MAG_3 やほかの N_2S_2 型配位子との Re 錯体の合成に有用である。

以上、DADS と Re との錯形成反応について基礎的に検討を行い、(1) DADS は HEDP の存在においても選択的に Re と錯体を形成すること、(2) Re-DADS 錯体の収率は、反応溶液に適切な濃度の glucoheptonate を添加することにより著しく増加すること、が明らかとなった。以上の結果を踏まえて、bisphosphonate-DADS conjugate の設計、合成、さらには Re 錯体の合成を行い、Re-HEDP との体内動態の比較等について今後詳細な検討を行うことを計画している。

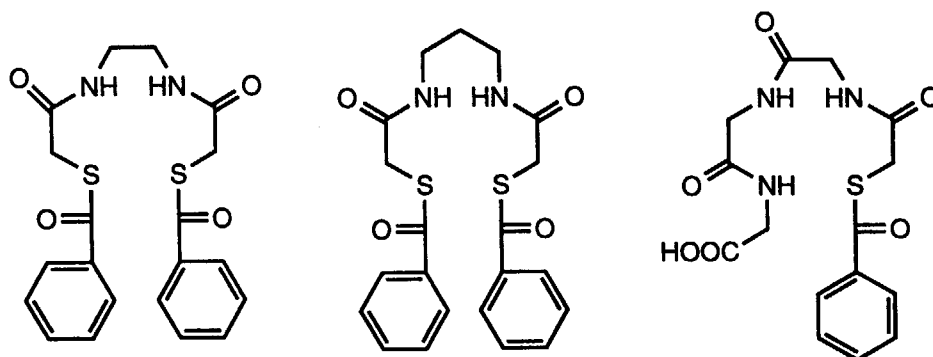


Fig. 3.1.6-1 Chemical structures of DADS derivatives and MAG₃ with sulfhydryl protective benzoyl groups.

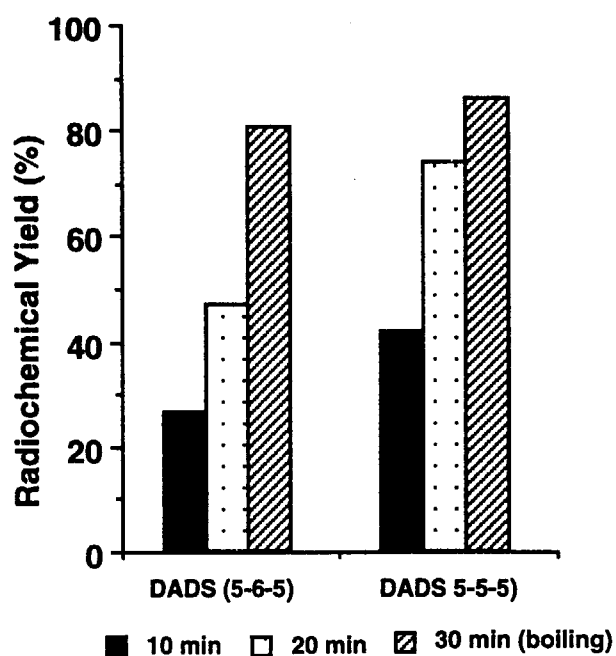


Fig. 3.1.6-2 Radiochemical yields of ¹⁸⁶Re complexes of DADS (5-5-5) and DADS (5-6-5) with boiling 1 N NaOH.

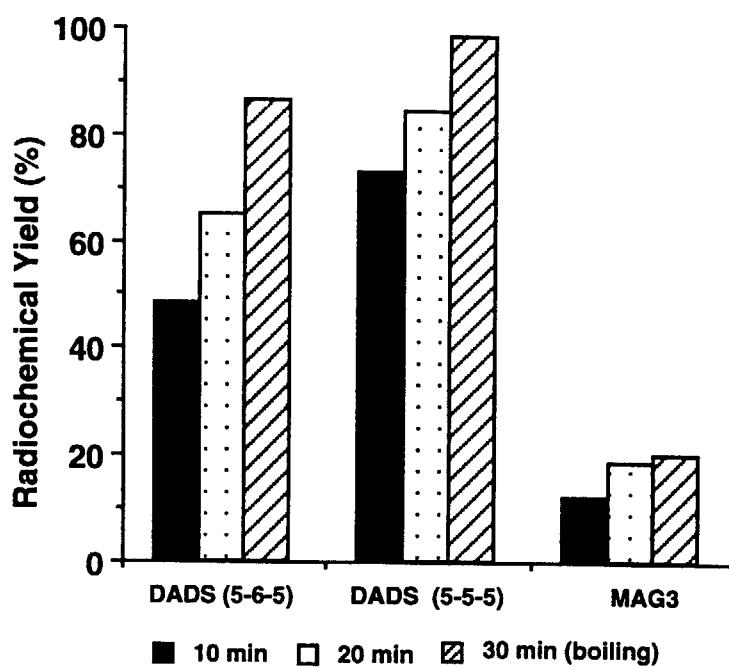


Fig. 3.1.6-3 Radiochemical yields of ^{186}Re complexes of DADS (5-5-5), DADS (5-6-5) and MAG₃ with boiling 5 N NaOH.

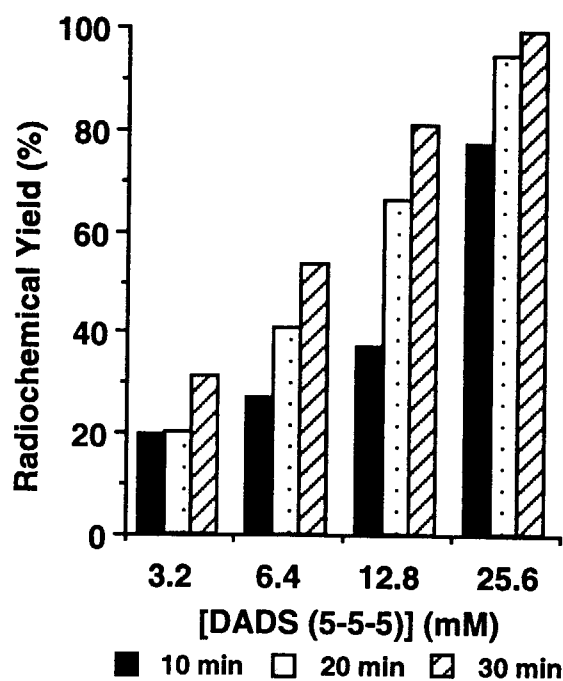


Fig. 3.1.6-4 Effect of the concentration of DADS (5-5-5) on the radiochemical yield of ^{186}Re complex with boiling 5 N NaOH.

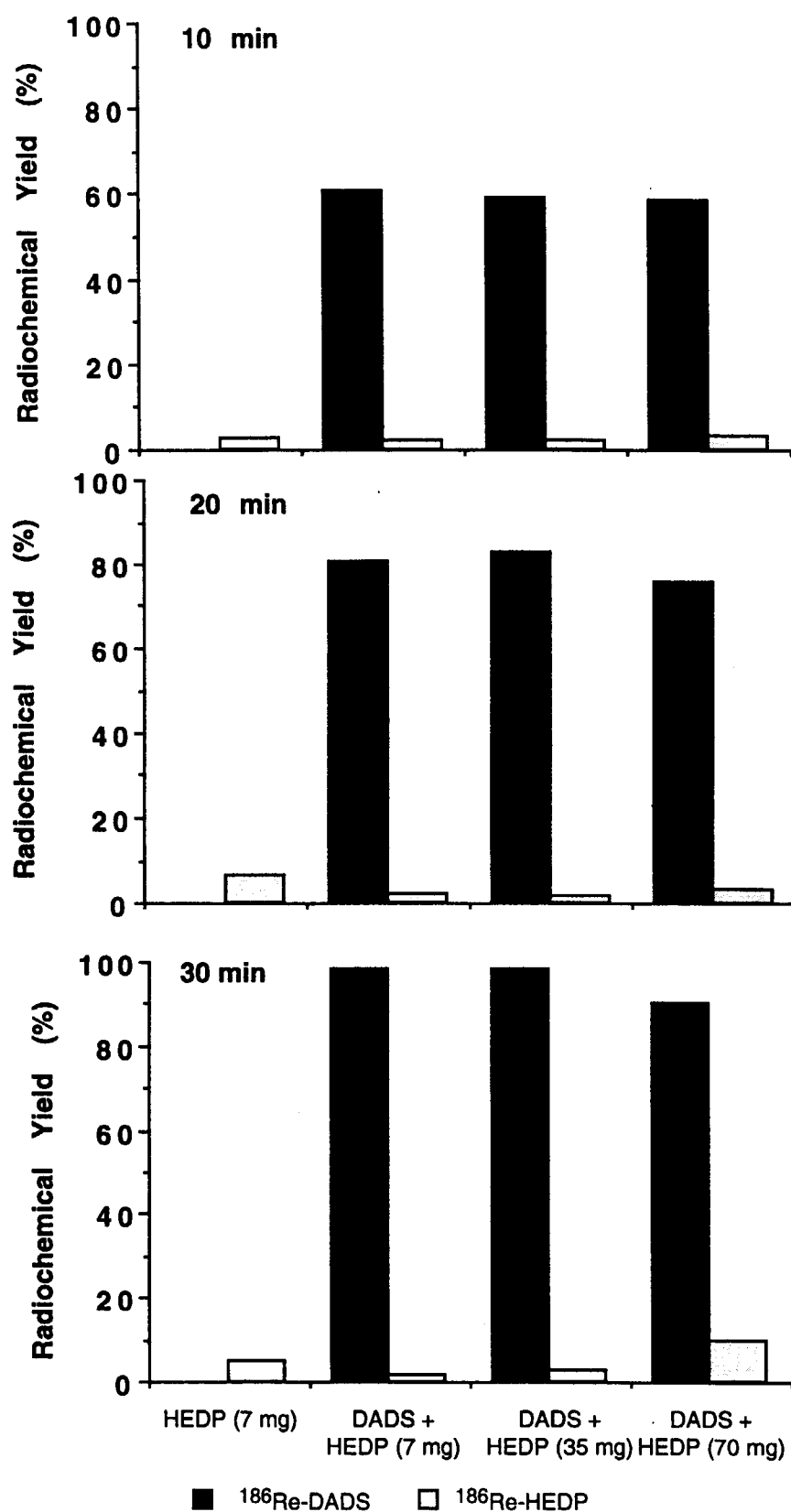


Fig. 3.1.6-5 Radiochemical yields of $^{186}\text{Re-DADS}$ in the presence of different amounts of HEDP. The reaction was allowed to continue for 10, 20 and 30 min on a water bath.

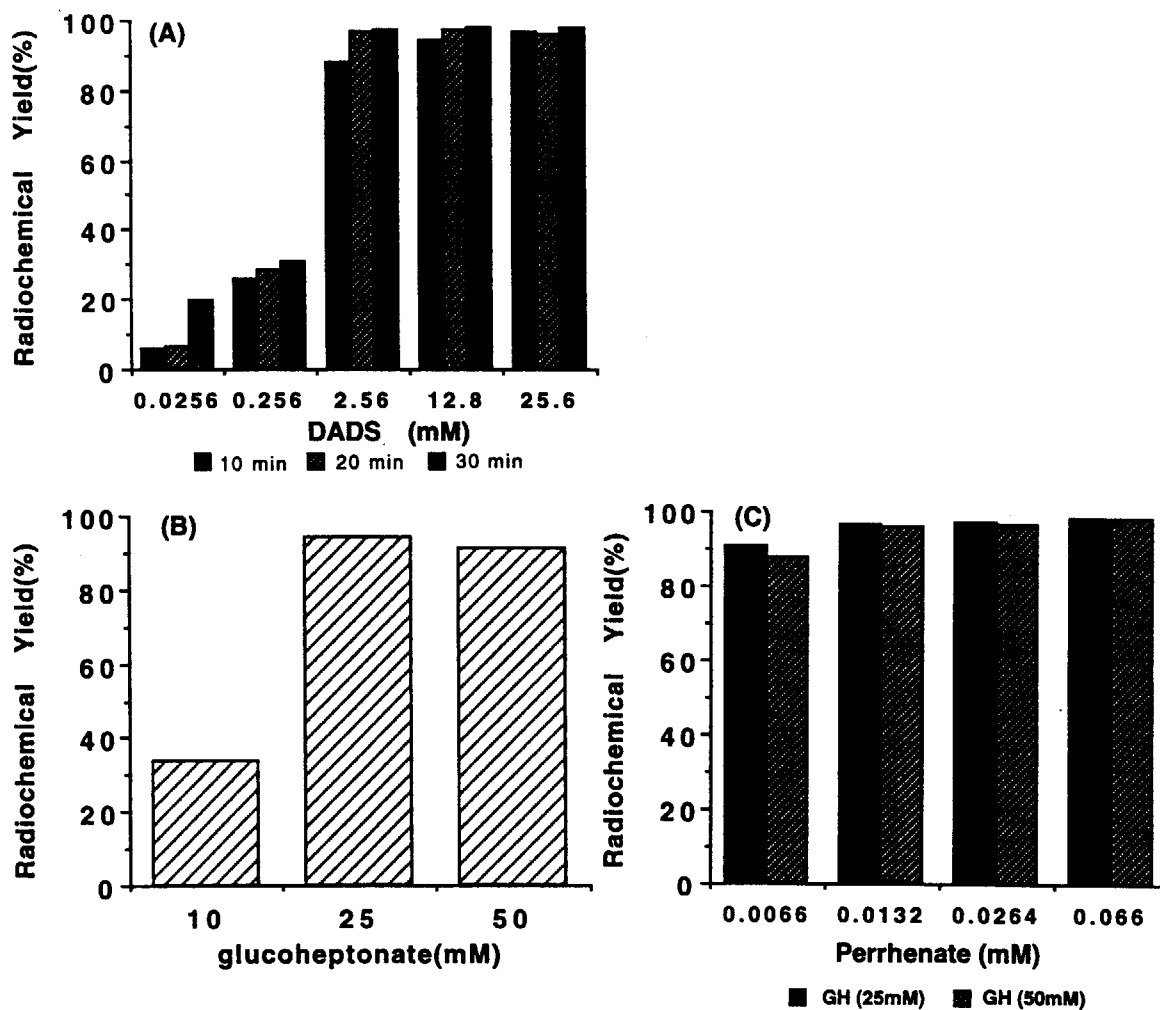


Fig. 3.1.6-6 Radiochemical yields of ^{186}Re -DADS in the presence of glucoheptonate (GH). (A) ^{186}Re -DADS was obtained with radiochemical yields over 95% at DADS concentrations over 2.59 mM in the presence of 50 mM GH. (B) ^{186}Re -DADS was obtained with radiochemical yields over 95% at GH concentrations of 25 and 50 mM. However, poor radiochemical yields of ^{186}Re -DADS were observed at GH concentrations below 10 mM. (C) ^{186}Re -DADS was obtained with high radiochemical yields over wide DADS concentrations in the presence of 25 and 50 mM of GH.

3.1.7 モノクローナル抗体

(1)¹⁸⁶Re 標識モノクローナル抗体作製及び動物実験

1) はじめに

Kohler と Milstein¹⁾によるモノクローナル抗体作製法の開発により、腫瘍関連抗原に対する特異性の高い抗体²⁻⁵⁾が数多く作製されている。近年モノクローナル抗体の腫瘍集積性に着目し、抗体自身を放射性核種で標識することにより、放射性核種の腫瘍へのターゲティングをめざす腫瘍の画像診断、治療に関する研究⁶⁻¹³⁾が盛んにおこなわれている。しかし膵臓癌に関しては、これまでモノクローナル抗体を用いた画像診断、治療に関する研究報告例¹⁴⁻¹⁶⁾は比較的少ない。

Koprowski ら¹⁷⁾により開発されたヒト大腸癌由来モノクローナル抗体 17-1A (MoAb 17-1A)は、腫瘍細胞膜の糖蛋白質を抗原とするモノクローナル抗体である。一方、MoAb 17-1A を認識する抗原は、大腸癌をはじめ膵臓癌、胃癌などでも発現が見られる¹⁸⁾。

我々は、放射免疫治療に最適な β 核種の一つとして¹⁸⁶Reを選んだ。¹⁸⁶Reは、半減期3.78日、放出する β 線の最大エネルギー1.08 MeVと生物学的効果が十分に期待できる。

本研究では、MoAb 17-1Aによる膵臓癌の放射免疫治療の可能性について検討するため、MoAb 17-1Aを¹⁸⁶Reで標識し、ヒト膵臓癌HuP-T4担癌ヌードマウスにおける生体内動態を検討した。

2) 実験材料及び実験方法

2)-1 試薬

MoAb 17-1A 溶液(10 mg/ml)は Centocor 社製を用いた。放射性レニウム($\text{H}^{186}\text{ReO}_4$: 500 MBq/ml)は、日本原子力研究所製を用いた。メルカプトアセチルグリシルグリシルグリシン(MAG₃)は、日本メジフィジックス社製を用いた。抗体の分離にはセファデックス G-50 (ファルマシア製)を用いた。2,3,5,6-Tetrafluorophenol(TFP), 1-ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl)-carbodiimide (EDC)をはじめ試薬は、和光の特級試薬を用いた。

2)-2 ¹⁸⁶Re 標識モノクローナル抗体の作製

a) 直接還元法

¹⁸⁶Re 標識は、John¹⁹⁾らの方法に準じておこなった。まず MoAb 17-1A 溶液にアスコルビン酸を、抗体の 1/100 重量比になるように加え室温で 60 分間還元反応をおこなった。一方 ¹⁸⁶Re については、クエン酸酸性下 (40 mg) 塩化第一スズ (4 mg) で還元をおこなった。抗体溶液に ¹⁸⁶Re 溶液を加え抗体の ¹⁸⁶Re 標識をおこなった。モノクローナル抗体の非特異的吸着を防止する目的であらかじめウシ血清アルブミンで平衡化したセファデックス G-50 カラムに抗体反応液を添加し、PBS で溶出した。各分画の 280 nm の吸光度を分光光度計 (日立 U-3200) で測定し、¹⁸⁶Re-MoAb17-1A 分画を得た。またオートウエルガンマカウンタ (アロカ ARC-2000) にて放射能を測定し、標識率を算出した。

b) キレート法

^{186}Re 標識は、Gerard²⁰⁾らの方法に準じておこなった。最初に 150 μl の 1 M Na_2CO_3 を $^{186}\text{ReO}_4$ に加え混ぜた。そこに MAG_3 (1 mg/ml $\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O}$ (9:1)) の 25 μl と $\text{SnCl}_2/\text{H}_2\text{O}$ (1 mg/ml) の 100 μl を加え 100°C に加熱、 N_2 雰囲気下、溶媒をエバポレートし乾固させた。15 分間程度余分に加熱後、氷の中に数分おいて冷却し 500 μl の水を加え析出物を溶解させた。1 N H_2SO_4 を適量加えて pH を 5.7-6.3 に調節した。TFP (100 mg/ml $\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O}$ (9:1)) の 200 μl と EDC 50 mg を加えた。pH が 5.7-6.3 であることを確認後、30 分間室温で反応させた。生成している $^{186}\text{Re}-\text{MAG}_3$ -TFP エステルを Sep-pak C_{18} (waters) で分離後、MoAb17-1A (10 mg/ml) を 100 μl 加え、pH を 0.05 M Na_2CO_3 で 9.5 に調整し 30 分間室温で ^{186}Re 標識化反応をおこなった。ウシ血清アルブミンで平衡化したセファデックス G-50 カラムに抗体反応液を添加し、生理食塩水で溶出した。各分画の 280 nm の吸光度を分光光度計(日立 U-3200)で測定し、 ^{186}Re -MoAb17-1A 分画を得た。またオートウエルガンマカウンタ(アロカ ARC-2000)にて放射能を測定し、標識率を算出した。

2)-3 標識 MoAb 17-1A の HuP-T4 担癌ヌードマウスでの体内動態

担癌動物は、斎藤ら²¹⁾によって樹立されたヒト膀胱癌株 Hup-T4 細胞(1×10^7 個/0.2 ml PBS/匹)を 5 週令の BALB/c-nu/nu マウス雄の左横腹皮下に移植し作製した。そして腫瘍径が約 0.5 cm に達した時、動物一匹あたり直接還元法より得た標識抗体の場合 2×10^5 cpm/80 μg 抗体/0.2 ml PBS を、キレート法より得た標識抗体の場合 2.5×10^5 cpm/100 μg /0.2 ml 生食を、コントロール群については ^{186}Re , 2×10^6 cpm/0.2 ml PBS をそれぞれ尾静脈内に投与し経時的に屠殺し、主要臓器を摘出し、その湿重量と放射能を測定して体内動態を調べた。結果は、放射能濃度(% dose/g tissue, ml blood)で表わした。一部のマウスについては、 ^{186}Re の尿中、糞中排泄量を投与後 3 日間測定した。

3) 結果

3)-1 MoAb 17-1A の ^{186}Re 標識率

直接還元法、キレート法(MAG_3)で ^{186}Re 標識したときの sephadex G-50 カラムクロマトグラムをそれぞれ Fig. 3.1.7(1)-1, 2 に示した。 ^{186}Re 標識抗体は、直接還元法の場合 Fr.5-8 に、キレート法 (MAG_3)の場合 Fr.3-5 にそれぞれ溶出した。標識率は、直接還元法の場合最大で 52.3%であった。キレート法 (MAG_3)の場合は、活性エステルとしての回収放射能が 4.4%で、 ^{186}Re 標識抗体の放射化学的収率は 60.9%であった。

3)-2 ^{186}Re -MoAb 17-1A の体内動態及び排泄挙動

^{186}Re 標識抗体投与後のヌードマウスの血液、腫瘍および主要臓器の ^{186}Re 放射能濃度を、直接還元法については Table 3.1.7(1)-1 に、キレート法(MAG_3)については Table 3.1.7(1)-2 に示した。 ^{186}Re の血中濃度変化及び腫瘍内取り込みについてそれぞれ Fig. 3.1.7(1)-3, 4 に示した。直接還元法による標識抗体投与群では、血中濃度は、それぞれ 24hr

で0.87%, 48hrで0.56%ID/mlであり、腫瘍内への取り込みはそれぞれ24hrで0.50%, 48hrで1.73%ID/gであった(投与後1.5hrのデータは得られていない)。MAG₃標識抗体投与群では、血中濃度は、それぞれ1hrで2.99%, 24hrで0.30%ID/mlであり、血中クリアランスは早かった。腫瘍内濃度は検出限界以下であった。一方コントロール群である¹⁸⁶Re単独投与では同様に血中クリアランスが早く(1hr: 4.07%, 24hr: 0.37%ID/ml)、腫瘍内への取り込みはそれぞれ24hrで0.15%, 48hrで0.09%ID/gと経時的に減少した。

¹⁸⁶Re標識抗体投与後のマウスの排泄挙動を標識方法によってFig. 3.1.7(1)-5~7に示した。尿中、糞中排泄挙動については、いずれの標識抗体においても尿中排泄量が糞中排泄量よりも多く尿中排泄が主であることがわかった。また総排泄量としては、¹⁸⁶Re標識抗体投与群では、24hrまでに投与放射能の30%-50%が、72hrまでに40%-70%がそれぞれ排泄されたが、Re単独投与群よりも少ない排泄量であった(24hr: 60%, 72hr: 90%)。

4) 考察

放射免疫治療が臨床の場合へ登場するには、いくつかの困難な問題を解決しなければならない。がんの放射免疫治療を考える場合、がんを抗原と認識する特異性の高い抗体を得ることができるかどうか問題となる。次にその抗体を放射性核種のcarrierとするために、抗体を核種で標識しなければならない。そして最適な核種を選択する際には、崩壊形式、物理的半減期、放出エネルギー、標識反応の容易さ等を考慮に入れなければならない。さらに標識方法によっては、生体内での安定性に違いが生ずることも十分考えられるので検討が必要である。

我々は、今回用いたヒトHuP-T4 腫瘍とMoAb 17-1Aとの親和性を確認しており、放射免疫診断、治療を目的とするヒト腫瘍実験系のモデルとしての有用性を報告している²²⁾。

¹⁸⁶Reは、周期律表では^{99m}Tcと同族のVIIaに属し物性として崩壊形式 β^- 、半減期3.78日、最大放出エネルギー1.08 MeVと放射免疫治療の有力な核種の一つである²³⁾。

抗体を放射性金属核種で標識する方法として、一般的には、直接共有結合という形で標識することは困難な場合が多くそれに代わって、抗体と核種を間接的に結合させるためにリガンドとして各種のbifunctional chelating agentsが開発されている²³⁾。

我々は、文献¹⁹⁻²⁰⁾に準拠し直接法と間接法(MAG₃キレート)での標識化を検討した。結果は、予想と大きく異なり標識化の困難さを示したが、その改善に向けて現在検討中である。体内動態及び排泄挙動に関しては、不十分なデータ数ではあるが、¹⁸⁶Reの血中クリアランスが早く、目的臓器である腫瘍への集積が低いことは、体外への早い排泄傾向がより明らかであり、放射免疫治療の目的からすれば不利な状況である。今後、¹⁸⁶Re標識率の問題を詳細に検討し、その結果を動物実験に反映させてより詳細な解析をおこないたいと考えている。

参考文献

- 1) Kohler, G. and Milstein, C.: *Nature*, 256, 495-497 (1975)
- 2) Carney, P.L., Rogers, P.E. and Johnson, D.K.: *J. Nucl. Med.*, 30, 374-384 (1989)
- 3) Greager, J.A., Chao, T.C., Blend, M.J., Atcher, R.W., Gansow, O.A., Brechbiel, M.W. and Das Gupta, T.K.: *J. Nucl. Med.*, 31, 1378-1383 (1990)
- 4) Laborda, J., Douillard, J.Y., Burg, C., Lizzio, E.F., Ridge, J., Levenbook, I. and Hoffman, T.: *J. Nucl. Med.*, 31, 1028-1034 (1990)
- 5) Worlock, A.J., Zalutsky, M.R. and Metzgar, R. S.: *Cancer Res.*, 50, 7246-7251 (1990)
- 6) Mach, J.P., Chatal, J.F., Lumbroso, J.D., Buchegger, F., Forni, M., Ritschard, J., Berche, C., Douillard, J.Y., Carrel, S., Herlyn, M., Steplewski, Z. and Koprowski, H.: *Cancer Res.*, 43, 5593-5600 (1983)
- 7) Delaloye, B., Bischof-Deialoye, A., Buchegger, F., Flidner, V., Grob, J.P., Volant, J.C., Pettavel, J. and Mach, J.P.: *J. Clin. Invest.*, 77, 301-311 (1986)
- 8) Halpern, S.E., Dillman, R.O., Witztum, K.F., Shega, J.F., Hagan, P.L., Burrows, W.M., Dillman, J.B., Clutter, M.L., Sobol, R.E., Frincke, J.M., Bartholomew, R.M., David, G.S. and Carlo, D.J.: *Radiology*, 155, 493-499 (1985)
- 9) Murray, J.L., Rosenblum, M.G., Lamki, L., Glenn, H.J., Krizan, Z., Hersh, E. M., Plager, C.E., Bartholomew, R.M., Unger, M.W. and Carlo, D.J.: *J. Nucl. Med.*, 28, 25-33 (1987)
- 10) Chatal, J.F., Fumoleau, P., Saccavini, J.C., Thedrez, P., Curter, C., Bianco-Arco, A., Chetanneau, A., Peltier, P., Kremer, M. and Gullard, Y.: *J. Nucl. Med.*, 28, 1807-1819 (1987)
- 11) Carrasquillo, J.A., Krohn, K.A., Beaumier, P., McGuffin, R.w., Brown, J.P., Hellstrom, K.E., Hellstrom, I. and Larson, S.M.: *Cancer Treat. Rep.*, 68, 317-328 (1984)
- 12) Zimmer, A.M., Rosen, S.T., Spies, S.M., Goldman-Leikin, R., Kazikiewicz, J.M., Silverstein, E.A. and Kaplan, E.H.: *J. Nucl. Med.*, 29, 174-180 (1988)
- 13) 川畑鈴佳, 小泉潔, 油野民雄, 渡辺直人, 秀毛範至, 絹谷清剛, 利波紀久, 久田欣一, 小西孝司, 宮崎逸夫, 高橋豊: *核医学*, 24, 919-925 (1987)
- 14) Bosslet, K., Keweloh, H.C., Hermentin, P., Muhrer, K.H., Sedlacek, H.H. and Schulz, G.: *Br. J. Cancer*, 62, 37-39 (1990)
- 15) Abdel-Nabi, H.H., Schwartz, A.N., Wechter, D.G., Higano, C.S., OrtmanNabi, J.A. and Unger, M.W.: *World J. Surg.*, 15, 122-127 (1991)
- 16) Tsuda, T., Koshiba, H., Usui, T., Kubota, M., Kikuchi, K. and Morita, K.: *Annals Nucl. Med.*, 4, 71-74 (1990)

- 17) Koprowski, H., Steplewski, Z., Mitchell, K., Herlyn, M., Herlyn, D. and Fuhrer, P.: Somatic Cell Genetics, 5, 91-105 (1979)
- 18) Gottlinger, H.G., Funke, I., Johnson, J.P., Gokel, J.M. and Riethmuller, G. : Int. J. Cancer, 38, 47-53 (1986)
- 19) John E., Thakur M. L., DeFulvio J., McDevitt M. R. and Damjanov I.: J. Nucl. Med., 34, 260-267 (1993)
- 20) Gerard W.M. Visser, Martijn Gerretsen, Jacobus D.M. Herscheid, Gordon B. Snow and Guus van Dongen.: J. Nucl. Med., 34, 1953-1963 (1993)
- 21) Saito, S. and Sasaki, H.: Human Cell, 1, 125 (1988)
- 22) Maeda M., Shoji M., Kawagoshi T., Futatsuya R., Honda T. and Brady L.W.: Cancer, 73, 800-807 (1994)
- 23) Hashimoto K. and Yoshihara K.: "Topics in Current Chemistry, 176 Technetium and Rhenium", Yoshihara K. and Omori T., Springer-Verlag, Heidelberg, 275-291 (1996)

Table 3.1.7(1)-1 Biodistribution of ^{186}Re -MoAb 17-1A (Direct method)

Tissue	1 hr	3 hr	5 hr	24 hr	48 hr
Blood	(4.07)	(1.52)	(1.82)	0.87 (0.37)	0.56 (0.08)
Tumor	(1.92)	(0.78)	(0.93)	0.50 (0.15)	1.73 (0.09)
Spleen	(1.29)	(0.58)	(0.69)	1.84 (0.14)	1.19 (0.05)
Heart	(1.21)	(0.52)	(0.55)	0.29 (0.12)	0.47 (0.05)
Liver	(1.82)	(0.83)	(0.93)	3.64 (0.20)	1.78 (0.02)
Kidney	(2.08)	(0.85)	(0.91)	1.68 (0.19)	0.67 (0.03)
Pancreas	(1.52)	(0.67)	(0.74)	0.54 (0.21)	1.36 (0.24)
Lung	(2.64)	(1.17)	(1.19)	0.42 (0.28)	0.61 (0.06)
Bone	(1.42)	(0.61)	(0.65)	1.06 (0.20)	1.32 (0.21)

Each value is expressed as % of injected dose/g, ml.

Values in parentheses represent the control's.

Table 3.1.7(1)-2 Biodistribution of ^{186}Re -MoAb 17-1A (MAG_3)

Tissue	1 hr	3 hr	5 hr	24 hr	48 hr
Blood	2.99	1.73	1.57	0.30	0.36
Tumor	—	—	—	—	—
Spleen	14.9	13.6	8.45	0.42	0.34
Heart	2.01	1.40	1.52	0.31	0.24
Liver	34.9	25.1	19.7	0.37	0.12
Kidney	5.22	3.86	3.11	0.26	0.13
Pancreas	—	—	—	—	—
Lung	2.89	1.76	1.38	—	—
Bone	—	—	—	—	—

Each value is expressed as % of injected dose/g, ml.

—: N.D.

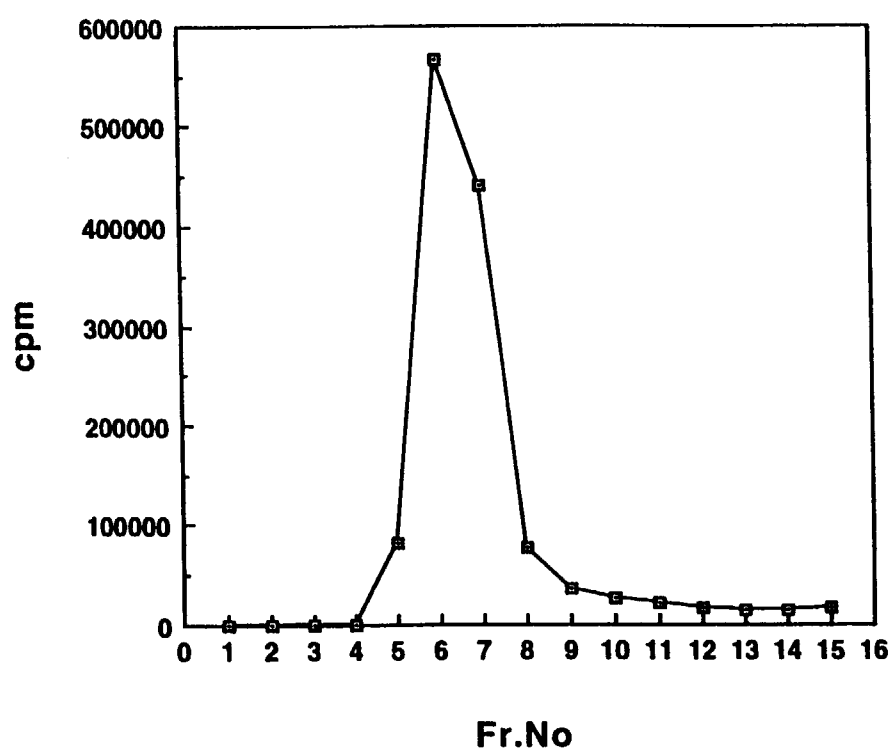


Fig. 3.1.7(1)-1 Column chromatogram of ^{186}Re -MoAb 17-1A (D.M).
 ^{186}Re -MoAb 17-1A (D.M) was eluted in Fr.5-8.

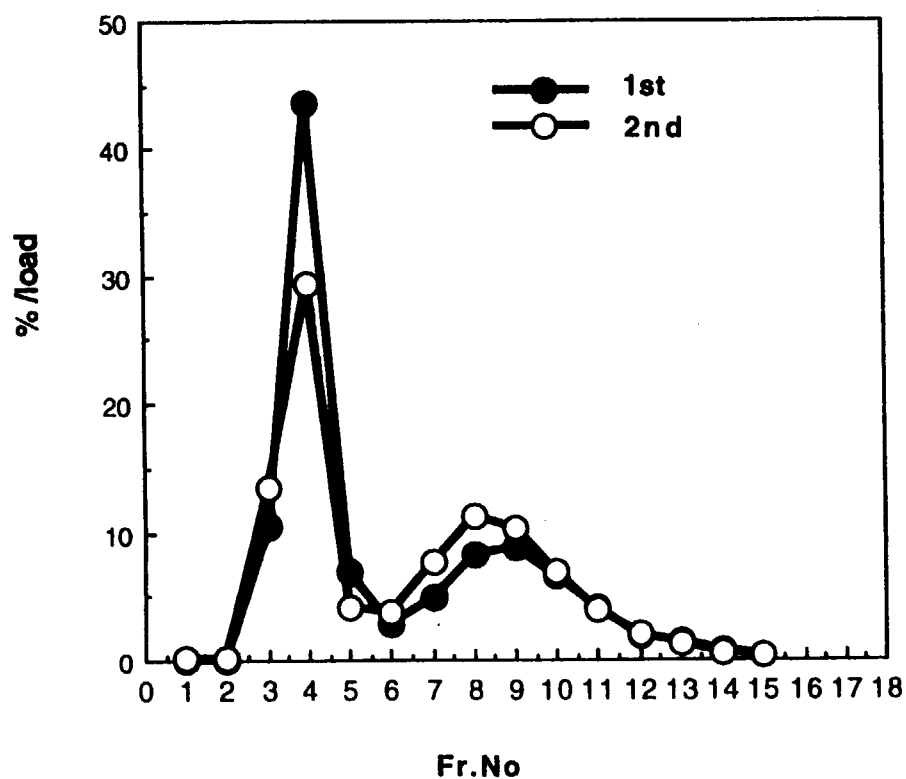


Fig. 3.1.7(1)-2 Column chromatogram of ^{186}Re -MoAb 17-1A (MAG_3).
 ^{186}Re -MoAb 17-1A (MAG_3) was eluted in Fr.3-5.

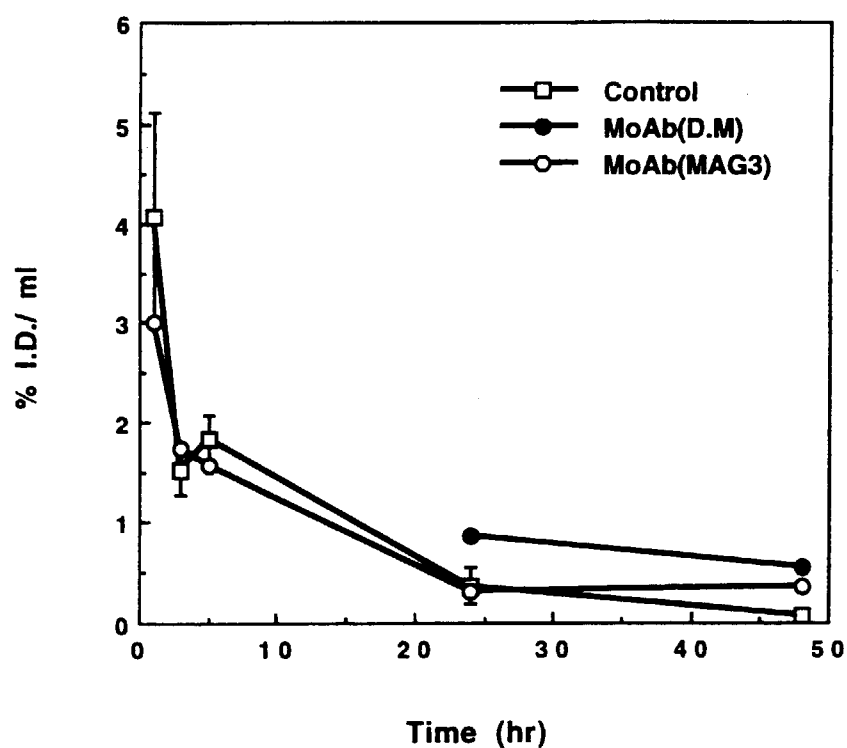


Fig. 3.1.7(1)-3 Blood concentration of ^{186}Re after I.V. injection of ^{186}Re -MoAb 17-1A (D.M), ^{186}Re -MoAb 17-1A (MAG₃) and ^{186}Re -PBS solution (control).

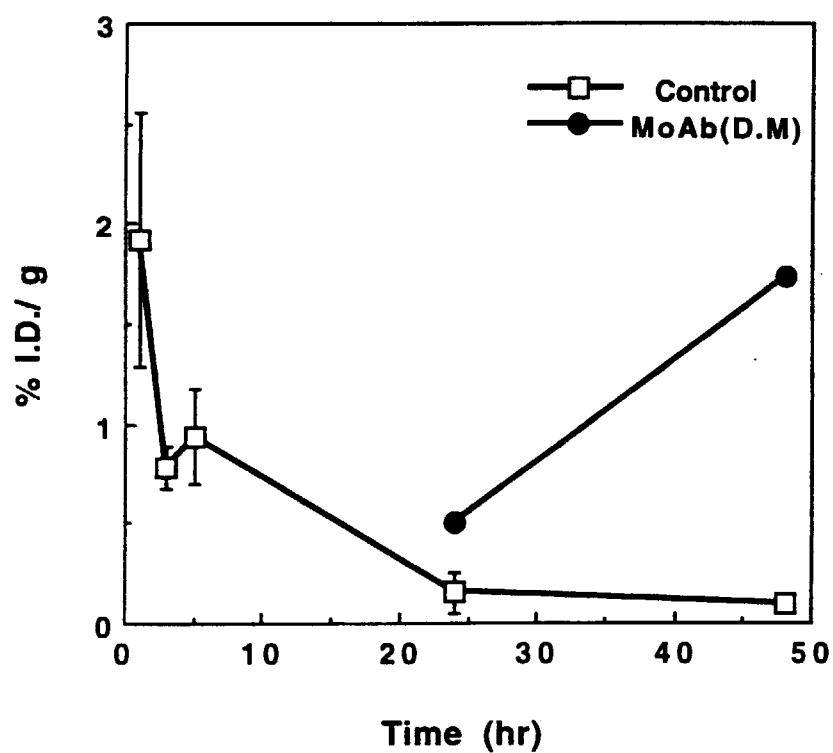


Fig. 3.1.7(1)-4 Tumor uptake of ^{186}Re after I.V. injection of ^{186}Re -MoAb 17-1A (D.M) and ^{186}Re -PBS solution (control).

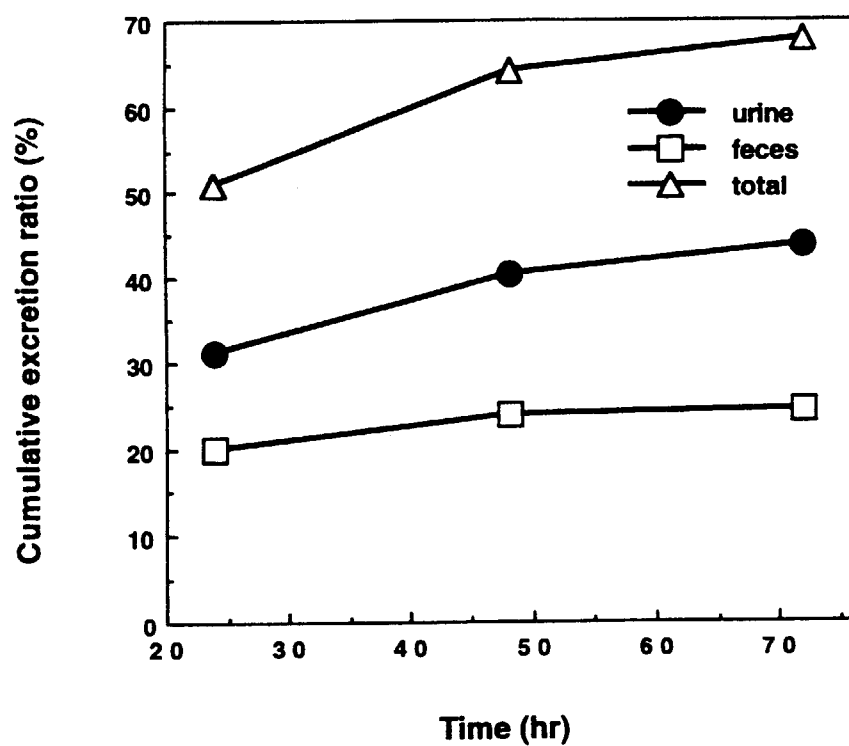


Fig. 3.1.7(1)-5 Excretion of ^{186}Re after I.V. injection of ^{186}Re -MoAb 17-1A (D.M.).

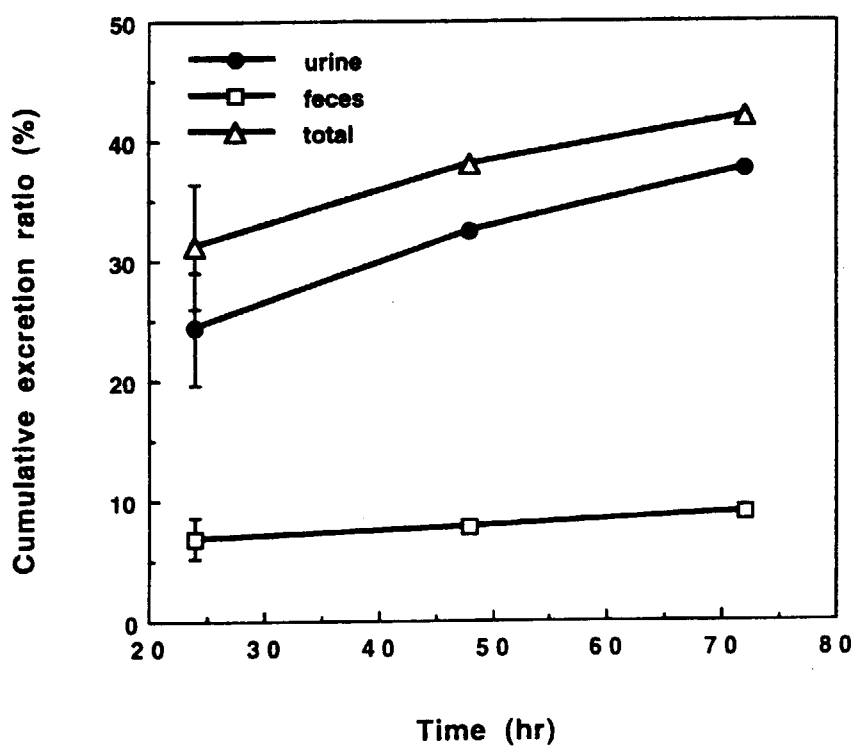


Fig. 3.1.7(1)-6 Excretion of ^{186}Re after I.V. injection of ^{186}Re -MoAb 17-1A (MAG_3).

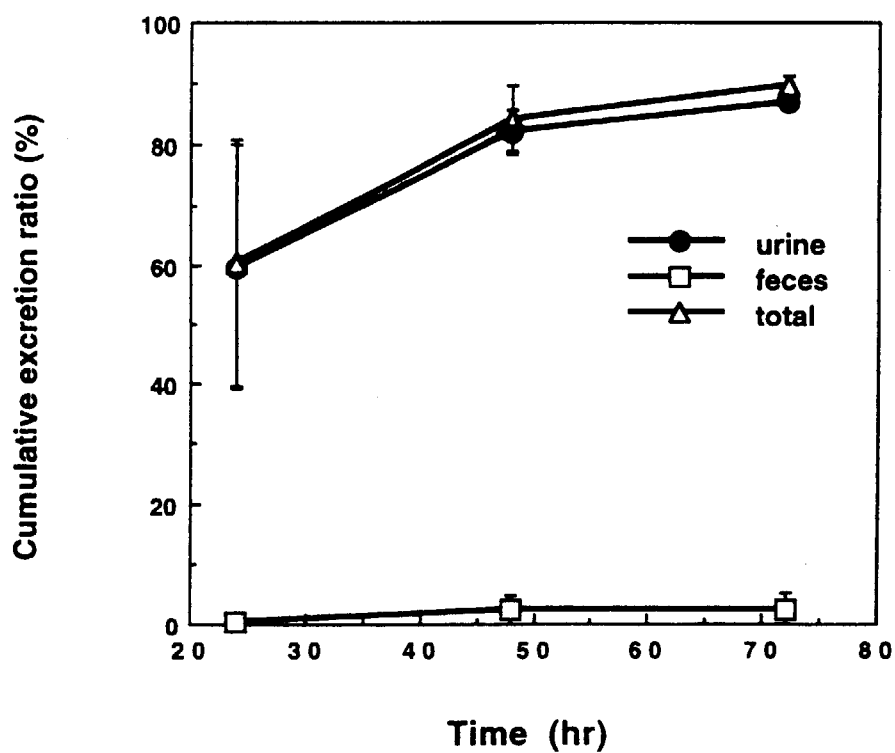


Fig. 3.1.7(1)-7 Excretion of ^{186}Re after I.V. injection of ^{186}Re -PBS solution (control).
Error bars represent a standard deviation ($n=3$).

(2) 1-[4-(10-maleimidopropyl)amidobenzyl]ethylenediamine-N,N,N',N'-tetraacetic acid (C10-Bz-EDTA)を用いた抗体の Re-186 標識のための予備的検討

生体内において metabolizable linker として作用する 1-[4-(10-maleimidopropyl)amidobenzyl]ethylenediamine-N,N,N',N'-tetraacetic acid (C10-Bz-EDTA)を用いたモノクローナル抗体の ^{186}Re 標識の可否を検討する。

1) 方法

1)-1 非抗体結合 C10-Bz-EDTA の $^{99\text{m}}\text{Tc}$ との反応性を検討し、得られた結果を ^{186}Re に応用してみる。還元剤として塩化第一スズ(SnCl_2 dissolved in 0.1 M HCl)を用い、種々の SnCl_2 濃度(C10-Bz-EDTA: $\text{SnCl}_2 = 1:4-8:1$)(C10-Bz-EDTA 7×10^{-2} mM, SnCl_2 0.875 - 28×10^{-2} mM)、反応 pH (4 - 7, 0.1 M acetate buffer)、反応時間 (10 min - 1 hr)における $^{99\text{m}}\text{Tc}$ と C10-Bz-EDTA の反応性を検討した結果、室温において C10-Bz-EDTA: $\text{SnCl}_2 = 4:1$ 、pH 4 の条件下で 30 min の反応で約 85%の放射能が C10-Bz-EDTA に結合した。この条件を、 ^{186}Re で試みた。

1)-2 gluconate を中間標識体として、C10-Bz-EDTA 標識を試みる。0.5 M gluconate-Na(pH 7) 5 ml (2.5 mmol)と SnCl_2 (in 0.1 N HCl) 400 μl (25 μmol)を混和し、この溶液 100 μl に ^{186}Re 溶液 50 μl を加え 1.5 時間反応させ、 ^{186}Re -gluconate を得る。この溶液 50 μl に C10-Bz-EDTA 溶液 50 μl (7.5 nmol) (10 mM citrate buffer, pH4 - 7)を加え、室温あるいは加温(80°C)状態における C10-Bz-EDTA 標識を検討した。

2) 結果および考察

2)-1 この条件では、目的とする標識体は得られなかった。80°Cに加温するも同様であった。

2)-2 この条件下で 60%の放射能が ^{186}Re -gluconate を形成した。しかしながら、放射能の C10-Bz-EDTA への移行は確認されなかった。

今回検討した諸条件では、残念ながら C10-Bz-EDTA 標識体は確認されなかった。原因が、反応条件の不適切にあるのかあるいは C10-Bz-EDTA の配位構造である EDTA の Re 配位能にあるのか現時点において不明である。

(3) MAG_3 による抗体の Re-186 標識および標識抗体の安定性

二種類の異なるモノクローナル抗体を用いて、S-benzoylmercaptoacetyltriglycine (S-benzoyl- MAG_3) による ^{186}Re 標識を試み、その試験管内における安定性を検討した。

1) 方法

標識は Visser ら¹⁾の報告に則り行った。 $^{186}\text{ReO}_4$ 溶液に 1 M Na_2CO_3 150 μl 、 Na_2SO_3 150 μl (120 μmol) 混和後、S-benzoyl- MAG_3 25 μl (68 nmol) (1 mg in 1 ml MeCN/ H_2O (9:1))、 $\text{SnCl}_2/2\text{H}_2\text{O}$ 100 μl (442 nmol) (1 mg/ml) を加え、窒素ガス下で 100°C 加熱した。加熱は乾燥後さらに 15 分間続ける。冷却後、500 μl の蒸留水で溶解し、1 N H_2SO_4 で pH を 6 に調整した後、2,3,5,6-tetrafluorophenol 200 μl (100 mg in 1 ml MeCN/ H_2O (9:1))、1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide 50 mg を加え室温で 30 分反応させた。活性エステルを Sep-pak C_{18} カートリッジで溶出(MeCN)後、溶液を生食水 0.5 μl に置換した。ZCE025 抗体 (マウス IgG1、1 mg) あるいは A7 抗体 (マウス IgG1、4 mg) を加え、0.05 M Na_2CO_3 で pH を 9.5 に調整した後、室温で 30 分反応させた。標識抗体は PD10 カラム (生食水) で精製した。

標識抗体の安定性は、血清中 (0.1% NaN_3 、37°C) および生食水中 (4°C) において観察した。評価は高速液体クロマトグラフィ (TSK-3000SWXL、0.1 M phosphate buffer) で行った。ZCE025 抗体の放射能濃度は血清中、生食中で各々 12 $\mu\text{Ci/ml}$ 、120 $\mu\text{Ci/ml}$ 、A7 抗体は各々 5 $\mu\text{Ci/ml}$ 、93 $\mu\text{Ci/ml}$ である。また A7 抗体では、アスコルビン酸 (5 mg/ml) を添加し 4°C で保存した場合、-80°C に凍結保存した場合、アスコルビン酸を添加したうえで凍結保存した場合の安定性の変化の検討を合わせおこなった。

2) 結果および考察

活性エステルの生成率は 85.0% を示し、Visser らの報告によく一致していた。ZCE025 抗体の標識率は 22.8% と彼らの報告と比較し低値であったが、これは反応に用いた抗体量が 1 mg と少なかったことによるものであろう。より大量の抗体 (4 mg) を用いた A7 抗体による検討では、60% 前後の抗体標識率が得られた。Visser らによれば、2 mg の IgG を反応させた場合で 50%、さらに 8-10 mg の抗体量を用いた場合は 75% の標識率が得られるとのことであり、今回得られた結果は妥当なものであると考えられる。

^{186}Re 放射能は、生食水中、血清中のいずれにおいても抗体から徐々に小分子量物質として解離し、ZCE025 抗体では 12 日後に生食水中では 30.8%、血清中では 12.5% が遊離放射能として存在した (Fig. 3.1.7(3)-1)。また、A7 抗体では、7 日後に生食水中では 45.1%、血清中では 17.7% の放射能が解離した (Fig. 3.1.7(3)-2)。血清中での解離の方が少ないが、これは血清中でより安定であるのではなく、放射能濃度の高低に基づく差であろうと考えられる。

5 mg/ml のアスコルビン酸を添加した場合は 7 日後まで、抗体からの放射能の解離は全く認められなかった。-80℃に凍結保存した場合、アスコルビン酸を添加したうえで凍結保存した場合も同様であった (Fig. 3.1.7(3)-2)。実際の放射免疫治療の場合にはさらに高濃度かつ高比放射能溶液となるので、radiolysis をこれらの方法で十分防ぐことが可能であるか否かはさだかではないものの、標識終了後に患者に投与するまでの間に生じる radiolysis に対するこれらの対策が必要であろう。

参考文献

- 1) Vesser et al. J. Nucl. Med., 34, 1953(1993).

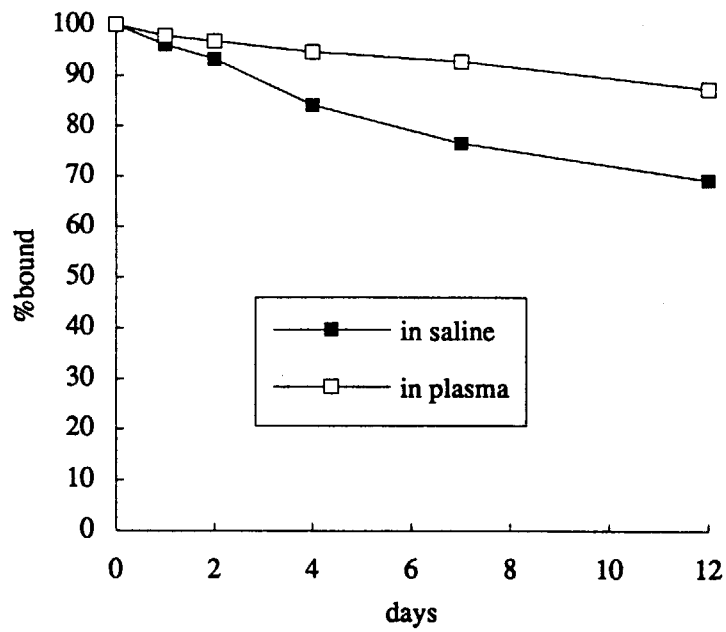


Fig. 3.1.7(3)-1 Stability of $^{186}\text{Re-MAG}_3\text{-ZCE025}$.

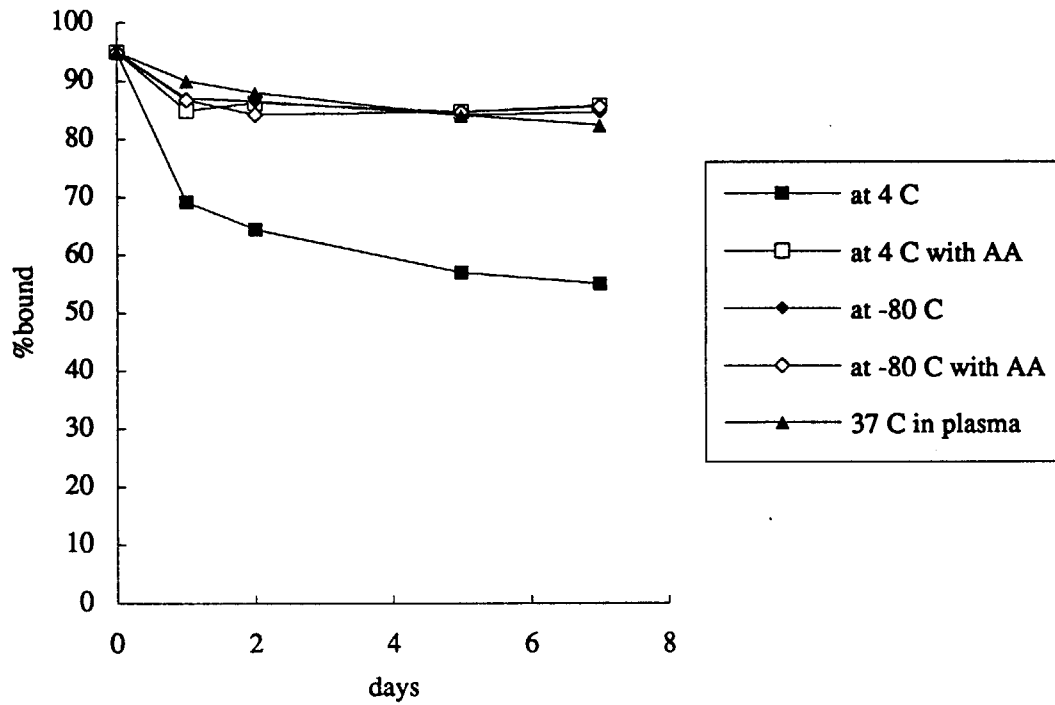


Fig. 3.1.7(3)-2 Stability of $^{186}\text{Re-MAG}_3\text{-A7}$.

3. 2 加速器製無担体 ^{186}Re を用いた研究

3.2.1 HEDP

(1) はじめに

レニウムは、周期律表においてマンガン族に属し、その化学的挙動は、テクネチウムに類似していると言われている。放射性レニウムのうち、レニウム-186 (^{186}Re)は、その核的性質(半減期: 90.64 時間, γ 線エネルギー: 137.2 keV, β 線最大エネルギー: 1.07 MeV)から、免疫核医学の分野において、注目されている核種の一つである。2.2 で述べたように、我々は、無担体 ^{186}Re の製造技術を開発した^{1), 2)}。この実験では、原研高崎 A V F サイクロトロンによる陽子ビームを利用して、 $^{186}\text{W}(\text{p}, \text{n})^{186}\text{Re}$ 反応を用いることにより、原子炉照射では得られない無担体 ^{186}Re を製造した。さらに、この無担体 ^{186}Re と原子炉での $^{186}\text{Re}(\text{n}, \gamma)^{186}\text{Re}$ 反応で製造した ^{186}Re を用いて [^{186}Re] 1-ヒドロキシエタン-1,1-ジホスホン酸 (^{186}Re -HEDP) を合成し、合成後の時間・pH 変化・希釈に対する標識率を測定し、両者の比較を行った。

(2) 実験

^{186}Re は、2.2 で述べた手法¹⁾ によって製造した加速器製 ^{186}Re (1.66 MBq/ml) および原子炉製 ^{186}Re (380 MBq/ml) を用いた。 ^{186}Re -HEDP の標識法は、基本的に de Klerk らの方法³⁾ に従った。還元剤であるスズの劣化を防ぐため、極力酸素との接触を避け不活性ガス雰囲気で行った。250 μl の HEDP 水溶液 (60%) に、予めヘリウムガスで置換した超純水 8 ml で溶解したゲンシチン酸 38.2 mg を加えた。別の容器に塩化第一スズ 47.15 mg を秤量し、0.1 M HCl を白濁が消えるまで加えた。これらを混ぜ合わせた後、12 等分し凍結乾燥した。また、凍結乾燥後においても、真空中で封じることにより、酸素との接触を避けた。キットに ^{186}Re 溶液 (加速器製 ^{186}Re 溶液: 原液, 原子炉製 ^{186}Re 溶液: 原液 250 μl を生理食塩水で 1 ml にメスアップ) を 1 ml 加えた後、100°C に加温し 10 分間反応させた。反応後、1 M CH_3COONa により pH を約 4 に調製した。合成した ^{186}Re -HEDP を一定時間毎に採取し、その標識率を測定した。pH および濃度変化については、標識後の ^{186}Re -HEDP 溶液に酢酸ナトリウム溶液、生理食塩水をそれぞれ加えて変化させ、標識率を測定した。標識率は、二次元薄層クロマトグラフィー法(一次展開: アセトン, 二次展開: 生理食塩水)を用いて分析し、その放射能測定は、ラジオルミノグラフィー装置により行った。

(3) 結果および考察

標識後の標識率の経時変化を Fig. 3.2.1-1 に示す。サイクロトロン製 ^{186}Re および原子炉製 ^{186}Re の双方とも標識後 3 時間までは、90%以上の標識率を保っているが、時間経過に連れて原子炉製 ^{186}Re -HEDP は分解し、20 時間後においては約 60%にまで減少する。

これに比べ、サイクロトロン製 ^{186}Re -HEDP は、分解はしているものの 48 時間後に至るまで、ほぼ 85% 以上の標識率が保たれた。しかし、この結果はサイクロトロン製 ^{186}Re の放射能強度が低いことによる可能性もあり、今後の検討が必要である。次に pH 依存性について Fig. 3.2.1-2 に示す。原子炉製 ^{186}Re は、pH 8 において 94% 以上を保っているが、サイクロトロン製 ^{186}Re は、pH 5 を境に pH 6 では 85% から急激に 25% まで減少し、 ^{186}Re -HEDP が分解したと考えられる。希釈による安定性は、Fig. 3.2.1-3 に示すように原子炉製 ^{186}Re -HEDP は、希釈されても変化はほとんど無いが、サイクロトロン製 ^{186}Re -HEDP については、4 から 16 倍で約 30% の減少が見られ、さらに 64 倍になると 20% まで分解してしまう。これらのことから、原子炉製 ^{186}Re で標識した HEDP は、経過時間による分解は著しいが、pH および希釈による分解はほとんど無いと言える。また、サイクロトロン製 ^{186}Re -HEDP については、標識後時間が経過しても安定であるが、pH 5 以上ならびに 16 倍以上の希釈において分解してしまうことがわかった。

^{186}Re が持つ核的性質は、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ では不可能である骨癌の疼痛緩和剤として用いるのに適していることから、生体内において比較的安定な原子炉製 ^{186}Re の方が適当であると結論された。しかし、免疫核医学においてがんの治療に ^{186}Re を用いるには、原子炉製による ^{186}Re よりも無担体であるサイクロトロン製 ^{186}Re を用いた標識抗体が必要である。今回、サイクロトロン製 ^{186}Re でも担体を含む原子炉製 ^{186}Re と同様に高い標識率が得られることが確認できたので、今後、サイクロトロン製 ^{186}Re を用いた標識方法についてさらに研究を進めていく必要がある。

参考文献

- 1) Shigeta N., Matsuoka H., Osa A., Koizumi M., Izumo M., Kobayashi K., Hashimoto K., Sekine T. and Lambrecht R. M. : J. Radioanal. Chem., **205**, 85 (1996).
- 2) Ishioka N. S., Sekine T. and Lambrecht R. M. : to be published in J. Radioanal. Chem.
- 3) de Klerk J. M. H., van Dijk A., van het Schip A. D., Zonnenberg B. A. and van Rijk P. P. : J. Nucl. Med., **33**, 646 (1992).

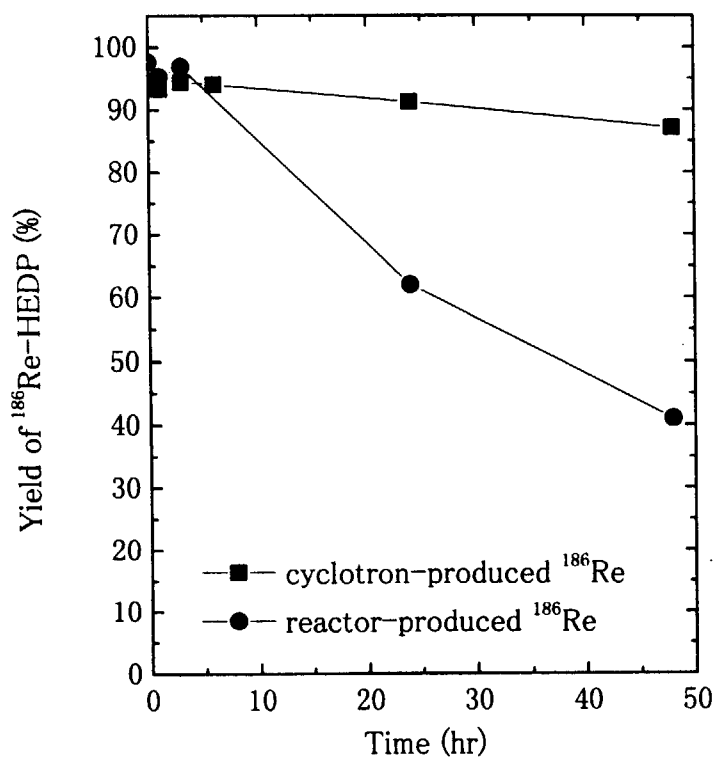


Fig. 3.2.1-1 Stability of ^{186}Re -HEDP using reactor- and cyclotron-produced ^{186}Re at room temperature for 48 hours

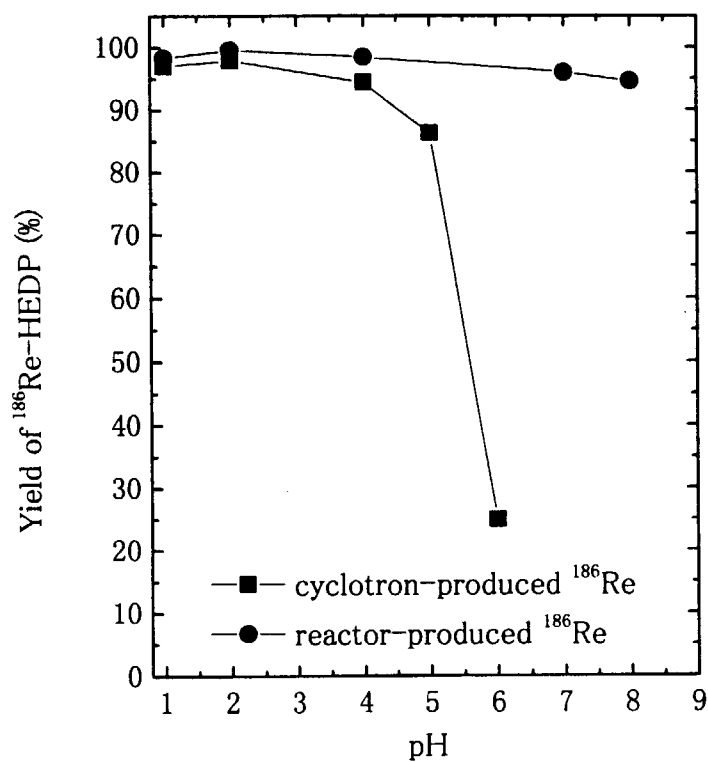


Fig. 3.2.1-2 Effect of pH on the stability of ^{186}Re -HEDP using reactor- and cyclotron-produced ^{186}Re ; the measurement was done 3 hours after preparation of the ^{186}Re -HEDP

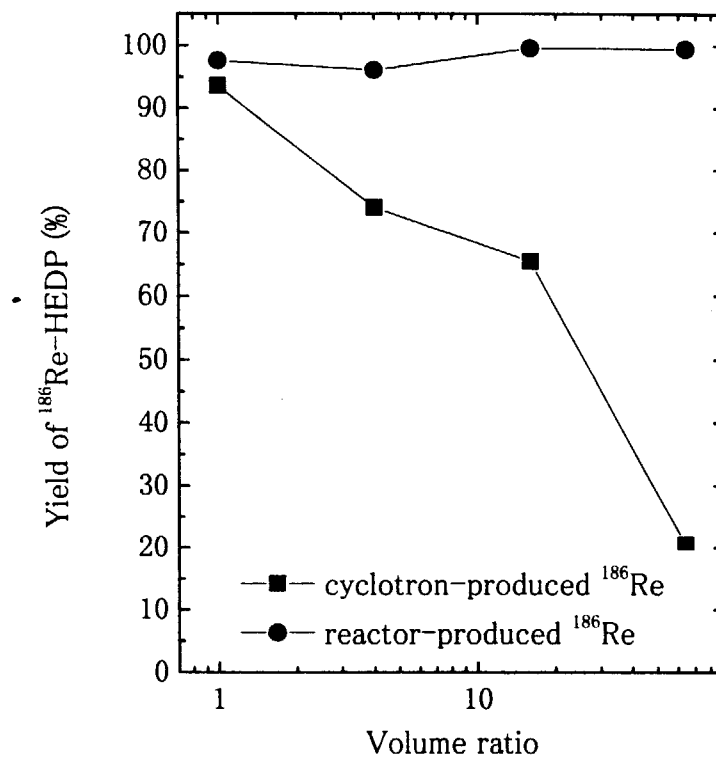


Fig. 3.2.1-3 Effect of dilution with saline on the stability of ^{186}Re -HEDP using reactor- and cyclotron-produced ^{186}Re

3. 3 ジェネレータ製無担体 ^{188}Re を用いた標識研究

3.3.1 MDP¹⁾

1) はじめに

テクネチウム-99m は、その優れた核的性質（半減期 6 h, 140 keV の γ 線の放出）、生体親和性の高さおよび入手の容易さ（ $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ ジェネレータ）から、放射性医薬品（診断薬）として、幅広く用いられている。一方、レニウム-186,188 は、その核的性質（ ^{186}Re : 半減期 3.78 d, 137 keV の γ 線, 1.08 MeV (max) の β 線/ ^{188}Re : 半減期 17.0 h, 155 keV の γ 線, 2.12 MeV (max) の β 線）から診断と治療が同時にできる核種として注目されている。また、レニウムはテクネチウムと同じ族（7 族）に属しており、その化学的性質については、テクネチウムとの類似点も多く、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 同様、幅広い利用が期待されている。

わが国で使用される $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 調製用試薬（Cold kit）のうち、骨の診断に関する試薬（二リン酸類）が、全体の 39% 程度（平成 8 年度）を占めている²⁾。特に、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -methylene diphosphonate（ $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MDP）は、骨疾患に加えて、脳腫瘍あるいは脳血管障害の診断に有効な放射性医薬品として幅広く用いられている。Re-MDP 標識化合物の合成については、 ^{186}Re (n, γ) 反応によって製造される ^{186}Re （担体を含む）を用いて、Eisenhut³⁾ が報告している。また、MDP の誘導体である HEDP ((1-hydroxyethylidene)diphosphonate) については、同じく担体を含む ^{186}Re を用いて標識実験および臨床実験が行われている。

そこで、本研究では、 $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ ジェネレータから得られる無担体の ^{188}Re を用いて、Re-MDP 標識化合物の合成条件の検討を行い、その最適条件を決定すると共に、担体を含む場合との違いについて、比較検討した。

2) 実験

ジェネレータの調製⁴⁾

三酸化タングステン $^{186}\text{WO}_3$ (^{186}W 濃縮度 : 99.79%、ISOTECH) の粉末約 20~50 mg を石英アンブルに封入し、所定のアルミニウムキャプセルに密封後、日本原子力研究所 J MTR（熱中性子束 : $3 \times 10^{14} \text{ cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ）または JRR-3M（熱中性子束 : $9 \times 10^{13} \text{ cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ）にて、7~26 日間照射を行った。照射後は、大量に生成する ^{187}W （半減期 : 23.8h）の放射能を減衰させるために、4 週間以上放置した。

照射済みターゲット (WO_3) は 1~2 M 水酸化カリウム（または水酸化ナトリウム）溶液で加熱溶解後、室温で放置した。その後、塩酸溶液 (0.1~4 M) を用いて、ターゲット溶解溶液の pH を約 2 に調整し、あらかじめ 0.01 M HCl により調製したアルミナカラム (10 mm I.D. $\times$ 60 mm L : BIO-RAD, AG-4, 100-200 mesh) に添加した。さらに、0.9% NaCl 溶液約 40 ml でカラムを洗浄し、ジェネレータとした。 ^{188}Re の溶出は、0.9% NaCl

溶液（流速：約 2 ml/min）により行った。溶出された ^{188}Re の化学形は、ペーパークロマトグラフィー（Whatman No.1/0.9%NaCl 溶液）により調べた。得られた ^{188}Re 溶液（ $5 \times 10^4 \sim 8 \times 10^5$ Bq/ml）は、そのまま標識実験に用いた。ジェネレータから得られた ^{188}Re 溶液中からは ^{188}W は検出されなかった。さらに、その化学形は、ペーパークロマトグラフィーの分析（ R_f 値（生理食塩水による展開）： ^{188}Re 0.74/標準物質 NH_4ReO_4 0.78）により過レニウム酸イオン（ $^{188}\text{ReO}_4^-$ ）単一成分であることが確認された。

^{188}Re -MDP の合成

MDP は、SIGMA 社製の Methylenediphosphonic acid trisodium salt tetrahydrate を用い、蒸留水に溶解後、容量を 10 ml にして使用した。MDP 標識キット（ $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 用）は、第一ラジオアイソトープ研究所の製品（1 バイアル中にメチレンジホスホン酸 7.5 mg、塩化第一スズ 0.38 mg、アスコルビン酸 0.17 mg を含む）を用いた。塩化第一スズ（ $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ）は、和光純薬製 0.38 g に 0.5 ml の濃塩酸を加えて溶解後、蒸留水を加えて 10 ml にして使用した。

標識実験は以下に示す手順で行った。バイアル瓶に MDP 溶液、pH 調整用の溶液（HCl, NaOH）、酸化防止剤水溶液（アスコルビン酸、ゲンチシン酸、クエン酸）、塩化第一スズ溶液及び ^{188}Re 溶液を加え、0.5～6 時間室温で（または、沸騰水中 30 分間）静置した。反応溶液の pH は、分析用試料を採取後、測定した。実験は、1 つのパラメータのみを変化させ、その他のパラメータは一定に保った。反応条件によっては、溶液が白濁することがあり、その場合は、分析の直前にろ過（ $0.22 \sim 0.45 \mu\text{m}$ ）した。 ^{188}Re -MDP, $^{188}\text{ReO}_2$ および未反応の $^{188}\text{ReO}_4^-$ の各割合は、シリカゲル薄層クロマトグラフィー（Merck No.5735/メチルエチルケトンまたはアセトン）及びペーパークロマトグラフィー（Whatman No.1/0.9% NaCl 溶液）による分析から求めた。シリカゲル薄層シート及びクロマトペーパーは、乾燥後、イメージスキャナー（AMBIS-100）により ^{188}Re の放射能分布を求めた。 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ の場合の文献値⁵⁾等との比較から各化学種の R_f 値は以下のように考えられる。

レニウム化学種の R_f 値

	TLC(Silica gel) / アセトンまたは MEK	Whatman No.1 / Saline
^{188}Re -MDP	0	0.9 - 1
$^{188}\text{ReO}_2$	0	0
$^{188}\text{ReO}_4^-$	1	0.7 - 0.8

^{188}Re -MDP の pH 変化及び希釈に対する安定性

最適条件下及び反応条件を変えて合成した ^{188}Re -MDP 溶液（2 ml）に酢酸ナトリウム水溶液または水酸化ナトリウム水溶液（0.5 ml）を加えて溶液の pH を変化させ、1 時間後、TLC 及び PC によって分析を行った。変化前の標識率に対する変化後の標識率の割

合（残存率％）を求めて、安定性を評価した。また、生理食塩水によって 2 倍～10 倍に希釈した場合についても、同様な実験を行った。

3) 結果及び考察

まず ^{99m}Tc で実用化されている方法と同じく市販の MDP 標識キットに、 ^{188}Re 溶液（生理食塩水）1 ml を加え、よく振とう後、室温に 30 分間放置し反応させた結果、標識率は 2 % ほどであった。さらに、反応溶液の pH を 1.5～5.7 の範囲で変化させたが、標識率の増加は観察されず、テクネチウムとは反応条件が異なることが認められた。そこで、試薬の MDP を用い、塩化第一スズ濃度や pH 等の反応条件の検討を行った。

反応時間

まず、予備実験の結果、pH 0.5、塩化第一スズ濃度 0.95 mg/ml、MDP 濃度 1.9 mg/ml、反応時間 30 分の場合、標識率は 45 % ほどであった。反応時間について 30 分～6 時間まで調べたところ、標識率はほぼ一定の値が得られ、30 分の反応時間で十分であること、および 6 時間までは安定であることが認められた。また、後述する最適条件下においても、30 分～6 時間では、ほぼ一定の標識率が得られた。

酸化防止剤の効果

酸化防止剤としてアスコルビン酸、ゲンチシン酸およびクエン酸を添加して（塩化第一スズと同重量）調べた。pH 0.5、塩化第一スズ濃度 0.96 mg/ml、MDP 1.9 mg/ml の条件でアスコルビン酸およびゲンチシン酸を用いた場合、標識率が 45 % から 69～75 % に増加した。クエン酸にはそのような効果は見られなかった。そこで、以下では、最も効果が大きかったアスコルビン酸を添加して、条件の検討を行った。

塩化第一スズ濃度依存性

予備実験では、塩化第一スズの濃度が増加すると白濁を生じ、一度増加した標識率も減少する傾向が得られた。この白濁を防止するために MDP の濃度を高くするのが有効である⁶⁾ことがわかったので、MDP 濃度を高くして（6.25 mg/ml）、塩化第一スズ濃度依存性を調べた。その結果を Fig. 3.3.1-1 に示す。塩化第一スズ濃度が増加するにつれて標識率も高くなり、塩化第一スズ濃度 1.9 mg/ml 以上では一定の値（85 % 前後）を示した。塩化第一スズ濃度 3.8 mg/ml では、白濁を生じた。

MDP 濃度依存性

MDP 濃度の影響を pH 0.6 付近及び pH 5 - 6 の領域で検討した。Fig. 3.3.1-2 に示すように、pH 0.6 では、MDP 濃度が高くなるにつれて ^{188}Re -MDP 錯体の標識率は増加し、0.1 mmol/ml では、95 % 以上であった。しかしながら、pH 5 - 6 付近では、標識率はほとんど増加せず、10 % 以下であった。

pH 依存性

MDP 濃度が 0.02 及び 0.1 mmol/ml（その他の条件：塩化第一スズ濃度 2.85 mg/ml、アスコルビン酸濃度（塩化第一スズと同重量） 2.85 mg/ml）で標識率の pH 依存性を調

べた。結果を Fig. 3.3.1-3 に示す。0.02 mmol/ml MDP では、pH 0.58～0.82 で標識率が 85～89% とほぼ一定の値を示し、pH が 0.5 以下、あるいは 1 以上では標識率は減少した。また、0.1 mmol/ml MDP でも、傾向は同様であるが、pH 0.6 - 0.8 での標識率は 95% 以上であった。これらの結果は、担体を含む Eisenhut の結果³⁾ (pH 1.4～1.6 で標識率 90% 以上) とは、若干異なる結果であるが (後述するように担体添加の効果が効いていると思われる)、pH が高くなると標識率が低くなるという傾向は一致している。また、pH が 6～8 では低い標識率しか得られなかった。MDP の類似体である HEDP の場合は、文献⁶⁾ によると pH 6～8 で高い標識率が得られており、MDP の場合と大きく異なっている。この件については、HEDP の項 (3.3.2) で詳しく述べる。

反応温度

これまでの室温での反応では、上述のように、反応溶液の pH が 2 以上では、標識率が 40% 以下である。そこで、反応溶液を加熱 (沸騰水中 20 分) した時の標識率の変化を pH 3.3 の場合について調べた。その結果、標識率は 6.5% で、室温での反応の場合 (10.2%) に比べて、かえって低くなり、加熱による標識率の増加は認められなかった。しかしながら、後述するように反応温度は ^{188}Re -MDP 錯体の安定性に影響を与えることがわかった。

担体添加の効果

原子炉による $^{185}\text{Re}(n, \gamma)$ 反応によって製造される ^{186}Re を用いる場合は、当然担体のレニウムが含まれることになる。さらに、M. Eisenhut の結果³⁾ と比較する上でも、標識率に及ぼす担体の効果について検討した。担体としては、 NH_4ReO_4 を用い、濃度は、0.02 mg Re/ml および 0.2 mg Re/ml について行った。それぞれの濃度の担体が存在する場合の標識率に対する依存性を調べた。

その結果、担体を含むものの方が無担体のものよりも高い標識率が得られた。さらに、担体濃度が高い方が標識率が高い傾向が観察された。前述した反応条件下 (MDP 0.02 mmol/ml) において、無担体の場合は、標識率 85～89% ほどであったのが、担体濃度 0.02 mg Re/ml の場合は、92% 前後、0.2 mg Re/ml の場合 (黄白色沈殿あり) は、95% 前後と高くなった。

pH 変化及び希釈に対する安定性

これまでの実験結果から高い標識率で Re-MDP を得るためには、pH が 0.6～0.8 でなければならない。この pH は、人体に投与したり、抗体標識に用いることを考えると、かなり低い値であり、少なくとも pH 3 以上が必要である。そこで、pH 0.6 付近で標識した反応溶液 (MDP 0.1 mmol/ml) に酢酸ナトリウム溶液を加えて pH を 3～5 に調整した場合の標識率の変化について、無担体および担体を加えた場合について検討した (Fig. 3.3.1-4)。その結果、無担体の場合、pH が高くなるにつれて、残存率が減少し、pH 4 付近では 80% 程度の残存率であった。一方、担体を含む場合では、ほぼ 100% の残存率であった。さらに、合成時の MDP 濃度が 0.02 mmol/ml の場合は、残存率はずっと低く、無担体の場合 50% 程度、担体を含む場合で 85% 程度であった。また、生理食塩水による

希釈の効果 (Fig. 3.3.1-5) は、無担体の場合 (pH 0.6、室温反応)、10 倍希釈で、残存率は 15% 程度まで減少することがわかった。担体を含む場合は、同一条件で残存率は 60% 程度であった。以上の結果から、担体を含む化合物の方が無担体の場合よりも安定性が高いことが認められた。更に、担体を含む MDP 化合物では、化合物合成時の反応条件 (反応温度) によっても安定性が異なることが認められ (Fig. 3.3.1-5)、沸騰水中で合成した化合物の方が、室温で合成した化合物よりも安定であり、無担体の場合は、化合物合成時の反応温度が異なっても化合物の安定性はほぼ同一であった。

4) まとめ

$^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ ジェネレータから得られる無担体の ^{188}Re を用いた ^{188}Re -MDP 標識化合物合成の最適条件を以下に示す。

pH : 0.6~0.8, 塩化第一スズ濃度 : 2.85 mg/ml, MDP 濃度 : 0.1 mmol/ml, アスコルビン酸濃度 : 2.85 mg/ml, 反応時間 : 沸騰水中 30 分。上記最適条件下で、 ^{188}Re -MDP 錯体の標識率は無担体の場合及び担体を含む場合共に 95% 以上であった。

参考文献

- 1) Hashimoto K., Bagiawati S., Izumo M. and Kobayashi K., Appl. Radiat. Isot. 47, 195 (1996).
- 2) 放射性医薬品流通統計平成 8 年度, Isotope News 518, 20 (1997).
- 3) Eisenhut M., Int. J. Appl. Radiat. Isot. 33, 99 (1982).
- 4) Callahan A. P., Rice D. E. and Knapp Jr F. F., NucCompact 20, 3 (1989).
- 5) Zucchini G. L., Marinelli M., Pozzato R. and Garuti P., Appl. Radiat. Isot. 38, 283 (1987).
- 6) Deutsch E., Libson K., Vanderheyden J. - L., Ketrang A. R. and Maxon H. R., Nucl. Med. Biol. 13, 465 (1986).

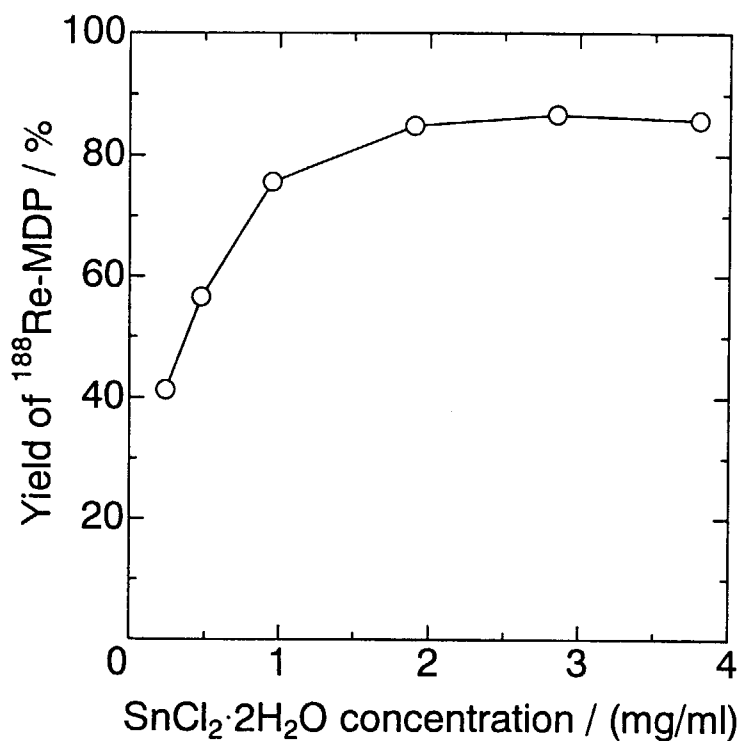


Fig. 3.3.1-1 Influence of the concentration of SnCl_2 on the yield of $^{188}\text{Re-MDP}$ using carrier-free ^{188}Re (pH 0.60 – 0.69, $[\text{MDP}] = 0.02$ mmol/ml, [ascorbic acid] = 2.9 mg/ml).

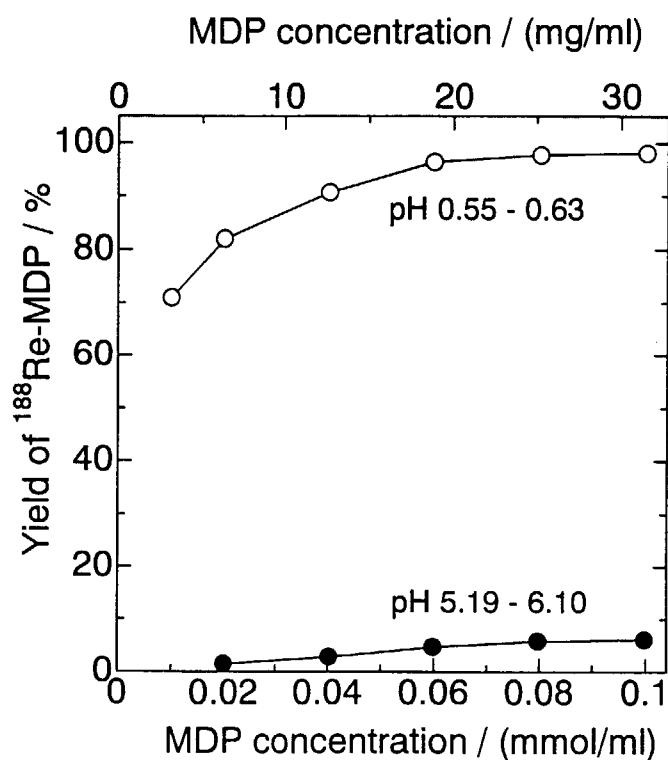


Fig. 3.3.1-2 Influence of the concentration of MDP on the yield of $^{188}\text{Re-MDP}$ using carrier-free ^{188}Re ($[\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}] = 2.9$ mg/ml, [ascorbic acid] = 2.9 mg/ml).

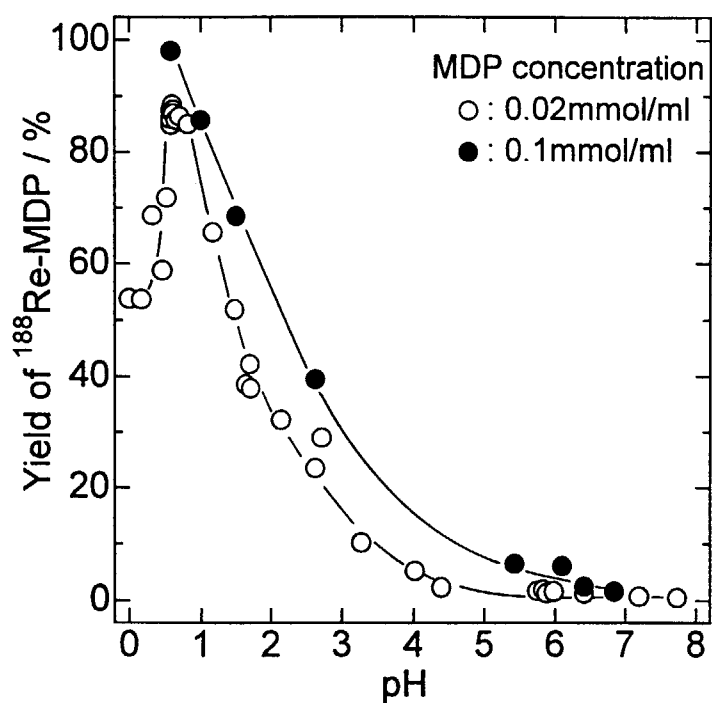


Fig. 3.3.1-3 Influence of pH on the yield of $^{188}\text{Re-MDP}$ at different MDP concentrations using carrier-free ^{188}Re ($[\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}] = 2.9 \text{ mg/ml}$, $[\text{ascorbic acid}] = 2.9 \text{ mg/ml}$).

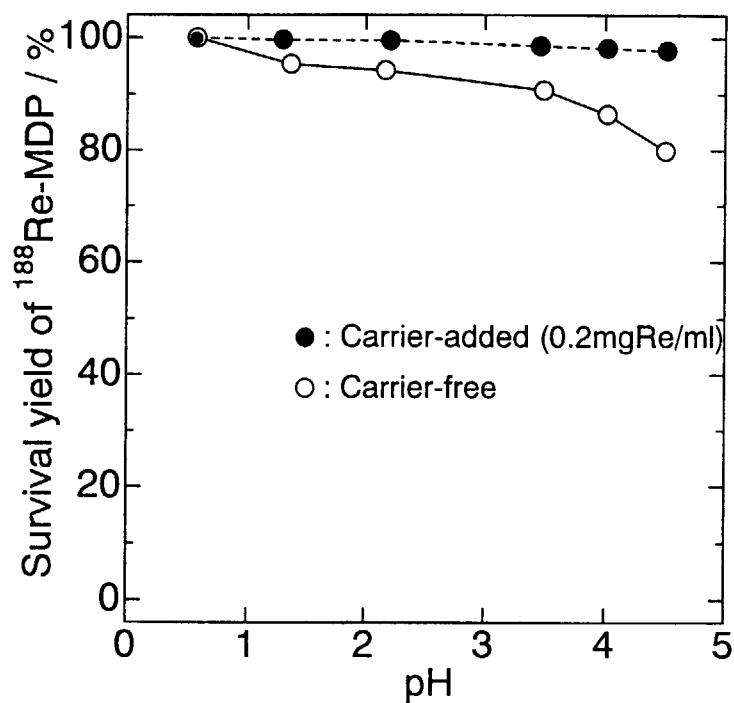


Fig. 3.3.1-4 Effect of pH on the stability of $^{188}\text{Re-MDP}$ (Initial pH: 0.57).

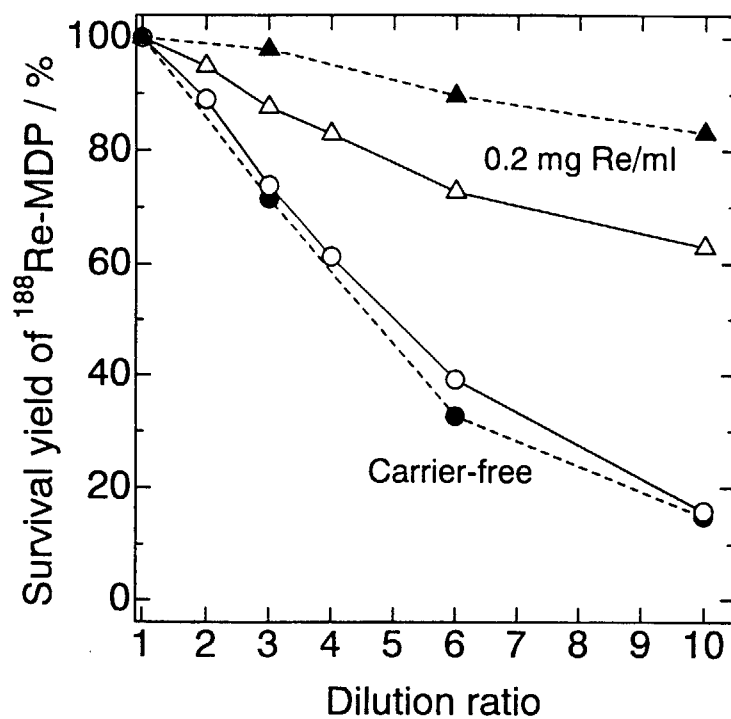


Fig. 3.3.1-5 Effect of dilution with saline on the stability of ^{188}Re -MDP for different formation conditions ($\circ$, $\triangle$: formed at room temperature / $\bullet$, $\blacktriangle$: formed in boiling water).

3.3.2 HEDP¹⁾

1) はじめに

MDP と同じジホスホン酸誘導体である HEDP (1-ヒドロキシエチリデンジホスホン酸) を用いて、¹⁸⁸Re-HEDP 錯体の合成条件の検討を詳しく行った。さらに、得られた ¹⁸⁸Re-HEDP 錯体の pH 変化及び生理食塩水による希釈に対する安定性についても調べた。得られた最適合成条件及び安定性について、¹⁸⁸Re-MDP 錯体の結果と比較検討を行った。

2) 実験

ジェネレータの調製

MDP の項 (3.3.1) と同じ。

¹⁸⁸Re-HEDP の合成

HEDP は、岸田化学製を用い、蒸留水に溶解後、容量を 10 ml にして使用した。塩化第一スズ (SnCl₂・2H₂O) は、和光純薬製 0.38 g に 0.5 ml の濃塩酸を加えて溶解後、蒸留水を加えて 10 ml にして使用した。

標識実験は以下に示す手順で行った。バイアル瓶に HEDP 溶液、pH 調整用の溶液 (HCl, NaOH)、酸化防止剤水溶液 (アスコルビン酸、ゲンチシン酸、クエン酸)、塩化第一スズ溶液及び ¹⁸⁸Re 溶液を加え、0.5～6 時間室温で (または、沸騰水中 30 分間) 静置した。反応溶液の pH は、分析用試料を採取後、測定した。実験は、1 つのパラメータのみを変化させ、その他のパラメータは一定に保った。反応条件によっては、溶液が白濁することがあり、その場合は、分析の直前にろ過 (0.22～0.45 μm) した。¹⁸⁸Re-HEDP, ¹⁸⁸ReO₂ および未反応の ¹⁸⁸ReO₄⁻ の各割合は、シリカゲル薄層クロマトグラフィー (Merck No.5735 / メチルエチルケトンまたはアセトン) 及びペーパークロマトグラフィー (Whatman No.1 / 0.9% NaCl 溶液) による分析から求めた。シリカゲル薄層シート及びクロマトペーパーは、乾燥後、イメージスキャナー (AMBIS-100) により ¹⁸⁸Re の放射能分布を求めた。

レニウム化学種の R_f 値

	TLC (Silica gel) / アセトンまたは MEK	Whatman No.1 / Saline
¹⁸⁸ Re-HEDP	0	0.9 - 1
¹⁸⁸ ReO ₂	0	0
¹⁸⁸ ReO ₄ ⁻	1	0.7 - 0.8

¹⁸⁸Re-HEDP の pH 変化及び希釈に対する安定性

最適条件下及び反応条件を変えて合成した ¹⁸⁸Re-HEDP 溶液 (2 ml) に酢酸ナトリウム水溶液または水酸化ナトリウム水溶液 (0.5 ml) を加えて溶液の pH を変化させ、1 時

間後、TLC 及び PC によって分析を行った。変化前の標識率に対する変化後の標識率の割合（残存率）を求めて、安定性を評価した。また、生理食塩水によって2倍～10倍に希釈した場合についても、同様な実験を行った。

3) 結果及び考察

反応時間

室温での反応時間の標識率に対する影響を調べた。低 pH（～0.6）では、0.5 – 6 時間で標識率はほぼ一定値を示した。しかしながら、高 pH（3 – 6）では、時間と共に標識率が増加し、4 時間後は一定値を示した。

塩化第一スズ濃度依存性

結果を Fig. 3.3.2-1 に示す。塩化第一スズ濃度が増加するにつれて標識率も高くなり、塩化第一スズ濃度 1.9 mg/ml 以上では一定の値を示した。この結果は、MDP の場合とほぼ同じ傾向であった。塩化第一スズ濃度は、2.9 mg/ml に固定した。

HEDP 濃度依存性

HEDP 濃度の影響を pH 0.6 付近及び pH 4 – 5 の領域で検討した。Fig. 3.3.2-2 に示すように、両 pH 領域共に、HEDP 濃度が高くなるにつれて ^{188}Re -HEDP 錯体の標識率は増加し、0.1 mmol/ml では、90%以上であった。MDP の場合は、pH 0.6 付近では、同様な結果であったが、pH 5 – 6 付近では HEDP の場合とは異なり、標識率はほとんど増加せず、10%以下であった。

pH 依存性

HEDP 濃度が 0.02 及び 0.1 mmol/ml で標識率の pH 依存性を調べた。結果を Fig. 3.3.2-3 に示す。0.02 mmol/ml HEDP では、標識率は、pH 0.6 – 0.8 で最大値であり、pH 0.5 以下及び pH 1 以上では、減少した。一方、0.1 mmol/ml HEDP では、広い pH 領域で高い標識率が得られた（pH 0.5 – 4.2 で 90%以上）。従って、Fig. 3.3.2-4 に示すように、0.1 mmol/ml の二リン酸濃度では、 ^{188}Re -HEDP と ^{188}Re -MDP の標識率の pH 依存性は大きく異なることが明らかになった。

反応温度

加熱による標識率増加は認められなかった。しかしながら、沸騰水中での反応では、30 分で十分であった。さらに、後述するように反応温度は ^{188}Re -HEDP 錯体の安定性に影響を与えることがわかった。

担体添加の効果

ジェネレータ製無担体 ^{188}Re に、担体を加えた場合の影響を 0.02 及び 0.2 mg Re/ml 濃度について調べた。その結果、 ^{188}Re -MDP の場合と同様に、担体を加えた場合の方が無担体の場合よりも高い標識率が得られた。ただし、担体を加えた場合でも、最適条件は無担体の場合と同じであった。担体を含む ^{188}Re -HEDP 錯体は、pH 7 付近でも 95%以上の標識率が得られた。

pH 変化及び希釈に対する安定性

得られた ^{188}Re -HEDP 標識化合物の pH 変化及び生理食塩水による希釈に対する安定性について調べた。まず、pH 変化に対する ^{188}Re -HEDP 錯体の残存率は、pH 6 付近でも、無担体の場合で 90%程度、担体を含む場合では、ほぼ 100%であった。一方、生理食塩水による希釈の効果は、無担体の場合 (pH 0.6、室温反応)、10 倍希釈で、残存率は 10%程度まで減少することがわかった。担体を含む場合は、同一条件で残存率は 60%程度であった。以上の結果から、担体を含む化合物の方が無担体の場合よりも安定性が高いことが認められた。更に、担体を含む HEDP 化合物では、化合物合成時の反応条件 (pH 及び反応温度) によっても安定性が異なることが認められ (Fig. 3.3.2-5)、沸騰水中で合成した化合物の方が、室温で合成した化合物よりも安定であり、しかも、pH 0.6 で合成した化合物の方が pH 4 で合成したものよりも安定であった。無担体の場合は、化合物合成時の反応条件が異なっても化合物の安定性はほぼ同一であった。また、 ^{188}Re -HEDP と ^{188}Re -MDP の安定性はほぼ同程度であることが分かった。

4) まとめ

^{188}Re -HEDP 錯体合成の最適条件を以下に示す。

pH : 0.6 – 0.8、塩化第一スズ ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 濃度 : 2.9 mg/ml、アスコルビン酸濃度 : 2.9 mg/ml、HEDP 濃度 : 0.1 mmol/ml、反応時間 : 沸騰水中で 30 分。上記最適条件下で、 ^{188}Re -HEDP 錯体の標識率は無担体の場合及び担体を含む場合共に 95%以上であった。

参考文献

- 1) Hashimoto K., Appl. Radiat. Isot., in press.

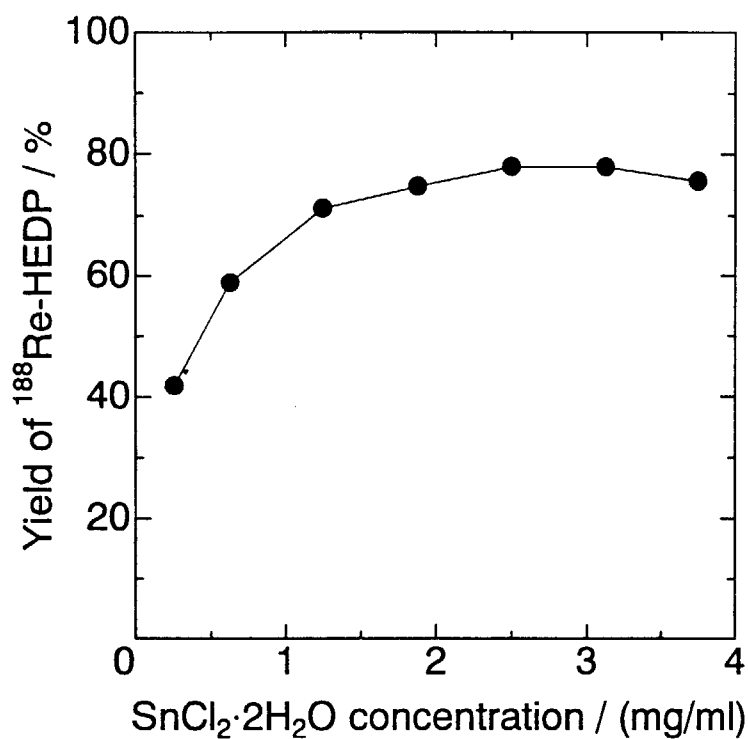


Fig. 3.3.2-1 Influence of the concentration of SnCl_2 on the yield of $^{188}\text{Re-HEDP}$ using carrier-free ^{188}Re (pH 0.6 – 0.7, $[\text{HEDP}] = 0.02 \text{ mmol/ml}$, $[\text{ascorbic acid}] = 2.9 \text{ mg/ml}$).

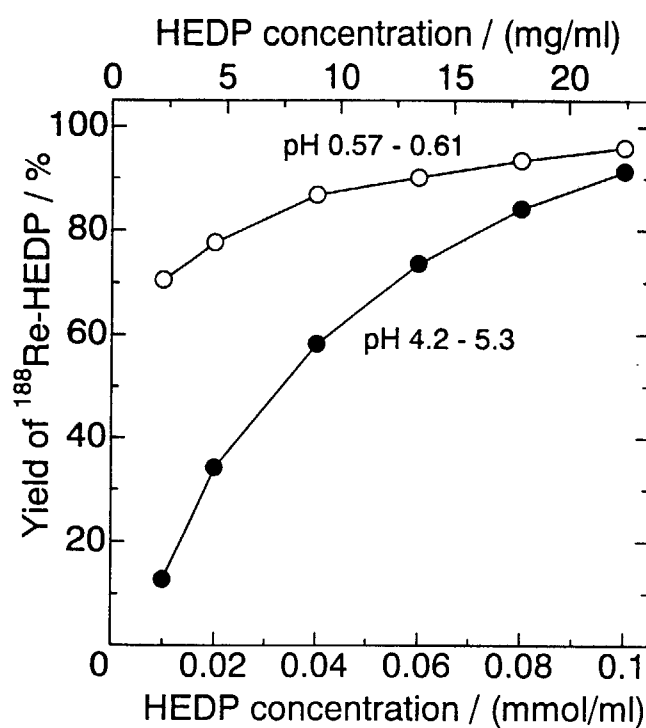


Fig. 3.3.2-2 Influence of the concentration of HEDP on the yield of $^{188}\text{Re-HEDP}$ using carrier-free ^{188}Re ($[\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}] = 2.9 \text{ mg/ml}$, $[\text{ascorbic acid}] = 2.9 \text{ mg/ml}$).

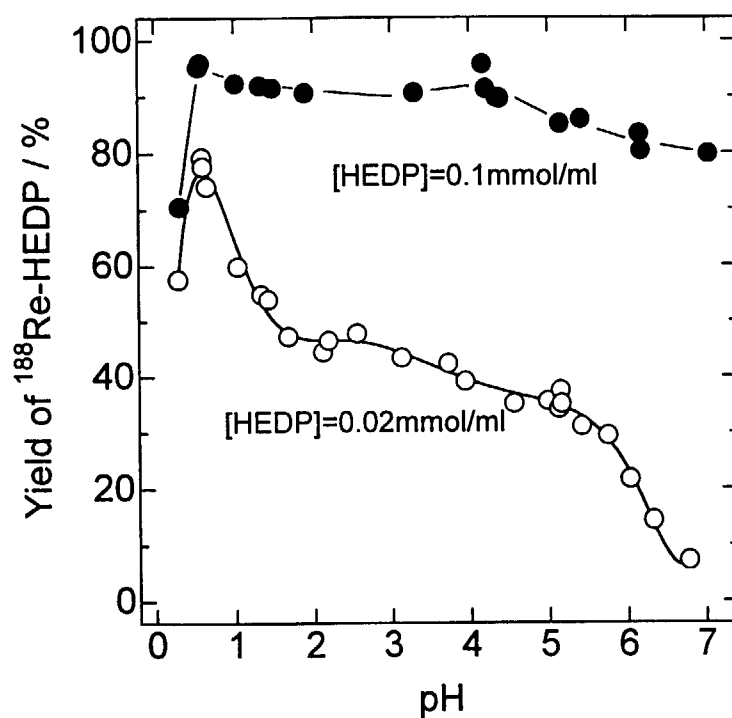


Fig. 3.3.2-3 Influence of pH on the yield of $^{188}\text{Re-HEDP}$ at different HEDP concentrations using carrier-free ^{188}Re ($[\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}] = 2.9 \text{ mg/ml}$),

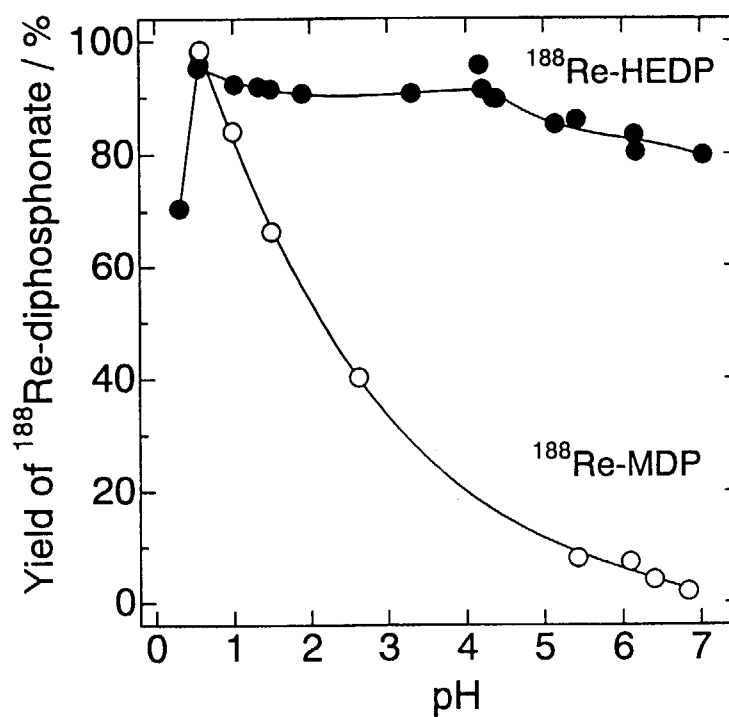


Fig. 3.3.2-4 Comparison of the dependence of the labeling yield on pH between $^{188}\text{Re-HEDP}$ and $^{188}\text{Re-MDP}$ at 0.1mmol/ml diphosphonate concentration ($[\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}] = 2.9 \text{ mg/ml}$, [ascorbic acid] = 2.9 mg/ml).

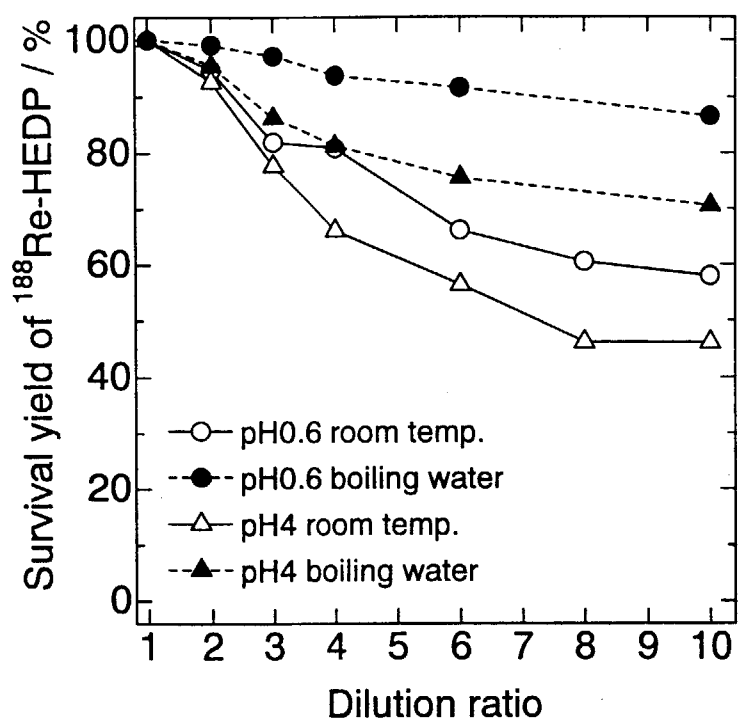


Fig. 3.3.2-5 Effect of dilution with saline on the stability of carrier-added $^{188}\text{Re-HEDP}$ for different formation conditions.

3.3.3 DMSA¹⁾

1) はじめに

ジメルカプトコハク酸テクネチウム (^{99m}Tc -DMSA) は、腎臓への集積率が高いため、腎疾患の診断に有効な放射性医薬品として幅広く用いられている。さらに、甲状腺がんなどに集積することも知られている²⁻⁴⁾。

そこで、本研究では、 $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ ジェネレータから得られる無担体の ^{188}Re を用いて、 ^{188}Re -DMSA 標識化合物の合成条件の検討を詳しく行い、その最適条件を決定すると共に、担体を含む場合との違いについて、比較検討した。

2) 実験

ジェネレータの調製

MDP の項 (3.3.1) と同じ。

 ^{188}Re -DMSA の合成

DMSA は、Aldrich 製の meso-2,3-dimercaptosuccinic acid を用い、0.25 M NaOH 2 ml に加熱溶解後、蒸留水を加えて 10ml にして使用した。DMSA 標識キット (^{99m}Tc 用) は、第一ラジオアイソトープ研究所の製品 (1 バイアル中にジメルカプトコハク酸 1.4 mg、塩化第一スズ (二水塩) 0.5 mg を含む) を用いた。塩化第一スズ ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) は、和光純薬製 80 mg に 0.5 ml の濃塩酸を加えて溶解後、蒸留水を加えて 10 ml にして使用した。

標識実験は以下に示す手順で行った。バイアル瓶に DMSA 溶液、pH 調整用の溶液 (HCl, NaOH)、酸化防止剤水溶液 (アスコルビン酸、ゲンチシン酸、クエン酸)、塩化第一スズ溶液及び ^{188}Re 溶液を加え、0.5~6 時間室温で (または、沸騰水中 30 分間) 静置した。反応溶液の pH は、分析用試料を採取後、測定した。実験は、1つのパラメータのみを変化させ、その他のパラメータは一定に保った。反応条件によっては、溶液が白濁することがあり、その場合は、分析の直前にろ過 ($0.22 \sim 0.45 \mu\text{m}$) した。 ^{188}Re -DMSA, $^{188}\text{ReO}_2$ および未反応の $^{188}\text{ReO}_4^-$ の各割合は、シリカゲル薄層クロマトグラフィー (Merck No.5735 / メチルエチルケトンまたはアセトン) 及びペーパークロマトグラフィー (Whatman No.1 / 0.9% NaCl 溶液) による分析から求めた。シリカゲル薄層シート及びクロマトペーパーは、乾燥後、イメージスキャナー (AMBIS-100) により ^{188}Re の放射能分布を求めた。

レニウム化学種の R_f 値

	TLC (Silica gel) / アセトンまたは MEK	Whatman No.1 / Saline
^{188}Re -DMSA	0	0.9 - 1
$^{188}\text{ReO}_2$	0	0
$^{188}\text{ReO}_4^-$	1	0.7 - 0.8

^{188}Re -DMSA の pH 変化及び希釈に対する安定性

最適条件下で合成した ^{188}Re -DMSA 溶液 (2 ml) に酢酸ナトリウム水溶液または水酸化ナトリウム水溶液 (0.5 ml) を加えて溶液の pH を変化させ、一定時間後 (2、24、48 時間)、TLC 及び PC によって分析を行った。変化前の標識率に対する変化後の標識率の割合 (残存率) を求めて、安定性を評価した。また、生理食塩水によって 2 倍～10 倍に希釈した場合についても、同様な実験を行った。

3) 結果及び考察

まず $^{99\text{m}}\text{Tc}$ で実用化されている方法と同じく市販の DMSA 標識キットに、 ^{188}Re 溶液 (生理食塩水) 1 ml を加え、30 秒よく振とう後、室温に 30 分間放置し反応させた結果、標識率は 57% ほどであった。テクネチウムとは反応条件が異なることが認められた。そこで、試薬の DMSA を用い、塩化第一スズ濃度や pH 等の反応条件の検討を行った。

反応時間

室温での ^{188}Re -DMSA 錯体の標識率は、反応時間の増加に伴って増加し、4 時間以上で一定の標識率を示した。

酸化防止剤の効果

酸化防止剤としてアスコルビン酸、ゲンチシン酸およびクエン酸を添加して (0.5 mg/ml) 調べた。その結果、アスコルビン酸およびクエン酸を用いた場合に標識率の増加が観察された。本研究では、アスコルビン酸を用いてさらに検討を続けた。

pH 依存性

pH を 0.77～10.0 まで変化した場合の標識率の変化を Fig. 3.3.3-1 に示す。pH 0.8～2.0 では、98% 以上の標識率が得られたが、pH 2 以上になると標識率が急激に減少し、中性領域及びアルカリ pH 領域では 1% ほどであった。

塩化第一スズ濃度依存性

塩化第一スズ濃度を 0.05～2 mg/ml まで変化させて、標識率の変化を調べた。結果を Fig. 3.3.3-2 に示す。無担体の場合、塩化第一スズ濃度 0.1～0.2 mg/ml でレニウムの還元には十分であり、 ^{188}Re -DMSA 錯体の標識率は、95% 以上を示した。塩化第一スズ濃度が 0.2 mg/ml 以上になると、標識率は、徐々に減少した。塩化第一スズ濃度が 1 mg/ml を越えると沈殿が生じた。

担体を含む場合は、塩化第一スズ濃度が増加するにつれて標識率が増加した。担体濃度が 0.02 mg Re/ml の場合、塩化第一スズ濃度 0.2～0.3 mg/ml 以上で標識率は一定値を示し、担体濃度が 0.2 mg Re/ml の場合は、さらに高濃度の塩化第一スズが必要であり、0.6 mg/ml 以上で一定値を示した。従って、還元剤である塩化第一スズの量は、溶液中に存在するレニウム化学量に依存することが明らかになった。

DMSA 濃度依存性

DMSA 濃度を 0.21~4.0 mg/ml まで変化させて、標識率の変化を調べた。無担体の場合、標識率はほぼ一定値を示した。担体を含む場合は、DMSA 濃度 1.4 mg/ml までは、標識率は増加し、さらに 2 mg/ml 以上では減少した（沈殿が生じた）。従って、DMSA 濃度は 1.4 mg/ml に固定した。

担体添加の効果

ジェネレータ製無担体 ^{188}Re に、担体を加えた場合の影響を 0.02 及び 0.2 mg Re/ml 濃度について調べた。pH 依存性に関しては、あまり大きな差は見られず、最適 pH は、無担体の場合と同じく 0.8 - 2.0 であった。塩化第一スズ濃度依存性に関しては、先に述べたように、担体濃度が高いほど、塩化第一スズの量が多く必要であった。

反応温度

沸騰水中 30 分での標識率は室温 4 時間での標識率と同じであった。従って、反応温度を上げると反応速度が、上昇することがわかった。さらに、塩化第一スズ濃度が低い領域では、沸騰水中で反応させた方が、室温反応よりも高い標識率が得られた。これは、温度が高い方が塩化第一スズによるレニウムの還元反応が進行しやすいことを意味していると考えられる。

 ^{188}Re -DMSA の pH 変化及び希釈に対する安定性

pH 変化及び生理食塩水による希釈に対する安定性を調べた。その結果、無担体の場合および担体を含むいずれの場合も、 ^{188}Re -DMSA 標識化合物は、安定性が非常に高く、標識後、pH を中性からアルカリ領域にあげても、標識率は 98%以上であり、pH 変化 48 時間後でも、その分解は認められなかった。また、生理食塩水による希釈に対する安定性の実験でも、分解は全く認められなかった。

4) まとめ

^{188}Re -DMSA 錯体合成の最適条件を以下に示す。

pH : 0.8 - 2.0、塩化第一スズ ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 濃度 : 0.2 mg/ml (担体濃度 0.02 mgRe/ml の場合は 0.2 - 0.8 mg/ml、担体濃度 0.2 mgRe/ml の場合は、0.6 - 0.8 mg/ml)、アスコルビン酸濃度 : 0.5 mg/ml、DMSA 濃度 : 1.4 mg/ml (7.7×10^{-3} mmol/ml)、反応時間 : 室温で 4 時間または沸騰水中で 30 分。上記最適条件下で、 ^{188}Re -DMSA 錯体の標識率は無担体の場合及び担体を含む場合共に 98%以上であった。

参考文献

- 1) Hashimoto K., Islam Md S. and Izumo M.: "Proceedings of 7th International Symposium on Advanced Nuclear Energy Research, March 18-20, 1996, Takasaki, Gunma, Japan", JAERI-Conf 97-003, 313 (1997).

- 2) Ohta H., Yamamoto K., Endo K., Mori T., Hamanaka D., Shimadu A., Ikekubo K., Makimoto K., Iida Y., Konishi J., Morita R., Hata N., Horiuchi K., Yokoyama A., Torizuka K. and Kuma K., J. Nucl. Med. 25, 323 (1984).
- 3) Clarke S. E. M., Lazarus C. R., Wraight P., Sampson C. and Maisey M. N., J. Nucl. Med. 29, 33 (1988).
- 4) Ohta H., Endo K., Fujita T., Konishi K., Torizuka K., Horiuchi K. and Yokoyama A., Nucl. Med. Commun. 9, 105 (1988).

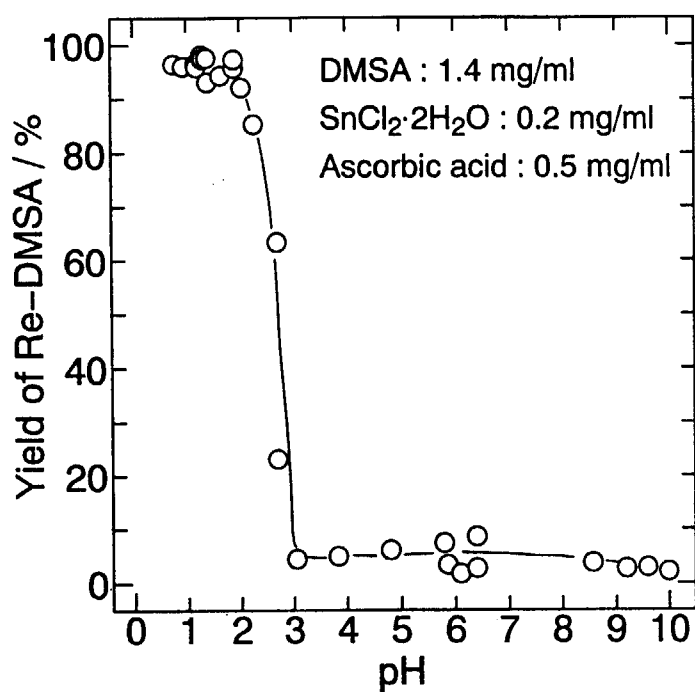


Fig. 3.3.3-1 Influence of pH on the yield of ^{188}Re -DMSA using carrier-free ^{188}Re ($[\text{DMSA}] = 1.4 \text{ mg/ml}$, $[\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}] = 0.2 \text{ mg/ml}$, $[\text{ascorbic acid}] = 0.5 \text{ mg/ml}$).

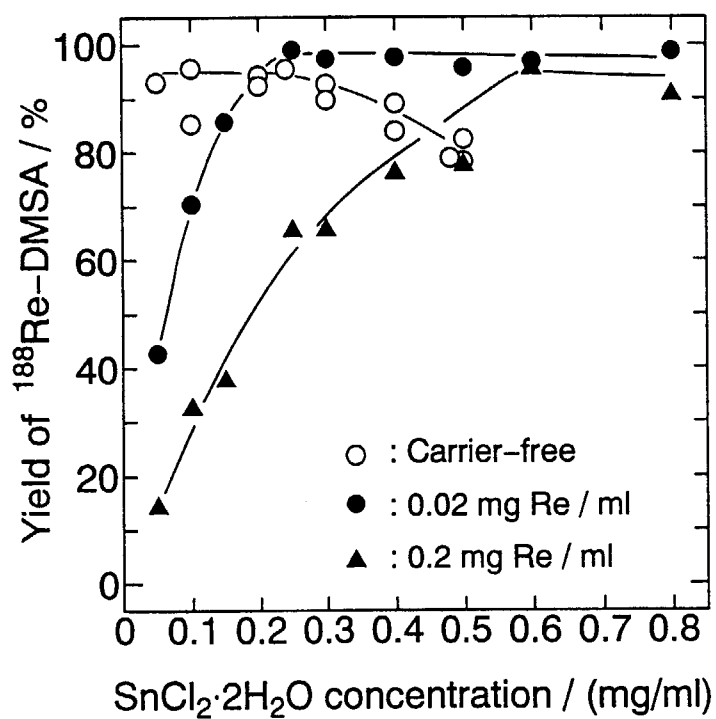


Fig. 3.3.3-2 Influence of the concentration of SnCl_2 on the yield of ^{188}Re -DMSA (pH 1.0-1.7, $[\text{DMSA}] = 1.4 \text{ mg/ml}$, $[\text{ascorbic acid}] = 0.5 \text{ mg/ml}$).

3.3.4 アミノメチレンリン酸誘導体 (EDTMP, EDBMP 及び NTMP) ¹⁾

1) はじめに

転移性骨がんの痛みの緩和用の放射性医薬品として、 ^{186}Re -HEDP (二リン酸誘導体) 及び ^{153}Sm -EDTMP (アミノメチレンリン酸誘導体) が使用されている。そこで本研究では、無担体の ^{188}Re を用いた EDTMP (Ethylenediamine-N,N,N',N'-tetrakis(methylene-phosphonic acid)) 及びその誘導体 EDBMP (Ethylenediamine-N,N'-bis(methylene-phosphonic acid)), NTMP (Nitrilotris(methylenephosphonic acid)) の標識について検討した。使用した配位子の構造を Fig. 3.3.4-1 に示す。標識率に対する pH、還元剤の濃度、配位子の濃度、温度及び担体添加の効果について詳しく調べた。さらに、得られた ^{188}Re 標識アミノメチレンリン酸誘導体の pH 変化及び生理食塩水による希釈に対する安定性について検討した。

2) 実験

ジェネレータの調製

MDP の項 (3.3.1) と同じ。

^{188}Re -アミノメチレンリン酸誘導体 (^{188}Re -amp) の合成

アミノメチレンリン酸誘導体 (EDTMP, EDBMP 及び NTMP) は、同仁化学研究所製を用いた。EDTMP, EDBMP は、0.5 M NaOH 5ml に加熱溶解し、NTMP は水に溶解し、蒸留水を加えて 10 ml にして使用した。塩化第一スズ ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) は、和光純薬製 0.38 g に 0.5 ml の濃塩酸を加えて溶解後、蒸留水を加えて 10 ml にして使用した。

標識実験は以下に示す手順で行った。バイアル瓶にアミノメチレンリン酸誘導体溶液、pH 調整用の溶液 (HCl, NaOH)、酸化防止剤水溶液 (アスコルビン酸、ゲンチシン酸、クエン酸)、塩化第一スズ溶液及び ^{188}Re 溶液を加え、0.5～6 時間室温で (または、沸騰水中 30 分間) 静置した。反応溶液の pH は、分析用試料を採取後、測定した。実験は、1つのパラメータのみを変化させ、その他のパラメータは一定に保った。反応条件によっては、溶液が白濁することがあり、その場合は、分析の直前にろ過 ($0.22 \sim 0.45 \mu\text{m}$) した。 ^{188}Re -amp, $^{188}\text{ReO}_2$ および未反応の $^{188}\text{ReO}_4^-$ の各割合は、シリカゲル薄層クロマトグラフィー (Merck No.5735/アセトン)、ペーパークロマトグラフィー (Whatman No.1/0.9% NaCl 溶液) 及びセルロースアセテート膜電気泳動法 (アドバンテック Seleca-V/0.05 M バルビタール緩衝液/600 V, 15 分) による分析から求めた。シリカゲル薄層シート、クロマトペーパー及びアセテートセルロース膜は、乾燥後、イメージスキャナー (AMBIS-100) により ^{188}Re の放射能分布を求めた。各化学種の R_f 値を表 (次頁) に示す。

レニウム化学種の R_f 値

	TLC (Silica gel) / アセトン	Whatman No.1 / Saline
$^{188}\text{Re-amp}$	0	0.9 - 1
$^{188}\text{ReO}_2$	0	0
$^{188}\text{ReO}_4^-$	1	0.7 - 0.8

 $^{188}\text{Re-amp}$ の pH 変化及び希釈に対する安定性

最適条件下及び反応条件を変えて合成した $^{188}\text{Re-amp}$ 溶液 (2 ml) に酢酸ナトリウム水溶液または水酸化ナトリウム水溶液 (0.5 ml) を加えて溶液の pH を変化させ、1 時間後、TLC 及び PC によって分析を行った。変化前の標識率に対する変化後の標識率の割合 (残存率) を求めて、安定性を評価した。また、生理食塩水によって 2 倍～10 倍に希釈した場合についても、同様な実験を行った。

3) 結果及び考察

 ReO_2 の評価

本研究において、ペーパークロマトグラムの原点に残る割合 (生理食塩水による展開) は、これまでの実験結果に比べて少し多かった。 $^{188}\text{Re-EDTMP}$: 1.5% (n=43)、 $^{188}\text{Re-EDBMP}$: 2.9% (n=35)、 $^{188}\text{Re-NTMP}$: 5.4% (n=27)、 $^{188}\text{Re-MDP}$: 0.8% (n=22)、 $^{188}\text{Re-HEDP}$: 0.9% (n=70)。しかしながら、ペーパークロマトグラムにおいて、主成分である $^{188}\text{Re-amp}$ 錯体及び $^{188}\text{ReO}_4^-$ ($R_f = 0.9$) のテーリングが原点方向に見られた。これは、 $^{188}\text{Re-amp}$ 錯体の分解のためであると考えられる。また、電気泳動分析では、 $^{188}\text{ReO}_4^-$ の移動距離と異なる距離 (陽極側) に単一の $^{188}\text{Re-amp}$ のピークが見られ、しかも原点には 0.5% 以下の ^{188}Re しか観察されなかった。したがって、本系では、 ReO_2 成分は無視できる量であると見なした。

反応時間

室温での $^{188}\text{Re-EDTMP}$ 錯体の標識率は、pH の違いによって、反応時間依存性が異なった。pH が 0.8 ほどの酸性領域では、0.5～6 時間の反応時間で一定の標識率を示したが、pH が 4 付近では、反応時間と共に徐々に標識率が増加するのが観察された。

塩化第一スズ濃度依存性

Fig. 3.3.4-2 に示すように $^{188}\text{Re-amp}$ 錯体の標識率は、塩化第一スズ濃度が濃くなるにつれて増加し、 $^{188}\text{Re-EDTMP}$ 及び $^{188}\text{Re-EDBMP}$ 錯体は、0.5 mg/ml ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 以上、 $^{188}\text{Re-NTMP}$ 錯体の場合は、2 mg/ml 以上で一定値を示した。さらに、塩化第一スズ濃度依存性は、反応液の pH にも影響を受け、pH 0.8 では、塩化第一スズ濃度 0.29 mg/ml で $^{188}\text{Re-EDTMP}$ の標識率は、98% 以上であったが、pH 3.1-3.3 では、塩化第一スズ濃度がおよそ十倍量の 2.85 mg/ml でようやく 97% ほどであった。したがって、本研究では、

0.57 及び 2.85 mg/ml の濃度でさらに実験を行った。

アミノメチレンリン酸誘導体の濃度依存性

EDTMP 濃度を 0.02 から 0.1 mmol/ml まで変化させて ^{188}Re -EDTMP 錯体の標識率を求めたところ、EDTMP 濃度の増加と共に、標識率は増加した。また、予備実験の結果から、EDTMP 濃度が低いと、白色沈殿が生成しやすい傾向が見られた。したがって、アミノメチレンリン酸誘導体の濃度は、0.1 mmol/ml に固定した。

pH 依存性

Fig. 3.3.4-3 に結果を示す。pH 3 以下の酸性領域において、高い標識率が得られたが、pH 3 を越えると急激に減少した。最適な pH は、0.7-0.8 であることが認められた。

反応温度

沸騰水中で 30 分反応させても、室温での反応に比べて標識率の増加は観察されなかった。しかしながら、後述するように反応温度は ^{188}Re -amp 錯体の安定性に影響を与えることがわかった。

担体添加の効果

ジェネレータ製無担体 ^{188}Re に、担体を加えた場合の影響を 0.02 mg Re/ml 濃度について調べた。 ^{188}Re -EDTMP 及び ^{188}Re -EDBMP 錯体に関しては、標識率に対する担体添加の効果は見られなかった。しかしながら、 ^{188}Re -NTMP 錯体に関しては、 ^{188}Re -二リン酸錯体 (^{188}Re -MDP 及び ^{188}Re -HEDP 錯体) の場合と同じく、担体を加えた場合の方が無担体の場合よりも高い標識率が得られた。ただし、担体を加えた場合でも、最適条件は無担体の場合と同じであった。

^{188}Re -amp 錯体の安定性

pH 変化及び生理食塩水による希釈に対する安定性を調べた。 ^{188}Re -amp 錯体の残存率は、pH が高くなるにつれて及び希釈率が大きくなるにつれて減少した。その減少の割合は、担体を含む錯体の方が無担体の錯体よりも小さく、担体を含む錯体の方が無担体の錯体よりも安定であることがわかった。さらに、 ^{188}Re -amp 錯体の生成条件—反応温度、pH、塩化第一スズ濃度—によって、錯体の安定性が異なることが認められた。担体を含む錯体の場合、沸騰水中で合成した ^{188}Re -amp 錯体の方が室温で合成した ^{188}Re -amp 錯体よりも安定であった。また、pH 0.8 で合成した方が pH 3 で合成したものよりも安定であった。しかしながら、無担体の錯体の場合は、異なる結果が得られた。無担体の ^{188}Re -EDBMP 及び ^{188}Re -NTMP 錯体の場合は、生成条件が異なってもその安定性に違いは見られなかった。しかしながら、 ^{188}Re -EDTMP 錯体だけは、無担体であっても生成条件によって安定性が異なった。結果を Fig. 3.3.4-4 に示す。0.57 mg/ml 塩化第一スズ濃度で沸騰水中で合成した ^{188}Re -EDTMP 錯体が最も安定であった。

3 種類の ^{188}Re -amp 錯体の安定性を比較すると、Fig. 3.3.4-5 及び Fig. 3.3.4-6 に示したように、 ^{188}Re -EDTMP 錯体が最も安定であり、続いて ^{188}Re -EDBMP 錯体、 ^{188}Re -NTMP 錯体の順であった。

4) まとめ

^{188}Re -amp 錯体合成の最適条件を以下に示す。

pH : 0.7 – 0.8、塩化第一スズ ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 濃度 : 0.57 mg/ml (^{188}Re -NTMP の場合は 2 mg/ml)、アスコルビン酸濃度 : 2.85 mg/ml、アミノメチレンリン酸濃度 : 0.1 mmol/ml、反応時間 : 沸騰水中で 30 分。無担体の ^{188}Re を用いた場合、上記最適条件下で、 ^{188}Re -EDTMP 及び ^{188}Re -EDBMP 錯体の標識率は 95%以上、 ^{188}Re -NTMP 錯体の標識率は 90%以上であった。担体を含む場合 (0.02 mg Re/ml) は、いずれの錯体の標識率も 95%以上であった。

参考文献

- 1) Hashimoto K.: "Proceedings of Second International Conference on Isotopes, October 12-16, 1997, Sydney, Australia", Paper 25/29.

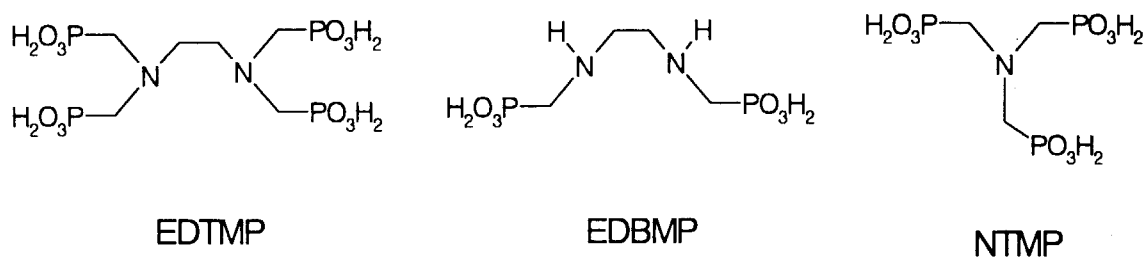


Fig. 3.3.4-1 Structures of the aminomethylenephosphonate ligands used in this study.

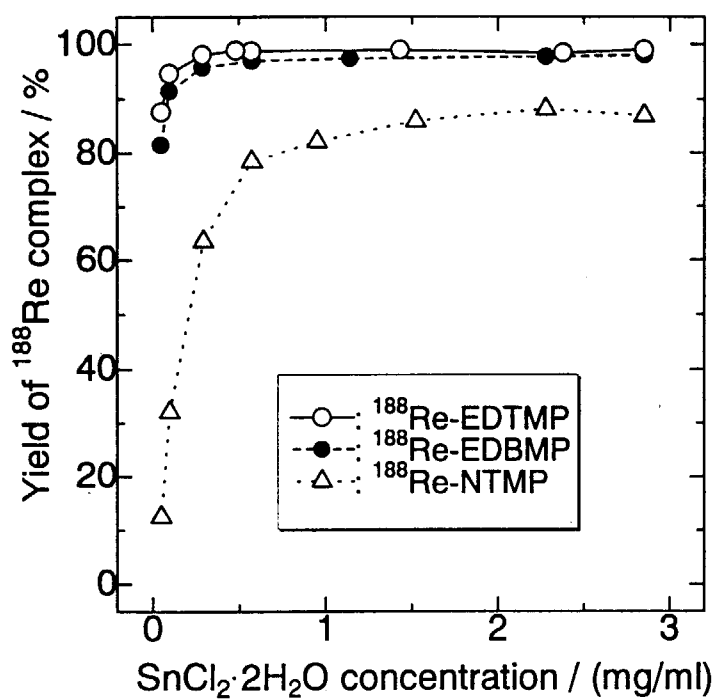


Fig. 3.3.4-2 Influence of the concentration of SnCl_2 on the yield of ^{188}Re -amp complex using carrier-free ^{188}Re (pH 0.8, room temp.).

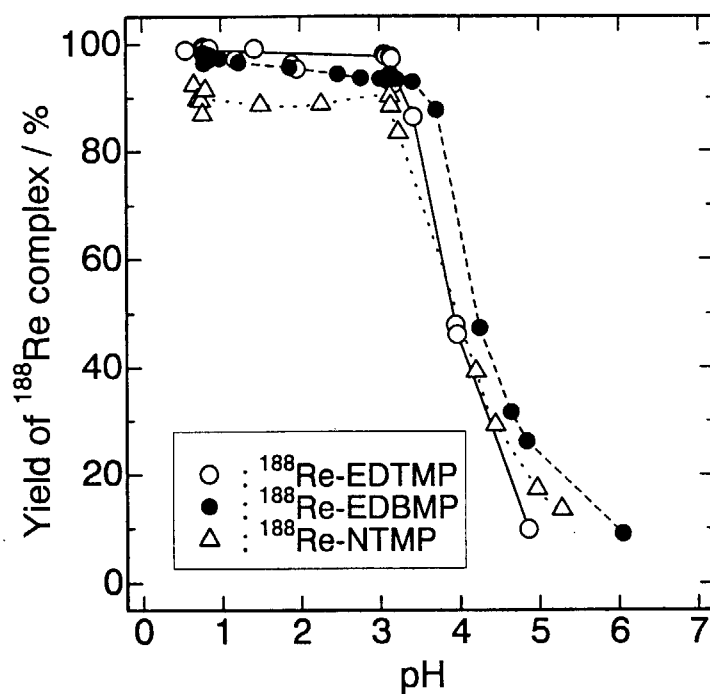


Fig. 3.3.4-3 Influence of pH on the yield of ^{188}Re -amp complex using carrier-free ^{188}Re ($[\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}] = 2.85 \text{ mg/ml}$, room temp.).

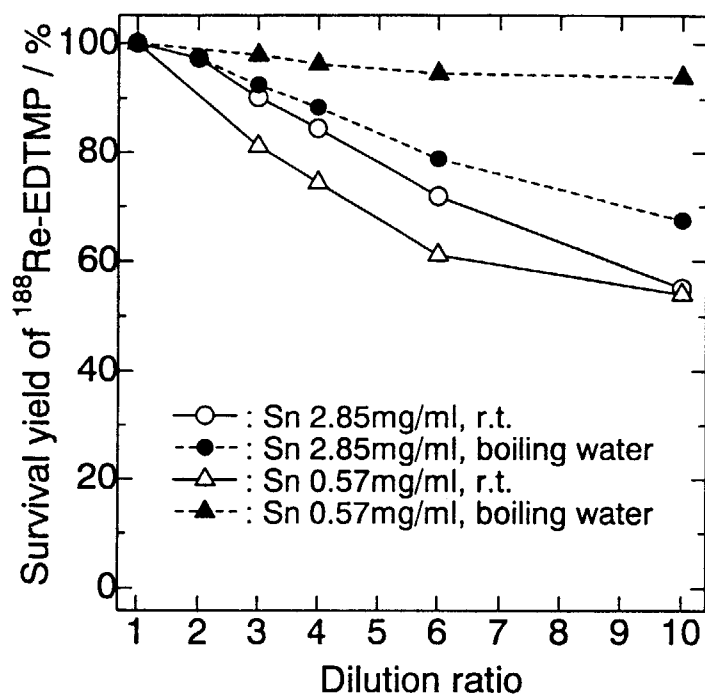


Fig. 3.3.4-4 Effect of dilution with saline on the stability of $^{188}\text{Re-EDTMP}$ at different formation conditions (pH 0.8).

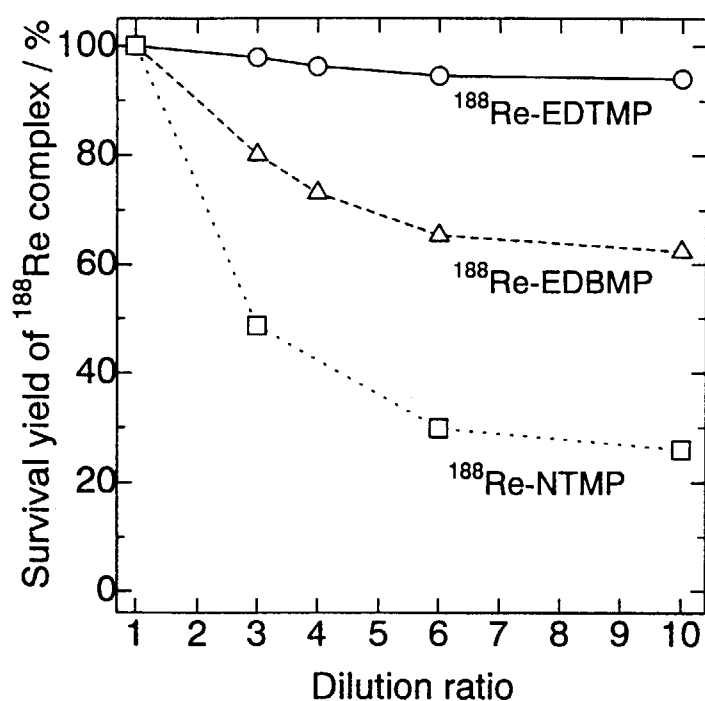


Fig. 3.3.4-5 Comparison of the stability of carrier-free ^{188}Re -amp complex (formation conditions: pH 0.8, $[\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}] = 0.57 \text{ mg/ml}$, in boiling water).

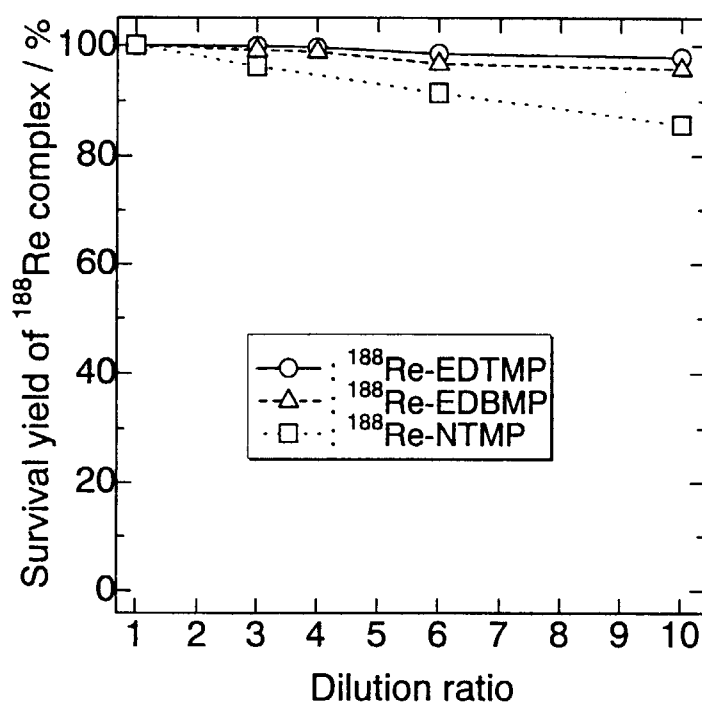


Fig. 3.3.4-6 Comparison of the stability of carrier-added ^{188}Re -amp complex (formation conditions: 0.02 mg Re/ml , pH 0.8, $[\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}] = 0.57 \text{ mg/ml}$, in boiling water).

3.3.5 DTPA

1) はじめに

DTPA (ジエチレントリアミン五酢酸) は、その ^{99m}Tc 標識化合物が腎シンチグラフィに広く臨床応用されている配位子である。また、DTPA から合成される cyclic DTPA anhydride (cDTPAA) は、抗体中のリジン残基のアミノ基及びチロシン残基の水酸基とのアシル化反応により直接抗体と結合することが可能である^{1,2)}。従って、cDTPAA は、 ^{99m}Tc 等の金属 R I を間接的に抗体に標識する方法で用いられる二官能性配位子として有効である。

そこで、本研究では、 $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ ジェネレータから得られる無担体の ^{188}Re を用いて、 ^{188}Re -DTPA 標識化合物の合成条件の検討を詳しく行い、その最適条件を決定すると共に、担体を含む場合との違いについて、比較検討した。

2) 実験

ジェネレータの調製

MDP の項 (3.3.1) と同じ。

^{188}Re -DTPA の合成

DTPA は、Aldrich 製を用い、2 M NaOH 2 ml に加熱溶解後、蒸留水を加えて 10 ml にして使用した。DTPA 標識キット (^{99m}Tc 用) は、第一ラジオアイソトープ研究所の製品 (1 バイアル中にジエチレントリアミン五酢酸 20 mg、塩化第一スズ (二水塩) 2.2 mg を含む) を用いた。塩化第一スズ ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) は、和光純薬製 0.38 g に 0.5 ml の濃塩酸を加えて溶解後、蒸留水を加えて 10 ml にして使用した。

標識実験は以下に示す手順で行った。バイアル瓶に DTPA 溶液、pH 調整用の溶液 (HCl, NaOH)、酸化防止剤水溶液 (アスコルビン酸、ゲンチシン酸、クエン酸)、塩化第一スズ溶液及び ^{188}Re 溶液を加え、0.5～6 時間室温で (または、沸騰水中 30 分間) 静置した。反応溶液の pH は、分析用試料を採取後、測定した。実験は、1 つのパラメータのみを変化させ、その他のパラメータは一定に保った。反応条件によっては、溶液が白濁することがあり、その場合は、分析の直前にろ過 ($0.22 \sim 0.45 \mu\text{m}$) した。 ^{188}Re -DTPA, $^{188}\text{ReO}_2$ および未反応の $^{188}\text{ReO}_4^-$ の各割合は、シリカゲル薄層クロマトグラフィー (Merck No.5735 / アセトン) 及びペーパークロマトグラフィー (Whatman No.1 / 0.9% NaCl 溶液) による分析から求めた。シリカゲル薄層シート及びクロマトペーパーは、乾燥後、イメージスキャナー (AMBIS-100) により ^{188}Re の放射能分布を求めた。各化学種の R_f 値を表 (次頁) に示す。

レニウム化学種の R_f 値

	TLC (Silica gel) / アセトン	Whatman No.1 / Saline
$^{188}\text{Re-DTPA}$	0	0.9 - 1
$^{188}\text{ReO}_2$	0	0
$^{188}\text{ReO}_4^-$	1	0.7 - 0.8

 $^{188}\text{Re-DTPA}$ の pH 変化及び希釈に対する安定性

最適条件下及び反応条件を変えて合成した $^{188}\text{Re-DTPA}$ 溶液 (2 ml) に酢酸ナトリウム水溶液または水酸化ナトリウム水溶液 (0.5 ml) を加えて溶液の pH を変化させ、1 時間後、TLC 及び PC によって分析を行った。変化前の標識率に対する変化後の標識率の割合 (残存率) を求めて、安定性を評価した。また、生理食塩水によって 2 倍～10 倍に希釈した場合についても、同様な実験を行った。

3) 結果及び考察

まず ^{99m}Tc で実用化されている方法と同じく市販の DTPA 標識キットに、 ^{188}Re 溶液 (生理食塩水) 1 ml を加え、よく振とう後、室温に 30 分間放置し反応させた結果、標識率は 8 % ほどであった。テクネチウムとは反応条件が異なることが認められた。そこで、試薬の DTPA を用い、塩化第一スズ濃度や pH 等の反応条件の検討を行った。

反応時間

pH 1.1、DTPA 濃度 13.2 mg/ml、塩化第一スズ濃度 1.98 mg/ml の条件で、室温において、反応時間を 1～6 時間に変えて、 $^{188}\text{Re-DTPA}$ 錯体の標識率の変化を調べた。その結果、反応時間に伴って標識率は増加し、4 時間で最大値を示した。一方、pH 2.9 の条件で調べたところ、4 時間での標識率 (16%) より 6 時間での標識率 (19%) の方が高かったが、大きな差ではなかった。従って、室温での反応時間は 4 時間に固定した。

酸化防止剤の効果

酸化防止剤としてアスコルビン酸、ゲンチシン酸およびクエン酸を添加して (0.5 mg/ml) 調べた。室温及び沸騰水中で調べたが、酸化防止剤の効果は認められなかった。さらに、アスコルビン酸の濃度を 50 mg/ml まで変化させたが、効果はなかった。

塩化第一スズ濃度依存性

塩化第一スズ濃度を 0.066～4.0 mg/ml まで変化させて標識率の変化を調べた。結果を Fig. 3.3.5-1 に示す。塩化第一スズ濃度が増加するにつれて標識率も高くなり、2 mg/ml 以上で一定値を示した。

pH 依存性

塩化第一スズ濃度 1.98 mg/ml、DTPA 濃度 26.4 mg/ml で、反応溶液の pH を 0.5～9 に変化させて、室温での標識率の変化を観察した。その結果を Fig. 3.3.5-2 に示す。pH 0.8～1.2 で、標識率がほぼ 95% と一定値を示した。しかしながら、pH 1.2 以上では、急

激に標識率が減少し、中性及びアルカリ領域では標識率はほとんど0であった。

DTPA 濃度依存性

塩化第一スズ濃度 1.98 mg/ml、pH 0.91- 1.1 で、DTPA 濃度を 2.6~52 mg/ml (0.0066~0.132 mmol/ml) まで変化させて、標識率の変化を調べた。DTPA 濃度が増加するにつれて標識率も高くなったが、26.5 mg/ml 以上で一定値を示した。従って、DTPA 濃度は、26.5 mg/ml (0.0674 mmol/ml) で固定した。

反応温度

室温4時間と沸騰水中 30 分の反応で比較したところ、無担体及び担体を添加した場合ともに、沸騰水中での反応の方が標識率が数パーセント高かった。

担体添加の効果

担体として NH_4ReO_4 を用い、濃度は 0.02 及び 0.2 mgRe/ml について検討した。その結果、無担体の場合の標識率と比較して、大きな差は観察されなかった。

^{188}Re -DTPA 錯体の安定性

まず、沸騰水中で 30 分反応させた後、室温で反応溶液を放置した場合の標識率の変化を 24 時間にわたり調べた。その結果、6時間までは、標識率の減少は、認められなかった(95%以上)。24 時間後では、わずかに標識率の減少が観察され、92-93%程度の標識率になった。

次に、pH 変化及び生理食塩水による希釈に対する安定性を調べた。 ^{188}Re -DTPA 錯体の残存率は、pH が高くなるにつれて減少し、無担体の場合、pH 4 付近で残存率が 65%程度、pH 7 付近で 10%程度であった。担体を含む場合は (0.2 mgRe/ml)、pH 4 付近で残存率が 80%程度、pH 7 付近で 65%程度であった。従って、担体を含む錯体の方が無担体の錯体よりも残存率減少の割合が小さく、担体を含む錯体の方が無担体の錯体よりも安定であることがわかった。また、生理食塩水による希釈に対する安定性に関しても、同様な結果が得られた。さらに、担体を含む ^{188}Re -DTPA 錯体の場合、その生成条件-反応温度-によって、錯体の安定性が異なることが認められた。担体を含む錯体の場合、沸騰水中で合成した ^{188}Re -DTPA 錯体の方が室温で合成した ^{188}Re -DTPA 錯体よりも安定であった。0.2 mgRe/ml の場合、pH 7 付近では、室温合成錯体の残存率は、65%程度であるが、沸騰水中で合成した錯体の残存率は、80%程度であった。無担体の場合は、生成温度が異なってもその安定性に違いは見られなかった。

4) まとめ

^{188}Re -DTPA 錯体合成の最適条件を以下に示す。

pH: 0.8-1.2、塩化第一スズ ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 濃度: 2.0 mg/ml、DTPA 濃度: 26.4 mg/ml (0.0674 mmol/ml)、反応時間: 沸騰水中で 30 分。無担体の ^{188}Re を用いた場合及び担体を含む場合 (0.02 及び 0.2 mg Re/ml) 共に、上記最適条件下で、 ^{188}Re -DTPA 錯体の標識率は 95%以上であった。

参考文献

- 1) Paik C. H., Ebbert M. A., Murphy P. R., Lassman C. R., Reba R. C., Eckelman W. C., Pak K. Y., Powe J., Steplewski Z. and Koprowski H., J. Nucl. Med. 24, 1158 (1983).
- 2) Quadri S. M. and Wessels B. W., Nucl. Med. Biol. 13, 447 (1986).

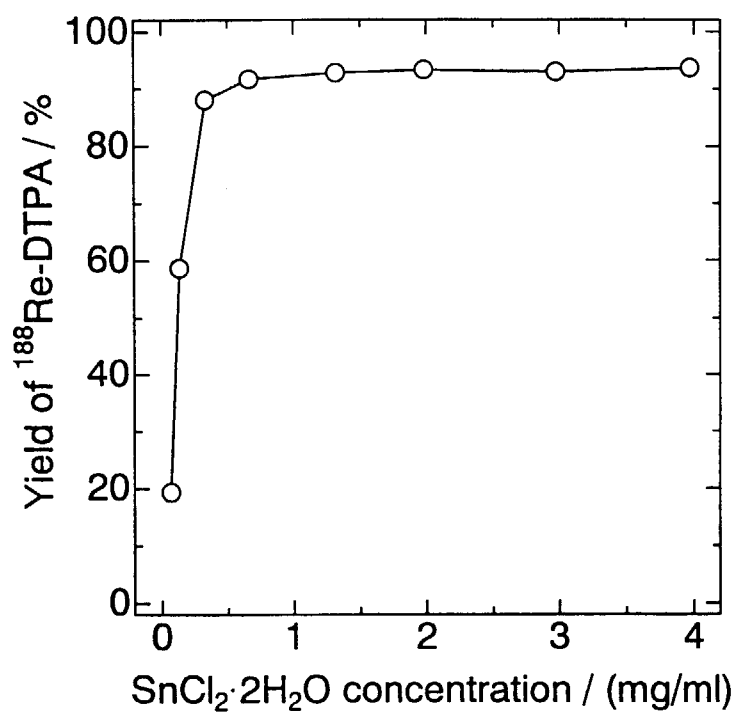


Fig. 3.3.5-1 Influence of the concentration of SnCl₂ on the yield of ¹⁸⁸Re-DTPA using carrier-free ¹⁸⁸Re (pH 0.77-0.91, [DTPA]=26.4 mg/ml).

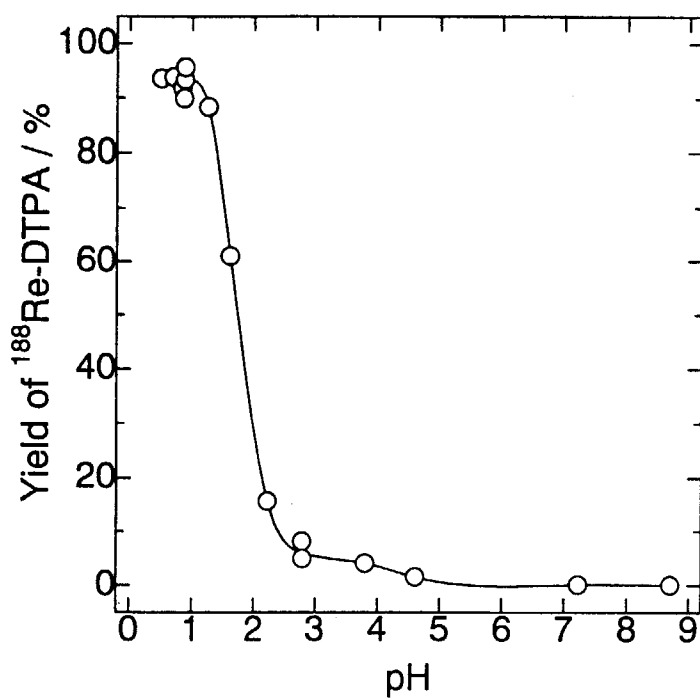


Fig. 3.3.5-2 Influence of pH on the yield of ¹⁸⁸Re-DTPA using carrier-free ¹⁸⁸Re ([DTPA]=26.4 mg/ml, [SnCl₂·2H₂O]=1.98 mg/ml).

3.3.6 モノクローナル抗体

(1) ^{188}Re を用いた $\text{MAG}_3\text{-IgG}$ 標識

1) はじめに

モノクローナル抗体はその生体特異性により癌などの疾患に選択的に取り込まれる性質がある。従って、その R I 標識体を各種疾患の診断 (radioimmunodetection, RAID) あるいは治療 (radioimmunotherapy, RAIT) に利用することができる。診断用に最適な R I として $^{99\text{m}}\text{Tc}$ が最も広く利用されているが、その同族元素であるレニウムの R I は RAIT 用に有望視されている。

$^{99\text{m}}\text{Tc}$ を抗体に標識するキレート物質の一つに N-[N-[N-[(benzoylthio)acetyl]glycyl]glycyl]glycine すなわち MAG_3 があり、これを ^{186}Re の標識に適用する実験も進められてきた¹⁻⁴⁾。この場合、標識には強アルカリ性あるいは高温などの条件が必要となるが、近年さらに有用なキレート物質である NHS- MAG_3 すなわち N-hydroxysuccinimide derivative of MAG_3 の簡便な合成法が開発され、これを用いることにより Hnatowich らは室温、中性付近の pH で $^{99\text{m}}\text{Tc}$ の抗体標識に成功した⁵⁾。

今回この NHS- MAG_3 を ^{188}Re の標識に適用し、標識の最適条件などについて調べたので以下に報告する⁶⁾。

2) 実験

実験で使用した ^{188}Re は、原研で製造した数 MBq レベルの $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ ジェネレータからその都度容離して用いた。また標識実験には以下のような分析用特級試薬を用いた。すなわち、塩化スズ ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)、酒石酸ナトリウム ($\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)、グルコン酸ナトリウム ($\text{NaC}_6\text{H}_{11}\text{O}_7$)、炭酸水素ナトリウム (NaHCO_3)、酢酸アンモニウム ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$)、ジメチルスルホン (DMSO)、マウス IgG、ジエチレントリアミン五酢酸 (DTPA)、モレキュラーシーブ (0.4 nm)、セファデックス G-50 などである。

今回使用した NHS- MAG_3 は Dr.D.J.Hnatowich (Univ. of Massachusetts) から提供されたものを用いた。この NHS- MAG_3 を用いたモノクローナル抗体の ^{188}Re 標識は間接標識法であるが、その手順を Fig. 3.3.6(1)-1 に示す。

3) 結果と考察

IgG と NHS- MAG_3 の結合および精製

始めに NHS- MAG_3 を DMSO 溶液中に濃度が 2.0 mg/ml となるように溶解した。マウス IgG は pH 8.5 の緩衝液で希釈して 5 mg/ml とした。

0.025 ml の IgG 溶液を NHS- MAG_3 /DMSO 溶液中に、そのモル比が MAG_3 : IgG=50:1 となるよう加えた。その溶液を攪拌し、室温で 30 分静置した。生成した $\text{MAG}_3\text{-IgG}$ は Sephadex G-50 のカラムを通して 0.2M 酢酸アンモニウム溶液、0.25 mM DTPA 溶液、さらに pH 5.2

の緩衝液で精製した。精製した NHS-MAG₃ は UV スペクトロメータで定量した (測定波長 280 nm)。カラムからの回収率は 70-80% であった。クロマトグラムの一例を Fig. 3.3.6(1)-2 に示す。

なお、生成した MAG₃-IgG の HPLC 分析によれば、標識の後でも IgG 分子はほぼ完全に原型を保ち、ほとんど分解が起きていないことが分かった。

¹⁸⁸Re によるグルコン酸の標識

グルコン酸 (GH) の標識は、0.9% 食塩水 0.23 ml 中 10-50 mg のグルコン酸ナトリウム、10% 酢酸 0.02 ml に 0.1-2.0 mg の SnCl₂・2H₂O、そして 0.2 ml の ¹⁸⁸Re 溶液を混合し、1 時間静置して行った。レニウム標識体とその他の成分は薄層クロマトグラム (0.9% 食塩水およびアセトン) により識別した。¹⁸⁸Re-GH の標識率と塩化スズ量の関係を Fig. 3.3.6(1)-3 に示す。また pH5-8 の範囲でその依存性も調べた。得られた最適標識条件は 0.9% 食塩水 0.2 ml 中にグルコン酸ナトリウム 10 mg、10% 酢酸 0.02 ml に 1 mg の SnCl₂・2H₂O、pH5、室温で 1 時間静置の時であった。

¹⁸⁸Re による MAG₃-IgG の標識

標識した ¹⁸⁸Re-GH 溶液に MAG₃-IgG を、塩化スズ (モル比は IgG:Sn=1:500) と共に加え、室温または 37°C で静置することにより、¹⁸⁸Re-MAG₃-IgG を得た。この時 pH は 0.5M 炭酸水素ナトリウム緩衝液により 7-9 に保った。標識率はアセトンおよび 0.9% 食塩水による薄層クロマトグラフィーにより調べた。

標識率と pH、静置時間、および温度の関係を Fig. 3.3.6(1)-4 および Fig. 3.3.6(1)-5 示す。pH 8.4、37°C で 19 時間静置したときに最も高い標識率 (約 38%) が得られた。しかしこれは ^{99m}Tc の場合に比べると低い標識率である。

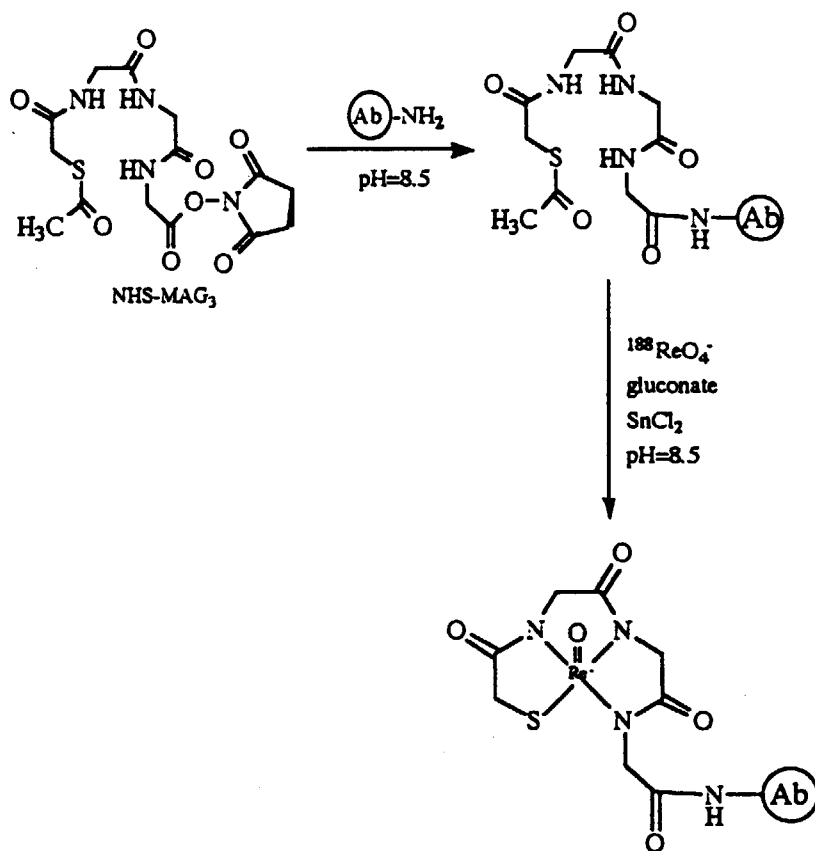
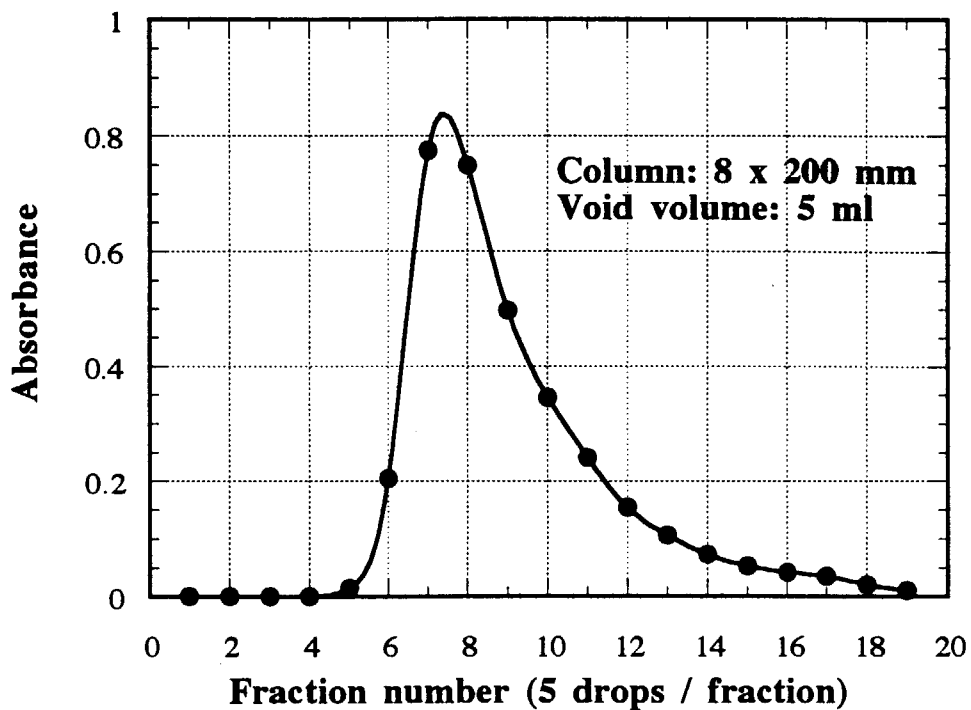
4) 結論

グルコン酸の ¹⁸⁸Re 標識は比較的高い標識率 (60%) が得られた。また NHS-MAG₃ と IgG との結合もよい結果が得られた。さらに ¹⁸⁸Re 標識グルコン酸をトランスキレート剤として用いることにより、¹⁸⁸Re-MAG₃-IgG を得ることができた。しかしその標識率は ^{99m}Tc の場合に比べると低く、また長時間を要した。したがって NHS-MAG₃ を用いる本手法を利用してレニウム標識モノクローナル抗体を医療用に応用するには、さらに検討を重ね、もっと短時間で高い標識率を得る条件を探す必要があろう。

参考文献

- 1) Goldrosen M. H. et al., Cancer Res., **50**, 7973-7978 (1990).
- 2) Visser W. M. et al., J. Nucl. Med., **34**, 1953-1963 (1993).
- 3) Siya R. et al., Cancer, **73**, 769-773 (1994).
- 4) van Gog F. B. et al., J. Nucl. Med., **37**, 352-362 (1996).

- 5) Hnatowich D. J. et al., J. Label. Comp. Radiopharma, 37, 330-331 (1996).
- 6) Du J. and Kushita K., private communication (1996).

Fig. 3-3-6(1)-1 Schematic representation of synthesis of $^{188}\text{Re-MAG}_3\text{-IgG}$.Fig. 3-3-6(1)-2 Chromatogram of IgG-MAG_3 with 0.25 M NH_4Ac , 0.25mM DTPA (pH 5.2) by Sephadex G-50.

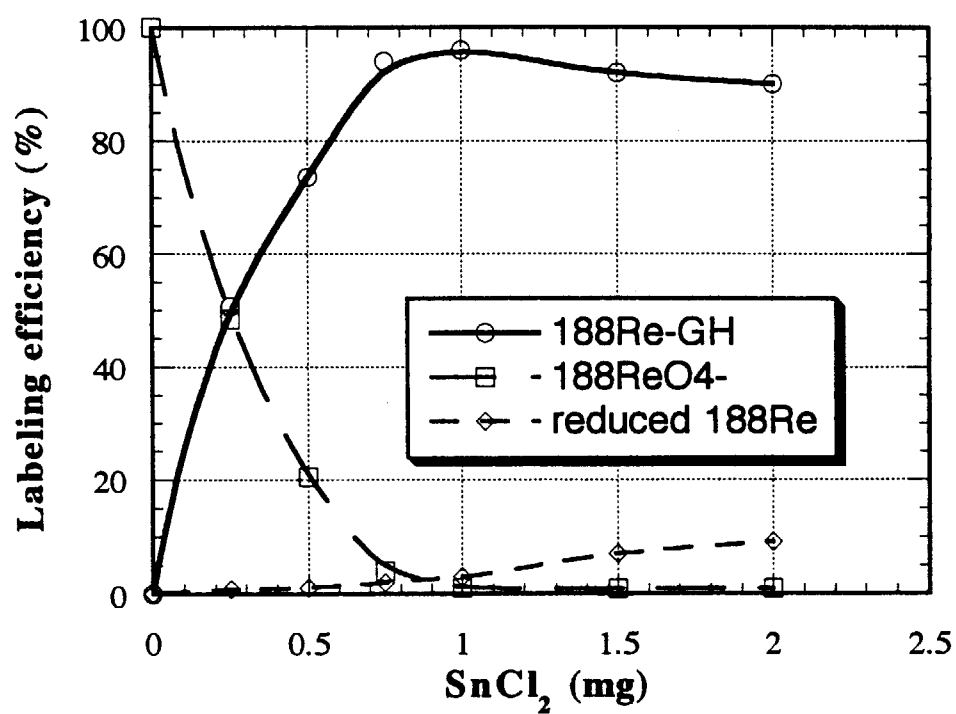


Fig. 3-3-6(1)-3 Effect of the mass of SnCl_2 on the labeling efficiency ^{188}Re -gluconate.

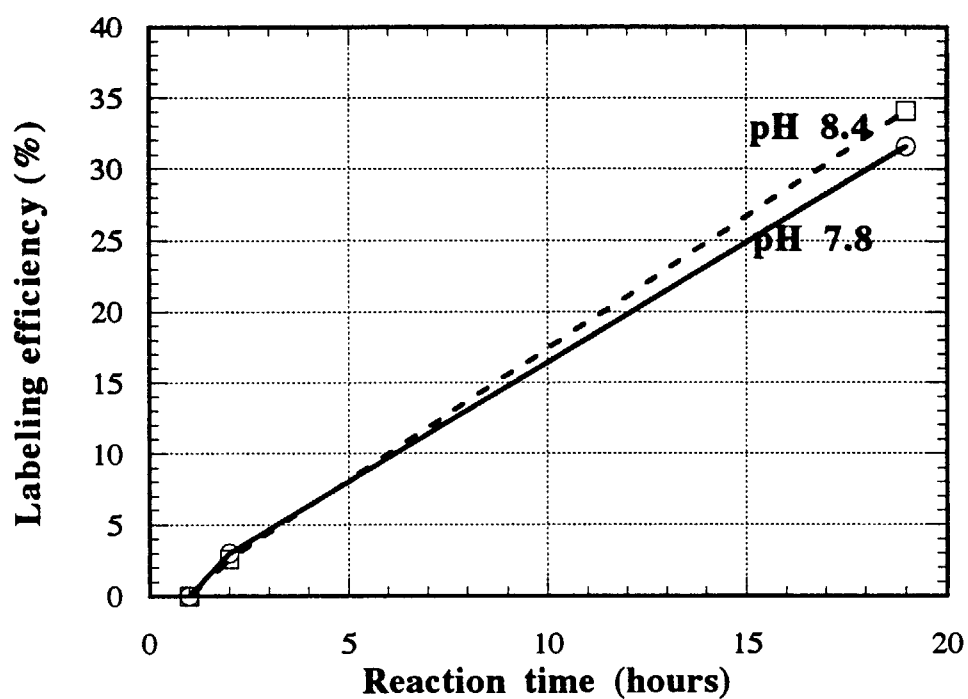


Fig. 3-3-6(1)-4 Labeling efficiency of $^{188}\text{Re-MAG}_3\text{-IgG}$ as a function of incubation time and pH (at RT).

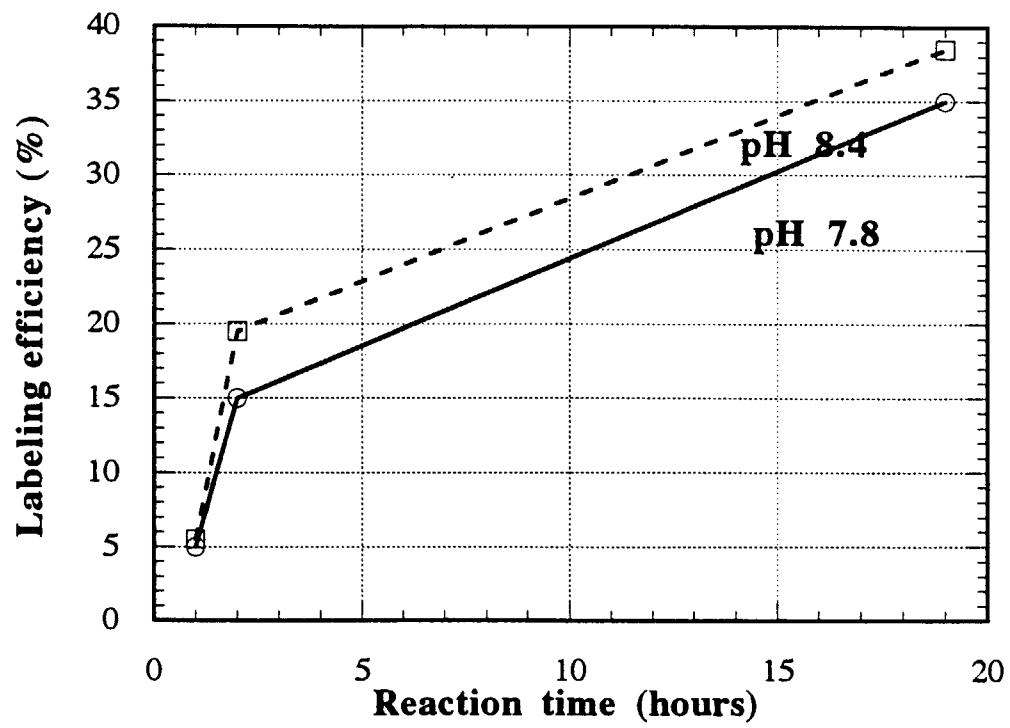


Fig. 3-3-6(1)-5 Labeling efficiency of $^{188}\text{Re-MAG}_3\text{-IgG}$ as a function of incubation time and pH (at 37°C).

(2) HEDP を用いたモノクローナル抗体及びそのフラグメントの ^{188}Re 標識¹⁾

1) はじめに

^{188}Re 等金属 R I による抗体標識法は、大きく 2 つに分類される。1 つは、2 官能性配位子を用いることにより、 ^{188}Re と抗体を間接的に結合させる方法である（間接法）。もう 1 つは、抗体に存在するジスルフィド結合（ $-\text{S}-\text{S}-$ ）を還元することにより生成するメルカプト基（ $-\text{SH}$ ）を介して、直接 ^{188}Re と結合させる方法である（直接法）。直接法の利点は、キット化が容易なことである。そこで、本研究では、Weak competing ligand を用いた直接法による ^{188}Re のモノクローナル抗体及びその $\text{F}(\text{ab})_2$ フラグメント標識について検討を行った。Weak competing ligand として、HEDP を用いた。標識条件として、pH、温度、配位子濃度、レニウムの還元剤である塩化第一スズ濃度等の標識率に対する影響を詳しく調べた。

2) 実験

試薬

モノクローナル抗体は、CIMAB (Center of Molecular Investigations, Havana, Cuba) 製の Monoclonal antibody murine IgG1 IOR CEA1 against carcinoembryonic antigen を用いた。標識条件の検討には、SIGMA 製の polyclonal rabbit immunoglobulin (IgG) を用いた。HEDP は、Chameleon Chemical Reagent 製、 $\text{F}(\text{ab})_2$ フラグメント調製キットは、塩化第一スズ及び 2-メルカプトエタノールは、和光純薬製、MDP 及びヒトアルブミンは、SIGMA 製を用いた。

ジェネレータの調製

MDP の項 (3.3.1) と同じ。

 $\text{F}(\text{ab})_2$ フラグメントの調製

$\text{F}(\text{ab})_2$ フラグメントは、PIERCE Chemical Co. 製のキットを用い、ペプシンの digestion によって調製した。10 mg の抗体溶液 (1.5 ml 20 mM 酢酸ナトリウムバッファ pH 4.5) に、0.125 ml のペプシン固定ゲルを加え、37℃の水浴中にて 18 時間振とうさせた。溶液 ($\text{F}(\text{ab})_2$ 、Fc フラグメント及び未反応の IgG を含む) とペプシン固定ゲルを専用分離器によって分離し、さらに、ゲルを 1.5 ml の 0.1% disodium EDTA 溶液 (pH 8.0) で洗浄し、その洗浄液を最初に分離した溶液と混合した。この溶液を附属の Protein A カラム (0.1% disodium EDTA 溶液 (pH 8.0) で前処理したもの) にチャージし、0.1% disodium EDTA 溶液 (pH 8.0) で溶離し、9 ml を分取した。この溶離液を、Waters 製 ProteinPack 300SW ゲルろ過カラム (0.1 M リン酸バッファ pH 7.4) により精製した。溶出液の蛋白質濃度は、UV 280 nm によって求めた。この溶液を凍結乾燥し、最終濃度が約 5 mg/ml になるように蒸留水を加えた。

抗体の還元（メルカプト基の生成）

抗体（5 mg/ml リン酸バッファ）は、1 mg 当たり 0.5 μ l の 2-メルカプトエタノール（2-ME と抗体のモル比は 1074:1）によって、還元した。この溶液を室温で 30 分攪拌し、ProteinPack 300SW ゲルろ過カラム（0.1 M リン酸バッファ pH 7.4）により精製した。本 HPLC システムにおける保持時間は、7.5-8.5（抗体）、9-10（F(ab')₂ フラグメント）及び 12.4 $\pm$ 0.3 分（2-ME）であった。0.05 M 酢酸バッファ（pH 4）を移動相に用いた場合は、抗体及び F(ab')₂ フラグメントの保持時間は 1.5-2 分増加した。HPLC カラムにより分取した還元抗体の濃度は約 1.0-1.2 mg/ml であった。

¹⁸⁸Re 標識抗体の合成

既知量の HEDP と 5 mg のゲンチシン酸を 0.5 ml の塩化第一スズ溶液（0.6 M HCl 溶液）に溶解した。その溶液を 6 M NaOH で中和し、そこへ 1.0 ml の還元抗体溶液（1.0 mg/ml 0.1 M リン酸バッファまたは 0.05 M 酢酸バッファ）及び 1.5 ml の ¹⁸⁸Re 溶液（3M HCl 溶液により pH を約 2 に調整）を加えた。溶液の pH を 1 M HCl で規定値に調整後、室温または 37℃ の水浴中で反応させた。各化学種（¹⁸⁸Re-antibody, ¹⁸⁸Re-HEDP, ¹⁸⁸ReO₄⁻ 及び ¹⁸⁸ReO₂）の放射化学的収率を、TLC 法により反応時間 15 分から 24 時間にわたり測定し、各化学種の割合の時間変化を求めた。

反応パラメータの検討

反応パラメータとしては、塩化第一スズ濃度（0.88, 1.76, 3.52, 7.04 及び 10.56 mM）、HEDP 濃度（30, 60, 90 及び 120 mM）、pH（3, 4 及び 5）、温度（室温または 37℃）、反応時間（30 分～24 時間）及び抗体の型（IgG, MoAb または F(ab')₂ フラグメント）について検討した。一度に 1 つのパラメータを変化させた。また、HEDP の代わりに MDP を用いた実験も行った。

放射化学的収率の決定

標識抗体の収率は、インスタント薄層クロマトグラフィー（ITLC）及び HPLC の併用によって求めた。

（A）ITLC-SG（Gelman Science）分析法

ITLC-SG（Gelman Science）を用いた場合の各化学種の R_f 値を表（次ページ）に示す。ITLC-SG（HSA）は、ITLC 片（1 $\times$ 10 cm）をヒトアルブミン 5mg/ml の生理食塩水溶液に室温で 30 分間浸した。その片を蒸留水で軽く洗浄後、6 時間風乾させた。ITLC-SG（HSA）は、1 週間以内に使用した。ITLC-SG における ¹⁸⁸Re の分布は、ITLC 片を上部及び下部に分け、それぞれの放射能を GM カウンターで測定した。または、ITLC 片全体を放射能イメージングシステム（AMBIS-100）により画像化し、放射能分布を求めた。

レニウム化学種の R_f 値

支持体 溶媒	ITLC-SG 0.9% NaCl	ITLC-SG アセトン	ITLC-SG (HAS) NH ₄ OH:ethanol:H ₂ O (1:2:5)
$^{188}\text{ReO}_4^-$	0.9 – 1.0	0.9 – 1.0	0.9 – 1.0
$^{188}\text{ReO}_2$	0.0	0.0	0.0
^{188}Re -Antibody	0.0	0.0	0.5 – 1.0
^{188}Re -HEDP	0.9 – 1.0	0.0	0.9 – 1.0

(B) HPLC 分析法

ProteinPack 300SW ゲルろ過カラムを用い、溶離液として 0.1M リン酸バッファ (pH 7.4) を使用し、流速 1.0 ml/min で分析した。放射能 (GM カウンター) と 280nm UV 吸収により、モニターした。

$^{188}\text{ReO}_2$ コロイドの量を評価するために、HPLC カラムからの回収率を求めた。HPLC カラムへ注入する前の放射能と溶出後の放射能を比較し、減少分を $^{188}\text{ReO}_2$ コロイドと見なした。放射能は高純度ゲルマニウム半導体検出器で測定した。

標識抗体の安定性

^{188}Re 標識抗体の安定性は、1050 倍量のヒトアルブミンを含む場合 (pH 7)、pH 7 (0.1 M リン酸バッファ)、pH 3 及び pH 10 (0.1 M 重炭酸ナトリウム溶液で 20 倍希釈) で室温放置した場合について、30 分から 24 時間にわたり調べた。

3) 結果及び考察

反応溶液中に存在する 4 種の化学種 (^{188}Re -antibody, ^{188}Re -HEDP, $^{188}\text{ReO}_4^-$ 及び $^{188}\text{ReO}_2$) の割合の時間変化の一例を Fig. 3.3.6(2)-1 に示す。 ^{188}Re -HEDP の割合が反応開始直後から増加し、少し遅れて、 ^{188}Re -antibody の割合が増加してくるのがわかる。その後、 ^{188}Re -HEDP の割合は、ピークを迎え、減少した。一方、 ^{188}Re -antibody の割合は、時間と共に増加した。以下、反応パラメータについて検討した。

Weak competing ligand 濃度

HEDP 濃度を 30~120 mM まで変化させて収率の変化を調べた。その結果、 $^{188}\text{ReO}_4^-$ の減少速度は HEDP 濃度の増加に伴って増加した。さらに、HEDP 濃度が増加しても、最終反応溶液中の ^{188}Re -HEDP 錯体の収率は無視できる程度であった。また、HEDP の代わりに MDP を用いた場合は、5 時間後でも ^{188}Re 標識抗体の収率は 5 % ほどであった。

温度

反応温度について、室温 (18-22℃) 及び 37℃ で比較を行った。抗体標識は室温で十分行えるが、37℃ で行くと反応速度が速くなり反応時間を少し短縮できる。レニウムの還元反応速度は、温度上昇によっても変化無かったが、配位子交換反応 (抗体とレニウムの

結合反応)速度は、速くなり、反応時間を減少できることがわかった。

pH 及び塩化第一スズ濃度

Fig. 3.3.6(2)-2 に pH 3, 4 及び 5 における標識抗体の収率の時間変化を示した。pH が低くなるほど標識反応速度は速くなることがわかった。pH 3 においては、1 時間以内で標識率 97%以上であったが、pH 4 では、5 時間を要した。さらに、pH 5 では、5 時間でも標識率は 30%程度であった。

一方、抗体標識率は、塩化第一スズ濃度が増加するにつれて増加することが明らかになった。しかし、塩化第一スズ濃度が 10.56 mM の場合は、白色沈殿が生じた。Table 3.3.6(2)-1 に高標識率を得るための反応条件をまとめた。pH 5 において、塩化第一スズ濃度が 7.04 mM の場合、18-22 時間反応させると標識率が 97%であった。pH 3 において標識率 97% (18-22 時間)を得ることができる塩化第一スズ濃度が 0.88 mM であるから、pH 5 では、pH 3 の場合の約 8 倍の塩化第一スズ濃度が必要である。また、pH 3、1.76 mM 塩化第一スズ、37°C の場合、1-2 時間の反応時間で 97%の標識率が得られた。

抗体の型

抗体の型の違いによる標識率の時間変化 (pH 3) を Fig. 3.3.6(2)-3 に示した。pH 3 において、標識の反応速度は、モノクローナル抗体 > ポリクローナル抗体 (IgG) > F(ab')₂ フラグメントの順で減少したが、最終的な標識率は 3 種とも同じであった。pH 4 においては、ほぼ同じ傾向が得られたが、pH 5 においては、モノクローナル抗体の標識速度は、ポリクローナル抗体の標識速度よりも遅い結果であった。これらの結果を説明するのは容易ではないが、抗体上に存在するメルカプト基 (-SH) とレニウムイオンとの位置関係が抗体の型や pH によって影響を受けているためであると考えられる。

標識抗体の安定性

Fig. 3.3.6(2)-4 に安定性の結果を示す。¹⁸⁸Re-IgG は、中性及びアルカリ領域では不安定であることがわかった。¹⁸⁸Re-IgG からの ¹⁸⁸Re の解離は、pH 7, 24 時間後で 30%程度、pH 10, 2 時間後で 80%程度であった。pH 3 では、24 時間後でも ¹⁸⁸Re の解離はほとんど認められなかった。さらに、pH 7 でも、ヒトアルブミンが存在する場合は、¹⁸⁸Re-IgG は安定であり、24 時間後でも ¹⁸⁸Re の解離は、10%以下であった。この結果は、他の研究者の結果²⁻⁴⁾とも一致している。

4) まとめ

Table 3.3.6(2)-1 にまとめたように、これらの反応条件により、ポリクローナル抗体 (IgG)、モノクローナル抗体 (IOR CEA1) 及び F(ab')₂ フラグメントいずれの場合にも、無担体 ¹⁸⁸Re による標識率が 95%以上を達成した。しかしながら、標識抗体の immunoreactivity を調べる必要がある。

参考文献

- 1) Ferro-Flores G. and Hashimoto K., Radiochim. Acta, in press.
- 2) Griffith G. L., Goldenberg D. M., Jones A. L. and Hansen H. J., Cancer Res. 51, 4594 (1991).
- 3) Schmidt F., S. Smith S. V. and Bundesen P., J. Labell. Comp. Radiopharm. 36, 533 (1995).
- 4) Rhodes B. A., Lambert C. R., Marek M. J., Knapp F. F. and Harvey E. B., Appl. Radiat. Isot. 47, 7 (1996).

Table 3.3.6(2)-1 Different formulations and reaction conditions to obtain ^{188}Re labeled antibodies in high radiochemical yields using HEDP as a weak competing ligand

Antibody	[SnCl ₂], mM (mg/ml)	[HEDP], mM (mg/ml)	pH	Labeling Time (h)	Temp. (°C)	Yield of ^{188}Re -IgG + $^{188}\text{ReO}_2$ (%)*
Polyclonal IgG	0.88 (0.17)	30 (6.25)	3	18-22	22	98
Polyclonal IgG	1.76 (0.33)	90 (18.5)	3	2	37	95
Polyclonal IgG	3.52 (0.66)	60 (12.5)	3	2	22	97
Polyclonal IgG	3.52 (0.66)	60 (12.5)	3	2	37	99
Polyclonal IgG	3.52 (0.66)	120 (25)	3	0.5	37	97
Polyclonal IgG	3.52 (0.66)	120 (25)	3	1	37	99
Polyclonal IgG	3.52 (0.66)	120 (25)	4	5	22	95
Polyclonal IgG	3.52 (0.66)	120 (25)	4	4	37	97
Polyclonal IgG	7.04 (1.32)	120 (25)	4	3	22	96
Polyclonal IgG	7.04 (1.32)	120 (25)	4	2	37	97.5
Polyclonal IgG	7.04 (1.32)	120 (25)	4	3	37	98.5
Polyclonal IgG	7.04 (1.32)	120 (25)	5	18-22	22	97
MoAb	1.76 (0.33)	60 (12.5)	3	2	22	97.5
MoAb	1.76 (0.33)	60 (12.5)	3	3	22	99
MoAb	3.52 (0.66)	120 (25)	3	1	22	98
MoAb	3.52 (0.66)	120 (25)	3	2	22	99
MoAb	3.52 (0.66)	120 (25)	3	0.5	37	98
MoAb	3.52 (0.66)	120 (25)	3	1	37	99
MoAb	3.52 (0.66)	120 (25)	4	5	37	97
F(ab') ₂	3.52 (0.66)	120 (25)	3	2	37	96

*The amount of $^{188}\text{ReO}_2$ determined by ITLC (HAS) strips and by HPLC recovery was less than 2.4% and less than 1.0%, respectively; n=35 for every data.

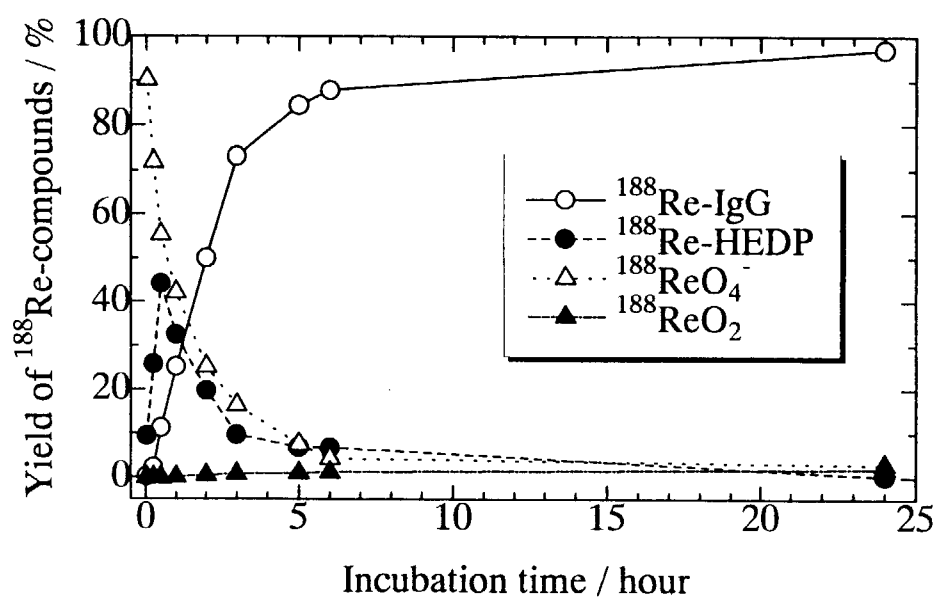


Fig. 3.3.6(2)-1 Kinetic behavior of the different radiochemical ^{188}Re -compounds involved during the synthesis of $^{188}\text{Re-IgG}$ at pH=5, 22°C ([SnCl_2]=7.4 mM, [HEDP]=120 mM).

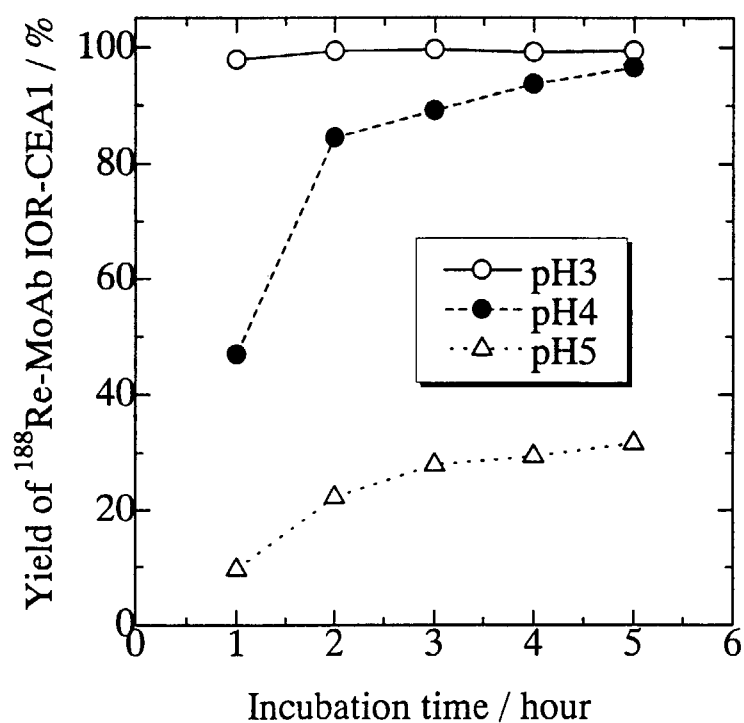


Fig. 3.3.6(2)-2 Influence of pH on MoAb IOR CEA1 labeling yield ([SnCl_2]=3.52 mM, [HEDP]=120 mM, 22°C).

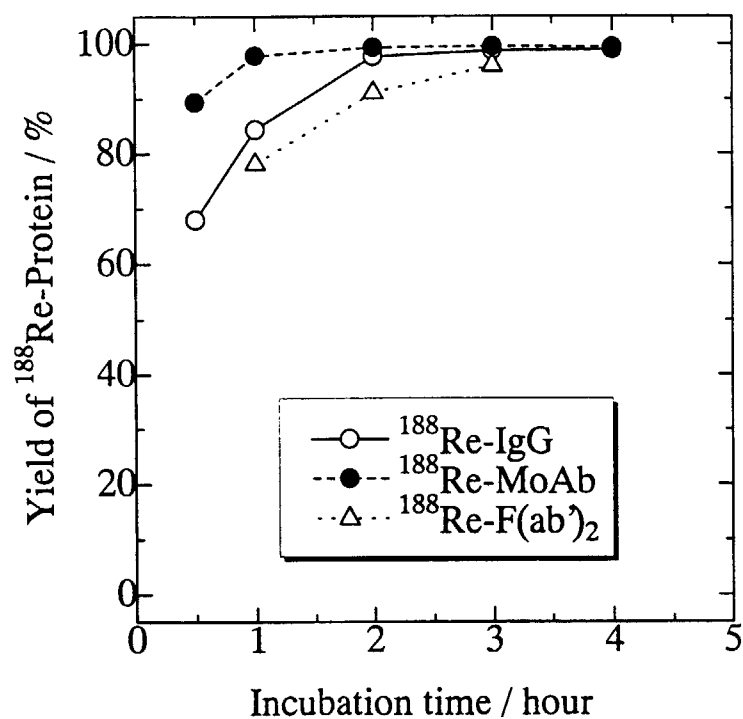


Fig. 3.3.6(2)-3 Effect of the type of antibody on the protein labeling yield at pH 3 ([SnCl₂]=3.52 mM, [HEDP]=120 mM, 22°C).

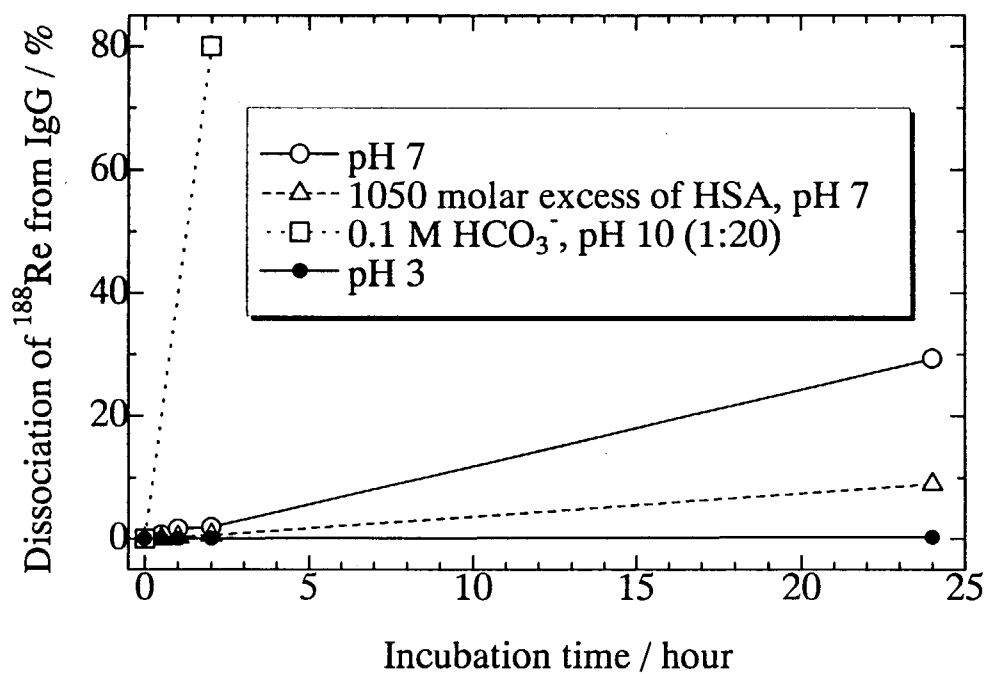


Fig. 3.3.6(2)-4 Stability of ^{188}Re -IgG complex.

4. 結語

原研東海研アイソトープ部及びアイソトープ研究委員会、製造・標識専門部会放射性レニウムに関する研究会では、がんの診断・治療のための医薬品の開発を目指して放射性レニウムの研究を、 ^{186}Re 及び ^{188}Re の製造・標識化合物の合成及びその体内動態と一環して進めてきた。平成9年度末には所期の目的を達成し、今後の一層の進展を期して研究を継続するが、ここに、これまでの成果を纏めて報告することとした。研究で得られた成果の要約は次の通りである。

原子炉による ^{186}Re 及び $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ ジェネレータの製造ならびに加速器を用いた $^{186}\text{W}(p,n)^{186}\text{Re}$ 反応による無担体 ^{186}Re の製造法を確立し、さらに、双子型熱伝導型カロリメータ及びチェレンコフ光を利用した放射能測定手法等を開発した。

HEDP の標識に関して、原子炉製 ^{186}Re 、無担体 ^{186}Re 及び無担体 ^{188}Re を用いて検討を行い、最適合成条件を決定すると共に、原子炉製 ^{186}Re -HEDP と無担体 ^{186}Re -HEDP の安定性の違いを明らかにした。原子炉製 ^{186}Re -HEDP のマウス体内動態に関しては、 ^{99m}Tc -HEDP、 ^{99m}Tc -HMDP の体内挙動と類似しており、骨集積性を示し、骨転移がんの疼痛緩和に期待が持てることを確認した。ただし、血中クリアランスは、やや遅く、胃への高い集積が観察された。

HMDP の標識に関して、原子炉製 ^{186}Re 及び無担体 ^{188}Re を用いて、その標識条件及び標識化合物の性質を精査した。マウス体内動態の実験では、 ^{186}Re -HMDP は骨集積性を示す ^{99m}Tc -HMDP と異なり、肝臓や脾臓に高い集積性を示した。この原因の一つとして、 ^{186}Re -HMDP が蛋白質や Ca との結合性が高いという性質が挙げられる。

パミドロン酸 (APD) の標識に関して、原子炉製 ^{186}Re を用いた標識条件及びマウス体内動態の研究を行った。 ^{186}Re -APD は、投与初期においては、腎臓、肝臓、膀胱への高い集積が見られるが、2時間後には骨への集積が一番高く、骨転移がんへの疼痛軽減の可能性を確認した。

MDP の標識に関して、無担体 ^{188}Re を用いて検討を行い、その最適標識条件を決定した。さらに、担体を含む場合と含まない場合での安定性の違いを明らかにした。

DMSA (DMS) の標識に関して、原子炉製 ^{186}Re 、無担体 ^{186}Re 及び無担体 ^{188}Re を用いて検討を行った。酸性条件で合成した ^{186}Re -DMSA のマウス体内動態の研究では、骨に集積することが認められ、胃への集積はあまり見られなかった。無担体 ^{188}Re -DMSA の体内分布も同様であった。一方、アルカリ性で合成した ^{186}Re -DMS (アルカリ条件で合成される DMSA 錯体を酸性条件で合成される錯体と区別するために、略号を変えた) のマウス体内分布は、 ^{99m}Tc -DMS との比較でほぼ類似した分布を示したが、腎臓への集積では相違点が見られた。これは、 ^{99m}Tc と ^{186}Re の濃度の差ではないかと推定した。

DADS の標識に関して、原子炉製 ^{186}Re を用いて、その基礎的な標識条件を検討した。その結果、DADS は、HEDP の存在下でも選択的に Re と錯体を形成し、その収率は、

反応溶液に適切な濃度の glucoheptanate の添加により、著しく増加することが明らかになった。

DTPA の標識に関して、原子炉製 ^{186}Re 及び無担体 ^{188}Re を用いて、その最適標識条件を決定した。さらに、その安定性について検討した。 ^{186}Re -DTPA のマウス体内動態の研究では、投与 10 分後から 1 時間後にかけて腎臓への集積が大幅に減少した。胃への集積は、1 時間後に最大になるが、 $^{186}\text{ReO}_4^-$ に分解したと考えられるほどの集積ではなかった。

アミノメチレンリン酸誘導体 (EDTMP, EDBMP 及び NTMP) の標識に関して、無担体 ^{188}Re を用いて検討を行い、その最適標識条件を決定した。さらに、その安定性について検討したところ、 ^{188}Re -EDTMP $>$ ^{188}Re -EDBMP $>$ ^{188}Re -NTMP の順で安定性が減少することが明らかになった。

モノクローナル抗体の標識に関して、原子炉製 ^{186}Re 及び無担体 ^{188}Re を用いて検討を行った。 ^{186}Re 標識モノクローナル抗体 (^{186}Re -MoAb17-1A) の合成において、直接還元法とキレート法 (MAG_3) による検討を進めたが、高収率での標識化は困難であった。C 10-Bz-EDTA を用いた ^{186}Re 標識抗体作成の予備的検討を諸条件下で進めたが、標識体は、得られなかった。また、 MAG_3 を用いた ZCE025 抗体の標識研究では、活性エステルの生成率は 85.0%を示し、抗体標識率は 22.8%と比較的低い値であったが、使用する抗体量の増加により向上できることを示唆した。一方、無担体 ^{188}Re を用いた抗体標識研究では、NHS- MAG_3 を用いた間接法によって、標識率約 38%を得た。また、HEDP を weak competing ligand として用いた直接法による ^{188}Re 標識モノクローナル抗体の合成研究においては、95%以上の標識率が得られた。しかしながら、安定性等の理由から、今後は、二官能性キレートを用いた間接法による抗体標識研究が重要であることの認識が得られた。

今後、医薬品として市販されるまでには、未だ、モノクローナル抗体など免疫学の進展、薬事承認、治療環境の整備、医師・術者・患者の被曝管理、廃棄物管理処理・処分、放射性治療薬品の診断・治療のみならず予防、ホスピス等としての人間の尊厳に係わる社会生活での共生等、多くの解決すべき課題がある。新しいがん治療用放射性医薬品の開発がこれらの課題解決と並行して進むよう努力を続けたい。ここでの成果がさらに有効なベータ核種、アルファ粒子放出核種での微弱放射能・高治療効果の方向へ進展すればバラ色の放射線治療の道が拓かれると確信している。また、キュリー夫妻によるラジウム発見 100 年の節目に本報告書を纏めることで、高齢化社会を迎える 21 世紀の QOL 向上を目指した新しい放射性治療医薬品の幕開けに役立てばと関係者一同期待を寄せている。

謝 辞

放射性レニウムを用いた標識化合物の合成研究にあたり、 ^{186}Re の運搬をお引き受けいただいた社団法人日本アイソトープ協会、HMDP及び標識キット MAG_3 をご提供いただいた日本メジフィジックス株式会社、モノクローナル抗体A7を提供下さいました京都府立医科大学第1外科、 ^{188}Re 標識化合物の動物実験に際してご協力をいただいた第一化学薬品株式会社東海研究所の諸氏に深謝いたします。また、放射性レニウムの原子炉照射でご協力いただいた研究炉部及び材料試験炉部、加速器照射では放射線高度利用センターの関係諸氏に深謝いたします。

This is a blank page.

国際単位系 (SI) と換算表

表 1 SI 基本単位および補助単位

量	名 称	記 号
長 さ	メ ー ト ル	m
質 量	キ ロ グ ラ ム	kg
時 間	秒	s
電 流	ア ン ペ ア	A
熱力学温度	ケ ル ビ ン	K
物 質 量	モ ル	mol
光 度	カ ン デ ラ	cd
平 面 角	ラ ジ ア ン	rad
立 体 角	ステラジアン	sr

表 3 固有の名称をもつ SI 組立単位

量	名 称	記号	他の SI 単位 による表現
周 波 数	ヘ ル ツ	Hz	s ⁻¹
力	ニ ュ ー ト ン	N	m·kg/s ²
圧 力, 応 力	パ ス カ ル	Pa	N/m ²
エネルギー, 仕事, 熱量	ジ ュ ー ル	J	N·m
工 率, 放 射 束	ワ ッ ト	W	J/s
電 気 量, 電 荷	ク ー ロ ン	C	A·s
電位, 電圧, 起電力	ボ ル ト	V	W/A
静 電 容 量	フ ェ ラ ド	F	C/V
電 気 抵 抗	オ ー ム	Ω	V/A
コンダクタンス	ジーメンズ	S	A/V
磁 束	ウ ェ ー バ	Wb	V·s
磁 束 密 度	テ ス ラ	T	Wb/m ²
インダクタンス	ヘ ン リ ー	H	Wb/A
セルシウス温度	セルシウス度	°C	
光 束	ル ー メ ン	lm	cd·sr
照 度	ル ク ス	lx	lm/m ²
放 射 能	ベ ク レ ル	Bq	s ⁻¹
吸 収 線 量	グ レ イ	Gy	J/kg
線 量 当 量	シーベル	Sv	J/kg

表 2 SI と併用される単位

名 称	記 号
分, 時, 日	min, h, d
度, 分, 秒	°, ', "
リ ッ ト ル	l, L
ト ン	t
電子ボルト	eV
原子質量単位	u

$$1 \text{ eV} = 1.60218 \times 10^{-19} \text{ J}$$

$$1 \text{ u} = 1.66054 \times 10^{-27} \text{ kg}$$

表 4 SI と共に暫定的に維持される単位

名 称	記 号
オングストローム	Å
バ ー ン	b
バ ー ル	bar
ガ ル	Gal
キ ュ リ ー	Ci
レ ン ト ゲ ン	R
ラ ド	rad
レ ム	rem

$$1 \text{ Å} = 0.1 \text{ nm} = 10^{-10} \text{ m}$$

$$1 \text{ b} = 100 \text{ fm} = 10^{-28} \text{ m}^2$$

$$1 \text{ bar} = 0.1 \text{ MPa} = 10^5 \text{ Pa}$$

$$1 \text{ Gal} = 1 \text{ cm/s}^2 = 10^{-2} \text{ m/s}^2$$

$$1 \text{ Ci} = 3.7 \times 10^{10} \text{ Bq}$$

$$1 \text{ R} = 2.58 \times 10^{-4} \text{ C/kg}$$

$$1 \text{ rad} = 1 \text{ cGy} = 10^{-2} \text{ Gy}$$

$$1 \text{ rem} = 1 \text{ cSv} = 10^{-2} \text{ Sv}$$

表 5 SI 接頭語

倍数	接頭語	記 号
10 ¹⁸	エ ク サ	E
10 ¹⁵	ペ タ	P
10 ¹²	テ ラ	T
10 ⁹	ギ ガ	G
10 ⁶	メ ガ	M
10 ³	キ ロ	k
10 ²	ヘ ク ト	h
10 ¹	デ カ	da
10 ⁻¹	デ シ	d
10 ⁻²	セ ン チ	c
10 ⁻³	ミ リ	m
10 ⁻⁶	マイク ロ	μ
10 ⁻⁹	ナ ノ	n
10 ⁻¹²	ピ コ	p
10 ⁻¹⁵	フ ェ ム ト	f
10 ⁻¹⁸	ア ト	a

(注)

- 表 1—5 は「国際単位系」第 5 版, 国際度量衡局 1985 年刊行による。ただし, 1 eV および 1 u の値は CODATA の 1986 年推奨値によった。
- 表 4 には海里, ノット, アール, ヘクタールも含まれているが日常の単位なのでここでは省略した。
- bar は, JIS では流体の圧力を表わす場合に限り表 2 のカテゴリーに分類されている。
- EC 閣僚理事会指令では bar, barn および「血圧の単位」mmHg を表 2 のカテゴリーに入れている。

換 算 表

力	N (=10 ⁵ dyn)	kgf	lbf
	1	0.101972	0.224809
	9.80665	1	2.20462
	4.44822	0.453592	1

$$\text{粘 度 } 1 \text{ Pa} \cdot \text{s} (\text{N} \cdot \text{s} / \text{m}^2) = 10 \text{ P (ポアズ)} (\text{g} / (\text{cm} \cdot \text{s}))$$

$$\text{動粘度 } 1 \text{ m}^2 / \text{s} = 10^4 \text{ St (ストークス)} (\text{cm}^2 / \text{s})$$

圧	MPa (=10 bar)	kgf/cm ²	atm	mmHg (Torr)	lbf/in ² (psi)
	1	10.1972	9.86923	7.50062 × 10 ³	145.038
力	0.0980665	1	0.967841	735.559	14.2233
	0.101325	1.03323	1	760	14.6959
	1.33322 × 10 ⁻⁴	1.35951 × 10 ⁻³	1.31579 × 10 ⁻³	1	1.93368 × 10 ⁻²
	6.89476 × 10 ⁻³	7.03070 × 10 ⁻²	6.80460 × 10 ⁻²	51.7149	1

エネルギー・仕事・熱量	J (=10 ⁷ erg)	kgf·m	kW·h	cal (計量法)	Btu	ft·lbf	eV
	1	0.101972	2.77778 × 10 ⁻⁷	0.238889	9.47813 × 10 ⁻⁴	0.737562	6.24150 × 10 ¹⁸
	9.80665	1	2.72407 × 10 ⁻⁶	2.34270	9.29487 × 10 ⁻³	7.23301	6.12082 × 10 ¹⁹
	3.6 × 10 ⁶	3.67098 × 10 ⁵	1	8.59999 × 10 ⁵	3412.13	2.65522 × 10 ⁶	2.24694 × 10 ²⁵
	4.18605	0.426858	1.16279 × 10 ⁻⁶	1	3.96759 × 10 ⁻³	3.08747	2.61272 × 10 ¹⁹
	1055.06	107.586	2.93072 × 10 ⁻⁴	252.042	1	778.172	6.58515 × 10 ²¹
	1.35582	0.138255	3.76616 × 10 ⁻⁷	0.323890	1.28506 × 10 ⁻³	1	8.46233 × 10 ¹⁸
	1.60218 × 10 ⁻¹⁹	1.63377 × 10 ⁻²⁰	4.45050 × 10 ⁻²⁶	3.82743 × 10 ⁻²⁰	1.51857 × 10 ⁻²²	1.18171 × 10 ⁻¹⁹	1

$$1 \text{ cal} = 4.18605 \text{ J (計量法)}$$

$$= 4.184 \text{ J (熱化学)}$$

$$= 4.1855 \text{ J (15 °C)}$$

$$= 4.1868 \text{ J (国際蒸気表)}$$

$$\text{仕事率 } 1 \text{ PS (仏馬力)}$$

$$= 75 \text{ kgf} \cdot \text{m/s}$$

$$= 735.499 \text{ W}$$

放射能	Bq	Ci
	1	2.70270 × 10 ⁻¹¹
	3.7 × 10 ¹⁰	1

吸収線量	Gy	rad
	1	100
	0.01	1

照射線量	C/kg	R
	1	3876
	2.58 × 10 ⁻⁴	1

線量当量	Sv	rem
	1	100
	0.01	1

がん治療医薬の開発を目指した放射性セニウムに関する研究

—製造・標識化合物の合成とその体内動態—