

변형 체내 표지법에 의한 적혈구 표지시 결합효율에 영향을 미치는 인자 평가

ABSTRACT

The Evaluation of Factors which Influence Binding Efficiency of Modified in Vivo Erythrocyte Labeling Technique

Department of Nuclear Medicine, Chonbuk National University Hospital, Chonju, Korea
Han-Kyung Seo

Purpose : We underwent this study to evaluate the factors which influence labelling efficiency when modified in vivo erythrocyte labeling technique was used.

Materials and methods : Thirty healthy volunteers (M:F = 19:11, age: 25±2 yrs) were enrolled in this study. Totally, two hundred ten samples were obtained from them. The 1 mg of stannous pyrophosphate was injected intravenously at the beginning of labeling. After suitable tinning time (5 min, 20 min, 35 min) passed by, blood (5 mL, 3 mL or 1 mL) was withdrawn into 10 mL syringe previously containing Tc-99m (740 MBq) and anticoagulant (heparin, ACD or CPDA) through 19-gauged scalp needle. The generator ingrowth time of Tc-99m was within 24 hrs in each case. The blood samples were placed on rotating inverter during incubation (10 min, 25 min, 40 min) but some of them were not. Immediately after the conclusion of incubation, the labeled blood specimens to analyze were centrifuged, and then %Unbound Tc-99m was calculated. Statical analysis was used paired T-test and one way ANOVA with SPSS 10.0.

Results : The binding efficiency at 1 mL of blood volume was 73±32%, 91±10% at 3 mL and 96±7% at 5 mL ($p < 0.01$). The binding efficiency at 5 min of tinning time was 45±23%, 98±6% at 20 min and 97±8% at 35 min ($p < 0.001$). The binding efficiency at 10 min of incubation time was 96±7%, 95±12% at 25 min and 98±3% at 40 min ($p > 0.05$). The binding efficiency in case of using rotating inverter was 96±7% and the binding efficiency in case of not using it was 87±18% ($p > 0.05$). There was no significant difference between them. In binding efficiency according to kinds of anticoagulants, ACD was 98±4%, CPDA was 97±6% and heparin was 89±20% ($p < 0.001$).

Conclusion : When modified in vivo erythrocyte labeling technique is used with Tc-99m, the methods to obtain the highest labeling efficiency are as follow. The withdrawing blood volume should be over 3 mL, tinning time should be kept between 20 min and 35 min, and

incubation time should be kept between 10 min and 40 min. ACD or CPDA have to be used as a anticoagulant except heparin and the blood samples should be placed on rotating inverter during incubation.

Key Words : binding efficiency, modified in vivo method, erythrocyte labeling

I 서론

Tc-99m 과산화테크네튬(이하 과산화테크네튬)은 매우 안정하여 다른 물질과 결합이 어려우나 적당한 환원제를 사용하여 산화수를 낮추면 여러 가지 배위자와 착화물을 형성할 수 있는 것으로 알려져 있다. 과산화테크네튬에 적혈구를 표지 시킬 때 사용하는 환원제로 주석이온을 주로 이용하는데, 그 이유는 다른 환원제에 비해 과산화테크네튬을 가장 정량적으로 환원시키고 결합하지 않은 테크네튬을 분리해 내야 할 필요가 없기 때문이다¹⁾. McRae 등²⁾은 주석 이온을 쥐에 주사하고 난 후 과산화테크네튬의 조직 내 분포가 13주 동안 남아 있는 것을 관찰하고 그 기전은 주석이온이 과산화테크네튬의 혈중 제거를 연장시킨 결과일 것으로 생각하였다. 그 후 여러 연구에서 위 사실이 입증되었고^{3,4)} 주석이온을 이용하여 과산화테크네튬에 적혈구를 표지하는 방법이 심혈관계의 해부학적인 또는 기능적인 평가⁵⁻⁷⁾, 간의 혈관중, 잔류비장⁸⁾ 그리고 위장관 출혈⁹⁻¹¹⁾ 등을 진단하는데 널리 이용되고 있다.

과산화테크네튬과 적혈구를 표지하는 방법에는 체내 표지법, 체외 표지법, 변형 체내 표지법 등이 있으며, 이중 결합효율이 높은 변형 체내 표지법이 적혈구 표지에 주로 이용된다. 변형 체내 표지법에서 과산화테크네튬과 적혈구간의 결합기전에 대하여 알려진 바로는, 환원제인 '주석-피로인산염'을 주입하면 주석이 적혈구 세포내로 들어가는 동시에 배위자인 피로인산염은 과산화테크네튬 이온이 적혈구 세포막을 잘 투과하도록 해준다. 이때 과산화테크네튬 이온을 주입하면 적혈구 세포막을 투과하여 들어가 세포 내의 주석 이온에 의해 환원되고 헤모글로민의 β고리에 결합되어 표지된다¹²⁾. 변형 체내 표지법으로 적혈구 표지시 영향을 미칠 수 있는 인자로는 수혈, 환자에게 투여된 약제, 염화주석의 양, 발생기 내부성장 시간(generator ingrowth time),

tinning 시간, 배양시간, 혈액의 양, 항응고제의 종류, 채취한 혈액을 배양시 rotating inverter 사용 유무 등 다양한 요인이 있는 것으로 알려져 있다^{13,14)}.

저자들은 변형 체내 표지법으로 적혈구 표지시 최상의 결합효율을 유지시키는 조건을 알아보기 위하여 표지에 영향을 주는 요인 중 tinning 시간, 배양시간, 혈액 양, 항응고제의 종류, 채취한 혈액 배양시 rotating inverter 사용 여부에 따른 표지효율을 조사하였다.

II 대상 및 방법

1. 대상

2003년 3월부터 2004년 2월까지 과거에 빈혈, 혈액 응고 질환, 출혈성 질환 등의 질병이 없는 연구의 목적과 과정에 동의한 자발적인 지원자 30명(남 : 여 = 19 : 11, 연령 : 25±2세)을 대상으로 하였다. 적혈구 표지시 tinning 시간, 배양시간, 혈액 양, 항응고제 종류에 따른 결합효율의 차이를 알아보기 위하여 각각 인자마다 15명을 대상으로 45개씩, 모두 180개의 혈액 샘플을 얻었다. 또한 채취한 혈액 배양시 rotating inverter 사용 유무에 따른 결합효율을 알아보기 위하여 15명을 대상으로 30개를 얻었다.

2. 방법

변형 체내 표지법에 의한 과산화테크네튬과 적혈구의 표지를 위하여 먼저 염화제일주석 1mg과 피로인산염(pyrophosphate, PYP) 5mg을 대상자에게 투여하였다. 적절한 tinning시간이 경과한 후 3-way stop cock에 연결된 19게이지 주사바늘을 통해 항응고제(전혈 1mL 당 acid citrate dextrose adenine(CPDA) : 0.14 mL, acid citrate dextrose(ACD) : 0.15 mL, 헤파린 : 2~4

unit)와 과산화테크네슘 740 MBq이 들어있는 주사기에 적당한 양의 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액은 즉시 rotating inverter 상에서 배양을 한 후에 원심분리기 (CS-6R centrifuge, Beckman, U.S.A)로 분리하여 결합효율을 측정하였다.

1) Tinning 시간에 따른 결합효율 평가

염화주석 제재를 주사한 후에 5분, 20분, 35분의 tinning 시간을 가진 후에 CPDA와 과산화테크네슘이 포함된 각각의 주사기에 혈액 5 mL를 채취하였다. 10분간 rotating inverter 상에서 배양한 후 원심분리 시켜 결합효율을 측정하였다.

2) 혈액 양에 따른 결합효율 평가

염화주석 제재를 주사하고 20분의 tinning 시간이 경과한 후 혈액 1 mL, 3 mL, 5 mL을 CPDA와 과산화테크네슘이 포함된 각각의 주사기에 채취하였다. 10분간 rotating inverter 상에서 배양한 후 원심분리 시켜 결합효율을 측정하였다.

3) Rotating inverter 사용 유무에 따른 결합효율 평가

염화주석 제재를 주사하고 20분의 tinning 시간이 경과한 후 혈액 5 mL를 CPDA와 과산화테크네슘이 포함된 각각의 주사기에 채취하였다. 15개의 혈액 샘플은 rotating inverter 상에서 10분간 배양하고, 15개는 rotating inverter 상에서 배양시키지 않고 원심분리 시켜 결합효율을 측정하였다.

4) 배양시간 차이에 따른 결합효율 평가

염화주석 제재를 주사하고 20분의 tinning 시간이 경과한 후 혈액 5 mL을 CPDA와 과산화테크네슘이 포함된 각각의 주사기에 채취하였다. 10분, 25분, 40분간 rotating inverter 상에서 배양한 후 원심분리 시켜 결합효율을 측정하였다.

5) 항응고제의 종류에 대한 평가

염화주석 제재를 주사하고 20분의 tinning 시간이 경과한 후 혈액 5 mL을 CPDA, ACD, 헤파린과 과산화테크네슘이 포함된 각각의 주사기에 채취하였다. 10분간 rotating inverter 상에서 배양한 후 원심분리 시켜 결합효율을 측정하였다.

3. 결합효율 측정

Rotating inverter 상에서 잘 혼합된 혈액 15 mL를 conical 튜브로 옮긴 후 생리식염수 10 mL를 첨가하고, 1300 G에서 5분간 원심분리 시킨후 상층액을 다른 튜브로 옮기고, 상층액과 하층액은 선량계(Atomlab 200 dose calibrator, Biodex, U.S.A)를 이용하여 각각의 방사능을 측정하였다.

$$\%Unbound \text{ } ^{99m}\text{Tc} = \frac{\text{Supernatant activity}}{\text{Erythrocyte activity} + \text{Supernatant activity}} \times 100$$

4. 통계분석

수집된 자료는 SPSS version 10.0 프로그램을 이용하여 paired T-test와 one way ANOVA 통계 검정을 실시하여 p<0.05를 통계적으로 유의하다고 정의하였다.

III 결 과

1. Tinning 시간에 따른 결합효율

Tinning 시간에 따른 결합효율은 5분일 때 45±23%, 20분일 때 97±8%, 35분일 때 98±6%를 보였다. 5분일

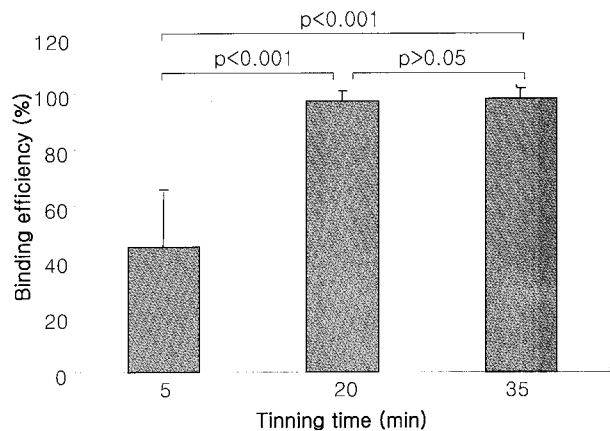


Fig. 1. There is a higher binding efficiency at 35 min (98±6%) and 20 min (97±8%) of tinning time than at 5 min (45±23%). No statistically significant difference in binding efficiency is found between 20 min and 35 min. However there is a significant difference between 5 min and 20 min, 5 min and 35 min respectively.

때에 비교시 20분과 35분일 때 결합효율이 모두 유의하게 높았으나, 20분과 35분 사이에는 통계학적인 유의한 차이는 없었다(Fig. 1).

2. 혈액 양에 따른 결합효율

혈액 양에 따른 결합효율은 1 mL일 때 73±32%, 3 mL일 때 91±10%, 5 mL일 때 가장 높은 96±7%를 보였다. 1 mL일 때와 비교시 3 mL와 5 mL일 때 결합효율이 모두 유의하게 높았으나, 3 mL와 5 mL 사이에는 통계학적인 유의한 차이는 없었다(Fig. 2).

3. Rotating inverter 사용 유무에 따른 결합효율

Rotating inverter를 사용한 경우에 결합효율은 96±7%로 사용하지 않은 경우(87±18%)에 비하여 높았으나 통계학적으로 유의한 차이는 없었다(p>0.05)(Fig. 3).

4. 배양시간 차이에 따른 결합효율

배양시간에 따른 결합효율은 10분일 때 96±7%, 25분일 때 95±12%, 40분일 때 98±3%를 보였다. 배양시간이 25분일 때 가장 작았고, 40분일 때 가장 높은 결합효율을 보였으나 배양시간에 따른 결합효율은 통계학적으로 유의한 차이가 없었다(p>0.05)(Fig. 4).

5. 항응고제의 종류에 따른 결합효율

항응고제로 헤파린을 사용하였을 때 89±20%, CPDA를 사용한 경우 97±6%, ACD를 사용한 경우 98±4%를 보였다. 헤파린을 사용한 경우에 비하여 CPDA나 ACD를 사용하였을 때 모두 유의하게 결합효율이 높았으나, CPDA와 ACD 사이에는 통계학적으로 유의한 차이가 없었다(Fig. 5).

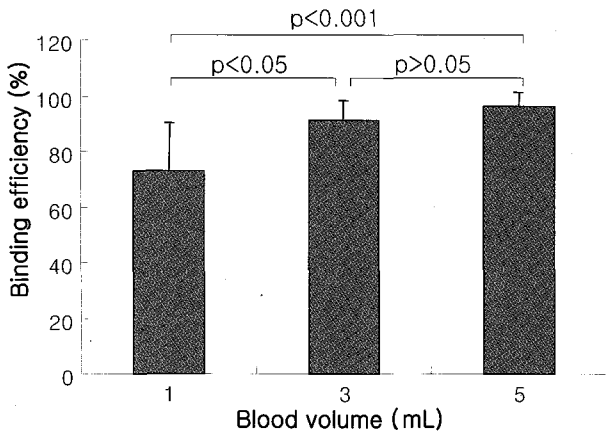


Fig. 2. The binding efficiency is much higher when 5 mL of blood (96±7%) is used, than when 3 mL (91±10%) and 1 mL (73±32%) are used. No statistically significant difference in binding efficiency is found between 3 mL and 5 mL. However there is a significant difference between 1 mL and 3 mL, 1 mL and 5 mL respectively.

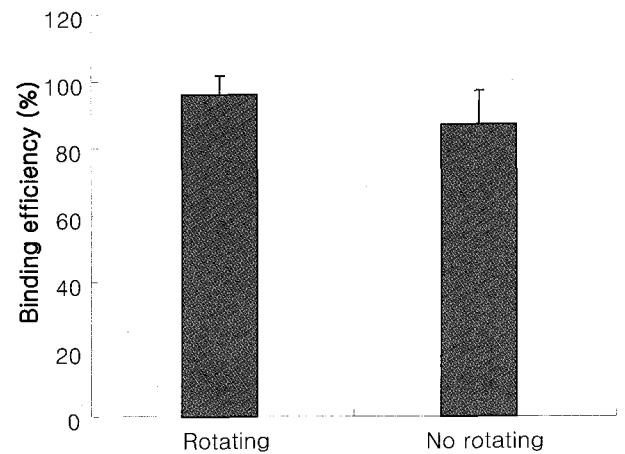


Fig. 3. Binding efficiency is 96±7% when rotating inverter is used and 87±18% when rotating inverter is not used. There is no significant difference between them (p>0.05).

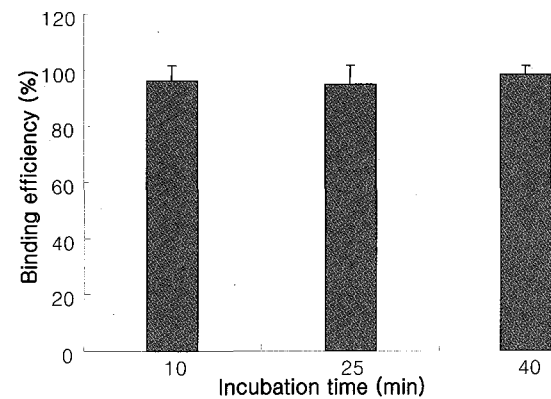


Fig. 4. There is the highest binding efficiency (98±3%) at 40 min of incubation time but the lowest binding efficiency (95±12%) at 25 min. Binding efficiency is 96±7% when incubation time is at 10 min. There is no significant difference among them (p>0.05).

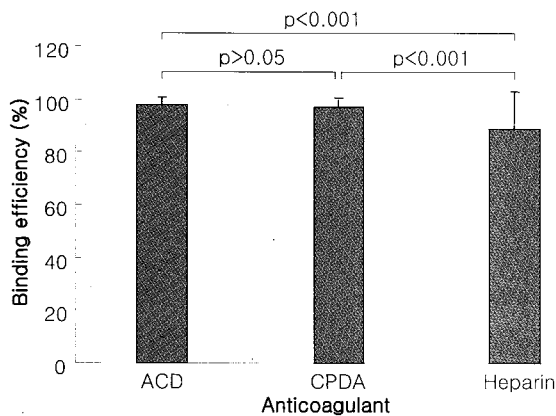


Fig. 5. The binding efficiency is 98±4% with ACD, 97±6% with CPDA and 89±20% with heparin. No statistically significant difference in binding efficiency was found between ACD and CPDA. However, there is a significant difference between heparin and ACD, heparin and CPDA respectively.

IV 고찰

이 연구의 목적은 변형 체내 표지법으로 적혈구 표지시 결합효율에 영향을 줄 수 있는 여러 인자 중에서 핵의학과에서 쉽게 접할 수 있는 tinning 시간, 배양시간, 혈액 양, 항응고제의 종류, 채취한 혈액 배양시 rotating inverter 사용 여부 등에 따른 표지효율의 차이를 알아보는 데 있었다. 저자들의 연구결과 채취하는 혈액 양은 3 mL 이상, 배양시간은 10분 이상(10~40분), 항응고제는 ACD나 CPDA를 사용한 경우, tinning 시간은 20분 이상(20~35분)을 유지한 경우에 높은 결합효율을 보였고, 통계학적인 유의한 차이는 없었으나 rotating inverter를 사용한 경우에 결합효율이 높게 관찰되었다.

적혈구와 과산화테크네튬의 결합효율에 관여하는 인자는 저자들의 연구에서 제시한 것 이외에 환자의 수혈, 디피리다몰, 헤파린, 싸이클로스포린, methyl dopa, propranolol, hydralazine, quinidine, doxorubicin 등을 포함한 일부 약제가 결합효율을 저하시킨다는 보고가 있다¹⁵⁾. 환자에게 투여되는 혈액이나 약물 이외에도 결합효율에 영향을 주는 인자에는 저자들의 연구에서 제시한 것 뿐만 아니라 발생기 내부성장 시간, 주석이온의 양 등이 있다. 변형 체내 표지법에 있어 사용하는 주석이온의 양은 0.5~1.0 mg, tinning 시간은 20분, 과

산화테크네튬이 700~900 MBq 함유된 주사기에 혈액은 3 ml를 첨가하여 10분간 배양하도록 권하고 있고^{13,16,17)} 발생기 내부성장 시간은 24시간 이하의 신선한 과산화테크네튬의 사용을 권장하고 있다^{13,18)}. 발생기 내부성장 시간이 긴 발생기에서 용출된 과산화테크네튬은 결합효율을 저하시키는데 그 이유는 발생기 내부성장 시간이 길면 몰리브덴이 붕괴해서 자핵종인 Tc-99m 과산화테크네튬을 생산하듯이 Tc-99m 과산화테크네튬도 일정한 시간이 경과한 후 Tc-99 과산화테크네튬이라는 딸핵종을 만들게 된다. 이것이 염화주석의 환원력을 약화시켜 결국 적혈구와 과산화테크네튬의 결합을 저하시키는 결과를 초래하게 된다^{17,19)}.

적혈구와 과산화테크네튬의 결합에 사용되는 항응고제인 헤파린은 개의 손상된 관상동맥과 심근을 조영하는데 이용했지만²⁰⁾ 간과 신장에도 많은 분포가 있었다. 이것은 헤파린을 이용하여 S-35와 적혈구를 결합시켰는데 그중 20~60%가 소변으로 배출되는 것을 보고도 확인할 수 있었다²¹⁾. 지나친 간과 신장에 섭취는 결국 질병의 진단을 방해하는 결과를 초래하게 된다. 이런 단점들을 보완하기 위해 ACD가 사용되었는데 이 항응고제는 헤파린 보다 우수한 결합효율을 보인다는 것이 Porter 등이 행한 실험에서 밝혀졌다¹³⁾. 저자들의 연구에서도 ACD, 헤파린, CPDA를 사용에 따른 결합효율을 측정할 결과 ACD와 CPDA에서는 97% 이상의 높은 결합효율을 보인 반면에 헤파린은 가장 낮은 결합효율을 보여 가능하면 헤파린의 사용을 피하는 것이 좋을 것으로 생각된다.

Tinning 시간이 5분일 경우에 낮은 결합효율을 보이는 것은 염화주석이 아직 충분히 적혈구내로 침투가 이루어지지 않아 과산화테크네튬이 충분히 환원되지 않아 결합이 이루어지지 않기 때문이다¹⁹⁾. 저자들의 연구에서도 5분에서 현저히 저하된 결합효율을 보였지만 20분과 35분에서는 97% 이상의 높은 결합효율을 보였다.

혈액양이 1 mL 이하 일 때 결합효율이 낮은 이유는 과산화테크네튬과 결합할 수 있는 적혈구 숫자의 부족 즉 적혈구 용적이 작기 때문이다²¹⁾. 또한 인체에서 바로 채혈한 혈액은 37°C 정도의 온도를 유지하고 있으나 이것이 주사기 내에 존재하는 생리식염수와 항응고제와의 갑작스런 혼합으로 인해 급격히 식혀지게 된다. 이런 현상은 채혈된 혈액양이 적을수록 심해지기 때문에 적은 양의 혈액에서는 결합효율이 낮게 나오는 원인이다^{15,21)}. 저자들의 연구에서도 혈액 양이 1 mL일 때 가

장 낮은 결합효율을 보였고 3 mL와 5 mL에서 통계학적으로 유의한 차이는 보이지 않았지만 5 mL일 때 가장 높은 결합효율을 보여 충분한 혈액양이 결합효율을 높이는 데 필요하다는 것을 제시하고 있다.

Callahn 등에 따르면 염화주석 0.5 mg을 주사하고 배양시간을 1분 간격으로 10분간 지속했을 때 그 결합효율이 점점 더 높아져 10분 째는 90% 이상을 기록하였다¹⁶⁾. Kelly에 의한 연구에서는 염화주석 1 mg을 주사하고 배양시간을 30분까지 연장시켰을 경우에도 높은 결합효율이 유지되고 있음을 확인할 수 있었다¹⁴⁾. 저자들의 연구에서도 통계적으로 유의한 차이는 보이지 않았지만 40분 일 때 가장 높은 결합효율을 보인 것으로 보아 그 배양시간을 40분까지 연장해도 높은 결합이 유지되는 것을 확인 할 수 있었다. 채혈한 혈액을 rotating inverter상에서 배양하는 이유는 항응고제와 혈액사이에서 충분한 혼합이 이루어져야 되기 때문이다. Rotating inverter사용 유무와 결합효율의 관계는 통계적으로 유의한 차이는 보이지 않았지만 그것을 사용했을 때 높은 결합효율 나타내는 것으로 보아 그 사용이 권장된다.

저자들의 연구결과 변형 체내 표지법으로 적혈구를 표시시 우수한 결합효율을 유지하기 위해서는 채취하는 혈액 양은 3 mL 이상, 배양시간은 10분 이상(10~40분), 항응고제는 ACD나 CPDA, tinning 시간은 20분 이상(20~35분)을 유지하고, 가능한 rotating inverter의 사용하는 것이 좋을 것으로 생각된다.

참고문헌

- Callahan RJ, Ramberg KL. Radiolabeling formed elements of blood: methods and mechanisms. In: Henkin RE, Boles MA, Dillehay GL, Halama JR, Karesh SM, Wagner RH, editors. *Nuclear Medicine*. St. Louis: Mosby; 1996. p. 397-409
- Mcrae J, Sugar RM, Shipley B, Hook GR. Alterations in tissue distribution of Tc-99m pertechnetate in rats given stannous tin. *J Nucl Med* 1974;15:151-5
- Greenberg DD, Som P, Meinken GE, Sacker DF, Atkins HL. Effects of preloading of stannous compounds on the distribution of 99mTc-pertechnetate. *Nuklearmedizin*. 1977Feb;16(1):26-9
- Chandler WM, Shuck LD. Effects of tin on pertechnetate distribution. *J Nucl Med* 1975;16:690
- Thrall JH, Freitas JE, Swanson D, Rogers WL, Clare JM, Brown ML, et al. Clinical comparison of cardiac blood pool visualization with technetium-99m red blood cells labeled in vivo and with technetium-99m human serum albumin. *J Nucl Med* 1978;19:796-803
- Alderson PO, Bernier DR, Ludbrook PA, Harwig JF, Roberts R, Sobel BE. Serial radionuclide determinations of the ejection fraction with Tc-99m labeled red blood cells. *Radiology* 1976;119:729-30
- Front D, Israel O. Tc-99m labeled red blood cells in the evaluation of vascular abnormalities. *J Nucl Med* 1981;22:149-151
- Armas RR, Thakur ML, Gottschalk A. A simplified method of selective spleen scintigraphy with Tc-99m labeled erythrocytes: clinical application. concise communication. *J Nucl Med* 1980;21:413-6
- Winzelberg GG, Froelich JW, McKusick KA, Waltman AC, Greenfield AJ, Athanasoulis CA, et al. Radionuclide localization of lower gastrointestinal hemorrhage. *Radiology* 1981;139:465-9
- Bunker SR, Brown JM, McAuley RJ, Lull RJ, Jackson JH, Hattner RS, et al. Detection of gastrointestinal bleeding sites. use of in vitro technetium Tc-99m labeled RBC's. *JAMA* 1982;247:789-92
- Smith RK, Arterburn JG. The advantages of delayed imaging and radiographic correlation in scintigraphic localization of gastrointestinal bleeding. *Radiology* 1981;139:471-2
- Yu KY, Cho SM, Shim SM, Cho KJ. The clinical comparison on cardiac blood pool scan agents labeling method. *Kor J Nucl Med Tech* 1986;2:39-41
- Porter WC, Dees SM, Freitas JE, Dworkin HJ. Acid-citrate-dextrose compared with heparin in the preparation of in vivo/in vitro technetium-99m red blood cells. *J Nucl Med* 1983;24:383-7
- Kelly MJ, Cowie AR, Antonino A, Barton H, Kalff V. An assessment of factors which influence the effectiveness of the modified in vivo technetium-99m-erythrocyte labeling technique in clinical use. *J Nucl Med* 1992;33:2222-5
- Callahan RJ, Rabito CA. Radiolabeling of erythrocytes with technetium-99m: role of band-3 protein in the transport of pertechnetate across the cell membrane. *J Nucl Med* 1990;31:2004-10
- Callahan RJ, Froelich JW, McKusick KA, Leppo J, Strauss HW. A modified method for the in vivo

- labeling of red blood cells with Tc-99m: concise communication. *J Nucl Med* 1982;23:315-8
17. Front D, Israel O, Groshar D, Weininger J. Technetium-99m-labeled red blood imaging. *Semin Nucl Med* 1984;14:226-50
18. Wilson ME, Hung JC. Evaluation of heparin and anticoagulant citrate dextrose in the preparation of technetium-99m red blood cells with Ultra Tag RBC kit. *J Nucl Med* 1992;33:306-8
19. Srivastava SC, Chervu LR. Radionuclide-labeled red blood cells: current status and future prospects. *Semin Nucl Med* 1984;14:68-82
20. Kulkarni PV, Parkey RW, Buja LM, Wilson JE 3rd, Bonte FJ, Willerson JT. Technetium-labeled heparin: preliminary report of a new radiopharmaceutical with potential for imaging damaged coronary arteries and myocardium. *J Nucl Med* 1978;19:810-5
21. Triplett DA. Heparin: biochemistry, therapy and laboratory monitoring. *Ther Drug Monit* 1979;1:173-97