

Phytate를 이용한 감시림프절 검사 시 Filter의 유용성 평가

전북대학교병원 핵의학과¹, 군산 서해대학교²

정영환¹ · 서한경¹ · 심철민¹ · 임성동¹ · 한동현² · 박영순² · 김동윤²

Evaluation on the Usefulness of Filter in Sentinel Lymphoscintigraphy Using ^{99m}Tc-Phytate

Yeong Hwan Jeong¹, Han Kyung Seo¹, Cheol Min Shim¹, Seong Dong Lim¹, Dong Hyeon Han²,
Yung Sun Park² and Dong Yun Kim²

Department of Nuclear Medicine, ¹Chonbuk National University Hospital, Jeonju, Korea;

²Department of Radiotechnology, Seohae College, Gunsan, Korea

Purpose: The aim of this study was to investigate distribution of particle size in phytate kit and compare filtered method with non-filtered method using 200 nm filter for sentinel lymphoscintigraphy (SLS). **Materials and Methods:** Five phytate kit of having the same available period was measured by particle size analyzer. For *in-vivo* experiment, ^{99m}Tc-phytate was injected intradermally at both foot to perform lymphoscintigraphy. Imaging was acquired at 1hour after injection. Region of interest (ROI) was drawn in inguinal and background area for analysis. RAW 264.7 cells (Murine macrophage cell) were prepared for measurement of cellular uptake as a representative of macrophages. Paired *t*-test was performed using SPSS (SPSS Inc, USA) for statistical analysis. **Results:** The size of most particle in Technetium phytate kit was distributed in 130~650 nm(90.5%). *In-vivo* study, the ROI analysis showed similar result between filtered and non-filtered sample, and the numerical value of count/pixel were 58.3±5.97 and 60.2±4.88. *In-vitro* study, cellular uptake study also showed no difference between filtered and non-filtered sample by gamma counting. **Conclusion:** The present study demonstrates that there was no meaning of 200 nm filtered method for SLS using ^{99m}Tc-phytate. (**Korean J Nucl Med Technol 2010;14(1):35-39**)

Key Words : Phytate, Sentinel Lymphoscintigraphy, 200 nm Filter

서 론

1977년 Cabanas 등¹⁾이 음경암 환자의 치료를 위해 도입한 감시림프절(sentinel lymphoscintigraphy) 검사에서 원발 종양에 가장 먼저 전이되는 림프절을 감시림프절이라고 정의했다. 이후 1993년 Krag 등²⁾이 유방암에서 처음 ^{99m}Tc-sulfur colloid를 사용하여 감시림프절을 찾았다. 또한 Giuliano 등³⁾이

1994년 isosulfan blue dye를 이용하여 감시림프절을 찾는 방법을 고안한 이래로 유방암 수술 시 액와림프절 절제를 결정하는 데 있어서 감시림프절 생검 결과는 중요한 지표로 사용되어 왔다. 감시림프절 생검의 장점은 수술, 마취에 의한 합병증을 줄일 수 있고, 절개 부위의 최소화, 병기 설정에의 정보를 제공한다는 것이다.⁴⁾ 감시림프절 검사 및 방사면역유도수술(radioimmunoguided surgery)에 이용되는 방사성 의약품의 조건은 감시림프절로 신속하게 수송된 다음 오랫동안 저류되고 입자 크기가 비교적 균일해야 한다. 또 구조적으로 ^{99m}Tc으로 표지할 수 있고 화학적으로 안정된 물질로서 오래 보관이 가능하며 생체 내에서 그 크기가 변화하지 않아야 한다.⁵⁾ 주사된 입자의 크기가 너무 작으면 림프계에서 이동속도가 빨라서 감시림프절 이후의 원위 림프절로

• Received: April 20, 2010. Accepted: April 30, 2010.
• Corresponding author: Han Kyung Seo
Department of Nuclear Medicine, Chonbuk National University Hospital,
634-18 Keumam-dong Duckjin-gu, Jeonju, 561-712, Korea
Tel: +82-63-250-1170, Fax: +82-63-250-1588
E-mail: 95760@cuh.co.kr

의 확산이 많아 감시림프절 이외의 원위 림프절까지 도달하게 되고, 입자의 크기가 큰 경우 주입된 방사성의약품이 림프계로 이동되지 않고 주사 부위에 머무는 양이 많다. 이 점을 고려할 때 감시림프절 검사에 이상적인 입자 크기는 10-200 nm 정도로 보고되고 있다.⁶⁾

그 동안 감시림프절 검사에는 ^{99m}Tc-ASC, ^{99m}Tc-Tin colloid, ^{99m}Tc-human serum albumin (HSA) 등이 사용되어 왔으나 공급 제한 등의 이유로 이용에 어려움이 많아 대체 방사성의약품으로 간 스캔에 사용되고 있는 ^{99m}Tc-phytate를 사용하게 되었다. 현재까지는 colloid계통의 방사성의약품에 대한 연구가 주를 이루고 있으며, 이 또한 균일하지 못한 입자 크기로 인해 필터 사용이 감시림프절 확인에 도움이 되는지 여부에 대해서는 많은 논란이 있다. 일부 저자들은 필터 사용이 충분한 유용성이 있다고 주장⁷⁻⁹⁾한 반면 ^{99m}Tc-phytate를 이용한 감시림프절 검사 시 필터를 사용하지 않은 방법이 기존에 사용되던 방사성의약품에 비해 좋은 결과를 보여준다는 보고도 있다.^{10,11)} 그러나 ^{99m}Tc-phytate의 대체 적절성에 대해 많은 연구가 이루어지지 않고 있는 실정이다. 이러한 점에 착안하여 본 연구는 국내에서 감시림프절 검사에 널리 이용되는 방사성의약품인 phytate의 입자 크기 분포를 분석하고 필터 사용의 적절성을 판단하고자 하였다.

실험재료 및 방법

1. Phytate 입자 크기 분포 측정

Phytate kit (Teche Phytate kit, Fuji film, Japan)에 함유된 2.9 mg의 sodium phytate 입자 크기 분포 측정은 입도 분석기(ELS-8000, Photal, Japan)를 이용하여 유효기간이 같은 5

개의 phytate kit를 생리식염수에 용해시켜 측정하였으며 각각의 측정치는 3회 측정의 평균치로 하였다.

2. ^{99m}Tc-phytate의 동물실험

1) 영상의 획득

실험 동물은 생후 12~15주령, 체중 250~300 g 암컷 백서를 사용하였다. 6마리의 백서를 3~5일 간격으로 비교군과 실험군으로 나누어 2회 시행하였다. 림프절 검사는 chloral hydrate 8% 용액 100 g당 0.5 mL를 복강 내 주사하여 전신 취시켰으며 림프절 검사 시 백서의 자세는 바로 누운 자세로 고정시켰다. 비교군은 여과시키지 않은 ^{99m}Tc-phytate 11.1 MBq (300 µCi) 인슐린 주사기를 이용하여 발가락 사이에 피하주사하였다. 실험군은 200 nm filter (Minisart, Satorius Stedim Biotech, Germany)에 여과시킨 ^{99m}Tc-phytate 11.1 MBq (300 µCi)를 비교군과 같은 방법으로 주사 하였다(Fig. 1A). 1시간 경과 후 이중 헤드 감마카메라(E.cam, Siemens, Germany)를 이용하여 촬영시간 10분, matrix size는 512×512로 영상을 획득하였다(Fig. 1B, 1C).

2) 영상의 분석

서혜부 림프절에 관심 영역을 설정하고 허벅지 근육에 백그라운드 영역을 설정하여 count/pixel 값을 얻어 영상을 분석 하였다(Fig. 1A-C).

3. ^{99m}Tc-phytate의 세포 실험

1) 세포 배양

RAW 264.7 (murine macrophage cell) 세포는 흔히 사용하는 실험용 흰색 쥐(BALB/c) 종의 복강 내에 존재하는 대식 세포를 플레이트 위에 배양한 것으로, 세포 배양용 배지는

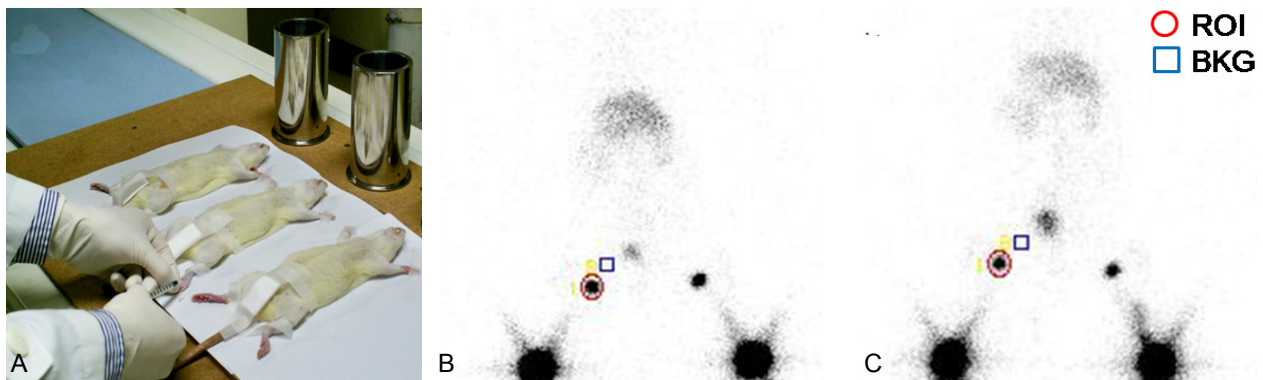


Fig. 1. 11.1 MBq (300 µCi) of ^{99m}Tc-phytate was injected to both foot (A). Images using filtered (B) and non-filtered (C) sample were acquired at 1 hr after injection. ROI was drawn in inguinal and background area for analysis (B, C). Figure (B, C) revealed lymphatic vessel, inguinal lymphnode and liver.

10% FBS (fetal bovine serum), 2 mm의 L-glutamine, 100 µg/mL의 penicillin G 그리고 100 µg/mL의 streptomycin이 함유된 세포 배양용 배지 중 하나인 DMEM을 사용하였으며, 5% CO₂, 37°C에서 배양하였다.

2) 세포 내 ^{99m}Tc-phytate 섭취 실험

RAW 264.7 세포주는 1×10⁶개씩 6 cm 세포 배양용 플레이트에 분주하였다. 24시간 세포를 안정화시킨 후 배지를 제거하고 FBS가 들어 있지 않은 배지에 200 nm 필터로 여과시킨 ^{99m}Tc-phytate 3.7×10⁴ Bq (1 µCi)와 여과시키지 않은 ^{99m}Tc-phytate 3.7×10⁴ Bq (1 µCi)를 넣어 주고 30분 동안 배양시켰다. 차가운 세포 실험용 생리식염수에 3회 세척하고 scrapper를 이용하여 플레이트에서 세포를 떼어냈다. 마지막으로 감마카운터(Gamma Counter, Cobra II PACKARD, USA)를 이용하여 각각의 ^{99m}Tc-phytate의 분당 카운트 값을 측정하였다.

4. 통계 분석

모든 통계 분석에서는 SPSS 12.0 (SPSS Inc., USA) 프로그램을 사용하였고, 각 통계 검사에서 변수는 평균±표준편차 (mean±SD)로 표현하였다. 두 실험군 사이의 차이를 비교하기 위해 paired t-test를 이용하였으며, p값이 0.05 미만일 때 통계적인 의미가 있는 것으로 간주하였다.

결 과

1. Phytate의 입자 크기 분포 측정

입도 분석기를 이용하여 얻은 여과 시키지 않은 phytate 입자의 입자 크기 분포는 130~650 nm가 85±5%였다(Fig. 2). 200 nm 필터로 여과시킨 후 입자 크기 분포 측정은 생리식염수에 용해된 phytate의 분자량이 충분하지 않아 입도 분석기를 통해서 측정하지 못하였다.

2. ^{99m}Tc-phytate의 동물 실험

동물 실험을 통해 획득한 영상을 분석한 결과 비교군에서는 60.2±4.88 count/pixel, 실험군에서는 58.3±5.97 count/pixel 값을 보였으며 통계 검정 결과 유의한 차이는 보이지 않았다(Fig. 3).

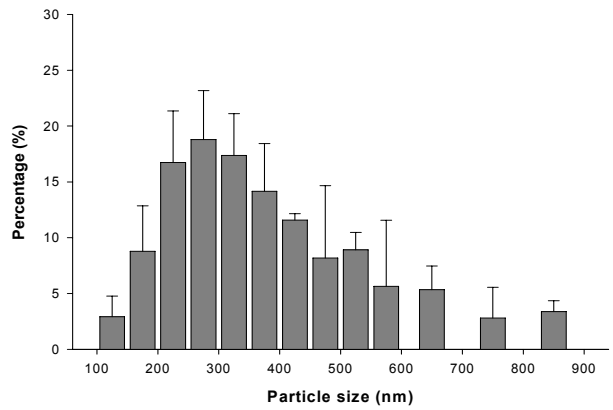


Fig. 2. Particle size of phytate in Technie phytate kit demonstrated the highest level (85±5%) between 130 nm and 650 nm.

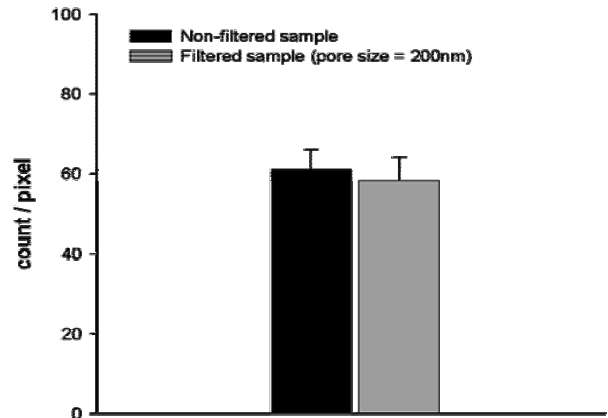


Fig. 3. The value of count/pixel showed 58.3±5.97 in filtered sample and 60.2±4.88 in non-filtered sample. However, there was no significant difference between filtered and non-filtered sample *in-vivo* study.

3. ^{99m}Tc-phytate의 세포 실험

세포 실험의 결과는 비교군은 17,152±1,165 cpm이고 실험군은 16,908±1,075 cpm을 보였다. 동물 실험과 마찬가지로 세포 실험에서도 통계적 차이는 보이지 않았다(Fig. 4).

고 찰

감시림프절 검사의 성공을 좌우하는 요소는 사용되는 방사성의약품의 입자 크기, 주사량, 주사 방법과 주사 부위 등이 있다. 이 중 사용되는 방사성의약품의 입자 크기가 검사 성공의 가장 큰 요인이다.¹²⁾ 방사성의약품의 입자 크기는 서론에서 언급했듯이 입자의 크기가 너무 크거나 작은 경우 본 검사 이용에 제약이 따른다. 일부에서는 10~200 nm로 권장하는⁶⁾ 반면 일부에서는 50~200 nm로 권장하고¹³⁾ 또 다른

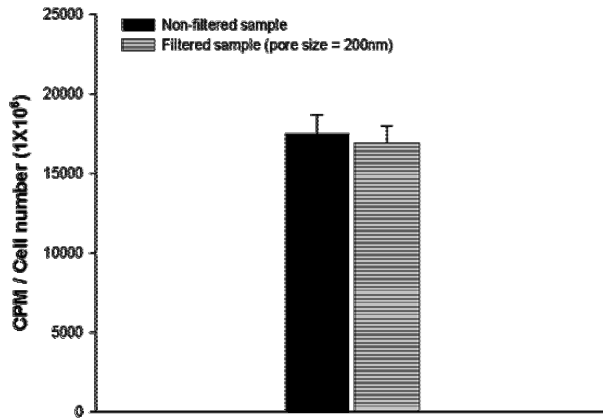


Fig. 4. The value of cpm showed 16,908±1,075 in filtered sample and 17,512±1,165 in non-filtered sample. However, there was no significant difference between filtered and non-filtered sample in-vitro study.

저자들은 100~200 nm의 사용을 권장하고 있다.¹⁴⁻¹⁷⁾ 그간 국내에서 널리 이용되어온 ^{99m}Tc-sulfur colloid는 입자 크기가 100~400 nm, ^{99m}Tc-human serum albumin (HSA)은 2~3 nm이다.¹⁸⁾ 그러나 언급한 의약품의 국내 공급이 중단되어 현재 림프절 검사와 감시림프절 검사는 ^{99m}Tc-phytate를 이용하여 시행하고 있다. ^{99m}Tc-phytate는 1973년에 Subramanian 등¹⁹⁾에 의해 칼슘과 결합하여 콜로이드를 결합하는 성질을 이용하여 세망내피계 영상을 위한 방사성의약품으로 사용된 이후 Alavi 등²⁰⁾이 ^{99m}Tc-phytate를 이용한 동물 실험을 통하여 림프절 검사에 이용하였다. Phytate의 입자 크기 분포는 100~200 nm 정도라고 보고가 있으나²¹⁾ 이를 확인하기 위해 저자들은 입도 분석기를 통해 국내에 공급되고 있는 phytate의 입자 크기 분포를 측정해 보았다.

그 결과 phytate 입자의 평균 직경은 130~650 nm가 85±5% 정도로 보고된 결과와는 차이가 있음을 알 수 있었다. 많은 연구자들이 감시림프절 검사에 사용될 수 있는 방사성의약품의 이상적인 크기를 200 nm 미만이라고 주장함^{6,13-17)}을 근거로 200 nm 필터를 이용하였다. 여과시킨 후의 입자 크기는 용매 내 phytate 입자의 농도가 너무 낮아 측정할 수 없었지만 백서를 이용한 영상에서 좋은 영상을 얻을 수 있는 이유는 입도 분석기를 통해서 phytate 입자의 크기를 측정할 수 있을 만큼의 충분한 분자량이 되지 못하더라도, 테크네슘과 결합하여 영상에 이용되는 분자 수는 충분하기 때문인 것으로 생각된다. 이것으로 보아 아주 소량의 방사성의약품이 테크네슘에 표지되어 영상에 이용해도 문제가 없음을 알 수 있었다. 본 실험에서 100 nm 필터는 너무 작은 크기의 입자를 만들어 감시림프절에 섭취가 되지 않고 이후의 원위

림프절까지의 확산이 될 가능성이 많아 고려대상에서 배제하였다.

저자들은 ^{99m}Tc-phytate를 이용한 감시림프절 검사에서 필터 사용 유무에 따른 섭취 정도를 동물 실험과 세포 실험을 통하여 필터링의 적절성을 판단해 본 결과, 200 nm 필터를 사용한 것과 사용하지 않은 것에 유의한 차이가 없음을 확인하였다. 필터의 사용은 고가의 필터를 구입해야 하고, 불필요한 시술자의 피로를 유발시킬 수 있는 등의 단점이 있다. 실험 결과를 바탕으로 저자들은 감시림프절 검사에서 ^{99m}Tc-phytate를 이용할 경우 필터를 사용하는 방법은 결과에 큰 영향을 미치지 않는다는 것을 확인하였다.

요 약

감시림프절 검사에는 ^{99m}Tc-ASC, ^{99m}Tc-Tin colloid, ^{99m}Tc-HSA 등이 사용되었으나 공급 제한으로 간 스캔에 사용되고 있는 ^{99m}Tc-phytate를 대체 방사성의약품으로 사용하고 있다. 이에 저자들은 phytate의 입자 크기 분포를 알아보고 200 nm 필터 사용유무에 따른 영상을 획득 분석하여 감시림프절 검사 시 필터 사용의 적절성을 판단하고자 하였다.

Photal사의 ELS-8000 장비를 이용하여 phytate kit의 입자 크기 분포를 측정 하였다. 동물 실험은 생후 12~15주령, 체중 250~300 g 암컷 백서를 사용하였으며, 전신 마취 후 양와 위로 고정시켜 영상을 획득하였다. 비교군으로 여과시키지 않은 ^{99m}Tc-phytate를 실험군으로는 200 nm 필터를 이용하여 여과시킨 ^{99m}Tc-phytate를 백서의 발가락 사이에 피하주사 하였다. 6마리의 백서를 3~4일 간격으로 비교군과 대조군으로 그룹을 나누어 2회씩 실시 하였으며, 주사 후 1시간 지연 영상을 얻은 후 서혜부에 관심영역을 설정하였으며 비정상적인 집적이 없는 부위를 선별하여 픽셀당 카운트를 얻었다. 세포 실험은 RAW 264.7 세포를 이용하여 비교군과 실험군에 ^{99m}Tc-phytate를 넣어주고 30분 동안 배양시켜 감마카운터를 이용하여 각각의 분 당 카운트 값을 측정하였다. 이 값들은 SPSS 12.0 프로그램을 이용하여 통계 검정하였다.

Phytate를 생리식염수에 용해시킨 후 측정 결과 평균 직경은 130~650 nm가 85±5% 정도였으나 200 nm 필터를 이용하여 여과시킨 후의 입자 크기는 용매 내 phytate 입자의 농도가 너무 낮아 측정할 수 없었다. 획득한 영상을 분석한 결과 비교군에서는 60.2±4.88 count/pixel, 실험군에서는 58.3±5.97 count/pixel 값을 보였다. 세포 실험에서 실험군의 카운트 값은 17,152±1,165 cpm이고 비교군은 16,908±1,075

cpm을 보였다. 동물 실험과 마찬가지로 세포 실험에서도 통계적 차이는 보이지 않았다.

이번 실험을 통하여 phytate의 사이즈가 매우 분산적이며 균일하지 못하다는 사실을 확인하였으며, 동물 실험과 세포 실험을 통한 필터 사용의 적절성을 판단한 결과 phytate를 이용한 감시림프절 검사에서 필터를 사용하는 방법은 결과에 큰 영향을 미치지 않는다는 것을 확인하였다.

REFERENCES

- Cabanas RM. An approach for the treatment of penile carcinoma. *Cancer* 1977;39:456-466.
- Krag DN, Weaver DL, Alex JC, Fairbank JT. Surgical resection and radiolocalization of the sentinel node in breast cancer using a gamma probe. *Surg Oncol* 1993;2:335-339.
- Giuliano AE, Kirgan DM, Guenther JM, Morton DL. Lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for breast cancer. *Ann Surg* 1994;220:391-401.
- Alazraki NP, Eshima D, Eshima LA, Herda SC, Murray DR, Vansant JP, et al. Lymphoscintigraphy, the sentinel node concept and the intraoperative gamma probe in melanoma, breast cancer and other potential cancers. *Semin Nucl Med* 1997;27:55-67.
- Wilhelm AJ, Mijnhout GS, Franssen EJ. Radio pharmaceuticals in sentinel lymph-node detection-an overview. *Eur J Nucl Med* 1999;26:36-42.
- Jang SJ, Moon SH, Kim SG, Kim BS, Kim SW, Chung KW, et al. Comparison of the results for sentinel lymph node mapping in the breast cancer patients using ^{99m}Tc -antimony trisulfide colloid, ^{99m}Tc -tin colloid and ^{99m}Tc -human serum albumin. *Korean J Nucl Med* 2007;41:546-552.
- Tafra L, Chua AN, Peter C, Aycock D, Swanson M, Lannin D. Filtered versus unfiltered technetium sulfur colloid in lymphatic mapping: a significant variable in a pig model. *Ann Surg Oncol* 1999;6:83-87.
- Linehan DC, Hill AD, Tran KN, Yeung H, Yeh SD, Borgen PI, et al. Sentinel lymph node biopsy in breast cancer: unfiltered radioisotope is superior to filtered. *J Am Coll Surg* 1999;199:377-381.
- Babiera GV, Delpassand ES, Breslin Tm, Ross MI, Ames FC, Singletary SE, et al. Lymphatic drainage patterns on early versus delayed breast lymphoscintigraphy performed after injection of filtered ^{99m}Tc -sulfur colloid in breast cancer patients undergoing sentinel lymph node biopsy. *Clin Nucl Med* 2005; 30:11-15.
- Takei H, Suemasu K, Kurosumi M, Ninomiya J, Horii Y, Inoue K, et al. ^{99m}Tc -phytate is better than ^{99m}Tc -human serum albumin as a radioactive tracer for sentinel lymph node biopsy in breast cancer. *Surg Today* 2006;36:219-224.
- Seok JW, Kim IJ. Comparison of the efficiency for ^{99m}Tc tin-colloid and ^{99m}Tc -phytate in sentinel node detection in breast cancer patients. *Korean J Nucl Med* 2008;42:451-455
- Linehan DC, Eberlein TJ. Mechanisms of radiocolloid localization in sentinel node biopsy. *Ann Surg Oncol* 2000;7:77.
- Weiss M, Kunte C, Schmid RA, Konz B, Dresel S, Hahn K. Sentinel node mapping in patients with malignant melanoma using ^{99m}Tc colloidal rhenium sulfide. *Clin Nuc Med* 2003; 28:379-384.
- Mariani G, Erba P, Villa G, Gipponi M, Manca G, Boni G, et al. Lymphoscintigraphic and intraoperative detection of sentinel lymph node in breast cancer patients: the nuclear medicine perspective[Review]. *J Surg Oncol* 2004;85:112-122.
- Watanabe T, Kimijima I, Ohtake T, Tsuchiya A, Shishido F, Takenoshita S. Sentinel node iopsy with technetium-99m colloidal rhenium sulphide in patients with breast cancer. *Br J Surg* 2001;88:704-707.
- Koizumi M, Nomura E, Yamada Y, Takiguchi T, Tanaka K, Yoshimoto M, et al. Sentinel node detection using ^{99m}Tc rhenium sulphide in breast cancer patients: evaluation of 1 day and 2day protocols and a dose-finding study. *Nucl Med Commun* 2003;24 :663-670.
- Mariani G, Moresco L, Viale G, Villa G, Bagnasco M, Canavese G, et al. Radioguided sentinel lymph node biopsy in breast cancer surgery. *J Nuc Med* 2001;42:1198-1215.
- Wilhelm AJ, Mijnhout GS, Franssen EJ. Radiopharmaceuticals in sentinel lymph-node dection-an overview. *Eur J Nucl Med* 1999;26:36-42.
- Subramanian G, McAfee JG, Mehta A, Blair RJ, Thomas ED. ^{99m}Tc stannous phytate; a new in vivo colloid for imaging the reticuloendothelial system. *J Nucl Med* 1973;14:459.
- Alavi A, Staum MM, Shesol BF, Bloch PH. Technetium-99m stannous phytate as an imaging agent for lymph node. *J Nucl Med* 1978;19:422-426.
- Ege GN, Warbick A, Lymphoscintigraphy: a comparison of ^{99m}Tc antimony sulphide colloid and ^{99m}Tc stannous phytate. *Br J Radiol* 1979;52:124-129.