

住友重機械工業社製 FDG 自動合成装置による [¹⁸F]フルマゼニル合成の基礎的検討

寺崎一典*1 石川洋一*2 小豆島正典*3 後藤祥子*4 岩田 錬*2

*1 岩手医科大学サイクロトロンセンター

020-0173 岩手県岩手郡滝沢村滝沢字留が森 348-58

*2 東北大学サイクロトロン・ラジオアイソトープセンター

980-8579 仙台市青葉区荒巻

*3 岩手医科大学歯科放射線学講座

020-8505 岩手県盛岡市内丸 19-1

*4 日本アイソトープ協会仁科記念サイクロトロンセンター

020-0173 岩手県岩手郡滝沢村滝沢字留が森 348-58

1. はじめに

中枢性ベンゾジアゼピン受容体イメージは神経細胞が保たれている指標となり、てんかんの焦点の検出¹⁾、脳虚血の診断²⁾などに有用である。従来から[¹¹C]フルマゼニル、SPECT用製剤の[¹²³I]イオマゼニルが広く利用されているが、¹¹Cより長い半減期、高比放射能体で得られる[¹⁸F]フルマゼニル ([¹⁸F]FMZ)を用いることによって、PETイメージングの応用領域の拡大に貢献できるものと期待される³⁾。

住友重機械工業製 FDG 自動合成装置 (F-100) は、国内で最も普及している信頼性の高い FDG 専用装置である。照射容器への[¹⁸O]ターゲット水の充填、照射後の回収を含め一連の FDG 合成反応を効率的に実施し、高品質の FDG 注射剤が製造できる。図 1 に示したように、本装置の大きな特徴は、フッ素の吸着が少ないグラッシカーボン製の反応容器を装備していることにある。

反応容器は油浴によって均一かつ迅速に温度制御され、反応液はスターラーチップによる攪拌によって均一に混合される。また、減圧装置を装備しているため溶媒除去のための加熱乾燥が確実にできる。各種試薬・溶媒の移送は装置前面に配置した 6 個のガラス製リザーバーからガス圧送される。反応液を分離・精製する高速液体クロマトグラフィー (HPLC)とは連動していないが、以上のように F-100 の基本機能は FDG 以外のフッ素標識薬剤の合成にも十分に適応可能と考える。今回は、 $[^{18}\text{F}]$ FMZ 合成に適応できるように F-100 の軽微な改造を施し、合成プログラムを作成し、自動合成のための基礎的条件の検討を行ったので報告する。

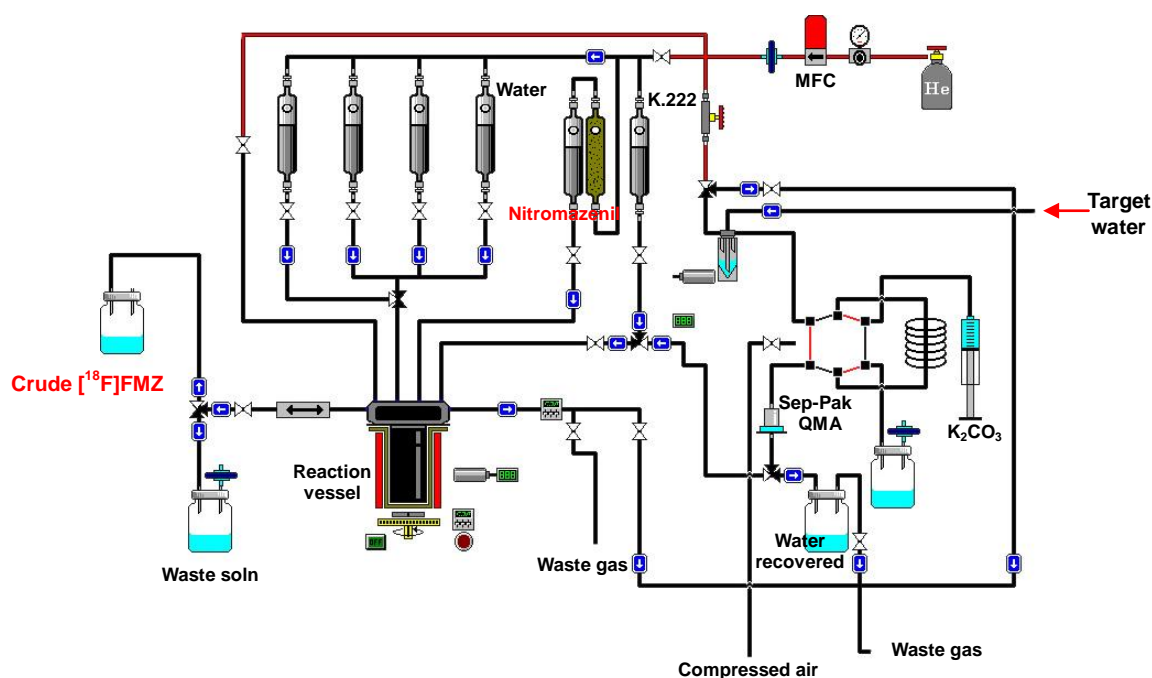


図1 $[^{18}\text{F}]$ フルマゼニル合成のための住重製合成装置のフローチャート

2. 方法

2.1 装置の改良およびプログラムの作成

FDG を含めてフッ素 18 標識化合物の多くは、 ^{18}F イオン、カリウムイオンおよび相関移動触媒のクリプトフィックス 2.2.2 (K2.2.2) の複合体と反応基質を無水溶媒中でフッ素化反応させ、酸あるいはアルカリで加水分解後、HPLC で目的物を分離・精製する一連のプロセスで合成される。

住友重機製 F-100 を $[^{18}\text{F}]$ FMZ の合成に適応させるため、次のような変更を加えた。従来 Sep-Pak QMA カートリッジからの ^{18}F の溶出には 66 mM K_2CO_3 溶液を用いていたが、回収効率を高めるため 33 mM K_2CO_3 溶液 (0.35 mL) に変更した。この場合容量の変更を伴うため K_2CO_3 溶液を注入・保持する PEEK 素材のチューブ (ループ状に巻いたもの) の長さを増やした。また、使用する基質溶液の量 (1 mL 以下) に適したより小型のガラスリザーバーに交換した。FDG の製造ではフッ素反応後の加水分解物の精製をイオン交換樹脂などで行っていたが、

[^{18}F]FMZ の場合、HPLC による分離・精製が必須になるため、フッ素化後の反応液はガラスバイアルに回収し、その後の固相抽出、分取 HPLC の注入操作は手作業で行った。住重製成装置の専用合成プログラム「Cupid」は温度、ガス流速などのパラメーターは任意に変更が可能で、柔軟性の高い合成プログラムである。フッ素化前の無水化処理のための乾燥工程は 3 段階の温度で加熱する F-100 の FDG 製造のパラメーターを適用した。また、フッ素化反応は反応容器過熱防止の最大温度である 150°C に、その他の合成パラメーターを設定し、本合成に適応した制御プログラムを作成した。

2.2 [^{18}F]フッ素の製造

[^{18}F]フッ素の製造は、サイクロトロン (MCY-1750、島津製作所) で加速した陽子ビームを (電流値: $20\ \mu\text{A}$ 、20 分間) [^{18}O]H $_2$ O (95%、太陽日酸) に照射し、回収後 [^{18}F]F $^-$ アニオンを含むターゲット水を QMA カートリッジ (炭酸イオン形) に通じて吸着させ、 $33\ \text{mM}\ \text{K}_2\text{CO}_3$ 溶液 ($0.35\ \text{mL}$) で脱離後、[^{18}F]KF として反応器に導入した。

2.3 [^{18}F]フルマゼニルの合成

[^{18}F]FMZ の合成は概報⁴⁾の合成法を一部変更して実施した。図 2 に合成反応のスキームを示す。K2.2.2 ($8\ \text{mg}$)のアセトニトリル溶液 ($1.5\ \text{mL}$) 加え、He ガス気流下で減圧加熱し、溶媒を留去した。次に DMF ($0.8\ \text{mL}$)に溶解した反応基質の 4*H*-Imidazo[1,5-*a*] [1,4]benzodiazepine-3-carboxylic acid, 5,6-dihydro-5-methyl-8-nitro-6-oxo-, ethyl ester (Nitromazenil) ($8\ \text{mg}$) を反応容器に導入し、閉鎖系で 150°C 、30 分間のフッ素化反応を行った。 40°C に冷却後、水 $2\ \text{mL}$ を加え反応容器から回収し、さらに $10\ \text{mL}$ の水を加えた後、Sep-Pak C18 カートリッジに通し [^{18}F]FMZ を吸着し、続いて水 ($20\ \text{mL}$) で未反応の [^{18}F]フッ素イオンおよび水溶性不純物を洗浄除去後、アセトニトリル ($0.5\ \text{mL}$) で溶出し、これを水 ($1.5\ \text{mL}$) で希釈した後、 $2\ \text{mL}$ の HPLC ループに導入して分離精製を行った。

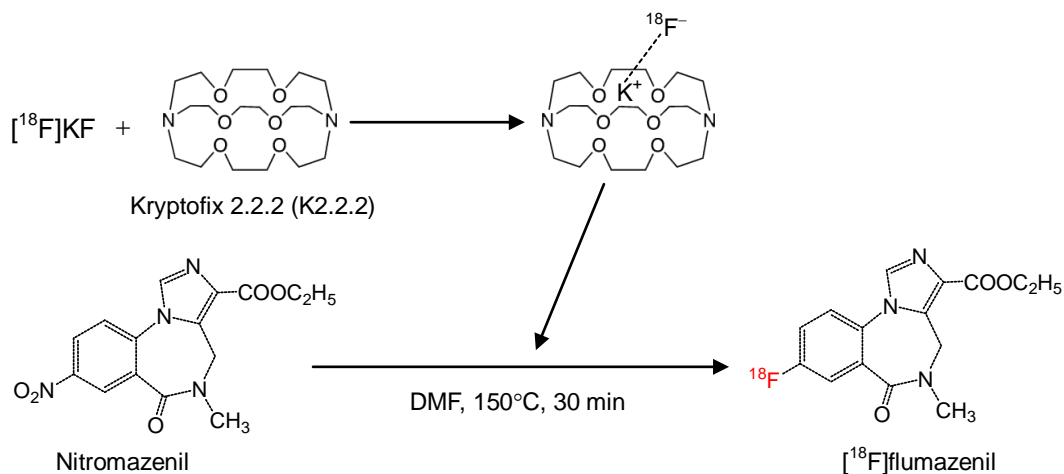


図2 [^{18}F]フルマゼニルの合成スキーム

3. 結果と考察

フッ素化後の反応終了液 132 mCi を Sep-Pak C18 で固相抽出することで、アセトニトリル抽出液 32 mCi (0.6 mL) が得られ、次いで水で希釈し、試料の極性を高めてから分取用 HPLC に導入した (図 4)。分取終了時で 20 mCi の ^{18}F FMZ が得られた。合成時間はターゲット水の回収から HPLC 分取終了まで約 80 分間を要した。図 3 はフッ素化の反応液の一部 (20 μL) を HPLC で分析したクロマトグラムである。FMZ のピークに一致した放射能のピークが検出され、 ^{18}F FMZ の生成を確認できた。しかし、この反応液を Sep-Pak C18 に通すとほとんどの放射能は未反応の ^{18}F として廃液中に回収された。図 4 は精製を目的としたセミ分取 HPLC による分離プロフィールである。反応液の注入後、約 23 分で FMZ が溶出し、その後、2 分後に反応基質が溶出されている。しかしながら、254 nm に吸収帯のある成分が FMZ のピークと重なっていることから、設定した溶離液などの分取条件は必ずしも最適とはいえない。合成収率は 10~15% (フッ素化反応終了時の放射能に基づく)、既報⁴⁾の収率 (~60%) に比べてはるかに低収率である。しかし、図 5 の示すように放射化学的純度は 98%以上を示していたが、分取クロマトグラムで確認された UV の夾雑成分は、わずかながら混入し、HPLC 分取条件を再検討する必要がある。一方、電流値 20 μA 、20 分の照射条件で得られた ^{18}F FMZ の実収量は、分取液の製剤化に要する時間を考慮しても、臨床応用が可能な量であると思われる。

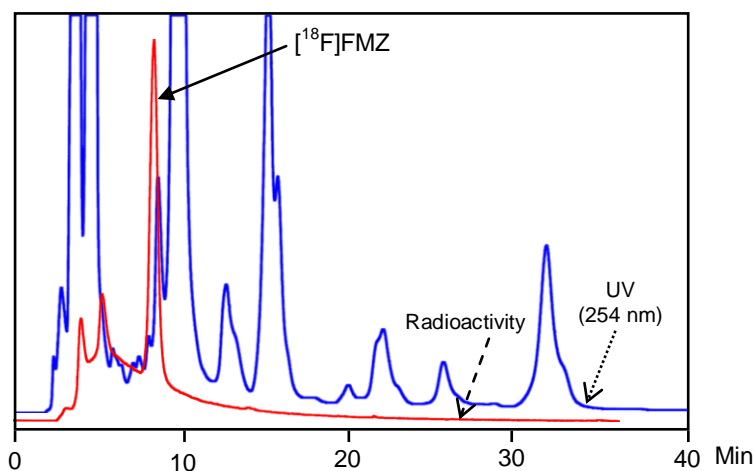


図 3 フッ素化後の反応液の HPLC クロマトグラム

フッ素化反応における水分の混入は、反応活性種であるフッ素アニオンと強固な水素結合を形成し、その結果反応性の低下を招く。そのため ^{18}F -標識化合物合成はフッ素化の前に少量のアセトニトリルを添加し、共沸によって無水化処理を確実にするための工程を追加する例が多い。図 1 の合成系統図からわかるように F-100 ではアセトニトリルなどの有機溶媒および水系の溶媒が反応容器に移送される流路はそれぞれ明確に独立し、相互の混入を極力防ぐ流路構成になっている。従って、本剤の合成では有機系溶媒に用いるリザーバーは K2.2.2/アセトニトリルと反応基質/アセトニトリル溶液の 2 つのリザーバーしか割り当てがなく、アセトニトリルを追加し

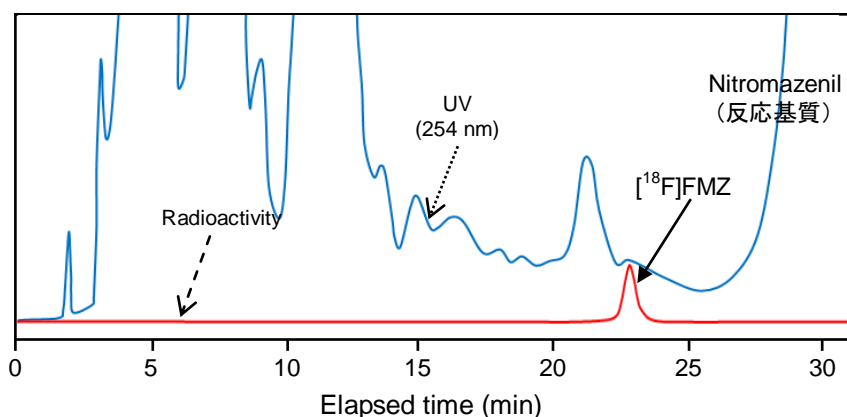
た加熱乾固は行うことができなかった。本研究で試みた FMZ 合成のなかには、ほとんどフッ素化反応が進行しなかった例もあり、今回示した合成結果を含め、この工程が確実に実施されているかを十分に検証する必要があると思われる。

標識化合物合成の自動化のためには、反応と分離・精製というスキームを常に考えなければならず、分離・精製の工程を含めて初めて合成の効率化が達成される。反応混合液の C18 による抽出、分取 HPLC への試料導入の操作は、合成者の被曝低減、合成時間の短縮のため自動化が必須である。そのため、F-100 と完全に連動する抽出・HPLC 自動注入ユニットの開発をおこなない、現在、応用試験を実施している。

今回は反応溶媒として *N,N*-ジメチルホルムアミド (DMF) のみを用いたが、非プロトン性溶媒で高沸点のジメチルスルホオキシド (DMSO) も本合成条件で使用可能であり、フッ素化の効率などを比較する予定である。また、近年マイクロウェーブ合成が、PET 製剤合成において反応時間の大幅な短縮、反応効率の改善に有効であるという報告があり⁵⁾、今後、この方法も併せて検討したい。臨床応用を目指した^[18F]FMZ のルーチン合成のためには今後、フッ素化の反応条件、特に、反応溶媒の種類、基質溶液の濃度、反応温度などをさらに検討する必要がある。

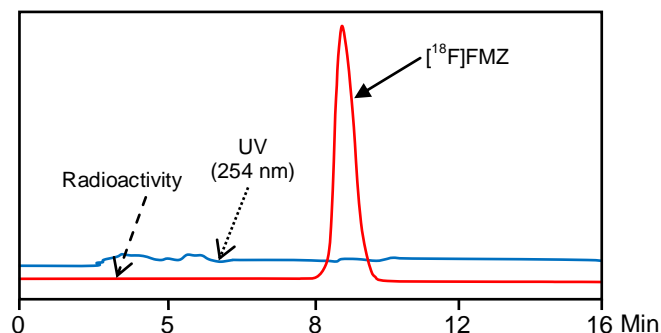
4. まとめ

住重製合成装置 F-100 を^[18F]FMZ 合成に適応した。合成の自動化、効率化のためには固相抽出や HPLC への自動注入装置が必須であった。HPLC 分取時点で得られた^[18F]FMZ は 20 mCi、全合成時間は約 80 分であった。設定した合成条件によって本剤をルーチンに製造して PET 検査に供する可能性があるものと結論された。



Mobile phase: 0.01M H₃PO₄/CH₃CN (80/20)
 Column: μ -Bondoshre (300 × 10 mm, 18, 15 μ m)
 Flow rate: 5 ml/min
 Detector: UV (254 nm), NaI

図 4 ^[18F]フルマゼニルの HPLC 精製プロフィール



Mobile phase: 0.01M H₃PO₄/CH₃CN (80/20)
 Column: YMC-Pak A-303 (250 × 4.6 mm, 5 μm)
 Flow rate: 1 ml/min
 Detector: UV (254 nm), NaI

図5 [18F]フルマゼニルの分析 HPLC クロマトグラム

参考文献

- 1) Savic I, Persson A, Roland P, Pauli S, Sedvall G, Widén L. In-vivo demonstration of reduced benzodiazepine receptor binding in human epileptic foci. *Lancet* 1988; 15,2(8616):863-866.
- 2) Heiss WD, Kracht L, Grond M, Rudolf J, Bauer B, Wienhard K, Pawlik G. Early [11C]Flumazenil/H₂O positron emission tomography predicts irreversible ischemic cortical damage in stroke patients receiving acute thrombolytic therapy. *Stroke* 2000 ;31(2):366-369
- 3) Chang YS, Jeong JM, Yoon YH, Kang WJ, Lee SJ, Lee DS, Chung JK, Lee MC. Biological properties of 2'-[18F]fluoroflumazenil for central benzodiazepine receptor imaging. *Nucl Med Biol* 2005;32(3):263-268.
- 4) Ryzhikov NN, Seneca N, Krasikova RN, Gomzina NA, Shchukin E, Fedorova OS, Vassiliev DA, Gulyás B, Hall H, Savic I, Halldin C. Preparation of highly specific radioactivity [18F]flumazenil and its evaluation in cynomolgus monkey by positron emission tomography. *Nucl Med Biol* 2005;32(2):109-116.
- 5) Guo N, Alagille D, Tamagnan G, Price RR, Baldwin RM. Microwave-induced nucleophilic [18F]fluorination on aromatic rings: synthesis and effect of halogen on [18F]fluoride substitution of meta-halo (F, Cl, Br, I)-benzonitrile derivatives. *Appl Radiat Isot* 2008 ;66(10):1396-1402.

Automated [^{18}F]flumazenil synthesis in the F-100 FDG synthesizer

K. Terasaki*¹, Y. Ishikawa*², M. Shozushima*³, S. Goto*⁴ and R. Iwata*²

*¹Cyclotron Research Center, Iwate Medical University
348-58 Tomegamori, Takizawa 020-0173, Japan

*²CYRIC, Tohoku University
Aramaki, Aoba-ku, Sendai 980-8578, Japan

*³Department of Dental Radiology, School of Dentistry, Iwate Medical University
19-1 Uchimarui, Morioka, 020-8505 Japan

*⁴Nishina Memorial Cyclotron Center, Japan Radioisotope Association
348-58 Tomegamori, Takizawa 020-0173, Japan

Abstract

[^{18}F]flumazenil ([^{18}F]FMZ), fluorine-18 labelled radiotracer, is that it possesses longer half-life (110 min) than carbon-11 and allows the examination of more patients per tracer production and the possibility of longer acquisition protocols. We performed the radiosynthesis of [^{18}F]FMZ by modifying the commercial FDG synthesizer module (F-100, Sumitomo Heavy Industries, Ltd.). [^{18}F]FMZ was synthesized by nucleophilic labelling of a solution of nitromazenil, nitro-precursor, in 0.5–1 mL of DMF using $\text{K}^{18}\text{F}/\text{Kryptofix 2.2.2}$ complex avoiding a performed azeotropic drying procedure. After semi-preparative HPLC purification, the [^{18}F]FMZ was obtained in 15–20% radiochemical yields (decay not corrected), with more than 95% radiochemical purity.