

ループ標識法を用いた $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$ の迅速・効率的な合成法の検討

寺崎一典¹、石川洋一²、後藤祥子³、高橋 智⁴、小豆島正典⁵、岩田 錬²

¹岩手医科大学サイクロترون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ترون・ラジオアイソトープセンター
980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉

³日本アイソトープ協会仁科記念サイクロترونセンター
020-0173 岩手県岩手郡滝沢村滝沢字留が森 348-58

⁴岩手医科大学内科学講座神経内科・老年科
020-8505 岩手県盛岡市内丸 19-1

⁵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

1 はじめに

Pittsburgh compound-B ($[^{11}\text{C}]\text{PIB}$) は PET によるアルツハイマー病 (AD) 患者のアミロイド β たんぱく質 (A β) の脳内蓄積を可視化するアミロイドイメージング剤である。 $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$ は既存の診断方法では困難な AD の早期診断、さらに AD 発症前の診断に有用と期待され、現在、最も広く臨床研究に利用されている。

$[^{11}\text{C}]\text{PIB}$ は米国ピッツバーグ大学の Mathis ら¹⁾によって開発された。原報では、 $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$ はフェノール基を保護するメトキシメチル基を保護基とする反応基質を用いて、 $[^{11}\text{C}]\text{ヨウ化メチル}$ ($[^{11}\text{C}]\text{MeI}$) によるメチル化反応、酸脱保護により合成された。その後、より反応性の高い標識前駆体である $[^{11}\text{C}]\text{メチルトリフレート}$ ($[^{11}\text{C}]\text{MeOTf}$) によって保護基を持たない基質に直接標識が可能になり、高収率で $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$ が得られるようになった²⁾。

ループ標識法による $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$ の合成は Wilson ら³⁾によって最初に報告された。高速液体クロマトグラフィー (HPLC) のサンプルループ内での $[^{11}\text{C}]\text{MeOTf}$ による $[^{11}\text{C}]\text{メチル化}$ 反応は迅速、高収率で、副生成物を伴わない合理的な合成を可能にした。また、近年、ループ法専用合成装置を用いて、標識合成の高効率化とルーチン合成の最適化の検討、固相抽出法による製剤化に関する報告が見受けられる。^{4,5)}

ループ標識法は、細いチューブをループ状にしたものに基質反応溶液を入れ、 $[^{11}\text{C}]\text{MeI}$ あるいは

$[^{11}\text{C}]\text{MeOTf}$ などのメチル化剤と反応させるフロー式の迅速・効率的な標識合成法である。この合成法は、いままで反応容器を用いたバッチ（バブリング）法で合成されてきたほとんどの ^{11}C -メチル化標識化合物に適応可能であると思われる^{4,6)}。最初ループ法は HPLC のインジェクションループを反応ループとして使い、標識反応を行うものとして Wilson ら⁶⁾により開発された。この方法は $[^{11}\text{C}]\text{MeI}$ による標識反応後、インジェクションバルブを切り替えてループを通るように HPLC 溶離液を流すことで迅速に HPLC カラムに試料を導入できる簡便な方法であるが、カラムには常に試料液とともに空気の混入を伴う。また、合成前のループの乾燥工程には十分注意を払う必要があった。それに対し、本合成で用いた方式^{7,8)}の場合、反応ループと HPLC インジェクションループの間にリザーバーを設置し、これに標識反応後のループをサンプルループ容量（2 mL）に相当する溶媒で洗い流し、リザーバーに回収してから完全に HPLC ループを試料で満たすため、空気の混入を全く気にすることなしに効率的に反応物を HPLC カラムに導入できる。また、本法はループ合成条件の最適化を指向する場合にも適している方法である。さらに、この方法を発展させたループ-SPE（固相抽出）法が開発され、ルーチンな製造に適応できるものと期待されている⁸⁾。

本報告は、 $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$ をループ標識法によって合成し、臨床利用可能な薬剤に成熟させることを目的として、高効率化のための反応溶媒、反応時間、HPLC 分離・精製などの最適な反応条件を検討した。また、固相抽出法による製剤化の方法、および製剤の安定性についても述べる。

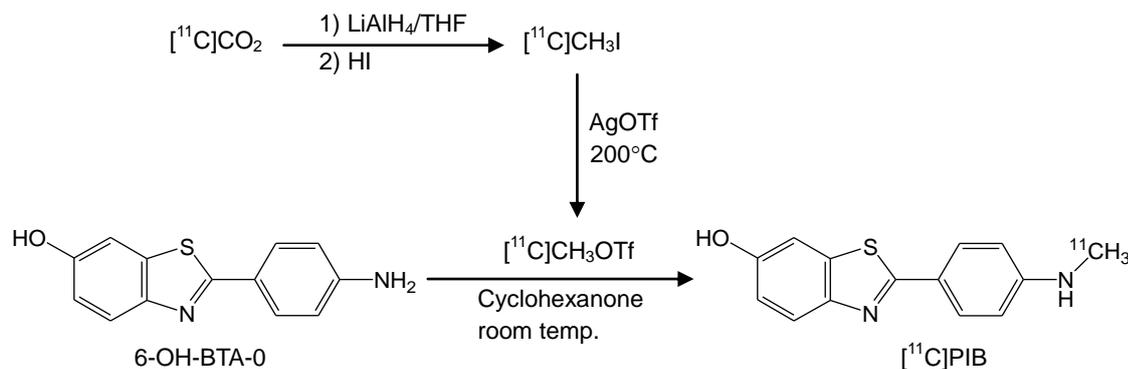


図 1 $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$ の合成スキーム

2 方法

2.1 ループ標識合成装置

標識合成の中心となる住友重機製の ^{11}C 標識合成装置は、トレイ上に電磁弁を配置し、その間をテフロン製の細い配管で連結しており、このトレイを交換することによって、種々の ^{11}C -メチル化標識化合物に対応できるように設計された応用性の高い装置である。ループ法への適応は、AgOTf カラムを 200°C 程度に加熱できる小型電気炉の設置、カラムの予備調整のためのヘリウムガス（50 mL/min）の導入、ループ反応物の洗い出しのためのシリンジポンプの設置等であり、装置の基本構造の変更なしに実施可能であった。反応ループは内径 0.75 mm、全長 100 cm の FTFE（テフゼル）チューブを直径 5 cm のループ状に巻いて作成した。図 2 に示すようにループは AgOTf カラムの下流に設置され、HPLC インジェクションユニットのリザーバーに接続されている。

2.2 反応ループの調製

代表的な非プロトン性の反応溶媒としてメチルエチルケトン（MEK）、ジメチルホルムアミド（DMF）およびジメチルスルホオキシド（DMSO）、シクロヘキサノン（CHO）をそれぞれ 60 μL で反応基質 2-(4'-Aminophenyl)-6-hydroxybenzothiazole（6-OH-BTA-0）（PharmaSynth AS, Estonia）1 mg を完全に溶解した後、その全量を反応ループに注入し、チューブ全体に分散させ保持させた。

2.3 $[^{11}\text{C}]$ メチルトリフレートによるループ標識反応

サイクロトロンのプロトン照射（電流値：25 μA 、照射時間：20 分間）によって得られる $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ を Lithium aluminium hydride (LiAlH_4) / THF (ABX) とヨウ化水素酸 (HI) によって $[^{11}\text{C}]$ ヨウ化メチルに合成した後、ヘリウム気流下 (20 mL/min)、210°C に加熱した AgOTf-Graphpac GC カラムに通し、 $[^{11}\text{C}]\text{MeOTf}$ へ変換、これをループに導入した。ループ近傍に設置した放射能検出器の放射能値が最大に達した後、ガスフローを停止し、室温で 5~60 秒間反応させた。 $[^{11}\text{C}]$ ヨウ化メチルから $[^{11}\text{C}]\text{MeOTf}$ への変換、および $[^{11}\text{C}]$ メチル化標識反応はオンライン的に進行する。続いて、ループ内の反応物を 2 mL の HPLC 溶離液で洗い出し、さらにヘリウムガスでパージし、HPLC インジェクションユニットのリザーバーに移送した後、HPLC で分離精製を行った。HPLC の分取条件は以下のとおりである。

カラム：YMC-Pack ODS-A-323

溶離液：アセトニトリル/水=50/50

流 速：4 mL/min

検出器：UV (254 nm)

2.4 $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$ の製剤化

$[^{11}\text{C}]\text{PIB}$ の HPLC 分画をあらかじめ 0.5%アスコルビン酸ナトリウム溶液または注射用蒸留水 (15 mL) を入れたリザーバーに分取した後、10 mL のエタノールで活性化させ、注射用蒸留水で平衡化した Sep-Pak Light C18 (日本ウォーターズ) に通し、0.5%アスコルビン酸ナトリウム溶液または注射用蒸留水 (10 mL) で洗浄した。精製した $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$ を無水エタノール (0.5 mL、扶桑薬品工業) で溶出し、これを生理食塩水 (5 mL) の入った無菌バイアルに回収し、Millex-GV フィルター (ϕ 13 mm、日本ミリポア) に通して、生理食塩水 (15 mL) の入った無菌バイアル (30 mL) に捕集し注射剤とした。

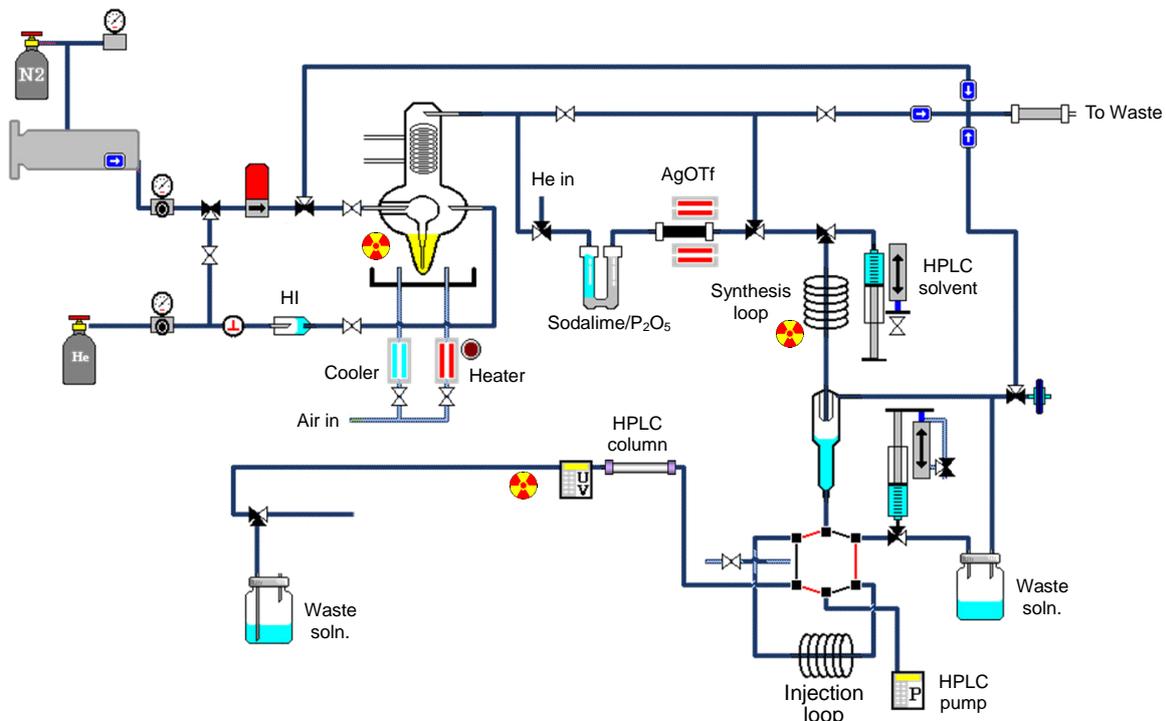


図 2 ループ標識法による $[^{11}\text{C}]$ メチル化合物合成装置の系統図

2.5 [^{11}C]PIB の品質試験

[^{11}C]PIB 注射剤中のアセトニトリル、CHO の残留試験をガスクロマトグラフ装置にて実施した。アスコルビン酸ナトリウムはアスコルビン酸測定用試験紙で行った。放射化学的純度と化学的純度は HPLC にて以下の測定条件により行った。

カラム：YMC A-303 (3.9×150mm)

溶離液：CH₃CN/20 mM 酢酸アンモニウム (55/45)

流速：1.0 mL/min

検出器：UV (254 nm、 γ 線検出器)

3 結果および考察

ループ標識法ではループ状にした内径の小さなチューブを反応容器として用いるため、通常のガラス反応容器に比し単位体積当たりの表面積（比表面積）が格段に大きくなり、これにより標識前駆体の迅速・効率的な捕獲、反応が可能になる。一般的に標識反応で用いられているバッチ（バブリング）法では、通常、反応溶媒は 0.3~0.5 mL 程度を用い、反応容器への吹き込み、加熱反応、冷却、クエンチ（希釈）、反応混合物のガス圧送移送、HPLC 注入など多くの工程が必要になる。また、バブリング法は、反応物の移送時に生じる損失、バブリングのため液中に挿入したチューブから反応液が逆流するなどの不具合が起こる可能性もある。一方、ループ法ではガスの気流下低速で標識前駆体をループに通すだけで標識反応させることができ、反応混合物を HPLC 溶媒で洗い出し、ガスでループを含む配管をパージすることで反応物の全量を HPLC カラムに注入できる。反応工程の簡略化、セットアップ、後処理の容易さなど優れた特徴を有する。

本法で実施した [^{11}C]PIB 合成結果は、反応溶媒に CHO を用い、反応時間 30 秒の設定で、収量は 1.7~3.3 GBq (25 μA 、20 分)、照射時間を除いた全合成時間は 27~30 分だった。ループ法に使用する反応溶媒は高沸点の非プロトン溶媒を基本とし、DMF、MEK がよく用いられるが、本研究では特に、環状ケトン体の CHO を用いた。Verdurand ら⁵⁾は市販のループ法専用合成装置 (AutoLoop、Bioscan) を使い、数種のケトン体溶媒で標識反応を行い、その結果、CHO (収率：13~15%、未補正) が MEK よりはるかに高い収率が得られ、DMF、DMSO では反応しなかったことを報告している。我々の結果でも CHO 以外の溶媒では満足な収率を得るには至らなかった。

反応溶媒として CHO、反応時間は 30 秒に設定してある。 [^{11}C]MeOTf の導入速度は低速ほどループの溶媒の高いトラップ効率が期待できるが、 ^{11}C の減衰効果を考慮しなければならないため、現実的な流速を 20 mL/min に設定した。 [^{11}C]ヨウ化メチルをヘリウムガス気流下 (20 mL/min) で AgOTf カラム通し、 [^{11}C]MeOTf をループに導入して約 30 秒でループの放射能が上昇してくる。約 2 分後に放射能値が最大に達したところで、ヘリウムガスのフローを停止し、標識反応を促進させるため数十秒ほど室温放置した後、HPLC 溶媒 (2 mL) で反応物を洗い出すことでループの放射能値は急激に低下し、このことから放射性的反応物はほぼ完全に移送されたことがわかる (図 3)。しかしながら、DMF、DMSO、および MEK では効率的な捕捉は実現しなかった。 [^{11}C]MeOTf は少量の水分の存在下でも容易に失活、分解してしまうので、ループ法の実施に当たっては、合成前にループを含む [^{11}C]MeOTf が通過するラインを十分に乾燥させることが非常に重要になってくる。本合成においても、10 分以上の乾燥工程を合成プログラムに組み入れて実施している。

図 4 に [^{11}C]PIB の代表的な分取 HPLC のクロマトグラムを示す。インジェクション開始後、約 3 分後に未反応の [^{11}C]MeOTf が失活・加水分解をうけて生成した [^{11}C]MeOH が分離溶出され、続いて反応基質、8 分後に目的物の [^{11}C]PIB が溶出している。この周辺には不純物成分のピークは確認されず良好に分離にされていることが明確に確認できる。また、14 分以降にわずかながら O-メチル化体の O- [^{11}C]Methylbenzothiazol 生成を認めるが、HPLC 精製で完全に除去される。反応容器を使って加熱反応の場合、多様な生成物を与えるのに対して、ループ法の場合、分解物、副生成物などの成分が少なく、目的生成物のフラクションのみを確実に分取することが可能である。また、使用した溶離液はアセトニトリル/H₂O (50/50) というシンプルな

組成であるため溶離液の調製は容易であった。

[¹¹C]MeOTf をループに導入し放射能値がプラトーに達した後、ガスフローを停止し、ここからの経過時間を反応時間 (0、5、15、30、60 秒間) とした。分取 HPLC クロマトグラムの未反応の [¹¹C]MeOTf が失活して生じた [¹¹C]MeOH と [¹¹C]PIB の面積のうち [¹¹C]PIB が占める割合を示している。反応時間に伴って PIB の割合が増加し、5 秒で 70%、30 秒で 88% となり、さらに 60 秒間では 95% まで向上するが、合成プロセスの迅速性を考慮して 30 秒間を妥当な反応時間であると判断し合成プログラムに組み入れた。

図 6 は固相抽出で使用する装置の系統図と固相抽出カラムの放射能の推移を示している。固相抽出の工程 (HPLC 分取液の希釈、洗浄、溶出) は 0.5% (v/w) アスコルビン酸ナトリウムを含む注射用蒸留水を用いた。分取液を含む希釈液、約 20 mL を C18 に通すと放射能が上昇し、洗浄後、0.5 mL の EtOH で精製された [¹¹C]PIB がほぼ全量溶出しているのが明確にわかる。その後、0.5 mL の PIB エタノール液として生理食塩水 5 mL 中に回収し、滅菌濾過後、さらに 15 mL の生理食塩水で希釈して製剤とした。

本法では、ロータリーエバポレーターによる濃縮乾固を行わず、固相抽出によって得られた [¹¹C]PIB のエタノール液を生理食塩水で希釈して製剤としている。一般的には HPLC 分取液は、ロータリーエバポレーターで加熱・乾固し溶媒を除いた後、注射用生理食塩水に溶解して製する (エバポレーター法)。しかしながら、この方法は、熱に不安定な化合物に対しては適応できず、高比放射能、高放射能濃度で製造した場合、放射線分解の影響を強く受ける。また、複数の製剤化に使用するエバポレーターに起因するクロスコンタミネーションの危険性を持っている。この工程には比較的時間を要し、自動化には適していない¹⁰⁾。乾固の後、難溶性のものには可溶化剤としてポリソルベートなどの可溶化剤の添加、放射線分解の防止のためアスコルビン酸の使用を考えなければならない。一方、固相抽出法による製剤化は使い捨ての固相抽出カートリッジを使い、短時間の精製を可能にする。精製物の溶出は通常エタノールで行われるため、そのまま投与可能なエタノール濃度に希釈して注射製剤とすることができる。エタノールは放射線分解防止と可溶化のため理想的な添加剤ではあるが、コールド体の溶解性やエタノールの副作用を十分に考慮し、製剤の安定性が保持できる最小のエタノール濃度を設定することが重要である。本合成では [エタノール濃度を 2.5% (最終濃度) と設定した。この場合、¹¹C]PIB の製造量を 1850 MBq (液量: 20 mL)、投与放射能を 370 MBq (4 mL) と仮定すると、投与されるエタノール量は 100 μL となる。静脈投与に際しては、エタノールに対する過敏症、肝障害、神経疾患のないことを十分に確認し、投与に要する時間を可能な限りゆっくり注入することが重要になる。

HPLC による [¹¹C]PIB 注射剤の放射化学的純度 (A) と化学的純度 (B) を図 7 に、品質試験の結果を表 1 に示す。注入放射能量は約 3.7 MBq (容量: 20~30 μL) とし、縦軸は相対的な放射能および UV (254 nm) を示している。¹¹C]PIB 注射剤は 2.5% EtOH を含む生理食塩水として調製してある。固相抽出による精製に注射用蒸留水を用いた場合、放射線分解に由来すると思われる放射性分解物が確認された (データは示していない)。一方、0.5% アスコルビン酸ナトリウム溶液を適用すると放射化学的純度はわずかながら改善した。アスコルビン酸ナトリウム溶液の HPLC 溶離液の添加も効果的と思われるが、254nm の波長はアスコルビン酸の吸収が強く表れるためその効果を確認することはできなかった。

まとめ

反応溶媒として CHO、および 30 秒間の反応時間で安定な収率で目的物が得られた。25 μA、20 分の照射条件で、収量は 1.7~3.3 GBq (75~115 mCi)、合成時間は 27~30 分を要した。比放射能は合成終了時において 17-21 GBq/μmol、放射化学的純度は 98-99%、注射剤の残留溶媒アセトニトリルは 13.9 ppm、シクロヘキサノン検出限界以下、アスコルビン酸は試験紙で測定し 50 ppm 以下だった。固相抽出法による製剤化は省力的、かつ効率的であり、製剤の安定性も十分に確保されていることを確認した。ループ標識法、および固相抽出による製剤化によって、迅速・簡便に [¹¹C]PIB 合成が達成された。

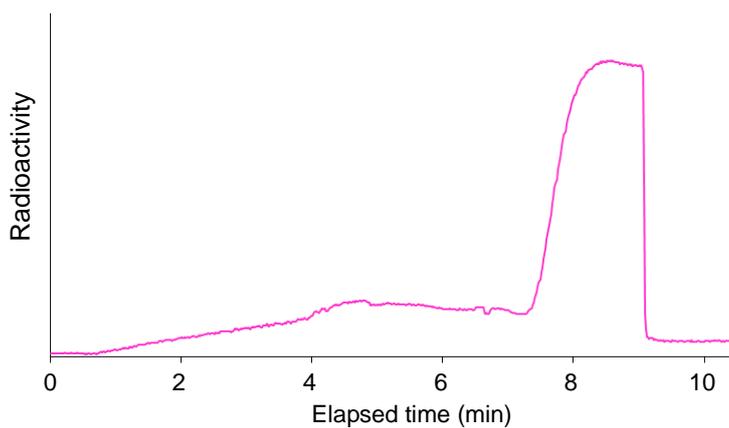
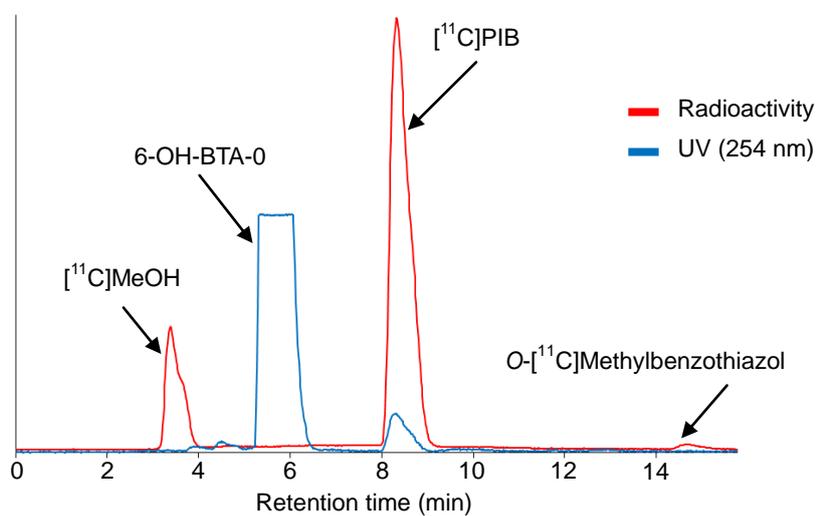


図3 合成ループの ^{11}C MeOTf トラップ



- Reaction solvent: Cyclohexanone
- Reaction time: 30 sec

図4 ^{11}C PIBの分取HPLCクロマトグラム

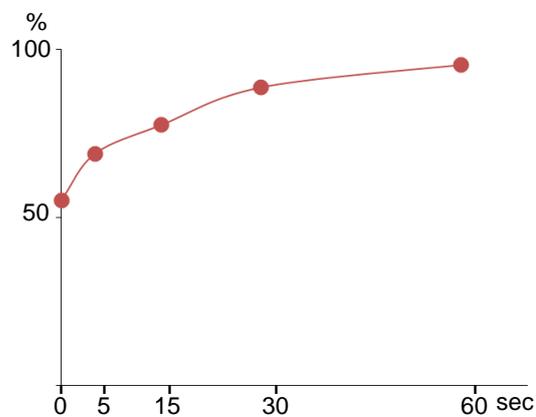


図5 反応時間と PIB の収率

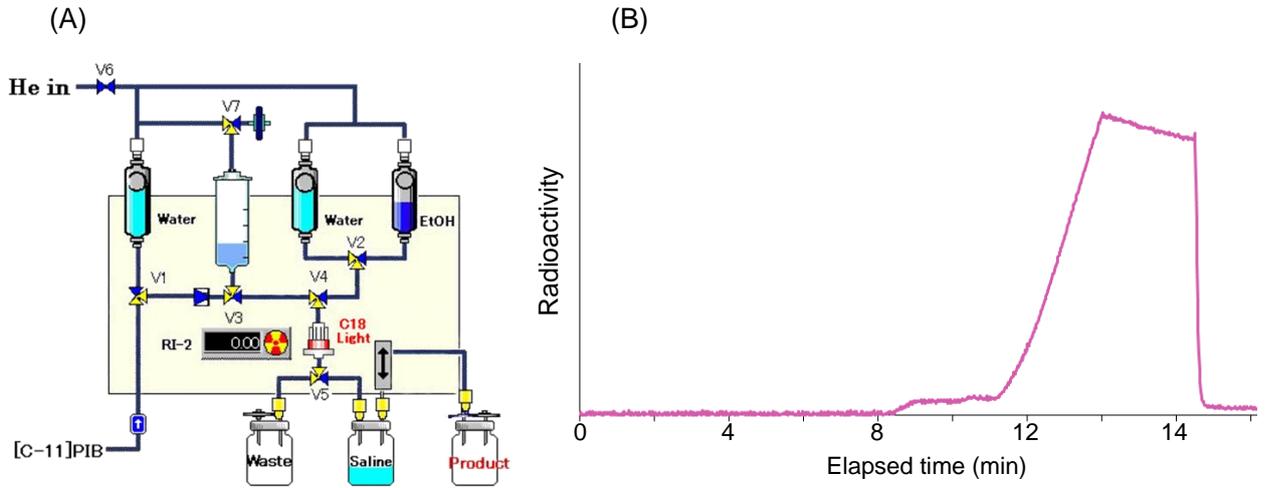


図6 固相抽出法による製剤化：
精製・製剤化装置 (A)および Sep-Pak C18 の放射能 (B)

表1 $[^{11}\text{C}]$ PIB 注射剤の品質試験結果

試験項目	結果
比放射能	17–21 GBq/ μmol
放射化学的純度	99–98%
MeCN	13.9 ppm
Cyclohexanone	ND
Sodium ascorbate	< 50 ppm

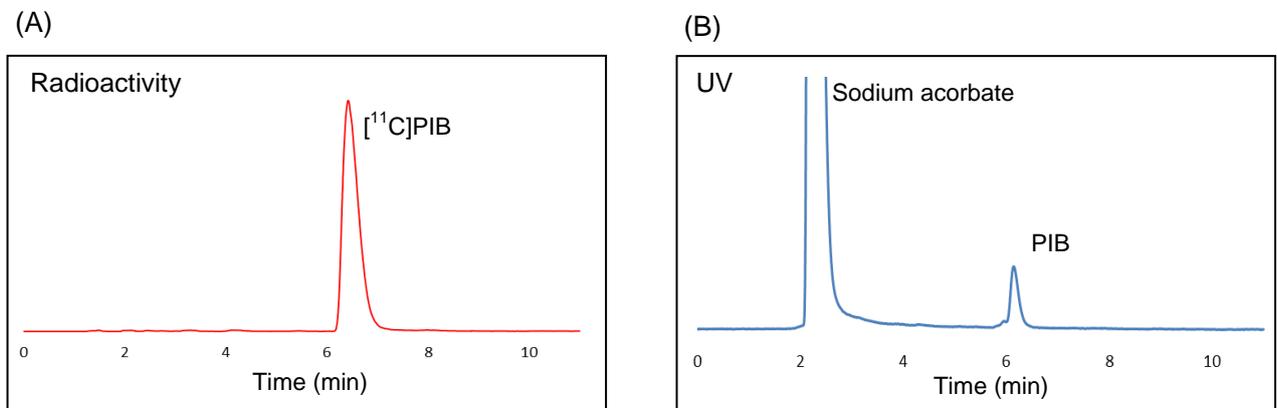


図7 $[^{11}\text{C}]$ PIB 注射剤の放射化学的純度 (A)と化学的純度 (B)

参考文献

1. Mathis CA, Wang Y, Holt DP, Huang GF, Debnath ML, Klunk WE. Synthesis and evaluation of ^{11}C -labelled 6-substituted 2-arylbenzothiazoles as amyloid imaging agents. *J Med Chem* 2003; 46:2740–2754.
2. Solbach C, Uebele M, Reischl G, Machulla HJ. Efficient radiosynthesis of carbon-11 labelled uncharged thioflavin T derivatives using [^{11}C]methyl triflate for b-amyloid imaging in Alzheimer's disease with PET. *Appl Radiat Isotop* 2005; 62:591–595.
3. Wilson AA, Garcia A, Chestakova A, Kung H, Houle S. A rapid one-step radiosynthesis of the β -amyloid imaging radiotracer N-methyl- ^{11}C 2-(40-methylaminophenyl)-6-hydroxybenzothiazole(^{11}C -6-OH-BTA-1). *J Labelled Compd Radiopharm*. 2004; 47: 679-682.
4. Wilson AA, Garcia A, Jin L, Houle S, Vasdev N. Utility of commercial radiosynthetic modules in captive solvent [^{11}C]methylation reactions. *J Labelled Compd Radiopharm*. 2009; 53: 490-492.
5. Verdurand M, Bort G, Tadino V, Bonnefoi F, Le Bars D, Zimmer L. Automated radiosynthesis of the Pittsburg compound-B using a commercial synthesizer. *Nucl Med Commun*. 2008; 29(10):920-926.
6. Wilson AA, Garcia A, Jin L, Houle S. Radiotracer synthesis from [^{11}C]iodomethane: a remarkably simple captive solvent method. *Nucl Med Biol* 2000; 27:529–532.
7. Iwata R, Pascali C, Bogni A, Miyake Y, Yanai K, Ido T. A simple loop method for the automated preparation of [^{11}C]raclopride from [^{11}C]methyl triflate. *Appl Radiat Isotop* 2001; 55:17–22.
8. Iwata R, Pascali C, Bogni, A, Yanai K, Kato M, Ido T, Ishiwata K. A combine loop-SPE method for the automated preparation of [^{11}C]doxetin. *J Labeld Compd Radiopharm*. 2002; 45:271-280.
9. Mock BH, Zheng QH, Degrado TR. Avoid DMF when labeling with ^{11}C -methyl triflate. *J Label Compd Radiopharm* 2007; 50:S197
10. Lemaire C, Plenevaux A, Aerts J, Fiore GD, Brihaye C, Bars DL, Comar D, Luxen A. Solid phase extraction—an alternative to the use of rotary evaporators for solvent removal in the rapid formulation of PET radiopharmaceuticals. *J Labeld Compd Radiopharm*. 1999; 42:63-75

Effective synthesis of [^{11}C]PIB for clinical application by using loop method

K. Terasaki¹, Y. Ishikawa², S. Goto³, S. Takahashi⁴, M. Shozushima⁵ and R. Iwata²

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

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

³Japan Radioisotope Association, Nishina Memorial Cyclotron Center.
348-58 Tomegamori, Takizawa 020-0173, Japan

⁴Department of Neurology and Gerontology, Iwate Medical University
19-1 Uchimaru, Morioka, 020-8505, Japan

⁵Department of Dental Radiology, School of Dentistry, Iwate Medical University
19-1 Uchimaru, Morioka, 020-8505, Japan

Abstract

The Pittsburg Compound B (^{11}C]PIB) is a radiotracer for imaging amyloid plaques in Alzheimer's disease by PET. A simple and rapid preparation of ^{11}C]PIB was achieved with an automated methylation labelling system based on the "loop method". ^{11}C]MeOTf passed through the loop, which contained 1 mg of precursor, 6-OH-BTA-O in Cyclohexanone (CHO). When activity peaks in the loop, the flow is stopped and the reaction allowed to proceed. After 30 sec, the reaction mixture was purified with HPLC. The products of the reaction are transferred by passing mobile phase to a semi-preparative HPLC system. Solid phase extraction (SPE) was used for the formulation of ^{11}C]PIB. The method involves dilution of the previously purified HPLC compound with water, trapping of the activity on a C18 cartridge, washing off the C18, elution of the radiopharmaceutical with 0.5 mL of ethanol and dilution with sterile isotonic saline solution. After optimization of the production process (modules drying, solvents, reaction time, and formulation), the method produced ^{11}C]PIB in less than 30 min after end of bombardment, with a 10% radiochemical yield, a 17-21 GBq/ μmol specific activity and a high radiochemical purity (>99%). In all cases, organic solvent levels in the injectable solution were below the recommended limits. These final ^{11}C]PIB activities are sufficient for a human PET scan.