

[¹¹C]メチオニンの効率的、信頼性の高い製造法の開発： オンカラム標識法の最適化と固相抽出による製剤化

寺崎一典¹、石川洋一²、小豆島正典³、別府高明⁴、後藤祥子⁵、岩田 錬²

¹岩手医科大学サイクロトロンセンター
020-0603 岩手県滝沢市留が森 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 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉

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

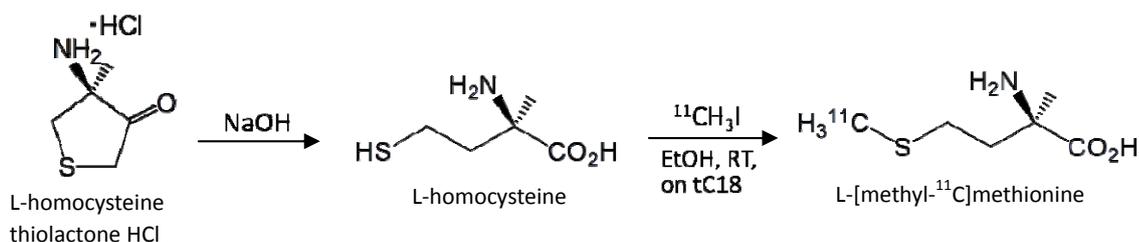
⁴岩手医科脳神経外科学講座
020-8505 岩手県盛岡市内丸 19-1

⁵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
020-0603 岩手県滝沢市留が森 348-58

1 はじめに

[¹¹C]メチオニン ([¹¹C]MET) は FDG では診断が困難な脳腫瘍に用いられ、とくに神経膠腫の術前診断や術後の再発診断、放射線壊死と再発の鑑別に有用性が高いとされている^{1,2)}。最初の[¹¹C]METの合成は、1970年代に開発されたもので、[¹¹C]ヨウ化メチルによる L-homocysteine thiolactone の S-¹¹C-メチル化反応に基づいて行われた³⁾。この反応には[¹¹C]ヨウ化メチルのトラップに冷却、標識反応は加熱が必要とされ、また、生成物は HPLC によって精製されるため、多くの時間を必要とし、自動化への適応は難しかった。その後、Pasli ら⁴⁾によって報告された Sep-Pak C18 カートリッジを用いた標識反応、オンカラム ¹¹C-メチレーション (表 1) は室温でも迅速で、操作の大幅な簡便化と合成時間の短縮がなされた。また、容易に自動化が可能であるため、現在、多くの PET 施設で標準的な[¹¹C]MET 製造法として用いられている。

本研究の目的は、[¹¹C]メチオニン製造の簡便法であるオンカラム標識法と固相抽出による製剤化法をリンクさせ、製造の迅速・効率化することにある。ロータリーエバポレーターによらない固相抽出法による製剤化は煩雑なプロセスを回避できるため、製造者の大幅な負担軽減が図られるほか、自動化が容易になり、また、製剤の高品質化も実現できる可能性がある。

図1 [¹¹C]METの合成スキーム

2 方法

2-1 SPE・製剤化モジュール

SPE・製剤化装置は図2に示すように、モジュールの前面に希釈用リザーバー（容量25 mL）、SPEカートリッジの洗浄液用（20 mL）および溶出液用（10 mL）のガラス製リザーバーを配置している。また、カートリッジの背面（装置内部）に設置した放射能センサーによって、放射能のモニタリングが可能であり、カートリッジへの通液、水洗浄、および溶出の各工程を確実に実施でき、最終の製剤調製までを自動で行うことができる。液の移送は窒素ガス圧利用し、モジュール導入口にはガス調圧器が設置されており、通液速度の可変が可能である。このためイオン交換樹脂カラムなど低流量（< 5 mL/min）での通液が必要な場合にも対応できる。本モジュールの制御には、USB対応のインターフェースモジュールを通して動作する専用のプログラムを、LabView（National Instruments）を用いて開発した。

2-2 [¹¹C]メチオニンのオンカラム標識合成⁴⁾

サイクロトロンによる¹⁴N(p,α)¹¹C核反応を経て製造した[¹¹C]CO₂を0.1 M Lithium aluminium hydride/THF (ABX)とヨウ化水素酸によって[¹¹C]ヨウ化メチルを合成した後、窒素ガス気流下（15~20 mL/min）、0.2 mLの反応液を注入したSep-Pak tC18 Plusカートリッジ（400 mg、37-55 μm、Waters）に通し捕集した。カートリッジ背面に設置した放射能センサーの値が最大に達した後、ガスフローを停止し、さらに反応を促進させるため30秒間放置させた後、tC18の生成物を注射用蒸留水（5 mL）、あるいは0.5%酢酸水溶液（3 mL）で反応物を洗い出した。標準的な反応液の調整は以下に行った。1 M NaOH水溶液（1 mL）にエタノール（1 mL）を加えて0.5 M NaOHの水-EtOH（1:1）溶液を調製し、この0.5 mLにL-homocysteine thiolactone·HCl（7.5 mg）を溶解する。この調製した液（0.2 mL）をシリンジに取り、tC18カートリッジに注入した。尚、tC18はエタノールを通し、完全に乾燥させた後使用した。

2-3 [¹¹C]メチオニンの製剤化

tC18カートリッジの水溶出液をあらかじめ注射用蒸留水（5 mL）を入れた希釈用リザーバーに回収した後、10 mLのエタノールで活性化、および注射用蒸留水で平衡化したOasis MAXカートリッジ（Waters）に、流速3~4 mL/minで通した後、注射用蒸留水（10 mL）で洗浄、50 mMリン酸緩衝液（5 mL）（大塚製薬）で溶出した。この溶出液を生理食塩水（5 mL）の入った無菌バイアルに捕集し注射剤とした。一方、中和用の0.5%酢酸水溶液（3 mL）でtC18カートリッジから反応生成物を洗い出し、ロータリーエバポレーターのフラスコに捕集し、過剰の酢酸を溶媒とともに充分留去した後、生理食塩水を加えて残渣を溶かし比較対照の注射剤とした。

2-4 [¹¹C]メチオニンのHPLC測定⁵⁾

放射化学的純度と化学的純度の測定は、YMC-Pack Pro C18カラム（4.6 × 250 mm、5 μm）（YMC）を用い、溶離液10 mM KH₂PO₄（pH 2.2）、紫外吸収波長225 nm、流速1 mL/minの条件で行った。L-homocysteine thiolactone·HCl、L-homocysteine、L-homocystine、メチオニンの各標準物質により各

ピークを同定し、クロマトグラム用データ処理装置 Chromato-PRO (ランタイムインストルメント) を用いて各濃度を算出した。鏡像異性体の測定は、キラルカラム CROWNPAK CR-I(+) (3.0 × 150 mm、5 μm) (ダイセル) を用い、溶離液に過塩素酸水溶液 (pH 1.5) / アセトニトリル (70/30)、流速 0.4 mL/min の条件で実施した。D-[¹¹C]メチオニン、L-[¹¹C]メチオニンはそれぞれ、保持時間 4.5 min、7.8 min で分離することができた。

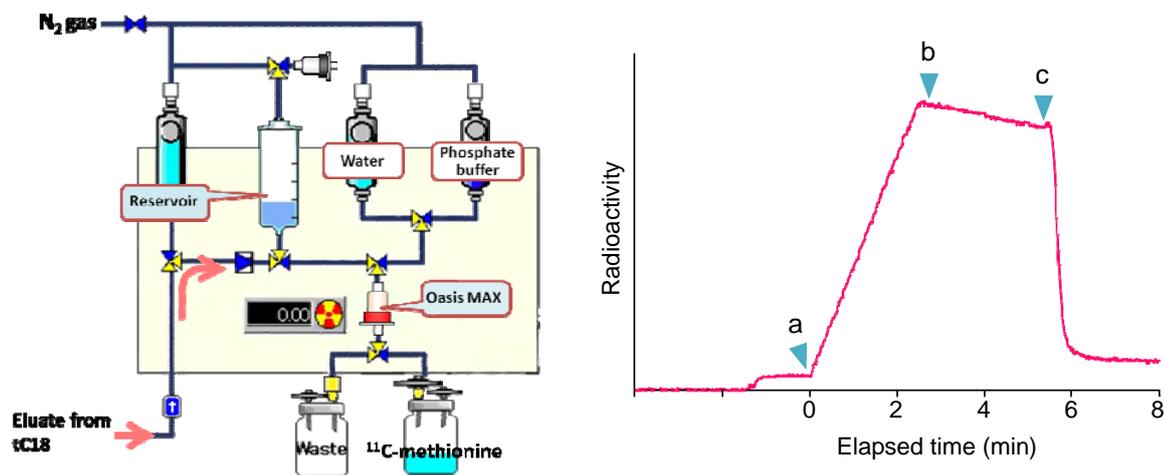


図2 SPE 製剤化装置の系統図と Oasis MAX の放射能の推移

a: 希釈 tC18 溶出液の Oasis MAX への通液, b: 水による洗浄, c: リン酸緩衝液による溶出

3 結果および考察

オンカラム標識法による [¹¹C]MET 合成は、使い捨ての C18 カートリッジに反応液を注入して標識前駆体として [¹¹C]ヨウ化メチルを用いる迅速・効率化な製法である。しかし、この製法の運用に関して、いくつかの問題点に対する対処が必要となる。揮発性の放射性ガスも同時にプロダクトバイアルに捕集される可能性が高く、その除去には窒素ガスなどの不活性ガスで短時間 (1 分間) バブリングを行う。HPLC 精製の工程を省いているので、反応基質および基質から生じた生成物が原理的には全て注射剤中に混入することになる。また、基質反応液に含まれる少量のエタノール (100 μL) が最終製剤中に持ち込まれる。さらに、反応液に含まれるアルカリのため製剤は最終的に中和を必要とする。一方、国内では標識後の製剤化は、主にエタノールの除去を目的とし、ロータリーエバポレーターによって加熱乾固を行った後、生理食塩水で溶解して注射剤としている (エバポレーター法)。エバポレーター法は回収率が不安定、クロスコンタミネーション、溶媒留去に時間を要するなど、安定な製造を妨げる多くの不確実的要素が存在する。本報告では、[¹¹C]MET のオンカラム標識法を最適化するとともに、エバポレーター法によらないイオン交換固相による製剤化法の開発を行った。この方法を適応することにより、製造における大幅な労力の軽減に寄与できるとともに、精製の過程でエタノールが除去され、また、不純物成分の低減につながる可能性があり、今後の [¹¹C]MET 製造の標準法になりうるものと期待される。

イオン交換樹脂を用いたアミノ酸の精製法は、最も古典的かつ代表的な方法として汎用されている。中性アミノ酸であるメチオニンは、等電点が 5.74、アミノ基の解離定数が 2.13、カルボキシル基の酸解離定数が 9.28 であることから陰イオン交換、陽イオン交換反応いずれにでも精製が可能であるが、本法の適用に関して、反応溶液にアルカリが含まれ、標識後の tC18 からの溶出液はアルカリ性 (≥pH 9) を示すことより容易に陰イオン交換反応が進行すると判断し、陰イオン交換固樹脂を使用した。4 級アンモニウム基を官能基にもつ強塩基陰イオン交換固相である Sep-Pak Accell QMA カートリッジ、および、ポリマー樹脂をベースと

する、逆相とイオン交換の2つの相互作用で保持が可能な Oasis MAX カートリッジを使用した。

固相の種類によって固相抽出操作における最適な通液速度は異なる。イオン交換樹脂の場合、イオン交換反応は逆相、順相よりゆっくり進行するので、流速は十分遅くする必要があり、本法では流速の制御にガス圧調整器を設置することで対処した。図2はSPE製剤化モジュールの系統図および固相抽出カートリッジ Oasis MAXの放射能の推移を示している。標識反応終了後の tC18 からの水溶出液と希釈水、約 10 mL をカートリッジに通すと放射能が上昇し、水洗浄、50 mM リン酸緩衝液で効率的に溶出しているのが明確にわかる。その後、溶出液は生理食塩水 5 mL を入れた滅菌バイアルに回収した。通液を開始して、洗浄を経て ^{11}C MET の溶出まで約 6 分を要し、pH は中性であり、2.4~3.4 GBq の実収量が得られた(照射条件: 20 μA 、10min)。一方、エバポレーターによる製剤化は、加熱温度 85°C で酢酸溶媒を留去し、残査を生理食塩水で溶解し注射剤を得た。

^{11}C MET のオンカラム標識法と SPE 製剤法における放射能分布を表1に示す。基質反応液として、0.5 M NaOH/エタノール (60/40)、ラクトン 3 mg、液量 0.2 mL を用いた。値は tC18 にトラップされた全放射能 (tC18 + AC-2 + Waste + MAX + ^{11}C -MET の合計) に対する各残留放射能の比 (%) で表している。特に、Oasis MAX の占める割合が 10.9% と高く、収率に影響しているが、 ^{11}C メチオニンとしては 80% と許容できる範囲にあった。また、Oasis MAX に対するトラップ率は 98% 以上であり、ほとんど漏出 (ブレイクスルー) はなく、選択したイオン交換カートリッジは効果的に機能することを確認した。一方、同じ 4 級アンモニウムを官能基にもつ Accell QMA の場合、この条件下では保持率は非常に低く、 ^{11}C MET の精製には適していなかった。

表1 ^{11}C MET 製造後の放射能分布

	Radioactivity distribution (%)*
Sep-Pak tC18	1.7
Charcoal (Waste gas)	4.6
Waste 1 (Waste liq.)	2.2
Waste 2 (Waste liq.)	< 1
Oasis MAX	10.9
^{11}C methionine	79.8

(decay corrected at EOS, n=3)

*Each data represent the ratio to total activity trapped on tC18.

*Activity of the product prepared by this method was 2.4-3.4 GBq (Irradiation time 10 min with a beam intensity of 20 μA).

エバポレーター法および SPE 法の製剤化によって得られた ^{11}C MET 注射剤の HPLC クロマトグラムと不純物成分の定量の結果を示す (図 3、図 4)。反応基質から生成した数種の不純物が検出された。いずれの場合もアルカリの作用で基質ラクトンが開環して生成した homocysteine が検出されたが、その量は 0.56 mg (SPE 法) と 1.18 mg (エバポレーター法) であり、米国薬局方 (USP)、ヨーロッパ薬局方 (EP) の検出限度 (2 mg/V) 以下だった。また、エバポレーター法ではヨウ化物と UV では同定が困難な不純物 (d) が認められた。両者の比較において SPE 法は不純物としての総量は少なく、イオン交換固相の精製効果を反映した結果であると思われる。

基質ラクトン環はアルカリの作用によって開環することで ^{11}C -メチル化が進行する。しかしながら、過剰なアルカリは ^{11}C MET の L-異性体の収率の減少をきたす⁹⁾。Gomzina らは、標準的な反応溶媒 (0.5 M NaOH/エタノール、1/1) を用いた L-homocysteine thiolactone のオンカラム法で得られる L- ^{11}C MET は 90% を下回り、また、反応液のアルカリ濃度 (< 0.5 M) およびエタノールの存在比を低くすることで鏡像異性の純

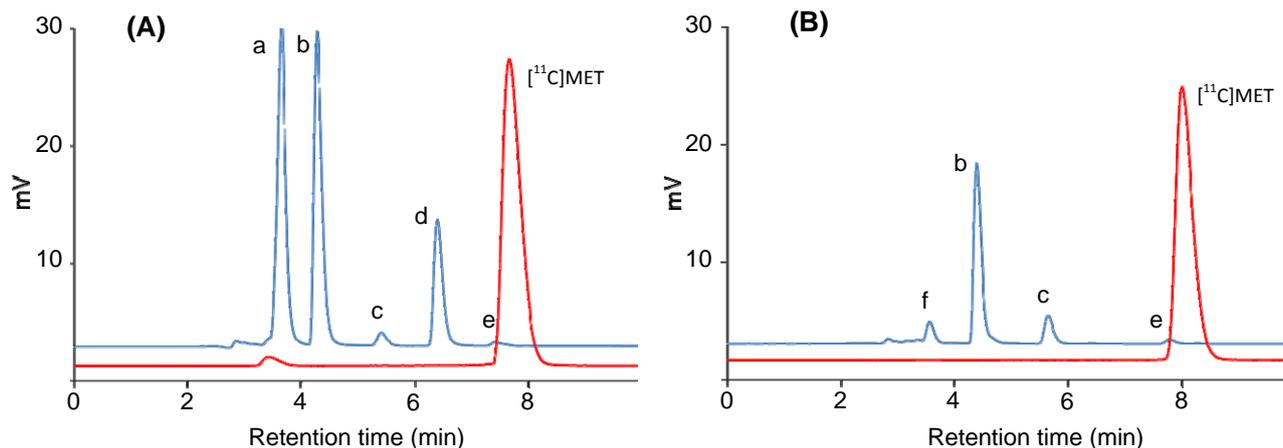


図7 $[^{11}\text{C}]\text{MET}$ の HPLC クロマトグラム

(A): evaporator method, (B): SPE method

a: Iodide, b: Homocysteine, c: Homocysteine, d: unknown, e: Methionine, f: L-homocysteine thiolactone

Analytical conditions

Column: YMC ODS A-323 (4.6 × 250 mm), Mobil phase: 10 mM KH_2PO_4 (pH: 2.2), UV: 225 nm,

Flow rate: 1 mL/min

表2 $[^{11}\text{C}]\text{MET}$ の不純物測定

	μg/V (5 mL)*			
	Lactone	Homocysteine	Homocysteine	Methionine
SPE method	1.8	567.5	100.0	10.9
Evaporator method		1188.3	122.0	11.1

V: the maximum dose in millilitres

*Data represent the average of 3 experiments.

度 (L-異性体の含有率) を改善できることを報告している⁷⁾。0.3~0.5 M の NaOH 濃度について検討を行った結果、0.3 M の濃度は、反応収率の著しい低下をもたらした。このアルカリ濃度はラクトン環の有効な開環に不十分であり、反応液中のエタノールに捕捉され標識反応に関与しない多量の $[^{11}\text{C}]$ ヨウ化メチルが固相に吸着されたものと推定される。このため、アルカリ濃度を 0.5 M に固定し、水-エタノール比に焦点をあてて実施した。その結果、水/エタノール比 60/40、65/34 の時、L-異性体は 91%の含有率で生成することができた (表3)。Gomez ら⁸⁾、反応基質に L-homocysteine 使用し 100%の L-異性体含有率を達成している。今後 L-homocysteine による標識合成の適応を試みる。キラルカラムによる鏡像異性体の測定は、得られるピーク形状はかなりブロードであるため、詳細な比較検討には課題がある。

表3 $[^{11}\text{C}]\text{MET}$ の鏡像異性体の測定

NaOH conc.	Water/EtOH (v/v)	L-isomer (%) [*]
0.5 M	50/50	87.5
0.5 M	60/40	91.6
0.5 M	65/35	91.2
0.4 M	50/50	89.6
0.3 M	50/50	87.4

*The lactone amount (3 mg), the time of ^{11}C -methylation (2 min), and the reaction mixture volume (0.2 mL) were fixed in every experiment.

4 まとめ

イオン交換カートリッジ (Oasis MAX) を用いた ^{11}C MET の製剤化は省力的、かつ効率的であり、製剤の不純物の低減にとっても有効な方法である。また、バブリング法 (バッチ法) による合成にも適応可能である。合成時間は $^{11}\text{CO}_2$ 回収から 20~22 分を要し、電流値 20 μA 、照射時間 10 分の照射条件で 2.4~3.4 GBq の実収量が得られた。注射液の pH はリン酸緩衝液による使用で中性付近を保持できる

参考文献

1. Andor W. J. M. Glaudemans & Roelien H. Enting & Mart A. A. M. Heesters & Rudi A. J. O. Dierckx & Ronald W. J. van Rheenen & Annemiek M. E. Walenkamp & Riemer H. J. A. Slart. Value of ^{11}C -methionine PET in imaging brain tumours and metastases. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2013; 40:615–635
2. Cook GJR, Maisey MN, Fogelman I. Normal variants, artefacts and interpretative pitfalls in PET imaging with 18-fluoro-2-deoxyglucose and carbon-11 methionine. *Eur J Nucl Med* 1999; 26:1363–1378.
3. Comar D, Cartron J, Maziere M, Marazano C. Labelling and metabolism of methionine-methyl- ^{11}C . *Eur J Nucl Med* 1976; 1(1):11-14.
4. Pascali C, Bogni A, Iwata R, Decise D, Crippa F, Bombardieri E. High efficiency preparation of ^{11}C methionine by on-column ^{11}C methylation on C18 Sep-Pak. *J Labelled Comp Radiopharm* 1999; 42:715–724.
5. Pascali C, Bogni A, Cucchi C, Laera L, Crispu O, Maiocchi G, Crippa F, Bombardieri E. Detection of additional impurities in the UV-chromatogram of L-[S-methyl- ^{11}C]methionine. *J Radioanal Nucl Chem* 2011; 288:405–409.
6. Ishiwata K, Ido T, Vaalburg W. Increased amount of D-enantiomer dependent on alkaline concentration in the synthesis of L-[methyl- ^{11}C]methionine. *Appl Radiat Isot* 1988; 39:311–314.
7. Gomzina NA, Kuznetsova OF. L-[methyl-(^{11}C)]-methionine of high enantiomeric purity production via on-line ^{11}C -methylation of L-homocysteine thiolactone hydrochloride. *Bioorg Khim* 2011; 37(2):216–222.
8. Gomez V, Gispert J.D, Amador V, Llop J. New method for routine production of L-[methyl- ^{11}C]methionine: in loop synthesis. *J Appl Radiat Isot* 2008; 51:83–86.

Effective and reliable production of [¹¹C]methionine: on-column ¹¹C-methylation method and simple formulation using solid phase extraction

K. Terasaki¹, Y. Ishikawa², M. Shozushima³, T. Beppu⁴, S. Goto⁵ and R. Iwata²

¹Cyclotron Research Center, Iwate Medical University
348-58 Tomegamori, Takizawa 020-0603, Japan

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

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

⁴Department of Neurosurgery, Iwate Medical University
19-1 Uchimaru, Morioka 020-8505, Japan

⁵Nishina Memorial Cyclotron Center, Japan Radioisotope Association
348-58 Tomegamori, Takizawa 020-0603, Japan

Abstract

[¹¹C]Methionine ([¹¹C]MET) is the most commonly used amino acid tracer for PET imaging of brain tumor. A simple and rapid preparation of [¹¹C]MET was achieved with “on column ¹¹C-methylation method” and solid-phase extraction (SPE) method for the formulation. [¹¹C]CH₃I was delivered under nitrogen flow (20 ml/min) to a Sep-Pak tC18 previously loaded with 0.2 mL of a solution of L-homocysteine thiolactone HCl 7.5 mg dissolved in NaOH 0.5 M in water/ethanol 50/50 (0.5 mL). The content of the cartridge was eluted with water (5 ml) from tC18 and collected in a reservoir containing water (5 mL). The diluted solution (pH≥9) passed through Oasis MAX (strong mixed-mode anion exchange cartridge). After trapping the product on cartridge, the cartridge washed with 10 mL water and the product eluted with 5 mL phosphate buffer. This solution was then dispensed a sterile vial containing 5 mL of saline solution. Chemical and radiochemical purity was analyzed by HPLC and enantiomeric purity was also evaluated using chiral HPLC column. Total synthesis time was 20-22 minutes including SPE formulation time (6-7 min) and the radiochemical yield was approximately 15% (end of synthesis) and radiochemical purity was always higher than 99%. In all cases, ethanol levels in the injectable solution were below the recommended limits. This fast and easy to automate process can be considered as an alternative to the conventional methods (rotary evaporators).