

1.3 藥劑合成・基礎研究

ループ標識法を用いた $[^{11}\text{C}]$ PK11195 の迅速・効率的な合成法の検討

寺崎一典¹、石川洋一²、別府高明³、小豆島正典⁴、後藤祥子⁵、岩田 鍊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岩手医科脳神経外科学講座
020-8505 岩手県盛岡市内丸 19-1

⁴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

⁵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

1 はじめに

$[^{11}\text{C}]$ PK11195 は、マクログリア、マクロファージのミトコンドリア外膜に分布している末梢性ベンゾジアゼピン受容体 (PBR) と特異的に結合し^{1,2)}、脳では神経炎症におけるマクログリアの活性化状態が描出されることから、アルツハイマー病³⁾、パーキンソン病などの脳変性疾患や虚血性脳疾患への応用が期待されている。

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液を注入し、高反応性の $[^{11}\text{C}]$ メチルトリフレートと基質を反応させるフロー式の迅速・高効率な標識合成法である。本研究は、東北大学、仁科記念サイクロترونセンターで多くの ^{11}C -レセプターリガンド合成実績のあるループ標識法^{4,5)}を用いて、迅速かつ効率的な $[^{11}\text{C}]$ PK11195 の合成法を開発し、臨床利用可能な薬剤に成熟させることを目的とする。ループ法を $[^{11}\text{C}]$ メチル化標識化合物の合成に適応するためには、反応溶媒の選択、添加する塩基の量と種類を適切に設定することが重要である。本研究では、ループ法による最適な標識合成条件および HPLC 分離・精製法などの検討を行ったので報告する。

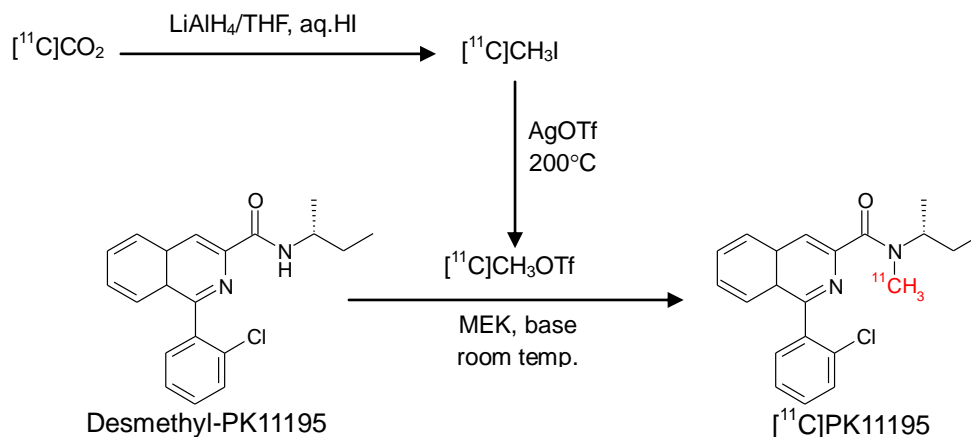


図 1 ^{11}C PK11195 の合成スキーム

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あり、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。

図 2 の ^{11}C PK11195 合成システムの系統図からわかるように、 ^{11}C ヨウ化メチル合成、銀トリフレート (AgOTf) カラム、標識反応ループ、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) インジェクションユニット、および分取用 HPLC から構成されている。 ^{11}C メチルトリフレート (MeOTf) を標識前駆体とするループ法を適用するにあたって、既存のシステムに次のような改造を施した。まず、 200°C に加熱した AgOTf カラムを予備調整するため、流速制御したヘリウムガス (50 mL/min) を流せるように電磁弁を 2 方から 3 方弁に

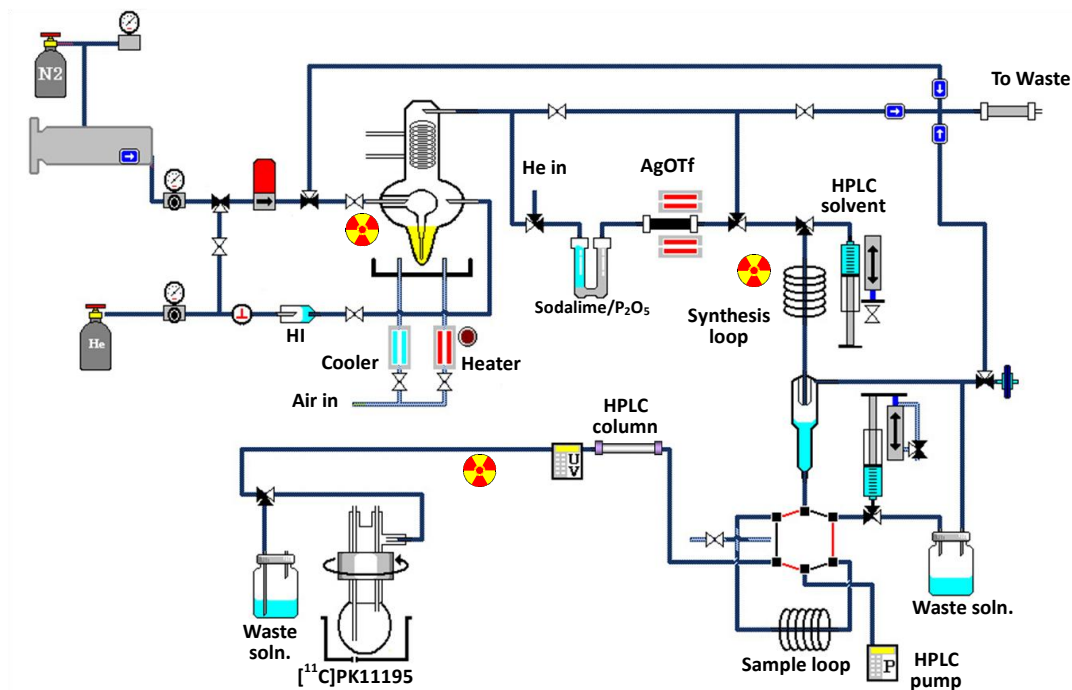


図 2 ループ標識法による ^{11}C メチル化合物合成装置の系統図

変更し、排ガスラインに至る電磁弁を解放することで常にヘリウムガスが流れるようにした。細いテフゼルチューブを巻いて作製したループ（内径 0.75 mm、約 50 cm）は、AgOTf カラムの下流に設置し、HPLC インジェクションユニットのガラス製リザーバーと接続した。また、ループ内の反応物を洗い出すためシリンジユニットを新たに追加し、液の流入の制御には 3 方電磁弁に変更して対応させた。また、従来、反応物の分離・精製はループから一旦ガラス製リザーバーに回収した後、HPLC ポンプを介して直接 HPLC カラムに流入させていたが、今回、新たに製作した HPLC インジェクションユニット使用し、リザーバーの反応液を HPLC サンプルループに充填、この後、バルブを切り替えることによって溶離液による希釈を気にすることなしに迅速にカラムに導入できるようになった。その結果として、ピーク波形の広がり改善され、他の成分の混入がない分離・分取が可能になった。

2.2 標識ループの調製

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キシド (DMSO) (60 μ L) を用い、約 1 mg の反応基質 Desmethyl-PK11195 (PharmaSynth AS, Estonia) を溶解した。塩基として 1 M テトラブチルアンモニウムヒドロキシド (TBAOH) のメタノール溶液 (3~9 μ L)、あるいは 1.2 M NaOH 溶液 (2~4 μ L) を加え、その全量を反応ループに注入し保持させた。

2.3 [11 C]メチルトリフレートによる標識反応

サイクロトロンのプロトン照射（電流値：30 μ A、照射時間：20 分間）によって得られる [11 C]CO₂ を常法によって [11 C]ヨウ化メチルに合成した後、ヘリウム気流下 (20~30 mL/min)、200°C に加熱した AgOTf-Graphpac GC カラムに通し、 [11 C]メチルトリフレート ([11 C]MeOTf) へ変換した後、これをループに導入し標識反応を行った。 [11 C]ヨウ化メチルから [11 C]MeOTf、および [11 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、HPLC インジェクションユニットのリザーバーに導き、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=70/30

流速：4 mL/min

検出器：UV (235 nm)

3 結果および考察

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、高反応性の [11 C]メチルトリフレートと反応させるフロー式の迅速・高効率な標識合成法である。通常多用されているループ法は反応ループとして HPLC インジェクションループを用いる方法である⁶⁾。この方法は、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い、そのため、カラム分離能の低下を招く危険性がある。また、通常、溶離液は通常ループを流れる構造になっているので、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る。それに対して本法の場合は、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、リザーバーに捕集してから完全に 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²⁾。

ループ法の特徴としてはオンラインで迅速に反応が進行するため、自動化に適している方法である。また、液体中にガスを吹き込む方法 (バブリング法) に比べ、合成プロセスが簡略化され、使用する反応溶媒量、

基質量を大幅に減じることができるため、HPLC 精製が容易になる。標識反応には加熱を必要としないため生成物の分解、副生成物への変換が抑えられるなどの優れた特徴を有する。

ループ標識の反応効率は反応溶媒と塩基の適切な選択が重要な因子になる。たとえば、ループ内の標識反応に揮発性の溶媒を使用すると、 $[^{11}\text{C}]$ メチルトリフレートがループ内を通過中に反応溶媒が蒸発し、このことが反応収率の低下を招く恐れがある。したがって、より高沸点の溶媒の使用が望ましく、また、その後のHPLC の分離・精製に影響を与えない溶媒を用いることが重要である。以上を考慮し、本研究では反応溶媒として高沸点で非プロトン性溶媒のメチルエチルケトン、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシドを使用した。

図 3 に反応容器とループの放射能の推移を示した。 $[^{11}\text{C}]\text{MeOTf}$ の導入速度はキャリアーガス 30 mL/min で実施した。さらに低い流速 (20 mL/min 以下) によって効率的な反応が期待できるが、本合成システムに採用されているフローコントローラの制御可能な最小流速は 50 mL/min 程度であるため、低速導入の効果を確かめることはできなかった。図からわかるように、 $[^{11}\text{C}]$ ヨウ化メチルから変換された $[^{11}\text{C}]\text{MeOTf}$ を導入して約 25 秒でループの放射能が急激に上昇してくる。放射能が上がらなくなったところで、HPLC 溶媒でループ内の標識物を洗い出すことによって、捕集された放射能がほぼ完全になくなり、HPLC リザーバーに移送されたことが明確にわかる。 ^{11}C の吹き込み開始からリザーバーへの移送完了までに要した時間は約 9 分である。 $[^{11}\text{C}]\text{MeOTf}$ 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 $[^{11}\text{C}]\text{MeOTf}$ が通過する細い配管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。

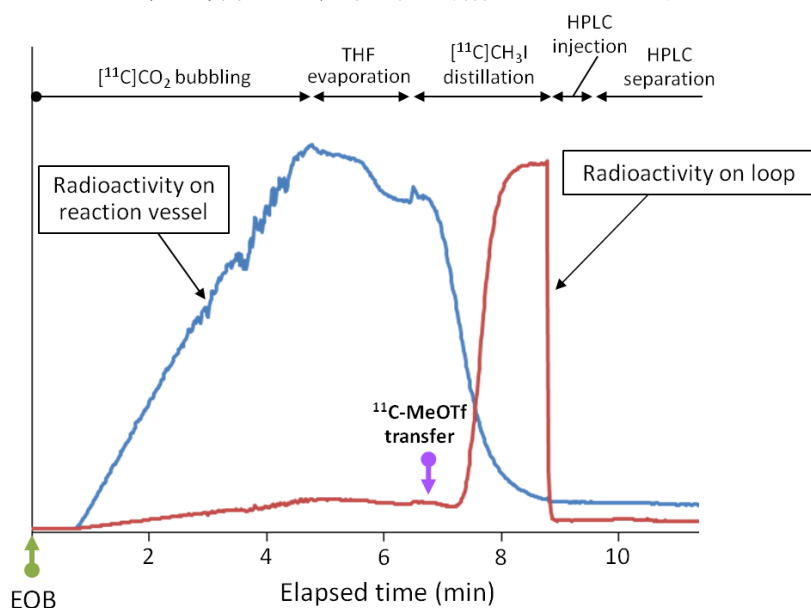
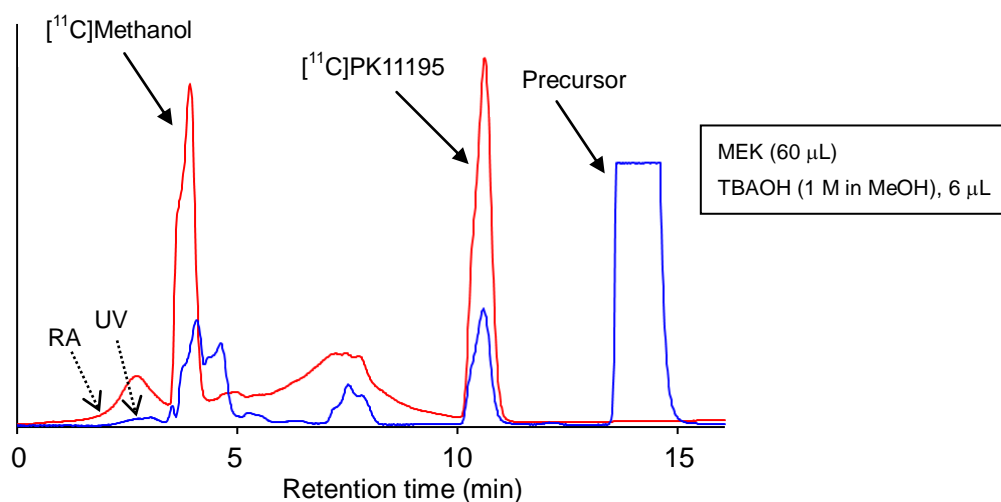


図 3 反応容器とループの放射能の推移

図 4 は UV および放射能検出器によって得られた分取 HPLC クロマトグラムの一例である。1 mg の反応基質と 60 μL の MEK、および 6 μL の 1M TBAOH を加えた基質反応液を用いて合成を実施した。HPLC 導入後 4 分で、 $[^{11}\text{C}]\text{MeOTf}$ が溶離液によって分解されたと考えられる $[^{11}\text{C}]$ メタノールのピークが確認され、その後、比較的大きな不明瞭な放射能ピーク波形が認められるものの、以後はベースラインに戻り、保持時間約 11 分で成績体の $[^{11}\text{C}]\text{PK11195}$ が明確に分離されているのがわかる。以上より、設定した HPLC 分離条件は妥当なものと判断され、また、 $[^{11}\text{C}]\text{PK11195}$ の分取フラクションは高い化学的・放射化学的純度を有しているものと推測される。



Column: YMC ODS A-323 (10×300 mm), Mobile phase: MeCN / Water (70/30)
Flow rate: 4 ml/min, Detector: UV (235 nm)

図4 分取 HPLC 分離パターン

表1は異なる反応溶媒を用いた $[^{11}\text{C}]$ PK11195の合成結果である。溶媒はMEK、DMFおよびDMSOをいずれも60 μL 使用し、塩基として1 M TBAOHを3~9 μL (反応基質に対して3 μL は1当量に相当する)を添加した。合成収率はHPLCカラムに注入した全放射能(300~500 mCi)に対する $[^{11}\text{C}]$ PK11195の分離フラクションの放射能の比率(%)で表した。表より明らかなように、MEK中の反応基質に対して6 μL (2当量)のTBAOHを加えた時が最も良好で安定な収率が得られた。実収量においても30 μA 、20分間のプロトン照射条件で45~90 mCi (1.7~3.3 GBq)が得られた。しかしながら、3 μL (1当量)のTBAOHでは明らかに不足であり、その収率は不安定だった。データは示していないが、水系の塩基としてよく用いられるNaOH水溶液(1 N、2 μL)を加えて反応させた場合、 $[^{11}\text{C}]$ MeOTfが反応溶媒にほとんど捕集されなかった。この結果は、NaOH水溶液の微量の水によって $[^{11}\text{C}]$ MeOTfが分解したものと推測された。一方、DMFを用いた場合は、DMFのUVと一致する大きな放射能のピークが認められ、ほとんど目的標識体が得られない、あるいは低収率の結果をもたらした。DMF、DMSOは脱プロトンしやすく求核性の高い反応試薬の場合は溶媒と反応することが報告されているが^{7,8)}。本例でもDMFと $[^{11}\text{C}]$ MeOTfとが直接反応し、収率が低下するという結果になった。また、DMSOを使用した場合も同様の傾向があると考えられた。

今後は注射剤の有効性、安全性が発揮されるよう、溶解補助剤、放射線分解防止のための添加剤を適切に選択し、PET臨床薬剤としての品質を保持した $[^{11}\text{C}]$ PK11195の製剤化を行う予定である。

表1 $[^{11}\text{C}]$ PK11195合成における反応溶媒と塩基の影響

Solvent (60 μL)	Precursor (mg)	Base, TBAOH ^a (μL)	yield (%) ^b
MEK	1	3 (1 eq.)	1-26 (n=4)
		6 (2 eq.)	25-60 (n=7)
		9 (3 eq.)	22
DMF	1	6	2-15 (n=3)
DMSO	1	6	23

^a 1 M TBAOH (in MeOH)

^b Decay corrected yield (%) from radioactivity trapped in the loop to isolated $[^{11}\text{C}]$ PK11195 HPLC fraction.

まとめ

[¹¹C]PK11195 をループ法によって合成した。MEK (60 μL) と 1M TBAOH (6 μL) の組み合わせで良好な収率で目的物が得られた。HPLC 分取時の収量は 1.7~3.3 GBq (45~90 mCi) だった。しかしながら、水系の塩基 (NaOH) の存在下では [¹¹C]MeOTf がほとんど捕集されなかった。DMF、DMSO は [¹¹C]MeOTf と直接反応する可能性があり低収率だった。ループ法によって迅速・簡便に安定した収率で [¹¹C]PK11195 の合成が達成された。

文献

1. Camsonne R. et al. Synthesis of N-(¹¹C)methyl, N-(methyl-1-propyl), (chloro-2-phenyl)-1-isoquinoline carboxamide-3(PK11195): a new ligand for peripheral benzodiazepine receptors. *J Labelled Compd. Radiopharm.* 21: 985-991, 1984.
2. Hashimoto K.I. et al. Synthesis and evaluation of ¹¹C-PK11195 for in vivo study of peripheral-type benzodiazepine receptors using positron emission tomography. *Ann Nucl Med.* 3: 63-71, 1989.
3. Wyss-Coray T. Inflammation in Alzheimer disease: driving force, bystander or beneficial response? *Nat Med.* 12: 1005-1015, 2006.
4. Iwata R, Pascali C, Bogni A, Miyake Y, Yanai K, Ido T. A simple loop method for the automated preparation of [¹¹C]raclopride from [¹¹C]methyl triflate. *Appl Radiat Isotop.* 55: 17-22, 2001.
5. Iwata R, Pascali C, Bogni A, Yanai K, Kato M, Ido T, Ishiwata K. A combined loop-SPE method for the automated preparation of [¹¹C]doxepin. *J Labeld Compd Radiopharm.* 45: 271-280, 2002.
6. Wilson A A., Garcia A, Houle S, Vasdev N. Utility of commercial radiosynthetic modules in captive solvent [¹¹C]-methylation reactions. *J Label Compd Radiopharm.* 52: 490-492, 2009.
7. Mock BH, Zheng QH, Degrado TR. Avoid DMF when labeling with ¹¹Cmethyl triflate. *J Label Compd Radiopharm.* 50: S197, 2007
8. Verdurand M, Bort G, Tadino V, Bonnefoi F, Le Bars D, Zimmer L. Automated radiosynthesis of the Pittsburgh compound-B using a commercial synthesizer. *Nucl Med Commun.* 29: 920-926, 2008.

Effective synthesis of [¹¹C]PK11195 for clinical application by using loop method

K. Terasaki¹, Y. Ishikawa², T. Beppu³, M. Shozushima⁴, S. Goto⁵ and R. Iwata²

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

²CYRIC, Tohoku University
Aramaki, Aoba-ku, Sendai 980-8579, Japan

³Department of neurosurgery, Iwate Medical University
19-1 Uchimaru, Morioka, 020-8505, Japan

⁴Department of Dental Radiology, School of Dentistry, Iwate Medical University
19-1 Uchimaru, Morioka, 020-8505, Japan

⁵Japan Radioisotope Association, Nishina Memorial Cyclotron Center
348-58 Tomegamori, Takizawa 020-0173, Japan

Abstract

[¹¹C]PK11195 is a specific ligand for the peripheral type benzodiazepine receptor and a marker of activated microglia, used to measure inflammation in neurologic disorders. A simple, rapid and fully automated preparation of [¹¹C]PK11195 was achieved with the automated methylation labelling system based on the loop method. To a solution desmethyl-PK11195 (1 mg) in MEK (60 μL) was added TBAOH (1 M in methanol, 6μL), and the solution loaded onto the loop. [¹¹C]MeOTf passed through the loop at room temperature. The products of the reaction were then transferred by passing mobile phase to a semi-preparative HPLC system. The method produced [¹¹C]PK11195 in approximately 20 min after end of bombardment, with a 25-60% radiochemical yield (decay corrected yield from radioactivity trapped in the loop to isolated HPLC fraction). The final [¹¹C]PK11195 activities are sufficient for several human PET. Moreover, the method can be successfully applied for routine clinical application, proved to be a simplified alternative to the bubbling method.

腫瘍をターゲットとする ¹⁸F-標識プローブの開発と臨床利用

岩田 錬、寺崎一典*、石川洋一

東北大学サイクロトロン・ラジオアイソトープセンター
980-8578 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 6-3

*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

1 はじめに

これまでに東北大学サイクロトロン・ラジオアイソトープセンター (CYRIC) と仁科記念サイクロトロンセンター (NMCC) 間の共同研究の成果として、^[13N]アンモニア合成装置、オンカラム^[11C]メチオニン/^[11C]コリン合成装置、¹¹C-標識ラジオリガンド・ループ法合成装置、^[18F]フルオロコリン・オンカラム合成装置を NMCC で稼働させ、臨床利用に供してきた。今回、NMCC における PET 臨床研究の一層の発展の一助となるべく、新たな ¹⁸F-標識腫瘍診断プローブ自動合成装置の開発を計画した。

表 1 に、現在その有用性が認められ、今後臨床利用を推進すべきとされる 6 種の ¹⁸F-標識腫瘍診断プローブを示す。^[18F]FDG は広く一般に使用されており、^[18F]NaF も NMCC で基礎的検討が行われている。また ^[18F]フルオロコリン (FCH) はすでに臨床利用が NMCC で進行中であり、本研究では岩手医科大学からの要望も踏まえ、残り 3 つの ¹⁸F-プローブから低酸素細胞イメージングプローブを取り上げることにした。

ほかの 5 つのプローブが腫瘍における代謝の亢進に基づき高く集積するのに対して、この低酸素細胞イメージングプローブは悪性腫瘍の増大に伴い発生する低酸素細胞に選択的に集積する。その集積メカニズムは、主骨格の 2-ニトロイミダゾールが、低酸素細胞内で還元を受けて巨大分子と結合あるいは極性の高い代謝物となって細胞内に留まるとされる。従って、いわゆるがんの早期発見には有用ではないが、放射線治療や化学療法などのがん治療抵抗性の大きな因子となっている低酸素細胞を定量的に画像化でき、従って、放射線治療の有効性や抗がん剤の選択に関して有用な情報を与え個別化した治療が可能となる。

本研究は、この低酸素細胞イメージング剤を臨床利用に供することができる自動合成法/装置を NMCC で立ち上げることを目的にする。そのため、東北大学で開発され、現在臨床評価が進んでいる^[18F]FRP-170 をターゲットプローブとして取り上げた¹⁻⁵⁾。図 1 に示すように、^[18F]FRP-170 は^[18F]FMISO と同様な 2-ニトロイ

表 1. 有用と認められている ¹⁸F-標識腫瘍診断プローブ

プローブ	診断情報・集積機序
^[18F] FDG	グルコース代謝
^[18F] NaF	骨代謝
^[18F] FLT	DNA 合成
^[18F] FET	アミノ酸代謝
^[18F] FCH	細胞膜代謝回転
^[18F] FMISO	低酸素細胞

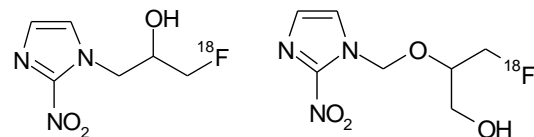


図 1. ^[18F]FMISO (左) と^[18F]FRP-170 (右)

ミダゾール骨格を有するが、より水溶性を増して血中から消失を改善したプローブである。

2 合成装置の開発

2.1 標識合成法

$[^{18}\text{F}]\text{FRP-170}$ の合成法を $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ と比較して図 2 に示す。いずれの反応も ^{18}F -フッ素化と脱保護のための加水分解の 2 段階の反応と HPLC による分離精製の 3 過程から成る。 $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ では標識と加水分解は一つの反応容器で行うワンポット合成が一般的であるが、水溶性の高い $[^{18}\text{F}]\text{FRP-170}$ では HPLC の良好な分離を考慮して ^{18}F -フッ素化された中間生成物を固相抽出カラムに保持して粗精製を行い、そのままオンカラムで加水分解を行う。

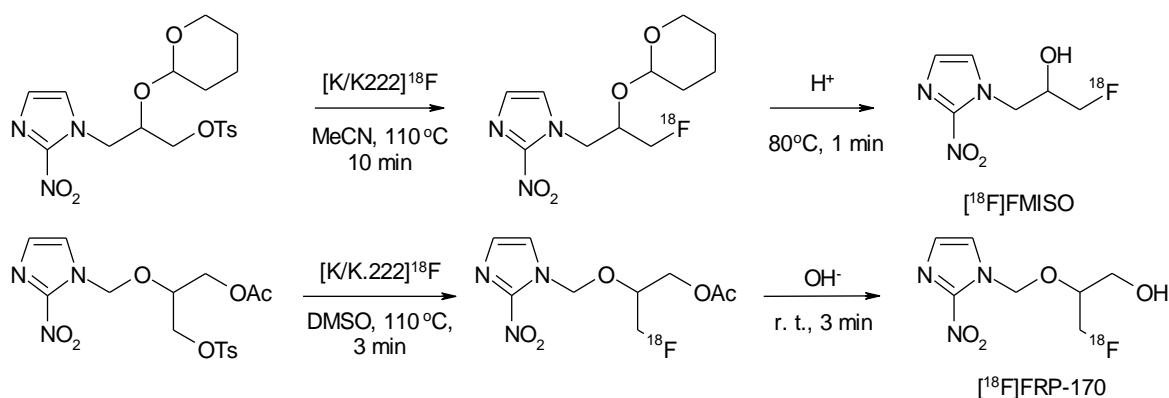


図 2. $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ と $[^{18}\text{F}]\text{FRP-170}$ の合成スキーム

自動合成のための合成手順は以下の通りである。

1. $[^{18}\text{F}]$ フッ素イオンを陰イオン交換カラム (Accell QMA、Waters) に保持して $[^{18}\text{O}]\text{H}_2\text{O}$ から分離した後、クリプトフィックス 2.2.2 (K.222) と K_2CO_3 の水-アセトニトリル (MeCN) 混合溶液で溶出し反応容器に集める。
2. 減圧下加熱して乾固する。
3. 前駆体を溶解した DMSO (2 mg、1 mL) を反応容器に添加し、 110°C で 3 分間加熱し ^{18}F -フッ素化を行う。
4. 反応液を室温まで冷却の後、希塩酸 (0.05 M、5 mL) を加え、活性化した ODS 固相抽出カラム (Sep-Pak C18 long、Waters) に通して目的生成物を保持し、次に適量の水 (5mL) で反応容器と C18 カラムを洗う。
5. C18 カラムに NaOH 水溶液 (0.2 M、2 mL) を満たし、室温で 3 分間保持し加水分解を行う。
6. C18 カラムを水 (1 mL) で洗い大部分の加水分解液 (NaOH) を追い出し、次に中和と溶出のため MeCN と酢酸混液でカラムを洗い、生成した $[^{18}\text{F}]\text{FRP-170}$ を HPLC インジェクターのリザーバーに集める。
7. 溶出液をインジェクターループに移送し、カラムに注入し分離精製を行う。
8. $[^{18}\text{F}]\text{FRP-170}$ のフラクションをロータリエバポレータのフラスコに集める。
9. エタノールを適時添加しつつ溶媒を減圧留去する。
10. 残差を生食に溶解し、滅菌フィルターを通してバイアルに集める。

2.2 自動合成装置

NMCCでは昨年度 TracerLab FDG 装置 (GE 社製) を導入して ^{18}F FDG のルーチン合成を行っている。従って、それまで使用してきた F100 装置 (住重製、図3の左を参照) は他のプローブ合成に利用可能となっている。本研究ではこの装置を利用することとした。F100 を用いた ^{18}F FDG 合成では、 ^{18}F -フッ素標識と酸加水分解反応をワンポットで行い、精製は使い捨てのカラムなどを使用しているため HPLC 精製を行うことはできない。このため、 ^{18}F FRP-170 を合成するためには、オンカラム加水分解と HPLC 精製のためのインジェ



図3. 住重製 F100 (左) と精製モジュール (右)

クターを増設する必要があった。そこで電動シリンジポンプと6方切換バルブから成るシリンジポンプモジュール (Hamilton 社製) と電動 HPLC インジェクター (Rheodyne 社製、図3の右)、3方電磁弁で構成される精製モジュールを試作導入した。図4にその構成図を示す。 ^{18}F -フッ素化反応とその後の希塩酸添加までを F100 で行い、この反応液の吸いだしをシリンジポンプで行う。C18 カラムへの NaOH の注入、洗い出し、HPLC インジェクターへの移送をすべてこのシリンジポンプと切換バルブの操作で行う。

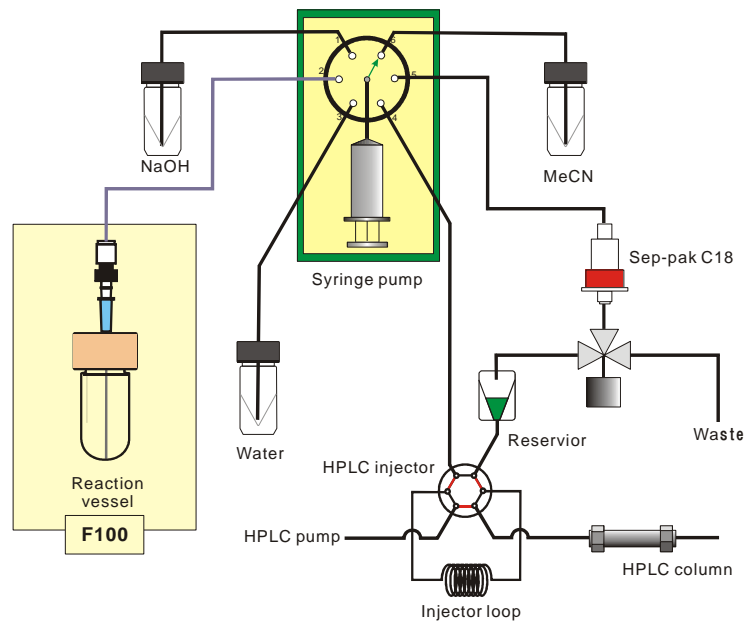


図4. 精製モジュールの流路図

3 結果と考察

本研究は2年間の予定で昨年10月に開始され、これまでのところ装置と自動合成プログラムの開発だけが完了している。従って、現在まではホット実験を行うには至っていない。今後、 ^{18}F フッ素イオンを使用したホット合成試験、再現性試験、品質試験を経て PET による臨床研究に ^{18}F FRP-170 を供する予定である。

謝 辞

本研究は平成 20 年度滝沢研究所研究助成を受けて実施しました。ここに深く感謝します。

参考文献

- 1) H. Wada, R. Iwata, T. Ido and Y. Takai: Synthesis of 1-[2- ^{18}F]fluoro-1-(hydroxymethyl)-ethoxy]methyl-2-nitroimidazole (^{18}F FENI), a potential agent for imaging hypoxic tissues by PET. *J. Labeld. Compd. Radiopharm.* **43**, 785-793 (2000).
- 2) Y. Ishikawa, R. Iwata, S. Furumoto and Y. Takai: Automated preparation of hypoxic cell marker [^{18}F]FRP-170 by on-column hydrolysis. *Appl. Radiat. Isot.* **62**, 705-710 (2005).
- 3) 石川洋一、船木善仁、岩田 錬、古本祥三、仲田栄子、工藤幸司、金田朋洋、袴塚 崇、高井良尋、山田章吾：低酸素細胞の PET 画像化を目的とする ^{18}F FRP-170 注射液の開発。 *核医学* **42**, 1-10 (2005).
- 4) T. Kaneta, Y. Takai, Y. Kagaya, Y. Yamane, H. Wada, M. Yuki, R. Iwata, M. Tsujitani, S. Takahashi and S. Yamada: Imaging of ischemic but viable myocardium using a new ^{18}F -labeled 2-nitroimidazole analog, ^{18}F -FRP170. *J. Nucl. Med.* **43**, 109-116 (2002).
- 5) K. Kaneta, Y. Takai, R. Iwata, T. Hakamatsuka, H. Yasuda, K. Nakayama, Y. Ishikawa, S. Watanuki, S. Furumoto, Y. Funaki, E. Nakata, K. Jingu, M. Tsujitani, M. Itoh, H. Fukuda, S. Takahashi, and S. Yamada: Initial evaluation of dynamic human imaging using ^{18}F -FRP170 as a new PET tracer for imaging hypoxia. *Ann. Nucl. Med.* **21**, 101-107 (2007).

Development of ^{18}F -labeled tumor imaging probes for clinical use

R. Iwata, K. Terasaki* and Y. Ishikawa

Cyclotron and Radioisotope Center, Tohoku University
6-3 Aoba, Aramaki, Aoba-ku, Sendai 980-8578, Japan

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

Abstract

A collaborative study between Tohoku University and Iwate Medical University was initiated to develop a new ^{18}F -labeled tumor imaging probe at Nishina Memorial Cyclotron Center. Considering several ^{18}F -probes which are presently evaluated to be useful for clinical use in oncology, [^{18}F]FRP-170, a potential hypoxic cell imaging agent which was originally developed at Tohoku University, was chosen as a candidate probe. Based on an automated module for [^{18}F]FDG preparation, F100, a new automated system was developed by introducing a purification module consisting of a syringe pump module and an HPLC injector for on-column base hydrolysis followed by HPLC purification. The study is currently in progress.

細胞周期に対する ^{18}F -Choline と ^{18}F FDG 集積の比較

小豆島正典、山本純子、原 康文¹、寺崎一典²、後藤祥子³、岩田 錬⁴

岩手医科大学歯学部歯科放射線学講座

020-8505 岩手県盛岡市内丸 19-1

¹岩手医科大学歯学部口腔外科学第2講座

020-8505 岩手県盛岡市内丸 19-1

²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留が森 348-58

³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

⁴東北大学サイクロトロン RIセンター

980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 01

1 はじめに

グルコース類似薬の Fluorine 18-2-deoxy-2-fluoro-D-glucose (^{18}F FDG)は、脳や心臓の疾患のみならず悪性腫瘍診断においても重要な RI トレーサーとして知られている^{1,2)}。筆者らは、 ^{18}F FDG に替わる新しい PET 用 RI トレーサーの ^{11}C -Choline の合成法の確立とその臨床応用の可能性について研究を行ってきた。その結果、収集量の良い ^{11}C -Choline の合成法が確立され、口腔癌に対し ^{18}F FDG と同様に強い集積を示すと同時に、投与後、短時間(10分： ^{18}F FDG の 1/6)で PET スキャンが可能など、将来的に ^{18}F FDG に替わる PET 用トレーサーになる可能性が示された。しかしながら ^{11}C は半減期が 20 分と短く、デリバティブとして供給できないという制限があった。本研究では、新たに ^{18}F で Choline を標識した ^{18}F -Choline を合成し、細胞周期に対する集積特性について ^{18}F FDG と比較検討した。

2 対象および方法

2.1 細胞培養

培養癌細胞にはヒト子宮頸癌由来の HeLa S3 (RCB0191、理化学研究所) を用い、Eagle's minimal essential medium (MEM) に 10% fetal calf serum (FCS) と penicillin、streptomycin を加え 5% CO₂・37℃ で培養を行った。この培養条件での細胞倍加時間は約 23 時間であった。培養容器は容量 50 ml、培養面積 25 cm² の組織培養フラスコ (Nunc, USA) を用いた。培養細胞数は細胞同調完了時 1x10⁶~3x10⁶ 個になることを目標に調整した。

2.2 細胞同調法と RI 投与

細胞の同調は、TdR によるダブルブロッキング法により行った。2 mM TdR を含む培地にて 24 時間培養後、TdR-free 培地で 11 時間培養、さらに 2 mM TdR を含む培地で 14 時間培養し、2 回目のブロッキングを行った。その後、TdR-free 培地に交換した。それぞれの培養細胞は決められた時間経過後 4℃ の氷水中に入れ、10 分経過後 4℃ 冷蔵庫にて保管し NMCC に運んだ。¹⁸F-Choline および ¹⁸FDG は NMCC にて合成され、培地 1 ml あたり 0.5 mCi 投与し、37℃・5% CO₂ のインキュベーターで 20 分間培養した。培養終了後、グルコース添加 Ca/Mg free phosphate-buffered saline (PBS) で洗浄後トリプシン処理し細胞を浮遊させ、さらにグルコース添加 PBS で洗浄し、ガンマーカウンタで細胞に取り込まれた ¹⁸F-Choline あるいは ¹⁸FDG の放射能を測定した。その後、細胞数を測定し、単位細胞数あたりに取り込まれたそれぞれの放射能を求めた。

2.3 Flow cytometry (FCM) による DNA 量の測定

各 phase に同調された細胞の一部は、flow cytometry (FCM) 分析のために使われ、細胞同調の確認および DNA 合成能の分析が行われた。相対的 DNA 量の変化を分析するため、2% Triton X-100 に細胞を浮遊させ、裸核後、RNase (最終濃度 0.5%) を添加し、propidium iodide (PI) (最終濃度 50 μg/ml) で DNA を蛍光染色した。細胞数を 1 x 10⁶ 個に調整後、FCM にて 1 x 10⁴ 個の細胞を分析した。

3 成績

HeLa S3 細胞の同調処理終了後から 14 時間経過までの cytogram を分析した。その結果、同調処理終了直後には細胞集団は S 期の前半に、続いて 4~7 時間後には、G2/M 期に、10 時間後には大部分の細胞が G1 期にシフトすることから、同調が良好に行われていることが確認された。

各細胞周期における ¹⁸F-Choline 集積と細胞数変化を観察したところ、¹⁸F-Choline 集積は、同調処理終了直後はピーク時の 77% あり、5 時間後にピークに達した。その後、次第に減少に転じ、10 時間以降では、ピーク時の約 58% まで減少した。それに対し、¹⁸FDG は S 期の前半である同調直後にピークに達し、その後次第に取り込みが低下し、10 時間以降では、ピーク時の約 50% まで減少した。

4 考察

ヒト正常細胞では、その多くが静止期(G0 期)にあって増殖を停止している。増殖刺激が加えられると細胞は増殖を開始し G0 期から G1 期(第 1 間期)、S 期(DNA 合成期)、G2 期(第 2 間期)、M 期(分裂期)と進み G1 期

に戻る。本研究に用いた HeLa 細胞の細胞周期は広く知られており、S 期は 9 時間、G2 期と M 期を合わせた G2/M 期は 3 時間とされている³⁾。細胞同調法には、TdR による S 期同調法や hydroxyurea による G1 期同調法、細胞附着性が M 期で低下することを利用した培養フラスコ振盪法が知られている。本研究では、均一な同調細胞を大量に得る必要性から、Knehr ら⁴⁾による TdR ダブルブロッキング法を採用した。1 回目の TdR ブロッキング終了時から 2 回目の TdR ブロッキング開始までの時間は、均一な同調細胞を得る上で非常に大切であり、本研究では、実際に FCM を観察することによりこの時間を決定した。その結果、良好な同調細胞が得られていることが FCM の観察から証明された。細胞をプレートから剥離させるためにトリプシン処理し細胞を浮遊させた。しかしながらトリプシンという酵素処理が細胞膜にある様々な糖鎖や蛋白に非生理的な影響を及ぼす可能性がある。そこで本研究では実験の前段階として、培地の温度を一時的に 20°C にすることにより細胞がプレートから剥離する性質を持つ温度応答性細胞培養プレート (UpCell, CellSeed 社) を用いて細胞を浮遊させ、¹⁸F-Choline と ¹⁸FDG の取り込み実験を行った。その結果、トリプシン処理を行った同調細胞に対する取り込み実験と同様の成績が得られることから、トリプシン処理の影響は無視できることを確認している。

Choline は細胞内に輸送され、リン酸化されたのち細胞内にトラップされる他、膜の構成要素であるリン脂質の合成にも利用される。悪性細胞では Choline の細胞内濃度が上昇していること、および Choline kinase 活性の増大が生じていることが明らかになっている⁵⁾。これらのことから、Choline は細胞の Choline 代謝亢進が反映されることが予想される。培養癌細胞 HeLa に対する ¹⁸F-Choline 集積を観察したところ、¹⁸F-Choline 集積は、S 期から G2/M 期にかけ上昇し、G2/M 期で最大となり、G1 期には約 58 % まで低下することが示された。それに対し、¹⁸FDG 集積は S 期で最大になり、G1 期には約 50 % まで低下することが示された。細胞分裂指数は、(S 期 + G2/M 期) / (G0G1 期 + S 期 + G2/M 期) × 100 (%) で表される。すなわち ¹⁸F-Choline 集積と ¹⁸FDG 集積は、それぞれ G2/M 期と S 期にピークを持つが、どちらのトレーサーを用いても PET 上では、細胞分裂指数が反映された画像が得られていると推測される。

Choline は、投与から腫瘍細胞に蓄積するまでの時間が 10 分以内と極めて短く、患者の時間的負担の大幅な軽減が期待されるほか、脳腫瘍と前立腺癌の診断や糖尿病患者にも使用できるという長所をもつ。特に ¹⁸F で標識した ¹⁸F-Choline の有用性が証明されれば、放射能の半減期が ¹⁸FDG と同じ 110 分であることから、自施設にサイクロトロンを持たずにデリバティブとして購入することが可能となる。将来的にそれぞれの病態に合わせて腫瘍トレーサーを選択し PET を行うことができるようになり、正診率の向上が図られるであろう。

文 献

- 1) Shinoura N., Nishijima M., Hara T. Haisa T., Yamamoto H., Fujii K., Mitsui I., Kosaka N., Kondo T., Hara T.: Brain tumors: detection with C-11 choline PET. *Radiology*. 202:497-503, 1997
- 2) Torizuka T., Kanno T., Futatsubashi M., Okada H., Yoshikawa E., Nakamura F., Takekuma M., Maeda M., Ouchi Y.: Imaging of gynecologic tumors: comparison of (11)C-choline PET with (18)F-FDG PET. *Journal of Nuclear*

Medicine. 44:1051-1056, 2003

- 3) Cao, G., Liu, L. M. and Cleary, S. F. : Modified method of mammalian cell synchronization improves yield and degree of synchronization. *Exp. Cell. Res.* 193 : 405-410, 1991.
- 4) Knehr, M., Poppe, M., Enulescu, M., Eickelbaum, W., Stoehr, M., Schroeter, D. and Paweletz, N. : A critical appraisal of synchronization methods applied to achieve maximal enrichment of HeLa cells in specific cell cycle phases. *Exp. Cell Res.* 217: 546-553, 1995.
- 5) Macara IG: Elevated phosphocholine concentration in rastransformed NIH3T3 cells arises from inbreased choline kinase activity, not from phosphatidylcholine breakdown. *Mol Cell Biol*, 9:325-328, 1999

Cell cycle dependency of ^{18}F -Choline and ^{18}F FDG uptake during proliferation of cultured human cancer cells

M. Shozushima, J. Yamamoto, Y. Hara¹, K. Terasaki², S. Goto³ and R. Iwata⁴

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

¹Department of Oral Surgery, School of Dentistry, Iwate Medical University
19-1 Uchimaru, Morioka 020-8505, Japan

²Cyclotron Research Center, Iwate Medical University
348-58 Tomegamori, Takizawa, Iwate 020-0173, Japan

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

⁴CYRIC Tohoku University
Aramaki, Aoba-ku, Sendai 980-8579, Japan

Abstract

In this study, the relationship between ^{18}F -Choline uptake and the cell cycle phase in cultured human cancer cells (HeLa S3), as well as how they compare to the conventional tracer ^{18}F FDG with PET was assessed.

Flow cytometry findings confirmed that the cells were well synchronized. ^{18}F -Choline uptake was 77% of the peak level in the early S-phase immediately after release, gradually increased, and peaked in the early G2/M phase. Subsequently, ^{18}F -Choline uptake steeply declined over the late G2/M phase to 58% in the G1 phase. However, ^{18}F FDG was significantly higher in the early S phase compared to the G1 phase.

The results suggest that the uptake of ^{18}F -Choline and ^{18}F FDG are cell cycle dependent, are associated with the proliferative activity of the tumor seen during PET imaging.