

^{99m}Tc 標識リン酸化合物の簡易分析

岡本 弥生*

若尾 博美*

要旨 ^{99m}Tc 標識リン酸化合物の標識率および安定性の分析法として、アニオン交換型のミニカラムによる分離分析を試みた。その結果、 ^{99m}Tc 標識リン酸化合物溶液中の遊離の $^{99m}\text{TcO}_4^-$ は中性リン酸緩衝液で、リン酸化合物に標識された ^{99m}Tc は、100 mM リン酸ナトリウム溶液で溶出するものとし、ものごとに分離して分析することができた。また、 ^{99m}Tc -MDP の分離は薄層クロマトグラフィ (TLC) よりも短時間で行うことができた。したがって、本法は ^{99m}Tc -標識リン酸化合物の分析に有効であり、特に標識率および安定性の分析等、時間的な制限をうける試料の分析には、現行の TLC 法よりも優れた点を持っていることが解った。

(核医学 34: 379-384, 1997)

I. はじめに

in vivo 用に開発された放射性医薬品は比較的半減期が短い。このことは、投与を受ける患者および術者にとっては利点である一方、その化学的分析は、迅速さを要するため容易でない場合が多々あり、簡便で迅速な分析法の開発が望まれている。その中でも ^{99m}Tc は、最も使用頻度の高い核種であり、種々のバリエーションに対応した分析法が必要である。骨シンチグラフィ用 ^{99m}Tc 標識リン酸化合物製剤の純度分析法としては、薄層クロマトグラフィ (TLC) やペーパークロマトグラフィ (PC) を使ったミニクロマトグラフィが 1980 年代を中心に報告されている¹⁻³⁾ が、今回は、迅速かつ簡便な分析法としてアニオン交換型のミニカラムを用いたクロマトグラフィにより、いくつかの ^{99m}Tc 標識化合物について分析を行った。このうち ^{99m}Tc -MDP に関しては、TLC との比較に

よる標識率の検証を行い、また、安定性の評価にも応用を試みたので報告する。

II. 材料および方法

1. 試薬および装置

ミニカラムは、アニオン交換型の Sep-pak Accell Plus QMA (360 mg/Cartridge, Waters) を選択した。カラム溶出液には、中性リン酸緩衝液 (pH 6.86, 和光純薬株式会社) と 100 mM リン酸ナトリウム溶液 (pH 12.23, 和光純薬株式会社) を用いた。

放射能の測定には、ウェル型シンチレーションカウンター AUTO WELL GAMMA SYSTEM ARC-500 (アロカ株式会社) を用いた。

TLC には、シリカゲル薄層プレートおよび展開溶媒としてメチルエチルケトン (特級, 和光純薬株式会社) を用い、放射能の定量解析には、Bio-imaging Analyzer (BAS2000, 富士写真フィルム株式会社) を用いた。

2. 試料溶液の調製

過テクネチウム酸ナトリウム (テクネシンチ注 10M, $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ 370 MBq/1 ml, 日本メジフィジックス株式会社) に、メチレンジホスホン酸 (テクネ MDP キット, (株) 第一ラジオアイソトープ研究所), ヒドロキシメチレンジホスホン酸 (HMDP

* 神奈川歯科大学放射線学教室

受付: 8 年 10 月 31 日

最終稿受付: 9 年 5 月 23 日

別刷請求先: 神奈川県川崎市中原区上丸子

山王町 1-1556 (☎ 211)

岡本 弥生

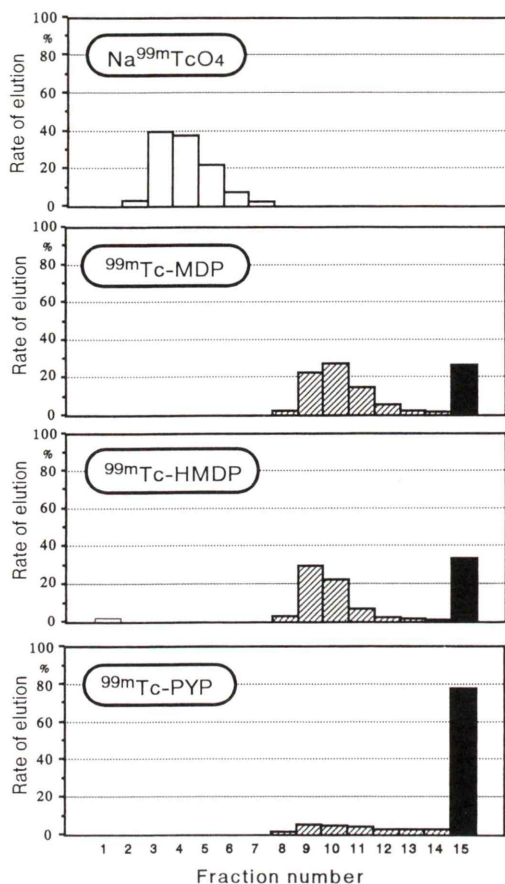


Fig. 1 Elution patterns of ^{99m}Tc -labeled compounds obtained from the mini-column. □: Neutral phosphate buffer (fr. 1-fr. 7), ▨: 100 mM Na_3PO_4 (fr. 8-fr. 14), ■: Column (fr. 15)

キット, 日本メジフィジックス株式会社) およびピロリン酸 (PYP キット, (株) 第一ラジオアイソトープ研究所) 1 バイアルを各々生理食塩水 1 ml に溶解したものを反応させ ^{99m}Tc -MDP, ^{99m}Tc -HMDP, ^{99m}Tc -PYP 試料溶液とした。

3. ミニカラムによる ^{99m}Tc 化合物の分離特性

$\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ 溶液および調製した ^{99m}Tc 標識リン酸化合物溶液の少量 (約 3.7 MBq/0.01 ml) を注射針を用いてカラムに添加した。次に, 中性リン酸緩衝液 7 ml を 1 ml ずつ 7 回に分けて流下し (fr. 1-fr. 7), 続いて, 100 mM リン酸ナトリウム溶液 7 ml を同様に流下した (fr. 8-fr. 14)。各フラク

Table 1 Elution rates of ^{99m}Tc -labeled compounds from mini-column

	Neutral phosphate buffer (fr. 1-fr. 7)	100 mM Na_3PO_4 (fr. 8-fr. 14)	Column (fr. 15)
$\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$	100	—	—
^{99m}Tc -MDP	—	74 ± 4.4	26 ± 4.4
^{99m}Tc -HMDP	3 ± 12	64 ± 7.9	33 ± 7.2
^{99m}Tc -PYP	—	21 ± 5.9	79 ± 5.9

Table 2 Comparison of radiochemical purity tests of ^{99m}Tc -MDP with TLC and mini-column method

Methods		$\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$	^{99m}Tc -MDP
Mini-column	fr. 1-7	100	$5 \pm 0.2\%$
	fr. 8-15	—	$95 \pm 0.2\%$
TLC	front	100	$5 \pm 0.6\%$
	origin	—	$95 \pm 0.6\%$

ション (fr. 1-fr. 14) を試験管に分取し, 各々の放射能を測定した。また, カラムの充填剤中に残留した化合物の放射能は, カラムを直接測定し (fr. 15), 全量を 100 とした時の各フラクションの相対値 ($\text{cpm}/\text{total cpm} \times 100$) を求めた。

4. TLC による ^{99m}Tc -MDP の純度検定

公定書に記載された純度試験法⁴⁾に基づき, $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ 溶液および前述の調製とは別に調製した ^{99m}Tc -MDP 溶液をメチルエチルケトンを展開溶媒としてシリカゲル薄層プレート上で展開した。展開した薄層プレートをイメージングプレートに密着, 感光させた後, BAS2000 を用いて標識率を測定し, 得られた結果と, 同試料を用いて分析したミニカラム法による結果とを比較解析した。

5. ^{99m}Tc -MDP の安定性

^{99m}Tc 標識リン酸化合物の安定性に影響を及ぼすと考えられる要因に調製した化合物の濃度がある^{5,6)}。そこで, 調製した ^{99m}Tc -MDP 溶液を生理食塩水で 1, 10, 100, 1000 倍に希釈し, 希釈直後および 24 時間後 (バイアル瓶を鉛容器中で遮光保存) にサンプリングした試料溶液をミニカラム法により分析した。

III. 結 果

1. ミニカラムによる ^{99m}Tc 化合物の分離特性
各試料溶液のカラムからの溶出パターンを Fig. 1 に示す. $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ 溶液は, 中性リン酸緩衝液 (fr. 1-fr. 7) ですべての ^{99m}Tc 化合物が回収された. ^{99m}Tc -MDP 溶液は, 100 mM リン酸ナトリウム溶液 (fr. 8-fr. 14) で 74%, カラム残分 (fr. 15) として 26% の回収が得られた. ^{99m}Tc -HMDP 溶液

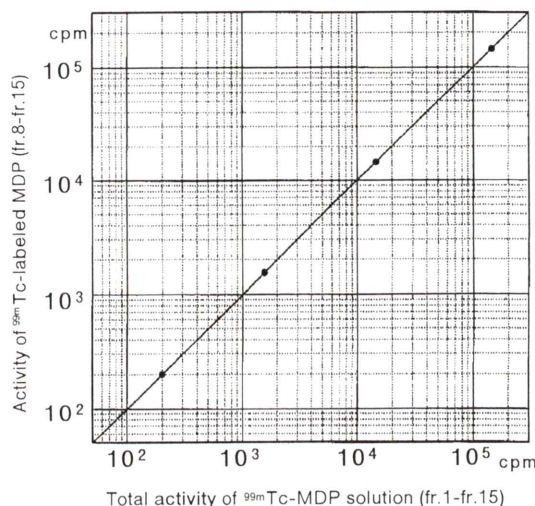


Fig. 2 Effect of dilution on the levels of ^{99m}Tc -labeled MDP in total ^{99m}Tc -MDP solutions. Correlation between activity of ^{99m}Tc -labeled MDP and total activity of ^{99m}Tc -MDP solutions (calibration curve).

は, 中性リン酸緩衝液で 3%, 100 mM リン酸ナトリウム溶液で 64%, カラム残分として 33% の回収が得られた. ^{99m}Tc -PYP 溶液は, 100 mM リン酸ナトリウム溶液で 21%, カラム残分として 79% の回収が得られた (Table 1).

2. TLC による ^{99m}Tc -MDP の純度検定

$\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ 溶液は, TLC で Rf 1.0 に 100%, ^{99m}Tc -MDP 溶液は, TLC で Rf 1.0 に $5 \pm 0.6\%$, 原点に $95 \pm 0.6\%$, ミニカラム法で fr. 1-fr. 7 に $5 \pm 0.2\%$, fr. 8-fr. 15 に $95 \pm 0.2\%$ の回収が得られた (Table 2).

3. ^{99m}Tc -MDP の安定性

希釈直後に分析した試料の fr. 1-fr. 15 の全放射エネルギーを x 軸に, fr. 8-fr. 15 の放射エネルギー (^{99m}Tc -MDP 純度) を y 軸にプロットした検量線を Fig. 2 に示す. 回帰直線は, $\ln(y) = \ln(x) - 0.0084$ ($r = 0.99999$) で表され, 高い正の相関を示した.

希釈直後と 24 時間後に分析した試料の溶出液ごとの分離パターンを Fig. 3 に示す. 希釈直後の試料 (a) では, 希釈率 1, 10, 100, 1000 倍の順に, 中性リン酸緩衝液で 0, 0, 3, 0%, 100 mM リン酸ナトリウム溶液で 85, 84, 78, 88%, カラム残分として 15, 16, 19, 12% の回収で, 分離パターンに大きな変化は見られなかった. 24 時間後の試料 (b) では, 中性リン酸緩衝液で 0, 7, 8, 36%, 100 mM リン酸ナトリウム溶液で 70, 79, 86, 55%, カラム残分として 30, 14, 7, 10% の回収で, 希釈直後の試料とは異なるパターンを示した.

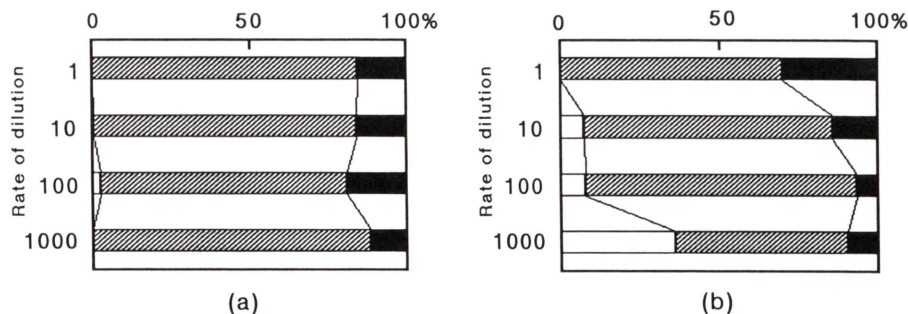


Fig. 3 Stability of standard ^{99m}Tc -MDP solution. a) Immediately after preparation. b) 24 hours after preparation. □: Neutral phosphate buffer (fr. 1-fr. 7), ▨: 100 mM Na_3PO_4 (fr. 8-fr. 14), ■: Column (fr. 15)

IV. 考 察

^{99m}Tc 標識リン酸化合物の分析目的には、主に製剤の標識率のチェックのための純度分析^{5,6)}と標識体の基礎実験および臨床試験における分離分析^{7,8)}がある。化合物の安定性および半減期を考えると、これらの分析法には簡便性と迅速性が求められている。従来から使用されている薄層クロマトグラフィ(TLC)^{4,6,9,10)}やペーパークロマトグラフィ(PC)^{6,11)}は、簡便性に優れ、主に標識体の純度分析に使用されている。安藤ら^{1,2)}や真田ら³⁾によって報告されているミニペーパークロマトグラフィでは、簡便性に加えて迅速性が改善されている。一方、高速液体クロマトグラフィ(HPLC)^{7,8,12,13)}では、分解能の優れているものも多いが、カラムのコンディショニングから系の洗浄まで分離の前後で煩雑さを伴い、簡便性、迅速性は劣る。

今回用いたミニカラム法では、HPLC^{7,8,12)}やミニカラム法^{9,14)}を参考にし、順相系、逆相系およびイオン交換系のカラムを用いて分離条件の検討を行った。その結果、順相系および逆相系では、 $^{99m}\text{Tc-MDP}$ と $^{99m}\text{TcO}_4^-$ を分離することはできず、また、溶出液(クエン酸、リン酸、酢酸の水系および有機溶媒系)の種類によらず回収率は安定しなかった。最も回収率が高かったのはアニオン交換型のミニカラムとリン酸系の溶出液の組合せで、 $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ および ^{99m}Tc 標識リン酸化合物をいくつかのフラクションに分離して簡便かつ迅速に安定して分析することができた(Fig. 1)。すなわち、中性リン酸緩衝液により遊離の $^{99m}\text{TcO}_4^-$ が溶出し、100 mM リン酸ナトリウム溶液により ^{99m}Tc 標識リン酸化合物の一部が溶出した。 ^{99m}Tc 標識リン酸化合物は、その一部がカラム充填剤に残留することから、カラムに残留した ^{99m}Tc 化合物を直接定量することを試みた。その際、充填剤の存在が測定値に影響を及ぼすことも考えられたが、別に行った実験により、その影響は僅かで無視できることも解った。また、カラムへの残留量は、溶出液の量、濃度およびpHを変えても大き

く変化することはなかった。

Wilson ら¹²⁾や Abdelnasser ら¹³⁾によると、アニオン交換型 HPLC による ^{99m}Tc 標識リン酸化合物の分離は、移動相の pH やイオン強度等の影響を受けることが報告されている。しかし、ミニカラム法における溶出条件の検討では、HPLC ほど分解能に影響を及ぼさなかった。

ミニカラムからの溶出パターンは標識体ごとに異なった。その中でも特に $^{99m}\text{Tc-PYP}$ の溶出パターンはカラム残留分が著しく多く、化学的構造の比較的類似している $^{99m}\text{Tc-MDP}$ と $^{99m}\text{Tc-HMDP}$ は溶出パターンも類似していた。今回用いたカラムはアニオン交換型であるため、主に溶出液の pH により化合物が溶出し、負電荷に帯電した化合物ほどカラムに残留する傾向がある。しかし、化合物の構造によっては、イオン交換以外の性質によってカラムに残留することも考えられ、分離された化合物を本法のみで分類および同定することは難しい。

Handeland ら⁸⁾によって報告されている HPLC 法では、カラムにより分離された ^{99m}Tc 標識化合物をそのまま骨シンチグラフィに使用することが試みられているが、今回のミニカラム法では、分離された ^{99m}Tc 化合物はすべて $^{99m}\text{TcO}_4^-$ と同じ画分に溶出する化合物になっていることが予備実験において解っていたため、遊離の $^{99m}\text{TcO}_4^-$ 以外、これらの同定は行えなかった。

しかし、遊離の $^{99m}\text{TcO}_4^-$ が中性リン酸緩衝液で 100% 回収されたことから、 $^{99m}\text{Tc-MDP}$ の標識率は、100 mM リン酸ナトリウム溶液溶出画分(fr. 8-fr. 14)およびカラム残分(fr. 15)の合計と考えた。この値は、同試料を用いて行った TLC による純度試験の結果とほぼ一致した。すなわち、TLC で Rf 1.0 に移動する $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ はミニカラム法では fr. 1-fr. 7 に回収され、原点に留まる ^{99m}Tc 標識 MDP は fr. 8-fr. 15 に回収された。

今回の比較実験では、TLC の展開に 30-40 分、乾燥および定量にかかった時間をあわせると約 1 時間を必要とした。これに対して、ミニカラム法は、カラム操作に約 5 分、定量にかかった時間を

あわせても 30 分未満であった。また、本法を調製した薬剤の純度分析に用いるのであれば、カラム操作は、fr. 1-fr. 7 まですべてを一度に溶出し、カラム残分との比を求めるだけで済むため、操作時間はさらに短縮されるものと思われる。

測定にかかる時間は、一度に測定できる試料の数や検出器の感度等装置の性能に依存することが多い。試料の放射能が測定装置の感度範囲外にある場合、放射能の減衰を待つか、試料を希釈する方法が取られる。希釈後の試料の分析が最も早く結果を出せる方法であると思われるが、試料の希釈は化合物の分解等測定結果に影響を及ぼすことが考えられる⁶⁾。 ^{99m}Tc -MDP は希釈率が大きいもののほど時間とともに分解し、標識率は低下する傾向がみられた (Fig. 3)。しかし希釈直後の試料であれば全放射能と標識体分画の測定値は正の相関を示し、標識率は濃度によらず一定の値を示した (Fig. 2)。したがって、あらかじめ測定装置の感度に合った濃度に試料を希釈して分析することは、希釈直後であれば有効であることが解った。

希釈を行わなかった ^{99m}Tc -MDP 試料は 24 時間後に標識率に変化は見られなかったものの、カラム残分の増加および 100 mM リン酸ナトリウム溶液溶出分の低下が見られた (Fig. 3)。 ^{99m}Tc -MDP 溶液は ^{99m}Tc の酸化数の異なるいくつかの化合物からなることが知られている^{5,6)}。このことから、 ^{99m}Tc -MDP 溶液の安定性は、標識されたリン酸化合物の標識率だけでなく化学的構造に関しても観察する必要があることを示唆している。

ミニカラムは使い捨てタイプであるため HPLC のカラムのように劣化の影響がなく、使用後に洗浄する必要もない。放射能により定量しているため、カラム充填剤からの溶出物や抽出溶媒による妨害はほとんどない。したがってカラムと抽出溶媒の種類の選定に制限がなく、幅広い応用が考えられる。

今回の分析条件は、簡便性に重点を置き、市販の緩衝液とリン酸塩を溶出溶媒に選んで極力簡便に分析できるよう設定した。TLC や PC に比べると簡便性が劣るが、ミニカラムと測定装置さえあ

れば簡単に分析することができる。

すべての標識体において、分離力は TLC や PC と比べて高く、HPLC と比べて低かったが、小さいカラムを用いて、分離度と簡便性および迅速性を兼ねそろえている分離条件を探すことは難しいと思われる。しかし、最近ではメーカーの努力によりミニカラムの種類も豊富となり、いろいろな条件で検討することも可能となってきた。今後、分離度の改善や in vivo 試料への応用および他の放射性医薬品への応用等検討していきたい。

謝辞：本研究の細部にわたって深甚なるご指導、ご協力いただいた神奈川歯科大学放射線学教室の鹿島勇教授および昭和薬科大学物理化学研究室内の遠藤和豊教授に感謝の意を表します。

文 献

- 1) 安東 醇, 平木辰之助, 真田 茂, 高橋 進, 津崎能昌, 鈴木 豊, 他: ^{99m}Tc 化合物の迅速純度検定法. 核医学 **12**: 681, 1975
- 2) 安東 醇, 真田 茂, 安東逸子, 平木辰之助, 久田欣一: ^{99m}Tc 標識医薬品の迅速純度検定法. Radioisotopes **33**: 226-229, 1984
- 3) Sanada S, et al: A single-strip mini-paper chromatographic method for rapid purity-control of ^{99m}Tc -labeled radiopharmaceuticals. Eur J Nucl Med **12**: 390-393, 1986
- 4) 厚生省薬務局新医薬品課監修: 放射性医薬品基準ハンドブック, 改訂 4 版, 社団法人日本アイソトープ協会, 東京, 1991, p. 45
- 5) 横山 陽: キット標識放射性医薬品の品質管理 (1) —— ^{99m}Tc 放射性医薬品の放射化学的純度を中心にして——. Radioisotopes **33**: 170-179, 1984
- 6) 横山 陽: キット標識放射性医薬品の品質管理 (2) —— ^{99m}Tc 放射性医薬品の放射化学的純度を中心にして——. Radioisotopes **33**: 237-246, 1984
- 7) Huigen YM, Tji TG, Gelsema WJ, de Ligny CL: Anion exchange chromatography of $^{99m}\text{Tc}(\text{Sn})$ -MDP complexes: influence of eluent composition, determination of void volume and charge of the main component. Int J Rad Appl Instrum A **39** (1): 25-30, 1988
- 8) Handeland A, Lindegaard MW, Heggli DE: Biodistribution of anionic separated MDP complexes from different MDP preparations. Eur J Nucl Med **15**: 609-611, 1989
- 9) Reilly RM, So M, Polihronis J, Houle S: Rapid quality control of ^{99m}Tc -sestamibi. Nucl Med Commun **13**:

- 664-666, 1992
- 10) 吉野富雄, 三好弘一, 岸 太郎, 佐藤一雄, 松本隆裕: ^{99m}Tc 標識 HMDP および MDP のヒドロキシアパタイトへの吸着. *Radioisotopes* **43**: 609-612, 1994
 - 11) 吉野富雄, 渡辺紀昭, 河原良英, 岡田京子, 西邑育代: 骨シンチグラフィ用 ^{99m}Tc -MDP の放射化学的純度ならびに安定性に関する検討. *Radioisotopes* **29**: 38-40, 1980
 - 12) Wilson GM, Pinkerton TC: Determination of change and size of technetium diphosphonate complexes by anion-exchange liquid chromatography. *Anal Chem* **57**: 246-253, 1985
 - 13) Abdelnasser MA, Deutsh E, Heineman WR: Anion-exchange high-performance liquid chromatography of technetium-labeled phosphonoacetic acid skeletal imaging agent preparations. *J Chrom* **488**: 463-469, 1989
 - 14) 夏目克巳, 鈴木栄里, 鈴木智子, 渡辺幸彦: ミニカラム法によるビタミン D3 分画の分画精製および 25 (OH) D 測定系の検討. *核医学* **32**: 99-104, 1995

Summary

Simplified Analytical Method of ^{99m}Tc -labeled Phosphonate

Yayoi M. OKAMOTO and Hiromi WAKAO

Department of Oral and Maxillofacial Radiology, Kanagawa Dental College

A simplified and rapid analytical method of ^{99m}Tc -labeled phosphonates was tested using a mini-column based on an anion-exchange type of cartridge. Free $^{99m}\text{TcO}_4^-$ in the prepared solutions of ^{99m}Tc -labeled phosphonate was eluted from the column by a neutral phosphate buffer solution. Partly components of the ^{99m}Tc -labeled phosphonates was eluted from the column by a 100 mM sodium phosphonate solution, while the residual components were not eluted from

the mini-column. In addition, for analysis of ^{99m}Tc -labeling rate in ^{99m}Tc -MDP solution, this method requires much less time than thin layer chromatography (TLC). Therefore, the method is more suitable for analysis of ^{99m}Tc -labeled phosphonates than TLC now in use, particularly rapid analysis for ^{99m}Tc -labeling rate of the compounds and the stability.

Key words: ^{99m}Tc -MDP, ^{99m}Tc -phosphonate, Mini-column, Rapid analysis, Anion-exchange.