

《ノート》

¹¹C-メチル基標識システム整備と利用の実際**Systematization of Methylation Procedure and Application in ¹¹C-labeled Compound**

村上松太郎* 高橋 和弘* 佐々木 広* 中道 博之**
 近藤 靖** 水沢 重則** 三浦 修一* 飯田 秀博*
 菅野 巍* 上村 和夫*

Matsutaro MURAKAMI*, Kazuhiro TAKAHASHI*, Hiroshi SASAKI*,
 Hiroyuki NAKAMICHI**, Yasushi KONDOW**, Shigenori MIZUSAWA**,
 Shuichi MIURA*, Hidehiro IIDA*, Iwao KANNO* and Kazuo UEMURA*

*Divisions of Radiology and Nuclear Medicine,
 **Internal Medicine, Research Institute for Brain and Blood Vessels Akita Japan

I. はじめに

ポジトロン標識試薬として ¹¹CH₃I は極めて重要であり、極めて多種のトレーサーが本試薬により標識されている。そこで ¹¹CH₃I による標識系を整備することは意義深いと考えられ、汎用性と比放射能の向上に留意してこれを整備した。次いで Methionine, N-Methylspiropiperidole (NMSP), Ro15-1788, YM-09151-2, Clorgyline の標識合成に利用し、満足する結果を得たので報告する。

II. ¹¹CH₃I 合成とメチル基標識**1. ¹¹CH₃I 合成システム**

Marazano らの方法¹⁾に準じた。すなわち、¹⁴N (p, α) ¹¹C により生じた ¹¹C を 700°C に熱した酸

* 秋田県立脳血管研究センター放射線医学研究部門
 ** 同 内科学研究部門

受付：2年7月3日

最終稿受付：2年9月4日

別刷請求先：秋田市千秋久保田町6-10 (〒010)

県立脳血管研究センター

放射線医学研究部門 村上松太郎

化銅により ¹¹CO₂ とする。次いで LiAlH₄ により還元したのち H₂O を加えて ¹¹CH₃OH とする。これに HI を作用させ ¹¹CH₃I を合成するものである。

合成システムの設計に際してはデッドボリュームの減少と炭素源の排除を念頭に置いて日本製鋼所製品を改造した。すなわち、ターゲットボックスを含む ¹¹CO₂ 回収ラインを独立に設けた。また、¹¹CH₃I 合成系は内径 1 mm のテフロン管で配管するとともに内容積を減少させた還元容器によるワンポットシステムを採用した (Fig. 1)。ここで、ターゲットボックス (30 mm ID, 250 mm Long) を含む ¹¹CO₂ 回収ラインは 190 ml, ¹¹CO₂ 還元容器を含む ¹¹CH₃I 蒸留スペースは 17 ml である。通常は、上記ターゲットボックスに高純度 (99.999% 以上) N₂ ガス 7.0 kg/cm² を充填し、陽子 (15.2 MeV on target) を照射して ¹¹C を製している。

還元試薬 LiAlH₄ はスイス Fluka AG 社製の 1 g ペレットをヘリウム置換したグローブボックス内で、10分割しテフロンコーティングしたゴムキ

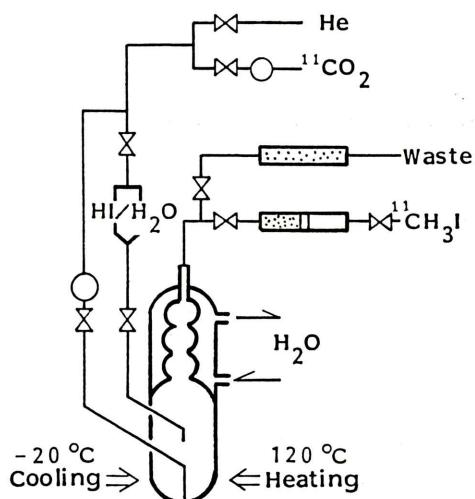


Fig. 1 The scheme of $^{11}\text{CH}_3\text{I}$ synthesis system. The columns connected to the waste and $^{11}\text{CH}_3\text{I}$ distillation line are packed with activated charcoal and sodalime plus P_2O_5 , respectively. The cooling and heating is carried out by liquid CO_2 and heating blower, respectively.

ヤップをかぶせ、アルミニウム冠で封じて遮光バイアル中に保存した。

$^{11}\text{CH}_3\text{I}$ 合成に先立ち、ヘリウム置換保存した特級テトラヒドロフラン (THF) を金属カリウム上で 3 時間以上還流したのち、金属接合部を有する注射針を経由して上記のバイアルに直接蒸留した。また、 LiAlH_4 を含まない乾燥バイアルに蒸留した THF を希釈に用いた。通常は飽和 LiAlH_4 /THF 液 0.1 ml と希釈用 THF 0.4 ml を使用した。

本システムと上記の試薬条件で、 $^{11}\text{CO}_2$ の回収流速を 350 ml/min にすると、4 分間で 80% 回収され、 $^{11}\text{CH}_3\text{I}$ は 150 ml/min のヘリウム気流下、3 分間でほぼ完全に蒸留されることが判明した (Fig. 2)。

$^{11}\text{CH}_3\text{I}$ 合成ステップと ^{11}C -放射能分布を Table 1 に示した。12 分以内に、回収した $^{11}\text{CO}_2$ のほぼ 80% が $^{11}\text{CH}_3\text{I}$ として得られることが判る。

なお、 $^{11}\text{CH}_3\text{I}$ 捕捉はアセトン (-40°C) 1 ml で行ったものである。

2. ^{11}C -メチル基標識・分離システム

$^{11}\text{CH}_3\text{I}$ 合成システムと同様に、デッドボリュ

ームの減少と汎用化を計った。すなわち、内径 0.5 mm のテフロン管でテフロン製フランジバルブを HPLC のインジェクター部に並べて接続した。これらのバルブにより $^{11}\text{CH}_3\text{I}$ の供給・停止、反応容器の閉鎖・解放、HPLC インジェクターへの導入・停止、HPLC 流出液の廃棄・収集がそれぞれ最少操作で可能となっている。収集された流出液は、エバポレーターと真空ラインを有する精製系へと導かれ、濾過滅菌済みの注射液として取り出せる。また、反応容器としてスクリューキャップ付随のガラス製容器 (内容 5 ml と 1 ml) を数個ずつ準備した (Fig. 3)。本システムでは、ホットセル小扉からの速やかな流路切り替えとともに、試薬の注入や反応途中でのサンプリングも可能である。また、システムは 20 kg/cm² までの耐圧性が示された。なお加熱はアルミニウムブロックヒーターを、冷却は冷却メタノールをそれぞれ用いている。

III. 利用の実際

1. Methionine

Comar らにより報告された方法²⁾を参考にした。予め -40°C 冷却したアセトン 1 ml 中に $^{11}\text{CH}_3\text{I}$ を捕捉する。次いで、反応容器を閉鎖系とし L-Homocysteinethiolactone 10 mg/0.2 N-NaOH 1 ml をシリジンで加える。80°C 加温槽に反応容器を移し 2 分後に反応容器を解放系とする。この時、六方流路切り替えバルブはエバポレーター直結ラインに向け、かつ系内を陰圧に保っておくことで 1 分以内に反応液の移送は終了する。なお、蒸発容器 (50 ml 梨型コルベット) に予め 0.05 M-NaH₂PO₄ 5 ml を入れて乾固しておくことで、反応液移送とアセトン除去を同時に実行し、次に生理食塩水を加えることで中性化できる。ついで ^{11}C -Methionine 液をヘリウム圧により 20 ml 注射筒の外筒を用いたリザーバーに送り、陰圧を利用してミリポアフィルターを通して滅菌バイアル中に集める。

以上の操作で $^{11}\text{CH}_3\text{I}$ 合成終了から 5 分前後で高純度の ^{11}C -Methionine が $^{11}\text{CH}_3\text{I}$ の 90% 以上の収率で得られた。

2. N-methylspiroperidole (NMSP)

Burns らの方法³⁾を参考にした。-40°C に冷却した Spiroperidole 1 mg/Dimethylformamide 0.5 ml に Tetrabutylammonium hydroxide 等モルを ¹¹CH₃I 導入の直前に加える。¹¹CH₃I 導入終了後、閉鎖系にて 80°C で 2 分間加温する。次いで系を開放するとともに HPLC (Intertsil ODS, 10.7 × 300 mm, CH₃CN 500: 0.1 M-AcONH₄ 500: AcOH 1) に移送し望みの画分を分取する。溶媒除去後生理食塩水に再溶解し、ミリポアフィルター経由に

て滅菌バイアル中に集める。

製品は照射終了から 30 分以内に ¹¹CH₃I の 50% 前後の収率で得られ、その化学量は 0.3 μmol 以下であり、反応基質の混入量も 20 nmol 以下であった。なお現在の臨床供給に際しては、アンモニアの毒性を考慮して、溶離液は CH₃CN (40): 0.01 M-NaH₂PO₄ (60) 混合液を用いている。本溶離液 7 ml/min で溶出させた場合、反応基質は 5.5 分、NMSP は 7.5 分前後にそれぞれ溶出する。

本標識条件は主に以下の基礎検討に基づくものである。NMSP の生成率と反応温度及び時間との関係を Fig. 4-A に示した。80°C よりは 50°C 反応で、6 分よりは 3 分反応で収率の高いことが判明した。このことは、50°C 以下の温度での反応の完結を意味する。別に、¹¹CH₃I 捕捉時の温度である -40°C からの反応容器内温度変化を 80°C 浴に浸した場合について測定したところ、2 分以内で 50°C に達することが判明した。また、反応基質である Spiroperidole の安定性と塩基である Tetrabutylammonium hydroxide 量との関係

Table 1 ¹¹CH₃I production

Process	Time (sec)	Radioactivity	%
¹¹ CO ₂ recovery	250	¹¹ CH ₃ I trapped	76.3 ± 3.6
THF ev up	240	¹¹ CH ₃ I wasted	5.2 ± 1.0
Cooling	40	SL/P ₂ O ₅ col	5.9 ± 2.4
HI injection	10	LiAlH ₄ ves	8.5 ± 2.0
¹¹ CH ₃ I distillation	180	¹¹ CO ₂ wasted	6.2 ± 2.2
Total	720	Total	100

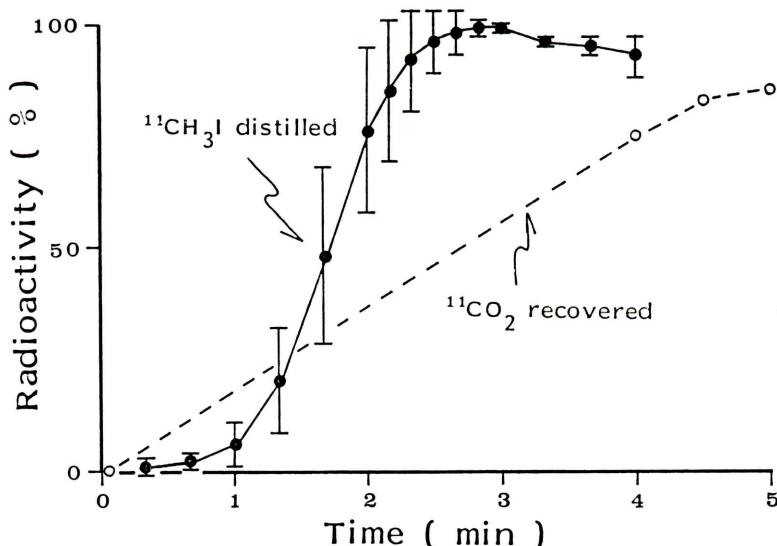


Fig. 2 The time courses of ¹¹CO₂ recovery and ¹¹CH₃I distillation. The time course of ¹¹CH₃I distillation was represented as the mean ± SD of 10 measurements which were continuously monitored at flow of 150 ml/min; but in the case of ¹¹CO₂ recovery, the data was calculated from the residual target gas pressure at the flow rate of 350 ml/min.

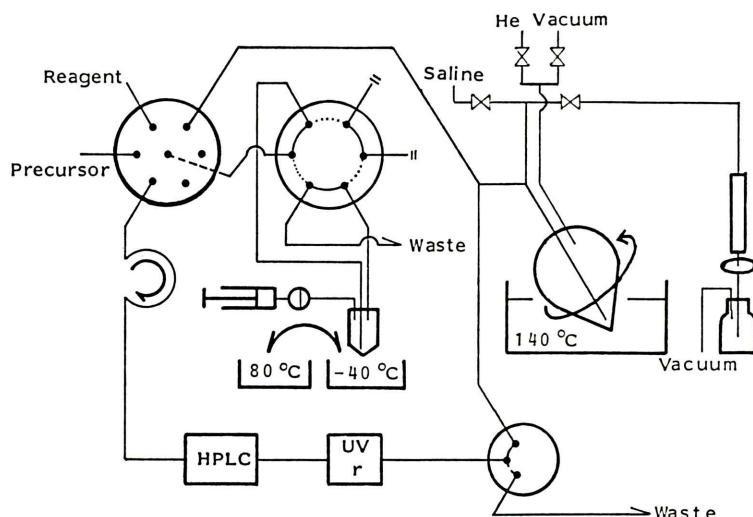


Fig. 3 The scheme of $^{11}\text{CH}_3\text{I}$ labeling, solvent removing, and sterilization system.

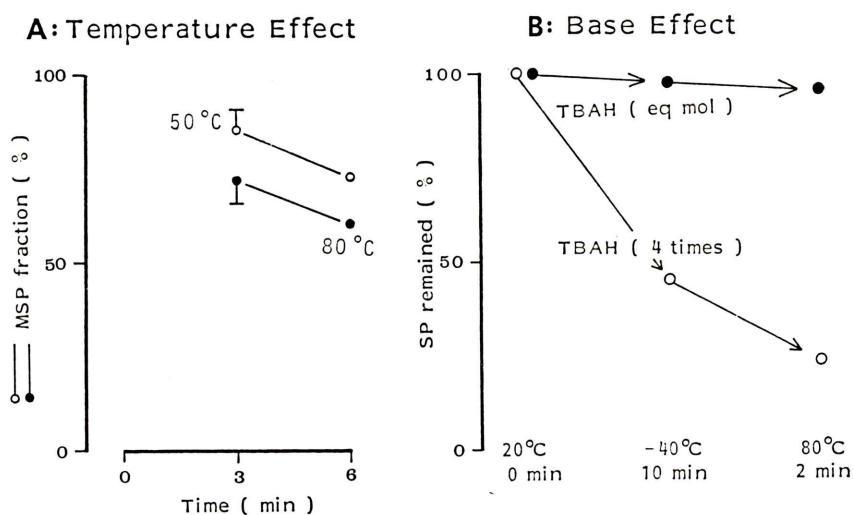


Fig. 4 The reaction condition in ^{11}C -NMSP synthesis. A: The effect of reaction temperature on ^{11}C -NMSP yield. Spiroperidole 1 mg/0.5 ml DMF that contained equimolar tetrabutylammonium hydroxide was incubated with $^{11}\text{CH}_3\text{I}$ at 50°C or 80°C for 3 min or 6 min. The reaction mixture was sampled and analyzed for ^{11}C -NMSP fraction by radiochromatogram. B: Effect of base amount on the stability of spiroperidole. Spiroperidole 1 mg/0.5 ml DMF was incubated with equimolar or four times molar tetrabutylammonium hydroxide at various temperatures, and for the indicated times. The medium was sampled and analyzed for the residual amount of spiroperidole by HPLC.

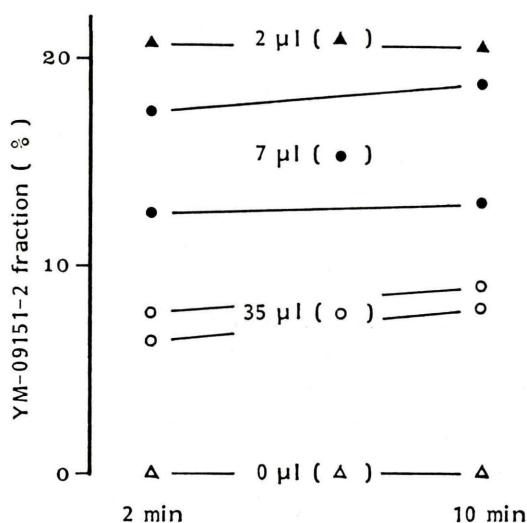


Fig. 5 Effect of base amount and reaction time on ¹¹C-YM-09151-2 yield. Desmethyl-YM-09151-2 1 mg/0.5 ml DMF was incubated at 80°C with ¹¹CH₃I in the presence of various amounts of tetrabutylammonium hydroxide, and at indicated times. The reaction medium was sampled and analyzed for ¹¹C-YM-09151-2 fraction by radiochromatogram.

をみると (Fig. 4-B), 多量の塩基を用いた場合には反応基質の分解が低温に於てさえ生じることが判明した。

3. Ro15-1788

Ehrin らによる方法⁴⁾を参考にした。Desmethyl-Ro15-1788 1 mg を反応基質として, HPLC 溶離液 (CH₃CN 30: 0.01 M-H₃PO₄ 70) を変えたのみで NMSP の場合と全く同一手順で合成したところ, 標識所要時間, 収率, 化学量, 反応基質混入量は NMSP の場合とほぼ同様であった。

4. YM-09151-2

Desmethyl-YM-09151-2 1 mg/dimethylformamide 0.5 ml に添加する Tetrabutylammonium hydroxide 量と, YM-09151-2 生成量との関係を 80°C 反応で時間を使って検討した (Fig. 5)。なお, 使用した HPLC 条件は NMSP の場合と同一である。その結果, 塩基の全く存在しない場合には反応は進行しないが, 等モルより多過ぎても生成量の減少することが判明した。なお, 反応基質は等

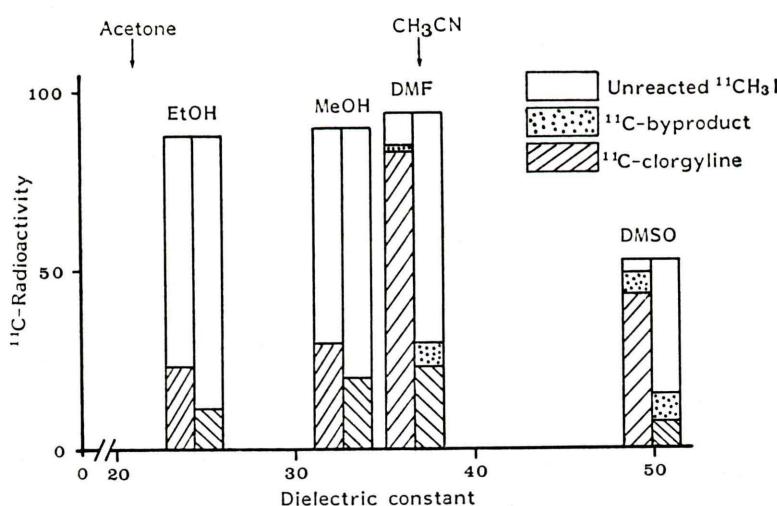


Fig. 6 Effect of solvent and base on ¹¹C-clorglyline yield. Desmethylclorglyline 20 μmol was dissolved in various solvents and incubated with ¹¹CH₃I in the presence or absence of equimolar tetrabutylammonium hydroxide. The trap of ¹¹CH₃I was carried out at -40°C except in the case of DMSO (20°C). After the reaction at 100°C for 3 min, the medium was analyzed by HPLC. ¹¹C-radioactivity was normalized by the amount of distilled ¹¹CH₃I. The discrepancy between 100 and the top of each columns thus means non-trapped ¹¹CH₃I fraction. The left and right columns represent the yields in the absence and presence of the base, respectively.

モルの Tetrabutylammonium hydroxide 存在下で 80°C-10 分の加温でも安定であった。また 2 分と 10 分の反応で生成量に大きな違いは認められなかった。收率の向上の為には塩基の種類や量の検討に加え、溶媒や反応温度の選択も重要なものと思われた。なお現在では、より收率の高い標識条件およびトレーサーの有用性が旗野ら⁵⁾によって報告されている。

5. Clogyline

Desmethylclorgyline を MacGregor ら⁶⁾の方法に準じて合成した。¹¹CH₃I によるメチル化条件として、等モル塩基 (Tetrabutylammonium hydroxide) 存在の可否と、反応溶媒の種類 (Ethanol, Methanol, Dimethylformamide, Dimethylsulfoxide) について検討した。すなわち、Desmethylclorgyline 20 μmol を -40°C に冷却した上記溶媒 0.5 ml に溶解し、¹¹CH₃I を導入し、100°C 下で 3 分間反応させ、HPLC 分取 (Inertsil ODS-5, 10.7 × 300 mm, Methanol 80: 0.05 M-Ammoniumformate 20) を行った (Fig. 6)。

その結果、誘電率(極性)の高い溶媒を用いるほど放射性不純物の生成する傾向が認められた。また、塩基の存在によって未反応の ¹¹CH₃I と放射性不純物の比率は増加した。以上の事実に加え、低温に於ける ¹¹CH₃I 捕捉が可能であることから、塩基の非存在下で Dimethylformamide または Acetonitrile 等を溶媒にするべきであるとの結論を得た。事実 Dimethylformamide 溶媒では、¹¹CH₃I の約 80% が ¹¹C-Clorgyline として得られた。標識は照射終了から 25 分以内に完了した。

IV. 考 察

¹¹CH₃I による標識合成、特に化学受容体結合リガンドの標識合成に際しては解決すべき種々の問題がある。すなわち、¹¹C の短い物理半減期のために大量の放射能から迅速に合成する必要を余儀なくされ、且つ炭素源の混入にも配慮する必要がある。これらはいずれも比放射能の向上には不可欠なものである。また、標識試薬として ¹¹CH₃I の利用頻度が高いために、汎用性を有す

るシステムを備え再現性ある実験を行うことは新しいトレーサーの開発のためにも重要である。その意味で今回、¹¹CH₃I 合成システムとそれによる標識システムを整備した。なお、HPLC 溶離液の除去および濾過滅菌過程は、¹⁸F-FDG 合成のための加水分解以降のシステムを共用した。

独立の ¹¹CO₂ 回収ラインを設け、¹¹CH₃I 合成システムの内容積減少を計ったことは、炭素源の混入回避や合成時間の短縮に有効と考えられた。また、標識システムに内径の小さいチューブとテフロン製フランジバルブを採用したことで一回の操作による流路切り替えが可能となり、合成者の被曝軽減と時間短縮につながった。さらに、本システムでは、各種の試薬注入と反応途中のサンプリングが可能で、さまざまのトレーサーの標識条件の検討実験にも極めて有用であった。

本システムを用い Methionine, NMSP, Ro15-1788 を臨床測定に供しているが、これらはいずれも ¹¹CH₃I 合成を含め、照射終了から 25 分以内に注射液として得られている。なお臨床供給には 5 倍希釈した LiAlH₄ を用いて ¹¹CH₃I を合成しているがその場合の NMSP と Ro15-1788 の化学量は 0.3 μmol 以下である。一方、他の目的で ¹¹CH₃I を合成した際、飽和 LiAlH₄ を用いた場合と希釈 LiAlH₄ を用いた場合で ¹¹C-メチル基標識物の化学量に大きな差は認められず、むしろ溶媒である THF の除去時間による影響が著明であるとの印象を得ている。また同容量の場合、溶存する LiAlH₄ 量が少ないほど短時間で THF 除去が完了する。よって、希釈 LiAlH₄ を用いることは容積増加につながり、高流速下での ¹¹CO₂ 捕捉を可能にするための有効な手段と考えている。この残存溶媒 (THF) と化学量との関係は岩田ら⁷⁾により詳細に検討されている。また、本文での標識所要時間は、化学量を知るために生成画分の総てを分取した場合のものであり、実際の臨床供給に際しては生成物ピークの一部を分取すれば十分であり、更なる時間短縮と混入基質の減少も可能である。

YM-0915-2 標識に関しては、今回のわれわれ

の収率は未だ臨床測定に供するレベルに達しておらず、旗野らの標識条件を採用すべきと考えている。

一方、¹¹C-Clorgyline は ¹¹CH₃I の約 80% の収率で照射終了から 25 分以内に得られることから、臨床利用に十分対応できると考えている。なお標識合成時にわずかに生成する水溶性不純物は、その生成条件から 4 級アンモニウム類縁の物質と推測されるが、分離が容易であることから、実質上の問題は少ないものと考えている。また、NMSP や Ro15-1788 の実積から、37 GBq (1 Ci)/μmol 以上の比放射能で標識することも可能と考えている。

最後に、本文で述べた ¹¹CH₃I 合成とそれによる標識システムは極めて低コストで整備可能であり完全に自動化された合成装置を所持しない施設や実験的に種々の ¹¹CH₃I 標識を試みる場合に於いては極めて有用と考えられる。

謝辞：標識前駆体である Spiroperidole, Desmethyl-Ro15-1788, Desmethyl-YM-09151-2 をご提供戴きましたエーザイ、日本ロッシュ、山之内各株式会社に深謝致します。なお本システム構成は、厚生省精神神経疾患研究依託事業(62 指 10)の援助に依ってなされた。記してここに謝意を表します。

文 献

- 1) Marazano C, Maziere M, Berger G, et al: Synthesis of Methyl Iodide-¹¹C and Formaldehyde-¹¹C. *Int J Appl Radiat Isotopes* **28**: 49-52, 1977
- 2) Comar D, Cartron J-C, Maziere M, et al: Labeling and Metabolism of Methionine-Methyl-¹¹C. *Eur J Nucl Med* **1**: 11-14, 1976
- 3) Burns HD, Dannals RF, Langstrom B, et al: (3-N-¹¹C-Methyl) Spiperone, A Ligand Binding to Dopamine Receptors: Radiochemical Synthesis and Biodistribution Studies in Mice. *J Nucl Med* **25**: 1222-1227, 1984
- 4) Ehrin E, Johnstrom P, S-Elander S, et al: Preparation and Preliminary Positron Emission Tomography Studies of ¹¹C-Ro15-1788, A Selective Benzodiazepine Receptor Antagonist. *Acta Pharm Suec* **21**: 183-188, 1984
- 5) Hatano K, Ishiwata K, Kawashima K, et al: D₂-Dopamine Receptor Specific Uptake of Carbon-11 Labeled YM-09151-2. *J Nucl Med* **30**: 515-522, 1989
- 6) MacGregor RR, Fowler JS, Wolf AP: Synthesis of Suicide Inhibitors of Monoamine Oxidase: Carbon-11 Labeled Clorgyline, L-Deprenyl and D-Deprenyl. *J Label Compds Radiopharm* **15**: 1-9, 1988
- 7) Iwata R, Ido T, Ujiie A, et al: Comparative Study of Specific Activity of (¹¹C)Methyl Iodide: A Search for the Source of Carrier Carbon. *Int J Appl Radiat Isot* **39**: 1-7, 1988