

令和元年6月17日現在

機関番号：13401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15575

研究課題名(和文) 酸化ハロゲン化反応を用いた放射性同位元素の迅速標識法の開発

研究課題名(英文) Development of rapid radioisotopes labeling method using oxidative halogenation reaction

研究代表者

牧野 顕 (Makino, Akira)

福井大学・高エネルギー医学研究センター・准教授

研究者番号：00566226

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：酸化還元酵素とマンガンスalen錯体を触媒として用いる放射性ハロゲンの新規標識法について検討を行った。

酸化還元酵素を用いる標識反応については、水系溶媒中で、放射性ハロゲンの半減期を考慮した迅速合成に応用することは現時点では難しい。

マンガンスalen錯体触媒を用いた標識反応については、これまで報告されている放射性フッ素以外の放射性ハロゲンにも適応可能であることを明らかにした。反応条件についての更なる検討や新たな錯体開発などの研究が今後、更に進むと期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

放射性医薬品は様々な疾患の非侵襲的な診断(PET)や、高い治療奏功性が期待される放射線内照射治療に幅広く使用されている。特に放射性ハロゲンは既に様々な放射性医薬品に用いられているだけでなく、新たな治療用核種としても注目されている。本研究で進めた放射性ハロゲンの迅速合成法の開発は、これまで合成が困難であった新たな放射性医薬品の開発や、既存の薬剤の製造コスト低減に繋がる技術であり、学術的意義が大きい。また、国民の健康に資する技術であり、社会的意義も大きい。

研究成果の概要(英文)：Development of new labeling methods for radioactive halogens using enzymes or manganese-salen complex as catalysts was performed.

At present, it is difficult to apply enzymes as catalyst for rapid synthesis considering the half life of radioactive halogens.

It was revealed that manganese-salen complex can be also used as catalyst for radioactive halogens other than radioactive fluorine-18, which have been reported previously. Further studies on reaction conditions and new metal-complex development are expected to proceed in the near future.

研究分野：放射性医薬品化学

キーワード：酸化還元酵素 マンガン salen 錯体 酸化ハロゲン化 放射性ハロゲン

1. 研究開始当初の背景

フッ素 (^{18}F)、臭素 (^{76}Br , ^{77}Br)、ヨウ素 (^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I) といったハロゲンの放射性同位元素は、基礎研究用途など比較的多くの場面で用いられている放射性同位元素であり、放射性医薬品としては、PET、SPECT などの核医学診断用トレーサーや放射線内照射治療薬などに利用されている。これら放射性医薬品の化学合成では、放射性同位元素の半減期と合成技術者の被ばく防護の観点から、放射性同位元素による標識反応を合成最終段階で行うことが一般的である。しかしながら、標識反応を最後に行うためには、標識部位に反応性置換基を導入しておく必要がある、標識部位以外の反応点に保護基を導入しておく必要があるなど、薬剤合成において様々な制約が生じる。特に複雑な構造を有する薬剤を合成するためには、この合成上の制約が合成経路煩雑化の原因となる場合が多く、新たな薬剤開発での大きな障害の一つとなっている。よって、反応性置換基や保護基の導入を必要としない、反応特異的かつ迅速な放射性ハロゲンの標識反応法を開発することは非常に重要な研究課題である。

解決策の一つとして酵素の高い反応特異性を利用した標識反応が検討されている。例えば、これまでにフッ素転移酵素の高い反応特異性を利用した放射性フッ素標識反応が検討されている。しかしながら、フッ素転移酵素は非常に高価である他、市販されていない、酵素の基質特異性が高く応用性に乏しいなど実用性という観点から、問題が残されている。

Groves 等は有機溶媒中で簡便な C-F 結合の形成を可能とするマンガンポルフィリン錯体やマンガンサレン錯体を触媒とした酸化的フッ素化反応を報告している (*Science*, 2012, 337, 1322-25, *J. Am. Chem. Soc.* 2014, 136, 6842-6845)。本申請者はマンガンサレン錯体が酸化還元酵素の人工モデル錯体であることに着目し、安価で市販されている酸化還元酵素を反応触媒とすることで、マンガンサレン錯体と同様に酸化的フッ素化反応が可能であるのではないかと考えた。実際に、類似反応メカニズムで進行するフェノールの酸化重合では、酸化還元酵素の一種であるペルオキシダーゼとそのモデル錯体である鉄サレン錯体のいずれでも反応が進行し、ポリフェノールを生成することが報告されている。また、酵素を触媒として用いることによって、反応溶媒として水系溶媒を使用することが可能になると考えられる。現行のフッ素化反応では、サイクロトンから供給される ^{18}F -水溶液を有機溶媒に置換する工程が合成時間の大きなロスとなっていることから、水系溶媒中での酸化還元酵素触媒による一段反応でのハロゲン(フッ素)標識反応が達成されれば、合成時間の大幅な短縮に繋がるものと期待される。

2. 研究の目的

酸化還元酵素およびそのモデル錯体である金属サレン錯体を触媒として用い、放射性ハロゲンの標識反応を開発する。特に酵素の高い反応特異性を利用することにより、従来の有機化学的手法では必要不可欠であった反応性置換基の保護、脱保護を行わず、一段反応で目的化合物の合成を可能とする手法の開発を進める。また酸化還元酵素を触媒とする水系溶媒中での反応を実現することによって、標識合成時間の大幅な短縮、環境への負荷が小さいグリーンケミストリーの実現を目指すことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 医療用小型サイクロトロンでの放射性ハロゲン核種の製造

放射性フッ素ならびに臭素は福井大学高エネルギー医学研究センター内に設置されている医療用小型サイクロトロンにて製造した。放射性フッ素 (^{18}F) は臨床用に常時製造をしていることから、既に確立している製造方法に従い、 ^{18}O - H_2O を原料とする (p,n) 反応によって製造した。研究用途で使用頻度が高い放射性臭素には ^{76}Br と ^{77}Br との二種類があるが、 ^{76}Br はポジトロン放出核種であり、被ばくによる人体影響が大きい。そこで本研究では ^{77}Br を用いることとし、 ^{77}Se を原料とする (p,n) 反応によって ^{77}Br を製造した。

(2) マンガンサレン錯体の合成とそれを触媒とした放射性ハロゲン化反応の検討

Groves 等が ^{18}F の標識反応用途に開発したマンガンサレン錯体 (Mn(salen)OTs) を化学合成し、これを触媒として、放射性臭素の修飾反応に応用可能か検討をした。また、マンガンサレン錯体を誘導化し、それらの触媒能について検討した。

(3) 酸化還元酵素を触媒とした放射性ハロゲン化反応の検討

市販されている酸化還元酵素を触媒として用い、放射性フッ素ならびに臭素の修飾反応に利用可能かを検討した。

酵素の選定に際しては、本研究の成果として簡便に放射性ハロゲンの標識反応への応用が可能なることに重点を置いた。具体的には、市販品で比較的簡単に入手ができること、コスト等を考慮して、シトクロム P450、ペルオキシダーゼとして市販されているものを選択、購入した。購入した酵素類は更に精製操作を加えるなどはせずに、そのまま使用した。

反応の進行はラジオ薄層クロマトグラフィーおよび高圧液体クロマトグラフィー（HPLC）にて評価した。

4. 研究成果

(1) 医療用小型サイクロトロンでの放射性ハロゲン核種の製造

放射性フッ素 (^{18}F) は定法に従い、 $[\text{H}_2\text{O}]^{18}\text{O}$ を原料とする (p,n) 反応によって製造し、水溶液として得たものを使用した。

放射性臭素 (^{77}Br) 製造では、タングステン製のディスクに $^{63}\text{Cu}_2^{77}\text{Se}$ を約 20 mg を溶着させた固体ターゲットを作製した。このディスクを医療用サイクロトロンに固定し、プロトンを照射（ビーム電流：8 μA 、エネルギー：11MeV）することによって、 ^{77}Se (p,n) ^{77}Br 反応を行った。固体ターゲット上に生成した ^{77}Br は乾式蒸留法にてターゲット上から分離し、0.5 N アンモニア水溶液中に回収した。固体ターゲットからの ^{77}Br 回収率は $51 \pm 6\%$ であり、一回の照射につき、50 MBq 程度の ^{77}Br を安定に製造する体制を整えた。

(2) マンガン salen 錯体の合成とそれを触媒とした放射性ハロゲン化反応の検討

マンガン salen 錯体を触媒としたフッ素標識反応 Groves 等の論文を参考に、マンガン salen 錯体が放射性フッ素以外のハロゲン元素（放射性臭素ならびにヨウ素）の標識反応に適応できるかどうかについて検討を進めた (Figure 1)。

反応用溶媒にはアセトニトリル、アセトンを用い、基質 10 種類に対して、 $\text{Mn}(\text{salen})\text{OTs}$ 、酸化剤を加え、室温～50 にて 10 分間反応を行った。Radio-薄層クロマトグラフィー (TLC) によって反応混合溶液を評価したところ、放射性臭素によって標識された化合物の生成が確認された。

反応系中に加える酸化剤ならびにマンガン salen 錯体の種類ならびに物質について最適化検討を進めているが、今のところ、 ^{77}Br 標識体の放射化学的収率 (Radio-TLC から得られる積分値ベース) は 10% 以下であり、更なる検討が必要である (Table 1)。

ヨウ素については、非放射性元素を用いて検討を進めたが、反応の進行を示すデータを得ることができなかったことから、今回の研究期間において、放射性ヨウ素を用いて検討を進めるまでに至らなかった。

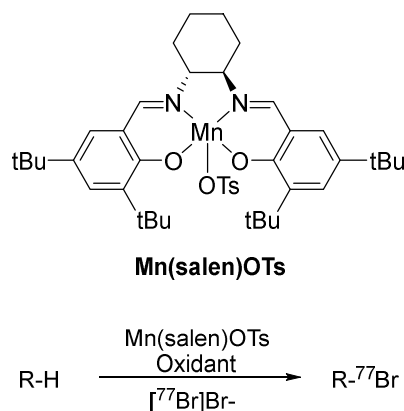


Figure 1. 実験に用いたマンガン salen 錯体の例と標識反応

Table 1. マンガン salen 触媒を用いた放射性臭素標識反応の例

| | Substrate | Temperature () | Yield (TLC, %) |
|---|-----------|-----------------|----------------|
| 1 | 1 | RT | 2 |
| 2 | 1 | 40 | 5 |
| 3 | 1 | 50 | 6 |
| 4 | 2 | 50 | <1 |
| 5 | 3 | 50 | 3 |
| 6 | 4 | 50 | <1 |

(3) 酸化還元酵素を触媒とした放射性ハロゲン化反応の検討

酸化還元酵素として、シトクロム P450、ペルオキシダーゼとして市販されている比較的安価で入手が容易なものを用いた。本検討においては、医療現場で最も良く使用される放射性ハロゲン元素である放射性フッ素 (^{18}F) を用いて検討をした。

サイクロトロンから得られた放射性フッ素を含む水溶液に対して基質と酸化剤を加えた後、経時的に反応溶液に含まれる化合物を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) ならびに Radio-TLC にて評価した。基質濃度、酵素濃度、反応温度、時間などの標識反応条件を検討したが、放射性フッ素が導入された化合物の生成を確認することができなかった。一方、複数の基質からは副生成物として沈殿物が生成した。

沈殿物を回収し、NMR ならびにサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) にて分析を行ったところ、特定の構造を有していない高分子量の有機化合物であった。沈殿物は酵素の作用によって活性種となった基質同士が重合反応し、生成したものと考えられる (Figure 2)。これは、ペルオキシダーゼ類がフェノール類のラジカル重合用の触媒として使用可能であるとする論文と矛盾しない。

放射性同位元素の標識反応では、反応系に加える放射性同位元素の物質量は基質や触媒である酵素の物質量と比べて極めて少ない。標識反応では、基質からプロトンが引き抜かれることにより生成した活性種が酵素に配位した放射性ハロゲンと速やかに反応する必要がある。今回の検討で目的とする放射性フッ素標識体が得られなかった理由として、放射性ハロゲンの絶対量が極めて少ないために、酸化還元酵素と放射性フッ素との配位が強すぎたために、活性化した基質と放射性ハロゲンとの反応が進まなかった、酸化還元酵素と放射性フッ素との配位体そのものが形成できていないために反応が進まなかった、ことが考えられる。結果として、反応系に残存した活性化した基質が基質同士で反応し、副生成物として重合物を与えたと考えている。これは、酸化還元酵素の一つである西洋わさび由来のペルオキシダーゼ (HRP) がフェノール類のラジカル重合用の触媒として使用可能であるとする論文とも矛盾しない。但し、これらの答えを出すためにはデータが不足しており、更なる検討が必要である。

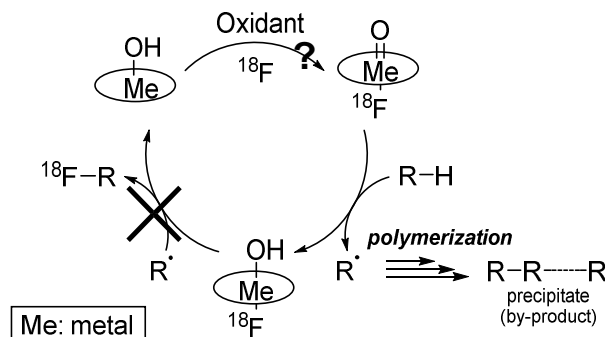


Figure 2. 酸化還元酵素による放射性ハロゲンの標識反応と副生成物の推定反応メカニズム

【結論】

酸化還元酵素を用いる放射性ハロゲンの標識反応については、水系溶媒中で放射性ハロゲンの半減期を考慮した迅速合成に応用することは現時点では難しく、更なる検討を進める必要がある。近年、ハロゲナーゼを触媒とした安定同位体のクロロ化反応が報告されていることから、適切な酵素と反応条件の組み合わせを見出すことが大きなブレイクスルーになることは間違いなく、継続的な探索が重要である。

有機溶媒中におけるマンガンサレン錯体触媒を用いたハロゲン化反応については、反応条件についての更なる検討が必要な状況であるが、放射性フッ素以外の放射性ハロゲンに適用することが可能であることが今回示された。新たな金属錯体の開発も含め、今後研究が更に発展していくことが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ

http://www.med.u-fukui.ac.jp/BIRC/study/idx_study.html

6．研究組織

(1)研究分担者
なし

(2)研究協力者
なし