

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 14 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293257

研究課題名(和文) マイクロリアクターによる¹⁸F-標識プローブ合成多目的装置の開発研究課題名(英文) Development of a multipurpose microreactor system for preparation of ¹⁸F-labeled probes

研究代表者

岩田 錬 (Iwata, Ren)

東北大学・サイクロトロン・ラジオアイソトープセンター・名誉教授

研究者番号：60143038

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：電気化学的に濃縮された¹⁸F-フッ素イオンを用いて、多種類のPETプローブを合成するマイクロリアクター装置開発を目的に、新規な手法としての中間濃縮チップと濃縮チップ内でのオンチップ標識、および固相抽出精製による¹⁸F-標識プローブの自動合成を検討した。その結果、試作した蒸発チップは所期の機能を果たせず、オンチップ標識では電解還元反応による不純物生成が支配的であり、いずれも実用性の観点から断念した。マイクロリアクター合成の利点を活かした固相抽出精製を取り入れた合成では、注射液としての品質を有する低酸素細胞イメージングプローブ[¹⁸F]FRP170を収率良く迅速に製造することができた。

研究成果の概要(英文)：A new microreactor system using electrochemically concentrated [¹⁸F]fluoride was developed for preparation of many useful ¹⁸F-labeled probes. Novel approaches were evaluated with re-concentration of a reaction solvent in an evaporation flow chip between microfluidic reactions and on-chip ¹⁸F-labeling in an electrochemical flow cell where [¹⁸F]fluoride was trapped from a flowing water and then released in an aprotic solvent. However, the results showed they were both not promising methods employed for microfluidic reaction. On the other hand, solid phase extraction was successfully adapted to the present system. As a typical demonstration, a hypoxic cell marker [¹⁸F]FRP170 was efficiently and rapidly prepared with high qualities as an injection.

研究分野：放射性医薬品学

キーワード：マイクロリアクター 標識合成 分子イメージング 自動合成 標識プローブ フッ素-18

1. 研究開始当初の背景

1970年半ばに開発された¹⁸F-FDGがPET(陽電子断層撮影法)の普及に大きく貢献したように、有用な診断プローブの出現がPETの更なる発展に必要不可欠である。今日、医療用3活栓などの使い捨て部品を多用するPETプローブの自動合成装置が医療用具として認可され、腫瘍診断における¹⁸F-FDGを補完する種々の¹⁸F-標識プローブや、アルツハイマー病診断における¹⁸F-標識アミロイド・タウイメージングプローブのルーチン合成にこれらの多目的合成装置が盛んに利用されようとしている。

近年、PET診断プローブの特徴の一つである非放射性担体が極微量であることを活かす微量流体工学に基づく標識合成(マイクロリアクター標識合成)が脚光を浴びている。我々は、サイクロトロンで製造される¹⁸F-フッ素イオン(通常2 mL前後の¹⁸O-濃縮水中に存在する)を電気化学的に極少量の有機溶媒中(<60 μL)に濃縮し、マイクロリアクター合成に供する画期的な方法を島津製作所と共同で開発した。この濃縮法を用いてその有用性を実証し、精製までも含めたトータルな合成システムを開発した(図1)。



図1. マイクロリアクター合成装置

世界のメガファーマをはじめ多くの製薬メーカーはこぞってPETによる研究開発拠点を立ち上げ、創薬研究にPETを応用し始めている。医薬品開発に於いては、今後抗体やペプチド・タンパク系の医薬品が主流になると言われているが、PETプローブ合成がマイクロレベルでペプチド・タンパク質の標識に対応することが急務となっている。加えてテーラーメイド医療の進展が予想される中、オンデマンドな診断プローブ合成法の開発と確立が今後重要性を増すと予想される。

2. 研究の目的

ペプチド・タンパク質標識前駆体として¹⁸F-標識アミノ酸([¹⁸F]フルオロプロリン、O-[¹⁸F]フルオロメチルタイロシン:[¹⁸F]FMT)、低酸素イメージングプローブと

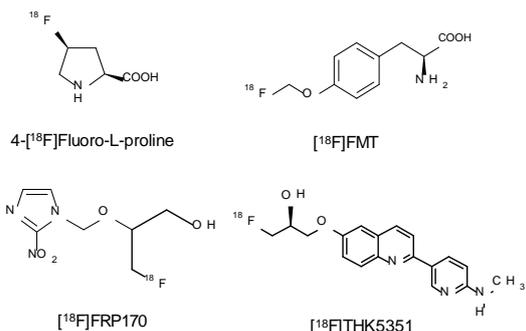


図2. 種々の¹⁸F-標識プローブ

して¹⁸F-FRP-170、タウイメージングプローブとして¹⁸F-THK5351(図2参照)等を取り上げ、合成収率の改善と最適な中間濃縮・精製法の新たな開発を目指す。加熱冷却ステージを開発して反応時間短縮と収率の改善を目的に、合成の最適反応条件を見出す。多段階のマイクロフロー合成のために中間濃縮法を開発する。種々のデザインの蒸発チップを試作し、反応溶媒に応じた最適な方法を探索する。また、より先駆的なマイクロリアクター合成法として、¹⁸F-フッ素イオン濃縮チップ内でマイクロスケール合成を試み、次世代のマイクロリアクター開発の足掛かりとする。加えて、マイクロスケール合成を活かし、簡便な固相抽出法によるプローブ精製を取り入れた合成法を確立する。

3. 研究の方法

既存のマイクロリアクター合成装置(図1)を使用し、新たな合成法を試験して評価した。

①中間濃縮用の蒸発チップの試作と評価

下層に反応フローセルからの反応液を導入して貯留し、上層にHeガスを流す構造の蒸発チップをデザインし、図3に示すシステムで評価した。気液分離チップとしての評価にはCH₂Br₂から合成されるCH₂Br-¹⁸Fを、濃縮と再溶解による回収の評価には¹⁸F-FDG合成の中間体を使用した。

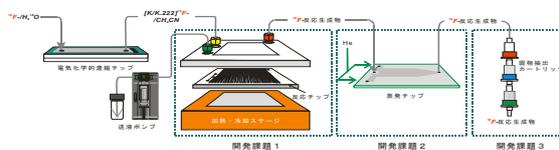


図3. 開発するマイクロリアクターシステムの概略図

②オンチップ標識

濃縮チップ(内容積16 μL)の出入り口に図4に示すように手動の6方バルブを組み込み、1)[¹⁸F]フッ素イオン捕捉、2)無水化、3-4)脱離と反応、5)回収の5つの過程を行い、反応物をHPLCで分析してその有用性を評価した。

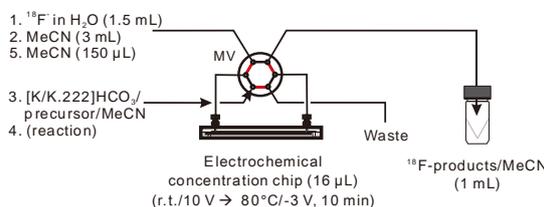


図4. オンチップ標識反応実験系

③固相抽出精製を用いる¹⁸F-標識プローブのマイクロ合成システム

マイクロリアクター合成を用いることで期待される利点は、使用する試薬類が従来法と比べ大幅に少なくできることである。ポンプと検出器で構成されるHPLC精製システムは大きな場所を占有する。これに代わり小さな使い捨ての固相抽出カートリッジで反応物を精製できれば、装置は小さく操作は簡

便化される。本システムでこの点を実証した。典型的な ^{18}F -標識合成反応である 1) ^{18}F -フッ素置換反応、2) 加水分解反応、3) HPLC 精製の 3 つの過程で得られる ^{18}F FRP170 を取り上げ、幾つかの市販固相抽出カートリッジを比較検討して有用な精製法を確立した。図 5 にそのトータルシステムの流路図を示す。

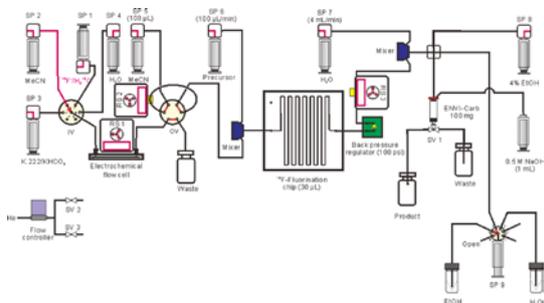


図 5. トータルマイクロ合成システム流路図

4. 研究成果

① 蒸発チップ

6 図に示すような構造を有するフローチップを数種類試作して評価した。その結果、初期のものは耐圧性に問題があり、試験中に上面が破損して失敗したが、ガラス厚を増して耐圧性を高め、図 7 に示す流路を有するチップで試験を行った。

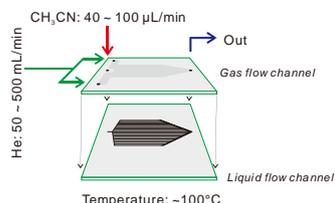


図 6. 蒸発チップの構造

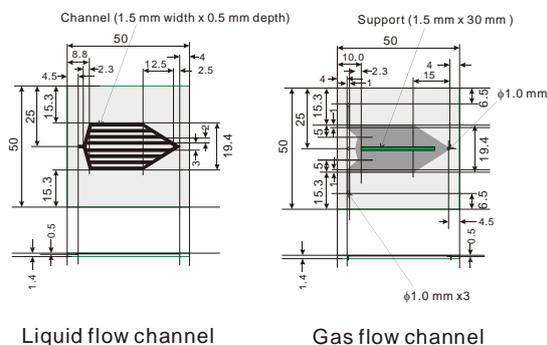


図 7. 評価した蒸発チップの設計図

前駆体化合物の CH_2Br_2 と反応生成物の $\text{CH}_2\text{Br}^{18}\text{F}$ の混合物を蒸発チップに導入して気液分離を行った結果、回収 He 中に無視できない量の CH_2Br_2 がチップ温度に依存せず混入し、短い吸着シリカカートリッジの通しても除去できなかった。従って、この方式による気液分離を実用的に行うことは困難であると結論した。

次に、 ^{18}F FDG 合成の反応液をこのチップに導入し、反応溶媒であるアセトニトリル (MeCN) を He 気流で蒸発留去し、再び MeCN を流して回収量と MeCN 量の関係を求めた。この結果、効率良く回収するためには導入した MeCN と同量かそれ以上が必要であり、チップ内で再溶解するための新たな

工夫が必要ではないかと推測され、この方法では実用的でない結論した。

② オンチップ標識

電気化学的に炭素陽極に捕捉された ^{18}F フッ素イオンは、逆電圧により Kryptofix 222- KHCO_3 錯体 ($[\text{K}/\text{K}.222]\text{HCO}_3$) を含む MeCN に放出されるが、この電極内の容積は約 $16 \mu\text{L}$ と少なく、この溶液中に前駆体化合物を同時に存在させて置換反応を行うことができれば、バッチ的なマイクロスケール合成が実現できると期待された。

^{18}F FDG、 ^{18}F THK5351、 ^{18}F TP001 について電圧、温度、時間を変化させて生成物の分布を HPLC で分析したが、図 8 にこれまでのフロー反応で得られた結果と比較して示すように、いずれの反応においても未知の標識物が主生成物として得られ、電解還元反応生成物が推測された。

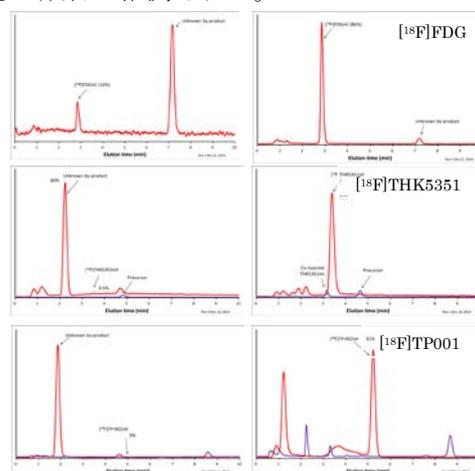


図 8. オンチップ反応 (左) とマイクロフロー反応 (右) の生成物 HPLC 分析

次にあまり還元反応を受けないと思われる単純な化合物である CH_2Br_2 と $\text{BrCH}_2\text{CO}_2\text{Et}$ を用いてオンチップ反応を行った結果、図 9 に示すように後者では比較的高い収率で目的物が得られた。一方、 $\text{CH}_2\text{Br}^{18}\text{F}$ の収率がほぼゼロであるのは反応温度が低すぎるためと推測される。

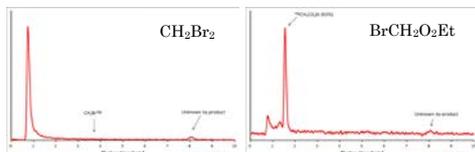


図 9. CH_2Br_2 (左) と $\text{BrCH}_2\text{CO}_2\text{Et}$ (右) によるオンチップ標識反応生成物の HPLC 分析

以上の結果から、濃縮チップ内でのマイクロスケールのオンチップ標識反応においては、電解還元反応を受けやすい前駆体では (多くの有用なプローブはそうであるが) 未知の副生成物が主に生成し、目的物を高収率で得ることはできないと結論された。

③ ^{18}F FRP170 合成

低酸素細胞のイメージングプローブである ^{18}F FRP170 は、我々が開発した PET プ

プローブであり、国内の数か所でルーチンに合成され PET 診断利用されている。この合成反応をマイクロフロー合成に移植して反応を最適化するとともに、使い捨ての市販固相抽出 (SPE) カートリッジで簡便に精製できる方法を開発した。

合成操作は、 ^{18}F -フッ素置換反応と引き続きアルカリ加水分解で脱保護反応を行い、その後分離精製する。マイクロフロー反応では、図 1 0 に示すように 0.1 分間の非常に短い反応時間で収率良く ^{18}F -フッ素化が進行した。

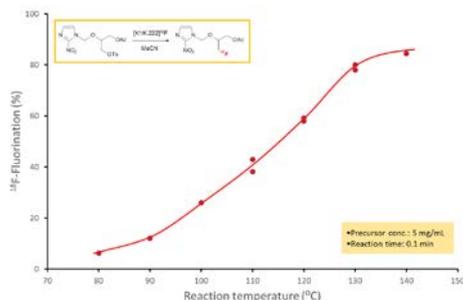


図 1 0. ^{18}F -フッ素化率と反応温度との関係

次のアルカリ加水分解反応は、逆相 SPE カートリッジ上でのオンカラム反応が適していることが既に知られているため、この方法を採用し、反応中間体を捕捉する種々の SPE カートリッジ (tC18 Long/Short と ENVI-Carb 100 mg/250 mg) を用いて、加水分解物の溶出液組成 (エタノール/水) が収率及び化学的・放射化学的純に及ぼす影響を調べた。この結果、放射化学的純度はほぼ 100%近い値で得られ、収率も 40~50%と良好な値で得られた。前駆体由来の RP170 の混入量を一層低減して注射液としての基準を満たすため、エタノール水による洗浄工程を検討することで、その量を $1.3 \mu\text{g/mL}$ まで低下することができた。図 1 1 にその最終精製液の HPLC 分析の結果を示す。

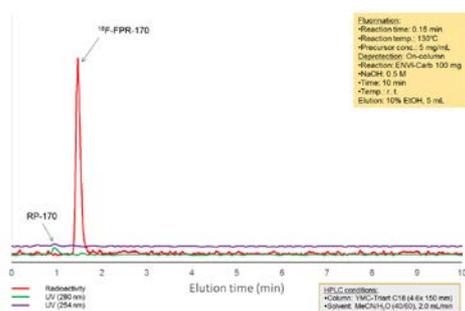


図 1 1. ^{18}F FRP170 精製液の HPLC 分析

この結果は、マイクロリアクター反応と従来法をうまく組み合わせることで、迅速・簡便で効率的な PET プローブの多目的合成装置が構築できることを示している。

本研究では、マイクロフロー反応による種々の PET プローブの微量合成システム構築を目指しオンチップ標識と蒸発チップを中心に開発を進めてきたが、いずれにおいても実用的な方法を得ることができなかった。フロー反応では逐次的な反応処理に従って

液量が増えざるを得なく、これを再濃縮し次のフロー反応に引き渡す革新的な方法が開発されない限りマイクロリアクターの明るい将来像は描けない。PET プローブの利点を活かした微量合成システムの開発は、今後再濃縮が容易なバッチ的な反応を採用することで達成されるのではと期待される。z

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 16 件)

①Harada R., Okamura N., Furumoto S., Furukawa K., Ishiki A., Tomita N., Hiraoka K., Watanuki S., Shidahara M., Miyake M., Ishikawa Y., Matsuda R., Inami A., Yoshikawa T., Tago T., Funaki Y., Iwata R., Tashiro M., Yanai K., Arai H., Kudo Y. [^{18}F]THK-5117 PET for assessing neurofibrillary pathology in Alzheimer disease. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imag.* 査読有 **42**, 1052-1061 (2015).

Doi: 10.1007/s00259-015-3035-4

②Beppu T., Sasaki T., Terasaki K., Saura H., Matsuura H., Ogasawara K., Sasaki M., Ehara S., Iwata R., Takai Y. High-uptake areas on positron emission tomography with the hypoxic radiotracer ^{18}F -FRP170 in glioblastomas include regions retaining proliferative activity under hypoxia. *Ann. Nucl. Med.* 査読有 **29**, 336-341 (2015).

Doi: 10.1007/s12149-015-0951-0

③Sato H., Ito C., Hiraoka K., Tashiro M., Shibuya K., Funaki Y., Yoshikawa T., Iwata R., Matsuoka H., Yanai K. Histamine H1 receptor occupancy by the new-generation antipsychotics olanzapine and quetiapine: a positron emission tomography study in healthy volunteers. *Psychopharmacol.* 査読有 **232**, 3497-3505 (2015).

Doi: 10.1007/s00213-015-4002-2

④Shidahara M., Watabe H., Tashiro M., Okamura N., Furumoto S., Watanuki S., Furukawa K., Arakawa Y., Funaki Y., Iwata R., Gonda K., Kudo Y., Arai H., Ishikawa Y., Yanai K. Quantitative kinetic analysis of PET amyloid imaging agents [^{11}C]BF227 and [^{18}F]FACT in human brain. *Nucl. Med. Biol.* 査読有 **47**, 734-744 (2015).

Doi: 10.1016/j.nucmedbio.2015.05.001

⑤Tago T., Furumoto S., Okamura N., Harada R., Adachi H., Ishikawa Y., Yanai K., Iwata R., Kudo Y. Preclinical evaluation of [^{18}F]THK-5015 enantiomers: effects of chirality on its effectiveness as a tau imaging radiotracer.

- Mol. Imaging Biol.* 査読有 *In press*, (2015).
Doi: 10.1007/s11307-015-0879-8
- ⑥ Beppu T., Terasaki K., Sasaki T., Fujiwara S., Matsuura H., Ogasawara K., Sera K., Yamada N., Sugai T., Kudo K., Sasaki M., Ehara S., Iwata R., Takai Y. Standardized uptake value in high uptake area on positron emission tomography with ¹⁸F-FRP170 as a hypoxic cell tracer correlates with intratumoral oxygen pressure in glioblastoma. *Mol. Imag. Biol.* 査読有 **16**, 127-135 (2014).
Doi: 10.1007/s11307-013-0670-7
- ⑦ Tago T., Furumoto S., Okamura N., Harada R., Ishikawa Y., Yanai K., Iwata R., Kudo Y. Synthesis and preliminary evaluation of 2-arylhydroxyquinoline derivatives for tau imaging. *J. Label. Compd. Radiopharm.* 査読有 **57**, 18-24 (2014).
Doi: 10.1002/jlcr.3133
- ⑧ Kaneta T., Okamura N., Arai A., Takanami K., Furukawa K., Tashiro M., Furumoto S., Iwata R., Takahashi S., Arai H., Yanai K., Kudo Y. Analysis of early phase [¹¹C]BF-227 PET, and its application for anatomical standardization of late-phase images for 3D-SSP analysis. *Jpn. J. Radiol.* 査読有 **32**, 138-44 (2014).
- ⑨ Arai A., Kaneta T., Okamura N., Tashiro M., Iwata R., Takanami K., Fukuda H., Takahashi S., Yanai K., Kudo Y., Arai H. Pitfalls of voxel-based amyloid PET analysis for diagnosis of Alzheimer's disease: Artifacts due to non-specific uptake in the white matter and skull. *Tohoku J. Exp. Med.* 査読有 **234**, 175-181 (2014).
- ⑩ Harada R., Okamura N., Furumoto S., Tago T., Maruyama M., Higuchi M., Yoshikawa T., Arai H., Iwata R., Kudo Y., Yanai K. Comparison of the binding characteristics of [¹⁸F]THK-523 and other amyloid imaging tracers to Alzheimer's disease pathology. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imag.* 査読有 **40**, 125-132 (2013).
Doi: 10.1007/s00259-012-2261-2
- ⑪ Tomita N., Furukawa K., Okamura N., Tashiro M., Une K., Furumoto S., Iwata R., Yanai K., Kudo Y., Arai H. Brain accumulation of amyloid β protein visualized by positron emission tomography and BF-227 in Alzheimer's disease patients with or without diabetes mellitus. *Geriatr. Gerontol. Int.* 査読有 **13**, 215-221(2013).
Doi: 10.1111/j.1447-0594.2012.00880.x
- ⑫ Shidahara M., Tashiro M., Okamura N., Furumoto S., Furukawa K., Watanuki S., Hiraoka K., Miyake M., Iwata R., Tamura H., Arai H., Kudo Y., Yanai K. Evaluation of the biodistribution and radiation dosimetry of the ¹⁸F-labelled amyloid imaging probe [¹⁸F]FACT in humans. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imag. Res.* 査読有 **3**, 32 (2013).
Doi: 10.1186/2191-219x-3-32
- ⑬ Furumoto S., Shinbo R., Iwata R., Ishikawa Y., Yanai K., Yoshioka T., Fukuda H. In-vitro and in-vivo characterization of 2-deoxy-2-[¹⁸F]fluoro-D-mannose as a tumor-imaging agent for positron emission tomography. *J. Nucl. Med. Mol. Imag.* 査読有 **54**, 1354-1361 (2013).
Doi: 10.2967/jnumed.112.113571
- ⑭ Okamura N., Furumoto S., Harada R., Tago T., Yoshikawa T., Fodero-Tavoletti M., Mulligan R.S., Villemagne V.L., Akatsu H., Yamamoto T., Arai H., Iwata R., Yanai K., Kudo Y. Novel ¹⁸F-labeled arylquinoline derivatives for non-invasive imaging of tau pathology in Alzheimer's disease. *J. Nucl. Med. Mol. Imag.* 査読有 **54**, 1420-1427 (2013).
Doi: 10.2967/inumed.112.117341
- ⑮ Furumoto S., Okamura N., Furukawa K., Tashiro M., Ishikawa Y., Sugi K., Tomita N., Waragai M., Harada R., Tago T., Iwata R., Yanai K., Arai H., Kudo Y. A ¹⁸F-Labeled BF-227 derivative as a potential radioligand for imaging dense amyloid plaques by positron emission tomography. *Mol. Imag. Biol.* 査読有 **15**, 497-506 (2013).
doi: 10.1007/s11307-012-0608-5
- ⑯ Sato H., Ito C., Tashiro M., Hiraoka K., Shibuya K., Funaki Y., Iwata R., Matsuoka H., Yanai K. Histamine H1 receptor occupancy by the new-generation antidepressants fluvoxamine and mirtazapine: a positron emission tomography study in healthy volunteers. *Psychopharmacology* 査読有 **230**, 227-234 (2013).
Doi: 10.1007/s00213-013-3146-1

[学会発表] (計 0件)

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

○取得状況 (計 0件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩田 錬 (IWATA REN)
東北大学・サイクロトロン・ラジオアイソ
トープセンター・名誉教授
研究者番号：60143038

(2) 研究分担者

古本 祥三 (FURUMOTO SHOZO)
東北大学・サイクロトロン・ラジオアイソ
トープセンター・教授
研究者番号：00375198

高橋 和弘 (TAKAHASHI KAZUHIRO)
慶応義塾大学・医学部・特任准教授
研究者番号：20370257

(3) 連携研究者

齋木 秀和 (SAIKI HIDEKAZU)
島津製作所・分析計測事業部・主任
研究者番号：70466382