

《原 著》

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

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****

要旨 低酸素細胞に集積する化合物として新規に開発された [^{18}F]FRP-170 ([^{18}F]1-(2-fluoro-1-(hydroxymethyl)ethoxy)methyl-2-nitroimidazole) の PET 臨床診断利用を目的にその注射液の開発を行った。再現性と信頼性の高い自動合成法を目指し、簡便なオンカラム加水分解法を導入し、液体試薬の移送と溶媒の留去に使用する He ガスの流量変化を検出することで全合成過程を自動化した。本法により、[^{18}F] フッ素アニオンからの放射化学的収率 15–20% (減衰補正後)、合成時間 60 分以内で [^{18}F]FRP-170 が得られた。合成終了時の比放射能は 40–60 GBq/ μmol 、放射化学的純度は 99% 以上で、生理食塩水中では 6 時間以上にわたって化学的に安定であった。また、[^{18}F]FRP-170 のマウスでの体内分布から被曝線量の評価を行った結果、全身の実効線量は 1.00 mSv/185 MBq であった。加えて、合成された [^{18}F]FRP-170 の毒性試験を実施し、本注射液が PET 診断に利用できることが示された。

(核医学 42: 1–10, 2005)

I. はじめに

ニトロイミダゾール誘導体は、電離放射線の生物作用を増強する放射線増感剤としての作用を示すことが知られている。また、これらは低酸素状態の細胞内でニトロ基が代謝還元され極性の高いアミン形の化合物となって細胞内に蓄積するため、放射性核種で標識されたニトロイミダゾール誘導体は低酸素細胞のイメージング剤としても利用される。 ^{18}F -標識のフルオロミソニダゾール

([^{18}F]FMISO)^{1,2)} は最初に合成された PET 診断用のニトロイミダゾール誘導体であるが、そのほかに、[^{18}F]FETNIM³⁾、[^{18}F]fluoroethanidazole⁴⁾、[^{18}F]EF1⁵⁾、[^{18}F]EF3⁶⁾、[^{18}F]EF5⁷⁾、などが報告されている。東北大学では、ポーラ化成工業が開発した低神経毒性の放射線増感剤 RP-170 (1-[2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethoxy]methyl-2-nitroimidazole)⁸⁾ のフッ素誘導体を ^{18}F で標識した新規低酸素細胞イメージング剤の [^{18}F]FRP-170 の合成に成功している⁹⁾。[^{18}F]FRP-170 は低酸素状態の腫瘍細胞をターゲットとして、[^{18}F]FDG PET を補完する有望な PET 腫瘍イメージング剤の一つとして期待される薬剤である¹⁰⁾。加えて虚血生存域において高集積を呈し実用的な虚血心筋の画像化のトレーサとしても適しており¹¹⁾、早急な臨床利用が期待されている。

臨床利用を目的とする放射性薬剤の合成では、合成従事者の被曝低減と省力化の観点から効率的で安定な供給を可能とする信頼性の高い自動合成

* 東北大学サイクロトロン・RI センター

** 東北大学先進医工学研究機構

*** 東北大学病院放射線診断科

**** 同 放射線治療科

受付：16 年 9 月 29 日

最終稿受付：16 年 12 月 1 日

別刷請求先：宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 6-3

(☎ 980-8578)

東北大学サイクロトロン・RI センター
核薬学研究部

石 川 洋 一

装置の使用が望ましい。本研究では、住友重機械工業 (住重) 製の F121 多目的 ^{18}F 標識化合物合成装置を用いて、 ^{18}F フッ素化反応から加水分解による脱保護反応を経て HPLC 精製に至る ^{18}F FRP-170 合成の全過程を自動化した標識合成法を開発した。

新規 PET 放射性薬剤を臨床利用するための毒性試験等の安全性試験に関する公表された指針はないが¹²⁾、今回 ^{18}F FRP-170 の利用にあたっては、まずその合成法と品質管理法を確立し、これに加え体内各臓器に対する被曝評価と化学的毒性データの取得および注射液そのものの毒性試験を行った。

II. 試薬と方法

試薬は、市販品特級を購入しそのまま使用した。Kryptofix 222 (K.222) は Merck K.K. から、無水ジメチルホルムアミド (DMF) は Sigma-Aldrich K.K. から、脱水アセトニトリル (MeCN) と留去に使用したエタノールは和光純薬工業 K.K. から、高速液体クロマトグラフィ (HPLC) 用溶離液に使用した MeCN (HPLC 用) は関東化学から購入した。合成前駆体は、ポーラ化成工業提供のニトロイミダゾール誘導体 RP-170 (1-[2-(toluene-4-Sulfoxy)-1-(acetoxymethyl)ethoxy]-methyl-2-nitroimidazole) から合成した⁷⁾。比放射能測定と毒性試験に使用した非放射性的の FRP-170 はポーラ化成工業から提供された。Sep-Pak Plus C18 (Environment) および Sep-Pak Light Accell QMA は Waters から購入した。 ^{18}F フッ素アニオンは、住重製サイクロトロン HM12 を使用し ^{18}O H₂O (日本酸素) をターゲットとして $^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$ 反応により製造した。

動物実験は、東北大学および東北大学サイクロトロン・RI センターの動物実験指針を遵守して行った。

1. 標識反応

使用した合成反応式を Fig. 1 に示す。標識反応は以下の手順に従った。

- ① K_2CO_3 (0.5 M, 10 ml) で炭酸イオン形に調製した Sep-Pak Light Accell QMA カートリッジにターゲット水を通し、 ^{18}F フッ素アニオンを分離捕集した。この ^{18}F フッ素アニオンを K_2CO_3 (33 mM, 0.6 ml) で溶出しガラス製反応容器に導き、K.222 (20 mg) を溶解した MeCN (3 ml) に加えた。
- ② 反応容器を 140°C に加熱し、He (400 ml/min) を容器内に流して水を MeCN 共沸下留去した。水分除去を確実にするため、脱水 MeCN (1 ml) でさらに 3 回共沸留去を繰り返した。
- ③ 反応容器をいったん 40°C まで冷却後、DMF (0.7 ml) に溶解した合成前駆体 **1** (2 mg) を加え、 110°C で 3 分間 ^{18}F フッ素化反応を行った。
- ④ 冷却後 HCl (0.05 M, 5 ml) を加え、混合液を活性化した Sep-Pak Plus C18 カートリッジ (Environment) に通して反応物 **2** を抽出し、引き続き H_2O (5 ml) で反応容器と C18 カートリッジを洗浄した。
- ⑤ C18 カートリッジに NaOH (0.5 M, 2 ml) を満たし、室温下 3 分間放置してオンカラム的に反応物 **2** の加水分解を行った。
- ⑥ C18 カートリッジを H_2O (1 ml) で洗浄して大部分の NaOH を除去後、加水分解生成物 **3** を MeCN と酢酸 (AcOH) の混合溶媒

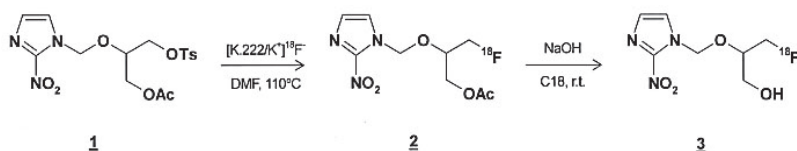


Fig. 1 Synthesis scheme of ^{18}F FRP-170.

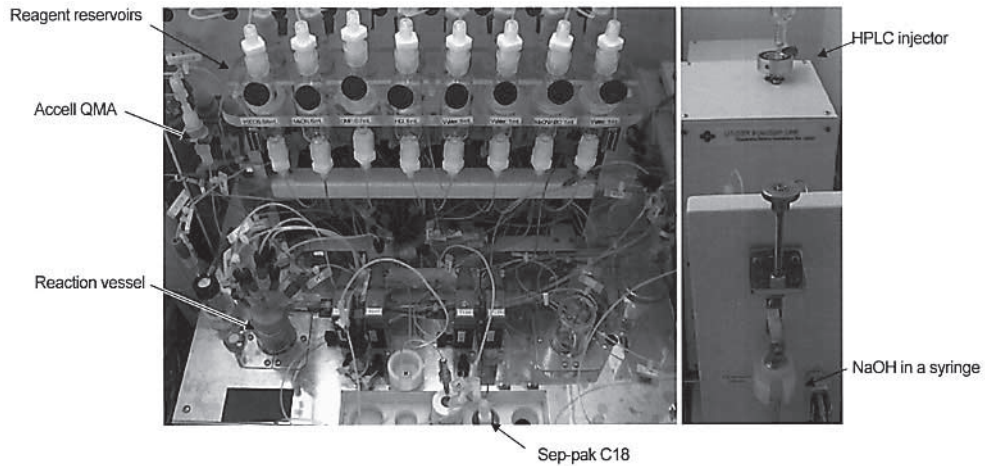


Fig. 2 A photographic view of the automated system.

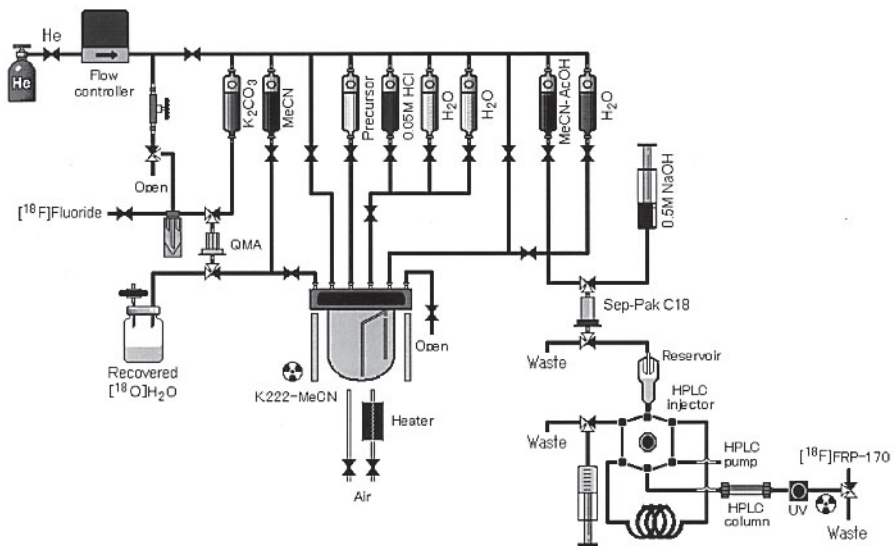


Fig. 3 A flow diagram of an automated system for $[^{18}\text{F}]$ FRP-170 preparation.

(MeCN 0.35 ml, AcOH 0.10 ml), 引き続き H_2O (1.55 ml) で溶出した。

- ⑦ この溶出液 (2 ml) をそのまま HPLC カラムに注入して迅速に分離精製を行った。HPLC カラム: YMC A-324 (10×300 mm), 溶離液: MeCN/ H_2O (12/88, 4.0 ml/min) の分離条件を用いた。溶出液を放射能および UV (280 nm) 検出器でモニターし、約 9 分

前後に溶出する $[^{18}\text{F}]$ FRP-170 の画分をロータリエバポレータのフラスコに集めた。

- ⑧ 減圧下エタノール (7~10 ml) を繰り返し添加することで迅速に溶媒を留去して分取液を乾固後、残渣を生理食塩水に溶解、滅菌フィルターを通して滅菌バイアルに捕集し、 $[^{18}\text{F}]$ FRP-170 注射液とした。

オンカラム加水分解反応および C18 カートリッ

ジからの溶出条件に関しては、使用する NaOH の濃度と反応時間、溶出溶媒の組成の最適化を行ったが、その詳細については別に報告する¹³⁾。

2. 自動合成

市販の住重製の F121 多目的標識化合物合成装置を使用して上述した標識反応に基づく $[^{18}\text{F}]$ FRP-170 の自動合成法を開発した。本装置は、加熱空冷可能な 2 つの反応部を中心に、 $[^{18}\text{F}]$ フッ素アニオンの分離部、8 つの液体試薬リザーバー、および外部に HPLC 分離精製部と小型ロータリエバポレータから構成され、反応容器や電磁弁をつなぐラインを組み換えることで多くの標識反応に柔軟に対応できる機能を有している。本装置を用いて自動化を行うにあたり、オンカラム加水分解のための NaOH 水溶液注入用シリンジポンプ 1 台を加えたほか、既存のガラス製反応容器を Wheaton 社製の丸底フラスコ (10 ml) に交換した (Fig. 2)。このため、反応容器と 6 本のチューブとの接続をセプタム (赤ゴム-テフロン) に針を差し込む方式に変更し、PEEK (Polyetheretherketone) 製の特注キャップを取り付けて針を固定することでセプタムからのリークの発生を防いだ。Fig. 3 は $[^{18}\text{F}]$ FRP-170 合成のために改造した後の F121 自動合成装置の流路図である。

自動制御プログラムは住重製の専用ソフトである Cupid を用いて開発した。 $[^{18}\text{F}]$ FRP-170 合成で最も基本的で多用される操作は液体試薬の加圧添加・移送と溶媒の加熱留去であるが、これらはすべて自動マスフローコントローラ (STEC Inc.) で流量を制御された He による加圧 (+0.15 MPa) と吹き付けで行った。気体を一定圧力でラインに流す場合、その流量は流路の抵抗 (圧力) に依存する。あらかじめ高めにその流量を設定した He で加圧して液体を移送する時、ライン中ではその大きすぎる抵抗でゆっくりと押し出される。したがって、He の流速も設定値よりかなり低くなるが、移送が完了してライン中に液体がなくなると He が抵抗なく流れ流速は設定値まで回復する。この流量の変化をサーマルマスフローセンサーを通して読み取ることで液体試薬の移送と添加の完

了を検出することができる¹⁴⁾。また液体を加熱蒸発させて He とともに細いチューブを通して容器外に排出する場合、蒸気と He を合わせた最大流量が流路の抵抗で決まるため、液体の蒸発量に応じて He の流速が変化する。すなわち、盛んに蒸発しているときは He 流量は抑えられて低下し、ほぼ蒸発が完了した時点で He 流速が設定値近くまで回復する。この変化を同様にして検出して溶媒留去の完了とする。本プログラムでは検出時点から最大 30 秒間留去を持続して水分除去を確実なものとした。

3. 放射化学的純度

放射化学的純度および比放射能の測定は、逆相 C18 カラム : Waters Puresil (4.6×150 mm) と溶離液 : MeCN/H₂O (7/93, 2.0 ml/min) を用いる HPLC 分析法で行った。FRP-170 の溶出時間は 5.1 分であった。

HPLC 分取液の留去に関しては、その迅速性と放射線分解の点から検討した。あらかじめエタノールもしくはアスコルビン酸注射液 (25%, 扶桑薬品) をフラスコ内に入れて分取液とともに乾固して、その放射化学的純度を HPLC 分析により求めた。また、最終的に生理食塩水中に得られた $[^{18}\text{F}]$ FRP-170 を最大 16 時間にわたって経時的に HPLC 分析し、その化学的安定性を調べた。

4. 被曝線量評価

各グループ 3 匹の WHT/Ht Albino 雄性マウス (36–38 g) の尾静脈より $[^{18}\text{F}]$ FRP-170 (約 740 kBq) を投与し、経時的 (10, 30, 60, 120, 150 分) に屠殺した。心臓より血液を採取後、各臓器を摘出し、得られた臓器は γ カウンターで放射能を測定後、重量を測定した。以上の実験を 2 回行い、その平均値の放射能の分布を % Injection dose/g で表示した。この結果を Medical Internal Radiation Dose (MIRD) の計算式に従って作成されたソフトウェアである MIRDose3¹⁵⁾ に入力して、吸収線量および実効線量を計算した。

5. 毒性試験

以下の実験は (株) ボゾリサーチセンターに委託して行った。

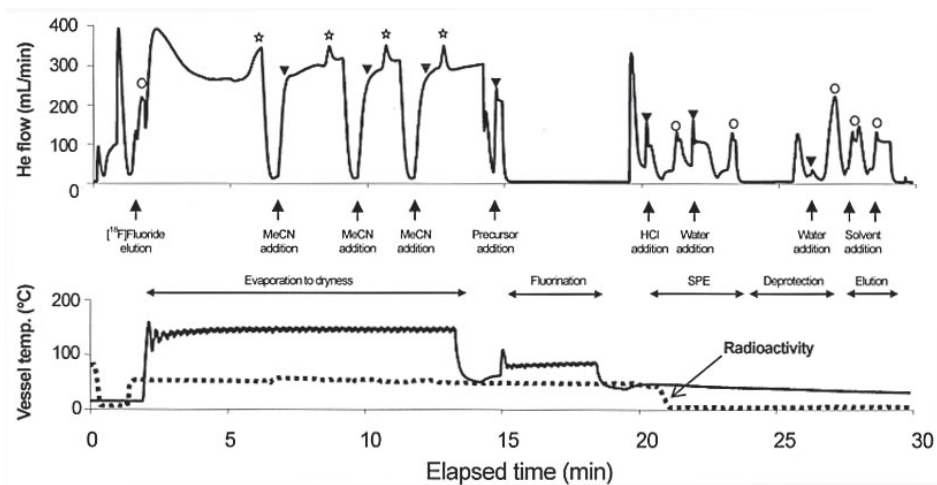


Fig. 4 A typical trend graph of He flow, vessel temperature and radioactivity.

☆: completion of evaporation

▼: completion of addition

○: completion of passage

a. 単回静脈内投与毒性試験

6 週齢の Sprague-Dawley 系雄性ラットを用い、FRP-170 を静脈内に単回投与し、ラットにおける毒性試験を実施した。FRP-170 の投与量は 0 (生理食塩水)、250, 500, 1,000 および 2,000 mg/kg とし、1 群当たりの動物数は 5 匹で行った。

b. 二週間反復静脈内投与毒性試験

6 週齢の Sprague-Dawley 系雄性ラットを用い、FRP-170 を静脈内に二週間反復投与を実施した。FRP-170 の投与量は 0 (生理食塩水)、10, 50 および 250 mg/kg とし、1 群当たりの動物数は 5 匹で行った。

c. 標識合成した注射液の毒性試験

6 週齢の Sprague-Dawley 系雄性ラットを用い、合成した [^{18}F]FRP-170 注射液 (全量 7 ml) を約 2 週間冷凍保管して放射能が十分に減衰後、静脈内に投与し、2 週間の経過観察を実施した。FRP-170 注射液の投与量は 0 (生理食塩水)、0.33 および 3.3 ml/kg とし、1 群当たりの動物数は 5 匹で行った。

6. 変異原性試験

以下の実験は (株) ボゾリサーチセンターに委託

して行った。

2 種類のサルモネラ菌株 (TA98, TA100) を用い、Ames 試験を行った。

III. 結果と考察

PET 診断用放射性薬剤のルーチンな標識合成には自動化が強く望まれる。自動合成においては、あらかじめ決定された各合成ステップの操作に必要な時間を一連のシーケンスとして実行するのではなく、温度や圧力、流量、放射能等の種々のセンサーから得られる情報に基づいて制御する方法がよい再現性と高い信頼性を与える。F121 は、流量センサーに加え温度と放射能センサーを備えているが、[^{18}F]FRP-170 合成の各ステップの完了はほとんど He 流量の変化を検出して行った。Fig. 4 は一連の合成過程におけるセンサー情報の変化を示したトレンドグラフである。移送や蒸発留去の完了が He 流量の増加ピークとして確実に検出され、次のステップへ自動的に移行している。

無担体添加の [^{18}F] フッ素アニオンを用いる置換反応では、一般に [^{18}F] フッ素アニオンと共に

持ち込まれた水分の除去が反応収率を決定する重要なファクターである。通常 MeCN を加えて共沸留去を繰り返すが、この操作を迅速かつ確実に自動化することはなかなか困難である。その理由の一つとして、一般に熱容量が大きい加熱した油浴に反応容器を浸す方法に比べ自動合成装置に使用される熱風加熱では、反応液が目的温度に達するのに時間がかかることが挙げられる。温度制御は反応容器の外に設けたセンサー(熱電対)で行うため、容器内部の液温と大きな差が生じてしまいがちである。本装置では壁厚の薄い市販のガラス反応容器(壁厚 1.2 mm)を採用してこの問題に対処した。また MeCN を添加して He 流量変化で水分の留去を確実に検出するとともに、次に容器底部に差し込んだ吸出し用の針とそのチューブ内部に He を流すことで、中に残留しがちな水分を除去した。この操作を 3 回繰り返し、反応容器内の水分を完全に除去した。これらの結果、再現性よく高収率の $[^{18}\text{F}]$ フッ素化 (70~80%) が可能となった。

標識合成を自動化するには、基本となる手動操作を自動化に適するように変更するだけでなく、できるだけ簡便化することが重要である。中でもオンカラム的な手法は優れた反応操作の簡便化法である。オンカラムアルカリ加水分解は $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ の合成においてその有用性が実証されているが¹⁶⁾、本合成法でその応用性が示された。 $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ 合成と同様に、 $[^{18}\text{F}]$ フッ素化物を固相抽出カートリッジで捕集して反応液から分離精製するとともに、そこにアルカリを満たして引き続き加水分解を行ったため、加水分解用の反応容器を不要にした。0.5 M NaOH 水溶液で室温下 3 分間の反応で約 90% の加水分解反応収率が得られた¹³⁾。一方、 $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ 合成と異なり、 $[^{18}\text{F}]\text{FRP-170}$ 合成では加水分解生成物を HPLC で精製する必要がある。このため、濃縮や溶媒の置換といった煩雑な操作を省いて C18 カートリッジからの溶出液をそのまま HPLC に注入する簡便な方法を開発した。すなわち、HPLC に注入できるインジェクターの試料量が 2 ml と限られ、この容量範囲

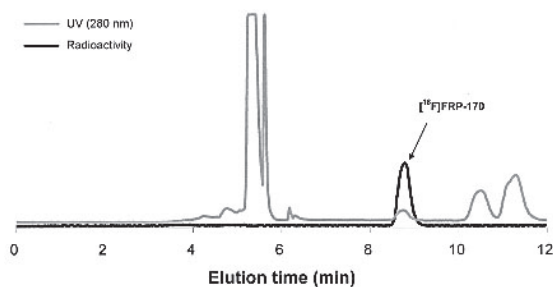


Fig. 5 A typical HPLC separation profile.
Column: YMC ODS-A 324
Solvent: MeCN- H_2O (12:88), 4.0 ml/min
UV: 280 nm

内の溶離液で効率よく C18 カートリッジから目的物を溶出するには、まず極性の低い MeCN-AcOH 混合溶媒 (0.45 ml) だけを通し、次に極性の高い水 (1.55 ml) で洗う方法が最も優れ $[^{18}\text{F}]\text{FRP-170}$ は約 60% の効率で得られた。また、この極性の試料溶液では HPLC の分離能の低下は観測されなかった。

Fig. 5 は、C18 カートリッジからの溶出液を直接 HPLC カラムに注入して得られた UV ならびに放射能検出器を用いた分離クロマトグラムの一例である。明らかに、分取した $[^{18}\text{F}]\text{FRP-170}$ 溶液中には他の非放射性・放射性不純物の混入はなく、十分に高い化学的・放射化学的純度で精製されている。この分取液をそのままロータリエバポレータで減圧乾固した場合、生理食塩水に回収された $[^{18}\text{F}]\text{FRP-170}$ の放射化学的純度はしばしば基準を下回る 95% 以下に低下した。これは比較的比放射能の高い PET 診断用放射性薬剤を乾固する時、その濃縮過程で引き起こされる放射線分解によるものと推測された。通常、アスコルビン酸注射液をあらかじめ数滴添加することでこの分解は効果的に防止できるが、 $[^{18}\text{F}]\text{FRP-170}$ の場合は逆にその放射化学的純度は 30~50% と顕著に低下した。 $[^{18}\text{F}]\text{FRP-170}$ は電子親和性が高いので、酸化防止作用のあるアスコルビン酸の添加は水和電子の濃度を高め、逆に還元的な分解を促進したと推測される。水和電子による分解を抑制す

Table 1 Tissue distribution of radioactivity in mice after intravenous injection of [¹⁸F]FRP-170

Organ	% Injection dose/g tissue				
	10 min	30 min	60 min	120 min	150 min
Blood	2.73±0.57	1.53±0.53	0.87±0.56	0.21±0.12	0.17±0.09
Heart	2.33±0.67	1.32±0.46	0.82±0.52	0.32±0.14	0.24±0.09
Lung	2.59±0.52	1.71±0.45	1.01±0.49	0.46±0.16	0.35±0.09
Liver	9.51±1.71	4.78±0.50	2.41±0.96	0.93±0.45	0.75±0.33
S. intestine	2.38±0.95	2.08±1.41	2.03±1.33	0.78±0.11	0.74±0.32
Kidney	7.36±0.85	5.51±0.55	3.16±1.48	0.97±0.32	0.69±0.27
Testis	1.23±0.43	1.22±0.50	0.90±0.58	0.36±0.20	0.22±0.15
Muscle	2.07±0.59	1.08±0.43	0.62±0.37	0.22±0.09	0.20±0.08
Bone	1.50±0.42	0.83±0.27	0.55±0.36	0.27±0.05	0.27±0.10
Brain	1.29±0.19	0.98±0.20	0.60±0.34	0.18±0.08	0.14±0.04

Data are expressed as means ± S.E.M. (n=6)

Table 2 Organ distribution of radioactivity in mice after intravenous injection of [¹⁸F]FRP-170

Organ	% Injection dose/organ				
	10 min	30 min	60 min	120 min	150 min
Heart	0.36±0.10	0.20±0.07	0.13±0.08	0.05±0.02	0.04±0.01
Lung	0.53±0.11	0.35±0.09	0.21±0.10	0.09±0.03	0.07±0.02
Liver	15.82±2.85	7.95±0.83	4.01±1.60	1.55±0.75	1.25±0.56
S. intestine	4.85±1.93	4.23±2.88	4.15±2.71	1.59±0.22	1.51±0.65
Kidney	3.50±0.41	2.62±0.26	1.50±0.70	0.46±0.15	0.33±0.13
Testis	0.26±0.09	0.26±0.10	0.19±0.12	0.08±0.04	0.05±0.03
Brain	0.57±0.08	0.43±0.09	0.27±0.15	0.08±0.04	0.06±0.02
Bladder	0.29±0.15	0.09±0.05	0.04±0.02	0.02±0.01	
Urine	12.09±3.43	22.37±12.20	39.23±2.60	40.74±5.48	

Data are expressed as means ± S.E.M. (n=6)

Table 3 Absorbed dose of [¹⁸F]FRP-170 for human adults estimated from mouse data

	μGy/MBq		μGy/MBq
Brain	5.97	Upper large intestine wall	5.38
Thyroid	4.86	Lower large intestine wall	4.84
Thymus	5.03	Adrenals	5.97
Breast	4.40	Kidneys	13.00
Heart	5.69	Testis	4.02
Lungs	5.57	Ovaries	5.59
Livers	13.90	Uterus	5.65
Pancreas	6.07	Urinary bladder wall	4.77
Spleen	5.42	Bone surfaces	4.70
Stomach wall	5.10	Red marrows	4.89
Small intestine wall	6.36	Muscle	4.08
Total body	5.40 μSv/MBq		

るには NaNO_3 の添加が効果的だとの報告があるが¹⁷⁾、ここではある程度水和電子の捕獲能力があり、水と共沸混合液をつくるエタノールを添加して乾固する方法を検討した。減圧留去中に数回に分けてエタノール (7~10 ml) を添加することで、この分解は完全に抑えられ、さらにその共沸効果により乾固操作も時間短縮された。

^{18}F FRP-170 は、室温で生理食塩水に 6 時間以上 16 時間近くまで、平均 99% 以上とほぼその高い放射化学的純度を保ち、化学的には非常に安定であることが明らかとなった。しかし、一般的に水溶液中での安定性と放射線分解に対する安定性は、そこに存在する放射能濃度とその比放射能に依存すると考えられるため、合成数量が数倍に増加するかあるいは比放射能が上昇した場合は、改めてこれらの安定性を調べる必要があると考えられる。

以上、本自動合成装置を使用して 10 GBq の ^{18}F フッ素アニオンから出発して 1 GBq 以上の ^{18}F FRP-170 が安定に得られた。その放射化学的純度は常に 99% 以上であり、比放射能は 40~60 GBq/ μmol であった。合成に要した時間は ^{18}F フッ素アニオン導入後 1 時間以内であった。

マウスにおける ^{18}F FRP-170 の体内分布の結果を Table 1 と 2 に示す。肝臓、腎臓に集積が高いことが示されたが、どの臓器も時間の経過と共に減少した。逆に、尿への排泄は時間と共に増大していることから、 ^{18}F FRP-170 は尿中排泄される薬剤である可能性が考えられる。

マウスのデータから推定される成人での ^{18}F FRP-170 の吸収線量および実効線量の計算結果を Table 3 に示す。 ^{18}F FRP-170 の各臓器における吸収線量は肝臓が最も高く、次いで腎臓、小腸の順となった。全身の吸収線量平均値は 4.5 $\mu\text{Gy}/\text{MBq}$ 、また実効線量は 5.4 (♂)~5.7 (♀) $\mu\text{Sv}/\text{MBq}$ であることが推定された。最大投与量を 185 MBq (5 mCi) として ^{18}F FRP-170 を投与した場合、吸収線量の一番高かった肝臓において 2.57 mGy、全身の吸収線量は 0.83 mGy となり、FDA によって規定された吸収線量の限界値である 50

mGy を大きく下回っている値となる¹⁸⁾。また、実効線量は 1.00 mSv となり、FDA の規定値 30 mSv を下回る。さらに、代表的な臨床用 PET 薬剤である ^{18}F FDG と実効線量を比較しても ^{18}F FRP-170 の実効線量は低い (^{18}F FDG を 185 MBq 投与の場合、実効線量は 4.44 mSv である)¹⁹⁾。したがって、臨床利用を目的として ^{18}F FRP-170 をヒトに投与しても充分安全な吸収線量、および実効線量であることが示された。

FRP-170 の単回静脈内投与毒性試験の結果、250 mg/kg 投与群ではラットの死亡は見られなかったが、500 mg/kg 投与群では 2/5 例、1,000 および 2,000 mg/kg 投与群では 5/5 とすべてのラットが死亡した。500 mg/kg 投与群の死亡したラットでは投与 1 日後に自発運動の減少および異常歩行が見られ、投与 2 日後に死亡した。1,000 mg/kg 投与群の死亡ラットでは、投与直後から 5 分後にかけて流涎が見られ、その後、自発運動の減少あるいは尿道口周囲の汚染を示して投与 1~2 日後に全例が死亡した。2,000 mg/kg 投与群の死亡ラットでは投与直後か 5 分後より自発運動の減少および流涎が見られた後、投与 2 時間後に全例が死亡した。生存動物においては異常は見られなかった。以上の結果から、FRP-170 の最小致死量は 250~500 mg/kg の間にあると推定された。 ^{18}F FRP-170 の最大投与放射能量を 185 MBq (5 mCi)、最小比放射能を 7.4 GBq/ μmol (200 mCi/ μmol) とすれば、成人への担体の最大投与量は 5.5 μg である。成人の体重を 60 kg と仮定し、最小致死量 (250 mg/kg) との比を計算すると

$$5.5 \times 10^{-6} \text{ g} / (0.25 \text{ g/kg} \times 60 \text{ kg}) = 0.37 \times 10^{-6}$$
となり、 ^{18}F FRP-170 を最大に投与しても最小致死量の百万分の一以下の投与量である。

FRP-170 の二週間反復静脈内投与毒性試験の結果、250 mg/kg 投与群では投与開始 6~11 日目に 3 例が死亡した。10 および 50 mg/kg 投与群ではいずれの動物も死亡しなかった。病理学検査の結果、250 mg/kg 投与群では胸水貯留、脾臓のリンパ性萎縮が見られた。また、50 mg/kg 投与群においても脾臓のリンパ性萎縮が見られた。10 mg/kg

投与群には異常は認められなかった。以上の結果より、FRP-170 の無毒性量は 10 mg/kg/day と推定された。

合成した [¹⁸F]FRP-170 注射液そのものの毒性試験の結果、高用量、低用量どちらの投与でも行動変化ならびに体重変化のいずれにおいても異常は観察されなかった。このことから、合成した [¹⁸F]FRP-170 注射液には重篤な変化を引き起こす不純物の混入はないものと考えられる。

FRP-170 の変異原性試験の結果、TA98 を用いた場合は 0.20 mg/ml 以上、TA100 を用いた場合には 0.018 mg/ml 以上で陰性対照の 2 倍を上回る復帰変異コロニー数となることが確認された。したがって、0.018 mg/ml 以下であれば変異は起きないものと考えられる。上記と同様に [¹⁸F]FRP-170 の最大量を投与したとき、分布容積を 42 l (0.7 l/kg × 60 kg) とすれば、

$$\begin{aligned} &0.018 \times 10^{-3} \text{ g/ml} / (5.5 \times 10^{-6} \text{ g} / 42 \times 10^3 \text{ ml}) \\ &= 1.37 \times 10^5 \end{aligned}$$

となり、変異原性に対する安全係数は十万倍以上となる。

以上、今回実施した安全性試験の結果から、[¹⁸F]FRP-170 注射液が診断薬として十分に安全であり、PET 診断利用に供することが可能であると結論された。

IV. 結 語

本法では、[¹⁸F]FRP-170 の [¹⁸F] フッ素アニオンからの放射化学的収率は 15–20% (減衰補正後)、合成時間 60 分以内という結果が得られた。これは、10 GBq の [¹⁸F] フッ素アニオンから出発して 1 GBq 以上の [¹⁸F]FRP-170 注射液が合成され 3 人前後の検査が可能であり、十分な合成収量であると考えられる。また、調製された [¹⁸F]FRP-170 注射液は、安全にルーチン臨床 PET 検査に供することが可能であると結論された。

謝辞：[¹⁸F]FRP-170 の安全性試験を実施するうえで、適切なご指導と助言をいただきました東北大学大学院医学系研究科・谷内一彦教授に厚く御礼申し上げます。

ます。[¹⁸F]FRP-170 の開発当初において東北大学サイクロトロン・RI センター・核薬学研究部に在籍し標識合成の研究に携わった和田裕明博士と結城雅弘博士に感謝します。また、RP-170 ならびに FRP-170 を提供くださいました POLA 化成工業に深謝いたします。

文 献

- 1) Jerabek PA, Patrick TB, Kilbourn MR, Dischino DD, Welch MJ: Synthesis and biodistribution of ¹⁸F-labeled fluoronitroimidazoles: potential *in vivo* markers of hypoxic tissue. *Appl Radiat Isot* 1986; 37: 599–605.
- 2) Grierson JR, Link JM, Mathis CA, Rasey JS, Krohn KA: A radiosynthesis of fluorine-18 fluoromisonidazole. *J Nucl Med* 1989; 30: 343–350.
- 3) Yang DJ, Wallace S, Cherif A, Gretzer MB, Kim EE, Podoloff DA: Development of F-18-labeled fluoronitroimidazole as a PET agent for imaging tumor hypoxia. *Radiology* 1995; 194: 795–800.
- 4) Tewson TJ: Synthesis of [¹⁸F]fluoroetanidazole: a potential new tracer for imaging hypoxia. *Nucl Med Biol* 1997; 24: 755–760.
- 5) Kachur AV, Dolbier WR, Evans SM, Shuie CY, Shuie GG, Skov KA, et al: Synthesis of new hypoxia markers EF1 and [¹⁸F]-EF1. *Appl Radiat Isot* 1999; 51: 643–650.
- 6) Josse O, Labar D, Georges B, Gregoire V, Marchand-Brynaert J: Synthesis of [¹⁸F]-labeled EF3 [2-(2-nitroimidazol-1-yl)-N-(3,3,3-trifluoropropyl)-acetamide], a marker for PET detection of hypoxia. *Bioorg Med Chem* 2001; 9: 665–675.
- 7) Dolbier WR, Li AR, Koch CJ, Shuie CY, Kachur AV: [¹⁸F]-EF5, a marker for PET detection of hypoxia: synthesis of precursor and a new fluorination procedure. *Appl Radiat Isot* 2001; 54: 73–80.
- 8) Murayama C, Suzuki A, Suzuki T, Miyata Y, Sakaguchi M, Tanabe Y, et al: Radiosensitization by a new nucleoside analogue: 1-[2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethoxy]methyl-2-nitroimidazole (RP-170). *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1989; 17: 575–581.
- 9) Wada H, Iwata R, Ido T, Takai Y: Synthesis of 1-[2-[¹⁸F]fluoro-2-(hydroxymethyl)-ethoxy]methyl-2-nitroimidazole ([¹⁸F]FENI), a potential agent for imaging hypoxic tissues by PET. *J Label Compd Radiopharm* 2000; 43: 785–793.
- 10) Kaneta T, Takai Y, Kagaya Y, Yamane Y, Wada E, Yuki M, et al: Image of ischemic but viable myocardium using a new ¹⁸F-labeled 2-nitroimidazole analog, ¹⁸F-FRP170. *J Nucl Med* 2002; 43: 109–116.

- 11) 高井良尋, 金田朋洋, 梅津篤志, 袴塚 崇, 奥村忠之, 村田隆紀, 他: 低酸素細胞の画像化— ^{18}F 化 RP-170 (^{18}F FRP-170) による低酸素細胞画像化に関する基礎研究. 癌の臨床 2001; 47: 59–63.
- 12) Bergström M, Grahnen A, Långström B: Positron emission tomography microdosing: a new concept with application in tracer and early clinical drug development. *Eur J Clin Pharmacol* 2003; 59: 357–366.
- 13) Ishikawa Y, Iwata R, Furumoto S, Takai Y: Automated preparation of hypoxic cell marker [^{18}F]FRP-170 by on-column hydrolysis. *Appl Radiat Isot* in press.
- 14) Iwata R, Yamazaki S, Ido T: Intelligent control of liquid transfer for the automated synthesis of positron emitting radiopharmaceuticals. *Appl Radiat Isot* 1990; 41: 509–511.
- 15) Stabin MG: MIRDOSE: computer software for internal dose assessment in nuclear medicine. *J Nucl Med* 1996; 37: 538–546.
- 16) Lemaire C, Damhaut P, Lauricella B, Mosdzianowski C, Morelle JL, Monclus M, et al: Fast [^{18}F]FDG synthesis by alkaline hydrolysis on a low polarity solid phase support. *J Label Compd Radiopharm* 2002; 45: 435–447.
- 17) Fukumura T, Araiike S, Yoshida Y, Suzuki K: Decomposition of an aqueous solution of [^{11}C]Ro 15-4513: implication of hydrated electrons in the radiolysis of [^{11}C]Ro 15-4513. *Nucl Med Biol* 2003; 30: 389–395.
- 18) DeGrado TR, Reiman RE, Price DT, Wang S, Coleman RE: Pharmacokinetics and Radiation Dosimetry of ^{18}F -Fluorocholine. *J Nucl Med* 2002; 43: 92–96.
- 19) Mejia AA, Nakamura T, Itoh M, Hatazawa J, Ishiwata K, Ido T, et al: Absorbed dose estimates in positron emission tomography studies based on the administration of ^{18}F -labeled radiopharmaceuticals. *J Radiat Res* 1991; 32: 243–261.

Summary

Development of [^{18}F]FRP-170 Injection for Imaging Hypoxia by PET

Yoichi ISHIKAWA*, Yoshihito FUNAKI*, Ren IWATA*, Shozo FURUMOTO**, Eiko NAKATA**, Yukitsuka KUDO**, Tomohiro KANETA***, Takashi HAKAMATSUKA***, Yoshihiro TAKAI*** and Shogo YAMADA***

*Cyclotron and Radioisotope Center, Tohoku University

**TUBERO, Tohoku University

***University Hospital, Tohoku University

A novel [^{18}F]FRP-170 injection for imaging hypoxia by PET was developed for clinical use. The preparation was based on the simple on-column basic-hydrolysis and the whole procedure was automated by detecting He flow change for transferring and evaporating liquids.

[^{18}F]FRP-170 was prepared in around 15–20% decay-corrected radiochemical yield within 60 min and

stable in saline for more than 6 hr. Radiochemical purity was over 99% and specific activity at EOS was 40–60 GBq/ μmol . The radiation-absorbed dose to the whole body was estimated to be 1.0 mSv/185 MBq. The [^{18}F]FRP-170 injection proved to be suitable for clinical use without acute toxicity or mutagenicity.

Key words: F-18, Hypoxic cell maker, FRP-170, Automated synthesis, PET radiopharmaceutical.