

資 料



ライフサイエンスのためのアイソトープ測定機器  
(第四シリーズ)

II. 加速器質量分析 (AMS) による  
 $^{14}\text{C}$  標識薬物のヒトでのマスバランス試験

野口英世

Reprinted from  
RADIOISOTOPES, Vol. 52, No. 4  
April 2003

社団法人 日本アイソトープ協会

## 資 料



## ライフサイエンスのためのアイソトープ測定機器 (第四シリーズ)

II. 加速器質量分析 (AMS) による<sup>14</sup>C 標識薬物の  
ヒトでのマスバランス試験<sup>†</sup>

野口英世

(株) 加速器分析研究所

961-0835 福島県白河市白坂字一里段 6-270

Key Words : accelerator mass spectrometry, mass balance study, pharmaceutical,  
Phase I study, safety evaluation, carbon-14

## 1. はじめに

Accelerator Mass Spectrometer 加速器質量分析計 (以下 AMS と略す) は1970年代に開発されて核物理の研究に用いられてきたが, 1987年にイタリアのトリノ大聖堂に安置されているキリストの聖骸布, 1 × 7 cm (1 mg carbon 相当) を複数の施設で測定し, AD1260-1390年のものであることを証明して有名になった。この測定を液体シンチレーション (以下 LSC と略す) 計数で行うと約 1 g 相当の炭素を必要とし, 測定による学術的意義が貴重な文化遺産の破壊につながることになる。その後, わが国でも AMS は遺蹟, 遺物, 文化財, 地層, 海水などの年代測定に用いられるようになり, <sup>14</sup>C の 10 倍半減期以上 (5.7 万年以上前の天然炭素で, 現代炭素に含まれる<sup>14</sup>C の 1/1024 以下のレベ

ル) も昔の年代を精度よく測定することが可能となった。

最近, 欧米では AMS を用いた<sup>14</sup>C の測定を *in vivo* での医薬品のトレーサ試験に利用する試みが始められているが, わが国では AMS が大型の装置であるために大学や国立研究機関のみに設置され, 医薬品開発における安全性評価研究への応用には関心が示されなかった。1999年に民間の研究機関である(株)加速器分析研究所が設立されたのを機に, 筆者は天然レベルの<sup>14</sup>C 標識薬物をヒトに投与して生体異物である医薬品の吸収, 代謝, 排泄などの物質収支を明らかにする Mass Balance 試験に利用することを思い立ち, AMS による天然レベルの<sup>14</sup>C トレーサ試験に関する検討を始めた。

## 2. 放射線計測による Bioanalysis の役割の低下

放射性同位元素を用いたトレーサ試験では<sup>14</sup>C や<sup>3</sup>H などが繁用されるほか, 蛋白製剤には<sup>125</sup>I 標識が用いられてきた。しかし, <sup>3</sup>H 標識は代謝や体内での交換反応によって標識が離脱することや, <sup>125</sup>I で標識した蛋白製剤は非標識の化合物とは化学的に異なるのみならず, <sup>125</sup>I

<sup>†</sup> Instruments for Radiation Measurement in Life Sciences(4). II. Mass Balance Studies of <sup>14</sup>C Labeled Pharmaceuticals in Human with Accelerator Mass Spectrometry.

Hideyo NOGUCHI: Institute of Accelerator Analysis Ltd., 6-270 Shirasaka Aza-ichiridan, Shirakawa-shi, Fukushima Pref. 961-0835, Japan.

のような巨大原子で標識された蛋白は作用部位がマスクされて薬理活性を失うこともあり、いずれも *in vivo* でのトレーサとしての信頼性に問題があるので薬物動態試験には用いられなくなってきた。

一方、電離性放射線は GM 計数管、シンチレーション計数管、蛍光板、写真フィルムなどで検出されるが、 $^{14}\text{C}$  が崩壊する際に放出される  $\beta$  線の最大エネルギーは 0.155 MeV と弱く、飛程も短いので、試料を計数管の中に封入したり、発光効率の高い蛍光剤を用いて高感度測定を行ってきた。代表的な高感度測定法には比例計数法、LSC 法、ラジオルミノグラフ法などがあるが、 $^{14}\text{C}$  のような長半減期の核種は崩壊確率が低いので放射線測定の感度には限界がある。また、従来から汎用されてきた LSC 法は、試料自身や測定容器に含まれる自然放射線や被験試料に含まれる蛍光物質や燐光物質による発光などによるバックグラウンド、シンチレータの発光効率や試料中に含まれる物質による化学消光や色消光などの問題があり、生体試料中の濃度を測定する bioanalysis としては測定精度や再現性が良いといえず、特に低濃度での測定値の信頼性には問題を感じてきた。近年、医薬品開発は超微量で薬効を発現する、分子レベルでの生体反応機序にもとづく化合物の創製が指向されており、生体試料中の薬物濃度を測定する bioanalysis も LCMSMS のような選択性の高い高感度分析が使われるようになり、標識薬物を用いた薬物動態試験の役割は低下してきた。しかし、標識薬物を用いた試験では薬物および代謝物を区別せずに測定する総量分析ができるので、投与した生体異物がどのような経路を経て完全に体外に排泄されるのかを容易に確認できる。また、未同定代謝物の存在を容易に発見でき、投与した薬物に対する同定代謝物の補足率を簡単に知ることができるなど、化合物毎に測定する特異的分析にはない特長を有している。したがって、生体異物である医薬品の安全性を考察するための有用な情報が得られるので、効

率的な開発を迅速に進めるために役立つ。

### 3. 自然界の $^{14}\text{C}$ レベル

炭素には $^{10}\text{C}$ 、 $^{11}\text{C}$ 、 $^{12}\text{C}$ 、 $^{13}\text{C}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{15}\text{C}$ などの同位元素があり、 $^{14}\text{C}$  は半減期 5730 年で徐々に  $\beta^-$  崩壊するので、薬物のトレーサとして汎用されてきた。 $^{12}\text{C}$ 、 $^{13}\text{C}$  は安定同位元素であるが、自然界の $^{13}\text{C}$  は $^{12}\text{C}$  の約 1% も存在するので、生体異物を投与して Mass Balance 試験のような総量を測定するトレーサ核種としては適していない。また、 $^{10}\text{C}$ 、 $^{11}\text{C}$  は半減期 19 秒、20 分でそれぞれ  $\beta^+$  崩壊し、 $^{15}\text{C}$  は 2.3 秒で  $\beta^-$  崩壊する短寿命の核種であるので、時間単位の生物学的半減期を有する医薬品の *in vivo* でのトレーサには利用できない。したがって、炭素の同位体のなかで薬物のトレーサ試験に利用できるのは $^{14}\text{C}$  のみである。

天然に存在する $^{14}\text{C}$  の存在量は pMC (%モダンカーボン) で表現し、1950年代の天然 $^{14}\text{C}$  存在量を基準に 100 pMC = 13.56 dpm/g carbon と定義されている。 $^{14}\text{C}$  は宇宙線による $^{14}\text{N}(n, p)$   $^{14}\text{C}$  反応によって生成し、地球上では平衡関係が成立していたが、1960年代以降の核実験によって北半球では自然界の $^{14}\text{C}$  が 180 pMC まで上昇した。そこで、核爆発の影響が比較的少ないと思われた南半球の Australian National University が作成した sucrose (ANU sucrose, 150.61 pMC) が天然の $^{14}\text{C}$  標準物質として用いられるようになった。その後、 $^{14}\text{C}$  は空中での拡散や海水中への吸収、植物への固定などによって、現在は 113 pMC 程度に低下している。

### 4. 医薬品開発における Mass Balance 試験の意義と役割

サリドマイドやクロロキンなどによる薬害事件への反省から昭和42年にわが国の新薬承認審査基準が厳格化され、新薬の承認申請には投与した薬物が体内に吸収されて、全身に分布し、代謝されて化学構造が変化し、原薬または代謝物として体外に排泄される全過程を明らかにす

ることが求められることになった。これらの試験では放射性同位元素で標識した薬物を動物に投与して、吸収と排泄の物質収支を明らかにし、体内分布の経時的収支や投与量に対する同定代謝物の把捉率などを明らかにし、投与した薬物とその代謝物の体内残留や蓄積の有無などが解明されてきた。その後、薬物の分離分析法は飛躍的な進歩を遂げてきたが、薬物の Mass Balance を明らかにするためには、薬物を投与した後に生成する代謝物のすべてを単離同定し、全代謝物標品を合成し、全代謝物の定量法を開発し、全代謝物を定量して積算する必要があるため、標識薬物を用いたトレーサ試験の重要性は今日でも変わっていない。

一方、動物で行った毒性試験からヒトでの安全性を外挿するためには、動物とヒトでの代謝が量的にも質的にも同じであることが望まれるが、残念ながらヒトと動物の代謝が同じであることは少ないので、新薬の開発過程ではヒトでの薬物動態試験を行ってヒトと動物を比較し、動物で行った毒性試験の結果からヒトでの安全性が評価できることを確認して、患者試験を進めて行く必要がある。その際、動物では検出されなかった代謝物がヒトで発見されると、動物で行った毒性試験ではヒト特有の代謝物による危険性が予測されていないことになり、この代謝物の毒性を別途評価する必要がある<sup>1)</sup>。また、ヒト特有の代謝物が存在すると動物試験で開発した分析法がヒト特有の代謝物によって妨害される可能性もあり、誤った体内濃度を測定して安全性評価を誤る可能性もある。このような危険を回避するためにはヒトに標識薬物を投与して代謝物プロファイルを調べ、生成する代謝物をヒトと動物とで比較する試験を実施する必要がある。

したがって、放射性同位元素で標識した薬物をヒトに投与して体内での挙動を追跡し、投与量に対する吸収率や排泄率、体内残留や蓄積などを明らかにし、同定した代謝物の補足率を保証することを目的としたヒトでの Mass Balance

試験は新医薬品開発における安全性評価において重要な役割を果たすと考えられている。

## 5. Mass Balance 試験の実施を阻む状況

欧米では健康人に標識薬物を投与して Mass Balance 試験を行い、薬物の残留性や蓄積性や代謝経路をヒトと動物で比較し、動物で行った毒性試験から開発後半に実施する患者試験での安全性を予測し、治験に参加する患者のリスクを低減する努力がなされている。しかし、残念ながらわが国ではヒトに標識薬物を投与して Mass Balance を明らかにする試験を行う基盤が整備されないまま今日に至っており、このような試験は国内では実施されてこなかった。幸か不幸か、わが国で開発される多くの医薬品は欧米先進国で評価された化合物を輸入することに依存してきたので、このような状況は大きな問題と考えられなかった。そのため、わが国で開発された新規化合物を国内で開発するためには、動物で行った毒性試験から予測されるヒトでの安全性評価のみではリスクを伴うと考え、安全な新薬開発を願う企業はグローバル開発の名のもとに評価試験の実施地域を分散させ、ヒトに標識薬物を投与する試験は欧米に依存してきた。このような開発方法はヒトにおける薬物動態に個人差や人種差が存在することが知られている今日、国産新薬の開発にとってきわめて不利な状況となっており、ヒトでの被験薬の体内残留や蓄積性やヒト特有の代謝物<sup>2)</sup>などの安全性を評価しないまま新薬開発を進めることに不安を感じている。

わが国でも放射性医薬品は承認前の治験薬でもヒトに投与して評価されているが、これは薬事法に基づいて行われている。しかし、放射性同位元素標識薬物を用いたトレーサ試験は放射線障害防止法に基づいて行われてきたために、放射性同位元素標識薬物はヒトに投与できないと考えられてきた。わが国と同様に ICRP の勧告を受け入れている欧米諸国では 1960 年代から開発中の医薬品についても合法的に Mass

Balance 試験が行われてきた現実と比べると、誠に奇妙なことであると言わざるを得ない。

6. AMS による<sup>14</sup>C の測定

AMS による<sup>14</sup>C の測定ではイオン源としてグラファイトを用いるので、一定量の有機物に CuO (Ag) を加えて真空中で 2 時間加熱 (850 °C) して CO<sub>2</sub> に酸化する。反応終了後、室温に冷却して内圧を測定して内圧の変化から生成した CO<sub>2</sub> 量を測定し、被験試料中の炭素含量を算出する。さらに、真空ライン中で温度差を利用して CO<sub>2</sub> を精製したのち、その約 1 mg 炭素相当量に Fe を添加して 2.1 倍当量の H<sub>2</sub> とともに 6 時間加熱 (650 °C) 還元してグラファイトを調製する。調製したグラファイトは内径 1 mm のアルミニウム製のカソードの穴に入れて 50 kgf でプレスしてイオン源に装着する。

加速器分析研究所では NEC 社製 Pelletron 9SDH-2 型 Tandem Accelerator を用いているが、その装置の概略は図 1 に示したように、イオン源、加速器、炭素同位体の検出器から成り、これらの間に静電分析器や電磁石などが配置されている。

イオン源は -70 kV の電位に設定され、カソードにはさらに -5 kV の電位を与える。Cs ボトルから漂い出たセシウム原子がカソード前面の加熱したイオナイザーによって正イオンとなる。Cs<sup>+</sup> イオンはイオナイザーとカソードの間の電位差によって 5 keV のエネルギーを得てプレスしたグラファイトに衝突する。衝突したセシウムは炭素原子に運動エネルギーを与えるとともに、カソードのグラファイト表面に膜を作る。グラファイト中の炭素原子のうち、十分なエネルギーを得た C<sup>-</sup> は Cs 膜を透過して表

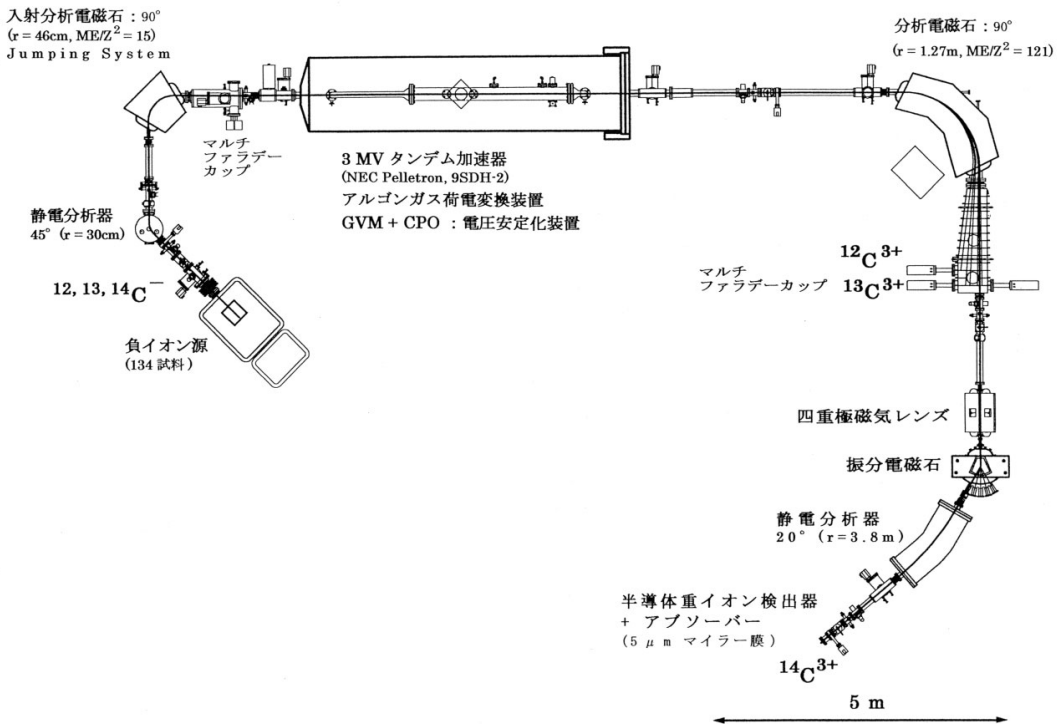


図 1 AMS 装置の概略図

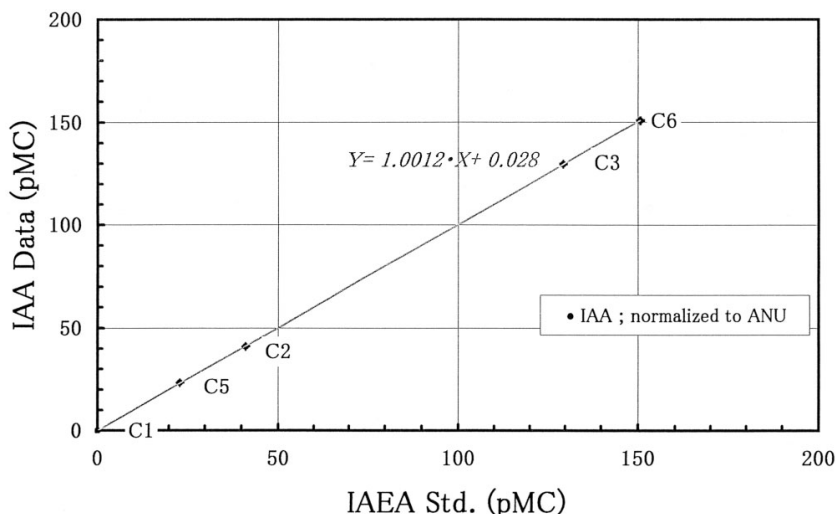


図2 IAEA 標準物質の表示値と AMS による加速器分析研究所 (IAA) での測定値の相関性

面から飛び出し、イオンイザーの中心付近のビームパスを通過して加速される。これらの過程をセシウムスパッタという。

イオン源から放出されたイオンは-1 価の電荷を持ち、75 keV のエネルギーを有するが、セシウムスパッタの初速度の差から種々のエネルギーを有している。これを静電ディフレクタでエネルギーを整え、入射電磁石で特定の質量数のイオンを加速器に導く。

加速器は中央部を高電位に設定し、ストリッパークャナルに Ar ガスを流して加速粒子と Ar を衝突させて電子を剥離して正イオンに変換する。正イオンは負に設定した加速器の出口に向かってさらに加速される。このように荷電変換を経て 2 段階に加速することがタンデムの名称の由来である。

加速器から放出された正イオンは、分析電磁石で<sup>12</sup>C, <sup>13</sup>C, <sup>14</sup>C を分離し、<sup>12</sup>C と<sup>13</sup>C は Multi Faraday Cup (MFC) で、<sup>14</sup>C は Surface Barrier Type Solid State Detector (SSD) で検出して<sup>14</sup>C/<sup>12</sup>C 比または<sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C 比を測定する。

この装置を用いて IAEA の標準物質の同位体存在比を測定し、測定値を ANU sucrose の

同位体比を用いて pMC に換算した結果は図 2 に示したように、原点を通る直線に回帰され、表示値と加速器分析研究所 (IAA) での測定値はよい相関を示した。また、本装置で ANU sucrose を繰り返し測定して日間変動と日内変動を求めた結果は表 1 に示したように、よい再現性を示した。これらの検討から、AMS による測定の信頼性は十分高いものであることを確認した。

## 7. AMS による<sup>14</sup>C の Bioanalysis

<sup>14</sup>C トレーサを AMS で測定する場合には 3 つの問題がある。第 1 は測定する検体中に含まれる<sup>14</sup>C を 1-5 dpm 以下に制限すること、第 2 は検体中の炭素量を 1 mg 前後に調製すること、第 3 は検体を試験環境の人工<sup>14</sup>C および天然<sup>14</sup>C で汚染しないことである。AMS 測定では現代炭素の<sup>14</sup>C 標準物質として ANU sucrose のほか、装置の校正や測定条件の補正に oxalic acid (シュウ酸) を用いている。これらの実測値は表 2 に示したが、化学実験室で通常入手可能な試薬である tartaric acid (酒石酸) や citric acid (クエン酸) は天然の<sup>14</sup>C 含量が若干低く、

表1 AMS測定の日内、日間変動

	$^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$ 比 $10^{-12}$	$^{14}\text{C}/^{13}\text{C}$ 比 $10^{-10}$	$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 比 %
ANU-1*	1.4870±0.048	1.4157±0.030	1.0504±0.081
ANU-2**	1.4847±0.251	1.4157±0.223	1.0492±0.095
ANU-3*	1.4886±0.068	1.4184±0.269	1.0501±0.013
ANU-4**	1.4828±0.275	1.4131±0.275	1.0506±0.056
ANU-5**	1.4830±0.287	1.4131±0.287	1.0504±0.056

\* : 1日4回測定を2回繰り返した平均±SD (%)

\*\* : 1日4回測定を3回繰り返した平均±SD (%)

表2 有機化合物が含有する $^{14}\text{C}$ 濃度

化合物	$^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$ 比	pMC*	dpm/mg C**
ANU sucrose***	$1.4974 \times 10^{-12}$	150.08	0.02035
Oxalic acid	$1.3296 \times 10^{-12}$	133.27	0.01807
Tartaric acid	$1.0956 \times 10^{-12}$	110.13	0.01493
Citric acid	$1.0889 \times 10^{-12}$	109.46	0.01484
Urea	$9.8539 \times 10^{-15}$	0.960	0.00013
Sodium benzoate	$5.4260 \times 10^{-15}$	0.530	0.00007

表の値は3回測定の平均値

\* : % modern carbon, \*\* : 炭素1 mg当たりのdpm

\*\*\* : Australian National University が作成した現代炭素標準品

表3 AMSによるBioanalysisにおける $^{14}\text{C}$ のバックグラウンド

試料	$^{14}\text{C}$ 濃度 (dpm/mL)
血漿10 $\mu\text{L}$	0.467
血漿10 $\mu\text{L}$ にANU sucrose 1 mgを添加	2.509
血漿10 $\mu\text{L}$ にsodium benzoate 1 mgを添加	0.474
血漿100 $\mu\text{L}$ をLSC測定した場合	ca 200

urea (尿素) や sodium benzoate (安息香酸ナトリウム) は化石炭素で構成されていて $^{14}\text{C}$ 含量は非常に低かった。したがって、手近で入手可能な有機試薬は現代炭素由来か化石炭素由来かによって $^{14}\text{C}$ 含量が異なり、合成試薬は合成原料によって現代炭素と化石炭素の混合比が異なり、現代炭素由来の化合物でも過去50年のどの時点で地理的にどの場所で得られた天然炭素であるかによって $^{14}\text{C}$ 含量が異なるものと思われる。

これらの基礎検討を背景に、われわれはLSC

法の検出限界 200 dpm/mL 以下の血漿 10  $\mu\text{L}$  (1 dpm 以下/mg 炭素) を被験試料とし、酸化反応に不足する炭素を ANU sugar (150.61 pMC) 約 1 mg を添加して補い、0.01–0.02 dpm/検体を検出限界に設定して 1–2 dpm/mL までの血漿中 $^{14}\text{C}$ 濃度を測定する方法を確立した。この方法で添加した炭素を化石炭素で構成される sodium benzoate に変更すると表3に示すように定量限界を天然 $^{14}\text{C}$ レベル以下に下げることが可能となる。また、LSC法で計測可能な高レベルの $^{14}\text{C}$ は希釈して測定するが、

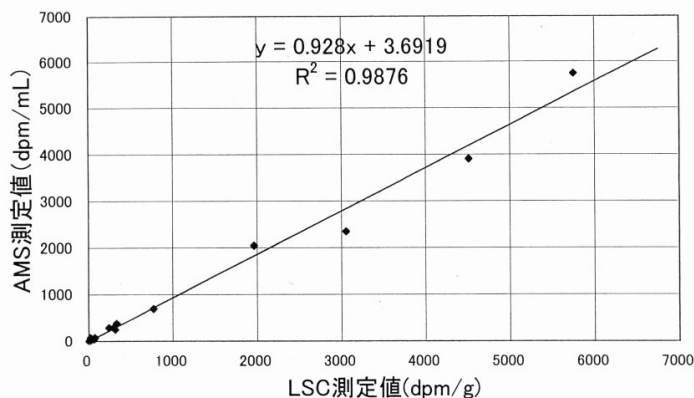


図3 AMS測定とLSC測定的相关性

希釈に生体成分などのマトリックスを用いると現代炭素による汚染が懸念されるので脱イオン水で希釈し、AMS法とLSC法の相関性を調べた。その結果は図3に示したように両者はよい相関を示し、AMSによる<sup>14</sup>CのbioanalysisがLSC法の代替法としても満足できるものであることが確認された。

AMS法の検出限界を下げるためには生体成分由来の現代炭素を脱イオン水で希釈し、不足する炭素を化石炭素で補うことによって、0.001 dpmの<sup>14</sup>Cを測定できるので、一般に入手可能な比放射能370 kBq/mgの標識化合物を用いた試験でもpgレベルの<sup>14</sup>C薬物を測定できる。したがって、AMSによる<sup>14</sup>Cの測定はヒトでのMass Balance試験以外に、作用部位や細胞レベルでの薬物濃度の測定にも適用できると考えられる。

## 8. おわりに

人類は過去50年間に天然<sup>14</sup>Cのレベルが1.8倍に上昇する変動を経験し、われわれの体は環境中の<sup>14</sup>Cと平衡関係を成立させてきた。したがって、この変動範囲を人工放射線の管理対象と同列に論じるのは非論理的と考える。すなわち、われわれの身体を構成する現代炭素が含有

する<sup>14</sup>Cの定常状態レベルの変動範囲の<sup>14</sup>Cを一過性に摂取することは天然の変動範囲の行為と考えられ、倫理的にも許されると思われる。

過去に経験した天然レベルの<sup>14</sup>Cの変動を80 pMCとすると、この値は10.84 dpm/gCであり、体重70 kgのヒトが体重の18%<sup>3)</sup>の炭素を保有しているとする136584 dpmの<sup>14</sup>Cが増加していたことになる。いま、生物学的半減期が0.5日の薬物を136584 dpmの投与量で体重70 kgのヒトに投与すると、その内部被曝量は約0.5 μSvと推定される。疫学調査で求められた一般人の年間被曝量は約1 mSvとされており、その20%に相当する200 μSvは食事由来とされているので、一日の食事による内部被曝量は約0.55 μSvと推定される。したがって、0.5 μSvの投与量はわれわれが一日分の食事で天然から摂取する<sup>14</sup>Cに相当し、今日の自然な生活を乱すものではないことがわかる。この投与量の50%が一日の尿中に排泄されると、その<sup>14</sup>Cの平均濃度は約45 dpm/mL、糞中排泄物を10%ホモジネートで測定すると約25 dpm/mL程度になるので、AMSによるbioanalysisの定量限界に比べて十分な放射能濃度が確保されている。最近、7326 dpmの<sup>14</sup>C標識薬物を0.06 μSvの内部被曝でヒトに投与



して Mass Balance 試験を行った結果が報告されており<sup>4)</sup>, AMS による<sup>14</sup>C の超高感度測定がヒトにおける天然レベルでの<sup>14</sup>C トレーサを現実的なものとしたことが証明された。

われわれは十分な技術力を有しながら、放射能に対する偏狭な倫理観と研究資源の有効な配分に恵まれなかったばかりに、日本人における医薬品の Mass Balance 試験が世界の最前線から遅れをとったことは誠に無念であるが、これもわが国の現実と諦めざるを得ない。しかし、今後は天然レベルの<sup>14</sup>C 標識薬物を用いた日本人での Mass Balance 試験によって、新薬開発の初期にヒトでの吸収、代謝経路、排泄経路などを明らかにすることによって、安全で効率的な新医薬品の開発に寄与していけるものと期待

している。

本稿を作成するにあたり資料を提供していただいた(株)加速器分析研究所の松井隆雄社長、小林紘一部長、磯野正明課長に深謝します。

## 文 献

- 1) 野口英世：毒性試験における薬物動態，薬物動態，**7**, 376-381 (1992)
- 2) Noguchi, H., Tada, K. and Iwasaki, K.: Urinary metabolite profile of tiaramide in man and some animal species, *Xenobiotica*, **12**, 211-220 (1982)
- 3) 吉岡政一，長谷川栄一：“新栄養学”，p. 79, 南江堂，東京 (1987)
- 4) Young, G., Ellis, W., Ayrton, J., Hussey, E. and Adamkiewicz, B.: *Xenobiotica*, **31**, 619 (2001)