

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)

Ⅲ. 加速器質量分析(AMS)による生体試料中 ^{14}C の定量

長塚伸一郎

Reprinted from
RADIOISOTOPES, Vol. 52, No. 5
May 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)

Ⅲ. 加速器質量分析 (AMS) による生体試料中 ^{14}C の定量[†]

長塚伸一郎

第一化学薬品株式会社 薬物動態研究所
319-1182 茨城県那珂郡東海村村松 2117

Key Words : accelerator mass spectrometry, carbon-14, biological sample

1. はじめに

加速器質量分析 (Accelerator Mass Spectrometry: AMS) は粒子加速器によってターゲットイオンを加速し, 適当な物質と衝突させて原子状態としてから質量分析を行うシステムである。タンデム Van de Graaff 型粒子加速器を用いた AMS は少ない試料で ^{14}C を感度良く測定できることから, 年代測定に汎用されてきた。近年では ^{14}C 標識された化合物のヒトや動物における体内動態, あるいは植物や環境中での動態の解析に AMS が次第に使われつつある^{1) - 5)}。本稿では AMS による ^{14}C 測定の概要について述べ, さらに AMS による生体試料中の ^{14}C の測定に関して注意すべき点について概説する。

2. 自然界における ^{14}C

自然界における ^{14}C のほとんどは大気中の窒素原子と宇宙線由来の熱中性子との反応により

大気圏上層部で生成されたものである。生成された ^{14}C は大気中の二酸化炭素, 海水中の炭酸イオンおよび生物界における有機物といった炭素プールの中を循環しながら半減期 5730 年で崩壊する。炭素の同位体存在比は ^{12}C が 99 %, ^{13}C が 1 %, そして ^{14}C はおよそ 0.0000000001 % である。生体試料はこの炭素プールから採取されたものであるから, もともと一定量の ^{14}C を含んでいる。試料中炭素における ^{14}C の存在量には pMC (パーセントモダンカーボン, 100 pMC は 13.56 dpm/g carbon に当る) という単位が用いられる。現在の炭素プールにおける ^{14}C の存在量は 116 pMC であるが, これを分かりやすく示すと, 例えばヒトの体重を 70 kg, 炭素の割合を 4.5 % とすれば, 人体には約 50 000 dpm の ^{14}C が含まれていることになる。

年代測定においては, 動植物が死ぬことによって炭素の循環系から外れると, ^{14}C の取り込みがなくなり, 時間と共に ^{14}C が減衰していくことを利用している。太古の動植物が由来である化石燃料には ^{14}C はまったく含まれていない。現在の炭素プールにおける ^{14}C が 116 pMC であるから, ある遺跡から発掘された木片試料における ^{14}C が 58 pMC であった場合, 単純に計算するとその試料は 5730 年前のものと推定されることになる。実際には, 宇宙線レベルの変動による ^{14}C 生成反応の変動, 核実験による ^{14}C

[†] Instruments for Radiation Measurement in Life Sciences (4). III. Quantitative Analysis of ^{14}C in Biological Samples by Using Accelerator Mass Spectrometry.

Shin-ichiro NAGATSUKA: ADME/TOX Research Institute, Daiichi Pure Chemicals Co., Ltd., 2117 Muramatsu, Tokai-mura, Naka-gun, Ibaraki Pref. 319-1182, Japan.

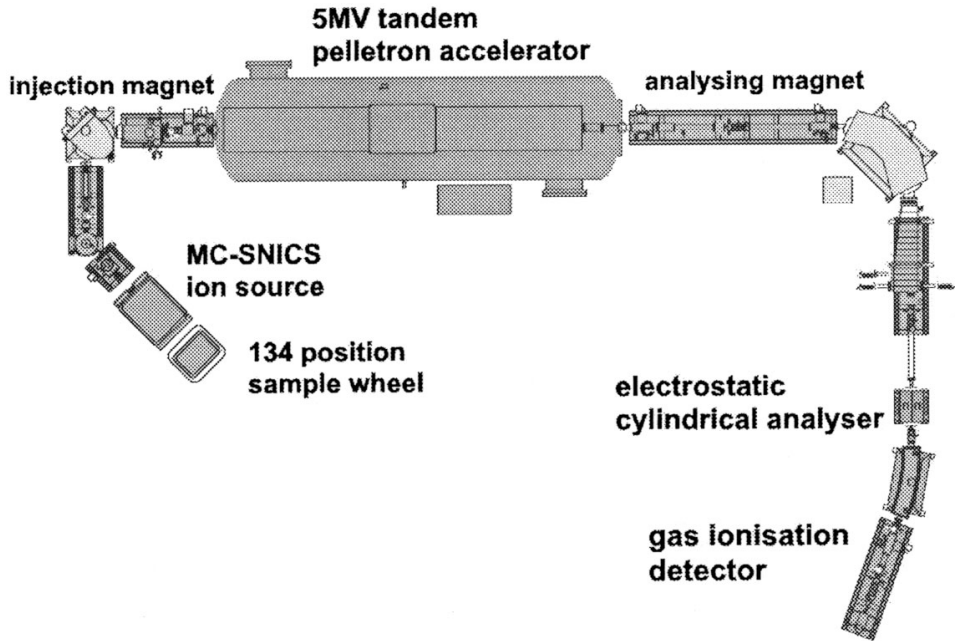


図1 AMS装置の模式図

の生成、そして18世紀以降の化石燃料の大量消費による ^{14}C の希釈などの変動要因を考慮して補正を行う。

3. AMS による ^{14}C の測定

AMS により生体試料中の ^{14}C を測定するには、まず試料中の炭素を酸化還元反応によりグラファイトとする前処理を行う。グラファイト試料はアルミニウム製の sample wheel にセットされ AMS かけられる。必要な試料量はグラファイトとして1から2 mg 程度である。

図1に典型的な AMS 装置の模式図を示した。グラファイト試料は真空中でセシウムイオン (Cs^+) ビームの照射を受ける (図1の ion source の部分)。ビームにより試料表面のスポットは高温となり、ビームに引かれて来た電子と試料が反応して陰イオンが放出される。このイオン化の際には $^{12}\text{C}^-$ 、 $^{13}\text{C}^-$ 、 $^{14}\text{C}^-$ の他に、質量数が14より大きいイオンや、さらに測定を妨害する可能性があるイオンとして空気中の窒素に由来する原子状の $^{14}\text{N}^-$ イオン、あるいは

分子状の $^{12}\text{CH}^-$ 、 $^{12}\text{CH}_2^-$ や $^{13}\text{CH}^-$ イオンなどが生成される。このうち $^{14}\text{N}^-$ は非常に不安定なため、すぐに分解してしまうので測定の障害とはならない。生成した陰イオンは減圧に引かれてスリットを通過し、通常は pre-accelerator によって加速され、適当なエネルギーのイオンビームとなって一次分析フィルタへと移動する。一次分析フィルタ (図1の injection magnet の部分) では磁場をかけてイオンビームを曲げ、質量数に応じてイオンを分配し、目的の範囲の質量数のイオン (この場合は質量数が12から14のイオン) のみを加速器へ導く。

Van de Graaff 型粒子加速器は印加電圧が最高で10 MV 程度であってサイクロトロンのような加速器に比べるとかなり低い。しかし、印加電圧を連続的に自由に変えられ、その電圧の安定性が非常に高いという利点がある。また、電子はぎとりカナルを挟んで Van de Graaff 型粒子加速器を直列に並べたタンデム加速器では中央部が正に、そしてビームの排出部が負に荷電しており二段加速が可能である。AMS では、

このタンデム加速器が用いられることが圧倒的に多い(図1の tandem pelletron accelerator)。加速器に導かれた陰イオンは、まず中央部の正に荷電している部分に向けて加速される。ターゲットイオンが炭素の場合には電子はぎとりチャンネルにアルゴンガスを配する。アルゴンガスのストリッピング効果により、陰イオンビームは平均すると4ないし5個の電子を奪われて陽イオンとなる。この際に $^{12}\text{CH}^-$ 、 $^{12}\text{CH}_2^-$ あるいは $^{13}\text{CH}^-$ などの分子状イオンは分解して原子イオンとなる。したがって、この部分でビームは1+から6+程度に荷電した ^{12}C 、 ^{13}C 、 ^{14}C の陽イオンのみとなる。これらの陽イオンはさらにビーム排出部の負の荷電に向けて加速される。

最後にビームは二次分析フィルタを通過して検出器へと導かれる。二次分析フィルタ(図1の analysing magnet)においても、磁場をかけて特定のイオンのみを検出器に導く。測定されるのは生成量の一番多いイオン(例えば3+に荷電した ^{12}C 、 ^{13}C 、 ^{14}C 陽イオン)であり、これはAMSの機種によって異なる(機種によっては4+の陽イオンが最も多い)。通常では ^{12}C と ^{13}C 陽イオンはファラデーカップにより、また、 ^{14}C 陽イオンはより感度の高いガスイオン化検出器によって、それぞれのビーム電流を測定する。このビーム電流の測定時間を長く取ることによって測定感度が上昇する。

^{14}C 陽イオンビームの電流測定値からだけでは ^{14}C を定量することはできない。それはさまざまな条件(主に装置全体の電圧安定性、真空度、電子はぎとりチャンネルのアルゴンガス濃度)によって途中でのイオンロス割合が異なるためである。そのため、AMSでは通常 ^{13}C と ^{14}C のイオンビームの電流測定値の比を用いて ^{14}C を定量する。したがって、 ^{13}C は内部標準の役割を果たすことになる。

以上のようにAMSでは ^{14}C の原子数(正確には内部標準に対する比)そのものを測定する。一方、従来の放射能測定においては ^{14}C 原子の壊変現象を測定している。 ^{14}C は比較的半減期

が長い安定な放射性同位体であるため、 ^{14}C 全体に比べて壊変するものの割合は極めてわずかである。このように割合として多い方を測定するという特性のため、AMSによる ^{14}C の測定感度は放射能測定に比較してはるかに高くなる。後で述べるように測定試料の特性により異なるが、最も良い条件下ではAMSによる ^{14}C の測定感度は放射能測定法に比べて数千倍以上高くなる。

AMSの欠点は設備が大規模で高価なことである。しかも、設備の維持のために高い知識を持ったスタッフが必要である。また、試料の前処理に時間がかかり、しかもある程度の熟練が必要とされる。試料の前処理には十数時間を要するため、測定試料の数が多き場合には、前処理が測定全体の律速段階となる。さらに、AMSでは極端に ^{14}C 量の異なる試料を交互に測定すると測定値が不安定になる。AMSで分析するグラファイト試料中の ^{14}C の量は2 dpm以下にすることが望ましい。しかし、このような微量の放射能は通常の計測では定量限界以下であるため、試料を十分に希釈して測定し、 ^{14}C 量の目安を付けてから、再度測定しなければならないこともある。

AMSにおける ^{14}C の精密測定においては測定対象試料数本ごとにキャリブレーション試料の測定を行い、測定対象試料の前後のキャリブレーション値で補正を行う。キャリブレーション用の試料としてはPocoグラファイト(化石燃料由来、0 pMC)、トリプチリン(グリセリントリプチレート、グリセリンの部分の三つの炭素は生物由来のため116 pMC)、ブチレート部分の12の炭素は化石燃料由来のため0 pMC、分子内の平均は23.2 pMC)、ANUシュガー(Australian National UniversityがAMS校正用として調製し、全世界に供給している、150.61 pMC)などが用いられる。この精密測定を行う場合には、測定対象試料に加えて、かなりの数のキャリブレーション用試料をも測定しなければならない。

4. AMSによる生体試料中¹⁴Cの測定

¹⁴C 標識化合物を用いた動態試験においては、試料が血漿や尿、あるいは組織ホモジネートなど生体由来の炭素を大量に含んでる場合と、これらの試料を有機溶媒抽出した抽出液やHPLC分析後の溶離液など生体由来の炭素の大部分あるいはすべてが除かれている場合とがある。前に述べたように生体由来の炭素はもともとかなりの¹⁴Cを含んでいる。とは言っても、例えば血漿であればただか0.5 dpm/mL程度であるがAMSの測定レベルから見ればかなりの放射能である。したがって、生体由来炭素を含む試料に比べると、それらが除かれた試料における¹⁴Cの測定感度は、バックグラウンドが低減するためかなり高くなる。

AMSによる直接的な測定値は¹⁴C/¹³C ratioであるが、pMCと¹⁴C/¹³C ratioは比例しているため、標準試料との比較から直接pMCに換算することができる。このpMCは試料中の炭素全体に対する¹⁴Cの比を示す値である(100 pMC = 13.56 dpm/g carbon)。したがって、pMCから放射能濃度を計算するためには、元素分析によって試料中の炭素の絶対量を求める必要がある。例えば、ある試料において元素分析による炭素の割合の測定値が4%、この試料0.05 mLをグラファイト化してAMS測定した結果が400 pMCであったとする。この場合、試料中の炭素は2 mg(試料の比重は1として計算)であり、pMCから計算される¹⁴Cの割合は54.24 dpm/g carbonとなる。したがって、この試料中の¹⁴C濃度は2.17 dpm/mLということになる。

年代測定の対象となる試料とは異なり、生体試料中の¹⁴Cの測定は放射能レベルとしてはAMS測定の上限に近い試料を扱うことが多く、そのままでは測定値がやや不安定である。そのため、数本の未知試料ごとに前に述べたキャリブレーション用の試料を測定し、補正を行う必要があるケースが多い。測定値の信頼性を保証

するためには、何らかの測定値の受け入れ基準(acceptance criteria)を設定することが望ましい。その基準としては次のような項目が考えられる。

(i) 内部標準である¹³Cのイオンビーム電流の測定値を一定の値以上とすること(ビーム電流の少ない測定は信頼できない)。

(ii) イオンビーム電流の測定を複数回行い、¹²Cと¹³Cのイオンビーム電流の比の平均と分散に一定の基準を設ける(分析フィルタを始めとしてAMS装置全体が正しく機能していることの確認となる)。

(iii) Poco グラファイトおよびトリブチリン(もしくはANUシュガー)を未知試料の測定の前後で測定し、pMC値が一定の基準内にあることを確認する(測定精度と同時に試料前処理からAMS分析の過程までのコンタミの有無の確認にもなる)。

5. 生体試料中¹⁴C測定の実例

血漿中¹⁴C放射能濃度測定の実例を紹介する(表1)。¹⁴C濃度が0 dpm/mL(バックグラウンド試料)、0.389 dpm/mLおよび3.11 dpm/mLの血漿試料をそれぞれ5本ずつ用意した。血漿試料0.03 mLにキャリアとして0.05 mLのトリブチリンを加えてグラファイト(約2 mg、グラファイト中の実質放射能としては約0.01および0.1 dpm)化した後、終末電圧4.5 MeVのタンデム粒子加速器を用いてAMS測定を行った。炭素イオンは4+のものを選択し、イオンビーム電流は100.7秒で3回測定して平均を求めた。各試料はランダムに配置し、キャリブレーション用試料としてトリブチリン0.05 mLを測定前に2本、5サンプルおきに1本の合計5本を置いた。

キャリブレーション用トリブチリン(23.2 pMC)測定値の平均回収率は100.2%、そのCVは3.0%だった。そのため、測定値の補正は行っていない。また、バックグラウンド試料の平均¹⁴C濃度は0.587 dpm/mL、そのCVは

表1 AMSによる血漿中¹⁴C濃度測定

| 試料 | AMS 測定値 (dpm/mL) | AMS-BKG (dpm/mL) | Recovery rate (%) | Average Recovery and CV |
|----------------|---------------------|---------------------|--------------------------------|------------------------------------------|
| 0dpm/mL BKG | 0.57300 | | Average conc. 0.5872 dpm/mL | |
| | 0.63000 | | | |
| | 0.58600 | | | |
| | 0.56400 | | | |
| | 0.58300 | | | |
| 0.389dpm/mL | 0.84500 | 0.25780 | 66.3 | Average Recovery 99.8% CV 23.3% |
| | 0.95500 | 0.36780 | 94.6 | |
| | 1.05200 | 0.46480 | 119.5 | |
| | 0.95500 | 0.36780 | 94.6 | |
| | 1.07100 | 0.48380 | 124.4 | |
| 3.11dpm/mL | 3.74500 | 3.15780 | 101.5 | Average Recovery 98.4% CV 5.5% |
| | 3.39100 | 2.80380 | 90.2 | |
| | 3.82500 | 3.23780 | 104.1 | |
| | 3.58400 | 2.99680 | 96.4 | |
| | 3.69900 | 3.11180 | 100.1 | |

4.3%だった。現在の炭素プールにおける¹⁴C存在量と血漿試料元素分析における炭素の割合の平均値から計算されるバックグラウンド血漿試料の¹⁴C濃度は0.55 dpm/mLであり、実測値は計算値より6.7%ほど高かったが、ほぼ通常レベルであると言える。バックグラウンドの約66%にあたる0.389 dpm/mLの放射能の回収率はほぼ100%、CVはほぼ20%であり、これが血漿試料0.03 mLを用いた際のAMS測定の測定下限であると考えられる。ただし、今回の検討ではビーム電流測定時間が約100秒と比較的短い時間だったが、測定時間を5分ほど取ることによりバックグラウンドの20%増し程度の¹⁴C濃度の測定も可能となる。通常のLSC計測の測定下限を20 dpmとして、同じ血漿量0.03 mLを測定したとすると、LSC計測の測定限界は約667 dpm/mLとなり、AMSの感度はLSCに比べ約1700倍高いということになる。ただし、LSC計測で0.5 mLの試料を用いるとすると、測定限界は40 dpm/mLとなり、この場合にはAMSの感度はLSCの約100倍となる。このように感度は試料量により異なるため、比較が難しいが実用的な条件を想定すると、生体由来の炭素を含む試料の測定にお

いてAMSの感度はLSCの数倍から1000倍程度であると考えられる。

生体由来の炭素を除けばAMSによる¹⁴Cの測定感度はさらに高くなる。例えば血漿試料において放射能の有機溶媒による回収率がほぼ100%であるならば、試料中の蛋白質等を有機溶媒抽出によって除くことにより感度はさらに高くなり、放射能測定法の数千から10000倍程度の感度になることも珍しくない。

図2に生体由来炭素を含まない試料の分析例を示した。これはin vitroでヒト肝臓のP-450フラクションと¹⁴C標識化合物をインキュベートした後に、有機溶媒抽出を行い、さらにHPLC分析を行った際の溶離液をAMSと低バックグラウンドLSCにより分析した結果である。HPLCカラムに注入した有機溶媒抽出液試料の放射能量は1 dpmである。通常のLSCより5倍程度感度の高い低バックグラウンドLSCを用いても、もちろんこのレベルの放射能量ではクロマトグラムにはバックグラウンドノイズしか見られないが、AMSでは代謝物の確認はもちろんのこと、定量分析も十分可能であった。LSCで同等の結果を得るためには約10000倍の注入放射能量を必要とした。

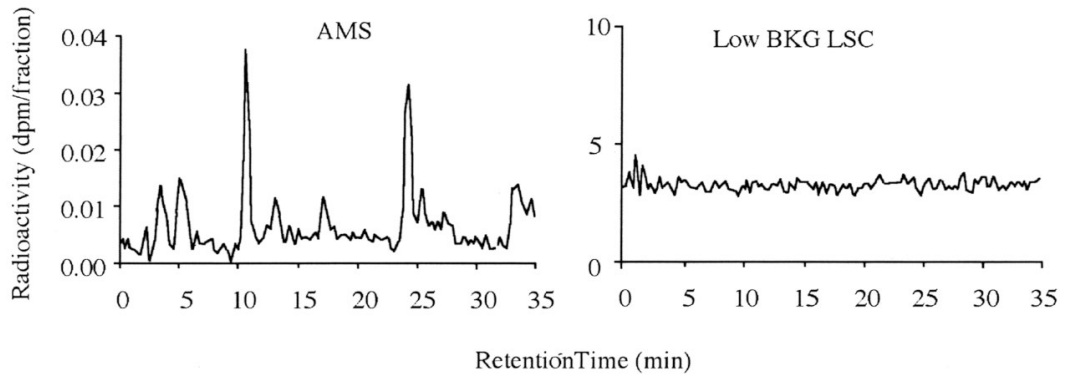


図2 AMSと低バックグラウンドLSCによるHPLCのフラクション測定
¹⁴C標識薬物とその代謝物を含む試料をHPLC分析し、各フラクションをAMSおよびLSCで測定した例。HPLCカラムにインジェクトした総放射能量は1dpmである。LSCでは明らかに感度不足で放射能は認められなかった。AMSでは未変化体と数種の代謝物が検出され、いずれも定量分析が可能であった。

6. おわりに

生体試料中の¹⁴C放射能をAMSで測定することにより、従来の放射能測定法、すなわちLSC計測と比較して数百から数千倍の感度を稼ぐことができる。この手法が注目を浴びているのは、ヒトにおける¹⁴C標識化合物の動態試験、いわゆるHot ADME試験を行う際に、被曝線量をほとんど無視できるレベルに低減することが可能であるためである^{6),7)}。

欧米で行われているヒトHot ADME試験では被曝線量の制限から投与量が1.85ないし3.7 MBq程度(場合によってはもっと低いレベル)に抑えられており、このため血漿中放射能濃度の推移から正確な半減期が求められなかったり、代謝物のプロファイリングが不十分になるケースがある。また、ヒトHot ADME試験を行う場合は、非放射性の一般の薬物を用いる臨床試験の申請項目に加えて、被曝線量の推定、実施施設およびインフォームドコンセントに関する資料が必要となるが、被曝線量推定にはかなりの労力が必要である上に問題点も多い。AMSを用いることにより、¹⁴C標識化合物の投与量は1000分の1程度にすることが可能で

あるが、この場合の被曝線量はジャンボジェット機で日本と欧州を往復する際に受ける宇宙線のそれよりも少なくなる。このため英国では、AMSによるヒトHot ADME試験を行う際には、Department of Health, Administration of Radioactive Substance Advisory Committeeに提出すべき被曝線量推定などの申請項目が免除されている。

ヒトにおけるHot ADME試験で最も重要なことは、ヒトに固有の代謝物の有無を確認し、もしそうした代謝物があるならば、その構造を決め、毒性の有無を評価することである。標識化合物を使用しないでこの目的を達成することは非常に難しい。だが、せっかくヒトHot ADME試験を行ったとしても、被曝線量の制限のためにこの検討が不十分になるのであれば、それは医薬品の安全性を保証する上で、場合によっては大きな問題となり得る。

AMSはこうした問題を解決する上で最も有望な手法である。AMS技術の進展と普及によって、医薬品の安全性をより高いレベルで保証できるようになることは疑いないと思われる。

文 献

- 1) Barker, J. and Garner, R. C. : Biomedical applications of accelerator mass spectrometry-isotope measurements at the level of the atom, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **13**, 285-293 (1999)
 - 2) Garner, R. C. : Accelerator mass spectrometry in pharmaceutical research and development — a new ultrasensitive analytical method for isotope measurement, *Curr. Drug Metab.*, **1**, 205-213 (2000)
 - 3) Turteltaub, K. W. and Vogel, J. S. : Bioanalytical applications of accelerator mass spectrometry for pharmaceutical research, *Curr. Pharm. Des.*, **6**, 991-1007 (2000)
 - 4) Garner, R. C., Barker, J., Flavell, C., Garner, J. V., Whattam, M., Young, G. C., Cussans, N., Jezequel, S. and Leong, D. : A validation study comparing accelerator MS and liquid scintillation counting for analysis of ¹⁴C-labelled drugs in plasma, urine and faecal extracts, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **15**, 197-209 (2000)
 - 5) Miyashita, M., Presley, J. M., Buchholz, B. A., Lam, K. S., Lee, Y. M., Vogel, J. S. and Hammock, B. D. : Attomole level protein sequencing by Edman degradation coupled with accelerator mass spectrometry, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **98**, 4403-4408 (2001)
 - 6) Buchholz, B. A., Fultz, E., Haack, K. W., Vogel, J. S., Gilman, S. D., Gee, S. J., Hammock, B. D., Hui, X., Wester, R. C. and Maibach, H. I. : HPLC-accelerator MS measurement of atrazine metabolites in human urine after dermal exposure, *Anal. Chem.*, **15**, 3519-3525 (1999)
 - 7) Young, G., Ellis, W., Ayrton, J., Hussey, E. and Adamkiewicz, B. : Accelerator mass spectrometry (AMS) : recent experience of its use in a clinical study and the potential future of the technique, *Xenobiotica*, **31**, 619-632 (2001)
-